

**ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

***SIDERITIS GERMANICOPOLITANA* BORNM., *SIDERITIS PERFOLIATA* L. VE
SIDERITIS LIBANOTICA LABILL. BİTKİLERİNDEN SEKONDER
METABOLİTLERİN İZOLASYONU VE ANTİPROLİFERATİF
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

Hüseyin AKŞİT

KİMYA ANABİLİM DALI

**ÇANKIRI
2017**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Hüseyin AKŞİT tarafından hazırlanan “*Sideritis germanicopolitana* Bornm., *Sideritis perfoliata* L. ve *Sideritis libanotica* Labill. bitkilerinden sekonder metabolitlerin izolasyonu ve antiproliferatif aktivitelerinin incelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Ramazan ERENLER

Üye : Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ

Üye : Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

Üye : Doç. Dr. Ahmet Ceyhan GÖREN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Muhammed ALTUN

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Doç. Dr. Tamer KEÇELİ

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

SIDERITIS GERMANICOPOLITANA BORNM., *SIDERITIS PERFOLIATA* L. VE
SIDERITIS LIBANOTICA LABILL. BİTKİLERİNDEN SEKONDER
METABOLİTLERİN İZOLASYONU VE ANTİPROLİFERATİF
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Hüseyin AKŞİT

Çankırı Karatekin Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

Bu çalışmada, *Sideritis germanicopolitana* Bornm., *Sideritis perfoliata* L. ve *Sideritis libanotica* Labill. türleri fitokimyasal olarak incelendi. *Sideritis germanicopolitana* bitkisinin metanol özütünden verbaskosid (**M1**), apigenin-7-*O*-(6''-*O*-*p*-kumaroil)- β -D-glukopiranosid (**M2**) klorojenik asit (**M3**), 3'-*O*-metilhipolaetin-7-*O*-(allosil-(1 \rightarrow 2)-glikozit) (**M4**), izoskutellerain-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-allosil-(1 \rightarrow 2)-glikozit] (**M5**), 3'-*O*-metilhipolaetin-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-allosil-(1 \rightarrow 2)-glikozit] (**M6**), izoskutellerain-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-allosil-(1 \rightarrow 2)-6''-*O*-asetil-glikozit] (**M7**), 3'-*O*-metilhipolaetin-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-allosil-(1 \rightarrow 2)-6'''-*O*-asetil-glikozit] (**M8**), sideridosid (**M9**), *Sideritis perfoliata* bitkisinin metanol özütünden 4'-*O*-metilzoskutellerain-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-allosil-(1 \rightarrow 2)-glikozit] (**M10**), ajugol (**M11**) ve ajugosid (**M12**) molekülleri izole edildi. *Sideritis perfoliata* bitkisinin etil asetat özütünden 13-epi-manoil oksit (**SP1**), 2-okso-13-epi-manoil oksit (**SP2**), 2- β -hidroksi-13-epi-manoil oksit (**SP3**), 7-asetil-izofoliol (**SP4**), 2- β -format-13-epi-manoil oksit (**SP5**) ve izolinearol (**SP6**) molekülleri, *Sideritis libanotica* bitkisinin etil asetat özütünden siderol (**SL1**) ve sideridiol (**SL2**) molekülleri izole edildi. İzole edilen moleküllerin yapıları NMR, MS ve IR gibi spektroskopik yöntemlerle aydınlatıldı. Sideridosid (**M9**) ve 2- β -format-13-epi-manoil oksit (**SP5**) moleküllerinin doğal kaynaklarda bulunduğu ilk defa rapor edildi. Bitkilerin üç farklı organının (gövde, yaprak ve çiçek) metanol özütlerinin ve izole edilen moleküllerin A549, HeLa, Hep3B ve FL hücre hatlarına karşı antiproliferatif etkisi MTT ve BrDU-Eliza yöntemleri ile incelendi. Kauren tipi terpenlerin (**SP4**, **SP6**, **SL1** ve **SL2**) yüksek antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu belirlendi.

2017, 166 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: *S. germanicopolitana* Bornm., *S. perfoliata* L., *S. libanotica* Labill., antiproliferatif aktivite

ABSTRACT

PhD. Thesis

ISOLATION AND ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITIES OF SECONDARY METABOLITES FROM *SIDERITIS GERMANICOPOLITANA* BORNM., *SIDERITIS PERFOLIATA* L. AND *SIDERITIS LIBANOTICA* LABILL.

Hüseyin AKŞİT

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

Supervisor: Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

In this study, *S. germanicopolitana* Bornm., *S. perfoliata* L. and *S. libanotica* Labill., plants were examined phytochemically. Verbascoside (**M1**), apigenin-7-*O*-(6''-*O*-*p*-coumaroyl)- β -D-glycopyranoside (**M2**) chlorogenic acid (**M3**), 3'-*O*-methylhypolaetin-7-*O*-(allosyl-(1 \rightarrow 2)-glycoside) (**M4**), isoscutellerain-7-*O*-[6'''-*O*-acetyl-allosyl-(1 \rightarrow 2)-glycoside] (**M5**), 3'-*O*-methylhypolaetin-7-*O*-[6'''-*O*-acetyl-allosyl-(1 \rightarrow 2)-glycoside] (**M6**), Isoscutellerain-7-*O*-[6'''-*O*-acetyl-allosyl-(1 \rightarrow 2)-6''-*O*-acetyl-glycoside] (**M7**), 3'-*O*-methylhypolaetin-7-*O*-[6'''-*O*-acetyl-allosyl-(1 \rightarrow 2)-6'''-*O*-acetyl-glycoside] (**M8**) and sideridoside (**M9**) were isolated from methanol extract of *Sideritis germanicopolitana*. 4'-*O*-methylisoscutellerain-7-*O*-[6'''-*O*-acetyl-allosyl-(1 \rightarrow 2)-glycoside] (**M10**), ajugol (**M11**) and ajugoside (**M12**) were also isolated from methanol extract of *Sideritis perfoliata* L. From ethyl acetate extract of *Sideritis perfoliata* L., 13-epi-manoyl oxide (**SP1**), 2-oxo-13-epi-manoyl oxide (**SP2**), 2- β -hydroxy-13-epi-manoyl oxide (**SP3**), 7-acetyl-isofoliol (**SP4**), 2- β -format-13-epi-manoyl oxide (**SP5**), isolinearol (**SP6**), from ethyl acetate extract of *Sideritis libanotica* Labill. siderol (**SL1**) and sideridiol (**SL2**) were isolated. The structures of the isolated molecules were determined by spectroscopic methods such as NMR, MS and IR. Sideridoside (**M9**) and 2- β -format-13-epi-manoyl oxide (**SP5**) have been reported for the first time. The antiproliferative effect of the methanol extracts of the three different organs of the plants (stem, leaf and flower) and the isolated molecules against the A549, HeLa, Hep3B and FL cell lines was investigated by MTT and BrDU-Elisa methods. The kauren type terpenes (**SP4**, **SP6**, **SL1** and **SL2**) were found to have high antiproliferative activity.

2017, 166 pages

Keywords: *S. germanicopolitana* Bornm., *S. perfoliata* L., *S. libanotica* Labill, antiproliferative activity.

ÖNSÖZ

Lisans bitirme tezi dahil yüksek lisans ve doktora tezim boyunca yaklaşık 12 yıldır danışmanlığımı sürdüren sayın Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ hocama, çalışmalarım boyunca bilgi ve ilgilerini esirgemeyen Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ ve Prof. Dr. Ramazan ERENLER hocama, bitki örneklerinin toplanması aşamasından yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. İsa TELCİ hocama NMR cihazımızın yokluğunu aratmayan Ali Rıza TÜFEKÇİ'ye "Her şey LC-TOF/MS'e verilmez!" demeyerek bütün analizlerimi büyük bir özveriyle yapan Fatih GÜL'e, aktivite testlerini yapan Dr. Ali AYDIN'a ve yıllarca aynı evi ve laboratuvarı paylaştığımız değerli arkadaşım Dr. Nusret GENÇ'e, hayat arkadaşım, sevgili eşim Zeynep AKŞİT'e, biricik kızım Eylül Esmâ AKŞİT'e, oğlum Ertuğrul Gazi AKŞİT'e ve aileme teşekkür ederim.

Ayrıca tezin sağlıklı şekilde yürütülebilmesi için gerekli tüm spektroskopik ve kromatografik cihazları sağlayan DPT'ye (2003K120510 ve K201012720), adeta evim bildiğim çalışma ortamlarımızı, laboratuvarlarımızı sağlayan hem Gaziosmanpaşa Üniversitesi hem de Çankırı Karatekin Üniversitesi'ne sonsuz şükranlarımı sunarım. Allah devlete, millete zeval vermesin.

Hüseyin AKŞİT

Çankırı, Ağustos 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1. <i>Sideritis</i> Türlerinin Botanik Özellikleri.....	4
2.2. <i>Sideritis</i> Türleri Ve Çalışılan Türlerin Kimyasal İçerikleri	5
2.2.1. Terpenik bileşikler	5
2.2.2. Flavon türevleri	9
2.2.3. Fenil etanoid türevleri.....	11
2.2.4. İridoidler	12
2.3. <i>Sideritis</i> Türlerinin Etnofarmakolojik Özellikleri	13
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	14
3.1. Bitkisel Materyal	14
3.2. Özütleme	14
3.3. Ayırma ve saflaştırma	16
3.3.1. Sefadeks LH-20 Üzerinden Yapılan Fraksiyonlandırmalar	16
3.3.2. C18 dolgu maddesi üzerinden fraksiyonlandırma, ayırma ve saflaştırma	17
3.3.3. Silika jel üzerinden saflaştırma.....	18
3.3.4. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) Uygulamaları	19
3.4. Antiproliferatif Aktivite Çalışmaları.....	19
3.4.1. Hücre hatları ve hücre kültürü	19
3.4.2. MTT Testi	20
3.4.3. BrDU Hücre Eliza Testi.....	21
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	23
4.1. <i>Sideritis germanicopolitana</i> Bitkisinden Fenolik Maddelerin Saflaştırılması ...	23
4.2. <i>Sideritis perfoliata</i> Bitkisinden Fenolik Maddelerin Saflaştırılması	43
4.3. <i>Sideritis perfoliata</i> Bitkisinden İridoid Türevlerinin Saflaştırılması	47
4.4. Apolar Bileşiklerin Saflaştırılması	52
4.4.1. <i>Sideritis perfoliata</i> bitkisindeki terpenik bileşiklerin izolasyon prosedürü	52
4.4.2. <i>Sideritis libanotica</i> bitkisindeki terpenik bileşiklerin izolasyon prosedürü ...	65
4.5. Antiproliferatif Aktivite Sonuçları	69
5. SONUÇ.....	75
KAYNAKLAR	79
EK-1. Verbaskosid molekülün asidik ortamda hidrolizi, türevlendirilmesi ve GC-MS analizi:	83
EK-2 Verbaskosid (M1) Molekülüne Ait Spektral Veriler	84
EK-3 Apigenin-7-O-(6'-O-p-kumaroil)-glikozit (M2) Molekülüne Ait Spektral Veriler	87
EK-4 Klorojenik Asit (M3) Molekülüne Ait Spektral Veriler	90

EK-5	3'-O-metilhipolaetin-7-O-(allosil-(1→2)-glikozit) (M4) Molekülüne Ait Spektral Veriler	93
EK-6	İzoskutellerain-7-O-[6'''-O-asetil-allosil-(1→2)-glikozit] (M5) Molekülüne Ait Spektral Veriler	96
EK-7	(3'-O-metilhipolaetin-7-O-[6'''-O-asetil-allosil-(1→2)-glikozit]) (M6) Molekülüne Ait Spektral Veriler.....	99
EK-8	İzoskutellerain-7-O-[6'''-O-asetil-allosil-(1→2)-6''-O-asetil-glikozit] (M7) Molekülüne Ait Spektral Veriler.....	102
EK-9	3'-O-metilhipolaetin-7-O-[6'''-O-asetil-allosil-(1→2)-6'''-O-asetil-glikozit] (M8) Molekülüne Ait Spektral Veriler	105
EK-10	Sideridosid (M9) Molekülüne Ait Spektral Veriler	108
EK-11	4'-O-metilizoskutellerain-7-O-[6'''-O-asetil-allosil-(1→2)-glikozit] (M10) Molekülüne Ait Spektral Veriler.....	113
EK-12	Ajugol (M11) Molekülüne Ait Spektral Veriler	115
EK-13	Ajugosid (M12) Molekülüne Ait Spektral Veriler	118
EK-14	13-epi-manoil oksid (SP1) Molekülüne Ait Spektral Veriler	121
EK-15	2-okso-13-epi-manoil oksit (SP2) Molekülüne Ait Spektral Veriler	124
EK-16	2-β-hidroksi-13-epi-manoil oksit (SP3) Molekülüne Ait Spektral Veriler.....	127
EK-17	7-asetil-izofoliol Molekülüne Ait Spektral Veriler	131
EK-18	2-β-format-13-epi-manoil oksit (SP5) Molekülüne Ait Spektral Veriler ...	134
EK-19	İzolinearol (SP6) Molekülüne Ait Spektral Veriler	138
EK-20	Siderol (SL1) Molekülüne Ait Spektral Veriler	142
EK-21	Sideridiol (SL2) Molekülüne Ait Spektral Veriler.....	145
	ÖZGEÇMİŞ.....	148

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

δ	Kimyasal Kayma
$^{\circ}$	Derece (Lokasyon)
'	Dakika (Lokasyon)
"	Saniye (Lokasyon)
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
MS	Kütle Spektroskopisi
IR	Infrared Spektroskopisi
LC-MS	Sıvı Kromatografi- Kütle Spektroskopisi
LC-TOF/MS	Sıvı Kromatografi-Uçuş Zamanlı Kütle Spektroskopisi
DAD	Diyot Array Detektör
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
DMSO	Dimetil Sülfoksit
COSY	Korelasyon Spektroskopisi
HMBC	Farklı Çekirdeklerin Çoklu Bağ Korelasyonu
GC-MS	Gaz Kromatografi-Kütle Spektroskopisi
EI	Elektron İmpakt İyonlaştırma
ESI	Elektron Sprey İyonlaştırma

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. <i>Sideritis</i> türlerinde bulunan pentasiklik triterpenler	5
Şekil 2. 2. <i>Sideritis</i> türlerinde yaygın bulunan diterpen iskeletleri	6
Şekil 2. 3. Türkiye orijinli <i>Sideritis</i> türlerinden izole edilen diterpenler	8
Şekil 2. 4. <i>Sideritis</i> türlerinde bulunan bazı flavon aglikonları.....	9
Şekil 2. 5. <i>Sideritis</i> türlerinde yaygın olarak bulunan flavon glikozitleri	10
Şekil 2. 6. <i>Sideritis</i> türlerinden izole edilen fenil etanoid türevleri	11
Şekil 2. 7. <i>Sideritis</i> türlerinden izole edilen iridoid türevleri.....	12
Şekil 3. 2. MTT ve renkli formazan ürününün kimyasal yapıları	20
Şekil 4. 1. <i>S. germanicopolitana</i> bitkisinin farklı organlarının HPLC kromatogramları	24
Şekil 4. 2. İki farklı metotla alınan özütlerinin LC-TOF kromatogramları	25
Şekil 4. 3. Sefadeks LH-20 kolon İTK görseli.....	26
Şekil 4. 4. C aralığı C18 kolon uygulaması İTK görseli.....	27
Şekil 4. 5. C4 aralığı C18 kolon uygulaması İTK görseli.....	28
Şekil 4. 6. <i>S. germanicopolitana</i> bitkisinden fenoliklerin ayırma ve saflaştırma prosesi	29
Şekil 4. 7. M1 (Verbaskosid) molekülünün kimyasal yapısı	29
Şekil 4. 8. M2 (Apigenin-7- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> - <i>p</i> -kumaroil)- β -D-glukopiranosid) molekülünün kimyasal yapısı.....	30
Şekil 4. 9. M3 (Klorojenik asit) molekülünün kimyasal yapısı	31
Şekil 4. 10. M4 (3'- <i>O</i> -metilhipolaetin-7- <i>O</i> -(allosil-(1 \rightarrow 2)-glikozit) molekülünün kimyasal yapısı.....	33
Şekil 4. 11. M5 (İzoskutellerain-7- <i>O</i> -[6'''- <i>O</i> -asetil-allosil-(1 \rightarrow 2)-glikozit]) molekülünün kimyasal yapısı.....	34
Şekil 4. 12. M6 (3'- <i>O</i> -metilhipolaetin-7- <i>O</i> -[6'''- <i>O</i> -asetil-allosil-(1 \rightarrow 2)-glikozit]) molekülünün kimyasal yapısı.....	35
Şekil 4. 13. M7 (İzoskutellerain-7- <i>O</i> -[6'''- <i>O</i> -asetil-allosil-(1 \rightarrow 2)-6''- <i>O</i> -asetil-glikozit]) molekülünün kimyasal yapısı.....	36
Şekil 4. 14. M8 (3'- <i>O</i> -metilhipolaetin-7- <i>O</i> -[6'''- <i>O</i> -asetil-allosil-(1 \rightarrow 2)-6'''- <i>O</i> -asetil-glikozit]) molekülünün kimyasal yapısı	37
Şekil 4. 15. M9 (Sideridosid) molekülünün kimyasal yapısı.....	38
Şekil 4. 16. <i>S. germanicopolitana</i> bitkisinden izole edilen moleküllerin ve ham özütün LC-TOF/MS kromatogramları	39
Şekil 4. 17. Çalışmaya konu olan bitkilerin HPLC kromatogramları <i>S. perfoliata</i> (A), <i>S. germanicopolitana</i> (B), <i>S. libanotica</i> (C) yaprak kısımları metanol özütü..	44
Şekil 4. 18. <i>S. perfoliata</i> bitkisi etil asetat özütü sefadeks LH-20 kolon İTK görseli.....	45
Şekil 4. 19. <i>S. perfoliata</i> etil asetat özütü C18 kolon uygulaması	45
Şekil 4. 20. M10 (4'- <i>O</i> -metilizoskutellerain-7- <i>O</i> -[6'''- <i>O</i> -asetil-allosil-(1 \rightarrow 2)-glikozit]) molekülünün kimyasal yapısı.....	46
Şekil 4. 21. <i>S. perfoliata</i> bitki organları metanol özütü LC-TOF/MS kromatogramları	47
Şekil 4. 22. <i>S. perfoliata</i> metanol özütü C18 uygulaması İTK görseli	48
Şekil 4. 23. M11 (Ajugol) molekülünün kimyasal yapısı	49
Şekil 4. 24. M12 (Ajugosid) molekülünün kimyasal yapısı	50
Şekil 4. 25. <i>Sideritis perfoliata</i> 'nın aseton özütünün sefadeks LH-20 kolonu ile İTK profili.....	53

Şekil 4. 26. <i>Sideritis perfoliata</i> 'nın apolar kısmının silika kolondan alınan fraksiyonların İTK görüntüleri.	53
Şekil 4. 27. <i>Sideritis perfoliata</i> 'nın apolar kısmının İTK görüntüleri (silika jel kolon).	54
Şekil 4. 28. <i>Sideritis perfoliata</i> 'nın apolar kısmına uygulanan preparatif İTK.	55
Şekil 4. 29. <i>Sideritis perfoliata</i> 'nın aseton özütünden terpenlerin izolasyon şeması.....	55
Şekil 4. 30. SP1 (13-epi-manoil oksit) molekülünün kimyasal yapısı.....	56
Şekil 4. 31. SP2 (2-okso-13-epi manoil oksit) molekülünün kimyasal yapısı.....	57
Şekil 4. 32. SP3 (2-β-hidroksi-13-epi-manoil oksit) molekülünün kimyasal yapısı	58
Şekil 4. 33. SP3 (2-β-hidroksi-13-epi-manoil oksit) molekülünün X-Ray ortep görüntüsü.....	59
Şekil 4. 34. SP4 (7-asetil-izofoliol) molekülünün kimyasal yapısı	60
Şekil 4. 35. SP5 (2-β-format-13-epi-manoil oksit) molekülünün kimyasal yapısı.....	61
Şekil 4. 36. SP6 (İzolinearol) molekülünün kimyasal yapısı.....	62
Şekil 4. 37. <i>Sideritis libanotica</i> bitkisinin etil asetat özütünün sefadeks LH-20 kolonundan elde edilen fraksiyonların İTK profili.	65
Şekil 4. 38. <i>Sideritis libanotica</i> 'nın apolar kısmının silika kolon fraksiyonlarının İTK görüntüsü.....	66
Şekil 4. 39. <i>Sideritis libanotica</i> apolar kısım silika kolon II İTK görüntüsü.....	67
Şekil 4. 40. <i>Sideritis libanotica</i> apolar kısım silika kolon III İTK görüntüsü.....	67
Şekil 4. 41. <i>S. libonatica</i> bitkisinden etil asetat özütünden izole edilen terpenler.	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4. 1. M3 (Klorojenik asit) ^1H ve ^{13}C -NMR dataları	32
Çizelge 4. 2. İzole edilen fenil etanoidlerin ^1H ve ^{13}C -NMR verileri	40
Çizelge 4. 3. İzole edilen flavon allosil glikozitlerin ^1H -NMR kimyasal kaymaları	41
Çizelge 4. 4. İzole edilen flavon allosil glikozitlerin ^{13}C -NMR dataları	42
Çizelge 4. 5. İridoid glikozitlerin ^1H ve ^{13}C kimyasal kaymaları	51
Çizelge 4. 6. <i>S. perfoliata</i> bitkisinden izole edilen monoil oksit türevlerinin ^1H -NMR değerleri.....	63
Çizelge 4. 7. <i>S. perfoliata</i> bitkisinden izole edilen terpenoidlerin ^1H ve ^{13}C -NMR verileri	64
Çizelge 4. 8. <i>S. libanotica</i> bitkisinden izole edilen terpenoidlerin ^1H ve ^{13}C -NMR verileri	68
Çizelge 4. 9. Ekstrelerin MTT testiyle belirlenen GI_{50} ve IC_{50} değerleri	69
Çizelge 4. 10. Test moleküllerinin MTT testiyle belirlenen GI_{50} ve IC_{50} değerleri.....	72
Çizelge 4. 11. Test moleküllerinin ELISA BrdU testiyle belirlenen GI_{50} ve IC_{50} değerleri	74

1. GİRİŞ

“Doğaya dönüş, yeşil akım, sağlıklı yaşam” gibi terimlerin yaygınlaşması ile birlikte son 15-20 yıldır tıbbi aromatik bitkilerin halk arasında kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır. Yıllar boyu yetiştiği bölgede kullanılagelen bazı bitkilerin metropol hayatına da girmesi, aktarlarda yaygınlaşması ve artık ülkenin dört bir tarafına yayılması ve yaygın olarak kullanılması; “doğaya dönüş” akımının bir sonucudur. Hiç bir ilacın olmadığı zamanlarda, insanoğlu hastalıkların tedavisinde bitkilerden faydalanmayı zaman içinde öğrenmiştir. Özellikle ilkel yaşamı konu alan filmlerde bu olgu sıklıkla vurgulanmıştır. Tıbbi aromatik bitki bakımından en zengin içeriğe sahip Anadolu coğrafyasında da bitkilerin kullanımı oldukça yaygındır. Tarih boyunca Anadolu’da halkımız birçok hastalığı doğadan topladıkları bitkilerle tedavi etmekteydi. Baş ağrısı, diş ağrısı, kas ağrısı, uyuz, sıtma, kurşun yarası, bıçak yarası vb. birçok rahatsızlıkta kullanılabilecek bitkiler ya da bitki karışımları bilinmekteydi. Nitekim 2001 yılına kadar dünya çapında rapor edilen 122 adet bitki kaynaklı ilaç etken maddesinin %80’i; bitkilerin orijinal etnofarmakolojik kullanımına uygun şekilde değerlendirilerek keşfedilmiştir. Örneğin; halk arasında öksürük kesici (antitüssif) olarak kullanılan *Ardisia japonica* bitkisinden aynı amaca yönelik bergenin maddesinin izole edilerek antitüssif ilaç formülasyonlarında kullanılması gibi (Fabricant and Farnsworth, 2001).

Biyoaktif moleküllerin bitkisel droglar olarak kullanımı neredeyse insanlık tarihi ile başlamasına rağmen; doğal kaynaklardan izole edilip karakterizasyonu yapılan bileşiklerin modern ilaç keşfi ve geliştirilmesi için kullanımı 19 yy’da başlamıştır. Tedavi için kullanılan ilk ticari, saf doğal bileşik morfindir ve 1826 yılında Merck firması tarafından piyasaya sürülmüştür. İlk semi sentetik ilaç; 1899 yılında Bayer firması tarafından üretilen halen popülerliğini koruyan aspirindir. Ayırma teknikleri geliştikçe, ayırmaya yönelik cihazların da yardımı ile doğal kaynakların ilaç hammaddelerine dönüşmesi gün geçtikçe hızlanmıştır. Örneğin akciğer, yumurtalık ve göğüs kanserine karşı kullanılagelen paklitaksel ve taksol porsuk ağacının (*Taxus*

brevifolia) kabuğundan izole edilmiştir. Sıtmaya karşı kullanılan artemisinin *Artemisia annua*'dan ve karaciğer hastalıklarında kullanılan silimarin *Silybum marianum*'dan izole edilerek kullanılan ilaçlara örnek verilebilir.

Doğal kaynaklar (bitkiler, ağaçlar, yosunlar, mantarlar) ilaç hammaddelerinin kaynağını oluşturmaya devam etmektedir. Bitkilerden izole edilen ve biyolojik aktiviteleri ortaya konulan moleküller insan hastalıklarının tedavisinde kullanılacak yeni maddelerin sentezi yada yarı-sentezi için kimyasal model oluşturmaktadır. İlaç keşfinde son zamanlarda; kombinatoriyal kimya (bilgisayarlar yardımı ile moleküler modelleme) gibi teknikler kullanılsa da doğal kimya her zaman ilaç hammaddelerin keşfinde önemini koruyacaktır.

Sideritis türleri ülkemizde “dağ çayı”, “ada çayı” ve “yayla çayı” adlarıyla bilinmekte, halk arasında toprak üstü kısımları çay olarak tüketilmektedir. Kaynatma veya demleme yöntemleri ile elde edilen çaylar hoş bir kokuya, güzel sarımtırak bir renge ve kendine has tada sahiptir. Akdeniz bölgesinde; kahvehanelerde siyah çaydan sonra en çok tüketilen çaylar arasındadır. İki şekilde servis edilir: demliğe yeterince bitki parçası atılır, sıcak su eklenir ve çay ocağının üstünde demlenmeye bırakılır, müşteriye sıcak su eklenerek veya sadece dem olarak servis edilir. Bu yöntemle hazırlanan çaylar biraz acı tada sahip olduğundan bal veya şeker ile sunulur. İkinci yöntemde ise; bitki parçaları su bardağında, sıcak su içinde servis edilir. Kullanıcı, bitkiyi bir müddet karıştırır ve çay istediği rengi ve kokuyu alınca bitki parçalarını uzaklaştırarak tüketir. Halk arasında bu şekilde hazırlanan çaya “dallı” denmektedir. Bu çaylar keyif için tüketilmesinin yanında, mide ve bağırsak rahatsızlarında (hazımsızlık ve midedeki gaz), ağrı, ateş, boğaz ağrısı, burun akıntısı gibi soğuk algınlığı semptomlarını yatıştırmak için ve diüretik olarak tüketilir.

Ülkemizde % 79.5 gibi yüksek bir endemizm oranına sahip *Sideritis* türleri üzerine yapılan çalışmalar son yıllarda artmıştır. Bu çalışmaların büyük bir kısmı ülkemizde

doğal yayılış gösteren türlerin uçucu yağlarının kimyasal içeriklerini ortaya koymak ve bunların bazı biyolojik aktivitelerini değerlendirmek için dizayn edilmiştir. Uçucu olmayan sekonder metabolitlerin izolasyonu ve tanımlanması üzerine yapılan çalışmalar devam ede gelmektedir. Bu çalışmaya konu olan  *Sideritis* türü (*S. germanicopolitana* Bornm., *S. perfoliata* L. ve *S. libanotica* Labill.) hem terpenik hem de fenolik madde içeriği bakımından fitokimyasal olarak incelendi. Çalışma aşağdaki  temel amaca yönelik dizayn edildi.

1. Bitkilerde bulunan polar ve apolar moleküllerin, bitki örneklerinden değerlik tekniklerle saflaştırılması ve çalışmaya konu olan bitkilerin her biri için kemotaksonomik öneme sahip moleküllerin belirlenmesi,
2. İzole edilen bileşiklerin yapılarının NMR, MS, IR gibi tekniklerle aydınlatılması, yeni ve hali hazırda bilinen bileşiklerin spektral verilerinin literatüre kazandırılması,
3. İzole edilen moleküllerin *in vivo* antiproliferatif aktivitelerinin belirlenmesi.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. *Sideritis* Türlerinin Botanik Özellikleri

Sideritis cinsinin, Dünya’da tek yıllık veya çok yıllık olmak üzere 150 türü vardır. Ülkemizde ise genelde Akdeniz Bölgesi’nde olmak üzere, Ege ve İç Anadolu’da da yayılış gösteren 46 tür 12 alttür ve 2 varyete ile temsil edilir (Huber-Morath, 1982). Ülkemizde yetişen türlerin endemizm oranı oldukça yüksektir (~%79) (Başer, 2002).

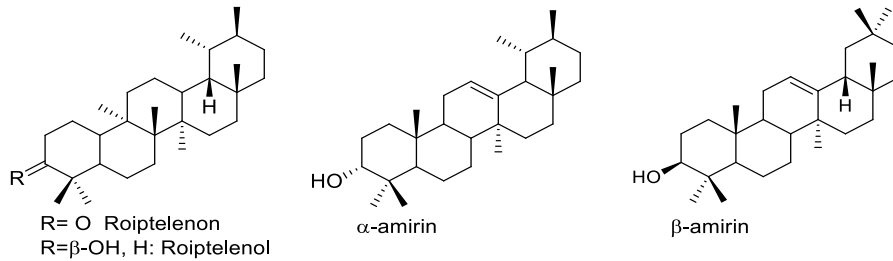
Sideritis türleri: ot ya da çalı formunda, dik gövdeli tek ya da çok yıllık türlerdir. Gövdeleri dik ve yükselici yapıda ve dört köşedir. Türe bağlı olarak gövdedeki tüyler; pilos (uzun, düz, dik), tomentos (yünlü görünümlü, keçe gibi) şeklinde bulunmakla beraber nadiren tüysüz de olabilir. Trikom (salgı bezi) bulunduran veya bulundurmeyen türler mevcuttur. Yaprakları basit veya parçalıdır. Yaprak kenarları krenat (oval tırtıklı) ya da dentat (testere kenarı gibi) şeklindedir ve petiol (saplı) ve sesil (sapsız) olabilir. Çiçek dizilimi; vertisillastrum (halka halka dizilişe sahip) ve sık veya seyrek şeklindedir. Brakteoller (yaprağa benzer küçük yapılar) yoktur. Brakteoler (çiçeği taşıyan çanak yaprak) yaprağa benzer ve kaliks tüpünü saklar. Kaliks; tüp şeklinde ve çana benzemektedir bazen de bilabiat (simetrik olmayan kaliks) olabilir. 5-10 arası damar bulunabilir 5 dikensi diş taşır. Korolla; genelde sarı olmakla beraber beyaz ve kırmızı renklere de olabilir.

2.2. *Sideritis* Türleri Ve Çalışılan Türlerin Kimyasal İçerikleri

2.2.1. Terpenik bileşikler

Terpenler; izopren birimlerinin birleşmeleri ile oluşan ve doğal ürünlerde en yaygın şekilde bulunan moleküllerdir. Oldukça fazla yapısal çeşitliliğe sahip olan bu moleküller; birçok biyolojik aktiviteye sahiptirler. Oksijen içeren terpenler, terpenoid olarak adlandırılır. Taşıdıkları karbon sayılarına göre; hemiterpen (5 karbonlu), monoterpen (10 karbonlu), seskiterpen (15 karbonlu), diterpen (20 karbonlu), sesterpenler (25 karbonlu), triterpenler (30 karbonlu) ve tetraterpenler (40 karbonlu) olarak isimlendirilir. Mono ve seskiterpenlerin çoğu uçucudur. Diterpenler ve daha çok karbon taşıyan terpenler uçucu değildirler. Terpenler; alkol, keton, aldehit ve karboksilik asit gibi fonksiyonel gruplar taşımakla beraber sadece hidrokarbon şeklinde de bulunabilirler. Günümüzde; çoğu uçucu monoterpenler olmak üzere; 20.000'den fazla terpenin yapısı bilinmektedir.

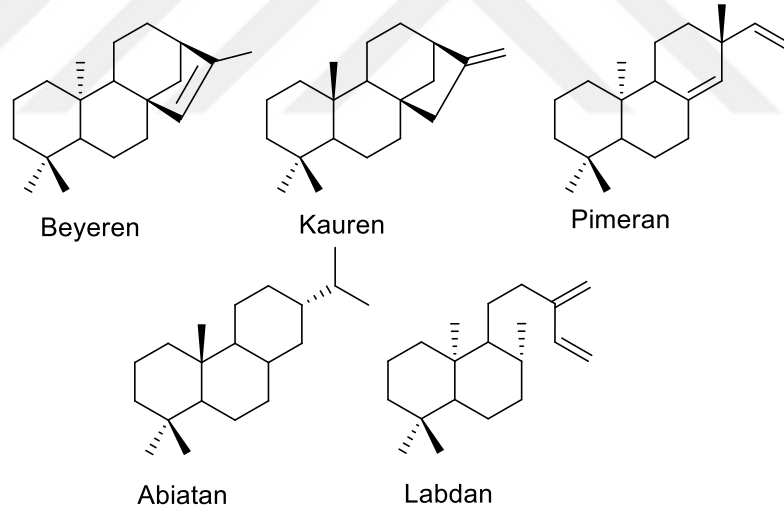
Sideritis türlerinde seskiterpenler ve triterpenler çok nadir bulunur. Birçok *Sideritis* türünün uçucu yağlarında monoterpenlerin varlığı tespit edilmiştir. Pentasiklik triterpen sınıfında olan roiptelenol ve roiptelenon bileşiklerinin *S. macrostachya* (Fraga et al., 2003) türünde α ve β -amirin bileşiklerinin *S. massoniana* türünde (Fraga et al., 1995); bulunduğu rapor edilmiştir.



Şekil 2. 1. *Sideritis* türlerinde bulunan pentasiklik triterpenler

Seskiterpen ve monoterpenlerin aksine diterpenler *Sideritis* türlerinde çok yaygın olarak bulunmaktadır. *Sideritis* türlerinde tanımlanan ilk diterpenler; *S. sicula* bitkisinden 1968 yılında izole edilen sideridiol ve siderol bileşikleridir (Piozzi et al., 1968). Günümüze kadar İberya Yarımadası, Kanarya Adaları ve Anadolu'da yetişen *Sideritis* türlerindeki diterpenlerin izolasyonu ve tanımlanması üzerine oldukça fazla çalışma rapor edilmiştir.

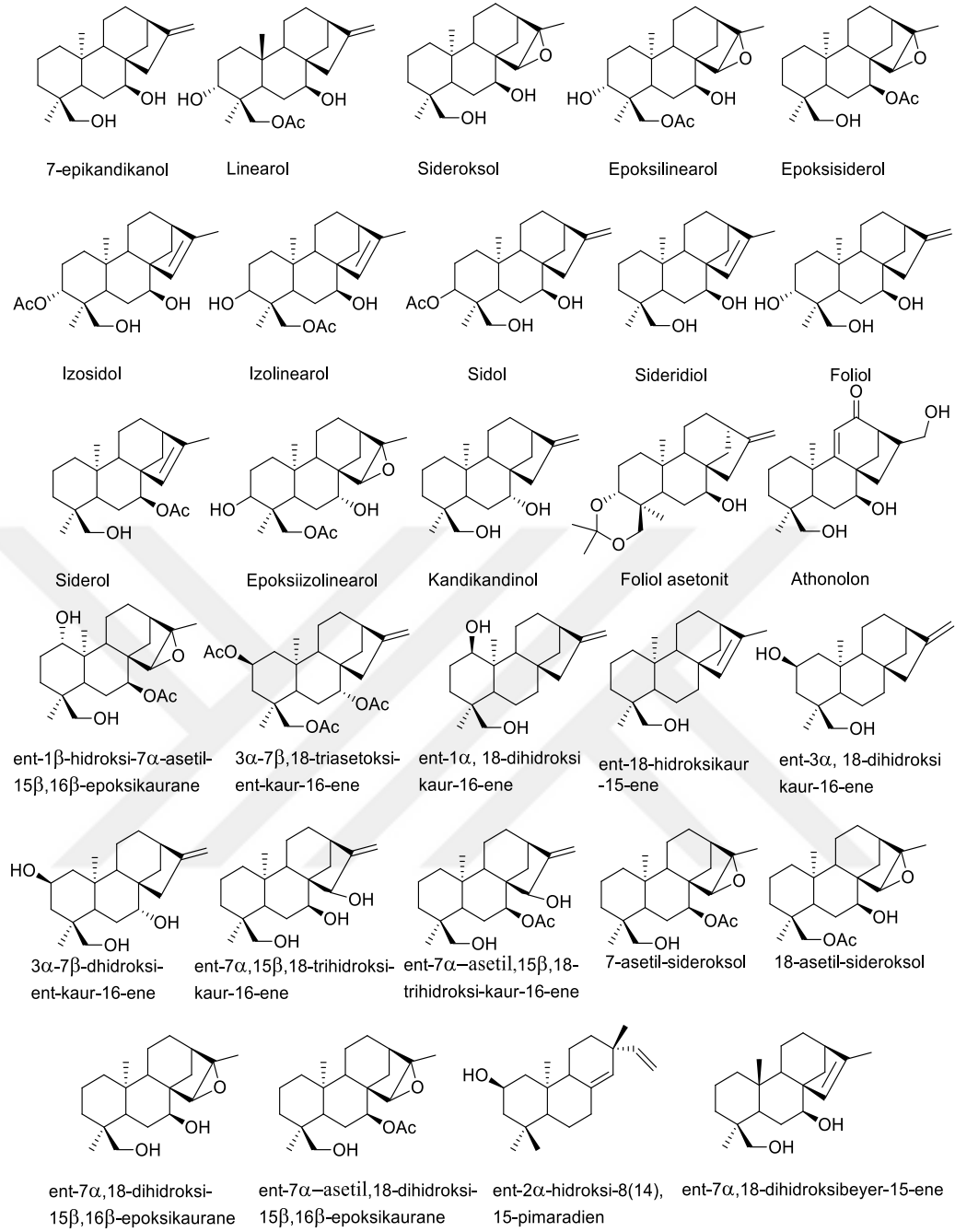
Sideritis türlerinde bulunan diterpenler; beyeren, kauren, pimarın, abiatan ve labdan olarak isimlendirilen temel iskeletlere sahiptir (Şekil 2. 2). Doğu Akdeniz bloğunda (Türkiye, Yunanistan ve İtalya) yayılış gösteren *Sideritis* türlerinde genelde kauren iskeletine sahip diterpenlere rastlanırken (Topçu vd., 1999; Fraga et al., 2003), Batı Akdeniz ve Makronezya bölgesinde yetişen türlerde değişik iskeletlere (kauren, labdan, pimarın, beyeren, atisen, rosan) sahip diterpenler de mevcuttur (Garcia granados et al., 1982; Cabrera et al., 1983).



Şekil 2. 2. *Sideritis* türlerinde yaygın bulunan diterpen iskeletleri

Türkiye'de yetişen türler üzerine yapılan çalışmalarda: *Sideritis sipylea*'dan siderol, linearol ve 7-epikandikandiol (Topçu vd., 2002; Loğoğlu vd., 2006), *Sideritis ozturkii*'den 7-epikandikandiol (Linden et al., 2006), *Sideritis stricta*'dan ent-1 β -hidroksi-7 α -asetil-15 β ,16 β -epoksikaurane, sideroksol, epoksisideroksol, 7-epikandikandiol, linearol, ent-7 α ,15 β -18-trihidroksi-kaur-16-ene, ent-7 α -asetil-15,18-

dihidroksi-kaur-16-ene, foliol, sideridiol, siderol, (Kılıç, 2006), *Sideritis leptoclada*'dan sideroksol, linearol, sidol, 7-epikandikandiol, ent-7 α ,15 β ,18-trihidroksikaur-16-ene, ent-7 α -asetoksi,15 β ,18-dihidroksikaur-16-ene, 7-asetilsideroksol, 18-asetilsideroksol (Kılıç vd., 2005), *Sideritis sipylea*'dan linearol, 7-epikandikandiol, sideridiol, siderol, izolinearol, izosidol, epoksiizolinearol (Topçu vd., 2002), *Sideritis dichotoma*'dan sideridiol, siderol, ent-7 α ,18-dihidroksi-15 β ,16 β -epoksikaurane, ent-7 α -asetoksi,18-hidroksi-15 β ,16 β -epoksikaurane, ent-7 α -asetil-15,18-dihidroksi-kaur-16-ene, ent-7 α ,15 β ,18-trihidroksikaur-16-ene, ent-7 α ,18-dihidroksibeyer-15-ene (Topçu vd., 2002), *Sideritis trojana*'dan ent-7 α -15 β ,16 β -epoksikaurane, ent-2 α -hidroksi-8(14),15-pimaradien, siderol, sideridiol, 7-epikandikandiol, izokandol B, kandol A asetat, ent-7 α -asetilkaur-15-ene (Topçu vd., 2002), *Sideritis athoa*'dan ent-1 α , 18-dihidroksikaur-16-ene, athonolon, ent-3 β -hidroksikaur-16-ene, ent-1 β , 7 α -dihidroksikaur-16-ene, 7-epikandikandiol, linearol, foliol, sidol (Topçu vd., 1999; Fraga et al., 2003), *Sideritis huber-morathii*'den sidol, linearol, 3 α ,7 β ,18-triasetoksi-ent-kaur-16-ene, ent-18-hidroksikaur-15-ene, kandikandiol, siderol, foliol asetonit, epoksisiderol (Başer vd., 1996) molekülleri izole edilmiştir. Moleküllerin kimyasal yapıları ve yaygın isimleri Şekil 2. 3'te verilmiştir. Türkiye'de yayılış gösteren *Sideritis* türlerinde genelde kauren iskeletine sahip diterpenler tespit edilmiştir. Ancak pimarane ve beyeren iskeletine sahip diterpenler de rapor edilmiştir.

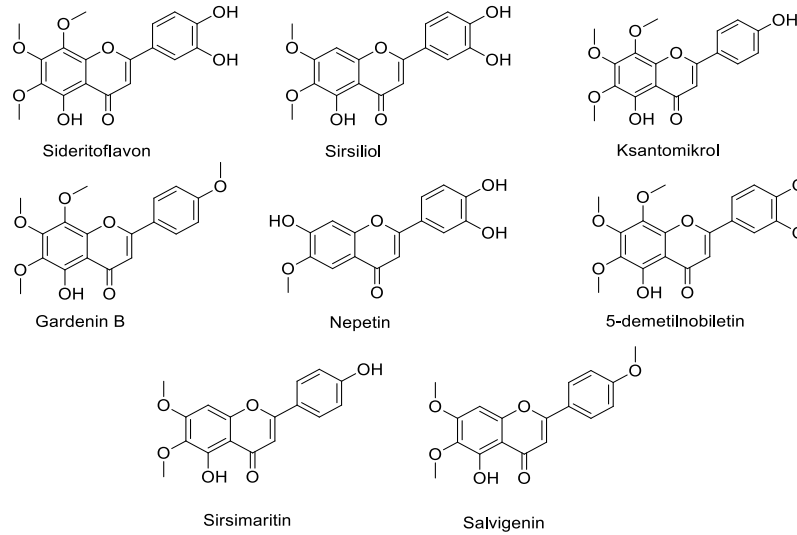


Şekil 2. 3. Türkiye orijinli *Sideritis* türlerinden izole edilen diterpenler

2.2.2. Flavon türevleri

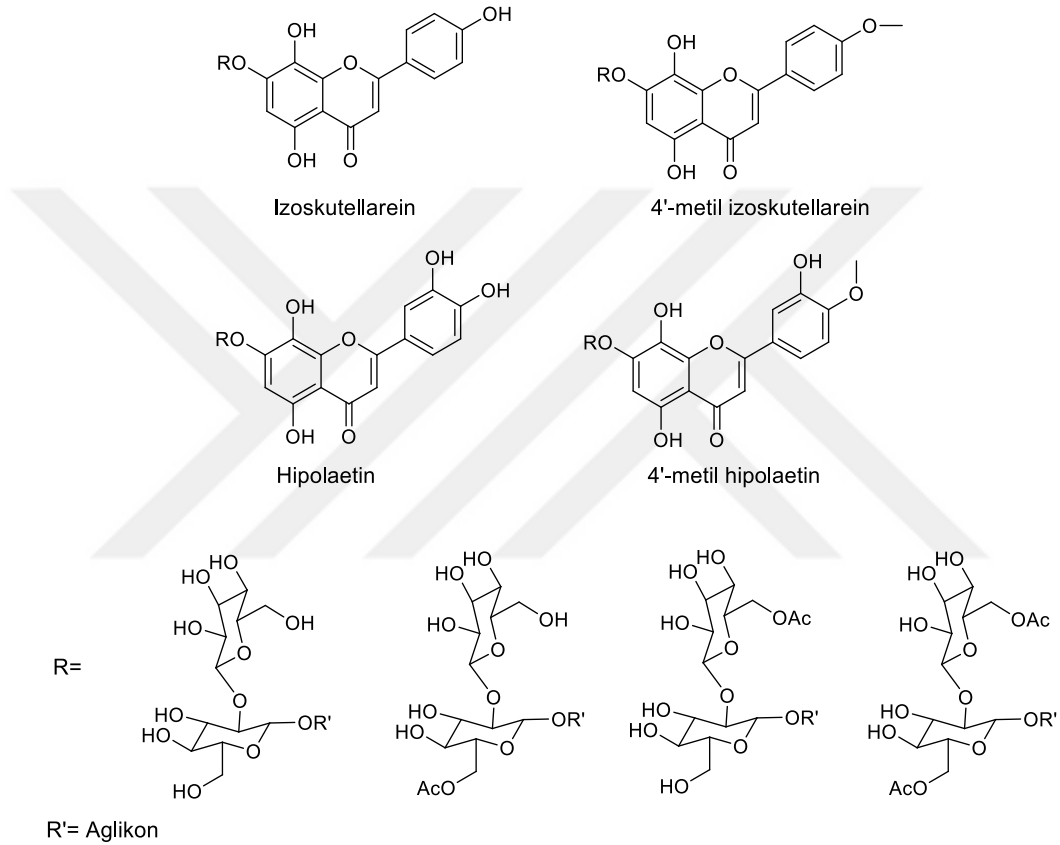
Sideritis türleri; flavon türevleri bakımından zengindir. Yapılan araştırmalarda *Sideritis* türlerinden değişik ana iskelete sahip gerek aglikon gerekse de glikozitleri halinde bulunan birçok flavon türevi izole edilip yapıları tayin edilmiştir. Genelde *Sideritis* türlerinde bulunan flavonoid türevleri; 5,7-dihidroksi flavon-7-glikozitler, 8-hidroksi flavon-7-allosilglikozitler ve *p*-kumaroil glikozitler ile flavon aglikonları olarak sınıflandırılabilir. Bu beş sınıfa ait flavonlar; izoskutellerain, hipolaetin, luteolin, apigenin ve krisoriol iskeletine sahip olabilir.

Makronezya Yarım Adaları ve İspanya'da yetişen *Sideritis* türlerinde; çoğunluğu polimetoksi flavonlar olmak üzere; desmetilnobiletin, sideritoflavon, ksantomikrol (Fernandez et al., 1988), sirsimaritin, salvigenin, nepetin ve gardenin B (Gil et al., 1993), sirsiliol (Tomasbarberan et al., 1988) gibi flavon aglikonlarının varlığı tespit edilmiştir. Bu moleküllerin bitkilerdeki miktarlarının çok olması araştırmacılar tarafından bitkilerin yarı kurak arazilere adapte olabilme çabası ile açıklanmaktadır. Moleküllerin kimyasal yapıları Şekil 2. 4'te verilmiştir.



Şekil 2. 4. *Sideritis* türlerinde bulunan bazı flavon aglikonları

Sideritis türlerinde rapor edilen flavon glikozitlerinden en yaygın olanları; izoskutellarein ve hipolaetin iskeletine sahip moleküllerdir. Genelde 7-O-allosil glikozitleri şeklinde bulunurlar. Şeker grupları; 6'' ve 6''' konumlarından biri ya da her ikisi asetil grubu taşır. Hem izoskutellarein hem de hipolaetin türevlerinin, 4' konumlarında metoksi grubu taşıdığı glikozidik moleküller de bazı türlerde tespit edilmiştir (Şekil 2. 5).



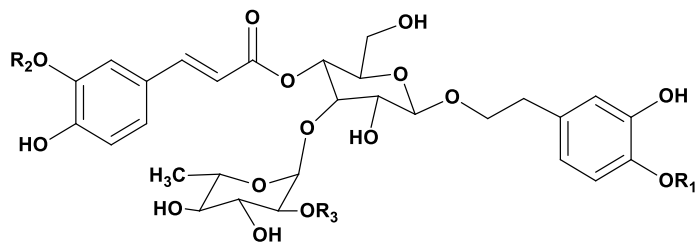
Şekil 2. 5. *Sideritis* türlerinde yaygın olarak bulunan flavon glikozitleri

Son yıllarda; LC sistemleri ile tümleşik MS, MS/MS, TOF ve bunların UV/DAD detektörleri ile kombinasyonlarını içeren cihazların yaygınlaşması; biyoaktif maddelerin (özellikle fenolikler) analizlerini oldukça kolaylaştırmıştır. Gerek internal gerekse de eksternal standartlar kullanılarak bir özütteki neredeyse tüm maddelerin hem kalitatif hem de kantitatif analizleri yapılabilmektedir. MS ve MS/MS detektörleri maddelerin kendine has kütle parçalanmalarını gösterdiğinden moleküllerin yapılarının tayininde oldukça fazla bilgi vermektedir. Her ne kadar bazı maddelerin yapılarının

aydınlatılmasında NMR spektroskopisine mutlaka ihtiyaç duyulsa da sadece MS verilerine göre maddelerin yapılarına yüksek doğrulukla karar verilebilmektedir. LC-MS ya da LC-MS/MS cihazları ile yapılan *Sideritis* türlerinin fenolik madde içeriği hakkında birçok rapor literatürde yer almaktadır (Alipieva et al., 2010; Petreska et al., 2011; Stanoeva et al., 2012).

2.2.3. Fenil etanoid türevleri

Fenil etanoid türevleri; doğal kaynaklarda bulunan, hidroksi feniletıl grubunun glikozidik bağı ile bir şekere bağlanmasıyla oluşur. Antibakteriyal, anti tümör, anti viral, antioksidan, hepatoprotektif gibi birçok biyolojik aktiviteye sahiptir (Fu et al., 2008). En yaygın bulunan feniletanoid türevi verbaskosid molekülüdür. Verbaskosid; bugüne kadar *Lamiaceae* familyasına ait *Stachys*, *Eremostachys*, *Faradaya*, *Lanium*, *Leonurus*, *Marrubium*, *Phlomis*, *Prostanthera*, *Oxera*, *Scutellaria* ve *Sideritis* türlerinden izole edilmiştir (Fu et al., 2008). Ekinakosit, lavandulifoliosit, martinosit, verbaskosid, lökoskeptosıt A gibi fenil etanoid türevlerinin; *S. lycia* (Akcoş vd., 1999), *S. raeseri* (Pljevljakusic et al., 2011), *S. scardica* (Petreska et al., 2011), *S. ozturkii* (Şahin vd., 2004), *S. perfoliata* (Ezer vd., 1992) türlerinde varlığı tespit edilmiştir.



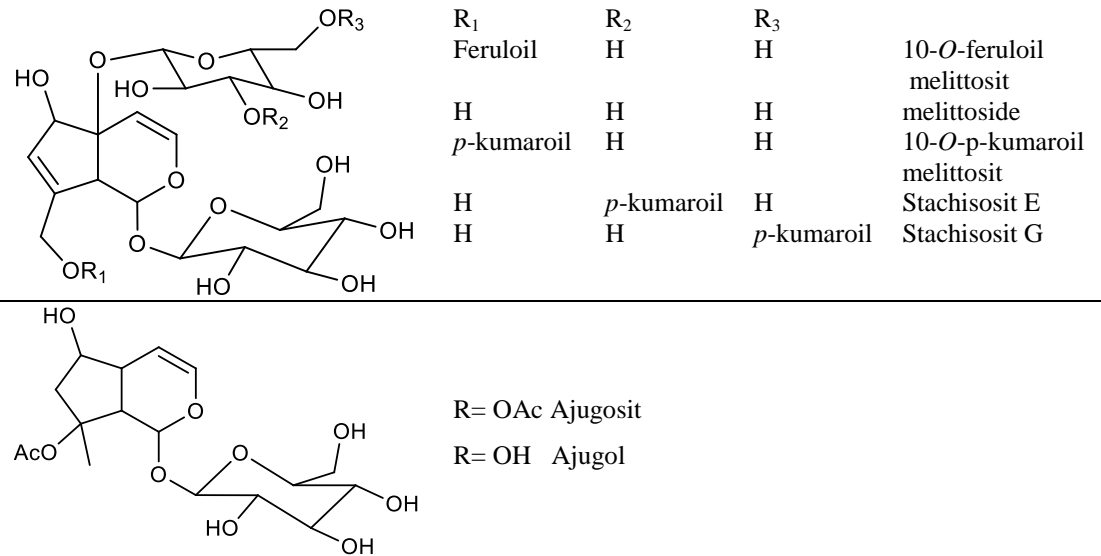
R1	R2	R3	
H	H	Arabinoz	Lavandulifoliosit
H	H	H	Verbaskosıt
-CH3	-CH3	H	Martinosit
H	-CH3	H	Lökoskeptosıt A
H	H	Glikoz	Ekinakosit

Şekil 2. 6. *Sideritis* türlerinden izole edilen fenil etanoid türevleri

2.2.4. İridoidler

İridoidler; siklopenta[c]piran tabanlı monoterpenoidlerin geniş bir sınıfını oluşturan ve yeni raporlarla halen genişlemekte olan doğal ürünlerdir. Genelde bitkilerden hazırlanan toniklerin acı tadından sorumludurlar. Anti tümör, antioksidan, antihepatoksik, antispazmodik, antialerjik vb. birçok biyolojik aktiviteye sahiptirler. İridoidler; *Apocynaceae*, *Scrophulariaceae*, *Diervillaceae*, *Lamiaceae*, *Loganiaceae* ve *Rubiaceae* gibi familyalarda yaygın olarak bulunmaktadır (Tundis et al., 2008). Doğal kaynaklarda iridoidler genelde glikozitleri halinde bulunur. Bitkiler tarafından; zararlılara ve mikroorganizmaların oluşturduğu enfeksiyonlara karşı savunma mekanizması olarak üretilir. İridoid iskeletinin yapısının ilk olarak 1959 yılında ortaya konulmasından bu yana yüzlerce türevi değişik kaynaklardan izole edilerek yapıları aydınlatılmıştır.

Sideritis türlerinde iridoidler çok yaygın olarak bulunur; *S. perfoliata* subs. *perfoliata*'dan ajugosit (Charami et al., 2008), *S. trojana*'dan 10-*O*-(*E*)-feruloil melittosit, melittosit, 10-*O*-(*E*)-*p*-kumaroil melittosit, stachisosit E ve G (Kırmızıbekmez vd., 2012), *S. italica*'dan ajugol ve ajugosid (Koleva and Handjieva, 1997) daha önce rapor edilmiştir.



Şekil 2. 7. *Sideritis* türlerinden izole edilen iridoid türevleri

2.3. *Sideritis* Türlerinin Etnofarmakolojik Özellikleri

Yetiştirildiği yöreye göre farklı isimler alan *Sideritis* türleri; farklı bölgelerde etnofarmakolojik kullanım şekli de değişiklik göstermektedir. Toros dağlarında yetişen *S. psicida* bitkisinin suda kaynatılan yaprakları arpa unu ve soğan rendesi ile lapa haline getirilerek karın bölgesindeki ağrılara yakı şeklinde uygulanır (Yeşilada vd., 1995). İç Anadolu bölgesinde *S. leptoclada*'nın yaprak ve çiçeklerinden elde edilen çay balgam söktürücü olarak kullanılır. Kazdağı civarında yetişen ve Türkmenler ile bu civarda yaşayan köylülerin sıklıkla tükettikleri ve sarıkız çayı yerel ismiyle anılan *S. trojana*; boğaz ve göğüs ağrılarına karşı kullanılmaktadır (Çelik vd., 2008). *Sideritis* türleri, aktarlarda "kış çayı" adı ile sunulan; karanfil, zencefil ve tarçın gibi bazı doğu kültürü bitkileri ile birlikte aynı pakette dağ çayı ya da adaçayı ismiyle sunulmaktadır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Bitkisel Materyal

Sideritis germanicopolitana: Tokat-Artova yolu 19. km, güney yamacı, kayalık alanlar, Lokasyon 40°07'44.3"N 36°20'37.5"E, 28 Temmuz 2015.

Sideritis perfoliata: Gümüştamla Köyü (Akseki, Antalya), İbradı (Antalya) yolu yönü çıkışı çamlık alanlar. Lokasyon 37°09'38.8"N 31°37'38.0"E, 8 Temmuz 2015.

Sideritis libanotica: Gümüştamla Köyü (Akseki, Antalya), İbradı (Antalya) yolu 8. km, Çam ormanı kenarı, kayalık alanlar, Güney yamacı, Lokasyon 37°11'15.8"N 31°40'58.7"E, 8 Temmuz 2015.

3.2. Özütleme

Polifenoller, organik asitler ve bunların glikozitleri bitkilerde bulunan yüksek polariteli sekonder metabolitlerdendir. Hem aglikon hem de glikon kısımlarında taşıdıkları hidroksi gruplarından dolayı; apolar özellikte (hekzan, etil asetat, diklorometan ve kloroform gibi) çözücülerle özütlenmesi oldukça zordur. Bitki sekonder metabolitlerinin izolasyonu ve tanımlanmasına yönelik bir çok çalışmada yaygın olarak kullanılan özütleme sistemleri şöyle sıralanabilir: Alkol (metanol ve etanol), alkol:su (metanol:su, etanol:su, değişik oranlarda), metanol:kloroform (ya da diklorometan), aseton:su ve son olarak da su (genelde kaynatarak). Bu sistemlerin her birinin kendi içinde avantajları ve dezavantajları vardır. Örneğin alkol, alkol:su ve alkol:kloroform gibi sistemlerde özüte klorofil ve sabit yağlar yüksek oranlarda geçmektedir. Alkol:su kombinasyonlarında bu

oran diğer sistemlere göre azdır. Klorofil içeren özütler su ile sıcak suda çözülüp çözünmeyen kalıntılar szldkten sonra sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi ile düşük polariteli (hekzan, kloroform ve diklorometan) zclerle uzaklaştırılabilir. Sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemlerinin; bazı yüksek polariteli maddelerin suda kalması gibi önemli bir handikabı vardır. Bu da sulu özütün yoğunlaştırılması işleminde yüksek sıcaklık gerektiren (evaporator) ve zaman alıcı (liyofilizasyon) tekniklerin kullanılmasını gerektirir. Su ile kaynatma işleminde bazı sekonder metabolitlerin bozunabildiği düşünülmektedir.

Bitkilerin polar içeriğinin özütlenmesi için metanol kullanıldı. 500 g bitki/5 L zc içinde 24 saatlik periyotlarla üç kez, oda Şartlarında tutuldu. Filtrasyon işleminde sonra çözücüler birleştirilerek kuruluğa kadar evaporatörde (50 °C'de) uzaklaştırıldı. Özütleme işleminde önce bitki örnekleri, makas ve bağ makası gibi kesici aletlerle küçük parçalara ayrıldı ve özütleme işlemi boyunca mekanik karıştırıcı (Sci Finetech, ETSDS-110) ile karıştırıldı (500-600 rpm).

Terpenler ve terpenoidler genelde apolar maddelerdir ve apolar çözücülerle özütlenmesi gerekir. Alkolik ztleme işlemleri ile de bitki örneğinden alınabilmelerine rağmen metanol/etanol kullanıldığında bitkide bulunan diğer polar bileşikler de zte geçeceğinden hedef yalnız terpenik bileşikler olduğunda aseton ve etil asetat (ve bunların hekzanla yapılabilecek kombinasyonları) uygun olacaktır. Bu çalışmada terpenik bileşikler etil asetat ile özütlendi ve ilk fraksiyonlandırma işlemi (terpenleri diğer metabolitlerden ayırma, kısmen zenginleştirme) sefadeks LH-20 üzerinden yapıldı. Hareketli faz olarak metanol kullanıldı. Çünkü sefadeks LH-20 polar bir çözücü ile Şişirilip Şartlandığında; polar bileşikleri daha fazla tutmakta apolar bileşiklerin elsyonunu hızlandırmaktadır. Nitekim çalışılan bütün apolar özütlerde terpenik bileşikler erken fraksiyonlarda ve klorofil ile beraber toplanmıştır.

3.3. Ayırma ve saflaştırma

3.3.1. Sefadeks LH-20 Üzerinden Yapılan Fraksiyonlandırmalar

Sefadeks LH-20 hem lipofilik hem de hidrofobik maddelerin fraksiyonlandırılmasında ve saflaştırılmasında kullanılabilir. Bu açıdan yağlar, streoidler, terpenler, fenolikler gibi apolardan polara değişik polaritelerdeki maddeleri içeren alkolik (etanol veya metanol) bitki özütlerinin fraksiyonlandırılmasında oldukça etkilidir. Büyük miktarlardaki özütlerin fraksiyonlandırılmasında aynı şartlarda tekrarlı çalışmalar gerekebileceğinden kolon stabilitesinin sağlanması için akış sabit hızda ve oldukça yavaş olacak şekilde mutlaka bir peristaltik pompa kullanılmalıdır. Sefadeks LH-20; uygun yıkama çözücülerini ile tekrar rejenere edilebilmesinden dolayı defalarca kullanılabilir.

Tecrübelerimize göre, klorofiller (A, B ve C) yüksek molekül ağırlıklarından dolayı sefadeks LH-20 ile kolaylıkla ve polar içerik ile girişim yapmadan özütten uzaklaştırılabilmektedir. Nitekim çalışma boyunca klorofil içeren tüm özütlerin sefadeks LH-20 üzerinden fraksiyonlandırılması işlemlerinde klorofilin erken fraksiyonlarda elüe olduğu polar içeriğinin takip eden fraksiyonlarda geldiği görülmüştür. Klorofil+polar maddeleri içeren fraksiyonlar kuruluğa kadar yoğunlaştırıldıktan sonra kloroform veya diklorometan ile yıkanması işlemi de klorofilin bu fraksiyonlardan uzaklaştırılmasını sağlamıştır.

Bu çalışmada; sefadeks LH-20 metanolik özütlerden apolar maddelerin uzaklaştırılmasında ve flavon türevlerinin fraksiyonlandırılmasında kullanıldı. Dolgu maddesi gece boyu (~ 12 saat) 4 ml/g oranında metanol ile şişirildi. Yürütücü olarak metanol peristaltik pompa (LongerPump, BT100-2J) yardımı ile 0.25 mL/dakika akış hızı ile kullanıldı. Fraksiyonlar; fraksiyon kolektörü (Foxy 2000) kullanılarak saatte bir

fraksiyon olacak şekilde toplandı. Uygulanan numune/dolgu maddesi oranı 1/20 aralığında tutuldu.

3.3.2. C18 dolgu maddesi üzerinden fraksiyonlandırma, ayırma ve saflaştırma

Ters faz (C18) dolgu maddeleri; katı silika yüzeyine kovalent olarak bağlanmış uzun zincirli alkil gruplarından oluşan dolgu maddesidir. Kullanılan alkil grubunun karbon zinciri sayısına göre C8, C16 ve C18 olarak adlandırılır. Oldukça hidrofobik özelliğe sahip olan C18, polar maddelerin ayrılmasında etkindir. Rejenere edilebilmesi, mobil faz olarak suyun kullanılabilmesi ve yüksek ayırma kapasitesi gibi üstün özelliklere sahiptir. Dolgu maddesinin lipofilik özelliğinden dolayı apolar maddelere ilgisi yüksek olduğundan apolar maddelerin ayrılmasında kullanışlı değildir. Ancak polar maddelerin ayrılmasında iyi bir mobil faz programı ile yüksek ayırma kapasitesine sahiptir. Ancak polariteleri birbirine yakın maddelerin ayrılmasında yetersiz kalabilmektedir.

Bu çalışmada C18 (Fluka, C18, 60757-250G); uygulanan madde miktarına bağlı olarak değişik miktarlarda elle doldurularak Flash kromatografi cihazına (CombiFlash, 206L2056) bağlanan XK26/70 (Pharmacia) kolon kullanıldı. Mobil faz olarak; su (% 2-5 formik asitli) ve metanol kullanıldı. Fraksiyonlar zaman ayarlı (15 dakikada bir fraksiyon olacak şekilde) fraksiyon toplayıcı ile toplandı. Mobil faz evaporatör ile uzaklaştırıldıktan sonra fraksiyonlar metanol ya da metanol:formik asit (20:1) ile çözülerek uygun kaplara aktarıldı. Tekrarlı çalışmalarda; toplanan fraksiyonlar TLC ile kontrol edilerek birleştirildi.

3.3.3. Silika jel üzerinden saflaştırma

Oldukça polar özelliğe sahip olan silika jel polar maddelerin kolonda daha fazla tutulmasını sağladığından apolar ya da orta polariteye sahip maddelerin saflaştırılması için uygundur. Rejenerasyonu neredeyse imkânsız olan silika jel bitki özütlerinin saflaştırılması ve fraksiyonlandırılmasında genelde tek kullanımlıktır. Polarite artışı ile yapılan çalışmalarda her bir polaritede farklı maddelerin elüsyonu sağlandığından genelde çok karışık özütlerin fraksiyonlandırılmasında kullanışlıdır. Yüksek polar özelliğinden dolayı çok yüksek polariteye sahip maddeleri tutması dezavantajlarından biridir. Ancak uygun polarite, uygun dolgu maddesi ve özüt miktarları ile güzel sonuçlar vermektedir.

Bu çalışmada silika jel (Merck, Kiesegel 60, 70-230 Mesh); sefadeks LH-20 ve C18 dolgu maddeleri üzerinden yapılan kolonlardan birlikte elüe olan ve TLC profiline göre iyi ayırım gözlenen fraksiyonların saflaştırılmasında kullanıldı. Çalışma boyunca uygulanan silika jel kolonlar, en iyi yürüme ve ayırma gözlenen polaritede şartlandırıldı. Tek bir çözücü sistemi ve oldukça yavaş akış hızı ile gerçekleştirildi. Kolon işlemleri; dolgu maddesi miktarı ve madde miktarına bağlı olarak değişik ebatlarda cam kolonlarda yapıldı. Çalışma boyunca kullanılan bu üç dolgu maddesinin en büyük handikabı ayrılacak maddelerin başlangıç polaritesinde çözülmemesi ihtimalidir. Başlangıç polaritesinden daha yüksek polarite ile özütün çözülmesi; hızlı bir sürüklenmeye neden olacağından ayırımın kalitesini düşürmekte hatta bazen ayırımı mümkün kılmamaktadır. Örneğin, sefadeks LH-20 uygulamasında; özütün metanol ile çözünmemesi ya da C18 uygulamasında su veya yüksek oranda su içeren metanol ya da asetonitril karışımları ile çözülmemesi durumu gibi. Bu gibi durumlarda C18 ve silika jel uygulamalarında sürüklenme etkisi çok olmayan, az miktarda DMSO ile birlikte formik ya da asetik asit başlangıç polaritelerine ilave edildi. Sefadeks LH-20 uygulamalarında ise kolon da aynı orandaki karışımla şartlandırılması koşulu ile %1-3 oranında formik asit kullanıldı.

3.3.4. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) Uygulamaları

Kolon uygulamalarından alınan fraksiyonların işlenmesinde, saflaştırılan maddelerin saflık kontrollerinde ticari olarak mevcut İTK tabakaları (Merck, Kiesegel 60 F₂₅₄, 1.0554.001) kullanıldı. Hareketli faz olarak; ön denemelerle belirlenmiş olan polar içerik için 7:2:1.5 (Etil asetat, Asit karışımı: metanol) sistemi, apolar içerik içinse 6:4 ve 7:3 (hekzan:etil asetat) sistemleri kullanıldı (Anılan asit karışımı: 250 mL için; 11 mL formik asit+10 mL asetik asit+26 mL su+203 mL etil asetat). Kullanılan asit karışımı özellikle de polar maddelerin silika jel etkileşimini azaltarak İTK analizinde güzel bir ayırım sağladı. İTK uygulamalarında görüntüleme işlemi UV lambası (254 ve 360 nm), belirteç olarak derişik sülfürik asit kullanıldı. İTK görselleri, elektronik ortama CamScanner (Google PlayStore'da mevcut) programı ile aktarıldı.

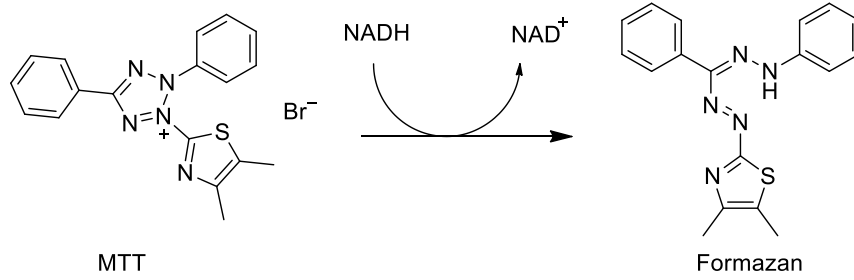
3.4. Antiproliferatif Aktivite Çalışmaları

3.4.1. Hücre hatları ve hücre kültürü

Çalışma kapsamında bitki özütlerinin ve izole edilen moleküllerin antiproliferatif aktivitelerinin belirlenmesinde HeLa (İnsan servikal kanser hücresi), A549 (İnsan akciğer kanser hücresi) ve Hep3B (İnsan karaciğer kanser hücresi) kanser hücre hatları ile FL (İnsan amniyon hücresi) hücre hattı kullanılmıştır. Tüm hücre hazırlama işlemleri laminar kabinde steril ortamda gerçekleştirilmiştir. Hücreler %10 FBS (Fetal Bovin Serum) ve %2 PenStrep (Penisilin-Streptomisin) solüsyonu içeren katkılı DMEM besi yerinde 37 °C, %5 CO₂ şartlarında yeterli çoğunluğa (konfluent) ulaşması sağlandıktan sonra kullanılmıştır. Ölçüm plakalarına kuyu başı 10.000 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Yaklaşık 16 saatlik ön inkübasyondan sonra, test molekülleri eklenerek 24 saatlik inkübasyon sonrasında ölçümler gerçekleştirilmiştir.

3.4.2. MTT Testi

MTT, [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid] tetrazolyum indirgeme testi 96-kuyucuk formatında yapılan deneylerde hücre canlılığını ölçmek için geliştirilmiş ve validasyonu yapılmış bir testtir. Bu test akademik camia tarafından benimsenmiş ve bu yöntemin kullanıldığı binlerce makale yayınlanmıştır. MTT substratı fizyolojik dengede bir çözelti içinde hazırlanarak son derişim 0.2-0.5 mg/ml olacak şekilde hücre kültürüne eklenerek en az 4 saat inkübe edilir. Canlı hücre sayısıyla doğru orantılı olarak ortamda oluşan formazan miktarındaki değişim 570 nm'deki absorbansı ölçülerek belirlenir. Canlı hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri sonucu MTT molekülü 570 nm'de maksimum absorbansa sahip mor renkli formazan ürünlerine dönüşür. Hücreler öldüğü zaman MTT'yi formazana dönüştürme yeteneğini kaybettiklerinden mor rengin oluşumu sadece canlı hücreler için bir belirteç olarak kullanılır. MTT'nin tam hücre sel mekanizması tam olarak anlaşılmamış olsa da NADH veya benzer indirgeyici moleküllerden mitokondriyal dehidrojenazlar tarafından MTT'ye elektron transferi ile gerçekleştiği düşünülmektedir (Şekil 3. 1).



Şekil 3. 1. MTT ve renkli formazan ürününün kimyasal yapıları

Oluşan formazan ürünü hücrelerde ve kültür ortamında çözünmeyen mor renkli bir kristal oluşturur. Absorbans ölçümünden hemen önce formazan ürününün çözülmesi gerekmektedir. Mor kristalin çözülmesi, rengin stabilize edilmesi, evaporasyonun azaltılması ve kültür ortamının girişimlerinin engellenmesi için asidik izopropanol, DMF, SDS gibi çözücüler kullanılmaktadır (Riss et al., 2016).

Bu çalışmada, bitki özütlerinin, izole edilen fenolik maddelerin ve terpenoidlerin hücre proliferasyonuna etkisi ve NCI-60 yaşam parametre değerlerini ölçmek amacıyla MTT testi kullanılmıştır. Özüt ve saf maddelerle kullanılan hücre hatları 24 saat inkübe edildikten sonra MTT test protokolü uygulanmıştır. Çözücü (DMSO) ile inkübe edilen hücrelerin absorbansları % 100 olarak kabul edilerek sonuçlar % inhibisyon= $[1-(A_{\text{test maddesi}}/A_{\text{kontrol}})\times 100]$ formülü ile % hücre inhibisyonu olarak hesaplanmıştır. Test maddelerinin IC₅₀ değerlerinin belirlenmesi için her bir test maddesinin ve pozitif kontrollerin 1.96, 3.91, 7.81, 15.62, 31.25, 62.5, 125 ve 250 µM derişimleri hazırlanarak hücre kültürü içeren kuyucuklara eklenerek üreticinin önerdiği test basamakları uygulandıktan sonra logaritmik fonksiyon kullanılarak doz-respons eğrileri çizilmiştir. Pozitif kontrol olarak *cis*-platin ve 5-Florourasil kullanılmıştır.

