
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

TÜRKİYE'DE YETİŞEN *CHRYSOPHTHALMUM* SCHULTZ BIP. TÜRLERİ ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR

Fatma AYAZ

DOKTORA TEZİ
FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AĞUSTOS 2017

Fatma AYAZ tarafından hazırlanan "Türkiye'de Yetişen *Chrysophthalmum* Schultz Bip. Türleri Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Farmakognozi Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Nurgün KÜÇÜKBOYACI
Farmakognozi Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~

Başkan : Prof. Dr. İhsan ÇALIŞ
Farmakognozi Anabilim Dalı, Yakın Doğu Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~

Üye : Prof. Dr. Bilge ŞENER
Farmakognozi Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~

Üye : Prof. Dr. Hasan KIRMIZIBEKMEZ
Farmakognozi Anabilim Dalı, Yeditepe Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~

Üye : Prof. Dr. Ayşe UZ
Farmakognozi Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~

Tez Savunma Tarihi: 24/08/2017

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Fatma Ayaz

24.08.2017

TÜRKİYE'DE YETİŞEN *CHRYSOPHTHALMUM* SCHULTZ BIP. TÜRLERİ ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR

(Doktora Tezi)

Fatma AYAZ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ağustos 2017

ÖZET

Bu çalışmada, *Chrysophthalmum* Schultz Bip. (Asteraceae) cinsine ait Türkiye'de yetişen *C. montanum* (DC.) Boiss., *C. dichotomum* Boiss. & Heldr. ve *C. gueneri* Aytac and Anderb.'nin *in vitro* sitotoksik, antienflamatuvar ve leishmanisidal aktiviteleri yönünden biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlama ile incelenmesi amaçlanmıştır. Üç türün (% 80) metanollü ekstresinden fraksiyonlanan *n*-hekzan, kloroform, *n*-butanol ve kalan sulu alt ekstrelerinin çeşitli kanser hücre soylarına karşı SRB ve MTT metodları ile sitotoksik; kemiluminesans yöntem ile antienflamatuvar ve *Leishmania* parazitine karşı leishmanisidal aktiviteleri test edilmiştir. *Chrysophthalmum* türlerinin kloroform alt ekstreleri incelenen aktiviteler açısından en aktif bulunmuştur. Bunun yanı sıra, üç türün *n*-hekzan alt ekstreleri test edilen hücre soyları üzerine seçici sitotoksisite göstermiştir, ayrıca *C. montanum*'un *n*-hekzan alt ekstresi önemli leishmanisidal aktiviteye sahip bulunmuştur. Bundan dolayı, çalışmalarımız *C. montanum*'un aktif kloroform ve *n*-hekzan ekstrelerinin biyoaktif sekonder metabolitlerinin izole edilmesi ve yapılarının aydınlatılması üzerine sürdürülmüştür. *C. montanum*'un kloroform alt ekstresi kromatografik metodlar kullanılarak (Silika jel KK, Sephadex KK, Preparatif İTK, normal faz ve ters faz YPSK) 8 ana fraksiyona (Fr. A-H) ayrılmıştır. Ardından, Fr. A-H'nin sitotoksik ve antienflamatuvar aktiviteleri incelenmiştir. Sonuç olarak, *C. montanum*'un kloroform ekstresinin aktif fraksiyonlarından (Fr. A-G) üçü yeni 11 bileşik (**CM-1 - CM-11**); *n*-hekzan ekstresinden 2 bileşik (**CM-12** ve **CM-13**) elde edilmiştir. Bileşiklerin yapıları spektroskopik teknikler (UV, IR, 1D ve 2D NMR, EI-MS ve HREI-MS) kullanılarak aydınlatılmış ve **CM-1**, **CM-2** ve **CM-7**'nin absolü konfigürasyonları X-ray kristalografisi ile belirlenmiştir. Toplamda izole edilen 13 bileşik, 5 temel grupta toplanmaktadır: seskiterpen laktonlar (**CM-1** - **CM-8**), bir sterol glikoziti (**CM-9**), bir lignan (**CM-10**), bir flavonoit (**CM-11**) ve triterpenler (**CM-12** ve **CM-13**). İzole edilen bileşiklerden **CM-1**, **CM-2**, **CM-3**, **CM-7** ve **CM-9**'un sitotoksik aktivitesi SRB yöntemi ile test edilmiştir. Ayrıca, **CM-1**, **CM-2**, **CM-3** ve **CM-7**'nin MTT yöntemi ile sitotoksik aktivitesi, bunun yanında antienflamatuvar ve leishmanisidal aktiviteleri araştırılmıştır.

Bilim Kodu : 1017

Anahtar Kelimeler : *Chrysophthalmum*, Asteraceae, sitotoksik, antienflamatuvar ve leishmanisidal aktiviteler, seskiterpen laktonlar

Sayfa Adedi : 262

Danışman : Prof. Dr. Nurgün KÜÇÜKBOYACI

PHARMACOGNOSIC RESEARCHES ON *CHRYSOPHTHALMUM* SCHULTZ BIP. SPECIES GROWING IN TURKEY

(Ph. D. Thesis)

Fatma AYAZ

GAZI UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

August 2017

ABSTRACT

In this study, *C. montanum* (DC.) Boiss., *C. dichotomum* Boiss. & Heldr. and *C. gueneri* Aytac and Anderb. growing in Turkey, belonged to the genus *Chrysophthalmum* Schultz Bip. (Asteraceae) were aimed to investigate from the point of view *in vitro* cytotoxic, anti-inflammatory and leishmanicidal activities by bioactivity guided fractionation. The *n*-hexane, chloroform, *n*-butanol and remaining water subextracts fractioned from the methanol (80%) extracts of three species were tested for cytotoxicity using SRB and MTT methods against various cancer cell lines, anti-inflammatory activity using chemoluminescence technique and leishmanicidal activity against *Leishmania* promastigotes. The chloroform subextracts of *Chrysophthalmum* species were found as the most active in point of above-mentioned activities. Moreover, the *n*-hexane subextracts of three species showed selective cytotoxicity against the tested cell lines, in addition the *n*-hexane subextract of *C. montanum* was found significant leishmanicidal activity. Therefore, our study was carried on isolation and elucidation of bioactive secondary metabolites from active chloroform and *n*-hexane subextracts of *C. montanum*. The chloroform subextract of *C. montanum* was performed by using chromatographic methods (Silica gel CC, Sephadex CC, Preparative TLC, normal phase and reverse phase HPLC) to give 8 main fractions (Fr. A-H). Then, the cytotoxic and anti-inflammatory activities of Fr. A-H were investigated. Consequently, 11 compounds (**CM-1**-**CM-11**), three of which new, from active fractions (Fr. A-G) of chloroform extract; 2 compounds (**CM-12** ve **CM-13**) from *n*-hexane extract of *C. montanum* were obtained. The structures of the compounds were elucidated by extensive spectroscopic techniques (UV, IR, 1D and 2D NMR, EI-MS and HREI-MS) and the absolute configurations of **CM-1**, **CM-2** ve **CM-7** were determined by X-ray crystallography. Totally, isolated 13 compounds categorized under five main groups: eight sesquiterpene lactones (**CM-1** - **CM-8**), a sterol glycoside (**CM-9**), a lignan (**CM-10**), a flavonoid (**CM-11**) and triterpenes (**CM-12** and **CM-13**). Among the isolated compounds, **CM-1**, **CM-2**, **CM-3**, **CM-7** and **CM-9** were tested for cytotoxic activity using SRB method. In addition, **CM-1**, **CM-2**, **CM-3** and **CM-7** were evaluated for cytotoxicitiy by MTT assay as well as anti-inflammatory and leishmanicidal activities.

Science Code : 1017

Key Words : *Chrysophthalmum*, Asteraceae, cytotoxic, anti-inflammatory and leishmanicidal activities, sesquiterpene lactones

Page Number : 262

Advisor : Prof. Dr. Nurgün KÜÇÜKBOYACI

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında kıymetli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, bana her konuda destek olan değerli hocam Prof. Dr. Nurgün KÜÇÜKBOYACI'ya çok teşekkür ederim. Çalışmalarım sırasında ilgi ve desteğini gördüğüm, tez izleme komitesi üyesi değerli hocam Prof. Dr. Bilge ŞENER'e; çalışmalarımın her aşamasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, tez izleme komitesi üyesi değerli hocam Prof. Dr. İhsan ÇALIŞ'a; Pakistan'daki çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübeleriyle destek olan değerli hocam Prof. Dr. Nezhun GÖREN'e teşekkürlerimi sunarım. Çalışma materyallerinin toplanmasında ve tayininde yardımcı olan değerli hocalarım Prof. Dr. Hayri DUMAN ve Yrd. Doç. Dr. Barış BANİ'ye çok teşekkür ederim. Sitotoksik aktivite deneylerinin yapılmasına imkan sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Engin ULUKAYA ve ekibinden Dr. Mehmet SARIMAHMUT ile Şeyma AYDINLIK'a çok teşekkür ederim. Çalışmam sırasında TÜBİTAK 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı kapsamında bulunduğum Pakistan-Karachi-ICCBS'de; izole edilen bileşiklerin spektroskopik ve X-ray kristalografik analizleri ile bazı aktivite testlerinin yapılmasına olanak sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Muhammad Iqbal CHOUDHARY ve Prof. Dr. Atta-ur-RAHMAN'a, X-ray analizlerini yapan Dr. Sammer YOUSUF'a, biyolojik aktivitelerin yapılmasına olanak sağlayan ve yardımlarını aldığım Dr. Almas JABEEN, Dr. Humera JAHAN, Dr. Mujeeb-ur-REHMAN ve Sadia SIDDIQ'a çok teşekkür ederim. Çalışmalarım süresince gösterdikleri anlayıştan dolayı Farmakognozi Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarım ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim. Çalışmalarım sırasında manevi desteğini her an yanımda hissettiğim değerli aileme çok teşekkür ederim. "Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı (2211-A)" ve "Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı (2214-A)" ile sağladığı maddi imkan için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkür ederim. Araştırmamızın bir bölümü, "Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP)" tarafından (02/2017-03) desteklenmiştir. Kuruma sağladığı maddi destek için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER vii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ ix

ŞEKİLLERİN LİSTESİ xii

RESİMLERİN LİSTESİ xx

HARİTALARIN LİSTESİ xxi

SİMGELER VE KISALTMALAR xxii

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. Botanik Bilgiler 3

2.1.1. Asteraceae familyası 3

2.1.2. *Chrysophthalmum* Schultz Bip. cinsi 3

2.2. *Chrysophthalmum* Türleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar 14

2.2.1. Anatomik, morfolojik ve filogenetik çalışmalar 14

2.2.2. Fitokimyasal çalışmalar 14

2.2.3. Halk arasında kullanılışı üzerine yapılan çalışmalar 16

2.2.4. Biyolojik aktivite çalışmaları 17

2.3. Seskiterpen Laktonlar Hakkında Genel Bilgiler 18

2.3.1. Seskiterpen laktonların sınıflandırılmaları 18

2.3.2. Seskiterpen laktonların biyosentezleri 21

3. GEREÇ VE YÖNTEM 25

3.1. Gereç 25

Sayfa

3.2. Yöntem 27
3.2.1. Fitokimyasal çalışmalar 27
3.2.2. Biyolojik aktivite çalışmaları 49
4. BULGULAR 53
4.1. Fitokimyasal Çalışmalara Ait Bulgular 53
4.1.1. İzole edilen seskiterpen laktonların yapı tayinlerine ait bulgular 55
4.1.2. İzole edilen sterol gikozitinin yapı tayinine ait bulgular 166
4.1.3. İzole edilen lignanın yapı tayinine ait bulgular 176
4.1.4. İzole edilen flavonoitin yapı tayinine ait bulgular 185
4.1.5. İzole edilen triterpenlerin yapı tayinlerine ait bulgular 195
4.2. Biyolojik Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular 213
4.2.1. *In vitro* sitotoksik aktivite bulguları 213
4.2.2. *In vitro* antienflamatuvar aktivite bulguları 223
4.2.3. *In vitro* leishmanisidal aktivite bulguları 225
5. TARTIŞMA 227
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 247
KAYNAKLAR 251
ÖZGEÇMİŞ 261

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 2.1. *C. montanum* (DC.) Boiss.'a ait herbaryum örnekleri 6

Çizelge 2.2. *C. dichotomum* Boiss. & Heldr.'a ait herbaryum örnekleri..... 10

Çizelge 2.3. *C. gueneri* Aytac and Anderb.'e ait herbaryum örnekleri..... 13

Çizelge 2.4. *C. montanum* bitkisinden izole edilen maddeler..... 15

Çizelge 2.5. Temel seskiterpen lakton yapıları..... 19

Çizelge 3.1. *Chrysophthalmum* türlerinin toplandığı bölgeler..... 25

Çizelge 3.2. İnce tabaka kromatografisi koşulları 27

Çizelge 3.3. Silika jel kolon kromatografisi koşulları 28

Çizelge 3.4. Sephadex kolon kromatografisi koşulları 29

Çizelge 3.5. Preparatif ince tabaka kromatografisi koşulları..... 31

Çizelge 3.6. Preparatif yüksek performanslı sıvı kromatografisi koşulları 32

Çizelge 4.1. 4α,9β-dihidroksi-6α-asetoksi-1βH-gaya-10(14),11(13)-dien-8α,12-olid (CM-6) bileşiğinin ^{1}H ve ^{13}C NMR spektroskopik değerleri ($CDCl_3$+CD_3OD: δ_H 500 MHz, δ_C 150 MHz; C_5D_5N: δ_H 500 MHz) ve HMBC korelasyonları 62

Çizelge 4.2. 1β,4β-dihidroksi-gaya-10(14),11(13)-dien-8α,12-olid (CM-4) bileşiğinin ^{1}H ve ^{13}C NMR spektroskopik değerleri ($CDCl_3$: δ_H 500 MHz, δ_C 150 MHz; DMSO-d_6: δ_H 500 MHz) ve HMBC korelasyonları 74

Çizelge 4.3. 6α-asetoksi-4α-hidroksi-1βH-gaya-9.11(13)-dien-12.8α-olid (CM-1) bileşiğinin ^{1}H NMR ve APT spektroskopik değerleri ($CDCl_3$: δ_H 400 MHz, δ_C 100 MHz) ve HMBC korelasyonları 89

Çizelge 4.4. 4α,6α-dihidroksi-1β,5α,7αH-gaya-9(10),11(13)-dien-12,8α-olid (CM-3) bileşiğinin ^{1}H NMR ve APT spektroskopik değerleri ($CDCl_3$: δ_H 400 MHz, δ_C 100 MHz) ve HMBC korelasyonları 102

Çizelge 4.5. 6α-asetoksi-4α-hidroksi-9β.10β-epoksi-1βH-gaya-11(13)-en-12.8α-olid (CM-2) bileşiğinin ^{1}H NMR ve APT spektroskopik değerleri ($CDCl_3$: δ_H 400 MHz, δ_C 100 MHz) ve HMBC korelasyonları 115

Çizelge 4.6. 4α, 6α-dihidroksi-9β,10β-epoksi-1βH-gaya-11(13)-en-8α,12-olid (CM-5) bileşiğinin ^{1}H ve ^{13}C NMR spektroskopik değerleri ($CDCl_3$: δ_H 600 MHz, δ_C 150 MHz; C_5D_5N: δ_H 500 MHz, δ_C 125 MHz) ve HMBC korelasyonları 128

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.7. (4*α*,5*α*,8*β*,10*β*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (CM-7) bileşiğinin ^{1}H ve ^{13}C NMR spektroskopik değerleri (CD_3OD: δ_H 400 MHz, δ_C 125 MHz; $CDCl_3$: δ_H 400 MHz) ve HMBC korelasyonları 143

Çizelge 4.8. (4*α*,5*α*,8*β*,10*α*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (CM-8) bileşiğinin ^{1}H ve ^{13}C NMR spektroskopik değerleri ($CDCl_3$: δ_H 800 MHz, δ_C 200 MHz; DMSO-d_6: δ_H 500 MHz, $\delta_C^{\#}$ 125 MHz) ve HMBC korelasyonları 157

Çizelge 4.9. *β*-sitosterol-3-O-*β*-D-glukopiranozit) (CM-9a) ve Stigmasterol 3-O-*β*-D-glukopiranozit (CM-9b) karışımının (CM-9) ^{1}H ve ^{13}C NMR spektroskopik değerleri ($CDCl_3$+ CD_3OD: δ_H 600 MHz, δ_C 125 MHz)* ve HMBC korelasyonları 169

Çizelge 4.10. Pinorezinol (CM-10) bileşiğinin ^{1}H ve ^{13}C NMR spektroskopik değerleri ($CDCl_3$: δ_H 800 MHz, δ_C 200 MHz) ve HMBC korelasyonları 179

Çizelge 4.11. Krizosplenol C (CM-11) bileşiğinin ^{1}H NMR ve APT spektroskopik değerleri ($CDCl_3$: δ_H 400 MHz, δ_C 100 MHz) ve HMBC korelasyonları 188

Çizelge 4.12. Ψ-Taraksasterol-asetat (CM-12a) ve Taraksasterol-asetat (CM-12b) karışımının (CM-12) ^{1}H ve APT spektroskopik değerleri ($CDCl_3$: δ_H 400 MHz, δ_C 100 MHz) ve HMBC korelasyonları 201

Çizelge 4.13. Ψ-Taraksasterol (CM-13a) ve Taraksasterol (CM-13b) karışımının (CM-13) ^{1}H ve APT spektroskopik değerleri (Aseton-d_6: δ_H 600 MHz, δ_C 100 MHz) ve HMBC korelasyonları 202

Çizelge 4.14. *C. montanum*'un ham metanol ekstresi ve alt ekstrelerinin SRB yöntemiyle tespit edilen sitotoksik aktiviteleri..... 214

Çizelge 4.15. *C. gueneri*'nin ham metanol ekstresi ve alt ekstrelerinin SRB yöntemiyle tespit edilen sitotoksik aktiviteleri..... 215

Çizelge 4.16. *C. dichotomum*'un ham metanol ekstresi ve alt ekstrelerinin SRB yöntemiyle tespit edilen sitotoksik aktiviteleri..... 216

Çizelge 4.17. *C. montanum*'un ham metanol ekstresi ve alt ekstrelerinin MTT yöntemiyle tespit edilen sitotoksik aktiviteleri..... 217

Çizelge 4.18. *C. gueneri*'nin ham metanol ekstresi ve alt ekstrelerinin MTT yöntemiyle tespit edilen sitotoksik aktiviteleri..... 218

Çizelge 4.19. *C. dichotomum*'un ham metanol ekstresi ve alt ekstrelerinin MTT yöntemiyle tespit edilen sitotoksik aktiviteleri..... 218

Çizelge 4.20. *C. montanum*'un kloroform ekstresinden elde edilen fraksiyonların (Fr. A-H) SRB yöntemiyle tespit edilen sitotoksik aktiviteleri..... 219

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.21. *C. montanum*'un kloroform ekstresinden elde edilen fraksiyonların (Fr. A-H) MTT yöntemiyle tespit edilen sitotoksik aktiviteleri 220

Çizelge 4.22. *C. montanum*'un kloroform ekstresinden izole edilen bileşiklerin SRB yöntemiyle tespit edilen sitotoksik aktiviteleri 221

Çizelge 4.23. *C. montanum*'un kloroform ekstresinden izole edilen bileşiklerin MTT yöntemiyle tespit edilen sitotoksik aktiviteleri 222

Çizelge 4.24. *Chrysophthalmum* türlerinin ham metanol ekstreleri ve alt ekstrelerinin antienflamatuvar aktiviteleri 223

Çizelge 4.25. *C. montanum* kloroform ekstresinden elde edilen fraksiyonların (Fr. A-H) antienflamatuvar aktiviteleri 224

Çizelge 4.26. *C. montanum*'un kloroform ekstresinden izole edilen bileşiklerin antienflamatuvar aktiviteleri 224

Çizelge 4.27. *Chrysophthalmum* türlerinden elde edilen ham metanol ekstreleri ve alt ekstrelerinin leishmanisidal aktiviteleri 225

Çizelge 4.28. *C. montanum*'un kloroform ekstresinden izole edilen bileşiklerin leishmanisidal aktiviteleri 226

Çizelge 5.1. İzole edilen gayanolidlerin (CM-1 - CM-8) H-7 ve H-8 rezonansları 234

Çizelge 5.2. *C. montanum*'dan izole edilen seskiterpen laktonların daha önce elde edildiği türler 240

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. Terpenlerin biyosentezi 21

Şekil 2.2. 2*E*,6*E*-farnesil pirofosfat'ın siklizasyonu ile seskiterpen laktonların biyosentezi 22

Şekil 2.3. Temel seskiterpen laktonların biyosentezi..... 23

Şekil 3.1. *C. montanum*'un ekstraksiyonu ve fraksiyonlanması 35

Şekil 3.2. *C. gueneri*'nin ekstraksiyonu ve fraksiyonlanması 36

Şekil 3.3. *C. dichotomum*'un ekstraksiyonu ve fraksiyonlanması..... 37

Şekil 3.4. *C. montanum*'un kloroform ekstresi üzerinde yapılan izolasyon çalışmaları..... 39

Şekil 3.5. Fraksiyon A üzerinde yapılan izolasyon çalışmaları 40

Şekil 3.6. Fraksiyon B üzerinde yapılan izolasyon çalışmaları 41

Şekil 3.7. Fraksiyon C üzerinde yapılan izolasyon çalışmaları 42

Şekil 3.8. Fraksiyon D üzerinde yapılan izolasyon çalışmaları 43

Şekil 3.9. Fraksiyon E üzerinde yapılan izolasyon çalışmaları 44

Şekil 3.10. Fraksiyon F üzerinde yapılan izolasyon çalışmaları..... 45

Şekil 3.11. Fraksiyon G üzerinde yapılan izolasyon çalışmaları 46

Şekil 3.12. *C. montanum*'un *n*-hekzan ekstresi üzerinde yapılan izolasyon çalışmaları 48

Şekil 4.1a. 4*α*,9*β*-dihidroksi-6*α*-asetoksi-1*β*H-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (CM-6)'nın ^{1}H NMR spektrumları (A, B: $CDCl_3$+CD_3OD, 500 MHz; C: C_5D_5N, 500 MHz) 63

Şekil 4.1b. 4*α*,9*β*-dihidroksi-6*α*-asetoksi-1*β*H-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (CM-6)'nın ^{13}C NMR (A), DEPT 135 (B) ve DEPT 90 (C) spektrumları ($CDCl_3$+CD_3OD, 150 MHz). 64

Şekil 4.1c. 4*α*,9*β*-dihidroksi-6*α*-asetoksi-1*β*H-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (CM-6)'nın COSY spektrumu ($CDCl_3$+CD_3OD, 500 MHz)..... 65

Şekil 4.1d. 4*α*,9*β*-dihidroksi-6*α*-asetoksi-1*β*H-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (CM-6)'nın HSQC spektrumu ($CDCl_3$+CD_3OD)..... 66

Şekil 4.1e. 4*α*,9*β*-dihidroksi-6*α*-asetoksi-1*β*H-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (CM-6)'nın HMBC spektrumu ($CDCl_3$+CD_3OD)..... 67

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.1f. 4*α*,9*β*-dihidroksi-6*α*-asetoksi-1*β*H-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (CM-6)'nın NOESY spektrumu ($CDCl_3$+CD_3OD, 500 MHz) 68

Şekil 4.1g. 4*α*,9*β*-dihidroksi-6*α*-asetoksi-1*β*H-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (CM-6)'da COSY korelasyonları 58

Şekil 4.1h. 4*α*,9*β*-dihidroksi-6*α*-asetoksi-1*β*H-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (CM-6)'da önemli uzak mesafe HMBC korelasyonları 59

Şekil 4.1i. 4*α*,9*β*-dihidroksi-6*α*-asetoksi-1*β*H-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (CM-6)'da NOESY korelasyonları..... 60

Şekil 4.2a. 1*β*,4*β*-dihidroksi-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (CM-4)'ün ^{1}H NMR spektrumları (A, B: $CDCl_3$, 500 MHz; C: DMSO-d_6, 500 MHz)..... 75

Şekil 4.2b. 1*β*,4*β*-dihidroksi-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (CM-4)'ün ^{13}C NMR (A), DEPT 135 (B) ve DEPT 90 (C) spektrumları ($CDCl_3$, 150 MHz)..... 76

Şekil 4.2c. 1*β*,4*β*-dihidroksi-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (CM-4)'ün COSY spektrumu ($CDCl_3$, 500 MHz) 77

Şekil 4.2d. 1*β*,4*β*-dihidroksi-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (CM-4)'ün HSQC spektrumu ($CDCl_3$) (DEPT 135 negatif modda)..... 78

Şekil 4.2e. 1*β*,4*β*-dihidroksi-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (CM-4)'ün HMBC spektrumu ($CDCl_3$) 79

Şekil 4.2f. 1*β*,4*β*-dihidroksi-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (CM-4)'ün NOESY spektrumu ($CDCl_3$, 500 MHz) 80

Şekil 4.2g. 1*β*,4*β*-dihidroksi-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (CM-4)'de COSY korelasyonları..... 71

Şekil 4.2h. 1*β*,4*β*-dihidroksi-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (CM-4)'de önemli uzak mesafe HMBC korelasyonları 72

Şekil 4.2i. 1*β*,4*β*-dihidroksi-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (CM-4)'de NOESY korelasyonları 72

Şekil 4.3a. 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-1*β*H-gaya-9.11(13)-dien-12.8*α*-olid (CM-1)'in ^{1}H NMR spektrumu (A, B, C: $CDCl_3$, 400 MHz) 91

Şekil 4.3b. 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-1*β*H-gaya-9.11(13)-dien-12.8*α*-olid (CM-1)'in APT spektrumu (A, B: $CDCl_3$, 100 MHz)..... 92

Şekil 4.3c. 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-1*β*H-gaya-9.11(13)-dien-12.8*α*-olid (CM-1)'in COSY spektrumu ($CDCl_3$, 400 MHz) 93

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.3d. 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-1*β*H-gaya-9.11(13)-dien-12.8*α*-olid (CM-1)'in HSQC spektrumu ($CDCl_3$)..... 94

Şekil 4.3e. 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-1*β*H-gaya-9.11(13)-dien-12.8*α*-olid (CM-1)'in HMBC spektrumu ($CDCl_3$)..... 95

Şekil 4.3f. 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-1*β*H-gaya-9.11(13)-dien-12.8*α*-olid (CM-1)'in NOESY spektrumu ($CDCl_3$, 400 MHz)..... 96

Şekil 4.3g. 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-1*β*H-gaya-9.11(13)-dien-12.8*α*-olid (CM-1)'de COSY korelasyonları..... 83

Şekil 4.3h. 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-1*β*H-gaya-9.11(13)-dien-12.8*α*-olid (CM-1)'de önemli uzak mesafe HMBC korelasyonları..... 84

Şekil 4.3i. 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-1*β*H-gaya-9.11(13)-dien-12.8*α*-olid (CM-1)'de NOESY korelasyonları..... 85

Şekil 4.3j. 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-1*β*H-gaya-9.11(13)-dien-12.8*α*-olid (CM-1)'in absolü konfigürasyonu..... 86

Şekil 4.4a. 4*α*,6*α*-dihidroksi-1*β*,5*α*,7*α*H-gaya-9(10),11(13)-dien-12,8*α*-olid (CM-3)'ün ^{1}H NMR spektrumu (A, B, C: $CDCl_3$, 400 MHz)..... 103

Şekil 4.4b. 4*α*,6*α*-dihidroksi-1*β*,5*α*,7*α*H-gaya-9(10),11(13)-dien-12,8*α*-olid (CM-3)'ün APT spektrumu ($CDCl_3$, 100 MHz)..... 104

Şekil 4.4c. 4*α*,6*α*-dihidroksi-1*β*,5*α*,7*α*H-gaya-9(10),11(13)-dien-12,8*α*-olid (CM-3)'ün COSY spektrumu ($CDCl_3$, 400 MHz)..... 105

Şekil 4.4d. 4*α*,6*α*-dihidroksi-1*β*,5*α*,7*α*H-gaya-9(10),11(13)-dien-12,8*α*-olid (CM-3)'ün HSQC spektrumu ($CDCl_3$)..... 106

Şekil 4.4e. 4*α*,6*α*-dihidroksi-1*β*,5*α*,7*α*H-gaya-9(10),11(13)-dien-12,8*α*-olid (CM-3)'ün HMBC spektrumu ($CDCl_3$)..... 107

Şekil 4.4f. 4*α*,6*α*-dihidroksi-1*β*,5*α*,7*α*H-gaya-9(10),11(13)-dien-12,8*α*-olid (CM-3)'ün NOESY spektrumu ($CDCl_3$, 400 MHz)..... 108

Şekil 4.4g. 4*α*,6*α*-dihidroksi-1*β*,5*α*,7*α*H-gaya-9(10),11(13)-dien-12,8*α*-olid (CM-3)'de COSY korelasyonları..... 99

Şekil 4.4h. 4*α*,6*α*-dihidroksi-1*β*,5*α*,7*α*H-gaya-9(10),11(13)-dien-12,8*α*-olid (CM-3)'de önemli uzak mesafe HMBC korelasyonları..... 100

Şekil 4.4i. 4*α*,6*α*-dihidroksi-1*β*,5*α*,7*α*H-gaya-9(10),11(13)-dien-12,8*α*-olid (CM-3)'de NOESY korelasyonları..... 100

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.5a. 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-9*β*.10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-12.8*α*-olid (CM-2)'nin ^{1}H NMR (A, B: $CDCl_3$, 400 MHz) ve APT spektrumları (C: $CDCl_3$, 100 MHz) 117

Şekil 4.5b. 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-9*β*.10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-12.8*α*-olid (CM-2)'nin COSY spektrumu ($CDCl_3$, 400 MHz)..... 118

Şekil 4.5c. 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-9*β*.10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-12.8*α*-olid (CM-2)'nin HSQC spektrumu ($CDCl_3$)..... 119

Şekil 4.5d. 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-9*β*.10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-12.8*α*-olid (CM-2)'nin HMBC spektrumu ($CDCl_3$)..... 120

Şekil 4.5e. 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-9*β*.10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-12.8*α*-olid (CM-2)'nin NOESY spektrumu ($CDCl_3$, 400 MHz)..... 121

Şekil 4.5f. 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-9*β*.10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-12.8*α*-olid (CM-2)'de COSY korelasyonları..... 111

Şekil 4.5g. 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-9*β*.10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-12.8*α*-olid (CM-2)'de önemli uzak mesafe HMBC korelasyonları..... 112

Şekil 4.5h. 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-9*β*.10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-12.8*α*-olid (CM-2)'de NOESY korelasyonları..... 113

Şekil 4.5i. 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-9*β*.10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-12.8*α*-olid (CM-2)'nin absolü konfigürasyonu..... 114

Şekil 4.6a. 4*α*, 6*α*-dihidroksi-9*β*,10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-8*α*,12-olid (CM-5)'in ^{1}H NMR spektrumu (A, B: $CDCl_3$, 600 MHz) 129

Şekil 4.6b. 4*α*, 6*α*-dihidroksi-9*β*,10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-8*α*,12-olid (CM-5)'in ^{1}H NMR spektrumu (A, B, C: C_5D_5N, 500 MHz) 130

Şekil 4.6c. 4*α*, 6*α*-dihidroksi-9*β*,10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-8*α*,12-olid (CM-5)'in ^{13}C NMR (A), DEPT 135 (B) ve DEPT 90 (C) spektrumları ($CDCl_3$, 150 MHz)..... 131

Şekil 4.6d. 4*α*, 6*α*-dihidroksi-9*β*,10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-8*α*,12-olid (CM-5)'in COSY spektrumu (C_5D_5N, 500 MHz) 132

Şekil 4.6e. 4*α*, 6*α*-dihidroksi-9*β*,10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-8*α*,12-olid (CM-5)'in HSQC spektrumu (C_5D_5N)..... 133

Şekil 4.6f. 4*α*, 6*α*-dihidroksi-9*β*,10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-8*α*,12-olid (CM-5)'in HMBC spektrumu (C_5D_5N) 134

Şekil 4.6g. 4*α*, 6*α*-dihidroksi-9*β*,10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-8*α*,12-olid (CM-5)'in NOESY spektrumu (C_5D_5N, 500 MHz)..... 135

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.6h. 4*α*, 6*α*-dihidroksi-9*β*,10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-8*α*,12-olid (CM-5)'de COSY korelasyonları (C_5D_5N) 125

Şekil 4.6i. 4*α*, 6*α*-dihidroksi-9*β*,10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-8*α*,12-olid (CM-5)'de önemli uzak mesafe HMBC korelasyonları (C_5D_5N) 126

Şekil 4.6j. 4*α*, 6*α*-dihidroksi-9*β*,10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-8*α*,12-olid (CM-5)'de NOESY korelasyonları (C_5D_5N) 126

Şekil 4.7a. (4*α*,5*α*,8*β*,10*β*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (CM-7)'nin ^{1}H NMR spektrumları (A: CD_3OD, 400 MHz; B: $CDCl_3$, 400 MHz)..... 145

Şekil 4.7b. (4*α*,5*α*,8*β*,10*β*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (CM-7)'nin ^{13}C NMR (A), DEPT 135 (B) ve DEPT 90 (C) spektrumları (CD_3OD, 125 MHz) 146

Şekil 4.7c. (4*α*,5*α*,8*β*,10*β*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (CM-7)'nin COSY spektrumu (CD_3OD, 500 MHz) 147

Şekil 4.7d. (4*α*,5*α*,8*β*,10*β*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (CM-7)'nin HSQC spektrumu (CD_3OD)..... 148

Şekil 4.7e. (4*α*,5*α*,8*β*,10*β*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (CM-7)'nin HMBC spektrumu (CD_3OD)..... 149

Şekil 4.7f. (4*α*,5*α*,8*β*,10*β*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (CM-7)'nin NOESY spektrumu (CD_3OD, 500 MHz)..... 150

Şekil 4.7g. (4*α*,5*α*,8*β*,10*β*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (CM-7)'de COSY korelasyonları..... 138

Şekil 4.7h. (4*α*,5*α*,8*β*,10*β*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (CM-7)'de önemli uzak mesafe HMBC korelasyonları..... 139

Şekil 4.7i. (4*α*,5*α*,8*β*,10*β*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (CM-7)'de NOESY korelasyonları 140

Şekil 4.7j. (4*α*,5*α*,8*β*,10*β*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (CM-7)'nin absolü konfigürasyonu..... 141

Şekil 4.8a. (4*α*,5*α*,8*β*,10*α*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (CM-8)'in ^{1}H NMR spektrumları (A, B: DMSO-d_6, 500 MHz; C: $CDCl_3$, 800 MHz) . 159

Şekil 4.8b. (4*α*,5*α*,8*β*,10*α*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (CM-8)'in ^{13}C NMR (A), DEPT 135 (B) ve DEPT 90 (C) spektrumları ($CDCl_3$, 200 MHz)..... 160

Şekil 4.8c. (4*α*,5*α*,8*β*,10*α*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (CM-8)'in COSY spektrumu (DMSO-d_6, 500 MHz)..... 161

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.8d. (4*α*,5*α*,8*β*,10*α*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (CM-8)'in HSQC spektrumu (DMSO-d_6) 162

Şekil 4.8e. (4*α*,5*α*,8*β*,10*α*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (CM-8)'in HMBC spektrumu (DMSO-d_6) 163

Şekil 4.8f. (4*α*,5*α*,8*β*,10*α*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (CM-8)'in NOESY spektrumu (DMSO-d_6, 500 MHz) 164

Şekil 4.8g. (4*α*,5*α*,8*β*,10*α*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (CM-8)'in NOESY spektrumu ($CDCl_3$, 800 MHz)..... 165

Şekil 4.8h. (4*α*,5*α*,8*β*,10*α*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (CM-8)'de COSY korelasyonları (DMSO-d_6) 154

Şekil 4.8i. (4*α*,5*α*,8*β*,10*α*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (CM-8)'de önemli uzak mesafe HMBC korelasyonları (DMSO-d_6)..... 155

Şekil 4.8j. (4*α*,5*α*,8*β*,10*α*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (CM-8)'de önemli NOESY korelasyonları (A: $CDCl_3$, B: DMSO-d_6)..... 155

Şekil 4.9a. *β*-sitosterol-3-O-*β*-D-glukopiranozit (CM-9a) ve Stigmasterol 3-O-*β*-D-glukopiranozit (CM-9b) karışımının (CM-9) ^{1}H NMR spektrumu ($CDCl_3$+ CD_3OD, 600 MHz) (*: CM-9b'ye ait sinyaller)..... 171

Şekil 4.9b. *β*-sitosterol-3-O-*β*-D-glukopiranozit (CM-9a) ve Stigmasterol 3-O-*β*-D-glukopiranozit (CM-9b) karışımının (CM-9) ^{13}C NMR (A), DEPT 135 (B) ve DEPT 90 (C) spektrumları ($CDCl_3$+ CD_3OD, 125 MHz) (*: CM-9b'ye ait sinyaller) 172

Şekil 4.9c. *β*-sitosterol-3-O-*β*-D-glukopiranozit (CM-9a) ve Stigmasterol 3-O-*β*-D-glukopiranozit (CM-9b) karışımının (CM-9) COSY spektrumu ($CDCl_3$+ CD_3OD, 600 MHz) (*: CM-9b'ye ait sinyaller) 173

Şekil 4.9d. *β*-sitosterol-3-O-*β*-D-glukopiranozit (CM-9a) ve Stigmasterol 3-O-*β*-D-glukopiranozit (CM-9b) karışımının (CM-9) HSQC spektrumu ($CDCl_3$+ CD_3OD) (*: CM-9b'ye ait sinyaller)..... 174

Şekil 4.9e. *β*-sitosterol-3-O-*β*-D-glukopiranozit (CM-9a) ve Stigmasterol 3-O-*β*-D-glukopiranozit (CM-9b) karışımının (CM-9) HMBC spektrumu ($CDCl_3$+ CD_3OD) (*: CM-9b'ye ait sinyaller)..... 175

Şekil 4.10a. Pinorezinol (CM-10)'un ^{1}H NMR spektrumu ($CDCl_3$, 800 MHz) 180

Şekil 4.10b. Pinorezinol (CM-10)'un ^{13}C NMR (A), DEPT 135 (B) ve DEPT 90 (C) spektrumları ($CDCl_3$, 200 MHz)..... 181

Şekil 4.10c. Pinorezinol (CM-10)'un COSY spektrumu ($CDCl_3$, 800 MHz) 182

Şekil 4.10d. Pinorezinol (CM-10)'un HSQC spektrumu ($CDCl_3$) 183

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.10e. Pinorezinol (CM-10)'un HMBC spektrumu ($CDCl_3$)..... 184

Şekil 4.10f. Pinorezinol (CM-10)'de COSY korelasyonları..... 177

Şekil 4.10g. Pinorezinol (CM-10)'de uzak mesafe HMBC korelasyonları..... 178

Şekil 4.11a. Krizosplenol C (CM-11)'in ^{1}H NMR spektrumu ($CDCl_3$, 400 MHz)..... 189

Şekil 4.11b. Krizosplenol C (CM-11)'in APT spektrumu ($CDCl_3$, 100 MHz)..... 190

Şekil 4.11c. Krizosplenol C (CM-11)'in COSY spektrumu ($CDCl_3$, 600 MHz)..... 191

Şekil 4.11d. Krizosplenol C (CM-11)'in HSQC spektrumu ($CDCl_3$)..... 192

Şekil 4.11e. Krizosplenol C (CM-11)'in HMBC spektrumu ($CDCl_3$)..... 193

Şekil 4.11f. Krizosplenol C (CM-11)'in NOESY spektrumu ($CDCl_3$, 600 MHz)..... 194

Şekil 4.11g. Krizosplenol C (CM-11)'de uzak mesafe HMBC korelasyonları..... 187

Şekil 4.11h. Krizosplenol C (CM-11)'de NOESY korelasyonları..... 187

Şekil 4.12a. Ψ-Taraksasterol-asetat (CM-12a) ve Taraksasterol-asetat (CM-12b) karışımının (CM-12) ^{1}H NMR spektrumu ($CDCl_3$, 400 MHz) (*: CM-12b'ye ait sinyaller)..... 203

Şekil 4.12b. Ψ-Taraksasterol-asetat (CM-12a) ve Taraksasterol-asetat (CM-12b) karışımının (CM-12) APT spektrumu ($CDCl_3$, 100 MHz) (*: CM-12b'ye ait sinyaller)..... 204

Şekil 4.12c. Ψ-Taraksasterol-asetat (CM-12a) ve Taraksasterol-asetat (CM-12b) karışımının (CM-12) COSY spektrumu ($CDCl_3$, 400 MHz) (*: CM-12b'ye ait sinyaller)..... 205

Şekil 4.12d. Ψ-Taraksasterol-asetat (CM-12a) ve Taraksasterol-asetat (CM-12b) karışımının (CM-12) HSQC spektrumu ($CDCl_3$) (*: CM-12b'ye ait sinyaller)..... 206

Şekil 4.12e. Ψ-Taraksasterol-asetat (CM-12a) ve Taraksasterol-asetat (CM-12b) karışımının (CM-12) HMBC spektrumu ($CDCl_3$) (*: CM-12b'ye ait sinyaller)..... 207

Şekil 4.12f. Ψ-Taraksasterol-asetat (CM-12a)'da uzak mesafe HMBC korelasyonları..... 200

Şekil 4.13a. Ψ-Taraksasterol (CM-13a) ve Taraksasterol (CM-13b) karışımının (CM-13) ^{1}H NMR spektrumu (Aseton-d_6, 600 MHz) (*: CM-13b'ye ait sinyaller)..... 208

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.13b. Ψ-Taraksasterol (CM-13a) ve Taraksasterol (CM-13b) karışımının (CM-13) APT spektrumu (Aseton-d_6,100 MHz) (*: CM-13b'ye ait sinyaller) 209

Şekil 4.13c. Ψ-Taraksasterol (CM-13a) ve Taraksasterol (CM-13b) karışımının (CM-13) COSY spektrumu (Aseton-d_6, 600 MHz) (*: CM-13b'ye ait sinyaller) 210

Şekil 4.13d. Ψ-Taraksasterol (CM-13a) ve Taraksasterol (CM-13b) karışımının (CM-13) HSQC spektrumu (Aseton-d_6) (*: CM-13b'ye ait sinyaller)..... 211

Şekil 4.13e. Ψ-Taraksasterol (CM-13a) ve Taraksasterol (CM-13b) karışımının (CM-13) HMBC spektrumu (Aseton-d_6) (*: CM-13b'ye ait sinyaller) 212

Şekil 4.13f. Ψ-Taraksasterol (CM-13a)'da uzak mesafe HMBC korelasyonları 198

Şekil 4.14. *Chrysophthalmum* türlerinden elde edilen ham metanol ekstreleri ve alt ekstrelerin SRB yöntemiyle tespit edilen sitotoksik aktiviteleri..... 213

Şekil 4.15. *C. montanum*'un ham metanol ekstresi ve alt ekstrelerinin SRB yöntemiyle tespit edilen sitotoksik aktiviteleri 214

Şekil 4.16. *C. gueneri'nin* ham metanol ekstresi ve alt ekstrelerinin SRB yöntemiyle tespit edilen sitotoksik aktiviteleri 215

Şekil 4.17. *C. dichotomum*'un ham metanol ekstresi ve alt ekstrelerinin SRB yöntemiyle tespit edilen sitotoksik aktiviteleri 216

Şekil 4.18. *C. montanum* kloroform ekstresinden elde edilen fraksiyonların (Fr. A-H) SRB yöntemiyle tespit edilen sitotoksik aktiviteleri..... 219

Şekil 4.19. *C. montanum*'un kloroform ekstresinden izole edilen bileşiklerin SRB yöntemiyle tespit edilen sitotoksik aktiviteleri 221

Şekil 5.1. Gayanolid yapıları 234

Şekil 5.2. 8,12-*cis* / *trans*-gayanolid yapıları..... 235

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 2.1. *C. montanum* (DC.) Boiss.'un genel görünüşü, Malatya-Akçadağ (Foto: *Hayri Duman*)..... 5

Resim 2.2. *C. dichotomum* Boiss. & Heldr.'un genel görünüşü (A) ve tek çiçek (B), Konya-Tınaztepe mağarası (Foto: *Barış Bani*)..... 9

Resim 2.3. *C. dichotomum* Boiss. & Heldr.'un habitatı, Konya-Tınaztepe mağarası (Foto: *Barış Bani*)..... 9

Resim 2.4. *C. gueneri* Aytac and Anderb.'nin genel görünüşü ve tek çiçek (A) ve taban yaprakları (B), Antalya-Cirlasun köprüsü civarı (Foto: *Barış Bani*).. 12

Resim 2.5. *C. gueneri* Aytac and Anderb.'nin genel görünüşü (A ve B), Antalya-Elmasu mevkii (Foto: *Fatma Ayaz*)..... 12

Resim 2.6. *C. gueneri* Aytac and Anderb.'nin habitatı (A) Antalya-Cirlasun köprüsü civarı (Foto: *Barış Bani*), (B) Antalya-Elmalısu mevkii (Foto: *Fatma Ayaz*)..... 12

Resim 3.1. A: *C. montanum*, Malatya (Foto: *Hayri Duman*); B: *C. gueneri*, Antalya (Foto: *Barış Bani*); C: *C. dichotomum*, Konya (Foto: *Barış Bani*) 26

Resim 3.2. Silika jel kolon kromatografisi (A, B) 29

Resim 3.3. Sephadex kolon kromatografisi (A, B)..... 30

Resim 3.4. Prep. İTK ve gooch hunisi ile vakum altında süzme (A, B)..... 31

Resim 3.5. Prep. YPSK Cihazı (Karachi Üniversitesi, HPLC Laboratuvarı)..... 32

HARİTALARIN LİSTESİ

Harita **Sayfa**

Harita 2.1. *C. montanum* (DC.) Boiss.'un ülkemizdeki yayılışı..... 5

Harita 2.2. *C. dichotomum* Boiss. & Heldr.'un ülkemizdeki yayılışı..... 9

Harita 2.3. *C. gueneri* Aytac and Anderb.'nin ülkemizdeki yayılışı..... 13

Harita 3.1. *Chrysophthalmum* örneklerinin toplandığı lokaliteler..... 26

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
°C	Santigrad derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
C_5D_5N	Dötero piridin
CD_3OD	Dötero metanol
$CDCl_3$	Dötero kloroform
CH_3OH	Metanol
$CHCl_3$	Kloroform
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
H_2SO_4	Sülfürik asit
Hz	Hertz
KBr	Potasyum bromür
kg	Kilogram
L	Litre
mg	Miligram
MHz	Megahertz
mL	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
ppm	Milyonda bir birim

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
2D NMR	2 Dimensional Nuclear Magnetic Resonance
ANK	Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryumu
APT	The Attached Proton Test
Aseton-d_6	Dötero aseton
ATCC	American Type Culture Correlation
br*d*	Broad doublet
br*dd*	Broad doublet of doublets
br*s*	Broad singlet
CD	*Chrysophthalmum dichotomum*
CG	*Chrysophthalmum gueneri*
CM	*Chrysophthalmum montanum*
COSY	Correlated spectroscopy
d	Doublet
DCM	Diklorometan
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarizaton Transfer
DMAPP	Dimetil alil pirofosfat
DMSO	Dimetilsülfoksit
DMSO-d_6	Dötero dimetilsülfoksit
dq	Doublet of quartets
EI-MS	Electron Impact Mass Spectrometry
ESI-MS	Electron Spray Ionization Mass Spectrometry
EtOAc	Etil asetat
FBS	Fetal bovine serum
FPP	Farnesil pirofosfat
Fr.	Fraksiyon
GAZI	Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryumu
GGPP	Geranil geranil pirofosfat
GPP	Geranil pirofosfat
GSH	Glutatyon (gamma-glutamyl-cysteinyl-glycine)
GUE	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu
HBSS^{++}	Hanks Balanced Salt Solution-
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
HREI-MS	High Resolution Electron Impact Mass Spectrometry
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Cohorence
HUB	Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryumu
IC_{50}	%50 inhibisyon gösteren doz
IPP	İzopentenil pirofosfat
IR	Infrared
i.p.	İntraperitoneal
İTK	İnce tabaka kromatografisi
J	Etkileşim sabiti
KK	Kolon kromatografisi
m	Multiplet
Me	Metil
MeOH	Metanol
MTT	3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromid
***n*-BuOH**	*n*-Butanol
NCI	National Cancer Institute (Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
PMN	Polimorfonükleer nötrofiller
Prep. İTK	Preparatif ince tabaka kromatografisi
Prep. YPSK	Preparatif yüksek performanslı sıvı kromatografisi
R-H_2O	Kalan su fazı
ROS	Reaktif oksijen türleri
s	Singlet
SL	Seskiterpen lakton
SRB	Sulforhodamin B
t	Triplet
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

Asteraceae familyası 1600 üzerinde cinse ait 23000'den fazla tür ile dünya üzerinde geniş yayılışa sahip, zengin kimyasal bileşimi ile geniş oranda kullanılan tıbbi bitkilerin bulunduğu çiçekli bitkilerin en büyük familyasıdır (Heywood, Harborne and Turner, 1977; Jeffrey, 2007). Asteraceae bitkileri, seskiterpen laktonlar (SL), pentasiklik triterpenler ve diterpen alkoller başta olmak üzere, yağ asidi türevi asetilenik bileşikler ve flavonoitlerce zengin kaynaklardır (Hegnauer, 1977; Zhang, Won, Ong ve Shen, 2005). Etnobotanik kayıtlara göre, pek çok Asteraceae bitkisinin kansere karşı kullanıldığı görülmektedir (Graham, Quinn, Fabricant ve Farnsworth, 2000). Bazı Asteraceae bitkilerinin sitotoksik ve antienflamatuvar aktiviteleri başta olmak üzere, antimikrobiyal, antioksidan ve leishmanisidal aktivitelere sahip olduğu tespit edilmiştir (Bessada, Barreira ve Oliveira, 2015; Rocha ve diğerleri, 2005; Salie, Eagles ve Leng, 1996; Seaman, 1982).

Bugüne kadar *Inula, Tanacetum, Centaurea, Cichorium, Helenium, Artemisia, Anthemis, Achillea, Erigeron* ve *Xanthium* başta olmak üzere pekçok Asteraceae familyasına ait türler sitotoksik etkileri bakımından araştırılmıştır. Yapılan araştırmalar ile etkiden sorumlu başlıca bileşikler "seskiterpen laktonlar" ve "flavonoitler" olarak tespit edilmiştir (Koukoulitsa, Skaltsa, Karioti, Demetzos ve Dimas, 2002; Loizzo ve diğerleri, 2004; Pan ve diğerleri, 2010; Rodriguez, Towers ve Mitchell, 1976; Zheng, 1994). Bunun yanında, izole edilen "asetilen türevi bileşikler" (Pellati ve diğerleri, 2006; Stavri ve diğerleri, 2005), "triterpenler" (Calabria ve diğerleri, 2008; Ukiya ve diğerleri, 2006) ve "lignanlar" (Matsumoto, Hosono-Nishiyama ve Yamada, 2006) da belirgin sitotoksik etki göstermiştir. Bu bitkilerden izole edilen bazı sitotoksik bileşikler (artemisininoidler, partenolidler, tapsigargin ve silibinin) üzerinde klinik çalışmalar sürdürülürken, bazı bileşikler de (öpatoriopikrin, helenanolidler ve ksantanolidler) klinik çalışmalar için aday olarak seçilmiştir (Ghantous, Gali-Muhtasib, Vuorela, Saliba ve Darwiche, 2010; Modzelewska, Sur, Kumar ve Khan, 2005; Patel, Shukla ve Gupta, 2007; Ramasamy ve Agarwal 2008; Zhang, Won, Ong ve Shen, 2005).

Asteraceae familyasından Inuleae tribusunda bulunan *Chrysophthalmum* Schultz Bip. cinsi, dünyada 4 türle temsil edilmekte olup, Türkiye, İran, Irak ve Suriye'de yayılış göstermektedir. Ülkemizde, *C. montanum* (DC.) Boiss., *C. dichotomum* Boiss. & Heldr. ve *C. gueneri* Aytac and Anderb. olmak üzere 3 türü yetişmektedir. *C. montanum* Güneydoğu

ve Doğu Anadolu Bölgesi'nde geniş yayılış göstermekte iken; *C. dichotomum* ve *C. gueneri* ülkemiz için endemik olup oldukça dar yayılışlı bitkilerdir (Aytac ve Anderberg, 2001; Grierson, 1975; internet; Rechinger, 1980).

Chrysophthalmum cinsi üzerine yapılan sınırlı sayıdaki biyolojik aktivite ve fitokimyasal çalışmaların sadece *C. montanum* üzerinde olduğu görülmektedir. Değişik bitki türlerinin *in vitro* asetilkolinesteraz enzimi üzerine inhibitör etkileri ve antimikrobiyal aktiviteleri yönünden test edildiği iki çalışmada, *C. montanum* ekstreleri de araştırılmıştır (Kirbağ, Zengin ve Kursat, 2009; Ozdemir, Turkoglu ve Demir, 2013). *C. montanum* üzerine son yıllarda yapılmış bir fitokimyasal çalışmada ise, bitkiden seskiterpen türevi bileşikler izole edilmiştir (Gürbüz, Dogan, Pasayeva ve Paksoy, 2016). Yapılan literatür incelemesine göre, *Chrysophthalmum* cinsi üzerinde yalnızca tek tür ile ilgili etnobotanik veriye ulaşılmıştır. *C. montanum*'un soğuk algınlığında ve nezlede akıntıyı gidermek, solunumu rahatlatmak ve yara iyi edici amaçla halk arasında kullanıldığı bildirilmiştir (Arasan ve Kaya, 2015; Özkan ve Koyuncu, 2005; Yeşil ve Akalın, 2009).

Ülkemizde yetişen *Chrysophthalmum* türleri üzerinde fitokimyasal ve biyolojik aktivite bakımından yapılan kapsamlı bir çalışmanın olmaması nedeniyle, bu türlerin farmakognozik açıdan incelenmesi planlanmıştır. Çalışmamızda, üç *Chrysophthalmum* türünün sitotoksik, antienflamatuvar ve leishmanisidal aktiviteleri bakımından biyoaktivite ile yönlendirilen fraksiyonlama ile incelenmesi ve *C. montanum*'un aktif bulunan fraksiyonlarından etkiden sorumlu olabilecek bileşiklerin izolasyonları ve yapılarının tayin edilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Botanik Bilgiler

2.1.1. Asteraceae familyası

Genellikle otsu veya çalımsı, nadiren de ağaç veya tırmanıcı formda. Yapraklar alternan ya da opozit dizilişli veya hepsi tabanda. Çiçek durumu kapitulum, kapitulum 1 veya çok serili involukrum ile çevrili. Çiçekler erdişi ya da tek eşeyli, aktinomorf veya zigomorf simetrili. Kaliks genellikle papus, halka ve pul biçiminde veya körelmiş. Korolla 5 parçalı, simpetal, tüpsü ya da dilsi. Stamenler 5 adet, anterler birleşik, filamentler serbest. Ovaryum alt durumlu, iki karpelden meydana gelmiş, tek ovüllü. Meyve tipi aken (Baytop, 1996; Grierson 1975).

Asteraceae (Compositae) familyası, Türkiye florasında 137 cins, 485'i endemik olmak üzere 1311 türle temsil edilmektedir (Güner, Aslan, Ekim, Vural ve Babaç, 2012; Güner ve Ekim, 2014).

2.1.2. *Chrysophthalmum* Schultz Bip. cinsi

Çok yıllık, dallanmış, otsu bitkiler, kök belirgin odunsu veya zayıf ipliksidir. Yapraklar basit, alternan dizilişli. Kapitulum homogam (kapitulumdaki bütün çiçekler aynı eşeyde) ve diskoit (kapitulumdaki bütün çiçekler tüpsü ve aynı şekil ve boyda) veya heterogam (kapitulumdaki çiçekler farklı eşeyden) ve diskiform (kapitulumun merkez çiçekleri tüpsü, kenardakiler ipliksi ve merkez çiçekler ile aynı boyda veya daha kısa), küçük, dal uçlarında tek başına. İnvolukrum kampanulat veya hemisferik; fillariler birçok seri halinde, hemen hemen eşit boyda, dıştaki fillariler otsu. Reseptakulum konveks, dar palealı. Çiçekler sarı, dişi çiçek (varsa) tüpsü, 2-3 dişli, hermafrodit çiçekler 5 dişli, akenler köşeli veya yarı silindirik, 3-5 damarlı, papus yok veya kısa, serbest ve kıl şeklinde (Grierson, 1975).

Chrysophthalmum Schultz Bip. cinsi, Inuleae tribusuna ait, dünyada 4 türle temsil edilen Türkiye, İran, Irak ve Suriye'de yayılış gösteren bir cinstir. Dünyada yayılış gösteren türleri; *C. montanum* (DC.) Boiss., *C. dichotomum* Boiss. & Heldr., *C. gueneri* Aytac and Anderb. ve *C. leptocladum* Rech.f.'dur (Aytac ve Anderberg, 2001; Grierson, 1975;

internet; Rechinger, 1980). Ülkemizde ise "tutça" Türkçe adıyla isimlendirilen *Chrysophthalmum* cinsi, *C. montanum* (tutça), *C. dichotomum* (çatal tutça) ve *C. gueneri* (gevne tutçası) olmak üzere 3 türle temsil edilmektedir. Bu türlerden *C. dichotomum* ve *C. gueneri* ülkemiz için endemik ve oldukça dar yayılışlı bitkilerdir (Aytac ve Anderberg, 2001; Grierson, 1975; Güner, Aslan, Ekim, Vural ve Babaç, 2012).

Chrysophthalmum cinsine ait tayin anahtarı aşağıda verilmiştir (Aytac ve Anderberg, 2001):

1. Kapitulum heterogam, diskiform. Dıştaki çiçekler dişi, içtekiler ise hermafrodit. Tabandaki genç yapraklar ipeksi tüylü. Papus küçük, pulsu, kıl şeklinde……..…….....…*C. montanum*

1. Kapitulum homogam, diskoit. Tüm çiçekler hermafrodit. Tabandaki genç yapraklar sık tüylü ama ipeksi değil. Papus yok……..…….……2

2. Pedunkul kapitulum altında bariz kalınlaşmış. Yapraklar eliptik-oblanseolat ……..*C. dichotomum*

2. Pedunkul ince, kapitulum altında kalınlaşmamış. Yapraklar linear-lanseolat …….....*C. gueneri*

Chrysophthalmum montanum (DC.) Boiss.

Syn: *Ceruana montana* DC. Prodr. 7:287 (1838); *Chrysophthalmum sternutatorium* Schultz Bip. ex Boiss. Fl. Or. 3: 182 (1875).

Gövde 20-40 cm uzunluğunda, az veya çok sık ve ipeksi kısa yumuşak tüylü. Yapraklar 4-10 x 0.4-1.8 cm, eliptik veya oblanseolat, sivri uçlu, atenuat, tabanda hafif saplı, tam kenarlı, az veya çok belirgin damarlı, hafifçe glandular ve özellikle genç taban yaprakları sık ipeksi tüylü. İnvolukrum 0.75-1 cm çapında; fillariler linear-lanseolat, 3-4.5 x 0.75-1 cm, yatık kısa yumuşak tüylü ve glandular. Palea linear, yaklaşık 4 x 0.25 mm. Dişi çiçekler az sayıda, korolla yaklaşık 4 mm. Hermafrodit çiçeklerde korolla 4.5-5 mm. Akenler 2 mm, koyu kahverengi, tüysüz, nispeten parlak. Papus beyaz, yaklaşık 0.4 mm

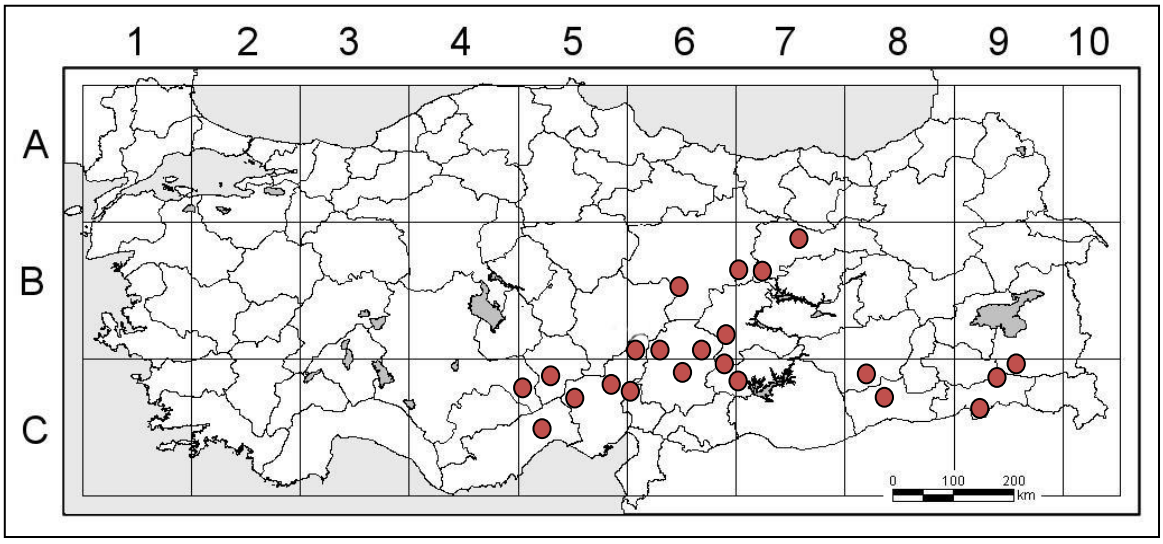
(Resim 2.1). İran-Turan elementi. Çiçeklenme: Temmuz- Eylül ayları arasında (Grierson, 1975).

Yayılış: Dünyada Kuzey Irak, Suriye ve Türkiye'de yayılış gösteren tür, ülkemizde Güneydoğu ve Doğu Anadolu Bölgesinde geniş yayılış göstermektedir (Harita 2.1, Çizelge 2.1) (Aytac ve Anderberg, 2001; Grierson, 1975).

Habitat: Kaya çatlakları ve kireçli dik kayalarda, 750-2200 m arasındaki yüksekliklerde yetişir (Grierson, 1975).



Resim 2.1. *C. montanum* (DC.) Boiss.'un genel görünüşü, Malatya-Akçadağ (Foto: *Hayri Duman*)



Harita 2.1. *C. montanum* (DC.) Boiss.'un ülkemizdeki yayılışı

Çizelge 2.1. *C. montanum* (DC.) Boiss.'a ait herbaryum örnekleri

Şehir	**Lokalite**
B5 Kayseri	Yahyalı, Çamlıca (Faraşa) köyü yolu üzeri, kaya çatlağı, 980 m, 04.07.2003 (A. Duran 6264) (GAZI) ! (HUB) !
B6 Adana	Saimbeyli-Obruk yaylası, kaya üzeri, 1100 m, 22.06.2008 (B. Bani 6170) (GAZI) !
B6 Kahramanmaraş	Göksun-Değirmendere-Koruyaz dağı, Meryemçil mevkii, taşlık arazi, 1800-1900 m, 19.08.1993, (M. Ekici 1641) (GAZI) ! Elbistan, Ca:1400 m, (P.H. Davis, A. Çetik 20437) (ANK) ! Elbistan, 1400 m, (Davis 20437b) (Grierson, 1975)
B6 Kayseri	Sarız, Yolak, Binboğa Dağı, kaya üzeri, 1500-1700 m, 04.08.1991, (H. Duman & Z. Aytaç 4338) (HUB) !
B6 Malatya	Doğanşehir, Eskiköy, 1900-2000 m, (Pesmen 2290) (Grierson, 1975) Doğan şehir: Eskiköy, Çobanderesi-İhtiyar mağarası arası, *Juniperus excelsa, Quercus* orman kalıntısı, 1600-1800 m, 25.08.1971, (H. Peşmen 2663) (HUB) ! Akçadağ yolu, 04.06.1968, (A. Pamukoğlu-Quezel) (HUB) ! Akçadağ, Tohma nehri vadisi, kaya üzeri, 810m, 10.07.2014, *H. Duman* (H. Duman 10324) (GAZI) !
B7 Erzincan	Kemaliye, 09.07.1982 (M. Koyuncu 10505) (GAZI) ! (HUB) ! Eğin (Kemaliye), Kemergoep (Gemergop), Sint. 1890:2597 (Grierson, 1975) 27.07.1990 (Şahabetiin Elçi) (GAZI) !
B7 Tunceli	Ovacık, Munzur Dağları, Kırkgözelen, 1300-1650 m, 27.07.1979, (Ş. Yıldırımlı 2199) (HUB) !
B7 Sivas	Divriği, Kalenin karşısı, kayalık yamaçlar, bozkır, 08.09.1994 (Ali A. Dönmez 4290-Zafer Yeşilyurt) (GAZI) ! Divriği, Kalenin karşısı, kayalık yamaçlar, bozkır, 08.09.1994, (Ali A. Dönmez 4290) HUB !
B9 Van	Artos dağı Gevaş ca. 2134 m, 14.7.1954, (P.H. Davis, O. Polumni 22691) (ANK) ! Bahçesaray- Serekani, ca. 1800 m, çayırlık, 30.07.1990, (A. Güner 7861)-E. Gündüz (HUB) !
C4 Adana	Artos Dağı, Gevaş'ın yukarısı, 2135 m, (Davis 22691) (Grierson, 1975)

Çizelge 2.1. (devam) *C. montanum* (DC.) Boiss.'a ait herbaryum örnekleri

C5 İçel	Pozantı-Ulukışla 10. km, kayalıklar, ca. 750 m, 24.06.1993 (Z.Aytaç 5878, A. Dönmez, H. Şağban) (GAZI) ! Aslanköy-İçel arası, 19.06.1970 (A. Pamukoğlu 38) (HUB) !
C5 Niğde	Maden'in doğusu, 1524 m, (Darrah 494) (Grierson, 1975) Ulukışla, Çiftehan, Horoz köyü, bahçelikler, 1200-1350 m, 30.07.1984, (Ş. Yıldırımlı 7098) (HUB) !
C5 Konya	Ereğli, Büyükdere köyü üzeri, 1300 m, 20.07.1995, (Z. Aytaç 7166, N. Adıgüzel) (GAZI) !
C5 Adana	Pozantı-Demirkazık yolu, 3 km 1300 m, 18.07.1995 (Z. Aytaç 7095, N. Adıgüzel) (GAZI)! Feke, Süphandere-Belanköy, ca. 900 m, (P.H. Davis, 19545) (ANK) ! Aslanköy yakınlarındaki kalker kayalarda ca. 1500 m, 1970, (P. Quirel ve ark.) (ANK) !
C6 Adana	Düldül Dağı Başkonuş yaylası, Hüseyin oluk çeşme, yükseklik, 20.08.1949 (ANK) ! Dülgül Dağı, Haruniye yakınları, 1525-2135 m, (Haradjian 2333) (Grierson, 1975)
C6 Kahramanmaraş	Engizek Dağı, Aksu Çayı kaynak yeri, kaya üzeri, 1300 m, 20.06.1987 (H. Duman 3451) (GAZI) ! Çağlayan Cerit, Öksüz dağı, Akdut mevkii, kuzey yamaçlar, 1100-1250 m, 04.07.1991 (H. Duman, Z. Aytaç Aytaç 3906) (GAZI) ! Süleymanlı, Kurudağ, 1000-1200 m, 10.09.1981 (B. Yıldız 3298) (HUB) ! Ahır Dağı, 1830-2135 m, (Haradjian 1636) (Grierson, 1975)
C6/7 Malatya	74 km güneybatısı, 1550 m, Sorger-71-45-9 (Grierson, 1975) Doğanşehir, Erkenek, Boğaz-Tünel mevkii arası, Köprü çevresi, yol kenarı yamaçlar, 1300 m, 15.07.1987, (E. Aktoklu 0839) (HUB) !
C7 Adıyaman	Kahta, Sincik çevresi, kayalık yamaçlar, 1380 m, *Quercus-Paliurus* çalılığı, kalker, 28.07.1995, (Ali A. Dönmez 4767) (HUB) !
C8 Siirt	Siirt-Eruh yeni yolu, Botan çayına 500 m kala, taşlık yamaç, 560 m, 10.06.2009 (S. Aslan 3862) (GAZI) ! Mar Goria, 750 m, Nabelek 3918 (Grierson, 1975)

Çizelge 2.1. (devam) *C. montanum* (DC.) Boiss.'a ait herbaryum örnekleri

C8 Mardin	Deyrulzafaran, 1888, (Sintenis 1091) (Grierson, 1975) Mardin-Diyarbakır arası, Sultanköy çevresi, 1050-1150 m, Seyrek meşelik, Kalker arazi, 16.06.1985 (A. Güner 6477)-E. Gündüz (HUB) !
C9 Mardin	Silopi, Cudi Dağ'ının güney etekleri, 900 m, (Davis 42771) (Grierson, 1975)
C9 Van	Çatak, Urganlı köyü kuzeyi, kaya üzeri, 1500-1700 m, 05.07.2003, (B. Bani 2064) (GAZI) !

ANK: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryumu
GAZI: Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryumu
HUB: Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryumu
! Tarafımızdan incelenmiş herbaryum örnekleri

Chrysophthalmum dichotomum Boiss. & Heldr.

Gövde 15-35 cm uzunluğunda, üst kısımda divarikat dallanmış, beyazımsı kısa yumuşak tüylü ve hafifçe glandular. Yapraklar eliptik-oblanseolat, sivri uçlu, tam kenarlı, her iki yüzeyde de kısa yumuşak tüylü ve glandular; taban yapraklar 3-10 x 0.6-1 cm, atenuat, kısa saplı, tabanda sık yumuşak tüylü; gövde yaprakları sapsız, 2-4.5-0.5-1.25 cm. Pedunkul 3-10 cm uzunluğunda, olgunlukta kalınlaşır. İnvolukrum 1-1.25 cm çapında; dıştaki fillariler yapraklı, oblanseolat veya spatül şeklinde, 6-10 x 2-3 mm; içteki fillariler linear, akuminat, 4-6 x 0.3-0.5 mm, kıkırdaksı, genelde uçları otsu, beyazımsı- kısa yumuşak tüylü ve glandular. Palea linear-setalı, 3.5-4 mm, glandular. Çiçeklerin tümü hermafrodit, korolla 3-3.5 mm, glandular. Akenler soluk kahverengi, yaklaşık 1.5 mm, özellikle tepesine yakın hafifçe kısa yumuşak tüylü,. Papus yok (Resim 2.2). Endemik, Akdeniz elementi. Çiçeklenme: Temmuz-Ağustos aylarında (Grierson, 1975).

Yayılış: Antalya (Manavgat-Akseki, Alanya), Konya ve Isparta'nın Antalya'ya yakın bölgelerinde yayılış gösterir (Harita 2.2, Çizelge 2.2) (Grierson, 1975).

Habitat: Ormanlık veya çalımsı vadi yataklarında, 450-1525 m arasındaki yüksekliklerde yetişir (Resim 2.3) (Grierson, 1975).



A

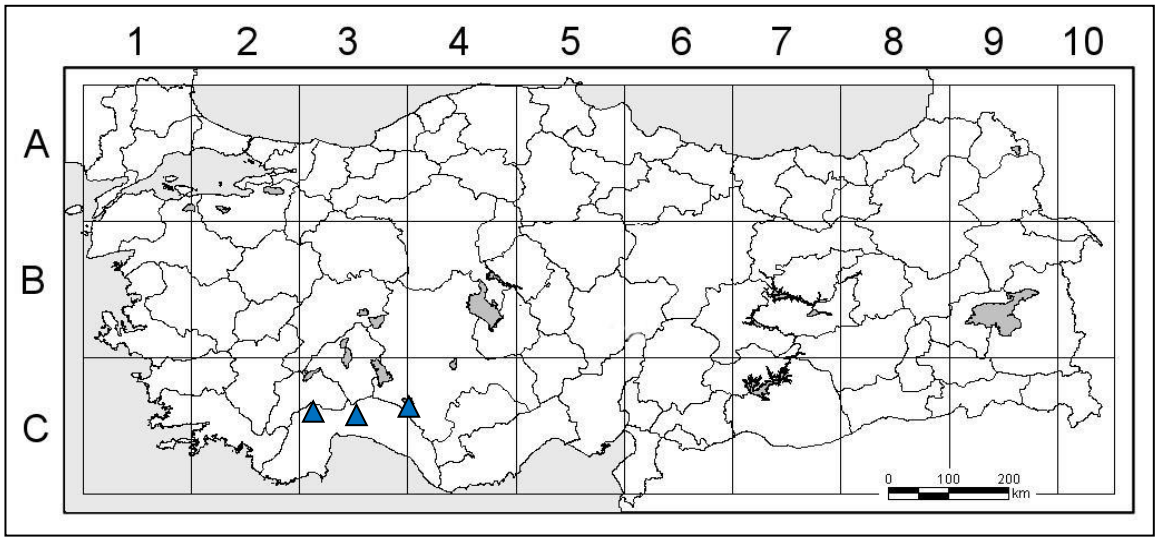


B

Resim 2.2. *C. dichotomum* Boiss. & Heldr.'un genel görünüşü (A) ve tek çiçek (B), Konya-Tınaztepe mağarası (Foto: *Barış Bani*)



Resim 2.3. *C. dichotomum* Boiss. & Heldr.'un habitatı, Konya-Tınaztepe mağarası (Foto: *Barış Bani*)



Harita 2.2. *C. dichotomum* Boiss. & Heldr.'un ülkemizdeki yayılışı

Çizelge 2.2. *C. dichotomum* Boiss. & Heldr.'a ait herbaryum örnekleri

Şehir	**Lokalite**
C3 Antalya	Serik, Belek, s.l. 1986 (A. İnce) (GAZI) ! Manavgat, Petrokent tatil köyü kumulu, ca. 10 m, 31.07.1994, (T. Ekici 9410) (GAZI) ! Serik, Belek, deniz kıyısı kumulu, 0-5 m, 25.06.1993, (H. Duman & F. Kahvelioğulları 4925) (GAZI) ! Kemer- Kesme boğazı, Tahtalı dağ, Kazdere 12.08.1947, (P.H. Davis 14058) (ANK) ! Kargı çayı ve Belister arasında, 1100 m 22.08.1947, (P.H. Davis 14237) (ANK) ! Akseki, 460 m, 06.1845, (Heldreich) (Grierson, 1975) Kemer yakınları, 14.08.1947, (Huber-Morat 17346) (Grierson, 1975)
C3 Isparta	Eğridir, Anamas, Yaka köyü, Kapız deresi, kalkerli sarp ve derin vadi, 1250-1450 m, 5.08.1974 (A. Güner 1838) (HUB) !
C4 Antalya	Gazipaşa, Sugözü köyü, Maha yaylası, korunmuş alan, 1450 m, 05.08.1983, (H. Sümbül 2379) (ANK) ! (HUB)!
C4 Konya	Akseki-Seydişehir arası, Konya'ya 114 km kala, Tınaztepe mağarası çevresi, Karaçam orman açıklığı, 1500 m, 12.08.2014, (37°14'51.00"K; 31°55'48.00"D) (F.Ayaz 46) (GAZI) !

! Tarafımızdan incelenmiş herbaryum örnekleri

Chrysophthalmum gueneri Aytac and Anderb.

Kısa rizomlu, çok yıllık bitkiler, tabanda soğansı tomurcukları mevcut; soğansı tomurcuklar villus tüylü. Gövde dik, 20-30 cm uzunluğunda, basit veya genellikle üst kısımda divarikat dallanmış, dallar ince-uzun, biraz kıvrık, uzun tüylü ve kısa glandular. Yapraklar alternan, linear-lanseolat, ucu sivri, uzun beyaz tüylerle birlikte ve kısa glandular tüylü, yaşlandıkça tüyler dökülür; yapraklar tabanda daralarak petiole bağlanır veya biraz gövdeyi sarıcı, 7-70 x 3-6 mm, belirgin orta damarlı, yan damarlar oldukça belirsiz veya yok. Yaprak kenarı tam veya birkaç kısa dişli. Bir sonraki sene bitki verecek olan taban yapraklar çoğu zaman rozet şeklinde, ayaları linear-lanseolat ve gövde yapraklarına benzer fakat daha uzun ve geniş. Pedunkul ince-uzun, kapitulum tabanda kalınlaşmaz, 3-10 cm uzunluğunda, uzun beyaz ve kısa glandular tüylü. Kapitulum homogam, diskoit, birkaç küçük dar yaprakla çevrili. Reseptakulum konik, palealı; palea dar linear, dar ve çiçeklerden biraz uzun. İnvolukrum hemisferik, 7-10 x 10 mm; brakteler tüylü, linear, az veya çok kıkırdaksı, çoğu zaman tabanı dar tepesi genişlemiş; dıştaki brakteler 4-6 x 1 mm, içteki brakteler 5-6 x 0.5-0.7 mm, korolla ile eşit boyda veya biraz daha uzun, uç kısmı morumsu. Çiçekler fertil. Korolla 5 loblu, tüpsü, turuncu-sarı, 3-3.5 mm uzunluğunda; korolla lobları glandular. Anterler mahmuzsuz. Stilus iki parçalı, stilus dalları obtus ve sırt tarafı sivri tüylü; stigma kısmı tepede birleşmiş iki şerit halinde. Akenler elips şeklinde, çoğu zaman iğsi, kahverengi, çizgili, kısa tüylü. Papus yok (Resim 2.4, 2.5). Endemik, Akdeniz elementi. Çiçeklenme: Temmuz–Ağustos aylarında (Aytac ve Anderberg, 2001).

Yayılış: Dar bir alanda yayılış göstermektedir. Alanya Cirlasun köprüsü civarı doğal habitatını oluşturmaktadır (Harita 2.3, Çizelge2.3) (Aytac ve Anderberg, 2001).

Habitat: Pinus nigra ormanlarındaki nemli kireçli kaya çatlakları ve kireçli dik kayalarda 1250-1450 m arasındaki yüksekliklerde yetişir (Resim 2.6) (Aytac ve Anderberg, 2001).



A **B**

Resim 2.4. *C. gueneri* Aytac and Anderb.'nin genel görünüşü ve tek çiçek (A) ve taban yaprakları (B), Antalya-Cirlasun köprüsü civarı (Foto: *Barış Bani*)



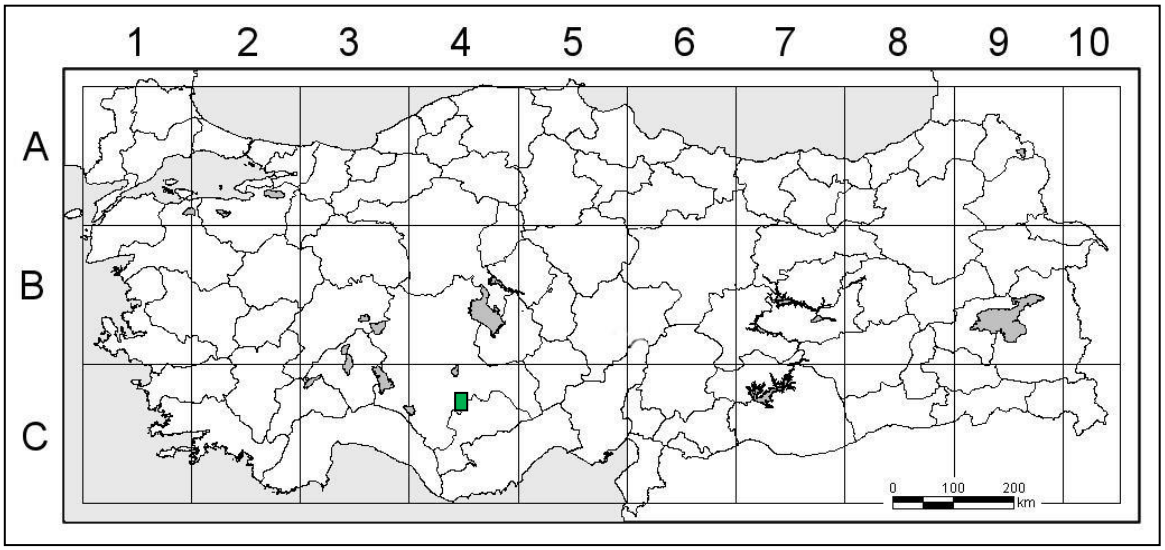
A **B**

Resim 2.5. *C. gueneri* Aytac and Anderb.'nin genel görünüşü (A ve B), Antalya-Elmasu mevkii (Foto: *Fatma Ayaz*)



A **B**

Resim 2.6. *C. gueneri* Aytac and Anderb.'nin habitatı (A) Antalya-Cirlasun köprüsü civarı (Foto: *Barış Bani*), (B) Antalya-Elmalısu mevkii (Foto: *Fatma Ayaz*)



Harita 2.3. *C. gueneri* Aytac and Anderb.'nin ülkemizdeki yayılışı

Çizelge 2.3. *C. gueneri* Aytac and Anderb.'ye ait herbaryum örnekleri

Şehir	**Lokalite**
C4 Konya	Hadim-Alanya, Gevne vadisi, Cirlasun köprüsü, Pinus açıklıkları, (K:36 45 21, N: 32 27 61), 14.07.1998, (A.Güner, Z. Aytaç, T. Ekim, H. Duman, A. Guner 12629, H. Duman 6258) (GAZI) ! Hadim-Alanya, Gevne vadisi, Cirlasun köprüsü, Pinus açıklıkları, (K:36 45 21, N: 32 27 61), 16.08.1999, (H. Duman, Z. Aytaç, Duman 7072) (GAZI) ! Alanya-Hadim yolu, Cirlasun köprüsü mevkii, 1250 m, 10.09.1998, (H.Duman 6258, Z.Aytaç) (GAZI) ! Taşkent-Alanya, Gevne vadisi Cirlasun köprüsü çevresi, *Pinus nigra* orman açıklığı nemli kayalar 1250 m 13.07.1999, (A. Güner 12629) (GAZI) ! Taşkent-Alanya, Gevne vadisi Cirlasun köprüsü çevresi, *Pinus nigra* orman açıklığı nemli kayalar 1250 m 16.07.2000, (Aytaç ve Duman 8021) (GAZI) !
C4 Antalya	Alanya, Gümüş Kavak köyü bahçe içi 300-400 m, 02.07.2007, (B. Bilgili 3401) (GAZI) ! Alanya-Hadim yolu çayırarası cırlavık mevkii, nemli sarp kayalıklar, 1250 m, 10.09.1998, (H. Duman, 6258) (GAZI) ! Taşkent-Alanya, Alanya'ya 40 km kala, Elmalısu mevkii, taşlık yerler, 1330 m, 11.08.2014, (36°34'11.00"K; 32°21'38.00"D), (F. Ayaz 45) (GAZI) ! Taşkent-Alanya, Cirlasun köprüsü civarı, karaçam orman açıklıklarındaki nemli yerler, 1350 m, 11.08.2014, (36°45'38.00"K; 32°27'23.00"D), (F. Ayaz 41) (GAZI) !

! Tarafımızdan incelenmiş herbaryum örnekleri

2.2. *Chrysophthalmum* Türleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar

2.2.1. Anatomik, morfolojik ve filogenetik çalışmalar

Inuleae tribusu üzerine yapılan filogenetik bir çalışmaya göre, *Chrysophthalmum* cinsi palea taşımayan taksonların oluşturduğu geniş monofiletik gruba çok yakın bir cins olarak belirtilmiştir. Inuleae tribusunun *Inula* L., *Pulicaria* Gaertn. ve diğer palea taşımayan cinsleri gibi, *Chrysophthalmum* cinsinde de tabanda akut yaygın tüylü stilus, endotel dokusu radyal kalınlaşmış anterler ve epidermis hücresinin her birinde geniş oksalat kristali bulunan sipselalar vardır (Eldenäs, Anderberg ve Källersjö, 1998). *Chrysophthalmum* cinsi palea bulundurması dışında, morfolojik pek çok karakteri bakımından *Inula* cinsine oldukça benzer olduğundan, bu iki cins kardeş grup olarak kabul edilmiştir (Eldenäs, Anderberg ve Källersjö, 1999).

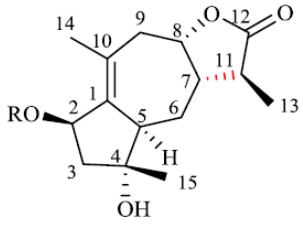
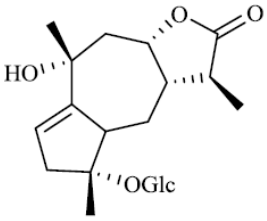
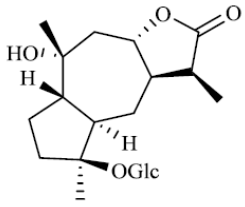
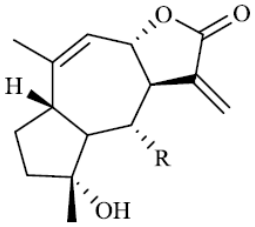
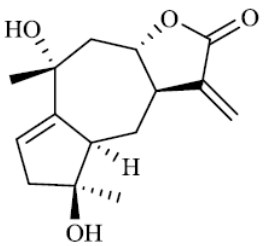
Chrysophthalmum türlerine ait polen morfolojisinin ışık mikroskobu ve SEM yardımıyla incelendiği bir çalışmada, polenlerin şekli, porlu yapısı ve duvar süs yapısı aynı bulunmuş; polenlerin diğer morfolojik karakterlerlerinin birbirinden farklılık gösterdiği bildirilmiştir (Karlıoğlu ve Paksoy, 2012).

Son yıllarda yapılan diğer bir çalışmada, Türkiye'de yetişen *Chrysophthalmum* türleri ışık ve taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscopy-SEM) kullanılarak sipsela ve trikom mikromorfolojisi bakımından incelenmiştir. Ayrıca gövde ve yaprakları enine ve yüzeysel kesitler alınarak anatomik olarak karşılaştırılmış, türler arasındaki anatomik farklar ortaya konmuştur (Selvi, Paksoy, Polat ve Cakilcioglu, 2014).

2.2.2. Fitokimyasal çalışmalar

Chrysophthalmum cinsi üzerine yapılan fitokimyasal çalışmalara bakıldığında, sadece *C. montanum* üzerinde 2016 yılında yayımlanmış bir çalışmanın olduğu görülmektedir. Bu çalışmada, bitkinin *n*-butanol ekstresi üzerinde ayırma ve saflaştırma teknikleri uygulanarak 4 adet yeni gayan tipinde seskiterpen lakton glikoziti izole edilmiştir. Ayrıca kloroform ekstresinden 3 adet bilinen gayan tipinde seskiterpen lakton yapısında bileşikler elde edilmiştir. Bu çalışmada izole edilen bileşikler Çizelge 2.4'de verilmiştir (Gürbüz ve diğerleri, 2016).

Çizelge 2.4. *C. montanum* bitkisinden izole edilen maddeler

 **(1)** R: Glu **(2)** R: 6'-*O*-(*E*)-Kafeoil-Glu	**(1)** 4*α*-hidroksi-gaya-1(10)-en-12,8*α*-olid 2*β*-*O*-*β*-D-glukopiranozit**(2)** 4*α*-hidroksi-gaya-1(10)-en-12,8α-olid 2*β*-*O*-(6′-*trans*-kafeoil)-*β*-D-glukopiranozit
 **(3)**	**(3)** 10*α*-hidroksi-gaya-1(2)-en-12,8*α*-olid 4*α*-*O*-*β*-D-glukopiranozit
 **(4)**	**(4)** 10*α*-hidroksi-gaya-12-8*α*-olid 4*β*-*O*-*β*-D-glukopiranozit
 **(5)** R: OH **(6)** R: OAc	**(5)** 4*α*,6*α*-dihidroksi-1*β*,5*α*,7*αH*-gaya-9(10),11(13)-dien-12,8*α*-olid **(6)** 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-1*β*H-gaya-9(10),11(13)-dien-12,8*α*-olid
 **(7)**	**(7)** 4*β*-10*α*-dihidroksi-5*α*-gaya-1(2),11(13)-dien-12,8*α*-olid

2.2.3. Halk arasında kullanılışı üzerine yapılan çalışmalar

Yapılan literatür taramasına göre, *Chrysophthalmum* cinsinin yalnızca tek türü ile ilgili etnobotanik verilerin olduğu görülmüştür. Diğer *Chrysophthalmum* türlerine göre geniş yayılış gösteren *C. montanum* ülkemizde halk arasında çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Kayseri-Pınarbaşı bölgesinde yapılan bir çalışmada, "tutça" ismiyle bilinen *C. montanum* bitkisinin kurutulmuş ve toz edilmiş toprak üstü kısımlarının soğuk algınlığında ve nezlede akıntıyı gidermek ve solunumu rahatlatmak amacıyla burna çekilerek uygulandığı bildirilmiştir (Özkan ve Koyuncu, 2005). Malatya'da yapılan başka bir çalışmada ise, Kürecik-Kepez bölgesinde yöresel olarak "nezle otu" adıyla bilinen *C. montanum* bitkisinin toprak üstü kısımlarının soğuk algınlığına ve nezleye karşı kullanıldığı belirtilmiştir (Yeşil ve Akalın, 2009).

Son yıllarda ülkemizin güneydoğu bölgesinin Mardin-Savur ilçesinde yapılan etnobotanik bir araştırmada, "Barnoti, Bıruheer, Heşişılkeyf, Heşşişıl beytmahmut, Heşşişıl sımmo" gibi yöresel isimleri ile tanınan *C. montanum* bitkisinin dahili ve harici olarak çeşitli amaçlar için kullanıldığı belirtilmiştir. Çiçekli dönemde toplanan bitkinin toprak üstü kısmından hazırlanan dekoksiyonun (uzunca bir süre kaynatılıp soğutulduktan sonra) yara iyileştirici olarak pamuk yardımıyla yaraların üzerine uygulandığı kayıtlıdır. Bunun yanında, kurutulmuş ve toz edilmiş bitkinin insanlarda ve hayvanlarda oluşan yaraların üzerine serpilerek uygulandığı da rapor edilmiştir. Ayrıca bitkinin toz hali buruna çekilerek nezle ve gripte görülen burun akıntısını tedavi edici olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Arasan ve Kaya, 2015).

2.2.4. Biyolojik aktivite çalışmaları

Chrysophthalmum cinsi üzerine yapılan biyolojik aktivite çalışmalarının oldukça az olduğu görülmektedir. Değişik bitki türlerinin antimikrobiyal aktiviteleri ve *in vitro* asetilkolinesteraz enzimi üzerine inhibitör etkileri yönünden incelendiği iki çalışmada, *C. montanum* ekstreleri belirtilen aktiviteler bakımından araştırılmıştır (Kirbağ ve diğerleri, 2009; Ozdemir ve diğerleri, 2013).

Kırbağ ve diğerleri (2009)'nın yaptığı çalışmada, *C. montanum* ekstresinin (solvan belirtilmemiştir) disk difüzyon metodu ile 6 bakteri suşuna (*Bacillus megaterium, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus vulgaris* ve *Staphylococus aureus*) ve 3 mikrofungusa (*Candida albicans, C. glabrata* ve *C. tropicalis*) karşı antimikrobiyal aktivitesi ölçülmüştür. *C. montanum* ekstresinin test edilen tüm mikroorganizmaların gelişimini baskıladığı (inhibisyon zonu: 14-22 mm) ve güçlü antimikrobiyal etki gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca incelenen bitkiler arasında *S. aureus* suşuna karşı 18 mm inhibisyon zonu çapı ile en yüksek aktivite *C. montanum* ekstresinde bulunmuştur.

Son yıllarda yapılan diğer bir tarama çalışmasında ise, *C. montanum*'un da yer aldığı bazı bitki ekstrelerinin (solvan belirtilmemiştir) insan eritrositlerinde asetilkolinesteraz enzim aktivitesi üzerine etkileri *in vitro* yöntemle araştırılmıştır. Aktiviteye karşı inhibitör konsantrasyon değerleri ile elde edilen grafikten *C. montanum* ekstresi için % 50 inhibisyon gösteren konsantrasyon değeri 1.074 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Bu çalışma ile *C. montanum* bitkisinin eritrositlerde asetilkolinesteraz enzim aktivitesinde yarışmalı inhibisyon gösterdiği bildirilmiştir (Ozdemir ve diğerleri, 2013).

2.3. Seskiterpen Laktonlar Hakkında Genel Bilgiler

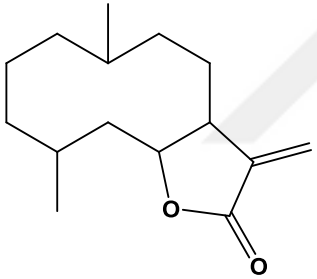
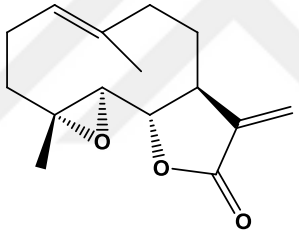
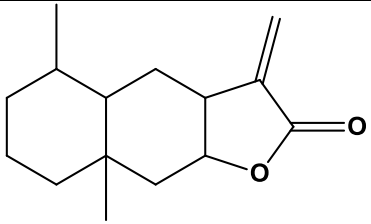
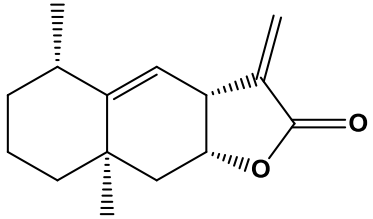
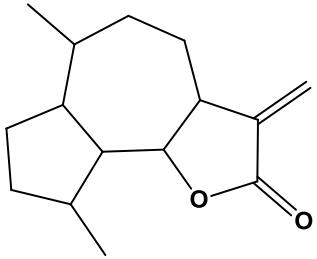
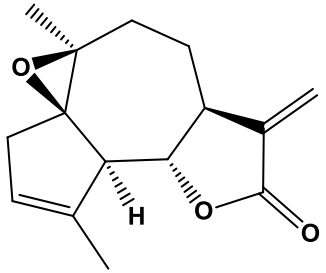
Terpen sözcüğü İngilizce "Turpentine" (Terebentin) kelimesinden türetilmiştir. Terebentin, çam reçinesi anlamında olup, reçine asitleri ve terpenleri içermektedir. Bitkilerde bulunan sekonder metabolitlerin önemli bir kısmını oluşturan terpenler, herbivorlara ve parazitlere karşı koruyucu rol oynar. Bitkide meydana gelen uçucu terpenler, tozlaşmaya yardımcı olurken, daha az uçucu ve acı olan terpenler bitkinin hayvanlar tarafından yenilmesini engelleyerek etki (antifeedant aktivite) gösterebilmektedir. Diğer bir grup terpenler ise, fitohormon olarak bitkide büyümeyi düzenleyici görev üstlenmektedir (Breitmaier, 2006).

Seskiterpen laktonlar (SL), yapısında γ-lakton taşıyan yaklaşık 3000 kadar maddenin tanımlandığı bir grup olup, "acı maddeler" adı altında genellikle Asteraceae bitkilerinin karakteristik sekonder metabolitlerini oluşturmaktadır. Asteraceae dışında Apiaceae, Lauraceae, Menispermaceae ve Magnoliaceae familyalarındaki bitkilerden de seskiterpen lakton yapısında bileşikler izole edilmiştir. Ayrıca SL, kapalı tohumlu bitkiler dışında kara yosunları ve mantarlarda da bulunabilmektedir. SL, başlıca bitkinin yapraklarında, salgı tüylerinde, gövdede, çiçek durumunun altındaki braktelerde ve akenlerde, nadiren toprak altındaki bitki organlarında bulunan, salgı tüylerinin alt kütikulasından atılan veya lateksteki depo edilen maddelerdir. Bu yapılar, sahip olduğu temel iskelet adının sonuna lakton halkası taşıdığını gösteren "olid" eki alarak isimlendirilmektedir (Bruneton, 1999; Saeidnia, 2015). *cis*-6,7; *cis*-7,8; *trans*-6,7 veya çoğu zaman *trans*-7,8 iskeletine sahip olan bu yapılar, genellikle "*α*-metilen, *γ*-lakton" fonksiyonel grubu taşır. Kara yosunları hariç diğer bitkisel kaynaklardan elde edilen seskiterpen laktonlarda H-7, çoğunlukla *α* konumda bulunur (Bruneton, 1999; Simonsen, Weitzel ve Christensen, 2013).

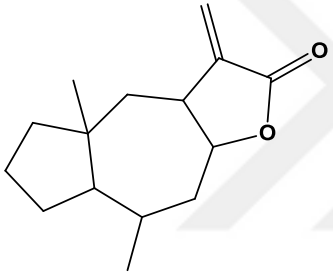
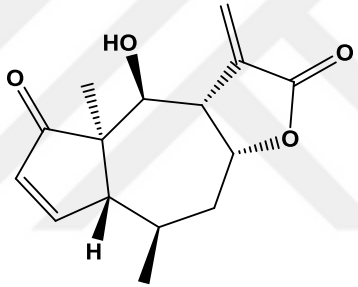
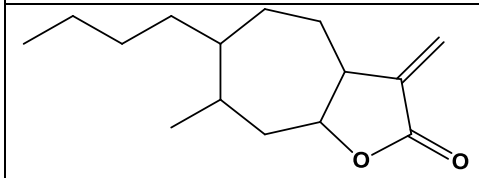
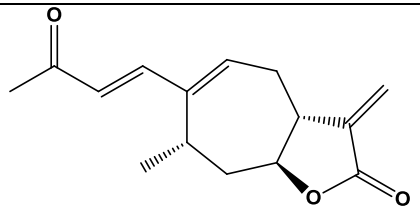
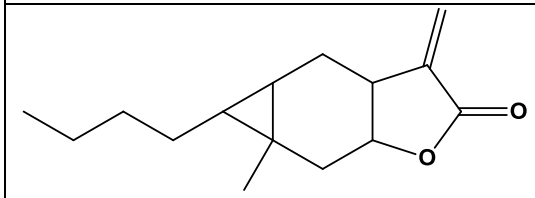
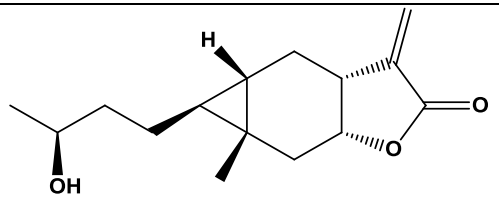
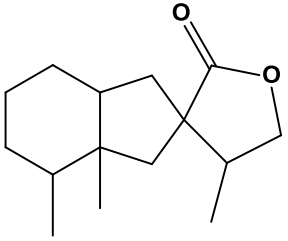
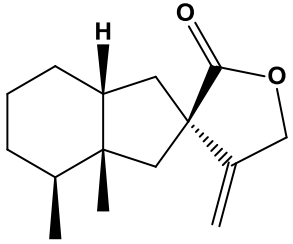
2.3.1. Seskiterpen laktonların sınıflandırılmaları

Seskiterpen laktonlar, karbosiklik halkanın lakton halkasına bağlanışına göre, temel olarak germakranolidler (10 üyeli halka), ödesmanolidler (2 adet orto-bağlanmış 6 üyeli halka), gayanolidler ve psödogayanolidler (orto-bağlanmış 7 ve 5 üyeli halkalar), ksantanolidler (7 üyeli halka), karabranolidler (birbirine bağlanmış 6 ve 3 üyeli halka) ve bakkenolidler (orto-bağlanmış 6 ve 5 üyeli halka) olmak üzere sınıflandırılmaktadır (Çizelge 2.5) (Ghantous ve diğerleri, 2010; Janecki, 2014).

Çizelge 2.5. Temel seskiterpen lakton yapıları

Temel seskiterpen lakton iskeleti	**Örnek bileşik**	**Elde edildiği bitki**	**Biyolojik aktivite**	**Kaynak**
 Germakranolid	 Partenolid	*Tanacetum partheniun*	Sitotoksik, antienflamatuvar, antiviral	George, Kumar, Suresh ve Kumar, 2012
 Ödesmanolid	 Alantolakton	*Inula helenium*	Antibakteriyel, sitotoksik, bitkileri böceğe karşı koruyucu	Ketai ve diğerleri, 2000
 Gayanolid	 Arglabin	*Artemisia myriantha*	Sitotoksik	Kalidindi ve diğerleri, 2007

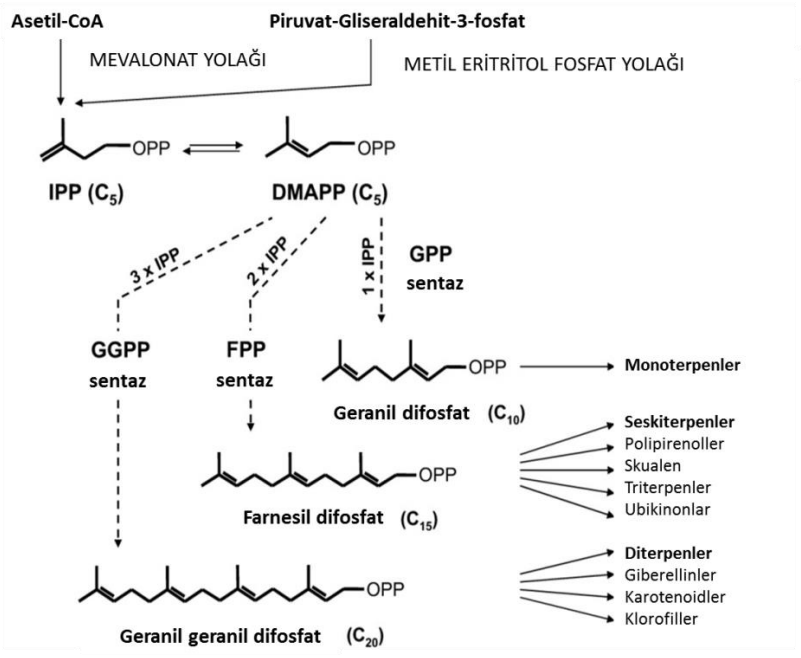
Çizelge 2.5. (devam) Temel seskiterpen lakton yapıları

 Psödogayanolid	 Helenalin	*Arnica montana*	Sitotoksik, antimalaryal, antiviral	Lyss, Schmidt, Merfort and Pahl,1997
 Ksantanolid	 Ksantatin	*Xanthium* spec.	Sitotoksik, Antimikrobiyal	Yokoe, Yoshida ve Shishido, 2008
 Karabranolid	 Karabrol	*Carpesium fabrei*	Sitotoksik	Li ve diğerleri, 2011
 Bakkenolid	 Bakkenolid A	*Petasites albus*	Sitotoksik	Jamieson, Reid, Turner and Jamieson, 1976

2.3.2. Seskiterpen laktonların biyosentezleri

Terpenlerin biyosentezi, Wallach ve Ruzicka ismindeki araştırmacıların geliştirdiği izopren kuralına göre gerçekleşmektedir. Bu kurala göre, çeşitli sayıdaki izopren (C_5H_8 = 2-metil 1,3-butadien) ünitelerinin "kafa-kuyruk" şeklinde birleşmesi ile terpen yapısında bileşikler meydana gelmektedir. Terpenlerin biyosentezi enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar sonucu aktif prekürsörler olan izopentenil pirofosfat (IPP) ve dimetil alil pirofosfat (DMAPP) aracılığı ile olmaktadır (Breitmaier, 2006; Bruneton, 1999).

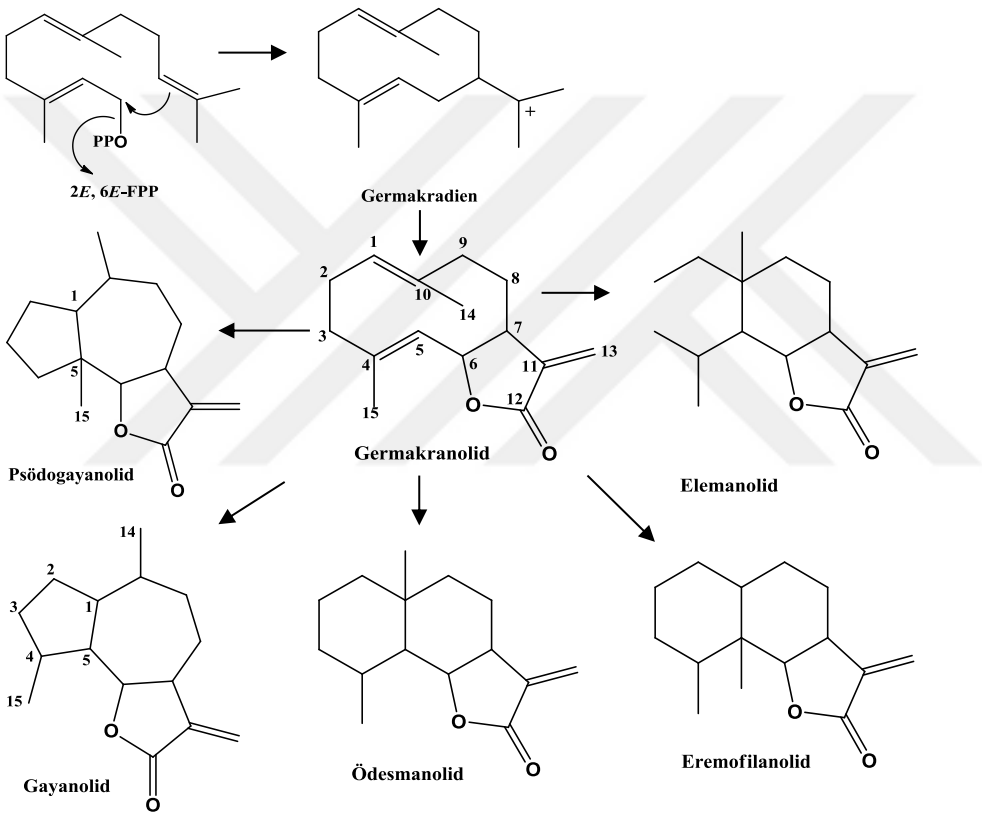
IPP biyosentezi, mevalonik asit yolağı ile sitoplazmada veya metileritritol fosfat yolağı ile plastidlerde olmak üzere iki şekilde gerçekleşir. IPP ve DMAPP aktif prekürsörleri genellikle kafa-kuyruk şeklinde birleşerek diğer prekürsörleri meydana getirir. IPP ve DMAPP, monoterpenlerin prekürsörü olan geranil pirofosfat (GPP)'ı; GPP ve IPP, seskiterpenlerin prekürsörü olan farnesil pirofosfat (FPP)'ı; FPP ve IPP, diterpenlerin prekürsörü olan geranil geranil pirofosfat (GGPP)'ı; GGPP ile IPP, sesterpenlerin prekürsörü olan geranil farnesil pirofosfat (GFPP)'ı meydana getirmektedir. Kuyruk-kuyruk şeklinde birleşmesi sonucu, triterpenler 2 FPP ünitesinden; tetraterpenler ise 2 GGPP ünitesinden meydana gelmektedir (Şekil 2.1) (Breitmaier, 2006; Bruneton, 1999; Hsieh, Chang, Ko ve Wang, 2011).



Şekil 2.1. Terpenlerin biyosentezi

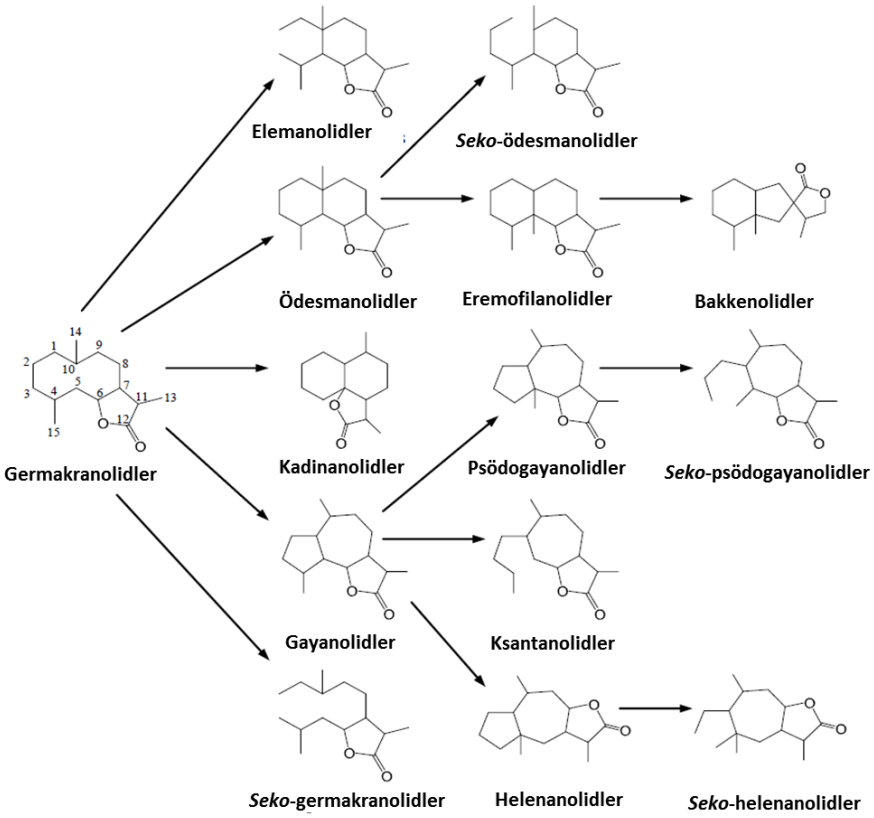
Seskiterpenler, doğada yaygın olarak bulunan uçucu yağların kimyasal bileşiminin bir bölümünü oluşturur ve farmakolojik aktivitelerine büyük oranda katkı sağlar. Prekürsör olarak FPP'dan meydana gelen bu yapılarda, 100'den fazla farklı seskiterpen iskeleti tanımlanmıştır (Bruneton 1999).

