



**TRAKYA BÖLGESİNDE YETİŞEN *Cirsium*
creticum (Lam.) D'Urv. subsp.
creticum (Asteraceae) bitkisinin
fitokimyasal incelenmesi ve
antioksidan aktivitesinin tayini**

Merve ÖZER

**Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Temine ŞABUDAK
2018**

T.C.

TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TRAKYA BÖLGESİNDE YETİŞEN *CIRSİUM CRETICUM* (LAM.) D'URV. SUBSP.
CRETICUM (ASTERACEAE) BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL İNCELENMESİ VE
ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Merve ÖZER

KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Prof. Dr. Temine ŞABUDAK

TEKİRDAĞ-2018

Her hakkı saklıdır



Bu tez TÜBİTAK tarafından 116Z450 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Prof. Dr. Temine ŞABUDAK danışmanlığında, Merve ÖZER tarafından hazırlanan “Trakya Bölgesinde Yetişen *Cirsium creticum* (Lam.) d’Urv. subsp. *creticum* (Asteraceae) Bitkisinin Fitokimyasal İncelenmesi ve Antioksidan Aktivitesinin Tayini” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Juri Başkanı : Doç. Dr. H. Hülya ORAK

İmza :

Üye : Prof. Dr. Temine ŞABUDAK

İmza :

Üye : Doç. Dr. Özlem DEMİRKIRAN

İmza :

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TRAKYA BÖLGESİNDE YETİŞEN *CIRSİUM CRETICUM* (LAM.) D'URV. SUBSP. *CRETICUM* (ASTERACEAE) BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL İNCELENMESİ VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Merve ÖZER

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Temine ŞABUDAK

Bu çalışmanın amacı, daha önce kimyasal içeriği ve biyolojik aktivitesi araştırılmamış olan, Trakya bölgesinde yetişen, *Cirsium creticum* (Lam.) d'Urv. subsp. *creticum* (Asteraceae) bitkisinin fitokimyasal bakımdan incelenmesi yapılarak özellikle yeni fenolik/flavonoid bileşiklerinin izolasyonu ve bu bileşiklerin kimyasal yapılarının tayinidir. Bu amaçla bitkide metanol, dietil eter, n-hekzan, etilasetat çözücüler ile ekstraksiyonlar yapılmış ve elde edilen ham ekstraktlarda toplam fenolik/flavonoid madde miktarı ile DPPH radikali giderim aktivitesi, ABTS•+ katyon radikali giderim aktivitesi, FRAP, β -karoten renk giderim aktivitesi, KUPRAK aktivitesi, süperoksit anyon radikali giderim aktivitesi yöntemleri kullanılarak antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre; ham ekstraktlarda en yüksek fenolik ve flavonoid madde miktarının MeOH ekstresinde olduğu belirlenmiştir. Antioksidan aktivite testlerine göre de metanol ekstresinin süperoksit anyon giderme kapasitesi ve KUPRAK aktivitesi dışında en yüksek aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Bu nedenle izolasyon çalışması için MeOH ekstresi seçilerek, maddeler birbirinden kromatografik yöntemlerle ayrılmış ve kimyasal yapıları 1D, 2D NMR ve MS teknikleriyle tayin edilmiştir. Çalışmanın sonucunda, *C. creticum* bitkisinden 5 alkil fenol (alkil kateşol), 1 ftalik ester ve 1 fenolik asit türevi olan 7 bileşik izole edilmiştir. İzole edilen 7 bileşik de *C. creticum* bitkisinden ilk defa izole edilmiştir. İzole edilen, miktarı fazla olan 2,3 ve 4 numaralı alkil fenol türevlerine üç yöntemle antioksidan aktivite testi uygulanmıştır. 2 numaralı bileşiğin ABTS•+ radikali giderme kapasitesi, KUPRAK ve FRAP aktivitesi bakımından diğer iki bileşikten daha yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Cirsium creticum*, Asteraceae, alkil fenoller, antioksidan aktivite, toplam fenolik madde miktarı, fenolik asit, alkil kateşol

2018, 181 Sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

PHYTOCHEMICAL INVESTIGATION OF *CIRSIIUM CRETICUM* (LAM.) D'URV.
SUBSP. *CRETICUM* (ASTERACEAE) PLANT WHICH GROWING IN TRAKYA REGION
AND DETERMINATION OF ITS ANTIOXIDANT ACTIVITY

Merve ÖZER

Namık Kemal University in Tekirdağ
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof.Dr. Temine ŞABUDAK

The aim of this study is to examination the phytochemical analysis of *Cirsium creticum* Lam.) d'Urv. subsp. *creticum* (Asteraceae) plant, which was grown in the Trakya region, whose chemical content and biological activity have not been investigated before, especially isolation of new phenolic / flavonoid compounds and determination of chemical structures of these compounds. For this purpose, plants were extracted by using methanol, diethyl ether, n-hexane, ethylacetate as solvent. Total phenolic / flavonoid content was determined in crude extracts and DPPH radical scavenging activity, ABTS^{•+} cation radical scavenging activity, FRAP capacity, β -carotene bleaching activity, CUPRAC and superoxide anion radical scavange activity methods applied for determination of antioxidant activity in crude extracts. As a result of this study; MeOH extract was revealed higher total phenolic/flavonoid content than the other extracts. According to antioxidant activity assays MeOH extract had highest antioxidant activity except superoxide anion radical scavange activity and CUPRAC activity. In the determination of antioxidant activity (except Superoxide and CUPRAC methods) MeOH extract was gave the best result. Therefore meOH extract was chosen for the isolation study and substances were separated by chromatographic methods and chemical structures were determined by 1D, 2D NMR and MS techniques. As a result of the work, 7 compounds including 5 alkyl phenol, 1 phthalic ester and 1 phenolic acid derivative were isolated from *C. creticum* plant. ABTS^{•+} scavenging activity and ferric-reducing antioxidant power (FRAP) applied to isolated compounds which are identified as 2,3 and 4 alkyl phenol derivates. The seven isolated compounds were first isolated from *C. creticum* plant. Antioxidant activity tests were applied to 2,3 and 4 alkyl phenol derivates which are isolated. ABTS^{•+} scavenging activity, CUPRAC and ferric-reducing antioxidant power (FRAP) of 2 numbered compound was found highest antioxidant activity.

Keywords: *Cirsium creticum*, Asteraceae, alkyl phenols, antioxidant activity, total phenolic content, phenolic acid, alkyl catechol

2018, 181 Pages

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL DİZİNİ	vi
TABLO DİZİ.....	x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	xiv
1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. Botanik Bilgiler.....	3
2.1.1. Asteraceae familyasının tanımı ve genel özellikleri	3
2.1.2. <i>Cirsium Mill.</i> cinsinin tanımı ve genel özellikleri.....	6
2.1.3. <i>Cirsium creticum</i> (Lam.) d'Urv. subsp. <i>creticum</i> (Asteraceae) türünün tanımı ve genel özellikleri.....	7
2.2. <i>Cirsium</i> Türleri İle İlgili Yapılan Kimyasal Çalışmalar.....	8
2.3. <i>Cirsium</i> Türleri İle İlgili Yapılan Biyolojik Aktivite Çalışmaları	12
2.4. Antioksidanlar.....	13
2.2.3. Fenolik Maddeler	15
2.4.1.1. Fenolik Asitler.....	17
2.4.1.2. Flavonoidler	18
2.4.1.3. Fenolik Lipidler.....	20
2.4.1.3.1. Alkilresorsinol.....	20
2.4.1.3.2. Alkilresorsinollerin Biyosentezi.....	21
2.4.1.4. Fenolik Polimerler (Tannenler).....	21
2.4.1.4.1. Kateşoller (Pirokateşol)	23
2.4.1.5. Fenolik Glikozitler	25
2.4.1.6. Fenolik Bileşiklerin İzolasyonu ve Yapı Tayinleri	25
3. MATERYAL VE YÖNTEM	31
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Belirteçler ve Cihazlar	31
3.2. DeneySEL Bölüm.....	36
3.2.1. Bitkinin Toplanması.....	36
3.2.2. Bitkinin Ekstraksiyonu	36

3.2.3. <i>C. creticum</i> Ham Ekstrelerinde Biyolojik Aktivite Tayini.....	37
3.2.3.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini	37
3.2.3.2. Toplam Flavonoid Madde Miktarı Tayini	37
3.2.3.3. Antioksidan Aktivite Tayini	38
3.2.3.3.1. DPPH Radikali Giderim Aktivitesi Tayini	38
3.2.3.3.2. ABTS ^{•+} Katyon Radikali Giderim Aktivitesi.....	39
3.2.3.3.3. Ferrik İyon İndirgeme Kapasitesi (FRAP).....	40
3.2.3.3.4. β-Karoten Renk Giderim Aktivitesi	41
3.2.3.3.5. Bakır (II) İndirgeme Gücü (KUPRAC)	41
3.2.3.3.6. Süperoksit Anyon Radikali Giderim Aktivitesi Tayini	42
3.2.4. Kromatografik Yöntemler Kullanılarak Yapılan İzolasyon Çalışmaları.....	42
3.2.4.1. <i>C. creticum</i> Bitkisinin MeOH Ekstresindeki Bileşiklerin İzolasyonu ve Saflaştırılması	42
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	45
4.1. <i>C. creticum</i> Bitkisinin Ham Ekstrelerinde Biyolojik Aktivite Tayini Sonuçları	45
4.1.1. <i>C. creticum</i> Ekstrelerinde Toplam Fenolik Madde Miktarı.....	45
4.1.2. <i>C. creticum</i> Ekstrelerinde Toplam Flavonoid Madde Miktarı.....	46
4.1.3. <i>C. creticum</i> Ekstrelerinde Antioksidan Aktivite Tayini Sonuçları	48
4.1.3.1. <i>C. creticum</i> Ekstrelerinde DPPH [•] Radikali Giderim Aktivitesi.....	48
4.1.3.2. <i>C. creticum</i> Ekstrelerinde ABTS ^{•+} Katyon Radikali Giderim Aktivitesi.....	50
4.1.3.3. <i>C. creticum</i> Ekstrelerinde Ferrik İyon İndirgeme Kapasitesi (FRAP)	52
4.1.3.4. <i>C. creticum</i> Ekstrelerinde β-Karoten Renk Giderim Aktivitesi.....	54
4.1.3.5. <i>C. creticum</i> Ekstrelerinde Bakır (II) İndirgeme Gücü (KUPRAC).....	55
4.1.3.6. <i>C. creticum</i> Ekstrelerinde Süperoksit Anyon Radikali Giderim Aktivitesi.....	58
4.1.4. <i>C. creticum</i> Bitkisinin Ham Ekstrelerinde Biyolojik Aktivite Tayini Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	59
4.2. <i>C. creticum</i> Bitkisinin Metanol Ekstresinden İzole Edilen Bileşikler	60
4.2.1. Alkil Fenoller (Alkil Kateşoller) ve Türevleri	60
4.2.1.1. 1 Numaralı Bileşik (CM-13-1-1-2): 4-(4',4'-dimetil-2'-vinil-desil) benzen-1,2-diol ..	60
4.2.1.2. 2 Numaralı Bileşik (CM-12-2-1): 2-O-α-D-glukopiranozil-4-(4',4'-dimetil-2'-vinil-desil) fenol.....	81
4.2.1.3. 3 Numaralı Bileşik (CM-12-4-1): 2-O-α-D-arabinofuranosil-4-(4',4'-dimetil-2'-vinil-desil) fenol.....	96
4.2.1.4. 4 Numaralı Bileşik (CM-13-4-1): 2-hidroksi-4-(4',4'-dimetil-2'-vinil-desil)- fenil-2",3",4"-trihidroksi bütanoat.....	106

4.2.1.5. 5 Numaralı Bileşik (CM-15-2-2): 2-hidroksi-4-(4',4'-dimetil-2'-vinil-desil)fenil-3'-hidroksi benzoat.....	118
4.2.2. Ftalik esterler	132
4.2.2.1. 6 Numaralı Bileşik (CM-9-1): Ftalik asit (2"-metil-pentil)-(2',2'-dimetil-nonil) esteri	132
4.2.3. Fenolik Asit Esterleri (Resorsinolik Asit Esterleri)	150
4.2.3.1. 7 Numaralı Bileşik (CM-3-1): (2'-3'-dihidroksipropil)-2,6-dihidroksi-3,5-dimetil benzoat	150
4.3. Elde Edilen Bileşiklerin Spektral Özellikleri	159
4.3.1. 1 Numaralı Bileşik CM-13-1-1-2.....	159
4.3.2. 2 Numaralı Bileşik CM-12-2-1.....	160
4.3.3. 3 Numaralı Bileşik CM-12-4-1.....	161
4.3.4. 4 Numaralı Bileşik CM-13-4-1.....	162
4.3.5. 5 Numaralı Bileşik CM-15-2-2.....	163
4.3.6. 6 Numaralı Bileşik CM-9-1	165
4.3.7. 7 Numaralı Bileşik CM-3-1	166
4.4. <i>C. creticum</i> Bitkisinden İzole Edilen ve Miktarı Yeterli Olan Bileşiklerin Antioksidan Aktivite Tayini.....	167
4.4.1. <i>C. creticum</i> Bitkisinden İzole Edilen ve Miktarı Yeterli Olan Bileşiklerin ABTS• ⁺ Katyon Radikali Giderim Aktiviteleri.....	167
4.4.2. <i>C. creticum</i> Bitkisinden İzole Edilen ve Miktarı Yeterli Olan Bileşiklerin Ferik İyon İndirgeme Kapasiteleri (FRAP).....	167
4.4.3. <i>C. creticum</i> Bitkisinden İzole Edilen ve Miktarı Yeterli Olan Bileşiklerin Kuprik İyon İndirgeme Kapasiteleri (KUPRAK).....	168
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	169
6. KAYNAKLAR.....	172
ÖZGEÇMİŞ.....	179

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2. 1. Asteraceae familyasının genel özellikleri (Anonim 2012).....	5
Şekil 2. 2. <i>Cirsium</i> türü bitki örnekleri (Sol baştan) <i>C. arvense</i> , <i>C. vulgare</i> , <i>C. japonicum</i> , <i>C. eriophorum</i> , <i>C. palustre</i> , <i>C. oligophyllum</i> , <i>C. arizonicum</i> , <i>C. polycephalum</i> , <i>C. esculentum</i>	6
Şekil 2. 3. <i>C. creticum</i> subsp. <i>creticum</i> (●), <i>C. creticum</i> subsp. <i>gaillardotii</i> (○)'un Türkiye'deki yayılış haritası (Köstekçi 2010).	7
Şekil 2. 4. <i>C. creticum</i> (Lam.) d'Urv. subsp. <i>creticum</i> (Asteraceae) bitkisi.....	8
Şekil 2. 5. hispidulin 7-neohesperidosit yapısı.....	9
Şekil 2. 6. 3,4-dihidroksibenzoik asit (Protokateşuik asit).....	9
Şekil 2. 7. Phomachalasins A-D bileşikleri (sırayla 1-4).....	10
Şekil 2. 8. (7E, 9R)-9-hidroksi-5, 7-megastigmadien-4-one-9-O- α -L-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glukopiranosit yapısı.....	10
Şekil 2. 9. quersetin-3-O-rutinosit (13), quersetin-3-O-neohesperidozit (14), apigenin-7-O-rutinosit (15), quersetin-3-O-glukopiranozit (16).....	11
Şekil 2. 10. (7S,8S)-Prebalanophonin (1), (7S,8S,7'R,8'S)-Prepikrasmalignan (2)	11
Şekil 2. 11. En yaygın fenolik bileşikler.....	17
Şekil 2. 12. Fenolik asitlerin sınıflandırılması.....	18
Şekil 2. 13. Flavonoidlerin genel yapısı.....	18
Şekil 2. 14. Flavonoidlerin iskelet yapıları (Kahraman 2002).	19
Şekil 2. 15. Flavonoidlerin sınıflandırılması	20
Şekil 2. 16. 1,3-dihidroksi-5-alkilbenzen (5-alkilresorsinol) yapısı	20
Şekil 2. 17. Alkilresorsinollerin biyosentez yolu.....	22
Şekil 2. 18. Kateşolün kimyasal yapısı	23
Şekil 2. 19. Kateşolün biyosentezi (Sun ve ark. 2013).	24
Şekil 2. 20. Önemli fenolik glikozitlerin bazıları	25
Şekil 2. 21. Bitki örneklerinden seçici ekstraksiyon yöntemiyle izolasyon işlemi şeması	26
Şekil 2. 22. Bitki örneklerinden diğer ekstraksiyon yöntemiyle izolasyon işlemi şeması	27
Şekil 3. 1. Kurutulmuş <i>C. creticum</i> (Lam.) d'Urv. subsp. <i>creticum</i> (Asteraceae) bitkisi.....	36
Şekil 3. 2. Silika jel ile karıştırılan metanol ekstresinin kolona eklenmeden önceki hali.....	43
Şekil 3. 3. Karışımın kolona tatbik edildikten sonraki hali	43
Şekil 4. 1. <i>C. creticum</i> için toplam fenolik madde tayini kateşin standart eğrisi	45
Şekil 4. 2. Toplam flavonoid madde kateşin standart eğrisi	46
Şekil 4. 3. Toplam flavonoid madde rutin standart eğrisi	47
Şekil 4. 4. <i>C. creticum</i> ekstrelerinin DPPH [•] radikal giderim aktivitesi	48
Şekil 4. 5. <i>C. creticum</i> ekstrelerinin DPPH [•] radikal giderme aktivitesi (%)	49
Şekil 4. 6. <i>C. creticum</i> ekstrelerinin DPPH [•] radikal giderim aktivitesine ilişkin EC ₅₀ değerleri	50
Şekil 4. 7. Troloks için ABTS ^{•+} (TEAC) standart çalışma grafiği	51
Şekil 4. 8. <i>C. creticum</i> ekstrelerinin ABTS ^{•+} radikali giderme aktivitesi	51
Şekil 4. 9. Ferrik iyon indirgeme kapasitesi (FRAP), FeSO ₄ .7H ₂ O standart eğrisi	52
Şekil 4. 10. <i>C. creticum</i> ekstrelerinin Ferrik iyon indirgeme kapasitesi (FRAP).....	53
Şekil 4. 11. <i>C. creticum</i> ekstrelerinin FRAP aktivitesi EC ₅₀ değerleri	54

Şekil 4. 12. <i>C. creticum</i> ekstrelerinin β -karoten linoleik asit emülsiyon sisteminde, linoleik asit asit oksidasyonuna inhibisyon etkisi	55
Şekil 4. 13. Troloks için KUPRAK standart çalışma grafiği	56
Şekil 4. 14. <i>C. creticum</i> ekstrelerinin konsantrasyona bağlı Kuprik iyon indirgeme kapasiteleri	57
Şekil 4. 15. <i>C. creticum</i> ekstrelerinin Süperoksit anyon radikali giderim aktivitesi	58
Şekil 4. 16. (4',4'-dimetil-2'-vinil-desil) benzen-1,2-diol yapısı.....	60
Şekil 4. 17. 1 Numaralı bileşiğin HMBC etkileşimleri.....	61
Şekil 4. 18. 1 numaralı bileşiğin kütle spektrumunda gözlenen bölünmeler	62
Şekil 4. 19. 1 Numaralı bileşiğin ^1H NMR spektrumu	63
Şekil 4. 20. 1 Numaralı bileşiğin ^1H NMR spektrumu	64
Şekil 4. 21. 1 Numaralı bileşiğin APT spektrumu (CDCl_3)	65
Şekil 4. 22. 1 Numaralı bileşiğin APT spektrumu (CDCl_3)	66
Şekil 4. 23. 1 Numaralı bileşiğin APT spektrumu (CDCl_3)	67
Şekil 4. 24. 1 Numaralı bileşiğin HSQC spektrumu.....	68
Şekil 4. 25. 1 Numaralı bileşiğin HSQC spektrumu.....	69
Şekil 4. 26. 1 Numaralı bileşiğin HSQC spektrumu.....	70
Şekil 4. 27. 1 Numaralı bileşiğin HSQC spektrumu.....	71
Şekil 4. 28. 1 Numaralı bileşiğin HSQC spektrumu.....	72
Şekil 4. 29. 1 Numaralı bileşiğin ^1H - ^1H COSY spektrumu	73
Şekil 4. 30. 1 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumu.....	74
Şekil 4. 31. 1 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumu.....	75
Şekil 4. 32. 1 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumu.....	76
Şekil 4. 33. 1 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumu.....	77
Şekil 4. 34. 1 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumu.....	78
Şekil 4. 35. 1 Numaralı bileşiğin ESI-MS spektrumları	79
Şekil 4. 36. 1 Numaralı bileşiğin LC-QTOF spektrumu	80
Şekil 4. 37. 2-O- α -D-glukopiranozil-4-(4',4'-dimetil-2'-vinil-desil) fenol yapısı.....	81
Şekil 4. 38. 2 numaralı bileşiğin kütle spektrumunda gözlenen bölünmeler	83
Şekil 4. 39. 2 Numaralı bileşiğin ^1H NMR spektrumu	84
Şekil 4. 40. 2 Numaralı bileşiğin ^1H NMR spektrumu	85
Şekil 4. 41. 2 Numaralı bileşiğin APT spektrumu (CDCl_3)	86
Şekil 4. 42. 2 Numaralı bileşiğin APT spektrumu (CDCl_3)	87
Şekil 4. 43. 2 Numaralı bileşiğin APT spektrumu (CDCl_3)	88
Şekil 4. 44. 2 Numaralı bileşiğin HSQC spektrumu.....	89
Şekil 4. 45. 2 Numaralı bileşiğin ^1H - ^1H COSY spektrumu.....	90
Şekil 4. 46. 2 Numaralı bileşiğin ^1H - ^1H COSY spektrumu.....	91
Şekil 4. 47. 2 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumu.....	92
Şekil 4. 48. 2 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumu.....	93
Şekil 4. 49. 2 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumu.....	94
Şekil 4. 50. 2 Numaralı bileşiğin ESI-MS spektrumu	95
Şekil 4. 51. 2-O- α -D-arabinofuranosil-4-(4',4'-dimetil-2'-vinil-desil) fenol.....	96
Şekil 4. 52. 3 numaralı bileşiğin kütle spektrumunda gözlenen bölünmeler	98
Şekil 4. 53. 3 Numaralı bileşiğin ^1H NMR spektrumu	99

Şekil 4. 54. 3 Numaralı bileşiğin APT spektrumu (CD ₃ OD)	100
Şekil 4. 55. 3 Numaralı bileşiğin APT spektrumu (CD ₃ OD)	101
Şekil 4. 56. 3 Numaralı bileşiğin ¹ H- ¹ H COSY spektrumu	102
Şekil 4. 57. 3 Numaralı bileşiğin ¹ H- ¹ H COSY spektrumu	103
Şekil 4. 58. 3 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumu.....	104
Şekil 4. 59. 3 Numaralı bileşiğin ESI-MS spektrumları	105
Şekil 4. 60. 2-hidroksi-4-(4',4'-dimetil-2'-vinil-desil)- fenil-2'',3'',4''-trihidroksi bütanoat yapısı	106
Şekil 4. 61. 4 Numaralı bileşiğin HMBC etkileşimleri.....	107
Şekil 4. 62. 4 numaralı bileşiğin kütle spektrumunda gözlenen bölünmeler	108
Şekil 4. 63. 4 Numaralı bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	109
Şekil 4. 64. 4 Numaralı bileşiğin APT spektrumu (CDCl ₃)	110
Şekil 4. 65. 4 Numaralı bileşiğin HSQC spektrumu.....	111
Şekil 4. 66. 4 Numaralı bileşiğin ¹ H- ¹ H COSY spektrumu	112
Şekil 4. 67. 4 Numaralı bileşiğin ¹ H- ¹ H COSY spektrumu	113
Şekil 4. 68. 4 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumu.....	114
Şekil 4. 69. 4 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumu.....	115
Şekil 4. 70. 4 Numaralı bileşiğin ESI-MS spektrumları	116
Şekil 4. 71. 4 Numaralı bileşiğin LC-QTOF spektrumu	117
Şekil 4. 72. 2-hidroksi-4-(4',4'-dimetil-2'-vinil-desil) fenil-3-hidroksi benzoat yapısı.....	118
Şekil 4. 73. 5 Numaralı bileşiğin HMBC etkileşimleri.....	120
Şekil 4. 74. 5 numaralı bileşiğin kütle spektrumunda gözlenen bölünmeler	120
Şekil 4. 75. 5 Numaralı bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	121
Şekil 4. 76. 5 Numaralı bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	122
Şekil 4. 77. 5 Numaralı bileşiğin APT spektrumu (CDCl ₃)	123
Şekil 4. 78. 5 Numaralı bileşiğin APT spektrumu (CDCl ₃)	124
Şekil 4. 79. 5 Numaralı bileşiğin ¹ H- ¹ H COSY spektrumu	125
Şekil 4. 80. 5 Numaralı bileşiğin ¹ H- ¹ H COSY spektrumu	126
Şekil 4. 81. 5 Numaralı bileşiğin HSQC spektrumu.....	127
Şekil 4. 82. 5 Numaralı bileşiğin HSQC spektrumu.....	128
Şekil 4. 83. 5 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumu.....	129
Şekil 4. 84. 5 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumu.....	130
Şekil 4. 85. 5 Numaralı bileşiğin ESI-MS spektrumu	131
Şekil 4. 86. Ftalik asit (2''-metil-pentil)-(2',2'-dimetil-nonil) esteri yapısı.....	132
Şekil 4. 87. 6 Numaralı bileşiğin HMBC etkileşimleri.....	133
Şekil 4. 88. 6 numaralı bileşiğin kütle spektrumunda gözlenen bölünmeler	134
Şekil 4. 89. Ftalik esterlerin ana kütle bölünmesi.....	134
Şekil 4. 90. 6 Numaralı bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	135
Şekil 4. 91. 6 Numaralı bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	136
Şekil 4. 92. 6 Numaralı bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	137
Şekil 4. 93. 6 Numaralı bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	138
Şekil 4. 94. 6 Numaralı bileşiğin APT spektrumu (CDCl ₃)	139
Şekil 4. 95. 6 Numaralı bileşiğin APT spektrumu (CDCl ₃)	140
Şekil 4. 96. 6 Numaralı bileşiğin APT spektrumu (CDCl ₃)	141

Şekil 4. 97. 6 Numaralı bileşiğin HSQC spektrumu	142
Şekil 4. 98. 6 Numaralı bileşiğin ¹ H- ¹ H COSYspektrumu	143
Şekil 4. 99. 6 Numaralı bileşiğin ¹ H- ¹ H COSYspektrumu	144
Şekil 4. 100. 6 Numaralı bileşiğin ¹ H- ¹ H COSYspektrumu.....	145
Şekil 4. 101. 6 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumu	146
Şekil 4. 102. 6 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumu	147
Şekil 4. 103. 6 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumu	148
Şekil 4. 104. 6 Numaralı bileşiğin LC-QTOF/MS spektrumu	149
Şekil 4. 105. (2'-3'-dihidroksipropil)-2,6-dihidroksi-3,5-dimetil benzoat.....	150
Şekil 4. 106. 7 Numaralı bileşiğin HMBC etkileşimleri.....	151
Şekil 4. 107. 7 numaralı bileşiğin kütle spektrumunda gözlenen bölünmeler	151
Şekil 4. 108. 7 Numaralı bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	152
Şekil 4. 109. 7 Numaralı bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	153
Şekil 4. 110. 7 Numaralı bileşiğin APT spektrumu (CD ₃ OD)	154
Şekil 4. 111. 7 Numaralı bileşiğin HSQC spektrumu.....	155
Şekil 4. 112. 7 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumu	156
Şekil 4. 113. 7 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumları.....	157
Şekil 4. 114. 7 Numaralı bileşiğin LC-QTOF spektrumları.....	158
Şekil 4. 115. İzole edilen bileşiklerin ABTS•+ radikali giderme aktiviteleri	167
Şekil 4. 116. İzole edilen bileşiklerin Ferik İyon İndirgeme Kapasiteleri (µmol Fe ²⁺ /g ekstrat)	168
Şekil 4. 117. İzole edilen bileşiklerin Kuprik İyon İndirgeme Kapasiteleri (KUPRAC)	168

TABLO DİZİNİ

Tablo 2. 1. <i>Cirsium creticum</i> (Lam.) d'Urv. subsp. <i>creticum</i> (Asteraceae) türünün sistematikteki yeri	3
Tablo 2. 2. antioksidanların sınıflandırılması (Kasun 2017).....	15
Tablo 2. 3. Fenolik bileşiklerin kağıt kromatografisi ile ayrılmasında kullanılan çözücü sistemi.....	28
Tablo 3. 1. Ekstrakt çözeltilerinin farklı dilüsyonlarının tüplerde hazırlanışı.....	39
Tablo 4. 1. <i>C. creticum</i> ekstrelerinin toplam fenolik madde içeriği	46
Tablo 4. 2. <i>C. creticum</i> ekstrelerinin toplam flavonoid madde içerikleri	47
Tablo 4. 3. <i>C. creticum</i> ekstrelerinin DPPH• giderim aktivitesi (% İnhibisyon)	49
Tablo 4. 4. <i>C. creticum</i> ekstrelerinin ABTS•+ radikali giderme aktivitesi	51
Tablo 4. 5. <i>C. creticum</i> ekstresinde ferrik iyon indirgeme kapasitesi FRAP ($\mu\text{mol Fe}^{2+}$ g-1 ekstrat)	52
Tablo 4. 6. <i>C. creticum</i> ekstrelerinin ferrik iyon indirgeme kapasitesi.....	53
Tablo 4. 7. <i>C. creticum</i> ekstrelerinin β -karoten linoleik asit reaksiyon ortamında, inkübasyon süresince 470 nm'de absorbans değerleri	54
Tablo 4. 8. <i>C. creticum</i> ekstrelerinin β -karoten linoleik asit emülsiyon sisteminde, oksidasyon hızına % inhibisyon etkisi.....	55
Tablo 4. 9. Standart eğri için Troloksun hacim-konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi	56
Tablo 4. 10. <i>C. creticum</i> ekstrelerinin konsantrasyona bağlı Kuprik iyon indirgeme kapasiteleri (mM Troloks g ekstrat-1).....	57
Tablo 4. 11. <i>C. creticum</i> ekstrelerinin % süperoksit inhibisyon kapasiteleri	58

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	: 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)
APT	: Proton saldırı testi
BHT	: Bütil hidroksi tolüen
BHA	: Bütil hidroksi anisol
CAT	: Kateşin
CDCl ₃	: Dötero kloroform
CD ₃ OD	: Dötero metanol
CHCl ₃	: Kloroform
CM	: <i>Creticum</i> metanol ekstresi
COSY	: Correlation Spektroskopisi
δ	: Kimyasal kayma
<i>d</i>	: Dublet
<i>dd</i>	: Duple dublet
<i>ddd</i>	: Triple dublet
dk	: Dakika
DEPT	: Polarizasyon transferi tarafından distorsiyonsuz geliştirme
DPPH	: 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)
EC ₅₀	: Bir kimyasalın en etkili olduğu konsantrasyonun yarısı
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
FCR	: Folin&Ciocalteu reaktifi
FRAP	: Ferrik iyon indirgeme kapasitesi
GC	: Gaz kromatografisi
HMBC	: Heteronuclear Multi Bond Coherence
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

HSQC	: Heteronükleer single quantum coherence spectroscopy
Hz	: Hertz
IR	: İnfrared (Kızıl ötesi)
J	: Yarılma sabiti
λ	: Dalga boyu
<i>m</i>	: Multiplet
MeOH	: Metanol
MHz	: Megahertz
MS	: Kütle spektroskopisi
ν	: Frekans
NA	: Naturstoffreagenz reaktifi
NaAc	: Sodyum asetat
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NaOH	: Sodyum hidroksit
nm	: Nanometre
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
PMS	: fenozin metosülfat
ppm	: Per part million
QER	: Kuersetin
RP-HPLC	: Ters faz kromatografisi
<i>s</i>	: singlet
<i>t</i>	: Triplet
TEAC	: Trolox eşdeğeri
TLC	: İnce tabaka kromatografisi
TMS	: Tetrametilsilan

TPTZ	: 2,4,6-tris(2-pyridil)-s-triazine
Tween -40	: Polioksi etilen sorbitan monopalmitat
UV	: Ultraviyole (Mor ötesi)



ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Namık Kemal Üniversitesi Kimya Bölümü Organik Kimya Ana Bilim Dalı, Organik Kimya Araştırma Laboratuvarında ve Teknik Bilimler Meslek Yüksek Okulu, Gıda Teknolojisi Bölümü, Gıda Analiz Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Bu araştırmanın planlanmasında ve yürütülmesinde, çalışmalarım süresince benden bilgisini, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek, akademik olduğu kadar günlük ilişkilerde de engin fikirleriyle yetişme ve gelişmeye katkıda bulunan, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Temine ŞABUDAK'a,

Antioksidan aktivite ve miktar tayini çalışmaları sırasında yardımlarını esirgemeyen, her türlü bilgi ve laboratuvar imkanı sağlayan hocam Sayın Doç. Dr. H. Hülya ORAK'a sonsuz saygı, teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi birikimlerini ve deneyimlerini benimle paylaşan hocam Sayın Doç. Dr. Yelda YALÇIN GÜRKAN'a,

Deneylerim esnasında yardımlarını benden hiçbir zaman esirgemeyen yüksek lisans arkadaşlarım Hilmican ÇALIŞKAN'a ve İlayda BAHRİSEFİT'e,

Ayrıca tüm hayatım boyunca olduğu gibi yüksek lisans çalışmalarım süresince de benden desteklerini esirgemeyen, bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan aileme ve dostlarıma teşekkürlerimi sunarım.

TÜBİTAK tarafından 116Z450 numaralı proje kapsamında sağlanan maddi destek için teşekkür ederim.

Temmuz, 2018

Merve ÖZER

1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI

İnsanoğlu ilk çağlardan bu yana başta besin gereksimini karşılamak için çeşitli amaçlarla bitkisel ürünlere ilgi göstermiştir. Daha sonra onları planlı bir şekilde kullanmaya, faydalı olduğunu düşündüğünü üretmeye ve geliştirmeye çalışmıştır. Bitkileri tanımaya çalışmış, deneme yanılma yöntemiyle, onları zararlı-zararsız olarak sınıflandırmıştır.

Topluluklar geliştikçe insan ömrü uzamaya ve yeni hastalıklar ortaya çıkmaya başlamıştır. Hastalıklar ortaya çıktıkça, tedavi bulmak amacıyla doğaya başvurmuş ve bitkilerden yararlanmak istemiştir. Onları karıştırarak, kurutarak, kaynatarak, macun haline getirerek kullanmıştır, bu yolla hastalıklara çare aramışlardır.

Bu nedenle; tıbbi bitkilerin tarihçesi; insanlık tarihi kadar eskiye dayanmaktadır (Karuncula 2013). Tıbbi bitkilerin hastalıkların tedavisinde bir kaynak olarak kullanılmasının ilk bilimsel izleri ve yazılı delilleri; binlerce yıl önceki Çin, Hint ve Yakındoğu medeniyetlerine kadar uzanmaktadır. Bugünkü Çin tıbbı; 2000 yıl önceki geleneksel halk hekimliğine dayandırılmaktadır. Çin hekimliğinde kullanılan ilaçların; genellikle kan, nefes ve su dolaşimleri için gerekli bileşikleri içeren reçeteler şeklinde olduğu bilinmektedir (Sütlüpinar 1994).

Bitkisel tıbaa ait ilk yazılı belge, M.Ö. 3000 yıllarına ait Ninova Tabletleri'dir. Bu belgeler, Mezapotamya'da, bitkisel ve hayvansal ilaçlarla tedavilerin yapılabildiğini kanıtlamıştır (Sütlüpinar 1994). Dioscoridis 'İlaçlar Bilgisi' adlı kitabı yazmış, bu kitapta Anadolu ve Doğu Ülkelerinin tıbbi bitkileri hakkında bilgilere yer vermiştir. Adana yakınlarındaki Anavarza'da doğan Dioscoridis'in; MS. 1 yy.'da yazdığı bu kitapta 500'den fazla tıbbi bitki kayıtlıdır. Selçuklu ve Osmanlı döneminde de birçok tıbbi bitkinin kültürü, ticareti yapılmış ve bunlar tedavi amaçlı kullanılmıştır (Ataç ve Yıldırım 2015).

Teknolojiyle birlikte ilaç sanayisi de hızla gelişmiştir. Sağlıklı ve uzun yaşama isteği ilaçlara olan talebi arttırmıştır. Sentetik yolla ilaç üretimi bir dönem ivme kazansa da bitki gibi doğal kaynaklardan yapılan ilaçlar kadar zararsız, daha az yan etkili ve ekonomik değillerdir. Bu sebeplerden dolayı ilaç sanayisinin yönü tekrar doğaya çevrilmiştir (Karuncula 2013).

Fenolik bileşikler; bitkiler âleminde en çok bulunan bileşik sınıfıdır. Bitki metabolizmalarının hepsinde sekonder metabolit olarak bulunurlar. Ancak hepsinin tam olarak

görevleri belirlenememiştir. Dolayısıyla bitkisel kökenli bütün gıdalarda bulunurlar. Bazı bitkilerin koku salgılamasını sağlar. Meyve ve sebzeler ile bunlardan elde edilen ürünler için de oldukça önemlidirler. Onların lezzetinin oluşmasını ve sarı, sarı-esmer, kırmızı-mavi tonlardaki renklerinin oluşmasını da sağlamaktadırlar. Özellikle meyveler, içerdikleri fenolik bileşiklerin antioksidatif ve antimikrobiyal etkilerinden dolayı sağlık üzerine olumlu katkı sağladıkları için, fonksiyonel gıda olarak nitelendirilirler. Ayrıca gıdalarda, enzim inhibisyonuna neden olmaları ve değişik gıdalarda kalite kontrol kriteri olmalarından dolayı büyük önem taşırlar. Bunların yanısıra endüstride; patlayıcı madde, ilaç, farmasötik, boya, plastik, kâğıt, pestisit ve antioksidanların üretimi gibi birçok alanda kullanılmaktadırlar (Anonim 2013).

Asteraceae familyası doğada kutuplar dışında hemen hemen her yerde bulunmaktadır. *Cirsium* Mill. Cinsi Avrasya, Kuzey Amerika ve Afrika'da yayılış gösteren 250 tür ile temsil edilmektedir (Kadereit ve Jeffrey 2007). Ülkemizde de oldukça yaygındır.

Cirsium Mill. (Köygöçüren) cinsine ait olan birçok taksonun halk arasında değişik amaçlar için yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir. Genellikle kök, tohum, gövde ve çiçeklerin kaynatılması ile hazırlanan ekstraksiyonlar, peptik ülser, hemoroid, varis, öksürük ve bronşit gibi başlıca rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Loizzo ve ark. 2004, Orhan ve ark. 2007). Genç ve Özhatay (2006), Çatalca'da (İstanbul) yapmış oldukları etnobotanik çalışmalarında *C. creticum* subsp. *creticum* (eşekçalısı) taksonunun meyvelerinin ise halk arasında mantar zehirlenmelerine karşı kullanıldığını tespit etmişlerdir. Yine başka bir çalışmada ise *C. creticum* subsp. *creticum* taksonunun gövdelerinin kabuklarının soyulup çiğ olarak yenildiği yada yemeğinin yapıldığı bildirilmiştir (Kızılarıslan ve Özhatay 2012).

Bu çalışmanın amacı, daha önce kimyasal içeriği ve biyolojik aktivitesi araştırılmamış olan, Trakya bölgesinde yetişen, *Cirsium creticum* (Lam.) d'Urv. subsp. *creticum* (*Asteraceae*) bitkisinin fitokimyasal bakımdan incelenmesi yapılarak özellikle yeni fenolik/flavonoid bileşiklerinin izolasyonu ve bu bileşiklerin kimyasal yapılarının tayinidir. Çalışmanın diğer adımında, bitkiden elde edilen 4 ekstrede (n-hekzan, eter, etilasetat ve metanol), toplam fenolik/flavonoid madde miktarı ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi, bunun yanında da izole edilen ve miktarı fazla olan saf maddelerde antioksidan aktivitenin tayini gerçekleştirilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Botanik Bilgiler

Cirsium creticum (Lam.) Da'urv. subsp. *creticum*; *Asteraceae* familyasına ait *Cirsium* Mill. cinsine aittir. Halk arasında “eşek çalısı” olarak da bilinir. Diğer bilinen adları “*Bull Thistle*” ve “*Cardo Cretese*”’dir.

Tablo 2. 1. *Cirsium creticum* (Lam.) d’Urv. subsp. *creticum* (*Asteraceae*) türünün sistematikteki yeri

ALEM	<i>Plantae</i>
ALT ALEM	<i>Tracheobionta</i>
BÖLÜM	<i>Magnaliophyta</i>
SINIF	<i>Magnoliopsida</i>
ALT SINIF	<i>Asteridae</i>
TAKIM	<i>Asterales</i>
FAMİLYA	<i>Asteraceae</i>
CİNS	<i>Cirsium</i>
TÜR	<i>Cirsium creticum</i> (Lam.) d’Urv

2.1.1. *Asteraceae* familyasının tanımı ve genel özellikleri

Ailenin adı yıldız şeklinde çiçekleri olan “Aster” cinsinden gelir. Çiçekleri, bir başta birden çok çiçek vermesi (kompozit yapısı) nedeniyle bu aile “*Compositae*” olarak da adlandırılmıştır. Genellikle otsu, çok azı çalı ağaç ya da odunsu sarılıcı bitkilerdir. Kuraklığa uyumlu ve çok güneş isteyen bitkilerdir. Yaprakları çok çeşitlidir. Basit ya da birleşik, stipulsuz, alternat, rozet şeklindedir. Marul, yıldız çiçeği, karahindiba, kasımpatı en bilinen *Asteraceae* familyası üyeleridir.

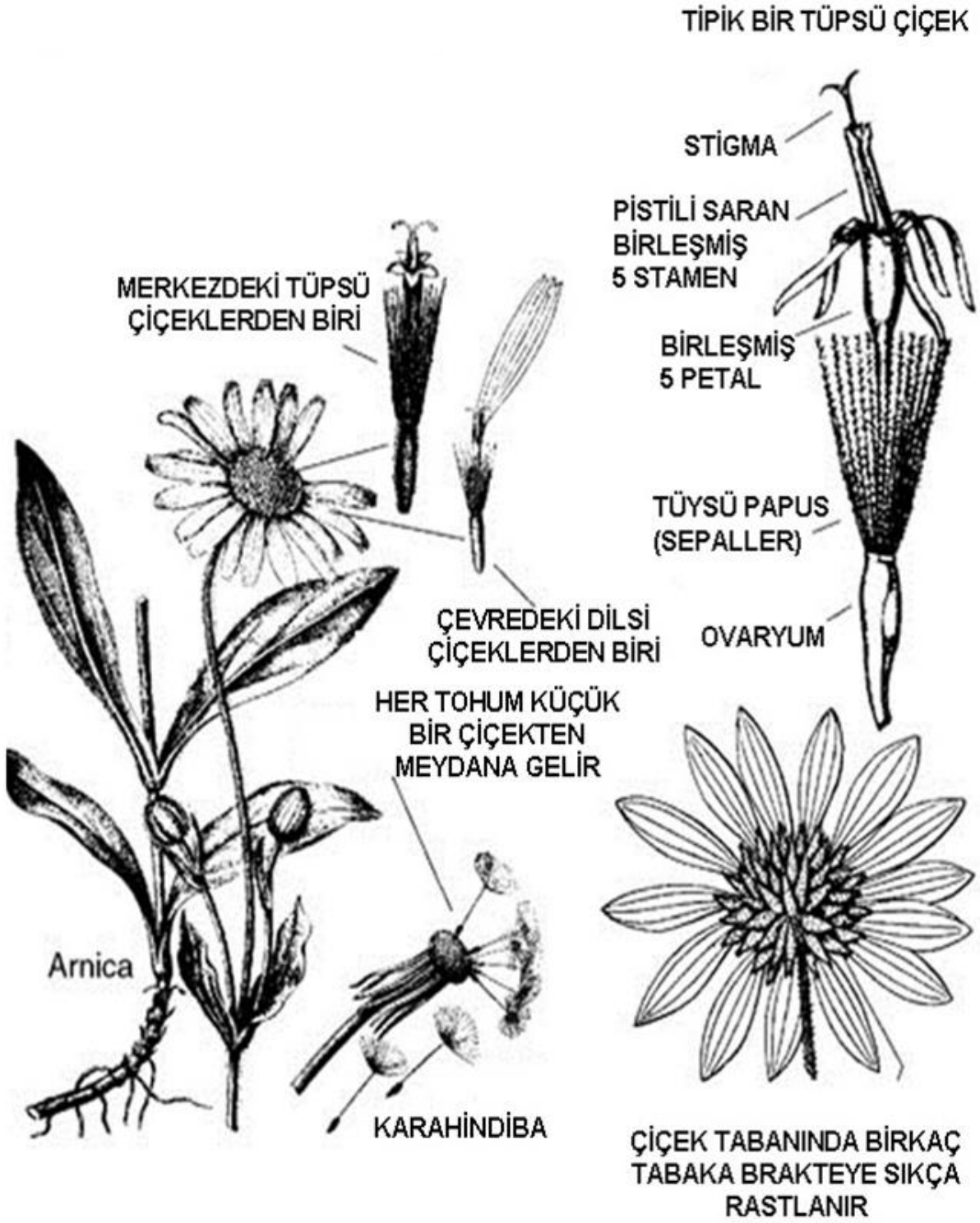
Dünyanın en kalabalık bitki ailelerindendir. Kutuplar hariç dünyanın hemen her yerinde bulunan bu familya özellikle Amerika’nın güneybatısı ve Meksika, Brezilya’nın güneyi, And

Dağları boyunca, Akdeniz Bölgesi, Güneybatı Asya, Orta Asya, Güney Afrika ve Avustralya'da yoğun olarak bulunmaktadır (Bremer 1994).

Asteraceae ailesi; Türkiye florasında toplam 1209 tür olarak kaydedilmiştir. Tür sayısı bakımından ilk sırada yer alır. Bu türlerin 447'si endemiktir ve 134 cinsi vardır (Davis ve ark. 1988, Özhatay ve Kültür 2006, Doğan 2007).

İki çenekliler sınıfından bir bitki familyasıdır. Çiçekler genellikle çok sayıdadır; ama nadiren tek ve sapsız olabilmektedir. Çiçek halkaları pul veya tüysü çanak yapraklardan oluşur. Tüysü ise papus adı verilir. Bitki; olgunlukta açılmayan tohum taşımaktadır. Yani meyveleri hem meyve hem de tohumdur. Buna örnek olarak ayçiçeğinin tohumu olan ay çekirdeği verilebilir.

Asteraceae familyası iki gruptan oluşmaktadır. Birincisi tek oymaklı Güney Amerika'da yayılış gösteren *Barnadesioideae* alt familyasıdır. İkincisi ise geri kalan oymakların oluşturduğu gruptur. Bu oymaklar *Mutisioideae*, *Carduoideae*, *Cichorioideae* ve *Asteroideae* alt familyaları altında toplanmışlardır. *Cirsium* cinsinin içinde yer aldığı *Carduinae* alt oymak *Cynareae* oymağıdır. *Cynareae* oymağı da *Carduoideae* alt familyasında yer almaktadır. *Carduoideae* alt familyasında yaklaşık 241 cinse ait yaklaşık 2.600 tür bulunmaktadır (Kadereit ve Jeffrey 2007).



Şekil 2. 1. Asteraceae familyasının genel özellikleri (Anonim 2012).

2.1.2. *Cirsium* Mill. cinsinin tanımı ve genel özellikleri

Cirsium kelimesi; eskiden damar hastalıkları için tedavi amacıyla kullanıldığından, damar hastalığı anlamına gelen Yunan kökenli '*kirsos*' kelimesinden gelmektedir. Philip Miller'in 1754'te yayınladığı '*The Gardens Dictionary*' adlı eserinde ilk kez detaylı olarak yer verilmiştir. Halk arasında 'Köygöçüren' olarak da bilinmektedir.

Cirsium cinsi; çok yıllıktır. İki yıllık ya da nadiren tek yıllık otsu bitkiler olarak da bulunan *Cirsium* cinsi bitkiler nadiren dişi ve erkek bitkiler farklı bitki üzerindedir (dioik); gövdeler dikenli-kanatlı ya da dikensiz, dallanmış ya da dallanmamıştır. *Cirsium* cinsinin, çoğunluğu Avrasya, Kuzey ve Doğu Afrika ile Kuzey Amerika'da olmak üzere günümüzde yaklaşık 250 türü bulunmaktadır. Türler genellikle kuzey yarımkürede yoğunlaşmış ve nemli alanlarda yayılış göstermektedir. Ülkemizde; 23'ü endemik 63 tür belirlenmiştir (Köstekçi 2010).

Cirsium; yapraklarının salgı kanallı olması ve köklerinin sürünücü kök olmaması ile diğer sekiyonlardan ayrılmaktadır.

Cirsium türü antik çağlardan bu yana tıbbi bir bitki olarak kabul edilir. *Cirsium* Mill. (Köygöçüren) cinsine ait olan birçok taksonun halk arasında farklı amaçlar için yaygın bir şekilde kullanıldığı bilinmektedir. Genellikle tohum, kök, gövde ve çiçeklerin kaynatılması ile hazırlanan ekstraksiyonlar, varis, hemoroid, peptik ülser, öksürük ve bronşit gibi başlıca rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Loizzo ve ark. 2004, Orhan ve ark. 2007). Ayrıca karaciğer ve safra kesesi hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Halk arasında çiçekli dalları, çiğ olarak tüketilerek; iştah açmak ve kuvvet vermek amacıyla da kullanılır.



Şekil 2. 2. *Cirsium* türü bitki örnekleri (Sol baştan) *C. arvense*, *C. vulgare*, *C. japonicum*, *C. eriophorum*, *C. palustre*, *C. oligophyllum*, *C. arizonicum*, *C. polycephalum*, *C. esculentum*.

