

***Origanum onites* L. BİTKİSİNİN ANTiOKSiDAN  
AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ, BİYOAKTİF  
BİLEŞİKLERİNİN İZOLASYONU VE  
KARAKTERİZASYONU**

**Beşir İSNAÇ**

**Yüksek Lisans Tezi  
Kimya Anabilim Dalı  
Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ  
2015  
Her Hakkı Saklıdır.**

T.C.  
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

*Origanum onites* L. BİTKİSİNİN ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİNİN  
BELİRLENMESİ, BİYOAKTİF BİLEŞİKLERİNİN İZOLASYONU VE  
KARAKTERİZASYONU

Beşir İSNAÇ

TOKAT

2015

Her Hakkı Saklıdır

**Bu tez çalışması;**

**TÜBİTAK tarafından (Proje No: 113 Z 195) desteklenmiştir.**

Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ danışmanlığında, Beşir İSNAÇ tarafından hazırlanan bu çalışma 15/05/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. İsa TELCİ

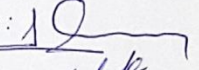
Üye : Prof. Dr. Ramazan ERENLER

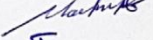
Üye : Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ

Üye : Doç. Dr. Esra KOÇ


Üye : Yrd. Doç. Dr. Fatma GEDİKLİ

İmza : 

İmza : 

İmza : 

İmza : 

İmza : 

Yukarıdaki sonucu onaylarım

  
Prof. Dr. Mehmet Ali ŞAKIN  
Enstitü Müdürü

09.06.2015

## TEZ BEYANI

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

Beşir İSNAÇ

15.05.2015

## ÖZET

Y. Lisans Tezi

### *Origanum onites* L. BİTKİSİNİN ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ, BİYOAKTİF BİLEŞİKLERİNİN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Beşir İSNAÇ

Gaziosmanpaşa Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ  
İkinci Danışman: Prof. Dr. Ramazan ERENLER

İzmir kekiği olarak bilinen *Origanum onites* L. bitkisi gıda, kozmetik ve tıp alanlarında kullanılmaktadır. Ayrıca bu bitki çeşitli rahatsızlıkların giderilmesinde geleneksel tıp ilacı olarak da halk arasında kullanıldığı bilinmektedir. Bu bitki ile ilgili fonksiyonel bileşiklerin saflaştırılması ve saflaştırılan bileşiklerin aktivite analizleri ile ilgili şimdiye kadar detaylı bir araştırma yapılmamıştır. Bu nedenle, bu çalışmada *Origanum onites* L. bitkisinin toprak üstü kısımları sırasıyla hekzan (Ekstre-I), etil asetat (Ekstre-II), metanol (Ekstre-III) ve son olarak da kalan bitki posası suda kaynatıldıktan sonra etil asetat (Ekstre-IV) ile ekstrakte edildi. Elde edilen ekstraktların antioksidan aktivitesi; toplam fenolik bileşik miktarı, ABTS<sup>++</sup>, DPPH<sup>\*</sup> ve FRAP testleri uygulandı. Ekstre-IV'ün diğer ekstrele göre daha yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlendi. Bundan dolayı, Ekstrakt-IV'ün içerdiği biyoaktif bileşikler kromatografik yöntemlerle (kolon kromatografisi, preparatif HPLC) izole edildi. İzole edilen bileşiklerin yapıları spektroskopik tekniklerle (1D-NMR, 2D-NMR ve LC-TOF-MS) belirlendi. *p*-Hidroksibenzaldehit (**1**), hidrokinon (**2**), kafeik asit(**3**), luteolin-7-O-β-glikozit (**4**), luteolin-7-O-β-ksilozit (**5**), rozmarinik asit (**6**), bifenil-3,3',4,4'-tetraol (**7**), apigenin-7-O-β-glukoronid (**10**), acacetin-7-O-β-glukoronid (**11**), litospermik asit-B (**12**) ve **iki yeni benzofuran türevi [ (Origanofuran A (8) ve Origanofuran B (9) ]** bitkiden ilk defa izole edildi. Bifenil-3,3',4,4'-tetraol (7) bileşiğinin DPPH<sup>\*</sup> (IC<sub>50</sub>= 0,91 µg/mL), FRAP ( 38,70 mmol TE/g saf bileşik) ve ABTS<sup>++</sup> (IC<sub>50</sub>= 0,37 µg/mL) testlerinde en yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlendi.

2014, 133 sayfa

Anahtar kelimeler: Kromatografi, *Origanum onites* L., izolasyon, antioksidan aktivite, LC-TOF-MS

## ABSTARCT

M. Sc. Thesis

### DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *Origanum onites* L., ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ITS BIOACTIVE COMPOUNDS

Beşir İSNAÇ

University of Gaziosmanpasa  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ  
Second Supervisor: Prof. Dr. Ramazan ERENLER

*Origanum onites* L. (known as “İzmir kekiği” in Turkish) is used in food, cosmetic and pharmaceutical industries. It is also used as a folk medicine in treatment of various diseases. There isn't any comprehensive study about purification of functional compounds from this plant material and its activity analysis. Therefore, in this study: the aerial parts of *Origanum onites* L. were extracted with hexane (Extract-I), ethyl acetate (Extract-II), methanol (Extract-III) sequentially and finally the plant residue was boiled in water then partitioned with ethyl acetate (Extract-IV). The antioxidant activity of extracts were evaluated by total phenolic compound, ABTS<sup>•+</sup>, DPPH and FRAP tests. The extract-IV has a greater activity than the other extracts. So that, the bioactive compounds of extract-IV were isolated using various chromatographic techniques (column chromatography and preparative HPLC). The structure elucidation was done using spectroscopic techniques (1D-NMR, 2D-NMR ve LC-TOF-MS). *p*-hydroxybenzaldehyde (**1**), hydroquinone (**2**), caffeic acid (**3**), luteolin-7-β-glucoside (**4**), luteolin-7-β-xyloside (**5**), rosmarinic acid (**6**), biphenyl-3,3',4,4'-tetraol (**7**), apigenin 7-O-β-glucuronide (**10**), acacetin-7-O-β-glucuronide (**11**), lithospermic acid B (**12**) and **two new benzofuran derivatives [ (Origanofuran A (8) ve Origanofuran B (9) ]** were isolated for the first time from plant material. It was determinate bifenil-3,3',4,4'-tetraol (7) has a great activity in DPPH<sup>•</sup> (IC<sub>50</sub>= 0,91 µg/mL), ABTS<sup>•+</sup> (IC<sub>50</sub>= 0,37 µg/mL) and FRAP (38,70 mmol TE/pure compound)

2015, 133 pages

Keywords: Chromatography, *Origanum onites* L., Isolation, Antioxidant Activity, LC-TOF-MS

## ÖNSÖZ

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

Çalıştığım bitki hakkında bilgi birikimini benimle paylaşan ve bitkiyi temin etme konusunda yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. İsa TELCİ' ye;

Gerek laboratuvar çalışmalarında gerekse tezimi yazma aşamasında bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen Uzman Hüseyin AKŞİT'e, Uzman Nusret GENÇ'e ve Uzman Özkan ŞEN'e, lisans ve yüksek lisans arkadaşlarım Ömer KAYIR, Süleyman M. ÇELİK, Bilal MERAL ve tüm Bitki Araştırma Laboratuvarı ekibine;

İzole ettiğim bileşiklerin kütle analizleri için çalışma imkânı sağlayan Çankırı Karatekin Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ'a ve bu çalışmalar sırasında yardımlarını esirgemeyen Uzman Fatih GÜL ve Uzman Ali Rıza TÜFEKÇİ' ye

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

Çalışmamı 113Z195'nolu proje ile destekleyen TÜBİTAK' a

Bütün hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan canım aileme;

Çok teşekkür ederim.

Beşir İSNAÇ

Mayıs 2015

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖZET .....	i
ABSTARCT.....	ii
ÖNSÖZ .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER VE KAYNAK ÖZETLERİ .....	3
2.1. <i>Origanum onites</i> L. Bitkisinin Özellikleri ve Yayılımı .....	3
2.2. Serbest Radikaller ve Antioksidan Aktivite.....	4
2.2.1. Serbest Radikaller.....	4
2.3. Antioksidan Aktivite.....	6
2.4. Antioksidan Aktiviteye Sahip Fenolik Bileşenler .....	8
2.4.1. Flavonoidler.....	8
2.4.2. Fenolik Asitler .....	10
2.5. Literatür Özetleri.....	11
3. MATERYAL ve METOT.....	14
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	14
3.2. Cihazlar .....	14
3.3. Bitkisel Materyal.....	14
3.4. Ekstraksiyon İşlemleri .....	15
3.5. Antioksidan Aktivite Analizleri.....	16
3.5.1. Toplam Fenolik Madde Tayini .....	16
3.5.2. Serbest Radikal Giderme Aktivitesi .....	16
3.5.3. İndirgeme Gücü Aktivitesi .....	16
3.5.4. Metal Şelatlama Aktivitesi .....	17
3.5.5. ABTS <sup>•+</sup> Radikali Giderme Aktivitesi .....	17
3.6. Etkili Bileşiklerin Saflaştırılması İşlemlerinde Kullanılan Teknikler .....	18
3.6.1. Kolon kromatografisi.....	18
3.6.2. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK).....	18
3.6.3. LC-TOF-MS (Uçuş zamanlı Sıvı Kromatografisi Kütle Spektroskopisi).....	18
3.6.4. Preperatif HPLC (P-HPLC).....	19

3.6.5. Preperatif HPLC (P-HPLC) Uygulaması .....	19
3.7. Yapı Tayininde Kullanılan Spektroskopik Teknikler .....	24
3.7.1. NMR Spektroskopisi .....	24
3.7.1.1. 1D NMR Teknikleri .....	24
3.7.1.2. 2D-NMR Teknikleri .....	24
3.7.1.2.1. COSY (Correlation Spectroscopy) .....	24
3.7.1.2.2. HETCOR (Heteronuclear Correlation) .....	25
3.7.1.2.3. HMBC (Heteronuclear Multi Bond Correlation) .....	25
4. BULGULAR .....	26
4.1. Elde Edilen Ekstrelerin % Verimlerinin Hesaplanması .....	26
4.2. Ham Ekstrelere Uygulanan Antioksidan Aktive Testlerinin Sonuçları .....	26
4.3. Fitokimyasal Çalışmalar .....	27
4.3.1. İzolasyon İşlemi .....	27
4.3.2. <i>Origanum onites</i> L. Bitkisinden İzle Edilen Bileşikler .....	31
4.3.2.1. <i>p</i> -Hidroksibenzaldehit'in (1) Fiziksel ve Spektral Özellikleri .....	31
4.3.2.2. Hidrokinon (2) Bileşiğinin Fiziksel ve Spektral Özellikleri .....	35
4.3.2.3. Kafeik asit'in (3) Fiziksel ve Spektral Özellikleri .....	40
4.3.2.4. Luteolin-7-O- $\beta$ -glukozit'in (4) Fiziksel ve Spektral Özellikleri .....	44
4.3.2.5. Luteolin-7-O- $\beta$ -ksilozit'in (5) Fiziksel ve Spektral Özellikleri .....	48
4.3.2.6. Rozmarinik asit'in (6) Fiziksel ve Spektral Özellikleri .....	52
4.3.2.7. Bifenil-3,3',4,4'-tetraol'ün (7) Fiziksel ve Spektral Özellikleri .....	57
4.3.2.8. Origanofuran A'nın (8) Fiziksel ve Spektral Özellikleri .....	61
4.3.2.9. Origanofuran B'nin (9) Fiziksel ve Spektral Özellikleri .....	71
4.3.2.10. Apigenin-7-O- $\beta$ -glukoronid'in (10) Fiziksel ve Spektral Özellikleri ..	82
4.3.2.11. Acacetin-7-O- $\beta$ -glukoronid'in (11) Fiziksel ve Spektral Özellikleri ..	86
4.3.2.12. Litospermik asit B'nin (12) Fiziksel ve Spektral Özellikleri .....	90
4.3.3. <i>Origanum onites</i> L. Bitkisinden İzole Edilen Bileşiklere Uygulanan Antioksidan Aktivitesi Sonuçları .....	96
5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....	97
KAYNAKLAR .....	102
EKLER .....	108
EK-1 Antioksidan Aktivite Testlerinde Kullanılan Standartların Kalibrasyon Grafikleri .....	108
EK-2. İzole Edilen Bileşiklerin 2D-NMR Spektrumları .....	109
ÖZGEÇMİŞ .....	115

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. <i>Origanum onites</i> L. bitkisi .....	3
Şekil 2. 2. Enerji transferi aracılığıyla ROT'ların üretimi .....	4
Şekil 2. 3. Bazı sentetik antioksidanların kimyasal yapıları .....	6
Şekil 2. 4. Genel flavon iskeleti (2-fenil benzopiron).....	8
Şekil 2. 5. Flavonoidlerin kimyasal yapısı (Manach ve ark., 2004) .....	9
Şekil 2. 6. <i>Origanum majorana</i> 'dan izole edilen flavonoidler .....	12
Şekil 2. 7. <i>Origanum vulgare</i> 'den izole edilen moleküller (Gulluce ve ark, 2012) .....	13
Şekil 3. 1. <i>Origanum onites</i> L. bitkisi için seçici ekstraksiyon şeması.....	15
Şekil 3. 2. Ekstre-IV'ten elde edilen 327-355 fraksiyonlarının P-HPLC kromatogramı	20
Şekil 3. 3. Ekstre-IV'ten elde edilen 417-501 fraksiyonlarının HPLC kromatogramı ...	21
Şekil 3. 4. Ekstre-IV'ten elde edilen 570-584 fraksiyonlarının HPLC kromatogramı ...	22
Şekil 3. 5. Ekstre-IV'ten elde edilen 503-610 fraksiyonlarının HPLC kromatogramı ...	23
Şekil 4. 1. <i>Origanum onites</i> L. bitkisinden izole edilen bileşikler.....	30
Şekil 4. 2. <i>p</i> -Hidroksibenzaldehit (1).....	31
Şekil 4. 3. <i>p</i> -Hidroksibenzaldehit'in (1) <sup>1</sup> H-NMR spektrumu ( <sup>1</sup> H-NMR 400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) .....	32
Şekil 4. 4. <i>p</i> -Hidroksibenzaldehit'in (1) <sup>13</sup> C-NMR spektrumu ( <sup>13</sup> C-NMR 100 MHz DMSO-d <sub>6</sub> ) .....	33
Şekil 4. 5. <i>p</i> -Hidroksibenzaldehit'in (1) LC-TOF-MS kromatogramı.....	34
Şekil 4. 6. Hidrokinon (2) .....	35
Şekil 4. 7. Hidrokinon'un (2) <sup>1</sup> H-NMR spektrumu ( <sup>1</sup> H-NMR400 MHz DMSO-d <sub>6</sub> ) .....	36
Şekil 4. 8. Hidrokinon'un (2) <sup>13</sup> C-NMR spektrumu ( <sup>13</sup> C-NMR100 MHz DMSO-d <sub>6</sub> ) ...	37
Şekil 4. 9. Hidrokinon (2) bileşiğinin APT spektrumu ( <sup>13</sup> C-NMR100 MHz DMSO-d <sub>6</sub> )	38
Şekil 4. 10. Hidrokinon (2) bileşiğinin LC-TOF-MS Kromatogramı.....	39
Şekil 4. 11. Kafeik asit (3) .....	40
Şekil 4. 12. Kafeik asit'in (3) <sup>1</sup> H-NMR spektrumu ( <sup>1</sup> H-NMR 400 MHz DMSO-d <sub>6</sub> ) ....	41
Şekil 4. 13. Kafeik asit'in (3) <sup>13</sup> C-NMR spektrumu ( <sup>13</sup> C-NMR100 MHz DMSO-d <sub>6</sub> ) ...	42
Şekil 4. 14. Kafeik asit'in (3) LC-TOF-MS kromatogramı .....	43
Şekil 4. 15. Luteolin-7-O-β-glikozit (4).....	44
Şekil 4. 16. Luteolin-7-O-β-glikozit'in (4) <sup>1</sup> H-NMR spektrumu ( <sup>1</sup> H-NMR 400, DMSO- d <sub>6</sub> ) .....	45
Şekil 4. 17. Luteolin-7-O-β-glikozit'in (4) <sup>13</sup> C-NMR spektrumu ( <sup>13</sup> C-NMR 100 MHz DMSO-d <sub>6</sub> ) .....	46

Şekil 4. 18. Luteolin-7-O- $\beta$ -glikozit'in (4) LC-TOF-MS kromatogramı .....	47
Şekil 4. 19. Luteolin-7-O- $\beta$ -ksilozit (5) .....	48
Şekil 4. 20. Luteolin-7-O- $\beta$ -ksilozit'in (5) $^1\text{H-NMR}$ spektrumu ( $^1\text{H-NMR}$ 400 MHz, DMSO- $d_6$ ) .....	49
Şekil 4. 21. Luteolin-7-O- $\beta$ -ksilozit'in (5) $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu ( $^{13}\text{C-NMR}$ 100 MHz DMSO- $d_6$ ) .....	50
Şekil 4. 22. Luteolin-7-O- $\beta$ -ksilozit'in (5) LC-TOF-MS kromatogramı .....	51
Şekil 4. 23. Rozmarinik asit (6) .....	52
Şekil 4. 24. Rozmarinik asit'in (6) $^1\text{H-NMR}$ ( $^1\text{H-NMR}$ 400 MHz, DMSO- $d_6$ ) spektrumu .....	53
Şekil 4. 25. Rozmarinik asit'in (6) $^{13}\text{C-NMR}$ ( $^{13}\text{C-NMR}$ 100 MHz, DMSO- $d_6$ ) spektrumu .....	54
Şekil 4. 26. Rozmarinik asit'in (6) DEPT-90, DEPT-135, APT NMR ( $^{13}\text{C-NMR}$ 100 MHz DMSO- $d_6$ ) spektrumu .....	55
Şekil 4. 27. Rozmarinik asit'in (6) LC-TOF-MS kromatogramı .....	56
Şekil 4. 28. Bifenil-3,3',4,4'-tetraol (7) .....	57
Şekil 4. 29. Bifenil-3,3',4,4'-tetraol (7) $^1\text{H-NMR}$ spektrumu ( $^1\text{H-NMR}$ 400 MHz, DMSO- $d_6$ ) .....	58
Şekil 4. 30. Bifenil-3,3',4,4'-tetraol'ün (7) $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu ( $^{13}\text{C-NMR}$ 100 MHz DMSO- $d_6$ ) .....	59
Şekil 4. 31. Bifenil-3,3',4,4'-tetraol'ün (7) LC-TOF-MS kromatogramı .....	60
Şekil 4. 32. Origanofuran A (8) .....	61
Şekil 4. 33. Origanofuran A'nın (8) LC-TOF-MS kromatogramı .....	61
Şekil 4. 34. Origanofuran A'nın (8) $^1\text{H-NMR}$ spektrumu ( $^1\text{H-NMR}$ 400 MHz, DMSO- $d_6$ ) .....	63
Şekil 4. 35. Origanofuran A'nın (8) $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu (100 MHz DMSO- $d_6$ ) .....	64
Şekil 4. 36. Origanofuran A'nın (8) APT ve DEPT135 ( $^{13}\text{C-NMR}$ 100 MHz DMSO- $d_6$ ) spektrumu .....	65
Şekil 4. 37. Origanofuran A'nın (8) HETCOR spektrumu ( $^1\text{H-NMR}$ 400 MHz, $^{13}\text{C-NMR}$ 100 MHz DMSO- $d_6$ ) .....	66
Şekil 4. 38. Origanofuran A'nın (8) COSY spektrumu ( $^1\text{H-NMR}$ 400 MHz DMSO- $d_6$ ) .....	67
Şekil 4. 39. Origanofuran A'nın (8) HMBC spektrumu ( $^{13}\text{C-NMR}$ 100 MHz DMSO- $d_6$ ) .....	68
Şekil 4. 40. Origanofuran A'nın (8) HMBC korelasyonları .....	69
Şekil 4. 41. Origanofuran A'nın (8) $\delta_C$ , $\delta_H$ ve etkileşme sabiti değerleri .....	70

Şekil 4. 42. Origanofuran B (9) .....	71
Şekil 4. 43. Origanofuran B'nin (9) LC-TOF-MS kromatogramı .....	72
Şekil 4. 44. Origanofuran B'nin (9) <sup>1</sup> H-NMR spektrumu (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) .....	74
Şekil 4. 45. Origanofuran B'nin (9) <sup>13</sup> C-NMR spektrumu (100 MHz DMSO-d <sub>6</sub> ) .....	75
Şekil 4. 46. Origanofuran B'nin (9) APT, DEPT-135 ve DEPT90 ( <sup>13</sup> C-NMR 100 MHz DMSO-d <sub>6</sub> ) spektrumu .....	76
Şekil 4. 47. Origanofuran B'nin (9) HETCOR spektrumu ( <sup>1</sup> H-NMR 400 MHz, <sup>13</sup> C-NMR 100 MHz DMSO-d <sub>6</sub> ) .....	77
Şekil 4. 48. Origanofuran B'nin (9) COSY spektrumu ( <sup>13</sup> C-NMR 100 MHz DMSO-d <sub>6</sub> ) .....	78
Şekil 4. 49. Origanofuran B'nin (9) HMBC spektrumu ( <sup>13</sup> C-NMR 100 MHz DMSO-d <sub>6</sub> ) .....	79
Şekil 4. 50. Origanofuran B'nin (9) HMBC korelasyonları .....	80
Şekil 4. 51. Origanofuran B'nin (9) δ <sub>C</sub> , δ <sub>H</sub> ve etkileşme sabiti değerleri.....	81
Şekil 4. 52. Apigenin-7-O-β-glukoronid (10).....	82
Şekil 4. 53. Apigenin-7-O-β-glukoronid'in (10) <sup>1</sup> H-NMR spektrumu (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) .....	83
Şekil 4. 54. Apigenin-7-O-β-glukoronid'in (10) <sup>13</sup> C-NMR spektrumu ( <sup>13</sup> C-NMR 100 MHz DMSO-d <sub>6</sub> ) .....	84
Şekil 4. 55. Apigenin-7-O-β-glukoronid'in (10) LC-TOF-MS kromatogramı.....	85
Şekil 4. 56. Acacetin-7-O-β-glukoronid (11).....	86
Şekil 4. 57. Acacetin-7-O-β-glukoronid'in (11) <sup>13</sup> C-NMR spektrumu (400 MHz DMSO-d <sub>6</sub> ) .....	87
Şekil 4. 58. Acacetin-7-O-β-glukoronid'in (11) <sup>13</sup> C-NMR spektrumu (100 MHz DMSO-d <sub>6</sub> ) .....	88
Şekil 4. 59. Acacetin-7-O-β-glukoronid'in (11) LC-TOF-MS kromatogramı .....	89
Şekil 4. 60. Litospermik asit B (12).....	90
Şekil 4. 61. Litospermik asit B'nin (12) <sup>1</sup> H-NMR spektrumu ( <sup>1</sup> H-NMR 400 MHz DMSO-d <sub>6</sub> ) .....	92
Şekil 4. 62. Litospermik asit B'nin (12) <sup>13</sup> C-NMR spektrumu ( <sup>13</sup> C-NMR 100 MHz DMSO-d <sub>6</sub> ) .....	94
Şekil 4. 63. Litospermik asit B'nin (12) LC-TOF-MS kromatogramı.....	95

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1. Biyolojik öneme sahip bazı serbest radikaller .....	5
Çizelge 2. 2. Antioksidanların sınıflandırılması (Gulcin, 2002).....	7
Çizelge 2. 3. Fenolik asitlerin kimyasal yapıları (Jackson, 2000; Fraga, 2010).....	10
Çizelge 3. 1. 327-355 fraksiyon aralığına uygulanan P-HPLC mobil faz programı .....	19
Çizelge 3. 2. 417-501 fraksiyon aralığı P-HPLC mobil faz programı .....	20
Çizelge 3. 3. 570-584 fraksiyon aralığı P-HPLC mobil faz programı .....	22
Çizelge 3. 4. 503-610 fraksiyon aralığı P-HPLC mobil faz programı .....	23
Çizelge 4. 1. Ham ekstrelelere uygulanan antioksidan aktivite test sonuçları.....	26
Çizelge 4. 2. <i>Origanum onites</i> L. Kolon Çözücü Sistemi, Birleştirilen Fraksiyon Aralıkları ve İzole Edilen Bileşikler.....	28
Çizelge 4. 3. İzole Edilen Bileşiklerin Yaygın İsimleri ve IUPAC İsimleri.....	29
Çizelge 4. 4. <i>p</i> -Hidroksibenzaldehit'in (1) <sup>1</sup> H-NMR ve <sup>13</sup> C-NMR kimyasal kayma değerleri.....	31
Çizelge 4. 5. Hidrokinon'un (2) <sup>1</sup> H-NMR ve <sup>13</sup> C-NMR kimyasal kayma değerleri .....	35
Çizelge 4. 6. Kafeik asit'in <sup>1</sup> H-NMR ve <sup>13</sup> C-NMR kimyasal kayma değerleri.....	40
Çizelge 4. 7. Luteolin-7-O-β-glikozit'in (4) <sup>1</sup> H-NMR ve <sup>13</sup> C-NMR kimyasal kayma değerleri.....	44
Çizelge 4. 8. Luteolin-7-O-β-ksilozit'in (5) <sup>1</sup> H-NMR ve <sup>13</sup> C-NMR kimyasal kayma değerleri.....	48
Çizelge 4. 9. Rozmarinik asit'in (6) <sup>1</sup> H-NMR ve <sup>13</sup> C-NMR kimyasal kayma değerleri	52
Çizelge 4. 10. Bifenil-3,3',4,4'-tetraol'ün (7) <sup>1</sup> H-NMR ve <sup>13</sup> C-NMR kimyasal kayma değerleri.....	57
Çizelge 4. 11. Origanofuran A'nın (8) <sup>1</sup> H-NMR ve <sup>13</sup> C-NMR kimyasal kayma değerleri .....	62
Çizelge 4. 12. Origanofuran B'nin (9) <sup>1</sup> H-NMR ve <sup>13</sup> C-NMR kimyasal kayma değerleri .....	73
Çizelge 4. 13. Apigenin-7-O-β-glukoronid'in (10) <sup>1</sup> H-NMR ve <sup>13</sup> C-NMR kimyasal kayma değerleri .....	82
Çizelge 4. 14. Acacetin-7-O-β-glukoronid'in (11) <sup>1</sup> H-NMR ve <sup>13</sup> C-NMR kimyasal kayma değerleri .....	86
Çizelge 4. 15. Litospermik asit B'nin (12) <sup>1</sup> H-NMR ve <sup>13</sup> C-NMR kimyasal kayma değerleri.....	91
Çizelge 4. 16. <i>Origanum onites</i> L. bitkisinden İzole Edilen Bileşiklere Uygulanan DPPH <sup>•</sup> , ABTS <sup>•+</sup> , FRAP ve Metal Şelatlama Aktivite testleri sonuçları.....	96

## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simge	Açıklama
$\mu\text{g}$	Mikrogram
mg	Miligram
kg	Kilogram
$\mu\text{L}$	Mikrolitre
mL	Mililitre
L	Litre
mM	Milimolar
$\mu\text{M}$	Mikromolar
<i>p</i> -	Para konum
$\beta$	Beta
$\alpha$	Alfa
C°	Santigrat Derece
%	Yüzde
e <sup>-</sup>	Elektron
R <sub>f</sub>	Yürüme Hızı

<b>Kısaltma</b>	<b>Açıklama</b>
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
P-HPLC	Preperatif Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
LC-TOF-MS	Uçuş zamanlı Sıvı Kromatografisi Kütle Spektroskopisi
UV-VIS	Ultra Viyole Görünür Bölge
DAD	Diod Array Dedektör
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
APT	Attached Proton Test
COSY	Correlation Spectroscopy
HETCOR	Heteronuclear Correlation
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
EtOAc	Etilasetat
MeOH	Metanol
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -Bütanol
CDCl <sub>3</sub>	Dötero kloroform
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dötero Dimetilsülfoksit
D <sub>2</sub> O	Dötero Su
TCA	Trikloro Asetik Asit
ABTS <sup>•+</sup>	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)
FRAP	Demir (III) İyonu İndirgenmesine Dayalı Antioksidan Aktivitesi
DPPH <sup>•</sup>	2,2-difenil-1-pikril hidrazil radikali
BHA	Bütillenmiş Hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş Hidroksitoluen
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
TROLOKS	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
IC <sub>50</sub>	Yüzde Aktivitenin Yarıısı Kadar Aktivite Gösteren Derişim
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
RNT	Reaktif Nitrojen Türleri
DNA	Deoksiribonükleik Asit
TBHQ	<i>t</i> - Bütül Hidrokinon
PG	Propil Gallat
GAE	Gallik Asite Eşdeğer
TE	Troloksa Eşdeğer
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi

## 1.GİRİŞ

Eski çağlardan beri bitkiler, etkili ve güvenli tıbbın zengin bir kaynağı olmuştur. Tıbbi bitkiler çoğu ülkede sağlık alanında en temel yapı taşı olmuştur. Gelişmekte olan ülkelerde nüfusun yaklaşık yüzde 80'i hala geleneksel tıbbi ilaçları kullanmaktadır (Schmincke, 2003). Bitkisel materyaller; nektar, reçineler, lipitler, uçucu yağlar ve diğer maddeler içermesine rağmen, bitkisel droglar, aktif maddelerle birlikte tatlandırıcı içermektedir (WHO, 1998). Epidemiyolojik çalışmalar, zengin besin değerine sahip bitkilerin tüketilmesinin bazı kanser türlerine ve kardiovasküler hastalıklara karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğunu vurgulamaktadır (Surh, 2003; Neuhouser, 2004a; Arts ve Hollman, 2005). Modern farmakopilerde hala en az %25 bitkisel kaynaklı ilaç bulunmaktadır. Diğer taraftan bir çok sentetik ilaç bitkilerden izole edilen biyoaktif maddelerden yola çıkarak formüle edildiği bilinmektedir (Lucy ve Edgar, 1999). Bu nedenle, doğal ürünlerden biyolojik aktif moleküllerin izolasyonu ve aktivitelerinin belirlenmesi önemini hala korumaktadır. Son yıllarda bu konu üzerinde bilimsel çalışmalar ivme kazanmış durumdadır.

İzmir kekiği olarak bilinen *Origanum onites* Ege ve Akdeniz bölgelerinde taşlık ve yamaçlık yerlerde yaygın, 40-50 cm boyunda çok yıllık bir bitkidir. Yapraklarının her iki yüzü sık örtü ve salgı tüyleri ile kaplıdır. Tohumdan, çelikle veya bitkiyi bölerek üretimi yapılır. Kekikte antifungustik ve antiparazitik özelliklere sahip olan karvakrolün yüksek olması aranan bir özelliktir. İzmir kekiği gastrointestinal rahatsızlıkların giderilmesinde ve antispazmotik etkisinin yanı sıra antiseptik ve ekspektoran etkiye de sahip olduğu rapor edilmiştir (Gül ve ark., 2002).

Her geçen gün baharat, bitkisel çay, gıda ve kozmetik sanayi gibi geniş alanlarda kullanımı artan tıbbi aromatik bitkilerin, biyolojik aktiviteleri ve kimyasal içeriklerinin belirlenmesi araştırma konuları içerisinde ön plana çıkmaktadır. Etken maddelerin izolasyonu, yapılarının belirlenmesi, farmakolojik etkilerinin ortaya konulması bu alandaki çalışmaların en önemli kısmını teşkil etmektedir.

Bitkilerde sentezlenen sekonder maddeler (uçucu yağlar, alkaloidler, glikozitler, fenolik bileşikler) biyoaktif özelliklerinden dolayı gıda, kozmetik ve ilaç sektörlerinde geniş

kullanım alanlarına sahiptir. Sekonder metabolitler grubunda yer alan fenolik bileşikler (flavonoidler, fenolik asitler, antosiyaninler vb.) antioksidan, antiviral, antikanser etkileri nedeniyle bunların değeri giderek artmaktadır. Antioksidan özelliği bakımından zengin olan bitkilerin belirlenmesi ve kimyasal yapılarının aydınlatılması aynı zamanda antioksidan özellik gösteren bileşiklerin izole edilmesi önemlidir. Zira her geçen gün faydalı olduğu sanılan, başta gıda olmak üzere çeşitli sektörlerde kullanılan sentetik kimyasalların birçok yan etkileri ortaya konulmuş ve insan sağlığı açısından tehlike arz ettikleri vurgulanmıştır. Sentetik antioksidanlar ve oluşturdukları yan ürünlerin çeşitli hastalıklara yol açabileceğini ortaya koyan çalışmalar rapor edilmiştir. Bu nedenle doğal kaynaklardan, sentetik antioksidanların yerini tutabilecek yeni antioksidan maddelerin bulunmasına yönelik çalışmalar giderek önem kazanmış ve bu alanda yapılan çalışmalar artmıştır.

*Origanum onites* bitkisi önemli kekik türlerinden biri olup, bu tür üzerinde yapılan çalışmalar uçucu yağ bileşenlerini belirleme ve bunun yanında ham ekstrelerin ve uçucu yağının bazı biyolojik aktivitelerini belirlenmesiyle sınırlı kalmıştır. Yaptığımız literatür araştırmasına göre bu bitki ile ilgili izolasyon çalışmalarına rastlanmamıştır. Bu nedenle; bu çalışmada *Origanum onites* bitkisinin herba kısmının kimyasal içeriğinin belirlenmesi ve antioksidan aktiviteye sahip bileşiklerin saflaştırılması amacıyla aktivite kontrollü izolasyon yapılması hedeflenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. *Origanum onites* L. Bitkisinin Özellikleri ve Yayılımı

*Origanum onites* L. bitkisinin yöresel isimleri İzmir kekiği, Bilyalı kekik, Taş kekiği, Güve kekiği ve Peynir kekiğidir (Şekil 2.1). Bitki; Herba-İnfüzyon olarak soğuk algınlıkları ve karın ağrısına karşı, uçucu yağ şeklinde analjezik, antioksidan, antifungal olarak, yaprak-infüzyonu olarak gargara yapılarak diş eti nevraljisi ve baş ağrısına karşı ve aromatik su halinde dâhilen veya gargara şeklinde mide ağrıları ve diş ağrılarına karşı kullanılmaktadır (Hartwell, 1982; Baytop, 1999).



Şekil 2. 1. *Origanum onites* L. bitkisi

#### **Sistematiik**

<b>Alem</b>	: Plantae
<b>Bölüm</b>	: Magnoliophyta
<b>Sınıf</b>	: Magnoliopsida
<b>Takım</b>	: Lamiales
<b>Alt Takım</b>	: Asteridae
<b>Familya</b>	: Lamiaceae
<b>Cins</b>	: <i>Origanum</i>
<b>Tür</b>	: <i>Origanum onites</i> L.
<b>Endemik</b>	: Endemik değil
<b>Ömür</b>	: Çok yıllık

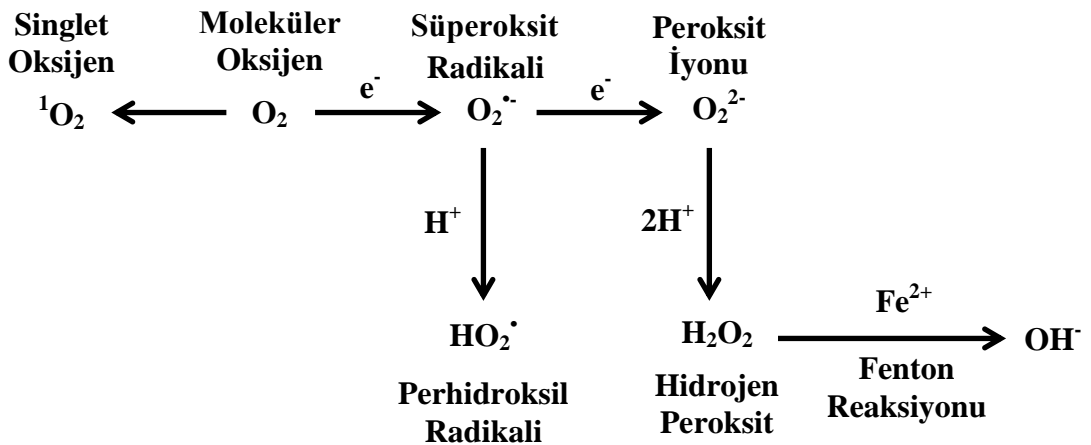
## 2.2. Serbest Radikaller ve Antioksidan Aktivite

### 2.2.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküllerdir. Bu tip maddeler, ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftir. Yarı ömürleri çok kısadır (Barber ve Harris, 1994; Halliwell, 1994).

Serbest radikaller, hücrenin normal metabolizması sırasında oluşabildikleri gibi, antineoplastik ilaçlar, anestezi maddeleri ve aromatik hidrokarbonların hücre içindeki metabolizması sırasında ve dış etkenler (ısı, ışık, radyasyon, hava kirliliği, sigara) etkisiyle de oluşabilmektedirler. Yaşam süreleri oldukça kısa olmasına karşın, yapılarındaki dengesizlik nedeniyle diğer moleküllerle kolaylıkla elektron alışverişi yaparak onların yapılarını bozarlar (Cadenas, 1998).

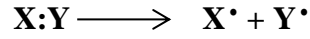
Serbest radikaller; reaktif oksijen türleri (ROT), reaktif nitrojen türleri (RNT) ve diğer reaktifler olmak üzere üç gruba ayrılır (Song, 2004). Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşan radikallerdir (Mates, 2000). Moleküler oksijenin indirgenmesi, süperoksit ( $O_2^{\bullet -}$ ) anyon radikali, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikali ( $OH^{\bullet}$ ) gibi ROT'ları (Şekil 2.2) oluşturur. (Gill ve Tuteja, 2010).



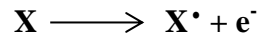
Şekil 2. 2. Enerji transferi aracılığıyla ROT'ların üretimi

➤ **Serbest radikaller üç yolla meydana gelmektedir:**

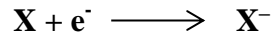
1. Molekülün kovalent bağının homolitik kırılması sonucu bağ yapısındaki iki elektronun her birinin ayrı atom üzerinde kalması



2. Normal bir molekülden bir elektronun kaybı



3. Normal bir moleküle bir elektron eklenmesi



Biyolojik öneme sahip radikallerden bazıları çizelge 2.1’ de verilmiştir (Halliwell ve Gutteridge, 2000).

Çizelge 2. 1. Biyolojik öneme sahip bazı serbest radikaller

<b>Radikaller</b>	<b>Non- radikaller</b>
Süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ )	Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )
Hidroksil ( $OH^{\cdot}$ )	Hipokloröz asit ( $HOCl$ )
Peroksil ( $RO_2^{\cdot}$ )	Ozon ( $O_3$ )
Alkoksil ( $RO^{\cdot}$ )	Singlet oksijen ( $^1O_2$ )
Hidroperoksil ( $HO_2^{\cdot}$ )	Peroksinitrit ( $ONOO^{\cdot}$ )
Nitrik oksit ( $NO^{\cdot}$ )	Lipid Hidroperoksit ( $LOOH$ )

Serbest radikaller, hücre metabolizması sırasında meydana gelen enzimatik reaksiyonlarda ara ürünler olarak enzimlerin aktif bölgelerinde devamlı oluşmaktadır. Ara ürünler olarak bilinen reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türleri, bazen enzimlerin aktif bölgelerinde sızarak moleküler oksijenle kazara etkileşir ve serbest oksijen radikallerini meydana getirirler (Altınışık, 2000; Pham-Huy ve ark., 2008). Kararsız yapıdaki bu reaktif oksijen türleri, kararlı hale gelmek için hücrelere saldırmakta ve hücre bileşenlerine zarar vermek suretiyle çeşitli hastalıklara yol açmaktadır (Janssen ve ark., 1993; Sardesai, 1995).

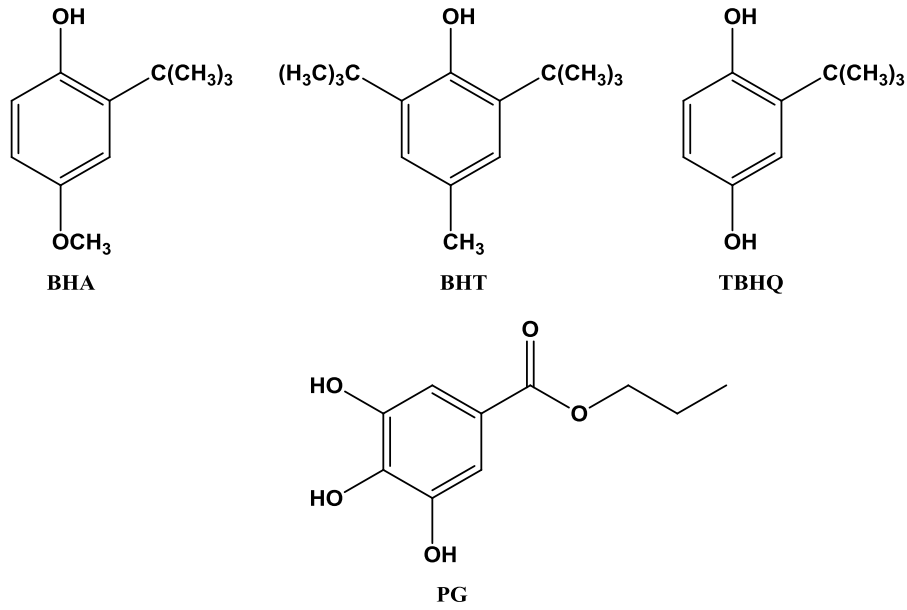
### 2.3. Antioksidan Aktivite

Serbest radikallerin oluşumunu engelleyen, serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddelere “antioksidan” adı verilir (Elliot, 1999).

Vücutta meydana gelen radikallerin oksidatif etkileri antioksidan sistem tarafından engellenmektedir. Oksidan ve antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması oksidatif strese neden olmaktadır (Cross ve ark., 1987). Oksidatif stres sonucunda protein, lipit, nükleik asit ve enzimlerin yapı ve fonksiyonları bozulmaktadır (McCord, 1993).

ROT ve RNT başta kanser, diyabet, otoimmün bozukluklar, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar olmak üzere birçok hastalığın oluşmasını tetikler (Ratnam ve ark., 2006; Cemeli ve ark., 2009; Pellegrini ve ark., 2009).

Günümüzde BHA (bütilenmiş hidroksianisol), BHT (bütilenmiş hidroksitoluen), PG (propil gallat) ve TBHQ (*t*-bütil hidrokinon) en çok kullanılan sentetik antioksidanlardır (Şekil 2.3.).



Şekil 2. 3. Bazı sentetik antioksidanların kimyasal yapıları

Ancak sentetik antioksidanlar ve oluşturdıkları yan ürünlerin çeşitli hastalıklara yol açabileceğini ortaya koyan çalışmalar vardır. Bu nedenle doğal kaynaklardan, sentetik antioksidanların yerini tutabilecek yeni antioksidan maddelerin bulunmasına yönelik çalışmalar giderek önem kazanmış (Yi ve ark., 2007; Kil ve ark., 2009) ve güvenilir olması, istenmeyen yan etkileri olmaması nedeniyle de sentetik antioksidanlara kıyasla daha fazla tercih edilir duruma gelmişlerdir (Pellegrini ve ark., 2009; Tozoğlu, 2011).

Antioksidanlar genel olarak endojen ve ekzojen antioksidanlar olmak üzere iki grupta incelenir (Yalçın, 1998).

Çizelge 2. 2. Antioksidanların sınıflandırılması (Gulcin, 2002)

<b>Antioksidanlar</b>			
<b>Endojen antioksidanlar</b>		<b>Ekzojen antioksidanlar</b>	
<b>Enzimler</b>	<b>Küçük moleküller</b>	<b>Sentetik</b>	<b>Doğal</b>
Katalaz	Askorbik Asit	BHA	Tokoferoller
Peroksidaz	Glutasyon	BHT	Karotenler
Süperoksit dismutaz	Ürik asit	TBHQ	Fenoller
Glutasyon peroksidaz	Metal bağlayıcılar (Hemoglobin, Miyoglobin vb.)	Propilgallat	Flavonlar
Glutasyon redüktaz			Kateşinler

Antioksidanlar çeşitli mekanizmalarla etkilerini göstermektedirler (Barber ve Harris, 1994).

**Bu mekanizmalar şunlardır:**

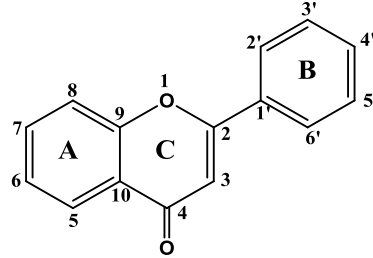
1. Radikal oluşumunun sınırlandırılması,
2. Tetiklenen biyokimyasal reaksiyonların durdurulması
3. Radikal reaksiyonlarının sona erdirilmesi
4. Oluşan radikallerin giderilmesi
5. Hasarlı moleküllerin ortadan kaldırılması

## 2.4. Antioksidan Aktiviteye Sahip Fenolik Bileşenler

Fenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteleri olduğu ve antioksidan ajan olarak kullanılabilceği konusu daha önce yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Rice-Evans ve ark., 1995; Pekkarinan ve ark., 1999).

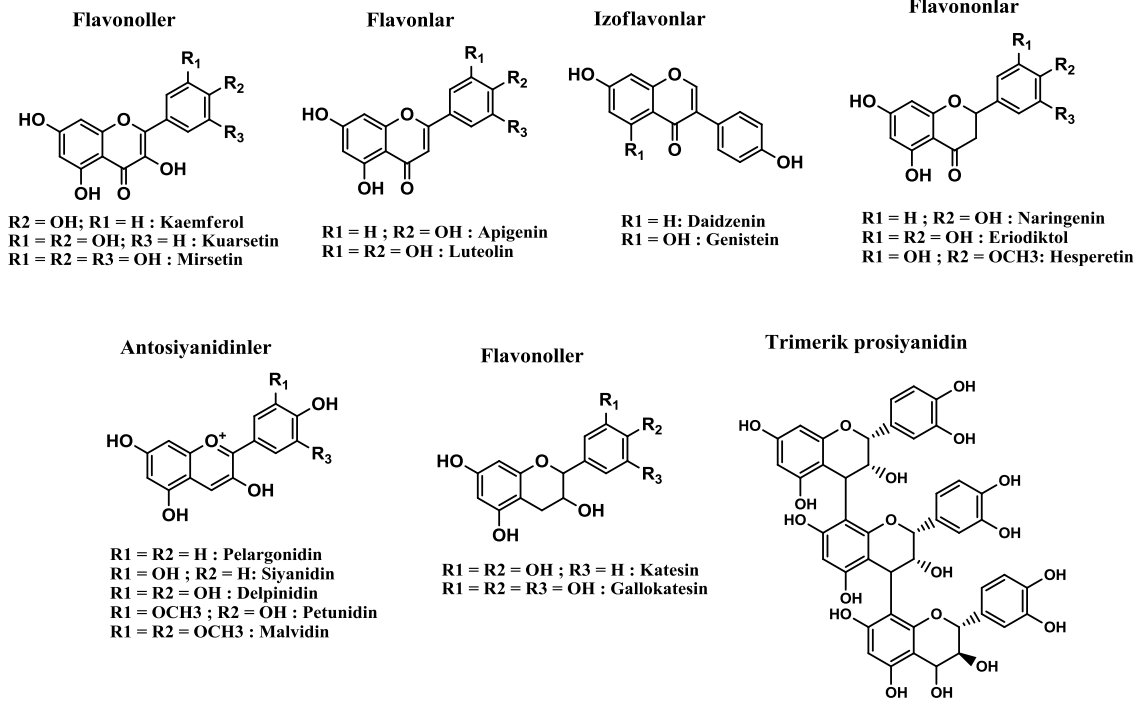
### 2.4.1. Flavonoidler

Flavonoidlerin karbon iskeletini, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren, A, B, C halkasından ibaret difenilpropan (C6-C3-C6) yapısı oluşturur. Flavonoidler büyük düzlemsel moleküllerdir ve yapılarının çeşitliliği hidroksilasyon, metoksilasyon veya glikozilasyon gibi süstitüsyon modellerinden kaynaklanır. Flavonoid aglikonlar C-4 de bir karbonil grubu, C-3 de bir hidroksil grubu ve C-2 ve C-3 arasında doymuş bir tekli bağın bulunduğu ve bulunmadığı hallerinin kombinasyonlarına bağlı olarak flavon, flavonol, flavanon ve flavanol tipleri içinde alt gruplara ayrılırlar (Şekil 2.5). İzoflavonoidler C halkasının C-3 pozisyonuyla B halkasına 4 bağlı flavonoidlerdir. Tüm flavonoid yapıları ana flavon bileşiği olan 2-fenil benzopiron (Şekil 2.4). ile ilişkilidir (Prasain ve ark., 2004).



Şekil 2. 4. Genel flavon iskeleti (2-fenil benzopiron)

Flavonoidler (Şekil 2.5.), bitkilerdeki fenolik bileşiklerin en geniş grubudur. Altı alt gruba ayrılırlar: flavonoller, flavonlar, flavanonlar, izoflavonoidler (izoflavonlar), flavanoller ve antosiyanidinlerdir (Aherne ve O'Brien, 2002; Manach ve ark., 2004).



Şekil 2. 5. Flavonoidlerin kimyasal yapısı (Manach ve ark., 2004)

Bugüne kadar en az 5000 tane fenolik madde tanımlanmış olup bunların 2000'den fazlası doğal flavonoidlerdir. Genelde bitkilerin yaprak, çiçek, meyve gibi canlı dokularında glikozitler şeklinde, odunsu dokularında anglikanlar şeklinde, çekirdeklerinde ise her iki formda da bulunabilmektedirler (Shahidi ve Naczki, 1995).

Fenolik bileşikler bitkilerin temel bileşenlerinden olup bitkilerin ve onlardan türetilen ürünlerinin besinsel ve organoleptik (renk, koku ve tat) özelliklerinde önemli rol oynarlar (Fabre ve ark., 2001; Borbalan ve ark., 2003; Fang ve ark., 2007).

Gıda bileşeni olarak fenolik bileşikler; insan sağlığı açısından işlevleri, tat ve doku oluşumundaki etkileri, renk oluşumu ve değişimine katılmaları, antimikrobiyal ve antioksidatif etki göstermeleri, enzim inhibisyonuna neden olmaları gibi birçok açıdan önem taşırlar (Çam ve Hışıl, 2004).

Flavonoidler genellikle insan beslenmesi üzerine direkt olarak etkili olmamakla birlikte, insan sağlığına olan yararlarından dolayı giderek yükselen bir ilgiye sahiptirler. Flavonoidlerin antioksidan, antimutajenik ve antikarsinojenik özelliklerinden dolayı insan sağlığını destekleyici bileşikler olduğu belirtilmektedir (Hertog ve ark., 1993).

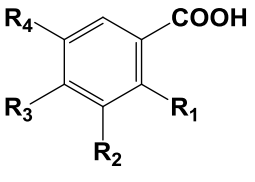
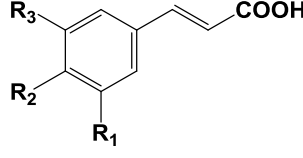
## 2.4.2. Fenolik Asitler

Fenolik asitler;

- ✓ Hidroksisinamik asitler
- ✓ Hidroksibenzoik asitler

Olmak üzere iki grupta incelenirler.