Seskiterpen laktonların biyosentezi, 2*E*,6*E*-farnesil pirofosfat (FPP)'ın siklizasyonu ile meydana gelen siklodekadien yapısındaki germakradien katyonu aracılığı ile oluşan "germakranolid" üzerinden gerçekleşmektedir (Şekil 2.2) (Bruneton, 1999).



Şekil 2.2. 2*E*,6*E*-farnesil pirofosfat'ın siklizasyonu ile seskiterpen laktonların biyosentezi

Germakranolid yapısı üzerinden, Asteraceae familyası bitkilerinde yaygın bulunan birçok seskiterpen lakton yapıları (ödesmanolidler, gayanolidler, psödogayanolidler, elemanolidler) oluşmaktadır (Şekil 2.3) (Herz, 1977).



Şekil 2.3. Temel seskiterpen laktonların biyosentezi

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

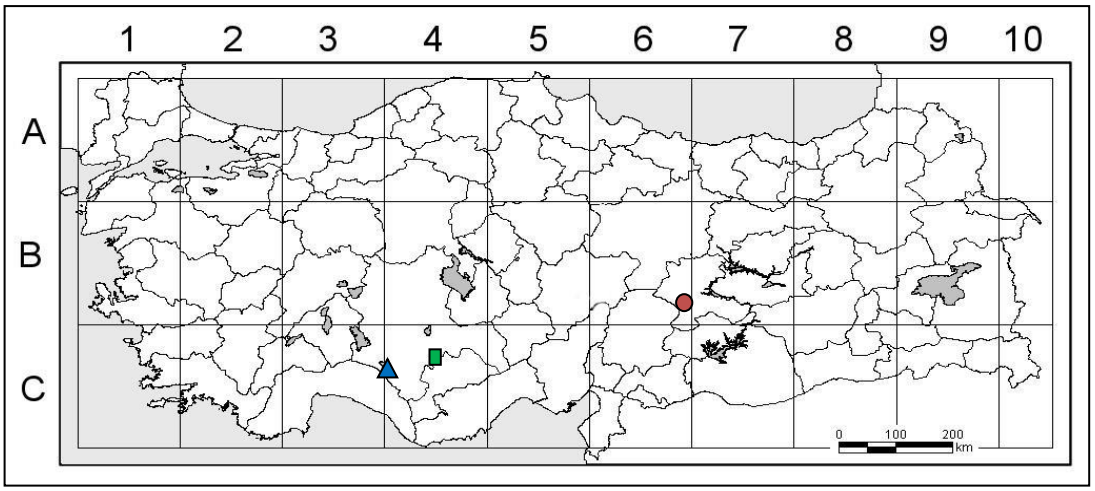
Türkiye florasında kayıtlı üç *Chrysophthalmum* Schultz Bip. türü [*C. montanum* (DC.) Boiss.; *C. gueneri* Aytac and Anderb. ve *C. dichotomum* Boiss. & Heldr.] doğal olarak yetiştiği bölgelerden çiçekli evrelerinde toplanmış (Resim 3.1), herbaryum örnekleri hazırlanarak teşhisleri Prof. Dr. Hayri DUMAN (Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü) ve Yrd. Doç. Dr. Barış BANİ (Kastamonu Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü) tarafından yapılmıştır. Örneklerin toplandığı lokaliteler aşağıda verilmiştir (Harita 3.1 ve Çizelge 3.1). Herbaryum örnekleri Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu (GUE) ve Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryumu'nda (GAZI) saklanmaktadır (Çizelge 3.1).

Kimyasal ve biyolojik aktivite araştırmalarının gerçekleştirildiği *Chrysophthalmum* örnekleri türleri gölgede uygun şartlarda kurutulmuş ve kullanılmadan önce orta incelikte toz edilmiştir.

Çizelge 3.1. *Chrysophthalmum* türlerinin toplandığı bölgeler

Tür	**Lokalite (Herbaryum numarası)**
C. montanum (DC.) Boiss.	**B6 Malatya:** Akçadağ, Tohma nehri vadisi, kaya üzeri, 810m, 10.07.2014, *H. Duman* (H. Duman 10324)*
C. gueneri Aytac and Anderb.	**C4 Antalya:** Taşkent-Alanya, Cirlasun köprüsü civarı, karaçam orman açıklıklarındaki nemli yerler, 1350 m, 11.08.2014, *F. Ayaz, H. Ayaz, B. Bani* (36°45'38.00"K; 32°27'23.00"D) (F. Ayaz 41)*
	C4 Antalya: Taşkent-Alanya, Alanya'ya 40 km kala, Elmalısu mevkii, taşlık yerler, 1330 m, 11.08.2014, *F. Ayaz, H. Ayaz, B. Bani* (36°34'11.00"K; 32°21'38.00"D) (F. Ayaz 45)
C. dichotomum Boiss. & Heldr.	**C4 Konya:** Akseki-Seydişehir arası, Konya'ya 114 km kala, Tınaztepe mağarası çevresi, Karaçam orman açıklığı, 1500 m, 12.08.2014, *F. Ayaz, H. Ayaz, B. Bani* (37°14'51.00"K; 31°55'48.00"D) (F. Ayaz 46)*

* Tez çalışmalarında kullanılan materyaller



● *C. montanum;* ■ *C. gueneri;* ▲ *C. dichotomum*

Harita 3.1. *Chrysophthalmum* örneklerinin toplandığı lokaliteler



A



B



C

Resim 3.1. **A**: *C. montanum*, Malatya (Foto: *Hayri Duman*); **B**: *C. gueneri*, Antalya (Foto: *Barış Bani*); **C**: *C. dichotomum*, Konya (Foto: *Barış Bani*)

3.2. Yöntem

3.2.1. Fitokimyasal çalışmalar

Kromatografik yöntemler

İnce tabaka kromatografisi (İTK)

Kromatografik yöntemlerle gerçekleştirilen ayırım ve izolasyon çalışmalarının izlenmesinde normal faz ve ters faz silika jel kaplı hazır plaklardan yararlanılmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. İnce tabaka kromatografisi koşulları

	Normal faz	**Ters faz**
Adsorban	▪ Silika jel (alüminyum folyo hazır plak, Kieselgel 60 F_{254}, 0.20 mm, Art. 5554, Merck), ▪ Silika jel (alüminyum folyo hazır plak, Alugram SIL G/UV_{254}, 0.20 mm, Macherey-Nagel 818133)	▪ Silika jel-RP-18 (alüminyum folyo hazır plak, Kieselgel 60 RP-18 F_{254}, Art. 5560, Merck)
Solvan sistemleri	▪ DCM: Aseton (80:20, 85:15), ▪ $CHCl_3$: Aseton (80:20), ▪ DCM: MeOH (97:3, 96:4, 95:5, 94:6, 93:7, 92:8) ▪ $CHCl_3$: MeOH (98:2, 97:3, 96:4, 95:5) ▪ Hekzan: EtOAc (30:70, 35:65, 50:50, 55:45)	▪ MeOH: Su (80:20, 70:30, 60:40, 50:50)
Tatbik:	Plağın 1 cm yukarısına ince cam kapiller yardımıyla tatbik noktaları arasında birer cm aralık bırakılarak yapılmıştır.	
Sürüklenme mesafesi:	7-10 cm	
Lekelerin belirlenmesi	:Plaklar UV_{254} ve UV_{366} nm'de (Camag UV lambası) incelenerek, gözlenen floresans ile maddeler tespit edilmiştir. Ardından plaklara **anisaldehit belirteci** (% 76 MeOH, % 19 *o*-fosforik asit ve % 5 *p*-anisaldehit karışımı), **% 20 H_2SO_4** veya **seryum (IV) sülfat belirteci** [%15 H_2SO_4 içerisinde %2 seryum (IV) sülfat] püskürtülerek 110 °C'de 5 dakika ısıtılarak lekeler (mor-pembe, sarı ve yeşilimsi renklerde) belirlenmiştir.	

Preparatif ayırma yöntemleri

Kolon kromatografisi (KK)

Çalışmalarımızda ekstrelerin ön fraksiyonlanması ve bazı fraksiyonların saflaştırılması Silika jel ve Sephadex LH-20 kolon kromatografisi ile gerçekleştirilmiştir.

- Silika jel kolon kromatografisi (Silika jel KK)

Kloroform ve *n*-hekzan ekstrelerinin ön fraksiyonlanması ve elde edilen bazı fraksiyonların saflaştırılması Silika jel KK ile gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Silika jel kolon kromatografisi koşulları

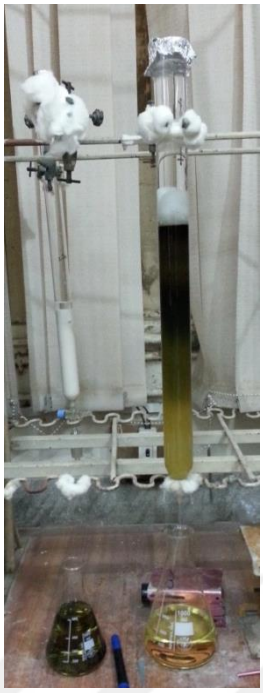
Dolgu materyali	Silika jel (Kieselgel 60, 0.063-0.200 mm, Art. 7734, Merck)
Solvan sistemleri	▪ DCM: Aseton (90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50) ▪ DCM: MeOH (60:40, 30:70, 0:100) ▪ Hekzan: EtOAc (100:0, 99.5:0.5, 99:1, 95:5, 90:10, 80:20, 65:35, 45:55, 0:100)

Kolonun hazırlanması: Uygun miktarda silika jel, elüsyona başlanacak solvan sistemi ile ile süspansiyon haline getirilmiştir. Hava kabarcıkları tamamen uzaklaştırıldıktan sonra bu karışım, alt ucuna pamuk yerleştirilmiş cam kolona aktarılmıştır. Kolondan bir miktar solvan geçirilerek adsorbanın yerleşmesi sağlandıktan sonra, solvan adsorbanın üzerinde birkaç mm yükseklikte kalıncaya kadar kolonu akıtma işlemine devam edilmiştir.

Numune tatbiki: Numune kuru veya yaş usulle kolona tatbik edilmiştir. Kuru usulde; numune yeterli miktarda uygun solvanda çözüldükten sonra, 1:1 oranında adsorban ile karıştırılarak solvan alçak basınç altında yoğunlaştırılmıştır. Adsorbana emdirilmiş halde elde edilen numune cam bir huni veya ince bir cam boru vasıtasıyla kolona uygulanmıştır. Yaş usulde; numune uygun miktarda elüsyona başlanacak solvan içerisinde çözülerek pastör pipeti yardımıyla kolona uygulanmıştır. Her iki uygulamada da yüzeyin bozulmasını önlemek için tatbikten sonra yüzeye pamuk yerleştirilerek elüsyona başlanacak solvan sistemi kolona aktarılmıştır (Resim 3.2).



A



B

Resim 3.2. Silika jel kolon kromatografisi (**A**, **B**)

- Sephadex kolon kromatografisi (Sephadex KK)

Elde edilen fraksiyonlardan klorofilin temizlenmesi, fenolik bileşiklerin (flavonoit ve lignan) izole edilmesi ve bazı fraksiyonların safsızlıktan kurtarılması Sephadex LH-20 kolon kromatografisi ile gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Sephadex kolon kromatografisi koşulları

Dolgu materyali	Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich)
Solvan sistemleri	▪ Hekzan:DCM:MeOH (7:4:1) ▪ DCM: MeOH (1:1) ▪ %100 MeOH

Kolonun hazırlanması: Sephadex LH-20 uygun miktarda ayırıma başlanacak çözücü içinde yaklaşık 6 saat şişmeye bırakılmıştır. Karışım alt ucuna pamuk yerleştirilmiş cam kolona aktarılmıştır. Kolondan bir miktar solvan geçirilerek adsorbanın yerleşmesi sağlanmıştır. Adsorbanın üzerinde birkaç mm solvan kalıncaya kadar kolon akıtılarak tatbik için hazır hale getirilmiştir.

Numune tatbiki: Numune yeterli miktarda uygun çözücüde çözüldükten sonra, pastör pipeti yardımıyla kolona aktarılmıştır. Tatbikten sonra yüzeyin bozulmasını önlemek amacıyla pamuk yerleştirilmiştir (Resim 3.3).



A **B**

Resim 3.3. Sephadex kolon kromatografisi (**A**, **B**)

Preparatif ince tabaka kromatografisi (Prep. İTK)

Kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlarda polariteleri birbirinden farklı olan bileşiklerin ayrılması veya bileşiklerin saflaştırılması amacıyla preparatif ince tabaka kromatografisinden yararlanılmıştır (Çizelge 3.5).

Numune tatbiki: Silika jel kaplı hazır cam plaklara, uygun solvanda çözündürülmüş numune, cam kapiler yardımıyla plağın alt kenarından 2 cm yukarısından bant halinde uygulanmıştır. Tatbik kuruduktan sonra, uygun solvan sistemi içerisinde sürüklenmiştir. Sürüklenmenin sonunda UV lambası altında bantların yeri tespit edilmiş, ardından plağın kenarından 2 cm enindeki kısım şerit halinde açıkta kalacak şekilde kapatılarak revelatör püskürtülmüştür. Belirlenen bantlar plaktan ayrı ayrı kazınmış ve uygun çözücü sistemi ile 7-8 defa yıkanarak gooch hunisinden (sintercam filtreli Por. 4) vakum altında süzülmüştür (Resim 3.4). Birleştirilen çözeltiler alçak basınç altında kuruluğa kadar yoğunlaştırılmıştır. Darası alınan kaplarda azot gazı altında kurutularak tartılmıştır.

Çizelge 3.5. Preparatif ince tabaka kromatografisi koşulları

Adsorban	Silika jel kaplı hazır cam plak (Kieselgel 60 F_{254}, 0.5 mm, Art. 5744, Merck)
Solvan sistemleri	Hekzan:EtOAc (50:50) $CHCl_3$:MeOH (98:2, 97:3, 96:4)



A **B**

Resim 3.4. Prep. İTK ve gooch hunisi ile vakum altında süzme (**A**, **B**)

Preparatif yüksek performanslı sıvı kromatografisi (Prep. YPSK)

Elde edilen fraksiyonlardan polariteleri birbirine çok yakın olan bileşiklerin ayrımını sağlamak veya bileşikleri saflaştırmak amacıyla uygulanan preparatif yüksek performanslı sıvı kromatografisi "LC-908W-C60 Recycling Preperative HPLC (Japan Analytical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan)" cihazında yapılmıştır (Çizelge 3.6).

Numune tatbiki: Öncelikle, mobil faz içerisinde çözülmüş az miktarda numune (1 mg/mL) ile profil kromatogramı elde etmek için numuneden 1 mL manuel olarak kolona enjekte edilmiştir. Toplanan fraksiyonların İTK profilleri, maddelerin Ultraviyole (UV) ve Refraktif indeksine (RI) göre elde edilen kromatogramlar ile birlikte değerlendirilmiştir. Bu şekilde yöntemin uygulanabilirliği tespit edildikten sonra, belirlenen maddenin izole edilmesi için numune yüksek derişimde (30 mg/3 mL) enjekte edilmiştir. Fraksiyonlar kromatogramların değerlendirilmesiyle manuel olarak toplanmıştır. Bazı fraksiyonlar toplanırken maddenin safsızlıklardan kurtarılması için recycling işlemi yapılmıştır (Resim 3.5).

Çizelge 3.6. Preparatif yüksek performanslı sıvı kromatografisi koşulları

	Normal faz	**Ters faz**
Kolon	JAIGEL-SIL	JAIGEL-ODS-M-80
Dolgu materyali	SIL-SiO_2	ODS-M-80 C18
Kolon, partikül büyüklüğü	20 mm x 250 mm, 10 µm	20 mm x 250 mm, 10 µm
Solvan sistemi	$CHCl_3$:MeOH (98:2)	MeOH: su (70:30, 50:50)
Akış hızı	3 mL/dk	3 mL/dk



Resim 3.5. Prep. YPSK Cihazı (Karachi Üniversitesi, HPLC Laboratuvarı)

İzole edilen bileşiklerin yapı tayini yöntemleri

İzole edilen bileşiklerin UV, IR, NMR ve Kütle spektral analizleri ile X-ışını kristalografisi analizleri Karachi Üniversitesi-International Center for Chemical and Biological Sciences (ICCBS)-Hussain Ebrahim Jamal (HEJ) Research Institute of Chemistry'de Prof. Dr. Muhammad Iqbal Choudhary'nin imkanlarıyla yapılmıştır.

Spesifik çevirme açısı tayini

Optikçe aktif bileşiklerin spesifik çevirme açıları, uygun çözücüde çözülerek "Rudolph Research Analytical/Autopol IV/6W" cihazında kaydedilmiştir.

Ultraviyole (UV) spektral analizleri

Bileşiklerin UV spektrumları, MeOH içerisinde çözülerek "Thermo Scientific Evolution 300 UV-Visible (UV-Vis) Spectrophotometer" cihazında kaydedilmiştir.

Infrared (IR) spektral analizleri

Bileşiklerin IR spektrumları KBr ile hazırlanan pelletler veya uygun çözücüde çözülerek "Bruker Vector 22 FT-IR Spectrophotometer" cihazında kaydedilmiştir.

Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektral analizleri

Bileşiklerin ^{1}H ve ^{13}C NMR spektrumları aşağıdaki cihazlarda kaydedilmiştir:

Bruker Avance AV-400 (400 MHz)

Bruker Avance AV-III HD 400 (400 MHz)

Bruker Avance AV-500 (500 MHz)

Bruker Avance 500 Cryo-Probe (500 MHz)

Bruker Avance 600 Cryo-Probe (LC) (600 MHz)

Bruker Avance AV-600 Cryo Probe (600 MHz)

Bruker Avance AV-III-HD 800 Cryo-Probe (800 MHz)

Kimyasal kayma değeri (δ) ppm olarak verilmiştir. Etkileşim sabiti (J) birimi Hz olarak ölçülmüştür.

Kütle spektral analizleri

Bileşiklerin EI-MS analizi "JEOL The MS route JMS-600H" cihazında yapılmıştır. HREI-MS için "Thermo Finnigan MAT 95 XP" cihazı kullanılmıştır. ESI-MS analizi "LC/MS/MS Agilent Technology 6460 QQQ LC/MS" cihazında yapılmıştır.

X-ışını kristalografisi

Kristal halinde elde edilen bileşiklerin "Bruker APEX II D8 Venture (PHOTON 100 dedektör) (CMOS Technology)" cihazı ile X-ışını kristalografisi analizi yapılmıştır.

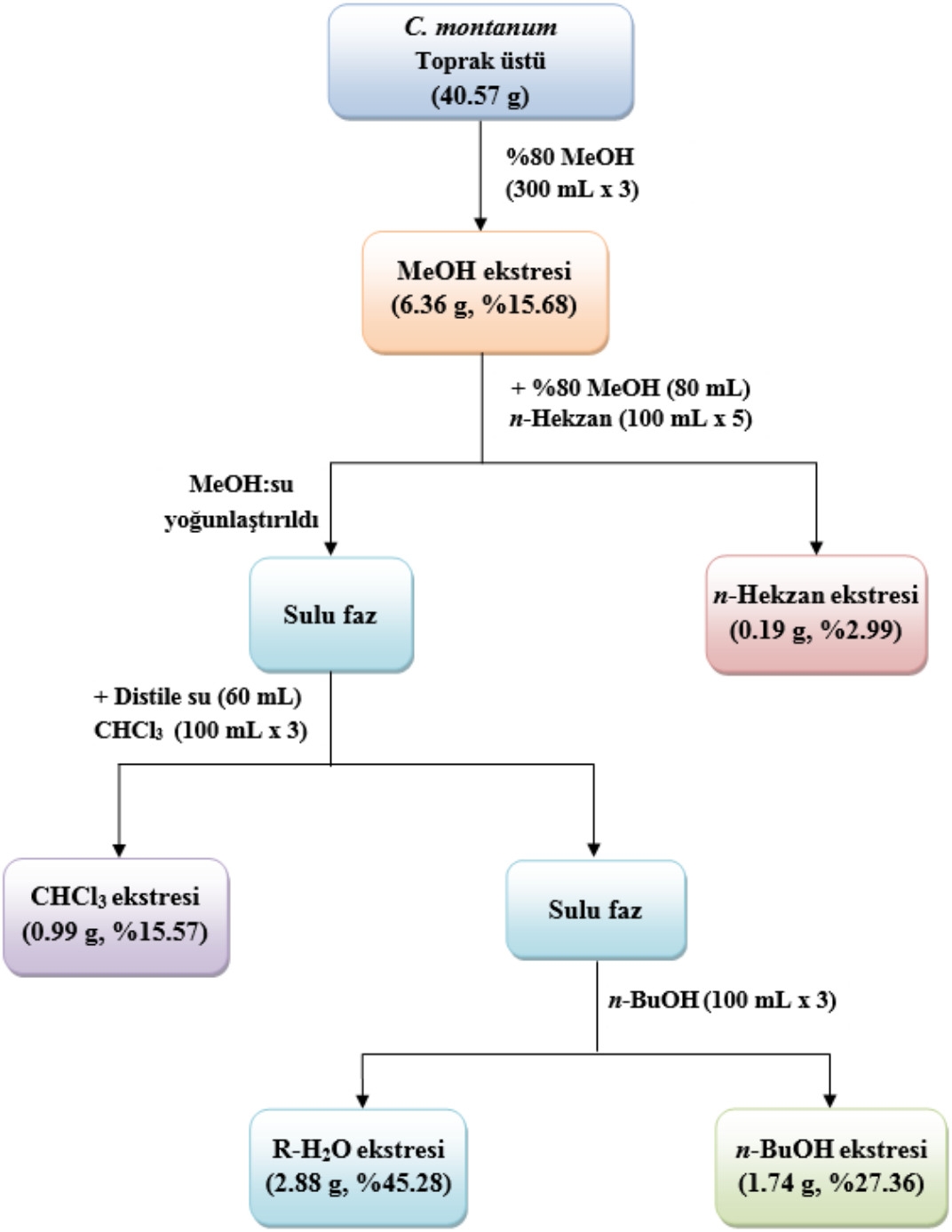
Biyoaktivite ile yönlendirilen ekstraksiyon ve izolasyon çalışmaları

Chrysophthalmum türleri üzerinde biyoaktivite ile yönlendirilen ekstraksiyon ve fraksiyonlama çalışmaları

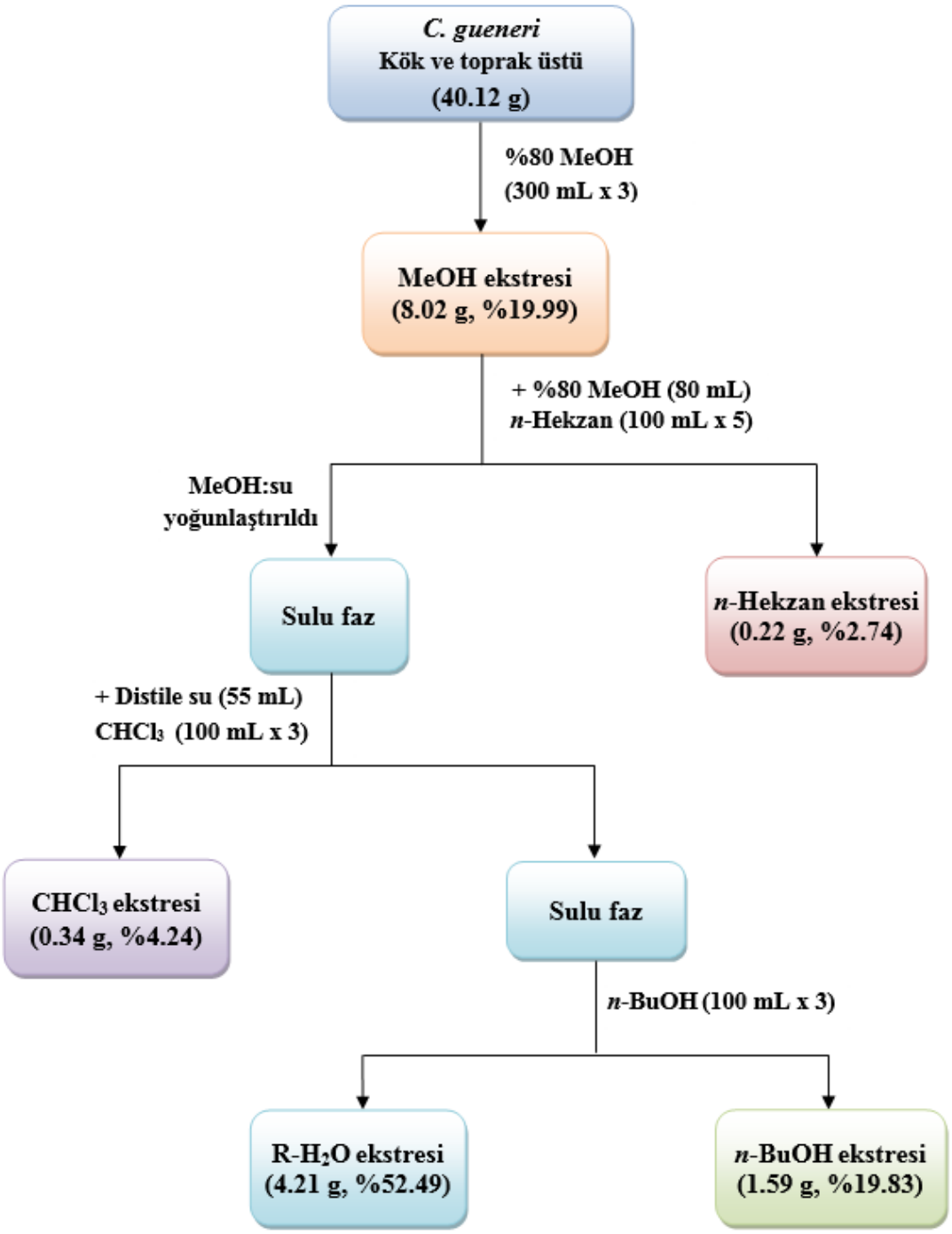
Kimyasal ve biyolojik aktivite çalışmaları için *Chrysophthalmum* türlerinden; *C. montanum* (CM) bitkisinin toprak üstü kısmı, *C. gueneri* (CG) ve *C. dichotomum* (CD) bitkilerinin tüm kısımları (kök ve toprak üstü kısımları) toz edildikten sonra (yaklaşık 40 g) % 80'lik metanol (300 mL) ile 40°C'de 6 saat ekstre edilip süzülmüştür. Ekstraksiyon aynı miktarda solvan ile aynı şartlar altında 2 kez daha tekrarlanmıştır. Birleştirilen MeOH ekstreleri alçak basınç altında kuruluğa kadar uçurulmuştur.

Chrysophthalmum türlerinin ham metanollü ekstreleri % 80 MeOH içerisinde çözülerek sırasıyla *n*-hekzan, kloroform ve *n*-butanol ile ayırma hunisinde ekstre edilmiştir. Her bir ekstre ve kalan su fazı (R-H_2O) alçak basınç altında yoğunlaştırılarak, *n*-hekzan, $CHCl_3$ ve *n*-BuOH ekstreleri elde edilmiştir. Yoğunlaştırılan kalan su fazı liyofilizatörde kurutularak R-H_2O esktreleri hazırlanmıştır (Şekil 3.1-3.3).

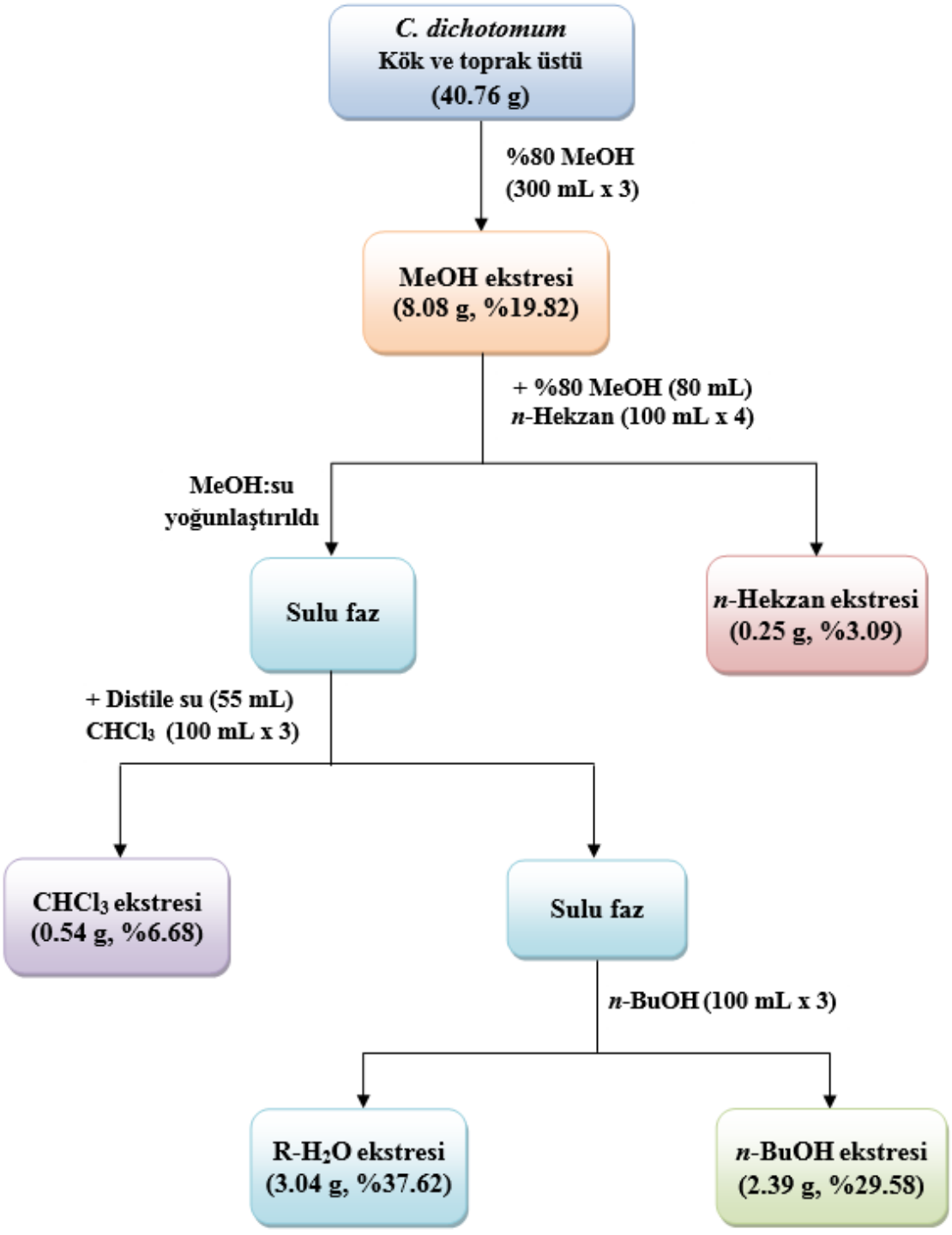
Chrysophthalmum türlerinin ham MeOH ekstreleri ve *n*-hekzan, $CHCl_3$, *n*-BuOH ve R-H_2O alt esktrelerinin sitotoksik, antienflamatuvar ve leishmanisidal aktiviteleri *in vitro* yöntemlerle incelenmiştir. Biyolojik aktivite çalışmaları sonucunda, üç türün $CHCl_3$ ve ardından *n*-hekzan alt ekstreleri en yüksek aktivitelere sahip bulunmuştur. Biyoaktivite ile yönlendirilen izolasyon çalışmaları *C. montanum*'un $CHCl_3$ ekstresi üzerinde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. *C. montanum*'un ekstraksiyonu ve fraksiyonlanması



Şekil 3.2. *C. gueneri*'nin ekstraksiyonu ve fraksiyonlanması



Şekil 3.3. *C. dichotomum*'un ekstraksiyonu ve fraksiyonlanması

C. montanum üzerinde ekstraksiyon ve izolasyon çalışmaları

Ekstraksiyon: C. montanum'un gölgede kurutulan toprak üstü kısımları toz edildikten sonra (500 g) % 80'lik metanol (3 L) ile manyetik karıştırıcı yardımıyla oda sıcaklığında 1 gün süreyle ekstre edilip süzülmüştür. Ekstraksiyon aynı miktar solvan ile aynı şartlarda tekrarlanmış ve birleştirilen MeOH ekstreleri rotavaporda 40°C'de kuruluğa kadar yoğunlaştırılmıştır (**MeOH esktresi**: 90.78 g, verim: %18.16)

Ham metanol ekstresi 260 mL % 80 MeOH içerisinde çözülerek ayırma hunisinde *n*-hekzan (250 mL x 11) ile ekstre edilmiştir. Birleştirilen *n*-hekzan fazları alçak basınç altında yoğunlaştırılmıştır (***n*-Hekzan ekstresi**: 1.74 g, verim: %1.92).

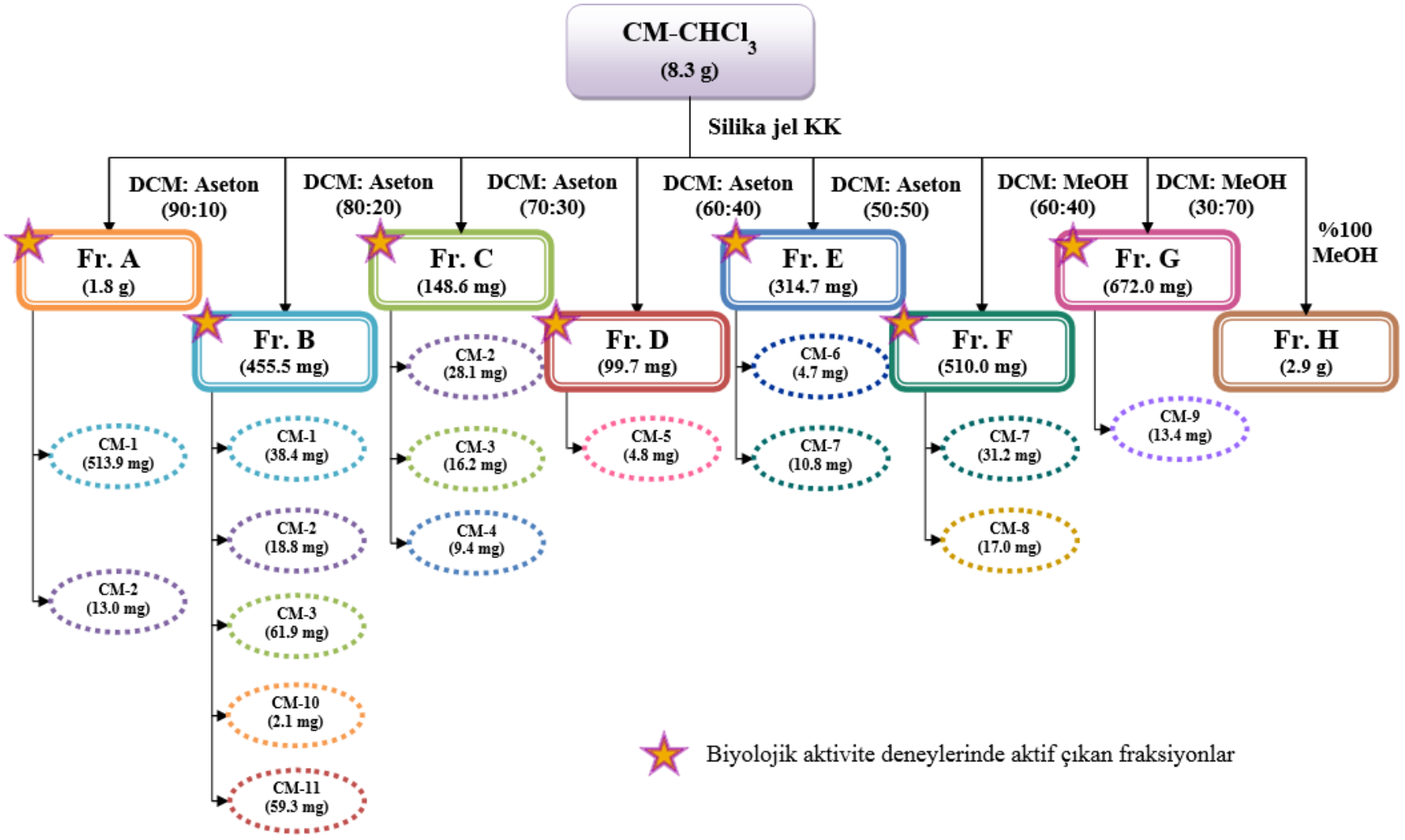
Kalan sulu-metanollü ekstre rotavaporda yoğunlaştırılmış ve distile su (200 mL) ilave edilerek ayırma hunisinde kloroform (250 mL x 8) ile ekstre edilmiştir. Kloroformlu fazlar birleştirilerek alçak basınç altında yoğunlaştırılmıştır (**$CHCl_3$ ekstresi**: 15.83 g, verim: %17.44).

Kalan sulu faz ayırma hunisinde su ile doyurulmuş *n*-butanol (250 mL x 8) ile ekstre edilmiştir. Birleştirilen *n*-butanollü fazlar alçak basınç altında yoğunlaştırılmıştır (***n*-BuOH esktresi**: 21.37 g, verim: %23.55).

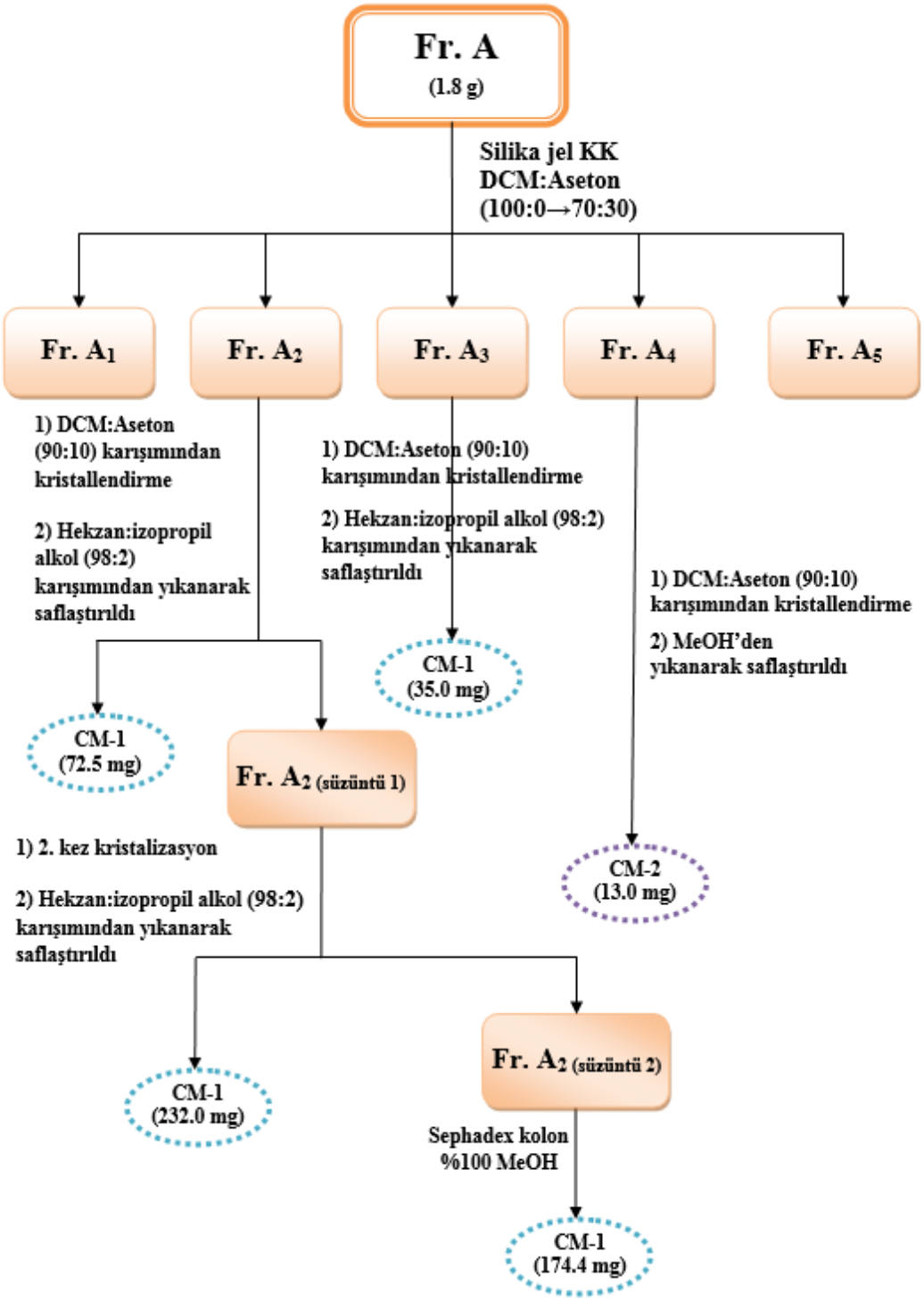
Kalan sulu faz alçak basınç altında yoğunlaştırılmış ve yoğun ekstre liyofilizatörde kurutulmuştur (**R-H_2O ekstresi**: 36.37 g, verim: %40.06).

Kloroform ekstresi üzerinde biyoaktivite ile yönlendirilen izolasyon çalışmaları:
Kloroform ekstresi (8.3 g), 540 g silika jel içeren kolona uygulanmıştır. Elüsyona dikolorometan ile başlanıp, polarite aseton ve ardından MeOH ilavesiyle artırılmış ve 8 ana fraksiyon toplanmıştır (Fr. A-H) (Şekil 3.4).

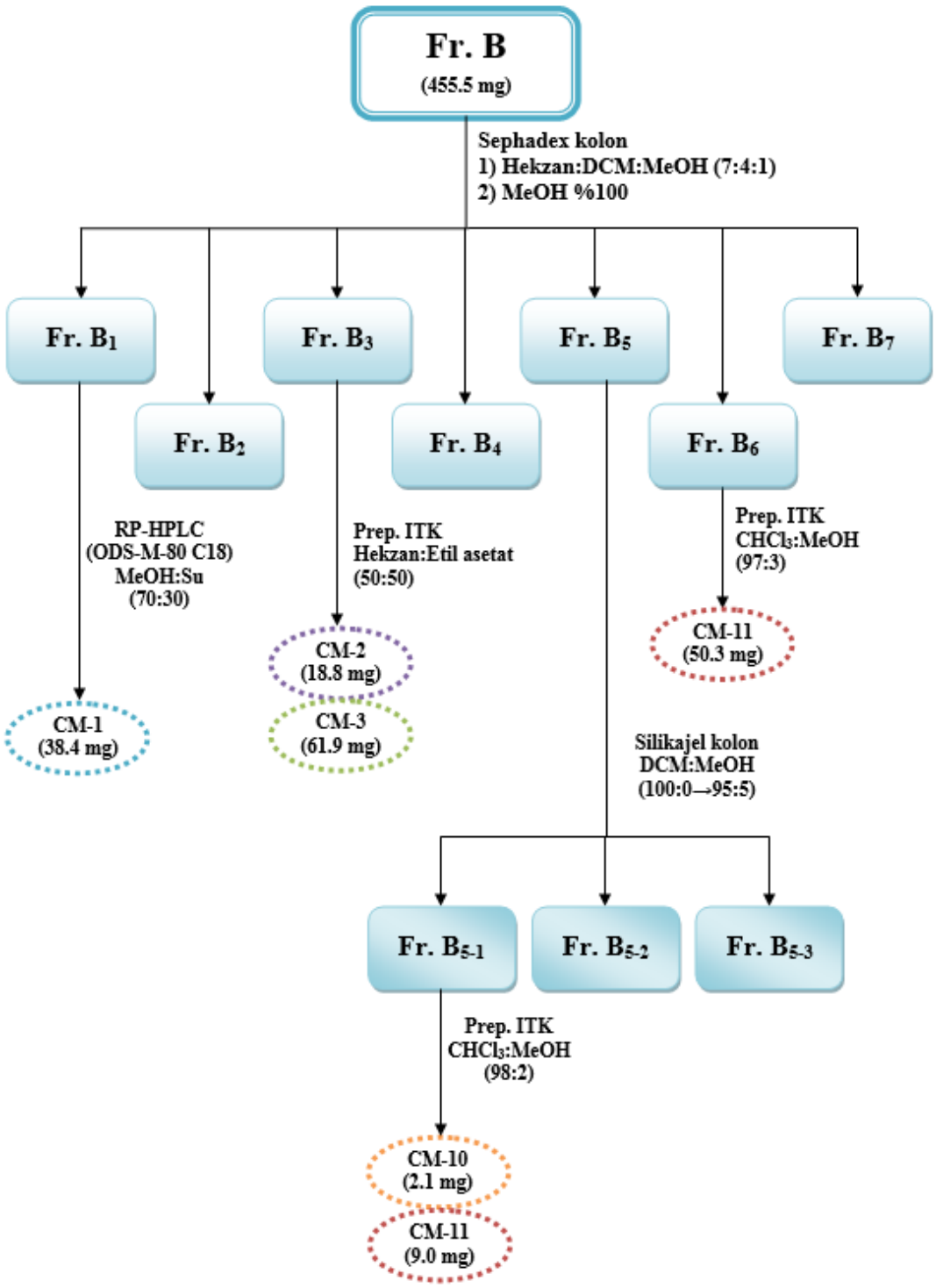
Her bir fraksiyon (Fr. A-H) sitotoksik ve antienflamatuvar aktiviteleri bakımından incelenmiştir. Etkili bulunan fraksiyonlar (Fr. A-G) üzerinde yapılan kromatografik çalışmalar (Silika jel KK, Sephadex KK, Preparatif İTK, Normal faz ve Ters Faz YBSK) ve kristallendirme işlemleri sonucu 11 bileşik (**CM-1 - CM-11**) saf olarak elde edilmiştir (Şekil 3.4-3.11).



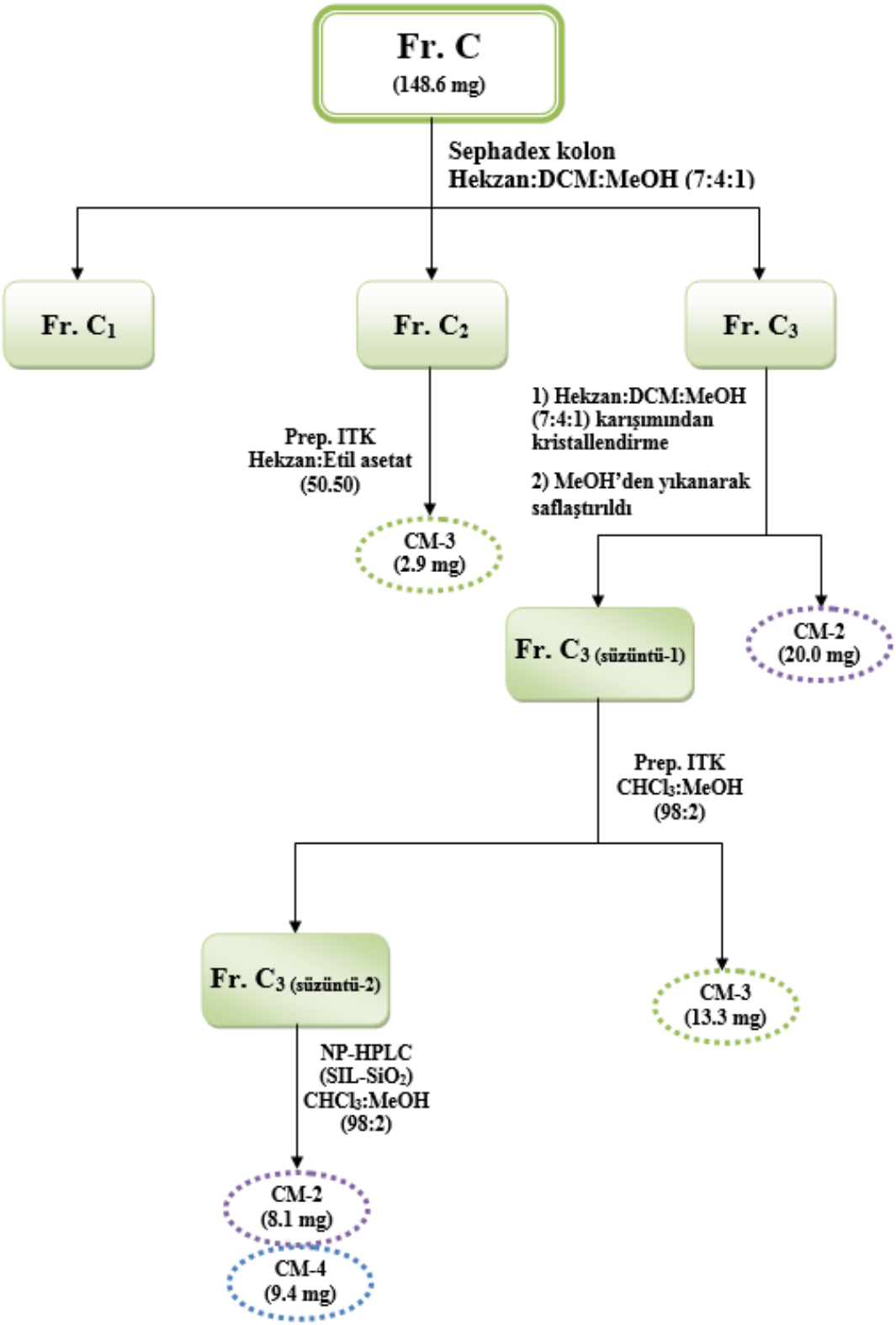
Şekil 3.4. *C. montanum*'un kloroform ekstresi üzerinde yapılan izolasyon çalışmaları



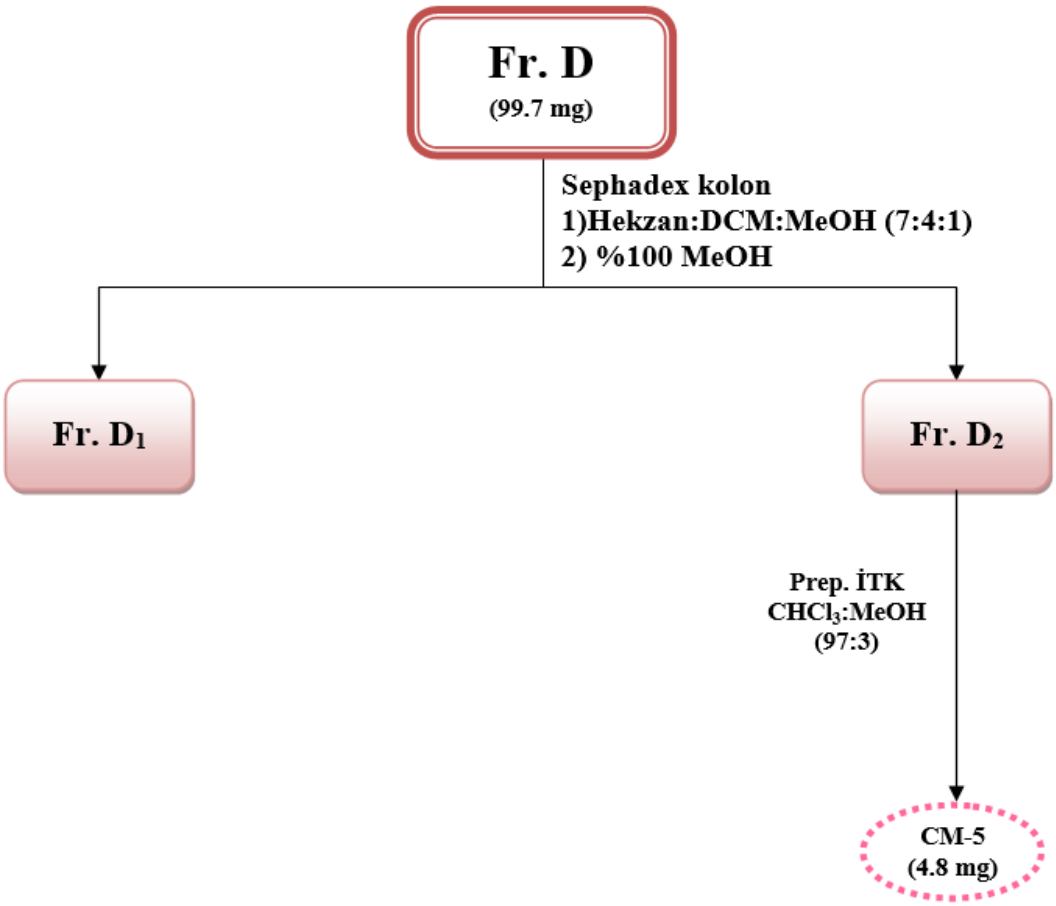
Şekil 3.5. Fraksiyon A üzerinde yapılan izolasyon çalışmaları



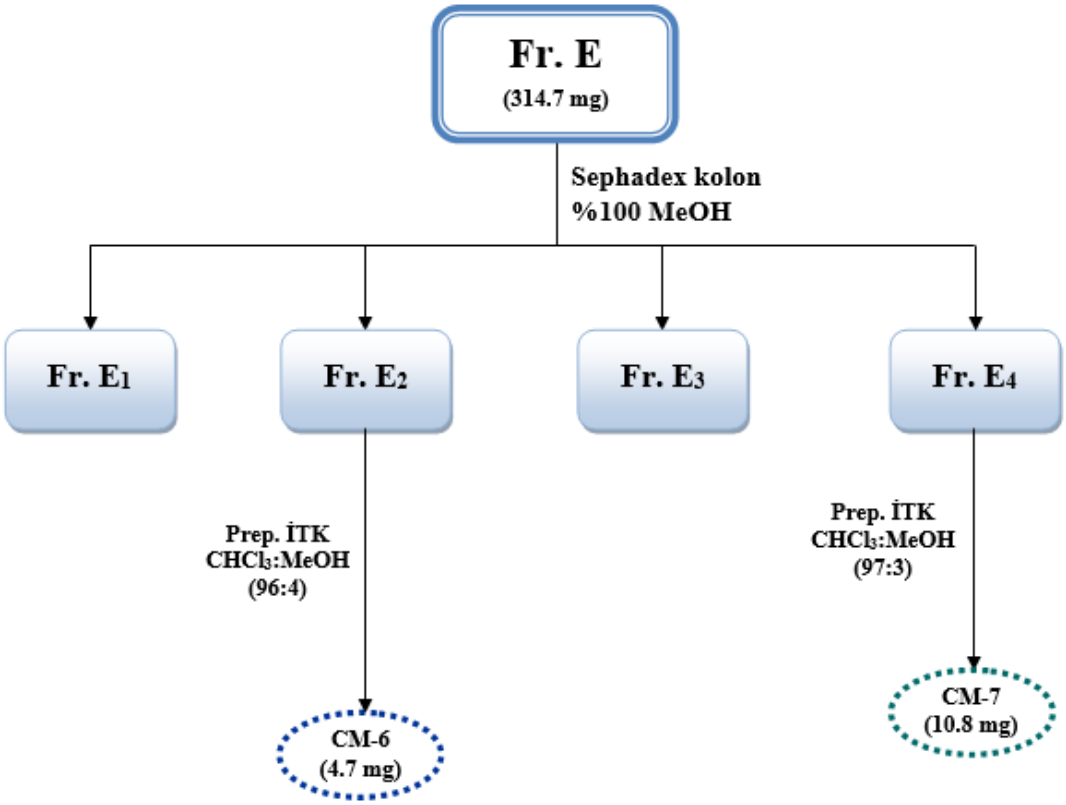
Şekil 3.6. Fraksiyon B üzerinde yapılan izolasyon çalışmaları



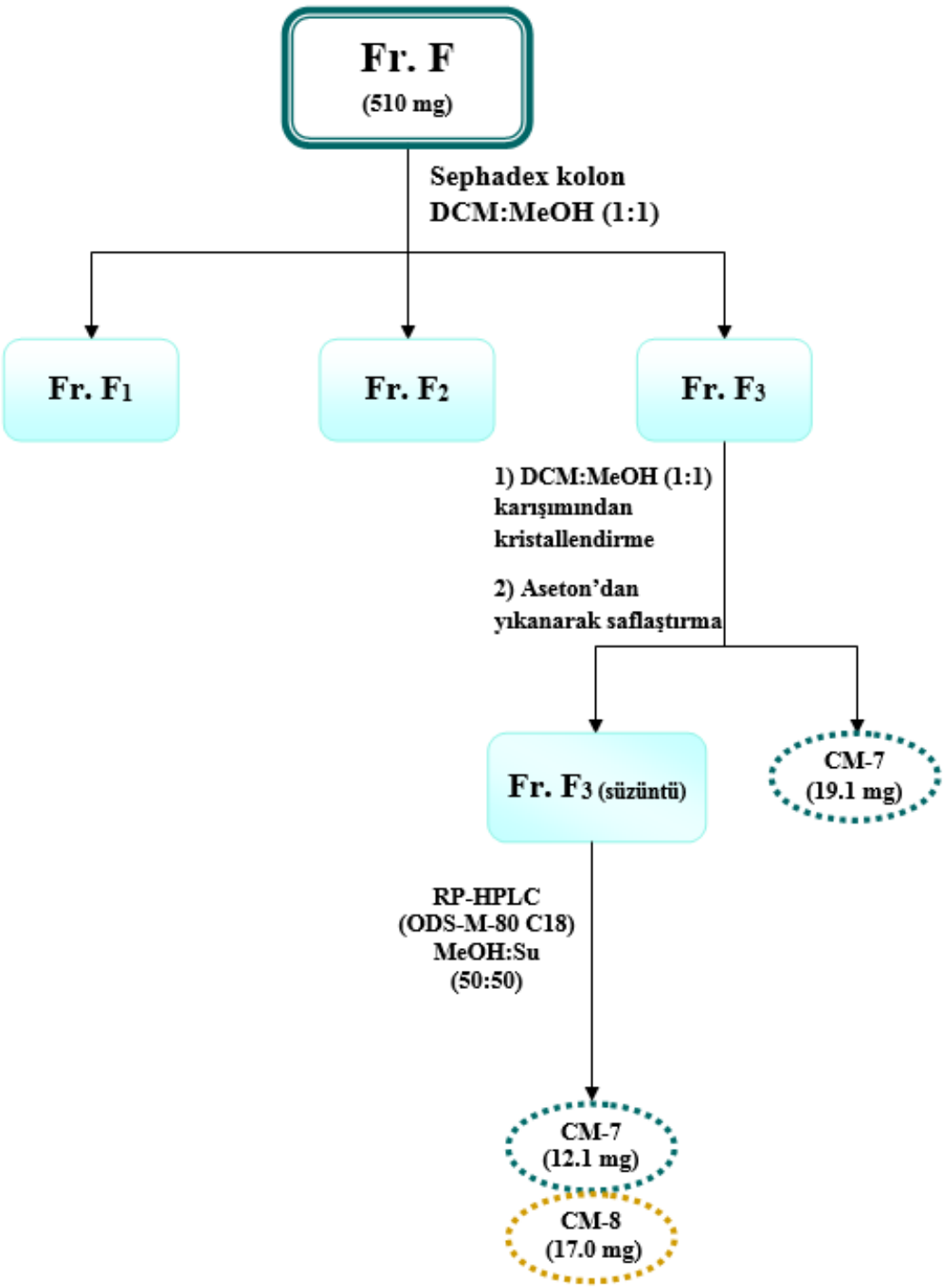
Şekil 3.7. Fraksiyon C üzerinde yapılan izolasyon çalışmaları



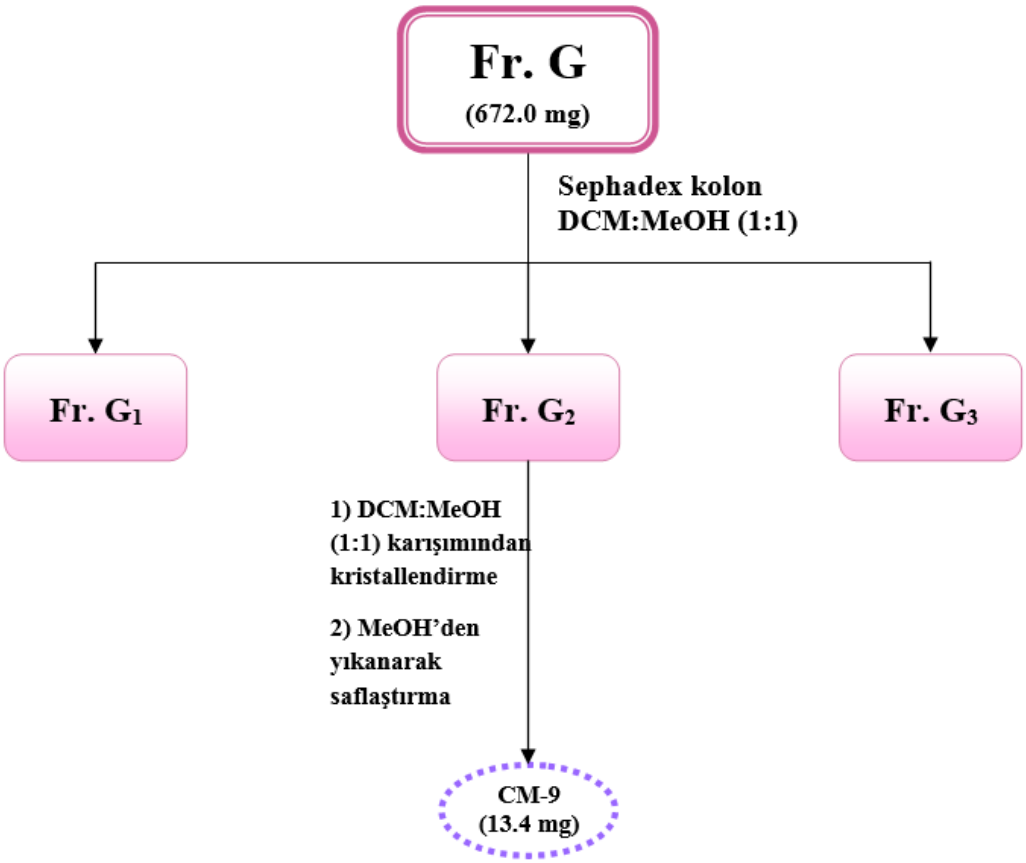
Şekil 3.8. Fraksiyon D üzerinde yapılan izolasyon çalışmaları



Şekil 3.9. Fraksiyon E üzerinde yapılan izolasyon çalışmaları



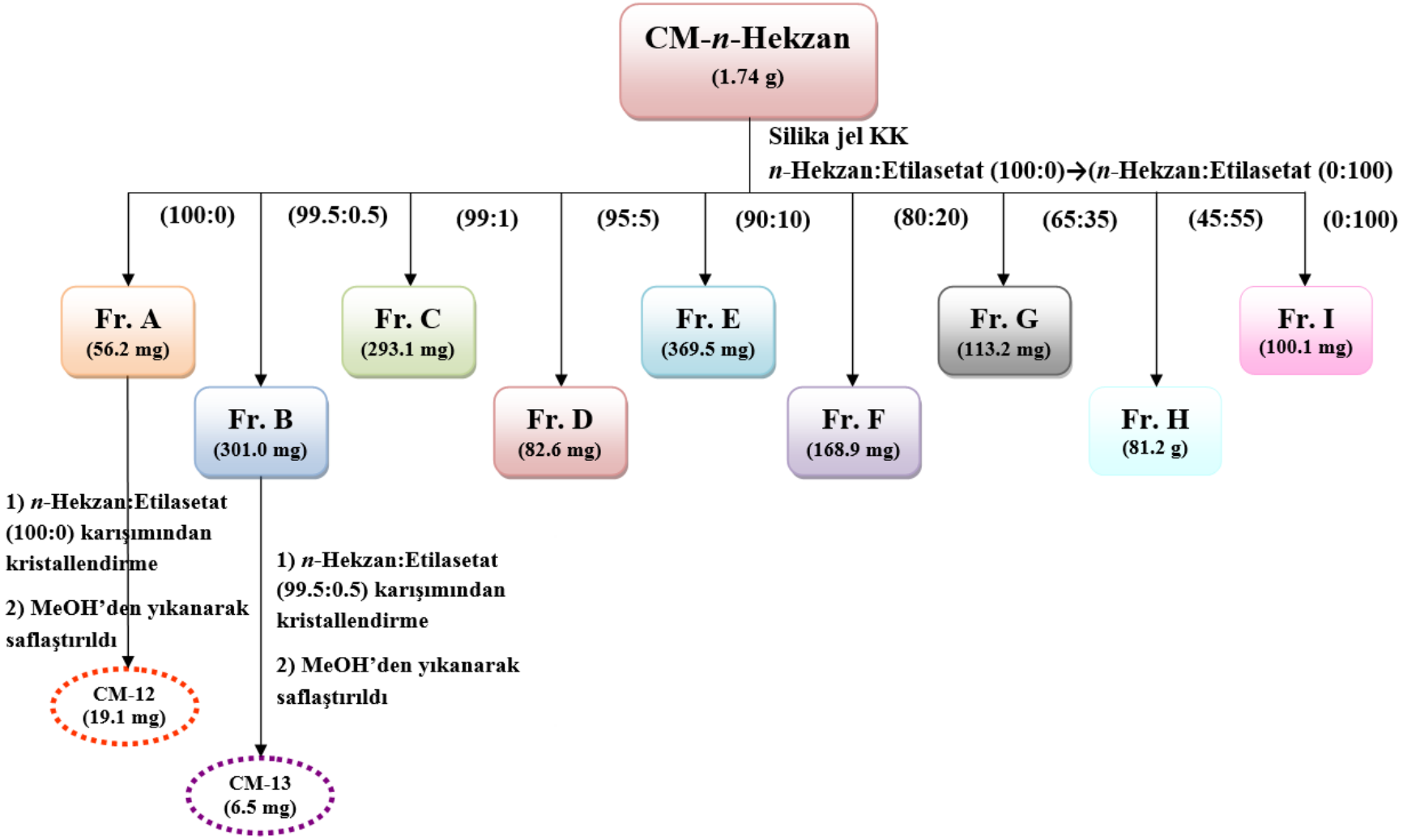
Şekil 3.10. Fraksiyon F üzerinde yapılan izolasyon çalışmaları



Şekil 3.11. Fraksiyon G üzerinde yapılan izolasyon çalışmaları

n-Hekzan ekstresi üzerinde yapılan izolasyon çalışmaları: *n*-Hekzan ekstresinin tamamı (1.74 g) Silika jel kolona uygulanmıştır. Elüsyona *n*-hekzan ile başlanıp, etilasetat oranı arttırılarak *n*-hekzan:etilasetat karışımları ile devam edilmiş ve 9 ana fraksiyon toplanmıştır (Fr. A-I) (Şekil 3.12).

Fr. A ve B üzerinde yapılan kristallendirme işlemleri sonucu 2 bileşik (**CM-12** ve **CM-13)** saf olarak elde edilmiştir (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. *C. montanum*'un *n*-hekzan ekstresi üzerinde yapılan izolasyon çalışmaları

3.2.2. Biyolojik aktivite çalışmaları

In vitro sitotoksik aktivite tayini

Sulforhodamin B (SRB) yöntemi

Ekstreler, alt ekstreler, fraksiyonlar ve saf maddelerin (**CM-1, CM-2, CM-3, CM-7** ve **CM-9**) *in vitro* sitotoksik aktiviteleri hücresel protein düzeyini ölçmeye dayalı Sulforhodamin B (SRB) hücre canlılık yöntemi ile Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD'da Prof. Dr. Engin Ulukaya'nın imkanlarıyla test edilmiştir (Ayaz, Sarimahmut, Küçükboyaci ve Ulukaya, 2016; Coskun, Erkisa, Ulukaya, Coskun, ve Ari, 2017; Tunc ve diğerleri, 2017). SRB testi için; östrojen reseptör (+) MCF-7 ve östrojen reseptör (-) MDA-MB-231 (meme), LNCaP (prostat), HT-29 (kolon) ve PC-3 (p53 mutant akciğer) kanser hücre soyları kullanılmıştır.

MCF-7, MDA-MB 231 ve LNCaP kanser hücre soyları için %1 Penisilin-G (100 U/mL)-Streptomisin (100 µg/mL) (PS) (Gibco, Grand Island, NY, USA), 2 mM L-glutamin (Gibco, Grand Island, NY, USA) ve % 10 fetal bovine serum (FBS) (Lonza, Verviers, Belgium) içeren RPMI 1640 (Lonza, Verviers, Belgium); HT-29 ve PC-3 kanser hücre soyları için ise, %1 PS, % 10 FBS ve % 1 L-glutamin ve non-esansiyel amino asit (Lonza, Verviers, Belgium) içeren RPMI 1640 besiyeri kullanılmıştır. Hücreler 37 °C'de nemli havada % 5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır.

Ekstre ve fraksiyonlar 20 µg/mL; izole edilen saf maddeler 20 µM konsantrasyonlarında tüm hücre soylarında test edilmiştir. Dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözündürülen numuneler [% 0.2 (v/v)/besiyeri] 96 kuyucuklu mikroplakalara uygulanmıştır. MCF-7, MDA-MB-231, LNCaP, HT-29 ve PC-3 hücre soylarından, besiyeri içerisinde $5x10^3$ hücre olacak şekilde her bir kuyucuğa ilave edilmiş ve 48 saat 37 °C, % 5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, her kuyucuğa 50 µL trikloroasetik asit (TCA) (%50, w/v) eklenmiş ve tekrar +4°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Deiyonize su ile yıkanan ve kurutulan mikraplakaların her kuyucuğuna 50 µL % 4 SRB solüsyonundan (% 1 asetik asit) eklenerek oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika bekletilmiştir. SRB'nin fazlası %1'lik asetik asit ile 4 defa yıkanarak uzaklaştırılmıştır. 150 µL 10 mM tris bazı (pH: 10) eklendikten sonra 10 dakika karıştırılan numunelerin absorbansları, ELISA

mikroplaka okuyucusunda (FLASH Scan S12, Analytik Jena, Almanya) 564 nm'de ölçülmüştür. Her hücre soyunda yapılan deneyler 3 bağımsız tekrar ile 2 kez çalışılmıştır. % Canlılık aşağıdaki Eş. 3.1'e göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{Absorbans (numune)} - \text{Absorbans (kör)}}{\text{Absorbans (kontrol)} - \text{Absorbans (kör)}} \times 100 \qquad (3.1)$$

MTT (3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromid) yöntemi

Ekstreler, alt ekstreler, fraksiyonlar ve saf maddelerin (**CM-1, CM-2, CM-3** ve **CM-7**) *in vitro* sitotoksik aktiviteleri formazan oluşumuna dayanan MTT yöntemi ile ölçülmüştür (Carmichael, DeGraff, Gazdar, Minna ve Mitchell, 1987; Mosmann, 1983; Scudiere ve diğerleri, 1988). Aktivite, Karachi Üniversitesi-International Center for Chemical and Biological Sciences (ICCBS)-Dr. Panjwani Center for Molecular Medicine and Drug Research (PCMD)'da Prof. Dr. Muhammad Iqbal Choudhary'nin imkanlarıyla test edilmiştir. MTT testi için; HeLa (servikal), H460 (akciğer), MCF-7 (meme), PC-3 (prostat) kanser hücre soyları ile 3T3 (fare fibroblastı) normal hücre soyu kullanılmıştır.

3T3 ve PC3 hücre soyları % 5 FBS (Sigma, St. Louis, USA) ve %1 PS (Gibco, Grand Island, NY, USA) içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma, St. Louis, USA); MCF-7 hücre soyu % 10 FBS içeren DMEM; HeLa hücre soyu % 5 FBS ve %1 PS içeren Minimum Essential Medium Eagle (Sigma, St. Louis, USA); H460 hücre soyu % 10 FBS ve %1 PS içeren RPMI (Sigma, St. Louis, USA) besiyerinde 37°C'de % 5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır. PC-3, H460, 3T3, HeLa ve MCF-7 hücre soylarından, besiyeri içerisinde sırasıyla $1x10^4$, $4x10^4$, $5x10^4$, $6x10^4$ ve $8x10^4$ hücre olacak şekilde mikroplakalara uygulanmış ve 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, her kuyucuğa ekstre ve fraksiyonlar için 30 µg/mL; izole edilen saf maddeler ve referanslar için 30 µM numune ilave edilmiştir. 48 saat inkübasyondan sonra, her bir kuyucuğa 200 µL MTT (0.5 mg/mL) eklenerek 4 saat bekletilmiştir. Oluşan formazan kristali 100 µL DMSO ile çözülmüş ve absorbanslar mikroplaka okuyucusunda (Spectra Max plus, Molecular Devices, CA, USA) H460 ve 3T3 hücre soyları için 540 nm; PC-3, HeLa ve MCF-7 hücre soyları için 570 nm'de ölçülmüştür. Doksorubisin ve siklohekzamid pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. % İnhibisyon aşağıdaki Eş.3.2'ye göre hesaplanmıştır:

$$\%\ \text{inhibisyon} = 100 - \left[\frac{\text{Absorbans (numune)} - \text{Absorbans (}-\text{kontrol)}}{\text{Absorbans (}+\text{ kontrol)} - \text{Absorbans (}-\text{ kontrol)}} \times 100\right] \quad (3.2)$$

Büyümeyi % 50'den fazla inhibe eden numunelerin IC_{50} değerleri, EZ-fit5 software ve Soft-Max Pro software (Molecular Device, USA) yardımıyla hesaplanmıştır. Deneyler her hücre soyunda 3 bağımsız tekrar ile çalışılmıştır.

In vitro antienflamatuvar aktivite tayini

Ekstreler, alt ekstreler, fraksiyonlar ve saf maddelerin (**CM-1, CM-2, CM-3** ve **CM-7**) kemiluminesans yöntemle *in vitro* antienflamatuvar aktiviteleri, zimosan ile stimüle edilen polimorfonükleer nötrofillerden (PMN) intrasellüler reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi üzerine inhibitör etkilerinin tayinine dayanmaktadır (Helfand, Werkmeister ve Roder, 1982). Antienflamatuvar aktivite, Karachi Üniversitesi-International Center for Chemical and Biological Sciences (ICCBS)-Dr. Panjwani Center for Molecular Medicine and Drug Research (PCMD)'da Prof. Dr. Muhammad Iqbal Choudhary'nin imkanlarıyla test edilmiştir.

Hank'ın dengelenmiş tuz solüsyonu (Hanks Balanced Salt Solution-$HBSS^{++}$) (Sigma, St. Louis, USA) ile dilüe edilen 25 µL tam kan örneği ve 25 µL numune (25 µg/mL), 96 kuyucuklu mikroplakalara (Costar, NY, USA) ilave edildikten sonra luminometrede (Labsystems, Helsinki, Finland) 37 ºC'de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra 25 µL serum opsonized zymosan (Fluka, Buchs, Switzerland) ve 25 µL luminol (Research Organics, Cleveland, OH, USA) negatif kontrol (sadece $HBSS^{++}$ içeren) hariç her kuyucuğa eklenmiştir. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) miktarı, luminometre yardımıyla RLU (Relative Light Units) cinsinden kaydedilmiştir. Pozitif kontrol olarak ibuprofen kullanılmıştır. % ROS inhibisyonu aşağıdaki Eş. 3.3'e göre hesaplanmıştır:

$$\%\ \text{inhibisyon} = \frac{\text{RLU (kontrol grubu)} - \text{RLU (test grubu)}}{\text{RLU (kontrol grubu)}} \times 100 \quad (3.3)$$

% 50'den fazla inhibisyon bulunan numunelerin (10, 50 ve 250 µg/mL konsanstrasyonlarda) IC_{50} değerleri, excel tabanlı bir formül yardımıyla hesaplanmıştır. Tüm deneyler 3 bağımsız tekrar ile çalışılmıştır.

Sonuçlar, IC_{50} değeri 20 µg/mL > olan numunelerin yüksek aktivitede; 20-40 µg/mL olan numunelerin orta; 40 µg/mL < olan numunelerin ise düşük aktivitede olduğunu göstermektedir.

In vitro leishmanisidal aktivite tayini

Ekstreler ve alt ekstrelerin *Leishmania major* (ATCC 50155)'e karşı; izole edilen saf maddelerin (**CM-1, CM-2, CM-3** ve **CM-7**) ise *L. donovani* (ATCC 30030)'e karşı *in vitro* leishmanisidal aktiviteleri (Choudhary, Yousaf, Ahmed ve Yasmeen, 2005; Habtemariam, 2003) Karachi Üniversitesi-International Center for Chemical and Biological Sciences (ICCBS)-Dr. Panjwani Center for Molecular Medicine and Drug Research (PCMD)'da Prof. Dr. Muhammad Iqbal Choudhary'nin imkanlarıyla tayin edilmiştir.

Leishmania promastigotları için normal fizyolojik tuzlu su içeren modifiye Novy-MCNeal-Nicolle (NNN) bifazik besiyeri kullanılmıştır. *Leishmania* promastigotları ısı ile inaktive edilmiş % 10 fetal calf serum (FCS) (PAA Laboratories GmbH, Austria) içeren RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, USA) besiyerinde inkübe edilmiştir. Parazitler, 2000 rpm'de 10 dakika santrifüje tabi tutulmuş ve üç kez tuzlu su ile yıkanmıştır. Parazitler taze besiyeri ile 10^6 hücre/mL olacak şekilde seyreltilmiştir. 180 µL besiyeri eklenen 96 kuyucuklu mikroplakalara 20 µL numune (1 mg numune 50 µL DMSO içerisinde çözülmüş ve hacim RPMI 1640 ile 1 mL'ye tamamlanmıştır) ilave edilerek seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Parazit içeren besiyerinden 100 µL tüm kuyucuklara eklenmiştir. Pozitif kontrol olarak amfoterisin B (MP Biomedical Inc.) ve pentamidin (ICN Biomedical Inc.) kullanılmıştır. Mikroplakalar 22-25 °C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Numuneler, mikroskobik yöntemle Neubaure sayım çemberinde incelenerek canlı parazitlerin sayısı belirlenmiştir. % Mortalite aşağıdaki Eş. 3.4'e göre hesaplanmıştır:

$$\%\ \text{mortalite} = 100 - \left[\frac{\text{test numunesinde sayılan toplam hücre sayısı}}{\text{kontrol numunesinde sayılan toplam hücre sayısı}} \times 100\right] \quad (3.4)$$

% 50'den fazla inhibisyon gösteren numunelerin, Software Ezfit 5.03 (Perella Scientific) yardımıyla IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Tüm deneyler 2 bağımsız tekrar ile çalışılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Fitokimyasal Çalışmalara Ait Bulgular

Chrysophthalmum montanum türünün toprak üstü kısmından hazırlanan kloroform ekstresinden 3'ü yeni olmak üzere 11 bileşik; hekzan ekstresinden 2 bileşik izole edilmiştir. Bileşiklerin yapı analizleri spektroskopik (UV, IR, 1D ve 2D NMR ve Kütle Spektroskopisi) yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Uygun kristalleri elde edilen bileşiklerin X-Ray Kristalografisi ile absolü konfügürasyonları belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre bileşikler beş farklı kimyasal grup altında toplanmıştır:

1. Seskiterpen Laktonlar (**CM-1 - CM-8**)
2. Sterol Glikoziti (**CM-9**)
3. Lignan (**CM-10**)
4. Flavonoit (**CM-11**)
5. Triterpenler (**CM-12** ve **CM-13**)

Çalışmamızda elde edilen bileşikler, tez içinde kimyasal gruplarına göre numaralandırılmıştır. Bitkimizin ana bileşenlerini oluşturan seskiterpen laktonlar kendi içerisinde 4 alt grupta toplanarak, bileşikler kendi grupları içerisinde yorumlanmıştır. Bileşiklerin yapı tayinlerinin tartışılmasında tekrardan kaçınmak için benzer bileşikler (**CM-12** ve **CM-13)** birarada ele alınmıştır.

Chrysophthalmum montanum'dan izole edilen bileşikler:

1. Seskiterpen Laktonlar

CM-1: 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-1*β*H-gaya-9.11(13)-dien-12.8*α*-olid

CM-2: 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-9*β*.10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-12.8*α*-olid

CM-3: 4*α*,6*α*-dihidroksi-1*β*,5*α*,7*α*H-gaya-9(10),11(13)-dien-12,8*α*-olid

CM-4: 1*β*,4*β*-dihidroksi-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid

CM-5: 4*α*, 6*α*-dihidroksi-9*β*,10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-8*α*,12-olid

CM-6: 4*α*,9*β*-dihidroksi-6*α*-asetoksi-1*β*H-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid

CM-7: (4*α*,5*α*,8*β*,10*β*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid

CM-8: (4*α*,5*α*,8*β*,10*α*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid

2. Sterol Glikoziti

CM-9: Daukosterol (*β*-sitosterol-3-O-*β*-D-glukopiranozit) (**CM-9a**) ve Stigmasterol 3-O-*β*-D-glukopiranozit (**CM-9b**) karışımı

3. Lignan

CM-10: Pinorezinol

4. Flavonoit

CM-11: Krizosplenol C (5,6,4'-trihidroksi-3,7,3'-trimetoksi flavon)

5. Triterpenler

CM-12: Ψ-Taraksasterol-asetat (**CM-12a**) ve Taraksasterol-asetat (**CM-12b**) karışımı

CM-13: Ψ-Taraksasterol (**CM-13a**) ve Taraksasterol (**CM-13b**) karışımı

4.1.1. İzole edilen seskiterpen laktonların yapı tayinlerine ait bulgular

İzole edilen seskiterpen laktonlar, inuviskolid ve izoinuviskolid yapıları temel alınarak gruplanmıştır.

İnuviskolid türevleri

CM-6: 4*α*,9*β*-dihidroksi-6*α*-asetoksi-1*β*H-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid

CM-4: 1*β*,4*β*-dihidroksi-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid

İzoinuviskolid türevleri

CM-1: 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-1*β*H-gaya-9.11(13)-dien-12.8*α*-olid

CM-3: 4*α*,6*α*-dihidroksi-1*β*,5*α*,7*α*H-gaya-9(10),11(13)-dien-12,8*α*-olid

C-9,10-epoksi-8,12-*trans*-gayanolidler

CM-2: 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-9*β*.10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-12.8*α*-olid

CM-5: 4*α*, 6*α*-dihidroksi-9*β*,10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-8*α*,12-olid

C1(2)-en, 8,12-*cis*-gayanolidler

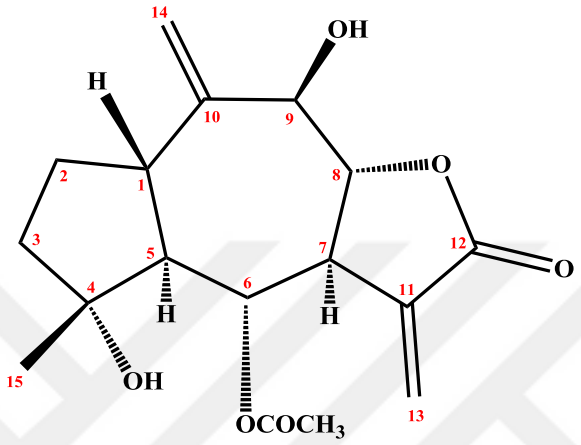
CM-7: (4*α*,5*α*,8*β*,10*β*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid

CM-8: (4*α*,5*α*,8*β*,10*α*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid

İnuviskolid türevleri

CM-6: 4*α*,9*β*-dihidroksi-6*α*-asetoksi-1*β*H-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid

CM-6 bileşiği (4.7 mg) kloroform ekstresinden beyaz renkte amorf toz bir madde halinde izole edilmiştir.



CM-6: $C_{17}H_{22}O_6$ (MA: 322)

$[\alpha]_D^{28.9}$: - 12.2 (*c* 0.05, CH_3OH)

UV (CH_3OH) λ_{max} nm: 213

IR ($CHCl_3$) υ_{max} cm^{-1}: 3418 ve 3382 (OH), 1756 (*α*-metilen, *γ*-lakton), 1658 (doymamışlık)

^{1}H NMR ($CDCl_3$+ CD_3OD, 500 MHz) δ_H: Şekil 4.1a

^{1}H NMR (C_5D_5N, 500 MHz) δ_H: Şekil 4.1a

^{13}C NMR ($CDCl_3$+ CD_3OD, 150 MHz) δ_C: Şekil 4.1b

DEPT 90 ($CDCl_3$+ CD_3OD, 150 MHz) δ_C: Şekil 4.1b

DEPT 135 ($CDCl_3$+ CD_3OD, 150 MHz) δ_C: Şekil 4.1b

COSY ($CDCl_3$+ CD_3OD, 500 MHz) δ_H: Şekil 4.1c

HSQC ($CDCl_3$+ CD_3OD) δ: Şekil 4.1d

HMBC ($CDCl_3$+ CD_3OD) δ: Şekil 4.1e

NOESY ($CDCl_3$+ CD_3OD, 500 MHz) δ_H: Şekil 4.1f

EI-MS m/z (relatif değer): 262.1 $[M\text{-}CH_3COOH]^+$ (50.62), 244.1 $[262\text{-}H_2O]^+$ (40.01), 215.1 $[244\text{-}COH]^+$ (26.32); 186.0 (100)

ESI-MS: m/z 345 $[M+Na]^+$, 667 $[2M+Na]^+$

CM-6'nın UV spektrumu λ 213 nm'de maksimum absorbsiyon bantı göstermiştir. IR spektrumunda ise, hidroksil grubu (3418 ve 3382 cm^{-1}), karakteristik α-metilen, γ-lakton (1756 cm^{-1}) ve doymamışlığa (1658 cm^{-1}) ait absorpsiyon bantları gözlenmiştir.

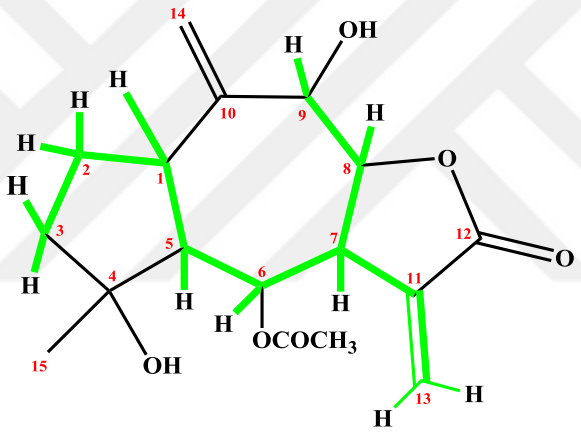
Bileşiğin $CDCl_3$+CD_3OD içerisinde alınan ^1H NMR spektrumunda (Şekil 4.1a-A, B), δ_H 6.12 (*d, J*=3.5 Hz, H-13a) ve 5.50 (*d, J*=3.5 Hz, H-13b)'de lakton halkasına bağlı karakteristik ekzosiklik metilen grubuna ait sinyaller ve ayrıca δ_H 5.20 (*brs*, H-14a) ve 5.12 (*brs*, H-14b)'de diğer bir ekzosiklik metilen grubuna ait sinyaller gözlenmiştir. δ_H 1.10 (*s*, H_3-15) ve 1.93 (*s*, CO***CH₃***)'de 2 adet metil, δ_H 4.08 (*d, J*=8.0 Hz, H-9), 4.18 (*dd, J*=8.5, 8.5 Hz, H-8) ve 5.15 (*dd "t", J*=10.0 Hz, H-6)'de 3 adet oksimetin gruplarına ait sinyaller gözlenmiştir. Bileşiğin ayrıca C_5D_5N içerisinde alınan ^1H NMR spektrumunda (Şekil 4.1a-C), diğer piklere ilaveten, δ_H 3.59'da geniş singlet halinde OH grubuna ait pik görülmüştür. Ayrıca bileşiğin ^1H NMR spektrumunda ($CDCl_3$+CD_3OD) δ_H 1.10 (*s*, H_3-15)'da gözlenen metil grubunun düşük alana kaymış olması, C-4'te OH sübstitüsyonu bulunduğunu desteklemiştir.

Tüm proton ve karbon rezonanslarının yorumlanmasında, ^{13}C NMR, DEPT ve 2D NMR (Çizelge 4.1, Şekil 4.1b-f) tekniklerinden yararlanılmıştır. Bu sonuçlara göre, bileşiğin ^{13}C NMR spektrumunda 2 adet metil karbonu [δ_C 23.09 (C-15); 20.85 (CO***CH₃***)], 3 adet oksimetin karbonu [δ_C 73.16 (C-6); 82.54 (C-8); 77.61 (C-9)], 2 adet olefinik metilen karbonu [δ_C 125.22 (C-13); 116.20 (C-14)], 1 adet oksijen fonksiyonuna bağlı sp^3 tersiyer karbon [δ_C 79.47 (C-4)], 2 adet sp^2 kuaterner karbon [δ_C 149.18 (C-10); 134.78 (C-11)], 1 adet lakton karbonili [δ_C 169.92 (C-12)] ve 1 adet ester karbonili [δ_C 170.63 (C-16)] taşıdığı tespit edilmiştir.

Seskiterpen laktonlarda biyosentez bakımından H-7'nin α konumda olması (Bruneton, 1999; Simonsen ve diğerleri, 2013) ve ^1H NMR spektrumunda ($CDCl_3$+CD_3OD, Şekil 4.1a-B) H-7 ve H-8 visinal protonları arasındaki etkileşim sabitinin $J_{7,8}$= 8.5 Hz ölçülmesi, H-8'in β pozisyonda olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca H_2-13 protonlarının [δ_H 6.12 (*d, J*=3.5 Hz, H-13a); 5.50 (*d, J*=3.5 Hz, H-13b)] H-7 ile gösterdiği etkileşim sabitinin $J_{7,13} > 3$ olması, Samek kuralına (Samek, 1978) uygun olarak lakton halkasının "**8,12-*trans***" bağlandığını göstermiştir. Ayrıca, bileşiğin ^1H NMR spektrumunda ($CDCl_3$+CD_3OD, Şekil 4.1a-B), H-6'nın H-5 ve H-7 ile etkileşim sabitinin eşit değerde ($J_{5,6}$=$J_{6,7}$=10 Hz) olmasından dolayı, H-6 sinyali 5.15 ppm'de *dd*"*t*" olarak görülmüştür. H-6'nın H-5 ve H-7

visinal protonları ile arasında büyük etkileşim sabitinin bulunması, H-6'nın β konumda olduğunu göstermiştir. H-6'nın kimyasal kayma değerinin (5.15 ppm) düşük alana kayması C-6'nın ester fonksiyonel grubu taşıdığına işaret etmiştir. δ_H 4.18'de görülen H-8'in H-9 visinal proton ile etkileşim sabitinin $J_{8,9}$= 8.5 Hz olması, H-9'un α; C-9'daki OH'in ise β pozisyonda olduğuna işaret etmiştir.

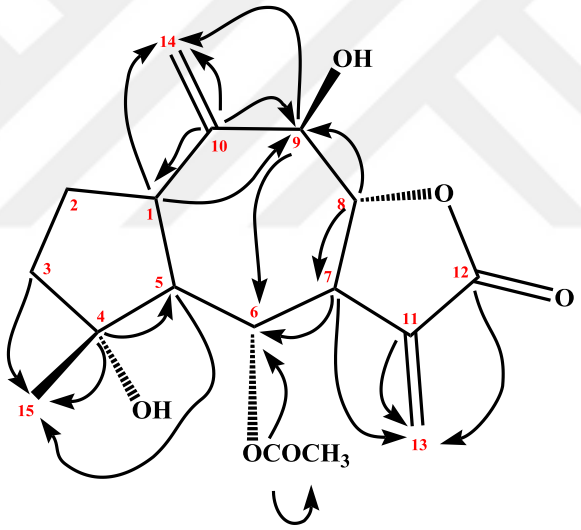
COSY spektrumunda (Şekil 4.1c) tek spin sistemi içinde, H-5/H-6, H-6/H-7, H7/H-8, H-8/H-9, H-1/H_2-2, H-1/H-5 ve H_2-2/H_2-3 visinal protonları arasında korelasyonlar gözlenmiştir. Ayrıca CM-6'nın lakton halkasında yer alan ekzosiklik metilen protonlarının (H_2-13) H-7 ile uzak mesafe allilik etkileşim gösterdiği, H-1'in ise H_2-3 ile uzak mesafe W etkileşim gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.1g).



Şekil 4.1g. 4α,9β-dihidroksi-6α-asetoksi-1βH-gaya-10(14),11(13)-dien-8α,12-olid (**CM-6**)'da COSY korelasyonları

HSQC spektrumundan (Şekil 4.1d), protonların üzerinde bulundukları karbon rezonansları yorumlanmıştır. HSQC yardımıyla, karakteristik ekzosiklik metilen protonlarının bağlı olduğu olefinik karbon (C-13) δ_C 125.22'de ve diğer ekzosiklik metilen (C-14) ise δ_C 116.20'de tespit edilmiştir. C-1, C-5 ve C-7 metin karbonlarının sırasıyla δ_C 37.70, 63.50 ve 42.83'de olduğu saptanmıştır. C-2 ve C-3'e ait metilen gruplarının karbon rezonansları ise, sırasıyla δ_C 25.20 ve 40.34'de görülmüştür. Metil gruplarına ait karbonlar (C-15 ve CO***CH₃***), sırasıyla δ_C 23.09 ve 20.85'de bulunmuştur. C-6, C-9 ve C-8'de yer alan oksimetin grupları ise, sırasıyla δ_C 73.16, 77.61 ve 82.54'de saptanmıştır.

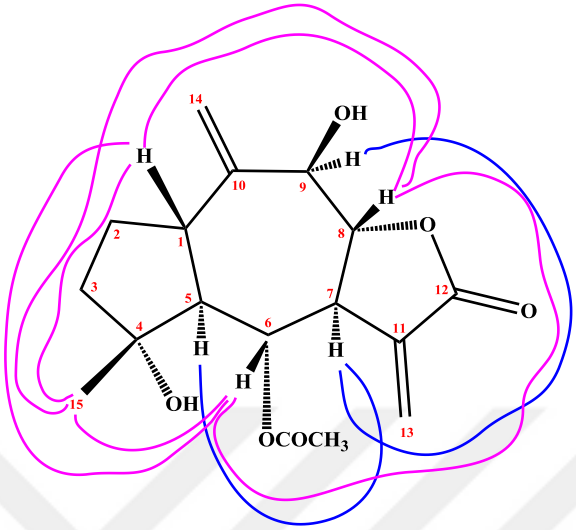
HMBC spektrumunda (Şekil 4.1e), δ_C 134.78'deki karbon ile H-7 ve H_2-13'ün uzak mesafe etkileşimleri, karakteristik ekzosiklik metilen grubunun C-11'e bağlı olduğunu göstermiştir. δ_C 149.18'deki karbon ile H-9, H-1 ve H_2-14 arasındaki heteronükleer etkileşimler, diğer ekzosiklik metilen grubunun C-10 konumunda olduğunu doğrulamıştır. Ayrıca, δ_C 77.61 ile etkileşim şiddeti sırasıyla giderek azalan H_2-14, H-8, H-7 ve H-6 protonlarının ilişkisi, integrali bir proton değerindeki δ_H 4.08 oksimetin sinyalinin C-9'da olduğuna işaret etmiştir. δ_C 73.16 ile H-5, H-7 ve H-8'in korelasyonları, δ_H 5.15'de gözlenen diğer bir oksimetin sinyalinin C-6'da bulunduğunu doğrulamıştır. δ_C 169.92'deki karbon rezonansı ile H_2-13 arasındaki etkileşim bu sinyalin lakton karboniline (C-12) ait olduğunu göstermiştir. Buna ilaveten, δ_C 170.63'deki sinyal ile asetoksi metili (CO***CH₃***) ve H-6 protonları arasındaki korelasyonlar, asetoksil fonksiyonel grubunun C-6'da bulunduğuna işaret etmiştir (Şekil 4.1h).



Şekil 4.1h. 4*α*,9*β*-dihidroksi-6*α*-asetoksi-1*β*H-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (**CM-6**)'da önemli uzak mesafe HMBC korelasyonları (*Oklar karbondan protona doğrudur*)

NOESY spektrumunda (Şekil 4.1f) H-7 (δ_H 2.88)/H-5 (δ_H 1.72) arasındaki korelasyon H-5'in H-7 gibi α pozisyonda olduğunu doğrulamıştır. NOESY yardımıyla, H-7 (δ_H 2.88)/H-9 (δ_H 4.08) arasındaki korelasyondan H-9'un da α pozisyonda olduğu tespit edilmiştir. Bu durum C-9'da bulunan OH grubunun β pozisyonda olduğunu göstermiştir. Buna ilave olarak, H-8 (δ_H 4.18)/H-6 (δ_H 5.15) arasında korelasyon bulunması H-6'nın β konumda olduğunu doğrulamıştır. NOESY spektrumunda ilave olarak, H-8 (δ_H 4.18)/H-1 (δ_H 2.33)

ve H-1/H_3-15 (δ_H 1.10) arasındaki korelasyonlar, H-1 ve H_3-15'in de β pozisyonda olduğunu göstermiştir (Şekil 4.1i).



Şekil 4.1i. 4α,9β-dihidroksi-6α-asetoksi-1βH-gaya-10(14),11(13)-dien-8α,12-olid (**CM-6**)'da NOESY korelasyonları

Bileşiğin EI-MS spektrumunda, $[M\text{-}CH_3COOH]^+$, $[262\text{-}H_2O]^+$ ve $[244\text{-}COH]^+$ pikleri sırasıyla m/z 262.1, 244.1 ve 215.1'de tespit edilmiştir. Bileşiğin ESI-MS spektrumunda ise bileşiğin molekül ağırlığı ile uyumlu m/z 345'de $[M+Na]^+$ piki gözlenmiştir. Bu bulgular, ^1H, ^{13}C ve 2D NMR spektroskopik bulguları (Çizelge 4.1, Şekil 4.1a-4.1f) ile birlikte değerlendirildiğinde, **CM-6**'nın moleküler formülü $C_{17}H_{22}O_6$ olan, "**inuviskolid**" türevi olduğu belirlenmiştir.

Literatür araştırması ve önerilen formül üzerinden yapılan bilgisayar taraması sonucunda, bileşiğin ^1H ve ^{13}C NMR verileri, literatürde "inuviskolid" için verilen değerlerle büyük oranda uyum göstermiştir (Bohlmann, Czerson and Schöneweiß, 1977; Zdero, Bohlmann, King ve Robinson, 1987). **CM-6**, 9. Konumda β-hidroksil, 9. Konumda α-asetoksil sübstitüsyonları taşıyan inuviskolid türevi bir bileşiktir. Bohlmann ve diğerleri, (1977), inuviskolid yapısı için C_6D_6 (J değerleri verilmiştir) ve $CDCl_3$ (J değerleri bulunmamaktadır) çözücülerinde alınan ^1H NMR verilerini açıklamış ve H-1'i α olarak bildirmiştir. Daha sonra Zdero ve diğerleri (1987), inuviskolid'in ^1H NMR verilerini ($CDCl_3$, J değerleri bulunmamaktadır) açıklamış ve Bohlmann ve diğerleri (1977)'nin aksine NOE difference spektroskopi ile H-1'in β pozisyonda olduğunu belirlemiştir. Yaptığımız literatür taramasında, inuviskolid yapısına benzer "8-*epi*-inuviskolid" ve "4,8-

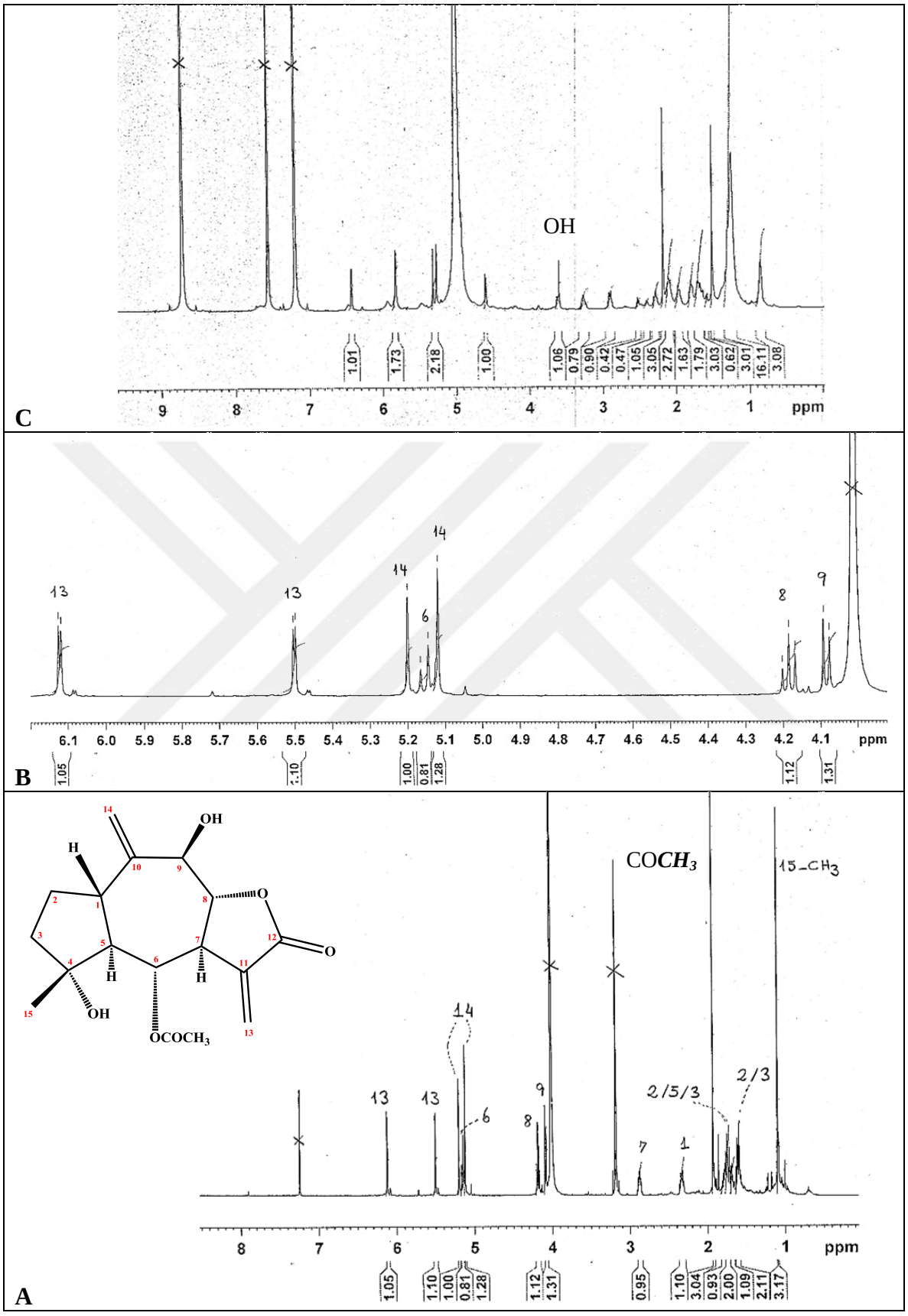
bis-*epi*-inuviskolid" (Zdero ve diğerleri 1987), "1-*epi*-inuviskolid" (Rustaiyan, Jakupovic, Chau-Thi, Bohlmann ve Sadjadi, 1987), "1*β*-hidroksi-4,8-*bis*-*epi*-inuviskolid" (Dendougui, Benayache, Benayache ve Connoly, 2000), "1*β*-hydroxy-8-*epi*-inuviskolid" (Ahmed ve Mahmoud, 1998) ve "6*α*-asetoksi-izoinuviskolid" (Rustaiyan, Zare, Biniyaz ve Fazlalizadeh, 1989) bileşiklerinin çeşitli Asteraceae bitkilerinden izole edildiği görülmüştür. Literatürde yer alan benzer inuviskolid türevlerinin ^{1}H ve ^{13}C NMR değerlerinin CM-6 ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Bu sonuçlara dayanarak, **CM-6** bileşiğinin yapısı "**4*α*,9*β*-dihidroksi-6*α*-asetoksi-1*β*H-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid"** olarak aydınlatılmıştır. Bileşik tarafımızdan literatürde yer alan inuviskolid yapısı temel alınarak **"9*β*-hidroksi-6*α*-asetoksi-inuviskolid**" isimlendirilmiştir. Literatür araştırmalarımıza göre, bu bileşik doğadan ilk olarak elde edilen yeni bir bileşiktir.