2.1.3. *Cirsium creticum* (Lam.) d'Urv. subsp. *creticum* (Asteraceae) türünün tanımı ve genel özellikleri

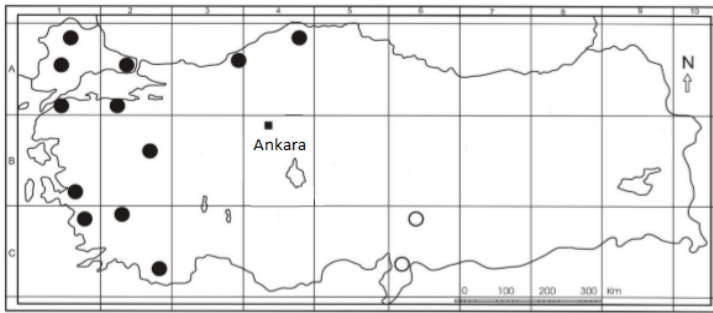
Cirsium creticum (Lam.) d'Urv. subsp. *creticum* (Asteraceae) halk arasında ‘‘Eşek çalısı’’ olarak da bilinmektedir. Diğer adı ‘‘*Cardo Cretese*’’dir.

Seritsi, alt yüzü beyaz ya da grimsi tüylü ve loblu yaprakları, yaprak uç lobunun yanal loblardan çok uzun olması ve fillarilerin ucunun, diken hariç yuvarlak olması tipik özellikleridir.

Çok dikenli, iki yıllık otsu bir bitkidir. 0-1300 metre arası yüksekliklerde yaşarlar. Endemik değildir. Bataklık ve nemli olan alanlarda yaşamaktadır. Boyları 60-100 cm arasındadır. Çiçek tablaları iri, sargı yaprakları uzun dikenlidir. Yaprakları tüysü kesik, kısa saplı, üstteki gövdeye bitişik haldedir. İri dikenli ve dişlidir (Köstekçi 2010).

C. vulgare 'ye oldukça fazla benzemektedir. *C. creticum* 'da yapraklar, özellikle de bazal ve medyan parçalar, bölünmez bir orta kısma sahiptir ve yaprakları *C. vulgare* 'den daha gelişmiş ve bu karakterin tanımlanması için ilk ve önemli bir unsurdur. *C. creticum* tohumlarının düzgün gri rengi vardır ve yaklaşık 2-3 mm uzunluğundadır; *C. vulgare* 'nin aksine, renkleri ve boyları daha büyüktür (Montanari ve ark. 2012).

Doğu Akdeniz ülkeleri ve İtalya'da yaygındır. Türkiye'de; Kuzeybatı Türkiye (Trakya), Batı Anadolu'da yetişmektedir.



Şekil 2. 3. *C. creticum* subsp. *creticum* (●), *C. creticum* subsp. *gaillardotii* (○)'un Türkiye'deki yayılış haritası (Köstekçi 2010).

C. creticum; halk arasında taze yaprakları öksürük, deri sivilceleri, nefes darlığı, çıban ve kötü huylu yaralar için kullanılmaktadır. Tohum ve yaprakların böbrek ağrılarında kullanıldığı bilinmektedir. Genç ve Özhatay (2006), Çatalca'da (İstanbul) yapmış oldukları etnobotanik çalışmasında *C. creticum* subsp. *creticum* (eşekçalısı) taksonunun meyvelerinin ise halk arasında mantar zehirlenmelerine karşı kullanıldığını tespit etmişlerdir. Başka bir

Çalışmada ise *C. creticum* subsp. *creticum* taksonunun gövdelerinin kabuklarının soyulup çiğ olarak yenildiğ i veya yemeğinin yapıldığı bildirilmiştir (Kızıllarslan ve zhatay 2012).

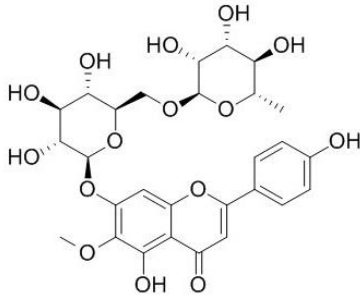


Şekil 2. 4. *C. creticum* (Lam.) d'Urv. subsp. *creticum* (Asteraceae) bitkisi

2.2. *Cirsium* Türleri İle İlgili Yapılan Kimyasal alışmalar

Kaneta ve arkadaşları (1978), *Composite* familyasına ait 16 farklı bitki türünü incelemişlerdir. *Cirsium* türünden, *C. nipponicum* (Maxim.) Makino ve *C. purpuratum* (Maxim.) Matsum bitkileri ile çalışılmıştır. Bu bitkilerin metanol ekstresinden yapılan ayırma ve yapı tayininde; kağıt kromatografisi, 2D kağıt kromatografisi ve UV yöntemleri kullanılmıştır. *C. nipponicum* (Maxim.) Makino bitkisinden Apigenin 7-O-glukozit; *C. purpuratum* (Maxim.) Matsum bitkisinden Luteolin 7-O-glukozit ve Apigenin bileşikleri elde edilmiştir.

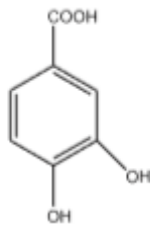
Park ve arkadaşları (1994), *C. japonicum* var. *ussuriense* bitkisinin metanol ekstratlarıyla yapmış oldukları çalışmada, cirsimaritin 4'-glukosit ve asetatın 7-rutinoside bileşiklerini ve ilk defa hispidulin 7-neohesperidosit flavonoid bileşiğini izole etmişlerdir. Bileşiklerin yapılarının belirlenmesinde UV, IR, ^1H ve ^{13}C NMR gibi spektroskopik yöntemler kullanılmıştır.



Şekil 2. 5. hispidulin 7-neohesperidosit yapısı

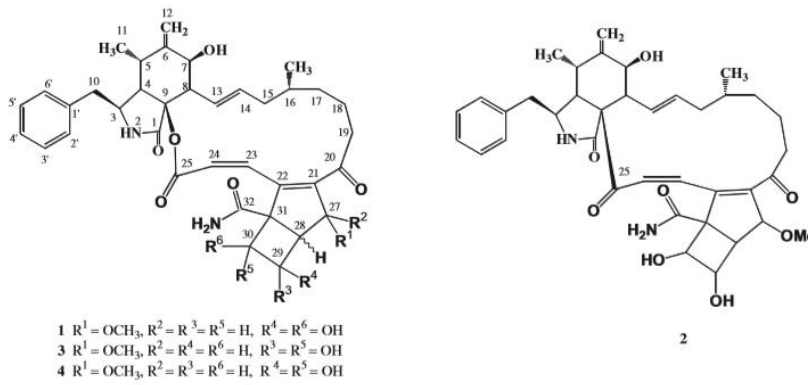
Iwashina ve arkadaşları (1999) *C. oligophyllum* yapraklarıyla yaptıkları çalışmada iki flavon glikoziti (hispidulin 4'-O- β -D-glukopiranosit ve nepetin 4'-O- β -D-glukopiranosit) izole etmişlerdir. Bileşiklerinin yapılarının belirlenmesinde, ^1H ve ^{13}C NMR, FAB-MS, UV gibi spektroskopik yöntemler kullanılmıştır.

Kozyra ve arkadaşları (2010), *C. oleraceum* (L.) Scop. bitkisinin metanol ekstresi ile yapmış oldukları çalışmada klorogenik, gallik, ellagik, rosmarinik, kafeik, protokateşuik, gentisik, hidroksi benzoik, p-kumarik, vanilik, ferrulik ve şiringik asit fenolik asitleri elde edilmiştir. Ayırma ve saflaştırmada 1D ve 2D TLC kullanılmış, RP-HPLC ile izole edilen bu bileşiklerin spektroskopik incelemeleri UV kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2. 6. 3,4-dihidroksibenzoik asit (Protokateşuik asit)

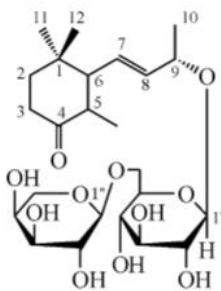
Evidente ve arkadaşları (2011) *C. arvense* bitkisi ile yaptıkları çalışma sonucunda UV, ^1H ve ^{13}C NMR, DEPT, HMBC, HSQC, ^1H - ^1H COSY, NOESY, HR-ESIMS yöntemlerini kullanarak 4 yeni sitoshalasins (phomashalasins A-D) bileşiklerini izole etmişlerdir.



Şekil 2. 7. Phomachalasins A-D bileşikleri (sırayla 1-4)

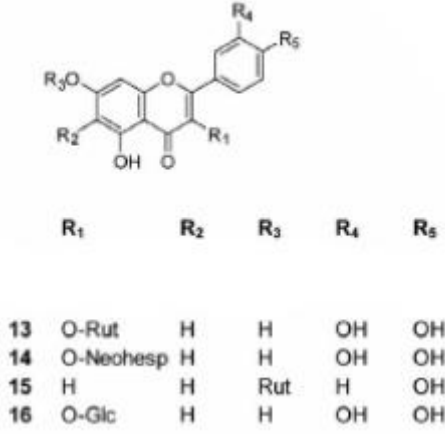
Boldizar ve arkadaşları (2012) *C. vulgare* bitkisinin meyve duvarında 2 farklı neolignan türü olan balanophonin ve butirolakton olduğunu kanıtlamışlardır. Bileşiklerinin yapılarının belirlenmesinde de NMR, GC-MS, LC-MS/MS, LC-TOFMS gibi spektroskopik yöntemleri kullanmışlardır.

Hai ve arkadaşları (2013) yapmış oldukları çalışmada, *C. setosum* (Willd.) MB. (*Compositae*) bitkisinden daha önce de izole edilmiş olan 6 farklı megastigmane bileşiğinin yanı sıra ilk defa glikozitli megastigmane olan (7E, 9R)-9-hidroksi-5, 7-megastigmadien-4-one-9-O- α -L-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glukopiranosit izole edilmiştir. İzole edilen bu bileşiklerin spektroskopik incelemeleri UV, IR, ^1H ve ^{13}C NMR, HMBC, HMQC, ^1H - ^1H COSY ve HR-ESI-MS yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



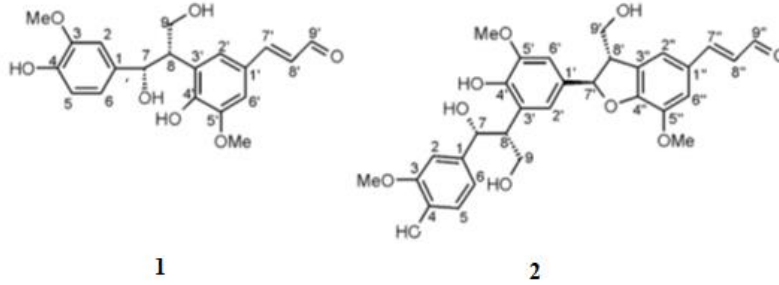
Şekil 2. 8. (7E, 9R)-9-hidroksi-5, 7-megastigmadien-4-one-9-O- α -L-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glukopiranosit yapısı

Abbet ve arkadaşları (2014), *C. spinosissimum* Scop. bitkisinin toprak üstü kısmında yaptıkları çalışma sonucunda çeşitli fenolik glikozitler, bir monoterpen lakton ve yağ asitleri dahil olmak üzere yirmi bileşik tanımlanmıştır. ^1H ve 2D NMR, ^{13}C NMR, ESI-MS spektroskopik yöntemler kullanılarak bileşiklerin yapıları aydınlatılmıştır.



Şekil 2. 9. quersetin-3-*O*-rutinosit (13), quersetin-3-*O*-neohesperidozit (14), apigenin-7-*O*-rutinosit (15), quersetin-3-*O*-glukopiranozit (16).

Solyomvary ve arkadaşları (2015), *C. eriophorum* (L.) Scop. bitkisi ile yaptıkları çalışma sonucunda, yeni bir balanophonin ve pikrasmalignan bileşikleri elde etmişlerdir. İzole edilen bu bileşiklerin spektroskopik incelemeleri ¹H ve ¹³C NMR, HPLC-MS, GC-MS yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2. 10. (7S,8S)-Prebalanophonin (1), (7S,8S,7'R,8'S)-Prepikrasmalignan (2)

C. creticum ile ilgili yapılan tek çalışma; *C. creticum* bitkisinin diğer üyesi olan *Cirsium creticum* (Lam.) D.'Urv. ssp. *triumfetti* (Lacaita) Werner bitkisinin esansiyel yağlarının kompozisyonu ve alleopatik etkisi incelenmiştir. Literatürdeki bu çalışmada, *C. creticum* *Triumfetti* bitkisinin su buharı destilasyonu ile elde edilen uçucu yağın bileşiminin incelenmesini konu almaktadır. GC-MS analizi sonucu, 4-etil guaiakol (%15), heksadekanoik asit (%10.6), (E) -β-damassenon (%7.8), dihidroaktinidiolit (% 6.0) ve 4-vinil guaiakol ana bileşiklerinin bu bitkideki varlığı gösterilmiştir. *C. creticum*, karşılaştırılan diğer bitkiye göre, daha iyi alleopatik aktivite göstermesine rağmen genel olarak iki bitki de alleopatik etkisi için yağlar zayıf bir inhibitör aktivite göstermişlerdir (Formisano ve ark. 2007). Literatürde yapılan

araştırmalar sonucunda, *C. creticum* bitkisi ile ilgili fitokimyasal bir çalışma bulunmamış olup, ilk kez bu çalışmada bu bitkinin fitokimyasal araştırması literatüre sunulmuş olacaktır.

2.3. *Cirsium* Türleri İle İlgili Yapılan Biyolojik Aktivite alışmaları

Endemik bir bitki olan *C. hypoleucum*'un metanol ekstresinden elde edilen ekstrenin yönlendirmeli fraksiyonlanması neticesinde n-butanol fraksiyonun kimyasal içeriği incelenmiştir. Kersetin-3-O-rutinozit (rutin) ve kemferol-3-O-rutinozit (nikotiflorin) bileşikleri izole edilmiştir. Bu bileşiklerin yapıları UV, IR, MS, ¹H ve ¹³C NMR teknikleri kullanılarak tayin edilmiştir. DPPH ve superoksit radikal süpürücü aktivite tayinleri uygulanmış ve iki analizde de rutin, nikotiflorine göre daha güçlü bir antioksidan etki gösterdiği bulunmuştur (Deliorman Orhan ve ark. 2007).

Nazaruk ve ark. (2008), 5 *Cirsium* türünün (*C. arvense*, *C. oleraceum*, *C. palustre*, *C. rivulare*, *C. vulgare*) antimikrobal ve antioksidan aktivitesini araştırmışlardır. Toplam tannin ve toplam fenolik analizleri sonuçlarına göre; toplam tannin içeriği en yüksek *C. oleraceum*, toplam fenolik içeriği en yüksek *C. palustre* olduğu gözlenmiştir. Antioksidan aktivite tayini ABTS katyon radikal giderim aktivitesi yöntemi ile belirlenmiş ve beş türünde aktivite sonuçları birbirine yakın bulunmuştur.

C. japonicum bitkisinin yapraklarınının metanol ve su ekstrelerinde, antikanser ve antioksidan aktivite tayini yapılmıştır. Antioksidan aktivite yöntemi olarak, DPPH radikal giderim aktivitesi yöntemi kullanılmıştır. En yüksek toplam fenolik, flavonoid içeriği ve DPPH aktivitesi yapraklarından elde edilen metanol ekstresinde saptanmıştır (Yin ve ark. 2008).

C. leucopsis DC. ve *C. sipyleum* O. Schwarz bitkilerinin kimyasal içerikleri, apolar bileşenleri, antioksidan ve antikolinesteraz aktiviteleri çalışılmıştır. Endemik olan her iki bitkinin toprak üstü kısımlarında sırasıyla petrol eteri, aseton ve metanol ile ekstraksiyon yapılmış, ekstrelerin toplam fenolik ve flavonoit miktarları tayin edildikten sonra β-karoten renk açılım, DPPH serbest radikali giderim, ABTS katyon radikali giderim, süperoksit anyon radikali giderim ve CUPRAC yöntemleri ile antioksidan aktiviteleri ve antikolinesteraz etkileri belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda hem toplam fenolik içerik hem de toplam flavonoit içerik bakımından *C. leucopsis* aseton ekstresinin ve *C. sipyleum* aseton ekstresinin flavonoit

içerik bakımından diğer ekstrelerden daha zengin oldukları saptanmıştır. DPPH aktivitesinde ve β -karoten renk açılım yönteminde tüm konsantrasyonlarda *C. leucopsis* en yüksek aktiviteyi göstermiştir. ABTS katyon radikali giderim aktivitesinde sadece *C. sipyleum* metanol ekstresi, süperoksit anyon radikali giderim aktivitesinde ise sadece *C. leucopsis* metanol ekstresi aktivite gösterirken, CUPRAC yönteminde hiçbir ekstrenin aktif olmadığı belirlenmiştir (Boğa 2012).

C. oleracum ve *C. rivulare* bitkilerinde toplam fenolik ve DPPH yöntemiyle antioksidan aktivite tayini yapılmış, iki bitki için de en yüksek aktivite metanol ekstresinde bulunmuştur (Nalewajko-Sieliwoniuk ve ark. 2012).

Nazaruk ve ark. (2012) diğer bir çalışmada *C. palustre* ve *C. rivulare* bitkilerinin meyve eksterelerinde toplam fenolik ve antioksidan aktivite tayini çalışması yapılmış, toplam fenolik içerikleri düşük çıkmıştır. Antioksidan aktivite DPPH yöntemiyle tayin edilmiştir ve metanol ekstreleri, n-hekzan ekstrelerinden daha yüksek aktivite göstermiştir.

Hassan ve ark. (2016) *C. wallichii* DC. bitkisinin çiçek, kabuk ve yapraklarının petrol eteri, metanol, su ve kloroform ekstrelerinde antimikrobiyal ve antioksidan aktivite tayini yapmışlardır.. Yaprakların petrol eteri ekstrelerinde en yüksek flavonoid, kabukların petrol eteri ekstrelerinde ise en yüksek fenolik içeriği bulunmuştur. En düşük ABTS radikal giderim aktivitesi çiçeklerin kloroform ekstresinde, en yüksek aktivite ise yaprakta ve su ekstrelerinde belirlenmiştir. En yüksek DPPH aktivitesine yaprakların sulu ekstreleri sahipken, en düşük DPPH aktivitesi yaprakların metanol ekstresinde bulunmuştur. Metal şelatlama aktivitesi en yüksek çiçeklerin petrol eteri ekstresinde gözlenmiştir.

Yapılan literatür çalışmaları sonucunda, *C. creticum* bitkisi ile ilgili antioksidan aktivite çalışması bulunmamış ve ilk kez bu çalışmada *C. creticum* bitkisinin antioksidan aktivitesi araştırılmıştır.

2.4. Antioksidanlar

Oksijen; canlılar için vazgeçilmezdir. Fakat canlılar yaşamlarını sürdürmek için oksijeni kullanırken oksijen kaynaklı radikaller de eş zamanlı olarak oluşmaktadır. Bunlar yüksek aktiviteye sahip radikallerdir. Özellikle sigara dumanında, kirli havada, bitki koruma ilaçlarında, radyasyon ortamında, bozulmuş gıdalarda ve normal vücut metabolizmasında (metabolik süreçte) bulunurlar. Serbest radikaller vücuttaki hücrelere saldırıp onları tahrip edebilirler. İlk saldırıda öncelikli olarak yeni bir serbest radikal oluşur ve kontrol edilemeyen

zincirleme bir reaksiyon başlar. Serbest radikaller, bir orbitalde sadece bir veya birden fazla ortaklanmamış elektron bulundurmalarıyla tanımlanır. En basit serbest radikal, bir proton ve bir elektron ihtiva eden hidrojen atomudur. Biyolojide, tıpta, toksikolojide, gıda ile farmasotik sanayisinde serbest radikallerin saldırıları sonucu oluşan reaksiyonlar ve bu reaksiyonların etki mekanizmalarına olan ilgi artmaktadır. Örneğin antioksidanları kullanarak, imalatçılar, lipit içeren gıdaların oksidasyonunu yavaşlatmayı hedeflerler (Kıyak 2013).

Canlıların bu oluşan radikallerin potansiyel yıkıcı etkilerine karşı kendilerini korumak için çeşitli savunma sistemleri vardır. Antioksidanlar; oksidasyon reaksiyonlarını durduran veya yavaşlatan, organizmadaki oksidatif strese dolaylı olarak oluşan çeşitli hastalıklara karşı koruma sağlayan, oksidanların önemli reaksiyona girmesini engelleyen, peroksidasyon zincir reaksiyonları oluşumunu engelleyen bileşikler olarak tanımlanmaktadır (Kasun 2017). Polifenoller antioksidanların en önemli örneğidir.

Endojen antioksidanlar, insan vücudunda bulunan antioksidan savunma sistemidir. Eksojen antioksidanlar, gıdaların yapısında doğal olarak bulunurlar fakat; gıdalardaki bazı özel kimyasal reaksiyonların sonucunda da oluşabilmektedir. Antioksidanlar çeşitli özelliklerine göre sınıflandırılabilir. Kaynaklarına ve katalitik aktivitelerine göre sınıflandırma aşağıda Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2. 2. antioksidanların sınıflandırılması (Kasun 2017)

ANTIÖKSİDANLAR				
ENDOJEN ANTIÖKSİDANLAR		EKZOJEN ANTIÖKSİDANLAR		
Enzimler	Enzim Olmayan Küçük Moleküller	Sentetik	Doğal	İlaç Olarak Kullanılan
Superoksit Dismutaz,	Glutasyon,	BHA,	α -tokoferol	Ksantin oksidaz
Glutasyon Peroksidaz,	Melatonin,	BHQ,	(vitamin E),	inhibitörleri,
Katalaz,	Seruloplazmin,	TBHQ,	β -karoten,	NADPH oksidaz
Glutasyon S-Transferazlar,	Transferrin,	Propil Gallat,	Askorbik asit	inhibitörleri,
Mitokondriyal	Hemoglobin,	Kuersetin,	(vitamin C),	Rekombinant
sitokrom	Miyoglobin,		Folik asit (folat),	süperoksit dismutaz,
oksidaz sistemi,	Ferritin,		Karotenler,	Trolox-C,
Hidroperoksidaz	Metiyonin,		Fenoller,	Sitokinler,
	Ürat,		Kateşinler	Barbitüratlar,
	Laktoferrin,			Demir şelatörleri
	Albumin,			
	Sistein			

Günümüze kadar kullanılan antioksidanlar, gıdaların raf ömrünü korumada ve serbest radikallerin olumsuz etkilerine karşı vücudun savunma mekanizmasına yardımcı olurlar. Bu nedenle sağlık açısından da büyük önem arz etmektedir.

2.2.3. Fenolik Maddeler

Fenolik bileşikler ve daha yaygın olarak kullanılan ismi ile polifenoller benzen halkası içeren bileşiklerdir. Bütün bitkiler metabolizmalarında, sekonder metabolit olarak çok sayıda fenolik madde içermektedir. Bitkilerin kendi metabolizmalarındaki rolleri yeterince bilinmediği gibi bitkisel kökenli bütün gıdalarda daima farklı nitelikte ve miktarda çeşitli fenolik bileşikler bulunmaktadır (Gezen ve Ay 2016).

Fenolik bileşikler; antioksidan aktiviteye sahip bileşiklerin en önemlilerindendir. En fazla antioksidan aktiviteye sahip olan bileşikler arasında, fenolikler; gallik asit, floroglusik asit, kafeik asit ve gentisik asit gibi bileşikler yer almaktadır. Serbest radikalleri nötralize eden antioksidanlar hastalıkları önlemede önemli rol oynamaktadır. Çeşitli meyveler üzerinde

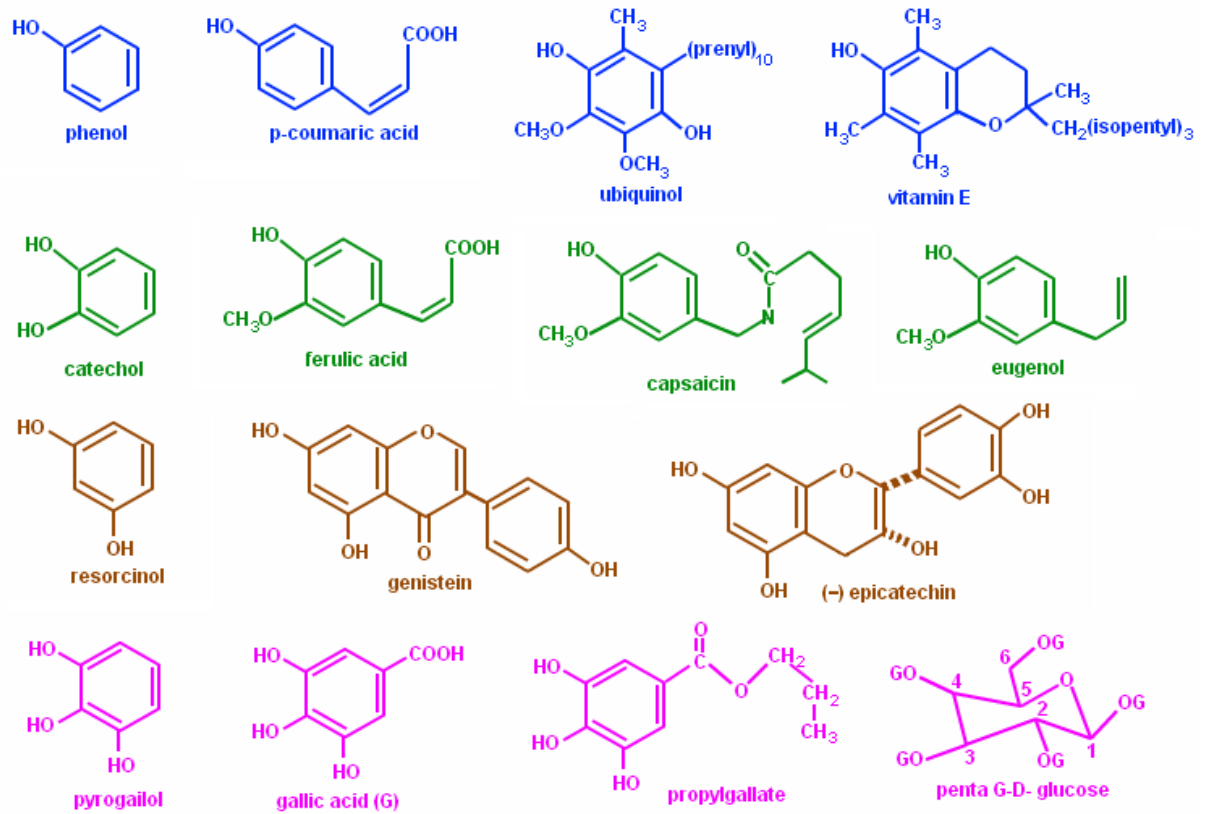
yapılan bir çalışmada en fazla antioksidan etkiyen sahip gıdaların sırasıyla üzm, greylurt, domates, portakal ve elma sularında olduğu tespit edilmiştir (Kolaç ve ark. 2017)

Meyve ve sebzelerin kendilerine özgü buruk veya acı tadını fenolik bileşikler verirler. Gıda bileşeni olarak fenolik bileşikler; insan sağlığı açısından işlevleri, tat ve koku oluşumundaki etkileri, renk oluşumu ve değişimine katılmaları, aktivite göstermeleri ve değişik gıdalarda saflık kontrol kriteri olmaları gibi birçok açıdan önemlidirler. Fenolik bileşikler, 80 monomerli bileşiklere kadar kondanse olabilirler ve proteinlerle kompleks oluşturarak tortu yapma özelliği vardır. Tortulaşma, meyve suyu endüstrisinde meyve suyunun durultulması sırasında yararlanılmaktadır.

Fenolik bileşiklere, beslenme fizyolojisi açısından olumlu etkileri nedeni ile ‘‘biyoflavonoid’’ adı verilmektedir. Kılcal dolaşım sisteminde geçirgenliği düzenleyici ve kan basıncını düşürücü etkisi sebebiyle bazı kaynaklarda ‘‘P faktörü veya P vitamini’’ olarak da adlandırılmaktadır (Anonim 2013).

Polifenollerin sağlığa olumlu etkilerinden yararlanmak için hayat tarzı haline getirilmeli, ömür boyu uygulanacak beslenme alışkanlıkları esas alınmalıdır. Bu bileşiklerin bulunduğu meyveler birkaç kerecik yeme ile ilaç etkisi veya tedavi edici etki yaratmayacaktır. Fenolik bileşiklerin alt grupları şunlardır;

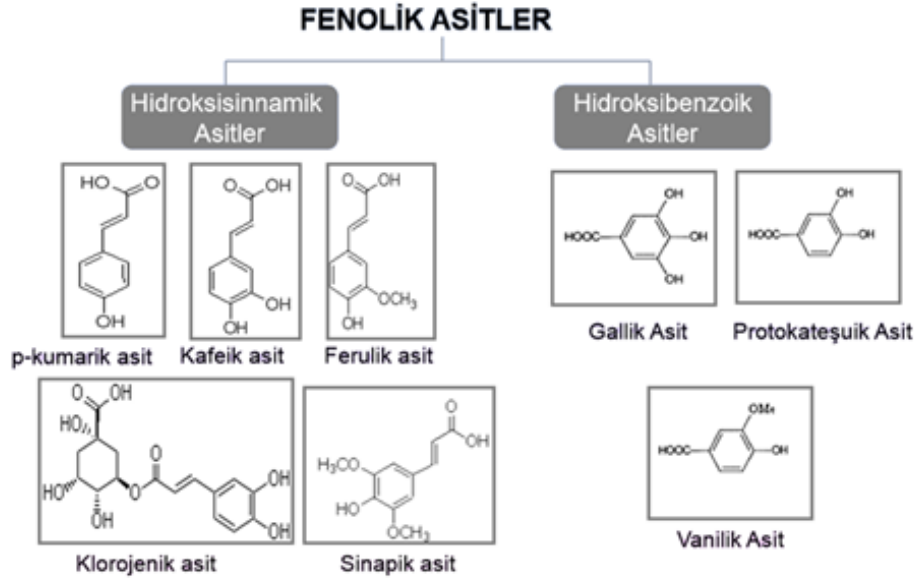
- Fenolik asitler
- Flavonoidler
- Fenolik polimerler (Tanenler) (Tütem 2011).

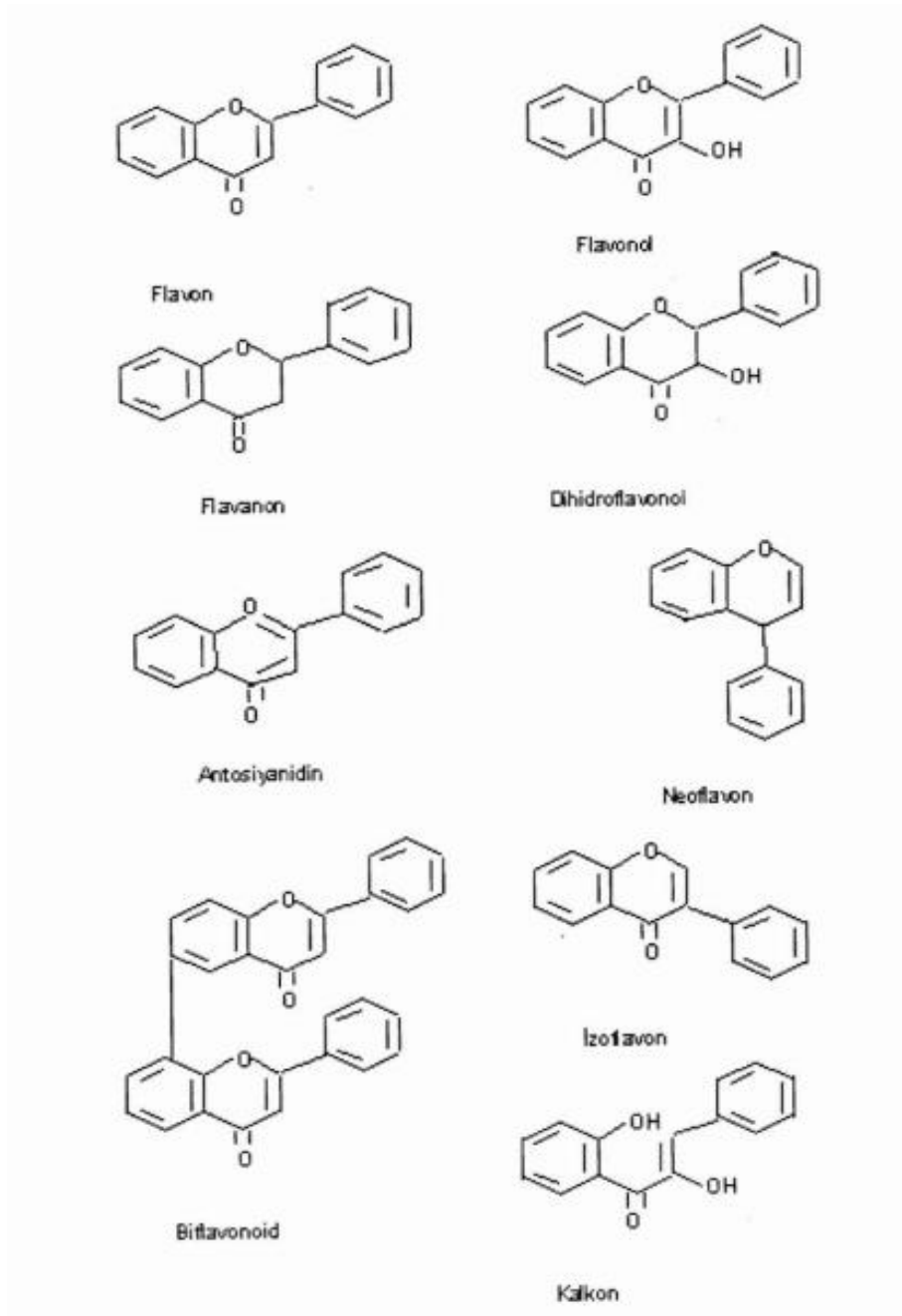


Şekil 2. 11. En yaygın fenolik bileşikler

2.4.1.1. Fenolik Asitler

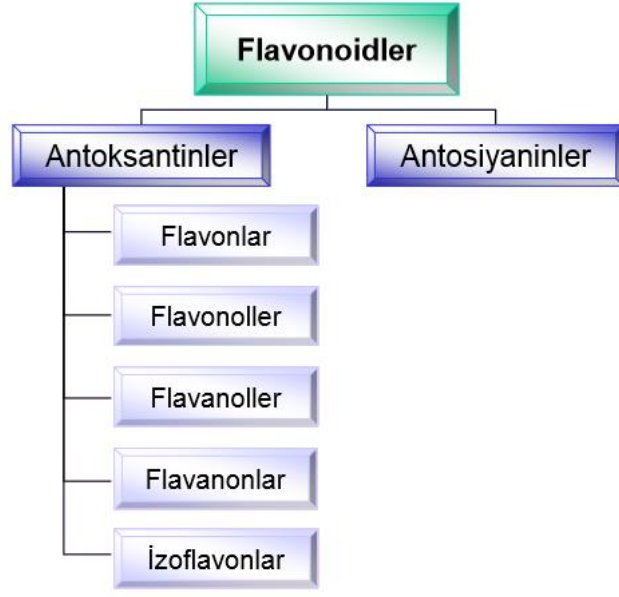
Fenolik asitler; hidroksisinamik asitler ve hidroksibenzoik asitler olmak üzere iki grupta incelenirler. Fenolik asitler genel olarak serbest halde bulunmazlar. Alkollerle fenol esterler, amino bileşikler ile de amidleri oluştururlar. Fenolik asitlerin, fenol halkasına bağlı hidroksil grupları oldukça aktiftir ve şekerlerle birleşerek glikozitleri oluştururlar (Anonim 2007).





Şekil 2. 14. Flavonoidlerin iskelet yapıları (Kahraman 2002).

Şekildeki gibi C atomlarına hidroksil gruplarının bağlanmasıyla çok çeşitli flavonoidler meydana gelmiştir.

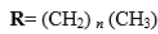
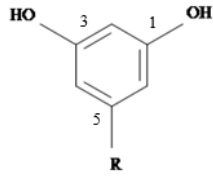


Şekil 2. 15. Flavonoidlerin sınıflandırılması

2.4.1.3. Fenolik Lipidler

2.4.1.3.1. Alkilresorsinol

Esas olarak alkilresorsinoller, benzen halkası üzerindeki 5. pozisyona bağlı tek sayılı hidrokarbon zinciri ile farklılık gösteren büyük bir fenolik lipid grubuna aittir. Yapısal olarak alkilresorsinoller, Şekil 2.16’da gösterildiği gibi, 13-27 karbon atomu içeren doymuş, tek sayılı bir hidrokarbon yan zinciri ile 5 konumunda alkillenmiş 1, 3-dihidroksi-5-alkilbenzen içerir. Alkilresorsinoller kaynağına bağlı olarak, yapı, alkil zinciri veya aromatik halka üzerindeki doymamışlık, zincir uzunluğu, halka veya zincir süstitüe fonksiyonel grupların derecesine ve alkil zincirinin pozisyonuna göre değişebilir (Günenç 2014).



$$n = 14, 16, 18, 20, 22, 24$$

Şekil 2. 16. 1,3-dihidroksi-5-alkilbenzen (5-alkilresorsinol) yapısı

Alkilresorsinoller; *Anacardiaceae*, *Ginkgoaceae*, *Proteaceae*, *Myrsinaceae*, *Primulaceae*, *Myristicaceae*, *Iridaceae*, *Compositae*, *Leguminosae* ve *Gramineae*'nin içinde bulunduğu toplam on bir bitki ailesinde bulunduğu bildirilmiştir (Hengtrakul ve ark. 1999).

2.4.1.3.2. Alkilresorsinollerin Biyosentezi

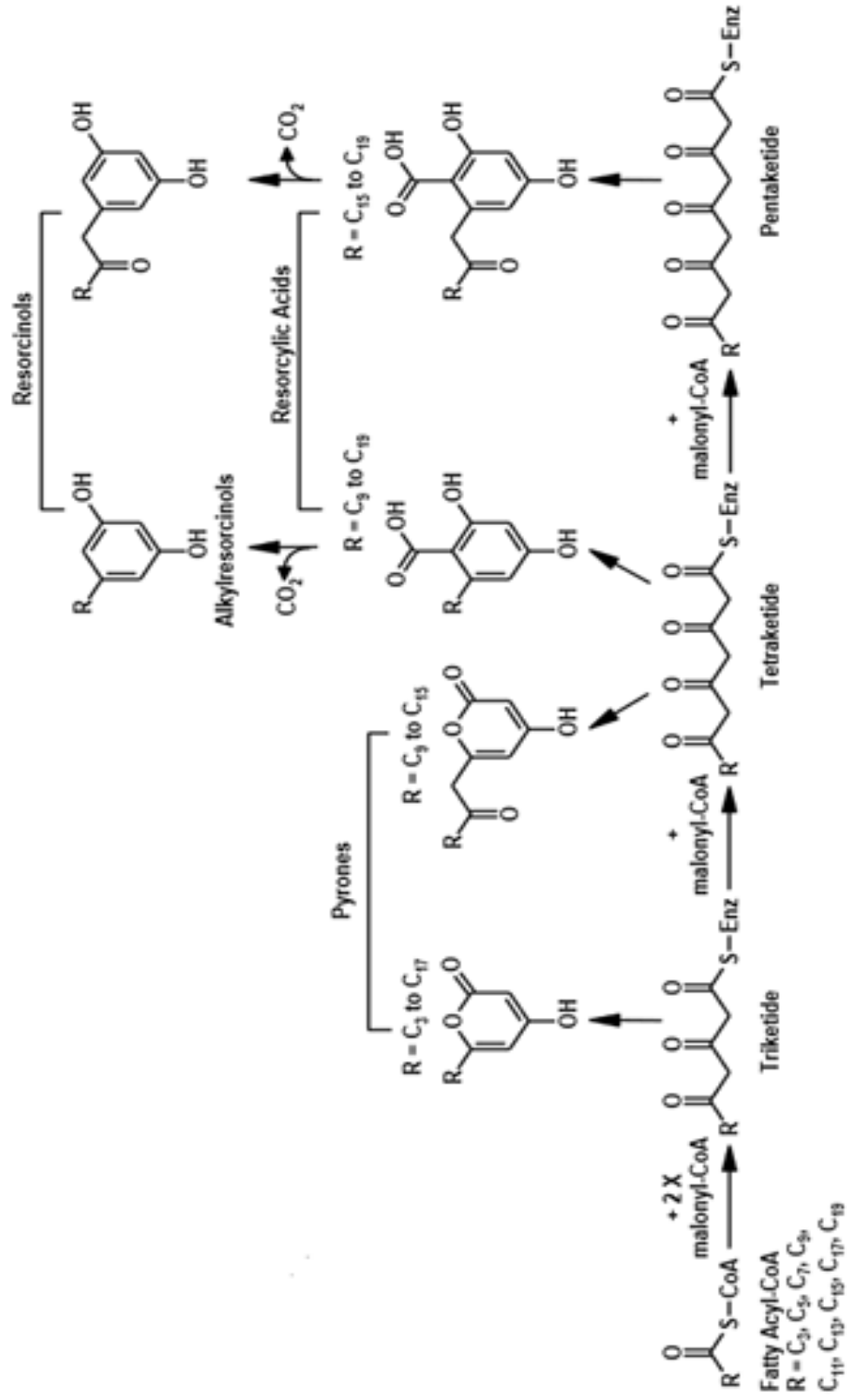
Bitki fenolik bileşikleri iki ana yoldan sentezlenir: şikimat yolu ve poliketid (asetat) yolu. En yakın yol formu hidroksisinnamik asitler ve kumarinler gibi fenilpropanoidler ve poliketid yolu, kuinonların oluşumuna yol açan basit fenoller üretir (Yu ve ark. 1999). En büyük fenolik grup (flavonoidler), her iki yolun bir kombinasyonu ile oluşturulur (Şekil 2.17).

2.4.1.4. Fenolik Polimerler (Tannenler)

Tanenler bitkilerin doğal yapısında bulunan polifenollerdir. Proteinlere bağlanmak ve çöktürmek tanenlerin başlıca görevidir. İnsanlar ve hayvanlar tarafından tüketilen birçok gıda ve yemin besleyici değerinde oldukça etkiye sahiptirler. Bitkilerin içerdikleri tanen miktarı hayvanlar için faydalı olabilecek seviyelerden toksisite oluşumuna ve ölüme yol açabilecek düzeylere kadar değişiklik göstermektedir. Moleküler yapılarına göre hidrolize olabilen ve hidrolize olmayan tanenler olarak iki gruptan oluşurlar.

Hidrolize olabilen tanenler: Hidrolize olabilen tanenlerin ana yapısını; karbonhidrat ve fenolik gruplarla esterleşmiş hidroksil grupları oluşturmaktadır. Zayıf asitler, zayıf bazlar, sıcak su veya bazı enzimlerle hidrolize edilmeleri sonucu karbonhidrat ve fenolik asite ayrışırlar.

Hidroliz olamayan tanenler (Proantosiyanidinler): Yem bitkisi olarak kullanılan ağaç ve çalılarda yaygın olarak bulunurlar. Kimyasal yapılarından dolayı genellikle kondanse tanenler olarak da bilinmektedirler. Enzim ya da seyreltik asitlerin etkisiyle hidrolize olmayan kateşik tanenler, kateşin'in kondenzasyon ürünüdür ve kuru distilasyonla pirokateşole dönüşürler (Aydın ve Üstün 2007).



Şekil 2. 17. Alkilresorsinollerin biyosentez yolu

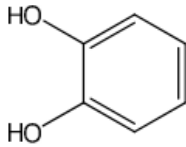
2.4.1.4.1. Kateşoller (Pirokateşol)

Genellikle kateşol adı ile bilinen tannen yapısı olarak bilinen ve $C_6H_6O_2$ kapalı formülüne sahip bir organik bileşiktir. Üç izomerik benzen-diolden biridir. Bu renksiz bileşik kendiliğinden meydana gelir. Pestisitlerin, çeşnilerin (tatların) ve güzel kokuların öncüsüdür. Monomerler arttıkça özellikleri değişir. Örneğin; 68 monomerli proantosiyandinler meyve ve sebzelerin buruk tadını verirken, 35 monomerli olanlar acı bir tat vermektedir

UIPAC ismi: pirokateşol

Diğer isimleri: Kateşol/Benzen 1,2-diol/2-Hidroksi fenol/ α - Hidroksi fenol/o- Hidroksi fenol/o-benzen diol/1,2-dihidroksi benzen/Pirokateşin

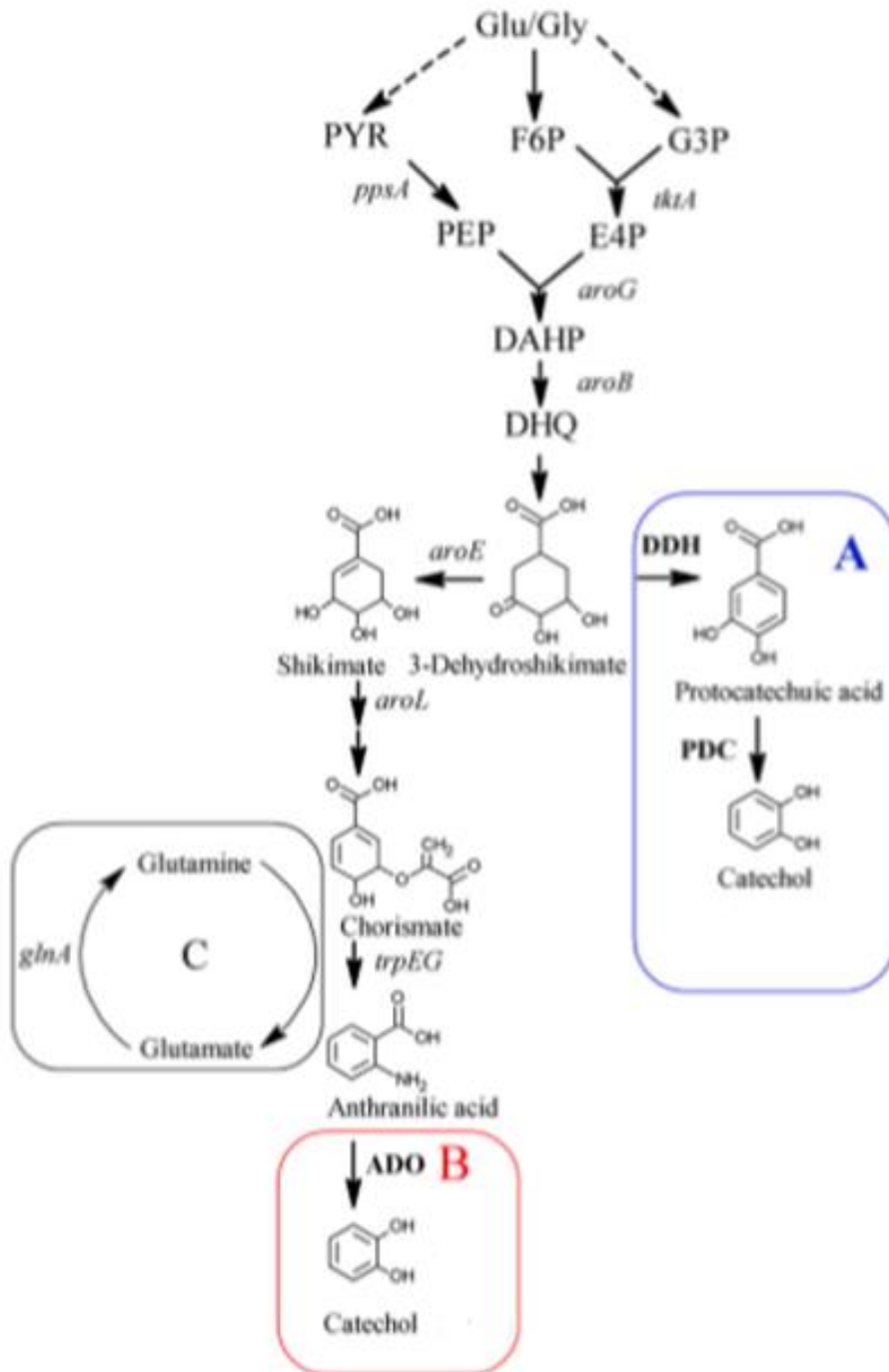
Kateşolün çok farklı endüstrilerde kullanımı bulunmaktadır; tıp (kanama durdurucu, antiseptik olarak), fotoğraf, elektro kaplama prosesleri ve diğer bazı kimyasalların üretimi gibi endüstri dallarıdır (Özcan 2010). Doğada; meşe ve söğütlerin dal ve yapraklarında, elma, şeftali, mango, avokado patates ve rafine zeytinyağı gibi gıdalarda bulunmaktadır (Sternitzke ve ark. 1992, Singh ve ark.1994, McDonald ve ark. 2001, Brenes ve ark. 2004).



Şekil 2. 18. Kateşolün kimyasal yapısı

Alkil kateşoller, özellikle yan zincirde üçten fazla karbon atomu ihtiva eden alkil kateşoller, antiseptikler olarak değerlidir. Farmasötik ilaçlar başta olmak üzere; çeşitli kimyasallarla karıştırılarak losyonlar, tuzlar, merhemler, gargaralar, spreylere halinde kullanılabilirler (Hartung 1935).

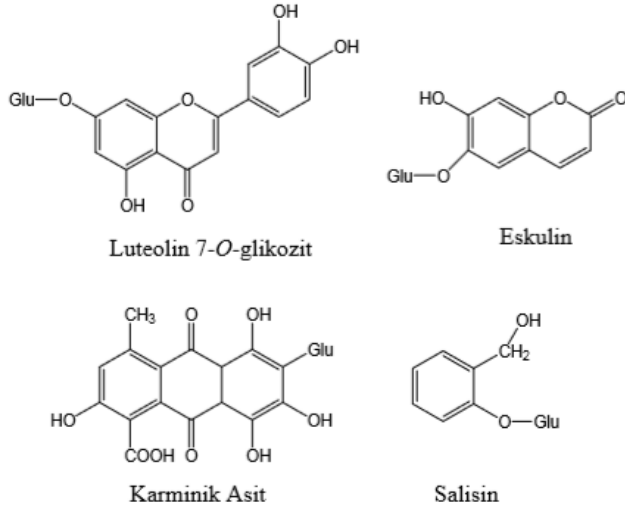
Şekerin kateşole dönüşümünün biyosentetik yolu Şekil 2.19’da gösterilmiştir. A halkası DDH (3-dehidroşikimat dehidrataz) enzimi ile dehidroşikimatın kateşuik asite ve onun da PDC (protokateşuat dekarboksilaz) enzimi ile kateşole dönüşüm basamağı, B halkası şikimattan kateşole uzanan basamak ve C halkası ise glutamin rejenerasyonun olduğu basamaktır.



