

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***ARNEBIA PURPUREA* S. ERİK & H. SÜMBÜL ÜZERİNDE
FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR**

Ecz. Merve YÜZBAŞIOĞLU

Farmakognozi Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA
2010

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***ARNEBIA PURPUREA* S. ERİK & H. SÜMBÜL ÜZERİNDE
FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR**

Ecz. Merve YÜZBAŞIOĞLU

Farmakognozi Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Ayşe UZ

ANKARA
2010

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü' ne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Farmakognozi Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. L. Ömür Demirezer
Hacettepe Üniversitesi



Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Ayşe Uz
Hacettepe Üniversitesi



Üye:

Prof. Dr. İclal Saraçoğlu
Hacettepe Üniversitesi



Üye:

Prof. Dr. Bilge Şener
Gazi Üniversitesi:



Üye:

Doç. Dr. Ü. Şebnem Harput
Hacettepe Üniversitesi



ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu' nun kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Hakan S. Orer

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bana her konuda destek olan kıymetli danışmanım Doç. Dr. Ayşe UZ'a

Tez çalışmalarım sırasında bana her türlü imkanı sağlayan önceki AbD başkanımız Prof. Dr. L. Ömür Demirezer'e ve şu anki AbD başkanımız Prof. Dr. İclal Saraçoğlu'na,

Bitki örneğinin toplanması ve tayininde yardımcı olan Prof. Dr. Hayri Duman ve Uzm. Bio. Bilgehan Bilgili'ye (Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü),

NMR analizlerini yapan ve madde yapılarının yorumlanmasında katkıda bulunan Doç. Dr. Zühal Güvenalp'e (Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi AbD), Doç. Dr. Cavit Kazaz'a (Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü), Prof. Dr. Gabor Toth ve Dr. Andras Simon'a (Budapeşte Teknoloji ve Ekonomi Üniversitesi, İnorganik ve Analitik Kimya Bölümü, Budapeşte, Macaristan), Kütle spektroskopisi analizini gerçekleştiren Prof. Dr. Hakan Göker'e (Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya AbD),

Aktivite çalışmalarımı gerçekleştirmeme olanak sağlayan Prof. Dr. İclal Saraçoğlu'na ve sitotoksisite çalışmalarımı yürüten Doç. Dr. Şebnem Harput'a, aktivite çalışmalarımızda kullanılan kanser hücrelerini temin ettiğimiz Doç. Dr. İmran Vural'a (Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji AbD),

Aktivite çalışmalarım sırasında yardımını gördüğüm Ecz. Yasin Genç'e, Botanik terimlerin çevrilmesinde yardımcı olan Uzm. Bio. Z. Ceren Arıtuluk'a, tez yazımı sırasında teknik desteğini esirgemeyen Bio. O. Tuncay Açar'a, Farmakognozi ve Farmasötik Botanik ailesindeki tüm öğretim üye ve yardımcılara,

BIDEB 2210- Yurtiçi Yüksek Lisans Destek Bursu için TÜBİTAK'a,

Benim bugünlerde olmamda çok büyük emekleri olan anneanneme, dedeme, aileme ve beni bu dönemde yalnız bırakmayan tüm arkadaşlarıma en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Ecz. Merve YÜZBAŞIOĞLU

ÖZET

Yüzbaşıoğlu M., *Arnebia purpurea* S. Erik & H. Sümbül Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognози Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2010.

Arnebia cinsi Türkiye bitki örtüsünde 5 tür ile temsil edilmektedir. Bu çalışmada, endemik bir tür olan ve üzerinde fitokimyasal ve biyolojik aktiviteye ait hiçbir çalışma yapılmamış olan *Arnebia purpurea* bitkisinin kökleri ve topraküstü kısımları kullanılarak hazırlanan ekstreler üzerinde Farmakognozik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bitkinin açık havada kurutulmuş ve toz edilmiş kökleri *n*-hekzan ile, topraküstü kısımları ise metanol ile ekstre edilmiştir. Metanol ekstresi, düşük ısıda ve alçak basınç altında uçurulduktan sonra, suda çözülüp petrol eteri ile partisyona tabi tutulmuş, petrol eterli fazda yağsı bileşikler ve pigmentler uzaklaştırılmış ve sulu ekstre ile çalışılmıştır. Hazırlanan ekstreler üzerinde gerçekleştirilen çeşitli kromatografik (açık kolon kromatografisi, vakum sıvı kromatografisi, orta basınçlı sıvı kromatografisi) izolasyon çalışmaları sonucunda, köklerden üçü karışım halinde toplam 5 naftokinon (izovalerilalkannin: **APK-3**, α -metil-*n*-butil alkannin: **APK-8**, izobutilalkannin: **APK-9**, asetilalkannin: **APK-4** ve alkannin **APK-5**); 1 steroid yapılı bileşik (β -sitosterol: **APK-6**); 1 triterpen (3-*O*-asetiloleanolik asit: **APK-7**); topraküstünden ikisi karışım halinde 3 flavonoid glikoziti (izoramnetin 3-*O*-rutinozit: **APT-4**, kemferol 3-*O*-rutinozit: **APT-5**, kemferol 3-*O*-(5"-asetil)apiofuranozit 7-*O*-ramnopiranozit: **APT-7**) ve bir fenolik asit (rozmarinik asit: **APT-1**) bileşiklerinin yapıları spektroskopik yöntemler (UV, IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, 2D-NMR, Kütle spektr.) kullanılarak aydınlatılmıştır. Elde edilen bileşiklerin sitotoksik etkileri, MTT yöntemi ile L929 fare fibrosarkoma hücreleri üzerinde araştırılmış ve naftokinon türevi olan maddelerin (**APK-3/8/9**, **APK-4** ve **APK-5**) denenen hücreler üzerinde kuvvetli sitotoksik etkileri olduğu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Arnebia purpurea*, Boraginaceae, naftokinonlar, flavonoidler, fenolik asitler, triterpen, steroid, MTT, sitotoksik aktivite.

ABSTRACT

Yuzbasioglu M., Pharmacognostical Researches on *Arnebia purpurea* ., S. Erik & H. Sümbül, Hacettepe University, Institute of Health Sciences, Pharmacognosy Programme, M. S. Thesis, Ankara, 2010. The genus *Arnebia* is represented by 5 species in Turkish flora. In this study, *Arnebia purpurea* which is an endemic plant and hasn't got any phytochemical or biological activity studies on it has been searched for determined its phytochemical composition and cytotoxic activity. The air dried and powdered roots of the plant were extracted with *n*-hexane and the air dried and powdered aerial parts of the plant were extracted with methanol. After evaporation of the methanolic extract under vacuum and low temperature, the extract was dissolved in water and extracted with petroleum ether to remove fatty substances and pigments and to obtain water extract. The extracts were performed on a serial chromatographic studies (open column chromatography, vacuum-liquid chromatography and medium-performance liquid chromatography). The *n*-hexane extract yielded 5 naphthoquinones, three of them are mixture (isovalerylalkannin: **APK-3**, α -methyl-*n*-butyl alkannin: **APK-8**, isobutylalkannin: **APK-9**, acetylalkannin: **APK-4** and alkannin **APK-5**), 1 triterpene (3-*O*-acetyloxy-oleanolic acid **APK-7**), 1 steroid (β -sitosterole: **APK 6**). The water extract prepared from aerial parts yielded 3 flavonoid glycosides two of them are mixture (isorhamnetin-3-*O*-rutinoside: **APT-4**, kaempferol-3-*O*-rutinoside: **APT-5**, kaempferol 3-*O*-(5"-acetyl)apiofuranoside 7-*O*-rhamnopyranoside **APT-7**); 1 phenolic acid (rosmarinic acid: **APT-1**). The structures of the isolated compounds were elucidated using spectroscopic methods (UV, IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, 2D-NMR and Mass spectrometry). Cytotoxic activities of the isolated compounds were investigated on L929 murine fibrosarcoma cell lines by using MTT method. The alkannin derivatives of naphthoquinones (**APK-3/8/9**, **APK-4** and **APK-5**) showed strong cytotoxic activity.

Key Words: *Arnebia purpurea*, Boraginaceae, naphthoquinones, flavonoid glycosides, triterpene, steroid, phenolic acid, MTT, cytotoxic activity

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
TABLolar	xii
ŞEKİLLER-ŞEMALAR-RESİMLER	xiv
SPEKTRUMLAR	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Botanik Bilgiler	3
2.1.1. Boraginaceae Familyası	3
2.1.2. <i>Arnebia</i> Forssk. Cinsi	4
2.1.3. Türkiye’de Yetişen <i>Arnebia</i> Türleri İçin Tayin Anahtarı	5
2.1.4. <i>Arnebia purpurea</i> S. Erik & H. Sümbül	6
2.2. <i>Arnebia</i> Türleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar	8
2.2.1. Fitokimyasal Çalışmalar	8
2.2.2. <i>Arnebia</i> Türlerinin Kullanışları ve Biyolojik Aktiviteleri	32
3. DENEYSEL KISIM	41
3.1. Fitokimyasal Çalışmalar	41
3.1.1. Bitkisel Materyal	41
3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Aletler	41
3.1.3. Kromatografik Yöntemler	44

3.1.4. Ekstraksiyon	48
3.1.5. İzolasyon Çalışmaları	49
3.2. Sitotoksik Aktivite Çalışması	55
4. BULGULAR	56
4.1. Fitokimyasal Çalışmalara Ait Bulgular	56
4.1.1. Köklerden İzole Edilen Bileşiklerin Yapı Tayini	56
4.1.2. Topraküstü Kısımlardan Elde Edilen Bileşiklerin Yapı Tayini	105
4.2. Sitotoksik Aktivite Çalışmasına Ait Bulgular	136
5. TARTIŞMA	138
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	152
KAYNAKLAR	153
ÖZGEÇMİŞ	170

SİMGELER VE KISALTMALAR

Ac	: Asetil
CD ₃ OD	: Dötero metanol
CDCl ₃	: Dötero kloroform
CHCl ₃	: Kloroform
CH ₂ Cl ₂	: Diklorometan
CH ₃ OH	: Metanol
¹³ C NMR	: ¹³ C-Nuclear Magnetic Resonance
COSY	: Correlated Spectroscopy
d	: Dublet
dd	: Dublet dublet
DEPT	: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
dt	: Dublet triplet
EI-MS	: Electron Ionisation Mass Spectroscopy
ESI-MS	: Electron Spray Ionization Mass Spectrometry
EtOAc	: Etil asetat
g	: Gram
gs	: Geniş singlet
¹ H NMR	: ¹ H- Nuclear Magnetic Resonance
H ₂ O	: Su
H ₂ SO ₄	: Sülfürik asit
HCOOH	: Formik Asit

HMBC	: Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	: Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HSQC	: Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	: Hertz
IR	: Infra-red
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
KBr	: Potasyum bromür
KK	: Kolon Kromatografisi
L929	: Murine Fibrosarcoma Cell
m	: Multiplet
Me	: Metil
MEM	: Minimum Essential Medium
MeOH	: Metanol
MHz	: Megahertz
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
MTT	: [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür]
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
NMR	: Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	: Nuclear Overhauser Enhancement Correlation Spectroscopy
OBSK	: Orta Basıncılı Sıvı Kromatografisi
OCH ₃	: Metoksil

PBS	: Phosphate Buffer Saline
ppm	:Parts per million (Milyonda bir kısım)
ROESY	: 2 D NOE in a rotating frame
SFK	: Sephadex LH-20 Kolon Kromatografisi
SK	: Silikajel Kolon Kromatografisi,
SDS	Sodium Dodesyl Sulphate
s	: Singlet
t	: Triplet
TF-İTK	: Ters Faz Silikajel İnce Tabaka Kromatografisi
TF-SK	: Ters Faz Silikajel KromatografisiTF
UV	: Ultra-violet
VSK	: Vakum Sıvı Kromatografisi

TABLOLAR

	Sayfa
Tablo 1. <i>Arnebia</i> türlerinden elde edilen alkannin türevi naftokinonlar	8
Tablo 2. <i>Arnebia</i> türlerinden elde edilen şikonin türevi naftokinonlar	10
Tablo 3. <i>Arnebia</i> türlerinden elde edilen hidroksialkannin türevi Naftokinonlar	12
Tablo 4. <i>Arnebia</i> türlerinden elde edilen diğer naftokinonlar	13
Tablo 5. <i>Arnebia</i> türlerinden elde edilen benzokinonlar	14
Tablo 6. <i>Arnebia</i> türlerinden elde edilen hidrokarbonlar	15
Tablo 7. <i>Arnebia</i> türlerinden elde edilen pirolizidin tip alkaloidler	17
Tablo 8. <i>Arnebia</i> türlerinden elde edilen diğer alkaloidler	19
Tablo 9. <i>Arnebia</i> türlerinden elde edilen Andromedan tip diterpenler-1	20
Tablo 10. <i>Arnebia</i> türlerinden elde edilen Andromedan tip diterpenler-2	21
Tablo 11. <i>Arnebia</i> türlerinden elde edilen diğer andromedan tip diterpenler-3	22
Tablo 12. <i>Arnebia</i> türlerinden elde edilen triterpenler	24
Tablo 13. <i>Arnebia</i> türlerinden elde edilen steroidal yapıli bileşikler	26
Tablo 14. <i>Arnebia</i> türlerinden elde edilen flavonoidler	27
Tablo 15. <i>Arnebia</i> türlerinden elde edilen fenolik asit ve türevleri	28
Tablo 16. <i>Arnebia</i> türlerinden elde edilen diğer bileşikler	31
Tablo 17. Kromatografik çalışmalarda kullanılan adsorbanlar	42
Tablo 18. Kromatografik çalışmalarda kullanılan solvan sistemleri	43
Tablo 19. <i>Arnebia purpurea</i> kök <i>n</i> -hekzan ekstresinden elde edilen bileşiklerin R _f değerleri	57
Tablo 20. <i>Arnebia purpurea</i> topraküstü metanol ekstresinden hazırlanan su ekstresinden elde edilen bileşiklerin R _f değerleri	57

Tablo 21. İzovalerilalkannin (APK-3) bileşiğinin ^{13}C ve ^1H NMR spektroskopik değerleri	63
Tablo 22. α -metil- <i>n</i> -butilalkannin (APK-8) bileşiğinin ^{13}C ve ^1H NMR spektroskopik değerleri	64
Tablo 23. İzobutilalkannin (APK-9) bileşiğinin ^{13}C ve ^1H NMR spektroskopik değerleri	65
Tablo 24. Asetilalkannin (APK-4) bileşiğinin ^{13}C ve ^1H NMR spektroskopik değerleri	73
Tablo 25. Alkannin (APK-5) bileşiğinin ^{13}C ve ^1H NMR spektroskopik Değerleri	82
Tablo 26. β -sitosterol (APK-6) bileşiğinin ^{13}C ve ^1H NMR spektroskopik Değerleri	91
Tablo 27. 3- <i>O</i> -asetoksioleanolik asit (APK-7) bileşiğinin ^{13}C ve ^1H NMR spektroskopik değerleri	100
Tablo 28. Rozmarinik Asit (APT-1) bileşiğinin ^{13}C ve ^1H NMR spektroskopik değerleri	108
Tablo 29. İzoramnetin-3- <i>O</i> -rutinozit (APT-4) bileşiğinin ^{13}C ve ^1H NMR spektroskopik değerleri	119
Tablo 30. Kemferol-3- <i>O</i> -rutinozit (APT-5) bileşiğinin ^{13}C ve ^1H NMR spektroskopik değerleri	120
Tablo 31. Kemferol 3- <i>O</i> - β -(5"-asetiloksi) apiofuranozit 7- <i>O</i> - α -ramnozit (APT-7) bileşiğinin ^{13}C NMR ve ^1H NMR spektroskopik değerleri	129
Tablo 32. <i>Arnebia purpurea</i> 'dan elde edilen sekonder metabolitlerin sitotoksik aktivite sonuçları	136
Tablo 33. APK-3,4,5,8,9'un C-11 süstitüe ^1H ve ^{13}C NMR değerleri	142

ŞEMALAR

	Sayfa
Şema 1. <i>Arnebia purpurea</i> kök <i>n</i> -hekzan ekstresi izolasyon şeması	53
Şema 2. <i>Arnebia purpurea</i> topraküstü metanol ekstresinden hazırlanan su ekstresi izolasyon şeması	54

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 1. <i>Arnebia purpurea</i> kök <i>n</i> -hekzan ekstresinden elde edilen Maddeler	139
Şekil 2. <i>Arnebia purpurea</i> topraküstü metanol ekstresinden hazırlanan su ekstresinden elde edilen maddeler	140

RESİMLER

	Sayfa
Resim 1. <i>Arnebia purpurea</i> S. Erik & H. Sümbül	xviii
Resim 2. <i>Arnebia purpurea</i> 'dan Elde Edilen Naftokinonların L929 Hücrelerine Karşı Sitotoksik Aktivitesi	137

SPEKTRUMLAR

	Sayfa
Spektrum 1. APK-3/8/9'un ^1H NMR Spektrumu	66
Spektrum 2. APK-3/8/9'un ^{13}C NMR Spektrumu	67
Spektrum 3. APK-3/8/9 2D ^1H, ^1H-Homonükleer Korelasyonlu Spektrumu (COSY)	68
Spektrum 4. APK-3/8/9'un 2D ^1H, ^{13}C-Heteronükleer Korelasyonlu (yakın mesafe) NMR Spektrumu (HMQC)	69
Spektrum 5. APK-3/8/9'un 2D ^1H, ^{13}C-Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) Spektrumları (HMBC)	70
Spektrum 6. APK-4'ün ^1H NMR Spektrumu	74
Spektrum 7. APK-4'ün ^{13}C NMR ve DEPT Spektrumu	75
Spektrum 8. APK-4'ün 2D ^1H, ^1H-Homonükleer Korelasyonlu Spektrumu (COSY)	76
Spektrum 9. APK-4'ün 2D ^1H, ^{13}C-Heteronükleer Korelasyonlu (yakın mesafe) NMR Spektrumu (HSQC)	77
Spektrum 10. APK-4'ün 2D ^1H, ^{13}C-Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) Spektrumu (HMBC)	78
Spektrum 11. APK-5'in ^1H NMR Spektrumu	83
Spektrum 12. APK-5'in ^{13}C NMR ve DEPT Spektrumu	84
Spektrum 13. APK-5'in 2D ^1H, ^1H-Homonükleer Korelasyonlu Spektrumu (COSY)	85
Spektrum 14. APK-5'in 2D ^1H, ^{13}C-Heteronükleer Korelasyonlu (yakın mesafe) NMR Spektrumu (HMQC)	86
Spektrum 15. APK-5'in 2D ^1H, ^{13}C-Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) Spektrumu (HMBC)	87
Spektrum 16. APK-5'in 2D nOe korelasyonlu spektrumu (NOESY)	88
Spektrum 17. APK-6'nın ^1H NMR Spektrumu	92
Spektrum 18. APK-6'nın ^{13}C NMR ve DEPT Spektrumu	93

Spektrum 19. APK-6'nin 2D ^1H, ^1H-Homonükleer Korelasyonlu Spektrumu (COSY)	94
Spektrum 20. APK-6'nin 2D ^1H, ^{13}C-Heteronükleer Korelasyonlu (yakın mesafe) NMR Spektrumu (HMQC)	95
Spektrum 21. APK-6'nin 2D ^1H, ^{13}C-Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) Spektrumu (HMBC)	96
Spektrum 22. APK-7'nin ^1H NMR Spektrumu	101
Spektrum 23. APK-7'nin ^{13}C NMR ve DEPT Spektrumu	102
Spektrum 24. APK-7'nin 2D ^1H, ^{13}C-Heteronükleer Korelasyonlu (yakın mesafe) NMR Spektrumu (HMQC)	103
Spektrum 25. APK-7'nin 2D ^1H, ^{13}C-Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) Spektrumu (HMBC)	104
Spektrum 26. APT-1'in ^1H NMR Spektrumu	109
Spektrum 27. APT-1'in ^{13}C NMR ve DEPT Spektrumu	110
Spektrum 28. APT-1'in 2D ^1H, ^1H-Homonükleer Korelasyonlu Spektrumu (COSY)	111
Spektrum 29. APT-1'in 2D ^1H, ^{13}C-Heteronükleer Korelasyonlu (yakın mesafe) NMR Spektrumu (HMQC)	112
Spektrum 30. APT-1'in 2D ^1H, ^{13}C-Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) Spektrumu (HMBC)	113
Spektrum 31. APT-1'in 2D nOe korelasyonlu spektrumu (NOESY)	114
Spektrum 32. APT-4/5'in ^1H NMR Spektrumu	121
Spektrum 33. APT-4/5'in ^{13}C NMR ve DEPT Spektrumu	122
Spektrum 34. APT-4/5'in 2D ^1H, ^1H-Homonükleer Korelasyonlu Spektrumu (COSY)	123
Spektrum 35. APT-4/5'in 2D ^1H, ^{13}C-Heteronükleer Korelasyonlu (yakın mesafe) NMR Spektrumu (HMQC)	124
Spektrum 36. APT-4/5'in 2D ^1H, ^{13}C-Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) Spektrumu (HMBC)	125
Spektrum 37. APT-7'nin ^1H NMR Spektrumu	130

Spektrum 38. APT-7'nin ^{13}C NMR ve DEPT Spektrumu	131
Spektrum 39. APT-7'nin 2D ^1H, ^1H-Homonükleer Korelasyonlu Spektrumu (COSY)	132
Spektrum 40. APT-7'nin 2D ^1H, ^{13}C-Heteronükleer Korelasyonlu (yakın mesafe) NMR Spektrumu (HMQC)	133
Spektrum 41. APT-7'nin 2D ^1H, ^{13}C-Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) Spektrumu (HMBC)	134
Spektrum 42. APT-7'nin 2D ^1H, ^1H-Homonükleer Korelasyonlu Spektrumu (ROESY)	135



Resim 1. *Arnebia purpurea* S. Erik & H. Sümbül

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Boraginaceae familyasında yer alan *Arnebia* cinsi ülkemizde 5 tür ile temsil edilmektedir (22,112). Halk arasında eyilik otu, kırmızı kök, eğnik, enlik, havaciva olarak da bilinen *A. densiflora*'nın kök kabukları haricen yara iyileştirmede ve yanık tedavisinde kullanılmaktadır (7,8,96-97)

Yapılan çalışmalarda *Arnebia* türlerinin ve bu türlerden elde edilen bileşiklerin antienflamatuvar (69,107), antimikrobiyal (50,101), antioksidan, antitümoral (19,39,53,121), yara iyi edici (4,60,105), kontraseptif (136), prostaglandin sentez inhibitörü (127-128), antiviral (24,54) ve platelet agregasyonunu inhibe edici etkileri (52) bulunmuştur.

Daha önceki çalışmalarda bu türlerden naftokinonlar (101), benzokinonlar (92), fenolik asitler (54), diterpenler (90), steroidler (123), triterpenler (50) ve bir flavonoid (40) elde edilmiştir.

Tez araştırmasında *Boraginaceae* familyası bitkileri üzerinde yaptığımız fitokimyasal çalışmalarımızın devamı olarak (64,65), 1983 yılında bilim dünyasına tanıtılan (112), Türkiye için endemik olan ve üzerinde herhangi bir fitokimyasal ve aktivite çalışması bulunmayan *Arnebia purpurea* bitkisi çalışılmıştır.

Boraginaceae familyasındaki bitkilerde yaygın olarak bulunan naftokinonların farklı tümör sistemlerine karşı yüksek sitotoksik aktivite taşıdıkları bilinmektedir (19). Antikanser ilaçların değerlendirilmesi için klinik öncesinde yapılan ön tarama çalışmalarından bir tanesi çeşitli tümör sistemleri üzerinde sitotoksik etkinin araştırılmasıdır. Gelişmiş ülkelerin en önemli sağlık sorunlarının başında kanser ve kanser tedavisi gelmektedir. Dünyada her yıl bir milyon yeni kanser hastası teşhis edilmektedir. Bu hastaların % 75'ten fazlasında hastaların büyük bir bölümüne herhangi bir evrede kemoterapi uygulanmaktadır. Günümüzde kanser hastalarının belli bir bölümünde kanserin tipine de bağlı olmak üzere kemoterapi ile tam tedavi veya uzun bir iyileşme dönemi sağlanabilmektedir. Günümüzde, tek başına cerrahi veya radyasyonla tedavi başarıları % 20 iken, kemoterapi ile tedavi

başarısı % 75'lere kadar çıkmıştır. Ancak bütün bu gelişmelere karşın, kardiyovasküler sisteme ait hastalıklardan sonra kanser, hala ölümlerin en sık ikinci nedenidir (83). Türkiye’de akciğer, meme, mide, mesane, kolon, over, prostat kanserleri en sık görülen kanser türleridir (28).

Kanser tedavisinde var olan medikal tedaviye yeni alternatifler bulmak veya daha etkili bileşiklere ulaşmak adına doğal kaynaklar önemli yer tutmaktadır.

Bu tez çalışmasında hem *Arnebia purpurea*’nın kimyasal profilinin aydınlatılması hem de var olduğu düşünülen naftokinonların ve farklı yapıdaki diğer metabolitlerin, L929 fare fibrosarkoma hücrelerinin çoğalması üzerindeki % inhibisyonlarının karşılaştırılarak kanser tedavisindeki etkinliklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmanın sonunda etkili bulunan maddeler, daha sonra yapılacak antikanser mekanizma çalışmalarına öncü moleküller olacaklardır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Botanik Bilgiler

2.1.1. Boraginaceae Familyası

Tek yıllık, iki yıllık veya çok yıllık otsu bitkiler, nadiren küçük çalılar veya ağaçlar. Yapraklar alternan, stipulasız, basit, sıklıkla bariz setalı tüy durumu ile birlikte. En uçtaki dallardaki çiçek durumları simoz, zembereksi simoz ve/veya sirsinus veya çiçek durumu nadiren tirsoit. Kaliks gamosepal, 5 loplu (nadiren 9 loplu veya düzensiz dentat), sıklıkla çiçeklenmeden sonra genişler. Korolla 5 loplu, aktinomorf veya nadiren zigomorf, genellikle bariz tüplü veya derince loplu lamina; korolla boğazı sıklıkla 5 ek yapıyla veya tüy yumağıyla veya tüylerden bir bölge ile birlikte veya pürüzsüz ve tüysüz. Stamenler 5, epipetal, korolla loplariyla birleşik. Ovaryum üst durumlu 4 (nadiren 2) gözlü; ginobazik stiluslu, çok nadir terminal, genellikle bölünmemiş, stigma düz veya 2 (-4) loplu. Meyve genellikle 4 fındıkçıktan oluşmuş, nadiren olgunlaşmadan düşme veya birleşme sonucu daha az veya 2 mantarimsı merikarptan oluşmuş veya bir drupa; fındıkçık piramidal bir çiçek tablasından çıkar, bağlanma yerindeki iz dardan geniş, veya bir taban altı halka veya sap ile birlikte veya değil, dikten yatığa doğru içe kıvrık gagalı veya gagasız, omurgalı veya değil, sıklıkla tabla ve kenar içine doğru farklılaşmış; kenar bazen yayılan veya kıvrılan kanatla uzamış, veya dikenli-çapa şeklinde tüylü; yüzey pürüzsüz veya farklı şekilli, tüysüz, çapa şeklinde tüylü, küçük yumrular ile ve/veya dikenli (22).

2.1.2. *Arnebia* Forssk. Cinsi

Tek yıllık ve çok yıllık bitkiler, rizomundan mor boya elde edilir. Gövde basit veya dallanmış, piloz, sert veya kadifemsi tüylü. Çiçek durumu çok yıllıklarda yoğun bir terminal baş, tek yıllıklarda gövdenin üst kısımlarında çok sayıda dallanmış; simoz brakteli. Kaliks derin parçalı, loplar lineardan lanseolata kadar. Korolla sarı, yayık laminalı boru şeklinden huni şekline kadar; korolla boğazı pulsuz ve kıvrımsız, halka var veya yok. Çiçeklerde stiluslar farklı şekillerde, stamenler içe gömülü, bir halka şeklinde dışarı çıkmış veya farklı seviyelerde düzensiz. Stilus içe gömülü, düz veya bifite kadar dallanmış iki loplu bifittir. Fındıkçıklar basık yumurta veya yarı küremsiden üç köşeliye kadar, dik, akuttan akuminata kadar, gaga ve ventral omurga ile birlikte (25).

Sinonimleri:

Echioides Ortega non Fabricus, *Macrotomia* DC, *Munbya* Boiss, *Alpyanthus* Steven, *Toxostigma* A. Rich., *Leptanthe* Klotzsch

2.1.3. Türkiye'de Yetişen *Arnebia* Türleri İçin Tayin Anahtarı

1. Çok yıllık, taban kısmı dik ve odunlu; çiçek durumu terminal bir baş şeklinde, korolla 20-45 mm, halka yok

2. Korolla 20-24 mm, lamina yaşla birlikte solan beş siyahımsı nokta ile birlikte, stamenler farklı seviyelere düzensizce yerleşmiş

1. pulchra

2. Korolla 35-45 mm, lamina noktasız, stamenler bir halka halinde

2. densiflora

2a. purpurea*

1. Tek yıllık; çiçek durumları terminal ve lateral, sık değil, korolla 15 mm den az, halka var

3. Meyve döneminde kaliks 8-10 mm, loplar linear, gövde yoğun olarak yayık hispit veya değil; stigma 4 loplu

3. decumbens

3. Meyve döneminde kaliks 10-15 (-20) mm, loplar lanseolattan oblonga; gövde seyrek olarak yatık hispit, az çok çıplaklaşan, stigma 2 loplu

4. linearifolia

* Bu tür 1983 yılında S. Erik ve H. Sümbül tarafından bilime kazandırılmış ve Flora of Turkey'in 10. Baskısında *Arnebia densiflora*'dan sonra 2a numaralı tür olarak kodlanmıştır. *A. densiflora*'dan korolla renginin mor olması ile ayrılmaktadır (112).

2.1.4. *Arnebia purpurea* S. Erik & H. Sümbül

Çok yıllık, nerdeyse tamamı dik sarı-setalı (gövde üzerindeki tüyler bazen beyazımsı). Gövde 15 cm'e kadar, tabandan itibaren dallanmış, taban yaprakları 5-15 x 0.6-1.5 cm, lamina linear-lanseolattan oblong-lanseolata, daralarak 1-2 cm'de petiolle birleşir. Dik veya yayık tek tip tüyler, sadece orta damarda beyazımsı; gövde yaprakları daha küçük, sapsız. Çiçek durumu sık bir terminal bir silindirik, yumurtamsı veya üçgen bazen zembereksi simoz 1.5-4 x 1.5-3 cm. Brakteler linear-lanseolat, 10-22 x 1-6 mm, kaliksle hemen hemen aynı boyda veya çok az uzun. Kaliks lopları 9-15 x 0,7-1,5 mm, linear, akut. Korolla mor, yayık laminalı boru şeklinde, 10-12 mm; tüp anterlerin aşağısında daralmış; dış yüzeyde biraz çıplak (ortada çok az piloz), anterlerin yakınında yoğun kısa yumuşak tüylü; loplar 1-1,2 mm, dış yüzde çok az yumuşak tüylü, içte tüysüz. Halka yok. Stamenler farklı seviyelerde (3+2) yerleşmiş; anterler yaklaşık 1-2 mm. Stilus 9-10 mm, bazen kaliksten dışarı çıkmış. Fındıkçıklar üç köşeli, karın tarafında omurgalı, çok az pürüzlü, uçta gagalı, parlak. Tabanda halkalı, taban halkası kestane renkli, 4 dorsal omurga izi ile birlikte (fındıkçık yüzeyinde başka yerlerde belli değil), diğer kısımlar beyazımsı, kahverengi çizgili; gaga 1 mm, ventral kısma doğru kıvrılmış. Endemik ve sadece tipin toplandığı yerden biliniyor. E. Medit. Element. Çiçeklenme 5. ayda (112).

İsimlendirme:

Arnebia türleri Türkiye'de halk arasında eğrik, kırmızı kök, eyilik otu, enlik olarak bilinir (3,7,8).

Yayılış:

C3 Antalya: Alanya, Gökbel Yaylası çevresi, 1550-1600 m *H. Duman* 4972! (HUB), Antalya: Alanya, Gökbel Yaylası çevresi, 1550-1600 m *H. Duman* 4972! (GAZİ) **C4** Antalya: Gazipaşa, Sugözü Köyü, Akçal tepesi, 1900-2000 m, *H. Sümbül* (holotip HUB 20215!), Antalya: Gazipaşa Sugözü Köyü .Akçal tepesi, 1900-2000 m *H. Sümbül* (Paratip, HUB 20216), Antalya: Gazipaşa, Sugözü Köyü, Maha yaylası Akçal tepesi arası 1500-1900 m *S. Erik ve H. Sümbül* (HUB 20218!), Antalya: Sapadere Köyü yukarısı, Koçdavut Geçidi üstü, 36° 33'165"K, 32° 19'685"D, 1261 m *Ali A. Dönmez* 13660! (HUB), Antalya: Gazipaşa, Sugözü Köyü, Maha yaylası Akçal tepesi arası 1500-1900 m. *S. Erik ve H.Sümbül* (HUB 20217!), Konya: Hadim, Beyreli, Gevne Vadisi, 1550-1600 m *Z. Aytaç* 6718! (GAZİ), **Konya: Taşkent, Belpınar Beli, B. Bilgili (GAZİ 3765!)** Antalya: Gazipaşa Sugözü Köyü Akçal tepesi, 1900-2000 m *H. Sümbül* 1768 (Paratip, GAZİ), Antalya: Gazipaşa Sugözü Köyü Maha yaylası Akçal tepesi arası, 1500-1900 m *H. Sümbül* 2926! (ANK),

Habitat:

1900-2000 m yükseklikte tepe yamaçlarında yetişir.

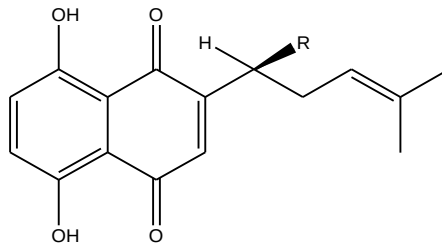
2.2. *Arnebia* Türleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar

2.2.1. Fitokimyasal Çalışmalar

Naftokinonlar

Naftokinon türevleri, *Arnebia* türlerinin köklerinde bulunan major bileşiklerdir. Optik ışığı çevirme durumlarına göre sola çevirenler (S)-alkannin ve sağa çevirenler (R)-şikonin olarak bilinmektedirler.

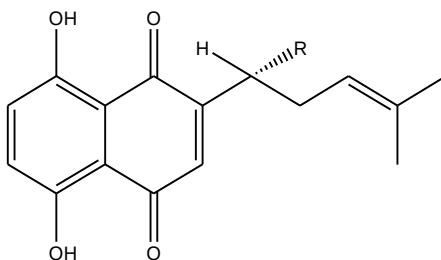
Tablo 1. *Arnebia* türlerinden elde edilen alkannin türevi naftokinonlar



Bileşik	R	Bitki	Kaynak
(S)-Alkannin (Arnebin 4)	OH	<i>A. hispidissima</i> , <i>A. nobilis</i> , <i>A. guttata</i> , <i>A. euchroma</i> , <i>A. tinctoria</i>	12,26,40,55-58,68,101,102,106
Deoksişikonin, (Deoksialkannin, Arnebin 7)	H	<i>A. decumbens</i> , <i>A. euchroma</i> , <i>A. guttata</i> , <i>A. hispidissima</i> , <i>A. benthamii</i> , <i>A. nobilis</i>	1,21,23,30,31,38,45,57,58,69,74- 76,104,106,119,123
(S)-Asetilalkannin (Arnebin 3)	OCOCH ₃	<i>A. hispidissima</i> , <i>A. nobilis</i> , <i>A. euchroma</i> , <i>A. densiflora</i> , <i>A. benthamii</i>	12,31,39,40,56-58,101,102

Tablo 1. *Arnebia* türlerinden elde edilen alkannin türevi naftokinonlar (devam)

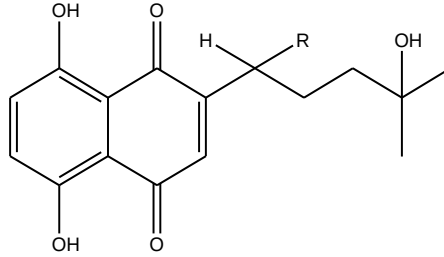
Bileşik	R	Bitki	Kaynak
(S)- β,β -Dimetilakrilalkannin (Arnebin 1)	$\text{OCOCH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$	<i>A. nobilis</i> , <i>A. euchroma</i> , <i>A. densiflora</i> , <i>A. hispidissima</i>	9,10,12,30,31,39,40, 46,48,56,58,71,75,101, 102,105,106
(RS)-Şikalkin	-OH	<i>A. hispidissima</i>	49
(S)-İzovalerilalkannin	$\text{OCOCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	<i>A. hispidissima</i> , <i>A. tinctoria</i> , <i>A. densiflora</i> , <i>A. euchroma</i>	9,10,26,55,101
(S)- β -Hidroksiizovaleril alkannin	$\text{OCOCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$ OH	<i>A. hispidissima</i> , <i>A. euchroma</i> , <i>A. guttata</i>	30,31,55
(S)- β –Asetiloksiizovaleril alkannin	$\text{OCOCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$ OCOCH ₃	<i>A. guttata</i> , <i>A. euchroma</i>	30,31,123
Terakrilalkannin	$\text{OCOCH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$	<i>A. densiflora</i>	9,10
α -Metil- <i>n</i> -butil alkannin	$\text{OCOCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$	<i>A. densiflora</i> , <i>A. euchroma</i>	9,10,101
(S)-İzobutilalkannin	$\text{OCOCH}(\text{CH}_3)_2$	<i>A. densiflora</i>	19
2',3'-Epoksialkannin	$\text{-O-CO-}\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{O} \end{array} \text{-CH}_3$	<i>A. densiflora</i>	19

Tablo 2. *Arnebia* türlerinden elde edilen şikonin türevi naftokinonlar

Bileşik	R	Bitki	Kaynak
(R)-Şikonin (İzoarnebin 4)	OH	<i>A. hispidissima</i> , <i>A. nobilis</i> , <i>A. guttata</i> , <i>A. euchroma</i> , <i>A. tinctoria</i>	2,13,16,23,30, 32,33,35,38,45, 58,59,61,62,66, 67,69,70,74,75, 84-86, 98,101,110, 113-115,119, 123, 125,135
5,8-Dihidroksi-2-(4-metilpent-3-enil)-1,4-naftokinon (deoksişikonin, deoksialkannin, arnebin 7)	H	<i>A. decumbens</i> , <i>A. euchroma</i> , <i>A. guttata</i> , <i>A. hispidissima</i> , <i>A. benthamii</i> , <i>A. nobilis</i>	1,20,22,30,31, 39,46,55,58,59, 68,73-75, 104,106,118, 120
(R)-Şikonin izovalerat	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂	<i>A. decumbens</i>	1
(R)-Asetilşikonin	OCOCH ₃	<i>A. euchroma</i> , <i>A. guttata</i> , <i>A. benthamii</i> , <i>A. hispidissima</i> , <i>A. decumbens</i>	2,14,21,23,30, 31,44,59,69, 74-76,84,94, 98,99, 101, 107, 110,119,121, 123,130,132, 137
(R)- β,β Dimetilakrilşikonin (izoarnebin 1)	OCOCH=C(CH ₃) ₂	<i>A. euchroma</i> , <i>A. nobilis</i> , <i>A. guttata</i> , <i>A. benthamii</i>	11,34,44,45, 57-59,76, 110,111, 119,123,137

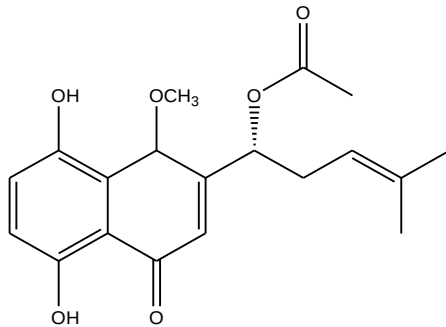
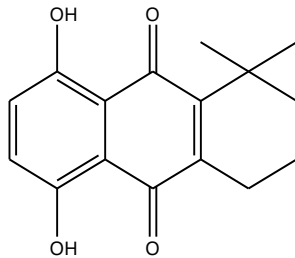
Tablo 2. *Arnebia* türlerinden elde edilen şikonin türevi naftokinonlar (devam)

Bileşik	R	Bitki	Kaynak
(R)-Terakrilşikonin	$\text{OCOCH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$	<i>A. euchroma</i> , <i>A. hispidissima</i> , <i>A. guttata</i>	11,59,69,107, 110,119,137
(R)-β-Asetoksiizovalerilşikonin	$\text{OCOCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OCOCH}_3$	<i>A. euchroma</i> , <i>A. guttata</i> , <i>A. benthamii</i> , <i>A. hispidissima</i>	98,99,130
(R)-İzobutilşikonin	$\text{OCOCH}(\text{CH}_3)_2$	<i>A. euchroma</i> , <i>A. guttata</i>	21,23,45,110
(R)-α-Metil- <i>n</i> -butil şikonin	$\text{OCOCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$	<i>A. euchroma</i> , <i>A. guttata</i>	21,45
(R)-İzovalerilşikonin	$\text{OCOCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	<i>A. euchroma</i> , <i>A. guttata</i>	45
(R)-β-Hidroksiizovaleril şikonin	$\begin{array}{c} \text{-OCOCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	<i>A. guttata</i> , <i>A. euchroma</i>	21,110,119,137
Propionil şikonin	OCOC_2H_5	<i>A. euchroma</i>	21,123

Tablo 3. *Arnebia* türlerinden elde edilen hidroksialkannin türevi naftokinonlar

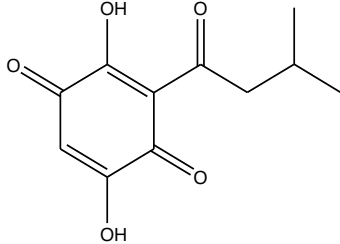
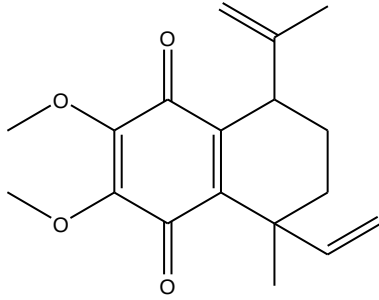
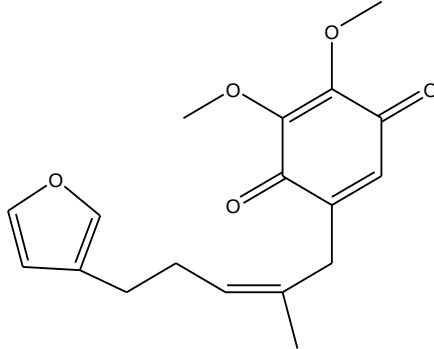
Bileşik	R	Bitki	Kaynak
Arnebin 5 (Hidroksialkannin)	H	<i>A. hispidissima</i> , <i>A. euchroma</i> , <i>A. nobilis</i>	56
Arnebin 6 (Asetilhidroksialkannin)	OCOCH ₃	<i>A. hispidissima</i> , <i>A. euchroma</i> , <i>A. nobilis</i> , <i>A. benthamii</i>	12,48,57,58,103,107
Arnebin 2 (β,β - Dimetilakrilhidroksialkannin)	OCOCH=C(CH ₃) ₂	<i>A. euchroma</i> , <i>A. nobilis</i>	48,57,58

Tablo 4. *Arnebia* türlerinden elde edilen diğer naftokinonlar

Bileşik	Formül	Bitki	Kaynak
1-Metoksiasetilşikoinin		<i>A. euchroma</i>	31
Sikloarnebin 7		<i>A. hispidissima</i>	106

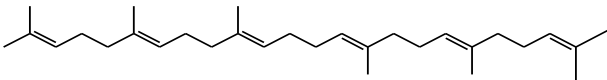
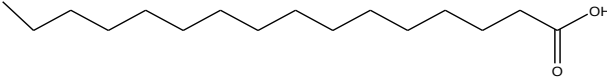
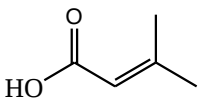
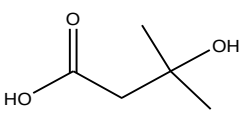
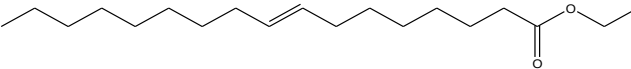
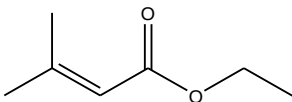
Benzokinonlar

Tablo 5. *Arnebia* türlerinden elde edilen benzokinonlar

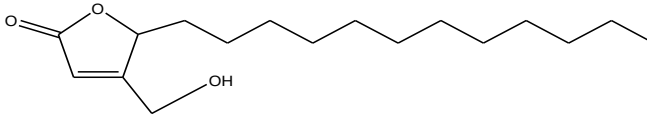
Bileşik	Formül	Bitki	Kaynak
3,6-dihidroksi-2- isovaleril-1,4 benzokinon		<i>A. decumbens</i>	92
Arnebinon		<i>A. euchroma</i>	73,129
Arnebifuranon		<i>A. euchroma</i>	126,129

Hidrokarbonlar

Tablo 6. *Arnebia* türlerinden elde edilen hidrokarbonlar

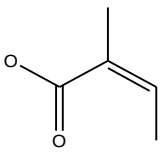
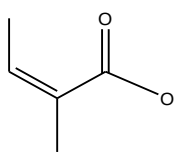
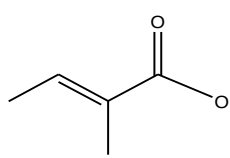
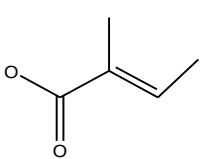
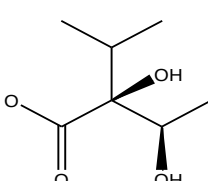
Bileşik	Formül	Bitki	Kaynak
Heptakozan	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{25}\text{CH}_3$	<i>A. euchroma</i>	130
Skualen		<i>A. euchroma</i>	130
Eikosan	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{CH}_3$	<i>A. nobilis</i>	12
Hekzadekanoik asit		<i>A. euchroma</i>	130
3-Metil-krotonik asit		<i>A. euchroma</i>	130
3-Hidroksi-3-metil butirik asit		<i>A. euchroma</i>	130
22-Trikosenoik asit	$\text{CH}_2=\text{CH}(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$	<i>A. euchroma</i>	130
Tetradekanoik asit	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	<i>A. euchroma</i>	72
Oktadekanoik asit	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	<i>A. euchroma</i>	72
Heptakozanoik asit	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{25}\text{COOH}$	<i>A. nobilis</i>	12,100
Etil oleat		<i>A. euchroma</i>	130
3-metil-krotonik asit etil ester		<i>A. euchroma</i>	130
Etil tetrakozanoat	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OCO}(\text{CH}_2)_{22}\text{CH}_3$	<i>A. euchroma</i>	130

Tablo 6. *Arnebia* türlerinden elde edilen hidrokarbonlar (devam)

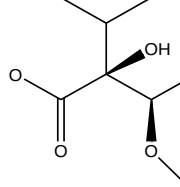
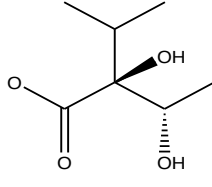
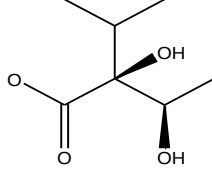
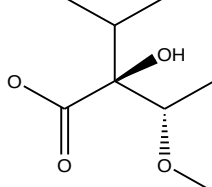
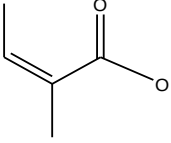
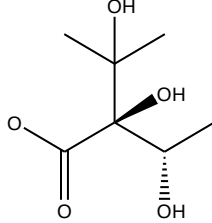
Bileşik	Formül	Bitki	Kaynak
Etil-9-hekzadekenoat	$C_2H_5OCO(CH_2)_7CH=CHC_2H_4CH_3$	<i>A. euchroma</i>	130
Gama-hekza-dekenoik asit lakton		<i>A. euchroma</i>	72
1-tetrakonazol	$CH_3(CH_2)_{23}OH$	<i>A. hispidissima</i> , <i>A. nobilis</i>	81
Hekzakonazol	$CH_3(CH_2)_{24}CH_2OH$	<i>A. nobilis</i>	100
1-Eikonazol	$CH_3(CH_2)_{19}OH$	<i>A. euchroma</i>	130

Alkaloitler

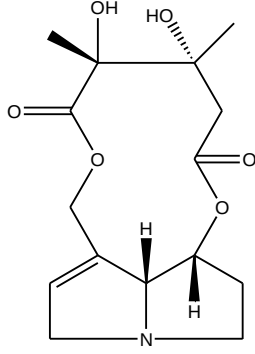
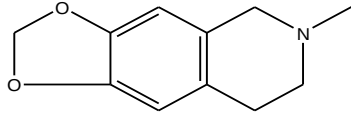
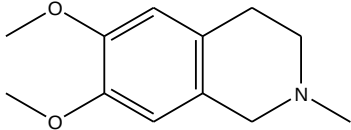
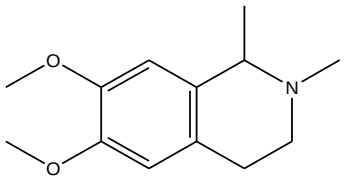
Tablo 7. *Arnebia* türlerinden elde edilen pirolizidin tip alkaloitler

Bileşik	R ₁	R ₂	Bitki	Kaynak
(1R,7aR) O ⁹ - anjeloilretronesin	OH		<i>A. euchroma</i> , <i>A. decumbens</i>	27,91
(1R,7aR) O ⁷ - anjeloilretronesin		OH	<i>A. euchroma</i> , <i>A. decumbens</i>	91
(1R, 7aR) 7- tigloilretronesin,		OH	<i>A. decumbens</i>	27
(1R, 7aR) 9- tigloilretronesin	OH		<i>A. decumbens</i>	27
(1R, 7aR) Supinin	H ₂		<i>A. decumbens</i>	27

Tablo 7. *Arnebia* türlerinden elde edilen pirolizidin tip alkaloitler (devam)

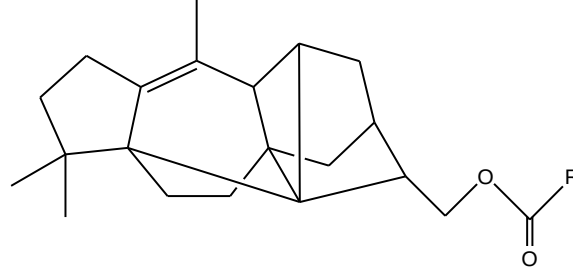
Bileşik	R ₁	R ₂	Bitki	Kaynak
(1R, 7aR) Heliotrin	OH		<i>A. decumbens</i>	27
(1R, 7aR) Likopsamin	OH		<i>A. decumbens</i>	27
(1S, 7aR) Rinderin	OH		<i>A. decumbens</i>	27
(1S, 7aR) Europin	OH		<i>A. decumbens</i>	27
(1R, 7aR) Ekhimidin			<i>A. hispidissima</i>	116

Tablo 8. *Arnebia* türlerinden elde edilen diğer alkaloidler

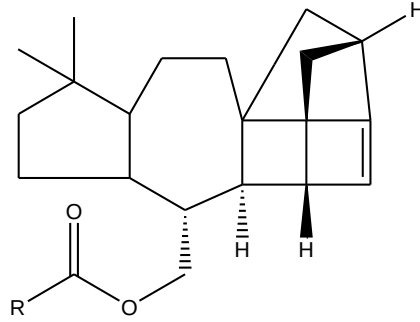
Bileşik	Formül	Bitki	Kaynak
Monokrotalin		<i>A. hispidissima</i>	116
Hidrohidrastinin		<i>A. decumbens</i>	27
N-Metilheliamin		<i>A. decumbens</i>	27
Karnegin		<i>A. decumbens</i>	27

Diterpenler

Tablo 9. *Arnebia* türlerinden elde edilen Andromedan tip diterpenler-1

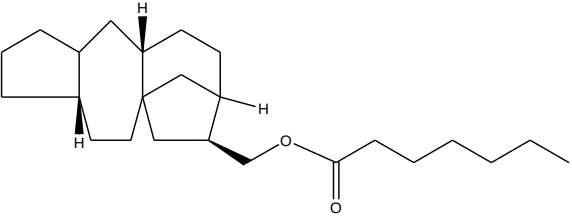
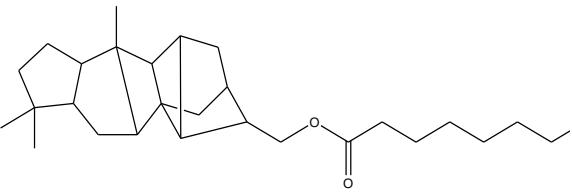
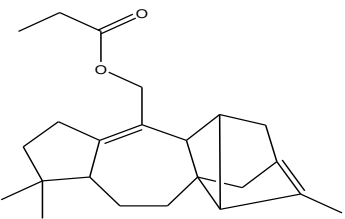
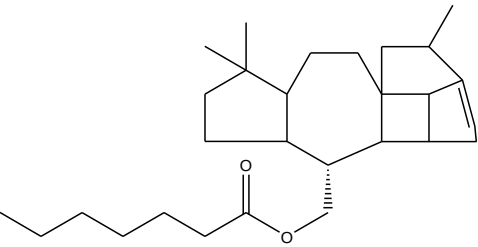