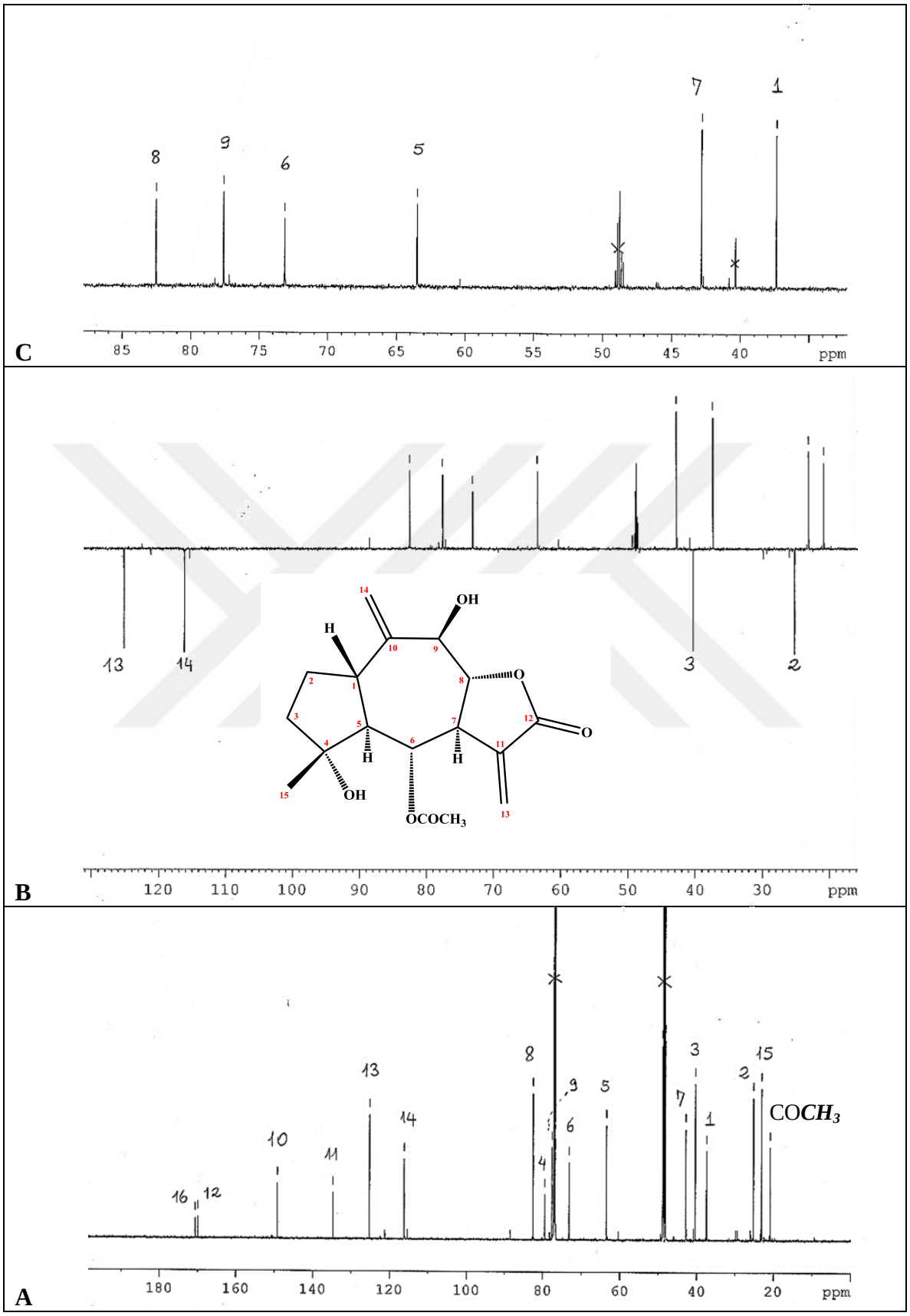
Çizelge 4.1. 4*α*,9*β*-dihidroksi-6*α*-asetoksi-1*β*H-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (**CM-6**) bileşiğinin ^{1}H ve ^{13}C NMR spektroskopik değerleri ($CDCl_3$+CD_3OD: δ_H 500 MHz, δ_C 150 MHz; C_5D_5N: δ_H 500 MHz) ve HMBC korelasyonları

Konum	**C/H**	**$CDCl_3$+CD_3OD**			**C_5D_5N**
		δ_C ppm	**δ_H ppm, *J* (Hz)**	**HMBC (C→H)**	**δ_H ppm, *J* (Hz)**
1	CH	37.70	2.33 m	H_2-14, H-9, H-5, H_2-3	2.90 m
2	CH_2	25.20	1.75***** m, 1.60***** m	H-1	2.1***** m, 1.96***** m
3	CH_2	40.34	1.70***** m, 1.60***** m	H_3-15	2.1***** m, 1.96***** m
4	C	79.47	-	H_3-15, H-5, H_2-2	-
5	CH	63.50	1.72***** m	H_3-15, H-1, H_2-14, H-6	2.1***** m
6	CH	73.16	5.15 dd "t"(10.0)	H-5, H-7, H-8	4.98***** m
7	CH	42.83	2.88 m	H-6, H-8, H_2-13	3.26 m
8	CH	82.54	4.18 dd (8.5/8.5)	H-9, H-7	4.98***** m
9	CH	77.61	4.08 d (8.0)	H_2-14, H-8, H-7, H-6	4.08 d (8.0)
10	C	149.18	-	H-9, H-1, H_2-14	-
11	C	134.78	-	H-7, H_2-13	-
12	C	169.92	-	H_2-13	-
13	CH_2	125.22	6.12 d (3.5) 5.50 d (3.5)	-	6.42 brs 5.82 brs
14	CH_2	116.20	5.20 brs 5.12 brs	H-9, H-1	5.31 brs 5.26 brs
15	CH_3	23.09	1.10 s	H_2-3, H-5	1.51 s
COCH_3	C	170.63	-	CO***CH_3***, H-6	-
CO***CH_3***	CH_3	20.85	1.93 s	-	2.17 s
OH	-	-	-	-	3.59 brs

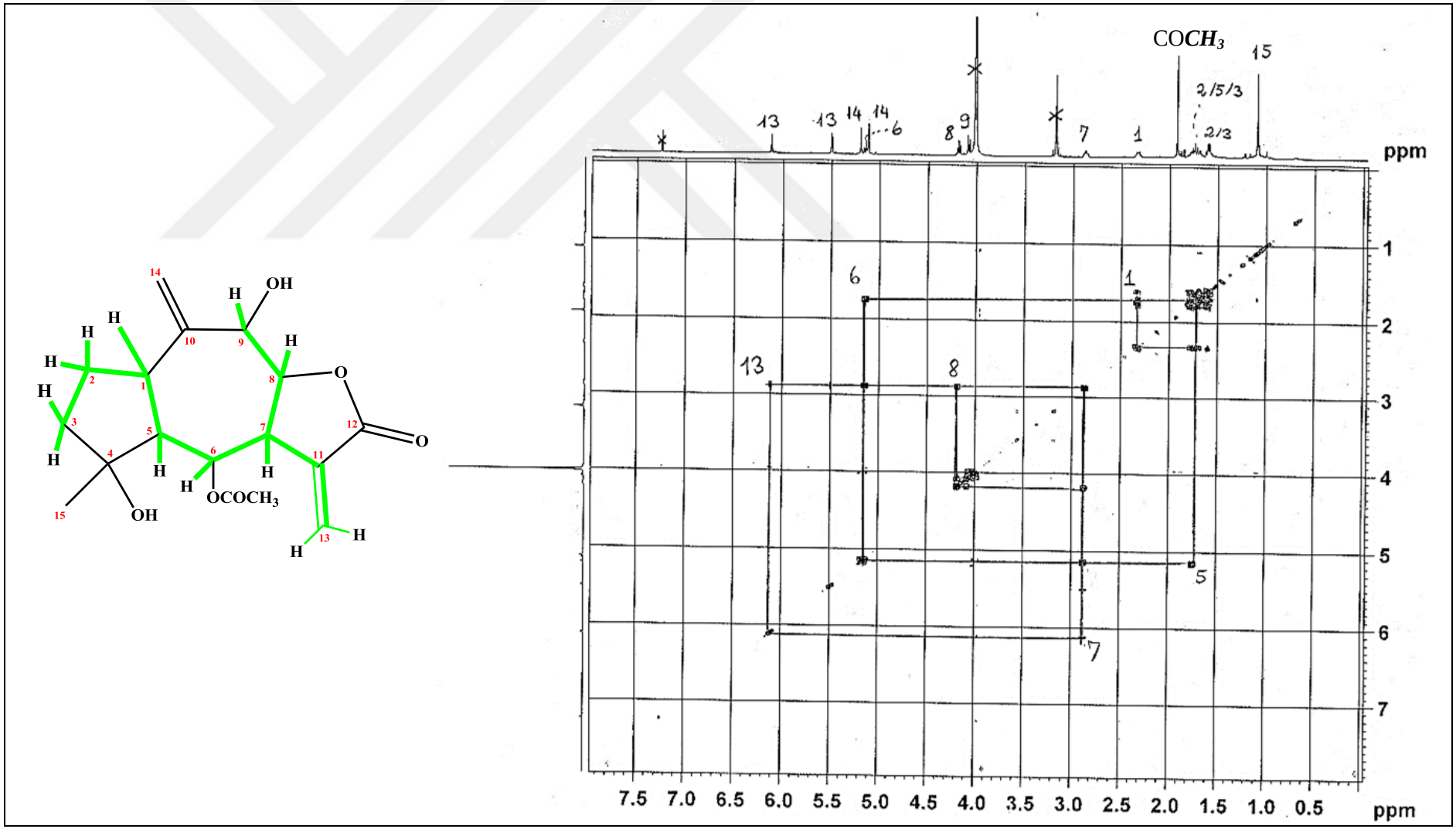
*****Üst üste çakışan protonlar



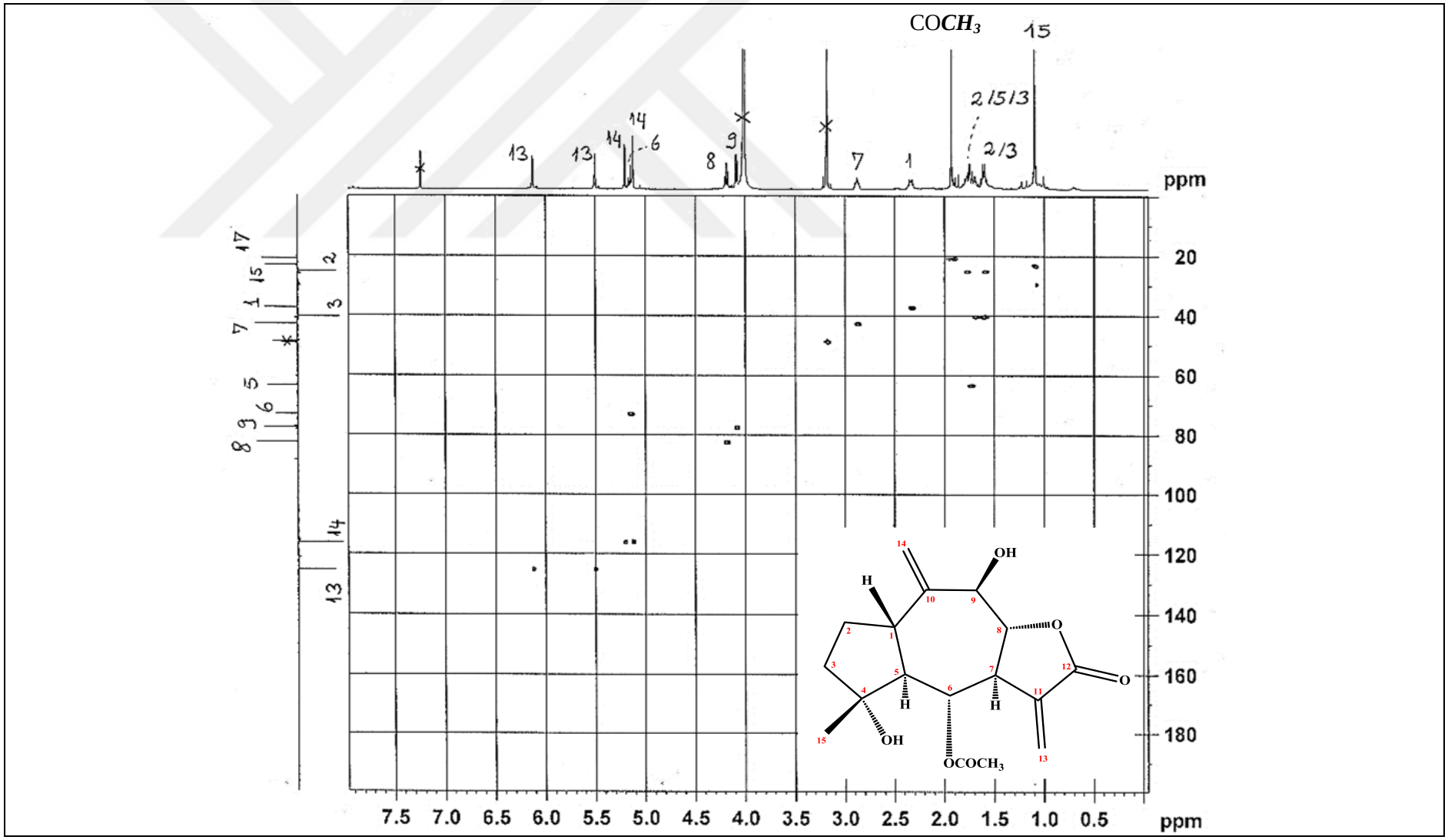
Şekil 4.1a. 4*α*,9*β*-dihidroksi-6*α*-asetoksi-1*β*H-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (**CM-6**)'nın ^{1}H-NMR spektrumları (A, B: $CDCl_3$+CD_3OD, 500 MHz; C: C_5D_5N, 500 MHz)



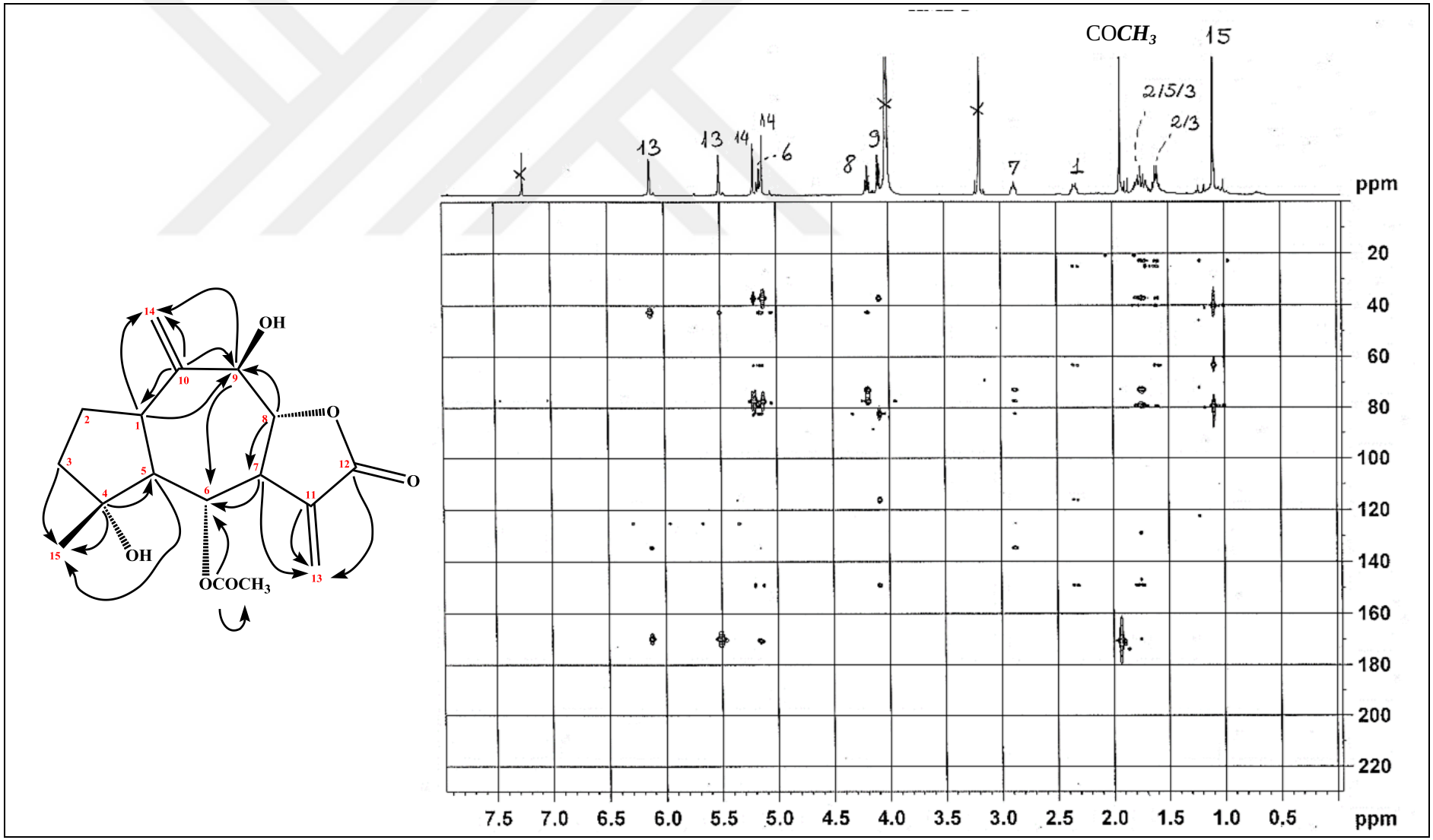
Şekil 4.1b. 4*α*,9*β*-dihidroksi-6*α*-asetoksi-1*β*H-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (**CM-6**)'nın ^{13}C NMR (A), DEPT 135 (B) ve DEPT 90 (C) spektrumları ($CDCl_3$+CD_3OD, 150 MHz)



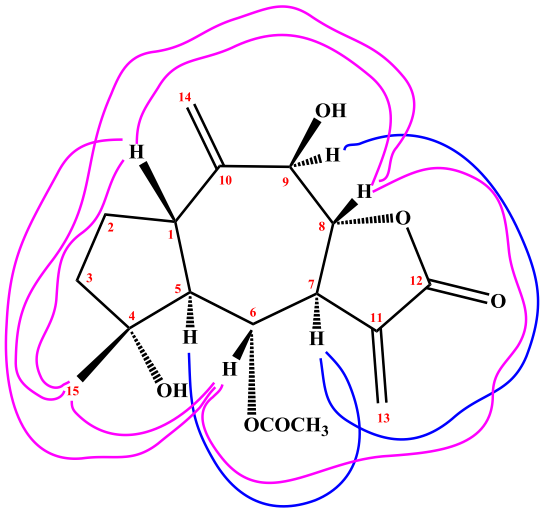
Şekil 4.1c. 4*α*,9*β*-dihidroksi-6*α*-asetoksi-1*β*H-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (**CM-6**)'nın COSY spektrumu ($CDCl_3$+CD_3OD, 500 MHz)

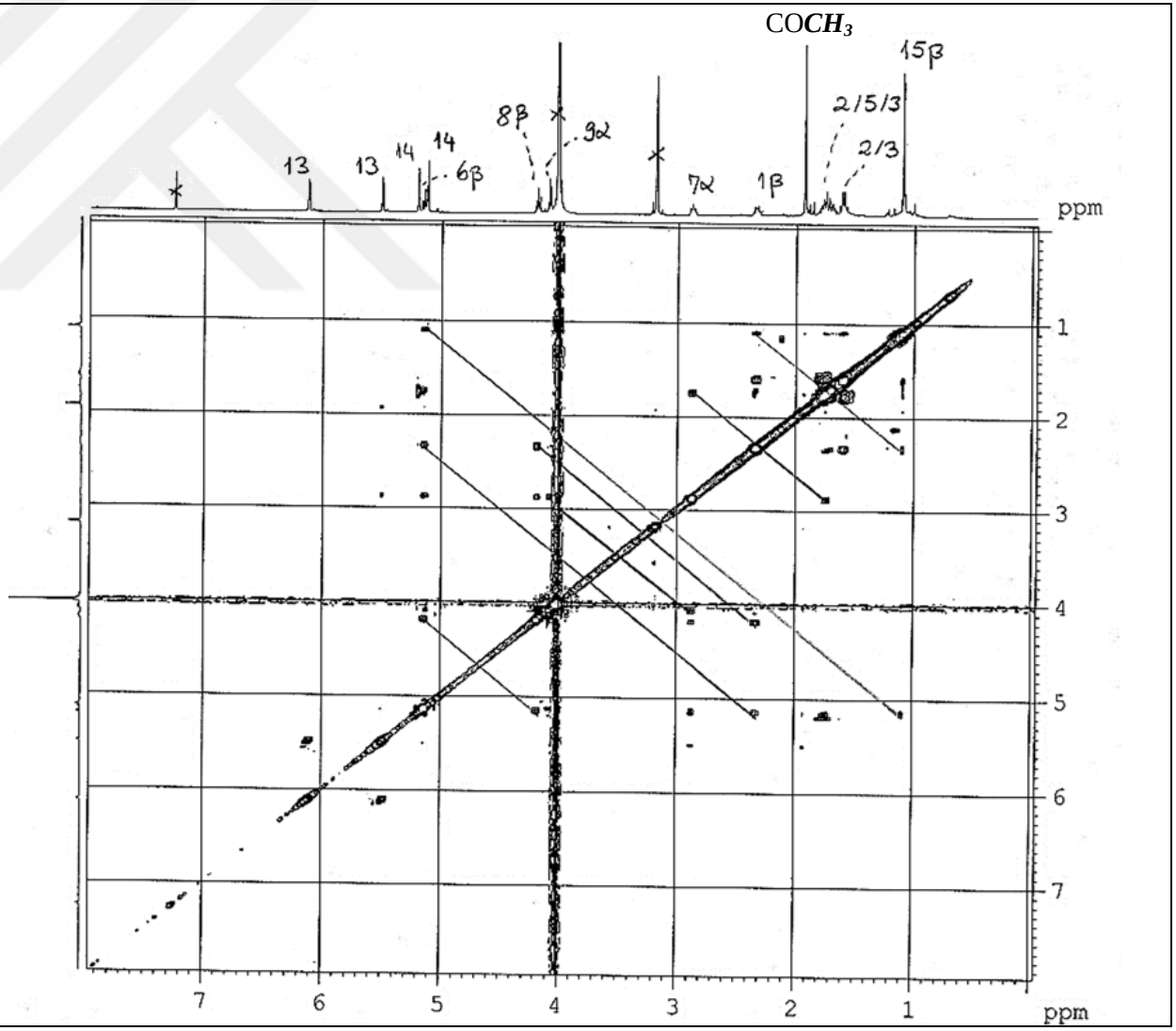


Şekil 4.1d. 4*α*,9*β*-dihidroksi-6*α*-asetoksi-1*β*H-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (**CM-6**)'nın HSQC spektrumu ($CDCl_3$+CD_3OD)



Şekil 4.1e. 4α,9β-dihidroksi-6α-asetoksi-1βH-gaya-10(14),11(13)-dien-8α,12-olid (**CM-6**)'nın HMBC spektrumu ($CDCl_3$+CD_3OD)

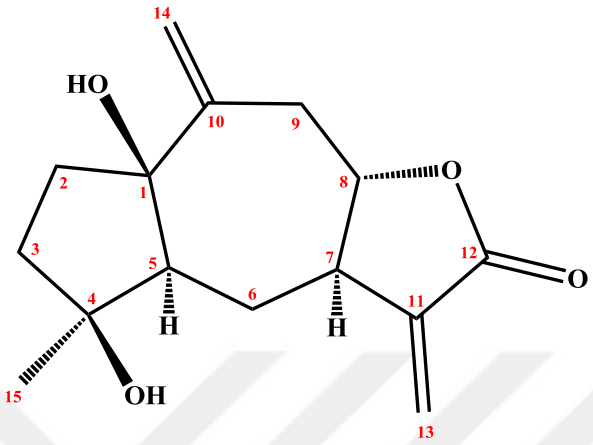




Şekil 4.1f. 4*α*,9*β*-dihidroksi-6*α*-asetoksi-1*β*H-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (**CM-6**)'nın NOESY spektrumu ($CDCl_3$+CD_3OD, 500 MHz)

CM-4: 1*β*,4*β*-dihidroksi-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid

CM-4 bileşiği (9.2 mg) kloroform ekstresinden sarımsı beyaz yağımsı bir madde halinde izole edilmiştir.



CM-4: $C_{15}H_{20}O_4$ (MA: 264)

$[\alpha]_D^{28.9}$: + 37.2 (*c* 0.15, CH_3OH)

UV (CH_3OH) λ_{max} nm: 214, 224

IR ($CHCl_3$) υ_{max} cm^{-1}: 3399 (OH), 1757 (*α*-metilen, *γ*-lakton), 1655 (doymamışlık)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ_H: Şekil 4.2a

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500 MHz) δ_H: Şekil 4.2a

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) δ_C: Şekil 4.2b

DEPT 90 ($CDCl_3$, 150 MHz) δ_C: Şekil 4.2b

DEPT 135 ($CDCl_3$, 150 MHz) δ_C: Şekil 4.2b

COSY ($CDCl_3$, 500 MHz) δ_H: Şekil 4.2c

HSQC ($CDCl_3$): Şekil 4.2d

HMBC ($CDCl_3$): Şekil 4.2e

NOESY ($CDCl_3$, 500 MHz): Şekil 4.2f

EI-MS m/z (relatif değer): 246.1 $[M\text{-}H_2O]^+$ (16.97), 231.1 $[246\text{-}CH_3]^+$ (17.23), 203.0 $[231\text{-}CO]^+$ (31.15), 188.1 $[203\text{-}CH_3]^+$ (36.16), 91.1 (100)

ESI-MS: m/z 287 $[M+Na]^+$

CM-4'ün UV spektrumu λ 214 nm'de maksimum absorbsiyon bantı göstermiştir. IR spektrumunda, hidroksil grubu (3399 cm^{-1}), karakteristik α-metilen, γ-lakton (1757 cm^{-1}) ve doymamışlığa (1655 cm^{-1}) ait absorpsiyon bantları gözlenmiştir.

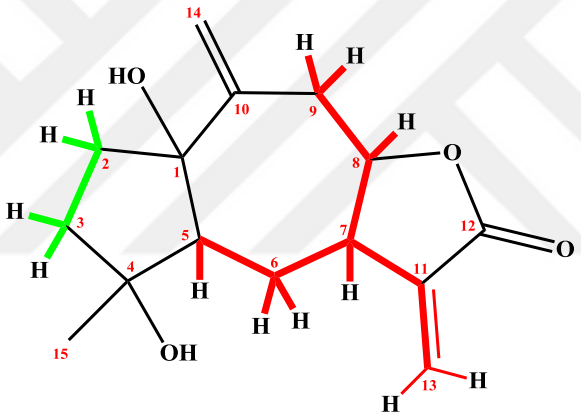
Bileşiğin $CDCl_3$ içerisinde alınan ^{1}H NMR spektrumunda (Şekil 4.2a-A, B), δ_H 6.23 (*d*, *J*=1.0 Hz, H-13a) ve 5.64 (*d*, *J*=1.5 Hz, H-13b)'de lakton halkasına bağlı karakteristik ekzosiklik metilen grubuna ait sinyaller ve ayrıca δ_H 5.37 (*brs*, H-14a) ve 5.09 (*brs*, H-14b)'da diğer bir ekzosiklik metilen grubuna ait sinyaller gözlenmiştir. δ_H 1.31 (*s*, H_3-15)'de metil, δ_H 4.54 (*ddd*, *J*=4.5, 9.0, 11.5 Hz, H-8)'de ise oksimetin grubuna ait sinyaller gözlenmiştir. DMSO-d_6 içerisinde alınan ^{1}H NMR spektrumunda (Şekil 4.2a-C), diğer piklere ilaveten δ_H 5.13 ve 5.42'de geniş singletler halinde moleküldeki OH protonlarına ait pikler görülmüştür. Bileşiğin NMR bulguları, C-1 konumunda α-OH sübstitüsyon taşıyan "1α,4α-dihidroksi-gaya-11(13)-en-8α,12-olid" için literatürde kayıtlı NMR değerleri ile karşılaştırıldığında; H-5 sinyalinin [(δ_H 1.92 ($CDCl_3$) ve 1.78'de (DMSO-d_6)] yaklaşık 0.6-0.7 ppm yüksek alanda gözlenmiş olması CM-4'ün 1β-OH sübstitüsyon taşıdığını göstermiştir (Al-Easa, Rizk ve Ahmed, 1996). Ayrıca bileşiğin ^{1}H NMR spektrumunda ($CDCl_3$) δ_H 1.31 (*s*, H_3-15)'de gözlenen metil grubunun düşük alana kaymış olması, C-4'te OH sübstitüsyonu bulunduğunu desteklemiştir. Bu bulgular, δ_H 5.13 ve 5.42'de görülen hidroksil gruplarının C-1 ve C-4'te olduğunu göstermiştir.

Tüm proton ve karbon rezonanslarının yorumlanmasında, ^{13}C NMR, DEPT ve 2D NMR (Çizelge 4.2, Şekil 4.2b-f) tekniklerinden yararlanılmıştır. Bu sonuçlara göre, bileşiğin ^{13}C NMR spektrumunda 1 adet metil karbonu [δ_C 25.09 (C-15)], 1 adet oksimetin karbonu [δ_C 79.07 (C-8)], 2 adet olefinik metilen karbonu [δ_C 122.82 (C-13); 115.49 (C-14)], 2 adet oksijen fonksiyonuna bağlı sp^3 tersiyer karbon [δ_C 86.92 (C-1); 83.53 (C-4)], 2 adet sp^2 katerner karbon [δ_C 143.93 (C-10); 141.02 (C-11)] ve 1 adet lakton karbonili [δ_C 169.88 (C-12)] taşıdığı tespit edilmiştir.

^{1}H NMR spektrumunda H-7 ve H-8 visinal protonları arasındaki etkileşim sabitinin büyük bir değerde olması ($J_{7,8}$= 11.5 Hz), H-8'in β pozisyonda olduğunu göstermiştir. Bu bulgu seskiterpen laktonlarda H-7'nin biyosentetik olarak α konumda olmasına uygun olarak (Bruneton, 1999; Simonsen ve diğerleri, 2013), CM-4'ün "**8,12-*trans* gayanolit**" yapısına sahip olduğuna işaret etmiştir. δ_H 4.54'de görülen H-8'in diğer visinal protonlar ile

etkileşimi ($J_{8,9\alpha}$= 9.0 Hz ve $J_{8,9\beta}$= 4.5 Hz), C-9 konumunda geminal protonların (δ_H 2.88 ve 2.43) varlığını göstermiştir. ^{1}H NMR spektrumunda, δ_H 1.53 (6α; J=2.5/5.0/14.0 Hz) ve 1.40 (6β; J=2.0/12.5/12.5 Hz)'de her biri *ddd* şeklinde yarılmalar gösteren geminal protonların ise H_2-6'ya ait olduğu saptanmıştır. Buna ilave olarak, H_2-2 ve H_2-3'e ait geminal protonlar 1.86-2.27 ppm'de multipletler şeklinde gözlenmiştir.

COSY spektrumunda (Şekil 4.2c), H_2-2/H_2-3 protonları ile H-5/H_2-6, H_2-6/H-7, H-7/H-8 ve H-8/H_2-9 visinal protonları arasında iki farklı spin sistemi içerisinde korelasyonlar gözlenmiştir. COSY korelasyonlarının 2 farklı spin sisteminde gözlenmesi, C-1'de proton bulunmadığını da doğrulamıştır. Ayrıca COSY yardımıyla, lakton halkasında yer alan ekzosiklik metilen protonlarının (H_2-13) H-7 ile uzak mesafe allilik etkileşim gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.2g).

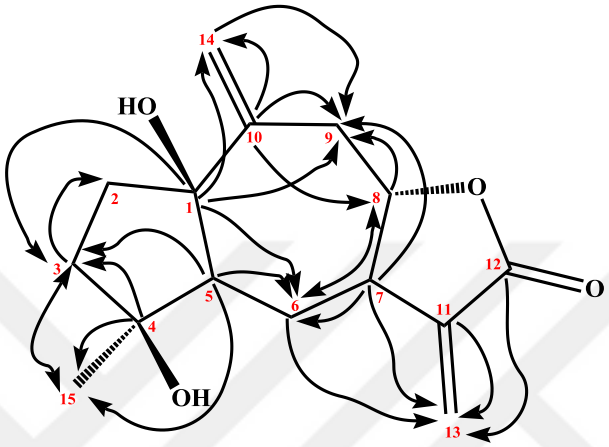


Şekil 4.2g. 1β,4β-dihidroksi-gaya-10(14),11(13)-dien-8α,12-olid (**CM-4**)'de COSY korelasyonları

HSQC spektrumundan (Şekil 4.2d), her protonun üzerinde olduğu karbon rezonansları belirlenmiştir. HSQC yardımıyla, karakteristik ekzosiklik metilen protonlarının bağlı olduğu olefinik karbon (C-13) δ_C 122.82'de ve diğer ekzosiklik metilen (C-14) ise δ_C 115.49'da bulunmuştur. C-5 ve C-7 metin; C-8 oksimetin karbonlarının sırasıyla 61.15, 42.85 ve 79.07 ppm'de olduğu saptanmıştır. C-2, C-3, C-6 ve C-9 metilen gruplarının karbon rezonansları ise, sırasıyla 37.09, 39.06, 31.85 ve 33.97 ppm'de görülmüştür. Ayrıca, metil grubuna ait karbon (C-15) 25.09 ppm'de rezonans göstermiştir.

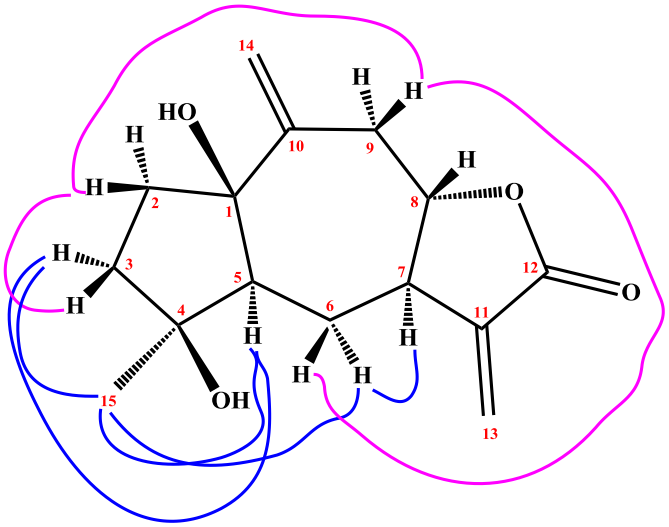
HMBC spektrumunda (Şekil 4.2e), δ_C 141.02'deki karbon ile H_2-13 arasındaki heteronükleer korelasyon, karakteristik ekzosiklik metilen grubunun C-11'de olduğunu

göstermiştir. C-10 ile H-9, H_2-14 ve H-8 arasındaki uzak mesafe etkileşimleri diğer ekzosiklik metilen grubunun C-10 konumunda olduğunu doğrulamıştır. δ_C 169.88'de görülen lakton karboniline ait karakteristik sinyalin H_2-13 ile uzak mesafe etkileşimi, bu sinyalin C-12'ye ait olduğunu göstermiştir. δ_C 83.53'deki sinyalin H_3-15 ve H_2-3 protonları ile; δ_C 86.92'deki sinyalin H_3-14, H_2-6, H_2-9 ve H_2-3 ile uzak mesafe etkileşimleri, bu sinyallerin sırasıyla C-4 ve C-1 konumunda olduğunu doğrulamıştır (Şekil 4.2h).



Şekil 4.2h. 1*β*,4*β*-dihidroksi-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (**CM-4**)'de önemli uzak mesafe HMBC korelasyonları (*Oklar karbondan protona doğrudur*)

NOESY spektrumunda (Şekil 4.2f), H-7 (δ_H 3.03)/H-6*α* (δ_H 1.53); H-6*α*/H_3-15 (δ_H 1.31) ve H_3-15/H-5 (1.92) arasındaki korelasyonlar H-5 ve H_3-15'in *α* pozisyonda olduğunu göstermiştir. Ayrıca, H-6*β* (δ_H 1.40)/H-9*β* (δ_H 2.43), H-9*β*/H-2*β* (δ_H 2.27) ve H-2*β*/H-3*β* (δ_H 1.86) arasında gözlenen korelasyonlardan *β* pozisyonda bulunan metilen protonları tespit edilmiştir (Şekil 4.2i).



Şekil 4.2i. 1*β*,4*β*-dihidroksi-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (**CM-4**)'de NOESY korelasyonları

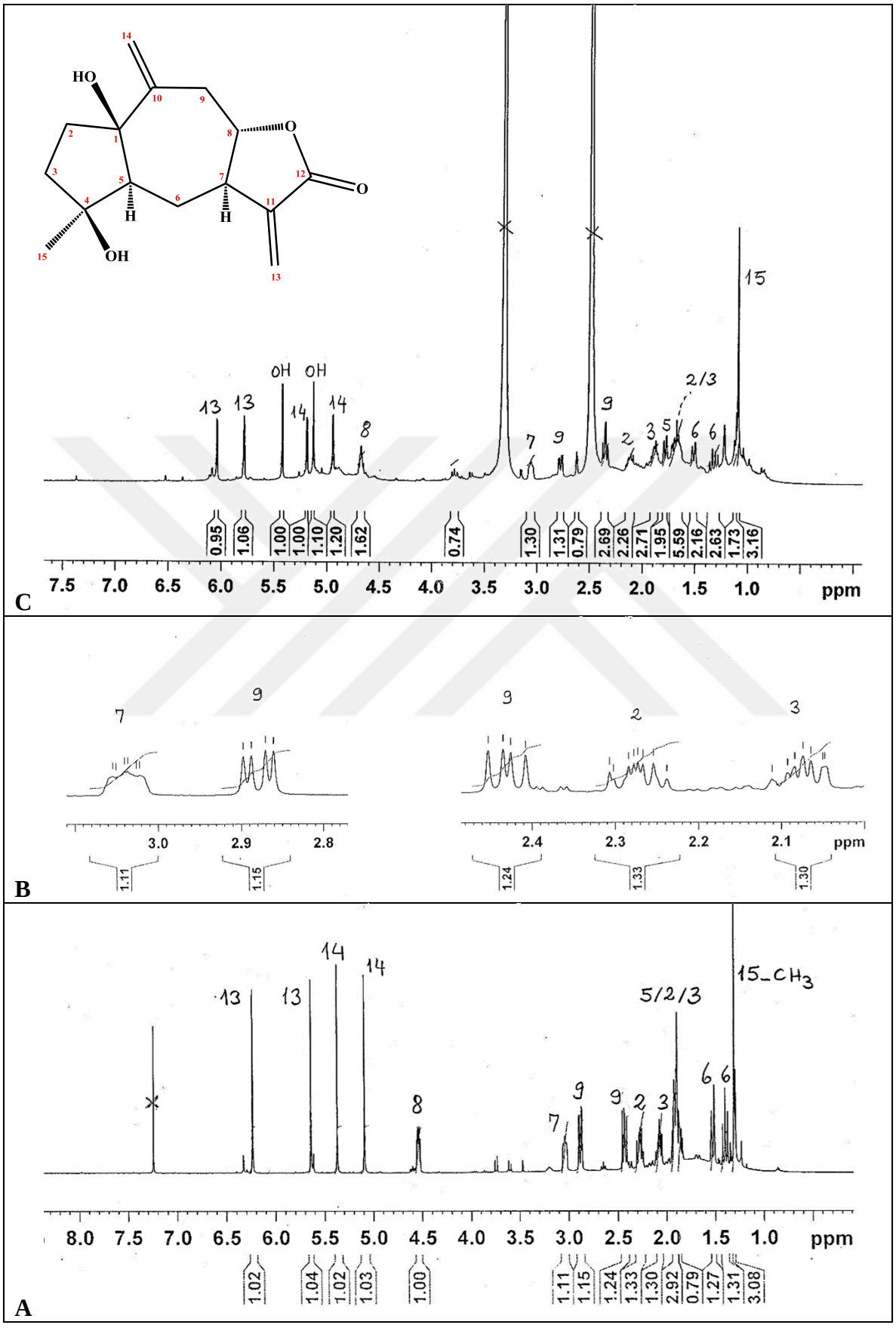
Bileşiğin EI-MS spektrumunda, $[M-H_2O]^+$, $[246-CH_3]^+$, $[231-CO]^+$ ve $[203-CH_3]^+$ pikleri sırasıyla m/z 246.1, 231.1, 203.0 ve 188.1'de tespit edilmiştir. ESI-MS spektrumunda ise, bileşiğin molekül ağırlığı ile uyumlu m/z 287 $[M+Na]^+$ piki gözlenmiştir. Bu bulgular, ^1H, ^{13}C ve 2D NMR spektroskopik bulguları (Çizelge 4.2, Şekil 4.2a-f) ile birlikte değerlendirildiğinde, **CM-4** bileşiğinin **CM-6**'ya benzer yapıda, moleküler formülü $C_{15}H_{20}O_4$ olan, "**inuviskolid**" türevi olduğu belirlenmiştir. Literatür araştırması ve önerilen formül üzerinden yapılan bilgisayar taraması sonucunda, bileşiğin ^1H ve ^{13}C NMR verilerinin, literatürde "1-*epi*-inuviskolid" (Rustaiyan ve diğerleri 1987), "8-*epi*-inuviskolid" ve "4,8-*bis*-*epi*-inuviskolid" (Zdero ve diğerleri 1987), "1*β*-hidroksi-8-*epi*-inuviskolid" (Ahmed ve diğerleri, 1998) ve "1*β*-hidroksi-4,8-*bis*-*epi*-inuviskolid" (Dendougui ve diğerleri 2000) için verilen değerlerle uyum gösterdiği belirlenmiştir.

Bu sonuçlara dayanarak, **CM-4** bileşiğinin yapısı "**1*β*,4*β*-dihidroksi-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid**" olarak aydınlatılmıştır. Bileşik tarafımızdan literatürde yer alan inuviskolid yapısı temel alınarak "**1*β*-hidroksi-4-*epi*-inuviskolid**" olarak da isimlendirilmiştir. Literatür araştırmalarımıza göre, bu bileşik doğadan ilk olarak elde edilen yeni bir bileşiktir.

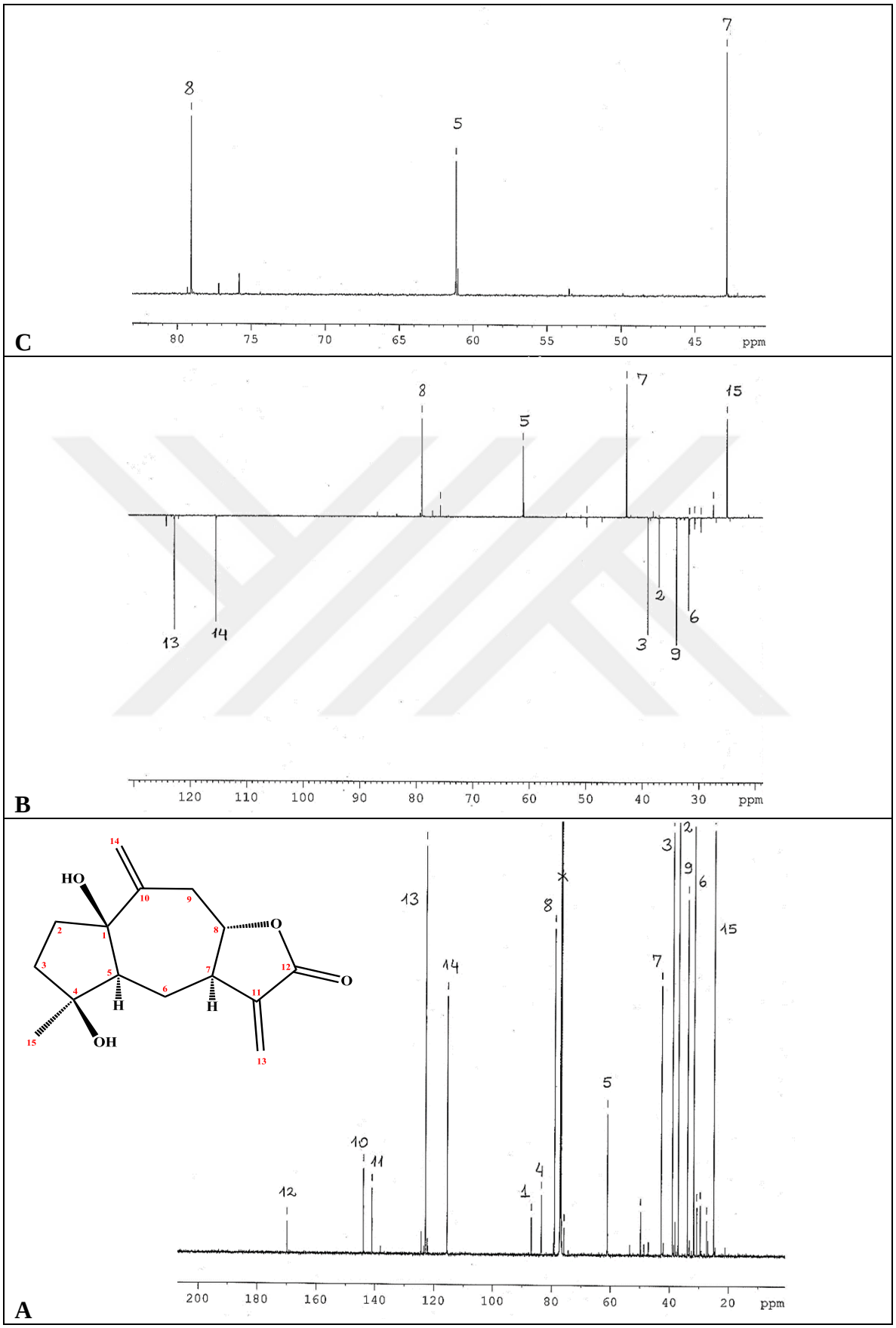
Çizelge 4.2. 1*β*,4*β*-dihidroksi-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (**CM-4**) bileşiğinin ^{1}H ve ^{13}C NMR spektroskopik değerleri ($CDCl_3$: δ_H 500 MHz, δ_C 150 MHz; DMSO-d_6: δ_H 500 MHz) ve HMBC korelasyonları

Konum	**C/H**	**$CDCl_3$**			**DMSO-d_6**
		δ_C ppm	**δ_H ppm, *J* (Hz)**	**HMBC (C→H)**	**δ_H ppm, *J* (Hz)**
1	C	86.92	-	H_2-14, H_2-6, H_2-9, H_2-3	-
2	CH_2	37.09	2.27 m, 1.90* m	H_2-3	2.11 m, 1.71* m
3	CH_2	39.06	2.07 m, 1.86* m	H_3-15, H_2-2	1.89 m, 1.71* m
4	C	83.53	-	H_3-15, H_2-3	-
5	CH	61.15	1.92* m	H_3-15, H_2-6, H_2-3	1.78 m
6	CH_2	31.85	1.53 ddd (2.5/5.0/14.0) 1.40 ddd (2.0/12.5/12.5)	H-8, H_2-13	1.52 m, 1.32 m
7	CH	42.85	3.03 m	H_2-13, H_2-9, H_2-6	3.06 m
8	CH	79.07	4.54 ddd (4.5/ 9.0/11.5)	H_2-9, H_2-6, H_2-14	4.67 m
9	CH_2	33.97	2.88 dd (13.5/4.5) 2.43 dd (13.5/9.0)	H_2-14	2.77 dd (5.0/14.0) 2.35 dd (10.5/13.5)
10	C	143.93	-	H_2-9, H_2-14, H-8	-
11	C	141.02	-	H_2-13	-
12	C	169.88	-	H_2-13	-
13	CH_2	122.82	6.23 d (1.0) 5.64 d (1.5)	-	6.04 d (1.5) 5.78 brs
14	CH_2	115.49	5.37 brs 5.09 brs	H_2-9	5.19 brs 4.94 brs
15	CH_3	25.09	1.31 s	H_2-3	1.10 s
OH	-	-	-	-	5.42 brs
OH	-	-	-	-	5.13 brs

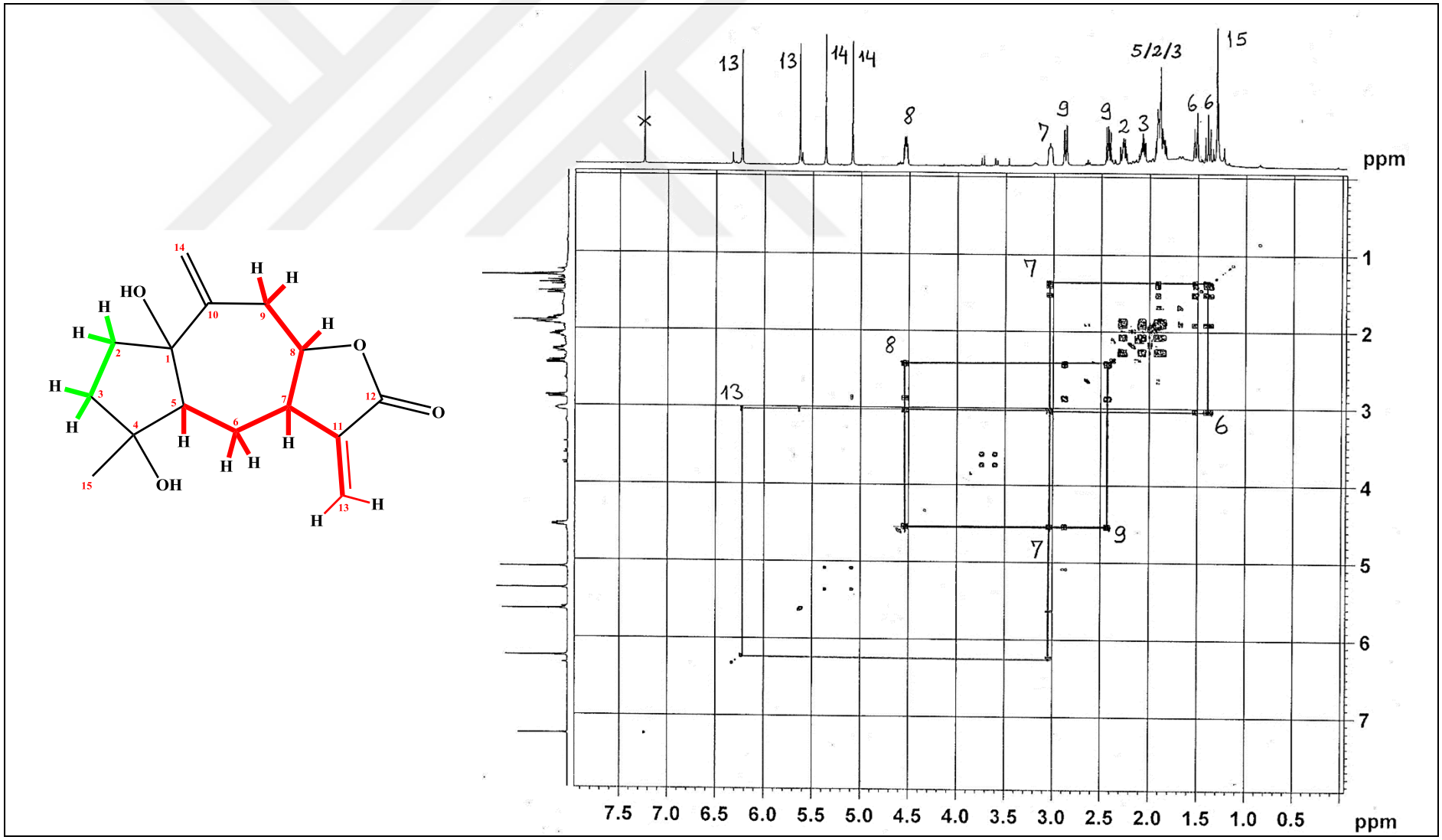
* Üst üste çakışan protonlar



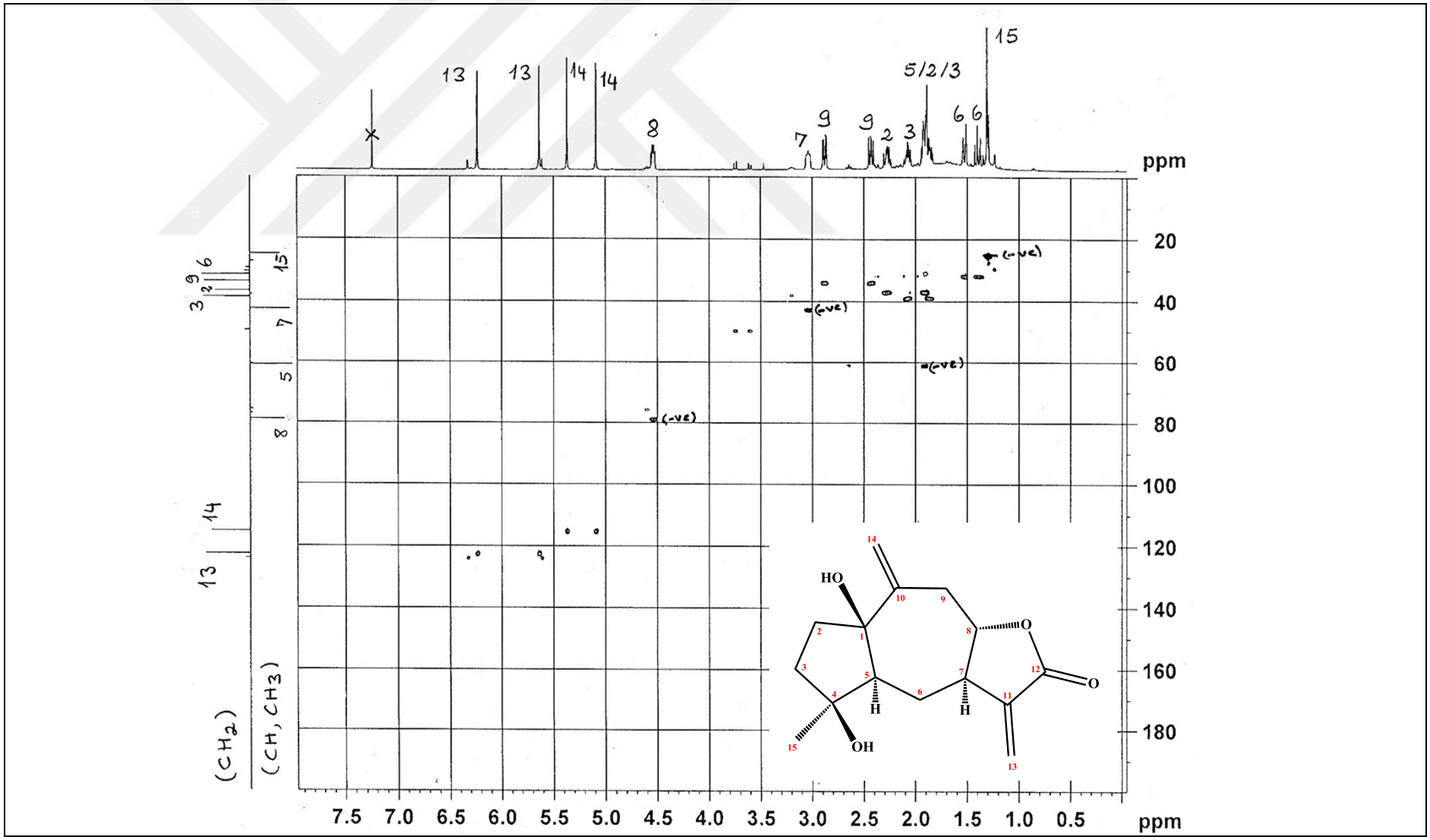
Şekil 4.2a. 1*β*,4*β*-dihidroksi-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (**CM-4**)'ün ^{1}H-NMR spektrumları (A, B: $CDCl_3$, 500 MHz; C: DMSO-d_6, 500 MHz)



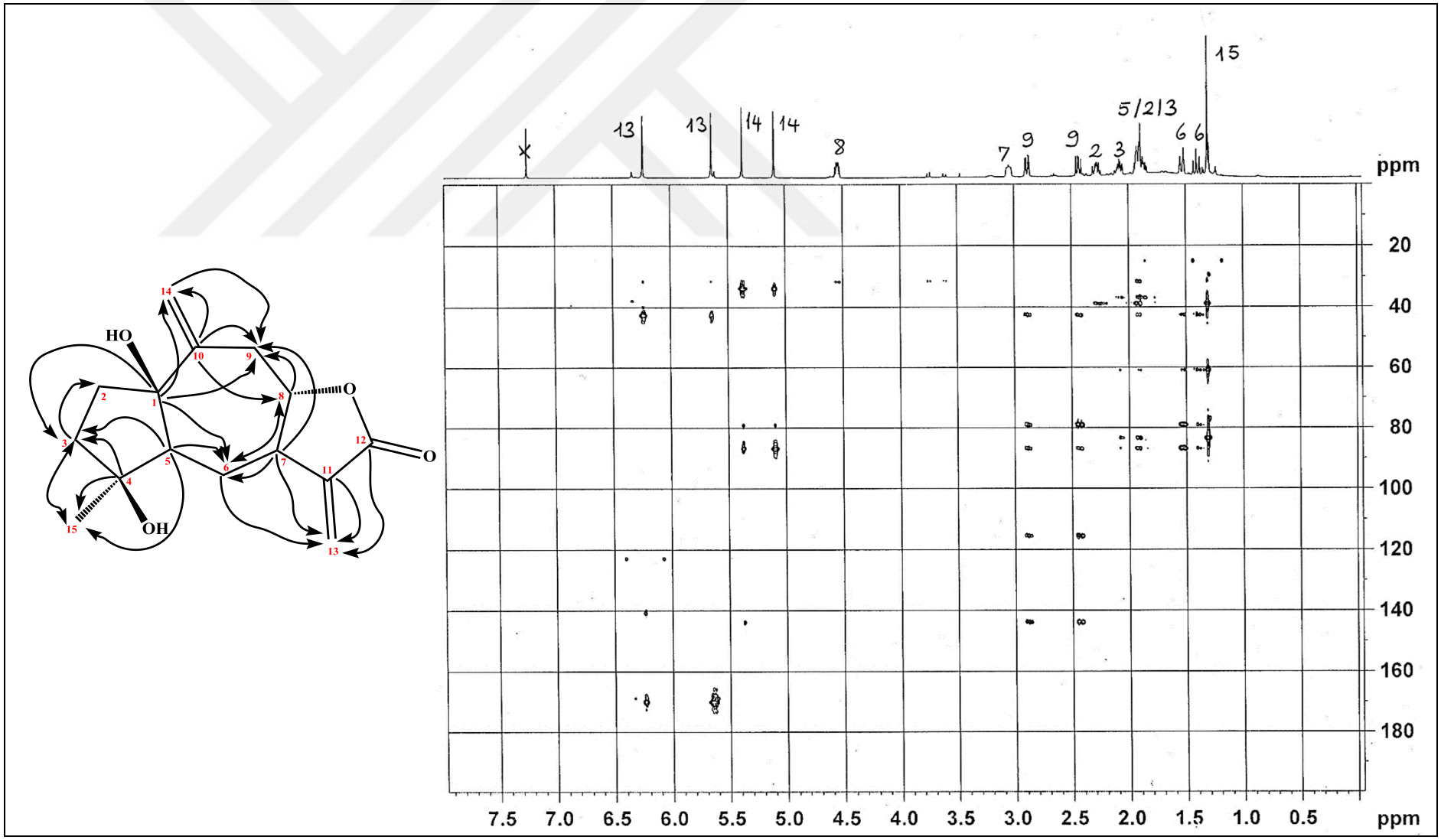
Şekil 4.2b. 1*β*,4*β*-dihidroksi-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (**CM-4**)'ün ^{13}C NMR (A), DEPT 135 (B) ve DEPT 90 (C) spektrumları ($CDCl_3$, 150 MHz)



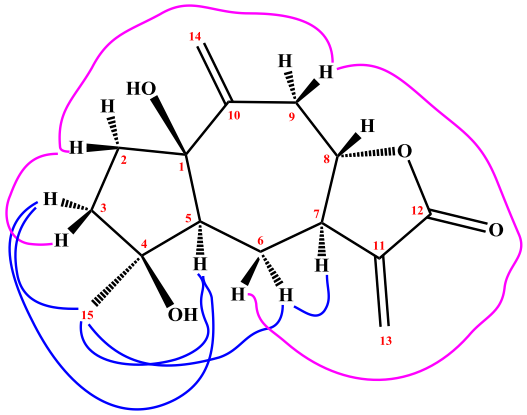
Şekil 4.2c. 1*β*,4*β*-dihidroksi-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (**CM-4**)'ün COSY spektrumu ($CDCl_3$, 500 MHz)

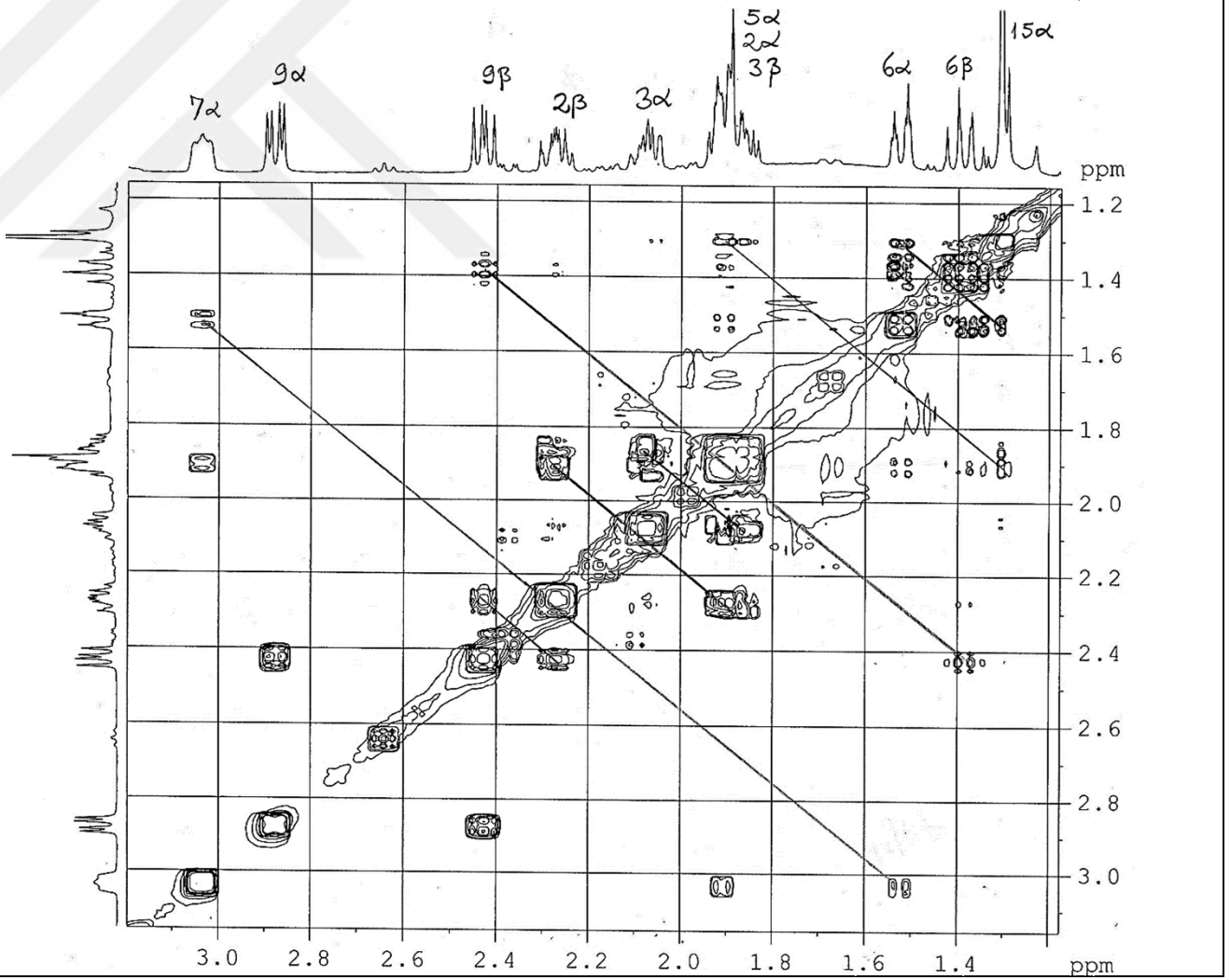


Şekil 4.2d. 1*β*,4*β*-dihidroksi-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (**CM-4**)'ün HSQC spektrumu ($CDCl_3$) (DEPT 135 negatif modda)



Şekil 4.2e. 1*β*,4*β*-dihidroksi-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (**CM-4**)'ün HMBC spektrumu ($CDCl_3$)



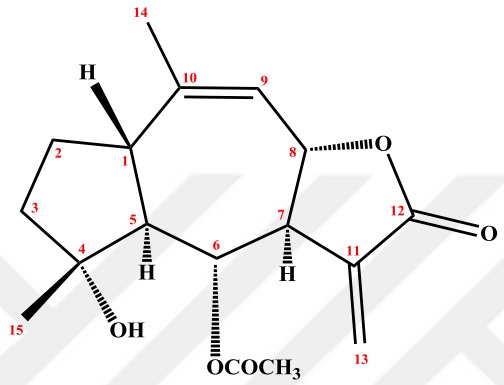


Şekil 4.2f. 1*β*,4*β*-dihidroksi-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid (**CM-4**)'ün NOESY spektrumu ($CDCl_3$, 500 MHz)

İzoinuviskolid türevleri

CM-1: 6α-asetoksi-4α-hidroksi-1βH-gaya-9.11(13)-dien-12.8α-olid

Kloroform ekstresinin major bileşeni olan **CM-1** (508.9 mg) beyaz amorf kristaller halinde izole edilmiştir. Bileşik $CHCl_3$:MeOH (1:0.5) karışımından kristallendirilerek X-ray kristalografisi için uygun kristaller elde edilmiştir.



CM-1: $C_{17}H_{22}O_5$ (MA: 306)

$[\alpha]_D^{27}$: - 63.7 (*c* 0.315, $CHCl_3$)

UV (CH_3OH) λ_{max} nm: 222, 214

IR ($CHCl_3$) υ_{max} cm^{-1}: 3425 (OH), 1765 (α-metilen, γ-lakton), 1660 (doymamışlık)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ_H: Şekil 4.3a

APT ($CDCl_3$, 100 MHz) δ_C: Şekil 4.3b

COSY ($CDCl_3$, 400 MHz) δ_H: Şekil 4.3c

HSQC ($CDCl_3$): Şekil 4.3d

HMBC ($CDCl_3$): Şekil 4.3e

NOESY ($CDCl_3$, 400 MHz) δ_H: Şekil 4.3f

EI-MS *m/z* (relatif değer): 246.1 $[M\text{-}CH_3COOH]^+$ (10.3), 228.1 $[246\text{-}H_2O]^+$ (23.7), 213.0 $[228\text{-}CH_3]^+$ (10.3), 188.0 (100)

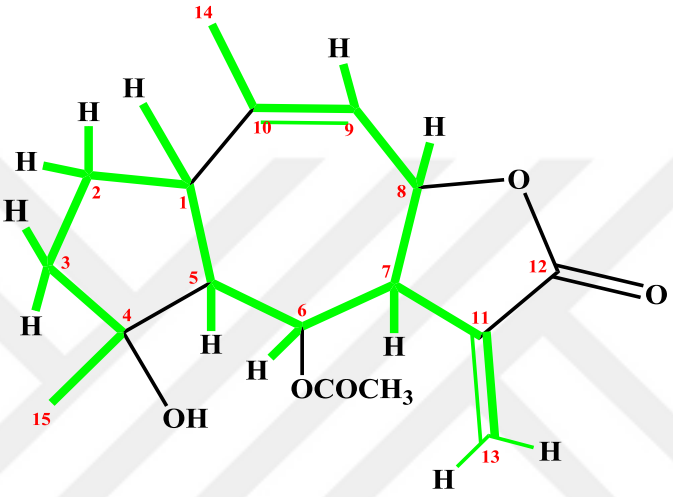
HREI-MS *m/z* (molekül formül): 246.1245 ($C_{15}H_{18}O_3$ için hesaplanan, 246.1256), 228.1140 ($C_{15}H_{16}O_2$ için hesaplanan, 228.1150)

CM-1 bileşiğinin UV spektrumunda, λ 222 ve 214 nm'de absorpsiyon bantları görülmüştür. IR spektrumunda, hidroksil (3425 cm^{-1}) grubu, karakteristik α-metilen, γ-lakton (1765 cm^{-1}) ve doymamışlığa ait (1660 cm^{-1}) absorpsiyon bantları gözlenmiştir.

Bileşiğin ^{1}H NMR spektrumunda (Şekil 4.3a), karakteristik ekzosiklik metilen grubuna ait sinyaller [δ_H 6.20 (*d*, *J*=3.6 Hz, H-13a); 5.50 (*d*, *J*=3.2 Hz, H-13b)], 1 adet olefinik metin protonu [δ_H 5.80 (*dq*, *J*=4.0, 2.0 Hz, H-9)]; 3 adet metil grubuna ait singletler [δ_H 1.81 (*s*, H_3-14); 1.28 (*s*, H_3-15); 2.1 (*s*, CO***CH₃***)], 2 adet oksimetin grubuna ait sinyaller [δ_H 4.72 (br*dd*, *J*=4.0, 9.0 Hz, H-8); 5.17 (br*dd* *J*=10.0, 10.4 Hz, H-6)] gözlenmiştir. Tüm proton ve karbon rezonanslarının yorumlanmasında, APT ve 2D NMR (Şekil 4.3b-f) tekniklerinden yararlanılmıştır. Bu sonuçlara göre, bileşiğin 3 adet metil karbonu [δ_C 20.87 (C-14); 22.25 (C-15); 21.65 (CO***CH₃***)], 2 adet oksimetin karbonu [δ_C 76.15 (C-6); 76.43 (C-8)], 1 adet olefinik metilen karbonu [δ_C 122.56 (C-13)], 1 adet olefinik metin karbonu [δ_C 125.78 (C-9)], 1 adet sp^3 oksijenli tersiyer karbon [δ_C 79.98 (C-4)], 1 adet sp^2 katerner karbon [δ_C 136.51 (C-11)], 1 adet olefinik katerner karbon [δ_C 140.84 (C-10)], 1 adet lakton karbonili [δ_C 169.65 (C-12)] ve 1 adet ester karbonili [δ_C 170.52 (C-16)] taşıdığı tespit edilmiştir.

^{1}H NMR spektrumunda (Şekil 4.3a), H-7 ve H-8 protonları arasındaki etkileşim sabitinin büyük bir değerde olması ($J_{7,8}$= 9.6 Hz), H-8'in β pozisyonda olduğunu göstermiştir. Bu bulgu ve seskiterpen laktonlarda biyosentetik olarak H-7'nin α pozisyonda bulunmasına uygun olarak (Bruneton, 1999; Simonsen ve diğerleri, 2013), CM-1'in "**8,12-*trans* gayanolid**" yapıya sahip olduğu belirlenmiştir. Samek kuralına (Samek, 1978) uygun olarak H-7 ile H_2-13 [δ_H 6.20 (*d*, *J*=3.6 Hz, H-13a); 5.50 (*d*, *J*=3.25 Hz, H-13b)] protonlarının etkileşim sabitinin $J_{7,13}$ > 3 olması, lakton halkasının "**8,12-*trans***" bağlandığını desteklemiştir. ^{1}H NMR spektrumunda, δ_H 4.72'de görülen H-8'in H-9 visinal proton ile tek bir etkileşim sabitine sahip olması ($J_{8,9}$= 4.0 Hz), C-9'da olefinik metin protonunun (δ_H 5.80) varlığını göstermiştir (Şekil 4.3a-B). H-6'nın H-5 ve H-7 ile etkileşim sabitinin eşit değerde ($J_{5,6}$=10.4; $J_{6,7}$=10.0 Hz) olmasından dolayı, H-6 sinyali 5.17 ppm'de "br*dd*" olarak görülmüştür. Ayrıca, H-6'nın H-5 ve H-7 ile büyük etkileşim sabitine sahip olması (*J*=10.0 Hz), H-6'nın β pozisyonda olduğunu göstermiştir. H-6'nın kimyasal kayma değerinin (5.17 ppm) düşük alana kayması C-6'da ester fonksiyonel grubunun varlığına işaret etmiştir.

COSY spektrumunda (Şekil 4.3c) tek spin sistemi içerisinde, H-5/H-6, H-6/H-7, H7/H-8, H-8/H-9, H-1/H_2-2, H-1/H-5 ve H_2-2/H_2-3 visinal protonları arasında korelasyonlar gözlenmiştir. Ayrıca COSY yardımıyla, H_2-13 ekzosiklik metilen protonlarının H-7 ile; ve H_3-14'ün H-9 ile uzak mesafe allilik etkileşimler; H_3-14'ün H-8 ile uzak mesafe homo allilik etkileşim; H_2-3'ün ise H_3-15 ile uzak mesafe W etkileşim gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.3g).

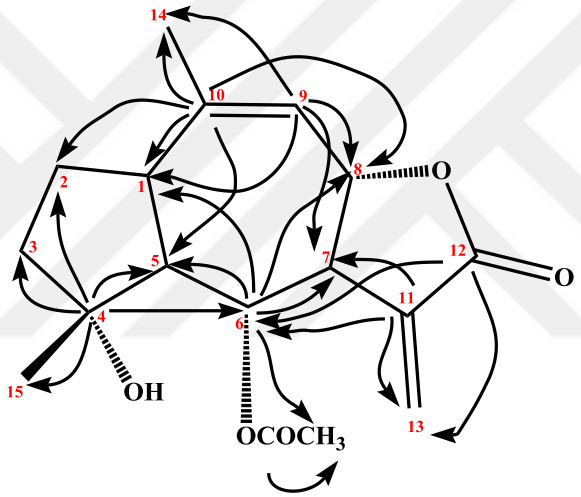


Şekil 4.3g. 6α-asetoksi-4α-hidroksi-1βH-gaya-9.11(13)-dien-12.8α-olid (**CM-1**)'de COSY korelasyonları

HSQC (Şekil 4.3d) yardımıyla, her protonun üzerinde olduğu karbon rezonansları belirlenmiştir. C-1, C-5 ve C-7 metin karbonlarının sırasıyla δ_C 39.61, 55.09 ve 49.14'de olduğu saptanmıştır. C-2 ve C-3 metilen; C-13 ekzosiklik metilen karbon rezonansları, sırasıyla δ_C 22.45, 42.00 ve 122.56'de görülmüştür. Ayrıca, C-9'da olefinik metin karbonu δ_C 125.78'de; C-14, C-15 ve CO***CH₃***'de metil gruplarına ait karbonlar sırasıyla δ_C 20.87, 22.25 ve 21.65'de; C-6 ve C-8'de oksimetin karbonları sırasıyla δ_C 76.15 ve 76.43'de saptanmıştır.

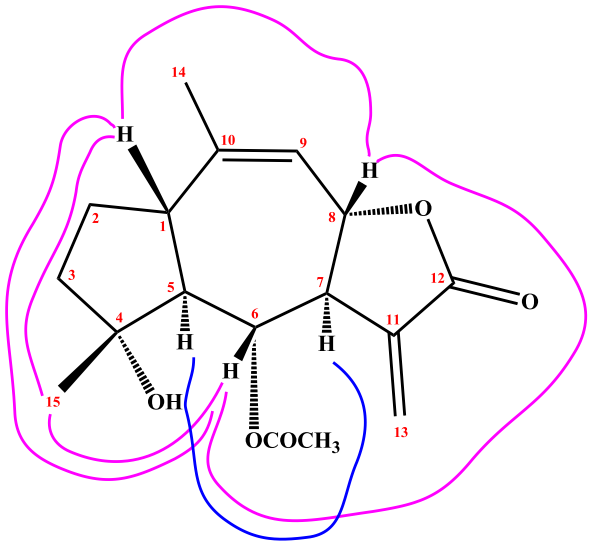
HMBC spektrumunda (Şekil 4.3e), δ_C 136.51'deki karbon rezonansı ile H_2-13, H-6 ve H-7 protonlarının ilişkisi, karakteristik ekzosiklik metilen grubunun C-11'e bağlı olduğunu göstermiştir. Trisübstitüe etilenik bağın C-9 ile C-10 arasında olduğu, δ_C 140.84'deki (C-10) olefinik sinyal ile etkileşim şiddeti giderek azalan H_3-14, H_2-2, H-5, H-1 ve H-8 protonları arasındaki HMBC korelasyonları ile doğrulanmıştır. İlave olarak, δ_C 125.78 ile H_3-14, H-8, H-1 ve H-7 protonları arasındaki ilişki, δ_H 5.80'de integrali 1 proton değerinde

gözlenen sinyalin olefinik metin karbonuna (C-9) ait olduğunu göstermiştir. δ_C 76.15 ile H-5, H-7, H-8, CO***CH₃*** ve H-1 protonları arasında gözlenen uzak mesafe etkileşimleri, δ_H 5.17'de gözlenen oksimetin sinyalinin C-6'da olduğunu doğrulamıştır. δ_H 2.1'deki asetoksi metil protonlarının (CO***CH₃***) C-6 ile etkileşimi ise, asetoksil fonksiyonel grubunun C-6'ya bağlı olduğunu göstermiştir. δ_C 169.65 ile H_2-13 ve H-6 arasındaki uzak mesafe etkileşimi, bu sinyalin lakton karboniline (C-12) ait olduğunu ispatlamıştır. δ_C 170.63 ile asetoksi metil protonları (CO***CH₃***) arasındaki etkileşim, bu sinyalin asetoksil fonksiyonel grubundaki karbonile ait olduğuna işaret etmiştir. δ_C 79.98'de tespit edilen sp^3 oksijenli tersiyer karbon sinyalinin H_2-2, H_2-3, H-5, H_3-15 ve H-6 ile etkileşimleri, bu katerner karbonun C-4 konumunda olduğunu göstermiştir (Şekil 4.3h).



Şekil 4.3h. 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-1*β*H-gaya-9.11(13)-dien-12.8*α*-olid (**CM-1**)'de önemli uzak mesafe HMBC korelasyonları (*Oklar karbondan protona doğrudur*)

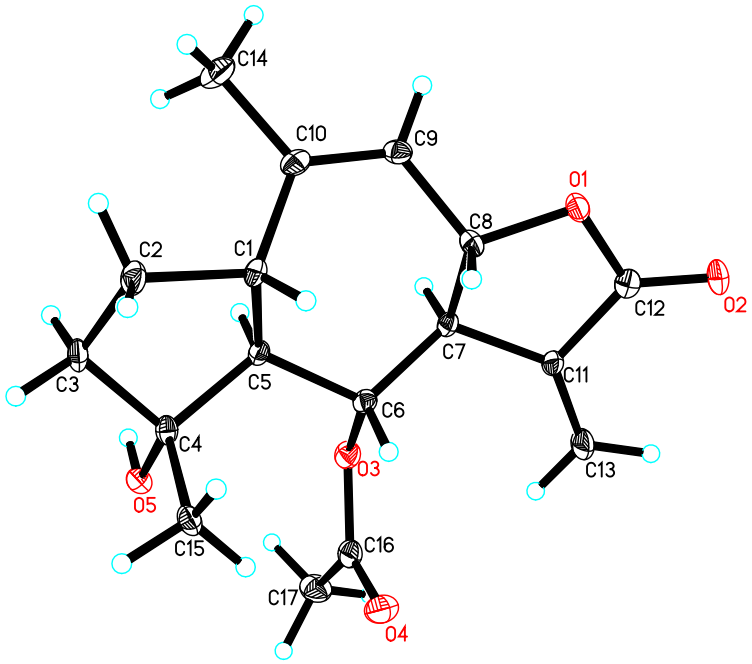
NOESY spektrumunda (Şekil 4.3f), H-8/H-6 (δ_H 5.17) arasında gözlenen korelasyon ile H-6'nın β konfigürasyonda olduğu doğrulanmıştır. H-7 (δ_H 3.04)/H-5 (1.94) arasında gözlenen NOESY ilişkisi ise H-5'in de H-7 gibi α pozisyonda olduğunu doğrulamıştır. Ayrıca, H-8 (δ_H 4.72)/H-1 (δ_H 2.57), H-1/H_3-15 (δ_H 1.28), H-1/H-6 (δ_H 5.17) ve H-6/H_3-15 arasındaki korelasyonlar H-1 ve H_3-15'in β pozisyonda olduğunu göstermiştir (Şekil 4.3i).



Şekil 4.3i. 6α-asetoksi-4α-hidroksi-1βH-gaya-9.11(13)-dien-12.8α-olid (**CM-1**)'de NOESY korelasyonları

Bileşiğin EI-MS spektrumunda, $[M\text{-}CH_3COOH]^+$, $[246\text{-}H_2O]^+$ ve $[228\text{-}CH_3]^+$ pikleri sırasıyla m/z 246.1, 228.1 ve 213.0'da gözlenmiştir. HREI-MS analizinde 246.1245 ve 228.1140 molekül ağırlığına sahip iyonlara ait kapalı formülleri $C_{15}H_{18}O_3$ ve $C_{15}H_{16}O_2$ olarak tespit edilmiştir. Bu bulgular, ^{1}H NMR, APT ve 2D NMR spektroskopik bulguları (Çizelge 4.3, Şekil 4.3a-f) ile birlikte değerlendirildiğinde, **CM-1**'in moleküler formülü $C_{17}H_{22}O_5$ olan, "**izoinuviskolid**" türevi bir bileşik olduğu belirlenmiştir.

CM-1'in absolü konfigürasyonu, tek kristal X-ışını kırınım analizi ile belirlenmiştir (Şekil 4.3j). Asimetrik birimde 2 bağımsız molekül bulunmaktadır. Molekül yapısı düzlemsel değildir, bağ uzunlukları ve bağ açıları beklenen değerlerde olup, literatürde yer alan benzer bileşikler için belirlenen değerlerle uyum içindedir (Ahmed ve diğerleri, 1993; González-Platas, Ruiz-Pérez, Gonzalez, Bermejo ve Medjroubi, 1999; López-Rodríguez, García, Zater, Benayache ve Benayache, 2009; Öksüz, Clark ve Herz, 1993; Wang, Min, ve Danishefsky, 2009). Molekül, merkezde 7 atomlu halka (C1/C5-C10), bu halkaya *trans* bağlı 5 atomlu lakton (O1-O2/C7-C8/C11-C12) ve siklopentan halkası (C1-C5), C7-C8 ve C1-C5 bağları boyunca, sırasıyla bulundurmaktadır. Merkezdeki 7 atomlu halka C9 ve C10 (1.329(5)Å) arasında olefinik bağ taşıdığından dönebilen esnek kayık konformasyonundadır. Atomların düzlemden sapması 0.1 Å'dan küçük; 2 Å'dan büyük bulunmuştur. İki tane 5 atomlu lakton halkası (O1-O2/C7-C8/C11-C12 ve C1-C5) zarf konformasyonundadır. Hidroksil ile asetat (O3-O4/C16-C17) fonksiyonel grupları da C4 ve C6 konumlarında psödo ekvatoryal bulunmaktadır.



Şekil 4.3j. 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-1*β*H-gaya-9.11(13)-dien-12.8*α*-olid (**CM-1**)'in absolü konfigürasyonu

Yukarıda açıklanan spektral ve kristal veriler ışığında, **CM**-1'in yapısı "**6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-1*β*H-gaya-9.11(13)-dien-12.8*α*-olid**" olarak aydınlatılmıştır. **CM-1** için elde ettiğimiz spektral bulgular, önerilen formül üzerinden yaptığımız bilgisayar taramasında, bu bileşik için literatürde verilen ^{1}H (Rustaiyan ve diğerleri, 1989) ve ^{13}C NMR (Chang, Qin, Cheng, Jin ve Zhang, 2012) değerleri ile uyum göstermiştir.

İzoinuviskolid yapısı ilk kez *Helenium autumnale* bitkisinden "helenium lakton" ismiyle izole edilmiştir. Bu çalışmada, bileşiğin önemli konumlarına ait ^{1}H NMR değerleri verilmiş ve bazı kimyasal reaksiyonlar yardımıyla konfigürasyon belirtilmeden yapı açıklanmıştır. Helenium lakton, literatürde *Helenium* türlerinden izole edilen 8,12-gayanolid yapısındaki ikinci bileşik olarak belirtilmiştir (Hikino, Kuwano ve Takemoto, 1968).

Sonraki yıllarda, izoinuviskolid yapısı taşıyan benzer bileşik olarak *Inula helenium* ve *I. royleana* bitkilerinden "4-*epi*-izoinuviskolid" izole edilmiş ve yapısı PMR analizi ile aydınlatılmıştır (Bohlmann, Mahanta, Jakupovic, Rastogi ve Natu, 1978). 4-*epi*-izoinuviskolid'in 1. konumundaki protonun konfigürasyonu, Bohlmann ve diğerleri, (1977)'nın önceki çalışmalarında izole ettikleri "inuviskolid" yapısında olduğu gibi, α pozisyonda bildirilmiştir (Bohlmann ve diğerleri, 1978). Daha sonra yapılan bir çalışmada, *I. britannica* var. *chinensis* bitkisinden de 4-*epi*-izoinuviskolid izole edilmiş ve literatürde bazı ^{1}H NMR değerleri rapor edilmiştir (Ito ve Lida, 1981). Bu çalışmada Bohlmann ve diğerleri, (1978)'nın çalışması referans gösterilerek, bileşiğin 1. konumundaki protonun α pozisyonda olduğu bildirilmiştir (Ito ve Lida, 1981).

1987 yılında yayınlanan bir literatürde, *Bedfordia arborescens* bitkisinden "inuviskolid" izole edilmiş ve NOE difference spektroskopi ile H-1'in β pozisyonda olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada, ilk olarak Bohlmann ve diğerleri, (1977)'nın 1. konumdaki protonu yanlışlıkla α pozisyonda açıklandığı ortaya konmuş ve H-1 β olarak düzeltilmiştir (Zdero ve diğerleri, 1987). Aynı yıl yapılan başka bir çalışma, Zdero ve ark (1987)'nın bu bulgusunu destekler niteliktedir. Bu çalışmada, *I. graveolens*'ten "1-*epi*-inuviskolid" izole edilmiş ve H-1'in α pozisyonda olduğu NOE difference spektroskopi ile doğrulanmıştır (Rustaiyan ve diğerleri 1987).

Literatürdeki inuviskolid'e ait bu düzeltmeden sonra, Rustaiyan ve diğerleri (1989) yaptıkları diğer bir çalışmada, *Postia bomycina* bitkisinden izoinuviskolid izole etmiş, ancak bileşiğin ismini "4α-hidroksi-1βH-gaya-9.11(13)-dien-12.8α-olid" olarak vermiştir. Ardından, Zdero ve diğerleri (1990), *Apalochlamys spectabilis* bitkisinden izoinuviskolid izole ettiklerini bildirmiş, ancak bileşiğe ait herhangi bir spektral veri, isim veya kimyasal okunuş belirtmeden sadece bileşiğin formülünü göstermişlerdir. Daha sonraki bir çalışmada ise, *I. montana* bitkisinden izoinuviskolid izole edilmiş ve ilk kez literatürde izoinuviskolid ismiyle yayınlanmıştır (González-Romero, Villaescusa-Castillo ve Díaz-Lanza, 2000). Bileşiğin ^{13}C NMR verileri ilk kez bu çalışmada verilmiştir. Ancak, 1. konumdaki protonun konfigürasyonu verilmemiş ve 1. konumu hatalı olarak α pozisyonda veren Ito ve Lida (1981)'nın çalışması ile karşılaştırma yaptıklarını bildirmişlerdir (González-Romero ve diğerleri 2000).

Son yıllarda yapılan bir çalışmada, *Inula graveolens*'ten 4-*epi*-izoinuviskolid izole edilmiş ve ^{13}C NMR verileri ilk kez rapor edilmiştir (Abou-Douh, 2008). Ancak burada da, 1. konumdaki protonun Bohlmann ve diğerleri (1978)'nin çalışması ile kıyaslanması neticesinde *α* pozisyonda yanlış belirtilmesi sürmüştür (Abou-Douh, 2008).

Literatür taramamıza göre, **CM-1** bileşiği ilk olarak *Postia bombycina*'dan "**6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-1*β*H-gaya-9.11(13)-dien-12.8*α*-olid**" ismiyle izole edilmiştir (Rustaiyan ve diğerleri, 1989). Daha sonra, *Inula hupehensis* (Qin ve diğerleri 2011), *I. helianthus-aquatica* (Chang ve diğerleri 2012), *I. sericophylla* (Cheng ve diğerleri 2012) bitkilerinden de izole edilerek "**6*α*-asetoksi-izoinuviskolid**" ismi ile yayınlanmıştır. Son yıllarda yapılan bir çalışmada ise, *Chrysophthalmum montanum*'dan izole edilen **CM-1** "**6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-1*β*H-gaya-9(10),11(13)-dien-12,8*α*-olid**" ismi ile yayınlanmıştır (Gürbüz ve diğerleri, 2016).

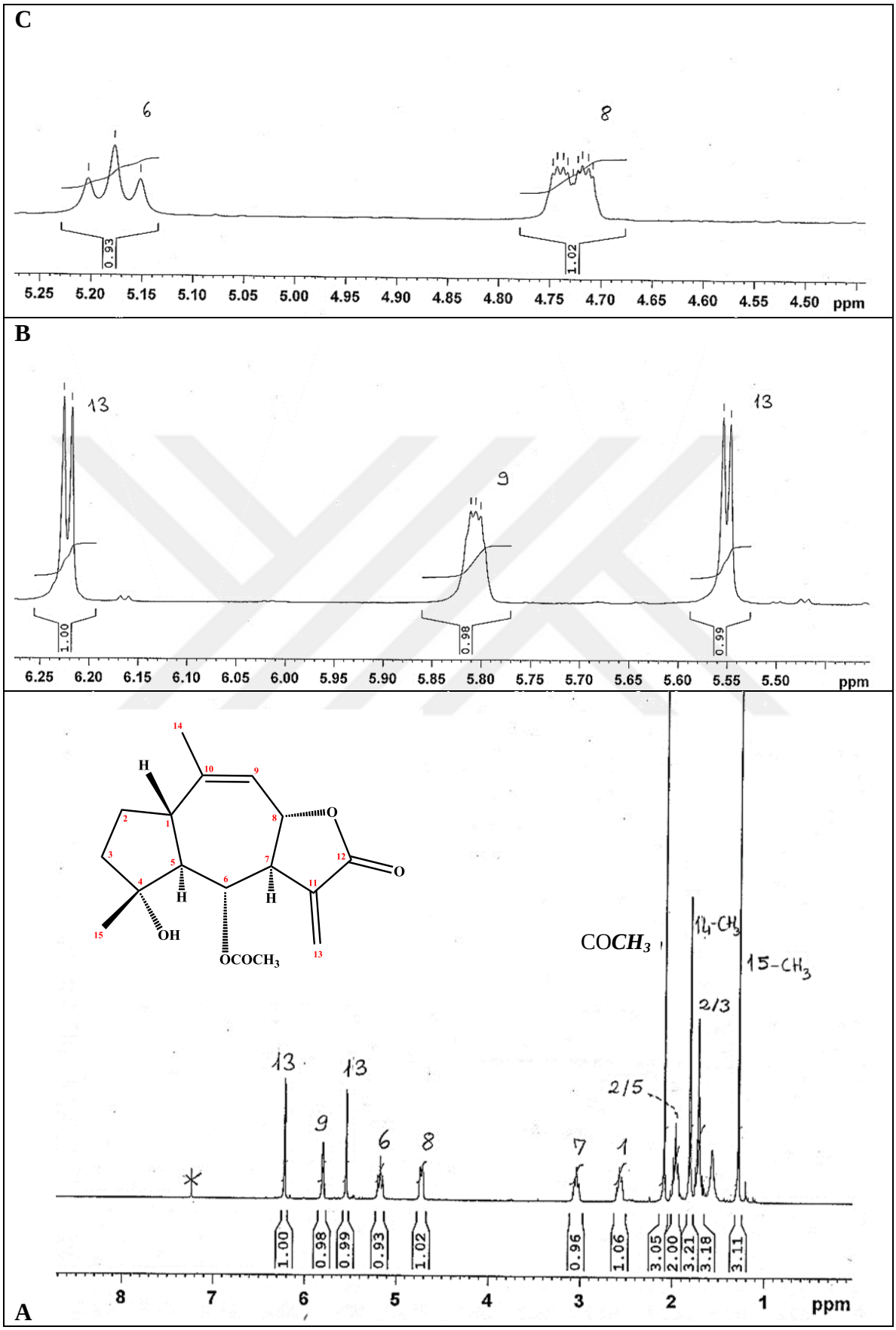
Yukarıda açıklandığı üzere, inuviskolid ve izoinuviskolid yapısında bileşiklerin yapı tayinleri ve isimlendirmelerinde, ilk baştan bugüne kadar süren karışıklıklar ve hatalar olduğu görülmektedir. Bu karışıklığa ışık tutacak şekilde, **CM-1**'in 1D ve 2D NMR spektral değerleri ayrıntılı ve tam olarak ilk kez tezimizde sunulmaktadır. Ayrıca, bileşiğin absolü konfigürasyonu X-ray kristalografisi ile ilk kez tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3. 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-1*β*H-gaya-9.11(13)-dien-12.8*α*-olid (**CM-1**) bileşiğinin ^{1}H NMR ve APT spektroskopik değerleri ($CDCl_3$: δ_H 400 MHz, δ_C 100 MHz) ve HMBC korelasyonları

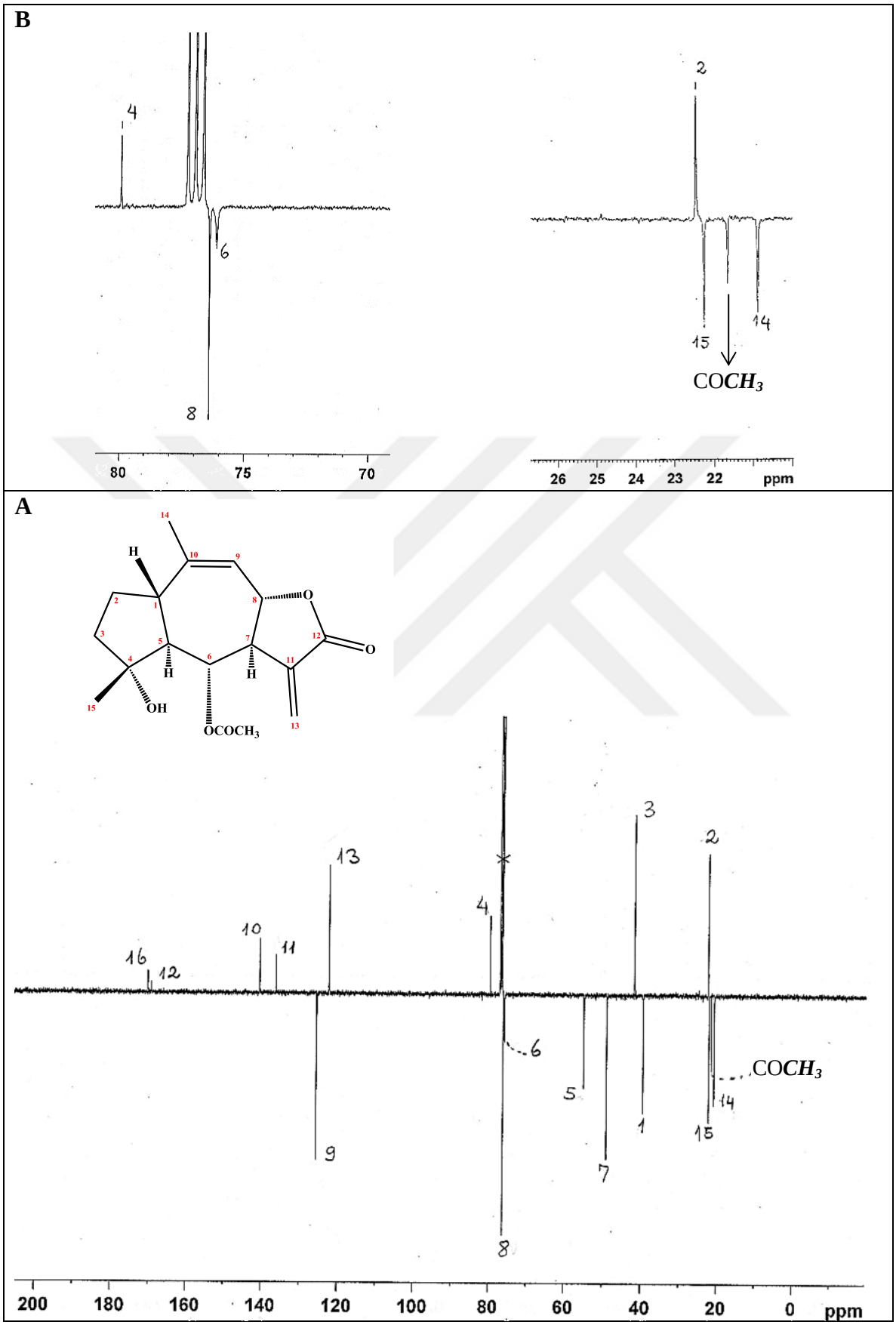
Konum	**C/H**	**$CDCl_3$**		
		δ_C ppm	**δ_H ppm, *J* (Hz)**	**HMBC (C→H)**
1	CH	39.61	2.57 brdd (10.0/10.4)	H_3-14, H-9, H_2-2, H_2-3, H-5
2	CH_2	22.45	1.94 m, 1.75-1.66 m	H-1, H-5, H_2-3, H_3-14
3	CH_2	42.00	1.75-1.66 m	H_3-15, H_2-2, H-1, H-5
4	C	79.98	-	H_2-2, H_2-3, H-5, H_3-15, H-6
5	CH	55.09	1.94 m	H_3-15, H_2-3, H-6, H-1
6	CH	76.15	5.17 brdd (10.0/10.4)	H-5, H-7, H-8, CO***CH₃***, H-1
7	CH	49.14	3.04 ddt (3.2/10.0/10.0)	H_2-13, H-6, H-8, H_3-14, H-5
8	CH	76.43	4.72 brdd (4.0/9.6)	H-7, H_2-13, H-6
9	CH	125.78	5.80 dq (2.0/4.0)	H_3-14, H-8, H-1, H-7
10	C	140.84	-	H_3-14, H_2-2, H-5, H-1, H-8
11	C	136.51	-	H_2-13, H-6, H-7
12	C	169.65	-	H_2-13, H-6
13	CH_2	122.56	6.20 d (3.6), 5.50 d (3.2)	H-7
14	CH_3	20.87	1.81 s	H-5,H-9
15	CH_3	22.25	1.28 s	H_2-3
COCH_3	C	170.52	-	CO***CH₃***
CO***CH₃***	CH_3	21.65	2.1 s	

X-ışını kırınım bulguları

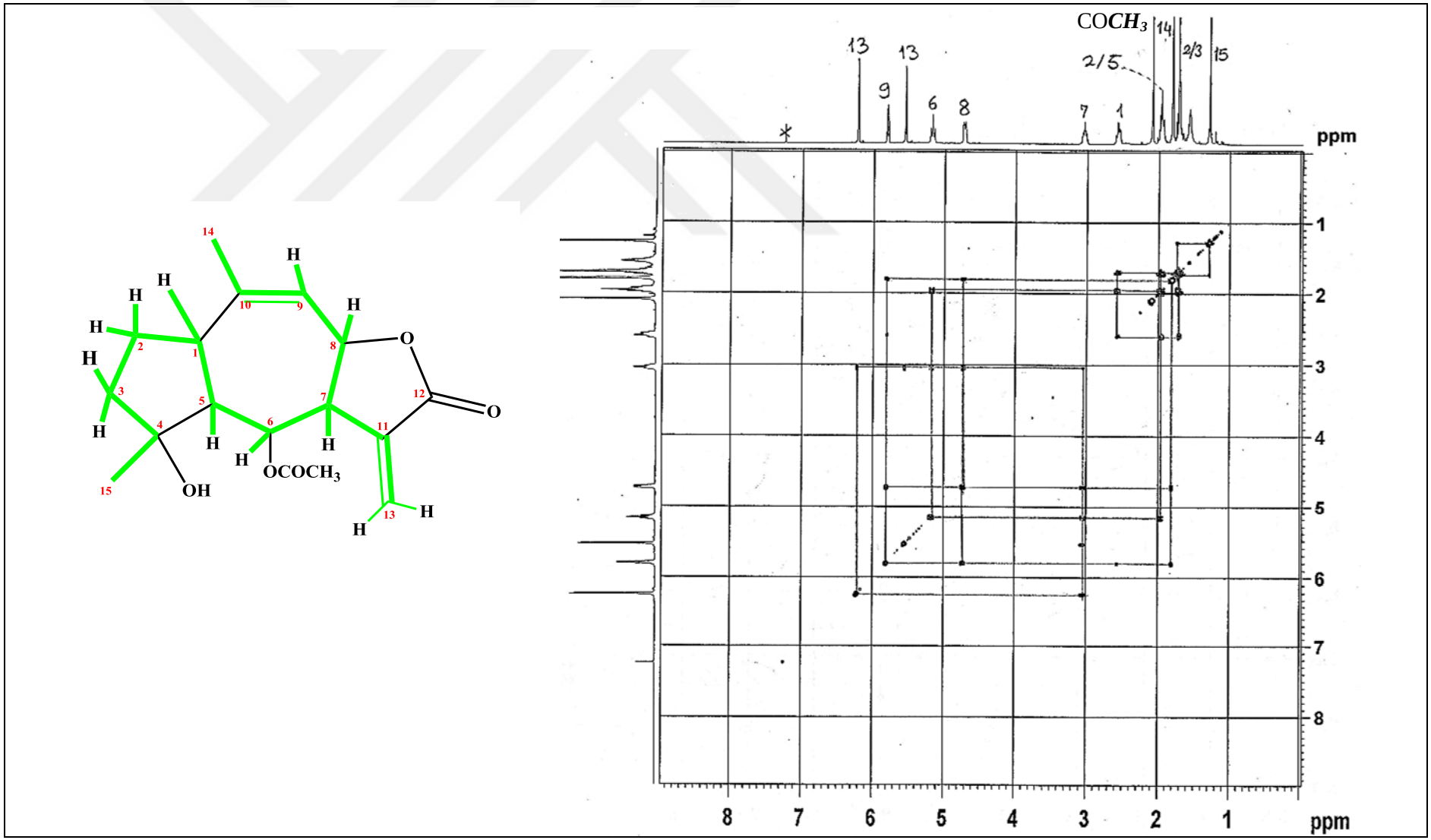
Kimyasal formül $C_{34}H_{44}O_{10}$; molekül ağırlığı 612.69; kristal sistemi monoklinik, uzay grubu P1, birim hücre parametreleri **a** = 11.819(2) Å, **b** = 10.341(3)Å, **c** = 12.564(2)Å, $\beta = 93.13(1)°$ ve birim hücre hacmi 1533.2(6) $Å^3$, Z = 2, hesaplanan yoğunluk 1.327 mg/m^3, F(000)= 656, kristal boyutu 0.31 x 0.11 x 0.07 mm, Θ açı aralığı 3.52-58.00°, toplanan yansıma sayısı 14908, bağımsız yansıma sayısı 4215 (R_{int} = 0.0404), uyuşum sonucu F^2 1.029, son R değerleri [I>2δ(I)] R1 = 0.0340, wR2 = 0.0864, R indisleri R1 = 0.0351, tüm veriler için wR2 = 0.0873, arıtım sonucunda elde edilen en büyük ve en küçük elektron yoğunluğu farkları, sırasıyla 0.489 ve -0.196 $e.Å^{-3}$.



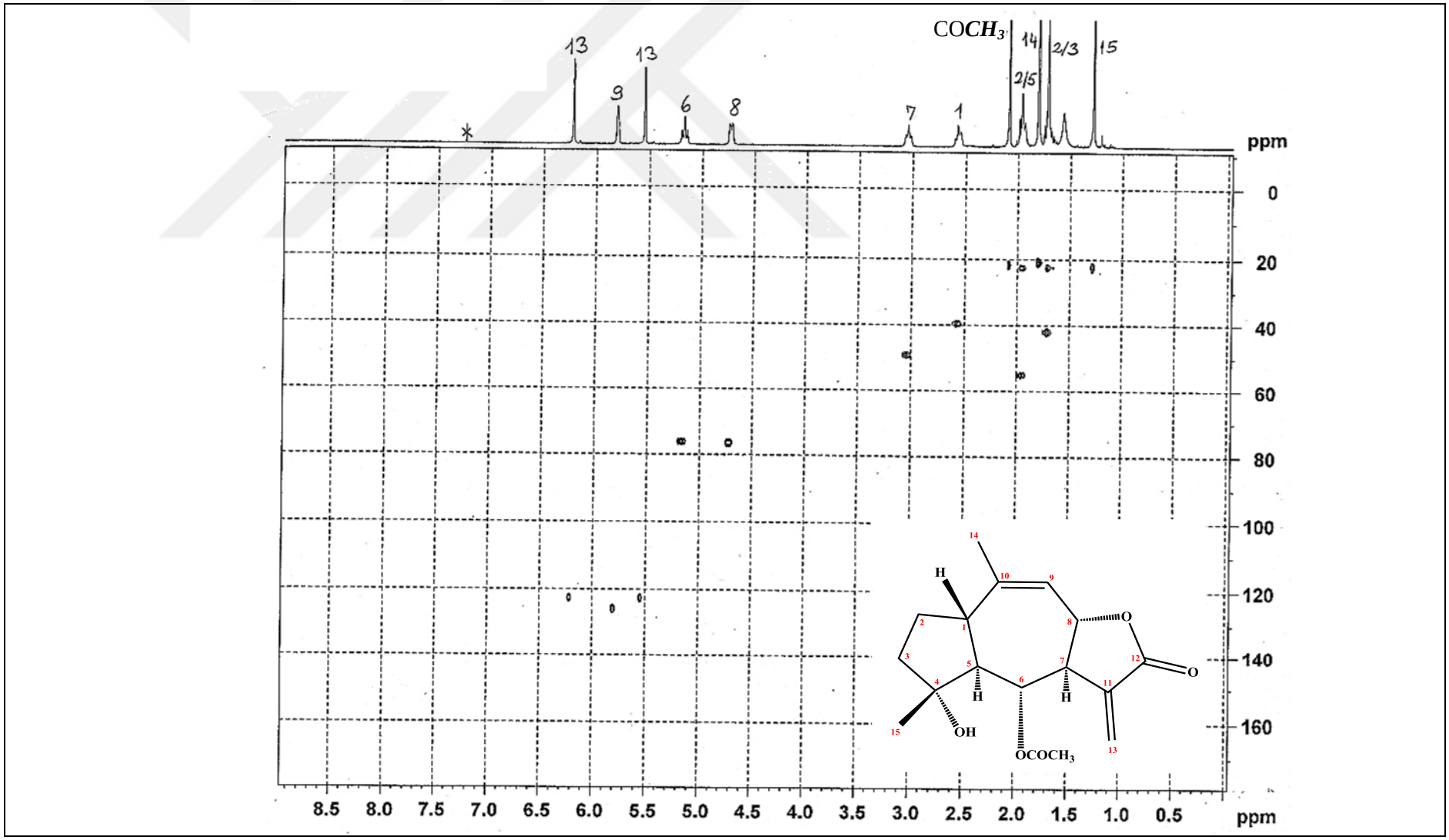
Şekil 4.3a. 6α-asetoksi-4α-hidroksi-1βH-gaya-9.11(13)-dien-12.8α-olid (**CM-1**)'in ^{1}H NMR spektrumu (A, B, C: $CDCl_3$, 400 MHz)



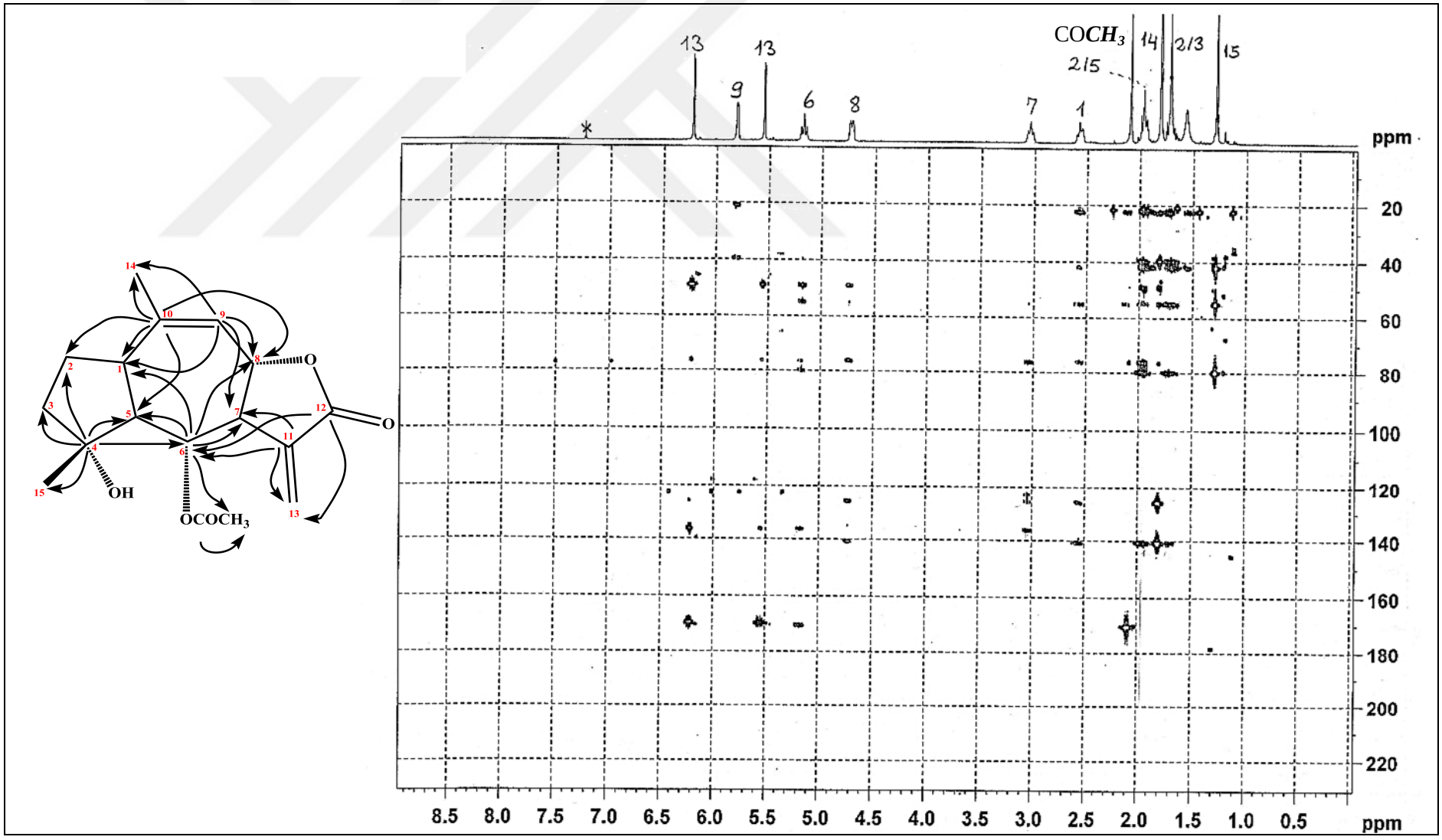
Şekil 4.3b. 6α-asetoksi-4α-hidroksi-1βH-gaya-9.11(13)-dien-12.8α-olid (**CM-1**)'in APT spektrumu (A, B: $CDCl_3$, 100 MHz)



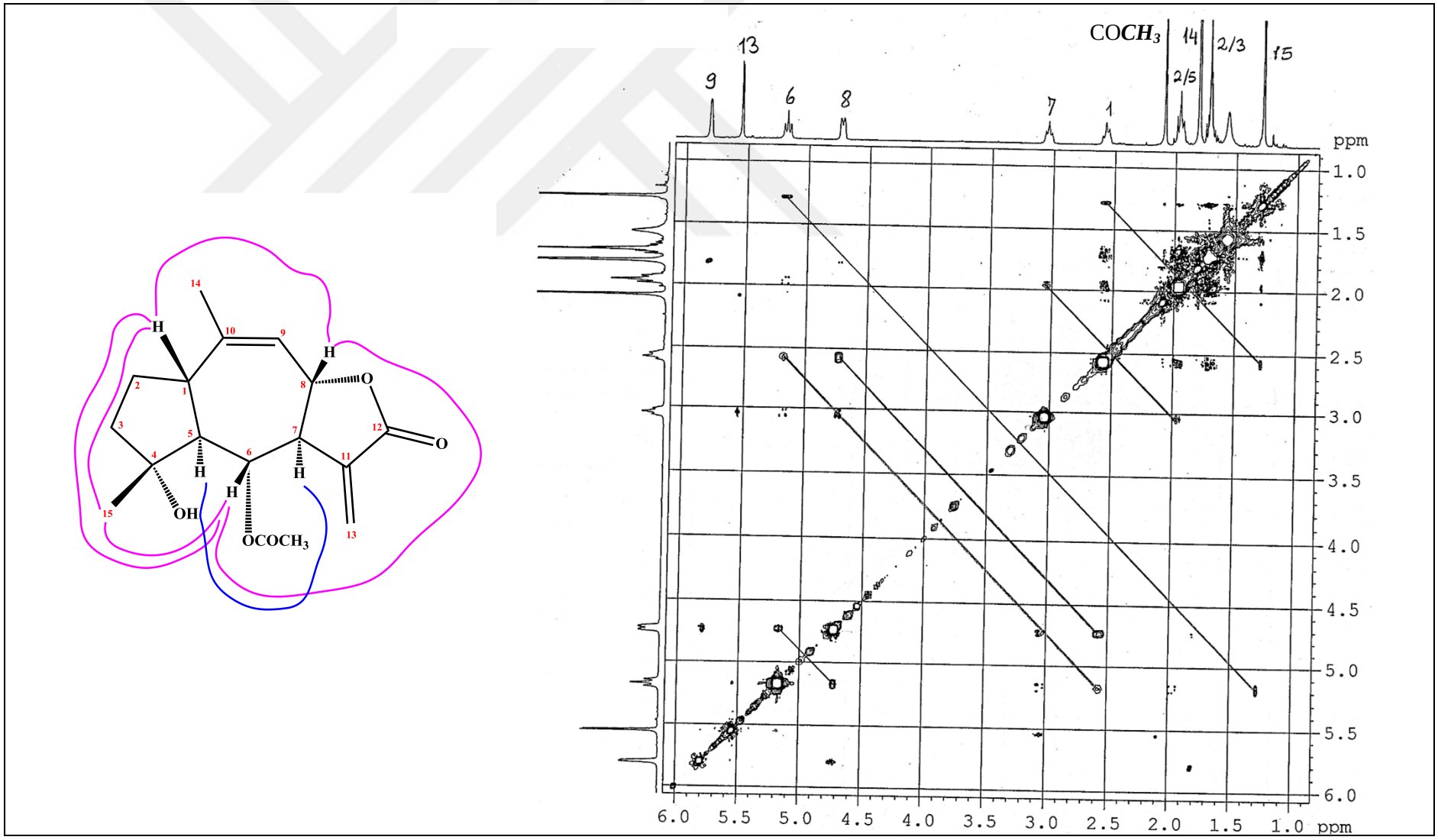
Şekil 4.3c. 6α-asetoksi-4α-hidroksi-1βH-gaya-9.11(13)-dien-12.8α-olid (**CM-1**)'in COSY spektrumu ($CDCl_3$, 400 MHz)



Şekil 4.3d. 6α-asetoksi-4α-hidroksi-1βH-gaya-9.11(13)-dien-12.8α-olid (**CM-1**)'in HSQC spektrumu ($CDCl_3$)



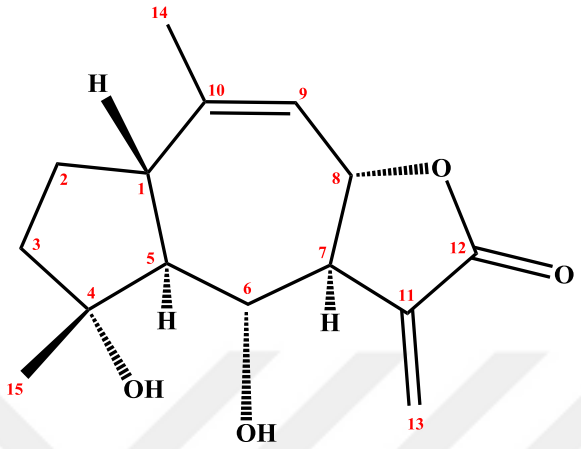
Şekil 4.3e. 6α-asetoksi-4α-hidroksi-1βH-gaya-9.11(13)-dien-12.8α-olid (**CM-1**)'in HMBC spektrumu ($CDCl_3$)



Şekil 4.3f. 6α-asetoksi-4α-hidroksi-1βH-gaya-9.11(13)-dien-12.8α-olid (**CM-1**)'in NOESY spektrumu ($CDCl_3$, 400 MHz)

CM-3: 4*α*,6*α*-dihidroksi-1*β*,5*α*,7*α*H-gaya-9(10),11(13)-dien-12,8*α*-olid

CM-3 bileşiği (78.1 mg) kloroform ekstresinden sarı yağımsı bir madde halinde izole edilmiştir.