Çizelge 2. 3. Fenolik asitlerin kimyasal yapıları (Jackson, 2000; Fraga, 2010)

	<b>Hidroksibenzoik asit</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>
	<i>p</i> -hidroksibenzoik asit	H	H	OH	H
	Protokateşik asit	H	OH	OH	H
	Vanilik asit	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
	Gallik asit	H	OH	OH	OH
	Şiringiç Asit	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
	Salisilik asit	OH	H	H	H
	Gentisik asit	OH	H	H	OH
		<b>Hidroksisinamik asit</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>
<i>p</i> -kumarik asit		H	OH	H	
Kafeik asit		OH	OH	H	
Ferulik asit		OCH <sub>3</sub>	OH	H	
Sinamik asit		OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	

## 2.5. Literatür Özetleri

Tıbbi bitkiler günümüzde birçok hastalığa karşı kullanılabilen bileşimlerin doğal kaynağıdır (Vital ve ark., 2010). Bitkiler, onları faydalı kılan protein, aminoasit, karbonhidrat, lipit ve vitamin gibi çeşitli bileşenleri içerse de son zamanlarda araştırmacılar, hastalıkları engellemede önemli rol oynayan sekonder metabolitler üzerinde yoğunlaşmıştır (Arts ve Hollman, 2005).

Bitkilerde bulunan polifenoller yapı ve genel sınıflandırma bakımından değişiklik gösterebilir, fakat en azından bir tane aromatik halkaya bağlı bir veya daha fazla hidroksil grubu içermeleri bakımından ortak özelliğe sahiptirler. Bitkilerdeki polifenolik bileşikler doğal antioksidan kaynaklarıdır ve bu bileşiklerin radikal giderme aktivitelerinin yanı sıra pek çok kronik hastalığı engellemede de önemli rol aldığı bildirilmiştir (Rice-Evans ve ark., 1997; Gross, 2004; Neuhaus, 2004b). Ayrıca anjiyogenez, tümör oluşumu ve metastaz oluşumunu engellediği (Kohlmeier ve ark., 1995; Stoner ve ark., 1997; Zhou, 2006) ve çoğunun antibakteriyel, antifungal ve anti-enflamatuar özelliğe sahip olduğu bilinmektedir (Christensen ve Brandt, 2006).

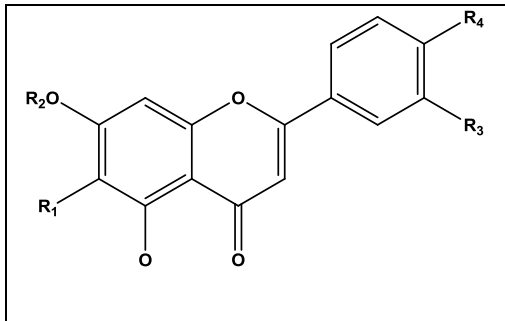
Türkiye, Lamiaceae familyasının önemli bir gen merkezi konumunda olup, bu familya 45 cinse ait toplam 731 takson ile temsil edilmektedir. Ülkemizdeki endemizm oranı % 44,2 olan bu familya Türkiye'nin en zengin üçüncü familyası konumundadır (Baser, 1993; Kocabas ve Karaman, 2001). *Origanum* türleri, birden fazla dik gövdesi olan, çok yıllık otsu veya yarı çalimsı bitkiler olup çiçekleri salkımsı veya gövde uçlarında toplu halde bulunmaktadır (Davis, 1982).

Ülkemizde beş cinse (*Origanum*, *Thymus*, *Thymbra*, *Satureja* ve *Coridotymus*) ait 15 kadar bitki türü kekik olarak kullanılmaktadır. Kekik olarak ticareti yapılan önemli türler *Origanum onites*, *Origanum vulgare* ssp. *hirtum*, *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*, *Origanum minutiflorum*, *Thymus capitatus*, *Thymbra spicata*, *Coridotymus capitatus*, *Saturea hortensis*, *Saturea cuneifolia* olarak sayılabilir. Lamiaceae familyasına ait bitkilerden, timol/karvakrol tipi uçucu yağ içeren türler kekik olarak kabul edilmektedir. Genelde *Origanum* ve *Thymbra* türlerinin uçucu yağları karvakrol, *Thymus* türlerinin uçucu yağları ise timol bakımından zengindir (Özhatay ve Koyuncu, 1998; Baydar, 2007).

*Origanum onites*'in bitkisinin metanol ve aseton ekstraktlarının antioksidan aktivitelerinin yüksek olduğu belirlenmiştir (Lagouri ve ark., 2010).

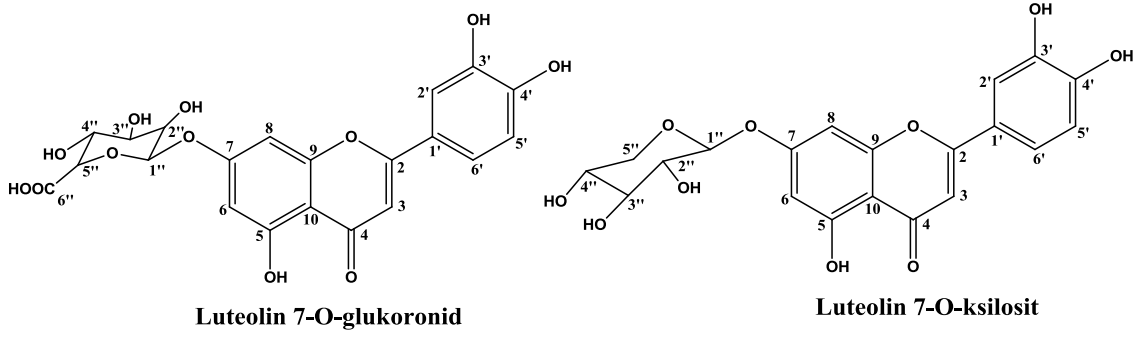
*Origanum onites*'in uçucu yağları üzerine yapılan bir çalışmada, en yüksek yağ oranının çiçeklenme dönemine ait olduğu (Toncer ve ark., 2009), uçucu yağ ana bileşeninin de kavrakrol olduğu belirtilmiştir (Kutlular ve Ozel, 2009). *Origanum onites* uçucu yağının bitkilerde görülen mantar (*Verticillium dahliae* mantarı) hastalığına karşı etkili olduğunu (Sokovic ve ark., 2002; Aslan ve Derviş, 2010) ve uçucu yağ bileşenlerinden timol ve karvakrolün, çam güvesi olan *Thaumetopoea wilkinsoni*'nin kontrolünde alternatif bir insektisit olarak kullanılabilirliği (Cetin ve ark., 2007) rapor edilmiştir.

Başka bir *Origanum*'un türü olan *Origanum majorana*'nın metanol ekstresine yapılan izolasyon çalışmasında, izole edilen beş adet 6-hidroksiflavonoidlerin (Şekil 2.6.) farelerde bağırsakta bulunan alfa-glikozidazı inhibe ettiği belirtilmiştir (Kawabata ve ark., 2003).

	R1	R2	R3	R4
				
1	OH	H	H	
2	OH	H	H	OH
3	OH	H	OH	OH
4	OH	$\beta$ -D-Glc	H	OH
5	OH	$\beta$ -D-Glc	OH	OH

Şekil 2. 6. *Origanum majorana*'dan izole edilen flavonoidler

*Origanum vulgare* bitkisinin petrol eteri, kloroform, etil asetat, *n*-bütanol ve su ekstraktlarını izolasyona hazırlamak için öncelikle bu ekstraktlara antimutajenik testler yaparak en etkili sonuçları gösteren *n*-bütanol ekstresine kolon kromatografisi uygulanarak Luteolin 7-O-glukuronit ve Luteolin 7-O-ksilosit gibi antimutajenik olarak aktif molekülleri izole etmişlerdir (Gulluce ve ark., 2012) (Şekil 2.7.).



Şekil 2. 7. *Origanum vulgare*'den izole edilen moleküller (Gulluce ve ark, 2012)

### 3. MATERYAL ve METOT

#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

**Çözücüler:** Metanol, etil asetat, hekzan, kloroform, etil asetat, asetonitril ve diklormetan kullanılmıştır. Bütün çözücüler destilleme işlemi yapıldıktan sonra kullanıldı. NMR ölçümleri için kullanılan döteryumlu çözümler:  $CDCl_3$ ,  $DMSO-d_6$ ,  $D_2O$  (Merck).

**Reaktifler:** DPPH<sup>•</sup>,  $FeCl_3$ , ferrozin (Sigma),  $K_3Fe(CN)_6$ , TCA,  $KH_2PO_4$ ,  $Na_2CO_3$ , Folin-Ciocalteu Reaktifi (Sigma-Aldrich), BHA, BHT, Vitamin E, Gallik asit (Merck), Amonyum seryum sülfat (Sigma).

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

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

#### 3.2. Cihazlar

**P-HPLC:** Perkin Elmer Series200 pompa Series200 UV-Vis detektör

**NMR:** Bruker Avence III 400 MHz  $^1H$  ve 100 MHz  $^{13}C$

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

**UV Spektrofotometre:** Hitachi U-2900

**Döner buharlaştırıcı:** Heidolph

**Manyetik karıştırıcı:** İKA

**Liyofilizatör:** ScanVac

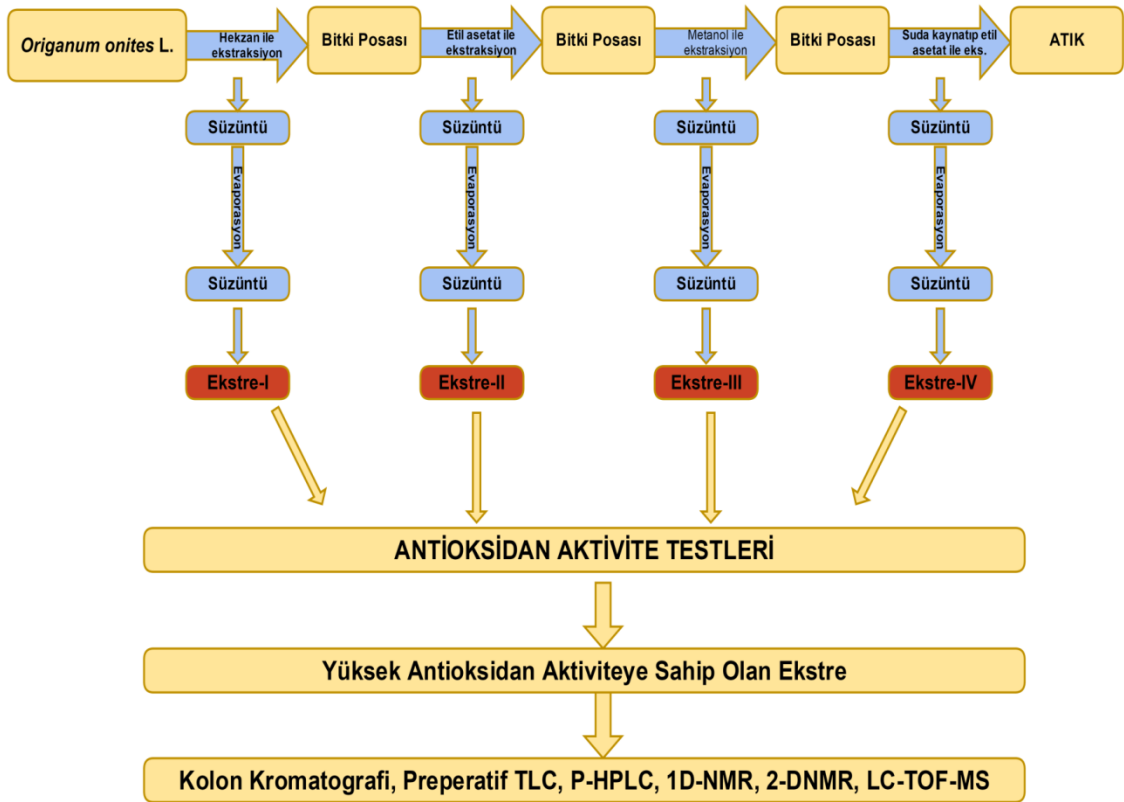
#### 3.3. Bitkisel Materyal

*Origanum onites* bitkisi Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla bitkileri arazisinden hasat edildi. Bitkinin tür teşhisi Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Orman Mühendisliği Bölümü Orman Botaniği Anabilim Dalı öğretim üyesi olan Prof. Dr. Özgür Emin AĞAOĞLU tarafından belirlendi. Bitki örneği Artvin Çoruh

Üniversitesi Herbariyumu'nda ARTH 5255 numarasıyla saklanmıştır. Bitkinin ekstrakte edilmesi, antioksidan aktivite için test numunelerinin hazırlanması, fraksiyonlandırma, ayırma, saflaştırma, antioksidan aktivite testleri ve saflaştırılan bileşiklerin yapı karakterizasyonları Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Kimya Bölümü Bitki Araştırma Laboratuvarı'nda yapıldı.

### 3.4. Ekstraksiyon İşlemleri

*Origanum onites* bitkisi güneş görmeyen ortamda kurutulduktan sonra bitkiden 1,5 kg alınarak sırasıyla hekzan, etil asetat, metanol ile ekstrakte edildi (Her bir çözücü için 3x5 L). Daha sonra kalan bitki posası suda kaynatılarak etil asetat ile ekstrakte edildi. Ayrıntılı ekstraksiyon seması Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3. 1. *Origanum onites* L. bitkisi için seçici ekstraksiyon şeması

### **3.5. Antioksidan Aktivite Analizleri**

#### **3.5.1. Toplam Fenolik Madde Tayini**

Total fenolik tayini Folin-Ciocalteu metodu kullanılarak tayin edilmiştir. Yöntem, suda ve organik çözücülerde çözülmüş olan fenolik bileşiklerin Folin-Ciocalteu ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan mor–menekşe renkli kompleks 760 nm’de maksimum absorbands verir (Slinkard ve Singleton, 1979). Bitki ekstraktı 100 µL (mg/mL) üzerine Folin-Ciocalteu reaktifi (100 µL) ve %2’lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (300 µL) ve 4,5 mL saf su ilave edildi. Bu karışım vortekslendi ve oda şartlarında iki saat inkübe edildikten sonra 760 nm’ de absorbands ölçümü yapıldı. Her bir numune için üçer tekrarlı yapılan test sonunda, gallik asit ile elde edilen kalibrasyon grafiği kullanılarak toplam fenolik bileşik miktarı hesaplanmıştır. Sonuçlar kg ekstrede g gallik aside eşdeğer (g GAE/kg ekstre) olarak verilmiştir.

#### **3.5.2. Serbest Radikal Giderme Aktivitesi**

Bitki ekstrelerinin ve izole edilen moleküllerin 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>) serbest radikalini giderme aktiviteleri etkileri Blois metoduna göre yapıldı (Blois, 1958). Reaksiyon karışımının absorbandsının düşmesi yüksek serbest radikal giderme aktivitesinin göstergesidir. DPPH<sup>•</sup> radikalini etkinliğinin giderilmesi çalışmaları çeşitli araştırmacıların ortaya koydukları metodu takiben yapılmıştır (Hatano ve ark., 1988). Her bir numune için (mg/mL derişimde) 10, 20, 40 ve 80 µg/mL dört farklı miktarda ve üçer tekrarlı olmak üzere örnekler hazırlandı. Örneklerin hacmi 3 mL olacak şekilde etanol ilave edildi. Daha sonra her numune üzerine 0,1 mM’lık DPPH<sup>•</sup> çözeltisinden 1 mL eklendi. Vorteks işleminden sonra karanlık ortamda oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilip, 517 nm’de absorbands ölçümü yapıldı. DPPH<sup>•</sup> giderme aktivite sonuçları IC<sub>50</sub> şeklinde verilmiştir.

#### **3.5.3. İndirgeme Gücü Aktivitesi**

Bu analiz Oyaizu metodunun (Oyaizu, 1986) bazı modifikasyonlarına (Elmastas ve ark., 2006) göre yapıldı. Ortamdaki indirgen madde Fe<sup>3+</sup> iyonlarını Fe<sup>2+</sup> iyonlarına indirger ve FeCl<sub>3</sub> ilavesiyle oluşan Prusya mavisi rengindeki kompleksin absorbandsı ölçülür. Yüksek absorbands değeri yüksek indirgeme kapasitesinin göstergesidir. Her bir numune

için (mg / mL derişimde) 10, 20, 40 ve 80 µg / mL dört farklı miktarda ve üçer tekrarlı olmak üzere örnekler alınarak fosfat tamponu ( 0,2 M, pH = 6,6) ile hacmi 1,25 mL'ye tamamlandı ve üzerine 1,25 mL potasyum ferrik siyanür [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] ( % 1'lik) ilave edildi. 50 °C'de 20 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra reaksiyon karışımı oda sıcaklığına getirilip üzerine 1 mL % 10'luk TCA ve 250 µL % 0,1'lik FeCl<sub>3</sub> eklendikten sonra 700 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Sonuçlar troloksa eşdeğer (mmol TE / g saf bileşik) şeklinde verilmiştir.

#### **3.5.4. Metal Şelatlama Aktivitesi**

Örneklerin ve standartların metal şelatlama kapasitesi Dinis ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntemler esas alınarak uygulandı (Dinis ve ark., 1994). Örnek ve standart çözeltilerinin konsantrasyonları (mg / mL derişimde) 10, 20, 40 ve 80 µg / mL dört farklı miktarda ve üçer tekrarlı olmak üzere örnekler hazırlanıp toplam hacimleri etanol ile 3,8 mL'ye tamamlandı. Daha sonra her bir numuneye 50 µL, 5 mM ferrozin ve 200 µL, 2 mM'lık FeCl<sub>2</sub> çözeltisi ilave edildi. Vorteks yapıldıktan sonra oda şartlarında 10 dakika inkübe edildi. Demir iyonları ve ferrozinin oluşturduğu kompleksin absorbansı 562 nm'de ölçüldü. Pozitif kontrol olarak EDTA kullanıldı. Sonuçlar IC<sub>50</sub> şeklinde verilmiştir.

#### **3.5.5. ABTS<sup>•+</sup> Radikali Giderme Aktivitesi**

ABTS<sup>•+</sup> radikali giderme aktivitesi Re ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre belirlendi (Re ve ark., 1999). ABTS<sup>•+</sup> oluşturulması, ABTS<sup>•+</sup>'nin potasyum persülfat (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) oksidasyonu ile direkt üretilir. Bu işlem için 2 mM'lık ABTS<sup>•+</sup> çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiliye 2,45 mM'lık potasyum persülfat çözeltisi eklenerek ABTS<sup>•+</sup> radikali elde edildi. Her bir numune için (mg/mL derişimde) 10, 20, 30 ve 40 µL dört farklı miktarda ve üçer tekrarlı olmak üzere örnekler hazırlandı. Hazırlanan örnekler, hacimleri 3 mL olacak şekilde olan fosfat tamponu (0,1 M'lık, pH = 7,4) eklendi. Daha sonra bütün örnekler ABTS<sup>•+</sup> çözeltisi (1 mL) ilave edildikten sonra 734 nm'de absorbansları ölçüldü. Sonuçlar IC<sub>50</sub> şeklinde verilmiştir.

### **3.6. Etkili Bileşiklerin Saflaştırılması İşlemlerinde Kullanılan Teknikler**

#### **3.6.1. Kolon kromatografisi**

Çalışmada; 20 g ekstreden (ekstre-IV) etkili bileşenlerin saflaştırılması için (2,5 x 80 cm) uzunluğunda cam kolon kullanıldı. Dolgu maddesi olarak 600 g silika jel kullanıldı. Mobil faz, hekzandan başlayarak % 10'luk artışlar şeklinde etil asetat ve metanol ile kademeli polarite artışı yapılarak 250 mL'lik hacimlerde toplamda 840 adet fraksiyon toplandı. Fraksiyonlar İTK ile kontrollü birleştirildi.

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

Kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlar İTK'ye tabi tutuldu. İTK için mobil faz belirlenirken, kolonda kullanılan mobil faz ile aynı polaritede çözücü kullanıldı. Saf olan fraksiyonların çözücüleri uzaklaştırıldıktan sonra NMR'ları alındı. Saf olmayan fraksiyonlar için  $R_f$  değerleri aynı olanlar, UV ışığında bakılarak birleştirildi. UV ışığında görünmeyen spotlar ise serik sülfat belirteci püskürtülerek hafif ısıtıldıktan sonra görünen renkler ve  $R_f$  değerlerine bakılarak benzer olan fraksiyonlar birleştirildi.

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

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

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

**Enjeksiyon hacmi:** 10  $\mu$ L

**Kolon sıcaklığı:** 35  $^{\circ}$ C

**Kolon:** ZORBAX SB-C18 4,6 x 100 mm, 3,5  $\mu$ m

### 3.6.4. Preperatif HPLC (P-HPLC)

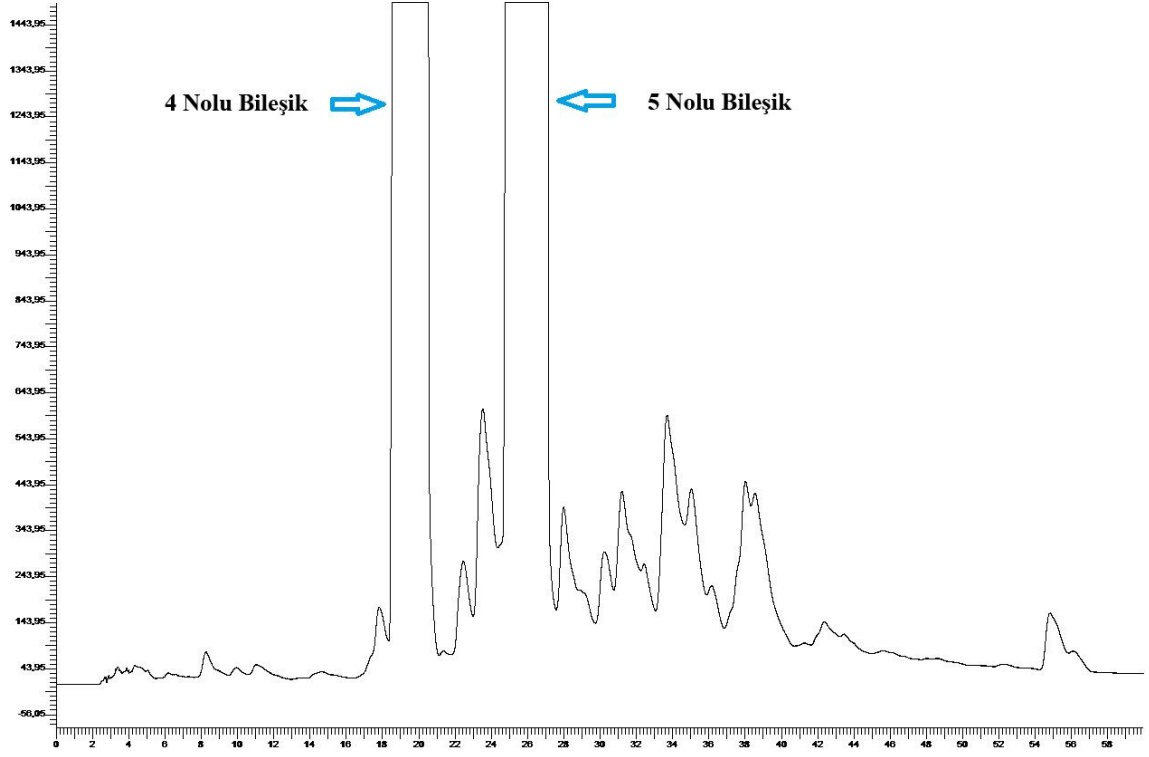
P-HPLC'nin Analitik HPLC'den temel farkı akış hızının, kolonun ve enjeksiyon yapılan madde miktarının yüksek olmasıdır. Tek bir enjeksiyon ile daha fazla madde ayrımını sağlar. Çalışmada kullanılan HPLC cihazı Perkin Elmer marka Series 200 model UV detektörlü bir cihazdır. Çalışma boyunca kolon fırını 35 °C'de sabit tutuldu. Enjeksiyonlar; hacmi 200 µL olan loop kullanılarak manüel olarak yapıldı. Ayırma işlemlerinin tamamında C18 ters faz dolgu maddesi içeren VYDAC marka (25 mm x 300 mm boyutlarda 10 µm partikül boyutlu) kolon kullanıldı.

### 3.6.5. Preperatif HPLC (P-HPLC) Uygulaması

Yaptığımız P-HPLC çalışmasında; Ekstre-IV'e uygulanan kolon kromatografisinde elde edilen fraksiyonlardan 327-355, 417-501, 570-584 ve 503-610 fraksiyon aralıkları madde miktarı bakımından yeterli olması nedeniyle bu fraksiyonlara P-HPLC uygulaması yapıldı. Belirlenen fraksiyon aralıklarına uygun metotlar oluşturulduktan sonra saflaştırma işlemleri yapıldı. P-HPLC uygulaması yapılan fraksiyon aralıklarının kromatogramları (Şekil 3.2, 3.3, 3.4 ve 3.5) ve P-HPLC de kullanılan mobil faz programları (Çizelge 3.1, 3.2, 3.3 ve 3.4) aşağıda verilmiştir.

Çizelge 3. 1. 327-355 fraksiyon aralığına uygulanan P-HPLC mobil faz programı

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

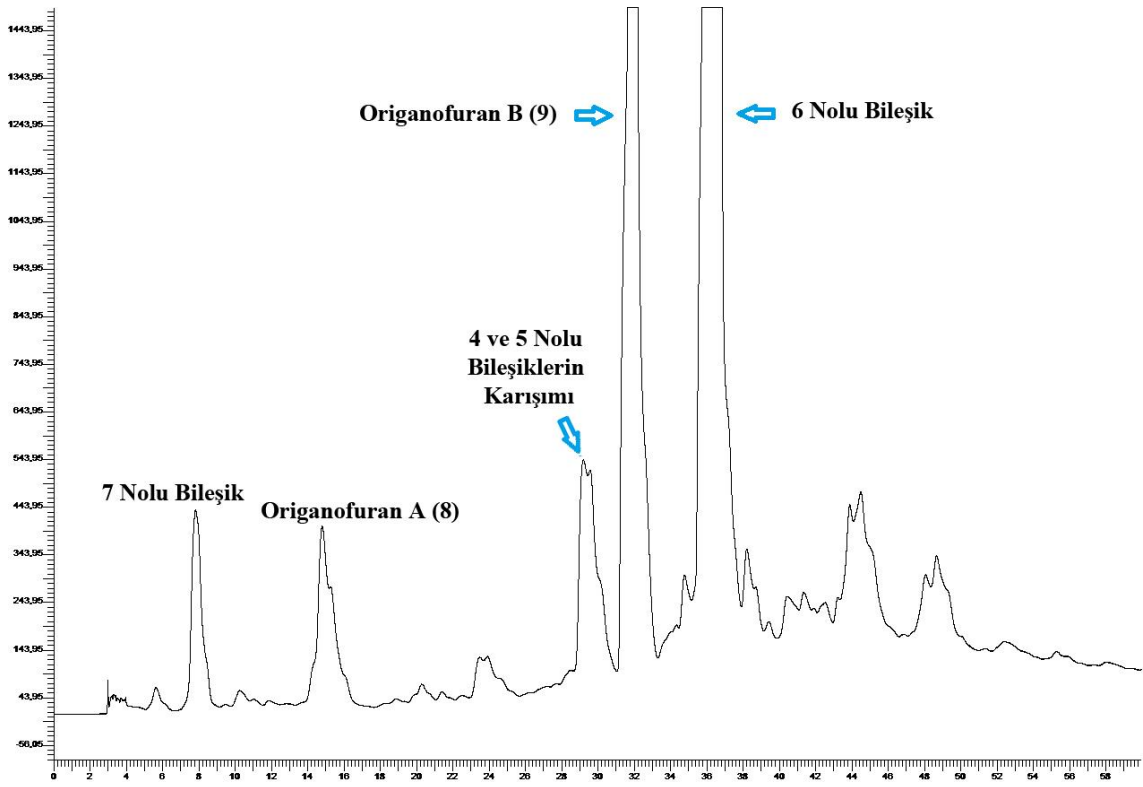


Şekil 3. 2. Ekstre-IV'ten elde edilen 327-355 fraksiyonlarının P-HPLC kromatogramı

Kolon kromatografisinde silika jel dolgu maddesi kullanılarak, Hekzan : EtOAc (2:8) çözücü sisteminde toplanan ve İTK kontrollü olarak birleştirilen 327-355'olu fraksiyonlarına P-HPLC uygulandı. Kromatogramda (Şekil 3.2) görüldüğü gibi 18-21, ve 24-27. dakika aralıklarında gelen büyük pikler farklı tüplere konularak evaporatörle çözücüleri uzaklaştırıldı. NMR'ları alınarak maddelerin 18-21. dakikalar arası Luteolin-7-O- $\beta$ -glikozit (4) ve 24-27. dakikalar arası Luteolin-7-O- $\beta$ -ksilozit (5) olduğu belirlendi.

Çizelge 3. 2. 417-501 fraksiyon aralığı P-HPLC mobil faz programı

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

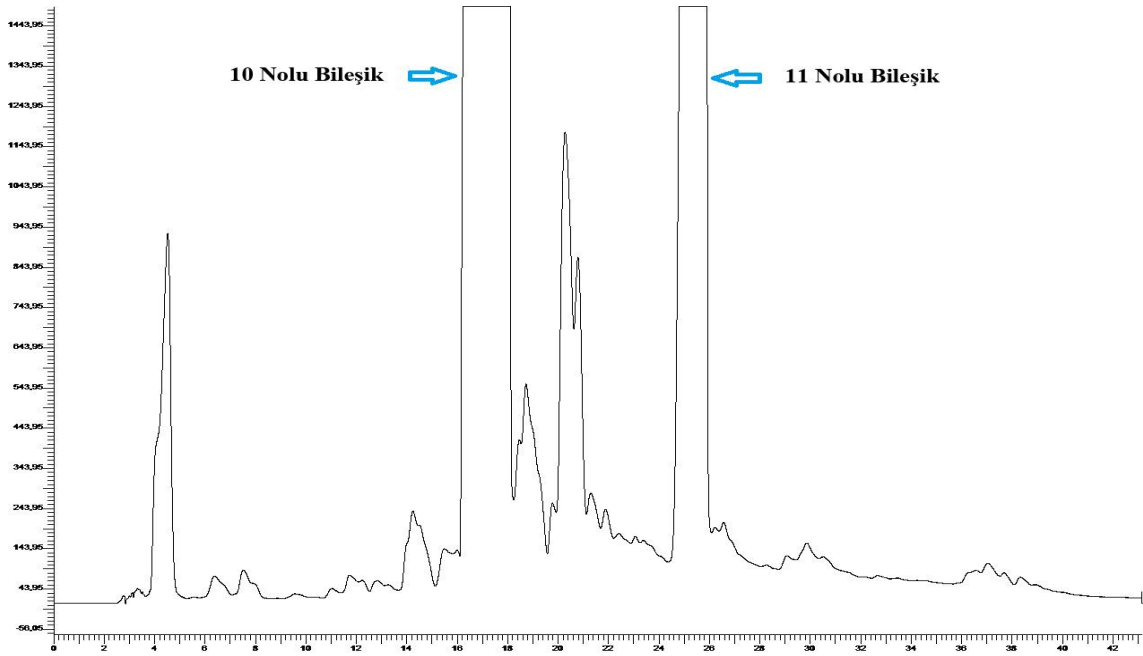


Şekil 3. 3. Ekstre-IV'ten elde edilen 417-501 fraksiyonlarının HPLC kromatogramı

Ekstre-IV kolon kromatografisi ile silikajel dolgu maddesi kullanılarak, MeOH:EtOAc (1:9) çözücü sistemlerinde toplanan ve İTK kontrollü olarak birleştirilen 417-501 nolu fraksiyonları için P-HPLC uygulaması yapıldı. Kromatogramda (Şekil 3.3) belirtilen 7-9. dakikalar arası Bifenil-3,3',4,4'-tetraol (7), 13-16. dakikalar arası **Origanofuran A (8)**, 27-31. dakikalar arası (4 ve 5 nolu bileşiklerin karışımı), 31-33. dakikalar arası **Origanofuran B (9)** ve son olarak 35-38. dakikalar arası ise Rozmarinik asit (6) nolu bileşikler olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 3. 3. 570-584 fraksiyon aralığı P-HPLC mobil faz programı

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

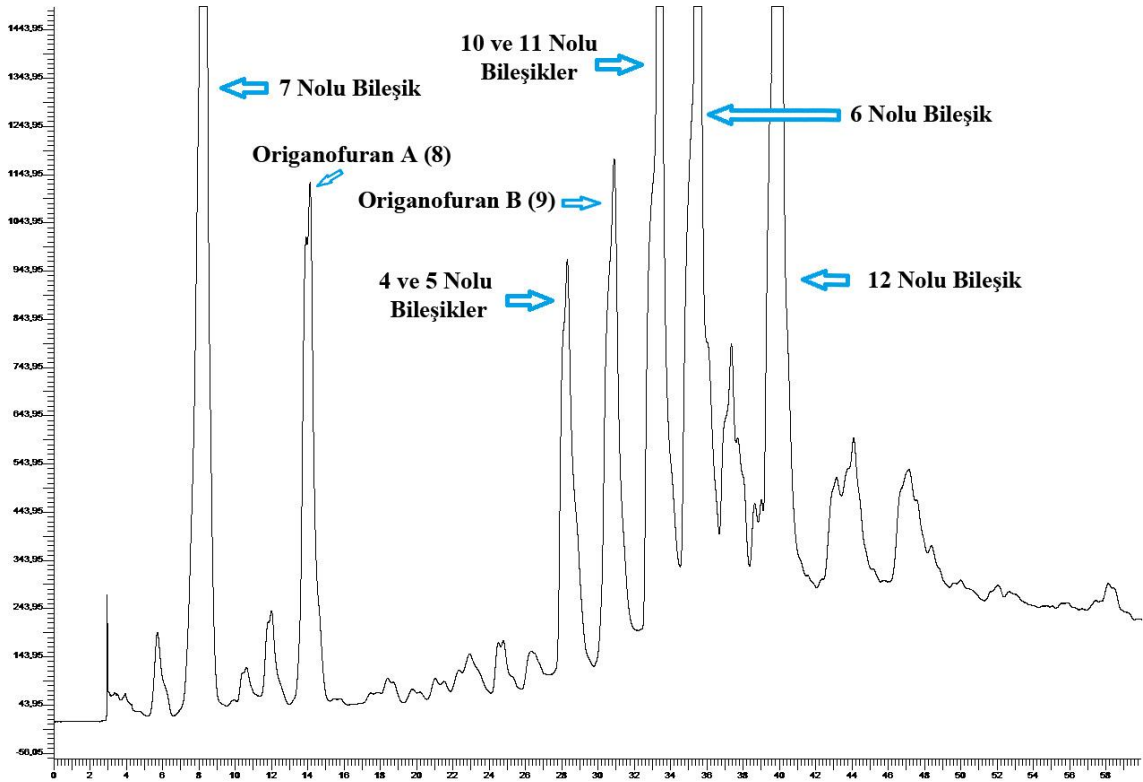


Şekil 3. 4. Ekstre-IV'ten elde edilen 570-584 fraksiyonlarının HPLC kromatogramı

Ekstre-IV kolon kromatografisi ile silikajel dolgu maddesi kullanılarak, MeOH : EtOAc (2:8) çözücü sisteminde 570-584 fraksiyon aralığında oluşan sarı renkli çökeleğin NMR'ı alındı. NMR yorumlandı ve iki maddenin karışımı olduğu belirlendi. Daha sonra 570-584 fraksiyon aralığı için preparatif HPLC uygulaması yapıldı. Kromatogramda (Şekil 3.4) görüldüğü gibi 16-18 ve 24-26. dakikalar arası gelen büyük pikler farklı tüplere konularak evaporatörle çözümleri uzaklaştırıldı ve tekrar NMR ları alınarak maddelerin 16-18. dakikalar arası Apigenin-7-O- $\beta$ -glukoronid (10) ve 24-26. dakikalar arası Acacetin-7-O- $\beta$ -glukoronid (11) olduğu belirlendi.

Çizelge 3. 4. 503-610 fraksiyon aralığı P-HPLC mobil faz programı

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



Şekil 3. 5. Ekstre-IV'ten elde edilen 503-610 fraksiyonlarının HPLC kromatogramı

Ekstre-IV kolon kromatografisi ile silikajel dolgu maddesi kullanılarak, MeOH: EtOAc (2:8) çözücü sisteminde toplanan ve İTK kontrollü olarak birleştirilen 503-610 nolu fraksiyonları için P-HPLC uygulaması yapıldı. Kromatogramda (Şekil 3.5) belirtilen 7-9. dakikalar arası Bifenil-3,3',4,4'-tetraol (7), 13-15. dakikalar arası **Origanofuran A (8)**, 27-30. dakikalar arası (4 ve 5 nolu bileşiklerin karışımı), 31-33. dakikalar arası **Origanofuran B (9)** 33-35. dakikalar arası (10-11 nolu bileşiklerin karışımı), 35-37 dakikalar arası Rozmarinik asit (6) ve son olarak da 41-43. dakikalar arası Litospermik asit B(12) nolu bileşikler olduğu belirlenmiştir.

## 3.7. Yapı Tayininde Kullanılan Spektroskopik Teknikler

### 3.7.1. NMR Spektroskopisi

#### 3.7.1.1. 1D NMR Teknikleri

**<sup>1</sup>H-NMR:** Moleküldeki kaç değişik protonun bulunduğu, farklı protonların göreceli sayıları, protonların elektronik çevreleri ve bir protonun komşusundaki protonlarla etkileşmeleri gibi bilgiler net bir şekilde elde edilebilir.

**<sup>13</sup>C-NMR:** Molekülde bulunan farklı karbonların sayısı belirlenir. Karbon sinyallerinin kimyasal kayma değerlerinden her bir karbon atomunun elektronik çevresi hakkında bilgi edinilebilir.

**DEPT-90:** <sup>13</sup>C-DEPT90 NMR spektrumunda sadece –CH tipi karbonlar spektrumda pozitif olarak gözlenirken –CH<sub>2</sub>, –CH<sub>3</sub> ve –C tipi karbonlar gözlenmez.

**DEPT-135:** <sup>13</sup>C-DEPT90 NMR spektrumunda sadece –CH ve –CH<sub>3</sub> tipi karbon atomları pozitif pik verirken –CH<sub>2</sub> tipi karbonlar ise negatif olarak pik verir. Kuarterner karbonlar ise bu spektrumlarda gözlenmez.

**APT:** <sup>13</sup>C-APT NMR spektrumunda bütün karbonların gözlenir. -C ve –CH<sub>2</sub> tipi karbonlar spektrumda pozitif olarak gözlenirken, -CH ve CH<sub>3</sub> tipi karbonlar negatif olarak gözlenir. Sonuç olarak bu tür NMR teknikleri kullanılmasıyla doğal kaynaklı moleküllerin yapılarının karmaşıklıklarına rağmen aydınlatılmasını kolaylaştırır.

#### 3.7.1.2. 2D-NMR Teknikleri

##### 3.7.1.2.1. COSY (Correlation Spectroscopy)

2D-NMR tekniklerinden olan COSY; spin-spin etkileşimlerini belirleyerek moleküldeki bağlanmaları tayin etmeye yarar. COSY’de üç bağı kadar etkileşmeler görülebilir (proton-protonun bağlı olduğu karbon- bu karbona komşu karbon ve komşuya bağlı proton arasındaki etkileşmeler). COSY spektrumlarında her iki eksen de proton

spektrumu yer alır ve moleküldeki protonların hangi protonlarla etkileştiği açıkça görülür.

#### 3.7.1.2.2. HETCOR (Heteronuclear Correlation)

Yalnız karbon atomuna doğrudan bağlı olan protonlar arasındaki etkileşmeyi ortaya koyan bu teknik, moleküldeki protonların hangi karbon atomuna bağlı olduklarını kesin olarak belirlemeye yarar. HETCOR spektrumlarından; proton karbon eşleşmesi yok ise bu karbona bağlı proton yoktur, karbon atomu iki çapraz pik vermişse karbon atomuna iki farklı proton bağlıdır, karbon atomu tek çapraz pik vermişse -karbona bağlı proton sayısı birdir ya da bağlı olan protonlar özdeştir yorumları yapılabilir.

#### 3.7.1.2.3. HMBC (Heteronuclear Multi Bond Correlation)

HETCOR spektrumlarında sadece karbona bağlı protonların korelasyonu verilirken HMBC spektrumlarında bir bağ üzerinden olan korelasyonların elimine edilirken iki ve üç bağ bazen de dört bağ üzerinden korelasyonlar gözlenir. İki ve üç bağ üzerinden etkileşmelerin verildiği spektrumlar; yapının daha kolay anlaşılmasını sağlamaktadır. HMBC spektrumları genelde yapıları çok kompleks olan doğal kaynaklı moleküllerin C-C bağlantılarının belirlenmesinde çok sık kullanılmaktadır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Elde Edilen Ekstrelerin % Verimlerinin Hesaplanması

Çalışmada ekstraksiyon verimini hesaplamak için bütün ekstrelerin % verim hesabı yapıldı. Her bir ekstre için ekstraksiyon verimi, % verim = (W1\*100) / W2 formülü ile hesaplandı. Formüldeki W1: kuru ekstraktın ağırlığı, W2: ekstraksiyonda kullanılan kuru bitkisel materyalin ağırlığıdır.

**Ekstre-I için;** % Verim = ( 46 \*100 ) / 1500 = 3,07 olarak hesaplandı.

**Ekstre-II için;** % Verim = ( 78 \*100 ) / 1500 = 5,2 olarak hesaplandı.

**Ekstre-III için;** % Verim = ( 114 \*100 ) / 1500 = 7,6 olarak hesaplandı.

**Ekstre-IV için;** % Verim = ( 20 \*100 ) / 1500 = 1,33 olarak hesaplandı.

Elde edilen dört farklı ekstrelerden ayrı ayrı 1 mg/mL' lik stok çözeltiler hazırlanarak total fenolik bileşik tayini testi ve DPPH<sup>•</sup>-giderme aktivitesi, FRAP, ABTS<sup>•+</sup> giderme aktivitesi ve metal şelat oluşturma testleri yapıldı (Çizelge 4.1).

### 4.2. Ham Ekstrelere Uygulanan Antioksidan Aktive Testlerinin Sonuçları

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

Numune	Toplam Fenolik (g GAE /Kg ekstrakt)	DPPH <sup>•</sup> Radikal Giderme [IC <sub>50</sub> (µg/mL)]	FRAP (mmol TE/kg ekstre)	ABTS <sup>•+</sup> Radikal Giderme [IC <sub>50</sub> (µg/mL)]	Metal Şelatlama Aktivitesi [IC <sub>50</sub> (µg/mL)]
<b>Ekstre-I</b>	106,1 ± 4,91	118,48 ± 7,54	1,68 ± 0,02	10,9 ± 1,40	185,20 ± 1,72
<b>Ekstre-II</b>	135,23 ± 2,47	28,15 ± 0,45	2,23 ± 0,10	5,02 ± 0,20	133,57 ± 4,87
<b>Ekstre-III</b>	146,37 ± 6,88	14,33 ± 0,73	3,20 ± 0,10	5,80 ± 0,12	86,09 ± 3,92
<b>Ekstre-IV</b>	<b>362,15 ± 1,51</b>	<b>3,53 ± 1,15</b>	<b>6,15 ± 0,64</b>	<b>1,60 ± 0,08</b>	<b>130,91 ± 1,23</b>
<b>BHT</b>	Test edilmedi	6,34 ± 0,83	5,86 ± 0,47	3,10 ± 0,04	Test edilmedi
<b>BHA</b>	Test edilmedi	45,7 ± 0,82	5,38 ± 0,27	3,04 ± 0,01	Test edilmedi
<b>Trolox</b>	Test edilmedi	1,38 ± 0,53	Test edilmedi	4,67 ± 0,17	Test edilmedi
<b>EDTA</b>	Test edilmedi	Test edilmedi	Test edilmedi	Test edilmedi	6,33 ± 0,69

Çizelge 4.1 incelendiğinde fenolik içerik bakımından zengin olan ekstrenin (ekstre-IV), bünyesinde 362,15 g gallik asite eşdeğer fenolik madde içerdiği, DPPH<sup>•</sup> radikal giderme (IC<sub>50</sub>= 3,63 µg/mL), indirgeme gücü (6,15 TE mmol/kg ekstre) ve ABTS<sup>•+</sup> radikal giderme (IC<sub>50</sub>= 1,60 µg/mL) değerleriyle de diğer ekstrele oranla daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlendi. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, aktiviteden sorumlu olan biyoaktif bileşenlerin saflaştırılması ve karakterizasyonu için kromatografik ve spektroskopik yöntemler uygulandı.

### **4.3. Fitokimyasal Çalışmalar**

#### **4.3.1. İzolasyon İşlemi**

Bitkiden aktif bileşenlerin ayrılması ve saflaştırılmasında 5 x 120 cm uzunluğunda cam kolon kullanıldı. Sabit faz olarak 120 g silika jel kullanıldı. Kolonun şartlanması basamağında ise; kolondan 1 L hekzan normal akış ile (basınçsız ve vakumsuz) geçirildi. Daha sonra 20 g ekstre (Ekstre-IV) az miktar çözücü ile çözüp 40 g silika jel ile homojenize hale gelene kadar karıştırıldı ve kolona tatbik edildi. Fraksiyonlar 250 mL hacimlerinde toplandı ve evaporasyonla çözücüsü uzaklaştırılan fraksiyonlar etiketlenmiş flakonlara uygun çözücü ile çözülerek aktarıldı. Toplanan çözücüler aynı polaritenin kullanıldığı basamaklarda tekrar kolonda kullanıldı. Kolon kromatografisinde hekzandan başlayarak etil asetat ve metanol ile kademeli bir şekilde polariteleri arttırılarak toplamda 839 adet fraksiyon toplandı. Fraksiyonlar İTK ile kontrol edilerek birleştirildi. Kolon çözücü sistemi, birleştirilen fraksiyon aralıkları ve izole edilen bileşikler aşağıdaki çizelgede (Çizelge 4.2) belirtilmiştir.

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

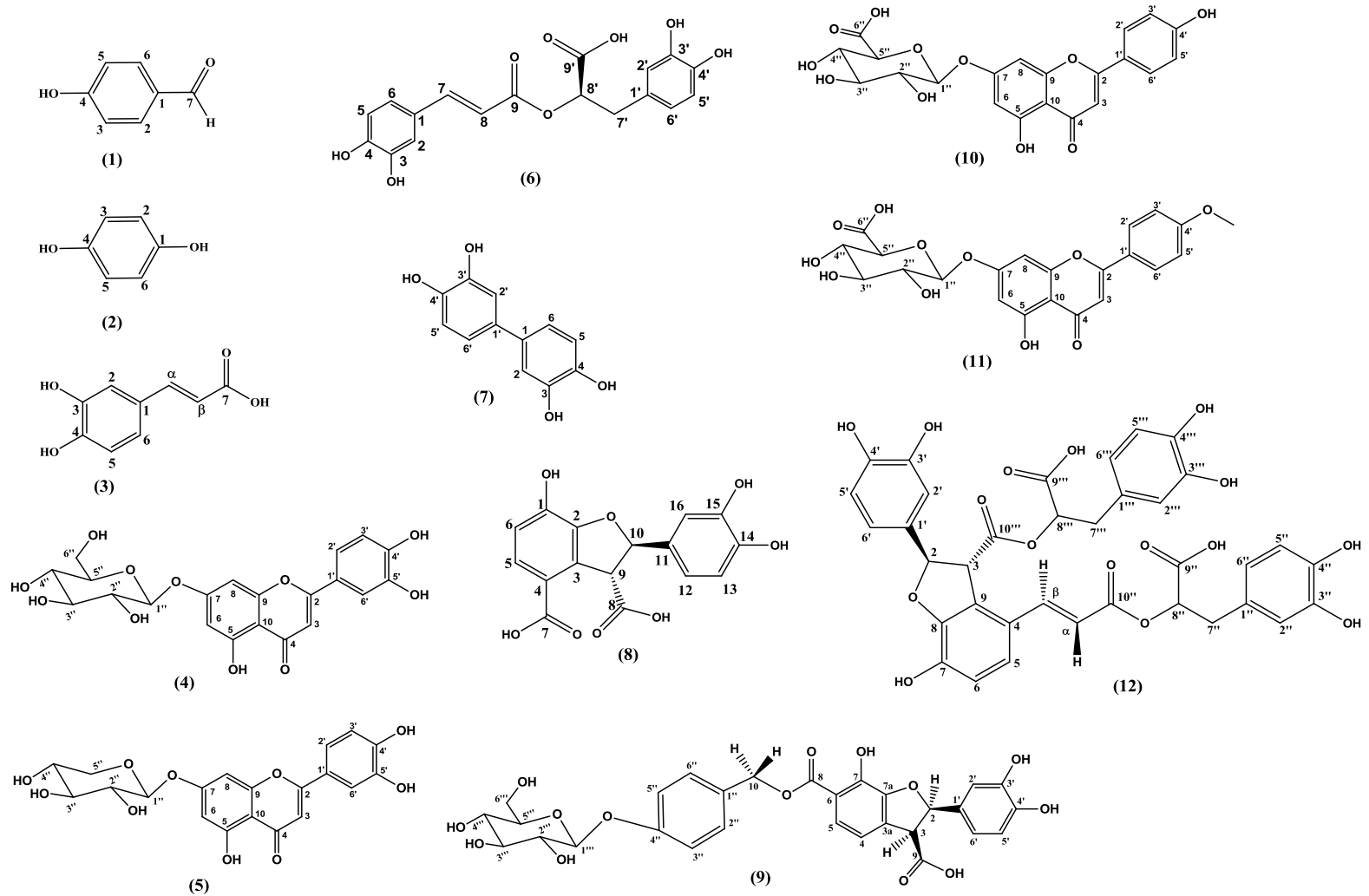
Çözücü Sistemi	Fraksiyon Aralıkları	Bileşenler
% 10 EtOAc / % 90Hekzan	0-14	Karışım
% 20 EtOAc / %80 Hekzan	15-77	<i>p</i> -hidroksibenzaldehit + Hidrokinon
% 30 EtOAc / %70 Hekzan	78-126	Karışım
% 40 EtOAc / %60 Hekzan	127-148	Kafeik asit
% 50 EtOAc / %50 Hekzan	149-219	
% 60 EtOAc / %40 Hekzan	220-275	Karışım
% 80 EtOAc / %20 Hekzan	276-355	Luteolin-7-O- $\beta$ -glikozit** + Luteolin-7-O- $\beta$ -ksilozit**
% 90 EtOAc / %10 Hekzan	356-401	
% 100 EtOAc	402-468	Bifenil-3,3',4,4'-tetraol** + Rozmarinik asit* + Origanofuran A** + Origanofuran B**
% 10 MeOH / % 90 EtOAc	469-529	
% 20 MeOH / % 80 EtOAc	530-664	Apigenin-7-O-glukoroneit** + Acacetin-7-O-glukoroneit** + Litospermik asit B**
% 30 MeOH / % 70 EtOAc	665-771	Karışım
% 40 MeOH / % 60 EtOAc	772-801	
% 50 MeOH / % 50 EtOAc	802-839son	

\* Hem silikajel kolon uygulamasından hem de P-HPLC uygulamasından saflaştırılan.