3.4.3. BrDU hücre eliza testi

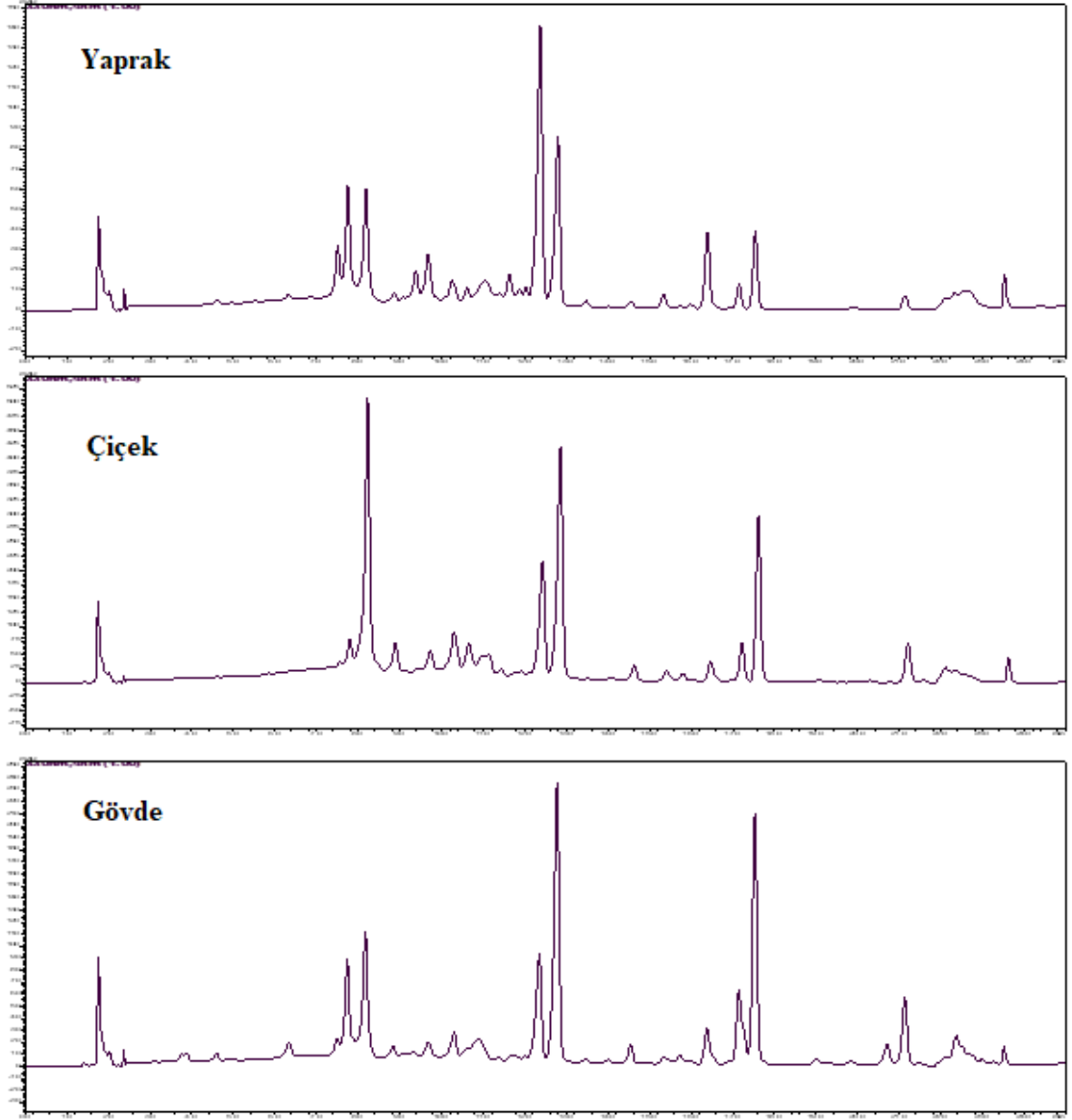
Çalışma kapsamında izole edilen bazı fenolik ve terpenoidlerin antiproliferatif aktivitelerinin belirlenmesinde HT29 (İnsan kolon kanser hücresi), A549 (İnsan akciğer kanser hücresi) ve Hep3B (İnsan karaciğer kanser hücresi) hücre hatları kullanıldı. Tüm hücre hazırlama işlemleri laminar kabinde steril ortamda gerçekleştirildi. Hücreler % 10 FBS (Fetal Bovin Serum) ve % 2 PenStrep (Penisilin-Streptomisin) solüsyonu içeren katkılı DMEM (Sigma, Germany) besi yerinde 37 °C, % 5 CO₂ şartlarında yeterli çoğunluğa (konfluent) ulaşması sağlandıktan sonra kullanıldı. Ölçüm plakalarına kuyu başı 10.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 16 saatlik ön inkübasyondan sonra, test maddeleri eklenerek 24 saatlik inkübasyon sonrasında ölçümler gerçekleştirildi. İzole edilen bazı moleküllerin hücre proliferasyonuna olan etkilerini ve NCI-60 yaşam parametre değerlerini ölçmek amacıyla ELISA BrDU testi kullanıldı. Test maddeleri ile kanser hücre hatları 24 saat inkübe edildikten sonra bu test protokolü uygulandı. ELISA BrdU testi genomik DNA çoğalmasına duyarlı olup, hücre çoğalması hakkında fikir veren bir testtir. Test maddeleri ile inkübasyonun sonunda ortama bir primidin analogu olan BrdU (5-bromourasil) eklenir ve 4 saat inkübe edilerek, DNA polimerazın BrdU'yu DNA'nın yapısına eklemesi beklenir. Sonra ortama DNA yapısına eklenen bu

BrdU'yu tanıyan ve üzerinde peroksidaz enzimi taşıyan Anti-BrdU antikoru eklenir. Antikora bağı enzim, ortama eklenen substratı 450-650 nm dalga boyunda maksimum pik veren bir ürüne çevirir. Spektrofotometrede kolorimetrik olarak bu pik değerinde absorbans ölçümü yapılarak % inhibisyon değerleri hesaplandı. Sonuçlar % hücre inhibisyonu olarak rapor edilerek, çözücü (DMSO) ile muamele edilmiş hücrelerin absorbansı % 100 olarak kabul edildi. Buna göre % inhibisyon $[1 - (A_{\text{test maddesi}} / A_{\text{çözücü kontrol}})] \times 100$ formülüne göre hesaplandı. Test maddelerinin IC₅₀ konsantrasyonlarının (ortamdaki hücrelerin %50'sinin proliferasyonunu inhibe eden konsantrasyon) belirlenmesi için her bir test maddesinin belirli bir aralıkta artan konsantrasyonlarının (1.96, 3.91, 7.81, 15.62, 31.25, 62.5, 125 ve 250 µM) hücreler üzerinde ELISA BrdU yöntemiyle test edilmesi sonrasında elde edilen absorbans değerlerinden hazırlanan eğri üzerinden Excel programı yardımıyla logaritmik fonksiyon kullanılarak analiz edildi.

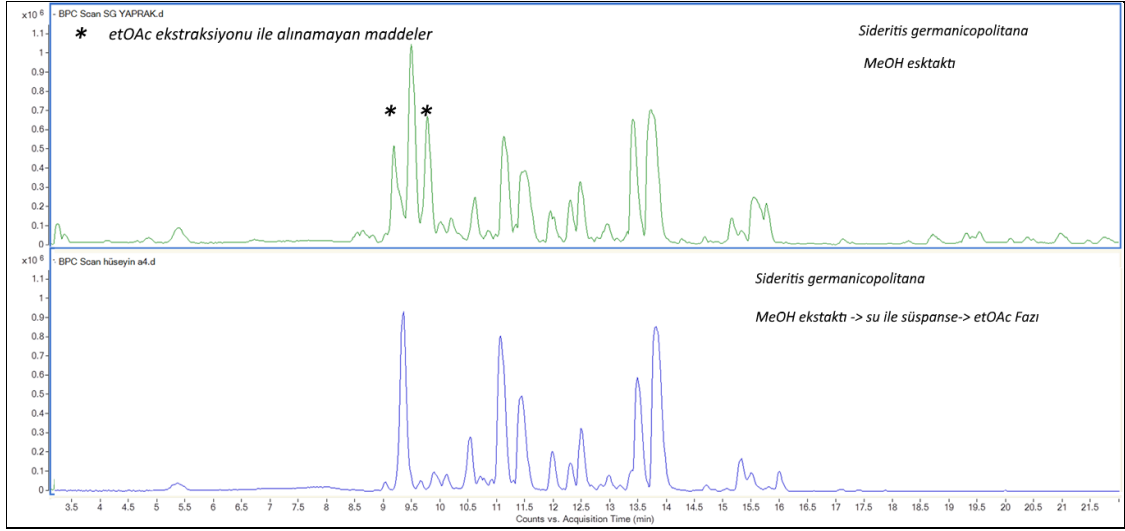
4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. *Sideritis germanicopolitana* Bitkisinden Fenolik Maddelerin Saflaştırılması

Şekil 4. 1'de verilen 340 nm'de kaydedilen HPLC kromatogramları incelendiğinde bitkinin bütün organların genelde aynı maddeleri, farklı miktarlarda içerdiği görülmektedir. Yapılan ön denemelerde *Sideritis germanicopolitana* bitkisinin metanol özütü ile bu özütün su ile çözüldükten sonra edildikten sonra etil asetat ile partitasyonu yöntemlerinin LC-TOF kromatogramları (Şekil 4. 2) incelendiğinde nispeten yüksek polariteye sahip iki majör bileşenin suda kaldığı görülmüştür. Bileşenlerin tamamını içeren özütten yola çıkılması için ayırma ve saflaştırma işlemlerine metanol özütünden başlandı. Su ile süspanse etme esnasında klorofilin büyük kısmı çözünmediği için filtrasyonla uzaklaştırılabilmektedir. Bu da ayırma işlemlerinde bir avantaj olarak görülebilir. Ancak ana bileşenlerin etil asetata çekilememesinden dolayı bu avantaj göz ardı edildi.

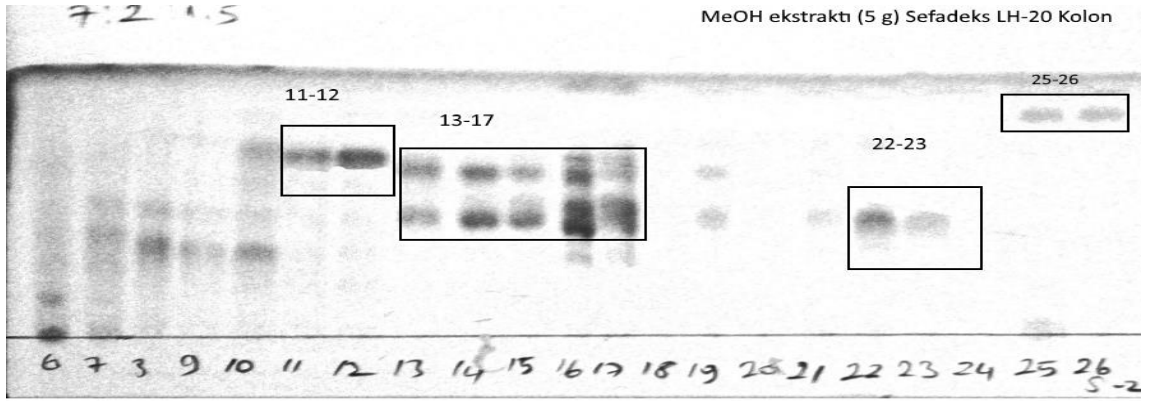


Şekil 4. 1. *S. germanicopolitana* bitkisinin farklı organlarının HPLC kromatogramları



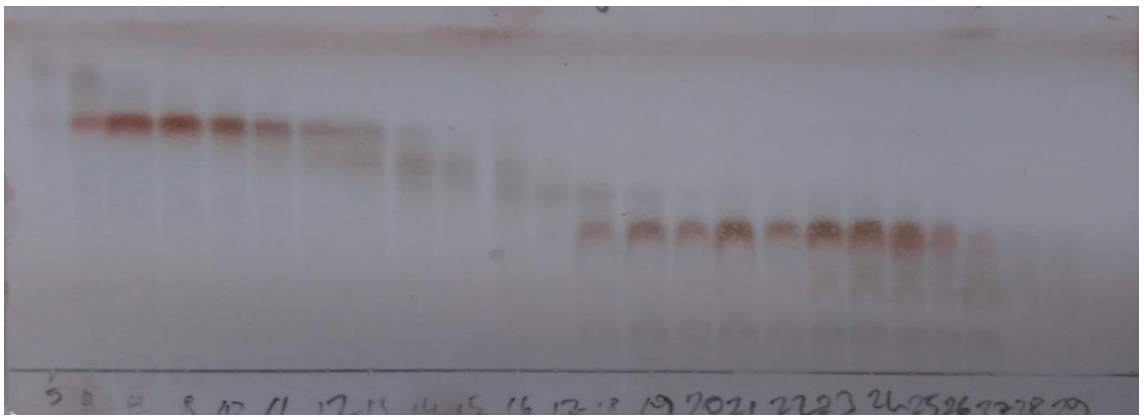
Şekil 4. 2. İki farklı metotla alınan özütlerinin LC-TOF kromatogramları

Bitkinin içerdiği fenolik bileşenlerin saflaştırılması ve karakterizasyonu amacıyla toprak üstü kısmı (600 g) öğütüldükten sonra 3 L metanolde 12 saatlik periyotlarda özütlendi. Çözücü uzaklaştırıldıktan sonra koyu yeşil renkli yarı akışkan özellikte 60 g özüt elde edildi. Özütten 30 g'lık kısmı 60 mL metanolde çözülerek her seferinde 10 mL'si alınarak sefadeks LH-20 üzerinden fraksiyonlandırıldı. Fraksiyonlandırma işlemi yukarıdaki şartlarda 6 defa tekrarlandı. Metanol ekstraktından 5 gr alınarak Sefadeks LH-20 üzerinden fraksiyonlandırıldı. Hareketli faz olarak; metanol, peristaltik pompa yardımı ile 0,25 mL/dakika akış hızında sabit tutularak kullanıldı. 150 g dolgu maddesi ile doldurulan 3.5x80 cm boyutlarında cam kolon ile yapılan ayırma işleminde; her saatte bir fraksiyon alınacak şekilde fraksiyon toplayıcısı ile toplam 26 fraksiyon alındı. İTK uygulaması ile benzer fraksiyonlar birleştirildi. A'dan E'ye kadar 5 ana grup elde edildi: 8-10 (A, 480 mg), 11-12 (B, 530 mg), 13-17 (C, 5.17 g), 22-23 (D, 130 mg), 25-26 (E, 50 mg). Bu çalışmaya ait TLC görüntüsü aşağıda verilmiştir. B'den **M1**, D'den **M2** ve E'den **M3** saf olarak elde edildi. Son saflaştırma işlemleri Sefadeks LH-20 (20 g dolgu maddesi, 1x25 cm, mobil faz 3:1 oranında MeOH:CHCl₃) üzerinden yapıldı.



Şekil 4. 3. Sefadex LH-20 kolon İTK görseli

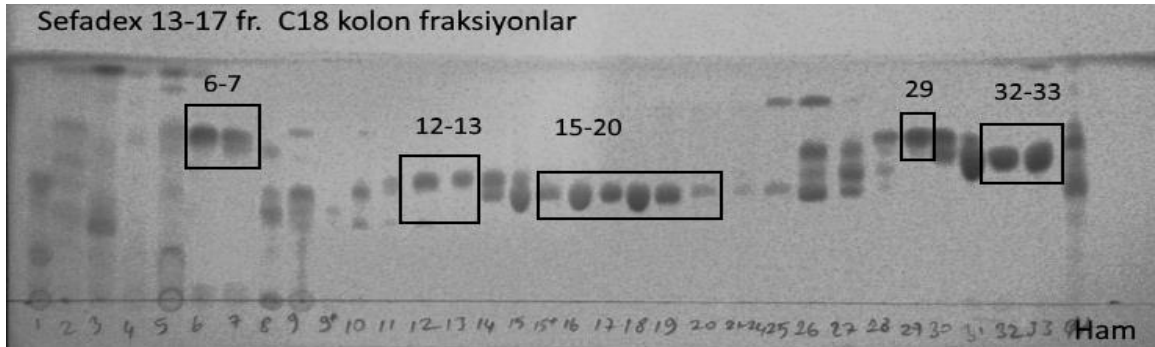
8-10 (A) aralığında sülfürik asit belirteci ile turuncu renk veren ve bekledikçe mora yakın renk alan iki ana spot gözlemlendi. Bu aralık için yapılan denemelerde sefadex LH-20 ve C18 dolgulu kolonlarda başarı sağlanmadığından silika jel dolgu maddeli kolon ile ayırım gerçekleştirildi. Kolon şartları şu şekildedir: Kolon boyutu: 3.5x60 cm (dolgu maddesi yüksekliği 45 cm), dolgu maddesi: Silika jel (300 g), hareketli faz: Etil asetat:metanol:asetik asit karışımı (7:2:1.5), fraksiyon toplama: manuel (1 fraksiyon/20 dakika), fraksiyon hacmi: ~12 mL, fraksiyon sayısı: 29. Dolgu maddesi, mobil faz ile bulamaç haline getirilerek kolona uygulandı ve 300 mL mobil faz ile şartlandırıldı. Kolon boyunca mobil fazın polaritesi sabit tutuldu. Kolondan elde edilen fraksiyonların İTK görseli Şekil 4. 5'te verilmiştir.



Şekil 4. 5. A aralığı silika jel kolon uygulaması İTK görseli

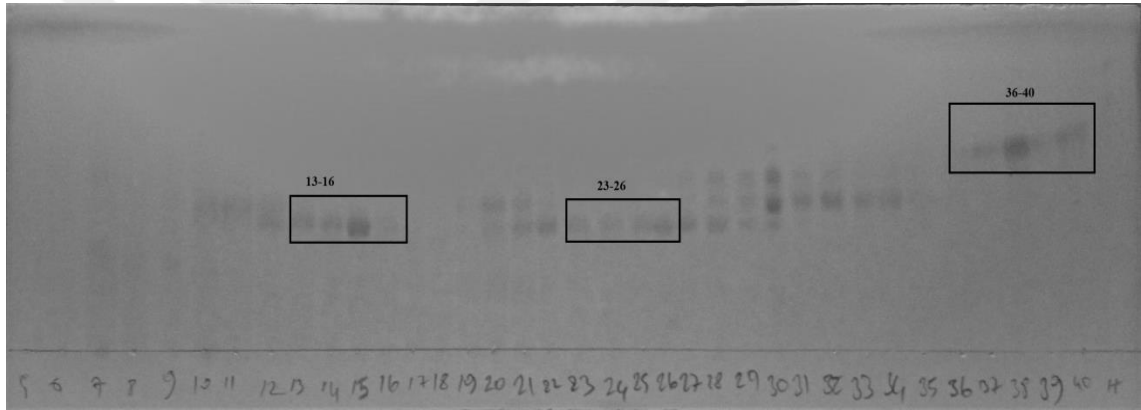
İTK profiline göre, 8-11 (A1, 18 mg) ve 18-22 (A2, 32 mg) fraksiyon aralıkları birleştirildi. A1 **M1**'i, A2 ise **M9**'u verdi. Yapılan spektral ve kromatografik analizlerden sonra A1 ve B birleştirildi. Her iki maddenin metanolde çözünürlüğü az olduğundan (ısıtma veya ultrasonik banyo olmadan) maddelerin ekstra saflaştırma işlemi metanol ile yıkanarak yapıldı.

13-17 (C) aralığı, 150 g C18 dolgu maddesi kullanılarak manüel olarak doldurulan 2.6x50 cm kolon üzerinden Flash kromatografi kullanılarak fraksiyonlandırıldı. Hareketli faz olarak metanol (A) ve %5 formik asitli su (B) karışımı 10 mL/dakika akış hızı ile kullanıldı. Uygulanan hareketli faz programı şu şekildedir: 15 (A):85 (B) 15 dakika, 20 (A):80 (B) 15 dakika, 25 (A):75 (B) 15 dakika, 30 (A):70 (B) 15 dakika, 35 (A):65 (B) 15 dakika, 40 (A):60 (B) 300 dakika, 55 (A):45 (B) 30 dakika, 50 (A):50 (B) 30 dakika, 100 (A):0 (B) 15 dakika (yıkama basamağı). Toplamda; 15 dakikada bir olacak şekilde 33 fraksiyon toplandı. TLC kontrolü ile benzer fraksiyonlar birleştirildi. C1'den C6'ya 6 grup elde edildi. 6-7 (C1, 60 mg), 12-13 (C2, 140 mg), 15-20 (C3, 330 mg), 21-28 (C4, 180 mg) 29 (C5, 68 mg), 32-33 (C6, 250 mg) saf olarak ayrıldı. Bu uygulamaya ait TLC görüntüsü aşağıda verilmiştir. C1'den **M1**, C2'den **M3**, C3'ten **M4**, C5'ten **M5** ve C6'dan **M6** elde edildi. Bu uygulamadan elde edilen maddeler yüksek saflıkta izole edildiğinden herhangi bir ekstra saflaştırma işlemine gerek görülmedi.



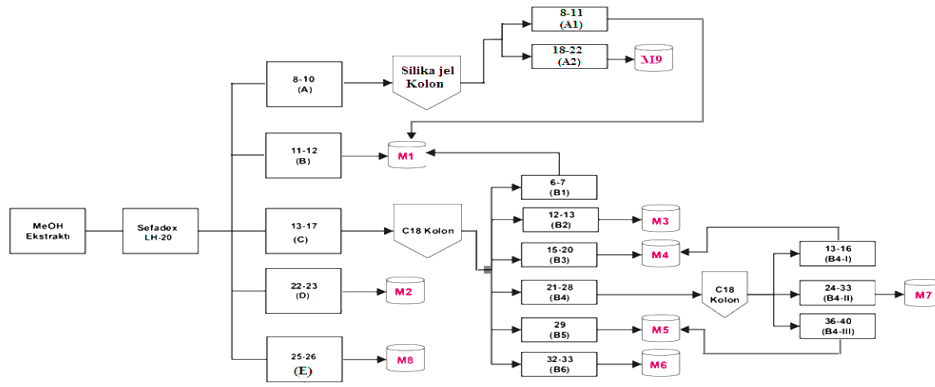
Şekil 4. 4. C aralığı C18 kolon uygulaması İTK görseli

C4 (21-28) aralığı C18 dolgu maddeli kolon ile fraksiyonlandırıldı. Uygulamada Flash kromatografiye entegre edilen 40 gr dolgu maddesi içeren Redisep kolon kullanıldı. Mobil faz olarak % 5 formik asitli su (A) ve metanol (B) 5 ml/dakika akış hızı ile kullanıldı. Mobil faz programı 65 (A):35 (B) sistemi ile 180 dakika izokratik elüsyon şeklinde uygulandı. Fraksiyonlar her 5 dakikada bir olmak üzere 25 mL hacimlerinde 36 fraksiyon toplandı. C4-1'den C4-3'e 3 alt grup elde edildi. 13-16 (C4-1, 12 mg), 23-26 (C4-2, 28 mg) ve 36-40 (C4-2, 12 mg) aralıkları İTK profiline göre birleştirildi. C4-1'den **M4**, C4-2'den **M7** ve C4-3'ten **M5** saf olarak elde edildi. C4-2 aralığı birleştirilip yoğunlaştırılıp oda sıcaklığında bekletildiğinde cam çeperine yapışık sarı renkli topların oluşumu gözlemlendi. Bu toplar metanol ile yıkandıktan sonra cam çeperinden koparılıp alındı. İşlem sonucunda **M7** yüksek saflıkta elde edildi.

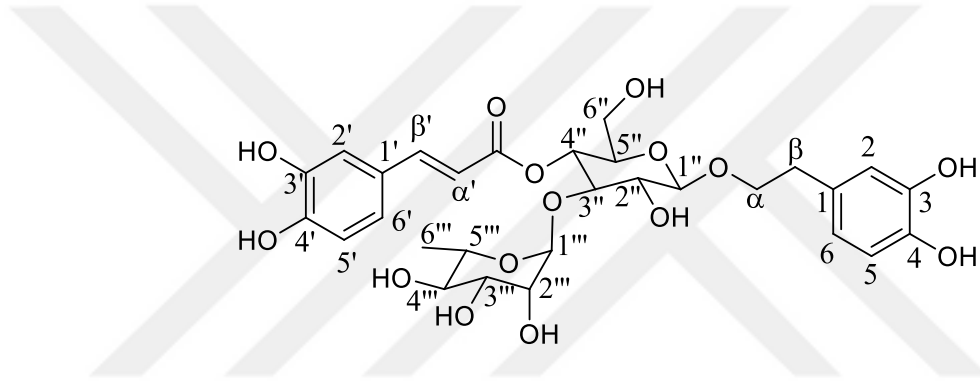


Şekil 4. 5. C4 aralığı C18 kolon uygulaması İTK görseli

Sideritis germanicopolitana bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen metanol özütünden **M1**'den **M9**'a 9 fenolik madde izole edildi. İzolasyon prosesini özetleyen şema aşağıda verilmiştir.



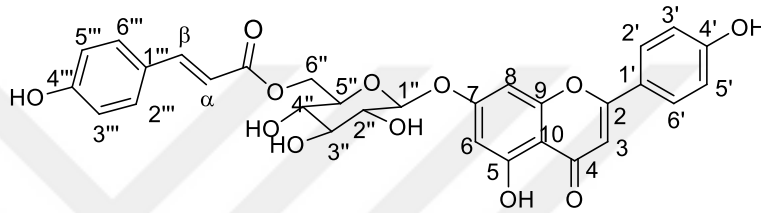
Şekil 4. 6. *S. germanicopolitana* bitkisinden fenoliklerin ayırma ve saflaştırma prosesi



Şekil 4. 7. **M1** (Verbaskosid) molekülünün kimyasal yapısı

Verbaskosid (M1): Bileşik sarı renkli amorf katı olarak izole edildi. λ_{\max} 330 nm (metanol içinde). Bileşiğin molekül formülü LC-TOF/MS cihazında gözlenen m/z $[M-H]^-$ 623.1928 ($C_{29}H_{35}O_{15}$ için hesaplanan 623.1974) sinyalinden yola çıkarak $C_{29}H_{36}O_{15}$ olarak belirlendi. 1H -NMR spektrumunda: iki farklı ABX sistemi: 3,4-dihidroksi- β -feniletoksil grubu için $[\delta$ 6.61 (brs), 6.63 (brd, 6.61 ile çakışık) ve 6.48 (d, $J=8.0$ Hz)]; kafeoil grubu için 7.01 (brs), 6.74 (d, $J=7.9$ Hz) ve 6.95 (d, $J=7.9$ Hz), iki trans olefinik proton $[\delta$ 7.44 (d, $J=15.8$ Hz) ve δ 6.18 (d, $J=15.8$ Hz)] sinyallerinin yanında iki anomerik proton β -glukoz için δ 4.33 (d, $J=7.7$ Hz) ve α -ramnoz için δ 5.01 (brs) sinyalleri gözlemlendi. Asidik ortamda molekülün hidrolizinden sonra türevlendirilerek yapılan GC-MS analizi glukoz ve ramnoz grubunu doğruladı. Hidroliz ve türevlendirme işlemleri için detaylı deneysel prosedür EK-1a'da verilmiştir. ^{13}C , COSY, HSQC ve HMBC spektrumları incelenerek; 3,4-dihidroksi- β -feniletoksil grubunun glukozu C-1'' pozisyonundan, trans-kafeoil grubunun C-4'' pozisyonundan, ramnoz grubunun C-3''

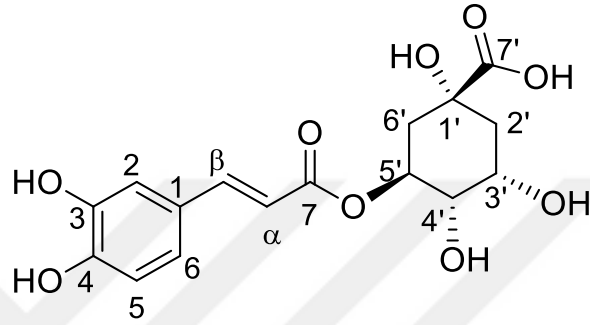
pozisyonundan bağılı olduğu belirlendi. HMBC spektrumunda görülen H-1'' (δ 4.33) ve CH₂- α (δ 70.7) etkileşimi feniletoksi grubunun C-1'' pozisyonundan, H-4'' (δ 4.69) ve karbonil karbonu (δ 166.2) etkileşimi kafeoil grubunun C-4'' pozisyonundan, H-1''' (δ 5.01) ve C-3'' (δ 79.6) etkileşimi ise ramnoz grubunun C-3'' pozisyonundan glukoz grubuna bağılı olduğunu gösterdi. Molekülün yapısı 3,4-dihidroksi- β -feniletoksi-*O*-(1 \rightarrow 2)- α -ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)-4-*O*-kafeoil- β -glukopiranozit (verbaskosid) olarak aydınlatıldı. Detaylı NMR verileri Çizelge 4.2'de, spektrumlar Ek-2'de verilmiştir.



Şekil 4. 8. **M2** (Apigenin-7-*O*-(6''-*O*-*p*-kumaroil)- β -D-glukopiranosid) molekülünün kimyasal yapısı

Apigenin-7-*O*-(6''-*O*-*p*-kumaroil)- β -D-glukopiranosid (M2): Bileşik kirlili beyaz renkte amorf katı olarak izole edildi. λ_{\max} (metanol içinde) 319, 270 nm olarak ölçüldü. C₃₀H₂₆O₁₂ kapalı formülüne uygun olarak m/z [M-H]⁻ 577.1293 moleküler iyon piki gözlemlendi (C₃₀H₂₅O₁₂ için 577.1346 olarak hesaplandı). Simetrik karbonların varlığından dolayı 26 karbon sinyali gözlemlendi. DEPT spektrumuna göre molekülde bir CH₂, on dört CH ve on bir kuarterner karbon bulunmaktadır. ¹H ve COSY spektrumlarının incelenmesinden sonra; iki AB sistemi gözlemlendi; Apigenin iskeletinin B halkası için [7.91 d(8.0 Hz) ve 6.89 d(8.0 Hz)] ve trans-*p*-kumaroil grubu için [7.34 d(7.7 Hz) ve 6.65 d(7.7 Hz)]. İki trans olefinik protonun [7.45 d(15.7 Hz) ve 6.28 d (15.7 Hz)] ve bir anomerik protonun [5.14 d(7.3 Hz)] bulunmasından dolayı molekülde 5,7,4'-trisubstitüe flavon iskeleti, trans-*p*-kumaroil grubu ve β -glukopiranoz gruplarının varlığına karar verildi. β -glukopiranoz grubunun C-7 pozisyonundan flavon iskeletine bağılı olduğu C-7 (δ_C 163.11) ve H-1'' (δ_H 5.14) arasındaki HMBC etkileşimi ile doğrulandı. Kaydedilen HMBC spektrumunun düşük rezölüsyonundan dolayı trans-*p*-kumaroil grubunun C-6'' pozisyonundan bağılandığını gösteren H-6''/C-9''' etkileşimi gözlenememiştir. Ancak H-2'' protonunun yukarı alana kayması ve C-6'' hidroksimetil sinyalinin aşağı alana

kayması *trans-p*-kumaroil grubunun C-6'' konumunda olduğunu gösterir (Jiao et al., 2006). δ_H 6.45, 6.79 ve 6.80 sinyalleri sırasıyla H-6, H8 ve H3'e aittir. İlk bakışta δ_H 6.79 ve 6.80'de görülen sinyallerin 7.9 Hz'lik bir dublet şeklinde görülmesine rağmen COSY ve HSQC spektrumlarının beraber incelenmesinden sonra bu sinyalin iki ayrı singlet olduğuna karar verildi. δ_H 8.26'da formik asit sinyali de gözlenmiştir. Moleküle ait NMR spektrumlar Ek-3'te sunulmuştur.

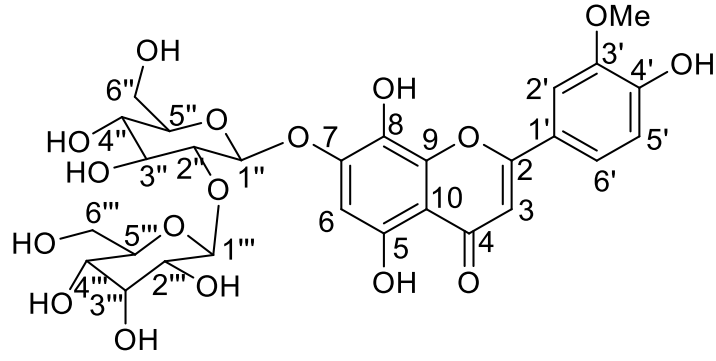


Şekil 4. 9. **M3** (Klorojenik asit) molekülünün kimyasal yapısı

Klorojenik Asit (M3): Bileşik kirli beyaz renkli amorf katı olarak elde edildi. λ_{max} (metanol içinde) 319, 270 nm olarak ölçüldü. LC-TOF/MS spektrumunda m/z $[M-H]^-$ 353.0826 ve $[M-162-H]^-$ 191.0522 moleküler iyon pikleri gözlemlendi. $C_{16}H_{17}O_9$ kapalı formülü için 353.0871 olarak hesaplandı. 162 birimlik kütle kaybı kafeoil grubunun varlığını gösterdi. ^{13}C -NMR spektrumunda altı kuarterner, yedi CH ve iki adet CH_2 sinyali olmak üzere 16 karbon sinyali bulunmaktadır. 1H -NMR spektrumunda, δ_H 6.13 (d, 15.8 Hz), 7.40 (d, 15.8 Hz) sinyalleri *trans*- α,β sistemini, 7.01 (brs), 6.96 (d, 8.0 Hz), 6.74 (d, 8.0 Hz) şeklinde gelen ABX sistemi 3,4-disübstitüe benzen halkasını gösterdiğinden molekülde *trans*-kafeoil grubunun varlığı ortaya konuldu. H-5' (δ 5.03) ile C-9 (δ 165,17) sinyallerinin HMBC etkileşimi küinik asit grubunun 5' konumundan *trans*-kafeoil grubuna bağlı olduğu belirlendi. Elde edilen spektral veriler literatürle tam uyum içindedir (Pauli et al., 1999). Detaylı DMSO- d_6 içinde çözölen 400 MHz'lik cihazda kaydedölen NMR verileri Çizelge 4. 1'de sunulmuştur. Moleküle ait NMR spektrumları EK-4'te verilmiştir.

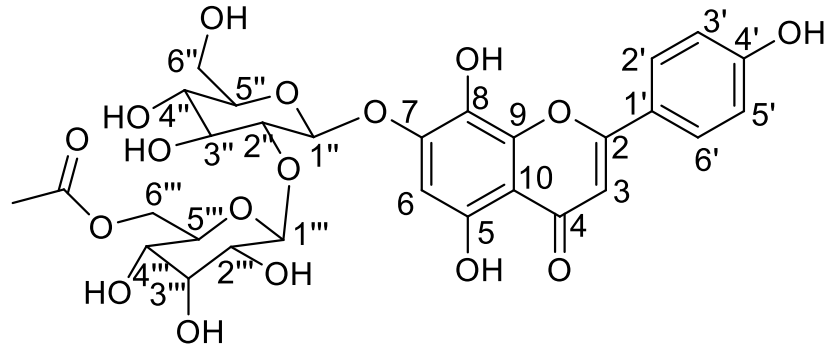
Çizelge 4. 1. **M3** (Klorojenik asit) ¹H ve ¹³C-NMR dataları

Konum	¹³ C (400 MHz)	¹ H (100 MHz)
1	126.08	-
2	115.21	7.04 (brs)
3	145.40	-
4	148.79	-
5	115.21	6.78 (d, 8.2 Hz)
6	121.83	6.98 (d, 8.2 Hz)
α	146.02	7.42 (d, 15.8 Hz)
β	114.79	6.15 (d, 15.8 Hz)
7	166.22	-
1'	73.99	5.08-5.04 (m)
2'	36.78	1.78 (dd, 13.0, 7.6 Hz) 2.03-1.98 (m)
3'	68.62	3.95-3.90 (m)
4'	71.33	3.60-3.60 (m)
5'	70.91	-
6'	37.267	2.05-2.00 (m) 1.98-1.96 (m)
7'	175.37	-



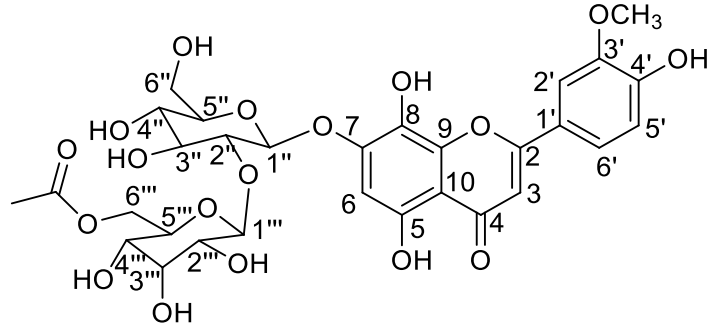
Şekil 4. 10. **M4** 3'-*O*-metilhipolaetin-7-*O*-(allosil-(1→2)-glikozit) molekülünün kimyasal yapısı

3'-*O*-metilhipolaetin-7-*O*-(allosil-(1→2)-glikozit) (M4): Bileşik sarı renkli katı halinde elde edildi. λ_{\max} (metanol içinde) 319, 270 nm olarak ölçüldü. LC-TOF/MS spektrumunda m/z $[M-H]^-$ 639.1773 moleküler iyon pikinden kapalı formülü $C_{28}H_{32}O_{17}$ olarak belirlendi ($C_{28}H_{31}O_{17}$ için 639.1559 olarak hesaplandı). ^{13}C -NMR spektrumunda on beş CH, iki CH_2 , bir CH_3 ve on adet C olmak üzere 28 karbon sinyali mevcut. δ_H 7.59 (d, 8.44 Hz), 7.49 (s) ve 7.10 (d, 8.5 Hz) sinyalleri B halkasının 3,4-disübstitüe olduğunu gösterir. δ_H 5.08 (d, 7.52 Hz) ve 4.89 (d, 7.78 Hz) β -konfigurasyonunda iki şekerin moleküle bağlı olduğunu gösterir. HMBC spektrumunda görülen H-1''/C-7 (5.08/151.75) etkileşimi glukoz grubunun 7 konumundan flavon iskeletine bağlı olduğunu, C-2''/H-1''' (81.63/4.89) etkileşimi allos grubunun glukoz grubuna C-2'' konumundan bağlı olduğunu ifade eder. 3.86/151.63 etkileşimi de metoksi grubunun 4' pozisyonunda olduğunu gösterir. Molekül; asidik ortamda hidroliz edilip aglikon kısmı uzaklaştırıldıktan sonra şeker kısmı asetil türevlerine çevrilerek GC-MS ile analiz edildi. GC kromatogramında benzer kütle fragmentlerine ve farklı alıkonma zamanına sahip iki pik gözlemlendi. Glikoz ticari standartla tayin edildi. Allos grubu MS kütüphanesindeki verilerle karşılaştırılarak tanımlandı. Molekül *Sideritis raeseri* bitkisinden daha önce izole edilmiştir (Gabrieli et al., 2005). Moleküle ait NMR değerleri Çizelge 4. 3 ve Çizelge 4. 4'te, NMR spektrumları ise Ek-5'te verilmiştir.



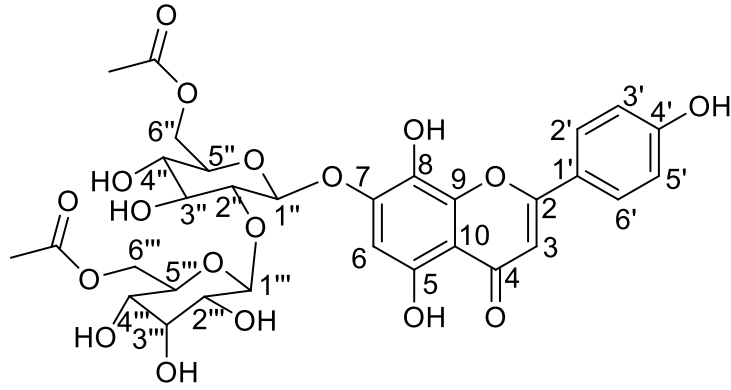
Şekil 4. 11. **M5** (İzoskutellerain-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-allosil-(1→2)-glikozit]) molekülünün kimyasal yapısı

İzoskutellerain-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-allosil-(1→2)-glikozit] (M5): Molekül parlak sarı renkte katı olarak elde edildi. λ_{\max} 326, 305, 276 nm (metanol içinde) olarak ölçüldü. LC-TOF/MS spektrumunda $C_{29}H_{32}O_{17}$ kapalı formülüne uygun olarak m/z [M-H]⁻ 651.1527 moleküler iyon piki gözlemlendi ($C_{29}H_{31}O_{17}$ için hesaplanan: 651.1559). ¹H-NMR spektrumunda δ_H 7.95 ve 6.93 ppm'de 8.3 Hz'lik iki orto etkileşime sahip dubletin bulunması flavon iskeletinin C-4' pozisyonundan mono sübstitüe olduğunu gösterdi. δ_H 6.60 ve 6.80'de bulunan sinyaller için iki uygun konum mevcut; C-3 ve C-6. 6.60 (H6)/106.01 (C-10), 6.60 (H6)/128.01 C8), 6.60 (H6)/150.97 (C-5) ve 6.60(H6)/152.65 (C-7) HMBC etkileşimlerinden δ_H 6.60 da gelen singletin H-6'ya ait olduğunu doğruladı. İki karakteristik anomerik protonun varlığı [δ_H 5.04 (d, 7.52 Hz) ve 4.90 (d, 8.0 Hz)] **M4**'te olduğu gibi şekerlerin glukoz ve allos olduğunu gösterdi. Nitekim hidroliz işlemi ve asetillemeden sonra yapılan GC-MS analizine göre M5 molekülü **M4** ile aynı şeker gruplarına sahip olduğu belirlendi. δ_C 20.91 ve 170.75 karbon sinyalleri molekülde bir asetil grubunun varlığını göstermektedir. Allos grubunun hidroksi metil sinyalinin (C-6'') aşağı alana kayması (61'lerden 64'lere) asetilin alloza bağlı olduğunu gösterdi. H-1''/C7 HMBC etkileşimi ise glukozun flavon iskeletine C-7 konumundan bağlandığını gösterdi. HMBC, HSQC ve COSY spektrumlarından elde edilen veriler ışığında hazırlanan detaylı NMR verileri Çizelge 4. 3 ve Çizelge 4. 4'te, NMR spektrumları ise Ek-6'da verildi.



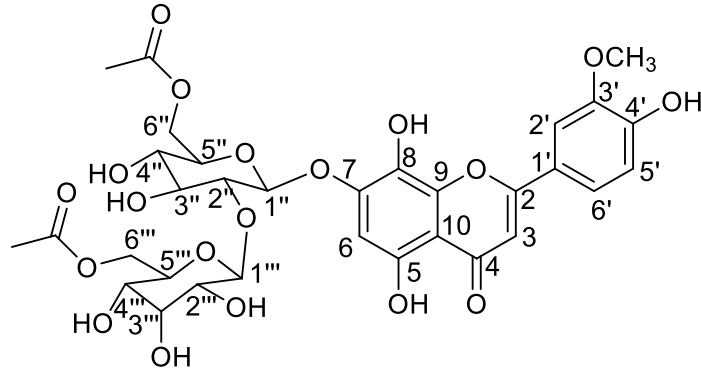
Şekil 4. 12. **M6** (3'-*O*-metilhipolaetin-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-allosil-(1→2)-glikozit])
molekülünün kimyasal yapısı

3'-*O*-metilhipolaetin-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-allosil-(1→2)-glikozit] (M6): Bileşik sarı renkli katı olarak elde edildi. Yapılan UV taramasında λ_{\max} (metanol içinde) 319, 270 nm olarak ölçüldü. LC-TOF/MS spektrumunda m/z [M-H]⁻ 681.1629 moleküler iyon pikinden kapalı formülü C₃₀H₃₄O₁₈ olarak belirlendi (C₃₀H₃₃O₁₇ için 681.1665 olarak hesaplandı). ¹H-NMR spektrumu incelendiğinde, aromatik halka sinyallerinin hem kimyasal kayma hem de yarıma şekilleri bakımından **M4** molekülü ile; alifatik bölge sinyallerinin de **M5** molekülü ile benzerlik gösterdiği için **M6**'nın 3'-*O*-metilhipolaetin türevi olduğu ve 6''' konumundan asetillenmiş allosil grubu içerdiği belirlendi. Şeker grubunun flavon iskeletine bağlantı noktası, metoksi grubunun konumu HMBC spektrumunda gözlenen etkileşimlerle doğrulandı. NMR verileri Çizelge 4. 3 ve Çizelge 4. 4'te verildi. Moleküle ait 1D ve 2D NMR spektrumları Ek 7'de verilmiştir.



Şekil 4. 13. **M7** (İzoskutellerain-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-allosil-(1→2)-6''-*O*-asetil-glikozit])
molekülünün kimyasal yapısı

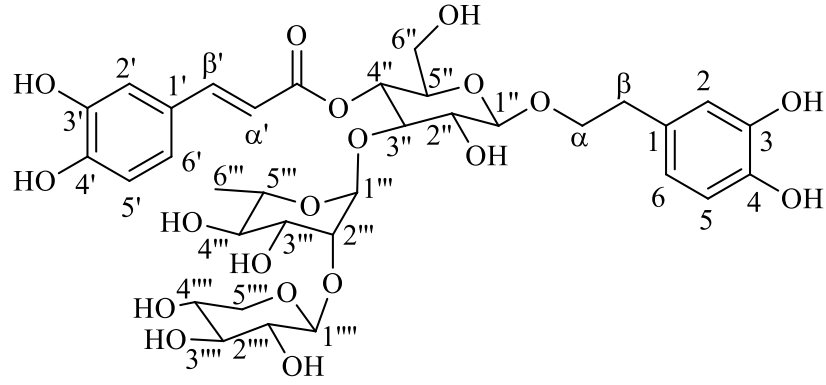
İzoskutellerain-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-allosil-(1→2)-6''-*O*-asetil-glikozit] (M7): Molekül sarı renkte amorf katı olarak izole edildi. λ_{\max} 326, 305, 276 nm (metanol içinde) olarak ölçüldü. LC-TOF/MS spektrumunda $C_{31}H_{34}O_{18}$ kapalı formülüne uygun olarak m/z $[M-H]^-$ 693.1626 moleküler iyon piki gözlemlendi ($C_{31}H_{33}O_{18}$ için hesaplanan: 693.1665). 1H -NMR spektrumu incelendiğinde flavon iskeletinin 4'-süstitüe B halkasına, 3 ve 6 konumu serbest halde A ve C halkasına sahip olduğu anlaşılmaktadır. Molekül **M5** ile aynı aromatik sisteme sahiptir. δ_H 1.83 ve 2.03 ppm'de iki metil sinyal, HSQC spektrumunda bu iki sinyal ile korele 20.90 ve 21.02 karbonları ve δ_C 170.60 ve 170.74 iki karbonil sinyali molekülde iki asetil grubun varlığını gösterir. Hem glukoz hem de allos gruplarının C-6 sinyallerinin aşağı alana kayması asetil gruplarının şeker gruplarına 6'' ve 6''' konumundan bağlandığını gösterir. Detaylı 1H ve ^{13}C kimyasal kaymaları Çizelge 4. 3 ve Çizelge 4. 4'te, NMR spektrumları ise Ek-8'de verildi.



Şekil 4. 14. **M8** (3'-*O*-metilhipolaetin-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-allosil-(1→2)-6'''-*O*-asetil-glikozit]) molekülünün kimyasal yapısı

3'-*O*-metilhipolaetin-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-allosil-(1→2)-6'''-*O*-asetil-glikozit] (M8):

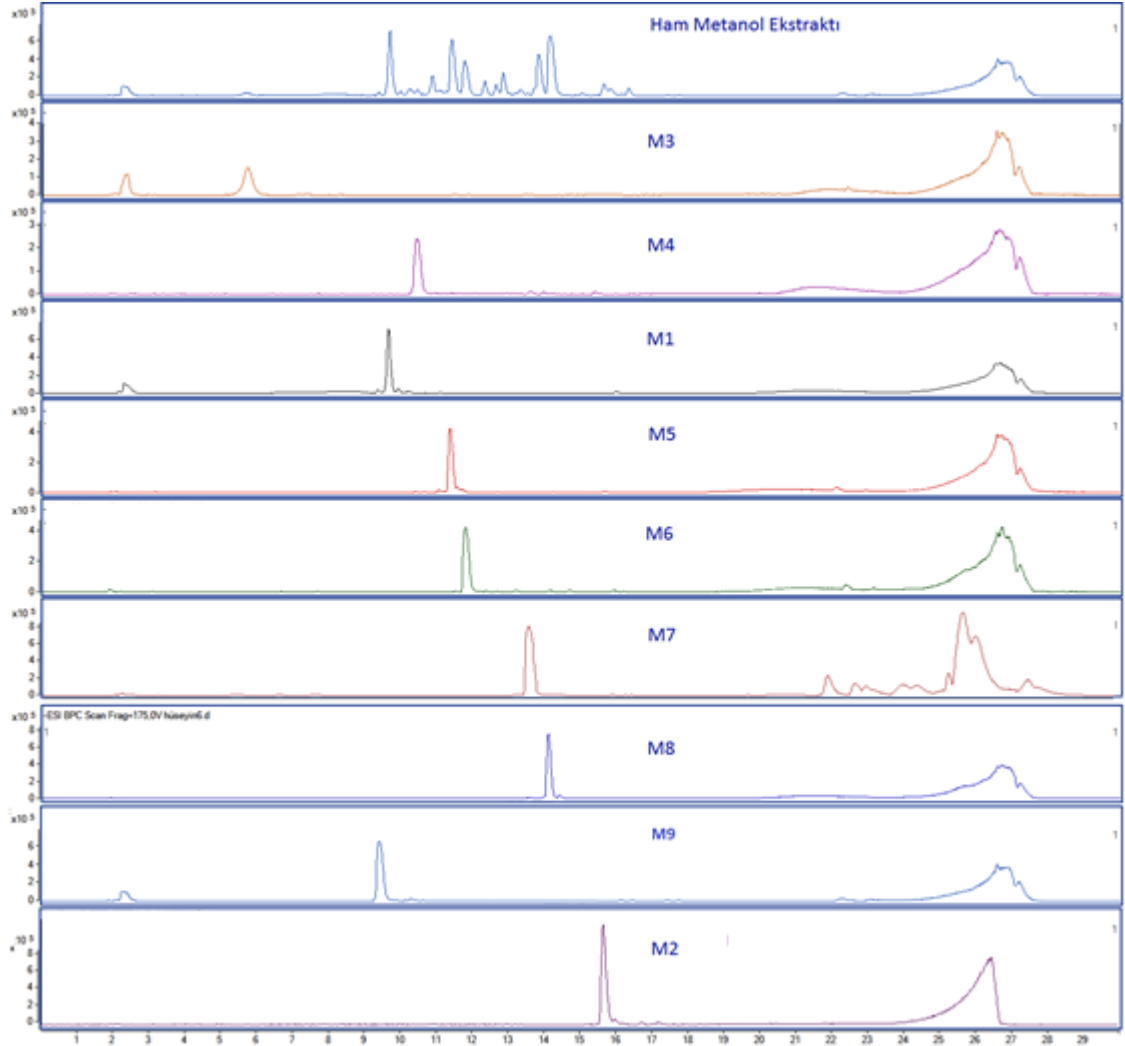
Molekül sarı renkli kristaller şeklinde izole edildi. LC-TOF/MS spektrumunda m/z [M-H]⁻ 723.1732 sinyali gözlemlendi. Bileşiğin kapalı formülü C₃₂H₃₆O₁₉ olarak belirlendi (C₃₂H₃₅O₁₉ için hesaplanan 723.1771). Bileşiğin ¹H-NMR spektrumunda 3,4-disüstitüe B halkası sinyalleri ABX sistemi şeklinde δ_H 7.59 (d, 8.6 Hz), 7.48 (brs), 7.10 (d, 8.6 Hz), H-3 protonu δ_H 6.61'de ve H-6 protonu δ_H 6.78'de singlet şeklinde gözlemlendi. δ_H 3.86'da rezonans olan metoksi sinyalinin 151.75 ile HMBC korelasyonu metoksi grubunun 3'-konumundan bağlı olduğunu göstermektedir. δ_H 1.85 ve 2.03 ppm'de görülen metil sinyalleri ve molekülde iki asetil grubunu doğruladı. ¹³C NMR spektrumunda molekülün kapalı formülüne uygun şekilde 32 sinyal gözlemlendi. **M8** molekülü daha önce *Sideritis libanotica* subs. *linearis* bitkisinden grubumuz tarafından izole edildi (Demirtaş vd., 2011). NMR verileri Çizelge 4. 3 ve Çizelge 4. 4'te verildi. Moleküle ait NMR spektrumları Ek-9'da verilmiştir.



Şekil 4. 15. **M9** (Sideridosid) molekülünün kimyasal yapısı

Sideridosid A (M9): Bileşik kirli beyaz renkli pamuğumsu yapıda amorf katı şeklinde izole edildi. LC-TOF/MS spektrumunda görülen m/z $[M-H]^-$ 755.2302 moleküler iyon pikine istinaden; molekül formülü $C_{34}H_{44}O_{19}$ olarak belirlendi ($C_{34}H_{43}O_{19}$ için hesaplanan 755.2397). Kafeik asit ve 3,4-dihidroksi feniletıl ve fenil etanoid gruplarının varlığı; 1H -NMR spektrumunda görülen iki ABX sistemi, iki trans olefinik proton (AB siteminde $J=15.8$ Hz), δ_H 2.66 ppm'de gelen β -metilen ve 3.87 ve 3.57 ppm'de gelen α -metilen sinyalleri ile ortaya konuldu. δ_H 5.24 (brs), 4.34 (d, 7.9 Hz) ve 4.20 (d, 6.7 Hz) ppm'de üç anomerik proton görüldü. ^{13}C -NMR spektrumundaki δ_C 106.30, 102.68 ve 100.47 ppm'deki 3 anomerik karbon molekülde üç şeker grubunun varlığını doğruladı. **M1** molekülü ile karşılaştırıldığında gözlenen fazladan 5 karbon **M9**'da ekstra 5 karbonlu bir şekerin bulunduğunu işaret etti. COSY, HMBC ve HSQC spektrumlarından elde edilen verilerle C-H korelasyonları yapıldı (Bkz. Çizelge 4.1). Kafeik asitin glukoza C-4' konumundan bağlandığı H-4' (δ_H 3.69, t, $J=9.7$ Hz) sinyalinin aşağı alana kayması ve bu protonun δ_C 166.21 ile HMBC korelasyonundan anlaşıldı. Ayrıca C-3' (δ_C 80.37) karbonunun yaklaşık 4 ppm'lik kayması bu konuma başka bir şeker grubunun bağlı olduğunu gösterdi. Nitekim ramnoz grubunun anomerik protonu (δ_H 5.24, brs) C-3' karbonu ile etkileşim halindedir. Ayrıca; HMBC spektrumunda görülen H-1' (δ_H 3.69, d, $J=6.7$ Hz)/C-2'' (δ_C 81.34) ve H' (δ_H 3.69, d, $J=6.7$ Hz)/C- α (70.71) etkileşimleri parçalar arası bağlantının kurulmasını sağladı. Yukarıdaki bilgiler ışığında **M9** molekülünün yapısı; 3,4-dihidroksi- β -feniletoksi- O - β -liksopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)-4- O -kafeoil- β -glukopiranosid olarak tanımlandı. Bileşiğe ait NMR verileri Çizelge 4. 2'de, NMR spektrumları ise Ek-10'da verildi.

M9 ile aynı aromatik örgüye sahip C6-C6-C5 şeker gruplarına sahip tri-glikozidik moleküller değişik bitki kaynaklarından izole edilmiştir. Örneğin; *Phlomis linearis* bitkisinden izole edilen filinosid (Bedir vd., 2003), (3,4-dihidroksi-β-feniletoksi-O-β -**ksilopiranosil**-(1→2)-α-ramnopiranosil-(1→3)-4-O-kafeoil-β-glukopiranosid), *Stachys lavandulifolia* bitkisinden izole edilen lavandulofoliosid (Delazar et al., 2011) (3,4-dihidroksi- β-feniletoksi-O- β-**arabinopiranosil**- (1→2)- α- ramnopiranosil-(1→3)-4-O-kafeoil-β-glukopiranosid) ve *Teucrium chamaedrys* bitkisinden izole edilen teukriosid (Bedir vd., 2003) (3,4-dihidroksi-β-feniletoksi-O-**α-likso**piranosil-(1→2)-α-ramnopiranosil-(1→3)-4-O-kafeoil-β-glukopiranosid) gibi.



Şekil 4. 16. *S. germanicopolitana* bitkisinden izole edilen moleküllerin ve ham özütün LC-TOF/MS kromatogramları

Çizelge 4. 2. İzole edilen fenil etanoidlerin ^1H ve ^{13}C -NMR verileri

	M1(Verbaskosid)		M9 (Sideridosid)	
1	129.57	-	129.40	-
2	116.22	6.63, (brs)	116.11	6.62, (brs)
3	145.40	-	145.76	-
4	143.96	-	144.29	-
5	116.74	6.62, (d, 8.0 Hz)	117.00	6.61, (d, 7.9 Hz)
6	119.98	6.49, (d, 8.0 Hz)	119.78	6.45, (d, 7.9 Hz)
α	72.82	3.85, (t, 6.7 Hz) 3.69 – 3.60, (m)	70.71	3.87, (dd, 15.0/ 9.1 Hz) 3.60 – 3.54, (m)
β	35.42	2.68, (t, 6.7 Hz)	35.46	2.73 – 2.62, (m)
1'	125.93	-	125.54	-
2'	115.07	7.03, (brs)	115.37	7.02, (brs)
3'	146.00	-	146.23	-
4'	148.92	-	149.78	-
5'	116.12	6.75, (d, 8.3 Hz)	116.47	6.74, (d, 8.2 Hz)
6'	122.14	6.98, (d, 8.3 Hz)	121.76	6.93, (d, 8.2 Hz)
α'	113.99	6.20, (d, 15.8 Hz)	113.54	6.17, (d, 15.8 Hz)
β'	146.00	7.45, (d, 15.8 Hz)	146.51	7.43, (d, 15.8 Hz)
C=O	166.15	-	166.21	-
1''	102.70	4.37, (d, 7.9 Hz)	102.68	4.34, (d, 7.9 Hz)
2''	74.91	3.23, (t, 8.4 Hz)	74.90	3.20, (t, 8.5 Hz)
3''	79.57	3.69 – 3.60, (m)	80.37	3.69, (t, 9.7 Hz)
4''	69.56	4.69, (t, 9.7 Hz)	69.47	4.69, (t, 9.7 Hz)
5''	74.94	3.52 – 3.46, (m)	74.73	3.46, (dd, 12.4/ 5.6 Hz)
6''	61.16	3.36 – 3.31, (m)	61.14	3.39 – 3.32, (m)
1'''	101.65	4.78 (d, 2.8 Hz)	100.47	5.24, (brs)
2'''	70.95	3.68 (d, 7.81 Hz)	81.34	3.75, (d, 3.3 Hz)
3'''	70.69	3.52 – 3.46, (m)	70.71	3.60 – 3.54, (m)
4'''	72.10	3.09, (t, 9.3 Hz)	73.04	3.39 – 3.32, (m)
5'''	69.17	3.39 – 3.32, (m)	69.00	3.39 – 3.32, (m)
6'''	18.57	0.96, (d, 6.2 Hz)	18.49	0.92, (d, 6.1 Hz)
1''''	-	-	106.30	4.20, (d, 6.7 Hz)
2''''	-	-	71.71	3.39 – 3.32, (m)
3''''	-	-	72.70	3.05, (t, 9.5 Hz)
4''''	-	-	68.11	3.60 – 3.54, (m)
5''''	-	-	66.11	3.69 – 3.60, (m) 3.39 – 3.32, (m)

Çizelge 4. 3. İzole edilen flavon allosil glikozitlerin ¹H-NMR kimyasal kaymaları

Konum	M4	M5	M6	M7	M8	M10
H-3	6.78, s	6.79, s	6.76, s	6.78, s	6.78, s	6.91, s
H-6	6.64, s	6.67, s	6.66, s	6.60, s	6.61, s	6.68, s
H-2'	7.49, brs	7.95, d (7.2)	7.54, brs	7.95, d (7.7)	7.48, brs	8.08, d (8.8)
H-3'	-	6.93, d (7.2)	-	6.91, d (7.7)	-	7.12, d (8.8)
H-5'	7.10, d (8.4)	6.93, d (7.2)	7.08, d (8.0)	6.91, d (7.7)	7.10, d (8.5)	7.12, d (8.8)
H-6'	7.59, d (8.4)	7.95, d (7.2)	7.97, d (8.0)	7.95, d (7.7)	7.59, d (8.5)	8.08, d (8.8)
H-1''	5.08, d (7.5)	5.03, d (5.7)	5.06, d (6.9)	5.11, d (7.1)	5.15, d (7.6)	5.06, d (7.5)
H-2''	3.66-3.56, m	3.59-3.54, m	3.61-3.55, m	3.60, t (8.3)	3.61, t (8.3)	3.59-3.54, m
H-3''	3.55-3.42, m	3.52-3.45, m	3.46-3.40, m	3.52, t (9.0)	3.52, t (8.9)	3.52-3.45, m
H-4''	3.66-3.56, m	3.28-3.20, m	3.29-3.18, m	3.28-3.20, m	3.28-3.20, m	3.28-3.20, m
H-5''	3.55-3.42, m	3.52-3.45, m	3.54-3.46, m	3.73, t(9.0)	3.74, t (8.5)	3.52-3.45, m
H-6''	3.76-3.67, m 3.55-3.42, m	3.44-3.34, m 3.92-3.82, m	3.92-3.82, m 3.44-3.34, m	4.32, d (11.4) 4.10, dd (11.4/7.6)	4.31, d(11.3) 4.11,dd(11.3/7.2)	3.44-3.34, m 3.92-3.82, m
COOCH ₃	-	-	-	1.86, s	1.85, s	-
H-1'''	4.89, d (7.8)	4.90, d (7.1)	4.91, d(7.5)	4.90, d (7.6)	4.90 d, (8.0)	4.91, d (8.0)
H-2'''	3.27-3.14, m	3.26-3.18, m	3.29-3.18, m	3.29-330, m	3.29-330, m	3.26-3.18, m
H-3'''	3.86, m	3.94-3.82, m	3.95-3.87, m	3.90, brs	3.89, brs	3.94-3.82, m
H-4'''	3.27-3.14, m	3.44-3.34, m	3.41-3.34, m	3.39, d (10.1)	3.38, t (7.9)	3.44-3.34, m
H-5'''	3.27-3.14, m	3.94-3.82, m	3.82, brs	3.85, brs	3.82, brs	3.94-3.82, m
H-6'''	3.43-3.36, m	4.14-3.92, m	4.02-3.94, m	4.6-3.97, m	4.14-3.92, m	4.14-3.92, m
-OCH ₃	3.86, s	-	3.86, s	-	3.84, s	3.86, s
COOCH ₃	-	1.85, s	1.84, s	2.03, s	2.03, s	1.85, s

Çizelge 4. 4. İzole edilen flavon allosil glikozitlerin ¹³C-NMR dataları

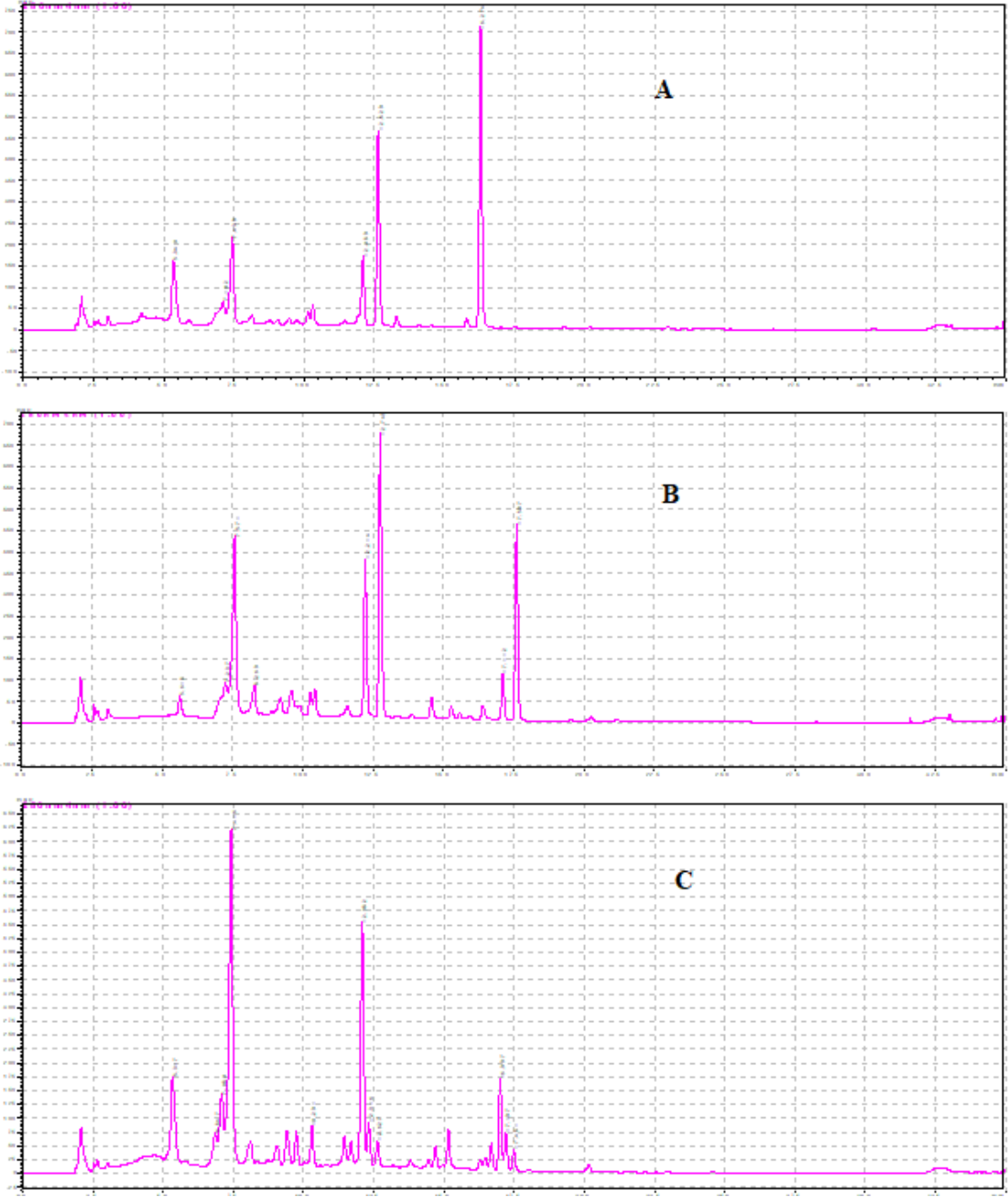
Konum	M4	M5	M6	M7	M8	M10
2	164.36	164.62	164.45	164.66	164.40	164.09
3	103.78	103.06	103.73	102.97	103.80	103.82
4	182.72	182.79	182.78	182.74	182.77	182.88
5	152.85	152.58	152.60	152.65	152.63	152.66
6	100.10	100.57	100.46	100.07	99.58	99.91
7	151.75	152.58	151.57	150.77	150.91	151.08
8	127.64	128.05	128.06	127.95	127.86	127.97
9	144.75	144.21	144.39	144.34	144.48	144.23
10	105.76	106.02	106.00	106.07	106.00	106.03
1'	123.56	121.30	123.49	123.24	123.51	123.32
2'	113.64	129.06	113.70	129.08	113.66	128.93
3'	147.21	116.50	147.39	116.56	147.20	115.03
4'	151.63	162.28	151.80	162.63	151.76	162.91
5'	112.63	116.50	112.52	116.56	112.53	115.03
6'	119.37	129.06	119.22	129.15	119.39	128.93
1''	99.28	99.93	99.84	99.74	99.88	100.48
2''	81.63	83.02	82.57	82.73	82.45	82.96
3''	77.51	77.63	77.55	75.78	75.73	77.60
4''	75.07	72.02	71.98	71.97	71.86	71.92
5''	76.14	76.05	75.99	74.17	74.10	76.05
6''	61.01	61.01	60.98	63.63	63.60	61.00
<u>COOMe</u>	-	-	-	170.74	170.72	-
<u>COOMe</u>	-	-	-	21.02	21.02	-
1'''	102.10	102.96	102.71	102.84	102.65	102.97
2'''	69.75	69.72	69.69	69.98	69.90	69.70
3'''	71.48	71.18	71.23	71.20	71.27	71.23
4'''	67.67	67.32	67.42	67.31	67.34	67.31
5'''	71.95	71.98	71.92	71.91	71.87	72.00
6'''	61.46	64.02	63.95	64.03	63.92	63.99
<u>OMe</u>	-	-	56.21	-	56.24	56.04
<u>COOMe</u>	-	170.73	170.74	170.60	170.62	170.74
<u>COOMe</u>	-	20.90	20.86	20.90	20.86	20.91

4.2. *Sideritis perfoliata* Bitkisinden Fenolik Maddelerin Saflaştırılması

Çalışmaya konu olan bitkilerin yaprak kısımlarının 340 nm’de kaydedilen HPLC kromatogramı (Şekil 4.17) incelendiğinde *S. perfoliata* bitkisinin diğer bitkilerde az miktarda bulunan bir bileşeni (Alıkonma zamanı; 16.27 dakika) majör olarak içerdiği görülmektedir. *S. germanicopolitana* bitkisi üzerinde yaptığımız çalışmada izole edilemeyen bu bileşiğin saflaştırılması ve tanımlanması için aşağıdaki prosedür takip edildi.

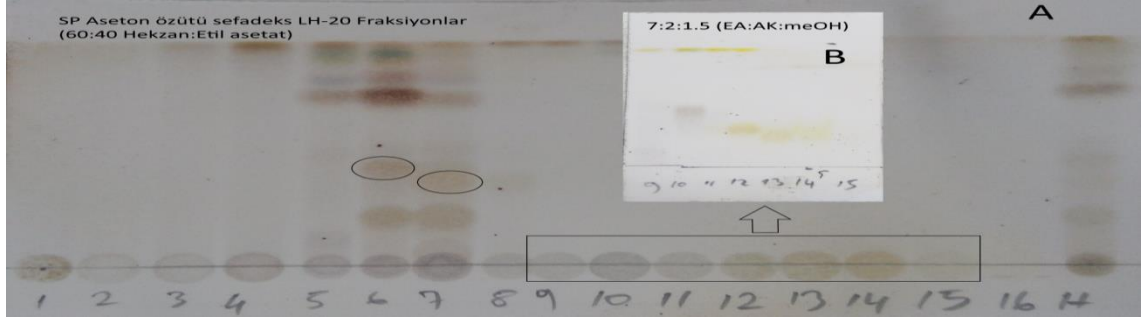
C18 dolgu maddesinin apolar yapısından dolayı polaritesi düşük maddelerin kolonda alıkonma süresi olacaktır. *S. perfoliata* bitkisinin metanol özütünün C18 kolon üzerinden yapılan analizinde en yüksek alıkonma süresine sahip olan özütte major olarak bulunan molekül, özütte bulunan diğer maddelere göre düşük polariteye sahiptir ve orta polariteye sahip bir çözücü ile özütlenabilir. Böylelikle bitkideki polar maddeler ayırım yapılacak özüte geçmeyecektir. Bu da yapılacak ayırma işleminde kolaylık sağlayacaktır. Buradan hareketle *S. perfoliata* bitkisinin yaprak kısımları (100 g) aseton ile özütlendi. Özüt (5 g) sefadeks LH-20 üzerinden fraksiyonlandırıldı.

Kolon şartları: hareketli faz olarak metanol, peristaltik pompa yardımı ile 0,25 mL/dakika akış hızında sabit tutularak kullanıldı. Dolgu maddesi sefadeks LH-20 (150 g) kolon ebatları 3.5x80 cm. Saatte bir fraksiyon alınacak şekilde fraksiyon toplayıcısı ile toplam 16 fraksiyon alındı.



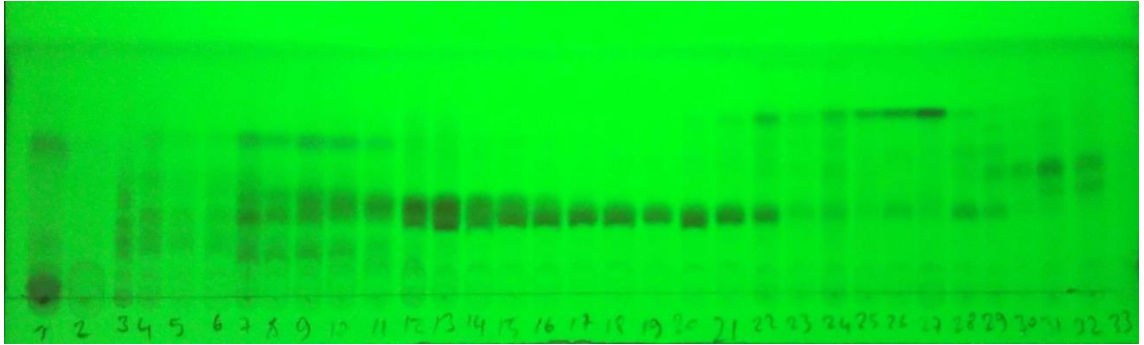
Şekil 4. 17. Çalışmaya konu olan bitkilerin HPLC kromatogramları *S. perfoliata* (A), *S. germanicopolitana* (B), *S. libanotica* (C) yaprak kısımları metanol özütü

Yapılan İTK kontrolünde fraksiyon 6, 7 ve 13-15 aralığı birleştirildi (430 mg). Fraksiyon 6 ve 7 apolar maddelerin saflaştırılmasında kullanıldı. 13-15 aralığı için İTK'da gözlenen (Bkz. Şekil 4. 18 B) küçük safsızlıkların giderilmesi için C18 kolon uygulaması yapıldı.



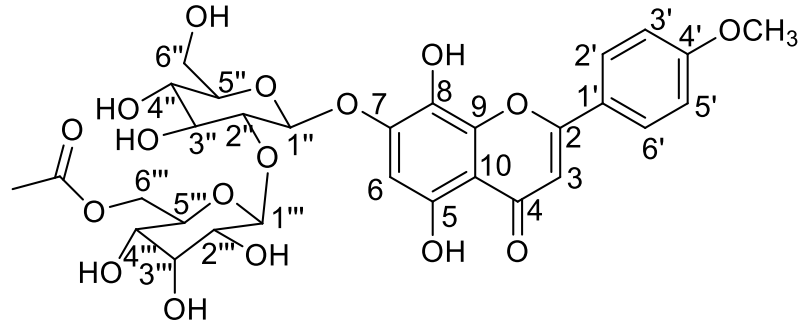
Şekil 4. 18. *S. perfoliata* bitkisi etil asetat özütü sefadeks LH-20 kolon İTK görseli

Fraksiyon 13-15 aralığı su:metanol:formik asit karışımı (85:13:2) ile çözülerek sıvı olarak flash kromatografi cihazına enjekte edildi. Uygulamada 40 gr dolgu maddesi içeren Redisep kolon kullanıldı. Mobil faz olarak %5 formik asitli su (A) ve metanol (B) 5 ml/dakika akış hızı ile kullanıldı. Mobil faz programı 85(A):15(B) sistemi ile 60 dakika, 70(A):30(B) sistemi ile 60 dakika 65(A):35(B) sistemi ile 40 dakika izokratik elüsyon şeklinde uygulandı. Fraksiyonlar her 5 dakikada bir olmak üzere 25 mL hacimlerinde 33 fraksiyon toplandı. Fraksiyonların çözücülerini uzaklaştırdıktan sonra İTK uygulaması yapıldı. İTK görseli Şekil 4. 19'da verilmiştir.



Şekil 4. 19. *S. perfoliata* etil asetat özütü C18 kolon uygulaması

İTK analizine göre 17-21 aralığı birleştirildi ve çözücüler uzaklaştırdı. Aralık metanolde çözülerek oda sıcaklığında bekletildiğinde sarı renkli çökelek oluşumu gözlemlendi. Çökelek üstü dikkatlice ortamdaki uzaklaştırdı. Kalan çökelek **M10**'u (140 mg) verdi.