CM-3: $C_{15}H_{20}O_4$ (MA: 264)

$[\alpha]_D^{28}$: - 63.2 (*c* 0.085, CH_3OH)

UV (CH_3OH) λ_{max} nm: 229

IR (KBr) υ_{max} cm^{-1}: 3432 (OH), 1763 (*α*-metilen, *γ*-lakton), 1646 (doymamışlık)

^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ_H: Şekil 4.4a

APT ($CDCl_3$, 100 MHz) δ_C: Şekil 4.4b

COSY ($CDCl_3$, 600 MHz) δ_H: Şekil 4.4c

HSQC ($CDCl_3$): Şekil 4.4d

HMBC ($CDCl_3$): Şekil 4.4e

NOESY ($CDCl_3$, 600 MHz) δ_H: Şekil 4.4f

EI-MS *m/z* (relatif değer): 246.1 $[M\text{-}H_2O]^+$ (9.56), 228.2 $[246\text{-}H_2O]^+$ (8.86), 213.1 $[228\text{-}CH_3]^+$ (7.98), 55.1 (100)

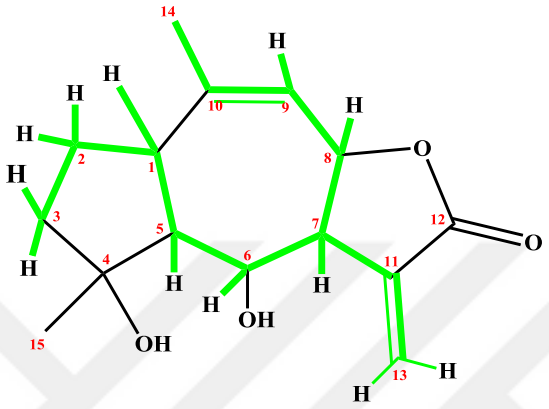
HREI-MS *m/z* (molekül formülü): 264.1358 ($C_{15}H_{20}O_4$ için hesaplanan, 264.1362), 246.1307 ($C_{15}H_{18}O_3$ için hesaplanan, 246.1256)

CM-3 bileşiğinin UV spektrumunda λ 229 nm'de absorpsiyon bantı görülmüştür. IR spektrumunda, hidroksil (3432 cm^{-1}) grubu, karakteristik α-metilen, γ-lakton (1763 cm^{-1}) ve doymamışlığa ait (1646 cm^{-1}) absorpsiyon bantları gözlenmiştir.

Bileşiğin ^{1}H NMR spektrumunda (Şekil 4.4a), karakteristik ekzosiklik metilen grubuna ait sinyaller [δ_H 6.26 (m, H-13a); 6.25 (m, H-13b)], 1 adet olefinik metin protonu [δ_H 5.80 (m, H-9)]; 2 adet metil grubuna ait singletler [δ_H 1.80 (*s*, H_3-14); 1.36 (*s*, H_3-15)], 2 adet oksimetin grubuna ait sinyaller [δ_H 4.62 (*brdd*, *J*=4.4, 10.0 Hz, H-8); 4.02 (*dd* "t" *J*=10.0 Hz, H-6)] gözlenmiştir. Tüm proton ve karbon rezonanslarının yorumlanmasında, APT ve 2D NMR (Şekil 4.4b-f) tekniklerinden yararlanılmıştır. Bu sonuçlara göre, bileşiğin 2 adet metil karbonu [δ_C 21.14 (C-14); 22.30 (C-15)], 2 adet oksimetin karbonu [δ_C 74.95 (C-6); 76.41 (C-8)], 1 adet olefinik metilen karbonu [δ_C 123.95 (C-13)], 1 adet olefinik metin karbonu [δ_C 125.82 (C-9)], 1 adet sp^3 oksijenli tersiyer karbon [δ_C 81.13 (C-4)], 1 adet sp^2 katerner karbon [δ_C 137.61 (C-11)], 1 adet olefinik katerner karbon [δ_C 140.41 (C-10)] ve 1 adet lakton karbonili [δ_C 170.47 (C-12)] taşıdığı tespit edilmiştir.

^{1}H NMR spektrumunda (Şekil 4.4a) H-7 ve H-8 protonları arasındaki etkileşim sabitinin büyük bir değerde olması ($J_{7,8}$= 10.0 Hz), H-8'in β pozisyonda olduğunu göstermiştir. Bu bulgu ve seskiterpen laktonlarda biyosentetik olarak H-7'nin α pozisyonda bulunmasına uygun olarak (Bruneton, 1999; Simonsen ve diğerleri, 2013), CM-3'ün "**8,12-*trans* gayanolid**" yapıya sahip olduğu belirlenmiştir. 8,12 Gayanolit yapısında seskiterpen laktonların, α-metilen, γ-lakton halkasında bulunan ekzosiklik metilen protonları (H-13a ve H-13b) C-6-α hidroksil grubundan dolayı ^{1}H NMR spektrumunda geminal etkileşim göstermektedir. Bu etkileşim dolayısıyla, H_2-13 sinyallerinin kimyasal kayma değerleri yakınlaşarak sinyal "*d*" yerine "*dd*", hatta kimyasal kayma değerlerinin çok yaklaştığı durumlarda "*m*" olarak görünmektedir (Yoshioka ve diğerleri 1971). **CM-3**'ün lakton halkasına ait ekzosiklik metilen protonlarının birbirine yaklaşarak δ_H 6.26 ve 6.25'te *m* gözlenmesi, C-6-α OH grubunun varlığını göstermiştir (Şekil 4.4a-C). ^{1}H NMR spektrumunda, δ_H 4.62'de görülen H-8'in, visinal H-9 protonu ile tek bir etkileşim ($J_{8,9}$= 4.4 Hz) göstermesi, C-9'da olefinik metin protonunun (δ_H 5.80) varlığını göstermiştir. H-6'nın H-5 ve H-7 ile etkileşim sabitinin eşit değerde ($J_{5,6}$= $J_{6,7}$=10.0 Hz) olmasından dolayı, H-6 sinyali δ_H 4.02'de *dd* "t" olarak görülmüştür. H-6'nın H-5 ve H-7 ile büyük etkileşim sabitine sahip olması (*J*=10.0 Hz) H-6'nın β pozisyonda olduğunu da göstermiştir (Şekil 4.4a-C).

COSY spektrumunda (Şekil 4.4c) tek spin sistemi içinde H-5/H-6, H-6/H-7, H7/H-8, H-8/H-9, H-1/H_2-2, H-1/H-5 ve H_2-2/H_2-3 visinal protonları arasında korelasyonlar gözlenmiştir. Ayrıca COSY yardımıyla, lakton halka sisteminde karbonil grubu ile konjüge ekzosiklik metilen protonlarının (H_2-13) H-7 ile; H_3-14'ün H-9 ile uzak mesafe allilik etkileşim; H_3-14'ün H-8 ile uzak mesafe homo allilik etkileşim gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.4g).

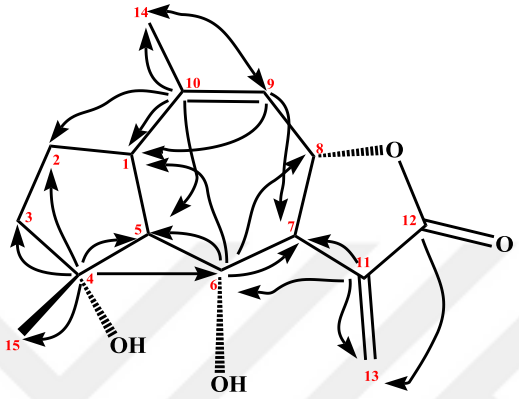


Şekil 4.4g. 4*α*,6*α*-dihidroksi-1*β*,5*α*,7*α*H-gaya-9(10),11(13)-dien-12,8*α*-olid (**CM-3**)'de COSY korelasyonları

CM-3 bileşiğinin HSQC (Şekil 4.4d) yardımıyla, her protonunun üzerinde bulunduğu karbon rezonansları belirlenmiştir. C-1, C-5 ve C-7 metin karbonlarının sırasıyla δ_C 38.69, 56.69 ve 51.58 'de olduğu saptanmıştır. Bileşikte, C-2 ve C-3 metilen; C-13 ekzosiklik metilen karbon rezonansları ise, sırasıyla δ_C 22.82, 40.97 ve 123.95'de görülmüştür. Ayrıca, 9. konumdaki olefinik metin karbonu δ_C 125.82'de; C-14 ve C-15'teki metil gruplarının karbon rezonansları sırasıyla δ_C 21.14 ve 22.30'de; 6. ve 8. konumdaki oksimetin karbon rezonansları ise sırasıyla δ_C 74.95 ve 76.41'de saptanmıştır.

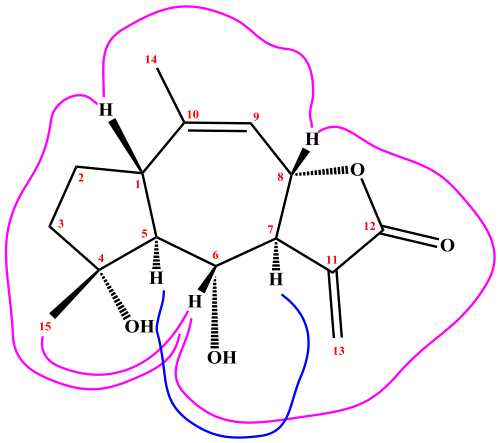
HMBC spektrumunda (Şekil 4.4e), δ_C 137.61'deki karbon ile etkileşim şiddeti sırasıyla giderek azalan H-6, H_2-13 ve H-7 protonlarının ilişkisi, gayanolid yapısının karakteristik ekzosiklik metilen grubunun δ_H 6.26 (H-13a); 6.25 (H-13b) C-11'e bağlı olduğunu göstermiştir. Trisübstitüe etilenik bağın C-9 ile C-10 arasında olduğu bu karbonların gösterdiği HMBC korelasyonları ile doğrulanmıştır. HMBC spektrumunda, H_3-14, H-1 ve H-7 protonlarının δ_C 125.82 ile ilişkisi, integrali bir proton değerindeki δ_H 5.80 olefinik metin sinyalinin C-9'da bulunduğuna işaret etmiştir. Ayrıca δ_C 140.41 ile H_3-14, H-5, H_2-2 ve H-1 arasında görülen etkileşimler, bu sinyalin C-10'daki olefinik katerner karbona ait olduğunu göstermiştir. δ_H 4.02'de gözlenen oksimetin sinyalinin C-6'da bulunduğu, δ_C

74.95'deki karbon rezonansı ile H-5, H-7, H-1 ve H-8 protonları arasında gözlenen uzak mesafe korelasyonları sonucunda belirlenmiştir. HMBC spektrumu yardımıyla, **CM-3**'ün lakton karboniline ait δ_C 170.47'de görülen karakteristik sinyalin H_2-13 ile uzak mesafe etkileşimi, karbonil grubunun C-12'de olduğunu göstermiştir. δ_C 81.13'de tespit edilen 1 tane sp^3 oksijenli tersiyer karbon sinyalinin H-6, H_3-15, H-5, H_2-2 ve H_2-3 ile etkileşimleri, bu karbonun C-4'de olduğunu göstermiştir (Şekil 4.4h).



Şekil 4.4h. 4*α*,6*α*-dihidroksi-1*β*,5*α*,7*α*H-gaya-9(10),11(13)-dien-12,8*α*-olid (**CM-3**)'de önemli uzak mesafe HMBC korelasyonları (*Oklar karbondan protona doğrudur*)

NOESY spektrumunda (Şekil 4.4f) belirlenen H-8 (δ_H 4.62)/H-6 (δ_H 4.02) arasındaki korelasyon ile H-6'nın β konfigürasyonda olduğu doğrulanmıştır. H-7 (δ_H 2.62)/H-5 (δ_H 1.58) arasında gözlenen korelasyon ise H-5'in de H-7 gibi α pozisyonda olduğunu doğrulamıştır. Ayrıca, H-8 (δ_H 4.62)/H-1 (δ_H 2.51-2.53), H-1/H-6 (δ_H 4.02) ve H-6/H_3-15 (δ_H 1.36) arasındaki korelasyonlar H-1, H-6 ve H_3-15'in β pozisyonda olduğunu göstermiştir (Şekil 4.4i).



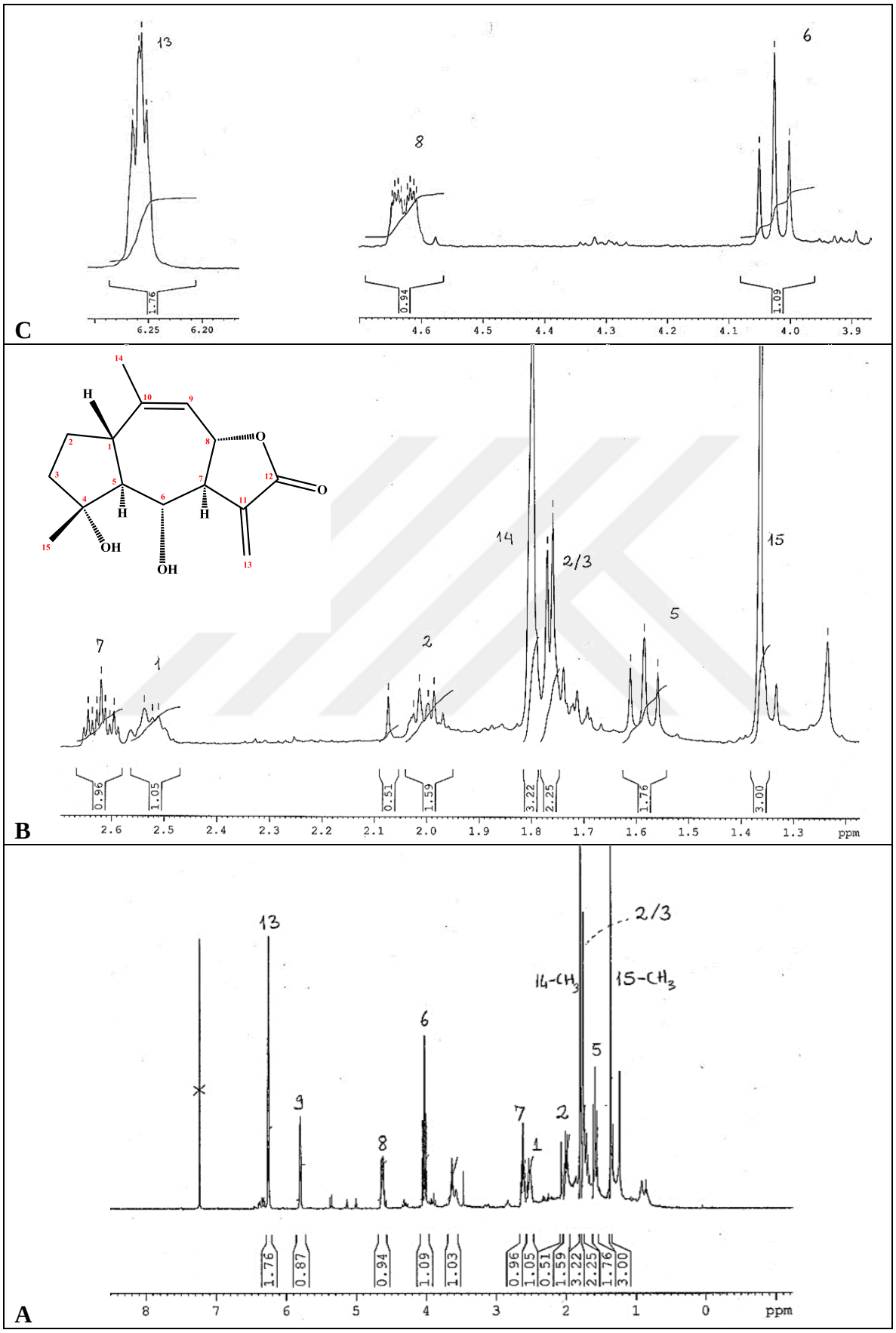
Şekil 4.4i. 4*α*,6*α*-dihidroksi-1*β*,5*α*,7*α*H-gaya-9(10),11(13)-dien-12,8*α*-olid (**CM-3**)'de NOESY korelasyonları

Bileşiğin EI-MS spektrumunda, $[M-H_2O]^+$, $[246-H_2O]^+$ ve $[228-CH_3]^+$ pikleri sırasıyla m/z 246.1, 228.2 ve 213.1'da gözlenmiştir. HREI-MS analizinde 264.1358 ve 246.1307 molekül ağırlığına sahip iyonlara ait kapalı formülleri $C_{15}H_{20}O_4$ ve $C_{15}H_{18}O_3$ olarak tespit edilmiştir. Bu bulgular ^1H, ^{13}C ve 2D NMR spektroskopik bulguları (Çizelge 4.4, Şekil 4.4a-f) ile birlikte değerlendirildiğinde, **CM-3** bileşiğinin, **CM-1**'den farklı olarak, C-6 konumunda asetoksil yerine hidroksil grubu taşıyan, moleküler formülü $C_{15}H_{20}O_4$ olan, "**izoinuviskolid**" türevi bir bileşik olduğu belirlenmiştir.

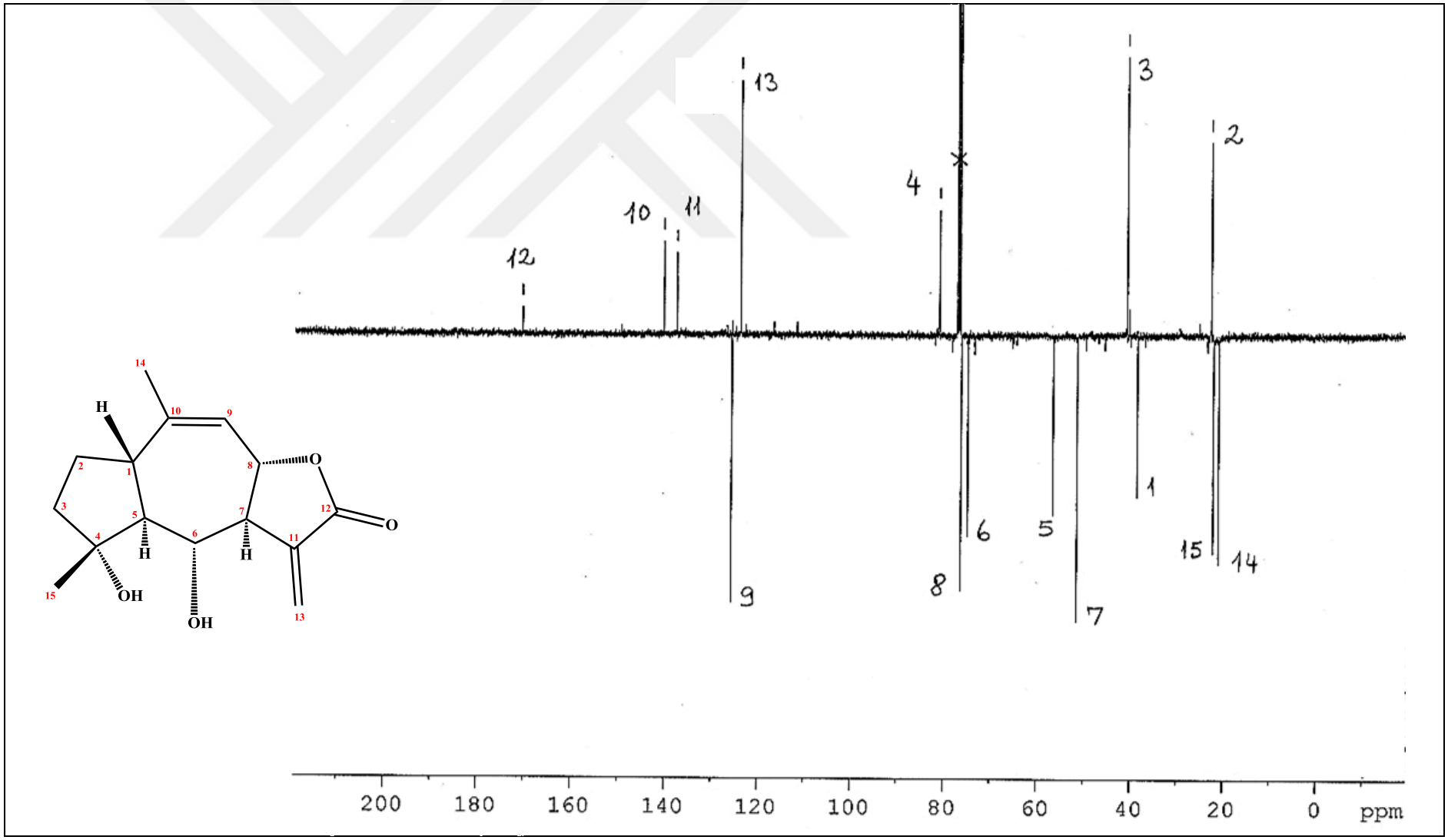
Yukarıdaki spektral veriler ışığında, **CM-3** bileşiğinin yapısı "**4*α*,6*α*-dihidroksi-1*β*,5*α*,7*α*H-gaya-9(10),11(13)-dien-12,8*α*-olid**" olarak aydınlatılmıştır. Bu bileşik daha önce *Inula falconeri* (Cheng ve diğerleri, 2011) ve *Chrysophthalmum montanum* (Gürbüz ve diğerleri, 2016) bitkilerinden izole edilmiş olup, elde ettiğimiz bulgular bileşiğin literatürde verilen ^1H ve ^{13}C NMR verileri ile uyum göstermiştir (Cheng ve diğerleri, 2011). Bileşik tarafımızdan literatürde yer alan izoinuviskolid yapısı temel alınarak "**6*α*-hidroksi-izoinuviskolid**" olarak isimlendirilmiştir. **CM-3**'ün 1D ve 2D NMR spektral değerleri ayrıntılı ve tam olarak ilk kez tezimizde açıklanmaktadır.

Çizelge 4.4. 4*α*,6*α*-dihidroksi-1*β*,5*α*,7*α*H-gaya-9(10),11(13)-dien-12,8*α*-olid (**CM-3**) bileşiğinin ^{1}H NMR ve APT spektroskopik değerleri ($CDCl_3$: δ_H 400 MHz, δ_C 100 MHz) ve HMBC korelasyonları

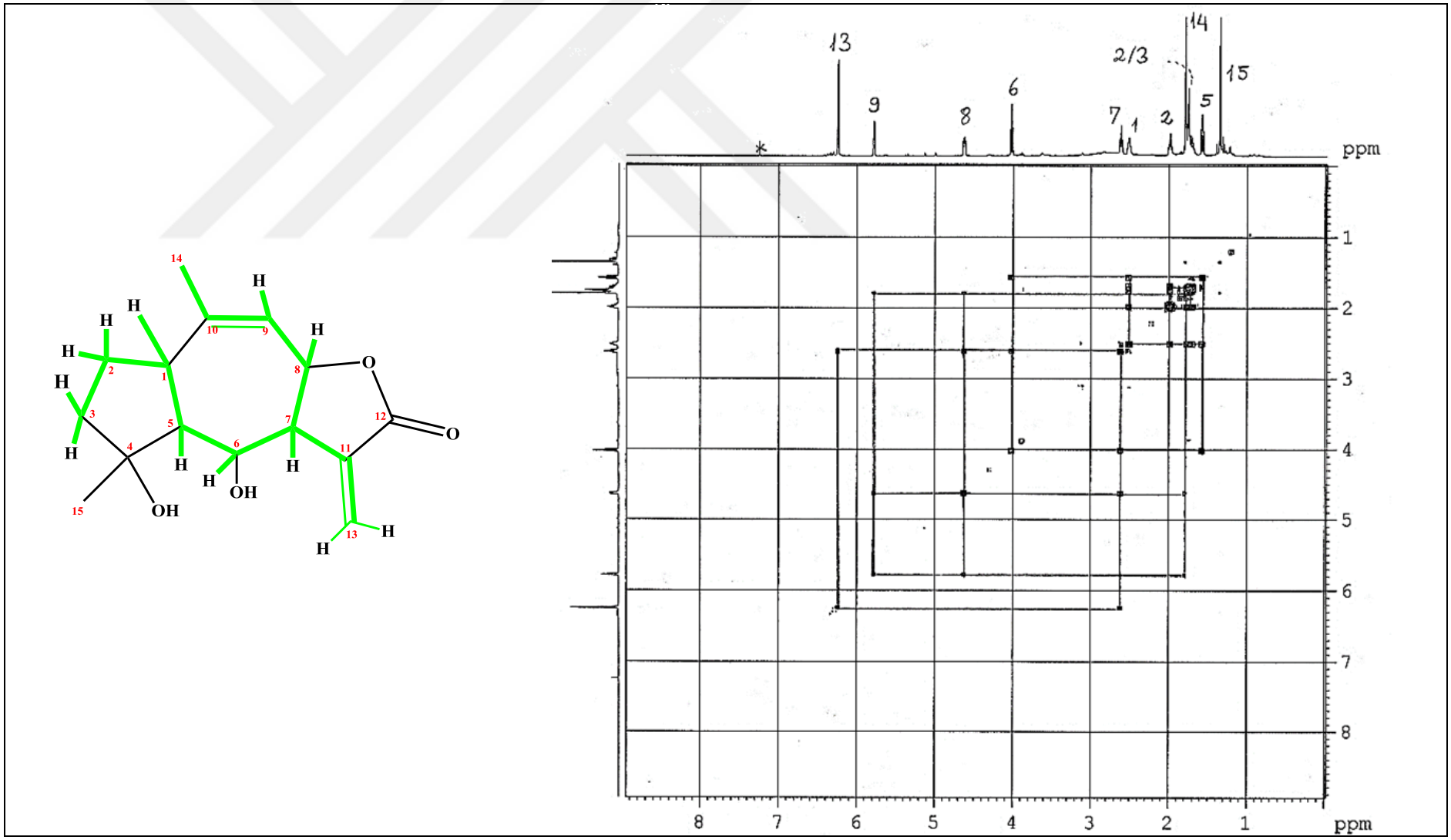
Konum	**C/H**	**$CDCl_3$**		
		δ_C ppm	**δ_H ppm, *J* (Hz)**	**HMBC (C→H)**
1	CH	38.69	2.51-2.53 m	H_3-14, H-5, H-9, H_2-3, H_2-2, H-6
2	CH_2	22.82	1.98-2.02 m, 1.77-1.68 m	H-1, H_2-5
3	CH_2	40.97	1.77-1.68 m	H_3-15, H_2-2
4	C	81.13	-	H-6, H_3-15, H-5, H_2-2, H_2-3
5	CH	56.69	1.58 dd (10.8/10.4)	H_3-15, H_2-3, H-6, H-1
6	CH	74.95	4.02 dd “t” (10.0)	H-5, H-7, H-1, H-8
7	CH	51.58	2.62 dddd (3.2/3.6/9.6/9.6)	H_2-13, H-6
8	CH	76.41	4.62 brdd (4.4/10.0)	H-7, H-6
9	CH	125.82	5.80 m	H_3-14, H-1, H-7
10	C	140.41	-	H_3-14, H-5, H_2-2, H-1
11	C	137.61	-	H-6, H_2-13, H-7
12	C	170.47	-	H_2-13
13	CH_2	123.95	6.26 m, 6.25 m	H-7
14	CH_3	21.14	1.80 s	H-9
15	CH_3	22.30	1.36 s	H_2-3



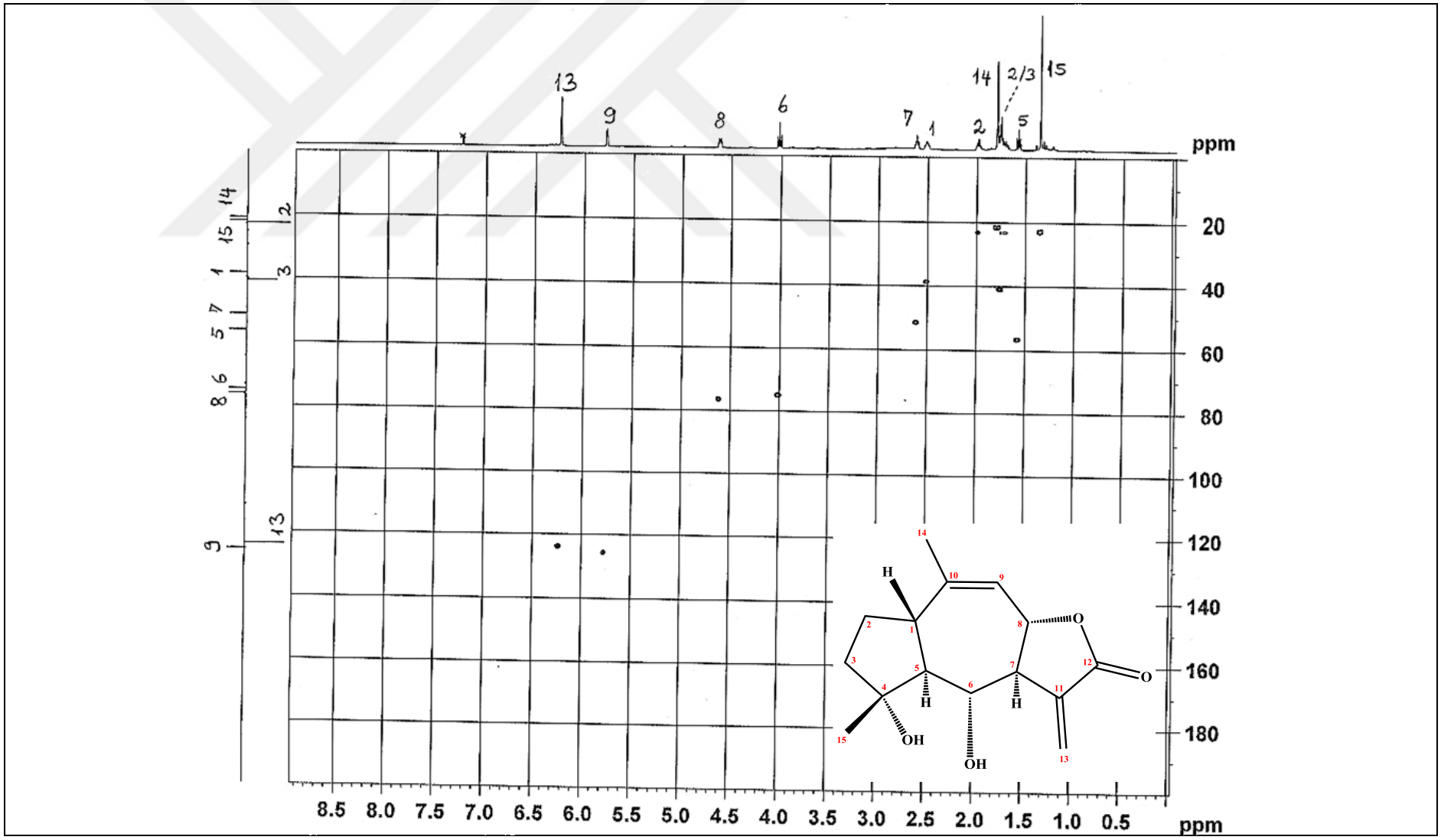
Şekil 4.4a. 4*α*,6*α*-dihidroksi-1*β*,5*α*,7*α*H-gaya-9(10),11(13)-dien-12,8*α*-olid (**CM-3**)'ün ^{1}H NMR spektrumu (A, B, C: $CDCl_3$, 400 MHz)



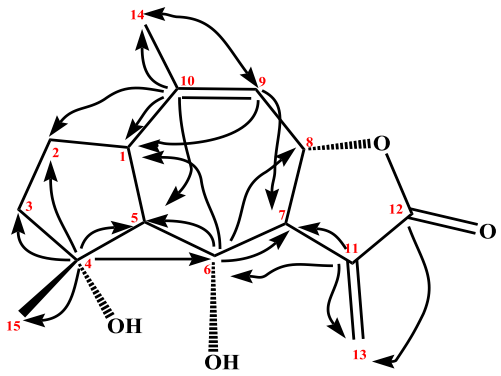
Şekil 4.4b. 4*α*,6*α*-dihidroksi-1*β*,5*α*,7*α*H-gaya-9(10),11(13)-dien-12,8*α*-olid (**CM-3**)'ün APT spektrumu ($CDCl_3$, 100 MHz)

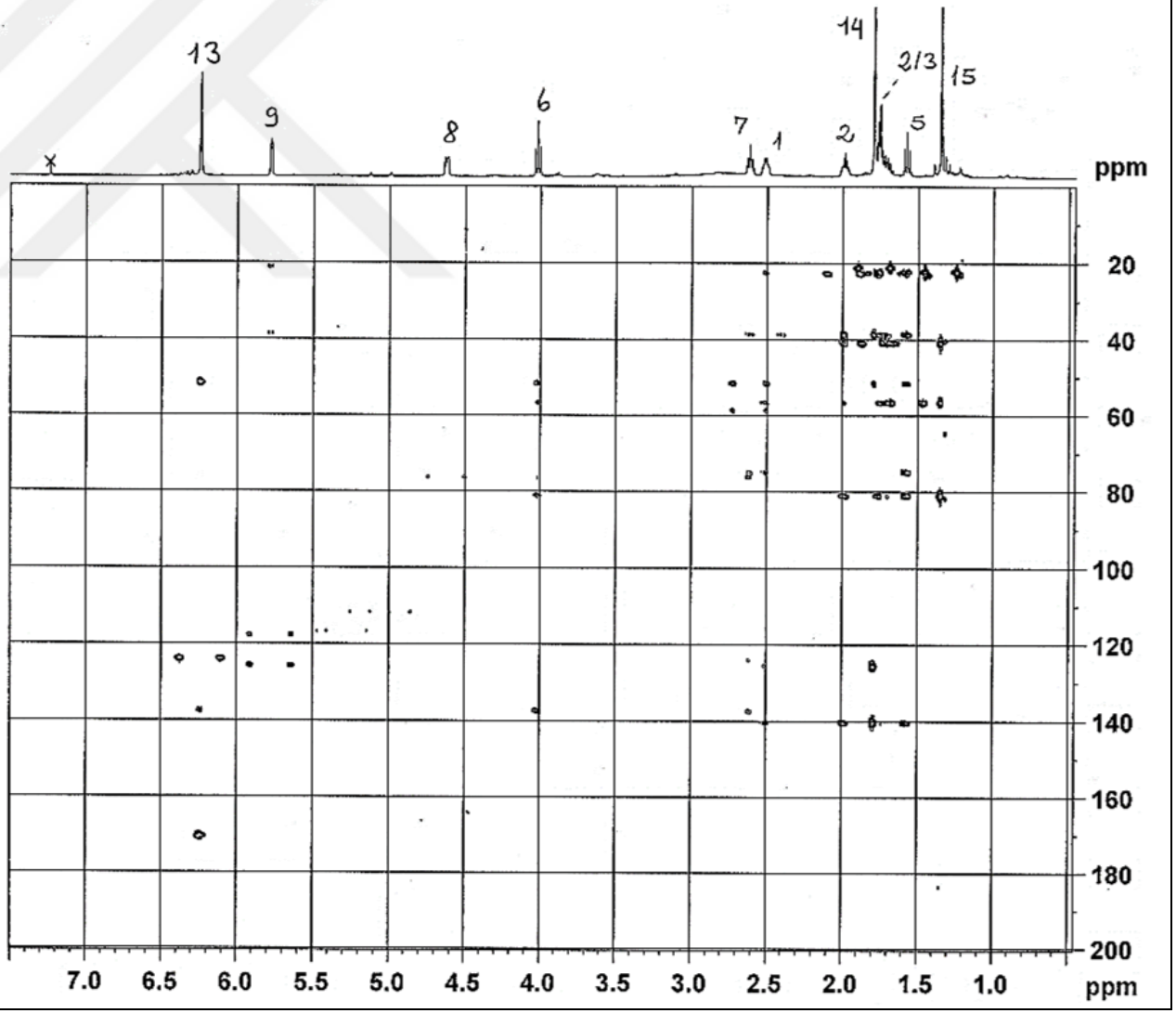


Şekil 4.4c. 4α,6α-dihidroksi-1β,5α,7αH-gaya-9(10),11(13)-dien-12,8α-olid (**CM-3**)'ün COSY spektrumu ($CDCl_3$, 400 MHz)

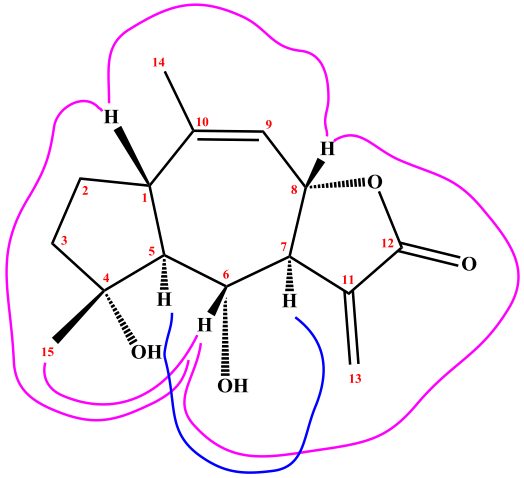


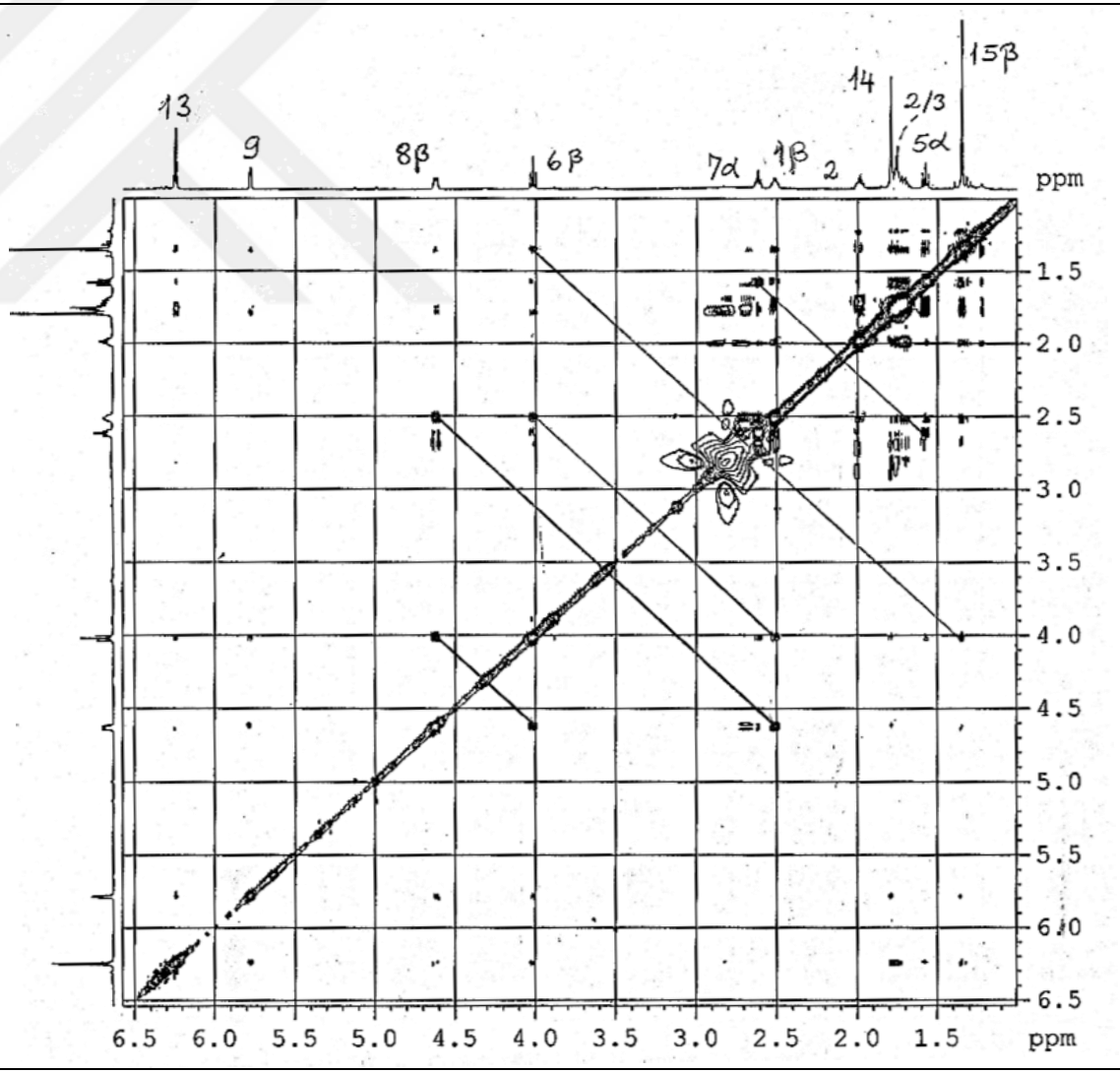
Şekil 4.4d. 4*α*,6*α*-dihidroksi-1*β*,5*α*,7*α*H-gaya-9(10),11(13)-dien-12,8*α*-olid (**CM-3**)'ün HSQC spektrumu ($CDCl_3$)





Şekil 4.4e. 4*α*,6*α*-dihidroksi-1*β*,5*α*,7*α*H-gaya-9(10),11(13)-dien-12,8*α*-olid (**CM-3**)'ün HMBC spektrumu ($CDCl_3$)



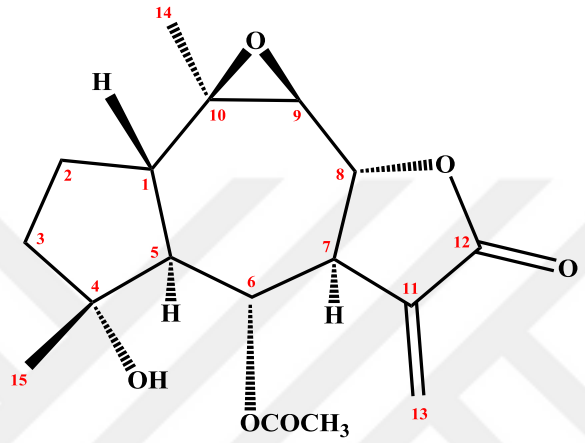


Şekil 4.4f. 4*α*,6*α*-dihidroksi-1*β*,5*α*,7*α*H-gaya-9(10),11(13)-dien-12,8*α*-olid (**CM-3**)'ün NOESY spektrumu ($CDCl_3$, 400 MHz)

C-9,10-epoksi-8,12-*trans*-gayanolidler

CM-2: 6α-asetoksi-4α-hidroksi-9β.10β-epoksi-1βH-gaya-11(13)-en-12.8α-olid

CM-2 bileşiği (59.9 mg) kloroform ekstresinden beyaz amorf küçük kristaller halinde izole edilmiştir. Bileşik $CHCl_3$:MeOH (1:0.5) karışımından kristallendirilerek X-ray kristalografisi için uygun kristaller elde edilmiştir.



CM-2: $C_{17}H_{22}O_6$ (MA: 322)

$[\alpha]_D^{27.6}$: - 54.7 (*c* 0.1, $CHCl_3$)

UV (CH_3OH) λ_{max} nm: 222, 214

IR (KBr) υ_{max} cm^{-1}: 3441 (OH), 1769 (α-metilen γ-lakton), 1730 (OAc)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ_H: Şekil 4.5a

APT ($CDCl_3$, 100 MHz) δ_C: Şekil 4.5a

COSY ($CDCl_3$, 400 MHz) δ_H: Şekil 4.5b

HSQC ($CDCl_3$): Şekil 4.5c

HMBC ($CDCl_3$): Şekil 4.5d

NOESY ($CDCl_3$, 400 MHz) δ_H: Şekil 4.5e

EI-MS *m/z* (relatif değer): 262.2 $[M- CH_3COOH]^+$ (8.95), 244.1 $[262-H_2O]^+$ (12.24), 219.1 $[262-CH_3CO]^+$ (24.03), 186.1 (100)

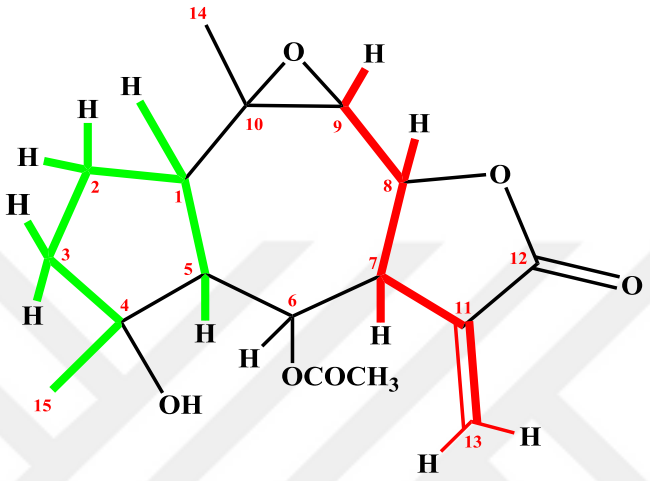
HREI-MS *m/z* (molekül formülü): 262.1214 ($C_{15}H_{18}O_4$ için hesaplanan, 262.1205), 244.1113 ($C_{15}H_{16}O_3$ için hesaplanan, 244.1099)

CM-2 bileşiğinin UV spektrumu λ 222 ve 214 nm'de maksimum absorpsiyon bantı göstermiştir. IR spektrumunda, hidroksil (3441 cm^{-1}) grubu, karakteristik α-metilen, γ-lakton (1769 cm^{-1}) ve asetil sübstitüsyonuna ait ester (1730 cm^{-1}) bantları gözlenmiştir.

Bileşiğin ^{1}H NMR spektrumunda (Şekil 4.5a), karakteristik ekzosiklik metilen grubuna ait sinyaller [δ_H 6.27 (*d*, *J*=3.2 Hz, H-13a); 5.63 (*d*, *J*=2.8 Hz, H-13b)], 3 adet metil grubuna ait singletler [δ_H 1.41 (*s*, H_3-14); 1.23 (*s*, H_3-15); 2.1 (*s*, CO***CH₃***)] ve 3 adet oksimetin grubuna ait sinyaller [δ_H 3.12 (*d*, *J*=6.4 Hz, H-9); 4.01 (*dd*, *J*=6.4, 10.4 Hz, H-8); 4.98 (br*dd* *J*=10.0, 10.0 Hz, H-6)] gözlenmiştir. Tüm proton ve karbon rezonanslarının yorumlanmasında, APT ve 2D NMR (Şekil 4.5a-e) tekniklerinden yararlanılmıştır. Bu sonuçlara göre, bileşiğin, 3 adet metil karbonu [δ_C 16.66 (C-14); 21.75 (C-15); 21.59 (CO***CH₃***)], 3 adet oksimetin karbonu [δ_C 75.26 (C-6); 78.49 (C-8); 63.36 (C-9)], 1 adet olefinik metilen karbonu [δ_C 123.70 (C-13)], 2 adet sp^3 oksijenli tersiyer karbon [δ_C 79.98 (C-4); 59.20 (C-10)], 1 adet sp^2 katerner karbon [δ_C 135.06 (C-11)], 1 adet lakton karbonili [δ_C 168.97 (C-12)] ve 1 adet ester karbonili [δ_C 170.56 (C-16)] taşıdığı tespit edilmiştir.

^{1}H NMR spektrumunda (Şekil 4.5a) H-7 ve H-8 visinal protonları arasındaki etkileşim sabitinin büyük bir değerde olması ($J_{7,8}$= 10.4 Hz), H-8'in β pozisyonda olduğunu göstermiştir. Bu bulgu ve seskiterpen laktonlarda biyosentez bakımından H-7'nin α konumda olmasına uygun olarak (Bruneton, 1999; Simonsen ve diğerleri, 2013), **CM-2**'nin "**8,12-*trans* gayanolit**" yapıya sahip olduğu belirlenmiştir. Samek kuralına (Samek, 1978) uygun olarak, H-7 ile H_2-13 [δ_H 6.27 (*d*, *J*=3.2 Hz, H-13a); 5.63 (*d*, *J*=2.8 Hz, H-13b] protonlarının gösterdiği etkileşim sabitinin $J_{7,13} > 3$ olması, lakton halkasının "**8,12-*trans***" bağlandığını desteklemiştir. ^{1}H NMR spektrumunda, H-6'nın H-5 ve H-7 ile etkileşim sabitinin eşit değerde ($J_{5,6}$=10.0; $J_{6,7}$=10.0 Hz) olmasından dolayı, H-6 sinyali 4.98 ppm'de br*dd* olarak görülmüştür. H-6'nın H-5 ve H-7 ile büyük etkileşim sabitine sahip olması (*J*=10.0 Hz) H-6'nın β pozisyonda olduğunu da göstermiştir. H-6'nın kimyasal kayma değerinin (4.98 ppm) düşük alana kayması C-6'da ester fonksiyonel grubunun varlığını düşündürmüştür. δ_H 3.12'de dublet görülen oksimetin sinyalinin (H-9), visinal H-8 protonu ile tek bir etkileşim sabitine ($J_{9,8}$=6.4 Hz) sahip olması, C-10'un proton taşımadığına işaret etmiştir. Bu bulgular 9. ve 10. konumda serbest hidroksil gruplarının veya C-9,10 epoksit halkasının varlığını düşündürmüştür.

COSY spektrumunda (Şekil 4.5b), iki farklı spin sistemi içerisinde H-1/H_2-2, H_2-2/H_2-3 ve H-1/H-5 ile H7/H-8 ve H-8/H-9 visinal protonları arasında korelasyonlar gözlenmiştir. Ayrıca COSY yardımıyla, H_2-13 ekzosiklik metilen protonlarının H-7 ile uzak mesafe allilik etkileşim; H_2-3'ün ise H_3-15 ile uzak mesafe W etkileşim gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.5f).

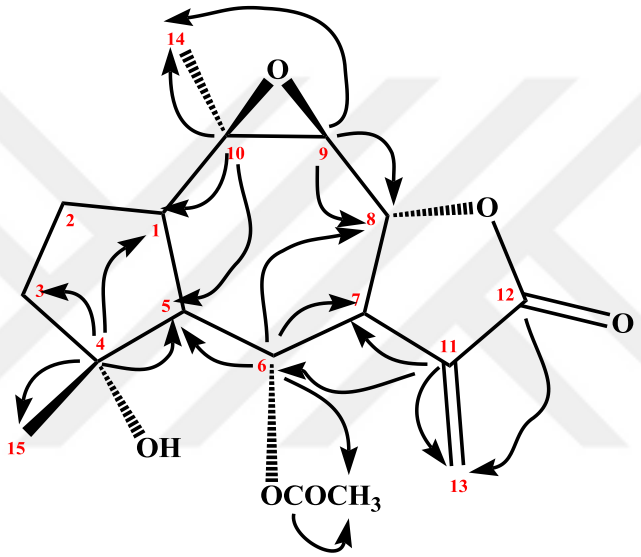


Şekil 4.5f. 6α-asetoksi-4α-hidroksi-9β.10β-epoksi-1βH-gaya-11(13)-en-12.8α-olid (**CM-2**)'de COSY korelasyonları

HSQC (Şekil 4.5c) yardımıyla, C-1, C-5 ve C-7 metin karbonlarının sırasıyla δ_C 42.39, 53.75 ve 46.07'de olduğu saptanmıştır. C-2 ve C-3 metilen; C-13 ekzosiklik metilen karbon rezonansları, sırasıyla δ_C 20.95, 41.89 ve 123.70'te görülmüştür. Ayrıca C-14, C-15 ve CO***CH₃***'de metil gruplarına ait karbonlar, sırasıyla δ_C 16.66, 21.75 ve 21.59'de; C-6, C-8 ve C-9'da oksimetin grupları sırasıyla δ_C 75.26, 78.49 ve 63.36'da saptanmıştır.

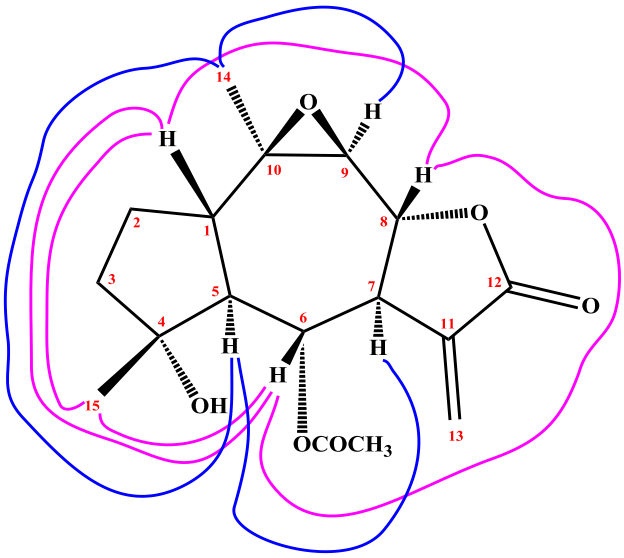
HMBC spektrumunda (Şekil 4.5d), δ_C 135.06'daki karbon rezonansı ile H_2-13 protonlarının ilişkisi, karakteristik ekzosiklik metilen grubunun C-11'e bağlı olduğunu göstermiştir. δ_C 63.36 ile H_3-14 ve H-8 protonları arasındaki korelasyonlar, δ_H 3.12'de görülen oksimetin sinyalinin C-9'da; δ_C 59.20 ile H_3-14, H-1, H_2-2, H-9 ve H-5 arasında görülen etkileşimler bu sinyalin C-10'daki katerner karbona ait olduğuna işaret etmiştir. Ayrıca, C-10'daki karbonun (δ_C 59.20), C-4'de (δ_C 79.97) yer alan diğer katerner karbon sinyaline oranla yüksek alanda görülmesi, C-10'da serbest hidroksil sübstitüsyonu yerine C-9,10 epoksit halkası olduğunu göstermiştir. δ_C 75.26 sinyali ile H-8 ve CO***CH₃*** protonları arasında gözlenen uzak mesafe etkileşimleri, δ_H 4.98'de gözlenen oksimetin

sinyalinin C-6'da olduğunu doğrulamıştır. δ_H 2.1'deki asetoksi metil protonlarının (CO***CH₃***) C-6 ile etkileşimi ise asetoksil fonksiyonel grubunun C-6'ya bağlı olduğunu göstermiştir. δ_C 168.97 ile H_2-13 arasındaki uzak mesafe etkileşimi, bu karbon sinyalinin lakton karbonili (C-12) olduğunu ispatlamıştır. δ_C 170.63 ile asetoksi metil protonları (CO***CH₃***) arasındaki etkileşim, bu sinyalin asetoksil fonksiyonel grubundaki karbonil grubuna ait olduğuna işaret etmiştir. δ_C 79.97'de tespit edilen sp^3 oksijenli tersiyer karbon sinyalinin H_3-15, H_2-2, H-1 ve H-5 ile etkileşimleri, bu katerner karbonun C-4 konumunda olduğunu göstermiştir (Şekil 4.5g).



Şekil 4.5g. 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-9*β*.10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-12.8*α*-olid (**CM-2**)'de önemli uzak mesafe HMBC korelasyonları (*Oklar karbondan protona doğrudur*)

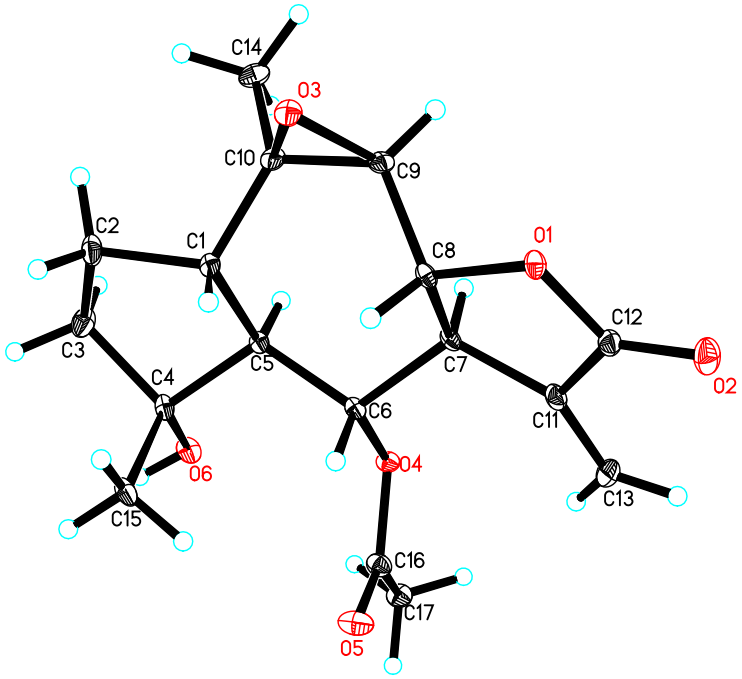
NOESY spektrumunda (Şekil 4.5e), H-8 (δ_H 4.01)/H-6 (δ_H 4.98) arasında gözlenen korelasyonlar ile H-6'nın β konumda olduğu doğrulanmıştır. H-7 (δ_H 3.39)/H-5 (δ_H 2.27) arasında gözlenen NOESY ilişkisi ise H-5'in de H-7 gibi α pozisyonda olduğunu doğrulamıştır. Ayrıca, NOESY spektrumunda H-5(δ_H 2.27)/H_3-14 (δ_H 1.41) ve H_3-14/ H-9 (δ_H 3.12) arasında gözlenen korelasyonlar, H-9 ve H_3-14'ün α pozisyonda olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, C-9,10 epoksit halkasının β konfigürasyonda olduğuna işaret etmiştir. H-8 (δ_H 4.01)/H-1 (δ_H 1.70), H-1/H_3-15 (δ_H 1.23), H-1/H-6 (δ_H 4.98) ve H-6/H_3-15 arasındaki korelasyonlar H-1 ve H_3-15'in de β pozisyonda olduğunu göstermiştir (Şekil 4.5h).



Şekil 4.5h. 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-9*β*.10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-12.8*α*-olid (**CM-2**)'de NOESY korelasyonları

Bileşiğin EI-MS spektrumunda, $[M\text{-}CH_3COOH]^+$, $[262\text{-}H_2O]^+$ ve $[262\text{-}CH_3CO]^+$ pikleri sırasıyla m/z 262.2, 244.1 ve 219.1'da gözlenmiştir. HREI-MS analizinde ise, 262.1214 ve 244.1113 molekül ağırlığına sahip iyonlara ait kapalı formülleri sırasıyla $C_{15}H_{18}O_4$ ve $C_{15}H_{16}O_3$ olarak tespit edilmiştir. Bu bulgular, ^1H, ^{13}C ve 2D NMR spektroskopik bulguları (Çizelge 4.5, Şekil 4.5a-e) ile birlikte değerlendirildiğinde, **CM-2** bileşiğinin inuviskolid (**CM-4** ve **CM-6**) ve izoinuviskolid (**CM-1** ve **CM-3**) yapılarından farklılık gösteren, moleküler formülü $C_{17}H_{22}O_6$ olan, "**C-9,10-epoksi-8,12-*trans*-gayanolit**" yapısında bir bileşik olduğu belirlenmiştir.

CM-2'nin absolü konfigürasyonu, tek kristal X-ışını kırınım analizi ile belirlenmiştir (Şekil 4.5i). Asimetrik birimde 6 bağımsız molekül bulunmaktadır. **CM-1**'de gözlendiği gibi CM-2'de de molekül yapısı düzlemsel değildir ve **CM-1**'e yapıca benzer olup, tek farkı C9-C10 olefinik bağının okside olarak epoksit oluşturmasıdır. Tüm diğer bağ uzunlukları ile bağ açıları beklenen değerlerde olup literatürde yer alan benzeri bileşikler için belirlenen değerlerle ve **CM-1** ile uyum içindedir (Ahmed ve diğerleri, 1993; González-Platas ve diğerleri, 1999; López-Rodríguez ve diğerleri, 2009; Öksüz ve diğerleri, 1993; Wang ve diğerleri, 2009). Merkezde 7 atomlu halka (C1/C5-C10) ve 2 adet 5 atomlu halka (O1-O2/C7-C8/C11-C12 ve C1-C5) esnek kayık ve zarf konformasyonunda *trans* bağlanmıştır. Hidroksil ve asetat (O4-O5/C16-C17) fonksiyonel grupları, C4 ve C6 konumlarında **CM-1**'de gözlendiği gibi psödo ekvatoryal bulunmaktadır.



Şekil 4.5i. 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-9*β*.10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-12.8*α*-olid (**CM-2**)'nin absolü konfigürasyonu

Yukarıda açıklanan spektral ve kristal veriler ışığında, **CM-2**'nin yapısı "**6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-9*β*.10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-12.8*α*-olid"** olarak aydınlatılmıştır. Bu bileşik daha önce *Postia bombycina* bitkisinden izole edilmiş olup, ^{1}H NMR bulgularımız literatürde verilen ^{1}H NMR değerleri (C_6D_6 içerisinde alınmıştır) ile uyum göstermiştir (Rustaiyan ve diğerleri, 1989).

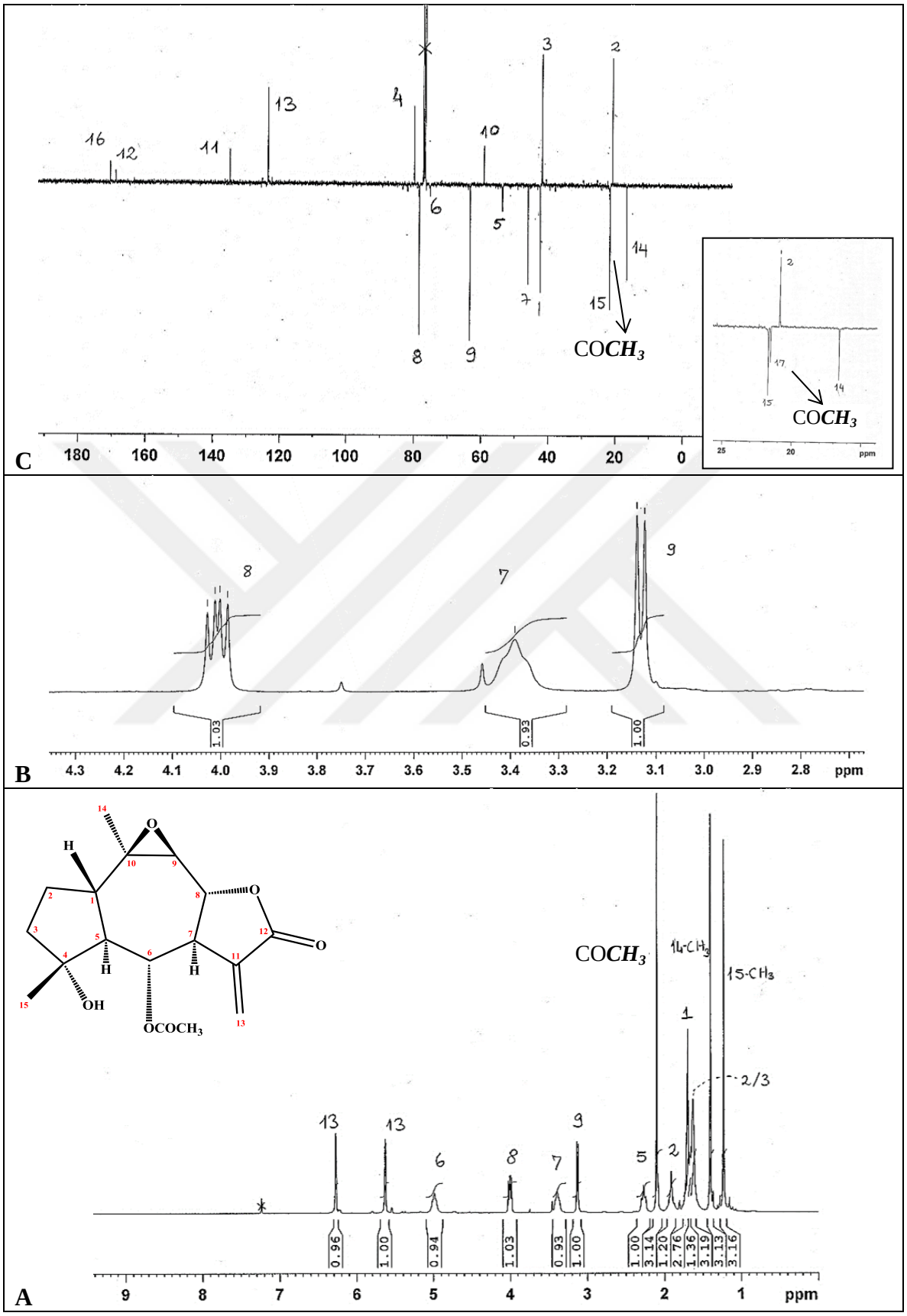
Literatür araştırmalarımıza göre **CM-2**, *C. montanum* bitkisinden ilk kez izole edilmektedir. Bileşik tarafımızdan literatürde yer alan izoinuviskolid yapısı temel alınarak "**6*α*-asetoksi-9*β*,10*β*-epoksi-izoinuviskolid**" olarak isimlendirilmiştir. Bileşiğin 1D ve 2D NMR spektral değerleri ayrıntılı ve tam olarak ilk kez tezimizde sunulmaktadır. Ayrıca bileşiğin absolü konfigürasyonu X-ray kristalografisi ile ilk kez tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5. 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-9*β*.10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-12.8*α*-olid (**CM-2**) bileşiğinin ^{1}H NMR ve APT spektroskopik değerleri ($CDCl_3$: δ_H 400 MHz, δ_C 100 MHz) ve HMBC korelasyonları

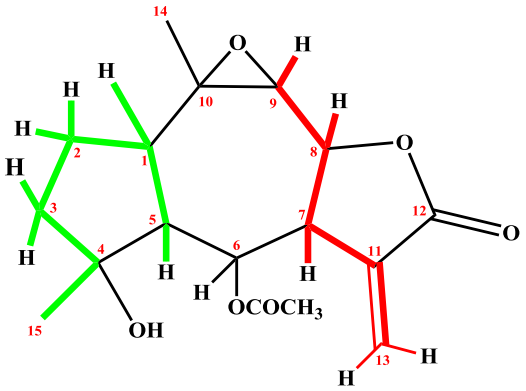
Konum	**C/H**	**$CDCl_3$**		
		δ_C ppm	**δ_H ppm, *J* (Hz)**	**HMBC (C→H)**
1	CH	42.39	1.70 m	H_2-2, H_3-14, H-5
2	CH_2	20.95	1.91 m, 1.70-1.63 m	H-1, H_2-3
3	CH_2	41.89	1.70-1.63 m	H_3-15
4	C	79.97	-	H_3-15, H_2-2, H-1, H-5,
5	CH	53.75	2.27 brdd (10.0/10.4)	H_3-15, H_2-2, H-1
6	CH	75.26	4.98 brdd (10.0/10.0)	H-8, CO***CH₃***
7	CH	46.07	3.39 m	H_2-13, H-8
8	CH	78.49	4.01 dd (6.4/10.4)	H-9, H_3-14
9	CH	63.36	3.12 d (6.4)	H_3-14, H-8
10	C	59.20	-	H_3-14, H-1, H_2-2, H-9, H-5
11	C	135.06	-	H_2-13
12	C	168.97	-	H_2-13
13	CH_2	123.70	6.27 d (3.2), 5.63 d (2.8)	-
14	CH_3	16.66	1.41 s	H-9
15	CH_3	21.75	1.23 s	H-1
COCH_3	C	170.56	-	CO***CH₃***
CO***CH₃***	CH_3	21.59	2.1 s	-

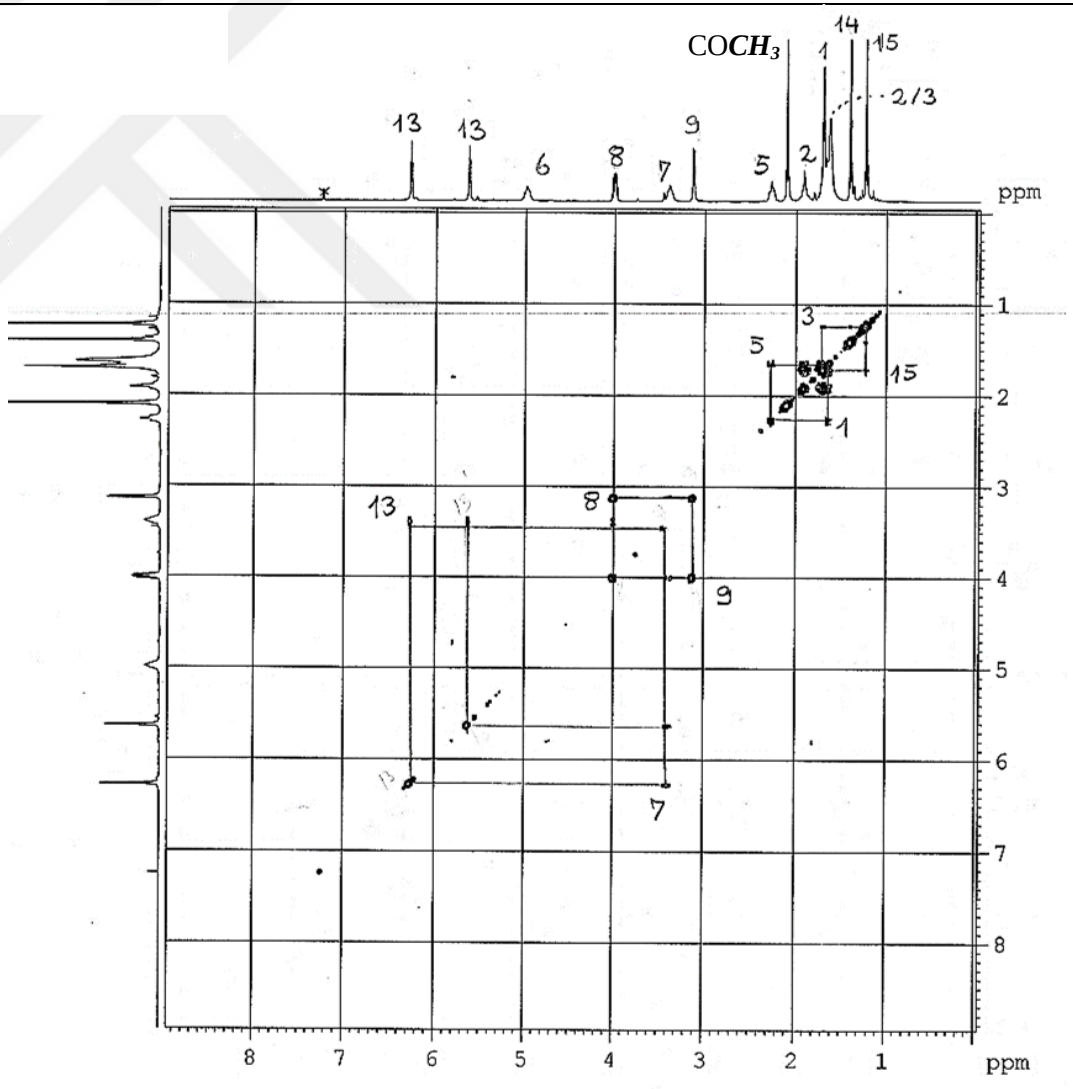
X-ışını kırınım bulguları

Kimyasal formülü $C_{17}H_{22}O_6$; molekül ağırlığı 322.35; kristal sistemi triklinik, uzay grubu P1, birim hücre parametreleri **a** = 5.663(2) Å, **b** = 17.241(4) Å, **c** = 23.853(6) Å, α= 85.90(2)°, β = 84.20(2)°, γ= 84.52(2)° ve birim hücre hacmi 2302.1(11) $Å^3$, Z = 6, hesaplanan yoğunluk 1.395 mg/m^3, F(000)= 1032, kristal boyutu 0.31 x 0.27 x 0.16 mm, Θ açı aralığı 2.58-72.32°, toplanan yansıma sayısı 76364, bağımsız yansıma sayısı 17181 (R_{int} = 0.0254), uyuşum sonucu F^2 1.054, son R değerleri [I>2δ(I)] R1 = 0.0388, wR2 = 0.1364, R1 = 0.0715, tüm veriler için wR2 = 0.1751, arıtım sonucunda elde edilen en büyük ve en küçük elektron yoğunluğu farkları, sırasıyla 0.324 ve -0.264 $e.Å^{-3}$.

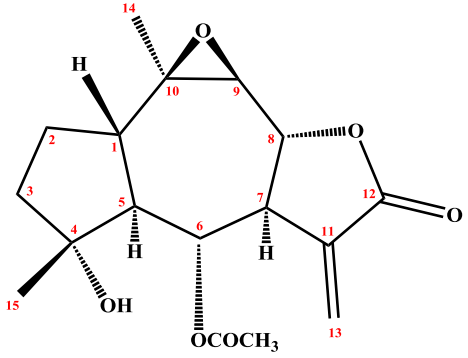


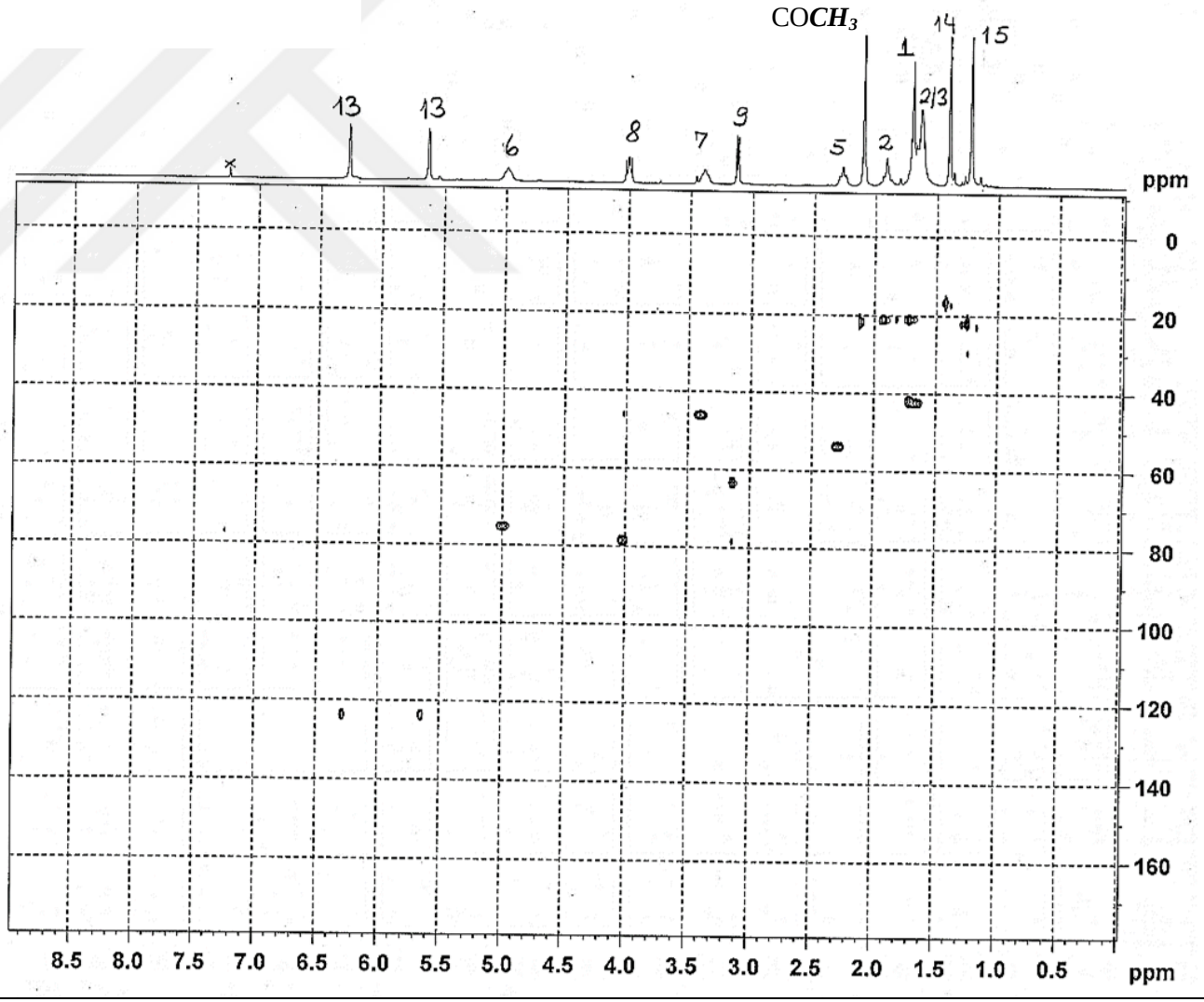
Şekil 4.5a. 6α-asetoksi-4α-hidroksi-9β.10β-epoksi-1βH-gaya-11(13)-en-12.8α-olid (**CM-2**)'nin ^{1}H NMR (A, B: $CDCl_3$, 400 MHz) ve APT spektrumları (C: $CDCl_3$, 100 MHz)



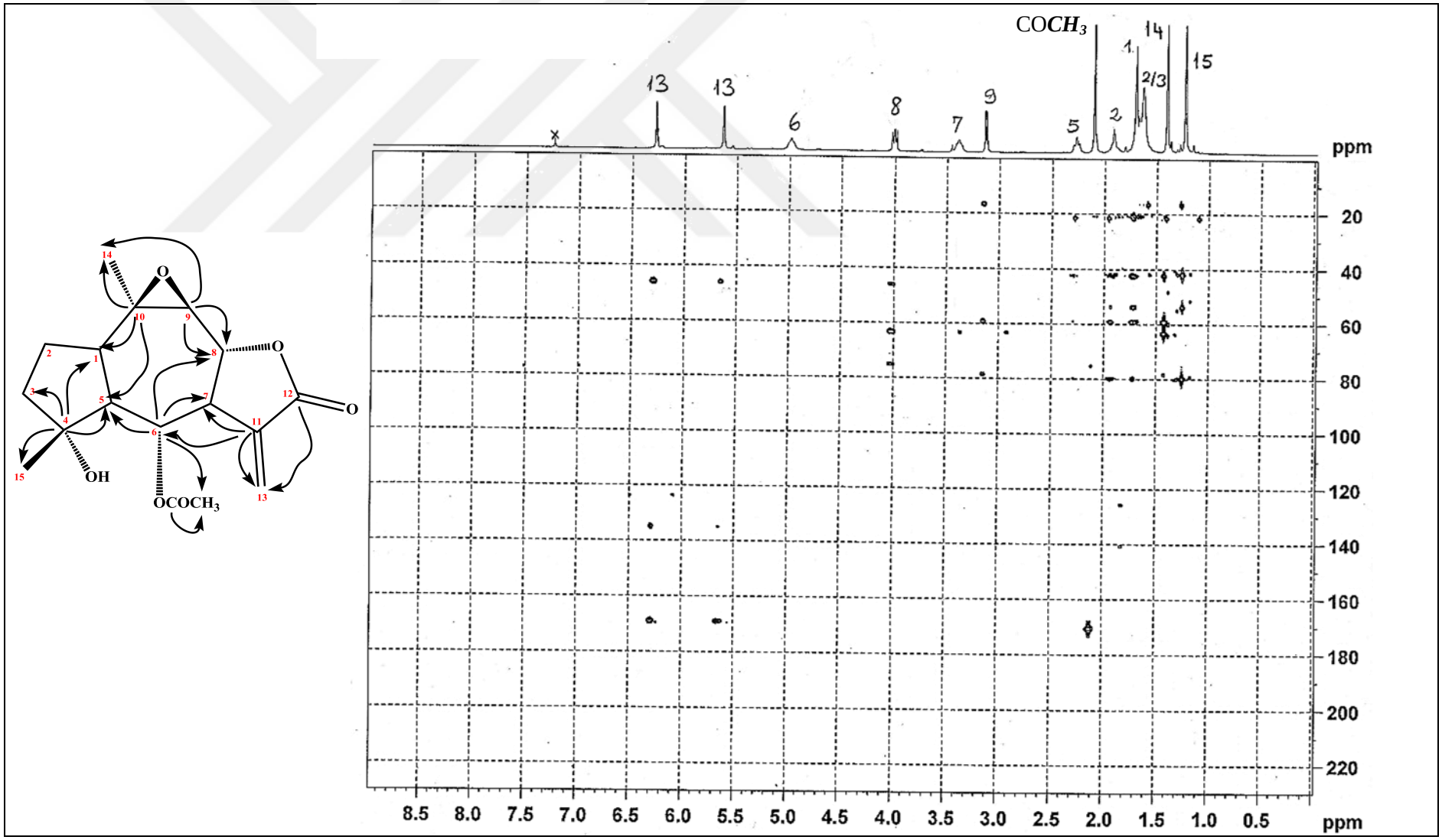


Şekil 4.5b. 6α-asetoksi-4α-hidroksi-9β.10β-epoksi-1βH-gaya-11(13)-en-12.8α-olid (**CM-2**)'nin COSY spektrumu ($CDCl_3$, 400 MHz)

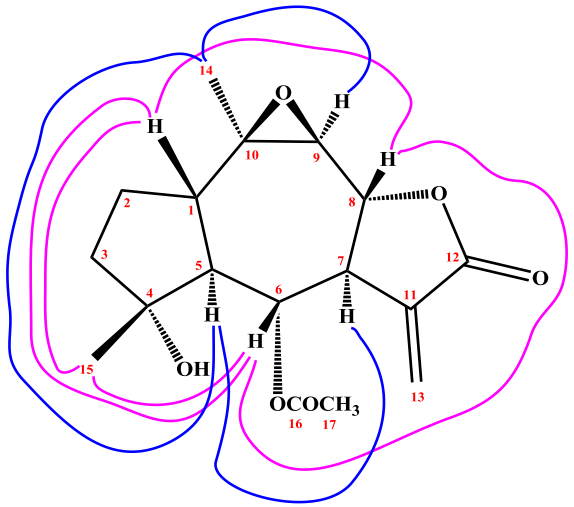


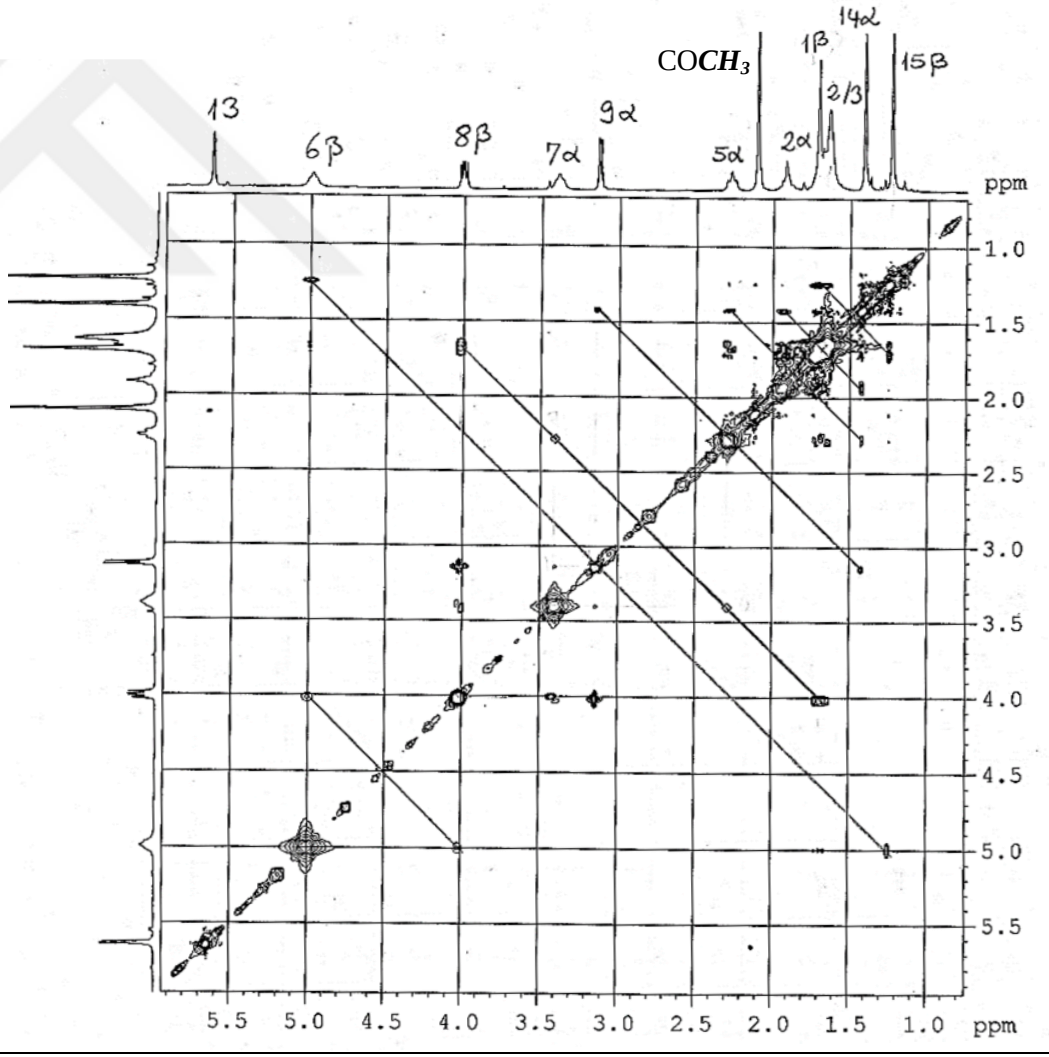


Şekil 4.5c. 6α-asetoksi-4α-hidroksi-9β.10β-epoksi-1βH-gaya-11(13)-en-12.8α-olid (**CM-2**)'nin HSQC spektrumu ($CDCl_3$)



Şekil 4.5d. 6α-asetoksi-4α-hidroksi-9β.10β-epoksi-1βH-gaya-11(13)-en-12.8α-olid (**CM-2**)'nin HMBC spektrumu ($CDCl_3$)

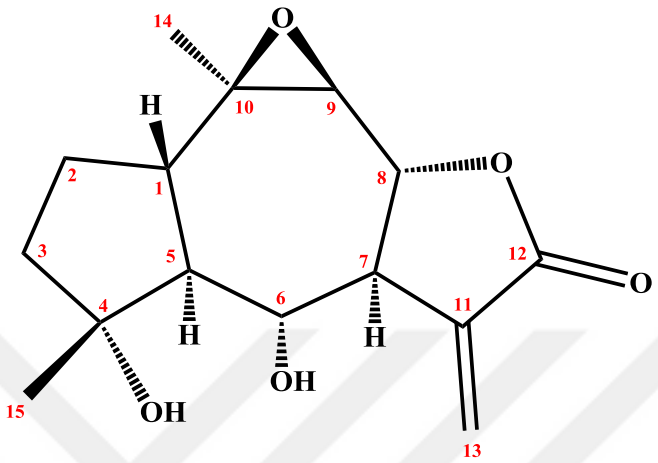




Şekil 4.5e. 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-9*β*.10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-12.8*α*-olid (**CM-2**)'nin NOESY spektrumu ($CDCl_3$, 400 MHz)

CM-5: 4α, 6α-dihidroksi-9β,10β-epoksi-1βH-gaya-11(13)-en-8α,12-olid

CM-5 bileşiği (4.8 mg) kloroform ekstresinden sarımsı-beyaz yağımsı bir madde halinde izole edilmiştir.



CM-5: $C_{15}H_{20}O_5$ (MA: 280)

$[\alpha]_D^{28.6}$: - 67.0 (*c* 0.05, CH_3OH)

UV (CH_3OH) λ_{max} nm: 222, 214

IR ($CHCl_3$) υ_{max} cm^{-1}: 3434 (OH), 1764 (α-metilen γ-lakton)

<u>$CDCl_3$ içerisinde alınan spektrumlar:</u>

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ_H: Şekil 4.6a

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) δ_C: Şekil 4.6c

DEPT 90 ($CDCl_3$, 150 MHz) δ_C: Şekil 4.6c

DEPT 135 ($CDCl_3$, 150 MHz) δ_C: Şekil 4.6c

COSY ($CDCl_3$, 600 MHz)

HSQC ($CDCl_3$)

HMBC ($CDCl_3$)

NOESY ($CDCl_3$, 600 MHz)

C_5D_5N içerisinde alınan spektrumlar:

^{1}H NMR (C_5D_5N, 500 MHz) δ_H: Şekil 4.6b

^{13}C NMR (C_5D_5N, 125 MHz)

DEPT 135 (C_5D_5N, 125 MHz)

COSY (C_5D_5N, 500 MHz) δ_H: Şekil 4.6d

HSQC (C_5D_5N): Şekil 4.6e

HMBC (C_5D_5N): Şekil 4.6f

NOESY (C_5D_5N, 500 MHz) δ_H: Şekil 4.6g

EI-MS m/z (relatif değer): 262.2 $[M\text{-}H_2O]^+$ (10.84), 244.1 $[262\text{-}H_2O]^+$ (14.45), 215.1 $[244\text{-}COH]^+$ (28.30); 55.1 (100)

HREI-MS *m/z* (molekül formülü): 262.1219 ($C_{15}H_{18}O_4$ için hesaplanan, 262.1205), 244.1135 ($C_{15}H_{16}O_3$ için hesaplanan, 244.1099)

CM-5 bileşiğinin UV spektrumunda λ 222 ve 214 nm'de absorpsiyon bantları görülmüştür. IR spektrumunda, hidroksil (3434 cm^{-1}) ve karakteristik α-metilen, γ-lakton (1764 cm^{-1}) 'dan ileri gelen absorpsiyon bantları gözlenmiştir.

Bileşiğin ^{1}H NMR spektrumunda ($CDCl_3$, Şekil 4.6a), H-6 ve H-8 protonlarının birbirine yakın kimyasal kayma değerlerinde (sırasıyla δ_H 3.89 *m* ve 3.91 *m*) gözlenmesi nedeniyle, bileşiğin C_5D_5N içerisinde de spektral analizleri (1D ve 2D NMR) alınarak bu protonların kimyasal kaymalarının ayrılması sağlanmıştır. Tüm proton ve karbon rezonanslarının yorumlanmasında her iki çözücüde alınan spektrumlardan faydalanılmıştır.

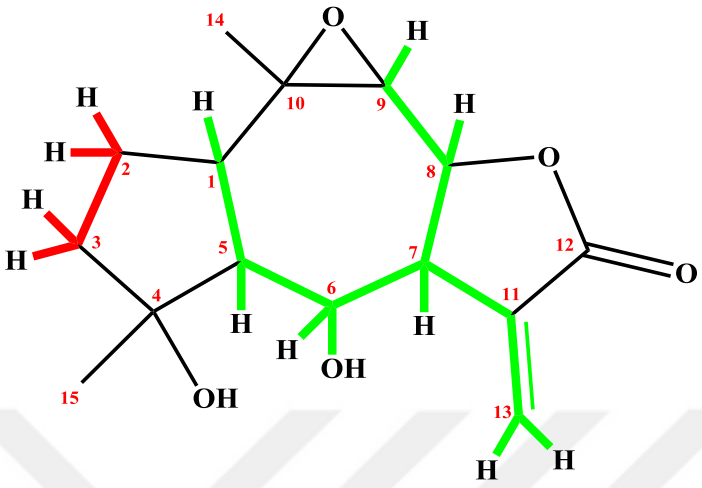
Bileşiğin C_5D_5N içerisinde alınan ^{1}H NMR spektrumunda (Çizelge 4.6, Şekil 4.6b), karakteristik olarak 1 adet ekzosiklik metilen grubuna ait sinyaller [δ_H 6.62 (*dd*, *J*=1.5, 2.5 Hz, H-13a); 6.45 (*dd*, *J*=1.5, 3.0 Hz, H-13b)], 2 adet metil grubuna ait singletler [δ_H 1.34 (*s*, H_3-14); 1.41 (*s*, H_3-15)], 3 adet oksimetin grubuna ait sinyaller [δ_H 3.24 (*d*, *J*=6.5 Hz, H-9); 4.14 (*dd* "t", *J*=9.5 Hz, H-6); 4.28 (*dd*, *J*=6.5, 10.5 Hz, H-8)] ve OH grubuna (δ_H 6.07, *brs*) ait bir sinyal gözlenmiştir. Tüm proton ve karbon rezonanslarının yorumlanmasında, ^{13}C NMR, DEPT ve 2D NMR (Şekil 4.6a-g) tekniklerinden

yararlanılmıştır. Bu sonuçlara göre, bileşiğin 2 adet metil karbonu [δ_C 16.88 (C-14); 21.98 (C-15)], 3 adet oksimetin karbonu [δ_C 74.28 (C-6); 79.16 (C-8); 63.66 (C-9)], 1 adet olefinik metilen karbonu [δ_C 123.88 (C-13)], 2 adet sp^3 oksijenli tersiyer karbon [δ_C 79.99 (C-4); 59.92 (C-10)], 1 adet sp^2 katerner karbon [δ_C 138.10 (C-11)] ve 1 adet lakton karbonili [δ_C 170.20 (C-12)] taşıdığı tespit edilmiştir.

C_5D_5N içerisinde alınan ^1H NMR spektrumunda (Şekil 4.6b), H-8 ile H-7 visinal protonları arasındaki etkileşim sabitinin büyük bir değerde olması ($J_{8,7}$=10.5 Hz), H-8'in β pozisyonda olduğunu göstermiştir. Bu bulgu ve seskiterpen laktonlarda biyosentez bakımından H-7'nin α konumda olmasına uygun olarak (Bruneton, 1999; Simonsen ve diğerleri, 2013), CM-5'in "**8,12-*trans* gayanolit**" yapıya sahip olduğu belirlenmiştir. $CDCl_3$ içerisinde alınan ^1H NMR spektrumunda, H-7 ile H_2-13 ekzosiklik metilen protonları [δ_H 6.36 $J_{7,13a}$=2.6 Hz (H-13a) ve 6.32 $J_{7,13b}$=3.5 Hz (H-13b)] arasındaki etkileşim sabitinin $J_{7,13} > 3$ olması, Samek kuralına (Samek, 1978) uygun olarak lakton halkasının "**8,12-*trans***" bağlandığını desteklemiştir. Seskiterpen laktonların 8,12 gayanolit yapılarında, α-metilen, γ-lakton halkasında bulunan ekzosiklik metilen protonları (H-13a ve H-13b) C-6-α hidroksil grubu nedeniyle ^1H NMR spektrumunda geminal etkileşim vermektedir. Bu nedenle, H_2-13 sinyallerinin kimyasal kayma değerleri yakınlaşarak "*d*" yerine "*dd*", hatta bazı durumlarda kimyasal kayma değerleri çok yaklaştığı için "*m*" olarak görünmektedir (Yoshioka ve diğerleri 1971). **CM-5**'in lakton halkasına ait ekzosiklik metilen protonlarının δ_H 6.62 ve 6.45'de *dd* gözlenmesi (C_5D_5N), literatürde de belirtildiği gibi, bileşiğin C-6-α OH grubu taşıdığını göstermiştir (Şekil 4.6b-C). ^1H NMR spektrumunda, H-6'nın H-5 ve H-7 ile etkileşim sabitinin eşit değerde ($J_{6,5}$=$J_{6,7}$=9.5 Hz) olmasından dolayı, H-6 sinyali 4.14 ppm'de *dd* "t"olarak görülmüştür (Şekil 4.6b-B). H-6'nın visinal protonları ile (H-5 ve H-7) büyük etkileşim sabitine sahip olması (J=9.5 Hz), H-6'nın β pozisyonda olduğunu desteklemiştir. δ_H 3.24'de dublet görülen oksimetin sinyalinin (H-9), visinal H-8 protonu ile tek bir etkileşim sabiti göstermesi ($J_{9,8}$=6.5 Hz), C-10'un proton taşımadığına işaret etmiştir. Bu bulgular **CM-5**'in **CM-2**'ye benzer şekilde, C-9,10 epoksit halkası taşıdığını düşündürmüştür.

COSY yardımıyla (C_5D_5N, Şekil 4.6d), iki farklı spin sistemi içerisinde H_2-2/H_2-3 ve H-1/H-5, H-5/H-6, H-6/H-7, H7/H-8, H-8/H-9 visinal protonları arasında korelasyonlar gözlenmiştir. δ_H 6.07'de görülen OH sinyali ve H-6 arasında geminal etkileşim tespit

edilmiştir. Ayrıca, ekzosiklik metilen protonlarının (H_2-13) H-7 ile uzak mesafe allilik etkileşim gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.6h).

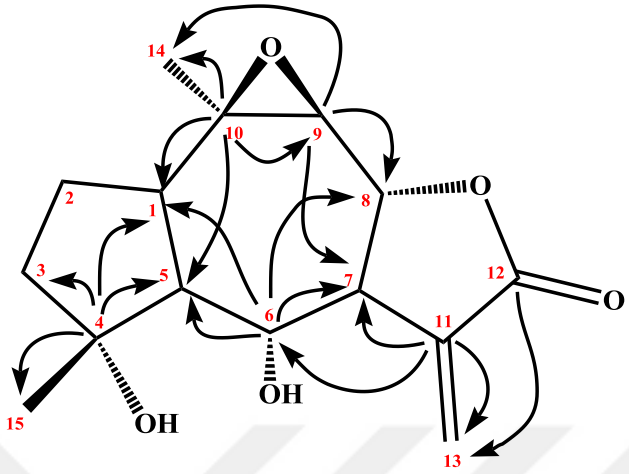


Şekil 4.6h. 4α, 6α-dihidroksi-9β,10β-epoksi-1βH-gaya-11(13)-en-8α,12-olid (**CM-5**)'de COSY korelasyonları (C_5D_5N)

HSQC spektrumundan (C_5D_5N, Şekil 4.6e), C-1, C-5 ve C-7 metin karbonlarının sırasıyla δ_C 41.53, 56.57 ve 49.34'te olduğu saptanmıştır. Bileşiğin C-2 ve C-3 metilen; C-13 ekzosiklik metilen karbon rezonansları ise, sırasıyla δ_C 21.72, 41.21 ve 123.88'de görülmüştür. Ayrıca C-14 ve C-15 metil gruplarına ait karbon rezonansları sırasıyla δ_C 16.88, 21.98'de; C-6, C-8 ve C-9 oksimetin grupları sırasıyla δ_C 74.28, 79.16 ve 63.66'de saptanmıştır.

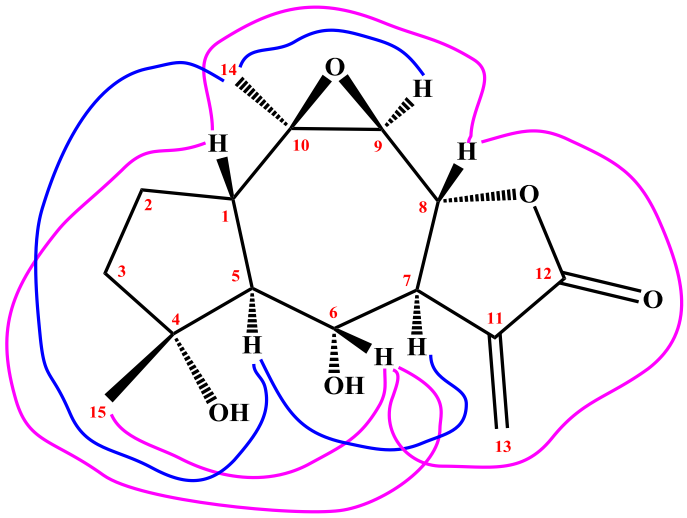
HMBC spektrumunda (C_5D_5N, Şekil 4.6f), δ_C 138.10'daki karbon ile H-7, H_2-13 ve H-6 protonları arasındaki ilişki, gayanolit yapısındaki karakteristik ekzosiklik metilen grubunun C-11'e bağlı olduğunu göstermiştir. δ_C 63.66'de gözlenen karbon rezonansı ile H_3-14, H-8 ve H-7 protonları arasındaki korelasyonlar, δ_H 3.24'de görülen oksimetin sinyalinin C-9'da; δ_C 59.92'deki karbon rezonansı ile H_3-14, H-1, H-5 ve H-9 arasında görülen etkileşimler bu sinyalin C-10'daki katerner karbona ait olduğuna işaret etmiştir. Ayrıca, C-10'daki karbonun (δ_C 59.92), C-4'de (δ_C 79.99) yer alan diğer katerner karbon sinyaline oranla yüksek alanda görülmesi, C-9,10 epoksit halkasının varlığını göstermiştir. δ_C 74.28 sinyali ile H-5, H-7, H-8 ve H-1 protonları arasında gözlenen uzak mesafe etkileşimleri, δ_H 4.14'de gözlenen oksimetin sinyalinin C-6'da olduğunu doğrulamıştır. δ_C 170.20'de görülen karbon sinyali ile H_2-13 arasındaki uzak mesafe etkileşimi, bu sinyalin lakton karbonili (C-12)

olduğunu göstermiştir. δ_C 79.99'de görülen karbon sinyalinin H_3-15, H-5, H_2-3 ve H-1 ile etkileşimleri, katerner karbonun C-4 konumunda olduğunu göstermiştir (Şekil 4.6i).



Şekil 4.6i. 4*α*, 6*α*-dihidroksi-9*β*,10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-8*α*,12-olid (**CM-5**)'de önemli uzak mesafe HMBC korelasyonları (C_5D_5N)
(*Oklar karbondan protona doğrudur*)

NOESY spektrumunda (C_5D_5N, Şekil 4.6g), H-8 (δ_H 4.28)/H-1 (δ_H 1.82-1.89), H-1/H6 (δ_H 4.14), H-8/H-6 ve H-6/H_3-15 (δ_H 1.41) arasında gözlenen korelasyonlar H-1, H-6 ve H_3-15'in *β* pozisyonda olduğunu göstermiştir. Ayrıca, H-7 (δ_H 3.17)/H-5 (δ_H 2.15), H-5/H_3-14 (δ_H 1.34) ve H_3-14/H-9 (δ_H 3.24) arasında gözlenen korelasyonlar H-5, H-9 ve H_3-14'ün *α* pozisyonda olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, C-9,10 epoksit halkasının *β* konfigürasyonda olduğuna işaret etmiştir (Şekil 4.6j).



Şekil 4.6j. 4*α*, 6*α*-dihidroksi-9*β*,10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-8*α*,12-olid (**CM-5**)'de NOESY korelasyonları (C_5D_5N)

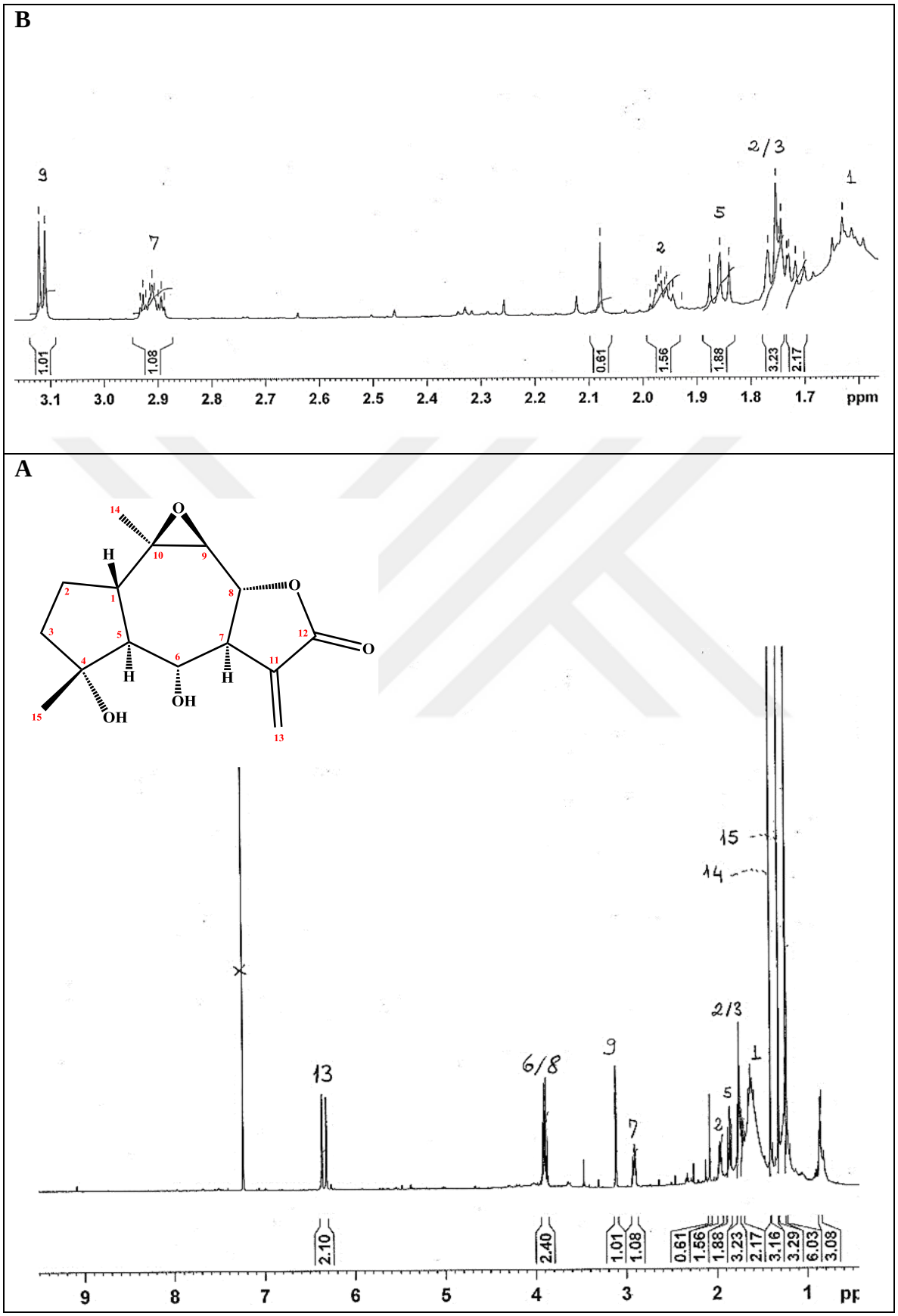
Bileşiğin EI-MS spektrumunda , $[M-H_2O]^+$, $[262-H_2O]^+$ ve $[244-COH]^+$ pikleri, sırasıyla m/z 262.1, 244.1 ve 215.1'de gözlenmiştir. HREI-MS analizinde ise, 262.1219 ve 244.1135 molekül ağırlığına sahip iyonlara ait kapalı formülleri sırasıyla $C_{15}H_{18}O_4$ ve $C_{15}H_{16}O_3$ olarak tespit edilmiştir. Bu bulgular, ^1H, ^{13}C ve 2D NMR spektroskopik bulguları (Çizelge 4.6, Şekil 4.6a-g) ile birlikte değerlendirildiğinde, **CM-5** bileşiğinin CM-2'den farklı olarak, C-6 konumunda asetoksi yerine hidroksil grubu taşıyan, moleküler formülü $C_{15}H_{20}O_5$ olan, "**C-9,10-epoksi-8,12-*trans*-gayanolit**" yapısında bir bileşik olduğu belirlenmiştir. Literatür araştırması ve önerilen formül üzerinden yaptığımız bilgisayar taramasında, bileşiğin ^1H ve ^{13}C NMR verilerinin, literatürde "6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-9*β*.10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-12.8*α*-olid" ve "4*α*-hidroksi-9*β*.10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-12.8*α*-olid" için verilen değerlerle benzer olduğu belirlenmiştir (Rustaiyan ve diğerleri, 1989).