\*\* P-HPLC uygulaması ile saflaştırılan.

Çizelge 4. 3. İzole Edilen Bileşiklerin Yaygın İsimleri ve IUPAC İsimleri

Bileşiklerin Yaygın İsimleri		Bileşiklerin IUPAC İsimleri
1	<i>p</i> -Hidroksibenzaldehit	4-Hydroxybenzaldehyde
2	Hidrokinon	Benzene-1,4-diol
3	Kafeik asit	3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid
4	Luteolin-7-O-β-glikozit	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-7-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxochromen-4-one
5	Luteolin-7-O-β-ksilozit	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-7-[(3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl)oxy]-4H-chromen-4-one
6	Rosmarinik asit	(2" <i>R</i> ")-2-[[2" <i>E</i> "]-3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]oxy]-3-(3,4-dihydroxyphenyl)propanoic acid
7	Bifenil-3,3',4,4'-tetraol	biphenyl-3,3',4,4'-tetraol
8	Origanofuran A	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> )-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-hydroxy-2,3-dihydrobenzofuran-3,4-dicarboxylic acid
9	Origanofuran B	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-hydroxy-6-((4-((2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)benzyloxy)carbonyl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-carboxylic acid
10	Apigenin-7-O-β-glukoronid	(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i> )-3,4,5-trihydroxy-6-[5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-oxochromen-7-yl]oxyoxane-2-carboxylic acid
11	Acacetin-7-O-β-glukoronid	(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i> )-3,4,5-trihydroxy-6-(5-hydroxy-2-(4-methoxyphenyl)-4-oxo-4H-chromen-7-yloxy)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid
12	Litospermik asit-B	2-((2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> )-4-(( <i>E</i> )-3-(1-carboxy-2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethoxy)-3-oxoprop-1-enyl)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-hydroxy-2,3-dihydrobenzofuran-3-carbonyloxy)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)propanoic acid

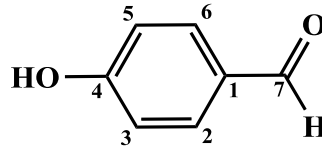


Şekil 4. 1. *Origanum onites* L. bitkisinden izole edilen bileşikler

### 4.3.2. *Origanum onites* L. Bitkisinden İzle Edilen Bileşikler

*Origanum onites* L. bitkisinden elde edilen Ekstre-IV'e uygulanan kromatografik teknikler sonunda ikisi yeni (**8 ve 9**) olmak üzere toplamda on iki adet (**1-7, 10-12**) izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır (Şekil 4.1).

#### 4.3.2.1. *p*-Hidroksibenzaldehit'in (1) Fiziksel ve Spektral Özellikleri

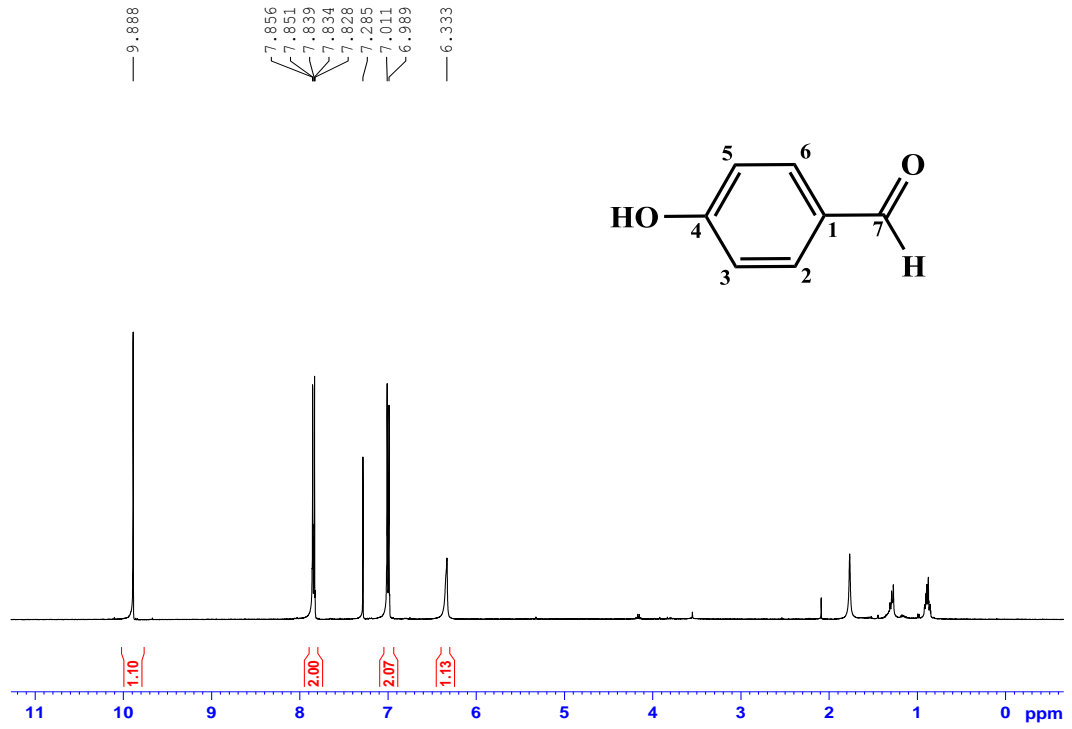


Şekil 4. 2. *p*-Hidroksibenzaldehit (1)

*p*-Hidroksibenzaldehit (1) bileşiği (Şekil 4.2), kolon kromatografisinde % 20 Etil asetat - %80 Hekzan çözücü sisteminden 10 mg olarak izole edildi. Beyaz renkli *p*-Hidroksibenzaldehit çökeleğinin kapalı formülü  $C_7H_6O_2$  olup molekül ağırlığı 122,04 g/mol'dür. *p*-Hidroksibenzaldehit molekülü bilinen bir bileşik olup elde edilen  $^1H$ -NMR ve  $^{13}C$ -NMR kimyasal kayma değerleri (Çizelge 4.4) literatür (Bao ve ark., 2009) ile uyum içindedir.

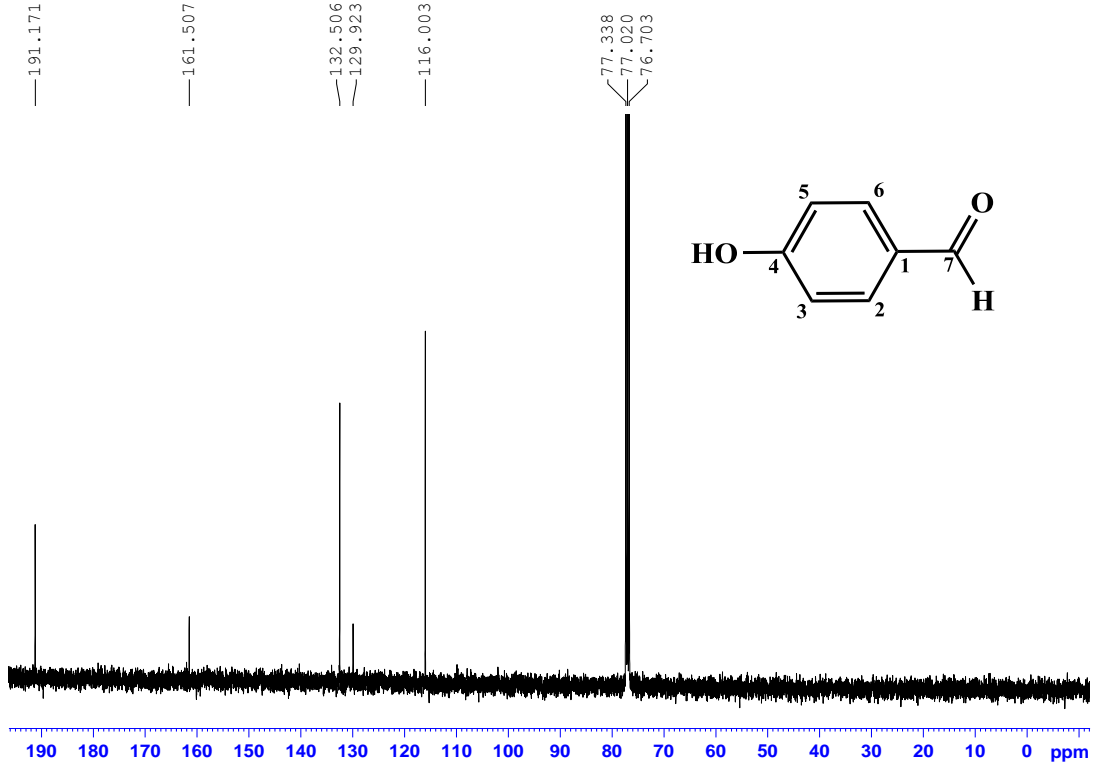
Çizelge 4. 4. *p*-Hidroksibenzaldehit'in (1)  $^1H$ -NMR ve  $^{13}C$ -NMR kimyasal kayma değerleri

Pozisyon	<i>p</i> -Hidroksibenzaldehit (1)	
	$\delta_H$	$\delta_C$
<b>1</b>	-	129,93
<b>2</b>	7,00 (d, $J = 8,64$ Hz)	116,00
<b>3</b>	7,85 (d, $J = 8,64$ Hz)	132,50
<b>4</b>	-	161,50
<b>5</b>	7,85 (d, $J = 8,64$ Hz)	132,50
<b>6</b>	7,00 (d, $J = 8,64$ Hz)	116,00
<b>7</b>	-	191,17



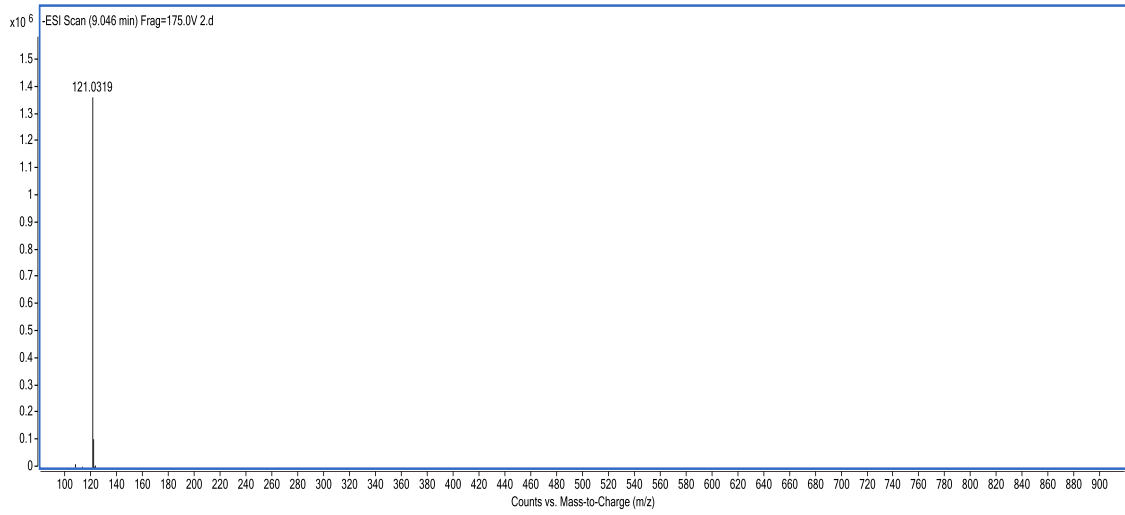
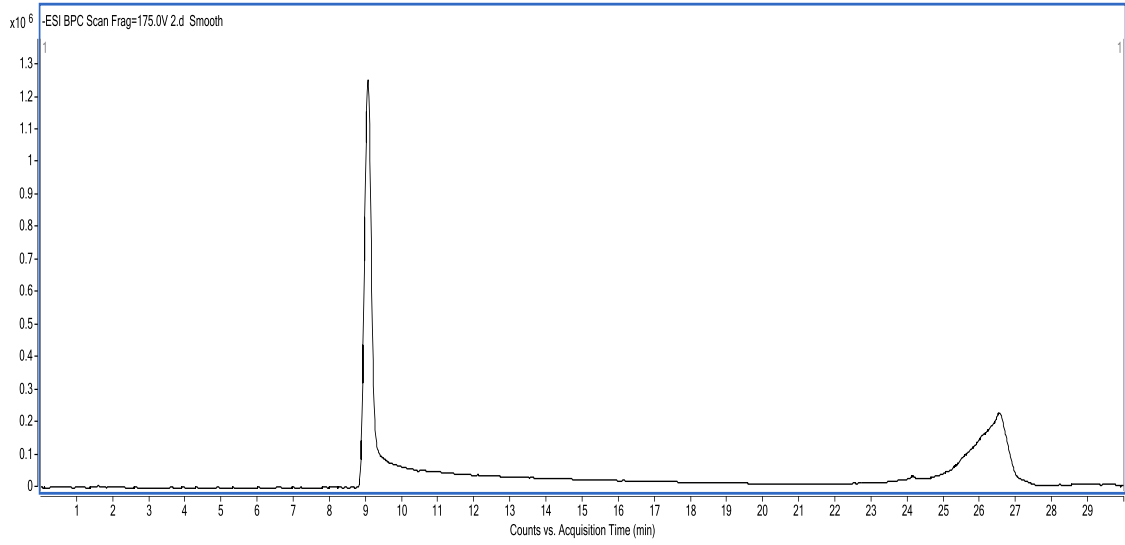
Şekil 4. 3. *p*-Hidroksibenzaldehit'in (1) <sup>1</sup>H-NMR spektrumu (<sup>1</sup>H-NMR 400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)

*p*-Hidroksibenzaldehit'in (1) <sup>1</sup>H-NMR spektrumundan (Şekil 4.3), bileşiğin bir aromatik halka içerdiği tespit edilmiştir. <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda aromatik halkasına ait proton rezonansları, H-3 ve H-7 protonları  $\delta_H = 7,00$  ppm'de (d,  $J = 8,64$  Hz) dublet şeklinde, H-4, H-6 protonu  $\delta_H = 7,85$  ppm'de (d  $J = 8,64$  Hz) dublet şeklinde rezonans olmuştur.



Şekil 4. 4. *p*-Hidroksibenzaldehit'in (1)  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu ( $^{13}\text{C}$ -NMR 100 MHz DMSO- $\text{d}_6$ )

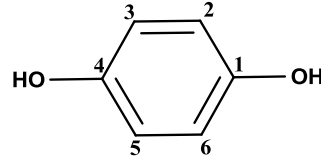
*p*-Hidroksibenzaldehit'in (1)  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu (Şekil 4.4) incelendiğinde, 7 tane karbon olduğu görülmektedir. 7 karbondan  $\delta_{\text{C}} = 129,9$  ve  $\delta_{\text{C}} = 161,5$  ppm' de ve  $\delta_{\text{C}} = 191,2$  ppm olmak üzere 3 tanesi kuarterner karbonu, 4 tanesi metin karbonu (C-2, C-6 ve C-3, C-5 karbonları simetrik olduklarında aynı yerde rezonans olmuştur)'dur. Bu verilere göre bileşiğin kapalı formülü  $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$  olarak belirlenmiştir.



Şekil 4. 5. *p*-Hidroksibenzaldehit'in (1) LC-TOF-MS kromatogramı

*p*-Hidroksibenzaldehit'in (1)  $C_7H_6O_2$  kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pikini  $[M-H]^-$  LC-TOF-MS kütle spektrumunda (Şekil 4.5)  $m/z$  121,0319 g/mol olarak belirlenmiştir.

#### 4.3.2.2. Hidrokinon (2) Bileşiminin Fiziksel ve Spektrel Özellikleri

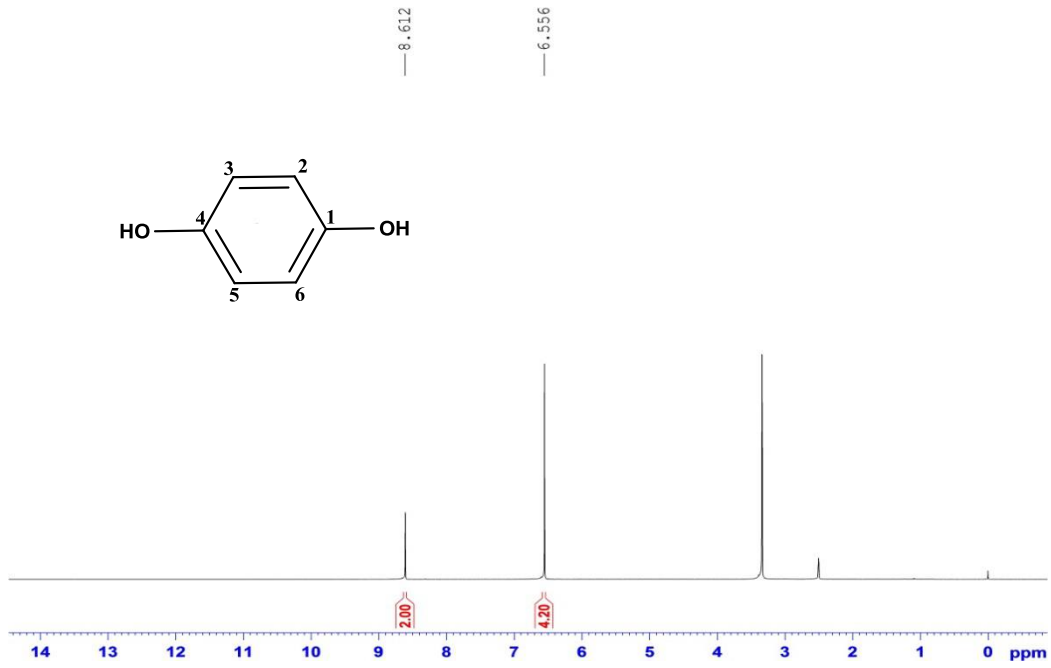


Şekil 4. 6. Hidrokinon (2)

Hidrokinon (2) bileşiği (Şekil 4.6) kolon kromatografisi ile silikajel dolgu maddesi kullanılarak ile EtOAc: hekzan (2:8) çözücü sisteminde 15-77 nolu fraksiyonlardan İTK kontrollü birleştirildi ve P-HPLC uygulaması yapılarak izole edildi (18 mg). Beyaz renkli katı haldeki Hidrokinon'un (2) kapalı formülü  $C_6H_6O_2$  olup molekül ağırlığı 110,0368 g/mol'dür. Hidrokinon bilinen bir bileşik olup elde edilen  $^1H$ -NMR ve  $^{13}C$ -NMR kimyasal kayma değerleri (Çizelge 4.5) literatür değerleri (Hajdok ve ark., 2012) ile uyum içindedir.

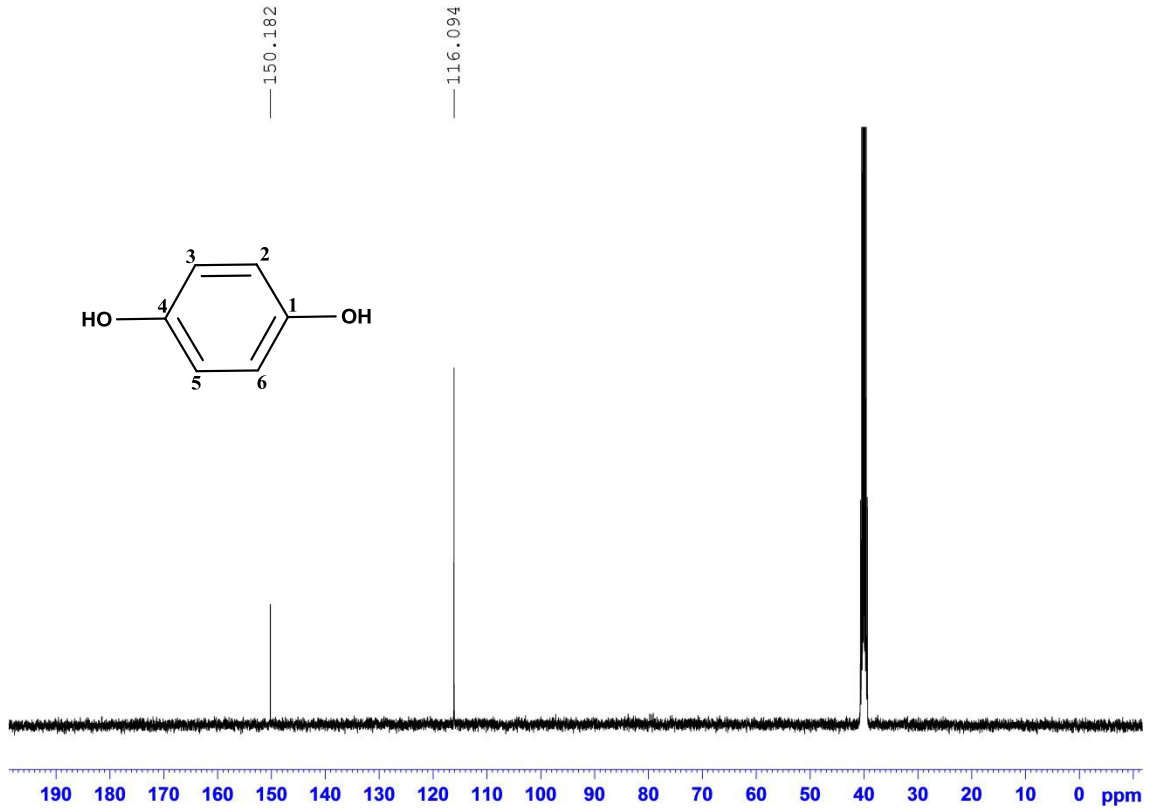
Çizelge 4. 5. Hidrokinon'un (2)  $^1H$ -NMR ve  $^{13}C$ -NMR kimyasal kayma değerleri

Pozisyon	Hidrokinon (2)	
	$\delta_C$	$\delta_H$
C <sub>1</sub> -H	150,2	-
C <sub>2</sub> -H	116,0	6,55 s
C <sub>3</sub> -H	116,0	6,55 s
C <sub>4</sub> -H	150,21	-
C <sub>5</sub> -H	116,0	6,55 s
C <sub>6</sub> -H	116,0	6,55 s



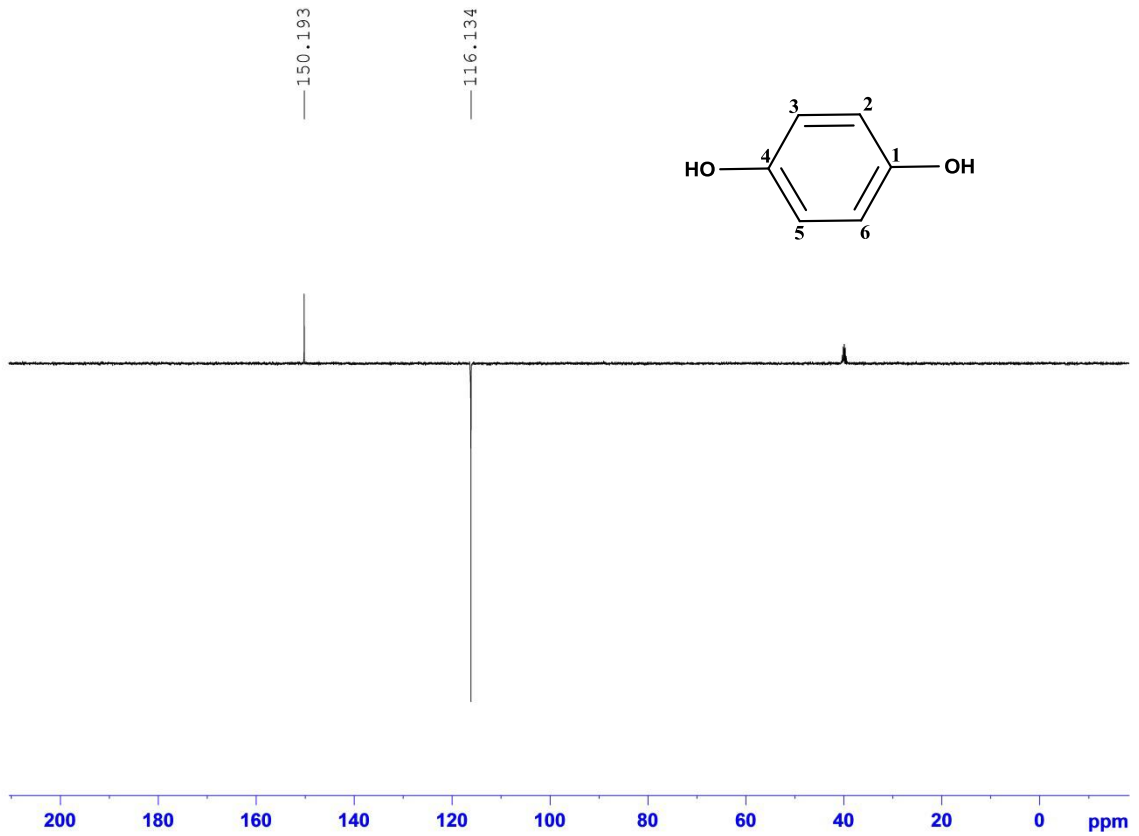
Şekil 4. 7. Hidrokinon'un (2)  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu ( $^1\text{H-NMR}400\text{ MHz DMSO-d}_6$ )

Hidrokinon bileşiğinin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumundan (Şekil 4.7) yapısında bir fenol iskeleti bulunduğu tespit edilmiştir. Bileşiğin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumunda, H-2, H-3, H-5, H-6 protonları simetrik olarak  $\delta_{\text{H}} = 6,55\text{ ppm}$ ' de singlet şeklinde gözlenmiştir. Benzen halkasına bağlı -OH grupları ise simetrik şekilde  $\delta_{\text{H}} = 8,61\text{ ppm}$ 'de rezonans olmaktadır.



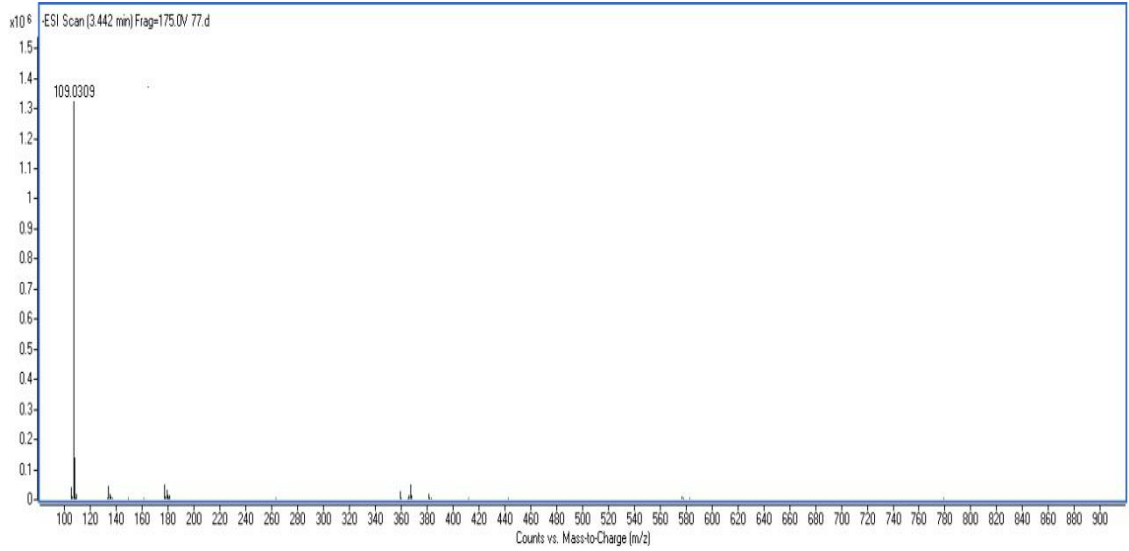
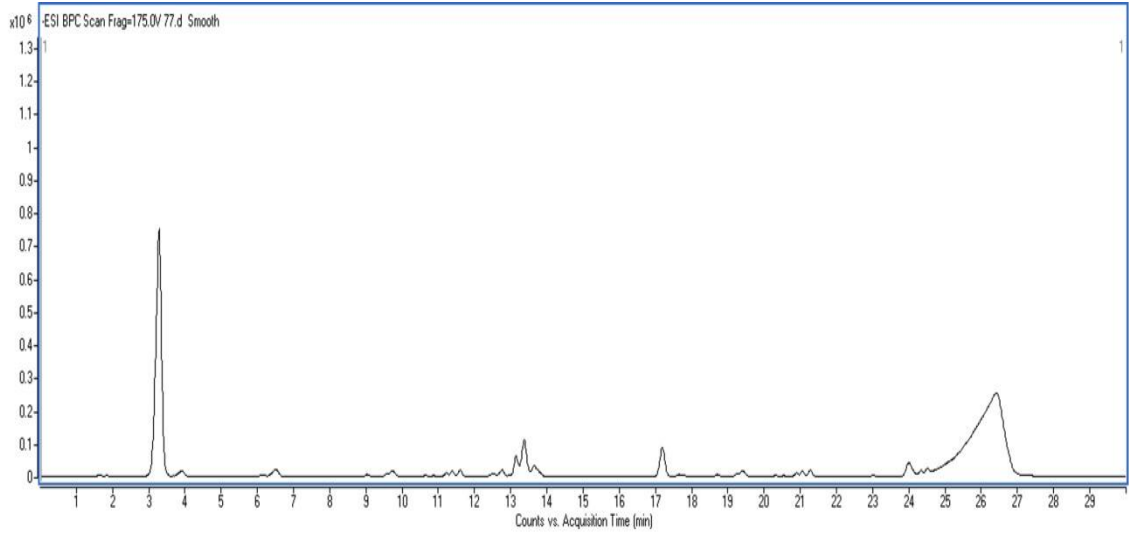
Şekil 4. 8. Hidrokinon'un (2)  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu ( $^{13}\text{C}$ -NMR100 MHz  $\text{DMSO-d}_6$ )

Hidrokinon (2) bileşiğinin  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu (Şekil 4.8) incelendiğinde yapıda 6 tane karbon olduğu görülmektedir. 6 Karbondan 2 tanesi kuartner karbonu, 4 tanesi metin karbonu bulunması bileşiğin kaba formülünün ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$ ) olduğunu göstermektedir. Bileşiğin OH grubuna bağlı karbonlar (C-1ve C-4) simetrik şekilde  $\delta_{\text{C}} = 150.2$  ppm ve metin karbonları ise (C-2, C-3, C-5, ve C-6)  $\delta_{\text{C}} = 116.10$  ppm' de simetrik şekilde rezonans olmuştur.



Şekil 4. 9. Hidrokinon (2) bileşiğinin APT spektrumu (<sup>13</sup>C-NMR100 MHz DMSO-d<sub>6</sub>)

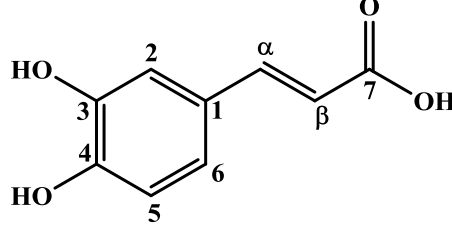
Hidrokinon (2) bileşiğinin APT spektrumunda (Şekil 4.9) 2 adet kuarterner karbonu (C-1 ve C-4) simetrik ve pozitif olarak gözlenirken, 4 adet metin (-CH) karbonları (C-2, C-3, C-5 ve C-6) simetrik ve negatif olarak gözlenmiştir. Bileşiğe ait metil (-CH<sub>3</sub>) karbonuna rastlanmamıştır.



Şekil 4. 10. Hidrokinon (2) bileşiğın LC-TOF-MS Kromatogramı

Hidrokinon (2) bileşiğının  $C_6H_6O_2$  kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pikini  $[M-H]^-$  LC-TOF-MS kütle spektrumunda (Şekil 4.10) (-)-ESI MS:  $m/z$  109,0309 g/mol olarak belirlenmiştir.

#### 4.3.2.3. Kafeik asit'in (3) Fiziksel ve Spektral Özellikleri

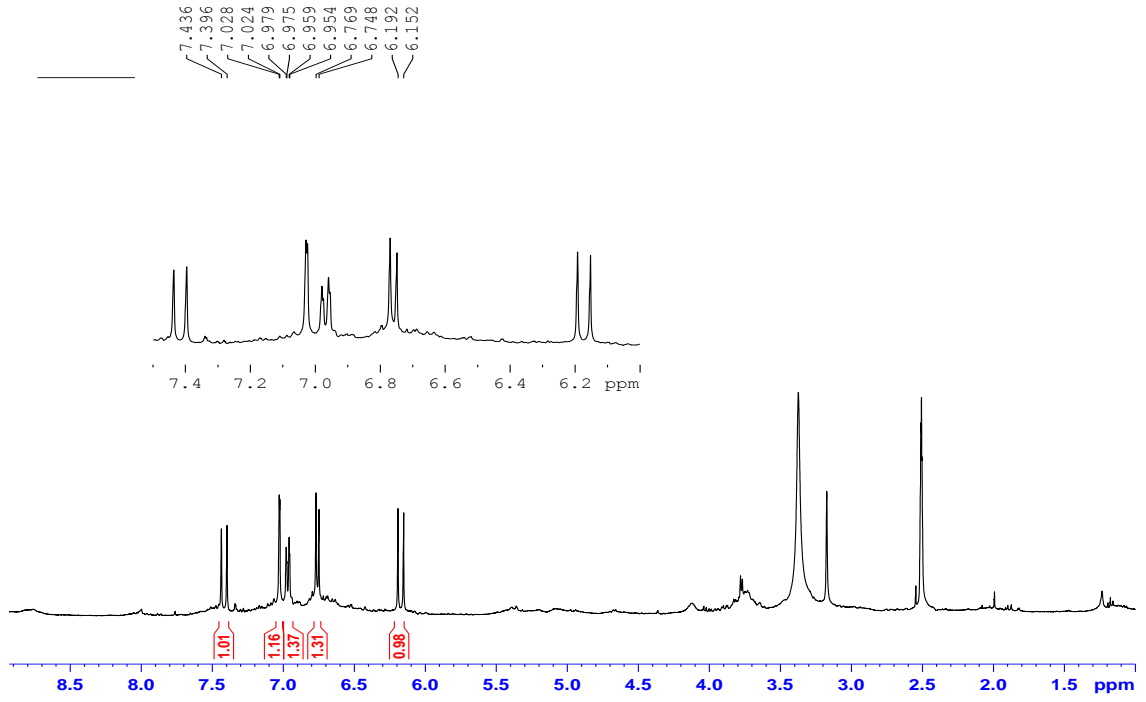


Şekil 4. 11. Kafeik asit (3)

Kafeik asit (3) ( Şekil 4.11) kolon kromatografisinde 127-219 nolu fraksiyonlarından izole edildi (36 mg). Fiziksel görünümü gri renkli amorf toz şeklinde olan kafeik asit'in (3) kapalı formülü C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub> olup molekül ağırlığı 180,0423 g/mol'dür. molekülü bilinen bir bileşik olup elde edilen <sup>1</sup>H-NMR ve <sup>13</sup>C-NMR kimyasal kayma değerleri (Çizelge 4.6) literatür (Durust ve ark., 2001) ile uyum içindedir.

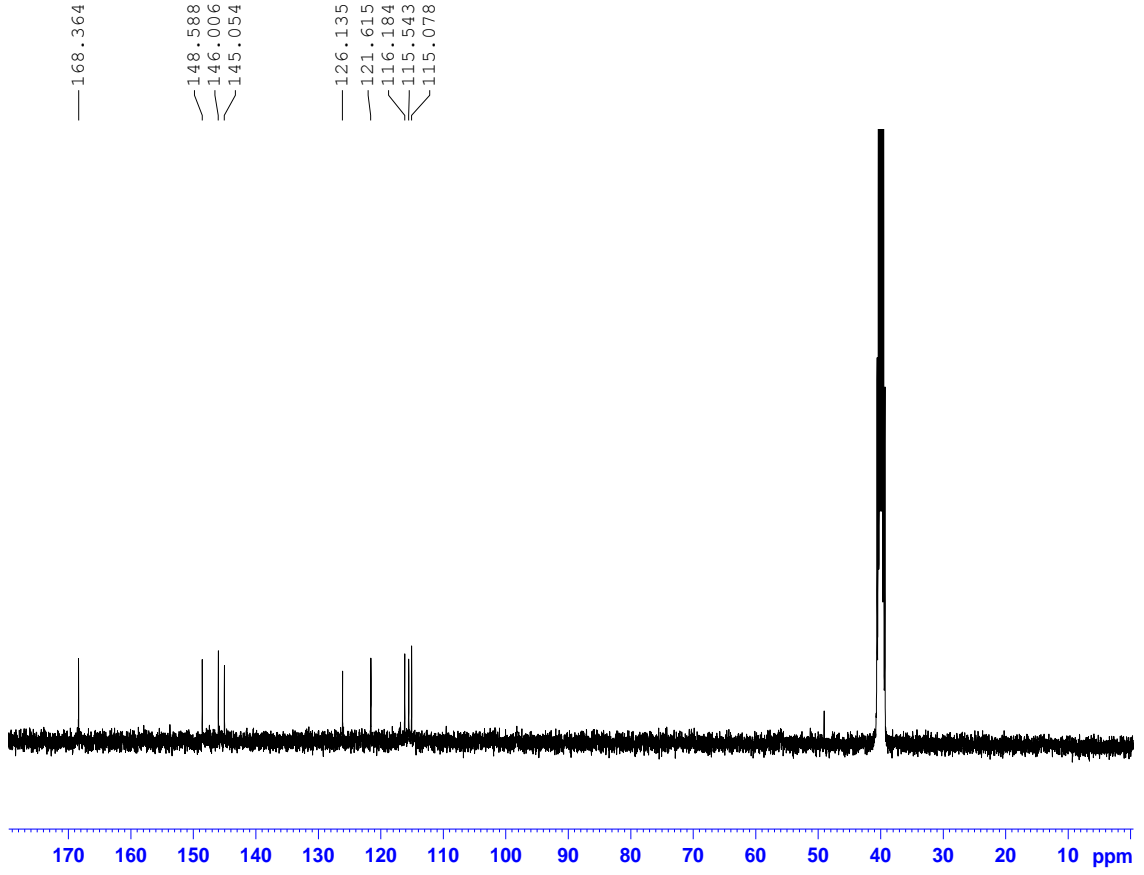
Çizelge 4. 6. Kafeik asit'in <sup>1</sup>H-NMR ve <sup>13</sup>C-NMR kimyasal kayma değerleri

Pozisyon	Kafeik asit (3)	
C/H	$\delta_C$	$\delta_H$
1	126,1	-
2	115,6	7,02 (d, $J = 1,80$ Hz)
3	148,6	-
4	145,1	-
5	116,2	6,75 (d, $J = 8,20$ Hz)
6	121,6	6,96 (dd, $J = 8,20, 1,80$ Hz)
$\alpha$	146,0	7,43 (d, $J = 15,8$ Hz)
$\beta$	115,1	6,17 (d, $J = 15,8$ Hz)
7	168,4	-



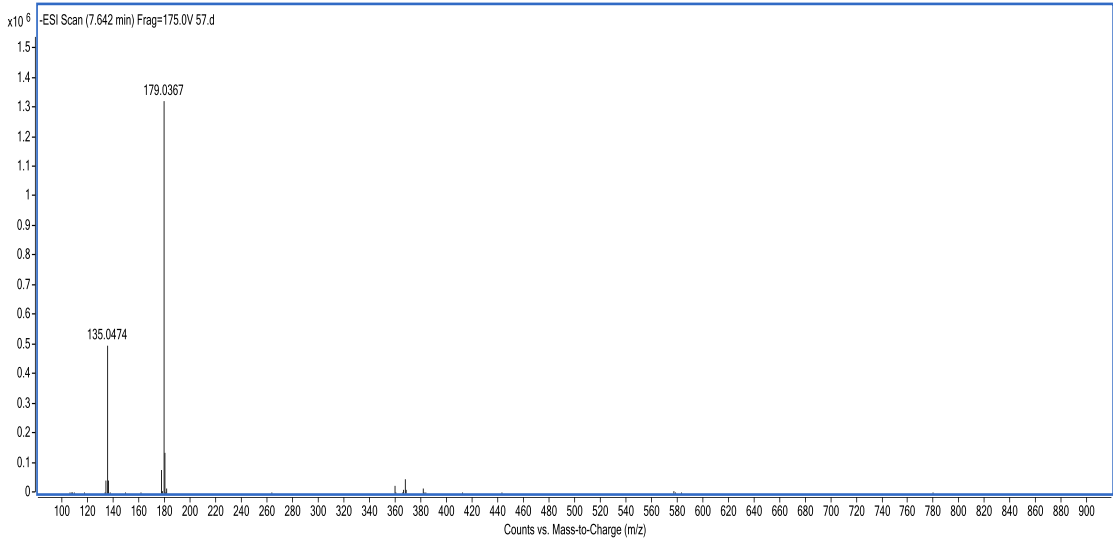
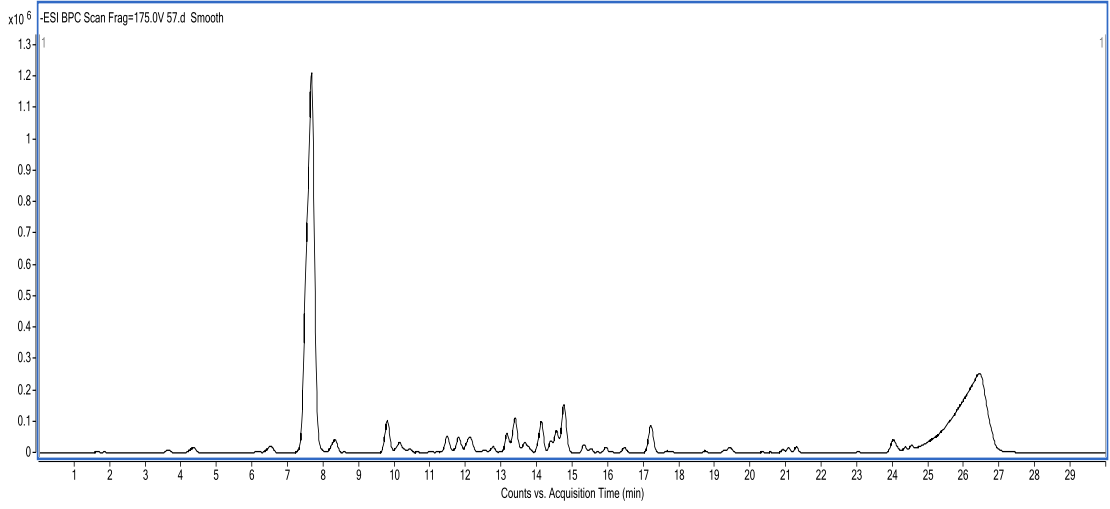
Şekil 4. 12. Kafeik asit'in (3) <sup>1</sup>H-NMR spektrumu (<sup>1</sup>H-NMR 400 MHz DMSO-d<sub>6</sub>)

Kafeik asit'in (3) <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda (Şekil 4.12) flavon yapısının aromatik halkasına ait proton rezonansları, ABX sistem protonları (sırasıyla H-2, 5, ve 6 numaralı protonlar) gözlenmiştir. H-2 ve H-5 protonları  $\delta_H = 7,02$  (d,  $J = 1,80$  Hz),  $\delta_H = 6,75$  (d,  $J = 8,20$  Hz) dublet şeklinde, H-6 protonu  $\delta_H = 6,96$  (dd,  $J = 8,20, 1,80$  Hz) rezonans olmuştur.  $\delta_H = 7,43$  (d,  $J = 15,8$ ) ve  $\delta_H = 6,17$  (d,  $J = 15,8$  Hz) ppm'deki kimyasal kayma değerleri molekülde birbirine göre trans konumda olan olefinik protonlarının varlığını göstermiştir.



Şekil 4. 13. Kafeik asit'in (3)  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu ( $^{13}\text{C}$ -NMR100 MHz DMSO- $\text{d}_6$ )

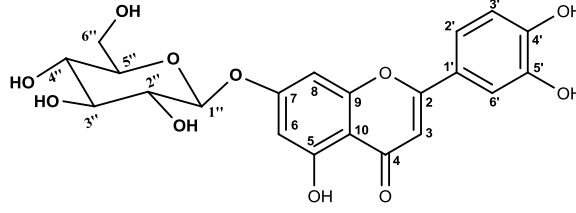
Kafeik asit'in (3)  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu (Şekil 4.13) incelendiğinde,  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu incelendiğinde bir fenil halkası üzerinde OH grupları ile süstitüe olmuş iki tane C atomu bulunmuştur. Bu karbonlar  $\delta_{\text{C}} = 148,6$  (C-3),  $145,1$  (C-4) ppm'de sinyaller vermiştir. Karbonil karbonu  $\delta_{\text{C}} = 168,4$  (C-9), olefinik karbonlar  $\delta_{\text{C}} = 146,0$  (C-7),  $115,1$  (C-8) ppm' de gözlenmiştir. Bulgular, literatür ile (Durust ve ark., 2001) desteklenerek maddenin kafeik asit olduğu bulunmuştur.



Şekil 4. 14. Kafeik asit'in (3) LC-TOF-MS kromatogramı

Kafeik asit'in (3)  $C_9H_8O_4$  kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pikini  $[M-H]^-$  LC-TOF-MS kütle spektrumunda (Şekil 4.14) (-)-ESI MS:  $m/z$  179,0367 g/mol olarak belirlenmiştir.

#### 4.3.2.4. Luteolin-7-O-β-glikozit'in (4) Fiziksel ve Spektral Özellikleri

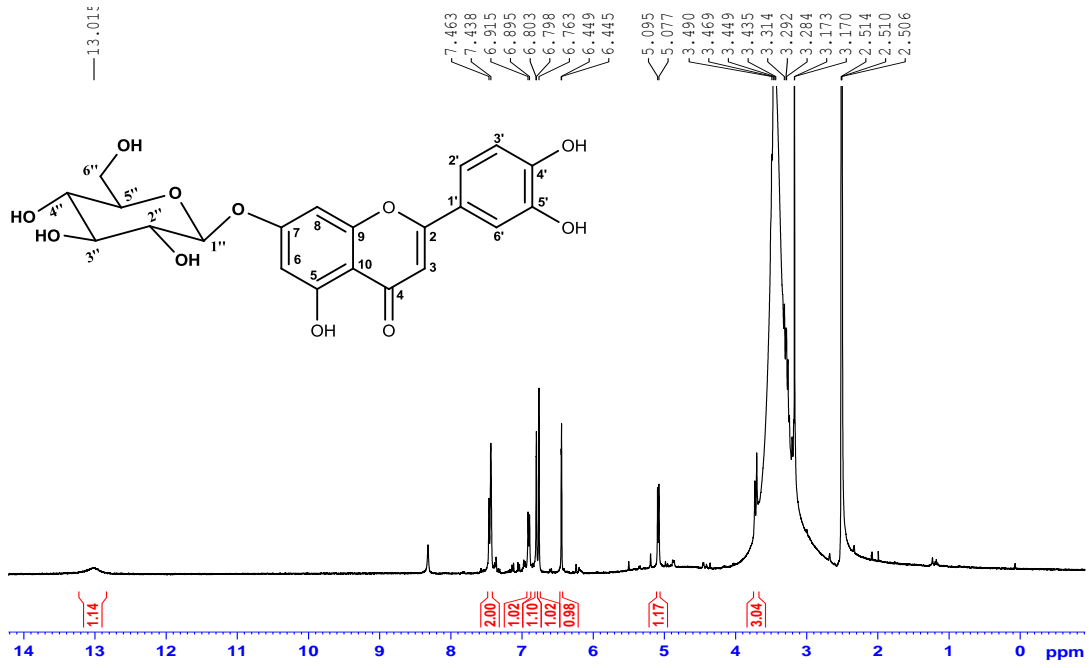


Şekil 4. 15. Luteolin-7-O-β-glikozit (4)

Luteolin-7-O-β-glikozit (4) (Şekil 4.15), kolon kromatografisinde %20 Hekzan-%80 EtOAc çözücü sisteminde gelen fraksiyonlardan, İTK ile birleştirilen 327-355 fraksiyon aralığına P-HPLC uygulaması (Bkz. Şekil 3.2) ile 25 mg izole edildi. Luteolin-7-O-β-glikozit'in kapalı formülü  $C_{21}H_{20}O_{11}$  olup molekül ağırlığı 448,10 g/mol'dür. Luteolin-7-O-β-glikozit bilinen bir bileşik olup elde edilen  $^1H$ -NMR ve  $^{13}C$ -NMR kimyasal kayma değerleri (Çizelge 4.7) literatür (Chiruvella ve ark., 2007) ile uyum içindedir.