Şekil 2. 19. Kateşolün biyosentezi (Sun ve ark. 2013).

2.4.1.5. Fenolik Glikozitler

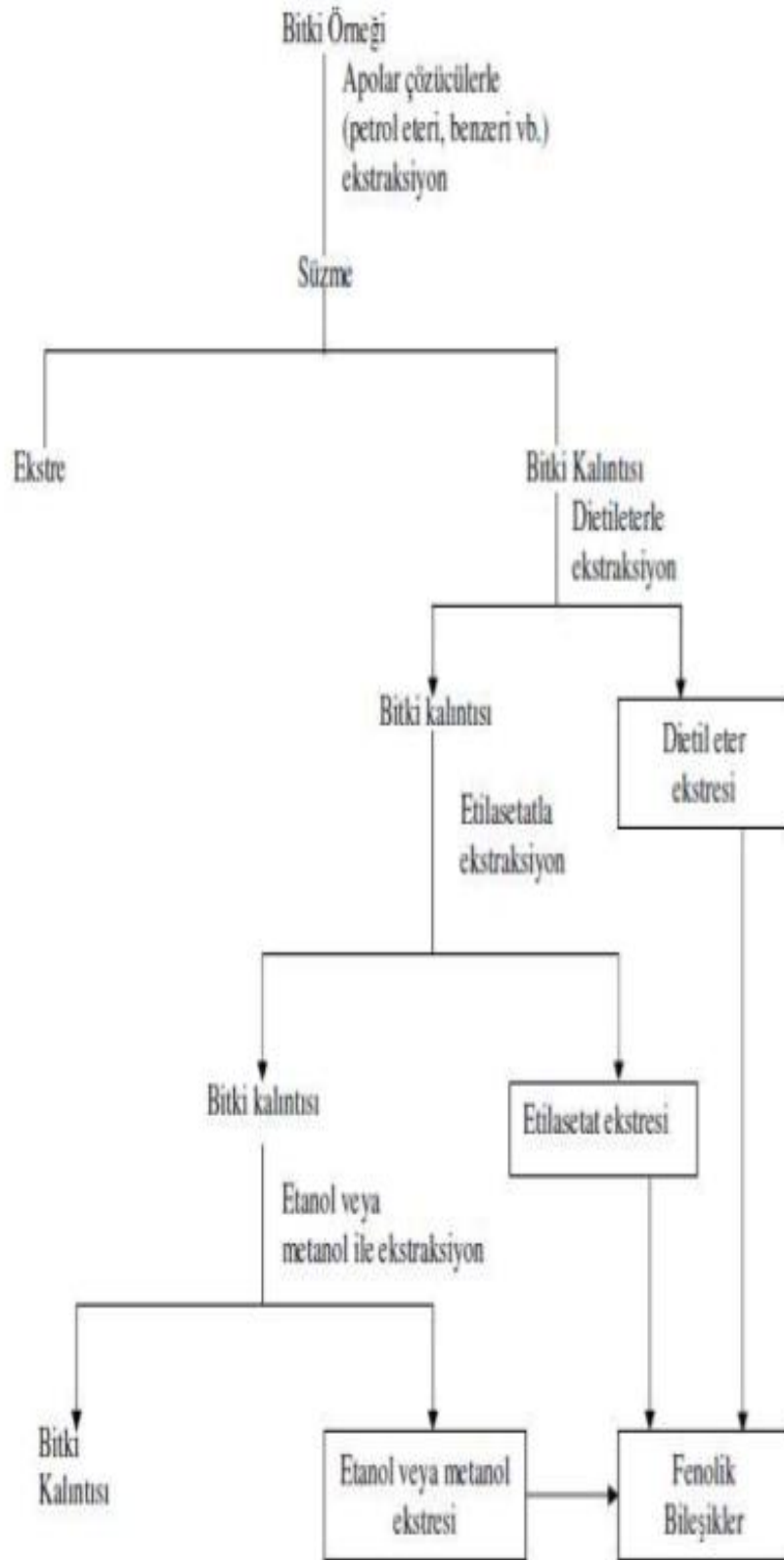
Fenolik bileşikler en çok glikozit oluşturmak için şekerlerle bir araya gelirler. Doğada çok rastlanan yapılardır. En önemli glikozit bileşikleri; basit fenol glikozitleri, antresen glikozitleri, flavon glikozitleri, antosiyanidin glikozitleri ve kumarin glikozitleridir (Koz 2007).



Şekil 2. 20. Önemli fenolik glikozitlerin bazıları

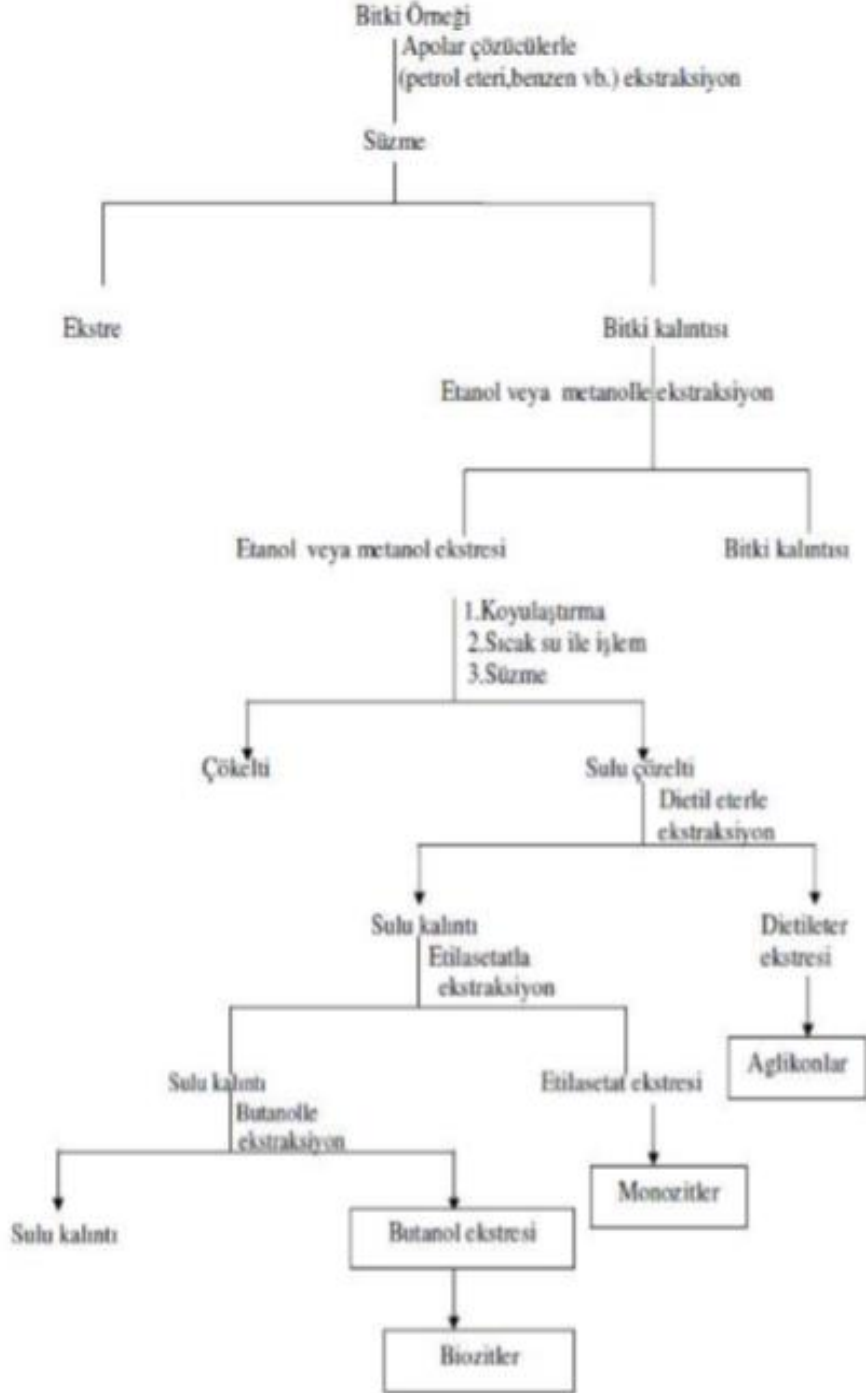
2.4.1.6. Fenolik Bileşiklerin İzolasyonu ve Yapı Tayinleri

Fenolik bileşiklerin bitkilerden izolasyonu için 2 yöntem kullanılır. Bitki örneklerinden fenolik bileşiklerin izolasyon çalışmaları çoğunlukla seçici ekstraksiyon yöntemi kullanılarak yapılır. Fenolik bileşikler, analiz edilecek bitki örneğinden farklı çözücülerle, ardarda polaritenin artış sırasına göre ekstraksiyonu yapılır. Ekstraksiyon yapılırken, bitkiden lipofil karakterli bileşikler (klorofil, karotenoidler, steroller, yağlar, vakslar vb.) arıtmak için önce petrol eteri veya hekzanla işlem yapılır. Daha sonra bitki kalıntısı artan polaritede çözücülerle; dietil eter, etil asetat, etanol veya metanol ile ardarda ekstre edilir. Yöntemin şeması Şekil 2.21’de verilmiştir.



Şekil 2. 21. Bitki örneklerinden seçici ekstraksiyon yöntemiyle izolasyon işlemi şeması

İkinci yöntemde; bitki örneği lipofil bileşiklerden arınması için önce apolar çözücü ile muamele edilir ve düşük molekül ağırlıklı alkolle (metanol veya etanol) veya bunların sulu çözeltileriyle birkaç kez ekstrakte edilir. Bu yöntemin şeması Şekil 2.22’de verilmiştir (Harmandar ve Bilaloglu 1999).



Şekil 2. 22. Bitki örneklerinden diğer ekstraksiyon yöntemiyle izolasyon işlemi şeması

Fenolik bileşiklerin kağıt kromatografisi ile ayrılmasında, kağıt türü çok önemlidir. Bu nedenle, kağıt kromatografisi tekniklere özel saflığa sahip, selüloz filtre kağıdı kullanılır. Ayrıca kağıt kromatografisi ile bileşenlerine ayırmada; çözücü sisteminin özellikleri de oldukça önemlidir. Fenolik bileşiklerin kağıt kromatografisi ile ayrılmasında kullanılan çözücü sistemlerinin bazıları Tablo 2.3’de gösterilmiştir.

Tablo 2. 3. Fenolik bileşiklerin kağıt kromatografisi ile ayrılmasında kullanılan çözücü sistemi

Sistemin Bileşenleri	Bileşenlerin Oranı	Ayrılacak Bileşikler
n-Butanol-asetik asit-su (BAW)	4:1:5 (üst faz)	Tüm fenolik bileşikler
Benzen-propiyonik asit-su (BPA)	2:2:1 (üst faz)	Fenolik asitler
2-propanol-amonyak-su	8:1:1 (homojen)	Fenolik asitler

İnce tabaka kromatografisi (TLC) genellikle, tüm fenolik bileşiklerin sınıflarını ayırmak için uygulanır. Fenolik bileşikler ince tabakada yürütüldükten sonra levhadan çözücü tümüyle uçurulur ve kromatograma UV ışıkta bakılır. Fenolik karboksilli asitler kromatogramda UV ışın etkisi ile mavi floresans verirler. İnce tabakada spotların açığa çıkması için çeşitli reaktifler kullanılır. Bu reaktiflerden biri iki çözelti sisteminden oluşan Natural Products Polyethylene Glycol Reagent (NP/PEG)’dir. Bu reaktif difenilborikasidin β -aminoetil eterinin %1’lik metanol ve polietilen glikol-4000’nin %5’lik etanol çözeltisinden oluşur. Reaktifler sırası ile kromatograma püskürtülür. Fenol karboksilli asitler, açık mavi lekeler halinde görünürler. Fenolik asitlerde adsorban genellikle silikajeldir ve çözücü sistemi olarak HOAc: CHCl_3 (1:9) kullanılır. Belirleme metodu olarak Folin kullanılır (Bilaloglu ve Harmandar 1999).

Bitkilerden elde edilen ekstraktların bileşenlerinin birbirinden ayrılması ve bileşiklerin miligram miktarlarda saf halde elde edilmesi için kolon kromatografisi kullanılır. Adsorban olarak; silikajel kullanılan kolonlar; az sayıda hidroksil grubu taşıyan fenolik bileşikleri ayırmak için daha uygundur. Düşük polariteye sahip çözücülerin kullanılması tavsiye edilir. Benzen: kloroform (1:1) oranından CHCl_3 ’a ve artan oranda EtOAc’a gidilir. En yaygın olarak kullanılan silikajel adsorban Kieselgel 60, 70-230 mesh (Merck)’tir (Markham 1975). Adsorban olarak selüloz kullanılan kolonlar tüm fenolik bileşik sınıflarını ve bunların glikozidlerini ayırmak için oldukça yararlıdır. Kullanılan solvente bağlı olarak adsorbsiyon ve partiyon kromatografisi uygulanabilir. Selüloz kolonun sınırlı ayırma kapasitesini arttırmak için silika jelselüloz (1:1;w/w) karışımı kullanılabilir (Van de Catelle ve ark. 1976). Selüloz

kolondan elüsyon kağıt kromatografisinde uygulanan çözelti sistemleri ile yürütülebilir, alternatif olarak farklı oranlarda metanol ve su içeren çözücü sistemleri kullanılır. En yaygın selüloz adsorbanlar mikrokristal selüloz (Merck, Macheray ve Nagel) ve Whatman CF-11 dir. Adsorban olarak Poliamid kullanılan kolonlar da fenolik bileşiklerin diğer bitki metabolitlerinden ayrılmasında kullanılan bir yöntemdir. Poliamid reçine olarak polikaprolaktam, polihekzametilen diamidoadipinat, polivinilpirolidon kullanılır (Markham 1982). Son dönemde, fenolik bileşiklerin izolasyonu ve saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılan bir diğer adsorban ise iyon değiştirici reçinelerdir. Yöntem; fenolik bileşiklerin, suda çözünebilir diğer fenolik olmayan safsızlıklardan ayrılması için uygundur (Lam ve Shaw 1970). Ekstrakt ön saflaştırma amacı ile iyon değiştirici reçine yüklenmiş kolondan uygun çözücü sistemi ile (%0,5-5 HOAc, %1 HCOOH veya su) yıkanır. Bu amaçla Zeokarb 222, Amberlit XAD-7, Amberlit CG-50, HP-20 vb. reçineler kullanılır. Kolonda kalan pigmentleri temizlemek için asetik asidin %10'lık metanolde hazırlanmış %2-5'lik çözeltisi ile yıkanarak ayrılırlar (Bilaloglu ve Harmandar 1999).

HPLC; çok iyi kalitatif ve kantitatif ayırma sağlayan bir yöntemdir. Fenolik bileşiklerin HPLC ile ayrılmasında birçok farklı çözücü sistemi ve kolon dolgu maddesi kullanılır. Ancak; non-polar fenolik bileşiklerin silika kolonlarda izokritik elüsyonla kromatografisi ve polar fenolik bileşiklerin ters faz silika kolonlarda gradient veya izokritik elüsyonla kromatografisi olarak iki temel yöntem vardır.

Fenolik bileşiklerin yapılarını açıklarken; UV, IR, ^1H ve ^{13}C NMR spektroskopisi kullanılmaktadır. UV spektroskopisinde; basit fenoller ve fenolik asitler 230-290 nm arasında bir veya iki güçlü band gösterirler.

IR spektroskopisinde; polar olmayan fenolik bileşikler; infrared spektral ölçümleri için genellikle kloroformda çözülürler. Diğer fenolik bileşiğin birçoğu; KBr ile karıştırılarak diskleri hazırlanır ve ölçümleri yapılır. Aslında; fenolik bileşiklerin karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılan bir yöntem değildir. Bu bileşikler için sadece karbonil grubu taşıyan fenolik bileşiklerin yapısını aydınlatmada faydalıdır. Sebebi; karbonil absorpsiyon bandının durumundan serbest bir hidroksil grubuna bağlı olup olmadığı anlaşılmasıdır (Dey ve Harborne 1989).

Proton ve karbon-13 NMR spektroskopisi için; örneğin 5-10 mg olması gereklidir. Çözücünün seçimi fenolik bileşiğin polaritesine bağlı olmalıdır. Düşük polariteli aglikonlar için

CDCl_3 ideal bir çözücüdür. Yaygın olarak $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, $\text{DMSO}-d_6$, CD_3OD , D_2O gibi çözücüler, polar fenolik bileşikler için daha uygundur. ^1H -NMR spektrumu fenolik bileşiklerin aromatik halka protonlarını ve sübstitüentlerin durumunu göstermeyi sağlar. Aromatik halka protonları genellikle, 5.00- 8.00 ppm arasında gözlenirler. Orto etkileşimlerde $J=8-9$ Hz, meta etkileşimlerde $J=2-3$ Hz'dir. Şeker grubu bağlı ise monoglikozidlerde şeker protonları 3.0-4.0 ppm arasında gözlenir. Şekerin H-1' protonu; 4.8-6.0 ppm gibi daha aşağı bir alanda dublet olarak görülür. H1'/H-2' etkileşme sabiti α ve β glikozit bağının isaretidir. Örneğin α -glukopiranozidlerin 'H-1'/H-2' etkileşme sabiti 3-4 Hz; β -glukopiranozidlerin 7-8 Hz olduğu için α - veya β - bağlı glukopiranozidler birbirinden kolayca ayırt edilebilirler (Harborne ve Mabry 1975).

^{13}C -NMR spektroskopisi, özellikle glikozidlerde, şekerlerin sırası ve bağlanma noktaları ya da glikozil grubundaki açıl gruplarının cinsi ve yerlerini incelemeye yararlıdır. 250 ppm'lik geniş bir alanda karbon sinyalleri gözlenmektedir. ^{13}C -NMR spektroskopisi; genellikle diğer veriler yeterli bilgi vermediğinde kullanılır. Spektrumda; sp^3 karbonları 0-70 ppm'de, sp^2 karbonları 100-170 ppm'de, sp karbonları 70-100 ppm'de soğurma yaparlar. Aromatik karbon atomları 100-160 ppm ve karbonil karbonları 140-220 ppm aralığında soğurma yaparlar (Erdik, 1993). Fenolik bileşiklerin çoğunluğu aromatik halkalarında OH, OCH_3 , OCH_2O , CH_3 , izoprenil ve şeker fonksiyonları içerdiği için yeni karbon rezonanslarının ortaya çıkmasına neden olur. Bu nedenle, sübstitüentin sayısına bağlı olarak aromatik kuarterner karbon sinyallerinin sayısında artma olur. O-glukozillenme bağlandığı karbon sinyalinin 2 ppm civarında yukarı çıkarken, orto ve özellikle para pozisyonlarında bulunan karbon sinyallerinin ise aşağı alana 1-4 ppm kaymasına neden olur (Harborne ve Mabry 1975).

Kütle spektroskopisinin diğer tekniklere göre en belirgin üstünlüğü; çok az miktarda madde (0.1 mg) ile analiz yapılabilmesidir. Küçük molekül ağırlıklı fenolik bileşikler için elektron bombardımanı kütle spektroskopisi (EI-MS) kullanılırken; yüksek polarlığa sahip ve molekül ağırlığı büyük, uçucu olmayan fenolik bileşiklerin molekül ağırlığının belirlenmesinde teknik hızlı atomik bombardıman tekniği olan FAB-MS tercih edilmektedir (Harborne ve Mabry 1975).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Belirteçler ve Cihazlar

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Toz NA (Difenil borik asit- β -aminoetil ester, Teknik), $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma 31606-100G), H_2SO_4 (Sigma 30743), NH_3 (Merck 1.05422.2500), n-hekzan (Merck 1.04374.2500), dietileter (Teknik), etilasetat (Honeywell 10303884), kloroform (Sigma 24216-2.5L-R), metanol (VWR 20864.320), metanol (Teknik), metanol (LC için gradient, Merck 1.06007.2500), etanol (Teknik), asetonitril (Merck 1.00030.2500), sephadex LH-20 (Sigma LH-20100-100G), silika jel (Merck 1.07734.1000), ince tabaka kromatografisi plakaları 60F₂₅₄ (Merck 1.05554.0001), benzen (Carlo Erba Reagent 426113), Folin & Ciocalteu Fenol reaktifi (Sigma F9252-1L), Na_2CO_3 (Honeywell 13418-1KG-R), kateşin (Sigma 43412-10MG), NaNO_2 (Sigma S2252-500G), $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Honeywell 237078-100G), Alüminyum nitrat nonahidrat (Honeywell 237973-100G), NaOH (Teknik), quersetin (Sigma Q4951-100G), Potasyum asetat (VWR 26667.236).

Antoksidan aktivite tayini için kullanılan kimyasal maddeler: DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, Sigma D9132-1G), ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat, Alfa aesar J65535.03), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (Sodyum persülfat, VWR C28000.236), (S)-Trolox metil eter (Sigma 238813-1G), glasiyal asetik asit (VWR 20102.320), sodyum asetat trihidrat (VWR 27652.298), HCl (Hidroklorik asit, Merck 1.00314.2500), demir (II) klorit (Alfa Aesar 12457.30), 2,3,5-trifenil tetra azoliumklorit (Alfa aesar A10870.09), TPTZ (2,4,6-tris(2-pyridil)-s-triazine, Sigma 93285-1G), 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazin-P,P-disülfonik asit (Sigma SAFA160601-1G), EDTA (etilendiamin tetraasetik asit, Sigma EDS-100G), demir (III) klorit (Sigma 701122-1G), potasyum fosfat (Honeywell P0662-25G), sodyum hidrojen fosfat (Sigma 255793-10G), timol (Sigma T0501-100G), Neokuprin (Sigma N1501-1G), NH_4Ac (Amonyum asetat, VWR 437453A), bakır (II) klorit (Sigma 307483-100G), L-askorbik asit (Sigma A92902-25G), β -karoten (Sigma 22040-5G-F), Tween 40 (polioksi etilen sorbitan monopalmilat, Sigma P1504-100mL), linoleik asit (Sigma L1376-10MG), BHT (butilat hidroksitoluen, Sigma B1253-100G), tokoferol (Sigma T3251-5G), dimetil sülfoksit PHR1309-3G), Trizma HCl (Sigma T5941-500G), NADH (β -nikotin amid adenin dinükleotid, VWR 424237L), NBT (Nitrotetrabluetetrazolium, Sigma N6876-1G), fenazin metosülfat (Alfa aesar H56718.06).

Preparatif TLC için cam plaka hazırlama: 5 g silika jel, 14 mL distile su içinde karıştırılarak çözdürülür. Hazırlanan çözelti; 20x20 temiz cam plakaların üzerine, hava kabarcıkları olmayacak şekilde baget tatbik edilir. Plakalar kullanılmadan önce 110 °C'deki etüvde 2 saat kurutularak aktifleştirilir ve hemen kullanılır.

Hazırlanan Çözeltiler

Toplam Fenolik Madde Miktarı için Hazırlanan Çözeltiler

Doymuş Na_2CO_3 çözeltisi: 35.0 g Na_2CO_3 100 mL %35'lik suda çözdürüldü.

Toplam Flavonoid Madde Miktarı için Hazırlanan Çözeltiler

%5'lik NaNO_2 çözeltisi: 1.25 g NaNO_2 , 25 mL distile su içerisinde çözdürülür.

%10'luk $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi: 2.5 g $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 25 mL in distile su ile çözülerek 25 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

1 M NaOH çözeltisi: 1g NaOH'ın distile su ile çözülerek 25 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

Antioksidan Aktivite Tayini için Hazırlanan Çözeltiler

DPPH çözeltisi: 9.86 mg DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) 25 mL MeOH'da çözüldürülerek hazırlandı ve analiz öncesinde 2 saat karanlıkta bekletildi.

ABTS çözeltisi: 96 mg ABTS 'nin 2.45 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ içine çözülmesi ile 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) katyon radikal ($\text{ABTS}^{\cdot+}$) çözeltisi hazırlandı.

FRAP reaktifi: FRAP reaktifi, 10:1:1 (v/v/v) olacak şekilde A,B,C olarak tanımlanan üç çözeltinin karıştırılması ile hazırlanmıştır. A çözeltisi (pH 3.6'da 300 mmol/ L asetat tamponu): 16 mL asetik asit 3.1 $\text{NaCOOH} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ile karıştırılır ve 1L'ye tamamlanır. B çözeltisi (TPTZ; 2,4,6-tris(2-pyridil)-s-triazine): 250 mL 40 mol/L HCl içinde 0.7808 g 10 mmol/ L TPTZ çözdürülür. C çözeltisi ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$): 20 mmol/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ için; 0.1352 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ distile su ile 25 mL'ye tamamlanır.

β -Karoten-linoleikasit emülsiyonu: 1 mg β -karoten 5 mL CHCl_3 içerisinde çözdürüldü. Bu çözeltiden 0.5 mL alınarak 10 mg linoleik asit ve 100 mg Tween 40 ile karıştırıldı. CHCl_3

uzaklaştırıldıktan sonra 25 mL ultra distile su ilave edilerek emülsiyon hazırlanmıştır. Her uygulamada çözeltiler günlük olarak hazırlanmıştır.

Süperoksit çözeltisi: Bütün çözeltiler 0.1 M fosfat tamponu (pH 7.4) içinde hazırlandı. Süperoksit radikalleri 1 mL NBT (50 µM), 1 mL NADH (78 µM) ve 25 – 50 µg aralığında ekstrat çözeltileri içeren 3 mL Tris-HCl tamponu (16 mM, pH 8.0) hazırlandı.

Kullanılan Belirteçler

NA Belirteci: (Naturstoffreagenz A: Difenil borik asit-b-aminoetil ester) 100 mg toz NA bileşiği 100 mL metanolde çözülerek hazırlandı.

Serik Sülfat Belirteci: 2 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 100ml %10'luk H_2SO_4 içinde çözülmesi ile hazırlandı. Belirteç püskürtüldükten sonra kromatografi plağı 100°C'de 5-10 dakika lekeler oluşuncaya kadar bekletildi.

Amonyak (NH_3) Buharları: Kromatografi plakları NH_3 şişesinin ağzı açılarak NH_3 buharında birkaç dakika bekletildi.

Kullanılan Cihazlar

UV spektrofotometre: Antioksidan aktivite tayininde absorbans değerleri için Hitachi Spektrofotometre, Model 121-002 kullanılmıştır.

UV Lambası: Kromatografi plağındaki lekeler Vilber Laurmat CN-6 UV lambası kullanılarak tayin edilmiştir.

HPLC: Shimadzu, Prominence LC-8AD/20A

Kolon: Shim-Pack Prep-ODS (C18)

Part no: 228-00815-91

Kolon no: 2025B14 (15 µm particle diameter, 100 Å⁰ pore diameter)

Pompa:

Pompa modu: Binary gradient

A pompası: LC-8A

B pompası: LC-8A

Toplam akış hızı: 10 mL/min

B çözücüsü ve konsantrasyonu: Metanol kullanılmıştır. Çalışmalarda, çözücü sistemi olarak, değişik konsantrasyonlarda MeOH ile başlanarak, çok polardan az polara doğru akış gerçekleştirilmiştir.

A çözücüsü ve konsantrasyonu: Su kullanılmıştır. Çalışmalarda, çözücü sistemi olarak, değişik konsantrasyonlarda MeOH ile başlanarak, çok polardan az polara doğru akış gerçekleştirilmiştir.

Maksimum basınç: 40.0 MPa

PDA Dedektör:

Model: SPD-M20A

Lamba tipi: D₂ ve W

Dalga boyu aralığı: 190-800 nm

Toplayıcı: Modeli FRC-10A

Santrifüj cihazı: IEC-HN-SII centrifuge.

NMR Spektrometresi: Bruker Avance III 500 MHz Spektrometresi ile NMR tayini yapılmıştır.

Kütle spektrumları: Kütle spektrumları; LC-MS QTOF Agilent 6530 + Agilent HPLC, LC-MS-MS Zivak Tandem Gold, LC-Q-TOF Abi-Sciex 4600 Triple Quadrapol TOF cihazları kullanılarak alınmıştır.

Evaporator: Buchi Rotavapor R-210 SJ29/32, S, WB, 100-120V

Vakum pompası: Buchi vakum pompası V-710 3.1 m³/h, 2 mbar, V-855, WB, Cond.

Manyetik Isıtıcı: Buchi B-491 su banyosu 230V

Terazi: Miktarlar; Ohaus PA 224 marka terazi kullanılarak alınmıştır.

İnkübatör: Daihan Scientific-Wisd Heating Block MaXtable H10-set

Vortex: Daihan Scientific vortex mixer, 60 Hz

Etüv: Ecocell etüv



3.2. Deneysel Bölüm

3.2.1. Bitkinin Toplanması

C. creticum (Lam.) d'Urv. subsp. *creticum* (Asteraceae) bitkisinin yetiştiği yerlerinin tespiti için, Trakya bölgesinde arazi çalışmaları yapılmıştır. Yapılan arazi çalışması sonucunda, Trakya bölgesinden *Cirsium creticum* Haziran-Ekim 2016 tarihinde toplanmıştır.

Bitkinin tanımlanma işlemi, Namık Kemal Üniversitesi Biyoloji Bölümü Botanik Ana Bilim Dalı'nda yapılmış ve bitkiye Herbaryum numarası verilmiştir.

Cirsium creticum (Lam.) d'Urv. subsp. *creticum* (Asteraceae): NGBB 7230



Şekil 3. 1. Kurutulmuş *C. creticum* (Lam.) d'Urv. subsp. *creticum* (Asteraceae) bitkisi

3.2.2. Bitkinin Ekstraksiyonu

C. creticum toplandıktan sonra gölgede kurutulup daha sonra da kesilerek küçük parçalara ayrılmıştır. Kuru ağırlığı 583.746 g olan bitki; oda koşullarında, büyük cam kavanozlarda, her seferinde 4 gün bekletilerek, toplam 4 defa maserasyon yöntemiyle ekstraksiyon yapılmıştır. Ekstraksiyon işlemi, artan polarite sırasıyla n-hekzan, dietileter, etilasetat, metanol çözücülerini kullanarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra çözücüler evaporatörde uçurularak ham ekstraktlar elde edilmiştir.

C. creticum n-hekzan ekstresi: 11.241 g

C. creticum dietileter ekstresi: 4.035 g

C. creticum etilasetat ekstresi: 3.467 g

C. creticum metanol ekstresi: 41.155 g

Bitkiden elde edilen ham ekstrelerde, toplam fenolik/flavonoid miktarı tayini ve antioksidan aktivite tayini çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; özellikle toplam fenolik madde içeriği ve toplam flavonoid madde miktarı yüksek olan ekstrelerde kromatografik ayırma ve saflaştırma işlemleri yapılmıştır.

3.2.3. *C. creticum* Ham Ekstrelerinde Biyolojik Aktivite Tayini

3.2.3.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini

Örneklerin toplam fenolik madde içeriklerini belirlemede Amarowicz ve arkadaşlarına (2005) ait metot kullanılmıştır. Fenolik bileşiklerin Fosfotungustik ($H_3PW_{12}O_{40}$) ve fosfomolibdik ($H_3PMo_{12}O_{40}$) asitlerin karışımı olan Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılır. Fenolik bileşikler, Folin-Ciocalteu reaktifi ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturur ve oluşan mor-menekşe renkli kompleksin oluşturduğu absorbans değerleri spektrofotometrede belirlenir. *C. creticum* bitkisinin ham ekstrelerinde yürütülen bu analizde spektrofotometrik olarak 725 nm'de absorbans değerleri belirlenmiştir. Analizler için ham ekstreler bitkide ekstraksiyon amaçlı kullanılan çözücüler kullanılarak uygun konsantrasyonlarda seyreltilmişlerdir. Metot, 0.25 mL örnek, 0.25 mL Folin reaktifi, 0.5 mL doymuş Na_2CO_3 çözeltisi ve 4 mL distile su ile hazırlanan karışımın, doymuş Na_2CO_3 çözeltisinin ilavesinden sonra karanlıkta 20 dakika bekletilmesi, 5000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmesi (IEC HN-SII Centrifuge) ve absorbansların 725 nm'de ölçülmesi esasına dayalıdır. Ölçümler kör olarak metanol kullanılarak, 725 nm'de (Hitachi spectrophotometer, Model 121-002) yürütülmüştür. Toplam fenolik madde miktarları, kateşin kullanılarak hazırlanan absorbans ve konsantrasyona karşı çizilen standart grafiklerin denklemlerinden mg ekstratta μg kateşin eşdeğeri (μg CAT mg ekstrakt⁻¹) olarak hesaplanmıştır. Tüm analizler 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır.

3.2.3.2. Toplam Flavonoid Madde Miktarı Tayini

Toplam flavonoid madde miktarı $AlCl_3$ - $NaNO_2$ metodu uygulanarak belirlenmiştir (Valcarcel ve ark. 2015). $AlCl_3/NaNO_2$ yönteminde toplam flavonoid içeriği, alüminyum klorür ve sodyum nitrit ayıraçları kullanılarak, alkali ortamda pembe renkli flavonoid alüminyum kompleksinin meydana gelmesi temeline dayanır. Örnek miktarı reaksiyon ortamında pembe

renk gözlemlenebilecek konsantrasyonda ve toplam reaksiyon hacmi tüm reaktiflerin ilavesinden sonra distile su ile ilavesi ile 2.5 mL olacak şekilde ayarlanmıştır (0.25 mL örnek +1.25 mL distile su). Üzerine 75 µL sodyum nitrit (%5'lik) ilave edilerek oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiş ve flavonoid-alüminyum kompleksi oluşturmak için 150 µL %10'luk $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi eklenmiştir. Oda sıcaklığında 6 dakika bekletildikten sonra 0,5 mL 1 M NaOH çözeltisi ilave edilmiş, her bir çözeltinin ilavesi ardında vortekslenmiş ve UV spektrofotometresinde 510 nm dalga boyunda distile su ile hazırlanan kör denemeye karşı absorbans değerleri ölçülmüştür (Hitachi spectrophotometer, Model 121-002). Kalibrasyon eğrileri kullanılarak hazırlanan eşitlikler yardımıyla toplam flavonoid miktarlarına ilişkin elde edilen sonuçlar kateşin ($\mu\text{g CAT mg}^{-1}$ ekstrakt), kuersetin ($\mu\text{g QER mg}^{-1}$ ekstrakt) ve rutin eşdeğeri ($\mu\text{g RUTİN mg}^{-1}$ ekstrakt) olacak şekilde hesaplanmıştır.

3.2.3.3. Antioksidan Aktivite Tayini

C. creticum bitkisinin metanol, etilasetat, dietileter ve *n*-hekzan ekstratlarında antioksidan aktiviteyi belirlemek için, DPPH radikali giderim aktivitesi, ABTS⁺ katyon radikali giderme aktivitesi, ferrik iyon indirgeme kapasitesi (FRAP), β -karoten lineoleik asit emülsiyon sisteminde ağartma aktivitesi, bakır (II) indirgeme gücü (KUPRAC) ve süperoksit anyon radikali giderim aktivitesi analiz yöntemleri uygulanmıştır.

3.2.3.3.1. DPPH Radikali Giderim Aktivitesi Tayini

DPPH[•] radikali giderim aktivitesi tayini; antioksidanların kararlı bir organik azot radikali olan DPPH[•] (2,2-difenil-1 pikrilhidrazil) radikalinin süpürücü etkilerini ölçmeye dayalı bir yöntemdir. DPPH[•] radikali, birkaç kararlı organik azot radikalinden bir tanesidir ve koyu menekşe renktedir. Bu metot DPPH radikalinin antioksidanlar tarafından bir redoks reaksiyonuna bağlı olarak süpürülmesi temeline dayanır. Metanolik DPPH çözeltisinin koyu menekşe rengi açılır ve absorbanstaki değişim spektrofotometrik ölçülür. Daha fazla renk açılması, reaksiyon karışımının absorbansında daha fazla düşme ile belirlenir ve daha yüksek radikal süpürme kapasitesi olduğunu gösterir (Ndhlala ve ark 2010). *C. creticum* bitkisinden elde edilen ekstratların DPPH[•] radikali giderim aktivitesi Brand-Williams ve arkadaşlarına göre (1995) belirlenmiştir. Analiz öncesinde, *C. creticum* ekstaktları uygun konsantrasyonlarda ve

elde edildiği ekstraksiyon çözücüsünde çözündürülerek ekstrat çözeltileri hazırlanmıştır. Analizin yürütülmesinde hazırlanan ekstratlar aşağıda belirtildiği gibi metanol ile seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda dilüsyonlar hazırlanmıştır.

Tablo 3. 1. Ekstrakt çözeltilerinin farklı dilüsyonlarının tüplerde hazırlanışı

	1	2	3	4	5	6
Ekstrakt Çözeltisi	0 µl	20 µl	40 µl	60 µl	80 µl	100 µl
Metanol	100 µl	80 µl	60 µl	40 µl	20 µl	0 µl

Antiradikal aktiviteyi belirlemek için seyreltilmiş solusyonlardan 100 µL alınarak, 2 mL metanol eklenmiş ve 250 µL DPPH• çözeltisi ilave edilerek, vortekslendikten sonra karışım oda sıcaklığında 20 dakika karanlıkta bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda absorbans değerleri spektrofotometre ile 517 nm’de metanole karşı ölçülmüştür. Kontrol örnek yerine metanol ile hazırlanmıştır. Örnek konsantrasyonları analizde uygulanan toplam 2.35 mL reaksiyon hacmine göre hesaplanmıştır (100 µl ekstrat çözeltisi + 2 ml metanol + 0.25 ml DPPH çözeltisi).

$$\%AA = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100 \quad (3.1)$$

A_{kontrol} : Kontrolün absorbans değeri

A_{sample} : Örneklerin absorbans değeri

DPPH radikalının başlangıç konsantrasyonunun %50’sinin inhibisyonunu sağlayan ekstrakt konsantrasyonu EC_{50} olarak tanımlanır. Bu değer çalışılan konsantrasyonlara karşı % inhibisyon değerlerinin yerleştirilmesi ile hazırlanan grafik kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar EC_{50} değerleri olarak verilmiştir.

3.2.3.3.2. ABTS^{•+} Katyon Radikali Giderim Aktivitesi

Bu yöntem; 2,2’-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) (ABTS^{•+}) kromojen radikal kationunun absorbansının, antioksidanlar tarafından inhibisyonunu temel alır. Trolox eşdeğeri antioksidan aktivite (TEAC) tayini Re et al. (1999)’a göre yapılmıştır. Başlangıç ABTS^{•+} çözeltisi 96 mg of ABTS’nin, 2.45 mmol L⁻¹ sodium persulfatın distile su ile hazırlanan çözeltisi içinde çözündürülerek hazırlanmış, karanlıkta ve oda sıcaklığında 16 saat bekletilmiştir. Analiz öncesinde hazırlanan ABTS^{•+} stok solüsyonu metanol ile 734 nm’de 0.70

± 0.02 absorbans aralığında seyreltilmiştir. Spektrofotometrik ölçümler için, 2 mL ABTS^{•+} çözeltisi ve 20 µL ekstrakt solusyonu karıştırılmış ve absorbans değerleri numunelerin 30 °C'de 6 dakika inkübe edilmesinden sonra 734 nm'de kaydedilmiştir. Blank 2 mL ABTS^{•+} çözeltisi ve 20 µL metanol ile hazırlanmıştır. Ekstraktlarının ABTS^{•+} radikali giderme aktiviteleri, standart eğriden elde edilen eşitlikten olarak mM troloks g⁻¹ ekstrat olarak hesaplanmıştır.

3.2.3.3.3. Ferrik İyon İndirgeme Kapasitesi (FRAP)

Bu yöntem; antioksidan bileşiklerinin mavi renkli Fe(II)– TPTZ kompleksi oluşturmaları sonucuyla indirgeyebilme kapasitelerini ölçmektedir. Örneklerin demir iyon indirgeme kapasitesi Benzie ve Strain'e (1996) göre yapılmıştır. Öncelikle, pH 3.6'da 300 mmol L⁻¹ asetat tampon çözeltisi, 40 mmol L⁻¹ HCl'de hazırlanan 10 mmol L⁻¹ TPTZ ve 20 mmol L⁻¹ FeCl₃ çözeltileri 10:1:1 (v/v/v) olacak şekilde karıştırılarak FRAP reaktifi hazırlanmıştır. Metodun uygulanışında 75 µL ekstrakt solusyonu, 2.25 mL FRAP reaktifi ve 225 µL distile su ile vorteksledikten sonra 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir (Daihan Scientific-Wısd Heating Block MaXtable H10-set). Reaksiyon sonucunda sonra örneklerin absorbans değerleri 593 nm'de (Hitachi spectrophotometer, Model 121-002) ölçülmüştür. Kör numune için 2,25 ml FRAP çözeltisi 300 µL distile su ile karıştırılıp, 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Örneklerin ferrik iyon indirgeme kapasiteleri FeSO₄.7H₂O olarak kullanılarak hazırlanan standart çalışma grafiğinden belirlenmiştir ve sonuçlar µmol Fe²⁺ g ekstrakt⁻¹ olacak şekilde hesaplanmıştır. Ekstraktlarının ABTS^{•+} radikali giderme aktiviteleri, standart eğriden elde edilen eşitlikten olarak mM troloks g⁻¹ ekstrat olarak hesaplanmıştır. Örneklerin belirlenen konsantrasyonlarda ABTS^{•+} radikali giderme aktiviteleri değerlerinin (TEAC kapasitesi) hesaplanması amacıyla $4.93 \times 10^{-2} - 9.80 \times 10^{-1}$ mmol Trolox mL⁻¹ konsantrasyon aralığında hazırlanan troloks çözeltisi kullanılarak standart çalışma grafiği hazırlanmıştır. Standart grafik, konsantrasyona karşı % radikal giderim aktivitesi belirlenerek hazırlanmış, hazırlanan kalibrasyon eğrisinden elde edilen eşitlikten olarak mM troloks g⁻¹ ekstrat olarak hesaplanmıştır. % ABTS^{•+} radikali giderme aktiviteleri aşağıdaki eşitlikten hesaplanarak belirlenmiştir.

$$\% \text{ radikal giderim aktivitesi} = 100 - (\text{ABS}_{\text{örnek}} / \text{ABS}_{\text{kontrol}} \times 100) \quad (3.2)$$

ABS_{örnek}: Örneklerin absorbans değeri

ABS_{control}: Kontrolün absorbands değeri

3.2.3.3.4. β-Karoten Renk Giderim Aktivitesi

Bu yöntemin esası, ısı veya ışık etkisi ile oksidasyona uğrayan karotenoidlerin renginde meydana gelen değişimin spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. Oksidasyon ya da otooksidasyon sonucunda peroksil radikali oluşur. β-karotenin oksidatif yıkımı sonucu oluşan renk kaybı kolorimetrik olarak ölçülür. Lipid peroksidasyon inhibisyonu ve linoleik asit oksidasyonundan ileri gelen konjuge dien hidroperoksitlerinin inhibisyonunun ölçülmesine dayanan bu yöntemde, antioksidan maddeler bu tepkimenin oluşumunu engellendiğinden, aktivite yükseldikçe β-karoten çözeltisinin sarı rengi stabil kalacaktır. *C. creticum* bitkisinin ham ekstraterinin, β-karoten-linoleik asit emülsiyonlarında, oksidasyon inhibisyon kapasitesi Miller (1971)'a göre, modifiye edilerek uygulanmıştır. β-karotene-linoleik asit emülsiyonunu hazırlamak için 1.6 mg β-karoten 2 mL kloroform içerisinde çözündürülmüş, 400 mg Tween 40 ve 40 µL linoleik asit ilave edilerek hazırlanmıştır. Karışımdan kloroform uzaklaştırıldıktan sonra emülsiyon çözeltisi hazırlanmıştır. Analizin uygulanışında, uygun konsantrasyonda ekstraktlar 200 µL örnek ve standart olarak BHT, 5 mL β-karoten-linoleik asit emülsiyonu ile vortekslenerek karıştırılmıştır. β-Karoten oksidasyon hızı 50 °C'de örneklerin 180 dakika süre ile bekletilmesi sırasında 30 dakikalık aralıklarla yapılan absorbands ölçümleri ile kaydedilmiştir. Oksidasyon hızı 470 nm'de absorbands değerleri kaydedilerek saptanmıştır. Antioksidan aktivite (AA) (% inhibisyon) aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$AA (\% \text{ inhibisyon}) = (1 - (A_0 - A_t / A_{00} - A_{0t})) \times 100 \quad (3.3)$$

A₀; Ekstrat içeren örneğin inkübasyon başlangıcı absorbands değeri,

A_t; Ekstrat içeren örneğin t dakikadaki absorbands değeri,

A₀₀; Ekstrat içermeyen örneğin inkübasyon absorbands değeri,

A_{0t}; Ekstrat içermeyen örneğin t dakikadaki absorbands değeri.

BHA ve α-Tokoferol (1 mg ml⁻¹) pozitif kontrol örneği olarak alınmıştır.

3.2.3.3.5. Bakır (II) İndirgeme Gücü (KUPRAC)

Apak ve arkadaşlarının (2004) geliştirdiği KUPRAC metodunda, 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin-Nc)'in Cu(II) ile oluşturduğu bakır(II)-neokuproin kompleksinin, 450

nm'de maksimum absorbans veren bakır(I)-neokuproin [Cu(I)-Nc] kelatına indirgenme özelliğinden yararlanarak antioksidan kapasite belirlenmektedir. Test tüplerine 1 mL 0.02 M CuCl₂ çözeltisi, 1 mL 7,5x 10⁻³ M Neokuprin ve 1 mL 1 M NH₄OAc ilave edildikten sonra vortekslenip toplam reaksiyon hacmi 4.1 mL olacak şekilde hazırlanmıştır. 4.1 mL nihai hacimde belirli konsantrasyonda ekstrakt çözeltisi veya standart çözelti x mL olacak şekilde (x mL) ve 1.1 mL'ye distile su ile tamamlayacak şekilde [H₂O; (1.1-x) mL] hazırlanmıştır. Ağzı kapatılan tüpler 30 dakika oda koşullarında bekletildikten sonra içinde örnek bulunmayan referans çözeltiye karşı 450 nm'de absorbans (A₄₅₀) değerleri belirlenmiştir. Ekstraktlarının bakır indirgeme gücü (KUPRAK aktiviteleri) standart olarak Troloksun etanolde belirli konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltileri ile elde edilen standart eğriden hesaplanarak olarak mM troloks g⁻¹ ektrat olarak bulunmuştur.

3.2.3.3.6. Süperoksit Anyon Radikali Giderim Aktivitesi Tayini

Süperoksit anyon radikali giderme kapasitesi Liu ve ark (1997)' a göre yapılmış ve 560 nm'de spektrofotometrik yöntemle ölçülerek bulunmuştur. Süperoksit radikalleri PMS-NADH sistemde NBT'nin indirgenmesi ile NADH'ın oksidasyonu ile belirlendi. Analizde süperoksit radikalleri 1 mL NBT (50 µM), 1 mL NADH (78 µM) ve 100-1000 µg/mL aralığında ekstrakt çözeltileri içeren 3 mL Tris-HCl tampon (16 mM, pH 8.0) ortamında oluşturuldu. Reaksiyon karışımına 1 mL of PMS solusyonun (10 µM) ilavesiyle başlatılmıştır. Reaksiyon için örnekler 25 °C'de 5 dakika inkübe edilmiş ve absorbans değerleri 560 nm' de köre karşı kaydedilmiştir. Kontrol olarak L-askorbik asit kullanılmış ve sonuçlar aşağıda belirtilen formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Süperoksit İnhibisyon Kapasitesi} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100 \quad (3.4)$$

A₀: Kontrolün absorbansı

A_T: Ekstrakt çözeltileri/ standart absorbansı

3.2.4. Kromatografik Yöntemler Kullanılarak Yapılan İzolasyon Çalışmaları

3.2.4.1. *C. creticum* Bitkisinin MeOH Ekstresindeki Bileşiklerin İzolasyonu ve Saflaştırılması

Yapılan biyolojik aktivite sonuçlarına göre; *C. creticum* bitkisinin metanol ekstresi; yüksek aktivite gösterdiğinden dolayı izolasyon çalışması yapmak için seçilmiştir. Seçilen

MeOH ekstresinin, silika jel kolonda (boy: 70 cm; çap: 7 cm) izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Kolona eklenecek ekstre; metanol ile özdüröldükten sonra silika jel ile karıştırılıp, oda sıcaklığında, bir gece bekletilip ve özöcö ütuktan sonra silika jel kolona tatbik edilmiştir. Kolon özöcösü olarak CHCl_3 ile başlatılmıştır.



şekil 3. 2. Silika jel ile karıştırılan metanol ekstresinin kolona eklenmeden önceki hali

%10'a kadar %1'lik artışlarla CHCl_3 : MeOH özöcö sistemi;

%50'ye kadar %5'lik artışlarla CHCl_3 : MeOH özöcö sistemi;

%100 MeOH'e kadar %10'luk artışlarla CHCl_3 : MeOH özöcö sistemi eluent olarak kullanıldı.

%100 MeOH'den sonra %20'lik artışlarla MeOH:H₂O özöcö sistemi eluent olarak kullanılmıştır.