Bu sonuçlara dayanarak, **CM-5** bileşiğinin yapısı "**4*α*,6*α*-dihidroksi-9*β*,10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-8*α*,12-olid**" olarak aydınlatılmıştır. Bileşik tarafımızdan literatürde yer alan isonuviskolid yapısı temel alınarak "**6*α*-hidroksi-9*β*,10*β*-epoksi-izoinuviskolid**" olarak da isimlendirilmiştir. Literatür araştırmalarımıza göre, bu bileşik doğadan ilk olarak elde edilen yeni bir bileşiktir.

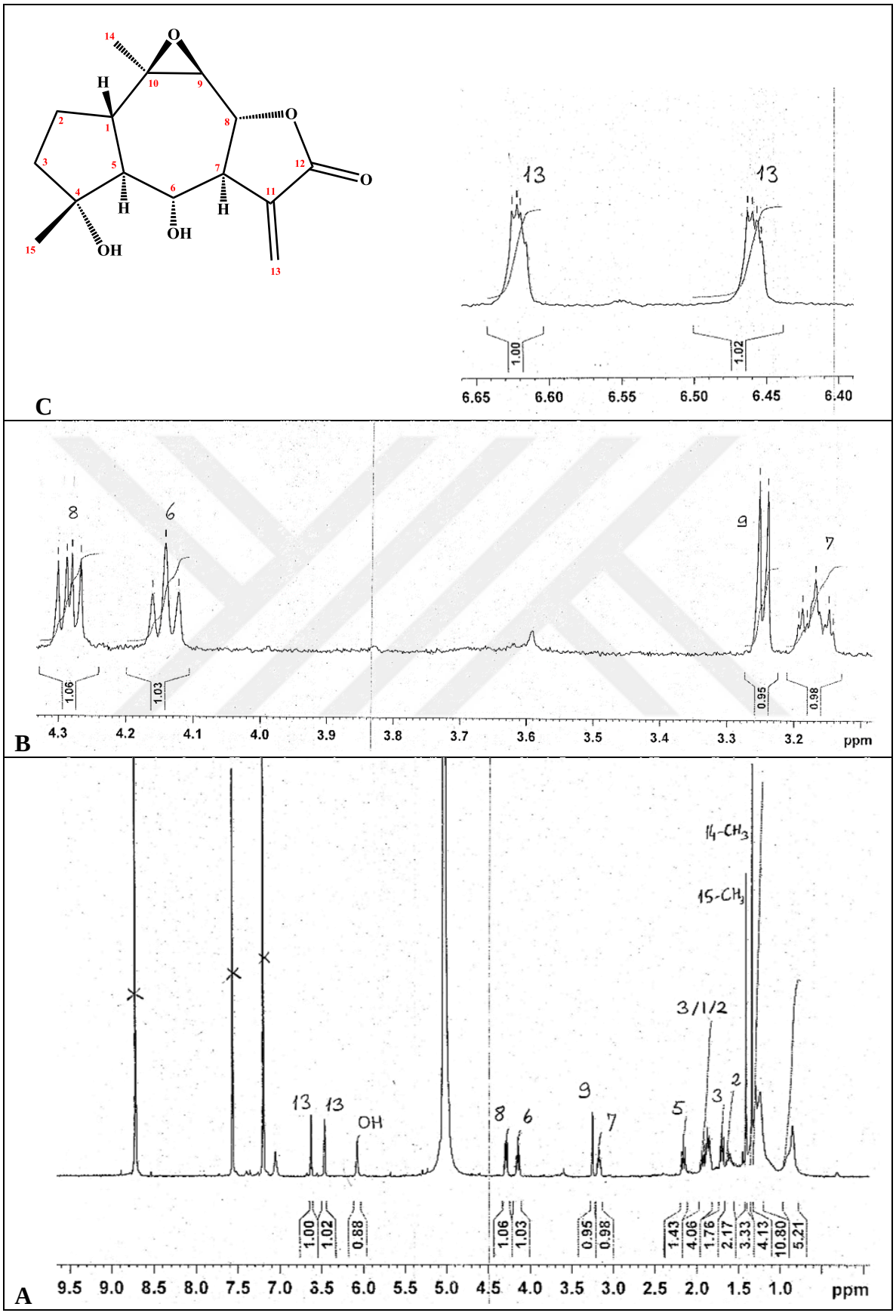
Çizelge 4.6. 4*α*, 6*α*-dihidroksi-9*β*,10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-8*α*,12-olid (**CM-5**) bileşiğinin ^{1}H ve ^{13}C NMR spektroskopik değerleri ($CDCl_3$: δ_H 600 MHz, δ_C 150 MHz; C_5D_5N: δ_H 500 MHz, δ_C 125 MHz) ve HMBC korelasyonları

		$CDCl_3$			**C_5D_5N**		
Konum	**C/H**	**δ_C ppm**	**δ_H ppm, *J* (Hz)**	**HMBC (C→H)**	**δ_C ppm**	**δ_H ppm, *J* (Hz)**	**HMBC (C→H)**
1	CH	41.23	1.63 m	H_3-14, H_2-3, H-5, H_2-2,	41.53	1.82-1.89***** m	H_2-3, H-5, H_3-14
2	CH_2	21.27	1.96 m, 1.71-1.77***** m	H-1	21.72	1.82-1.89***** m, 1.58-1.64 m	H_2-3
3	CH_2	41.09	1.71-1.77***** m	H_3-15	41.21	1.89-1.96 m, 1.66-1.72 m	H_3-15, H_2-2, H-1
4	C	81.02	-	H_3-15, H-5, H_2-2, H_2-3, H-6	79.99	-	H_3-15, H-5, H_2-3, H-1
5	CH	55.66	1.85 dd (10.0/11.4)	H_3-15, H_2-2	56.57	2.15 brdd (10.5/11.0)	H_2-3, H_3-15, H-1
6	CH	73.85	3.89***** m	H-5, H-8, H-7	74.28	4.14 dd "t" (9.5)	H-5, H-7, H-8, H-1
7	CH	48.92	2.91 m	H_2-13, H-8	49.34	3.17 m	H_2-13, H-8, H-6
8	CH	78.21	3.91***** m	H-9, H-7	79.16	4.28 dd (6.5/10.5)	H-7, H-6
9	CH	63.38	3.11 d (6.4)	H_3-14, H-8, H-7	63.66	3.24 d (6.5)	H_3-14, H-8, H-7
10	C	59.36	-	H_3-14, H-5, H_2-2, H-9	59.92	-	H_3-14,, H-1, H-5, H-9
11	C	135.89	-	H-6, H_2-13, H-7	138.10	-	H-7, H_2-13, H-6
12	C	169.78	-	H_2-13	170.20	-	H_2-13
13	CH_2	125.30	6.36 dd (2.6), 6.32 dd (3.5)		123.88	6.62 dd (1.5/2.5), 6.45 dd (1.5/3.0)	H-7
14	CH_3	16.82	1.40 s	H-9	16.88	1.34 s	H-9
15	CH_3	21.65	1.31 s	H-5, H_2-3	21.98	1.41 s	H-5
6-OH	-	-	-	-	-	6.07 brs	-

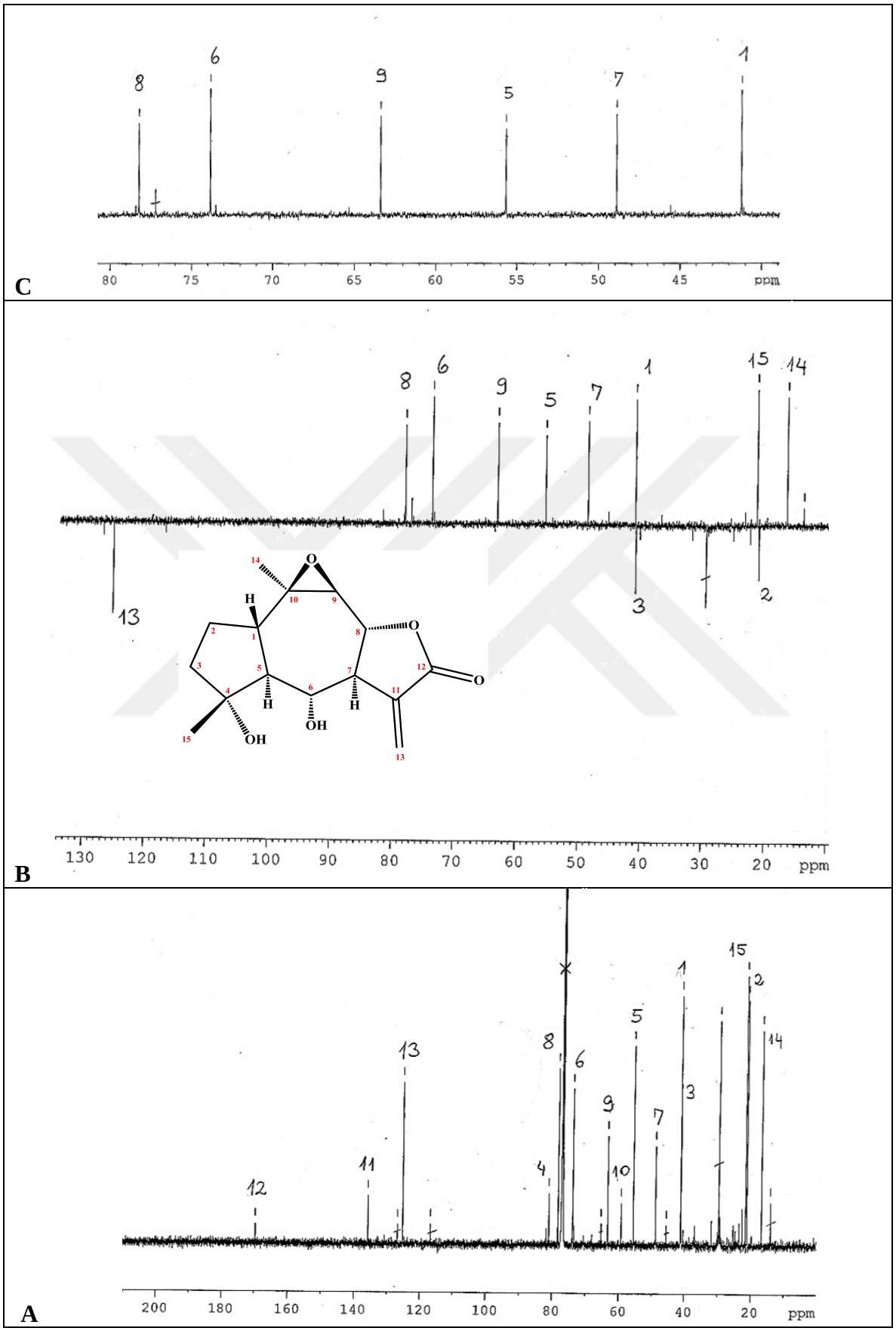
***** Üst üste çakışan protonlar



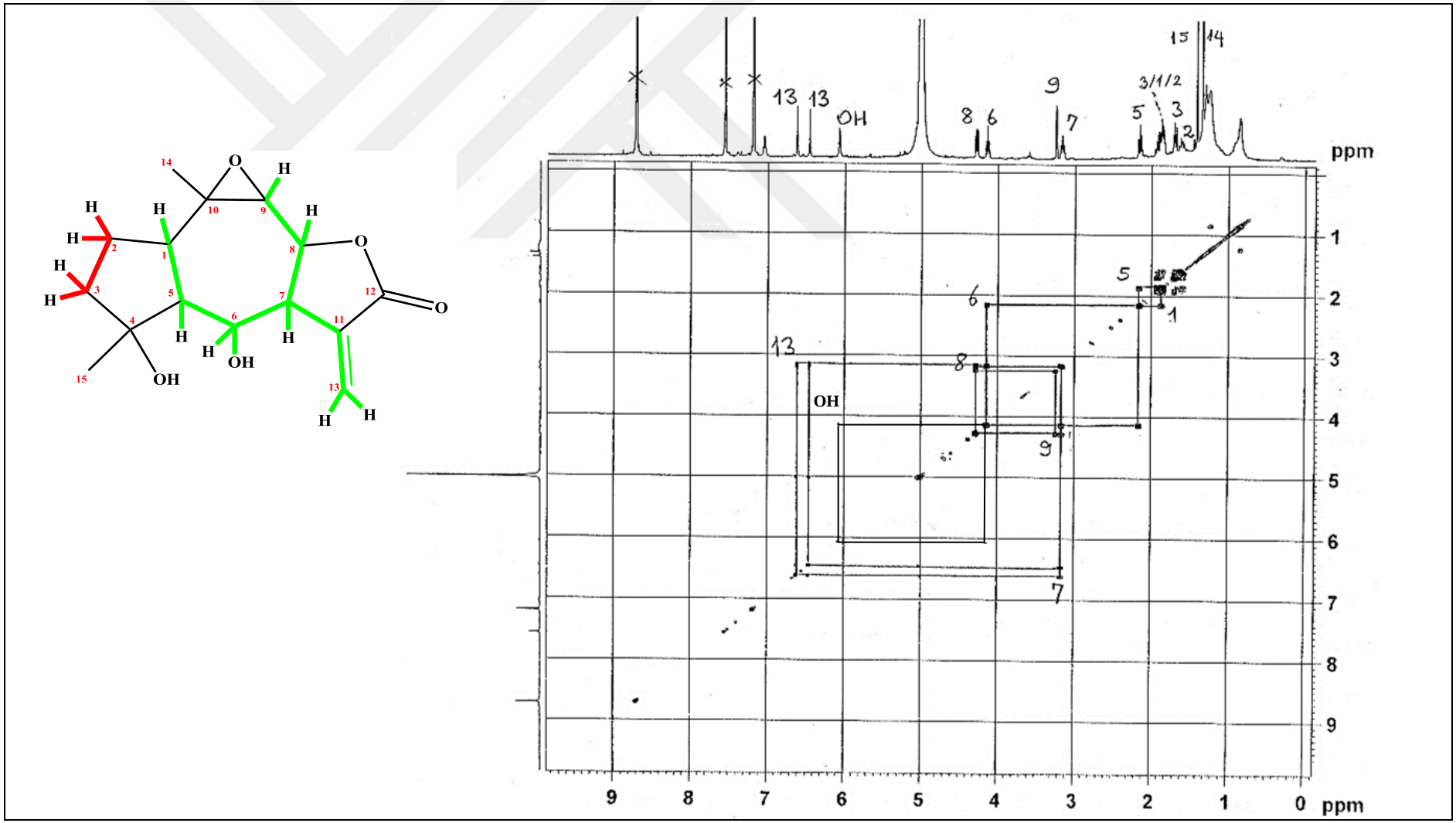
Şekil 4.6a. 4*α*, 6*α*-dihidroksi-9*β*,10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-8*α*,12-olid (**CM-5**)'in ^{1}H NMR spektrumu (A, B: $CDCl_3$, 600 MHz)



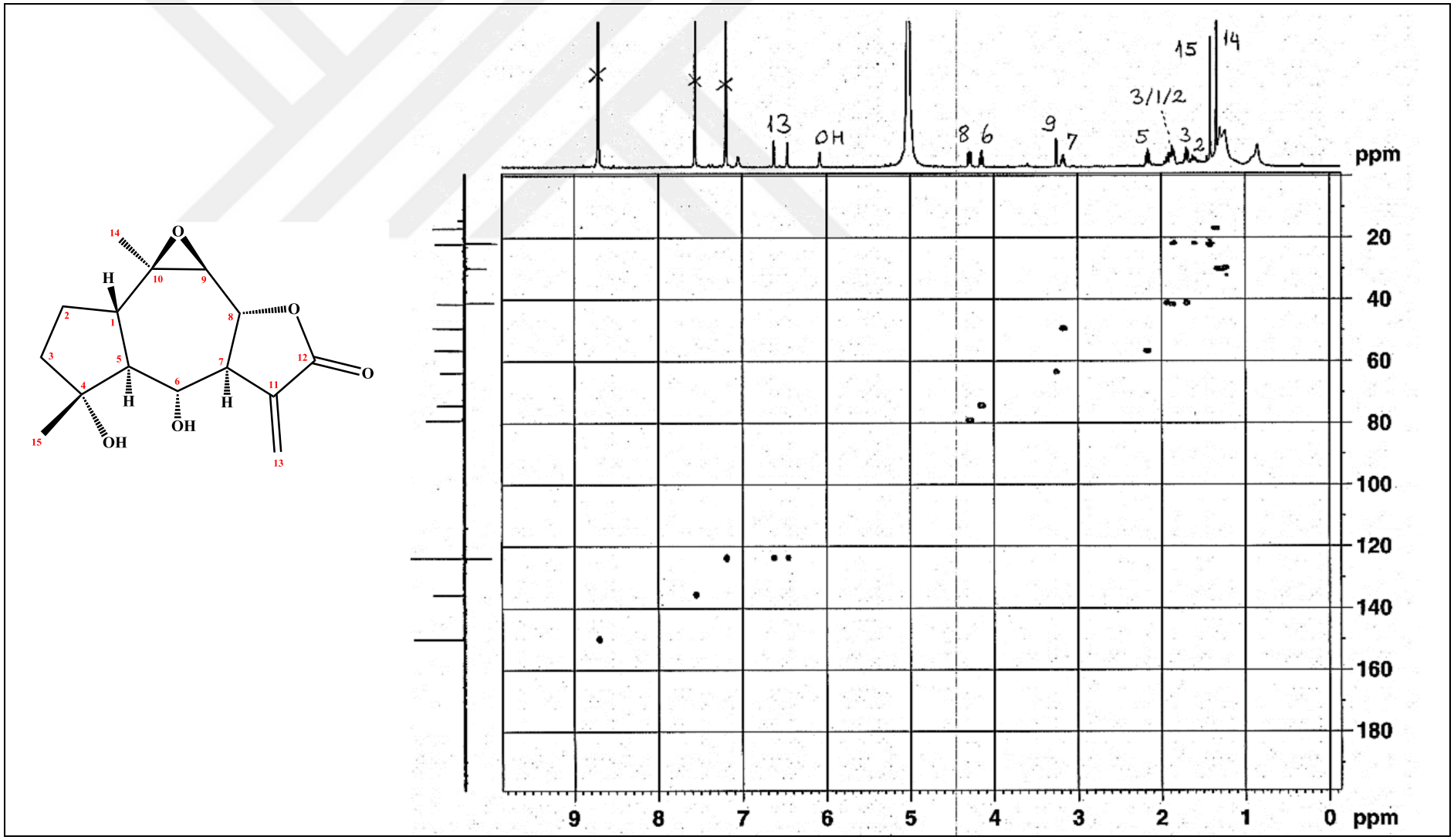
Şekil 4.6b. 4*α*, 6*α*-dihidroksi-9*β*,10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-8*α*,12-olid (**CM-5**)'in ^{1}H NMR spektrumu (A, B, C: C_5D_5N, 500 MHz)



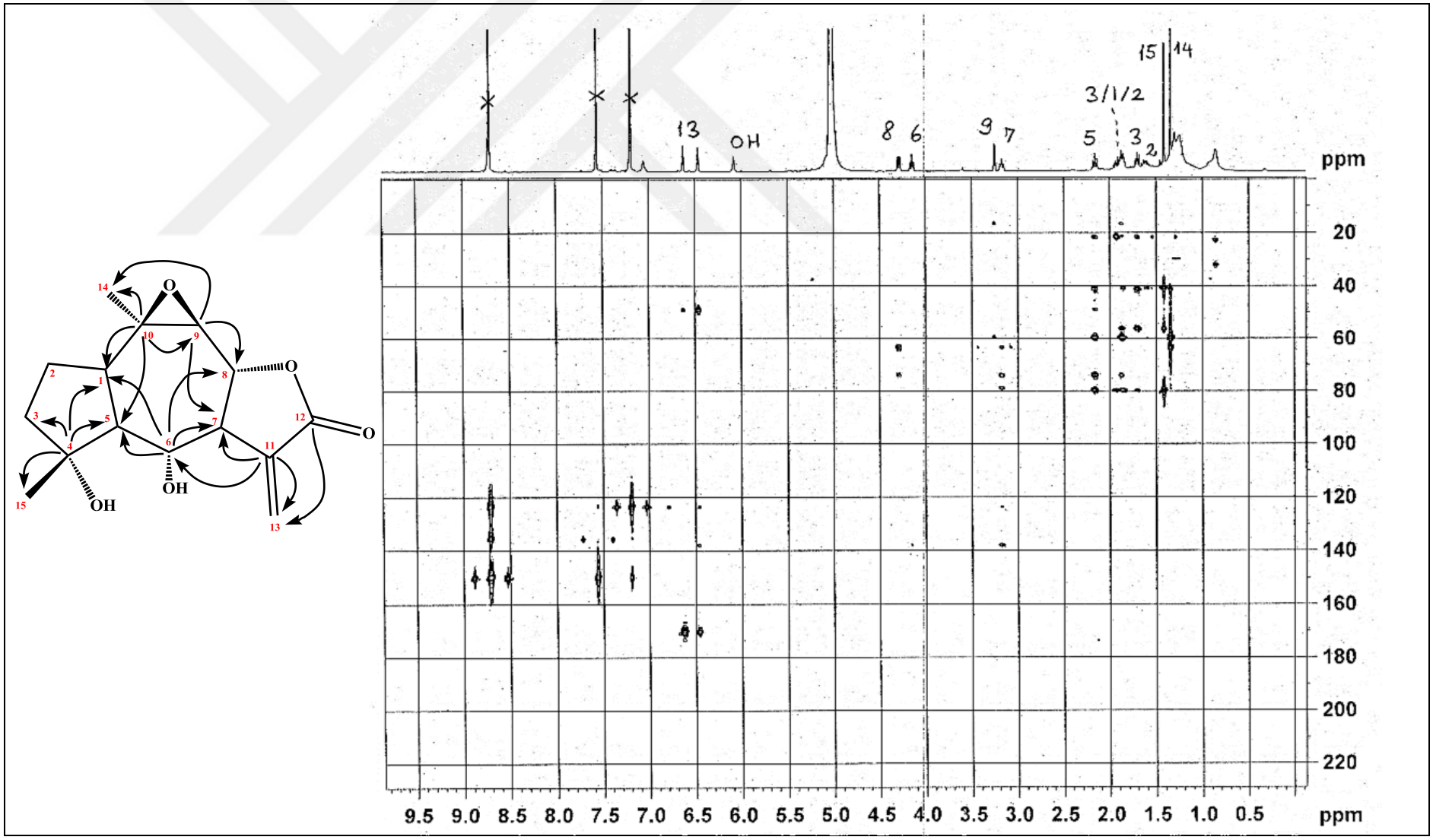
Şekil 4.6c. 4*α*, 6*α*-dihidroksi-9*β*,10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-8*α*,12-olid (**CM-5**)'in ^{13}C NMR (A), DEPT 135 (B) ve DEPT 90 (C) spektrumları ($CDCl_3$, 150 MHz)



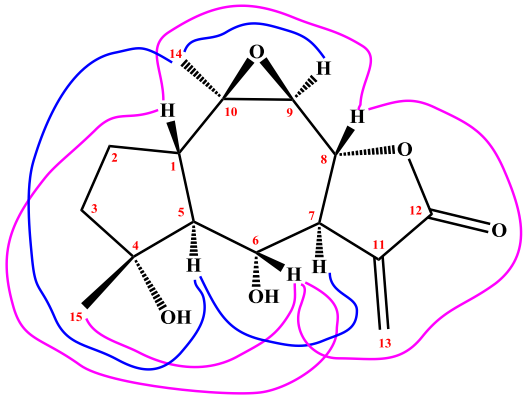
Şekil 4.6d. 4α, 6α-dihidroksi-9β,10β-epoksi-1βH-gaya-11(13)-en-8α,12-olid (**CM-5**)'in COSY spektrumu (C_5D_5N, 500 MHz)

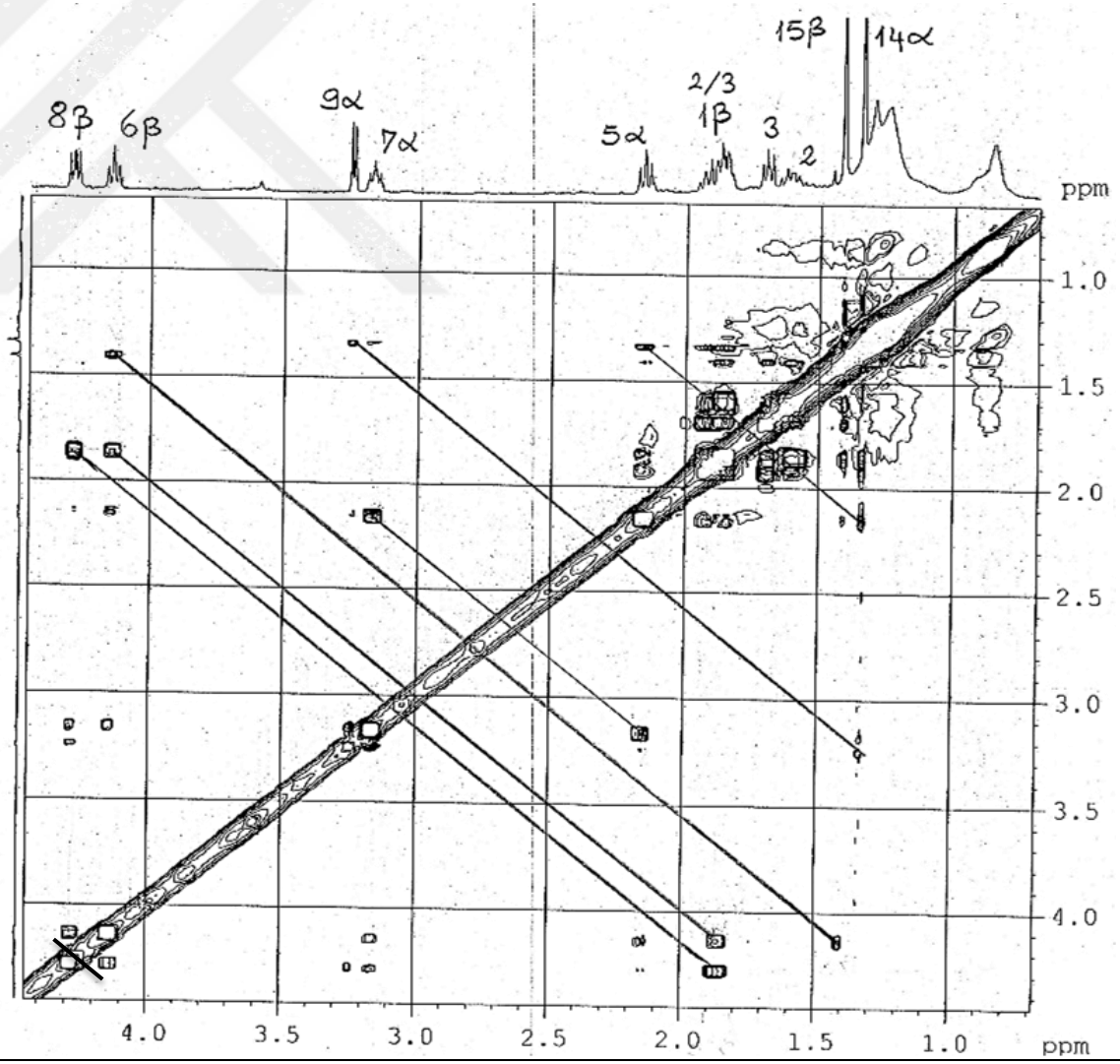


Şekil 4.6e. 4α, 6α-dihidroksi-9β,10β-epoksi-1βH-gaya-11(13)-en-8α,12-olid (**CM-5**)'in HSQC spektrumu (C_5D_5N)



Şekil 4.6f. 4α, 6α-dihidroksi-9β,10β-epoksi-1βH-gaya-11(13)-en-8α,12-olid (**CM-5**)'in HMBC spektrumu (C_5D_5N)



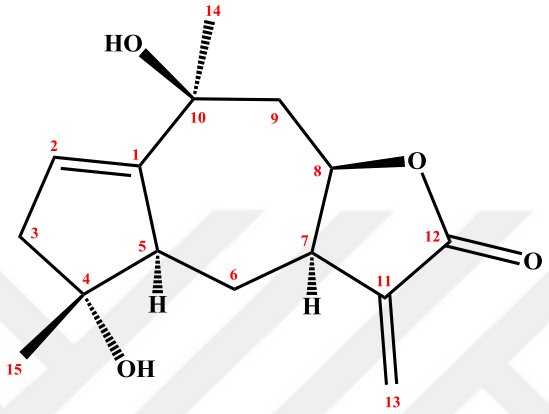


Şekil 4.6g. 4*α*, 6*α*-dihidroksi-9*β*,10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-8*α*,12-olid (**CM-5**)'in NOESY spektrumu (C_5D_5N, 500 MHz)

C1(2)-en, 8,12-*cis*-gayanolidler

CM-7: (4*α*,5*α*,8*β*,10*β*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid

CM-7 bileşiği (31.2 mg) kloroform ekstresinden beyaz amorf küçük kristaller halinde izole edilmiştir. Bileşik MeOH: *n*-hexane (1:0.5) karışımında kristallendirilerek X-ray kristalografisi için uygun kristaller elde edilmiştir.



CM-7: $C_{15}H_{20}O_4$ (MA: 264)

$[\alpha]_D^{28}$: + 20.3 (*c* 0.08, $CHCl_3$)

UV (CH_3OH) λ_{max} nm: 228, 222, 214

IR (KBr) υ_{max} cm^{-1}: 3343 (OH), 1756 (*α*-metilen *γ*-lakton), 1653 (doymamışlık)

^{1}H NMR (CD_3OD, 400 MHz) δ_H: Şekil 4.7a

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ_H: Şekil 4.7a

^{13}C NMR (CD_3OD, 125 MHz) δ_C: Şekil 4.7b

DEPT 90 (CD_3OD, 125 MHz) δ_C: Şekil 4.7b

DEPT 135 (CD_3OD, 125 MHz) δ_C: Şekil 4.7b

COSY (CD_3OD, 500 MHz) δ_H: Şekil 4.7c

HSQC (CD_3OD): Şekil 4.7d

HMBC (CD_3OD): Şekil 4.7e

NOESY (CD_3OD, 500 MHz) δ_H: Şekil 4.7f

EI-MS m/z (relatif değer): 246.1 $[M\text{-}H_2O]^+$ (32.3), 231.0 $[246\text{-}CH_3]^+$ (37.7), 213.1 $[231\text{-}H_2O]^+$ (7.6), 119.0 (100)

HREI-MS m/z (molekül formül): 246.1252 ($C_{15}H_{18}O_3$ için hesaplanan, 246.1256), 231.1027 ($C_{14}H_{15}O_3$ için hesaplanan, 231.1021)

CM-7 bileşiğinin UV spektrumunda, λ 228, 222 ve 214 nm'de absorpsiyon bantları görülmüştür. IR spektrumunda, hidroksil grubu (3343 cm^{-1}), karakteristik *α*-metilen, *γ*-lakton (1756 cm^{-1}) ve doymamışlık (1653 cm^{-1}) bantları gözlenmiştir.

CD_3OD içerisinde alınan ^1H NMR spektrumunda (Şekil 4.7a), H-7 ve H-8 protonlarının çözücü sinyalleri ile üst üste çakışması nedeniyle, bileşiğin $CDCl_3$ içerisinde de ^1H NMR spektrumu alınarak üst üste çakışmış olan protonların kimyasal kaymalarının ayrılması sağlanmıştır. Tüm proton rezonanslarının yorumlanmasında her iki çözücüde alınan spektrumlardan faydalanılmıştır.

Bileşiğin CD_3OD içerisinde alınan ^1H NMR spektrumunda (Çizelge 4.7-A, Şekil 4.7a), karakteristik olarak 1 adet ekzosiklik metilen grubuna ait sinyaller [δ_H 6.20 (*d*, *J*=2.4 Hz, H-13a); 5.74 (*d*, *J*=2.4 Hz, H-13b)], 2 adet metil grubuna ait singletler [δ_H 1.33 (*s*, H_3-14); 1.25 (*s*, H_3-15)], 1 adet oksimetin grubuna ait sinyal [δ_H 4.87 (*m*, H-8)], 1 adet olefinik protona ait sinyal [δ_H 5.65 (*m*, H-2)] gözlenmiştir. $CDCl_3$ içerisinde alınan ^1H NMR spektrumunda (Şekil 4.7a-B) diğer piklere ilaveten, oksimetin grubuna ait proton sinyali δ_H 4.75 (*ddd*, *J*=4.4, 8.0, 12.0 Hz, H-8)'te görülmüştür.

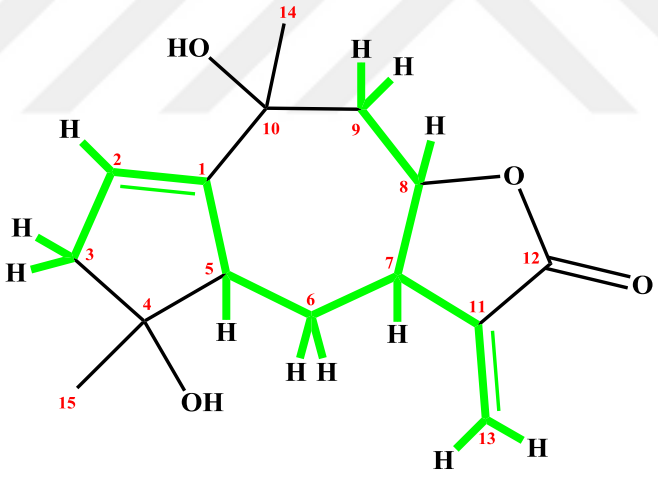
Tüm proton ve karbon rezonanslarının yorumlanmasında ^{13}C NMR, DEPT ve 2D NMR (Şekil 4.7a-f) tekniklerinden yararlanılmıştır. Bu sonuçlara göre bileşiğin, 2 adet metil karbonu [δ_C 27.24 (C-14); 24.67 (C-15)], 1 adet oksimetin karbonu [δ_C 79.17 (C-8)], 1 adet olefinik metilen karbonu [δ_C 123.27 (C-13)], 1 adet olefinik metin karbonu [δ_C 121.34 (C-2)] belirlenmiştir. Ayrıca karakteristik olarak 2 adet sp^3 oksijenli tersiyer karbon [δ_C 82.57 (C-4); 71.66 (C-10)], 1 adet sp^2 katerner karbon [δ_C 142.29 (C-11)], 1 adet olefinik katerner karbon [δ_C 153.19 (C-1)] ve 1 adet lakton karbonili [δ_C 171.82 (C-12)] taşıdığı tespit edilmiştir.

Bileşiğin CD_3OD içerisinde alınan ^1H NMR spektrumunda (Şekil 4.7a), δ_H 2.38 ve 2.30'da H_2-3 metilen protonlarına ait sinyaller (*brd*, $J_{3a,2}=J_{3b,2}$=16.4 Hz) görülmüştür. H-2'nin δ_H 5.65 *m* ve H_2-3'ün *brd* olarak tespit edilmesi, bunun yanısıra C-1 ve C-2 karbon rezonanslarının düşük alanda sırasıyla δ_C 153.19 ve 121.34'de görülmesi, çifte bağın C-1 ve C-2 konumları arasında olduğuna işaret etmiştir. δ_H 4.87'de görülen H-8'in diğer visinal protonlar ile etkileşimi ($J_{8,9\alpha}$=4.4, $J_{8,9\beta}$= 12.0 Hz) C-9'da geminal protonların varlığını göstermiştir. H_2-9 proton sinyallerinin geminal ve visinal etkileşimleri [δ_H 2.12 (*dd*,

$J_{9\alpha,8}$=4.4, $J_{9\alpha,9\beta}$=12.8), 1.97 (*brdd*, $J_{9\beta,8}$=12.4, $J_{9\beta,9\alpha}$=12.8)], C-10'un katerner olduğuna işaret etmiştir. Düşük alana kaymış olarak δ_H 1.33 (*s*, H_3-14) ve 1.25 (*s*, H_3-15)'de gözlenen metil grupları C-4 ve C-10'da OH sübstitüsyonu bulunduğunu düşündürmüştür.

Seskiterpen laktonlarda H-7'nin biyosentez bakımından α konumda (Bruneton, 1999; Simonsen ve diğerleri, 2013) ve ^{1}H NMR spektrumunda ($CDCl_3$, Şekil 4.7a) H-8 ile H-7 visinal protonları arasındaki etkileşim sabitinin $J_{8,7}$=8 Hz olması, H-8'in β pozisyonda olabileceğini düşündürmüştür. Ancak, H_2-13 protonlarının [δ_H 6.20 (*d*, $J_{7,13a}$=2.4 Hz); 5.74 (*d*, $J_{7,13b}$=2.4 Hz)] H-7 ile gösterdiği etkileşim sabitinin $J_{7,13} < 3$ olması, Samek kuralına (Samek, 1978) uygun olarak lakton halkasının "**8,12-*cis***" bağlandığına işaret etmiştir.

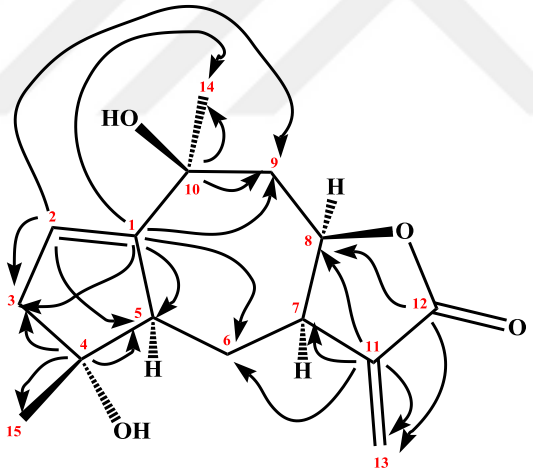
Moleküldeki visinal protonlar COSY yardımıyla tayin edilmiştir. COSY spektrumunda (Şekil 4.7c) tek spin sistemi içinde H-2/H_2-3, H-5/H_2-6, H_2-6/H-7, H-7/H-8 ve H-8/H_2-9 visinal protonları arasında korelasyonlar, H_2-13/H-7 ve H-2/H-5 arasında uzak mesafe allilik etkileşimler saptanmıştır (Şekil 4.7g).



Şekil 4.7g. (4α,5α,8β,10β)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (**CM-7**)'de COSY korelasyonları

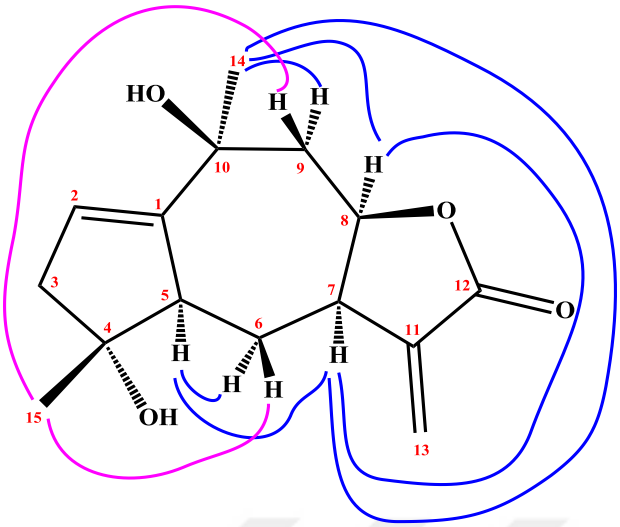
HSQC spektrumundan (Şekil 4.7d), üzerinde proton bulunan her karbonun rezonansı belirlenmiştir. C-2 olefinik metin ile C-5 ve C-7 metin karbonlarının sırasıyla 121.34, 56.73 ve 43.09 ppm'de olduğu saptanmıştır. Bileşiğin C-3, C-6, C-9 ve C-13'e ait metilen karbon rezonansları ise, sırasıyla 47.15, 32.96, 44.53 ve 123.27 ppm'de görülmüştür. Ayrıca metil gruplarına (C-14 ve C-15) ait karbon rezonansları sırasıyla 27.24 ve 24.67 ppm'de; oksimetin grubu (C-8) 79.17 ppm'de saptanmıştır.

HMBC spektrumunda (Şekil 4.7e), trisübstitüe etilenik bağın C-1 ile C-2 arasında olduğu δ_C 153.19'daki (C-1) olefinik sinyal ile etkileşim şiddeti giderek azalan H_3-14, H_2-6, H_2-3, H_2-9 ve H-5 protonları arasındaki HMBC korelasyonları ile doğrulanmıştır. İlave olarak, H_2-3, H-5 ve H_2-9 ile δ_C 121.34 arasındaki korelasyonlar, δ_H 5.65'te gözlenen integrali 1 proton değerindeki olefinik metin karbonunun C-2 konumunda olduğunu desteklemiştir. δ_C 142.29'de görülen karakteristik karbon sinyali ile H_2-13 arasındaki uzak mesafe ilişkisi, δ_H 6.20 (H-13a); 5.74 (H-13b)'de gözlenen karakteristik ekzosiklik metilen protonlarının C-11'e bağlı olduğunu göstermiştir. δ_C 82.57 ppm'de gözlenen karbon rezonansı ile H_3-15, H_2-3, H-5 ve H_2-2 arasındaki korelasyonlar, katerner karbon sinyalinin C-4'e; δ_C 71.66'daki karbon rezonansı ile H_3-14 ve H-9 arasında görülen etkileşimler ise katerner karbon sinyalinin C-10'a ait olduğunu doğrulamıştır. δ_C 79.17'deki karbon rezonansının H_2-9, H-6 ve H_3-14 protonları ile gösterdiği uzak mesafe korelasyonları oksimetin grubunun C-8'de bulunduğunu göstermiştir. δ_C 171.82'de görülen karakteristik karbon sinyali ile H_2-13 ve H-8 arasındaki uzak mesafe etkileşimi, bu sinyalin lakton karboniline (C-12) ait olduğunu göstermiştir (Şekil 4.7h).



Şekil 4.7h. (4*α*,5*α*,8*β*,10*β*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (**CM-7**)'de önemli uzak mesafe HMBC korelasyonları (*Oklar karbondan protona doğrudur*)

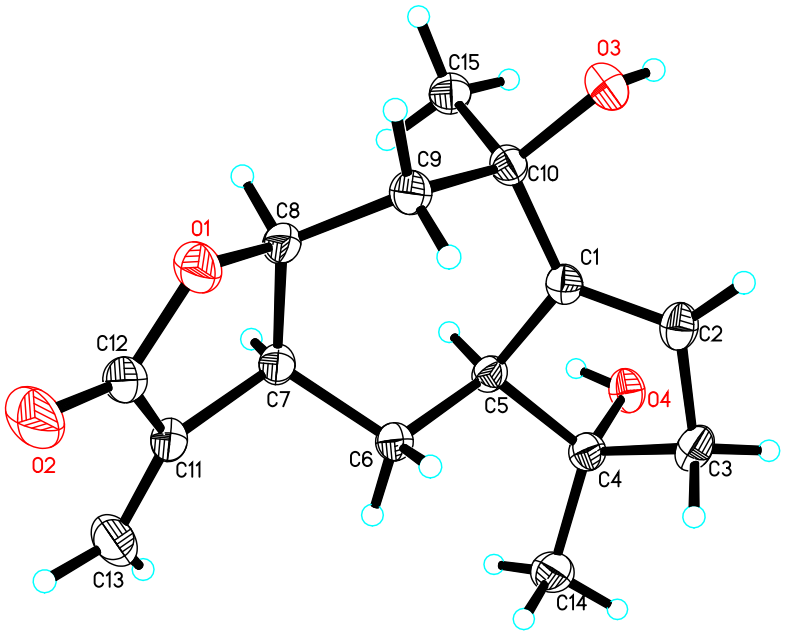
Bileşiğin NOESY spektrumunda (Şekil 4.7f), H-7 (δ_H 3.30)/H-8 (δ_H 4.87), H-8/H_3-14 (δ_H 1.33), H-7/H_3-14, H-7/H-5 (δ_H 2.49), H-7/H-6*α* (δ_H 1.97), H-5/H-6*α*, H-5/ H_3-14, H-5/H-8, H-8/H-9*α* (δ_H 2.12), H-8/H-6*α* ve H_3-14/H-9*α* arasında gözlenen korelasyonlar, H-5, H-8 ve H_3-14'ün *α* pozisyonda olduğunu göstermiştir. Ayrıca, H-6*β* (δ_H 1.46)/H_3-15 (δ_H 1.25) ve H-9*β* (δ_H 1.97)/H_3-15 arasında belirlenen korelasyonlar ile H_3-15'in *β* pozisyonda olduğu saptanmıştır. Bu bulgular C-4 ve C-10'daki OH gruplarının sırasıyla *α* ve *β* pozisyonda olduğunu göstermiştir (Şekil 4.7i).



Şekil 4.7i. (4*α*,5*α*,8*β*,10*β*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (**CM-7**)'de önemli NOESY korelasyonları

Bileşiğin EI-MS spektrumunda, $[M\text{-}H_2O]^+$, $[246\text{-}CH_3]^+$ ve $[231\text{-}H_2O]^+$ pikleri sırasıyla m/z 246.1, 231.0 ve 213.1'da gözlenmiştir. HREI-MS analizinde ise, 246.1252 ve 231.1027 molekül ağırlığına sahip iyonlara ait kapalı formüller sırasıyla $C_{15}H_{18}O_3$ ve $C_{14}H_{15}O_3$ olarak tespit edilmiştir. Bu bulgular ^1H, ^{13}C ve 2D NMR spektroskopik bulguları (Çizelge 4.7, Şekil 4.7a-f**)** ile birlikte değerlendirildiğinde, **CM-7** bileşiğinin inuviskolid (**CM-4** ve **CM-6**), izoinuviskolid (**CM-1** ve **CM-3**) ve C-9,10 epoksit halkası taşıyan (**CM-2** ve **CM-5**) seskiterpen lakton yapılarından farklılık gösteren, moleküler formülü $C_{15}H_{20}O_4$ olan, "**C1(2)-en, 8,12-*cis*-gayanolit**" türevi bir bileşik olduğu belirlenmiştir.

CM-7'nin absolü konfigürasyonu, tek kristal X-ışını kırınım analizi ile belirlenmiştir (Şekil 4.7j). Asimetrik birimde 2 bağımsız molekül bulunmaktadır. **CM-1** ve **CM-2**'de gözlendiği gibi molekül yapısı düzlemsel değildir. Merkezde 7 atomlu halka (C1/C5-C10), 2 adet 5 atomlu halkalardan O1-O2/C7-C8/C11-C12 *cis*; C1-C5 *trans* bağlanmıştır. Hidroksil grupları, C4 ve C10 konumlarında sırasıyla psödo ekvatoryal ve psödo aksiyal bulunmaktadır. CM-7 için elde ettiğimiz kristal veriler literatür ile uyumlu bulunmuştur (Ahmed ve diğerleri, 1993).



Şekil 4.7j. (4*α*,5*α*,8*β*,10*β*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (**CM-7**)'nin absolü konfigürasyonu

Yukarıda açıklanan spektral ve kristal veriler ışığında, **CM-7**'nin yapısı **"(4*α*,5*α*,8*β*,10*β*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid"** olarak aydınlatılmıştır. Bu bileşik ilk olarak *Jasonia candicans* bitkisinden izole edilmiş olup, bulgular literatürde kayıtlı ^{1}H ve ^{13}C NMR değerleri ile büyük oranda uyumlu bulunmuştur (Ahmed ve diğerleri 1993). Literatürde bileşiğin yapı tayini için DEPT, NOESY, COSY ve HMQC analizleri ile X-ray kristalografisinden yararlanılmıştır. C-6 ve C-9'a ait karbon rezonansları sırasıyla δ_C 43.9 ve 31.9 olarak bildirilmiştir (Ahmed ve diğerleri 1993). **CM-7** üzerinde yapı tayinine yönelik yaptığımız spektral analizler sonucunda, C-6 ve C-9'un karbon rezonansları Ahmed ve diğerleri, (1993)'nin aksine, sırasıyla δ_C 32.96 ve 44.53'de tespit edilmiştir. Ahmed ve diğerleri, (1993), H_2-9'un visinal H-8 protonu ile verdiği etkileşim sabitini $J_{8,9\alpha}$=12.2, $J_{8,9\beta}$= 4.2 Hz; H_2-6'nın visinal H-5 protonu ile verdiği etkileşim sabitini $J_{5,6\alpha}$=12.0, $J_{5,6\beta}$= 2.0 Hz; H_2-6'nın H-7 visinal protonu ile verdiği etkileşim sabitini $J_{6\alpha,7}$=12.1, $J_{6\beta,7}$=2.0 Hz olarak belirtmiştir. **CM-7**'nin ^{1}H NMR (CD_3OD) spektral analizinde, H_2-9 proton sinyallerinin geminal ve visinal etkileşimleri δ_H 2.12 (*dd*, $J_{9\alpha,8}$=4.4, $J_{9\alpha,9\beta}$=12.8), 1.97 (*brdd*, $J_{9\beta,8}$=12.4, $J_{9\beta,9\alpha}$=12.8) olarak tespit edilmiştir. H-7 ve H_2-6'nın bir

protonun multiplet görünmesi nedeniyle, sadece H_2-6'nın visinal H-5 protonu ile verdiği etkileşim sabiti ($J_{5\alpha,6\beta}$=12.0 Hz) saptanmıştır. Bulgularımız ışığında, Ahmed ve diğerleri, (1993)'nin NOESY ve X-ray analizi yapmalarına rağmen, H_2-9'un H-8 ve H_2-6'nın H-5 visinal protonları ile etkileşim sabitlerini α ve β konfigürasyonlarına uyumlu vermedikleri tespit edilmiştir.

CM-7, son yıllarda *Leucophyta brownii* ve *Carpesium faberi*'den de izole edilmiş ve Ahmed ve diğerleri, (1993)'nin verdiği isimden farklı bir kimyasal isimle "4α,10β-dihidroksi-5α(H)-1,11(13)-gayadien-8β,12-olid" olarak yayınlanmıştır (Hyldgaard ve diğerleri 2015; Li ve diğerleri, 2011). Literatürde bileşiğin 1D (^{1}H ve ^{13}C NMR, DEPT 135) ve 2D NMR (COSY, NOESY, HSQC ve HMBC) analizlerine ait tüm spektrumları destekleyici bilgi olarak verilmiş (Hyldgaard ve diğerleri 2015) olmakla birlikte, Ahmed ve diğerleri, (1993) referans gösterilerek hiçbir spektral değer belirtilmemiştir.

Literatür araştırmalarımıza göre **CM-7**, *C. montanum* bitkisinden ilk kez izole edilmiş ve bileşiğe ait 1D ve 2D NMR spektral değerleri ayrıntılı ve tam olarak ilk kez tezimizde sunulmuştur.

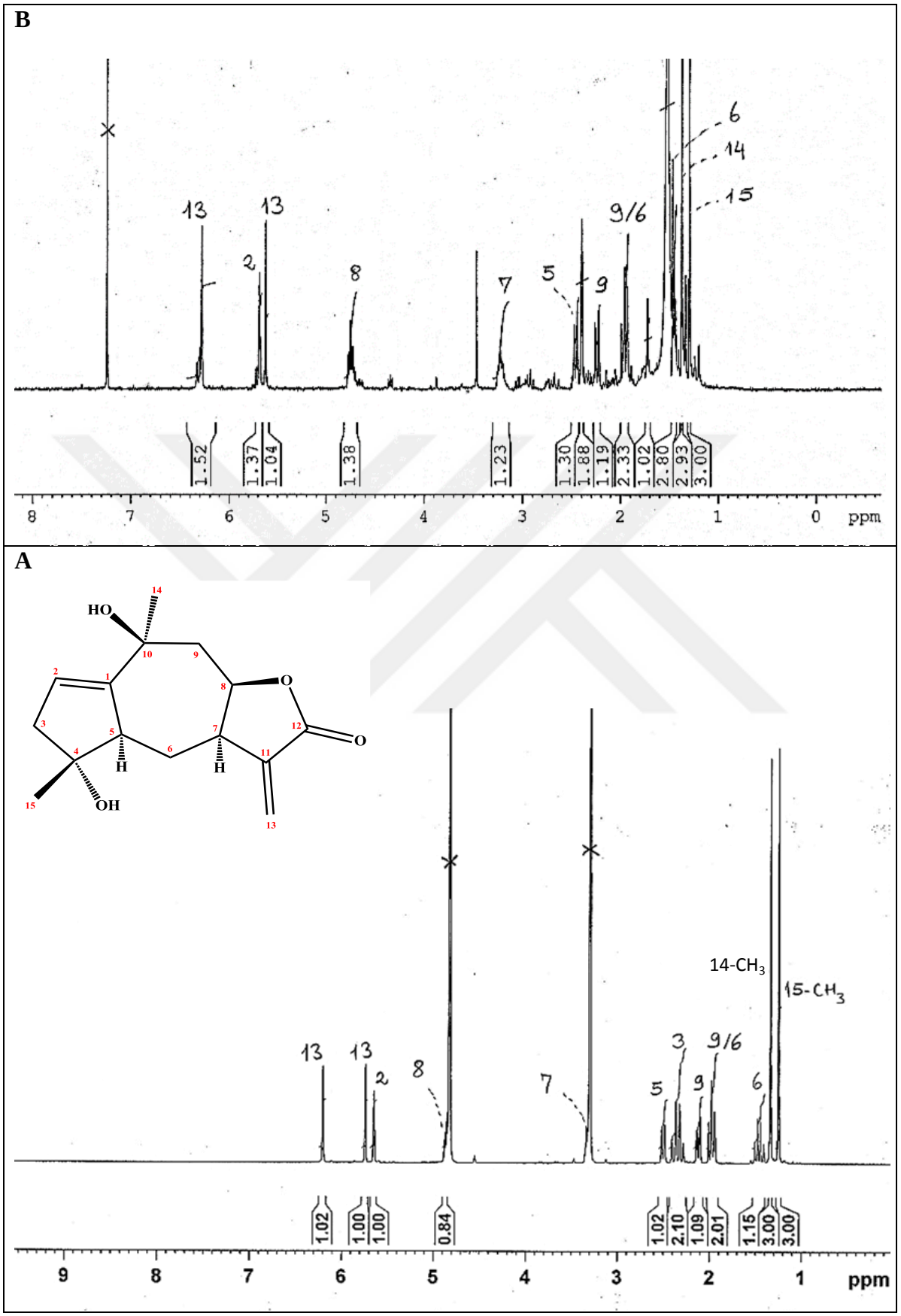
Çizelge 4.7. (4*α*,5*α*,8*β*,10*β*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (**CM-7**) bileşiğinin ^{1}H ve ^{13}C NMR spektroskopik değerleri (CD_3OD: δ_H 400 MHz, δ_C 125 MHz; $CDCl_3$: δ_H 400 MHz) ve HMBC korelasyonları

Konum	**C/H**	**CD_3OD**			**$CDCl_3$**
		δ_C ppm	**δ_H ppm, *J* (Hz)**	**HMBC (C→H)**	**δ_H ppm, *J* (Hz)**
1	C	153.19	-	H_3-14, H_2-6, H_2-3, H_2-9 ve H-5	-
2	CH	121.34	5.65 m	H_2-3, H-5 ve H_2-9	5.69 m
3	CH_2	47.15	2.38 brd (16.4) 2.30 brd (16.4)	H_3-15, H-2	2.40 m
4	C	82.57	-	H_3-15, H_2-3, H-5, H_2-2	-
5	CH	56.73	2.49 brd (12.0)	H_3-15, H_2-6, H-2	2.45 brd (12.4)
6	CH_2	32.96	1.97* m, 1.46 ddd (12.4/12.8/13.2)	H-8, H_3-15	1.93-1.99* m 1.43-1.47 m
7	CH	43.09	3.30 m	H_2-6, H_2-9, H_2-13	3.23 m
8	CH	79.17	4.87 m	H_2-9, H_2-6, H_3-14	4.75 ddd (4.4/8.0/12.0)
9	CH_2	44.53	2.12 dd (4.4/12.8) 1.97* dd (12.4/12.8)	H_3-14	2.24 dd (4.4/13.2) 1.93-1.99* dd (12.4/12.8)
10	C	71.66	-	H_3-14, H_2-9	-
11	C	142.29	-	H_2-13, H_2-6, H-7, H-8	-
12	C	171.82	-	H_2-13, H-8	-
13	CH_2	123.27	6.20 d (2.4) 5.74 d (2.4)	-	6.28 d (2.8) 5.62 d (2.4)
14	CH_3	27.24	1.33 s	H_2-9	1.37 s
15	CH_3	24.67	1.25 s	H_2-3	1.29 s

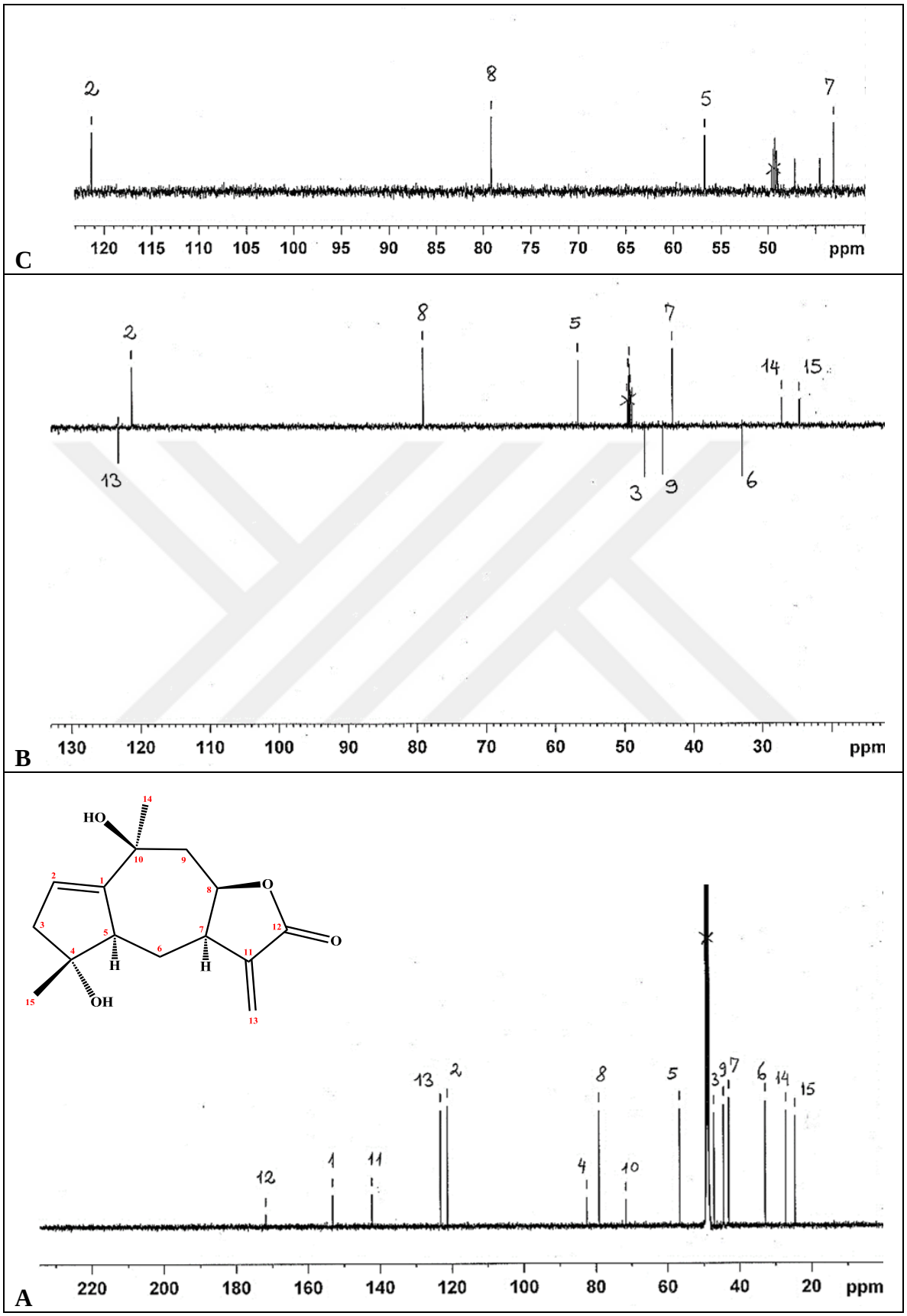
***** Üst üste çakışan protonlar

X-ışını kırınım bulguları

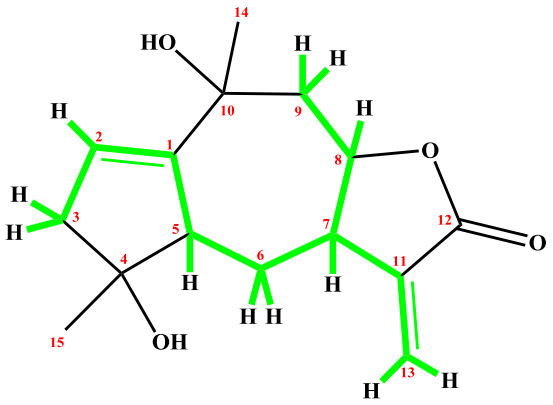
Kimyasal formülü $C_{15}H_{20}O_4$; molekül ağırlığı 264.29; kristal sistemi monoklinik, uzay grubu $P2_1$, birim hücre parametreleri **a** = 7.970(6) Å, **b** = 6.366(2) Å, **c** = 13.588(5) Å, β = 97.77(4)° ve birim hücre hacmi 683.2(6) $Å^3$, Z = 2, hesaplanan yoğunluk 1.299 mg/m^3, F(000)= 286, kristal boyutu 0.50 x 0.30 x 0.10 mm, Θ açı aralığı 3.28-72.16°, toplanan yansıma sayısı 13260, bağımsız yansıma sayısı 2598 (R_{int} = 0.0406), uyuşum sonucu F^2 1.064, son R değerleri [I>2δ(I)] R1 = 0.0340, wR2 = 0.0888, R1 = 0.0351, wR2 = 0.0896 tüm veriler için, arıtım sonucunda elde edilen en büyük ve en küçük elektron yoğunluğu farkları, sırasıyla 0.175 ve -0.193 $e.Å^{-3}$.

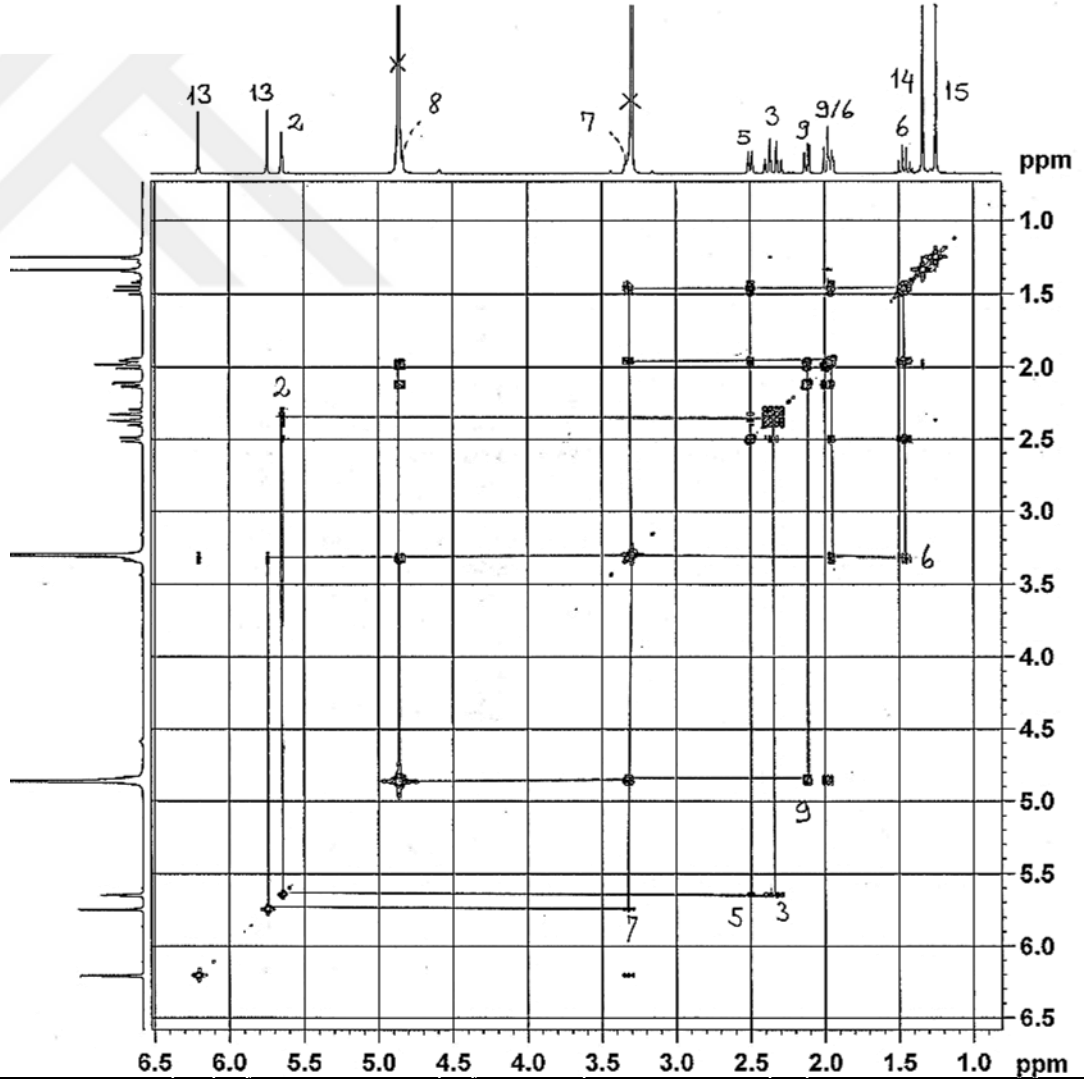


Şekil 4.7a. (4*α*,5*α*,8*β*,10*β*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (**CM-7**)'nin ^{1}H NMR spektrumları (A: CD_3OD, 400 MHz; B: $CDCl_3$, 400 MHz)

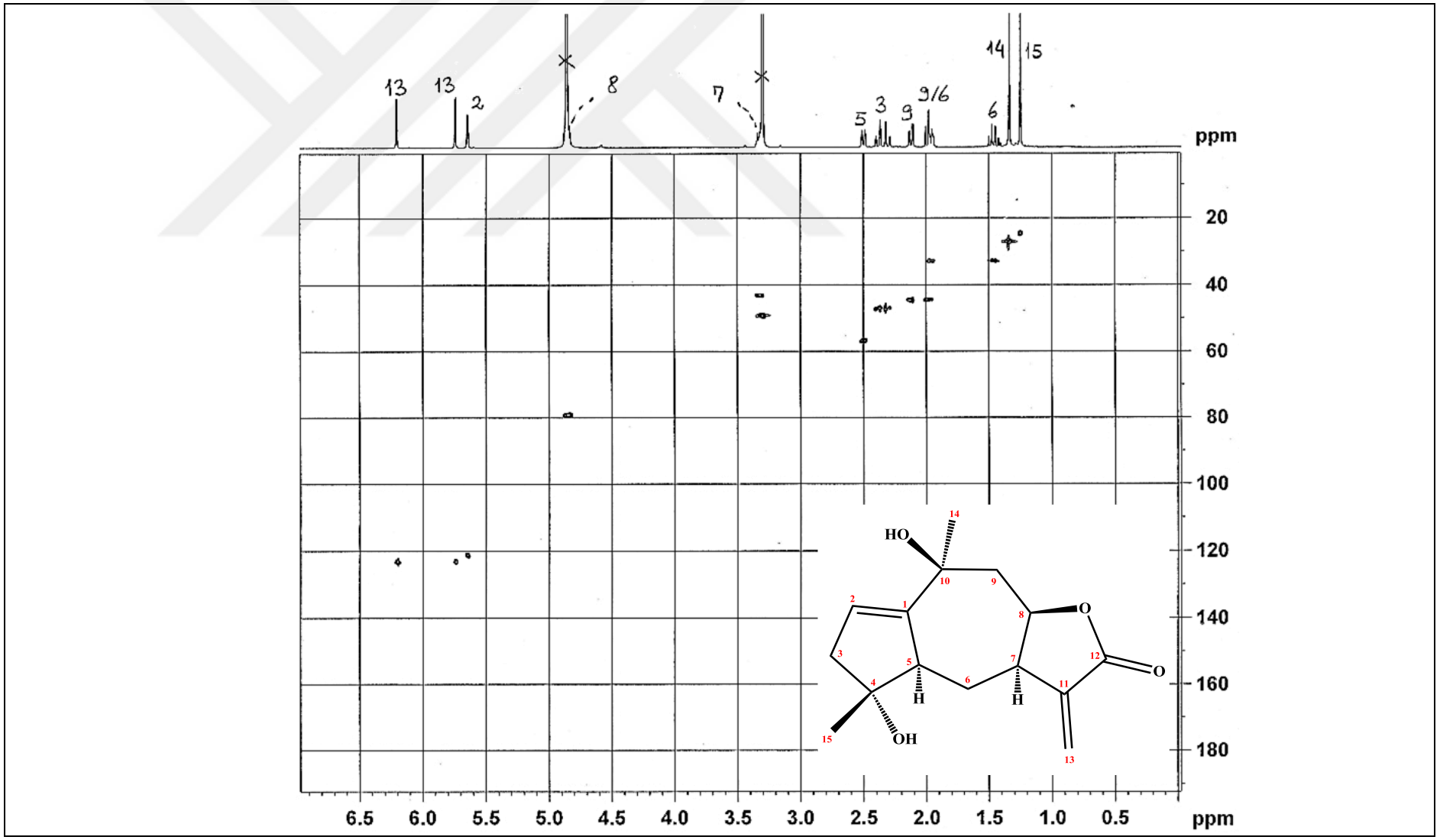


Şekil 4.7b. (4*α*,5*α*,8*β*,10*β*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (**CM-7**)'nin ^{13}C NMR (A), DEPT 135 (B) ve DEPT 90 (C) spektrumları (CD_3OD, 125 MHz)

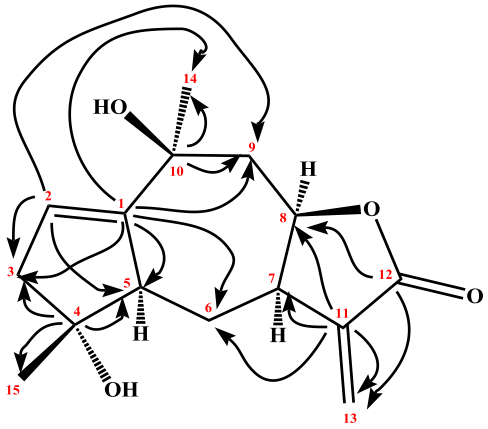


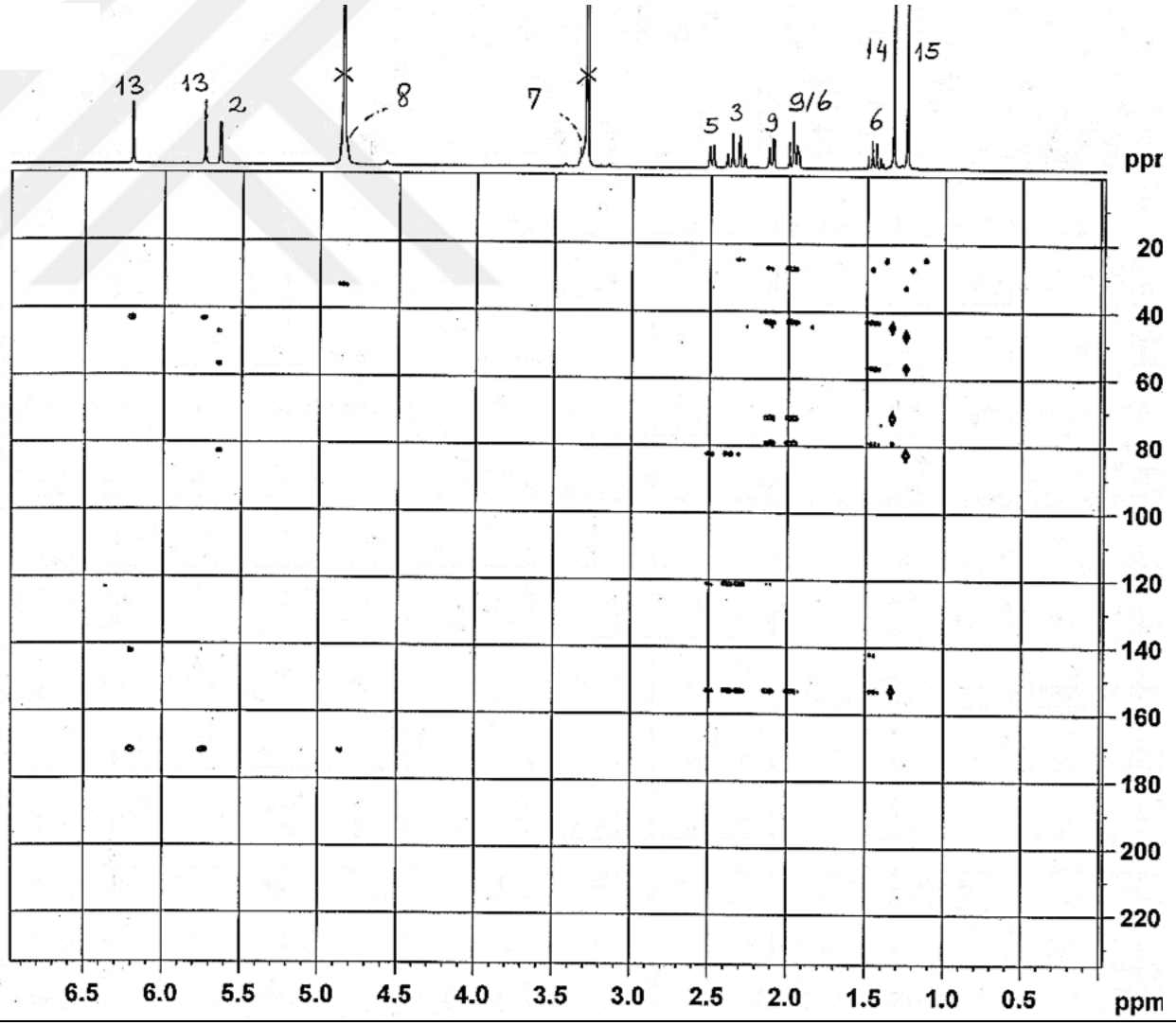


Şekil 4.7c. (4*α*,5*α*,8*β*,10*β*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (**CM-7**)'nin COSY spektrumu (CD_3OD, 500 MHz)

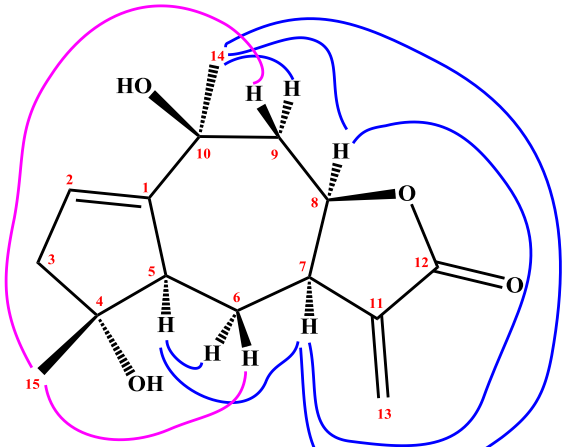


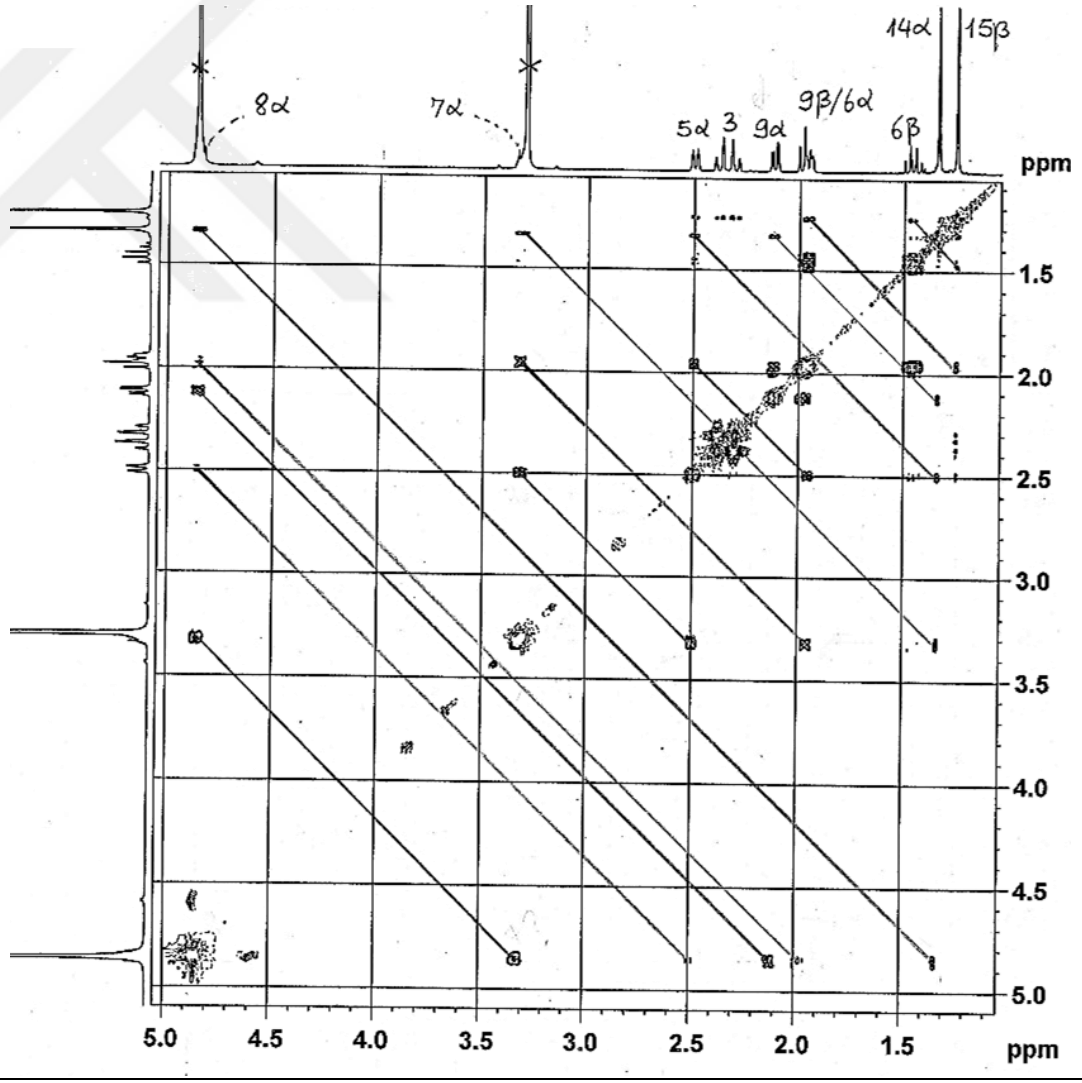
Şekil 4.7d. (4*α*,5*α*,8*β*,10*β*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (**CM-7**)'nin HSQC spektrumu (CD_3OD)





Şekil 4.7e. (4*α*,5*α*,8*β*,10*β*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (**CM-7**)'nin HMBC spektrumu (CD_3OD)

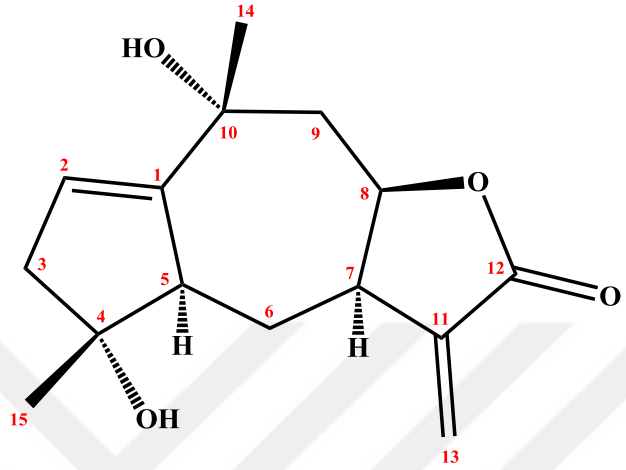




Şekil 4.7f. (4*α*,5*α*,8*β*,10*β*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (**CM-7**)'nin NOESY spektrumu (CD_3OD, 500 MHz)

CM-8: (4*α*,5*α*,8*β*,10*α*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid

CM-8 bileşiği (17 mg) kloroform ekstresinden sarımsı beyaz renkte yağımsı bir madde halinde izole edilmiştir.



CM-8: $C_{15}H_{20}O_4$ (MA: 264)

$[\alpha]_D^{28.3}$: - 27.3 (*c* 0.23, $CHCl_3$)

UV (CH_3OH) λ_{max} nm: 222, 229

IR (KBr) υ_{max} cm^{-1}: 3446 (OH), 1735 (*α*-metilen *γ*-lakton), 1661 (doymamışlık)

<u>$CDCl_3$ içerisinde alınan spektrumlar:</u>

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 800 MHz) δ_H: Şekil 4.8a

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 200 MHz) δ_C: Şekil 4.8b

DEPT 90 ($CDCl_3$, 200 MHz) δ_C: Şekil 4.8b

DEPT 135 ($CDCl_3$, 200 MHz) δ_C: Şekil 4.8b

COSY ($CDCl_3$, 800 MHz)

HSQC ($CDCl_3$)

HMBC ($CDCl_3$)

NOESY ($CDCl_3$, 800 MHz) δ_H: Şekil 4.8g

DMSO-d_6 içerisinde alınan spektrumlar:

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500 MHz) δ_H: Şekil 4.8a

COSY (DMSO-d_6, 500 MHz) δ_H: Şekil 4.8c

HSQC (DMSO-d_6): Şekil 4.8d

HMBC (DMSO-d_6): Şekil 4.8e

NOESY (DMSO-d_6, 500 MHz) δ_H: Şekil 4.8f

EI-MS m/z (relatif değer): 246.1 $[M-H_2O]^+$ (12.8), 231.1 $[246-CH_3]^+$ (20.1), 203.1 $[231-CO]^+$ (44.8), 43.0 (100)

ESI-MS: m/z 287 $[M+Na]^+$, 551 $[2M+Na]^+$

CM-8 bileşiğinin UV spektrumunda λ 222 ve 229 nm'de absorpsiyon bantları görülmüştür. IR spektrumunda, hidroksil (3446 cm^{-1}), karakteristik α-metilen, γ-lakton (1735 cm^{-1}) ve doymamışlık (1661 cm^{-1}) bantları gözlenmiştir.

Bileşiğin $CDCl_3$ ile alınan ^{1}H NMR spektrumunda (Şekil 4.8a-C), H-6 ve H_3-15 sinyallerinin (sırasıyla δ_H 1.31 *m* ve 1.33 *m*) üst üste çakışması nedeniyle, bileşiğin DMSO-d_6 çözücüsünde de NMR spektrumları (^{1}H NMR ve 2D NMR) alınarak üste üste çakışmış olan protonların kimyasal kaymalarının ayrılması sağlanmıştır. Tüm proton ve karbon rezonanslarının yorumlanmasında her iki çözücüde alınan spektrumlardan faydalanılmıştır (Şekil 4.8a-g).

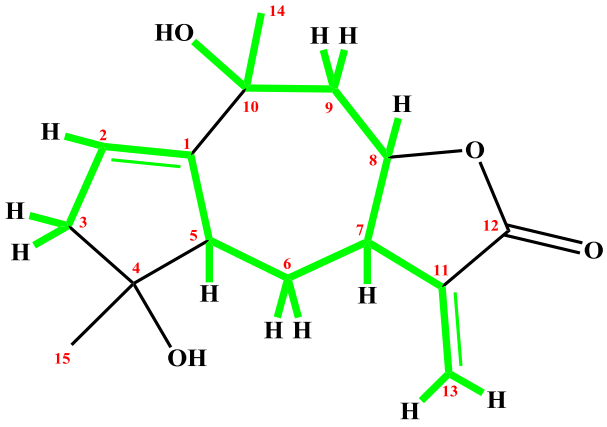
Bileşiğin DMSO-d_6 içerisinde alınan ^{1}H NMR spektrumunda (Çizelge 4.8, Şekil 4.8a-A, B), karakteristik olarak 1 adet ekzosiklik metilen grubuna ait sinyaller [δ_H 6.04 (*d*, *J*=2.5 Hz, H-13a); 5.71 (*d*, *J*=2.5 Hz, H-13b)], 2 adet metil grubuna ait singletler [δ_H 1.37 (*s*, H_3-14); 1.12 (*s*, H_3-15)], 1 adet oksimetin grubuna ait sinyal [δ_H 4.98 (*ddd*, *J*=4.0, 8.0, 11.5 Hz, H-8)], 1 adet olefinik protona ait sinyal [δ_H 5.42 (*m*, H-2)] ve OH gruplarına ait 2 adet sinyal [δ_H 4.47 *s* (C-4); 4.72 *s* (C-10)] gözlenmiştir. DMSO-d_6 içerisinde alınan HSQC ve HMBC spektrumlarından (Şekil 4.8d ve 4.8e) bileşiğin karbon rezonansları belirlenmiştir.

Buna göre; bileşikte 2 adet metil karbonu [δ_C 29.85 (C-14); 24.95 (C-15)], 1 adet oksimetin karbonu [δ_C 77.85 (C-8)], 1 adet olefinik metilen karbonu [δ_C 121.44 (C-13)] ve 1 adet olefinik metin karbonu [δ_C 119.89 (C-2)] belirlenmiştir. Ayrıca karakteristik olarak 2 adet sp^3 oksijenli tersiyer karbon [δ_C 79.76 (C-4); 67.98 (C-10)], 1 adet sp^2 katerner karbon [δ_C 140.94 (C-11)], 1 adet olefinik katerner karbon [δ_C 151.26 (C-1)] ve 1 adet lakton karbonili [δ_C 169.49 (C-12)] taşıdığı tespit edilmiştir.

Bileşiğin DMSO-d_6 çözücüsünde alınan ^{1}H NMR spektrumunda, δ_H 2.24 ve 2.16'da H_2-3 metilen protonlarına ait sinyaller (*brd*, $J_{3a,2}$=16.0; $J_{3b,2}$=16.5 Hz) görülmüştür. H-2'nin δ_H 5.42 *m* ve H_2-3'ün *brd* olarak tespit edilmesi, bunun yanında C-1 ve C-2 karbon rezonanslarının düşük alanda sırasıyla δ_C 151.26 ve 119.89'de görülmesi, çifte bağın C-1 ve C-2 konumları arasında olduğuna işaret etmiştir. δ_H 4.98'de görülen H-8'in diğer visinal protonlar ile etkileşimi ($J_{8,9\alpha}$=4.0, $J_{8,9\beta}$= 11.5 Hz), C-9'da geminal protonların varlığını göstermiştir. H_2-9 proton sinyallerinin geminal ve visinal etkileşimleri [δ_H 2.01 (*dd*, $J_{9\alpha,8}$=4.0, $J_{9\alpha,9\beta}$=13.5), 1.66 (*brdd*, $J_{9\beta,8}$=$J_{9\beta,9\alpha}$=12.0)], C-10'un katerner olduğuna işaret etmiştir. δ_H 1.37 (*s*, H_3-14) ve 1.12 (*s*, H_3-15)'de gözlenen metil gruplarının düşük alana kaymış olması, C-4 ve C-10'da OH sübstitüsyonu bulunduğunu desteklemiştir. Bu bulgular, δ_H 4.47 ve 4.72'de görülen hidroksil gruplarının sırasıyla C-4 ve C-10'da olduğunu göstermiştir.

Seskiterpen laktonlarda H-7 biyosentez bakımından α konumdadır (Bruneton, 1999; Simonsen ve diğerleri, 2013).^{1}H NMR spektrumunda (DMSO-d_6, Şekil 4.8a) H-8 ile H-7 visinal protonları arasındaki etkileşim sabitinin $J_{8,7}$=8 Hz olması H-8'in β pozisyonda olabileceğini düşündürmüştür. Ancak, H_2-13 protonlarının [δ_H 6.04 (*d*, $J_{7,13a}$=2.5 Hz); 5.71 (*d*, $J_{7,13b}$=2.5 Hz)] H-7 ile gösterdiği etkileşim sabitinin $J_{7,13} < 3$ olması, Samek kuralına (Samek, 1978) uygun olarak lakton halkasının "**8,12-*cis***" bağlandığına işaret etmiştir.

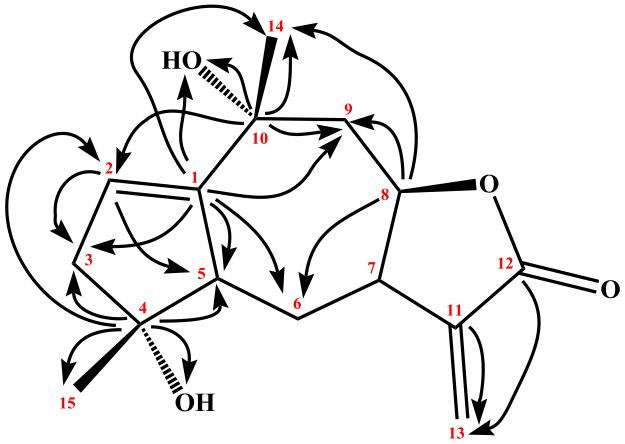
COSY spektrumunda (DMSO-d_6) (Şekil 4.8c) tek spin sistemi içinde H-2/H_2-3 ve H-5/H_2-6, H_2-6/H-7, H7/H-8 ve H-8/H_2-9 visinal protonları arasında korelasyonlar gözlenmiştir. H_2-13/H-7 ve H-2/H-5 arasında uzak mesafe allilik etkileşimler saptanmıştır. Ayrıca OH (C-10)/ H_3-14 ve OH (C-10)/H_2-9 arasında görülen visinal etkileşimler C-10 konumundaki OH'in yerini doğrulamıştır (Şekil 4.8 h).



Şekil 4.8h. (4α,5α,8β,10α)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (**CM-8**)'de COSY korelasyonları (DMSO-d_6)

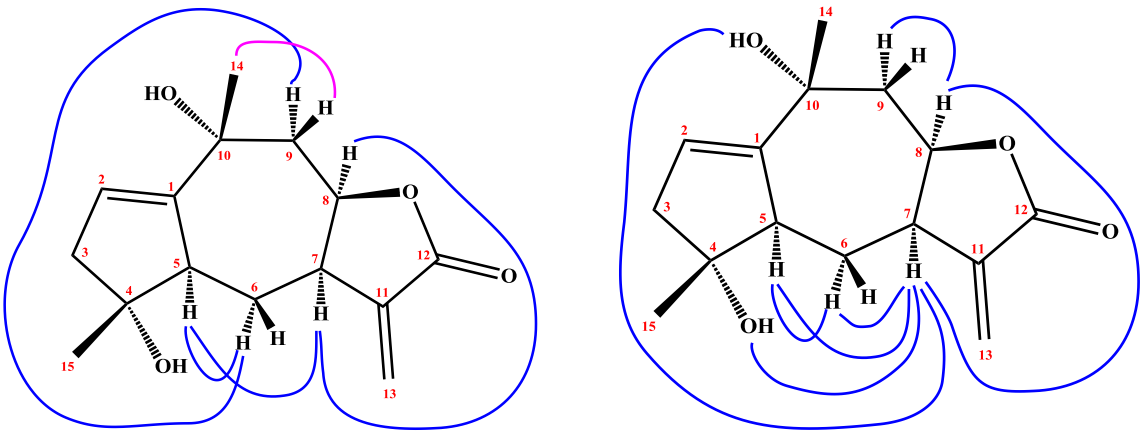
DMSO-d_6 içerisinde alınan HSQC spektrumundan (Şekil 4.8d), C-2 olefinik metin ile C-5 ve C-7 metin karbonlarının sırasıyla 119.89, 54.53 ve 41.31 ppm'de olduğu saptanmıştır. Bileşiğin C-3, C-6, C-9 ve C-13'e ait metilen karbon rezonansları ise, sırasıyla 46.47, 31.16, 41.93 ve 121.44 ppm'de görülmüştür. Ayrıca metil gruplarına ait karbon rezonansları 29.85 (C-14) ve 24.95 (C-15) ppm'de; oksimetin grubu 77.85 (C-8) ppm'de saptanmıştır.

HMBC spektrumunda (DMSO-d_6) (Şekil 4.8e), trisübstitüe etilenik bağın C-1 ile C-2 arasında olduğu δ_C 151.26'daki (C-1) olefinik sinyal ile etkileşim şiddeti giderek azalan H_3-14, OH (C-10), H_2-9, H_2-3, H_2-6 ve H-5 protonları arasındaki HMBC korelasyonları ile doğrulanmıştır. İlave olarak, H_2-3 ve H-5 ile δ_C 119.89 arasındaki ilişki, δ_H 5.42'de gözlenen integrali 1 proton değerindeki olefinik metin karbonunun C-2 konumunda olduğunu desteklemiştir. δ_C 140.94'de görülen karakteristik karbon sinyali ile H_2-13 arasındaki uzak mesafe ilişkisi, δ_H 6.04 (H-13a) ve 5.71 (H-13b)'de gözlenen karakteristik ekzosiklik metilen protonlarının C-11'e bağlı olduğunu göstermiştir. δ_C 79.76'da gözlenen karbon rezonansı ile H_3-15, H-2, OH (C-4), H-5 ve H_2-3 arasındaki korelasyonlar katerner karbon sinyalinin C-4'e; δ_C 67.98'deki karbon rezonansı ile H_3-14, H_2-9, OH (C-10) ve H-2 arasında görülen etkileşimler ise katerner karbon sinyalinin C-10'a ait olduğunu doğrulamıştır. δ_C 77.85'deki karbon rezonansının H_2-9, H_3-14 ve H-6 protonları ile gösterdiği uzak mesafe korelasyonları oksimetin grubunun C-8'de bulunduğunu göstermiştir. δ_C 169.49'da görülen karakteristik karbon sinyali ile H_2-13 arasındaki uzak mesafe etkileşimi, bu sinyalin lakton karboniline (C-12) ait olduğunu göstermiştir (Şekil 4.8i).



Şekil 4.8i. (4*α*,5*α*,8*β*,10*α*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (**CM-8**)'de önemli uzak mesafe HMBC korelasyonları (DMSO-d_6) (*Oklar karbondan protona veya hidroksil grubuna doğrudur*)

Bileşiğin $CDCl_3$ içerisinde alınan NOESY spektrumunda (Şekil 4.8g), H-7 (δ_H 3.35)/H-8 (δ_H 5.12), H-7/H-5 (δ_H 2.67), H-5/H-6*α* (δ_H 2.04) ve H-6*α*/H-9*α* (δ_H 2.27) arasında gözlenen korelasyonlar, H-5 ve H-8'in *α* pozisyonda olduğunu göstermiştir. 9*β* (δ_H 1.72) /H_3-14 (δ_H 1.52) arasındaki korelasyon H_3-14'ün *β* pozisyonda olduğunu göstermiştir (Şekil 4.8j). DMSO-d_6 içerisinde alınan NOESY spektrumunda (Şekil 4.8f), H-7 (δ_H 3.28)/OH (C-4), H-7/ OH (C-10), H-7/H-5 (δ_H 2.60), H-7/H-8 (δ_H 4.98), H-5/ H-6*α* (δ_H 1.92), H-7/H-6*α* ve H-8/H-9*α* (δ_H 2.01) arasında korelasyonların gözlenmesi, C-4 ve C-10'daki OH gruplarının *α* pozisyonda olduğunu göstermiştir. Bu bulgu ile H_3-14 ve H_3-15'in *β* pozisyonda olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.8j). NOESY analizleri ($CDCl_3$ ve DMSO-d_6), bileşiğin "**8,12-*cis* gayanolit**" yapıya sahip olduğunu doğrulamıştır.



Şekil 4.8j. (4*α*,5*α*,8*β*,10*α*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (**CM-8**)'de önemli NOESY korelasyonları (A: $CDCl_3$, B: DMSO-d_6)

Bileşiğin EI-MS spektrumunda, $[M-H_2O]^+$, $[246-CH_3]^+$ ve $[231-CO]^+$ pikleri sırasıyla m/z 246.1, 231.1 ve 203.1'da gözlenmiştir. ESI-MS spektrumunda ise, bileşiğin molekül ağırlığı ile uyumlu m/z 287 $[M+Na]^+$ piki gözlenmiştir. Bu bulgular, ^1H, ^{13}C ve 2D NMR spektroskopik bulguları (Çizelge 4.8, Şekil 4.8a-g) ile birlikte değerlendirildiğinde, **CM-8** bileşiğinin **CM-7** ile C-10'da yer alan OH'in konfigürasyonu bakımından farklılık gösteren, moleküler formülü $C_{15}H_{20}O_4$ olan, "**C1(2)-en, 8,12-*cis*-gayanolit**" türevi bir bileşik olduğu belirlenmiştir.

Yukarıda açıklanan spektral veriler ışığında, CM-8'in yapısı **"(4*α*,5*α*,8*β*,10*α*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid**" olarak aydınlatılmıştır. Bu bileşik ilk olarak *Jasonia candicans* bitkisinden izole edilmiş olup, bulgular literatürde kayıtlı ^1H ve ^{13}C NMR değerleri ile büyük oranda uyumlu bulunmuştur (Ahmed ve diğerleri 1993). Literatürde, bileşiğin yapı tayini için DEPT, NOESY, COSY, HMQC ve X-ray kristalografisinden yararlanılmıştır. C-6 ve C-9'a ait karbon rezonansları sırasıyla δ_C 42.8 ve 32.2 olarak bildirilmiştir (Ahmed ve diğerleri 1993). **CM-8** üzerinde yapı tayinine yönelik yaptığımız spektral analizler sonucunda, C-6 ve C-9'un karbon rezonansları Ahmed ve diğerleri, (1993)'nın aksine, sırasıyla δ_C 32.48 ve 42.55'de tespit edilmiştir. Ahmed ve diğerleri, (1993), H_2-9'un visinal H-8 protonu ile verdiği etkileşim sabitini $J_{8,9\alpha}$=11.8, $J_{8,9\beta}$=3.6 Hz; H_2-6'un visinal H-5 protonu ile verdiği etkileşim sabitini $J_{5,6\alpha}$=11.9, $J_{5,6\beta}$= 1.2 Hz; H_2-6'nın H-7 visinal protonu ile verdiği etkileşim sabitini $J_{6\alpha,7}$=6.4, $J_{6\beta,7}$= <1 Hz olarak belirtmiştir. **CM-8**'in ^1H NMR (DMSO-d_6) spektral analizinde, H_2-9 proton sinyallerinin geminal ve visinal etkileşimleri δ_H 2.01 (*dd*, $J_{9\alpha,8}$=4.0, $J_{9\alpha,9\beta}$=13.5), 1.66 (*brdd*, $J_{9\beta,8}$=12.0, $J_{9\beta,9\alpha}$=13.0) olarak tespit edilmiştir. H-7 ve H_2-6'nın multiplet görünmesi nedeniyle, sadece H_2-6'nın visinal H-5 protonu ile verdiği etkileşim sabiti ($J_{5\alpha,6\beta}$=12.0 Hz) tespit edilmiştir. Bu bulgular ışığında, Ahmed ve diğerleri, (1993)'nın NOESY ve X-ray analizi yapmalarına rağmen, H_2-9'un H-8, H_2-6'nın H-5 ve H_2-6'nın H-7 visinal protonları ile etkileşim sabitlerini α ve β konfigürasyonlarına uyumlu vermedikleri tespit edilmiştir.

Literatür araştırmalarımıza göre **CM-8**, *C. montanum* bitkisinden ilk kez izole edilmiş ve bileşiğe ait 1D ve 2D NMR spektral değerleri ayrıntılı ve tam olarak ilk kez tezimizde sunulmuştur.

Çizelge 4.8. (4*α*,5*α*,8*β*,10*α*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (**CM-8**) bileşiğinin ^{1}H ve ^{13}C NMR spektroskopik değerleri ($CDCl_3$: δ_H 800 MHz, δ_C 200 MHz; DMSO-d_6: δ_H 500 MHz, δ_C[#] 125 MHz) ve HMBC korelasyonları

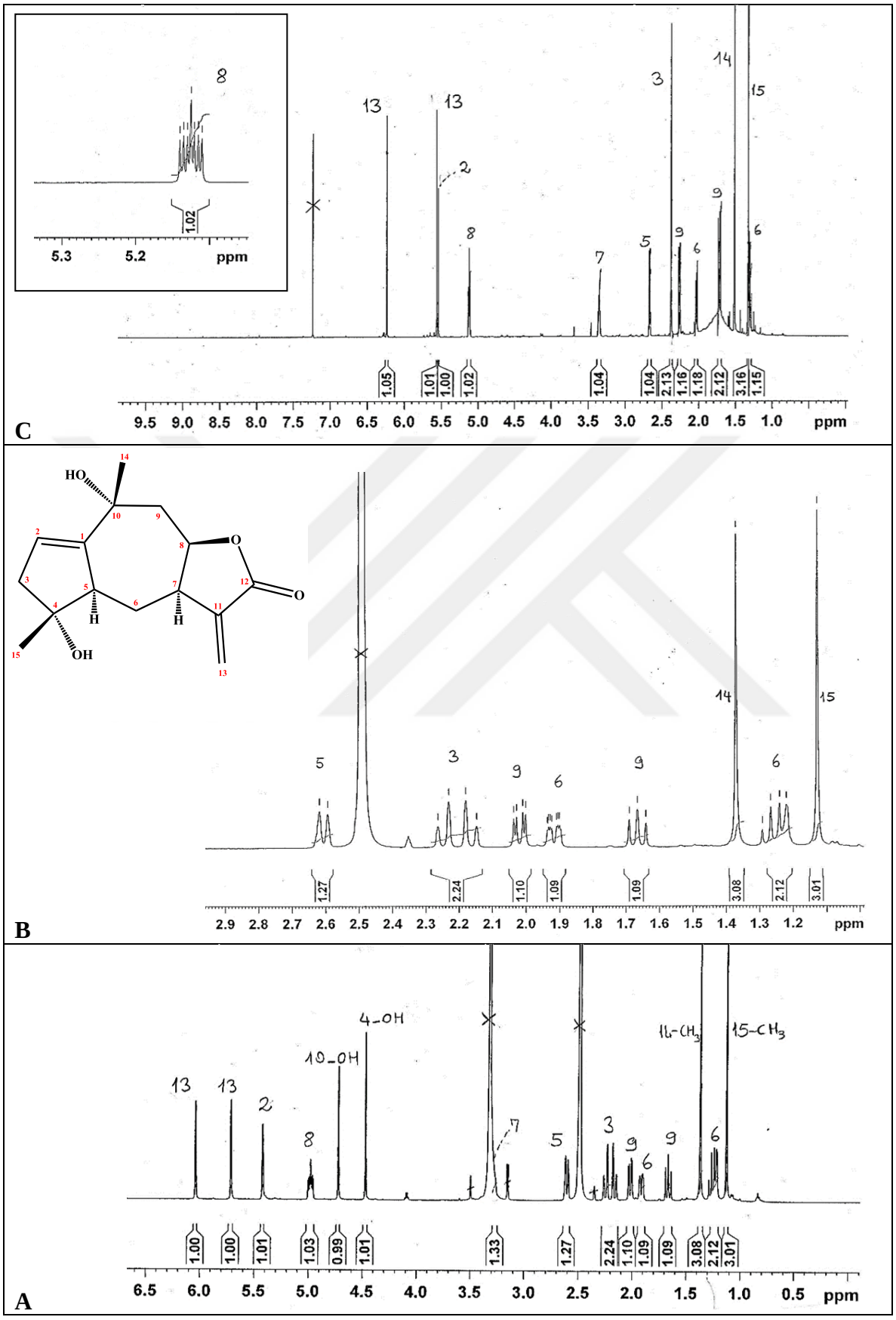
		$CDCl_3$			**DMSO-d_6**		
Konum	**C/H**	**δ_C ppm**	**δ_H ppm, *J* (Hz)**	**HMBC (C→H)**	**δ_C ppm**	**δ_H ppm, *J* (Hz)**	**HMBC (C→H)**
1	C	151.90	-	H_3-14, H_2-3, H_2-9, H_2-6, H-5, H-2	151.26	-	H_3-14, OH (C-10), H_2-9, H_2-3, H_2-6, H-5
2	CH	121.55	5.54 m	H_2-3, H-5, H_3-14, H_2-9	119.89	5.42 m	H_2-3, H-5
3	CH_2	46.60	2.38 m	H_3-15, H-2, H-5	46.47	2.24 brd (16.0), 2.16 brd (16.5)	H_3-15, OH (C-4), H-2
4	C	81.32	-	H_3-15, H_2-3, H_2-6, H-5, H-2	79.76	-	H_3-15, H-2, OH (C-4), H-5, H_2-3
5	CH	55.21	2.67 brd (12.0)	H_2-6, H_3-15, H-2, H_2-3, H-7	54.53	2.60 brd (12.0)	H_3-15, OH (C-4), H_2-6, H-2
6	CH_2	32.48	2.04 brdd (1.6/4.8/13.6), 1.31***** m	H-5, H-8, H_3-15, H-7, H_2-13, H_2-3	31.16	1.92 m, 1.25 m	H_3-15, H-5, H-8
7	CH	42.20	3.35 m	H_2-6, H_2-9, H_2-13, H-5	41.31	3.28 m	H_2-9, H_2-13, H_2-6
8	CH	77.55	5.12 ddd (4.0/8.0/12.0)	H_2-9, H_2-6, H_3-14, H-7	77.85	4.98 ddd (4.0/8.0/11.5)	H_2-9, H_3-14, H-6

Çizelge 4.8. (devam) (4*α*,5*α*,8*β*,10*α*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (**CM-8**) bileşiğinin ^{1}H ve ^{13}C NMR spektroskopik değerleri ($CDCl_3$: δ_H 800 MHz, δ_C 200 MHz; DMSO-d_6: δ_H 500 MHz, δ_C[#] 125 MHz) ve HMBC korelasyonları

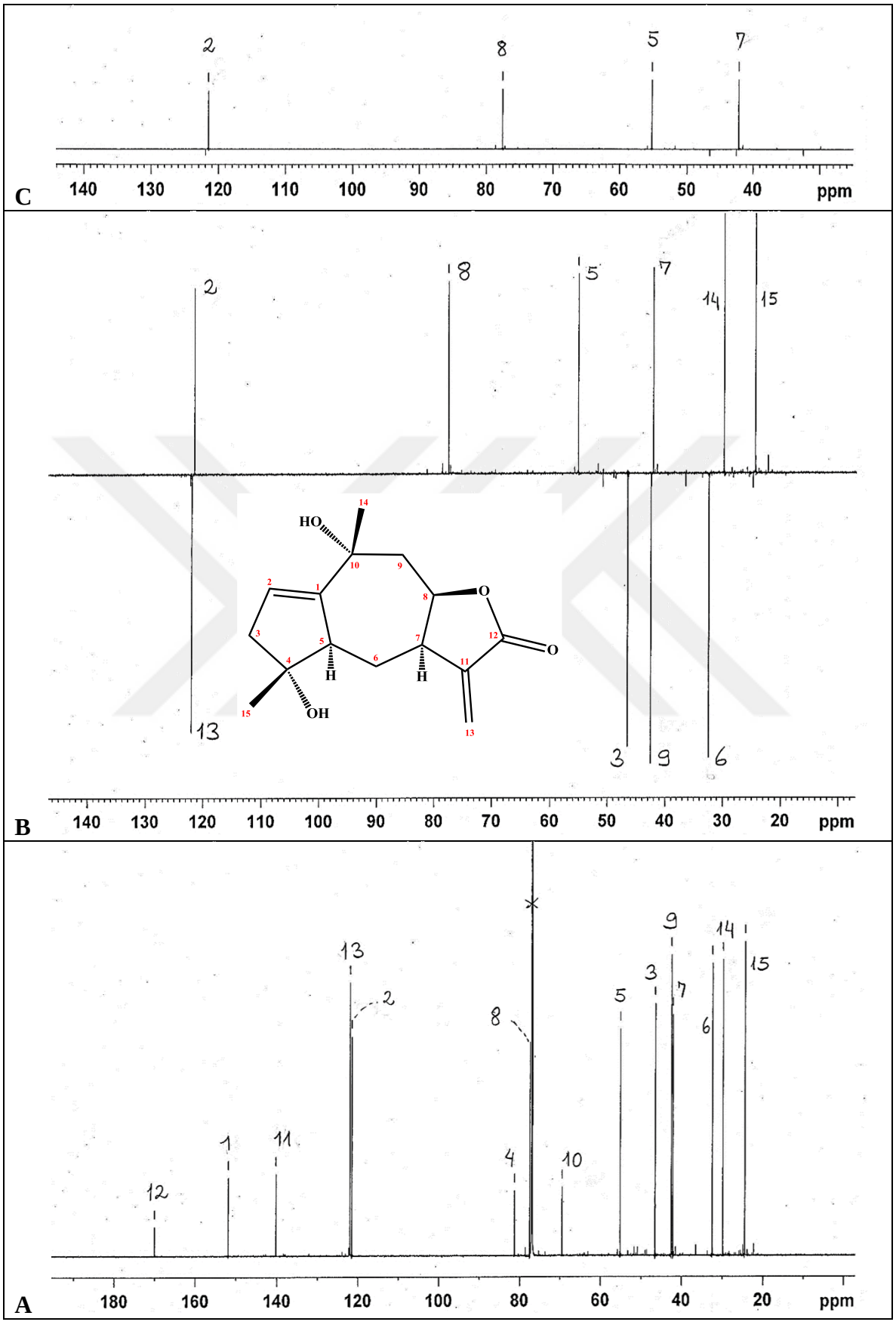
9	CH_2	42.55	2.27 dd (4.0/14.4), 1.72 dd (12.0/14.4)	H_3-14, H-8	41.93	2.01 dd (4.0/13.5), 1.66 brdd (12.0/13.0)	H_3-14, OH (C-10)
10	C	69.49	-	H_3-14, H_2-9, H-8, H-2, H_2-3	67.98	-	H_3-14, H_2-9, OH (C-10), H-2
11	C	140.25	-	H_2-6, H-8, H_2-13, H-7	140.94	-	H_2-13
12	C	170.07	-	H_2-13, H-8, H-7	169.49	-	H_2-13
13	CH_2	121.99	6.24 d (3.2), 5.56 d (2.4)	H-7	121.44	6.04 d (2.5), 5.71 d (2.5)	-
14	CH_3	29.89	1.52 s	H_2-9	29.85	1.37 s	H_2-9
15	CH_3	24.49	1.33***** s	H_2-3	24.95	1.12 s	OH (C-4)
4-OH	-	-	-	-	-	4.47 s	-
10-OH	-	-	-	-	-	4.72 s	-

***** Üst üste çakışan protonlar

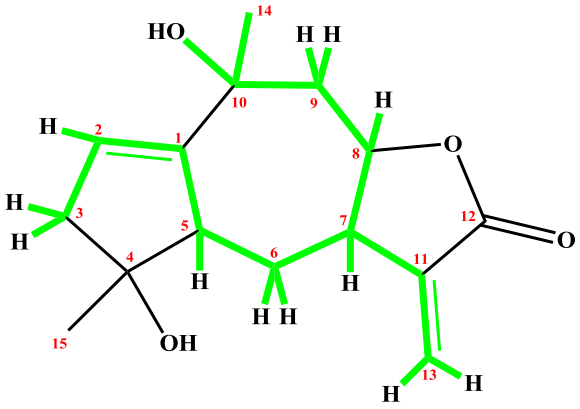
[#] DMSO içerisinde alınan HSQC ve HMBC spektrumlarından bileşiğin karbon rezonansları belirlenmiştir.