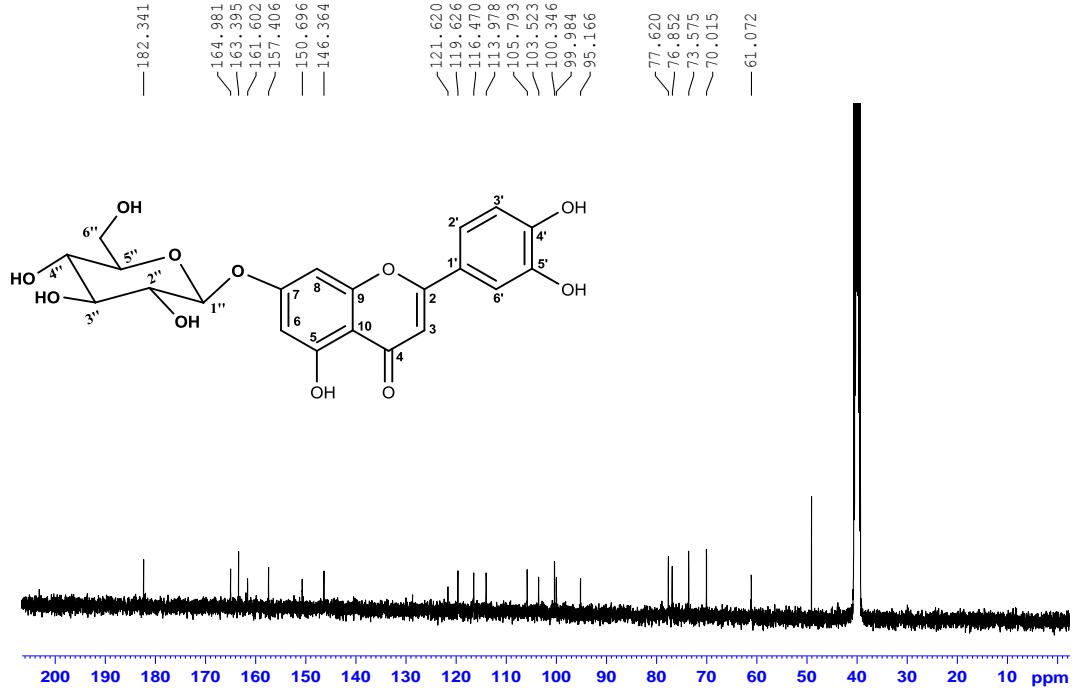
Çizelge 4. 7. Luteolin-7-O-β-glikozit'in (4)  $^1H$ -NMR ve  $^{13}C$ -NMR kimyasal kayma değerleri

Pozisyon	Luteolin-7-O-β-glikozit (4)	
	$\delta_H$	$\delta_C$
2	-	164,98
3	6,76 (s)	103,52
4	-	182,34
5	-	161,61
6	6,45 (d, $J = 1,7$ Hz)	99,99
7		163,40
8	6,79 (s)	95,17
9	-	157,41
10	-	105,79
1'	--	121,62
2'	7,45 (d, $J = 10,1$ Hz)	113,98
3'	-	146,37
4'	-	150,70
5'	6,90 (d, $J = 7,9$ Hz)	116,47
6'	7,45 (d, $J = 10,1$ Hz)	119,93
1''	5,08 (d, $J = 7,3$ Hz)	100,35
2''	3,26 (m)	73,58
3''	3,45 (m)	77,62
4''	3,17 (m)	70,02
5''	3,30 (m)	76,85
6a''	3,48 (m)	61,07
6b''	3,72 (d, $J = 9,9$ Hz)	61,07



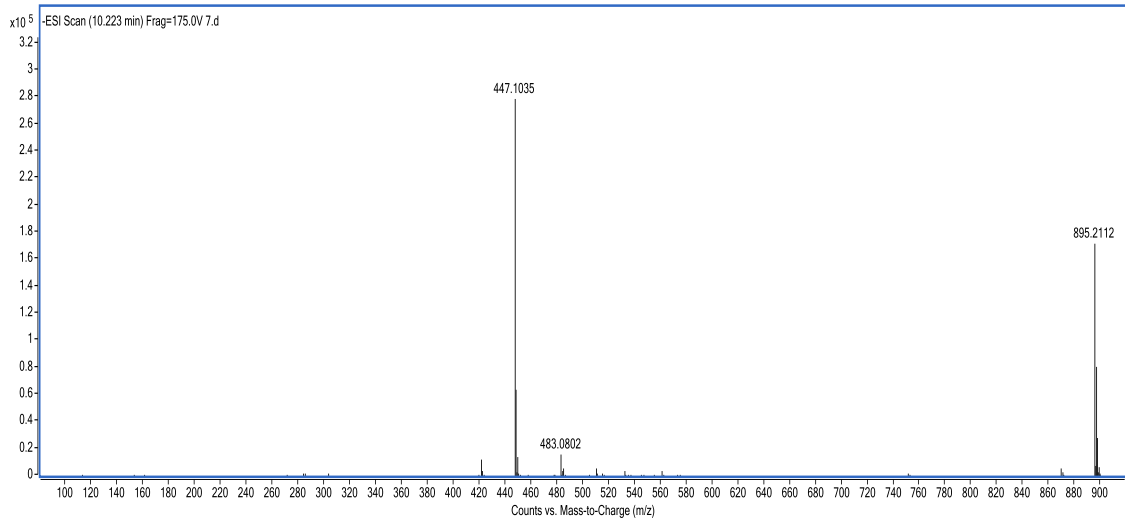
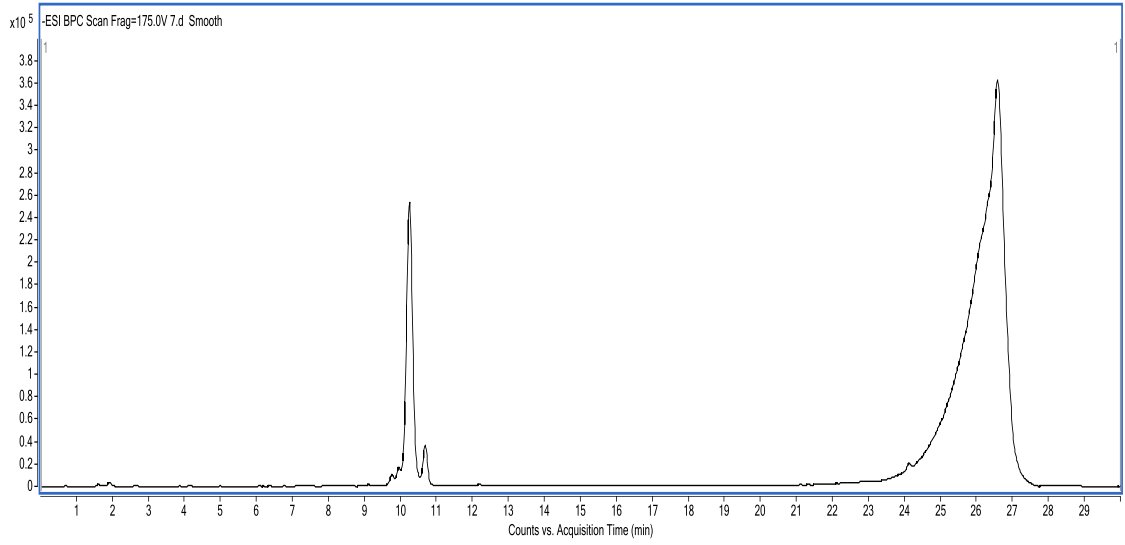
Şekil 4. 16. Luteolin-7-O- $\beta$ -glükozit'in (4)  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu ( $^1\text{H-NMR}$  400,  $\text{DMSO-d}_6$ )

Luteolin-7-O- $\beta$ -glükozit'in (4)  $^1\text{H-NMR}$  spektrumuna (Şekil 4.16) bakıldığında  $\delta_{\text{H}} = 7,45$  (d,  $J = 10,1$  Hz) ppm'de görülen sinyaller B halkasının C-2' ve C-6' protonlarına,  $\delta_{\text{H}} = 6,90$  (d,  $J = 7,9$  Hz) ppm'de görülen sinyaller B halkasının C-5' protonuna ve  $\delta_{\text{H}} = 6,45$  (d,  $J = 1,7$  Hz) ve  $\delta_{\text{H}} = 6,79$  (s) ppm'de görülen sinyal ise A halkasının C-6 ve C-8 protonuna ait olduğu tespit edilmiştir. H-3 ( $\delta_{\text{H}} = 6,76$ ) ppm'de singlet olarak görülen bu sinyal molekülümüzün flavon olduğuna işaret eder.  $\delta_{\text{H}} = 5,08$  (H-1'') ppm'de görülen sinyal glükoz moleküllerinin anomerik protonuna aittir. Anomerik proton dublete yarıldığı ve etkileşme sabitlerinin  $J = 7,3$  Hz olduğu görülmüştür, buradan da glükozun  $\beta$  konfigürasyonda olduğuna karar verilmiştir. Luteolin-7-O- $\beta$ -glükozit'in (4) HETCOR spektrumu incelendiğinde (Ek-II'de verilmiştir)  $\delta_{\text{H}} = 3,17-3,73$  ppm aralığında görülen karbon-proton etkileşimleri ile bileşikteki glükozun karbonlarına ait protonlar oldukları ve proton spektrumundan da H-6b'' protonunun etkileşme sabiti değeri belirlenmiştir. Fakat çözücüden ( $\text{DMSO-d}_6$ 'dan) gelen sinyalin perdelemesi nedeniyle şeker protonlarının diğer etkileşme sabiti değerleri belirlenememiştir.



Şekil 4. 17. Luteolin-7-O-β-glikozit'in (4)  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu ( $^{13}\text{C}$ -NMR 100 MHz DMSO- $d_6$ )

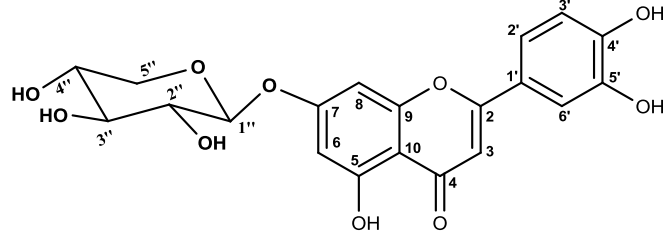
Luteolin-7-O-β-glikozit'in (4)  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumunda (Şekil 4.17) 20 karbon sinyali görülmektedir.  $\delta_{\text{C}} = 113,9$  ve  $\delta_{\text{C}} = 119,6$  ppm'de görülen sinyallerin sırasıyla, C-2' ve C-6' ile  $\delta_{\text{C}} = 116,5$  ppm'de görülen sinyallerin C-5' konumlarına ait olduğunu literatürler değerleri de desteklemektedir.  $\delta_{\text{C}} = 61,1-77,6$  ppm arasında görülen sinyaller glikoz kısmına aittir.  $\delta_{\text{C}} = 100,3$  ppm'de görülen sinyalin anomerik karbon atomuna ait olduğu literatür bilgileri ile karşılaştırılarak karar verilmiştir.



Şekil 4. 18. Luteolin-7-O- $\beta$ -glikozit'in (4) LC-TOF-MS kromatogramı

Luteolin-7-O- $\beta$ -glikozit'in (4) LC-TOF-MS spektrumunda (Şekil 4.18) (-)-ESI MS: m/z 447,1035 g/mol ( $[M-H]^-$ ) ve m/z 895,2112 g/mol ( $[2M-H]^-$ ) iyon pikleri gözlenmiş ve molekül formülü  $C_{21}H_{20}O_{11}$  olarak belirlenmiştir.

#### 4.3.2.5. Luteolin-7-O- $\beta$ -ksilozit'in (5) Fiziksel ve Spektral Özellikleri

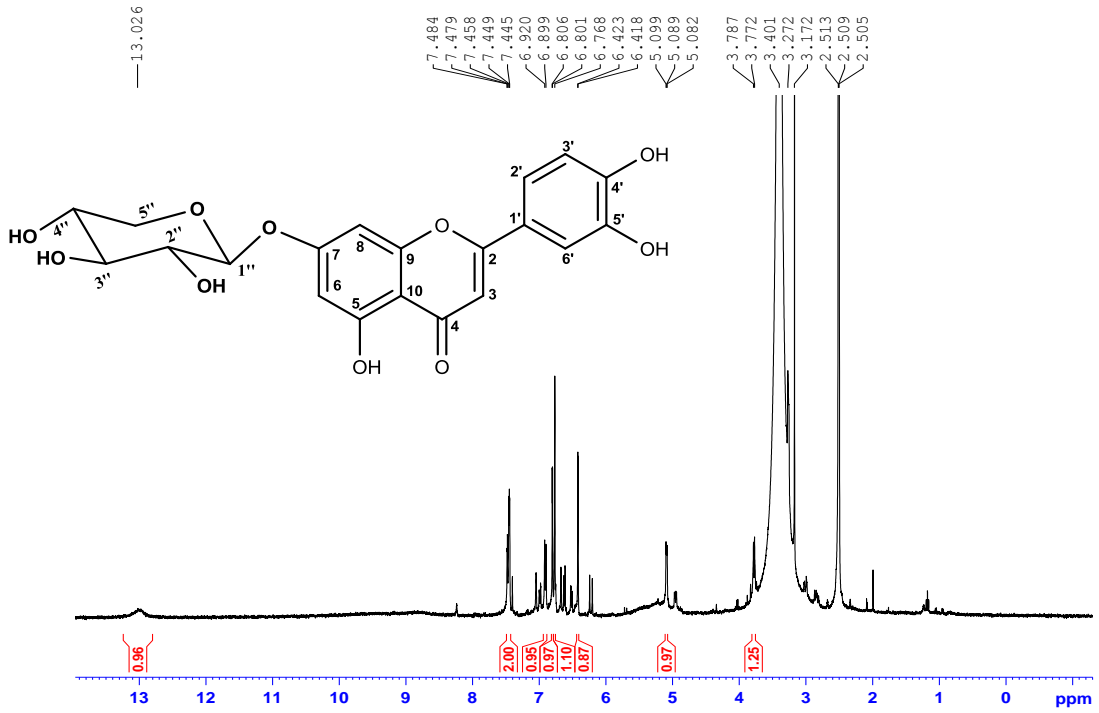


Şekil 4. 19. Luteolin-7-O- $\beta$ -ksilozit (5)

Luteolin-7-O- $\beta$ -ksilozit'in (5) (Şekil 4.19), kolon kromatografisinde % 20 Hekzan - %80 Etil asetat çözücü sisteminde gelen fraksiyonlardan, İTK kontrollü olarak birleştirilen 327-355 fraksiyon aralığına preparatif HPLC uygulaması (Bkz. Şekil 3.2) ile 22 mg izole edildi. Katı ve sarı renkli Luteolin-7-O- $\beta$ -ksilozit'in kapalı formülü  $C_{20}H_{18}O_{10}$  olup molekül ağırlığı 418,09 g/mol'dür. Luteolin-7-O- $\beta$ -ksilozit (5) bilinen bir bileşik olup elde edilen  $^1H$ -NMR ve  $^{13}C$ -NMR kimyasal kayma değerleri (Çizelge 4.8) literatür (Gulluce ve ark., 2012) ile uyum içindedir.

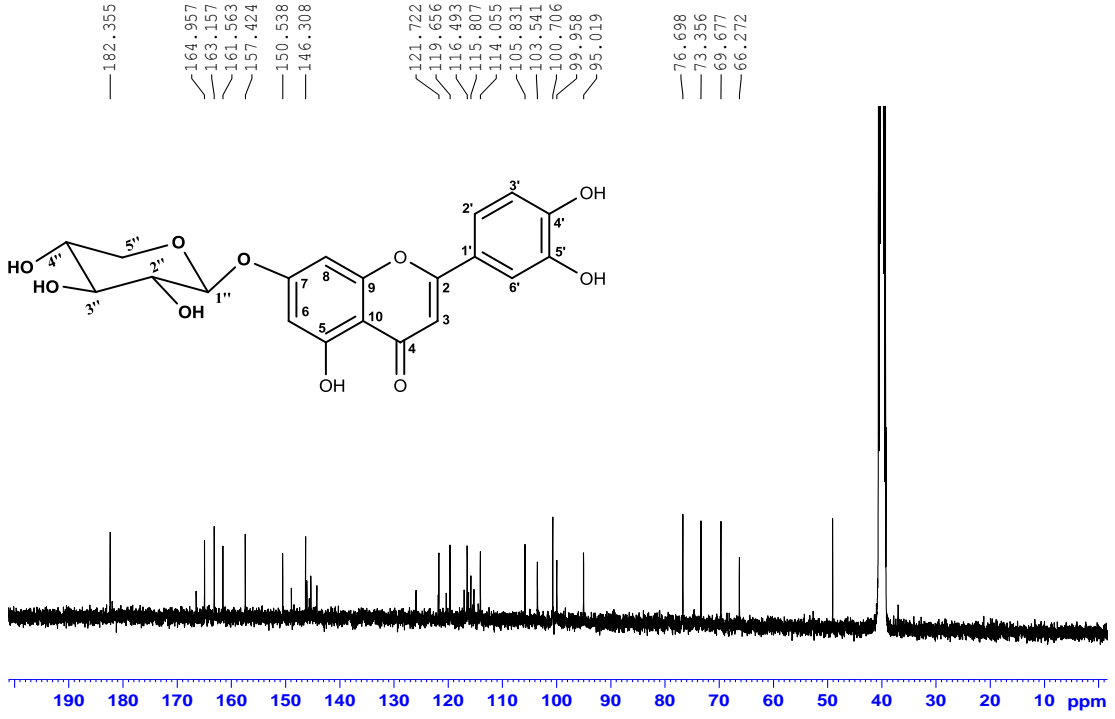
Çizelge 4. 8. Luteolin-7-O- $\beta$ -ksilozit'in (5)  $^1H$ -NMR ve  $^{13}C$ -NMR kimyasal kayma değerleri

Pozisyon	Luteolin-7-O- $\beta$ -ksilozit (5)	
	$\delta_H$	$\delta_C$
2	-	164,96
3	6,77 (s)	103,54
4	-	182,36
5	-	161,57
6	6,42 (d, $J = 2,0$ Hz)	99,96
7	-	163,16
8	6,81 (s)	95,02
9	-	157,43
10	-	105,83
1'	-	121,72
2'	7,44 (m)	114,06
3'	-	146,31
4'	-	150,54
5'	6,91 (d, $J = 8,3$ Hz)	116,50
6'	7,44 (m)	119,66
1''	5,09 (d, $J = 7,3$ Hz)	100,71
2''	3,37 (m)	69,68
3''	3,23 (m)	73,36
4''	3,25 (m)	76,70
5''	3,75 (d, $J = 6.2$ Hz)	66,27



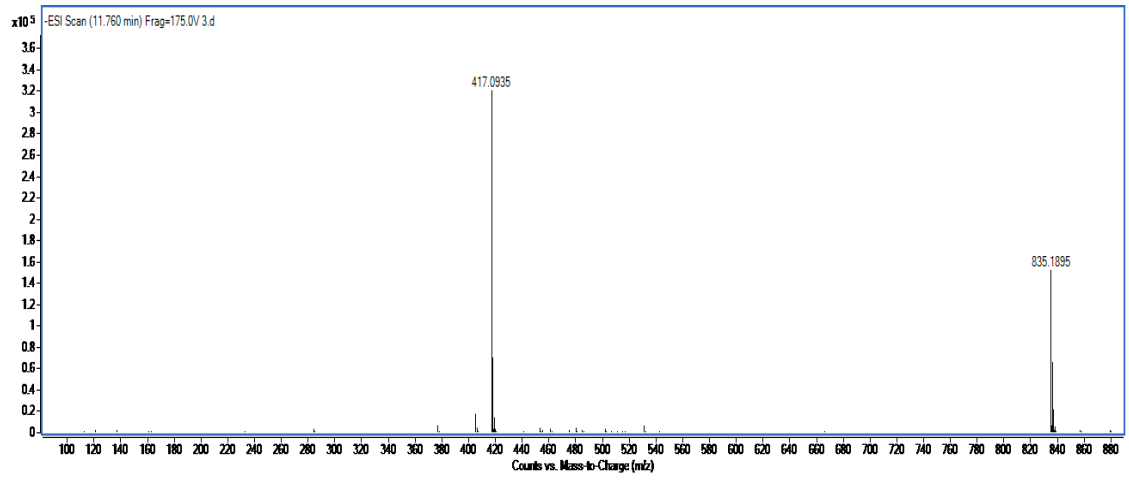
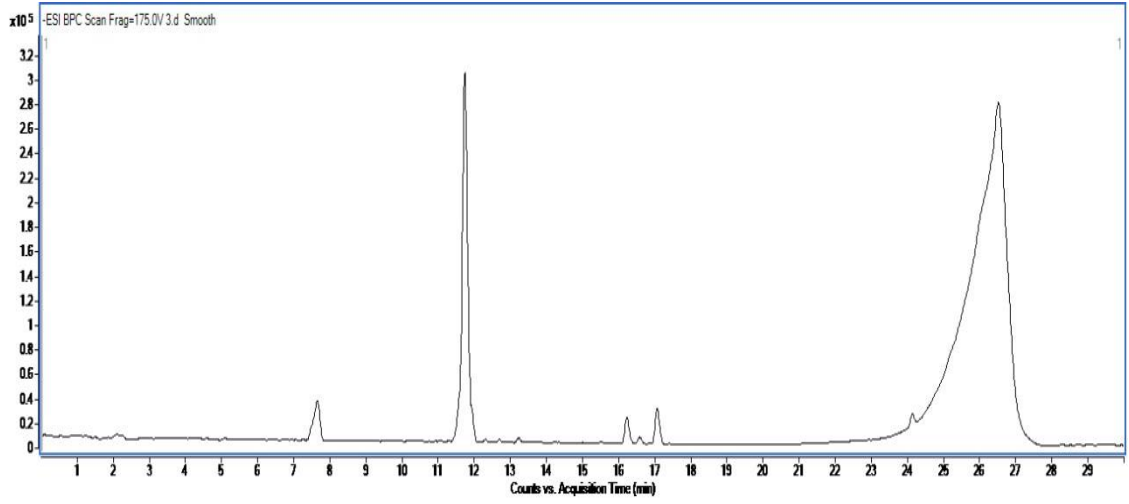
Şekil 4. 20. Luteolin-7-O- $\beta$ -ksilozit'in (5)  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu ( $^1\text{H-NMR}$  400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )

Luteolin-7-O- $\beta$ -ksilozit'in (5)  $^1\text{H-NMR}$  spektrumuna (Şekil 4.20) bakıldığında  $\delta_{\text{H}} = 7,44$  (2H, m) ppm'de görülen sinyaller B halkasının C-2' ve C-6' protonlarına,  $\delta_{\text{H}} = 6,91$  (d,  $J = 8,3$  Hz) ppm'de görülen sinyaller B halkasının C-5' protonuna ve  $\delta_{\text{H}} = 6,42$  (d,  $J = 2,0$  Hz) ve  $\delta_{\text{H}} = 6,81$  (s) ppm'de görülen sinyal ise A halkasının C-6 ve C-8 protonuna ait olduğu tespit edilmiştir. H-3 ( $\delta_{\text{H}} = 6,77$ ) ppm'de singlet olarak görülen bu sinyal molekülümüzün flavon olduğuna işaret eder.  $\delta_{\text{H}} = 5,08$  (H-1'') ppm'de görülen sinyal ksiloz moleküllerinin anomerik protonuna aittir. Anomerik proton dublete yarıldığı ve etkileşme sabitlerinin  $J = 7,3$  Hz olduğu görülmüş ve buradan ksilozun  $\beta$  konfigürasyonda olduğuna karar verilmiştir. Luteolin-7-O- $\beta$ -ksilozit'in (5) HETCOR spektrumu incelendiğinde (Ek-II'de verilmiştir)  $\delta_{\text{H}} = 3,23-3,75$  ppm aralığında görülen karbon-proton etkileşimleri ile bileşikteki glikozun karbonlarına ait protonlar oldukları ve proton spektrumundan da H-5'' ( $\delta_{\text{H}} = 3,75$ ) protonunun etkileşme sabiti değeri belirlenmiştir. Fakat çözücüden ( $\text{DMSO-d}_6$ 'dan) gelen sinyalin perdelemesi nedeniyle şeker protonlarının diğer etkileşme sabiti değerleri belirlenememiştir.



Şekil 4. 21. Luteolin-7-O- $\beta$ -ksilozit'in (5)  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu ( $^{13}\text{C}$ -NMR 100 MHz DMSO- $\text{d}_6$ )

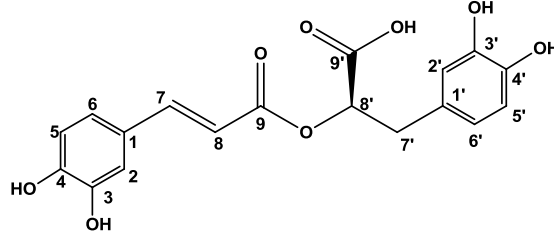
Luteolin-7-O- $\beta$ -ksilozit'in (5)  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumunda (Şekil 4.21) 20 karbon sinyali görülmektedir.  $\delta_{\text{C}} = 114,1$  ve  $\delta_{\text{C}} = 119,7$  ppm'de görülen sinyallerin sırasıyla, C-2' ve C-6' ile  $\delta_{\text{C}} = 116,5$  ppm'de görülen sinyallerin C-5' konumlarına ait olduğunu literatürler değerleri de desteklemektedir.  $\delta_{\text{C}} = 66,3-76,7$  ppm'ler arasında görülen sinyaller ksiloz molekülüne aittir.  $\delta_{\text{C}} = 100,7$  ppm'de görülen sinyalin anomerik karbon atomuna ait olduğu literatür bilgileri ile karşılaştırılarak karar verilmiştir.



Şekil 4. 22. Luteolin-7-O- $\beta$ -ksilozit'in (5) LC-TOF-MS kromatogramı

Luteolin-7-O- $\beta$ -ksilozit'in (5) LC-TOF-MS spektrumunda (Şekil 4.22) (-)-ESI MS: m/z 417,0935 g/mol ( $[M-H]^-$ ) ve m/z 835,1895 g/mol ( $[2M-H]^-$ ) iyon pikleri gözlenmiş ve molekül formülü  $C_{20}H_{18}O_{10}$  olarak belirlenmiştir.

#### 4.3.2.6. Rozmarinik asit'in (6) Fiziksel ve Spektral Özellikleri

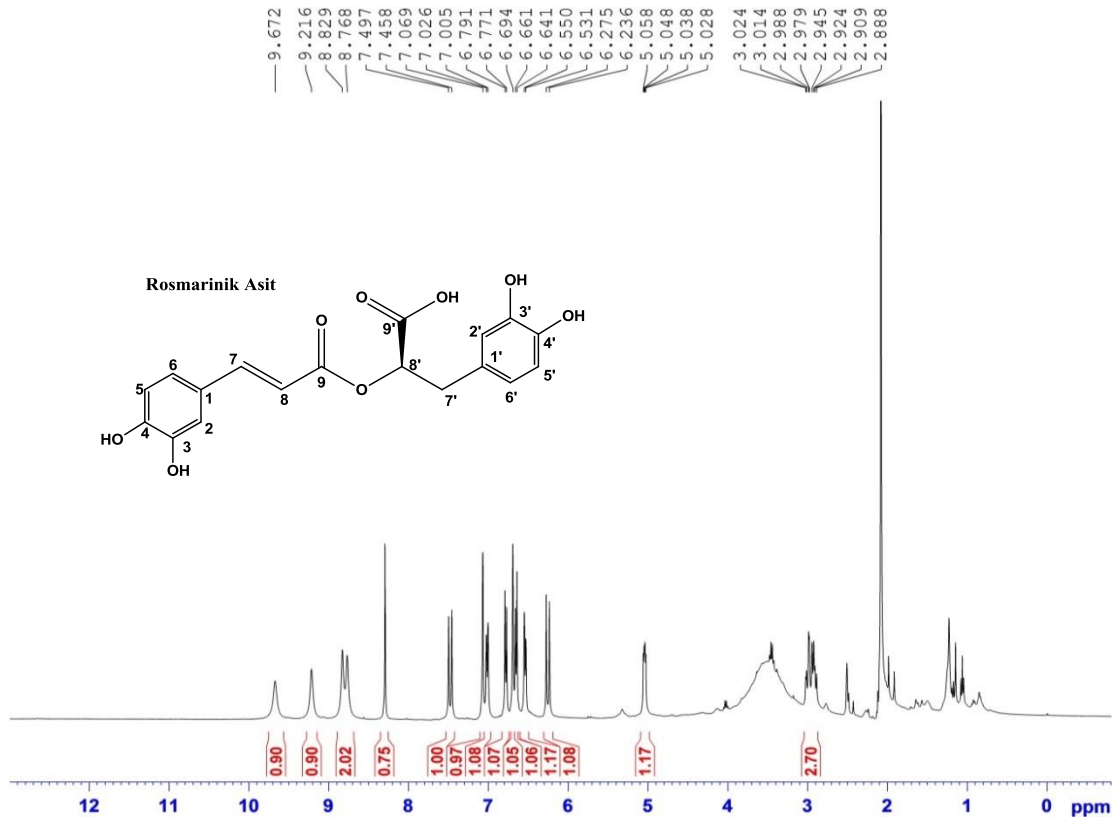


Şekil 4. 23. Rozmarinik asit (6)

Rozmarinik asit (6) (Şekil 4.23) kolon kromatografisi ile silikajel dolgu maddesi kullanılan kolonda % 90 EtOAc-%10 MeOH çözücü sisteminde 469-529 nolu fraksiyonlardan izole edildi (57 mg). İzole edilen molekülün fiziksel görünümü ise sarı renkli toz şeklindedir. Bileşik  $C_{18}H_{16}O_8$  kapalı formülüne sahip olup molekül ağırlığı  $m/z$  360,0845 g/mol'dür. Rozmarinik asit (6) bilinen bir bileşik olup elde edilen  $^1H$ -NMR ve  $^{13}C$ -NMR kimyasal kayma değerleri (Çizelge 4.9) literatür (Aksit ve ark., 2014) ile uyum içindedir.

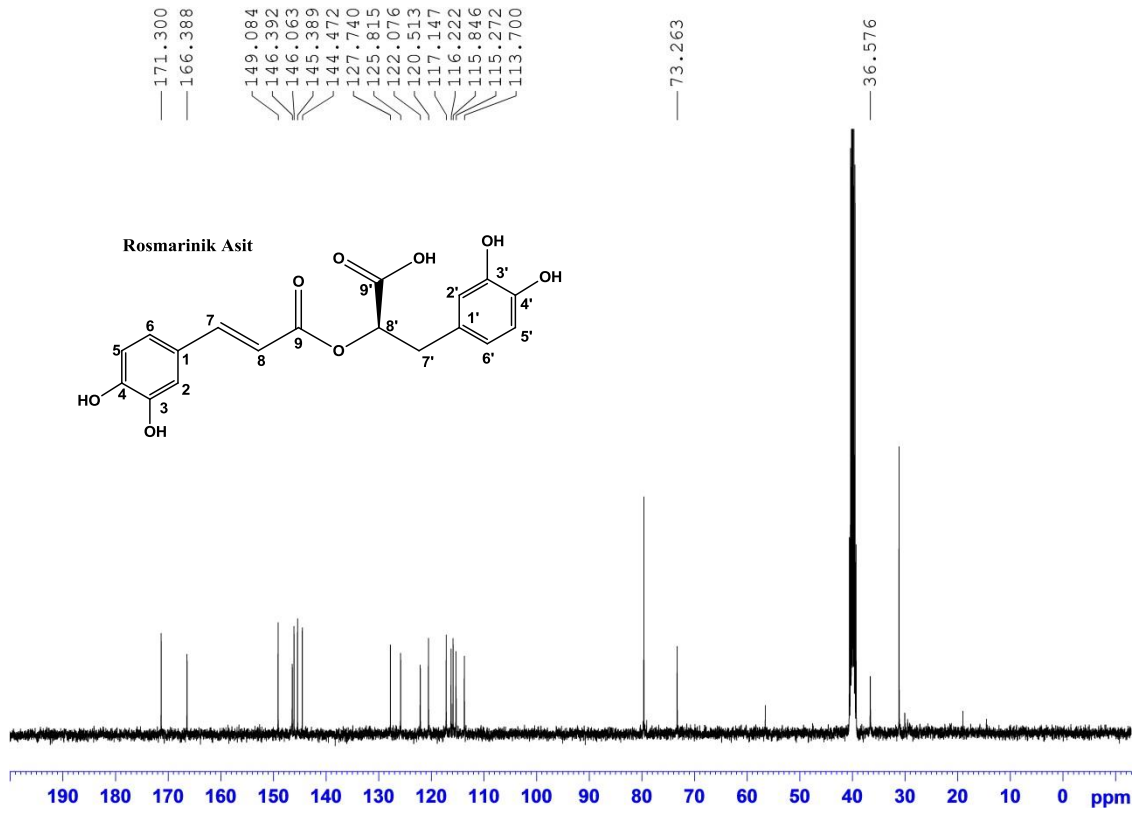
Çizelge 4. 9. Rozmarinik asit'in (6)  $^1H$ -NMR ve  $^{13}C$ -NMR kimyasal kayma değerleri

Pozisyon	Rozmarinik asit (6)	
	$\delta_C$	$\delta_H$
1	-	125,82
2	7,06 (d, $J = 1,4$ Hz)	115,27
3	-	149,08
4	-	146,06
5	6,77 (d, $J = 8,1$ Hz)	116,22
6	7,02 (dd, $J = 8,1, 2,0$ Hz)	122,07
7	7,46 (d, $J = 15,8$ Hz)	146,39
8	6,24 (d $J = 15,8$ Hz)	113,66
9	-	166,38
1'	-	127,74
2'	6,69 (d, $J = 1,5$ Hz)	117,15
3'	-	144,47
4'	-	145,38
5'	6,54 (d $J = 7,92$ Hz)	120,51
6'	6,65 (d $J = 7,92$ Hz)	115,85
7a'	2,93 (dd $J = 14,1/10,0$ Hz)	36,58
7b'	2,94 (dd $J = 14,1/3,7$ Hz)	36,58
8'	5,08 (dd $J = 10,0/2,8$ Hz)	73,26
9'	-	171,30



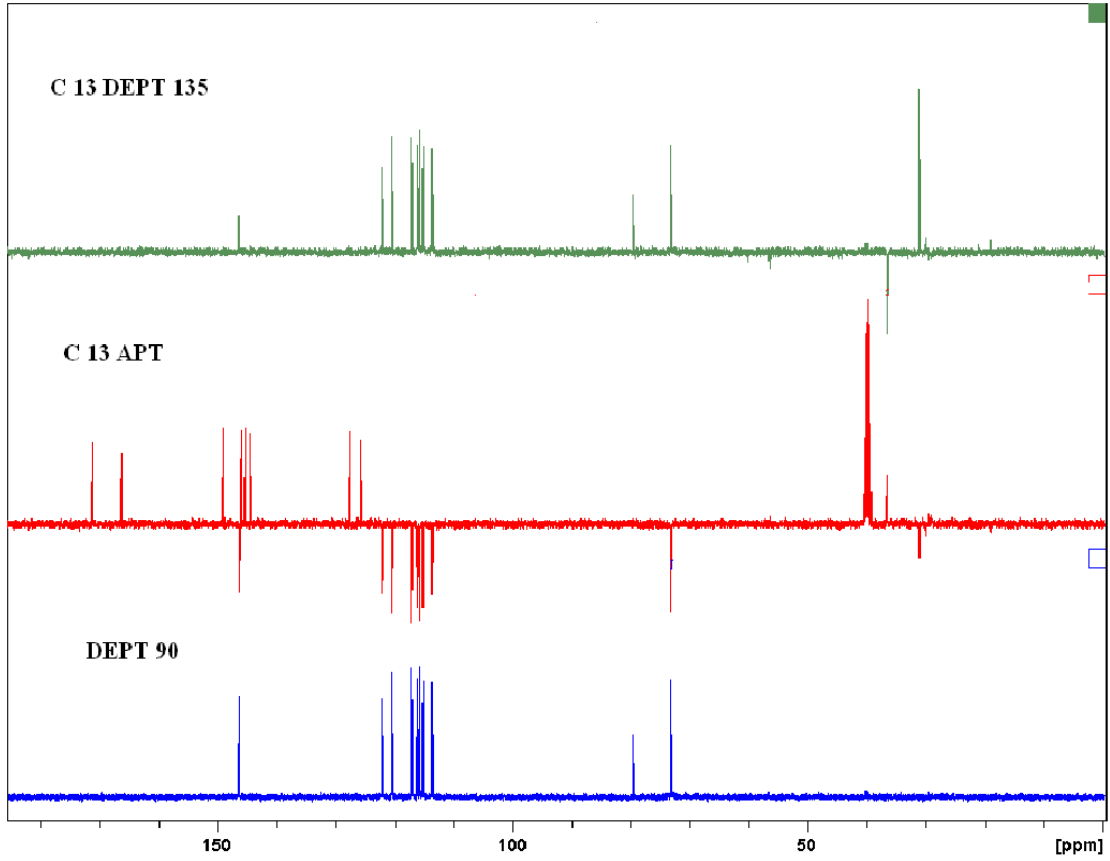
Şekil 4. 24. Rozmarinik asit'in (6)  $^1\text{H-NMR}$  ( $^1\text{H-NMR}$  400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) spektrumu

Rozmarinik asit'in (6)  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu (Şekil 4.24) incelendiğinde,  $\delta_{\text{H}} = 7,02$  (d,  $J = 2,2$  Hz),  $\delta_{\text{H}} = 7,02$  (dd,  $J = 8,1/2,0$  Hz),  $\delta_{\text{H}} = 6,79$  (d,  $J = 8,1$  Hz) ve  $\delta_{\text{H}} = 6,74$  (d,  $J = 2,2$  Hz),  $\delta_{\text{H}} = 6,68$  (d,  $J = 8,1$  Hz),  $\delta_{\text{H}} = 6,62$  (dd,  $J = 8,1/2,2$  Hz) ppm'de iki grup aromatik ABX sistem protonları (sırasıyla H-2, 6, 5 ve H-2', 5', 6' numaralı protonlar) gözlenmiştir.  $\delta_{\text{H}} = 7,46$  (d,  $J = 15,8$ ) ve  $\delta_{\text{H}} = 6,24$  (d,  $J = 15,8$  Hz) ppm'deki kimyasal kayma değerleri molekülde birbirine göre trans konumda olan olefinik protonların varlığını göstermiştir.  $\delta_{\text{H}} = 5,08$  (dd,  $J = 10,0/2,8$  Hz) ppm'de gözlenen sinyalin oksijen atomuna komşu olan H-8' protonu olduğu ve  $\delta_{\text{H}} = 2,93$  ve (dd,  $J = 14,1/3,7$  Hz),  $\delta_{\text{H}} = 2,94$  (dd,  $J = 14,3/10,0$  Hz) ppm'de gözlenen sinyallerin C-7' konumundaki metilene ait protonlar olduğu literatürlerle karşılaştırılarak tespit edilmiştir.



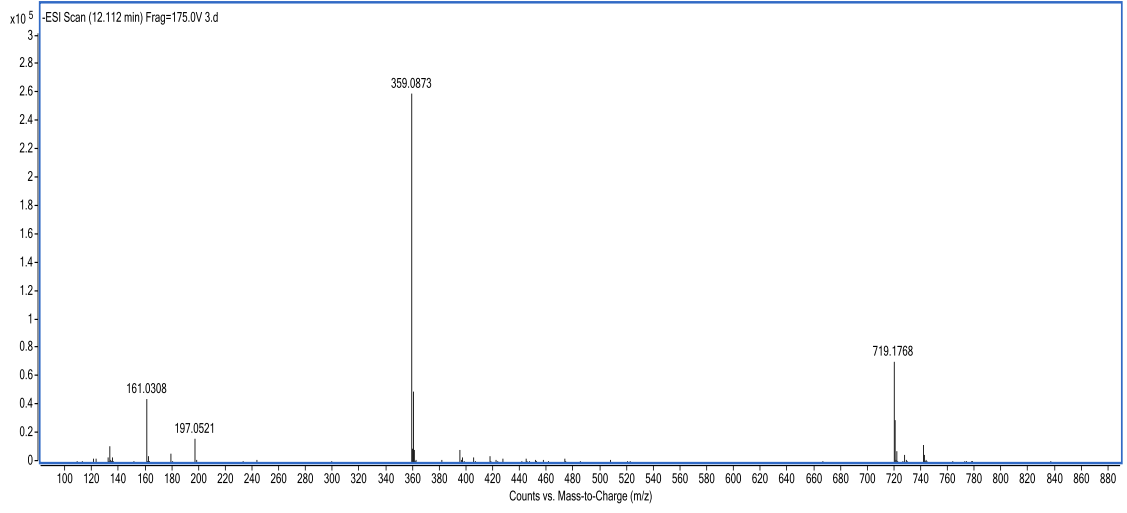
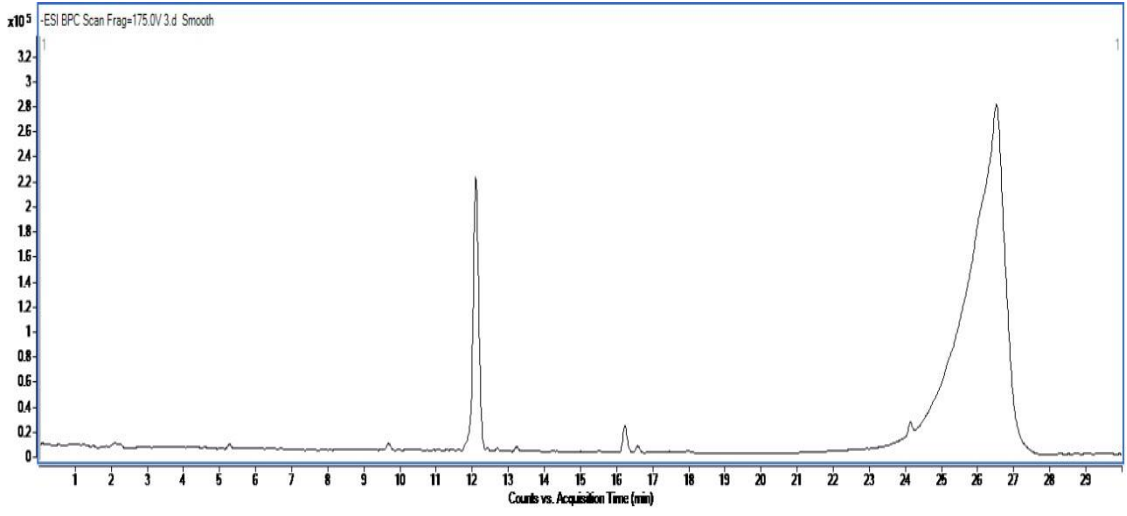
Şekil 4. 25. Rozmarinik asit'in (6)  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $^{13}\text{C}$ -NMR 100 MHz, DMSO-*d*6) spektrumu

Rozmarinik asit'in (6)  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu (Şekil 4.25) incelendiğinde,  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu incelendiğinde iki fenil halkası üzerinde OH grupları ile süstitüe olmuş dört tane C atomu bulunmuştur. Bu karbonlar  $\delta_{\text{C}} = 146,1$  (C-4),  $149,1$  (C-3),  $144,5$  (C-3') ve  $145,4$  (C-4') ppm'de sinyaller vermiştir. İki tane karbonil karbonu  $\delta_{\text{C}} = 171,3$  (C-9'),  $166,4$  (C-9) ppm'de, olefinik karbonlar  $\delta_{\text{C}} = 146,4$  (C-7),  $113,7$  (C-8) ppm'de, bir tane de estere komşu karbon atomu  $\delta_{\text{C}} = 73,3$  (C-8') ppm'de gözlenmiştir. Bulgular, literatürler ile desteklenerek bileşiğin rozmarinik asit (6) olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4. 26. Rozmarinik asit'in (6) DEPT-90, DEPT-135, APT NMR ( $^{13}\text{C}$ -NMR100 MHz DMSO- $d_6$ ) spektrumu

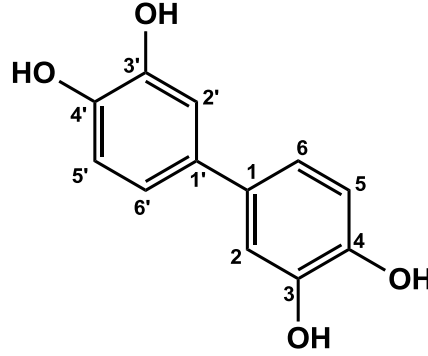
Rozmarinik asit'in (6) APT, DEPT-90 ve DEPT-135 spektrumları (Şekil 4.26) incelendiğinde yapıda 18 karbon atomu olduğu görülmektedir. 18 karbondan 8 tanesi kuaterner karbonu (DEPT-90 ve DEPT-135 spektrumlarında sinyal vermeyen kısım), 9 tanesi metin karbonu (DEPT-90 ve DEPT-135 spektrumunda pozitif sinyal), 1 metilen karbonu (DEPT-135 spektrumunda negatif ve APT spektrumundaki pozitif sinyaller) içerdiği tespit edilmiştir.



Şekil 4. 27. Rozmarinik asit'in (6) LC-TOF-MS kromatogramı

Rozmarinik asit'in (6) LC-TOF-MS spektrumunda (Şekil 4.27) (-)-ESI MS: m/z 359,0873 g/mol ( $[M-H]^-$ ), m/z 197,0521 g/mol ( $[M\text{-Kafeik asit}]^-$ ) ve m/z 719,1768 g/mol ( $[2M-H]^-$ ) iyon pikleri gözlenmiş ve molekül formülü  $C_{18}H_{16}O_8$  olarak belirlenmiştir.

#### 4.3.2.7. Bifenil-3,3',4,4'-tetraol'ün (7) Fiziksel ve Spektral Özellikleri

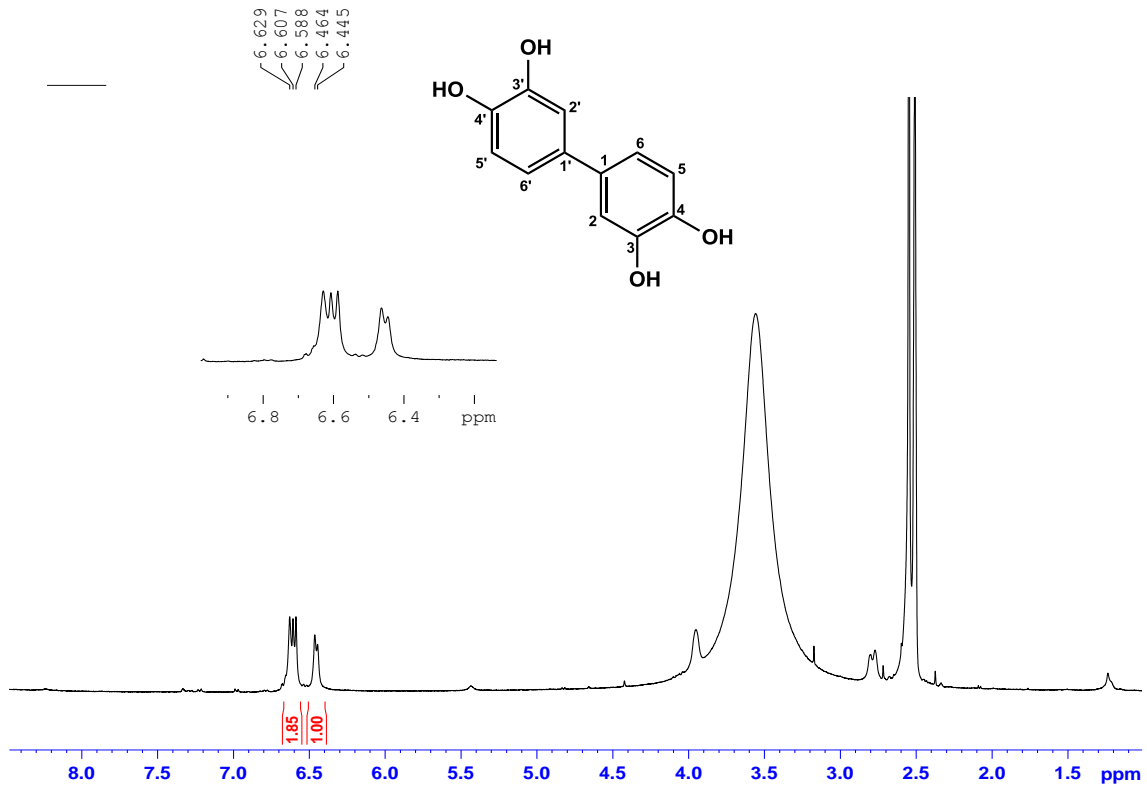


Şekil 4. 28. Bifenil-3,3',4,4'-tetraol (7)

Bifenil-3,3',4,4'-tetraol (7) bileşiği (Şekil 4.28) kolon kromatografisinde % 40 Hekzan - %60 EtOAc çözücü sisteminde karışık olarak elde edildi. %100 EtOAc ve %90 EtOAc-%10 MeOH çözücü sistemlerinde gelen fraksiyonlardan, İTK kontrollü olarak birleştirilen 417-501 fraksiyon aralığına preparatif HPLC uygulaması (Bkz. Şekil 3.3) ile 13 mg izole edildi. Beyaz renkli bifenil-3,3',4,4'-tetraol (7) kristalinin kapalı formülü  $C_{12}H_{10}O_4$  olup molekül ağırlığı 218,0579 g/mol'dür. Bifenil-3,3',4,4'-tetraol (7) bileşiği bilinen bir bileşik olup elde edilen  $^1H$ -NMR ve  $^{13}C$ -NMR kimyasal kayma değerleri (Çizelge 4.10) literatür (Bhutani ve ark., 2001) ile uyum içindedir.

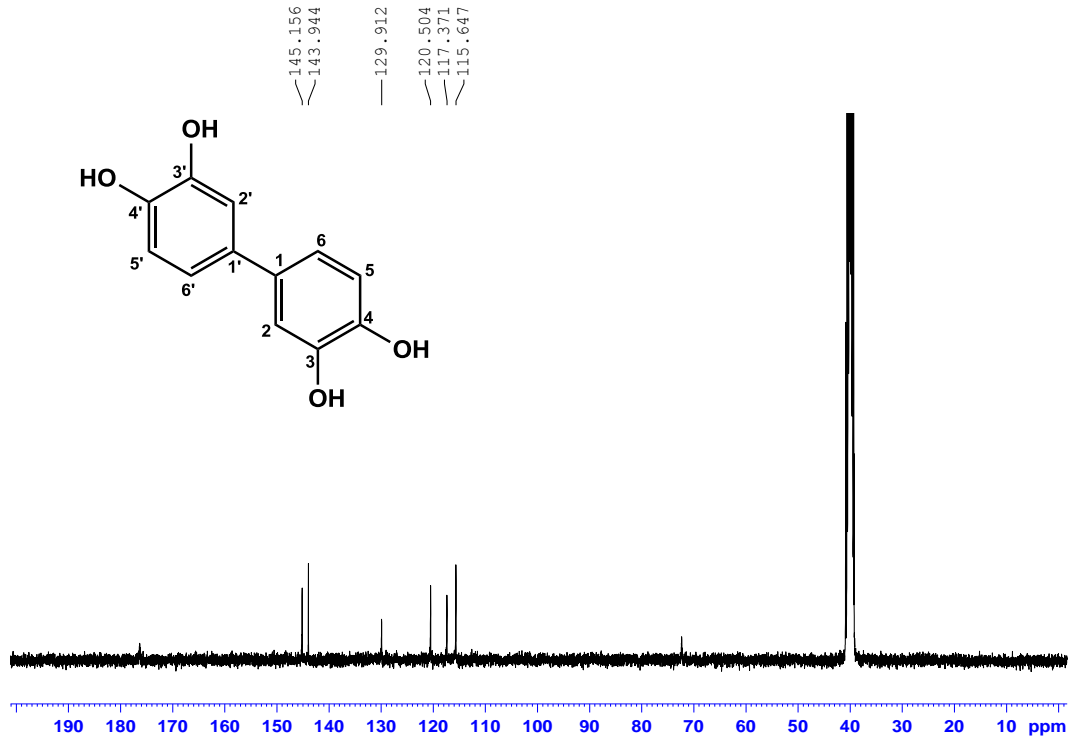
Çizelge 4. 10. Bifenil-3,3',4,4'-tetraol'ün (7)  $^1H$ -NMR ve  $^{13}C$ -NMR kimyasal kayma değerleri

Pozisyon	Bifenil-3,3',4,4'-tetraol (7)	
	$\delta_H$	$\delta_C$
1	-	129,92
2	6,63 (s)	117,37
3	-	145,16
4	-	143,95
5	6,60 (d, $J = 7,6$ Hz)	115,65
6	6,45 (d, $J = 7,6$ Hz)	120,50
1'	-	129,92
2'	6,63 (s)	117,37
3'	-	145,16
4'	-	143,95
5'	6,60 (d, $J = 7,6$ Hz)	115,65
6'	6,45 (d, $J = 7,6$ Hz)	120,50



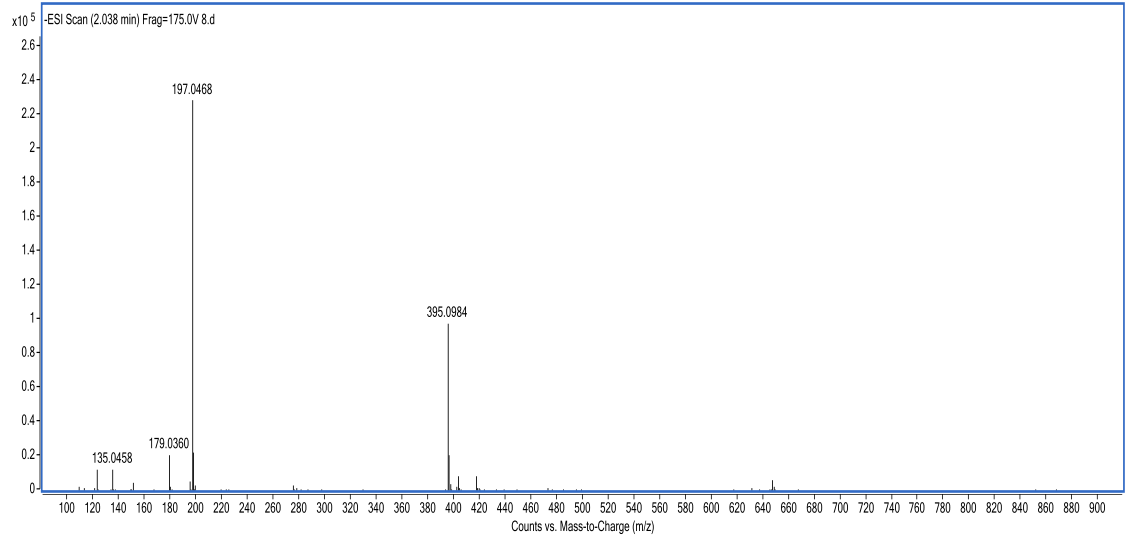
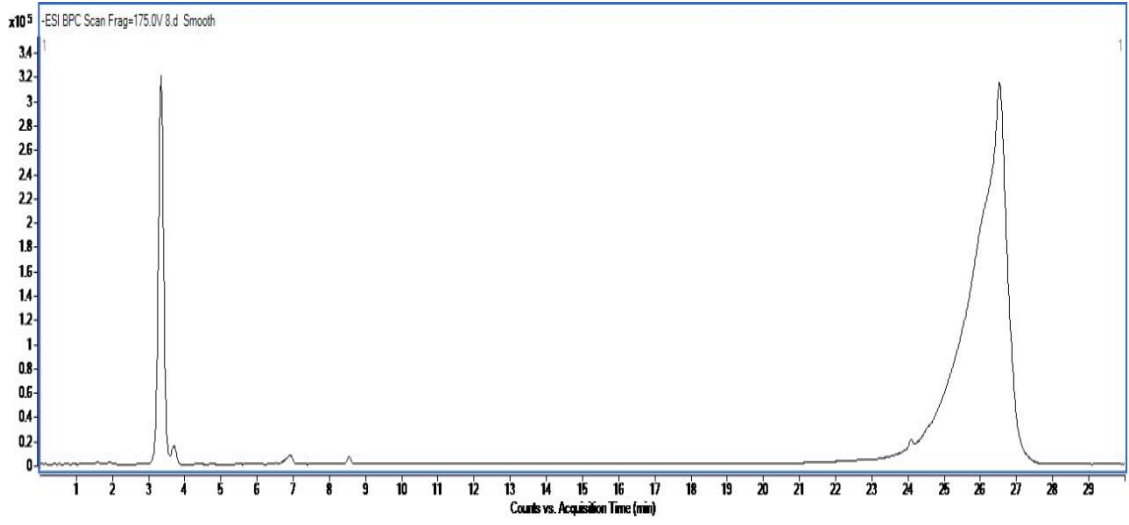
Şekil 4. 29. Bifenil-3,3',4,4'-tetraol (7) <sup>1</sup>H-NMR spektrumu (<sup>1</sup>H-NMR 400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)

Bifenil-3,3',4,4'-tetraol (7) bileşiminin <sup>1</sup>H-NMR spektrumundan (Şekil 4.29), bileşimin aromatik halka içerdiği tespit edilmiştir. <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda aromatik halkasına ait proton rezonansları, H-6 ve H-6' protonları  $\delta_H = 6,45$  ppm'de ( $J = 7,6$  Hz) dublet şeklinde, H-5, H-5' protonu  $\delta_H = 6,60$  ppm'de ( $J = 7,6$  Hz) dublet şeklinde, H-2 ve H-2' protonları  $\delta_H = 6,63$  ppm'de singlet şeklinde rezonans olmuştur.