Bileşik	R	Bitki	Kaynak
5(15),11(15)-Endobisiklikandromed-1(10)-en-17-oksi-1'-heptanoat	$(CH_2)_5CH_3$	<i>A. nobilis</i>	89
5(15),11(15)-Endobisiklikandromed-1(10)-en-17-oksi-1'-nonanoat	$(CH_2)_7CH_3$	<i>A. nobilis</i>	89
5(15)-Endosiklikandromed-1(10)-en-17-oksi-1'-heptanoat	$(CH_2)_4CH_3$	<i>A. nobilis</i>	89
5(15),11(15)-Endobisiklikandromed-1(10)-en-17-oksi-1'-heptanoat	$(CH_2)_5CH_3$	<i>A. nobilis</i>	89
11(15)-Endosiklikandromed-1(10)-en-17-oksi-1'-heptanoat	$(CH_2)_5CH_3$	<i>A. nobilis</i>	89
5(15),11(15)-Endobisiklikandromed-1(10)-en-17-oksi-1'-propanoat	CH_2CH_3	<i>A. nobilis</i>	89

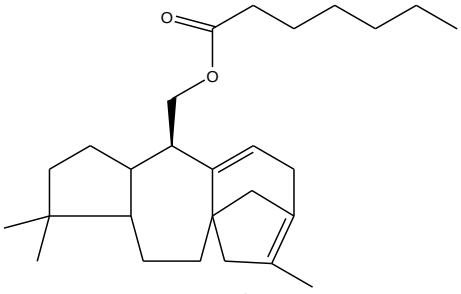
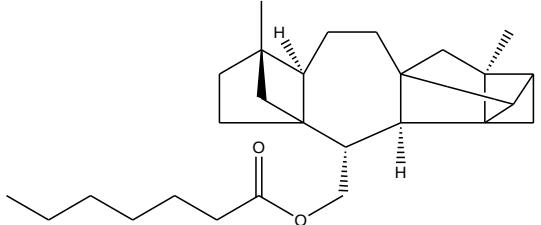
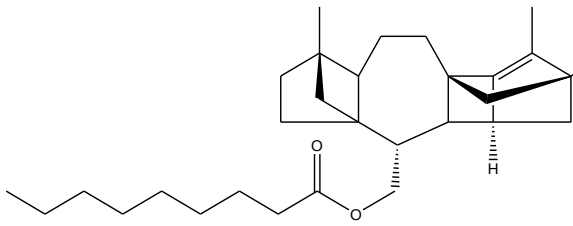
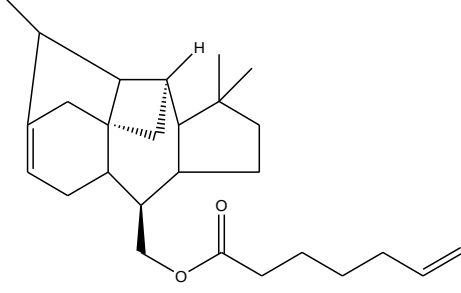
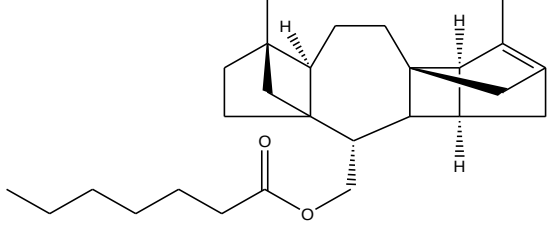
Tablo 10. *Arnebia* türlerinden elde edilen Andromedan tip diterpenler-2

Bileşik	R	Bitki	Kaynak
Andromedanoil-20-nonanoat	$(CH_2)_7CH_3$	<i>A. nobilis</i>	90
Andromedanoil-20-undekanoat	$(CH_2)_9CH_3$	<i>A. nobilis</i>	90

Tablo 11. *Arnebia* türlerinden elde edilen andromedan tip diterpenler-3

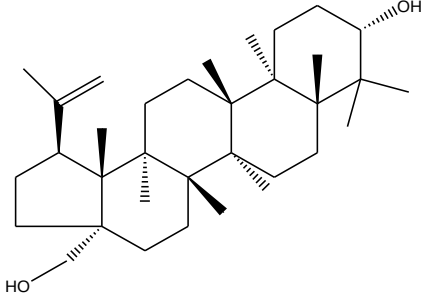
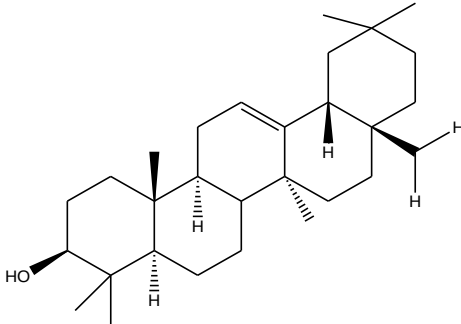
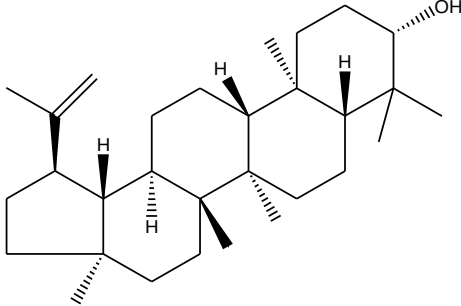
Bileşik	Formül	Bitki	Kaynak
Andromed-1(10)-en-17-oksi-1'-heptanoat		<i>A. nobilis</i>	89
7(10),12(15)-Biendoandromedan-17-oksi-1'-heptanoat		<i>A. nobilis</i>	89
12(15)-Endoandromed-13(16)-en-20-oksi-1'-heptanoat		<i>A. nobilis</i>	89
Andromedanoil-20-heptanoat A		<i>A. nobilis</i>	90

Tablo 11. *Arnebia* türlerinden elde edilen andromedan tip diterpenler-3 (devam)

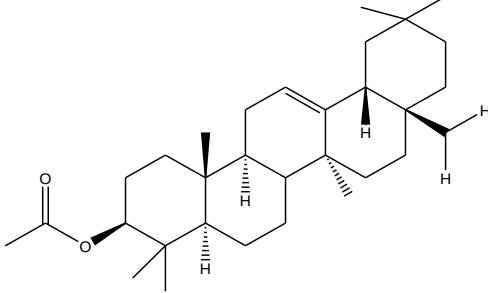
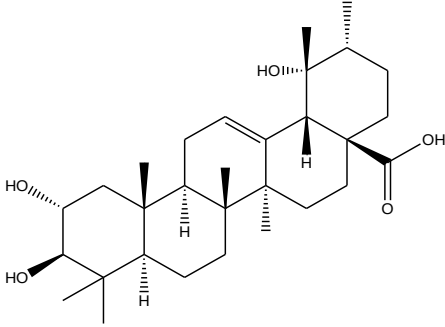
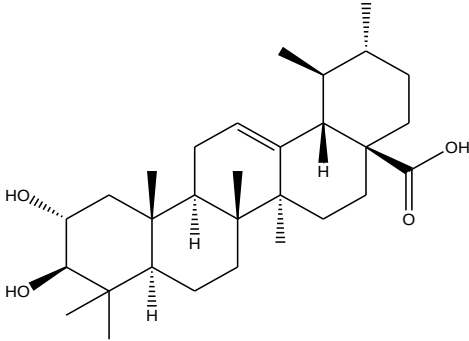
Bileşik	Formül	Bitki	Kaynak
Andromedanoil-20-heptanoat B		<i>A. nobilis</i>	90
Andromedanoil-20-heptanoat-C		<i>A. nobilis</i>	90
Andromedanoil-20-heptanoat D		<i>A. nobilis</i>	90
Andromedanoil-20-heptanoat E		<i>A. nobilis</i>	90
Andromedanoil-20-heptanoat F		<i>A. nobilis</i>	90

Triterpenler

Tablo 12. *Arnebia* türlerinden elde edilen triterpenler

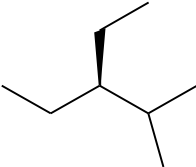
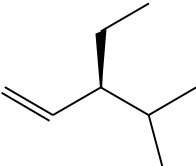
Bileşik	Formül	Bitki	Kaynak
Betulin		<i>A. hispidissima</i>	50
β -Amirin		<i>A. hispidissima</i>	50
Lupeol		<i>A. hispidissima</i>	50

Tablo 12. *Arnebia* türlerinden elde edilen triterpenler (devam)

Bileşik	Formül	Bitki	Kaynak
β -Amirin asetat		<i>A. hispidissima</i>	50
Tormentik asit		<i>A. euchroma</i>	124
2- α -Hidroksi ursolik asit		<i>A. euchroma</i>	124

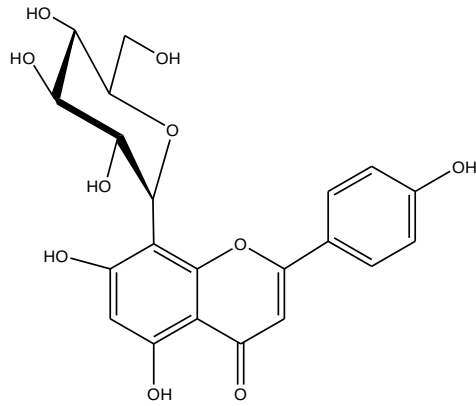
Steroidler

Tablo 13. *Arnebia* türlerinden elde edilen steroidal yapılı bileşikler

Bileşik	R	Bitki	Kaynak
β-Sitosterol		<i>A. euchroma</i> , <i>A. hispidissima</i> , <i>A. nobilis</i>	12,55,81,100,123
Stigmasterol		<i>A. decumbens</i>	2

Flavonoitler

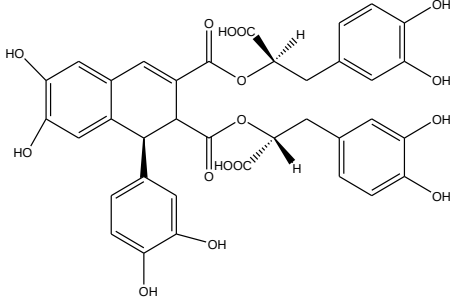
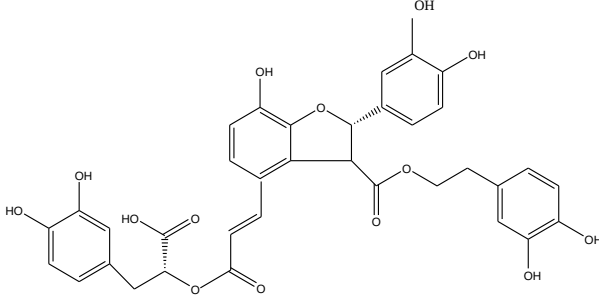
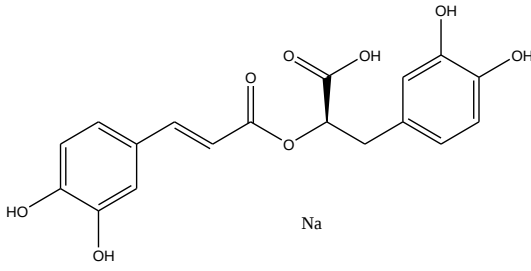
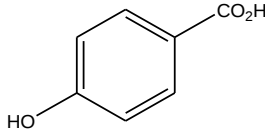
Tablo 14. *Arnebia* türlerinden elde edilen flavonoitler



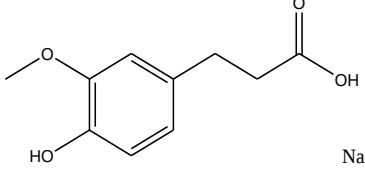
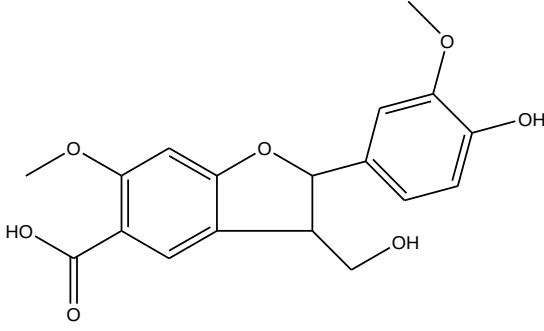
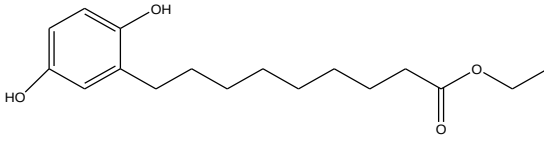
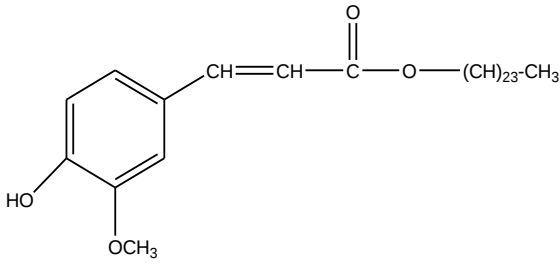
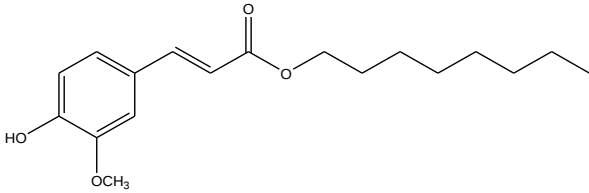
Bileşik	Bitki	Kaynak
Viteksin	<i>A. hispidissima</i>	40,87

Fenolik Asitler ve Türevleri

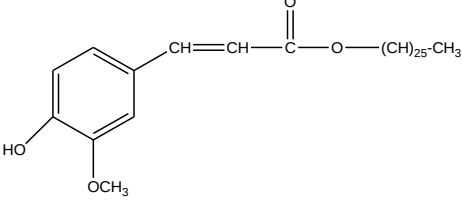
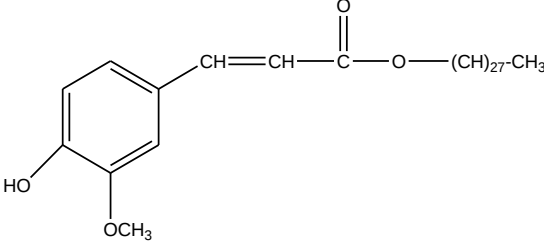
Tablo 15. *Arnebia* türlerinden elde edilen fenolik asit ve türevleri

Bileşik	Formül	Bitki	Kaynak
Rabdosiin		<i>A. euchroma</i>	53
Salvianolik asit B		<i>A. euchroma</i>	88
Sodyum rozmarinat		<i>A. euchroma</i>	136
4-hidroksi-benzoik asit		<i>A. nobilis</i>	12

Tablo 15. *Arnebia* türlerinden elde edilen fenolik asit ve türevleri (devam)

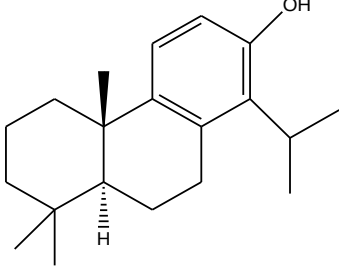
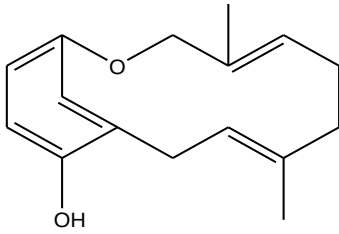
Bileşik	Formül	Bitki	Kaynak
Sodyum ferulat		<i>A. euchroma</i>	136
2-(3'-trimetoksi-4'-hidroksi)-fenil-3-hidroksimetil-6-metoksi-5-benzofuran formik asit		<i>A. euchroma</i>	77
Etil 9-(2',5'-dihidroksifenil) nonanoat		<i>A. euchroma</i>	73
Tetrakozil ferulat		<i>A. euchroma</i>	101
Oktil ferulat		<i>A. euchroma</i>	73

Tablo 15. *Arnebia* türlerinden elde edilen fenolik asit ve türevleri (devam)

Bileşik	Formül	Bitki	Kaynak
Hekzakozil ferulat		<i>A. euchroma</i>	101
Oktakozil ferulat		<i>A. euchroma</i>	101

Diğer Bileşikler

Tablo 16. *Arnebia* türlerinden elde edilen diğer bileşikler

Bileşik	Formül	Bitki	Kaynak
Podokarpa- 8,11,13-trien-13-ol, 14-isopropil		<i>A. euchroma</i>	130
Arnebinol		<i>A. euchroma</i> , <i>A. hispidissima</i>	93,106,127,128

2.2.2. *Arnebia* Türlerinin Kullanışları ve Biyolojik Aktiviteleri

Boraginaceae familyasına ait *Alkanna*, *Arnebia*, *Maharanga* ve *Onosma* cinslerinde bulunan toplam 8 türün kök ve rizomlarından oluşan Ratanjot'un ekzama, yara ve isilikte etkili olduğu, Hindistan'da göz hastalıkları, bronşit, karın ağrıları ve kaşıntı tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir (56).

Hindistan'da yapılan etnobotanik bir çalışmada *Arnebia benthamii*'nin hardal yağında bekletilmiş köklerinin saç çıkartıcı amaçla halk arasında kullanıldığı bildirilmiştir (108).

Nepal'in batısında *Arnebia benthamii*'nin kurutulmuş ve toz edilmiş köklerinin kan temizleyici, soğuk algınlığı ve vücut ağrılarını iyileştirici; yağda bekletilmiş köklerinin ise saç çıkartıcı amaçla ve saç için kırmızı boya olarak kullanıldığı kayıtlıdır (63).

Türkiye'de halk arasında *Arnebia densiflora*'nın kök kabukları haricen yara iyileştirmede ve yanık tedavisinde kullanılmaktadır (7,96). Kars, Iğdır yöresinde yapılan bir etnobotanik çalışmada *Arnebia densiflora*'nın kök kabukları ve çam türlerinin odunlarının parçalanıp karıştırılarak tereyağ içerisinde pişirilmesi ile hazırlanan merhem yara iyileştirme ve yanık tedavisinde kullanıldığı kayıtlanmıştır (97).

Antitümöral Etki

A. euchroma'dan elde edilen rabdosiin ve izomeri, memeli DNA topoizomerazlarının *in vitro* non-selektif inhibitörleri olarak etki göstermişlerdir (53).

A. euchroma köklerinden elde edilen 3 naftokinon türevinin (asetilalkannin, izobutilalkannin, 2',3'-epoksialkannin) insan kolorektal kanser hücrelerinde (HCT116) ve insan hepatoma (Hep G2) hücrelerinde yapılan MTT deneyi sonucunda IC₅₀ değerleri, HCT hücreleri üzerinde sırasıyla (0,34 ± 0,09 µM, 0,30 ± 0,09 µM, 0,39 ± 0,08 µM) Hep-G2 hücreleri üzerinde sırasıyla (0,39 ± 0,07 µM, 0,42 ± 0,03 µM, 0,34 ± 0,04 µM) olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar hidroksinaftokinon türevlerinin her iki hücre üzerinde de güçlü hücre büyümesini engelleyici etkileri olduğunu göstermiştir (19).

A. euchroma'nın antitümör etkisi MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) deneyi ile *in vitro* olarak insan akciğer adenokarsinoma hücreleri (A549), insan karaciğer karsinoma hücreleri (Bel-7402), insan meme adenokarsinoma hücreleri (MCF-7), fare Lewis akciğer karsinoma (LLC) hücreleri üzerinde; *in vivo* ise LLC modeli ile karsinoma oluşturulmuş C₅₇BL/6 farelerinin kullanıldığı çalışma ile araştırılmıştır. LLC dokusunda bax, bcl-2 ve kaspaz-3 proteinlerinin ekspresyonu immunohistokimyasal boyama ile teşhis edilmiştir. A549, Bel-7402, MCF-7 ve LLC hücre hatlarında asetilşikonin hücre çoğalmasını doza bağımlı olarak inhibe etmiştir. Bu hücrelerdeki IC₅₀ değerleri sırasıyla 5,6 ± 0,86 µg/ml, 6,82 ± 1,5 µg/ml, 3,04 ± 0,44 µg/ml ve 2,72 ± 0,38 µg/ml olarak bulunmuştur. Ayrıca asetilşikonin, LLC ile tümör oluşturulmuş C₅₇BL/6 farelerindeki tümör büyümesini baskılamıştır. Asetilşikoninin 2 mg/kg dozdaki inhibisyon oranının % 42,85 olduğu bulunmuştur. İmmunohistokimyasal boyama sonuçları asetilşikoninin bax ve kaspaz-3 ekspresyonu yaptığını; bcl-2 ekspresyonunu azalttığını göstermiştir ki bu durum asetilşikoninin pro-apoptotik bcl-2 ve kaspaz-3 ü aktive ederek tümör hücre apoptozisini indüklediğini göstermiştir (121).

Doymamış pirolizidin alkaloitleri içeren *A. hispidissima* ekstresi Ehrlich asit karsinoma hücrelerinde *in vitro* olarak sitotoksik aktivite göstermiştir (117).

Yapılan çalışmalarda *Arnebia nobilis*'in yüzde 50'lik alkoldeki kök ekstresi ve bu ekstreden elde edilen arnebin 1 ve arnebin 3 Walker karsinosarkoma 256 farelerinde *in vivo* olarak etkili bulunmuştur ve naftokinonlar tümör hücrelerini *in vitro* olarak inhibe etmiştir (39).

Yaşlanmayı Engelleyici Etki

A. euchroma'nın yağda çözünen ekstresinin (AE-I) yaşlanmaya karşı etkisi farelerdeki D-galaktoz ile oluşturulmuş subakut yaşlanma modeli üzerinde denenmiştir. D-galaktoz ile yaşlanan fare modeli % 1-2 D-galaktozun (10 mL/kg) enjeksiyonu ile oluşturulmuştur. Timus ve dalağın aktivite katsayıları, kan üre azotu (BUN) içeriği ve serumdaki total antioksidan kapasite (T-AOC); karaciğer dokusundaki süperoksit dismutaz (T-SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri, malonildialdehit miktarı ve beyin homojenatındaki monoamin peroksidaz (MAO), nitrik oksit sentaz aktiviteleri ölçülmüştür. Tüm dozlarda AE-I'in farelerdeki serum BUN düzeyini azalttığı ($p<0,01$); karaciğer homojenatındaki T-SOD aktivitesini anlamlı ölçüde artırdığı; GSH-Px aktivitesini güçlendirdiği ($p<0.05$); fakat timus karaciğer ve beyin homojenatları üzerinde belirgin etkisinin bulunmadığı gözlenmiştir ($p>0.05$). Elde edilen biyokimyasal sonuçlara göre AE-I in farelerde D-galaktoz tarafından oluşturulan subakut yaşlanma üzerinde yaşlanmayı engelleyici etkisinin olduğu görülmüştür (78).

Antienflamatuvar Etki

A. euchroma'dan elde edilen asetilşikonin histaminle indüklenen kapiller permeabilite, fare pençe ödemi ve koton pellet ile oluşturulan granulomu inhibe etmiştir. Ayrıca asetilşikonin, böbreküstü bezi çıkartılmış farelerde de antienflamatuvar etki göstermiştir. Bu farelerdeki LD₅₀ değeri 22,75 mg/kg bulunmuştur (69).

A. euchroma'nın köklerinin petrol eteri, kloroform, alkol ve sulu ekstralarının antienflamatuvar etkinliği karragen indükleyici fare pençe ödemi metodu ile araştırılmıştır. 100-150 g ağırlığında albino porton farelerinin kullanıldığı deneyde kontrol grubuna % 1lik tuz içeren taşıyıcı çözelti, standart olarak kullanılacak gruba ise ibuprofen 50 mg/kg oral dozda verilmiştir. Her bir ekstrenin farelere 500 mg/kg oral dozda verildiği deneyin sonucunda maksimum ödem inhibisyonları % 61,2, % 45, % 27,5 ve % 60 olarak bulunmuştur. Bulunan bu sonuçlar karragen ile indüklenmiş fare pençe ödeme 300 dakikalık zaman aralığında ekstraların aktivitelerinin referans ilaç olan ibuprofenle kıyaslanabilir olduğu gösterilmiştir (ibuprofen 50 mg/kg, p.o., % 61,6 inhibisyon) (52).

A. hispidissima'nın etanolik ekstresi ve bu ekstreden kromatografik metotlar sonucu elde edilen arnebin-5, arnebin-6, terakrilşikonin, arnebinon ve asetilşikoninin antienflamatuvar aktiviteleri farelerde oluşturulan karragen ile indüklenmiş pençe ödemi ve komplet Freund adjuvanı (CFA) ile indüklenmiş kronik artrit ile araştırılmıştır. Karragen ile indüklenen fare pençe ödemi deneyinde 150–200 g ağırlığında erkek Wistar albino fareleri, CFA ile indüklenmiş kronik artrit deneyinde 25-30 g ağırlığında Swiss albino fareler kullanılmıştır. Kontrol grubuna sadece % 2 lik tuz çözeltisi verilmiş; standart olarak ise asetilsalisilik asitin etanoldeki % 1 lik çözeltisi kullanılmıştır. Sonuçlar *A. hispidissima*'nın etanol ekstresinin ve tüm naftokinon türevlerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde antienflamatuvar etkinliğinin olduğunu göstermiştir ($p<0,01$). Karragen ile indüklenmiş akut artrit inhibisyonunda 8 saat sonunda 5 mg/kg dozda arnebinon % 27,17 inhibisyonla en etkili, CFA ile indüklenmiş kronik artrit ilerlemesinin baskılanmasında ise yine

arnebinon 1. günün sonunda 5 mg/kg dozda % 62,45 inhibisyon ile en yüksek etkili bulunmuştur (107).

A. hispidissima'nın *n*-hekzan ekstresinin ve bu ekstreden elde edilen naftokinonların (arnebin-1, arnebin-7, tiglik asit, alkannin, arnebinol ve sikloarnebin-7) antienflamatuvar etkisi, farelerde oluşturulan karragen ile indüklenmiş akut artrit ve komplet Freund adjuvanı (CFA) ile indüklenmiş kronik artrit ile araştırılmıştır. Karragen ile indüklenmiş akut artrit enflamasyon deneyinde 4–6 haftalık, 150–200 g, erkek Wistar albino fareler; CFA ile yapılan deneyde ise 4-6 haftalık, 25-30 g, erkek Swiss albino fareler kullanılmıştır. *n*-hekzan ekstresi 100 ve 500 mg/kg, p.o; naftokinonlar ise 50-100 mg/kg, p.o dozlarda farelere verilmiştir. Her iki deneyde de kontrol grubuna sadece tuz verilmiş, standart olarak da %1 karboksimetilselüloz içinde 50 ve 100 mg/kg, p.o. dozlarda asetilsalisilik asit verilmiştir. Sonuçlara göre her 2 metotta da *n*-hekzan ekstresi ve naftokinonların anlamlı ölçüde antienflamatuvar etki gösterdiği bulunmuştur ($p<0.01$). Karragen ile indüklenmiş akut artrit inhibisyon deneyinde 4. saatin sonunda 50 mg/kg dozda sikloarnebin-7'nin % 56,3 inhibisyonla standarttan sonra en etkili, CFA ile indüklenmiş kronik artrit ilerlemesinin baskılanmasında ise 1. günün sonunda 50 mg/kg dozda arnebin-1'in % 60,4 inhibisyonla standarttan sonra en etkili olduğunu görülmüştür (106).

Prostaglandin Biyosentez İnhibitör Etki

Yapılan deneyde *A. euchroma*'dan elde edilen major içerik olan naftokinonların prostaglandin biyosentez inhibitörü olmadığı gösterilmiştir. Yine bu bitkiden elde edilen şikonafuran B, C ve de-O-metilasidiplodinde en fazla, arnebinol ve arnebinonda ise daha az olmak üzere prostaglandin biyosentez inhibitörü etki gözlenmiştir (127).

Yapılan bir diğer çalışmada, *A. euchroma*'nın metanol ekstresinden elde edilen arnebinol ve de-O-metilasidiplodinin prostaglandin biyosentez inhibitörü olduğu bulunmuştur. Arnebinolün IC_{50} değeri 29,5 μ M, ve de-O-metilasidiplodinin 20 g/ml de % 62,7 inhibitör etkisi olduğu gösterilmiştir (128).

Platelet Agregasyonu İnhibe Edici Etki

A. euchroma'nın kloroform ekstresinden kromatografik işlemler sonucu β - β dimetilakrilşikonin, asetilşikonin, terakrilşikonin ve şikonin elde edilmiştir. Elde edilen şikonin ve türevlerinin antiplatelet etkinlikleri, yıkanmış tavşan plateletlerinde ayrı ayrı kollajen, araşidonik asit, platelet aktive edici faktör (PAF) veya trombin nedeni ile oluşan % agregasyonun ölçülmesiyle araştırılmıştır. Yapılan deneyin sonuçlarına göre 2 μ g/ml dozda trombin ile indüklenmiş platelet agregasyonunun terakrilşikonin ve asetilşikonin tarafından kısmen inhibe edildiği, araşidonik asit ile indüklenmiş platelet agregasyonunun asetilşikonin tarafından önemli bir oranda inhibe edildiği, kollajen ile indüklenmiş platelet agregasyonunda terakrilşikonin ve asetilşikoninin tamamıyla inhibisyon gösterdiği, PAF ile indüklenmiş platelet agregasyonunda ise terakrilşikonin, asetilşikonin ve şikoninin çok az oranda inhibisyon gösterdiği bulunmuştur (11).

Antiviral Etki

AIDS tedavisinde yeni, tolerans gelişmemiş ve terapötik indeksi geniş olan ilaç olabilecek maddelerin araştırıldığı bir çalışmada; Çin tıbbında AIDS'e karşı kullanılan ve daha önce yapılan çalışmalarda aseton ekstresinin infekte edilmiş H9 hücrelerinde HIV replikasyonunu engelleyici etkinliği bulunan *Arnebia euchroma*'nın *n*-hekzan ekstresinden hareketle aseton ekstresi hazırlanmış ve hazırlanan aseton ekstresinin biyolojik aktivite rehberli çalışılması sonucu en aktif fraksiyonundan kafeik asit tetramer tuzları ve kafeik asit tetramer glukozitlerinin dipotasyum ve potasyum tuzları elde edilmiştir. Bu bileşiklerin anti-HIV etkinlikleri ELISA testi ile araştırılmış ve rabdosiinin monosodyumlu, monopotasyumlu ve rabdosiinin optik izomerinin monosodyumlu türevlerinin sırasıyla EC₅₀ değerleri 2,8, 4 ve 1,5 μ g/ml bulunmuştur ve bu durum kafeik asit tetramerlerinin monosodyum ve monopotasyum tuzlarının; glukozlu veya disodyum/dipotasyumlu türevleri ile karşılaştırıldığında en güçlü anti-HIV aktivite gösterdiğini kanıtlamıştır (54).

A. euchroma'dan elde edilen glikozaminoglukanların (AEG) papillomavirüse karşı etkinliği RT-PCR metodu ile araştırılmıştır. Verruka

dokularının kullanıldığı bu PCR tekniğinde kontrol grubunda serum fizyolojik çözeltisi, deney grubunda ise AEG'nin 8 farklı dozu kullanılmıştır. Deney sonuçları AEG'nin anti-HPV etkisinin olduğunu ve en düşük etkili konsantrasyonun 0,781 mg/ml olduğunu göstermiştir (24).

Yara İyi Edici Etki

A. densiflora kök ekstresinin fare damak mukozasındaki yara iyi edici etkisini gözlemek amacıyla bir çalışma yapılmıştır. 10 mm kalınlığında mukozal yaralar skalpek kullanılarak farelerin damaklarının orta hattında oluşturulmuştur. Deney grubunda oluşturulan yaralara günde bir defa topikal olarak % 10 *A. densiflora* kök ekstresi ile hazırlanmış merhem tatbik edilmiştir. 4., 7., 14. ve 21. günlerde yaraların üzerinden doku örnekleri alınarak histolojik incelemeler yapılmıştır. Deney grubunda % 10 *A. densiflora* kök ekstresinin yara iyileşmesinde giderek artan etkisi olduğu gösterilmiştir (60).

A. densiflora'nın *n*-hekzan, kloroform, etilasetat ve metanol ile ekstraktları hazırlanmış ve erkek Sprague–Dawley fareleri (160–180 g) ile Swiss albino fareleri (20–25 g) üzerinde linear insizyon ve eksizyon yara modelleri oluşturularak bu ekstraktların yara iyi edici aktiviteleri araştırılmıştır. % 1 *n*-hekzan ekstresi içeren merhem her iki modelde de referans merhem olan Madecassol ile karşılaştırılabilir düzeyde yüksek etkinlik göstermiştir (4).

Yapılan bir çalışmada *A. nobilis*'ten elde edilen arnebin-1 in kütanöz punch yara modeli üzerinde normal ve bozulmuş yara iyi edici etkisi araştırılmıştır. Arnebin-1 hidrokortizon ile muamele edilmiş veya edilmemiş olan yaralar üzerine günlük topikal olarak uygulanmıştır. Arnebin-1 hidrokortizonlu veya hidrokortizonsuz yaralar üzerinde yaranın genişliği ve boşluk uzunluğunu açıkça azaltarak kontrollerle karşılaştırılabilir düzeyde önemli yara iyi edici etki göstermiştir. Arnebin-1 tedavisi hücre proliferasyonu, hücre göçü ve kalın granüle dokudan damar oluşumunu ve yaralarda yeniden epitel doku oluşumunu sağlamıştır. Hidrokortizonsuz kontrol grupları ile karşılaştırıldığında arnebin-1 ile muamele edilmiş yaralarda kollajen, fibronektin ve büyüme faktörü β -1 (TGF- β 1) in sentezinde artış görülmüştür.

TGF- β 1in yara iyileşmesinin hızını artırması ve hidrokortizon ile tedavi edilmiş yaralardaki bozuklukların tedavisinde de etkili olması; arnebin-1 in de steroid ile bozulmuş yaralardaki iyileşmeyi sağlamak için iyi bir terapötik ajan olabileceğini düşündürmüştür (105).

Antimikrobiyal Etki

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve Vankomisine dirençli enterekoklara (VRE) karşı etkinliği araştırılan *A. euchroma* nın biyolojik aktivite rehberli çalışmasında elde edilen altı naftokinon türevinin (minimum inhibitör konsantrasyonları (MICs) 1.56 ve 3.13 ug/mL arasında), alkannin ve şikonine (MIC = 6.25 μ g/mL) göre daha yüksek anti-MRSA aktivite gösterdiği bulunmuştur. Bu türevler aynı zamanda anti-MRSA ya benzer minimum inhibitör konsantrasyonlarda anti-VRE etkinlik göstermişlerdir (101).

A. hispidissima'nın petrol eteri ekstresinin ve bu bitkiden elde edilen triterpenler olan β -amirin, β -amirin asetat, lupeol ve betulinin *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus thuringiensis*'e karşı antibakteriyel; *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Rhizoctonia phaseoli* ve *Penicillium chrysogenum*'e karşı antifungal etkileri disk difüzyon metodu kullanılarak karşılaştırılmıştır. Bakteriler için referans olarak 1 mg gentamisin; mantarlar için ise referans olarak mikostatin kullanılmıştır. Petrol eteri fraksiyonu *K. pneumoniae* (İnhibisyon zon çapı;=IZ=14 mm) ve *P. chrysogenum* (IZ=7 mm) e karşı maksimum aktivite göstermiştir. Elde edilen triterpenlerden β –amirin'in *E. coli*'ye karşı; (IZ=16 mm) β -amirin asetatın ise *R. phaseoli*'ye (IZ =10 mm) karşı maksimum aktivite gösterdiği bulunmuştur (50).

Kontraseptif Etki

A. euchroma'nın köklerinden izole edilen dipotasyum rabdosiin, potasyum rozmarinat, sodyum rozmarinat ve sodyum ferulatın kontraseptif etkileri incelenmiş ve dipotasyum rabdosiinin yüksek oranda kontraseptif etki gösterdiği bulunmuştur (136).

Toksisite

A. euchroma'nın akut toksisitesi bu bitkinin köklerinden hazırlanan petrol eteri, etilasetat, etanol ve su ekstraktlarının fareler üzerinde yapılan toksisite deneyleriyle araştırılmıştır. Deney sonuçlarına göre petrol eteri, etilasetat, etanol ve su ekstraktlarında farelerdeki maksimum tolere edilen doz sırası ile 2,0 g/kg, 12,5 g/kg, 19,5 g/kg, ve 23,4 g/kg bulunmuştur. Bu durum UV spektrofometresi ile yapılan şikonin miktar tayini ile paralellik göstermiştir ve şikoninin en fazla petrol eteri fazında olduğu, farelerde akut toksisitesinin en fazla olduğu da görülerek doğrulanmıştır (20).

A. hispidissima'nın taşıdığı monokrotalin ve ekhimidin adındaki pirolizidin tip alkaloidlerinden dolayı memelilere hepatotoksik etkili olabileceği öngörülmüştür (116).

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Fitokimyasal Çalışmalar

3.1.1. Bitkisel Materyal

Arnebia purpurea S. Erik & H. Sümbül bitkisi Mayıs 2009'da Belpınar Beli, Taşkent, Konya'dan kayalık-taşlık alanlardan toplanmıştır. Bitki örneği, Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Herbaryumu'nda saklanmaktadır. (GAZI 3765)

Bu çalışmada, bitkinin gölgede ve hava alan bir ortamda kurutulmuş toprakaltı kısımları ve çiçekli toprak üstü kısımları ayrı ayrı kullanılmıştır.

3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Aletler

Kimyasal Katı Maddeler: Vanilin (Merck),

Solvanlar: Diklorometan, etilasetat, metanol, *n*-hekzan, petrol eteri, sülfürik asit, formik asit, aseton (Merck, Carlo Erba, Riedel)

Aletler:

UV Spektrofotometresi	: Biotek µQuant
IR Spektrofotometresi	: Jasco 420 Fourier
Kütle Spektrometresi	: Waters 2695 Alliance Micromass ZQ LC-MS
NMR Spektrometresi	: Varian Mercury Plus 400 MHz, Bruker Avance DRX 500 MHz
Liyofilizatör	: Virtis Freezemobile 6
Rotavapor	: Büchi R-200, Büchi R-210
UV Lambası	: Camag (Tip: 29000)
Kromatografi Tankı	: Camag (cam küvet, 22 x 23 x 8 cm)
Fraksiyon toplayıcı	: Dionex (Model: Foxy Jr)
Vakum pompası	: Millipore
Ultrasonik banyo	: Transsonic 570

Adsorbanlar: Kromatografik çalışmalarda kullanılan adsorbanlar Tablo 17’de verilmiştir.

Tablo 17. Kromatografik çalışmalarda kullanılan adsorbanlar

Yöntem	Adsorban
İTK	SK (Hazır alüminyum plak, Kieselgel 60 F ₂₅₄ , 0,2 mm, Merck 5554),
TF-İTK	TF-SK (Hazır alüminyum plak, RP-18, 0,2 mm, Merck 5559)
KK	SK (Kieselgel 60, 0,063-0,2 mm, Merck 7734) SFK (Sephadex LH-20, Fluka)
OBSK	TF-SK (LiChroprep RP-18, 40-63 µm, Merck)
VSK	TF-SK (LiChroprep RP-18, 40-63 µm, Merck)

İTK: İnce Tabaka Kromatografisi, **KK:** Kolon Kromatografisi, **OBSK:** Orta Basıncılı Sıvı Kromatografisi, **VSK:** Vakum Sıvı Kromatografisi **SK:** Silikajel Kolon Kromatografisi, **SFK:** Sephadex LH-20 Kolon Kromatografisi, **TF-SK:** Ters Faz Silikajel Kromatografisi, **İTK:** Normal Faz silikajel İnce Tabaka Kromatografisi, **TF-İTK:** Ters Faz Silikajel İnce Tabaka Kromatografisi

Solvan Sistemleri: Kromatografik çalışmalarda kullanılan solvan sistemleri Tablo 18'de verilmiştir.

Tablo 18. Kromatografik çalışmalarda kullanılan solvan sistemleri

Solvan Sistemi	Kromatografik Yöntem
CH ₂ Cl ₂ -HCOOH (99,5:0,5)	SK, İTK
CH ₂ Cl ₂ -MeOH-HCOOH (80:20:0,5)	SK
<i>n</i> -hekzan-EtOAc-HCOOH (99:1:0,5→70:30:0,5)	SK, İTK
CH ₂ Cl ₂ -MeOH-H ₂ O (80:20:2)	SK, İTK
CH ₂ Cl ₂ -MeOH-H ₂ O (70:30:3)	SK, İTK
CH ₂ Cl ₂ -MeOH-H ₂ O (61:32:7)	SK, İTK
CH ₂ Cl ₂ -MeOH-H ₂ O (50:50:5)	SK, İTK
CH ₂ Cl ₂ -MeOH (100:0→0:100)	SK
MeOH	SFK, SK
MeOH-H ₂ O (0:100→100:0)	OBSK, TF-İTK, VSK
<i>n</i> -hekzan:aseton (95:5)	SFK

3.1.3. Kromatografik Yöntemler

İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

Yapılan tüm kromatografi çalışmalarında toplanan fraksiyonların takip edilmesinde ve bileşiklerin şahit maddeler ile karşılaştırılmasında, normal faz ve ters faz silika jel kaplı hazır aluminyum plaklar kullanılmıştır.

Numune Tatbiki: Numuneler bir pastör pipeti yardımıyla, plağın alt ucunun 1 cm yukarısından ve 0,6 cm aralıklarla tatbik edilmiştir. Kromatografi tankına konulan plaklar oda sıcaklığında 7-10 cm mesafe boyunca sürüklenmiştir.

Lekelerin Belirlenmesi: UV lambası ile 254 ve 366 nm'de; Vanilin'in derişik sülfürik asit içindeki % 1'lik çözeltisi püskürtüldükten sonra 105°C'de birkaç dakika ısıtılması ile.

Kolon Kromatografisi (KK)

Normal Faz Silikajel Kolon Kromatografisi

Kök (*n*-hekzan) ekstresinin ön fraksiyonlanmasında ve saflaştırılmasında, topraküstü MeOH ekstresinden hazırlanan su ekstresinin saflaştırılmasında silikajel kolon kromatografisinden yararlanılmıştır.

Kolonun Hazırlanması: İstenilen miktarda tartılan silika jel yeterli miktarda solvan sistemi ile süspansiyon haline getirilmiştir ve bu karışım, alt ucuna pamuk yerleştirilmiş olan cam kolona aktarılmıştır. Kolondan yeterli miktarda solvan sistemi (Tablo 17) geçirilerek adsorbanın yerleşmesi sağlanmıştır. Adsorban üzerinde 2-3 mm solvan kalıncaya kadar beklenmiş ve solvan sisteminde çözülmüş olan numune kolona tatbik edilmiştir.

Sephadex LH-20 Kolon Kromatografisi (SFK)

Topraküstü metanol ekstresinden hazırlanan su ekstresinin ön fraksiyonlanmasında ve saflaştırılmasında, kökten hazırlanan *n*-hekzan ekstresinin saflaştırılmasında Sephadex LH-20 Kolon Kromatografisi kullanılmıştır.

Kolonun Hazırlanması: İstenilen miktarda tartılan Sephadex LH-20, yeterli miktarda solvan (Tablo 17) ile karıştırılmıştır. Karışım, alt ucuna pamuk yerleştirilmiş olan cam kolona doldurulmuş ve adsorban tamamen yerleşinceye kadar kolondan solvan geçirilmiştir. Adsorbanın üzerinde 1-2 mm solvan kalınca metanolde çözülen numune kolona tatbik edilmiştir.

Kolon Kromatografisi İçin Numune Tatbiki

A. Yaş (Çözücü yardımı ile) tatbik: Numune yeterli miktarda solvan/solvan sistemi içinde tamamı çözüldükten sonra, bir pastör pipeti yardımı ile kolona tatbik edilmiştir. Kolon musluğu açılarak numune adsorbana emdirilmiştir. Kolonun üzerine, adsorban yüzeyinin bozulmasını engellemek için pamuk yerleştirilmiş ve kolona yeterli miktarda solvan sistemi eklenerek elüsyona başlanmıştır.

B. Kuru tatbik: Numune 1-2 ml çok iyi çözündüğü bir solvan içinde çözülmüştür. Çözelti, kolondaki adsorban ve tatbik edilecek numune miktarları da göz önünde tutularak, yeterli miktarda adsorban ile karıştırılmıştır. Adsorbanın çözeltiyi iyice adsorbe etmesi ve tam kuruması sağlanmıştır. Daha önce hazırlanan ve üzerinde 1-3 cm solvan bırakılan kolona kuru olarak aktarılmıştır. Kolonun üzerine, adsorban yüzeyinin bozulmasını engellemek için pamuk yerleştirilmiş ve kolona yeterli miktarda solvan sistemi eklenerek elüsyona başlanmıştır.

Vakum Sıvı Kromatografisi

Topraküstü metanol ekstresinden hazırlanan su ekstresinin fraksiyonlarının saflaştırılmasında vakum sıvı kromatografisi kullanılmıştır.

Ayırımında, ters faz silika jel (LiChroprep C₁₈) materyali ile doldurulmuş kolonlar kullanılmıştır. Numune tatbik edildikten sonra, uygun solvan sistemleri (Tablo 17) ile elüsyona başlanmış ve solvan sisteminin polaritesinin arttırılması ile devam edilmiştir.

Kolonun Hazırlanması: Yeterli miktarda adsorban, bir vakum pompası ile sağlanan vakum yardımıyla kolona doldurulmuştur. Kolondan, metanol geçirilerek adsorbanın yerleşmesi sağlanmıştır. Kolon, önce yeterli miktarda su, sonra da elüsyona başlanacak solvan sistemi ile şartlandırılarak tatbik için hazır hale getirilmiştir.

Numune tatbiki: Numune, elüsyona başlanacak solvanda (1-2 ml) çözülerek bir pipet yardımıyla kolona tatbik edilmiştir. Kolonun alt ucu vakum erleninin kapak mantarının içinden geçirilmiştir ve mantar kapatılarak kolon erlene oturtulmuştur. Vakum açılarak numune adsorbana emdirilmiş ve adsorbanın yüzeyinin bozulmasını engellemek amacıyla üzerine pamuk yerleştirilmiştir. Kolona solvan sistemi eklenerek vakum erleni içerisinde fraksiyonları toplamak için bir tüp yerleştirilmiş ve vakum açılarak elüsyona başlanmıştır.

Orta Basıncılı Sıvı Kromatografisi (OBSK)

Adsorban	: LiChroprep C ₁₈ (40 - 63 µm, Merck)
Kolon	: Büchi, 2,5 x 45cm
Peristaltik Pompa	: Dionex P680 HPLC Pumps
Enjektör	: Rheodyne (Loop 2 ml)
Solvan Sistemi	: MeOH - H ₂ O (% 0 - 100 MeOH)
Akış Hızı	: 5 ml/dak
Basınç	: 5 - 15 bar
Fraksiyon Hacmi	: 5 - 10 ml
Fraksiyon Toplayıcı	: Büchi C-660

Kolonun Hazırlanması: Yeterli miktarda adsorban kuru sistemle kolona doldurularak basınç altında ve bir vibratör yardımıyla sıkıştırılmış, kolondan yeterli miktarda metanol geçirilerek adsorbanın yerleşmesi sağlanmıştır. Kolon, önce yeterli miktarda su, sonra da elüsyona başlanacak solvan sistemi geçirilerek şartlandırılmıştır. Numune, 1-2 ml solvan sistemi içinde çözülerek bir enjektör yardımıyla kolona enjekte edilmiştir.

3.1.4. Ekstraksiyon

Köklerden *n*-Hekzan Ekstresinin Hazırlanması:

Bitkinin gölgede kurutulmuş, toz edilmiş kökleri (250 g) 3 l *n*-hekzan ile 40 °C'de 8 saat süreyle üç defa ekstre edilmiştir. Ekstreler sıcakken süzgeç kağıdından süzölmüş ve süzöntüler birleştirilmiştir. Birleştirilen süzöntüler, rotavaporda, düşük ısıda ve alçak basınç altında kuruluğa kadar yoğunlaştırılmıştır (*n*-hekzan ekstresi, 8 g, verim % 3,2).

Topraküstü Kısımlarından Metanol Ekstresinin Hazırlanması

Bitkinin gölgede kurutulmuş, toz edilmiş topraküstü kısımları (125 g) 3 l MeOH ile 45 °C'de 8 saat süreyle üç defa ekstre edilmiştir. Ekstreler sıcakken süzgeç kağıdından süzölmüş ve süzöntüler birleştirilmiştir. Birleştirilen süzöntüler, rotavaporda, düşük ısıda ve alçak basınç altında kuruluğa kadar yoğunlaştırılmıştır (MeOH ekstresi, 14 g, verim % 11,12).

Ham metanol ekstresi 100 ml suda çözüldükten sonra bir ayırma hunisine alınmış, klorofillerden ve yağsı maddelerden uzaklaştırmak amacı ile petrol eteri ile çalkalanmıştır (Petrol eteri ekstresi: 3 g, verim % 2,5) Sulu kısım rotavaporda, 45 °C'de ve alçak basınç altında *n*-butanol yardımıyla kuruluğa kadar uçurulmuş ve liyofilize edilmiştir (Sulu ekstre, 12 g, verim % 9,6).

3.1.5. İzolasyon Çalışmaları

Köklerden Hazırlanan *n*-hekzan Ekstresi Üzerinde Yapılan İzolasyon Çalışmaları

7 g *n*-hekzan ekstresi, yeterli miktar CH₂Cl₂-HCOOH (99,5:0,5) karışımında çözülerek silikajel kolona tatbik edilmiştir. Elüsyonda solvan sistemi olarak CH₂Cl₂-HCOOH (99,5:0,5), CH₂Cl₂-MeOH-HCOOH (80:20:0,5) ve MeOH-HCOOH (100:0,5) kullanılmıştır. Kolondan 100'er ml toplanan fraksiyonlar İTK ile kontrol edilerek 7 ana fraksiyonda (Fr. A-G) birleştirilmiştir.

Fr. A :17,3 mg

Fr. B: 330,3 mg

Fr. C:1,12 g

Fr. D: 347,3 mg

Fr. E: 109,1 mg,

Fr. F: 285 mg,

Fr. G: 552 mg

Fr. A (17,3 mg)'nın İTK kontrolleri sonucu tek madde taşıdığı görülmüştür (**APK-0**).

Fr. B'nin silikajel kolon kromatografisine uygulanarak *n*-hekzan-EtOAc-HCOOH (90:5:0,5) solvan sistemi ile fraksiyonlanması sonucu elde edilen fraksiyonlar üç ana fraksiyonda toplanmıştır (Fr. B1-3). Fr. B2 silikajel kolon kromatografisine *n*-hekzan-EtOAc-HCOOH (99:1:0,5) solvan sisteminde uygulanmış ve Fr. 35-46 **APK-1** (125 mg) olarak tanımlanmıştır. Fr. 14-29 solvan sistemi olarak *n*-hekzan-EtOAc-HCOOH (99:1:0,5)'in

kullanıldığı silikajel kolona tatbik edilmiş ve buradan İTK kontrolleri sonucu saf olduğu belirlenen Fr. 9-11, **APK-2** (1 mg), maddesi elde edilmiştir.

Fr. D *n*-hekzan-EtOAc-HCOOH (80:20:0,5) solvan sisteminde hazırlanan silikajel kolona tatbik edilmiş, yapılan İTK kontrolleri sonucu dört ana fraksiyonda birleştirilmiş ve yoğunlaştırılmıştır (Fr. D1-4). Fr. D1'in temiz olduğu saptanmış ve **APK-3+8+9** (57 mg) maddesi tanımlanmıştır. Fr. D3 ün tatbik edildiği *n*-hekzan-EtOAc-HCOOH (87,5:12,5:0,5) ile hazırlanan silikajel kolondan alınan Fr. 13-33 [**APK-4** (99,3 mg)] saf olarak alınmıştır.

Fr. F, *n*-hekzan-EtOAc-HCOOH (85:15:0,5) solvan sisteminde hazırlanan silikajel kolona tatbik edilmiştir. Yapılan silikajel kolon sonucunda toplanan üç ana fraksiyondan (Fr. F1-3) biri olan Fr. F1 *n*-hekzan-aseton-HCOOH (95:5:0,5) solvan sistemi kullanılarak hazırlanan Sephadex LH-20 kolona tatbik edilmiş ve buradan alınan Fr. 6-12, *n*-hekzan-aseton-HCOOH (87,5:12,5:0,5) ile hazırlanan Sephadex LH-20 kolonuna konulmuş ve Fr. 5-17 [**APK-7** (11,8 mg)] saf olarak alınmıştır. Fr. F3 *n*-hekzan-aseton-HCOOH (80:20:0,5) sisteminde çözülerek aynı solvan sistemi ile kurulan Sephadex LH-20 kolona uygulanmış ve temiz olduğu İTK kontrolleri sonucu anlaşılan Fr. 22-37'ye **APK-5** (7,8 mg) kodu verilmiştir. Sephadex LH-20 kolondan alınan Fr. 3-19, *n*-hekzan-EtOAc-HCOOH (87,5:12,5:0,5) solvan sistemi ile kurulan silikajel kolona tatbik edilmiş ve buradan da Fr. 22-31, **APK-6** (11,2 mg) maddesi alınmıştır.

Topraküstü Kısımlarının Metanol Ekstresinden Hazırlanan Su Ekstresi Üzerinde Yapılan İzolasyon Çalışmaları

11 g su ekstresi, metanolde çözülerek metanol ile hazırlanan Sephadex LH-20 kolona tatbik edilmiştir. 100'er ml toplanan fraksiyonlar İTK ile kontrol edilerek benzer fraksiyonlar 5 ana fraksiyonda (Fr. A-E) birleştirilmişler ve yoğunlaştırılmışlardır.

Fr. A: 2,90 g

Fr. B: 6,55 g

Fr. C: 387 mg

Fr. D: 313 mg

Fr. E: 368 mg

Fr. E metanolde çözülerek Sephadex LH-20 kolona tatbik edilmiş ve bu kolon kromatografisi sonucu beş ana fraksiyon toplanmıştır (Fr. E1-5) Fr. E4'te yoğun bulunan madde saflaştırılmak üzere bidistile suda çözülerek VSK sistemine uygulanmış ve (%95 Su) alınan Fr. 2-5 in saf olduğu yapılan İTK kontrolleri sonucu anlaşılmış ve bu madde **APT-1** (70,4 mg) olarak kodlanmıştır.