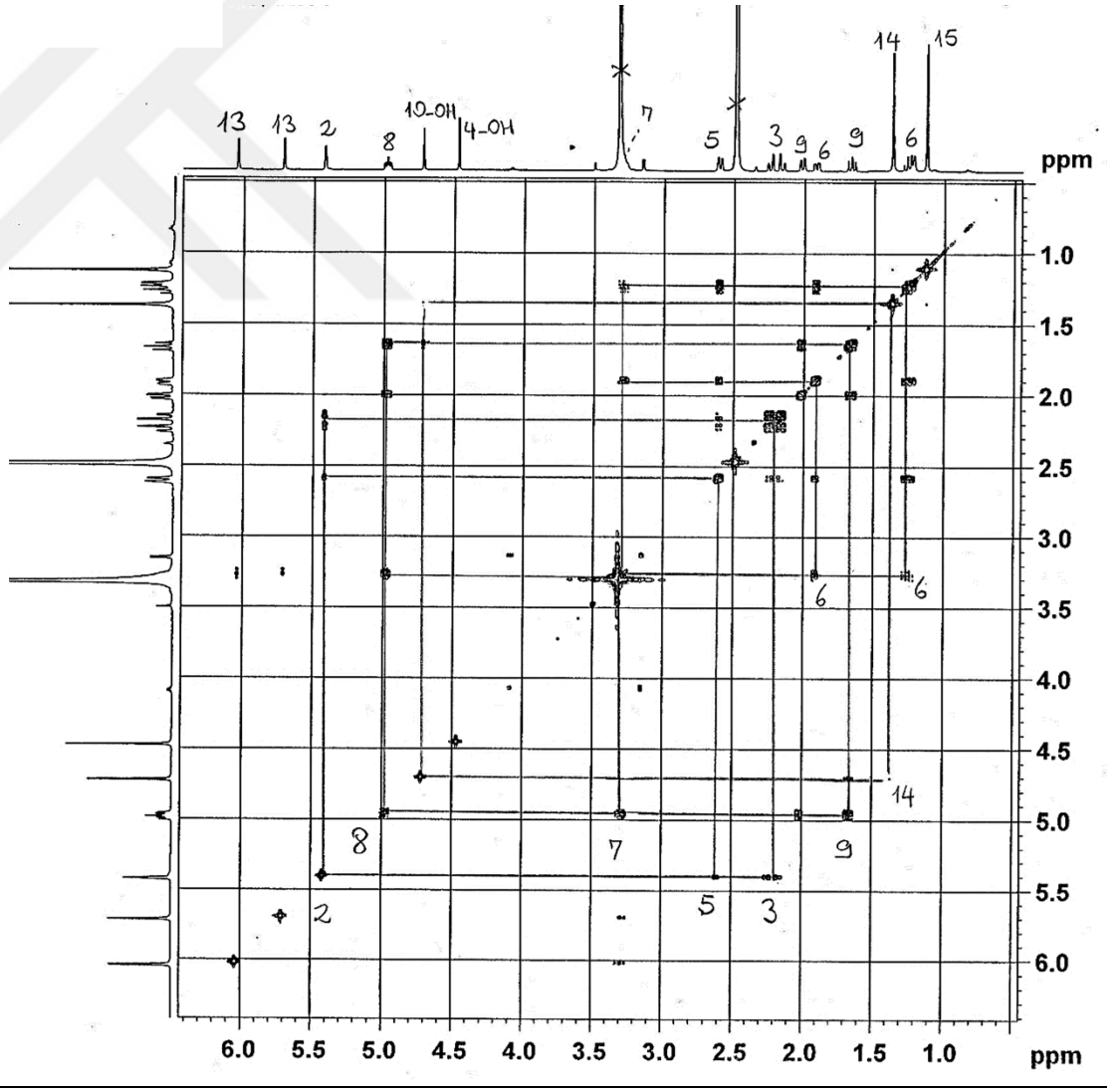


Şekil 4.8a. (4*α*,5*α*,8*β*,10*α*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (**CM-8**)'in ^{1}H NMR spektrumları (A, B: DMSO-d_6, 500 MHz; C: $CDCl_3$, 800 MHz)

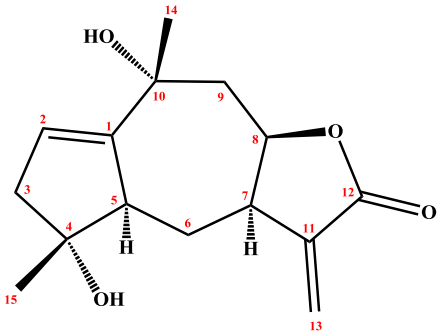


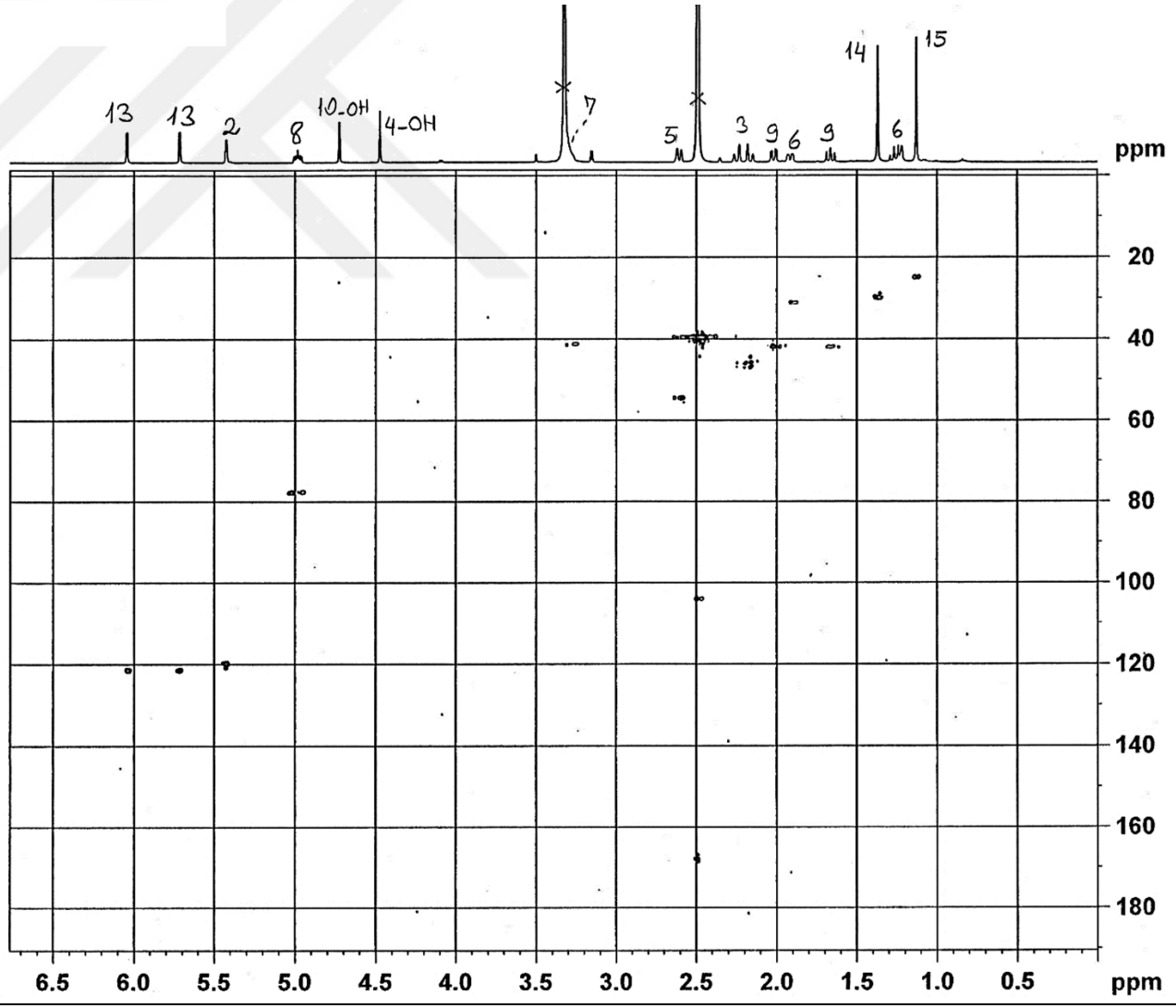
Şekil 4.8b. (4*α*,5*α*,8*β*,10*α*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (**CM-8**)'in ^{13}C NMR (A), DEPT 135 (B) ve DEPT 90 (C) spektrumları ($CDCl_3$, 200 MHz)



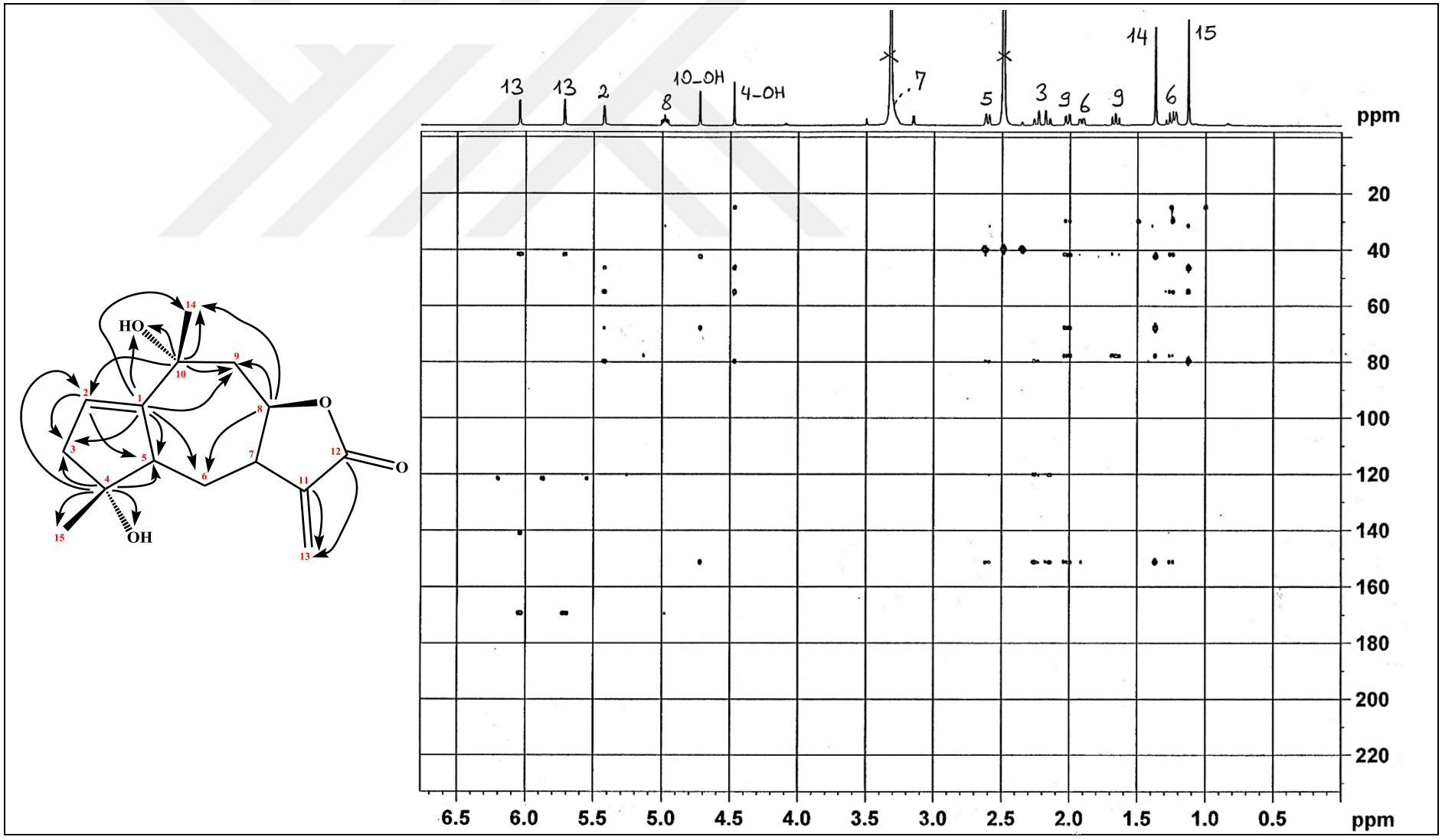


Şekil 4.8c. (4*α*,5*α*,8*β*,10*α*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (**CM-8**)'in COSY spektrumu (DMSO-d_6, 500 MHz)

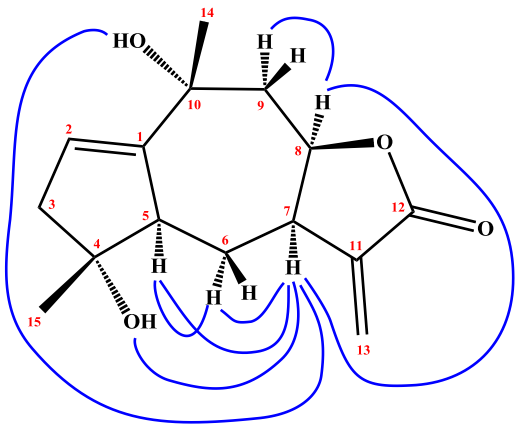


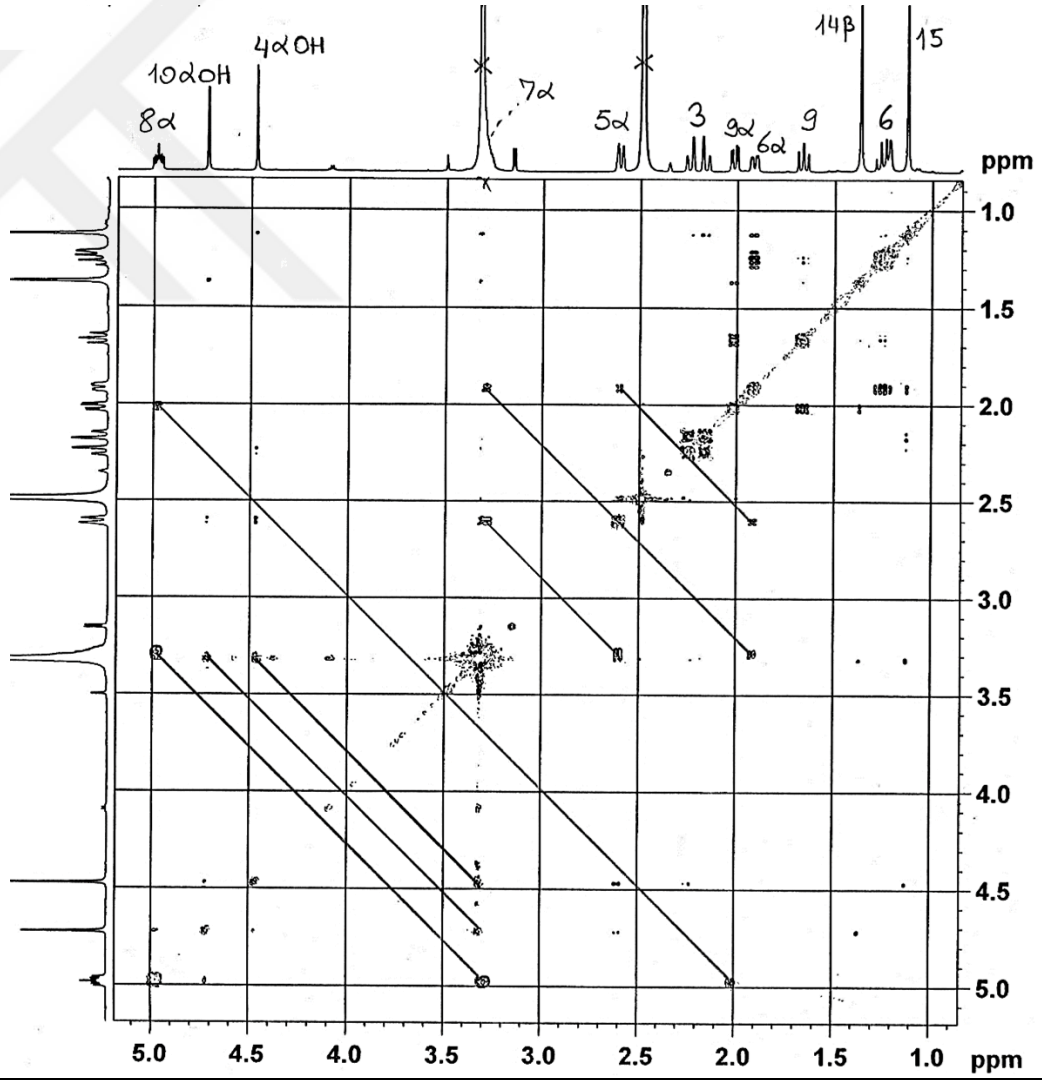


Şekil 4.8d. (4*α*,5*α*,8*β*,10*α*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (**CM-8**)'in HSQC spektrumu (DMSO-d_6)

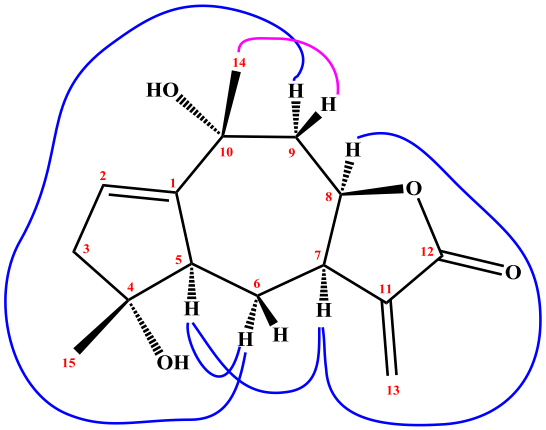


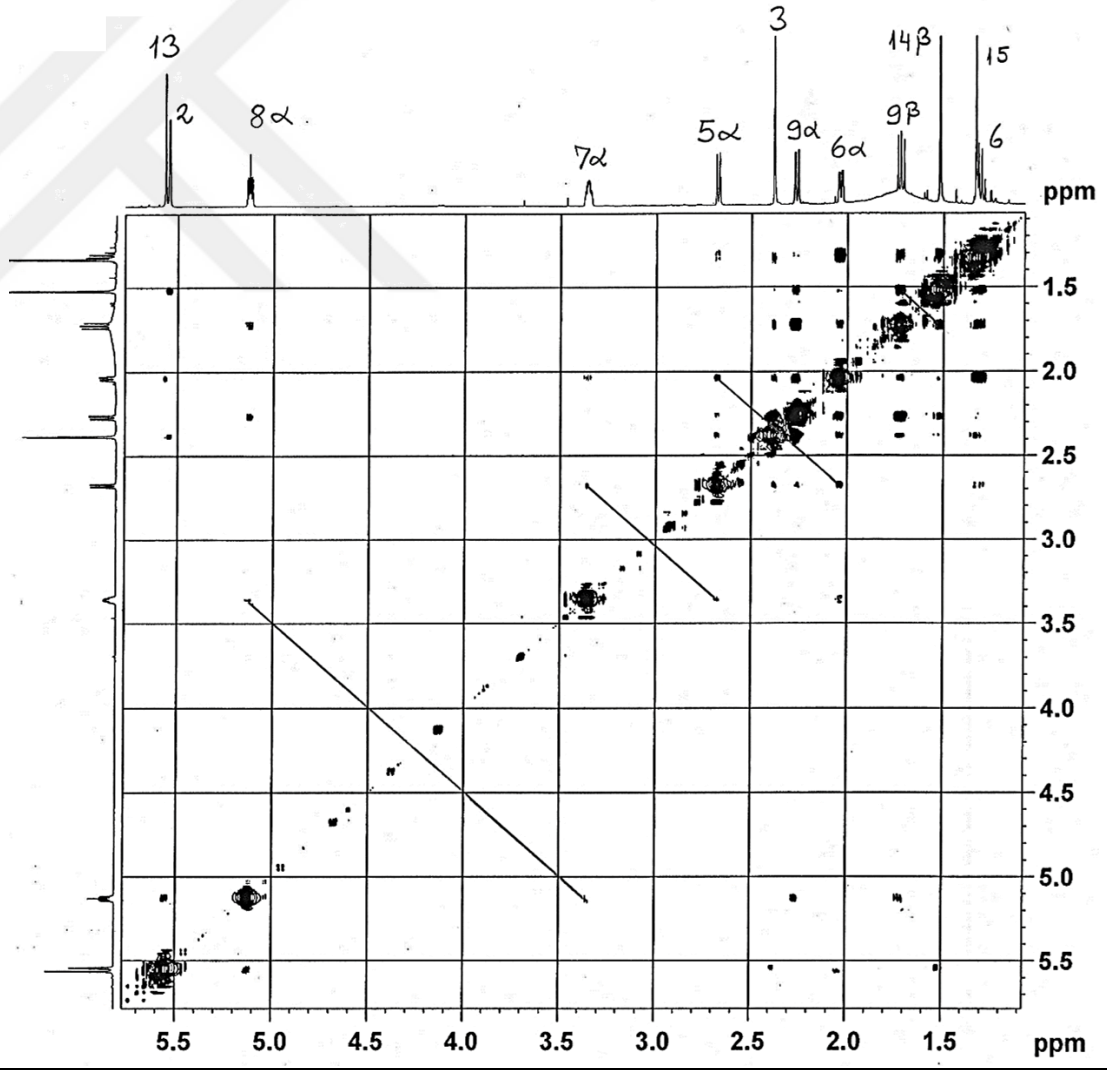
Şekil 4.8e. (4*α*,5*α*,8*β*,10*α*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (**CM-8**)'in HMBC spektrumu (DMSO-d_6)





Şekil 4.8f. (4*α*,5*α*,8*β*,10*α*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (**CM-8**)'in NOESY spektrumu (DMSO-d_6, 500 MHz)



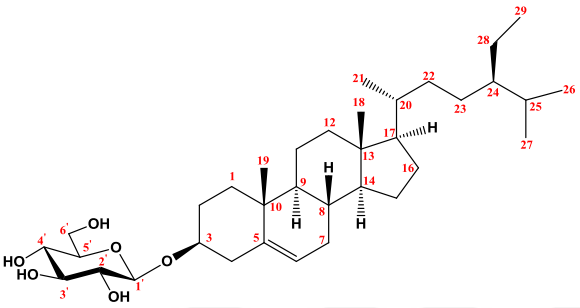


Şekil 4.8g. (4*α*,5*α*,8*β*,10*α*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid (**CM-8**)'in NOESY spektrumu ($CDCl_3$, 800 MHz)

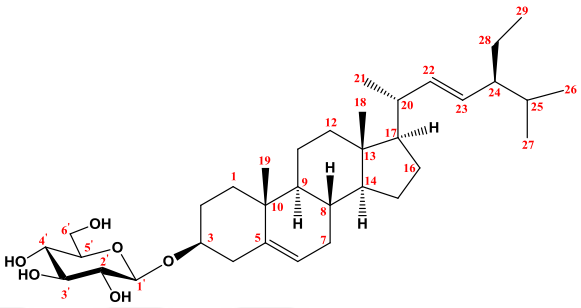
4.1.2. İzole edilen sterol gikozitinin yapı tayinine ait bulgular

CM-9: Daukosterol (*β*-sitosterol-3-O-*β*-D-glukopiranozit) (**CM-9a**) ve Stigmasterol 3-O-*β*-D-glukopiranozit (**CM-9b**) karışımı

CM-9 bileşiği (13.4 mg) kloroform ekstresinden beyaz renkte amorf bir toz halinde izole edilmiştir.



Daukosterol (CM-9a)



Stigmasterol 3-O-*β*-D-glukopiranozit (CM-9b)

CM-9a: $C_{35}H_{60}O_6$ (MA: 576)

CM-9b: $C_{35}H_{58}O_6$ (MA: 574)

UV (CH_3OH) λ_{max} nm: 208, 229 (omuz)

IR (KBr) υ_{max} cm^{-1}: 3412 (OH), 2934 (CH), 1068, 1024 (-C-O-C-)

^1H NMR ($CDCl_3$+ CD_3OD, 600 MHz) δ_H: Şekil 4.9a

^{13}C NMR ($CDCl_3$+ CD_3OD, 125 MHz) δ_C: Şekil 4.9b

DEPT 90 ($CDCl_3$+ CD_3OD, 125 MHz) δ_C: Şekil 4.9b

DEPT 135 ($CDCl_3$+ CD_3OD, 125 MHz) δ_C: Şekil 4.9b

COSY ($CDCl_3$+ CD_3OD, 600 MHz) δ_H: Şekil 4.9c

HSQC ($CDCl_3$+ CD_3OD): Şekil 4.9d

HMBC ($CDCl_3$+ CD_3OD): Şekil 4.9e

EI-MS m/z (relatif değer): **CM-9a:** 414.1 $[M\text{-glukoz+H}]^+$ (26.3), 396.2 $[414\text{-}H_2O]^+$ (100)

CM-9b: 412.2 $[M\text{-glukoz+H}]^+$ (25.5), 394.2 $[412\text{-}H_2O]^+$ (48.5)

HREI-MS *m/z* (molekül formül): **CM-9a:** 414.3871 ($C_{29}H_{50}O_1$, için hesaplanan, 414.3862), 396.3767 ($C_{29}H_{48}$ için hesaplanan, 396.3756)

CM-9b: 412.3719 ($C_{29}H_{48}O_1$, için hesaplanan, 412.3705), 394.3615 ($C_{29}H_{46}$ için hesaplanan, 394.3600)

CM-9'un UV spektrumu λ_{maks} 208 ve 229 (omuz) nm'de absorbsiyon bantları göstermiştir. IR spektrumunda ise, 3412 cm^{-1} de hidroksil grubuna ait bant, 2934, 2870 cm^{-1} de alifatik CH gerilim bantları, 1460 cm^{-1} de C=C gerilim bantı ile 1068, 1024 cm^{-1} de glikozidik yapıdan ileri gelen eter (-C-O-C-) absorbsiyon bantları gözlenmiştir. Bileşiğin İTK analizinde, UV 254 ve 366 nm'lerde herhangi bir leke gözlenmezken, % 1'lik vanilin-H_2SO_4 püskürttükten ve ardından 105 °C'de ısıtıldıktan sonra kırmızımsı renkte leke görülmüştür. Yapının monoglukozidik olmasına rağmen $CHCl_3$ fazından izole edilmiş olması, bileşiğin İTK'daki görünüşü ve çözünürlüğü, aglikonun apolar özellikte olduğunu düşündürmüştür.

Bileşiğin ^{1}H NMR spektrumunda (Çizelge 4.9, Şekil 4.9a) majör madde için karakteristik olarak δ_H 4.29 (*d*, *J*=7.8 Hz, H-1')'de gözlenen anomerik proton sinyali, monoglukozidik bir yapı olduğunu göstermiştir. Bu sinyalden hareketle ^{13}C NMR, DEPT ve COSY yardımıyla (Şekil 4.9b ve c), oza ait diğer sinyallerin yerleri (H-1′ - H_2-6′) tespit edilmiştir. HSQC (Şekil 4.9d) spektrumu ile bu sinyallere karşılık gelen δ_C 100.80 (C-1′), 73.26 (C-2′), 76.12 (C-3′), 69.77 (C-4′), 75.15 (C-5′) ve 61.50 (C-6′) karbon rezonansları yapıda β-glukozun var olduğunu göstermiştir. ^{1}H ve ^{13}C NMR (Şekil 4.9a ve b) spektrumlarında özellikle yüksek alanda gözlenen karakteristik sinyaller, steroidal veya triterpenik bileşik olduğunu düşündürmüştür. Ayrıca ^{13}C NMR spektrumunda belirgin olarak görülen 29 karbon rezonansı ile birlikte glukozdan ileri gelen 6 karbon, 35 karbonlu bir yapıya işaret etmiştir. DEPT 90 ve 135 spektrumları yardımıyla, aglikonun 6 adet metil, 11 adet metilen, 9 adet metin grubu ile 3 adet katerner karbon bulunan 29 karbonlu bir steroit iskeletine sahip olduğu bulunmuştur. δ_C 121.97 'de görülen olefinik metin karbon sinyali (C-6) ve δ_C 140.01'de görülen sp^2 katerner karbon sinyali (C-5) steroit iskeletinde bir çifte bağın varlığına işaret etmiştir. ^{1}H NMR spektrumunda, δ_H 5.25'de olefinik protona ait sinyalin (H-6) gözlenmesi yapıdaki çifte bağın diğer bir göstergesidir. Glukoz sinyalleri dışında

sterole ait δ_H 3.46 (*m*, H-3) ve δ_C 78.91 (C-3) sinyalleri, aglikonda oksijenli bir sübstitüentin varlığını göstermiştir.

^{1}H NMR spektrumunda, bunun dışında yüksek alanda görülen δ_H 0.57 (Me-18) ve 0.88 (Me-19)'de singlet sinyaller, δ_H 0.70 (Me-27, *J*=9 Hz), 0.72 (Me-26, *J*=9 Hz) ve 0.78 (Me-21, *J*=6.6 Hz)'de dublet sinyaller ile 0.73 (Me-29) sinyali bileşikte 6 adet metil grubunun varlığını göstermiştir. Aglikona ait sinyaller COSY, HSQC ve HMBC (Çizelge 4.9, Şekil 9c-e) ile değerlendirildiğinde, steroit iskeletinin birçok bitkide rastlanan "*β*-sitosterol" olduğu ortaya çıkmıştır. HMBC spektrumu yardımıyla (Şekil 4.9e), glukozun anomerik protonu (H-1') ile sitosterol'ün C-3 karbonu arasındaki uzak mesafeli etkileşim glukozun C-3 (OH) üzerinden bağlı olduğunu açıklamıştır. Minör bileşiğin (**CM-9b**) ise, majör bileşikten farklı olarak 22. ve 23. konumlarının doymamışlık içermesi nedeniyle, ^{1}H ve ^{13}C NMR spektrumunda ilave olefinik metin gruplarına ait proton ve karbon sinyalleri [δ_H 5.03 (*dd*, *J*=15.0; 9.0 Hz, H-22) ve 4.90 (*dd*, *J*=15.0; 9.0 Hz, H-23); δ_C 138.15 (C-22); 129.00 (C-23)] görülmüştür.

Bileşiğin EI-MS spektrumunda moleküler iyon piki gözlenmemiştir. Buna karşılık, m/z 414.1 / 412.2 ve 396.2 / 394.2 iyon çiftleri, sırasıyla, majör ve minör bileşiklere ait [M-glukoz+H]$^+$ ve [M-glukoz+H-H_2O]$^+$ moleküler fragmentlerine atfedilmiş ve her iki yapının monoglukozidik olduğu anlaşılmıştır. HREI-MS analizinde ise majör molekülün 414.3871 ve 396.3767 ($C_{29}H_{50}O_1$ ve $C_{29}H_{48}$) piklerine ait; minör molekülün 412.3719 ve 394.3615 ($C_{29}H_{48}O_1$ ve $C_{29}H_{46}$) piklerine ait kapalı moleküler formülleri tespit edilmiştir. Bu bulgular, ^{1}H ve ^{13}C NMR spektroskopik bulguları ile birlikte değerlendirildiğinde (Çizelge 4.9, Şekil 4.9a-e), bileşiğin moleküler formülü $C_{35}H_{60}O_6$ ve $C_{35}H_{58}O_6$ olan iki bileşiğin 1:0.5 oranında, karışım halinde olduğu bulunmuştur.

Bu bulgular ışığında, **CM-9**'un majör bileşiğinin yapısı "***β*-sitosterol-3-O-*β*-D-glukopiranozit"** minör bileşiğinin yapısı **"stigmasterol 3-O-*β*-D-glukopiranozit"** olarak (1:0.5 oranında) aydınlatılmıştır. Sonuçlar, literatürde yer alan *β*-sitosterol glukoziti "daukosterol" (Manayi ve diğerleri 2013; Rashed ve diğerleri 2014) ve stigmasterol 3-O-*β*-D-glukopiranozit'e (Kojima ve diğerleri 1990; Ridhay, Noor, Soekamto, Harlim ve van Altena, 2012) ait spektral değerler ile uyumlu bulunmuştur. *β*-sitosterol-3-O-*β*-D-glukopiranozit ve stigmasterol 3-O-*β*-D-glukopiranozit *C. montanum* bitkisinden ilk kez izole edilmiştir.

Çizelge 4.9. *β*-sitosterol-3-O-*β*-D-glukopiranozit) (**CM-9a**) ve Stigmasterol 3-O-*β*-D-glukopiranozit (**CM-9b**) karışımının (**CM-9**) ^{1}H ve ^{13}C NMR spektroskopik değerleri ($CDCl_3$+ CD_3OD: δ_H 600 MHz, δ_C 125 MHz)* ve HMBC korelasyonları

Sitosterol-3-*O*-*β*-D-glukopiranozit (Daukosterol) (CM-9a)					**Stigmasterol 3-*O*-*β*-D-glukopiranozit# (CM-9b)**		
Konum	**C/H**	**δ_C ppm**	**δ_H ppm, *J* (Hz)**	**HMBC (C→H)**	**C/H**	**δ_C ppm**	**δ_H ppm, *J* (Hz)**
1	CH_2	36.99	1.74†/0.94†		CH_2		
2	CH_2	31.67	1.85†/1.32†		CH_2		
3	CH	78.91	3.46 m	H-1'	CH		
4	CH_2	38.41	2.28 dd (13.2/2.4) 2.15 dd (13.2/11.4)		CH_2		
5	C	140.01	-	Me-19	C		
6	CH	121.97	5.25 brd		CH		
7	CH_2	29.33	1.78†/1.48†		CH_2		
8	CH	31.60	1.85†		CH		
9	CH	49.89	0.79†	Me-19	CH		
10	C	36.46	-	Me-19, Me-21	C		
11	CH_2	20.80	1.36†		CH_2		
12	CH_2	39.48	1.87†/1.05†		CH_2		
13	C	42.06	-		C		
14	CH	56.48	0.88†		CH	56.50	
15	CH_2	24.05	1.45†/0.96†		CH_2		
16	CH_2	28.02	1.73†/1.14†		CH_2		
17	CH	55.76	1.0†	Me-18, Me-21	CH	55.70	
18	CH_3	11.58	0.57 s		CH_3	11.77	
19	CH_3	18.70	0.88 s		CH_3		
20	CH	35.91	1.22†	Me-21	CH		
21	CH_3	18.49	0.78 d (6.6)		CH_3		
22	CH_2	33.65	1.20†/0.88†		CH	138.15	5.03 dd (15.0/9.0)
23	CH_2	25.69	1.04†		CH	129.00	4.90 dd (15.0/9.0)

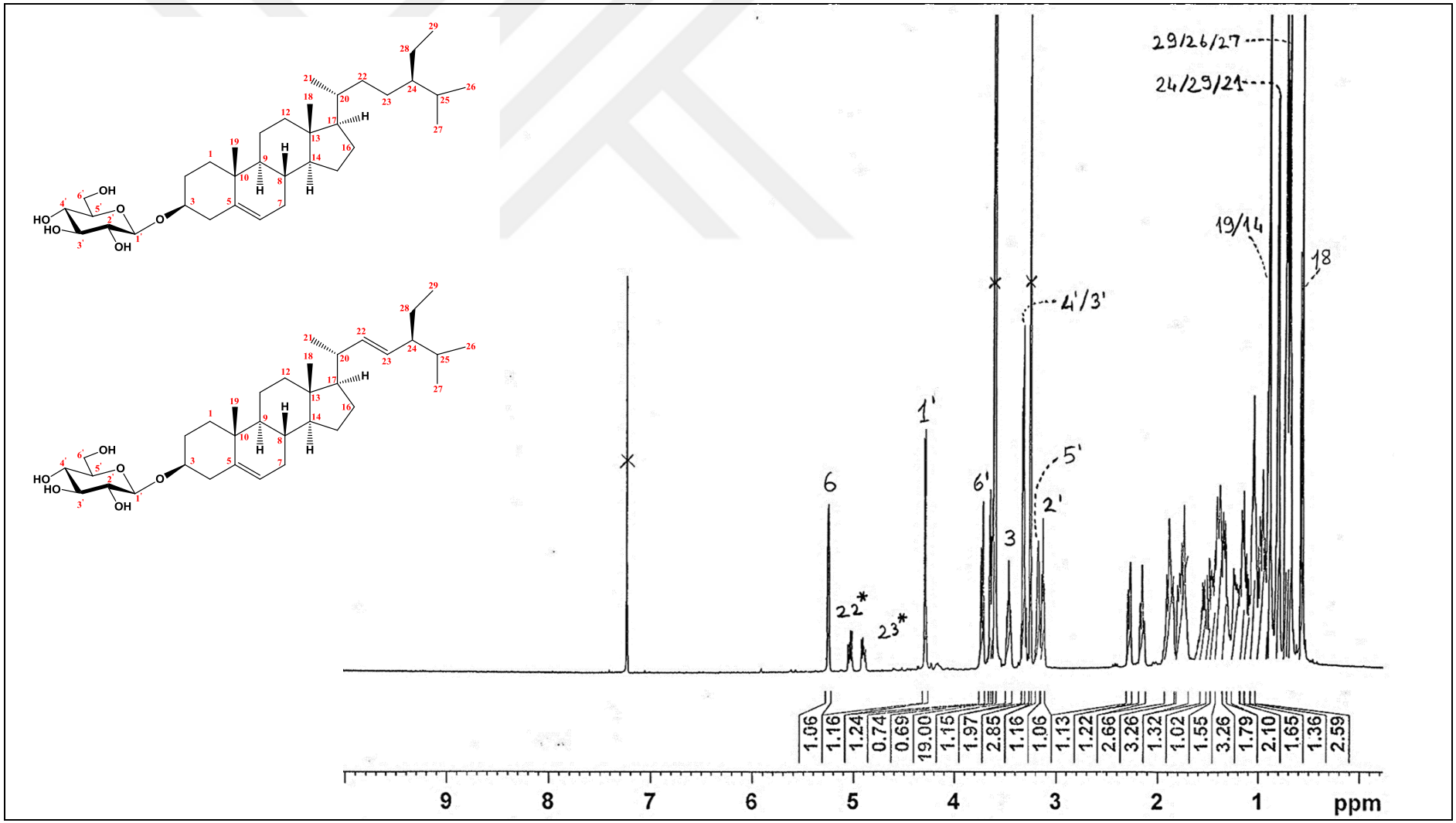
Çizelge 4.9. (devam) *β*-sitosterol-3-O-*β*-D-glukopiranozit) (**CM-9a**) ve Stigmasterol 3-O-*β*-D-glukopiranozit (**CM-9b**) karışımının (**CM-9**) ^{1}H ve ^{13}C NMR spektroskopik değerleri ($CDCl_3$+ CD_3OD: δ_H 600 MHz, δ_C 125 MHz)* ve HMBC korelasyonları

24	CH	45.55	0.80†		CH		
25	CH	28.81	1.13†	Me-26, Me-27	CH		
26	CH_3	19.54	0.72 d (9.0)		CH_3		
27	CH_3	19.06	0.70 d (9.0)		CH_3		
28	CH_2	22.77	1.14†		CH_2		
29	CH_3	11.67	0.73†		CH_3	11.99	
1'	CH	100.8	4.29 d (7.5)		CH	101.76	
2'	CH	73.26	3.12 dd (7.5/9.0)		CH		
3'	CH	76.12	3.32 dd "t" (9.0)		CH		
4'	CH	69.77	3.33 dd "t" (9.0)		CH		
5'	CH	75.15	3.17†		CH		
6'	CH_2	61.50	3.73 dd (12.0/3.0) 3.64 dd (12.0/4.8)		CH_2		

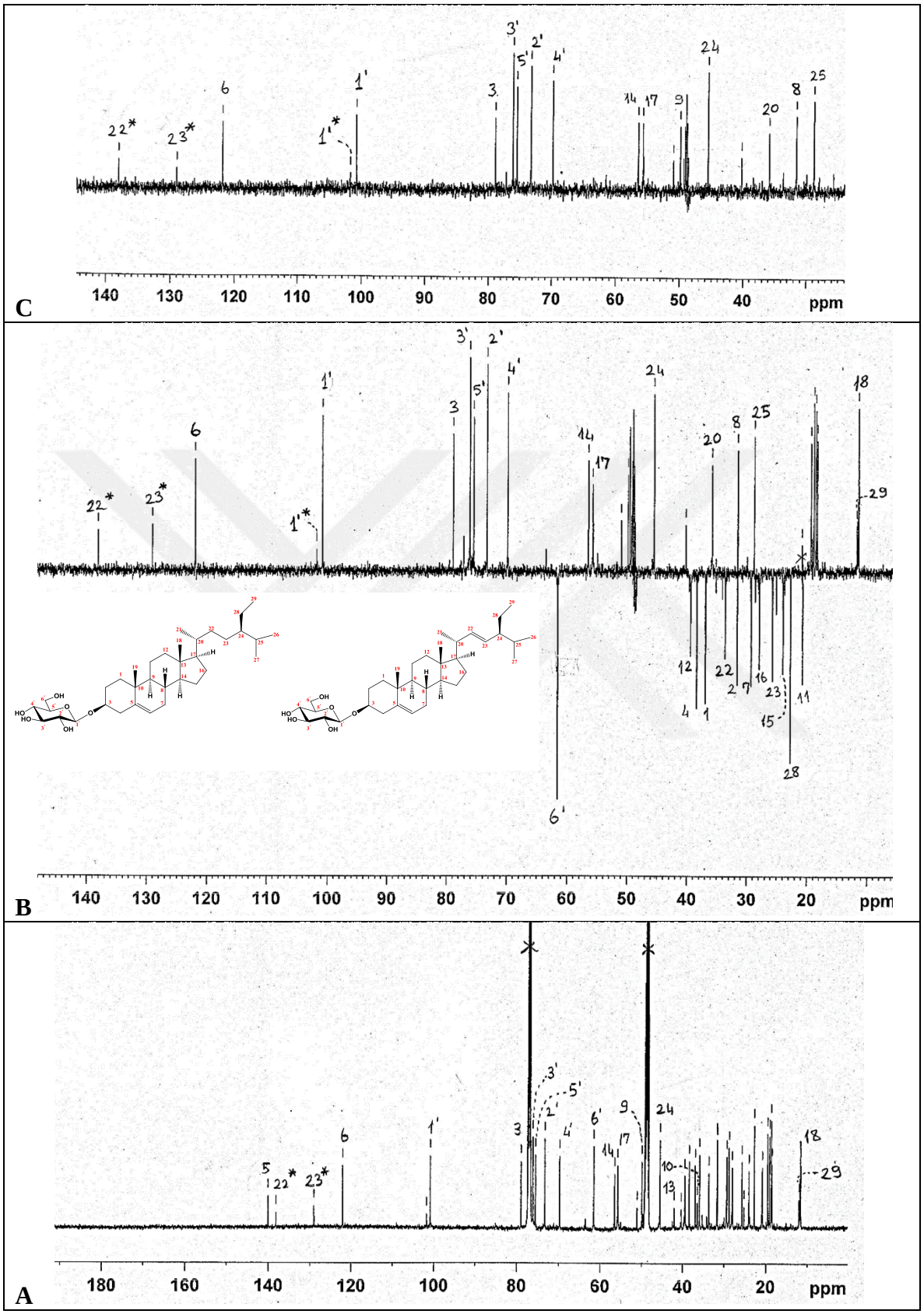
*C ve H kimyasal kayma değerleri, 2D NMR(COSY, HSQC ve HMBC) yardımıyla hesaplanmıştır.

[#] Minör madde olduğu için sadece farklılığa neden olan önemli sinyaller tabloda gösterilmiştir.

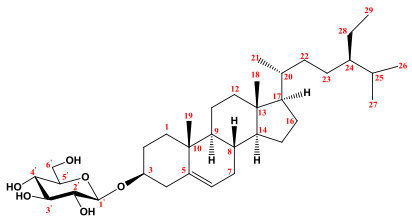
† Sinyal örtüştüğü için *J* değerleri ölçülemedi.

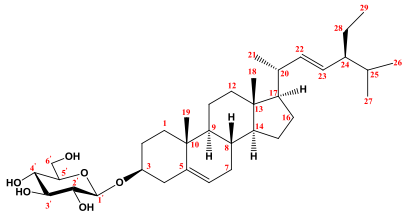


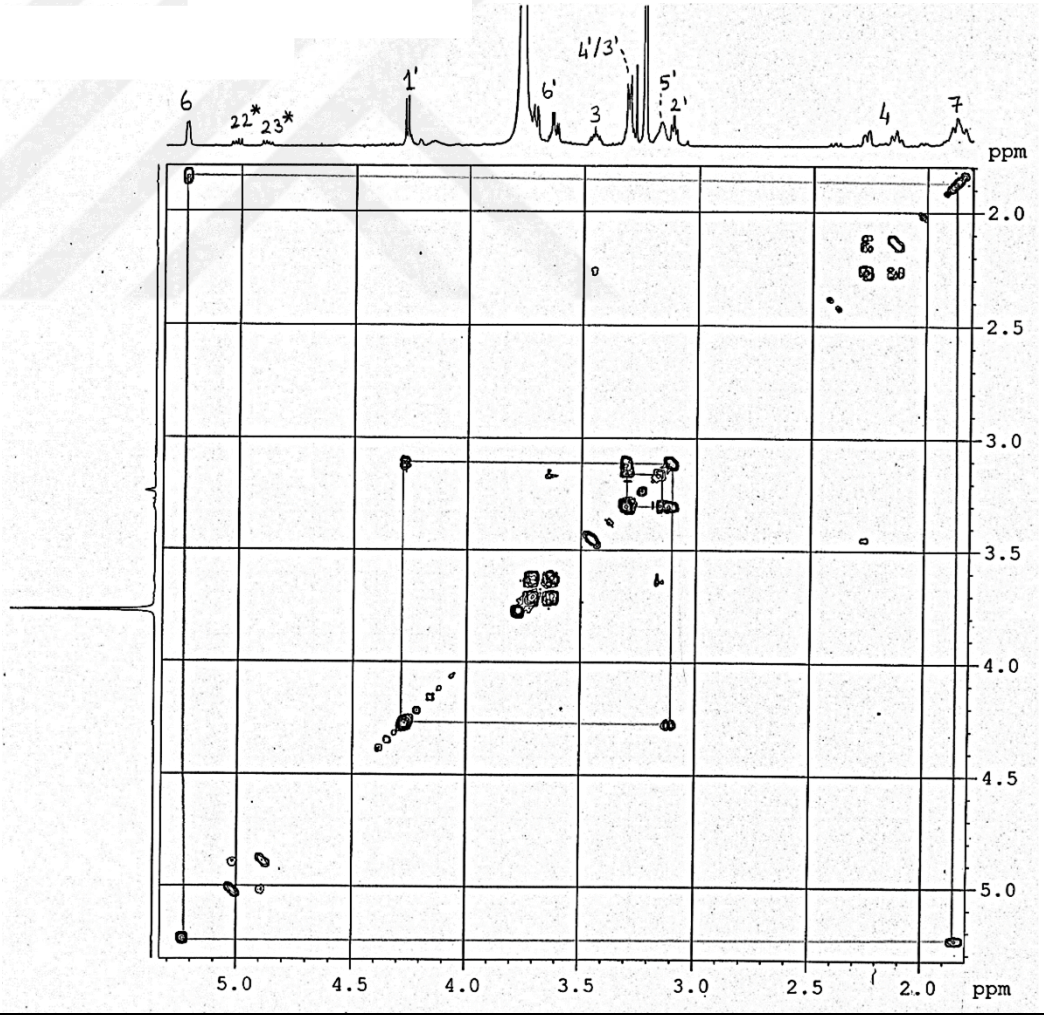
Şekil 4.9a. *β*-sitosterol-3-O-*β*-D-glukopiranozit (**CM-9a**) ve Stigmasterol 3-O-*β*-D-glukopiranozit (**CM-9b**) karışımının (**CM-9**) ^{1}H NMR spektrumu ($CDCl_3$+ CD_3OD, 600 MHz) (*: **CM-9b**'ye ait sinyaller)



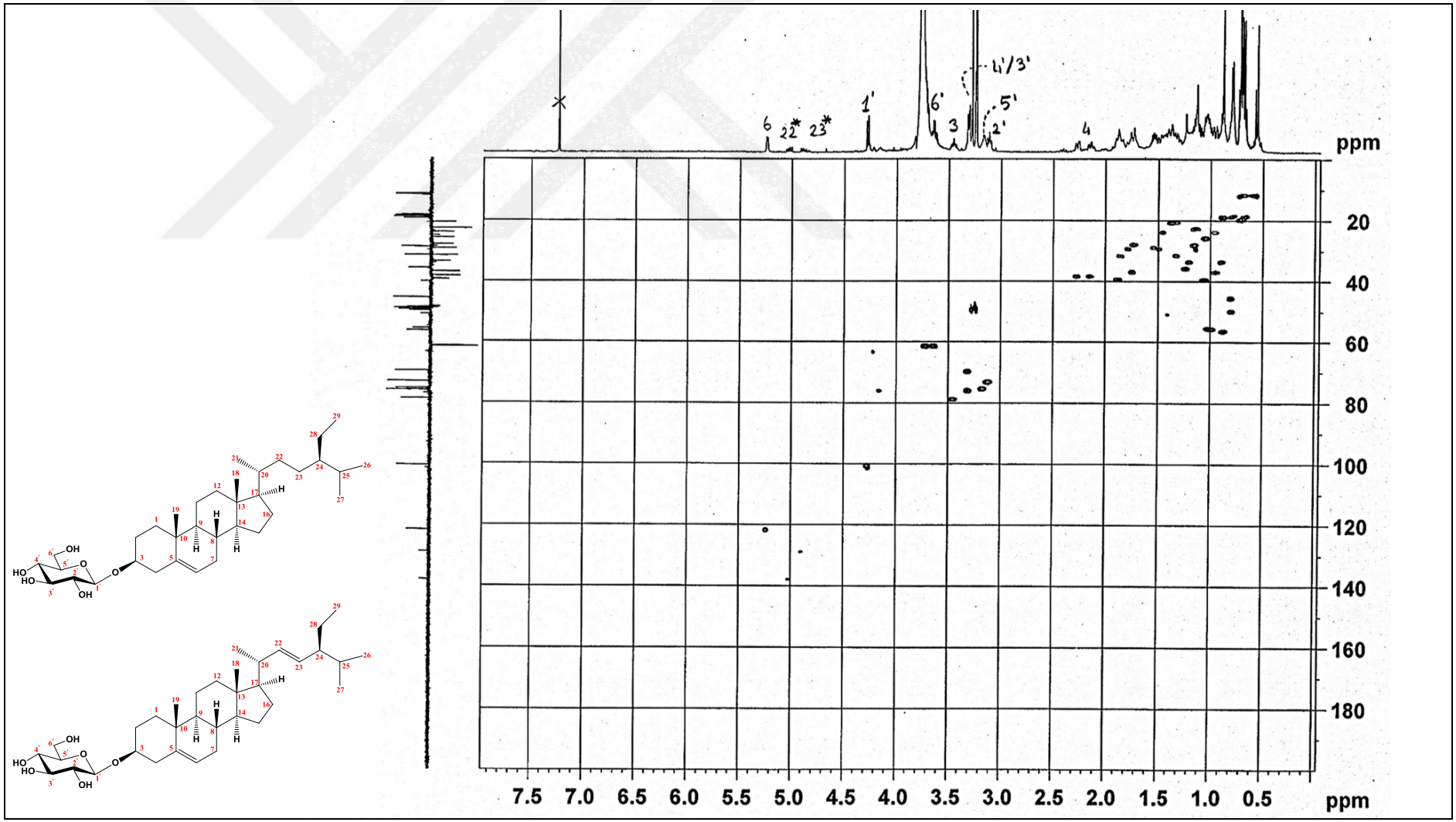
Şekil 4.9b. *β*-sitosterol-3-O-*β*-D-glukopiranozit (**CM-9a**) ve Stigmasterol 3-O-*β*-D-glukopiranozit (**CM-9b**) karışımının (**CM-9**) ^{13}C NMR (A), DEPT 135 (B) ve DEPT 90 (C) spektrumları ($CDCl_3$+ CD_3OD, 125 MHz) (*: **CM-9b**'ye ait sinyaller)



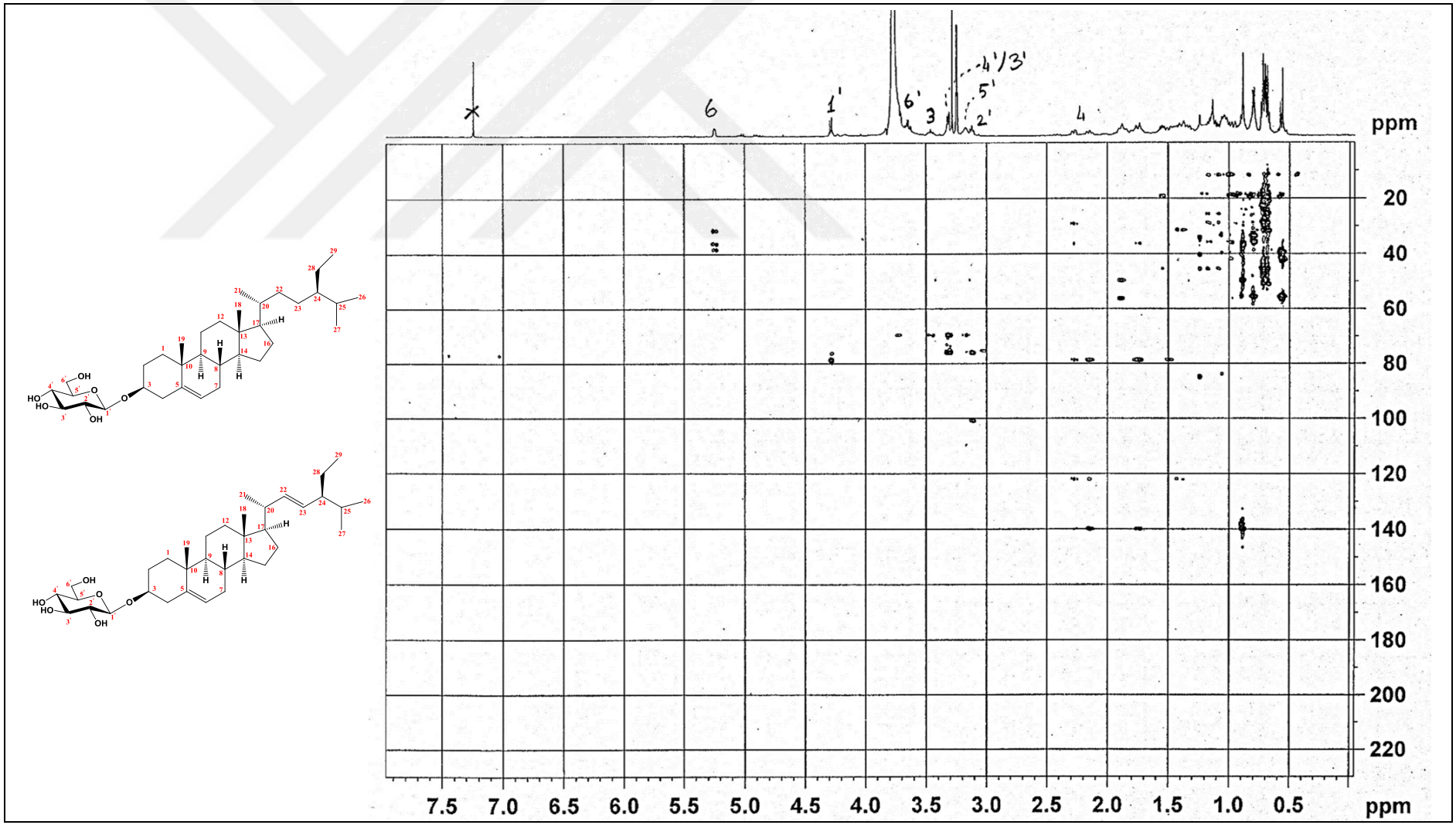




Şekil 4.9c. *β*-sitosterol-3-O-*β*-D-glukopiranozit (**CM-9a**) ve Stigmasterol 3-O-*β*-D-glukopiranozit (**CM-9b**) karışımının (**CM-9**) COSY spektrumu ($CDCl_3$+ CD_3OD, 600 MHz) (*: **CM-9b**'ye ait sinyaller)



Şekil 4.9d. *β*-sitosterol-3-O-*β*-D-glukopiranozit (**CM-9a**) ve Stigmasterol 3-O-*β*-D-glukopiranozit (**CM-9b**) karışımının (**CM-9**) HSQC spektrumu ($CDCl_3$+ CD_3OD) (*: **CM-9b**'ye ait sinyaller)

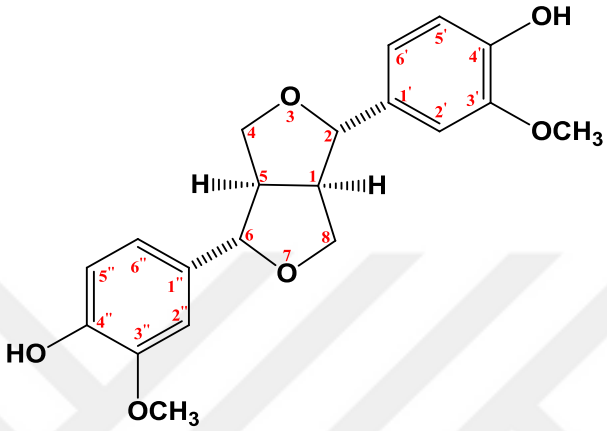


Şekil 4.9e. *β*-sitosterol-3-O-*β*-D-glukopiranozit (**CM-9a**) ve Stigmasterol 3-O-*β*-D-glukopiranozit (**CM-9b**) karışımının (**CM-9**) HMBC spektrumu ($CDCl_3$+ CD_3OD) (*: **CM-9b**'ye ait sinyaller)

4.1.3. İzole edilen lignanın yapı tayinine ait bulgular

CM-10: Pinorezinol

CM-10 bileşiği (2.1 mg) kloroform ekstresinden beyaz renkte amorf bir toz halinde izole edilmiştir.



Pinorezinol

CM-10: $C_{20}H_{22}O_6$ (MA: 358)

$[\alpha]_D^{28.3}$: - 12.7 (*c* 0.08, CH_3OH)

UV (MeOH) λ_{max} nm: 210, 230 ve 281

IR (KBr) υ_{max} cm^{-1}: 3451 (OH), 2924 (C-H), 1635 (C=C), 1277 (C-O)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 800 MHz) δ_H: Şekil 4.10a

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 200 MHz) δ_C: Şekil 4.10b

DEPT 90 ($CDCl_3$, 200 MHz) δ_C: Şekil 4.10b

DEPT 135 ($CDCl_3$, 200 MHz) δ_C: Şekil 4.10b

COSY ($CDCl_3$, 800 MHz) δ_H: Şekil 4.10c

HSQC ($CDCl_3$): Şekil 4.10d

HMBC ($CDCl_3$): Şekil 4.10e

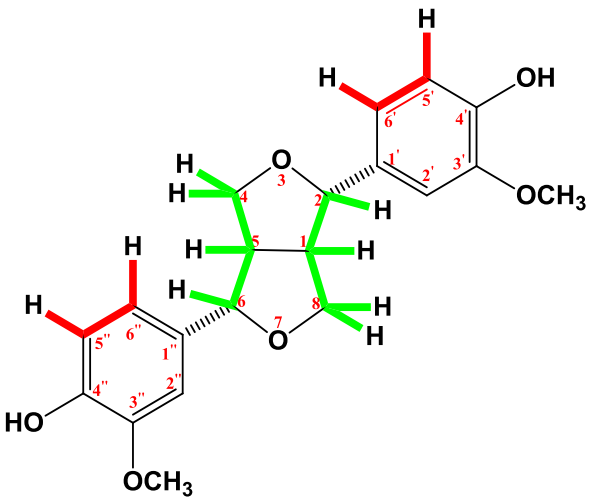
EI-MS m/z (relatif değer): 358.4 $[M]^+$ (19.5), 341.3 $[M\text{-}H_2O+H]^+$ (2.4), 151.1 (100), 137.2 (48.3)

HREI-MS *m/z* (molekül formülü): 358.1477 ($C_{20}H_{22}O_6$ için hesaplanan, 358.1416), 340.1324 ($C_{20}H_{20}O_5$ için hesaplanan, 340.1311)

CM-10 bileşiğinin UV spektrumu λ_{maks} 210, 230 ve 281 nm'de absorbsiyon bantları göstermiştir. IR spektrumunda ise, 3451 cm^{-1} de hidroksil grubuna ait bant, 2924 cm^{-1} de alifatik C-H gerilim bandı, 1635 cm^{-1} de C=C gerilim bandı ve 1277 cm^{-1} de ise C-O gerilim bandı gözlenmiştir.

Bileşiğin ^{1}H NMR spektrumunda (Çizelge 4.10, Şekil 4.10a), aromatik bölgede δ_H 6.88 (*d*, *J*=1.6 Hz), 6.87 (*d*, *J*=8.8 Hz) ve 6.80 (*dd*, *J*=8.8,1.6 Hz)'de ABX sinyal sistemi şeklinde gözlenen sinyal çiftleri yapıda 2 adet "1,3,4-trisübstitüe benzen" halkasına işaret etmiştir. Ayrıca, δ_H 4.71 (*d*, *J*=4.0 Hz)'de oksimetin sinyali, δ_H 4.23 (*dd*, *J*=8.8, 7.2 Hz) ve 3.85'te (*dd*, *J*=8.8, 3.2 Hz) oksijene komşu metilen sinyalleri ve δ_H 3.08'de (*m*) bir metin protonu aynı spin sistemi içinde gözlenmiştir. Ayrıca, δ_H 3.89'da görülen 2 singlet sinyali yapıda 2 metoksil grubunun varlığını düşündürmüştür. ^{13}C NMR, DEPT 90 ve DEPT 135 (Şekil 4.10b) spektrumlarının birlikte değerlendirilmesi bileşiğin simetrik yapıda bir lignan olabileceğine işaret etmiştir.

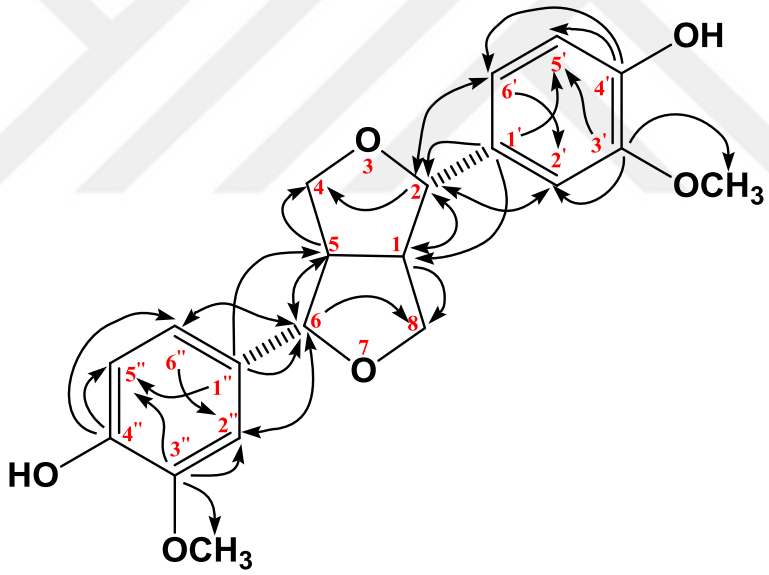
Bileşiğin COSY spektrumunda (Şekil 4.10c), δ_H 3.08 (H-5)/4.71 (H-6), H-5/4.23 (Ha-4) ve H-5/3.85 (Hb-4) arasında visinal etkileşimler görülmüştür. Ayrıca, aromatik bölgede δ_H 6.88 (H-5") ve 6.80 (H-6") arasında COSY korelasyonları belirlenmiştir. Bileşiğin simetrik yapısı nedeniyle, COSY etkileşimleri molekülün diğer yarısında da tespit edilmiştir (Şekil 4.10f).



Şekil 4.10f. Pinorezinol (**CM-10**)'de COSY korelasyonları

Bileşiğin HSQC spektrumunda (Şekil 4.10d), 1,3,4-trisübstitüe benzen halkasının 6.88 (H-2', 2"), 6.87 (H-5', 5") ve 6.80 (H-6', 6") ppm'de görülen üç adet aromatik metin protonlarının bağlı olduğu karbon rezonansları δ_C 108.5 (C-2', 2"), 114.2 (C-5', 5") ve 118.9 (C-6', 6")'de gözlenmiştir. δ_C 85.9'da görülen karbon sinyali oksimetin gruplarına (C-2,6) ve δ_C 55.9'da görülen karbon sinyali metoksil grubunun varlığına işaret etmiştir.

Bileşiğin HMBC spektrumunda (Şekil 4.10e), δ_C 85.9'daki karbon (C-2) rezonansının, H-1 ile; δ_C 71.6'daki karbon (C-8) rezonansının H-2 ile uzak mesafe etkileşimler gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca δ_C 132.9'daki karbon (C-1') sinyalinin H-2 ve H-1 ile; δ_C 108.5'daki karbon (C-2') ile 118.9'daki karbon (C-6') rezonanslarının H-2 ile HMBC korelasyonu göstermesi bileşiğin fenilpropan yapısında olduğunu göstermiştir. 146.6 ppm'deki karbon (C-3') rezonansının, OMe ile HMBC korelasyonu göstermesi, aromatik halkanın 3. konumunda metoksil sübstitüsyonu olduğuna işaret etmiştir (Şekil 4.10g).



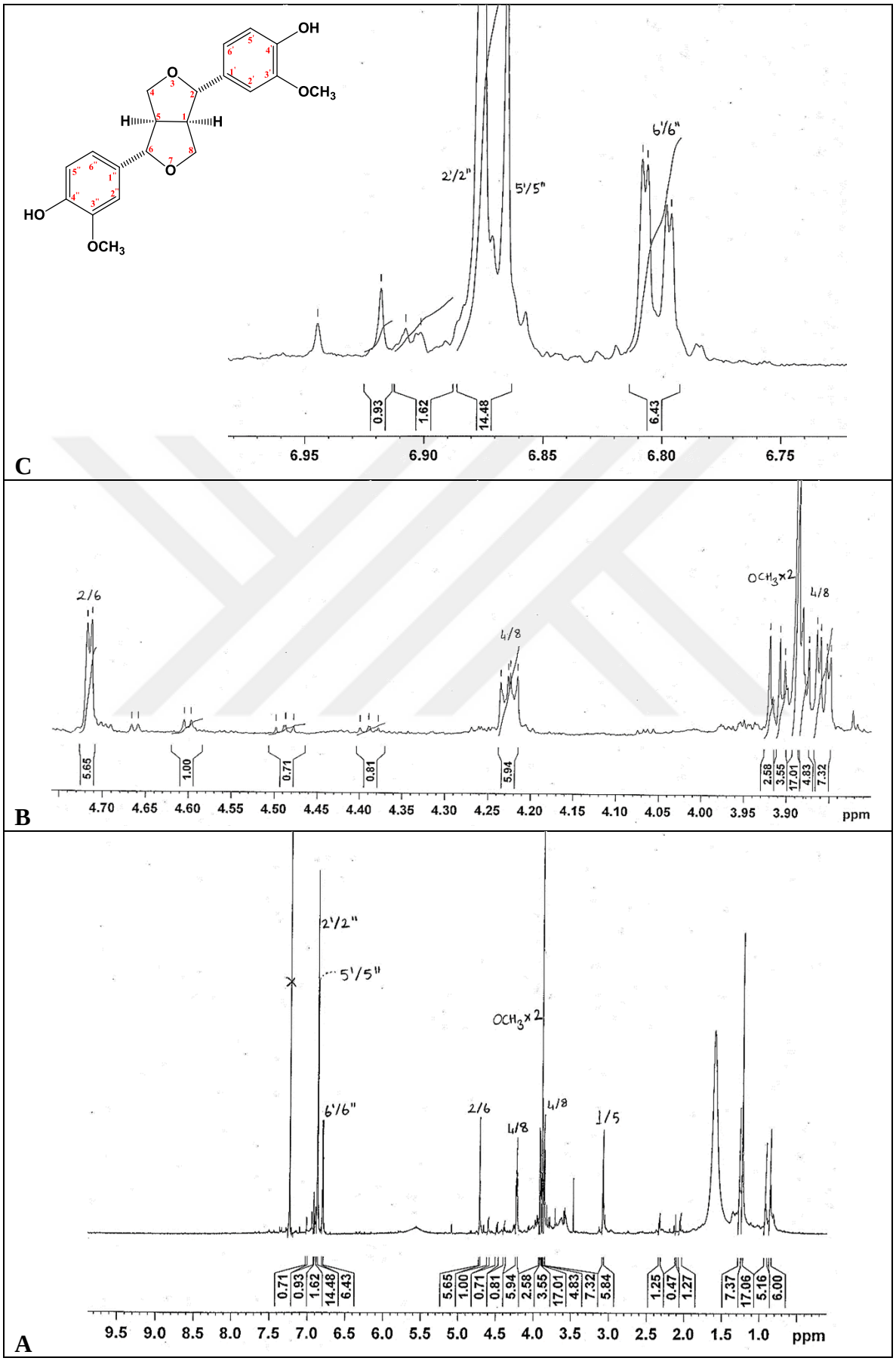
Şekil 4.10g. Pinorezinol (**CM-10**)'de uzak mesafe HMBC korelasyonları
(Oklar karbondan protona doğrudur.)

Bileşiğin EI-MS spektrumunda m/z 358.4 $[M]^+$ ve 341.3 $[M\text{-}H_2O+H]^+$ iyonlar; HREI-MS analizinde 358.1477 ve 340.1324 piklerine ait kapalı moleküler formüller (sırasıyla $C_{20}H_{22}O_6$ ve $C_{20}H_{20}O_5$) tespit edilmiştir. Bu bulgular, ^1H, ^{13}C ve 2D NMR spektroskopik bulguları (Çizelge 4.10, Şekil 4.10a-e) ile birlikte değerlendirildiğinde, bileşiğin moleküler formülü $C_{20}H_{22}O_6$ olan, "**dimerik bir fenilpropan**" olduğu belirlenmiştir. Spektral bulgulara dayanarak, **CM-10** bileşiğinin furanofuranoid tipinde lignan yapısında

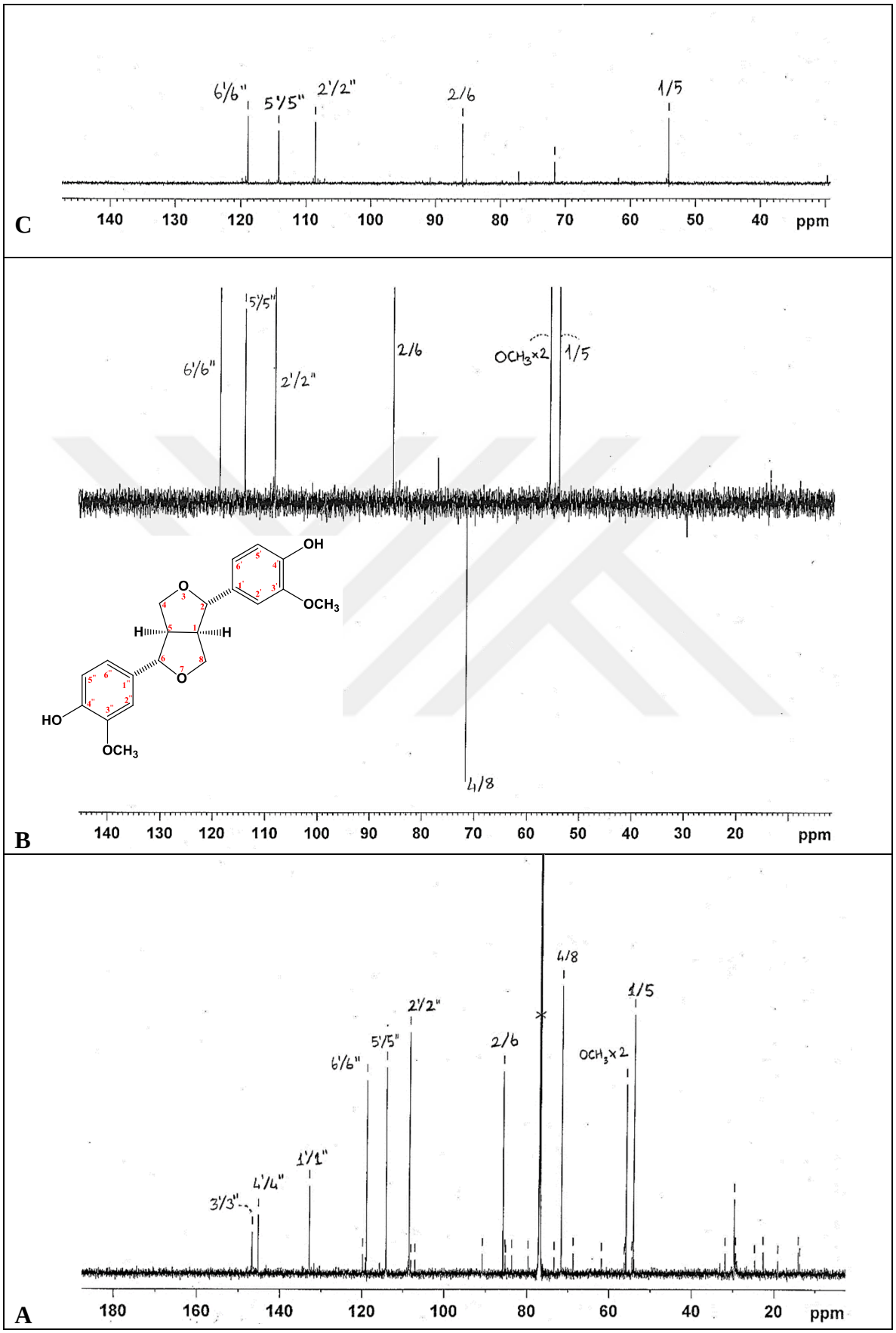
"**pinorezinol"** olduğu tespit edilmiştir. Pinorezinol'ün simetrik yapısı nedeniyle NMR değerleri monomerik bir fenilpropanoit izlenimi vermiştir. Bulgularımız literatürde pinorezinol için verilen değerlerle uyumlu bulunmuştur (Chi, Li, Yang ve Zhang, 2016; Diep ve diğerleri 2007). Pinorezinol, *C. montanum* bitkisiden ilk kez izole edilmiştir.

Çizelge 4.10. Pinorezinol (**CM-10**) bileşiğinin ^{1}H ve ^{13}C NMR spektroskopik değerleri ($CDCl_3$: δ_H 800 MHz, δ_C 200 MHz) ve HMBC korelasyonları

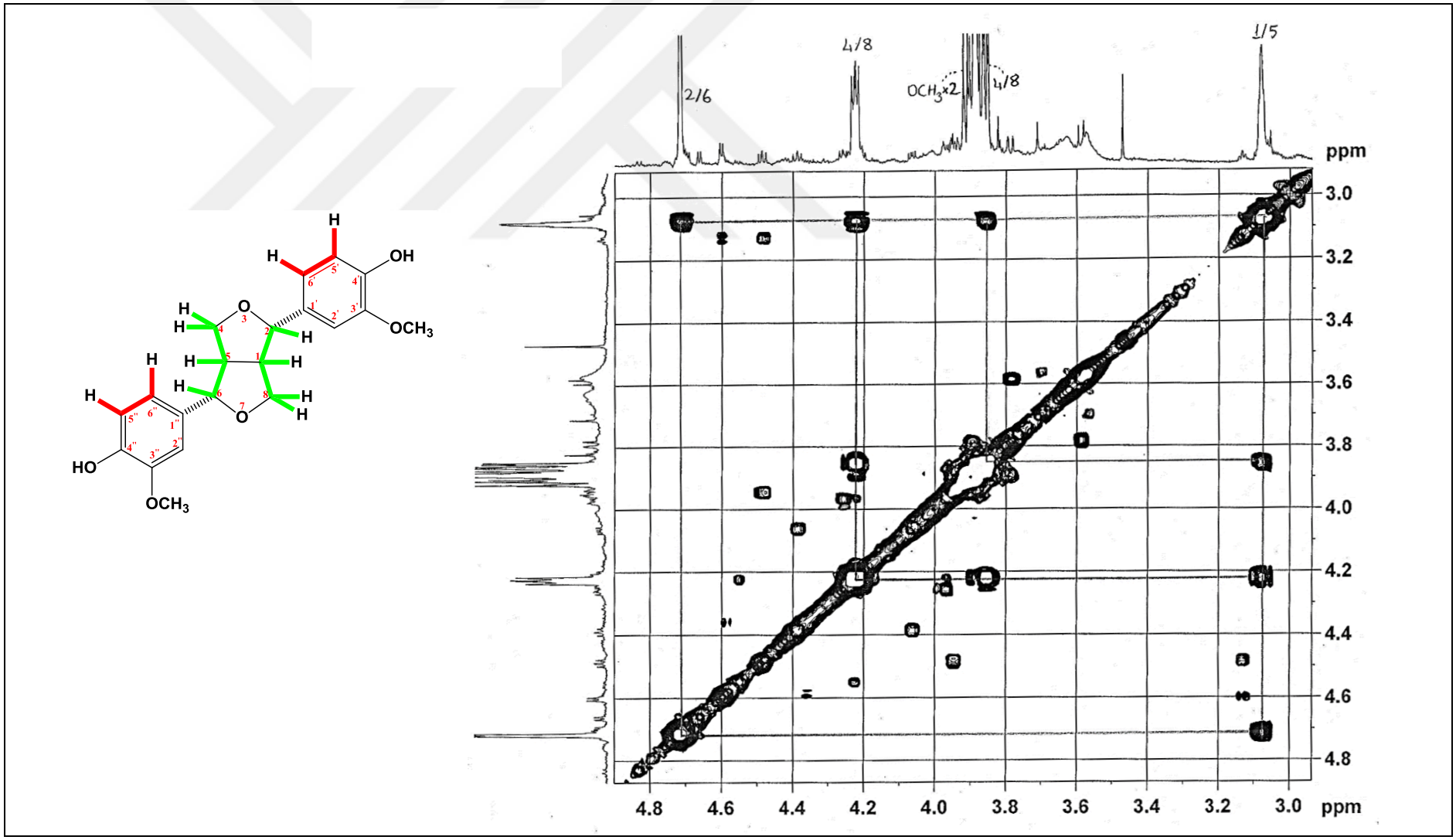
Konum	**C/H**	**δ_C ppm**	**δ_H ppm, *J* (Hz)**	**HMBC (C→H)**
1, 5	CH	54.1	3.08 m	H-2, H_2-8
2, 6	CH	85.9	4.71 d (4.0)	H-2', H-6', H-1, H_2-8
4, 8	CH_2	71.6	4.23 dd (8.8/7.2) 3.85 dd (8.8/3.2)	H-2
1', 1"	C	132.9	-	H-5', H-2, H-1
2', 2"	CH	108.5	6.88 d (1.6)	H-2
3', 3"	C	146.6	-	OMe, H-2', H-5'
4', 4"	C	145.2	-	H-5', H-6'
5', 5"	CH	114.2	6.87 d (8.8)	-
6', 6"	CH	118.9	6.80 dd (8.8/1.6)	H-2', H-2
OMe	CH_3	55.9	3.89 s	-
4', 4" (OH)	OH	-	5.50 brs	-



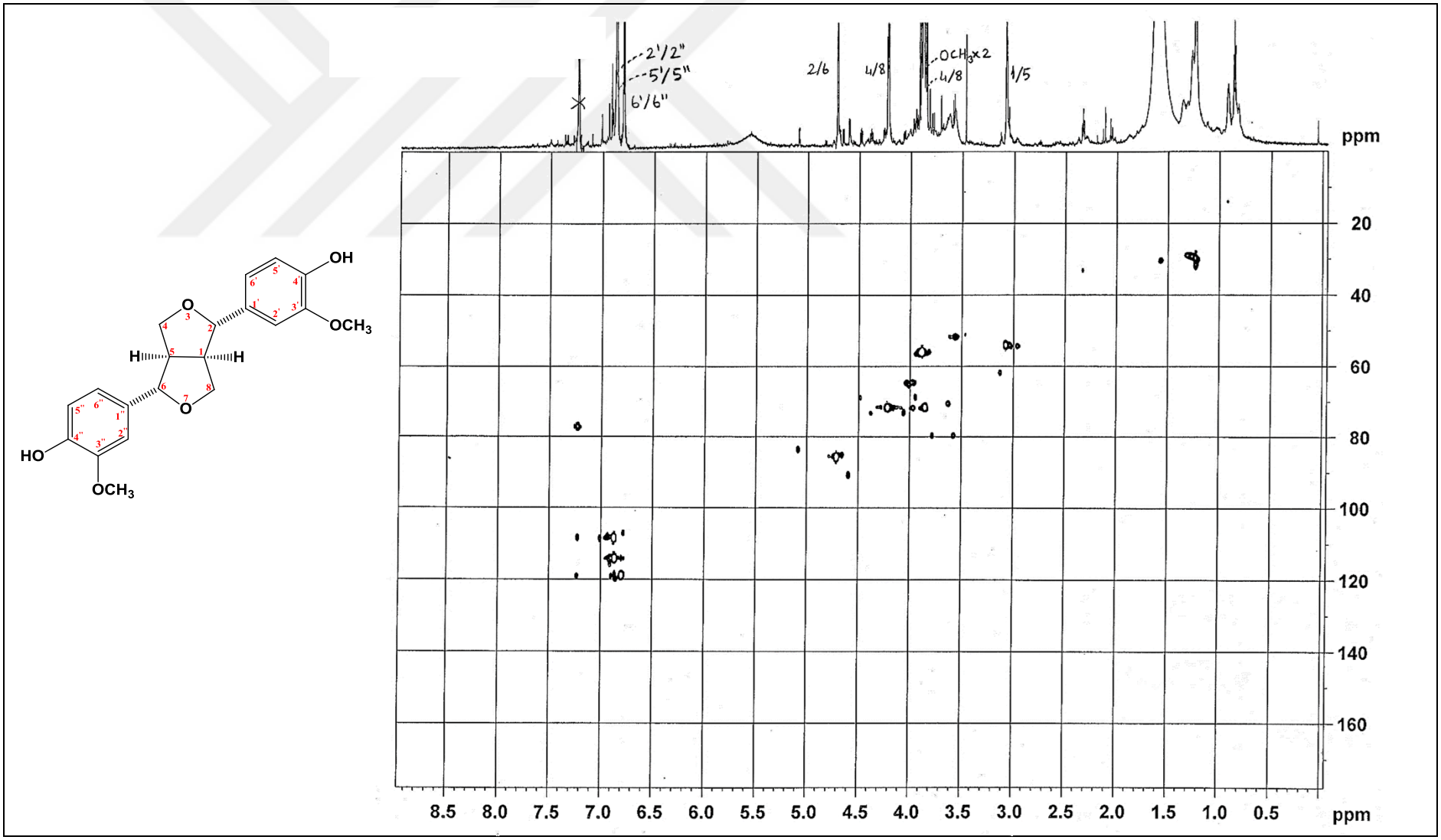
Şekil 4.10a. Pinorezinol (**CM-10**)'un ^{1}H NMR spektrumu ($CDCl_3$, 800 MHz)



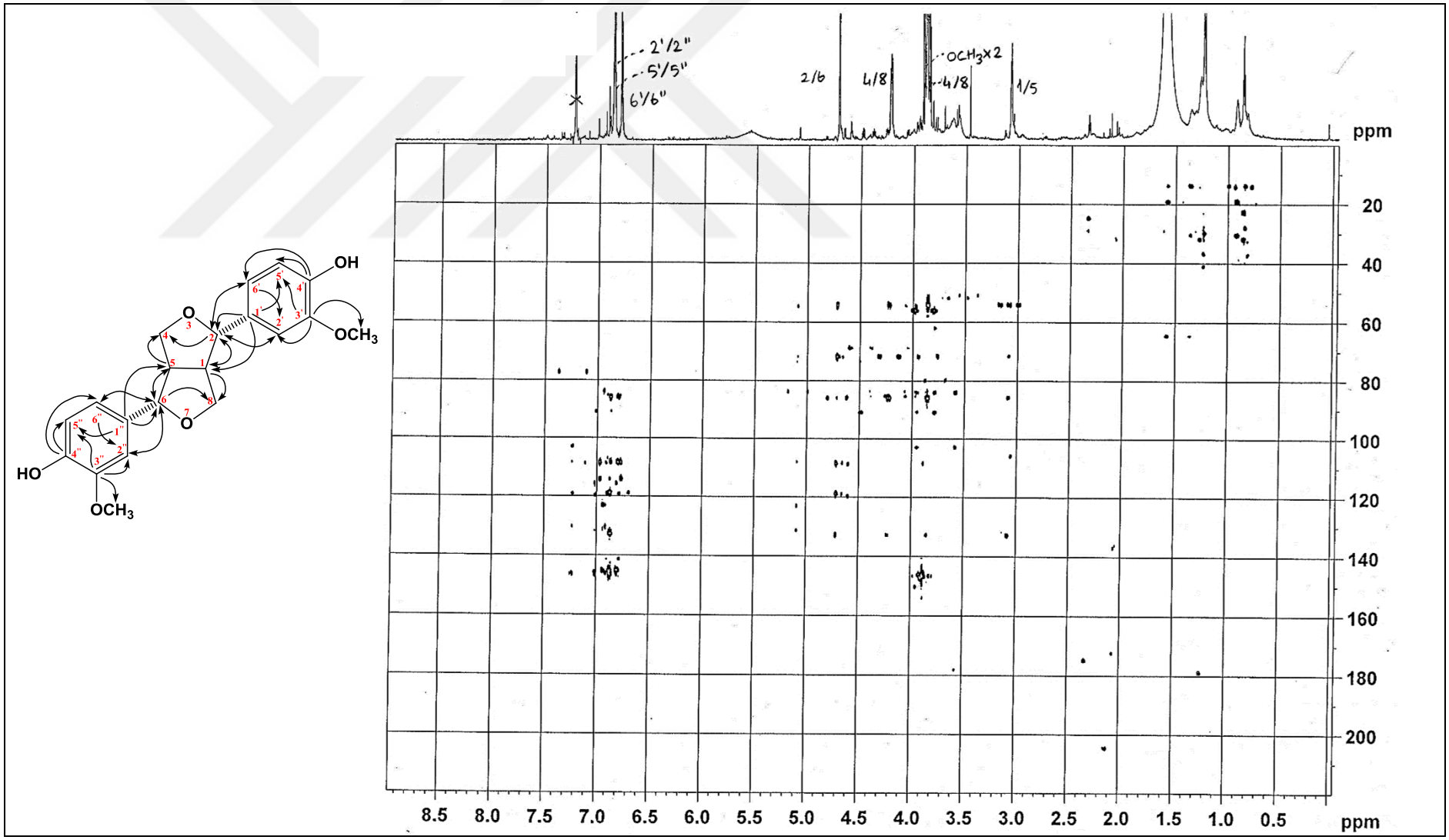
Şekil 4.10b. Pinorezinol (**CM-10**)'un ^{13}C NMR (A), DEPT 135 (B) ve DEPT 90 (C) spektrumları ($CDCl_3$, 200 MHz)



Şekil 4.10c. Pinorezinol (**CM-10**)'un COSY spektrumu ($CDCl_3$, 800 MHz)



Şekil 4.10d. Pinorezinol (**CM-10**)'un HSQC spektrumu ($CDCl_3$)

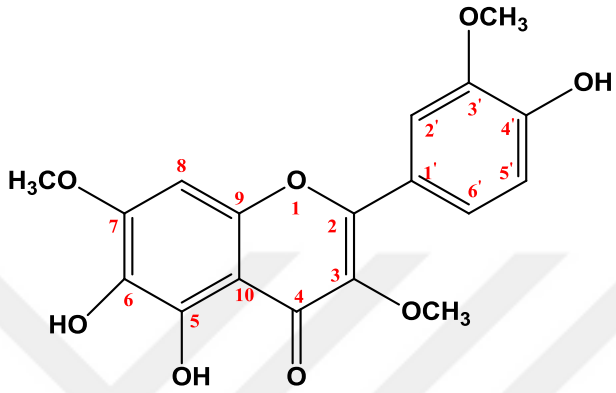


Şekil 4.10e. Pinorezinol (**CM-10**)'un HMBC spektrumu ($CDCl_3$)

4.1.4. İzole edilen flavonoitin yapı tayinine ait bulgular

CM-11: Krizosplenol C (5,6,4'-trihidroksi-3,7,3'-trimetoksi flavon)

CM-11 bileşiği (59.3 mg) kloroform ekstresinden sarı renkte amorf küçük kristaller halinde izole edilmiştir.



Krizosplenol C

CM-11: $C_{18}H_{16}O_8$ (MA: 360)

UV (MeOH) λ_{max} nm: 252, 282 ve 349

IR (KBr) υ_{max} cm^{-1}: 3399 (OH), 1663 γ-piron (C=O), 1595 aromatik (C=C), 1486 olefinik (C=C), 1276 (C-O-C)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ_H: Şekil 4.11a

APT ($CDCl_3$, 100 MHz) δc: Şekil 4.11b

COSY ($CDCl_3$, 600 MHz) δ_H: Şekil 4.11c

HSQC ($CDCl_3$): Şekil 4.11d

HMBC ($CDCl_3$): Şekil 4.11e

NOESY ($CDCl_3$, 600 MHz) δ_H: Şekil 4.11f

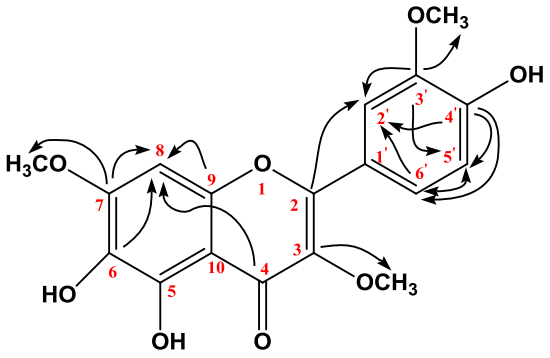
EI-MS m/z (relatif değer): 360.2 $[M]^+$ (60.6), 345.2 $[M\text{-}CH_3]^+$ (19.6), 317.2 $[345\text{-}CO]^+$ (21.3)

HREI-MS *m/z* (molekül formülü): 360.0848 ($C_{18}H_{16}O_8$ için hesaplanan, 360.0845), 345.0619 ($C_{17}H_{13}O_8$ için hesaplanan, 345.0610), 317.0581 ($C_{16}H_{13}O_7$ için hesaplanan, 317.0661)

CM-11 bileşiğinin UV spektrumunda λ_{maks} 252, 282 ve 349 nm'de gözlenen absorbsiyon bantları, bileşiğin flavon türevi olduğunu göstermiştir. IR spektrumunda ise, 3399 cm^{-1} de hidroksil grubuna ait bant, 1663 cm^{-1} de γ-piron (C=O) gerilim bandı, 1595 cm^{-1} de aromatik C=C gerilim bandı, 1486 cm^{-1} de olefinik C=C gerilim bandı, 1276 cm^{-1} de ise C-O-C gerilim bandı gözlenmiştir.

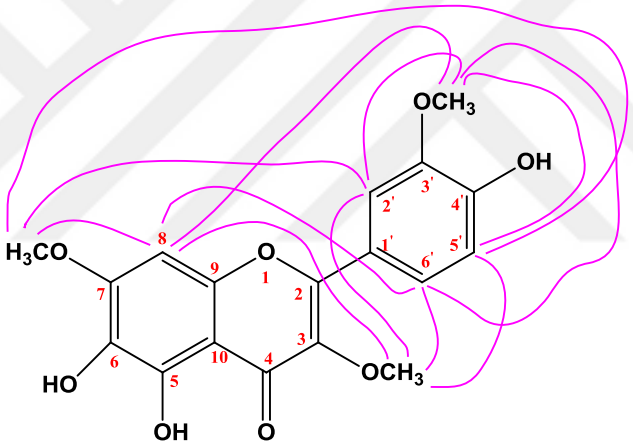
Bileşiğin ^{1}H NMR spektrumunda (Çizelge 4.11, Şekil 4.11a), aromatik bölgede δ_H 7.68 (*d*, *J*=2 Hz), 7.02 (*d*, *J*=8.4 Hz) ve 7.64 (*dd*, *J*=8.4/2.0 Hz)'de ABX sinyal sistemi şeklinde gözlenen karakteristik sinyaller 1,3,4-trisübstitüe benzen halkasına işaret etmiştir. Ayrıca ^{1}H NMR spektrumunda, δ_H 6.53 (*s*)'de bir metin grubuna ait proton sinyali görülmüş ve δ_H 3.85, 3.97 ve 3.98'deki 3H değerindeki karakteristik singlet sinyaller, bileşiğin 3 adet metoksil grubu taşıdığına işaret etmiştir. Bileşiğin APT ve HSQC (Şekil 4.11b ve d) spektrumları birlikte değerlendirildiğinde, molekülde 4 adet metin, 3 adet metil ve 11 adet katerner karbon olmak üzere 18 karbon rezonansı tespit edilmiştir. Bunlardan δ_C 56.15 ve 56.48'deki sinyallerin, en az bir serbest *orto* konumu olan aromatik metoksil grupları için karakteristik (55-57 ppm) ve δ_C 60.16'daki sinyalin ise C-3'de metoksil sübstitüsyonu taşıyan flavon türevleri için karakteristik olduğu görülmüştür (Agrawal, 1989). Kalan 15 karbon rezonansı 2,3-doymamış flavonoid çekirdeğinin karakteristik 90-200 ppm aralığında (Agrawal, 1989) tespit edilmiş: 6'sı oksijensiz aromatik karbon sinyallerine (δ_C 90.18, 106.38, 110.98, 114.58 122.60, ve 122.63), 8'i oksiaril karbon sinyallerine (δ_C 129.23, 138.70, 145.30, 146.36 148.33, 149.75, 152.88 ve 156.19) ve δ_C 178.73'deki sinyal 4-keto fonksiyonel grubuna ait bulunmuştur.

Bileşiğin COSY spektrumunda (Şekil 4.11c), δ_H 7.02 (C-5')/7.64 (C-6') arasında visinal etkileşim görülmüştür. HMBC spektrumunda (Şekil 4.11e), δ_C 138.70 ile δ_H 3.85'in; δ_C 146.36 ile δ_H 3.97'nin; δ_C 152.88 ile δ_H 3.98'in gösterdiği uzak mesafe etkileşimleri metoksil gruplarının sırasıyla C-3, C-3' ve C-7'ye bağlı olduklarını göstermiştir. Ayrıca HMBC yardımıyla, δ_C 178.73 (C-4), 152.88 (C-7), 149.75 (C-9), 129.23 (C-6) ve 106.38 (C-10) ile δ_H 6.53 (H-8) arasındaki uzak mesafe etkileşimleri, metin grubunun A halkasında olduğuna işaret etmiştir. Diğer anlamlı C-H uzak mesafe etkileşimleri (long-range korelasyonlar) Şekil 4.11'de gösterilmiştir.



Şekil 4.11g. Krizosplenol C (**CM-11**)'de uzak mesafe HMBC korelasyonları (*Oklar karbondan protona doğrudur*)

Bileşiğin NOESY spektrumunda (Şekil 4.11f) ise, H-2', H-5', H-6' ve H-8 protonlarının her birinin 7-OCH_3, 3'-OCH_3 ve 3-OCH_3 grupları ile NOESY korelasyonları gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.11h).

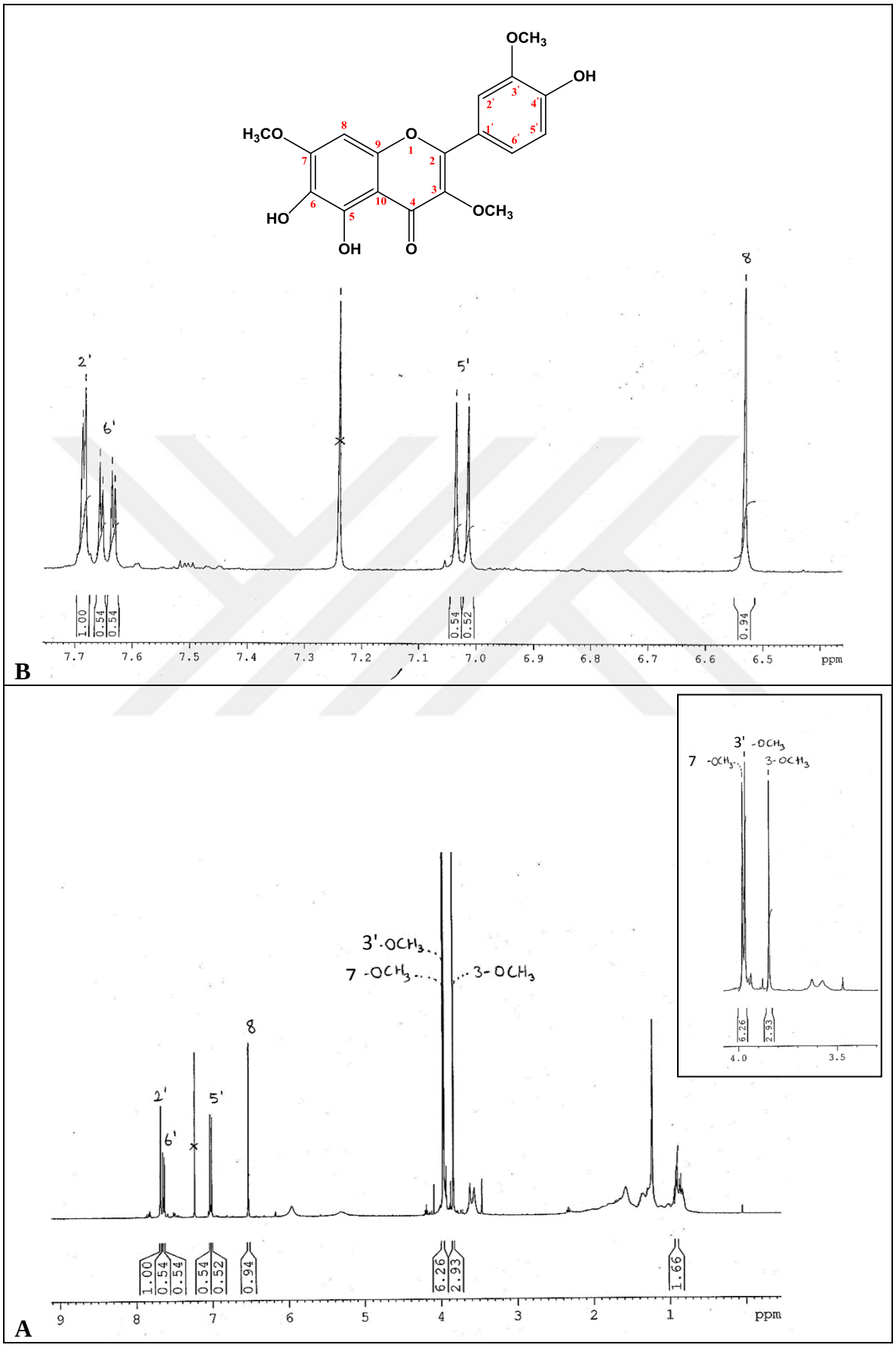


Şekil 4.11h. Krizosplenol C (**CM-11**)'de NOESY korelasyonları

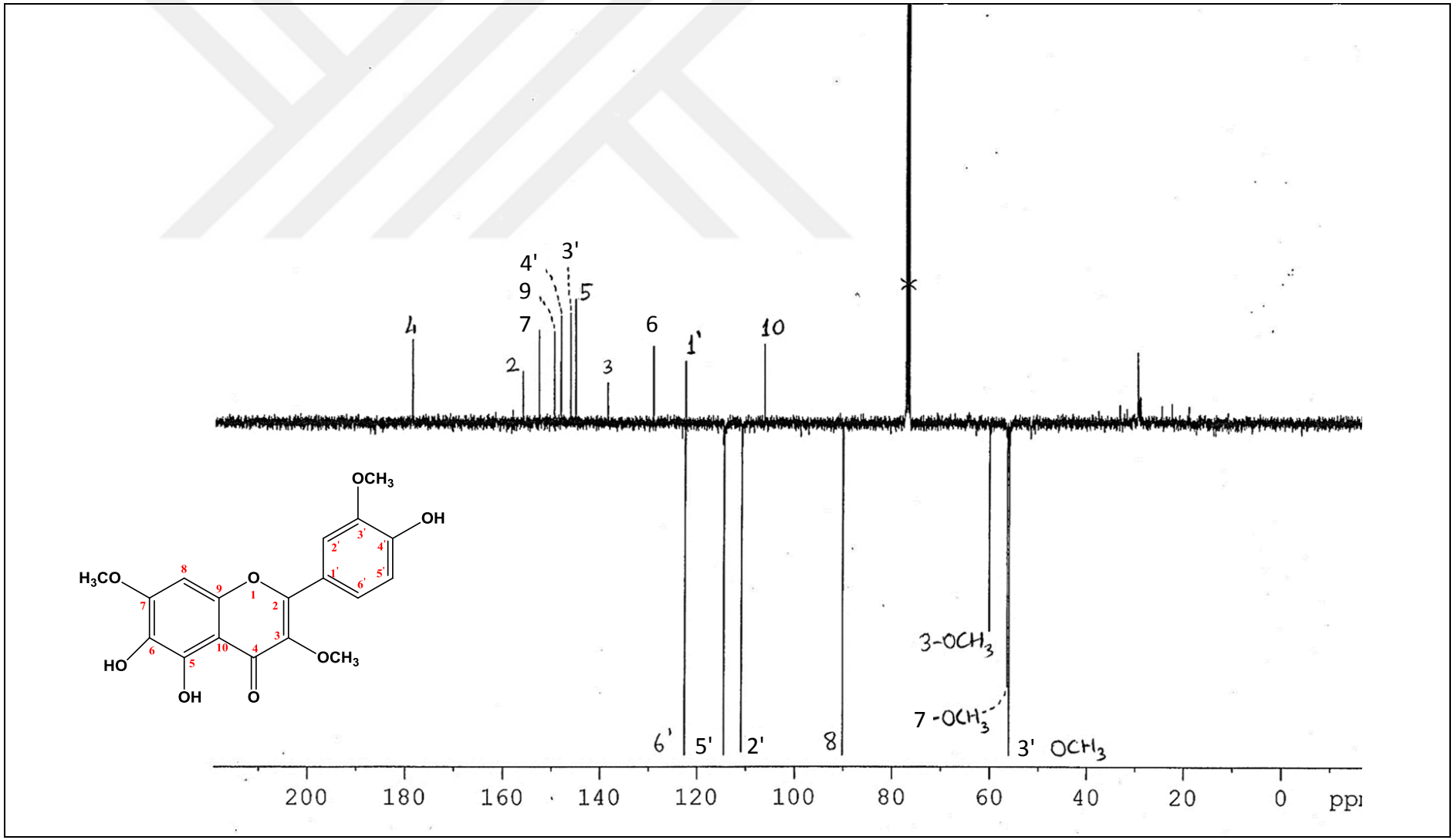
Bileşiğin EI-MS spektrumunda, m/z 360.2 $[M]^+$, 345.2 $[M\text{-}CH_3]^+$, 317.2 $[M\text{-}CH_3\text{-}CO]^+$ iyonlar; HREI-MS analizinde 360.0848, 345.0619 ve 317.0581 piklerine ait kapalı moleküler formüller (sırasıyla $C_{18}H_{16}O_8$, $C_{17}H_{13}O_8$ ve $C_{16}H_{13}O_7$) tespit edilmiştir. Bu bulgular, ^1H, APT ve 2D NMR spektroskopik bulguları (Çizelge 4.11, Şekil 10a-e) ile birlikte değerlendirildiğinde, bileşiğin moleküler formülü $C_{18}H_{16}O_8$ olan, **"Krizosplenol C" (5,6,4'-trihidroksi-3,7,3'-trimetoksi flavon)** olduğu belirlenmiştir. Spektral bulgularımız literatürde krizosplenol C için verilen değerlerle uyumlu bulunmuştur (Zheng ve diğerleri, 2015). Daha önce bazı Asteraceae bitkilerinden (*Pterocaulon sphacelatum* ve *Inula cappa*) izole edilmiş olan krizosplenol C (Semple, Nobbs, Pyke, Reynolds ve Flower, 1999; Zheng ve diğerleri, 2015), *C. montanum*'dan ilk kez elde edilmiştir.