Şekil 4. 30. Bifenil-3,3',4,4'-tetraol'ün (7)  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu ( $^{13}\text{C}$ -NMR 100 MHz DMSO- $\text{d}_6$ )

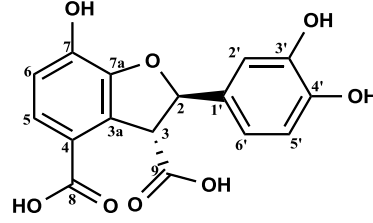
Bifenil-3,3',4,4'-tetraol'ün (7)  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu (Şekil 4.30) incelendiğinde, 12 tane karbon olduğu görülmektedir. 12 karbondan  $\delta_{\text{C}} = 129,9$ ,  $\delta_{\text{C}} = 143,9$  ve  $\delta_{\text{C}} = 145,2$  ppm'de 6 tanesi kuartener karbonu, 6 tanesi metin karbonu (C-2 / C-2', C-5 / C5' ve C-6 / C6' karbonları) simetrik olduklarında aynı yerde rezonans olmuştur. Bu verilere göre bileşiğin kapalı formülü  $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_4$  olarak belirlenmiştir



Şekil 4. 31. Bifenil-3,3',4,4'-tetraol'ün (7) LC-TOF-MS kromatogramı

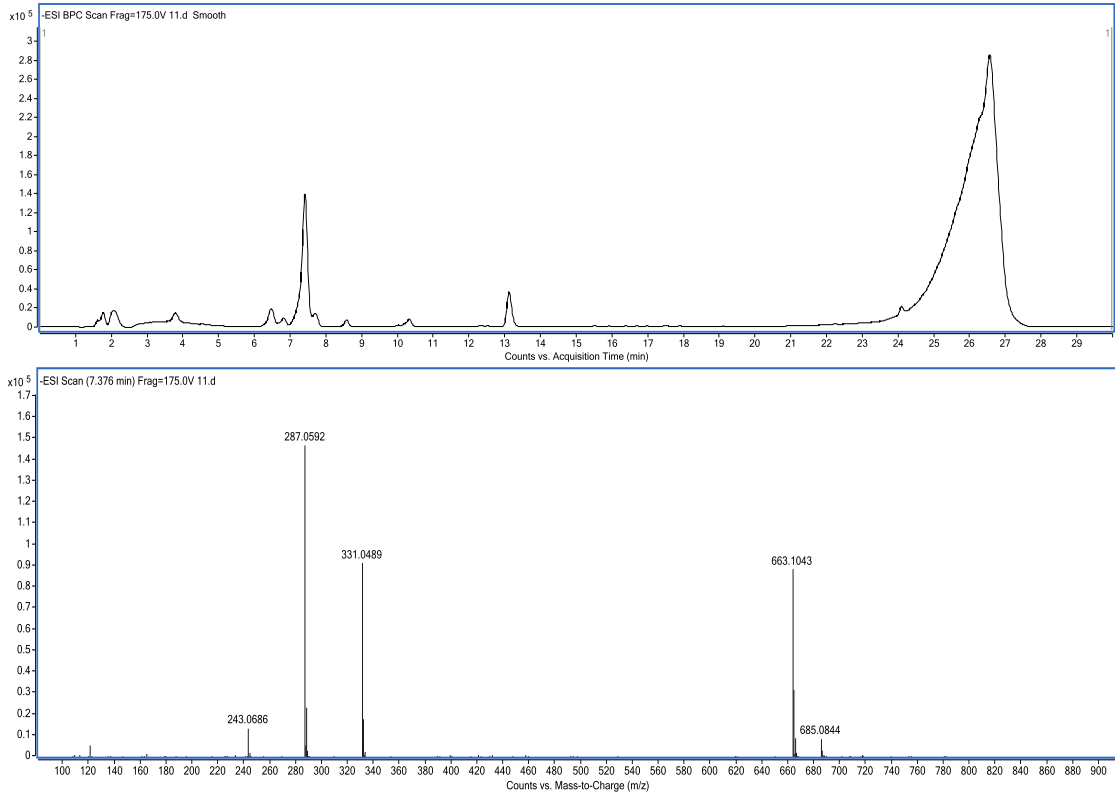
Bifenil-3,3',4,4'-tetraol'ün (7) LC-TOF-MS spektrumunda (Şekil 4.31) (-)-ESI MS: m/z 197,0468 g/mol ( $[M-H_2O]^+$ ) iyon piki gözlenmiş ve molekül formülü  $C_{18}H_{16}O_8$  olarak belirlenmiştir.

#### 4.3.2.8. Origanofuran A'nın (8) Fiziksel ve Spektral Özellikleri



Şekil 4. 32. Origanofuran A (8)

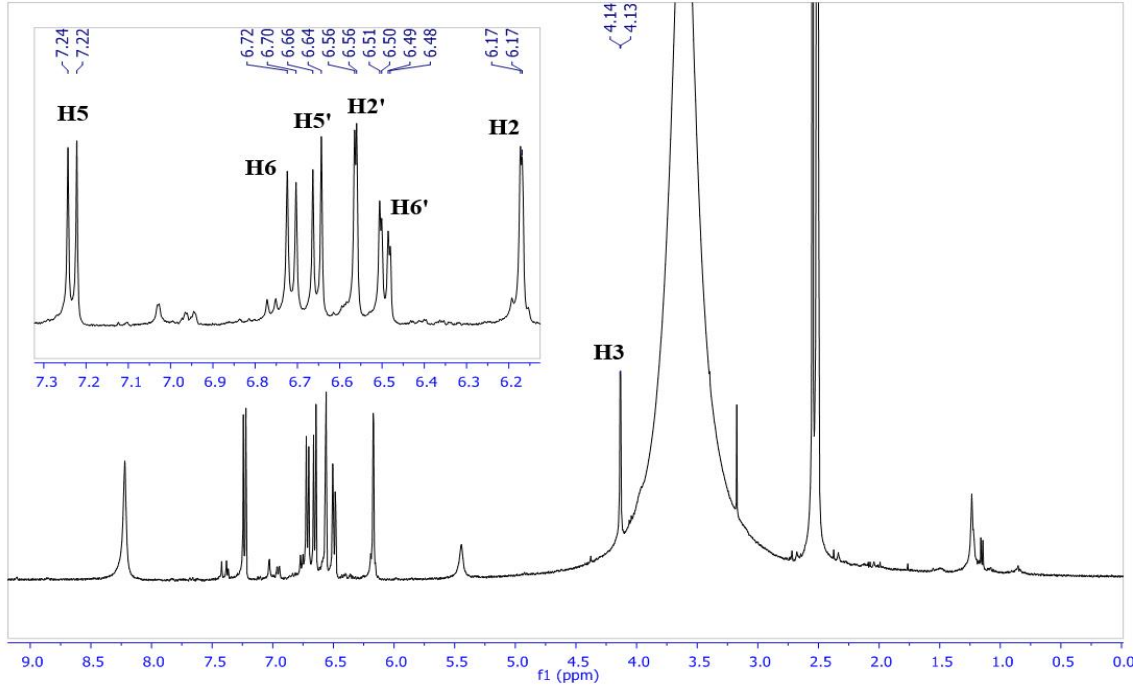
Origanofuran A (8) bileşiği (Şekil 4.32), kolon kromatografisinde %90 EtOAc-%10 MeOH çözücü sisteminde toplanan fraksiyon aralıklarının P-HPLC uygulamasında 14 mg izole edildi (Bkz. Şekil 3.3). Bileşik metanol içinde iki gün bekletilip amorf, beyaz renkte katı olarak elde edilmiştir. Origanofuran A'nın (8)  $^1\text{H-NMR}$  ve  $^{13}\text{C-NMR}$  kimyasal kayma değerleri (Çizelge 4.11) verilmiştir. Bileşiğin LC-TOF-MS spektrumunda (Şekil 4.33). (-)-ESI MS:  $m/z$  287,0592 ( $[\text{M-CO}_2]^-$ ),  $m/z$  331,0489 ( $[\text{M-H}]^-$ ) ve  $m/z$  663,1043 ( $[\text{2M-H}]^-$ ) iyon pikleri gözlenmiş ve molekül formülü  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_8$  olarak belirlenmiştir.



Şekil 4. 33. Origanofuran A'nın (8) LC-TOF-MS kromatogramı

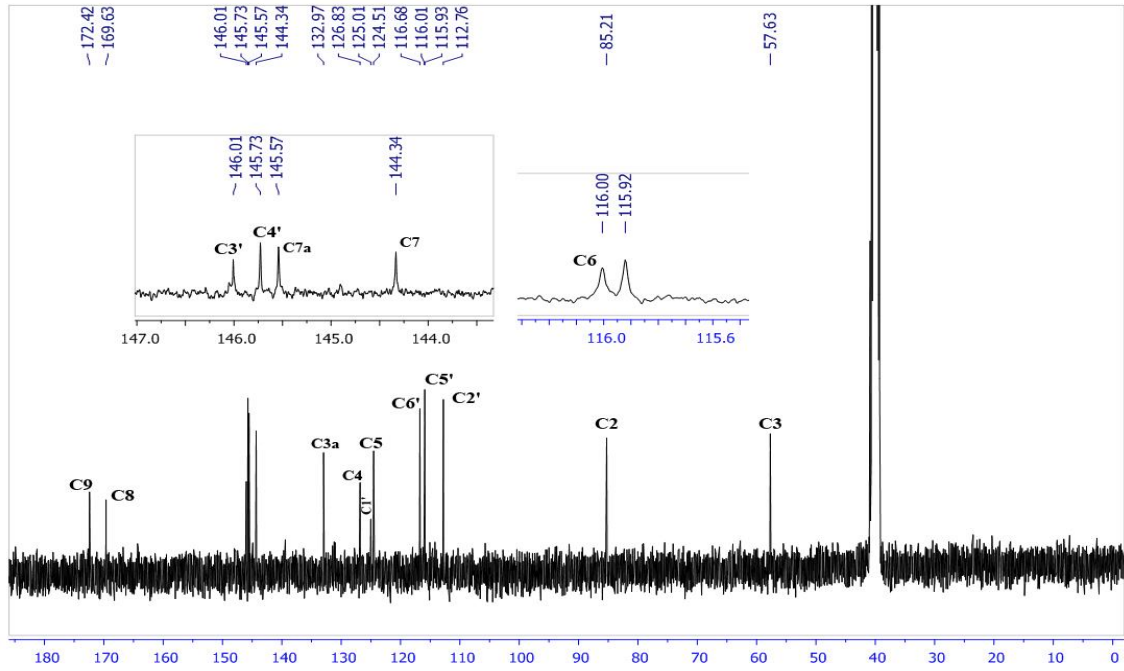
Çizelge 4. 11. Origanofuran A'nın (8)  $^1\text{H-NMR}$  ve  $^{13}\text{C-NMR}$  kimyasal kayma değerleri

Pozisyon	Origanofuran A (8)	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
<b>2</b>	6,17 (d, $J = 1,7$ Hz)	85,21
<b>3</b>	4,13 (d, $J = 1,7$ Hz)	57,63
<b>3a</b>	-	132,97
<b>4</b>	-	126,83
<b>5</b>	7,23 (d, $J = 8,4$ Hz)	124,51
<b>6</b>	6,71 (d, $J = 8,4$ Hz)	116,01
<b>7</b>	-	144,34
<b>7a</b>	-	145,57
<b>8</b>	-	169,63
<b>9</b>	-	172,42
<b>1'</b>	-	125,01
<b>2'</b>	6,56 (d, $J = 1,9$ Hz)	112,76
<b>3'</b>	-	146,01
<b>4'</b>	-	145,73
<b>5'</b>	6,65 (d, $J = 8,1$ Hz)	115,93
<b>6'</b>	6,49 (dd, $J = 8,1/1,9$ Hz)	116,68



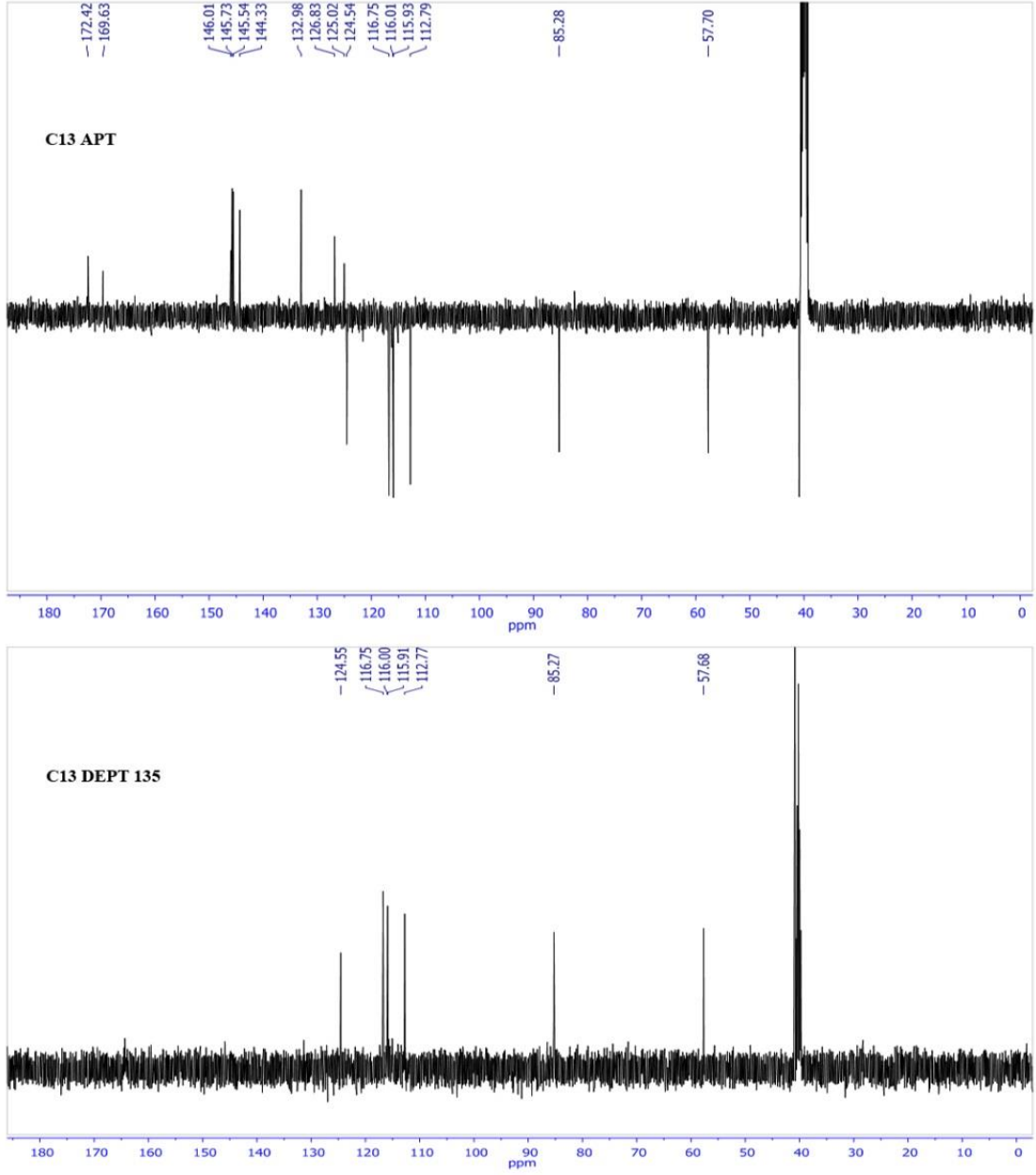
Şekil 4. 34. Origanofuran A'nın (8)  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu ( $^1\text{H-NMR}$  400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )

Origanofuran A'nın (8)  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu (Şekil 4.34) incelendiğinde,  $\delta_{\text{H}} = 6,49$  (dd,  $J = 8,1, 1,9$  Hz),  $\delta_{\text{H}} = 6,65$  (d,  $J = 8,1$  Hz) ve  $\delta_{\text{H}} = 6,56$  (d,  $J = 1,9$  Hz) ppm'de aromatik ABX sistem protonları (sırasıyla H-12, 13, 16 numaralı protonlar) di-sübstitüe aromatik halkanın varlığını göstermektedir. HETCOR analizinde (Şekil 4.37) bu protonların sırasıyla  $\delta_{\text{C}} = 116,6$ ,  $\delta_{\text{C}} = 115,9$  ve  $\delta_{\text{C}} = 112,7$  karbonlarıyla korelasyonu görülmüştür ve bu protonların  $\delta_{\text{C}} = 145,7$  ve  $\delta_{\text{C}} = 146,0$  karbonlarıyla gözlenen HMBC korelasyonu halkanın 3,4-dihidroksi sübstitüe olduğunun kanıtıdır.  $\delta_{\text{C}} = 85,21$  (C-2) karbonuna bağlı  $\delta_{\text{H}} = 6,17$  ppm'deki (d,  $J = 1,7$  Hz) ve  $\delta_{\text{C}} = 57,63$  (C-3) karbonuna bağlı 4,13 ppm'deki (d,  $J=1,7$  Hz) protonları benzofuran halkasının varlığını göstermektedir ve bu iki protonun etkileşme sabitlerinin küçük olmasından dolayı birbirlerine göre trans konumunda olduğu belirlenmiştir. Bu protonların her ikisi de  $\delta_{\text{C}} = 172,4$  (C-9) karbonu ile HMBC korelasyonu (Şekil 4.39), 3 numaralı karbonda karboksilik asit grubunun bağlı olduğunu gösterir.  $\delta_{\text{H}} = 7,23$  (d,  $J = 8,4$  Hz) ve  $\delta_{\text{H}} = 6,71$  (d,  $J = 8,4$  Hz) ppm'de gözlenen sinyaller orto sübstitüe aromatik halkanın varlığını ortaya koymaktadır. Bu protonların  $\delta_{\text{C}} = 144,3$  (C-7) karbonuyla HMBC korelasyonu, halkaya 7 konumundan hidroksi grubunun bağlı olduğunu ve  $\delta_{\text{H}} = 7,23$  protonunun  $\delta_{\text{C}} = 169,6$  karbonuyla etkileşmesi 4 konumuna karboksilik asit grubunun bağlı olduğunu göstermektedir.



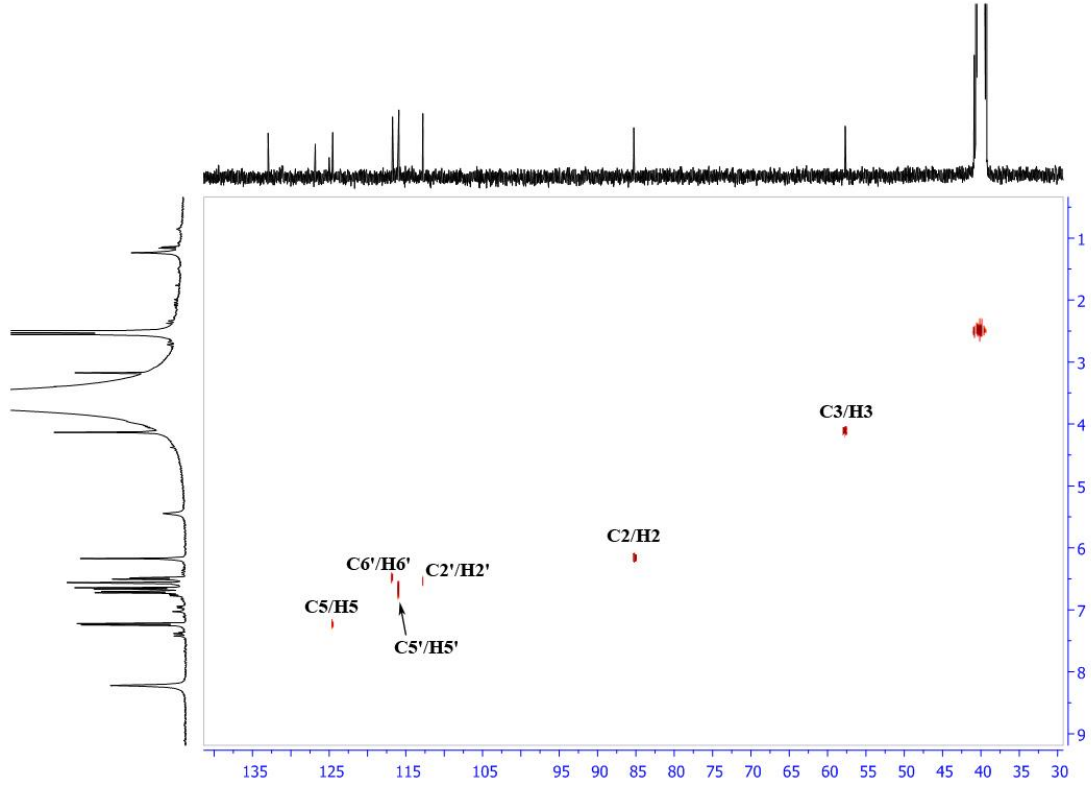
Şekil 4. 35. Origanofuran A'nın (8) <sup>13</sup>C-NMR spektrumu (100 MHz DMSO-d<sub>6</sub>)

Origanofuran A'nın (8) <sup>13</sup>C-NMR spektrumu (Şekil 4.35) incelendiğinde, <sup>13</sup>C-NMR spektrumu incelendiğinde iki fenil halkası üzerinde -OH grupları ile süstitüe olmuş üç tane C atomu bulunmuştur. Bu karbonlar  $\delta_C = 144,3$  (C-7),  $145,7$  (C- 4'),  $146,0$  (C-3')'de sinyaller vermiştir. İki tane karbonil karbonu  $\delta_C = 172,4$  (C-9),  $169,6$  (C-8) ppm'de, bir tane de estere komşu karbon atomu  $\delta_C = 85,2$  (C-2) ppm'de gözlenmiştir.



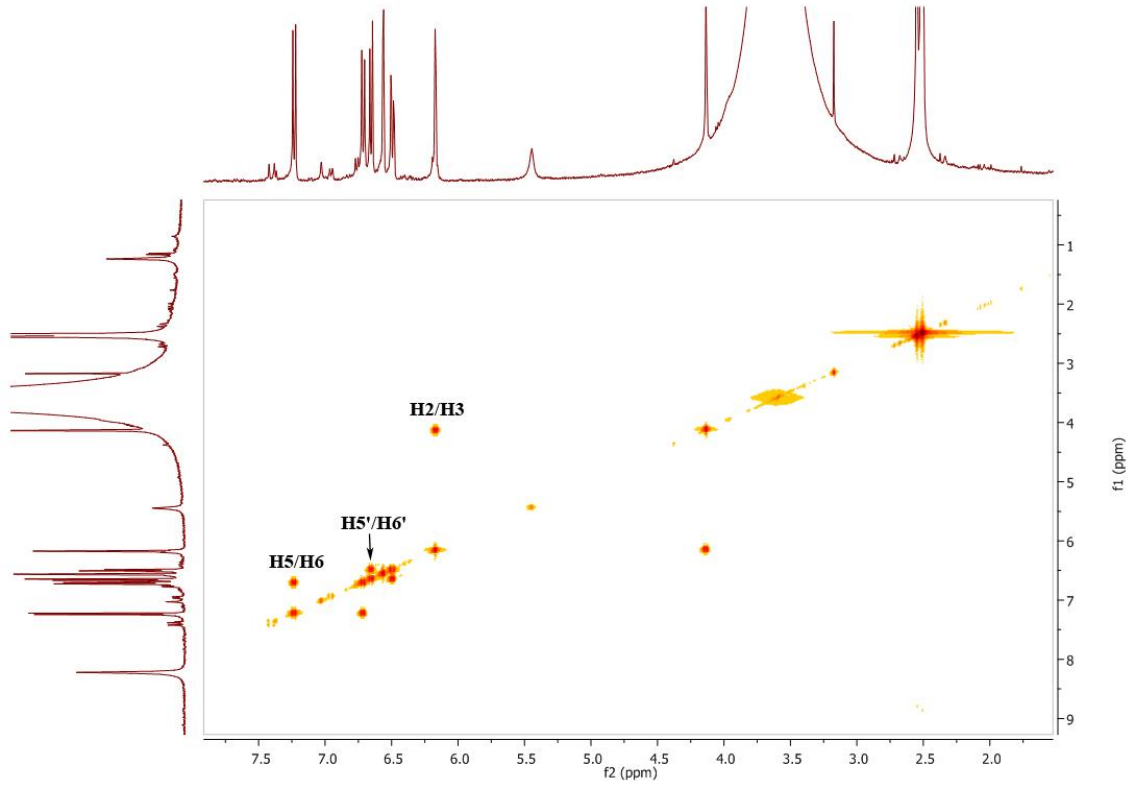
Şekil 4. 36. Origanofuran A'nın (8) APT ve DEPT135 (<sup>13</sup>C-NMR100 MHz DMSO-d<sub>6</sub>) spektrumu

Origanofuran A'ya (8) ait APT ve DEPT-135 spektrumları (Şekil 4.36) incelendiğinde yapıda 16 karbon atomu olduğu görülmektedir. 16 karbondan 9 tanesi kuaterner karbonu (DEPT-135 spektrumlarında sinyal vermeyen kısım), 7 tanesi metin karbonu (DEPT-135 spektrumunda pozitif sinyal), içerdiği tespit edilmiştir.



Şekil 4. 37. Origanofuran A'nın (8) HETCOR spektrumu ( $^1\text{H-NMR}$  400 MHz,  $^{13}\text{C-NMR}$  100 MHz DMSO- $d_6$ )

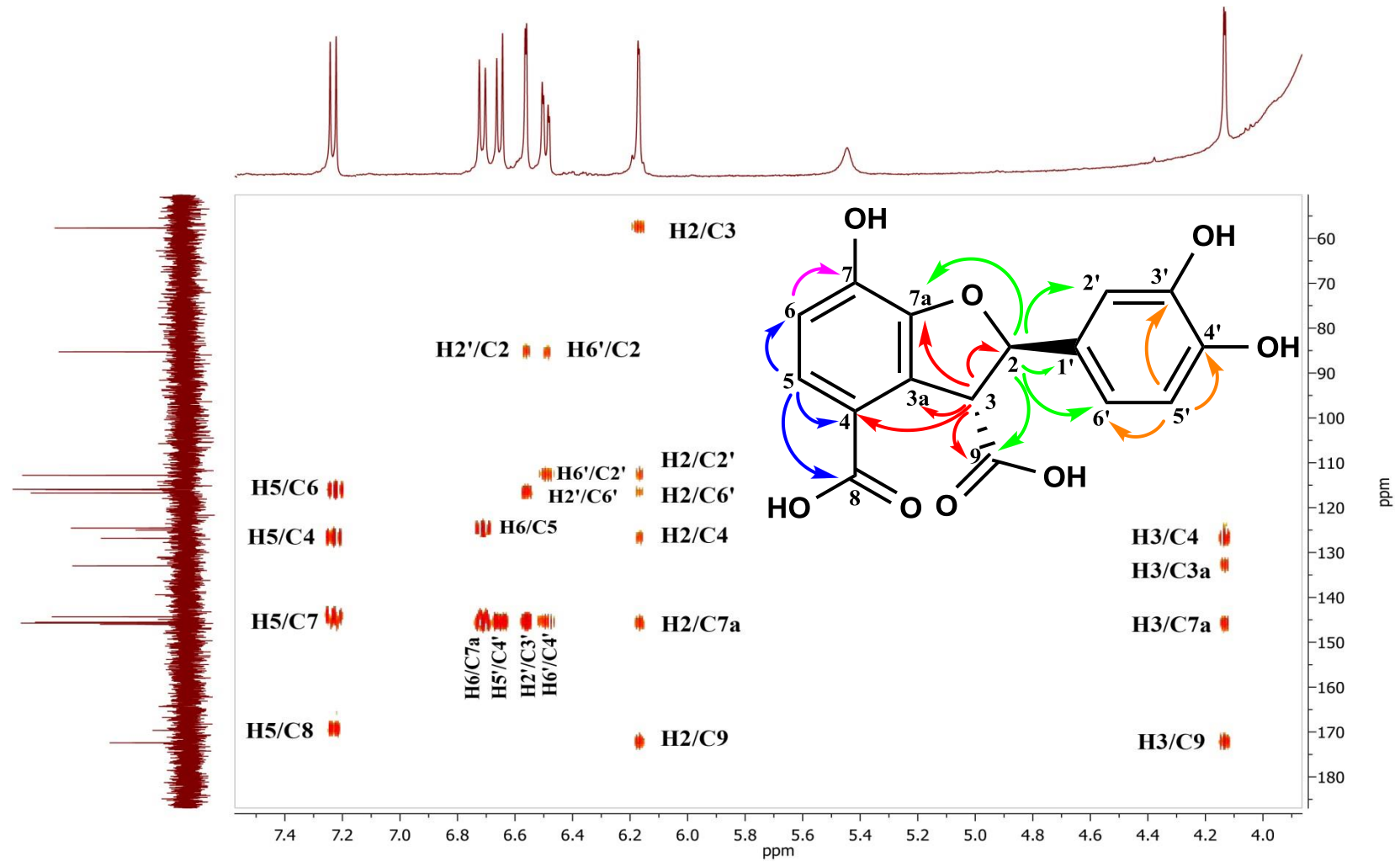
HETCOR spektrumunda, bileşikteki proton karbon eşleşmeleri tespit edilmektedir. Origanofuran A'nın (8) HETCOR spektrumunda (Şekil 4.37), görüldüğü gibi, benzofuran halkasındaki C-3 ( $\delta_{\text{C}} = 57,6$ ) karbonunun  $\delta_{\text{H}} = 4,13$  protonuyla, C-2 ( $\delta_{\text{C}} = 85,2$ ) karbonunun  $\delta_{\text{H}} = 6,17$  protonuyla korele olduğu ve 3,4-dihidroksi süstitüe olan benzen halkasındaki C-2' ( $\delta_{\text{C}} = 112,7$ ) karbonunun  $\delta_{\text{H}} = 6,56$  ppm'deki protonla, C-6' ( $\delta_{\text{C}} = 116,6$ ) karbonunun  $\delta_{\text{H}} = 6,49$  ppm'deki protonla, C-5' ( $\delta_{\text{C}} = 115,93$ ) karbonunun  $\delta_{\text{H}} = 6,65$  ppm'deki protonla ve C-5 ( $\delta_{\text{C}} = 124,51$ ) karbonunun  $\delta_{\text{H}} = 7,23$  ppm'deki protonla etkileştiği belirlenmiştir.



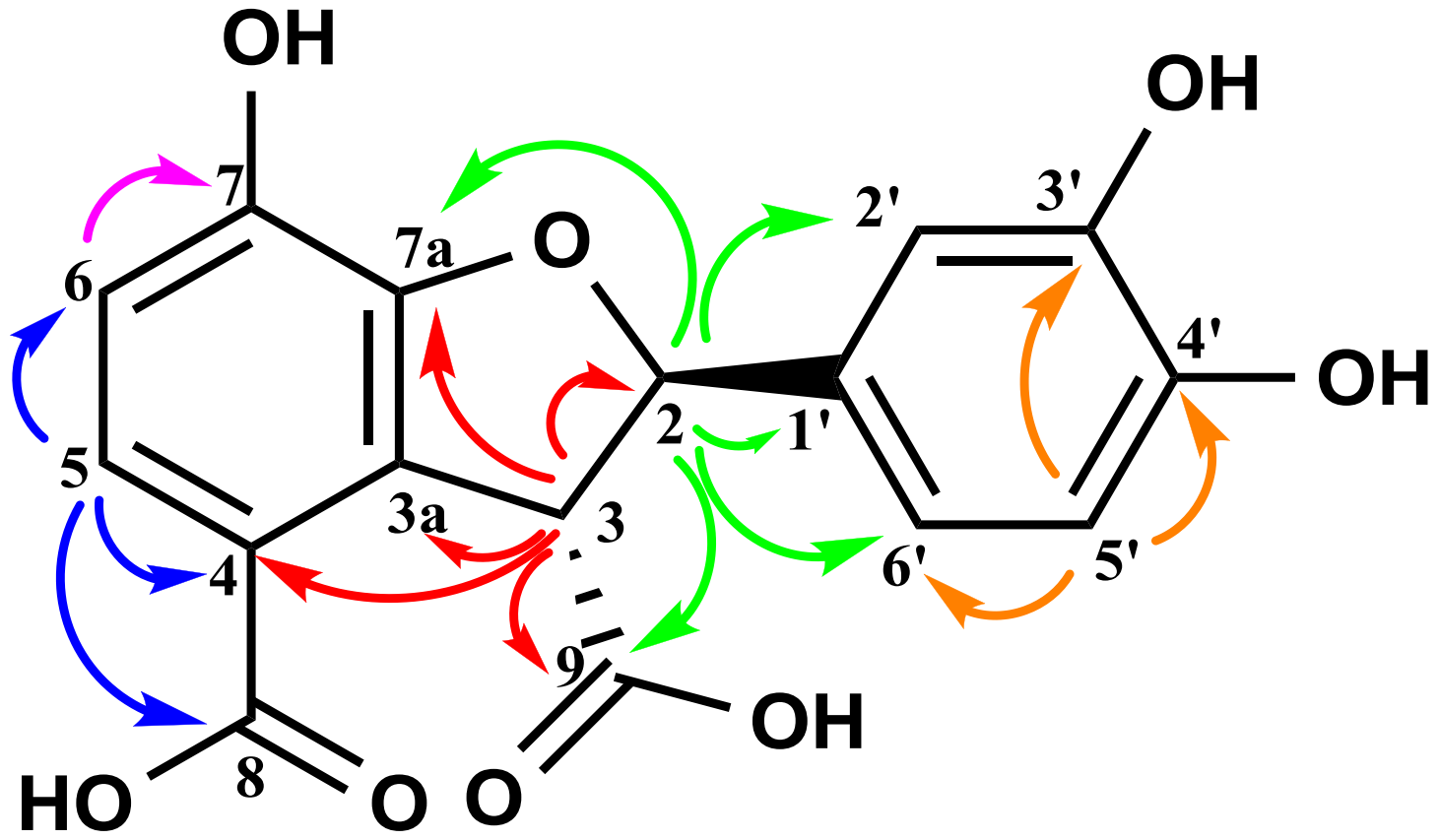
Şekil 4. 38. Origanofuran A'nın (8) COSY spektrumu ( $^1\text{H-NMR}$  400 MHz DMSO- $d_6$ )

Origanofuran A'nın (8) COSY (proton-proton etkileşimleri) spektrumu (Şekil 4.38) incelendiğinde benzofuran halkasındaki H-2 ( $\delta_{\text{H}} = 6,17$ ) protonunun H-3 ( $\delta_{\text{H}} = 4,13$ ) protonuyla, H-5' ( $\delta_{\text{H}} = 6,65$ ) protonunun H-6' protonuyla ve H-5 ( $\delta_{\text{H}} = 7,23$ ) protonuyla etkileştiği görülmektedir.

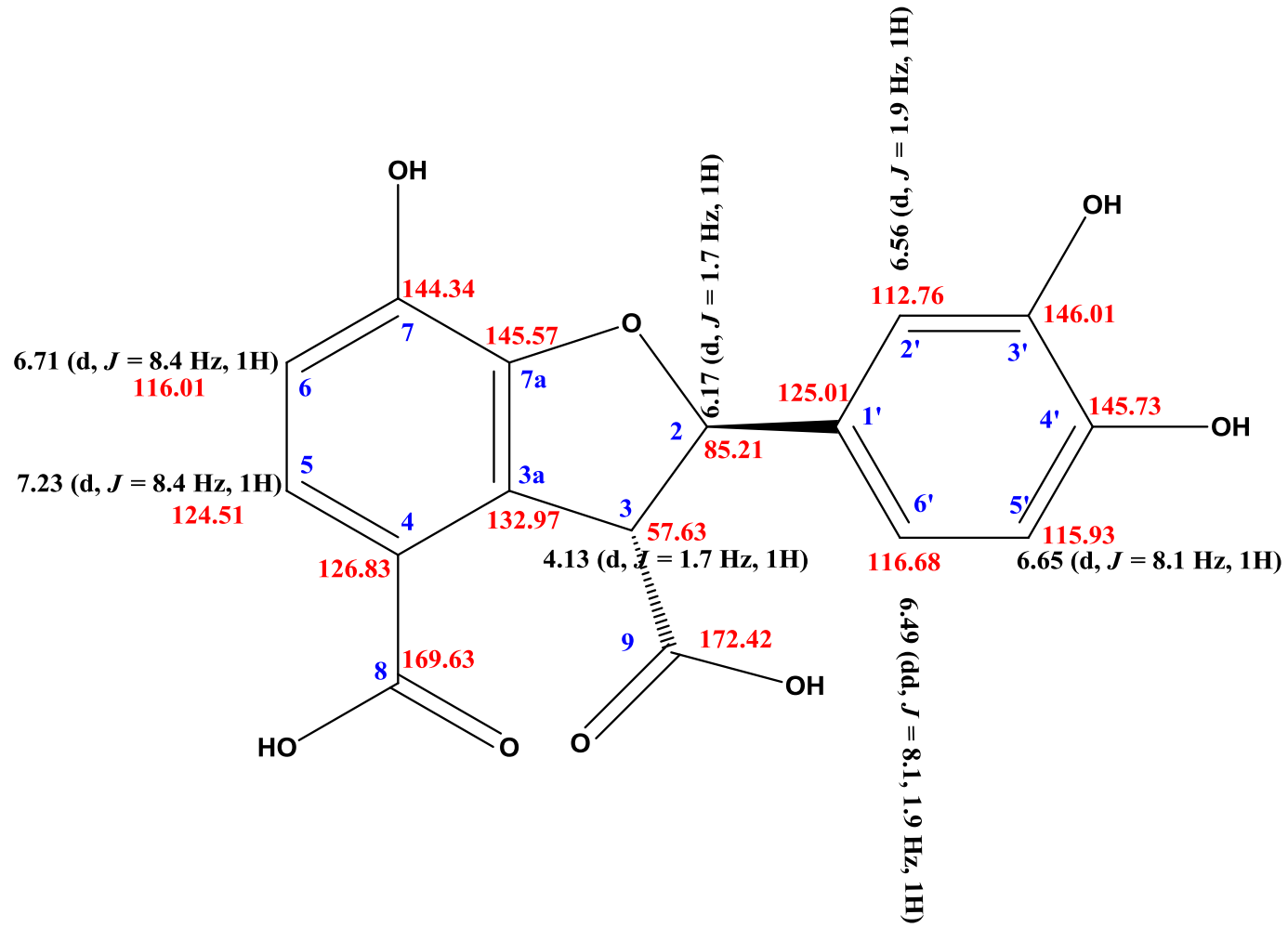
Origanofuran A'ya (8) ait HMBC spektrumu ve HMBC korelasyonları (Şekil 4.39 ve 4.40) aşağıda verilmiştir. Tüm etkileşimler, molekülün yapısının doğruluğunu desteklemekte ve özellikle karbonil gruplarının konumlarını, 3,4-dihidroksi sübstütie benzen halkasının benzofuran grubuna 2 konumundan bağlandığını göstermesi gibi önemli bilgiler sağlamıştır.



Şekil 4. 39. Origanofuran A'nın (8) HMBC spektrumu ( $^{13}\text{C}$ -NMR100 MHz DMSO- $\text{d}_6$ )

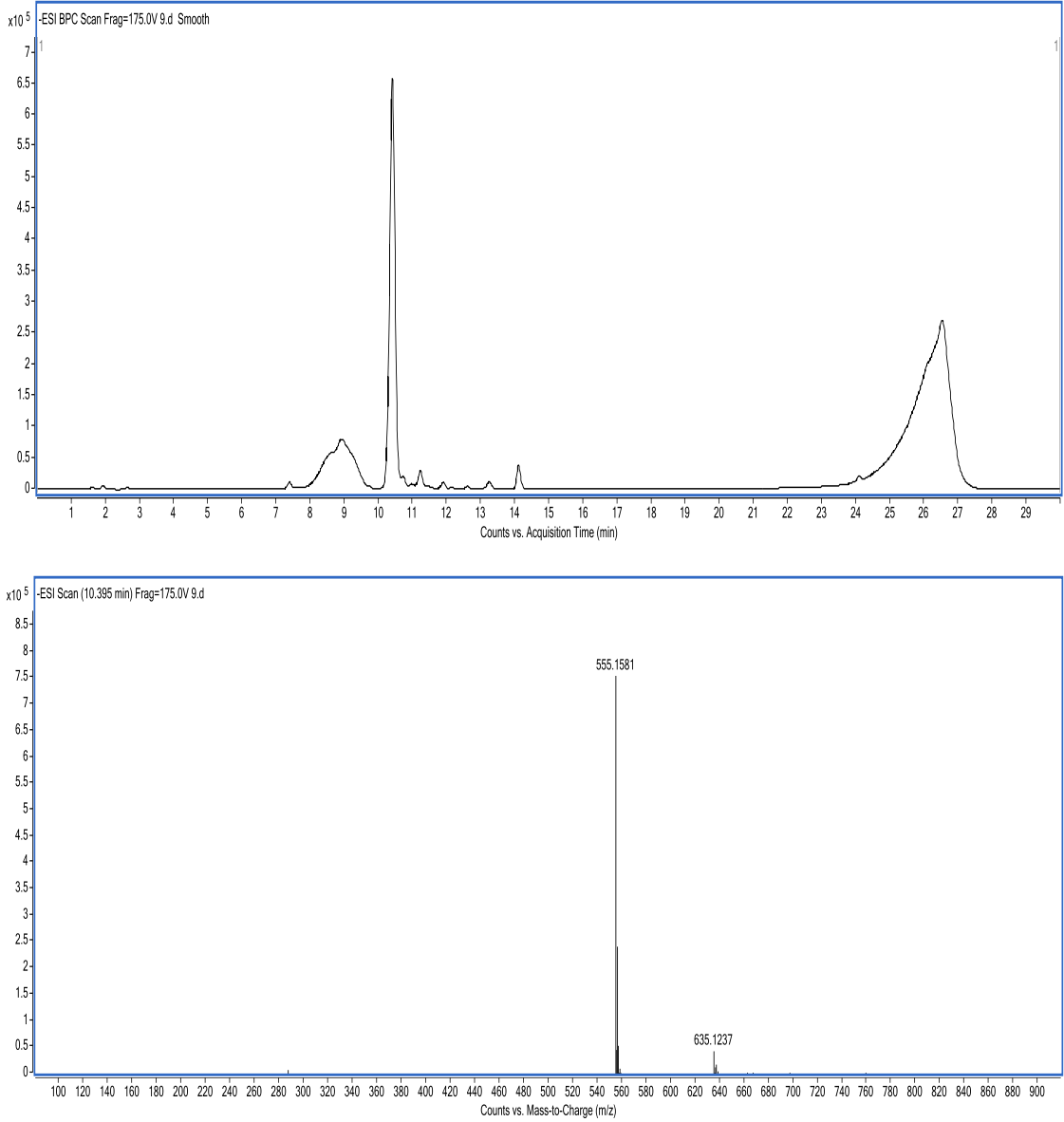


Şekil 4. 40. Origanofuran A'nın (8) HMBC korelasyonları



Şekil 4. 41. Origanofuran A'nın (8)  $\delta_C$ ,  $\delta_H$  ve etkileşme sabiti değerleri



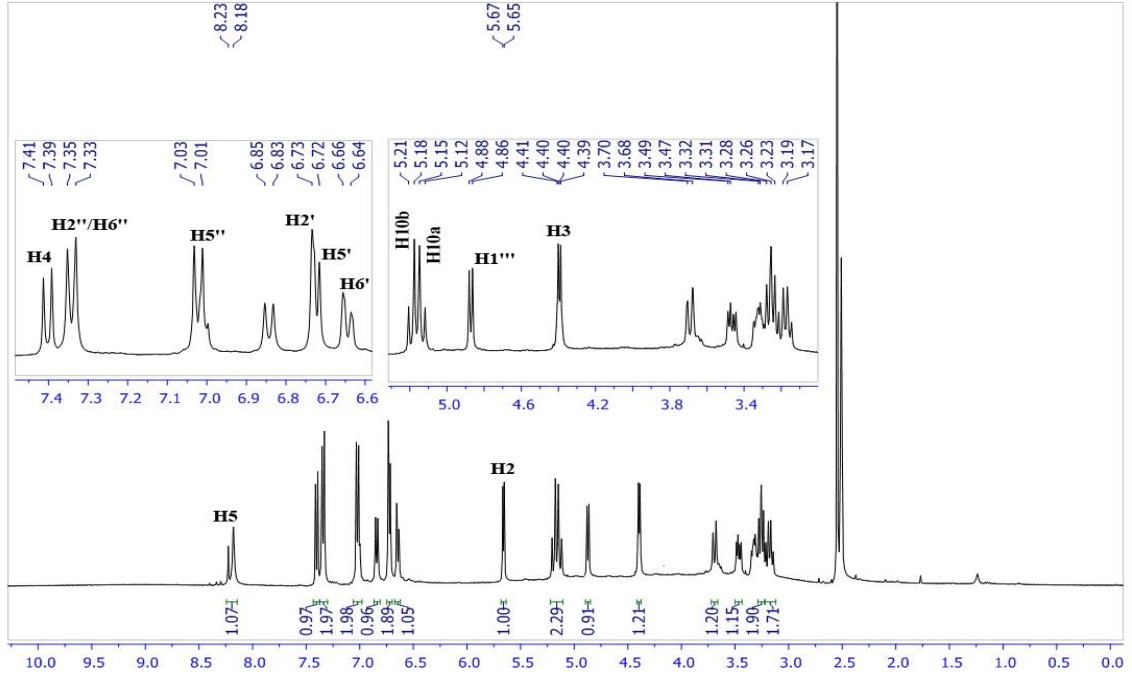


Şekil 4. 43. Origanofuran B'nin (9) LC-TOF-MS kromatogramı

Origanofuran B'nin (9) LC-TOF-MS spektrumunda (Şekil 4.43) (-)-ESI MS: m/z 555,1581 ( $[M-COOH]^-$ ) ve m/z 635,1237 ( $[M+Cl]^-$ ) iyon pikleri gözlenmiş ve molekül formülü  $C_{29}H_{28}O_{14}$  olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4. 12. Origanofuran B'nin (9) <sup>1</sup>H-NMR ve <sup>13</sup>C-NMR kimyasal kayma değerleri