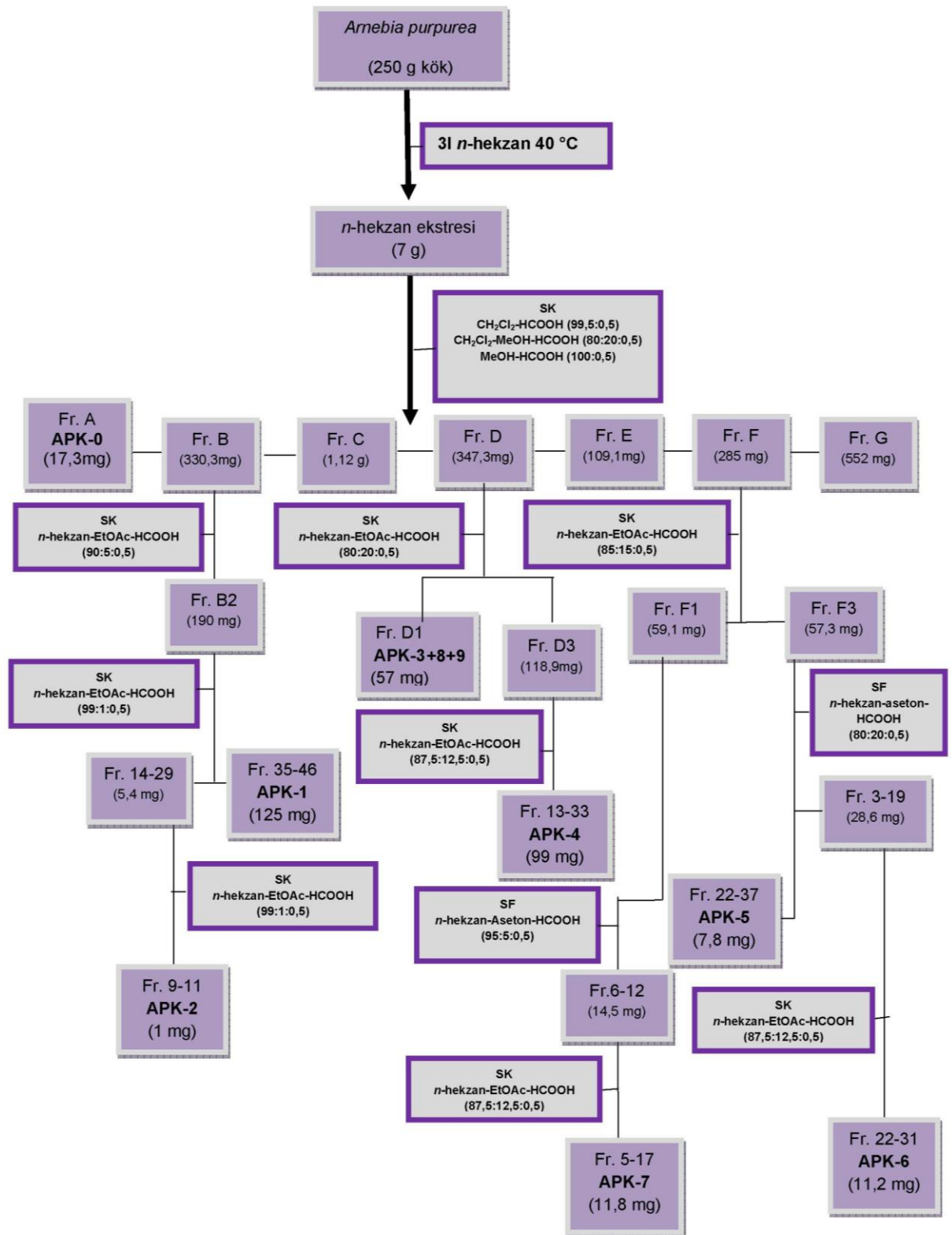
Fr. D OBSK sistemine uygulanmış ve MeOH/H₂O (%0-100 MeOH) solvan sistemi kullanılarak dört ana fraksiyonda toplanmıştır (Fr. D1-4). Saf olduğu belirlenen Fr.D1, **APT-2** (98,4 mg) maddesi olarak tanımlanmıştır.

Fr. C suda çözülerek OBSK sistemine tatbik edilmiş ve MeOH/H₂O (%0-100 MeOH) solvan sisteminin kullanıldığı kolondan beş ana fraksiyon toplanmıştır (Fr. C1-5). Fr. C1, %50 MeOH'da çözülerek VSK'ya uygulanmış ve Fr. 28-30 **APT-3** (95,2 mg) olarak tanımlanmıştır. Fr. C3 ün % 40 MeOH'da çözülerek VSK'ya uygulanmasıyla toplanan fraksiyonlardan temiz olduğu İTK ile tespit edilen Fr. 26-27'den **APT-4+5** (7 mg) bileşiği elde

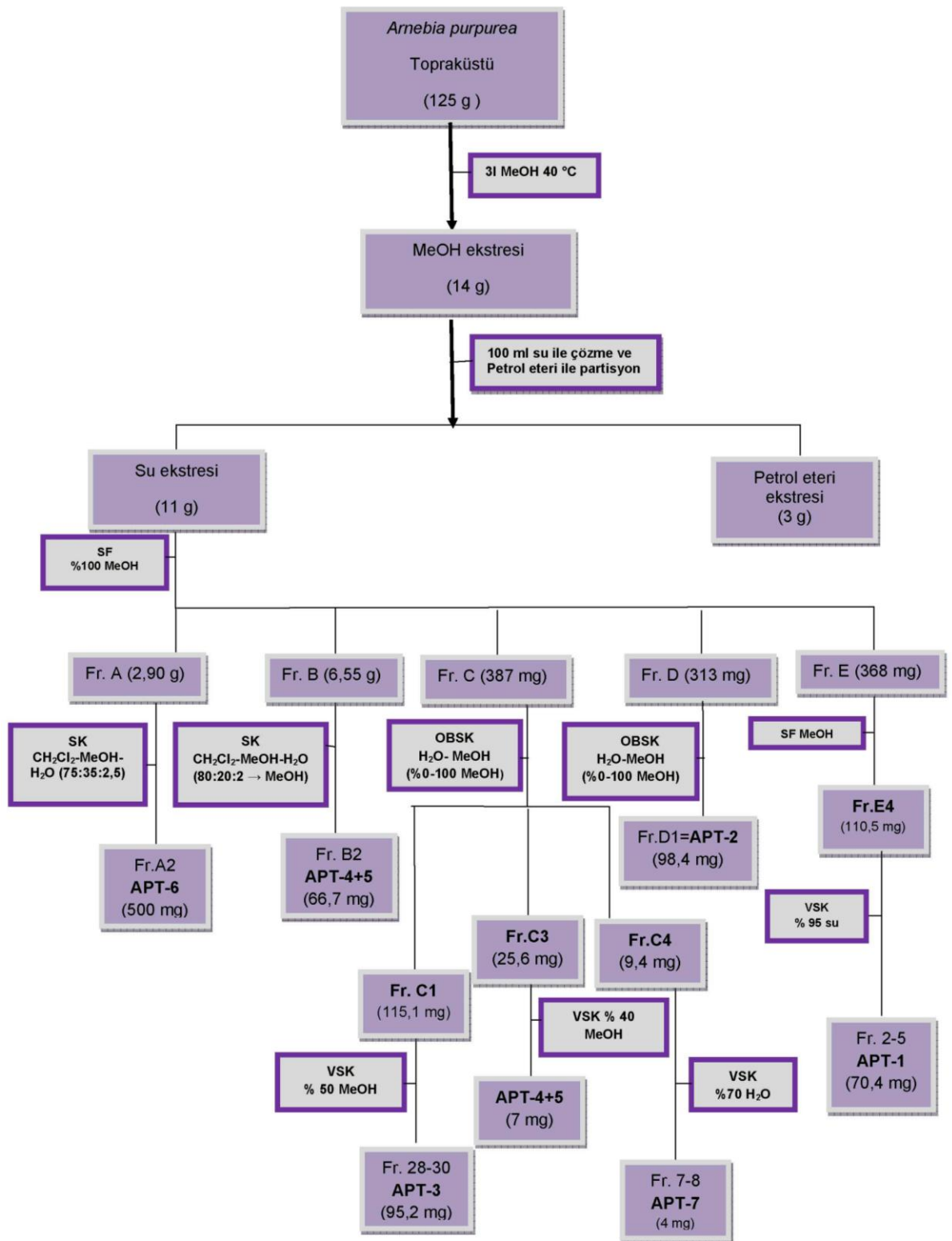
edilmiştir. Fr. C4 ün VSK sistemine uygulanmasıyla ise Fr. 7-8, **APT-7** (4 mg) maddesi elde edilmiştir.

Fr. B, Silikajel (% 10 distile su ile deaktive edilmiş) ile hazırlanan kolona tatbik edilmiş, $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (80:20:2 $\rightarrow$ MeOH) sistemi kullanılarak toplanan fraksiyonlardan benzer olanları birleştirilip yoğunlaştırılmış ve üç ana fraksiyonda toplanmıştır (Fr. B1-3). Fr. B2 nin yapılan İTK kontrollerinde **APT-4+5** (66,7 mg) olduğu saptanmıştır.

Fr. A Silikajel adsorbanı ve $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (75:35:2,5) solvan sistemi ile hazırlanan kolona tatbik edilmiştir. Toplanan fraksiyonlardan Fr. A2'den **APT-6** (500 mg) bileşiği saf olarak alınmıştır.



Şema 1. *Arnebia purpurea* kök *n*-hekzan ekstresi izolasyon şeması



Şema 2. *Arnebia purpurea* topraküstü metanol ekstresinden hazırlanan su ekstresi izolasyon şeması

3.2. Sitotoksik Aktivite Çalışması

Arnebia purpurea'dan elde edilen maddelerin sitotoksik aktivite tayininde **MTT** [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür] yöntemi kullanılmıştır (80).

Sitotoksik aktivite çalışması, hayvan kaynaklı kanser hücresi olan L929 (Murine Fibrosarcoma= Fare Fibrosarkoma) serileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 48 saatlik hücre kültürlerinden $8,2 \times 10^4$ olacak şekilde hücre süspansiyonları hazırlanmış ve 100'er µl olarak 96 çukurlu plakalara dağıtılmıştır. %5'lik CO₂ inkübatöründe %10 dana serumu ve % 1 antibiyotik çözeltisi içeren MEM vasatında 24 saat çoğaltılmıştır. Köklerden elde edilen ve polar çözücülerde çözünürlüğü iyi olmayan maddeler DMSO'da çözülmüş; topraküstünden elde edilen maddeler ise metanolde çözülmüşlerdir. Kullanılan DMSO ve MeOH oranı %0,5'i geçmemiştir (120). Belirlenen yüksek (50 µg/ml) ve alçak (10 µg/ml) konsantrasyonlarda hazırlanan bu çözeltiler 96 çukurlu plakadaki hücre süspansiyonlarının üzerine ilave edilmiş ve sitotoksitenin görülebilmesi için 48 saat inkübasyona bırakılmışlardır. Süre sonunda her bir çukurdaki ekstre çözeltileri aspire edilmiş ve üzerlerine 100 µl taze vasat ilave edilmiştir. 5 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde PBS ile hazırlanan MTT çözeltisi de plakadaki her bir çukura 10'ar µl ilave edilmiş ve plaka 6 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda oluşan formazon kristallerinin çözünmesi amacıyla çukurlara 100'er µl % 10 SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) çözeltisi ilave edilerek 20 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda 577/655 nm'de plaka okuyucuda optik dansiteler ölçülmüştür. Her bir madde için % inhibisyon değeri :

$$\% \text{ İnhibisyon} : [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{numune}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Fitokimyasal Çalışmalara Ait Bulgular

Arnebia purpurea bitkisi üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar sonucunda köklerden: üçü karışım halinde olmak üzere 5 naftokinon (izovalerilalkannin: **APK-3**, α -metil-*n*-butil alkannin: **APK-8**, izobutilalkannin: **APK-9**, asetilalkannin: **APK-4** ve alkannin **APK-5**); 1 steroid yapılı bileşik (β -sitosterol: **APK-6**); 1 triterpen (3-*O*-asetiloleanolik asit: **APK-7**); topraküstü kısımlarından: ikisi karışım halinde olmak üzere 3 flavonoit glikoziti (izoramnetin-3-*O*-rutinozit: **APT-4**, kemferol-3-*O*-rutinozit: **APT-5**, kemferol 3-*O*-(5"-asetil)apiofuranozit 7-*O*-ramnopiranozit: **APT-7** ve bir fenolik asit (rozmarinik asit: **APT-1**) izole edilmiş ve bu bileşiklerin yapıları spektroskopik yöntemler (UV, IR, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, 2D-NMR, Kütle spektr.) kullanılarak aydınlatılmıştır. Yapı tayinleri ile ilgili detaylı bilgiler aşağıda verilmiştir.

İzole edilen saf maddelerden **APK-0**, **APK-1**, **APT-3** ve **APT-6**'nın uzun zincirli hidrokarbon yapısında oldukları düşünülmekle birlikte yapılar tam olarak saptanamamıştır. Bu bileşiklerin yapı tayini çalışmaları devam etmektedir. **APK-2**'nin miktarı NMR analizleri için yeterli olmamıştır. **APT-2** için uygun NMR çözücüsü bulunamamıştır.

Elde Edilen Maddelerin Kullanılan İTK Solvan Sistemlerindeki Rf Değerleri

Tablo 19. *Arnebia purpurea* kök *n*-hekzan ekstresinden elde edilen bileşiklerin Rf değerleri

Bileşik	Rf Değeri*
APK-3/8/9	0,52
APK-4	0,45
APK-5	0,38
APK-6	0,28
APK-7	0,64

*: İTK solvan sistemi: *n*-hekzan:EtOAc:HCOOH (80:20:0,5)

Tablo 20. *Arnebia purpurea* topraküstü metanol ekstresinden hazırlanan su ekstresinden elde edilen bileşiklerin Rf değerleri

Bileşik	Rf Değeri*
APT-1	0,33
APT-4/5	0,64
APT-7	0,84

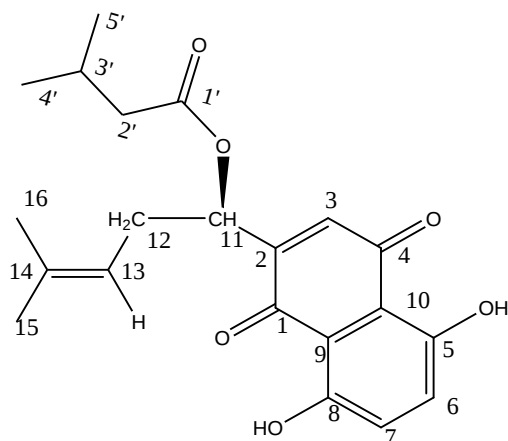
*: İTK solvan sistemi: CH₂Cl₂:MeOH:H₂O (70:30:3)

4.1.1. Köklerden İzole Edilen Bileşiklerin Yapı Tayini

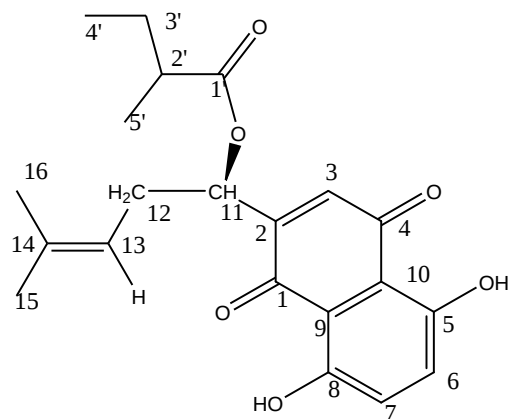
İzovalerilalkannin (APK-3)

α -Metil-*n*-butil-alkannin (APK-8)

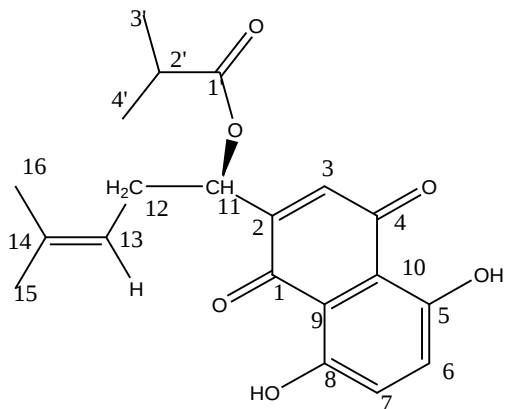
İzobutilalkannin (APK-9)



APK-3
İzovalerilalkannin



APK-8
 α -Metil-*n*-butil-alkannin



APK-9
İzobutilalkannin

$C_{21}H_{24}O_6$ (MA 372) **APK-3**

$C_{21}H_{24}O_6$ (MA 372) **APK-8**

$C_{20}H_{22}O_6$ (MA 358) **APK-9**

UV $\lambda_{\text{maks.}}$ (MeOH) nm	IR $\nu_{\text{maks.}}$ (% 1 KBr) cm^{-1}
224	3400 (OH)
273	2916 (CH)
513	1738 (C=O)
	1616 (C=C)

$[\alpha]_D^{20}$ (CHCl_3)	: -3,6
ESI-MS (m/z)	: 395 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ APK-3
	: 395 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ APK-8
	: 381 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ APK-9
^1H NMR Spektrumu (CDCl_3 , 400 MHz)	: Spektrum 1
	: Tablo 21-23
^{13}C NMR Spektrumları (CDCl_3 , 100 MHz)	: Spektrum 2
	: Tablo 21-23
2D $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -Homonükleer Korelasyonlu Spektrumları (COSY)	: Spektrum 3
2D $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -Heteronükleer Korelasyonlu (yakın mesafe) Spektrumu (HMQC)	: Spektrum 4
2D $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) Spektrumu (HMBC)	: Spektrum 5
	: Tablo 21-23

Kırmızı renkli, amorf bir toz görünümünde olan karışımın yapılan İTK analizinde, vanilin/H₂SO₄ reaktifi püskürtüldükten sonra 105 °C de ısıtılması sonucunda karışıma ait lekenin koyu kırmızı renkten grimsi-mavi renge dönmesi bileşiklerin naftokinon olabilecekleri hakkında bilgi vermiştir.

UV spektrumunda naftokinon yapısına işaret eden 224, 273, 513 nm de absorpsiyonlar görülmüştür. Bileşiğin IR spektrumunda 1616 ve 1738 cm⁻¹ deki kinonik karbonil ve ester karbonilini gösteren bantlar görülmüştür.

Bileşiklerin tüm proton ve karbon değerleri, 1D ve 2D NMR (COSY, HMQC ve HMBC) spektrumları birlikte yorumlanarak belirlenmiştir.

Karışımın ¹H ve ¹³C NMR (Spektrum 1-2, Tablo 21-23) spektrumlarına bakıldığında karışımda major olarak bulunan bir madde (**APK-3**) ve iki minör madde (**APK-8** ve **APK-9**) olduğu anlaşılmıştır.

APK-3 bileşiğinde aromatik halkaya ait 3, 6 ve 7'de bulunan proton sinyalleri sırasıyla δ_H 6,99 (s, H-3), δ_H 7,18 (s, H-6) ve δ_H 7,18 (s, H-7)'de gözlenmiştir. 11 ve 13'te bulunan bir proton değerindeki metin pikleri ise δ_H 6,02 (dd, J= 4,6/7 Hz, H-11), δ_H 5,12 (t, J= 7,2 Hz, H-13)'de, 12 numaralı konumda bulunan iki proton değerindeki metilen pikleri 2,46 ppm (m, H-12a) ve 2,62 ppm de (m, H-12b), metil gruplarına ait üç proton değerindeki pikler ise δ_H 1,58 (s, H-15) ve δ_H 1,68 (s, H-16)'de görülmüşlerdir.

¹³C NMR spektrumundaki aromatik halkayı gösteren piklerden δ_C 178,26 (C-1) ve δ_C 176,6 (C-4) bu halka üzerinde karbonil grubu varlığını; δ_C 166,93 (C-8) , δ_C 167,47 (C-5), üzerinde –OH bağlı bulunan C atomlarını ve δ_C 148,50 (C-2), δ_C 131,48 (C-3), δ_C 132,86 (C-6), δ_C 132,70 (C-7), δ_C 111,85 (C-9), δ_C 111,59 (C-10) sinyalleri de bu bileşiğin 5,8-dihidroksi-1,4-naftokinon iskeleti taşıdığını göstermiştir. C-2 den süstitüe olan kısımda δ_C 69,17 (C-11), δ_C 32,98 (C-12), bir alken grubunun varlığını gösteren δ_C 117,88 (C-13), δ_C 136,00 (C-14), ve metil gruplarına ait δ_C 25,77 (C-15), δ_C 17,94 (C-16) karbon piklerinin bulunması bu bileşiğin yapısının alkannine ait olabileceğine işaret etmiştir.

APK-3'in COSY (Spektrum 3) spektrumunda 2,46 ppm ve 2,62 ppm'de gözlenen H₂-12 protonları ile 5,12 ppm'de gözlenen H-13 protonu arasında yakın mesafe etkileşimi görülmüştür. Bileşiğin HMBC (Spektrum 5, Tablo 21-23) spektrumunda başlıca H-11, H-15 ve H-16 ile C-13; H-3 ile C-11; H-6 ve H-7 ile C-8 ve C-9; H-11 ile C-3; H-12 deki protonlar ile C-11 ve C-14 arasında etkileşimler gözlenmiştir.

APK-3 bileşiğinin ¹³C NMR spektrumunda alkannin halkasını oluşturan karbon pikleri dışında 2 adet metil piki δ_C 22,35 (C-4'), δ_C 22,38 (C-5'), 1 adet karbonil piki δ_C 171,86 (C-1'), 1 adet CH₂ piki δ_C 43,38 (C-2'); 1 adet CH piki δ_C 25,77 (C-3') görülmektedir. ¹H NMR spektrumunda ise alkannin halkasında gözlenen proton rezonansları dışında, iki proton değerinde δ_H 2,23 (d, H₂-2'a) ve δ_H 2,25 (d, H₂-2'b), bir proton değerinde δ_H 2,13 (m, H-3') ve üç proton değerinde δ_H 0,97 (d, H₃-4'), δ_H 0,98 (d, H₃-5') pikleri bulunmuştur. HMBC spektrumunda C-1' ve C-2'deki karbonlar ile H-11 protonu arasında uzak mesafe etkileşimi görülmüştür. Bu durum alkanninin 11. karbonu üzerinden sübstitüe olduğunu kanıtlamıştır. Yine HMBC spektrumunda görülen C-1' karbonunun H₂-2' protonları ve H-3' protonu ile uzak mesafe etkileşimi; C-2' karbonunun H₃-4' ve H₃-5' protonları ile etkileşmesi, COSY de H₂-2' ile H₃-4' ve H₃-5' protonlarının etkileşmesi alkannin üzerindeki bu 5 karbonlu yapının izovaleril olacağını kanıtlamıştır.

ESI kütle spektrumunda m/z 395 [M+Na]⁺ moleküler iyon piki ve NMR değerleri yardımıyla bileşiğin kapalı formülü C₂₁H₂₄O₆ olarak bulunmuştur. Sonuçlar literatür bilgileri ile karşılaştırıldığında karışımın major bileşiği olan **APK-3**'ün yapısı **izovaleril alkannin** olarak aydınlatılmıştır (5).

¹³C ve ¹H NMR spektrumunda, **APK-3**'ün C-11 sübstitüe alkannin yapısına ait piklerinin çok yakınında veya aynı ppm'de gözlenen diğer pikler karışımda bulunan **APK-8** ve **APK-9** bileşiklerinin de alkannin türevi olduğunu düşündürmüştür.

APK-8 bileşiğinin ¹³C NMR spektrumunda alkannin halkasına ek olarak 2 adet metil piki δ_C 11,61 (C-4'), δ_C 16,65 (C-5'), bir adet karbonil piki

175,4 (C-1'), bir adet metin grubuna ait pik δ_C 41,22 (C-2') ve bir adet metilen piki δ_C 26,63 (C-3')'de görülmüştür. 1H spektrumunda ise alkannin halkasında gözlenen proton rezonansları dışında bir proton değerinde δ_H 2,48 (m, H-2'), iki proton değerinde δ_H 1,60 (m, H₂-3') ve üç proton değerinde δ_H 1,20 (H₃-5') ve δ_H 0,91 (H₃-4') proton rezonansları görülmüştür. HMBC spektrumunda δ_C 175,4 (C-1')'deki karbonil grubunun karbonu ile δ_H 6,02 (H-11)'deki proton arasındaki uzak etkileşme bu alkannin türevinin de 11 üzerinden sübstitüe olduğunu kanıtlamıştır. HMBC spektrumundaki diğer önemli etkileşimler ise; δ_C 41,22 (C-2') ile δ_H 1,20 (H₃-5') ve δ_H 0,91 (H₃-4') arasında, δ_C 26,63 (C-3') ile δ_H 1,20 (H₃-5') arasında görülmüştür. Elde edilen bulgular literatür değerleri ile karşılaştırıldığında **APK-8** bileşiğinin yapısı **α -metil-*n*-butil-alkannin** olarak belirlenmiştir (5,101).

APK-9 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumunda alkannin halkasına C-11'den sübstitüe bir adet karbonil δ_C 175,4 (C-1'), bir adet metin δ_C 34 (C-2') ve 2 adet metil δ_C 18,85 (C-3'), δ_C 18,96 (C-4') taşıdığı; 1H spektrumuna bakıldığında ise alkannin halkasına ait olan protonlar dışında bir metin grubu δ_H 2,63 (m, H₃-2') ve 2 metil grubu δ_H 1,22 (H₃-3') ve δ_H 1,21 (d, J=, H₃-4') taşıdığı görülmüştür. Bileşiğin HMBC spektrumunda δ_C 175,4 (C-1') ile δ_H 6,02 (H-11), δ_H 1,22 (H-3') ve δ_C 34,0 (C-2') ile δ_H 1,21 (H₃-4') arasında uzak mesafe etkileşmeleri görülmüştür. Elde edilen bulgular literatür verileri ile karşılaştırıldığında **APK-9** bileşiğinin yapısı **izobutilalkannin** olarak saptanmıştır (5,41).

Karışımın optik çevirme ölçümü sonucunda polarize ışığı sola çevirdiği gözlenmiş ve bileşiklerin (S)-alkannin türevi oldukları kesinleştirilmiştir.

Tablo 21. İzovalerilalkannin (**APK-3**) bileşiğinin ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) ve ^1H (400 MHz, CDCl_3) NMR spektroskopik değerleri

C/H	DEPT	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), J (Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	C	178,26		
2	C	148,50		
3	CH	131,48	6,99 s	C-2, C-4, C-9, C-11
4	C	176,6		
5	C	167,47		
6	CH	132,86	7,18 s	C-8, C-9
7	CH	132,70	7,18 s	C-8, C-9
8	C	166,93		
9	C	111,85		
10	C	111,59		
11	CH	69,17	6.02 (dd, 4,6/7,0)	C-1', C-2', C-2, C-3, C-13
12	CH ₂	32,98	2,46 m, 2,62 m	C-11, C-13, C-14
13	CH	117,88	5,12 (t, 7,2)	C-15, C-16
14	C	136,00		
15	CH ₃	25,77	1,58 s	C-13, C-14
16	CH ₃	17,94	1,68 s	C-13, C-14
5,8-OH	-	-	12,42 s 12,58 s	
1'	C	171,86		
2'	CH ₂	43,38	2,23 d*, 2,25 d*	
3'	CH	25,77	2,13 m	C-1'
4'	CH ₃	22,35	0,97 d*	C-1', C-2'
5'	CH ₃	22,38	0,98 d*	C-2'

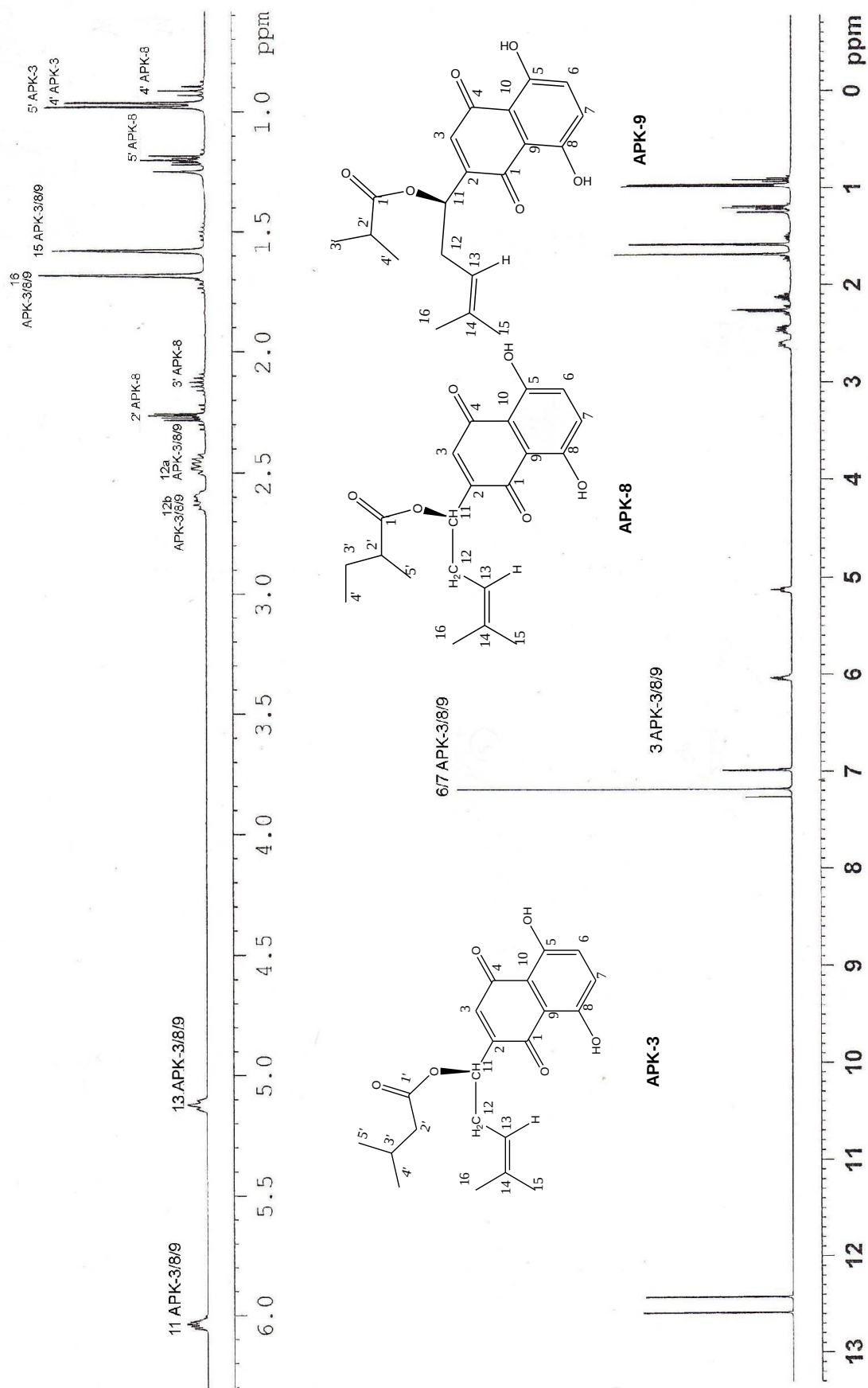
*: J değerleri hesaplanamamıştır.

Tablo 22. α -metil-n-butilalkannin (**APK-8**) bileşiğinin ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) ve ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spektroskopik değerleri

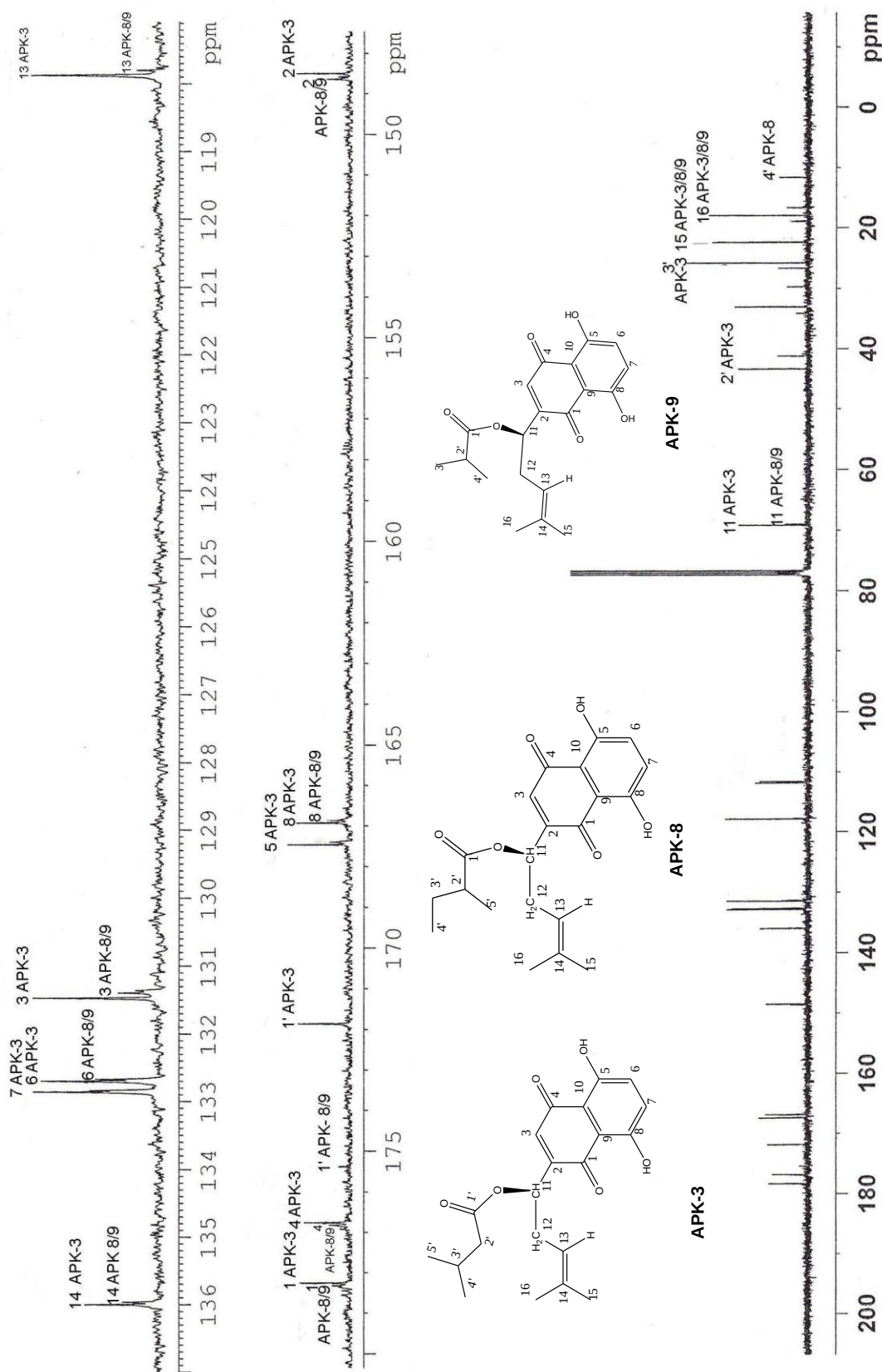
C/H	DEPT	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), J (Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	C	178,33		
2	C	148,64		
3	CH	131,40	6,99 s	C-2, C-4, C-9, C-11
4	C	176,82		
5	C	167,40		
6	CH	132,84	7,18 s	C-8, C-9
7	CH	132,67	7,18 s	C-8, C-9
8	C	166,86		
9	C	111,85		
10	C	111,59		
11	CH	69,04	6.02 (dd, 4,6/7,0)	C-1', C-2, C-3, C-13
12	CH ₂	33,03	2,46 m, 2,62 m	C-11, C-13, C-14
13	CH	117,80	5,12 (7,2)	C-15, C-16
14	C	135,97		
15	CH ₃	25,75	1,58 s	C-1', C-13, C-14
16	CH ₃	17,94	1,68 s	C-13, C-14
5,8-OH	-	-	12,42 s 12,58 s	
1'	C	175,4		
2'	CH	41,22	2,48 m	C-1'
3'	CH ₂	26,63	1,60 m	
4'	CH ₃	11,61	0,91 t	C-2', C-3'
5'	CH ₃	16,65	1,20 s	C-2', C-3'

Tablo 23. İzobutilalkannin (**APK-9**) bileşiğinin ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) ve ^1H (400 MHz, CDCl_3) NMR spektroskopik değerleri

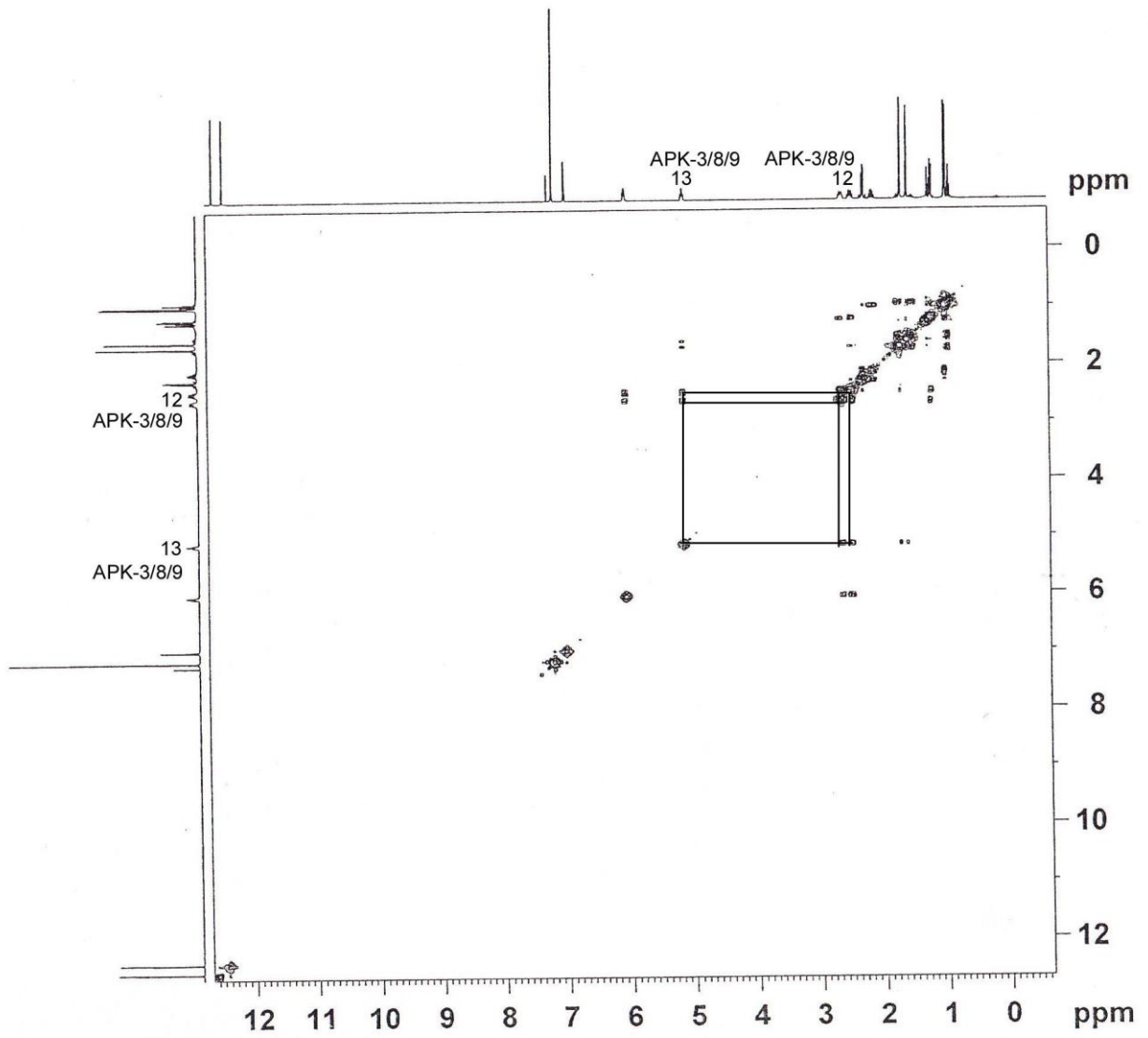
C/H	DEPT	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), J (Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	C	178,33		
2	C	148,64		
3	CH	131,40	6,99 s	C-2, C-4, C-9, C-11
4	C	176,82		
5	C	167,40		
6	CH	132,84	7,18 s	C-8, C-9
7	CH	132,67	7,18 s	C-8, C-9
8	C	166,86		
9	C	111,85		
10	C	111,59		
11	CH	69,04	6.02 (dd, 4,6/7,0)	C-1', C-2, C-3, C-13
12	CH ₂	33,03	2,46 m, 2,62 m	C-11, C-13, C-14
13	CH	117,80	5,12 (t, 7,2)	C-15, C-16
14	C	135,97		
15	CH ₃	25,75	1,58 s	C-1', C-13, C-14
16	CH ₃	17,94	1,68 s	C-13, C-14
5,8-OH	-	-	12,42 s 12,58 s	
1'	C	175,4		
2'	CH	34,0	2,63 m	
3'	CH ₃	18,85	1,22 s	C-1'
4'	CH ₃	18,96	1,21 s	C-2'



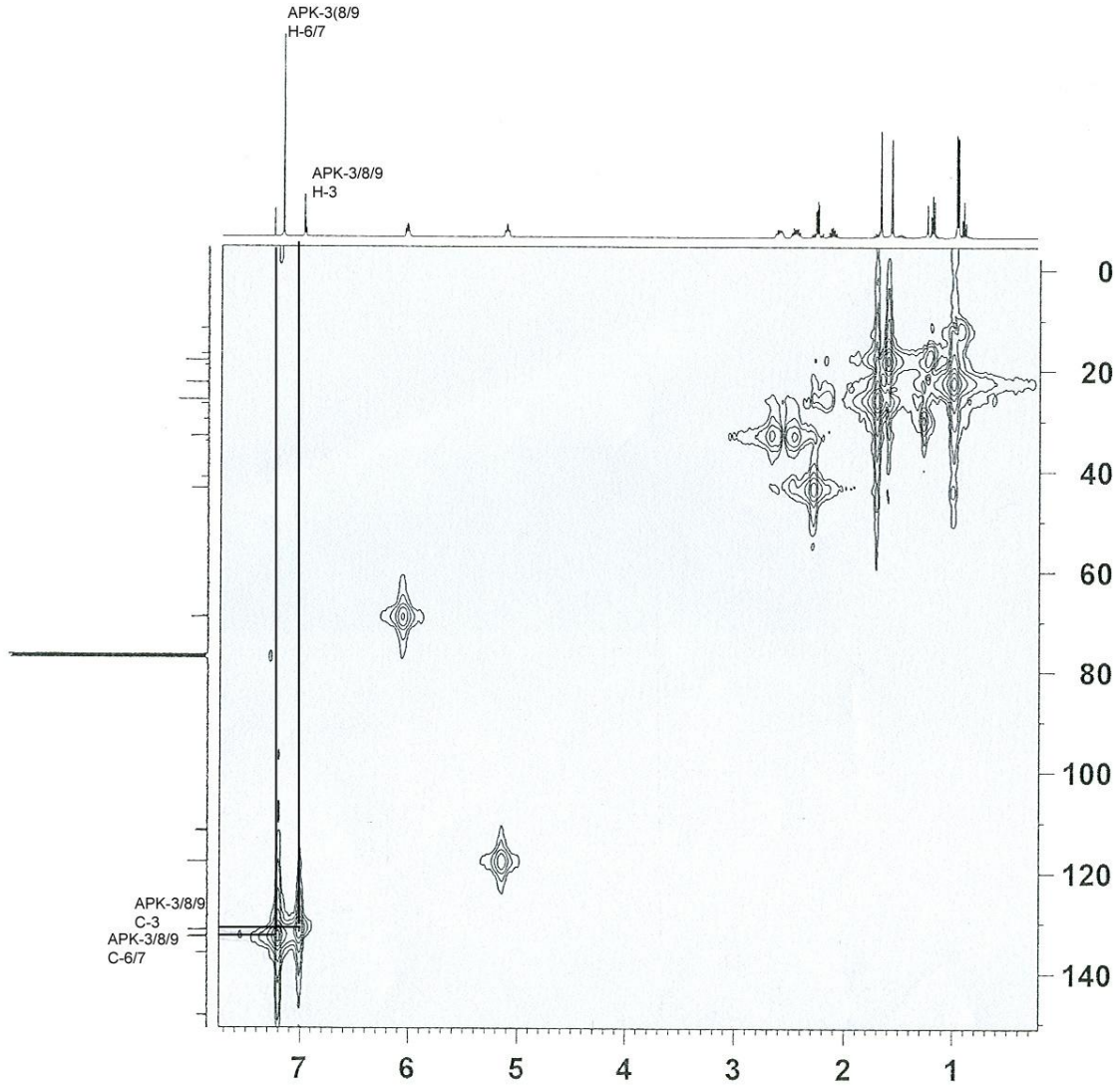
Spektrum 1. APK-3/8/9'un ¹H NMR Spektrumu (, CDCl₃, 400 MHz)



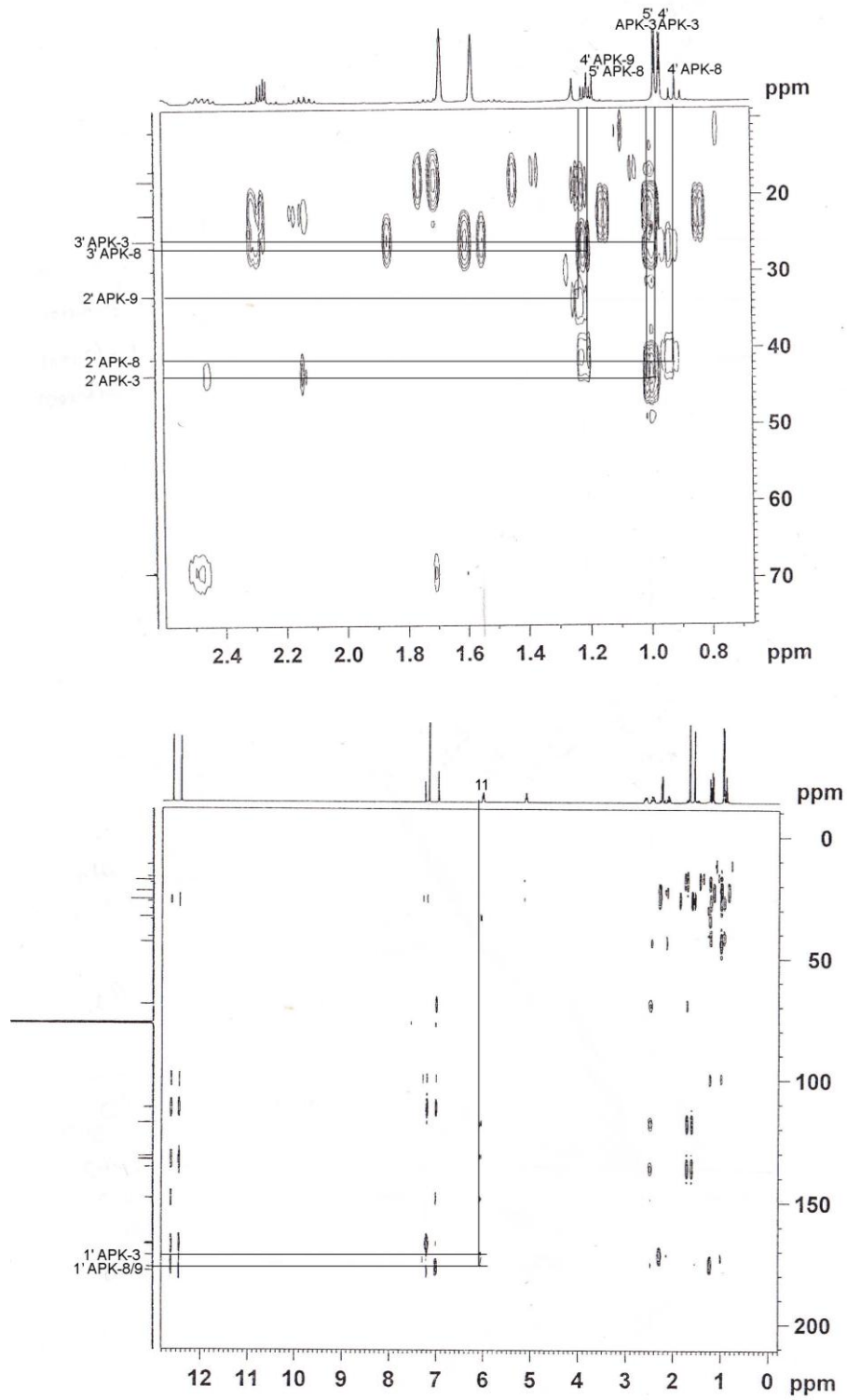
Spektrum 2 .APK-3/8/9'un ¹³C NMR Spektrumu (CDCl₃, 100 MHz)



Spektrum 3. APK-3/8/9 2D ^1H , ^1H -Homonükleer Korelasyonlu Spektrumu (COSY)

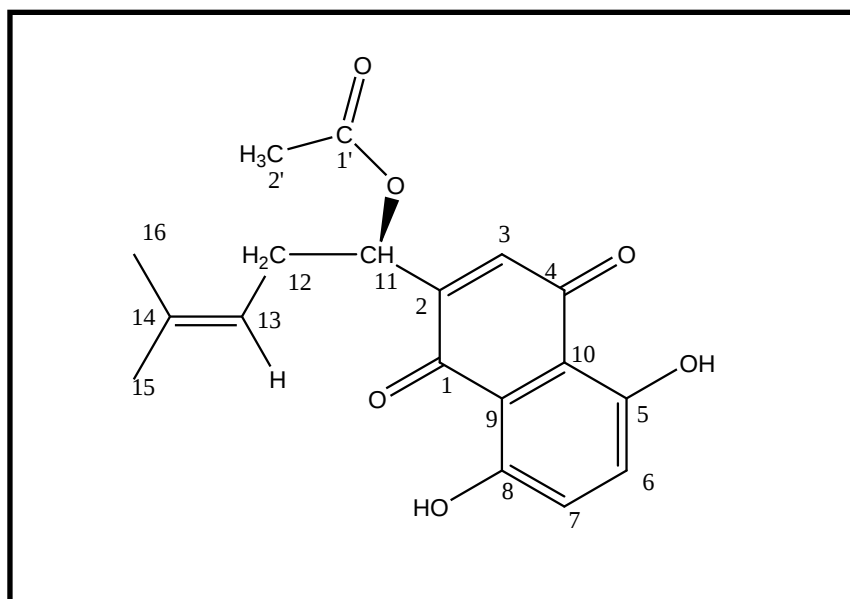


Spektrum 4. APK-3/8/9'un 2D ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (yakın mesafe) NMR Spektrumu (HMQC)



Spektrum 5. APK-3/8/9'un 2D ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) Spektrumları (HMBC)

Asetilalkannin (APK-4)



C₁₈H₁₈O₆ (MA 330)

UV $\lambda_{\text{maks.}}$ (CHCl ₃) nm	IR $\nu_{\text{maks.}}$ (% 1 KBr) cm ⁻¹
223	3400 (OH)
272	2920 (CH)
513	1730 (COO-)
	1620 (C=O)

$[\alpha]_D^{20}$ (CHCl₃)

: -3,6

ESI-MS (*m/z*)

: 353 [M+Na]⁺

¹H NMR Spektrumu (CDCl₃, 400 MHz)

: Spektrum 6

Tablo 24

DEPT-90 ve ¹³C NMR Spektrumları (CDCl₃, 100 MHz)

: Spektrum 7
Tablo 24

2D ¹H,¹H-Homonükleer Korelasyonlu Spektrumları (DQF-COSY)

: Spektrum 8

2D ¹H,¹³C-Heteronükleer Korelasyonlu (yakın mesafe) Spektrumu (HMQC)

: Spektrum 9

2D ¹H,¹³C-Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) Spektrumu (HMBC)

Tablo 24

Kırmızı renkli, amorf bir toz görünümünde olan **APK-4** bileşiğinin yapılan İTK analizinde görülen leke vanilin/H₂SO₄ reaktifi püskürtüldükten sonra 105 °C de ısıtılması sonucunda koyu kırmızı renkten grimsi-mavi renge dönmüştür.

UV spektrumunda naftokinon yapısına işaret eden 223, 272, 513 nm absorpsiyonları görülmüştür. Bileşiğin IR spektrumunda ise 1620 ve 1730 cm⁻¹ deki kinonik karbonil ve ester karbonilini gösteren bantlar görülmüştür.

ESI-MS ve NMR analizi sonucu **APK-4**'ün molekül formülü C₁₈H₁₈O₆ olarak bulunmuştur (psödomoleküler iyon m/z [M+Na]⁺=353). Bileşiğin tüm proton ve karbon değerleri, 1D ve 2D NMR (COSY, HMQC ve HMBC) spektrumları birlikte yorumlanarak belirlenmiştir.