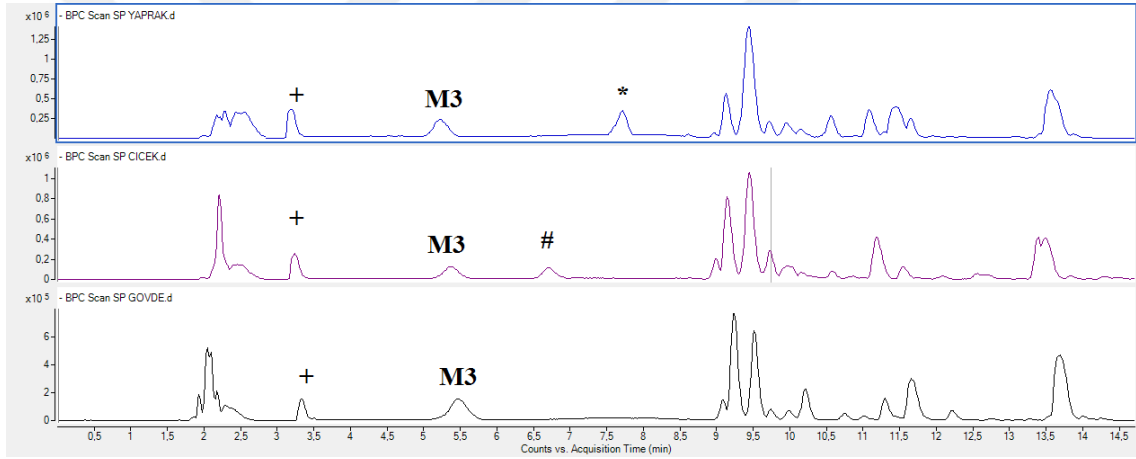


Şekil 4. 20. **M10** (4'-O-metilizoskutellerain-7-O-[6'''-O-asetil-allosil-(1→2)-glikozit])
molekülünün kimyasal yapısı

4'-O-metilizoskutellerain-7-O-[6'''-O-asetil-allosil-(1→2)-glikozit] (M10): Molekül mat sarı renkte amorf katı olarak elde edildi. UV spektrofotometresinde λ_{\max} 326, 305, 276 nm olarak ölçüldü. LC-TOF/MS spektrumunda m/z [M-H]⁻ 665.1732 moleküler iyon piki gözlemlendi. Buradan hareketle molekülün kapalı formülü $C_{30}H_{34}O_{17}$ olarak belirlendi ($C_{30}H_{33}O_{17}$ için hesaplanan: 651.1716). ¹³C-NMR spektrumunda bu kapalı formüle uyumlu olarak 28 karbon sinyali gözlemlendi (simetrik karbonlar mevcut). Molekülün ¹H-NMR spektrumu incelendiğinde **M5** molekülü ile benzer aromatik sinyallere sahip olduğu görüldü. 2 birimlik integrasyon değerine sahip δ 7.12 (d, 8.8 Hz, H-3'/H-5') ve 8.08 (d, 8.8 Hz, H-2'/H-6') sinyallerin B halkasının 4'-süstitüe olduğunu gösterdi. δ_H 3.86 ve δ_C 56.04 sinyalleri molekülde bir metoksi grubunun varlığını, 3.86 (-OMe)/162.91(C-4') HMBC etkileşimi metoksi grubunun 4'-konumundan bağlı olduğunu gösterdi. ¹H-NMR spektrumunda δ_H 5.06 (d, 7.6 Hz, H-1'') ve δ_H 4.90 (d, 8,0 Hz, H-1''') anomerik protonlar mevcut. δ_H 1.85 ppm'de 3 birimlik integrasyona sahip sinyal, δ_C 170.74 (COOCH₃) ve δ_C 20.91 (COOCH₃) sinyalleri moleküldeki bir asetil grubunu doğruladı. 5.06 (H-1'')/151.08 (C-7) HMBC etkileşimi glikozun flavon iskeletine C-7'den bağlandığını, 4.90 (H-1''')/82.96(C-2'') HMBC etkileşimi allos grubunun glikoza C-2'' konumundan bağlı olduğunu gösterdi. Bu bilgiler doğrultusunda molekül 4'-O-metilizoskutellerain-7-O-[6'''-O-asetil-allosil-(1→2)-glikozit] olarak tanımlandı. Detaylı NMR verileri Çizelge 4. 3 ve Çizelge 4. 4'te verilmiştir. Moleküle ait NMR spektrumları Ek-11'de verilmiştir.

4.3. *Sideritis perfoliata* Bitkisinden İridoid Türevlerinin Saflaştırılması

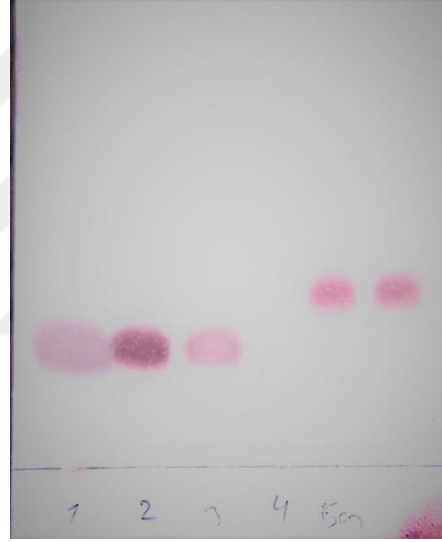
S. perfoliata bitkisinin farklı organlarının LC-TOF/MS kromatogramları karşılaştırıldığında kromatogramın erken dakikalarında organlarda farklı maddelerin varlığı tespit edildi. Şekil 4. 21’de 8. dakikada gelen (*) madde sadece yaprakta, 6.5-7. dakikalar arasında gelen (#) madde sadece çiçekte ve 3-3.5 dakikalar arasında gelen (+) madde ise bütün organlarda mevcuttur. **M3** (klorojenik asit) ise daha önce *S. germanicopolitana* bitkisinden izole edilerek bu bitkideki varlığı hem HPLC hem de LC-TOF/MS ile belirlendi. Bitkide çiçek organının az bulunmasından dolayı # ile vurgulanan madde için izolasyon çalışması yapılamadı.



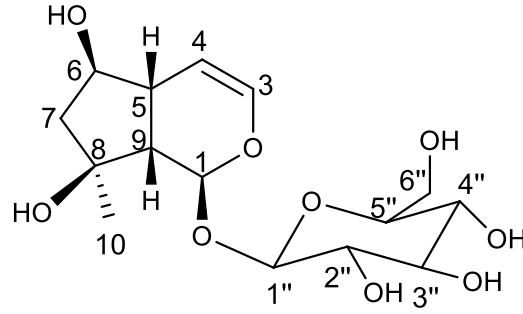
Şekil 4. 21. *S. perfoliata* bitki organları metanol özütü LC-TOF/MS kromatogramları

UV’de aktif olamayan bu iki maddenin izolasyonu için geliştirilen proses şu şekildedir: maddeler C18 dolgu maddesi üzerinden ayırım yapan LC-TOF/MS kromatogramında erken dakikalarda geldiğinden yüksek polariteye sahiptir. C18 dolgu maddesinde yüksek polariteye sahip maddeler %100 su veya %90:10 su:MeOH gibi sistemler ile kolondan elüe edilebilir. Maddeler polar olduğu için polar bir çözücü ile özütlenmelidir. Bundan dolayı bitkinin yaprak kısmı metanol ile özütlendi. Yaklaşık 5 g özüt 50 mL suda çözüldü. Çözülmeyen kısımlar filtrasyonla uzaklaştırıldı. Berrak çözelti 100 mL’ye tamamlanarak sanki hareketli fazmış gibi su ile şartlanmış C18 kolona peristaltik pompa yardımı ile verildi. Kolonun daha düşük polariteli maddeleri tutması sağlandı.

Hazırlanan 100 mL çözelti ve ilave 100 mL saf su kolondan geçirildikten sonra kolondan gelen ve neredeyse tamamen berrak elüent kuruluğa kadar evaporatörde çektirildi. Elde edilen sarımtırak katı su ile çözüldü ve tekrar C18 kolon uygulaması yapıldı. Hareketli faz olarak %100 sudan başlanarak %90 su'ya 10 dakikada bir, %2'lik değişim olacak şekilde gradiyent yapıldı. Fraksiyonların çözücüleri uzaklaştırıldıktan sonra maddeler cam çeperine yapışık sarımtırak katılar halinde elde edildi. Katılar %2 formik asit içeren metanol ile çözülerek tüplere alındı. Fraksiyon 1-3 aralığında kristale benzer katılar oluşurken 5-6 aralığında bu oluşum gözlenmedi. Uygulamaya ait İTK görseli Şekil 4. 22'de verilmiştir. Görsel incelendiğinde yapılan ayırımın ne derece kaliteli olduğu görülebilir. Fraksiyon 1-3 aralığı **M11**'i 5-6 aralığı ise **M12**'yi verdi.

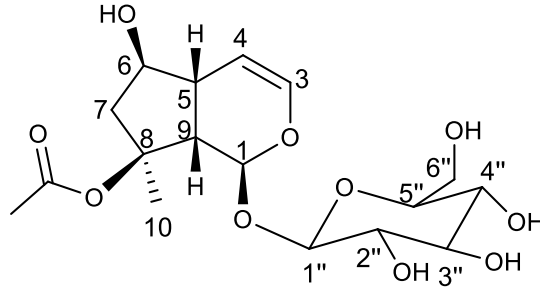


Şekil 4. 22. *S. perfoliata* metanol özütü C18 uygulaması İTK görseli



Şekil 4. 23. **M11** (Ajugol) molekülünün kimyasal yapısı

Ajugol (M11): Bileşik pamuğumsu yapıda beyaz toz halinde elde edildi. Bileşiğin molekül formülü ^{13}C -NMR ve LC-TOF/MS m/z [$\text{M}+\text{FA}-\text{H}$] 393.1616) verilerinden yola çıkılarak $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_9$ olarak belirlendi ($\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{O}_{11}$ için hesaplanan 393.1397). Bileşiğe ait ^1H , ^{13}C ve 2D-NMR spektrumlarının incelenmesinden sonra molekülün bir iridoid türevi olduğu ve bir glikozit grubu içerdiğine karar verildi. δ 97.89 (C-1') karbonuna bağlı ve 4.43 (H-1') ppm'de dublet ($J=7.9$ Hz) şeklinde gelen proton sinyali; iridoid grubuna bağlı β -konfigurasyonunda bir glikoz grubunun varlığını gösterir. Anomerik protonun δ 91.89 ppm'de karbon ile etkileşimi şekerin C-1 pozisyonundan bağlı olduğunu gösterir. 105.43 (C-4) ve 139.2 (C-3) ppm'de olefinik protonlar mevcut. H-4 (6.10, dd, $J=6.3, 2.0$) protonunun dd şeklinde yarılmasından dolayı C-5 konumunun serbest olduğu kanısına varıldı. 1.83 (s, H-10) sinyalinin HMBC spektrumunda 50.37 (C-7) ve 77.55 (C-8) karbonları ile temiz etkileşimleri görülmüştür. Bu da metil grubunun oksijenlenmiş quarterner karbona bağlı olduğunu gösterir. H-7 $_{\alpha}$ ve H-7 $_{\beta}$ 'nin COSY spektrumunda sadece H-6 [3.75-3.69 (m)] protonu ile etkileşimin gözlenmesinden dolayı C-6 konumuna bağlı hidroksi grubunun yerini doğruladı. C-5 karbonuna bağlı proton çözücü (DMSO) sinyali ile çakışık halde gelmiştir. Ancak COSY spektrumunda H-5'in H-6 ve H-3 ile etkileşimleri gözlenmektedir. Spektral veriler çözücü farkından dolayı küçük kaymalarla birlikte literatürle uyum içindedir (Pianaro et al., 2007). Moleküle ait detaylı NMR verileri Çizelge 4. 5'da sunulmuştur. NMR spektrumları Ek-12'de verilmiştir.



Şekil 4. 24. **M12** (Ajugosid) molekülünün kimyasal yapısı

Ajugosid (M12): Bileşik kristalimsi yapıda kirli beyaz katı olarak izole edildi. Bileşiğin LC-TOF/MS spektrumunda gözlenen m/z $[M+Na+H]^+$ 413.1288 iyon pik molekülün $C_{17}H_{26}O_{10}$ kapalı formülü ile uyumludur ($C_{17}H_{27}O_{10}Na$ için hesaplanan 413.1418). 1H -NMR spektrumu incelendiğinde molekülün bir iridoid glikozidi olduğu ve bir asetil grubu taşıdığı görülmektedir. δ 2.90-3.60 ppm arasındaki sinyallerin ve karakteristik anomerik proton sinyallerinin varlığı (4.44, d, 7.9 Hz) β -glikoz grubunun varlığını gösterir. HMBC spektrumunda gözlenen 4.44 (H-1')/92.54 (C-1) etkileşimi şeker grubun C-1'e bağlı olduğunu gösterir. δ 6.15 (dd, 2.2/ 6.3 Hz) ve δ 4.68 (dd, 1.86/6.3 Hz) ppm'de gözlenen olefinik protonlar sırasıyla H-3 ve H-4'e aittir. COSY spektrumunda H-5 (δ 2.59, m) H-3, H-4, H-6 (δ 3.84, m) ve H-9 (δ 2.64, d, 9.7 Hz) ile etkileşim halindedir. Aynı zamanda H-9 ile H-1 (5.60, d, 2.1 Hz) etkileşimi de gözlenmektedir. H-9'un bunlardan başka COSY etkileşiminin olmaması C-8 konumunun tamamen süstitüe olduğunu gösterir. Metil sinyalinin (δ 1.88, s) kuarterner C-8 karbonu ile (δ 88.3) HMBC korelasyonu metil grubunun C-8 konumuna bağlı olduğunu gösterir. C-6 (δ 75.1) ve C-8 (δ 88.3) aşağı alana kayması bu pozisyonlarda hidroksi gruplarının bağlı olduğunu gösterir. H-7 $_{\alpha}$ (2.11–2.05, m) H-7 $_{\beta}$ (2.00–1.95, m) sinyallerinin H-6 ile COSY etkileşimi gözlenmektedir. HMBC spektrumunda gözlenen 1.89/88.3 etkileşiminden dolayı asetil grubunun konumu C-8 olarak belirlendi. Ayrıca ajugol molekülü ile karşılaştırıldığında C9 ve C7'nin aşağı alana C8'in de yukarı alana kayması asetilin yerini doğrulamaktadır. COSY, HSQC ve HMBC spektrumlarının incelenmesinden sonra molekül ajugosid olarak aydınlatıldı. Detaylı NMR dataları Çizelge 4. 5'de verilmiştir. Elde edilen spektral veriler literatür ile uyum içindedir (Taşdemir vd., 1999). Ajugosid daha önce *Sideritis perfoliata* subsp. *perfoliata* bitkisinden izole edilmiştir (Charami et al., 2008). Ancak aynı bitki örneğinde ajugol'un

varlığından bahsedilmemiştir. *Sideritis italica* bitkisinde ise her iki iridoid türevinin de varlığı rapor edilmiştir (Koleva and Handjieva, 1997). Moleküle ait NMR spektrumları Ek-13'te verilmiştir.

Çizelge 4. 5. İridoid glikozitlerin ^1H ve ^{13}C kimyasal kaymaları

	M11 (Ajugol)		M12 (Ajugosid)	
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
1	91,89	5.27 (d, 2.1 Hz)	92.5	5.60 (d, 2.1 Hz)
3	139,2	6.10 (dd, 6.3, 2.0 Hz)	140.6	6.18 (dd, 6.3, 2.2 Hz)
4	105.4 3	4.78 (dd, 6.3, 3.0 Hz)	103.9	4.68 (dd, 6.3, 1.9 Hz)
5	40,47	2,51-2.44 (m)	40.2	2,61-2.57 (m)
6	75,89	3.75-3.69 (m)	75.1	3.83 (dt, 4.9, 2.6 Hz)
7	50,37	1.84 (dd, 6.0, 12.9 Hz) 1.63 (dd, 5.6, 12.9 Hz)	47.7	2.11 – 2.05 (m) 2.00 – 1.95 (m)
8	77,55	-	88.3	-
9	50,29	2.32 (dd, 9.8, 1.4 Hz)	48.5	2.64 (d, 9.7 Hz)
10	25,49	1.13 (s)	22.5	1.89 (s)
1'	97,89	4.43 (d, 7.9 Hz)	98.4	4.44 (d, 7.9 Hz)
2'	73,60	3.06-2.98 (m)	73.6	2.97 – 2.92 (m)
3'	77,42	3.10-3.16 (m)	77.5	3.12 – 3.09 (m)
4'	70,50	3.05 – 3.01 (m)	70.6	
5'	77,22	3.05 – 3.01 (m)	77.2	3.05 – 3.01 (m)
6'	62,90	3,68-3.60 (m) 3.50-3,40 (m)	61.7	3.66 (d, 10.4 Hz) 3.43 (dd, 11.8, 6.2 Hz)
OCOCH_3	-	-	171.0	-
OCOCH_3	-	-	22.7	1.41 (s)

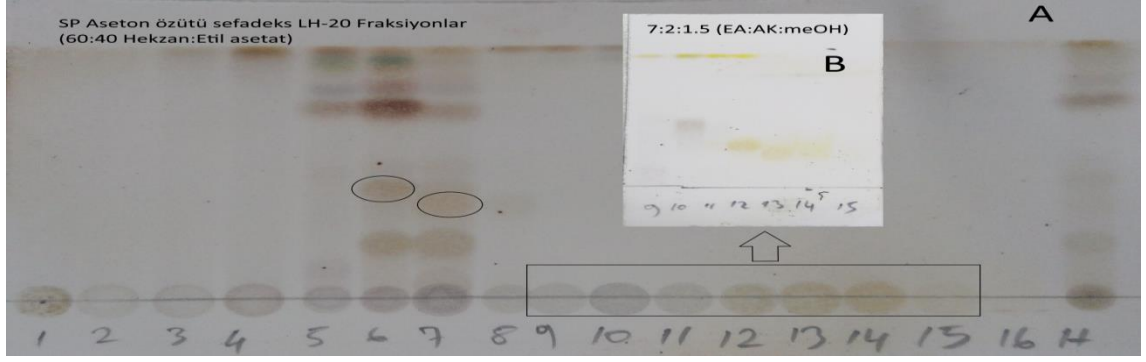
Bölüm 4.2'de verilen *S. germanicopolitana* bitkisinden izole edilen tüm fenolik maddeleri içermekte olan *S. perfoliata* bitkisinin yapraklarından iridoid glikozitleri olan ajugol (M11) ve ajugosid (M12) izole edildi. Bu iki bileşiğe çalışmaya konu olan diğer iki bitkide rastlanmamıştır. Ayrıca diğer bitkilerde az miktarda bulunan ancak *S. perfoliata* bitkisinin majör fenoliklerinden olan 3'-metilizoskutellerain-7-O-[6'''-O-asetil-allosil-(1→2)-glikozit] (M10) bileşiği de izole edilmiştir. Adı geçen üç bileşikle beraber *S. perfoliata* bitkisinin polar özütlerinde toplam 12 molekülün varlığı tespit edilmiş oldu.

4.4. Apolar Bileşiklerin Saflaştırılması

Terpenler ve terpenoidler genelde apolar maddelerdir ve apolar çözücülerle özütlenmesi gerekir. Alkolik özütleme işlemleri ile de bitki örneğinden alınabilmelerine rağmen metanol/etanol kullanıldığında bitkide bulunan diğer polar bileşikler de özüte geçeceğinden hedef yalnız terpenik bileşikler olduğunda aseton ve etil asetat (ve bunların hekzanla yapılabilecek kombinasyonları) uygun olacaktır. Bu çalışmada terpenik bileşikler etil asetat ile özütlendi ve ilk fraksiyonlandırma işlemi (terpenleri diğer polar metabolitlerden ayırma) sefadeks LH-20 üzerinden yapıldı. Hareketli faz olarak metanol kullanıldı. Çünkü sefadeks LH-20 polar bir çözücü ile şişirilip şartlandığında; polar bileşikleri daha fazla tutmakta apolar bileşiklerin elüsyonunu hızlandırmaktadır. Terpenik maddelerin ileri saflaştırma işlemlerinde silika jel dolgulu kolonlar tercih edildiğinden sefadeks LH-20 terpenik maddelerce zengin fraksiyonların toplanmasında kullanıldı. Nitekim çalışılan bütün apolar özütlerde terpenik bileşikler erken fraksiyonlarda ve klorofil ile beraber toplanmıştır.

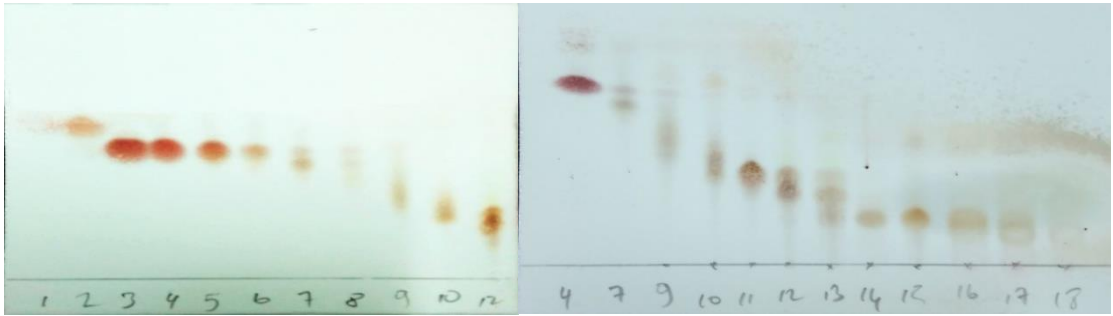
4.4.1. *Sideritis perfoliata* bitkisindeki terpenik bileşiklerin izolasyon prosedürü

5 g aseton özütü sefadeks LH-20 üzerinden fraksiyonlandırıldı. Hareketli faz olarak metanol kullanıldı. 0.5 mL/dakika akış ile her biri 30 mL olmak üzere 16 fraksiyon toplandı. Fraksiyonların İTK profili aşağıda verilmiştir (Şekil 4. 25). Şekilde terpenik moleküllerin 5-7 fraksiyonlarda toplandığı görülmektedir. Polar içerik 10-15 fraksiyonlarda toplanmıştır (Şekil 4. 25B). Fraksiyon 6 (A) ve 7 (B) R_f değerleri birbirine yakın, ortak olmayan iki farklı madde içerdiğinden birleştirilmedi.



Şekil 4. 25. *Sideritis perfoliata*'nın aseton özütünün sefadeks LH-20 kolonu ile İTK profili

Silika jel kolon 1: Fraksiyon 6 (450 mg); 600 g silika jel ile doldurulup 60:40 hekzan:etil asetat ile şartlandırılan kolona, aynı çözücü sistemi ile çözülerek tatbik edildi. Maddelerin elüsyonu tamamlanana kadar polarite sabit tutuldu. İTK kontrolü ile; ilk gelen madde ile beraber fraksiyon toplama işlemi başlatıldı. Mobil faz akış hızı; kolon musluğu ile ayarlanarak 30 dakikada bir fraksiyon olacak şekilde yaklaşık 8 mL'lik hacimlerde toplam 18 fraksiyon toplandı. Fraksiyonların İTK görüntüsü Şekil 4. 26'da verilmiştir.

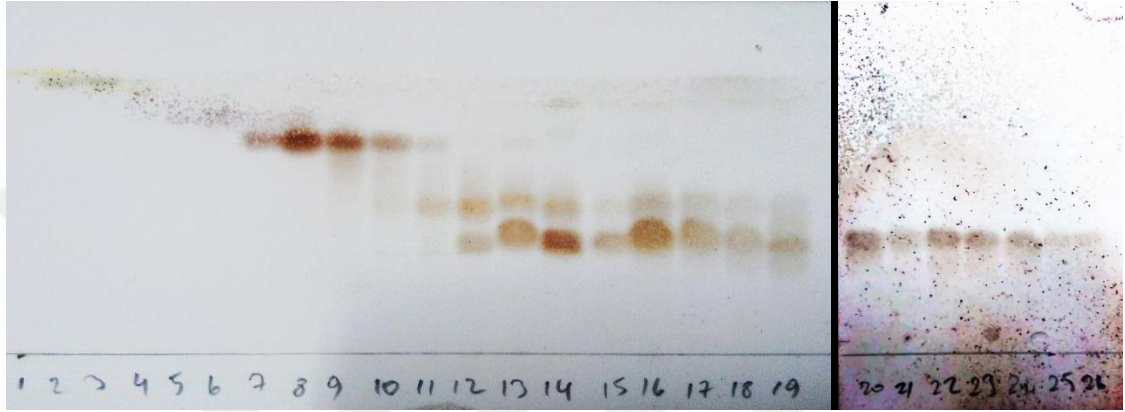


Şekil 4. 26. *Sideritis perfoliata*'nın apolar kısmının silika kolondan alınan fraksiyonların İTK görüntüleri.

Fraksiyon 1'den **SP1**, 2'den **SP2**, 3-6 aralığından **SP3** ve 14-16 aralığından ise **SP4** molekülleri saf olarak elde edildi.

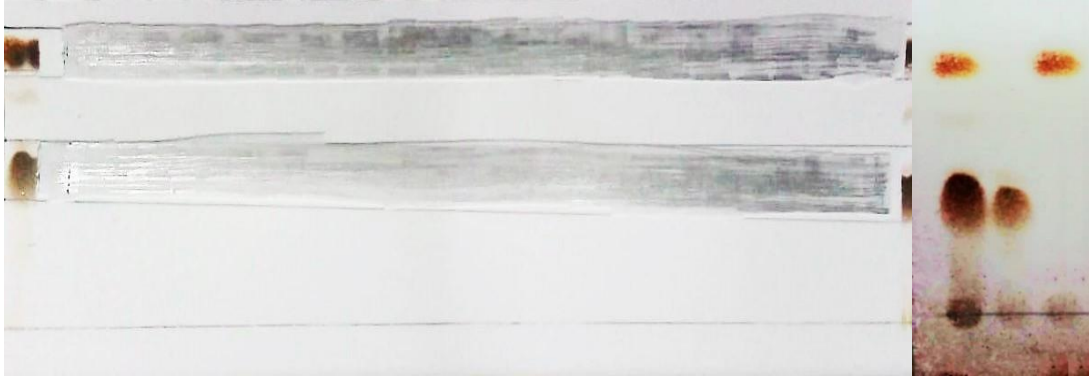
Silika jel kolon 2: Fraksiyon 7 (350 mg); 500 g silika jel ile doldurulmuş ve 60:40 hekzan:etil asetat ile şartlandırılmış cam kolona tatbik edildi. Mobil faz akış hızı; kolon

musluğu olabildiğince kısılarak oldukça yavaşlatıldı. Her biri yaklaşık 5 mL hacimlerde 24 fraksiyon toplandı. Toplama işlemi fraksiyon kolektörü ile damla sayısı baz alınarak yapıldı (250 damla). Toplanan fraksiyonların İTK görüntüsü Şekil 4. 27’de verilmiştir. Buradan; 7-10, 12-19 ve 20-24 fraksiyon aralıkları birleştirildi. Fraksiyon 7-10 aralığı kolon 1’de ayrılan **SP-3** molekülü ile aynı olduğu için (TLC, GC-MS ve NMR verilerine göre) birleştirildi.



Şekil 4. 27. *Sideritis perfoliata*'nın apolar kısmının İTK görüntüleri (silika jel kolon)

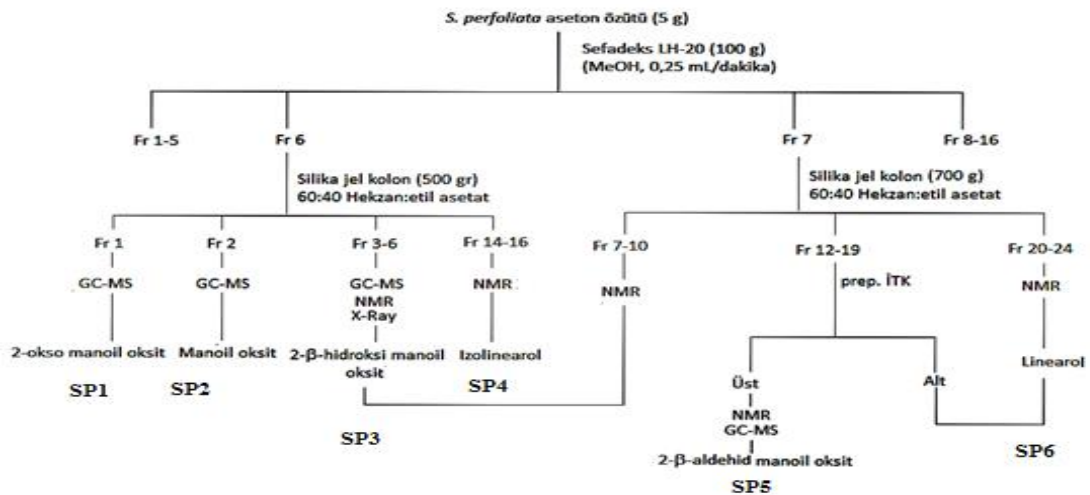
Fraksiyon 12-19 aralığı; iki madde içerdiğinden preperatif İTK ile ayrıldı. Yapılan denemelerde; 60:35:5 hekzan:klorofom:etil asetat karışımı, bu iki maddenin ayrılmasında en uygun çözücü sistemi olduğundan, preperatif ayırmada bu çözücü sistemi kullanıldı. Spotlar birbirine temas etmeyecek şekilde uygulandı. Maddeler çıplak gözle ve UV ışığı altında görünür olmadığından sadece kenar spotlar açık kalacak şekilde İTK kapatılarak sülfürik asit belirteci ile görünür hale getirildi. Bantlar İTK yüzeyinden spatül ile kazındıktan sonra aseton ile çözülüp silikajel kalıntıları süzüldü. Preperatif İTK uygulaması, ham karışım ve uygulamadan elde edilen bantlardan alınan maddelerin bireysel İTK uygulamaları Şekil 4. 28’de sunulmuştur.



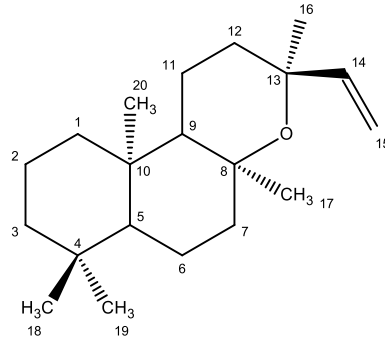
Şekil 4. 28. *Sideritis perfoliata*'nın apolar kısmına uygulanan preparatif İTK.

Preparatif İTK'dan elde edilen alt bant hem görsel olarak hemde spektral verilere göre fr 20-24 (**SP6**) ile aynı olduğundan birleştirildi. Üst tabakadan alınan madde (**SP5**) biraz daha yağmsı ve cam çeperine yapışık halde katı olarak elde edildi.

Fraksiyon 20-24 (**SP6**) aralığı birleştirilip çözücüsü uzaklaştırıldıktan sonra aseton içinde oda şartlarında gece boyu bekletildiğinde; balon çeperinde top şeklinde kristallendiği gözlemlendi. Kristaller hekzan ile yıkandıktan sonra kurutulup cam çeperinden kazınarak alındı. *Sideritis perfoliata* bitkisinin aseton özütünden **SP1**, **SP2**, **SP3**, **SP4**, **SP5** ve **SP6** moleküllerinin izolasyon şemasını gösteren görsel Şekil 4. 29'da verilmiştir.

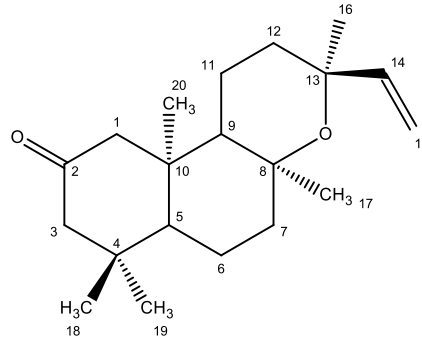


Şekil 4. 29. *Sideritis perfoliata*'nın aseton özütünden terpenlerin izolasyon şeması



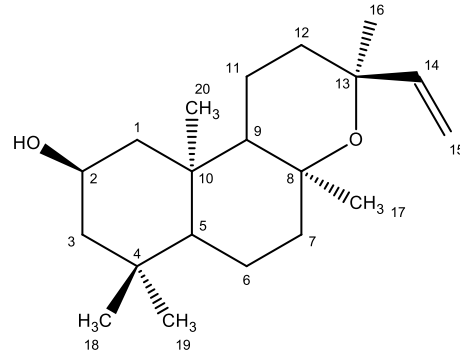
Şekil 4. 30. **SP1** (13-epi-manoil oksit) molekülünün kimyasal yapısı

SP1 (13-epi-manoil oksit): Bileşik renksiz sıvı olarak elde edildi. Bileşiğin GC-MS spektrumunda m/z $[M-CH_3]^+$ 275 moleküler iyon piki molekülün $C_{20}H_{34}O$ kapalı formülü ile uyumludur ($C_{19}H_{31}O$ için hesaplanan 275). Molekülün ana iyon piki gözlenmemiştir. Bunun sebebi; 16 numaralı metil grubunun ayrılmasından sonra oluşan pozitif yükün vinil grubu ile konjugasyonundan dolayı daha stabil olması ile açıklanabilir. Benzer kütle fragmentleri *Stemodia trifoliata* bitkisinden izole edilen 6-hidroksi manoil oksit bileşiği için de rapor edilmiştir (Silva et al., 2009). Ayrıca MS spektrumunda $[M-CH_3-H_2O]^+$ 257 sinyali gözlenmektedir. Bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumunda kısıtlı numune miktarından dolayı kuarterner karbon sinyalleri (C8, C10 ve C13) gözlenmemiştir. Ancak H20, H16 ve H17 metil sinyalleri ile sırasıyla C10, C13 ve C8 karbonlarının net HMBC etkileşimleri gözlenmiştir. HMBC çapraz piklerinden yola çıkılarak C8, C10 ve C13 karbonlarının kimyasal kaymaları sırası ile 75.76, 37.70 ve 73.28 olarak belirlenmiştir. Bu bilgiler ışında **SP1** bileşiği 13-epi-manoil oksit olarak tanımlandı. Detaylı 1H ve ^{13}C -NMR verileri Çizelge 4. 6'da, NMR spektrumları ise Ek-14'te verilmiştir. Elde edilen spektral veriler literatür ile uyumludur (Pietsch and König, 2000). Bileşiğin *Sideritis germanicopolitana* bitkisinin uçucu yağında da % 5 civarında bulunduğu grubumuz tarafından tespit edilmiştir (Bayan ve Akşit, 2016).



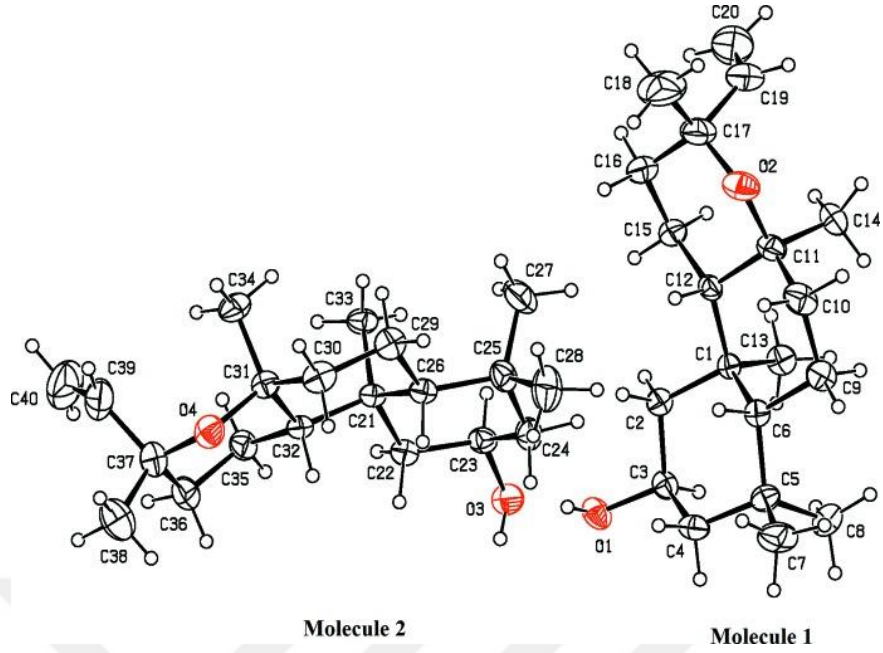
Şekil 4. 31. **SP2** (2-okso-13-epi manoil oksit) molekülünün kimyasal yapısı

SP2 (2-okso-13-epi manoil oksit): Molekül beyaz renkli kristaller şeklinde izole edildi. Bileşiğin formülü GC-MS spektrumunda m/z $[M-CH_3]^+$ 289 iyon pikinden yola çıkılarak $C_{20}H_{32}O_2$ olarak belirlendi ($C_{19}H_{29}O_2$ için hesaplanan 291). **SP1** ile benzer vinilik proton yarılımlarına sahip olan molekülün ^{13}C -NMR spektrumunda 211.66 ppm'de bir karbonil sinyali gözlemlendi. HMBC spektrumunda bu karbonil karbonu (C2) ile iki farklı diastrotopik proton grubunun ($H_{1\alpha}$, $H_{1\beta}$ ve $H_{3\alpha}$, $H_{3\beta}$) ve H20 (1.02, s) protonunun etkileşmesi karbonil grubunun C2 pozisyonunda olduğunu gösterir. Molekülün diğer geriye kalan bütün karbon sinyalleri **SP1** molekülü ile benzer kimyasal kaymalara sahiptir. Bileşik; Sezik (1985) tarafından *S. perfoliata* bitkisinden izole edilen 2- α -hidroksi-13-epi-manoil oksit molekülünden trioksit ve piridin karışımında indirgenmesi ile yarı sentetik olarak elde edilmiştir (Sezik vd., 1985). 1991 yılında ise bileşiğin doğal kaynaklarda bulunduğu ilk olarak (Fraga et al., 1991) tarafından rapor edildi. Bu çalışmada ise 2-okso-epi-manoil oksit bileşiğinin *S. perfoliata* bitkisinde 13-epi-manoil oksit bileşiği ile beraber doğal olarak bulunduğu ilk defa rapor edildi. NMR verileri Çizelge 4. 6'da, NMR spektrumları ise Ek-15'te verilmiştir



Şekil 4. 32. **SP3** (2-β-hidroksi-13-epi-manoil oksit) molekülünün kimyasal yapısı

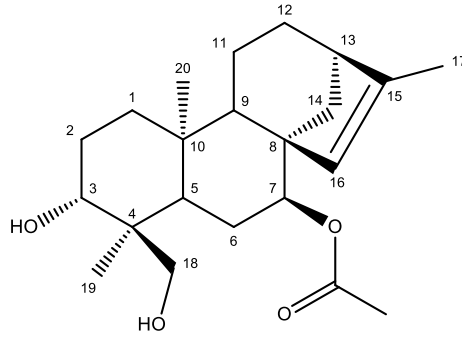
SP3 (2-β-hidroksi-13-epi-manoil oksit): İğne şeklinde renksiz kristaller olarak elde edildi. Etil asetat ve metanol ile kristallendirme denemelerinde ise madde beyaz amorf toz olarak elde edildi. En güzel kristal şekilleri hekzan, aseton ve bu çözücülerin karışımlarında elde edildi. Molekülün ^{13}C -NMR spektrumunda gözlenen 20 karbon sinyali; molekülün $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_2$ kapalı formülü ile uyumludur. Kütle spektrumunda; moleküler iyon piki m/z $[\text{M}]^+$ 306 gözlenmemiştir. m/z $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ 291 iyon pikinden yola çıkarak bileşiğin molekül formülü $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_2$ olarak belirlendi. Metil grubunun ayrılmasında sonraki art arda iki dehidrasyon ürünü 273 ve 255 fragmentleri de gözlemlendi. COSY spektrumunda görülen, 3.90 (H2) ile 2.00/0.77 (H1 $_{\alpha}$ /H1 $_{\beta}$) ve 1.78/1.08 (H3 $_{\alpha}$ /H3 $_{\beta}$) etkileşimi, HMBC spektrumunda 48.4 (C1) ve 51.2 (C3) etkileşimleri hidroksi grubunun C2 konumunda olduğunu gösterir. 147.4 (C14) ve 109.6 (C15) ile korale 5.97 (dd, $J = 17.3$ ve 11.1 Hz, H14), 4.95 (d, $J = 17.9$ Hz, H15 $_{\alpha}$) ve 4.94 (d, $J = 7.8, 10.9$ Hz, H15 $_{\beta}$) ^1H -NMR sinyalleri C13 konumunda vinil grubunun varlığını gösterir. SP3, GC-MS, NMR ve X-Ray spektrumlarından edinilen datalarının ışığında **2-β-hidroksi-13-epi-manoil oksit** olarak tanımlandı. X-ray dataları grubumuz tarafından yayınlanmıştır (Çelik vd., 2016).



Şekil 4. 33. **SP3** (2-β-hidroksi-13-epi-manoil oksit) molekülünün X-Ray ortep görüntüsü

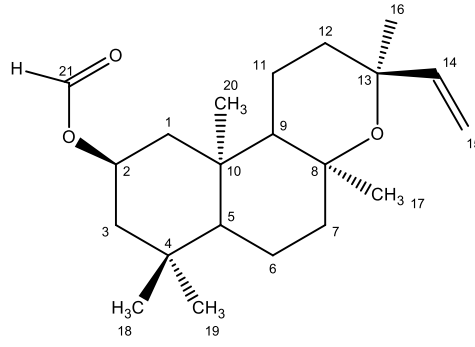
Şekil 4.33'de görülen **SP3** molekülüne ait ortep görüntüleri incelendiğinde, kristalografik olarak birbirinden bağımsız, benzer konformasyona sahip iki farklı molekül gözlemlendi. Molekül 1'de OH grubunun bağlı olduğu sikloheksan halkası (C1-C6) ve merkezi sikloheksan halkası (C1/C6/C9-C12) $Q_T = 0.536 (3) \text{ \AA}$, $\theta = 0.0 (3)$, $\varphi = 270 (81)^\circ$ and $Q_T = 0.584 (3) \text{ \AA}$, $\theta = 4.4 (3)$, $\varphi = 59 (4)^\circ$ parametrelerine göre sandalye konformasyonunda bükülmüştür. Molekül 2'deki eşdeğer halkalar (C21-C16, C21/C26/C29-C32 and O4/C31/C32/C35-C37) ise $Q_T = 0.534 (3) \text{ \AA}$, $\theta = 1.9 (3)$, $\varphi = 296 (11)^\circ$, $Q_T = 0.583 (3) \text{ \AA}$, $\theta = 5.0 (3)$, $\varphi = 72 (3)^\circ$ and $Q_T = 0.554 (3) \text{ \AA}$, $\theta = 11.9 (3)$, $\varphi = 127.2 (15)^\circ$ parametreleri ile bükülmüştür. Bağ uzunlukları ve bağ açıları daha önce rapor edilen benzer moleküllerle benzerlik göstermektedir (CCDC numarası 1501445).

2-β-Hidroksi-13-epi-manoil oksit bileşiği ilk olarak bu çalışmaya da konu olan *Sideritis perfoliata* bitkisinden 1985 yılında izole edilmiştir (Sezik vd., 1985). 2005 tarihli bir çalışmada Lübnan orijinli *S. perfoliata* bitkisinde (coğrafik koşullara dayandırılarak) bulunmadığı rapor edilmiştir (Bruno et al., 2005). Günümüze kadar diğer *Sideritis* türlerinde varlığı rapor edilmemiştir. Bu yüzden bitkinin kemotaksonomik sınıflandırılmasında önemli bir bileşendir.



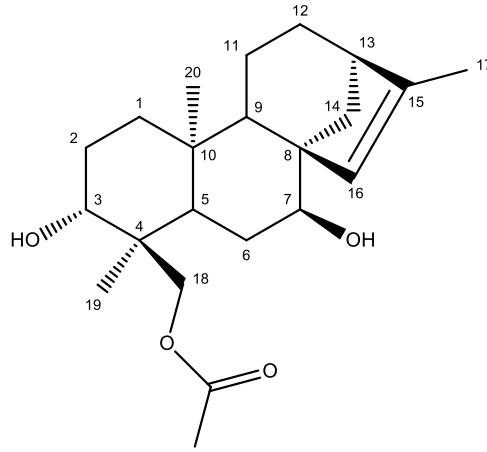
Şekil 4. 34. **SP4** (7-asetil-izofoliol) molekülünün kimyasal yapısı

SP4 (7-asetil-izofoliol): Bileşik beyaz renkli amorf katı olarak izole edildi. GC-MS spektrumunda gözlenen m/z $[M]^+$ 362 iyon pikinden hareketle molekülün kapalı formülü $C_{22}H_{34}O_4$ olarak belirlendi. 1H -NMR spektrumunda 5.50 ppm'de singlet şeklinde gözlenen olefinik proton sinyalinin ve HMBC spektrumundaki 1.75 (H17)/143.81 (C16) etkileşiminin varlığından dolayı bileşiğin ent-kauren iskeletine sahip olduğu belirlendi. ^{13}C -NMR spektrumunda gözlenen 74.59 (C3) ve 74.87 (C7) sinyalleri hidroksi grubu bağlı iki karbonun olduğunu gösterdi. 64.06 ppm'de iki diastrotopik proton taşıyan [(3.31, d, 12.4 Hz, H18_a) ve (2.98, d, 12.4 Hz H18_β)] karbon sinyalinden bir oksimeten grubunun olduğu belirlendi. 171.83 ve 21.17 sinyalleri molekülde bir asetil grubunun varlığını gösterdi. 2.06 ppm'de (s, H21) rezonans olan protonun, 74.59 ppm'de rezonans olan karbon ile HMBC etkileşmesi, asetil grubunun C7 karbonuna bağlı olduğunu gösterdi. 1D ve 2D-NMR spektrumlarının detaylı incelenmesinden sonra molekül 7-asetil-isofoliol olarak aydınlatıldı. Bileşiğin *Sideritis perfoliata* bitkisindeki ve diğer *Sideritis* türlerindeki varlığı henüz rapor edilmemiştir. Bu yüzden bileşik tür için yenidir. C7 konumunda asetil taşımayan isofoliol bileşiği *Sideritis leucantha* bitkisinden izole edilmiştir (Quesada et al., 1972). Detaylı NMR verileri Çizelge 4. 7'de NMR spektrumları ise Ek-17'de verilmiştir.



Şekil 4. 35. **SP5** (2-β-format-13-epi-manoil oksit) molekülünün kimyasal yapısı

SP5 (2-β-format-13-epi-manoil oksit): Aynı iskelete sahip **SP3** molekülü iğne şeklinde kristaller halinde elde edilmesine rağmen, 2 konumunda format grubu taşıyan ve ilk kez bu çalışmada rapor edilen **SP5** molekülü; beyaz renkli, yağmsı ve cam çeperine yapışık bir görüntü sergilemektedir. Bu iki molekülün ^{13}C -NMR dataları karşılaştırıldığında; C1, C2 ve C3'ün kimyasal kaymaları dışında büyük benzerlik göstermektedirler. ^1H -NMR spektrumunda $\delta_{\text{H}}=8.02$ ppm'deki singlet ve ^{13}C -NMR spektrumunda $\delta_{\text{C}}=160.7$ ppm'deki CH sinyal molekülde bir aldehit grubunun varlığını gösterir. Nitekim IR spektrumundaki (Bkz. EK 18) 1710 cm^{-1} (C=O) ve 2952 cm^{-1} (=C-H) gerilme sinyalleri bunu doğrulamaktadır. MS spektrumunda (Bkz. EK-18) **SP3**'de olduğu gibi metil grubun (C16) ayrılmasıyla oluşan m/z 319 ($[\text{M}-\text{CH}_3]^+$) fragmenti gözlenmiş ve bundan sonra aldehitlerin yaygın fragmentasyon ürünü olan 28 $[\text{M}-\text{CO}]^+$ ayrılması gerçekleşmiştir. Ayrıca m/z 273 ve 255 art arda iki dehidrasyon fragmentleri de spektrumda yer almaktadır. HMBC spektrumunda $\text{H}_2 \rightarrow \text{C}_{21}$ ve $\text{H}_{21} \rightarrow \text{C}_2$ etkileşimleri format grubunun C2'ye bağlı olduğunu gösterir. COSY spektrumunda da zayıf da olsa H_2/H_{21} (5.20/8.02) etkileşmesi mevcuttur. Ayrıca H2 komşu diastropik protonların ($\text{H}_{1\alpha}/\text{H}_{1\beta}$ ve $\text{H}_{3\alpha}/\text{H}_{3\beta}$) herbiri ile ayrı ayrı etkileşim içindedir. Bu bulgular format grubunun C2'den bağlı olduğunun ispatıdır. C2 konumunda format grubu taşıyan **SP5** molekülü elde edilen spektral veriler ışığında 2-oksit olarak tanımlandı. Bileşik daha önceden bilinmeyen bir bileşiktir. Molekülün doğal ürünlerde bulunduğu ilk defa bu çalışmada rapor edilmiştir. Ancak 3-β-format-13-epi-manoil oksit türevinin *Sideritis canariensis* türünde bulunduğu literatürde yer almaktadır (Gonzalez et al., 1973). Moleküle ait detaylı ^1H ve ^{13}C -NMR verileri Çizelge 4. 6'da, NMR spektrumları ise Ek-18'de verilmiştir



Şekil 4. 36. **SP6** (Ízolinearol) molekülünün kimyasal yapısı

SP6 (Ízolinearol): Bileşik beyaz renkli kristalimsi yapı katı olarak izole edildi. GC-MS spektrumunda gözlenen m/z $[M]^+$ 362 iyon pikinden hareketle molekülün kapalı formülü $C_{22}H_{34}O_4$ olarak belirlendi. Bileşik **SP5** ile aynı kapalı formüle sahiptir. Ancak GC-MS spektrumları karşılaştırıldığında; m/z $[M-Ac]^+$ 316 deasetilasyon fragmentinin **SP6**'da daha kararlı olduğu görülmektedir. Bu da deasetilasyon işleminden sonra oluşan yükün oksimetilen grubu tarafından daha kararlı kılındığını gösterir. Bileşiğin 1H ve ^{13}C -NMR spektrumları incelendiğinde; **SP4** molekülü ile benzer proton yarılmalarına ve karbon sinyallerine sahip olduğu görülmektedir. $H_{18\alpha}/H_{18\beta}$ diastrotopik protonlarının ve C18'in aşağı alana kayması asetil grubunun C18 konumunda olduğunu düşündürdü. Sırasıyla 4.07 (d, 11.6 Hz) ve 3.97 (d, 11.6 Hz) ppm'de rezonans olan $H_{18\alpha}/H_{18\beta}$ protonlarının 171.80 (C21), 39.10 (C4) ve 74.84 (C3) ile net HMBC etkileşimleri asetil grubunun yerini doğruladı. Bileşiğe ait 1H ve ^{13}C -NMR verileri Çizelge 4. 7'de, NMR spektrumları ise Ek-19'da verilmiştir. Bileşik spektral verilerin yorumlanmasından sonra izolinearol olarak tanımlandı. Bileşik daha önce *S. sipylea* (Topçu vd., 2002) , *S. stricta* (Şahin vd., 2006) ve *S. euboica* (Venturella and Bellino, 1977) bitkilerinden izole edilmiştir.

Çizelge 4. 6. *S. perfoliata* bitkisinden izole edilen monoil oksit türevlerinin ¹H-NMR değerleri

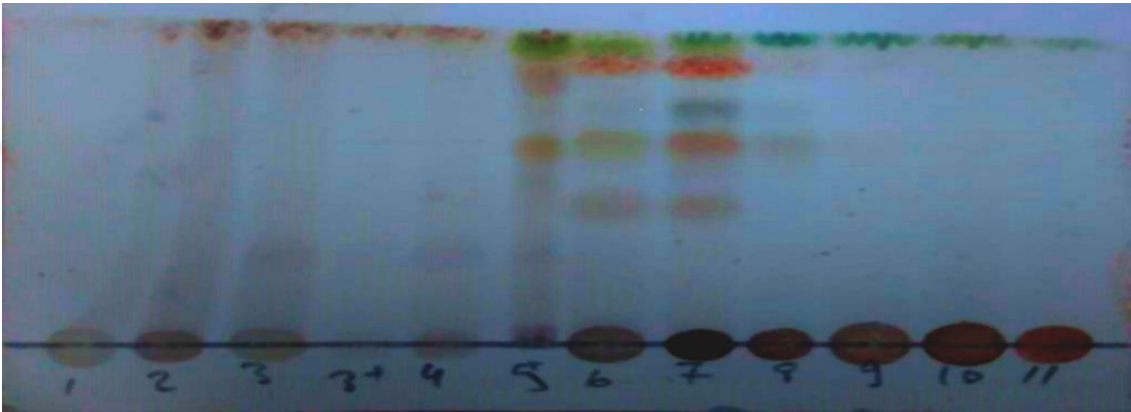
	SP1		SP2		SP3		SP5	
1	43.09	1.50-1.47(m)	55.05	2.00 (d, 12.5 Hz) 2.34 (dd, 12.5, 1.6 Hz)	48.42	2.00 (dd, 11.3, 3.3 Hz) 0.77 (d, 11.3 Hz)	44.39	2.04 (ddd, 11.6, 4.6, 1.7 Hz) 0.95 (d, 11.6 Hz)
2	18.62	1.23-1.19 (m)	211.69	-	65.17	3.92 – 3.85 (m)	69.16	5.20 (ddd, 16.0, 11.6, 4.3 Hz)
3	39.33	1.12-1.07 (m)	55.63	2.15 (dd, 1.6, 12.45) 2.24-2.20 (m)	51.21	1.78 – 1.71 (m) 1.08 (d, 11.3 Hz)	46.77	1.81 – 1.78 (m) 1.29 – 1.23 (m)
4	34.83	-	34.58	-	34.77	-	34.77	-
5	56.45	0.98-0.90 (m)	56.47	1.54 (dd, 12.27, 2.31)	55.93	0.93 (d, 12.4 Hz)	55.94	1.01 (dd, 12.3, 2.1 Hz)
6	19.89	1.76 (dt, 12.1, 3.2 Hz) 1.37(dd, 12.1, 3.1 Hz)	19.98	1.78-1.72 (m) 1.37 (m)	19.49	1.66 (ddd, 12.4, 5.9, 3.0 Hz)	19.44	1.67 (ddd, 13.8, 6.7, 3.3 Hz)
7	42.16	1.81-1.75 (m) 1.45-1.40 (m)	42.42	1.82 (dt, 12.1, 3.1 Hz) 1.47-1.41 (m)	42.87	1.78 – 1.71 (m) 1.36 (t, 12.4 Hz)	42.82	1.38 (dt, 12.8, 3.5 Hz)
8	*	-	75.56	-	75.93	-	75.71	-
9	58.45	1.31-1.27 (m)	57.86	1.47-1.41 (m)	58.32	1.22 (t, 8.7 Hz)	58.29	1.29 – 1.23 (m)
10	*	-	38.63	-	38.45	-	38.46	-
11	15.86	1.48-1.43 (m)	16.15	1.45-1.37 (m)	16.04	1.52-1.48 (m) 1.44-1.40 (m)	16.11	1.51 – 1.42 (m)
12	34.83	1.65-1.60 (m)	34.58	1.47-1.41 (m)	34.70	2.20 – 2.18 (m) 1.48 – 1.40 (m)	34.67	2.22 (dd, 10.9, 4.0 Hz) 1.44 (dd, 7.5, 4.0 Hz)
13	*	-	73.42	-	73.41	-	73.35	-
14	147.71	6.01 (dd, 17.9, 11.6 Hz)	147.15	5.97 (dd, 17.9, 11.0 Hz)	147.41	5.97 (dd, 17.8, 11.1 Hz)	147.37	5.99 (dd, 17.9, 11.0 Hz)
15	109.45	4.96 (d, 17.9 Hz) 4.90 (d, 11.6 Hz)	109.83	4.95 (d, 17.9 Hz) 4.90 (d, 11.0 Hz)	109.63	4.95 (d, 17.9 Hz) 4.89 (d, 10.9 Hz)	109.69	4.96 (d, 17.9 Hz) 4.91 (d, 11.0 Hz)
16	32.70	1.13 (s)	32.60	1.12 (s)	32.60	1.10 (s)	32.62	1.12 (s)
17	23.91	1.21 (s)	23.36	1.20 (s)	23.99	1.19 (s)	23.95	1.21 (s)
18	33.31	0.78 (s)	33.33	1.03 (s)	33.39	0.90 (s)	33.26	0.94 (s)
19	21.23	0.85 (s)	22.82	0.83 (s)	22.09	0.80 (s)	21.94	0.86 (s)
20	15.83	0.72 (s)	16.86	0.71 (s)	16.89	0.75 (s)	16.70	0.81 (s)
21	-	-	-	-	-	-	160.69	8.02 (s)

Çizelge 4. 7. *S. perfoliata* bitkisinden izole edilen terpenoidlerin ^1H ve ^{13}C -NMR verileri

	SP4 (7-asetil-isofoliol)		SP6 (İzolinearol)	
	^{13}C	^1H (CDCl_3 , 600 MHz)		
1	38.4	1.89 – 1.85 (m) 0.98 (dd, 12.7, 6.8 Hz)	38.4	1.84 (dt, 13.3, 3.5 Hz) 1.00 – 0.93 (m)
2	24.8	1.50 – 1.43 (m)	26.4	1.70 – 1.67 (m,)
3	74.8	3.65 – 3.62 (m)	74.8	3.65, (t, 2.8 Hz)
4	38.8	-	39.1	-
5	37.0	1.96 (dd, 10.7, 3.6 Hz)	37.8	1.65 (dd, 12.9, 2.3 Hz)
6	26.0	1.70 – 1.67 (m)	26.7	1.70 – 1.67 (m)
7	74.6	4.90 (dd, 11.9, 4.7 Hz)	72.2	3.53 – 3.49 (m)
8	53.2	-	53.0	-
9	43.7	1.36 (dd, 9.9, 5.1 Hz)	43.8	1.36 – 1.32 (m)
10	41.7	-	41.8	-
11	18.5	1.50 – 1.43 (m)	18.4	1.54 – 1.46 (m)
12	23.4	1.79 (dd, 12.7, 3.4 Hz)	24.8	1.54 – 1.46 (m)
13	44.6	2.38 – 2.34 (m)	44.6	2.38 – 2.35 (m)
14	41.9	1.85 – 1.82 (m) 1.36 (dd, 9.9, 5.1 Hz)	42.0	1.89 (d, 10.1 Hz) 1.37 (dd, = 10.1, 5.3 Hz)
15	143.9	-	143.9	-
16	129.9	5.50 (s)	129.9	5.50 (s)
17	15.4	1.74 (s, 3H)	15.4	1.71 (s)
18	64.0	3.31 (d, 12.5 Hz) 2.98 (d, 12.4 Hz)	66.0	4.07 (d, 11.6 Hz) 3.97 (d, 11.6 Hz)
19	12.6	0.66 (s)	11.8	0.70 (s, 3H)
20	17.9	1.06 (s)	18.0	1.06 (s)
21	171.8	-	171.8	-
22	21.2	2.06 (s)	21.2	2.08 (s, 3H)

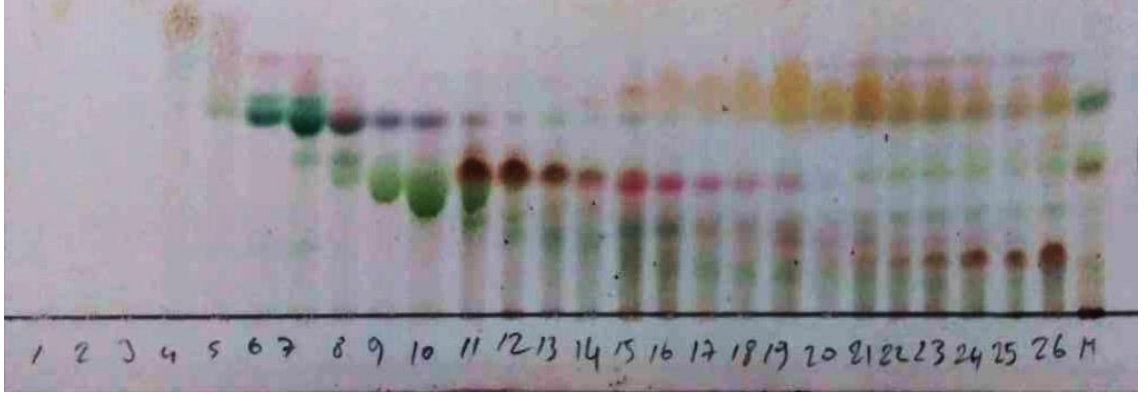
4.4.2. *Sideritis libanotica* bitkisindeki terpenik bileşiklerin izolasyon prosedürü

Sideritis libanotica bitkisinin apolar içeriğinin özütlenmesinde etil asetat kullanıldı. Özüt (3.2 g) sefadeks LH-20 üzerinden fraksiyonlandırıldı. Hareketli faz olarak metanol kullanıldı. 0.5 mL/dakika akış ile her biri 30 mL olmak üzere 18 fraksiyon toplandı. Fraksiyonların İTK profili Şekil 4.37’de verilmiştir.



Şekil 4. 37. *Sideritis libanotica* bitkisinin etil asetat özütünün sefadeks LH-20 kolonundan elde edilen fraksiyonların İTK profili.

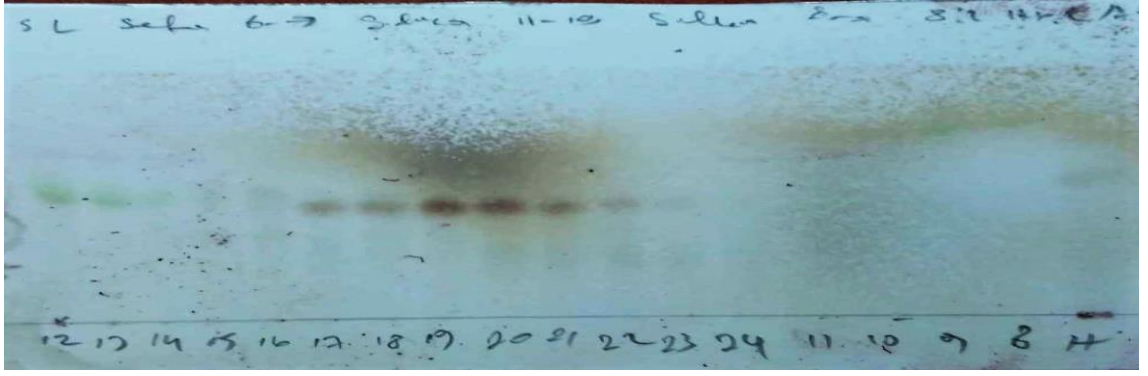
İTK incelendiğinde; terpenik moleküllerin 5-8 fraksiyonlarda elüe olduğu (klorofil ile beraber) görülmektedir. 3.2 g özütün fraksiyonlandırılmasından 1.2 g terpenik bileşiklerce zengin özüt elde edildi. Terpenik maddeler; 60:40 hekzan:etil asetat yürütücü fazı ile; 500 g dolgu maddesi içeren 35x70 cm boyutlarında cam kolon kullanılarak silika jel üzerinden fraksiyonlandırıldı. 500 g silika jel 1 L 60:40 hekzan:etil asetat karışımı ile bulamaç haline getirilip kolona aktarıldı ve yine 1L aynı karışım ile şartlandırıldı. Özüt 2 g silika jel ile karıştırılarak kolona uygulandı. Toplamda 20 mL’lik hacimlerde 26 fraksiyon toplandı. Mobil faz akış hızı 1 mL/dak olacak şekilde ayarlandı. Fraksiyonların İTK profili Şekil 4. 38’de verilmiştir.



Şekil 4. 38. *Sideritis libanotica*'nın apolar kısmının silika kolon fraksiyonlarının İTK görüntüsü

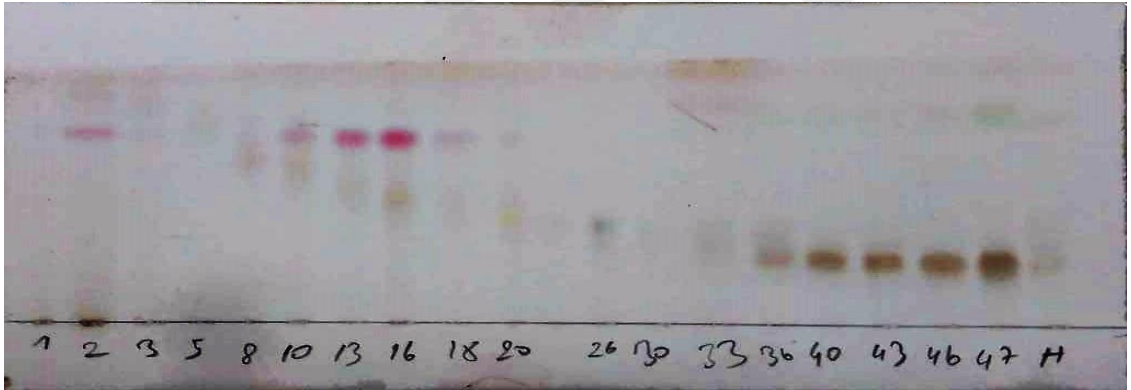
İTK profiline göre 11-19 (A), 20-26 (B) aralıkları birleştirildi. A aralığı birleştirilip çözücüleri uzaklaştırılırken balon çeperinde kristaller gözlemlendi. Ancak kristallerin yıkama, yeniden kristallendirme ve kazınarak alınma gibi teknikler ile saf şekilde ortamdan alınamamasından dolayı silika jel kolon ile ayrımı yapıldı.

A aralığı (11-19 fr), 65:35 hekzan etil asetat karışımında çözümlenerek aynı oranda çözücü sistemi ile doldurulup şartlandırılan silika jel kolona uygulandı. Fraksiyonlar kolektör yardımı ile damla sayısı baz alınarak 300 damla/saat (yaklaşık saatte 6 mL) toplandı. Toplamda 24 fraksiyon alındı. 17-22 fraksiyonlar benzer İTK profiline sahip olmasından hem de kristaller gözlenmesinden dolayı birleştirildi. Fraksiyonların İTK görüntüsü Şekil 4. 39'da verilmiştir. Birleştirilen bu fraksiyonlardan **SL1** (45 mg) olarak saf şekilde izole edildi.

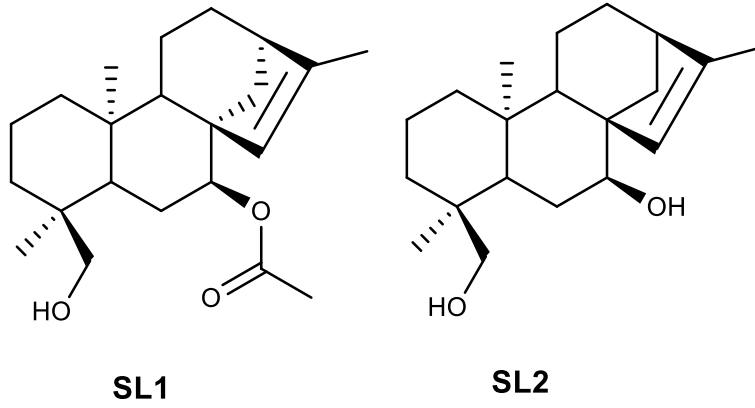


Şekil 4. 39. *Sideritis libanotica* apolar kısım silika kolon II İTK görüntüsü

B (32-37) aralığı 55:45 hekzan: etil asetat ile şartlandırılmış silika jel kolona aynı sistemle çözülerek uygulandı (350 g silika jel, 2.5x80 cm). Hareketli faz olarak kullanılan sistem kolon boyunca sabit tutuldu. Saatte bir fraksiyon olacak şekilde yaklaşık 20 mL hacimlerde 47 fraksiyon toplandı. 36-47 aralığından **SL2** saf olarak elde edildi.



Şekil 4. 40. *Sideritis libanotica* apolar kısım silika kolon III İTK görüntüsü



Şekil 4. 41. *S. libanotica* bitkisinden etil asetat özütünden izole edilen terpenler.

Çizelge 4. 8. *S. libanotica* bitkisinden izole edilen terpenoidlerin ^1H ve ^{13}C -NMR verileri

	SL1		SL2	
	^{13}C	^1H (CDCl_3 , 600 MHz)	^{13}C	^1H (CDCl_3 , 600 MHz)
1	39.83	0.82 (dd, 3.49, 13.1 Hz) 1.75-1.72 (m)	39.88	1.80-1.75 (m) 0.87-0.79 (m)
2	18.27	1.67-1.60 (m) 1.55-1.50 (m)	18.30	1.53-1.48 (m)
3	35.19	1.50-1.45 (m) 1.25-1.20 (m)	35.08	1.67-1.62 (m) 1.15 (d, 11.8 Hz)
4	39.07	-	39.22	-
5	44.53	2.36 (d, 2.9 Hz)	44.06	1.35-1.30 (m)
6	24.75	1.53-1.47 (m)	26.21	1.60 (dd, 12.8, 3.2 Hz)
7	78.23	4.70-4.68 (m)	75.36	3.62-3.58 (m)
8	51.84	-	53.48	-
9	44.84	1.36-1.30 (m)	44.72	2.35 (d, 3.0 Hz)
10	36.97		37.10	-
11	17.33	1.12-1.08 (m) 0,71 (d, 3.0 Hz)	17.96	1.64-1.59 (m)
12	23.48	1.74 (dd, 2.0, 13.1 Hz)	24.92	1.49-1.44 (m)
13	39.78	1.80 (d, 13.1 Hz) 1.67-1.63 (m)	38.12	1.80-1.75 (m)
14	41.97	1.96 (d, 10 Hz) 1.46-1.40 (m)	42.16	1.90 (d, 10.0 Hz) 1.35-1.30 (m)
15	129.77	5.25 (s)	129.88	5.46 (s)
16	143.75	-	143.97	-
17	15.33	1.69 (s)	15.46	1.71 (s)
18	71.39	3.32 (d, 10.8 Hz) 2.99 (d, 10.8 Hz)	70.81	2.91 (d, 11.4 Hz) 3.48 (d, 11.4 Hz)
19	17.73	1.07 (s)	17.71	1.05 (s)
20	17.89	0.70 (s)	17.62	0.67 (s)
21	170.69	-	-	
22	21.42	2.05 (s)	-	

4.5. Antiproliferatif Aktivite Sonuçları

Bitki özütlerinin MTT yöntemiyle tespit edilen GI_{50} değerleri incelendiğinde, bunların HeLa ve Hep3B kanser hücreleri üzerinde pozitif kontrollere göre çok az antiproliferatif etki gösterdiği, A549 kanser hücre hattı üzerinde ise pozitif kontrolle (5FU ve *cis*-platin) benzer antiproliferatif etki gösterdiği görülmektedir (Çizelge 4. 9). Özellikle; *S. germanicopolitana* bitkisinin bütün organları (**SGY**, **SGÇ**, **SGG**) ve *S. libanotica* bitkisinin gövde kısmı (**SLG**), A549 hücreleri üzerinde oldukça düşük GI_{50} değerlerine sahiptir (4.28–5.74 $\mu\text{g/mL}$). Bu değerlerin kontrol hücre hattı FL (insan amniyon hücresi) ile karşılaştırıldığında düşük kalması (7.28–40.81 $\mu\text{g/mL}$) bu ekstrelerin akciğer kanseri tedavisinde kullanılabilecek öncül molekülleri yüksek oranda taşıdığını göstermektedir (Çizelge 4. 9). Özütlerin IC_{50} değerleri incelendiğinde, **SGG**'nin tüm kanser hücre hatlarında (A549, HeLa ve Hep3B) kontrol hücre FL'ye göre düşük IC_{50} değerlerine sahip olması normal hücrelere fazla zarar vermeden kanserli hücrelerin çoğalmasını engellediğini gösterir. Ancak bu özütlerin aktivitelerinin (292.5–496.2 $\mu\text{g/mL}$) pozitif kontrol olarak kullanılan *cis*-platin ve 5-Florourasil (43.71–62.22 $\mu\text{g/mL}$) ile karşılaştırıldığında düşük olduğu görülür. Özütlerin genelde normal hücreye (FL) pozitif kontroller kadar zarar vermedikleri görülmektedir. Ancak kanserli hücrelerin büyümesini de yeterli derecede inhibe edemedikleri belirlendi.

Çizelge 4. 9. Ekstrelerin MTT testiyle belirlenen GI_{50} ve IC_{50} değerleri

Bileşikler ($\mu\text{g/mL}$)	GI_{50}				IC_{50}			
	A549	HeLa	Hep3B	FL	A549	HeLa	Hep3B	FL
SGY	3.84	26.32	98.83	7.28	234.1	295.7	376.4	211.4
SGÇ	4.28	31.97	85.72	12.01	279.4	302.9	344.8	311.4
SGG	2.58	239.6	97.74	26.85	292.5	294.6	417.3	543.7
SLY	22.12	87.96	81.32	16.41	522.3	393.3	813.7	425.8
SLÇ	34.69	91.72	45.43	24.53	827.4	351.3	350.4	442.3
SLG	5.74	61.53	77.80	40.81	386.8	458.5	817.3	585.3
SPY	13.46	60.13	46.19	10.93	299.4	602.1	523.7	254.3
SPÇ	16.72	77.85	58.96	15.62	288.5	396.3	356.2	240.2
SPG	20.45	85.21	65.21	21.44	300.12	450.4	378.2	268.5
5FU	5.43	6.02	5.96	5.29	62.22	58.99	55.64	57.15
Cis-platin	3.81	4.06	4.98	4.27	59.79	43.41	45.51	49.98

SP4 ve **M4** molekülleri A549, HeLa ve Hep3B kanser hücre hatlarında (GI_{50} değerleri 8.58 ve 13.88 μM) kontrol hücre hattı FL'ye (14.33–24.33 μM) göre oldukça düşük GI_{50} değerlerine sahiptirler (Bkz. Çizelge 4. 10). Bu verilerden elde edilen yaşam parametreleri incelendiğinde, kontrol hücre hattı FL'ye göre düşük GI_{50} ve IC_{50} değerlerine sahip olan bu iki molekül ayrıca pozitif kontrol ilaçlar olan 5FU ve *cis*-platinden de çok daha iyi bir antiproliferatif aktivite sergilediğinden; akciğer kanseri, rahim ağzı kanseri ve karaciğer kanserinin tedavisinde ileri farmakolojik testler için umut verici aday bileşikler olarak düşünülebilirler. **SP6**, **SL1** ve **SL2** molekülleri ise FL hücrelerine karşı da antiproliferatif etki göstermektedirler (GI_{50} değerleri 6.57-7.73 μM). Bu açıdan kanserli hücrelerin çoğalmasını engellerken normal hücrelere de benzer etki gösterdiğinden bu moleküller için ileri farmakolojik testlerin yapılması uygun görülmedi. Genel olarak izole edilen moleküllerin aktiviteleri incelendiğinde; **SP6** (GI_{50} değerleri 6.15–7.39 μM , IC_{50} değerleri 130.3–146.7 μM) molekülü, A549 ve HeLa kanser hücre hatlarına karşı; **M8** ve **M9** (GI_{50} değerleri 8.37–21.17 μM , IC_{50} değerleri 179.3–219.1 μM) izolatları Hep3B kanser hücre hattına karşı; **M2** (GI_{50} değerleri 15.47 μM , IC_{50} değerleri 380.1 μM) molekülü A549 kanser hücre hattına karşı kontrol olarak kullanılan antiproliferatif ilaçlar kadar aktivite sergilemişlerdir (Bkz. Çizelge 4. 10).

M3 (klorojenik asit) test edilen moleküller arasında; kanser hücrelerine karşı antiproliferatif etkisi en az olan moleküldür. A549, HeLa, Hep3b için GI_{50} değerleri sırasıyla 48.73, 62.27 ve 20.17 μM şeklindedir. Ancak FL hücrelerine karşı kanserli hücrelere göre oldukça aktiftir (GI_{50} 13.28 μM). Bu açıdan **M3** molekülü kanserli hücrelerin çoğalmasını inhibe edemezken normal hücreye karşı daha zararlıdır.