şekil 3. 3. Karışımın kolona tatbik edildikten sonraki hali

Kolondan, 50 mL 'lik erlenler kullanılarak elusyon çözeltileri toplanmıştır. Kolondan 631 erlen toplanmış ve her birine TLC yapılmıştır. TLC spotları ilk önce NH_3 , daha sonra NA belirteci püskürtölerek spotlar UV ışığı altında, flavonoid/fenolik bileşiklere ait olan renkli

spotlar belirlenmiştir. Yapılan ince tabaka kromatografisine göre, benzer olan bu fraksiyonlar birleştirilerek, 29 alt fraksiyon (CM-1- CM-29) elde edilmiştir. Elde edilen bu alt fraksiyonlarda; özellikler mor, koyu mor, mavi, turuncu ve sarı renk gözlenen lekelerin bulunduğu ve miktarı yeterli olan alt fraksiyonlar seçilerek, tekrar kolon kromatografisi, ince tabaka kromatografisi, preparatif ince tabaka kromatografisi, sefadeks kolon kromatografisi ve RP-HPLC kromatografisi uygulanarak izolasyon ve saflaştırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Preparatif RP-HPLC 'de yapılan izolasyon işlemlerinde %100'lük H₂O içeren H₂O/Asetonitril çözücü sisteminden başlayıp, %100 MeOH ile sonlanan gradient sistemlerde ayırma tabi tutulmuştur. %100 kloroform çözücü sistemi ile elde edilen, CM-3 numaralı alt fraksiyondan, 7 numaralı bileşik; 2'-3'-dihidroksipropil)-2,6-dihidroksi-3,5-dimetil benzoat (129 mg) izole edilmiştir. Hekzan: Kloroform (1:1) çözücü sistemi ile izole edilen, CM-9 numaralı saflaştırılması sonucu 6 numaralı bileşik; Ftalik asit (2"-metil-pentil), (2',2'-dimetil-nonil) ester (30 mg) elde edilmiştir. Kloroform: metanol (10:0.5) çözücü sistemi ile izole edilen, CM-12 numaralı alt fraksiyonun saflaştırılması sonucu 2 numaralı bileşik; 2-O- α -D-glukopiranozil-4-(4',4'-dimetil-2'-vinil-desil) benzen-1-ol (15 mg) ve 3 numaralı bileşik; 2-O- α -D-arabinofuranosil-4-(4',4'-dimetil-2'-vinil-desil) benzen-1-ol (13 mg) elde edilmiştir. Kloroform: metanol (3:1) çözücü sistemi ile izole edilen, CM-13 numaralı alt fraksiyonun saflaştırılması sonucu 1 numaralı bileşik; 4-(4',4'-dimetil-2'-vinil-desil) benzen-1,2-diol (17 mg) ve 4 numaralı bileşik; 4-(4',4'-dimetil-2'-vinil-desil)-2-hidroksi-fenil-2",3",4"-trihidroksi bütanoat (14 mg) elde edilmiştir. Kloroform: metanol (9:1) çözücü sistemi ile izole edilen, CM-15 numaralı alt fraksiyonun izolasyonu sonucu 5 numaralı bileşik; 2-hidroksi-4-(4',4'-dimetil-2'-vinil-desil) fenil-3-hidroksi benzoat (19 mg) elde edilmiştir.

İzole edilen bu saf maddelerin (CM-3-1, CM-9-1, CM-12-2-1, CM-12-4-1, CM-13-1-1-2, CM-13-4-1, CM-15-2-2), 1D ve 2D NMR (APT, ¹H-¹H COSY, HSQC ve HMBC) ile LC-MS-MS ve LC-QTOF-MS spektrumları alınarak kimyasal yapıları tayin edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

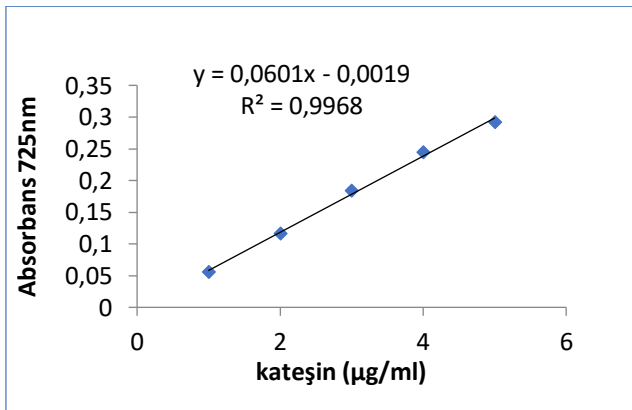
Bu tez çalışmasında *C. creticum* bitkisinin ham ekstralarında toplam fenolik, flavonoid miktarı tayini, antioksidan aktivite tayini (β -karoten renk açılım, DPPH serbest radikali giderim, ABTS katyon radikali giderim, süperoksit anyon radikali giderim, FRAP ve CUPRAC) ve metanol ekstresinin fitokimyasal incelenmesi gerçekleştirilmiştir. Literatürde *C. creticum*'un biyolojik aktivitesi ve fitokimyasal incelenmesiyle ilgili makale mevcut değildir. Bu bağlamda; yapılan bu çalışma ile literatüre ilk kez sunulmuş olacaktır.

4.1. *C. creticum* Bitkisinin Ham Ekstrelerinde Biyolojik Aktivite Tayini Sonuçları

4.1.1. *C. creticum* Ekstrelerinde Toplam Fenolik Madde Miktarı

Toplam fenolik miktarı (TPC) Folin&Ciocalteu Reaktifi (FCR) kullanılarak kateşin eşdeğeri olarak belirlenmiştir. Bu amaçla öncelikle kateşinin etanolde çözündürülerek, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ - $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ aralığında standart çözeltileri hazırlanmış ve kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı standart olarak kateşin kullanılarak elde edilen eğriden ve aşağıdaki eşitlikten $\mu\text{g CAT mg ekstrakt}^{-1}$ eşdeğeri şeklinde hesaplanarak bulunmuştur. Kateşinin kalibrasyon eğrisi Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

$$\text{Absorbans} = 0.0601\text{kateşin } (\mu\text{g}) - 0.0019 \quad (R^2: 0.9968)$$



Şekil 4. 1. *C. creticum* için toplam fenolik madde tayini kateşin standart eğrisi

Yapılan analizler sonucunda bulunan *C. creticum* ekstralarının toplam fenolik madde içerikleri Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4. 1. *C. creticum* ekstrelerinin toplam fenolik madde içeriği

Bitki adı	Ekstre	TPC ($\mu\text{g CAT mg ekstrakt}^{-1}$)*
<i>C. creticum</i>	Metanol	$99.33 \pm 1.41^{**}$
	Etil asetat	34.06 ± 2.27
	Dietileter	42.77 ± 0.46
	n-Hekzan	5.21 ± 0.16

*Kateşin eşdeğeri olarak toplam fenolik madde miktarı

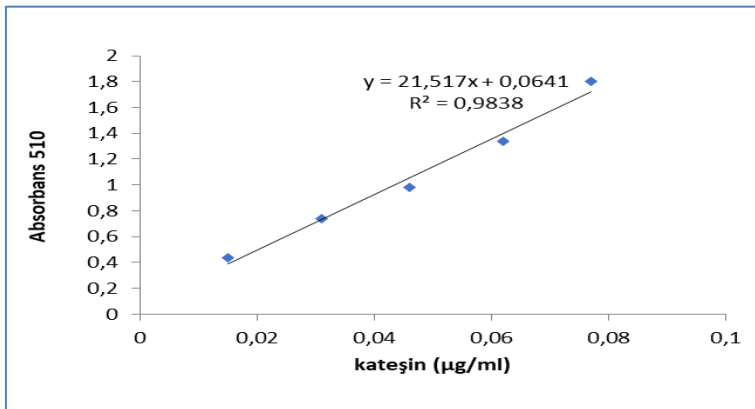
**Sonuçlar ortalama değer olarak hesaplanmış, ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir (n = 3).

Tablodan da görüldüğü üzere *C. creticum* ekstrelerinin toplam fenolik madde içerikleri 5.21- 99.33 μg kateşin eşdeğeri mg ekstrakt^{-1} arasında bulunmuştur. En yüksek toplam fenolik madde miktarı metanol ekstresinde bulunurken, en düşük değer n-hekzan ekstresinde saptanmıştır (Tablo 4.1).

4.1.2. *C. creticum* Ekstrelerinde Toplam Flavonoid Madde Miktarı

C. creticum ekstrelerinin toplam flavonoid içeriği $\text{AlCl}_3/\text{NaNO}_2$ metoduna göre belirlenmiştir. Farklı çözücü ekstratlarında toplam flavonoid içeriğini belirlemek amacıyla kateşin ve rutin standart bileşikler kullanılarak kalibrasyon eğrileri hazırlanmıştır (Şekil 4.2). Kalibrasyon eğrileri kullanılarak yapılan hesaplamalardan elde edilen toplam flavonoid miktarlarına ilişkin sonuçlar kateşin ($\mu\text{g CAT mg ekstrakt}^{-1}$) ve rutin eşdeğeri ($\mu\text{g RUTİN mg ekstrakt}^{-1}$) olacak şekilde hesaplanmıştır (Tablo 4.2). Toplam flavonoid madde miktarı standart olarak kateşin kullanılarak elde edilen eğriden ve aşağıdaki eşitlikten hesaplanarak bulunmuştur (Şekil 4.2).

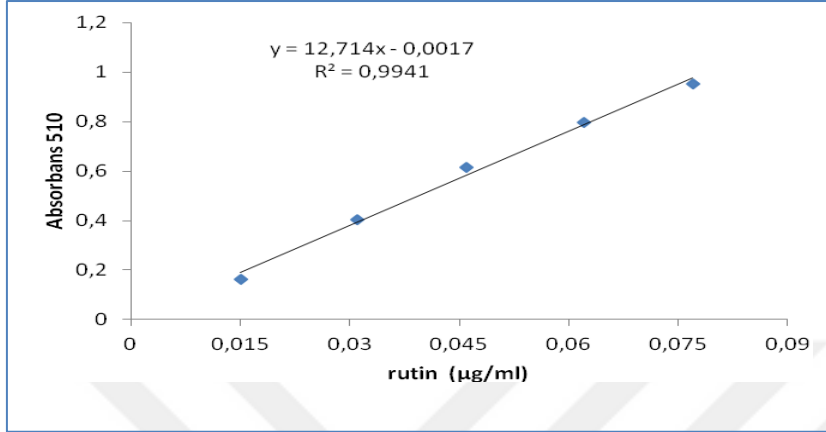
$$\text{Absorbans } (\lambda:510 \text{ nm}) = 21,782 (\text{kateşin}) + 0.0349 (R^2:0.9938) \quad (4.1.)$$



Şekil 4. 2. Toplam flavonoid madde kateşin standart eğrisi

Toplam flavonoid madde miktarı, standart rutin bileşiği kullanılarak aşağıda belirtilen standart eğriden elde edilen eşitlikten rutin eşdeğeri hesaplanarak bulunmuştur (Şekil 4.3).

$$\text{Absorbans } (\lambda: 510 \text{ nm}) = 12,714 (\text{rutin}) + 0,0017 (R^2: 0,9941) \quad (4.2.)$$



Şekil 4. 3. Toplam flavonoid madde rutin standart eğrisi

C. creticum ekstrelerinin toplam flavonoid madde içerikleri Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4. 2. *C. creticum* ekstrelerinin toplam flavonoid madde içerikleri

Bitki Adı	Ekstre	TF (µg CAT mg ekstrakt ⁻¹)*	TF (µg RUTİN EQ mg ekstrakt ⁻¹)
<i>C. creticum</i>	Metanol	20.35± 0.01	35.59 ± 0.02
	Etil Asetat	nd	nd
	Dietileter	1.59 ± 0.01	2.55 ± 0.02
	n-Hekzan	nd	nd

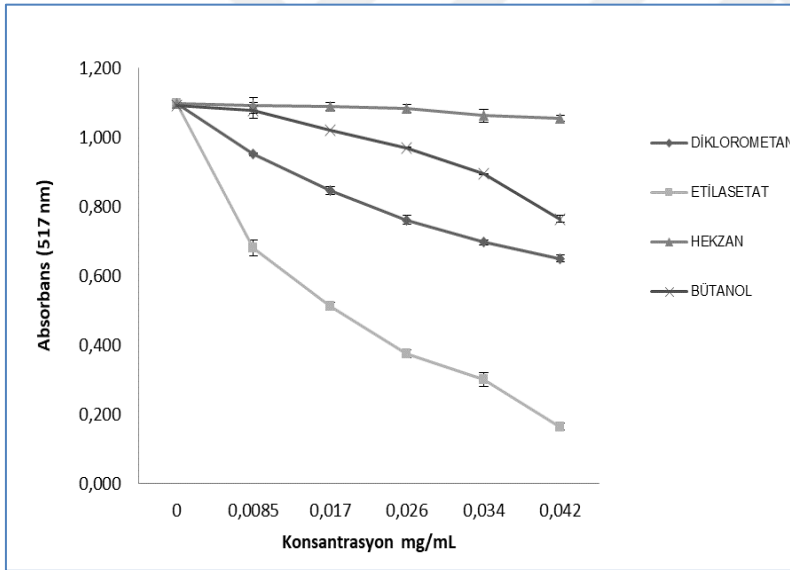
*Sonuçlar ortalama değer olarak hesaplanmış, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir (n = 3).

Tablo 4.2’de da görüldüğü gibi *C. creticum* ekstrelerinin n-hekzan ve etil asetat ekstrelerinde flavonoid madde saptanamamıştır. En yüksek flavonoid içeriği metanol ekstresinde, daha sonra da dietileter ekstresinde bulunmuştur. Metanol ekstresinde toplam flavonoid miktarı 20.35 µg CAT mg ekstrakt⁻¹ ve 35.59 Q µg RUTİN mg ekstrakt⁻¹ olarak belirlenmiştir (Tablo 4.2).

4.1.3. *C. creticum* Ekstrelerinde Antioksidan Aktivite Tayini Sonuçları

4.1.3.1. *C. creticum* Ekstrelerinde DPPH• Radikalı Giderim Aktivitesi

C. creticum ekstrelerinin DPPH• radikalı giderim aktivitesiyle ilişkili, konsantrasyona bağlı absorbans değişimi Şekil 4.4’de gösterildiği gibidir. *C. creticum* ekstrelerinin DPPH• radikalı giderim aktivitesine ilişkin, konsantrasyona bağlı % inhibisyon değerleri Tablo 4.3 ve Şekil 4.4’de görüldüğü gibidir. Analiz sonuçlarında ekstrakt konsantrasyonlarına bağlı olarak DPPH radikal giderim aktivitesinde önemli farklılıklar bulunmuştur. Konsantrasyon arttıkça, radikal giderim aktivitesi önemli düzeyde yükselmiştir. Tüm ekstraktlar içerisinde metanol ekstraktları en yüksek aktiviteye sahiptir. Şekil 4.4’de görüldüğü gibi *C. creticum* metanol ekstreleri 0.017 µg/mL konsantrasyonda % 91.67 aktiviteye sahip iken diğer ekstreler daha yüksek konsantrasyonlarda daha düşük aktivite göstermişlerdir. n-hekzan, etilasetat, dietileter, metanol ekstrelerinde aktivite 0.0085 µg/mL konsantrasyonda sırasıyla % 1.54, % 5.76, % 4.97, % 47.4 olarak belirlenmiştir (Tablo 4.3).

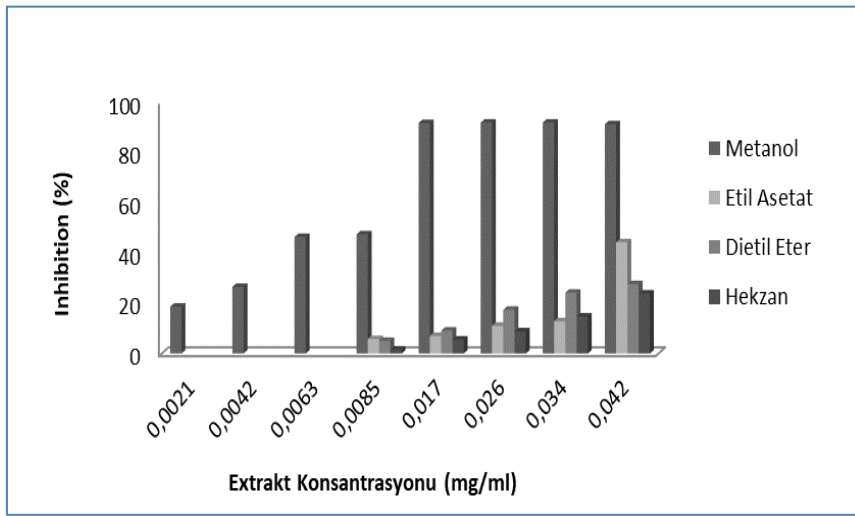


Şekil 4. 4. *C. creticum* ekstrelerinin DPPH• radikal giderim aktivitesi

En düşük aktivite n-hekzan ekstrelerinde belirlenmiştir. Farklı çözücülere ait ekstrelerin DPPH• radikal giderim aktiviteleri sırasıyla metanol > etilasetat > dietileter > n-hekzan olarak saptanmıştır (Tablo 4.3 ve Şekil 4.4 ve Şekil 4.5).

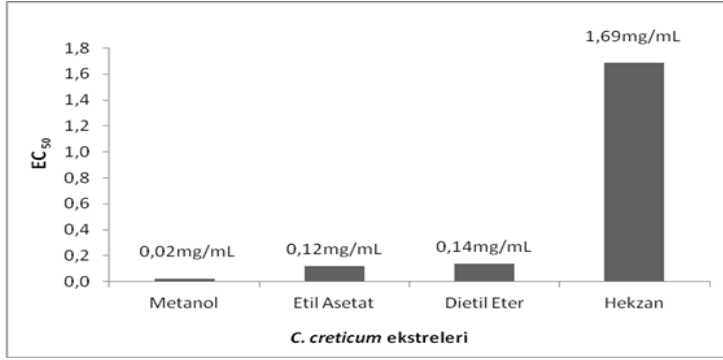
Tablo 4. 3. *C. creticum* ekstrelerinin DPPH* giderim aktivitesi (% İnhibisyon)

Ekstre	Konsantrasyon (mg mL ⁻¹)							
	0.0021	0.0042	0.0063	0.0085	0.017	0.026	0.034	0.042
Metanol	18.63±0.02	26.46±0.03	46.33±0.21	47.4±0.67	91.67±0.60	91.83±1.08	91.83±0.94	91.18±0.83
Etilasetat	-	-	-	5.76±0.04	6.93±0.05	11.02±0.08	12.85±0.10	44.24±0.04
Dietileter	-	-	-	4.97±0.03	9.11±0.07	17.39±0.12	24.19±0.08	27.59±0.16
n-Hekzan	-	-	-	1.54±0.02	5.53±0.04	8.79±0.08	14.69±0.14	23.84±0.10



Şekil 4. 5. *C. creticum* ekstrelerinin DPPH* radikal giderme aktivitesi (%)

Reaksiyon ortamındaki DPPH radikalinin % 50'sinin giderilmesi için gereken etkili antioksidan konsantrasyonu EC₅₀ değeri olarak tanımlanmıştır ve düşük EC₅₀ değeri yüksek antiradikal aktiviteyi göstermektedir. *C. creticum* ekstraktlarının herbiri için ayrı ayrı çizilen konsantrasyon - % inhibisyon grafiklerinden yararlanarak DPPH aktivitesine ilişkin EC₅₀ değerleri belirlenmiştir. Elde edilen sonulara göre farklı çözücülerde ekstrelerin DPPH* radikali giderim aktivitesine ilişkin EC₅₀ değerleri toplam fenolik madde içeriğine benzer şekilde, önemli düzeyde farklılıklar göstermiştir. Şekilden de görüldüğü gibi en düşük EC₅₀ değeri 0.02 mg/mL değeri ile metanol ekstresinde bulunurken, en yüksek EC₅₀ değeri hekzan ekstresine ve 1.69 mg/mL olarak saptanmıştır (Şekil 4.6).



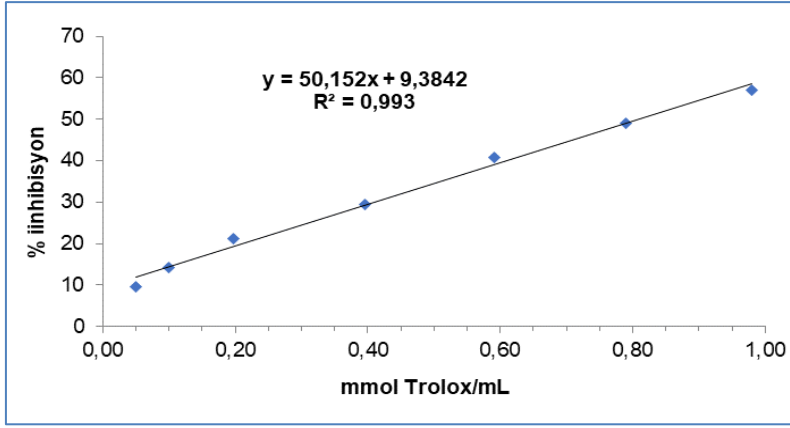
Şekil 4. 6. *C. creticum* ekstrelerinin DPPH• radikal giderim aktivitesine ilişkin EC₅₀ değerleri

Aktivite sonuçları arasındaki farklılık ekstraksiyonda kullanılan farklı çözücülerin aktif maddeleri hem bileşen hem de konsantrasyon olarak farklı düzeylerde ekstrakte edebilme potansiyeliyle açıklanabilir. Araştırma sonuçlarına göre; metanol ekstraktlarının diğer çözücülere nazaran çok daha yüksek antioksidan potansiyele sahip olduğu görülmektedir. Bu durum büyük ölçüde metanolün daha yüksek polarite ilr bitkisel materyallerde bulunan fenolik bileşikler daha yüksek oranda ekstrakte etmesi ile açıklanabilir (Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).

4.1.3.2. *C. creticum* Ekstrelerinde ABTS•⁺ Katyon Radikali Giderim Aktivitesi

ABTS•⁺ katyon radikali giderim aktivitesi Trolox eşdeğeri olarak belirlenmiştir. Örneklerin belirlenen konsantrasyonlarda TEAC değerlerinin hesaplanması amacıyla $4.93 \times 10^{-2} - 9.80 \times 10^{-1}$ mmol Trolox mL⁻¹ konsantrasyon aralığında hazırlanan Trolox çözeltisi kullanılarak standart çalışma grafiği hazırlanmıştır. *C. creticum* ekstraktlarının ABTS•⁺ radikali giderme aktiviteleri, standart eğriden elde edilen aşağıdaki eşitlikten olarak mM Trolox g⁻¹ ektrat olarak hesaplanmıştır. Örneklerin antioksidan aktiviteleri Trolox eşdeğeri (TEAC) ve yüzde ABTS•⁺ inhibisyonu olarak Tablo 4.4 ve Şekil 4.7’de gösterilmiştir.

$$y = 50,152 \text{ Trolox (mmol)} + 9,3842 \text{ (R}^2: 0.993) \quad (4.3.)$$



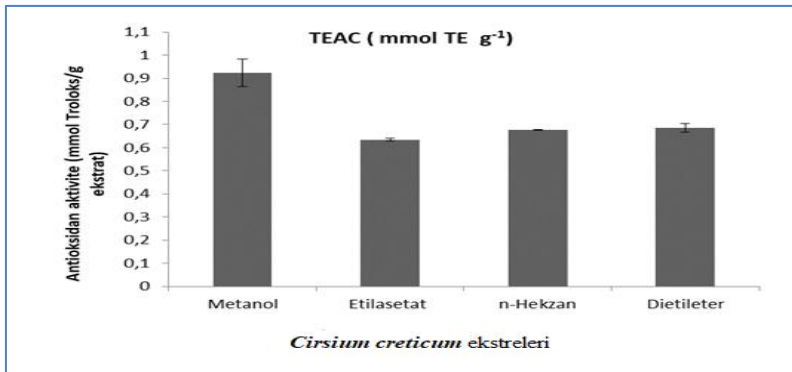
Şekil 4. 7. Trolox için ABTS^{•+} (TEAC) standart çalışma grafiği

C. creticum ekstralarının, 1 mg/mL konsantrasyonda ABTS^{•+} radikali giderme aktivitesine ilişkin sonuçlar Tablo 4.4 ve Şekil 4.8’de verilmiştir. *C. creticum* metanol ekstraları 1 mg/mL konsantrasyonda 0.932 mmol Trolox mg ekstrakt⁻¹ aktiviteye sahip iken, diğer ekstralar daha düşük aktivite göstermiştir. En düşük aktivite etilasetat ekstresinde bulunmuştur (0.634 mmol TE g⁻¹). Farklı çözücülere ait ekstraların ABTS^{•+} radikali giderme aktivitesi sırasıyla metanol > dietileter > n-hekzan > etilasetat olarak saptanmıştır. Araştırma sonuçlarına göre, metanol ekstralarının diğer çözücülere nazaran çok daha yüksek ABTS^{•+} radikali giderme aktivitesine sahip olduğu görülmektedir (Tablo 4.4 ve Şekil 4.8).

Tablo 4. 4. *C. creticum* ekstralarının ABTS^{•+} radikali giderme aktivitesi

Ekstre	ABTS ^{•+} Katyon Radikali Giderim Aktivitesi (mmol trolox eşdeğeri / g ekstrakt)
Metanol	0.932 ± 0.06*
Etilasetat	0.633 ± 0.01
Dietileter	0.687 ± 0.002
n-Hekzan	0.675 ± 0.002

*Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir (n = 3).

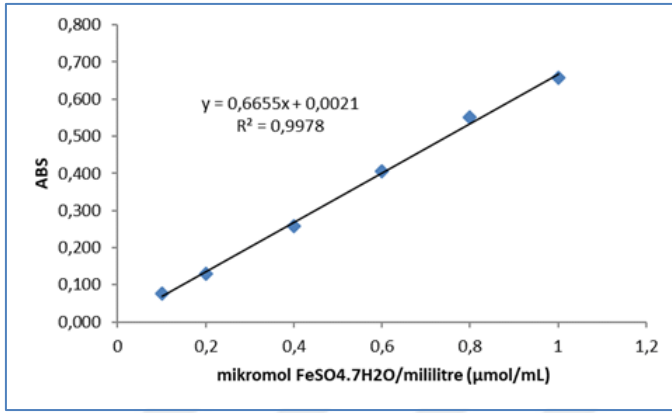


Şekil 4. 8. *C. creticum* ekstralarının ABTS^{•+} radikali giderme aktivitesi

4.1.3.3. *C. creticum* Ekstrelerinde Ferrik İyon İndirgeme Kapasitesi (FRAP)

C. creticum örneklerinin Ferrik iyon indirgeme kapasiteleri $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ kullanılarak hazırlanan standart çalışma grafiğinden belirlenmiştir (Şekil 4.9). 0.1-1.0 $\mu\text{mol/mL}$ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyon aralığında hazırlanan standart çalışma grafiği yardımıyla örneklerin Ferrik iyon indirgeme kapasiteleri $\mu\text{mol Fe}^{2+}\text{g}^{-1}$ ekstrakt olacak şekilde hesaplanmıştır. *C. creticum* ekstraktlarının Ferrik iyon indirgeme kapasitelerini belirlemek amacıyla hazırlanan grafik ve hesaplamada kullanılan eşitlik aşağıda belirtilmiştir.

$$\text{Absorbans } (\lambda: 734 \text{ nm}) = 0,6655 \text{ Fe}^{2+} (\mu\text{mol}) + 0,0021 \quad (R^2: 0.9978) \quad (4.4.)$$



Şekil 4. 9. Ferrik iyon indirgeme kapasitesi (FRAP), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ standart eğrisi

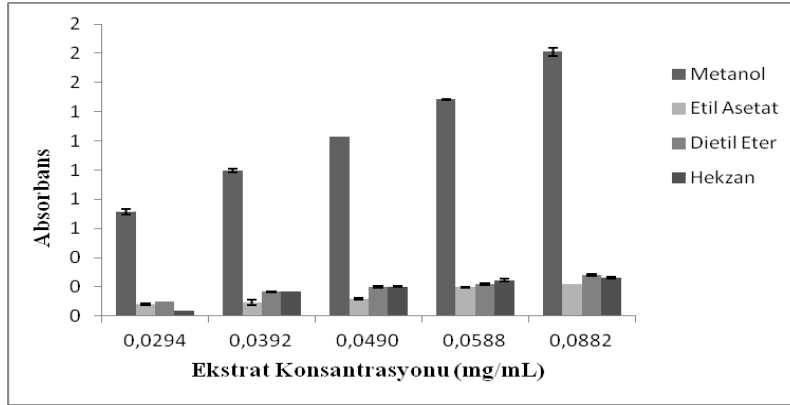
Yapılan analizler sonucunda *C. creticum* ekstrelerinin, farklı konsantrasyonlarında FRAP aktivitesine ilişkin değerler Tablo 4.5 ve Şekil 4.10'de verilmiştir.

Tablo 4. 5. *C. creticum* ekstresinde ferrik iyon indirgeme kapasitesi FRAP ($\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{g}^{-1}$ ekstrat)

Ekstrat/ Ekstrat konsantrasyon (mg mL^{-1})	Absorbans				
	0.0294	0.0392	0.049	0.0588	0.0882
Metanol	0.713 $\pm$ 0.018	0.997 $\pm$ 0.013	1.229 $\pm$ 0.001	1.485 $\pm$ 0.003	1.810 $\pm$ 0.026
Etilasetat	0.081 $\pm$ 0.006	0.094 $\pm$ 0.019	0.119 $\pm$ 0.008	0.198 $\pm$ 0.004	0.218 $\pm$ 0.000
Dietileter	0.099 $\pm$ 0.002	0.167 $\pm$ 0.004	0.198 $\pm$ 0.005	0.218 $\pm$ 0.006	0.281 $\pm$ 0.004
n-Hekzan	0.037 $\pm$ 0.004	0.055 $\pm$ 0.001	0.202 $\pm$ 0.101	0.245 $\pm$ 0.048	0.263 $\pm$ 0.007

*Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir (n = 3).

Yapılan analiz çalışmaları sonucunda, farklı konsantrasyonlardaki *C. creticum* ekstrelerindeki FRAP aktivite değerleri, konsantrasyon arttıkça yükselirken, en yüksek aktivitenin metanol ekstresinde olduğu görülmektedir. Tüm ekstratlar arasında en düşük aktivite n-hekzan ekstresinde bulunmuştur. Ekstrelerin konsantrasyona bağlı olarak aktivitelerinin sırasıyla metanol > dietileter > etilasetat > n-hekzan olduğu görülmektedir (Tablo 4.5 ve Şekil 4.10).



Şekil 4. 10. *C. creticum* ekstrelerinin Ferrik iyon indirgeme kapasitesi (FRAP)

C. creticum ekstrelerinin ferrik iyon indirgeme kapasitesi $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ kullanılarak hazırlanan standart eğriden hesaplanmış ve $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$ ekstrat bulunmuştur (Tablo 4. 6). Buna göre en yüksek aktivite methanol eksteresinde ve $1065.70 \pm 26.25 \mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$ ekstrat olarak saptanırken en düşük aktivite hegzan ekstresinde ve $52.83 \pm 6.06 \mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$ ekstrat olarak belirlenmiştir.

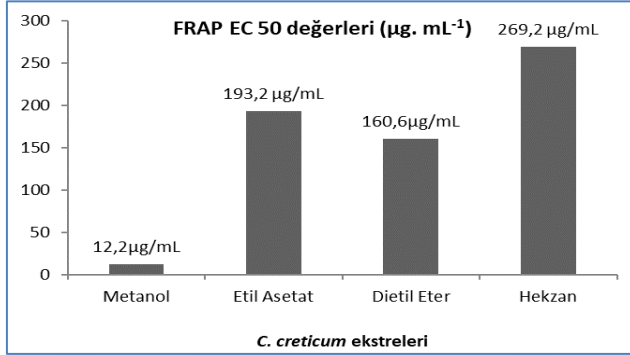
Tablo 4. 6. *C. creticum* ekstrelerinin ferrik iyon indirgeme kapasitesi

Ekstre	FRAP ($\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$ ekstrat)
Metanol	1065.70 ± 26.25
Etilasetat	117.79 ± 8.66
Dietileter	145.28 ± 2.60
n-Hekzan	52.83 ± 6.06

*Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir (n = 3).

FRAP aktivitesine ilişkin EC_{50} değerleri 593 nm de ekstrat konsantrasyonuna ($\mu\text{g/mL}$) karşılık absorbans değerlerine ilişkin elde edilen grafikten bulunmuştur. Elde edilen grafikte 0.5 absorbans değerini sağlayan ekstrakt konsantrasyonu EC_{50} değeri olarak bulunmuştur. *C. creticum* ekstrelerindeki FRAP aktivite değerlerine ilişkin EC_{50} değerleri Şekil 4.11'de

verilmiştir. Şekil 4.11’de görüldüğü gibi metanol ekstralarının EC₅₀ değerleri 12.2 µg/mL iken dietileter ekstresinde 160.6 µg/mL, etilasetat ekstresinde 193.2 µg/mL olarak saptanmıştır. DPPH aktivitesinde olduğu gibi en düşük EC₅₀ değeri n-hekzan ekstresinde bulunmuştur (Şekil 4.11).



Şekil 4. 11. *C. creticum* ekstralarının FRAP aktivitesi EC₅₀ değerleri

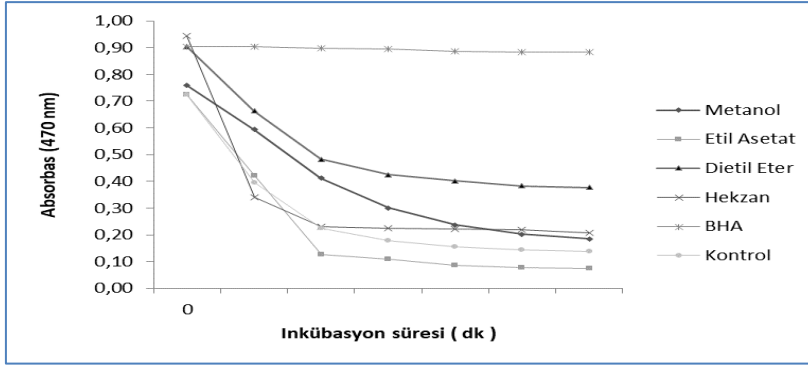
4.1.3.4. *C. creticum* Ekstrelerinde β-Karoten Renk Giderim Aktivitesi

C. creticum ekstralarında toplam antioksidan aktivite tayini, β-karotenin renginin açılmasına dayanan ve linoleik asit oksidasyon hızını ölçen β-karoten-linoleik asit yöntemiyle belirlenmiştir. Standart madde olarak BHA kullanılmıştır. Elde edilen verilerden ekstraların 1 mg mL⁻¹ konsantrasyonda absorban değerleri Tablo 4.7 ve şekil 4.12’de gösterilmiştir.

Tablo 4. 7. *C. creticum* ekstralarının β-karoten linoleik asit reaksiyon ortamında, inkübasyon süresince 470 nm’de absorban değerleri

Ekstre	Absorbans Değerleri (470 nm)						
	0 dakika	30 dak.	60 dak.	90 dak.	120 dak.	150 dak.	180 dak.
Metanol	0.758	0.594	0.411	0.300	0.237	0.202	0.185
Etilasetat	0.724	0.422	0.127	0.109	0.085	0.078	0.074
Dietileter	0.903	0.663	0.483	0.424	0.402	0.383	0.377
n-Hekzan	0.963	0.340	0.229	0.224	0.223	0.218	0.208
BHA	0.903	0.903	0.898	0.896	0.886	0.884	0.882

*Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir (n = 3).



Şekil 4. 12. *C. creticum* ekstralarının β-karoten linoleik asit emülsiyon sisteminde, linoleik asit asit oksidasyonuna inhibisyon etkisi

Tablo 4. 8. *C. creticum* ekstralarının β-karoten linoleik asit emülsiyon sisteminde, oksidasyon hızına % inhibisyon etkisi

Ekstraktlar	İnkübasyon Süresi					
	30 dak.	60 dak.	90 dak.	120 dak.	150 dak.	180 dak.
Metanol	50.00	30.46	16.12	8.27	3.97	3.97
Etilasetat	33.91	-1.65	0.00	0.00	0.00	0.00
Dietileter	34.96	15.15	13.35	12.87	11.15	10.65
n-Hekzan	1.32	-1.22	-1.01	0.00	0.00	0.00
BHA	102.44	101.17	102.34	101.75	101.16	101.16
Tokoferol	85.98	85.98	91.81	89.47	87.21	84.88

C. creticum ekstralarının linoleik asit ve β-karotenin oksidasyon hızına ve renk ağarmasına karşı en yüksek inhibisyon etkisinin metanol ve dietil eter ekstralarında olduğu buna karşılık n-hekzan ekstralarının aktivite göstermediği görülmektedir. Etil asetat ekstralarında ilk 30 dakikada gözlenen inhibisyon etkisi 180 dakikalık inkübasyon süresince gözlenememiştir (Tablo 4.8).

4.1.3.5. *C. creticum* Ekstrelerinde Bakır (II) İndirgeme Gücü (KUPRAC)

Yöntem, Cu (II) klorür çözeltisi, neokuproin çözeltisi ve amonyum asetat (pH=7 tamponu) çözeltilerinin, antioksidan çözeltisinin ilave edilmesi ve bunu takip eden 30 dakika sonunda, içerisinde antioksidan bulunmayan referansa karşı 450 nm’de absorbans değerlerinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Kuprak yönteminde standart eğri için etanolde

$$\text{Absorbans } (\lambda: 450 \text{ nm}) = 17604 \text{ Trolox (Molar)} - 0,1075 (R^2: 0.988) \quad (4.5.)$$

Tablo 4. 9. Standart eğri için Troloksun hacim-konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi

Graph showing the linear relationship between Trolox concentration (M) and Absorbance (ABS) at 450 nm. The equation of the line is $y = 17604x - 0,1075$ and the coefficient of determination is $R^2 = 0,988$.

TROLOX (M)	ABS (450 nm)
0,00018	0,1
0,00022	0,35
0,00042	0,8
0,00095	1,4
0,00145	2,55

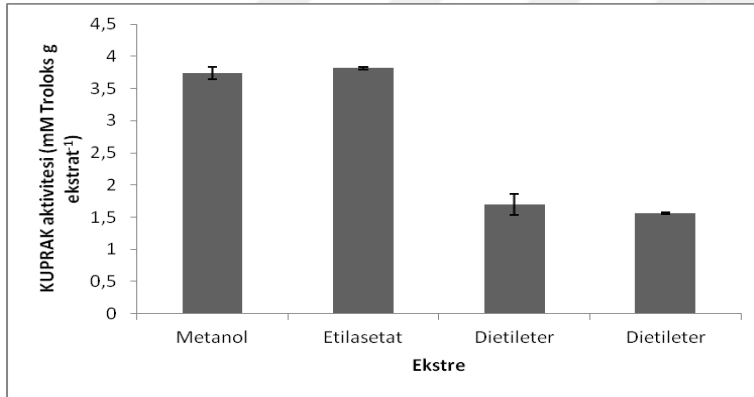
C. creticum ekstrelerinin konsantrasyonlara bağlı kuprik iyon indirgeme kapasiteleri Tablo 4.10 ve Şekil 4.14’de gösterilmiştir.

Tablo 4. 10. *C. creticum* ekstrelerinin konsantrasyona bağı Kuprik iyon indirgeme kapasiteleri (mM Troloks g ekstrat⁻¹)

Ekstre	KUPRAK aktivitesi (mM Troloks g ekstrat ⁻¹)
Metanol	3.74 ± 0.09
Etilasetat	3.82 ± 0.02
Dietileter	1.70 ± 0.16
n-Hekzan	1.56 ± 0.01

*Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir (n = 3).

Şekil 4.14’de görüldüğü gibi *C. creticum* ekstrelerinde konsantrasyona bağı önemli düzeyde aktivite artışı bulunmaktadır. En yüksek aktivite etilasetat ekstresinde (4.77 µg mL⁻¹) bulunurken, en düşük aktivite n-hekzan (0.06 µg mL⁻¹) ekstresinde belirlenmiştir. Metanol ekstresinin kuprik iyon indirgeme kapasitesinin, diğr antioksidan aktivite yöntemlerinden farklı olarak etilasetat ekstresinden düşük olduğı görülmektedir.

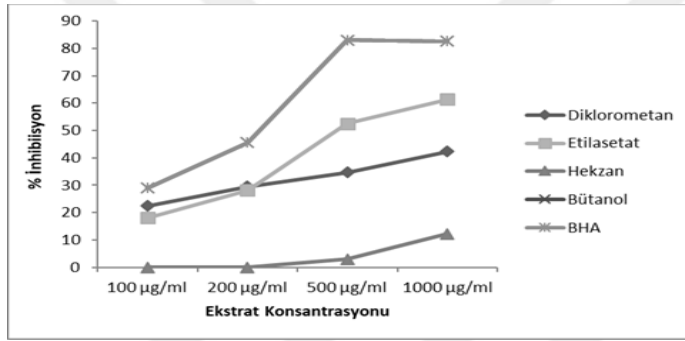


Şekil 4. 14. *C. creticum* ekstrelerinin konsantrasyona bağı Kuprik iyon indirgeme kapasiteleri

Şekilden 4.14’de görüldüğü üzere *C. creticum* ekstreleri içerisinde etilasetat ekstresi en yüksek kuprik iyon indirgeme kapasitesine sahip iken, onu sırasıyla metanol, dietileter ve n-hekzan ekstreleri izlemiştir.

4.1.3.6. *C. creticum* Ekstrelerinde Süperoksit Anyon Radikali Giderim Aktivitesi

C. creticum ekstrelerinde süperoksit anyon radikali giderim aktivitesi belirlemede, askorbik asit kontrol olarak alınmış ve ekstraktların aktiviteleri BHA standardına karşı kıyaslanarak % inhibisyon düzeyi olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.15). İlgili şekil ve tabloda da görüldüğü gibi dietileter ekstresinde en yüksek aktivite saptanmış olup, 1 mg/mL konsantrasyonda %76 düzeyinde inhibisyon etkisi göstermiştir. Onu % 59.38 aktiviteyle metanol ekstresi izlemiş ve daha sonra etilasetat ekstresinin % 50.5 inhibisyon aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur. Etilasetat ekstresinde 100 ve 200 µg/mL konsantrasyonlarda aktivite belirlenmemiş ancak, 500 µg/mL’de saptanmıştır. Hekzan ekstresinde süperoksit anyon radikali giderim aktivitesi ise çalışılan konsantrasyonlarda belirlenememiştir (Tablo 4.11; Şekil 4.15).



Şekil 4. 15. *C. creticum* ekstrelerinin Süperoksit anyon radikali giderim aktivitesi

Tablo 4. 11. *C. creticum* ekstrelerinin % süperoksit inhibisyon kapasiteleri

Ekstre	Ekstrat konsantrasyonu			
	100 µg/mL	200 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL
Metanol	13.25	16.92	31.16	59.38
Etil Asetat	nd	nd	17.51	50.5
Dietil Eter	13.68	30.30	70.31	76
n-Hekzan	nd	nd	nd	nd
BHA	29.03	45.64	83.03	82.57

*Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir (n = 3).

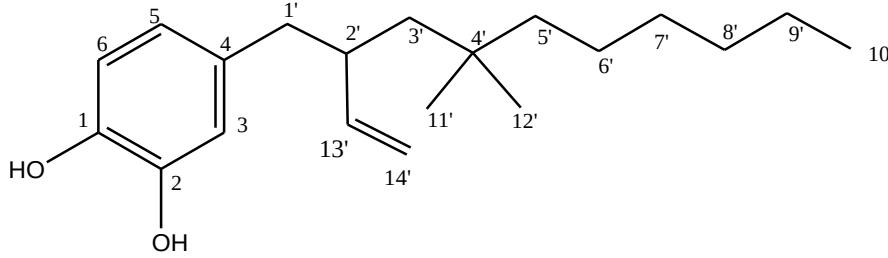
4.1.4. *C. creticum* Bitkisinin Ham Ekstrelerinde Biyolojik Aktivite Tayini Sonuçlarının Değerlendirilmesi

C. creticum bitkisinin fenolik madde içeriği en yüksek metanol ekstresinde ve 99.33 µg CAT mg ekstrakt⁻¹ olarak bulunmuştur. Toplam flavonoid madde içeriği açısından sadece metanol ve dietileter içeriği sonuç verirken en yüksek değerler metanolde (20.35 µg CAT mg ekstrakt⁻¹) belirlenmiştir. DPPH radikal giderim aktivitesine ilişkin EC₅₀ değeri en düşük metanol ekstresinde bulunarak 1.69 mg mL⁻¹ değeri ile en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Benzer şekilde metanol ekstresi 0.932 µg Trolox eşdeğeri mg ekstrakt⁻¹ en yüksek ABTS•⁺ radikali giderme aktivitesine sahip bulunurken, 2711.02 µmol Fe²⁺/g ekstrat aktivite değeri ile en yüksek FRAP (Ferrik iyon indirgeme kapasitesi) aktivitesine sahip bulunmuştur ve β-Karoten renk giderim inhibisyon aktivitesi en yüksek metanol ekstresindedir. Kuprik iyon indirgeme kapasitesi açısından düşük konsantrasyonlarda metanol ekstresi daha yüksek aktivite gösterirken, yüksek konsantrasyonda etilasetat ekstresi ile benzer sonuç vermiştir (sırasıyla; 4.63 ve 4.77 mg trolox mg ekstrakt⁻¹). Fakat *C. creticum* ekstrelerinde Süperoksit anyon radikali giderim aktivitesi en yüksek dietileter ekstresinde (%76) olduğu ve metanol ekstresinin ikinci sırada geldiği görülmektedir.

4.2. *C. creticum* Bitkisinin Metanol Ekstresinden İzole Edilen Bileşikler

4.2.1. Alkil Fenoller (Alkil Kateşoller) ve Türevleri

4.2.1.1. 1 Numaralı Bileşik (CM-13-1-1-2): 4-(4',4'-dimetil-2'-vinil-desil) benzen-1,2-diol



Şekil 4. 16. (4',4'-dimetil-2'-vinil-desil) benzen-1,2-diol yapısı

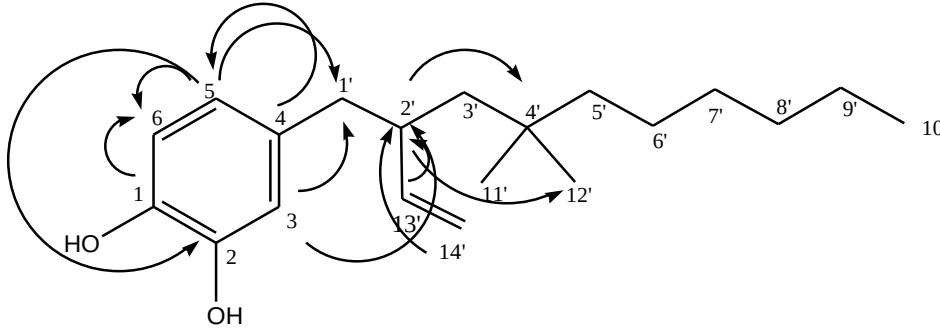
1 numaralı bileşik; beyaz renkli katı halde olup TLC plakasında 254 nm UV ışık altında görünmemiş, 366 nm UV ışık altında mor renkli olarak görünmüştür. İlk önce NH_3 buharıyla muamele edilmiş, ardından NA belirteci püskürtülmüş ve 366 nm ışık altında mor renginde değişme görünmemiştir. TLC çözücü sistemi olarak $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (3:1) kullanılmıştır.

^1H NMR spektrumunda (CDCl_3 , δ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.19; Şekil 4.20) bileşiğin 7.46 ppm'de (1H, *d*, $J = 8.6$ Hz) H-6'nın H-5 ile orto etkileşimi; 7.28 ppm'de (1H, *t*, $J = 2.1$ Hz) H-3'ün H-5 ile meta etkileşimi ve 7.06 ppm'de (1H, *dd*, $J = 2.5, 8.6$ Hz) H-5'in H-6 ile orto etkileşimi ve H-3 ile meta etkileşimi gözlenmiştir. Bu durum 1,2,4 tri süstitüe aromatik halkanın varlığını göstermiştir. Ayrıca 4.92 (1H, *ddd*, $J = 1.6, 3.6, 17.1$ Hz, $\text{H}_b\text{-14'}$) ve 4.86 ppm'de (1H, *ddd*, $J = 1.04, 3.1, 10.1$ Hz, $\text{H}_a\text{-14'}$) gözlenen *ddd* pikleri ile 5.74 ppm'de (1H, *ddd*, $J = 17.1, 10.3, 6.7$ Hz, H-13') gözlenen *ddd* piki, $\text{CH}_2=\text{CH-}$ (vinil) grubunun kanıtı olmuştur. Bunun yanında 1.26 ppm'deki (6H, *s*, H-11' ve H-12') singlet ile 1.14-1.63 ppm arasındaki multipliket pik grubu da benzen halkasına bağlı olan alkil grubunun varlığını göstermektedir.

^{13}C NMR, APT ve HSQC spektrumunda (CDCl_3 , δ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.21; Şekil 4.22; Şekil 4.23; Şekil 4.24; Şekil 4.25; Şekil 4.26; Şekil 4.27; Şekil 4.28) 1 numaralı bileşiğin 138.58 ppm (C-4), 124.50 ppm (C-5), 124.02 ppm (C-3), 119.15 ppm'de (C-6) aromatik karbon gözlenirken; 147.72 ppm (C-1) ve 147.67 ppm'de (C-2) ise oksijene bağlı iki aromatik karbon gözlenmiştir. Vinil grubunun karbonları 139.34 ppm (C-13') ve 114.11 ppm'de (C-14') belirlenirken, sp^3 hibritleşmesi yapmış 12 karbon 14.16-37.34 ppm aralığında tespit edilmiştir. APT spektrumuna bakıldığında bunu destekleyici bilgi vermiş olup 14.16-37.34 ppm aralığında; 3 metil karbonu [30.24 (C-11'/12'), 14.16 (C-10')], 1 metin karbonu [31.48 (C-2')], 1 kuarternar karbonu [37.34 (C-4')], 7 metilen karbonu [34.92 (C-1'), 33.87 (C-3'), 31.97, 29.74, 29.56, 29.41, 22.74 (C-5'/6'/7'/8'/9')] gözlenmiştir.

^1H - ^1H COSY spektrumunda (CDCl_3 , δ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.29) aromatik halkada bulunan 7.06 ppm'deki (1H, *dd*, J = 2.5, 8.6 Hz) H-5 protonunun, 7.46 ppm'deki (1H, *d*, J = 8.6 Hz) H-6 protonuyla ve 7.28 ppm'deki (1H, *t*, J = 2.1 Hz) H-3 protonunun 7.46 ppm'deki (1H, *d*, J = 8.6 Hz) H-6 protonuyla etkileştiği görülmüştür. Ayrıca 5.74 ppm'deki (1H, *ddd*, J = 17.1, 10.3, 6.7 Hz, H-13') vinilik metin protonu H-13' 'nün 4.86 ppm'deki (1H, *ddd*, J =1.04, 3.1, 10.1 Hz) H_a-14' ve 4.92 ppm'deki (1H, *ddd*, J = 1.6, 3.6, 17.1 Hz) H_b-14' ile 1.96 ppm'deki (1H, *q*, J = 6.8 Hz) H-2' protonları ile etkileşimi kanıtlanmıştır. Bununla birlikte 0.5-2.27 ppm aralığında da birbirine komşu metil, metilen, metin protonlarının etkileşimi de görülmektedir.