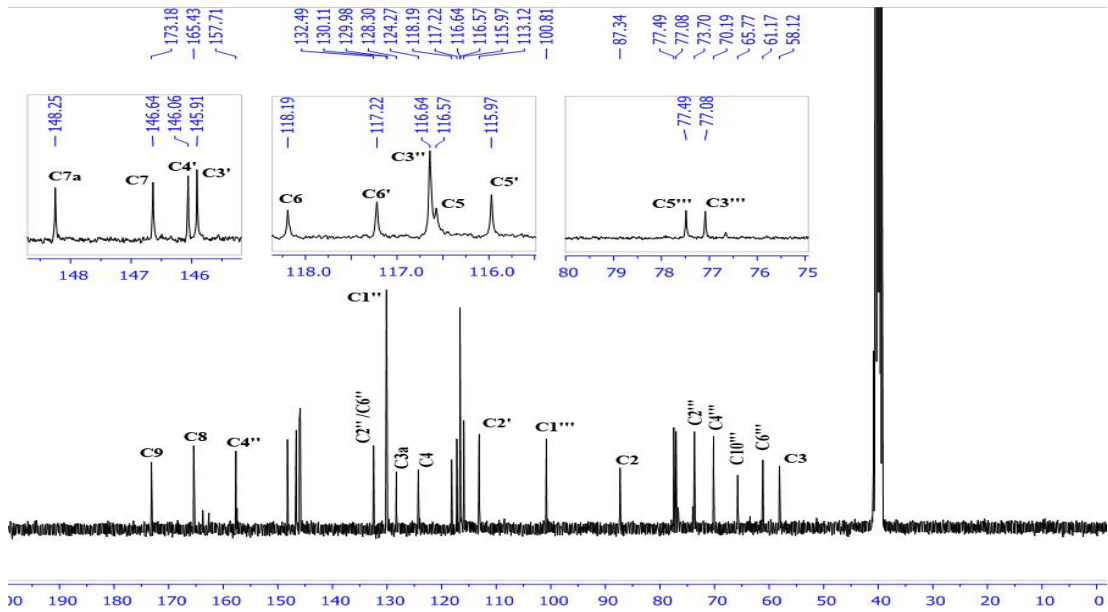
Pozisyon	Origanofuran B (9)	
	$\delta_H$	$\delta_C$
<b>2</b>	5,65 (d, $J = 5,3$ Hz)	87,33
<b>3</b>	4,39 (d, $J = 5,3$ Hz)	58,12
<b>3a</b>	-	128,30
<b>4</b>	7,39 (d, $J = 8,4$ Hz)	124,27
<b>5</b>	6,81 (d, $J = 8,4$ Hz)	116,57
<b>6</b>	-	118,19
<b>7</b>	-	146,64
<b>7a</b>	-	148,25
<b>8</b>	-	165,44
<b>9</b>	-	173,18
<b>10a</b>	5,13 (d, $J = 12,2$ Hz)	65,77
<b>10b</b>	5,19 (d, $J = 12,2$ Hz)	65,77
<b>1'</b>	-	132,49
<b>2'</b>	6,74 (d, $J = 2,2$ Hz)	113,12
<b>3'</b>	-	145,91
<b>4'</b>	-	146,06
<b>5'</b>	6,72 (d, $J = 8,1$ Hz)	115,97
<b>6'</b>	6,64 (d, $J = 8,1$ Hz)	117,22
<b>1''</b>	-	129,98
<b>2''</b>	7,33 (d, $J = 8,5$ Hz)	130,11
<b>3''</b>	7,03 (d, $J = 8,5$ Hz)	116,64
<b>4''</b>	-	157,71
<b>5''</b>	7,03 (d, $J = 8,5$ Hz)	116,64
<b>6''</b>	7,33 (d, $J = 8,5$ Hz)	130,11
<b>1'''</b>	4,87 (d, $J = 7,3$ Hz)	100,81
<b>2'''</b>	3,23 (m)	73,70
<b>3'''</b>	3,27 (m)	77,09
<b>4'''</b>	3,16 (m)	70,19
<b>5'''</b>	3,31 (m)	77,49
<b>6'''a</b>	3,48 (m)	61,17
<b>6'''b</b>	3,66 (m)	61,17



Şekil 4. 44. Origanofuran B'nin (9)  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )

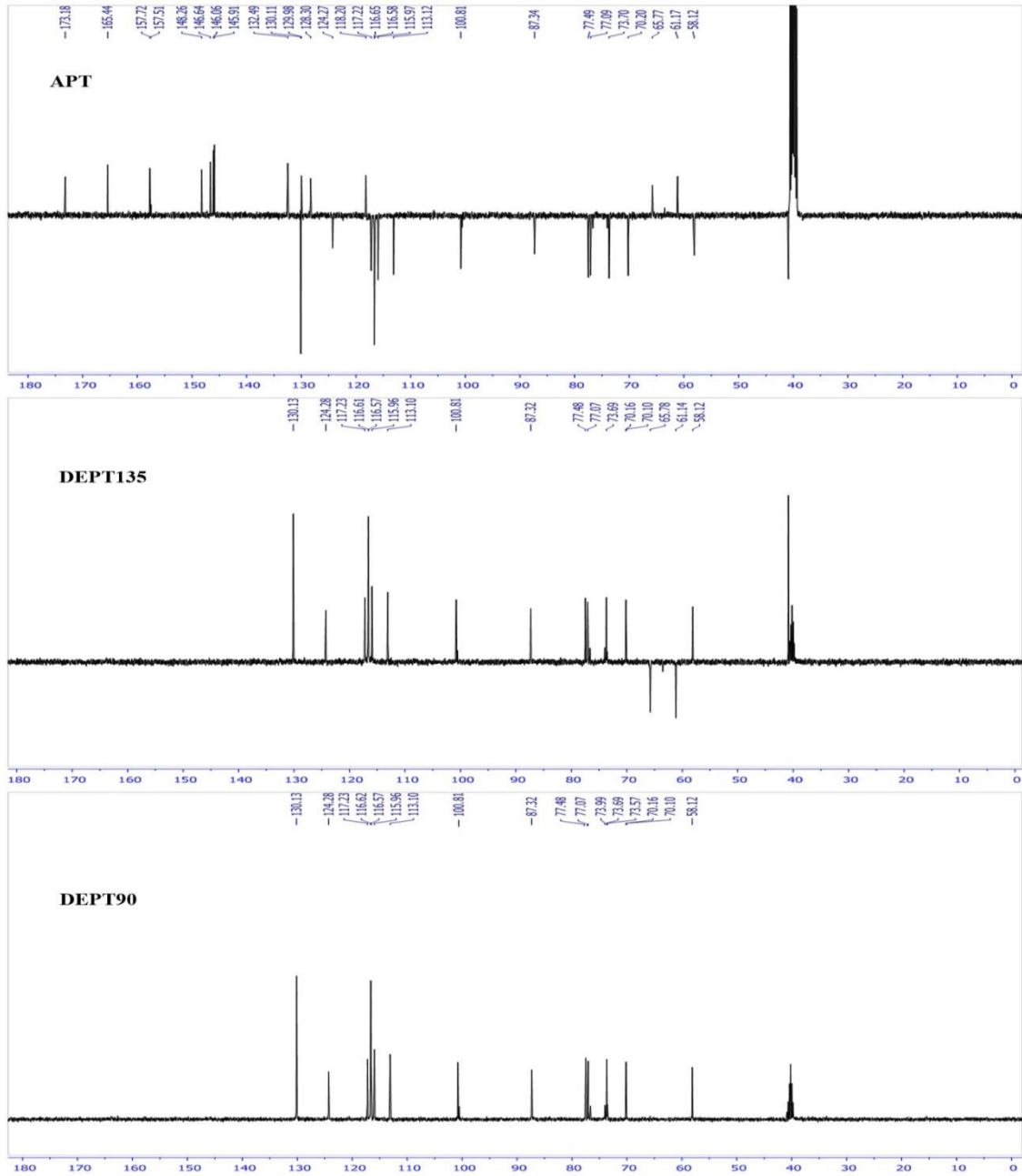
Origanofuran B'nin (9)  $^1\text{H-NMR}$  ve  $^{13}\text{C-NMR}$  kimyasal kayma değerleri (Çizelge 4.12) ve  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu (Şekil 4.44) incelendiğinde,  $\delta_{\text{H}} = 6,64$  (dd,  $J = 8,1/2,2$  Hz),  $\delta_{\text{H}} = 6,72$  (d,  $J = 8,1$  Hz) ve  $\delta_{\text{H}} = 6,74$  (d,  $J = 2,2$  Hz) ppm'de aromatik ABX sistem protonları (sırasıyla H-6', 5', 2' numaralı protonlar) di-süstitüe aromatik halkanın varlığını göstermektedir. HETCOR analizinde (Şekil 4.47) bu protonların sırasıyla  $\delta_{\text{C}} = 117,2$ ,  $\delta_{\text{C}} = 115,9$  ve  $\delta_{\text{C}} = 113,1$  karbonlarıyla korelasyonu görülmüştür ve bu protonların  $\delta_{\text{C}} = 145,7$  ve  $\delta_{\text{C}} = 146,0$  karbonlarıyla gözlenen HMBC korelasyonu (Şekil 4.49) halkanın 3,4-dihidroksi süstitüe olduğunun kanıtıdır.  $\delta_{\text{C}} = 87,3$  (C-2) karbonuna bağlı  $\delta_{\text{H}} = 6,17$  (d,  $J = 1,7$  Hz) ve  $\delta_{\text{C}} = 58,1$  (C-3) karbonuna bağlı  $\delta_{\text{H}} = 4,39$  (d,  $J = 5,3$  Hz) protonları benzofuran halkasının varlığını göstermektedir ve bu iki protonun etkileşme sabitlerinin büyük olmasından dolayı birbirlerine göre cis konumunda olduğu belirlenmiş ve literatürle desteklenmiştir (Yan ve ark., 2004). Bu protonların her ikisinin de HMBC korelasyonu, 3 numaralı karbona ( $\delta_{\text{C}} = 173,1$  karbonu ile) karboksilik asit grubunun bağlı olduğunu doğrulamaktadır.  $\delta_{\text{H}} = 7,39$  (d,  $J = 8,4$  Hz) ve  $\delta_{\text{H}} = 6,81$  (d,  $J = 8,4$  Hz) ppm'de gözlenen sinyaller orto süstitüe aromatik halkanın varlığını ortaya koymaktadır. Bu protonların  $\delta_{\text{C}} = 146,6$  karbonuyla HMBC korelasyonu, halkaya 7 konumundan hidroksi grubunun bağlı olduğunu ve  $\delta_{\text{H}} = 6,81$  protonunun  $\delta_{\text{C}} = 165,4$  karbonuyla etkileşmesi 6 konumuna karboksil grubunun bağlı olduğunu göstermektedir.

Bileşiğin  $^1\text{H}$  spektrumunda görülen  $\delta_{\text{H}} = 7,33$  (d,  $J = 8,5$  Hz) ve  $\delta_{\text{H}} = 7,03$  (d,  $J = 8,5$  Hz) proton sinyalleri, yapıda başka bir aromatik halkanın varlığını göstermektedir. HMBC spektrumunda  $\delta_{\text{H}} = 5,13$  (d,  $J = 12,2$  Hz) ve  $\delta_{\text{H}} = 5,19$  (d,  $J = 12,2$  Hz) protonlarının  $\delta_{\text{C}} = 165,4$  (C-10 karbonunu), (C-8) ile etkileştiği belirlenmesiyle (-OH kısmından) bağ yaptığı ve yine bu protonların  $\delta_{\text{C}} = 129,9$  (C-1'') karbonuyla etkileşmesiyle aromatik halkaya C-1'' konumundan bağlı olduğu belirlenmiştir. Bileşiğin  $^1\text{H}$  spektrumunda 3-5 ppm aralığında görülen sinyaller yapıda bir şeker grubunun olduğunu göstermektedir. HMBC spektrumuna bakıldığında şekerin anomerik protonunun  $\delta_{\text{H}} = 4,87$  (d,  $J = 7,3$  Hz),  $\delta_{\text{C}} = 157,7$  (C-4'') karbonuyla korele olduğu belirlenmiş ve aromatik halkaya C-4'' konumundan bağlı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca anomerik protonun  $J = 7,3$  Hz'lik etkileşimine sahip olması şekerin konfügrasyonunun trans-diaksiyal ( $\beta$ -konfügrasyon) olduğunu gösterir.



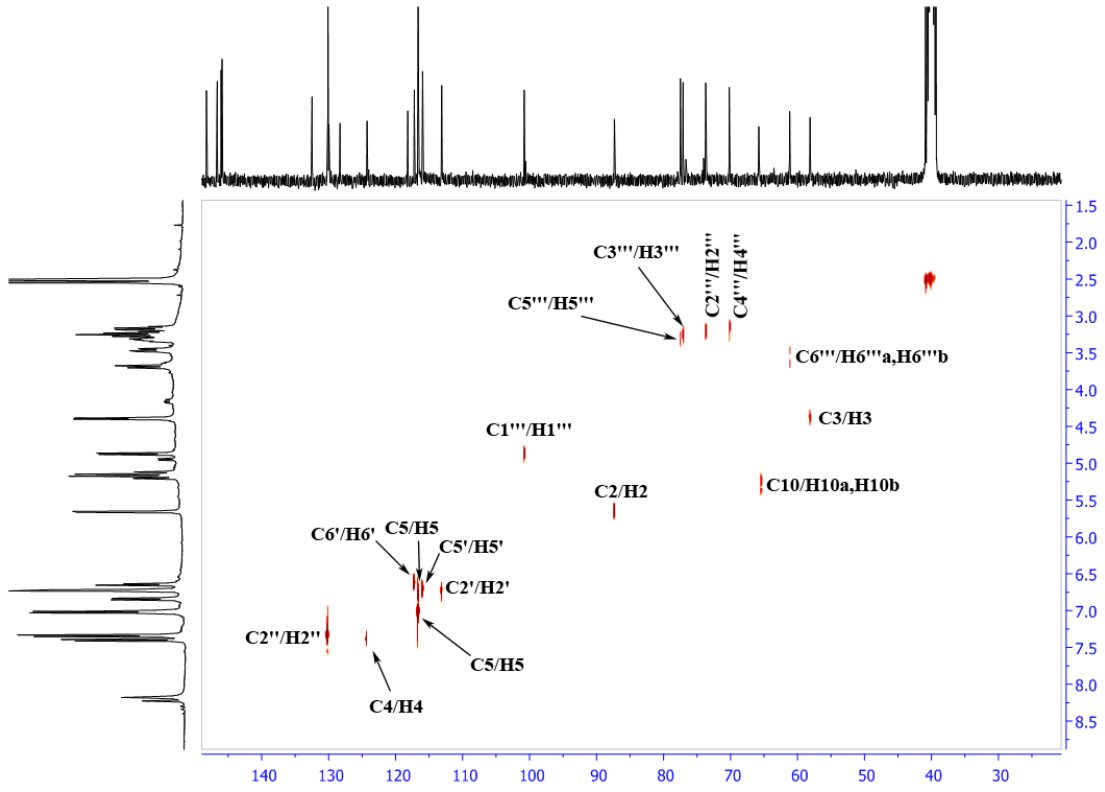
Şekil 4. 45. Origanofuran B'nin (9)  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu (100 MHz  $\text{DMSO-d}_6$ )

Origanofuran B'nin (9)  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu (Şekil 4.45) incelendiğinde,  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu incelendiğinde iki fenil halkası üzerinde -OH grupları ile süstitüe olmuş üç tane C atomu bulunmuştur. Bu karbonlar  $\delta_{\text{C}} = 146,6$  (C-1), 145,9 (C-26), 146,1 (C-26)'de sinyaller vermiştir. İki tane karbonil karbonu  $\delta_{\text{C}} = 165,4$  (C-7), 173,2 (C-21) ppm'de, bir tane de estere komşu karbon atomu  $\delta_{\text{C}} = 87,3$  (C-23) ppm'de gözlenmiştir. Bulgular, literatürler ile desteklenmiştir.



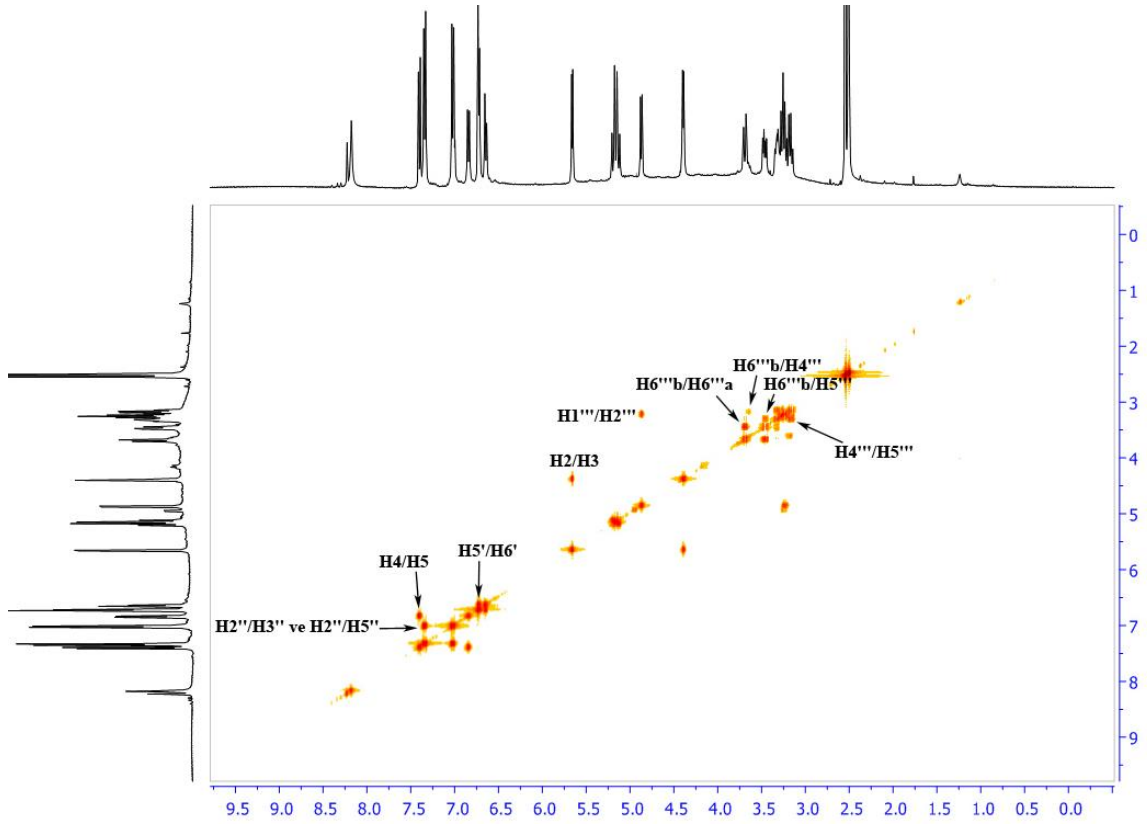
Şekil 4. 46. Origanofuran B'nin (9) APT, DEPT-135 ve DEPT90 ( $^{13}\text{C}$ -NMR100 MHz DMSO- $\text{d}_6$ ) spektrumu

Origanofuran B'ye (9) ait APT, DEPT-135 ve DEPT-90 spektrumları (Şekil 4.46) incelendiğinde yapıda 29 karbon atomu olduğu görülmektedir. 29 karbondan 10 tanesi kuaterner karbon (DEPT-135 spektrumlarında sinyal vermeyen kısım), 17 adet  $-\text{CH}$  (DEPT-135 spektrumunda pozitif sinyaller) ( $\text{C}-3''$ ,  $5''$  ve  $\text{C}-2''$ ,  $\text{C}-6''$  simetrik karbonlar) ve 2 adet  $-\text{CH}_2$  (DEPT-135 spektrumunda negatif sinyaller) karbonu içerdiği tespit edilmiştir.



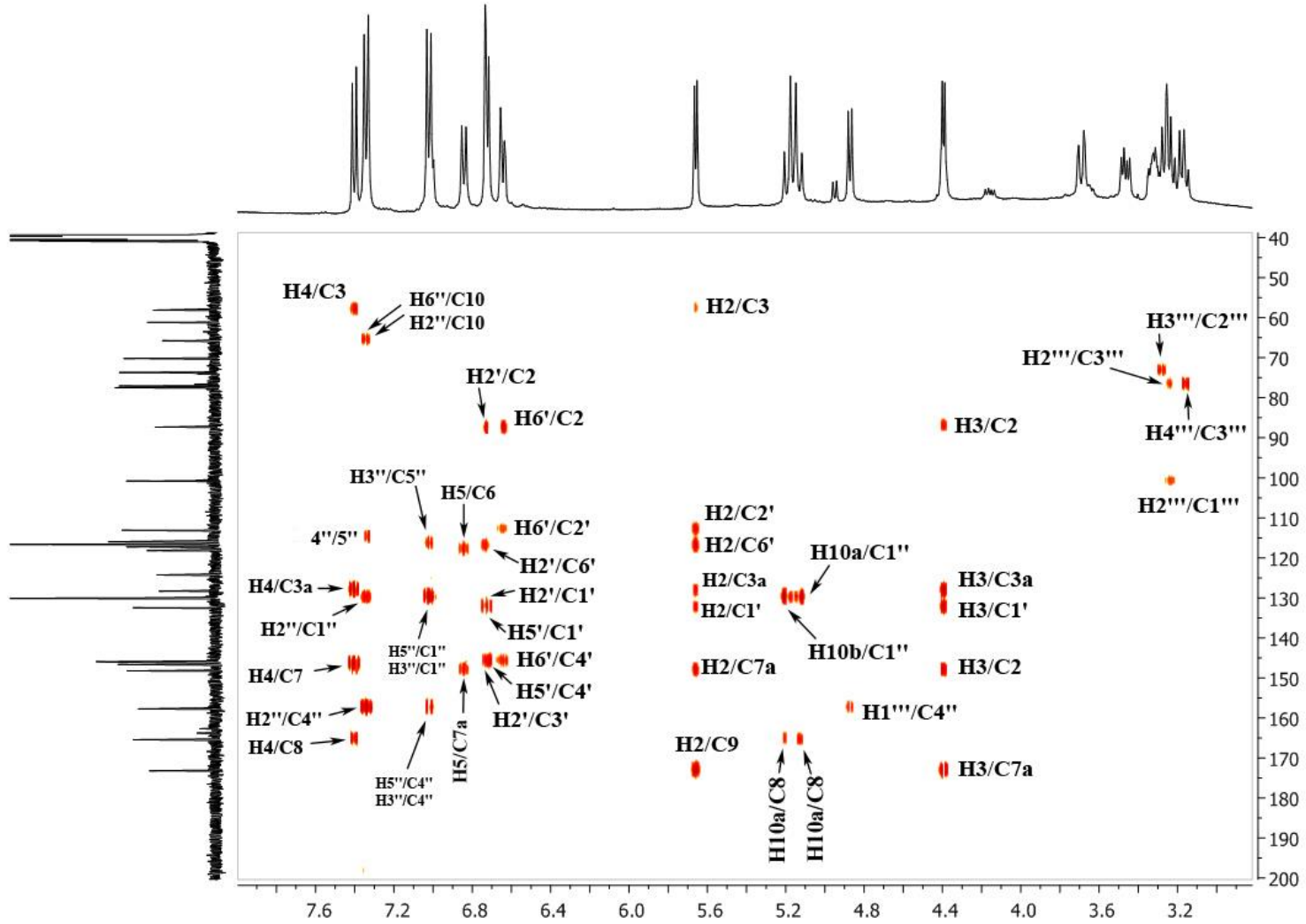
Şekil 4. 47. Origanofuran B'nin (9) HETCOR spektrumu ( $^1\text{H-NMR}$  400 MHz,  $^{13}\text{C-NMR}$  100 MHz DMSO- $d_6$ )

Origanofuran B'nin (9) HETCOR spektrumunda (Şekil 4.47) görüldüğü gibi, benzofuran halkasındaki C-5 ( $\delta_{\text{C}} = 116,5$ ) karbonunun  $\delta_{\text{H}} = 6,81$  protonuyla, C-4 ( $\delta_{\text{C}} = 124,2$ ) karbonunun  $\delta_{\text{H}} = 7,39$  protonuyla C-3 ( $\delta_{\text{C}} = 58,1$ ) karbonunun  $\delta_{\text{H}} = 4,39$  protonuyla, C-2 ( $\delta_{\text{C}} = 87,3$ ) karbonunun  $\delta_{\text{H}} = 5,65$  protonuyla korele olduğu ve 3,4-dihidroksi süstitüe olan benzen halkasındaki C-2' ( $\delta_{\text{C}} = 113,1$ ) karbonunun  $\delta_{\text{H}} = 6,7$  protonuyla, C-6' ( $\delta_{\text{C}} = 117,2$ ) karbonunun  $\delta_{\text{H}} = 6,64$  protonuyla, C-5' ( $\delta_{\text{C}} = 115,9$ ) karbonunun  $\delta_{\text{H}} = 6,72$  protonuyla korele olduğu, C-10 ( $\delta_{\text{C}} = 65,7$ ) karbonunun  $\delta_{\text{H}} = 5,13/5,19$  protonlarıyla etkileştikleri, şeker protonlarından C-1''' ( $\delta_{\text{C}} = 100,8$ ) karbonunun  $\delta_{\text{H}} = 4,87$  protonuyla, 2''' ( $\delta_{\text{C}} = 73,7$ ) karbonunun  $\delta_{\text{H}} = 3,23$  protonuyla, 3''' ( $\delta_{\text{C}} = 77,1$ ) karbonunun  $\delta_{\text{H}} = 3,27$  protonuyla, 4''' ( $\delta_{\text{C}} = 70,2$ ) karbonunun  $\delta_{\text{H}} = 3,16$  protonuyla, 5''' ( $\delta_{\text{C}} = 77,5$ ) karbonunun  $\delta_{\text{H}} = 3,31$  protonuyla, 6''' ( $\delta_{\text{C}} = 61,1$ ) karbonunun  $\delta_{\text{H}} = 3,48/3,66$  protonlarıyla etkileştiği belirlenmiştir.

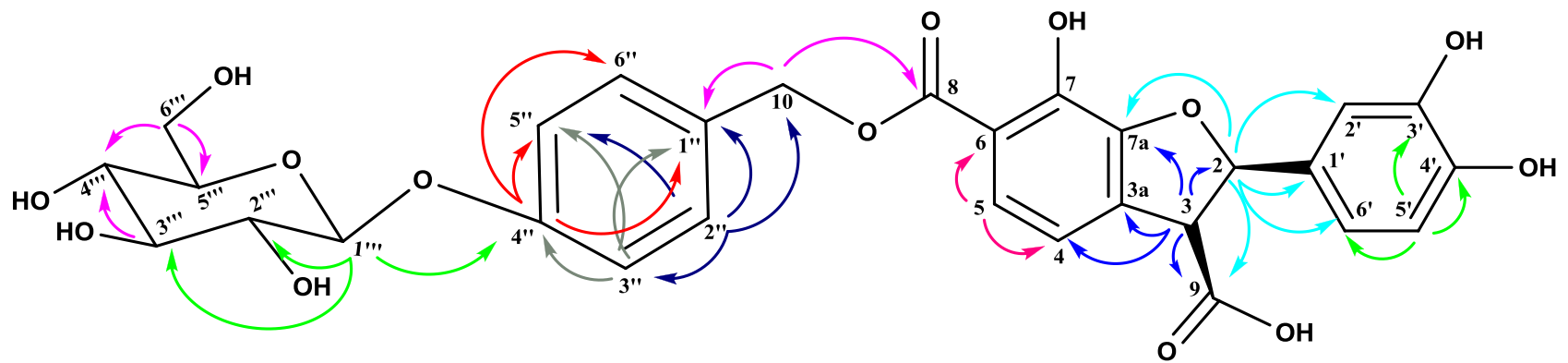


Şekil 4. 48. Origanofuran B'nin (9) COSY spektrumu ( $^{13}\text{C-NMR}$ 100 MHz DMSO- $d_6$ )

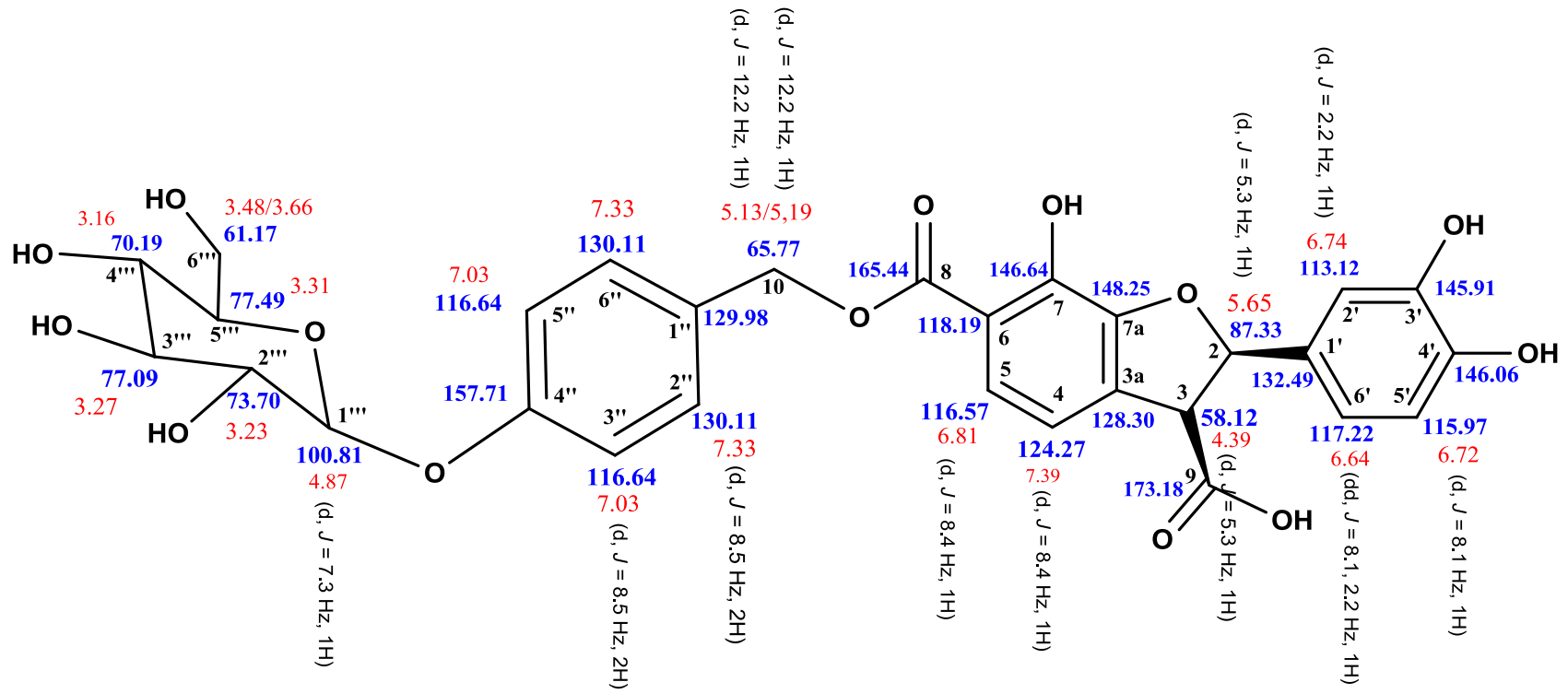
Origanofuran B'nin (9) COSY spektrumu (Şekil 4.48) (proton-proton etkileşmeleri) incelendiğinde benzofuran halkasındaki H-2 ( $\delta_{\text{H}} = 5,65$  ppm) protonunun H-3 ( $\delta_{\text{H}} = 4,39$  ppm) protonuyla, H-4 ( $\delta_{\text{H}} = 7,39$  ppm) protonunun H-5 ( $\delta_{\text{H}} = 6,81$  ppm) protonuyla, H-5' ( $\delta_{\text{H}} = 6,72$  ppm) protonunun H-6' protonuyla ( $\delta_{\text{H}} = 6,64$  ppm) protonuyla körele olduğu, şekerin bağlı olduğu aromatik halkada bulunan H-2'' ( $\delta_{\text{H}} = 7,33$  ppm) protonunun H-3'' ve H-5'' protonlarıyla ( $\delta_{\text{H}} = 7,03$  ppm) etkileştiği, şeker protonlarından H-1''' ( $\delta_{\text{H}} = 4,87$  ppm) protonunun H-2''' ( $\delta_{\text{H}} = 3,23$  ppm) protonuyla, H-4''' ( $\delta_{\text{H}} = 3,16$  ppm) protonunun H-5''' ( $\delta_{\text{H}} = 3,31$  ppm) protonuyla ve H-6'''b ( $\delta_{\text{H}} = 3,66$  ppm) protonunun H-4''' ve H-5''' ( $\delta_{\text{H}} = 3,16 / 3,31$  ppm) protonlarıyla etkileştiği belirlenmiştir.



Şekil 4. 49. Origanofuran B'nin (9) HMBC spektrumu (<sup>13</sup>C-NMR100 MHz DMSO-d<sub>6</sub>)

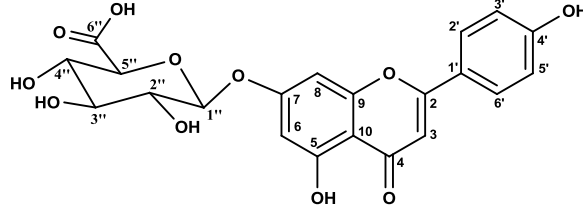


Şekil 4. 50. Origanofuran B'nin (9) HMBC korelasyonları



Şekil 4. 51. Origanofuran B'nin (9)  $\delta_C$ ,  $\delta_H$  ve etkileşme sabiti değerleri

#### 4.3.2.10. Apigenin-7-O-β-glukoronid'in (10) Fiziksel ve Spektral Özellikleri

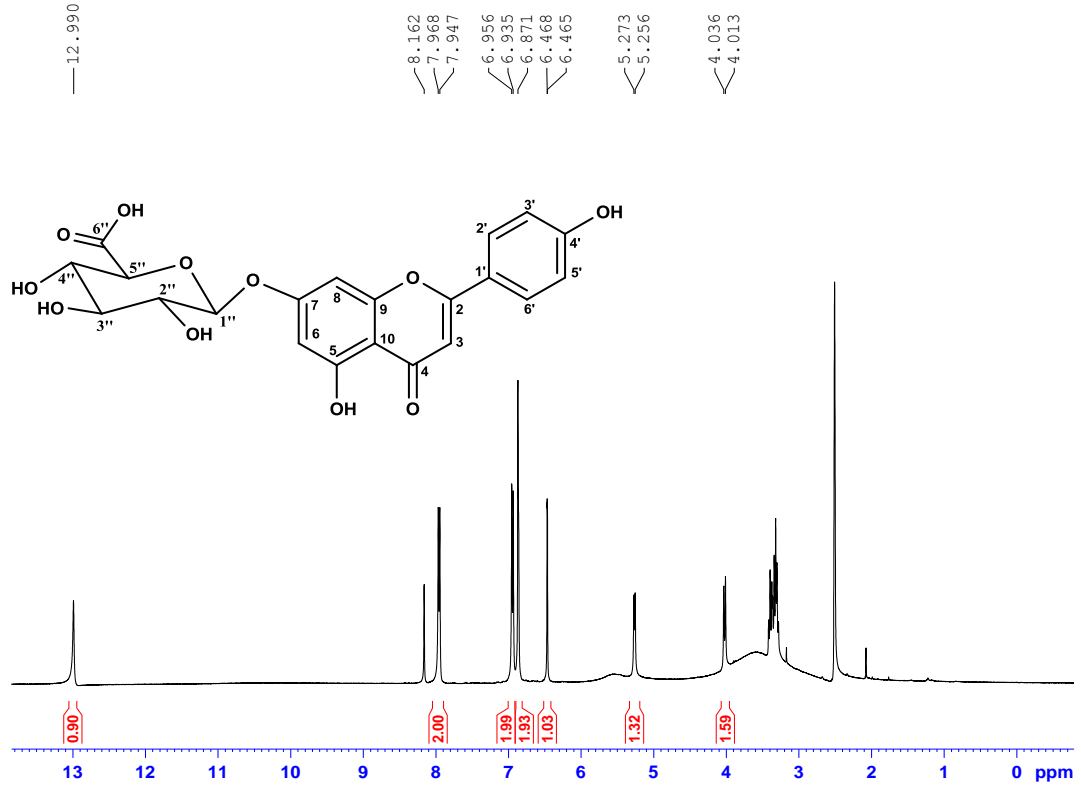


Şekil 4. 52. Apigenin-7-O-β-glukoronid (10)

Apigenin-7-O-β-glukoronid (10) (Şekil 4.52), kolon kromatografisinde % 20 Hekzan - %80 Etil asetat çözücü sisteminde gelen fraksiyonlardan, İTK kontrollü olarak birleştirilen 570-584 fraksiyon aralığına preparatif HPLC uygulaması (Bkz. Şekil 3.3) ile 19 mg izole edildi. Katı ve açık sarı renkli Apigenin-7-O-β-glukoronid'in (10) kapalı formülü  $C_{21}H_{18}O_{11}$  olup molekül ağırlığı 446,0849 g/mol'dür. Apigenin-7-O-β-glukoronid (10) bilinen bir bileşik olup elde edilen  $^1H$ -NMR ve  $^{13}C$ -NMR kimyasal kayma değerleri (Çizelge 4.13) literatür (Iwashina, 2012) ile uyum içindedir.

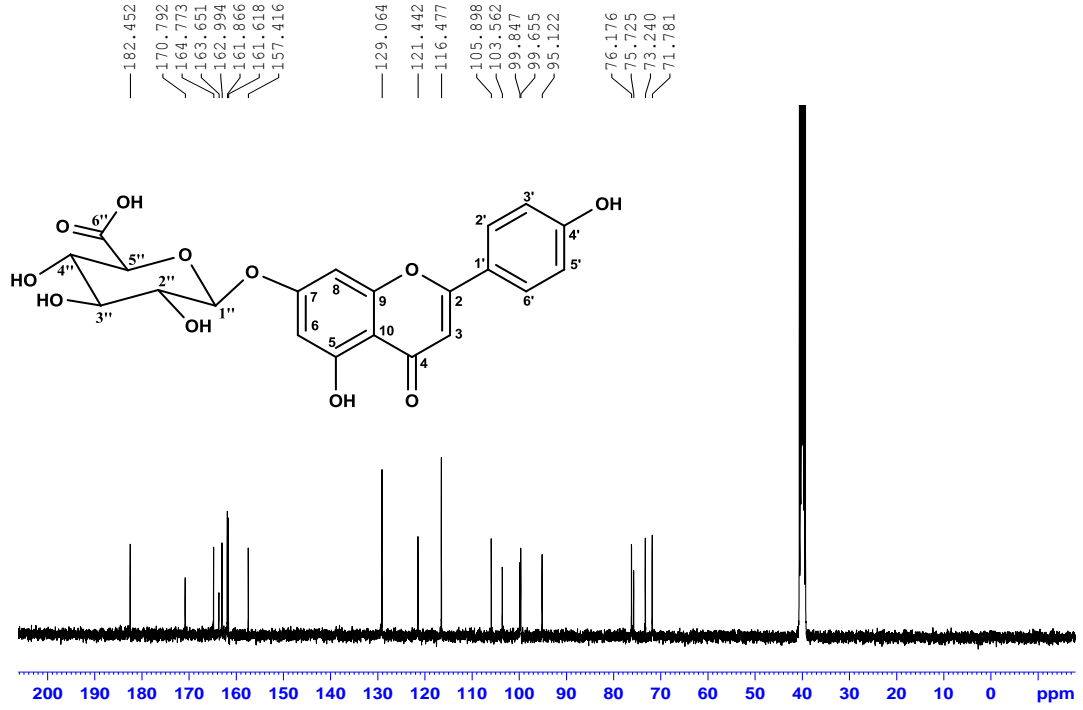
Çizelge 4. 13. Apigenin-7-O-β-glukoronid'in (10)  $^1H$ -NMR ve  $^{13}C$ -NMR kimyasal kayma değerleri

Pozisyon	Apigenin-7-O-β-glukoronid (10)	
	$\delta_C$	$\delta_H$
2		164,77
3	6,86 (s)	103,56
4		182,45
5		161,87
6	6,46 (s)	99,85
7		163,66
8	6,86 (s)	95,12
9		157,41
10		105,90
1'		121,44
2'	7,95 (d, $J = 8,5$ Hz)	129,07
3'	6,95 (d, $J = 8,5$ Hz)	116,48
4'	-	161,62
5'	6,95 (d, $J = 8,5$ Hz)	116,48
6'	7,95 (d, $J = 8,5$ Hz)	129,07
1''	5,26 (d, $J = 7,0$ Hz)	99,65
2''	3,38 (m)	71,78
3''	3,29 (m)	73,24
4''	4,02 (d, $J = 9,2$ Hz)	75,72
5''	3,33 (m)	76,18
6''	-	170,80



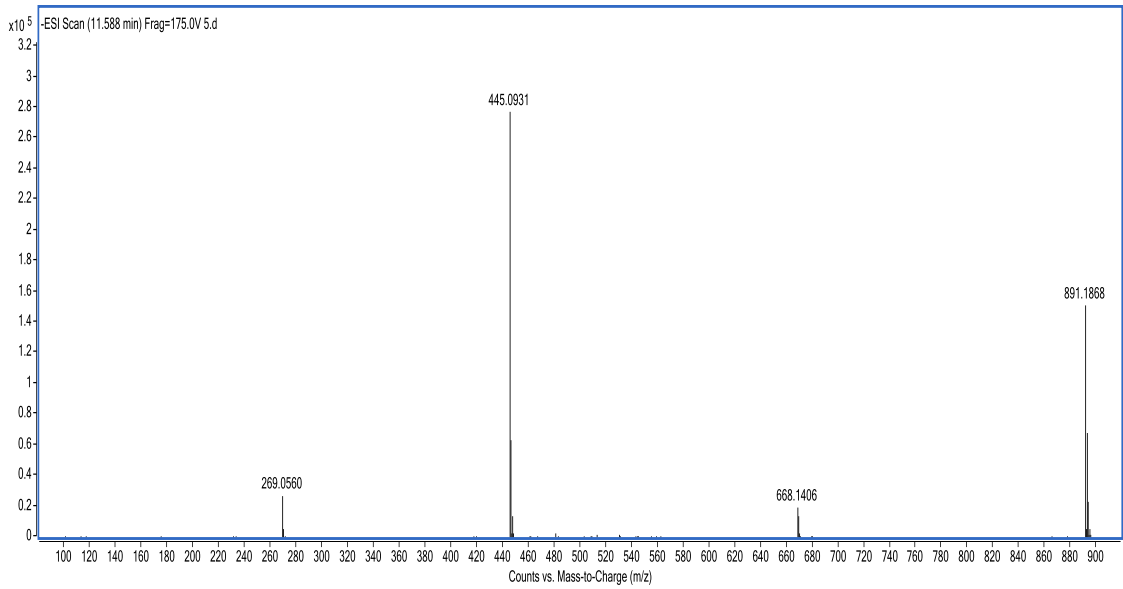
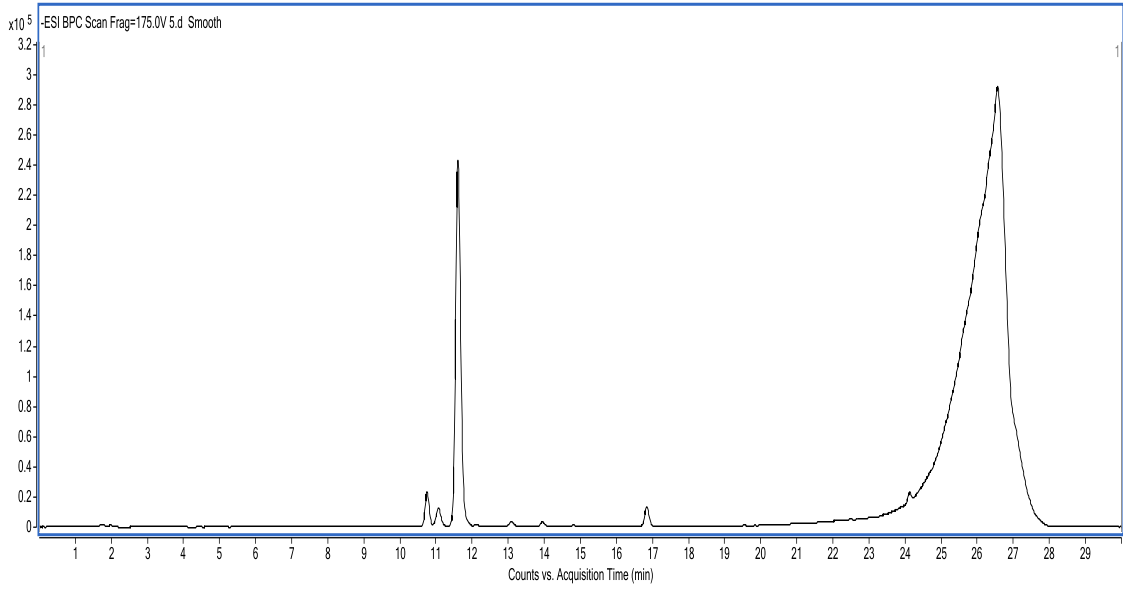
Şekil 4. 53. Apigenin-7-O- $\beta$ -glukoronid'in (10)  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )

Apigenin-7-O- $\beta$ -glukoronid'in (10)  $^1\text{H-NMR}$  spektrumuna (Şekil 4.53) bakıldığında  $\delta_{\text{H}} = 7,95$  (d,  $J = 8,5$  Hz) ppm'de görülen sinyaller B halkasının C-2' ve C-6' protonlarına,  $6,95$  (d,  $J = 8,5$  Hz) ppm'de görülen sinyaller B halkasının C-3' ve C-5' protonlarına,  $\delta_{\text{H}} = 6,46$  ile  $\delta_{\text{H}} = 6,86$  ppm'de görülen sinyaller ise A halkasının C-6 ve C-8 protonlarına ait olduğu tespit edilmiştir.  $\delta_{\text{H}} = 6,86$  ppm'de singlet olarak görülen bu sinyal molekülümüzün flavon olduğuna işaret eder.  $\delta_{\text{H}} = 5,26$  görülen sinyal glüköz moleküllerinin anomerik protona aittir. Anomerik proton dublete yarıldığı ve etkileşme sabitlerinin  $J = 7,0$  Hz olduğu görülmüştür, buradan da glüközün  $\beta$  konfigürasyonda olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 4. 54. Apigenin-7-O- $\beta$ -glukoronid'in (10)  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu ( $^{13}\text{C}$ -NMR 100 MHz DMSO- $d_6$ )

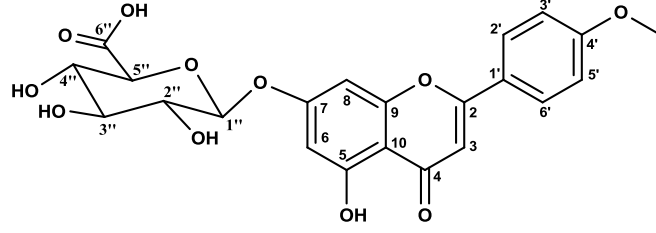
Apigenin-7-O- $\beta$ -glukoronid'in (10)  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu (Şekil 4.54) incelendiğinde 20 karbon sinyali görülmektedir.  $\delta_{\text{C}} = 129,1$  ve  $\delta_{\text{C}} = 116,5$  ppm'de görülen sinyallerin sırasıyla, C-2' ve C-6' ile C-3' ve C-5' konumlarına ait olduğunu literatürler değerleri de desteklemektedir.  $\delta_{\text{C}} = 70-77$  ppm'ler arasında görülen sinyaller glikoz molekülüne aittir.  $\delta_{\text{C}} = 99,65$  ppm'de görülen sinyalin anomerik karbon atomuna ait olduğu ve 170 ppm' de ise glukoronidin karbonil sinyali literatür bilgileri ile karşılaştırılarak karar verilmiştir.



Şekil 4. 55. Apigenin-7-O- $\beta$ -glukoronid'in (10) LC-TOF-MS kromatogramı

Apigenin-7-O- $\beta$ -glukoronid'in (10) LC-TOF-MS spektrumunda (Şekil 4.55) (-)ESI MS: m/z 445,0931 g/mol ( $[M-H]^-$ ) ve m/z 891,1868 g/mol ( $[2M-H]^-$ ) iyon pikleri gözlenmiş ve molekül formülü  $C_{21}H_{18}O_{11}$  olarak belirlenmiştir.

#### 4.3.2.11. Acacetin-7-O- $\beta$ -glukoronid'in (11) Fiziksel ve Spektral Özellikleri

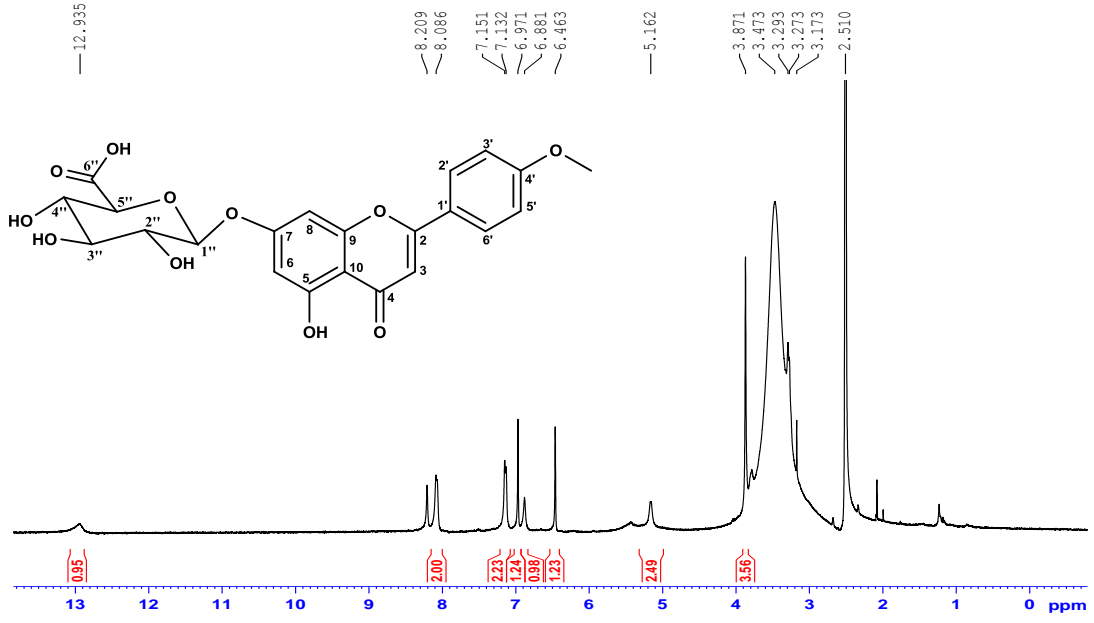


Şekil 4. 56. Acacetin-7-O- $\beta$ -glukoronid (11)

Acacetin-7-O- $\beta$ -glukoronid (11) (Şekil 4.56), kolon kromatografisinde % 20 Hekzan - %80 Etil asetat çözücü sisteminde gelen fraksiyonlardan, İTK kontrollü olarak birleştirilen 570-584 fraksiyon aralığına preparatif HPLC uygulaması (Bkz. Şekil 3.3) ile 15 mg izole edildi. Katı ve açık sarı renkli Acacetin-7-O- $\beta$ -glukoronid (11) kapalı formülü  $C_{22}H_{20}O_{11}$  olup molekül ağırlığı 460,1006 g/mol'dür. Acacetin-7-O- $\beta$ -glukoronid (11) bilinen bir bileşik olup elde edilen  $^1H$ -NMR ve  $^{13}C$ -NMR kimyasal kayma değerleri (Çizelge 4.14) literatür (Porfirio ve ark., 2010) ile uyum içindedir.