4'-metilhipolaetin türevleri olan **M6** (6'' bir asetil) ve **M8** (6'' ve 6''' iki asetil) moleküllerinin aktiviteleri karşılaştırıldığında A549 ve HeLa hücre hatlarında benzer aktiviteler gözlenirken Hep3B hücre hattında iki asetil grubuna sahip **M8** molekülü daha aktiftir. FL hücre hattı için her iki molekülün her iki formu benzer etkiye sahiptir. 4'-metilhipolaetin türevlerinin toksisitesi *cis*-platine yakın değerde iken 5-FU'dan daha yüksektir.

İzoskutellerain türevleri olan **M7** (iki asetil taşıyan) ve **M5** (bir asetil taşıyan) moleküllerin aktiviteleri karşılaştırıldığında iki asetil taşıyan türevin hem normal (FL) hem de kanserli hücre hatlarına karşı (A549, HeLa ve Hep3B) aktivitesi daha yüksektir. Benzer bir eğilim 4'-metilizokutellerain türevleri olan **M4** ve **M10** molekülleri için de söz konusudur. Buradan hareketle flavon allosil glukozitlerin antiproliferatif etkileri şeker gruplarındaki asetil sayısı ile ilişkilendirilebilir. Bu olgu; asetil gruplarının hidroksi gruplarına göre daha fazla lipofilik özelliğe sahip olmasından dolayı lipofilik yapıdaki hücre çeperinden geçerek hedef hücrelerin DNA'larına kolay ulaşımı ile açıklanabilir. Moleküllerin lipofilizm özelliğine katkı sağlayacak bir başka olgu ise metoksi gruplarıdır. Aynı fenolik iskelete aynı asetil sayısına sahip **M10** ve **M5** moleküllerinin aktivitesi incelendiğinde 4'-konumunda metoksi grubu taşıyan **M10**'un bütün hücre hatlarına karşı daha aktif olduğu görülmektedir.

M2 (Apigenin-7-(6''-*p*-kumaroil glikozit) molekülü test edilen flavon türevleri arasında en düşük aktiviteye sahiptir. Kanser hücrelerine karşı düşük antiproliferatif etkiye sahipken FL hücresine karşı en aktif moleküllerden biridir. Bu yönüyle antiproliferatif ajan adayı olarak gösterilemeyecek moleküllerden biridir.

M9 (Sideridosid) ve **M1** (verbaskosid) moleküllerinin test hücrelerine verdiği tepkiler benzerdir. Moleküller benzer fenolik yapıya sahiptir. Taşıdıkları şeker gruplarındaki farklılık, gösterdikleri aktivitede dikkate değer bir fark oluşturmamıştır.

Çizelge 4. 10. Test moleküllerinin MTT testiyle belirlenen GI₅₀ ve IC₅₀ değerleri

Bileşikler (μM)	GI ₅₀				IC ₅₀			
	A549	HeLa	Hep3B	FL	A549	HeLa	Hep3B	FL
SP1	8.21	10.30	84.11	8.77	245.9	165.8	394.4	185.2
SP2	23.30	77.97	80.41	14.81	404.1	495.8	828.2	306.8
SP3	8.15	26.56	11.61	10.23	205.1	190.1	196.3	187.7
SP4	8.58	10.95	12.40	14.33	180.1	152.2	189.2	191.1
SP5	22.31	28.26	61.16	85.96	483.1	419.5	412.8	855.2
SP6	6.15	7.39	12.32	7.42	146.7	130.3	175.2	168.1
SL1	8.20	9.55	15.62	7.73	184.5	143.8	194.6	164.3
SL2	8.24	8.25	9.52	6.57	165.1	131.4	161.1	147.2
M1	20.76	34.55	18.20	13.25	334.9	229.4	204.9	258.4
M2	15.47	83.65	134.5	22.3	380.1	447.9	527.1	510.5
M3	48.73	62.27	20.17	13.79	552.2	570.7	312.7	280.2
M4	12.92	13.88	7.52	24.23	242.8	196.6	177.2	252.8
M5	8.69	41.69	14.63	12.66	270.1	263.6	217.3	217.7
M6	7.28	31.70	15.47	15.00	231.7	242.1	201.2	214.3
M7	6.87	18.64	13.18	10.77	281.9	232.5	222.6	213.7
M8	9.44	27.81	8.37	13.58	303.4	224.9	179.3	211.8
M9	15.13	29.00	21.17	24.99	338.1	217.4	219.1	273.5
M10	6.95	15.12	12.33	9.19	256.9	277.5	220.7	190.5
5FU	41.91	46.35	45.89	40.74	478.4	453.6	427.8	439.2
Cis-platin	12.73	13.56	16.63	14.24	199.3	144.7	151.7	166.6

Manoil oksit türevleri olan **SP1**, **SP2**, **SP3** ve **SP5** moleküllerinin aktiviteleri karşılaştırıldığında, C2 konumunda hidroksi grubu taşıyan **SP3**'ün A549 ve Hep3b hücre hatlarına karşı oldukça aktif olmasına rağmen, FL hücre hattına karşı etkin olduğu görülmektedir. C2 konumunda karbonil grubu taşıyan **SP2** molekülünün aktivitesi **SP3** ile karşılaştırıldığında kanserli hücrelere karşı aktivitesi düşerken FL hücre hattına karşı aktivitesi oldukça yükselmiştir. Normal hücrelere karşı aktivitesi en düşük manoil oksit türevi C2 konumunda format grubu taşıyan **SP5** molekülüdür. C2 konumu süstitüe olmamış **SP1** molekülü, normal hücrelere karşı en etkin moleküldür. *cis-platin* ve 5-FU'dan daha yüksek sitotoksositeye sahiptir.

Aynı terpenik iskete sahip **SP4** ve **SP6** moleküllerinin taşıdıkları asetil gruplarının konumlarının değişmesi Hep3b hücre hattına karşı olan aktiviteleri değiştirmezken, C7 konumunda asetil taşıyan **SP6** molekülü **SP4**'e göre A549 ve HeLa hücre hatlarında

daha aktif iken FL hücre hattına karşı neredeyse 2 kat daha aktiftir. İki molekülün IC₅₀ değerleri incelendiğinde pozitif kontrollerden daha aktif oldukları görülmektedir. Ancak normal hücreye de aynı derecede aktif olduklarından antiproliferatif ajan olarak kullanılabilme ihtimalleri düşüktür.

Aynı iskelete sahip **SL1** ve **SL2** moleküllerinin aktiviteleri incelendiğinde Hep3b hücre hattının dışında diğer test hücrelerine benzer tepkiler verdiği görülmektedir. C7 konumunda asetil grubu taşımayan **SL2**, Hep3b hücre hattına karşı daha aktiftir.

Bu çalışmada izole edilen fenolik (M serisi) ve terpenik moleküllerin (SP ve SL serisi) aktiviteleri incelendiğinde terpenik moleküllerin en aktif moleküller olduğu görülmektedir. Terpen türevlerinin (IC₅₀ değerleri 130.3-194.6) gerçekleştirilen test koşullarında pozitif kontrollerden (IC₅₀ değerleri 144.7-478.4 µM) daha aktif olduğu görülmektedir. Ancak normal hücre hattına (FL) karşı en az *cis*-platin kadar ve 5-FU'dan iki kat daha aktiftirler.

MTT testinde yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenen SP, SL ve M serisi moleküllerin ELISA BrdU test sonuçlarının GI₅₀ ve IC₅₀ verileri incelendiğinde, bu izolatların tamamı A549, HT29 ve Hep3B kanser hücreleri üzerinde kontrol antiproliferatif moleküller olan 5-Florourasil ve *cis*-platinden daha fazla antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu görülmektedir (Çizelge 4. 11). ELISA BrdU test sonuçları, büyük ihtimalle bu moleküllerin DNA'ya doğrudan bağlanıp DNA sentezini ya da DNA polimerazla etkileşip DNA polimerazı inhibe ettiğini göstermektedir.

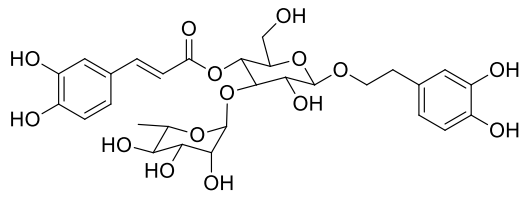
Çizelge 4. 11. Test moleküllerinin ELISA BrdU testiyle belirlenen GI₅₀ ve IC₅₀ değerleri

	GI ₅₀ (µM)			IC ₅₀ (µM)		
	A549	HT29	Hep3B	A549	HT29	Hep3B
<i>SP4</i>	4.91	5.81	3.73	40.13	75.75	20.28
<i>SP6</i>	3.24	6.16	1.78	21.76	85.48	6.41
<i>SL1</i>	1.47	9.87	2.56	17.08	323.4	15.23
<i>SL2</i>	2.75	6.27	2.68	14.24	145.3	15.09
<i>M4</i>	3.34	6.14	2.14	16.42	71.54	10.86
<i>M5</i>	3.44	3.61	1.32	34.13	40.15	6.32
<i>M6</i>	2.49	5.22	4.21	25.59	188.3	26.47
<i>M8</i>	3.08	5.27	1.75	27.94	65.91	7.69
<i>M10</i>	3.73	3.84	3.95	27.13	19.79	34.64
<i>5FU</i>	41.91	46.35	45.89	478.4	453.6	427.8
<i>Cis-platin</i>	12.73	13.56	16.63	199.3	144.7	151.7

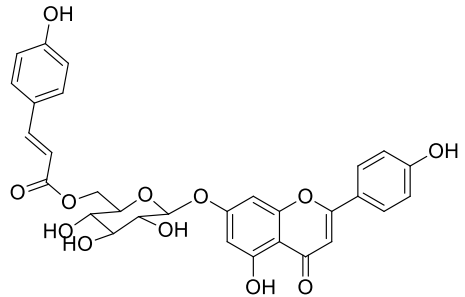
5. SONUÇ

Ülkemizde yetişen *S. germanicopolitana*, *S. perfoliata* ve *S. libanotica* türleri üzerinde yapılan bu çalışmada; izolasyon çalışmalarına rehberlik üzere her bitkinin yaprak, kök ve gövde kısımlarının metanol özütleri elde edilerek, özütlerin A549, Hep3b, HeLa ve FL hücre hatlarına karşı antiproliferatif aktiviteleri MTT yöntemi ile belirlendi. *S. germanicopolitana* bitkisinin yaprak ve çiçeklerinden elde edilen metanol özütleri A549 ve HeLa hücre hatlarına karşı yüksek aktivite gösterdi (GI₅₀ değerleri 3.84-31.97 µg/mL). Bitkinin yaprak ve çiçek kısımlarının FL hücre hattına karşı toksisitesi pozitif kontrollerle karşılaştırıldığında daha düşük olduğu belirlendi. Bitkinin kimyasal içeriğinin belirlenmesi ve moleküllerin bireysel antiproliferatif etkilerinin ortaya konulması için yapılan izolasyon çalışmaları sonucu *S. germanicopolitana* bitkisinin yaprak kısımlarının metanol özütünden değişik kromatografik yöntemler kullanılarak 9 fenolik madde izole edildi. İzole edilen moleküller sırasıyla; verbaskosid (**M1**), Apigenin-7-*O*-(6''-*O*-*p*-kumaroil)-β-D-glukopiranosid (**M2**) klorojenik asit (**M3**), 3'-*O*-metilhipolaetin-7-*O*-(allosil-(1→2)-glikozit) (**M4**), İzoskutellerain-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-allosil-(1→2)-glikozit] (**M5**), 3'-*O*-metilhipolaetin-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-allosil-(1→2)-glikozit] (**M6**), İzoskutellerain-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-allosil-(1→2)-6''-*O*-asetil-glikozit] (**M7**), 3'-*O*-metilhipolaetin-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-allosil-(1→2)-6'''-*O*-asetil-glikozit] (**M8**), sideridosid (**M9**) şeklindedir.

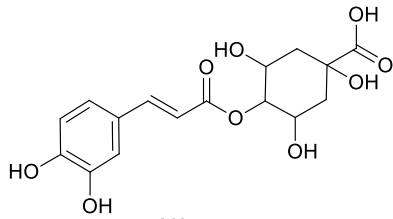
Çalışmada kullanılan üç bitkinin HPLC/DAD ve LC-TOF/MS spektrumlarının karşılaştırılmasından sonra *Sideritis perfoliata* bitkisinin diğer bitkilerden farklı bir fenolik madde içerdiği görüldü. Yapılan saflaştırma işlemi sonrası bitkininin yaprak kısımlarının aseton özütünden 4'-*O*-metilizoskutellerain-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-allosil-(1→2)-glikozit] bileşiği saflaştırıldı (**M10**). Yine sadece *Sideritis perfoliata* bitkisinin yaprak kısmının metanol özütünün LC-TOF/MS kromatogramında gözlenen iki sinyalden yola çıkılarak ve sadece bu bileşiklere odaklanılarak gerçekleştirilen izolasyon çalışmalarında ajugol (**M11**) ve ajugosid (**M12**) molekülleri izole edildi. **M11** ve **M12** moleküllerine sadece *S. perfoliata* bitkisinde rastlandı.



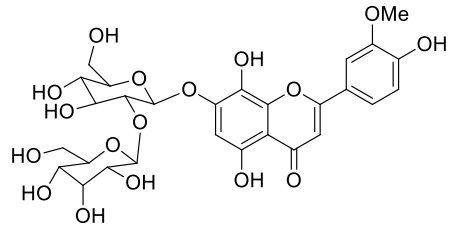
M1



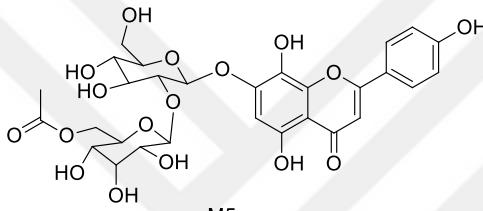
M2



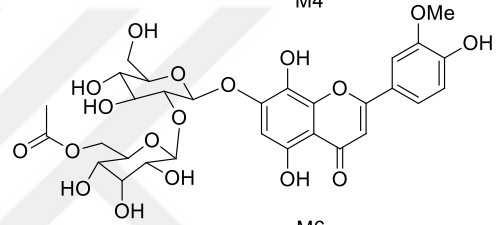
M3



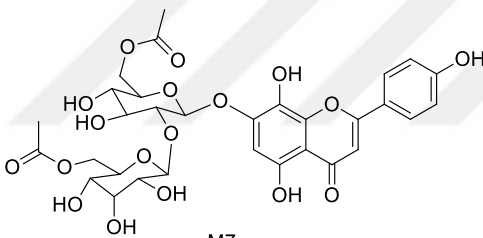
M4



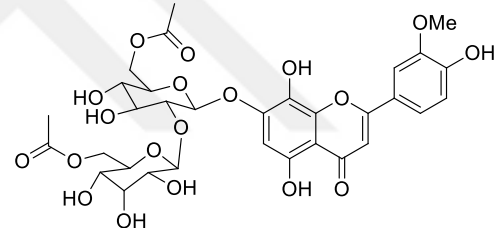
M5



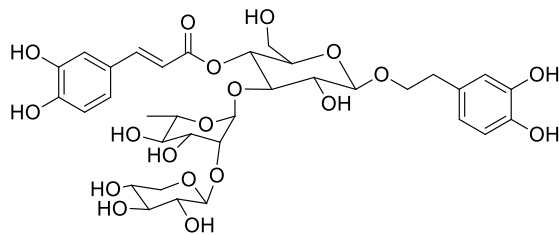
M6



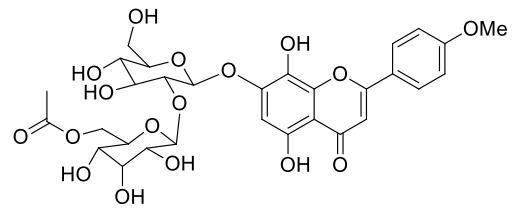
M7



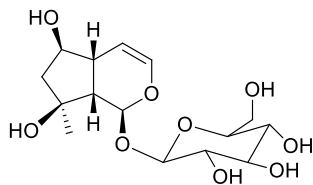
M8



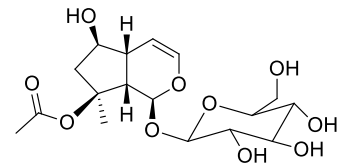
M9



M10



M11



M12

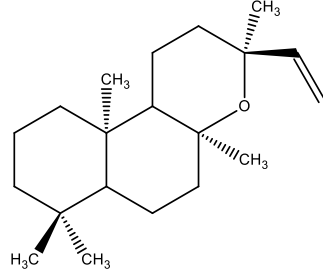
Bitkilerde bulunan terpenik moleküllerin saflaştırılması için *S. perfoliata* ve *S. libanotica* bitkilerinin etil asetat özütleri elde edildi. Özütlerin sefadeks LH-20 üzerinden fraksiyonlandırılmasının ardından silika jel dolgulu kolon ile yapılan saflaştırma işlemleriyle, *S. perfoliata* bitkisinden labdan (**SP1**, **SP2**, **SP3** ve **SP5**) ve kauren (**SP4** ve **SP6**) iskeletine sahip 6 terpenoid ve *S. libanotica* bitkisinden kauren türevi (**SL1** ve **SL2**) iki adet terpenoid türevi izole edildi. İzole edilen moleküllerin yapıları spektroskopik yöntemlerle (NMR, HPLC-TOF/MS, IR ve UV) belirlendi.

S. perfoliata bitkisinden izole edilen **SP5** (2- β -format-13-epi-manoil oksit) molekülü literatürde bilinmemektedir. Sezik (1985) tarafından *S. perfoliata* bitkisinden izole edilen **SP3** molekülünden yarı sentetik olarak elde edilen **SP1** ve **SP2** moleküllerinin de bitki örneğinde doğal olarak bulunduğu ilk defa bu çalışmada rapor edildi. **SP4** (7-asetil-izofoliol) molekülünün *Sideritis* türlerinde bulunması daha önce rapor edilmemiştir. Ayrıca **SP3** molekülünün X-ray datası tarafımızdan yayınlandı .

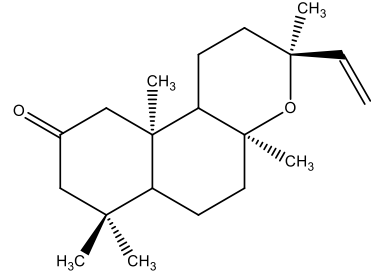
S. libanotica bitkisinden izole edilen **SL1** (siderol) bileşiği daha önce aynı bitki örneğinden grubumuz tarafından izole edilmiştir . Bu çalışmada **SL2** (sideridiol) bileşiğinin de bulunduğu ilk defa ortaya konuldu.

İzole edilen moleküllerin antiproliferatif aktiviteleri A549, Hep3b, HeLa ve FL hücre hatlarına karşı MTT ve BrDU-Eliza yöntemleri ile değerlendirildi. Bitkilerden izole edilen terpenoid türevlerinin fenolik maddelere kıyasla daha yüksek aktiviteye sahip oldukları belirlendi. *Sideritis perfoliata* bitkisinden izole edilen manoil oksit türevlerinden olan **SP5** (2- β -format-13-epi-manoil oksit) ve **SP2** (2-okso-13-epi-manoil oksit) moleküllerinin test edilen diğer manoil oksit türevlerinden ve kauren türevlerinden daha düşük aktiviteye sahip olduğu görüldü. İzole edilen fenolik bileşiklerden A549 hücre hattına karşı **M5**, **M6**, **M7**, **M8** ve **M10**, HeLA hücre hattına karşı **M4**, **M7** ve **M10**, Hep3b hücre hattına karşı **M4**, **M8** ve **M10** en etkili moleküller olduğu tespit edildi. M serisi fenolik maddelerin kanserli hücre hatlarına karşı (A549,

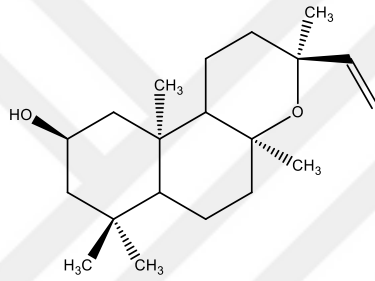
HeLa ve Hep3b) aktiviteleri, normal hücre hattına (FL) göre daha yüksektir. Ancak izole edilen terpenik maddelerin FL hücre hattına karşı aktiviteleri de oldukça yüksektir. Buradan hareketle fenolik maddelerin terpenoidlere göre sitotoksik etkisi daha düşük olduğu görüldü.



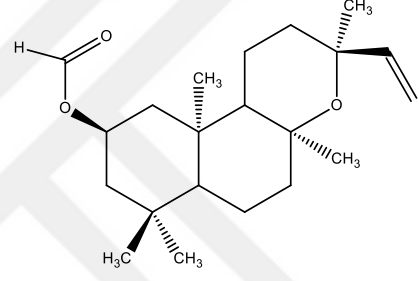
SP1



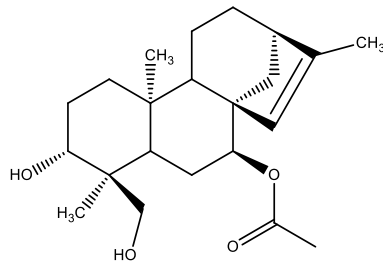
SP2



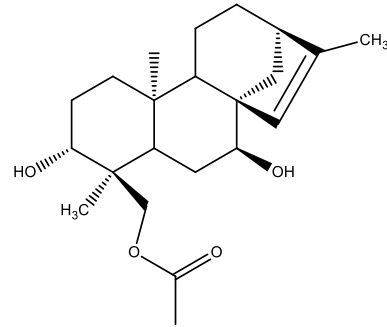
SP3



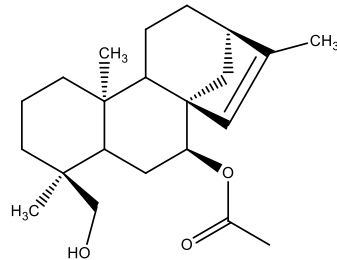
SP5



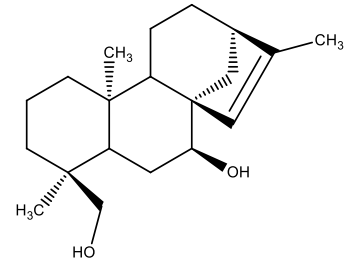
SP4



SP6



SL1



SL2

KAYNAKLAR

- Akçoş, Y., N. Ezer, I. Çalis, R. Demirdamar, B. C. Tel, 1999. Polyphenolic compounds of *Sideritis lycia* and their anti-inflammatory activity. *Pharmaceutical Biology*, 37(2), 118-122.
- Alipieva, K., J. Petreska, A. Gil-Izquierdo, M. Stefova, L. Evstatieva, V. Bankova, 2010. Influence of the extraction method on the yield of flavonoids and phenolics from *Sideritis* spp. (Pirin Mountain tea). *Natural Product Communications*, 5(1), 51-54.
- Başer, K. H., 2002. Aromatic biodiversity among the flowering plant taxa of Turkey. *Pure and Applied Chemistry*, 74(4), 527-545.
- Başer, K. H. C., M. L. Bondi, M. Bruno, N. Kırımer, F. Piozzi, G. Tümen, N. Vassallo, 1996. An ent-kaurane from *Sideritis huber-morathii*. *Phytochemistry*, 43(6), 1293-1295.
- Bayan, Y., H. Aksit, 2016. Antifungal Activity of Essential Oils and Plant Extracts from *Sideritis germanicopolitana* BORNM. growing in Turkey. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 26(2), 333.
- Bedir, E., R. Manyam, I. A. Khan, 2003. Neo-clerodane diterpenoids and phenylethanoid glycosides from *Teucrium chamaedrys* L. *Phytochemistry*, 63(8), 977-983.
- Bruno, M., F. Piozzi, N. A. Arnold, K. H. C. Başer, N. Tabanca, N. Kırımer, 2005. Kaurane diterpenoids from three *Sideritis* species. *Turkish Journal of Chemistry*, 29(1), 61-64.
- Cabrera, E., A. Garcíagranados, A. S. Deburuaga, J. M. S. Deburuaga, 1983. Terpenic Components of Spanish Labiatae .16. Diterpenoids from *Sideritis-Hirsuta* Subsp *Nivalis*. *Phytochemistry*, 22(12), 2779-2781.
- Charami, M. T., D. Lazari, A. Karioti, H. Skaltsa, D. Hadjipavlou-Litina, C. Souleles, 2008. Antioxidant and antiinflammatory activities of *Sideritis perfoliata* subsp. *perfoliata* (Lamiaceae). *Phytotherapy Research*, 22(4), 450-454.
- Çelik, İ., C. C. Ersanlı, R. Köseoğlu, H. Akşit, R. Erenler, İ. Demirtaş, M. Akkurt, 2016. Crystal structure of 3, 4a, 7, 7, 10a-pentamethyl-3-vinyldodecahydro-1H-benzo [f] chromen-9-ol isolated from *Sideritis perfoliata*. *Acta Crystallographica Section E: Crystallographic Communications*, 72(10), 1380-1382.
- Çelik, S., K. Ersin, U. İsmet, 2008. Plants have been Collected from Mythological Kazdağı (Mt. Ida) National Park, West Turkey by Turkmens and their Folk, Cultural and Social Uses. *European Journal of Scientific Research*, 19(4), 835-843.
- Delazar, A., M. R. Delnavazi, L. Nahar, S. B. Moghadam, M. Mojarab, A. Gupta, A. S. Williams, M. Mukhlesur Rahman, S. D. Sarker, 2011. Lavandulifolioside B: a new phenylethanoid glycoside from the aerial parts of *Stachys lavandulifolia* Vahl. *Natural product research*, 25(1), 8-16.
- Demirtaş, İ., B. Ayhan, A. Şahin, H. Akşit, M. Elmastaş, İ. Telci, 2011. Antioxidant activity and chemical composition of *Sideritis libanotica* Labill. ssp *linearis* (Bentham) Borm. (Lamiaceae). *Natural Product Research*, 25(16), 1512-1523.

- Ezer, N., M. K. Sakar, B. Rodriguez, M. C. De La Torre, 1992. Flavonoid glycosides and a phenylpropanoid glycoside from *Sideritis perfoliata*. *International Journal of Pharmacognosy*, 30(1), 61-65.
- Fabricant, D. S., N. R. Farnsworth, 2001. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*, 109(Suppl 1), 69.
- Fernandez, C., B. M. Fraga, M. G. Hernandez, J. M. Arteaga, 1988. Flavonoid aglycones from some canary islands species of *Sideritis*. *Journal of Natural Products*, 51(3), 591-593.
- Fraga, B. M., R. Guillermo, M. G. Hernández, T. Mestres, J. M. Arteaga, 1991. Diterpenes from *Sideritis canariensis*. *Phytochemistry*, 30(10), 3361-3364.
- Fraga, B. M., M. G. Hernandez, C. E. Diaz, 2003. On the ent-kaurene diterpenes from *Sideritis athoa*. *Natural Product Research*, 17(2), 141-144.
- Fraga, B. M., M. G. Hernandez, J. M. H. Santana, D. Terrero, M. F. Galvan, 1995. A chemotaxonomical study of *Sideritis massoniana* Taxa. *Biochemical Systematics and Ecology*, 23(7-8), 835-842.
- Fraga, B. M., M. Reina, J. G. Luis, M. L. Rodriguez, 2003. Rhoiptelenol and rhoiptelenone, two pentacyclic triterpenes from *Sideritis macrostachya*. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences*, 58(9-10), 621-625.
- Fu, G., H. Pang, Y. H. Wong, 2008. Naturally occurring phenylethanoid glycosides: potential leads for new therapeutics. *Current Medicinal Chemistry*, 15(25), 2592-2613.
- Gabrieli, C., P. Kefalas, E. Kokkalou, 2005. Antioxidant activity of flavonoids from *Sideritis raeseri*. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(3), 423-428.
- Garciagranados, A., P. A. Martinez, A. Parra, 1982. Terpenic Components from Spanish Labiatae - Diterpenes from *Sideritis leucantha* var. *eridionalis* Font Quer. *Anales De Quimica Serie C-Quimica Organica Y Bioquimica*, 78(3), 410-412.
- Gil, M. I., F. Ferreres, A. Marrero, F. Tomaslorente, F. A. Tomasbarberan, 1993. Distribution of Flavonoid Aglycones and Glycosides in *Sideritis* Species from The Canary-Islands And Madeira. *Phytochemistry*, 34(1), 227-232.
- Gonzalez, A., B. Fraga, M. Hernandez, J. Luis, 1973. New diterpenes from *Sideritis canariensis*. *Phytochemistry*, 12(5), 1113-1116.
- Huber-Morath, H. 1982. *Sideritis* L. *Flora of Turkey and East Aegean Islands*, P. H. Davis. Edinburg, Edinburg University Press. 7: 193.
- Jiao, R. H., H. M. Ge, D. H. Shi, R. X. Tan, 2006. An Apigenin-Derived Xanthine Oxidase Inhibitor from *Palhinhaea cernua*. *Journal of natural products*, 69(7), 1089-1091.
- Kılıç, T., 2006. Isolation and biological activity of new and known isolation and biological activity of new and known diterpenoids from *Sideritis stricta* Boiss. & Heldr. *Molecules*, 11(4), 257-262.
- Kılıç, T., Y. K. Yıldız, G. Topçu, A. C. Gören, M. Ay, S. G. Bodige, W. H. Watson, 2005. X-ray analysis of sideroxol from *Sideritis leptoclada*. *Journal of Chemical Crystallography*, 35(8), 647-650.
- Kırmızıbekmez, H., E. Ariburnu, M. Masullo, M. Festa, A. Capasso, E. Yeşilada, S. Piacente, 2012. Iridoid, phenylethanoid and flavonoid glycosides from *Sideritis trojana*. *Fitoterapia*, 83(1), 130-136.

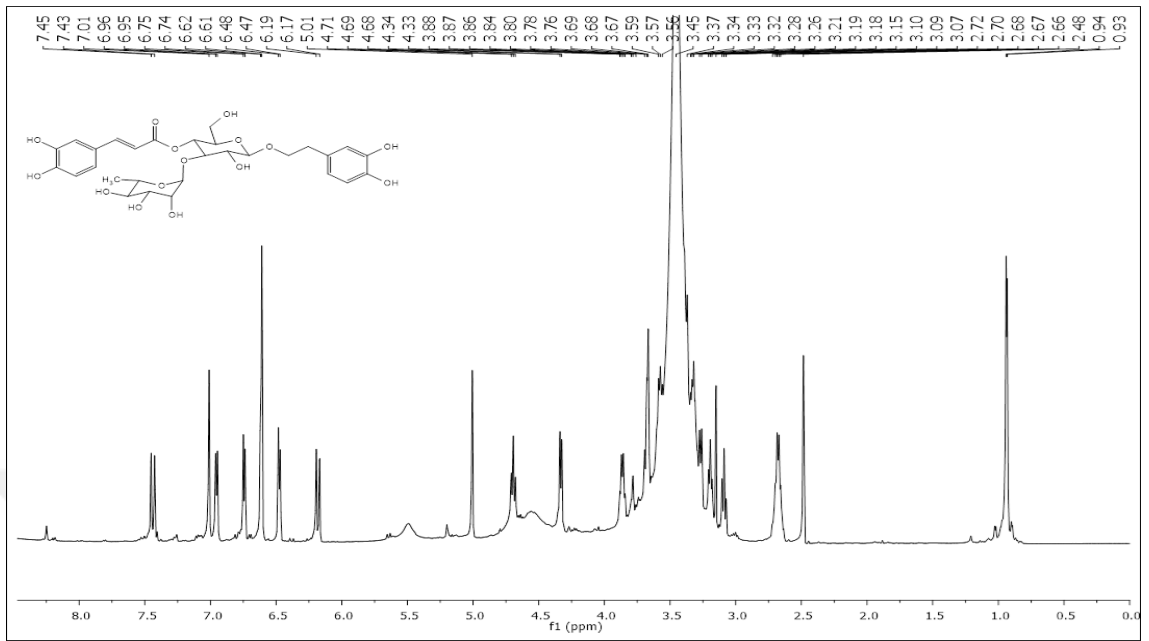
- Koleva, I., N. Handjieva, 1997. Study of the iridoid glycosides in *Sideritis* (Lamiaceae). Nauchni Trudove, 42 75-79.
- Linden, A., F. P. Şahin, N. Ezer, I. Çaliş, 2006. Ent-7 α ,18-hydroxykaur-16-ene ethanol solvate. Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications, 62(5), o253-o255.
- Loğoğlu, E., S. Arslan, A. Öktemer, I. Şakiyan, 2006. Biological activities of some natural compounds from *Sideritis sipylea* Boiss. Phytotherapy Research, 20(4), 294-297.
- Pauli, G. F., U. Kuczkowiak, A. Nahrstedt, 1999. Solvent effects in the structure dereplication of caffeoyl quinic acids. Magnetic resonance in chemistry, 37(11), 827-836.
- Petreska, J., M. Stefova, F. Ferreres, D. A. Moreno, F. A. Tomas-Barberan, G. Stefkov, S. Kulevanova, A. Gil-Izquierdo, 2011. Potential bioactive phenolics of Macedonian *Sideritis* species used for medicinal "Mountain Tea". Food Chemistry, 125(1), 13-20.
- Pianaro, A., J. Pereira Pinto, D. T. Ferreira, N. Kazue Ishikawa, R. Braz-Filho, 2007. Iridoid glucoside and antifungal phenolic compounds from *Spathodea campanulata* roots. Semina: Ciências Agrárias, 28(2).
- Pietsch, M., W. A. König, 2000. Enantiomers of sesquiterpene and diterpene hydrocarbons in *Araucaria* species. Phytochemical Analysis, 11(2), 99-105.
- Piozzi, F., P. Venturella, A. Bellino, R. Mondelli, 1968. Diterpenes from *Sideritis sicula ucra*. Tetrahedron, 24(11), 4073-4081.
- Pljevljakusic, D., K. Savikin, T. Jankovic, G. Zdunic, M. Ristic, D. Godjevac, A. Konic-Ristic, 2011. Chemical properties of the cultivated *Sideritis raeseri* Boiss. & Heldr. subsp. *raeseri*. Food Chemistry, 124(1), 226-233.
- Quesada, T. G., B. Rodriguez, S. Valverde, S. Huneck, 1972. Six new diterpenes from *Sideritis leucantha* Cav. and *Sideritis linearifolia* Lam. Tetrahedron Letters, 13(22), 2187-2190.
- Riss, T. L., R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, T. J. Worzella, L. Minor, 2016. Cell viability assays.
- Sezik, E., N. Ezer, J. A. Huesorodriguez, B. Rodriguez, 1985. Ent-2-Alpha-Hydroxy-13-Epi-Manoyl Oxide from *Sideritis-Perfoliata*. Phytochemistry, 24(11), 2739-2740.
- Silva, W. M. B. d., J. C. d. C. Assunção, R. M. Araújo, E. R. Silveira, O. D. Pessoa, 2009. New volatile constituents from leaves of *Stemodia trifoliata* (Link.) Reichb.(*Schrophulariaceae*). Journal of the Brazilian Chemical Society, 20(1), 37-41.
- Stanoeva, J. P., D. Bagashovska, M. Stefova, 2012. Characterization of Urinary Bioactive Phenolic Metabolites Excreted after Consumption of a Cup of Mountain Tea (*Sideritis Scardica*) Using Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry. Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering, 31(2), 229-243.
- Şahin, F. P., N. Ezer, I. Çaliş, 2004. Three acylated flavone glycosides from *Sideritis ozturkii* Aytac & Aksoy. Phytochemistry, 65(14), 2095-2099.
- Şahin, F. P., N. Ezer, İ. Çaliş, 2006. Terpenic and phenolic compounds from *Sideritis stricta*. Turkish Journal of Chemistry, 30(4), 495-504.
- Taşdemir, D., L. Scapozza, O. Zerbe, A. Linden, İ. Çalis, O. Sticher, 1999. Iridoid glycosides of *Leonurus persicus*. Journal of natural products, 62(6), 811-816.

- Tomasbarberan, F. A., M. Rejdali, J. B. Harborne, V. H. Heywood, 1988. External and Vacuolar Flavonoids from Ibero North African *Sideritis* Species - a Chemosystematic Approach. *Phytochemistry*, 27(1), 165-170.
- Topçu, G., A. C. Gören, T. Kılıç, Y. K. Yıldız, G. Tümen, 1999. Ent-kaurene diterpenes from *Sideritis athoa*. *Natural Product Letters*, 14(2), 123-129.
- Topçu, G., A. C. Gören, T. Kılıç, Y. K. Yıldız, G. Tümen, 2002. Diterpenes from *Sideritis sipylea* and *S. dichotoma*. *Turkish Journal of Chemistry*, 26(2), 189-194.
- Topçu, G., A. C. Gören, T. Kılıç, Y. K. Yıldız, G. Tümen, 2002. Diterpenes from *Sideritis trojana*. *Natural Product Letters*, 16(1), 33-37.
- Tundis, R., M. R. Loizzo, F. Menichini, G. A. Statti, F. Menichini, 2008. Biological and pharmacological activities of iridoids: recent developments. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 8(4), 399.
- Venturella, P., A. Bellino, 1977. Eubotriol and eubol, new diterpenes from *Sideritis euboica*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 33(10), 1270-1271.
- Yeşilada, E., G. Honda, E. Sezik, M. Tabata, T. Fujita, T. Tanaka, Y. Takeda, Y. Takaishi, 1995. Traditional medicine in Turkey. V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains. *Journal of Ethnopharmacology*, 46(3), 133-152.

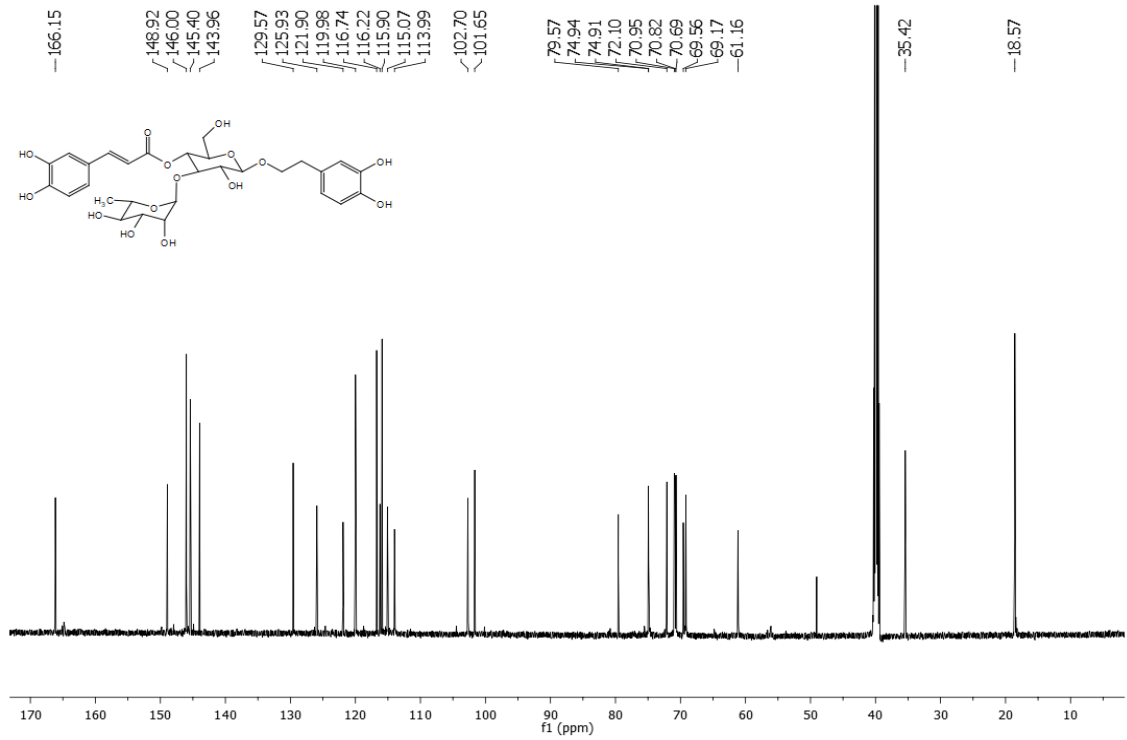
EK-1. Verbaskosid molekülün asidik ortamda hidrolizi, türevlendirilmesi ve GC-MS analizi:

5 mg verbaskosid 10 mL % 5 HCl içinde 2 saat reflüks edildi. Oda şartlarına kadar soğutulan karışım evaporatörde kuruluğa kadar çektiirildi. 10 mL su ile çözülen karışım 20 mL su ile şartlandırılmış C18 kartuştan 10 mL su ile elüe edilerek şekerler toplandı. Toplanan elüentler, aglikon kısımların uzaklaştırılması için etil asetat ile ekstakte edildi ve su fazı evaporatörde kuruluğa kadar çektiirildi. Nemin uzaklaştırılması için örnek liyofilizatörde 2 saat tutuldu. Balona 2 mL asetik anhidrit ve 2 mL pridin eklendikten sonra 2 saat reflüks edildi. Oda sıcaklığa soğutulan karışımdan 1 mL'si alınarak GC-MS ile analiz edildi. analiz sonucunda iki farklı şeker grubunun varlığı tespit edildi. Glukoz pentaasetat:EI⁺ (70 eV) *m/z* 242(2), 200 (5), 182 (1), 169 (5), 157 (10), 145 (4), 140 (5), 115(23), 109 (6), 103 (8), 98 (16), 43 (100). Ramnoz tetraasetat: EI+ (70 eV) *m/z* 184 (4), 170 (1), 157 (17), 128 (1), 115 (27), 103 (6), 97 (1), 83 (5), 73(5), 60 (3), 43 (100)

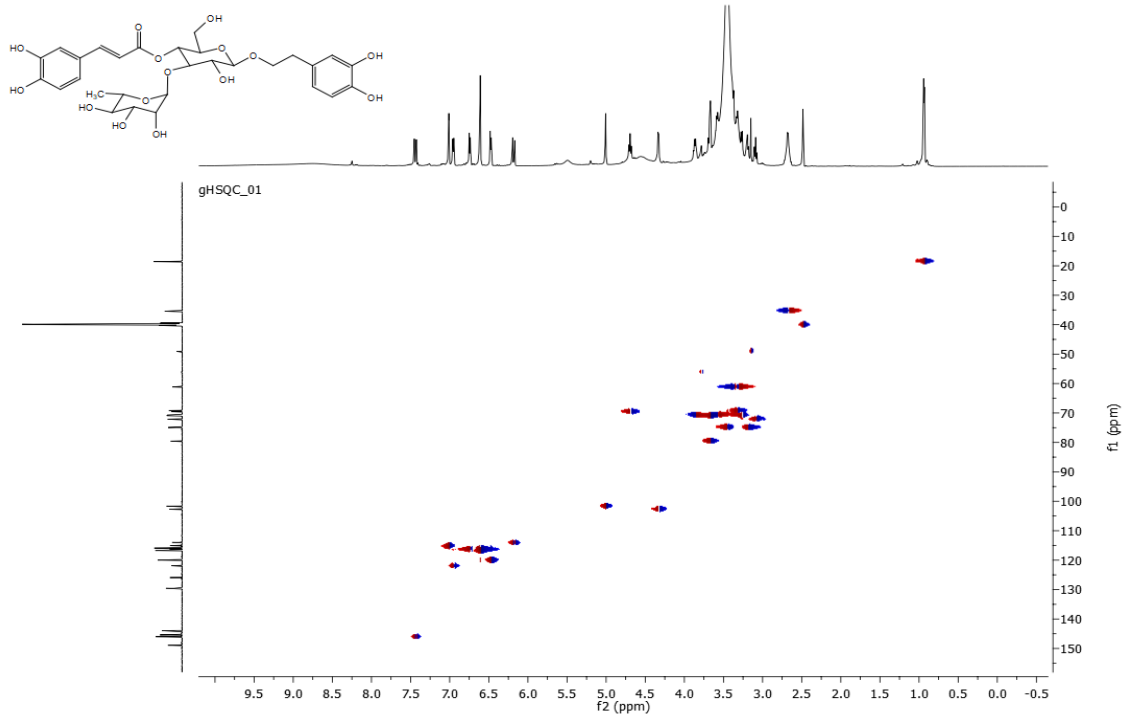
EK-2 Verbaskosid (M1) Molekülüne Ait Spektral Veriler



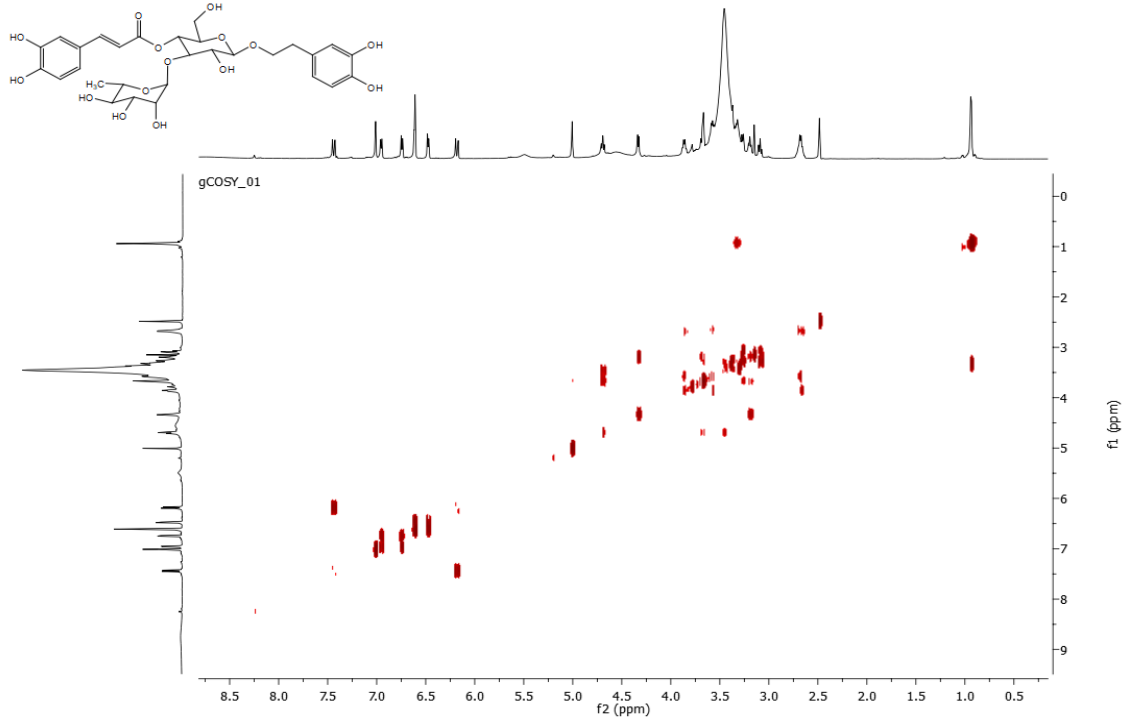
Verbaskosid (M1) molekülü ¹H-NMR spektrumu



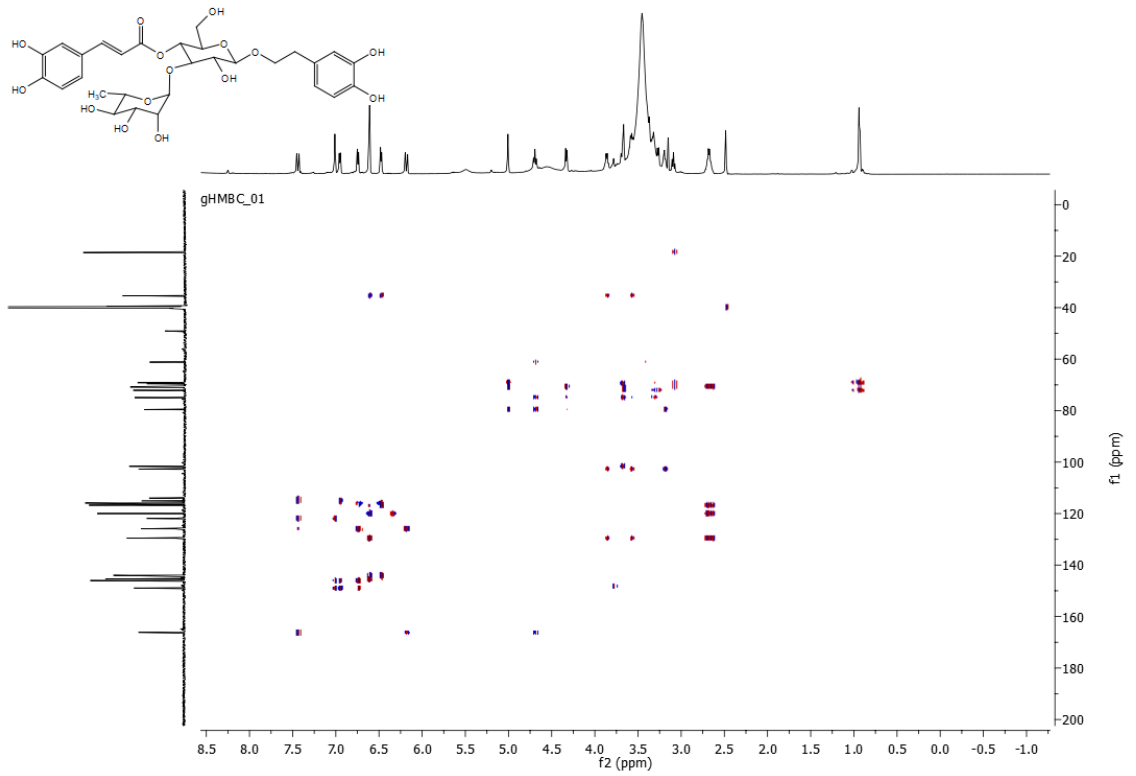
Verbaskosid (M1) molekülü ¹³C-NMR spektrumu



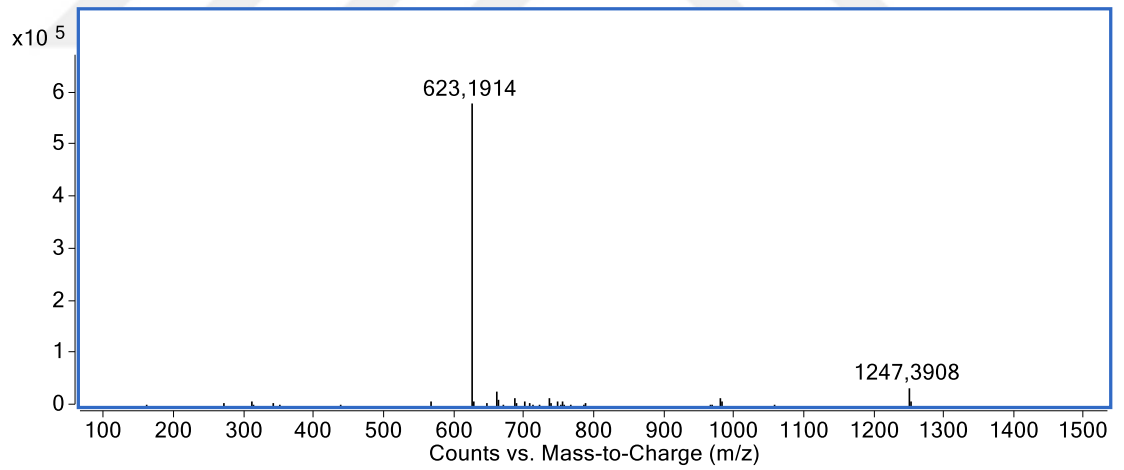
Verbaskosid (M1) molekülü HSQC spektrumu



Verbaskosid (M1) molekülü COSY spektrumu

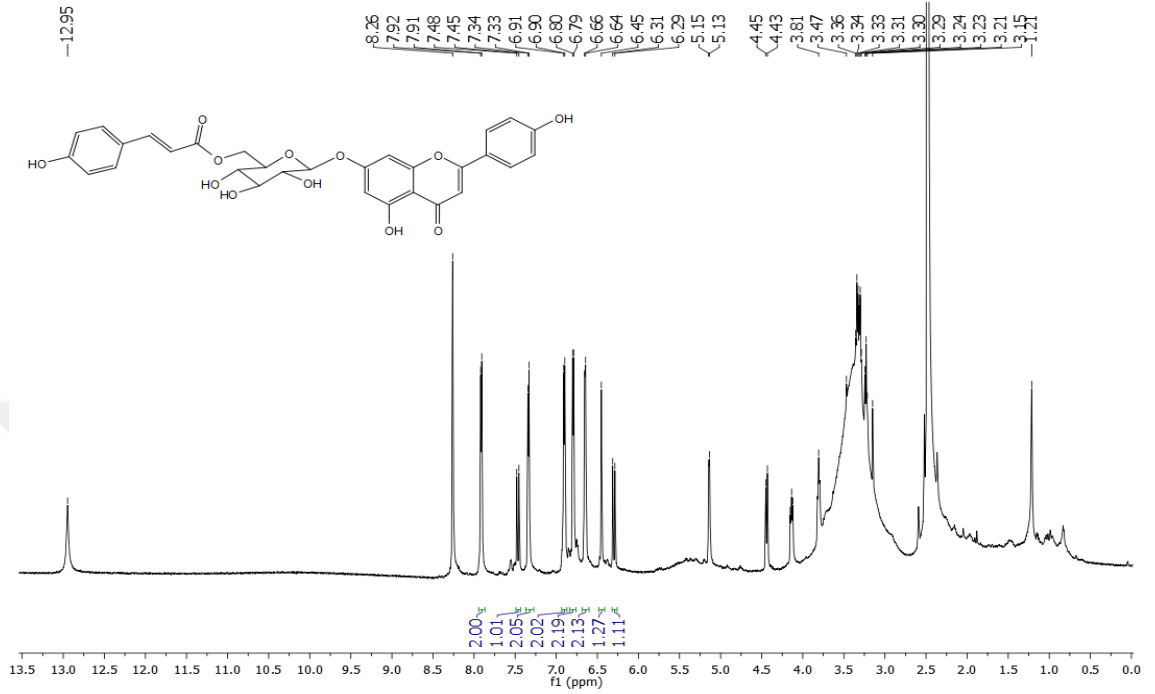


Verbaskosid (M1) molekülü HMBC spektrumu

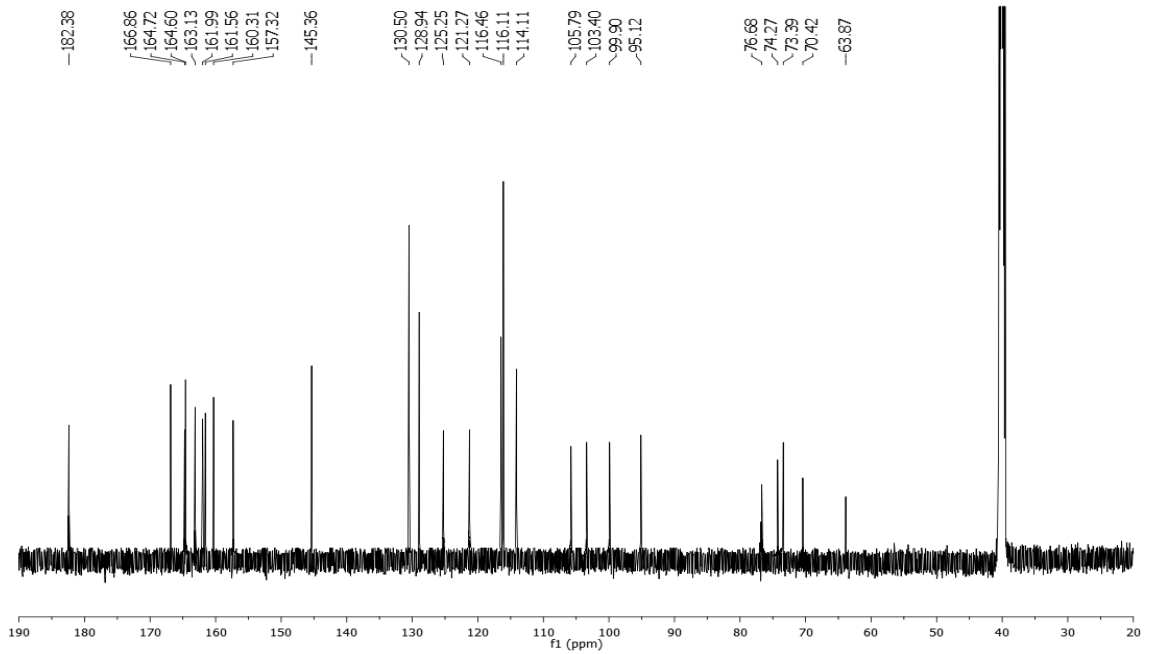


Verbaskosid (M3) LC-TOF/MS spektrumu

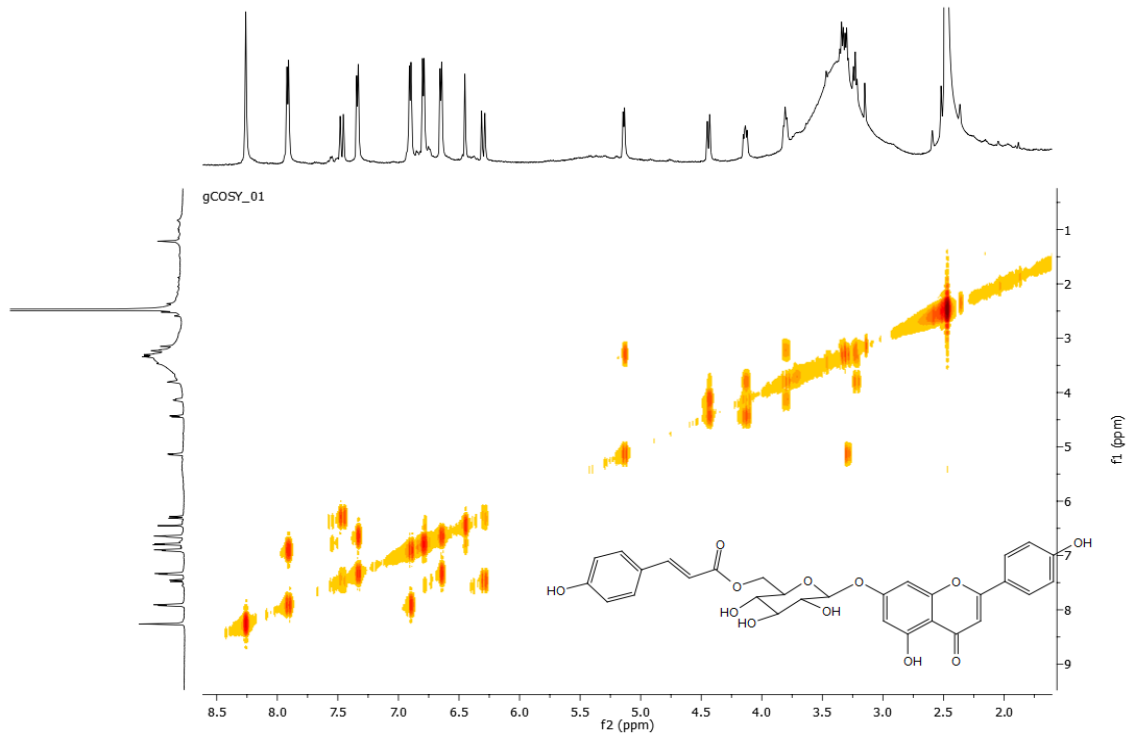
EK-3 Apigenin-7-O-(6''-O-p-kumaroil)-glikozit (M2) Molekülüne Ait Spektral Veriler



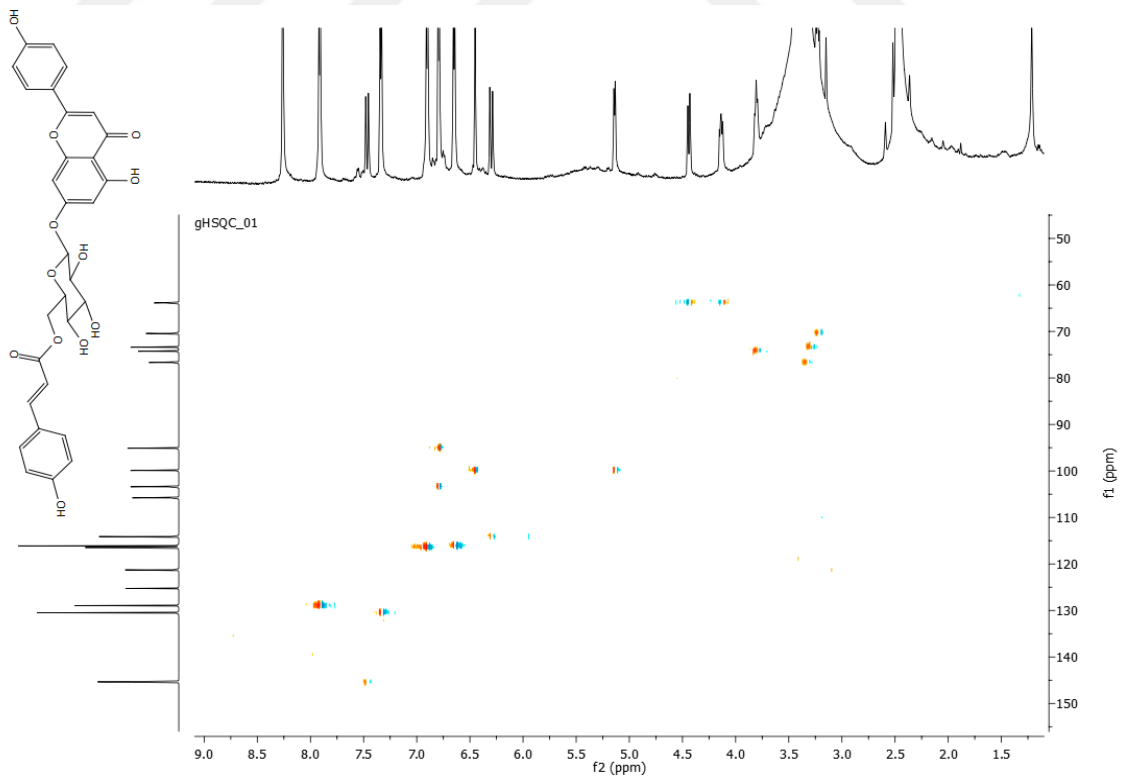
Apigenin-7-O-(6''-O-p-kumaroil)-glikozit (M2) molekülü ¹H-NMR spektrumu



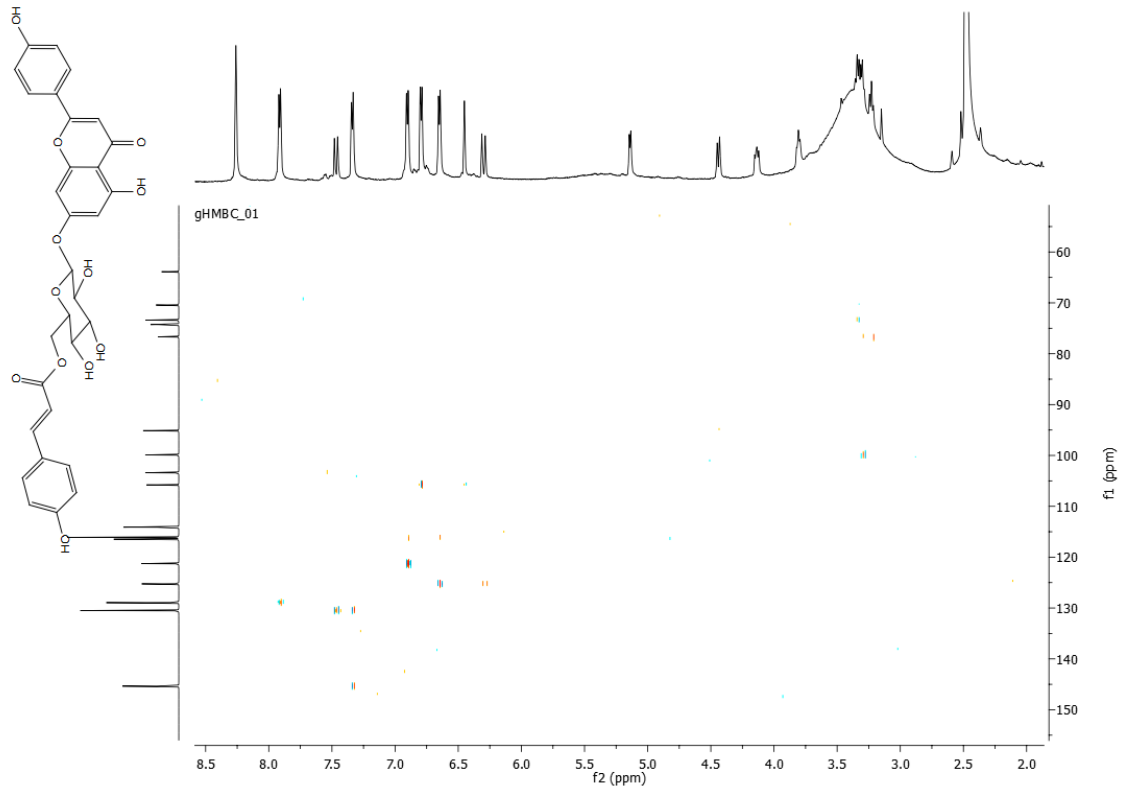
Apigenin-7-O-(6''-O-p-kumaroil)-glikozit (M2) molekülü ¹³C-NMR spektrumu



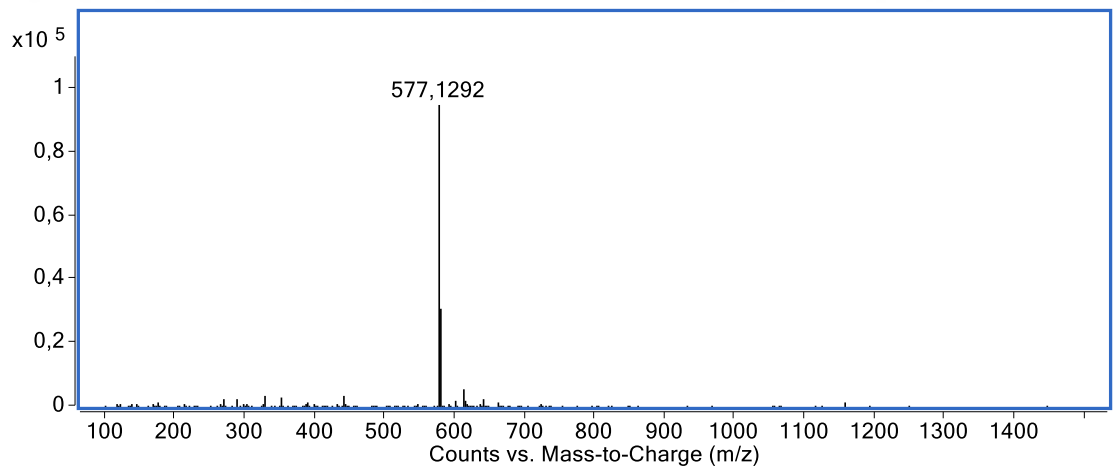
Apigenin-7-O-(6''-O-p-kumaroil)-glikozit (M2) molekölü COSY spektrumu



Apigenin-7-O-(6''-O-p-kumaroil)-glikozit (M2) molekölü COSY spektrumu

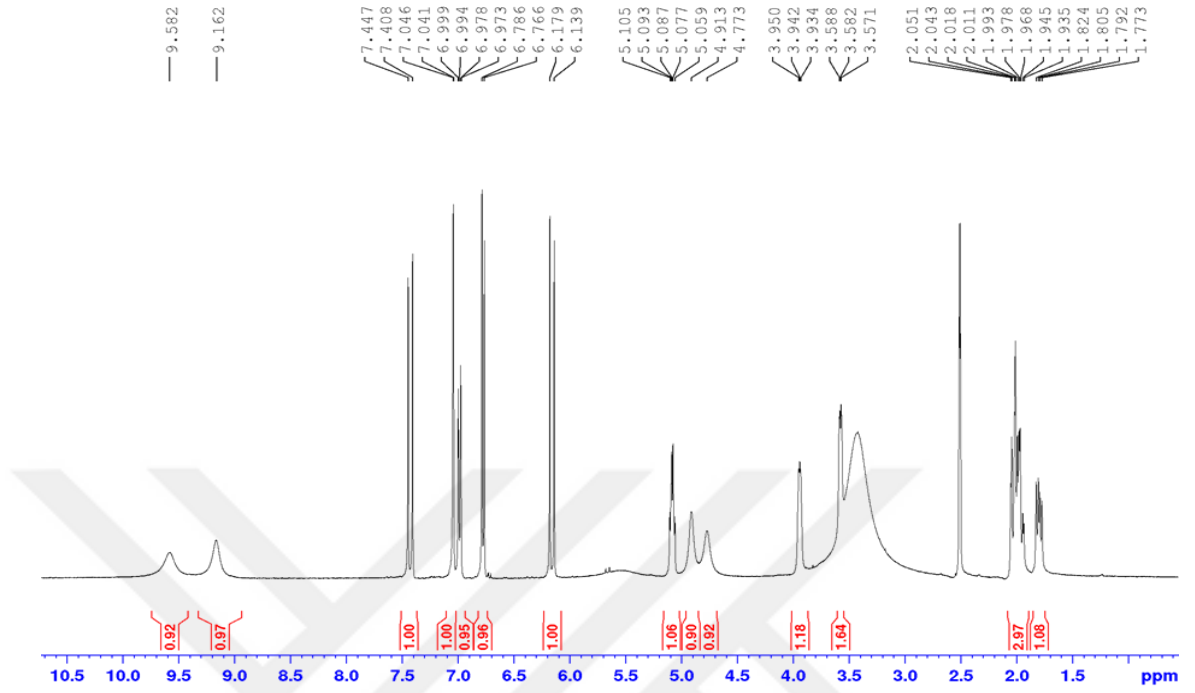


Apigenin-7-*O*-(6''-*O*-*p*-kumaroyl)-glukozit (**M2**) molekülü HMBC spektrumu

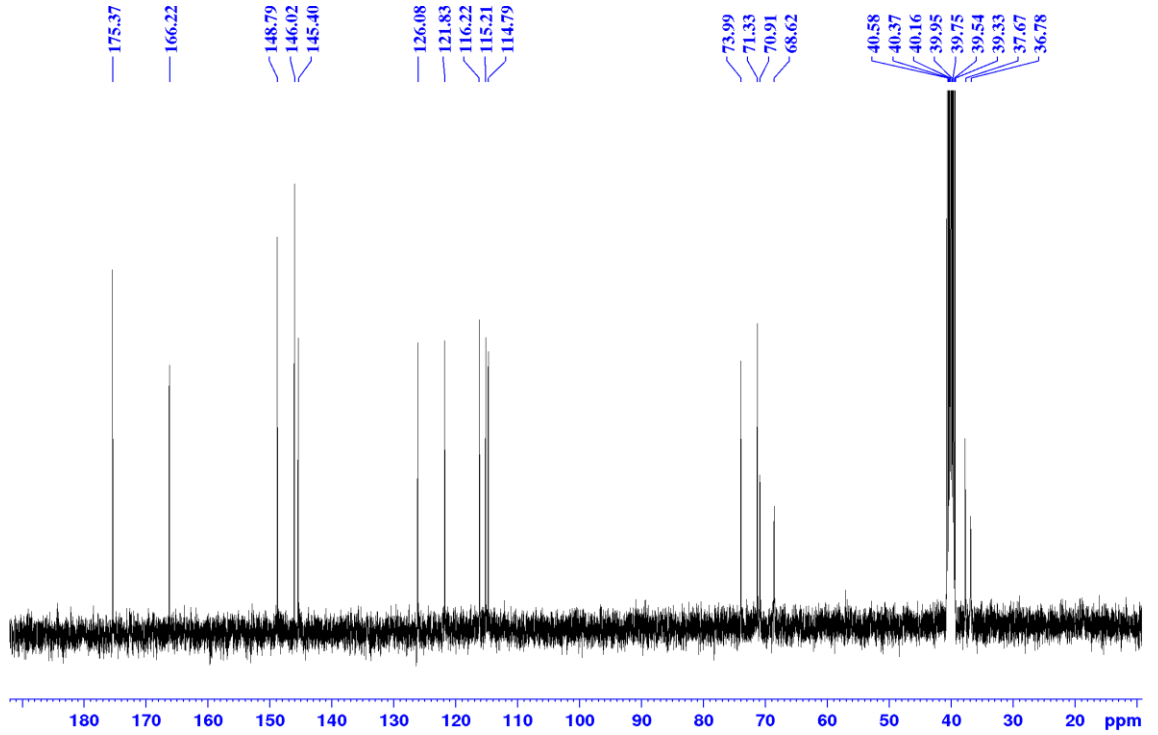


Apigenin-7-*O*-(6''-*O*-*p*-kumaroyl)-glukozit (**M2**) molekülü LC-TOF/MS spektrumu

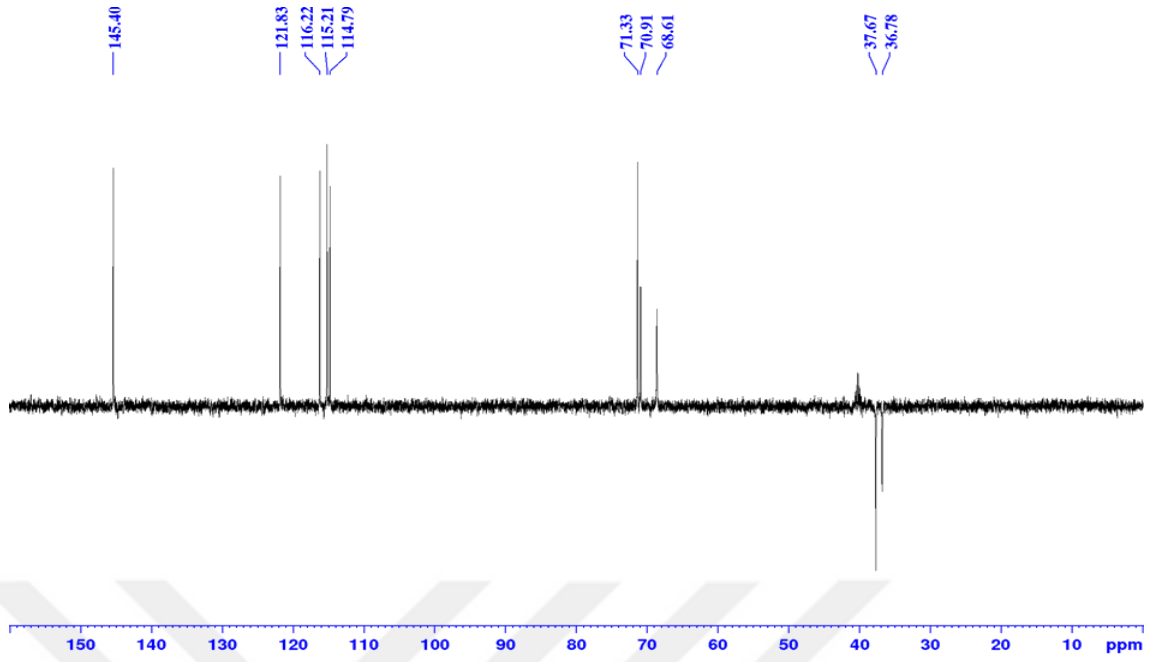
EK-4 Klorojenik Asit (M3) Molekülüne Ait Spektral Veriler