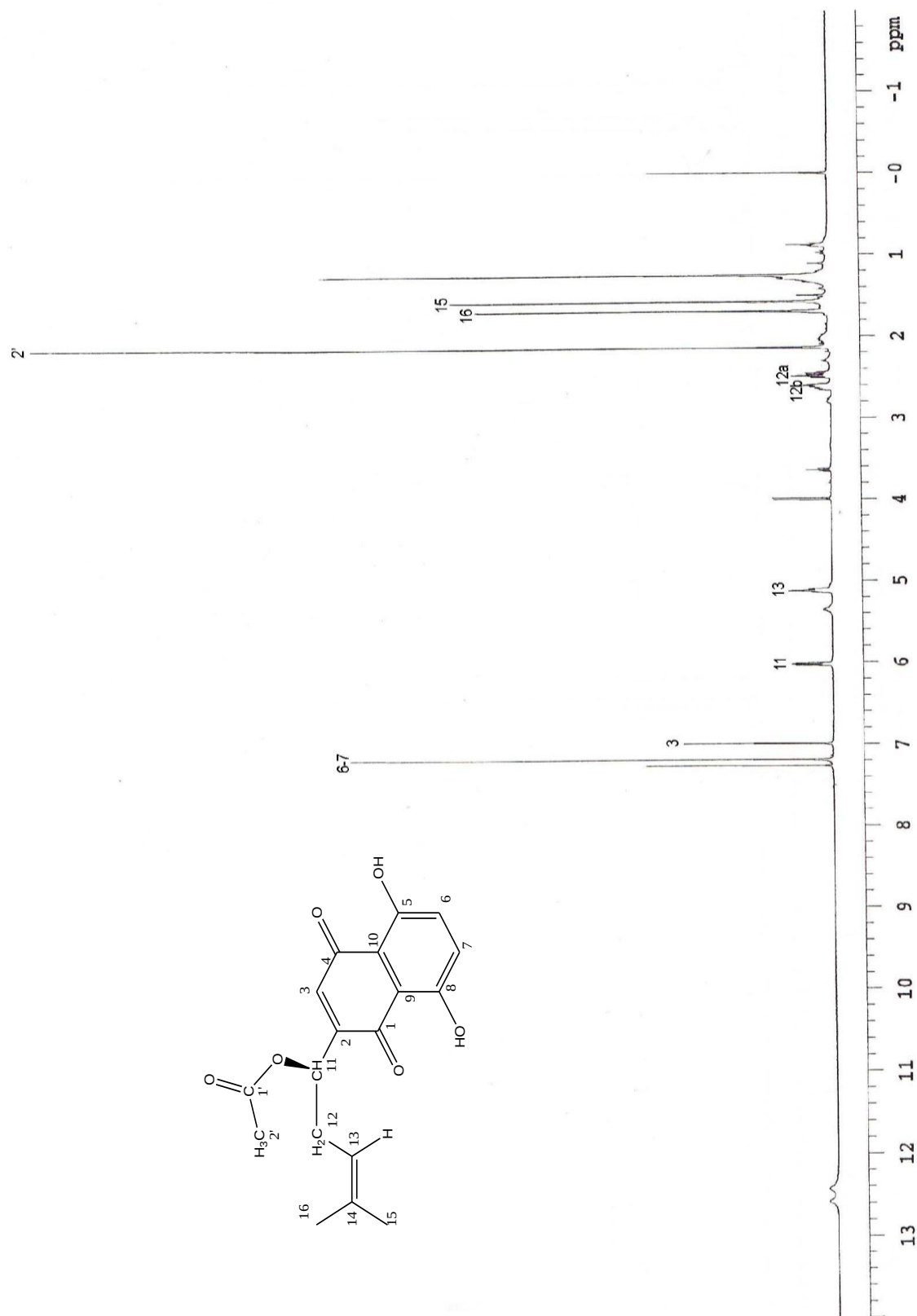
APK-4 bileşiğinin ¹H NMR ve ¹³C NMR (Spektrum 6, Spektrum 7, Tablo 24) spektrumuna bakıldığında 9 katerner karbon, 5 metin, 1 metilen, 3 metil olmak üzere toplam 18 adet karbon ve 16 adet proton taşıdığı görülmüştür. Bunlardan 16 adet karbona ait piklerin **APK-3**'te belirtilen C-11 süstitüe alkannin halkasına ait piklerle örtüştüğü görülmektedir. Diğer 2 adet karbon pikinden birinin asetil grubunun katerner karbonuna ait (δ_C 170,01), diğerinin ise asetil grubunun metiline ait olduğu (δ_C 21,22, δ_H 2,14) bulunmuştur. HMBC (Spektrum 10, Tablo 24) spektrumunda gözlenen δ_H 6,02 (dd, H-11) ile δ_C 170,01 (C-1') ile uzak mesafe etkileşimi asetil grubunun C-11'den bağlı olduğunu göstermiştir.

Polarimetrede yapılan optik çevirme ölçümü sonucunda bileşiğin polarize ışığı sola çevirdiği ($[\alpha]_D^{20}$ =-3,6) ve (S)-asetilalkannin olduğu tespit edilmiştir.

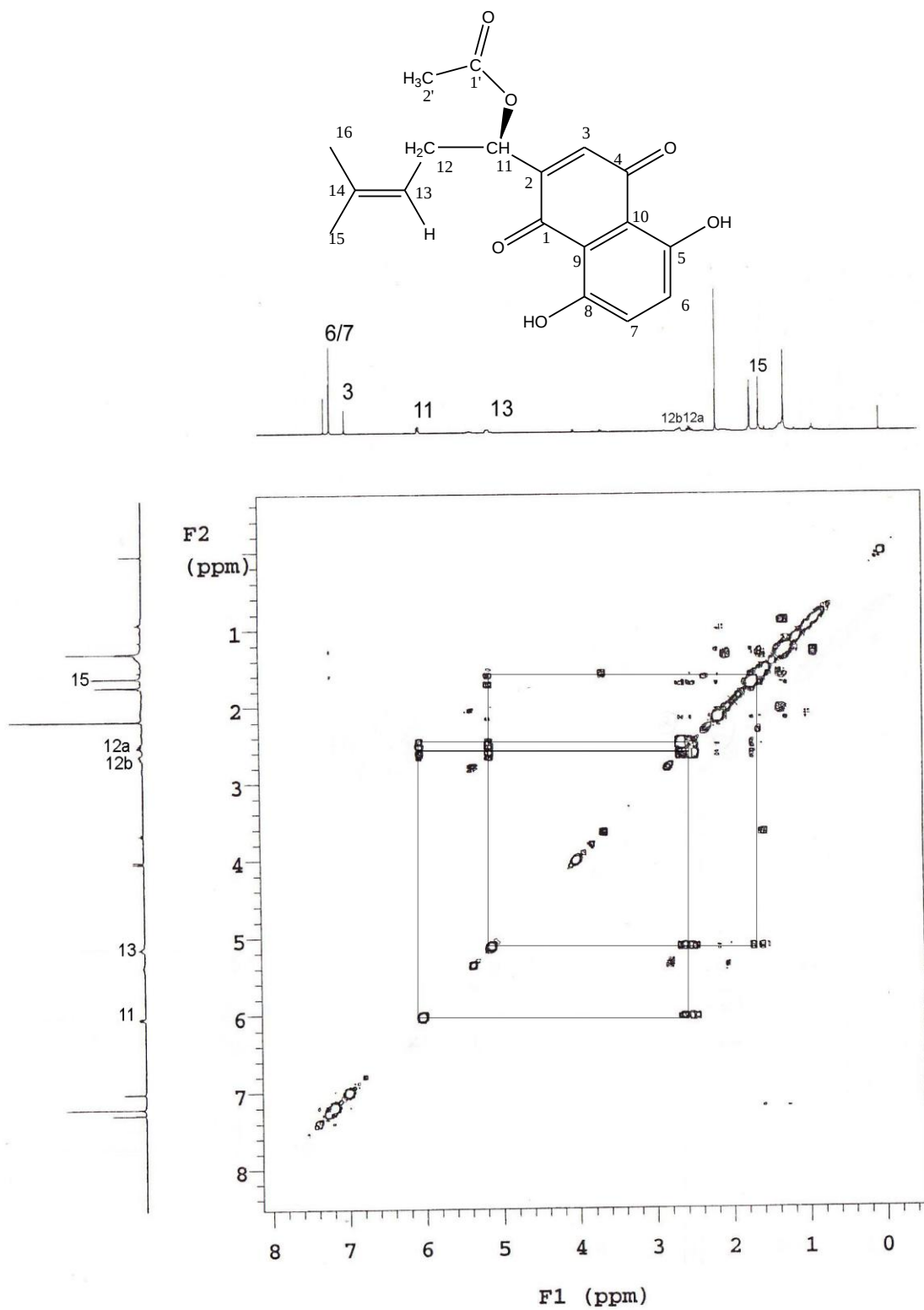
Elde edilen tüm bu bulgular ve literatürde kayıtlı değerler **APK-4** bileşiğinin **asetilalkannin** olduğunu kanıtlamıştır (5).

Tablo 24. Asetilalkannin (**APK-4**) bileşiğinin ^{13}C ve ^1H NMR spektroskopik değerleri

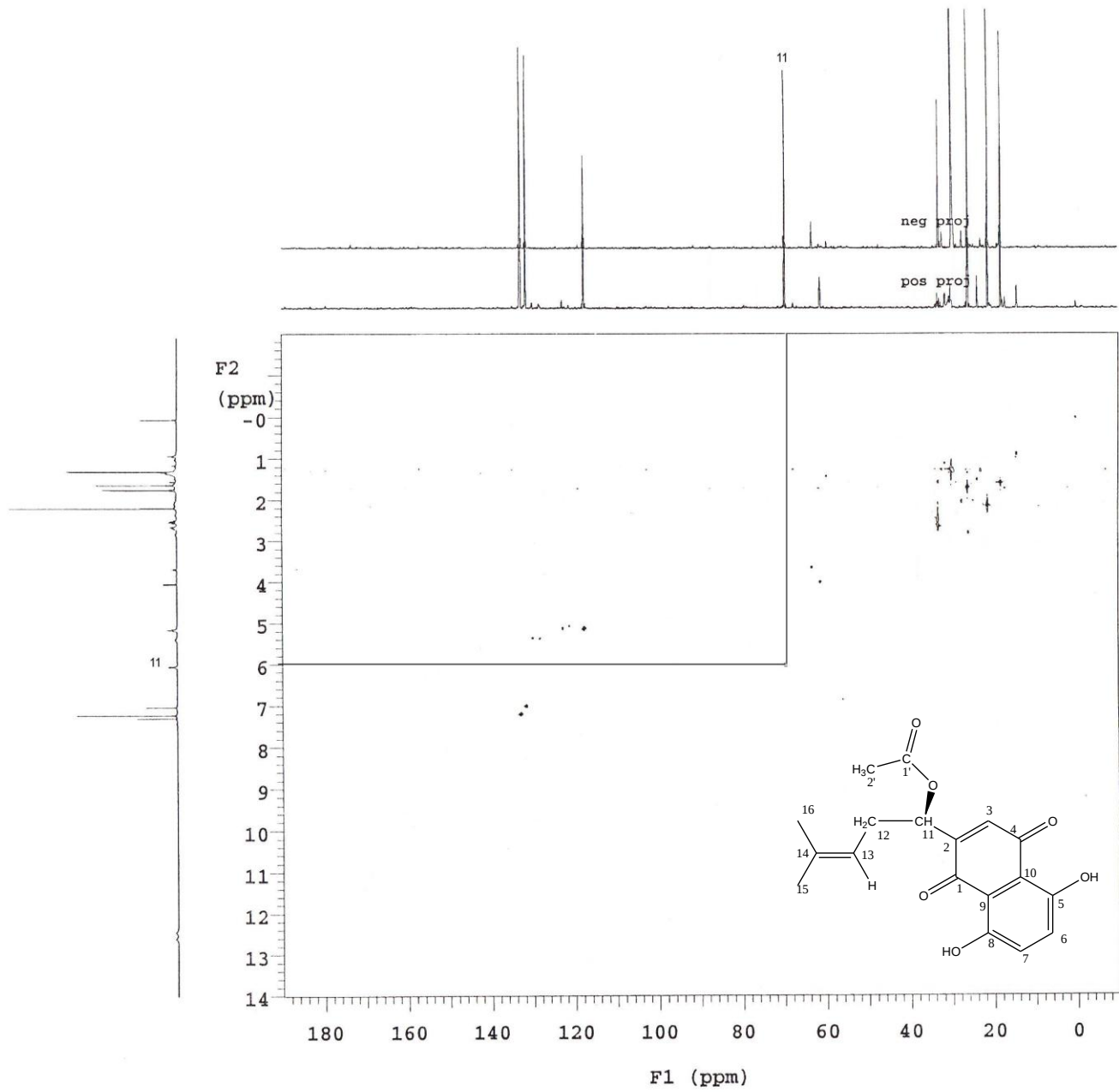
C/H	DEPT	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), J (Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	C	178,45		
2	C	148,45		
3	CH	131,70	6,99 s	C-3, C-4, C-9, C-11
4	C	176,93		
5	C	167,73		
6	CH	133,13	7,19 s	C-5
7	CH	132,97	7,19 s	C-8
8	C	167,20		
9	C	112,06		
10	C	111,81		
11	CH	69,76	6.02 (dd, 4,6/7,0)	C-2, C-3, C-12, C-13, C-1'
12	CH ₂	33,06	2,47m, 2,62 m	C-11, C-13, C-2 (sadece H-12a ile)
13	CH	117,90	5,12 (t, 7,2)	C-12, C-15, C-16
14	C	136,37		
15	CH ₃	26,01	1,57 s	C-13, C-14, C-16,
16	CH ₃	18,18	1,69 s	C-13, C-14, C-15
1'	C	170,01		
2'	CH ₃	21,22	2,14 s	C-1'



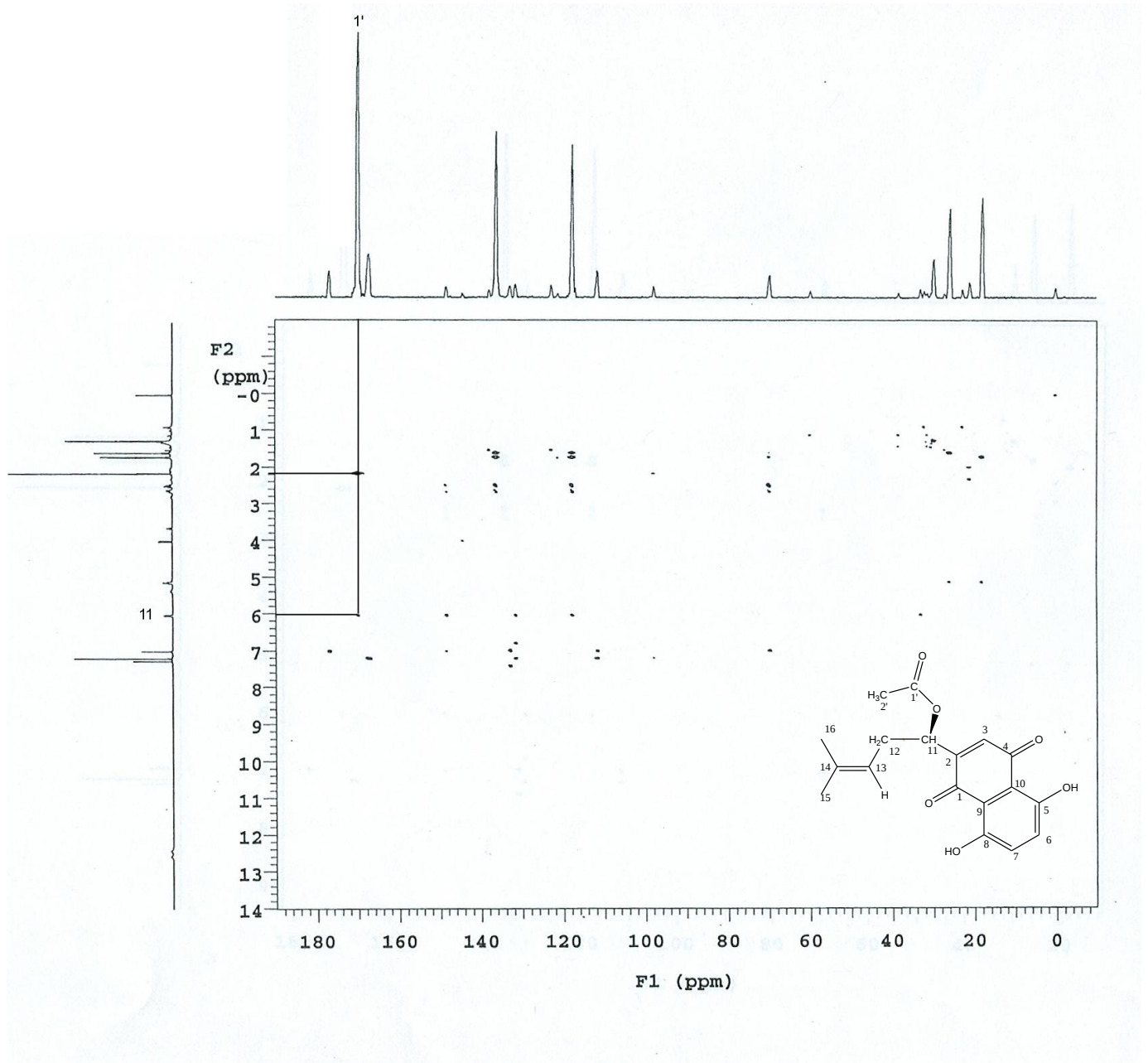
Spektrum 6. APK-4'ün ¹H NMR Spektrumu (CDCl₃, 400 MHz)



Spektrum 8. APK-4'ün 2D ^1H , ^1H -Homonükleer Korelasyonlu Spektrumu (COSY)

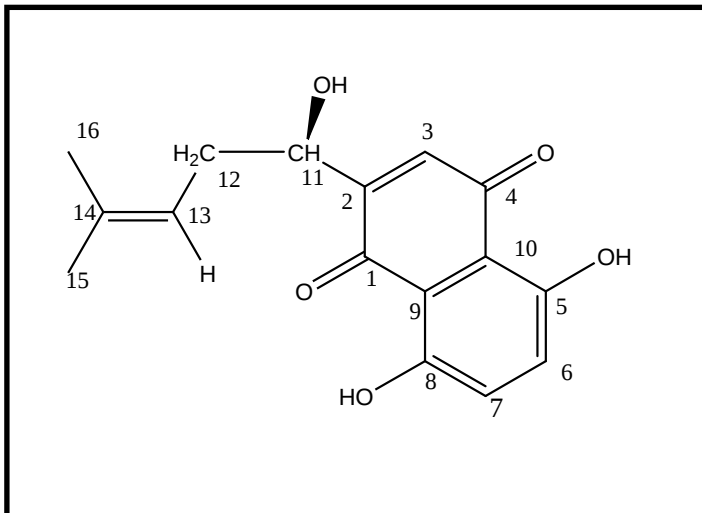


Spektrum 9. APK-4'ün 2D ¹H, ¹³C-Heteronükleer Korelasyonlu (yakın mesafe) NMR Spektrumu (HSQC)



Spektrum 10. APK-4'ün 2D ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) Spektrumu (HMBC)

Alkannin (APK-5)



C₁₆H₁₆O₅ (MA 288)

UV $\lambda_{\text{maks.}}$ (MeOH) nm	IR $\nu_{\text{maks.}}$ (% 1 KBr) cm ⁻¹
227	3400 (OH)
273	1680 (<u>C</u> OOH)
484	1620 (C=O)

$[\alpha]_D^{20}$ (CHCl ₃)	: -20
ESI-MS (<i>m/z</i>)	: 311 [M+Na] ⁺
¹ H NMR Spektrumu (CDCl ₃ , 500 MHz)	: Spektrum 11 Tablo 25
DEPT ve ¹³ C NMR Spektrumları (CDCl ₃ , 125 MHz)	: Spektrum 12 Tablo 25
2D ¹ H, ¹ H-Homonükleer Korelasyonlu Spektrumları (COSY)	: Spektrum 13
2D ¹ H, ¹³ C-Heteronükleer Korelasyonlu (yakın mesafe) Spektrumu (HMQC)	: Spektrum 14
2D ¹ H, ¹³ C-Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) Spektrumu (HMBC)	: Spektrum 15 Tablo 25
2D nOe Korelasyonlu Spektrumu (NOESY)	: Spektrum 16

Kırmızı renkli, amorf bir toz görünümünde olan **APK-5** bileşiği yapılan İTK analizinde, vanilin/H₂SO₄ reaktifi püskürtüldükten sonra 105 °C de ısıtılması sonucunda koyu kırmızı renkten grimsi-mavi renge dönmüştür.

UV spektrumunda naftokinon yapısına işaret eden 227, 273, 484 nm absorpsiyonları görülmüştür. Bileşiğin IR spektrumunda ise 1620 ve 1680 cm⁻¹ deki kinonik karbonil ve ester karbonilini gösteren bantlar görülmüştür.

Bileşiğin tüm proton ve karbon değerleri, 1D ve 2D NMR (NOESY, COSY, HMQC ve HMBC) spektrumları birlikte yorumlandığında yapının naftokinon türevi olduğu bulunmuştur.

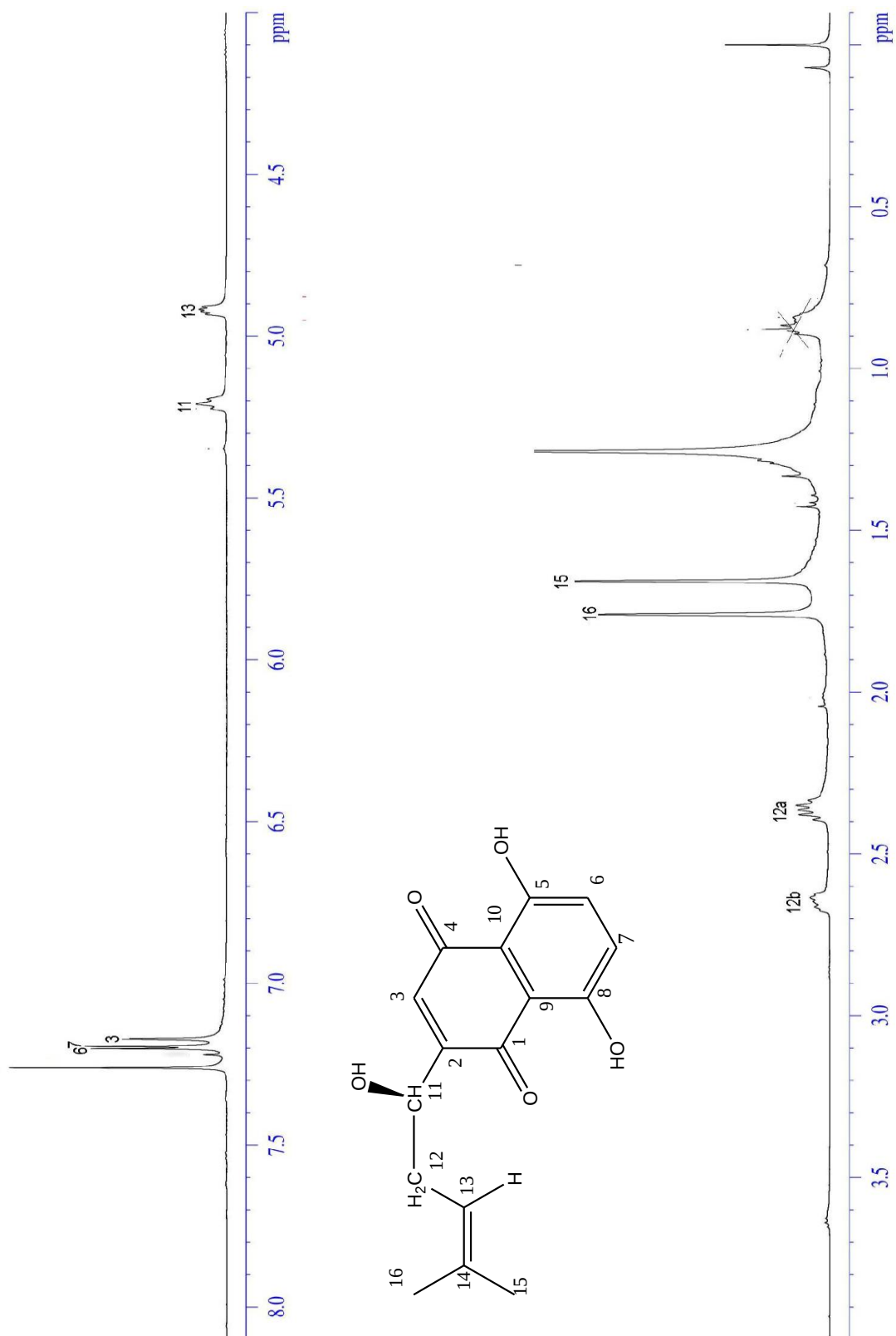
Aromatik halkaya ait 3, 6 ve 7. konumda bulunan protonlara ait sinyaller sırasıyla δ_H 7,17 (d, $J = 0,9$ Hz, H-3), δ_H 7,21 (s, H-6) ve δ_H 7,19 (s, H-7)'da gözlenmiştir. H-11 piki δ_H 4,92'de (dd, $J = 7,8/4,3$ Hz), H-13 piki δ_H 5,21'de (ddt, $J = 8/6,9/1,4$ Hz, H-13), 12 numaralı konumda bulunan iki protona ait pikler 2,36 ppm (dt, $J = 14,5/7,9$ Hz, H-12a) ve 2,65 ppm de (dt, $J = 14,5/4,6$ Hz, H-12b), metil gruplarına ait üç proton değerindeki pikler ise δ_H 1,76 (s, H-15) ve δ_H 1,66 (s, H-16)'da görülmüşlerdir. ¹³C NMR spektrumundaki (Spektrum 12, Tablo 25) aromatik halkayı gösteren piklerden δ_C 179,84 (C-1) ve δ_C 180,62 (C-4) bu halka üzerinde karbonil grubu varlığını; δ_C 165,54 (C-8), δ_C 164,92 (C-5), üzerinde –OH bağlı bulunan C atomlarını ve δ_C 151,43 (C-2), δ_C 132,41 (C-3), δ_C 132,30 (C-6), 131,87 (C-7), δ_C 112,05 (C-9), δ_C 111,57 (C-10) da bu bileşiğin ikinci konumdan sübstitüe olmuş 5,8 dihidroksi-1,4 naftokinon yapısını doğrulamıştır. C-2 den sübstitüe olan kısımda δ_C 68,39 (C-11), δ_C 35,69 (C-12), bir alken grubunun varlığını gösteren δ_C 118,45 (C-13), δ_C 137,40 (C-14), ve metil gruplarına ait δ_C 25,93 (C-15), δ_C 18,1 (C-16) karbon piklerinin bulunması bu bileşiğin yapısının alkannine ait olabileceğine işaret etmiştir.

APK-5'in COSY spektrumunda (Spektrum 13) 2,36 ppm ve 2,65 ppm'de gözlenen H₂-12 protonları ile 5,21 ppm'de gözlenen H-13 protonu arasında ve δ_H 5,21 (H-13) ile δ_H 4,92 (H-11) arasında yakın mesafe etkileşimleri görülmüştür. NOESY spektrumunda (Spektrum 16) aynı düzlemde bulunan protonlar saptanmıştır. Bu etkileşimlerden bir tanesi olan 1,76'daki H₃-15 protonları ile 5,21'deki H-13 protonları arasında etkileşim C-15'in yerini kanıtlamıştır. Bileşiğin HMBC spektrumunda (Spektrum 25, Tablo 25) H-11, H-15 ve H-16 ile C-13; H-3 ile C-11; H-6 ile C-5; H-7 ile C-8; H-11 ile C-3; H-12 deki protonlar ile C-11 ve C-14 arasında etkileşimler gözlenmiştir.

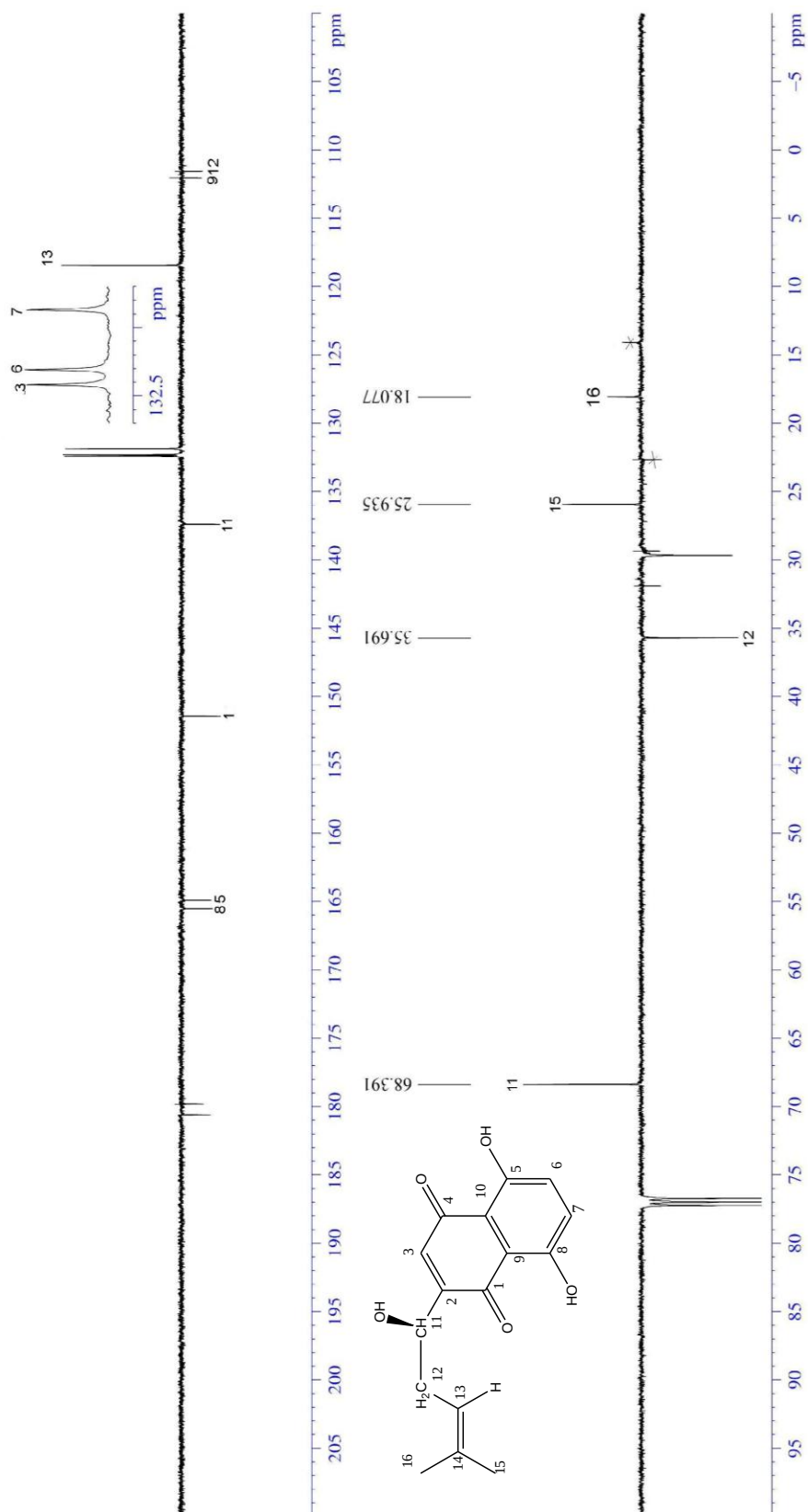
Polarimetrede yapılan optik çevirme ölçümü sonucunda bileşiğin polarize ışığı sola çevirdiği ($[\alpha]_D^{20} = -20$) görülmüş ve elde edilen tüm bulgular ve literatürde kayıtlı veriler **APK-5** bileşiğinin (S)-alkannin olduğunu ispatlamıştır (133).

Tablo 25. Alkannin (**APK-5**) bileşiminin ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) ve ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) spektroskopik değerleri

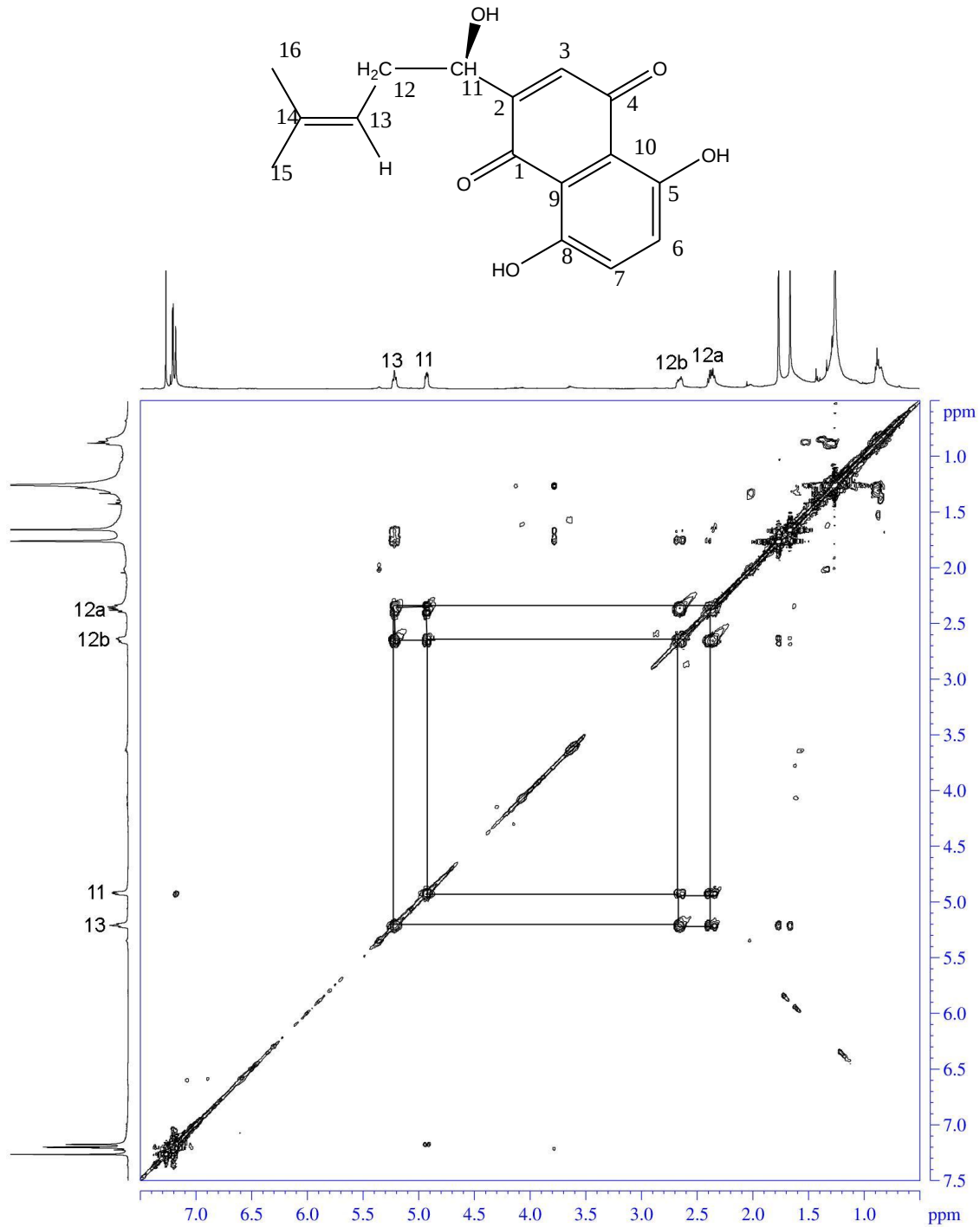
C/H	DEPT	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), J (Hz)	HMBC (H→C)
1	C	179,84		
2	C	151,43		
3	CH	132,41	7,17 d (0,9)	C-3, C-4, C-9, C-11
4	C	180,62		
5	C	164,92		
6	CH	132,30	7,21 s	C-5
7	CH	131,87	7,19 s	C-8
8	C	165,54		
9	C	112,05		
10	C	111,57		
11	CH	68,39	4,92 dd (7,8/4,3 Hz)	C-2, C-3, C-12, C-13
12	CH ₂	35,69	2,36 dt (14,5/7,9), 2,65 dt (14,5/4,6)	C-11, C-14, C-2 (sadece H-12a ile)
13	CH	118,45	5,21 ddt (8/6,9/1,4Hz)	C-12, C-15, C-16
14	C	137,40		
15	CH ₃	25,93	1,76 s	C-13, C-14, C-16,
16	CH ₃	18,01	1,66 s	C-13, C-14, C-15



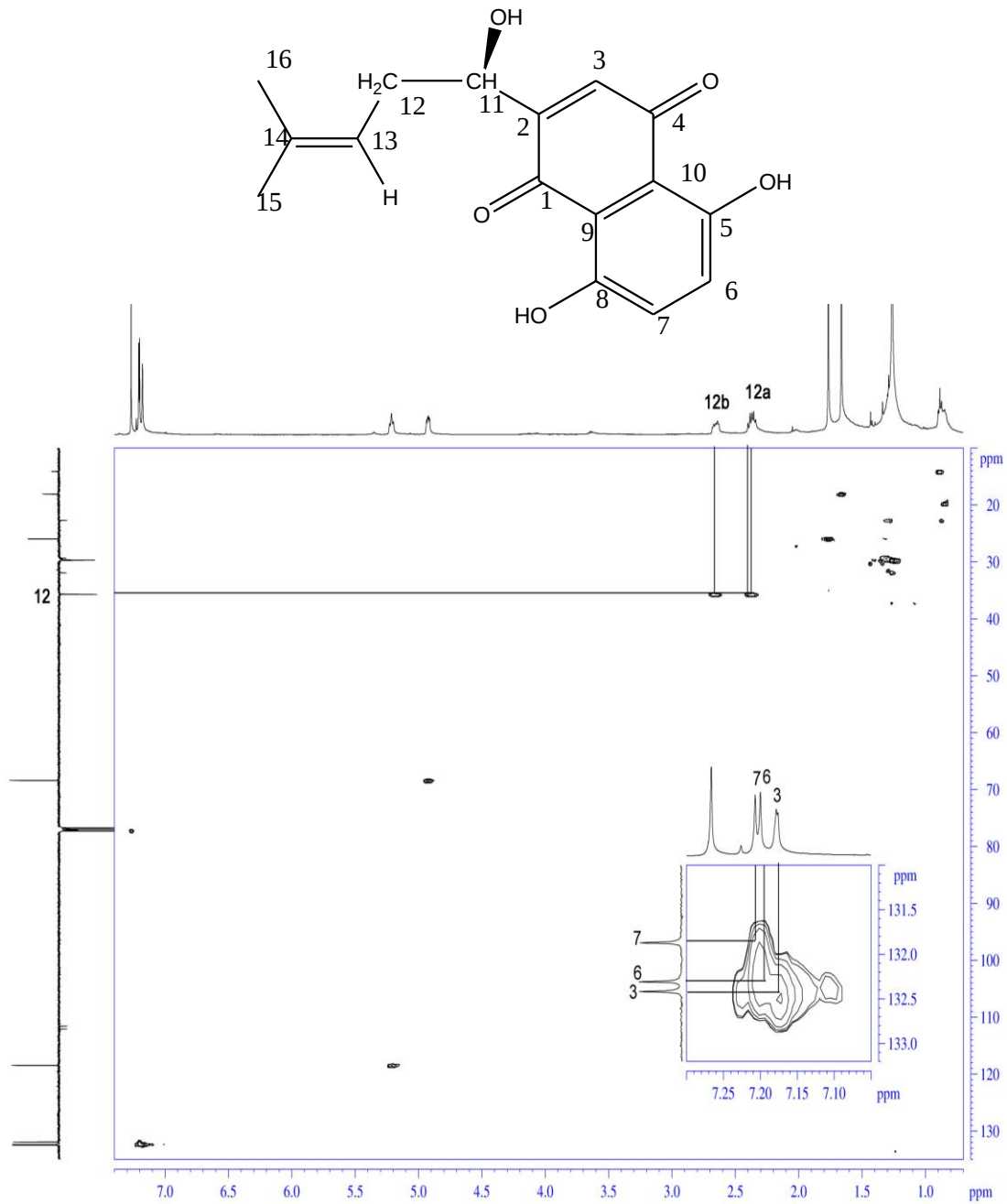
Spektrum 11. APK-5 in ^1H NMR Spektrum (CDCl_3 , 500 MHz)



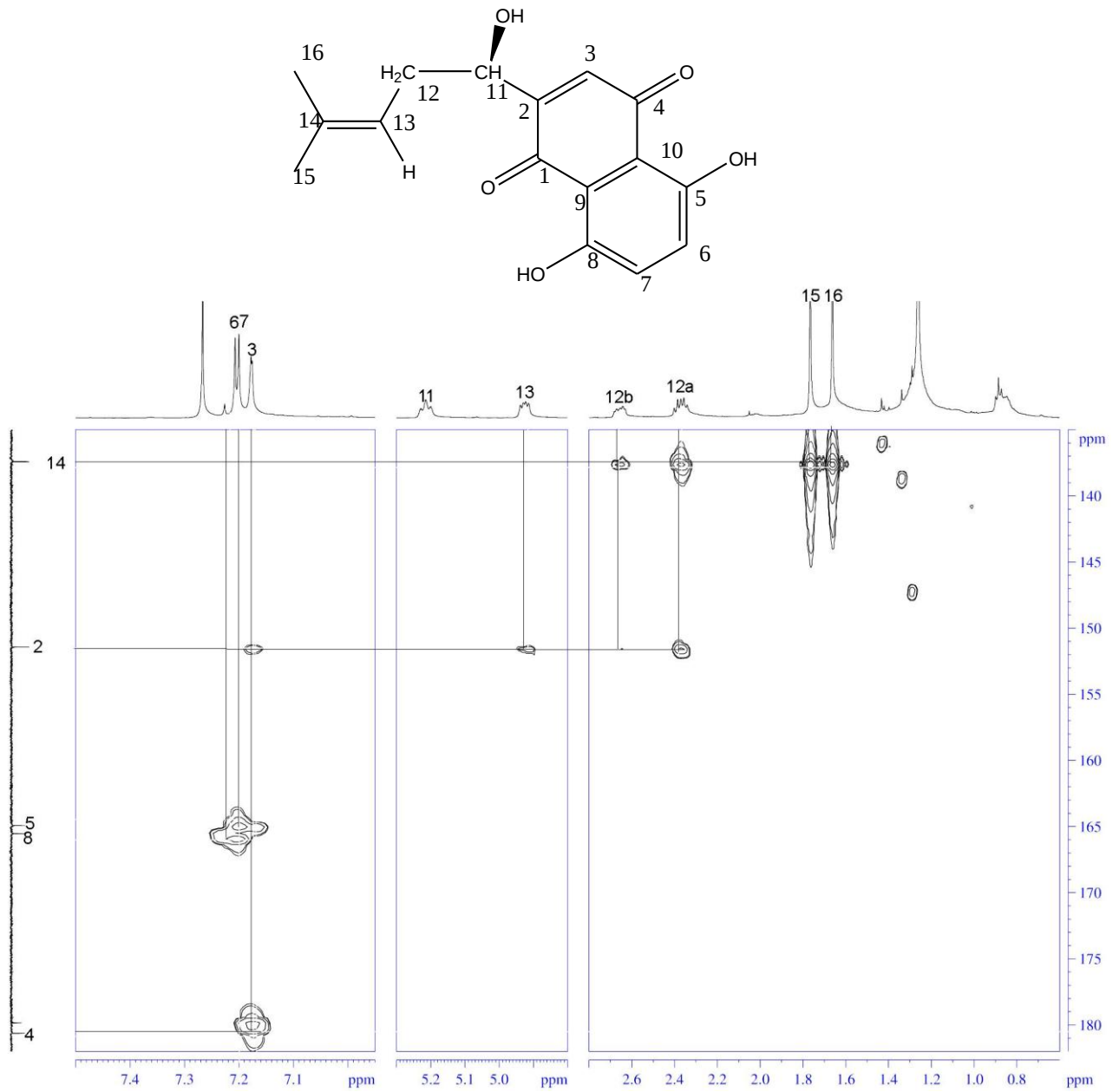
Spektrum 12. APK-5'in ^{13}C NMR ve DEPT Spektrumu (CDCl_3 , 125 MHz)



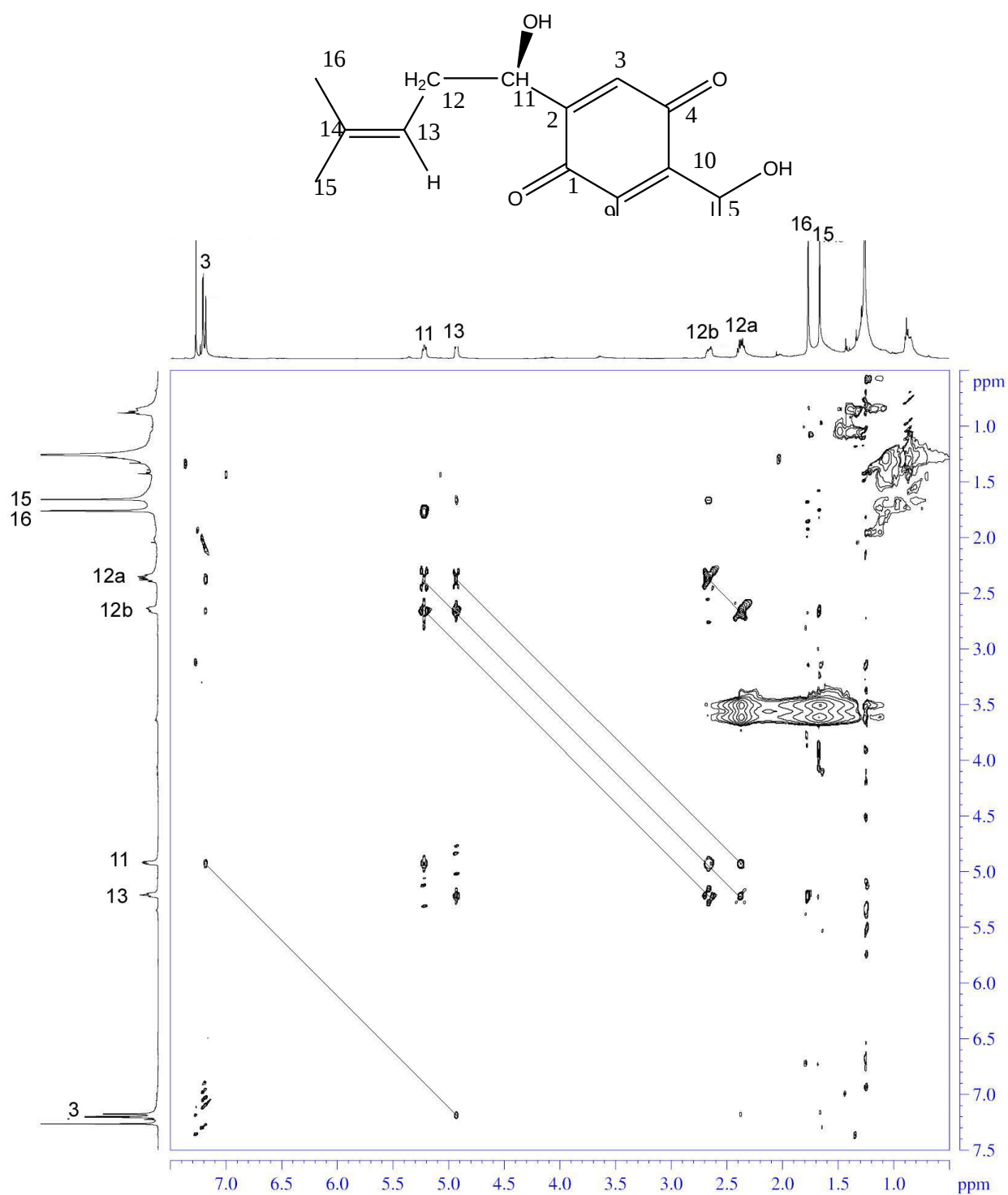
Spektrum 13. APK-5'in 2D ^1H , ^1H -Homonükleer Korelasyonlu Spektrumu (COSY)



Spektrum 14. APK-5'in 2D ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (yakın mesafe) NMR Spektrumu (HMQC)

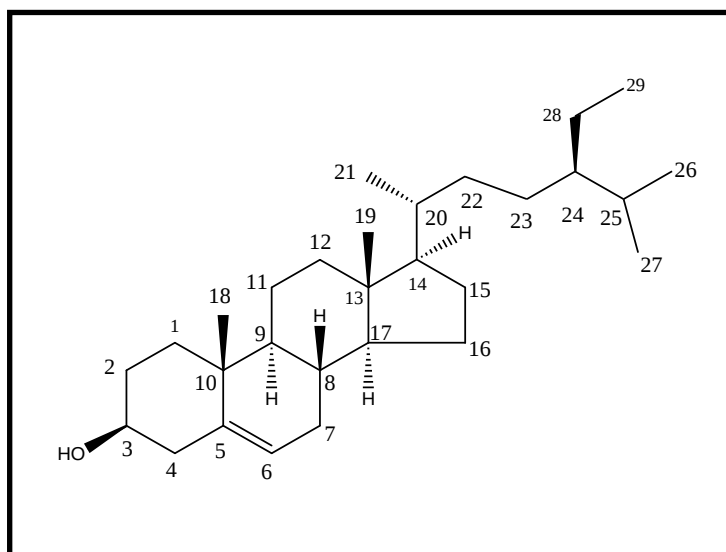


Spektrum 15. APK-5'in 2D ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) Spektrumu (HMBC)



Spektrum 16. APK-5'in 2D nOe spektrumu (NOESY)

β -SİTOSTEROL (Stigmast-5-en-3 β -ol) (APK-6)



C₂₉H₅₀O (MA 413)

UV $\lambda_{\text{maks.}}$ (MeOH) nm **IR** $\nu_{\text{maks.}}$ (% 1 KBr) cm⁻¹

213	3415 (OH)
225	2960(C-H)
321	

¹H NMR Spektrumu (CDCl₃, 500 MHz) : Spektrum 17
Tablo 26

¹³C NMR Spektrumu (CDCl₃, 125 MHz) : Spektrum 18
Tablo 26

2D ¹H,¹H-Homonükleer Korelasyonlu Spektrumları : Spektrum 19
(COSY)

2D ¹H,¹³C-Heteronükleer Korelasyonlu (yakın : Spektrum 20
mesafe) Spektrumu (HMQC)

2D ¹H,¹³C-Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) : Spektrum 21
Spektrumu (HMBC) Tablo 26

Beyaz renkli kristalize toz görünümünde olan **APK-6** bileşiği yapılan İTK analizinde vanilin/H₂SO₄ reaktifi püskürtüldükten sonra 105 °C de ısıtılması sonucunda mor renge dönmüştür.

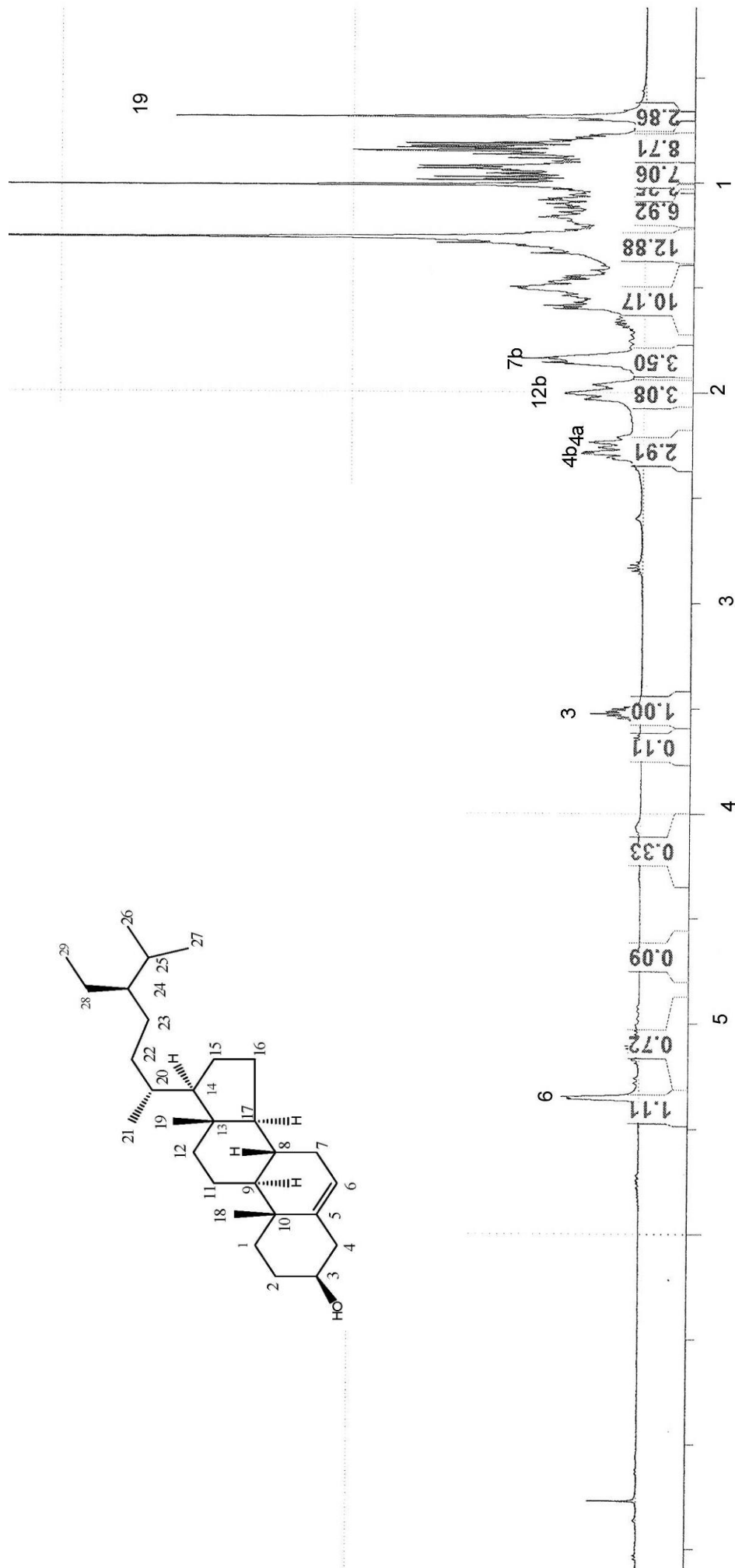
UV spektrumunda 213, 225 ve 321 nm de absorpsiyonlar ve IR spektrumunda 3415 (OH) ve 2960 (CH) absorpsiyon bantları görülmüştür.