Çizelge 4.11. Krizosplenol C (**CM-11**) bileşiğinin ^{1}H NMR ve APT spektroskopik değerleri ($CDCl_3$: δ_H 400 MHz, δ_C 100 MHz) ve HMBC korelasyonları

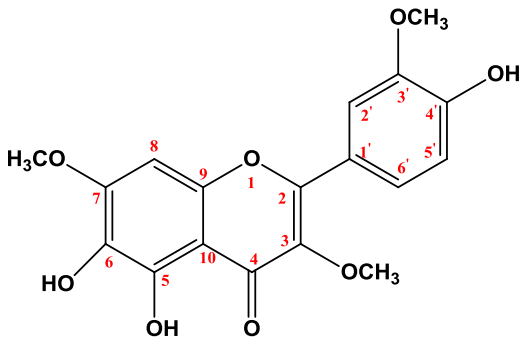
Konum	**C/H**	**δ_C ppm**	**δ_H ppm, *J* (Hz)**	**HMBC (C→H)**
2	C	156.19	-	H-2'
3	C	138.70	-	3-OCH_3
4	C	178.73	-	H-8
5	C	145.30	-	-
6	C	129.23	-	H-8
7	C	152.88	-	7-OCH_3, H-8
8	CH	90.18	6.53 s	-
9	C	149.75	-	H-8
10	C	106.38	-	H-8
1'	C	122.60	-	-
2'	CH	110.98	7.68 d (2.0)	-
3'	C	146.36	-	3'-OCH_3, H-5', H-2'
4'	C	148.33	-	H-5', H-2', H-6'
5'	CH	114.58	7.02 d (8.4)	H-6'
6'	CH	122.63	7.64 dd (8.4/2.0)	H-2', H-5'
3-OMe	CH_3	60.16	3.85 s	-
3'- OMe	CH_3	56.15	3.97 s	-
7-OMe	CH_3	56.48	3.98 s	-

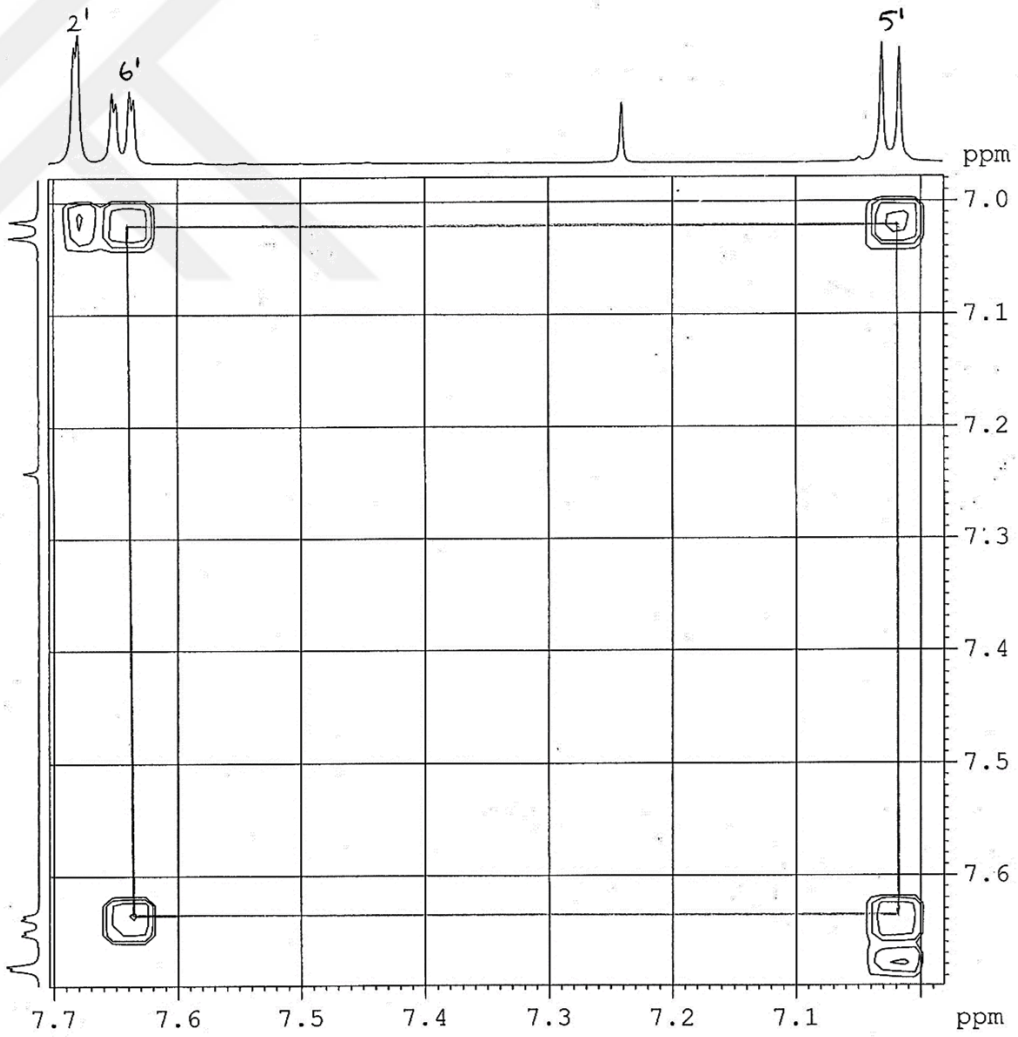


Şekil 4.11a. Krizosplenol C (**CM-11**)'in ^{1}H NMR spektrumu ($CDCl_3$, 400 MHz)

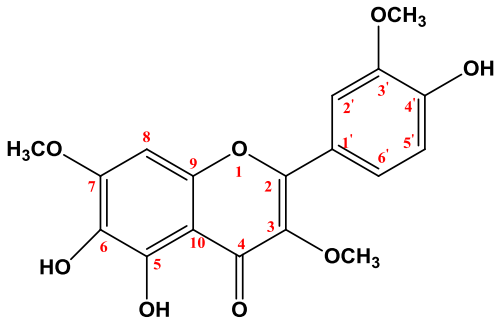


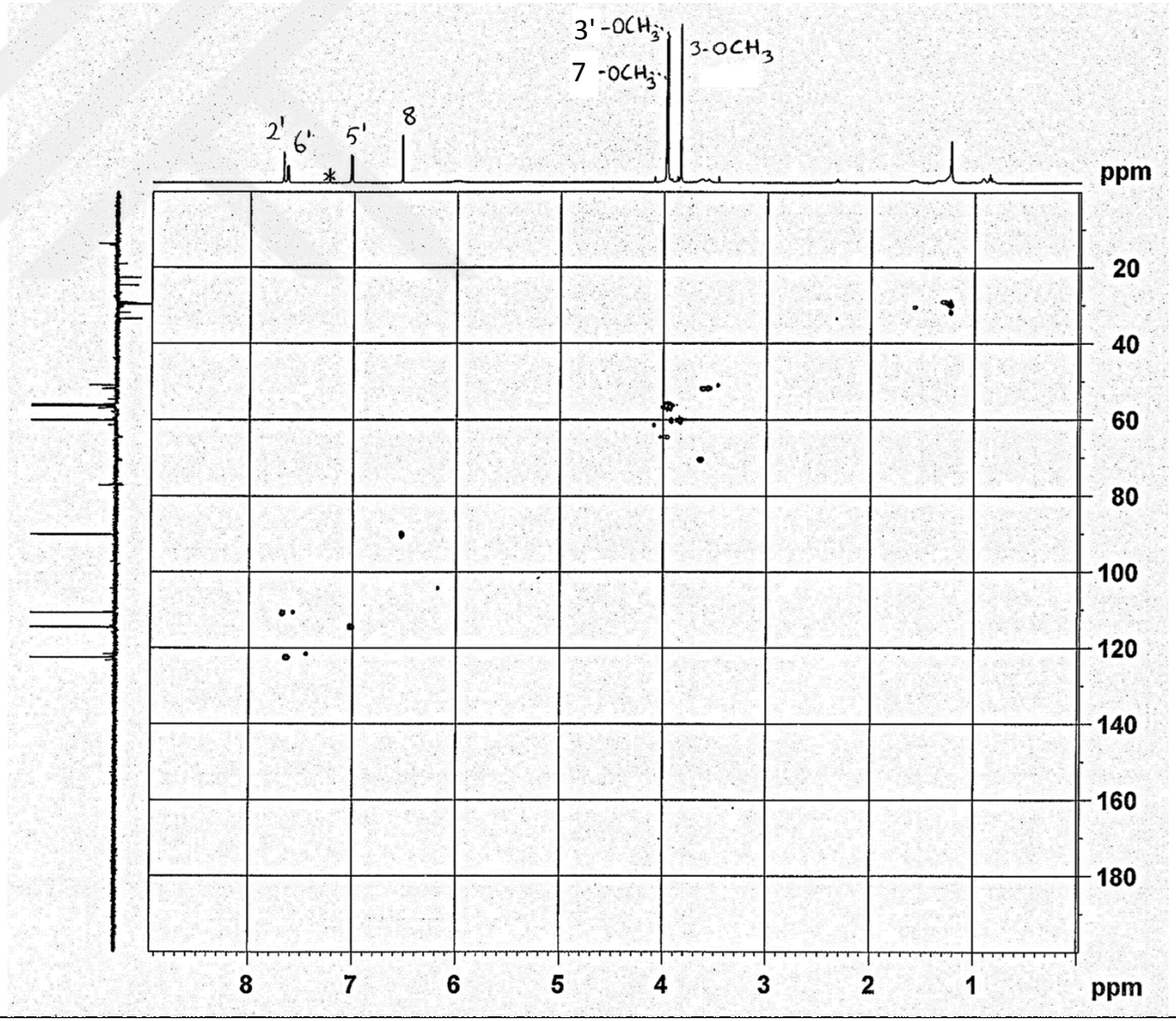
Şekil 4.11b. Krizosplenol C (**CM-11**)'in APT spektrumu ($CDCl_3$, 100 MHz)



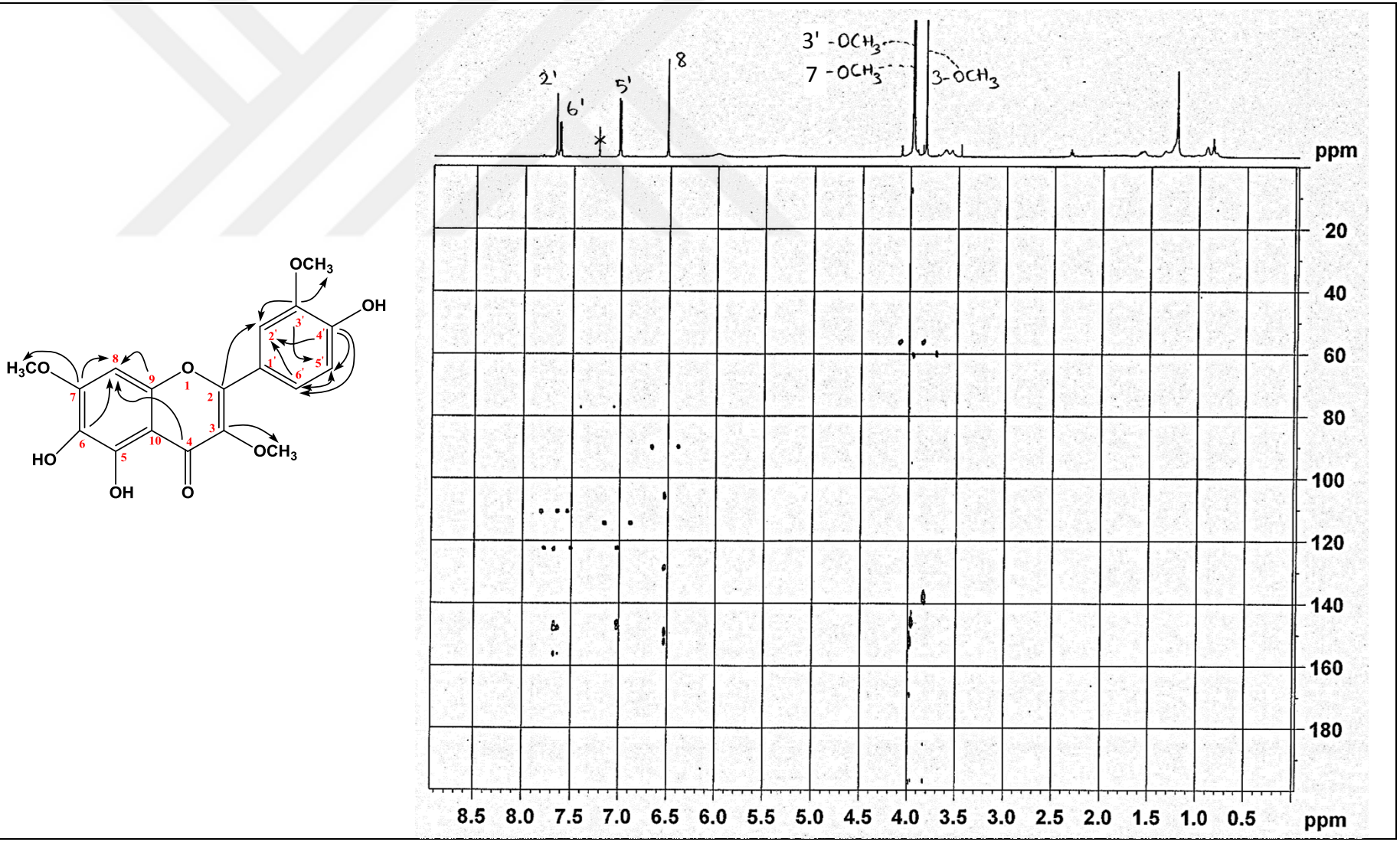


Şekil 4.11c. Krizosplenol C (**CM-11**)'in COSY spektrumu ($CDCl_3$, 600 MHz)

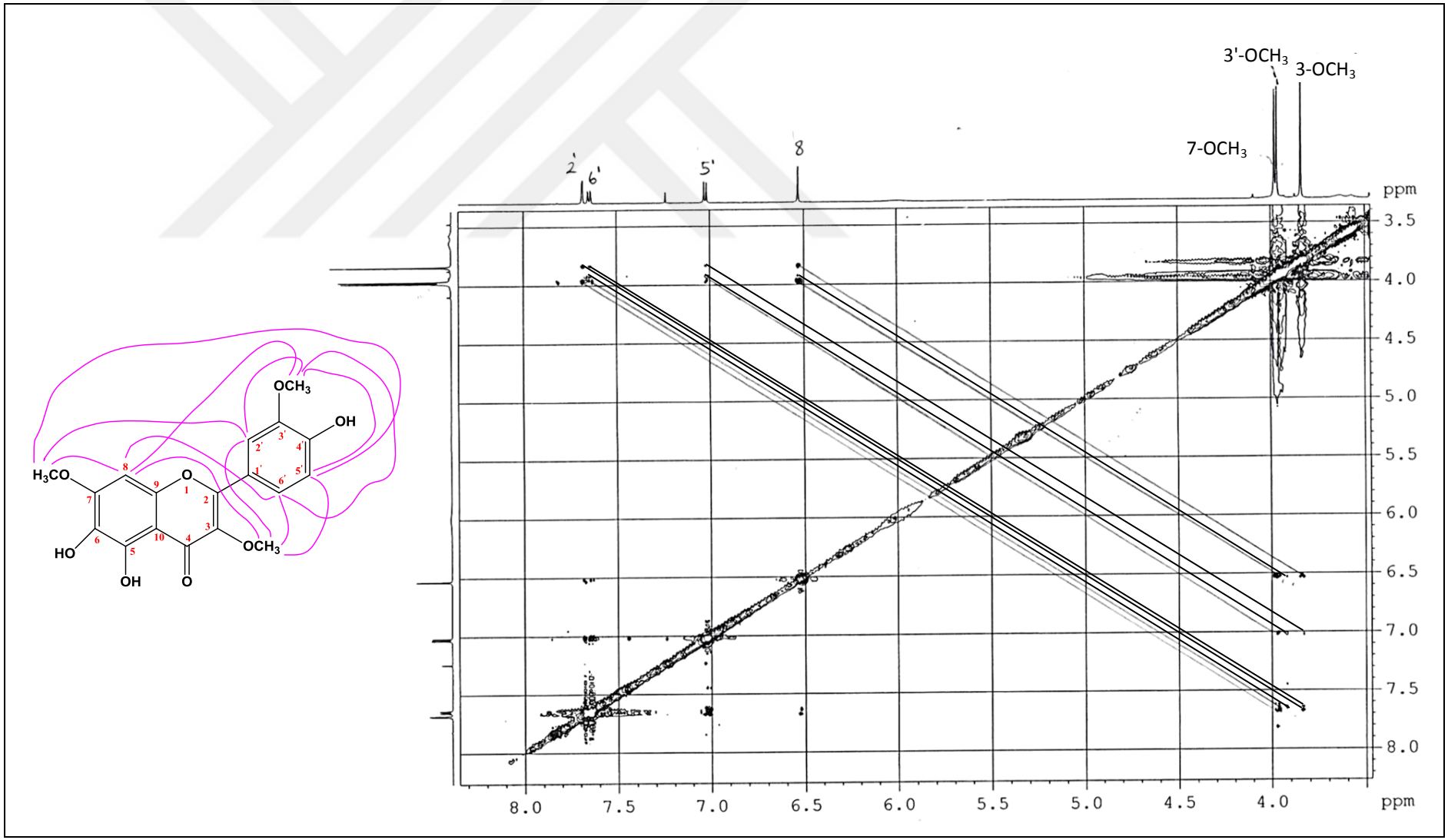




Şekil 4.11d. Krizosplenol C (**CM-11**)'in HSQC spektrumu ($CDCl_3$)



Şekil 4.11e. Krizosplenol C (**CM-11**)'in HMBC spektrumu ($CDCl_3$)

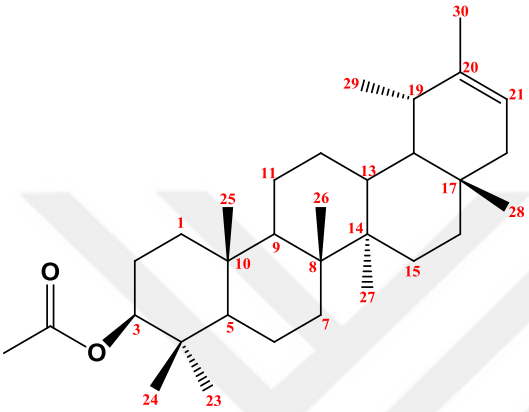


Şekil 4.11f. Krizosplenol C (**CM-11**)'in NOESY spektrumu ($CDCl_3$, 600 MHz)

4.1.5. İzole edilen triterpenlerin yapı tayinlerine ait bulgular

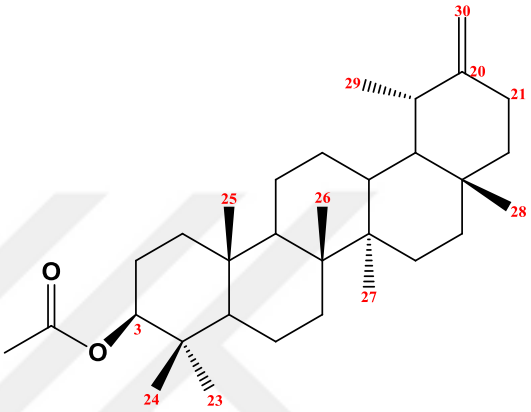
CM-12: Ψ-Taraksasterol-asetat (**CM-12a**) ve Taraksasterol-asetat (**CM-12b**) karışımı ve **CM-13:** Ψ-Taraksasterol (**CM-13a**) ve Taraksasterol (**CM-13b**) karışımı

CM-12 ve **CM-13** *n*-hekzan ekstresinden sırasıyla 19.1 mg ve 6.5 mg beyaz renkte amorf toz halinde izole edilmiştir.



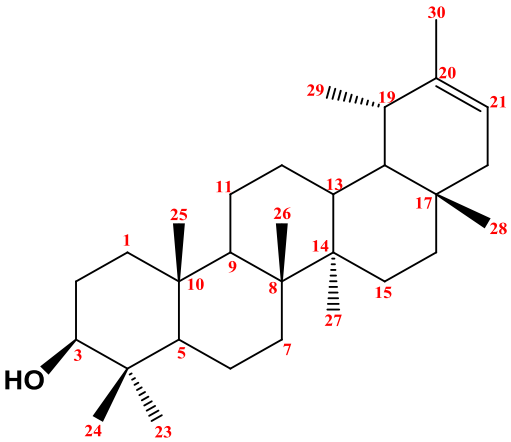
Ψ-**Taraksasterol-asetat (CM-12a)**

CM-12a: $C_{32}H_{52}O_2$ (MA: 468)



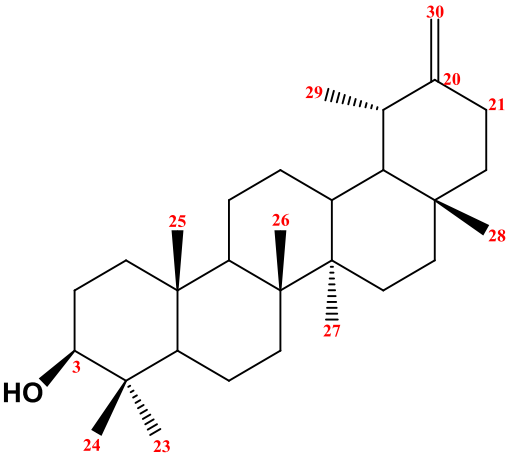
Taraksasterol-asetat (CM-12b)

CM-12b: $C_{32}H_{52}O_2$ (MA: 468)



Ψ-**Taraksasterol (CM-13a)**

CM-13a: $C_{30}H_{50}O_1$ (MA: 426)



Taraksasterol (CM-13b)

CM-13b: $C_{30}H_{50}O_1$ (MA: 426)

CM-12

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ_H: Şekil 4.12a

APT ($CDCl_3$, 100 MHz) δ_C: Şekil 4.12b

COSY ($CDCl_3$, 400 MHz) δ_H: Şekil 4.12c

HSQC ($CDCl_3$): Şekil 4.12d

HMBC ($CDCl_3$): Şekil 4.12e

EI-MS m/z (relatif değer): 468.2 $[M]^+$ (92.9), 408.2 $[M\text{-}CH_3COOH]^+$ (60.9), 393.2 $[408\text{-}CH_3]^+$ (20.9), 189.0 (100)

HREI-MS *m/z* (molekül formülü): 468.3957 ($C_{32}H_{52}O_2$, için hesaplanan, 468.3967), 408.3759 ($C_{30}H_{48}$ için hesaplanan, 408.3756) 393.3544 ($C_{29}H_{45}$ için hesaplanan, 393.3521)

CM-13

^{1}H NMR (Aseton-d_6, 600 MHz) δ_H: Şekil 4.13a

APT (Aseton-d_6, 100 MHz) δ_C: Şekil 4.13b

COSY (Aseton-d_6, 600 MHz) δ_H: Şekil 4.13c

HSQC (Aseton-d_6): Şekil 4.13d

HMBC (Aseton-d_6): Şekil 4.13e

EI-MS m/z (relatif değer): 426.2 $[M]^+$ (53.4), 411.1 $[M\text{-}CH_3]^+$ (13.6), 393.2 $[M\text{-}H_2O]^+$ (8.9), 189.1 (100)

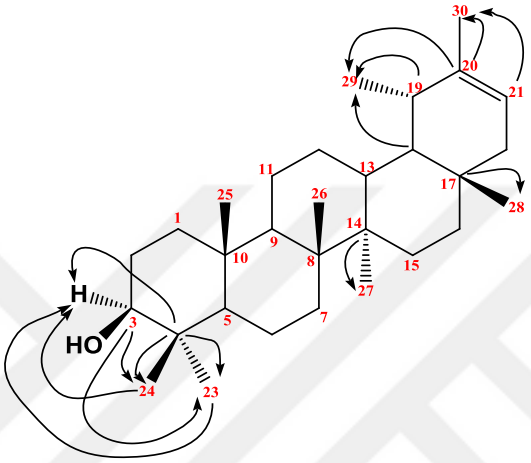
HREI-MS *m/z* (molekül formülü): 426.3872 ($C_{30}H_{50}O$, için hesaplanan, 426.3862), 411.3666 ($C_{29}H_{47}O$ için hesaplanan, 411.3627) 393.3552 ($C_{29}H_{45}$ için hesaplanan, 393.3521)

CM-13 bileşiğinin EI-MS spektrumunda m/z 426.2 $[M]^+$ ve 411.1 $[M\text{-}CH_3]^+$ iyonları görülmüştür. HREI-MS analizinde ise molekülün 426.3872 ve 411.3666 ($C_{30}H_{50}O_1$ ve $C_{29}H_{47}O_1$) piklerine ait kapalı moleküler formüller tespit edilmiştir. Bu bulgular ^{1}H NMR, APT ve 2D NMR spektrumları (Çizelge 4.13, Şekil 4.13a-e) ile birlikte değerlendirildiğinde, CM-13 aynı moleküler formüle sahip ($C_{30}H_{50}O_1$) triterpen yapısında iki bileşiğin karışımı olarak bulunmuştur.

^{1}H NMR spektrumunda (Şekil 4.13a) karakteristik olarak, **CM-13a** için olefinik metin grubuna ait sinyal [δ_H 5.25 (*d*, *J*=6.0), H-21] ve **CM-13b** için ekzosiklik metilen grubuna ait sinyal [δ_H 4.62/4.59, H-30)] görülmüştür. Ayrıca spektrumda **CM-13a**'ya ait 8 adet metil [δ_H 0.95 *s*, 0.75 *s*, 0.87 *s*, 1.07 *s*, 0.97 *s*, 0,74 *s*, 0.98 *d* (*J*=6.5 Hz) ve 1.62 *s*; sırasıyla Me-23, Me-24, Me-25, Me-26 Me-27, Me-28, Me-29 ve Me-30] rezonansı gözlenmiştir. Bileşiğin protonlarına ait sinyallerin 0.6-2.2 ppm arasında ve üstüste olması nedeniyle sadece önemli olan protonların kimyasal kayma değerleri verilmiştir. Proton sinyallerinin kimyasal çevrelerinin benzer ve karbon rezonanslarının birbirine çok yakın olması nedeniyle bileşiğin COSY spektrumu yardımıyla (Şekil 4.13c), H-21 ve Me-30 protonları arasında allilik etkileşimler tespit edilmiştir.

APT spektrumunda (Şekil 4.13b), **CM-13a** için bir triterpene ait 30 karbon rezonansının, 8'i metil, 9'u metilen, 7'si metin ve 6'sı katerner karbon olarak saptanmıştır. **CM-13a**'da δ_C 119.7'de (C-21) olefinik metin ve 21.8'de (C-30) metil grupları görülürken, **CM-13b**'de çifte bağın yeri değiştiği için C-21 ve C-30 karbon rezonansları sırasıyla δ_C 24.2 (metilen) ve 107.7'de (ekzosiklik metilen) görülmüştür. Dolayısıyla, **CM-13b** bileşiğinde gözlenen metil sinyal sayısı toplam yedi olarak saptanmıştır. Bu bulgulara dayanarak, **CM-13a** ve **CM-13b** arasındaki farkın, E-halkasındaki çifte bağın konumundan kaynaklandığı; **a** bileşiğinde gözlenen olefinik metil (Me-30) sinyali sebebiyle, çifte bağın C-20 ve C-21 karbonları arasında olduğu **b** bileşiğinde ise çifte bağın C-20 ile C-30 arasında, diğer bir deyişle ekzosiklik metilen şeklinde konumlandığı görülmüştür (Çizelge 4.13, **CM-13a** için C-20, C-21, C-30 ve H-21, Me-30; **CM-13b** için C-20, C-21, C-30 ile H_2-21 ve H_2-30). APT ve HSQC yardımıyla (Şekil 4.13b ve d), 3.13 ppm'de [*dd* (*J*= 13.0, 8.0)] görülen oksimetin protonlarına ait sinyallerin karbon rezonansları **CM-13a** için 78.6 ve **CM-13b** için 78.4 ppm'de gözlenmiştir. Bu bulgular, **CM-13**'in triterpen yapılı benzer (izomer) iki yapının karışımı olduğunu ve her iki bileşikte de C-3'te sekonder alkol grubunun bulunduğunu göstermiştir.

HMBC yardımıyla (Şekil 4.13e), **CM-13a**'ya ait uzak mesafe etkileşimleri belirlenmiştir. δ_C 139.5'da gözlenen katerner karbon (C-20) rezonansı ile Me-29 ve Me-30 proton sinyalleri arasında; ayrıca δ_C 119.7'de gözlenen olefinik metin (C-21) karbon rezonansı ile Me-30 proton sinyali arasında görülen korelasyonlardan çifte bağın C-20 ve C-21 arasında bulunduğu anlaşılmıştır. δ_C 78.6'da görülen karbon (C-3) rezonansı ile Me-23 ve Me-24 proton sinyalleri arasında belirlenen uzak mesafe etkileşimleri oksimetin grubunun C-3'te olduğunu doğrulamıştır (Şekil 4.13f).



Şekil 4.13f. Ψ-Taraksasterol (**CM-13a**)'da uzak mesafe HMBC korelasyonları (*Oklar karbondan protona doğrudur*)

Bu spektral bulgulara dayanarak, **CM-13a** ve **CM-13b**'nin taraksastan tipinde triterpen yapısında sırasıyla "**taraksasterol**" ve "**Ψ-taraksasterol**" olduğu tespit edilmiştir. Bulgularımızın, literatürde bu maddeler için verilen değerlerle uyum gösterdiği görülmüştür (Yekta ve Alavi, 2008). Taraksasterol ve Ψ-taraksasterol *C. montanum* bitkisinden ilk kez izole edilmiştir.

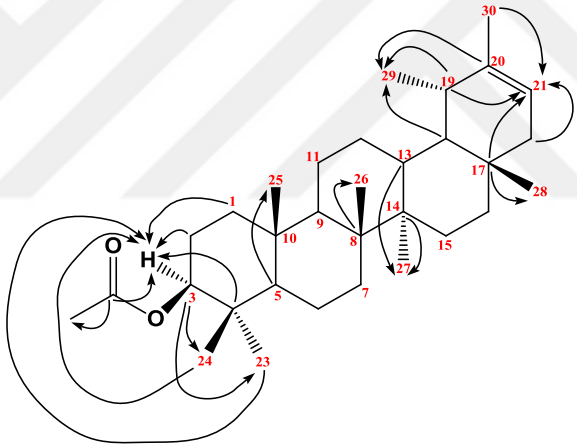
CM-12 ile **CM-13**'in spektrumları karşılaştırıldığında, **CM-12** bileşiği **CM-13**'e oldukça benzer bulunmuştur. **CM-12**'nin EI-MS spektrumunda m/z 468.2 $[M]^+$ ve 408.2 $[M-CH_3COOH]^+$ iyonları görülmüştür. HREI-MS analizinde ise molekülün 468.3957 ve 408.3759 ($C_{32}H_{52}O_2$ ve $C_{30}H_{48}$) piklerine ait kapalı moleküler formüller tespit edilmiştir. Bu bulgular ^{1}H NMR, APT ve 2D NMR spektrumları (Çizelge 4.12, Şekil 12a-e) ile birlikte değerlendirildiğinde, **CM-12**'nin **CM-13**'ün asetil türevi olan, aynı moleküler formüle sahip ($C_{32}H_{52}O_2$) triterpen yapısında iki bileşiğin karışımı olduğu belirlenmiştir.

^{1}H NMR spektrumunda (Şekil 4.12a) karakteristik olarak, **CM-12a** için olefinik metin grubu (H-21) ve **CM-12b** için ekzosiklik metilen grubuna (H-30) ait sinyaller, sırasıyla δ_H 5.24 (br*d*, *J*=8.0) ve 4.60/4.58'de bulunmuştur. Ayrıca spektrumda **CM-12a** için 8 adet metil [δ_H 0.83 *s*, 0.82 *s*, 0.86 *s*, 1.02 *s*, 0.93 *s*, 0,71 *s*, 0.96 *d* (*J*=6.5 Hz) ve 1.62 *s*; sırasıyla Me-23, Me-24, Me-25, Me-26 Me-27, Me-28, Me-29 ve Me-30] sinyali gözlenmiştir. **CM-12**'nin protonlarına ait sinyallerin yüksek alanda (0.6-2.2 ppm arasında) ve üstüste olması nedeniyle sadece önemli protonların kimyasal kayma değerleri verilmiştir. Proton sinyallerinin ve karbon rezonanslarının birbirine çok yakın olması nedeniyle bileşiğin COSY spektrumu yardımıyla (Şekil 4.12c), H-21 ve Me-30 protonları arasında allilik etkileşimler tespit edilmiştir.

APT spektrumunda (Şekil 4.12b), **CM-12a** için bir triterpene ait 32 karbon rezonansının, 9'i metil, 9'u metilen, 7'si metin ve 7'si katerner karbon olarak saptanmıştır. **CM-12a**'da δ_C 118.9'da (C-21) olefinik metin ve 21.6'da (C-30) metil grupları görülürken, **CM-12b**'de çifte bağın yeri değiştiği için C-21 ve C-30 karbon rezonansları sırasıyla δ_C 25.5 (metilen) ve 107.7'de (ekzosiklik metilen) görülmüştür. Dolasıyla, **CM-12b** bileşiğinde gözlenen metil sayısı toplam 8 olarak saptanmıştır. Bu bulgulara dayanarak, **CM-12a** ve **CM-12b** arasındaki farkın, E-halkasındaki çifte bağın konumundan kaynaklandığı; **a** bileşiğinde gözlenen olefinik metil (Me-30) sinyali sebebiyle, çifte bağın C-20 ve C-21 karbonları arasında olduğu **b** bileşiğinde ise çifte bağın C-20 ile C-30 arasında, diğer bir deyişle ekzosiklik metilen şeklinde konumlandığı görülmüştür (Çizelge 4.12, **CM-12a** için C-20, C-21, C-30 ve H-21, Me-30; **CM-12b** için C-20, C-21, C-30 ile H_2-21 ve H_2-30). APT spektrumunda C-20'ye ait katerner karbon rezonansı, **CM-12a** için δ_C 139.9'da; **CM-12b** için δ_C 154.7'da tespit edilmiştir. APT ve HSQC yardımıyla (Şekil 4.12b ve d), **CM-12a** için 4.47 ppm'de [*dd* (*J*= 13.0, 8.0 Hz)] görülen oksimetin protonuna ait sinyalin karbon rezonansı 81.0 ppm'de gözlenmiştir. Ayrıca asetil grubunun metil sübstitüsyonuna işaret

eden δ_H 2.03'deki singlet proton sinyalinin karbon rezonansı 21.3 ppm'de bulunmuştur. Bu bulgular, **CM-12**'nin triterpen yapılı benzer (izomer) iki yapının karışımı olduğunu ve her iki bileşikte de C-3'e bağlı asetil grubunun varlığını göstermiştir.

HMBC yardımıyla (Şekil 4.12e), **CM-12a**'ya ait uzak mesafe etkileşimleri belirlenmiştir. δ_C 139.9'da gözlenen katerner karbon (C-20) rezonansı ile Me-29 proton sinyali arasında görülen; δ_C 36.3'de gözlenen metin (C-19) karbon rezonansı ile H-21 ve Me-29 proton sinyalleri arasında görülen korelasyonlar çifte bağın C-20 ve C-21 arasında bulunduğunu göstermiştir. δ_C 81.0'da görülen karbon rezonansı (C-3) ile Me-23 ve Me-24 proton sinyalleri arasında belirlenen uzak mesafe etkileşimleri, oksimetin grubunun C-3'te olduğunu doğrulamıştır. Buna ilaveten, δ_C 171.0'da görülen katerner karbon rezonansı (***CO***CH_3**)** ile H-3 ve CO***CH₃*** proton sinyalleri arasında belirlenen korelasyonlar asetil grubunun C-3'e bağlı olduğunu doğrulamıştır (Şekil 4.12f).



Şekil 4.12f. Ψ-Taraksasterol-asetat (**CM-12a**)'da uzak mesafe HMBC korelasyonları (*Oklar karbondan protona doğrudur*)

Spektral bulgulara dayanarak, **CM-12a** ve **CM-12b**'nin taraksastan tipinde triterpen yapısında sırasıyla "**taraksasterol asetat**" ve "**Ψ-taraksasterol asetat**" olduğu tespit edilmiştir. Bulgularımızın, literatürde bu maddeler için verilen değerlerle uyum gösterdiği görülmüştür (Khalilov ve diğerleri, 2003; Öksüz, 1976). Taraksasterol asetat ve Ψ-taraksasterol asetat *C. montanum* bitkisinden ilk kez izole edilmiştir.

Çizelge 4.12. Ψ-Taraksasterol-asetat (**CM-12a**) ve Taraksasterol-asetat (**CM-12b**) karışımının (**CM-12**) ^{1}H ve APT spektroskopik değerleri ($CDCl_3$: δ_H 400 MHz, δ_C 100 MHz) ve HMBC korelasyonları

CM-12a: Ψ-Taraksasterol-asetat					**CM-12b: Taraksasterol-asetat**		
Konum	**C/H**	**δ_C ppm**	**δ_H ppm, *J* (Hz)**	**HMBC C'dan→H'a**	**C/H**	**δ_C ppm**	**δ_H ppm, *J* (Hz)**
1	CH_2	38.5		H-3	CH_2		
2	CH_2	27.6		H-3	CH_2		
3	CH	81.0	4.47 dd (13.0/8.0)	Me-23, Me-24	CH		4.47 dd (13.0/8.0)
4	C	38.5	-	H-3	C		-
5	CH	55.5	0.78*	Me-25	CH		
6	CH_2	18.2			CH_2		
7	CH_2	34.2			CH_2		
8	C	41.1	-	Me-26	C		
9	CH	50.4	1.32*		CH		
10	C	37.0	-		C		-
11	CH_2	21.6			CH_2		
12	CH_2	23.7			CH_2		
13	CH	39.2		Me-27	CH		
14	C	42.3		Me-27	C		
15	CH_2	27.0			CH_2	26.6	
16	CH_2	36.7			CH_2		
17	C	34.4	-	H-21, Me-28	C	34.5	
18	CH	48.7	1.30*	Me-29	CH		
19	CH	36.3		H-21, Me-29	CH		
20	C	139.9	-	Me-29	C	154.7	
21	CH	118.9	5.24 brd (8.0)		CH_2	25.5	
22	CH_2	42.18		H-21	CH_2	38.9	
23	CH_3	28.0	0.83 s	H-3	CH_3		
24	CH_3	16.1	0.82 s	H-3	CH_3		
25	CH_3	16.5	0.86 s		CH_3		
26	CH_3	16.4	1.02 s		CH_3		
27	CH_3	14.7	0.93 s		CH_3		
28	CH_3	17.7	0.71 s		CH_3		
29	CH_3	22.5	0.96 d (6.5)		CH_3		
30	CH_3	21.6	1.62 s	H-21	CH_2	107.1	4.60/4.58
COCH_3	C	171.0	-	H-3, CO***CH_3***	C		
CO***CH_3***	CH_3	21.3	2.03 s		CH_3		

*C ve H kimyasal kayma değerleri, 2D NMR(COSY, HSQC ve HMBC) yardımıyla hesaplanmıştır.

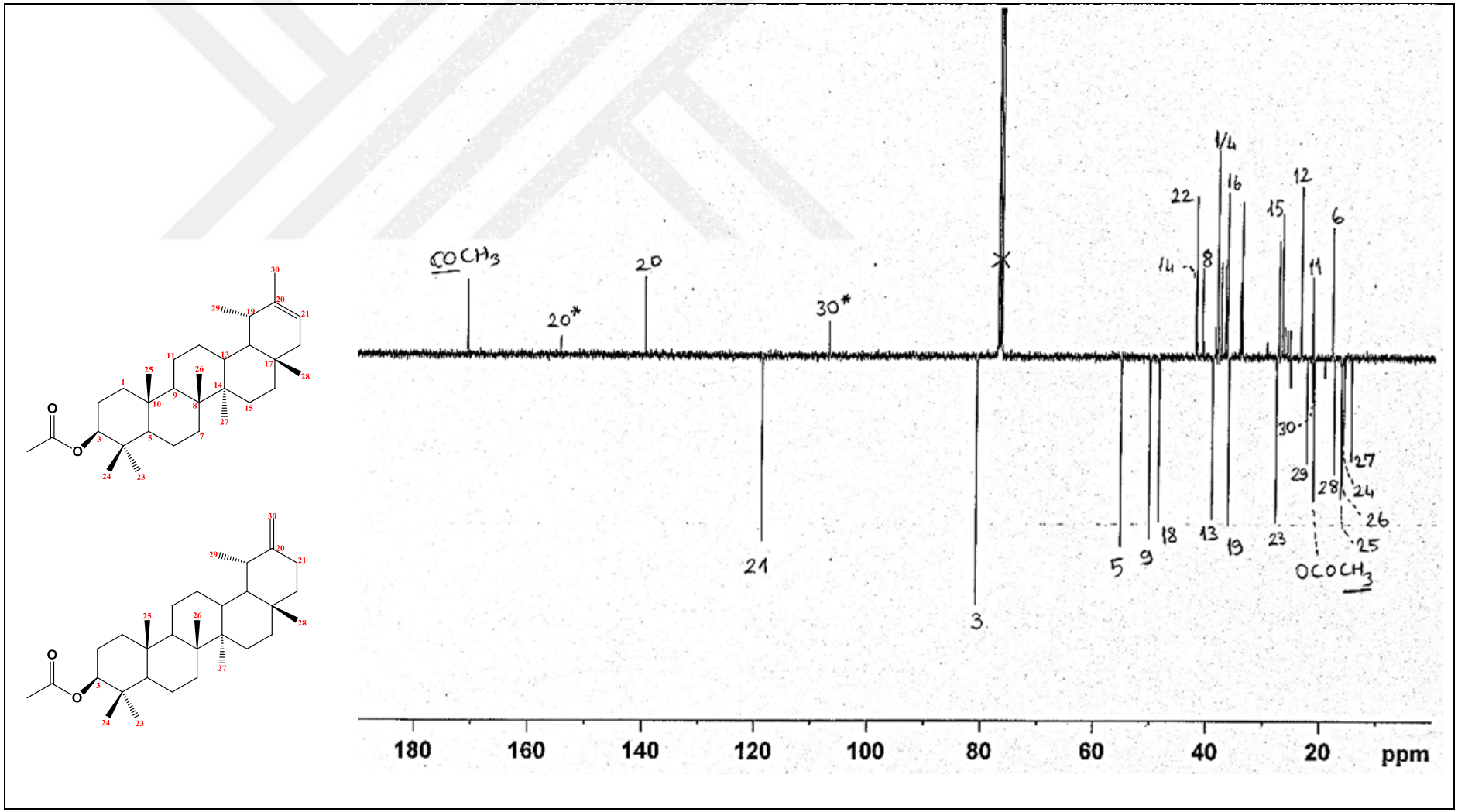
Çizelge 4.13. Ψ-Taraksasterol (**CM-13a**) ve Taraksasterol (**CM-13b**) karışımının (**CM-13**) ^{1}H ve APT spektroskopik değerleri (Aseton-d_6: δ_H 600 MHz, δ_C 100 MHz) ve HMBC korelasyonları

CM-13a: Ψ-Taraksasterol					**CM-13b: Taraksasterol**		
Konum	**C/H**	**δ_C ppm**	**δ_H ppm, *J* (Hz)**	**HMBC C'dan→H'a**	**C/H**	**δ_C ppm**	**δ_H ppm, *J* (Hz)**
1	CH_2	39.6			CH_2		
2	CH_2	28.3			CH_2		
3	CH	78.6	3.13 dd (13.0/8.0)	Me-23, Me-24	CH	78.4	3.13 dd (13.0/8.0)
4	C	39.6	-	H-3, Me-23, Me-24	C		-
5	CH	56.27	0.73*	Me-25	CH		
6	CH_2	19.1			CH_2		
7	CH_2	34.2			CH_2		
8	C	42.8			C		
9	CH	51.3	1.35*		CH		
10	C	37.4	-		C		-
11	CH_2	22.3			CH_2		
12	CH_2	27.8			CH_2		
13	CH	40.1			CH		
14	C	42.8		Me-28	C		
15	CH_2	27.4			CH_2		
16	CH_2	36.1			CH_2		
17	C	35.1		Me-28	C		
18	CH	49.6	1.08*	Me-29	CH		
19	CH	37.0		Me-29	CH	36.1	
20	C	139.5		Me-2 9, Me-30	C	gözlenmedi	
21	CH	119.7	5.25 d (6.0)	Me-30	CH_2	24.2	
22	CH_2	42.8			CH_2	40.1	
23	CH_3	28.5	0.95 s	H-3	CH_3		
24	CH_3	15.84	0.75 s	H-3	CH_3		
25	CH_3	16.8	0.87 s		CH_3		
26	CH_3	16.1	1.07 s		CH_3		
27	CH_3	14.6	0.97 s		CH_3		
28	CH_3	18.0	0.74 s		CH_3		
29	CH_3	22.9	0.98 d (6.5)		CH_3		
30	CH_3	21.8	1.62 s		CH_2	107.7	4.62/4.59

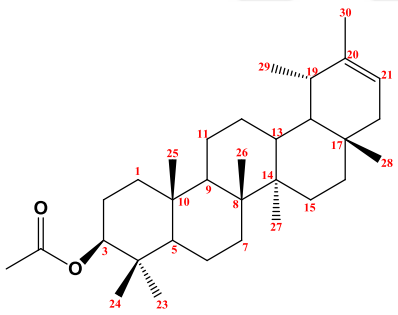
*C ve H kimyasal kayma değerleri, 2D NMR(COSY, HSQC ve HMBC) yardımıyla hesaplanmıştır.

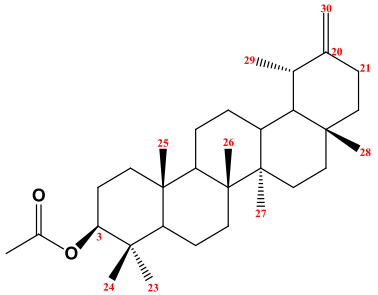


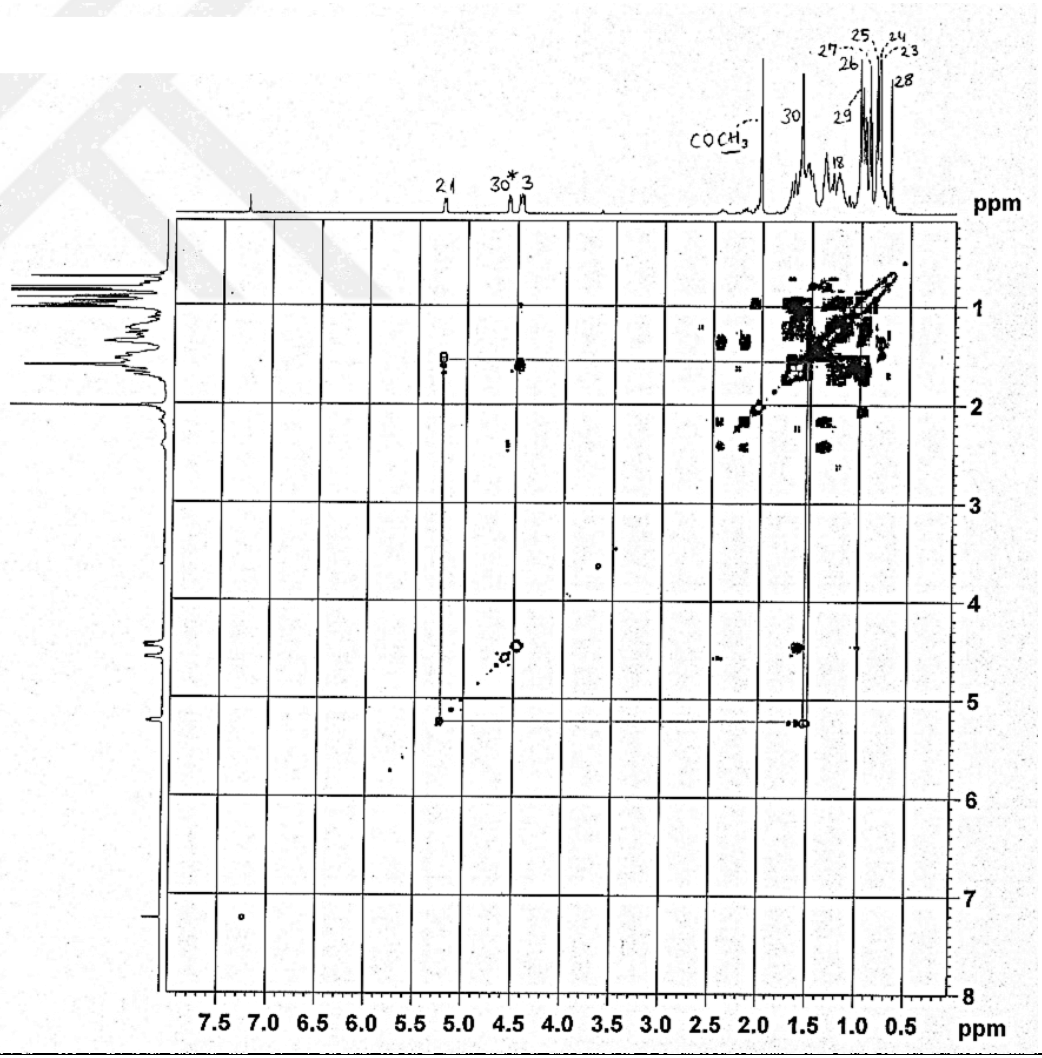
Şekil 4.12a. Ψ-Taraksasterol-asetat (**CM-12a**) ve Taraksasterol-asetat (**CM-12b**) karışımının (**CM-12**) ^{1}H NMR spektrumu ($CDCl_3$, 400 MHz) (*: **CM-12b**'ye ait sinyaller)



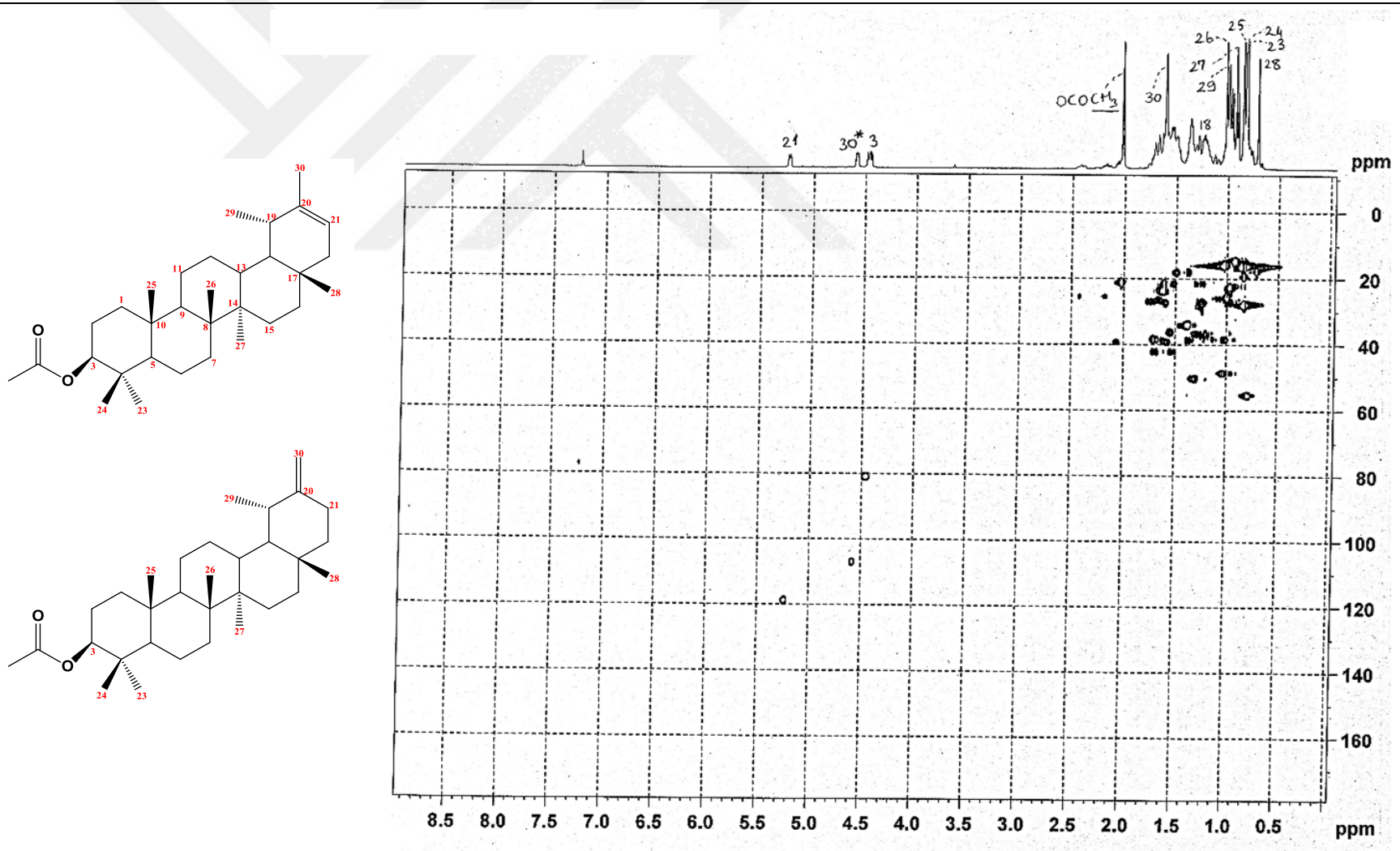
Şekil 4.12b. Ψ-Taraksasterol-asetat (**CM-12a**) ve Taraksasterol-asetat (**CM-12b**) karışımının (**CM-12**) APT spektrumu ($CDCl_3$, 100 MHz) (*: CM-12b'ye ait sinyaller)



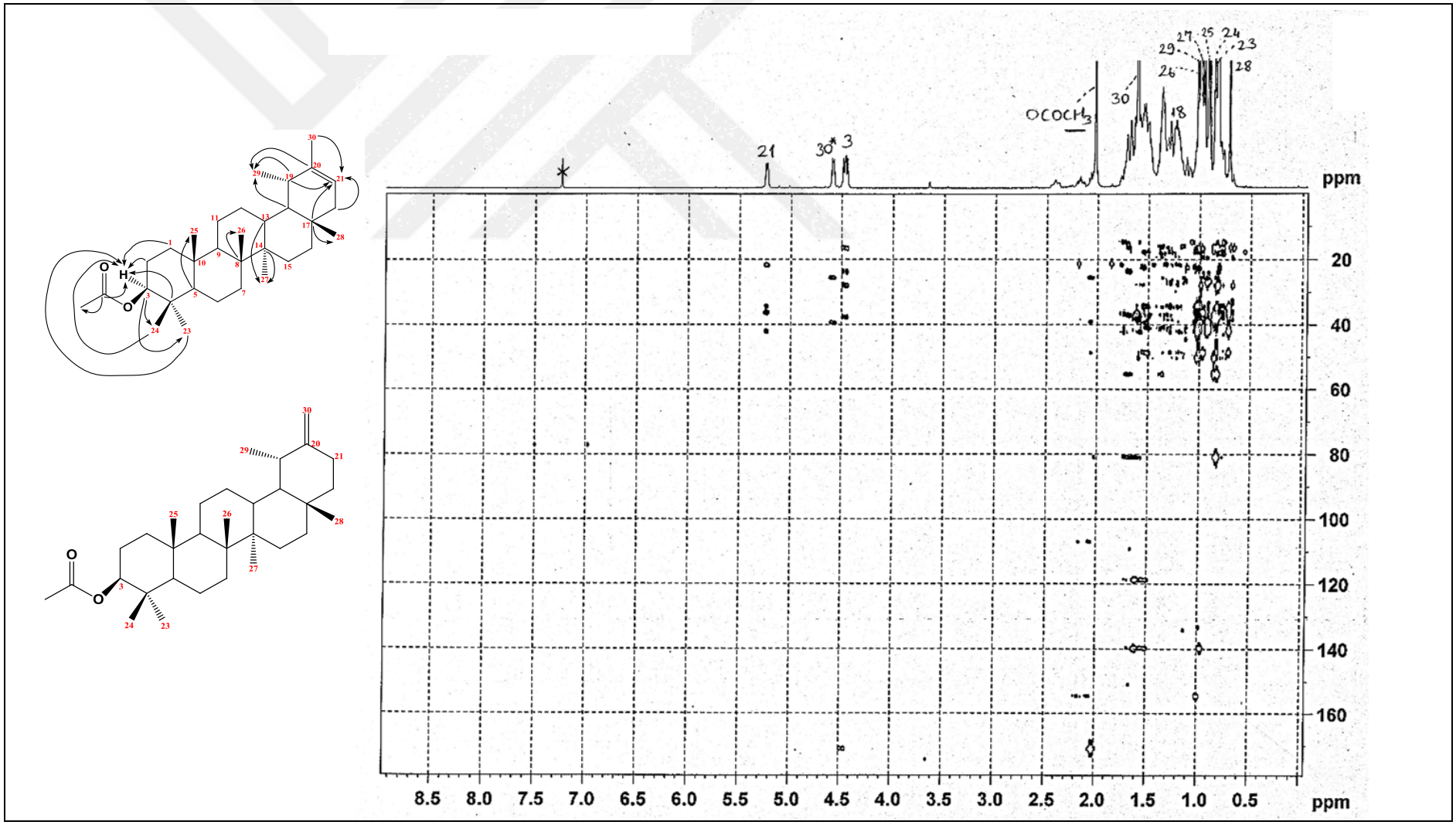




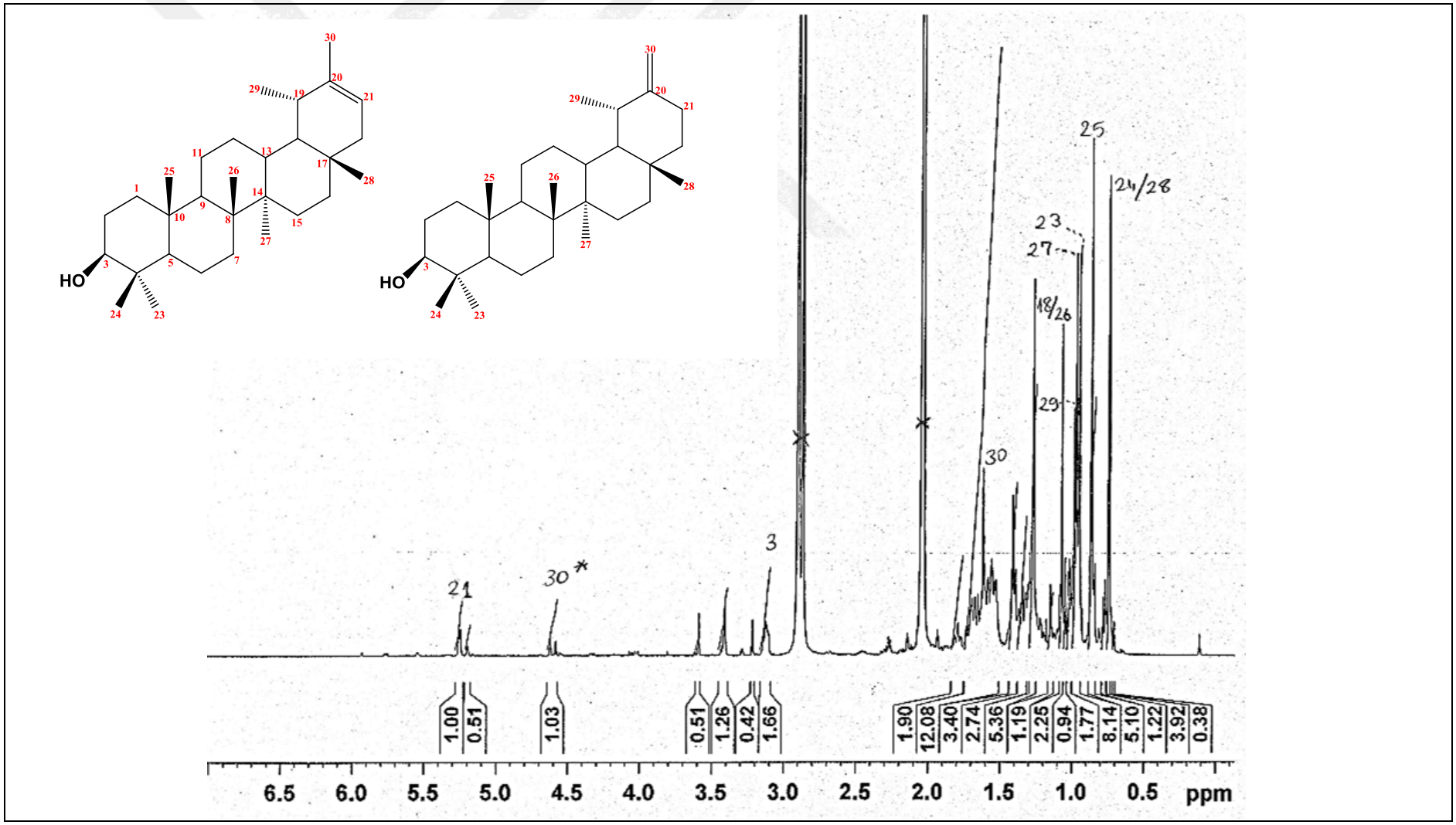
Şekil 4.12c. Ψ-Taraksasterol-asetat (**CM-12a**) ve Taraksasterol-asetat (**CM-12b**) karışımının (**CM-12**) COSY spektrumu ($CDCl_3$, 400 MHz) (*: **CM-12b**'ye ait sinyaller)



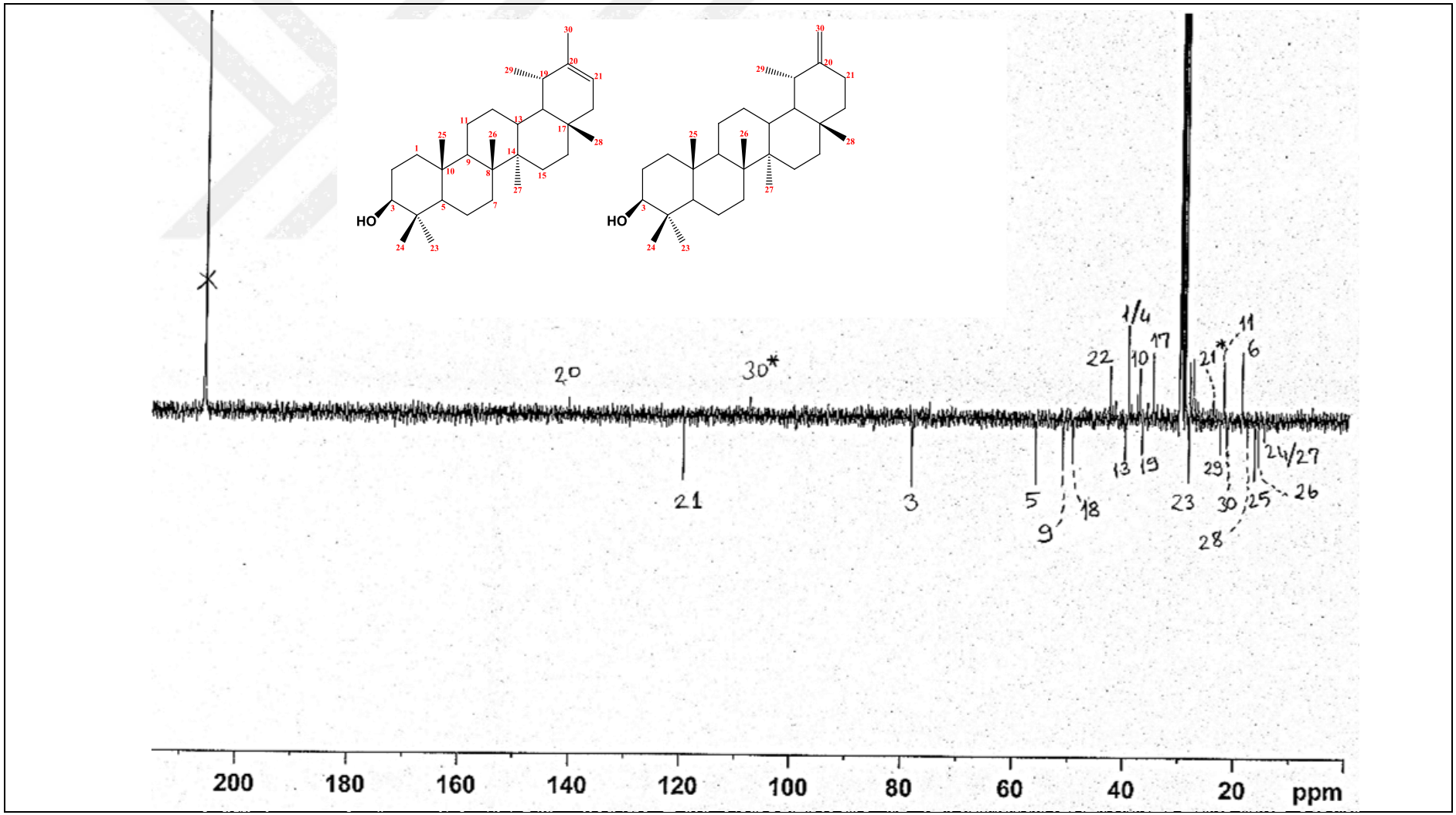
Şekil 4.12d. Ψ-Taraksasterol-asetat (**CM-12a**) ve Taraksasterol-asetat (**CM-12b**) karışımının (**CM-12**) HSQC spektrumu ($CDCl_3$)
(*: CM-12b'ye ait sinyaller)



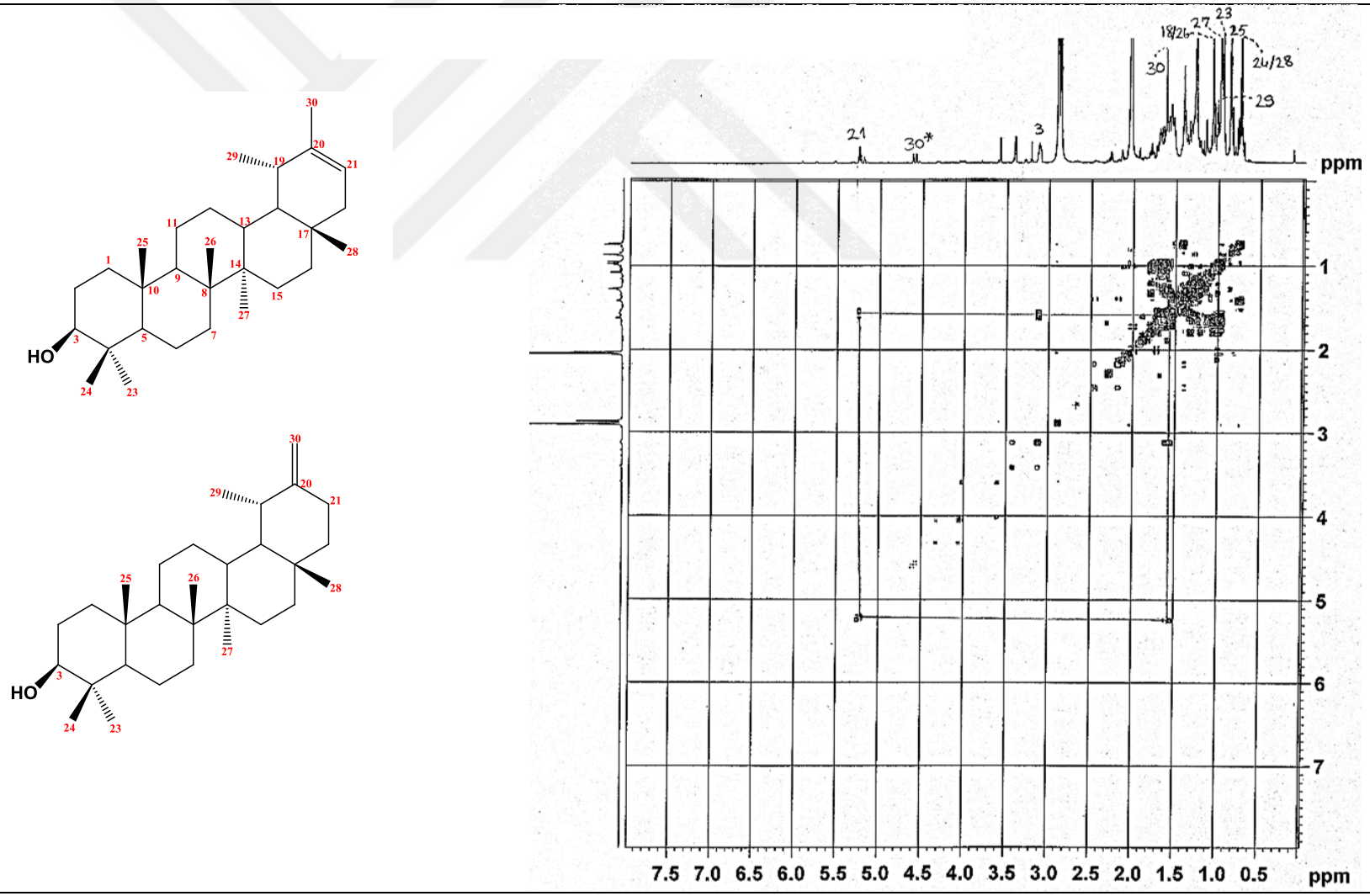
Şekil 4.12e. Ψ-Taraksasterol-asetat (**CM-12a**) ve Taraksasterol-asetat (**CM-12b**) karışımının (**CM-12**) HMBC spektrumu ($CDCl_3$)
(*: CM-12b'ye ait sinyaller)



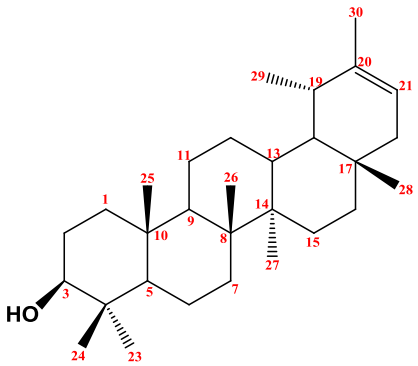
Şekil 4.13a. Ψ-Taraksasterol (**CM-13a**) ve Taraksasterol (**CM-13b**) karışımının (**CM-13**) ^{1}H NMR spektrumu (Aseton-d_6, 600 MHz)
(*: CM-13b'ye ait sinyaller)

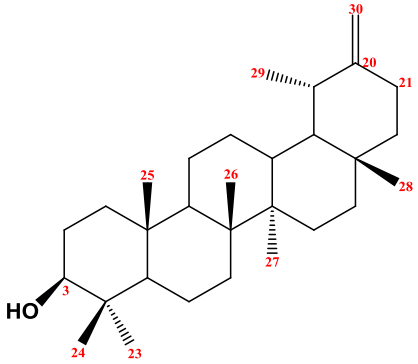


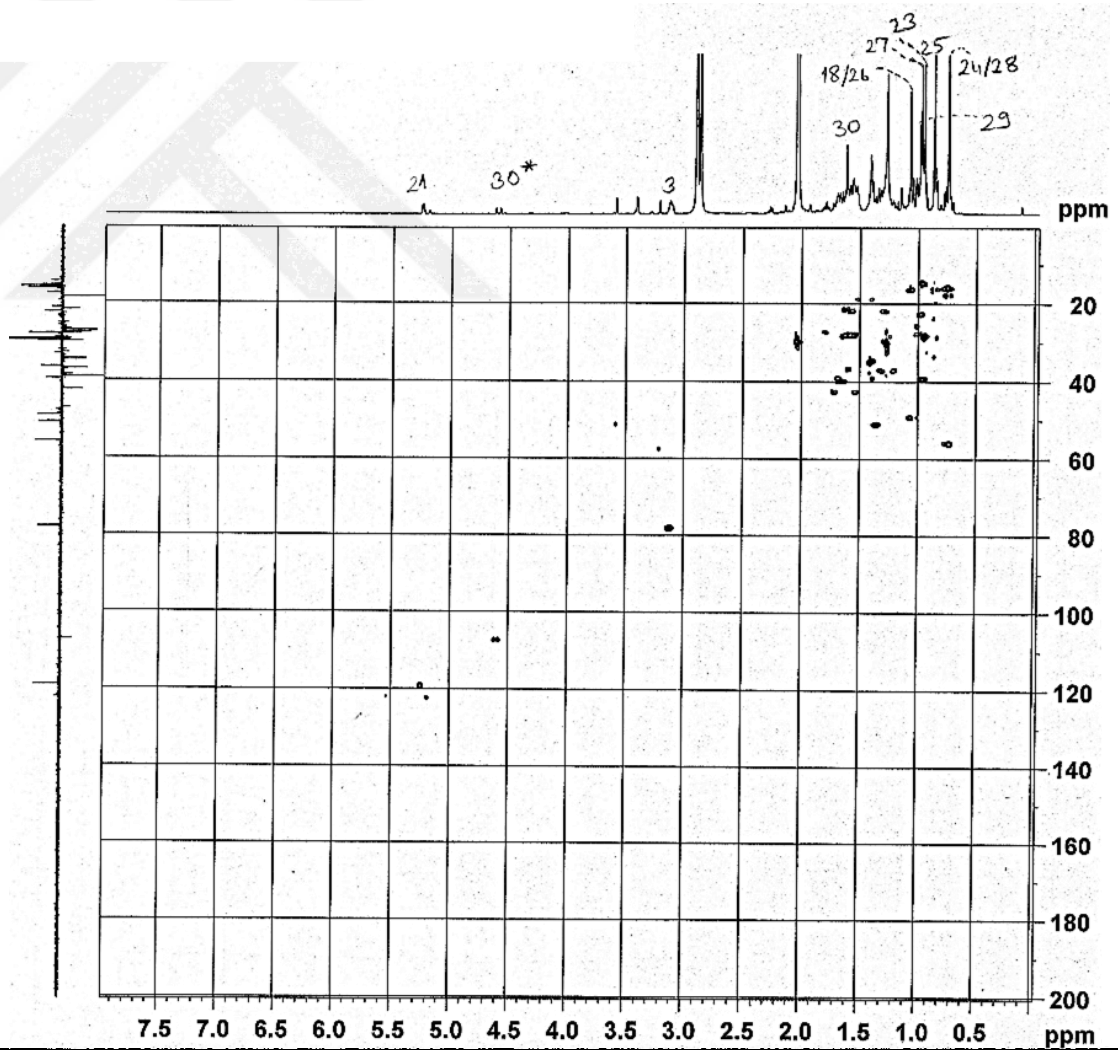
Şekil 4.13b. Ψ-Taraksasterol (**CM-13a**) ve Taraksasterol (**CM-13b**) karışımının (**CM-13**) APT spektrumu (Aseton-d_6,100 MHz)
(*: CM-13b'ye ait sinyaller)



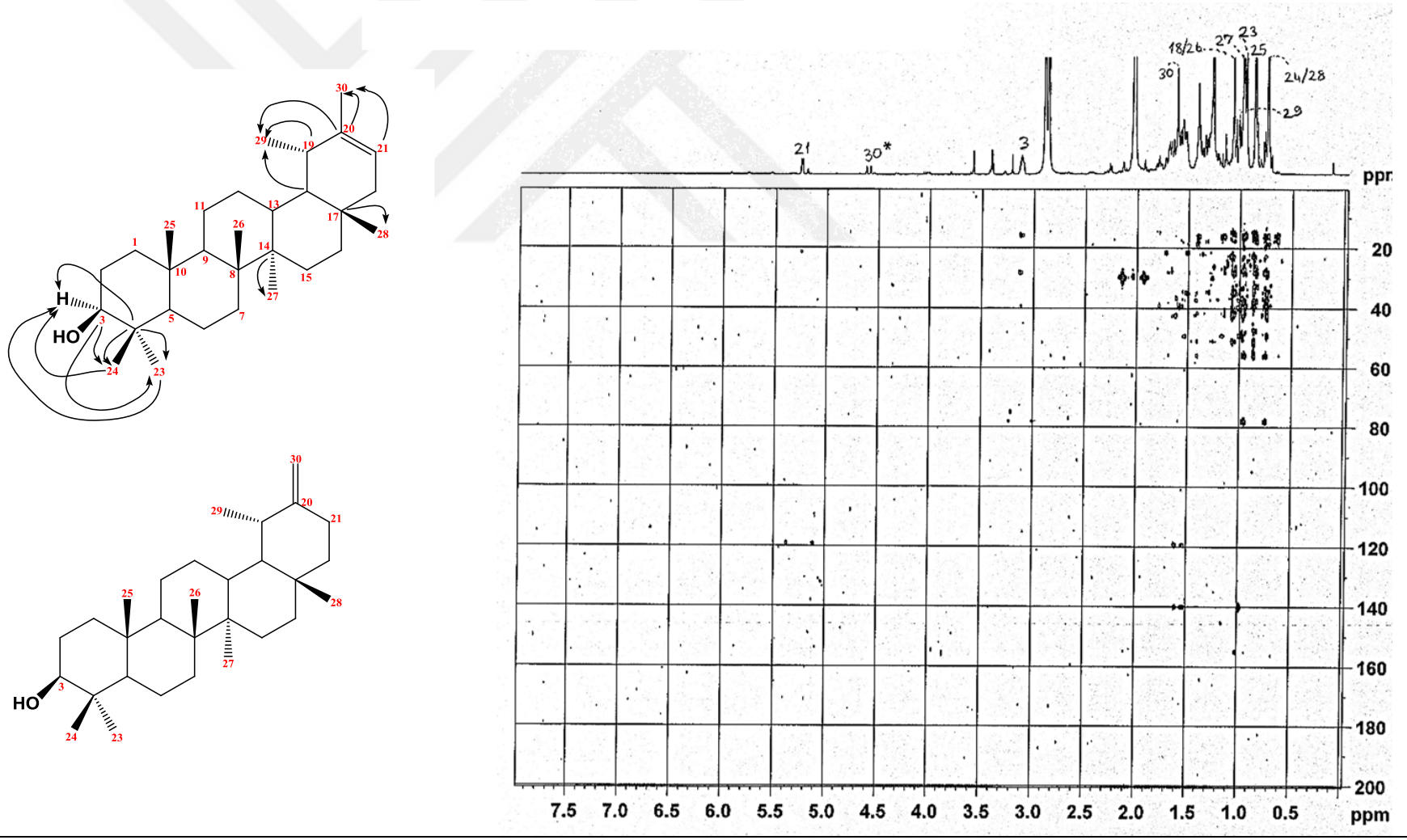
Şekil 4.13c. Ψ-Taraksasterol (**CM-13a**) ve Taraksasterol (**CM-13b**) karışımının (**CM-13**) COSY spektrumu (Aseton-d_6, 600 MHz)
(*: CM-13b'ye ait sinyaller)







Şekil 4.13d. Ψ-Taraksasterol (**CM-13a**) ve Taraksasterol (**CM-13b**) karışımının (**CM-13**) HSQC spektrumu (Aseton-d_6) (*: CM-13b'ye ait sinyaller)



Şekil 4.13e. Ψ-Taraksasterol (**CM-13a**) ve Taraksasterol (**CM-13b**) karışımının (**CM-13**) HMBC spektrumu (Aseton-d_6)
(*: CM-13b'ye ait sinyaller)

4.2. Biyolojik Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular

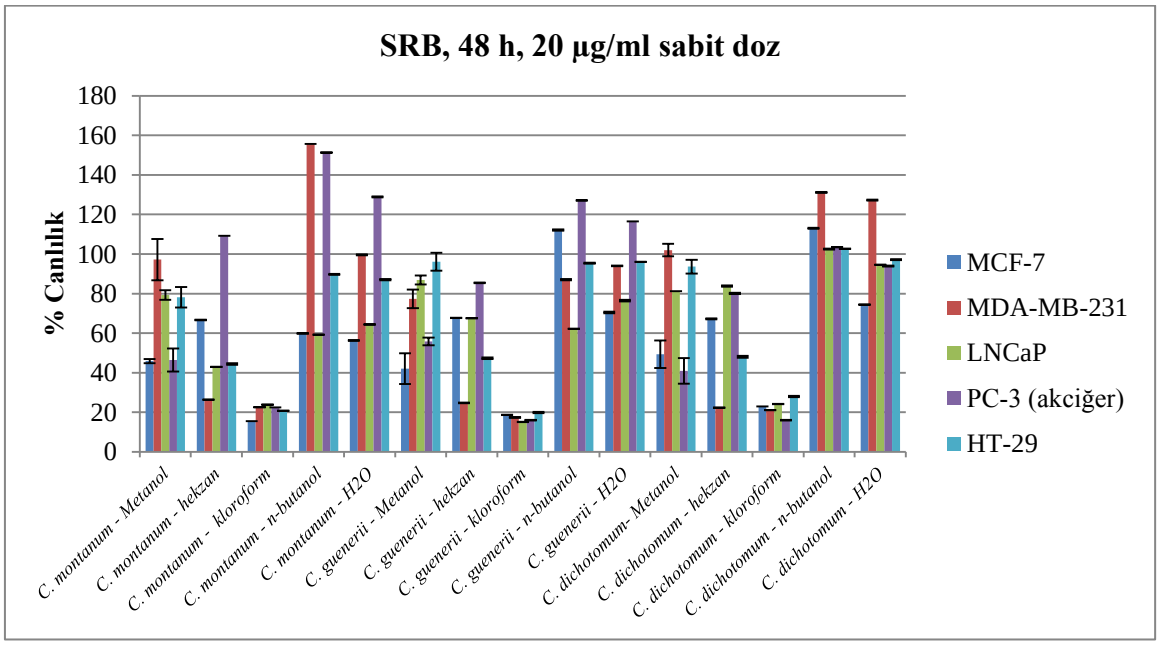
Chrysophthalmum türlerinin ham metanol ekstreleri ve *n*-hekzan, $CHCl_3$, *n*-BuOH ve R-H_2O alt ekstreleri ile daha ileri çalışmalar için seçilen *C. montanum*'un kloroform ekstresinin fraksiyonları (Fr. A-H) ve yeterli miktarda izole edilen bileşiklerin (**CM-1**, **CM-2**, **CM-3**, **CM-7** ve **CM-9**) *in vitro* sitotoksik ve antienflamatuvar aktivite sonuçları; ayrıca ekstreler ve miktarı yeterli olan saf bileşiklerin *in vitro* leishmanisidal aktivite sonuçları çizelge ve grafikler halinde verilmiştir.

4.2.1. *In vitro* sitotoksik aktivite bulguları

Chrysophthalmum türlerinin ham metanol ekstreleri ve alt ekstrelerinin sitotoksik aktivite bulguları

Chrysophthalmum türlerinin SRB yöntemine göre sitotoksik aktivite bulguları

Chrysophthalmum türlerinden elde edilen ham metanol ekstreleri ve alt ekstrelerinin SRB hücre canlılık yöntemiyle tespit edilen sitotoksik aktivite bulguları aşağıda grafik halinde sunulmuştur (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. *Chrysophthalmum* türlerinden elde edilen ham metanol ekstreleri ve alt ekstrelerin SRB yöntemiyle tespit edilen sitotoksik aktiviteleri

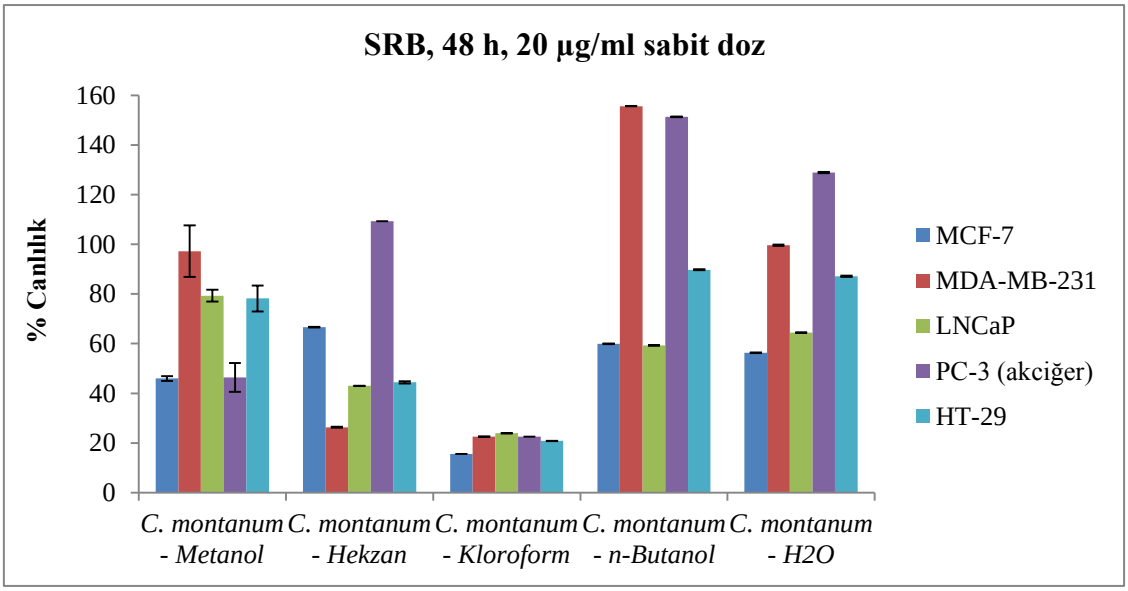
SRB yöntemiyle elde edilen bulgulara göre; *Chrysophthalmum* türlerinin $CHCl_3$ ekstrelerinin denenen kanser hücre soylarından bağımsız olarak, hücre büyümesini % 80 civarında inhibe ettiği görülmüştür. Ayrıca, türlerin *n*-hekzan ekstreleri MDA-MB-231 hücre soyuna karşı selektif olarak sitotoksik etkide bulunmuştur (Şekil 4.14).

Her bir *Chrysophthalmum* türünün kanser hücre soylarına karşı gösterdiği % canlılık değerleri, aşağıdaki çizelge ve grafiklerde gösterilmiştir (Çizelge 4.14-4.16, Şekil 4.15-4.17).

Çizelge 4.14. *C. montanum*'un ham metanol ekstresi ve alt ekstrelerinin SRB yöntemiyle tespit edilen sitotoksik aktiviteleri

CM ekstreleri	**% Canlılık± SS**				
	MCF-7	**MDA-MB-231**	**LNCaP**	**PC-3 (akciğer)**	**HT-29**
CM-Metanol	45.93±1.03	97.20±10.40	79.28±2.40	46.43±5.82	78.16 ±5.22
CM-*n*-Hekzan	66.62±0.17	26.33±0.15	43.01±0.09	109.29±0.01	44.39±0.39
CM-$CHCl_3$	15.59±0.02	22.55±0.12	23.91±0.05	22.54±0.03	20.80±0.07
CM-*n*-BuOH	59.93±0.16	155.62±0.02	59.23±0.12	151.35±0.15	89.73±0.17
CM-R-H_2O	56.26±0.14	99.60±0.24	64.43±0.17	128.87±0.22	87.12±0.32

SS: Standart sapma

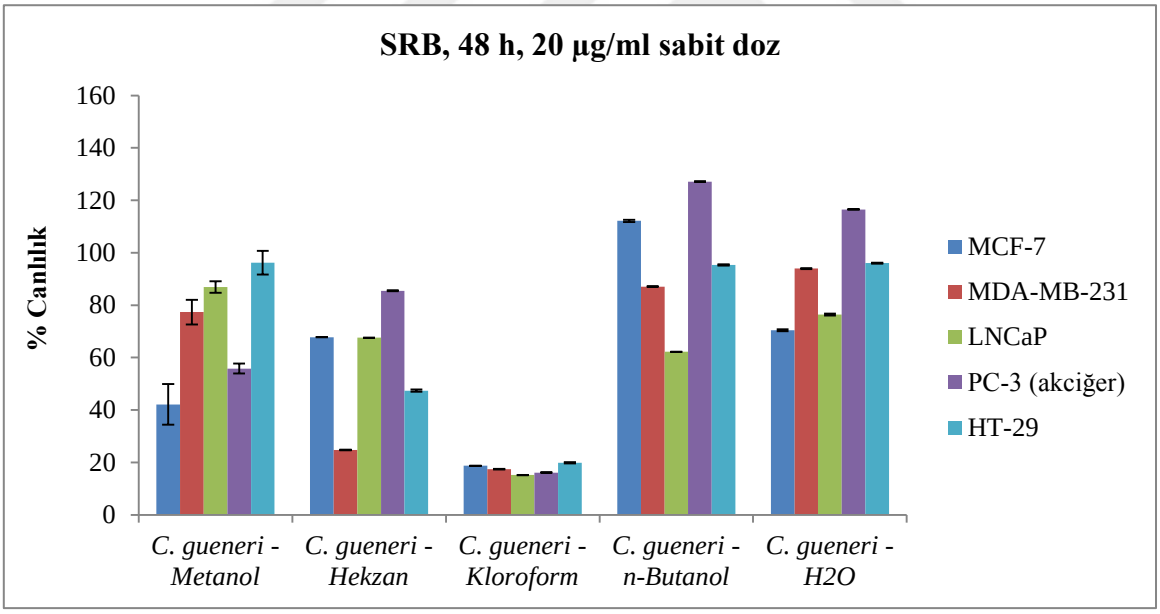


Şekil 4.15. *C. montanum*'un ham metanol ekstresi ve alt ekstrelerinin SRB yöntemiyle tespit edilen sitotoksik aktiviteleri

Çizelge 4.15. *C. gueneri*'nin ham metanol ekstresi ve alt ekstrelerinin SRB yöntemiyle tespit edilen sitotoksik aktiviteleri

CG ekstreleri	% Canlılık± SS				
	MCF-7	**MDA-MB-231**	**LNCaP**	**PC-3 (akciğer)**	**HT-29**
CG-Metanol	42.12±7.78	77.34±4.73	86.90±2.22	55.80±1.93	96.14 ±4.52
CG-*n*-Hekzan	67.78±0.07	24.75±0.11	67.60±0.06	88.49±0.20	47.38±0.40
CG-$CHCl_3$	18.70±0.07	17.43±0.08	15.15±0.04	16.10±0.16	19.91±0.24
CG-*n*-BuOH	112.14±0.40	87.05±0.27	62.19±0.09	127.16±0.11	95.39±0.23
CG-R-H_2O	70.47±0.36	94.00±0.13	76.45±0.37	116.50±0.05	96.05±0.16

SS: Standart sapma

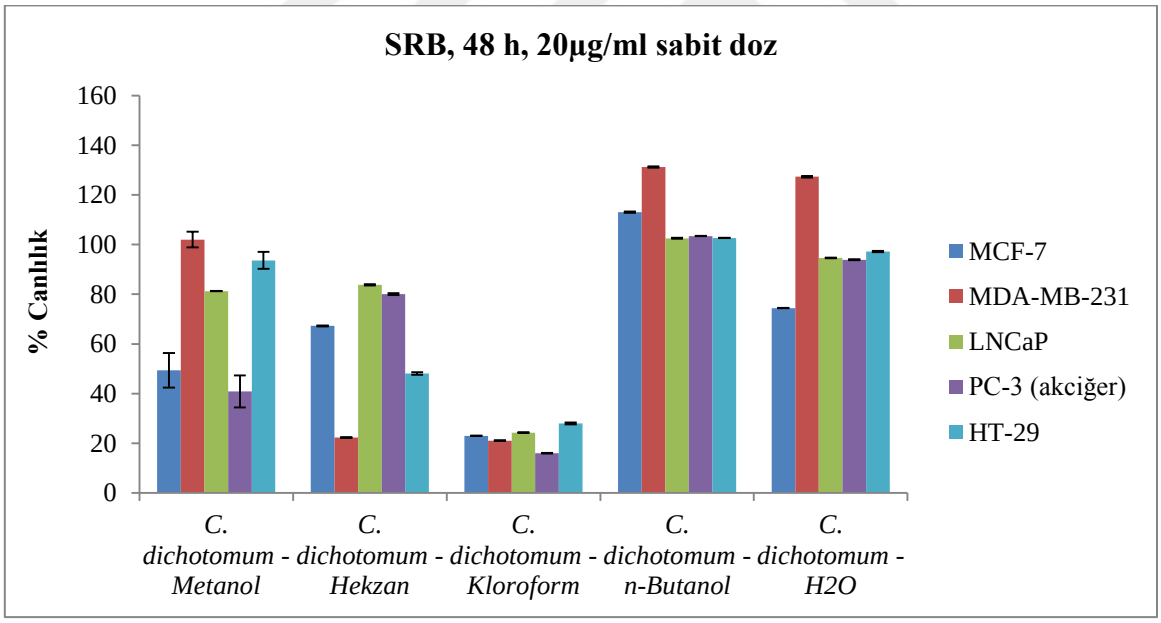


Şekil 4.16. *C. gueneri'nin* ham metanol ekstresi ve alt ekstrelerinin SRB yöntemiyle tespit edilen sitotoksik aktiviteleri

Çizelge 4.16. *C. dichotomum*'un ham metanol ekstresi ve alt ekstrelerinin SRB yöntemiyle tespit edilen sitotoksik aktiviteleri

CD ekstreleri	**% Canlılık± SS**				
	MCF-7	**MDA-MB-231**	**LNCaP**	**PC-3 (akciğer)**	**HT-29**
CD-MeOH	49.37±6.95	102.00±3.13	81.26±0.06	40.93±6.43	93.63±3.41
CD-*n*-Hekzan	67.26±0.19	22.33±0.11	83.81±0.27	80.07±0.34	48.05±0.50
CD-$CHCl_3$	22.99±0.06	21.08±0.08	24.27±0.07	16.02±0.14	28.00±0.34
CD-*n*-BuOH	113.06±0.26	131.18±0.29	102.53±0.20	103.43±0.06	102.66±0.10
CD-R-H_2O	74.44±0.12	127.30±0.30	94.61±0.10	93.91±0.23	97.19±0.30

SS: Standart sapma



Şekil 4.17. *C. dichotomum*'un ham metanol ekstresi ve alt ekstrelerinin SRB yöntemiyle tespit edilen sitotoksik aktiviteleri

Chrysophthalmum türlerinin MTT yöntemine göre sitotoksik aktivite bulguları

Chrysophthalmum türlerinden elde edilen ham metanol ekstreleri ve alt ekstrelerinin (*n*-hekzan, $CHCl_3$, *n*-BuOH ve R-H_2O) MTT yöntemiyle belirlenen % inhibisyon ve IC_{50} değerleri aşağıda her bir tür için ayrı çizelgeler halinde verilmiştir (Çizelge 4.17-4.19).

MTT yöntemiyle elde edilen bulgulara göre; *Chrysophthalmum* türlerinin $CHCl_3$ alt ekstreleri denenen tüm hücre soylarına karşı en yüksek sitotoksisitede bulunmuştur. Ayrıca, *C. montanum* ve *C. dichotomum*'un *n*-hekzan ekstreleri de denenen tüm hücre soylarına karşı aktiviteye sahip bulunmuştur (Çizelge 4.17-4.19).

Çizelge 4.17. *C. montanum*'un ham metanol ekstresi ve alt ekstrelerinin MTT yöntemiyle tespit edilen sitotoksik aktiviteleri

Numuneler	**IC_{50}±SS (µg/mL)* (% inhibisyon)**				
	HeLa	**H460**	**MCF-7**	**PC-3**	**3T3**
CM-MeOH	- (33.60)	- (21.44)	- (28.66)	- (41.54)	- (41.71)
CM-*n*-Hekzan	13.41±0.420 (79.79)	12.94±0.380 (78.73)	20.15±0.490 (98.81)	14.40±0.004 (81.01)	15.08±0.004 (83.63)
CM-$CHCl_3$	5.38±0.020 (91.08)	6.26±0.060 (97.92)	10.17±0.760 (98.57)	5.98±0.080 (92.21)	6.78±0.001 (82.95)
CM-*n*-BuOH	- (49.60)	- (23.93)	- (2.48)	- (40.57)	- (38.86)
CM-R-H_2O	- (33.63)	- (16.93)	- (4.82)	- (30.21)	- (40.40)
Doksorubisin	0.20±0.030 (95.90)	0.21±0.030 (80.40)	0.92±0.10 (89.19)	0.25±0.008 (81.97)	0.30±0.020 (85.00)

IC_{50}: %50 inhibisyon gösteren doz

* IC_{50} değeri %50'nin üstünde gözlenen inhibisyonlar için hesaplanmıştır, SS: Standart sapma, -: etki gözlenmedi

Çizelge 4.18. *C. gueneri*'nin ham metanol ekstresi ve alt ekstrelerinin MTT yöntemiyle tespit edilen sitotoksik aktiviteleri

Numuneler	**IC_{50}±SS (µg/mL)* (% inhibisyon)**				
	HeLa	**H460**	**MCF-7**	**PC-3**	**3T3**
CG-MeOH	- (40.53)	- (25.31)	- (11.31)	- (40.01)	- (39.43)
CG-*n*-Hekzan	- (41.63)	- (28.71)	- (9.31)	- (31.07)	- (10.84)
CG-$CHCl_3$	5.17±0.230 (93.95)	5.85±0.560 (94.66)	7.11±0.060 (98.76)	6.23±0.050 (90.09)	8.67±0.050 (91.29)
CG-*n*-BuOH	- (24.56)	- (16.39)	- (9.38)	- (30.01)	- (30.57)
CG-R-H_2O	- (13.33)	- (19.48)	- (1.76)	- (10.21)	- (27.82)
Doksorubisin	0.20±0.030 (95.90)	0.21±0.030 (80.40)	0.92±0.100 (89.19)	0.25±0.008 (81.97)	0.30±0.020 (85.00)

* IC_{50} değeri %50'nin üstünde gözlenen inhibisyonlar için hesaplanmıştır, SS: Standart sapma, -: etki gözlenmedi

Çizelge 4.19. *C. dichotomum*'un ham metanol ekstresi ve alt ekstrelerinin MTT yöntemiyle tespit edilen sitotoksik aktiviteleri

Numuneler	**IC_{50}±SS (µg/mL)* (% inhibisyon)**				
	HeLa	**H460**	**MCF-7**	**PC-3**	**3T3**
CD-MeOH	- (20.03)	- (17.09)	- (17.79)	- (30.73)	- (30.43)
CD-*n*-Hekzan	27.40±0.200 (55.74)	19.43±0.340 (68.57)	- (36.16)	20.40±0.006 (50.41)	30.20±0.050 (60.47)
CD-$CHCl_3$	6.21±0.160 (96.63)	5.63±0.780 (98.91)	11.89±1.208 (98.54)	5.75±0.005 (95.53)	8.23±0.050 (70.91)
CD-*n*-BuOH	- (17.92)	- (11.73)	- (23.19)	- (21.07)	- (20.58)
CD-R-H_2O	- (32.63)	- (27.91)	- (6.61)	- (18.29)	- (35.76)
Doksorubisin	0.20±0.030 (95.90)	0.21±0.030 (80.40)	0.92±0.100 (89.19)	0.25±0.008 (81.97)	0.30±0.020 (85.00)

* IC_{50} değeri %50'nin üstünde gözlenen inhibisyonlar için hesaplanmıştır, SS: Standart sapma, -: etki gözlenmedi

C. montanum'un kloroform ekstresinden elde edilen fraksiyonların (Fr. A-H) sitotoksik aktivite bulguları

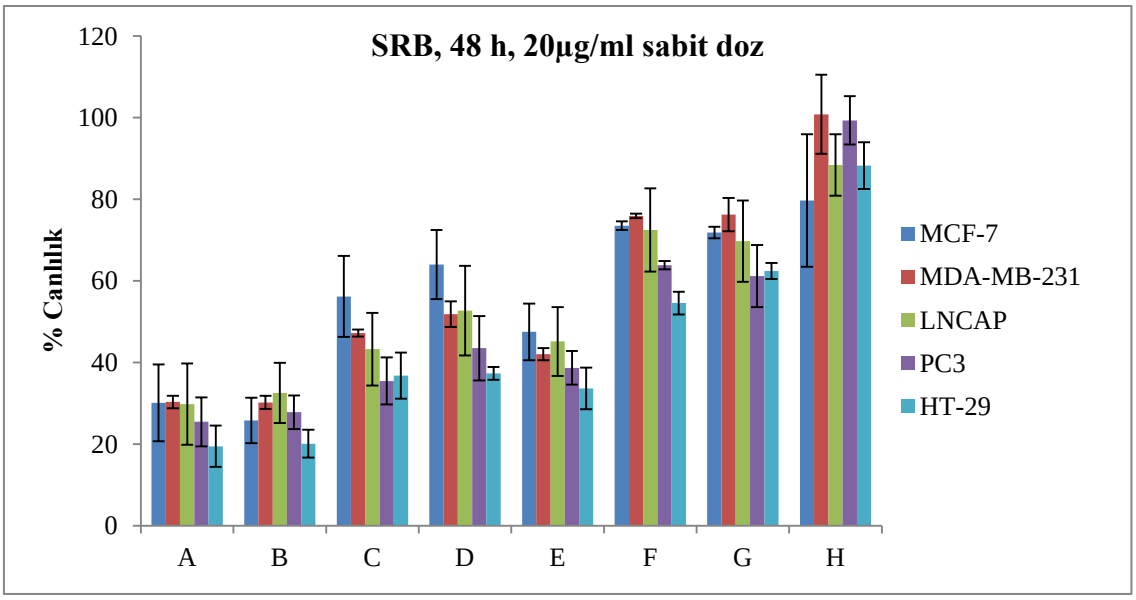
Fr. A-H'nin SRB yöntemine göre sitotoksik aktivite bulguları

C. montanum'un kloroform ekstresinden elde edilen Fr. A-H'nin SRB yöntemiyle belirlenen % canlılık değerleri Çizelge 4.20 ve buna ait grafik ise Şekil 4.18'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.20. *C. montanum*'un kloroform ekstresinden elde edilen fraksiyonların (Fr. A-H) SRB yöntemiyle tespit edilen sitotoksik aktiviteleri

CM-$CHCl_3$ fraksiyonları	**% Canlılık ± SS**				
	MCF-7	**MDA-MB-231**	**LNCaP**	**PC-3 (akciğer)**	**HT-29**
Fr. A	30.13±9.42	30.31±1.51	29.79±14.99	25.45±16.00	19.47±5.03
Fr. B	25.80±5.56	30.21±1.61	32.51±7.38	27.81±14.13	20.09±3.41
Fr. C	56.20±19.95	47.21±0.87	43.27±18.90	35.47±15.77	36.76±5.67
Fr. D	64.02±18.45	51.84±3.13	52.72±15.99	43.50±12.88	37.34±1.55
Fr. E	47.51±6.96	42.02±1.48	45.16±13.43	38.67±14.12	33.62±5.10
Fr. F	73.52±1.05	75.94±0.56	72.48±15.20	63.86±1.01	54.56±2.76
Fr. G	71.88±1.42	76.22±4.08	69.74±9.95	61.20±7.62	62.45±1.97
Fr. H	79.70±16.25	100.82±9.71	88.44±7.54	99.35±5.91	88.24±5.72

SS: Standart sapma



Şekil 4.18. *C. montanum* kloroform ekstresinden elde edilen fraksiyonların (Fr. A-H) SRB yöntemiyle tespit edilen sitotoksik aktiviteleri

Fr. A-H'nin MTT yöntemine göre sitotoksik aktivite bulguları

C. montanum'un kloroform ekstresinden elde edilen Fr. A-H'nin MTT yöntemiyle belirlenen % inhibisyon ve IC_{50} değerleri Çizelge 4.21'de verilmiştir.

Çizelge 4.21. *C. montanum*'un kloroform ekstresinden elde edilen fraksiyonların (Fr. A-H) MTT yöntemiyle tespit edilen sitotoksik aktiviteleri

CM-$CHCl_3$ fraksiyonları	**IC_{50}±SS (µg/mL)* (% inhibisyon)**		
	HeLa	**PC-3**	**3T3 (normal)**
Fr. A	10.23±0.010 (83.14)	11.12±0.080 (82.75)	5.01±0.020 (71.29)
Fr. B	12.44±0.010 (80.24)	11.44±0.020 (83.48)	0.81±0.500 (80.66)
Fr. C	9.12±0.030 (89.92)	8.27±0.030 (87.55)	0.92±0.004 (51.66)
Fr. D	25.41±0.080 (50.53)	25.46±0.001 (55.03)	- (46.22)
Fr. E	10.89±0.002 (65.65)	15.82±0.020 (68.68)	- (41.69)
Fr. F	16.81±0.080 (67.07)	17.32±0.800 (67.67)	- (44.71)
Fr. G	17.89±0.010 (71.28)	7.80±0.002 (75.62)	- (47.73)
Fr. H	- (18.01)	- (19.53)	- (18.13)
Doksorubisin	0.20±0.03 (95.90)	0.25±0.008 (81.97)	-
Siklohekzamid	-	-	0.30±0.020 (85.00)

* IC_{50} değeri %50'nin üstünde gözlenen inhibisyonlar için hesaplanmıştır, SS: Standart sapma,
-: etki gözlenmedi

C. montanum'un kloroform ekstresinden elde edilen Fr. A-H'nin SRB ve MTT yöntemiyle elde edilen bulgulara göre; denenen hücre soylarına karşı Fr. C, A ve B en yüksek sitotoksisiteye sahip bulunmuştur (Çizelge 4.20 ve 4.21).

C. montanum'un kloroform ekstresinden izole edilen bileşiklerin sitotoksik aktivite bulguları

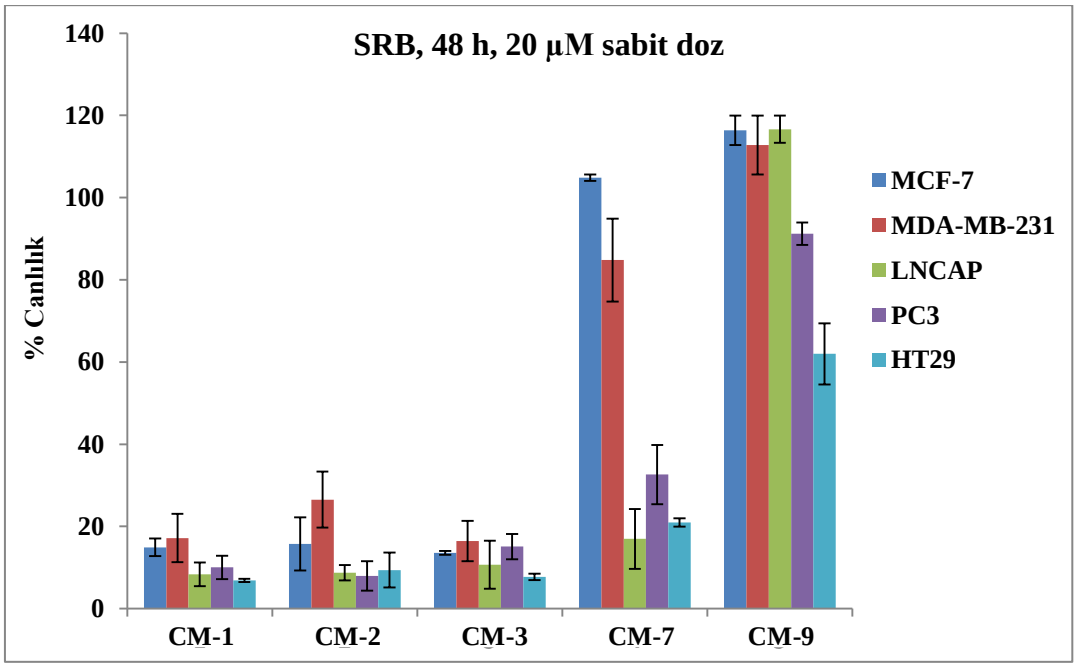
İzole edilen bileşiklerin SRB yöntemine göre sitotoksik aktivite bulguları

C. montanum'un kloroform ekstresinin etkili bulunan fraksiyonlarından izole edilen **CM-1**, **CM-2**, **CM-3**, **CM-7** ve **CM-9** bileşiklerinin SRB yöntemiyle belirlenen sitotoksik aktiviteleri Çizelge 4.22 ve Şekil 4.19'da verilmiştir.