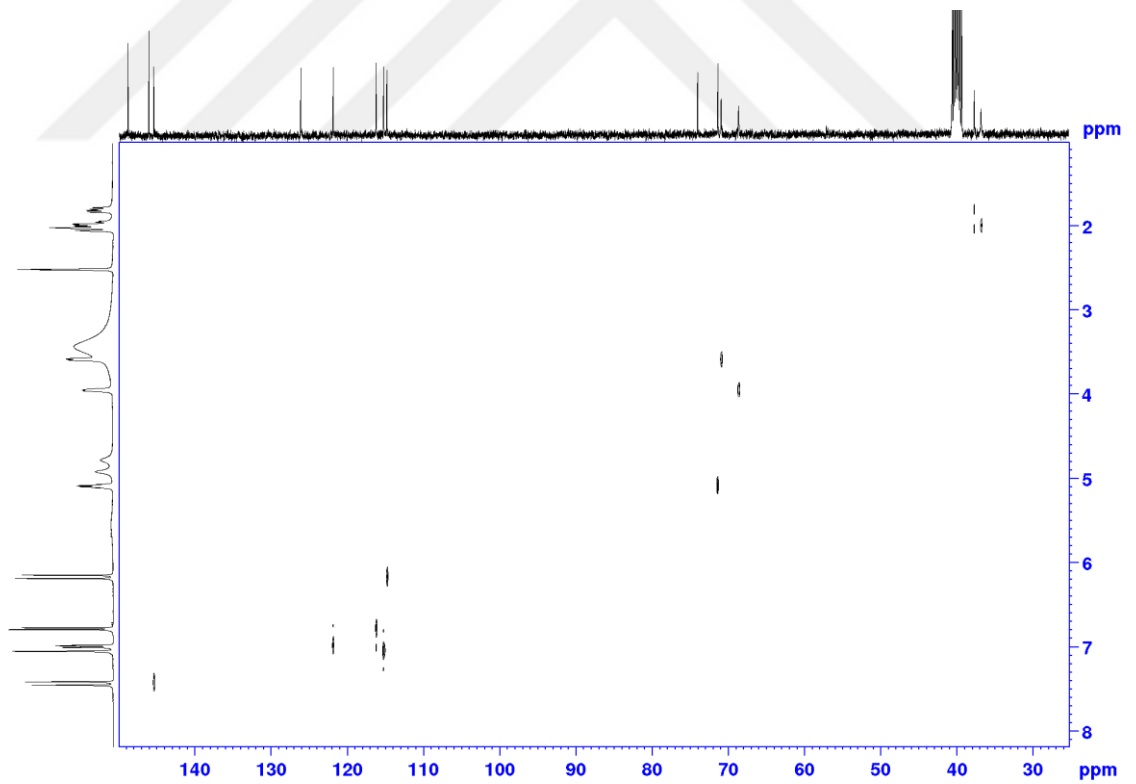
Klorojenik asit (M3) molekülü ¹H-NMR spektrumu



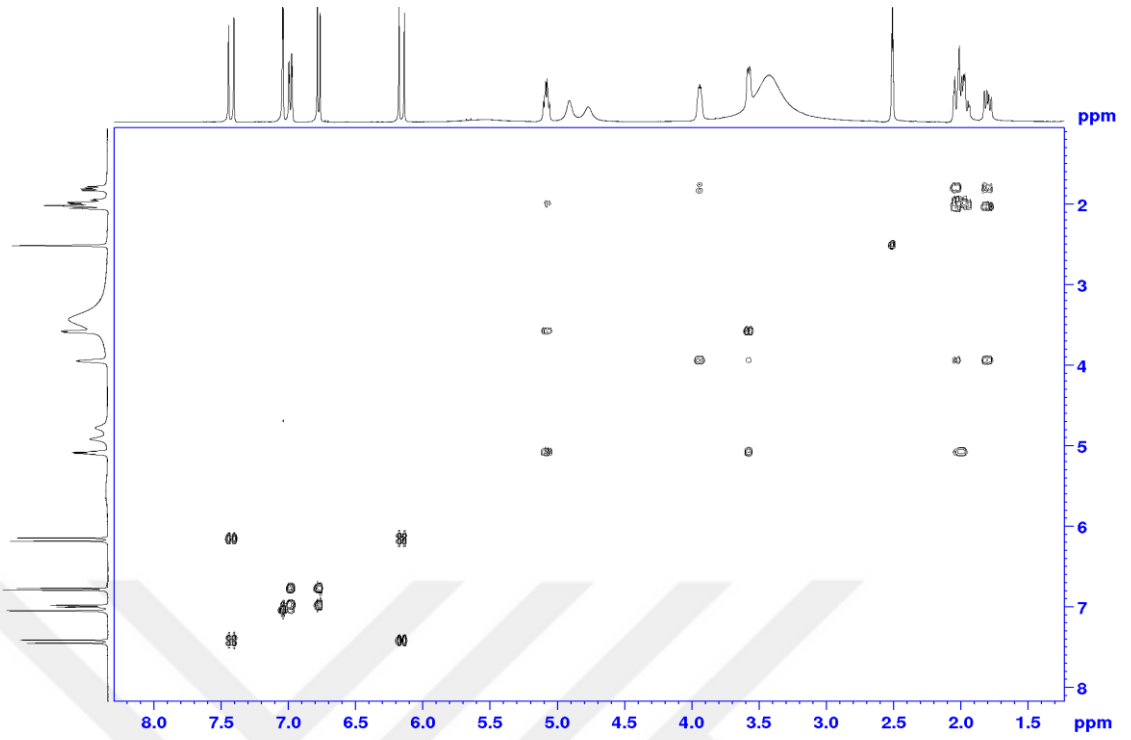
Klorojenik asit (M3) molekülü ¹³C-NMR spektrumu



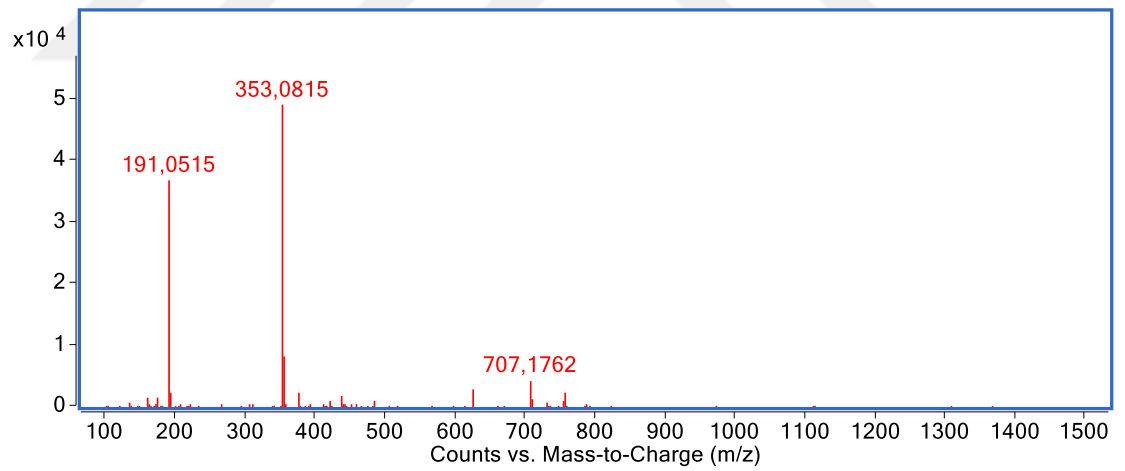
Klorojenik asit (**M3**) molekülü ^{13}C -DEPT-135 spektrumu



Klorojenik asit (**M3**) molekülü HETCOR spektrumu

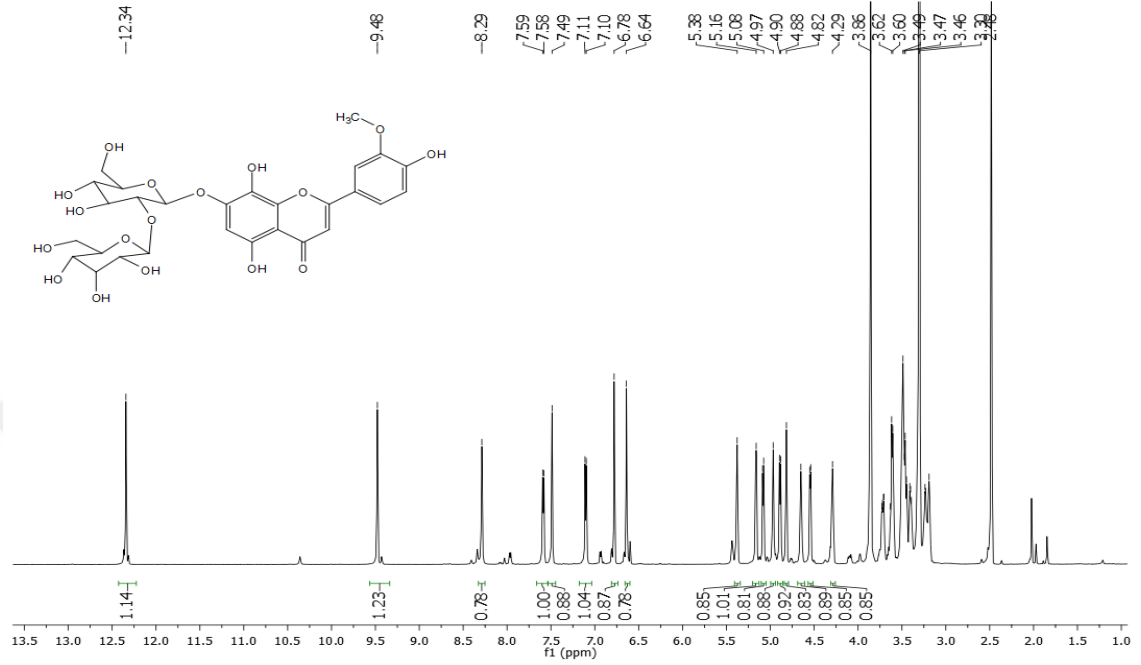


Klorojenik asit (**M3**) molekülü COSY spektrumu

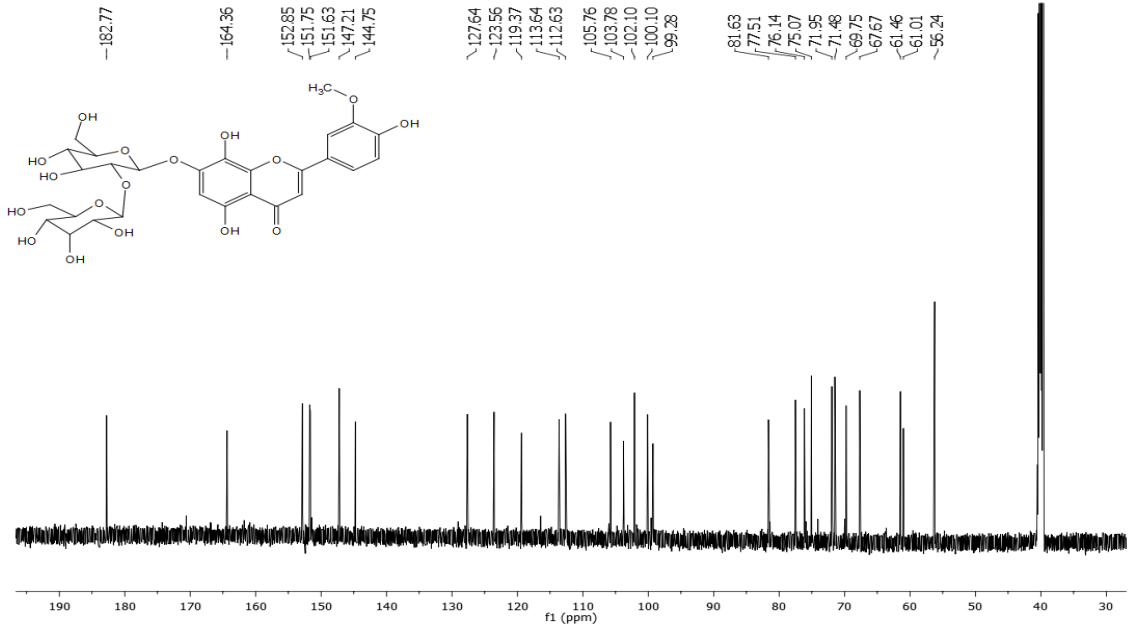


Klorojenik asit (**M3**) molekülü LC-TOF/MS spektrumu

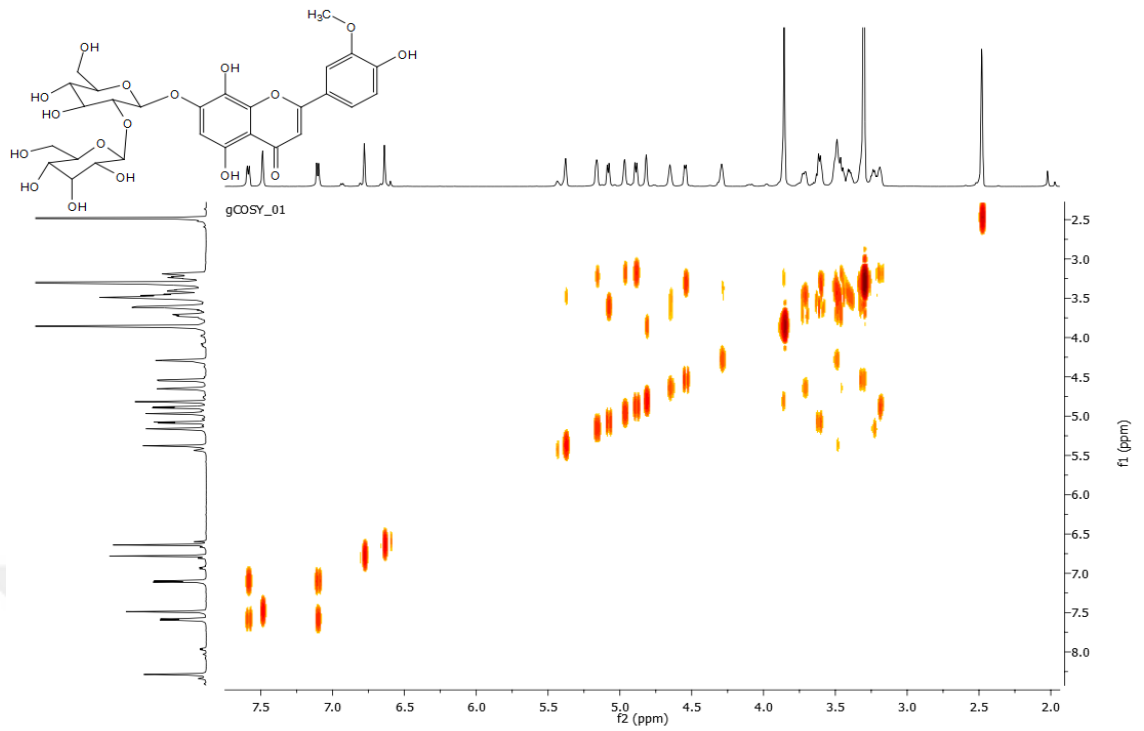
EK-5 3'-O-metilhipolaetin-7-O-(allosil-(1→2)-glikozit) (M4) Molekülüne Ait Spektral Veriler



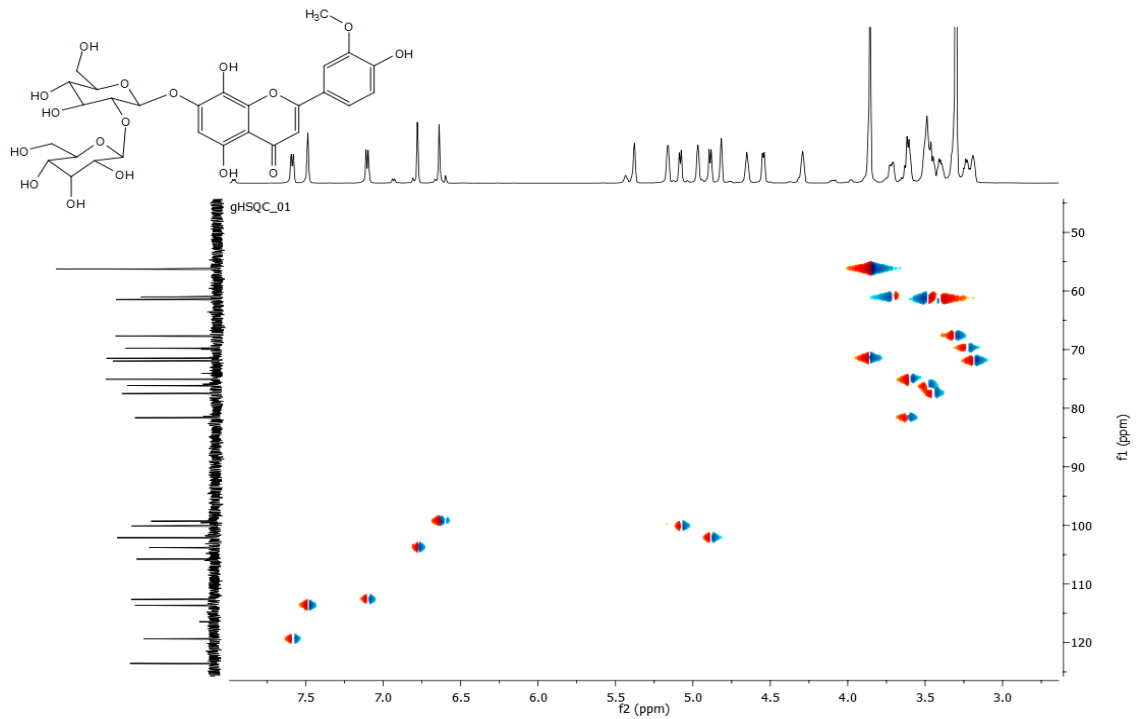
3'-O-metilhipolaetin-7-O-(allosil-(1→2)-glikozit) (M4) molekülü ¹H-NMR spektrumu



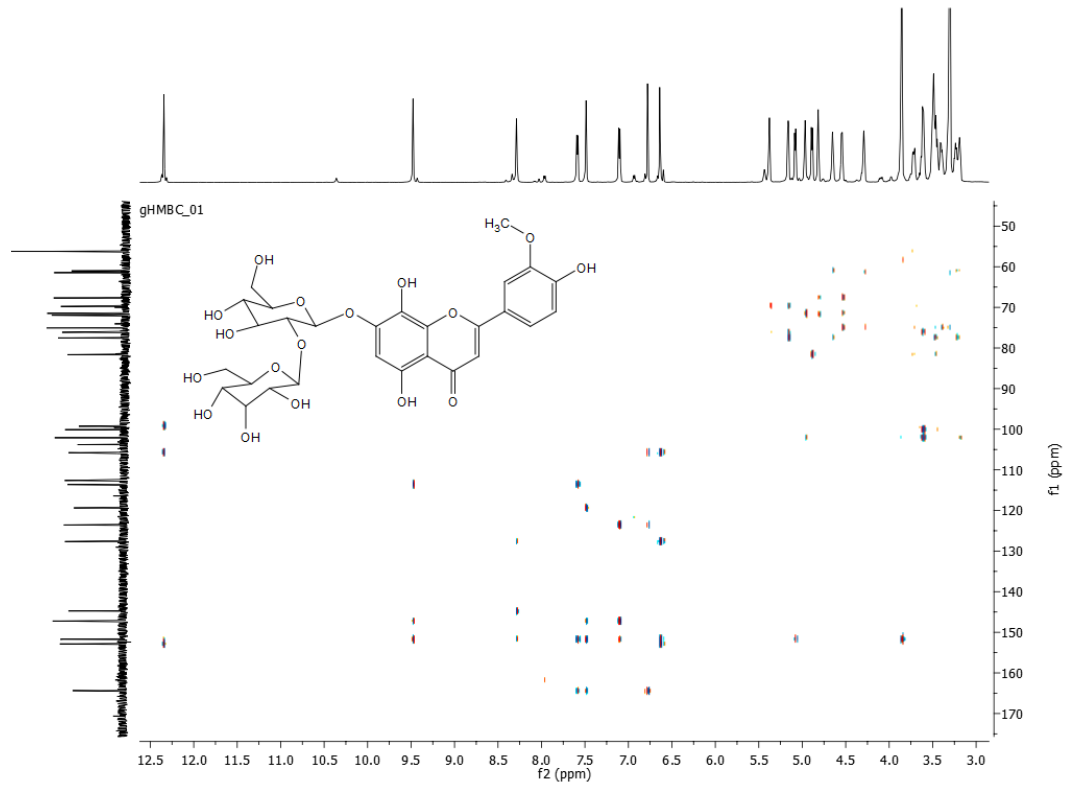
3'-O-metilhipolaetin-7-O-(allosil-(1→2)-glikozit) (M4) molekülü ¹³C-NMR spektrumu



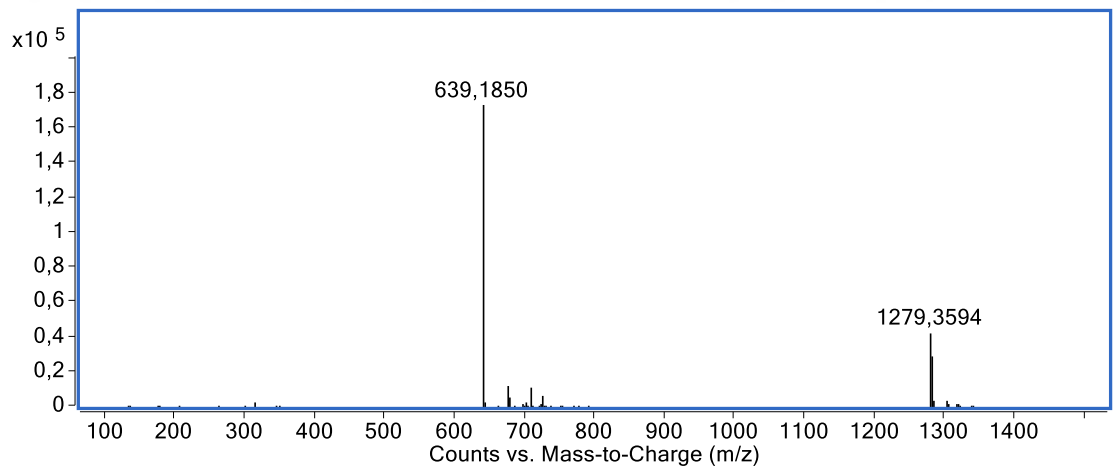
3'-*O*-metilhipolaetin-7-*O*-(allosil-(1→2)-glikozit) (**M4**) molekülü COSY spektrumu



3'-*O*-metilhipolaetin-7-*O*-(allosil-(1→2)-glikozit) (**M4**) molekülü HSQC spektrumu

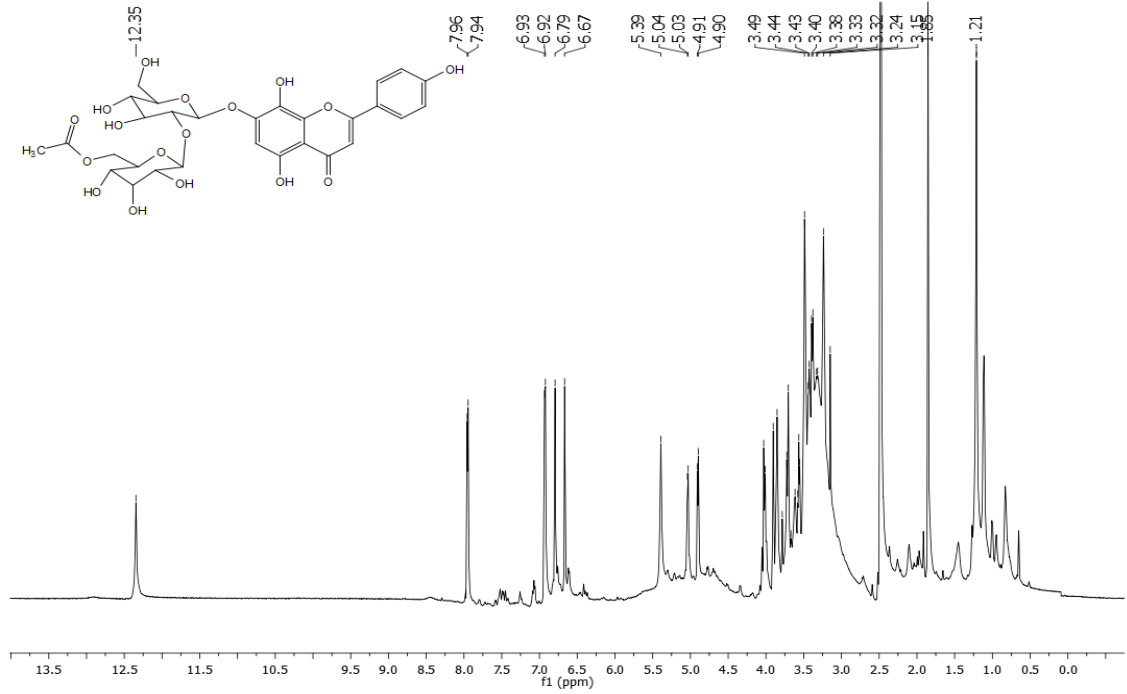


3'-*O*-metilhipolaetin-7-*O*-(allosil-(1→2))-glikozit (**M4**) molekülü HMBC spektrumu

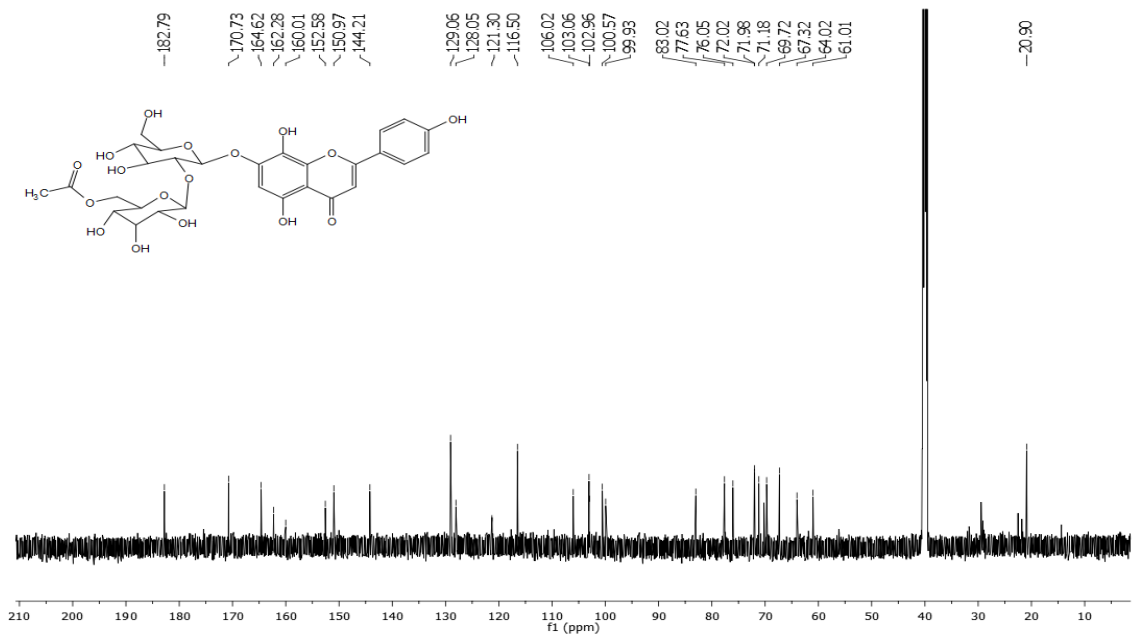


3'-*O*-metilhipolaetin-7-*O*-(allosil-(1→2))-glikozit (**M4**) molekülü LC-TOF/MS spektrumu

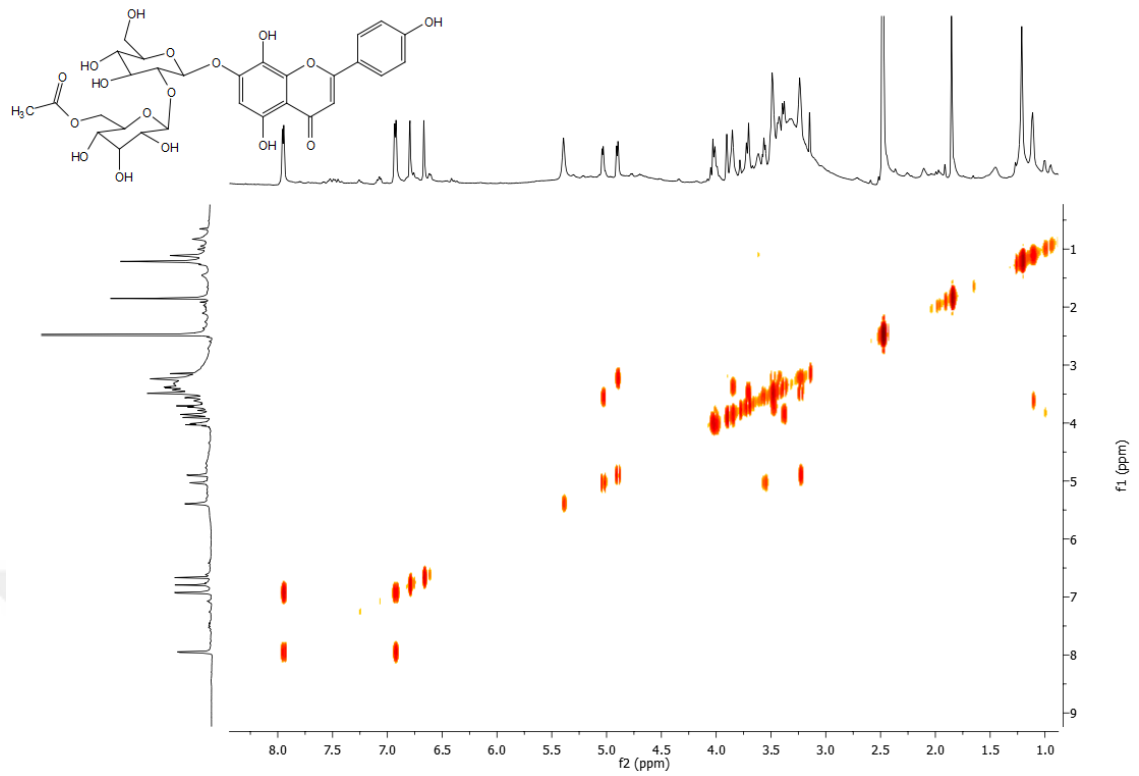
EK-6 İzoskutellerain-7-O-[6'''-O-asetil-allosil-(1→2)-glikozit] (M5) Molekülüne Ait Spektral Veriler



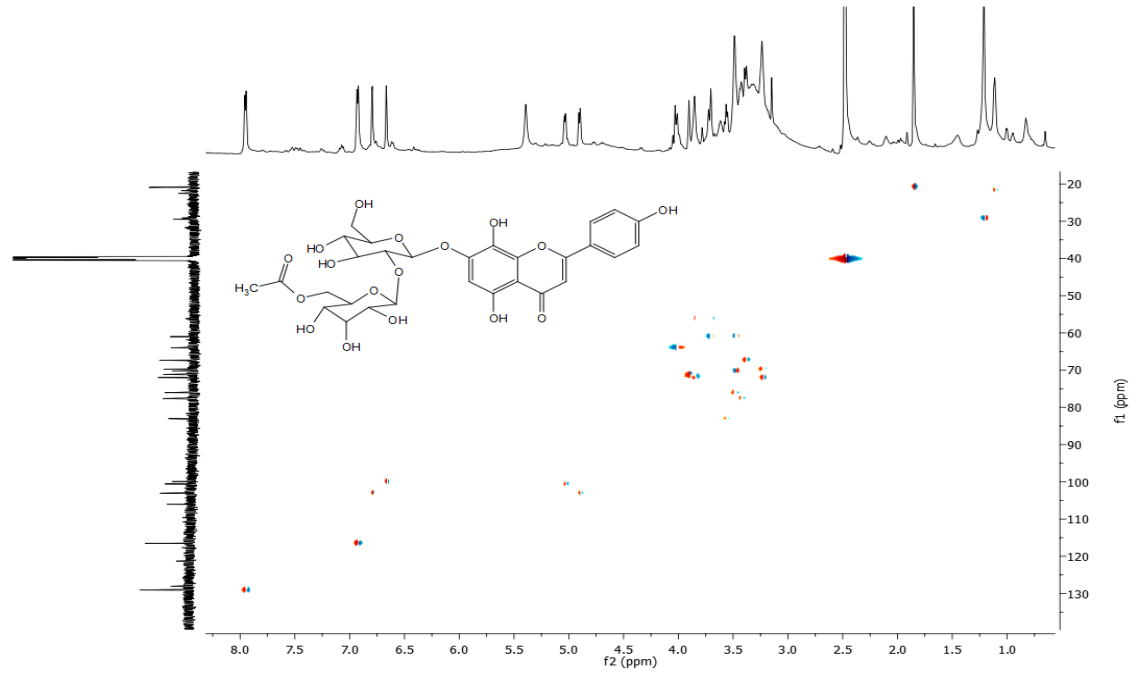
İzoskutellerain-7-O-[6'''-O-asetil-allosil-(1→2)-glikozit] (M5) ¹H-NMR spektrumu



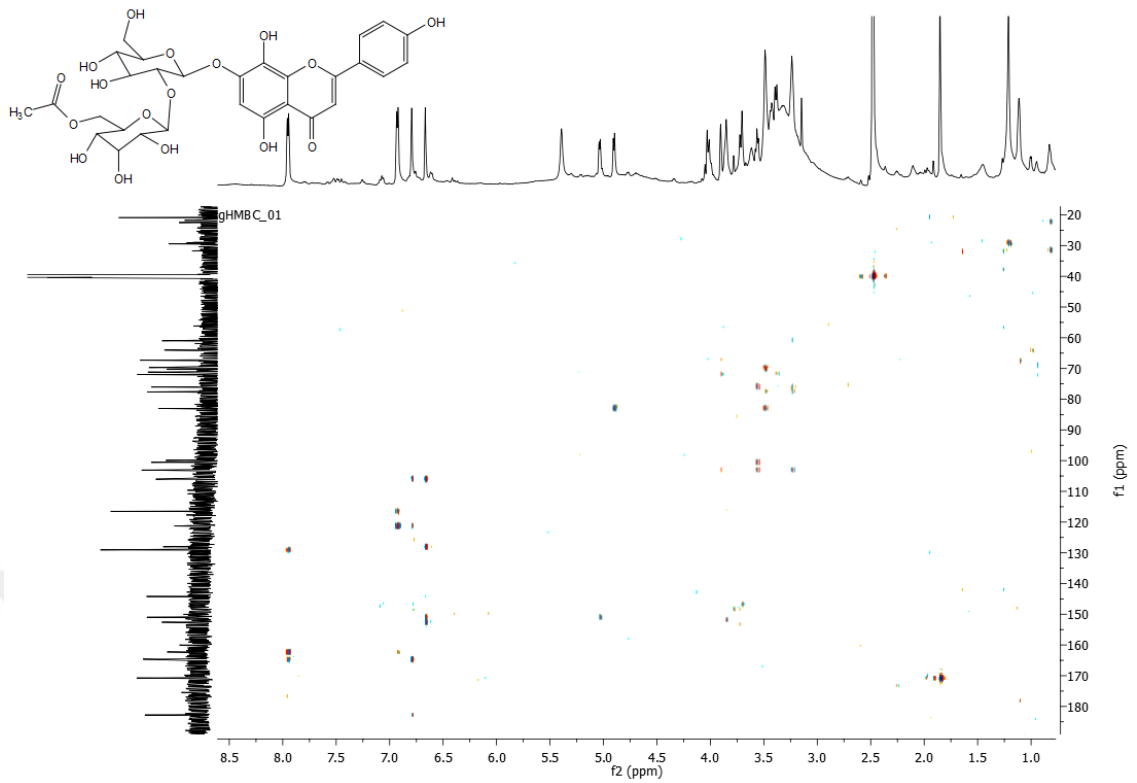
İzoskutellerain-7-O-[6'''-O-asetil-allosil-(1→2)-glikozit] (M5) ¹³C-NMR spektrumu



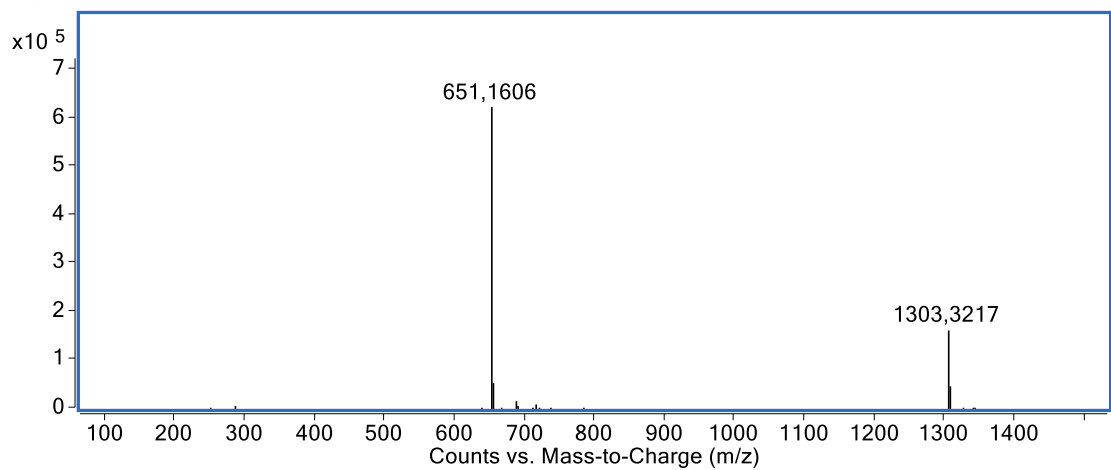
Izoskutellerain-7-O-[6'''-O-asetil-allosil-(1→2)-glikozit] (M5) COSY spektrumu



Izoskutellerain-7-O-[6'''-O-asetil-allosil-(1→2)-glikozit] (M5) HSQC spektrumu

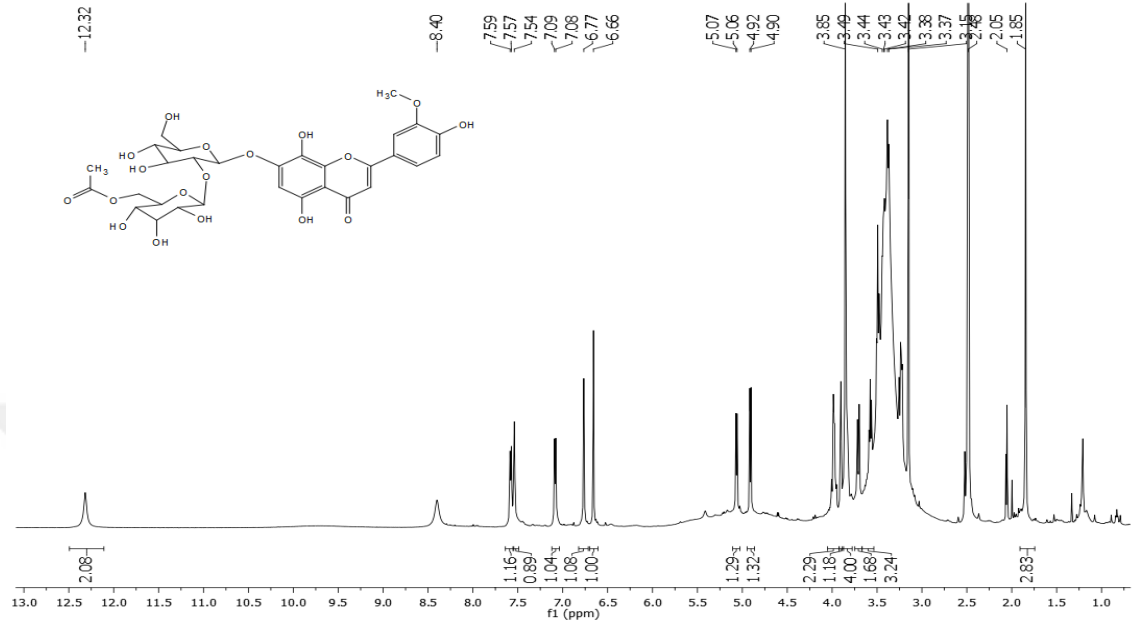


İzoskutellerain-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-allosil-(1→2)-glikozit] (**M5**) HMBC spektrumu

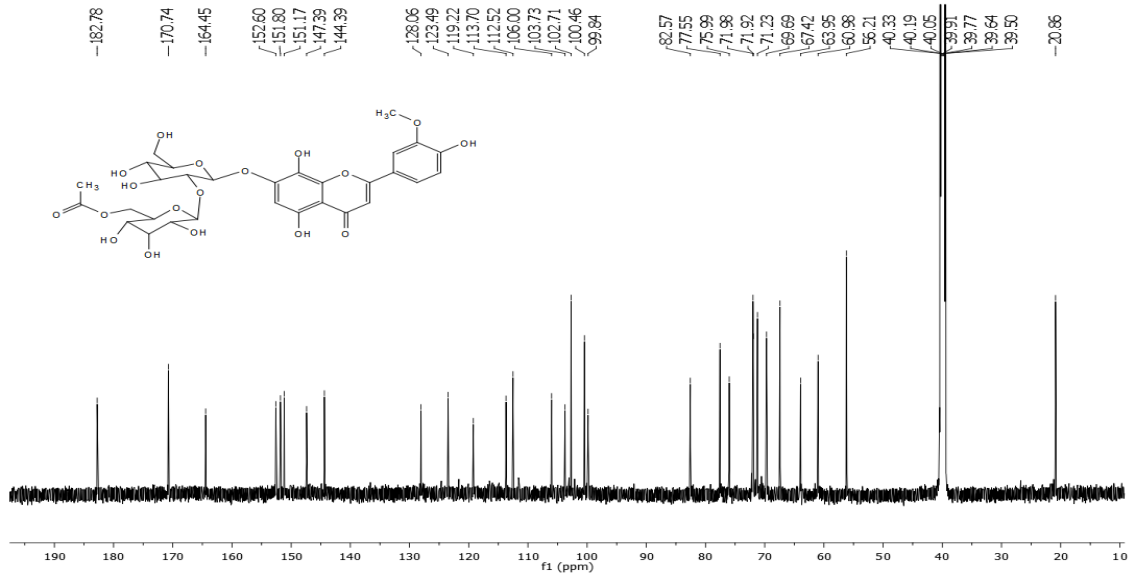


İzoskutellerain-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-allosil-(1→2)-glikozit] (**M5**) LC-TOF/MS spektrumu

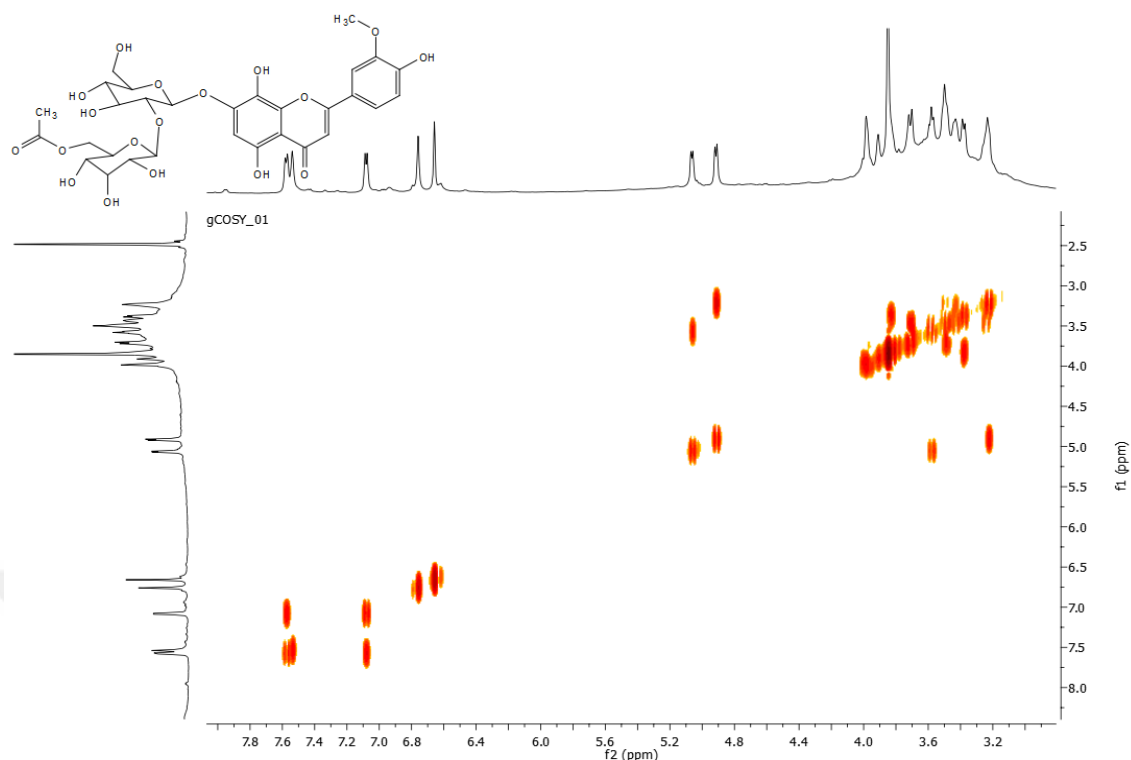
EK-7 (3'-O-metilhipolaetin-7-O-[6'''-O-asetil-allosil-(1→2)-glikozit]) (M6)
Molekülüne Ait Spektral Veriler



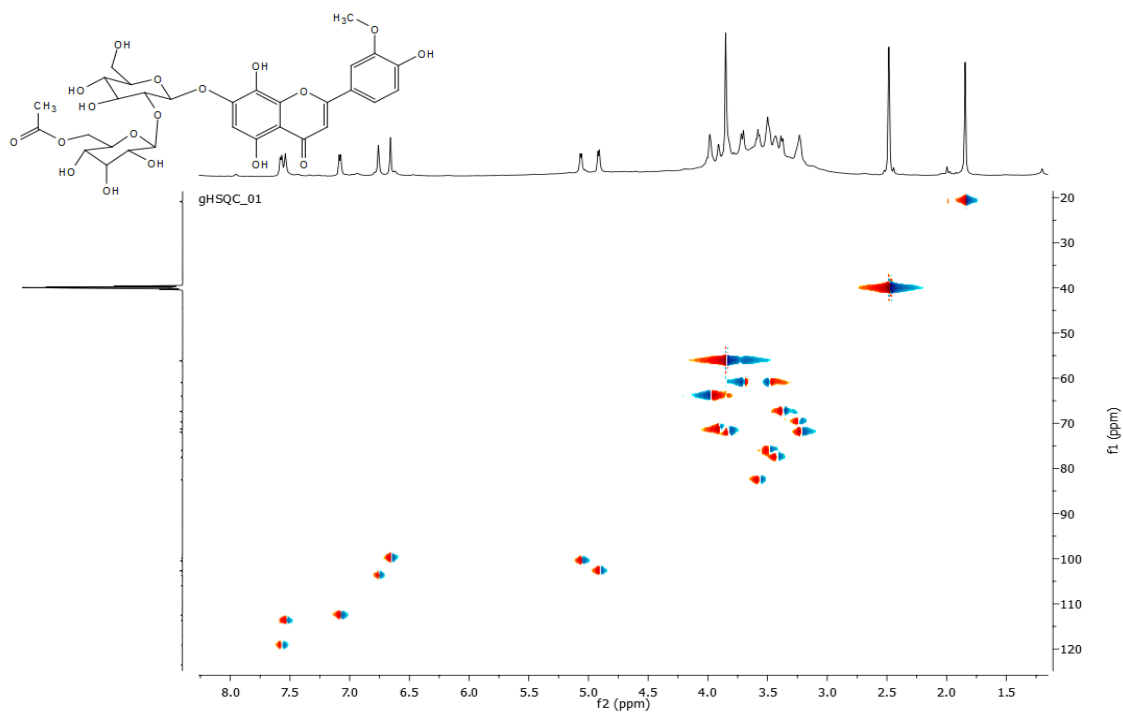
3'-O-metilhipolaetin-7-O-[6'''-O-asetil-allosil-(1→2)-glikozit] (M6) ¹H-NMR spektrumu



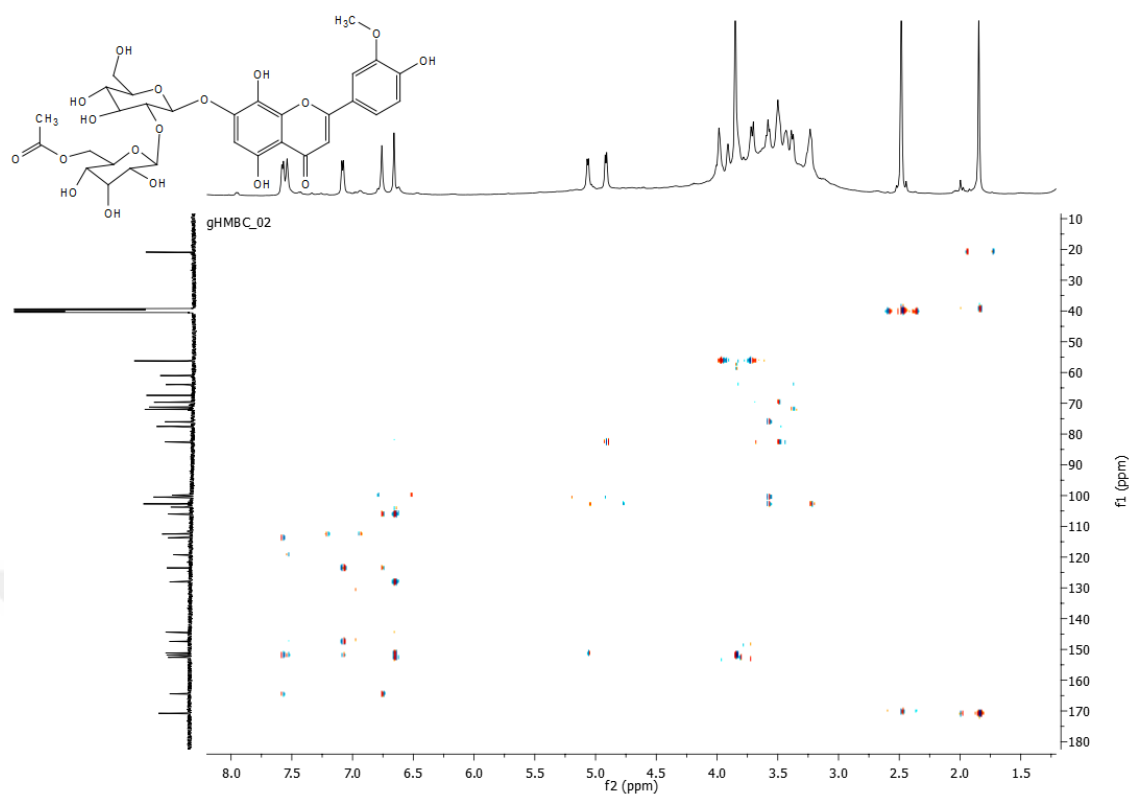
3'-O-metilhipolaetin-7-O-[6'''-O-asetil-allosil-(1→2)-glikozit] (M6) ¹³C-NMR spektrumu



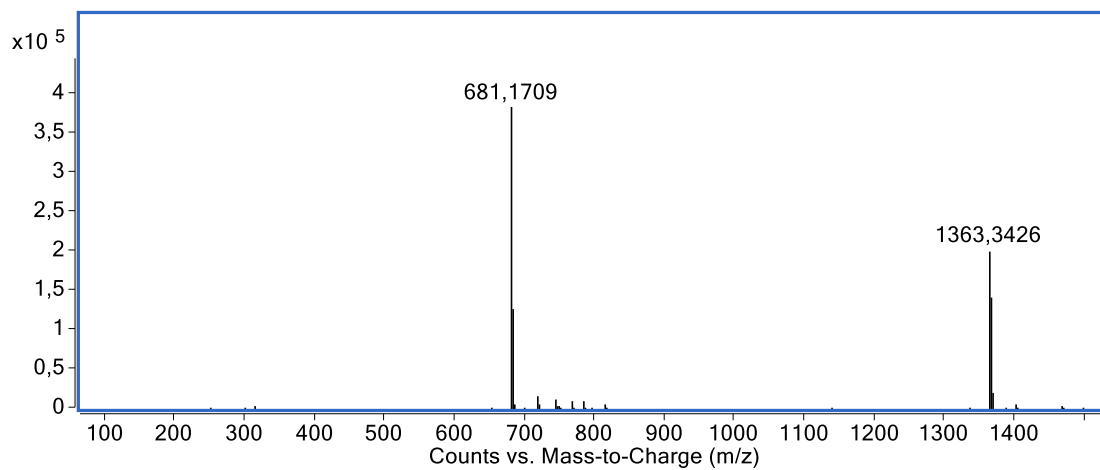
3'-*O*-metilhipolaetin-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-allosil-(1→2)-glikozit] (M6) COSY spektrumu



3'-*O*-metilhipolaetin-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-allosil-(1→2)-glikozit] (M6) HSQC spektrumu

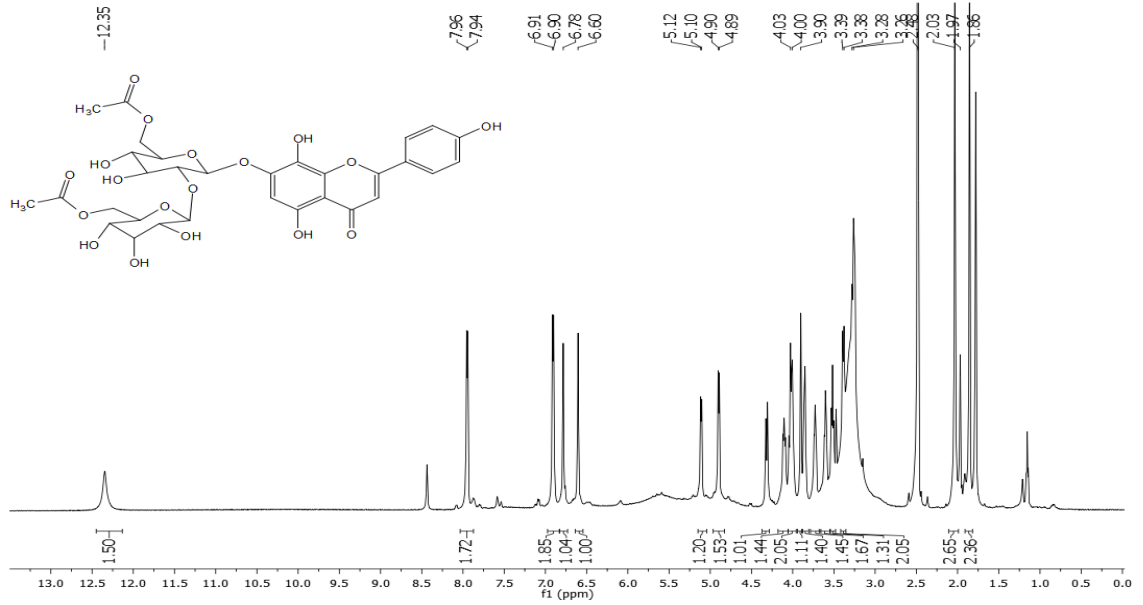


3'-*O*-metilhipolaetin-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-allosil-(1→2)-glikozit] (M6) HMBC spektrumu

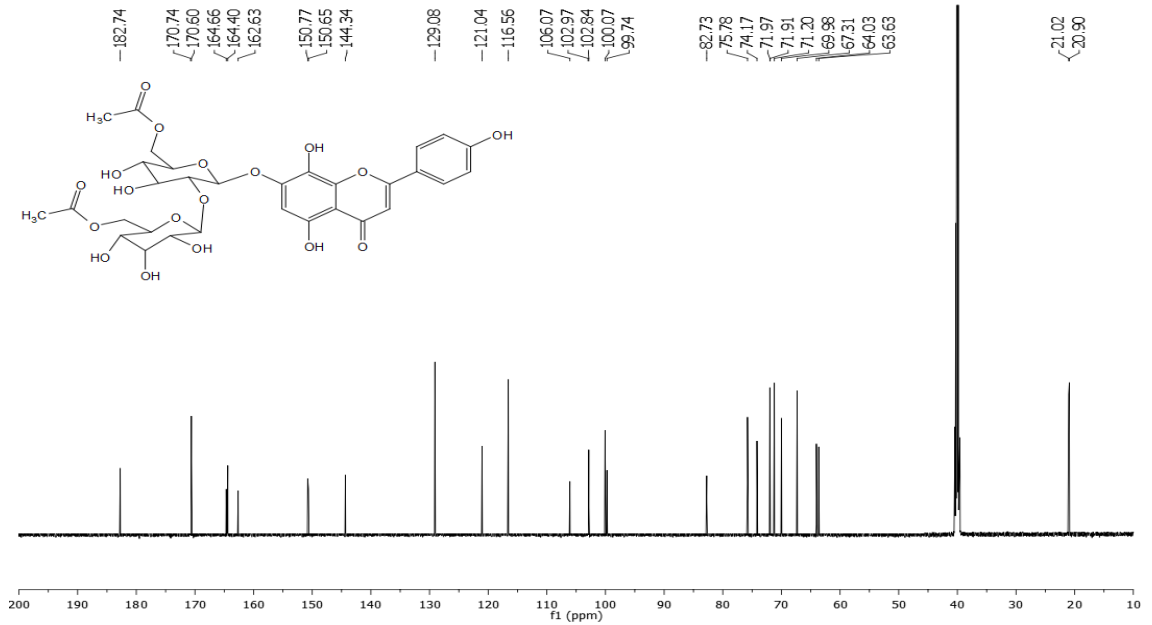


3'-*O*-metilhipolaetin-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-allosil-(1→2)-glikozit] (M6) LC-TOF/MS spektrumu

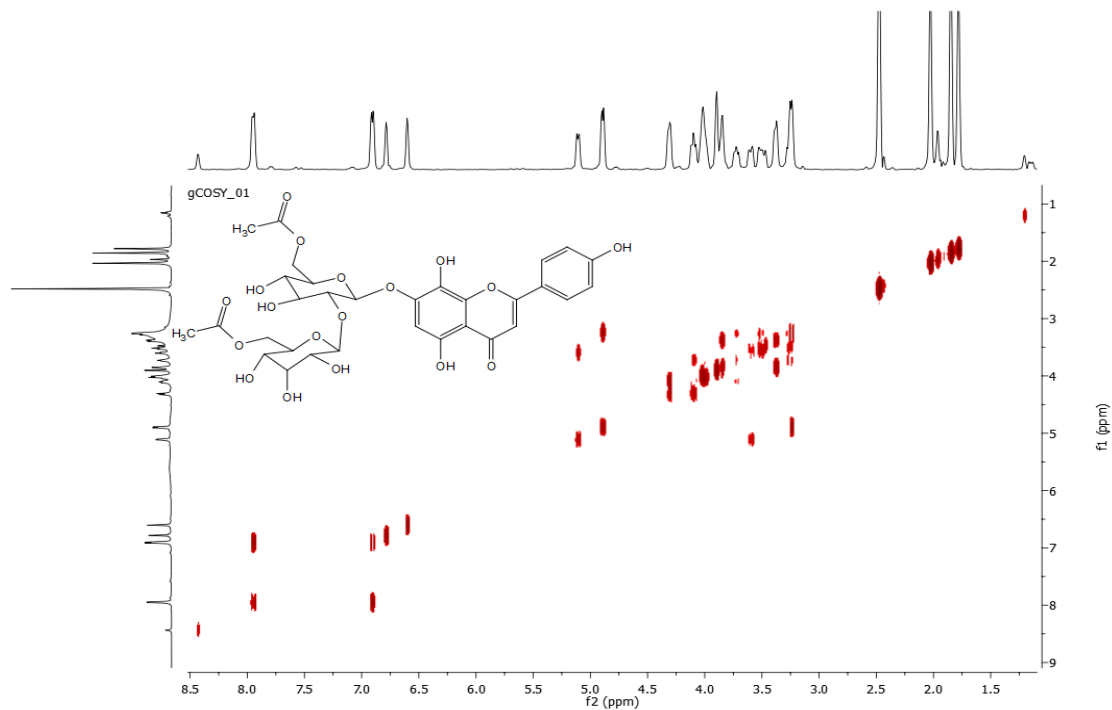
EK-8 İzoskutellerain-7-O-[6'''-O-asetil-allosil-(1→2)-6''-O-asetil-glikozit] (M7)
Molekülüne Ait Spektral Veriler



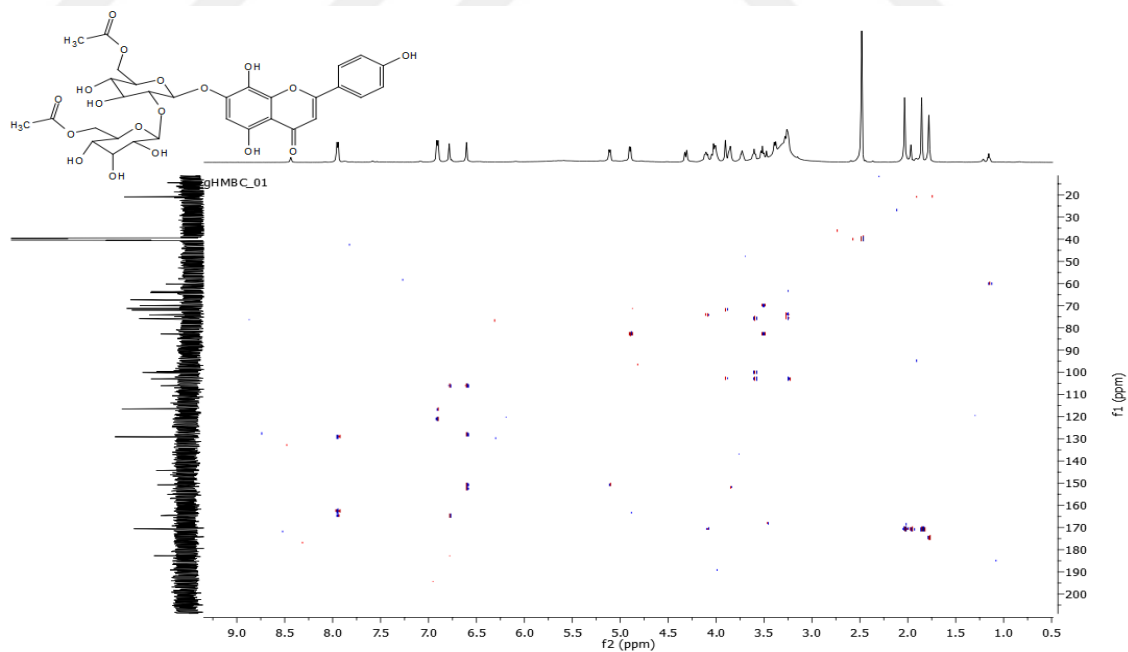
İzoskutellerain-7-O-[6'''-O-asetil-allosil-(1→2)-6''-O-asetil-glikozit] (M7) ¹H-NMR
spektrumu



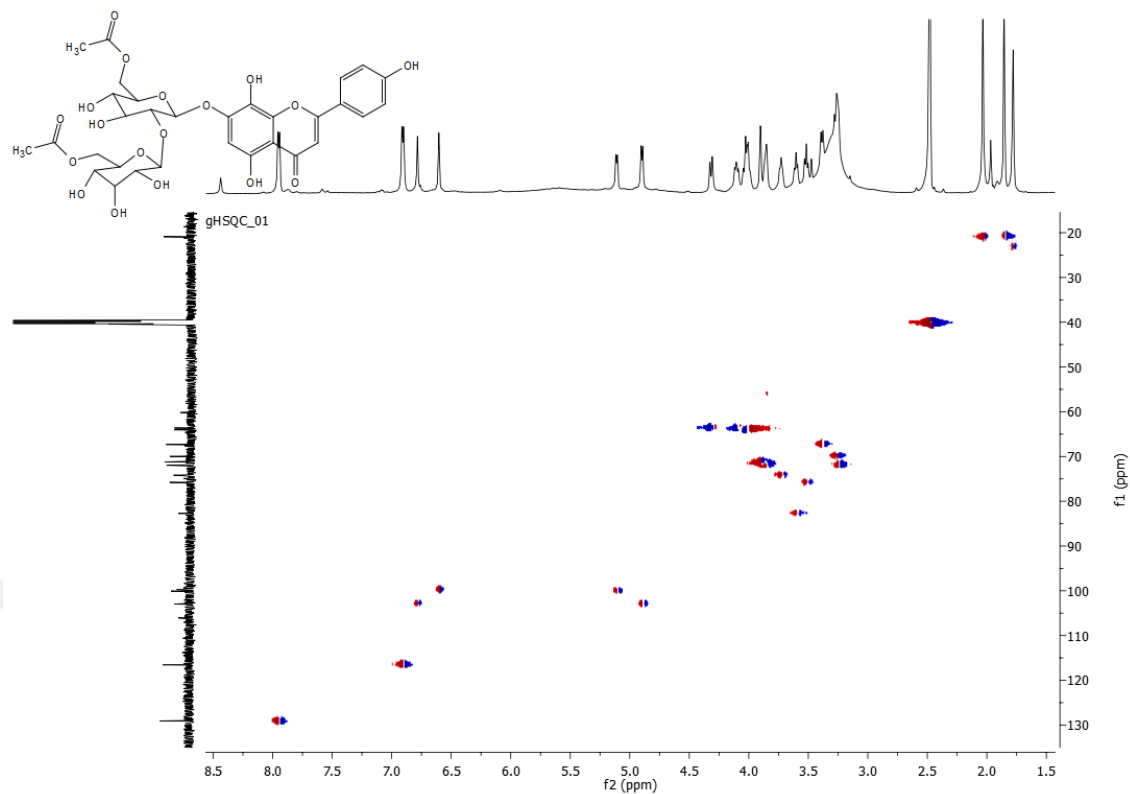
İzoskutellerain-7-O-[6'''-O-asetil-allosil-(1→2)-6''-O-asetil-glikozit] (M7) ¹³C-NMR
spektrumu



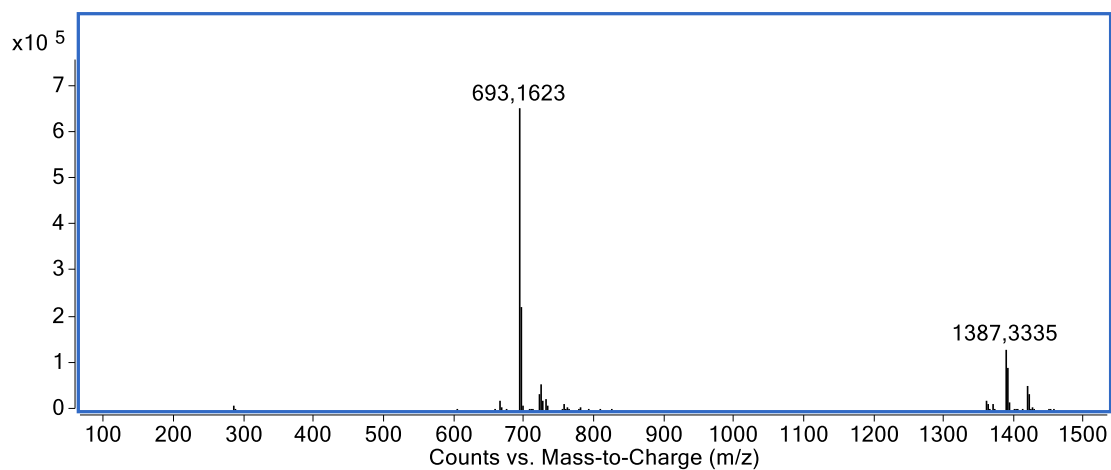
İzoskutellerain-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-allosil-(1→2)-6''-*O*-asetil-glikozit] (M7) COSY spektrumu



İzoskutellerain-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-allosil-(1→2)-6''-*O*-asetil-glikozit] (M7) COSY spektrumu

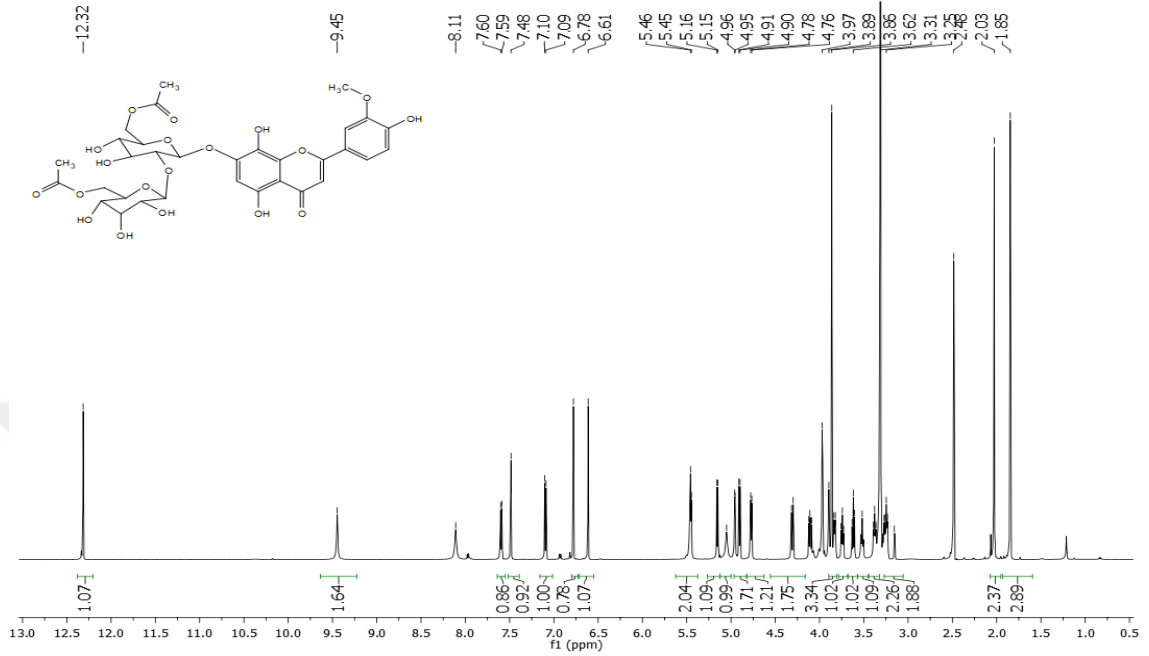


İzoskutellerain-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-allosil-(1→2)-6''-*O*-asetil-glikozit] (**M7**) HSQC spektrumu

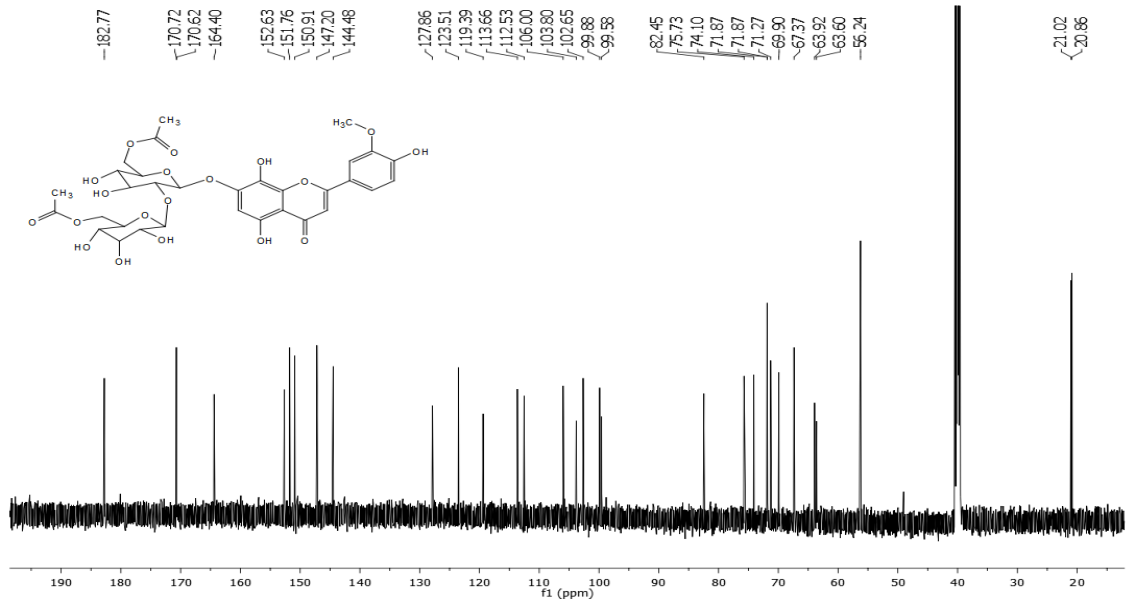


İzoskutellerain-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-allosil-(1→2)-6''-*O*-asetil-glikozit] (**M7**) LC-TO/MS spektrumu

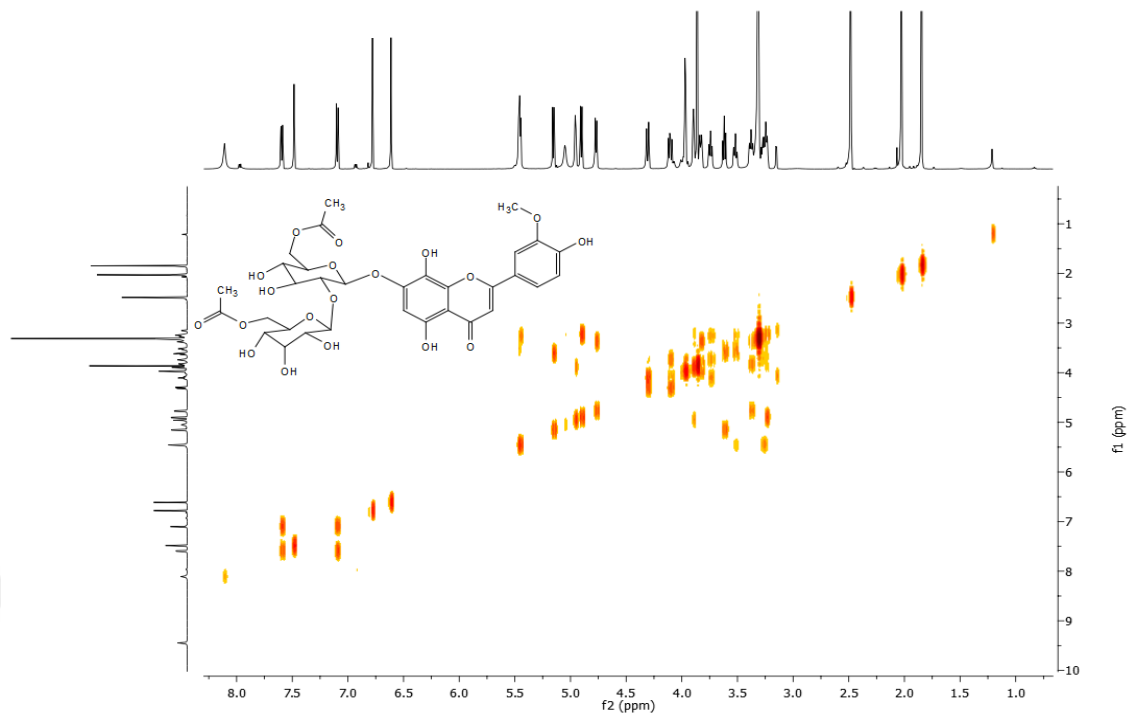
EK-9 3'-O-metilhipolaetin-7-O-[6'''-O-asetil-allosil-(1→2)-6'''-O-asetil-glikozit] (M8) Molekölüne Ait Spektral Veriler



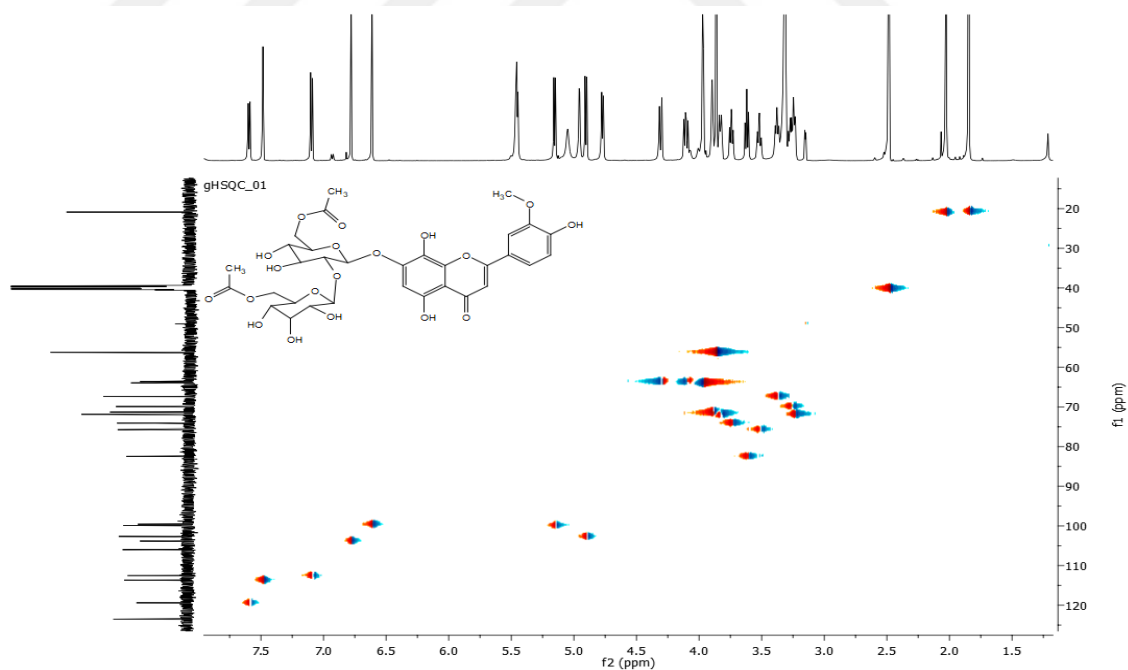
3'-O-metilhipolaetin-7-O-[6'''-O-asetil-allosil-(1→2)-6'''-O-asetil-glikozit] (M8) ¹H-NMR spektrumu



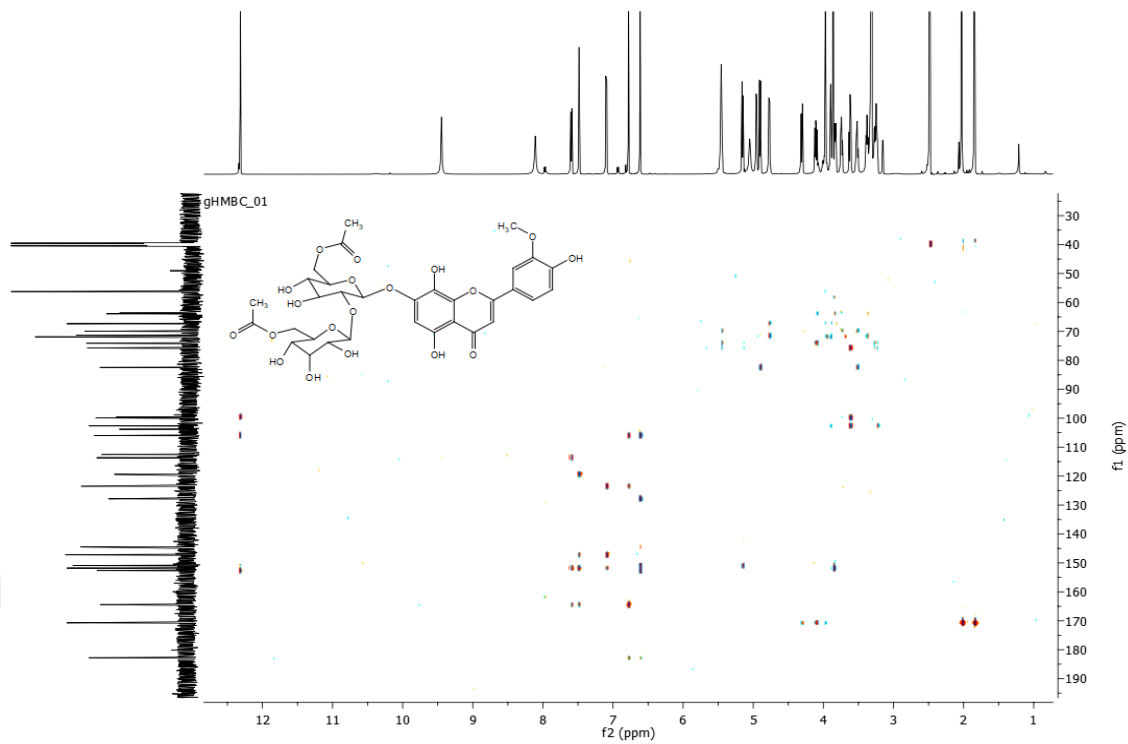
3'-O-metilhipolaetin-7-O-[6'''-O-asetil-allosil-(1→2)-6'''-O-asetil-glikozit] (M8) ¹³C-NMR spektrumu



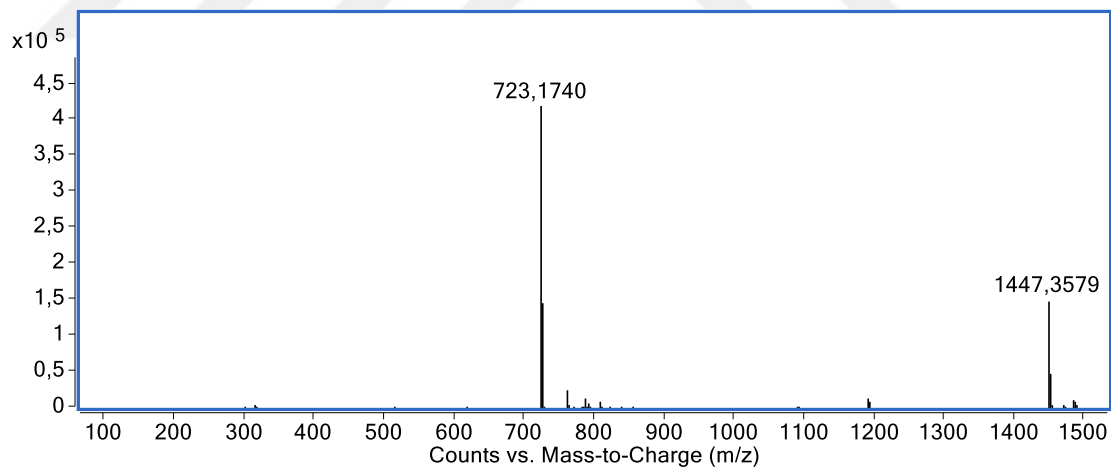
3'-*O*-metilhipolaetin-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-allosil-(1→2)-6'''-*O*-asetil-glikozit] (**M8**) COSY spektrumu



3'-*O*-metilhipolaetin-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-allosil-(1→2)-6'''-*O*-asetil-glikozit] (**M8**) HSQC spektrumu

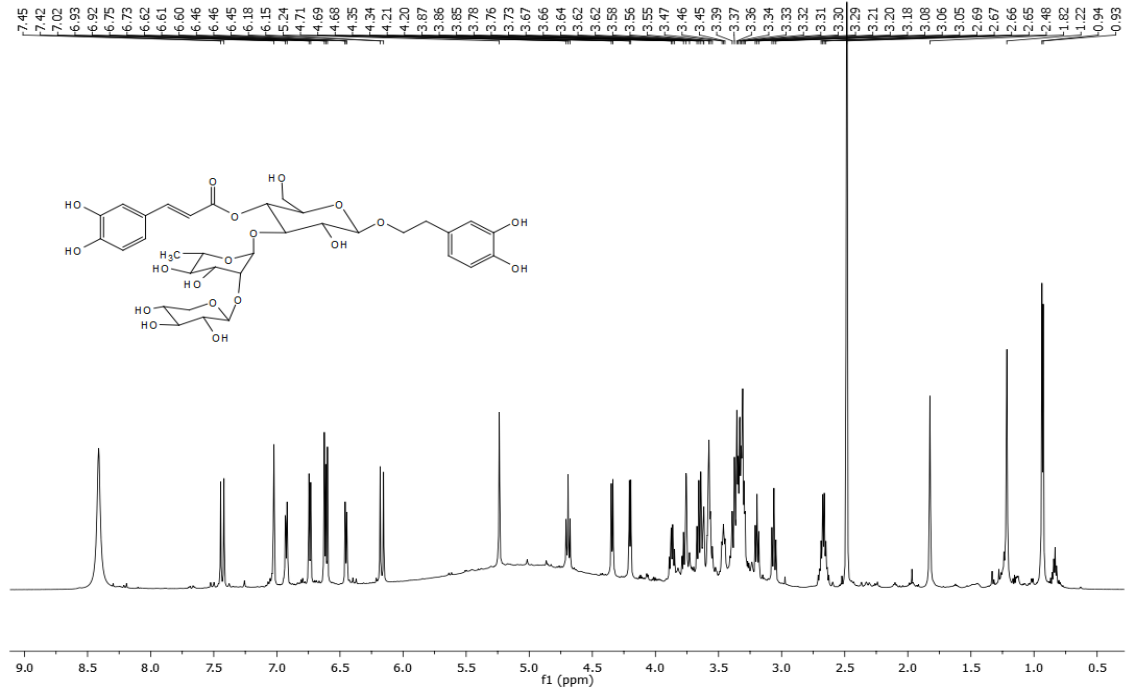


3'-*O*-metilhipolaetin-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-allosil-(1→2)-6'''-*O*-asetil-glikozit] (**M8**) HMBC spektrumu

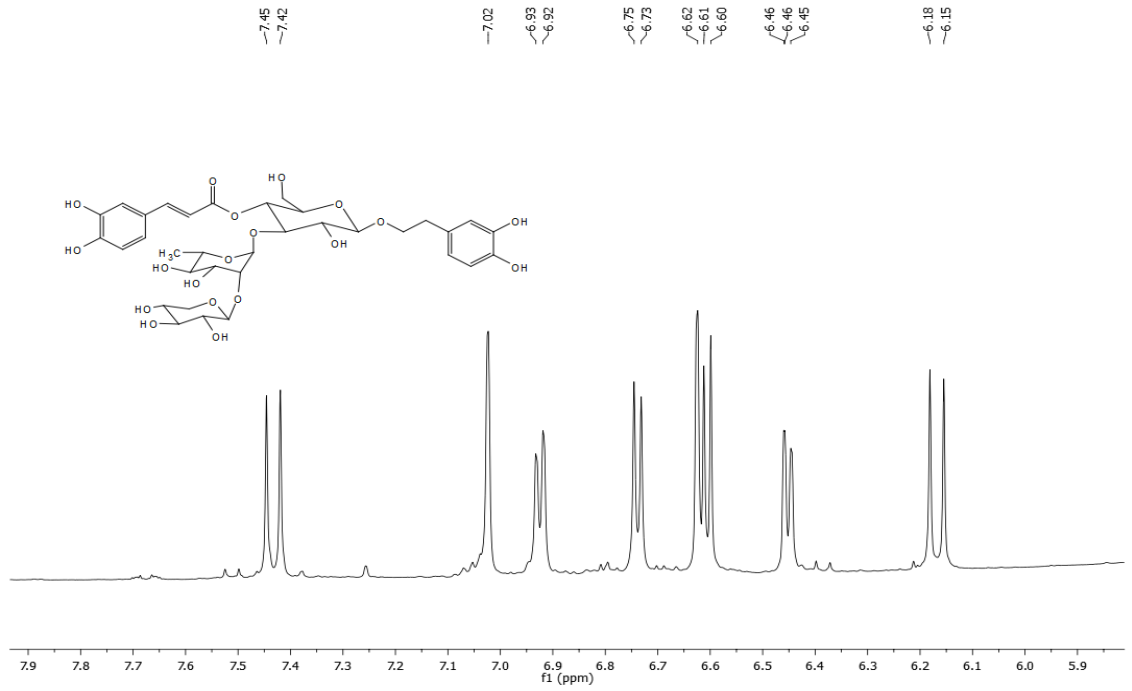


3'-*O*-metilhipolaetin-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-allosil-(1→2)-6'''-*O*-asetil-glikozit] (**M8**) LC-TOF/MS spektrumu

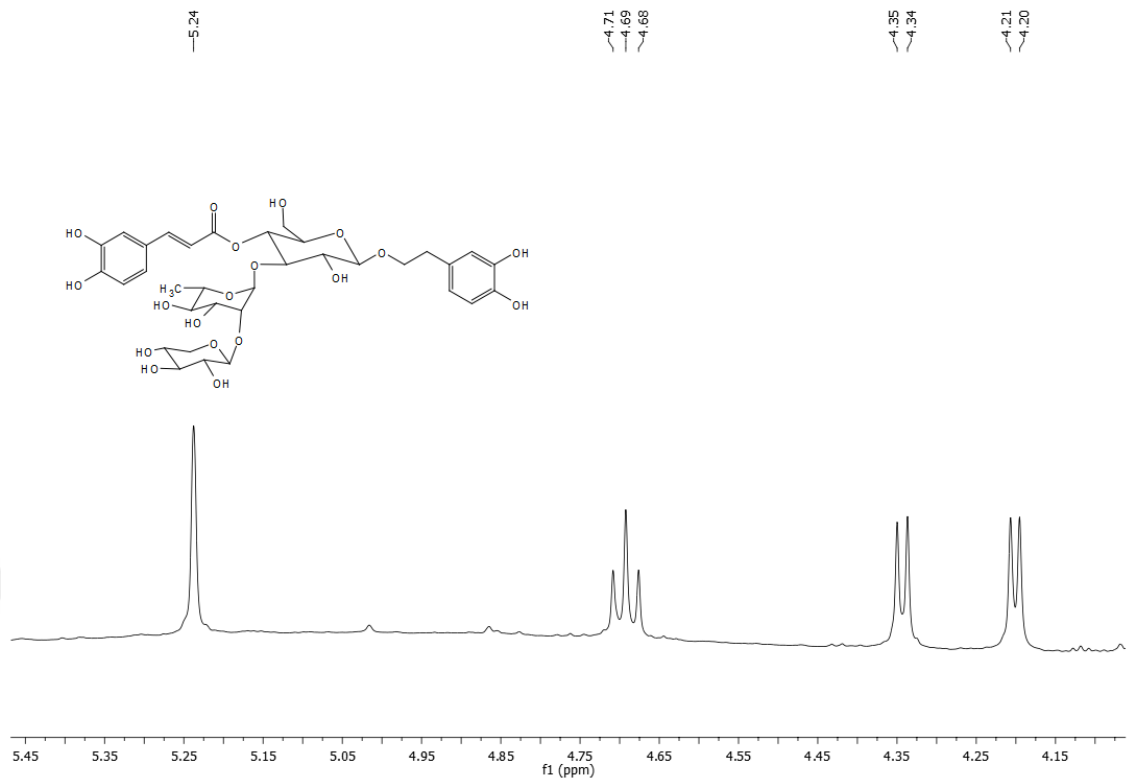
EK-10 Sideridosid (M9) Molekölüne Ait Spektral Veriler



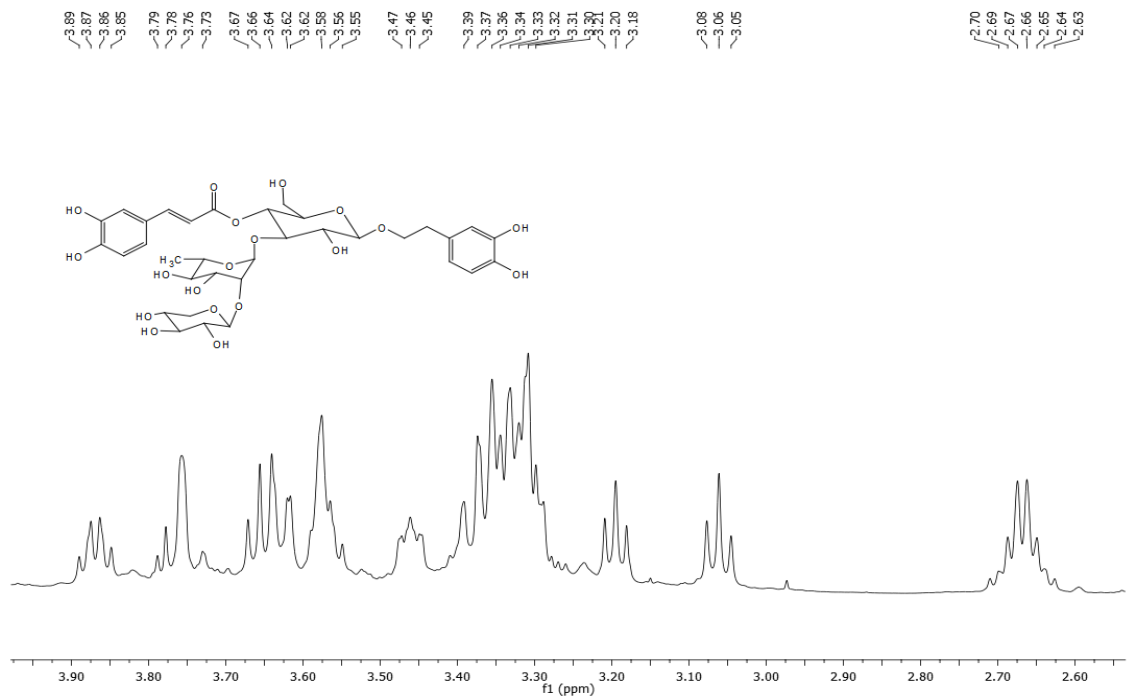
Sideridosid (M9) ¹H-NMR spektrumu



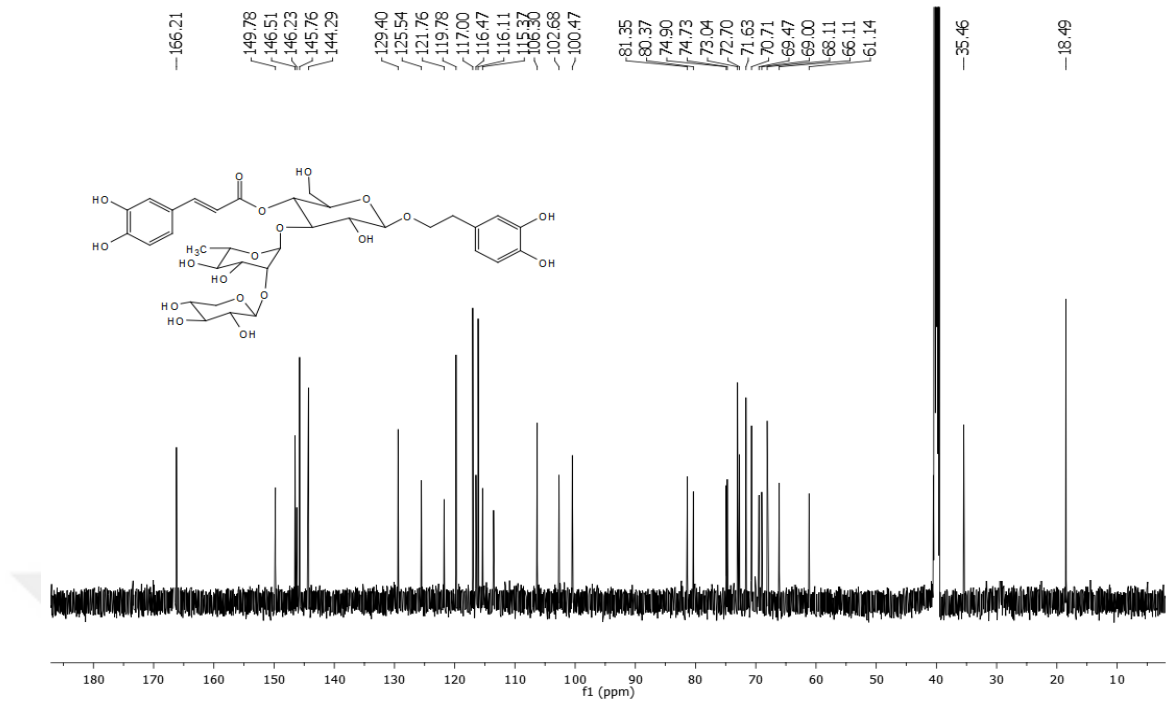
Sideridosid (M9) ¹H-NMR spektrumu (6-8 ppm genişletilmiş)



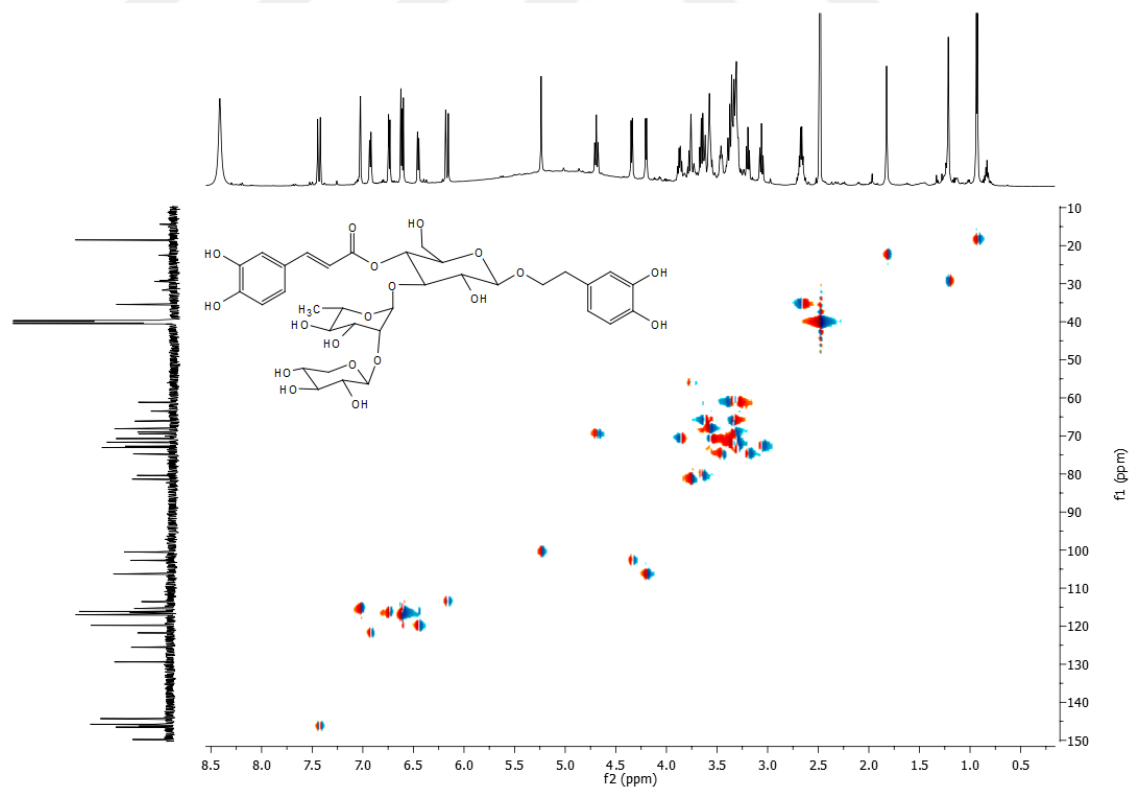
Sideridosid (M9) ¹H-NMR spektrumu (4-6 ppm genişletilmiş)



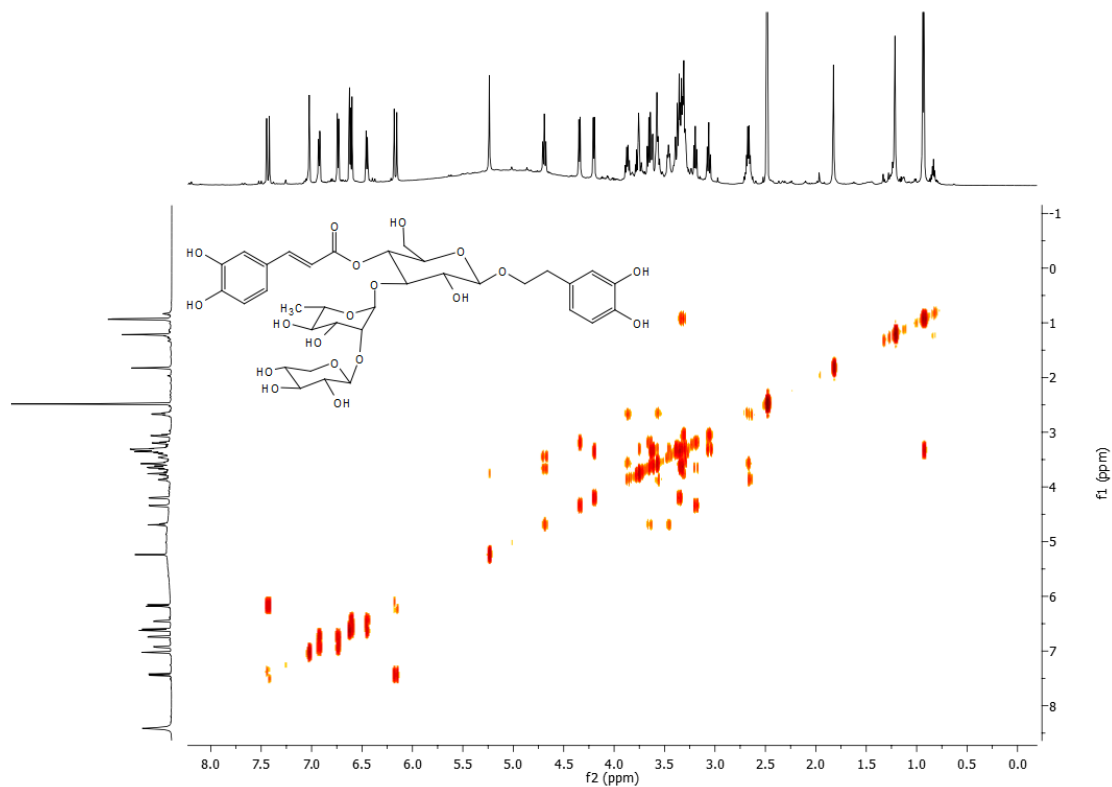
Sideridosid (M9) ¹H-NMR spektrumu (2-4 ppm genişletilmiş)



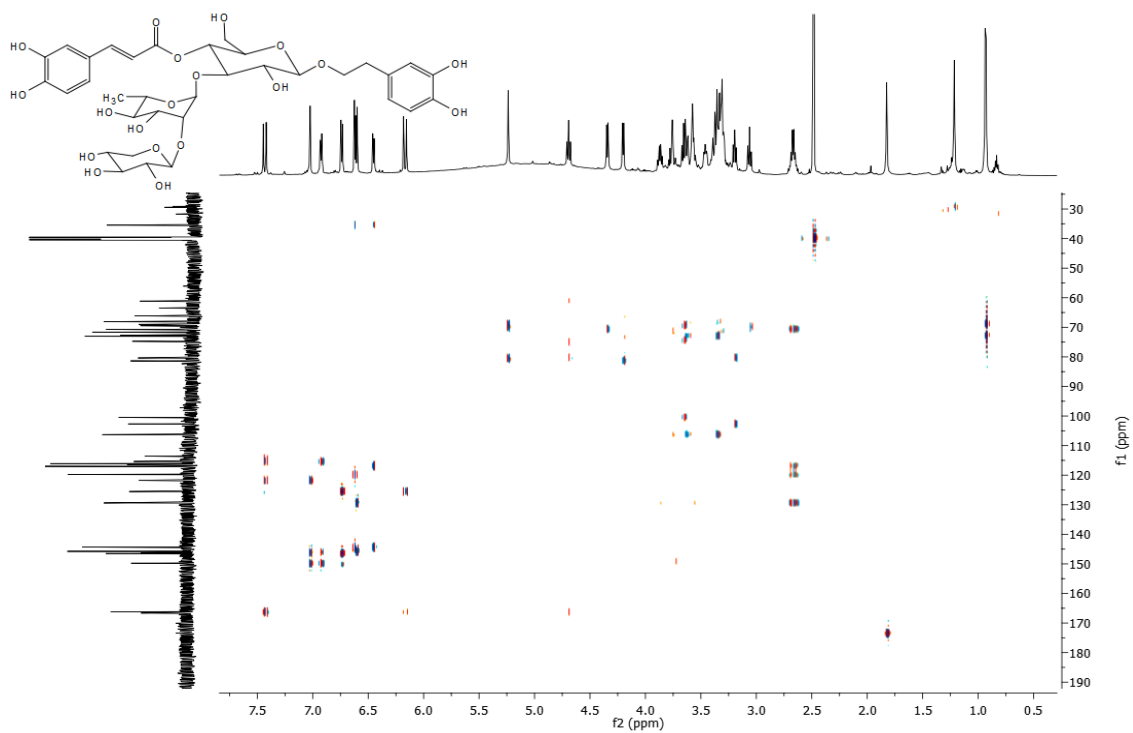
Sideridosid (M9) ^{13}C -NMR spektrum



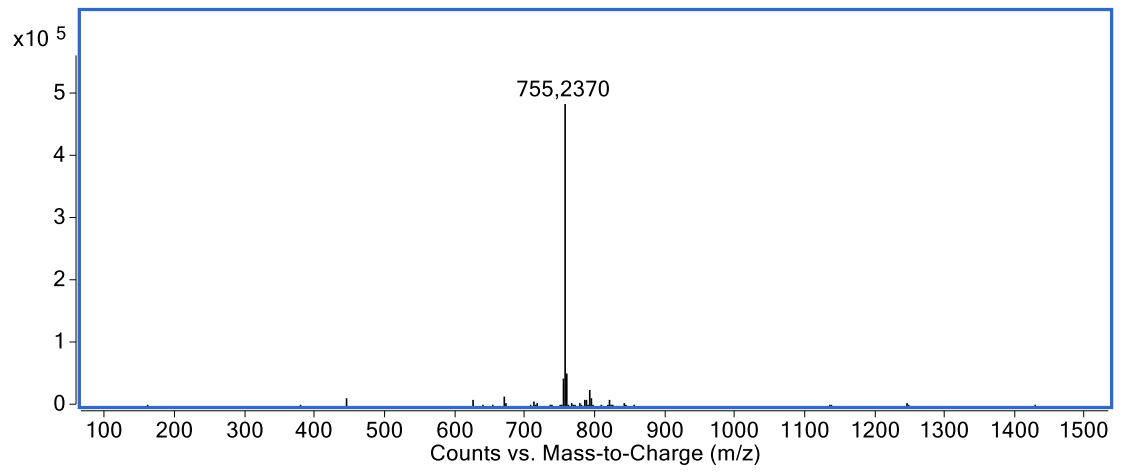
Sideridosid (M9) HSQC spektrum



Sideridosid (M9) HSQC spektrumu



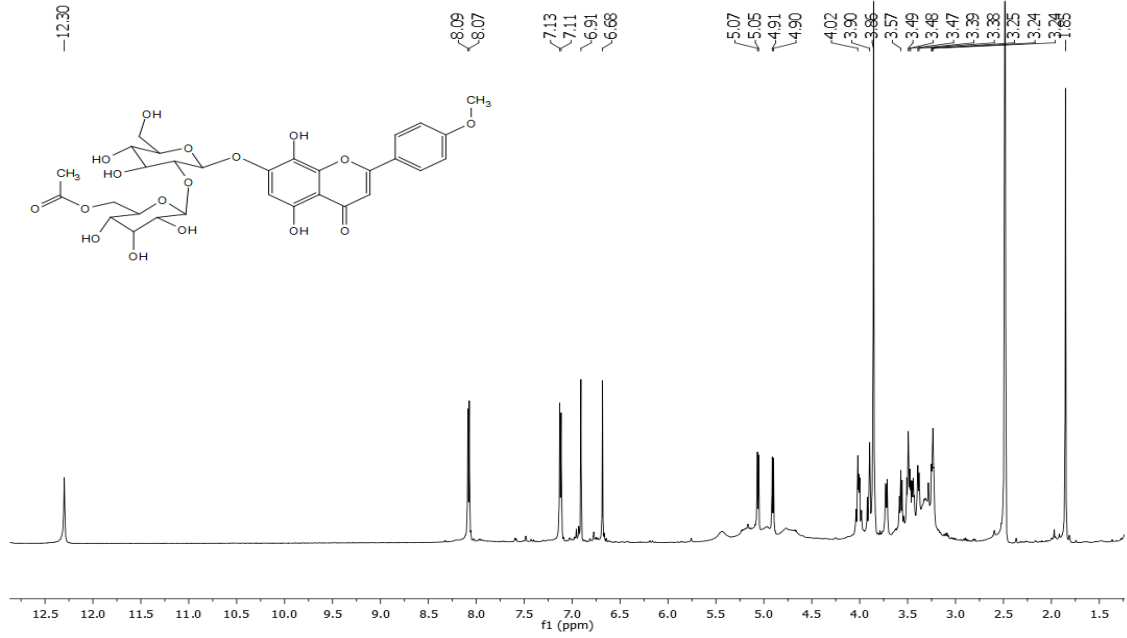
Sideridosid (M9) HMBC spektrumu



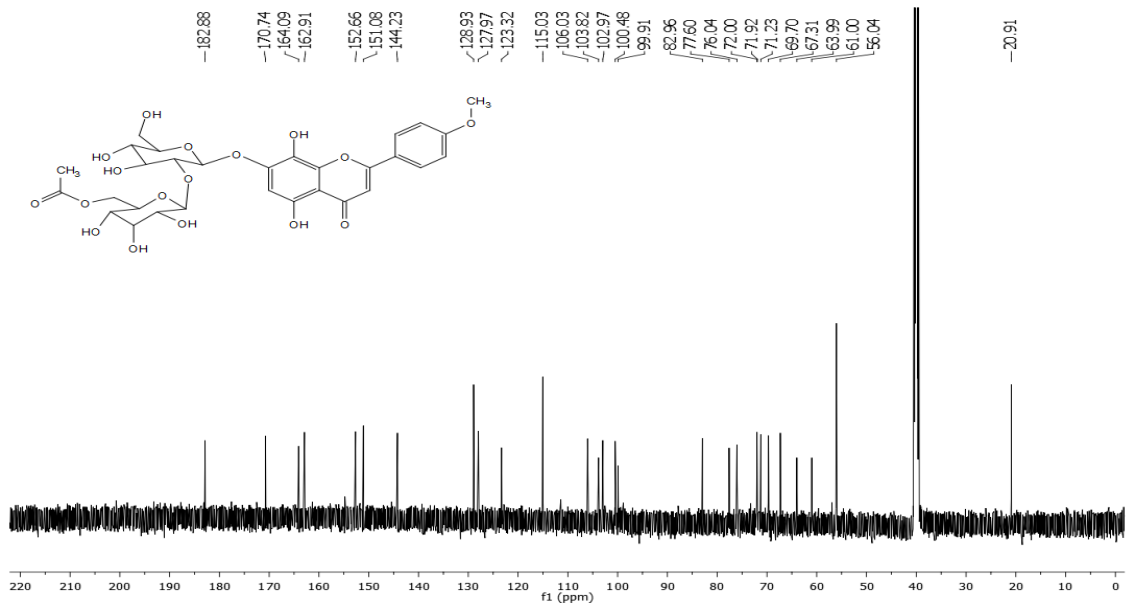
Sideridosid (M9) LC-TOF/MS spektrumu



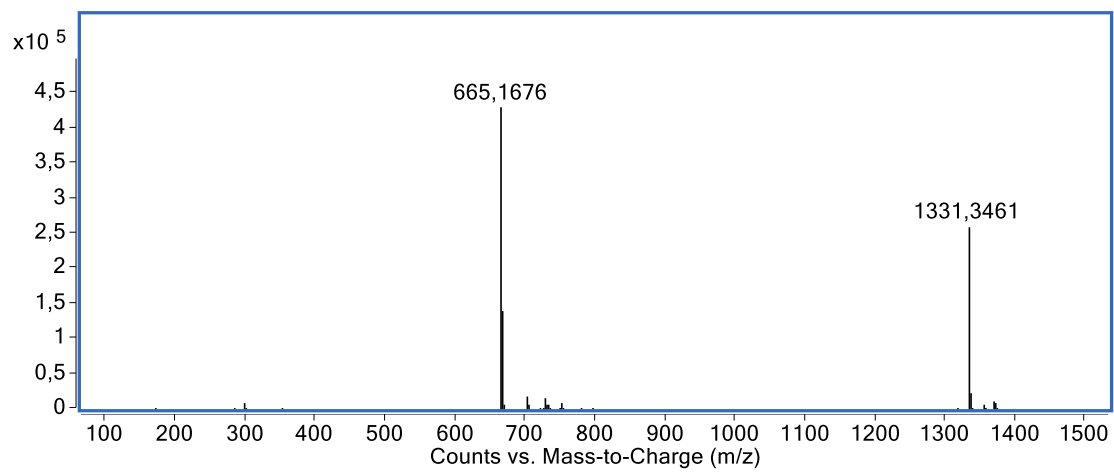
EK-11 4'-O-metilizoskutellerain-7-O-[6'''-O-asetil-allosil-(1→2)-glikozit] (M10)
Molekülüne Ait Spektral Veriler



4'-O-metilizoskutellerain-7-O-[6'''-O-asetil-allosil-(1→2)-glikozit] (M10) ¹H-NMR
spektrumu

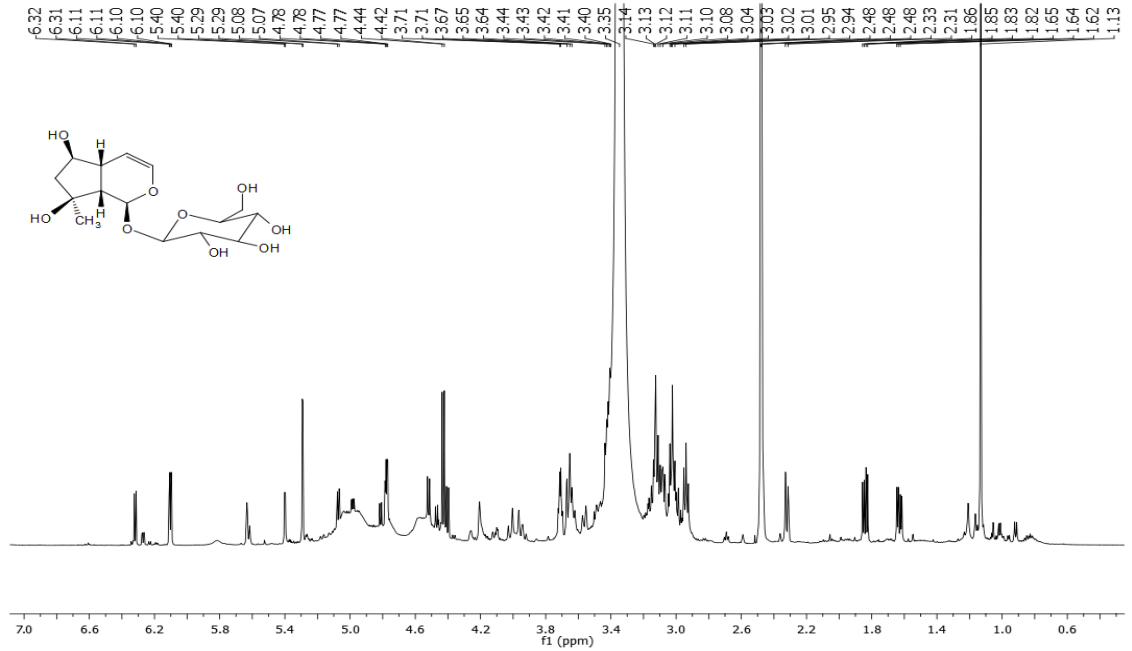


4'-O-metilizoskutellerain-7-O-[6'''-O-asetil-allosil-(1→2)-glikozit] (M10) ¹³C-NMR
spektrumu

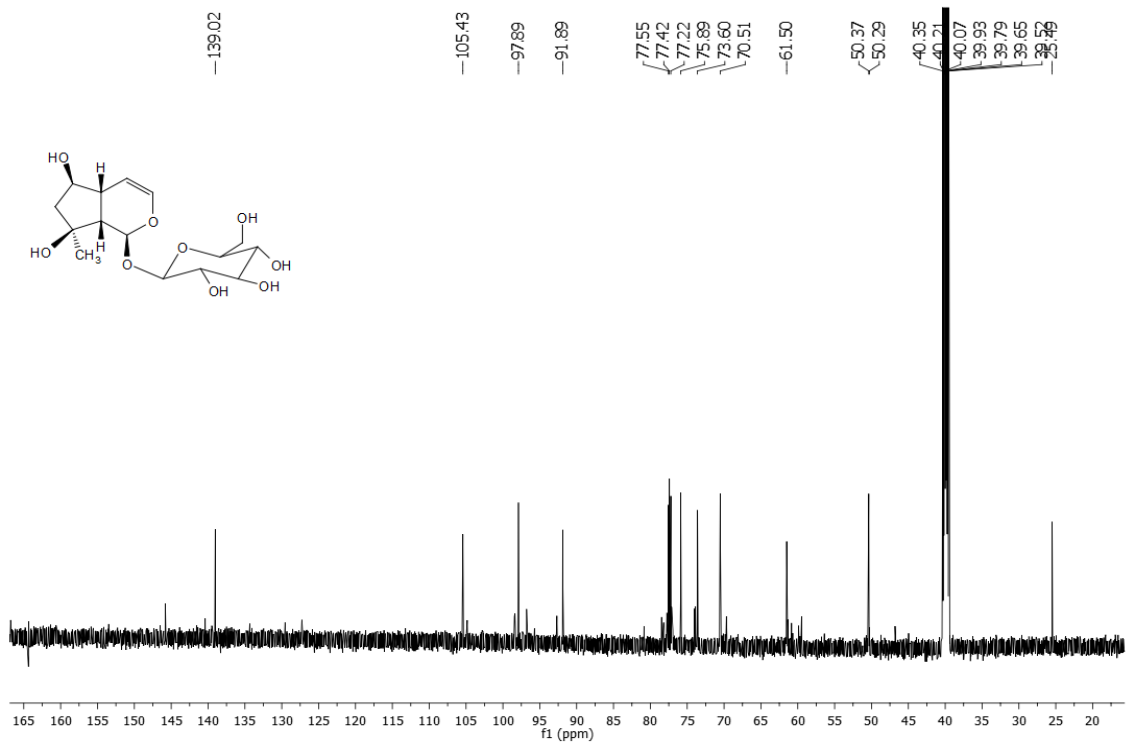


4'-*O*-metilizoskutellerain-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-allosil-(1→2)-glikozit] (**M10**) LC-TOF/MS spektrumu

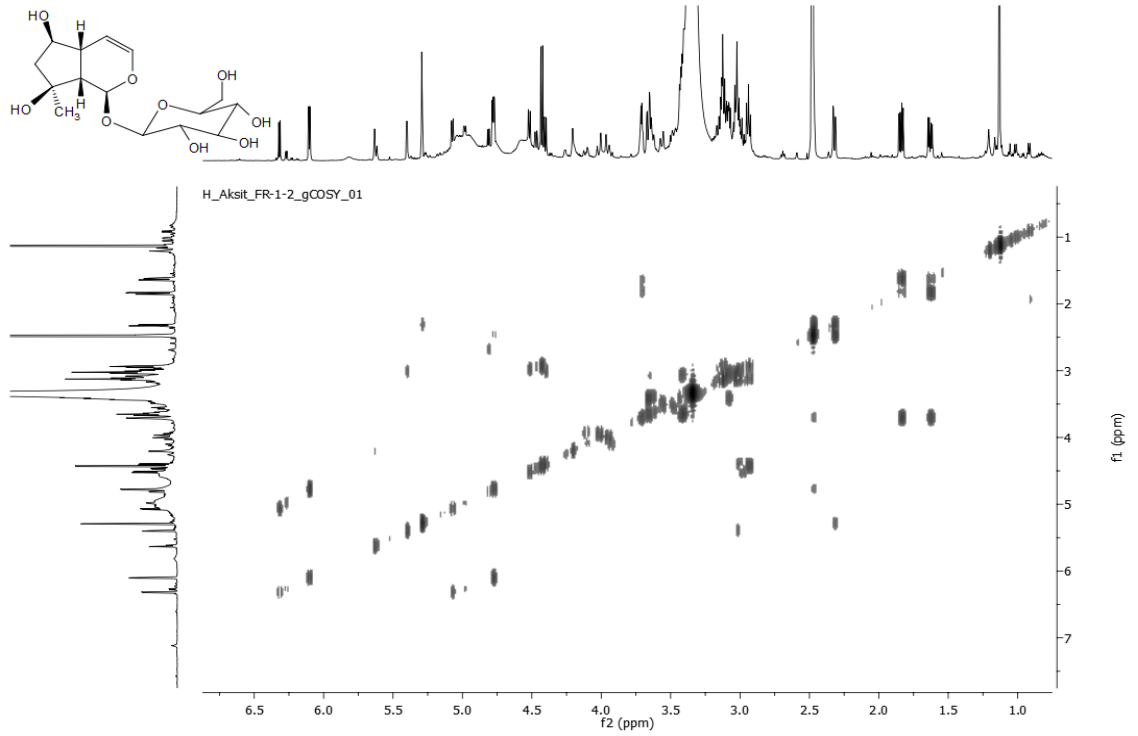
EK-12 Ajugol (M11) Molekülüne Ait Spektral Veriler



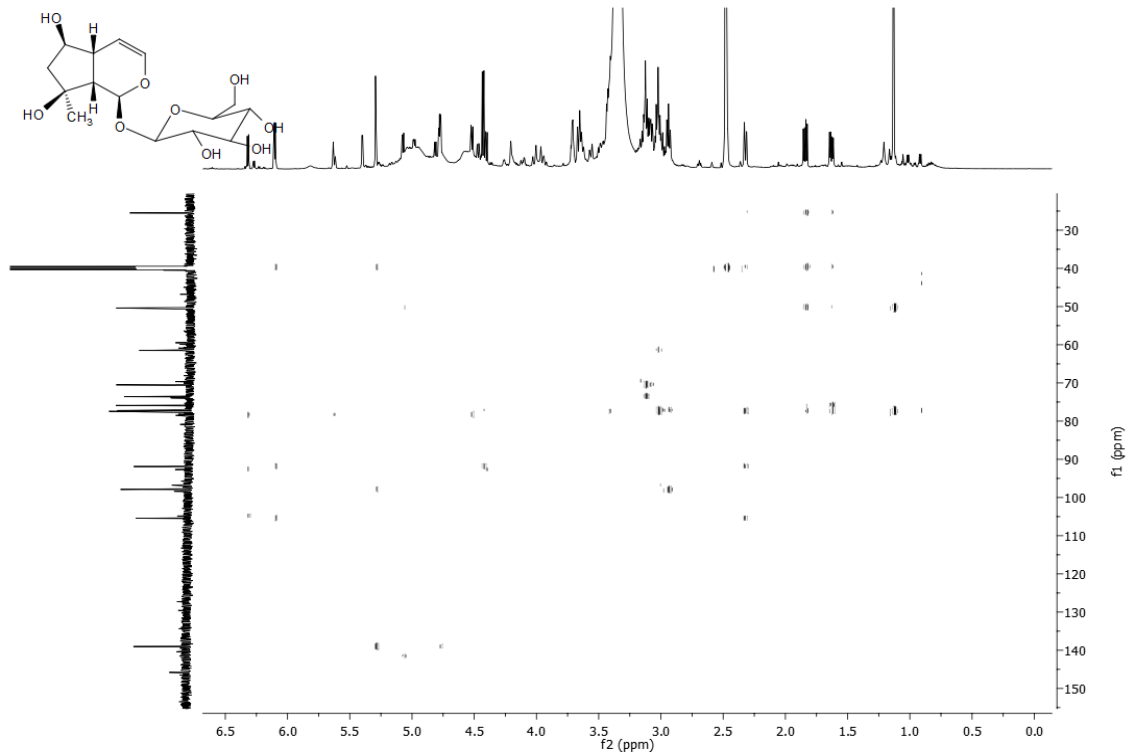
Ajugol (M11) Molekülü ¹H-NMR Spektrumu



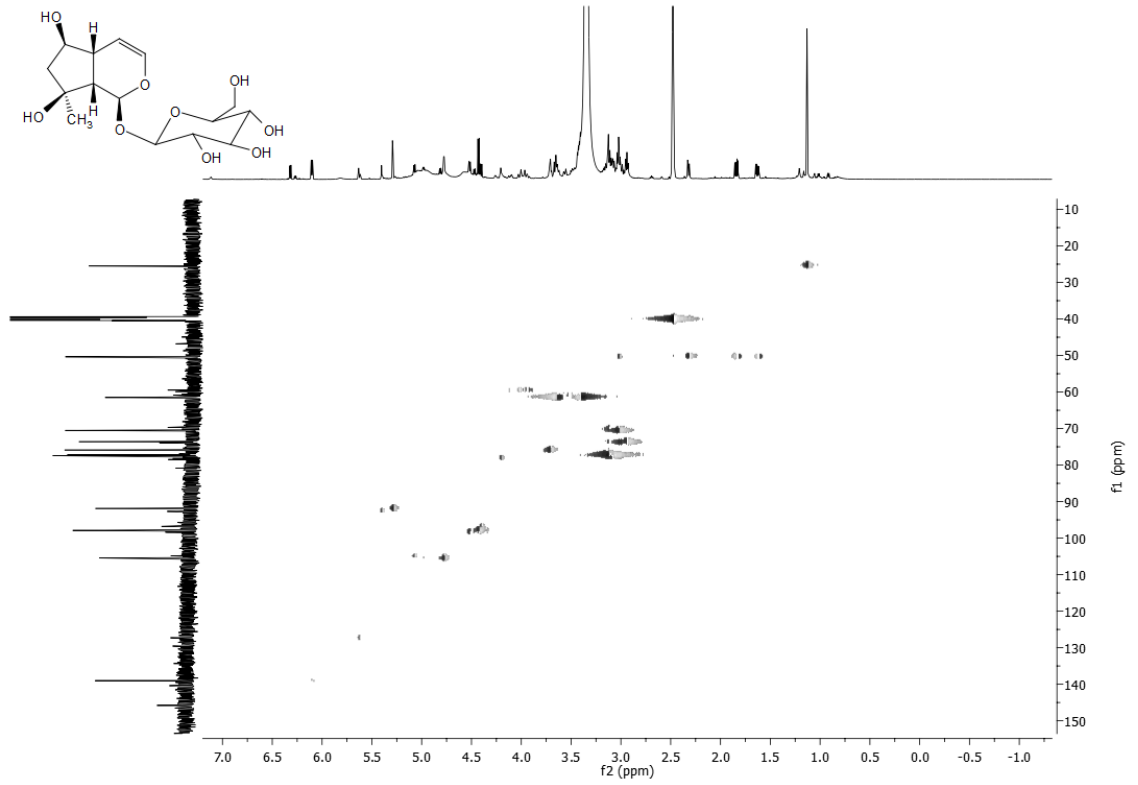
Ajugol (M11) Molekülü ¹³C-NMR Spektrumu



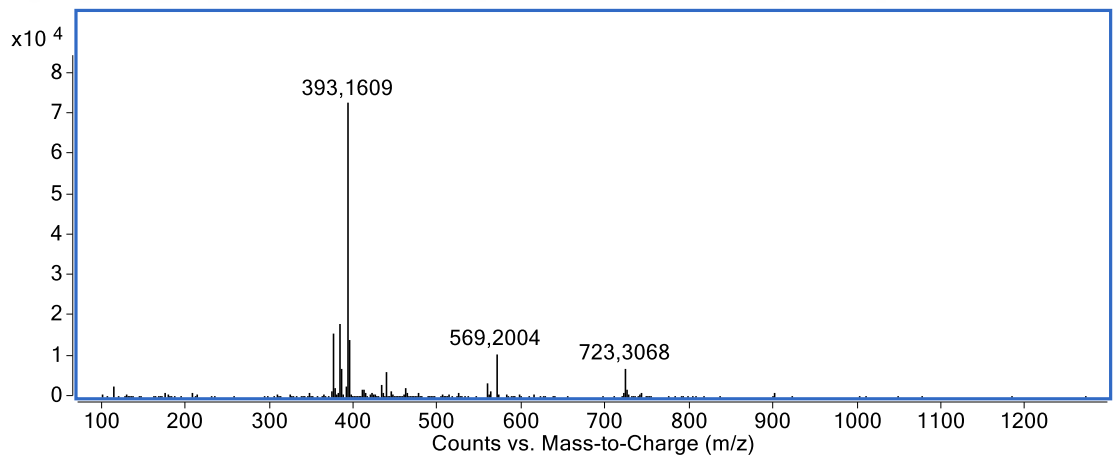
Ajugol (M11) Molekülü COSY Spektrumu



Ajugol (M11) Molekülü HMBC Spektrumu

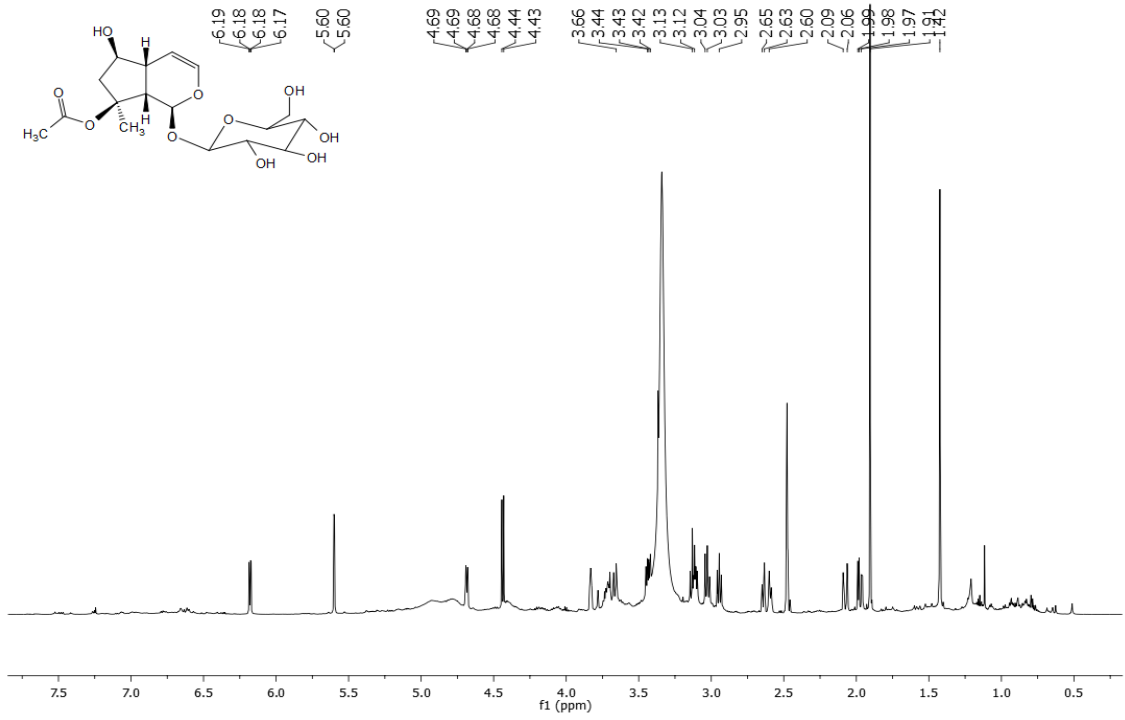


Ajugol (M11) Molekülü HSQC Spektrumu

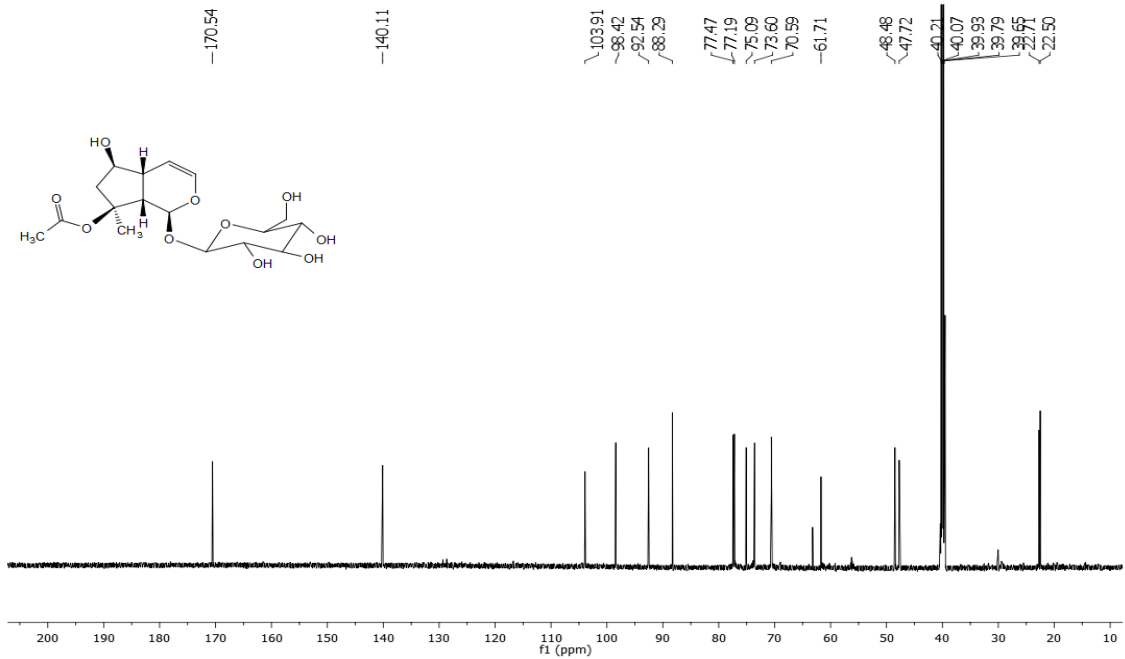


Ajugol (M11) Molekülü LC-TOF-MS (ESI) Spektrumu

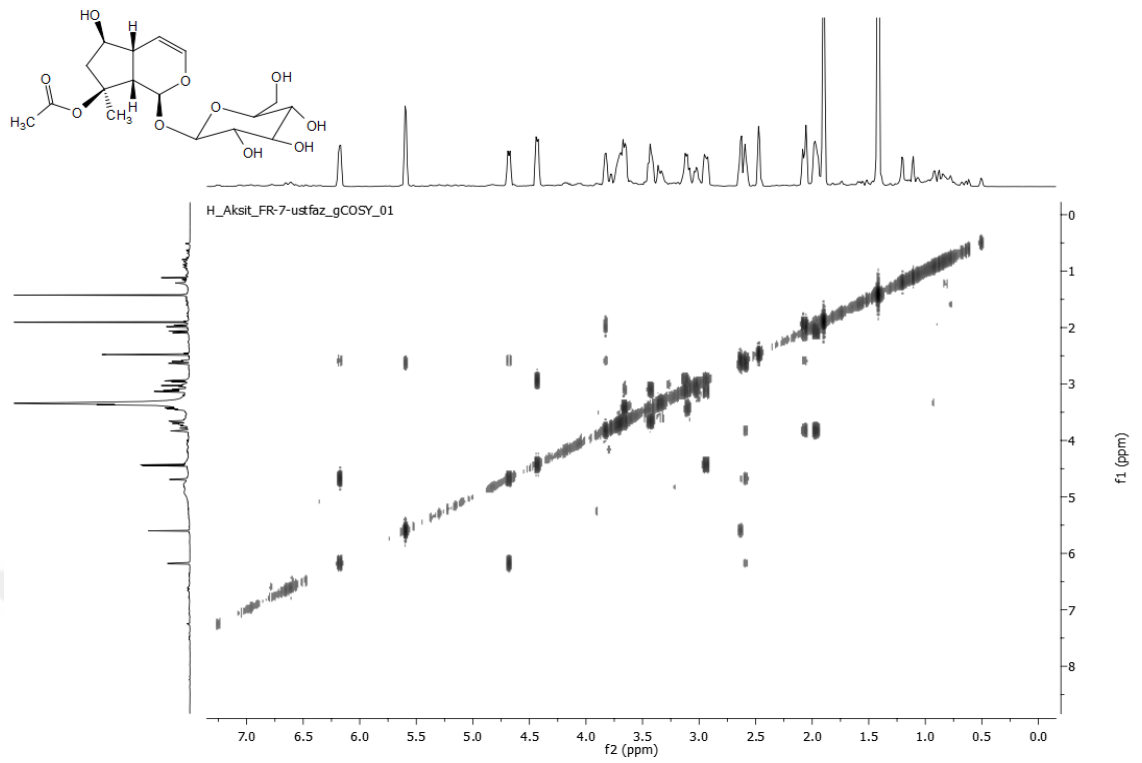
EK-13 Ajugosid (M12) Molekülüne Ait Spektral Veriler



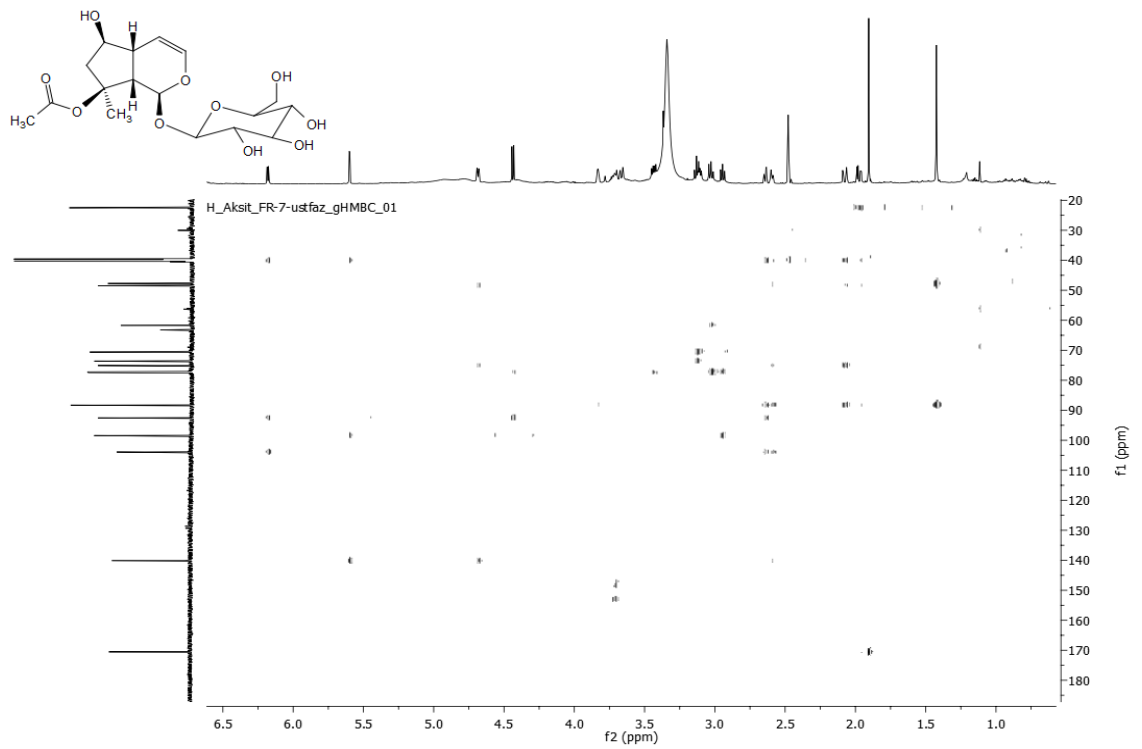
Ajugosid (M12) molekülü ¹H-NMR Spektrumu



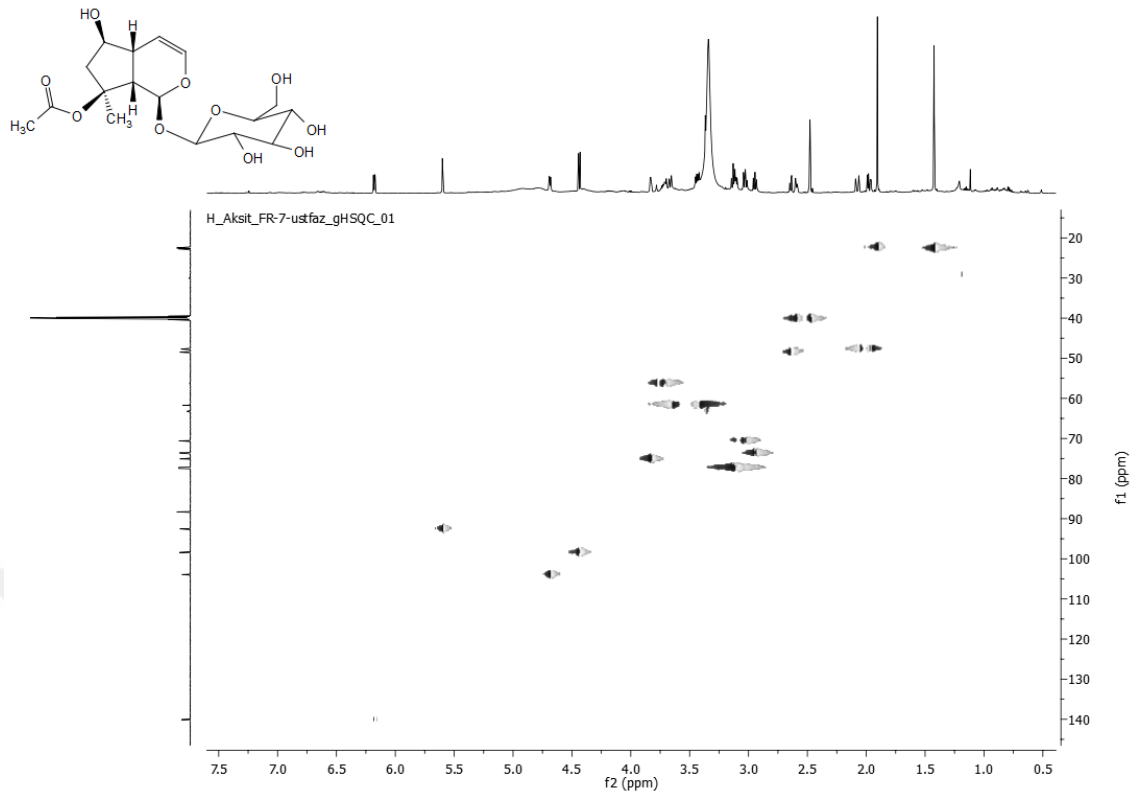
Ajugosid (M12) molekülü ¹³C-NMR Spektrumu



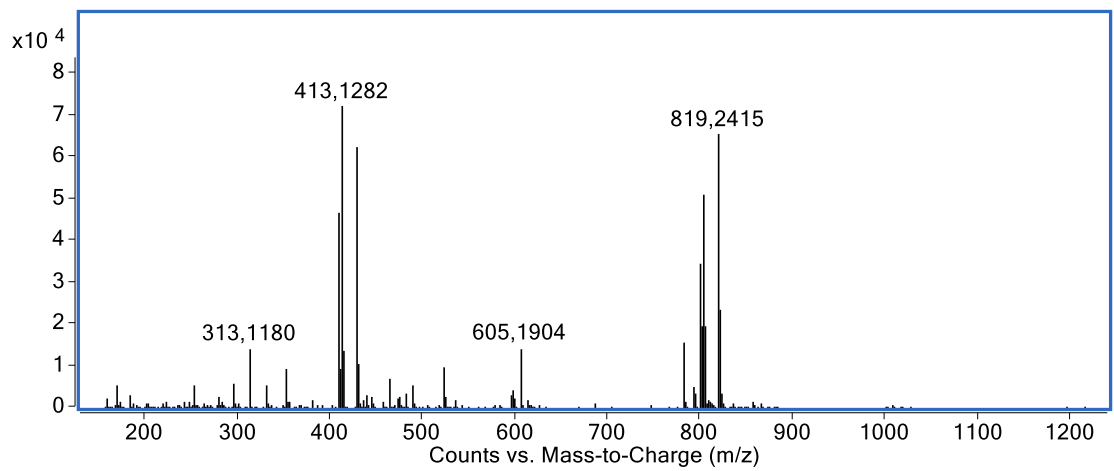
Ajugosid (M12) molekülü COSY Spektrumu



Ajugosid (M12) molekülü HMBC Spektrumu

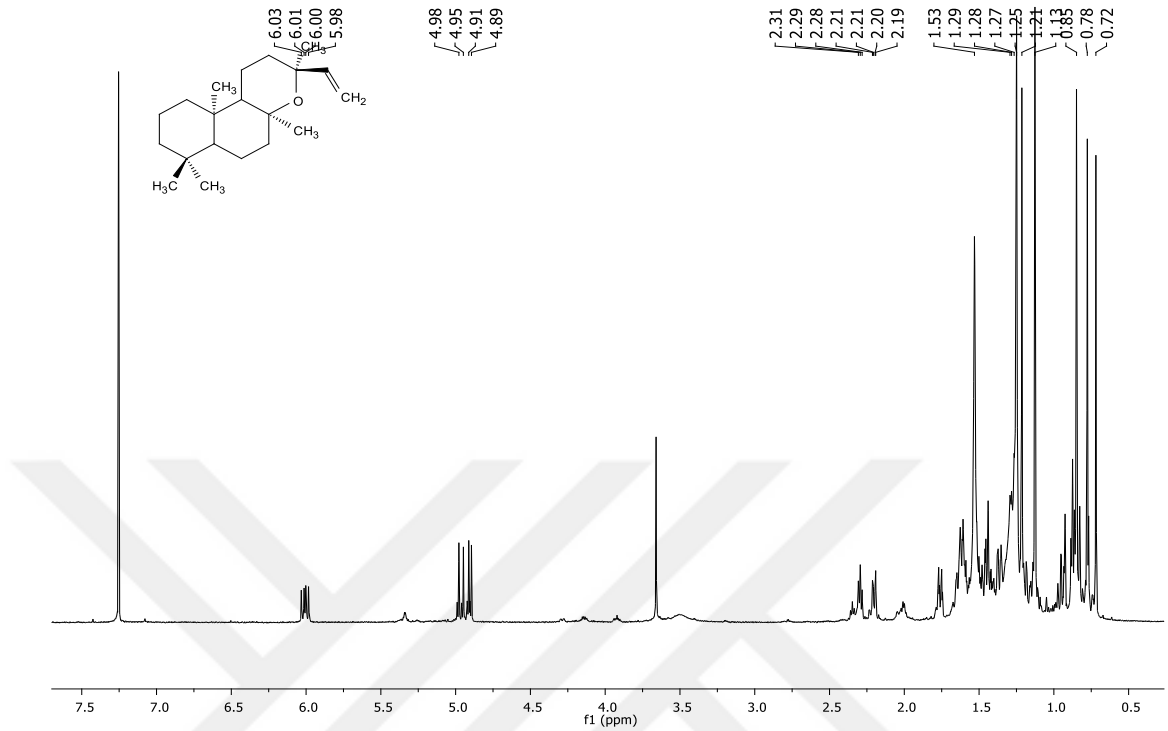


Ajugosid (M12) molekülü HSQC Spektrumu

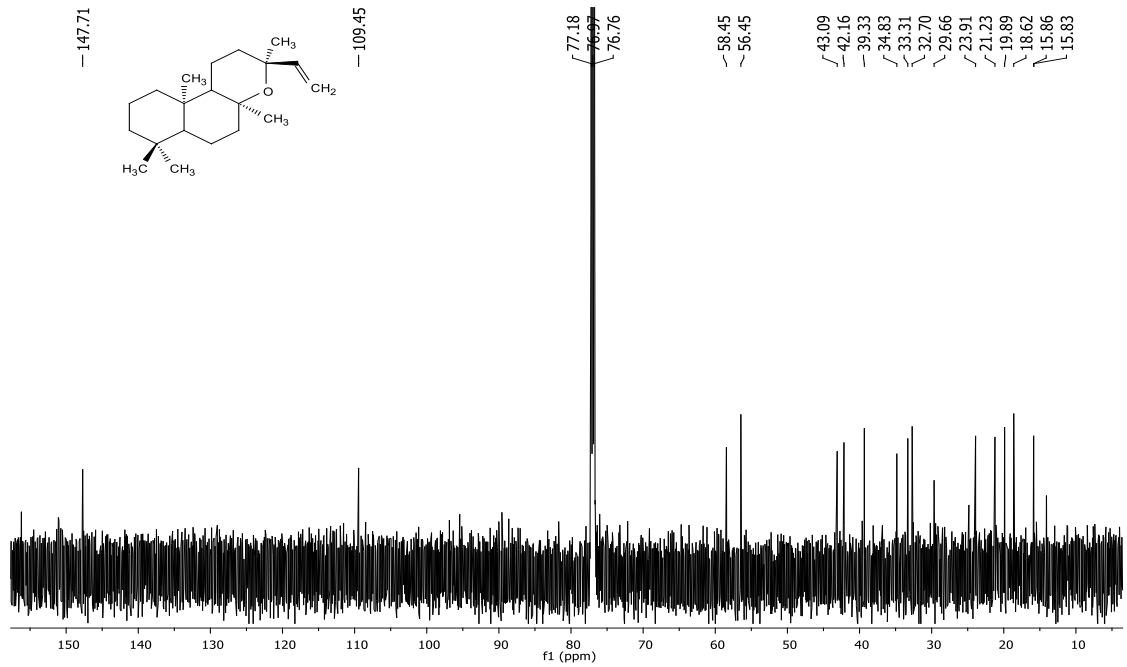


Ajugosid (M12) molekülü LC-TOF/MS (ESI⁺) Spektrumu

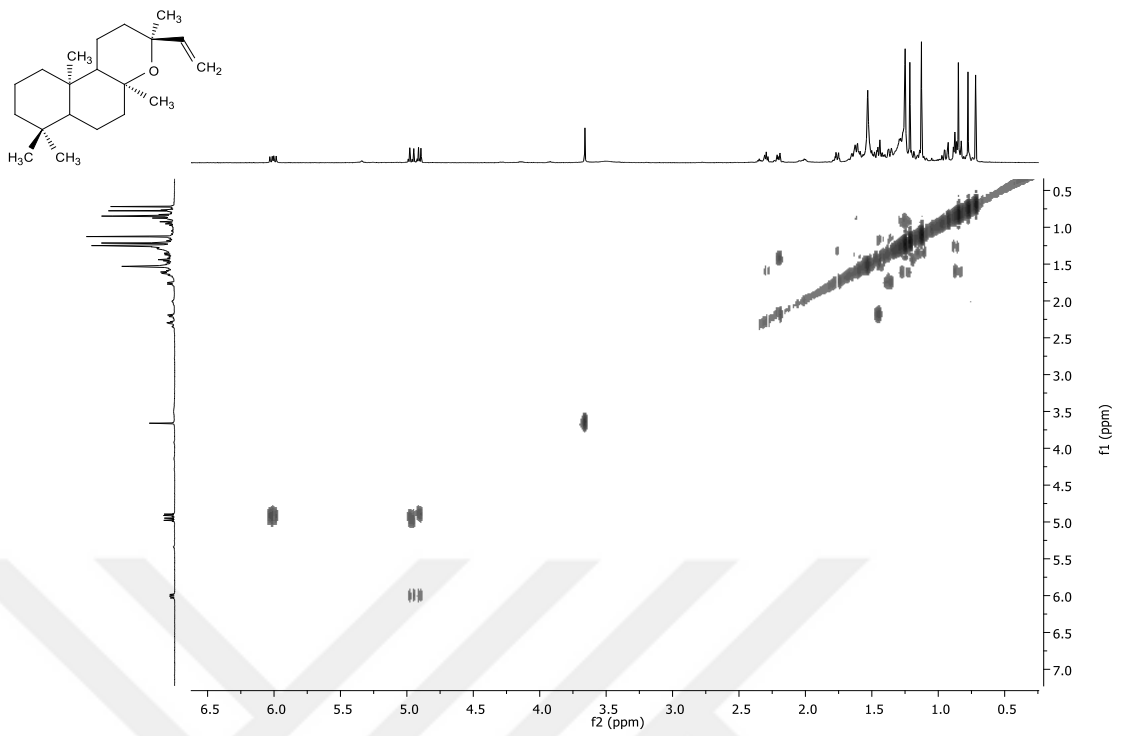
EK-14 13-epi-manoil oksid (SP1) Molekölüne Ait Spektral Veriler