Bileşiğin ¹³C NMR spektrumunda (Spektrum 18, Tablo 26) 29 karbon taşıdığı görülmüştür, 1D ve 2D NMR (COSY, HMQC ve HMBC) spektrumları birlikte yorumlandığında **APK-6**'nın steroidal bir çekirdek taşıdığı sonucuna varılmıştır. ¹³C NMR spektrumunda gözlenen δ_C 121,67 (C-6) ve δ_C 140,76 (C-5) ve ¹H NMR spektrumunda (Spektrum 17, Tablo 26) 5,35 ppm (dt, J= 5,4/1,9, H-6) de gözlenen olefinik rezonanslar molekül üzerinde bir çiftte bağ varlığını göstermiştir. ¹H NMR spektrumunda δ_H 0,69 (s, H₃-19), δ_H 1,01 (s, H₃-18), δ_H 0,95 (s, H₃-21a), δ_H 0,97 (s, H₃-21b), δ_H 0,87 (s, H₃-26), δ_H 0,85 (s, H₃-27), δ_H 0,89 (s, H₃-29) gözlenen metil protonlarına ait 6 karbon HSQC spektrumu (Spektrum 20) kullanılarak sırasıyla δ_C 11,84 (C-19), δ_C 19,37 (C-18), δ_C 18,77 (C-21), δ_C 20,98 (C-26), δ_C 19,03 (C-27), δ_C 11,96 (C-29) olarak tespit edilmiştir. COSY spektrumunda (Spektrum 19) H-3 protonu H-4b ve H₂-2 protonları arasında yakın mesafe etkileşimleri görülmüştür. NOESY spektrumunda H-18 ile H-8 ve H-19 arasında korelasyon görülmüştür. HMBC spektrumunda (Spektrum 21) başlıca H-1 ile C-3, H-4 ile C-3, C-5 ve C-6, H-2 ile C-10, H-7 ile C-9 ve C-10, H-18 ile C-9 ve C-10, H-21 ile C-14 protonları arasında uzak mesafe etkileşimleri görülmüştür.

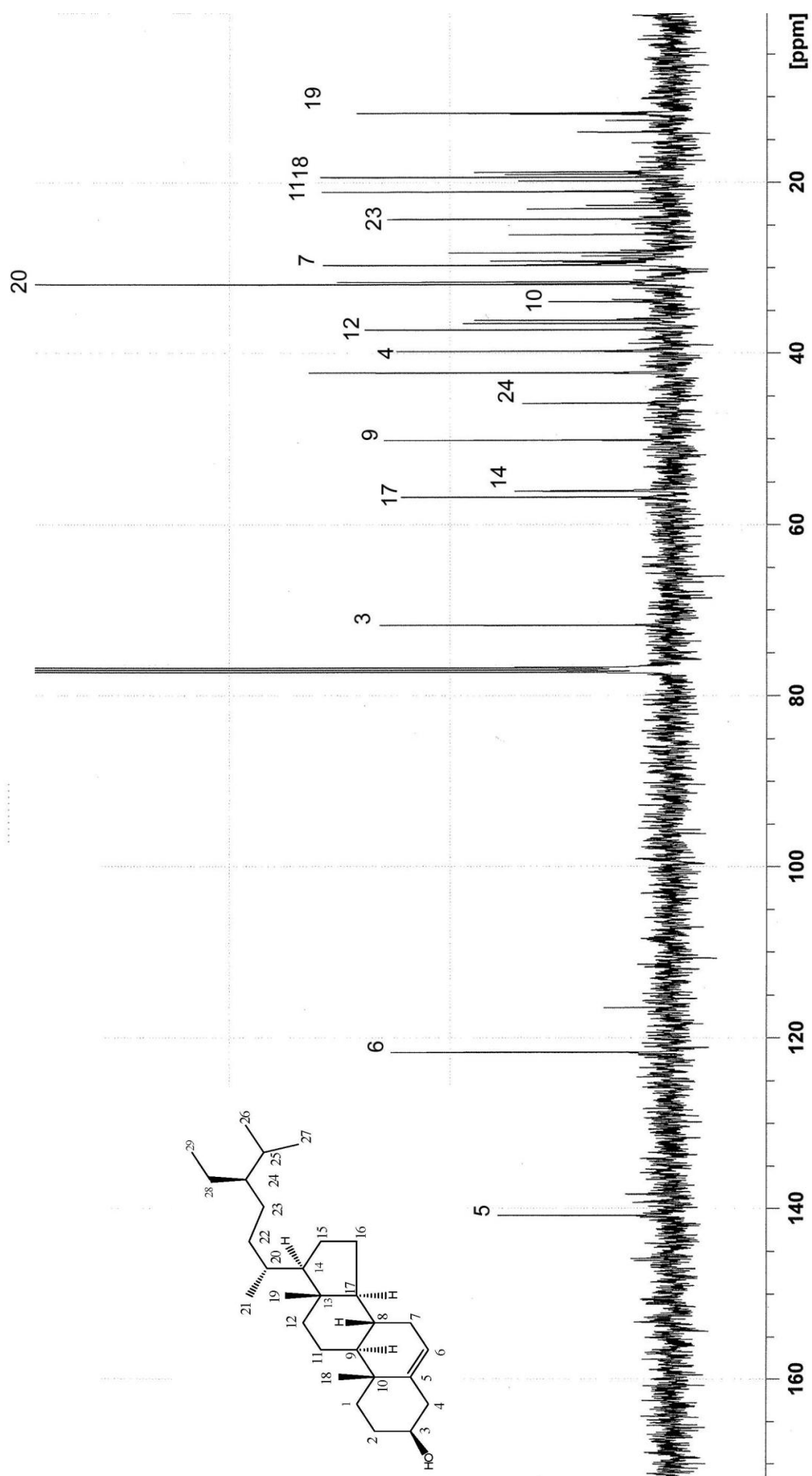
Elde edilen tüm bu sonuçlar literatürdeki veriler ile karşılaştırıldığında **APK-6** bileşiğinin yapısı β -sitosterol olarak saptanmıştır (41).

Tablo 26. β -sitosterol (**APK-6**) bileşiminin ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) ve ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) NMR spektroskopik değerleri

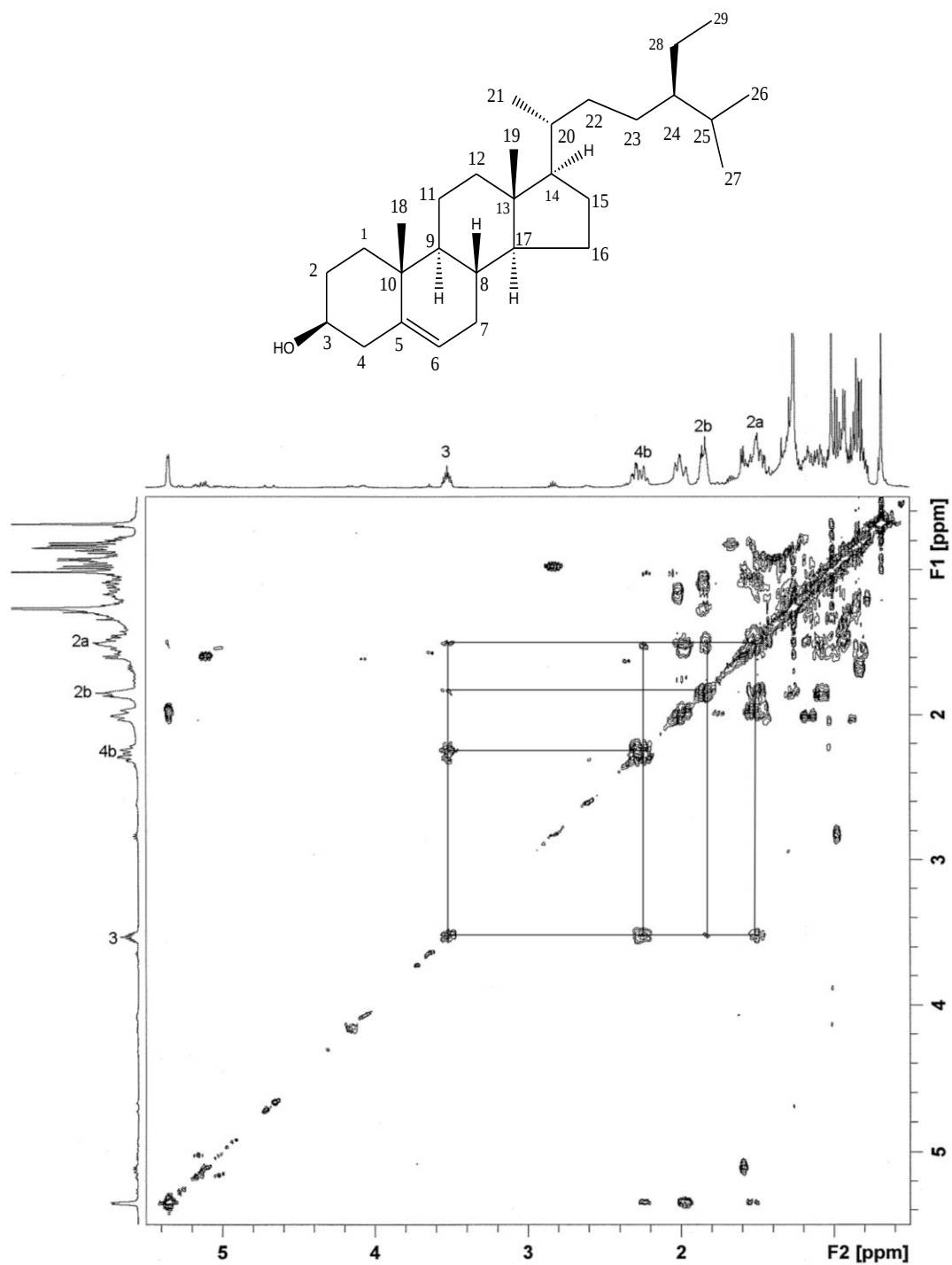
C/H	DEPT	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), J (Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	CH ₂	37,25	1,08 tt, 1,84	H-1a $\rightarrow$ C-3, C-9 H-1b $\rightarrow$ C-3, C-10
2	CH ₂	31,63	1,50, 1,84	C-10
3	CH	71,77	3,52 tt	
4	CH ₂	42,31	2,22 t, 2,30dd	C-3, C-5, C-6
5	C	140,76		
6	CH	121,67	5,35 dt (5,4/1,9)	
7	CH ₂	31,89	1,53, 1,98	C-9, C-10
8	CH	31,91	1,48	
9	CH	50,14	0,94	
10	C	36,49		
11	CH ₂	21,07	1,45, 1,58,	C-9
12	CH ₂	39,77	1,17, 2,02	
13	C	42,31		
14	CH	56,06		
15	CH ₂	24,28	1,08, 1,58	C-14
16	CH ₂	28,22	0,97, 1,85	
17	CH	56,76	1,00	
18	CH ₃	19,37	1,01	C-9, C-10
19	CH ₃	11,84	0,69	
20	CH	36,13	1,38	
21	CH ₃	18,77	0,95, 0,97	C-14
22	CH ₂	33,95	1,03, 1,34	
23	CH ₂	26,10	1,17, 1,33	
24	CH	45,84	0,93	
25	CH	29,34	0,82	
26	CH ₃	20,98	0,87	
27	CH ₃	19,03	0,85	
28	CH ₂	23,07	0,85, 1,03	
29	CH ₃	11,96	0,89	



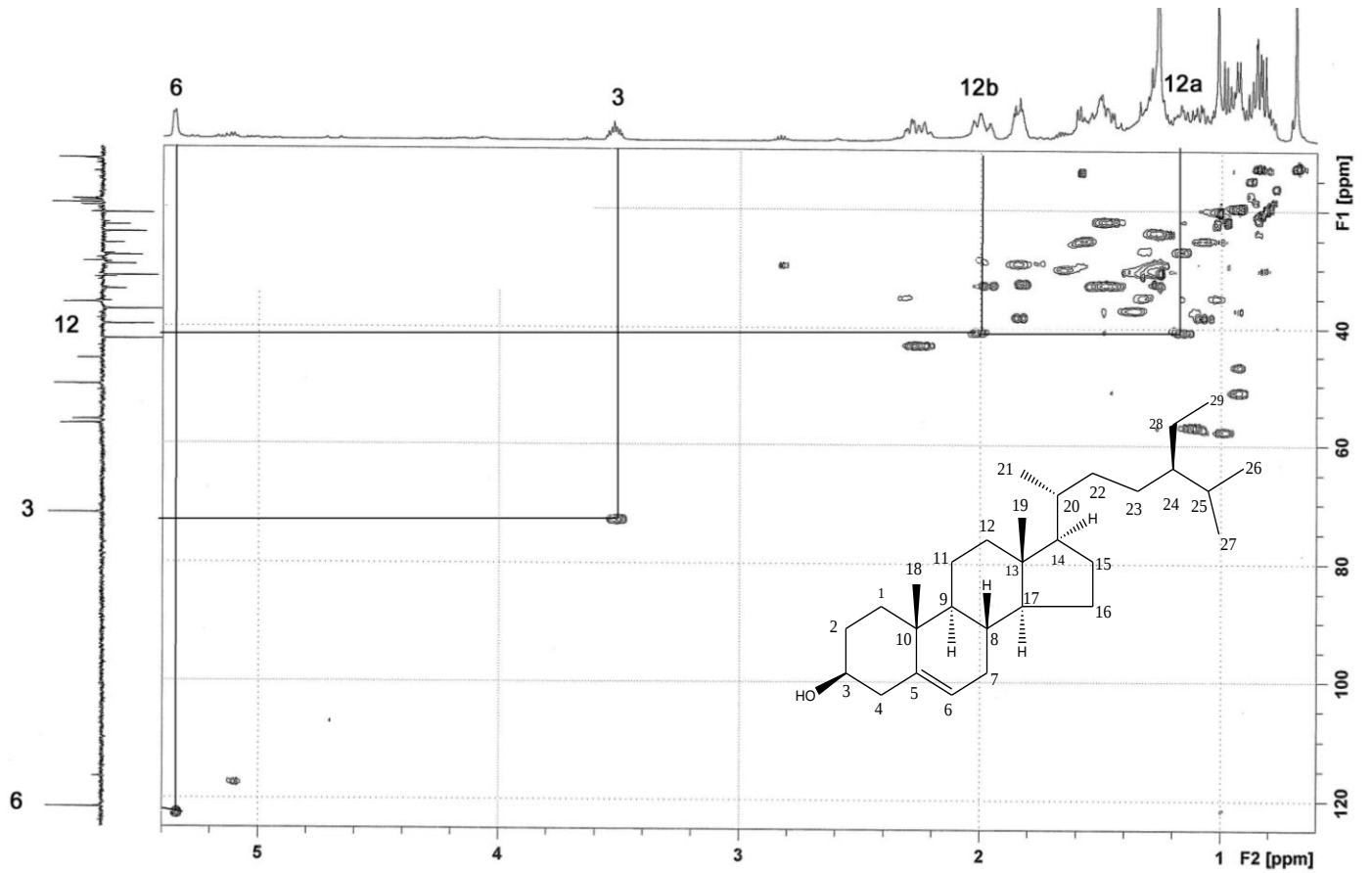
Spektrum 17. APK-6'nin ^1H NMR Spektrum (CDCl₃, 500 MHz)



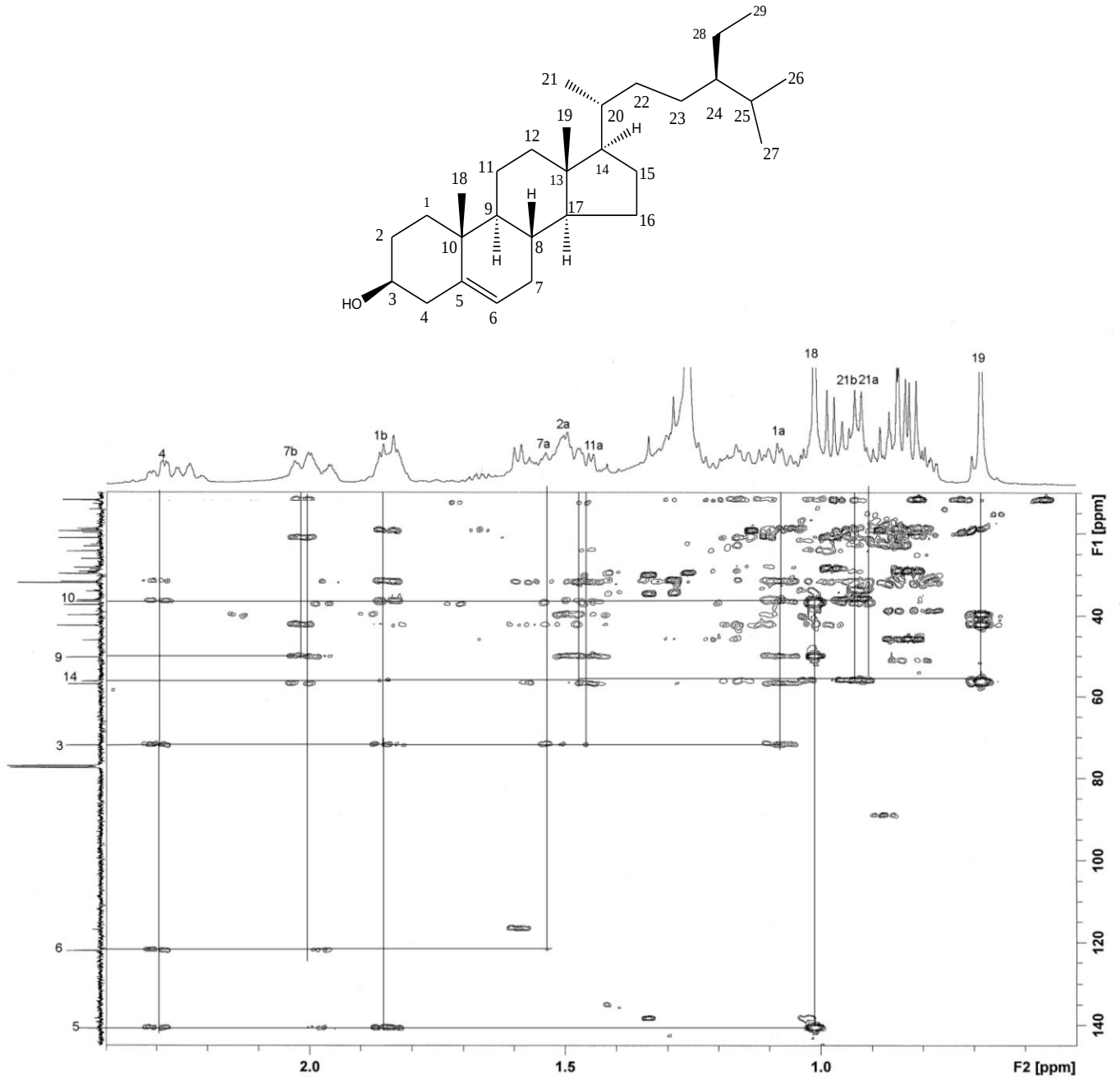
Spektrum 18. APK-6'nin ^{13}C NMR Spektrum (CDCl_3 , 125 MHz)



Spektrum 19. APK-6'nin 2D ¹H,¹H-Homonükleer Korelasyonlu Spektrumu (COSY)



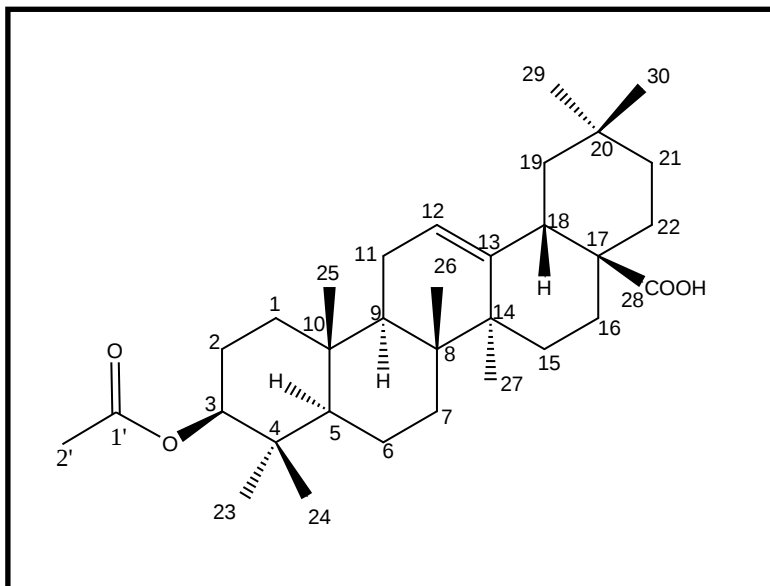
Spektrum 20. APK-6'nin 2D ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (yakın mesafe) NMR Spektrumu (HMQC)



Spektrum 21. APK-6'nin 2D ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) Spektrumu (HMBC)

3-Asetoksi olean 12-en-28-oik asit (APK-7)

(=3-O-Asetiloleanolik asit=Oleanolik asit asetat)



$C_{32}H_{50}O_4$ (MA:498)

UV $\lambda_{maks.}$ (MeOH) nm	IR $\nu_{maks.}$ (% 1 KBr) cm^{-1}
229	1540 (C=C)
	1690 (<u>COOH</u>)
	2939 (Alifatik CH)
	3400 (OH)

1H NMR Spektrumu ($CDCl_3$, 400 MHz) : Spektrum 22

Tablo 27

DEPT-90 ve ^{13}C NMR Spektrumları ($CDCl_3$, 100 MHz) : Spektrum 23

Tablo 27

2D $^1H, ^{13}C$ -Heteronükleer Korelasyonlu (yakın mesafe) Spektrumu (HMQC) : Spektrum 24

2D $^1H, ^{13}C$ -Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) Spektrumu (HMBC) : Spektrum 25

Tablo 27

Beyaz renkli, amorf bir toz olan **APK-7** bileşiği, İTK analizinde, vanilin/H₂SO₄ reaktifi kullanılarak ısıtılması sonucunda, zamanla erguvani bir renk vermiştir. Bileşiğin UV spektrumunda ($\lambda_{\text{maks.}}$ 229 nm) görülen absorpsiyon piki ve IR spektrumunda gözlenen 3400, 1690 ve 1540 cm⁻¹'deki gerilim bantları hidroksil grubu, karbonil grubu ve çifte bağ fonksiyonu bileşiğin yapısının bir triterpen olabileceğini düşündürmüştür.

Bileşiğin tüm proton ve karbon değerleri, 1D ve 2D NMR (HMQC ve HMBC) spektrumları birlikte yorumlanarak belirlenmiştir.

APK-7 bileşiğinin DEPT ve ¹³C NMR spektrumlarına (Spektrum 23, Tablo 27) bakıldığında, 8 tane metil, 10 tane metilen, 5 metin ve 9 katerner karbon atomuna ait toplam 32 tane sinyal belirlenmiştir. 122,7 ve 143,7 ppm de çıkan çifte bağ gösteren karbon pikleri, δ_C 181,5'ta görülen karboksilik asite ait pik ve bileşiğin HMQC spektrumunda (Spektrum 24), yedi metil grubu ve ilgili karbon atomları arasındaki ¹H-¹³C direkt ilişki, bileşiğin oleanolik asit olduğunu göstermiştir. Metil gruplarına ait rezonanslar ve bağlı bulundukları karbonlar; δ_H 0,87 (C-24), δ_H 0,86 (C-23), δ_H 0,94 (C-29), δ_H 0,97 (C-26), δ_H 0,98 (C-30) ve δ_H 1,05 (C-27) olarak saptanmıştır. 30 karbonlu oleanolik asit yapısını gösteren sinyaller haricinde, ¹³C NMR spektrumunda 171,2 ppm de görülen karbonile ait pik ve ¹H NMR spektrumunda (Spektrum 22, Tablo 27) 2,05 ppm de çıkan metile ait pik bileşiğin yapısına bir asetoksi grubunun süstitüe olduğunu göstermiştir. HMQC spektrumunda, δ_H 4,48'de (dd $J=13,3/5$ Hz) görülen metin pikinin, δ_C 79,2 karbonuyla etkileştiği görülmüş ve bu proton asetoksi grubuna komşu olduğu için spektrumda düşük alana kayan 3 numaralı karbon atomuna atfedilmiştir. ¹H NMR spektrumunda, δ_H 5,35 ppm'de gözlenen geniş singlet pike ait protonun üzerinde bulunduğu karbon atomu, HMQC spektrumundan 122, 8 ppm olarak belirlenmiş ve bu proton, H-12 (CH)'ye atfedilmiştir.

APK-7 bileşiğinin, ¹³C spektrumunda görülen ve 20 numaralı karbon atomuna atfedilen 36,13 ppm'deki sinyal, HMBC spektrumunda (Spektrum 25, Tablo 27) 0,94 ppm (H-29)'deki protonla etkileşme göstermektedir ve bu

karbon sinyalinin ^{13}C NMR ve DEPT spektrumlarından da katerner bir yapıda olduğu ve iki tane metil grubunu üzerinde taşıdığı anlaşılmıştır.

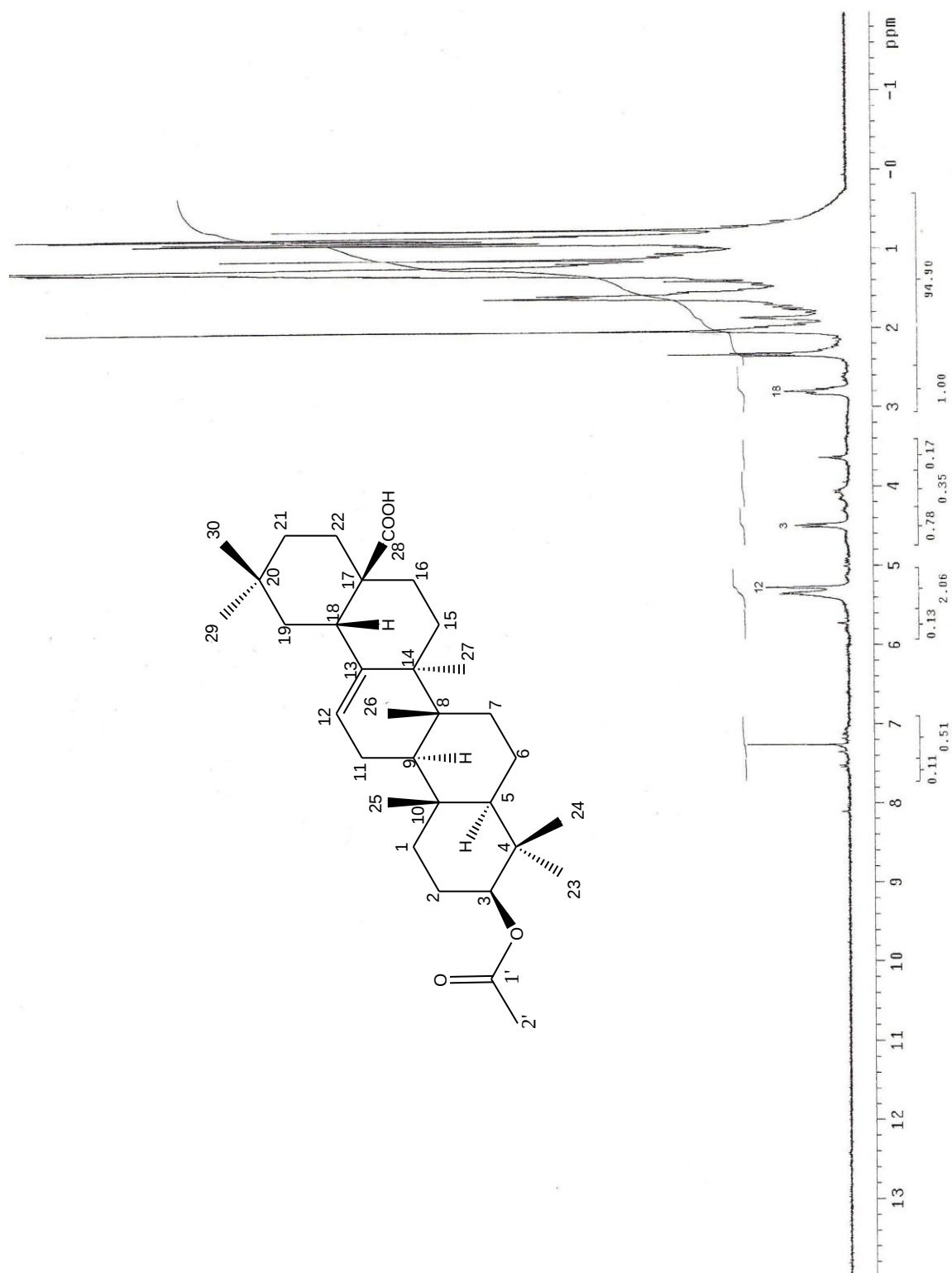
HMBC spektrumunda görülen önemli etkileşmelerin, δ_{H} 0,86 (H-23), δ_{H} 0,87 (H-24) / δ_{C} 79,2 (C-3) ve δ_{H} 0,87 (H-24) / δ_{C} 55,5 (C-5) olduğu anlaşılmıştır.

Bileşiğin yapısında yer alan proton ve karbon sinyallerinin çözümlemelerinde kullanılan 1D ve 2D NMR analizlerine ve yayınlanmış olan literatür bilgilerine dayanarak bileşiğin oleanan ana iskeletine sahip pentasiklik bir triterpen olduğu, üç numaralı konumda bir asetiloksi, 12 ve 13 numaralı karbon atomları arasında bir çift bağ bulunduğu, 28 numaralı konumdan da bir karboksilik asit fonksiyonunun bağlı olduğu görülmüştür.

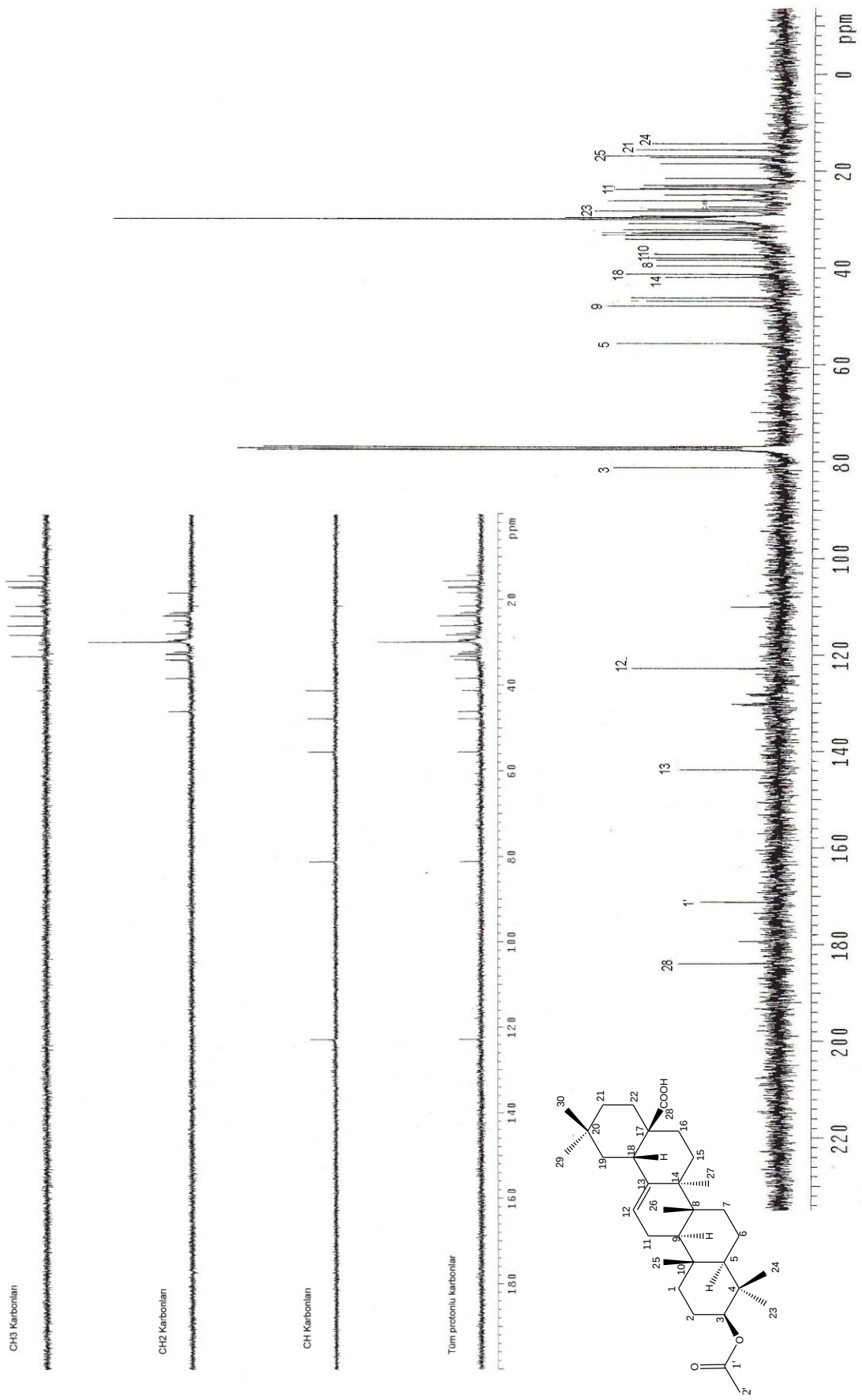
Yapılan değerlendirmeler ve elde edilen bulguların, literatürde kayıtlı bulgularla örtüşmesinden dolayı, **APK-7** bileşiğinin yapısı, **3-O-asetoksiolean-12-en-28-oik asit** (= **oleanolik asit asetat**) olarak aydınlatılmıştır (82).

Tablo 27. 3-O-asetoksioleanolik asit (APK-7) bileşiğinin ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) ve ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) NMR spektroskopik değerleri

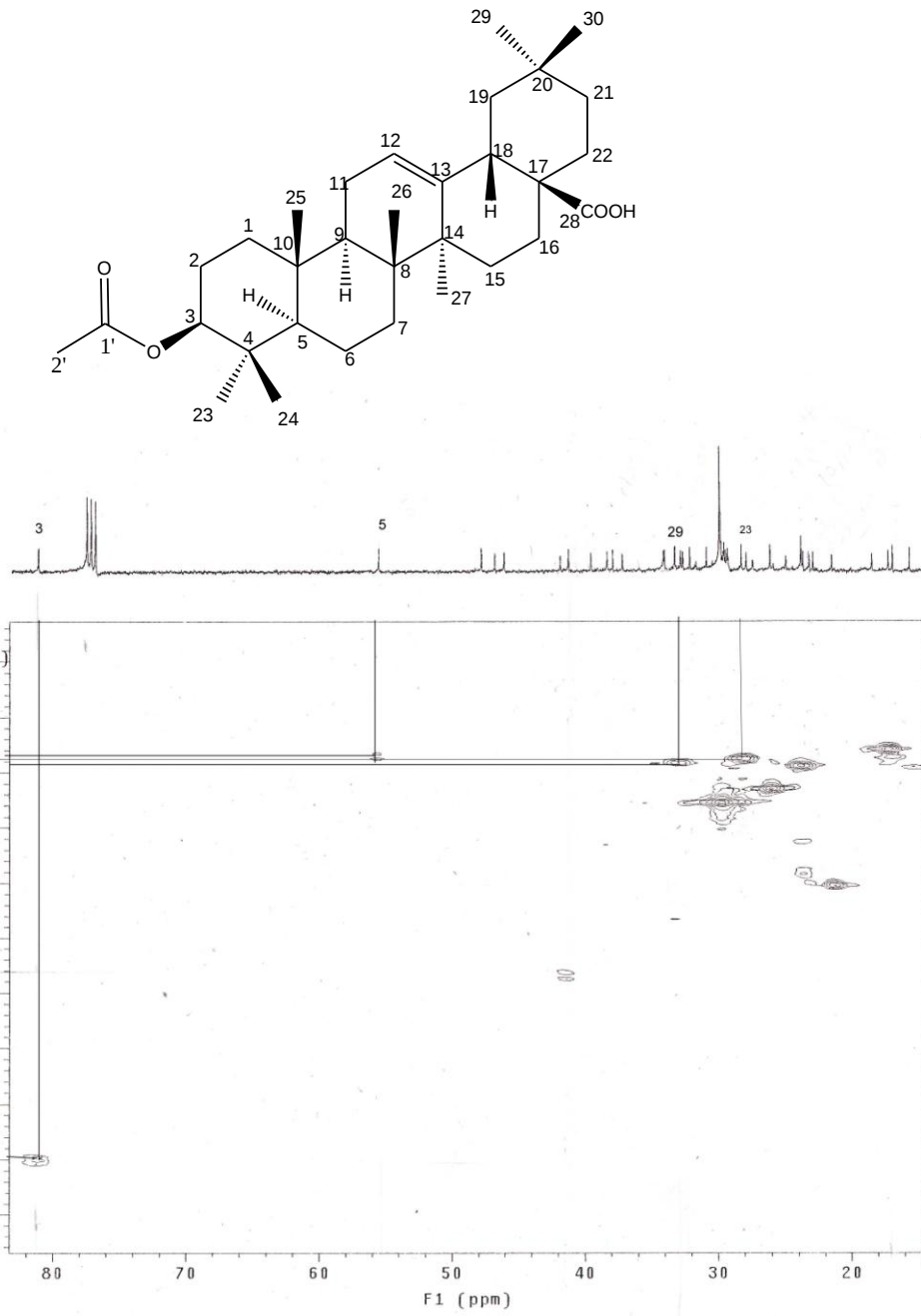
C/H	DEPT	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), J (Hz)	HMBC (H→C)
1	CH_2	38,3	0,85, 1,58	
2	CH_2	23,7	1,71	
3	CH	79,2	4,48 (dd, 13,3/5)	
4	C	37,9		
5	CH	55,5	0,82	
6	CH_2	18,4		
7	CH_2	32,7		
8	C	39,5		
9	CH	47,7		
10	C	37,1		
11	CH_2	22,8	1,97	
12	CH	122,7	5,35 gs	
13	C	143,7		
14	C	41,8		
15	CH_2	27,8		
16	CH_2	23,1		
17	C	46,7		
18	CH	41,2	2,80 dd (13,8/4,2)	C-14
19	CH_2	46,1		
20	C	36,13		
21	CH_2	34,00	2,33	C-28
22	CH_2	32,1		
23	CH_3	28,3	0,86 s	C-3, C-5
24	CH_3	14,3	0,87 s	C-3, C-5
25	CH_3	15,5	0,82 s	
26	CH_3	16,8	0,97 s	
27	CH_3	26,1	1,05 s	
28	COOH	181,5	0,85, 1,03	
29	CH_3	33,2	0,94 s	C-20
30	CH_3	23,8	0,98 s	
1'	COOCH_3	171,2		
2'	COOCH_3	21,4	2,05 s	



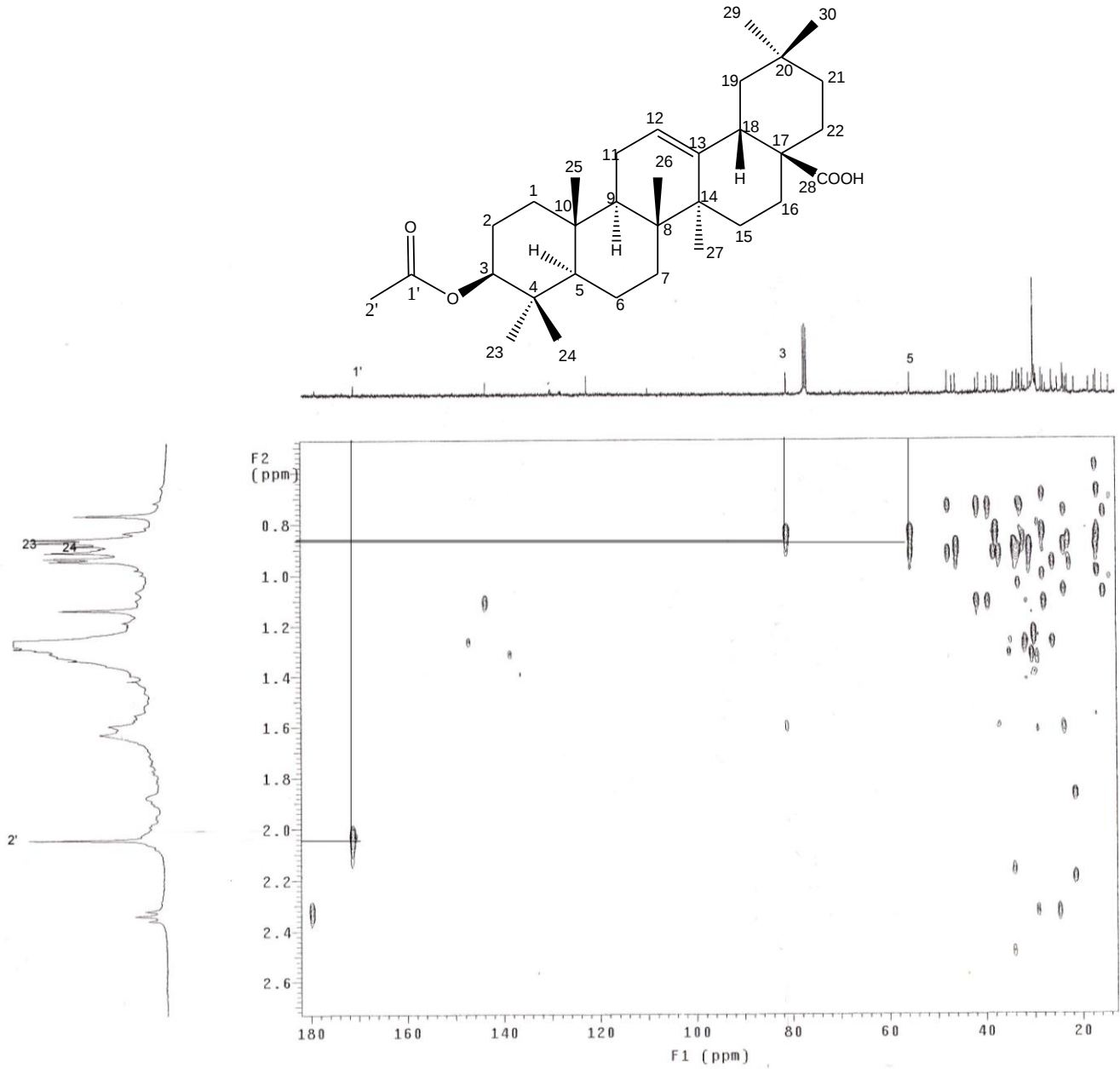
Spektrum 22. APK-7'nin ^1H NMR Spektrum (CDCl_3 , 400 MHz)



Spektrum 23. APK-7'nin ¹³C NMR ve DEPT Spektrumları (CDCl₃, 100 MHz)



Spektrum 24. APK-7'nin 2D ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (yakın mesafe) NMR Spektrumu (HMQC)

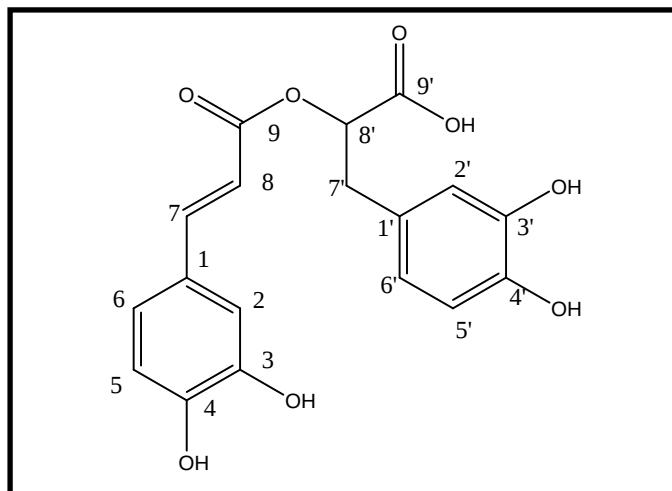


Spektrum 25. APK-7'nin 2D ¹H, ¹³C-Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) Spektrumu (HMBC)

4.1.2. Topraküstü Kısımlardan Elde Edilen Bileşiklerin Yapı Tayini

Rozmarinik Asit (APT-1)

(= α -O-transkafeoil-3',4'-dihidroksifenilaktik asit)



C₁₈H₁₆O₈ (MA:360)

UV $\lambda_{\text{maks.}}$ (MeOH) nm	IR $\nu_{\text{maks.}}$ (% 1 KBr) cm ⁻¹
243	1600 (C=C)
284	1680 (<u>COOH</u>)
292	3400 (OH)

ESI-MS (m/z)	: 359 [M-H] ⁻
¹ H NMR Spektrumu (CD ₃ OD, 500 MHz)	: Spektrum 26 Tablo 28.
DEPT ve ¹³ C NMR Spektrumları (CD ₃ OD, 125 MHz)	: Spektrum 27 Tablo 28.
2D ¹ H, ¹ H-Homonükleer Korelasyonlu Spektrumları (COSY)	: Spektrum 28
2D ¹ H, ¹³ C-Heteronükleer Korelasyonlu (yakın mesafe) Spektrumu (HMQC)	: Spektrum 29
2D ¹ H, ¹³ C-Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) Spektrumu (HMBC)	: Spektrum 30 Tablo 28
2D nOe Korelasyonlu Spektrumu (NOESY)	: Spektrum 31

Krem renkli, amorf bir toz görünümünde olan **APT-1** bileşiğinin yapılan İTK analizinde, kromatogramda vanilin/H₂SO₄ reaktifi püskürtüldükten sonra 105 °C de ısıtılması sonucunda, zamanla solan pembe bir renk verdiği gözlenmiştir. Bileşiğin UV spektrumunda ($\lambda_{maks.}$ 243 nm, 284 nm, 292 nm) görülen absorpsiyon pikleri ve IR spektrumunda gözlenen hidroksil (OH), ester karbonili, asidik karbonil gruplarına (C=O) ve aromatik halkalara ait absorpsiyon bantları aromatik halkalı ester yapısında bir fenolik asit varlığını göstermiştir.

ESI Kütle Spektrumunda m/z 359 [M-H]⁻ moleküler iyon piki ve 1D, 2D NMR spektrumları yardımıyla bileşiğin kapalı formülü **C₁₃H₁₆O₈** olarak bulunmuştur.

Bileşiğin yapısında yer alan proton ve karbon sinyallerinin çözümlemelerinde kullanılan 1D ve 2D NMR (COSY, NOESY, HMQC ve HMBC) analizlerine dayanarak bileşiğin kafeik asit içeren disüstitüe bir fenolik asit olduğu saptanmıştır.

APT-1 bileşiğinin ¹H NMR spektrumuna (Spektrum 26, Tablo 28) bakıldığında 2 ABX sistemine ait proton sinyalleri 7,03 ppm (d, $J = 2,1$ Hz, H-2), 6,76 ppm (d, H-5), 6,91 ppm (dd, $J = 8,1/2,1$ Hz, H-6), δ_H 6,77 (s, H-2'), δ_H 6,68 (d, $J = 8$ Hz, H-5'), δ_H 6,63 (dd, $J = 8/2$ Hz, H-6') trisüstitüe benzen halkalarını, 6,25 ppm (d, $J = 15,9$ Hz, H-8), 7,5 ppm (d, $J = 15,9$ Hz, H-7) de görülen sinyaller olefinik protonları δ_H 5,06 (dd, $J = 9,8/3,4$, H-8') da görülen proton rezonansı metin protonlarını, δ_H 2,94 (dd, $J = 14,3/9,8$ Hz, H-7_a') ve δ_H 3,07 (dd, $J = 14/3,4$ Hz, H-7_b') de iki proton değerindeki dublet-dublet sinyalleri ise metilen protonlarını göstermektedir.

¹³C NMR spektrumunda (Spektrum 27, Tablo 28) gözlenen altı tane aromatik karbon sinyali [δ_C 116,37 (C-5'), 117,50 (C-2'), 121,89 (C-6'), 131,40 (C-1'), 146,08 (C-3') ve 144,92 (C-4')], bir karbinol sinyali [δ_C 78,09 (C-8')] ve bir karboksil sinyali [δ_C 177,88 (s, C-9')] ile DEPT spektrumundaki δ_C 38,95 (C-7') sinyali ile gözlenen bir CH₂ grubunun varlığı, dihidroksi fenil laktik asit yapısını göstermiştir. Bununla birlikte spektrumda görülen: δ_C 115,83 (C-8), δ_C 115,32 (C-2), δ_C 116,63 (C-5), δ_C 123,00 (C-6), δ_C 128,13 (C-1), δ_C

146,76 (C-7), δ_C 146,76 (C-3), δ_C 149,51 (C-4) ve δ_C 169,32 (C-9).sinyalleri de yapıda esterleşmiş bir kafeik asit bulunduğuna işaret etmiştir.

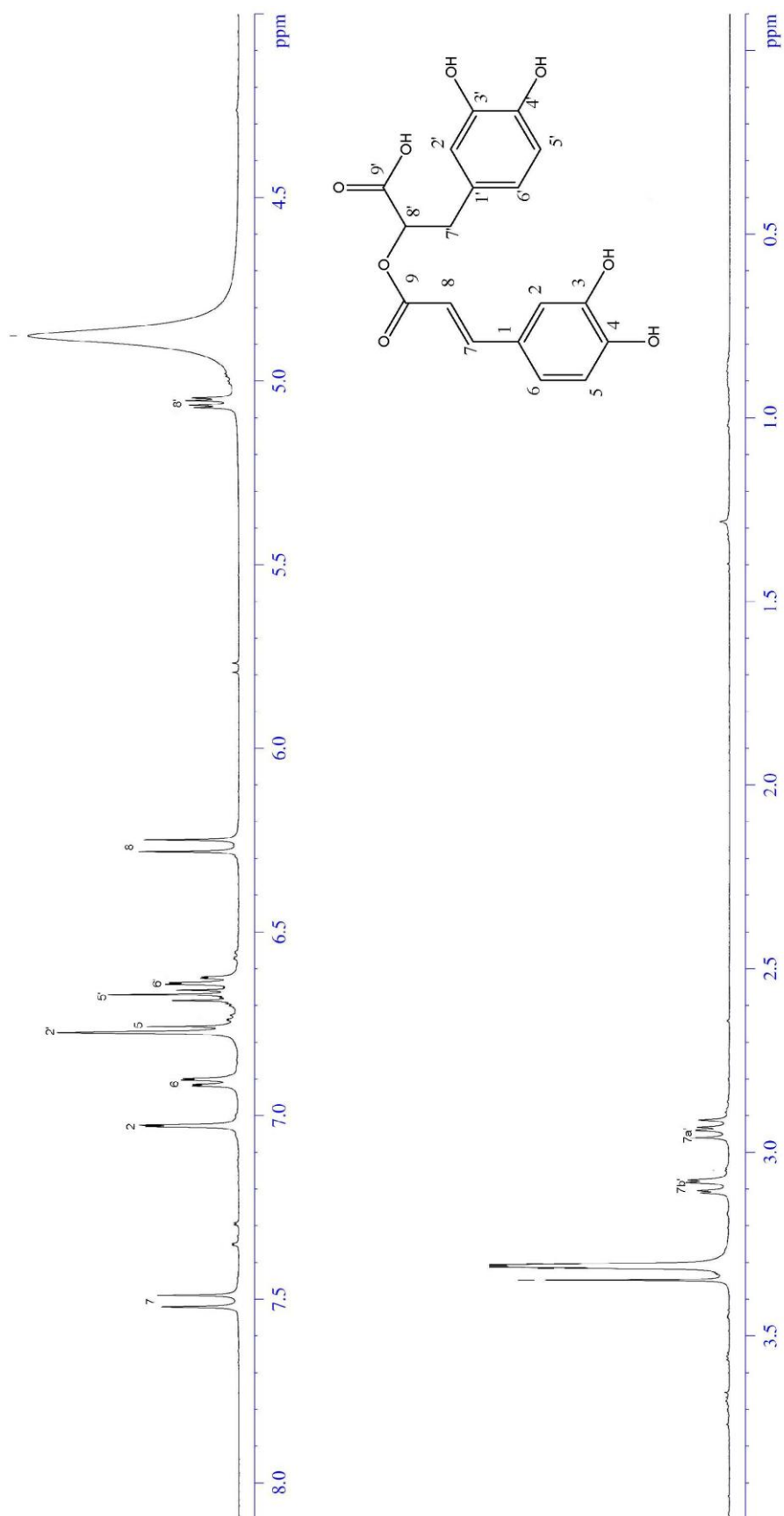
APT-1'in COSY spektrumunda (Spektrum 28) 2,94 ppm ve 3,07 ppm'de gözlenen H₂-7'protonları ile 5,06 ppm'de gözlenen H-8'protonu arasında, δ_H 6,63 (H-6') ile δ_H 6,68 (H-5') arasında, δ_H 7,5 (H-7) ile δ_H 6,25 (H-8) arasında ve δ_H 6,76 (H-5) ile δ_H 6,91 (H-6) protonları arasında spin sistemleri saptanmıştır. Bileşiğin HMBC spektrumunda (Spektrum 30) 8'protonunun, C-9, C-1've C-9'konumlarındaki karbon atomlarıyla uzak mesafe etkileşimleri gözlenmiş ve bu da kafeik asitin dihidroksi fenil laktik asit ile bağlantı noktasının 8'konumundan olduğunu doğrulamıştır.