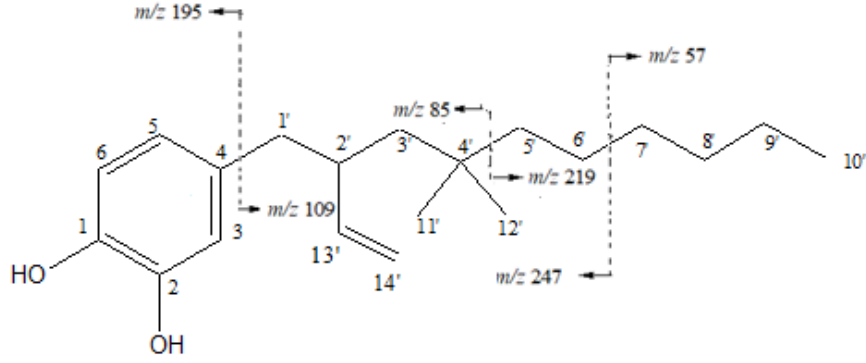
1 numaralı bileşiğin HMBC spektrumuna (CDCl_3 , δ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.30; Şekil 4.31; Şekil 4.32; Şekil 4.33; Şekil 4.34) bakıldığında 2.27 ppm'deki H-1' protonunun 147.67 ppm'deki C-2 karbonuyla, 139.34 ppm'deki C-13' karbonuyla, 124.50 ppm'deki C-5 karbonuyla, 124.02 ppm'deki C-3 karbonuyla ve 114.11 ppm'deki C-14' karbonuyla etkileşimi gözlenmiştir. Bu etkileşimler de alkil grubunun 4 konumunda fenol halkasına bağlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca 5.74 ppm'deki H-13' protonunun 138.58 ppm'deki C-4 karbonuyla etkileşimi tespit edilmiştir. Aromatik protonlar H-3 ve H-5'in; 34.92 ppm'deki C-1' karbonuyla etkileşimi de HMBC spektrumunda tespit edilirken, H-11' ve H-12' protonlarının 139.14 ppm'deki C-13' karbonuyla etkileşimi gözlenmiştir. 1 numaralı bileşiğin diğer HMBC etkileşimleri Şekil 4.17'de gözlenmiştir.



Şekil 4. 17. 1 Numaralı bileşiğin HMBC etkileşimleri

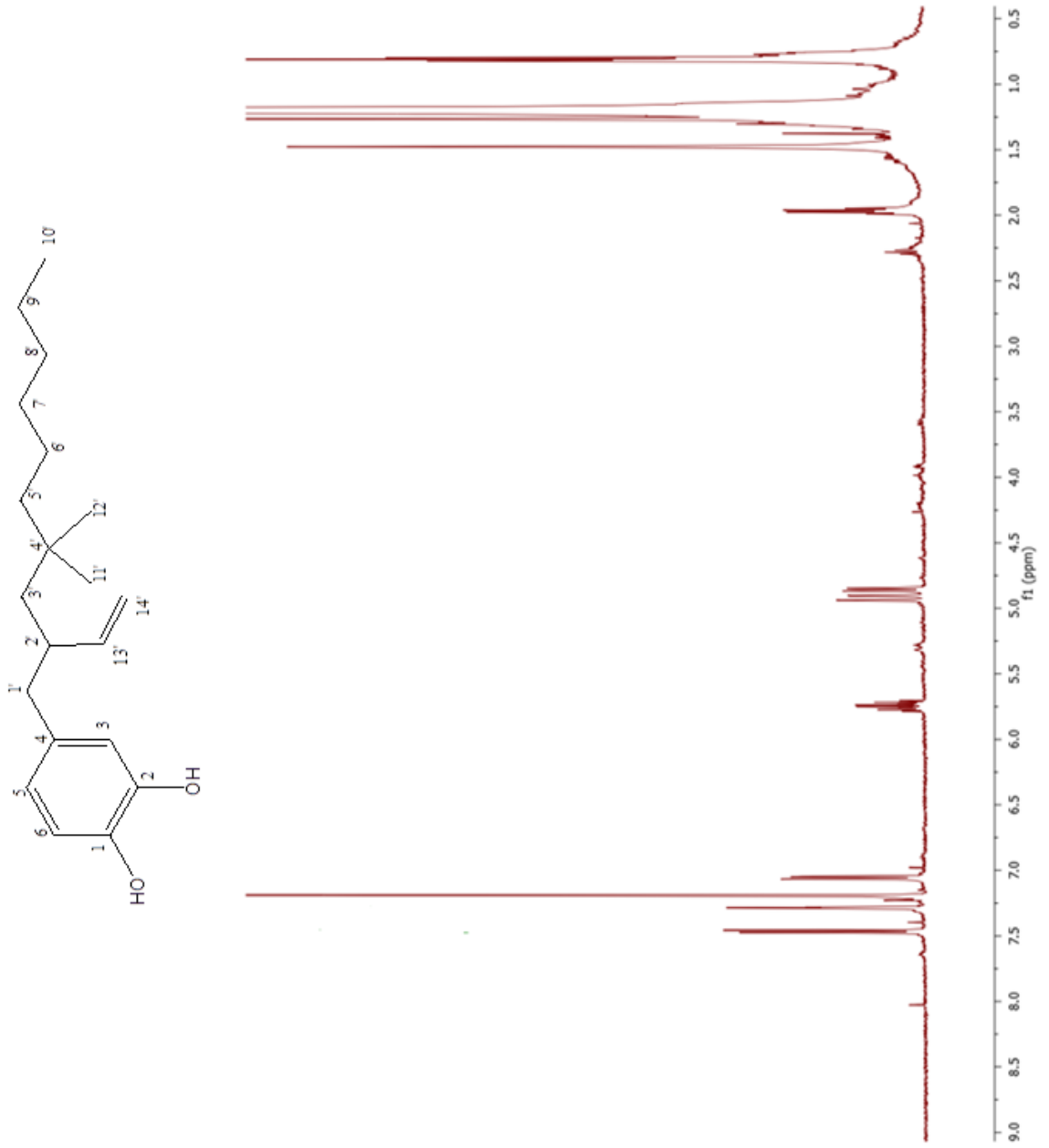
LC-MSMS cihazıyla alınan kütle spektumunda (Şekil 4.35; Şekil 4.36) moleküler iyon piki m/z 304 $[\text{M}]^+$ (%17) vererek, bileşiğin $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_2$ kapalı formülüne sahip olduğunu göstermiştir. Bileşiğin parçalanma ürünlerinden m/z 268 (%100) iyon piki $[\text{M}-2\text{xH}_2\text{O}]^+$, moleküldeki iki hidroksil grubunun varlığının kanıtıdır. Bunun yanında m/z 220 (%46) piki $[(\text{M}+1)-\text{C}_6\text{H}_{13}]^+$ moleküldeki heksil grubu varlığını; m/z 270 (%83) piki $[(\text{M}+\text{Na})-\text{C}_4\text{H}_9]^+$

moleküldeki bütıl grubu varlığını ve m/z 132 (%32) piki $[(M+Na)-C_{14}H_{27}]^+$ fenolik bileşikten 14 karbonlu alkıl zincirinin ayrılışını göstermiştir. 1 numaralı bileşğin kütle spektrumunda gözlenen bölünmeler şekil 4.18’da gösterilmiştir.

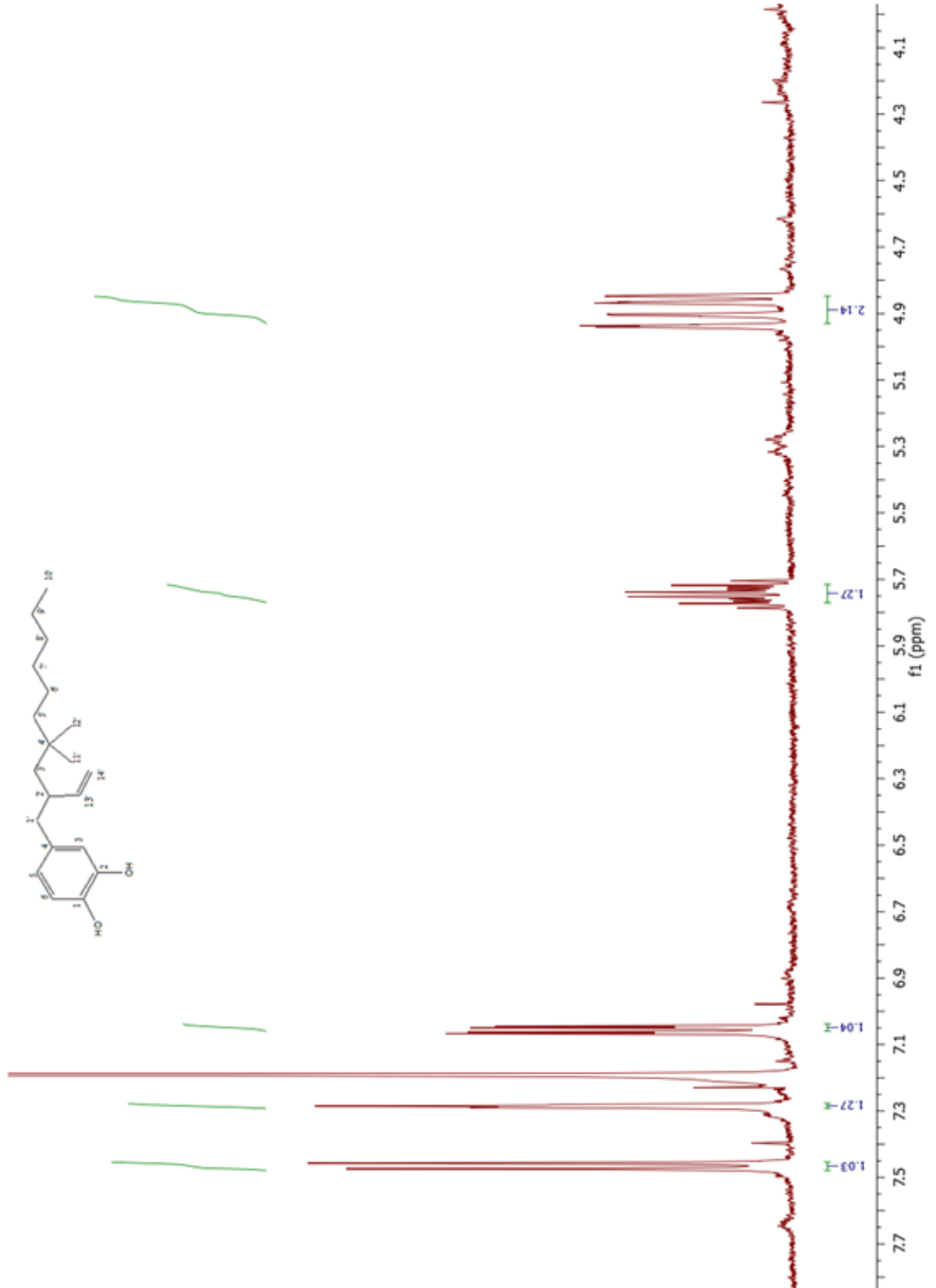


Şekil 4. 18. 1 numaralı bileşğin kütle spektrumunda gözlenen bölünmeler

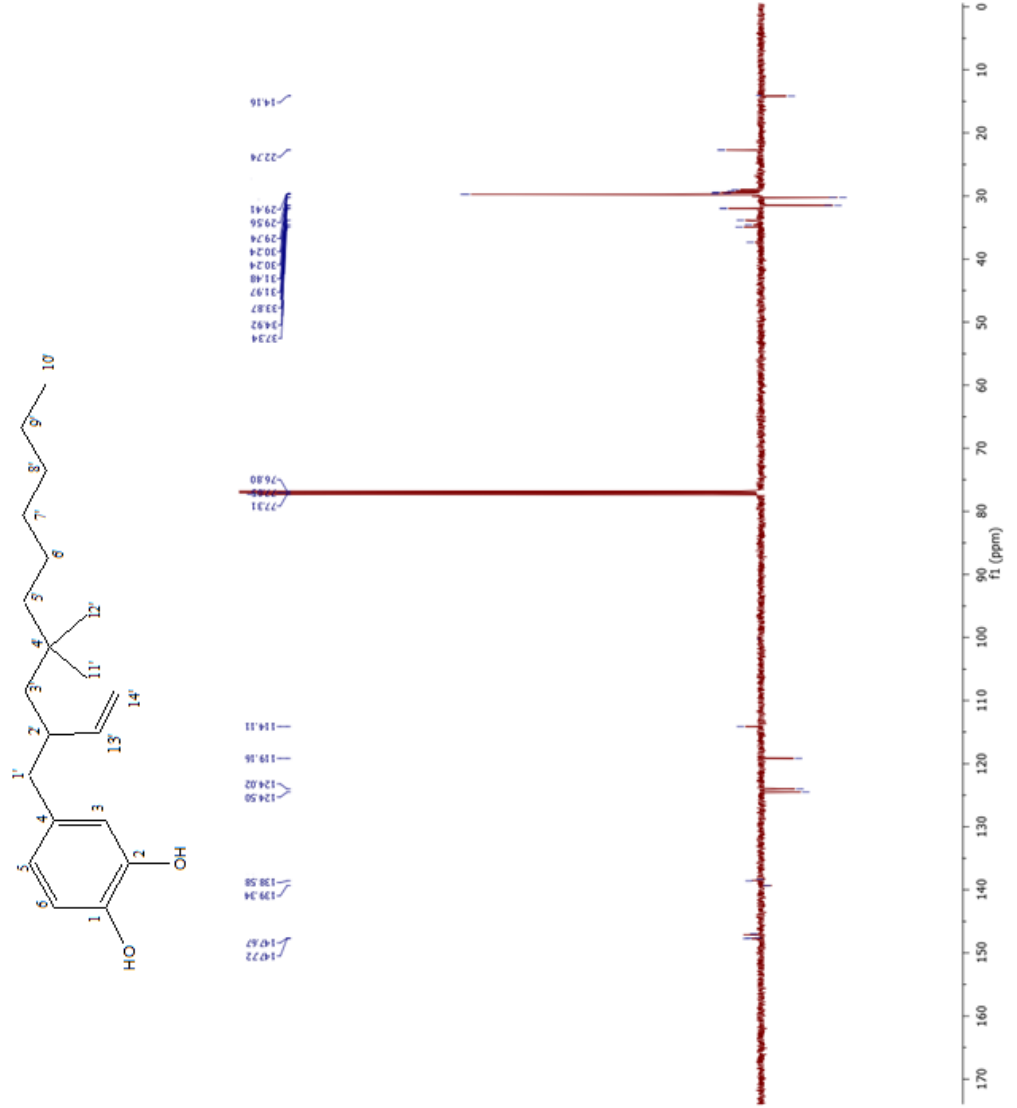
Tüm spektroskopik veriler ve yapılan literatür çalışmaları sonucunda 1 numaralı bileşğin yapısının; 4-(4',4'-dimetil-2'-vinil-desil) benzen-1,2-diol olduğunu göstermiştir (Kıtahara ve Kanda 1975, Juch ve Rüedi 1997, Pauli ve ark. 1998, Suzuki vb. 1998, Feresin vb. 2003, Tyman ve Mehet 2003, Mastelic ve ark. 2004, Lu ve ark. 2006, Saito vb. 2007, Arumugam vb. 2010, Li ve ark. 2011, Zidorn 2016, Gaca ve ark. 2017, Megawati ve Darmawan 2017). Bu bileşik *C. creticum* bitkisinden ilk defa izole edilen bir bileşiktir.



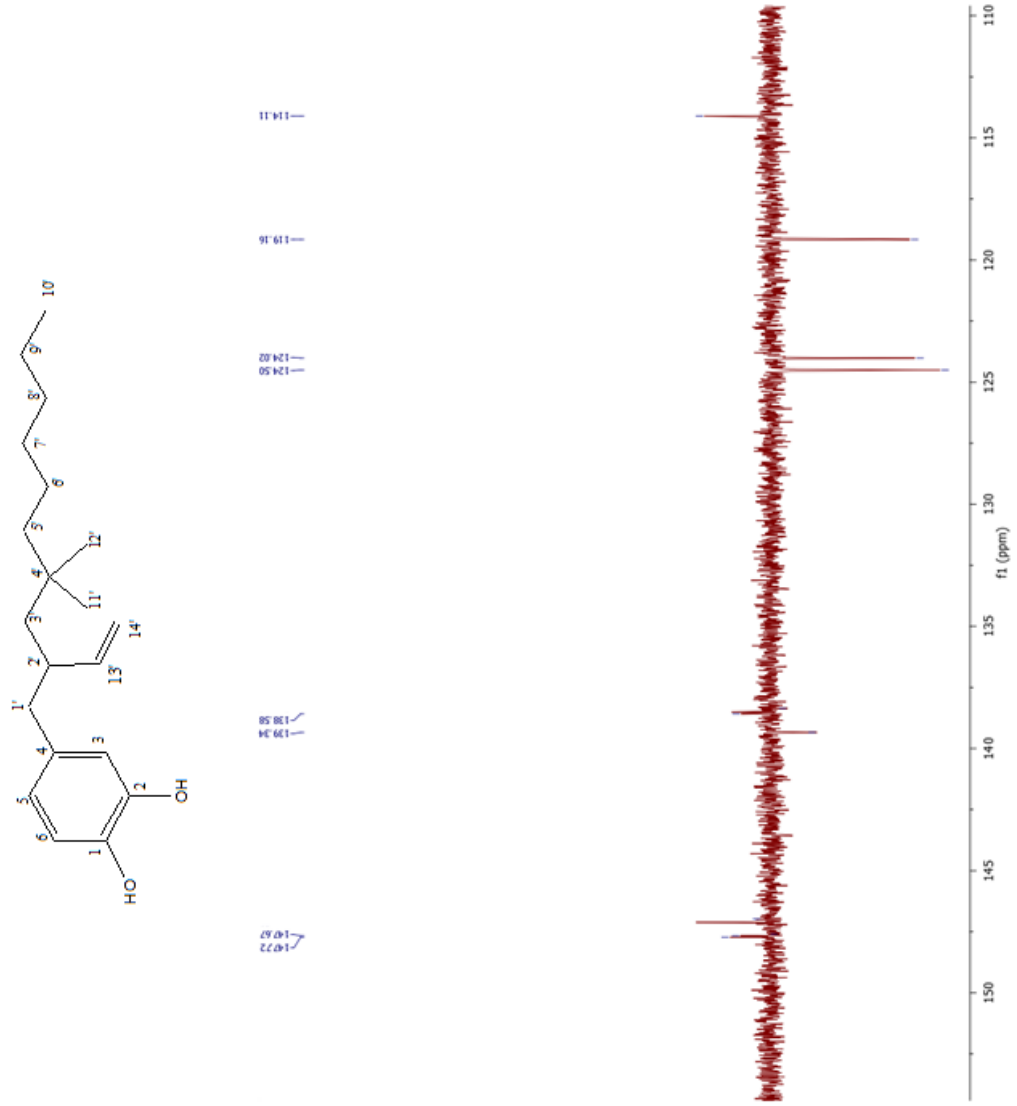
Şekil 4. 19. 1 Numaralı bileşiğin ^1H NMR spektrumu



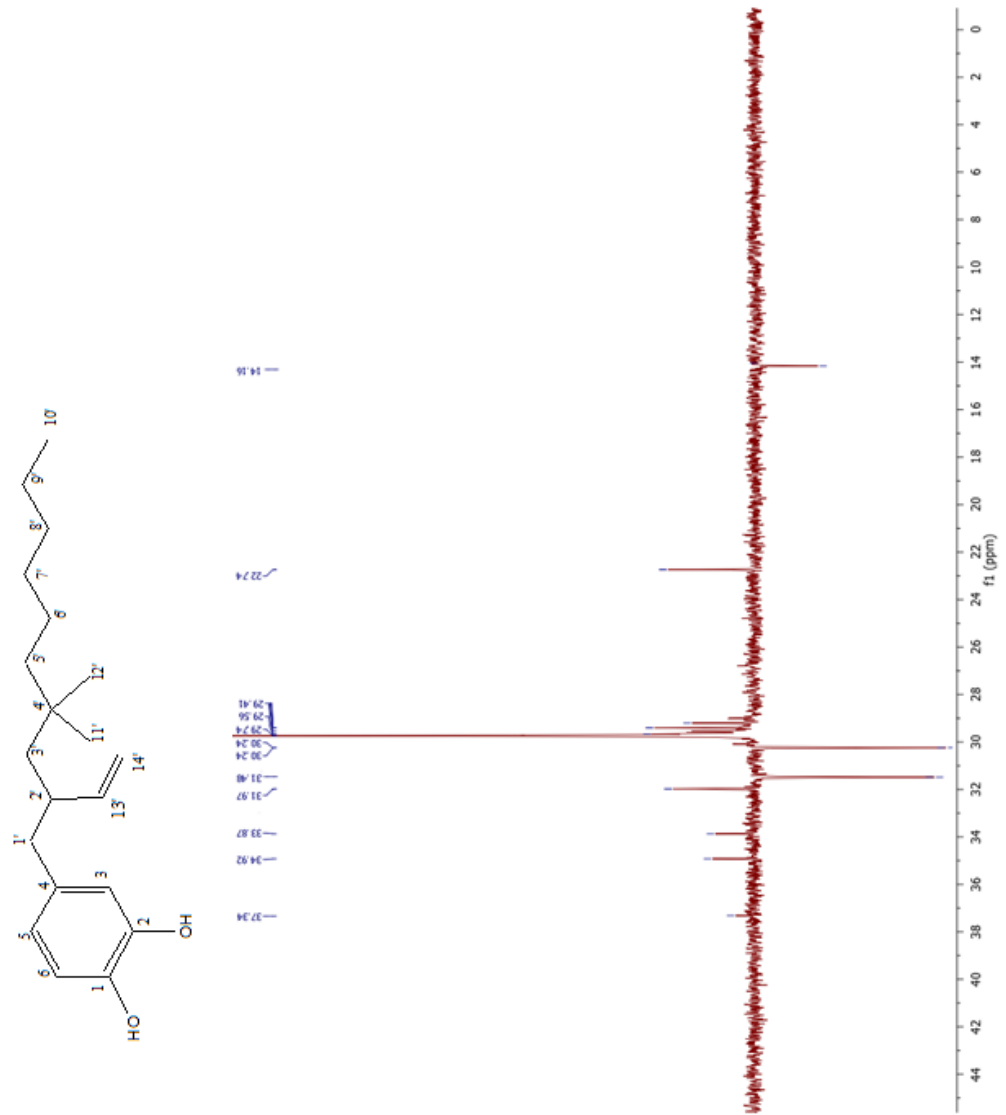
Şekil 4. 20. 1 Numaralı bileşiğin ^1H NMR spektrumu



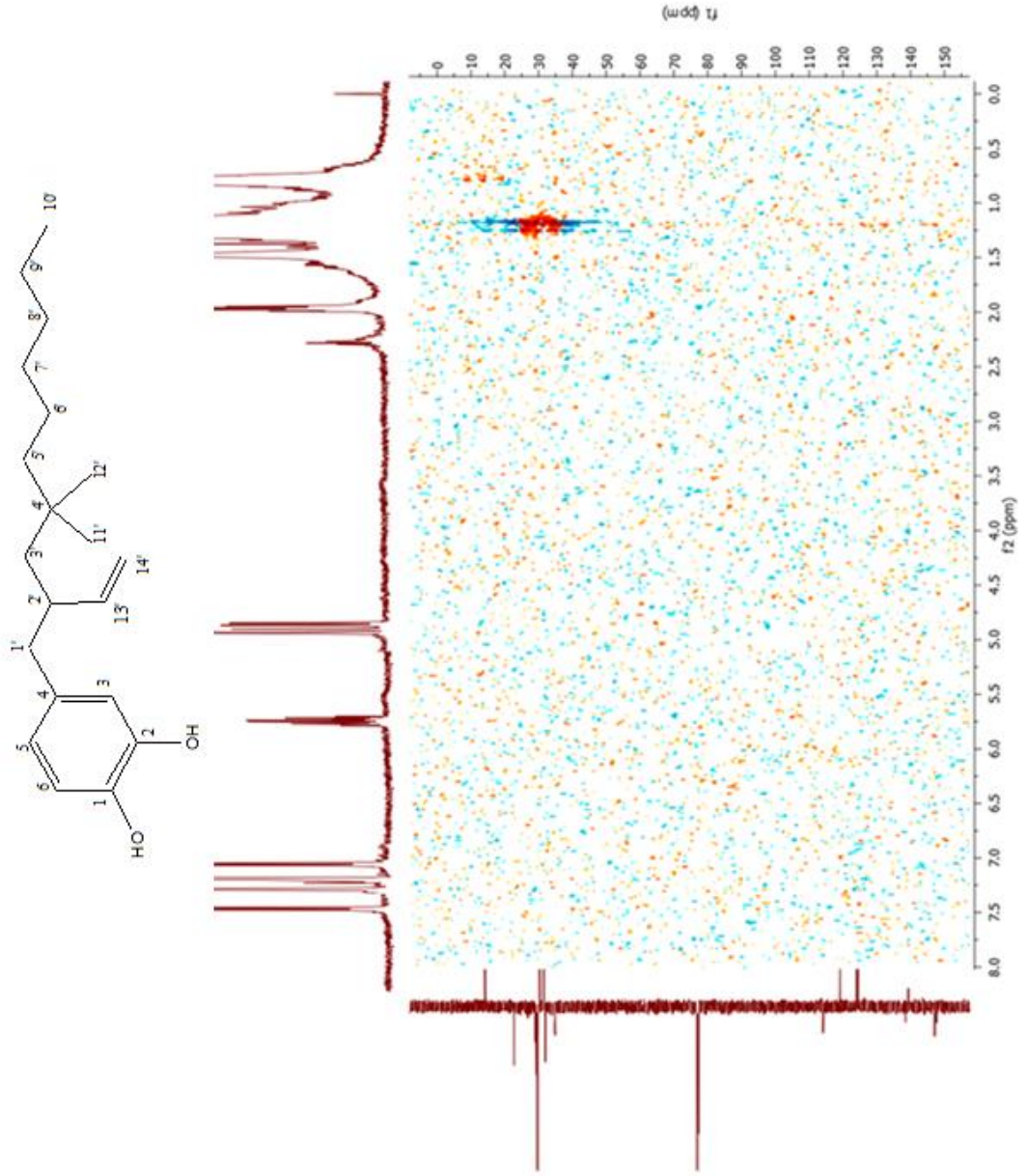
Şekil 4. 21. 1 Numaralı bileşiğin APT spektrumu (CDCl_3)



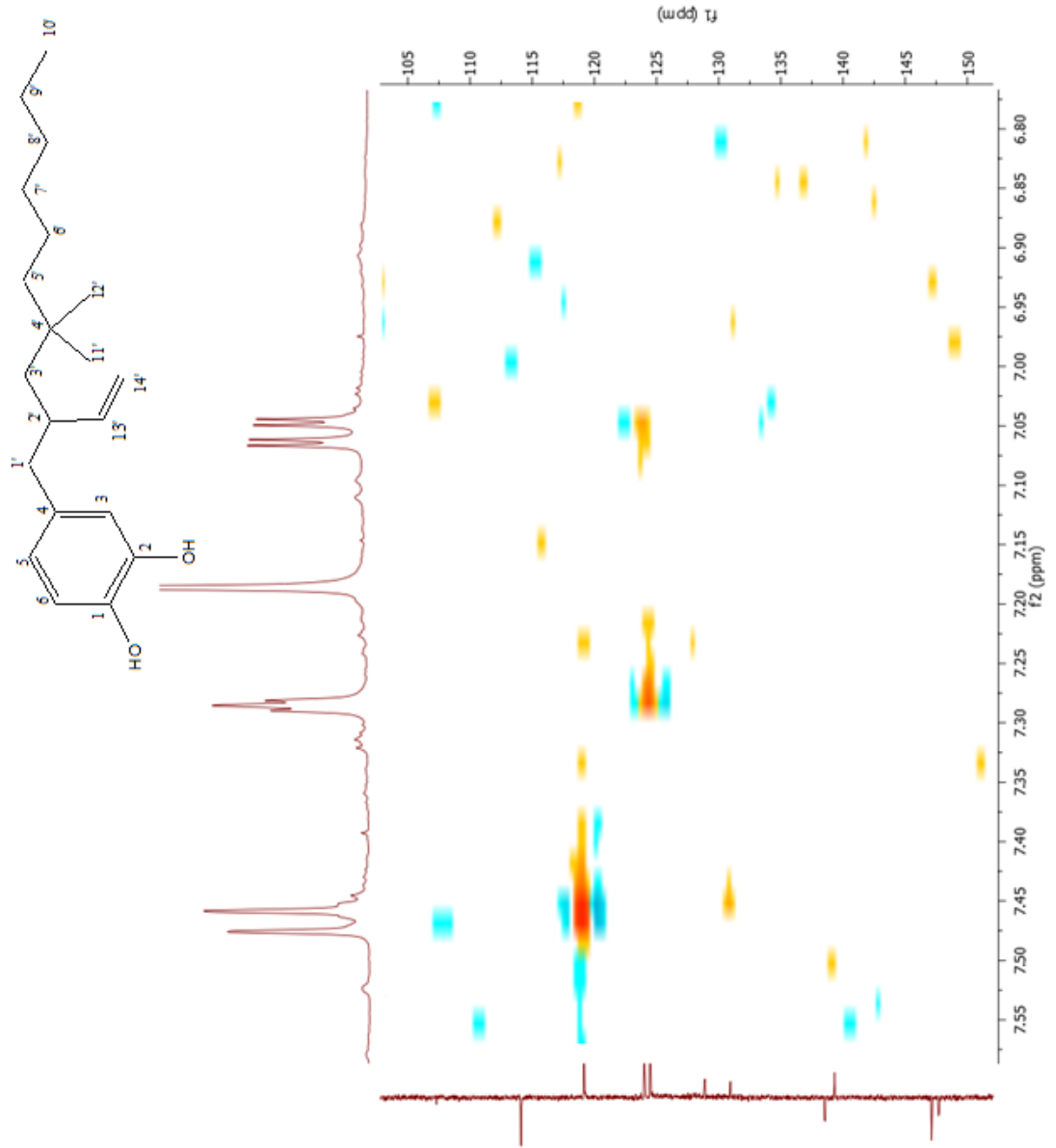
Şekil 4. 22. 1 Numaralı bileşiğin APT spektrumu (CDCl₃)



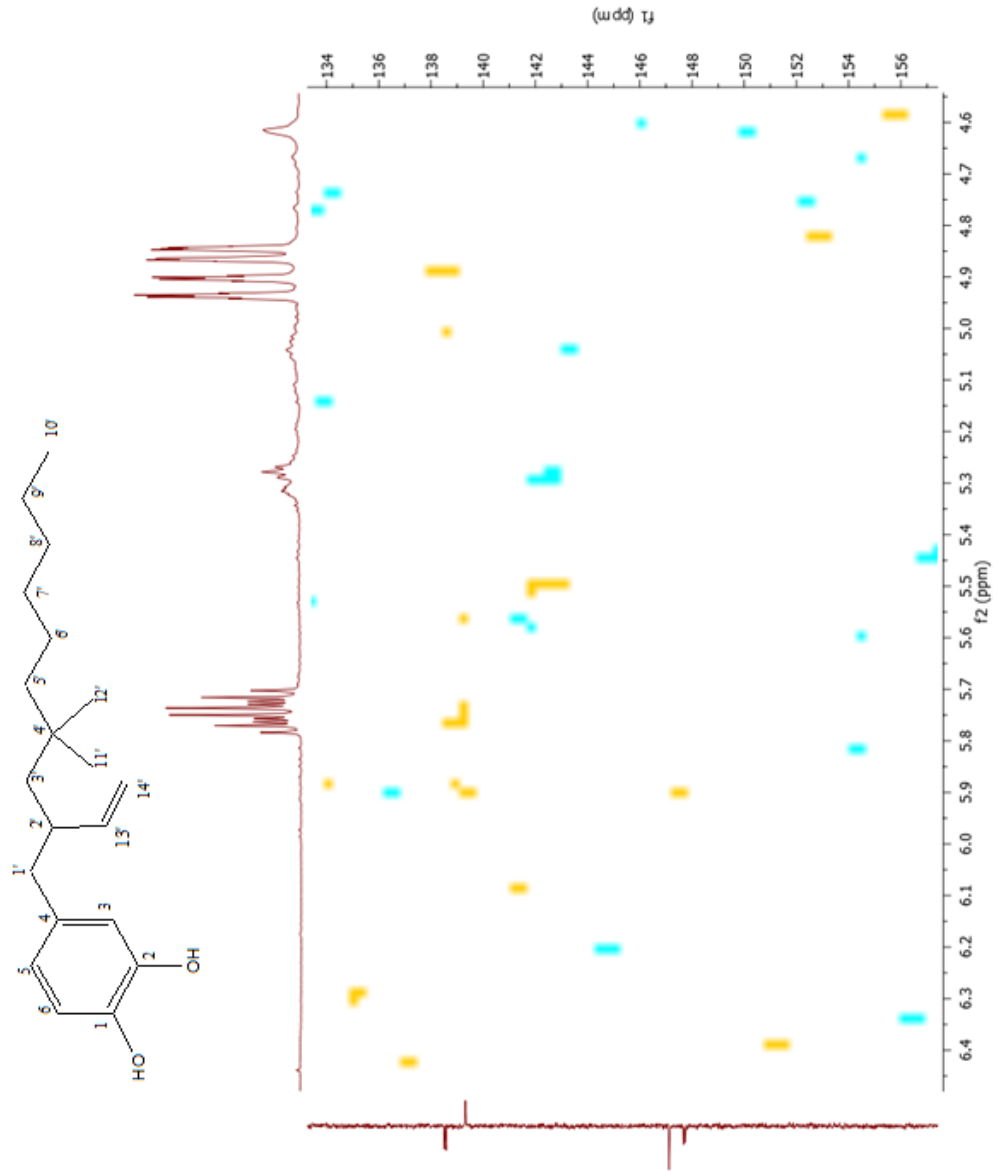
Şekil 4. 23. 1 Numaralı bileşiğin APT spektrumu (CDCl₃)



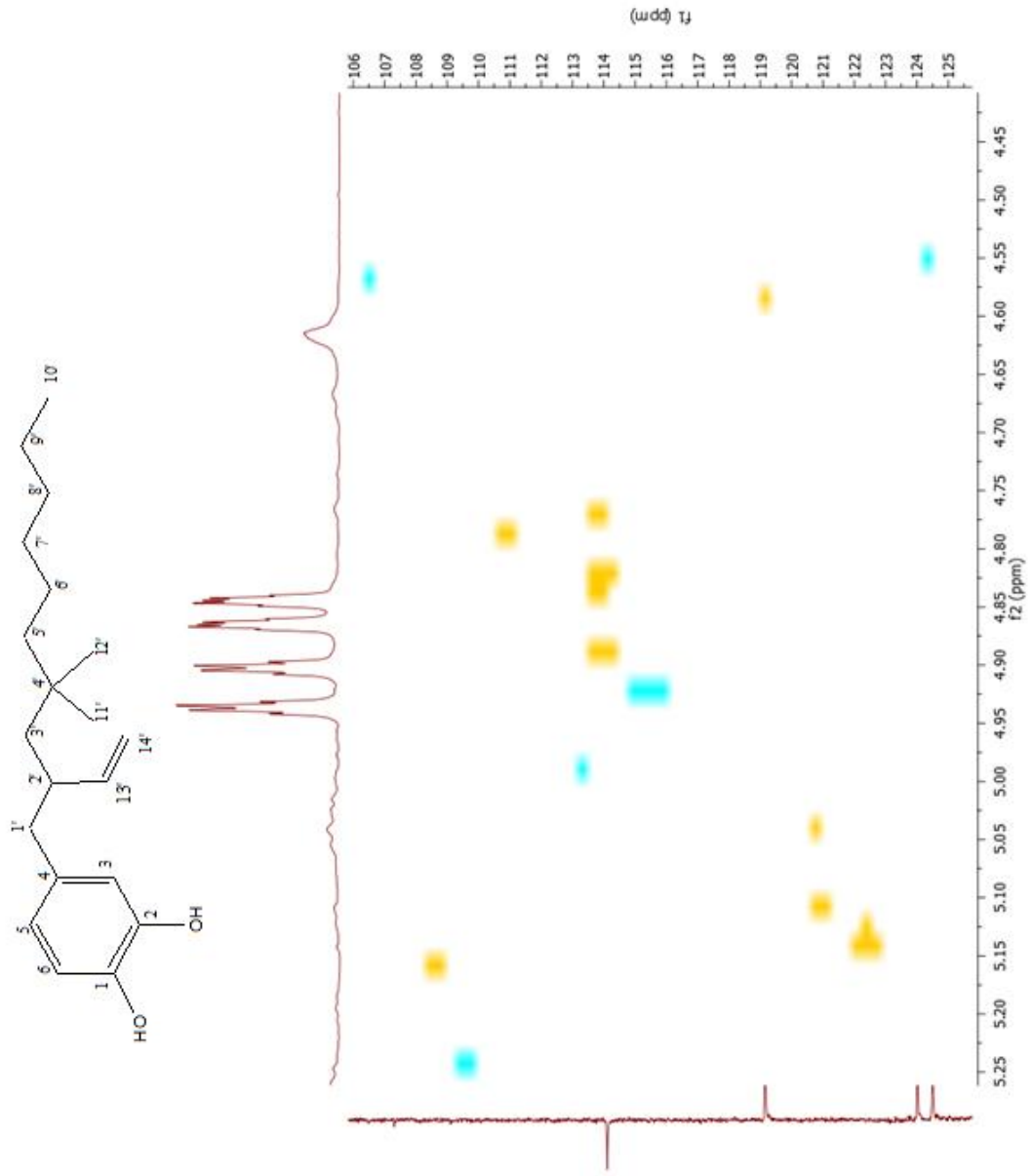
Şekil 4. 24. 1 Numaralı bileşiğin HSQC spektrumu



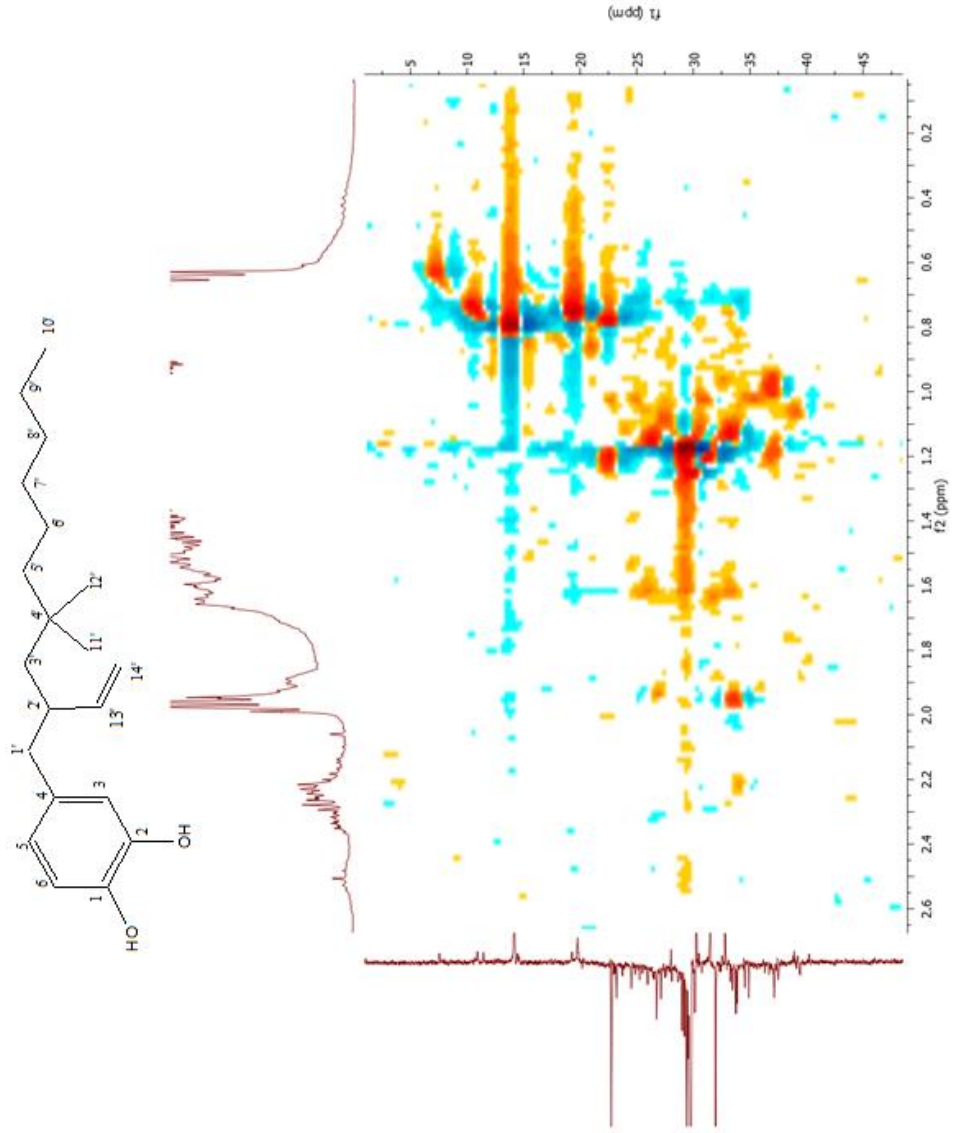
Şekil 4. 25. 1 Numaralı bileşiğin HSQC spektrumu



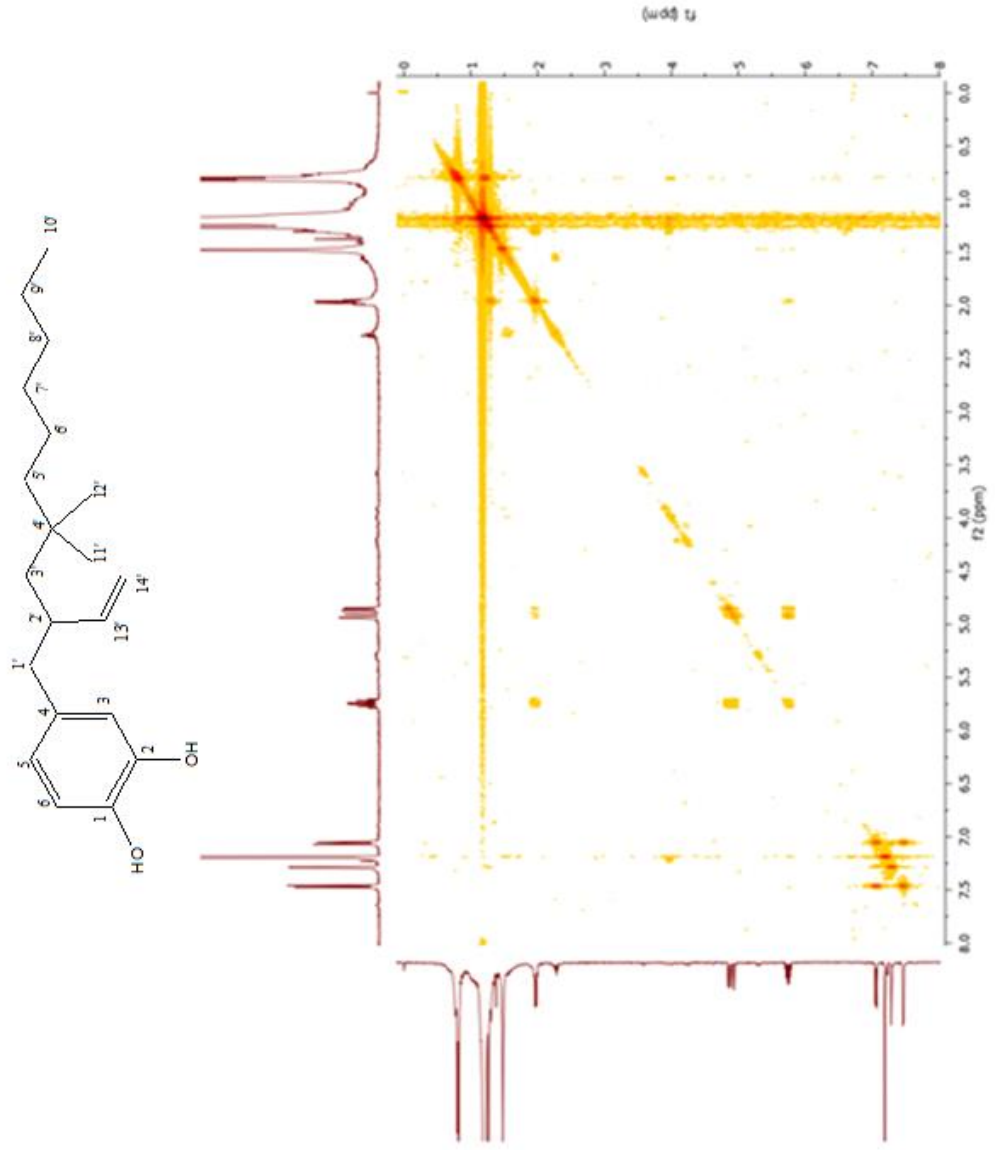
Şekil 4. 26. 1 Numaralı bileşiğin HSQC spektrumu



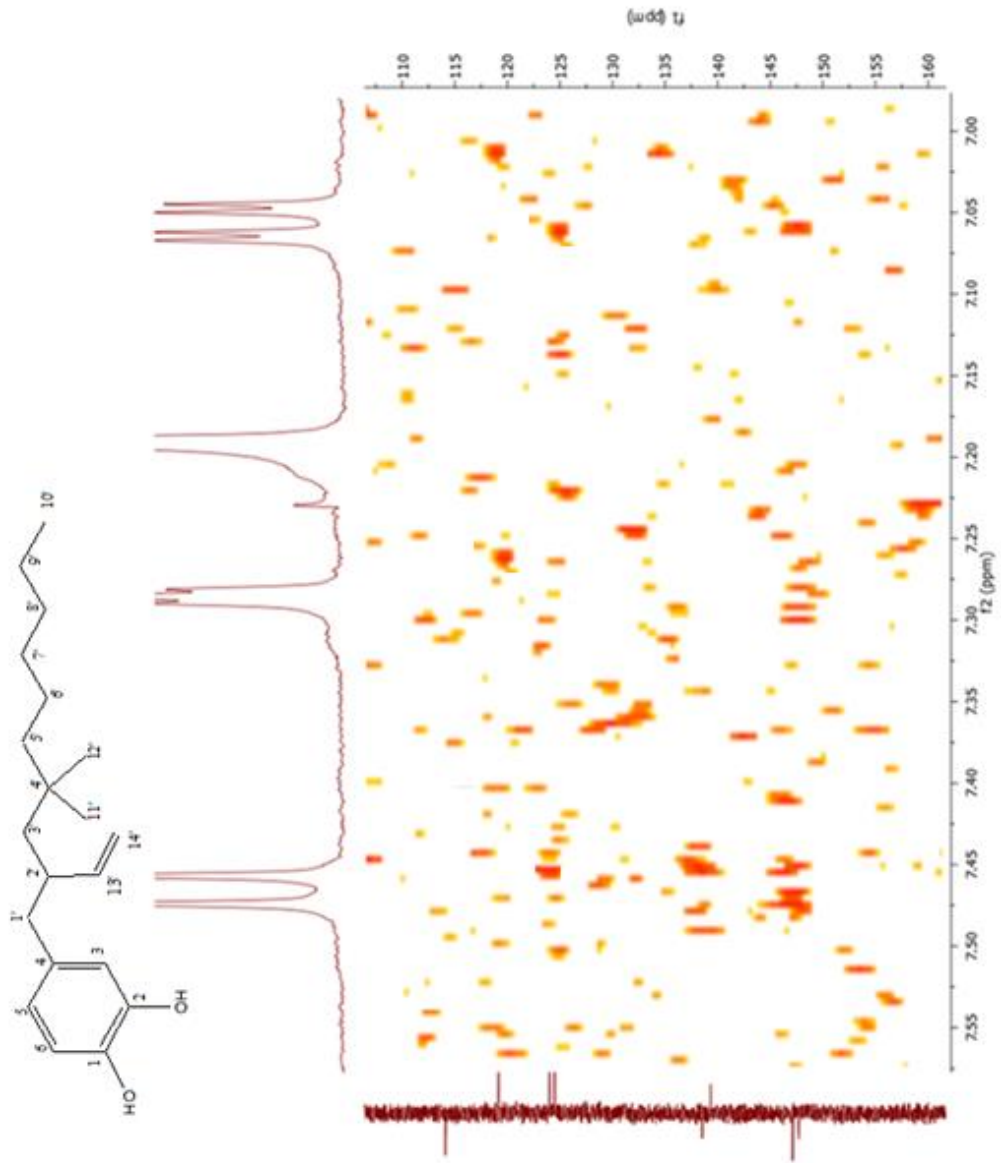
Şekil 4. 27. 1 Numaralı bileşiğin HSQC spektrumu