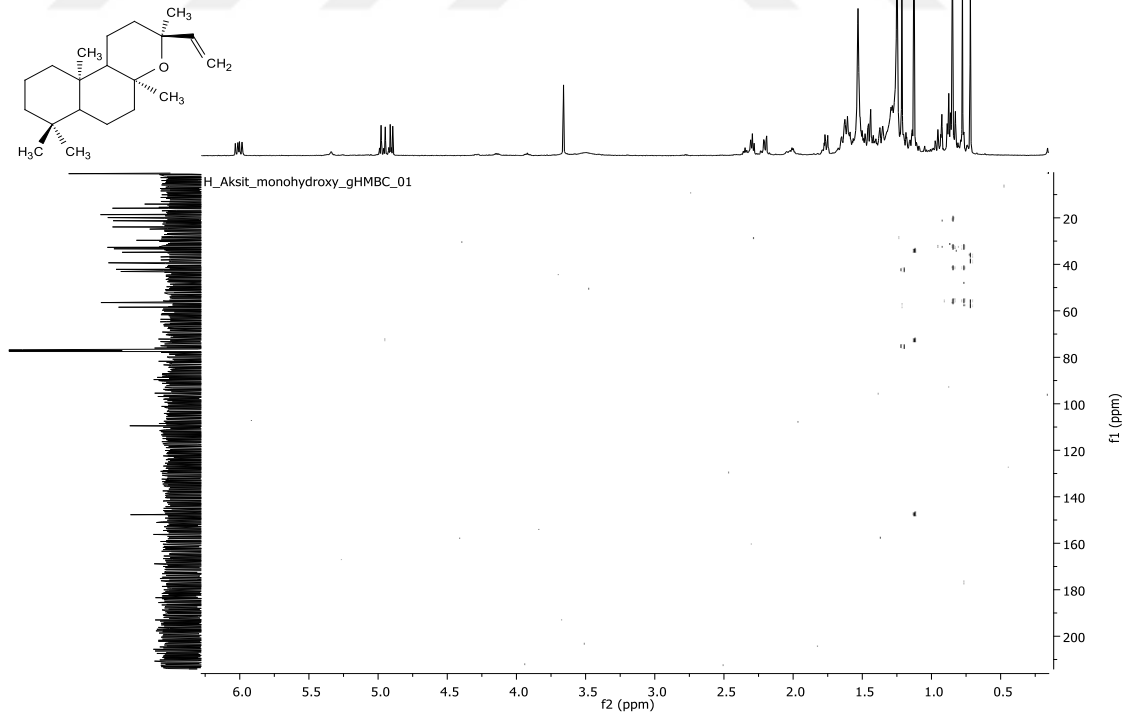
13-epi-manoil oksid (SP1) ¹H-NMR spektrumu



13-epi-manoil oksid (SP1) molekülü ¹³C-NMR spektrumu



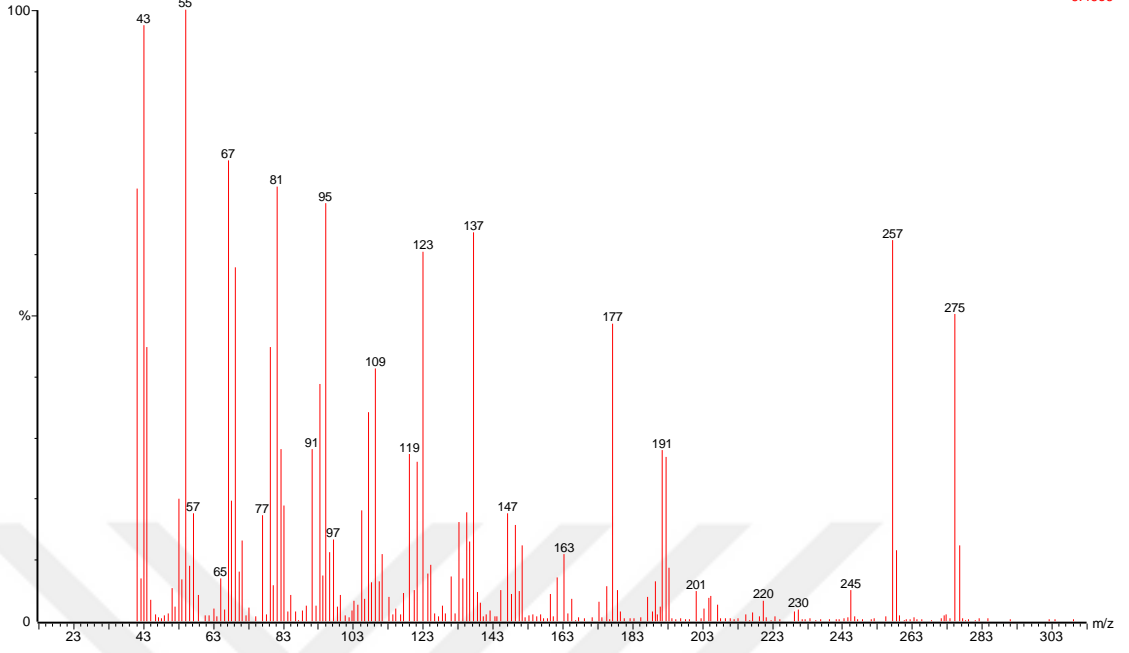
13-epi-manoil oksid (SP1) molekülü COSY spektrumu



13-epi-manoil oksid (SP1) molekülü HMBC spektrumu

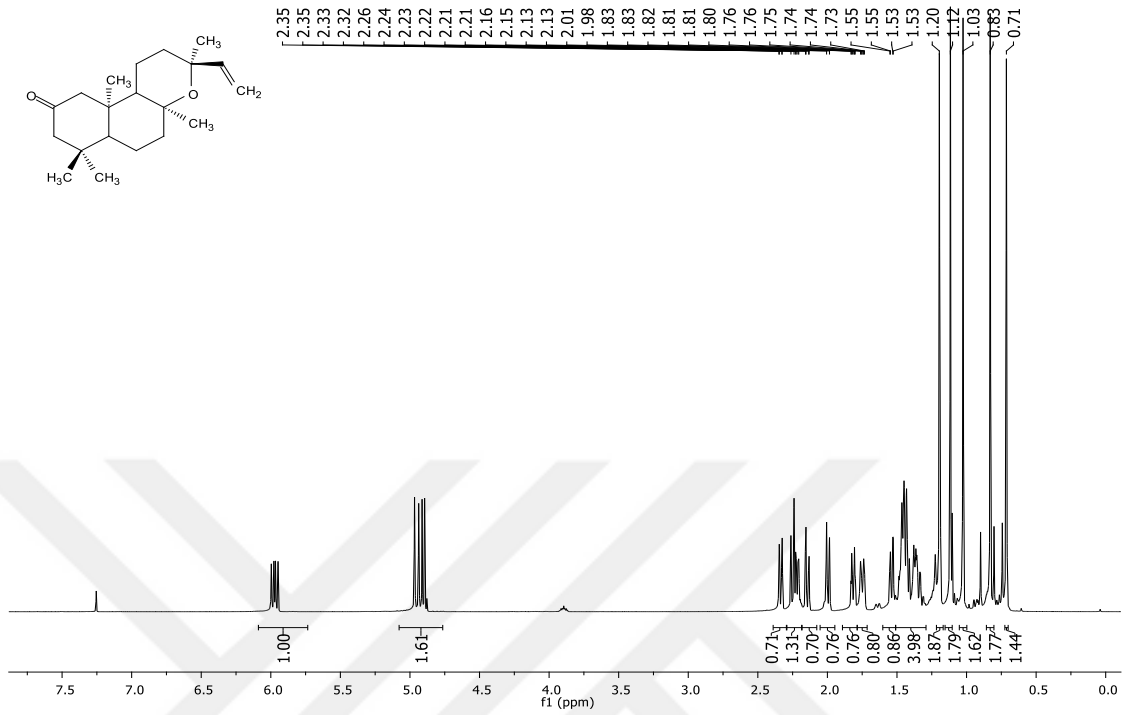
SP hekzan son 3253 (19.511)

Scan EI+
6.46e6

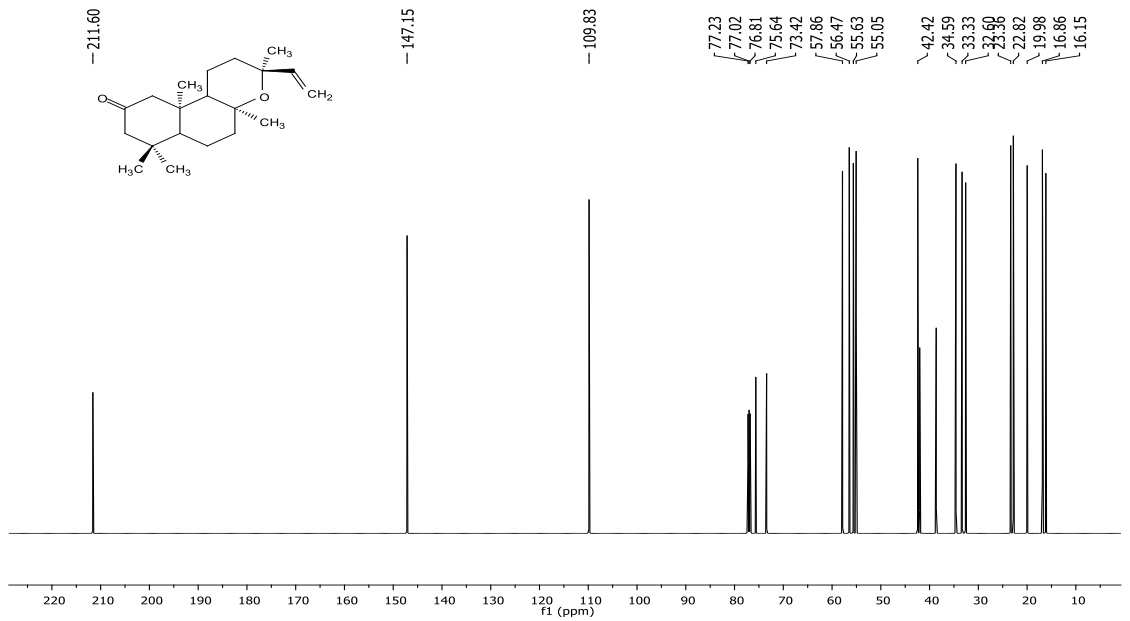


13-epi-manoil oksid (SP1) molekölü MS (EI⁺) spektrumu

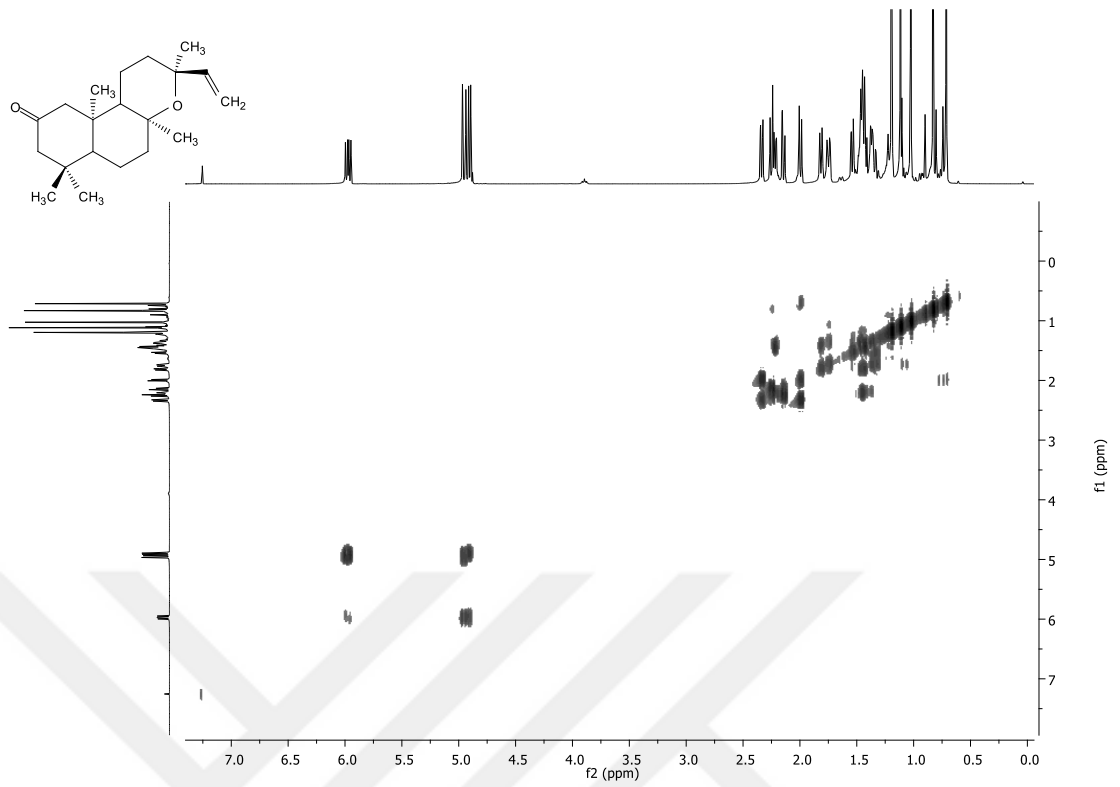
EK-15 2-okso-13-epi-manoil oksit (SP2) Molekölüne Ait Spektral Veriler



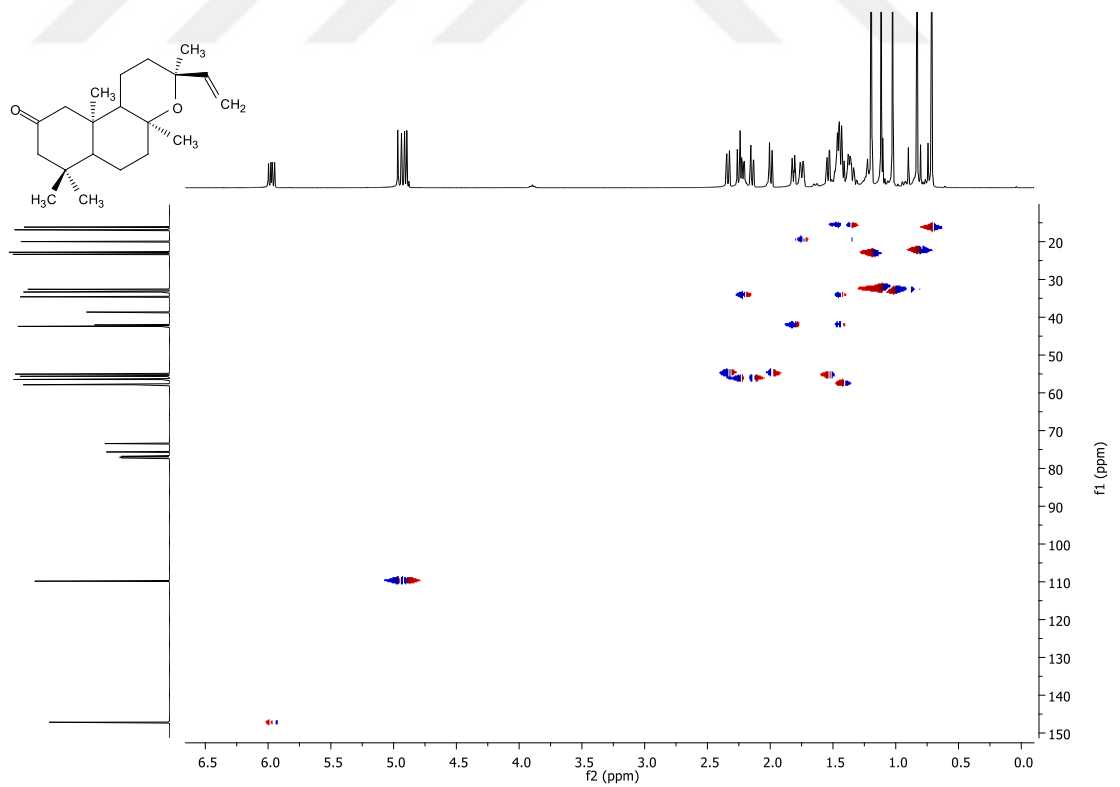
2-okso-manoil-13-epi-oksit (SP2) molekülü ¹³C-NMR Spektrumu



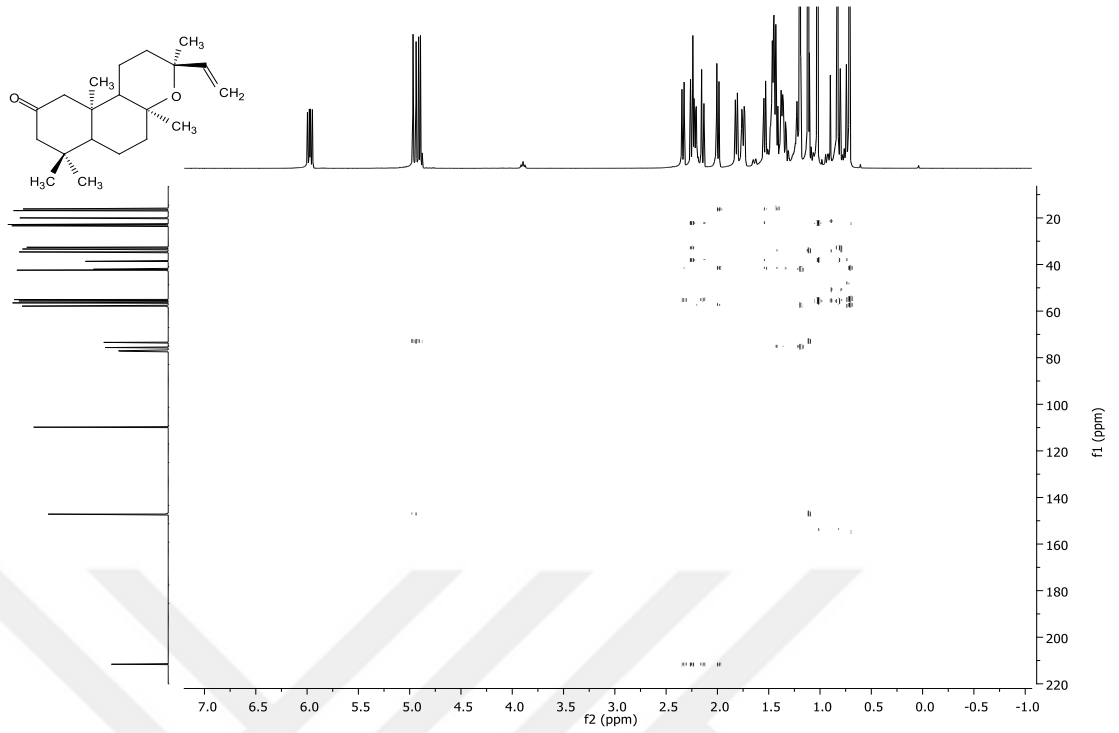
2-okso-manoil-13-epi-oksit (SP2) ¹³C-NMR spektrumu



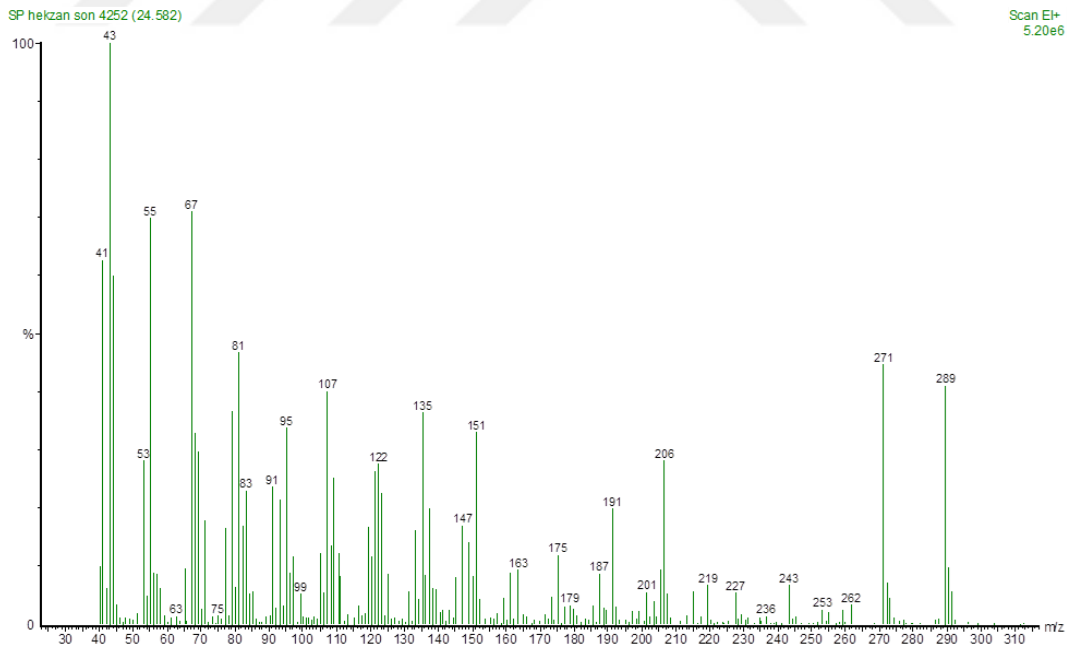
2-okso-manoil-13-epi-oksit (SP2) COSY spektrumu



2-okso-manoil-13-epi-oksit (SP2) HSQC spektrumu

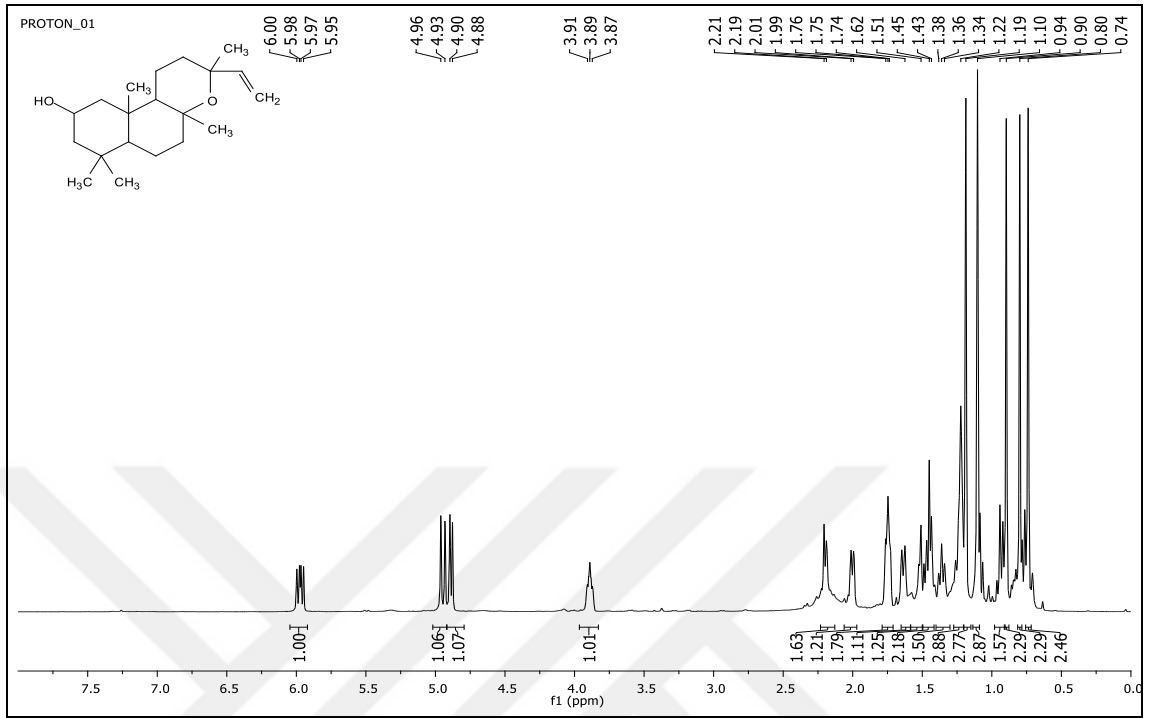


2-okso-manoil-13-epi-oksit (SP2) HMBC spektrumu

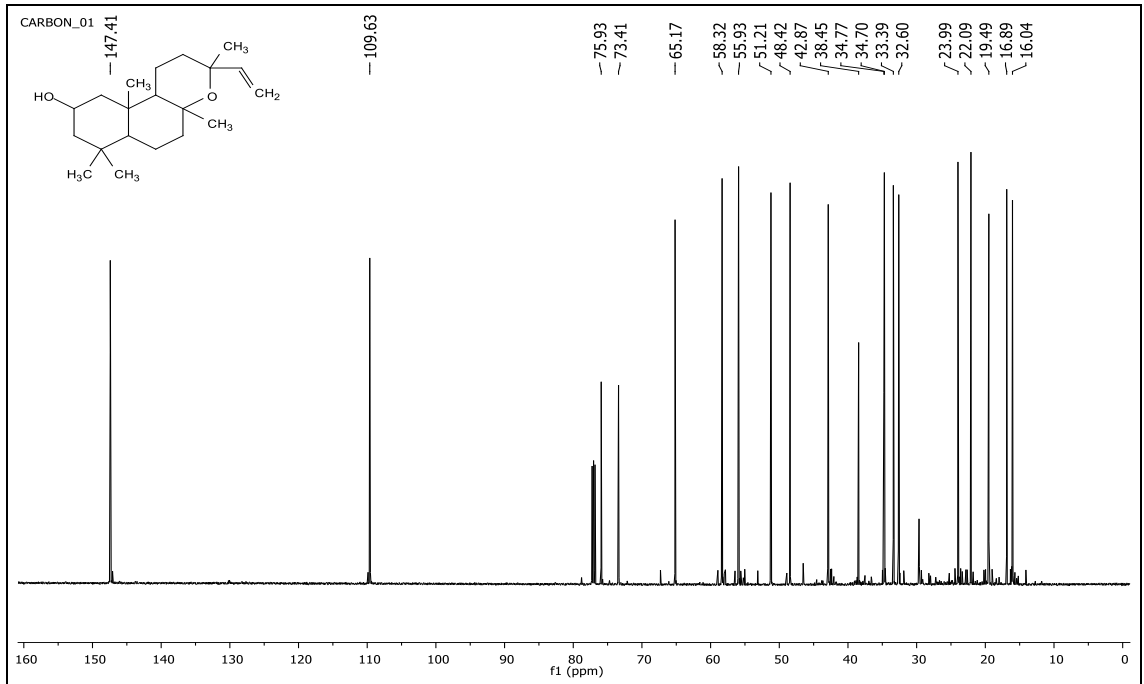


2-okso-manoil-13-epi-oksit (SP2) MS (EI⁺) spektrumu

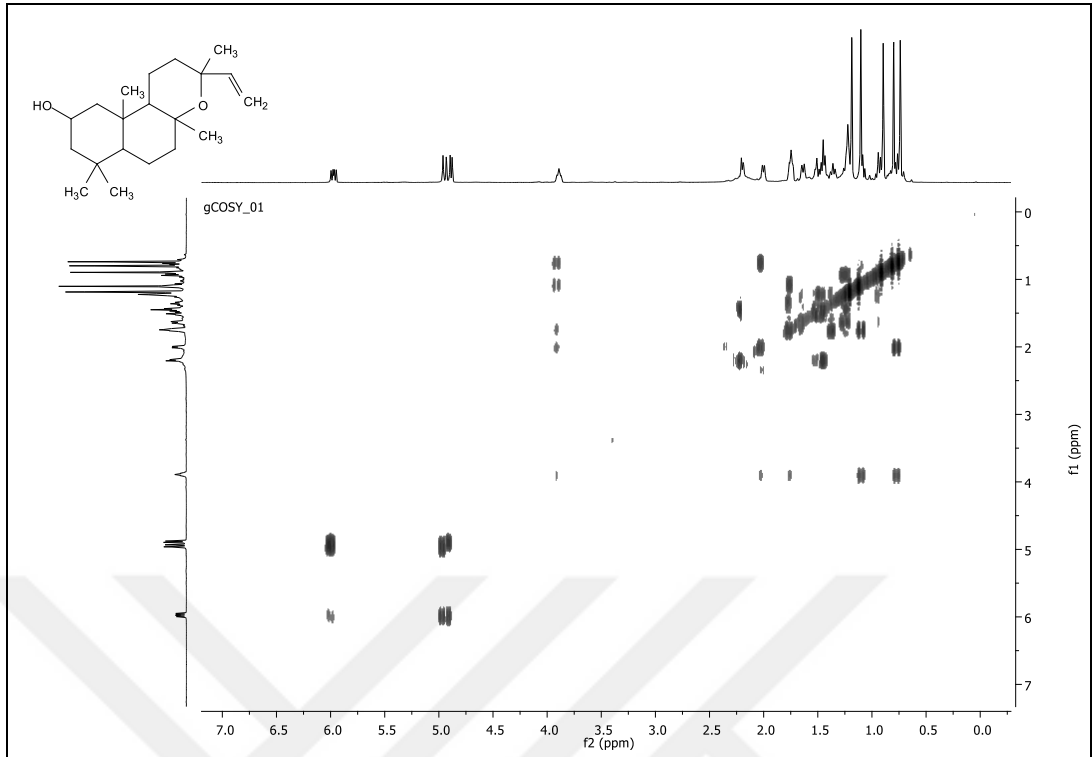
EK-16 2-β-hidroksi-13-epi-manoil oksit (SP3) Moleküler Ait Spektral Veriler



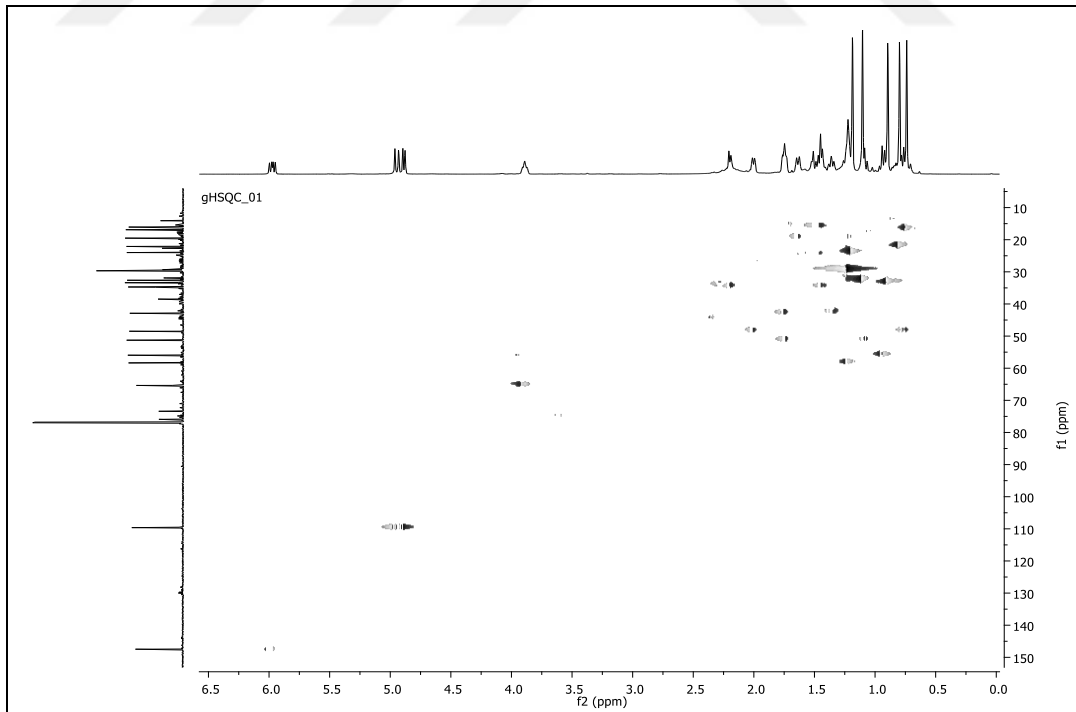
2-β-hidroksi-13-epi-manoil oksit (SP3) moleküler ^1H -NMR spektrumu



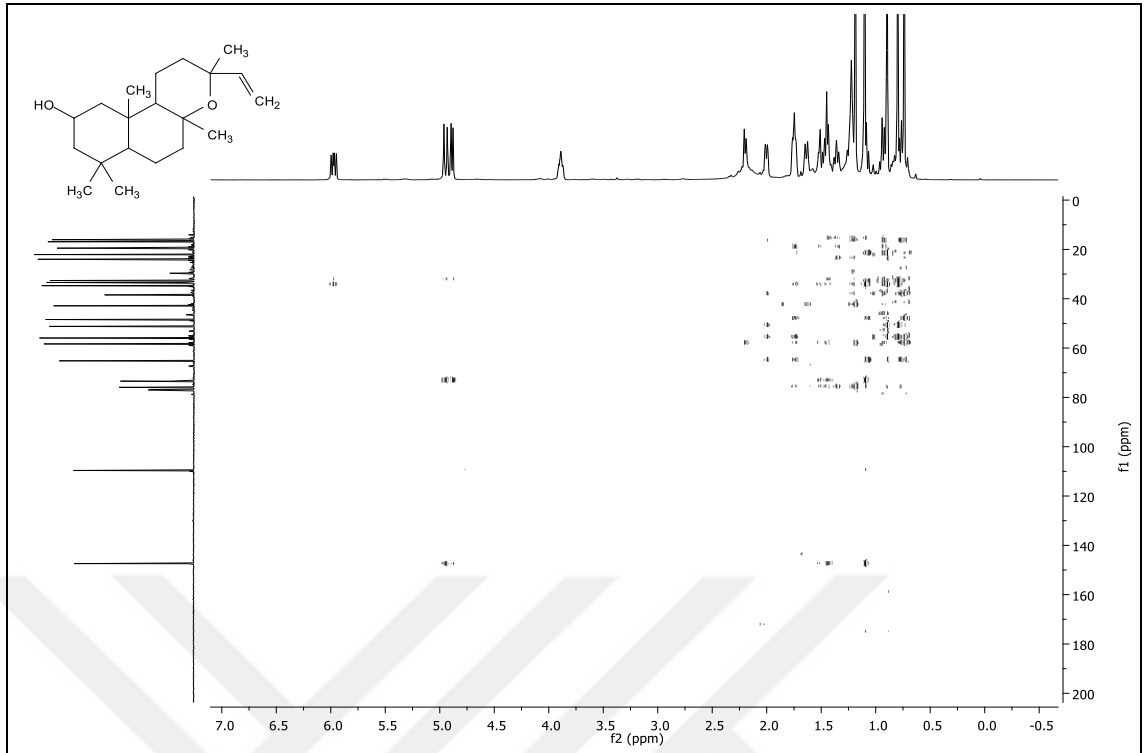
2-β-hidroksi-13-epi-manoil oksit (SP3) moleküler ^{13}C -NMR spektrumu



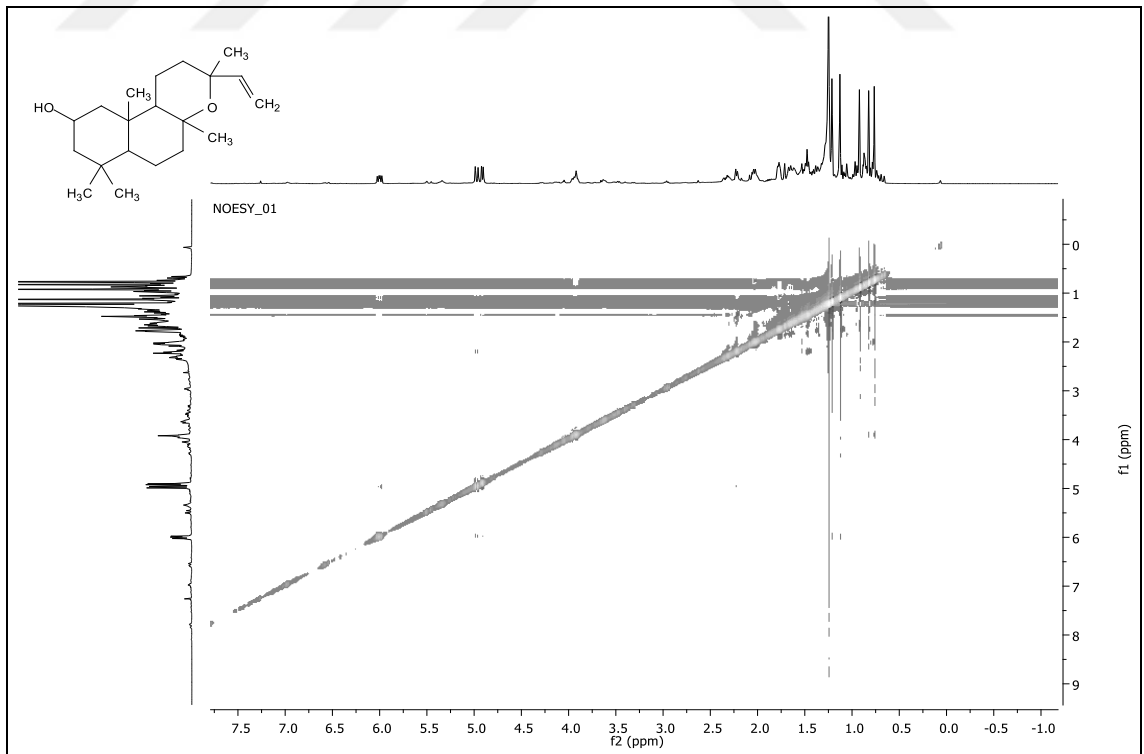
2-β-hidroksi-13-epi-manoil oksit (SP3) molekülü COSY spektrumu



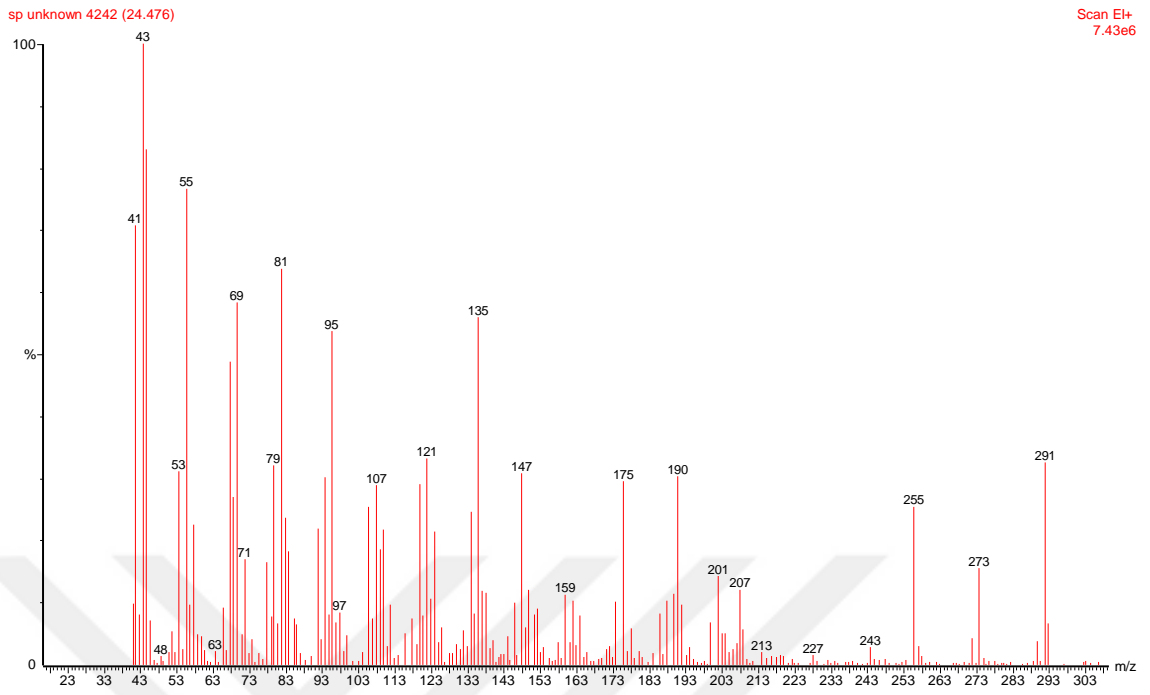
2-β-hidroksi-13-epi-manoil oksit (SP3) molekülü HSQC spektrumu



2-β-hidroksi-13-epi-manoil oksit (SP3) molekülü HMBC spektrumu

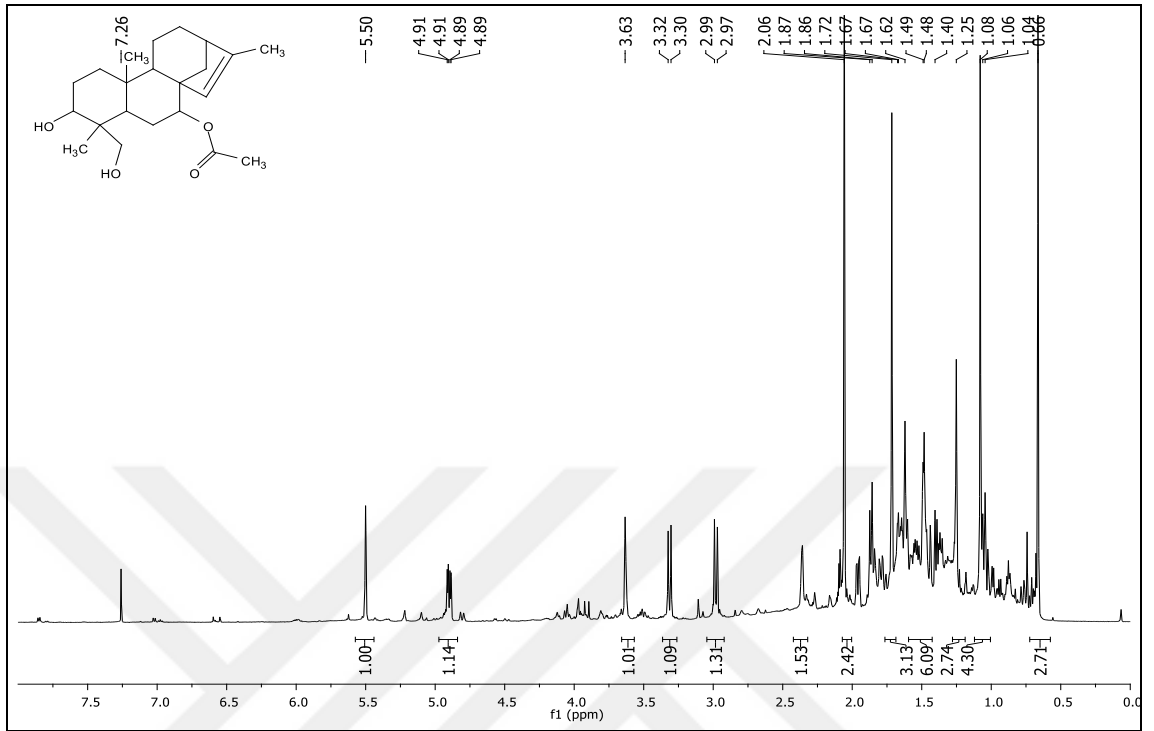


2-β-hidroksi-13-epi-manoil oksit (SP3) molekülü NOESY spektrumu

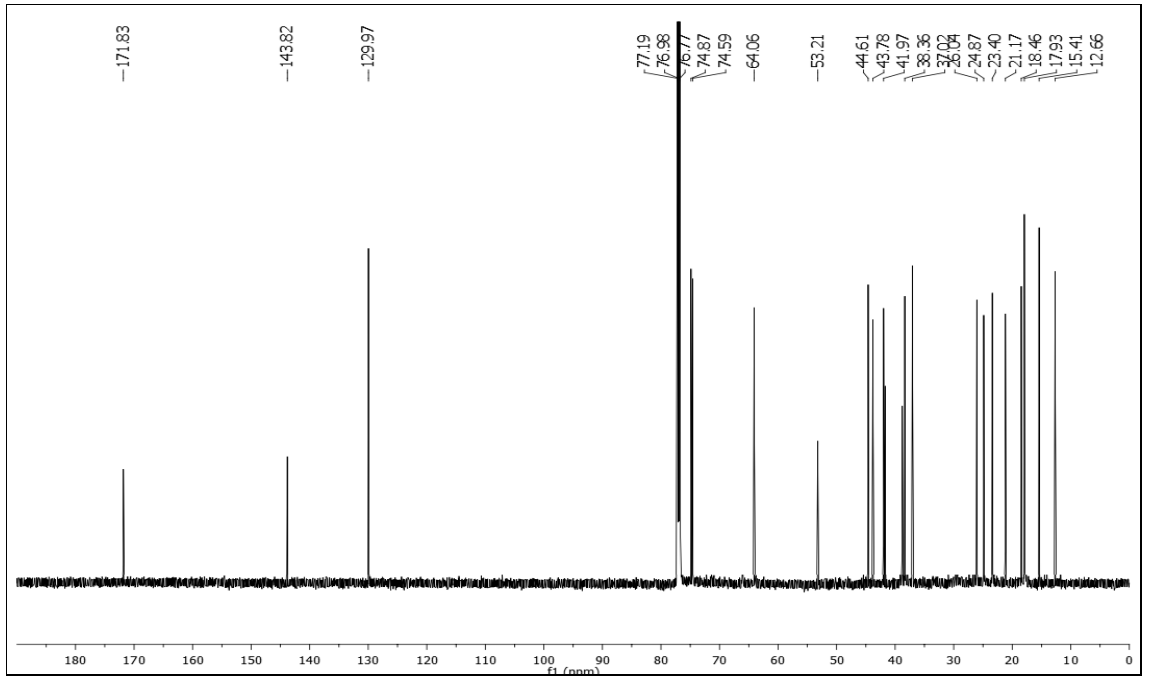


2-β-hidroksi-13-epi-manoil oksit (SP3) molekölü MS (EI⁺)spektrumu

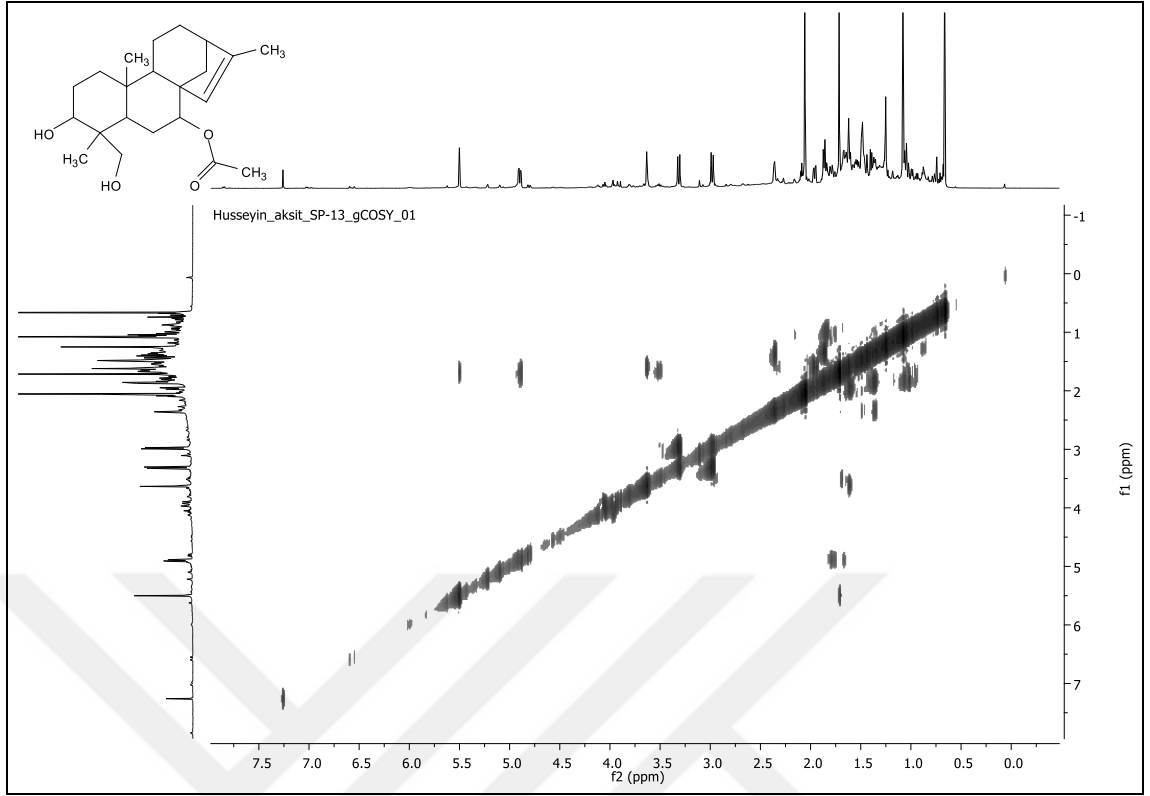
EK-17 7-asetil-izofoliol Molekülüne Ait Spektral Veriler



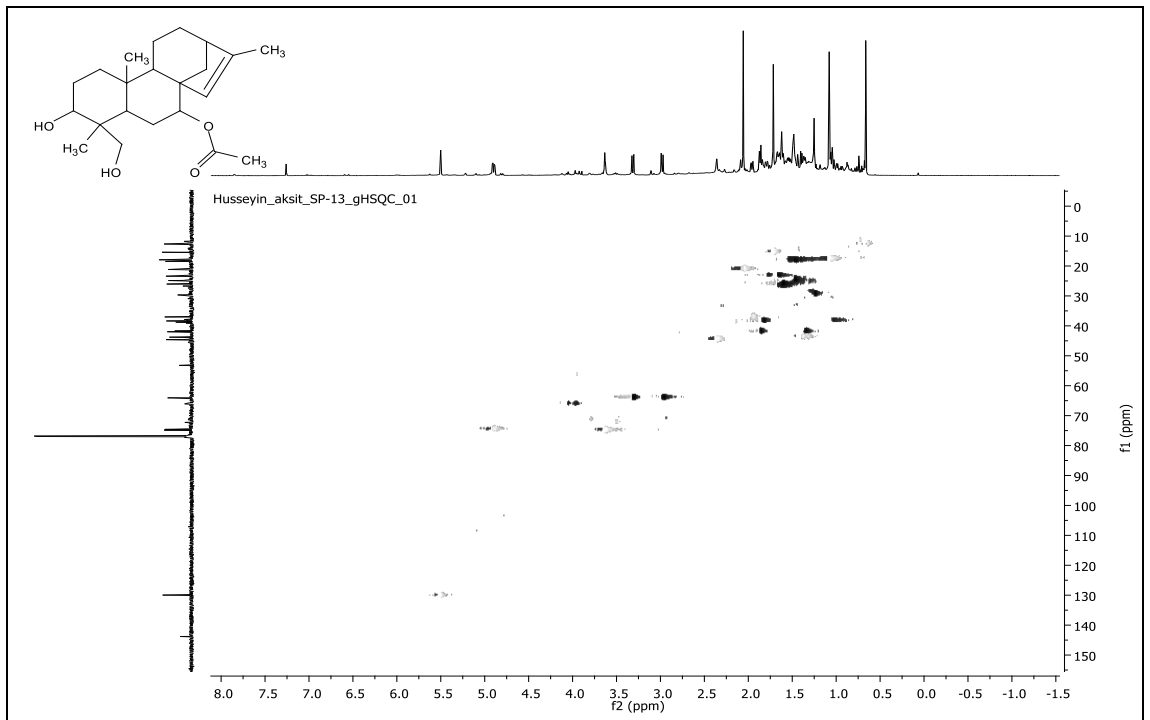
7-asetil-izofoliol (SP4) molekülü ¹H-NMR spektrumu



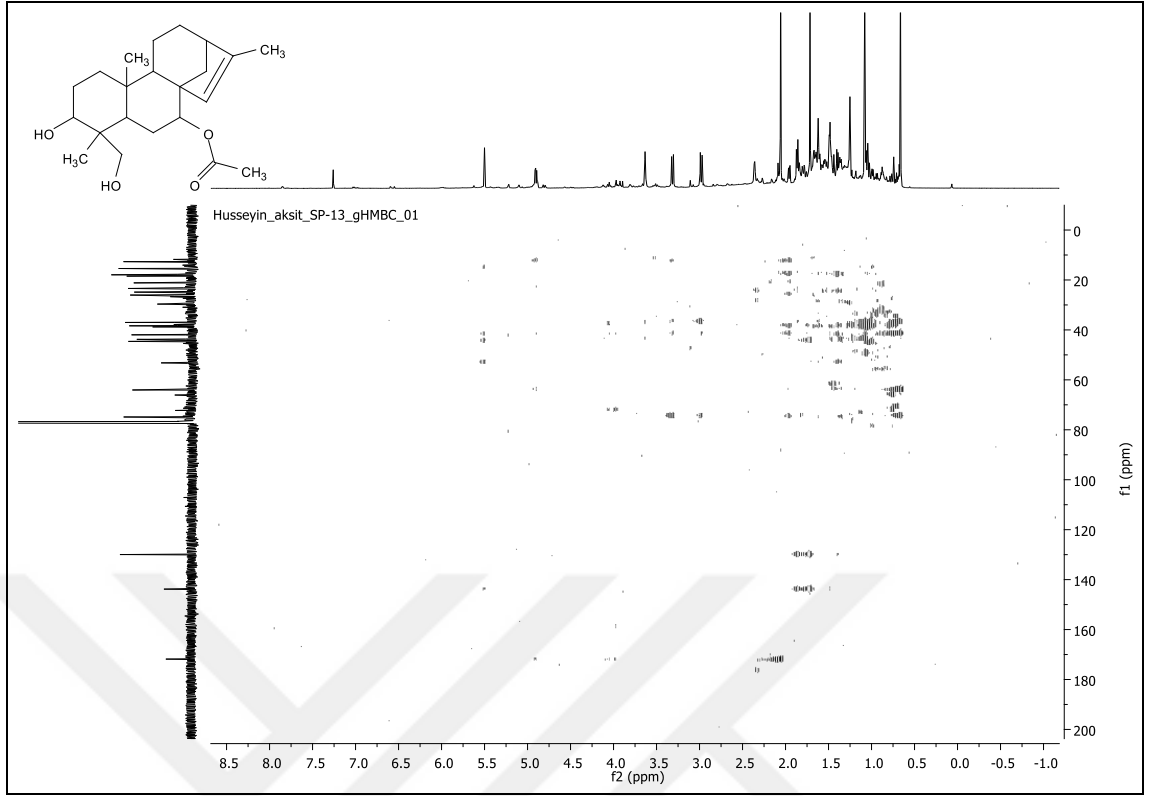
7-asetil-izofoliol (SP4) molekülü ¹³C-NMR spektrumu



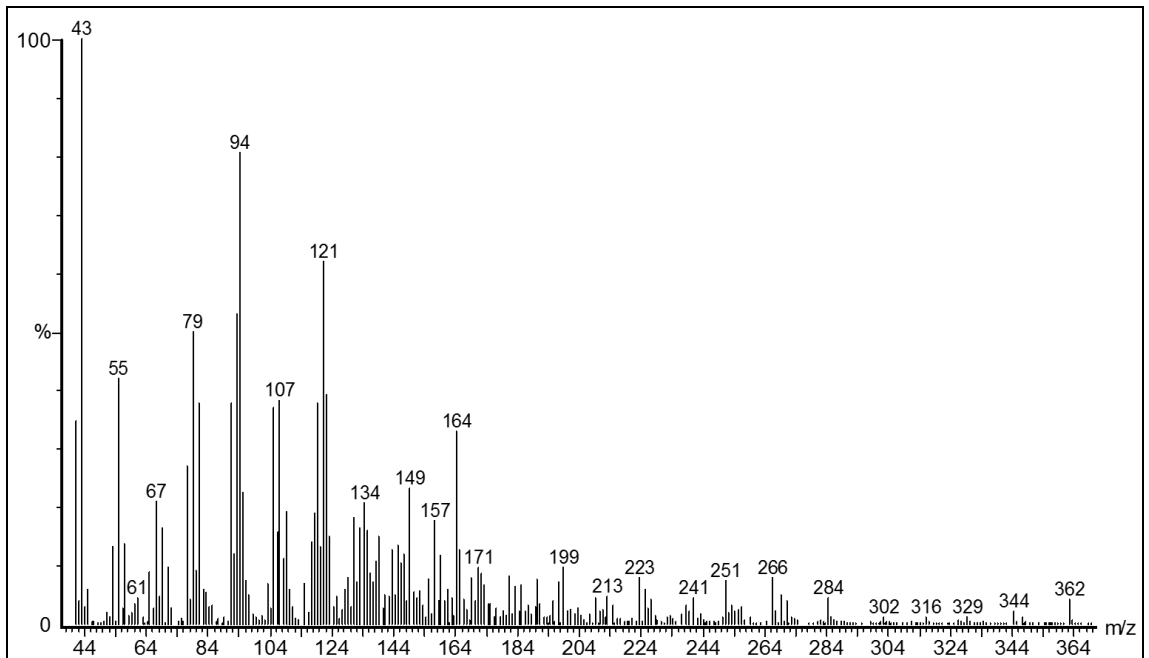
7-asetil-izofoliol (SP4) molekülü COSY spektrumu



7-asetil-izofoliol (SP4) molekülü HSQC spektrumu

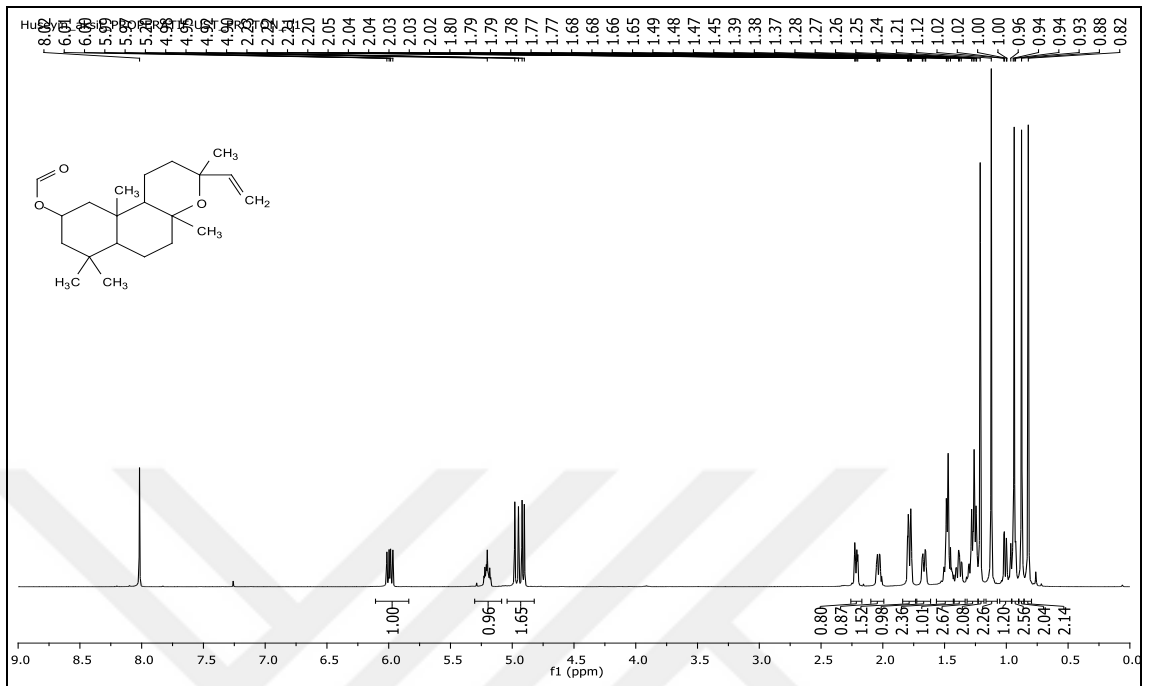


7-asetil-izofoliol (SP4) molekülü HMBC spektrumu

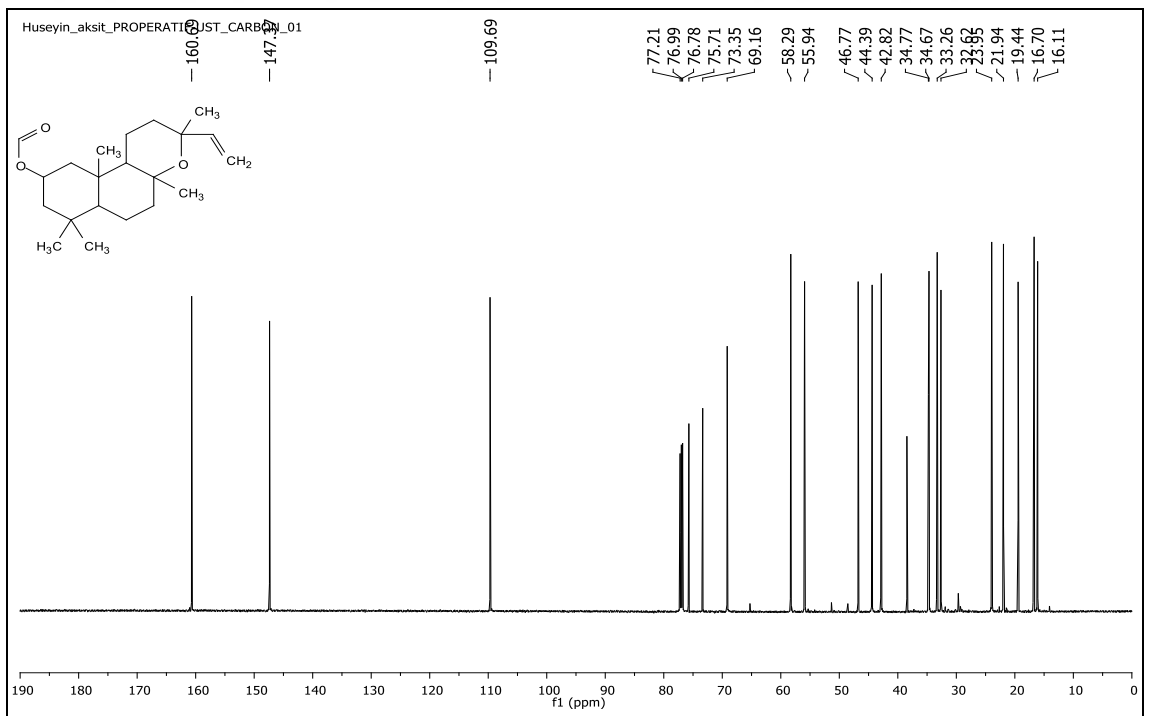


7-asetil-izofoliol (SP4) molekülü (EI⁺)MS spektrumu

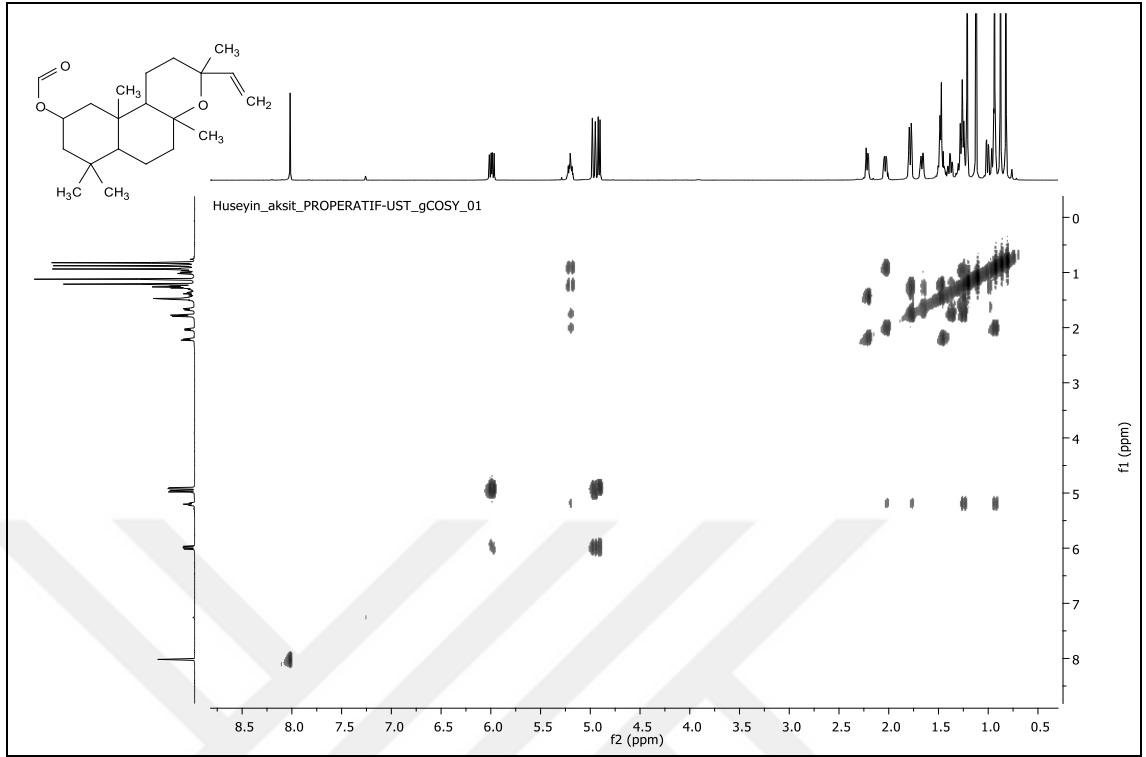
EK-18 2-β-format-13-epi-manoil oksit (SP5) Molekülüne Ait Spektral Veriler



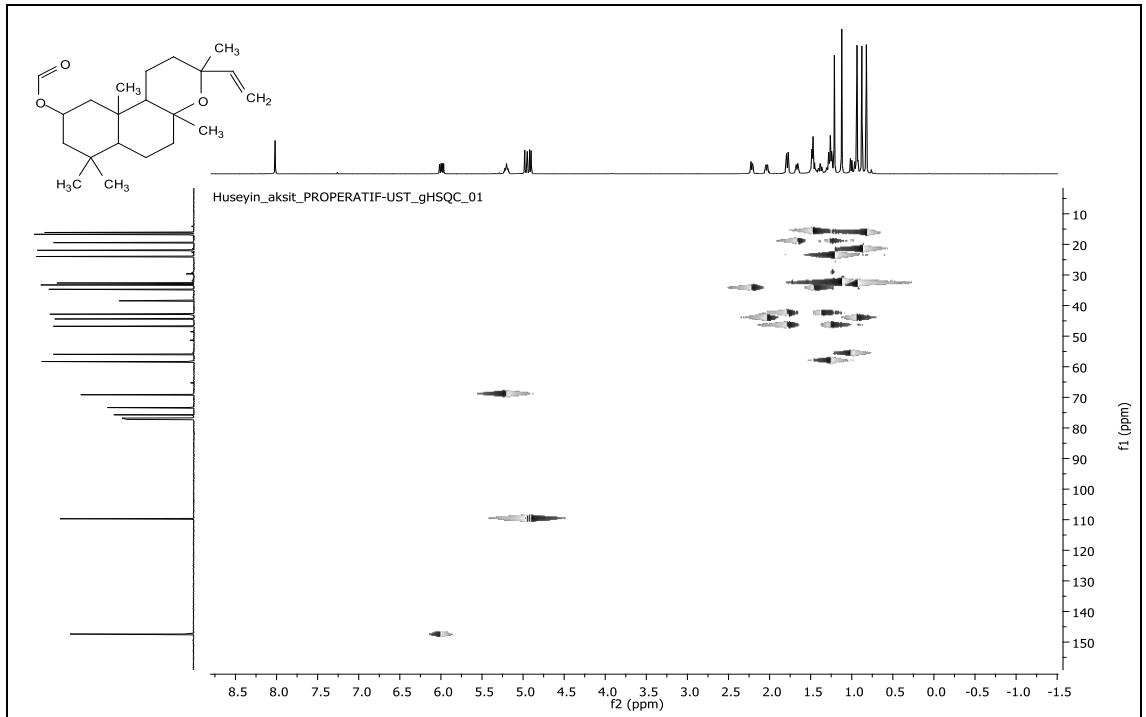
2-β-format-13-epi-manoil oksit (SP5) molekülü ¹H-NMR Spektrumu



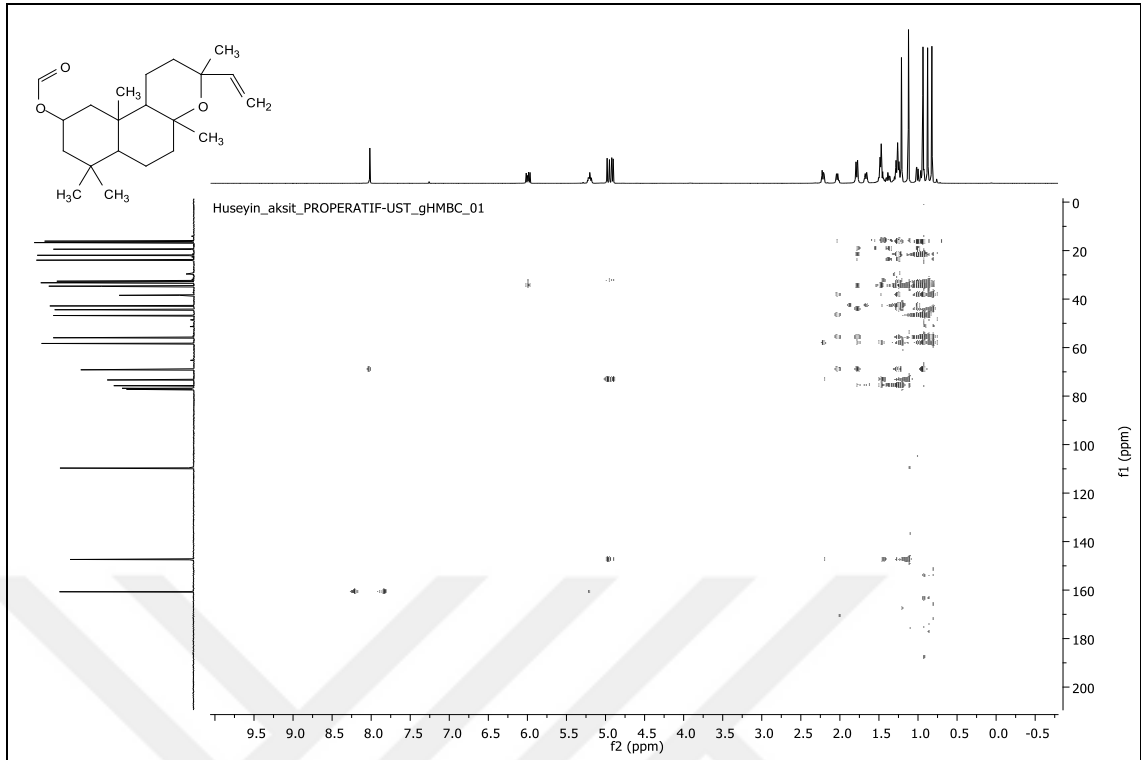
2-β-format-13-epi-manoil oksit (SP5) molekülü ¹³C-NMR spektrumu



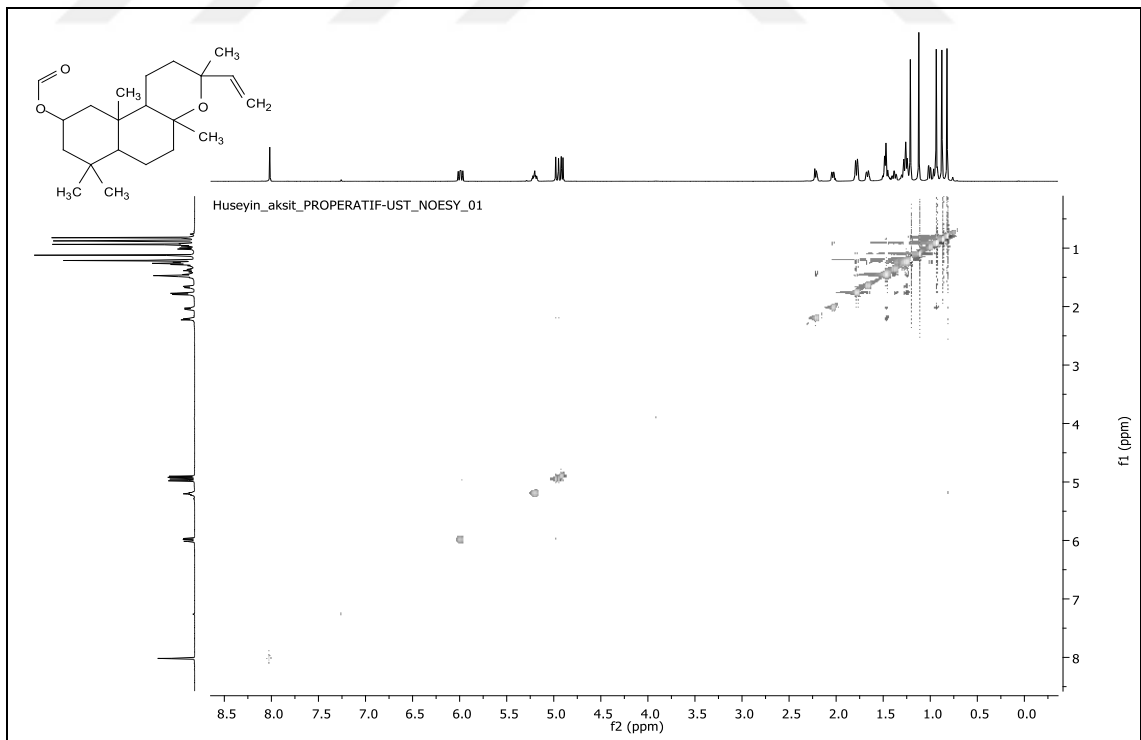
2-β-format-13-epi-manoil oksit (SP5) molekülü COSY spektrumu



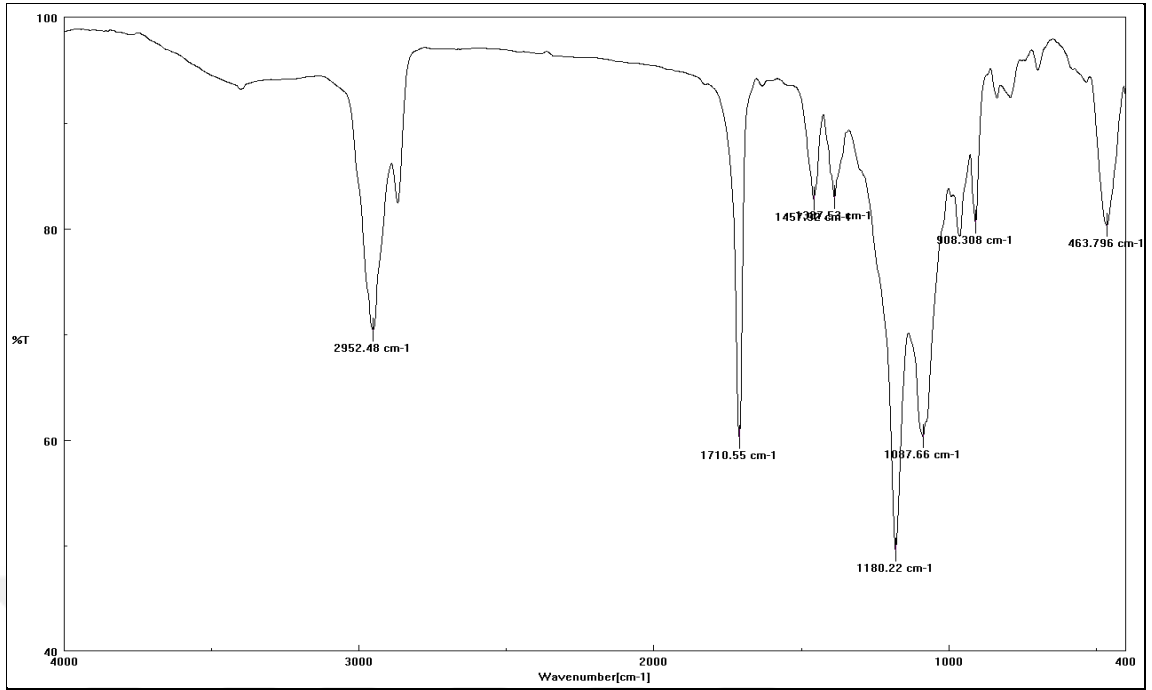
2-β-format-13-epi-manoil oksit (SP5) molekülü HSQC spektrumu



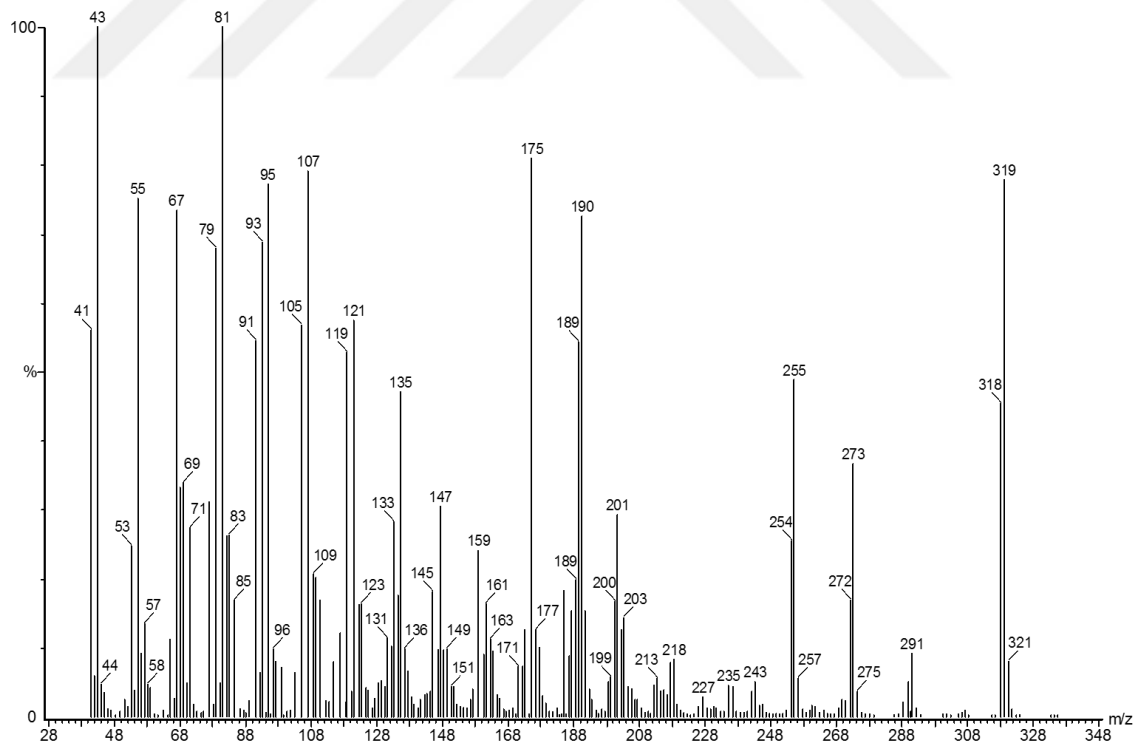
2-β-format-13-epi-manoil oksit (SP5) molekülü HMBC spektrumu



2-β-format-13-epi-manoil oksit (SP5) molekülü NOESY spektrumu

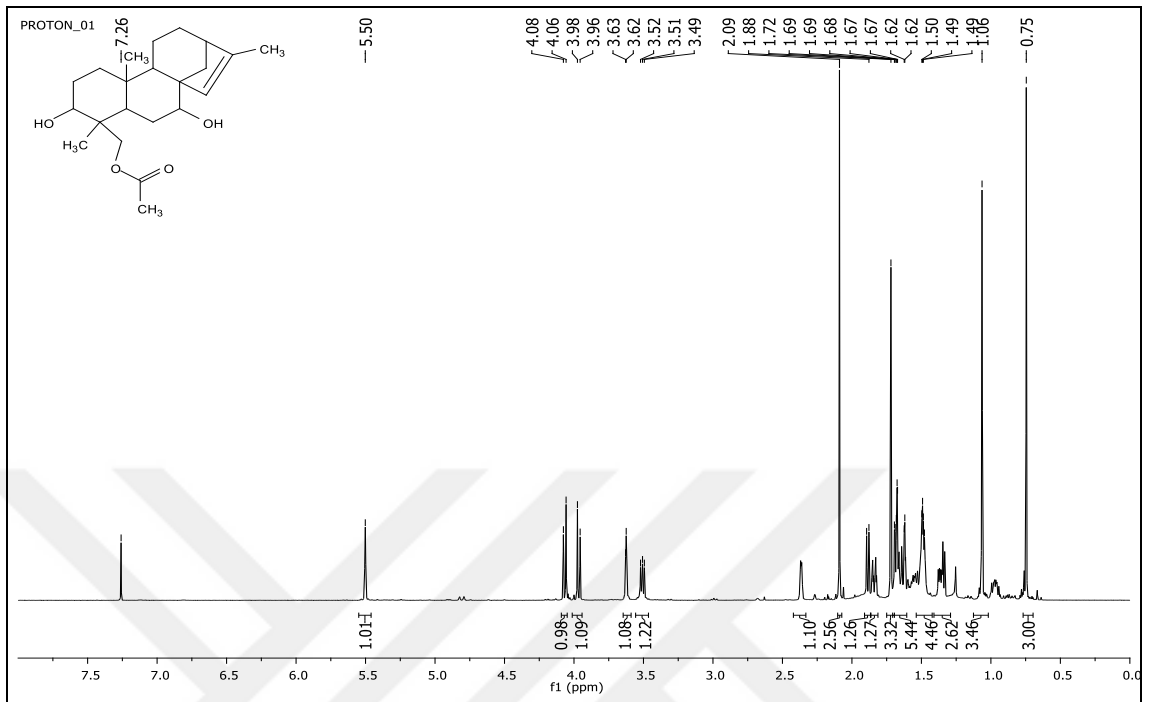


2-β-format-13-epi-manoil oksit (SP5) molekülü IR spektrumu

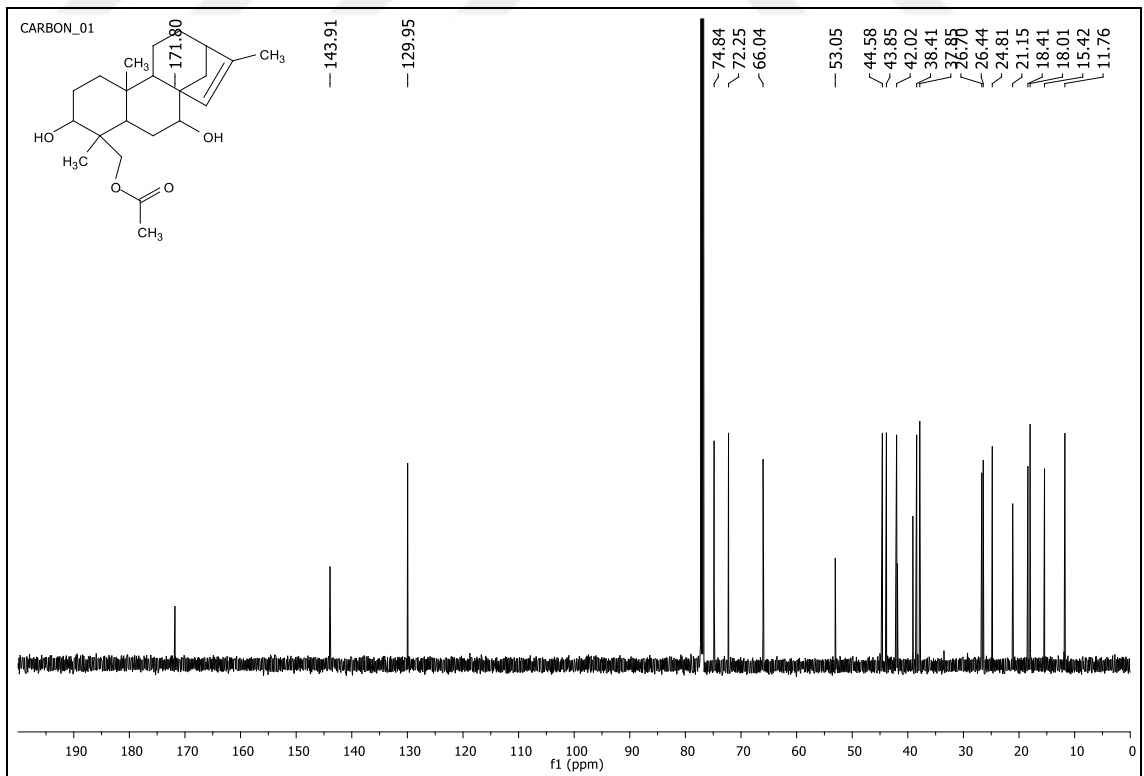


2-β-format-13-epi-manoil oksit (SP5) MS (EI+) spektrumu

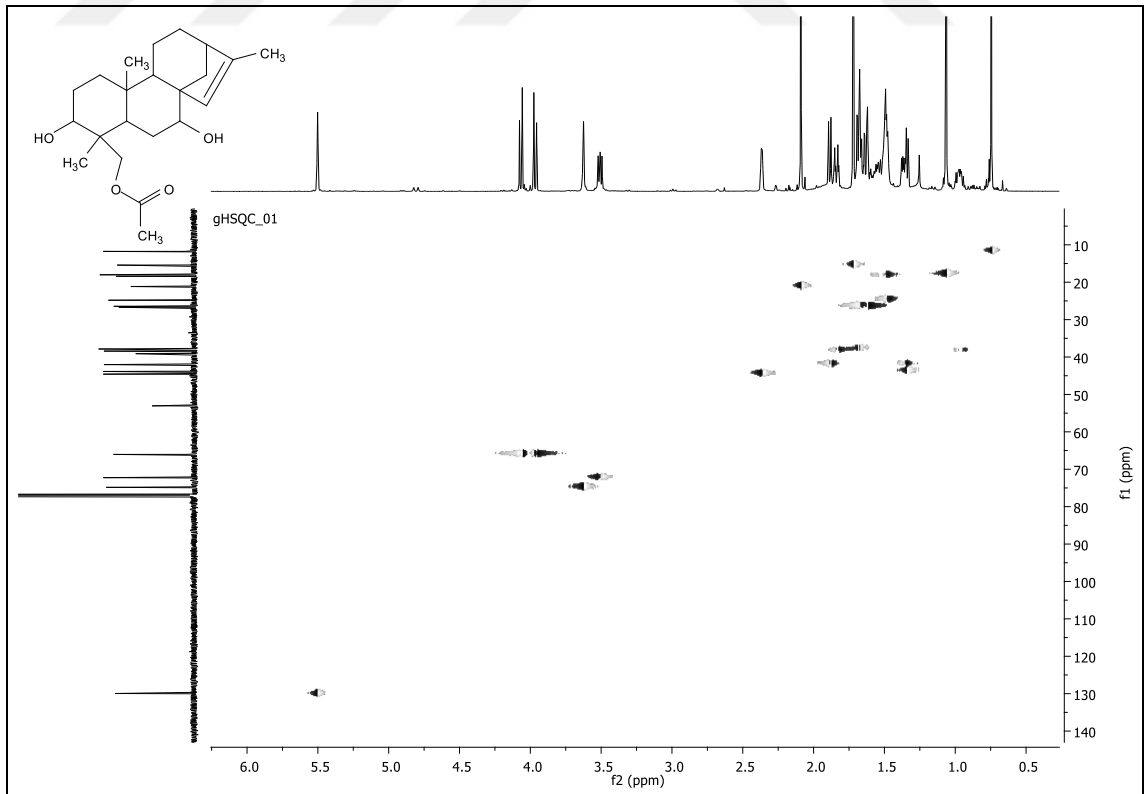
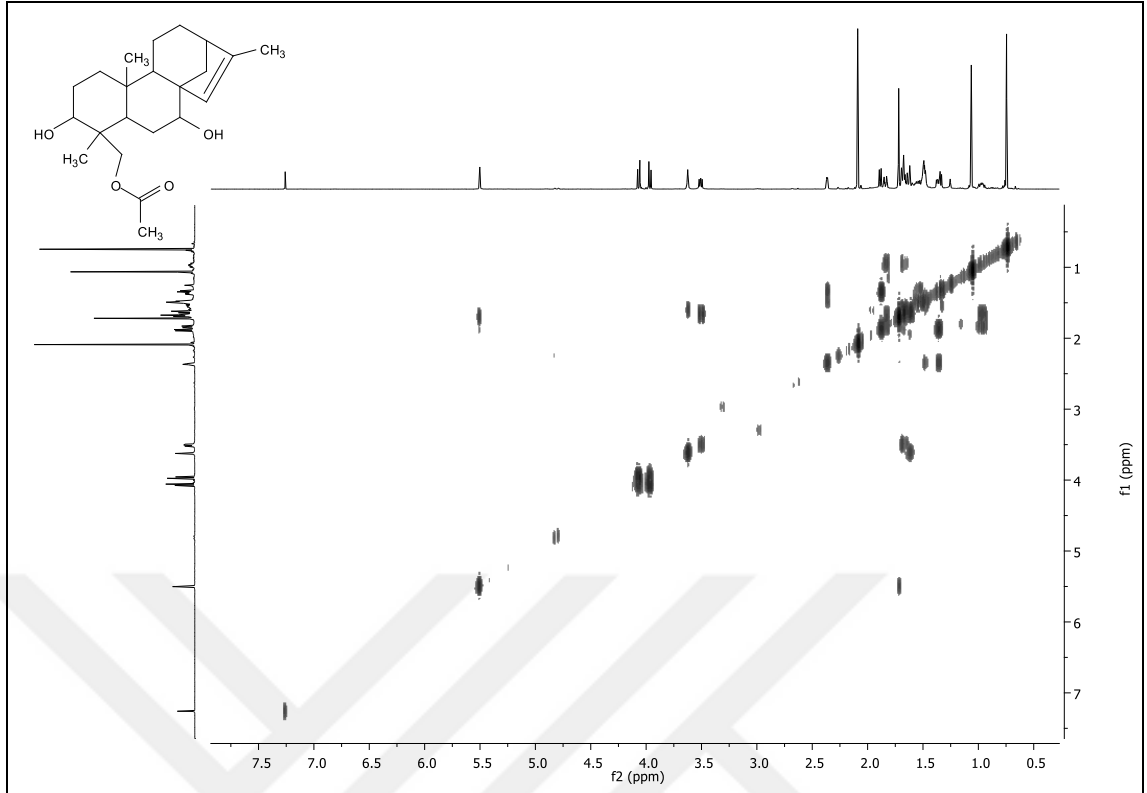
EK-19 İzolinearol (SP6) Molekülüne Ait Spektral Veriler

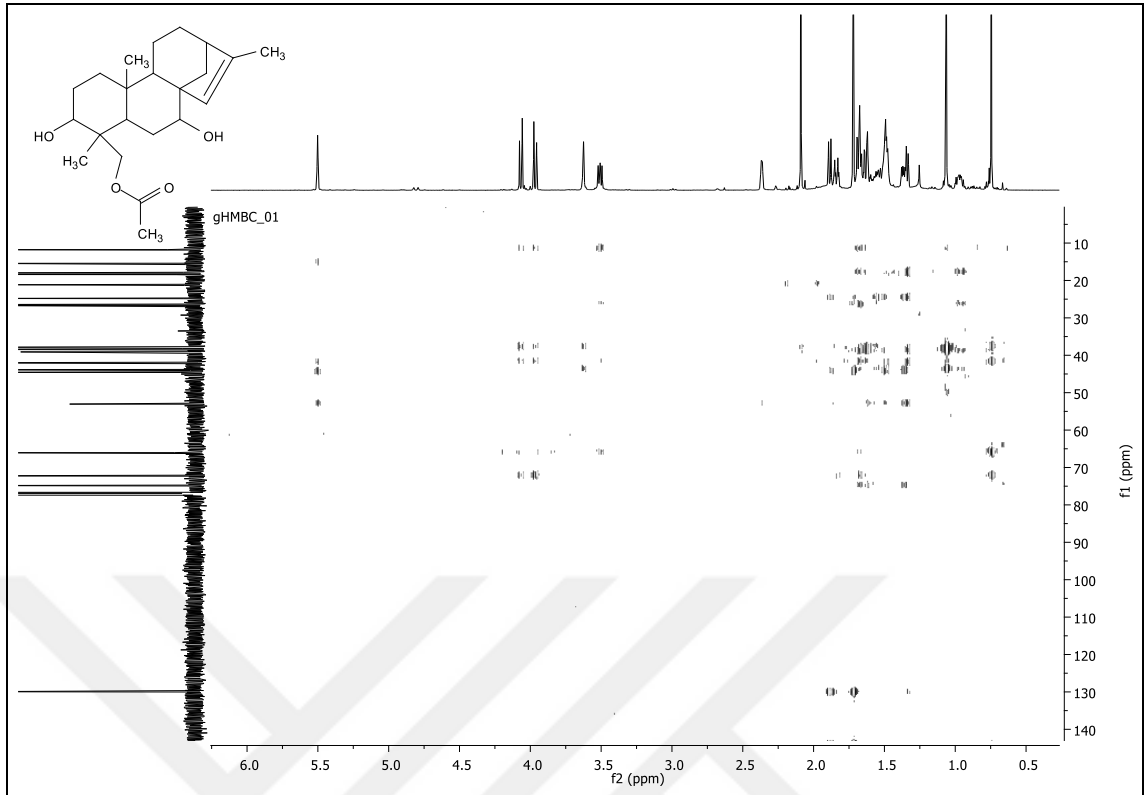


İzolinearol (SP6) molekülü ^1H -NMR spektrumu

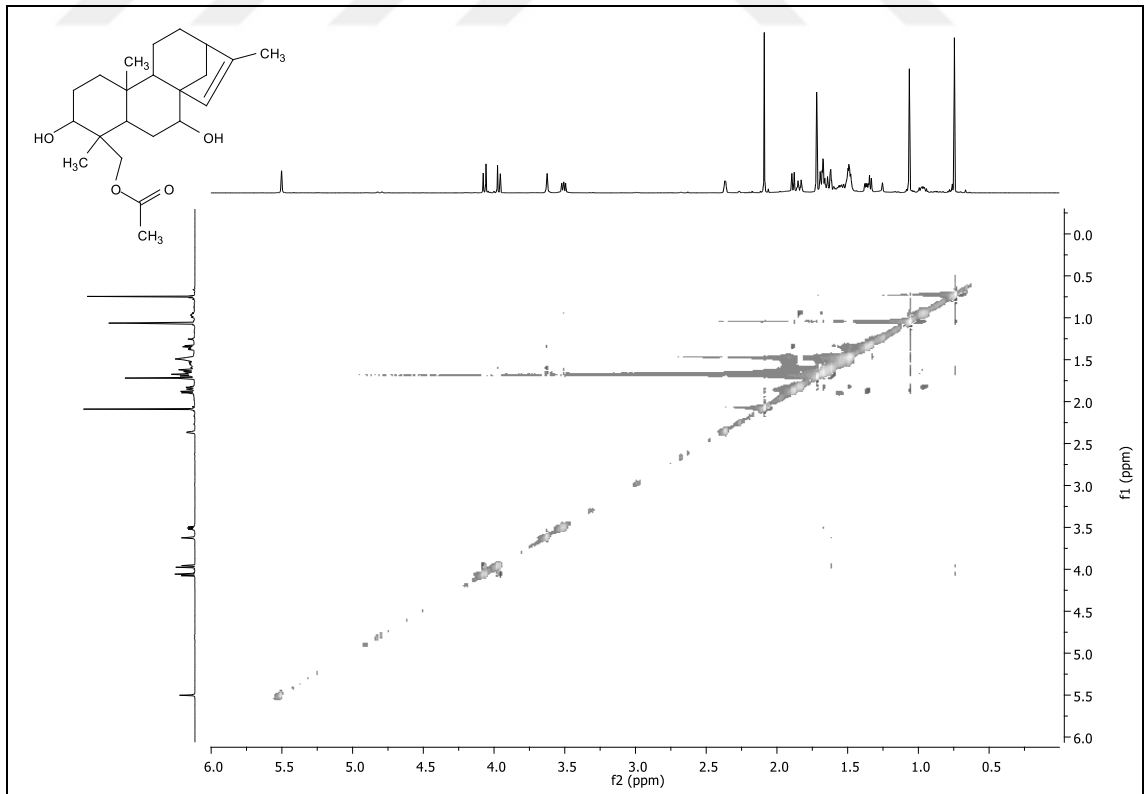


İzolinearol (SP6) molekülü ^{13}C -NMR spektrumu

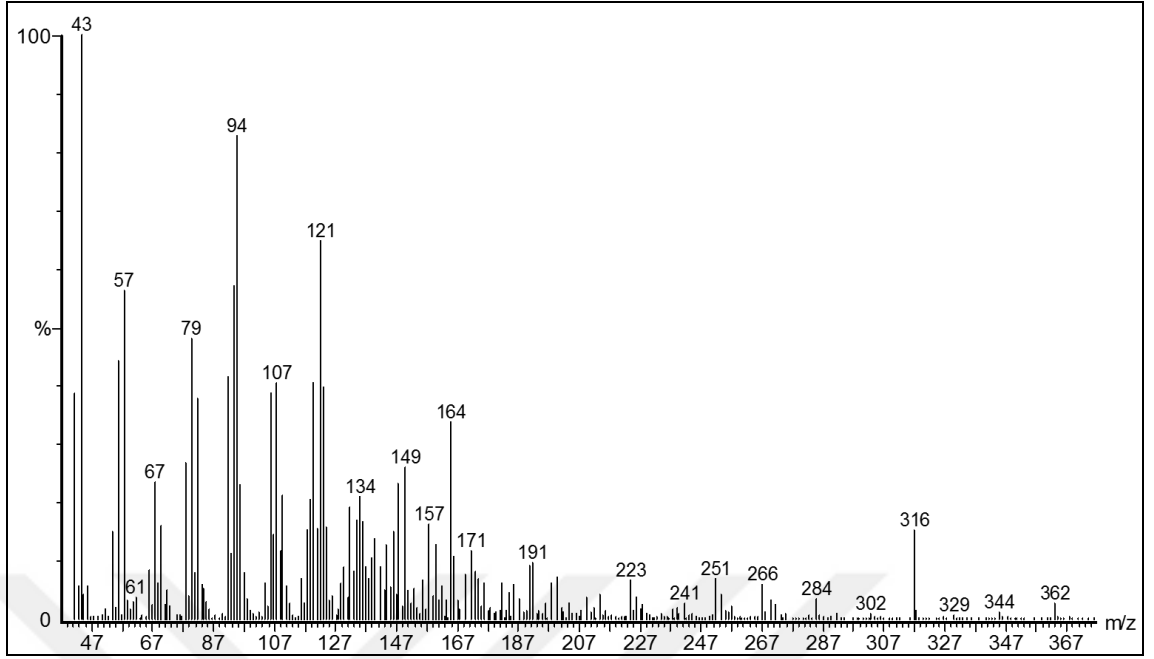




İzolinearol (SP6) molekülü HMBC spektrumu

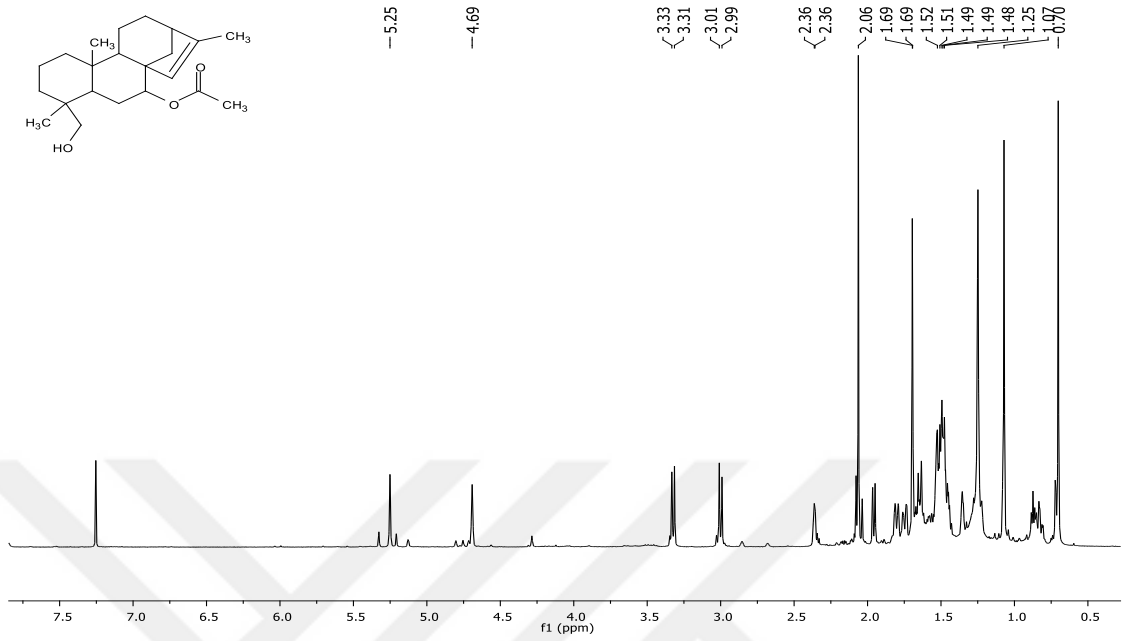


İzolinearol (SP6) molekülü NOESY spektrumu

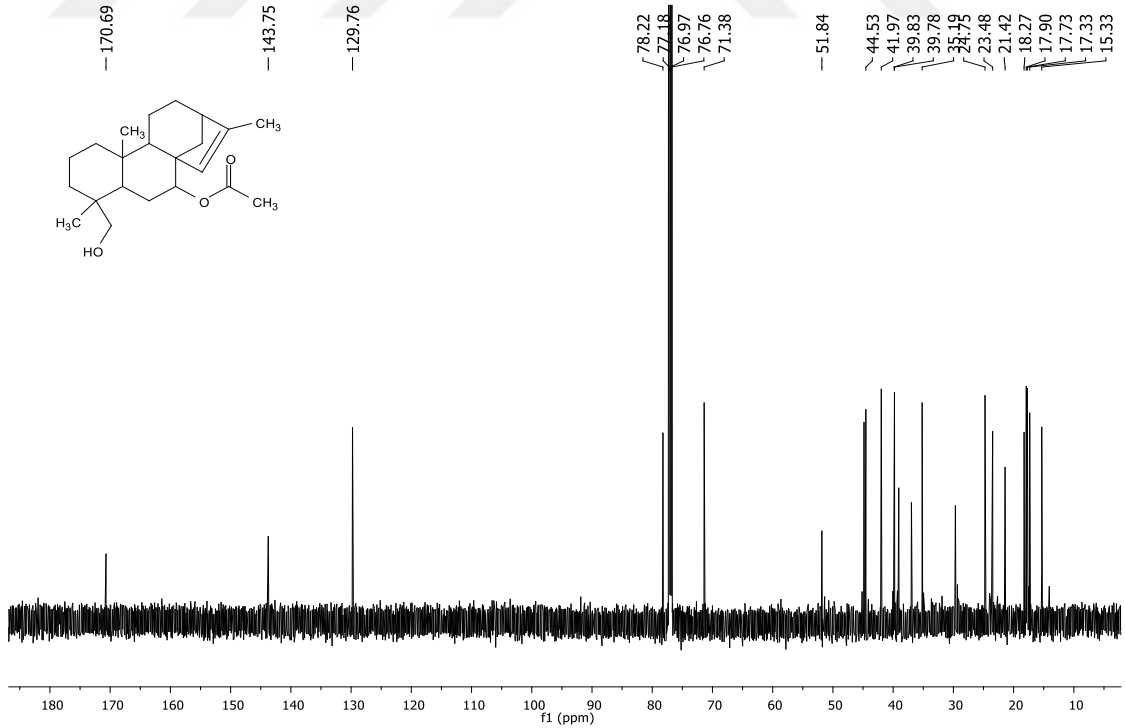


İzolinearol (SP6) molekülü MS (EI⁺) spektrumu

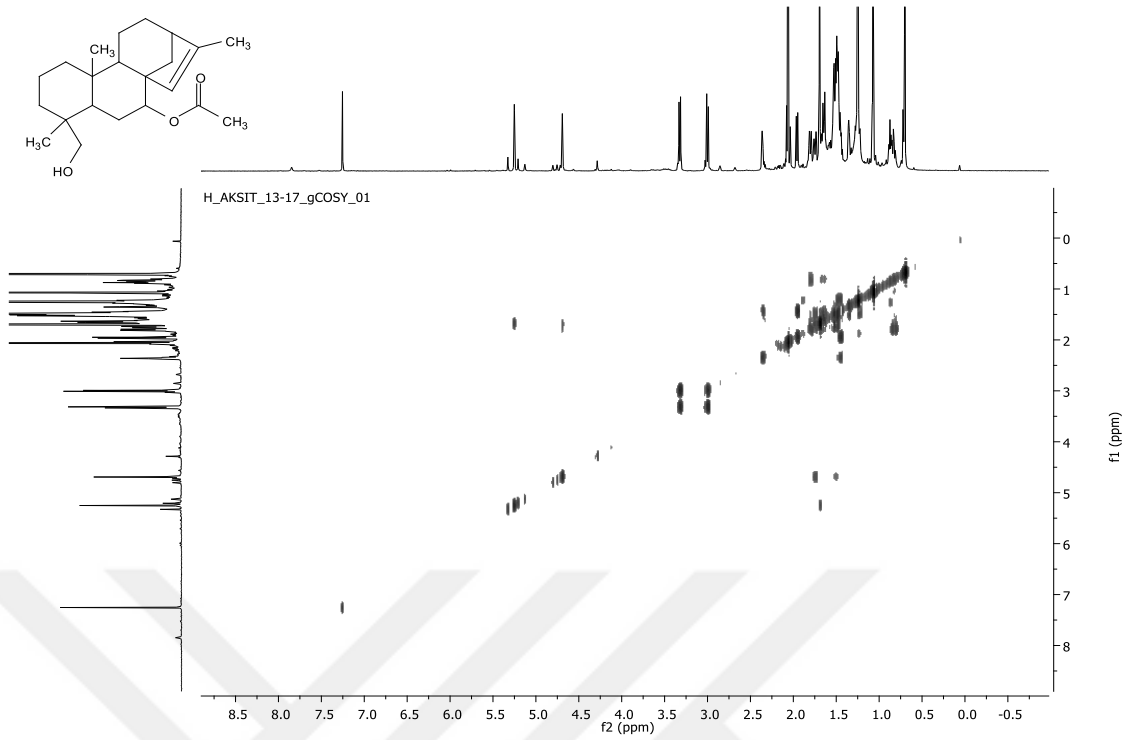
EK-20 Siderol (SL1) Molekülüne Ait Spektral Veriler



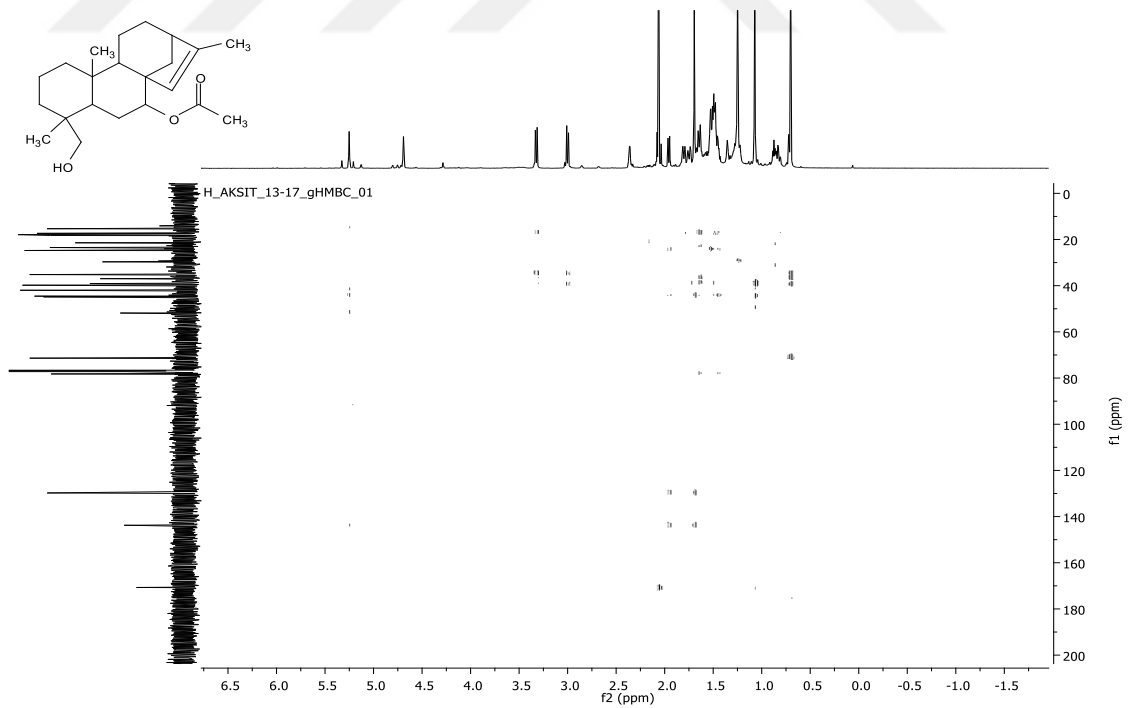
Siderol (SL1) molekülü ¹H-NMR spektrumu



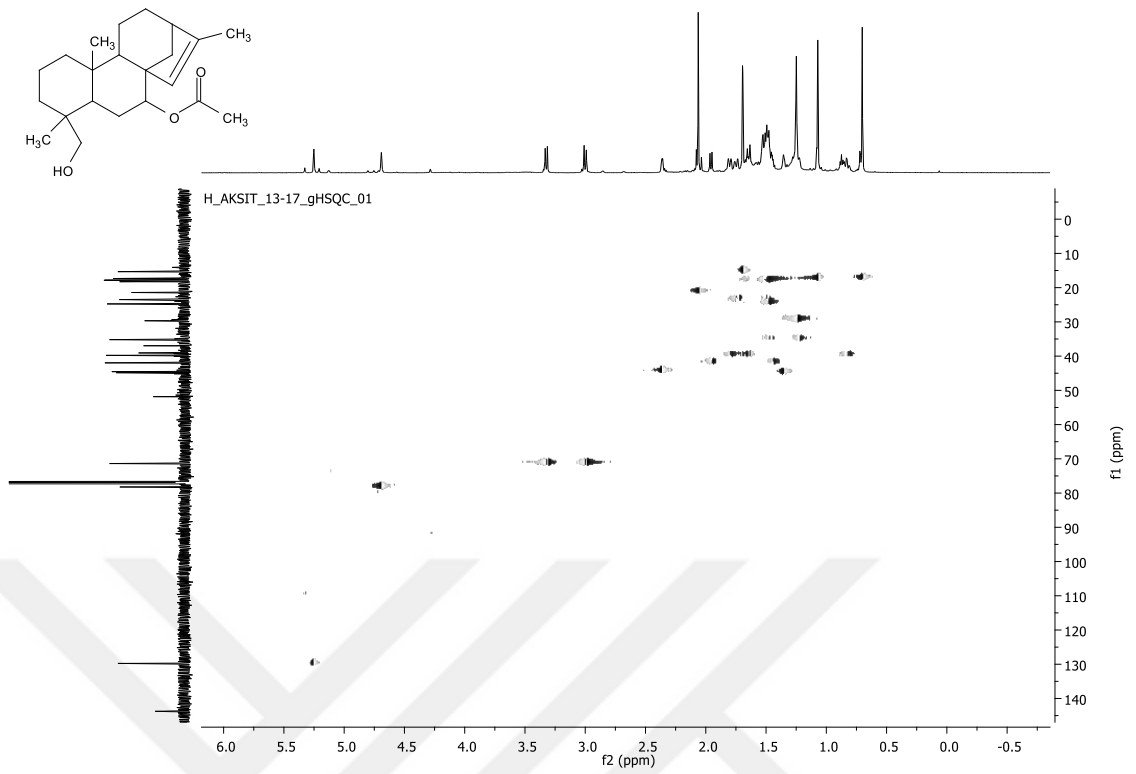
Siderol (SL1) molekülü ¹³C-NMR Spektrumu



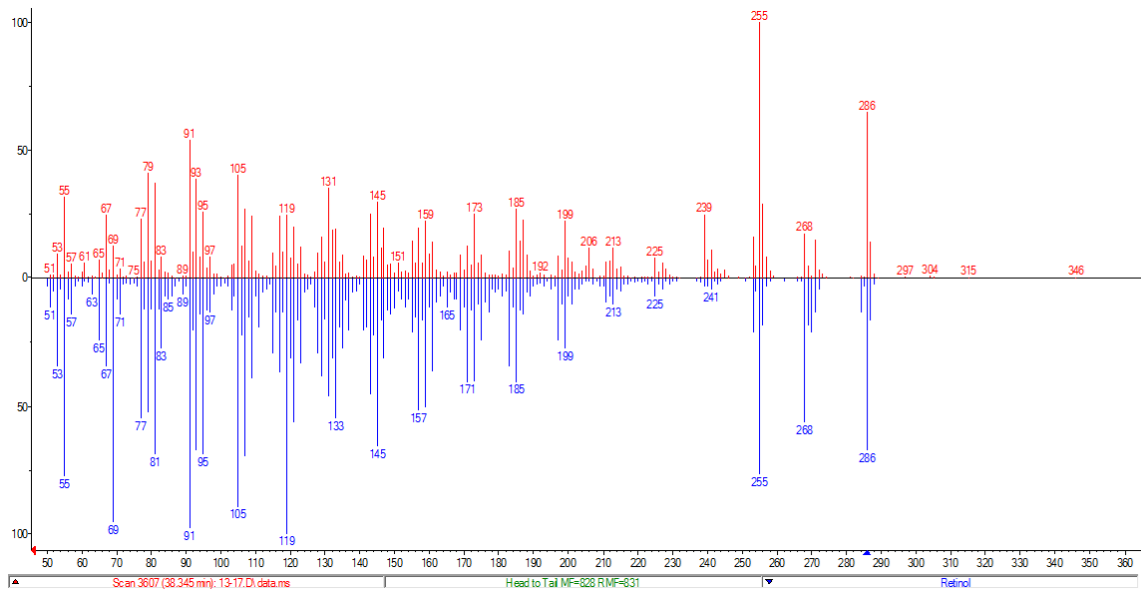
Siderol (SL1) molekülü COSY spektrumu



Siderol (SL1) molekülü HMBC spektrumu

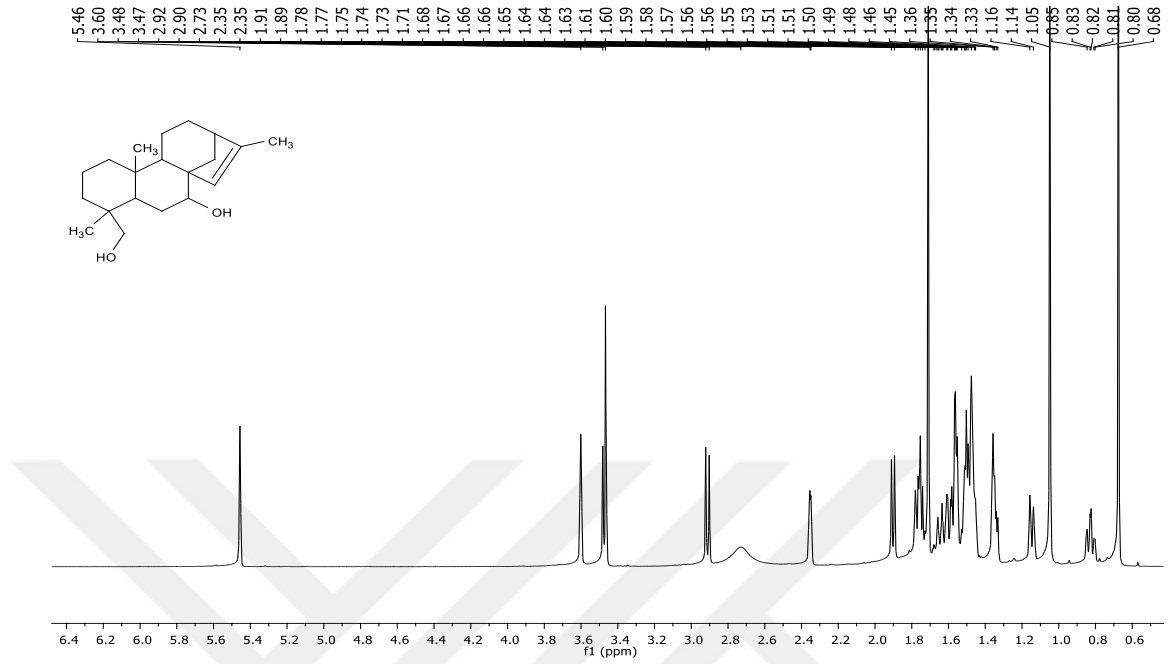


Siderol (SL1) molekülü HSQC spektrumu

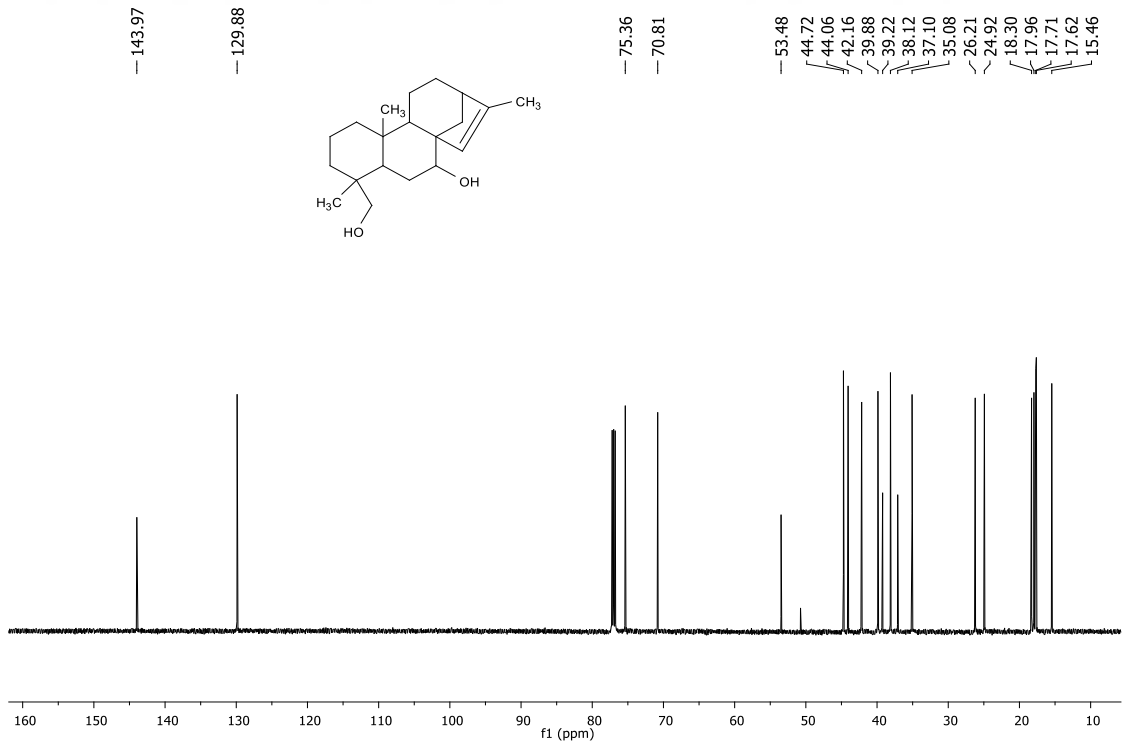


Siderol (SL1) molekülü MS (EI⁺) spektrumu

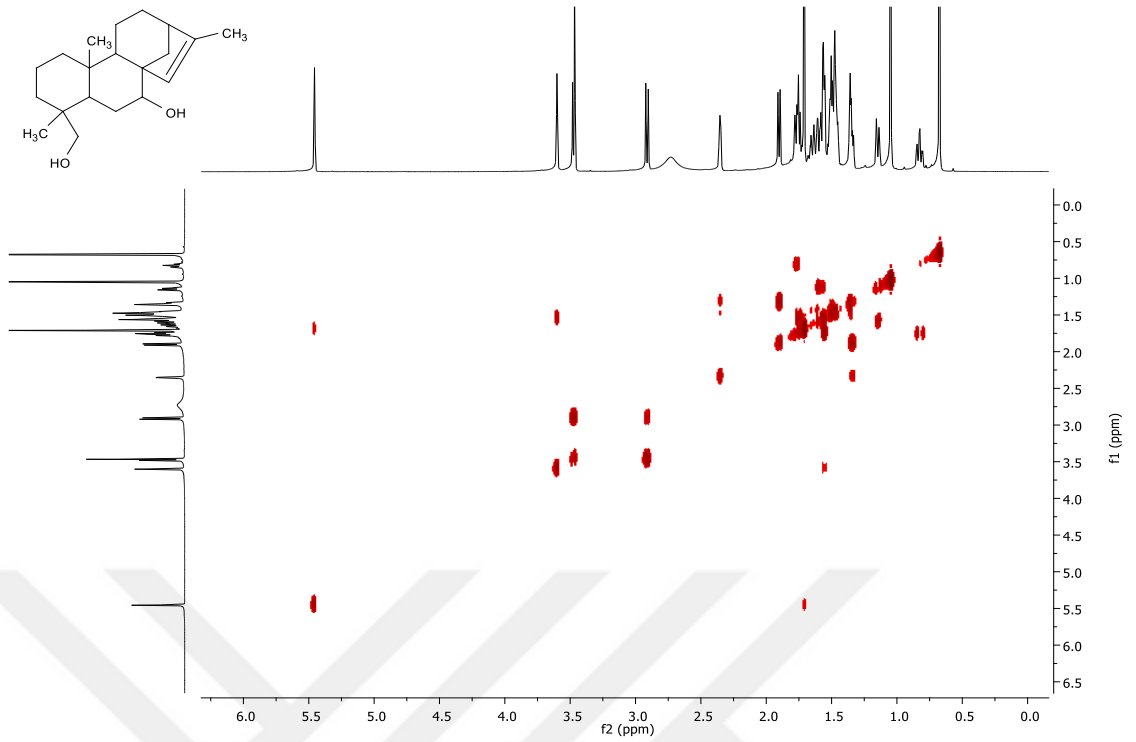
EK-21 Sideridiol (SL2) Molekülüne Ait Spektral Veriler



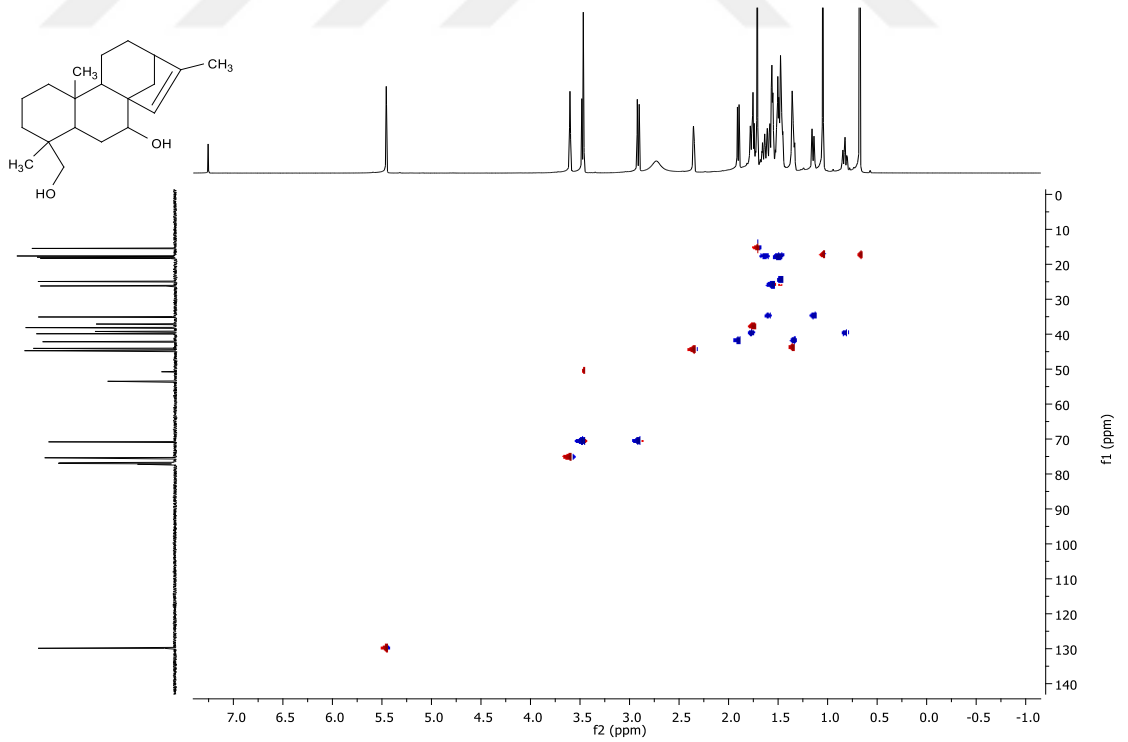
Sideridiol (SL2) molekülü ¹H-NMR spektrumu



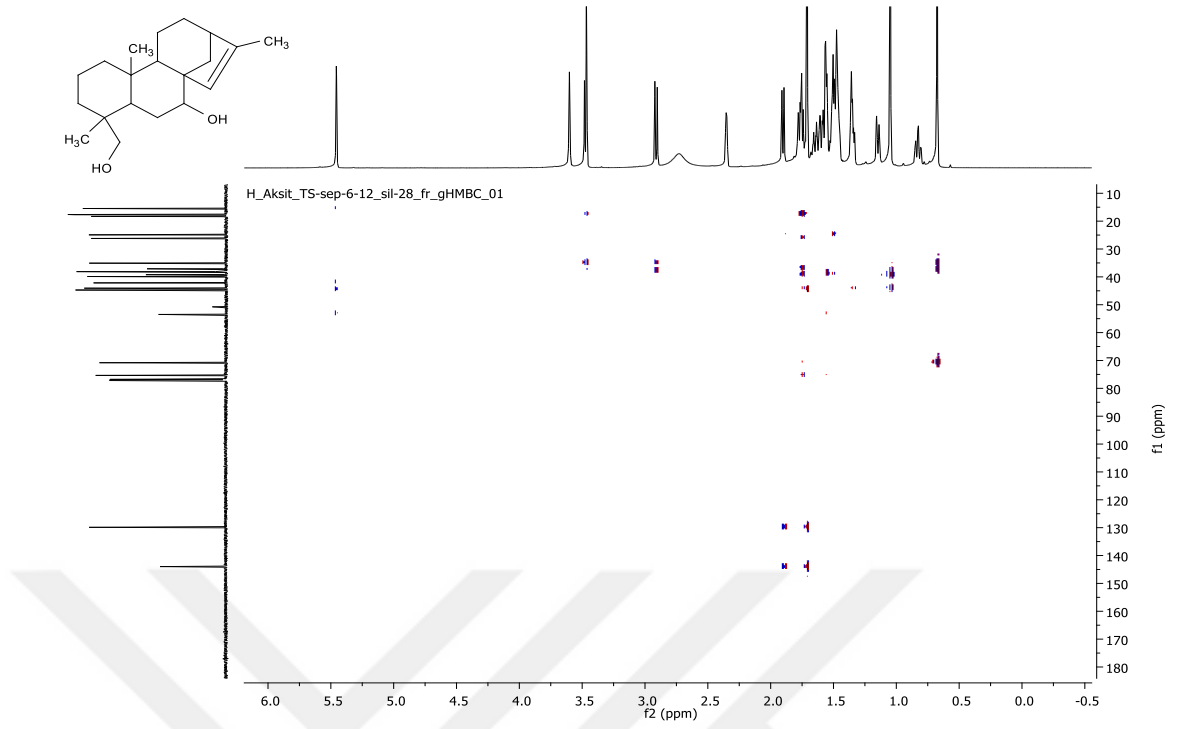
Sideridiol (SL2) molekülü ¹³C-NMR spektrumu



Sideridiol (SL2) molekülü COSY spektrumu



Sideridiol (SL2) HSQC spektrumu



Sideridiol (SL2) molekülü HMBC spektrumu

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hüseyin AKŞİT

Doğum Yeri : Çameli/Denizli

Doğum Tarihi : 10.10.1981

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Adres : Gaziosmanpaşa Üniversitesi Kimya Bölümü 60250 TOKAT

Tel : 5413420118

E-posta : huseyinarsit@gmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Denizli Lisesi (1997)

Lisans : 2006

Yüksek Lisans: Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen-Bil. Ens., Kimya ABD, 2008

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Uzman, 2010

Yayınları:

Akşit, H., I. Demirtaş, I. Telci, G. Tarımcılar, 2013. Chemical diversity in essential oil composition of *Mentha longifolia* (L.) Hudson subsp. *typhoides* (Briq.) Harley var. *typhoides* from Turkey. Journal of Essential Oil Research, 25(5), 430-437.

Akşit, H., S. M. Çelik, Ö. Şen, R. Erenler, I. Demirtaş, I. Telci, M. Elmastaş, 2014. Complete isolation and characterization of polar portion of *Mentha dumetorum* water extract. Records of Natural Products, 8(3), 277-280

Alkan, M., H. Yüksek, F. Islamoğlu, Ş. Bahçeci, M. Calapoğlu, M. Elmastaş, H. Akşit, M. Özdemir, 2007. A study on 4-acylamino-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-ones. Molecules, 12(8), 1805-1816.

Bayan, Y., H. Akşit, 2016. Antifungal activity of essential oils and plant extracts from *Sideritis germanicopolitana* Bornm. Growin in Turkey. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 26(2), 333-337.

Beyhan, O., M. Elmastaş, N. Genc, H. Akşit, 2011. Effect of altitude on fatty acid composition in turkish hazelnut (*Coryllus avellana* L.) varieties. African Journal of Biotechnology, 10(71), 16064-16068.

Celik, I., C. C. Ersanli, M. Akkurt, H. Aksit, R. Erenler, 2016. Synthesis, crystal structure and theoretical characterization of (3R, 4R, 6S)-3,6-dihydroxy-1-menthene isolated from *Echinophora tenuifolia*. Gazi University Journal of Science, 29(4), 953-957.

Çelik, I., M. Akkurt, H. Akşit, R. Erenler, S. García-Granda, 2015. Crystal structure and computational study of 3,4-dihydroxy-3-hydroxymethyl-9-methyl-6-methylidene-3a,4,5,6,6a,9,9a,9b-octahydroazuleno [4,5-b]furan-2,8(3H,7H)-dione. Acta Crystallographica Section E: Crystallographic Communications, 71 1425-1428.

Çelik, I., C. C. Ersanli, R. Köseoğlu, H. Akşit, R. Erenler, I. Demirtaş, M. Akkurt, 2016. Crystal structure of 3,4a,7,7,10a-pentamethyl-3-vinyldodecahydro-1H-benzo[f]chromen-9-ol isolated from *Sideritis perfoliata*. Acta Crystallographica Section E: Crystallographic Communications, 72 1380-1382.

Demirtas, I., B. Ayhan, A. Sahin, H. Aksit, M. Elmastas, I. Telci, 2011. Antioxidant activity and chemical composition of *Sideritis libanotica* Labill. ssp. *linearis* (Bentham) Borm. (Lamiaceae). Natural Product Research, 25(16), 1512-1523.

Doruk, S., I. Demirtaş, H. Akşit, U. Erkorkmaz, Z. Seyfikli, 2012. Assessment of exposure to tobacco smoke: Measurement of exhaled carbon monoxide and hair nicotine. Turkish Journal of Medical Sciences, 42(4), 739-745.

Elmastas, M., R. Erenler, B. Isnac, H. Aksit, O. Sen, N. Genc, I. Demirtas, 2016. Isolation and identification of a new neo-clerodane diterpenoid from *Teucrium chamaedrys* L. Natural Product Research, 30(3), 299-304.

Elmastaş, M., İ. Telci, H. Akşit, R. Erenler, 2015. Comparison of total phenolic contents and antioxidant capacities in mint genotypes used as spices. Turkish Journal of Biochemistry, 40(6), 456-462.

Erenler, R., O. Sen, H. Aksit, I. Demirtas, A. S. Yaglioglu, M. Elmastas, I. Telci, 2016. Isolation and identification of chemical constituents from *Origanum majorana* and investigation of antiproliferative and antioxidant activities. Journal of the Science of Food and Agriculture, 96(3), 822-836.

Erenler, R., S. Yilmaz, H. Aksit, O. Sen, N. Gene, M. Elmastas, I. Demirtas, 2014. Antioxidant activities of chemical constituents isolated from *Echinops orientalis* Trauv. Records of Natural Products, 8(1), 32-36.

Guzel, A., H. Aksit, M. Elmastas, R. Erenler, 2017. Bioassay-guided isolation and identification of antioxidant flavonoids from *Cyclotrichium origanifolium* (Labill.) manden and scheng. Pharmacognosy Magazine, 13(50), 316-320.

Karaman, S., B. Ozturk, H. Aksit, T. Erdogdu, 2013. The effects of pre-harvest application of aminoethoxyvinylglycine on the bioactive compounds and fruit quality of 'Fortune' plum variety during cold storage. *Food Science and Technology International*, 19(6), 567-576.

Kucuker, E., B. Ozturk, H. Aksit, N. Genc, 2015. Effect of pre-harvest aminoethoxyvinylglycine (AVG) application on bioactive compounds and fruit quality of plum (*Prunus salicina* lindell cv. black beauty) at the time of harvest and during cold storage. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 25(3), 763-770.

Kucuker, E., B. Ozturk, S. M. Celik, H. Aksit, 2014. Pre-harvest spray application of methyl jasmonate plays an important role in fruit ripening, fruit quality and bioactive compounds of Japanese plums. *Scientia Horticulturae*, 176 162-169.

Onaran, A., M. Yilar, S. Belguzar, Y. Bayan, H. Aksit, 2014. Antifungal and bioherbicidal properties of essential oils of *Thymus fallax* F., *Origanum vulgare* L. and *Mentha dumetorum* Schult. *Asian Journal of Chemistry*, 26(16), 5159-5164.

Ozen, T., I. Demirtas, H. Aksit, 2011. Determination of antioxidant activities of various extracts and essential oil compositions of *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii*. *Food Chemistry*, 124(1), 58-64.

Telci, I., A. Sahin-Yaglioglu, F. Eser, H. Aksit, I. Demirtas, S. Tekin, 2014. Comparison of seed oil composition of *Nigella sativa* L. and *N. damascena* L. during seed maturation stages. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(10), 1723-1729.

Yilar, M., Y. Bayan, H. Aksit, A. Onaran, I. Kadioglu, Y. Yanar, 2013. Bioherbicidal effects of essential oils isolated from *Thymus fallax* F., *Mentha dumetorum* Schult. and *Origanum vulgare* L. *Asian Journal of Chemistry*, 25(9), 4807-4811.

ULUSAL BİLİMSEL TOPLANTILARDA SUNULAN VE BİLDİRİ KİTABINDA BASILAN BİLDİRİLER

Şahin A., Aksit H., Telci İ., Demirtaş I., “Bazı Yabani Nanelerin Kemotiplerinin Belirlenmesi ve Uçucu Yağlarının Antikanserojen Aktivitesi” 24. Ulusal Kimya Kongresi 29 Haziran-2 Temmuz, Zonguldak 25 Haziran 2010.

Oğuz A., Özdemir A., Özer A., Madenci B., Akçe O., Karakuş O., Albak Ö., Demirtaş İ., Akşit H., Telci I., “*Ocimum basilicum* L. Türlerine ait bazı bitkilerin Uçucu yağ Bileşenlerinin Belirlenmesi” 23. Ulusal Kimya Kongresi, Sivas, 16-20 Haziran 2009.

Somtürk B., Peker B., Avcı E., Şimşek A., Akşit H., Demirtaş İ., Özen T., “*Matricaria chamomilla* bitkisinde antioksidan, antikanserijen ve aktimikrobiyal aktivitelerin incelenmesi” 23. Ulusal Kimya Kongresi, Sivas,16-20 Haziran 2009.

Akşit H., Demirtaş İ., Şahin A., Karakoç Ö. “Boğa dikenini (*Eryngium campestre*) bitkisinin kimyasal bileşenleri ve biyolojik aktivitesinin incelenmesi” 23. Ulusal Kimya Kongresi, Sivas,16-20 Haziran 2009.

Demirtaş İ., Ayhan B., Şahin A., Aksit H., Elmastaş M., Tekin Ş., Telci İ., “Endemik *Sideritis libanotica* Bitkisinin Fitokimyasal Analizi ve Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi” 23. Ulusal Kimya Kongresi, Sivas,16-20 Haziran 2009.

Yılar M., Bayan Y., Töre Ö., Aksit H., Kadioğlu İ., “*Artemisia scoparia* Waldst. et Kit. Uçucu Yağının Biyoherbisidal Etkisi” Türkiye VII. Herboloji Kongresi, , Kahramanmaraş, 28-30 Haziran 2011.

Telci İ., Demirtaş İ., Sülü E., Akşit H., “Türkiye de Farklı Orijinli Dereotu (*Anethum graveolans*) Popülasyonlarının Tarımsal ve Kimyasal Özellikleri” Türkiye VIII. Tarla Bitkileri Kongresi, Hatay, 19-22 Ekim 2009.

Alagöz B., Elmastaş M., Demirtaş İ., Genç N., Akşit H., Karaçay Z., Şafak Z., “Yabani Hindiba (*Cichorium intybus* L.) Bitkisinin Sekonder Metabolitlerinin İzolasyonu ve Karakterizasyonu, Antioksidan Aktivite Analizi” 25. Ulusal Kimya Kongresi, Erzurum, 27 Haziran-2 Temmuz 2011.

Çiğdem H., Elmastaş M., Genç N., Telci İ., Akşit H., “Tarhana Otu (*Echinophora tenuifolia* L. ssp. *sibthorpiana* (Guss.) Tutin) Bitkisinin Gelişme Dönemlerine Göre Antioksidan Aktivite Değişimi ve Sekonder Metabolitlerin İzolasyonu” 25. Ulusal Kimya Kongresi, Erzurum, 27 Haziran-2 Temmuz 2011.

Eser F., Demirtaş İ., Şahin A., Akşit H. “*Glycyrrhiza glabra* Bitkisinin Sabit Yağlarının Antiproliferatif ve Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi”

Gül F., Demirtaş İ., Akşit H., Şahin A., Genç N., Tüfekçi A. R., “*Mentha villosa nervata* Bitkisinin Uçucu Yağ ve Fenolik Bileşiklerinin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Bazı Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi” 25. Ulusal Kimya Kongresi, Erzurum, 27 Haziran-2 Temmuz 2011.

Eser F., Şahin A., Akşit H., Önal A., “*Althaea officinalis* Bitkisinin Sabit Yağlarının Antiproliferatif ve Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi” 25. Ulusal Kimya Kongresi, Erzurum, 27 Haziran-2 Temmuz 2011.

Türk H., Demirtaş İ., Akşit H., Şahin A., Genç N., Erenler R., “Sarı Kekik (*Thymus Fallax* Fisch. Et Mey.) Bitkisinin Sekonder Metabolitlerin İzolasyonu, Karakterizasyonu, Antioksidan ve Antikanser Aktivitelerinin İncelenmesi” 25. Ulusal Kimya Kongresi, Erzurum, 27 Haziran-2 Temmuz 2011.

Karaçay Z., Elmastaş M., Erenler R., Demirtaş İ., Genç N., Akşit H., Alagöz B., Erdoğan H., “Çaşır (*Ferula* spp.) Bitkisinin Sekonder Metabolitlerinin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi” 25. Ulusal Kimya Kongresi, Erzurum, 27 Haziran-2 Temmuz 2011.

Eser F., Akşit H., Acar N., Önal A., Demirtaş İ., “Civanperçemi (*Achillea millefolium*) Yapraklarının Uçucu Bileşenlerinin Belirlenmesi” Kromatografi 2013, Bursa, 19-22 Haziran 2013.

Eser F., Akşit H., Özturan S. Ö., Çekirdek S., Demirtaş İ., Önal A., “Kalecik Yöresinde Yetiştirilen Kalecik Karası Üzümünden Üretilen Bazı Ürünlerde Kullanılan Pestisit Kalıntısının GC-MS ile tayini” Kromatografi 2013, Bursa, 19-22 Haziran 2013.

Şen Ö., Kahraman Z., Ağıl A. T., Özel E., Akşit H., Telci İ., Erenler R., “Türkiye’de Kültürü Yapılan Bazı *Origanum* Türlerinin Uçucu Yağ Bileşenlerinin GC- MS ile Belirlenerek Karşılaştırılması” Kromatografi 2013, Bursa, 19-22 Haziran 2013.

İsnaç B., Elmastaş M., Genç N., Akşit H., Şen Ö., Demirtaş İ., Erenler R., “*Teucrium chamaedrys* L. subsp. *chamaedrys* Bitkisinden Diterpenoid Bileşiklerinin İzolasyonu ve Karakterizasyonu” Kromatografi 2013, Bursa, 19-22 Haziran 2013.

Meral B., Çiğdem H., Demir S., Elmastaş M., Telci İ., Genç N., Akşit H., Güzel A., Erenler R., “*Echinophora tenuifolia* L. ssp. *sibthorpiana* (Guss.) Hasat Zamanına Göre Uçucu Yağ Bileşenlerindeki Değişiminin İncelenmesi” Kromatografi 2013, Bursa, 19-22 Haziran 2013.

Çelik S. M., Erdoğan T., Elmastaş M., Akşit H., Erenler R., Telci İ., Şen Ö., Albayrak A., “*Mentha dumetorum* Bitkisinden Bazı Sekonder Metabolitlerinin Saflaştırılması ve Yapılarının Aydınlatılması” Kromatografi 2013, Bursa, 19-22 Haziran 2013.

Akşit Z., Kaya C., Akşit H., “Bazı Tıbbi Aromatik Bitkilerden Suda Çözünebilir Çay Üretimi ve Bazı Kromatografik Analizleri” Kromatografi 2013, Bursa, 19-22 Haziran 2013.

Genç N., Ak M., Akşit H., Güzel A., Elmastaş M., “Depolama Süresinin Fındık Yağ Asit Bileşenleri Üzerine Etkisi” Kromatografi 2013, Bursa, 19-22 Haziran 2013.

Alagöz B., Karaçay Z., Genç N., Akşit H., Elmastaş M., Türkekul İ., “Bazı Yenebilen Yabani Mantar Türlerinde Yağ Asidi Kompozisyonları” Kromatografi 2012, Tokat, 6-9 Haziran 2012.

Elmastaş M., İsnaç B., Akşit H., Genç N., Taş A., “Kısa Mahmut Otunun (*Teucrium chamaedrys* L. subsp. *chamaedrys*) Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi ve Etkili Bileşiklerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu” Kromatografi 2012, Tokat, 6-9 Haziran 2012.

Mısırlı D., Akşit H., Telci İ., Şahin A., Tüfekçi A. R., Erenler R., “Farklı Bölgelerden Toplanan *Mentha spicata* Bitkisinde Bulunan Flavanoidlerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu” Kromatografi 2012, Tokat, 6-9 Haziran 2012.

Çiğdem H., Erenler R., Akşit H., Demirtaş İ., “*Stachys annua* Bitkisinden Flavonların İzolasyonu Ve Karakterizasyonu” Kromatografi 2012, Tokat, 6-9 Haziran 2012.

Akşit H., Elmastaş M., Erenler R., Kurtaran H., Gürbüzlü B., “*Mentha dumetorum* Bitkisinden Polimetoksi Flvanonların Flash Kromatografi ve Preperatif TLC ile Saflaştırılması” Kromatografi 2012, Tokat, 6-9 Haziran 2012.

Keçeci M., Elmastaş M., Telci İ., Akşit H., “Reyhan (*Ocimum basilicum*) Bitkisinden Rosmarinik Asidin Flash Kromatografi İle Hızlı ve Kolay İzolasyonu” Kromatografi 2012, Tokat, 6-9 Haziran 2012.

Bakraç M., Akşit H., Önal A., Erenler R., Telci İ., “Adaçayı (*Salvia officinalis*) Uçucu Yağ Bileşenlerinin Hidrodestilasyon Prosesi Boyunca Zamana Bağlı Olarak Değişimi” Kromatografi 2012, Tokat, 6-9 Haziran 2012.

Şen Ö., Erenler R., Akşit H., Demirtaş İ., “Çaşır (*Ferula communis*) Bitkisinin Sekonder Metabolitlerinin İzolasyonu ve Karakterizasyonu” Kromatografi 2012, Tokat, 6-9 Haziran 2012.

Arslan R., Erenler R., Akşit H., Şen Ö., Genç N., “*Salvia Aethiopsis* Bitkisindeki Uçucu Yağ Bileşenleri” Kromatografi 2012, Tokat, 6-9 Haziran 2012.

Erenler R., Akşit H., Şen Ö., Gönül N., Seymen M., “*Falcaria Vulgaris* Bitkisindeki Uçucu Yağ Bileşenleri” Kromatografi 2012, Tokat, 6-9 Haziran 2012.

Yılmaz S., Erenler R., Akşit H., Şen Ö., Demir A., Demirtaş İ., “*Echinops orientalis* Trautv. Bitkisindeki Sekonder Metabolitlerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu” Kromatografi 2012, Tokat, 6-9 Haziran 2012.

Çelik S. M., Elmastaş M., Akşit H., Öztürk B., Küçükler E., Erdem H., Erdoğan T., “BA-29 Anacı Üzerine Aşılı Armut Çeşitlerinin Biyoaktif Bileşikleri Üzerine Yapraktan Uygulanan Bazı Mineral Elementlerin Etkisi” Kromatografi 2012, Tokat, 6-9 Haziran 2012.

Akşit H., Erdoğan T., Elmastaş M., Genç N., Telci İ., “*Mentha piperita* Sekonder Metabolitlerinin İzolasyonu ve Kantitatif Analizi” Kromatografi 2012, Tokat, 6-9 Haziran 2012.

Karaçay Z., Elmastaş M., Akşit H., Telci İ., “*Mentha Dumetorum* Bitkisinin Olgunlaşma Süresi Boyunca HPLC ile Rosmarinik Asit İçeriğinin Değişiminin İncelenmesi” Kromatografi 2012, Tokat, 6-9 Haziran 2012.

Zirek E., Elmastaş M., Genç N., Akşit H., “Yayla Kekiği (*Origanum minutiflorum*) Bitkisinden Polifenol Bileşiklerin Saflaştırılması ve HPLC ile Kantitatif Analizi” Kromatografi 2012, Tokat, 6-9 Haziran 2012.

İsnaç B., Aksit H., Telci İ., Elmastaş M., Köysü P., Erenler R., Şen Ö., “*Origanum onites* L. Bitkisinden İzole Edilen Bileşenlerin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi” 15. Ulusal Kromatografi Kongresi 8-10 Nisan 2015, Uşak

Aksit H., Ozan E., Elmastaş M., Erenler R., İnal İ., “Pelin Otu Bitkisinin Uçucu Bileşenlerinin Saflaştırılması ve İnsektisit Aktivitesinin İncelenmesi” 15. Ulusal Kromatografi Kongresi 8-10 Nisan 2015, Uşak

Aksit H., Aksit Z., Elmastaş M., Erenler R., “Kara Havuç Antosiyaninlerinin Preperatif HPLC ile Saflaştırılması ve Yapı Taiyini “15. Ulusal Kromatografi Kongresi 8-10 Nisan 2015, Uşak

Elmastaş M., Güzel A., Aksit H., Çelik S.M., “Nane Ruhu Bitkisinden Antioksidan Aktiviteye Sahip Flavon Türevlerinin Saflaştırılması ve Yapı Tayini” 15. Ulusal Kromatografi Kongresi 8-10 Nisan 2015, Uşak

Çelik S.M., Elmastaş M., Aksit H., “*Origanum minutiflorum* O. Schwarz & P.H. Davis Bitkisindeki Sekonder Metabolitlerin İzolasyonu” 15. Ulusal Kromatografi Kongresi 8-10 Nisan 2015, Uşak

ULUSLARARASI BİLİMSEL TOPLANTILARDA SUNULAN VE BİLDİRİ KİTABINDA (PROCEEDINGS) BASILAN BİLDİRİLER

Aydın Z., Etgü H., **Akşit H.**, Demirtaş I., Hayta M., Fincan M., "A Comparative Study For Pulsed Electric Field Induced Cellular Permeabilization Of Different Plant Tissues", International Conference on Bio and Food Electrotechnologies, Compigne, FRANSA, 22-23 Ekim 2009.

Saygı K.Ö., Sahin A., Kavak F., Aksit H., Erenler R., “Determination Of Phenolic Compounds in Some *Juniperus* Species Grown in Amasya (Turkey)” 1st International Symposium on Secondary Metabolites, Denizli, TURKEY, 12-15 Eylül 2011.

Eser F., Aksit H., Demirtas I., Onal A., “Determination of Fatty Acid Content of Ribwort Plantain (*Plantago lanceolata*) plant” 44th World Chemistry Congress, İstanbul, TURKEY, 11-16 Ağustos 2013.

Erenler R., Aksit H., Gul F., Demirtas I, “Natural Products from *Thuja Orientalis*” 3rd Biothechnology World Congress, Dubai, UNITED ARABIC EMİRATES, 10-12 Şubat 2014.

Erenler R., Elmastaş M., Şen Ö., İsnac B., Akşit H., Yıldız I., Telci I., Topçu G., “Antioxidant Activity Of Chemical Constituent Isolated From Some *Origanum* Species” 5th Annual International Congress of Medicchem” Suzhou, Çin, 18-20 Kasım 2014

Genç N. Elmastaş M., Akşit H., “Rapid Isolation of Oleuropein from *Olea europea* Leaves”. 2nd İneternational Turkic Word Conference on Chemical Sciences And Technologies, Skopje, Makedonya, 26-30 Ekim 2016.

Bayan, Y. Akşit H., “Investigation Of Antifungal Activity Of *Sideritis germanicopolitana* Bornm. Methanol Extracts Against *Verticilum Dalhia*”. VII International Scientefic Agriculture Symposium, Jahorina, Bosna Hersek, 06-09 Ekim 2016.

ULUSAL KONGRELERDE YAPILAN SÖZLÜ SUNUMLAR

Akşit H., “*Mentha dumetorum* Bitkisinin Baskın Fenolik Bileşiklerinin HPLC ile Kantitatif Analizi” Kromatografi 2013, Bursa, 19-22 Haziran 2013.

Akşit H., Demirtaş İ., “Bazı Doğal Ürünlerin Kantitatif Analizlerinde NMR ve Yaygın Kromatografik Tekniklerin Karşılaştırılması” Kromatografi 2012, Tokat, 6-9 Haziran 2012.

Akşit H., Demirtaş İ., Cevatemre B., “Dağ Çayı (*Sideritis germanicopolitana*) Bitkisinin Kimyasal İçeriğinin Belirlenmesi ve Bazı Biyolojik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi” 15. Ulusal Kromatografi Kongresi 31 Ağustos-2 Eylül 2016, Malatya