NOESY spektrumunda (Spektrum 31) gözlenen H-7 ve H-8 protonları arasındaki nOe etkileşimi ve *J* değerinin 15,9 olması bu protonların trans konumlu olduğunu göstermiştir.

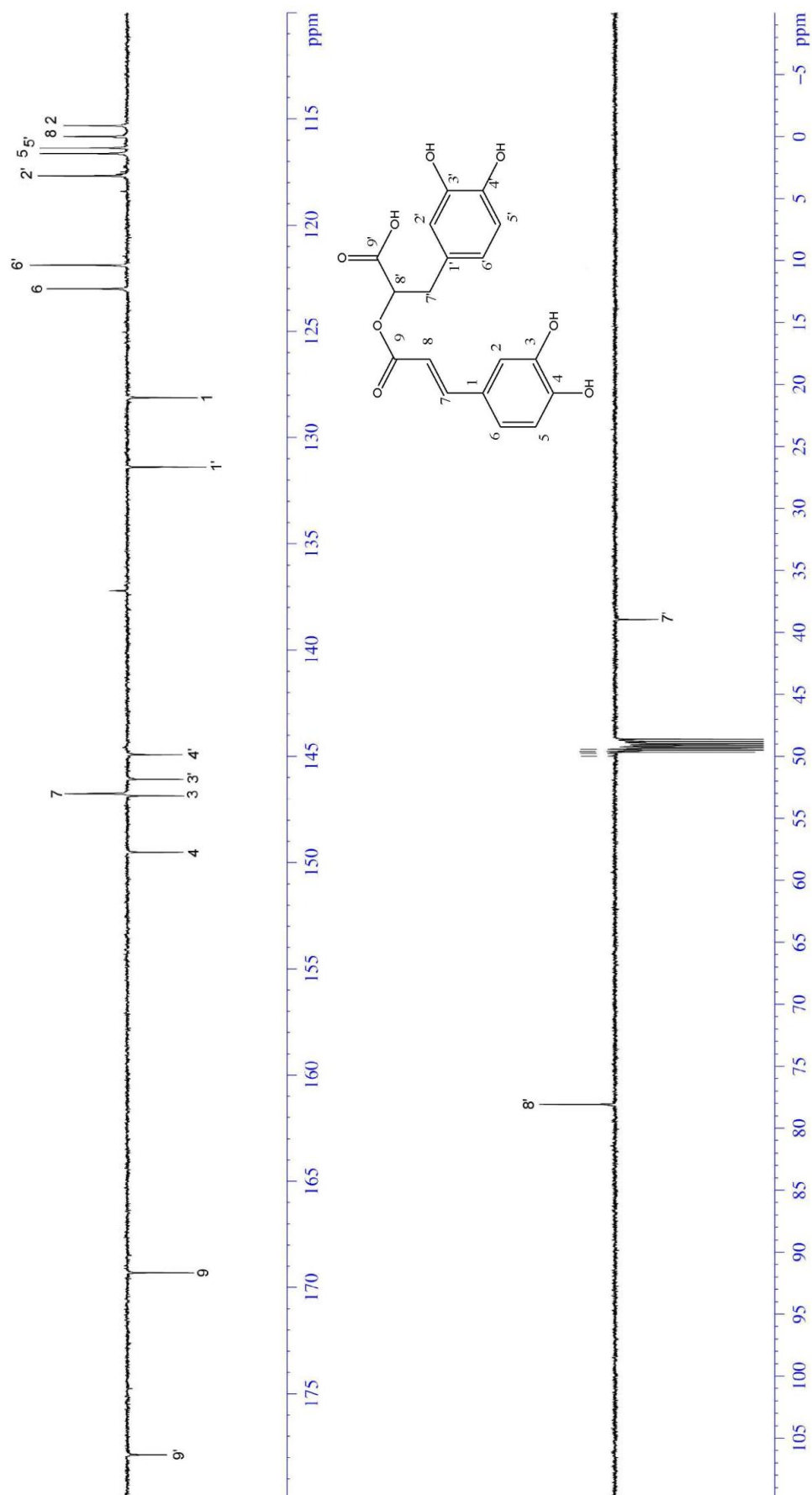
APT-1 bileşiğinin yapısı, elde edilen bulgular ve literatürde kayıtlı bulguların birlikte değerlendirilmesi sonucunda **rozmarinik asit (α -O-kafeoil-3',4'-dihidroksifenilaktik asit)** olarak aydınlatılmıştır (51).

Tablo 28. Rozmarinik Asit (**APT-1**) bileşiğinin ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) ve ^1H (CD_3OD , 500 MHz) NMR spektroskopik değerleri

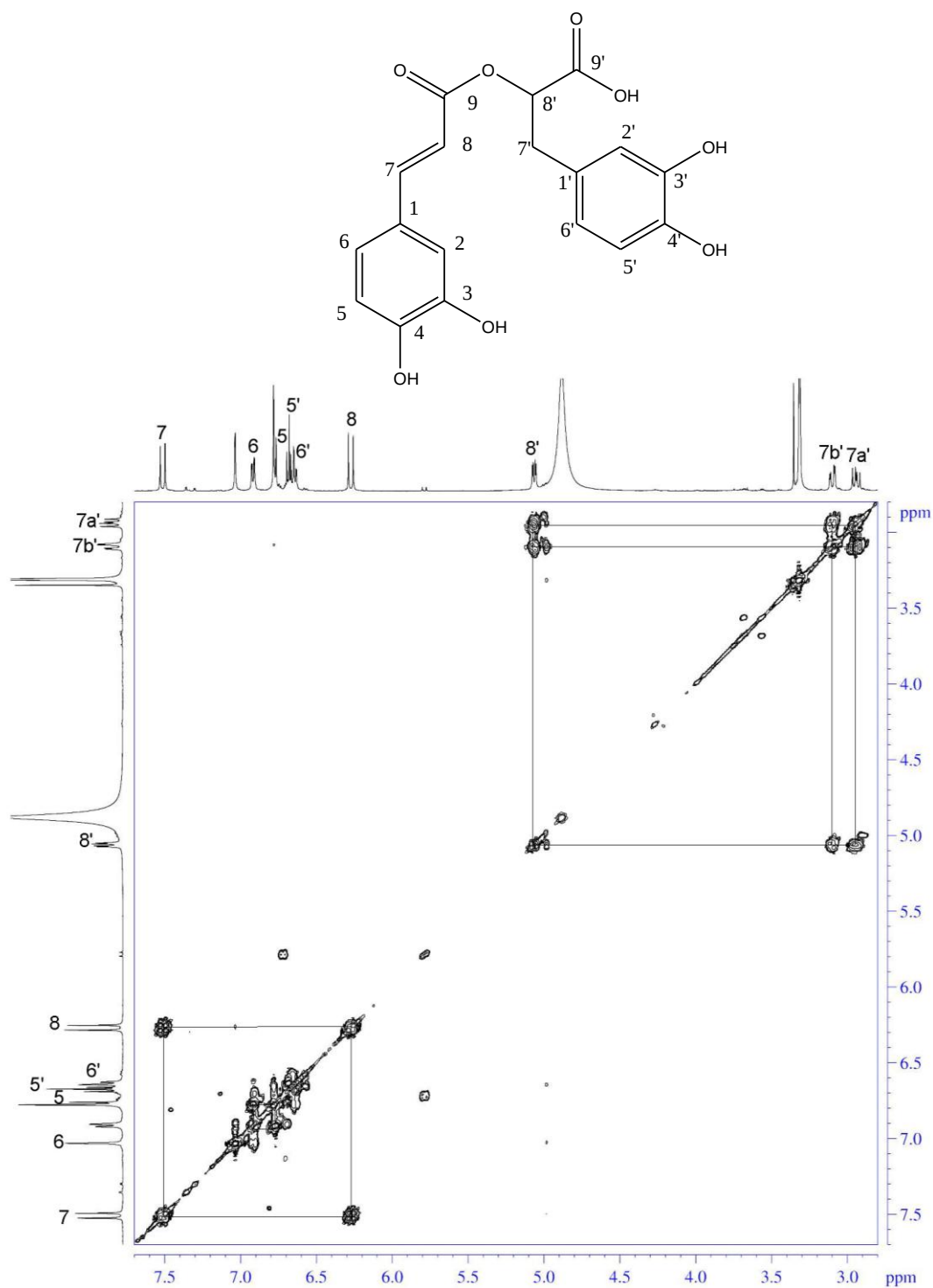
C/H	DEPT	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm), J (Hz)	HMBC (H→C)
1	C	128,13		
2	CH	115,32	7,03 d (2,1)	C-3, C-4
3	C	146,76		
4	C	149,51		
5	CH	116,63	6,76 d (8)	C-1, C-3, C-4, C-6, C-8, C-6'
6	CH	123,00	6,91 dd (2,1/8,1)	C-2, C-4, C-7
7	CH	146,76	7,5 d (15,9)	C-1, C-2, C-6, C-8, C-9, C-5'
8	CH	115,83	6,25 d (15,9)	C-1, C-9
9	C	169,32		
1'	C	131,40		
2'	CH	117,50	6,77 s	C-3, C-7',
3'	C	146,08		
4'	C	144,92		
5'	CH	116,37	6,68 d (8)	C-1', C-3', C-4'
6'	CH	121,89	6,63 dd (8/2,1)	C-2', C-7'
7'	CH ₂	38,95	2,94 dd (14,3/9,8) 3,07 dd (14/3,4)	C-9', C-6', C-8', C-1'
8'	CH	78,09	5,06 dd (9,8/3,4)	C-1, C-1', C-9, C-9'
9'	C	177,88		



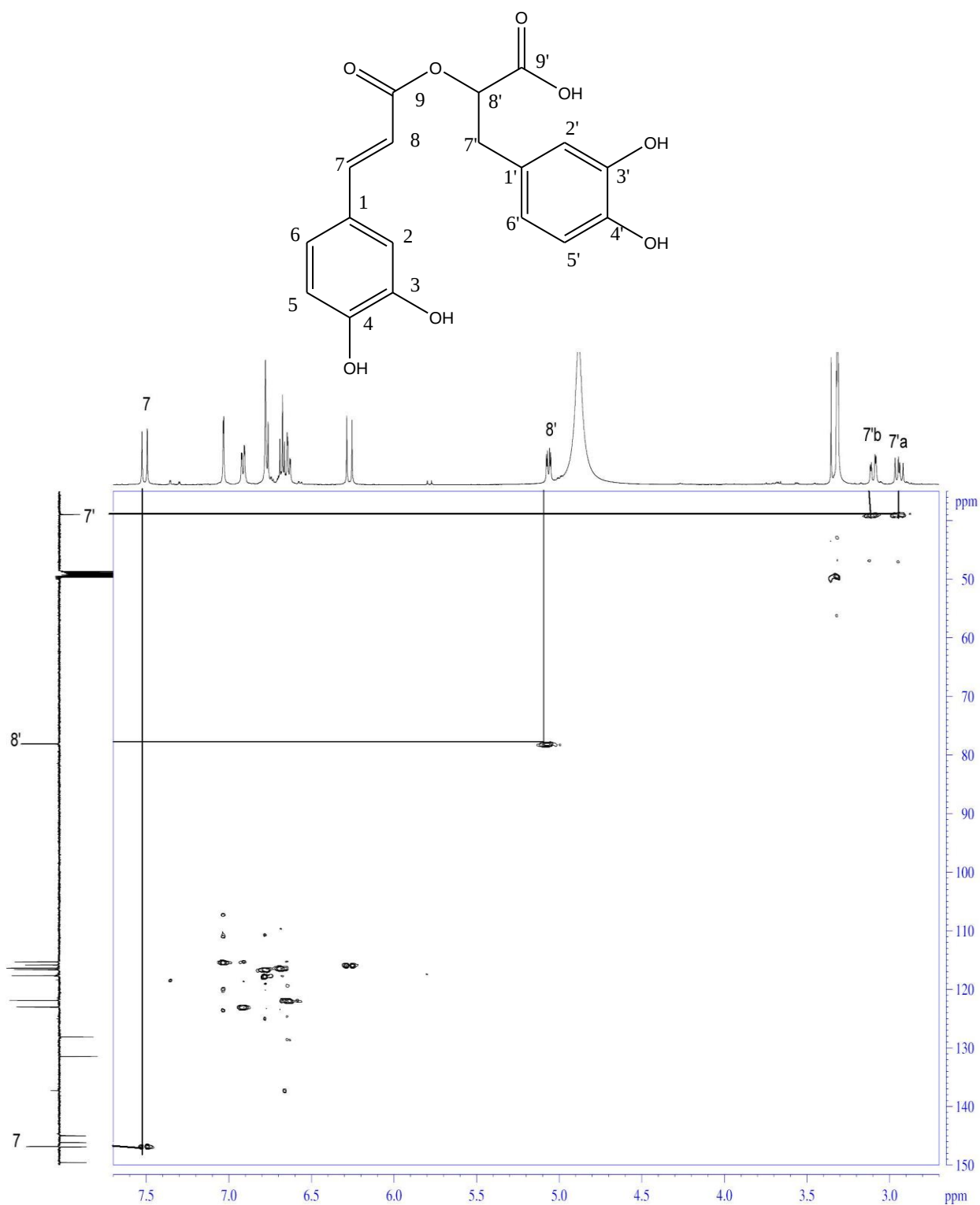
Spektrum 26. APT-1'in ^1H NMR Spektrumu (CD_3OD , 500 MHz)



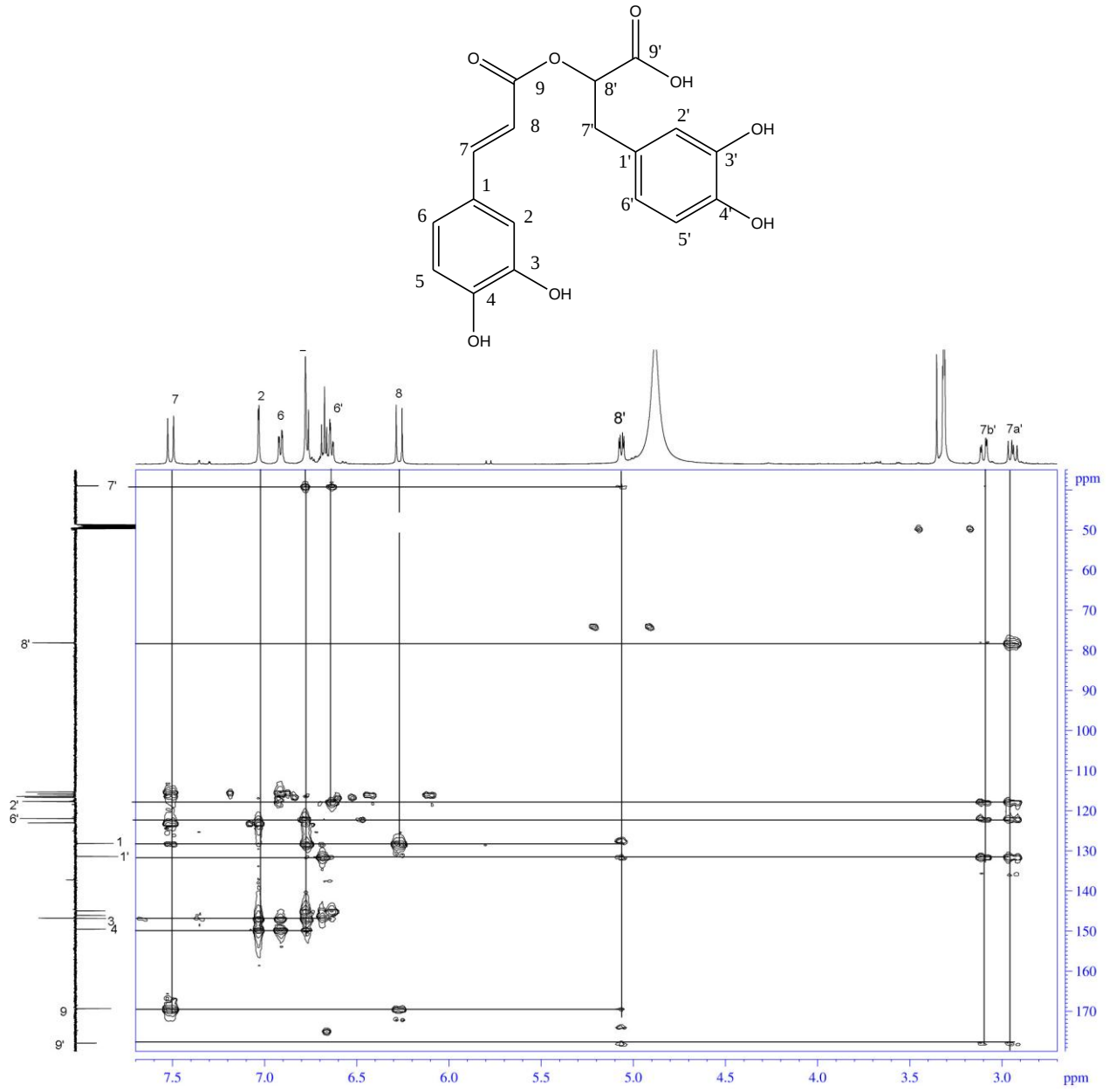
Spektrum 27. APT-1'in ^{13}C NMR ve DEPT Spektrumu (CD_3OD , 500 MHz)



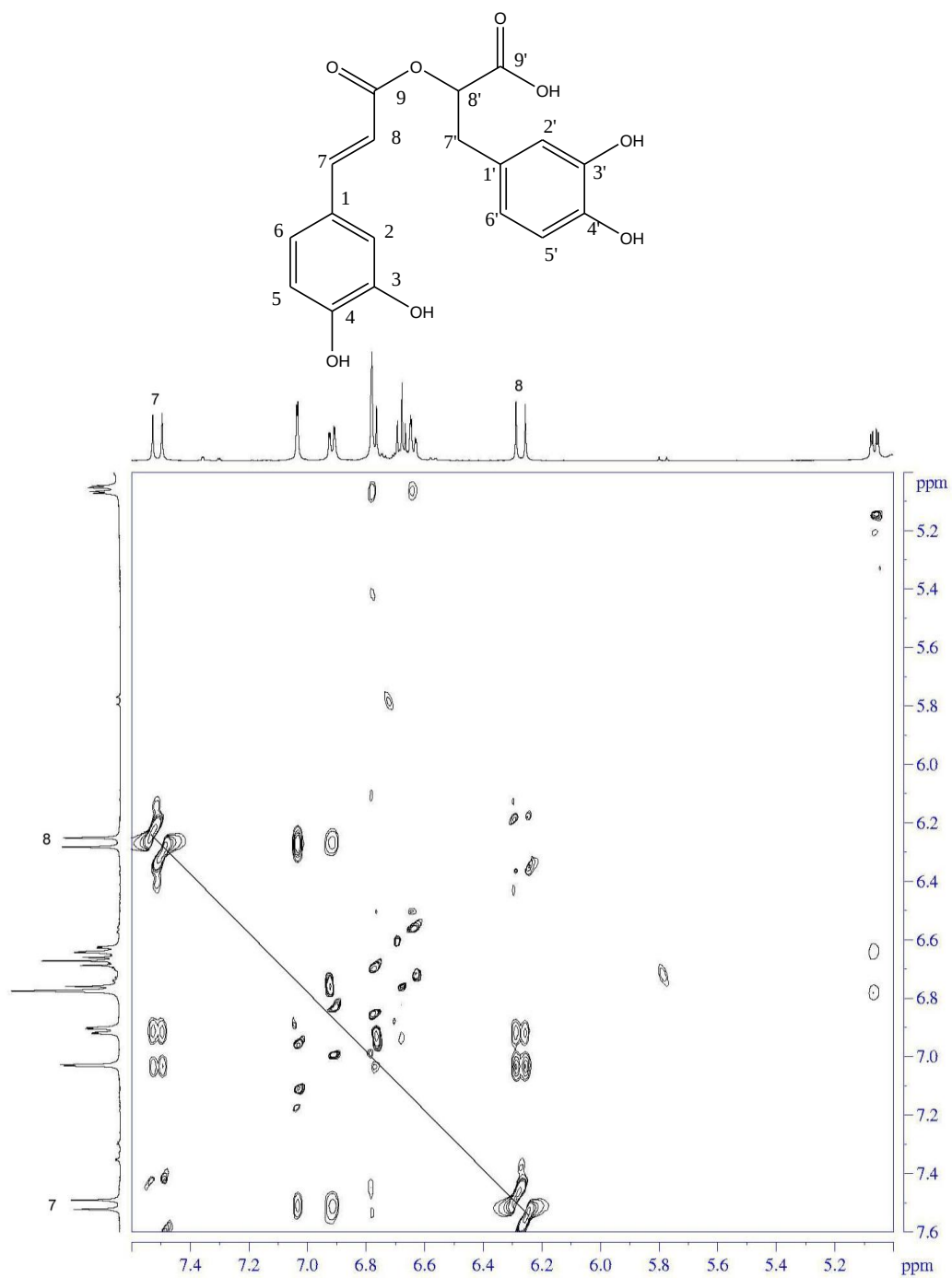
Spektrum 28. APT-1'in 2D ^1H , ^1H -Homonükleer Korelasyonlu Spektrumu (COSY)



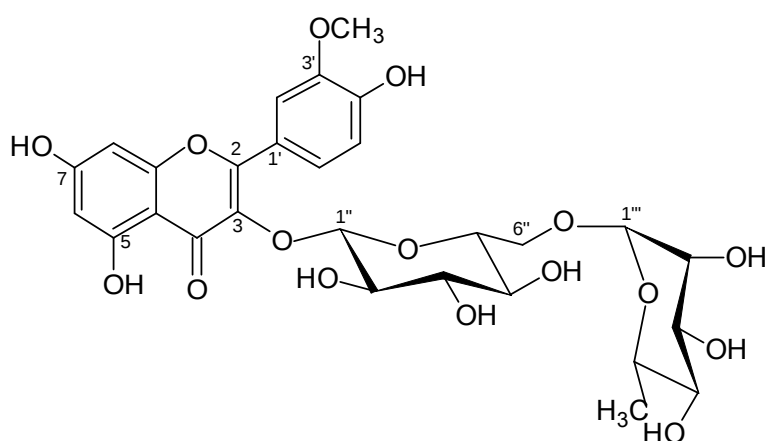
Spektrum 29. APT-1'in 2D ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (yakın mesafe) NMR Spektrumu (HMQC)



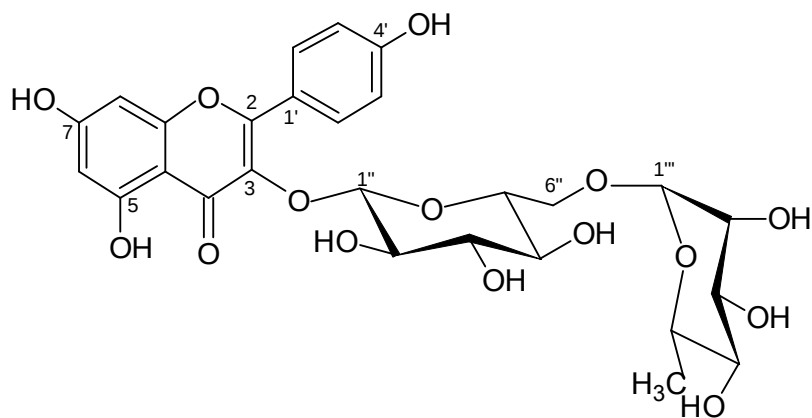
Spektrum 30. APT-1'in 2D ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) Spektrumu (HMBC)



Spektrum 31. APT-1'in 2D nOe korelasyonlu spektrumu (NOESY)

İzoramnetin 3-O-rutinozit (APT-4)**(=Narsissin)****Kemferol 3-O-rutinozit (APT-5)**

APT-4
İzoramnetin
3-O-rutinozit



APT-5
Kemferol
3-O-rutinozit

C₂₈H₃₂O₁₆ (MA 624) APT-4

C₂₇H₃₀O₁₅ (MA 594) APT-5

UV $\lambda_{\text{maks.}}$ (MeOH) nm	IR $\nu_{\text{maks.}}$ (% 1 KBr) cm ⁻¹
227	1600 (C=C)
268	1680 (<u>COOH</u>)
356	3400 (OH)

ESI- MS (<i>m/z</i>)	: 623 [M-H] ⁻
	: 593 [M-H] ⁻
¹ H NMR Spektrumu (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz)	: Spektrum 32
	Tablo 29-30
DEPT ve ¹³ C NMR Spektrumları (DMSO- <i>d</i> ₆ , 100 MHz)	: Spektrum 33
	Tablo 29-30
2D ¹ H, ¹ H-Homonükleer Korelasyonlu Spektrumları (COSY)	: Spektrum 34
2D ¹ H, ¹³ C-Heteronükleer Korelasyonlu (yakın mesafe) Spektrumu (HMQC)	: Spektrum 35
2D ¹ H, ¹³ C-Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) Spektrumu (HMBC)	: Spektrum 36
	Tablo 29-30

Sarı renkli, amorf toz görünümünde olan **APT-4** kodlu maddenin İTK analizinde, UV₂₅₄'te açık sarı, UV₃₆₆'da koyu mor renk gözlenmiştir. Vanilin/H₂SO₄ reaktifi ile 105 °C'de 1-2 dakika ısıtılma sonucunda, karışıma ait lekede sarı-turuncu bir renklenme gözlenmesi bileşiğin flavonoit olabileceğini göstermiştir.

UV spektrumunda, flavonoit yapısının sinnamoil sistemi (Bant I, 356 nm) ve benzoil sistemi (Bant II, 268 nm) için karakteristik iki absorpsiyon bandı ve IR spektrumunda ise hidroksil ve karbonil gruplarına ait bantlar görülmüştür.

1D ve 2D NMR spektrumları incelendiğinde söz konusu maddenin 3:1 oranında iki bileşiğin karışımından oluştuğu gözlenmiş ve bu bileşiklere **APT-4** ve **APT-5** kodları verilmiştir.

¹H NMR spektrumunda (Spektrum 32, Tablo 29-30), **APT-4** bileşiği için aromatik bölgede toplam 5 protona karşılık gelen sinyaller: δ_H 6,10 (gs, H-6); δ_H 6,32 (gs, H-8); δ_H 7,82 (d, $J= 2$ Hz, H-2'), δ_H 6,85 (d, $J= 8,4$ Hz, H-5'), δ_H 7,45 (dd, $J= 8,4/2$, H-6') da gözlenen ABX sistemi trisüstitüe bir aromatik halkaya (B halkası) gözlenmiştir. **APT-5** bileşiği için ise aromatik bölgedeki 6 protona ait sinyaller: δ_H 6,10 (gs, H-6); δ_H 6,30 (gs, H-8), 4 proton değerinde AA'BB'sistemini gösteren δ_H 7,92 (d, $J= 8$ Hz, H-2'/6'), δ_H 6,82 (d, $J=8$ Hz, H-3'/5') gözlenmiştir.

APT-4 için δ_H 5,36 (d) ve δ_H 4,36 (gs)'da, **APT-5** için δ_H 5,23 (d) ve δ_H 4,32 (gs)'de gözlenen sinyallerin aglikonlara bağlı ikişer oz ünitesinin anomerik protonlarına ait olduğu düşünülmüştür. δ_H 5,36 ve δ_H 5,23'deki protonların kenetlenme sabitlerinden (**APT-4**: $J= 7,3$ Hz, H-1"; **APT-5**: $J= 7,4$ Hz) her iki bileşikte bulunan ozlardan bir tanesinin β -glukoz olduğu anlaşılmıştır. Her iki bileşikteki δ_H 0,92 ve δ_H 0,93'teki dublet olarak gözlenen metil sinyalleri $J= 6$ Hz ise ramnozun metil grubu için karakteristiktir ve yapılarında bulunan ikinci ozun α -ramnoz olabileceğini göstermiştir.

¹³C NMR spektrumunda (Spektrum 33, Tablo 29-30), her iki bileşiğin yapısındaki β -glukoz ve α -ramnoza ait 12'şer karbon sinyali haricinde gözlenen rezonanslar **APT-4** bileşiğinin aglikonuna ait 16 karbonun ve **APT-5** bileşiğinin aglikonuna ait 15 karbonun varlığını göstermiştir. HMQC

spektrumu (Spektrum 35) yardımıyla karbonlara ait protonlar saptanmıştır. Glukozun C-6"sinyalinin (δ_C 67,3), yaklaşık 5 ppm düşük alana kayması (glikozidasyon etkisi), ramnozun bu konumdan bağlı olduğunu göstermiştir. HMBC spektrumu (Spektrum 36, Tablo 29-30) yardımıyla aglikonların glikozidasyon yerleri ve ozlar arasındaki bağlantı noktaları kesin olarak saptanmıştır. C-3'ün düşük alanda çıkması (δ_C 131,29) ve C-3/H-1"arasındaki HMBC etkileşimleri oz ünitesinin aglikona bağlı olduğu yeri göstermiştir. Ayrıca ramnozun H-1""protonu ile glukozun C-6"karbon atomu arasındaki uzak mesafe etkileşimi de iki ozun 1→6 bağı ile bağlı olduğunu ispatlamıştır. **APT-4** bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumunda 147,37 ppm e kayan aromatik karbon sinyali ve HMBC spektrumunda metoksil protonları δ_H 3,95 ile δ_C 147,37 arasındaki etkileşim, 2'karbonunun yüksek alana kayması metoksil grubunun **APT-4** bileşiğinin 3'konumuna bağlı olduğunu göstermiştir.

1H NMR, ^{13}C NMR ve 2D NMR spektrumları yardımı ile tespit edilen aglikon rezonansları literatür verileri ile karşılaştırıldığında aglikonların izoramnetin ve kemferol olduğu tespit edilmiş, elde edilen bulgular sonucunda, **APT-4** bileşiğinin yapısı literatür bulguları da dikkate alınarak **izoramnetin 3-O-rutinozit** ve **APT-5** bileşiğinin yapısı ise **kemferol 3-O-rutinozit** olarak aydınlatılmıştır (42,43).

Tablo 29. İzoramnetin 3-O-rutinozit (**APT-4**) bileşiğinin ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) ve ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) NMR spektroskopik değerleri

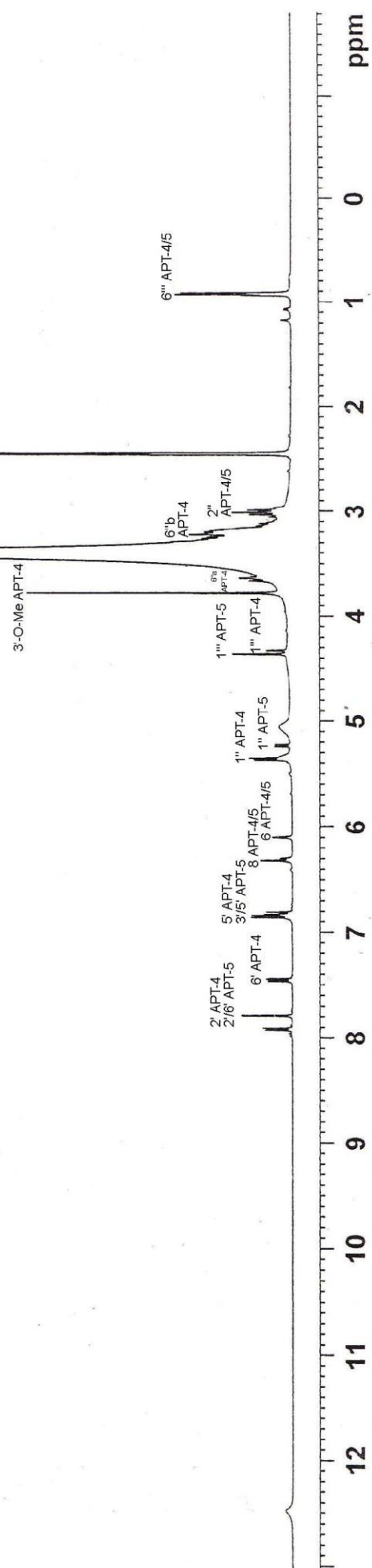
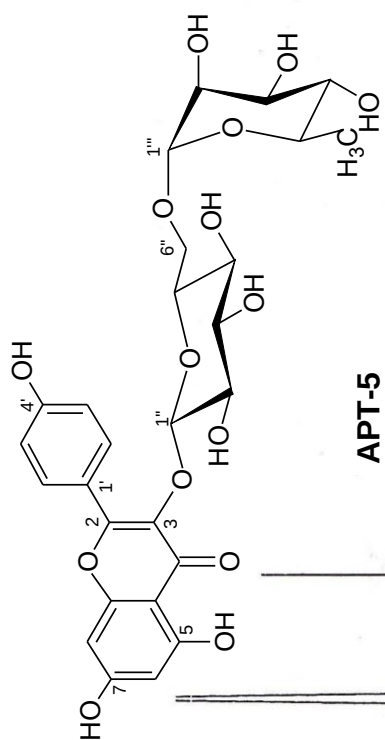
C/H	DEPT	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), J (Hz)	HMBC (H→C)
2	C	156,67		
3	C	131,29		
4	C	177,8		
5	C	162,0		
6	CH	101,23	6,10 gs	C-5
7	C	161,60		
8	CH	94,46	6,32 d (2)	C-6, C-10, C-2
9	C	157,05		
10	C	104,50		
1'	C	121,5		
2'	CH	113,7	7,92 d (2)	C-2, C-3'
3'	C	147,37		
4'	C	133,42		
5'	CH	115,56	6,85 d (8,4)	C-6'
6'	CH	122,70	7,45 dd (8,4/1,9)	C-2, C-2'
3'-O-Me	CH ₃	56,1	3,95 s	C-3'
Glukoz				
1''	CH	101,78	5,36 d (7,3)	C-3
2''	CH	72,9	3,14 d	C-6''
3''	CH	76,3	3,01 m	C-4''
4''	CH ₂	68	3,00-3,70*	
5''	CH	76,9	3,00-3,70*	
6''	CH ₂	67,3	3,62 dd (11/2) 3,11 dd (11/5)	C-2''
Ramnoz				
1'''	CH	101,35	4,36 gs	C-6''
2'''	CH	70,54	3,00-3,70*	
3'''	CH	71,05	3,00-3,70*	
4'''	CH	72,26	3,00-3,70*	
5'''	CH	70,37	3,2	
6'''	CH ₃	18,15	0,93 d (6)	

*: Solvan pikinin altında kaldığından hesaplanamamıştır.

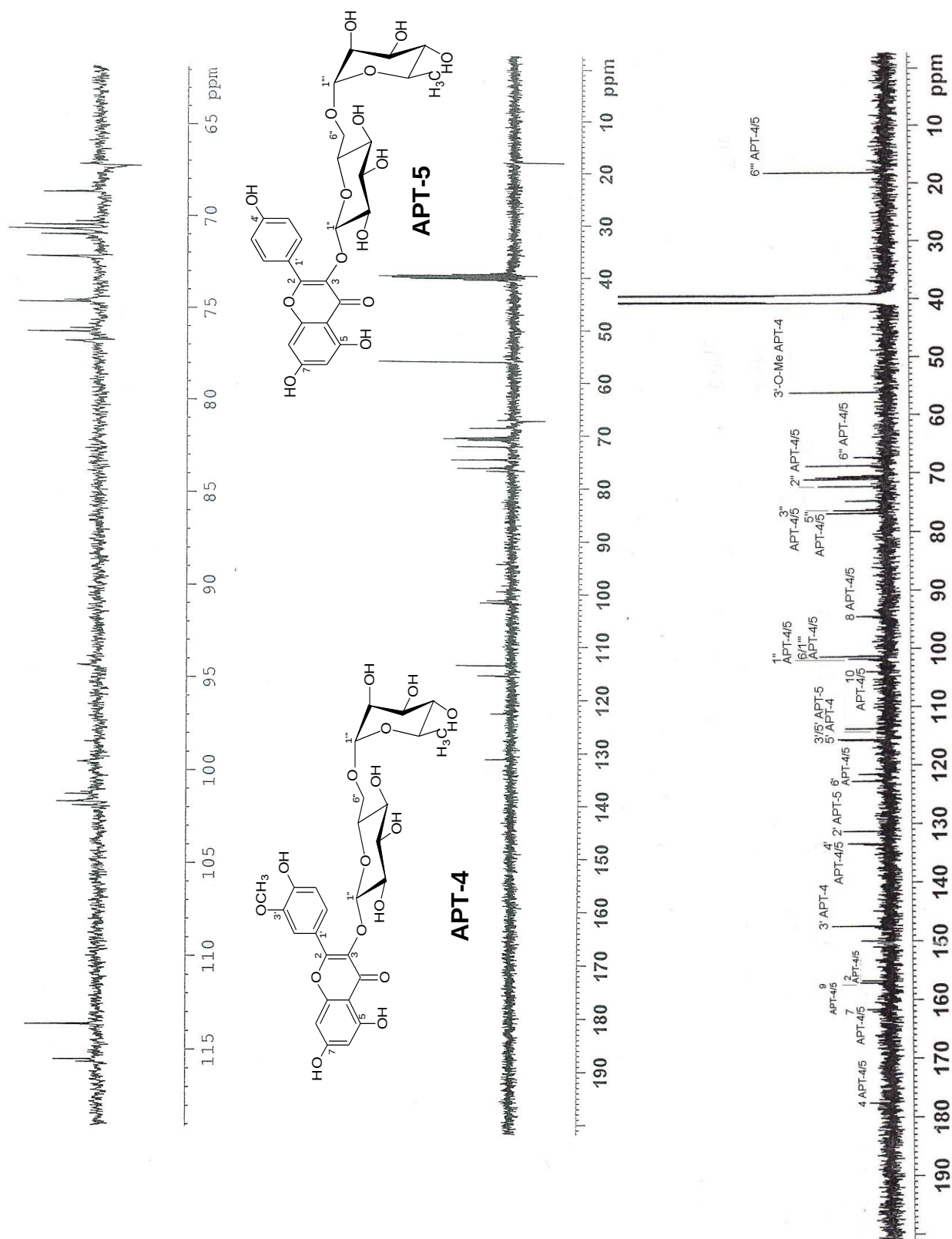
Tablo 30. Kemferol 3-O-rutinozit (**APT-5**) bileşiğinin ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) ve ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) NMR spektroskopik değerleri

C/H	DEPT	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), J (Hz)	HMBC (H→C)
2	C	156,67		
3	C	131,29		
4	C	177,8		
5	C	162,0		
6	CH	101,23	6,10 gs	C-5
7	C	161,60		
8	CH	94,46	6,32 d (2)	C-6, C-10, C-2
9	C	157,05		
10	C	104,50		
1'	C	121,5		
2'	CH	131,29	7,92 d (8)	C-2, C-3'
3'	CH	147,37	6,82 d (8)	
4'	C	133,62		
5'	CH	115,71	6,82 d (8)	C-6'
6'	CH	122,70	7,92 d (8)	C-2, C-2'
Glukoz				
1"	CH	101,78	5,23 d (7,4)	C-3
2"	CH	72,9	3,14 d	C-6"
3"	CH	76,3	3,01 m	C-4"
4"	CH ₂	68	3,00-3,70*	
5"	CH	76,9	3,00-3,70*	
6"	CH ₂	67,3	3,62 dd (11/2) 3,11 dd (11/5)	C-2"
Ramnoz				
1'''	CH	101,35	4,32 gs	C-6"
2'''	CH	70,54	3,00-3,70*	
3'''	CH	71,05	3,00-3,70*	
4'''	CH	72,26	3,00-3,70*	
5'''	CH	70,37	3,2	
6'''	CH ₃	18,15	0,92 d (6)	

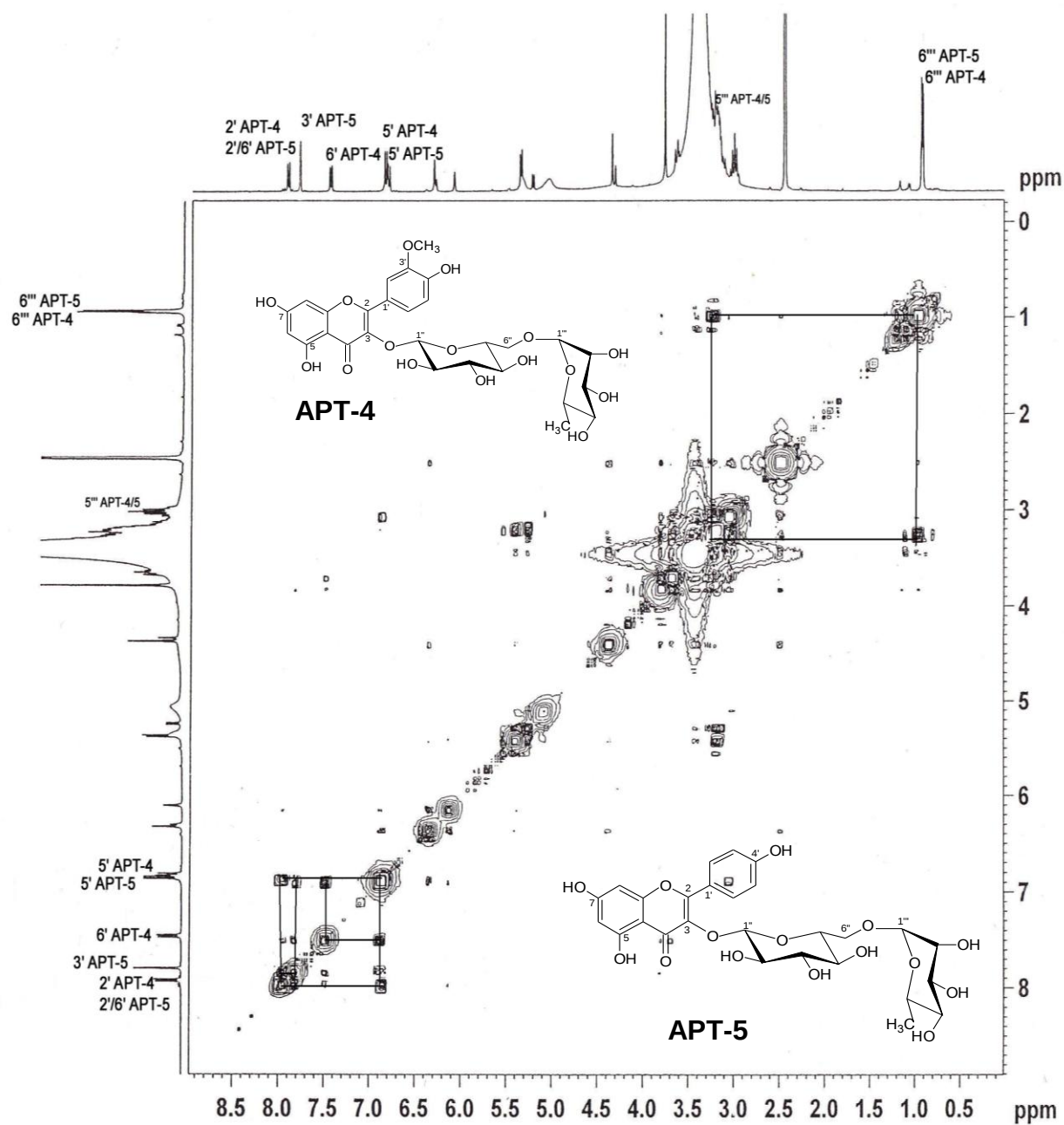
*: Solvan pikinin altında kaldığından hesaplanamamıştır.



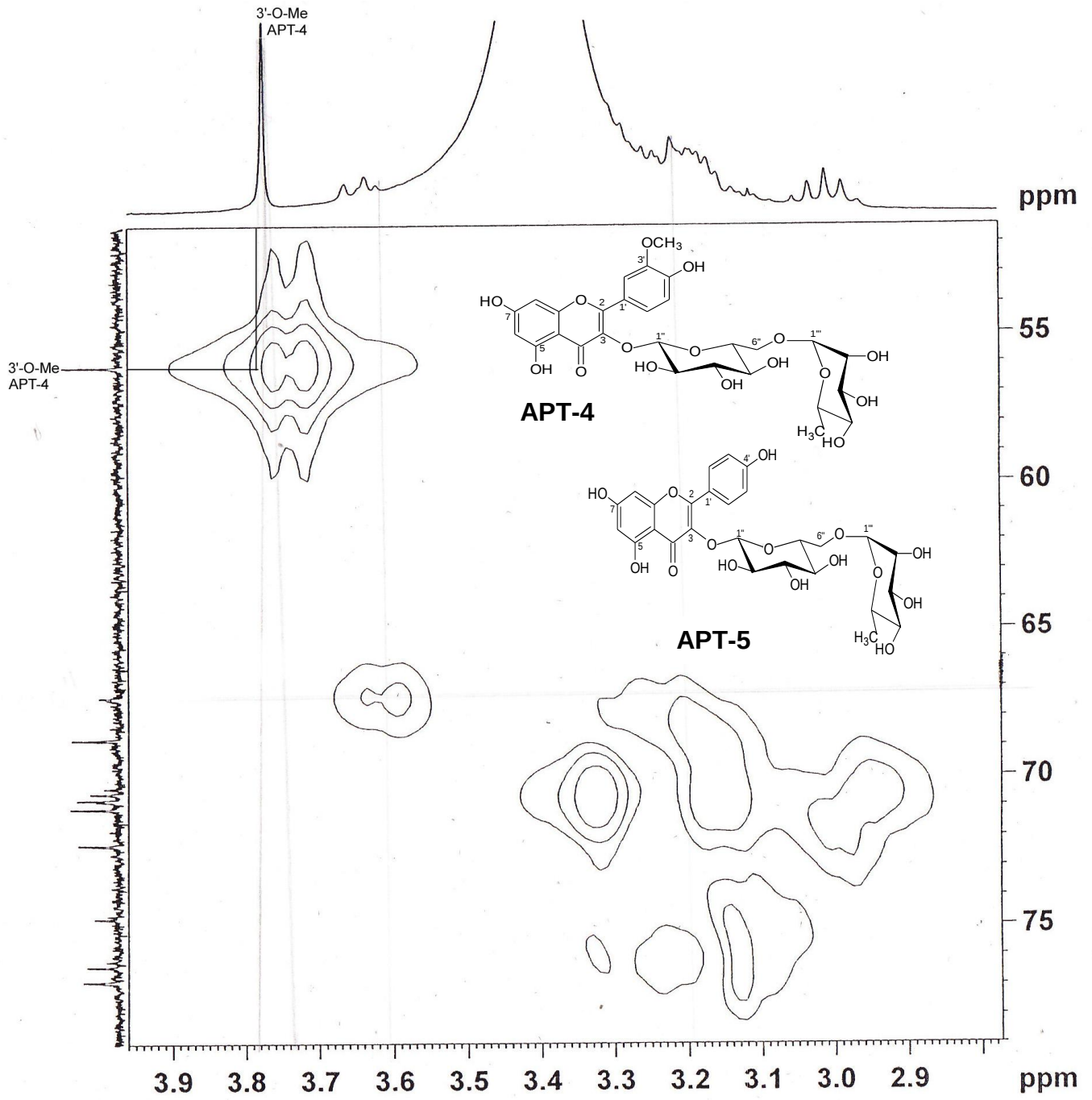
Spektrum 32. APT-4/5'in ^1H NMR Spektrumu (DMSO- d_6 , 400 MHz)



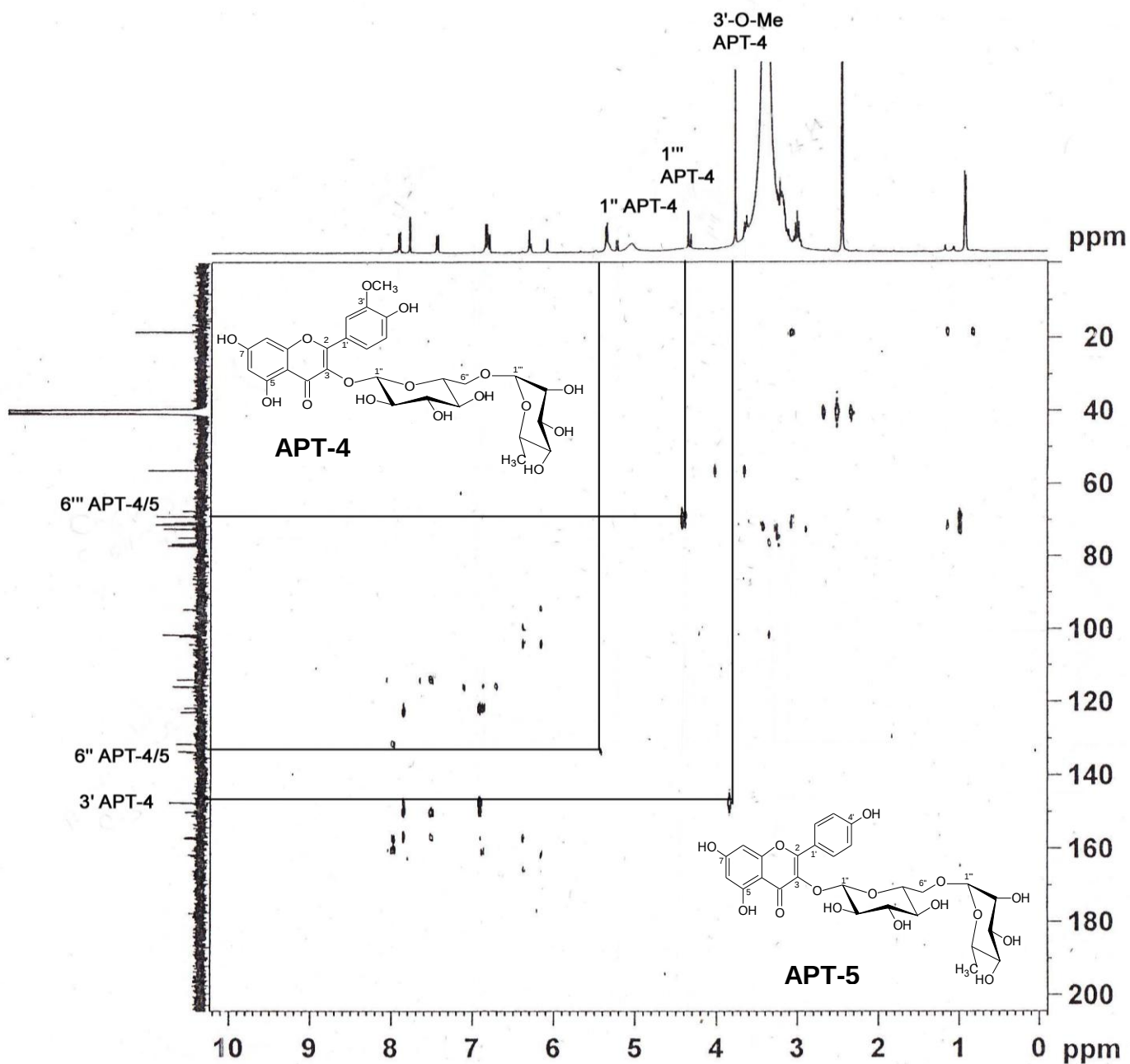
Spektrum 33. APT-4/5'in ^{13}C NMR ve DEPT Spektrumları (DMSO- d_6 , 100 MHz)



Spektrum 34. APT-4/5'in 2D ^1H , ^1H -Homonükleer Korelasyonlu Spektrumu (COSY)

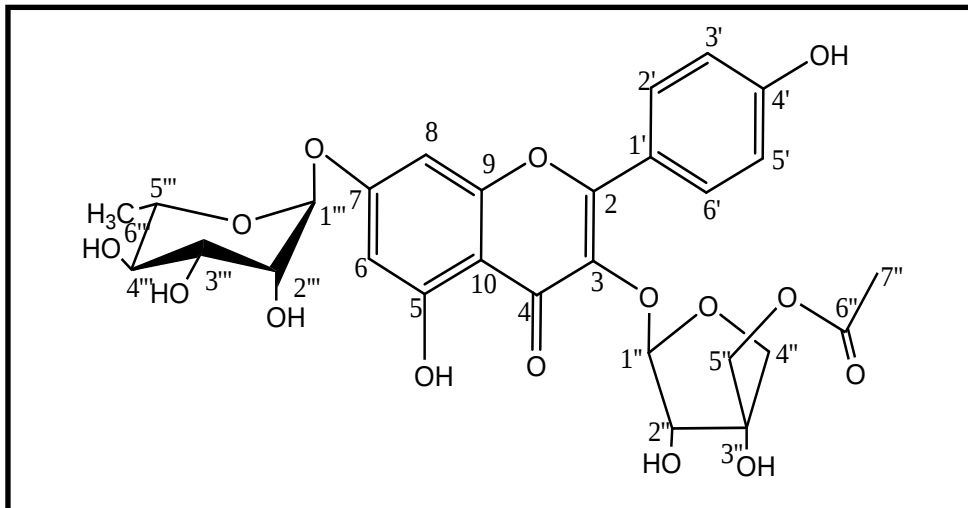


Spektrum 35. APT-4'ün 2D ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (yakın mesafe) NMR Spektrumu (HMQC)



Spektrum 36. APT-4/5'in 2D ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) Spektrumu (HMBC)

**Kemferol 3-O- β -(5''-asetil) apiofuranozit-7-O- α -ramnopiranozit
(APT-7)**



C₂₈H₃₀O₁₅ (MA 606)

UV $\lambda_{\text{maks.}}$ (MeOH) nm	IR $\nu_{\text{maks.}}$ (% 1 KBr) cm ⁻¹
228	1600 (C=C)
243	1680 (COOH)
267	3180-3400 (OH)
342	

ESI-MS (*m/z*)

:629 [M+Na]⁺

455 [M+Na-asetilapioz]⁺

¹H NMR Spektrumu (CD₃OD, 500 MHz)

: Spektrum 37

Tablo 31

DEPT ve ¹³C NMR Spektrumları (CD₃OD, 125 MHz)

: Spektrum 38

Tablo 31

2D ¹H,¹H-Homonükleer Korelasyonlu Spektrumları : Spektrum 39
(COSY)

2D ¹H,¹³C-Heteronükleer Korelasyonlu (yakın : Spektrum 40
mesafe) Spektrumu (HMQC)

2D ¹H,¹³C-Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) : Spektrum 41
Spektrumu (HMBC)

Tablo 31

2D ¹H,¹H-Homonükleer Korelasyonlu Spektrumu : Spektrum 42
(ROESY)

Sarı renkli, amorf toz görünümünde olan **APT-7** bileşiğinin İTK analizinde, UV₂₅₄'te açık sarı, UV₃₆₆'da koyu mor renk gözlenmiştir. Vanilin/H₂SO₄ reaktifi ile 105 °C'de 1-2 dakika ısıtılma sonucunda, bileşiğe ait lekede sarı-turuncu bir renklenme gözlenmesi bileşiğin flavonoit olabileceğini düşündürmüştür.

APT-7'nin UV spektrumunda, flavonoit yapısının sinnamoil sistemi (Bant I, 342 nm) ve benzoil sistemi (Bant II, 267 nm) için karakteristik iki absorpsiyon bandı ve IR spektrumunda ise karbonil (1680 cm⁻¹) ve hidroksil (3400 cm⁻¹) gruplarına ait bantlar görülmüştür. Kütle spektrumunda görülen [M+Na]⁺ *m/z* 629 piki bileşiğin kapalı formülünün **C₂₈H₃₀O₁₅** olduğunu göstermiştir.

Bileşiğin ¹H NMR spektrumunda (Spektrum 37, Tablo 31), δ_H 5,56 (gs) ve δ_H 5,70 (d)'de iki oza ait anomerik proton sinyalleri görülmüştür. δ_H 5,70'te dublet şeklinde gözlenen ve kenetlenme sabiti değeri 1,5 olan beş karbonlu ozun apioz; δ_H 5,56'da geniş singlet şeklinde gözlenen ozun ise yapısında bir metil grubu (δ_H 1,26) taşıyan α-ramnoz olduğu anlaşılmıştır.

Meta etkileşim (*J*= 2 Hz) gösteren iki protona (H-6 ve H-8) ait olan dublet sinyaller (δ_H 6,45 ve 6,72) ve AB sistemi gösteren B halkasındaki H-2'/6'[δ_H 7,85 d (2H), *J*= 8,7 Hz] ve H-3'/5'[δ_H 6,91 d (2H), *J*= 8,7 Hz] sinyalleri gözlenmiştir. COSY spektrumunda H-2'ile H-3' ve H-5'ile H-6'sinyalleri arasında korelasyon gözlenmiştir. ¹³C NMR spektrumunda (Spektrum 38, Tablo 31) görülen 15 karbon sinyali **APT-7** bileşiğinin aglikonunun 3,7 disüstitüe kemferol yapısında olduğuna işaret etmiştir.

HMBC spektrumunda (Spektrum 41, Tablo 31) α-ramnoza ait olan δ_H 5,56'daki anomerik proton sinyali δ_C 163,7 (C-7)'deki karbon ile uzak mesafeli etkileşimi α-ramnozun aglikona bağlantısının 7. konumdan olduğunu göstermiştir. Apiozun anomerik protonuna ait δ_H 5,70'deki sinyalin ROESY spektrumunda (Spektrum 42) H-2'/H-6'protonları ile korelasyon göstermesi ise apiozun bu bileşiğe aglikonun 3 numaralı konumundan bağlı olduğunu kanıtlamıştır.

¹³C NMR spektrumunda δ_C 172,7'de gözlenen karbonil sinyali ve δ_C 20,8'de görülen metil sinyali yapıda bir asetil grubunun varlığına işaret

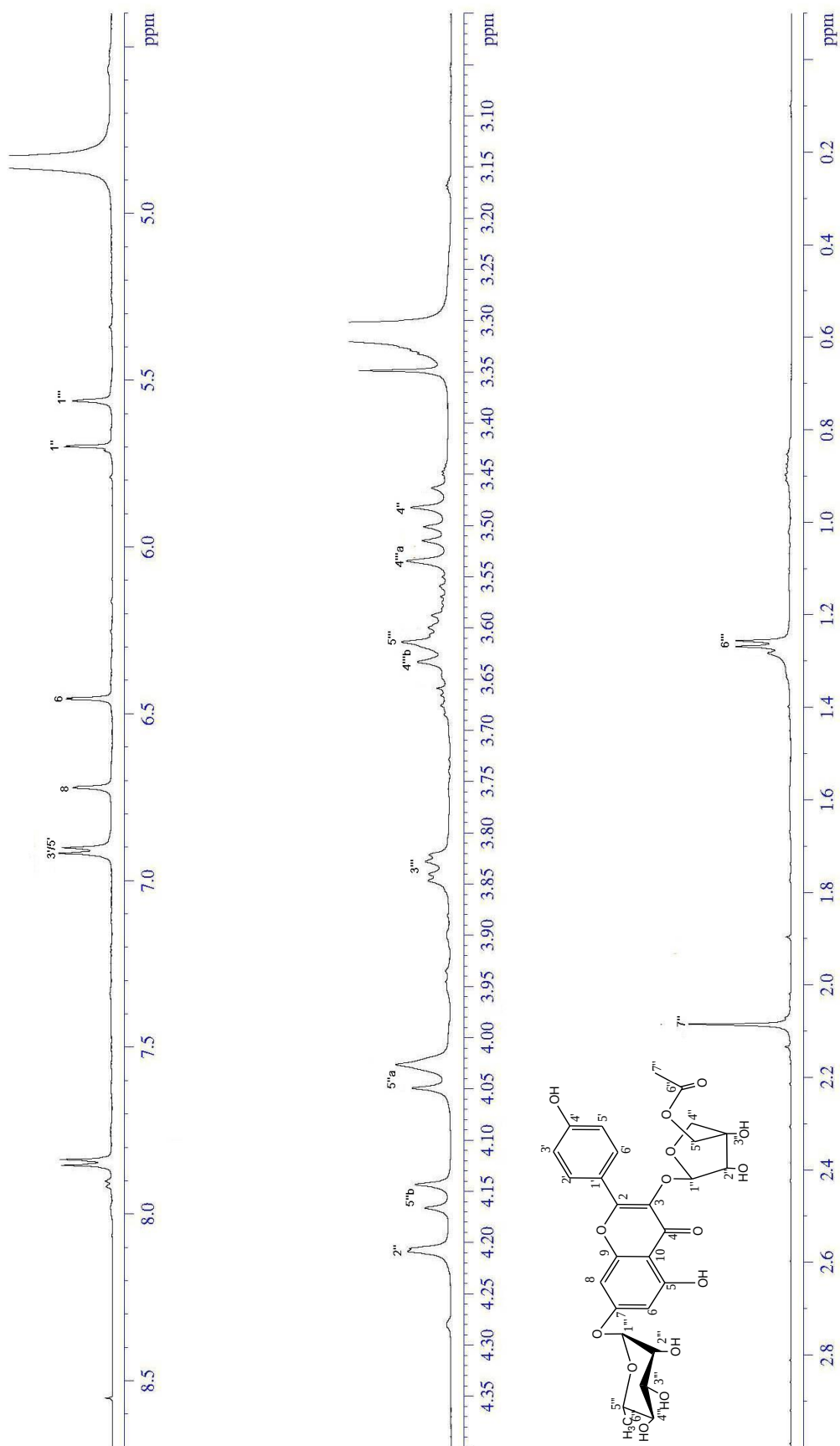
etmiştir. δ_C 172,7 sinyali ile δ_H 4,04 (d, $J= 11,5/-$) ve δ_H 4,15 (d, $J= 11,5/-$)'deki H_2-5'' protonları ve δ_H 2,09 H_3-7'' protonları arasında HMBC spektrumunda gözlenen etkileşme asetil grubunun apiozun 5. konumundan grubuna bağlı olduğunu göstermiştir

Elde edilen tüm veriler ve yapılan literatür taramaları sonucunda bileşiğin yapısının **Kemferol 3-O- β -(5''-asetil) apiofuranozit-7-O- α -ramnopiranozit olduğu** bulunmuştur (109) .

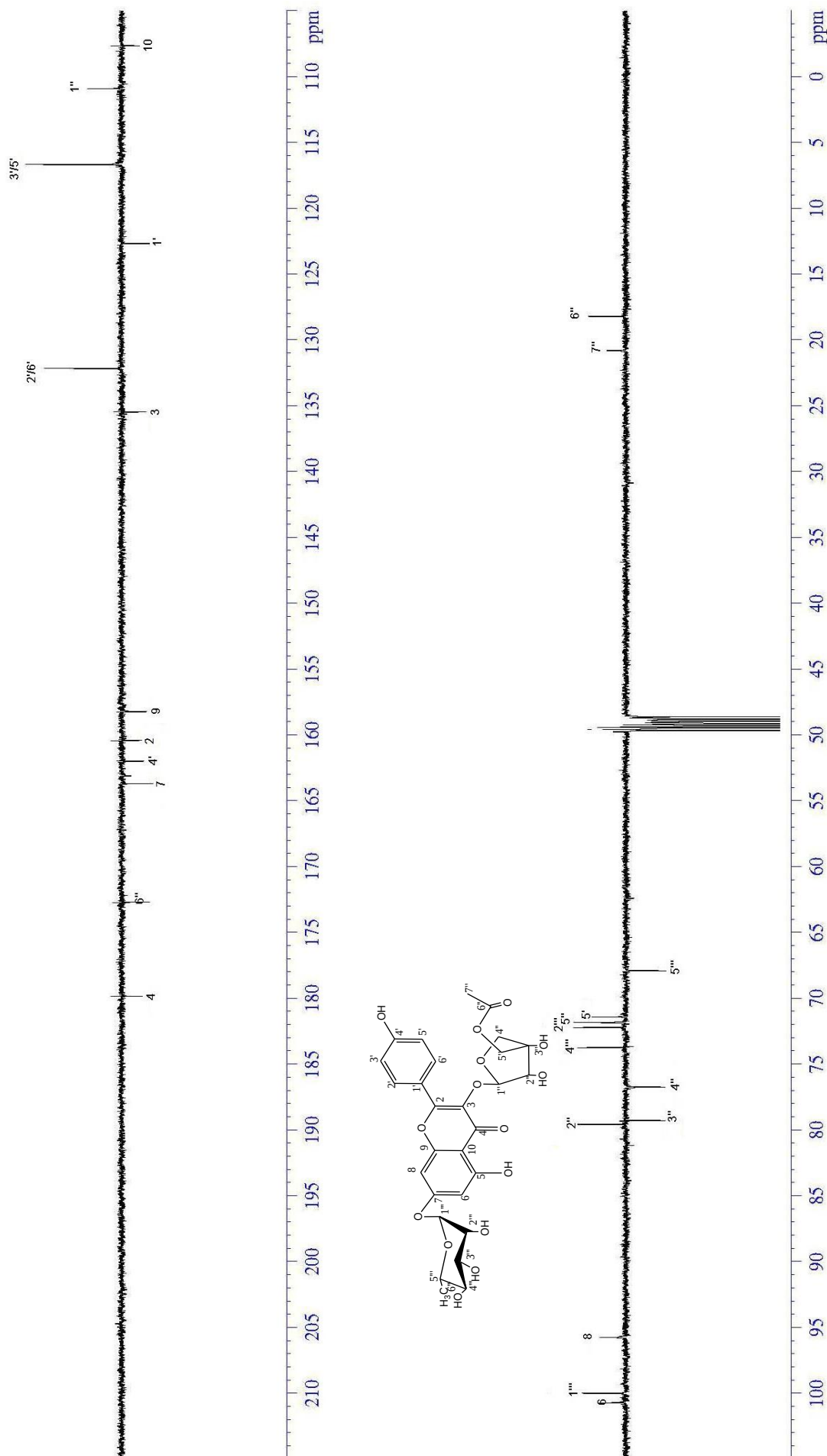
Tablo 31. Kemferol 3-O-β-(5"-asetiloksi) apiofuranozit-7-O-α-ramnopiranozit bileşiminin ¹³C (CD₃OD, 125 MHz) NMR ve ¹H (CD₃OD, 500 MHz) NMR spektroskopik değerleri

C/H	DEPT	δ _C (ppm)	δ _H (ppm), J (Hz)	HMBC (H→C)
2	C	160,4		
3	C	135,5		
4	C	179,9		
5	C	163,1		
6	CH	100,7	6,45 d (2)	C-7, C-5, C-10, C-8
7	C	163,7		
8	CH	95,8	6,72 d (2)	C-7, C-9, C-10, C-6
9	C	158,3		
10	C	107,7		
1'	C	122,7		
2', 6'	CH	132,2	7,85 d (8,7)	C-4', C-9, C-2'/C-6'
3', 5'	CH	116,7	6,91 d (8,7)	C-4', C-1', C-3'/5'
4'	C	162,0		
Apioz				
1"	CH	110,9	5,70 d (1,5)	C-2", C-3", C-4"
2"	CH	79,6	4,21 d (1,5)	C-1", C-5"
3"	C	79,3		
4"	CH ₂	76,8	4a: 3,52 d (9,9) 4b: 3,62 d (9,9, *)	C-2", C-3" C-1", C-2", C-3"
5"	CH ₂	67,9	5a: 4,04 d (11,5, *) 5b: 4,15 d (11,5)	C-2", C-3", C-4", C-6" C-2", C-3", C-4", C-6"
OAc				
6"	C	172,7		
7"	CH ₃	20,8	2,09 s	C-7"
Ramnoz				
1'''	CH	100,0	5,56 gs	C-7, C-3''', C-5'''
2'''	CH	71,85	4,03 *	C-3''', C-4'''
3'''	CH	72,2	3,84 dd (9,5/3,4)	C-4'''
4'''	CH	73,8	3,48 t (9,5)	C-3''', C-5''', C-6'''
5'''	CH	71,4	3,61 *	C-4'''
6'''	CH ₃	18,2	1,26 d (6,2)	C-4''', C-5'''

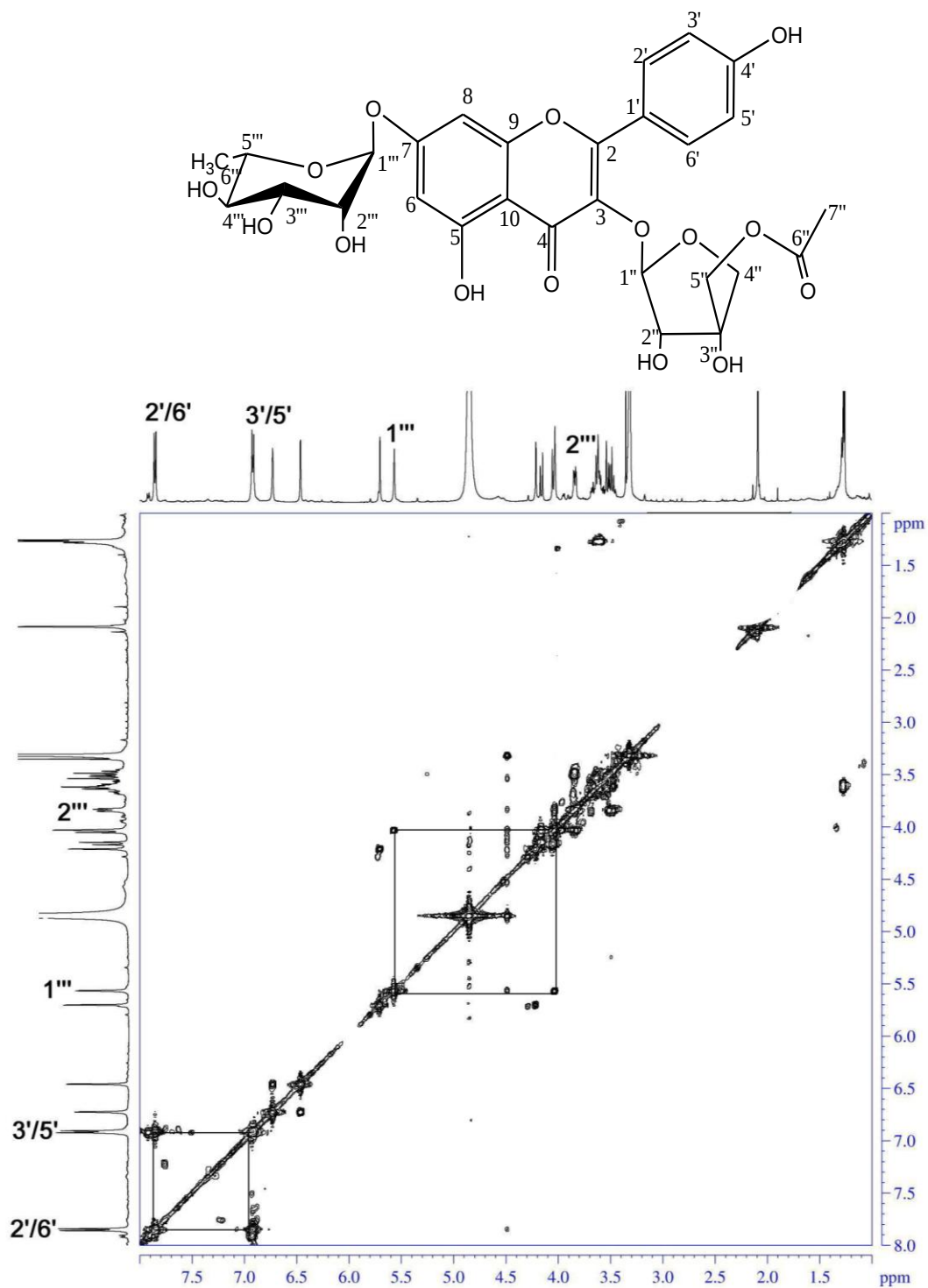
*: Sinyal girişimi nedeni ile saptanamamıştır



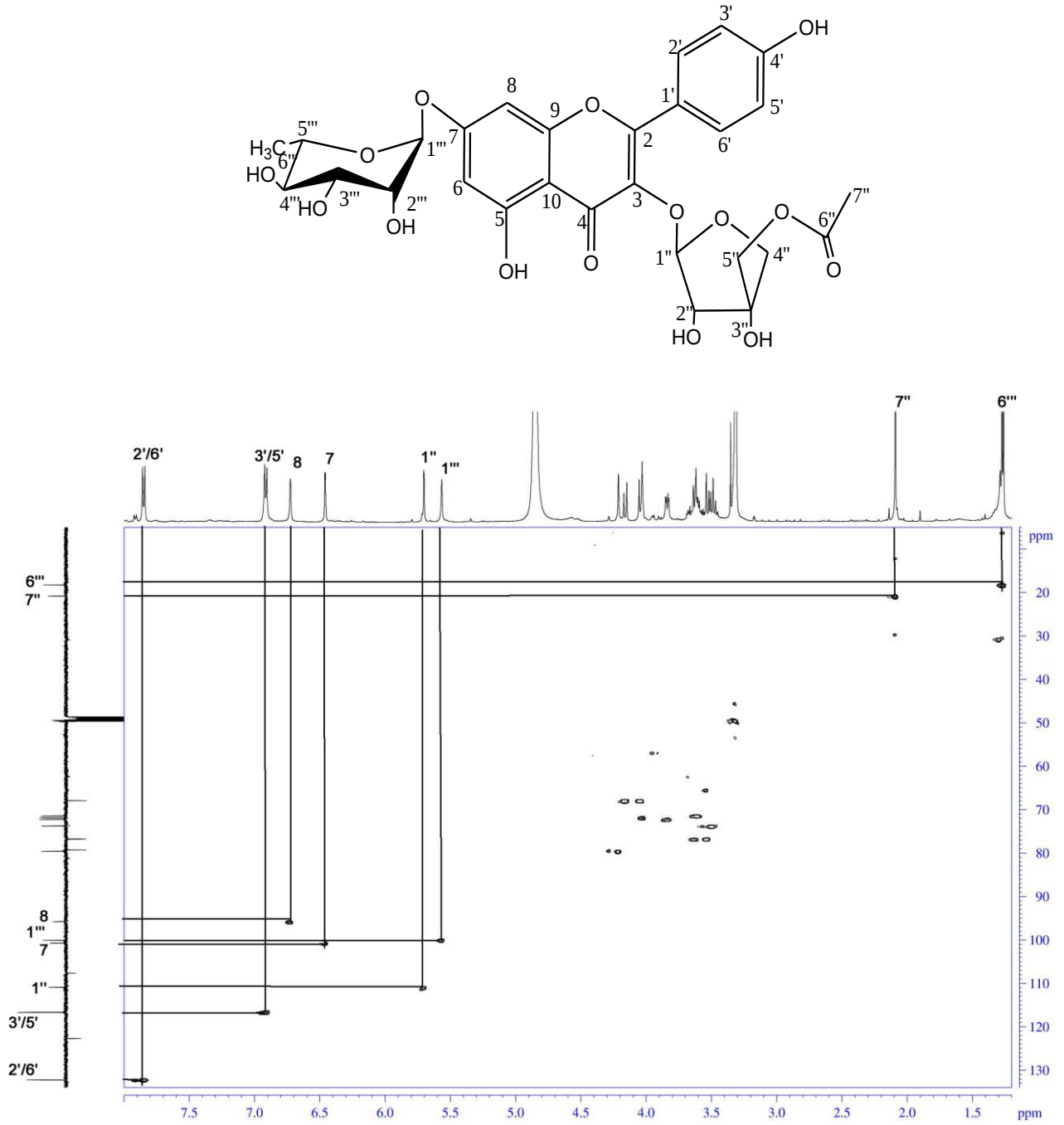
Spektrum 37. APT-7'nin ^1H NMR Spektrumu (CD_3OD , 500 MHz)



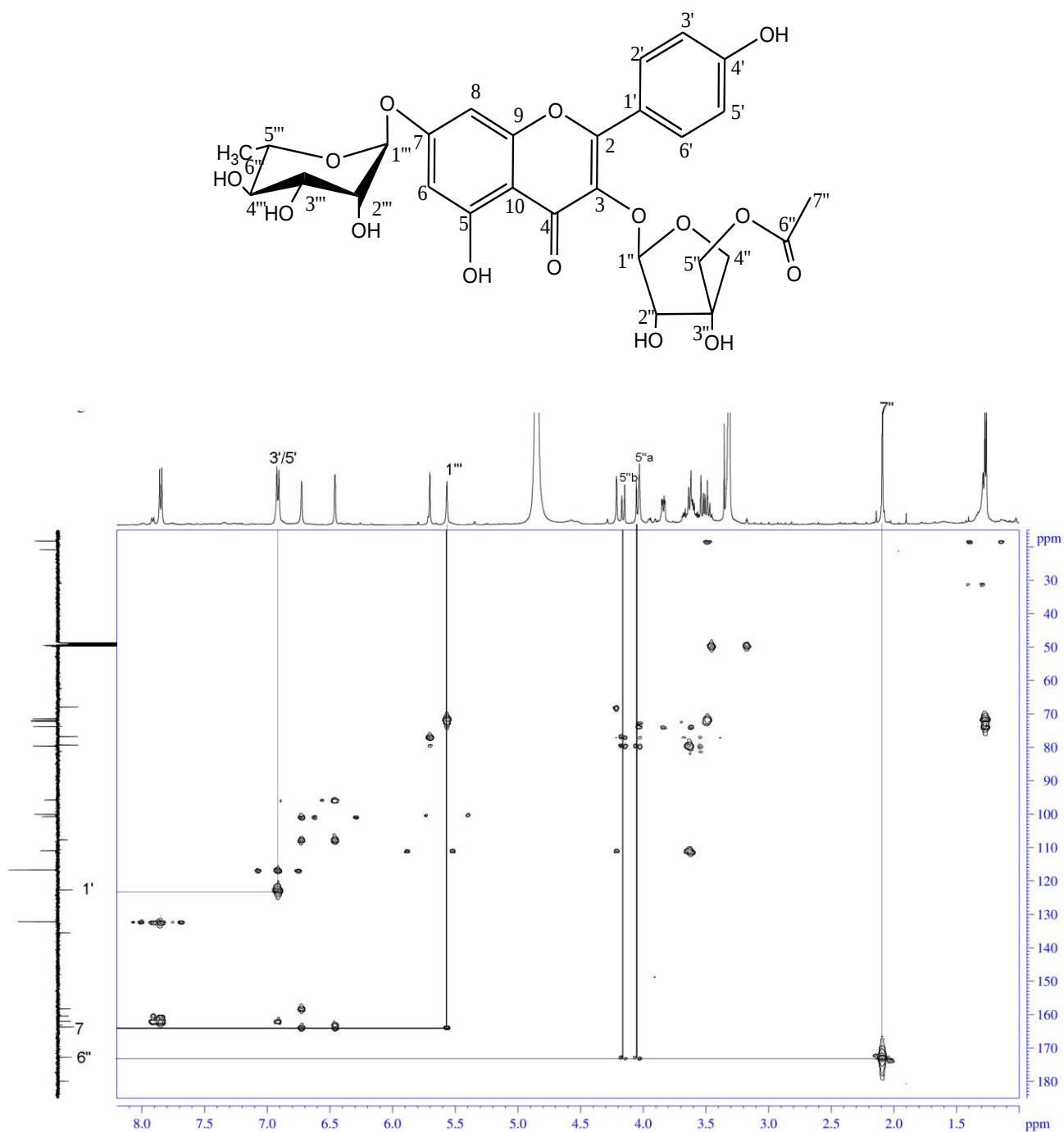
Spektrum 38. APT-7'nin ^{13}C NMR ve DEPT Spektrumları (CD_3OD , 125 MHz)



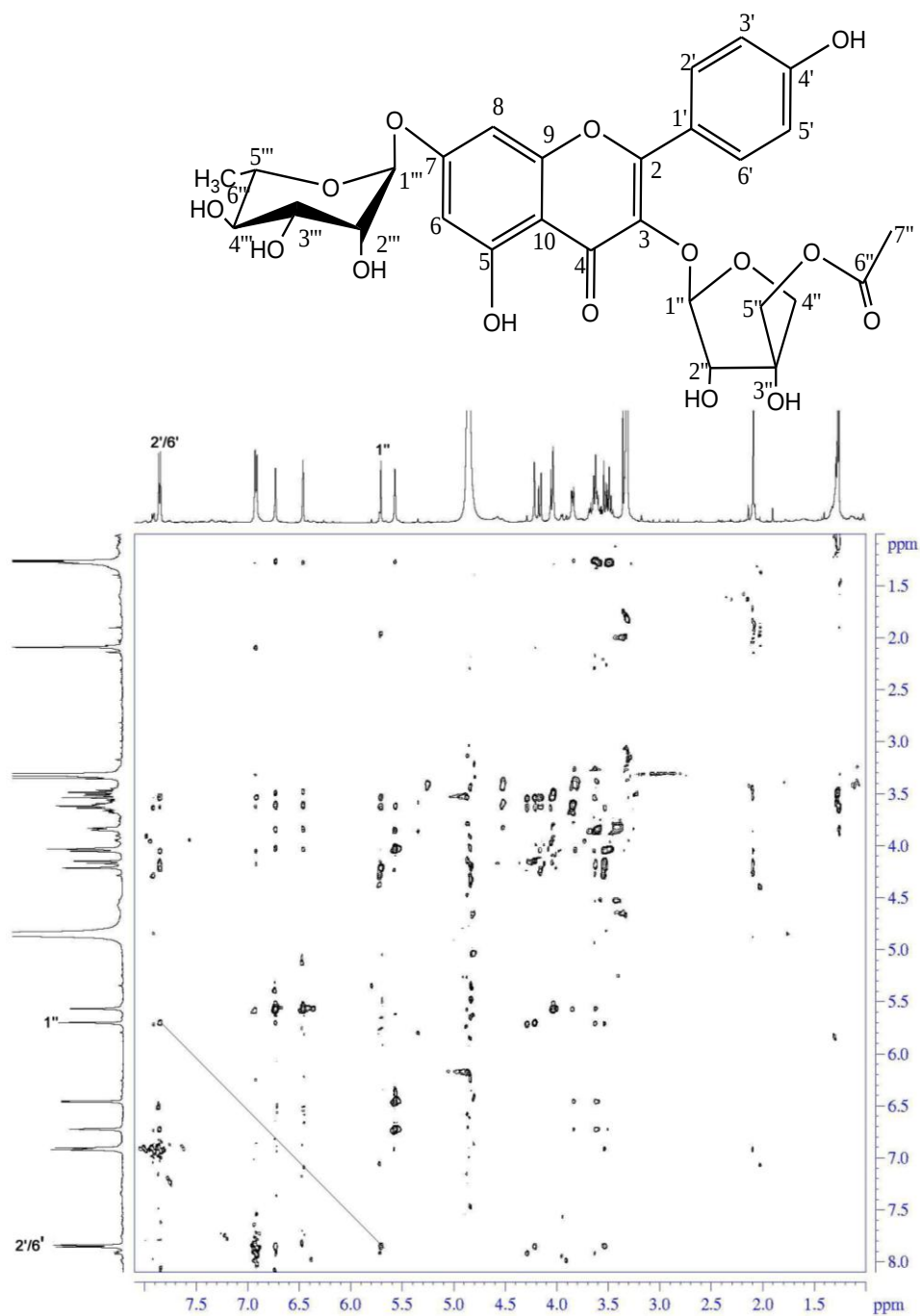
Spektrum 39. APT-7'nin 2D ^1H , ^1H -Homonükleer Korelasyonlu Spektrumu (COSY)



Spektrum 40. APT-7'nin 2D ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (yakın mesafe) NMR Spektrumu (HMQC)



Spektrum 41. APT-7'nin 2D ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) Spektrumu (HMBC)



Spektrum 42. APT-7'nin 2D ^1H , ^1H -Homonükleer Korelasyonlu Spektrumu (ROESY)

4.2. Sitotoksik Aktivite Çalışmasına Ait Bulgular

Arnebia purpurea'nın kök ve topraküstü kısımlarından elde edilen ve kimyasal yapısı saptanan tüm maddelerin sitotoksitesisi MTT yöntemi kullanılarak fare fibrosarkoması (L929) hücre serilerinde tayin edilmiştir. (Tablo 32, Resim 2)

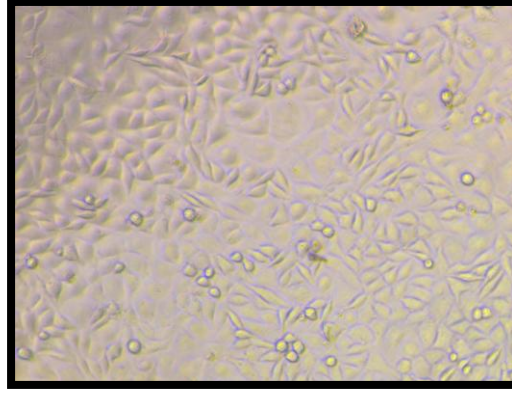
Bileşiklerin yüksek (**50 µg/ml**) ve alçak (**10 µg/ml**) olarak belirlenen konsantrasyonlardaki % inhibisyonları aşağıdaki gibidir:

Tablo 32. *Arnebia purpurea*'dan elde edilen sekonder metabolitlerin sitotoksik aktivite sonuçları

Madde	50 µg/ml'deki % İnhibisyon	10 µg/ml'deki % İnhibisyon
APK-3	98,52	96,67
APK-4	97,41	93,52
APK-5	97,67	94,45
APK-6	65,93	30,12
APK-7	43,70	21,11
APT-1	13,15	5,56
APT-4	†	†
APT-7	17,59	1,72

†: %inhibisyon değeri saptanamamıştır

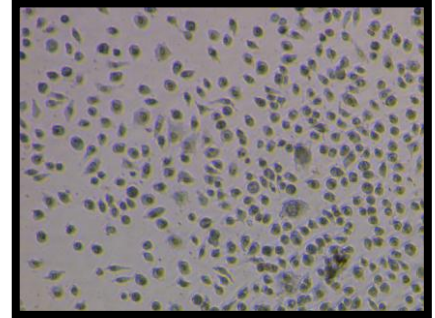
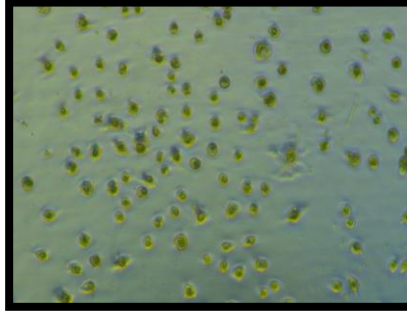
Kontrol
(0 µg/ml madde)



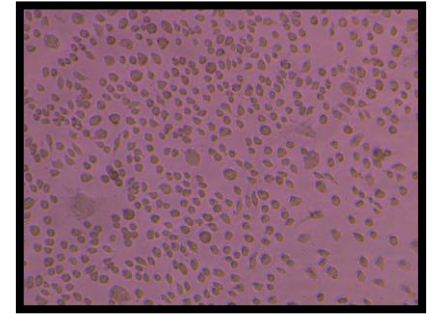
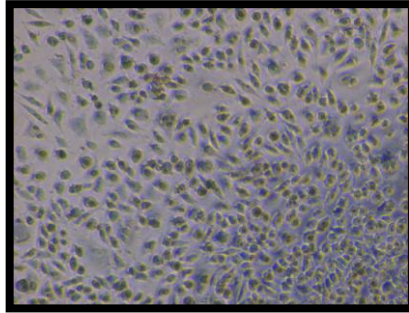
10 µg/ml Konsantrasyon

50 µg/ml Konsantrasyon

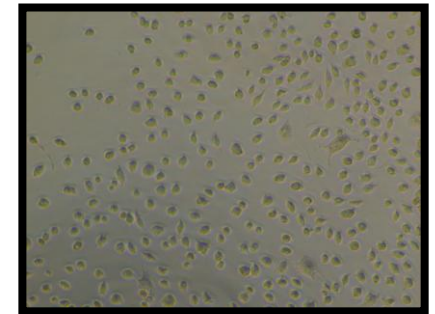
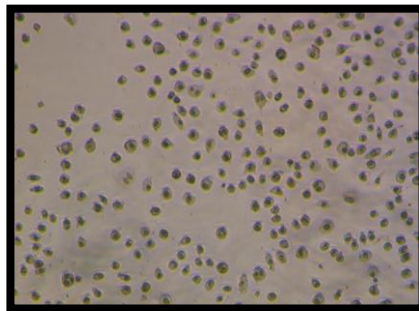
APK-3/8/9



APK-4



APK-5



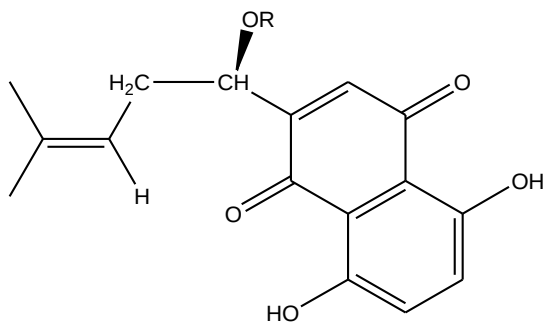
Resim 2. *Arnebia purpurea*'dan Elde Edilen Naftokinonların L929 Hücrelerine Karşı Sitotoksik Aktivitesi

5. TARTIŞMA

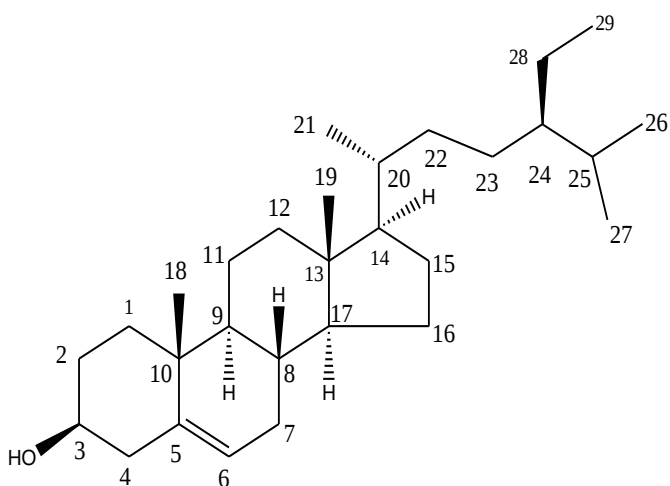
Arnebia (Boraginaceae) cinsinin Türkiye’de yetişen bir tanesi endemik 5 türü bulunmaktadır. Kökleri halk arasında yara, yanık ve nasır tedavisinde ve kökboyası olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda, özellikle taşıdıkları alkannin ve şikonin türevi naftokinonların yara iyi edici, antienflamatuvar ve güçlü sitotoksik etkileri olması nedeniyle *Arnebia* türleri üzerinde yapılan çalışmalar artış göstermiştir (15,17,95,106,121). Dünyada *Arnebia* türlerinin tek veya başka bitkilerle kombine halde özellikle yara ve yanık iyi edici etkileri nedeniyle hazırlanan preparatları çoğunlukta olmak üzere kayıtlı 176 tane patenti bulunmaktadır (29).

Çalışmamızda Türkiye’de endemik olarak yetişen ve üzerinde daha önce kimyasal ve biyolojik aktivite yönünden çalışma yapılmamış olan *Arnebia purpurea* bitkisinin kökleri ve topraküstü kısımları ayrı ayrı fitokimyasal yönden incelenmiştir ve fitokimyasal çalışmalar sonucunda elde edilen saf maddelerin sitotoksik aktivitelerine bakılmıştır.

Planlanan çalışma sonucunda köklerden üç tanesi karışım halinde toplam 5 naftokinon (izovalerilalkannin: **APK-3** + α -metil-*n*-butil alkannin: **APK-8** + izobutilalkannin: **APK-9**, asetilalkannin: **APK-4** ve alkannin **APK-5**); 1 steroid yapılı bileşik (β -sitosterol: **APK-6**); 1 triterpen (3-*O*-asetiloleanolik asit: **APK-7**); topraküstü kısımlarından ise ikisi karışım halinde 3 flavonoit glikoziti (izoramnetin 3-*O*-rutinozit: **APT-4** + kemferol-3-*O*-rutinozit: **APT-5**, kemferol 3-*O*-(5"-asetil)apiofuranozit 7-*O*- α -ramnopiranozit: **APT-7**) ve 1 fenolik asit (rozmarinik asit: **APT-1**) izole edilmiş ve kimyasal yapıları spektroskopik yöntemler kullanılarak [UV, IR, ESI Kütle, 1D ve 2D NMR (COSY, NOESY, ROESY, HMQC ve HMBC)] saptanmıştır. MTT deneyinde, naftokinonlar başta olmak üzere steroid ve triterpenin L929 kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkisi bulunmuştur.

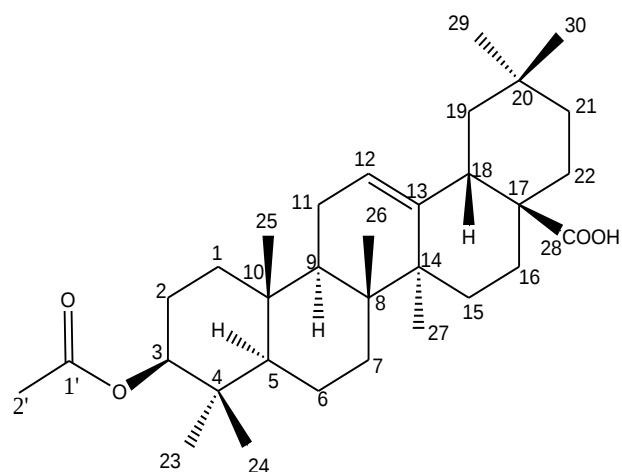


Bileşik	R
APK-3 (İzovalerilalkannin)	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
APK-4(Asetilalkannin)	OCOCH ₃
APK-5 (Alkannin)	H
APK-8 (α-Metil- <i>n</i> -butil alkannin)	OCOCH(CH ₃)CH ₂ CH ₃
APK-9 (İzobutilalkannin)	OCOCH(CH ₃)



APK-6

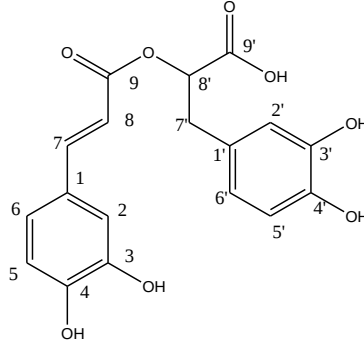
(β-Sitosterol)



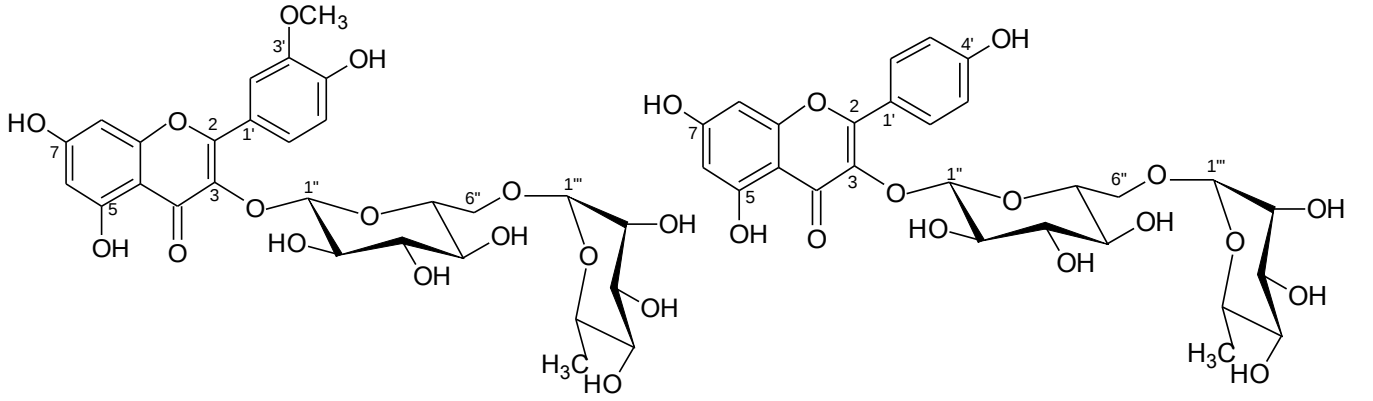
APK-7

(3-Asetoksi olean 12-en-28-oik asit)

Şekil 1. *Arnebia purpurea* kök *n*-hekzan ekstresinden elde edilen maddeler

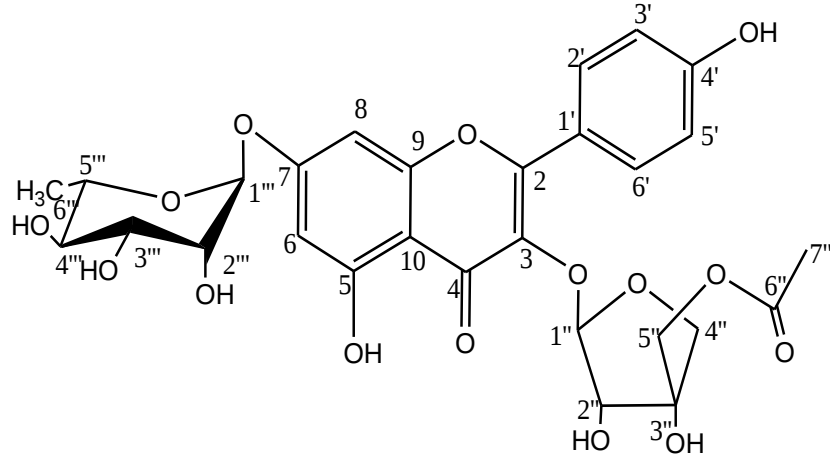


APT-1 (Rozmarinik Asit)



APT-4 (İzoramnetin 3-O-rutinozit)

APT-5 (Kemferol 3-O-rutinozit)



APT-7 (Kemferol 3-O-(5''-asetil)apiofuranozit 7-O-α-ramnopiranozit)

Şekil 2. *Arnebia purpurea* topraküstü metanol ekstresinden hazırlanan su ekstresinden elde edilen maddeler

n-Hekzan ekstresinden bir karışım olarak elde edilen **APK-3**, **APK-8** ve **APK-9** ile **APK-4** ve **APK-5** bileşikleri İTK'da revelatör püskürtülmeden koyu kırmızı lekeler vermişlerdir. Vanilin/H₂SO₄ reaktifi püskürtüldükten sonra 105 °C de ısıtılması sonucunda koyu kırmızı renkten grimsi-mavi renge dönmüşlerdir. Bileşiklerin UV spektrumlarında gözlenen 272-273 nm'de kinonik karbonil ve 484-513 nm'de benzen bantları, IR spektrumlarında gözlenen 3400 cm⁻¹ de hidroksile ait geniş bant, 1730-1738 cm⁻¹ de ester karboniline ait bant ve 1620 cm⁻¹ de kinonik karbonile ait bantlar bu bileşiklerin naftokinon türevi olduklarını düşündürmüştür.

Bu bileşiklerin ¹H NMR ve ¹³C-NMR spektrumuna bakıldığında (Spektrum 1, Spektrum 2, Spektrum 6, Spektrum 7, Spektrum 11, Spektrum 12, Tablo 21-25) 1,8-dihidroksi-1,4 naftokinon halkasına ait 3 adet CH proton sinyali δ_H 6,99-7,17 (s, H-3), 7,18-7,21 (s, H-6) ve 7,18-7,19 (s, H-7) arasında , karbon değerleri ise δ_C 131,4-132,4 (C-3), δ_C 132,3-133,1 (C-6), δ_C 131,9-132,9 (C-7) değerleri arasında gözlenmiştir. Bu halkadaki 2 karbonil pikine ait değer ise δ_C 178,26-179,8 (C-1) ve δ_C 176,6-180,6 (C-4) arasında çıkmıştır. Yapıda bulunan C-OH bağı gösteren karbon pikleri ise δ_C 165,5-167,2 (C-8), δ_C 164,8 -167,4 (C-5) değerleri arasında görülmüştür. Tüm bileşiklerin HMBC spektrumunda (Spektrum 5, Spektrum 10, Spektrum 15, Tablo 21-25) H-11 protonları ile C-2 karbonu arasında gözlenen uzak mesafe etkileşimi 1,8-dihidroksi-1,4 naftokinon halkasına 2 numaralı konumdan bağlı bir yan zincir olduğunu göstermiştir. Yan zincire ait 2 CH, 1 CH₂, 1 C ve 2 CH₃ karbonları δ_C 68,39-69,76 (C-11), δ_C 32,98-35,69 (C-12), δ_C 117,80-118,45 (C-13), δ_C 135,97-137,40 (C-14), δ_C 25,75-26,01 (C-15) ve δ_C 17,94-18,18 (C-16)'de görülmüştür. δ_C 117,80-118,45 ve δ_C 135,97-137,40'ta çıkan karbonlar ve HMQC spektrumunda (Spektrum 4, Spektrum 9, Spektrum 14) gözlenen C-13 karbonuna ait proton değerinin δ_H 5,12-5,21 arasında olması bu iki karbonun alken yapısında olduğunu doğrulamıştır. Bileşiklerin HMBC spektrumunda başlıca H-11, H-15 ve H-16 ile C-13; H-3 ile C-11; H-6 ve H-7 ile C-8 ve C-9; H-11 ile C-3; H-12 deki protonlar ile C-11 ve C-14 arasındaki etkileşimler ile yan zincirin yapısı aydınlatılmış ve elde edilen bulgular literatür verileriyle

karşılaştırıldığında **APK-5**'in C-11 nonsübstitüe **alkannin** olduğu (133), **APK-3/8/9** ve **APK-4**'ün ise C-11 sübstitüe alkannin yapısında olduğu saptanmıştır (Tablo 33).

Tablo 33. APK-3,4,8,9'un C-11'den sübstitüe gruplarının ^1H (400 MHz, CDCl_3) ve ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) değerleri (ppm)

C/H	APK-3		APK-4		APK-8		APK-9	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1'	-	171,8	-	170	-	175,4	-	175,4
2'	2,23/ 2,25	43,38	2,14	21,2	2,48	41,22	2,63	34,0
3'	2,13	25,77	-	-	1,60	26,63	1,22	18,85
4'	0,97	22,35	-	-	0,91	11,61	1,21	18,96
5'	0,98	22,38	-	-	1,20	16,15	-	-

APK-3/8/9 ve **APK-4** bileşiklerinin yapıları, HMBC spektrumlarında C-11 ile H-2' arasında görülen etkileşim ile 11. konumdan bağlı olduğu anlaşılan yan zincire ait rezonans değerleri, 1D, 2D (HMQC HMBC COSY) NMR metotları kullanılarak ve literatür bulguları ile karşılaştırılmaları sonucunda daha önce *Arnebia* türlerinden elde edilmiş olan alkannin türevlerinden (**APK-3**) izovaleril alkannin (5); (**APK-8**) α -metil-*n*-butil alkannin (5,101).; (**APK-9**), izobutil alkannin (5,41) ve (**APK-4**), asetilalkannin (5) olarak bulunmuştur.

Polarimetrede yapılan optik çevirme ölçümü sonucu bileşiklerin polarize ışığı sola çevirdiği ve alkannin türevi oldukları tespit edilmiştir.

Boraginaceae familyasındaki cinslerin hem alkannin hem şikonin türevlerini taşıdığı bilinmekle birlikte, daha önce yapılan araştırmalarda özellikle Avrupa ve Türkiye'deki örneklerin alkannin, Doğu'daki ülkelere ait örneklerin ise şikonin taşıdığı saptanmıştır (5). Elde edilen maddelerin optikçe çevirme açıları da bu sonucu doğrulamıştır.

Bitkinin kök *n*-hekzan ekstresinden elde edilen **APK-6** bileşiğinin İTK analizinde revelatör püskürtülüp 105°C de ısıtıldığında mor renk gözlenmiştir. UV spektrumundaki absorpsiyonlar 215, 296, 321 nm iken, IR spektrumunda 3415 cm⁻¹ (OH), 2960 cm⁻¹ (CH₂) bantları görülmüştür. 1D, 2D NMR bulgularının yardımıyla bileşiğin kapalı formülü **C₂₉H₅₀O** olarak hesaplanmıştır.

Bileşiğin taşıdığı 29 karbon steroidal bir sapogenol varlığına işaret etmiştir. ¹H ve ¹³C NMR spektrumunda (Spektrum 17, Spektrum 18, Tablo 26) 6 metil, 11 metilen, 3 katerner karbon bulunduğu görülmektedir. ¹H spektrumunda δ_H 0,69-1,01 arasında gözlenen 6 adet metil rezonansına karşılık gelen karbonlar HMQC spektrumunda (Spektrum 20) δ_C 11,18-20,98 arasında bulunmuştur. 5,35 ppm (dt, *J*=5,4/1,9, H-6) de gözlenen olefinik proton rezonansı ve ¹³C spektrumunda gözlenen δ_C 121,7 (C-6) ve δ_C 140,8 (C-5) de gözlenen olefinik proton rezonansları molekül üzerinde bir çifte bağ varlığını göstermektedir. HMBC spektrumunda (Spektrum 21, Tablo 26) başlıca H-1 ile C-3, H-4 ile C-3, C-5 ve C-6, H-2 ile C-10, H-7 ile C-9 ve C-10, H-18 ile C-9 ve C-10, H-21 ile C-14 protonları arasında uzak mesafe etkileşimleri görülmüştür.

Elde edilen sonuçlar literatürdeki veriler ile karşılaştırıldığında **APK-6** bileşiğinin yapısı daha önce *Arnebia* türlerinden elde edilmiş olan β-sitosterol olarak saptanmıştır (41).

Bitkinin köklerinin *n*-hekzan ekstresinden elde edilen ve yapısı aydınlatılan son bileşik **3-O-oleanolik asit asetat (APK-7)** dir.

Beyaz renkli, amorf bir toz olan **APK-7** bileşiğinin, İTK analizinde, revelatör püskürtmeden UV₂₅₄ nm'de floresan vermemesi ve UV₃₆₆ nm'de kırmızı görülmesi, %1'lik vanilin / sülfürik asit püskürtülüp ısıtılınca zamanla solan, pembe/mor renk vermesi ve UV spektrumunda λ_{maks} 229 nm de gözlenmiş olan absorpsiyon maksimumu bu yapının triterpenik olabileceğini düşündürmüştür. Bileşiğin IR spektrumuna bakıldığında, hidroksil grubu (3400 cm⁻¹) ve olefinik çifte bağa ait (1540 cm⁻¹) absorpsiyon bantları gözlenmiştir.

APK-7 bileşiğinin DEPT ve ¹³C NMR spektrumlarına (Spektrum 23, Tablo 27) bakıldığında, 8 tane metil, 10 tane metilen, 5 metin ve 9 katerner karbon atomuna ait toplam 32 tane sinyal belirlenmiştir. 122,7 ve 143,7 ppm de çıkan çifte bağ gösteren karbon pikleri, δ_C 181,5'ta görülen karboksilik asite ait pik ve bileşiğin HMQC spektrumunda (Spektrum 24), yedi metil grubu ve ilgili karbon atomları arasındaki ¹H-¹³C korelasyon, bileşiğin oleanolik asit olduğunu göstermiştir. Metil gruplarına ait rezonanslar ve bağlı bulundukları karbonlar; δ_H 0,87 (C-24), 0,86 (C-23), 0,94 (C-29), 0,97 (C-30, C-26) ve 1,05 (C-27) olarak saptanmıştır. 30 karbonlu oleanolik asit yapısını gösteren sinyaller haricinde, ¹³C NMR spektrumunda 171,2 ppm de görülen karbonile ait pik ve ¹H NMR spektrumunda (Spektrum 23, Tablo 27) 2,05 ppm de çıkan metile ait pik bileşiğin yapısına bir asetil grubunun süstitüe olduğunu göstermiştir. HMQC spektrumunda, δ_H 4,48'de (dd $J=13,3/5$ Hz) görülen metin pikinin, 79,2 karbonuyla etkileştiği görülmüş ve bu proton asetoksi grubuna komşu olduğu için spektrumda düşük alana kayan 3 numaralı karbon atomuna atfedilmiştir. ¹H NMR spektrumunda, δ_H 5,35 ppm'de gözlenen geniş singlet pike ait protonun üzerinde bulunduğu karbon atomu, HMQC spektrumundan 122,8 ppm olarak belirlenmiş ve bu proton, H-12 (CH)'ye atfedilmiştir.

APK-7 bileşiğinin, ^{13}C spektrumunda görülen ve 20 numaralı karbon atomuna atfedilen 30,8 ppm'deki sinyal, HMBC spektrumunda (Spektrum 25, Tablo 27) 0,94 ppm (H-29)'deki protonla etkileşme göstermektedir ve bu karbon sinyalinin ^{13}C NMR ve DEPT spektrumlarından da katerner bir yapıda olduğu ve iki tane metil grubunu üzerinde taşıdığı anlaşılmıştır.

HMBC spektrumunda görülen önemli etkileşmeler, δ_{H} 0,86 (H-23), δ_{H} 0,87 (H-24) / δ_{C} 81,1 (C-3) ve δ_{H} 0,87 (H-24) / δ_{C} 55,5 (C-5) olarak görülmüştür.

Yapılan değerlendirmeler ve elde edilen bulguların, literatürde kayıtlı bulgularla örtüşmesinden dolayı, **APK-7** bileşiğinin yapısı, **3-O-asetoksiolean-12-en-28-oik asit** (= **oleanolik asit asetat**) olarak aydınlatılmıştır (82). Bu bileşik *Arnebia* türlerinden ilk defa elde edilmiştir.

Arnebia purpurea'nın topraküstü kısımlarının metanol ekstresi üzerinde yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda elde edilen **APT-1** bileşiğinin yapılan İTK analizinde, kromatogramda vanilin/ H_2SO_4 reaktifi püskürtüldükten sonra 105 °C'de ısıtılması sonucunda, zamanla solan pembe bir renk verdiği gözlenmiştir. Bileşiğin UV spektrumunda ($\lambda_{\text{maks.}}$ 215nm, 296 nm, 321 nm) görülen absorpsiyon pikleri ve IR spektrumunda gözlenen hidroksil (OH), ester karbonili, asidik karbonil gruplarına (C=O) ve aromatik halkalara ait absorpsiyon bantları aromatik halkalı ester yapısında bir fenolik asit varlığına işaret etmiştir.

EI Kütle Spektrumunda m/z 359 $[\text{M}-\text{H}]^-$ moleküler iyon piki, ^1H NMR spektrumu ve ^{13}C NMR spektrumu yardımıyla bileşiğin kapalı formülü **C₁₈H₁₆O₈** olarak bulunmuştur.

APT-1 bileşiğinin ^1H NMR spektrumuna (Spektrum 26, Tablo 28) bakıldığında 2 ABX sistemine ait proton sinyalleri 7,03 ppm (d, J = 2 Hz, H-2), 6,76 ppm (d, H-5), 6,92 ppm (dd, J = 2/8,1 Hz, H-6), δ_{H} 6,77 (s, H-2'), δ_{H} 6,68 (d, J = 8 Hz, H-5'), δ_{H} 6,63 (dd, J = 8/2 Hz, H-6') trisüstitüe benzen halkalarını, 6,25 ppm (d, J = 15,9 Hz, H-8), 7,5 ppm (d, J = 15,9 Hz, H-7) de görülen sinyaller olefinik protonları, δ_{H} 5,06 (dd, J = 9,7/3,4, H-8') da görülen proton rezonansı metin protonlarını, δ_{H} 2,94 (dd, J = 14,2/9,8 Hz, H-7_a') ve δ_{H}

3,07 (dd, $J = 14/3,4$ Hz, H-7_b') de iki proton değeriindeki dublet-dublet sinyalleri ise metilen protonlarını göstermektedir. ^{13}C NMR spektrumunda (Spektrum 27, Tablo 28) gözlenen altı tane aromatik karbon sinyali [δ_{C} 116,4 (C-5'), δ_{C} 117,6 (C-2'), δ_{C} 121,8 (C-6'), δ_{C} 131,4 (C-1'), δ_{C} 146,1 (C-3') ve δ_{C} 144,9 (C-4')], bir karbinol sinyali [δ_{C} 78,1 (C-8')] ve bir karboksil sinyali [δ_{C} 177,8 (s, C-9')] ile DEPT spektrumundaki [δ_{C} 38,95 (C-7')] sinyali bir CH_2 grubunun varlığı, dihidroksi fenil laktik asit yapısını göstermiştir. Bununla birlikte spektrumda görülen: δ_{C} 115,8 (C-8), δ_{C} 115,3 (C-2), δ_{C} 116,6 (C-5), δ_{C} 123 (C-6), δ_{C} 128 (C-1), δ_{C} 146,7 (C-7), δ_{C} 149,5 (C-3), δ_{C} 146,7 (C-4) ve δ_{C} 169,3 (C-9) sinyalleri, yapıda esterleşmiş bir kafeik asit bulunduğuna işaret etmiştir.

APT-1'in COSY spektrumunda (Spektrum 28), 2,93 ppm ve 3,09 ppm'de gözlenen H₂-7'protonları ile 5,06 ppm'de gözlenen H-8'protonu arasında ve δ_{H} 6,62 (H-6') ile δ_{H} 6,67 (H-5') arasında yakın mesafe etkileşimleri görülmüştür. COSY yardımıyla ayrıca diğer spin sistemleri: H-7/H-8 ve H-5/H-6 protonları olarak saptanmıştır. Bileşiğin HMBC spektrumunda (Spektrum 30, Tablo 28) 8'protonunun, C-9, C-1' ve C-9'konumlarındaki karbon atomlarıyla uzak mesafe etkileşimleri saptanmış ve bu da bileşiğin kafeik asit kısmıyla 8'konumundan bağlanmış olduğunu doğrulamıştır. NOESY spektrumunda (Spektrum 31, Tablo 28) gözlenen H-7 ve H-8 protonları arasındaki nOe etkileşimi bu protonların trans konumlu olduğunu göstermiştir.

APT-1 bileşiğinin yapısı, elde edilen bulgular ve literatürde kayıtlı bulguların birlikte değerlendirilmesi sonucunda **rozmarinik asit (α -O-transkafeoil-3',4'-dihidroksifenilaktik asit)** olarak aydınlatılmıştır (51). Daha önce yapılan araştırmalarda sadece *Arnebia euchroma*'da rozmarinik asit tuzuna rastlanmıştır.

Sarı renkli, amorf toz görünümünde bir karışım olan **APT-4/5** ve **APT-7** bileşiklerinin İTK analizinde, UV₂₅₄'te açık sarı, UV₃₆₆'da koyu mor renk gözlenmiştir. Vanilin/H₂SO₄ reaktifi ile 105 °C'de 1-2 dakika ısıtılma sonucunda, **APT-4/5** karışımına ve **APT-7**'ye ait lekede sarı-turuncu bir renklenme gözlenmesi maddelerin flavonoit olabileceğini düşündürmüştür.

Bileşiklerin UV spektrumunda, flavonoit yapısının sinnamoil sistemi (Bant I, 350 nm) ve benzoil sistemi (Bant II, 267 nm) için karakteristik iki absorpsiyon bandı görülmüştür. ESI Kütle spektrometresinde görülen **APT-7** bileşiği için [M+Na]⁺ *m/z* 629 piki bileşiğin kapalı formülünün **C₂₈H₃₀O₁₅** olduğunu, **APT-4** bileşiği için [M-H]⁻ *m/z* 623 piki bileşiğin kapalı formülünün **C₂₈H₃₂O₁₆** olduğunu, **APT-5** bileşiği için [M-H]⁻ *m/z* 593 piki bileşiğin kapalı formülünün **C₂₇H₃₀O₁₅** olduğunu göstermiştir.

APT-5 ve **APT-7**'nin ¹H NMR spektrumunda (Spektrum 32, Spektrum 37, Tablo 29-31) meta etkileşim (*J*= 2 Hz) gösteren iki protona (H-6 ve H-8) ait olan dublet sinyaller (δ_H 6,10-6,45 ve δ_H 6,72-6,91), AB sistemi gösteren B halkasındaki H-2'/6' [δ_H 7,85-7,92 d (2H)] ve H-3'/5' [δ_H 6,82-6,91 d (2H)] sinyalleri ve ¹³C NMR spektrumundaki (Spektrum 33, Spektrum 37, Tablo 29-31) aglikona ait değerler literatür bulguları ile karşılaştırıldığında **APT-5** ve **APT-7** bileşiklerinin kemferol türevi bir aglikona sahip olduğunu göstermiştir. **APT-4** bileşiğinde bulunan aglikona ait 16 karbon, aromatik bölgedeki δ_H 6,10 (gs, H-6); δ_H 6,32 (gs, H-8); δ_H 7,82 (d, *J*= 2 Hz, H-2'), δ_H 6,85 (d, *J*= 8,4 Hz, H-5'), δ_H 7,45 (dd, *J*= 8,4/2, H-6') sinyalleri ve yapısındaki metoksil grubunun (δ_H 3,95) ile aglikonun C-3' (δ_C 147,37) konumundan süstitüe olduğunu gösteren HMBC etkileşimi aglikonun izoramnetin olduğunu göstermiştir.

APT-4'de δ_H 5,36 ve δ_H 4,36'da, **APT-5**'de δ_H 5,23 ve δ_H 4,32'de, **APT-7**'de ise δ_H 5,56 ve δ_H 5,70 gözlenen sinyallerin aglikonlara bağlı 2 oz ünitesinin anomerik protonlarına ait olduğu düşünülmüştür. δ_H 5,36 ve δ_H 5,23'deki protonların kenetleme sabitlerinden (**APT-4**: *J*= 7,3 Hz, H-1"; **APT-5**: *J*= 7.4 Hz) her iki ozun da β konfigürasyonuna sahip olan glukoz olduğunu göstermiştir. Her üç bileşikteki δ_H 0,93, 0,94 ve 1,26'daki dublet olarak gözlenen (*J*=6 Hz) metil sinyalleri ile δ_H 4,32, δ_H 4,36, δ_H 5,56 daki geniş

singlet olarak gözlenen anomerik proton sinyalleri ise ramnoz için karakteristiktir ve yapıda bulunan diğer uzun α -ramnoz olabileceğini göstermiştir.

APT-4/5'te δ_C 18,15-101,78 ppm arasında gözlenen oz karbonlarına ait 12 tane sinyal, her iki bileşiğin yapısındaki iki oz ünitesinin varlığını doğrulamaktadır. Ozlara ait karbon atomlarına bağlı protonlar HMQC spektrumu (Spektrum 35) yardımıyla tespit edildiğinde, yapıdaki ozların β -glukoz ve α -ramnoz oldukları anlaşılmıştır. Glukozun C-6''sinyalinin (δ_C 67,3), yaklaşık 5 ppm düşük alana kayması (glikozidasyon etkisi), ramnozun bu konumdan bağlı olabileceğini göstermiştir. HMBC spektrumu yardımıyla (Spektrum 36, Tablo 29-30) aglikonların glikozidasyon yerleri ve ozlar arasındaki bağlantı noktaları kesin olarak saptanmıştır. C-3'ün düşük alanda çıkması (δ_C 131,29) ve C-3/H-1''arasındaki HMBC etkileşimleri oz ünitesinin bu konumdan bağlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca 2. ozun H-1'''protonu ile ilk ozun C-6''karbon atomu arasındaki uzak mesafe etkileşimi de iki ozun 1→6 bağı ile bağlı olduğunu göstermiştir.

APT-7 bileşiğinde ise 1H NMR spektrumunda δ_H 5,56 ve δ_H 5,70'de görülen iki oza ait anomerik protonlardan δ_H 5,70'de dublet şeklinde gözlenen ve kenetlenme sabiti değeri 1,5 olan beş karbonlu oz apioz, δ_H 5,56'da geniş singlet şeklinde gözlenen ve yapısında 1H NMR spektrumunda δ_H 1,26'da çıkan bir sekonder metil bulunan oz ise ramnoz olarak belirlenmiştir.

HMBC spektrumunda (Spektrum 41, Tablo 31) α -ramnoza ait olan δ_H 5,56'daki anomerik proton sinyali δ_C 163,7 (C-7)'deki karbon ile uzak mesafeli etkileşimi α -ramnozun aglikona bağlantısının 7. konumdan olduğunu göstermiştir. Apiozun anomerik protonuna ait δ_H 5,70'deki sinyalin ROESY spektrumunda (Spektrum 42) H-2'/H-6'protonları ile korelasyon göstermesi ise apiozun bu bileşiğe aglikonun 3 numaralı konumundan bağlı olduğunu kanıtlamıştır.

^{13}C NMR spektrumunda δ_C 172,7'de gözlenen karbonil sinyali ve δ_C 20,8'de görülen metil sinyali yapıda bir asetil grubunun varlığına işaret etmiştir. δ_C 172,7 sinyali ile δ_H 4,04 (d, $J= 11,5/-$) ve δ_H 4,15 (d, $J= 11,5/-$)'deki

H₂-5"protonları ve δ_H 2,09 H₃-7"protonları arasında HMBC spektrumunda gözlenen etkileşme asetil grubunun apiozun 5. konumundan grubuna bağlı olduğunu göstermiştir.

Literatür bulguları da dikkate alınarak, elde edilen tüm bulguların yorumlanması sonucunda, **APT-4** bileşiğinin yapısı **izoramnetin 3-O-rutinozit**, **APT-5** bileşiğinin yapısı **kemferol 3-O-rutinozit** ve **APT-7** bileşiğinin yapısı ise **kemferol 3-O- β -(5"-asetil) apiofuranozit 7-O- α -ramnopiranozit** olarak aydınlatılmıştır (42,43,109).

Yapılan literatür taramaları sonucunda *Arnebia* türlerinden sadece bir C- glikozidik flavonoit olan viteksinin elde edildiği görülmüştür. Bu tez çalışmasında *Arnebia* türlerinden O-glikozidik flavonoit yapısında 3 flavonoit türevi ilk kez tarafımızca izole edilmiştir.

Arnebia türleri üzerinde yapılan araştırmalara bakıldığında bu türlerin naftokinon, benzokinon, hidrokarbon, alkaloid, diterpen, triterpen, steroid, flavonoit ve fenolik asit yapısında bileşikler taşıdıkları görülmektedir (Tablo 1-16). Türkiye'de doğal olarak yetişen türlerde sadece naftokinon türevleri izole edilmiştir (9,10). Daha önce üzerinde herhangi bir Farmakognozik araştırma yapılmamış olan *A. purpurea* üzerinde yaptığımız çalışmalar sonucunda elde ettiğimiz maddelerden **3-O-asetoksiolean-12-en-28-oik asit (APK-7,oleanolik asit asetat)**, **izoramnetin 3-O-rutinozit (APT-4)**, **kemferol 3-O-rutinozit (APT-5)** ve **kemferol 3-O- β -(5"-asetil) apiofuranozit 7-O- α -ramnopiranozit (APT-7)** daha önce *Arnebia* türlerinden elde edilmemiş bileşikler olup, çalışmamızın diğer bir önemli sonucu da **kemferol 3-O- β -(5"-asetil) apiofuranozit 7-O- α -ramnopiranozit (APT-7)**'e çalıştığımız tür haricinde doğada sadece Leguminosae familyası bitkilerinden *Lotus edulis*'te rastlanmıştır (109).

Yapısı saptanan maddelerin sitotoksik aktivitelerinin MTT yöntemi ile fare kaynaklı kanser hücre kültüründe (L929) araştırılması sonucunda sitotoksik aktivite, köklerden elde edilen naftokinon türevi (**APK-3/8/9**, **APK-4**, **APK-5**) bileşiklerde en yüksek (sırasıyla 50 μ g/ml'deki % inhibisyon=% 98,57; % 97,41; % 97,67), β -sitosterolde (**APK-6**) naftokinonlarla kıyaslanabilir derecede yüksek (50 μ g/ml'deki % inhibisyon=% 65,93) ve

triterpenik türevi olan **APK-7**'de de anlamlı derecede (50 µg/ml'deki % inhibisyon= % 43,70) bulunmuştur.

Alkannin ve türevlerinin yüksek aktivite göstermesi son zamanlarda diğer araştırmacıların da ilgisini çekmiş ve bu bileşikler üzerinde yapılan sitotoksikite çalışmaları artmıştır. 2010 yılında yapılan bir çalışmada *Alkanna* türlerinden elde edilen alkanninin HT-29, MDA-MB-231, PC-3, AU565, Hep G2, LNCaP, MCF7, HeLa, SK-BR-3, DU 145, Saos-2, ve Hep 3B hücreleri üzerindeki aktivitesi araştırılmış ve alkanninin araştırılan tüm hücreler üzerinde sitotoksik aktivitesi gözlenmiştir (95). Bir başka çalışmada izobutilalkannin, izovalerilalkannin ve asetilalkanninin HCT 116, CCL-247, Hep G2, RCB0459 hücreleri üzerinde kuvvetli inhibisyona sahip olduğu gösterilmiştir (19). Şikoninin L929 hücre serileri üzerindeki etkisi araştırılmış ve etkili olduğu gösterilmiştir (118). Bu tez çalışması ise alkannin türevlerinin L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin araştırıldığı ilk çalışmadır.

β-sitosterol üzerinde yapılan çalışmalar da bu maddenin çok farklı metotlarla antikanser etkinlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Yapılan bir çalışma β-sitosterolün COLO 320 DM hücreleri üzerinde doza bağımlı olarak hücre çoğalmasını inhibe ettiğini göstermiştir (6). Triterpenlerin de sitotoksik aktivite gösterdiği bilinmektedir, oleanolik asit ve türevlerine ait sitotoksik aktivitenin bildirildiği çalışmalar bulunmaktadır (134).

Yapılarına göre farklılık göstermekle birlikte bazı flavonoidlerin (apigenin, luteolin gibi) kanserden koruyucu ve/veya kanser tedavisinde etkin olduğu bilinmektedir. Flavonoidlerin sitotoksik etkisinde proteaz inhibitör, yağ asidi sentezi inhibe edici, p53 molekülü uyarıcı aktivitelerinin rol aldığı düşünülmektedir. Yapılan bir çalışma 3,6 dihidroksi flavon aglikonuna sahip flavonoidlerin yüksek sitotoksik aktivite gösterdiğini kanıtlamıştır (47). İzoramnetin 3-O-rutinozit bileşiğinin HT-29, CF-7 b, HepG-Z hücrelerinde sitotoksik aktivitesi ölçülmüş ancak sitotoksikite saptanamamıştır (122). Kemferol 3-O-rutinozit bileşiğinin A549 SK-OV-3 SK-MEL-2 XF498 HCT15 hücrelerinde aktivitelerine bakılmış; ancak bu flavonoite ait de herhangi bir aktivite gözlenememiştir (18). Bizim çalışmamızda flavonoidlerde sitotoksikite gözlenmemiştir.

Yapılan alışmalar rozmarinik asitin proliferatif etkisinin olduğunu göstermektedir (131). Bir çalışmada insan lösemi hücrelerinde düşük sitotoksik etkisinin olduğu bulunmuştur (79).

Çalışmalarımızda elde ettiğimiz sonuçlar literatür verileri ile uygunluk göstermiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışması sonucunda, araştırmamızın başlangıcında öngörüle bulduğumuz hedeflere ulaşılmış ve ülkemizde endemik olarak yetişen *Arnebia purpurea*'nın major sekonder metabolitleri elde edilmiş, yapıları saptanmış ve L929 kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkileri belirlenmiştir.

In vitro olarak gerçekleştirilen aktivite deneyi sonucunda literatür bulgularına benzer olarak naftokinon yapısındaki maddelerin yüksek sitotoksik etkisi bulunmuştur. Ancak yapılacak ileri çalışmalarla bu maddelerin daha düşük konsantrasyonlardaki aktivitelerine bakılarak IC₅₀ değeri belirlenmeli ve etki mekanizması saptanmalıdır. Ayrıca somatik hücrelerdeki etkinliğine bakılması ve terapötik aralığının belirlenmesi gerekmektedir.

Elde edilen tüm bileşikler, bu cinse ait türlerin kemotaksonomisinin belirlenmesinde önemli yer tutmaktadır.

Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi projesi kapsamında naftokinon türevlerinin sitotoksik etkisi üzerindeki çalışmalarımız AbD hücre kültürü laboratuvarımızda devam etmektedir. İleri sonuçlarımızın kanser tedavisinde kullanılan ilaçlara yeni bir bakış açısı getireceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Afzal, M., Al-Oriqat, G. (1986). Shikonin derivatives. V. Chemical investigations of *Arnebia decumbens*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50(3), 759-760.
2. Afzal, M., Al-Oriqat, G. (1986). Shikonin derivatives, Part VI. Chemical investigations of *Arnebia decumbens*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50(6), 1651-1652.
3. Akalın, Ş. (1952). *Büyük Bitkiler Kılavuzu*. Ankara.
4. Akkol E., Koca, U., Pesin, I., Yilmazer, D., Toker, G., Yesilada, E. (2009). Exploring the wound healing activity of *Arnebia densiflora* (Nordm.) Ledeb. by *in vivo* models. *Journal of Ethnopharmacology*, 124(1), 137-141.
5. Albrecht, A., Vovk, I., Simonovska, B., Srbinoska, M. (2009). Identification of shikonin and its ester derivatives from the roots of *Echium italicum* L. *Journal of Chromatography A*, 1216(15), 3156-3162.
6. Baskar, A.A., Ignacimuthu, S., Paulraj, G.M., Al Numair, K.S. (2010). Chemopreventive potential of beta-sitosterol in experimental colon cancer model - an *in vitro* and *in vivo* study. *Bmc Complementary and Alternative Medicine*, 10, 24.
7. Baytop, T. (1999). *Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün)*, (2. bs). İstanbul: Nobel Tıp Kitap Evleri.
8. Baytop, T. (1994). *Türkçe Bitki Adları Sözlüğü*. Ankara: Atatürk Kültür, Dil Ve Tarih Yüksek Kurumu.
9. Bozan, B., Başer, K.H.C., Kara, S. (1997). Quantitative determination of naphthoquinones of *Arnebia densiflora* (Nordm.) Ledeb. by an improved high-performance liquid chromatographic method. *Journal of Chromatography A*, 782(1), 133-136.

10. Bozan, B., Başer, K.H.C., Kara, S. (1999). Quantitative determination of naphthoquinones of *Arnebia densiflora* by TLC-densitometry. *Fitoterapia*, 70(4), 402-406.
11. Chang, Y.S., Kuo, S.C., Weng, S.H., Jan, S.C., Ko, F.N., Teng, C.M. (1993). Inhibition of platelet aggregation by shikonin derivatives isolated from *Arnebia euchroma*. *Planta Medica*, 59(5), 401-404.
12. Chauhan, S.M.S., Singh, R., Geetanjali, B. (2003). Phytochemical investigation of *Arnebia nobilis*. *Asian Journal of Chemistry*, 15(3-4), 1791-1794.
13. Chen, S., Hou, S. (1994). Recovery of shikonin from bioreactor cultured solution of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa*, 6(3), 97-100. Ref: C. A. 121:155810 (1994).
14. Chen, S., Hou, S., Ye, H., Li, G., Zhang, J., Li, X. ve diğerleri. (1994). Large scale culture of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston cells in 5L outloop airlift bioreactor. *Shengwu Gongcheng Xuebao*, 10(1), 81-86.
15. Chen, X., Yang, L., Oppenheim, J.J., Howard, O.M.Z. (2002). Cellular pharmacology studies of shikonin derivatives. *Phytotherapy Research*, 16 3), 199-209.
16. Chen, Y., Lu, W., Wang, F., Ma, H., Li, J. (2008) Induction and culture of hairy roots from *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston. *Xibei Zhiwu Xuebao*, 28(12), 2423-2428. Ref: C. A. 152:31592 (2008).
17. Cheng, Y.W., Chang, C.Y., Lin, K.L., Hu, C.M., Lin, C.H., Kang, J.J. (2008). Shikonin derivatives inhibited LPS-induced NOS in RAW 264.7 cells via downregulation of MAPK/NF- κ B signaling. *Journal of Ethnopharmacology*, 120(2), 264-271.
18. Choi, S.Z., Choi, S.U., Lee, K.R. (2004). Phytochemical constituents of the aerial parts from *Solidago virga-aurea* var. *gigantea*. *Archives of Pharmacol Research*, 27(2), 164-168.

19. Cui, X.-R., Tsukada, M., Suzuki, N., Shimamura, T., Gao, L., Koyanagi, J. ve diğerleri. (2008). Comparison of the cytotoxic activities of naturally occurring hydroxyanthraquinones and hydroxynaphthoquinones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43(6), 1206-1215.
20. Dai, B., Zhou, X., Yin, A., Pan, Y, Zou, S. (2005). Determination of shikonin content in *Arnebia euchroma* extracts from four kinds of solvent systems and experimental observation on its acute toxicity. *Zhongguo Zhongyiyao Keji*, 12(3), 168-169. Ref: C.A. 146:344647 (2006).
21. Damianakos, H., Graikou, K., Pietrosiuk, A., Syklowska-Baranek, K.,Chinou, I. (2009). Shikonin pigments from cultures of *Lithospermum conescens* and *Arnebia euchroma*. *Planta Medica*, 75 (9), 906-907.
22. Davis, P.H. (1978). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* (c. 6): Edinburgh University Press, Edinburgh
23. Davydenkov, V.N., Patudin, A.V., Popov, Y.G., Rabinovich, S.A.,Miroshnikov, A.I. (1991) Cultured *Arnebia euchroma* (Royle) Jonst. cells, a new source of shikonin production. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*, 25(1), 53-55. Ref: C.A. 115:47729 (1991).
24. Deng, Y., Wang, H., Han, L. (2008). Isolation, purification and biological activities of *Arnebia euchroma* glycosaminoglycans. *Zhongyaocai*, 31(5), 753-756.
25. Edmondson, J.R. (1978). *Arnebia* Forssk. P. H. Davis (Ed.). *Flora of Turkey and the Aegean Islands* (c. 6): Edinburgh University Press, Edinburgh
26. El-Afly, T.S., El-Tanbouly, N.D.,Sokkar, N.M. (1996). Naphthoquinones of *Arnebia tinctoria* (Forssk). *Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37 (1-6), 65-70. Ref: C.A. 126:328044 (1997).
27. El-Dahmy, S., Ghani, A.A. (1995). Alkaloids of *Arnebia decumbens*. *Al-Azhar Journal of Pharmaceutical Science*, 15, 24-34.

28. Eser, S. (2007). Türkiye'de Kanser İnsidansı. Tuncer, M. (Ed.) *Türkiye'de Kanser Kontrolü*. (s. 17-46). Ankara: Onur Matbaacılık.
29. European Patent Office. (t.y.). Erişim: 23.07.2010, <http://www.ep.espacenet.com>.
30. Fu, S., Shang, T., Xiao, P. (1984). Analysis of naphthaquinone pigments in some Chinese medicinal "Zi Cao". *Yaoxue Xuebao*, 19(12), 921-925. Ref: C.A. 103:11307 (1985).
31. Fu, S., Xiao, P. (1986) Naphthoquinone pigments in Xinjiang Ruanzicao (*Arnebia euchroma*). *Zhongcaoyao*, 17 (10), 434-437. Ref: C.A. 106:55728 (1987).
32. Fu, X.Q., Lu, D. W. (1998). Effects of *Rhizopus oryzae* elicitor on shikonin secretion in suspension cultures of *Arnebia euchroma*. *Zhiwu Shengli Xuebao*, 24 (4), 380-384. Ref: C. A. 130:266402 (1998).
33. Fu, X. Q., Lu, D.W. (1999). Stimulation of shikonin production by combined fungal elicitation and in situ extraction in suspension cultures of *Arnebia euchroma*. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(5/6), 243-246.
34. Gaddipati, J.P., Mani, H., Shefali, Raj, K., Mathad, V.T., Bhaduri, A.P. ve diğerleri. (2000). Inhibition of growth and regulation of IGFs and VEGF in human prostate cancer cell lines by shikonin analogue 93/637 (SA). *Anticancer Research*, 20(4), 2547-2552.
35. Gasmelseed, G.A., Hayat, L.J., El-Rayyess, N.R. (1989). Solvent selection and recovery in a counter-current leaching process. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 24(8), 935-942.
36. Ge, F., Chen, C., Wang, X., Zhao, B., Wang, Y. (2008). Effects of ultrasonic wave on cell growth and shikonin biosynthesis in suspension culture of *Arnebia euchroma*. *Guocheng Gongcheng Xuebao*, 8(1), 115-119. Ref: C. A. 148:325427 (2008).

37. Ge, F., Yuan, X., Wang, X., Zhao, B., Wang, Y. (2006). Cell growth and shikonin production of *Arnebia euchroma* in a periodically submerged airlift bioreactor. *Biotechnology Letters.*, 28(8), 525-529.
38. Guo, H., Kong, H., Ma, C. (2006). Chemical constituents of pericarp of *Arnebia euchroma* oil extract. *Shizhen Guoyi Guoyao*, 17(2), 153-154. Ref: C.A. 147:308470 (2007).
39. Gupta, S.K., Mathur, I.S. (1972). Effect of *Arnebia nobilis* and its naphthoquinones in rat walker carcinosarcoma 256. *Indian Journal of Cancer*, 9(1), 50-55.
40. Hamdard, M.E., Badar, Y., Khan, M.S., Shamsi, M.A. (1988). Revised phytochemical study of *Arnebia hispidissima*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Science*, 1(1), 19-20. Ref: C.A. 109:146300 (1988).
41. Han, H., Weng, X.C., Bi, K.S. (2008). Antioxidants from a Chinese medicinal herb - *Lithospermum erythrorhizon*. *Food Chemistry*, 106(1), 2-10.
42. Han, J., Bang, M., Chun, O., Kim, D., Lee, C., Baek, N. (2004). Flavonol glycosides from the aerial parts of *Aceriphyllum rossii* and their antioxidant activities. *Archives of Pharmacal Research*, 27(4), 390-395.
43. Harput, U.S., Saracoglu, I., Ogihara, Y. (2004). Methoxyflavonoids from *Pinaropappus roseus*. *Turkish Journal of Chemistry*, 28(6), 761-766.
44. Hu, C.M., Cheng, Y.W., Cheng, H.W., Kang, J.J. (2004). Impairment of vascular function of rat thoracic aorta in an endothelium-dependent manner by shikonin/alkannin and derivatives isolated from roots of *Macrotomia euchroma*. *Planta Medica* 70(1), 23-28.
45. Hu, Y., Jiang, Z., Leung, K.S., Zhao, Z. (2006). Simultaneous determination of naphthoquinone derivatives in Boraginaceous herbs by high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 577 (1), 26-31.

46. Huang, Z.-S., Gu, L.-Q., Che, Z.-T., Zhang, M., Qiu, G.-Q. (2000). The nucleophilic reaction of beta-dimethylacrylalkannin with aniline and thiophenol. *Huaxue Xuebao*, 58(8), 1043-1049.
47. Hui, C. (2009) Structurally related cytotoxic effects of flavonoids on human cancer cells *in vitro*. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 55, 683-683.
48. Indrayan, A.K., Yadav, V., Tyagi, P.K., Kumar, M. (2004) Antibacterial activity of the dye from rhizome of *Arnebia nobilis* (Ratanjot). *Indian Journal of Microbiology*, 44(1), 69-71.
49. Jain, A.C., Mathur, S.K. (1965) Pigment of *Arnebia hispidissima*. *Bull. Natl. Inst. Sci. India*, 28, 52-56.
50. Jain, S.C., Jain, R., Singh, B. (2003) Antimicrobial principles from *Arnebia hispidissima*. *Pharmaceutical. Biology*, 41(4), 231-233.
51. Jayasinghe, C., Gotoh, N., Aoki, T., Wada, S. (2003) Phenolics composition and antioxidant activity of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 51(15), 4442-4449.
52. Kaith, B.S., Kaith, N.S., Chauhan, N.S. (1996) Anti-inflammatory effect of *Arnebia euchroma* root extracts in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 55(1), 77-80.
53. Kashiwada, Y., Bastow, K.F., Lee, K.-H. (1995). Novel lignan derivatives as selective inhibitors of DNA topoisomerase II. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 5(8), 905-908.
54. Kashiwada, Y., Nishizawa, M., Yamagishi, T., Tanaka, T., Nonaka, G., Cosentino, L.M. ve diğ erleri. (1995) Anti-AIDS agents, 18. Sodium and potassium salts of caffeic acid tetramers from *Arnebia euchroma* as anti-HIV agents. *Journal of Natural Products*, 58(3), 392-400.

55. Khan, H.A., Chandresekharan, I., Ghanim, A. (1983) Naphthazarins from *Arnebia hispidissima*. *Phytochemistry*, 22(2), 614-615.
56. Khatoon, S., Mehrotra, B.N., Mehrotra, S. (2003). Pharmacognostic evaluation of ratanjot-*Arnebia nobilis* Rech. F. *Natural Product Sciences*, 9 (4), 286-290. Ref: C.A. 140:258797 (2004).
57. Khatoon, S., Mehrotra, S. (2000). Pharmacognostical study of Japanese drug 'Nan-Shikon', root of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston growing in India. *Nature Medicine*, 54(4), 171-177. Ref: C.A. 135:37003 (2000).
58. Khatoon, S., Mehrotra, S., Shome, U., Mehrotra, B.N. (1993). Analysis of commercial 'Ratanjot' by TLC fluorescence fingerprinting. *International Journal of Pharmacognosy*, 31(4), 269-277.
59. Ko, F.N., Lee, Y.S., Kuo, S.C., Chang, Y.S., Teng, C.M. (1995). Inhibition on platelet activation by shikonin derivatives isolated from *Arnebia euchroma*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1268(3), 329-334.
60. Kosger, H.H., Ozturk, M., Sokmen, A., Bulut, E., Ay, S. (2009). Wound healing effects of *Arnebia densiflora* root extracts on rat palatal mucosa. *European Journal of Dentistry*, 3(2), 96-99.
61. Kozlovitseva, L.V., Zaitseva, G.V., Strogov, S.E. (1994). Suspension culturing of the cells of *Arnebia euchroma*. Optimization of the conditions of production of shikonin. *Biotehnologiya*, 3, 24-26. Ref: C.A. 121:228870 (1994).
62. Kunakh, V.A., Poronnik, O.O. (2000). Shikonin content heterogeneity and supporting selections in the *Arnebia euchroma* cell culture. *Dopov. Nats. Akad. Nauk Ukr.*, 7, 191-195.

63. Kunwar, R., Nepal, B., Kshhetri, H., Rai, S., Bussmann, R. (2006). Ethnomedicine in Himalaya: a case study from Dolpa, Humla, Jumla and Mustang districts of Nepal. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2(1), 27.
64. Kuruuzum-Uz, A., Guvenalp, Z., Stroch, K., Demirezer, L.O., Zeeck, A. (2004) Phytochemical and antimicrobial investigation of *Echium vulgare* growing in Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32 (9), 833-836.
65. Kuruuzum-Uz, A., Güvenalp, Z., Kazaz, C., Salih, B., Demirezer, L. (2010). Four New Triterpenes from *Anchusa azurea* var. *azurea*. *Helvetica Chimica Acta*, 93, 457.
66. Li, H., Luo, S., Zhou, T. (1999). Studies on *in vitro* metabolism of shikonin. *Phytotherapy Research*, 13(3), 236-238.
67. Li, Q., Chen, Z., Zhou, X., Pan, A., Wang, L. (2006) Determination of shikonin in *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston by capillary electrophoresis. *Fenxi Huaxue*, 34(7), 991-994. Ref. C.A. 146:149252 (2006).
68. Li, Z., Zhang, M., Guo, L. (1986) Determination of alkannin in Zicao (Radix Arnebiae or Lithospermum). *Yaowu Fenxi Zazhi*, 6(1), 41-42.
69. Lin, Z. B., Chai, B. L., Wang, P., Guo, Q. X., Lu, F. S., Xiang, G.-Q. (1980). Studies on the antiinflammatory effect of chemical principle of Zi-Cao [*Arnebia euchroma* (Royle) Johnston]. *Pei-ching I Hsueh Yuan Hsueh Pao*, 12(2), 101-106. Ref: C.A. 93:143008 (1980).
70. Liu, C. J., Hou, S.-S. (1998). Effects of fungal elicitors on the cell growth and the shikonin biosynthesis in *Arnebia euchroma* cells in suspension culture. *Zhiwu Shengli Xuebao*, 24(1), 6-10. Ref: 129:148102 (1998).

71. Liu, G. S. (1981). Isolation and identification of alkannin beta ,beta - dimethylacrylate, a new naphthoquinone component in *Arnebia euchroma* Johnst. *Yao Hsueh T'ung Pao*, 16 (5), 14-15. Ref: C.A. 95:156425 (1981).
72. Liu, H., Chen, H.-s., Geng, D.-s., Jin, Y.-s., Yang, X.-n. (2010). GC-MS/MS analysis of the low polarity components from the root of *Arnebia euchroma*. *Yaoxue Shijian Zazhi*, 28(1), 17-18, 59.
73. Liu, H., Jin, Y.S., Song, Y., Yang, X.N., Yang, X.W., Geng, D.S. ve diğ erleri. (2010) Three new compounds from *Arnebia euchroma*. *Journal of Asian Natural Product Research*, 12(4), 286-292.
74. Lu, F., Xiang, Q., Zhu, F. (1983) Studies on the chemical constituents of *Arnebia guttata* Bunge. *Zhiwu Xuebao*, 25(5), 455-459. Ref: C.A. 100:99960 (1984).
75. Luo, S., Mai, L. (1986). HPTLC densitometric analysis of naphthoquinone components of *Arnebia euchroma*. *Yaowu Fenxi Zazhi*, 6(5), 280-282.
76. Luo, S.R., Li, T. (1991). Determination of naphthoquinones in tissue cultured Zicao. *Yaoxue Xuebao*, 26(12), 953-955. Ref: C.A. 116:221670 (1992).
77. Maierdan, M., Qin, D., He, J., Rena, K. (2009). Water soluble constituents of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston. *Xinjiang Yike Daxue Xuebao*, 32(4), 371-373.
78. Maierdan, M., Xu, J., Gulixian, H. (2009). Anti-aging effects of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston extracts in subacute aging mice caused by D-galactose. *Xinjiang Yike Daxue Xuebao*, 32(4), 383-386.
79. Moon, D.O., Kim, M.O., Lee, J.D., Choi, Y.H., Kim, G.Y. (2010). Rosmarinic acid sensitizes cell death through suppression of TNF-alpha-induced NF-kappa B activation and ROS generation in human leukemia U937 cells. *Cancer Letters*, 288(2), 183-191.

80. Mossman, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
81. Nigam, S.K., Mitra, C.R. (1964). Coloring matter of *Arnebia hispidissima*. *Indian Journal of Applied Chemistry*, 27(1), 34-36. Ref: C.A. 61:49447 (1964).
82. Ogihara, K., Iraha, R., Higa, M., Yogi, S. (1997). Studies on Constituents from the Twigs of *Messerschmidia argentea* 2. *Bull. Coll. Sci., Univ. Ryukyus*, 64, 53-59.
83. Ölgen, S., Bıçak, I., Nebioğlu, D. (2002) Angiogenesis ve kanser tedavisinde yeni yaklaşımlar. *Journal of Faculty of. Pharmacy of. Ankara University*, 31(3), 193-214.
84. Pietrosiuk, A., Urmantseva, V., Furmanowa, M. (1999) Some naphthoquinones and pyrrolizidine alkaloids in cell culture of *Arnebia euchroma* (Royle) Jonst. *Herba Polonica.*, 45(4), 354-361. Ref: C.A. 133:161787 (1999).
85. Poronnik, O.A., Kunakh, V.A. (2005) Biosynthesis of naphthoquinone pigments in plants from Boraginaceae family in nature and in vitro culture. *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal*, 77(6), 24-36.
86. Poronnik, O.A., Kunakh, V.A., Adonin, V.I. (1999). Shikonin accumulation and cytological peculiarities of highly productive *Arnebia euchroma* cell strain upon surface and submerged cultivation. *Biopolimer Kletka*, 15(6), 501-509. Ref: C.A. 134:128570 (2000).
87. Prabhakar, M.C., Bano, H., Kumar, I., Shamsi, M.A., Khan, S.Y. (1981). Pharmacological investigations on vitexin. *Planta Medica*, 43(12), 396-403.

88. Qin, D., Maierdan, M., Zhu, S., Xu, Y. (2009). Applying grading methods of synthesis multiple guidelines optimizing extracting technology for compound *Arnebia euchroma* granule. *Shihezi Daxue Xuebao, Ziran Kexueban*, 27 (1), 70-72.
89. Ramachandram, R., Ali, M. (2002). New andromedane type diterpenes from the roots of *Arnebia nobilis*. *Journal of Saudi Chemical Society.*, 6(1), 97-106.
90. Ramachandram, R., Ali, M., Mir, S.R. (2007). Andromedane-type derivatives from roots of *Arnebia nobilis*. *Oriental Journal of Chemistry*, 23(2), 533-540.
91. Roder, E., Rengel-Mayer, B. (1993). Pyrrolizidine alkaloids from *Arnebia euchroma*. *Planta Medica*, 59(2), 192.
92. Salim, M.L., Ammar, H.A., Oriquat, G.A. (1996). Isolation and structure elucidation of 3,6-dihydroxy-2-isovaleryl-1,4 benzoquinone from the roots of *Arnebia decumbens* (Boraginaceae). *Bulletin Faculty of Pharmacy (Cairo University)*, 34(3), 231-234.
93. Sankawa, U. (1983) Inhibition of prostaglandin biosynthesis contained in Chinese medicinal drugs. *Igaku no Ayumi*, 126(11), 867-874.
94. Sasaki, K., Yoshizaki, F., Abe, H. (2000) The anti-Candida activity of shikon *Yakugaku Zasshi*, 120(6), 587-589.
95. Sevimli-Gur, C., Akgun, I.H., Deliloglu-Gurhan, I., Korkmaz, K.S., Bedir, E. (2010) Cytotoxic naphthoquinones from *Alkanna cappadocica*. *Journal of Natural Products*, 73(5), 860-864.
96. Sezik, E., Tabata, M., Yesilada, E., Honda, G., Goto, K., Ikeshiro, Y. (1991). Traditional Medicine in Turkey .1. Folk Medicine in Northeast Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, 35(2), 191-196.

97. Sezik, E., Yesilada, E., Tabata, M., Honda, G., Takaishi, Y., Fujita, T. ve diğ erleri. (1997). Traditional medicine in Turkey .8. Folk medicine in east Anatolia; Erzurum, Erzincan, Agri, Kars, Igdir provinces. *Economic Botany*, 51(3), 195-211.
98. Sharma, N., Sharma, U.K., Gupta, A.P., Devla, Sinha, A.K., Lal, B. ve diğ erleri. (2009). Simultaneous densitometric determination of shikonin, acetylshikonin, and beta –acetoxysovalerylshikonin in ultrasonic-assisted extracts of 4 *Arnebia* species using reversed-phase thin layer chromatography. *Journal of Seperation Sciences*, 32(18), 3239-3245.
99. Sharma, N., Sharma, U.K., Malik, S., Bhushan, S., Kumar, V., Verma, S.C. ve diğ erleri. (2008) Isolation and purification of acetylshikonin and beta -acetoxysovalerylshikonin from cell suspension cultures of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston using rapid preparative HPLC. *Journal of Seperation Sciences*, 31(4), 629-635.
100. Sharma, S.C., Shukla, Y.N.,Tandon, J.S. (1972). Constituents of *Colocasia formicata*, *Sagittaria sagittiflora*, *Arnebia nobilis*, *Ipomoea paniculata* *Rhododendron niveum*, *Paspalum scrobiculatum*, *Mundulea sericea* and *Duabanga sonneratiodes*. *Phytochemistry*, 11(8), 2621.
101. Shen, C.C., Syu, W.J., Li, S.Y., Lin, C.H., Lee, G.H.,Sun, C.M. (2002). Antimicrobial activities of naphthazarins from *Arnebia euchroma*. *Journal of Natural Products*, 65(12), 1857-1862.
102. Shukla, Y.N., Tandon, J.S., Bhakuni, D.S.,Dhar, M.M. (1969). Chemical constituents of the antibiotic fraction of *Arnebia nobilis*. *Experientia*, 25 (4), 357-358.
103. Shukla, Y.N., Tandon, J.S., Bhakuni, D.S.,Dhar, M.M. (1971). Naphthaquinones of *Arnebia nobilis*. *Phytochemistry*, 10(8), 1909.
104. Shukla, Y.N., Tandon, J.S., Dhar, M.M. (1973). Arnebin-7, a New Naphthaquinone from *Arnebia nobilis*. *Indian Journal of Chemistry*, 11(6), 528-529.

105. Sidhu, G.S., Singh, A.K., Banaudha, K.K., Gaddipati, J.P., Patnaik, G.K., Maheshwari, R.K. (1999). Arnebin-1 accelerates normal and hydrocortisone-induced impaired wound healing. *The Journal of Investigative Dermatology*, 113(5), 773-781.
106. Singh, B., Sahu, P.M., Jain, S.C., Singh, S. (2004) Estimation of naphthaquinones from *Arnebia hispidissima* (Lehm.) DC. *in vivo* and *in vitro* antiinflammatory screening. *Phytotherapy Research*, 18(2), 154-159.
107. Singh, B., Sharma, M.K., Meghwal, P.R., Sahu, P.M., Singh, S. (2003) Anti-inflammatory activity of shikonin derivatives from *Arnebia hispidissima*. *Phytomedicine*, 10(5), 375-380.
108. Singh, H. (2008) Importance of local names of some useful plants in ethnobotanical study. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 7(2), 365-370.
109. Spanou, C., Bourou, G., Dervishi, A., Aligiannis, N., Angelis, A., Komiotis, D. ve diğerleri. (2008) Antioxidant and chemopreventive properties of polyphenolic compounds derived from Greek legume plant extracts. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 56(16), 6967-6976.
110. Subbaramaiah, K., Bulic, P., Lin, Y., Dannenberg, A.J., Pasco, D.S. (2001) Development and use of a gene promoter-based screen to identify novel inhibitors of cyclooxygenase-2 transcription. *Journal of Biomolecular Screening*, 6(2), 101-110.
111. Sung, C.-W., Liu, K.-S., Li, N.-W. (1980) Survey on resource of *Lithospermum erythrorrhizon* and related herbs in China. *Yao Hsueh T'ung Pao*, 15(5), 3-5.
112. Sümbül, S.E.H. (1988). *Arnebia purpurea* P. H. Davis, Mill R.R. ve Tan K (Ed.). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* (Cilt 10) Edinburgh: Edinburgh University Press.

113. Tareeva, N.V., Romanova, A.S., Ban'kovskii, A.I. (1970) Detection of shikonin in Boraginaceae plants. *Sb. Nauch. Rab., Vses. Nauch.-Issled. Inst. Lek. Rast.*, No. 1, 175-181. Ref: C.A. 76:70042 (1972).
114. Urmantseva, V.V., Karyagina, T.B., Chertkova, R.V., Murav'eva, T.I., Bairamashvili, D.I. (1999). Induction of phenylalanine ammonia-lyase by methyl jasmonate in cultured cells of *Arnebia euchroma*. *Russian Journal Plant Physiology*, 46(6), 749-753.
115. Wang, W.J., Bai, J.Y., Liu, D.P., Xue, L.M., Zhu, X.Y. (1994). The antiinflammatory activity of shikonin and its inhibitory effect on leukotriene B₄ biosynthesis. *Yao Xue Xue Bao*, 29(3), 161-165.
116. Wassel, G., El-Menshaw, B., Saeed, A., Mahran, G. (1987) Toxic pyrrolizidine alkaloids of certain boraginaceous plants. *Acta Pharmaceutica Suec.*, 24(4), 199-204.
117. Wassel, G., El-Menshaw, B., Saeed, A., Mahran, G., El-Merzabani, M. (1987). Screening of selected plants for pyrrolizidine alkaloids and antitumor activity. *Pharmazie*, 42(10), 709.
118. Wu, Z., Wu, L.J., Li, L.H., Tashiro, S., Onodera, S., Ikejima, T. (2004). Shikonin regulates HeLa cell death via caspase-3 activation and blockage of DNA synthesis. *Journal of Asian Natural Product Research*, 6(3), 155-166.
119. Xia, K., Yan, R., Zhang, Y., Zhu, M., Yu, E., Fang, Z. (1991). Supercritical fluid extraction of plants I. Extraction of pigments from Sinkiang-Tibet *Arnebia* (*Arnebia euchroma*). *Zhongcaoyao*, 22(5), 202-204. Ref: C.A. 115: 203304 (1991).
120. Xie, Y., Morikawa, T., Ninomiya, K., Imura, K., Muraoka, O., Yuan, D. ve diğ erleri. (2008). Medicinal flowers. XXIII. New taraxastane-type triterpene, *Punicanolic acid*, with tumor necrosis factor- α inhibitory activity from the flowers of *Punica granatum*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 56(11), 1628-1631.

121. Xiong, W., Luo, G., Zhou, L., Zeng, Y., Yang, W. (2009). *In vitro and in vivo* antitumor effects of acetylshikonin isolated from *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst (Ruanzicao) cell suspension cultures. *Chinese Medicine*, 4, 14.
122. Xu, M.L., Li, G., Moon, D.C., Lee, C.S., Woo, M.H., Lee, E.S. ve diğeri. (2006). Cytotoxicity and DNA topoisomerase inhibitory activity of constituents isolated from the fruits of *Evodia officinalis*. *Archives of Pharmacal Research*, 29(7), 541-547.
123. Xu, X., Wang, B., Sun, Z., Zhang, J., Zhang, H. (2010). Chemical constituents from root of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. *Jilin Daxue Xuebao Lixueban*, 48(2), 319-322.
124. Yang, M.H., Blunden, G., O'Neill M, J., Lewis, J.A. (1992). Tormentic acid and 2- α -Hydroxyursolic acid from *Arnebia euchroma*. *Planta Medica*, 58(2), 227.
125. Yao, S., Huang, X., Yang, S. (2006). Determination of L-shikonin in *Arnebia euchroma* oil extract. *Zhongguo Yiyuan Yaoxue Zazhi*, 26 (7), 902-903.
126. Yao, X., Ebizuka, Y., Noguchi, H., Kiuchi, F., Seto, H., Sankawa, U. (1984). Structure of arnebifuranone, new monoterpenylbenzoquinone from *Arnebia euchroma*. *Tetrahedron Letters*, 25(48), 5541-5542.
127. Yao, X.S., Ebizuka, Y., Noguchi, H., Kiuchi, F., litaka, Y., Sankawa, U. ve diğeri. (1983) Prostaglandin biosynthesis inhibitors of Nan-shikon, the root of *Arnebia euchroma*. *Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu*, 26, 134-141.
128. Yao, X.S., Ebizuka, Y., Noguchi, H., Kiuchi, F., Litaka, Y., Sankawa, U. ve diğeri. (1983) Structure of arnebinol, a new ansa-type monoterpenylbenzenoid with inhibitory effect on prostaglandin biosynthesis. *Tetrahedron Letters*, 24(23), 2407-2410.

129. Yao, X.S., Ebizuka, Y., Noguchi, H., Kiuchi, F., Shibuya, M., Iitaka, Y. ve diğerleri. (1991). Biologically active constituents of *Arnebia euchroma*: structures of new monoterpenylbenzoquinones: arnebinone and arnebifuranone. *Chemical Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, 39 (11), 2962-2964.
130. Ye, J., Mu, Q. (2009). Hydrophobic constituents of *Arnebia euchroma*. *Zhongyaocai*, 32 (10), 1553-1555.
131. Yesil-Celiktas, O., Sevimli, C., Bedir, E., Vardar-Sukan, F. (2010). Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(2), 158-163.
132. Zakhlenjuk, O.V. (1994). Characteristics of p-fluorophenylalanine-resistant *Macrotomia euchroma* cell cultures. *Biopolimer Kletka*, 10(2), 32-37. Ref: C.A. 122:235505 (1994).
133. Zare, K., Nazemiyeh, H., Movafeghi, A., Khosrowshahli, M., Motallebi-Azar, A., Dadpour, M. ve diğerleri. (2010) Bioprocess engineering of *Echium italicum* L.: induction of shikonin and alkannin derivatives by two-liquid-phase suspension cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 100(2), 157-164
134. Zhang, P.X., Li, H.M., Chen, D., Ni, J.H., Kang, Y.M., Wang, S.Q. (2007) Oleanolic acid induces apoptosis in human leukemia cells through caspase activation and Poly(ADP-ribose) polymerase cleavage. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 39(10), 803-809.
135. Zhao, X., Wang, G., Fei, H., Zhang, Y., Zhao, H., Wei, Y. (2008) Study on extraction of the effective constituents of *Arnebia euchroma* and their anti-inflammatory effect. *Zhongyao Yaoli Yu Linchuang*, 24(4), 36-38. Ref: C.A. 150:464140 (2009).

136. Zhen, H., Liao, M., Xuan, L., Guo, J. (2002) Contraceptive constituent from *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa*, 14(1), 1-4.
137. Zhu, F., Lu, F., Xiang, G. (1984) Isolation of shikonin and its derivatives by HPLC. *Sepu*, 1(2), 131-133.

ÖZGEÇMİŞ

13 Ekim 1987 tarihinde Konya’da doğdum. İlköğrenimimi Özel İdeal İlköğretim Okulu’nda, orta öğrenimimi Özel İdeal Anadolu Lisesi’nde tamamladım. 2004 yılında H. Ü. Eczacılık Fakültesi’ne girdim. 2008 yılında bu fakülteden mezun oldum. Aynı yıl Farmakognozi Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak göreve başladım. Halen aynı göreve devam etmekteyim.