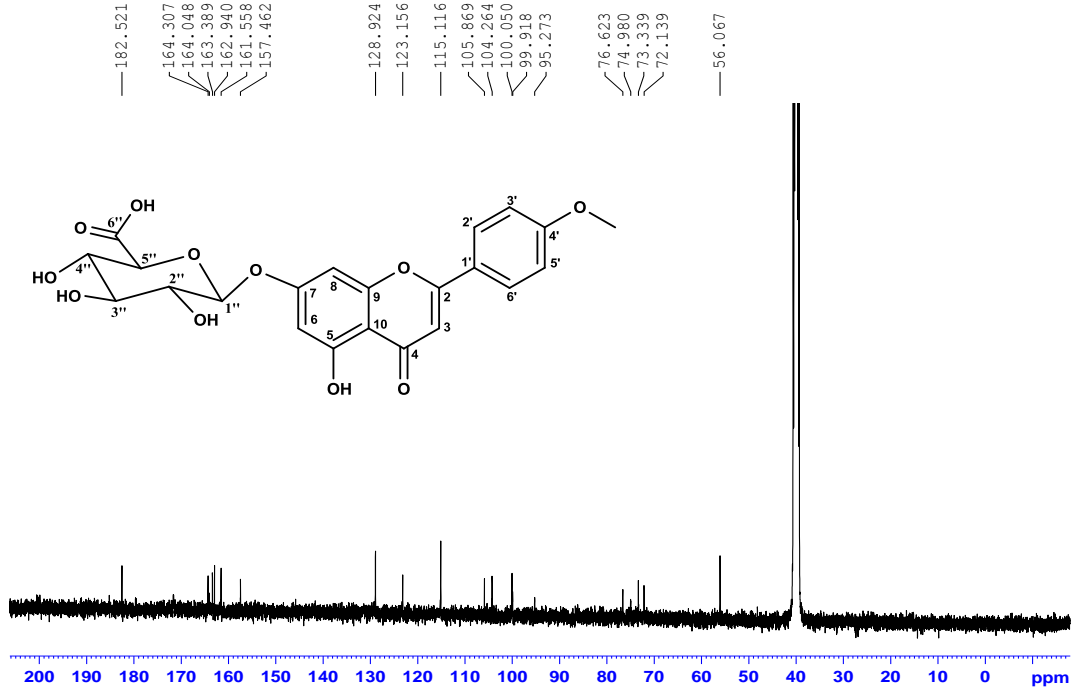
Çizelge 4. 14. Acacetin-7-O- $\beta$ -glukoronid'in (11)  $^1H$ -NMR ve  $^{13}C$ -NMR kimyasal kayma değerleri

Pozisyon	Acacetin-7-O- $\beta$ -glukoronid	
	$\delta_H$	$\delta_C$
2	-	164,31
3	6,96 (s)	104,27
4	-	182,52
5	-	162,94
6	6,45 (s)	100,05
7	-	163,39
8	6,86 (s)	95,12
9	-	157,46
10	-	105,87
1'	-	123,16
2'	8,08 (d, $J = 6,9$ Hz)	128,93
3'	7,14 (d, $J = 8,2$ Hz)	115,12
4'	-	161,56
5'	7,14 (d, $J = 8,2$ Hz)	115,12
6'	8,08 (d, $J = 6,9$ Hz)	128,93
4'OCH <sub>3</sub>	3,86 (s)	56,07
1''	5,16 (d, $J = 7,4$ Hz)	99,8
2''	3,28 (d, $J = 7,9$ Hz)	73,34
3''	3,31 (m)	76,62
4''	3,28 (d, $J = 7,9$ Hz)	72,14
5''	3,81 (m)	74,93
6''	-	171,59



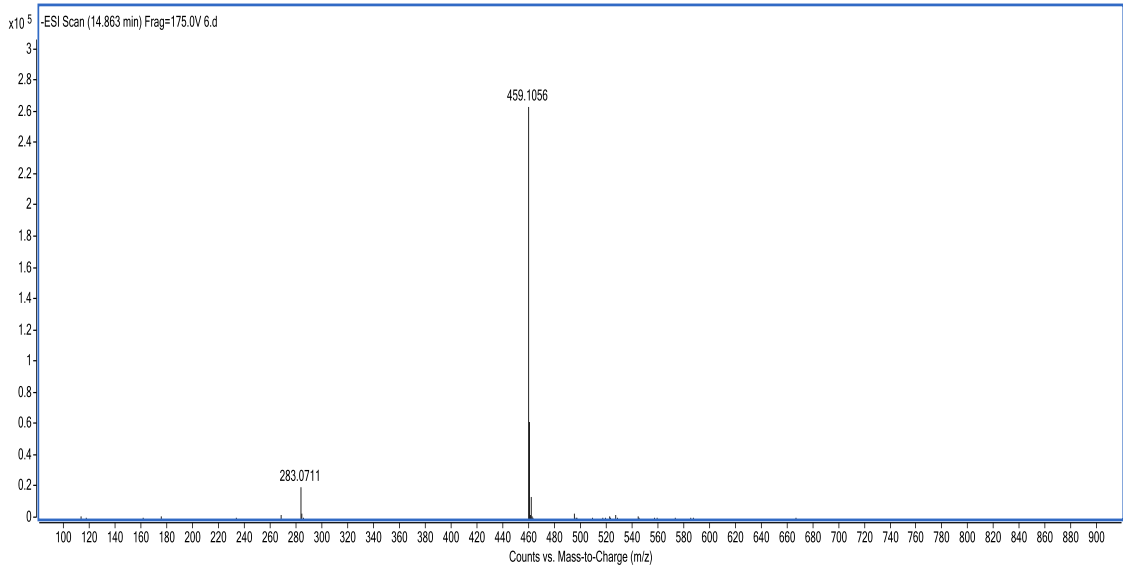
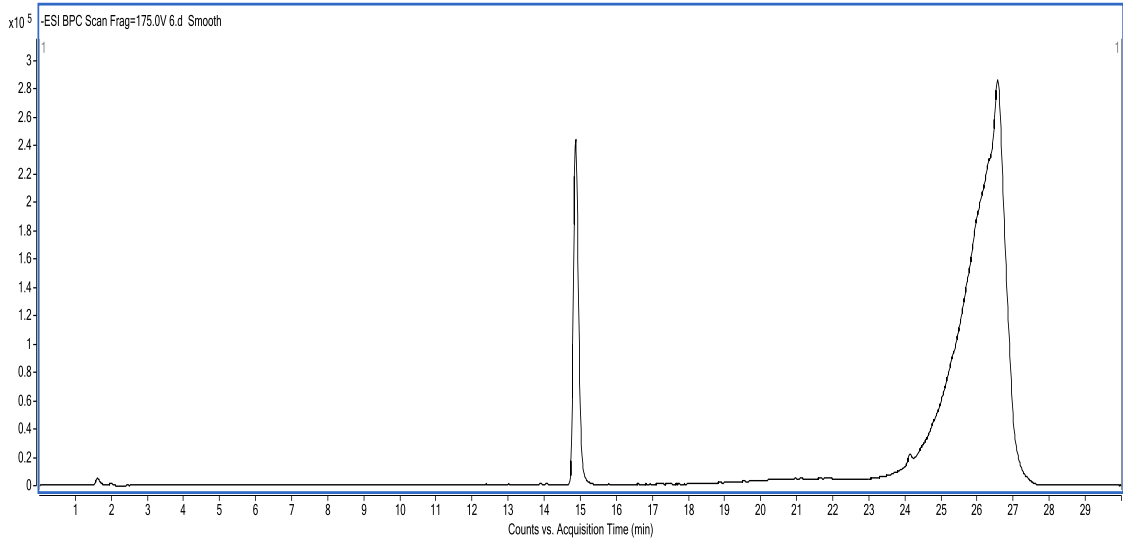
Şekil 4. 57. Acacetin-7-O- $\beta$ -glukoronid'in (11)  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu (400 MHz DMSO- $\text{d}_6$ )

Acacetin-7-O- $\beta$ -glukoronid'in (11)  $^1\text{H}$ -NMR spektrumuna (Şekil 4.57) bakıldığında  $\delta_{\text{H}} = 8,08$  (d,  $J = 6,9$  Hz) ppm'de görülen sinyaller B halkasının C-2' ve C-6' protonlarına,  $7,14$  (d,  $J = 8,2$  Hz) ppm'de görülen sinyaller B halkasının C-3' ve C-5' protonlarına,  $\delta_{\text{H}} = 6,46$  ile  $\delta_{\text{H}} = 6,86$  (s) ppm'de görülen sinyaller ise A halkasının C-6 ve C-8 protonlarına ait olduğu tespit edilmiştir.  $\delta_{\text{H}} = 6,86$  ppm'de singlet olarak görülen bu sinyal molekülümüzün flavon olduğuna işaret eder.  $\delta_{\text{H}} = 5,16$  görülen sinyal glüköz moleküllerinin anomerik protonuna aittir. Anomerik proton dublete yarıldığı ve etkileşme sabitlerinin  $J = 7,4$  Hz olduğu görülmüştür, buradan da glüközün  $\beta$  konfigürasyonda olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 4. 58. Acacetin-7-O- $\beta$ -glukoronid'in (11)  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu (100 MHz DMSO- $\text{d}_6$ )

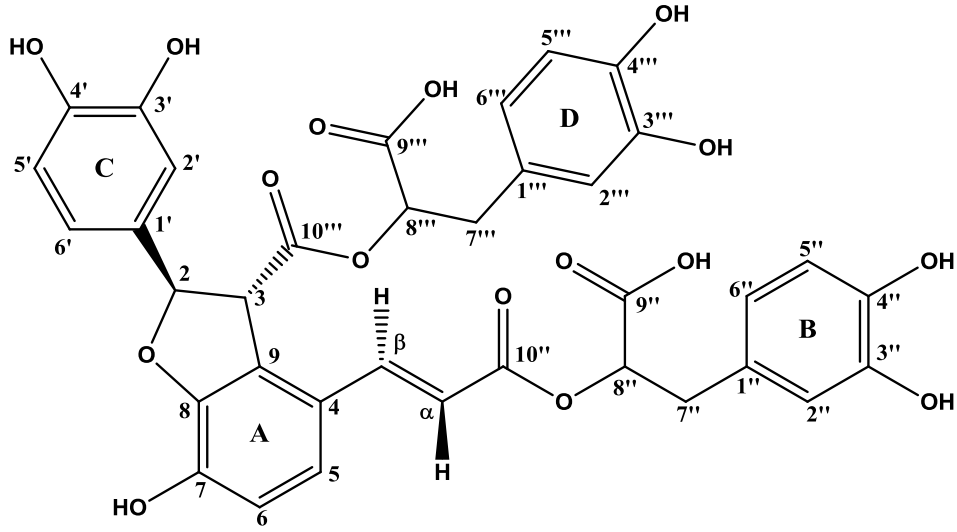
Acacetin-7-O- $\beta$ -glukoronid'in (11)  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumunda (Şekil 4.58) 20 karbon sinyali görülmektedir.  $\delta_{\text{C}} = 128,9$  ve  $\delta_{\text{C}} = 115,1$  ppm'de görülen sinyallerin sırasıyla, C-2' ve C-6' ile C-3' ve C-5' konumlarına ait olduğunu literatürler değerleri de desteklemektedir.  $\delta_{\text{C}} = 70-77$  ppm'ler arasında görülen sinyaller glukoz molekülüne aittir.  $\delta_{\text{C}} = 99,8$  ppm'de görülen sinyalin anomerik karbon atomuna ait olduğu ve  $\delta_{\text{C}} = 171,6$  ppm' de ise glukoronid karbonil sinyali literatür bilgileri ile karşılaştırılarak karar verilmiştir.



Şekil 4. 59. Acacetin-7-O-β-glukoronid'in (11) LC-TOF-MS kromatogramı

Acacetin-7-O-β-glukoronid'in (11) LC-TOF-MS spektrumunda (Şekil 4.59) (-)-ESI MS: m/z 459,1056 g/mol ( $[M-H]^-$ ) ve m/z 283,0711 g/mol ( $[M-ksiloz]^-$ ) iyon pikleri gözlenmiş ve molekül formülü  $C_{22}H_{20}O_{11}$  olarak belirlenmiştir.

#### 4.3.2.12. Litospermik asit B'nin (12) Fiziksel ve Spektral Özellikleri

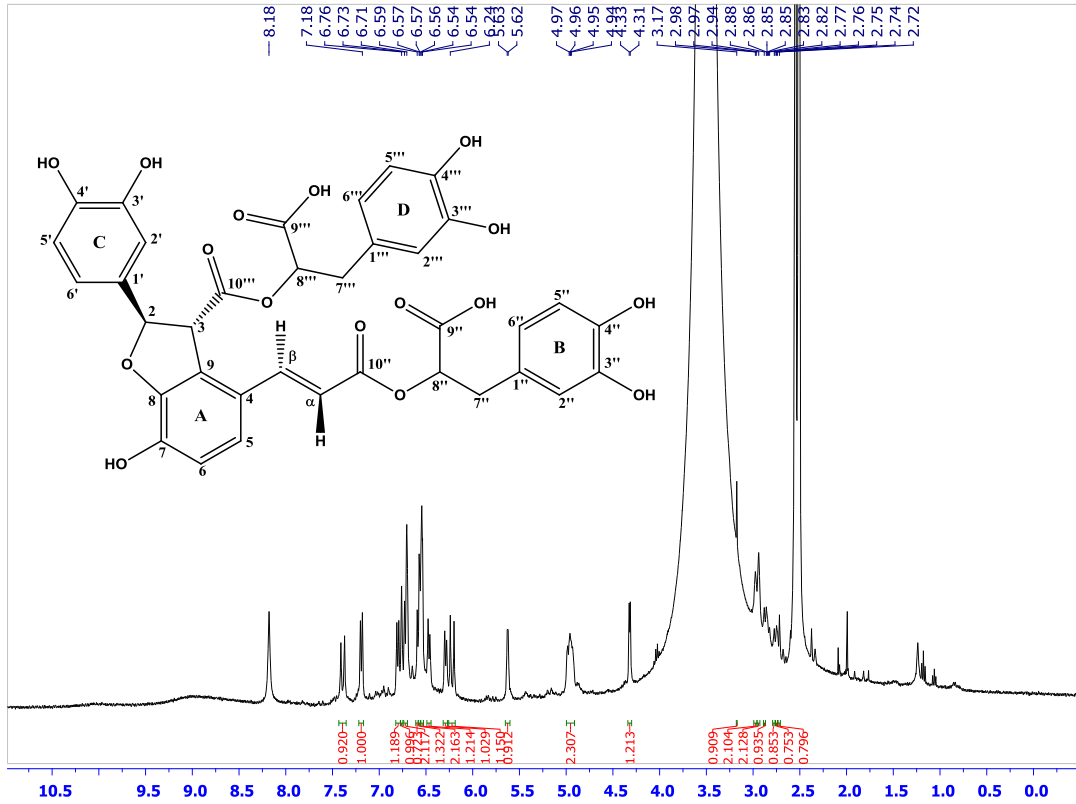


Şekil 4. 60. Litospermik asit B (12)

Litospermik asit B (12) (Şekil 4.60), kolon kromatografisinde %20 MeOH-%80 EtOAc çözücü sisteminde gelen fraksiyonlardan, İTK kontrollü olarak birleştirilen 503-610 fraksiyon aralığına preparatif HPLC uygulaması (Bkz. Şekil 3.5) ile 33 mg izole edildi. Beyaz toz şeklindeki Litospermik asit B'nin (12) kapalı formülü  $C_{36}H_{30}O_{16}$  olup molekül ağırlığı 718,1534 g/mol'dür. Litospermik asit B (12) bilinen bir bileşik olup elde edilen  $^1H$ -NMR ve  $^{13}C$ -NMR kimyasal kayma değerleri (Çizelge 4.15) literatür (Sun ve ark., 2009; Murata ve ark., 2013) ile uyum içindedir.

Çizelge 4. 15. Litospermik asit B'nin (12) <sup>1</sup>H-NMR ve <sup>13</sup>C-NMR kimyasal kayma değerleri

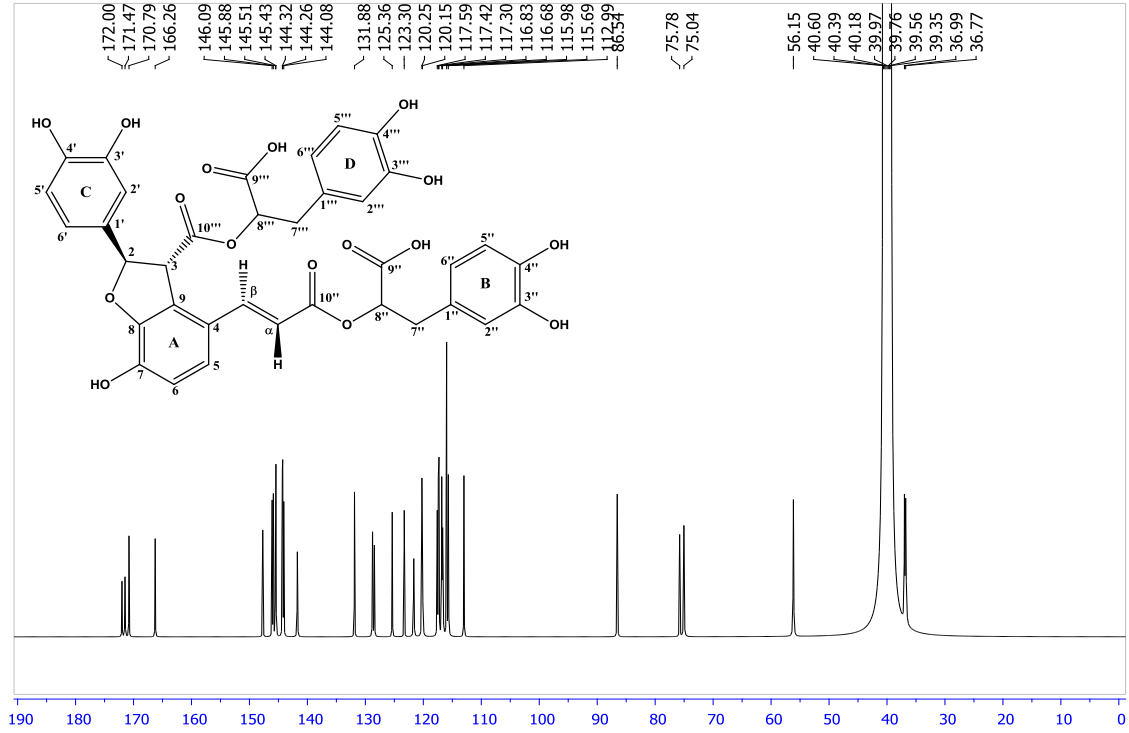
Pozisyon	Litospermik asit B	
	$\delta_H$	$\delta_C$
2	5,63 (d, $J = 4,52$ Hz)	86,54
3	4,32 (d, $J = 4,61$ Hz)	56,15
4	-	123,30
5	7,19 (d, $J = 8,51$ Hz)	121,62
6	6,80 (d, $J = 8,41$ Hz)	117,59
7	-	147,70
8	-	146,09
9	-	125,36
$\alpha$	6,22 (d, $J = 15,90$ Hz)	116,68
$\beta$	7,39 (d, $J = 15,90$ Hz)	141,74
1'	-	128,46
2'	6,70 (m)	112,99
3'	-	145,43
4'	-	144,33
5'	6,59 (d, $J = 8,28$ Hz)	115,69
6'	6,71 (m)	115,98
1''	-	128,77
2''	6,54 (m)	117,42
3''	-	145,88
4''	-	145,51
5''	6,57 (m)	116,83
6''	6,29 (d, $J = 7,90$ Hz)	120,24
7''	2,94 / 2,80 (m)	37,03
8''	4,92 (dd, $J = 9,5/5,3$ Hz)	75,04
9''	-	171,62
10''	-	166,26
1'''	-	131,88
2'''	6,76 (s)	117,30
3'''	-	144,26
4'''	-	144,08
5'''	6,71 (m)	115,98
6'''	6,47 (d, $J = 7,78$ Hz)	120,15
7'''	2,75 (m)	36,76
8'''	4,97 (dd, $J = 9,6/4,0$ Hz)	75,78
9'''	-	170,79
10'''	-	172,01



Şekil 4. 61. Litospirik asit B'nin (12) <sup>1</sup>H-NMR spektrumu (<sup>1</sup>H-NMR 400 MHz DMSO-d<sub>6</sub>)

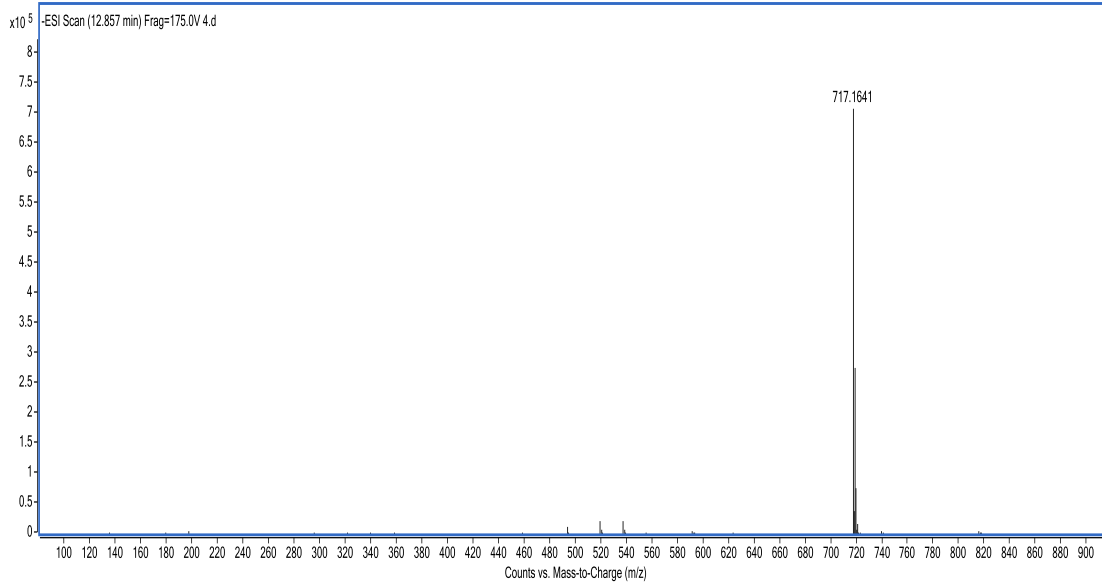
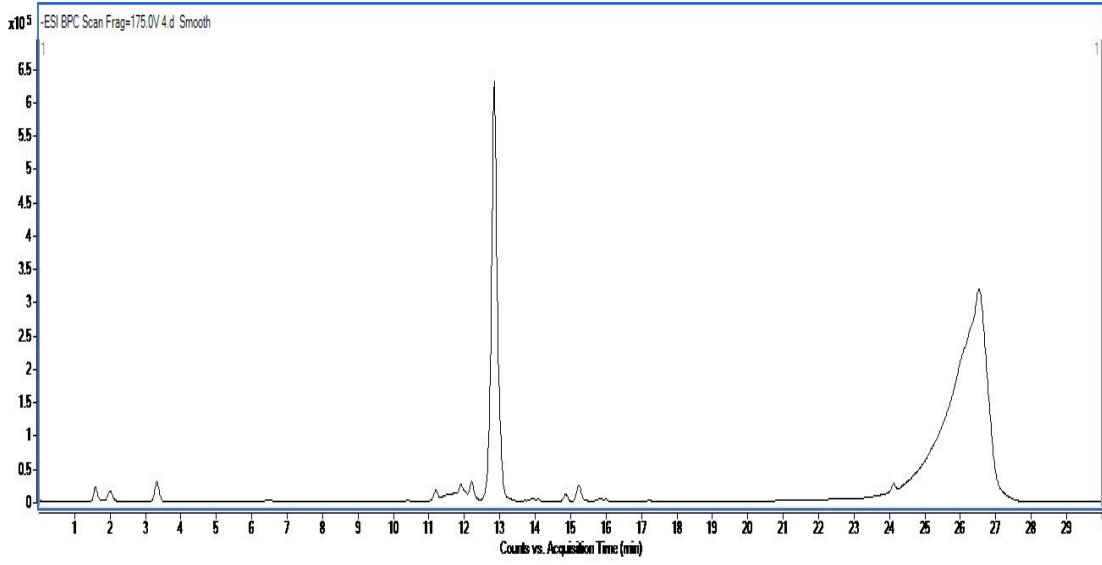
Litospirik asit B'nin (12) <sup>1</sup>H-NMR spektrumuna (Şekil 4.61) incelendiğinde, aromatik protonların geldiği 6-8 ppm aralığında B halkasına ait  $\delta_H = 6,54$  (m),  $\delta_H = 6,29$  (d,  $J = 7,90$  Hz) ve  $\delta_H = 6,57$  (m) ppm'de aromatik ABX sistem protonları (sırasıyla H-2'', 6'', 5'' numaralı protonlar) di-sübstitüe aromatik halkanın varlığını, HETCOR analizinde (Ek-II'de verilmiştir) bu protonların sırasıyla  $\delta_C = 117,4$ ,  $\delta_C = 120,2$  ve  $\delta_C = 116,8$  karbonlarıyla korelasyonu görülmüştür ve bu protonların  $\delta_C = 145,9$  ve  $\delta_C = 145,5$  karbonlarıyla gözlenen HMBC korelasyonu halkanın 3'',4''-dihidroksi sübstitüe olduğunun kanıtıdır. C halkasına ait  $\delta_H = 6,70$  (d,  $J = 9,66$  Hz),  $\delta_H = 6,70$  (d,  $J = 9,66$  Hz) ve  $\delta_H = 6,59$  (d  $J = 8,28$  Hz) ppm'de aromatik ABX sistem protonları (sırasıyla H-2', 6', 5' numaralı protonlar) di-sübstitüe aromatik halkanın varlığını, HETCOR analizinde (Ek-II'de verilmiştir) bu protonların sırasıyla  $\delta_C = 113,0$ ,  $\delta_C = 116,0$  ve  $\delta_C = 115,7$  karbonlarıyla korelasyonu görülmüştür ve bu protonların  $\delta_C = 145,4$  ve  $\delta_C = 144,3$  karbonlarıyla gözlenen HMBC korelasyonu halkanın 3',4'-dihidroksi sübstitüe olduğunun kanıtıdır. D halkasına ait  $\delta_H = 6,76$  (m),  $\delta_H = 6,47$  (d,  $J = 7,78$  Hz) ve  $\delta_H = 6,70$  (d  $J = 9,66$  Hz) ppm'de aromatik ABX sistem protonları (sırasıyla H-2''', 6''', 5''')

numaralı protonlar) di-sübstitüe aromatik halkanın varlığını, HETCOR analizinde (Ek-II'de verilmiştir) bu protonların sırasıyla  $\delta_C = 117,3$ ,  $\delta_C = 120,2$  ve  $\delta_C = 116,0$  karbonlarıyla korelasyonu görülmüştür ve bu protonların  $\delta_C = 144,3$  ve  $\delta_C = 144,1$  karbonlarıyla gözlenen HMBC korelasyonu halkanın 3''',4'''-dihidroksi sübstitüe olduğunun kanıtıdır. Son olarak da A halkasına ait  $\delta_H = 7,19$  (d,  $J = 8,51$  Hz),  $\delta_H = 6,80$  (d,  $J = 8,41$  Hz) sırasıyla H-5 ve H-6 protonlarının HETCOR analizinde (Ek-II'de verilmiştir) bu protonların sırasıyla  $\delta_C = 121,6$  ve  $\delta_C = 117,6$  karbonlarıyla korelasyonu görülmüştür. Bu veriler göz önüne alındığında bileşiğin dört adet aromatik halka içerdiği literatürlerle desteklenerek belirlenmiştir.  $\delta_C = 86,54$  (C-2) karbonuna bağlı  $\delta_H = 5,63$  ppm'deki (d,  $J = 4,5$  Hz) ve  $\delta_C = 56,15$  (C-3) karbonuna bağlı 4,32 ppm'deki (d,  $J = 4,60$  Hz) protonları benzofuran halkasının varlığını göstermektedir ve bu iki protonun etkileşme sabiti değerleri ile birbirlerine göre trans konumunda olduğu literatürlerle karşılaştırılarak belirlenmiştir. Bu protonların her ikisi de  $\delta_C = 172,0$  (C-10''') karbonu ile HMBC korelasyonu (Ek-II'de verilmiştir), 3 numaralı karbonda karboksilik asit grubunun bağlı olduğunu gösterir.  $\delta_H = 7,19$  (d,  $J = 8,50$  Hz) ve  $\delta_H = 6,80$  (d,  $J = 8,41$  Hz) ppm'de gözlenen sinyaller orto sübstitüe aromatik halkanın (A halkası) varlığını ortaya koymaktadır. Bu protonların  $\delta_C = 147,7$  (C-7) karbonuyla HMBC korelasyonu, halkaya 7 konumundan hidroksi grubunun bağlı olduğunu ve  $\delta_H = 7,19$  protonunun  $\delta_C = 141,7$  karbonuyla etkileşmesi 4 konumundan konjuge  $\alpha$ ,  $\beta$  doymamış çift bağ sisteminin bağlı olduğunu göstermektedir.  $\alpha$ ,  $\beta$  doymamış sistem protonlarının ( $\delta_H = 6,22$  ve  $\delta_H = 7,39$ )  $J = 15,90$  Hz'lik etkileşime sahip olması bu protonların birbirine göre trans konumunda olduğunu göstermiş ve literatürlerle desteklenmiştir.



Şekil 4. 62. Litospermik asit B'nin (12) <sup>13</sup>C-NMR spektrumu (<sup>13</sup>C-NMR 100 MHz DMSO-d<sub>6</sub>)

Litospermik asit B'nin (12) <sup>13</sup>C-NMR spektrumu (Şekil 4.62) incelendiğinde, <sup>13</sup>C-NMR spektrumu incelendiğinde  $\delta_C = 147,7$  (C-7),  $144,3$  (C-4'),  $145,4$  (C-3'),  $145,5$  (C-4''),  $145,9$  (C-3''),  $144,1$  (C-4''),  $144,3$  (C-3'')'de sinyalleri fenil halkaları üzerinde -OH grupları ile sübstitüe olmuş yedi tane C atomu olduğunu ve. dört adet karbonil karbonu  $\delta_C = 171,6$  (C-9''),  $166,3$  (C-10''),  $170,8$  (C-9''') ve  $172,0$  (C-10''') ppm'de, bir adet de estere komşu karbon atomu  $\delta_C = 86,5$  (C-2) ppm'de gözlenmiştir.



Şekil 4. 63. Litospermik asit B'nin (12) LC-TOF-MS kromatogramı

Litospermik asit B'nin (12) LC-TOF-MS spektrumunda (Şekil 4.63) (-)-ESI MS:  $m/z$  717,1641 g/mol ( $[M-H]^-$ ) iyon piki gözlenmiş ve molekül formülü  $C_{36}H_{30}O_{16}$  olarak belirlenmiştir.

### 4.3.3. *Origanum onites* L. Bitkisinden İzole Edilen Bileşiklere Uygulanan Antioksidan Aktivitesi Sonuçları

Çizelge 4. 16. *Origanum onites* L. bitkisinden İzole Edilen Bileşiklere Uygulanan DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup>, FRAP ve Metal Şelatlama Aktivite testleri sonuçları

Bileşikler		DPPH <sup>•</sup> Radikal Giderme [IC <sub>50</sub> (µg/mL)]	FRAP (mmol TE / g saf bileşik)	ABTS <sup>•+</sup> Radikal Giderme [IC <sub>50</sub> (µg/mL)]	Metal Şelatlama [IC <sub>50</sub> (µg/mL)]
1	<i>p</i> -Hidroksibenzaldehit	3294, 45 ± 708,88	1,64 ± 0,08	11,38 ± 0,32	44,36 ± 3,32
2	Hidrokinon	1,92 ± 0,07	25,07 ± 0,56	2,66 ± 0,07	66,49 ± 4,66
3	Kafeik asit	35,35 ± 0,33	28,33 ± 0,34	8,07 ± 0,38	99,16 ± 3,25
4	Luteolin-7-O-β-glikozit	19,36 ± 1,49	17,64 ± 1,01	1,88 ± 0,10	54,83 ± 2,98
5	Luteolin-7-O-β-ksilozit	12,52 ± 0,27	25,02 ± 1,21	1,88 ± 0,07	65,70 ± 1,14
6	Rosmarinik asit	8,58 ± 0,13	33,30 ± 1,85	3,36 ± 0,06	74,03 ± 2,97
7	Bifenil-3,3',4,4'-tetraol	0,91 ± 0,13	38,70 ± 2,02	0,37 ± 0,02	66,63 ± 3,82
8	Origanofuran A	17,21 ± 1,18	19,44 ± 0,73	2,28 ± 0,27	91,63 ± 0,04
9	Origanofuran B	19,98 ± 1,50	11,48 ± 0,97	3,49 ± 0,14	59,13 ± 2,91
10	Apigenin-7-O-β-glukoronid	244,37 ± 21,21	2,64 ± 0,09	2,75 ± 0,30	50,23 ± 2,74
11	Acacetin-7-O-β-glukoronid	168,37 ± 21,44	3,72 ± 0,13	5,45 ± 1,21	41,03 ± 2,33
12	Litospermik asit-B	15,95 ± 1,94	22,77 ± 0,46	2,64 ± 0,11	56,22 ± 2,98
13	BHT	18,52 ± 2,05	25,53 ± 1,02	1,4 ± 0,08	Test Edilmedi
14	BHA	9,05 ± 0,23	33,44 ± 1,34	1,79 ± 0,11	Test Edilmedi
15	Trolox	9,50 ± 0,27	23,21 ± 1,19	3,05 ± 0,15	Test Edilmedi
16	EDTA	Test Edilmedi	Test Edilmedi	Test Edilmedi	6,33 ± 0,68

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışma kapsamında, *Origanum onites* L. bitkisinden elde edilen beş farklı ekstrenin, toplam fenolik bileşik miktarı ve antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Fenolik madde içeriği bakımından zengin ve DPPH<sup>•</sup> FRAP ABTS<sup>•+</sup> ve Metal Şelat oluşturma gibi antioksidan aktivite testleri sonucuna göre yüksek aktiviteye sahip olan ekstrenin Ekstre-IV olduğu belirlenmiştir. Ekstre-IV'e uygulanan kromatografik teknikler sonunda ikisi yeni (**8 ve 9**) olmak üzere toplamda on iki (**1-7, 10-12**) adet bileşik saflaştırılıp yapıları aydınlatılmış ve antioksidan aktiviteleri (Çizelge 4.16) incelenmiştir.

Ekstre-IV'den izole edilen bileşiklerin aktiviteleri incelendiğinde;

***p*-Hidroksibenzaldehit (1):** Bilinen bir bileşik olup DPPH<sup>•</sup> (IC<sub>50</sub> = 3294,45 µg/mL), FRAP (1,64 mmol TE/g saf bileşik), ABTS<sup>•+</sup> (IC<sub>50</sub> = 11,38 µg/mL), ve Metal Şelat oluşturma (IC<sub>50</sub> = 44,36 µg/mL), değerleriyle antioksidan aktivitesi standart antioksidanlarla kıyaslandığında çok düşük olduğu görülmüştür (Çizelge 4.16). Khallouki ve ark., (2012) yaptığı bir çalışmada *Prunus domestica* L. bitkisinin fenolik içeriği belirlenmiş ve *p*-Hidroksibenzaldehit standardının kullanıldığı aktivite analizinde DPPH<sup>•</sup> ve FRAP testlerinde inaktif olduğu rapor edilmiştir. Yaptığımız çalışma bu çalışma ile uyum içindedir.

**Hidrokinon (2):** Bilinen bir bileşik olup DPPH<sup>•</sup> (IC<sub>50</sub> = 1,92 µg/mL), FRAP (25,07 mmol TE/g saf bileşik), ABTS<sup>•+</sup> (IC<sub>50</sub> = 2,66 µg/mL), ve Metal Şelat oluşturma (IC<sub>50</sub> = 66,49 µg/mL), değerleriyle DPPH testinde BHA, BHT ve Troloks standartlarından yüksek aktivite gösterdiği, ABTS<sup>•+</sup> testinde Troloks'dan daha yüksek aktivite gösterdiği ve FRAP testinde de Troloks standardından daha yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.16). Yamaguchi ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada hidrokinon (2) bileşiğinin DPPH<sup>•</sup> aktivitesini EC<sub>50</sub> = 1,20 µM olarak rapor etmiş ve yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Bu bulgular bizim çalışmadaki sonuçlarla uyum içindedir.

**Kafeik asit (3):** Bilinen bir bileşik olup DPPH<sup>•</sup> (IC<sub>50</sub> = 35,35 µg/mL), ABTS<sup>•+</sup> (IC<sub>50</sub> = 8,07 µg/mL) ve Metal Şelat oluşturma (IC<sub>50</sub> = 99,16 µg/mL) değerleriyle aktivite testlerinde standartlardan düşük aktivite gösterdiği, FRAP (28,33 mmol TE/g saf bileşik) testinde ise BHT ve Troloksdan yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.16). Erkan (2012) yaptığı çalışmada Kafeik asit'in DPPH aktivitesini 12,4 µg/mL olarak rapor etmişlerdir. Bu aktivite değeri bizim bulduğumuz değerden yüksektir.

**Luteolin-7-O-β-glikozit (4):** Bilinen bir bileşik olup DPPH<sup>•</sup> (IC<sub>50</sub> = 19,36 µg/mL), FRAP (17,64 mmol TE/g saf bileşik), ABTS<sup>•+</sup> (IC<sub>50</sub> = 1,88 µg/mL), ve Metal Şelat oluşturma (IC<sub>50</sub> = 54,83 µg/mL), değerleriyle DPPH<sup>•</sup> testinde BHA, BHT, ve Troloks standartlarından düşük aktivite gösterdiği, ABTS<sup>•+</sup> testinde de Troloks standardından daha yüksek olmakla beraber BHA ve BHT standartlarının aktivitelerine yakın bir aktivite gösterdiği ve FRAP testinde ise standartlardan daha düşük aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.16). Boldbaatar ve ark (2014) yaptıkları çalışmada Luteolin-7-O-β-glikozit'in (4) DPPH<sup>•</sup> aktivitesini IC<sub>50</sub> = 8,40 µg/mL ile yüksek aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir.

**Luteolin-7-O-β-ksilozit (5):** Bilinen bir bileşik olup DPPH<sup>•</sup> (IC<sub>50</sub> = 12,52 µg/mL), FRAP (25,02 mmol TE/g saf bileşik), ABTS<sup>•+</sup> (IC<sub>50</sub> = 1,88 µg/mL), ve Metal Şelat oluşturma (IC<sub>50</sub> = 65,70 µg/mL), değerleriyle DPPH<sup>•</sup> testinde BHT standardından yüksek olduğu, ABTS<sup>•+</sup> testinde de Troloks standardından daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği, FRAP testinde ise Troloks standardından daha yüksek aktivite gösterdiği görülmektedir (Çizelge 4.16). Literatürde Luteolin-7-O-β-ksilozit (5) bileşiği ile ilgili bir antioksidan aktivite çalışması rapor edilmemiş olup ilk defa bu çalışmada antioksidan aktivite çalışması yapılmıştır.

**Rosmarinik asit (6):** Bilinen bir bileşik olup DPPH<sup>•</sup> (IC<sub>50</sub> = 8,58 µg/mL), FRAP (33,30 mmol TE/g saf bileşik), ABTS<sup>•+</sup> (IC<sub>50</sub> = 3,36 µg/mL), ve Metal Şelat oluşturma (IC<sub>50</sub> = 74,03 µg/mL), değerleriyle DPPH<sup>•</sup> testinde aktivitesinin bütün standartlardan yüksek olduğu, ABTS<sup>•+</sup> testinde standartlarının aktivitelerine yakın bir aktivite gösterdiği ve FRAP testinde ise BHA ve Troloksdan daha yüksek aktivite gösterdiği görülmektedir (Çizelge 4.16). Erkan'ın (2012) yaptığı çalışmada DPPH<sup>•</sup> aktivitesi IC<sub>50</sub> = 12,4 µg/mL

rapor edilmiştir. Bu değer bizim bulduğumuz antioksidan aktivite değerden yüksek değerdedir.

**Bifenil-3,3',4,4'-tetraol (7):** Literatürde yer almayan bir bileşik olup DPPH<sup>•</sup> (IC<sub>50</sub> = 0,91 µg/mL), FRAP (38,70 mmol TE/g saf bileşik), ABTS<sup>•+</sup> (IC<sub>50</sub> = 0,37 µg/mL), ve Metal Şelat oluşturma (IC<sub>50</sub> = 66,63 µg/mL), değerleriyle DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup> ve FRAP testlerinde bütün bileşikler ve standartlardan yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.16). Literatürde bifenil-3,3',4,4'-tetraol (7) bileşiği ile ilgili bir antioksidan aktivite çalışması rapor edilmemiş olup ilk defa bu çalışmada antioksidan aktivite çalışması yapılmıştır.

**Origanofuran A (8):** Literatürde yer almayan bir bileşik olup, DPPH<sup>•</sup> (IC<sub>50</sub> = 17,21 µg/mL), FRAP (19,44 mmol TE/g saf bileşik), ABTS<sup>•+</sup> (IC<sub>50</sub> = 2,28 µg/mL), ve Metal Şelat oluşturma (IC<sub>50</sub> = 91,63 µg/mL), değerleriyle DPPH<sup>•</sup> testinde BHT standardından yüksek olduğu, ABTS<sup>•+</sup> testinde de Troloks standardından daha yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.16).

**Origanofuran B (9):** Literatürde yer almayan bir bileşik olup, DPPH<sup>•</sup> (IC<sub>50</sub> = 19,98 µg/mL), FRAP (11,48 mmol TE/g saf bileşik), ABTS<sup>•+</sup> (IC<sub>50</sub> = 3,49 µg/mL), ve Metal Şelat oluşturma (IC<sub>50</sub> = 59,13 µg/mL), değerleriyle aktivite testlerinde standardından daha düşük aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.16).

**Apigenin-7-O-β-glukoronid (10):** Bilinen bir bileşik olup, DPPH<sup>•</sup> (IC<sub>50</sub> = 244,37 µg/mL), FRAP (2,64 mmol TE/g saf bileşik), ABTS<sup>•+</sup> (IC<sub>50</sub> = 2,75 µg/mL), ve Metal Şelat oluşturma (IC<sub>50</sub> = 50,23 µg/mL), değerleriyle DPPH<sup>•</sup> testinde standartlardan düşük aktiviteye sahip olduğu, ABTS<sup>•+</sup> testinde de Troloks standardından daha yüksek bir aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.16). Zaabat ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada Apigenin-7-O-β-glukoronid (10) bileşiğinin DPPH<sup>•</sup> ve ABTS<sup>•+</sup> analizlerinde standartların aktivitelerinden daha düşük aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. Bu bulgular bizim bulduğumuz aktivite değeriyle uyum içindedir.

**Acacetin-7-O-β-glukoronid (11):** Bilinen bir bileşik olup, DPPH<sup>•</sup> (IC<sub>50</sub> = 168,37 µg/mL), FRAP (3,72 mmol TE/g saf bileşik), ABTS<sup>•+</sup> (IC<sub>50</sub> = 5,45 µg/mL), ve Metal Şelat oluşturma (IC<sub>50</sub> = 41,03 µg/mL), değerleriyle aktivite testlerinde standartlardan daha düşük aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.16). Kim ve ark. (2007)

yaptıkları çalışmada, Acacetin-7-O- $\beta$ -glukoronid'in (11) antioksidan aktivite analizinde DPPH' aktivitesi  $IC_{50} = 102,62 \mu M$  olarak rapor edilmiştir. Bu aktivite değeri bizim bulduğumuz aktivite değeriyle uyum içindedir.

**Litospermik asit-B (12):** Bilinen bir bileşik olup, DPPH' ( $IC_{50} = 15,95 \mu g/mL$ ), FRAP (22,77 mmol TE/g saf bileşik), ABTS<sup>++</sup> ( $IC_{50} = 2,64 \mu g/mL$ ), ve Metal Şelat oluşturma ( $IC_{50} = 50,23 \mu g/mL$ ), değerleriyle DPPH' testinde BHT standardından yüksek olduğu, ABTS<sup>++</sup> testinde de Troloks standardından daha yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.16). Chen ve ark. (1999) yaptıkları çalışmada litospermik asit B'nin (12) DPPH' testinde  $IC_{50} = 3,87 \mu M$  ile yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu aktivite değeri bizim bulduğumuz aktivite değeriyle uyum içindedir.

Bütün antioksidan testlerin sonuçları değerlendirildiğinde saflaştırılan bileşiklerden bifenil-3,3',4,4'-tetraol (7) bileşiğinin standartlar dahil en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Hidrokinon (2) bileşiğinin DPPH' radikal giderme aktivitesi bifenil-3,3',4,4'-tetraol (7) hariç, diğer saflaştırılan bileşiklerden daha yüksek aktivite göstermiştir. Rosmarinik asit (6) bileşiğinin DPPH' aktivitesi bifenil-3,3',4,4'-tetraol (7) ve hidrokinon'dan (2) daha düşük iken standartlar ve diğer bileşiklerden daha yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada yapısı daha önce bilinmeyen benzofuran türevi Origanofuran A'nın (8) DPPH' aktivitesi; BHT, luteolin-7-O- $\beta$ -glikozit (4), apigenin-7-O- $\beta$ -glukoronid (10), acacetin-7-O- $\beta$ -glukoronid (11) ve kafeik asit (3) bileşiklerinin aktivitesinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu bileşiğin DPPH' aktivitesi bifenil-3,3',4,4'-tetraol (7), hidrokinon (2), rosmarinik asit (6), luteolin-7-O- $\beta$ -ksilozit (5), BHA ve Troloksdan daha düşük radikal giderme aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Origanofuran A'nın (8) FRAP aktivitesi luteolin-7-O- $\beta$ -glikozit (4), Origanofuran B (9), apigenin-7-O- $\beta$ -glukoronid (10), acacetin-7-O- $\beta$ -glukoronid'den (11) yüksek iken; izole edilen diğer bileşiklerden ve standartlardan daha düşük olduğu belirlenmiştir. Origanofuran A'nın (8) ABTS<sup>++</sup> radikal giderme aktivitesi BHT, BHA, bifenil-3,3',4,4'-tetraol (7), luteolin-7-O- $\beta$ -glikozit (4), luteolin-7-O- $\beta$ -ksilozit'ten (5) daha düşük iken, Troloks Origanofuran B (9), rosmarinik asit (6), litospermik asit (12), apigenin-7-O- $\beta$ -

glukoronid (10), acacetin-7-O- $\beta$ -glukoronid (11) ve kafeik asit (3) bileşiklerinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Origanofuran B'nin (9) DPPH<sup>\*</sup> aktivitesi; apigenin-7-O- $\beta$ -glukoronid (10) ve acacetin-7-O- $\beta$ -glukoronid (11) bileşiklerinin aktivitesinden daha yüksek iken standartlar ve izole edilen diğer bileşiklerden daha düşük aktivite gösterdiği görülmüştür. Origanofuran B'nin (9) FRAP aktivitesine bakıldığında; DPPH<sup>\*</sup> aktivitesinde olduğu gibi apigenin-7-O- $\beta$ -glukoronid (10) ve acacetin-7-O- $\beta$ -glukoronid (11) bileşiklerinin aktivitesinden daha yüksek iken; izole edilen diğer bileşiklerden ve standartlardan daha düşük aktivite gösterdiği görülmüştür. Origanofuran B'nin (9) ABTS<sup>\*\*</sup> radikal giderme aktivitesi; standartlardan, bifenil-3,3',4,4'-tetraol (7), hidrokinon (2), luteolin-7-O- $\beta$ -glikozit (4), luteolin-7-O- $\beta$ -ksilozit (5), rosmarinik asit (6), apigenin-7-O- $\beta$ -glukoronid (10) ve litospermik asit-B'nin (12) aktivitesinden daha düşük iken, acacetin-7-O- $\beta$ -glukoronid (11) ve kafeik asit (3) bileşiklerinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Sonuçlar göz önüne alındığında, izole edilen bileşiklerin aktiviteden sorumlu olan biyoaktif bileşenler olduğu görülmektedir. Tıbbi ve aromatik bitkilerden olan ve aynı zamanda kültürü yapılan *Origanum onites* L. bitkisinin uçucu yağı ve farklı ekstratlarıyla ilgili literatürde birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda antioksidan, antibakteriyel, antifungal ve insektisit gibi çeşitli biyolojik aktivite çalışmaları rapor edilmiştir. *Origanum onites* L. bitkisinden bileşik saflaştırılması ve yapı belirlenmesi ile ilgili önceden yapılmış bir çalışma bulunmadığından bu çalışma, bitkinin kimyasal içeriğini ortaya koyması açısından büyük önem arz etmektedir.

Bu çalışmada *Origanum onites* L. bitkiden izole edilen benzofuran türevi olan iki yeni bileşiğin (8 ve 9 Nolu bileşikler) saflaştırılması ve bunların aktivitelerinin de yüksek olması literatüre kazandırılmış bir değerdir. Bitkiden izole edilen yeni bileşiklerin yüksek antioksidan aktiviteye sahip olması, antioksidan ajan olarak kullanılan sentetiklerin alternatifi olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada elde edilen sonuçların ileriki dönemlerde yapılacak olan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarına basamak olma potansiyeline sahiptir.

## KAYNAKLAR

- Aherne, S. A., O'Brien, N. M., 2002. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 18(1), 75-81.
- Aksit, H., M. Celik, S., Sen, O., Erenler, R., Demirtas, İ., Telci, İ., Elmastas, M., 2014. Complete Isolation and Characterization of Polar Portion of *Mentha dumetorum* Water Extract. *Records Of Natural Products* 8(3), 277-280.
- Altınışık, M. 2000. Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar. AydınTıp Fak Biyokimya Ders Notları.
- Arts, I. C., Hollman, P. C., 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr*, 81(1 Suppl), 317S-325S.
- Aslan, M., Derviş, S., 2010. Antifungal activity of essential oils against three vegetative-compatibility groups of *Verticillium dahliae*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 26(10) 1813-1821.
- Bao, K., Fan, A., Dai, Y., Zhang, L., Zhang, W., Cheng, M., Yao, X., 2009. Selective demethylation and debenzoylation of aryl ethers by magnesium iodide under solvent-free conditions and its application to the total synthesis of natural products. *Org Biomol Chem*, 7(24), 5084-5090.
- Barber, D. A., Harris, S. R., 1994. Oxygen free radicals and antioxidants: a review. *Am Pharm*, NS34(9), 26-35.
- Baser, K. H. C., 1993. Essential Oils of Anatolian Labiatea. A Profile. *Acta Horticulturae*, 333 217-237.
- Baydar, H., 2007. Tıbbi Aromatik ve Keyf Bitkileri Bilim ve Teknolojisi. SDÜ Ziraat Fakültesi (Isparta), 51.
- Baytop, T. 1999. Therapy with Medicinal Plants in Turkey (Past and Present). Istanbul,193, Nobel Tıp Publications, .
- Bhutani, K. K., Mehta, M., Kaur, N., 2001. Determination of marker constituents from *Cissus quadrangularis* Linn. and their quantitation by HPTLC and HPLC. *Phytochemical Analysis* 12 91-95.
- Blois, M. S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 26 1199-1200.
- Boldbaatar, D., El-Seedi, H. R., Findakly, M., Jabri, S., Javzan, B., Choidash, B., Goransson, U., Hellman, B., 2014. Antigenotoxic and antioxidant effects of the Mongolian medicinal plant *Leptopyrum fumarioides* (L): An in vitro study. *Journal of Ethnopharmacology*, 155(1), 599-606.
- Borbalan, A. M. A., Zorro, L., Guillen, D. A., Barroso, C. G., 2003. Study of the polyphenol content of red and white grape varieties by liquid chromatography-mass spectrometry and its relationship to antioxidant power. *Journal of Chromatography A*, 1012(1), 31-38.
- Cadenas, E. 1998. Mechanisms of antioxidant action. In: Tomris Özben, editor. *Free Radicals, Oxidative Stress and Antioxidants*. New York: Plenum Press, 1998; 237-251.
- Cemeli, E., Baumgartner, A., Anderson, D., 2009. Antioxidants and the Comet assay. *Mutat Res*, 681(1), 51-67.
- Cetin, H., Erler, F., Yanikoglu, A., 2007. A comparative evaluation of *Origanum onites* essential oil and its four major components as larvicides against the pine

- processionary moth, *Thaumetopoea wilkinsoni* Tams. *Pest Manag Sci*, 63(8), 830-833.
- Chen, C. P., Yokozawa, T., Chung, H. Y., 1999. Inhibitory effect of caffeic acid analogues isolated from *Salviae Miltiorrhizae Radix* against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Exp Toxicol Pathol*, 51(1), 59-63.
- Chiruvella, K. K., Mohammed, A., Dampuri, G., Ghanta, R. G., Raghavan, S. C., 2007. Phytochemical and Antimicrobial Studies of Methyl Angolensate and Luteolin-7-O-glucoside Isolated from Callus Cultures of *Soymida febrifuga*. *Int J Biomed Sci*, 3(4), 269-278.
- Christensen, L. P., Brandt, K., 2006. Acetylenes ve Psoralens In *Plant Secondary Metabolites*. Blackwell Publishing, Oxford, U.K. 147-163.
- Cross, C. E., Halliwell, B., Borish, E. T., Pryor, W. A., Ames, B. N., Saul, R. L., Mccord, J. M., Harman, D., 1987. Oxygen Radicals and Human-Disease. *Annals of Internal Medicine*, 107(4), 526-545.
- Çam, M., Hışıl, Y., 2004. Gıda Flavonoidlerinin Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi ile Analizi. *Akademik Gıda Dergisi*, 8 22-25.
- Davis, P. H. 1982. *Flora of Turkey and Aegean Islands*. Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Dinis, T. C., Maderia, V. M., Almeida, L. M., 1994. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys*, 315(1), 161-169.
- Durust, N., Ozden, S., Umur, E., Durust, Y., Kucukislamoglu, M., 2001. The isolation of carboxylic acids from the flowers of *Delphinium formosum*. *Turkish Journal of Chemistry*, 25(1), 93-97.
- Elliot, J. G., 1999. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Tech*, 53(2), 46-48.
- Elmastas, M., Gulcin, I., Beydemir, S., Kufrevioglu, O. I., Aboul-Enein, H. Y., 2006. A study on the in vitro antioxidant activity of juniper (*Juniperus communis* L.) fruit extracts. *Analytical Letters*, 39(1), 47-65.
- Erkan, N., 2012. Antioxidant activity and phenolic compounds of fractions from *Portulaca oleracea* L. *Food Chemistry*, 133(3), 775-781.
- Fabre, N., Rustan, I., de Hoffmann, E., Quetin-Leclercq, J., 2001. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 12(6), 707-715.
- Fang, Z. X., Zhang, M., Wang, L. X., 2007. HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in bayberries (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.). *Food Chemistry*, 100(2), 845-852.
- Fraga, C. G. 2010. *Plant Phenolics and Human Health*. New Jersey, 593, Wiley.
- Gill, S. S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem*, 48(12), 909-930.
- Gross, M., 2004. Flavonoids and cardiovascular disease. *Pharmaceutical Biology*, 42 21-35.
- Gulcin, İ., 2002. Isırgan otunun (*Urtica dioica*) antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, oksidatif enzimlerinin karakterizasyonu ve bazı in vivo etkilerinin incelenmesi. Ataturk Universitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü s114.

- Gulluce, M., Karadayi, M., Guvenalp, Z., Ozbek, H., Arasoglu, T., Baris, O., 2012. Isolation of some active compounds from *Origanum vulgare* L. ssp *vulgare* and determination of their genotoxic potentials. *Food Chemistry*, 130(2), 248-253.
- Gül, S., Çevik, G., Gül, M., Özel, N., Eds. (2002). Ege Bölgesinde İzmir Kekigi (*Origanum onites*) ve Adaçayının (*Salvia triloba*) Yağ Analizlerinden Yararlanarak Yörelere Göre Kesim Zamanının Belirlenmesi. Ege Ormancılık Araştırma Müdürlüğü. Teknik Bülten No:21. Orman Bakanlığı Yayın No: 153, Müdürlük Yayın No: 28 İzmir, Türkiye.
- Hajdok, S., Conrad, J., Beifuss, U., 2012. Laccase-catalyzed domino reactions between hydroquinones and cyclic 1,3-dicarbonyls for the regioselective synthesis of substituted p-benzoquinones. *J Org Chem*, 77(1), 445-459.
- Halliwell, B., 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, 344(8924), 721-724.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. 2000. *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York: Oxford
- Hartwell, J. L. 1982. *Plants Used Against Cancer*. Quarterman Publications, Lawrence-Massachusetts.
- Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., Okuda, T., 1988. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 36(6), 2090-2097.
- Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., Vandeputte, B., 1993. Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of Tea Infusions, Wines, and Fruit Juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(8), 1242-1246.
- Iwashina, T. K., G., 2012. Flavone and Flavonol Glycosides from the Leaves of *Triumfetta procumbens* in Ryukyu Islands. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science Series B*, 38(2), 63-67.
- Jackson, R. S. 2000. *Wine Science*, 633, Elsevier.
- Janssen, Y. M., Van Houten, B., Borm, P. J., Mossman, B. T., 1993. Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab Invest*, 69(3), 261-274.
- Kawabata, J., Mizuhata, K., Sato, E., Nishioka, T., Aoyama, Y., Kasai, T., 2003. 6-hydroxyflavonoids as alpha-glucosidase inhibitors from marjoram (*Origanum majorana*) leaves. *Biosci Biotechnol Biochem*, 67(2), 445-447.
- Khallouki, F., Haubner, R., Erben, G., M. Ulrich, C. M., Owen, R. W., 2012. Phytochemical composition and antioxidant capacity of various botanical parts of the fruits of *Prunus domestica* L. from the Lorraine region of Europe. *Food Chemistry*, 133(3), 697-706.
- Kil, H. Y., Seong, E. S., Ghimire, B. K., Chung, M., Kwon, S., S., Goh, E. J., Heo, K., Kim, M. J., Lim, J. D., Lee, D., Yu, C. Y., 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of crude *Sorghum* extract. *Food Chemistry*, 115 1234-1239.
- Kim, E. O., Oh, J. H., Lee, S. K., Lee, J. Y., Choi, S. W., 2007. Antioxidant properties and quantification of phenolic compounds from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds. *Food Science and Biotechnology*, 16(1), 71-77.
- Kocabas, Y. Z., Karaman, S., 2001. Essential oils of Lamiaceae family from South East Mediterranean Region (Turkey). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4 1221-1222.
- Kohlmeier, L., Simonsen, N., Mottus, K., 1995. Dietary modifiers of carcinogenesis. *Environ Health Perspect*, 103 Suppl 8 177-184.

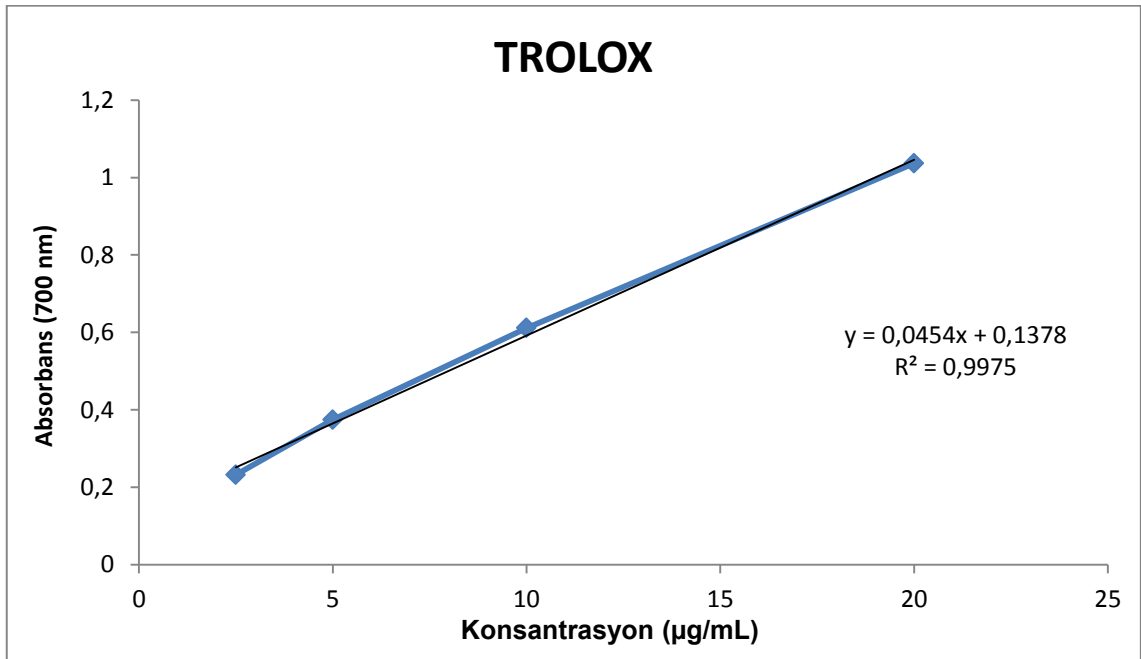
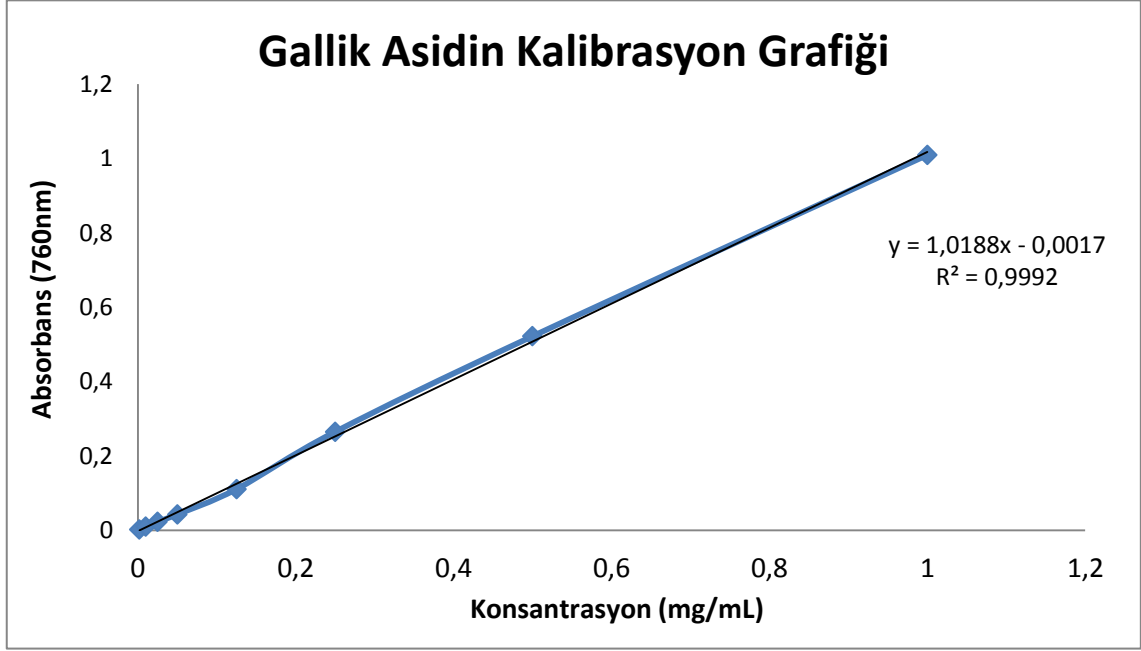
- Kutlular, O., Ozel, M. Z., 2009. Analysis of Essential Oils of *Origanum onites* by Superheated Water Extraction Using GCxGC-TOF/MS. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 12(4), 462-470.
- Lagouri, V., Bantouna, A., Stathopoulos, P., 2010. A Comparison of the Antioxidant Activity and Phenolic Content of Nonpolar and Polar Extracts Obtained from Four Endemic Lamiaceae Species Grown in Greece. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34(5), 872-886.
- Lucy, H., Edgar, J. D., 1999. Medicinal Plants: A reemerging Health aid. *Electronic. J. Biotechnol*, 2(2), 1-15.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 79(5), 727-747.
- Mates, J. M., 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153(1-3), 83-104.
- McCord, J. M., 1993. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem*, 26(5), 351-357.
- Murata, T., Oyama, K., Fujiyama, M., Oobayashi, B., Umehara, K., Miyase, T., Yoshizaki, F., 2013. Diastereomers of lithospermic acid and lithospermic acid B from *Monarda fistulosa* and *Lithospermum erythrorhizon*. *Fitoterapia*, 91 51-59.
- Neuhouser, M. L., 2004a. Flavonoids and cancer prevention: what is the evidence in humans. *Pharm. Biol*, 42 34-45.
- Neuhouser, M. L., 2004b. Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. *Nutr Cancer*, 50(1), 1-7.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn. J. Nutr.* , 44 307-315.
- Özhatay, N., Koyuncu, M. (1998). Türkiye’de doğal bitkilerin ticareti. Ankara.: 11-38.
- Pekkarinan, S. S., Heinonen, I. M., Hopia, A. I., 1999. Flavonoids quercetin, myricetin, kaemferol and (+)-catechin as antioxidants in methyl linoleate. *J. Sci. Food Agric*, 79 499-506.
- Pellegrini, N., Miglio, C., Del Rio, D., Salvatore, S., Serafini, M., Brighenti, F., 2009. Effect of domestic cooking methods on the total antioxidant capacity of vegetables. *Int J Food Sci Nutr*, 60 Suppl 2 12-22.
- Pham-Huy, L. A., He, H., Pham-Huy, C., 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci*, 4(2), 89-96.
- Porfirio, S., Fale, P. L. V., Madeira, P. J. A., Florencio, M. H., Ascensao, L., Serralheiro, M. L. M., 2010. Antiacetylcholinesterase and antioxidant activities of *Plectranthus barbatus* tea, after in vitro gastrointestinal metabolism. *Food Chemistry*, 122(1), 179-187.
- Prasain, J. K., Wang, C. C., Barnes, S., 2004. Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free Radic Biol Med*, 37(9), 1324-1350.
- Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K., Kumar, M. N., 2006. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J Control Release*, 113(3), 189-207.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26(9-10), 1231-1237.

- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., Pridham, J. B., 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res*, 22(4), 375-383.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G., 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2 152–159.
- Sardesai, V. M., 1995. Role of antioxidants in health maintenance. *Nutr Clin Pract*, 10(1), 19-25.
- Schmincke, K. H., 2003. Medicinal Plants for forest conservation and healthcare. *Non-Wood Forest Products 11*, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Shahidi, F., Naczk, M. 1995. *Food Phenolics*. Lanchester, USA,199-225, TechnomicPublishing Company Book.
- Slinkard, J., Singleton, V. L., 1979. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Viticult.*, 28 49-55.
- Sokovic, M., Tzakou, O., Pitarokili, D., Couladis, M., 2002. Antifungal activities of selected aromatic plants growing wild in Greece. *Nahrung*, 46(5), 317-320.
- Song, O., 2004. Oxidative Stress: A Theoretical Model or Biological Reality? *C. R. Biologies*, 327 649-662.
- Stoner, G. D., Morse, M. A., Kelloff, G. J., 1997. Perspectives in cancer chemoprevention. *Environ Health Perspect*, 105 Suppl 4 945-954.
- Sun, Y., Zhu, H., Wang, J., Liu, Z., Bi, J., 2009. Isolation and purification of salvianolic acid A and salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* by high-speed counter-current chromatography and comparison of their antioxidant activity. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 877(8-9), 733-737.
- Surh, Y. J., 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer*, 3(10), 768-780.
- Toncer, O., Karaman, S., Kizil, S., Diraz, E., 2009. Changes in Essential Oil Composition of *Oregano (Origanum onites L.)* due to Diurnal Variations at Different Development Stages. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 37(2), 177-181.
- Tozoğlu, F. 2011. Erzincan kirazı (*Cerasus erzincanica*; Ş. Yıldırım) sap ve tohum kısımlarının antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Erzincan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Vital, P. G., Velasco, R. N., Demigillo, J. M., Rivera, W. L., 2010. Antimicrobial activity, cytotoxicity and phytochemical screening of *Ficus septica* Burm and *Sterculia foetida* L. leaf extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(1), 58-63.
- WHO (1998). *Quality control methods for medicinal plant materials*. Geneva.
- Yalçın, A. S., 1998. Antioksidanlar. *Klinik Gelisim*, 11 S:342-346.
- Yamaguchi, L. F., Lago, J. H., Tanizaki, T. M., Mascio, P. D., Kato, M. J., 2006. Antioxidant activity of prenylated hydroquinone and benzoic acid derivatives from *Piper crassinervium* Kunth. *Phytochemistry*, 67(16), 1838-1843.
- Yan, F. L., Wang, A. X., Jia, Z. J., 2004. Benzofuran derivatives from *Ligularia stenocephala*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 51(4), 863-868.
- Yi, O., Jovel, E. M., Towers, G. H., Wahbe, T. R., Cho, D., 2007. Antioxidant and antimicrobial activities of native *Rosa* sp. from British Columbia, Canada. *Int J Food Sci Nutr*, 58(3), 178-189.

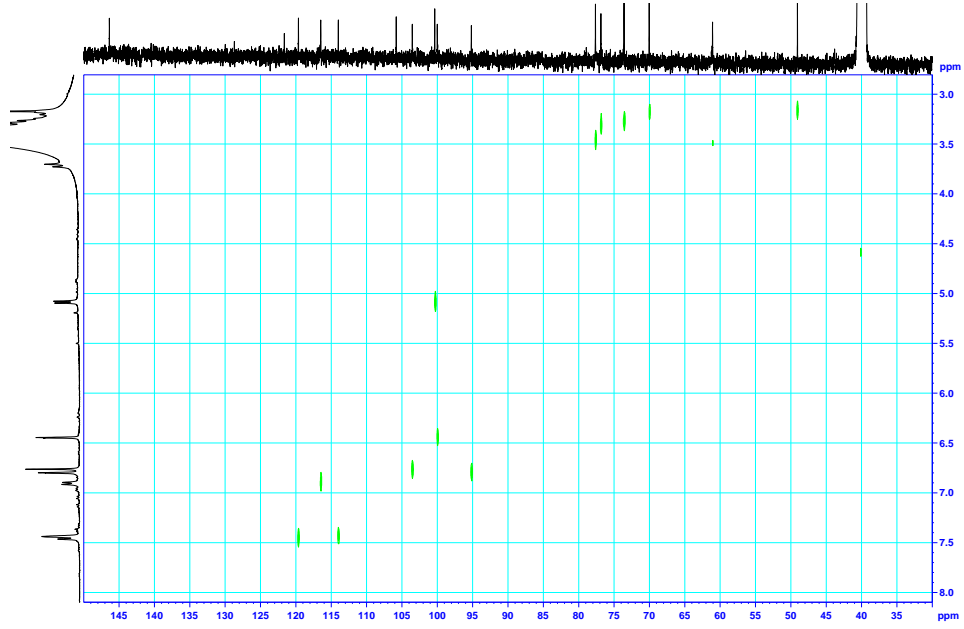
- Zaabat, N., Hay, A. E., Michalet, S., Darbour, N., Bayet, C., Skandrani, I., Chekir-Ghedira, L., Akkal, S., Dijoux-Franca, M. G., 2011. Antioxidant and antigenotoxic properties of compounds isolated from *Marrubium deserti* de Noe. *Food Chem Toxicol*, 49(12), 3328-3335.
- Zhou, J. R. (2006). Flavonoids as inhibitors of tumor metastasis. In *Nutrition and Cancer PreVention*: 325-349.

## EKLER

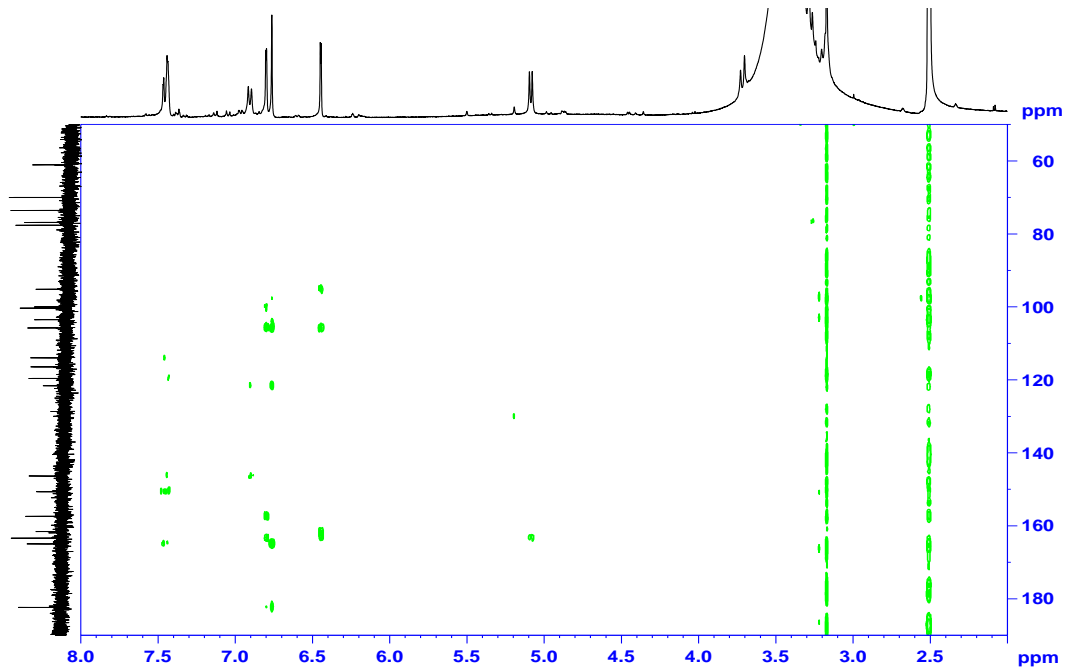
### EK-1 Antioksidan Aktivite Testlerinde Kullanılan Standartların Kalibrasyon Grafikleri



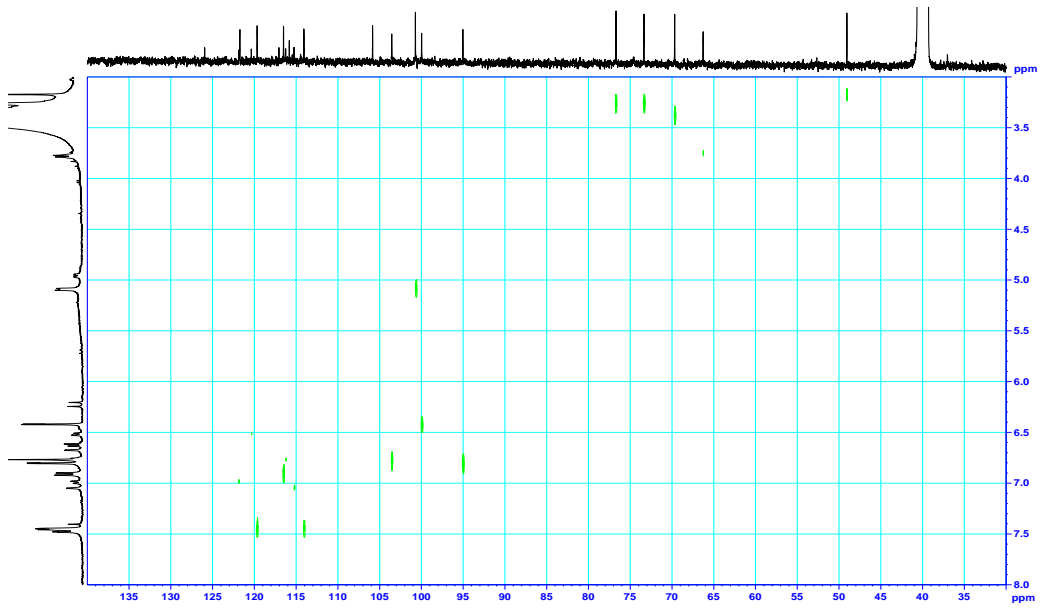
## EK-2. İzole Edilen Bileşiklerin 2D-NMR Spektrumları



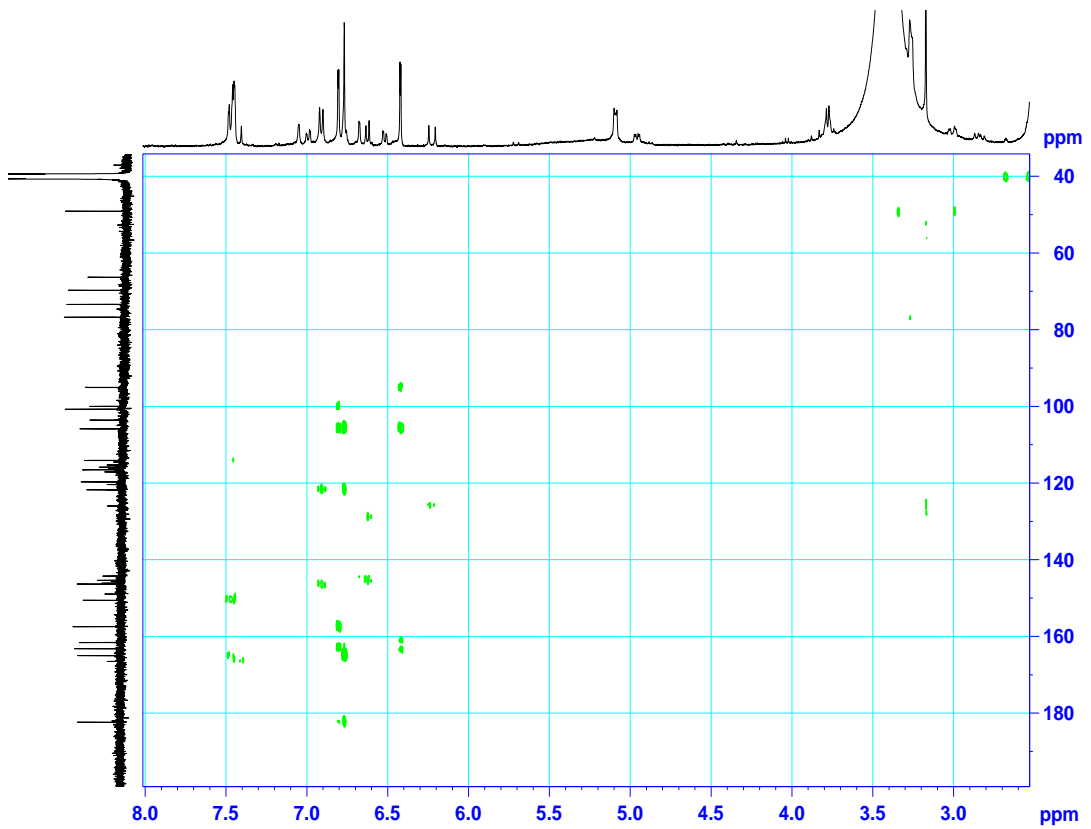
Luteolin-7-O- $\beta$ -glükozit'in (4) HETCOR spektrumu ( $^1\text{H-NMR}$  400 MHz,  $^{13}\text{C-NMR}$  100 MHz DMSO- $d_6$ )



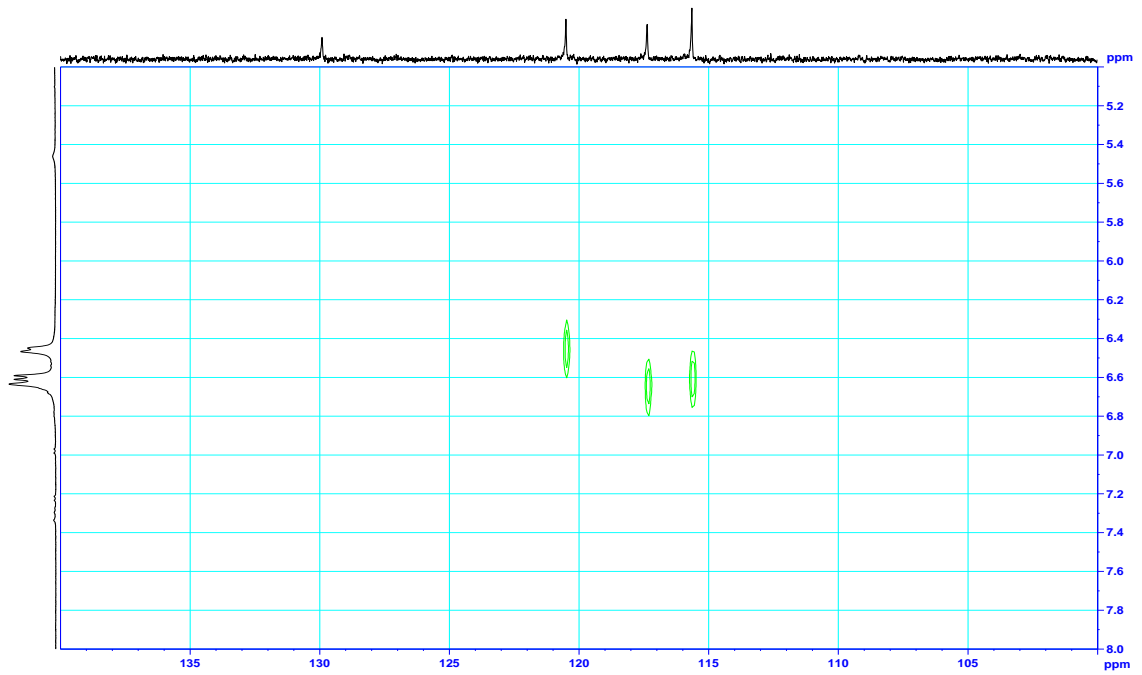
Luteolin-7-O- $\beta$ -glükozit'in (4) HMBC spektrumu ( $^{13}\text{C-NMR}$  100 MHz DMSO- $d_6$ )



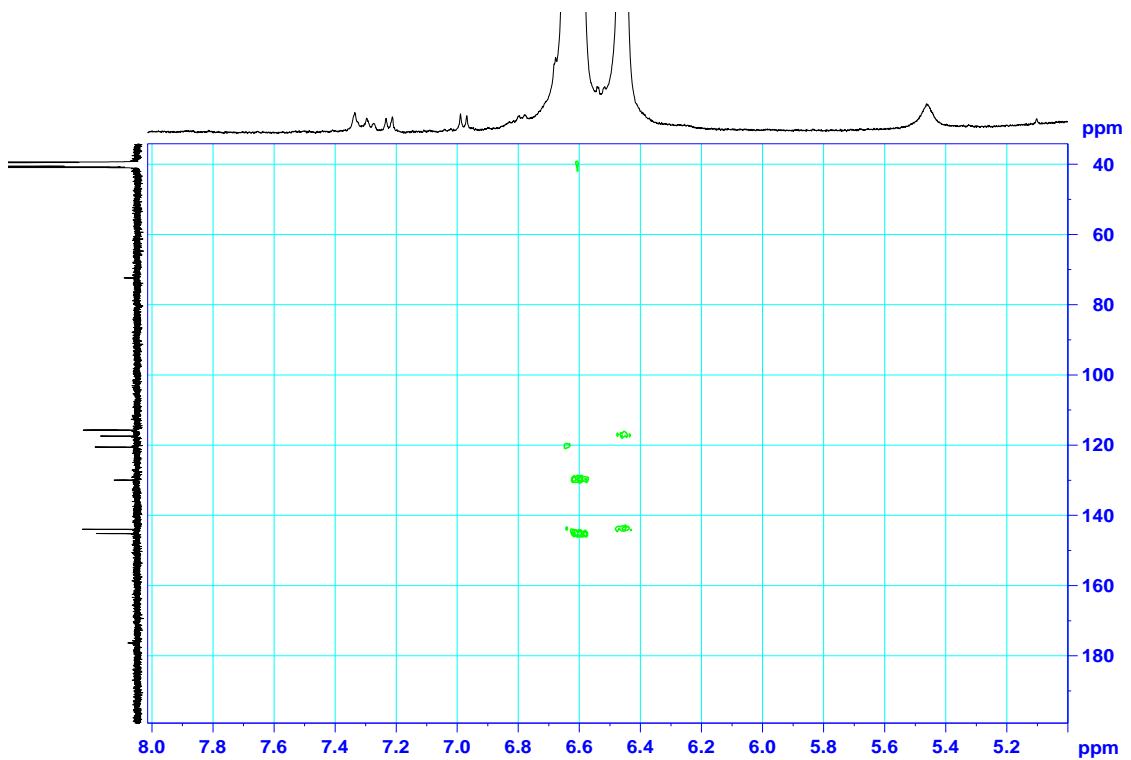
Luteolin-7-O- $\beta$ -ksilozit'in (5) HETCOR spektrumu ( $^1\text{H-NMR}$  400 MHz,  $^{13}\text{C-NMR}$  100 MHz DMSO- $d_6$ )



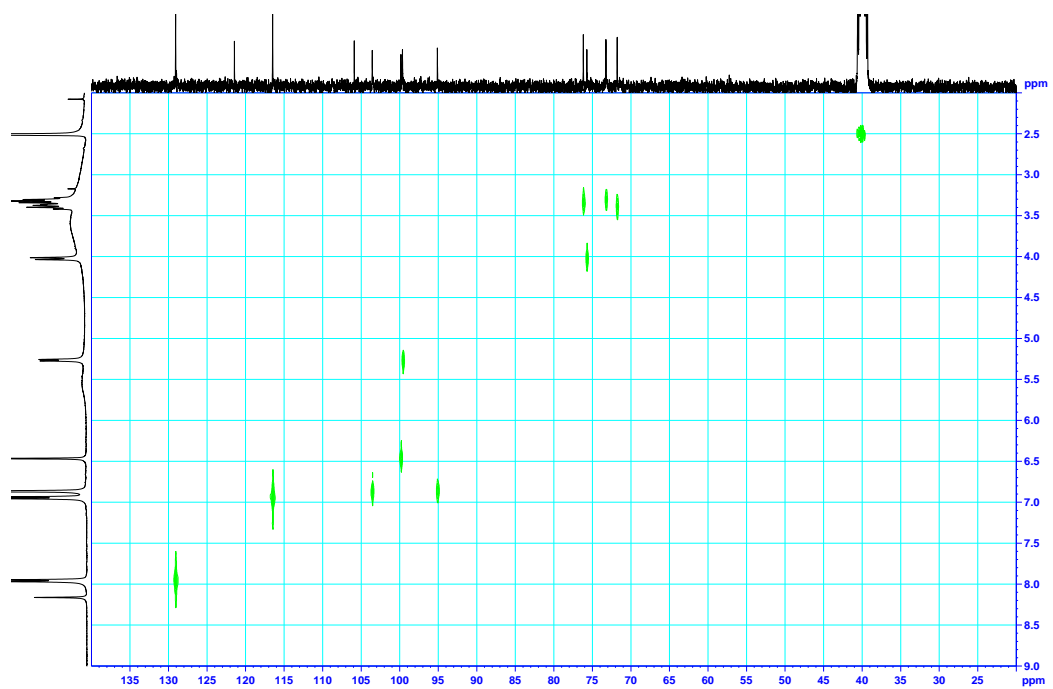
Luteolin-7-O- $\beta$ -ksilozit'in (5) HMBC spektrumu ( $^{13}\text{C-NMR}$  100 MHz DMSO- $d_6$ )



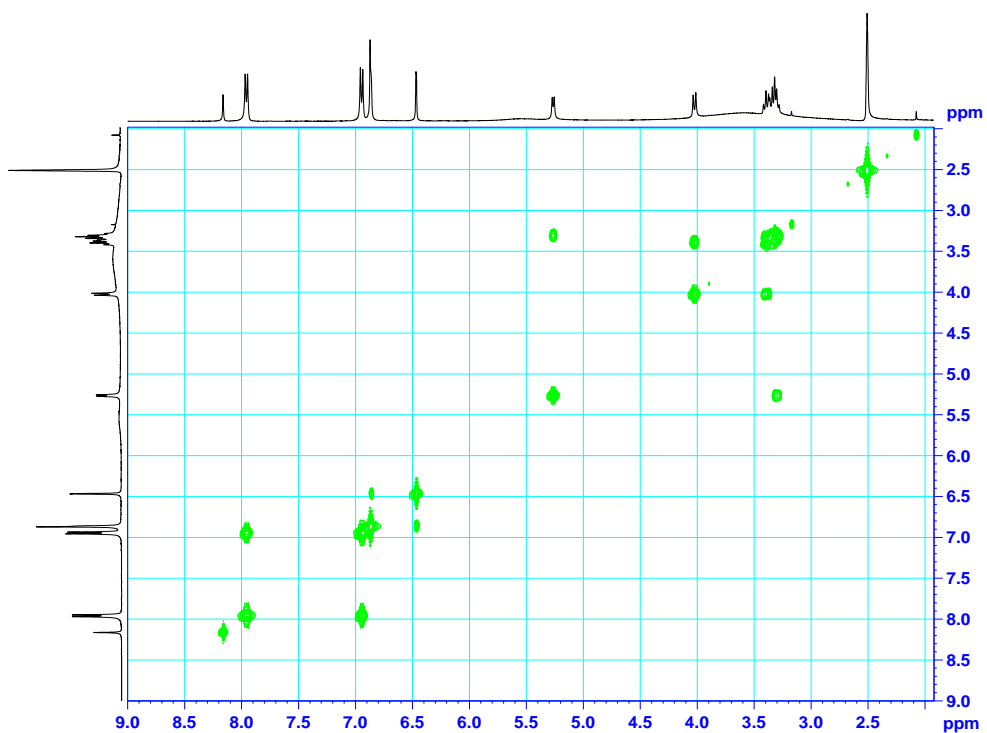
Bifenil-3,3',4,4'-tetraol'ün (7) HETCOR spektrumu ( $^1\text{H}$ -NMR 400 MHz,  $^{13}\text{C}$ -NMR 100 MHz DMSO- $\text{d}_6$ )



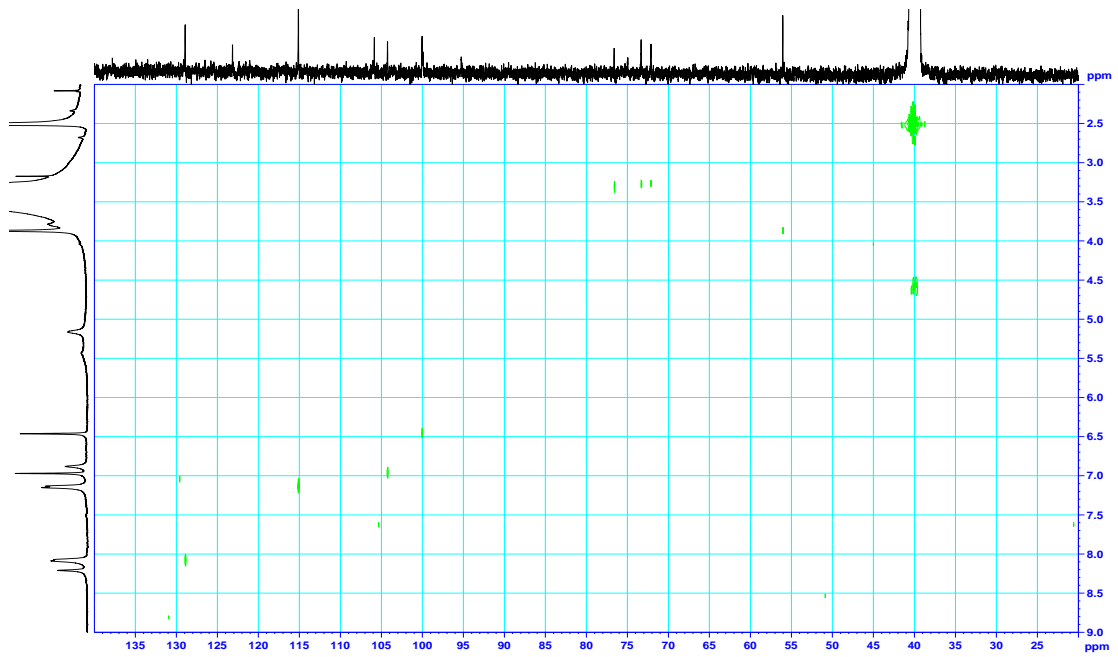
Bifenil-3,3',4,4'-tetraol'ün (7) HMBC spektrumu ( $^{13}\text{C}$ -NMR 100 MHz DMSO- $\text{d}_6$ )



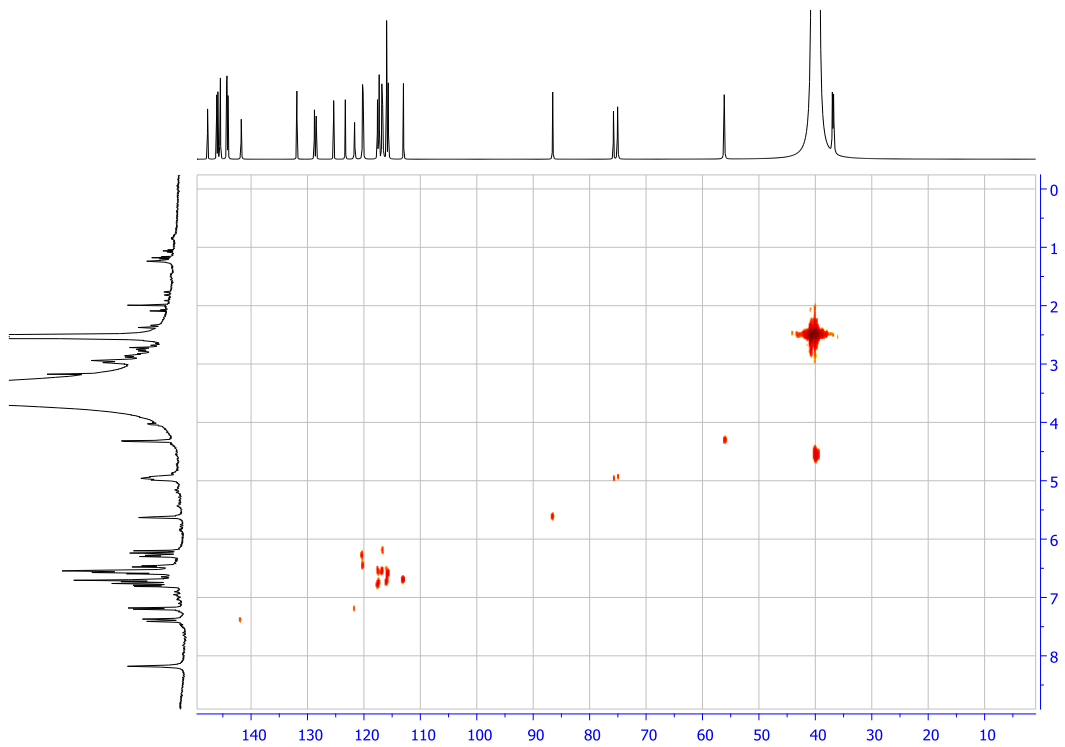
Apigenin-7-O- $\beta$ -glukoronid'in (10) HETCOR spektrumu ( $^1\text{H-NMR}$  400 MHz,  $^{13}\text{C-NMR}$  100 MHz DMSO- $d_6$ )



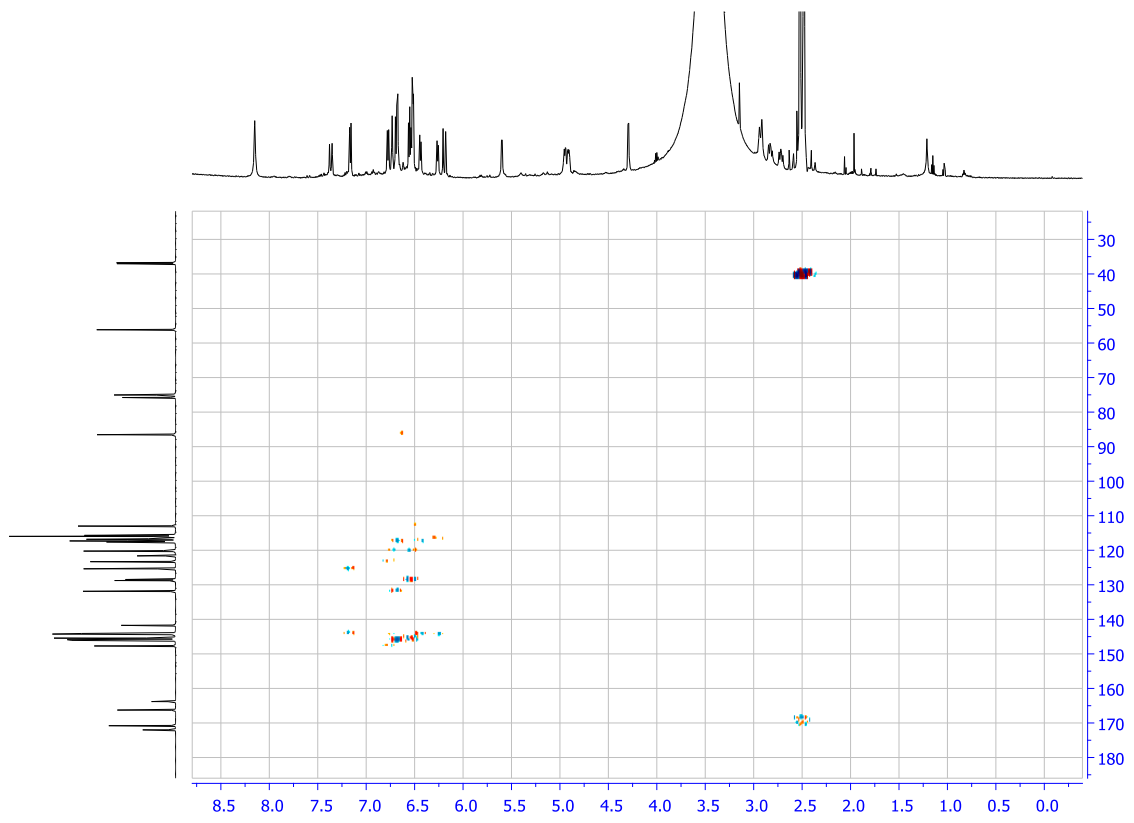
Apigenin-7-O- $\beta$ -glukoronid'in (10) COSY spektrumu ( $^1\text{H-NMR}$  400 MHz DMSO- $d_6$ )



Acacetin-7-O- $\beta$ -glukoronid'in (11) HETCOR spektrumu ( $^1\text{H-NMR}$  400 MHz,  $^{13}\text{C-NMR}$  100 MHz DMSO- $d_6$ )



Litospermik asit B'nin (12) HETCOR spektrumu ( $^1\text{H-NMR}$  400 MHz,  $^{13}\text{C-NMR}$  100 MHz DMSO- $d_6$ )



Litospermik asit B'nin (12) HMBC spektrumu (<sup>13</sup>C-NMR100 MHz DMSO-d<sub>6</sub>)

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Beşir İSNAÇ  
Doğum Tarihi ve Yer : 24.10.1987  
Medeni Hali : Bekar  
Yabancı Dili : İngilizce  
Telefon : 0538 393 47 34  
Faks : -  
e-mail : [besirsnac33@gmail.com](mailto:besirsnac33@gmail.com)

### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi	2015
Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi	2013
Lise	İncesu Lisesi	2004

### Projelerde Yaptığı Görevler

#### Tübitak Projeleri:

*Origanum solymicum* P.H. Davis, *Origanum onites* L., *Origanum cyriacum* L. Bitkilerindeki sekonder metabolitlerin aktivite kontrollü izolasyonu, yapılarının aydınlatılması ve antioksidan aktivitelerinin incelenmesi (113Z195) **Bursiyer** 2013-2015.

## **Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP)**

Kısa Mahmut Otuunun (*Teucrium chamaedrys* L. Subsp. *chamaedrys*) Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi ve Etkili Bileşiklerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu (2011/16). Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, **Lisans Bitirme Tezi**, 2011-2012.

## **Yayınlar**

1. Erenler, R., Elmastas, M., Sen, O., **İsnac, B.**, Topcu G., Aksit, H., Yildiz, I., Telci, I. and Topcu, G., Antioxidant Activities of Chemical Constituents Isolated Some *Origanum* Species, BIT' s 5<sup>th</sup> Annual International Congress of Medicchem Biotechnology World Congress November 18<sup>th</sup>- 20<sup>th</sup>, 2014, Suzhou, China.
2. Erenler, R., **İsnac, B.**, Sen, O., Aksit, H., Kayir, O. and Elmastas, M., Secondary Metabolites Isolated from *Origanum onites* Activities of Chemical Constituents Isolated Some *Origanum* Species, BIT' s 5<sup>th</sup> Annual International Congress of Medicchem Biotechnology World Congress November 18<sup>th</sup>- 20<sup>th</sup>, 2014, Suzhou, China
3. Şen, Ö., Şahin, A., Gezer, E., Yurt, M., **İsnaç, B.**, Tüfekçi, A.R., Demirtaş, İ., *Centaurea solstitialis* subsp. *solstitialis* bitkisinin antiproliferatif aktivitelerinin incelenmesi ve fitokimyasal analizi, 25. Ulusal Kimya Kongresi, 27 Haziran – 2 Temmuz 2011, Erzurum.
4. Şen, Ö., **İsnaç, B.**, Gezer, E., Yurt, M., Genç, N., *Centeurea solstitialis* subsp. *solstitialis* Bitkisinin Yaprak ve Çiçek Kısmı Ekstraktlarının Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi, 25. Ulusal Kimya Kongresi, 27 Haziran – 2 Temmuz 2011, Erzurum.
5. **İsnaç, B.**, Elmastaş, M., Genç, N., Akşit, H., Şen, Ö., Demirtaş, İ., Erenler, R., *Teucrium chamaedrys* L. Subsp. *chamaedrys* Bitkisinden Diterpenoid Bileşiklerinin İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Kromatografi Kongresi, Uludağ Üniversitesi 19-22 Haziran 2013, Bursa.

**6. İsnaç, B.,** Elmastaş, M., Genç, N., Akşit, H., TAŞ, A., 2012. Kısa Mahmut Otuunun (*Teucrium Chamaedrys L. Subsp. Chamaedrys*) Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi ve Etkili Bileşenlerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Kromatografi Kongresi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tokat.

**7. İsnaç, B.,** Telci, İ., Elmastaş, M., Erenler, R., Akşit, H., Şen, Ö., *Origanum onites L.* Bitkisinden Hidrokinon Molekülünün Saflaştırılması, Antioksidan ve Antikanser Aktivitelerinin Araştırılması. 3. İlaç Kimyası: İlaç Etkin Maddesi Tasarımı, Sentezi, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi, 20-22 Mart 2015, Antalya

**8. İsnaç, B.,** Akşit, H., Telci, İ., Elmastaş, M., Köysü, P., Erenler, R., Şen, Ö., *Origanum onites L.* Bitkisinden İzole Edilen Bileşenlerinin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi. Kromatografi Kongresi, Uşak Üniversitesi, 8-10 Nisan 2015, Uşak