Çizelge 4.22. *C. montanum*'un kloroform ekstresinden izole edilen bileşiklerin SRB yöntemiyle tespit edilen sitotoksik aktiviteleri

Saf bileşikler	% Canlılık ± SS*				
	MCF-7	MDA-MB-231	LNCaP	PC-3 (akciğer)	HT-29
CM-1	14.91±2.17	17.16±5.87	8.35±2.88	10.03±2.84	6.86±0.37
CM-2	15.76±6.46	26.51±6.83	8.73±1.84	7.95±3.57	9.39±4.25
CM-3	13.54±0.45	16.43±4.93	10.69±5.84	15.11±3.08	7.73±0.77
CM-7	104.85±0.78	84.82±10.09	16.96±7.26	32.61±7.17	20.99±1.01
CM-9	116.37±3.59	112.78±7.15	116.64±3.32	91.20±2.75	61.99±7.44

SS: Standart sapma, * 20 µM dozda test edilmiştir.



Şekil 4.19. *C. montanum*'un kloroform ekstresinden izole edilen bileşiklerin SRB yöntemiyle tespit edilen sitotoksik aktiviteleri

İzole edilen bileşiklerin MTT yöntemine göre sitotoksik aktivite bulguları

C. montanum'un kloroform ekstresinin etkili bulunan fraksiyonlarından izole edilen **CM-1**, **CM-2**, **CM-3** ve **CM-7** bileşiklerinin MTT yöntemiyle belirlenen sitotoksik aktiviteleri Çizelge 4.23'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.23. *C. montanum*'un kloroform ekstresinden izole edilen bileşiklerin MTT yöntemiyle tespit edilen sitotoksik aktiviteleri

Saf bileşikler	**IC_{50}±SS (µg/mL)* (% inhibisyon)**	
	HeLa	**3T3 (normal)**
CM-1	- (15.00)	- (42.00)
CM-2	- (18.00)	- (33.00)
CM-3	- (15.00)	- (27.00)
CM-7	- (10.00)	- (36.00)
Doksorubisin	1.20±0.40 (71.00)	-
Siklohekzamid	-	0.80±0.20 (70.00)

* 30 µM dozda test edilmiştir. IC_{50} değeri % 50'nin üstünde gözlenen inhibisyonlar için hesaplanmıştır, SS: Standart sapma, -: etki gözlenmedi.

4.2.2. *In vitro* antienflamatuvar aktivite bulguları

Chrysophthalmum türlerinden elde edilen ham metanol ekstreleri ve alt ekstrelerinin antienflamatuvar aktiviteleri Çizelge 4.24'de verilmiştir.

Çizelge 4.24. *Chrysophthalmum* türlerinin ham metanol ekstreleri ve alt ekstrelerinin antienflamatuvar aktiviteleri

Numuneler		**% inhibisyon**	**IC_{50} ±SS (µg/ml)***
CM ekstreleri	**CM-MeOH**	39.5	-
	CM-*n*-Hekzan	85.6	54.8±3.5
	CM-$CHCl_3$	100.3	12.4±1.9
	CM-*n*-BuOH	60.6	28.7±0.7
	CM-R-H_2O	8.9	-
CG ekstreleri	**CG-MeOH**	17.7	-
	CG-*n*-Hekzan	12.0	-
	CG-$CHCl_3$	100.7	23.1±2.5
	CG-*n*-BuOH	60.9	103.4±7.7
	CG-R-H_2O	0.1	-
CD ekstreleri	**CD-MeOH**	65.0	57.5±7.6
	CD-*n*-Hekzan	16.0	-
	CD-$CHCl_3$	92.4	12.7±1.0
	CD-*n*-BuOH	16.2	-
	CD-R-H_2O	11.1	-
Standard	**Ibuprofen**	73.2	11.2±1.9

* IC_{50} değeri %50'nin üstünde gözlenen inhibisyonlar için hesaplanmıştır, SS: Standart sapma, -: etki gözlenmedi.

Chrysophthalmum türlerinin ham metanollü ekstreleri ve alt ekstrelerinin *in vitro* kemiluminesans oksidatif patlama deneyi bulgularına göre; *C. montanum* ve *C. dichotomum*'un kloroform ekstrelerinde yüksek; *C. gueneri*'nin kloroform ve *C. montanum*'un *n*-BuOH ekstrelerinde ise orta derecede antienflamatuvar etki gözlenmiştir (Çizelge 4.24).

C. montanum üzerinde gerçekleştirilen biyoaktivite ile yönlendirilen izolasyon çalışmaları sonucunda, kloroform ekstresinden elde edilen fraksiyonların (Fr. A-H) antienflamatuvar aktiviteleri Çizelge 4.25'de verilmiştir.

Çizelge 4.25. *C. montanum* kloroform ekstresinden elde edilen fraksiyonların (Fr. A-H) antienflamatuvar aktiviteleri

CM-$CHCl_3$ fraksiyonları	**IC_{50} ±SS (µg/ml)***
Fr. A	19.5±1.5
Fr. B	0.6±0.1
Fr. C	25.5±2.4
Fr. D	24.1±4.8
Fr. E	19.2±3.2
Fr. F	27.2±2.4
Fr. G	34.2±3.0
Fr. H	-
Ibuprofen	11.2±1.9

* IC_{50} değeri %50'nin üstünde gözlenen inhibisyonlar için hesaplanmıştır, SS: Standart sapma, -: etki gözlenmedi.

C. montanum'un kloroform ekstresinin en yüksek antienflamatuvar aktiviteye sahip fraksiyonu (Fr. B) ve diğer aktif fraksiyonlarından izole edilen **CM-1**, **CM-2**, **CM-3** ve **CM-7** bileşiklerinin antienflamatuvar aktivite sonuçları Çizelge 4.26'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.26. *C. montanum*'un kloroform ekstresinden izole edilen bileşiklerin antienflamatuvar aktiviteleri

Saf bileşikler	**% inhibisyon**	**IC_{50} ±SS (µg/ml)***
CM-1	92.5	3.4±0.05
CM-2	29.9	-
CM-3	37.8	-
CM-7	7.9	-
Ibuprofen	73.2	11.2±1.9

* IC_{50} değeri %50'nin üstünde gözlenen inhibisyonlar için hesaplanmıştır, SS: Standart sapma, -: etki gözlenmedi.

4.2.3. *In vitro* leishmanisidal aktivite bulguları

Chrysophthalmum türlerinden elde edilen ham metanol ekstreleri ve alt ekstrelerinin *L. major*'a karşı leishmanisidal aktivite sonuçları aşağıdaki çizelgede verilmiştir (Çizelge 4.27).

Çizelge 4.27. *Chrysophthalmum* türlerinden elde edilen ham metanol ekstreleri ve alt ekstrelerinin leishmanisidal aktiviteleri

Numuneler		**IC_{50} ±SS (µg/mL)***	**Leishmanisidal aktivite**
CM ekstreleri	**CM-MeOH**	<100	-
	CM-*n*-Hekzan	18.49±0.10	Önemli
	CM-$CHCl_3$	15.61±0.20	Önemli
	CM-*n*-BuOH	>100	-
	CM-R-H_2O	>100	-
CG ekstreleri	**CG-MeOH**	>100	-
	CG-*n*-Hekzan	57.74±0.50	Orta
	CG-$CHCl_3$	15.99±0.10	Önemli
	CG-*n*-BuOH	>100	-
	CG-R-H_2O	>100	-
CD ekstreleri	**CD-MeOH**	55.91±0.10	Orta
	CD-*n*-Hekzan	72.56±0.10	Düşük
	CD-$CHCl_3$	8.86±0.50	Önemli
	CD-*n*-BuOH	>100	-
	CD-R-H_2O	56.75±0.20	Orta
Standard	**Amfoterisin B**	0.20±0.50	
Standard	**Pentamidin**	5.09±0.90	

* IC_{50} değeri %50'nin üstünde gözlenen inhibisyonlar için hesaplanmıştır, SS: Standart sapma, -: etki gözlenmedi.

Ayrıca *Chrysophthalmum* türlerinin ham metanollü ekstreleri ve alt ekstrelerinin *in vitro* leishmanisidal aktiviteleri incelendiğinde, üç türün kloroform ekstreleri ile *C. montanum*'un *n*-hekzan ekstresinin önemli derecede aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.27).

C. montanum'un kloroform ekstresinden izole edilen **CM-1**, **CM-2**, **CM-3** ve **CM-7** bileşiklerinin *L. donovani*'ye karşı leishmanisidal aktiviteleri aşağıdaki çizelgede verilmiştir (Çizelge 4.28).

Çizelge 4.28. *C. montanum*'un kloroform ekstresinden izole edilen bileşiklerin leishmanisidal aktiviteleri

Saf bileşikler	**IC_{50} ± SS (µg/mL)***	**Leishmanisidal aktivite**
CM-1	4.5±0.60	Kuvvetli
CM-2	>100	-
CM-3	21.6±0.53	Önemli
CM-7	3.12±0.37	Kuvvetli
Amfoterisin B	0.49±0.90	
Pentamidin	0.37±0.60	

* IC_{50} değeri %50'nin üstünde gözlenen inhibisyonlar için hesaplanmıştır, SS: Standart sapma, - : etki gözlenmedi.

5. TARTIŞMA

Türkiye'de yetişen üç *Chrysophthalmum* türü, üzerinde sürdürmüş olduğumuz farmakognozik araştırmalarımızda biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlama ile sitotoksik, antienflamatuvar ve leishmanisidal aktiviteleri açısından incelenmiştir. Bu türlerden yaygın olan *C. montanum*, sitotoksik ve antienflamatuvar etkiden sorumlu sekonder metabolitleri yönünden araştırılmıştır.

Chrysophthalmum montanum'un toprak üstü kısmı, *C. gueneri* ve *C. dichotomum*'un tüm bitki kısımları kurutulup toz edildikten sonra % 80'lik metanol ile üç kez 40°C'de ekstre edilmiştir. Yoğunlaştırılan MeOH'lü ekstreler aynı çözücü içerisinde çözülmüş ve sırasıyla *n*-hekzan, kloroform ve *n*-butanol ile sıvı-sıvı ektraksiyon yapılarak farklı polaritede ekstreler (*n*-hekzan, $CHCl_3$, *n*-BuOH ve R-H_2O ekstreleri) elde edilmiştir. *Chrysophthalmum* türlerinin ham metanollü ekstreleri ve elde edilen tüm alt ekstreleri *in vitro* sitotoksik, antienflamatuvar ve leishmanisidal aktiviteleri bakımından incelenmiştir.

Çalışmamızda, *in vitro* sitotoksik aktivite tayini için SRB ve MTT testleri kullanılmıştır. *In vitro* sitotoksik aktivite tayinlerinde sıklıkla kullanılan SRB testi, Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü (National Cancer Institute-NCI) tarafından rutin olarak uygulanan bir test olup, MTT gibi formazan oluşumuna dayalı testlere kıyasla daha hassas sonuçlar vermektedir (Houghton ve diğerleri, 2007; Skehan ve diğerleri, 1990). NCI'nın kriterlerine göre, sitotoksik aktivite ekstreler için IC_{50} < 20 μg/mL, saf bileşikler için IC_{50} < 4 μg/mL olduğunda aktif olarak değerlendirilmektedir (Boyed, 1997).

Chrysophthalmum türlerinin ham ekstreleri (% 80 MeOH) ve alt ekstrelerinin (*n*-hekzan, kloroform, *n*-butanol ve kalan su) sitotoksik aktiviteleri, SRB yöntemiyle östrojen reseptör (+) MCF-7 ve östrojen reseptör (-) MDA-MB-231 (meme), LNCaP (prostat), HT-29 (kolon) ve PC-3 (p53 mutant, akciğer) kanser hücre soylarına karşı % canlılık değerleri hesaplanarak belirlenmiştir. Ayrıca ekstrelerin MTT yöntemiyle PC-3 (prostat), MCF-7 (meme), HeLa (servikal) ve H460 (akciğer) kanser hücre soyları ile 3T3 (fare fibroblastı) normal hücre soyuna karşı sitotoksik aktiviteleri % inhibisyon ve IC_{50} (% 50 inhibisyon gösteren derişim) değerleri ile tayin edilmiştir.

SRB yönteminin sonuçlarına göre; her üç *Chrysophthalmum* türünün $CHCl_3$ ekstreleri denenen kanser hücre soyundan bağımsız olarak hücre büyümesini yaklaşık % 80 oranında inhibe ederek en yüksek sitotoksisiteye sahip bulunmuştur. *C. montanum*, *C. gueneri* ve *C. dichotomum*'un $CHCl_3$ ekstreleri denenen tüm hücre soylarına karşı sırasıyla % 15.59-23.91, 15.15-19.91 ve 16.02-28.00 aralığında canlılık göstermiştir. *C. montanum*'un $CHCl_3$ ekstresi MCF-7, *C. gueneri*'nin $CHCl_3$ ekstresi LNCaP ve *C. dichotomum*'un $CHCl_3$ ekstresi PC-3 (akciğer) hücre soylarına karşı en yüksek sitotoksisitede bulunmuştur. Ayrıca, *C. montanum*, *C. gueneri* ve *C. dichotomum*'un *n*-hekzan ekstrelerinde, MDA-MB-231 hücre soyuna karşı sırasıyla % 26.33, 24.75 ve 22.33 canlılık ile selektif sitotoksisite gözlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.14-4.16, Şekil 4.15-4.17).

MTT yönteminin sonuçları SRB ile parallelik göstermiş; *C. montanum*, *C. gueneri* ve *C. dichotomum*'un $CHCl_3$ ekstreleri denenen tüm hücre soylarına karşı en yüksek sitotoksik aktivitede (IC_{50} değerleri sırasıyla 5.38-10.17, 5.17-8.67 ve 5.63-11.89 µg/mL) belirlenmiştir. *C. montanum* ve *C. gueneri*'nin $CHCl_3$ ekstreleri HeLa'ya, *C. dichotomum*'un $CHCl_3$ ekstresi ise H460 kanser hücre soyuna karşı en yüksek sitotoksisitede bulunmuştur. Ayrıca, *C. montanum* ve *C. dichotomum*'un *n*-hekzan ekstrelerinin denenen tüm hücre soylarına karşı IC_{50} değerleri sırasıyla12.94-20.15 ve 19.43-30.20 µg/mL olarak tespit edilmiş ve her iki türün *n*-hekzan ekstrelerinin en yüksek sitotoksik aktivitesi H460'a karşı gözlenmiştir. NCI kriterlerine göre, üç *Chrysophthalmum* türünün $CHCl_3$ ekstreleri ve *C. montanum*'un *n*-hekzan ekstresi denenen tüm hücre soylarına karşı aktif bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.17-4.19).

Çalışmamızda, PMN'den ROS salımının inhibisyonu kemiluminesans yöntemle ölçülmüştür (Helfand ve diğerleri, 1982). ROS dokularda enflamasyona yol açarak, çeşitli enflamatuvar hastalıkların oluşuma neden olmaktadır. Bu nedenle, PMN'den ROS salımının inhibisyonu antienflamatuvar etki ile ilişkilendirilmektedir (Afonso, Champy, Mitrovic, Collin ve Lomri, 2007). *In vitro* antienflamatuvar aktivite sonuçlarına göre, *C. montanum* ve *C. dichotomum*'un $CHCl_3$ ekstreleri ibuprofen (IC_{50}=11.2 µg/mL) ile kıyaslandığında yüksek aktivitede (IC_{50} değerleri sırasıyla 12.4 ve 12.7 µg/mL) tespit edilmiştir. *C. gueneri*'nin $CHCl_3$ ve *C. montanum*'un *n*-BuOH ekstreleri ise orta derecede antienflamatuvar etkide (IC_{50} değerleri sırasıyla 23.1 ve 28.7 µg/mL) bulunmuştur.

In vitro leishmanisidal aktivite sonuçları, *C. dichotomum*, *C. montanum* ve *C. gueneri*'nin $CHCl_3$ ekstrelerinin önemli düzeyde aktiviteye sahip olduğunu (IC_{50} değerleri sırasıyla 8.86, 15.61 ve 15.99 µg/mL) göstermiştir. *C. dichotomum*'un $CHCl_3$ ekstresi (IC_{50}=8.86 µg/mL) Pentamidin'e yakın etkide bulunmuştur. Ayrıca *C. montanum*'un *n*-hekzan ekstresi de önemli leishmanisidal aktivitede (IC_{50}=18.49 µg/mL) bulunmuştur.

Biyolojik aktivite deneylerine ait sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, *Chrysophthalmum* türlerinin $CHCl_3$ ekstrelerinin en yüksek aktivitelere sahip olduğu görülmüştür. $CHCl_3$ ekstreleri değişik solvan sistemleri kullanılarak İTK ile incelendiğinde, üç türün de terpenik bileşikler bakımından zengin olduğu tespit edilmiştir. *C. montanum*'un halk tıbbında çeşitli amaçlarla da kullanılıyor olması nedeniyle, biyoaktivite ile yönlendirilen izolasyon çalışmaları *C. montanum* $CHCl_3$ ekstresi üzerinde sürdürülmüştür. Ayrıca, bitkinin $CHCl_3$ ekstresinden sonra aktif bulunan *n*-hekzan ekstresi üzerinde de fitokimyasal çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

C. montanum'un etkili bulunan $CHCl_3$ ekstresinin biyoaktivite ile yönlendirilen fraksiyonlanmasında Silika jel kolon kromatografisi uygulanarak 8 fraksiyon (Fr. A-H) elde edilmiştir. Her bir fraksiyon (Fr. A-H) sitotoksik ve antienflamatuvar aktiviteleri bakımından incelenmiştir.

Fraksiyonların (Fr. A-H) SRB hücre canlılık yöntemine göre MCF-7, MDA-MB-231, LNCaP, HT-29 ve PC-3 (p53 mutant) kanser hücre soylarına karşı % canlılık değerleri, Fr. A-E için % 19.47-64.02, Fr. F ve G için % 54.56-76.22 ve Fr. H için % 79.70-100.82 olarak bulunmuştur. En yüksek sitotoksik aktivite, HT-29 hücre soyuna karşı % 19.47 ve 20.09 canlılık değerleri ile sırasıyla Fr. A ve B'de gözlenmiştir. Fr. A-H'nin sitotoksik aktiviteleri ayrıca MTT yöntemiyle, HeLa ve PC-3 kanser ile 3T3 normal hücre soylarına karşı test edilmiştir. PC-3 ve HeLa'ya karşı Fr. H hariç tüm fraksiyonların % 50'den büyük inhibisyon gösterdiği (IC_{50}= 7.80-25.26 µg/mL) bulunmuştur. En yüksek sitotoksik aktivite Fr. A, B ve C'de (IC_{50} = 8.27-12.44 µg/mL) belirlenmiştir. 3T3 normal hücre soyuna karşı Fr. D-H % 50'den daha düşük inhibisyon gösterirken, Fr. A-C % 50'nin üzerinde bir inhibisyona (IC_{50}= 0.81-5.01 µg/mL) sahip bulunmuştur. NCI kriterlerine göre, *C. montanum*'un Fr. D ve H hariç tüm fraksiyonları denenen tüm kanser hücre soylarına karşı aktif bulunmuştur. 3T3 normal hücre soyuna karşı ise, Fr. A, B ve C aktif bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.21).

Fr. A-H'nin antienflamatuvar aktivite sonuçlarına göre, Fr. H hariç diğer fraksiyonlar % 50'nin üzerinde inhibisyon göstermiştir. Fr. B (IC_{50}=0.6 µg/mL), ibuprofen'e (IC_{50}=11.2 µg/mL) kıyasla oldukça yüksek etkide tespit edilmiştir. Ayrıca, Fr. E ve A'nın (sırasıyla, IC_{50} = 19.2 ve 19.5 µg/mL) yüksek antienflamatuvar etkiye sahip olduğu; Fr. D, C, F ve G'nin (sırasıyla, IC_{50}=24.1, 25.5, 27.2 ve 34.2 µg/mL) ise orta etkide bulunduğu görülmüştür.

Sitotoksik ve antienflamatuvar etkiye sahip bulunan fraksiyonlar (Fr. A-G) üzerinde kromatografik çalışmalar (Silika jel KK, Sephadex KK, Preparatif İTK, Normal faz ve Ters Faz YBSK) ve kristallendirme işlemleri ile 3'ü yeni (**CM-4, CM-5** ve **CM-6**) olmak üzere 11 bileşik (**CM-1 - CM-11**) elde edilmiştir. Ayrıca *n*-hekzan ekstresinden 2 bileşik (**CM-12** ve **CM-13**) izole edilmiştir. Bileşiklerin yapı tayinleri spektroskopik (UV, IR, 1D ve 2D NMR ve MS) teknikler kullanılarak yapılmıştır. Bunun yanında iyi kristallenen bileşiklerin X-ışını kristalografisi ile absolü konfigürasyonları belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre izole edilen toplam 13 sekonder metabolit; seskiterpen laktonlar, sterol glikozitleri, lignan, flavonoit ve triterpenler olmak üzere beş farklı kimyasal grup altında toplanmıştır.

Seskiterpen laktonlar kendi içinde 4 farklı grup altında toplanmıştır:

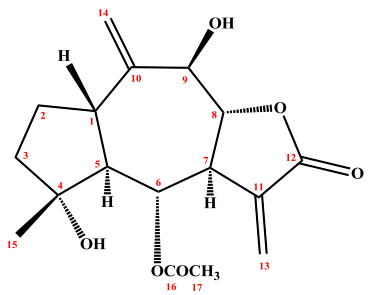
a) İnuviskolid türevleri (**CM-6 ve CM-4**)

b) İzoinuviskolid türevleri (**CM-1 ve CM-3**)

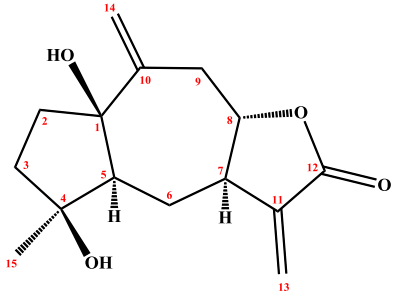
c) C-9,10-epoksi-8,12-*trans*-gayanolidler (**CM-2 ve CM-5**)

d) C1(2)-en, 8,12-*cis*-gayanolidler (**CM-7 ve CM-8**)'dir.

a) İnuviskolid türevleri



CM-6



CM-4

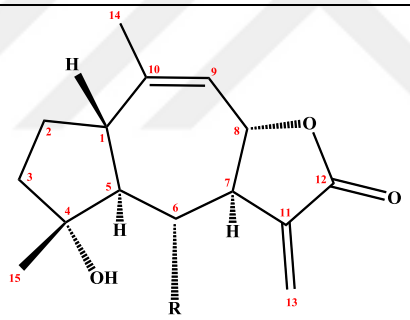
CM-6: 4*α*,9*β*-dihidroksi-6*α*-asetoksi-1*β*H-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid* (9*β*-hidroksi-6*α*-asetoksi-inuviskolid)**

CM-4: 1*β*,4*β*-dihidroksi-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid* (1*β*-hidroksi-4-*epi*-inuviskolid)**

***yeni bileşiktir**, kimyasal okunuşu ile tarafımızdan isimlendirilmiştir

**inuviskolid yapısı temel alınarak tarafımızdan verilen isimdir

b) İzoinuviskolid türevleri



	R
CM-1	$OCOCH_3$
CM-3	OH

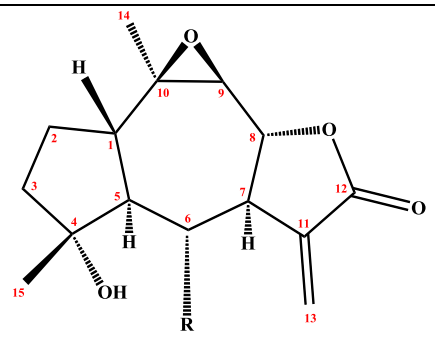
CM-1: 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-1*β*H-gaya-9.11(13)-dien-12.8*α*-olid[a] (6*α*-asetoksi-izoinuviskolid)[b] (6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-1*β*H-gaya-9(10),11(13)-dien-12,8*α*-olid)[c]

CM-3: 4*α*,6*α*-dihidroksi-1*β*,5*α*,7*α*H-gaya-9(10),11(13)-dien-12,8*α*-olid[d] (6*α*-hidroksi-izoinuviskolid) *

[a,b,c,d] Literatürde verilen isimlerdir. Bileşik, literatürde ilk olarak verildiği ismi ile kullanılmıştır (a: Rustaiyan ve diğerleri, 1989; b: Qin ve diğerleri, 2011; Chang ve diğerleri, 2012; Cheng ve diğerleri, 2012; c: Gürbüz ve diğerleri, 2016; d: Cheng ve diğerleri, 2011; Gürbüz ve diğerleri, 2016)

* izoinuviskolid yapısı temel alınarak tarafımızdan verilen isimdir

c) C-9,10-epoksi-8,12-*trans*-gayanolidler



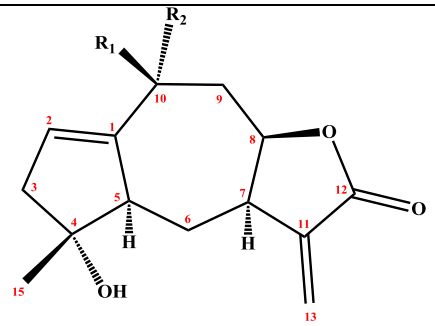
	R
CM-2	$OCOCH_3$
CM-5	OH

CM-2: 6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-9*β*.10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-12.8*α*-olid[a] (6*α*-asetoksi-9*β*,10*β*-epoksi-izoinuviskolid)*

CM-5: 4*α*,6*α*-dihidroksi-9*β*,10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-8α,12-olid* (6*α*-hidroksi-9*β*,10*β*-epoksi-izoinuviskolid)**

[a] Literatürde verilen isimdir (a: Rustaiyan ve diğerleri, 1989)
***yeni bileşiktir**, kimyasal okunuşu ile tarafımızdan isimlendirilmiştir
**izoinuviskolid yapısı temel alınarak tarafımızdan verilen isimlerdir

d) C1(2)-en, 8,12-*cis*-gayanolidler



	R_1	**R_2**
CM-7	OH	CH_3
CM-8	CH_3	OH

CM-7: (4*α*,5*α*,8*β*,10*β*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid[a] (4*α*,10*β*-dihidroksi-5*α*(H)-1,11(13)-gayadien-8*β*,12-olid)[b]

CM-8: (4*α*,5*α*,8*β*,10*α*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid[a]

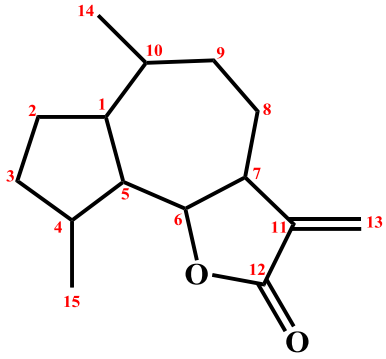
[a, b] Literatürde verilen isimlerdir. Bileşik, literatürde ilk olarak verildiği ismi ile kullanılmıştır (a: Ahmed ve diğerleri, 1993; b: Li ve diğerleri, 2011; Hyldgaard ve diğerleri, 2015)

Seskiterpen laktonların gayanolid yapılarının IR spektrumları incelendiğinde, karakteristik α-metilen γ-lakton (1735 - 1769 cm^{-1}), doymamışlık (1646 - 1661 cm^{-1}) ve hidroksil gruplarına (3343 - 3446 cm^{-1}) ait absorpsiyon bantları gözlenmiştir.

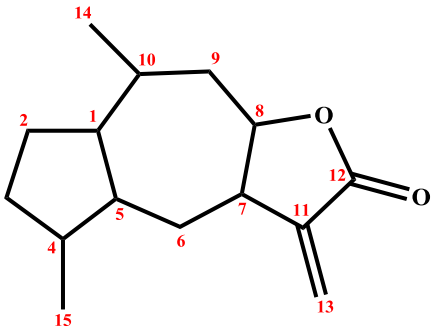
Gayanolidlerin NMR ile yapı tayininde; yüksek rezolüsyonlu ^{1}H ve ^{13}C NMR spektrumları ile birlikte, her protonun üzerinde olduğu karbon rezonanslarını belirlemek için HSQC ve yapıdaki sübstitüsyonları belirlemek için HMBC tekniklerinden yararlanılmıştır. Ayrıca visinal protonlar arasındaki spin-spin etkileşimlerinin belirlenmesi için COSY ve tüm protonların uzaysal yerleşiminin tespiti için ise NOESY teknikleri kullanılmıştır.

^{1}H NMR spektrumunda tespit edilen H-1 ve H-5 protonlarının kendi aralarında gösterdiği COSY etkileşimleri ile C-1 ve H-5 arasında görülen HMBC korelasyonları izole ettiğimiz seskiterpen laktonların "gayanolid iskeleti" taşıdığını göstermiştir. Ödesmanolid ve germakranolid yapılarında bu etkileşimler görülmemektedir (Ahmed ve Mahmoud, 1998).

Gayanolidlerde α,β-doymamış γ-lakton halkası, 6. ve 7. konumlardan (6,12-gayanolidler) veya 7. ve 8. konumlardan (8,12-gayanolidler) bağlanmaktadır (Şekil 5.1) (Bruneton, 1999; Janecki, 2014). 6,12-gayanolidlerin ^{1}H NMR spektrumunda, H-6 ve H-7 için karakteristik proton sinyalleri sırasıyla δ_H 3.62-4.71 (*dd* veya *t*) ve δ_H 2.32-4.10'da (*ddddd* veya *dddt*) gözlenmektedir. Ancak 8. konuma bağlı sübstitüsyonlara göre H-7'nin kimyasal kayma değerinde ve görünümünde değişiklikler görülmektedir (Sigstad ve diğerleri 1991; Trifunović, Milosavljević, Vajs, Macura ve Todorović, 2008). 8,12-gayanolidlerin ^{1}H NMR spektrumunda, H-7 ve H-8 için karakteristik proton sinyalleri sırasıyla δ_H 2.47-3.35 (*ddddd*) ve δ_H 3.96-4.31 (*ddd*)'de görülmektedir (Dendougui ve diğerleri 2000; Topcu, Öksüz, Herz ve Díaz, 1995). Ancak 6. ve 9. konumlardaki sübstitüsyonlara göre, H-7 ve H-8'in kimyasal kayma değerleri ve görünümünde değişiklikler gözlenmektedir (Ahmed ve diğerleri, 1993; Hyldgaard ve diğerleri 2015; Li ve diğerleri 2011a; Qin ve diğerleri 2011; Topcu ve diğerleri 1995; Topcu ve Öksüz, 1990). İzole ettiğimiz gayanolidlerin ^{1}H NMR spektrumları değerlendirildiğinde, H-7 ve H-8 için karakteristik proton sinyallerinin (Çizelge 5.1), literatürde "8,12-gayanolidler" için verilen değerler ile uyumlu olduğu belirlenmiştir.



6,12-gayanolid



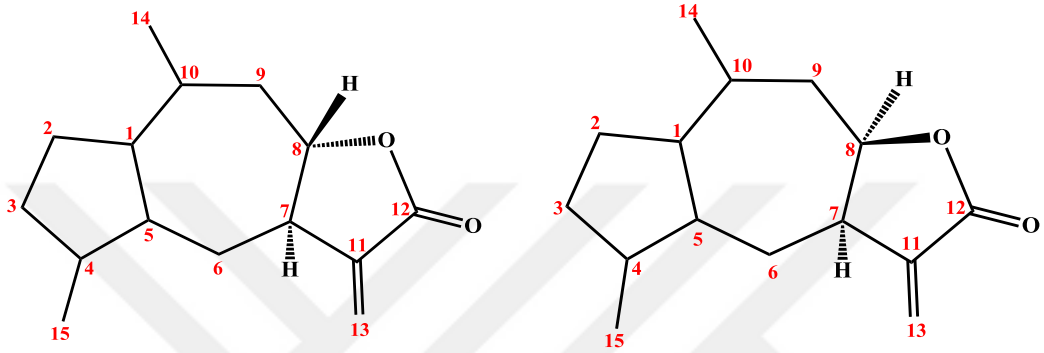
8,12-gayanolid

Şekil 5.1. Gayanolid yapıları

Çizelge 5.1. İzole edilen gayanolidlerin (**CM-1** - **CM-8**) H-7 ve H-8 rezonansları

Seskiterpen laktonlar		**H-7** δ_H, ***J*** **(Hz) (çözücü)**	**H-8** δ_H, ***J*** **(Hz) (çözücü)**
İnuviskolid türevleri	**CM-6**	2.88 m ($CDCl_3$+CD_3OD)	4.18 dd (8.5/8.5) ($CDCl_3$+CD_3OD)
		3.26 m (C_5D_5N)	4.98 m (C_5D_5N)
	CM-4	3.03 m ($CDCl_3$)	4.54 ddd (4.5/9.0/11.5) ($CDCl_3$)
		3.06 m (DMSO-d_6)	4.67 m (DMSO-d_6)
İzoinuviskolid türevleri	**CM-1**	3.04 ddt (3.2/10.0/10.0) ($CDCl_3$)	4.72 brdd (4.0/9.6) ($CDCl_3$)
	CM-3	2.62 dddd (3.2/3.6/9.6/9.6) ($CDCl_3$)	4.62 brdd (4.4/10.0) ($CDCl_3$)
C-9,10-epoksi-8,12-*trans*-gayanolidler	**CM-2**	3.39 m ($CDCl_3$)	4.01 dd (6.4/10.4) ($CDCl_3$)
	CM-5	2.91 m ($CDCl_3$)	3.91 m ($CDCl_3$)
		3.17 m (C_5D_5N)	4.28 dd (6.5/10.5) (C_5D_5N)
C1(2)-en, 8,12-*cis*-gayanolidler	**CM-7**	3.30 m (CD_3OD)	4.87 m (CD_3OD)
		3.23 m ($CDCl_3$)	4.75 ddd (4.4/8.0/12.0) ($CDCl_3$)
	CM-8	3.35 m ($CDCl_3$)	5.15 ddd (4.0/8.0/12.0) ($CDCl_3$)
		3.28 m (DMSO-d_6)	4.98 ddd (4.0/8.0/11.5) (DMSO-d_6)

Gayanolid yapılarında H-7 biyosentez bakımından stereokimyasal olarak *α* konumdadır (Bruneton, 1999; Simonsen ve diğereri, 2013). H-7'nin *α* konumda olduğu kabul edilerek, *α*, *β*-doymamış *γ*-lakton halkasının siklohеptan halkasına bağlanışına göre, H-8 *α* veya *β* konumda bulunur. Böylece gayanolid yapıları; "8,12-*cis*-gayanolidler" ve "8,12-*trans*-gayanolidler" (Şekil 5.2) olmak üzere iki grup altında toplanır (Bruneton, 1999; Janecki, 2014).



8,12-*trans*-gayanolid 8,12-*cis*-gayanolid

Şekil 5.2. 8,12-*cis* / *trans*-gayanolid yapıları

Gayanolidlerin yapı tayininde, H-7 ile visinal H-8 protonları arasındaki etkileşim sabiti (*J*, Hz) dikkate alınarak, H-8'in *α* veya *β* konfigürasyonda olduğu öngörülür. NOESY, NOE difference spektroskopisi veya X-ışını kırınım analizi ile lakton halkasının "*cis*" veya "*trans*" bağlandığı ispatlanır. Ayrıca, seskiterpen laktonlarda, lakton halkasının *cis* / *trans* bağlandığı "Samek kuralı" ile de desteklenebilmektedir (Samek, 1978). Samek kuralına göre, 8,12 gayanolidlerde lakton halkasının *cis / trans* bağlanışı, H-7'nin H-8 visinal proton ile gösterdiği etkileşim ve H-7'nin karakteristik ekzosiklik metilen protonları (H_2-13) ile gösterdiği allilik etkileşime göre belirlenebilmektedir. Samek kuralına göre, lakton halkasındaki karakteristik H_2-13 ile H-7 arasında görülen allilik etkileşim $|J_{7,13}|$ (*trans*-lakton) $\geq 3 \geq |J_{7,13}|$ (*cis*-lakton) kuralı ile ifade edilmektedir. Ayrıca, $|J_{7,13}| > 3$ olduğu durumlarda, H-7'nin H-8 visinal protonu ile gösterdiği etkileşim $|J_{7,8}| \approx$ 8-10 ise lakton halkasının *cis / trans* bağlandığının belirlenemediği bildirilmiştir. Ancak, bazı durumlarda bu kuralların farklılık gösterebileceği de ifade edilmiştir. Samek, gayanolid yapılarının büyük çoğunluğunda lakton halkasının konformasyonel faktörlerden dolayı "*trans*" pozisyonda bağlandığını, *cis*-lakton konformasyonuna oldukça az rastlandığını belirtmektedir (Samek, 1978). İzole ettiğimiz seskiterpen laktonların Samek kuralına uygunluğu ve NOESY korelasyonları birlikte değerlendirildiğinde, "**CM-1 - CM-6**"da

lakton halkasının "***trans***"; "**CM-7** ve **CM-8**" de ise "***cis***" pozisyonda bağlandığı belirlenmiştir. Ayrıca **CM-1**, **CM-2** ve **CM-7**'nin X-ışını kristalografisi ile absolü konfigürasyonları doğrulanmıştır.

6,12- ve 8,12-gayanolidlerin ^{1}H NMR spektrumunda, ekzosiklik metilen (H-13a ve H-13b) protonlarına ait sinyaller karakteristik olarak 5-6 ppm civarında (J=1-4 Hz) "*d*" şeklinde görülmektedir (Yoshioka, Mabry, Irwin, Geissman ve Samek, 1971). Bu bulguya uygun olarak, **CM-3** ve **CM-5** hariç, izole ettiğimiz gayanolidlerin hepsinin ^{1}H NMR spektrumlarında karakteristik ekzosiklik metilen protonları (H-13a ve H-13b) δ_H 6.04-6.42 ve 5.50-5.82'de (J=1-4 Hz) "*d*" veya "brs" şeklinde görülmüştür. 8,12 gayanolid yapılarında α-metilen, γ-lakton halkasında bulunan ekzosiklik metilen protonları (H-13a ve H-13b), C-6-α hidroksil grubu nedeniyle ^{1}H NMR spektrumunda geminal etkileşim verir. Bu nedenle, H_2-13 sinyallerinin kimyasal kayma değerleri yakınlaşarak "*d*" yerine "*dd*", hatta bazı durumlarda kimyasal kayma değerleri çok yaklaştığı için "*m*" olarak görülür (Yoshioka ve diğerleri 1971). Buna göre, **CM-3** ve **CM-5**'da C-6-α hidroksil sübstitüsyonu bulunması nedeniyle ^{1}H NMR spektrumlarında ($CDCl_3$), ekzosiklik proton sinyalleri sırasıyla δ_H 6.26 (*m*, H-13a)/6.25 (*m*, H-13b) ve 6.62 (*dd*, J=1.5/2.5 Hz, H-13a)/6.45 (*dd*, J=1.5/3.0 Hz, H-13b)'de görülmüştür (Bkz. Şekil 4.4a-C, Şekil 4.6b-C). Gayanolidlerin hepsinin HSQC spektrumları incelendiğinde, karakteristik ekzosiklik metilen karbon (C-13) rezonansları δ_C 121.44-125.30'da gözlenmiştir. Ayrıca, karakteristik ekzosiklik metilen protonlarının bağlı olduğu sp^2 katerner karbon (C-11) rezonansları HMBC yardımıyla doğrulanarak δ_C 134.78-141.02'de görülmüştür.

Bunun yanında, sadece inuviskolid türevi olan **CM-4** ve **CM-6**'nın ^{1}H NMR spektrumunda görülen diğer ekzosiklik metilen protonları (H-14a ve H-14b), sırasıyla δ_H 5.19-5.37 ve 4.94-5.26'de "*brs*" şeklinde gözlenmiştir. **CM-4 ve CM-6**'te bulunan diğer ekzosiklik metilen karbon (C-14) rezonansları ise, sırasıyla δ_C 116.20 ve 115.49'da tespit edilmiştir. HMBC korelasyonları yardımıyla, **CM-4 ve CM-6**'te bulunan diğer ekzosiklik metilen karbon rezonanslarının bağlı olduğu sp^2 katerner karbon (C-10) rezonansları sırasıyla δ_C 149.18 ve 143.93'te tespit edilmiştir.

Gayanolid iskeletinde C-9,10 trisübstitüe etilenik bağ bulunan **CM-1** ve **CM-3**'ün ^{1}H NMR spektrumlarında, karakteristik olefinik metin protonu (H-9) δ_H 5.80'de "*m*" veya "*dq*" şeklinde görülmüştür (Bkz. Şekil 4.3a-B). Ayrıca **CM-1** ve **CM-3**'te C-9 karbon

sinyallerinin rezonansları, HMBC korelasyonları ile desteklenerek düşük alanda sırasıyla δ_C 125.78 ve 125.82'de gözlenmiştir. Gayanolidlerin tümünde ^{13}C NMR ve APT spektrumları incelendiğinde, gayanolid iskeletindeki karakteristik lakton karboniline ait karbon rezonansları δ_C 169.49-171.82'de kolaylıkla farkedilmektedir. Ayrıca, **CM-1, CM-2** ve **CM-6** bileşiklerinde, C-6'da bulunan asetoksil sübstitüsyonundaki karbonil rezonansları HMBC etkileşimlerinden sırasıyla δ_C 170.63, 170.52 ve 170.56'da bulunmuştur.

CM-1, **CM-2**, **CM-3**, **CM-5** ve **CM-6**'nın ^{1}H NMR spektrumlarında, H-6 oksimetin protonunun visinal H-5 ve H-7 protonları ile etkileşim sabitinin eşit değerde ($J_{6,5}$=$J_{6,7}$=10 Hz civarında) olması nedeniyle, H-6 sinyali br*dd*, *dd* veya *dd*"*t*"olarak görülmektedir. (Bkz. Şekil 4a-C, Şekil 6b-B). H-6'nın visinal protonlar (H-5 ve H-7) ile büyük etkileşim sabitine (J=10 Hz civarında) sahip olması, H-6'nın β pozisyonda olduğunu da göstermektedir.

Asetilli gayanolid yapılarının (**CM-1, CM-2** ve **CM-6**) ^{1}H NMR spektrumları incelendiğinde, asetat gruplarına ait metil singletleri kimyasal kayma değerlerinden kolaylıkla farkedilerek sırasıyla δ_H 1.93, 2.10 ve 2.10'de gözlenmiştir. **CM-1** ve **CM-3**'te bulunan H_3-14 metilleri ise, C-9,10 olefinik bağ dolasıyla düşük alana (sırasıyla δ_H 1.81 s ve 1.80 s) kaymıştır. İzole edilen seskiterpen laktonların hepsinin ^{1}H NMR spektrumları incelendiğinde, C-4'te yer alan OH sübstitüsyonu nedeniyle, H_3-15 singlet metil protonlarına ait sinyaller δ_H 1.10-1.41'de düşük alana kaymış olarak gözlenmiştir.

Seskiterpen laktonlarda COSY spektrumlarından, visinal protonların etkileşiminin (H-1/H_2-2/H_2-3; H-1/H-5/H-6/H-7/H-8/H-9) yanısıra karakteristik H_2-13 ekzosiklik metilen protonlarının H-7 ile uzak mesafe allilik etkileşimi ve H_2-3'ün H_3-15 ile uzak mesafe W etkileşimi gözlenmektedir. Ayrıca C-9 ile C-10 arasında bulunan çifte bağdan dolayı H_3-14'ün H-9 ile uzak mesafe allilik etkileşimi ve H_3-14'ün H-8 ile uzak mesafe homo allilik etkileşimi görülebilmektedir.

İzole ettiğimiz seskiterpen laktonların rölatif konfigürasyonları ise NOESY spektrumlarından yararlanılarak belirlenmiştir. Özellikle lakton halkasının bağlandığı konumlarda bulunan protonların (H-7, H-8, H-1 ve H-5) kendi arasında veya H_3-14, H_3-15,

H-9 ve H-6 protonları ile gösterdiği NOESY korelasyonları, seskiterpen laktonların yapılarının aydınlatılmasında yardımcı olmuştur.

Çalışmamız sırasında kloroform ekstresinden sterol glikozitlerinin karışımı (*β*-sitosterol-3-O-*β*-D-glukopiranozit ve stigmasterol 3-O-*β*-D-glukopiranozit karışımı) (**CM-9)** izole edilmiştir. Bileşiğin ^{1}H NMR spektrumunda (Bkz. Şekil 4.9a), karakteristik olarak görülen anomerik proton sinyalinden monoglukozidik bir yapı olduğu anlaşılmıştır. COSY ve HSQC yardımıyla tespit edilen oza ait sinyaller molekülde *β*-glukozun bulunduğunu göstermiştir. ^{13}C NMR spektrumunda görülen glukozdan ileri gelen 6 karbonun ve aglikonu oluşturan 29 karbonun rezonansları steroit iskeletinde 35 karbonlu bir glikozit yapısını açıklamaktadır.

İzole edilen bileşikler arasında, dimerik fenilpropan yapısında, simetrik yapılı furanofuranoid tipinde bir lignan (pinorezinol, **CM-10**) izole edilmiştir. ^{1}H NMR spektrumunda (Bkz. Şekil 4.10a), aromatik bölgede 1,3,4-trisübstitüe benzen halkalarına ait ABX sinyal sistemleri çakışmış halde δ_H 6.88 (*d*, *J*=1.6 Hz), 6.87 (*d*, *J*=8.8 Hz) ve 6.80 (*dd*, *J*=8.8/1.6 Hz)'de gözlenmiştir. Ayrıca, görülen diğer karakteristik sinyaller aromatik halkalarda birer metoksil grubunun varlığını göstermiştir. Bileşiğin COSY spektrumunda, oksimetin, oksimetilen ve metin sinyalleri aynı spin sistemi içinde görülmüştür. Yapılan 1D ve 2D NMR bulguları sonucuna göre yapının simetrik bir furanofuranoid lignan olan pinorezinol olduğu ortaya konmuştur.

Araştırmalarımız sırasında, kloroform ekstresinden fenolik karakterde diğer bir bileşik olarak, flavon yapısında krizosplenol C (**CM-11**) izole edilmiştir. Bileşiğin, ^{1}H NMR spektrumunda (Bkz. Şekil 4.11a), 1,3,4-trisübstitüe benzen halkasına işaret eden ABX sinyal sistemi şeklinde δ_H 7.68 (*d*, *J*=2 Hz), 7.02 (*d*, *J*=8.4 Hz) ve 7.64 (*dd*, *J*=8.4/2.0 Hz)'de karakteristik sinyaller tespit edilmiştir. Ayrıca δ_H 3.85, 3.97 ve 3.98'de singlet şeklinde görülen karakteristik metoksil sinyallerinin, HMBC yardımıyla C-3, C-3' ve C-7'ye bağlı oldukları tespit edilmiştir. Bulgularımız **CM-11**'in 5,6,4'-trihidroksi-3,7,3'-trimetoksi flavon yapısında olduğunu göstermiştir.

C. montanum'un *n*-hekzan ekstresinden triterpen yapısında iki bileşik (**CM-12** ve **CM-13**) elde edilmiştir. **CM-13**'ün ^{1}H NMR spektrumunda (Bkz. Şekil 4.13a), karakteristik olarak 7 adet metil sinyalinin görülmesi ve APT spekrumunda 30 karbon rezonansının tespit

edilmesi, bileşiğin taraksastan iskeletinde olan triterpen yapılı izomer bileşiklerin karışımı (Ψ-taraksasterol ve taraksasterol) olduğunu göstermektedir. Ayrıca asetil grubunun metil sübstitüsyonuna işaret eden δ_H 2.03'deki singlet proton sinyali, **CM-12**'nin (Ψ-taraksasterol-asetat ve taraksasterol-asetat) **CM-13**'den farklı olarak C-3'e bağlı bir asetil grubu taşıdığını göstermiştir (Bkz. Şekil 4.12a).

C. montanum üzerinde yapmış olduğumuz fitokimyasal çalışmalar sonucunda, bitkinin başlıca seskiterpen laktonlar bakımından zengin olduğu saptanmıştır. Biyoaktif bulunan $CHCl_3$ ekstresinden izole edilen seskiterpen lakton yapısındaki bileşiklerin, daha önce elde edildikleri türler Çizelge 5.2'de verilmektedir. *C. montanum*'dan ayrıca sterol glikozitleri karışımı, fenolik yapıda (lignan ve flavonoit) ve triterpen yapısında bileşikler izole edilmiştir. *C. montanum*'dan izole ettiğimiz seskiterpen laktonların *Inula* cinsinden izole edilen seskiterpen laktonlar ile benzer yapılara (inuviskolid ve izoinuviskolid türevi gayanolidler başta olmak üzere) sahip oldukları görülmüştür (Çizelge 5.2). Bu bulgu, *Inula* ve *Chrysophthalmum* cinslerinin filogenetik açıdan yakınlık gösterdiği bulgusunu (Eldenäs ve diğerleri, 1999) desteklemektedir.

İzole edilen saf bileşiklerden biyolojik aktivite tayinleri için yeterli miktarda bulunanların sitotoksik, antienflamatuvar ve leishmanisidal aktiviteleri tayin edilmiştir. **CM-1**, **CM-2**, **CM-3**, **CM-7** ve **CM-9**'un sitotoksik aktiviteleri, SRB hücre canlılık yöntemiyle MCF-7, MDA-MB-231, LNCaP, HT-29 ve PC-3 (p53 mutant) kanser hücre soylarına karşı test edilmiş ve en yüksek sitotoksisite HT-29 hücre soyuna karşı 20 µM konsantrasyonda % 6.86 ve 7.73 canlılık ile sırasıyla **CM-1** ve **CM-3**'te tespit edilmiştir. Takiben PC-3 (p53 mutant) hücre soyuna karşı **CM-2**'nin % 7.95 canlılık, LNCaP hücre soyuna karşı **CM-1** ve **CM-2**'nin sırasıyla % 8.35 ve 8.73 canlılık gösterdiği bulunmuştur. Bileşiklerden **CM-7**'nin ise, denenen hücre soyları içerisinde LNCaP ve HT-29'a karşı seçici sitotoksik aktivite (sırasıyla % 16.96 ve 20.99 canlılık) gösterdiği görülmüştür. Ayrıca SRB testinde yüksek inhibisyon gösteren seskiterpen laktonlardan **CM-1**, **CM-2**, **CM-3** ve **CM-7** bileşikleri HeLa hücre soyuna karşı MTT yönteminde 30 µM konsantrasyonda inaktif olarak bulunmuştur. Ayrıca normal hücrelere (3T3) karşı toksisite göstermemiştir (Bkz. Çizelge 4.23).

İzole edilen seskiterpen laktonlardan **CM-1**, **CM-2**, **CM-3** ve **CM-7**'nin antienflamatuvar aktiviteleri incelendiğinde, major bileşik olan **CM-1**'in % 92.5 inhibisyon (IC_{50}=3.4

µg/mL) ile ibuprofen'e (IC_{50}=11.2 µg/mL) kıyasla oldukça yüksek aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur.

CM-1, **CM-2**, **CM-3** ve **CM-7**'nin leishmanisidal aktiviteleri incelendiğinde, **CM-1** ve **CM-7**'nin sırasıyla 3.12 ve 4.5 µg/mL IC_{50} değerleri ile en yüksek aktiviteye sahip olduğu; ardından **CM-3**'ün (IC_{50}=21.6 µg/mL) önemli aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.28).

Çizelge 5.2. *C. montanum*'dan izole edilen seskiterpen laktonların daha önce elde edildiği türler

İzole edilen seskiterpen laktonlar	İsimleri	Daha önce elde edildiği türler	Kaynaklar
CM-1	6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-1*β*H-gaya-9.11(13)-dien-12.8*α*-olid	*Postia bombycina*	Rustaiyan ve diğerleri, 1989
	6*α*-asetoksi-izoinuviskolid	*Inula hupehensis*	Qin ve diğerleri, 2011
		Inula helianthus-aquatica	Chang ve diğerleri, 2012
		Inula hookeri	Cheng ve diğerleri, 2012
	6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-1*β*H-gaya-9(10),11(13)-dien-12,8*α*-olid	*Chrysophthalmum montanum*	Gürbüz ve diğerleri, 2016
CM-2	6*α*-asetoksi-4*α*-hidroksi-9*β*.10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-12.8*α*-olid	*Postia bombycina*	Rustaiyan ve diğerleri, 1989
CM-3	4*α*,6*α*-dihidroksi-1*β*,5*α*,7*α*H-gaya-9(10),11(13)-dien-12,8*α*-olid	*Inula falconeri*	Cheng ve diğerleri, 2011
		Chrysophthalmum montanum	Gürbüz ve diğerleri, 2016
CM-4*	1*β*,4*β*-dihidroksi-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid	-	-
CM-5*	4*α*,6*α*-dihidroksi-9*β*,10*β*-epoksi-1*β*H-gaya-11(13)-en-8α,12-olid	-	-
CM-6*	4*α*,9*β*-dihidroksi-6*α*-asetoksi-1*β*H-gaya-10(14),11(13)-dien-8*α*,12-olid	-	-
CM-7	4*α*,5*α*,8*β*,10*β*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid	*Jasonia candicans*	Ahmed ve diğerleri, 1993
	4*α*,10*β*-dihidroksi-5*α*(H)-1,11(13)-gayadien-8*β*,12-olid	*Carpesium faberi*	Li ve diğerleri, 2011
		Leucophyta brownii	Hyldgaard ve diğerleri, 2015
CM-8	4*α*,5*α*,8*β*,10*α*)-4,10-dihidroksi-1,11(13)-gayadien-12,8-olid	*Jasonia candicans*	Ahmed ve diğerleri, 1993

* **CM-4**, **CM-5** ve **CM-6** yeni bileşik

Asteraceae bitkilerinin karakteristik bileşenlerini oluşturan seskiterpen laktonların, sitotoksik, antienflamatuvar, analjezik, antimalaryal, antiprotozoal, insektisidal, fitotoksik, antiviral, antibakteriyel, antifungal, antimigren ve sedatif gibi birçok aktivitesi üzerinde, genellikle yapılarında ortak olarak bulunan "*α*-metilen-*γ*-lakton" fonksiyonel grubu etkili olmaktadır (Chadwick ve diğerleri, 2013; Saeidnia, 2015). Seskiterpen laktonların α-metilen, γ-lakton grubu, nükleofiller (en reaktif olanı proteinlerdeki sistein'in tiyol grupları) ile Michael tipi katım reaksiyonu vererek kovalent bağ oluşturarak hücrede apoptozise neden olmaktadır. Ayrıca, serbest intrasellüler glutatyon (GSH) ile reaksiyona girerek, hücrede majör proseslerden biri olan GSH metabolizmasının bozulmasına yol açmaktadır (Ghantous ve diğerleri, 2010; Janecki 2014; Saeidnia, 2015). Seskiterpen laktonların hücrede major prosesler üzerinde geniş hedef alanına sahip olması, bu bileşik grubunun çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olmasını açıklamaktadır. Bundan dolayı yeterli selektiviteye sahip seskiterpen laktonlar (örn. partenolid ve helenalin) klinik çalışmalar için önem taşımaktadır (Janecki 2014).

Seskiterpen laktonların sitotoksik ve antienflamatuvar aktiviteleri üzerinde önemli diğer faktörler, lipofilisiteleri ve moleküler geometrileridir. Lipofilisitesinin yüksek olması, bileşiğin hücre membranından penetrasyonunu kolaylaştırdığı için aktiviteyi arttırmaktadır. Konformasyonal fleksibilite seskiterpen laktonların biyoaktiviteleri üzerinde önemli bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada, 7,8-*cis* bağlı lakton halkası taşıyan helenalinlerin, rijid yapıdaki 7,8-*trans* bağlı lakton halkası taşıyan meksikanin I türevlerinden daha toksik olduğu tespit edilmiştir (Beekman ve diğerleri, 1997). Ayrıca stereokimyanın da antitümör ve antienflamatuvar etki üzerinde önemli olduğu bildirilmiştir. Gayanolid ve psödogayanolid yapıları üzerindeki çalışmalar, aktivitenin 3. konumda bulunan OH grubunun stereokimyası (3*α*-OH veya 3*β*-OH) ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Ghantous, Nasser, Saab, Darwiche ve Saliba, 2009; Recio ve diğerleri 2000).

Ayrıca, seskiterpen laktonların sitotoksik ve antienflamatuvar özellik gösterebilmeleri için *α*-metilen-*γ*-lakton yanında, *β*-unsbütitüe siklopentenon ve *α*-epoksisiklopentanon yapılarının da önemli olduğu bildirilmiştir. Bunun yanında, lakton veya siklopentenon veya ester yan zincirinde bulunan doymamış karbonil veya "enon" ($O=C-C=CH_2$) sistemlerinin, tümör hücrelerine karşı toksisiteyi arttırdığı bulunmuştur (Ghantous ve diğerleri, 2010).

Literatür taramasına göre, izole ettiğimiz bilinen seskiterpen laktonlardan (**CM-1**, **CM-2**, **CM-3**, **CM-7 ve CM-8**) bugüne kadar sadece **CM-7**'nin MTT testi ile MCF-7 hücre soyuna karşı sitotoksisitesi araştırılmıştır. *Carpesium faberi*'den izole edilen 4*α*,10*β*-dihidroksi-5*α*(H)-1,11(13)-gayadien-8*β*,12-olid (**CM-7**), MCF-7 hücre soyuna karşı (IC_{50}=26.5±0.6 µg/mL) 5-florourasil (IC_{50}=14.1±0.7 µg/mL) ve daunorubisin'e (IC_{50}=0.5±0.1 µg/mL) kıyasla düşük sitotoksisitede bulunmuştur (Li ve diğerleri, 2011). SRB testi sonuçlarımıza göre, **CM-7**, MCF-7 hücre soyuna karşı % 141.11±0.33 canlılık ile önemli sitotoksisiteye sahip bulunmamıştır. Bununla birlikte, SRB sonuçlarımıza göre **CM-7**, LNCaP ve HT-29 hücre soylarına karşı selektif sitotoksik aktivite gösterdiğinden (sırasıyla % 16.96 ve 20.99 canlılık), hücresel düzeyde etki mekanizmalarını belirlemek üzere ileri çalışmalar yapılması uygun bulunmuştur. SRB sonuçlarımıza göre, **CM-1**, **CM-2** ve **CM-3** test edilen tüm hücre soylarına karşı (MCF-7 (meme), MDA-MB-231 (meme), LNCaP (prostat), HT-29 (kolon) ve PC-3 (p53 mutant akciğer) gösterdikleri yüksek sitotoksisite nedeniyle, genel sitotoksik etkiye sahip olarak değerlendirilmiştir.

Sterol türevi bileşikler, bitkilerde oldukça yaygın olarak bulunan sekonder metabolitlerdir. Literatürde, **CM-9**'un majör bileşeni olan "*β*-sitosterol-3-O-*β*-D-glukopiranozit" *Lythrum salicaria*'dan izole edilerek, MTT yöntemi ile K-562 (lösemi), NIH-3T3 (normal), T47D (meme duktal kanseri) ve HT-29 (kolon kanseri) hücre soylarına karşı sitotoksisitesi test edilmiştir. Bu çalışmada, *β*-sitosterol-3-O-*β*-D-glukopiranozit'in K-562, NIH-3T3, T47D ve HT-29 hücre soylarına karşı (IC_{50} değerleri sırasıyla 50.2±1.12, 530.4±6.7, 228.7±8.8 ve 192.7±11.2 µg/mL) metotreksat (IC_{50}=0.16-0.32 µg/mL)'a kıyasla oldukça düşük sitotoksisite gösterdiği bulunmuştur (Manayani ve diğerleri, 2013). Çalışmamızda, *β*-sitosterol-3-O-*β*-D-glukopiranozit ve stigmasterol 3-O-*β*-D-glukopiranozit'in karışımı (1:0.5) olan **CM-9**, SRB testinde 20 µM konsantrasyonda HT-29 hücre soyuna karşı % 61.99±7.44 canlılık ile önemli sitotoksisitede bulunmamıştır.

İzole ettiğimiz lignan yapısındaki pinorezinol (**CM-10**)'ün sitotoksisitesi üzerine son yıllarda yapılan bir çalışmada, *Euonymus alatus*'dan izole edilen pinorezinol'ün, SRB yöntemiyle A549 (küçük hücreli olmayan akciğer), SK-OV-3 (ovaryum), SK-MEL-2 (deri melanoma) ve HCT-15 (kolon) kanser hücre soylarına karşı sitotoksik aktivitesi incelenmiş ve IC_{50} değerleri sırasıyla >50.0, >50.0, 39.76 ve >50.0 µM bulunarak standarda kıyasla (doksorubisin için IC_{50} değerleri sırasıyla 0.002, 0.012, 0.001 ve 0.129 µM) düşük sitotoksisitede olduğu tespit edilmiştir (Lee, Moon, Choi ve Kim, 2016). Diğer bir

çalışmada ise, *Bupleurum chinense*'den izole edilen pinorezinol MTT yöntemiyle A549, HepG2, U251, Bcap-37 ve MCF-7 hücre soylarına karşı (IC_{50} değerleri sırasıyla 29.35, 62.35, >80, >80 ve 75.32 μM) 5-florourasil'e kıyasla (sırasıyla IC_{50}=34.27, 49.72, 48.60, 47.09 ve 42.78 μM) daha düşük sitotoksisitede bulunmuştur (Li ve diğerleri, 2017).

Literatürde, izole ettiğimiz flavon yapısında krizosplenol C (**CM-11**)'nin sitotoksisitesi üzerine yapılmış bir araştırma bulunmamaktadır. Yapılan bir çalışmada, krizosplenol C Avustralya'da geleneksel olarak soğuk algınlığına karşı kullanılan *Pterocaulon sphacelatum* bitkisinden poliovirus etkenine karşı antiviral etkiden sorumlu bileşik (EC_{50}=0.27 μg/mL) olarak izole edilmiştir. Bileşiğin 4'-hidroksi-3-metoksi flavon grubundan dolayı, soğuk algınlığına neden olan rhinoviruslerin replikasyonunu inhibe ederek antiviral aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Semple ve diğerleri, 1999). Ülkemizde halk arasında toprak üstü kısımları soğuk algınlığı ve nezleye karşı kullanılan *C. montanum*'dan (Özkan ve Koyuncu, 2005; Arasan ve Kaya, 2015) krizosplenol C'nin izole edilmesi, *C. montanum*'un halk arasındaki bu kullanımını desteklemektedir.

CM-13 karışımını oluşturan bileşiklerden olan "taraksasterol" üzerinde yapılmış bir çalışmada, *Cornus kousa*'dan izole edilen bileşik, MTT yöntemi ile sitotoksik aktivitesi bakımından HCT-116 (kolon), MCF-7 (meme), HeLa (serviks), SK-OV-3 ve SK-MEL-5 kanser hücre soylarına karşı denenmiş ve IC_{50} değerleri sırasıyla 100.0, 53.3, 49.5, 100.0 ve 49.6 μM olarak tespit edilmiştir. Taraksasterol'ün pozitif kontrol olarak kullanılan doksorubisin (sırasıyla IC_{50} = 3.2, 10.6, 4.8, 0.58, 1.03 μM) ve paklitaksel'e (sırasıyla IC_{50} = 0.05, 0.9, 1.1, 0.46, 0.15 μM) kıyasla düşük sitotoksisite gösterdiği bildirilmiştir (Lee ve diğerleri, 2010).

İzole ettiğimiz bilinen seskiterpen laktonların (**CM-1**, **CM-2**, **CM-3**, **CM-7 ve CM-8**) antienflamatuvar aktiviteleri üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde, sadece **CM-1**, **CM-3** ve **CM-7** üzerinde *in vitro* yöntemlerle yapılan aktivite çalışmalarına rastlanmıştır (Cheng ve diğerleri 2011; Hyldgaard ve diğerleri 2015; Qin ve diğerleri 2011). Qin ve diğerleri (2011)'nin yaptığı çalışmada, *Inula hupehensis*'den izole edilen **CM-1**'in *in vitro* antienflamatuvar aktivitesi, RAW 264.7 makrofajlarında LPS ile indüklenmiş nitrik oksit üretimindeki inhibisyonu ölçülerek belirlenmiştir. **CM-1**'in (IC_{50} =17.1±1.32 μM) pozitif kontrol olarak kullanılan aminoguanidin'den (IC_{50}=7.9±0.35 μM) düşük antienflamatuvar aktivitede olduğu bulunmuştur. Çalışmamızda, kemiluminesans yöntemle elde ettiğimiz

bulgulara göre, **CM-1** (IC_{50}=3.4 µg/mL) ibuprofen'e (IC_{50}=11.2 µg/mL) kıyasla oldukça yüksek antienflamatuvar aktivitede tespit edilmiştir. Cheng ve diğerleri (2011)'nin yaptığı çalışmada ise, *Inula falconeri*'den izole edilen **CM-3**'ün *in vitro* antienflamatuvar aktivitesi, RAW 264.7 makrofajlarında LPS ile indüklenmiş nitrik oksit üretimindeki inhibisyonun ölçülmesi ile bulunmuştur. **CM-3** (IC_{50} =0.13 µM) aminoguanidin'e (IC_{50}=0.20 µM) kıyasla oldukça yüksek aktivite göstermiştir. Son yıllarda yapılan bir çalışmada (Hyldgaard ve diğerleri 2015), *Leucophyta brownii*'den izole edilen **CM-7**'nin *in vitro* antienflamatuvar aktivitesi, RAW 264.7 makrofajlarında LPS ile indüklenmiş tromboksan B2 (TrxB2) ve Prostaglandin E2 (PGE2) üretimindeki inhibisyonun ölçülmesiyle incelenmiş ve IC_{50} değerleri sırasıyla 37.5 µM ve 21.2 µM olmak üzere pozitif kontrol olarak kullanılan hidrokortizon'dan (IC_{50}=10 µM) düşük aktivitede tespit edilmiştir.

CM-9'un bileşiminde bulunan *β*-sitosterol-3-O-*β*-D-glukopiranozit'in *Pyrus bretschneideri*'den izole edilerek *in vivo* yöntemle antienflamatuvar aktivitesinin araştırıldığı bir çalışma rapor edilmiştir. Çalışmada, izole edilen *β*-sitosterol-3-O-*β*-D-glukopiranozit ile *β*-sitosterol bileşikleri ksilen nedenli kulak ödemi modeline göre fareler üzerinde test edilmiştir. *β*-sitosterol-3-O-*β*-D-glukopiranozit 10 ve 20 mg/kg dozda sırasıyla % 39.46 ve 52.08 inhibisyon göstererek, *β*-sitosterol (sırasıyla % 29.93 ve 41.06)'den daha aktif olmak üzere deksametazon'dan (10 mg/kg için % 66.02) düşük antienflamatuvar aktivitede bulunmuştur (Huang ve diğerleri, 2010).

İzole ettiğimiz pinorezinol (**CM-10**) üzerine son yıllarda yapılan bir çalışmada, *Euonymus alatus*'dan izole edilen pinorezinol'ün, LPS ile aktive olmuş BV-2 hücrelerinde NO üretimine gösterdiği inhibisyon değerlendirilmiş ve IC_{50} değeri 6.75 µM olarak standarda kıyasla (NMMA için IC_{50} değeri 18.23 µM) düşük aktivite tespit edilmiştir (Lee, Moon, Choi ve Kim, 2016).

CM-12 karışımını oluşturan bileşiklerden "taraksasterol asetat"ın, *Echinops echinatus*'den izole edilerek sıçanlarda *in vivo* antienflamatuvar aktivitesi incelenmiştir. Karragenan ile oluşturulan ödem üzerine taraksasterol asetat 12.5, 25, 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarında i.p. ve oral yoldan uygulanmış, 4 saatin sonunda sırasıyla % 16.10-68.31 ve 13.79-63.25 inhibisyon ile standarda kıyasla (fenilbutazon: 50 mg/kg için % 69.03 ve 46.23 inhibisyon) yüksek antienflamatuvar aktivitede bulunmuştur. Bileşik, sıçanlarda formaldehit ile

oluşturulmuş akut ve kronik enflamasyon modellerinde, 10, 20, 40 ve 80 mg/kg dozlarında i.p. yoldan verilerek, 4 saat ve 10 gün sonunda sırasıyla % 17.72-50.70 ve 29.70-70.64 inhibisyon gösterdiği ve standard (fenilbutazon 50 mg/kg için sırasıyla % 22.69 ve 56.16 inhibisyon) ile kıyaslandığında yüksek antienflamatuvar aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Adjuvan ile oluşturulmuş akut ve kronik rat modelinde, 18 saat ve 21 gün sonunda sırasıyla % 29.50-57.91 ve 39.62-67.47 inhibisyon göstermiş ve standard (fenilbutazon 50 mg/kg için sırasıyla 34.16 ve 64.21) ile kıyaslandığında yüksek antienflamatuvar aktivitede bulunmuştur (Sing, Ram, Pandey, Joshi ve Gambhir, 1991). Bir başka çalışmada, *Pluchea lanceolata*'dan izole edilen taraksasterol asetat ve Ψ-taraksasterol asetat sıçanlarda karragenan nedenli ödem modelinde 100 mg/kg dozda oral yoldan uygulandığında, sırasıyla % 37.0 ve 0 inhibisyon gözlenmiş ve fenilbutazon'a kıyasla (30 mg/kg için % 54.2) düşük antienflamatuvar aktivitede tespit edilmiştir (Srivastava, Varma, Tandon ve Srimal, 1990).

Leishmanisidal aktiviteye sahip doğal bileşikler üzerine yapılan çalışmalara bakıldığında, bugüne kadar seskiterpen lakton, triterpen, steroit, alkaloit, kalkon ve lignan yapısında pek çok sekonder metabolitin önemli aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Rocha, Almeida, Macedo ve Barbosa-Filho, 2005). Seskiterpen laktonlardan antiprotozoal aktivite bakımından en çok incelenen madde gruplarını gayanolidler, psödogayanolidler, germakranolidler, ksantanolidler ve ödesmanolidler oluşturmaktadır. Dehidrozaluzanin C, dehidrolökodin, 11,13-dehidrokompressanolid ve digayaperfolin gibi gayanolid türevi seskiterpen laktonlar, çeşitli *Leishmania* etkenlerine karşı etkili bulunmuştur. *Tanacetum parthenium* bitkisinden izole edilen 11,13-dehidrokompressanolid, promastigot formundaki *L. amazonensis*'e karşı IC_{50}=2.6 μg/mL ile aktif bulunmuştur. 11,13-dehidrokompressanolid bileşiğinin hücre içindeki amastigot formunda % 90 oranında canlılığı azaltması için 10 kat yüksek dozunun (20 μg/mL) gerekli olduğu ve bu bileşiğin promastigotlara selektif olarak 385 kat daha toksisite gösterdiği bildirilmiştir. Bitkinin ana bileşeni olan 11,13-dehidrokompressanolid, iyi bilinen bir seskiterpen lakton olan partenolid'e kıyasla daha az aktif olmasına rağmen, 10 kat daha yüksek selektiviteye sahip bulunmuştur (Schmidt ve diğerleri 2012). Çalışmamızda izole ettiğimiz seskiterpen laktonların leishmanisidal aktivitesi üzerine herhangi bir çalışma bulunmamıştır. Sadece izole ettiğimiz sterol glikozitleri karışımının **(CM-9)** leishmanisidal aktivitesinin belirlendiği bir çalışmaya rastlanmıştır. *Pourouma guianensis*'den izole edilen sitosterol ve stigmasterol glukozit karışımı, *Leishmania amazonensis*'in promastigot ve amastigotlarına

karşı *in vitro* yöntemle test edilmiş ve IC_{50} değerleri sırasıyla 50 ve >100 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Standart olarak kullanılan pentamidin izotiyonat (promastigotlara karşı IC_{50}=6 µg/mL) ve meglumin antimonyat (amastigotlara karşı IC_{50}=83 µg/mL) ile karşılaştırıldığında düşük aktivitede bulunmuştur (Torres-Santos ve diğerleri, 2004).

Doğal kaynaklardan hareketle kanser kemoterapisinde, çeşitli enflamatuvar hastalıklarda ve özellikle tropikal ve subtropikal ülkelerde önemli bir protozoa etkeni olan *Leishmania* parazitine karşı etkili ve düşük toksisiteye sahip yeni ilaç molekülleri geliştirmek üzere birçok araştırma yapılmaktadır. Doğal bileşiklerdeki biyoçeşitlilik yeni ilaç moleküllerinin keşfinde önemli bir yere sahiptir. *Chrysophthalmum* türleri taşıdıkları sitotoksik, antienflamatuvar ve leishmanisidal etkili sekonder metabolitler yönünden önemli bir kaynak olarak görülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmalarımız sonucunda Türkiye'de yetişen *Chrysophthalmum* türlerinin önemli sitotoksik, antienflamatuvar ve leishmanisidal aktivitelere sahip olduğu ilk defa ortaya konmuş ve *C. montanum*'dan biyoaktivite yönlendirmeli izolasyon ile seskiterpen laktonlar (**CM-1** - **CM-8**), sterol glikoziti (**CM-9**), lignan (**CM-10**), flavonoit (**CM-11**) ve triterpenler (**CM-12** ve **CM-13**) olmak üzere 13 sekonder metabolit (**CM-1** - **CM-13**) elde edilmiştir. Bu çalışmalar sonunda;

1. *C. montanum*'un aktif $CHCl_3$ ekstresinin ana bileşenleri olarak izole ettiğimiz seskiterpen laktonlardan üçü (**CM-4**, **CM-5** ve **CM-6**) yeni bileşik olarak bilime kazandırılmıştır.
2. İzole ettiğimiz sekiz bileşik (**CM-2**, **CM-7**, **CM-8**, **CM-9**, **CM-10**, **CM-11**, **CM-12** ve **CM-13**) *Chrysophthalmum* cinsinden ilk defa rapor edilmiştir.
3. Seskiterpen laktonlardan beş bileşiğin (**CM-1**, **CM-2**, **CM-3**, **CM-7** ve **CM-8**) spektral verileri ayrıntılı ve tam olarak ilk kez verilmiştir.
4. Seskiterpen laktonlardan üç bileşiğin (**CM-1**, **CM-2** ve **CM-7**) absolü konfigürasyonları X-ray kristalografisi ile belirlenmiş olup, bunlardan **CM-1** ve **CM-2**'nin kristal verileri ilk kez rapor edilmiştir.

Elde ettiğimiz biyolojik aktivite bulgularına göre, *C. montanum*'dan biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlama ile elde edilen $CHCl_3$ alt ekstresi ve Fr. A-C en yüksek aktivitelere sahip bulunmuştur. En yüksek aktiviteye sahip bulunan Fr. A-C'den başlıca seskiterpen lakton yapısında dört (**CM-1** - **CM-4**) ve fenolik yapıda iki bileşik (**CM-10** ve **CM-11**) izole edilmiştir. Fr. A-C'nin yüksek aktivitelere sahip bulunması, içerdikleri bileşiklerin gösterdiği sinerjizm ile açıklanabilir. Fr. A, B ve C'den izole edilen **CM-1**, **CM-2** ve **CM-3**'ün seçilen kanser hücre soylarına karşı sitotoksik aktiviteleri ilk kez test edilmiş ve bileşiklerin hepsi yüksek sitotoksisitede bulunmuştur. Ayrıca, aktif bulunan Fr. E ve F'den biyolojik aktivite testleri için yeterli miktarda izole ettiğimiz **CM-7**'nin sitotoksik aktivitesi MCF-7 hariç olmak üzere seçilen hücre soyları üzerinde ilk kez incelenmiş ve LNCaP ile HT-29 hücre soylarına karşı selektif sitotoksisite gösterdiği tespit edilmiştir.

Sitotoksik aktiviteye paralel olarak antienflamatuvar etkileri bakımından incelediğimiz seskiterpen laktonlardan **CM-1**, **CM-2**, **CM-3** ve **CM-7**'nin antienflamatuvar aktivitesi ilk kez *in vitro* kemiluminesans yöntem kullanılarak araştırılmıştır. **CM-1** referans maddeden daha yüksek antienflamatuvar aktivitede bulunmuştur. **CM-1**'i taşıyan fraksiyonlardan Fr. B'nin antienflamatuvar aktivitesinin ise bileşikten çok daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu durum, Fr. B'de bulunan bileşiklerin (seskiterpen lakton yapısında **CM-1, CM-2** ve **CM-3;** flavonoit yapısında krizosplenol C ve lignan yapısında pinorezinol) sinerjik etkileri veya **CM-1**'den daha aktif olabilecek bileşiklerin varlığı ile açıklanabilir.

Diğer biyolojik aktivitelerde olduğu gibi en yüksek leishmanisidal aktiviteye sahip bulunan *C. montanum*'un $CHCl_3$ ekstresinden izole edilen seskiterpen laktonlar (**CM-1**, **CM-2**, **CM-3** ve **CM-7**) leishmanisidal aktiviteleri bakımından ilk kez tez kapsamında incelenmiş ve bu bileşiklerden **CM-1** ile **CM-7** kuvvetli; **CM-3** önemli leishmanisidal aktivite göstermiştir.

Ülkemizde yetişen diğer *Chrysophthalmum* türleri üzerinde yaptığımız biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlama çalışmaları, *C. dichotomum* ve *C. gueneri*'nin $CHCl_3$ alt ekstrelerinin en yüksek sitotoksik, antienflamatuvar ve leishmanisidal aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.

Elde ettiğimiz bulgular ışığında, çalışmamızın devamında aşağıdaki öneriler sunulabilir:

1. Selektif sitotoksisitesi bulunan **CM-7**'nin hücre ölümü mekanizması üzerine çalışmaların yapılması; sitotoksik aktiviteleri test edilmeyen seskiterpen laktonların (**CM-4**, **CM-5**, **CM-6** ve **CM-8)** miktarlarının arttırılarak sitotoksik aktivitelerinin incelenmesi; sitotoksik aktiviteleri test edilen bileşiklerin farklı hücre soylarına karşı sitotoksik aktivitelerinin araştırılması.

2. Yüksek antienflamatuvar aktiviteye sahip bulunan **CM-1**'in etki mekanizmalarının belirlenmesi üzerine çalışmaların yapılması; antienflamatuvar aktiviteleri test edilmeyen seskiterpen laktonların (**CM-4**, **CM-5**, **CM-6** ve **CM-8)** miktarlarının arttırılarak antienflamatuvar aktivitelerinin araştırılması.

3. Kuvvetli leishmanisidal aktiviteye sahip bulunan **CM-1** ve **CM-7** üzerinde daha ileri çalışmaların yapılması; leishmanisidal aktiviteleri test edilmeyen diğer seskiterpen laktonların (**CM-4**, **CM-5**, **CM-6** ve **CM-8)** miktarlarının arttırılarak leishmanisidal aktivitelerinin araştırılması.

4. *C. dichotomum* ve *C. gueneri* üzerinde fitokimyasal ve biyolojik aktivite çalışmaları.

5. *Chrysophthalmum* türlerinin ve elde edilen saf bileşiklerin başka aktiviteler bakımından incelenmesi.

KAYNAKLAR

Abou-Douh, A. M. (2008). New eudesmane derivatives and other sesquiterpenes from the epigeal parts of *Dittrichia graveolens*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *56*(11), 1535-1545.

Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., and Lomri, A. (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine*, *74*(4), 324-329.

Agrawal, P. K., (1989). *Carbon-13 NMR of Flavonoids*. Amsterdam: Elsevier.

Ahmed, A. A., and Mahmoud, A. A. (1998). Jasonol, a rare tricyclic eudesmane sesquiterpene and six other new sesquiterpenoids from Jasonia candicans. *Tetrahedron*, *54*(28), 8141-8152.

Ahmed, A. A., Mahmoud, A. A., Williams, H. J., Scott, A. I., Reibenspies, J. H., and Mabry, T. J. (1993). New sesquiterpene α-methylene lactones from the Egyptian plant *Jasonia candicans*. *Journal of Natural Products*, *56*(8), 1276-1280.

Al-Easa, H. S., Rizk, A. F. M., and Ahmed, A. A. (1996). Guaianolides from *Picris radicata*. *Phytochemistry*, *43*(2), 423-424.

Arasan, S., and Kaya, I. (2015). Some important plants belonging to Asteraceae family used in folkloric medicine in Savur (Mardin/Turkey) area and their application areas. *Journal of Food and Nutrition Research*, *3*(5), 337-340.

Ayaz, F., Sarimahmut, M., Küçükboyaci, N., and Ulukaya, E. (2016). Cytotoxic effect of *Conyza canadensis* (L.) Cronquist on human lung cancer cell lines. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(3), 342-346.

Aytac, Z., and Anderberg, A. A. (2001). A new species of *Chrysophthalmum* Schultz Bip.(Asteraceae-Inuleae) from Turkey. *Botanical Journal of the Linnean Society*, *137*(2), 211-214.

Baytop, A. (1996). *Farmasötik Botanik Ders Kitabı*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi.

Beekman, A. C., Woerdenbag, H. J., van Uden, W., Pras, N., Konings, A. W., Wikström, H. V., and Schmidt, T. J. (1997). Structure-cytotoxicity relationships of some helenanolide-type sesquiterpene lactones. *Journal of Natural Products*, *60*(3), 252-257.

Bessada, S. M., Barreira, J. C., and Oliveira, M. B. P. (2015). Asteraceae species with most prominent bioactivity and their potential applications: A review. *Industrial Crops and Products*, *76*, 604-615.

Bohlmann, F., Czerson, H., and Schöneweiß, S. (1977). Natürlich vorkommende Terpen-Derivate, 83. Neue Inhaltsstoffe aus *Inula viscosa* Ait. *European Journal of Inorganic Chemistry*, *110*(4), 1330-1334.

Bohlmann, F., Mahanta, P. K., Jakupovic, J., Rastogi, R. C., and Natu, A. A. (1978). New sesquiterpene lactones from *Inula species*. *Phytochemistry*, *17*(7), 1165-1172.

Boyed, M. R. (1997). The NCI in vitro anticancer drug discovery screen. In: Teicher, B. (Ed.), *Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials and Approval*. Totowa: Humana Press, pp. 30.

Breitmaier, E. (2006). *Terpenes-Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones.* Weinheim, Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosy Phytochemistry Medicinal Plants*. (2nd edition). Paris, France: Lavoisier Publishing.

Calabria, L. M., Piacente, S., Kapusta, I., Dharmawardhane, S. F., Segarra, F. M., Pessiki, P. J., and Mabry, T. J. (2008). Triterpene saponins from *Silphium radula*. *Phytochemistry*, *69*(4), 961-972.

Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., and Mitchell, J. B. (1987). Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research*, *47*(4), 936-942.

Chadwick, M., Trewin, H., Gawthrop, F., and Wagstaff, C. (2013). Sesquiterpenoids lactones: benefits to plants and people. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(6), 12780-12805.

Chang, R. J., Qin, J. J., Cheng, X. R., Jin, H. Z., and Zhang, W. D. (2012). Chemical constituents from *Inula helianthus-aquatica*. *Natural Product Research & Development*, *24*, 291-297.

Cheng, X. R., Li, W. W., Ren, J., Zeng, Q., Zhang, S. D., Shen, Y. H., Yan, S. K., Jin, H. Z., and Zhang, W. D. (2012). Sesquiterpene lactones from *Inula hookeri*. *Planta Medica*, *78*(05), 465-471.

Cheng, X., Zeng, Q., Ren, J., Qin, J., Zhang, S., Shen, Y., Zhu, J., Zhang, F., Chang, R., Zhu, Y., and Zhang, W. (2011). Sesquiterpene lactones from *Inula falconeri*, a plant endemic to the Himalayas, as potential anti-inflammatory agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *46*(11), 5408-5415.

Chi, J., Li, B. C., Yang, B. T., and Zhang, M. (2016). Chemical components and their bioactivities of *Artemisia austro-yunnanensis*. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, *38*(3), 533-533.

Choudhary, M. I., Yousuf, S., Ahmed, S., and Yasmeen, K. (2005). Antileishmanial physalins from *Physalis minima*. *Chemistry & Biodiversity*, *2*(9), 1164-1173.

Coskun, D., Erkisa, M., Ulukaya, E., Coskun, M. F., and Ari, F. (2017). Novel 1-(7-ethoxy-1-benzofuran-2-yl) substituted chalcone derivatives: Synthesis, characterization and anticancer activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *136*, 212-222.

Dendougui, H., Benayache, S., Benayache, F., and Connoly, J. D. (2000). Sesquiterpene lactones from *Pulicaria crispa*. *Fitoterapia*, *71*(4), 373-378.

Diep, T. T., Minh, C. V., Dong, N. T., Braca, A., Tung, N. H., Kiem, P. V., and Bang, B. T. (2007). Pinoresinol and 3, 4', 5, 7-tetrahydroxy-3'-methoxyflavanone from the fruits of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Journal of Chemistry*, *45*(2), 219-222.

Eldenäs P, Anderberg, A. A., and Källersjö, M. (1998). Molecular phylogenetics of the tribe Inuleae s.str. (Asteraceae), based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Plant Systematics and Evolution*, *210*(3), 159-173.

Eldenäs, P., Källersjö, M., and Anderberg, A. A. (1999). Phylogenetic placement and circumscription of tribes Inuleae s.str. and Plucheeae (Asteraceae): Evidence from sequences of chloroplast gene *ndh*F. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *13*(1), 50-58.

Fuchino, H., Koide, T., Takahashi, M., Sekita, S., and Satake, M. (2001). New sesquiterpene lactones from *Elephantopus mollis* and their leishmanicidal activities. *Planta Medica*, *67*(07), 647-653.

George, V. C., Kumar, D. N., Suresh, P. K., and Kumar, R. A. (2012). A review on the therapeutic potentials of parthenolide: a sesquiterpene lactone. *International Research Journal of Pharmacy*, *3*(2), 69-73.

Ghantous, A., Gali-Muhtasib, H., Vuorela, H., Saliba, N. A., and Darwiche, N. (2010). What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials?. *Drug Discovery Today*, *15*(15), 668-678.

Ghantous, A., Nasser, N., Saab, I., Darwiche, N., and Saliba, N. A. (2009). Structure–activity relationship of seco-tanapartholides isolated from *Achillea falcata* for inhibition of HaCaT cell growth. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *44*(9), 3794-3797.

González-Platas, J., Ruiz-Pérez, C., Gonzalez, A. G., Bermejo, J., and Medjroubi, K. (1999). 4β, 15-Dihydro-3-dehydrosolstitialin A. *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications*, *55*(11), 1837-1839.

González-Romero, M. A., Villaescusa-Castillo, L., and Díaz-Lanza, A. M. (2000). Sesquiterpene lactones from *Inula montana* L. *Zeitschrift für Naturforschung C*, *55*(9-10), 697-700.

Graham, J. G., Quinn, M. L., Fabricant, D. S., and Farnsworth, N. R. (2000). Plants used against cancer–an extension of the work of Jonathan Hartwell. *Journal of Ethnopharmacology*, *73*(3), 347-377.

Grierson, A. J. C. (1975). *Chrysophthalmum* Schultz Bip. In: Davis, P. H. (ed) *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* (Vol. 5). Edinburgh University Press: Edinburgh pp. 52-53.

Güner, A. ve Ekim, T. (Editörler). (2014). *Resimli Türkiye Florası cilt 1.* İstanbul: NGBB Yayınları Floralar Araştırmaları Derneği ve Türkiye İş Bankası Kültür Yayınları yayını.

Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M. ve Babaç, M. T. (2012). *Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)*. İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını.

Gürbüz, P., Dogan, S. D., Pasayeva, L., and Paksoy, M. Y. (2016). Guaiane-type Sesquiterpene Lactones from *Chrysophthalmum montanum*. *Records of Natural Products, 10*(6), 714.

Habtemariam, S. (2003). In vitro antileishmanial effects of antibacterial diterpenes from two Ethiopian Premna species: *P. schimperi* and *P. oligotricha*. *BMC Pharmacology*, *3*(1), 6.

Hegnauer, R. (1977). The chemistry of the Compositae. In: Heywood, V. H., Harborne, J. B. and Turner, B. L., (eds) *The Biology and Chemistry of the Compositae* (Vol. 1). London-New York-San Francisco: Academic Press, pp. 283-335.

Helfand, S. L., Werkmeister, J. and Roder, J. C. (1982). Chemiluminescence response of human natural killer cells. I. The relationship between target cell binding, chemiluminescence, and cytolysis. *Journal of Experimental Medicine*, *156*(2), 492-505.

Herz, W. (1977). Sesquiterpene lactones in the Compositae. In: Heywood, V. H., Harborne, J. B. and Turner, B. L., (eds) *The Biology and Chemistry of the Compositae* (Vol. 1). London-New York-San Francisco: Academic Press, pp. 337-358.

Heywood, V. H., Harborne, J. B., and Turner, B. L. (1977). In: Heywood, V. H., Harborne, J. B. and Turner, B. L. (eds) An overture to the Compositae, *The Biology and Chemistry of the Compositae* (Vol. 1). London-New York-San Francisco. Academic Press, pp. 1-20.

Hikino, H., Kuwano, D., and Takemoto, T. (1968). Structure of Helenium lactone. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *16*(8), 1601-1604.

Houghton, P., Fang, R., Techatanawat, I., Steventon, G., Hylands, P. J., and Lee, C. C. (2007). The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods*, *42*(4), 377-387.

Hsieh, F. L., Chang, T. H., Ko, T. P., and Wang, A. H. J. (2011). Structure and mechanism of an Arabidopsis medium/long-chain-length prenyl pyrophosphate synthase. *Plant Physiology*, *155*(3), 1079-1090.

Huang, L. J., Gao, W. Y., Li, X., Zhao, W. S., Huang, L. Q., and Liu, C. X. (2010). Evaluation of the *in vivo* anti-inflammatory effects of extracts from *Pyrus bretschneideri* Rehd. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(16), 8983-8987.

Huo, C. H., Li, Y., Zhang, M. L., Wang, Y. F., Zhang, Q., Qin, F., Shi, Q. W., and Kiyota, H. (2013). Cytotoxic flavonoids from the flowers of *Achillea millefolium*. *Chemistry of Natural Compounds*, *48*(6).

Hyldgaard, M. G., Purup, S., Bond, A. D., Fretté, X. C., Qu, H., Jensen, K. T., and Christensen, L. P. (2015). Guaianolides and a seco-eudesmane from the resinous exudates of cushion bush (*Leucophyta brownii*) and evaluation of their cytostatic and anti-inflammatory activity. *Journal of Natural Products*, *78*(8), 1877-1885.

İnternet: *Chrysophthalmum*, he plant list. http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.theplantlist.org%2Ftpl1.1%2Fsearch%3Fq%3Dchrysophthalmum&date=2017-07-16, Son Erişim Tarihi: 16.07.2017.

Ito, K., and Iida, T. (1981). Seven sesquiterpene lactones from *Inula britannica* var. *chinensis*. *Phytochemistry*, *20*(2), 271-273.

Jamieson, G. R., Reid, E. H., Turner, B. P., and Jamieson, A. T. (1976). Bakkenolide-A. Its distribution in *Petasites* species and cytotoxic properties. *Phytochemistry*, *15*(11), 1713-1715.

Janecki, T. (2014). Natural Lactones and Lactams: Synthesis, Occurrence and Biological Activity. Weinheim, Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Jeffrey, C. (2007). Compositae - Introduction with key to tribes, In: Kadereit, J. W., and Jeffrey, C. (eds) *Flowering Plants. Eudicots: Asterales* (Vol. 8). Berlin: Springer-Verlag pp. 61-86.

Kalidindi, S., Jeong, W. B., Schall, A., Bandichhor, R., Nosse, B., and Reiser, O. (2007). Enantioselective synthesis of arglabin. *Angewandte Chemie International Edition*, *46*(33), 6361-6363.

Karlıoğlu, N. ve Paksoy, M. Y. (2012, Eylül). *Chrysophthalmum (Asteraceae) Cinsi Polen Morfolojisi*. 21. Ulusal Biyoloji Kongresinde sunuldu, İzmir.

Ketai, W., Huitao, L., Yunkun, Z., Xingguo, C., Zhide, H., Yucheng, S., and Xiao, M. (2000). Separation and determination of alantolactone and isoalantolactone in traditional Chinese herbs by capillary electrophoresis. *Talanta*, *52*(6), 1001-1005.

Khalilov, L. M., Khalilova, A. Z., Shakurova, E. R., Nuriev, I. F., Kachala, V. V., Shashkov, A. S., and Dzhemilev, U. M. (2003). PMR and 13 C NMR spectra of biologically active compounds. XII. Taraxasterol and its acetate from the aerial part of *Onopordum acanthium*. *Chemistry of Natural Compounds*, *39*(3), 285-288.

Kirbağ, S., Zengin, F., and Kursat, M. (2009). Antimicrobial activities of extracts of some plants. *Pakistan Journal of Botany*, *41*(4), 2067-2070.

Kojima, H., Sato, N., Hatano, A., and Ogura, H. (1990). Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry*, *29*(7), 2351-2355.

Koukoulitsa, E., Skaltsa, H., Karioti, A., Demetzos, C., and Dimas, K. (2002). Bioactive sesquiterpene lactones from *Centaurea* species and their cytotoxic/cytostatic activity against human cell lines in vitro. *Planta Medica*, *68*(07), 649-652.

Lee, D. Y., Jung, L., Park, J. H., Yoo, K. H., Chung, I. S., and Baek, N. I. (2010). Cytotoxic triterpenoids from *Cornus kousa* fruits. *Chemistry of Natural Compounds*, *46*(1), 142-145.

Lee, S., Moon, E., Choi, S. U., and Kim, K. H. (2016). Lignans from the twigs of *Euonymus alatus* (Thunb.) siebold and their biological evaluation. *Chemistry & Biodiversity*, *13*(10), 1391-1396.

Li, D. Q., Wang, D., Zhou, L., Li, L. Z., Liu, Q. B., Wu, Y. Y., Yang, J. Y., Song ,S. J., and Wu, C. F. (2017). Antioxidant and cytotoxic lignans from the roots of *Bupleurum chinense*. *Journal of Asian Natural Products Research*, *19*(5), 519-527.

Li, X. W., Weng, L., Gao, X., Zhao, Y., Pang, F., Liu, J. H., Zhang, H. F., and Hu, J. F. (2011). Antiproliferative and apoptotic sesquiterpene lactones from *Carpesium faberi*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *21*(1), 366-372.

Loizzo, M. R., Statti, G. A., Tundis, R., Conforti, F., Ando', S., and Menichini, F. (2004). Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Cirsium tenoreanum*. *Fitoterapia*, *75*(6), 577-580.

López-Rodríguez, M., García, V. P., Zater, H., Benayache, S., and Benayache, F. (2009). Cynaratriol, a sesquiterpene lactone from *Centaurea musimomum*. *Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online*, *65*(8), o1867-o1868.

Lyss, G., Schmidt, T. J., Merfort, I., and Pahl, H. L. (1997). Helenalin, an anti-inflammatory sesquiterpene lactone from *Arnica*, selectively inhibits transcription factor NF-κB. *Biological Chemistry*, *378*(9), 951-962.

Manayi, A., Saeidnia, S., Ostad, S. N., Hadjiakhoondi, A., Ardekani, M. R. S., Vazirian, M., Akhtar, Y., and Khanavi, M. (2013). Chemical constituents and cytotoxic effect of the main compounds of *Lythrum salicaria* L. *Zeitschrift für Naturforschung C*, *68*(9-10), 367-375.

Matsumoto, T., Hosono-Nishiyama, K., and Yamada, H. (2006). Antiproliferative and apoptotic effects of butyrolactone lignans from *Arctium lappa* on leukemic cells. *Planta Medica*, *72*(03), 276-278.

Modzelewska, A., Sur, S., Kumar, S. K., and Khan, S. R. (2005). Sesquiterpenes: natural products that decrease cancer growth. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, *5*(5), 477-499.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.

Öksüz, S. (1976). ω–Taraxasterol acetate from *Inula viscosa*. *Planta Medica*, *29*(04), 343-345.

Öksüz, S., Clark, R. J., and Herz, W. (1993). A guaianolide diol monoacetate from *Centaurea behen* and *C. solstitialis* ssp. *schouwii*. *Phytochemistry*, *33*(5), 1267-1268.

Ozdemir, A., Turkoglu, V., and Demir, H. (2013). In vitro effect of some plant extracts on acetylcholinesterase enzyme in human erythrocytes and serum. *Fresenius Environmental Bulletin*, *22*(9), 2510-2515.

Özkan, A. M. G., and Koyuncu, M. (2005). Traditional medicinal plants used in Pınarbaşı area (Kayseri-Turkey). *Turkish Journal of Pharmaceutical Science*, *2*(2), 63-82.

Pan, L., Lantvit, D. D., Riswan, S., Kardono, L. B., Chai, H. B., de Blanco, E. J. C., Farnsworth, N. R., Soejarto, D. D. I., and Kinghorn, A. D. (2010). Bioactivity-guided isolation of cytotoxic sesquiterpenes of *Rolandra fruticosa*. *Phytochemistry*, *71*(5), 635-640.

Patel, D., Shukla, S., and Gupta, S. (2007). Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise. *International Journal of Ooncology*, *30*(1), 233-245.

Pellati, F., Calò, S., Benvenuti, S., Adinolfi, B., Nieri, P., and Melegari, M. (2006). Isolation and structure elucidation of cytotoxic polyacetylenes and polyenes from *Echinacea pallida*. *Phytochemistry*, *67*(13), 1359-1364.

Qin, J. J., Zhu, J. X., Zeng, Q., Cheng, X. R., Zhu, Y., Zhang, S. D., Shan, L., Jin, H. Z., and Zhang, W. D. (2011). Pseudoguaianolides and guaianolides from *Inula hupehensis* as potential anti-inflammatory agents. *Journal of Natural Products*, *74*(9), 1881-1887.

Ramasamy, K., and Agarwal, R. (2008). Multitargeted therapy of cancer by silymarin. *Cancer Letters*, *269*(2), 352-362.

Rashed, K., Ćirić, A., Glamočlija, J., Calhelha, R. C., Ferreira, I. C., and Soković, M. (2014). Antimicrobial and cytotoxic activities of *Alnus rugosa* L. aerial parts and identification of the bioactive components. *Industrial Crops and Products*, *59*, 189-196.

Rechinger, K. H. (1980). *Chrysophthalmum* Schultz-Bip. In Kotschy. In: Rechinger, K. H. (ed) *Flora Iranica 145. Compositae IV-Inuleae*. Akademische Druck und Verlagsanstalt: Graz pp. 131-132.

Recio, M. C., Giner, R. M., Uriburu, L., Manez, S., Cerda, M., De la Fuente, J. R., and Rios, J. L. (2000). In vivo activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. *Life Sciences*, *66*(26), 2509-2518.

Ridhay, A., Noor, A., Soekamto, N. H., Harlim, T., and van Altena, I. (2012). A stıgmasterol glycosıde from the root wood of *Melochia Umbellata* (Houtt) Stapf var. degrabrata K. *Indonesian Journal of Chemistry*, *12*(1), 100-103.

Rocha, L. G., Almeida, J. R. G. S., Macedo, R. O., and Barbosa-Filho, J. M. (2005). A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine, 12*(6), 514-535.

Rodriguez, E., Towers, G. H. N., and Mitchell, J. C. (1976). Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry, 15*(11), 1573-1580.

Rustaiyan, A., Jakupovic, J., Chau-Thi, T. V., Bohlmann, F., and Sadjadi, A. (1987). Further sesquiterpene lactones from the genus *Dittrichia*. *Phytochemistry*, *26*(9), 2603-2606.

Rustaiyan, A., Zare, K., Biniyaz, T., and Fazlalizadeh, G. (1989). A seco-guaianolide and other sesquiterpene lactones from *Postia bombycina*. *Phytochemistry*, *28*(11), 3127-3129.

Saeidnia, A. (2015). *New Approaches to Natural Anticancer Drugs.* Switzerland: Springer International Publishing AG.

Salie, F., Eagles, P. F. K., and Leng, H. M. J. (1996). Preliminary antimicrobial screening of four South African Asteraceae species. *Journal of Ethnopharmacology*, *52*(1), 27-33.

Samek, Z. (1978). On the validity of the" cis/trans" lactone rule for allylic coupling constants of the α-exomethylene protons in natural sesquiterpenic α-exomethylene γ-lactones. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications, 43*(12), 3210-3226.

Schmidt, T. J., Khalid, S. A., Romanha, A. J., Alves, T. M. A., Biavatti, M. W., Brun, R., Da Costa, F. B., de Castro, S. L., Ferreira, V. F., de Lacerda, M. V. G., Lago, J. H. G., Leon, L. L., Lopes, N. P., das Neves Amorim, R. C., Niehues, M., Ogungbe, I. V., Pohlit, A. M., Scotti, M. T., Setzer, W. N., Soeiro, M. de N. C., Steindel, M. and Tempone A. G. (2012). The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases-part I. *Current medicinal chemistry*, 19(14), 2128-2175.

Scudiere D. A., Shoemaker R. H., Paul K. D., Monks A., Tierney S., Nofziger T. H., Currens M.J., Seniff D., and Boyd M.R. (1988). Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research,* 48(17), 4827-4833.

Seaman, F. C. (1982). Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. *The Botanical Review, 48*(2), 121-594.

Selvi, S., Paksoy, M. Y., Polat, R., and Cakilcioglu, U. (2014). Micromorphological and anatomical characteristics of the Genus *Chrysophthalmum* Schultz Bip.(Asteraceae) growing in Turkey. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, *84*(2), 431-438.

Semple, S. J., Nobbs, S. F., Pyke, S. M., Reynolds, G. D., and Flower, R. L. P. (1999). Antiviral flavonoid from *Pterocaulon sphacelatum*, an Australian Aboriginal medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 68(1-3), 283-288.

Sigstad, E. E., Catalán, C. A., Gutiérrez, A. B., Diaz, J. G., Goedken, V. L., and Herz, W. (1991). Guaianolides and germacranolides from *Stevia grisebachiana*. *Phytochemistry*, *30*(6), 1933-1940.

Simonsen, H. T., Weitzel, C., and Christensen, S. B. (2013). In: Ramawat, K. G., Merillon, and J. M. (eds) *Handbook of Natural Products-Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*. Springer-Verlag: Berlin, Germany pp. 3069-3098.

Sing, B., Ram, S. N., Pandey, V. B., Joshi, V. K., and Gambhir, S. S. (1991). Studies on antiinflammatory activity of taraxasterol acetate from *Echinops echinatus* in rats and mice. *Phytotherapy Research*, *5*(3), 103-106.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T. Bokesch, H., Kenney, S., and Boyd, M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *82*(13), 1107-1112.

Srivastava, V., Varma, N., Tandon, J. S., and Srimal, R. C. (1990). Anti-inflammatory activity of *Pluchea lanceolata*: isolation of an active principle. *International Journal of Crude Drug Research*, *28*(2), 135-137.

Stavri, M., Ford, C. H., Bucar, F., Streit, B., Hall, M. L., Williamson, R. T., Mathew, K.T., and Gibbons, S. (2005). Bioactive constituents of *Artemisia monosperma*. *Phytochemistry*, *66*(2), 233-239.

Topcu, G., and Öksüz, S. (1990). Guaianolides from *Inula anatolica*. *Phytochemistry*, *29*(11), 3666-3667.

Topcu, G., Öksüz, S., Herz, W., and Díaz, J. G. (1995). Structurally related guaianolides from *Inula thapsoides*. *Phytochemistry*, *40*(6), 1717-1722.

Torres-Santos, E. C., Lopes, D., Oliveira, R. R., Carauta, J. P. P., Falcao, C. B., Kaplan, M. A. C., and Rossi-Bergmann, B. (2004). Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. *Phytomedicine*, *11*(2-3), 114-120.

Trifunović, S., Milosavljević, S., Vajs, V., Macura, S., and Todorović, N. (2008). Stereochemistry and conformations of natural 1, 2-epoxy-guaianolides based on 1D and 2D NMR data and semiempirical calculations. *Magnetic Resonance in Chemistry*, *46*(5), 427-431.

Tunc, D., Dere, E., Karakas, D., Cevatemre, B., Yilmaz, V. T., and Ulukaya, E. (2017). Cytotoxic and apoptotic effects of the combination of palladium (II) 5, 5-diethylbarbiturate complex with bis (2-pyridylmethyl) amine and curcumin on non small lung cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *25*(5), 1717-1723.

Ukiya, M., Akihisa, T., Yasukawa, K., Tokuda, H., Suzuki, T., and Kimura, Y. (2006). Anti-inflammatory, anti-tumor-promoting, and cytotoxic activities of constituents of marigold (*Calendula officinalis*) flowers. *Journal of Natural Products*, *69*(12), 1692-1696.

Wang, Z., Min, S. J., and Danishefsky, S. J. (2009). Total synthesis and structural revision of (±)-tricholomalides A and B. *Journal of the American Chemical Society*, *131*(31), 10848-10849.

Yekta, M., and Alavi, S. H. R. (2008). New triterpenoids from *Peucedanum ruthenicum*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *4*(4), 289-294.

Yeşil, Y., and Akalın E. (2009). Folk medicinal plants in Kürecik area (Akçadağ/Malatya)", *Turkish Journal of Pharmaceutical Science*, *6*(3), 207-220.

Yokoe, H., Yoshida, M., and Shishido, K. (2008). Total synthesis of (−)-xanthatin. *Tetrahedron Letters*, *49*(21), 3504-3506.

Yoshioka, H., Mabry, T. J., Irwin, M. A., Geissman, T. A., and Samek, Z. (1971). The geminal coupling and paramagnetic shift of exomethylene protons in the α, β′-unsaturated γ-lactone group of sesquiterpene lactones containing c8-α-hydroxyl groups. *Tetrahedron*, *27*(15), 3317-3322.

Zdero, C., Bohlmann, F., King, R. M., and Robinson, H. (1987). Sesquiterpene lactones from *Bedfordia arborescens*. *Phytochemistry*, *26*(4), 1207-1209.

Zhang, S., Won, Y. K., Ong, C. N., and Shen, H. M. (2005). Anti-cancer potential of sesquiterpene lactones: bioactivity and molecular mechanisms. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, *5*(3), 239-249.

Zheng, G. Q. (1994). Cytotoxic terpenoids and flavonoids from *Artemisia annua*. *Planta Medica*, *60*(01), 54-57.

Zheng, L. H., Hao, X. J., Yuan, C. M., Huang, L. J., Zhang, J. X., Dong, F., Fan, T. Y., Wu, G. H., Chen, Y., Ma, Y., Fan, Y. M. and Gu, Y. M. (2015). Study on chemical constituents of *Inula cappa*. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 40(4), 672-678.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler



Soyadı, adı : AYAZ, Fatma

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri : 21.11.1988-Ankara

Medeni hali : Bekar

Telefon : 0 (505) 3328030

Faks : 0 (312) 2235018

e-mail : fatmaayaz88@hotmail.com; fatmaayaz@gazi.edu.tr

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi/Farmakognozi ABD	Devam ediyor
Lisans	Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2011
Lise	Süleyman Demirel Anadolu Lisesi	2006

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2012- Devam ediyor	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. OZEL KAYA, G., KUCUKBOYACI, N., **AYAZ, F.,** HURKUL, M.M., UZUNHISARCIKLI, M.E., KOROGLU, A.: Ankara ve Adana'da Aktarlarda "Hatmi" Adı Altında Satılan Drogların Avrupa Farmakopesine Uygunluğunun Değerlendirilmesi, **Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi,** 39(4), 291-316, 2010.

2. **AYAZ, F.**, SARIMAHMUT, M., KUCUKBOYACI, N., ULUKAYA, E.: Cytotoxic Activity of *Conyza canadensis* (L.) Cronquist Extracts Against Human Lung Adenocarcinoma Cell Lines, **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, 13(3), 342-346, 2016.

3. KUCUKBOYACI, N., **AYAZ, F.**, ADIGUZEL, N., BANI, B., GOREN, A.C., Fatty Acid Methyl Ester Composition of Some Turkish Apiaceae Seed Oils: New Sources for Petroselinic Acid, **Natural Product Communications**, 11(11), 1697-1700, 2016.

4. KUCUKBOYACI, N., DEMIRCI, B., **AYAZ, F.**, BANI, B., ADIGUZEL, N.: Analysis of the Essential Oils of Subgenus Caropodium from Turkey; *Grammosciadium schischkinii* (V.M.Vinogr. & Tamamsch.) V.M.Vinogr., *G. haussknechtii* Boiss., *G. pterocarpum* Boiss. and *G. platycarpum* Boiss. & Hausskn. ex Boiss., **Journal of Essential Oil Research**, 29(2), 163-168, 2017**.**

5. KUCUKBOYACI, N., DEMIRCI, B., **AYAZ, F.**, BANI, B., ADIGUZEL, N.: Composition of the Essential Oils of the Subgenus *Grammosciadium* from Turkey; *G. confertum, G. cornutum, G. macrodon subsp. macrodon, G. macrodon subsp. nezaketae* and *G. daucoides*, **Records of Natural Products**, 10(5), 572-581, 2016.

6. **AYAZ, F.**, KUCUKBOYACI, N., DEMIRCI, B., Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Conyza canadensis* (L.) Cronquist from Turkey, **Journal of Essential Oil Research,** 29(4), 336-343, 2017.

7. AYAZ, F., KUCUKBOYACI, N., DEMIRCI, B., Essential Oil Composition and Antimicrobial Activity of *Aster subulatus* Michx. from Turkey, **Records of Natural Products**, 11(4), 389-394, 2017.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR...