



***Origanum minutiflorum* O. Schwarz & P.H. Davis BİTKİSİNDEKİ
SEKONDER METABOLİTLERİN İZOLASYONU VE
ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

SÜLEYMAN MUHAMMED ÇELİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANA BİLİM DALI

Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ

Mart - 2016

Her hakkı saklıdır

**T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Origanum minutiflorum* O. Schwarz & P.H. Davis BİTKİSİNDEKİ SEKONDER
METABOLİTLERİN İZOLASYONU VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN
İNCELENMESİ**

SÜLEYMAN MUHAMMED ÇELİK

**TOKAT
Mart - 2016**

Her hakkı saklıdır



Bu tez çalışması;


**Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından
114Z020 nolu proje ile desteklenmiştir.**

Süleyman Muhammed ÇELİK tarafından hazırlanan “*Origanum minutiflorum*
O. Schwarz & P.H. Davis Bitkisindeki Sekonder Metabolitlerin İzolasyonu ve
Antioksidan Aktivitelerin İncelenmesi” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 22
MART 2016 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği / Oy
Çokluğu İle Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü KİMYA ANA BİLİM
DALI ‘nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

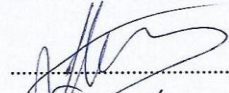
Jüri Üyeleri

İmza

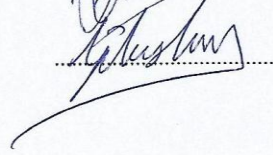
Danışman
Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ



Üye
Yrd. Doç. Dr. Meliha Burcu GÜRDERE
Gaziosmanpaşa Üniversitesi



Üye
Yrd. Doç. Dr. Halil İbrahim Geçibesler
Bingöl Üniversitesi



Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Memmet ALI SAKIN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

22.03/2016

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

SÜLEYMAN MUHAMMED ÇELİK

22 Mart 2016

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Origanum minutiflorum* O. Schwarz & P.H. Davis BİTKİSİNDEKİ SEKONDER METABOLİTLERİN İZOLASYONU VE ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

SÜLEYMAN MUHAMMED ÇELİK

GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. MAHFUZ ELMASTAŞ

Sekonder metabolitler bitkiler tarafından üretilen ve günümüzde birçok sektörde hammadde olarak kullanılan bitkinin temel yaşamsal işlevleri ile doğrudan ilişkisi olmayan, buna karşılık en az bitkinin yaşamsal işlevleri ile doğrudan ilişkili primer metabolitler (protein, lipit, karbonhidrat) kadar önemli olan kimyasal maddelerdir. Sekonder metabolitler günümüzde de önemli rollere sahiptirler. Bunlar başta ilaç sanayisinin hammaddesi olup kozmetik, besin katkı maddesi, tıp, eczacılık, zirai ilaç sanayiinde ve birçok kimya sektöründe kullanılmaktadır.

Bu çalışmada *Origanum minutiflorum* O. Schwarz & P.H. Davis bitkisindeki sekonder metabolitlerin izolasyonu ve yapı analizleri yapıp yapıları aydınlatılmıştır. Kolon kromatografisi, preparatif ince tabaka kromatografisi ve preparatif HPLC ile izole edilen saf moleküllerin yapılarının aydınlatılması, 1D-NMR ve 2D-NMR ile yapıldı. Bu proje kapsamında; iki yağ alkol (**1**, **2**), bir laktam türevi olan azepan-2-one (**3**) ve sekiz adet fenolik bileşik (**4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9**, **10**, **11**) türevi olmak üzere on bir adet bileşik saflaştırılmış ve yapıları aydınlatılmış. Yapıları aydınlatılan moleküllerin antioksidan kapasiteleri indirgeme gücü aktivitesi, bakır (II) iyonu indirgeme aktivitesi (CUPRAC), (DPPH•) serbest radikal giderme aktivitesi, (ABTS⁺) radikal giderme aktivitesi ve metal şelat oluşturma aktivite testleri ile belirlenmiştir. *Origanum minutiflorum* O. Schwarz & P.H. Davis bitkisinden yapıları bilinen 8 bileşik (**1**, **2**, **3**, **4**, **6**, **7**, **8**, **10**) ilk kez bu proje kapsamında bu bitkiden saflaştırılmış ve antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Origanum minutiflorum*, antioksidan aktivite, izolasyon ve yapı analizi, sekonder metabolit

ABSTRACT

MASTER THESIS

ISOLATION OF SECONDARY METABOLITES FROM *Origanum minutiflorum* O. Schwarz & P.H. Davis AND DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITIES

SÜLEYMAN MUHAMMED ÇELİK

GAZIOSMANPASA UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

SUPERVISOR: PROF. DR. MAHFUZ ELMASTAŞ

Secondary metabolites, used as pharmaceutical industries, not related directly to the vital function are produced by plants, however they are as important as primer (proteins, lipids, carbohydrates) metabolites. Secondary metabolites have been used in cosmetic, food additive, medicine, pharmacy, and agriculture. Secondary metabolites have important roles today. These are the raw material for pharmaceutical industry mainly cosmetics, food additives, medicine, pharmacy, in the agrochemical industry and is used in many chemical industries.

The plant materials, *Origanum minutiflorum* O. Schwarz & P.H. Davis, secondary metabolites have been isolated and elucidated. Molecules were isolated by column chromatography, preparative thin layer chromatography and preparative HPLC. Elucidation of the structure of the molecules was performed primarily by 1D-NMR and 2D-NMR. In this project; two fatty alcohol (**1, 2**), an azepan-2-one which derivative of lactam (**3**) and eight derivatives of phenolic compound (**4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11**) purified and structures elucidation have been done. Antioxidant capacity of isolated molecules was determined by reducing power activity, copper (II) ions reduced activity (CUPRAC), (DPPH[•]) free radical scavenging activity, (ABTS⁺) radical scavenging activity and metal chelate activity tests. Known 8 compounds (**1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10**) were first purified from *Origanum minutiflorum* O. Schwarz & PH. Davis plant in this work and theirs antioxidant activity were determined.

Keywords: *Origanum minutiflorum*, antioxidant activity, isolation and identification, secondary metabolite

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim boyunca gerek ders aşamasında gerekse tez aşamasında bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, benim için her zaman yol gösterici olan değerli hocam Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ'a;

Gerek laboratuvar çalışmalarında gerekse tezimi yazma aşamasında bilgilerini benden esirgemeyen Uzman Hüseyin AKŞİT'e, Uzman Nusret GENÇ'e ve Uzman Özkan ŞEN'e;

Çalışmalarım esnasında desteklerini esirgemeyen yüksek lisans arkadaşlarım ve Bitki Araştırma Laboratuvarı ekibine;

Bölümümüzün her türlü imkânından faydalanmamı sağlayan Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü yöneticilerine ve manevi desteğini esirgemeyen bütün öğretim elemanlarına;

Çalışmamı 114Z020'nolu proje ile destekleyen TÜBİTAK' a

Bütün hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan CANIM AİLEME;

Çok teşekkür ederim.

SÜLEYMAN MUHAMMED

ÇELİK

22 Mart 2016

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
ÇİZELGELER LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER VE KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. <i>Origanum minutiflorum</i> Bitkisinin Özellikleri ve Yayılımı	3
2.2. Literatür Özetleri.....	4
2.3. <i>Origanum minutiflorum</i> O. Schwarz & P.H. Davis Bitkisi ile ilgili Yapılan Çalışmalar	6
3. MATERYAL VE METOT	9
3.1. Kullanılan Kimyasallar Maddeler.....	9
3.2. Kullanılan Cihazlar	9
3.3. Bitkisel Materyal.....	9
3.4. Ekstraksiyon İşlemleri	10
3.5. Antioksidan Aktivite Analizleri.....	12
3.5. 1. Toplam Fenolik Madde Tayini	12
3.5. 2. Serbest radikal (DPPH•) giderme aktivitesi	12
3.5. 3. İndirgeme gücü aktivitesi	13
3.5. 4. Metal şelatlama aktivitesi	13
3.5. 5. ABTS ⁺ radikali giderme aktivitesi.....	14
3.5. 6. Cu ⁺⁺ iyonlarını Cu ⁺ iyonlarına indirgeme (Cuprac) Aktivitesi	14
3.6. Etkili Bileşiklerin Saflaştırılması İşlemlerinde Kullanılan Teknikler	15

	<u>Sayfa</u>
3.6.1. Kolon Kromatografisi	15
3.6.2. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)	15
3.6.3. LC-TOF (Uçuş zamanlı Sıvı Kromatografisi Kütle Spektroskopisi)	15
3.6.4. Preperatif HPLC (P-HPLC)	16
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	20
4.1. Ham Ekstrelelere Uygulanan Antioksidan Aktivite Testlerinin Sonuçları.....	20
4.2. Fitokimyasal Çalışmalar	21
4.2.1. İzolasyon İşlemi	21
4.3. İzole Edilen Bileşiklerin Yapı Analizi	22
4.3.1. Tricosan-1-ol (1)	23
4.3.2. (8E,16E)-tetracosan-8,16-diene-1,24-diol (2)	24
4.3.3. Azepan-2-one (3)	26
4.3.4. 3,4-dihidroksi benzoik asit (4)	29
4.3.5. Apigenin (5).....	32
4.3.6. Eriodiktiol (6)	35
4.3.7. Globoidnan-A (7).....	38
4.3.8. Luteolin (8)	42
4.3.9. Rozmarinik Asit (9)	45
4.3.10. Apigenin-7-O-glukoronoid (10)	49
4.3.11. Vicenin-II (11)	52
4.4. <i>O. Minutiflorum</i> bitkisinden İzole Edilen Bileşiklere Uygulanan Antioksidan Aktivitesi Sonuçları.....	56
5. SONUÇ ve TARTIŞMA	59
6. KAYNAKLAR	61
7. EKLER	65

Sayfa

EK-1. Antioksidan Aktivite Testlerinde Kullanılan Standartların Kalibrasyon	
Grafikleri	65
EK-2. İzole Edilen Bileşiklerin 2D-NMR Spektrumları	66
8. ÖZGEÇMİŞ	72



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Simge	Açıklama
--------------	-----------------

L	Litre
ppm	Milyonda bir kısım
°C	Santigrat derece
µL	Mikrolitre
g	Gram
µg	Mikrogram
mg	Miligram
kg	Kilogram
mL	Mililitre
β	Beta
α	Alfa
%	Yüzde
mM	Milimol
µM	Mikromol

Kısaltma	Açıklama
-----------------	-----------------

ABTS ⁺	2,2-azino-bis-3- etilbenzothiazolin-6-sülfonik asit
FRAP	Demir (III) İyonu İndirgenmesine Dayalı Antioksidan Aktivitesi
DPPH [•]	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
BHA	Bütillenmiş Hidroksi anisol
BHT	Bütillenmiş Hidroksi toluen
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
TCA	Trikloro Asetik Asit

TROLOKS	6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
APT	Tümleşik Proton Testi
COSY	Korelasyon Spektroskopisi
HETCOR	Heteronükleer Korelasyon
HMBC	Heteronükleer Çoklu Bağ Korelasyonu
EtOAc	Etilasetat
MeOH	Metanol
IC ₅₀	Yüzde Aktivitenin Yarıya Kadar Aktivite Gösteren Derişim
GAE	Gallik Asite Eşdeğer
TE	Trolaksa Eşdeğer
DMSO	Dimetilsülfoksit
P-HPLC	Preparatif Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
LC-TOF-MS	Uçuş zamanlı Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi
DMSO-d ₆	Dötero Dimetilsülfoksit
UV-VIS	Ultra Viyole Görünür Bölge

ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. <i>Origanum minutiflorum</i> bitkisi	3
Şekil 3.1. <i>Origanum minutiflorum</i> bitkisi için ekstraksiyon şeması	11
Şekil 3.2. n-bütanol fazı 186-356 fraksiyonlarının HPLC kromatogramları	17
Şekil 3.3. n-bütanol fazı 357-567 fraksiyonlarının HPLC kromatogramları	18
Şekil 3.4. n-bütanol fazı 567-648 fraksiyonlarının HPLC kromatogramları	19
Şekil 4.1. Tricosan-1-ol bileşiğinin yapısı	23
Şekil 4.2. Tricosan-1-ol'ün (1) ¹ H-NMR spektrumu (¹ H-NMR 400 MHz, CDCl ₃ -d ₁)..	23
Şekil 4.3. Tricosan-1-ol'ün (1) ¹³ C-NMR spektrumu (¹³ C-NMR 100 MHz CDCl ₃ -d ₁).	24
Şekil 4.4. (8E,16E)-tetracosan-8,16-diene-1,24-diol bileşiğinin yapısı	24
Şekil 4.5. (8E,16E)-tetracosan-8,16-diene-1,24-diol'ün (2) ¹ H-NMR spektrumu (¹ H-NMR 400 MHz, CDCl ₃ -d ₁).....	25
Şekil 4.6. (8E,16E)-tetracosan-8,16-diene-1,24-diol'ün (2) ¹³ C-NMR spektrumu (¹³ C-NMR 100 MHz CDCl ₃ -d ₁)	26
Şekil 4.7. Azepan-2-one bileşiğinin yapısı	26
Şekil 4.8. Azepan-2-one (3) ¹ H-NMR spektrumu (¹ H-NMR 400MHz, DMSO-d ₆)....	27
Şekil 4.9. Azepan-2-one (3) ¹³ C-NMR spektrumu (¹³ C-NMR 100MHz DMSO-d ₆)	28
Şekil 4.10.3,4-dihidroksi benzoik asit bileşiğinin yapısı	29
Şekil 4.11. 3,4-dihidroksi benzoik asit (4) ¹ H-NMR spektrumu (¹ H-NMR 400 MHz, DMSO-d ₆)	30
Şekil 4.12. 3,4-dihidroksi benzoik asit'in (4) ¹³ C-NMR spektrumu (¹³ C-NMR 100 MHz DMSO-d ₆).....	31
Şekil 4.13. Apigenin bileşiğinin yapısı	32
Şekil 4.14. Apigenin'in (5) ¹ H-NMR spektrumu (¹ H-NMR 400 MHz, DMSO-d ₆)....	33
Şekil 4.15. Apigenin'in (5) ¹³ C-NMR spektrumu (¹³ C-NMR 100 MHz DMSO-d ₆)....	34

Şekil 4.16. Eriodiktiol bileşiğinin yapısı	35
Şekil 4.17. Eriodiktiol'ün (6) ¹ H-NMR spektrumu (¹ H-NMR 400 MHz, DMSO-d ₆)...	36
Şekil 4.18. Eriodiktiol'ün (6) ¹³ C-NMR spektrumu (¹³ C-NMR 100 MHz DMSO-d ₆)	37
Şekil 4.19. Globoidnan-A bileşiğinin yapısı.....	38
Şekil 4.20. Globoidnan-A'nın (7) ¹ H-NMR spektrumu (¹ H-NMR 400 MHz, DMSO-d ₆).....	39
Şekil 4.21. Globoidnan-A (7) ¹³ C-NMR spektrumu (¹³ C-NMR 100MHz DMSO-d ₆).	40
Şekil 4.22. Globoidnan-A'nın (7) DEPT-90, DEPT-135 NMR (¹³ C-NMR 100 MHz DMSO-d ₆) spektrumu.....	41
Şekil 4.23. Luteolin bileşiğinin yapısı	42
Şekil 4.24. Luteolin (8) ¹ H-NMR spektrumu (¹ H-NMR 400 MHz, DMSO-d ₆).....	43
Şekil 4.25. Luteolin (8) ¹³ C-NMR spektrumu (¹³ C-NMR 100 MHz DMSO-d ₆)	44
Şekil 4.26. Rozmarinik Asit bileşiğinin yapısı	45
Şekil 4.27. Rozmarinik Asit'in (9) ¹ H-NMR spektrumu (¹ H-NMR 400 MHz, DMSO-d ₆).....	46
Şekil 4.28. Rozmarinik Asit'in (9) ¹³ C-NMR spektrumu (¹³ C-NMR 100 MHz DMSO-d ₆).....	47
Şekil 4.29. Rozmarinik Asit'in (9) DEPT-90, DEPT-135, APT NMR (¹³ C-NMR 100 MHz DMSO-d ₆) spektrumu.....	48
Şekil 4.30. Apigenin-7-O-glukoronoid bileşiğinin yapısı	49
Şekil 4.31. Apigenin-7-O-glukoronoid'in (10) ¹ H-NMR spektrumu (¹ H-NMR 400 MHz, DMSO-d ₆).....	50
Şekil 4.32. Apigenin-7-O-glukoronoid'in (10) ¹³ C-NMR spektrumu (¹³ C-NMR 100 MHz DMSO-d ₆).....	51
Şekil 4.33. Vicenin-II bileşiğinin yapısı	52
Şekil 4.34. Vicenin-II'nin (11) ¹ H-NMR spektrumu(¹ H-NMR 400 MHz, DMSO-d ₆)	53

Sayfa

Şekil 4.35. Vicenin-II'nin (11) ^{13}C -NMR spektrumu(^{13}C -NMR 100 MHz DMSO- d_6) 54

Şekil 4.36. Vicenin-II'nin (11) DEPT-90, APT NMR

(^{13}C -NMR 100 MHz DMSO- d_6) spektrumu..... 55



ÇİZELGELER LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1. 186-356 fraksiyon aralığına uygulanan P-HPLC mobil faz programı	17
Çizelge 3.2. 357-567 fraksiyon aralığına uygulanan P-HPLC mobil faz programı	18
Çizelge 3.3. 567-648 fraksiyon aralığına uygulanan P-HPLC mobil faz programı	19
Çizelge 4.1. Ham ekstrelere uygulanan antioksidan aktivite test sonuçları.....	21
Çizelge 4.2. <i>Origanum minutiflorum</i> Kolon Çözücü Sistemi, Birleştirilen Fraksiyon Aralıkları ve İzole Edilen Bileşikler	22
Çizelge 4.3. 1 nolu bileşiğin elementel analiz değerleri	23
Çizelge 4.4. 2 nolu bileşiğin elementel analiz değerleri	25
Çizelge 4.5. 3 nolu bileşiğin ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR kimyasal kayma değerleri	27
Çizelge 4.6. 4 nolu bileşiğin ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR kimyasal kayma değerleri	29
Çizelge 4.7. 5 nolu bileşiğin ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR kimyasal kayma değerleri	32
Çizelge 4.8. 6 nolu bileşiğin ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR kimyasal kayma değerleri	35
Çizelge 4.9. 7 nolu bileşiğin ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR kimyasal kayma değerleri	38
Çizelge 4.10. 8 nolu bileşiğin ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR kimyasal kayma değerleri	42
Çizelge 4.11. 9 nolu bileşiğin ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR kimyasal kayma değerleri	45
Çizelge 4.12. 10 nolu bileşiğin ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR kimyasal kayma değerleri	49
Çizelge 4.13. 11 nolu bileşiğin ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR kimyasal kayma değerleri	52
Çizelge 4.14. O. minutiflorum bitkisinden İzole Edilen Bileşiklere Uygulanan DPPH•, ABTS ⁺ , İndirgeme Gücü, Metal Şelatlama ve CUPRAC Aktivite Testleri Sonuçları.....	56

1. GİRİŞ

Türkiye’de tıbbi bitkilerin üretiminin çoğunlukla yerel popülasyonlarla gerçekleştirilmesi, genetik ve kimyasal bakımdan önemli varyetabilitenin araştırılmasını zorunlu hale getirmektedir. Bu nedenle, son yıllarda tıbbi bitkilerdeki çalışmalar doğal ve kültür popülasyonlarının kimyasal bakımından karakterizasyonu ve önemli olanların kültüre kazandırılması üzerinde çalışmalar önem kazanmış ve bu konuda araştırmalar ivme kazanmıştır. Doğal tıbbi bitkilerin kültür çalışmalarına başlamadan önce fonksiyonel bileşiklerin karakterizasyonu ve bunların biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi ile ancak bu tür çalışmalar şekillenebilir.

Origanum türlerinin halk arasında mide ve bağırsak rahatsızlıkları, öksürük, bronşit, bademcik, yaralar iyileşmesi gibi rahatsızlıklara karşı kullanılmaları ayrıca uçucu yağlarının, Avrupa gıda kodeksi, Amerikan gıda kodeksi ve ulusal kodekslerinde yer almaları *Origanum* türlerinin önemini ortaya koymaktadır. Bu nedenle bu bitkilerde sekonder metabolitlerinin izolasyonu, yapılarının aydınlatılması ve biyolojik aktivitelerinin incelenmesi son derece önem arz etmektedir.

Türkiye’de yaklaşık 10 000 bitki türü yetişmekte ve bu türlerin yaklaşık 3 000’i endemiktir. Türkiye tüm Avrupa’dakinden daha fazla endemik bitki türüne sahiptir. Türkiye’nin Asya ve Avrupa arasındaki konumundan dolayı, üç iklimi barındırması ve dağlık yapısı nedeniyle bu kadar zengin bir bitki örtüsüne sahip olmasını mümkün kılmıştır. Canlılarda sekonder metabolitlerin sentezi; iklim ve çevre şartları, biyotik ve abiyotiklerin etkisi, stres koşullarıyla değişmektedir. Buda, endemik bitkilerin sekonder metabolitlerinin (fonksiyonel bileşiklerinin) doğal ve kültürü yapılan bitkilerden farklı olmasına neden olmaktadır. Bu nedenle, endemik bitkilerin kimyasal karakterizasyonu ve fonksiyonel bileşiklerinin saflaştırılıp biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi önemli hale gelmektedir.

Bugün Avrupa başta olmak üzere dünya’ da çevre kirliliğinin önlenmesi ve insan sağlığının korunması açısından çeşitli endüstriyel alanlarda doğal bitkisel katkı maddelerinin kullanımı fevkalade önem taşıyan bir konu durumundadır. Fakat

Avrupa'nın bitki örtüsü bu problemin çözümü için yetersiz kaldığından bu konuda yapılan çalışmalar Güneydoğu Asya (Çin, Hindistan) ve Güney Amerika ülkelerine kaymıştır. Bu ülkelerde bitkisel ürünler konusunda araştırma–geliştirme etkinliklerinin hızla gelişmesi sonucunda üretilen bitkisel ürünler dünya pazarlarını işgal etmiş durumdadır. Türkiye ise zengin bitki örtüsüyle Güneydoğu Asya ve Güney Amerika ülkelerinden geri kalmamaktadır. Buna rağmen söz konusu alanlarda yeterli bilimsel çalışmalar yapılmamıştır. Bu nedenle, bitkisel ürünler yönünden Türkiye dünya pazarında hak ettiği yere ulaşamamıştır. Bitkisel ürün konusunda araştırmaların yapılması ve uygulamasıyla Türkiye bu alanda dünyada önemli bir yer tutabilecek ve ülke ekonomisine önemli katkılar sağlayacaktır.

Bu çalışma kapsamında, Isparta'nın Sütçüler ilçesinde yetişen ve Akdeniz Bölgesine endemik olan *Origanum minutiflorum* O. Schwarz & P.H. Davis bitkisindeki sekonder metabolitlerin izolasyonu ve yapı analizleri yapılarak antioksidan aktiviteleri DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) serbest radikal giderme aktivitesi, ABTS⁺(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sülfonik asit)) kation radikali giderme aktivitesi, İndirgeme gücü aktivitesi, Metal şelat oluşturma aktivitesi ve CUPRAC metotlarıyla *in vitro* olarak belirlendi.

2. GENEL BİLGİLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. *Origanum minutiflorum* Bitkisinin Özellikleri ve Yayılımı

Origanum minutiflorum bitkisinin yöresel isimleri Yayla kekiği, Eşek kekiği, Tota kekiği ve Sütçüler kekiğidir. Bitki; Herba-İnfüzyon olarak soğuk algınlıkları ve karın ağrısına karşı, uçucu yağ şeklinde analjezik, antioksidan, antifungal olarak, yaprak-İnfüzyonu olarak gargara yapılarak diş eti nevraljisi ve baş ağrısına karşı ve aromatik su halinde dâhilen veya gargara şeklinde mide ağrıları ve diş ağrılarına karşı kullanılmaktadır (Hartwell, 1982; Baytop, 1999).



Şekil 2. 1. *Origanum minutiflorum* bitkisi

Sistematik

- Latince Adı** : *Origanum minutiflorum*
Alem : *Plantae*
Bölüm : *Magnoliophyta*
Sınıf : *Magnoliopsida*
Takım : *Lamiales*
Alt Takım : *Asteridae*
Familya : *Lamiaceae*
Cins : *Origanum*
Tür : *Origanum minutiflorum* O. Schwarz et P. H. Davis
Endemik : Akdeniz Bölgesine Endemik
Ömür : Çok yıllık

2.2. Literatür Özeti

Bitkilerin ilaç, yiyecek ve kozmetik amaçlı kullanımı insanın varlığıyla başlamış günümüze kadar süregelmiştir. Olağan olan hastalıkların varlığı ve bunların tedavi edilmesi amacıyla bu geçen zaman içerisinde bitkilerin kullanımı ve her birisine ait spesifik özellikleri insanlar tarafından keşfedilmiş ve pozitif yada negatif denemelerle de geliştirilmiştir. Günümüzde 20 000 den fazla bitki alternatif tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır. Bu gelişmeler ve hastalıklara karşı ilaç veya etken madde keşfi için tıbbi bitkilere ve bu bitkilerden çeşitli maddelerin izole edilerek insanlığın hizmetine sunma çalışmaları da son derece önem kazanmıştır.

Birçok sebepten dolayı geleneksel ve tamamlayıcı (destekleyici) tedavinin, zararlı etkisi olmayan bitki haplarının, farklı hastalıkların tedavisinde kullanılması son zamanlarda artmıştır. Halk arasında tedavi amaçlı kullanılan bitkilerin doğal bileşiklerinin izolasyonu ve yapılarının aydınlatılması, hastalıkların tedavisinde yeni, etkili ve yan etkisi olmayan tedavi yöntemlerinin gelişmesine öncülük edecektir. Bu amaç doğrultusunda yapılacak araştırmaların hastalık tedavisinde yararlı olacağı birçok araştırmacı ve konu uzmanları tarafından düşünülmektedir.

Canlıların yaşamlarını devam ettirebilmeleri için gerekli olan enerjiyi karşılayabilmeleri, alınan besinlerin metabolizmaya girişi ile mümkün olmaktadır. Vücut tarafından alınan besinlerin enerjiye dönüştürülmesi için oksijen mutlaka gereklidir. Katabolizma sırasında harcanan oksijenin bir dezavantajı reaktivitesi çok yüksek olan reaktif oksijen ara ürünleri (ROS) olarak bilinen zararlı bazı radikallerin meydana gelmesidir. Bu radikallerin üretimi stres durumlarında artış gösterir ve vücutta birçok hastalığın da sebebidir. Bu nedenle strese dayalı hastalıklar başta olmak üzere bir hastalık tedavisinde preperatif antioksidan maddelerin kullanılması hekimler tarafından tavsiye edilmektedir. Günümüzde kanserle serbest radikaller arasındaki ilişki yapılan deneylerle ispat edilmiştir. Bilindiği gibi serbest radikaller canlı organizmalarda ve dokularda diğer madde ve gruplarla reaksiyona girerek hücre içerisinde istenmeyen toksik maddeler oluşturabilirler. Bu ürünler vücuda zararlı olup çeşitli mekanizmalarla hücre harabiyetini tetikleyerek hücre ölümüne yol açarlar (Gordon, 1996). Memeli

hayvan hücrelerinde bu maddeler yaşlanmayı da hızlandırır. Serbest radikaller; lipit, protein, karbonhidrat ve DNA gibi biyomoleküllerle etkileşerek, onları dejenere eder ve mutasyonların oluşumuna yol açarlar (Davies ve ark., 1995). Metabolizma ile bu maddelerin toksik özellikleri yok edilerek hücre dışına atılır. Bu reaksiyonlarda antioksidan maddeler ve antioksidan enzim sistemleri oldukça önemli rol oynar ve bu maddeler bu yüzden oldukça önemlidirler. Bütillenmiş hidroksi tolüen (BHT) ve bütillenmiş hidroksi anisöl (BHA) gibi sentetik antioksidanların toksik ve kanserojen şüphesini ortaya koyan çalışmalardan sonra bazı ülkelerde bu bileşiklerin kullanımında sınırlamalar getirilmiş ve buda bitkisel doğal antioksidanlara olan ilgiyi artırmıştır. Meyve, sebze, bitkisel çay ve baharatlar önemli antioksidan kaynaklarıdır. Yapılan çalışmalarda bitkilerdeki antioksidan aktivitelerin içerdiği uçucu yağ, flavonoidler, fenolik asitler ve antosiyanin gibi sekonder bileşiklerden kaynaklandığı belirlenmiştir (Safer ve Nughamich, 1999; Fukumoto ve Mazzo, 2000).

Bitkilerde bulunan etken bileşiklerin saflaştırılması ve yapılarının aydınlatılması son zamanlarda önem arz etmektedir. Doğal kaynaklardan saflaştırılan ve yapısı aydınlatılan bileşiklerin biyolojik aktivitelerinin incelenmesi ise çok daha önemli olduğu açıktır. Bu nedenle, bu konularda yapılacak çalışmalar daha da önemli hale gelmiştir. Bu tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmaların bu konuda önemli bir boşluğu dolduracağı kanaatindeyiz.

Türkiye, mevcut bitkisel çeşitliliği yönünden oldukça dikkate değer ve zengin bir floraya sahiptir. Bu zenginlik; üç fitocoğrafik bölgenin kesiştiği noktada bulunması, Güney Avrupa ile Güney Batı Asya arasında köprü olması, pek çok cins ve seksiyonun orijin ve farklılaşma merkezinin Anadolu olmasından ileri gelmektedir. Ayrıca ekolojik ve fito coğrafik farklılaşma sonucu olarak tür endemizminin yüksek olması da burada etkili faktördür (Yiğit ve Benli, 2005).

Dünyadaki baharat bitkileri ticaretinde *Origanum* cinsleri önemli bir rol oynamaktadır. *Origanum* cinsi Türkiye’ de 23 tür ve diğer alttür ve varyetelerle birlikte toplam 32 takson ile temsil edilmektedir. *Origanum* cinsi ticari öneme sahip, büyük miktarlarda

ihraç edilen bir bitkidir (Kılıc ve Bağcı, 2008). Türkiye’ de en çok kullanılan *Origanum* türleri *O. vulgare* ve *O. onites*’ tir (Şarer ve ark., 1996).

Baharatlar başlangıçta sadece yabancı yetişen bitkilerden elde edilmekteydi. Kullanımın artması ve çeşitlenmesiyle bitkilerin kültüre alınmasına başlanmıştır. Günümüzde baharatların büyük bölümü, tarımı yapılan bitkilerden kaynaklanır. Gelişmiş ülkelerde yerli veya yabancı bitkiler daha çok kültüre alınmaktadır. Miktar ve değer açısından başta gelen birçok baharat ise, coğrafik özelliklere bağlı olarak hala üçüncü dünya ülkelerinden kaynaklanmaktadır. Bu ülkelerde de yabancı yetişen bitkilerin yerini tarımı yapılanlar almıştır. Bununla birlikte mercanköşk, kekik, biberiye, defne gibi bazı baharatların önemli ölçüde yabancı bitkilerden kaynaklandığı görülmektedir. Kalite ve temin açısından, kültür bitkilerden üretilen baharatlar genellikle tercih edilir (Akgül, 1993).

Yaşadığımız yüzyılın son dönemlerinde artan çevre kirliliğine paralel olarak sentetik yollarla üretilen teknoloji ürünü malzemelere duyulmaya başlayan tepki, yeniden doğaya dönüş özlemleri taşıyan ve sayıları hızla artan bir topluluğu doğurmuştur. Bu topluluk bireylerinin isteklerine ve beğenilerine uygun olarak, söz konusu bitkiler ve yan ürünlerinin pazarlanması giderek büyümekte, ekonomik açıdan önemi çok artmaktadır. İhraç edilen bu ürünlerin içinde gerek miktar ve gerekse değer açısından birinci sırayı kekik almaktadır (Yagcioglu, 1999).

2.3. *Origanum minutiflorum* O. Schwarz & P.H. Davis Bitkisi ile ilgili Yapılan Çalışmalar

Süntar ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada Türkiye’de geleneksel olarak kullanılan bazı bitkilerin (*Origanum minutiflorum* O. Schwarz & P.H. Davis bitkisi dahil) uçucu yağlarının karışımı ile yaptıkları bir kremin yara iyileşmesinde kullanılmış ve bu kremin deney hayvanlarında oluşturulan yaraların iyileşmesinin hızlandığını belirtmektedirler (Suntar ve ark., 2011).

Origanum minutiflorum O. Schwarz & P.H. Davis bitkisinin değişik çözücülerle (Aseton, Etanol, Etilasetat, n-Hekzan, Metanol ve Su) elde ettikleri ham ekstrelerin antioksidan, antimikrobiyal ve sitotoksitelerini araştırmışlardır. Antimikrobiyal aktivitenin n-hekzan ile elde edilen ekstrede yüksek olduğu ve bu kısmın sitotoksik olduğunu belirtmişler. Su ve metanol ekstrelerinin antioksidan aktivitelerinin yüksek olduğu ve 10-100 µg/mL arasındaki konsantrasyonlarda yavru hamster böbrek fibroblast hücrelerine (BHK 21 cell line) karşı sitotoksik etkilerinin olmadığını bulmuşlardır. Yapılan çalışmada ham ekstreler kullanılmış ve sonuç kısmında antioksidan bileşiklerin bu bitkiden saflaştırılması gerektiğini belirtmişlerdir (Oke ve Aslim, 2010).

Origanum minutiflorum O. Schwarz & P.H. Davis'in uçucu yağının kenelerde yapılan bir çalışmada 10 µl/L çözeltilinin 120 dakika sonra kenelerin hepsinin öldüğünü gözlemlemişler (Cetin ve ark., 2009).

Origanum minutiflorum bitkisinin uçucu yağının 16 bakteri ve 2 adet maya mikro organizmalarına karşı yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmasında *Pseudomonas aeruginosa* mikroorganizması hariç diğer mikroorganizmalara karşı güçlü bir aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (Unlu ve ark., 2007). Yapılan benzer çalışmalar *Origanum minutiflorum* bitkisinin uçucu yağının iyi bir antibakteriyal olduğu rapor edilmektedir (Baydar ve ark., 2004; Dadalioglu ve ark., 2004).

Baddal tarafından Yüksek lisans tezi olarak yapılan çalışmada *O. minutiflorum* uçucu yağ, hekzan, metanol, aseton, diklorometan ve kloroform ekstrelerinin antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre *O. minutiflorum* uçucu yağ ve diğer ekstrelerin yüksek bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Baddal ve Özmen, 2010).

Bu bitki ile ilgili tek bir izolasyon çalışması yapılmıştır (Karaoglan Sezen ve Özgen, 2011). Doktora tezi olan bu çalışmada, Bazı *Origanum* Türleri Üzerinde Farmakognozik Çalışmalar yapılmış ve endemik olan *O. micranthum*, *O. Minutiflorum*, *O. rotundifolium* türlerinin kloroform, etil asetat ve su ekstreleri çalışılmış. Bu türlerde bazı bileşikler kromatografik tekniklerle saflaştırılmış ve yapıları aydınlatılmıştır.

O. minutiflorum kloroform ekstresinden 1 düz zincirli doymuş yağ alkolü olan 1-tetradekanol (miristol), etil asetat ekstresinden rosmarinik asit ve apigenin, su ekstresinden de visenin-2, izole edilmiştir.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Kimyasallar Maddeler

Çözücüler: Metanol, etil asetat, hekzan, kloroform, asetonitril, n-bütül alkol, aseton ve diklorometan kullanılmıştır. Bütün çözücüler destilleme işlemi yapıldıktan sonra kullanıldı.

NMR çözücüleri: D₂O, CDCl₃, DMSO-d₆ (Merck).

Reaktifler: DPPH[•], FeCl₃, ferrozin (Sigma), K₃Fe(CN)₆, TCA, KH₂PO₄, Na₂CO₃, Folin-Ciocalteu Reaktifi (Sigma-Aldrich), BHA, BHT, Gallik asit (Merck), Amonyum seryum sülfat (Sigma).

Dolgu maddeleri; Silika jel (Merck 60-230 mesh), silika jel G_{F254} İTK tabakaları (20x20), (Merck).

Belirteçler: Serik sülfat (12 g amonyum seryum(IV)sülfat + 50 mL Derişik Sülfürik Asit+ 450 mL su şeklinde hazırlandı).

HPLC cihazı için: asetonitril, metanol, deiyonize su ve formik asit.

3.2. Kullanılan Cihazlar

¹H-NMR (Bruker 400 MHz Spektrometre)

¹³C-NMR (Bruker 100 MHz Spektrometre)

P-HPLC Perkin Elmer Series200 pompa Series 200 UV-Vis dedektör

Döner buharlaştırıcı (Heidolph)

Manyetik karıştırıcı (İKA)

Liyofilizatör (ScanVac)

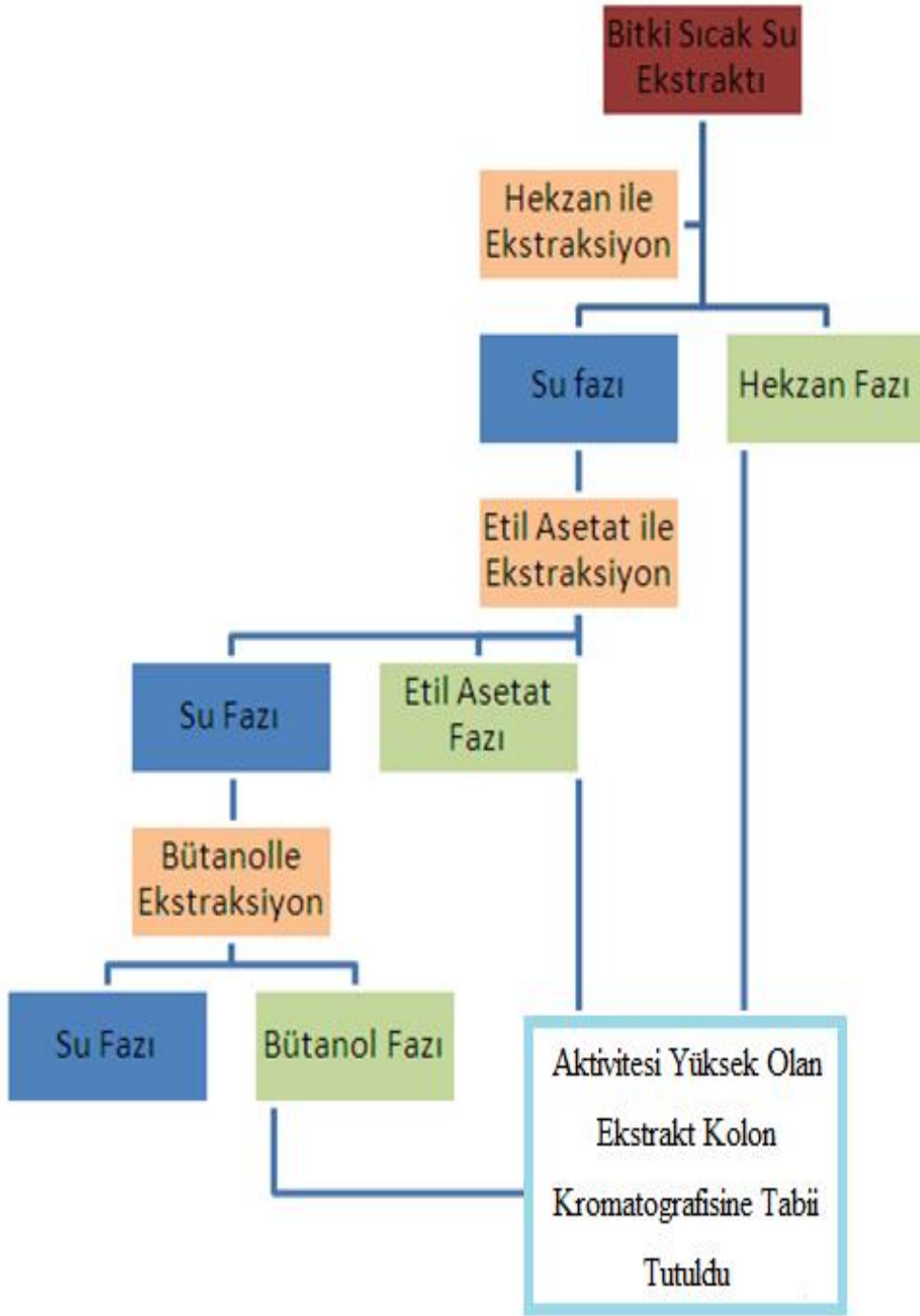
3.3. Bitkisel Materyal

Origanum minutiflorum bitkisi Isparta'nın Sütçüler ilçesinden toplandı. Bitkinin tür teşhisi Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hasan ÖZÇELİK tarafından belirlendi. Tanık Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi Herbaryumu'nda saklanmıştır. Bitkinin ekstrakte edilmesi, antioksidan aktivite için test numunelerinin hazırlanması, fraksiyonlandırma, ayırma,

saflaştırma, antioksidan aktivite testleri ve saflaştırılan bileşiklerin yapı karakterizasyonları Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Kimya Bölümü Bitki Araştırma Laboratuvarı-A'da yapıldı.

3.4. Ekstraksiyon İşlemleri

Origanum minutiflorum bitkisi güneş görmeyen ortamda baskısız kağıtlar üzerinde kurutulmuş ve küçük parçalara ayrılmış bitkiden (0.7 kg) alınarak (5L) sıcak suda açık atmosferde (1 saat) kaynatıldı ve bu sürenin sonunda oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra filtre kağıdı ile süzülerek sulu konfüzyon elde edildi. Bu kısım hekzan ile (1:1 oranında) partitisyona tabii tutuldu ve hekzan fazları birleştirilerek kuruluğa kadar evaporatörde çözücü uzaklaştırılarak hekzan fazı elde edildi. Hekzan ile yapılan partitasyon su fazındaki yüksek polariteli primer ve sekonder metabolitlerin sulu fazda kalmasını düşük polariteli moleküllerin hekzan fazında birikmesini sağladı. Hekzan ekstraktından sonra kalan sulu kısım aynı şekilde etil asetat ve n-bütanol ile ekstrakte edildi. Bitkiden toplam 3 faz elde edilerek ve bu ekstraktlar için antioksidan aktivite testleri gerçekleştirilmiştir. Aktivitesi yüksek olan fazın aktivitesinden sorumlu bileşiklerin izolasyonu için kolon kromatografisi gerçekleştirilmiştir ve ayrıca 3 fazın LC-TOF kromatogramları birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Ekstraksiyon seması Şekil 3.1' de verilmiştir.



Şekil 3. 1. *Origanum minutiflorum* bitkisi için ekstraksiyon şeması

3.5. Antioksidan Aktivite Analizleri

3.5.1. Toplam Fenolik Madde Tayini

Total fenolik tayini Folin-Ciocalteu metodu kullanılarak tayin edilmiştir. Yöntem, suda ve organik çözücülerde çözünmüş olan fenolik bileşiklerin Folin-Ciocalteu reaktifleri ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan mor–menekşe renkli kompleks 760 nm’de maksimum absorbans oluşturur (Slinkard ve Singleton, 1979). Ekstraktlar içindeki toplam fenol miktarları, bu yöntem kullanılarak spektrofotometrik olarak tayin edildi. Folin-Ciocalteu yöntemine göre, 1 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde destile suyla seyreltilmiş 100 µl bitki ekstresi ve 100 µl Folin-Ciocalteu reaktifi 5 dakika süreyle karıştırıldı. %2’lik sodyum karbonat çözeltisinden 300 µL eklendikten sonra tüpler vortekste 1 dakika karıştırılarak bu karışımın üzerine 4.5 mL destile su ilave edildi. Daha sonra tüpler tekrar vortekslenerek oda koşullarında karanlıkta iki saat inkübe edildikten sonra UV spektrofotometrede 760 nm’de absorbansları ölçülüp kaydedildi. Gallik asit kullanılarak elde edilen kalibrasyon grafiği kullanılarak toplam fenolik bileşik hesaplanmıştır. Sonuçlar kg ekstrede mg gallik aside eşdeğer (mg GAE/kg ekstre) olarak verilmiştir.

3.5.2. Serbest Radikal Giderme Aktivitesi (DPPH• Testi)

Bitki ekstratlarının ve izole moleküllerin DPPH• serbest radikalini süpürücü etkileri 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil stabil radikalinin menekşe/mor rengini giderme yetenekleri ile ölçülmektedir. Bu maddelerin DPPH• ile oluşturdukları rengin 517 nm’de ölçümüne ve standart madde ile karşılaştırılmasına dayanmaktadır (Blois, 1958). Metot, ekstraktların bir proton veya elektron verebilme yeteneğinin, mor renkli DPPH• çözeltisinin rengini açması esasına dayanır. Reaksiyon karışımının absorbansının düşmesi yüksek serbest radikal giderme aktivitesinin göstergesidir. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH•) radikalinin etkinliğinin giderilmesi çalışmaları çeşitli araştırmacıların ortaya koydukları metodu takiben yapılmıştır (Hatano ve ark., 1988). Bu metoda göre, her bir numune için (10, 20, 40, 80 µL) 1 mg/mL’lik konsantrasyona sahip olan dört farklı miktarda örnekler ve standartların çözeltileri alınıp 3 mL olacak şekilde etil alkol ilave edildikten sonra üzerlerine 0.1 mM’lık DPPH• çözeltisinden 1’er mL eklendi. Vorteks yardımıyla 30

saniye karıştırıldıktan sonra karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi. Ardından 517 nm'deki absorbans değerleri spektrofotometre ile ölçülerek kaydedildi. DPPH• giderme aktivite sonuçları IC₅₀ şeklinde verilmiştir.

3.5.3. İndirgeme Gücü Aktivitesi

Bitki ekstraktlarının, moleküllerin ve standartların indirgeme kapasitesi Oyaizu metoduna göre tayin edildi (Oyaizu, 1986). Ortamdaki indirgen madde Fe³⁺ iyonlarını Fe²⁺ iyonlarına indirger ve FeCl₃ ilavesiyle oluşan Prusya mavisi rengindeki kompleksin absorbansı ölçülür. Yüksek absorbans değeri yüksek indirgeme kapasitesinin göstergesidir. Bu metoda göre, her bir numune için 50, 100, 150 ve 200 µg/mL konsantrasyonlara sahip örnek ve standartlardan 0.1 mL alınıp 0.2 M fosfat tamponu (pH=6.6) ile 1.25 mL'ye tamamlanıp karıştırıldı. Daha sonra 1.25 mL %1'lik potasyum ferrisiyanür [K₃Fe(CN)₆] eklenerek 50 °C'de 20 dk inkübasyona bırakıldı. Bu aşamadan sonra reaksiyon karışımı oda sıcaklığına getirilip üzerine 1.25 mL %10'luk trikloroasetik asit eklendi ve 250 µL %0.1'lik FeCl₃ eklendikten sonra 1 dakika vortekslelendikten sonra 700 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Sonuçlar troloksa eşdeğer (µmol TEAC/g numune) şeklinde verilmiştir.

3.5.4. Metal Şelatlama Aktivitesi

Metal şelatlama özelliği olan antioksidan maddeler serbest demiri bağlamak suretiyle onu etkisizleştirir ve böylece fenton reaksiyonları sonucu oluşan hidroksil ve peroksit gibi radikal oluşumunu inhibe eder. Bu deneyde örneklerin Fe⁺² şelatlama etkisi incelendi. Bu amaçla FeCl₂ çözeltisi kullanıldı. Fe⁺² iyonu ve ferrozinin oluşturduğu kompleksin 562 nm'de mor renk oluşmasına dayanılarak şelatlama aktivitesi belirlendi. Örneklerin ve standartların metal şelatlama kapasitesi Dinis ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntemler esas alınarak uygulandı. Örnek ve standart çözeltilerinin konsantrasyonları 25, 50, 75 ve 100 µg/mL olacak şekilde toplam hacimleri metanol ile 2 mL'ye tamamlandı. Her bir numune 25 µL, 2 mM FeCl₂.4H₂O çözeltisi ile 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 100 µL, 5 mM ferrozin eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Demir iyonları ve ferrozinin oluşturduğu kompleksin absorbansı

562 nm'de ölçüldü. Pozitif kontrol olarak EDTA kullanıldı. Sonuçlar IC₅₀ şeklinde verilmiştir (Dinis ve ark., 1994).

3.5.5. ABTS⁺ Radikali Giderme Aktivitesi

ABTS⁺ (2,2'-azino-bis-3-etilbenzothiazolin-6-sülfonik asit) radikali giderme aktivitesi Re ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre belirlendi. ABTS⁺ radikali oluşturulması, ABTS⁺'nin potasyum persülfat (K₂S₂O₈) oksidasyonu ile direkt üretilir. Bu işlem için 2 mM'lık ABTS⁺ çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiye 2.45 mM'lık potasyum persülfat çözeltisi eklenerek ABTS⁺ radikali elde edildi. Elde edilen çözelti kullanılmadan önce 734 nm'de absorbansı 0.1 M ve pH'sı 7.4 olan fosfat tamponu ile 0.700±0.025 nm'ye ayarlandı. Farklı konsantrasyonlardaki (100-400 µg/mL) ekstraktların ve izole moleküllerin stok çözeltisine (100 µL) ABTS⁺ radikali çözeltisi (1 mL) ilave edildikten sonra üzerine tampon çözelti ilave edilerek son hacim 4 mL olacak şekilde seyreltme işlemi yapıldı. Tampondan oluşan köre karşı 734 nm'de absorbansları kaydedildi. Sonuçlar IC₅₀ şeklinde verilmiştir (Re ve ark., 1999).

3.5.6. Cu²⁺ iyonlarını Cu¹⁺ iyonlarına indirgeme (Cuprac) Aktivitesi

Bitki ekstraktlarının, moleküllerin ve standartların cuprac yöntemiyle antioksidan kapasitesi Chang ve arkadaşlarının geliştirdiği metoda göre tayin edildi. Ortamdaki indirgen madde Cu²⁺ iyonlarını Cu¹⁺ iyonlarına indirger ve CuCl₂ ilavesiyle oluşan sarı renkteki kompleksin absorbansı ölçülür. Yüksek absorbans değeri yüksek antioksidan kapasitesinin göstergesidir. Bu metoda göre, her bir ekstrakt için 50, 100, 150 ve 200 µg/mL konsantrasyonlara sahip örnek ve standartların 1 mL'si, 1 mL (0.01 M) CuCl₂ ile karıştırıldı. Daha sonra 1 mL neokuprin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) (7.5×10⁻³ M alkolde çözünmüş) ve 1 mL amonyum asetat (NH₄Ac) tampon çözeltisi ilave edildikten sonra iyice karıştırıldı. Oda sıcaklığında 30 dk inkübasyona bırakıldı sonra 450 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Troloks kalibrasyon eğrisi kullanılarak sonuçlar troloks'a eşdeğer olarak değerlendirildi. Sonuçlar troloksa eşdeğer (µmol TEAC/g numune) şeklinde verilmiştir (Chang ve ark., 2002).

3.6. Etkili Bileşiklerin Saflaştırılması İşlemlerinde Kullanılan Teknikler

3.6.1. Kolon kromatografisi

Elde edilen (25 g) n-bütanol ham ekstresindeki etken maddelerin saf olarak elde edilmesi için (4 cm çapında ve 120cm uzunluğunda) cam kolon kullanıldı. Kolon dolgu maddesi olarak (600 gram) (60 mesh partikül boyutunda) silika jel kullanıldı. Hareketli faz olarak %100 hekzandan başlayarak artan polarite ile hekzan-diklorometan, diklorometan, diklorometan-EtOAc, EtOAc ve EtOAc-metanol çözücü sistemleri ile kademeli olarak artırılarak elue edildi. 250'şer mL olacak şekilde 810 adet fraksiyon toplandı. Toplanan fraksiyonlar İTK ile kontrollü olarak birleştirildi.

3.6.2. İnce tabaka kromatografisi (İTK)

Kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlardan benzer fraksiyonların birleştirilmesi amacıyla İTK'ye tabi tutuldu. İTK için mobil faz belirlenirken, kolonda kullanılan mobil faz ile aynı polaritede çözücü kullanıldı. Saf olan fraksiyonların çözücüleri uzaklaştırıldıktan sonra NMR spektrumları alındı. Saf olmayan fraksiyonlar için R_f değerleri aynı olanlar UV (254 ve 366 nm) ışığı altında kontrol edilerek birleştirildi. UV ışığında görünmeyen spotlar ise serik sülfat belirteci püskürtülerek hafif ısıtıldıktan sonra görünen renkler ve R_f değerlerine bakılarak benzer olan fraksiyonlar birleştirildi.

3.6.3. LC-TOF/MS (Uçuş zamanlı Sıvı Kromatografisi Kütle Spektroskopisi)

Uçuş zamanlı (TOF) kütle spektrometresinde iyonlar elektrik alan tarafından ivmelendirilir ve iyonların dedektöre uçuş süresi ölçülür. Hafif olan iyonlar ağır olan iyonlara göre daha hızlı uçacağı için iyonlar uçuş zamanının bir fonksiyonu olarak ayrılmış olur. TOF-MS ünitesi bileşimlerin elemental formlarını spesifik ve seçicilikle aydınlatır. Çalışmada kullanılan cihazın ve kolonun özellikleri aşağıda verilmiştir.

Cihaz: Agilent technologies 1260 infinity LC, 6210 TOF-MS

Enjeksiyon hacmi: 10 μ L

Kolon sıcaklığı: 35 $^{\circ}$ C

Kolon: ZORBAX SB-C18 4.6x100mm, 3.5 μ m

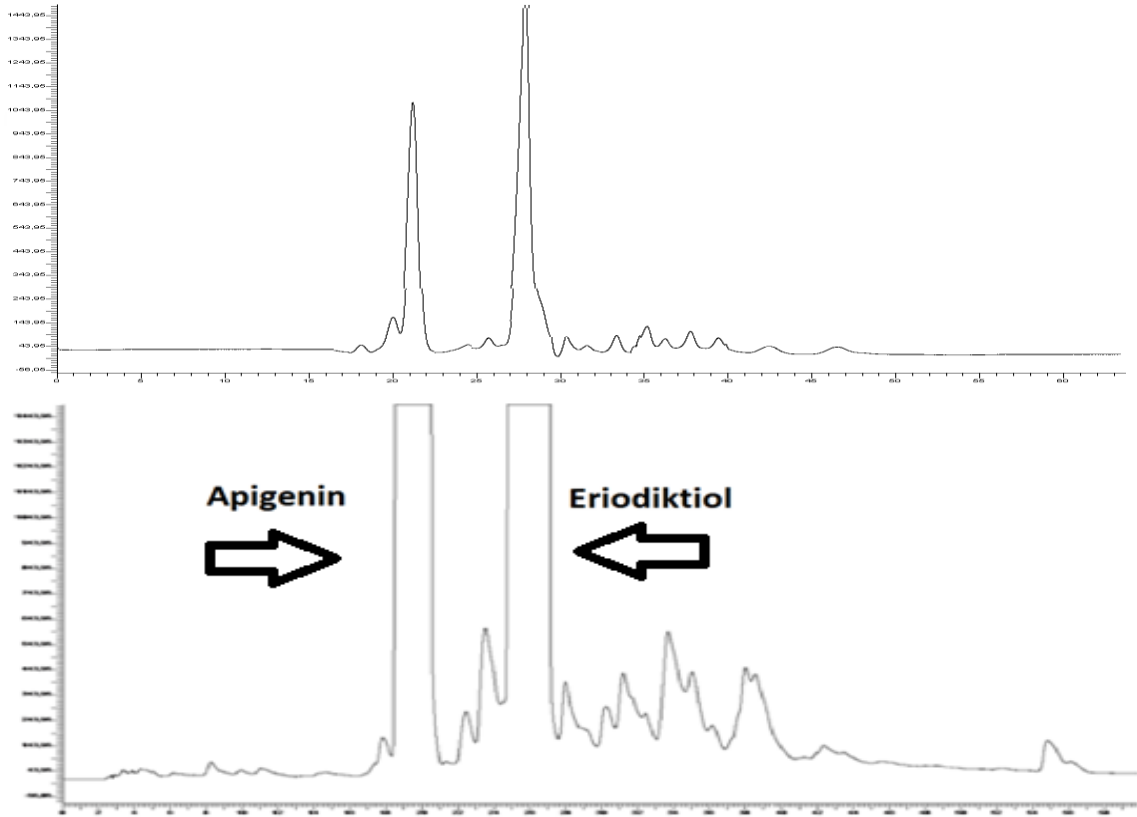
3.6.4. Preperatif HPLC (P-HPLC)

P-HPLC'nin Analitik HPLC'den temel farkı akış hızının, kolonun ve enjeksiyon yapılan madde miktarının yüksek olmasıdır. Tek bir enjeksiyon ile daha fazla madde ayrımını sağlar. Çalışmada kullanılan HPLC cihazı Perkin Elmer marka Series 200 model UV detektörlü bir cihazdır. Çalışma boyunca kolon fırını 30 °C'de sabit tutuldu. Enjeksiyonlar; hacmi 200 µL olan loop kullanılarak manuel olarak yapıldı. Ayırma işlemlerinin tamamında C18 ters faz dolgu maddesi içeren VYDAC marka (25 mm x 300 mm boyutlarda 10 µm partikül boyutlu) kolon kullanıldı.

Yapılan P-HPLC çalışmasında; n-bütanol ekstresine uygulanan kolon kromatografisinde elde edilen fraksiyonların (186-356, 357-567 ve 568-648), İTK yardımıyla ikiden fazla madde içerdiği belirlendi. Uygun metot oluşturulduktan sonra P-HPLC uygulaması yapıldı. Bu fraksiyon aralıklarının HPLC ve P-HPLC kromatogramları aşağıda verilmiştir (Şekil 3.2, 3.3, 3.4).

Çizelge 3. 1. 186-356 fraksiyon aralığına uygulanan P-HPLC mobil faz programı

	Çözücü Akış Hızı (mL/dk)	Zaman (dk)	%2.5'lik Formik Asitli su (v/v)	Asetonitril (v/v)
1	5	0	% 95	% 5
2	5	60	% 70	% 30
3	5	3	% 0	% 100
4	5	2	% 95	% 5

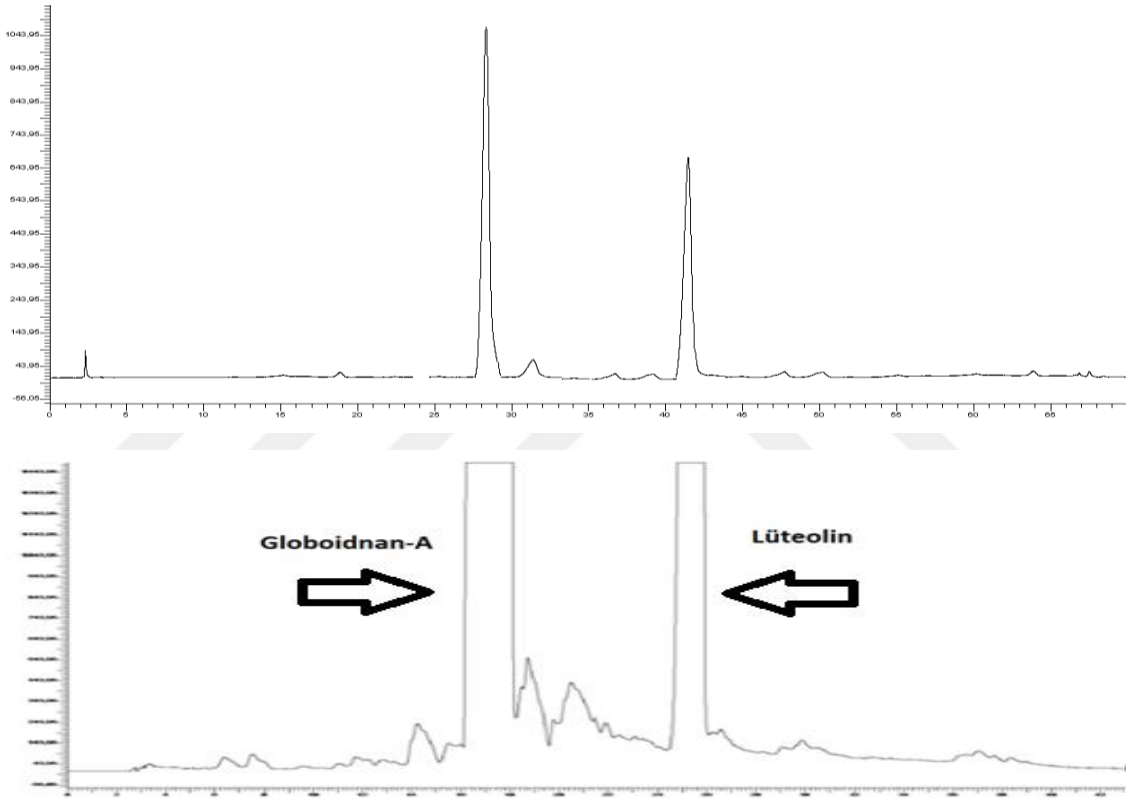


Şekil 3. 2. n-bütanol fazı 186-356 fraksiyonlarının HPLC kromatogramları

Kolon kromatografisinde silikajel dolgu maddesi kullanılarak, Hekzan (%40) – EtOAC (%60) çözücü sisteminde toplanan ve İTK kontrollü olarak birleştirilen 186-356'nolu fraksiyonlarına P-HPLC uygulandı. Kromatogramda (Şekil 3. 2) görülen büyük pikler farklı tüplere konularak evaporatörle çözümleri uzaklaştırıldı. NMR'ları alınarak maddelerin **Apigenin** ve **Eriodiktol** olduğu belirlendi.

Çizelge 3. 2. 357-567 fraksiyon aralığına uygulanan P-HPLC mobil faz programı

	Çözücü Akış Hızı (mL/dk)	Zaman (dk)	%2.5'lik Formik Asitli su (v/v)	Asetonitril (v/v)
1	5	0	% 100	% 0
2	5	60	% 65	% 35
3	5	3	% 0	% 100
4	5	2	% 100	% 0

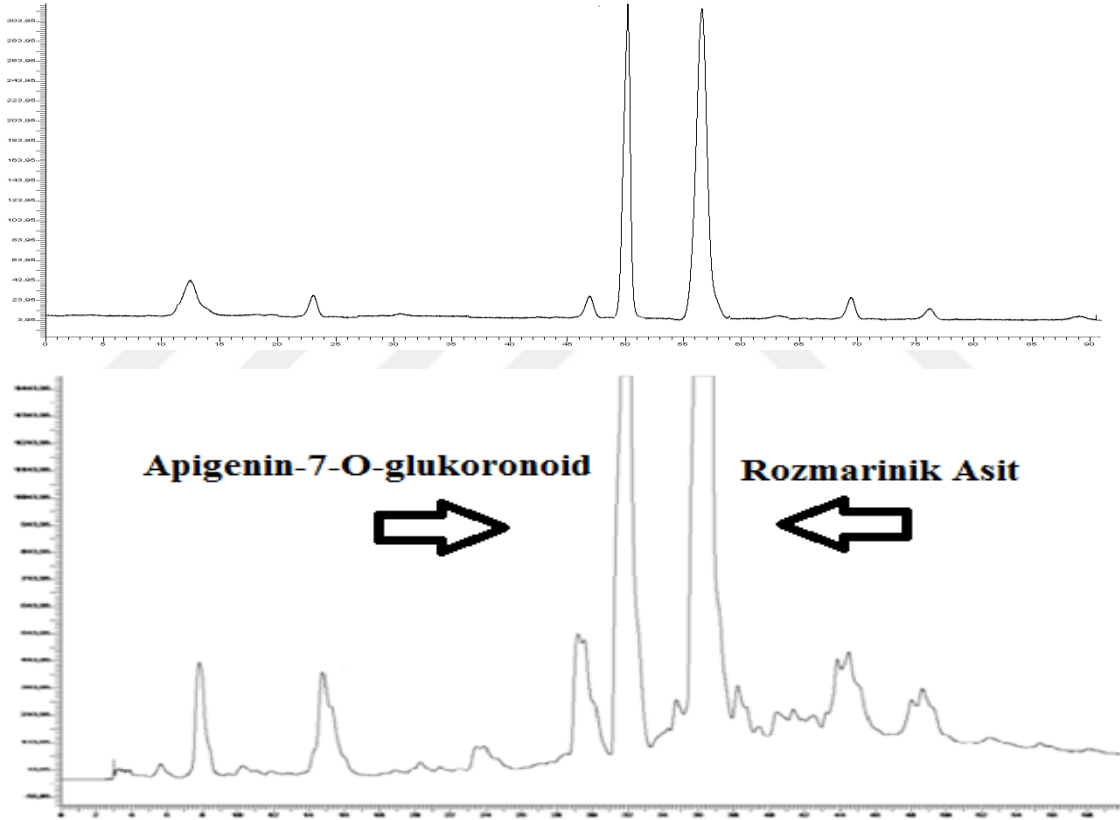


Şekil 3.3. n-bütanol fazı 357-567 fraksiyonlarının HPLC kromatogramları

n-bütanol fazından kolon kromatografisi ile silikajel dolgu maddesi kullanılarak, EtOAc (%100) çözücü sisteminde toplanan ve İTK kontrollü olarak birleştirilen 357-567 nolu fraksiyonları için P-HPLC uygulaması yapıldı. Kromatogramda (Şekil 3. 3) görülen büyük pikler farklı tüplere konularak evaporatörle çözümleri uzaklaştırıldı. NMR'ları alınarak maddelerin **Globoidnan-A** ve **Luteolin** olduğu belirlendi.

Çizelge 3. 3. 567-648 fraksiyon aralığına uygulanan P-HPLC mobil faz programı

	Çözücü Akış Hızı (mL/dk)	Zaman (dk)	%2.5'lik Formik Asitli su (v/v)	Asetonitril (v/v)
1	5	0	% 95	% 5
2	5	60	% 60	% 40
3	5	3	0	% 100
4	5	2	% 95	% 5



Şekil 3.4. n-bütanol fazı 567-648 fraksiyonlarının HPLC kromatogramları

n-bütanol fazından kolon kromatografisi ile silikajel dolgu maddesi kullanılarak, Metanol (%10) - Etil asetat (%90) çözücü sisteminde 567-648 fraksiyon aralığı için preparatif HPLC uygulaması yapıldı. Kromatogramdaki pikler farklı tüplere konularak evaporatörle çözümleri uzaklaştırıldı ve tekrar NMR ları alınarak maddelerin **Apigenin-7-O-glukoronid** ve **Rozmarinik Asit** olduğu belirlendi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Ham Ekstrelelere Uygulanan Antioksidan Aktive Testlerinin Sonuçları

Ekstrelerin antioksidan kapasiteleri, toplam fenolik bileşik, DPPH• radikal giderme aktivitesi, indirgeme gücü aktivitesi, ABTS⁺ katyon radikali giderme aktivitesi, Metal Şelatlama aktivitesi ve Cuprac aktiviteleri ölçülerek belirlendi. Bitkiden elde edilen ekstrelerin antioksidan kapasitelerini belirledikten sonra antioksidan kapasitesi yüksek olan ekstre sekonder metabolitlerin izolasyonu için kullanıldı.

Çizelge 4.1’de de görüldüğü gibi fenolik içerik bakımından zengin olan ekstrenin (n-bütanol ekstraktı), bünyesinde 131.32 g gallik aside eşdeğer fenolik madde içerdiği, DPPH• radikal giderme (IC₅₀= 24.54 µg/mL), indirgeme gücü (4.63 TE µmol/g ekstre), ABTS⁺ radikal giderme (IC₅₀= 10.70 µg/mL) ve Cuprac (bakır (II) iyonu indirgeme aktivitesi) (10.89 TE µmol/g ekstre) değerleriyle de diğer ekstrelelere oranla daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlendi. Diğer ekstrelerden daha yüksek fenolik bileşik içermesi ve DPPH•, ABTS⁺, Cuprac aktiviteleri daha yüksek olmasından dolayı bu ekstre izolasyon işlemlerinde kullanıldı. Etil asetat ekstresinin FRAP aktivitesi n-bütanolden yüksek çıkmış olsa da diğer aktivite testleri göz önünde tutularak izolasyon işlemleri için etil asetat ekstresi tercih edilmedi. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, sekonder metabolitlerin izolasyonu ve yapı analizleri için n-bütanol ekstresine kromatografik ve spektroskopik yöntemler uygulandı.

Çizelge 4. 1. Ham ekstrelelere uygulanan antioksidan aktivite test sonuçları.

Numune	Toplam Fenolik (g GAE /Kg ekstre)	DPPH [•] Radikal Giderme [IC ₅₀ (µg/mL)]	İndirgeme Gücü (µmol TE/g ekstre)	ABTS ⁺ Radikal Giderme [IC ₅₀ (µg/mL)]	Metal Şelatlama Aktivitesi [IC ₅₀ (µg/mL)]	Cuprac (µmol TE/g ekstre)
Hekzan Ekstraktı	28.5 ± 1.7	229.55 ± 9.12	0.58 ± 0.01	65.34 ± 2.48	-	5.80 ± 0.03
Etil Asetat Ekstraktı	102.27 ± 6.88	51.61 ± 1.32	5.68 ± 0.85	11.72 ± 0.17	-	7.88 ± 0.01
n-bütanol Ekstraktı	131.32±5.81	24.54 ± 0.56	4.63 ± 0.57	10.70 ± 0.09	-	10.89±0.16
BHT	-	5.42 ± 0.41	4.33 ± 0.23	5.03 ± 0.01	-	4.82 ± 0.38
BHA	-	8.20 ± 0.68	7.26 ± 0.26	7.56 ± 0.04	-	8.14 ± 0.19
Trolox	-	17.26 ± 0.32	3.96 ± 0.26	13.80 ± 0.13	-	4.13 ± 0.43
EDTA	-	-	-	-	3.29 ± 0.29	-

4.2. Fitokimyasal Çalışmalar

4.2.1. İzolasyon İşlemi

Bitkiden aktif bileşenlerin ayrılması ve saflaştırılmasında 4 cm çapında ve 120 cm uzunluğunda cam kolon kullanıldı. Sabit faz olarak 600 g silika jel kullanıldı. Kolonun şartlanması basamağında ise; kolondan hekzan normal akış ile (basınçsız ve vakumsuz) geçirildi. Daha sonra 25 g ekstre (n-bütanol) az miktar çözücü ile çözüp 25 g silika jel ile homojenize hale gelene kadar karıştırıldı ve kolona tatbik edildi. Fraksiyonlar 250 mL hacimlerinde toplandı ve evaporasyonla çözücüsü uzaklaştırılan fraksiyonlar etiketlenmiş tüplere uygun çözücü ile çözülüp aktarıldı. Toplanan çözücüler aynı polaritenin kullanıldığı basamaklarda tekrar kolonda kullanıldı. Kolon kromatografisinde hekzandan başlayarak diklorometan, etil asetat ve metanol ile kademeli bir şekilde polariteleri arttırılarak toplamda 810 adet fraksiyon toplandı. Fraksiyonlar İTK ile kontrol edilerek birleştirildi.

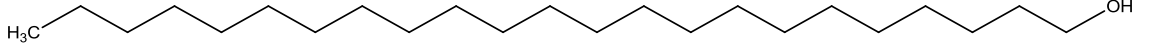
Çizelge 4. 2. *Origanum minutiflorum* Kolon Çözücü Sistemi, Birleştirilen Fraksiyon Aralıkları ve İzole Edilen Bileşikler

Çözücü Sistemi	Fraksiyon Aralıkları	Bileşenler
% 100 Hekzan	0-25	tricosan-1-ol
% 50 Diklorometan / %50 Hekzan	26-58	(8E,16E)-tetracosa-8,16-diene-1,24-diol
% 100 Diklorometan	59-112	Azapan-2-one
% 50 Etil asetat / %50 Hekzan	113-186	3,4-dihidroksi benzoik asit
% 60 Etil asetat / %40 Hekzan	187-263	Apigenin + Eriodiktiol
% 75 Etil asetat / %25 Hekzan	264-356	
% 90 Etil asetat / %10 Hekzan	357-434	Globoidnan-A + Luteolin
% 100 Etil asetat	435-567	
% 5 Metanol / % 95 Etil asetat	568-648	Rozmarinik asit + Apigenin-7-O-glukoronoid
% 10 Metanol / % 90 Etil asetat	649-718	Vicenin-II
% 20 Metanol / % 80 Etil asetat	719-810	

4.3. İzole Edilen Bileşiklerin Yapı Analizi

Origanum minutiflorum O. Schwarz & P.H. Davis bitkisinden elde edilen n-bütanol'e uygulanan kromatografik teknikler sonunda toplamda on bir adet molekül izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır.

4.3.1. Tricosan-1-ol (1)

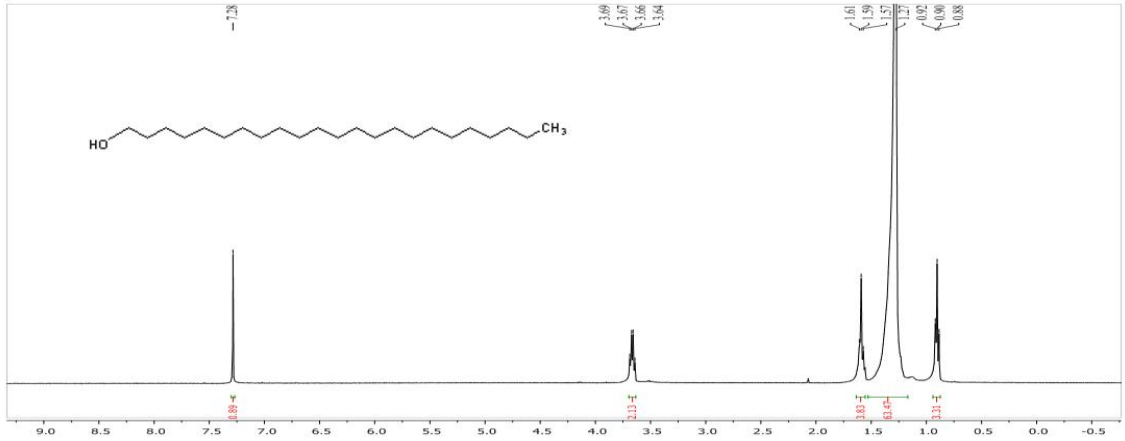


Şekil 4.1. Tricosan-1-ol bileşiğinin yapısı

Tricosan-1-ol bileşiği, kolon kromatografisinden %100 Hekzan çözücü sisteminden 30 mg olarak izole edildi. Beyaz renkli tricosan-1-ol kristalinin kapalı formülü $C_{23}H_{48}O$ olup molekül kütlesi 340 g/mol'dür. Bu molekülü bilinen bir bileşik olup elde edilen veriler literatür ile uyum içindedir (Oshima ve ark., 1981).

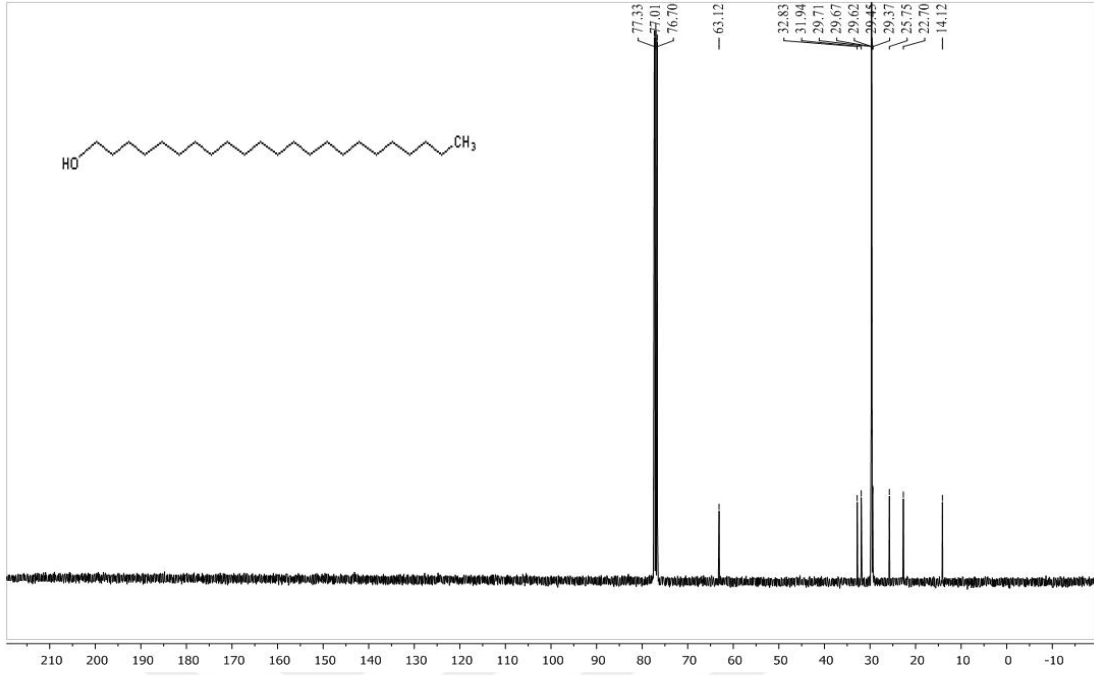
Çizelge 4.3. 1 nolu bileşiğin elemental analiz değerleri

Element	%
C	80.77
H	14.57



Şekil 4.2. Tricosan-1-ol'ün (1) 1H -NMR spektrumu (1H -NMR 400 MHz, $CDCl_3-d_1$)

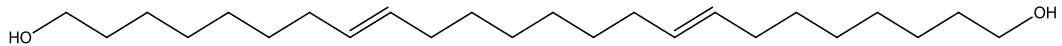
Tricosan-1-ol bileşiğinin 1H -NMR spektrumuna bakıldığında $\delta_H = 3.66$ ppm'de görülen pik hidroksil grubuna yakın olan CH_2 'nin protonlarını $\delta_H = 0.90$ ppm'de görülen sinyal CH_3 protonunu $\delta_H = 1.27$ ppm'de CH_2 'lerin protonlarına ait olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.3. Tricosan-1-ol'ün (1) ^{13}C -NMR spektrumu (^{13}C -NMR 100 MHz $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$)

Tricosan-1-ol bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumuna bakıldığında $\delta_{\text{C}} = 63.12$ ppm'de görülen sinyal hidroksil gurubuna yakın olan CH_2 'nin karbonuna, $\delta_{\text{C}} = 14.12$ ppm'de görülen sinyal CH_3 karbonuna diğer sinyallerin ise CH_2 gruplarının karbonlarına ait olduğu tespit edilmiştir.

4.3.2. (8E,16E)-tetracosa-8,16-diene-1,24-diol (2)

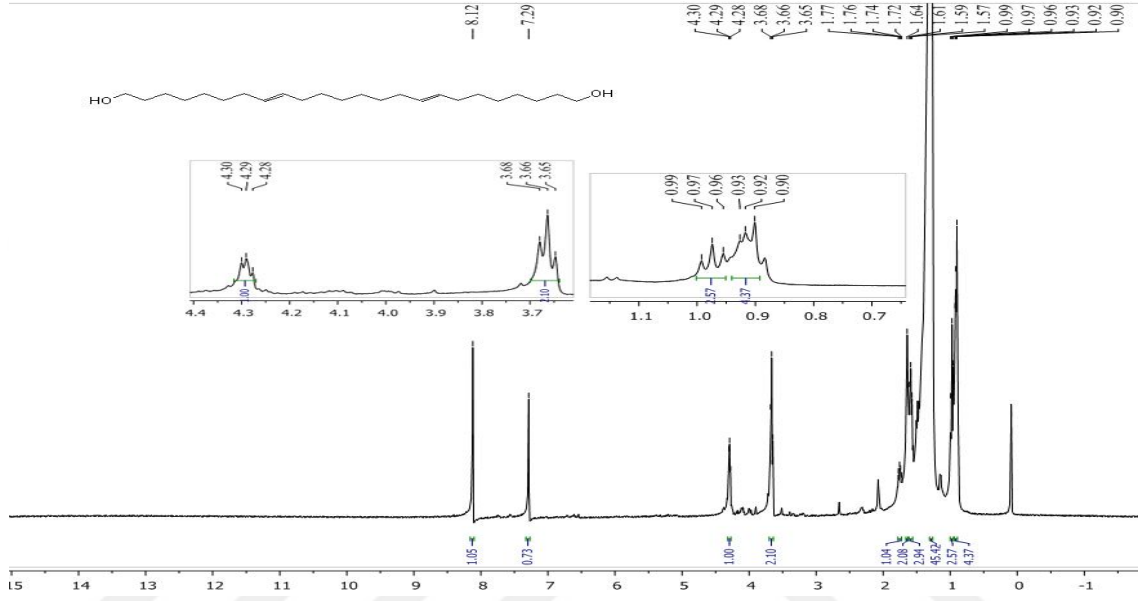


Şekil 4.4. (8E,16E)-tetracosa-8,16-diene-1,24-diol bileşiğinin yapısı

2 nolu bileşik ((8E,16E)-tetracosa-8,16-diene-1,24-diol) bileşiği, kolon kromatografisi ile % 50 Diklormetan - %50 Hekzan çözücü sisteminden 26 mg olarak izole edildi. Beyaz renkli (8E,16E)-tetracosa-8,16-diene-1,24-diol kristalinin kapalı formülü $\text{C}_{24}\text{H}_{46}\text{O}_2$ olup molekül kütlesi 366,345 g/mol'dür. Bu molekül bilinen bir bileşiktir.

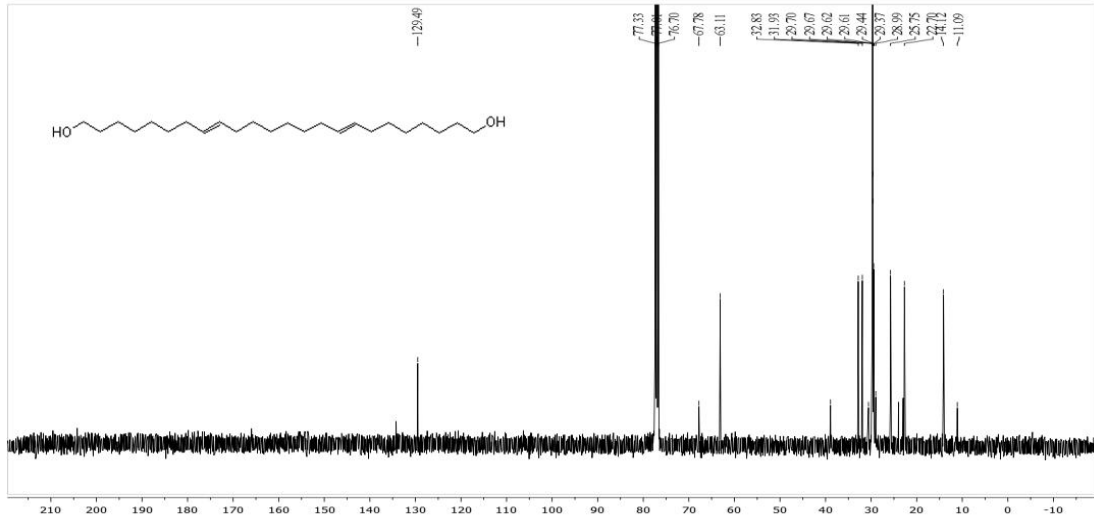
Çizelge 4.4. 2 nolu bileşiğin elemental analiz değerleri

Element	%
C	78.01
H	12.88



Şekil 4.5. (8E,16E)-tetracos-8,16-diene-1,24-diol'ün (2) ¹H-NMR spektrumu (¹H-NMR 400 MHz, CDCl₃-d₁)

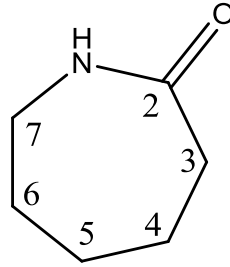
(8E,16E)-tetracos-8,16-diene-1,24-diol bileşiğinin ¹H-NMR spektrumuna bakıldığında $\delta_H = 3.66$ ppm'de görülen (t, $J=6.6$ Hz) triplet CH₂ protonlarına, $\delta_H = 4.29$ (m) ppm'de görülen multipllet CH protonlarına ve $\delta_H = 8.12$ ppm'de görülen pikin hidroksil grubuna ait olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.6. (8E,16E)-tetracos-8,16-diene-1,24-diol'ün (2) ^{13}C -NMR spektrumu (^{13}C -NMR 100 MHz $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$)

(8E,16E)-tetracos-8,16-diene-1,24-diol bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumuna bakıldığında $\delta_{\text{C}} = 129.90$ ppm'de görülen sinyal CH gurubuna görülen diğer sinyallerin ise CH_2 gruplarının karbonlarına ait olduğu tespit edilmiştir.

4.3.3. Azepan-2-one (3)

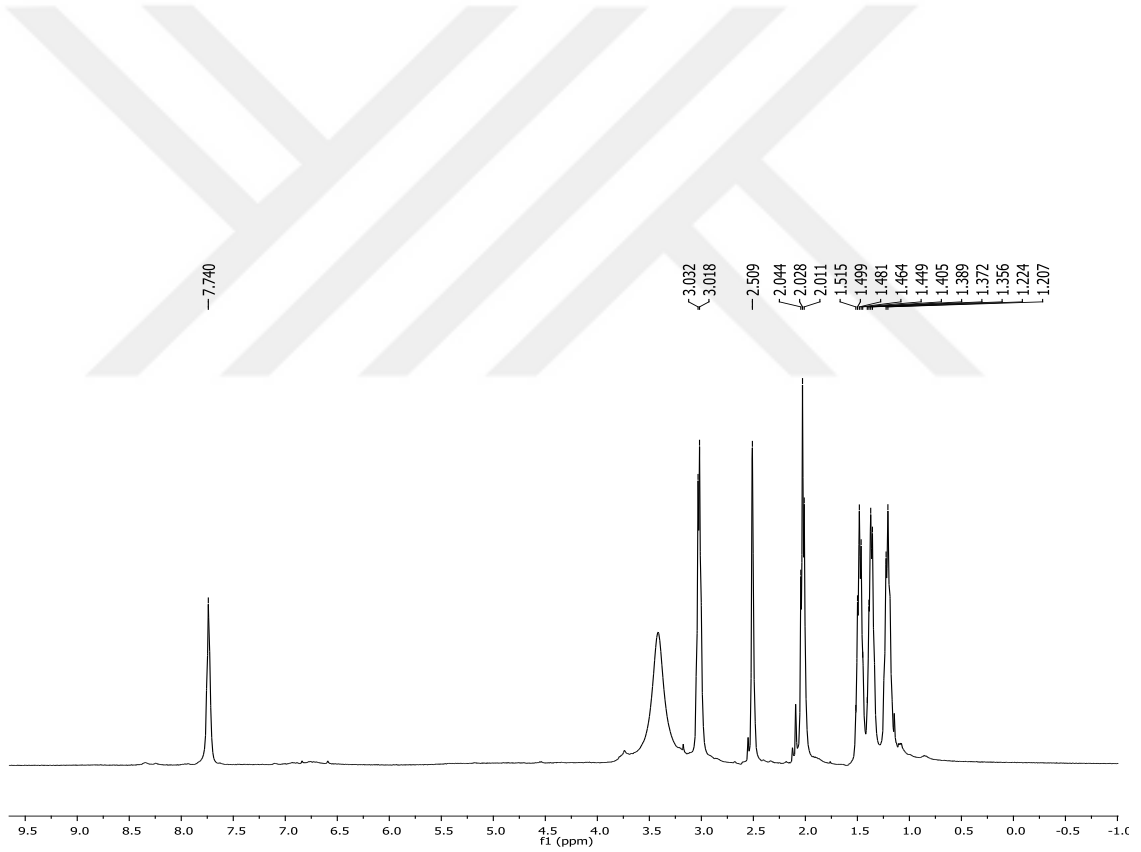


Şekil 4.7. Azepan-2-one bileşiğinin yapısı

3 nolu bileşik (Azepan-2-one) kolon kromatografisinden %100 diklorometan çözücü sisteminden 50 mg izole edildi. Bileşik beyaz kristal halindedir. Molekül bilinen bir bileşik olup elde edilen veriler literatür (Borgen ve Rise, 1993) ile uyum içindedir.

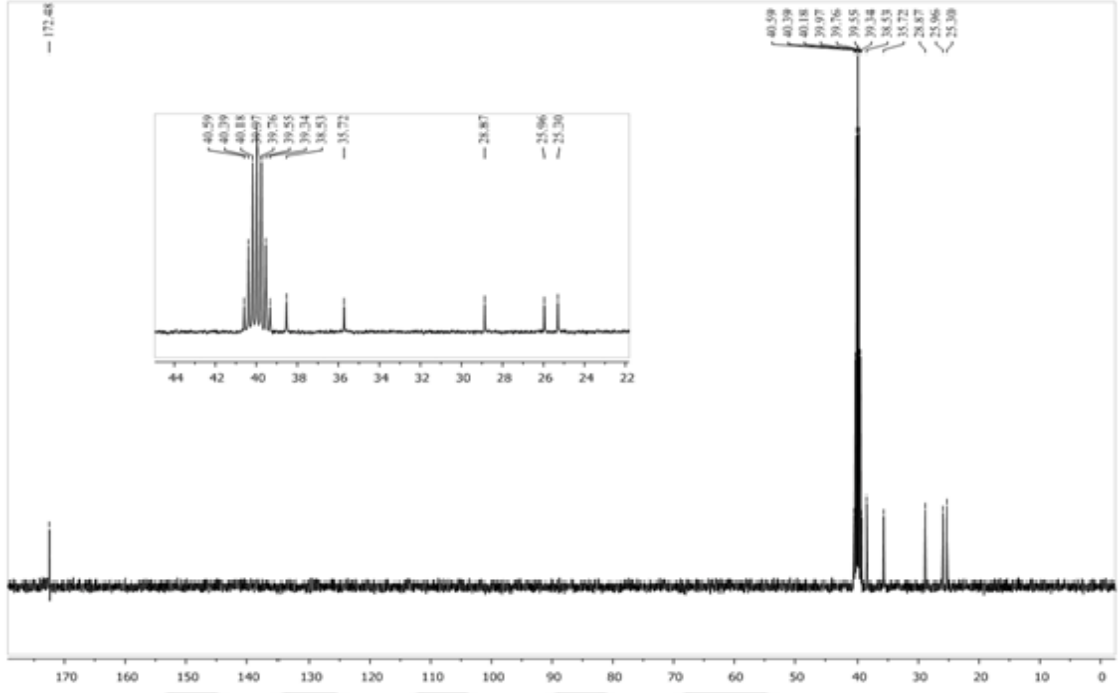
Çizelge 4.5. 3 nolu bileşiğin $^1\text{H-NMR}$ ve $^{13}\text{C-NMR}$ kimyasal kayma değerleri

Pozisyon	3 Nolu Bileşik	
	δ_{H}	δ_{C}
N-H	7.74(s)	
2		172.48
3	2.03(m)	35.72
4	1.19(m)	25.30
5	1.21(m)	25.96
6	1.36(m)	28.87
7	3.02(m)	38.53



Şekil 4. 8. Azepan-2-one' nin (3) $^1\text{H-NMR}$ spektrumu ($^1\text{H-NMR}$ 400 MHz, DMSO-d_6)

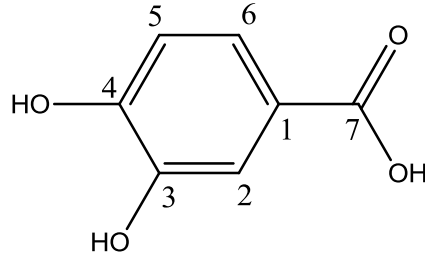
Azepan-2-one bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumuna bakıldığında $\delta_{\text{H}} = 2.03, 1.19, 1.21, 1.36$ ve 3.02 (m) ppm'de görülen sinyaller azepan halkasının C-3, C-4, C-5, C-6 ve C-7 protonlarına, 7.74 (s) ppm' de görülen sinyal NH protonuna ait olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.9. Azepan-2-one'nin (3) ¹³C-NMR spektrumu (¹³C-NMR 100 MHz DMSO-d₆)

Azepan-2-one bileşiminin ¹³C -NMR spektrumuna bakıldığında $\delta_c = 172.48, 35.72, 25.30, 25.96, 28.87$ ve 38.53 ppm'de görülen sinyaller azepan halkasının C-2, C-3, C-4, C-5, C-6 ve C-7 karbonlarına ait olduğu tespit edilmiştir.

4.3.4. 3,4-dihidroksi benzoik asit (4)

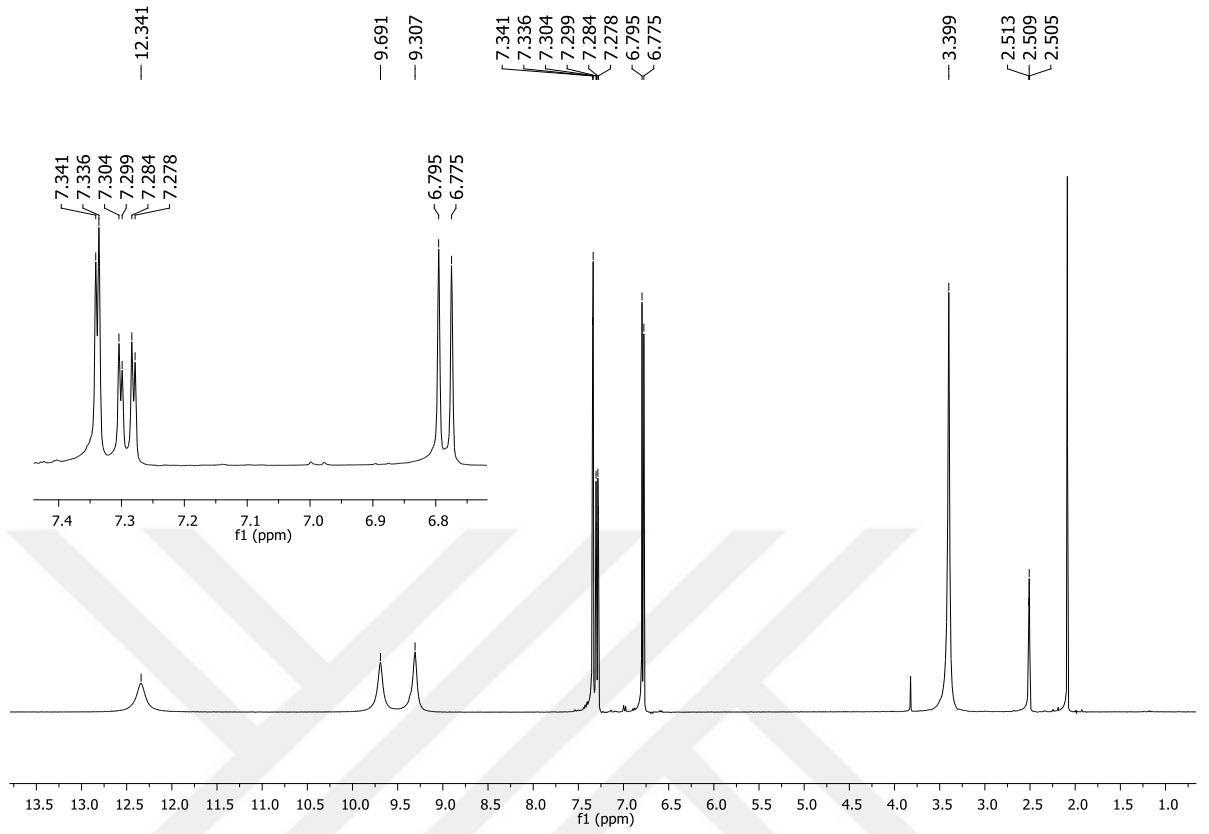


Şekil 4.10. 3,4-dihidroksi benzoik asit bileşiğinin yapısı

3,4-dihidroksi benzoik asit bileşiği kolon kromatografisinden %50 etil asetat - %50 hekzan çözücü sisteminden izole edildi (11 mg). Bileşiğin kapalı formülü $C_7H_6O_4$ olup molekül kütlesi 154,027g/mol'dür. 3,4- dihidroksi benzoik asit molekülü bilinen bir bileşik olup elde edilen veriler literatür ile uyum içindedir (Ban ve ark., 2006).

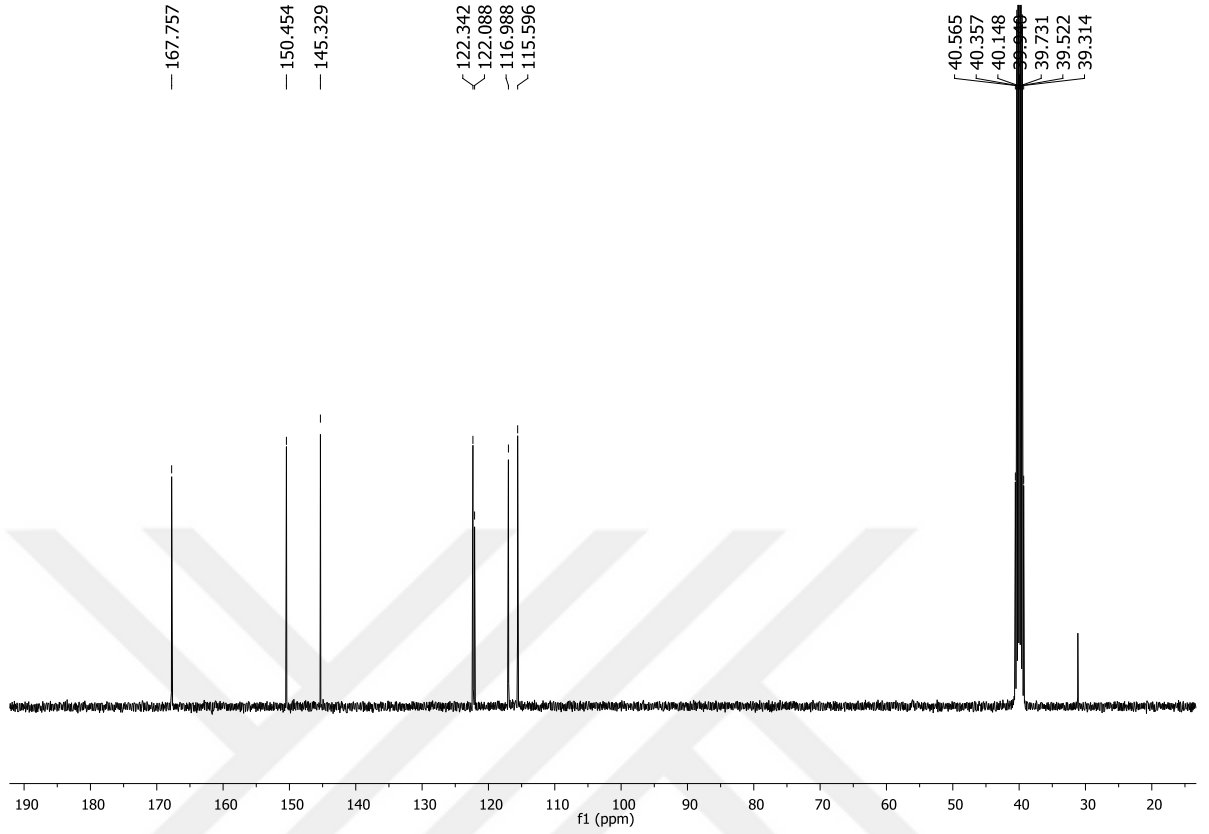
Çizelge 4.6. 4 nolu bileşiğin 1H -NMR ve ^{13}C -NMR kimyasal kayma değerleri

Pozisyon	4 Nolu Bileşik	
	δ_H	δ_C
1		122,34
2	7.34 (d, $J = 2.1$ Hz)	115.60
3		145.33
4		150.45
5	6.79 (d, $J = 8.2$ Hz)	116.99
6	7.28 (dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz)	122.09
7		167.76



Şekil 4.11. 3,4-dihidroksi benzoik asit'in (¹H-NMR 400 MHz, DMSO-d₆)

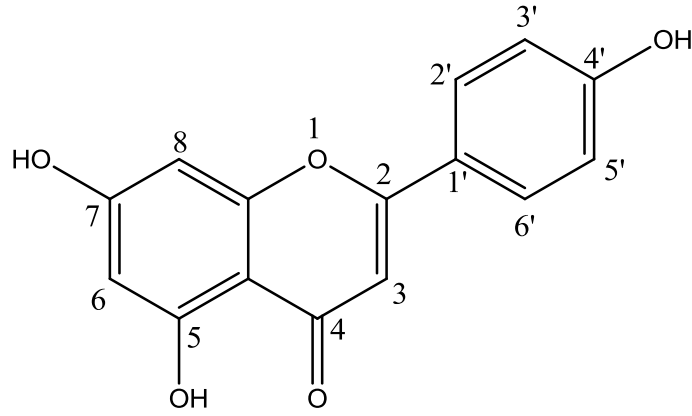
3,4-dihidroksi benzoik asit bileşiğinin ¹H-NMR spektrumundan, bileşiğin aromatik halkasına ait proton rezonansları, ABX sistem protonları (sırasıyla H-2, H-6, H-5 numaralı protonlar) gözlenmiştir. H-2 protonu $\delta_H = 7.34$ ppm' de (d, $J = 2.1$ Hz) dublet ve H-5 protonu $\delta_H = 6.79$ ppm' de (d, $J = 8.2$ Hz) dublet, H-6 protonu $\delta_H = 7.28$ ppm' de dubletin dubleti (dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz) olarak rezonans olmuştur.



Şekil 4.12. 3,4-dihidroksi benzoik asit'in (4) ^{13}C -NMR spektrumu (^{13}C -NMR 100 MHz, DMSO- d_6)

3,4-dihidroksi benzoik asit bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu incelendiğinde bir fenil halkası üzerinde OH grupları ile süstitüe olmuş iki tane C atomu bulunmuştur. Bu karbonlar $\delta_{\text{C}} = 145.33$ (C-3), 150.45 (C-4) ppm'de sinyaller vermiştir. Karboksilik asit karbonu $\delta_{\text{C}} = 167.76$ (C-7). Bulgular, literatürler ile desteklenerek maddenin 3,4-dihidroksi benzoik asit olduğu tespit edilmiştir.

4.3.5. Apigenin (5)

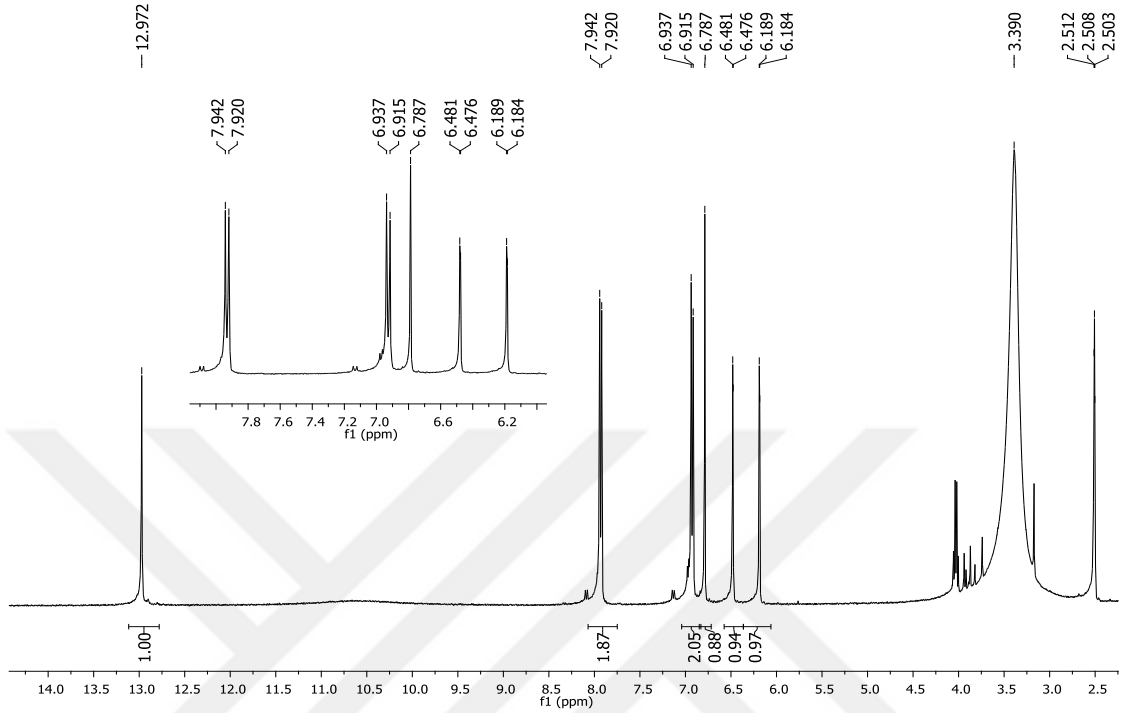


Şekil 4.13. Apigenin bileşiğinin yapısı

İTK kontrollü olarak birleştirilen 187-356'nolu fraksiyonlarına preparatif HPLC uygulandı ve 13 mg Apigenin izole edildi. Beyaz renkli Apigenin molekülü kapalı formülü $C_{15}H_{10}O_5$ olup molekül kütlesi 270,053 g/mol'dür. Bilinen bir bileşik olup elde edilen veriler literatür (Owen ve ark., 2003) ile uyum içindedir.

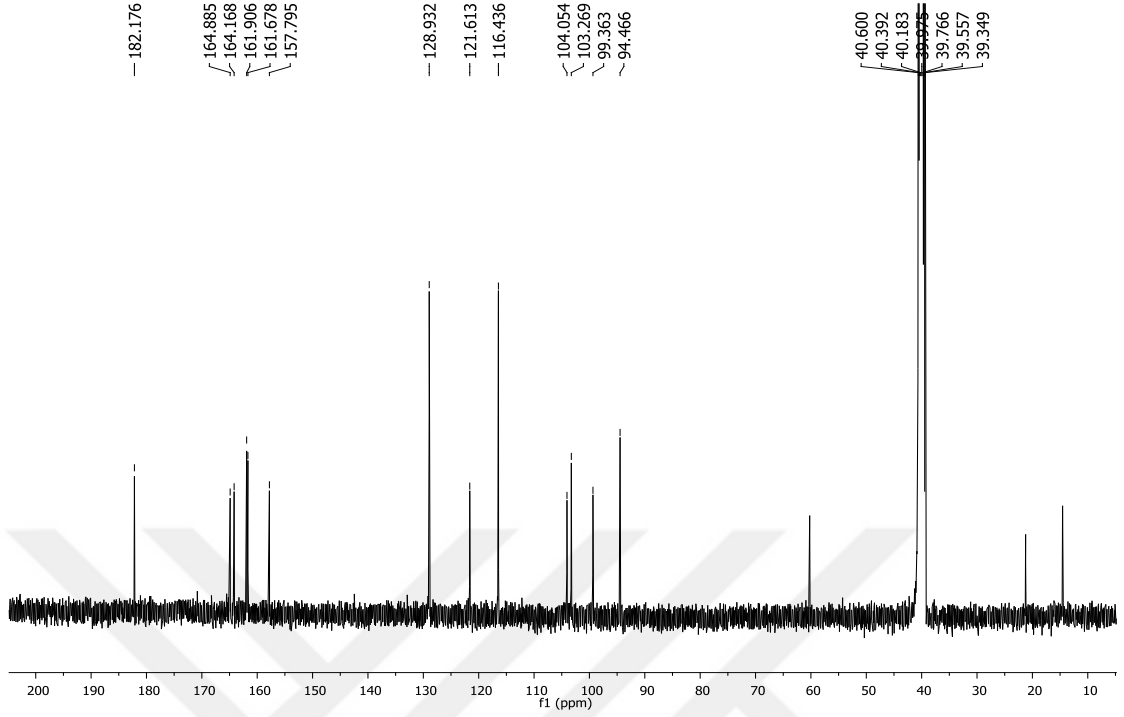
Çizelge.4.7. 5 nolu bileşiğin 1H -NMR ve ^{13}C -NMR kimyasal kayma değerleri

Pozisyon	5 Nolu Bileşik	
	δ_H	δ_C
2		164.88
3	6.78 (s)	103.27
4		182.17
5		161.90
6	6.19 (d, $J = 2.0$ Hz)	99.36
7		164.17
8	6.48 (d, $J = 2.0$ Hz)	94.47
9		157.80
10		104.05
1'		121.61
2' ve 6'	7.93 (d, $J = 8.80$ Hz)	128.93
3' ve 5'	6.93 (d, $J = 8.80$ Hz)	116.44
4'		161.68



Şekil 4.14. Apigenin'in (5) $^1\text{H-NMR}$ spektrumu ($^1\text{H-NMR}$ 400 MHz, DMSO-d_6)

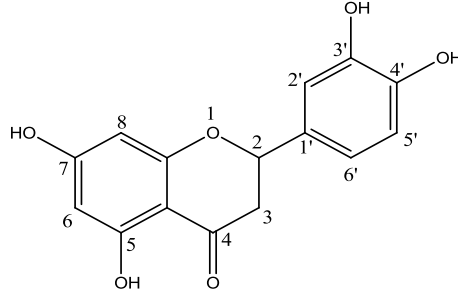
Apigenin bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumuna bakıldığında $\delta_{\text{H}} = 7.93$ (d, $J = 8.80$ Hz) ppm'de görülen sinyaller B halkasının C-2' ve C-6' protonlarına, 6.93 (d, $J = 8.80$ Hz) ppm'de görülen sinyaller B halkasının C-3' ve C-5' protonlarına, $\delta_{\text{H}} = 6.19$ ile $\delta_{\text{H}} = 6.48$ (d, $J = 2.0$ Hz) ppm'de görülen sinyaller ise A halkasının C-6 ve C-8 protonlarına ait olduğu tespit edilmiştir. $\delta_{\text{H}} = 6.78$ ppm'de singlet olarak görülen sinyal molekülümüzün flavon olduğuna işaret eder. Bulgular, literatürler ile desteklenerek maddenin apigenin olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.15. Apigenin'in (5) ^{13}C -NMR spektrumu (^{13}C -NMR 100 MHz, DMSO- d_6)

^{13}C -NMR spektrumunda 15 karbon sinyali görülmektedir. $\delta_{\text{C}}= 128.93$ ve $\delta_{\text{C}}= 116.44$ ppm'de görülen sinyallerin sırasıyla, C-2' ve C-6' ile C-3' ve C-5' konumlarına, $\delta_{\text{C}}= 103.27$ ppm' de C-3 konumu, $\delta_{\text{C}}= 99.36$ ve $\delta_{\text{C}}= 94.47$ ve ppm' de C-6 ve C-8 konumlarına ait olduğu ve C halkasında yer alan karbonil karbonunun $\delta_{\text{C}}= 182.17$ ppm'de olduğu literatür değerleri de desteklemektedir.

4.3.6. Eriodiktiol (6)

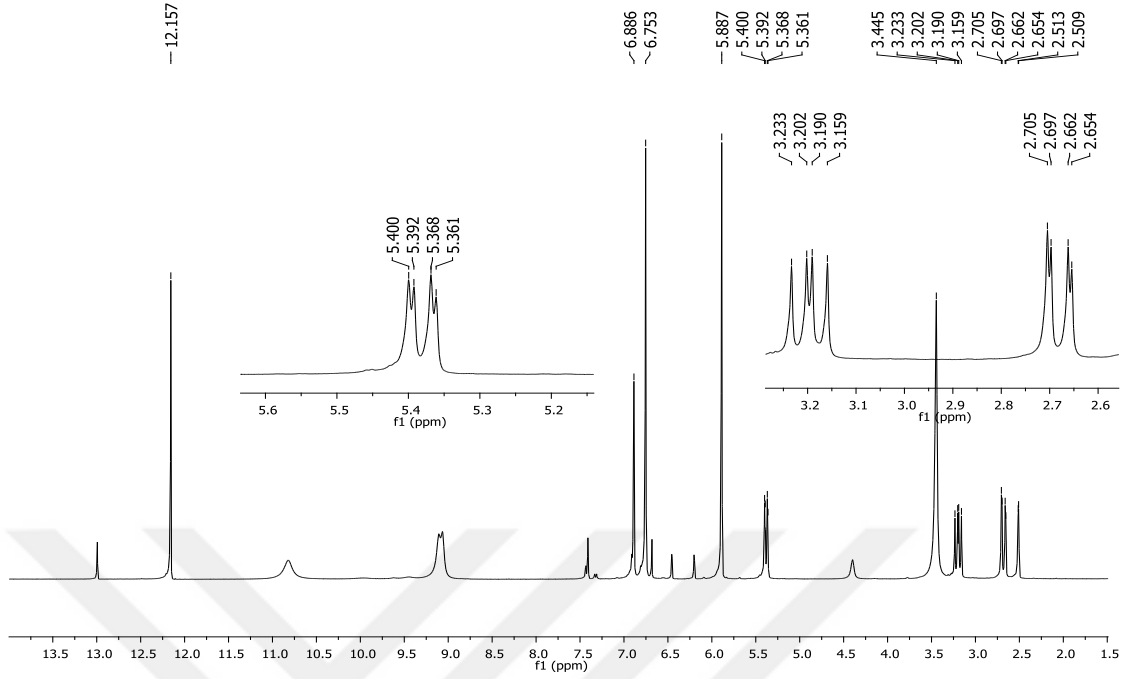


Şekil 4.16. Eriodiktiol bileşiminin yapısı

6 nolu bileşik (Eriodiktiol) İTK kontrollü olarak birleştirilen 187-356 fraksiyonlarına uygulanan preparatif HPLC sonucu 14 mg izole edildi. İzole edilen molekülün fiziksel görünümünü ise beyaz renkli toz şeklindedir. Bileşik $C_{15}H_{12}O_6$ kapalı formülüne sahiptir. Eriodiktiol molekülü bilinen bir bileşik olup elde edilen veriler literatür (Encarnacion ve ark., 1999) ile uyum içindedir.

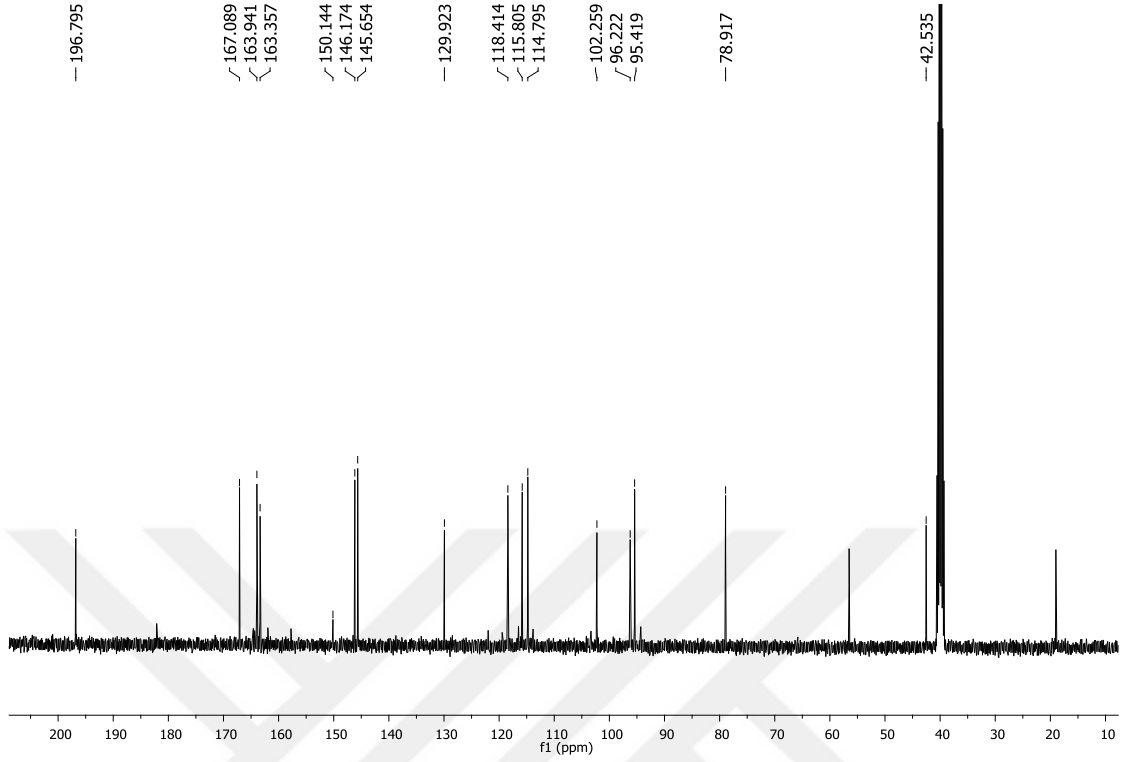
Çizelge 4.8. 6 nolu bileşimin 1H -NMR ve ^{13}C -NMR kimyasal kayma değerleri

Pozisyon	6 Nolu Bileşik	
	δ_H	δ_C
2	5.38 (dd, $J= 12.5, 2.9$ Hz)	78.92
3a	3.20 (dd, $J=17.1, 12.6$ Hz)	42.53
3b	2.68 (dd, $J= 17.1, 2.9$ Hz)	
4		196.79
5		163.94
6	5.88 (brs)	95.42
7		167.09
8	5.88 (brs)	96.22
9		163.36
10		102.26
1'		129.92
2'	6.75 (brs)	115.80
3'		146.17
4'		145.65
5'	6.88 (brs)	114.80
6'	6.75 (brs)	118.42



Şekil 4.17. Eriodiktiol'ün (6) $^1\text{H-NMR}$ spektrumu ($^1\text{H-NMR}$ 400 MHz, DMSO-d_6)

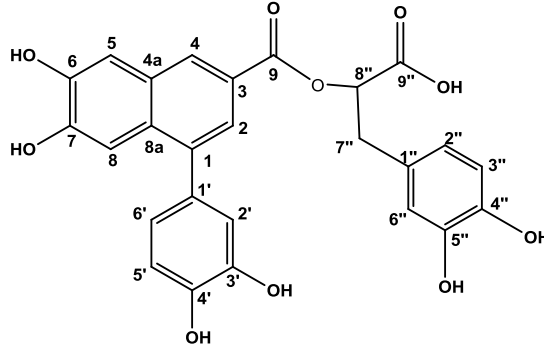
Eriodiktiol bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumundan, bileşiğin flavonon iskeleti içerdiği tespit edilmiştir. $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda flavon yapısının B (sinnamoil) halkasına ait proton rezonansları, H-2' ve H-6' protonları $\delta_{\text{H}}=6.75$ ppm' de geniş singlet şeklinde, H-5' protonu $\delta_{\text{H}}=6.88$ ppm' de rezonans olmuştur. Flavonoid iskeletindeki A (benzoil) halkasındaki H-6 ve H-8 protonları $\delta_{\text{H}}=5.88$ ppm'de geniş singlet şeklinde C halkasına ait H-3a protonu $\delta_{\text{H}}=3.20$ ppm'de ($J=17.1, 12,6$ Hz), H-3b protonu $\delta_{\text{H}}=2.68$ ppm' de ($J=17.1, 2,9$ Hz) ve H-2 protonu ise $\delta_{\text{H}}=5.38$ ppm' de ($J=12.5, 2,9$) dubletin dubleti şeklinde rezonans olmuştur.



Şekil 4.18. Eriodiktiol'ün (6) ^{13}C -NMR spektrumu (^{13}C -NMR 100 MHz, DMSO-d_6)

Eriodiktiol bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu incelendiğinde, 15 karbon atomu olduğu görülmektedir. 15 karbondan 9 tanesi kuaterner karbonu, 6 tanesi metin karbonunu göstermektedir. A halkasında yer alan iki $-\text{OH}$ grubuna bağlı karbonlar sırası ile $\delta_{\text{C}} = 163.94$ (C-5) ve $\delta_{\text{C}} = 167.09$ (C-7) ppm'de rezonans olurken; B halkasına ait hidroksil gruplarının bağlı olduğu karbonlar $\delta_{\text{C}} = 146.17$ (C-3') ve $\delta_{\text{C}} = 145.65$ (C-4') ppm'de sinyal vermiştir. C halkasında yer alan karbonil karbonu $\delta_{\text{C}} = 196.79$ ppm'de gözlenmiştir.

4.3.7. Globoidnan-A (7)



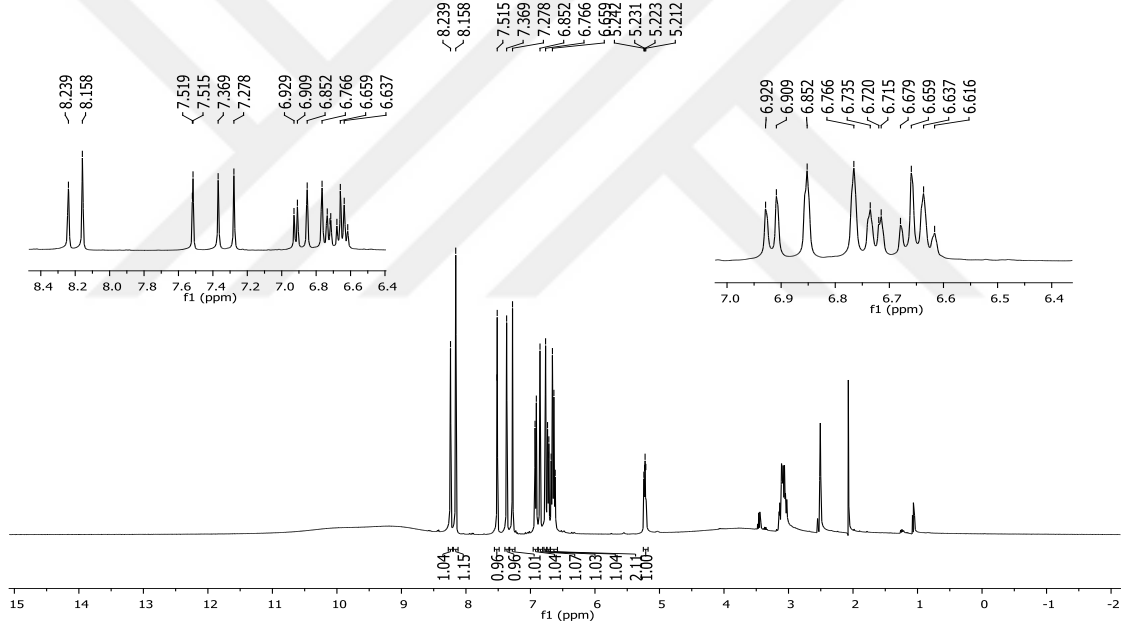
Şekil 4.19. Globoidnan-A bileşiğinin yapısı

7 Nolu Bileşik (Globoidnan-A), kolon kromatografisinden İTK kontrollü olarak birleştirilen 357-567 fraksiyonlarına uygulanan preparatif HPLC sonucu 17 mg izole edildi. İzole edilen molekülün fiziksel görünümünü ise sarı renkli toz şeklindedir. Bileşik $C_{26}H_{20}O_{10}$ kapalı formülüne sahip olup molekül ağırlığı 492.44 g/mol'dür. Globoidnan-A molekülü bilinen bir bileşik olup elde edilen veriler literatür (Ovenden ve ark., 2004) ile uyum içindedir.

Çizelge 4. 9. 7 nolu bileşiğin 1H -NMR ve ^{13}C -NMR kimyasal kayma değerleri

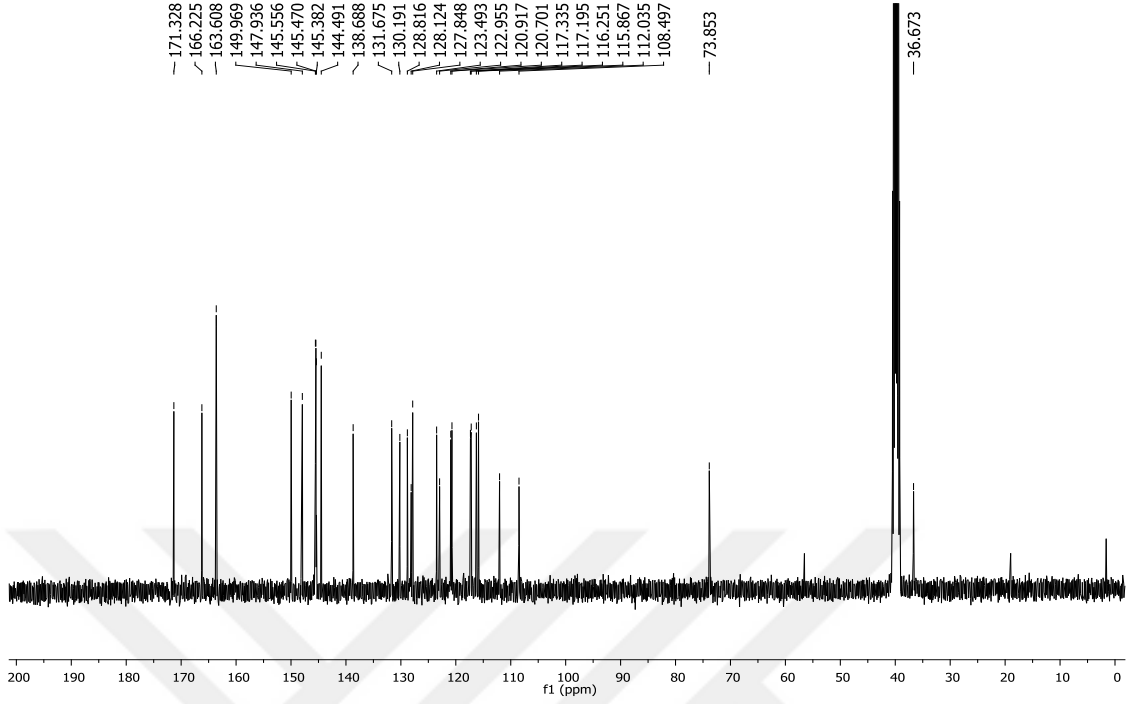
Pozisyon	7 Nolu Bileşik	
	δ_H	δ_C
1		128.79
2	7.51(s)	122.95
3		123.64
4	8.23(s)	128.11
4a		130.12
5	7.36(s)	111.99
6		147.92
7		149.92
8	7.27(s)	108.47
8a		138.63
9		166.22
1'		131.67

2'	6.85(s)	117.33
3'		145.45
4'		145.55
5'	6.92 (d, $J = 8.00$ Hz)	116.22
6'	6.73 (dd, $J=1.70, 8.00$ Hz)	120.88
1''		127.85
2''	6.64 brs	120.61
3''	6.67 brs	117.14
4''		144.43
5''		144.49
6''	6.68 brs	115.83
7''	3.03-3.10(m)	36.78
8''	5.23(dd, $j=4.44, 7.68$ Hz)	74.18
9''		171.58



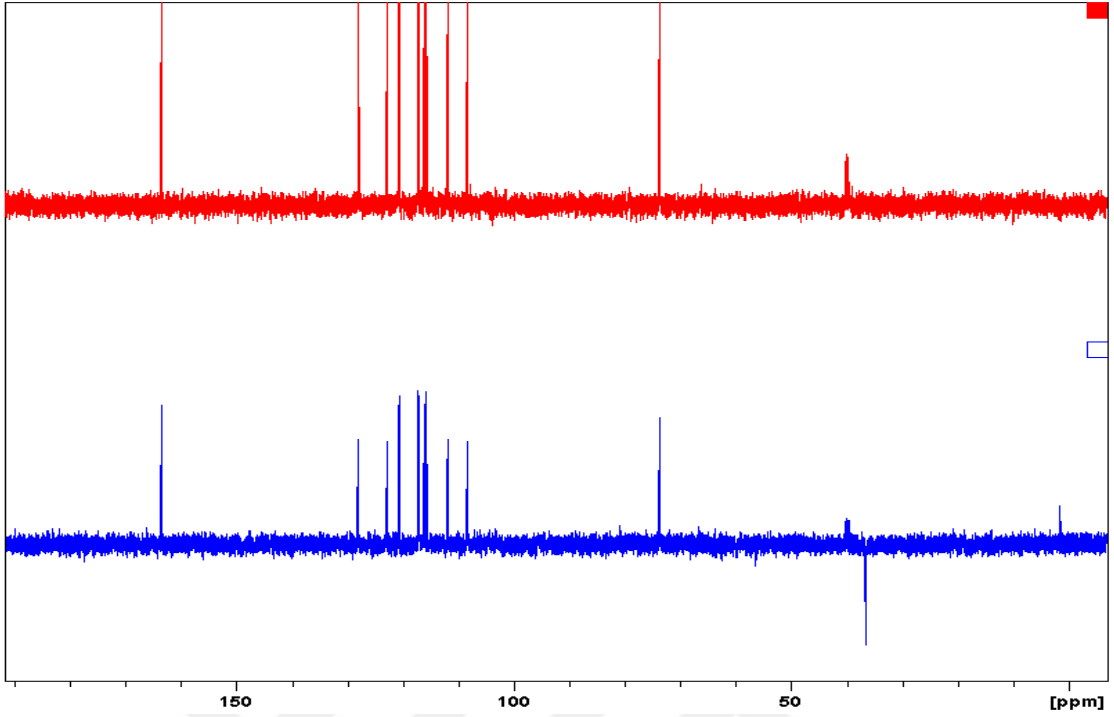
Şekil 4.20. Globoidnan-A'nın (7) $^1\text{H-NMR}$ spektrumu ($^1\text{H-NMR}$ 400 MHz, DMSO-d_6)

Globoidnan-A bileşiğinin H-NMR spektrumu incelendiğinde, naftalin halkasında H-2, H-4, H-5, H-8 nolu protonlar sırasıyla $\delta\text{H}= 7.51$ (s), $\delta\text{H}= 8.23$ (s), $\delta\text{H}= 7.36$ (s) ve $\delta\text{H}= 7.27$ (s) ppm' de ve fenil halkasında ABX sistem protonları sırasıyla H-2', 5', 6' ve H-2'', 3'', 6'', 7'', 8'', numaralı protonlar 6.85 (s), 6.92 (d, $J = 8.00$), 6.73 (dd, $J = 1.70, 8.00$) ve 6.64 (brs), 6.67 (brs), 3.03-3.10 (m), 5.23 (dd, $J = 4.44, 7.68$) ppm' de literatürlerle karşılaştırılarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.21. Globoidnan-A (7) ^{13}C -NMR spektrumu (^{13}C -NMR 100 MHz DMSO- d_6)

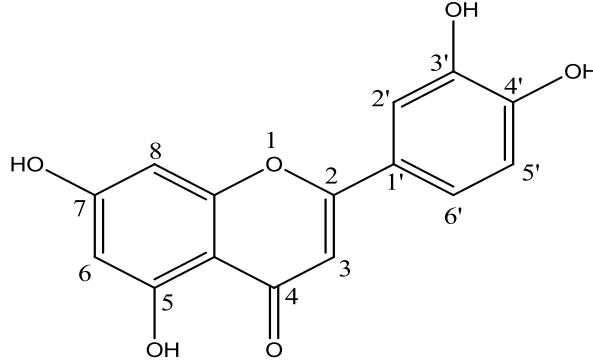
Globoidnan-A bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu incelendiğinde, ^{13}C -NMR spektrumu incelendiğinde bir nafatalin halkası ve fenil halkası üzerinde üzerinde OH grupları ile sübstitüe olmuş altı tane C atomu bulunmuştur. Bu karbonlar $\delta\text{C}= 147.92$ (C-6), 149.92 (C-7), $\delta\text{C}= 145.45$ (C-3'), 145.55 (C-4'), $\delta\text{C}= 144.43$ (C-4''), 144.49 (C-5'') ppm' de halkası üzerinde OH grupları ile sübstitüe olmuş iki tane C atomu sırasıyla $\delta\text{C}= 145.45$ (C-3'), 145.55 (C-4'), ppm' de ve sinyaller vermiştir. Naftalin halkasına komşu karbonil karbonu $\delta\text{C}= 166.63$ (C-9) ppm' de gözlenmiştir. Bulgular, literatürler ile desteklenerek maddenin Globoidnan olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.22. Globoidnan-A (7) DEPT-90, DEPT-135 NMR spektrumu (¹³C-NMR 100 MHz DMSO-d₆)

Globoidnan-A bileşiğine ait APT, DEPT-90 ve DEPT-135 spektrumları incelendiğinde yapıda 26 karbon atomu olduğu görülmektedir. 26 karbondan 14 tanesi kuarterner karbonu (DEPT-90 ve DEPT-135 spektrumlarında sinyal vermeyen kısım), 11 tanesi metin karbonu (DEPT-90 ve DEPT-135 spektrumunda pozitif sinyal) 1 metilen karbonu (DEPT-135 spektrumunda negatif sinyal içerdiği tespit edilmiştir).

4.3.8. Luteolin (8)

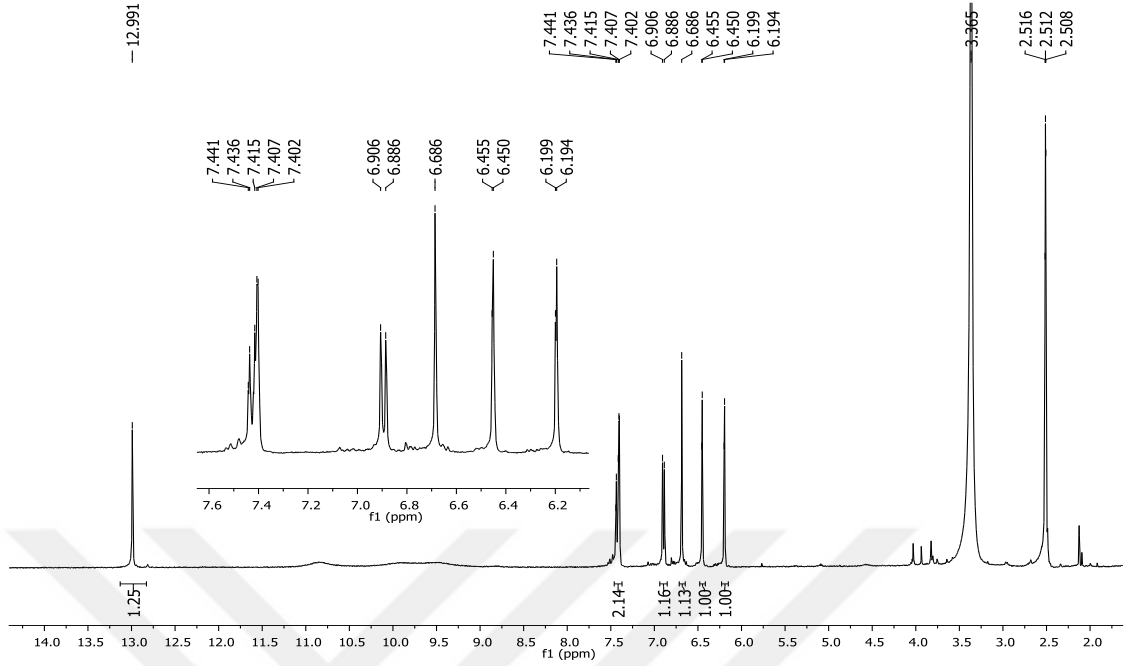


Şekil 4.23. Luteolin bileşiğinin yapısı

8 nolu bileşik (Luteolin), kolon kromatografisinden İTK kontrollü olarak birleştirilen 357-567 fraksiyonlarına uygulanan preparatif HPLC sonucu 14 mg izole edildi. Luteolin molekülünün fiziksel görünümü sarı renkli toz şeklindedir. Bileşiğin formülü $C_{15}H_{10}O_6$ olup molekül ağırlığı 286.24 g/mol'dür. Luteolin molekülü bilinen bir bileşik olup elde edilen veriler literatür ile uyum içindedir (Stochmal ve ark., 2001).

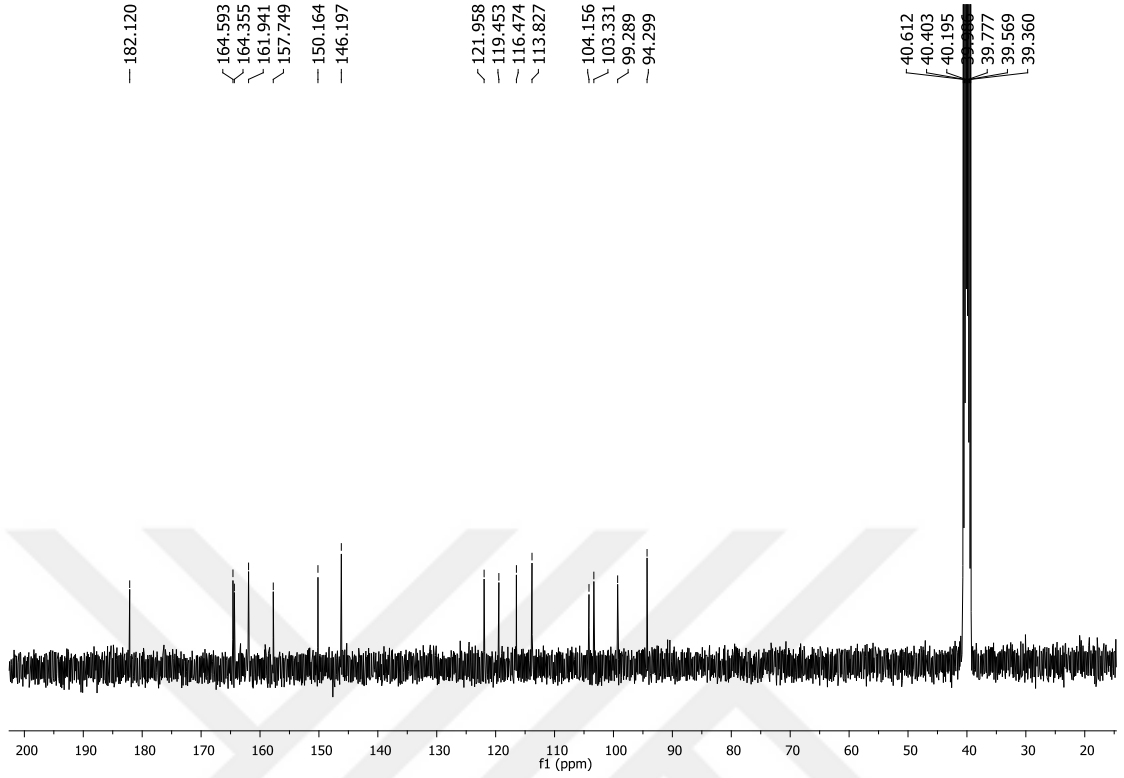
Çizelge.4.10. 8 nolu bileşiğin 1H -NMR ve ^{13}C -NMR kimyasal kayma değerleri

Pozisyon	8 Nolu Bileşik	
	δ_H	δ_C
2		164.59
3	6.67 (s)	103.33
4		182.12
5		161.94
6	6.19 (d, $J = 2.0$ Hz)	99.28
7		164.35
8	6.45 (d, $J = 2.0$ Hz)	94.29
9		157.74
10		104.15
1'		121.95
2'	7.40 (d, $J = 2.2$ Hz)	113.82
3'		146.19
4'		150.16
5'	6.90 (d, $J = 8.3$ Hz)	116.47
6'	7.43 (dd, $J = 8.3$ Hz, 2.2 Hz)	119.45



Şekil 4.24. Luteolin(8) bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu ($^1\text{H-NMR}$ 400 MHz, DMSO-d_6)

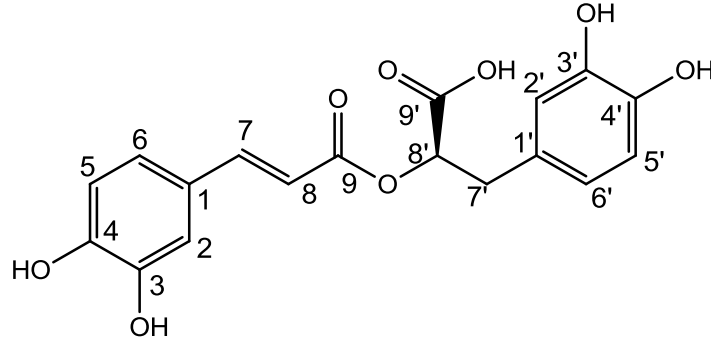
Luteolin bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu incelendiğinde, $\delta_{\text{H}} = 12.99$ ppm'de gözlenen sinyal 5-OH protonuna ait olup, diğer protonların kimyasal kayma değerleri incelendiğinde molekülün bir flavon iskeletine sahip olduğu belirlenmiştir. $\delta_{\text{H}} = 6.19$ (H-6) ve $\delta_{\text{H}} = 6.45$ (H-8) protonlarına ait sinyaller meta etkileşimine sahip 2 aromatik protonu gösterirken, $\delta_{\text{H}} = 6.67$ ppm'de (H-3) gözlenen singlet proton ve 6.90; 7.40; 7.43 ppm'de gözlenen sinyallerin sırası ile H-5'; H-2' ve H-6' protonlarına ait olduğu gözlenmiştir. $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda gözlenen bu sinyaller karakteristik 5,7,3',4'-tetrasubstitue flavon yapısına ait olup, değerler literatür ile karşılaştırılarak bileşiğin luteolin olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.25. Luteolin (8) ^{13}C -NMR spektrumu (^{13}C -NMR 100 MHz DMSO- d_6)

Luteolin bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu incelendiğinde, 15 karbon atomu olduğu görülmektedir. 15 karbondan 9 tanesi kuaterner karbonu, 6 tanesi metin karbonunu göstermektedir. A halkasında yer alan iki $-\text{OH}$ grubuna bağlı karbonlar sırası ile $\delta_{\text{C}} = 161.94$ (C-5) ve $\delta_{\text{C}} = 164.35$ (C-7) ppm'de rezonans olurken; B halkasına ait hidroksil gruplarının bağlı olduğu karbonlar $\delta_{\text{C}} = 146.19$ (C-3') ve $\delta_{\text{C}} = 150.16$ (C-4') ppm'de sinyal vermiştir. C halkasında yer alan karbonil karbonu $\delta_{\text{C}} = 182.12$ ppm'de gözlenmiştir.

4.3.9. Rozmarinik Asit (9)



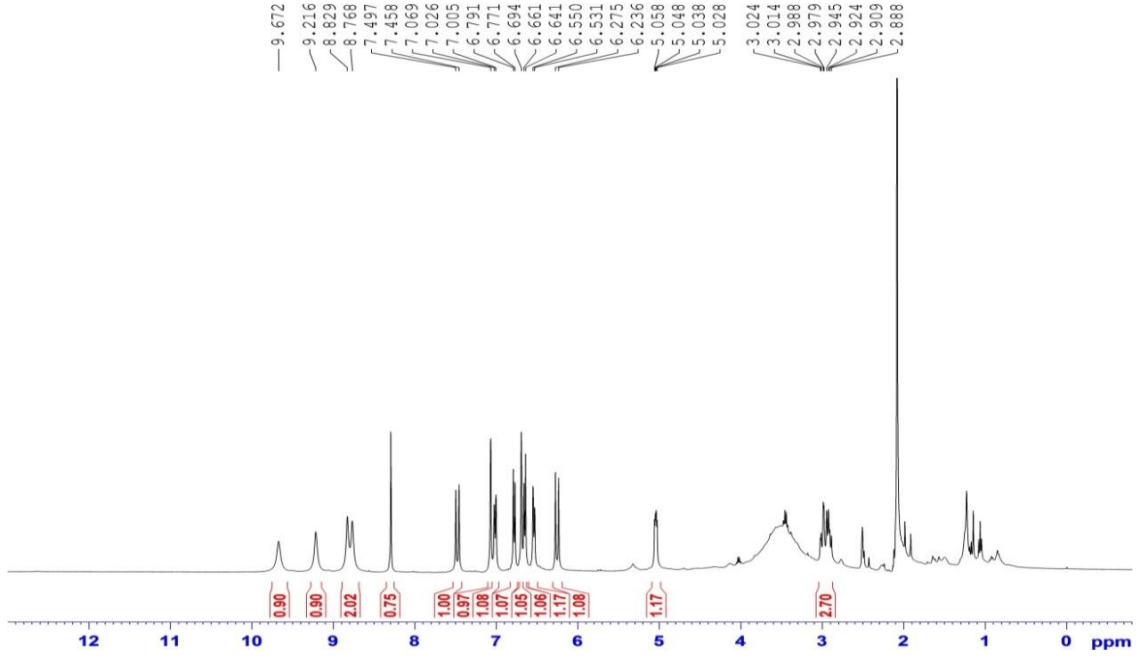
Şekil 4.26. Rozmarinik Asit bileşiğinin yapısı

9 nolu bileşik (Rozmarinik asit), kolon kromatografisinde %95 Etil asetat - % 5 Metanol çözücü sisteminden İTK kontrollü olarak birleştirilen 568-648 fraksiyonlarına uygulanan preparatif HPLC sonucu 43 mg olarak izole edildi. İzole edilen molekülün fiziksel görünümünü ise sarı renkli amorf toz şeklindedir. Rosmarinik asit molekülü bilinen bir bileşik olup elde edilen veriler literatür (Lu ve Foo, 1999) ile uyumludur. Bileşiğin formülü $C_{18}H_{16}O_8$ olup molekül ağırlığı 360.32 g/mol'dür.

Çizelge 4.11. 9 nolu bileşiğin 1H -NMR ve ^{13}C -NMR kimyasal kayma değerleri

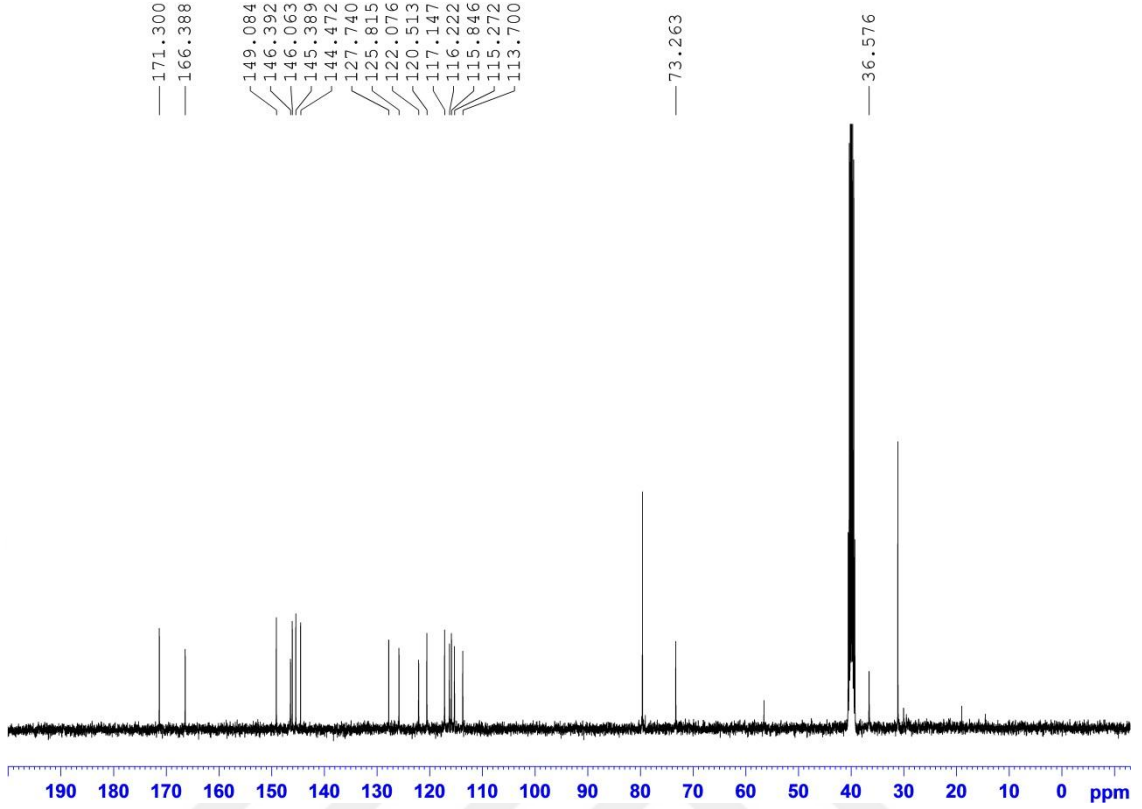
Pozisyon	9 Nolu Bileşik	
	δ_H	δ_C
1	-	125.90
2	7.06 (d, $J = 1.4$ Hz)	115.28
3	-	149.10
4	-	146.07
5	6.77 (d, $J = 8.1$ Hz)	116.23
6	7.02 (dd, $J = 8.1, 2.0$ Hz)	122.02
7	7.46 (d, $J = 15.8$ Hz)	146.39
8	6.24 (d $J = 15.8$ Hz)	113.66
9	-	166.43
1'	-	127.70
2'	6.69 (d, $J = 1.5$ Hz)	117.17
3'	-	144.50
4'	-	145.41

5'	6.54 (d $J = 7.92$ Hz)	120.53
6'	6.65 (d $J = 7.92$ Hz)	115.85
7a'	2.93 (dd)	36.61
7b'	2.94 (dd $J = 14.1, 3.7$ Hz)	
8'	5.08 (dd)	73.70
9'	-	176.5



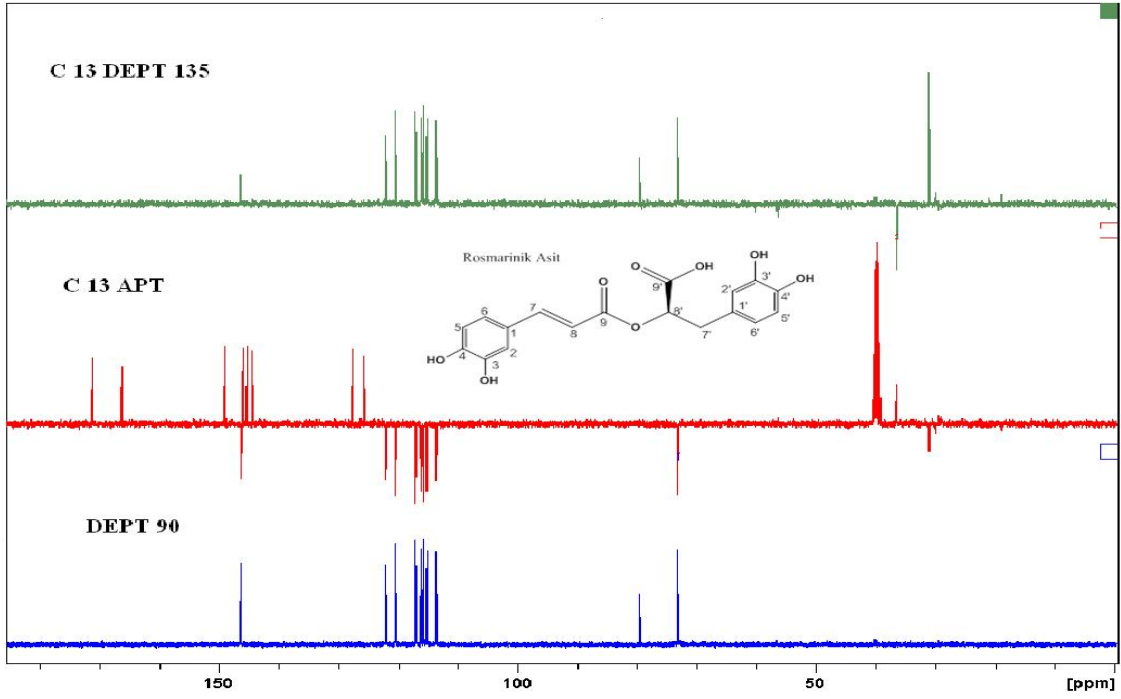
Şekil 4.27. Rozmarinik Asit'in (9) ¹H-NMR spektrumu (¹H-NMR 400 MHz, DMSO-d₆)

Rozmarinik asit bileşiğinin H-NMR spektrumu incelendiğinde, $\delta H = 7.02$ (1H, d, $J = 2.2$ Hz), $\delta H = 7.02$ (1H, dd, $J = 8.1$ Hz, $J = 2.0$ Hz), $\delta H = 6.79$ (1H, d, $J = 8.1$ Hz) ve $\delta H = 6.74$ (1H, d, $J = 2.2$ Hz), $\delta H = 6.68$ (1H, d, $J = 8.1$ Hz), $\delta H = 6.62$ (1H, dd, $J = 8.1$, $J = 2.2$ Hz) ppm'de iki grup aromatik ABX sistem protonları (sırasıyla H-2, 6, 5 ve H-2', 5', 6' numaralı protonlar) gözlenmiştir. $\delta H = 7.46$ (1H, d, $J = 15.8$) ve $\delta H = 6.24$ (1H, d, $J = 15.8$ Hz) ppm'deki kimyasal kayma değerleri molekülde birbirine göre trans konumda olan olefinik protonların varlığını göstermiştir. $\delta H = 5.08$ (dd, $J = 10$, $J = 2.8$ Hz) ppm'de gözlenen sinyalin oksijen atomuna komşu olan H-8' protonu olduğu ve $\delta H = 2.93$ ve (dd, $J = 14.1$, $J = 3.7$ Hz), $\delta H = 2.94$ (dd, $J = 14.3$, $J = 10.0$ Hz) ppm'de gözlenen sinyallerin C-7' konumundaki metilene ait protonlar olduğu literatürlerle karşılaştırılarak tespit edilmiştir.



Şekil 4. 28. Rozmarinik Asit'in(9)¹³C-NMR spektrumu (¹³C-NMR 100 MHz DMSO-d₆)

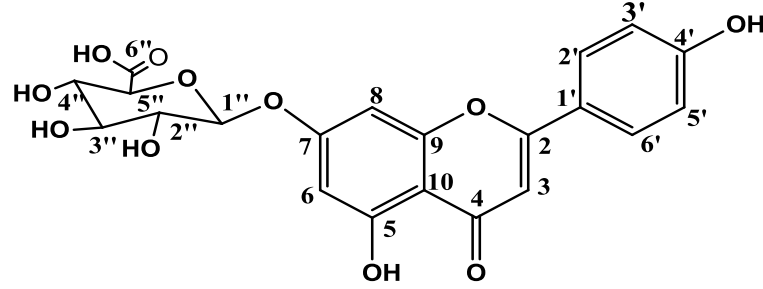
Rozmarinik asit bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu incelendiğinde, ¹³C-NMR spektrumu incelendiğinde iki fenil halkası üzerinde OH grupları ile süstitüe olmuş dört tane C atomu bulunmuştur. Bu karbonlar $\delta C = 148.2$ (C-4), 145.6 (C-3), 144.7 (C-3') ve 143.6 (C-4') ppm'de sinyaller vermiştir. İki tane karbonil karbonu $\delta C = 176.5$ (C-9'), 167.9 (C-9) ppm'de, olefinik karbonlar $\delta C = 145.5$ (C-7), 113.9 (C-8) ppm'de, bir tane de estere komşu karbon atomu $\delta C = 73.7$ (C-8') ppm'de gözlenmiştir. Bulgular, literatürler ile desteklenerek maddenin rozmarinik asit olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.29. Rozmarinik Asit'in (9) DEPT-90, DEPT-135, APT NMR (^{13}C -NMR 100 MHz DMSO- d_6) spektrumu

Rozmarinik asit bileşiğine ait APT, DEPT-90 ve DEPT-135 spektrumları incelendiğinde yapıda 18 karbon atomu olduğu görülmektedir. 18 karbondan 8 tanesi kuaterner karbonu (DEPT-90 ve DEPT-135 spektrumlarında sinyal vermeyen kısım), 9 tanesi metin karbonu (DEPT-90 ve DEPT-135 spektrumunda pozitif sinyal), 1 metilen karbonu (DEPT-135 spektrumunda negatif ve APT spektrumundaki pozitif sinyaller) içerdiği tespit edilmiştir.

4.3.10. Apigenin-7-O-glukoronid (10)

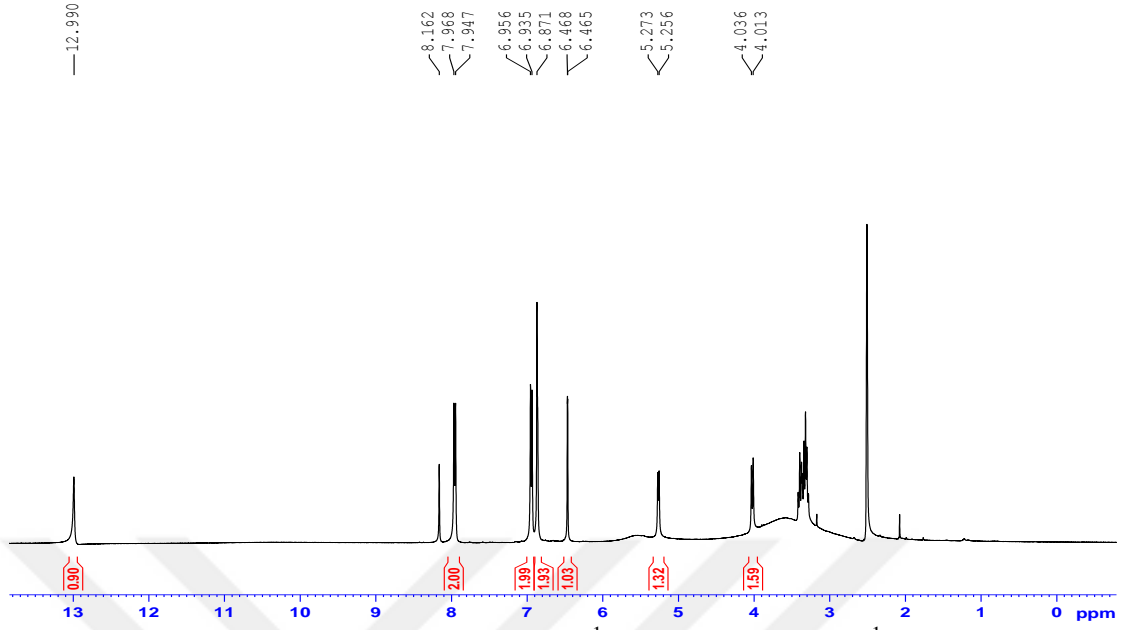


Şekil 4.30. Apigenin-7-O-glukoronid bileşiğinin yapısı

10 nolu bileşik, kolon kromatografisinde % 5 Metanol - % 95 Etil asetat çözücü sisteminden İTK kontrollü olarak birleştirilen 568-648 fraksiyonlarına uygulanan preparatif HPLC sonucu 38 mg olarak izole edildi. Beyaz renkli Apigenin-7-O-glukoronid kristalinin formülü $C_{21}H_{18}O_{11}$ olup molekül ağırlığı 446.084 g/mol'dür. Apigenin-7-O-glukoronid molekülü bilinen bir bileşik olup elde edilen veriler literatür (Iwashina, 2012) ile uyum içindedir.

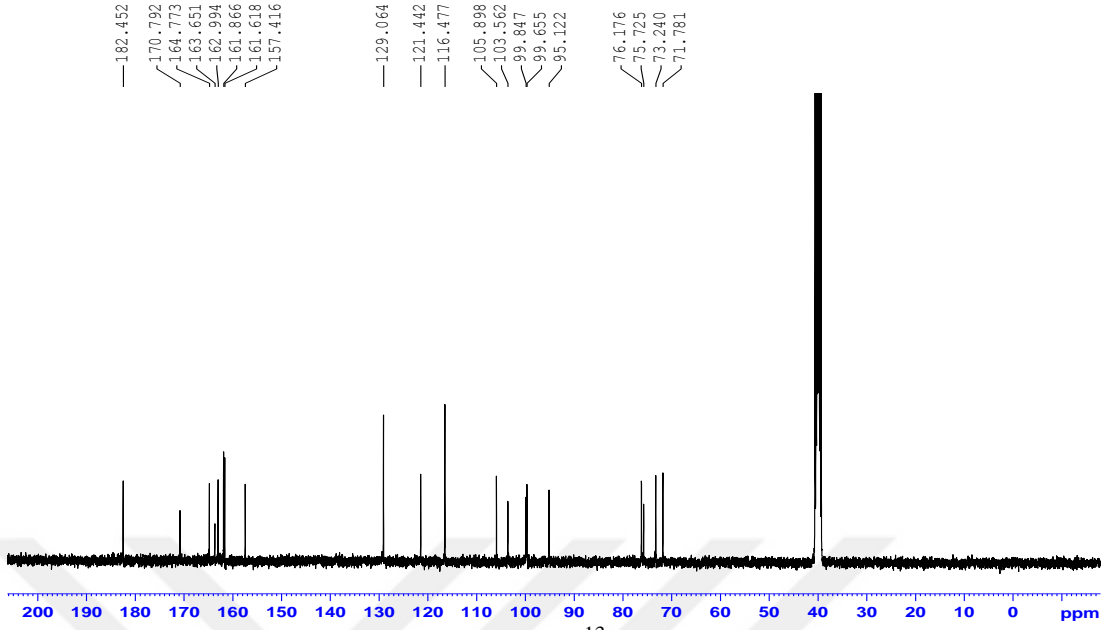
Çizelge. 4. 12. 10 nolu bileşiğin 1H -NMR ve ^{13}C -NMR kimyasal kayma değerleri

Pozisyon	10 Nolu Bileşik	
	δ_H	δ_C
2		164.77
3	6.86 (s)	103.56
4		182.45
5		161.87
6	6.46 (d, $J = 1.5$ Hz)	99.85
7		163.66
8	6.86 (d, $J = 1.5$ Hz)	95.12
9		157.41
10		105.90
1'		121.44
2' ve 6'	7.95 (d, $J = 8.5$ Hz)	129.07
3' ve 5'	6.95 (d, $J = 8.5$ Hz)	116.48
4'	-	161.62
1''	5.26 (d, $J = 6.9$ Hz)	99.65
2''	3.38 (m)	71.78
3''	3.29 (m)	73.24
4''	4.02 (d, $J = 9.2$ Hz)	75.72
5''	3.33 (m)	76.18
6''		170.80



Şekil 4.31. Apigenin-7-O-glukoronoid'in (10) $^1\text{H-NMR}$ spektrumu ($^1\text{H-NMR}$ 400 MHz, DMSO-d_6)

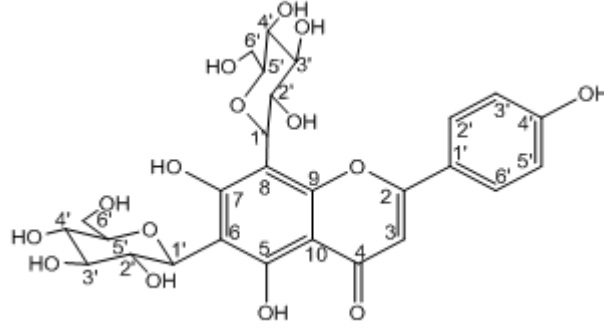
Apigenin-7-O-glukoronoid bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumuna bakıldığında $\delta_{\text{H}} = 7.95$ (d, $J = 8.5$ Hz) ppm'de görülen sinyaller B halkasının C-2' ve C-6' protonlarına, 6.95 (d, $J = 8.5$ Hz) ppm'de görülen sinyaller B halkasının C-3' ve C-5' protonlarına, $\delta_{\text{H}} = 6.46$ ile $\delta_{\text{H}} = 6.86$ (d, $J = 1.5$ Hz) ppm'de görülen sinyaller ise A halkasının C-6 ve C-8 protonlarına ait olduğu tespit edilmiştir. $\delta_{\text{H}} = 6.86$ ppm'de singlet olarak görülen bu sinyal molekülümüzün flavon olduğuna işaret eder. $\delta_{\text{H}} = 5.26$ görülen sinyal glüköz moleküllerinin anomerik protona aittir. Anomerik proton dublete yarıldığı ve etkileşme sabitlerinin $J = 6.9$ Hz olduğu görülmüştür, buradan da glüközlerin β konfigürasyonda olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 4. 32. Apigenin-7-O-glukoronoid'in (10) ^{13}C -NMR spektrumu
(^{13}C -NMR 100 MHz DMSO- d_6)

Apigenin-7-O-glukoronoid bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu incelendiğinde 21 karbon sinyali görülmektedir. $\delta_{\text{C}}= 129.07$ ve $\delta_{\text{C}}= 116.48$ ppm'de görülen sinyallerin sırasıyla, C-2' ve C-6' ile C-3' ve C-5' konumlarına ait olduğunu literatürler değerleri de desteklemektedir. $\delta_{\text{C}}= 70-77$ ppm'ler arasında görülen sinyaller glikoz molekülüne aittir. $\delta_{\text{C}}= 99.65$ ppm'de görülen sinyalin anomerik karbon atomuna ait olduğu ve 170.80 ppm' de ise glükronidin karbonil sinyali literatür bilgileri ile karşılaştırılarak karar verilmiştir.

4.3.11. Vicenin-II (11)



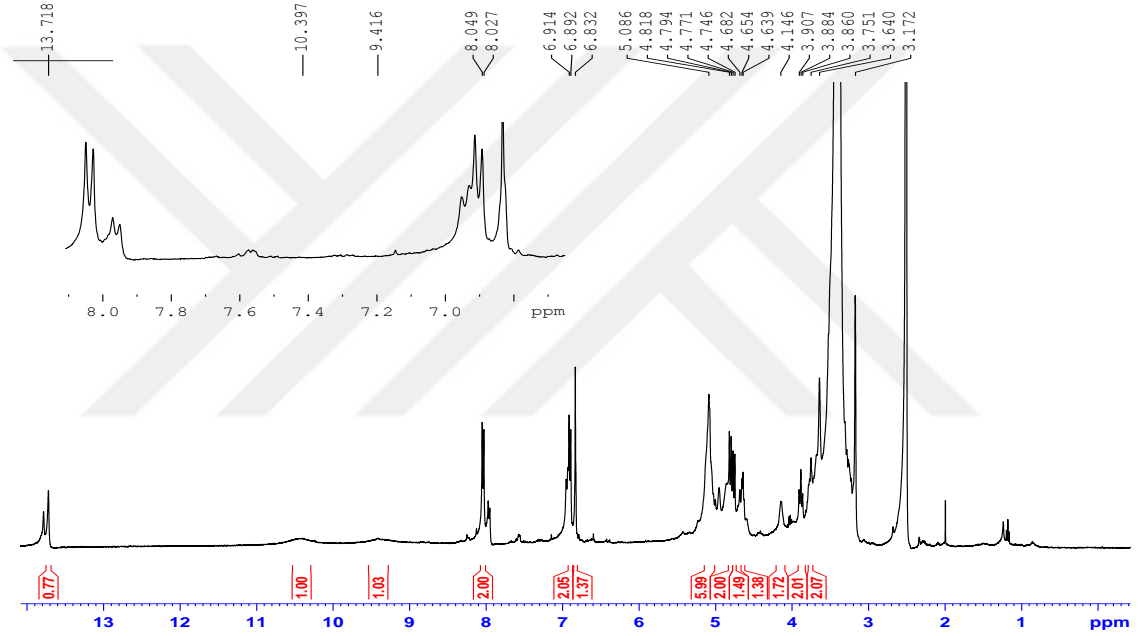
Şekil 4.33. Vicenin-II bileşiğinin yapısı

11 nolu bileşik (Vicenin-II), kolon kromatografisinde % 20 Metanol - %80 Etil asetat çözücü sisteminden 649-810 fraksiyon aralıkları İTK kontrollü olarak birleştirilmesi sonucu 47 mg olarak izole edildi. Sarı renkli amorf toz yapıda bulunan bileşiğin formülü $C_{27}H_{30}O_{15}$ olup molekül ağırlığı 594.52 g/mol'dür. Vicenin-II molekülü bilinen bir bileşik olup elde edilen veriler literatür (Lu ve Foo, 2000) ile uyum içindedir.

Çizelge 4.13. 11 nolu bileşiğin 1H -NMR ve ^{13}C -NMR kimyasal kayma değerleri

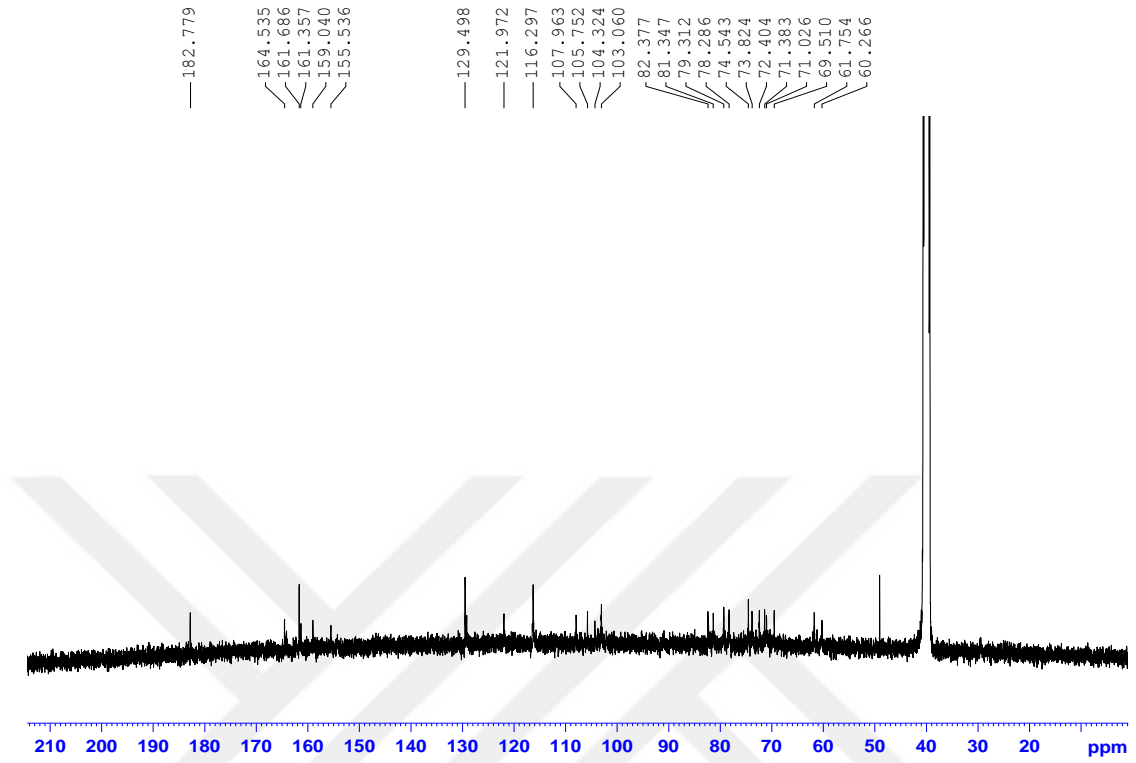
Pozisyon	11 Nolu Bileşik	
	δ_H	δ_C
2		164.53
3	6.83(s)	103.05
4		182.77
5		159.03
6		107.96
7		161.35
8		105.75
9		155.53
10		104.32
1'		121.97
2' ve 6'	8.04 (d, $J=8.52$)	129.49
3' ve 5'	6.90 (d, $J=8.52$)	116.29
4'	-	161.68
1''	4.75 (d, $J=9.78$)	73.82
2''	3.39 (m)	69.51
3''	3.28 (m)	78.28

4''	3.88 (m)	71.38
5''	3.33 (m)	81.34
6''a	3.58 (m)	61.26
6''b	3.70 (m)	
1'''	4.80 (d, $J=9.78$)	74.54
2'''	3.41 (m)	71.38
3'''	3.29 (m)	79.31
4'''	3.52 (m)	72.40
5'''	3.23 (m)	82.37
6a'''	3.58 (m)	61.75
6b'''	3.78 (m)	



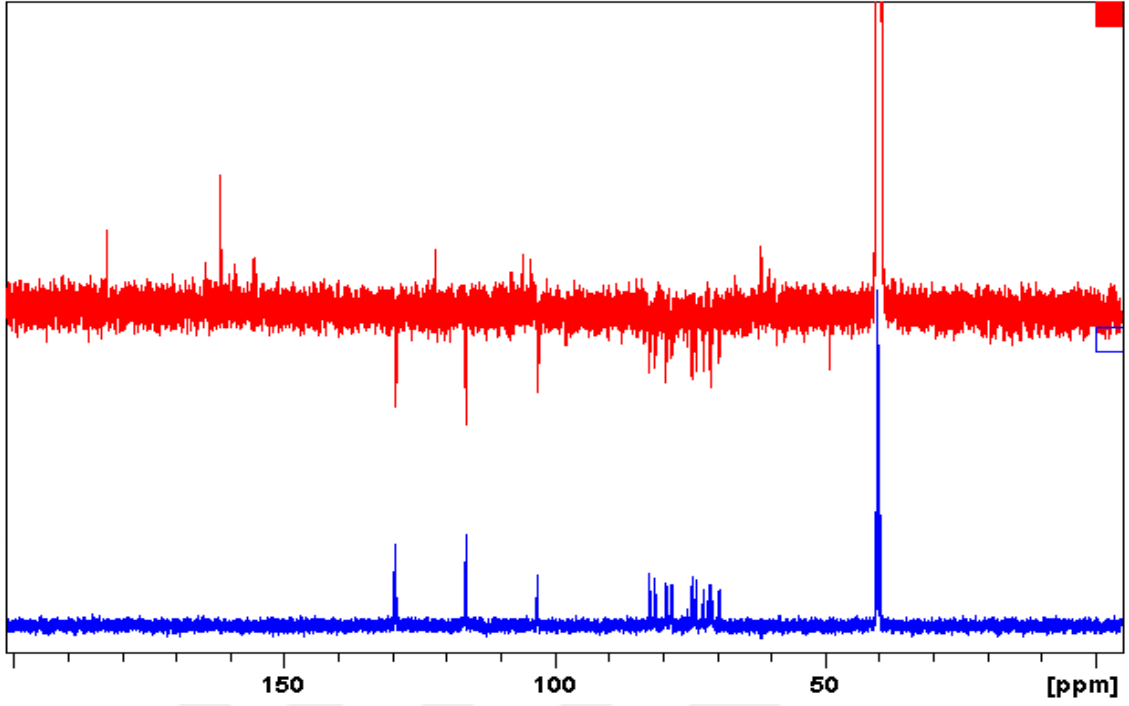
Şekil 4.34. Vicenin-II'nin (11) $^1\text{H-NMR}$ spektrumu ($^1\text{H-NMR}$ 400 MHz, DMSO-d_6)

Vicenin-II bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumuna bakıldığında $\delta = 8.04$ (d, $J = 8.52$ Hz) ppm'de görülen sinyaller B halkasının H-2' ve H-6' protonlarına, 6.90 (d, $J = 8.52$ Hz) ppm'de görülen sinyaller B halkasının H-3' ve H-5' protonlarına, $\delta = 6.83$ (s) ppm'de görülen sinyal ise A halkasının H-3 protonuna ait olduğu tespit edilmiştir. $\delta = 6.78$ ppm'de singlet olarak görülen bu sinyal molekülümüzün flavon olduğuna işaret eder. $\delta = 4.75$ ve 4.80 ppm'de görülen sinyaller glikoz moleküllerinin H-1'' ve H-1''' protonlarına aittir ve protonların dublete yarıldığı, etkileşme sabitlerinin $J = 9.78$ Hz olduğu görülmüştür, buradan da glikozların β konfigürasyonda olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 4. 35. Vicenin-II'nin (11) ¹³C-NMR spektrumu (¹³C-NMR 100 MHz DMSO-d₆)

Vicenin-II bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumunda 27 karbon sinyali görülmektedir. $\delta = 129.49$ ve $\delta = 116.29$ ppm'de görülen sinyallerin sırasıyla, C-2' ve C-6' ile C-3' ve C-5' konumlarına ait olduğunu literatürler değerleri de desteklemektedir. $\delta = 60-83$ ppm'ler arasında görülen sinyaller 2 adet glikoz molekülüne aittir. $\delta = 73.82$ ve 74.54 ppm'de görülen sinyallerin C-1'' ve C-1''' karbon atomlarına ait olduğu literatür bilgileri ile karşılaştırılarak karar verilmiştir.



Şekil 4. 361. Vicenin-II'nin (11) APT, DEPT-90 NMR spektrumu (¹³C-NMR100 MHz DMSO-d₆)

Vicenin-II bileşiğine ait APT ve DEPT-90 spektrumları incelendiğinde yapıda 27 karbon atomu olduğu görülmektedir. 27 karbondan 10 tanesi kuartener karbonu (DEPT-90 spektrumlarında sinyal vermeyen kısım), 15 tanesi metin karbonu (DEPT-90 spektrumunda pozitif sinyaller), 2 metilen karbonu (DEPT-135 spektrumunda negatif ve APT spektrumundaki pozitif sinyaller), içerdiği tespit edilmiştir.

4.4. *O. minutiflorum* bitkisinden İzole Edilen Bileşiklere Uygulanan Antioksidan Aktivitesi Sonuçları

Çizelge.4.14. *Origanum minutiflorum* bitkisinden İzole Edilen Bileşiklere Uygulanan DPPH[•], ABTS⁺, İndirgeme Gücü, Metal Şelatlama ve CUPRAC Aktivite testleri sonuçları

	Bileşikler	DPPH [•] Radikal Giderme [IC ₅₀ (µg/mL)]	İndirgeme Gücü (µmol TE/g numune)	ABTS ⁺ Radikal Giderme [IC ₅₀ (µg/mL)]	Metal Şelatlama [IC ₅₀ (µg/mL)]	CUPRAC (µmol TE/g numune)
1	tricosan-1-ol	---	---	177.53 ± 4.57	66.03 ± 3.32	3.03 ± 0.01
2	(8E,16E)- tetracosan-8,16- diene-1,24-diol	---	0.25 ± 0.01	102.81 ± 3.98	59.03 ± 3.09	3.28 ± 0.63
3	Azepan-2-one	133.14 ± 8.33	---	76.52 ± 0.88	---	3.02 ± 0.03
4	3,4-dihidroksi benzoik asit	8.37 ± 0.14	14.77 ± 0.71	7.26 ± 0.59	--	8.82 ± 0.02
5	Apigenin	236.05 ± 10.72	0.21 ± 0.01	9.61 ± 0.57	65.27 ± 2.58	4.80 ± 0.31
6	Eriodiktiol	35.26 ± 3.18	4.80 ± 0.03	7.09 ± 0.33	---	12.85 ± 0.05
7	Globoidnan-A	28.11 ± 2.32	4.05 ± 0.03	11.56 ± 0.54	564.74 ± 10.10	9.53 ± 0.05
8	Luteolin	16.26 ± 1.22	2.66 ± 0.05	5.61 ± 0.28	254.39 ± 8.04	15.41 ± 0.68
9	Rozmarinik Asit	45.65 ± 3.98	4.42 ± 0.07	14.31 ± 0.14	---	10.43 ± 0.31
10	Apigenin-7-O- glukoronoid	51.44 ± 3.81	1.85 ± 0.02	12.57 ± 0.36	---	7.31 ± 0.41
11	Vicenin-II	414.17 ± 18.11	---	40.25 ± 1.85	49.23 ± 2.47	4.52 ± 0.03
12	BHA	8.20 ± 1.02	7.26 ± 0.26	7.56 ± 0.17	Test Edilmedi	8.14 ± 0.19
13	BHT	5.42 ± 0.29	4.33 ± 0.23	5.03 ± 0.12	Test Edilmedi	4.82 ± 0.38
14	Trolox	17.26 ± 0.58	3.96 ± 0.26	13.80 ± 0.19	Test Edilmedi	4.13 ± 0.43
15	EDTA	Test Edilmedi	Test Edilmedi	Test Edilmedi	3.29 ± 0.22	Test Edilmedi

Tricosan-1-ol (1): *Prosopis cineraria* L.(druce) yapraklarında yapılan fitokimyasal çalışmada tricosan-1-ol molekülü izole edilmiştir (Malik, 2007). Antioksidan aktivitesi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

(8E,16E)-tetracos-8,16-diene-1,24-diol (2): Bu bileşikle ilgili literatürde herhangi bir izolasyon veya antioksidan çalışmasına rastlanmamıştır.

Azepan-2-one (3): Literatürde izolasyon olarak hiçbir çalışmaya rastlanmamış ama çok sayıda sentez çalışması yapılmış bir bileşiktir. Antioksidan aktivitesi incelenmemiş ama azepan-2-one'nin bağlı olduğu sentez ürünü olan capuramycin molekülünün antimikrobiyal aktivitesi yüksek çıkmıştır (Hotoda, 2003).

3,4-dihidroksi benzoik asit (4): Diğer adı ile protokateşik asit olarak bilinen 3,4-d, h, droksi benzoik asit *Origanum* ve *Mentha* türlerinde bilinen bir bileşiktir. Renksiz bileşikler olan benzoik asit türevleri, bitkisel gıdaların yapısında genellikle iz miktarlarda (10 ppm kadar) bulunur veya hiç bulunmayabilirler (Saldamlı, 2005). *Centaurea ensiformis* bitkisinden bu bileşik saflaştırılmış ve antioksidan aktiviteleri incelenmiştir (Baykan Erel, 2014).

Apigenin (5): *Perilla frutescens* bitkisinden apigenin bileşiğinin izolasyonu karakterizasyonu ve bazı aktiviteleri değerlendirilmiştir (Huo, 2015). Lamiaceae familyasından *Scutellaria barbata* türünde olan bitkiden apigenin ve luteolin molekülleri izole edilip antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir (Sato, 2000).

Eriodiktiol (6): *Cordia globosa* ve *Solanum hidnsianum* adlı bitkide naringenin-4¹,7-dimethyl ether ve eriodiktiol adlı flavanonlar izole edilmiştir (Silva, 2010; Encarnacion, 1999).

Globoidnan-A (7): Globoidnan-A bileşiği ile ilgili fazla çalışma bulunmamaktadır. Çok fazla yaygın olmayan bir bileşiktir. *Eucalyptus globoidea* bitkisinin özütlerine yapılan biyolojik aktivite sonuçları incelenerek metanol özütünden globoidnan-A bileşiği izole edilip biyolojik aktivite değerleri incelenmiştir (Ovenden, 2004).

Luteolin (8): Hertog ve arkadaşları (1993), yaptıkları çalışmada sebze, meyve ve çaydaki quercetin, kaempferol, myricetin, apifenin ve luteolin gibi flavonoidlerin kişilerde miyokardiyal infarktüs ve koroner kalp hastalıklarından ölüm riskini azalttığını belirlemişlerdir. Birçok bitkide yaygın olarak bulunan luteolin bileşiğinin antioksidan (Ko, 1998), anti-inflammatuar (Chen, 2007), antimikrobiyal (McNally, 2003), antibakteriyel (Basile, 1999), antiviral (Tshikalange, 2005), antifungal (Zhu, 2004) ve antikanser (Lopez-Lazaro, 2009) gibi aktiviteleri incelenip rapor edilmiştir.

Rozmarinik Asit (9): Kanser oluşumunu engelleyici, oksidatif stress azaltıcı, antioksidan ve anti-inflammatuar aktivite gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip ve vücudun savunma mekanizmasında önemli rol oynayan rosmarinik asit bileşiğinin biyolojik ve farmakolojik önemi daha önce yapılan bir çalışma ile rapor edilmiştir (Al-Dhabi, 2014). Aksit ve arkadaşları (2014) yapmış oldukları çalışmada *Mentha dumetorum* bitkisinden polar bileşiklerin ve rosmarinik asitin izole edildiği rapor edilmiştir.

Apigenin-7-O-glukoronoid (10): *Triumfetta procumbens* bitkisinin yapraklarında yapılan çalışmada flavon, Apigenin-7-O-glukoronoid ve benzeri flavanol glikozitler izole edilmiş ve rapor edilmiştir (Iwashina, 2012).

Vicenin-II (11): Karaoğlan'ın (2011) yaptığı doktora tez çalışmasında *Origanum minutiflorum* bitkisinin toprak üstü kısmının metanol ekstresinde yapılan çalışmada Vicenin-II bileşiği izole edilmiş ve metanol ekstresinin beyin korteks hücre kültüründe nöroprotektif etkisi incelenmiştir.

5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Bu çalışmada *Origanum minutiflorum* O. Schwarz & P.H. Davis bitkisinden elde edilen üç farklı ekstrenin, toplam fenolik bileşik miktarı ve antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Fenolik madde içeriği bakımından zengin ve DPPH• FRAP ABTS⁺ ve CUPRAC gibi antioksidan aktivite testleri sonucuna göre yüksek aktiviteye sahip olan ekstrenin n-bütanol olduğu belirlenmiştir. n-bütanol ekstresine uygulanan kromatografik teknikler sonunda 11 adet (**1-11**) bileşik saflaştırılmış, yapıları aydınlatılmış ve antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Bileşiklerin indirgeme gücü aktiviteleri (FRAP) ile Cu⁺⁺ indirgeme aktiviteleri (CUPRAC) µmol trolox eşdeğer/g numune olarak hesaplanmıştır. Serbest radikal giderme aktivitesi (DPPH•), kation radikal giderme aktivitesi (ABTS⁺) ve metal şelat oluşturma aktiviteleri IC₅₀ olarak hesaplanmıştır.

Saflaştırılan bileşikler içerisinde en yüksek indirgeme gücü aktivitesine (FRAP) sahip olan 3,4-dihidroksi benzoik asit (**4**) iken diğer bileşiklerin indirgeme aktiviteleri düşük olarak bulunmuştur.

Cu⁺⁺ iyonunu indirgeme gücü aktivitesi (CUPRAC)'nde en yüksek aktiviteyi gösteren bileşikler Luteolin (**8**), Eridiktiol (**6**), Rosmarinik asit (**9**) ve 3,4-dihidroksi benzoik asit (**4**) bileşikleri olduğu tespit edilmiştir.

Serbest radikal giderme aktivitesi (DPPH•) en yüksek olan bileşik 3,4-dihidroksi benzoik asit (**4**) bileşiğidir.

Kation radikali giderme aktivitesi (ABTS⁺) en yüksek olan bileşiklerin Luteolin (**8**), Eridiktiol (**6**) ve 3,4-dihidroksi benzoik asit (**4**) bileşikleri olduğu tespit edilmiştir.

Metal şelat oluşturma aktivitesi en yüksek olan bileşik vicenin-II (**11**) bileşiği olarak tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde Luteolin (**8**), Eridiktiol (**6**), Rosmarinik asit (**9**), vicenin-II (**11**) ve 3,4-dihidroksi benzoik asit (**4**) bileşikleri radikal oluşumunun engellenmesinde antioksidan ajan olarak kullanılabilir. Radikal giderme ajanı olarak Luteolin (**8**), Eridiktiol (**6**), Rosmarinik asit (**9**) ve 3,4-dihidroksi benzoik asit (**4**) bileşikleri kullanılabilir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre *Origanum minutiflorum* bitkisinden 11 adet bileşik saflaştırılmış ve yapıları aydınlatılmıştır. Bu bileşiklerin antioksidan

aktiviteleri incelendiğinde saflaştırılan bileşiklerden beş tanesi (4), (6), (8), (9), (11) nolu bileşiklerin antioksidan kapasitesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Gıda, kozmetik ve aroma endüstrisinde eğer bu kekik türü kullanılacaksa katkı maddesi olarak ilave antioksidan bileşik kullanmaya gerek olmayacağı öngörülmektedir. Ayrıca Azepan-2-one (3) ve Globoidnan-A (7) bileşikleri *Origanum* türlerinde daha önce rastlanmamıştır. Bu bileşikler *Origanum minutiflorum*'dan ilk kez saflaştırılmış ve antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir.



6. KAYNAKLAR

- Akgül, A., 1993. "Baharat Bilimi ve Teknolojisi". Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, 15.
- Aksit, H., M. Celik, S., Sen, O., Erenler, R., Demirtas, İ., Telci, İ., Elmastas, M., 2014. Complete Isolation and Characterization of Polar Portion of *Mentha dumetorum* Water Extract. *Records Of Natural Products* 8(3), 277-280.
- Al-Dhabi, N., Arasu, M.V., Park, C.H., Park, S.U., 2014. Recent studies on rosmarinic acid and its biological and pharmacological activities. *EXCLI Journal*, 13, 1192-1195.
- Baddal, M. K., Özmen, İ., 2010. "Origanum minutiflorum Antioksidan Özelliklerinin İncelenmesi". Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı (Yüksek Lisans Tezi) Isparta.
- Ban, J. Y., Jeon, S.-Y., Bae, K., Song, K.-S., Seong, Y. H., 2006. "Catechin and epicatechin from *Smilacis chinae* rhizome protect cultured rat cortical neurons against amyloid β protein (25–35)-induced neurotoxicity through inhibition of cytosolic calcium elevation". *Life Sciences*, 79(24), 2251-2259.
- Basile, A., Giordano, S., Lopez-Saez, J.A., Cobianchi, R.C., 1999. Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry*, 52 1479-1482.
- Baydar, H., Sagdic, O., Ozkan, G., Karadogan, T., 2004. "Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey.". *Food Control* 15 169–172.
- Baykan Erel, Ş., Ballar, P., Karaalp, C., 2014. "Antioxidant Activities of Phenolic Compounds Of *Centaurea ensiformis* P.H. Davis". *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(1), 19-24.
- Baytop, T. 1999. *Therapy with Medicinal Plants in Turkey (Past and Present)*. Istanbul,193, Nobel Tip Publications, .
- Blois, M. S., 1958. "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical.". *Nature* 26 1199-1200.
- Borgen, G., Rise, F., 1993. "Low-Temperature Nmr of Epsilon-Caprolactam". *Magnetic Resonance in Chemistry*, 31(1), 51-53.
- Cetin, H., Cilek, J. E., Aydin, L., Yanikoglu, A., 2009. "Acaricidal effects of the essential oil of *Origanum minutiflorum* (Lamiaceae) against *Rhipicephalus turanicus* (Acari: Ixodidae)". *Vet Parasitol*, 160(3-4), 359-361.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., Chern, J. C., 2002. "Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods". *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(178-182).
- Chen, C., Peng, WH., Tsai, KD., Hsu, SL., 2007. Luteolin suppresses inflammation-associated gene expression by blocking NF-kappaB and AP-1 activation pathway in mouse alveolar macrophages. *Life Sci* 1222-1230.
- Dadalioglu, I., Akdemir, G., Dilek, E., 2004. "Chemical Compositions and Antibacterial Effects of Essential Oils of Turkish Oregano (*Origanum minutiflorum*), Bay Laurel (*Laurus nobilis*), Spanish Lavender (*Lavandula stoechas* L.), and Fennel (*Foeniculum vulgare*) on Common Foodborne Pathogens". *J. Agric. Food Chem*, 52 8255-8260.
- Davies, K. J. A., Rice, E., Halliwell, C. B., Lunt, G. G., 1995. "Free radicals and oxidative stress". *Portland Press London U.K.* 1-31.

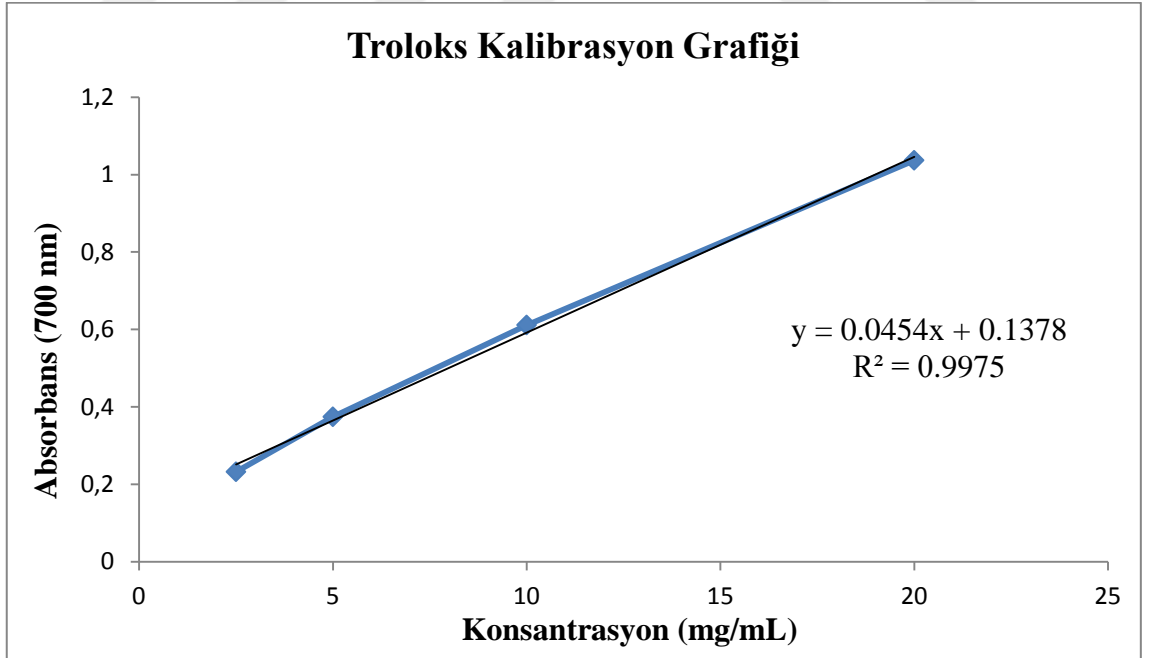
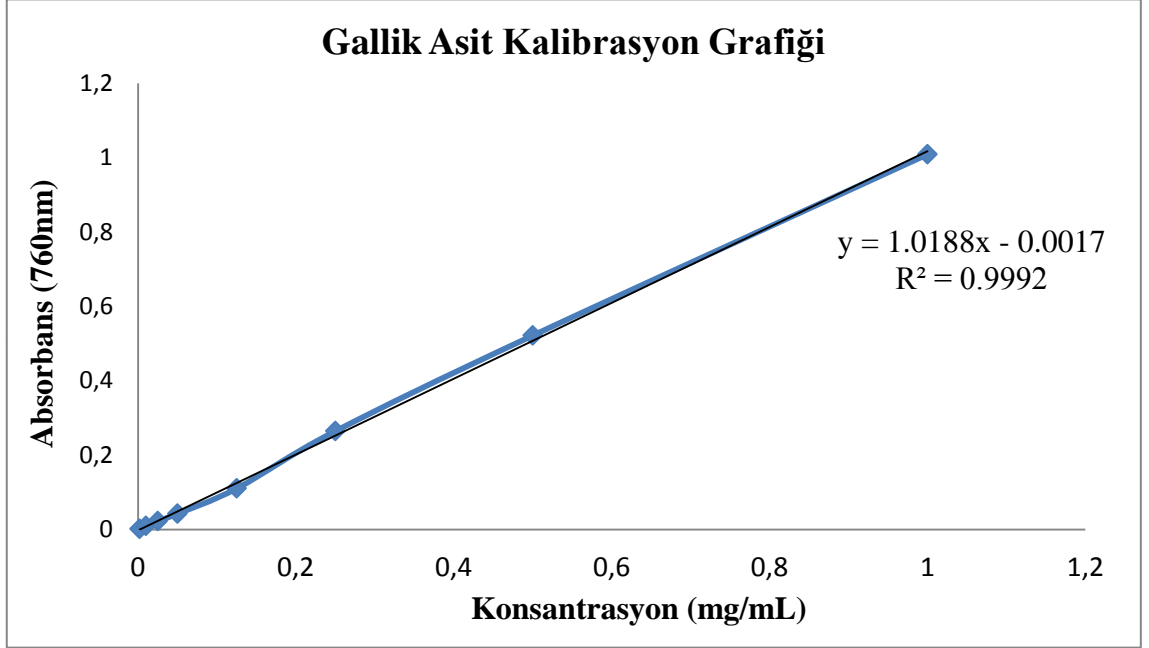
- Dinis, T. C., Maderia, V. M., Almeida, L. M., 1994. "Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers". *Arch Biochem Biophys*, 315(1), 161-169.
- Encarnacion, D. R., Nogueiras, C. L., Salinas, V. H. A., Anthoni, U., Nielsen, P. H., Christophersen, C., 1999. "Isolation of eriodictyol identical with huazhongilexone from *Solanum hindsianum*". *Acta Chemica Scandinavica*, 53(5), 375-377.
- Fukumoto, L. R., Mazzo, G., 2000. "Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds". *J. Agric. Food Chem*, 48 3597-3604.
- Gordon, M., 1996. "Dietary antioxidants in disease prevention". *Nat Prod Rep*, 13(4), 265-273.
- Hartwell, J. L. 1982. *Plants Used Against Cancer*. Quarterman Publications, Lawrence-Massachusetts.
- Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., Okuda, T., 1988. "Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects". *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 36(6), 2090-2097.
- Hertog, MGL., Feskens, EJM., Kromhout, D., 1993. "Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study". *The Lancet*, 342(2), 1007-1011.
- Hotoda, H., Furukawa, M., Daigo, M., Maruyama, K., Kaneko, M., 2003. "Synthesis and antimycobacterial activity of capuramycin analogues. Part 1: substitution of the azepan-2-one moiety of capuramycin". *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters*, 17(13), 2829-2832.
- Huo, LN., Wang, W., Zhang, CY., Shi, HB., Liu, Y., 2015. "Bioassay-Guided Isolation and Identification of Xanthine Oxidase Inhibitory Constituents from the Leaves of *Perilla frutescens*". *Molecules*, 20(10), 17848-17859.
- Iwashina, T. K., G., 2012. "Flavone and Flavonol Glycosides from the Leaves of *Triumfetta procumbens* in Ryukyu Islands". *Bulletin of the National Museum of Nature and Science Series B*, 38(2), 63-67.
- Karaoglan Sezen, E., Özgen, U., 2011. "Bazı Organım Türleri Üzerinde Farmakognozik Çalışmalar". Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi Anabilim Dalı (Doktora Tezi) Erzurum.
- Kılıc, Ö., Bağcı, E., 2008. "Origanum vulgare L. subsp. gracile (C.Koch) Ietswaart' nin Uçucu Yağ Verimi, Kompozisyonu ve Çay Olarak Kullanılabilirliğinin Araştırılması Üzerine Bir Çalışma". *Fırat Üniv. Fen ve Müh. Bil. Dergisi*, 20(1), 83-89.
- Ko, F., Chu, CC., Lin, CN., Chang, CC., Teng, CM.. 1998. Isoorientin-6"-O-glucoside, a water-soluble antioxidant isolated from *Gentiana arisanensis*. *Biochim.Biophys. Acta*, 1389, 81-90.
- Lu, Y., Foo, L. Y., 1999. "Rosmarinic acid derivatives from *Salvia officinalis*". *Phytochemistry*, 51(1), 91-94.
- Lu, Y., Foo, L. Y., 2000. "Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*". *Phytochemistry*, 55(3), 263-267.
- Malik, A., Kalidhar, SB., 2007. "Phytochemical examination of *Prosopis cineraria* L.(druce) leaves" *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 69(4), 576-578.

- McNally, D., Wurms, KV., Labbe, C., Quideau, S., Belanger, RR., 2003. Complex C-glycosyl flavonoid phytoalexins from *Cucumis sativus*. *J. Nat. Prod*, 66, 1280-1283.
- Oke, F., Aslim, B., 2010. "Biological potentials and cytotoxicity of various extracts from endemic *Origanum minutiflorum* O. Schwarz & P.H. Davis". *Food and Chemical Toxicology*, 48(6), 1728-1733.
- Oshima, Y., Konno, C., Hikino, H., 1981. "The Validity of Oriental Medicines .28. Structure of Moracenin-D, a Hypotensive Principle of *Morus* Root Barks". *Heterocycles*, 16(6), 979-982.
- Ovenden, S. P. B., Yu, J., San Wan, S., Sberna, G., Murray Tait, R., Rhodes, D., Cox, S., Coates, J., Walsh, N. G., Meurer-Grimes, B. M., 2004. "Globoidnan A: a lignan from *Eucalyptus globoidea* inhibits HIV integrase". *Phytochemistry*, 65(24), 3255-3259.
- Owen, R. W., Haubner, R., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W. E., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., 2003. "Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes". *Food and Chemical Toxicology*, 41(5), 703-717.
- Oyaizu, M., 1986. "Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. ". *Jpn. J. Nutr.* , 44 307-315.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. "Antioxidant activity applying an improved ABTS⁺ radical cation decolorization assay". *Free Radic Biol Med*, 26(9-10), 1231-1237.
- Safer, A. M., Nughamich, A., 1999. "Hepatotoxicity induced by the antioxidant food additive butylated hydroxy toluene (BHT) in rats. An electron microscopical study". *Hist. Histopathol*, 14 391-406.
- Saldamlı, İ., 2005. *Gıda Kimyası*. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 587s, Ankara.
- Sato, Y., Suzaki, S., Nishikawa, T., Kihara M., Shibata, H., 2000. "Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*". *Journal of Ethnopharmacology*, 72(3), 483-488.
- Silva, SA., Agra, MD., Tavares, JF., Barbosa, JM., 2010. "Flavanones from aerial parts of *Cordia globosa* (Jacq.) Kunth, Boraginaceae". *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(5), 682-685.
- Slinkard, J., Singleton, V. L., 1979. "Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. ". *Am. J. Enol. Viticult.*, 28 49-55.
- Stochmal, A., Piacente, S., Pizza, C., De Riccardis, F., Leitz, R., Oleszek, W., 2001. "Alfalfa (*Medicago sativa* L.) flavonoids. 1. Apigenin and luteolin glycosides from aerial parts". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 753-758.
- Suntar, I., Akkol, E. K., Keles, H., Oktem, A., Baser, K. H., Yesilada, E., 2011. "A novel wound healing ointment: a formulation of *Hypericum perforatum* oil and sage and oregano essential oils based on traditional Turkish knowledge". *J Ethnopharmacol*, 134(1), 89-96.
- Şarer, E., Pañçalı, S., Yıldız, S., 1996. "*Origanum minutiflorum* O. Schwarz et P.H. Davis Uçucu Yağının Bileşimi ve Antimikrobiyal Aktivitesi". *Ankara Ecz, Fak. Dergisi*, 25(1).

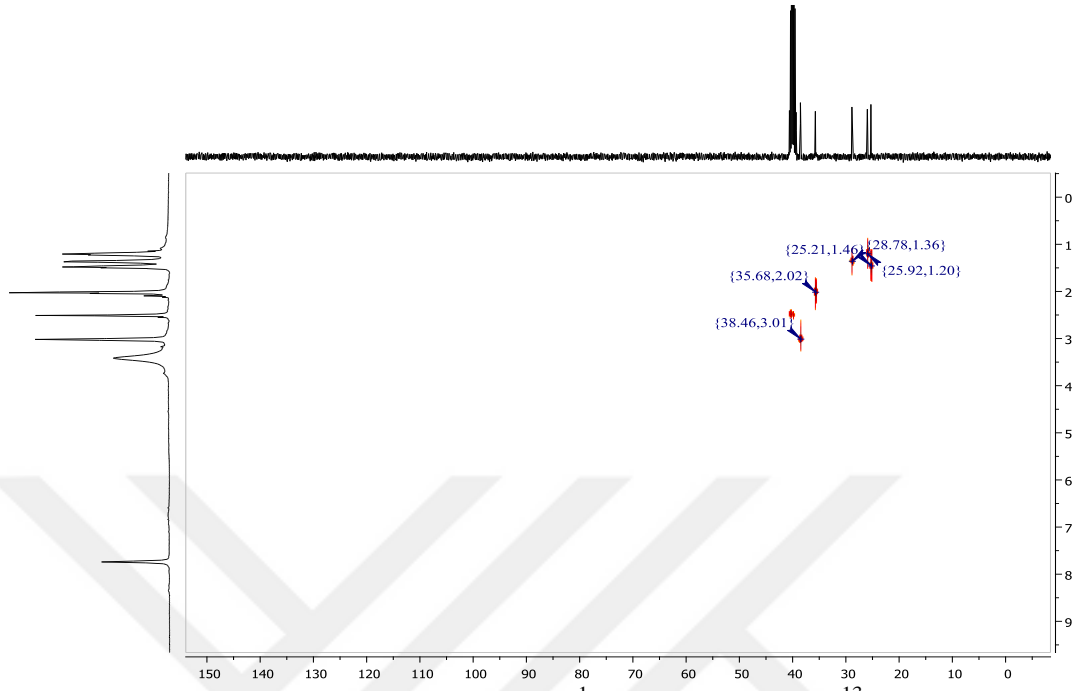
- Tshikalange, T., Meyer, JJ., Hussein, AA., 2005. Antimicrobial activity, toxicity and the isolation of a bioactive compound from plants used to treat sexually transmitted diseases. *J. Ethnopharmacol*, 96, 515-519.
- Unlu, G. V., Unlu, M., Donmez, E., Vural, N., 2007. "Chemical composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Origanum minutiflorum* O Schwarz & PH Davis.". *J Sci Food Agric* 87 255-259.
- Yagcioglu, A., 1999. "Defne Yaprağının (*Laurus nobilis* L.) Farklı Kurutma Havası Koşullarındaki Kuruma Teknikleri". Ege Üniv. Ziraat Fak. Tarım Mak. Bölümü, Ege Üniv. Araştırma Fonu Proje Raporu.
- Yiğit, N., Benli, M., 2005. "Ülkemizde Yaygın Kullanımı Olan Kekik (*Thymus vulgaris*) Bitkisinin Antimikrobiyal Aktivitesi". *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 3(8), 1-8.
- Zhu, X., Zhang, H., Lo, R., 2004. "Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities". *J. Agric. Food Chem*, 52, 7272-7278.

7. EKLER

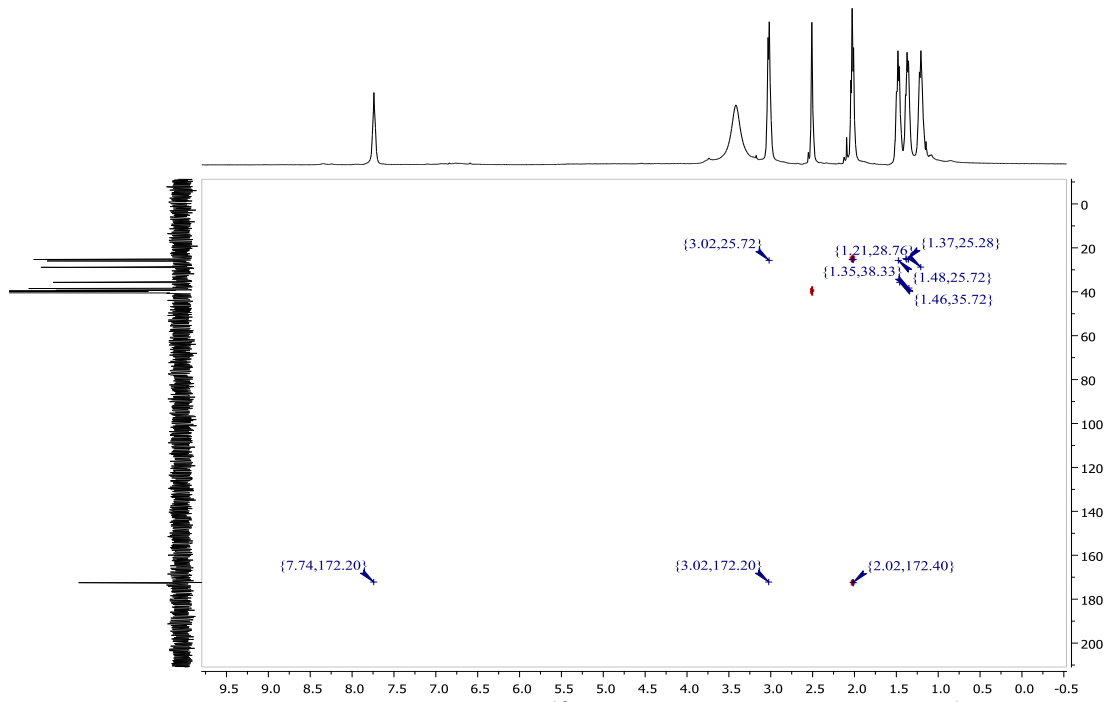
EK-1. Antioksidan Aktivite Testlerinde Kullanılan Standartların Kalibrasyon Grafikleri



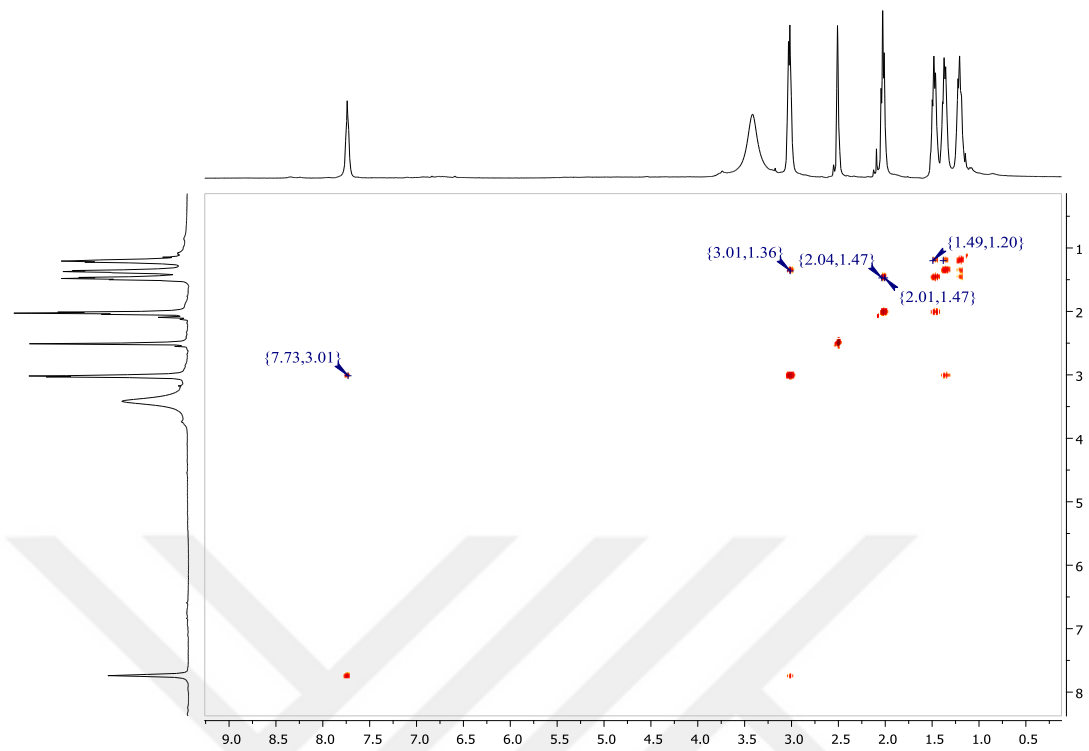
EK-2. İzole Edilen Moleküllerin 2D NMR spektrumları



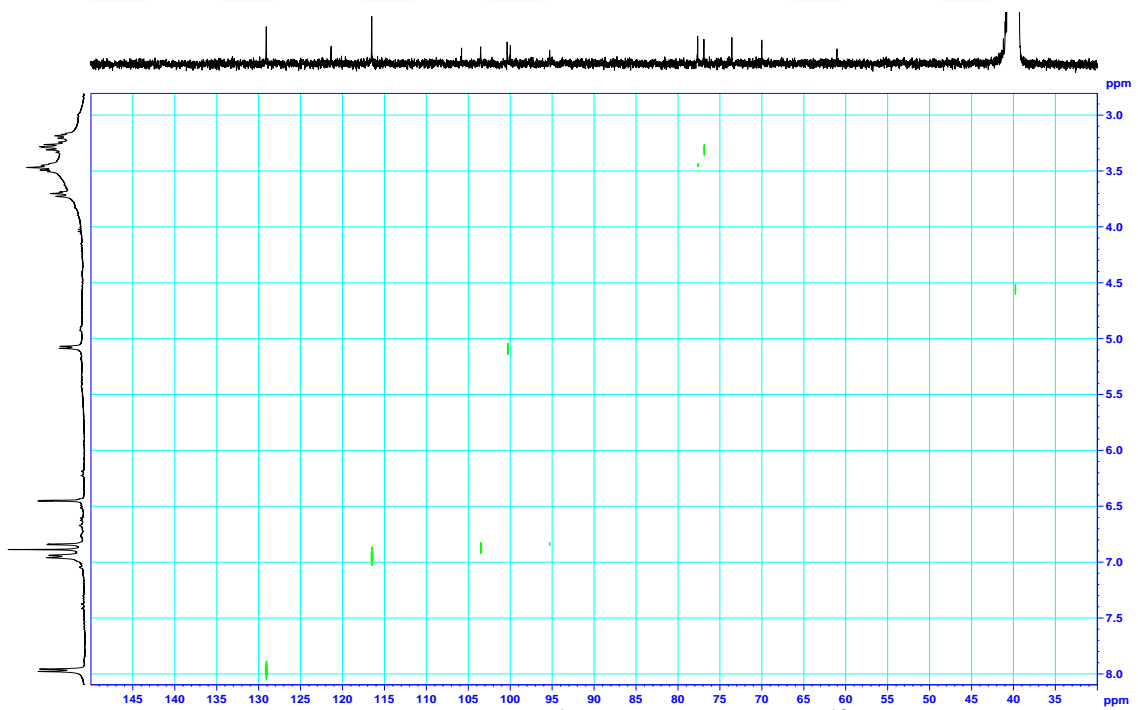
Azepan-2-one'nin (3) HETCOR spektrumu ($^1\text{H-NMR}$ 400 MHz, $^{13}\text{C-NMR}$ 100 MHz
DMSO- d_6)



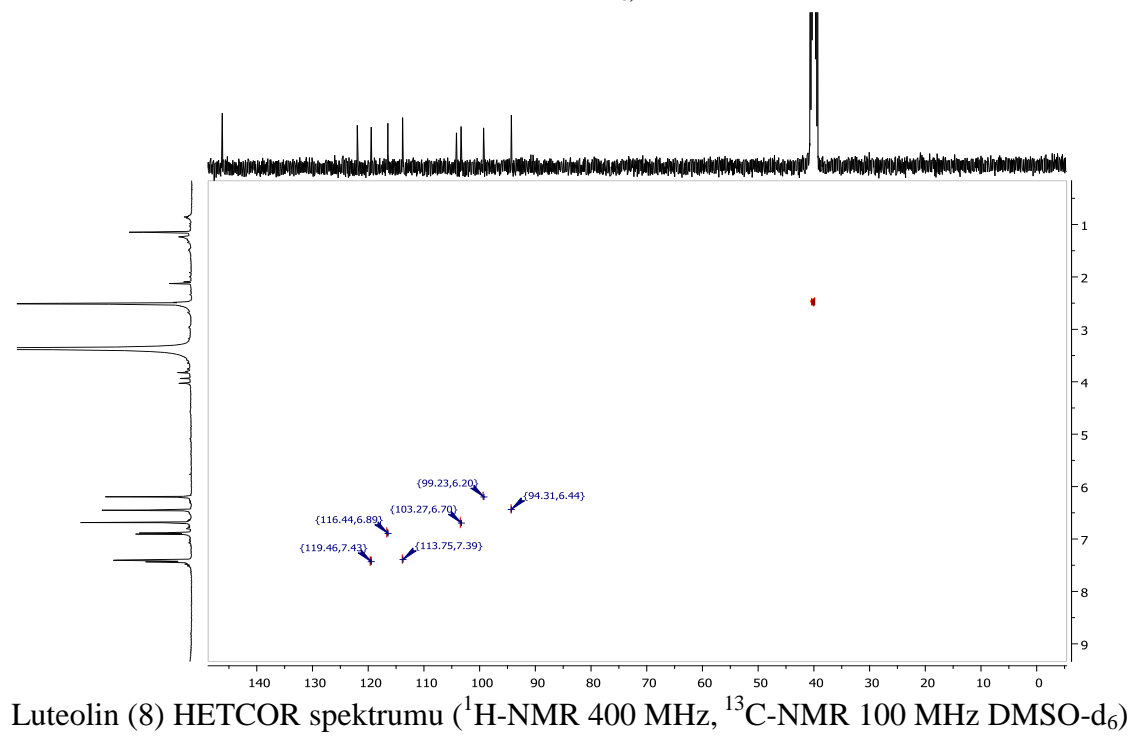
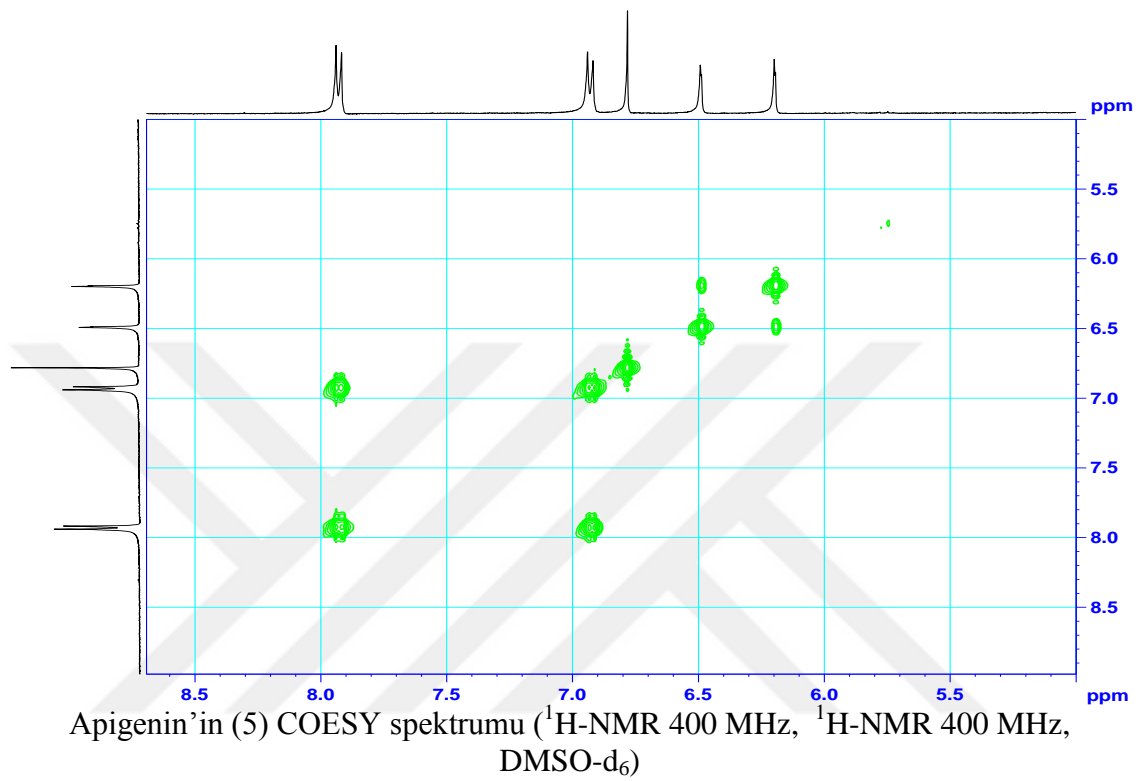
Azepan-2-one'nin (3) HMBC spektrumu ($^{13}\text{C-NMR}$ 100 MHz DMSO- d_6 , $^1\text{H-NMR}$ 400 MHz)

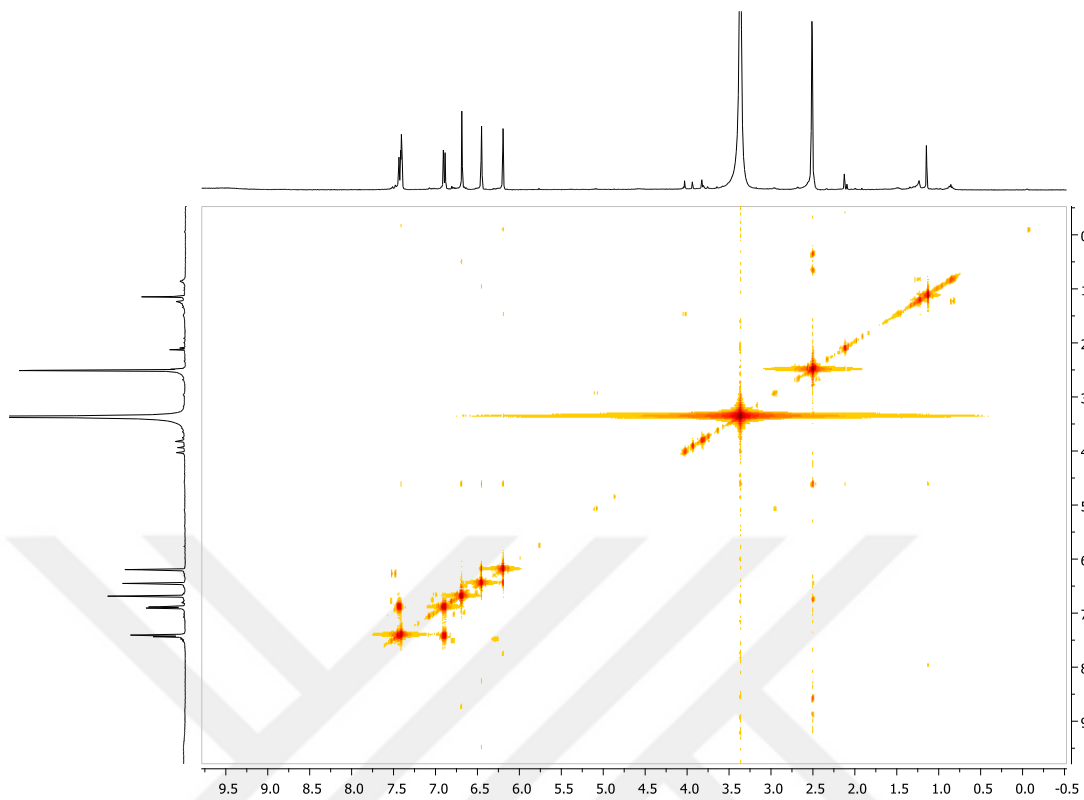


Azepan-2-one'nin (3) COESY spektrumu ($^1\text{H-NMR}$ 400 MHz DMSO-d_6 , $^1\text{H-NMR}$ 400 MHz DMSO-d_6)

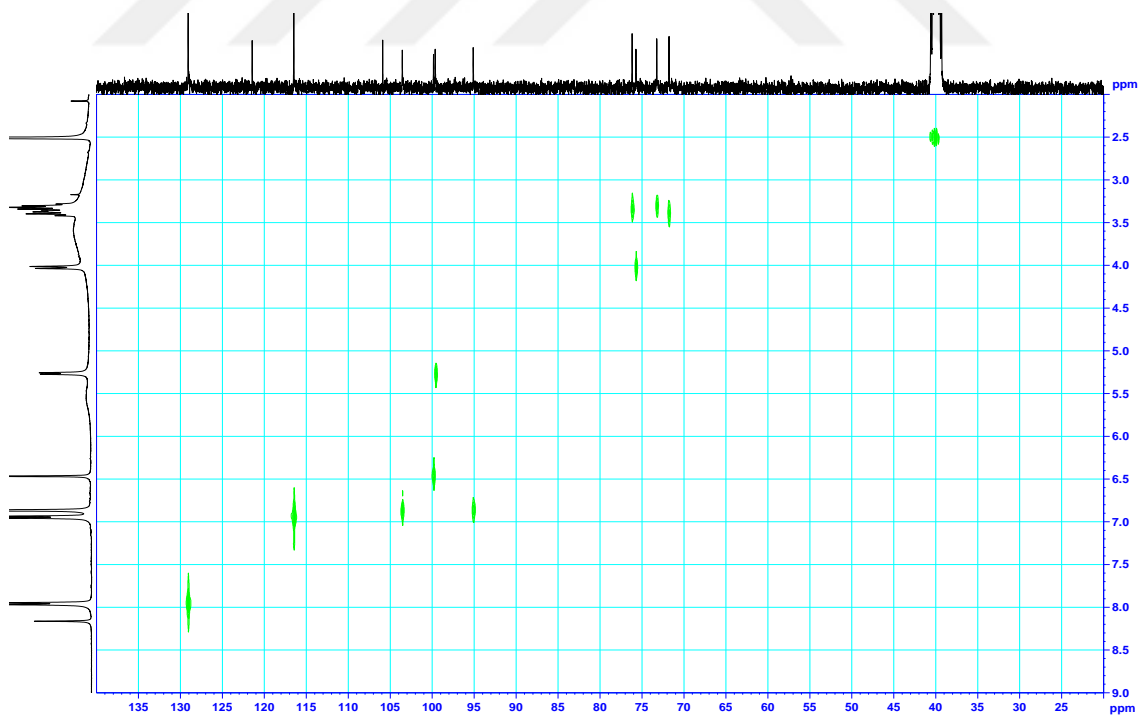


Apigenin'in (5) HETCOR spektrumu ($^1\text{H-NMR}$ 400 MHz, $^{13}\text{C-NMR}$ 100 MHz DMSO-d_6)

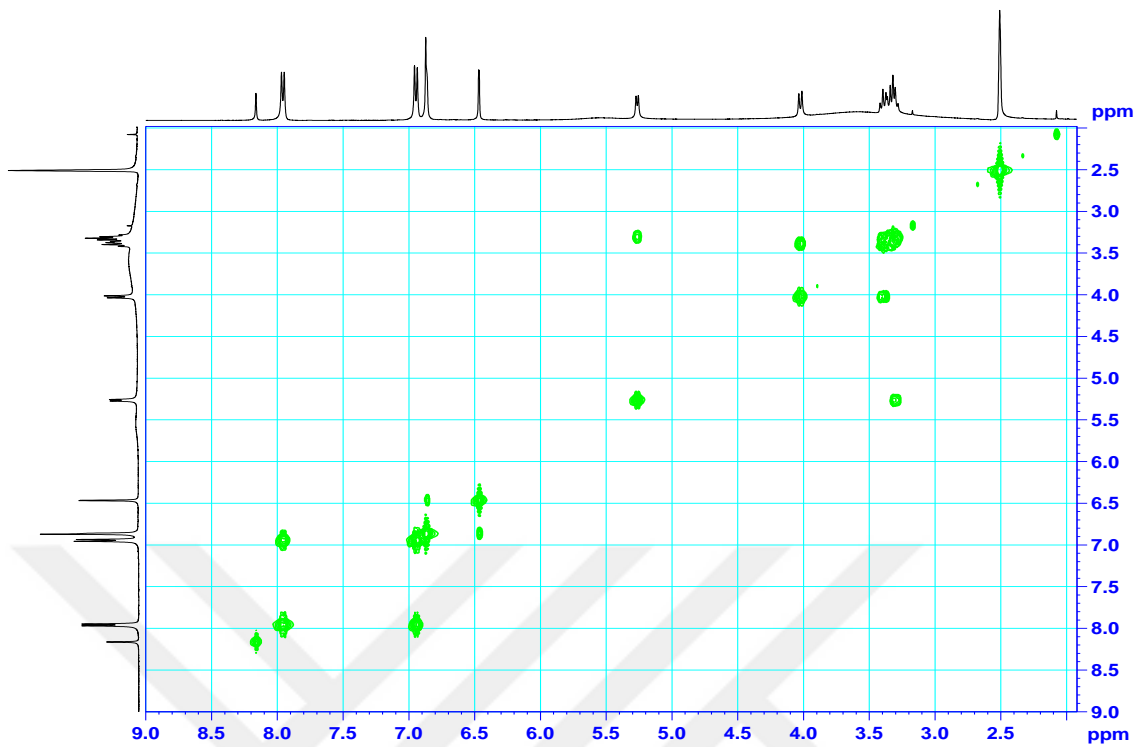




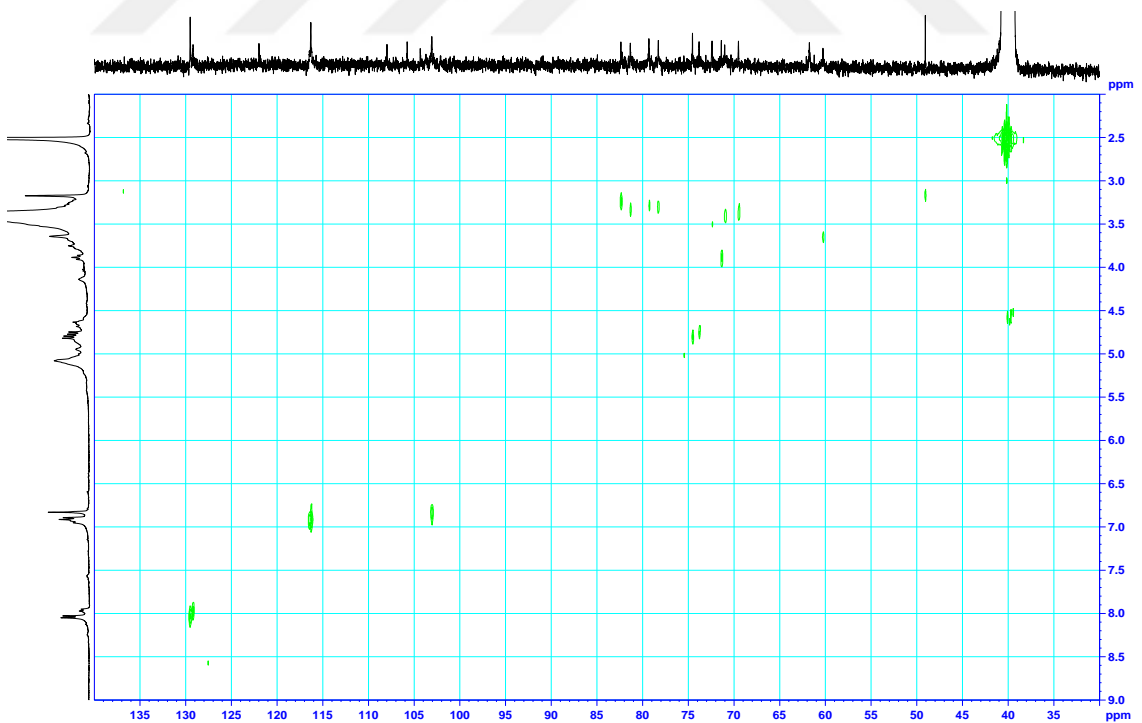
Luteolin (8) COESY spektrum ($^1\text{H-NMR}$ 400 MHz, $^1\text{H-NMR}$ 400 MHz DMSO- d_6)



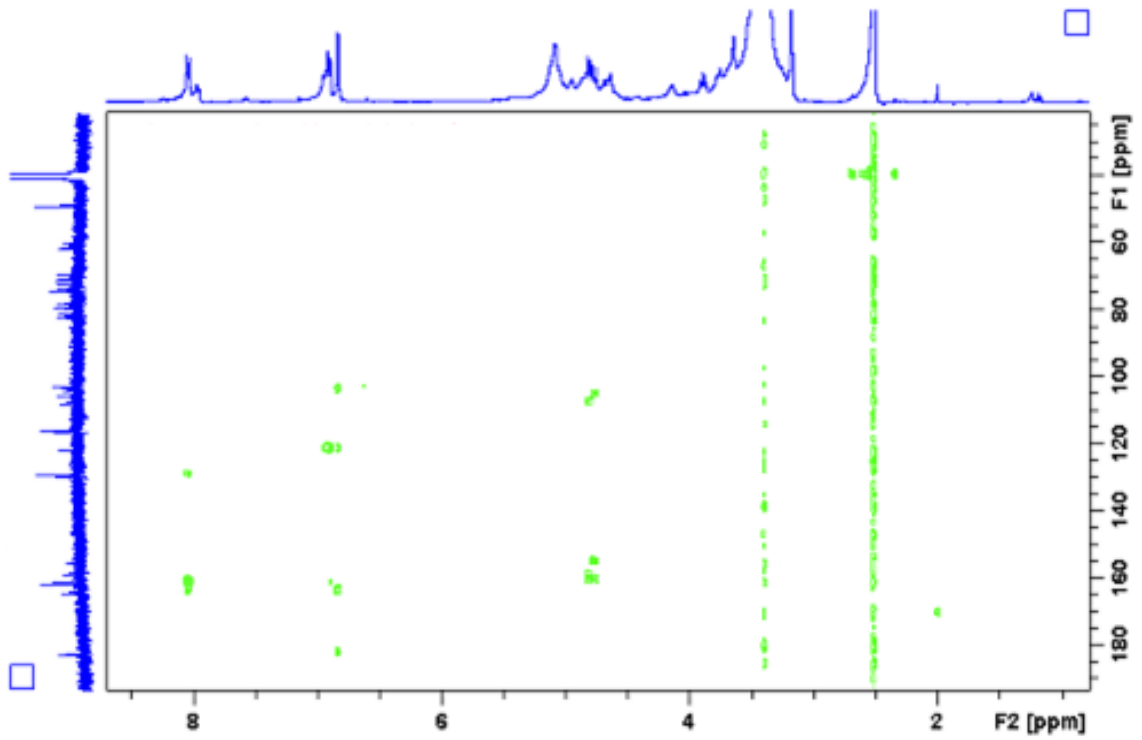
Apigenin-7-O-glukoronid'in (10) HETCOR spektrum ($^1\text{H-NMR}$ 400 MHz, $^{13}\text{C-NMR}$ 100 MHz DMSO- d_6)



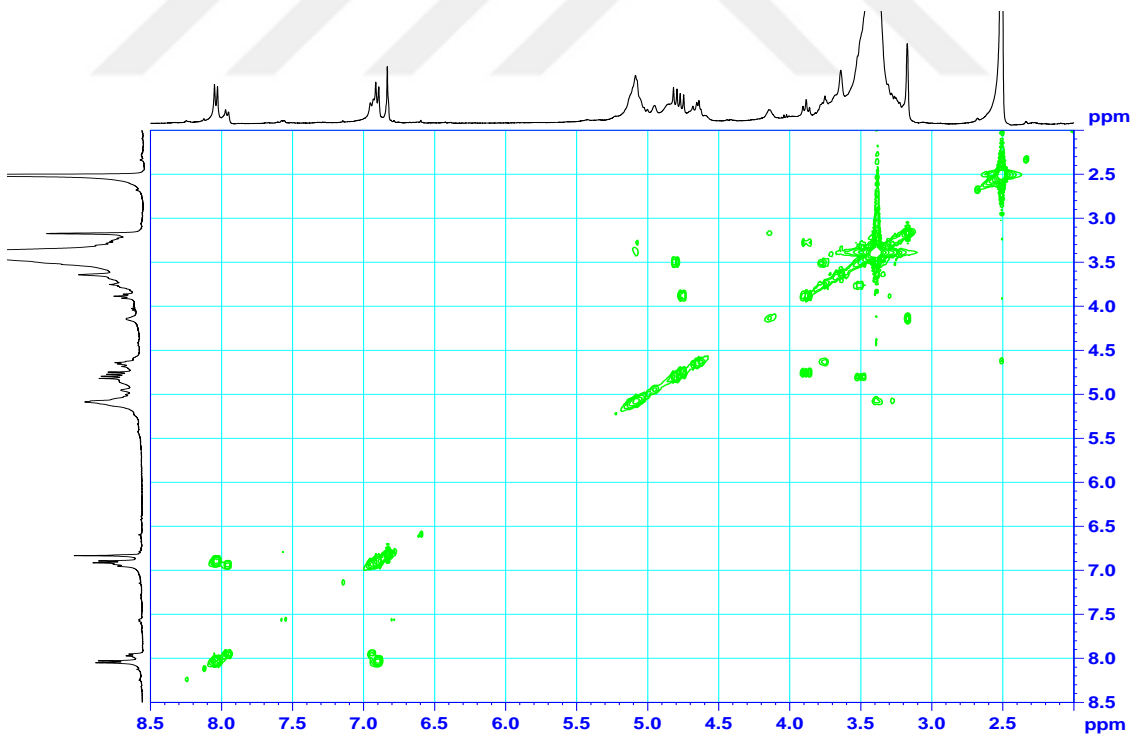
Apigenin-7-O-glukoronid'in (10) COESY spektrumu ($^1\text{H-NMR}$ 400 MHz, $^1\text{H-NMR}$ 400 MHz DMSO-d_6)



Vicenin-II'nin (11) HETCOR spektrumu ($^1\text{H-NMR}$ 400 MHz, $^{13}\text{C-NMR}$ 100 MHz DMSO-d_6)



Vicenin-II'nin (11) HMBC spektrumu (^1H -NMR 400 MHz, ^{13}C -NMR 100 MHz DMSO- d_6)



Vicenin-II bileşiğinin (11) COESY spektrumu (^1H -NMR 400 MHz, ^1H -NMR 400 MHz DMSO- d_6)

8. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Süleyman Muhammed ÇELİK

Doğum Tarihi ve Yer : 02.06.1989 / ISPARTA

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Telefon : 0505 245 09 49

Faks : -

e-mail : suleymancelik10@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi	2016
Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi	2012
Lise	Isparta Milli Piyango Anadolu Lisesi	2007

Projelerde Yaptığı Görevler

Tübitak Projeleri:

1. *Origanum minutiflorum* O. Schwarz & P.H. Davis Bitkisindeki Sekonder Metabolitlerin İzolasyonu ve Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi (114Z020) **Bursiyer** 2014-2015.
2. İzlenebilirlik Sistemi Ve Entegre Mücadele Yöntemi İle Yeşil Etiketli Tarım Yapılarak "Bebekler İçin Elma Püresi" Geliştirilmesi (3140083) Kimyager 2015-2016

Yayınlar

1. Karaman, S., Ozturk, B., Genç, N., **Çelik, S.M.**, 2012. Effect Of Preharvest Application Of Methyl Jasmonate On Fruit Quality Of Plum (*Prunus Salicina* Lindell Cv. "Fortune") At Harvest And During Cold Storage, Journal of Food Processing and Preservation. ISSN 1745-4549.
2. Akşit H., **Çelik S.M.**, Şen O., Erenler R., Demirtaş İ., Telci İ., Elmastaş M. 2014. Complete Isolation and characterisation of Polar Portion of Mentha dumetorum water extract. Record of Natural Product. 8(3), 277-280.
3. Kucuker E., Ozturk B., **Çelik S.M.**, Aksit H. 2014. Pre-Harvest Spray Application Of Metil Jasmonate Plays an Important Role Fruit Ripening, Fruit Quality and Bioactive Compounds of Japanese Plums. Scientia Horticulturae. 176 162-169.
4. Ozturk B., Yıldız K., Kucuker E., **Çelik S.M.**, 2015. Changes of Bioactive Compounds and Ethylene Production of Japanese Plums Treated with Pre-Harvest Aminoethoxyvinylglycine. International Journal of Food Properties. 18 2165-2186.

5. Ozturk B., **Çelik S.M.**, Karakaya M., Karakaya O., İslam A., Yargılaç T., 2015. Storage Temperature Affects Phenolic Content, Antioxidant Activity and Fruit Quality Parameters of Cherry Laurel (*Prunus laurocerasus* L.). Journal of Food Processing and Preservation. ISSN 1745-4549.
6. **Çelik, S.M.**, Erdoğan, T., Elmastaş, M., Akşit, H., Öztürk, B., Küçüker, E., Erdem H., 2012. BA-29 Anacı Üzerine Aşılı Armut Çeşitlerinin Biyoaktif Bileşikleri Üzerine Yapıpraktan Uygulanan Bazı Mineral Elementlerin Etkisi, Kromatografi 2012 Kongresi,6-9 Haziran, Tokat/Türkiye.
7. **Çelik, S.M.**, Erdoğan, T., Elmastaş, M., Akşit, H., Telci, İ., Erenler, R., Şen, Ö., Albayrak A. İ.,2013. *Mentha dumetorum* Bitkisinden Bazı Sekonder Metabolitlerinin Saflaştırılması ve Yapılarının Aydınlatılması, Kromatografi 2013 Kongresi, 19-23 Haziran, Bursa/Türkiye.
8. **Çelik, S.M.**, Elmastaş, M., Akşit, H., Şen, Ö., 2013. *Origanum minutiflorum* O. Schwarz & P.H. Davis Bitkisinin Farklı Polaritelerdeki Ekstraktlarının Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi, I. Ulusal Organik Kimya Kongresi 2013,25-29 Ekim, Sakarya/Türkiye.
9. **Çelik, S.M.**, Elmastaş, M., Meral, B., Erdoğan, T., Telci, İ., Erenler, R., 2013. Limon Otu (*Lippia citriodora*) ve Oğul Otu (*Mellisa officinalis*) Bitkilerinin Uçucu Yağ Bileşenlerinin Belirlenmesi, I. Ulusal Organik Kimya Kongresi 2013,25-29 Ekim, Sakarya/Türkiye.
10. **Çelik, S.M.**, Elmastaş, M., Telci, İ., Yayla Kekigi (*Origanum minutiflorum* O.) Uçucu Yağ Bileşenleri ve Antioksidan Kapasitesi 3. İlaç Kimyası: İlaç Etkin Maddesi Tasarımı, Sentezi, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi, 20-22 Mart 2015, Antalya

11. elik, S.M., Elmastaş, M., Akşit, H., *Origanum minutiflorum* O. Schwarz & P.H. Davis Bitkisindeki Sekonder Metabolitlerin İzolasyonu . Kromatografi Kongresi, Uşak Üniversitesi, 8-10 Nisan 2015, Uşak