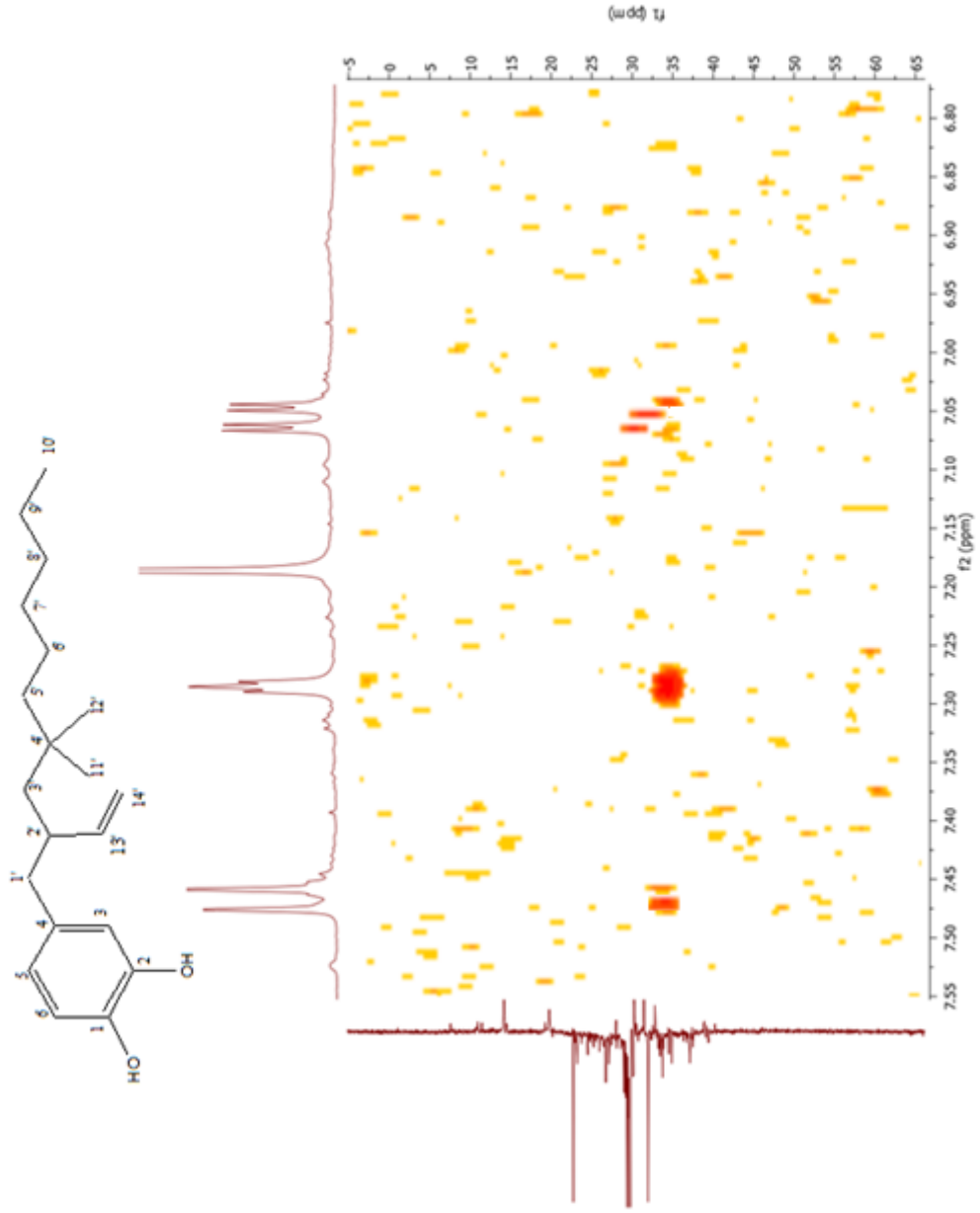
Şekil 4. 28. 1 Numaralı bileşiğin HSQC spektrumu



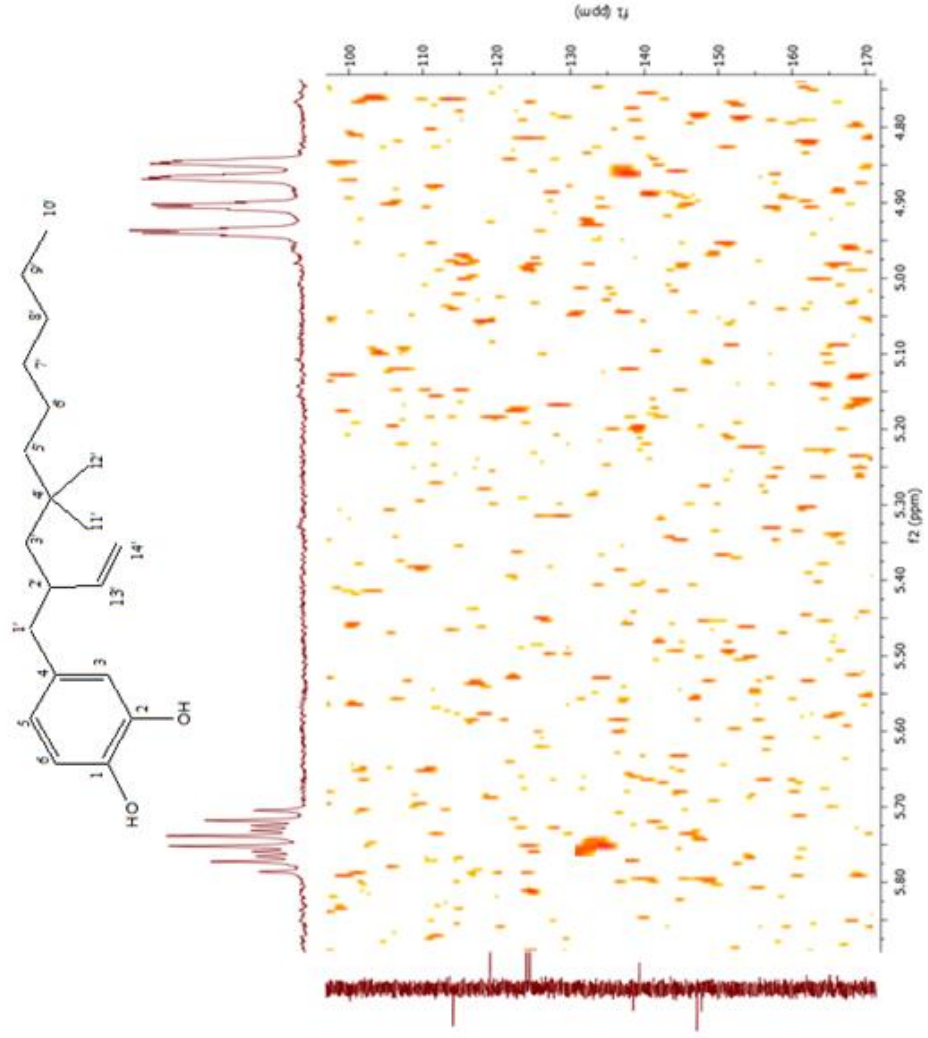
Şekil 4. 29. 1 Numaralı bileşiğin ^1H - ^1H COSY spektrumu



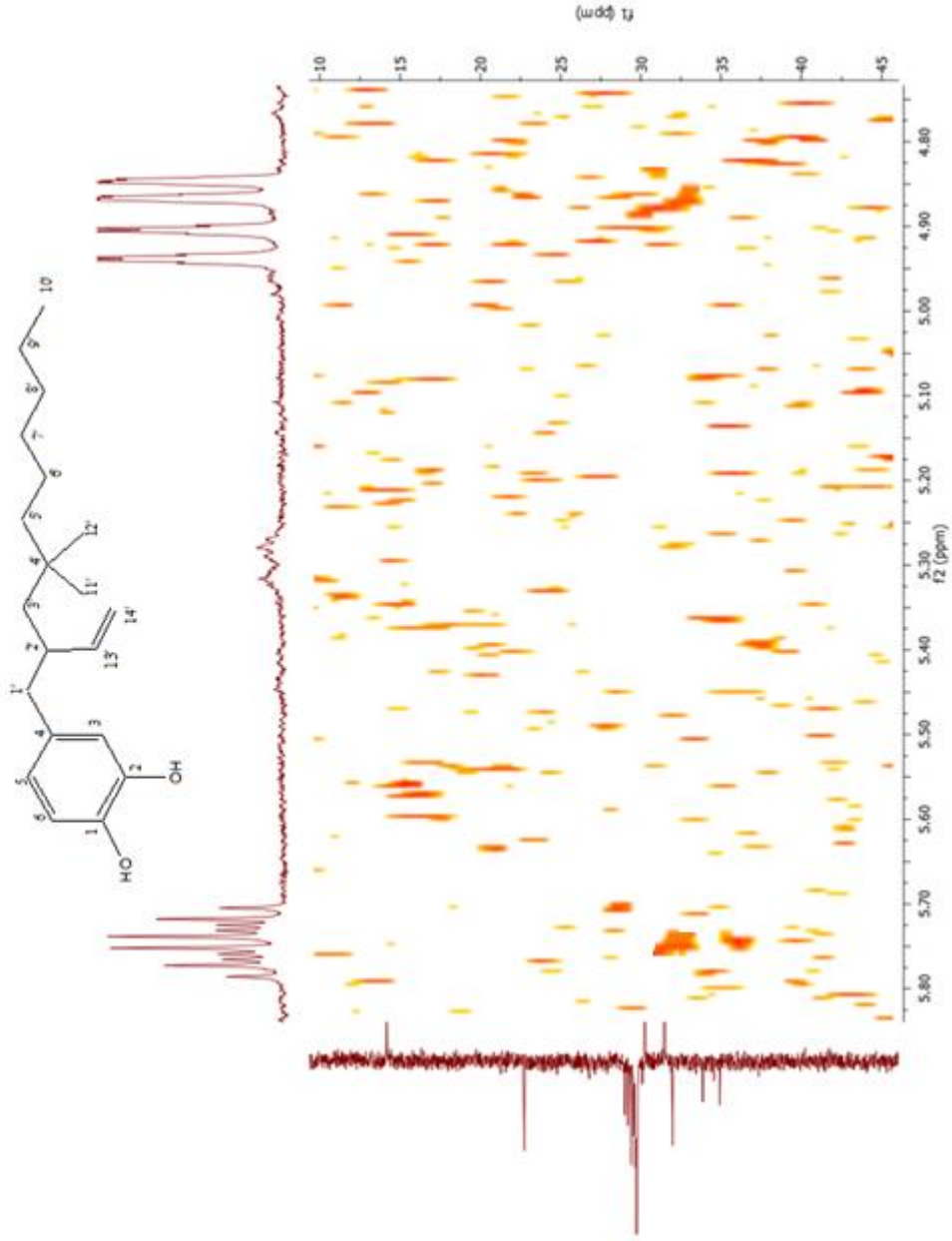
Şekil 4. 30. 1 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumu



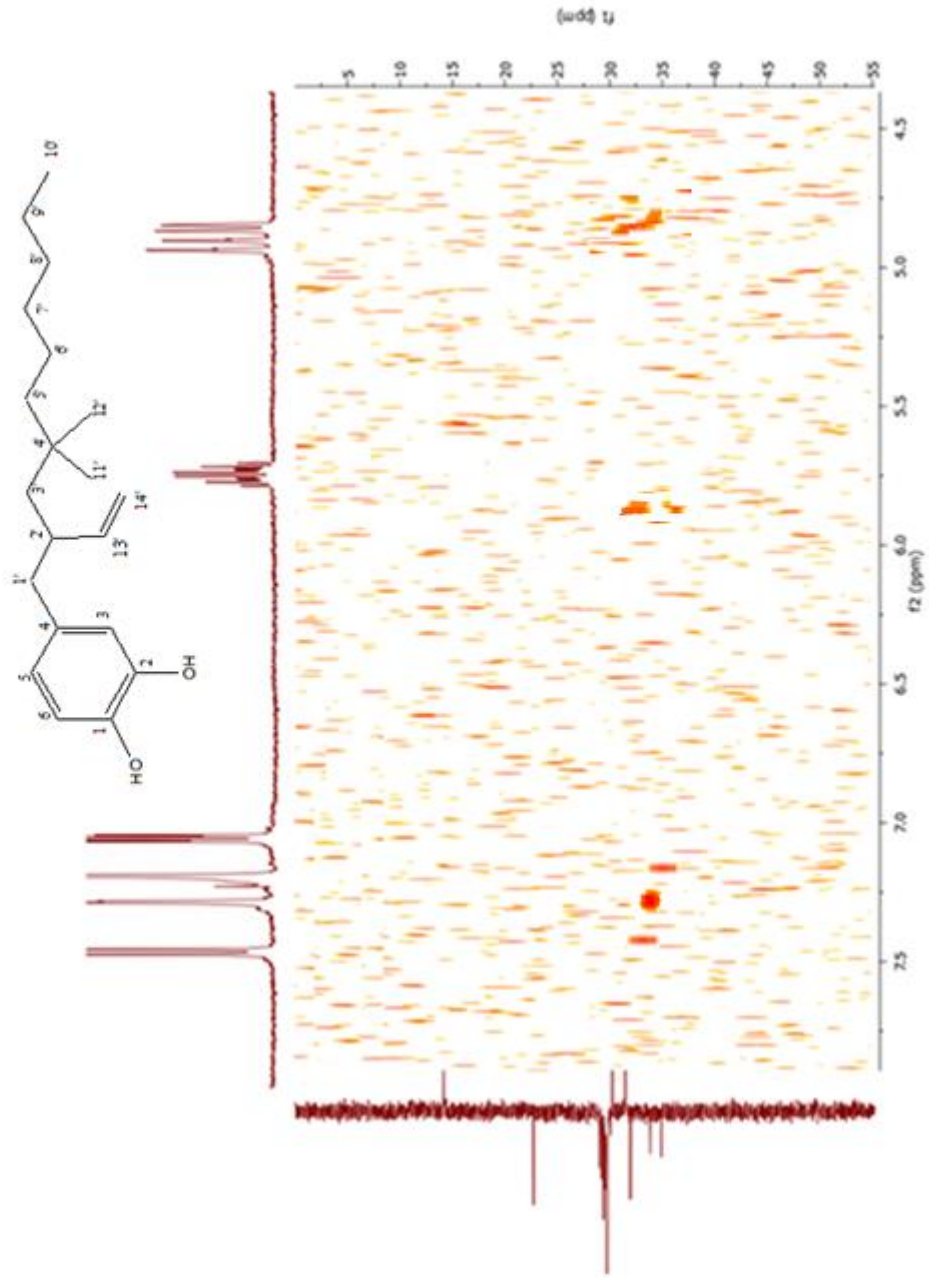
Şekil 4. 31. 1 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumu



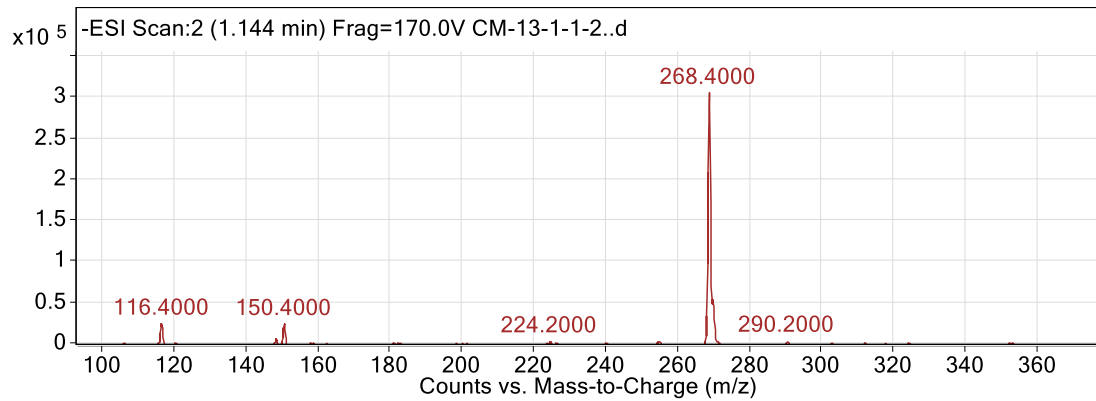
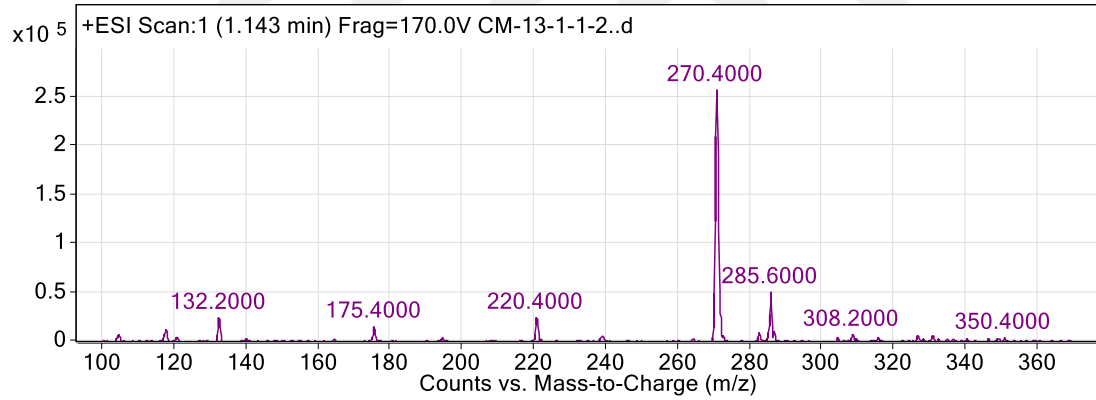
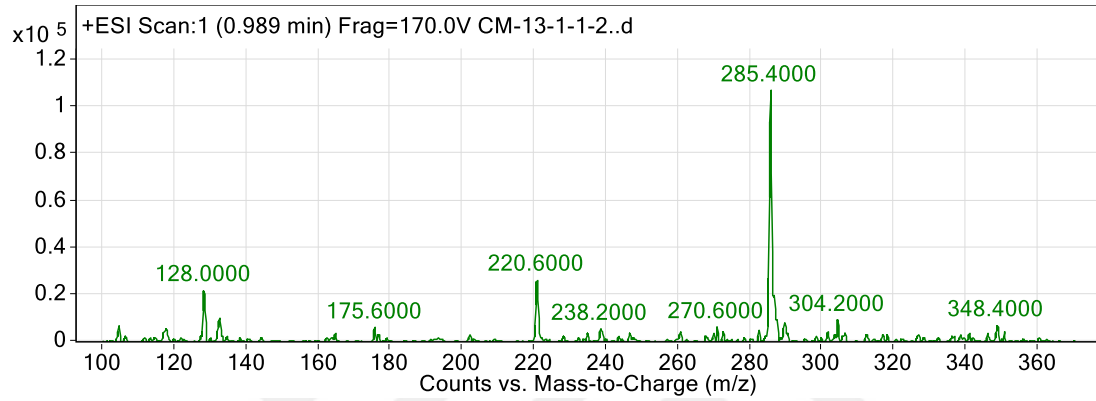
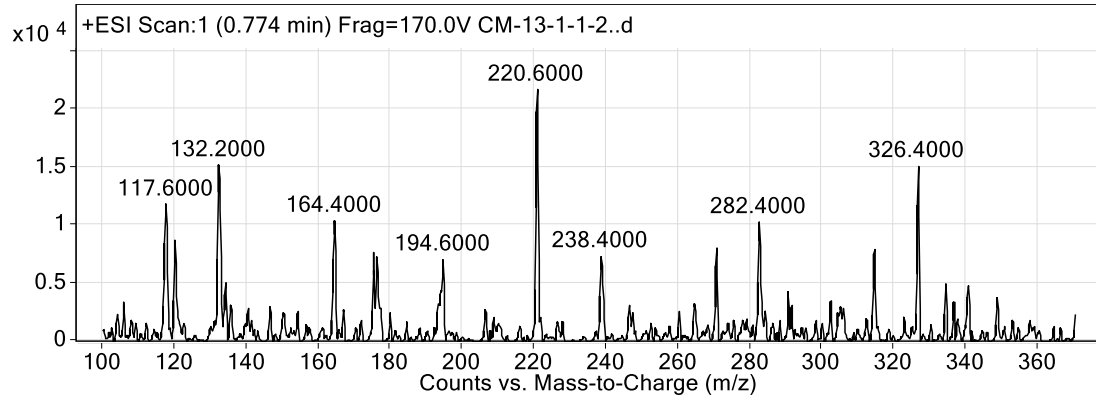
Şekil 4. 32. 1 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumu



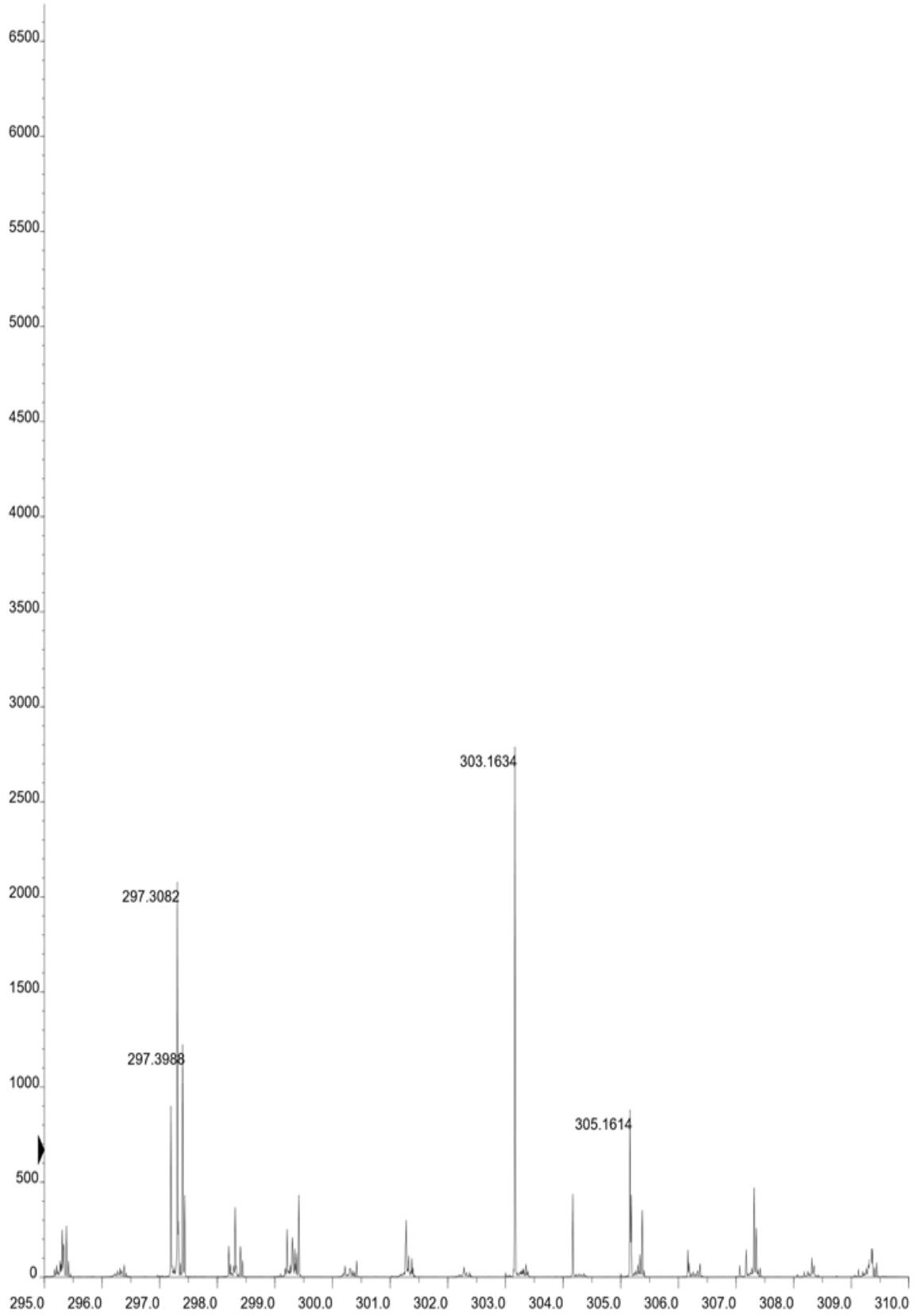
Şekil 4. 33. 1 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumu



Şekil 4. 34. 1 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumu

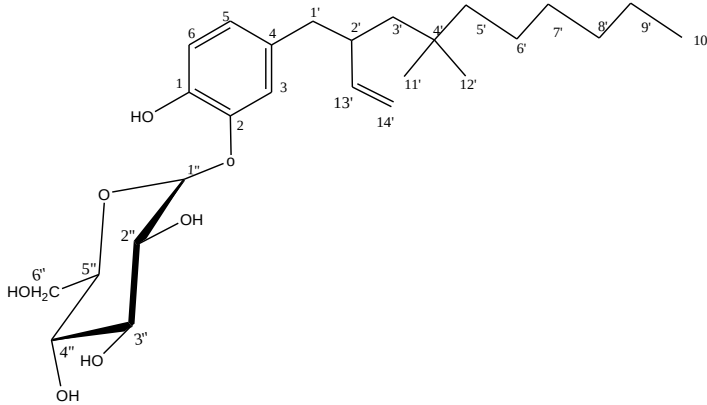


Şekil 4. 35. 1 Numaralı bileşiğin ESI-MS spektrumları



Şekil 4. 36. 1 Numaralı bileşiğin LC-QTOF spektrumu

4.2.1.2. 2 Numaralı Bileşik (CM-12-2-1): 2-O- α -D-glukopiranozil-4-(4',4'-dimetil-2'-vinil-desil) fenol



Şekil 4. 37. 2-O- α -D-glukopiranozil-4-(4',4'-dimetil-2'-vinil-desil) fenol yapısı

2 numaralı bileşik sarı renkli katı halde olup, TLC plakasında 254 nm UV ışık altında görünmemiş, 366 nm UV ışık altında mor renkli olarak görünmüştür. İlk önce NH_3 buharıyla muamele edilmiş, ardından NA belirteci püskürtülmüş ve 366 nm ışık altında mor renginde değişme görünmemiştir. TLC çözücü sistemi olarak CHCl_3 : MeOH (10:0.5) kullanılmıştır.

^1H NMR spektrumunda (CDCl_3 , δ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.39; Şekil 4.40) bileşiğin 7.46 ppm'de (1H, *d*, $J = 8.6$ Hz) H-6'nın H-5 ile orto etkileşimi; 7.28 ppm'de (1H, *t*, $J = 2.1$ Hz) H-3'ün H-5 ile meta etkileşimi ve 7.06 ppm'de (1H, *dd*, $J = 2.5, 8.6$ Hz) H-5'in H-6 ile orto etkileşimi ve H-5'in H-3 ile meta etkileşimi gözlenmiştir. Bu durum 1,2,4 tri sübstitüe aromatik halkanın varlığını göstermiştir. Ayrıca 4.90 (1H, *ddd*, $J = 1.6, 3.6, 17.1$ Hz, $\text{H}_b\text{-14'}$) ve 4.86 ppm'de (1H, *ddd*, $J = 1.04, 3.1, 10.1$ Hz, $\text{H}_a\text{-14'}$) gözlenen pikler ile 5.75 ppm'de (1H, *ddd*, $J = 17.1, 10.3, 6.7$ Hz, H-13') gözlenen pik; $\text{CH}_2=\text{CH-}$ (vinil) grubunun varlığını kanıtlamıştır. Bunun yanında 1.26 ppm'deki (6H, *s*, H-11' ve H-12') singlet ile 1.2-1.50 ppm arasındaki multipl pik grubu da benzen halkasına bağlı olan alkil grubunun varlığını göstermektedir. Bu bileşikte 1 numaralı bileşikten (CM-13-1-1-2) farklı olarak, 3.5-4.61 arasında şeker protonları gözlenmiştir. Anomerik proton H-1", proton spektrumunda 4.61 (1H, *brs*) ppm'de belirlenmiştir.

2 numaralı bileşiğin ^{13}C NMR, APT ve HSQC spektrumunda (CDCl_3 , δ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.41; Şekil 4.42; Şekil 4.43; Şekil 4.44) 138.50 ppm'de (C-4), 124.50 ppm'de (C-5), 124.02 ppm'de (C-3), 119.15 ppm'de (C-6) aromatik karbonları gözlenirken; 147.66 ppm (C-1) ve 147.13 ppm'de (C-2) ise oksijene bağlı iki aromatik karbon gözlenmiştir. Vinil grubunun karbonları 139.33 ppm (C-13') ve 114.11 ppm'de (C-14') belirlenirken, sp^3

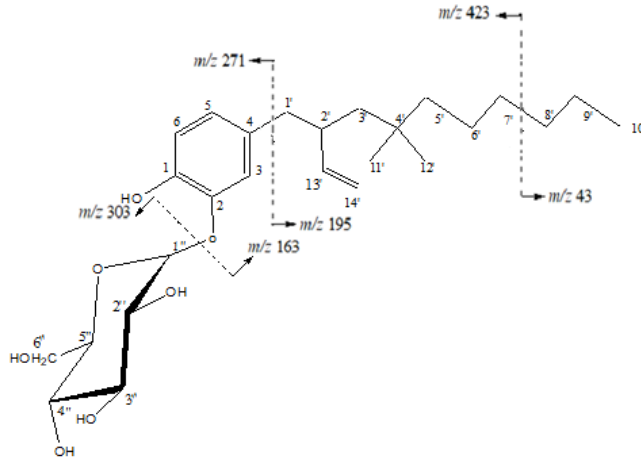
hibritleşmesi yapmış 12 karbon ($\text{CH}_3/\text{CH}_2/\text{CH}$) 4.15-37.47 ppm aralığında tespit edilmiştir. APT spektrumuna bakıldığında bunu destekleyici bilgi vermiş olup, 14.15-37.47 ppm aralığında; 3 metil karbonu [30.24 (C-11'/12'), 14.15 (C-10')], 1 metin karbonu [31.47 (C-2')], 1 kuarterner karbonu [37.47 (C-4')], 7 metilen karbonu [34.91 (C-1'), 33.86 (C-3'), 31.97, 29.74, 29.41, 26.75, 22.74 (C-5'/6'/7'/8'/9')] gözlenmiştir. 2 numaralı bileşiğin anomerik karbonu, 106.63 ppm'de gözlenmiştir.

^1H - ^1H COSY spektrumunda (CDCl_3 , δ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.45; Şekil 4.46) aromatik halkada bulunan 7.06 ppm'deki (1H, *dd*, $J = 2.5, 8.6$ Hz) H-5 protonunun, 7.46 ppm'deki (1H, *d*, $J = 8.6$ Hz) H-6 protonuyla ve 7.28 ppm'deki (1H, *t*, $J = 2.1$ Hz) H-3 protonunun 7.06 ppm'deki (1H, *dd*, $J = 2.5, 8.6$ Hz) H-5 protonuyla etkileştiği görülmüştür. Ayrıca 5.75 ppm'deki (1H, *ddd*, $J = 17.1, 10.3, 6.7$ Hz) vinilik metin protonu H-13' 'nün 4.86 ppm'deki (1H, *ddd*, $J = 1.04, 3.1, 10.1$ Hz) H_a-14' ve 4.90 ppm'deki (1H, *ddd*, $J = 1.6, 3.6, 17.1$ Hz) H_b-14' ve 1.96 ppm'deki (1H, *q*, $J = 6.8$ Hz) H-2' protonları ile etkileşimi kanıtlanmıştır. Bununla birlikte 0.81-2.27 ppm aralığında da birbirine komşu metil, metilen, metin protonlarının etkileşimi de görülmektedir. 3.5-4.61 ppm aralığında, şeker protonlarının etkileşimi de COSY spektrumunda gözlenmiştir.

2 numaralı bileşiğin HMBC spektrumuna (CDCl_3 , δ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.47; Şekil 4.48; Şekil 4.49) bakıldığında 2.27 ppm'deki H-1' protonunun 147.13 ppm'deki C-2 karbonuyla, 139.33 ppm'deki C-13' karbonuyla, 124.50 ppm'deki C-5 karbonuyla, 124.02 ppm'deki C-3 karbonuyla ve 114.11 ppm'deki C-14' karbonuyla etkileşimi gözlenmiştir. Bu etkileşimler, alkil grubunun 4 konumunda fenol halkasına bağlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca 5.75 ppm'deki H-13' protonunun 138.50 ppm'deki C-4 karbonuyla etkileşimi tespit edilmiştir. Bununla birlikte 7.28 ppm'deki H-3 protonunun anomerik karbonla (106.63 ppm) etkileşiminin gözlenmesi, şekerin 2-O-glukozit bağı yaptığını kanıtlamaktadır. 4.61 ppm'deki anomerik protonun 147.66 ppm'deki (C-1), 147.13 ppm'deki (C-2) ve 124.02 ppm'deki (C-3) karbonuyla etkileşimi de şekerin aromatik halkaya 2 konumunda bağlı olduğunu göstermiştir. 2 numaralı bileşiğin diğer HMBC etkileşimleri Şekil 4.47; Şekil 4.48; Şekil 4.49'de gözlenmiştir.

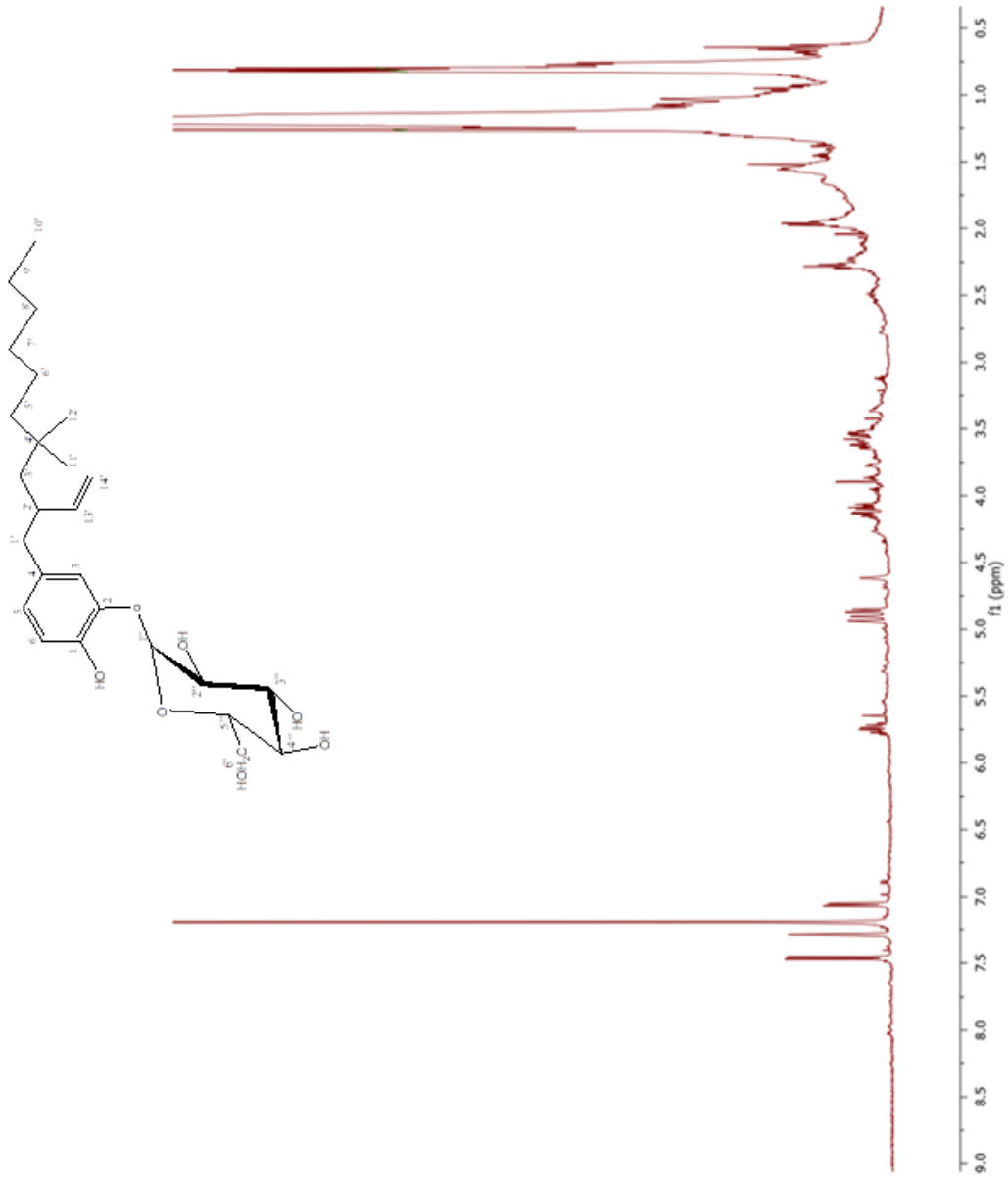
Bileşiğin ESI-MS spektrumunda (Şekil 4.50) m/z 466 $[\text{M}+1]^+$ (%100) pikinin gözlenmesi bileşiğin kapalı formülünün $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{O}_7$ olduğunu göstermiştir. Moleküldeki diğer parçalanma ürünlerine bakıldığında m/z 272 (%28) piki $[(\text{M}+1)-\text{C}_{14}\text{H}_{27}]^+$ moleküldeki yan zincirin varlığını; m/z 304 (%21) piki $[(\text{M}+1)-\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5]^+$ ise moleküldeki heksos şekerin

varlığını kanıtlamıştır. 2 numaralı bileşiğin kütle spektrumunda gözlenen bölünmeler Şekil 4.38’ da gösterilmiştir.

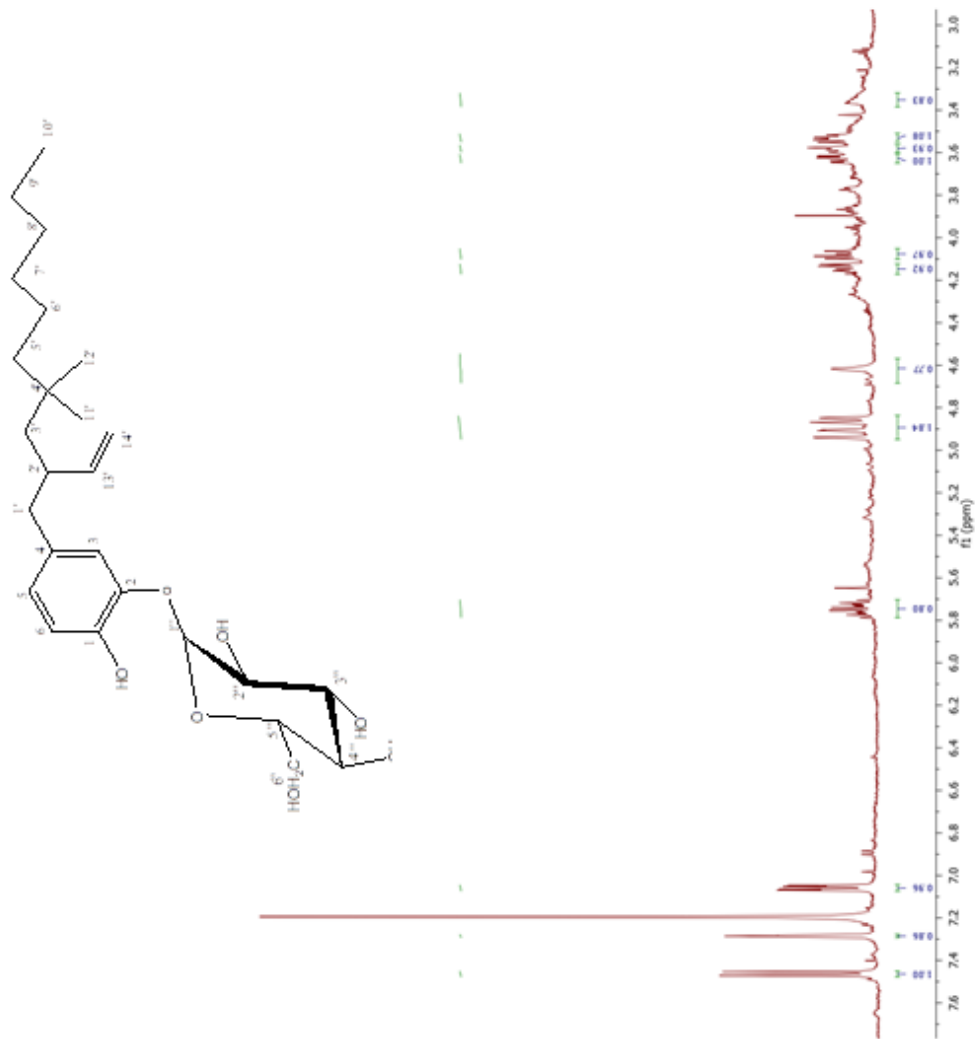


Şekil 4. 38. 2 numaralı bileşiğin kütle spektrumunda gözlenen bölünmeler

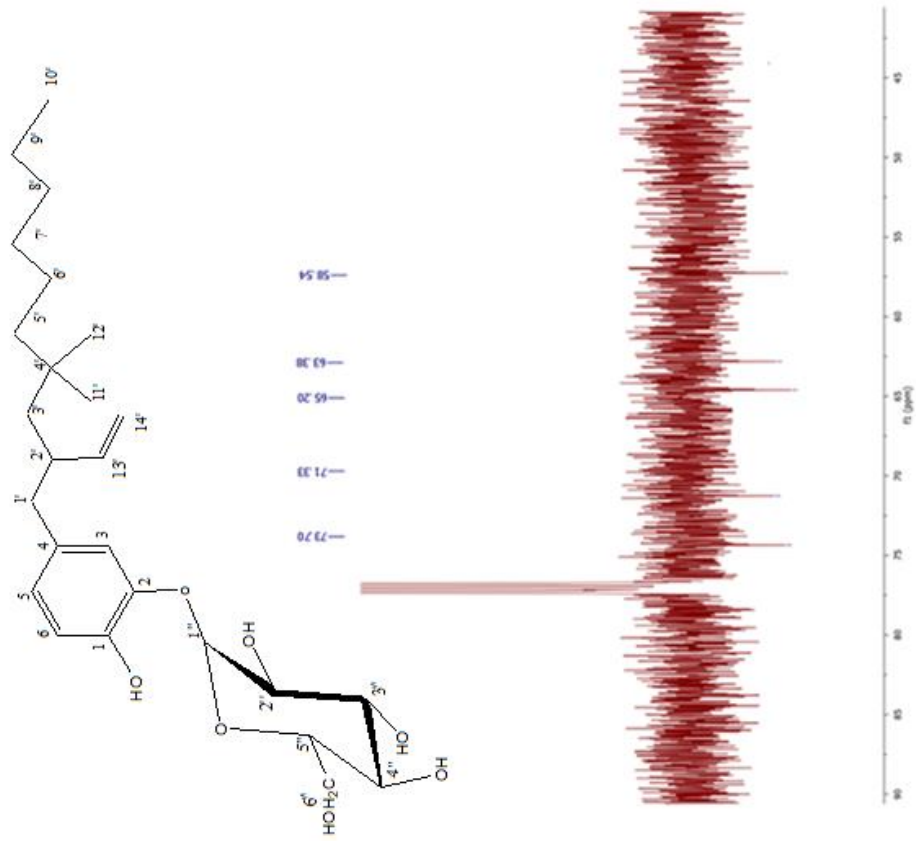
Tüm spektroskopik veriler ve literatür çalışmaları, maddesinin yapısının 2-O- α -D-glukopiranozil-4-(4',4'-dimetil-2'-vinil-desil) fenol olduğunu ispatlamıştır (Ozawa ve Takino 1979, Nonaka ve ark. 1982, Schuster ve ark. 1986, Agrawal 1992, Juch ve Rüedi 1997, Kim ve ark. 1999, Plock ve ark. 2001, Takara ve ark. 2002, Parejo ve ark. 2004, Zhang ve ark. 2009, Cherchar ve ark. 2018). Bu bileşik *C. creticum* bitkisinden ilk defa izole edilen bir bileşiktir.



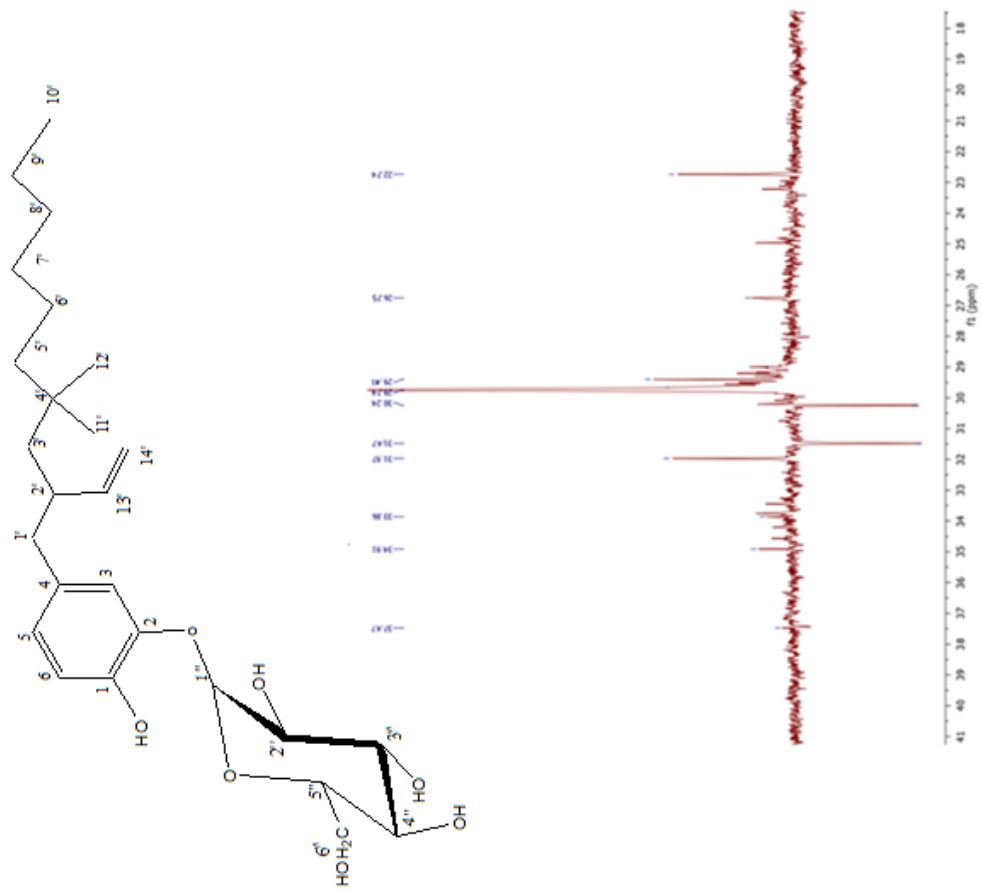
Şekil 4. 39. 2 Numaralı bileşiğin ^1H NMR spektrumu



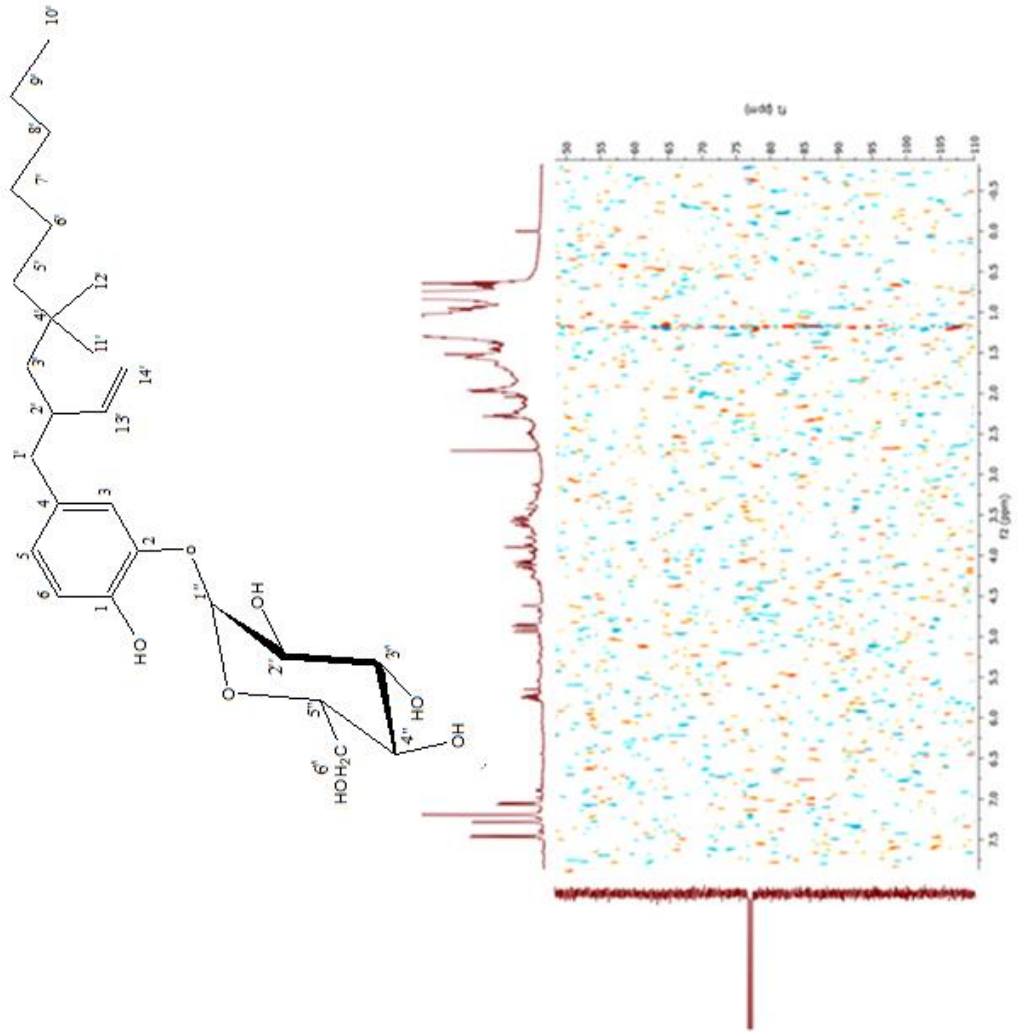
Şekil 4. 40.2 Numaralı bileşiğin ^1H NMR spektrumu



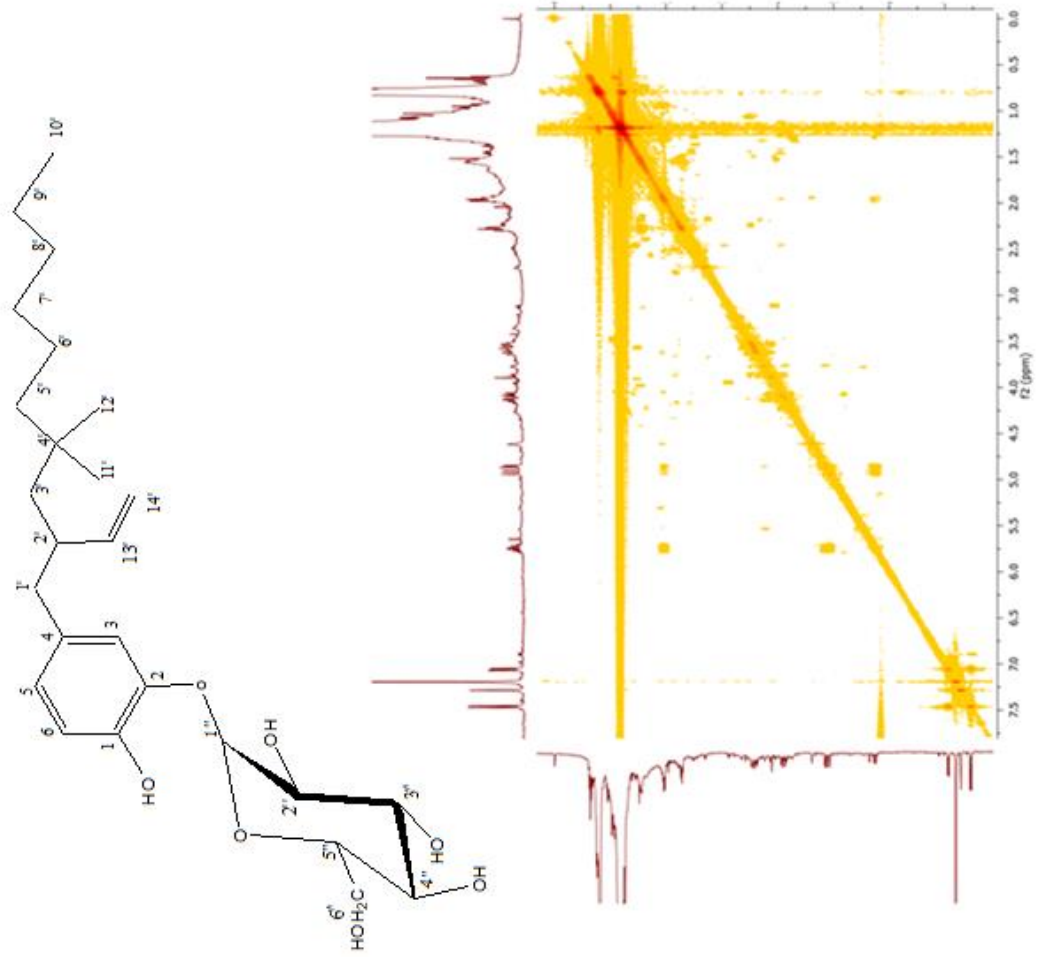
Şekil 4. 42. 2 Numaralı bileşiğin APT spektrumu (CDCl₃)



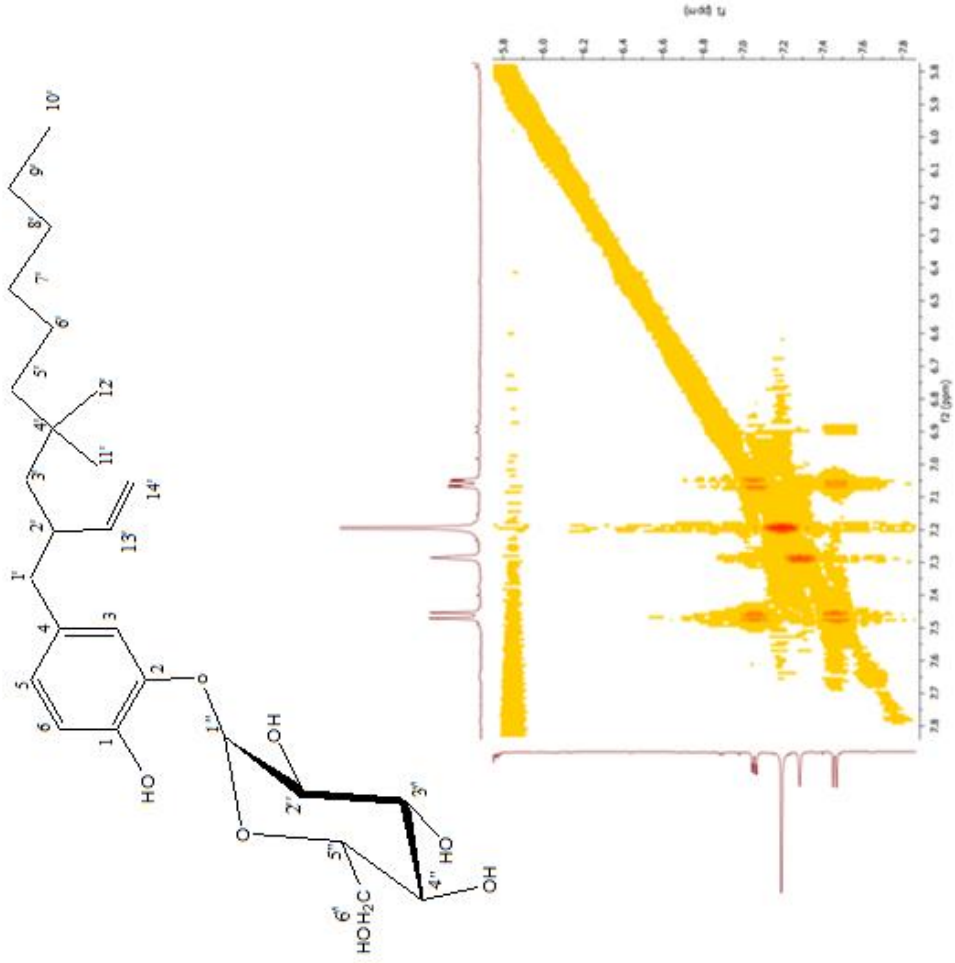
Şekil 4. 43. 2 Numaralı bileşiğin APT spektrumu (CDCl₃)



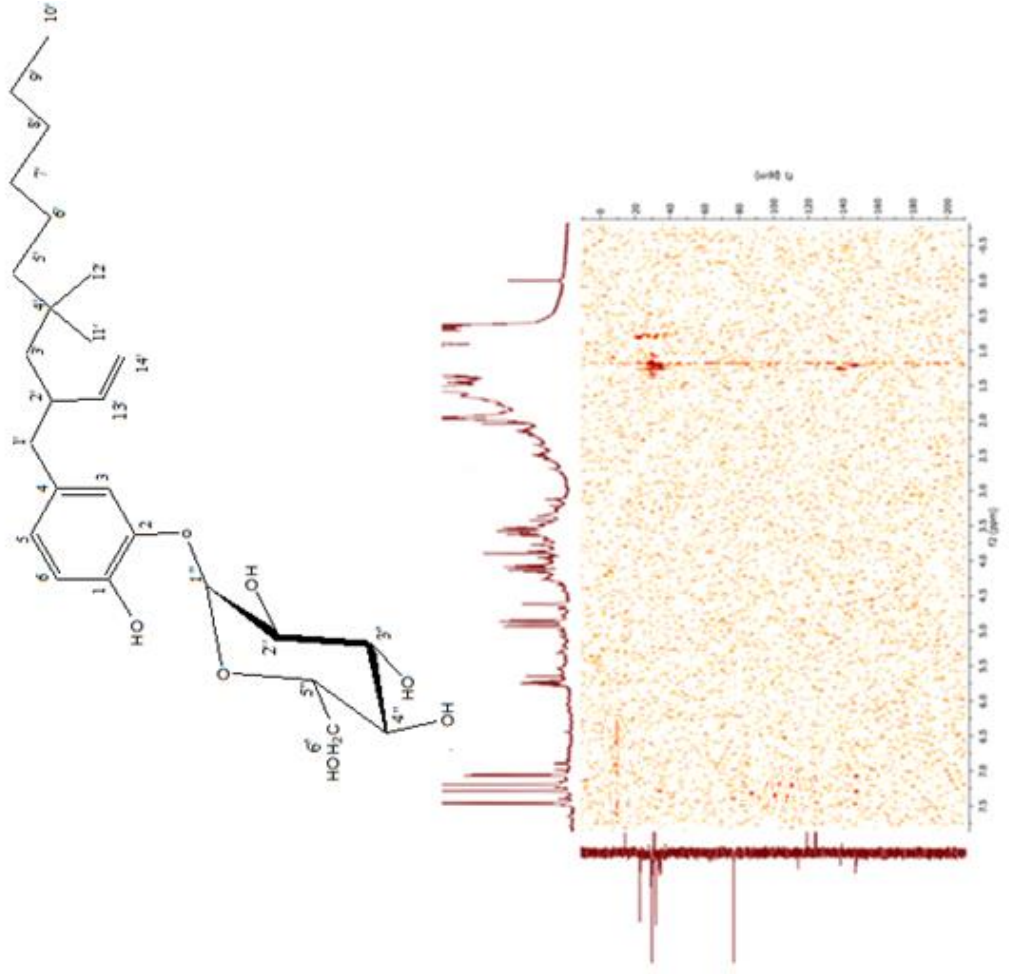
Şekil 4. 44. 2 Numaralı bileşiğin HSQC spektrumu



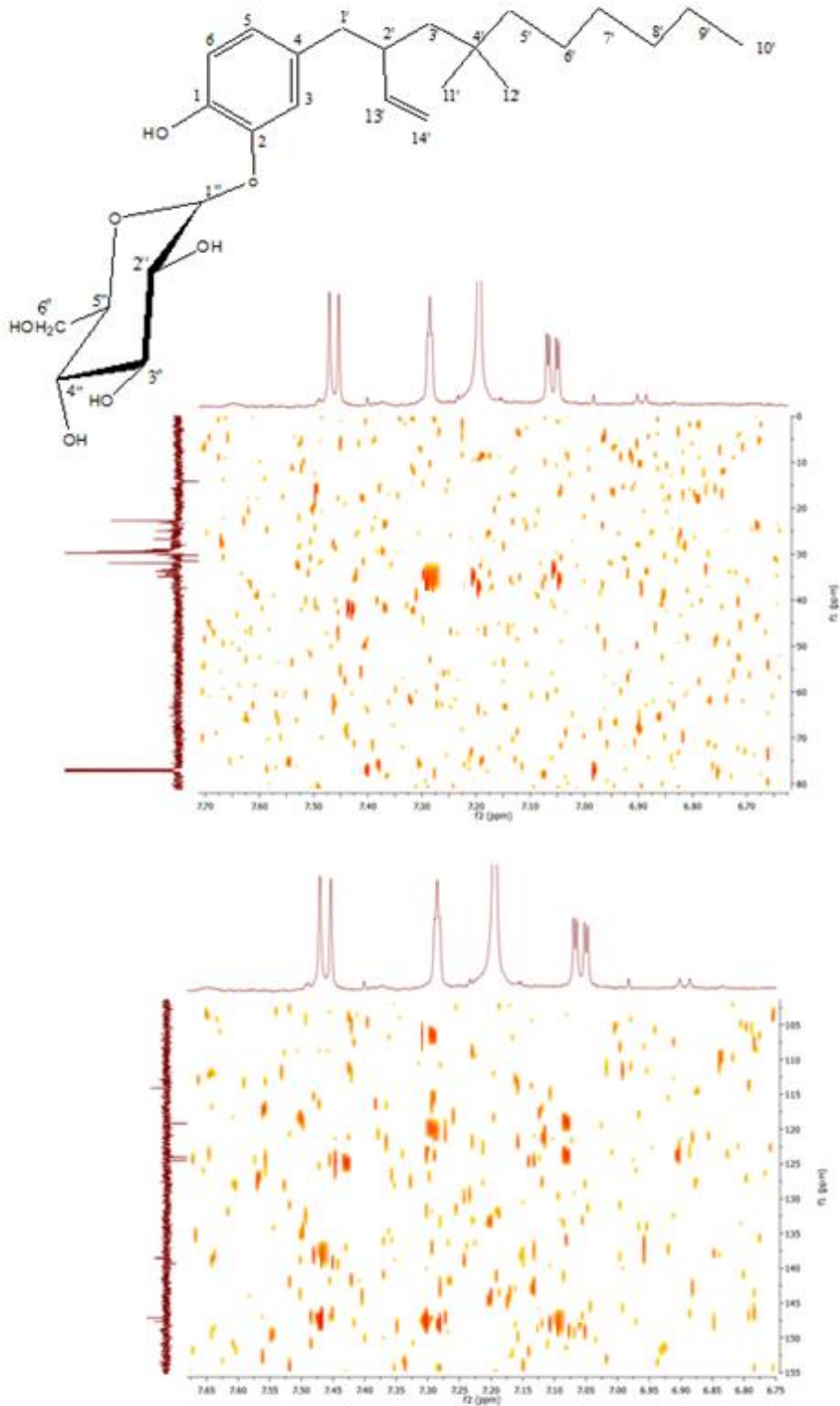
Şekil 4. 45. 2 Numaralı bileşiğin ^1H - ^1H COSY spektrumu



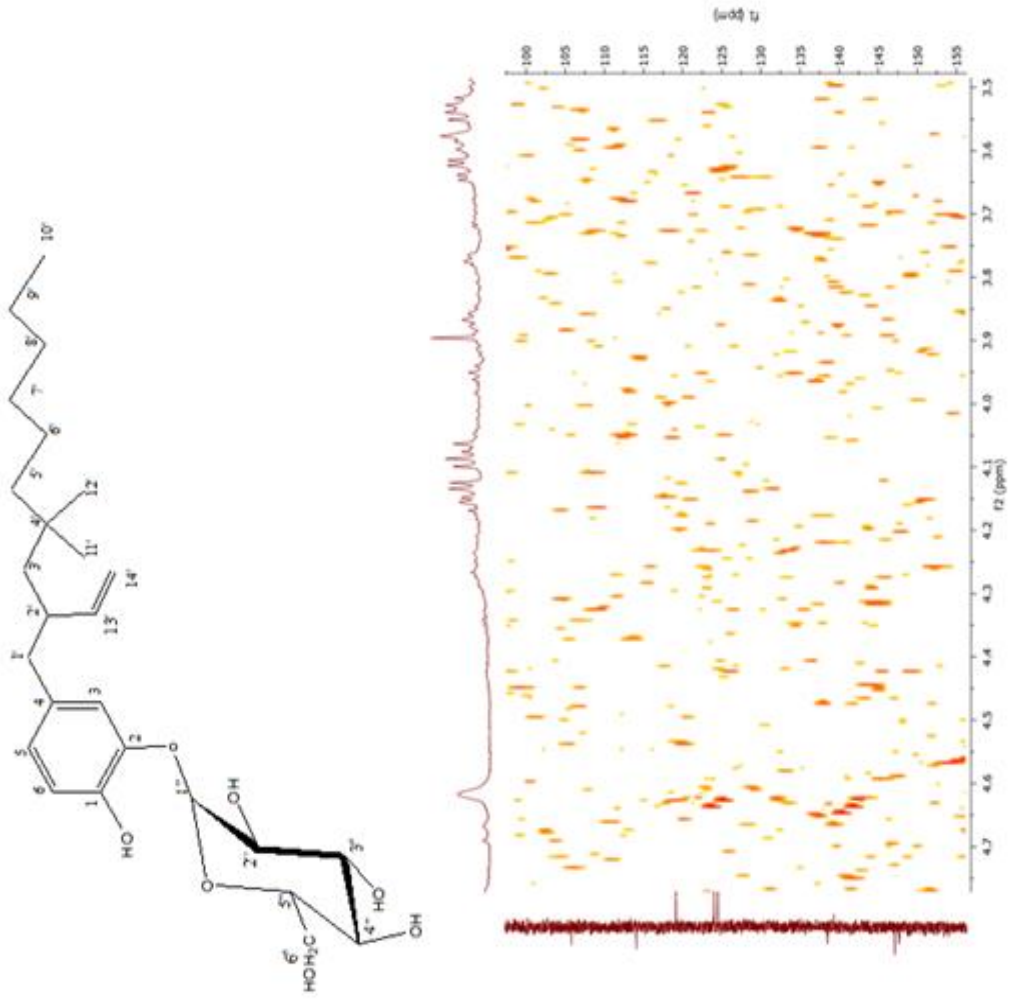
Şekil 4. 46. 2 Numaralı bileşiğin ^1H - ^1H COSY spektrumu



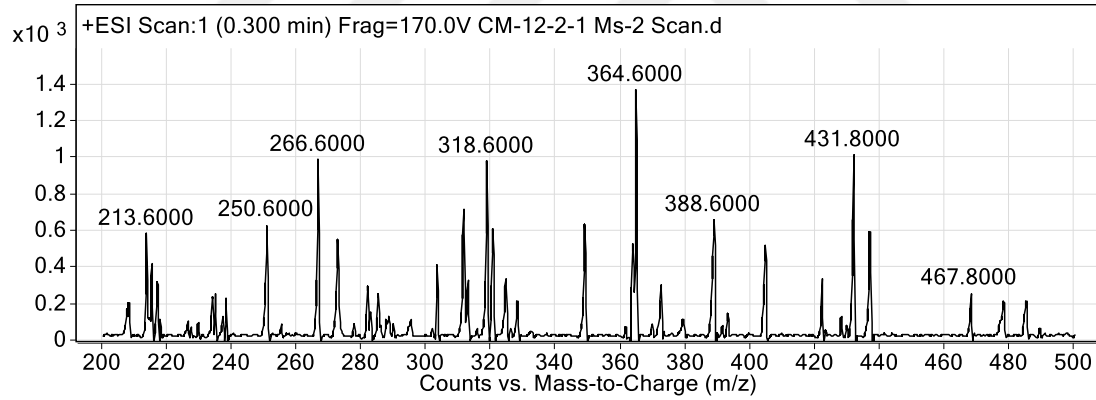
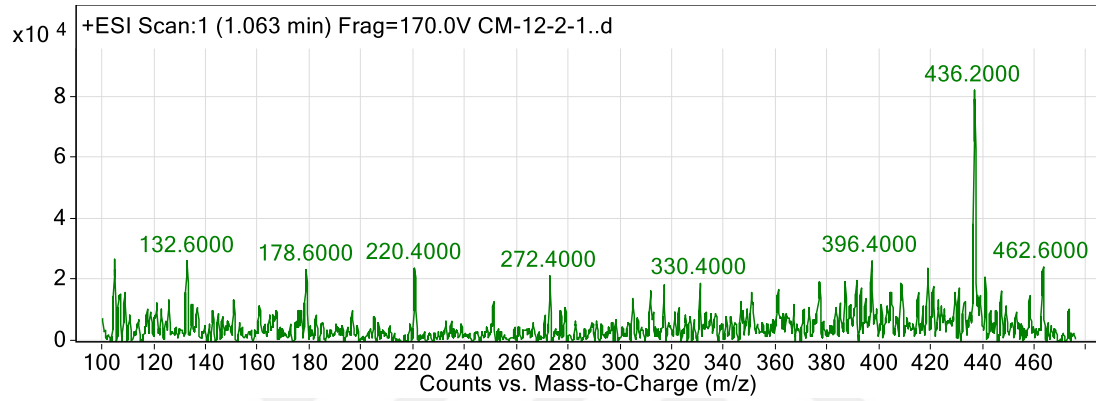
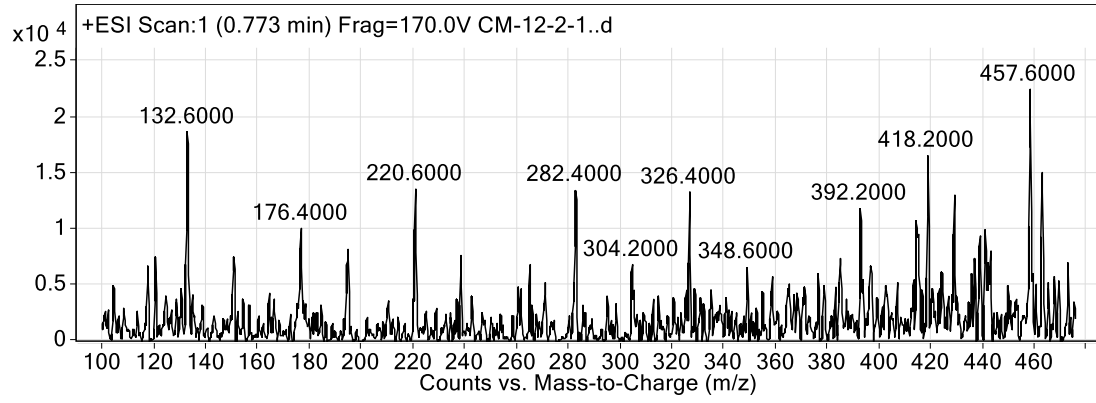
Şekil 4. 47. 2 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumu



Şekil 4. 48. 2 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumu

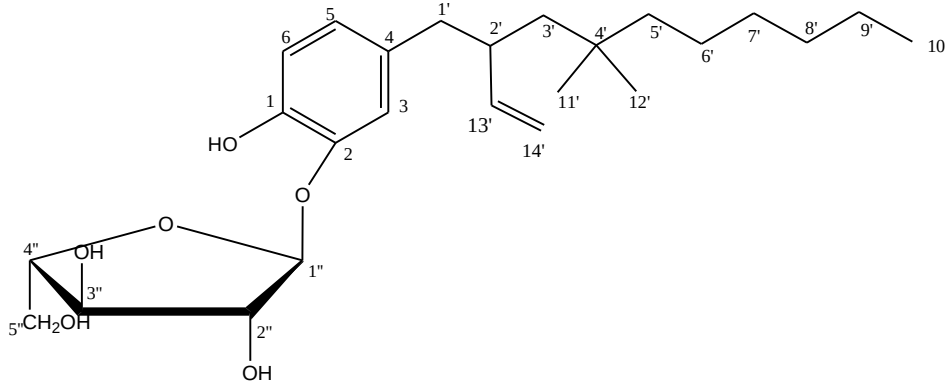


Şekil 4. 49. 2 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumu



Şekil 4. 50. 2 Numaralı bileşiğin ESI-MS spektrumu

4.2.1.3. 3 Numaralı Bileşik (CM-12-4-1): 2-O- α -D-arabinofuranosil-4-(4',4'-dimetil-2'-vinil-desil) fenol



Şekil 4. 51. 2-O- α -D-arabinofuranosil-4-(4',4'-dimetil-2'-vinil-desil) fenol

3 numaralı bileşik; beyaz renkli katı halde olup TLC plakasında 254 nm UV ışık altında kahve renkli, 366 nm UV ışık altında mor renkli olarak görünmüştür. İlk önce NH₃ buharıyla muammele edilmiş, ardından NA belirteci püskürtülmüş ve 366 nm ışık altında mor renginde değişme görülmemiştir. TLC çözücü sistemi olarak CHCl₃: MeOH (10:0.5) kullanılmıştır.

¹H NMR spektrumunda (CDCl₃, δ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.53) bileşiğin 7.46 ppm'de (1H, *d*, *J*= 8.6 Hz) H-6'nın H-5 ile orto etkileşimi; 7.28 ppm'de (1H, *t*, *J*= 2.1 Hz) H-3'ün H-5 ile meta etkileşimi ile 7.06 ppm'de (1H, *dd*, *J*= 2.5, 8.6 Hz) H-5'in H-6 ile orto etkileşimi ve H-5'in H-3 ile meta etkileşimi gözlenmiştir. Bu durum 1,2,4 tri sübstitüe aromatik halkanın varlığını göstermiştir. Ayrıca 4.93 (1H, *ddd*, *J*= 1.6, 3.6, 17.1 Hz, H_b-14') ve 4.85 ppm'de (1H, *ddd*, *J*=1.04, 3.1, 10.1 Hz, H_a-14') gözlenen pikler ile 5.74 ppm'de (1H, *ddd*, *J*= 17.1, 10.3, 6.7 Hz, H-13') gözlenen pik; CH₂=CH- (vinil) grubunun varlığını kanıtlamıştır. Bunun yanında 1.26 ppm'deki (6H, *s*, H-11' ve H-12') singlet ile 1.2-1.7 ppm arasındaki multipler pik grubu da benzen halkasına bağlı olan alkil grubunun varlığını göstermiştir. 3 numaralı bileşikte 2 numaralı bileşiğe benzer olarak, 4.61 ppm'de (*brs*, H-1'') anomerik proton gözlenirken 3.24-3.67 ppm (H-2'',3'',4'',5'') aralığında da 5 şeker proton gözlenmiştir. Yapılan literatür araştırmasına göre şeker yapısının arabinoz olduğu gözlenmiştir (Agrawal 1992, Ritchie vb., 1974).

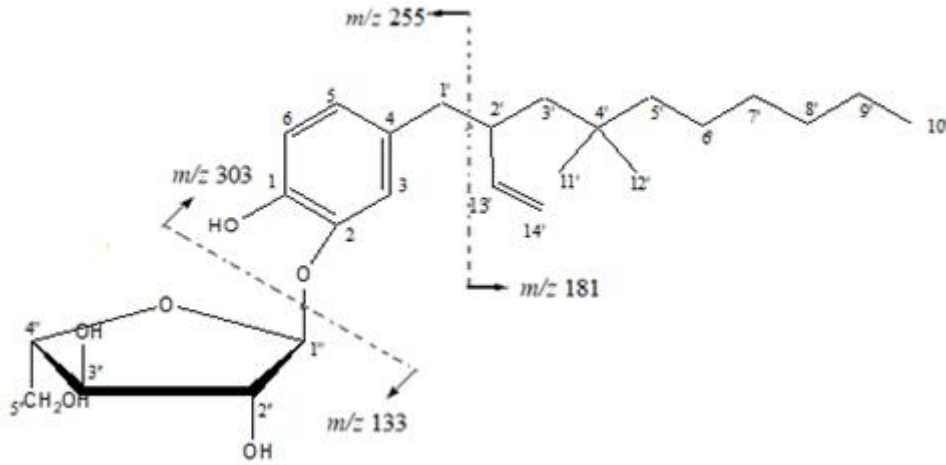
¹³C NMR, APT ve HSQC spektrumunda (CD₃OD, δ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.54; Şekil 4.55) 3 numaralı bileşiğin, 142.55 ppm'de (C-4), 128.50 ppm'de (C-5), 127.90 ppm'de (C-3), 122.88 ppm'de (C-6) aromatik karbonları gözlenirken; 151.40 ppm (C-1) ve 151.29 ppm'de (C-2) ise oksijene bağlı iki aromatik karbon gözlenmiştir. Vinil grubunun karbonları 143.20 ppm (C-13') ve 117.90 ppm'de (C-14') belirlenirken, sp³ hibritleşmesi yapmış 12 karbon

(CH₃/CH₂/CH) 17.92-38.77 ppm aralığında tespit edilmiştir. APT spektrumuna bakıldığında bunu destekleyici bilgi vermiş olup, 17.92-38.77 ppm aralığında; 3 metil karbonu [35.27 (C-11'/12'), 17.92 (C-10')], 1 metin karbonu [34.06 (C-2')], 1 kuarternier karbonu [38.77 (C-4')], 7 metilen karbonu [37.60 (C-1'), 35.82 (C-3'), 33.58, 33.25, 30.59, 27.06, 26.57 (C-5'/6'/7'/8'/9')] gözlenmiştir. 3 numaralı bileşiğin anomerik karbonu, 111.11 ppm'de gözlenmiştir.

¹H-¹H COSY spektrumunda (CDCl₃, δ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.56; Şekil 4.57) aromatik halkada bulunan 7.06 ppm'deki (1H, *dd*, *J*= 2.5, 8.6 Hz) H-5 protonunun, 7.46 ppm'deki (1H, *d*, *J*= 8.6 Hz) H-6 protonuyla ve 7.28 ppm'deki (1H, *t*, *J*= 2.1 Hz) H-3 protonuyla etkileştiği görülmüştür. Ayrıca 5.74 ppm'deki (1H, *ddd*, *J*= 17.1, 10.3, 6.7 Hz) vinilik metin protonu H-13' 'ün 4.85 ppm'deki (1H, *ddd*, *J*=1.04, 3.1, 10.1 Hz) H_a-14', 4.93 ppm'deki (1H, *ddd*, *J*= 1.6, 3.6, 17.1 Hz) H_b-14' ile 1.96 ppm'deki (1H, *q*, *J*= 6.8 Hz) H-2' protonları ile etkileşimi kanıtlanmıştır. Bununla birlikte 0.5-2.27 ppm aralığında da birbirine komşu metil, metilen, metin protonlarının etkileşimi de görülmektedir. 3.24-4.61 aralığındaki şeker protonlarının etkileşimi de COSY spektrumunda gözlenmiştir.

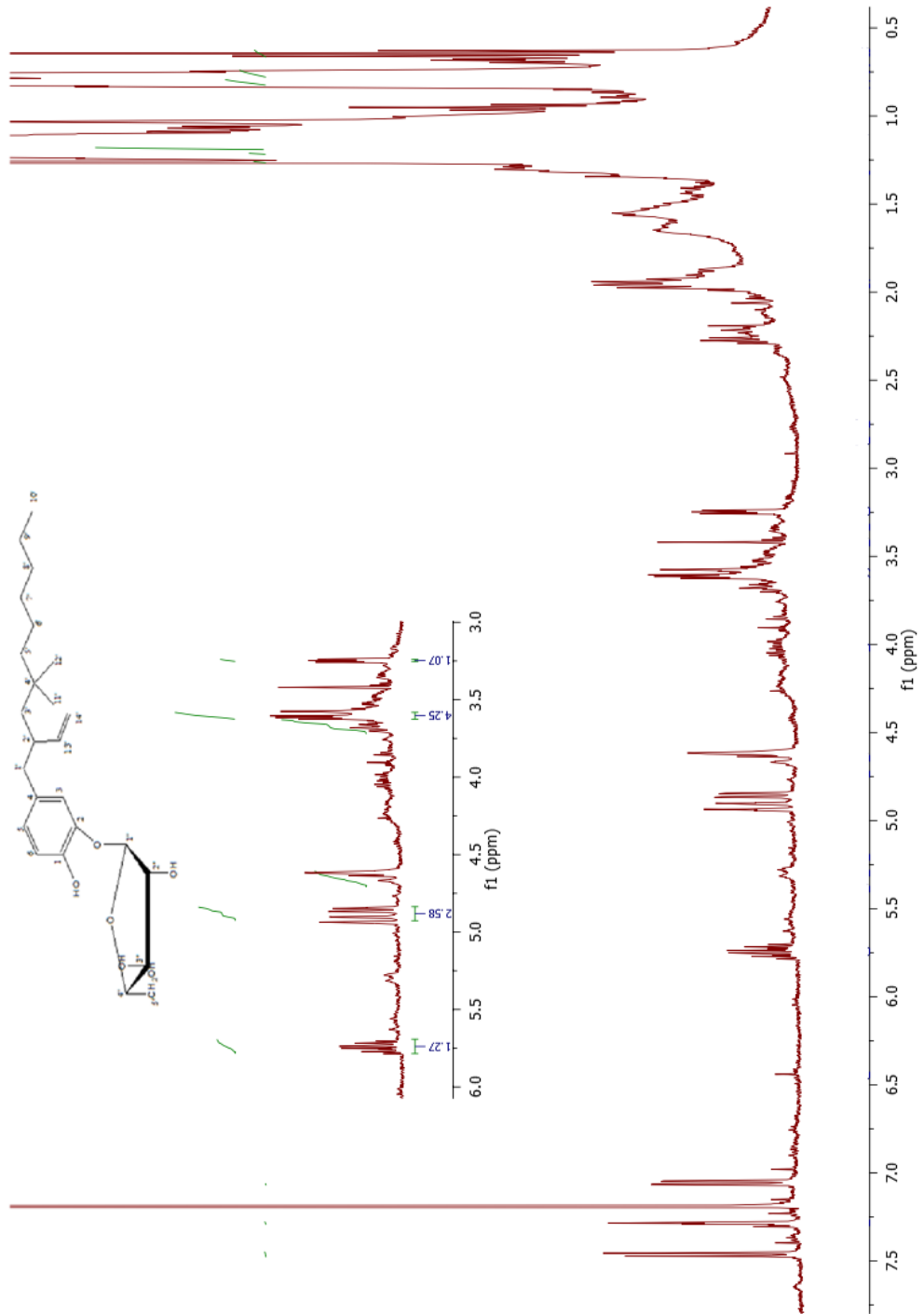
3 numaralı bileşiğin HMBC spektrumuna (CDCl₃, δ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.58) bakıldığında 2.27 ppm'deki H-1' protonunun 151.29 ppm'deki C-2 karbonuyla, 143.20 ppm'deki C-13' karbonuyla, 128.5 ppm'deki C-5 karbonuyla, 127.90 ppm'deki C-3 karbonuyla ve 117.90 ppm'deki C-14' karbonuyla etkileşimi gözlenmiştir. Bu etkileşimler de alkil grubunun 4 konumunda fenol halkasına bağlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca 5.74 ppm'deki H-13' protonunun 142.55 ppm'deki C-4 karbonuyla etkileşimi tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra 7.28 ppm'deki H-3 ve 7.46 ppm'deki (H-6) anomerik karbonla (111.11 ppm) etkileşiminin gözlenmesi; şekerin 2-O-arabinofuranozit bağı yaptığını kanıtlamaktadır. Ayrıca 4.61 (H-1'') ppm'deki protonunun, 151.40 (C-1) ppm ve 127.90 (C-3) ppm karbonlarıyla etkileşimi de şekerin aromatik halkaya, 2 konumundan bağlı olduğunu göstermiştir. Moleküldeki diğer etkileşimler aşağıdaki Şekil 4.58'da verilmiştir.

Bileşiğin ESI spektumunda (Şekil 4.59) moleküler iyon piki *m/z* 436 [M+1]⁺ (%100) pikinin gözlenmesi bileşiğin kapalı formülünün C₂₅H₄₀O₆ olduğunu göstermiştir. Moleküldeki önemli parçalanma ürünleri arasında, *m/z* 418 (%54) pikinin [M-H₂O]⁺ gözlenmesi yapıdaki bir hidroksil grubunun varlığını gösterirken; spektrumdaki *m/z* 133 (%25) piki [C₅H₉O₄]⁺ pentoz şeker varlığını ve *m/z* 254 (%50) piki [(M-1)-C₁₃H₂₅]⁺ bileşikteki yan zincir kopmasını ve 2-O-şeker bağlı benzilik yapının varlığını kanıtlamıştır. 3 numaralı bileşiğin kütle spektrumunda gözlenen bölünmeler Şekil 4.52'de gösterilmiştir.

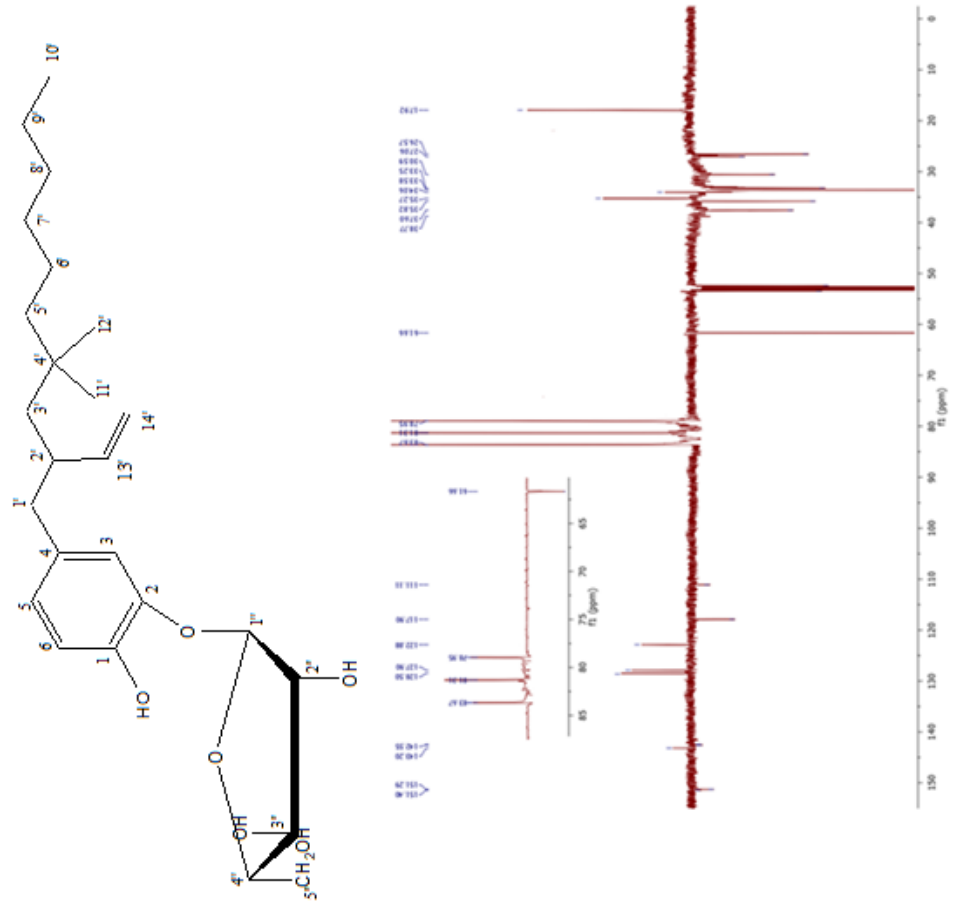


Şekil 4. 52. 3 numaralı bileşiğin kütle spektrumunda gözlenen bölünmeler

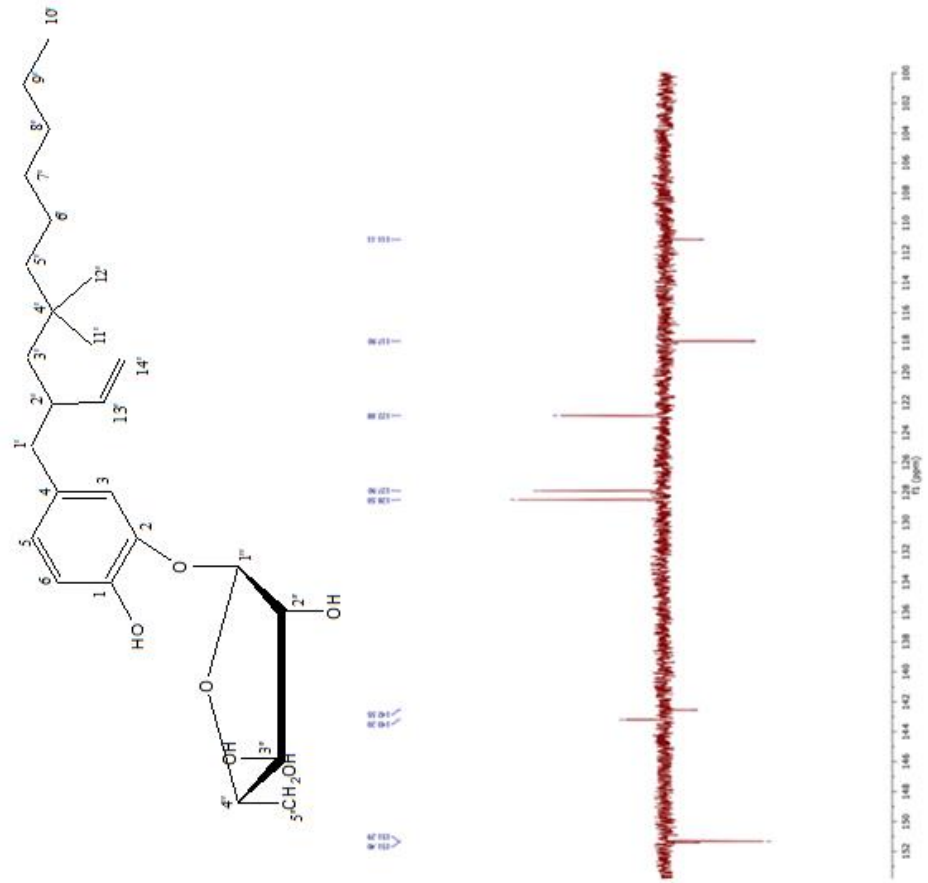
Tüm bu spektroskopik veriler ve yapılan literatür çalışmaları sonucunda 3 numaralı bileşiğin yapısının; 2-O- α -D-arabinofuranosil-4-(4',4'-dimetil-2'-vinil-desil) fenol olduğu tayin edilmiştir (Ritchie vb. 1974, Tam ve ark. 1979, Schuster ve ark. 1986, Agrawal 1992, Juch ve Rüedi 1997, Kim ve ark. 1999, Plock ve ark. 2001, Takara ve ark. 2002, Parejo ve ark. 2004, Zhang ve ark. 2009, Zhang ve ark. 2013). Bu bileşik *C. creticum* bitkisinden ilk defa izole edilen bir bileşiktir.



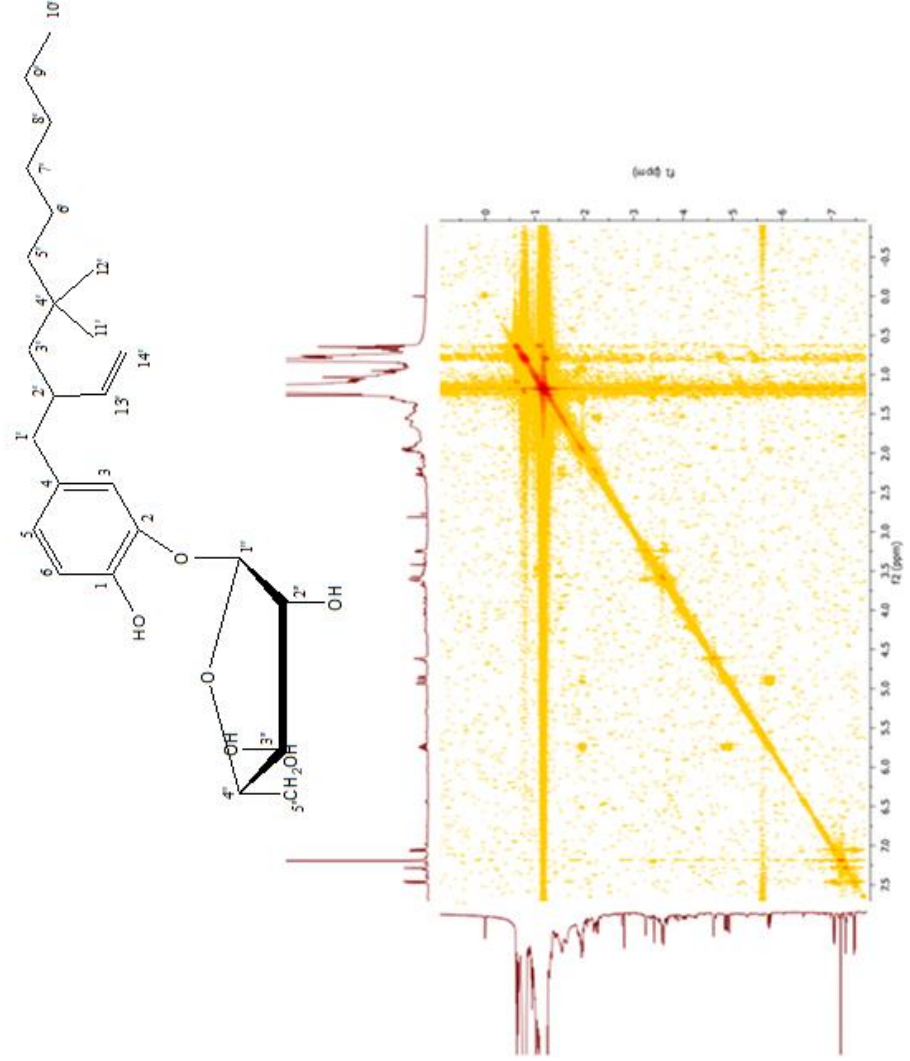
Şekil 4. 53. 3 Numaralı bileşiğin ^1H NMR spektrumu



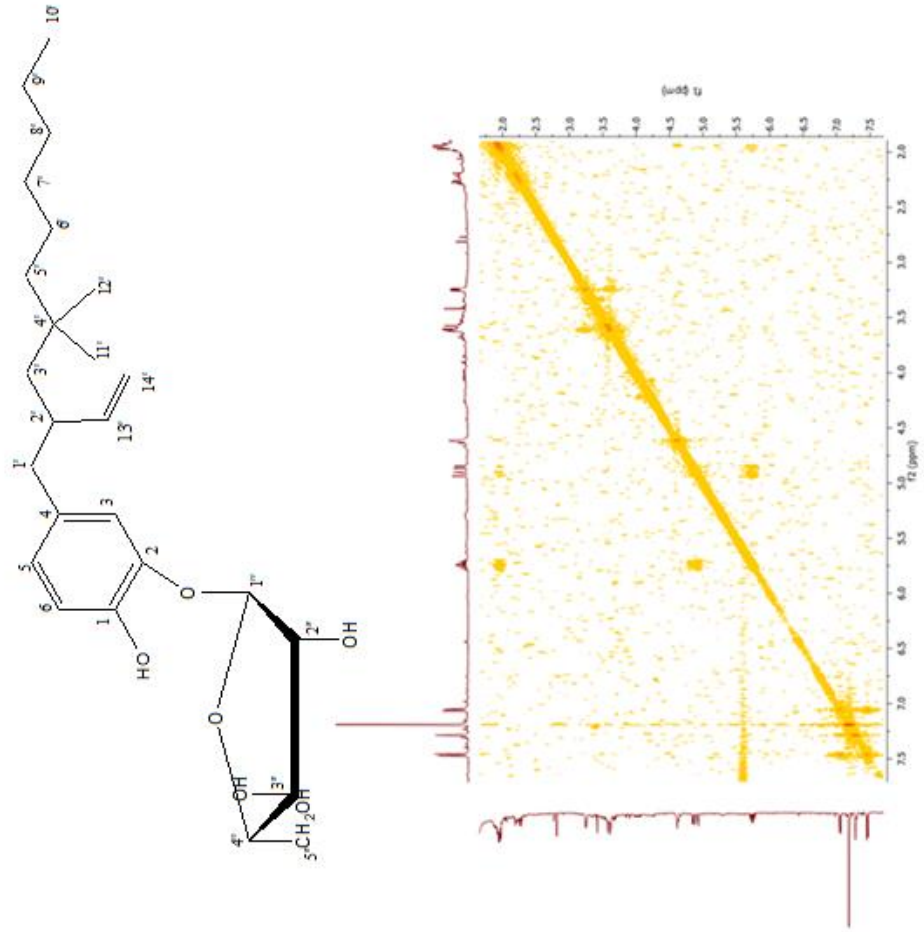
Şekil 4. 54. 3 Numaralı bileşiğin APT spektrumu (CD₃OD)



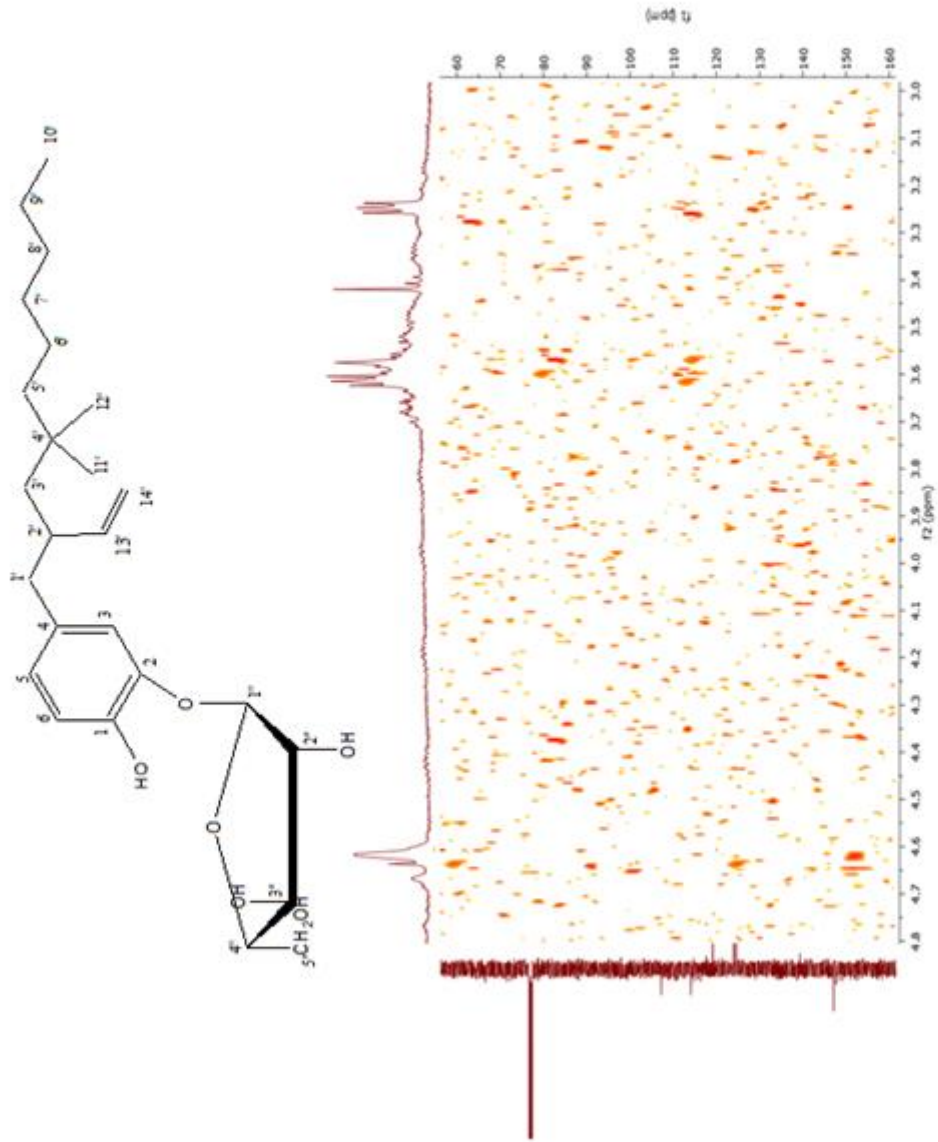
Şekil 4. 55. 3 Numaralı bileşiğin APT spektrumu (CD₃OD)



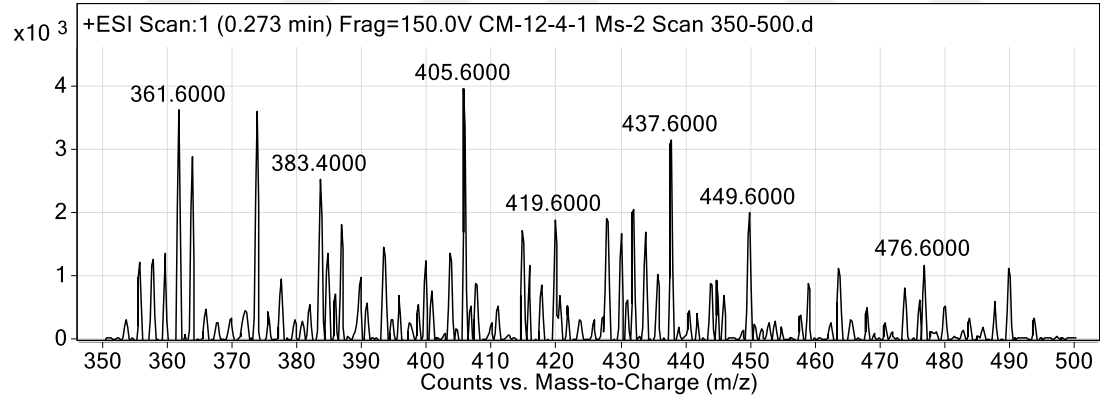
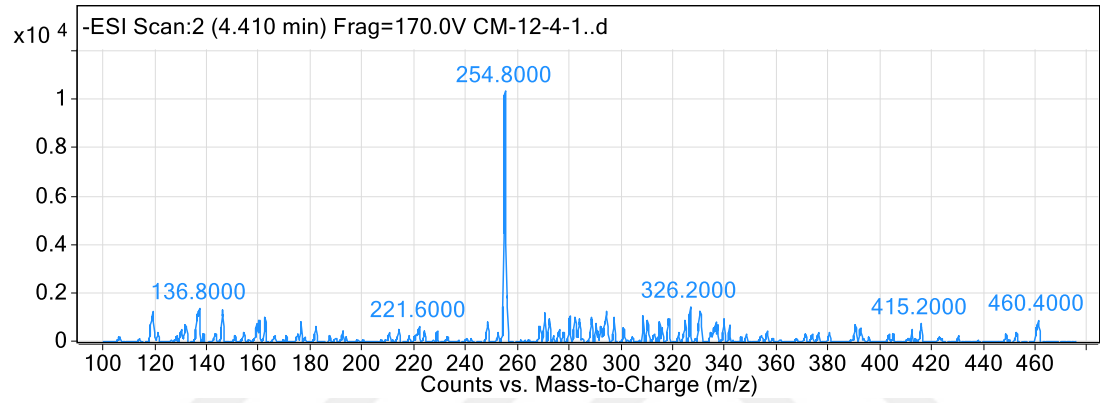
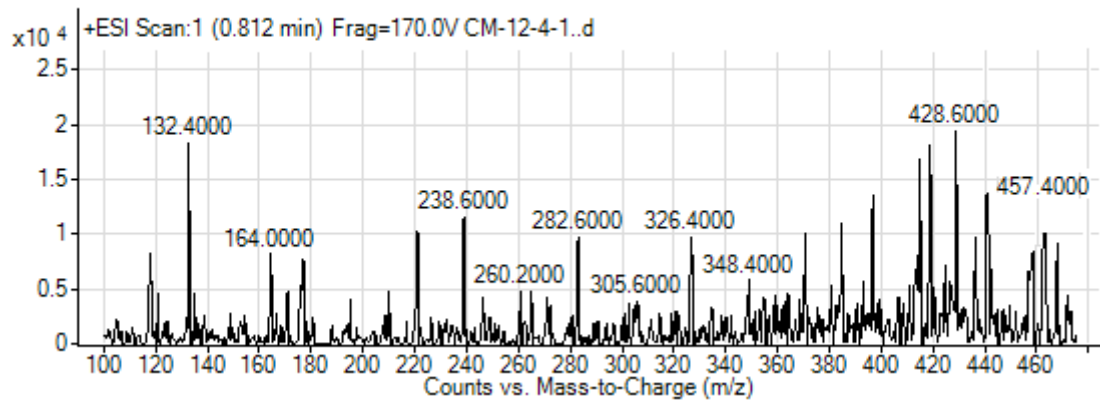
Şekil 4. 56. 3 Numaralı bileşiğin ^1H - ^1H COSY spektrumu



Şekil 4. 57. 3 Numaralı bileşiğin ^1H - ^1H COSY spektrumu

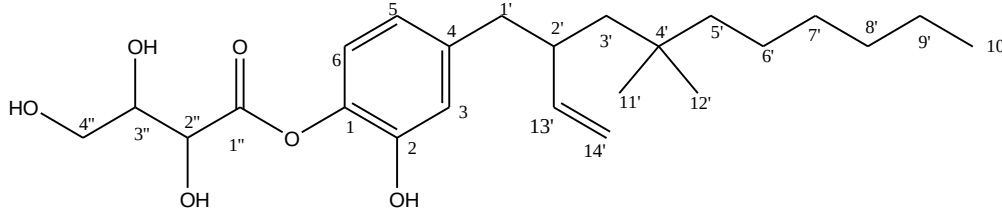


Şekil 4. 58. 3 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumu



Şekil 4. 59. 3 Numaralı bileşiğin ESI-MS spektrumları

4.2.1.4. 4 Numaralı Bileşik (CM-13-4-1): 2-hidroksi-4-(4',4'-dimetil-2'-vinil-desil)- fenil-2'',3'',4''-trihidroksi bütanoat



Şekil 4. 60. 2-hidroksi-4-(4',4'-dimetil-2'-vinil-desil)- fenil-2'',3'',4''-trihidroksi bütanoat yapısı

4 numaralı bileşik; beyaz renkli katı halde olup TLC plakasında 254 nm UV ışık altında mavi renkli, 366 nm UV ışık altında mavi renkli olarak görülmüştür. İlk önce NH₃ buharıyla muamele edilmiş, ardından NA belirteci püskürtülmüş ve 366 nm ışık altında mavi renginde değişme görülmemiştir. TLC çözücü sistemi olarak CHCl₃: MeOH (15:0.5) kullanılmıştır.

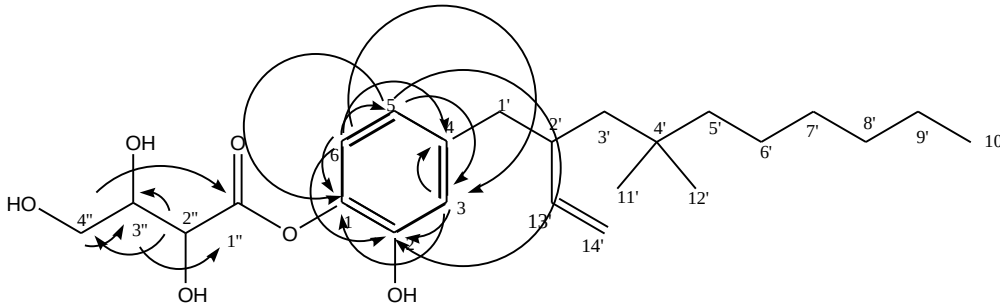
¹H NMR spektrumunda (CDCl₃, δ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.63) bileşiğin 7.45 ppm'de (1H, *d*, *J*= 8.6 Hz) H-6'nın H-5 ile orto etkileşimi; 7.28 ppm'de (1H, *t*, *J*= 2.1 Hz) H-3'ün H-5 ile meta etkileşimi ve 7.05 ppm'de (1H, *dd*, *J*= 2.5, 8.6 Hz) H-5'in H-6 ile orto etkileşimi ve H-3 ile meta etkileşimi gözlenmiştir. Bu durum 1,2,4 tri sübstitüe aromatik halkanın göstergesidir. Ayrıca 4.92 (1H, *ddd*, *J*= 1.6, 3.6, 17.1 Hz, H_b-14') ve 4.86 ppm'de (1H, *ddd*, *J*=1.04, 3.1, 10.1 Hz, H_a-14') gözlenen pikler ile 5.74 ppm'de (1H, *ddd*, *J*= 17.1, 10.3, 6.7 Hz, H-13') gözlenen pik; CH₂=CH- (vinil) grubunun kanıtı olmuştur. Bunun yanında 1.26 ppm'deki (6H, *s*, H-11' ve H-12') singlet ile 1.2-1.63 ppm arasındaki metilen grubu da benzen halkasına bağlı olan alkil grubunun varlığını göstermektedir. Ayrıca 4 numaralı bileşiğin proton NMR spektrumunda, 3.86 ppm'de (1H, *d*, *J*= 2.7, H-2'') ve 3.48 ppm'de (1H, *dt*, *J*= 2.8, 8.2, H-3''), oksijene bağlı metin protonları gözlenirken, 3.57 (2H, *m*, H-4'') ppm'de oksi metin protonları tespit edilmiştir.

¹³C NMR, APT ve HSQC spektrumunda (CDCl₃, δ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.64; Şekil 4.65) 4 numaralı bileşiğin 138.58 ppm (C-4), 124.50 ppm (C-5), 124.01 ppm (C-3), 119.13 ppm'de (C-6) aromatik karbon gözlenirken; 147.66 ppm (C-1) ve 147.13 ppm'de (C-2) ise oksijene bağlı iki aromatik karbon gözlenmiştir. Vinil grubunun karbonları 139.33 ppm (C-13') ve 114.10 ppm'de (C-14') belirlenirken, sp³ hibritleşmesi yapmış 12 karbon 14.16-34.91 ppm aralığında tespit edilmiştir. APT spektrumuna bakıldığında bunu destekleyici bilgi vermiş olup, 14.16-34.91 ppm aralığında; 3 metil karbonu [30.24 (C-11'/12'), 14.16 (C-10')], 1 metin karbonu [31.48 (C-2'')], 1 kuarterner karbonu [34.91 (C-4')], 7 metilen karbonu [33.86 (C-1'), 33.70 (C-3'), 31.96, 29.74, 29.40, 24.82, 22.84 (C-5'/6'/7'/8'/9')] gözlenmiştir. Bununla birlikte

77.24 ppm (C-3''), 73.71 ppm (C-2'') ve 58.50 ppm'de (C-4'') 3 oksijene bağı karbon gözlenirken, 176.89 ppm'de de (C-1'') karbonil karbonu gözlenmiştir.

^1H - ^1H COSY spektrumunda (CDCl_3 , δ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.66; Şekil 4.67) aromatik halkada bulunan 7.05 ppm'deki (1H, *dd*, $J= 2.5, 8.6$ Hz) H-5 protonunun, 7.45 ppm'deki (1H, *d*, $J= 8.6$ Hz) H-6 protonuyla ve 7.28 ppm'deki (1H, *t*, $J= 2.1$ Hz) H-3 protonuyla etkileştiği görülmüştür. Ayrıca 5.74 ppm'deki (1H, *ddd*, $J= 17.1, 10.3, 6.7$ Hz) vinilik metin protonu H-13' 'ün, 4.86 ppm'deki (1H, *ddd*, $J=1.04, 3.1, 10.1$ Hz) H_a-14', 4.92 ppm'deki (1H, *ddd*, $J= 1.6, 3.6, 17.1$ Hz) H_b-14' ve 1.96 ppm'deki (1H, *q*, $J= 6.8$ Hz) H-2' protonları ile etkileşimi kanıtlanmıştır. Bununla birlikte 0.8-2.27 ppm aralığında da birbirine komşu metil, metilen, metin protonlarının etkileşimi de görülmektedir. Ayrıca hidroksil grubuna bağı olan metin (C-3'' ve C-2'') ve metilen (C-4'') protonları arasındaki etkileşim de COSY spektrumunda gözlenmiştir.

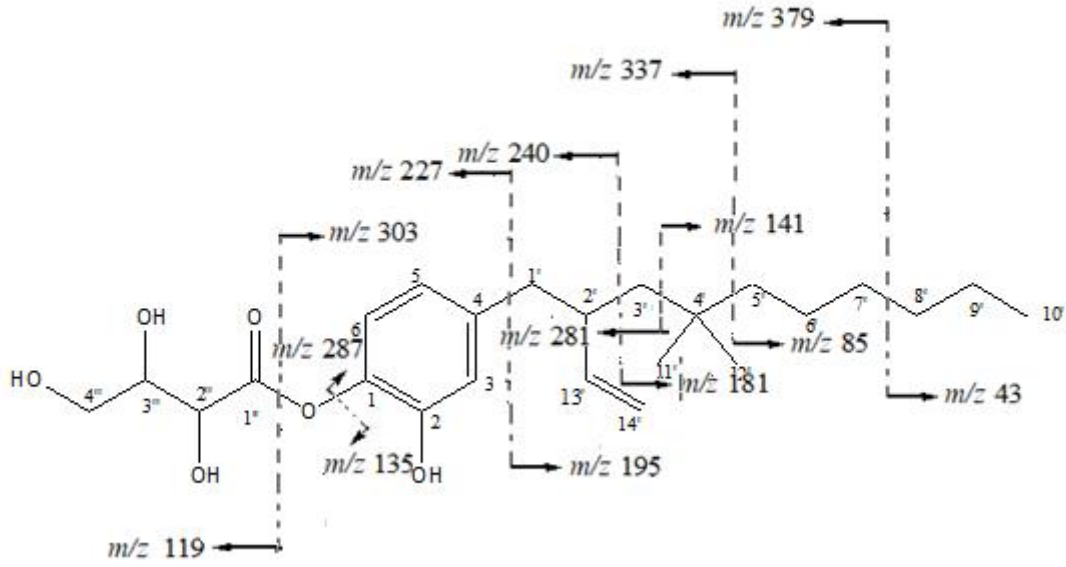
4 numaralı bileşiğin HMBC spektrumuna (CDCl_3 , δ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.68; Şekil 4.69) bakıldığında 2.27 ppm'deki H-1' protonunun 147.13 ppm'deki C-2 karbonuyla, 139.33 ppm'deki C-13' karbonuyla, 124.50 ppm'deki C-5 karbonuyla, 124.01 ppm'deki C-3 karbonuyla ve 114.10 ppm'deki C-14' karbonuyla etkileşimi gözlenmiştir. Bu etkileşimler de alkil grubunun 4 konumunda fenol halkasına bağı olduğunu göstermektedir. Ayrıca 5.74 ppm'deki H-13' protonunun 138.58 ppm'deki C-4 karbonuyla etkileşimi tespit edilmiştir. Bunun yanında 3.86 ppm'deki H-2'' protonunun 176.89 ppm'deki (C-1'') karbonil karbonuyla ve aromatik halkadaki oksijene bağı C-1 (147.66 ppm'de) karbonuyla etkileşimi HMBC spektrumunda belirlenmiştir. 4 numaralı bileşiğin HMBC spektrumunda gözlenen diğ etkileşimler Şekil 4.61'de gözlenmiştir.



Şekil 4. 61. 4 Numaralı bileşiğin HMBC etkileşimleri

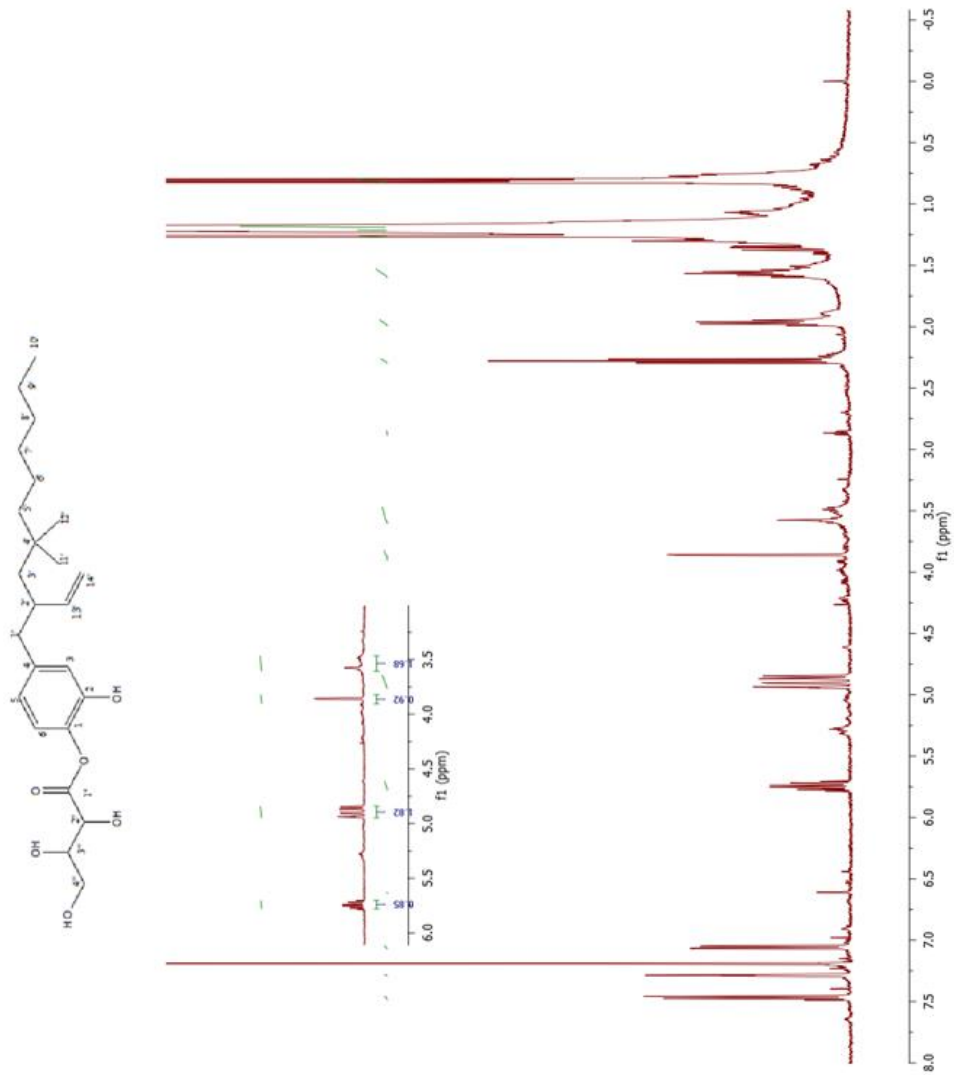
Bileşiğin ESI ve TOF-MS kütle spektrumunda (Şekil 4.70; Şekil 4.71) moleküler iyon piki m/z 422 $[\text{M}+1]^+$ (%100) vererek kapalı formülünün $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_6$ olduğunu göstermiştir. Spektrumunda; m/z 136 (%37) pikinin $[(\text{M}+2)-\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}]^+$ ve m/z 286 (%25) pikinin $[(\text{M}-1)-$

(OCOCH(OH)CH(OH)CH₂OH)]⁺ gözlenmesi; C-1 konumundan, aromatik halkaya bağlı olan; 2'',3'',4''-trihidroksi butanoil grubunun varlığını kanıtlamıştır. Bunun yanında m/z 193 (%16) piki [(M-2)-C₁₀H₁₁O₆]⁺, moleküldeki C-4 konumundaki alkil grubunun varlığını kanıtlarken; m/z 119 (%27) piki [M-C₂₀H₃₁O₂]⁺ (-OCCH(OH)CH(OH)CH₂(OH)) grubunun varlığını göstermiştir. Ayrıca m/z 240 (%13) piki [(M-1)-C₁₃H₂₅]⁺ moleküldeki C-3'-12' alkil grubunun ayrılışını ve benzilik karbonun oluşumunu desteklemektedir. 4 numaralı bileşiğin kütle spektrumunda gözlenen bölünmeler Şekil 4.62'de gösterilmiştir.

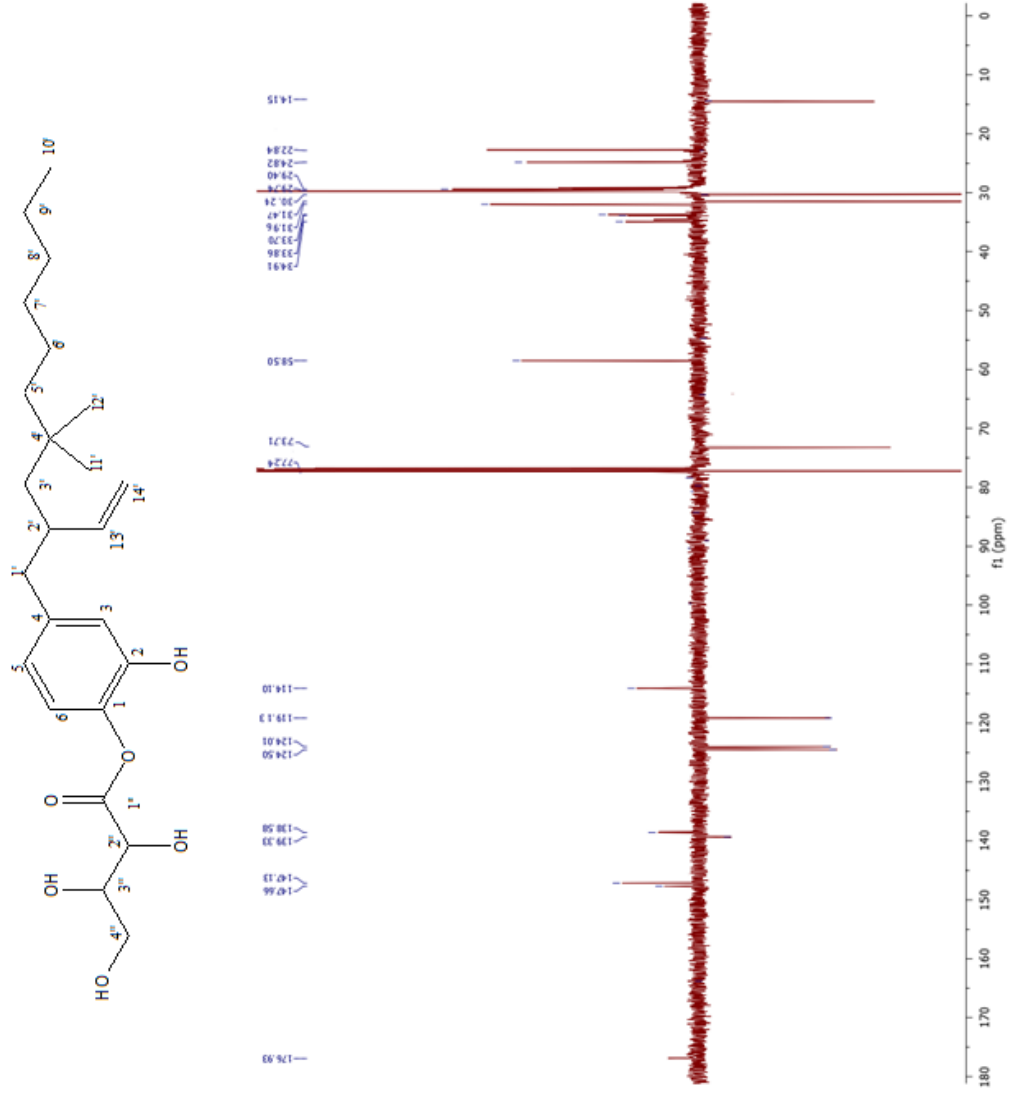


Şekil 4. 62. 4 numaralı bileşiğin kütle spektrumunda gözlenen bölünmeler

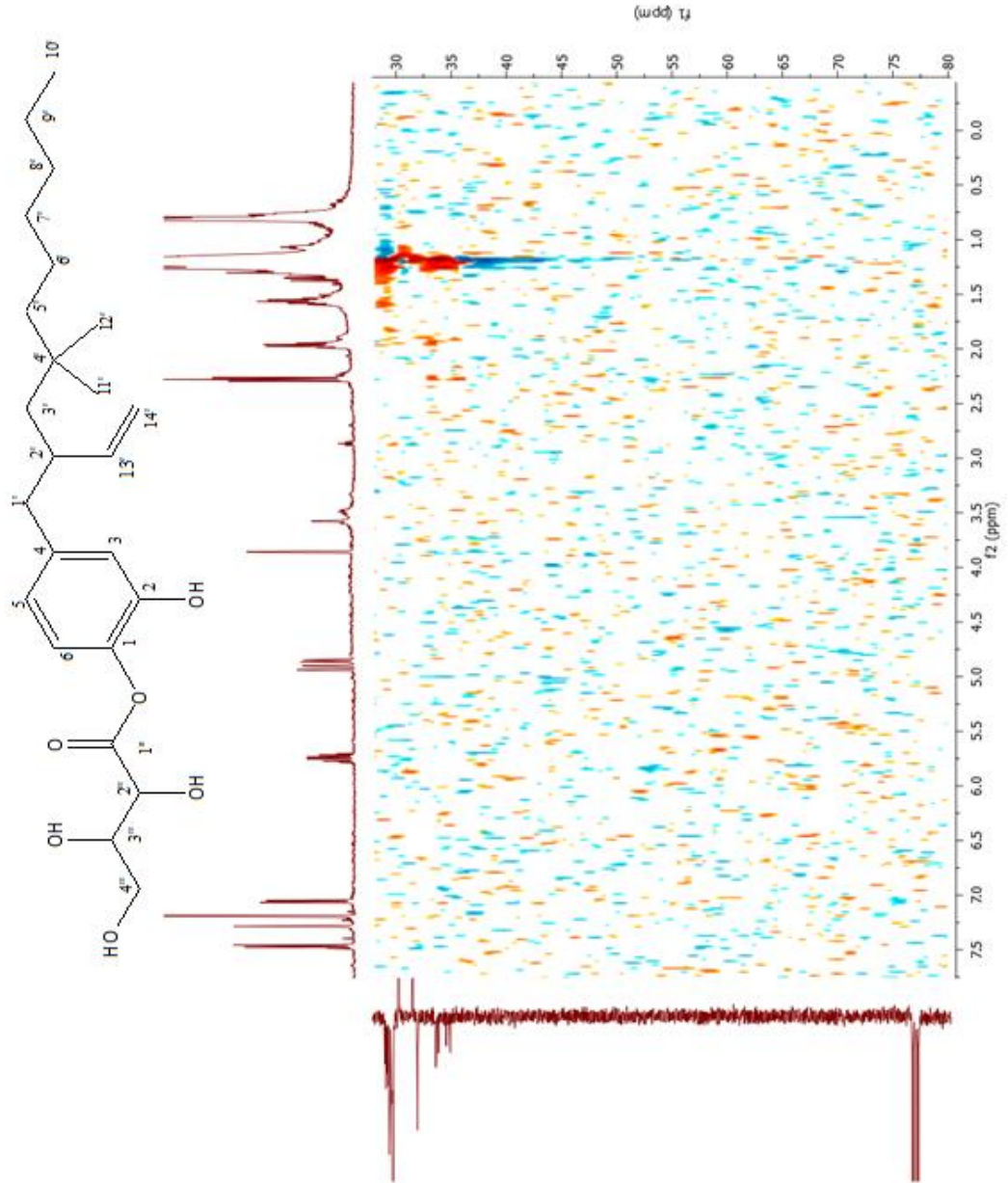
Tüm spektroskopik veriler ve yapılan literatür çalışmaları sonucunda, 4 numaralı bileşiğin yapısının; 2-hidroksi-4-(4',4'-dimetil-2'-vinil-desil)-fenil-2'',3'',4''-trihidroksi bütanoat olduğuna karar verilmiştir. Bu bileşik *C. creticum* bitkisinden ilk defa izole edilen bir bileşiktir.



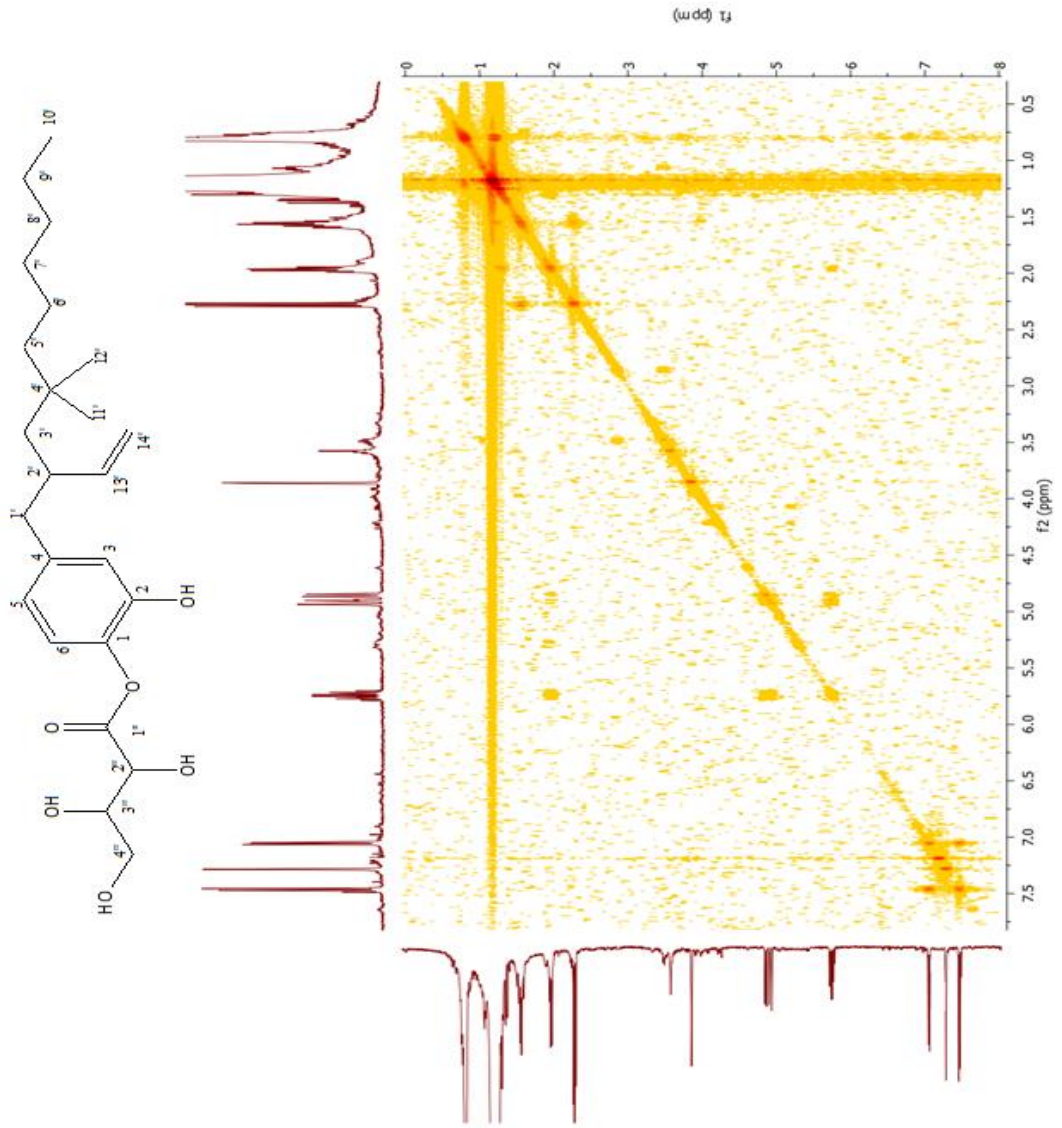
Şekil 4. 63. 4 Numaralı bileşiğin ^1H NMR spektrumu



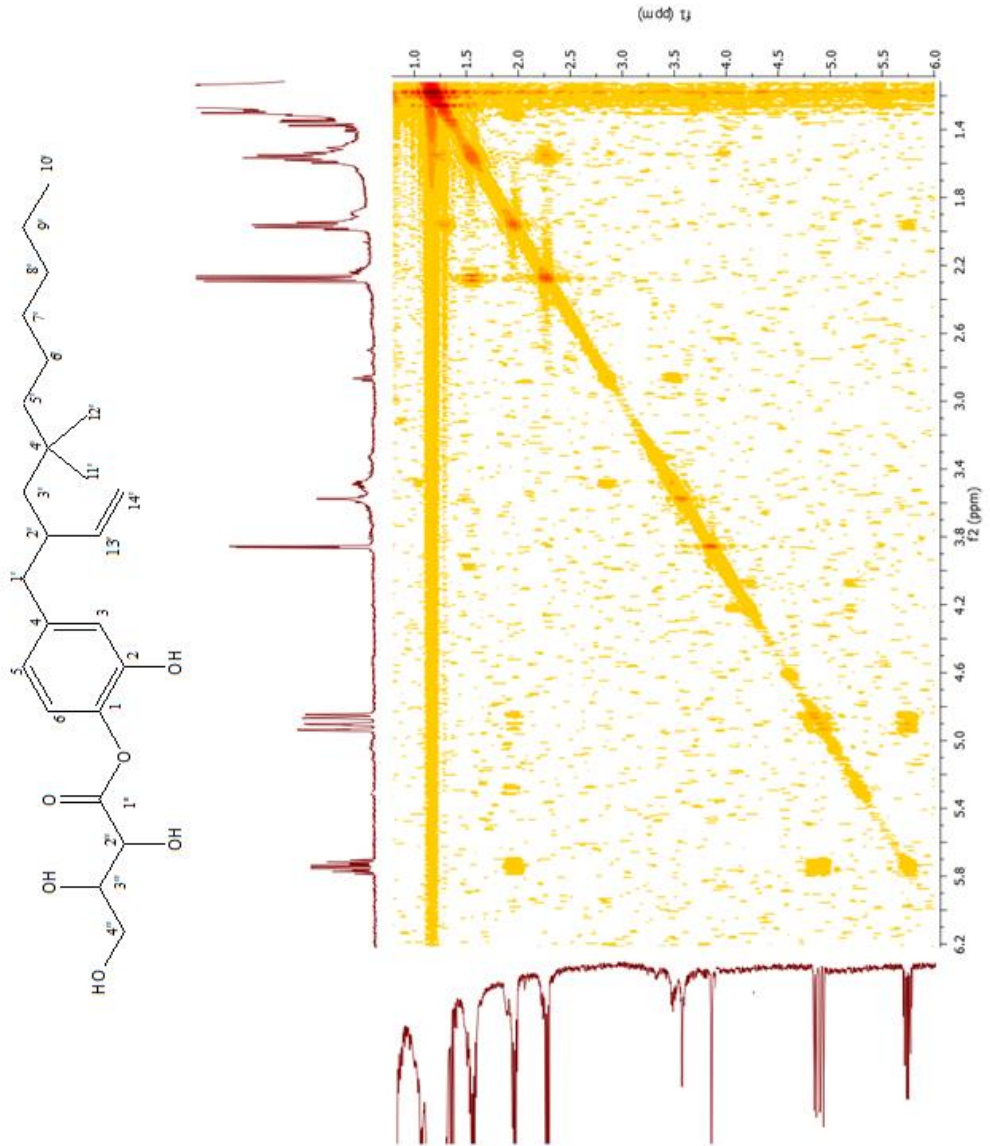
Şekil 4. 64. 4 Numaralı bileşiğin APT spektrumu (CDCl₃)



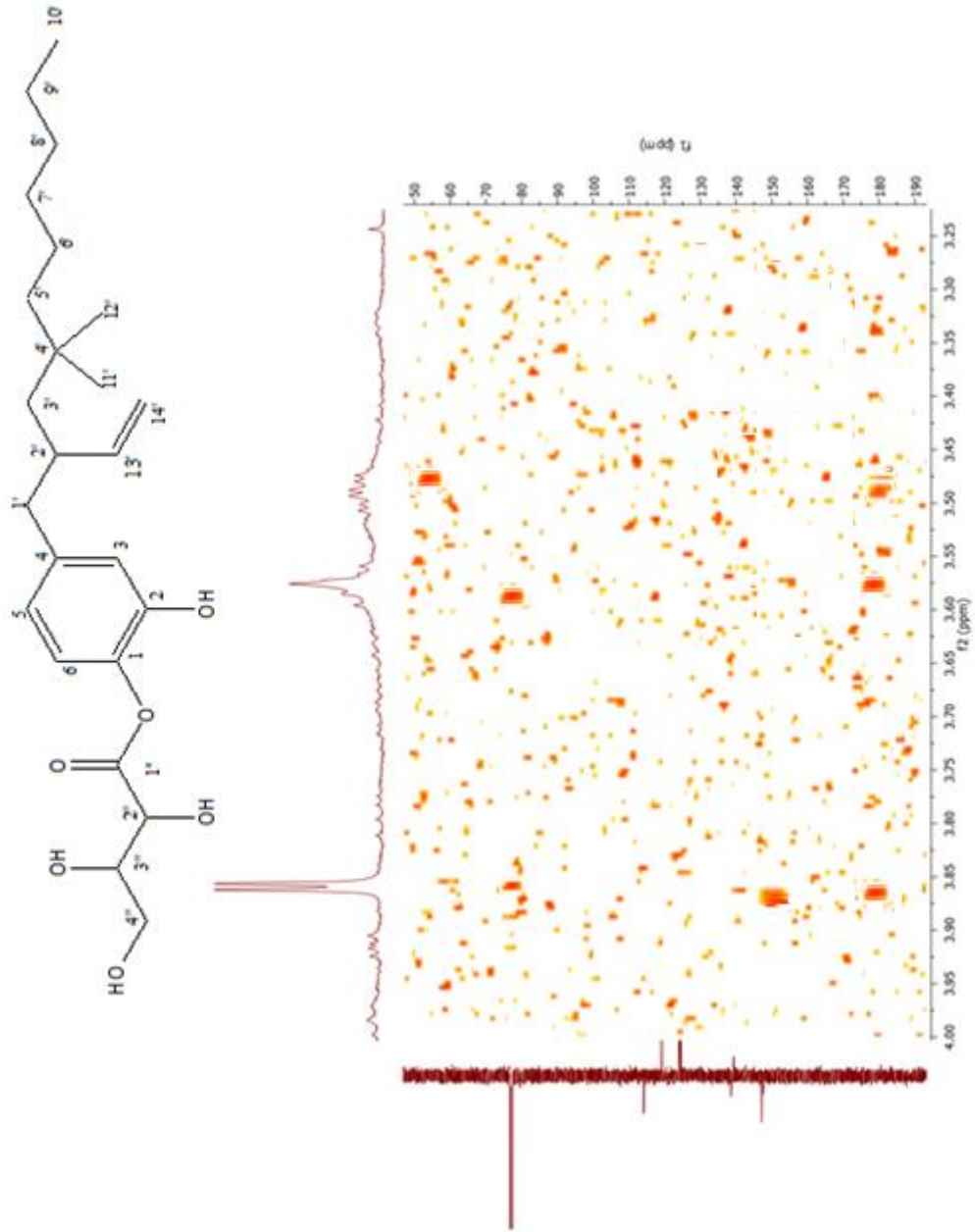
Şekil 4. 65. 4 Numaralı bileşiğin HSQC spektrumu



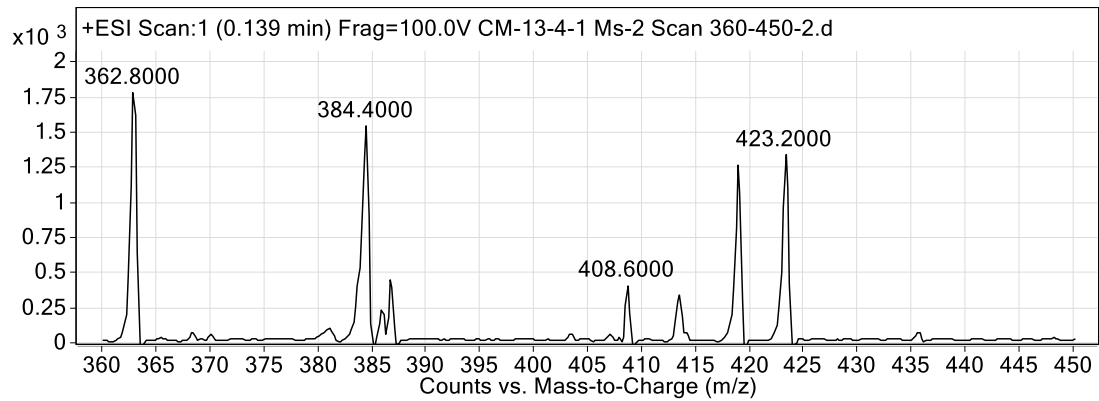
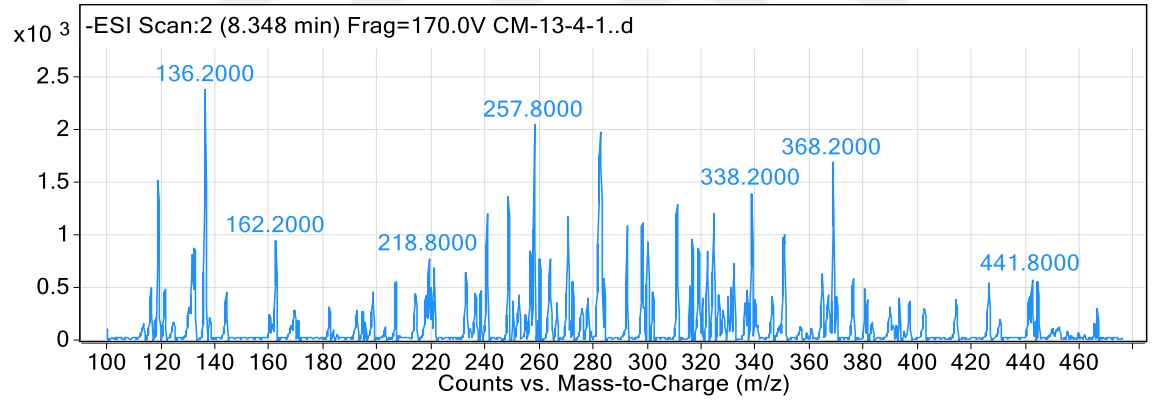
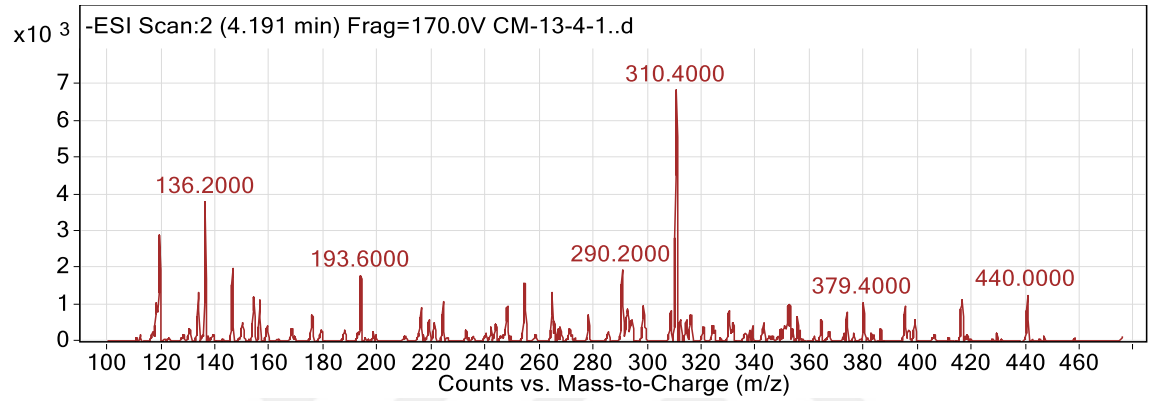
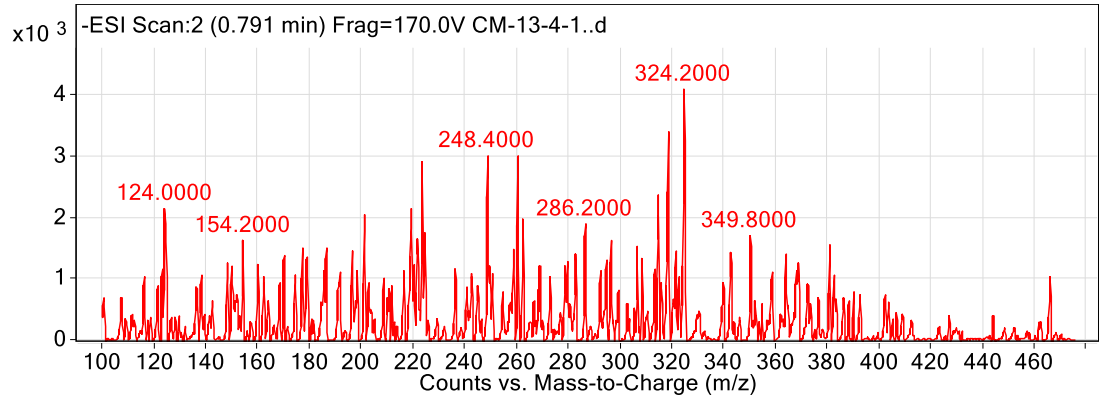
Şekil 4. 66. 4 Numaralı bileşiğin ^1H - ^1H COSY spektrumu



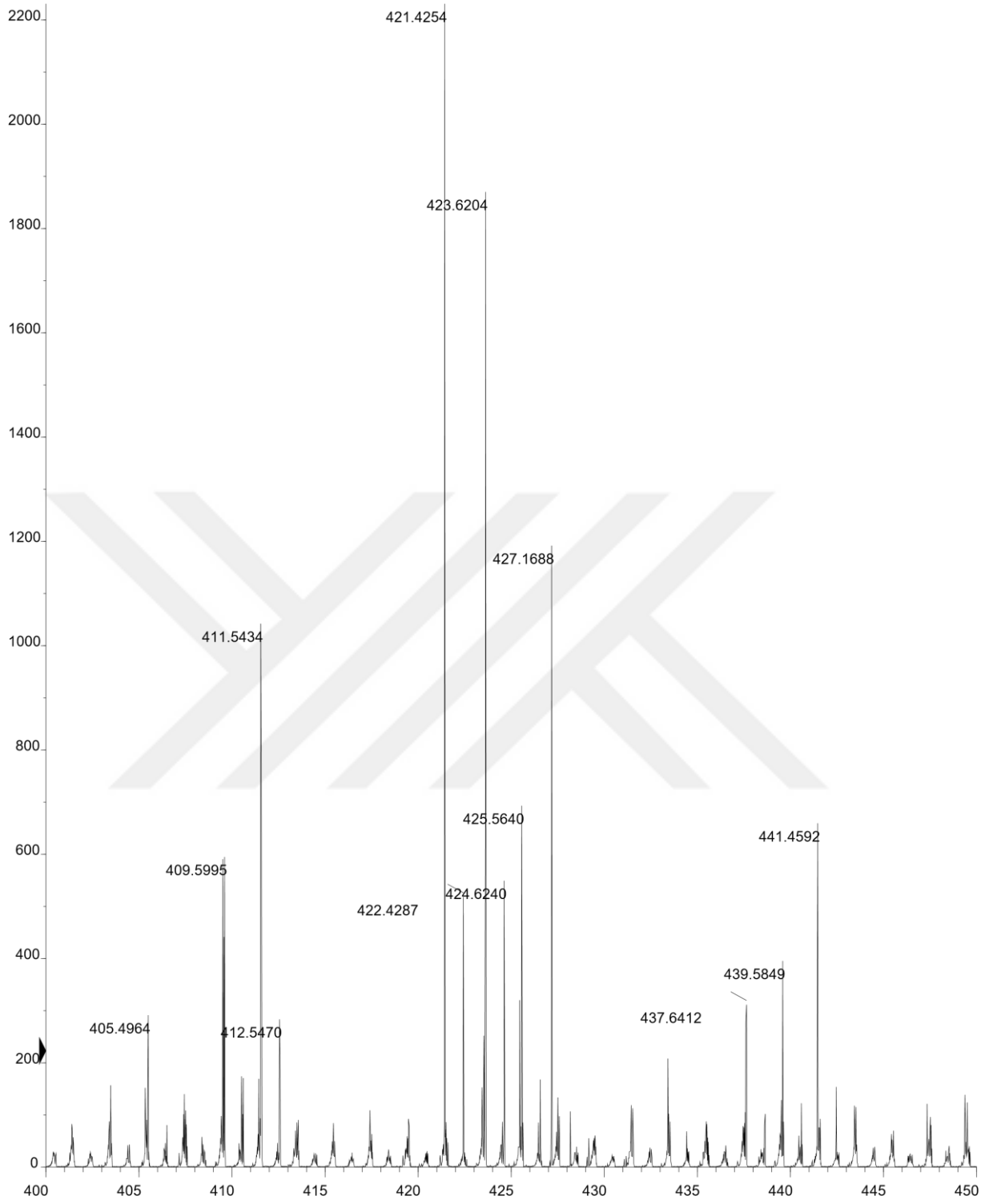
Şekil 4. 67. 4 Numaralı bileşiğin ^1H - ^1H COSY spektrumu



Şekil 4. 69. 4 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumu

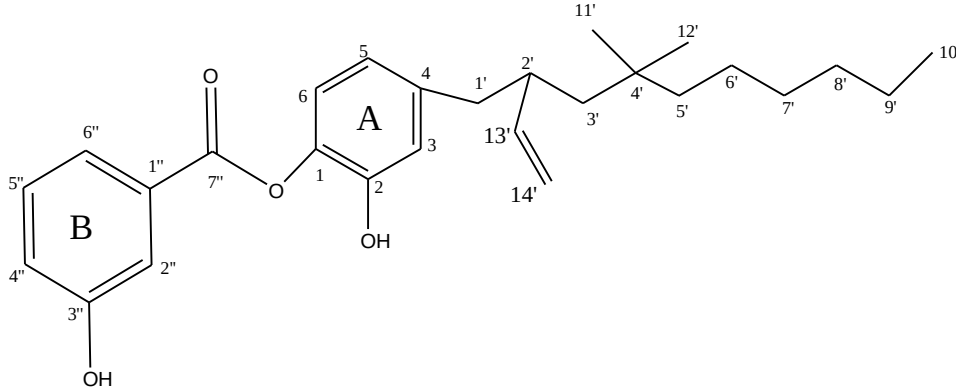


Şekil 4. 70. 4 Numaralı bileşiğin ESI-MS spektrumları



Şekil 4. 71. 4 Numaralı bileşiğin LC-QTOF spektrumu

4.2.1.5. 5 Numaralı Bileşik (CM-15-2-2): 2-hidroksi-4-(4',4'-dimetil-2'-vinil-desil)fenil-3''-hidroksi benzoat



Şekil 4. 72. 2-hidroksi-4-(4',4'-dimetil-2'-vinil-desil) fenil-3-hidroksi benzoat yapısı

5 numaralı bileşik; beyaz renkli katı halde olup TLC plakasında 254 nm UV ışık altında kahve renkli ve 366 nm UV ışık altında mor renkli olarak görünmüştür. İlk önce NH₃ buharıyla muamele edilmiş, ardından NA belirteci püskürtülmüş ve 366 nm ışık altında sarı renkte görünmüştür. TLC çözücü sistemi olarak CHCl₃:MeOH (9:1) kullanılmıştır.

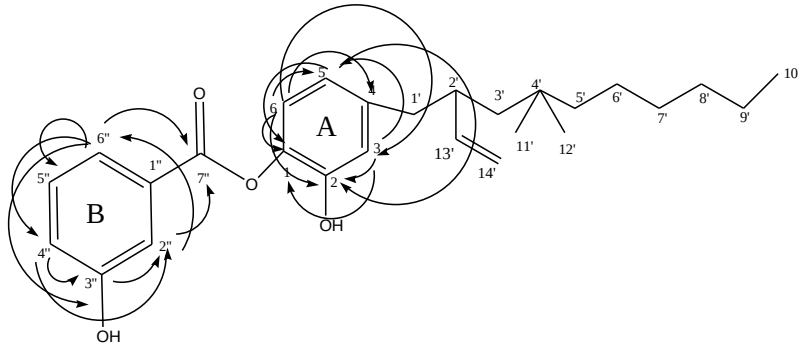
¹H NMR spektrumunda (CDCl₃, δ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.75; Şekil 4.76) bileşiğin 7.46 ppm'de (1H, *d*, *J* = 8.6 Hz) H-6'nın H-5 ile orto etkileşimi; 7.28 ppm'de (1H, *t*, *J* = 2.1 Hz) H-3'ün H-5 ile meta etkileşimi ve 7.06 ppm'de (1H, *dd*, *J* = 2.5, 8.6 Hz) H-5'in H-6 ile orto etkileşimi ve H-3 ile meta etkileşimi gözlenmiştir. Bu durum 1,2,4 tri süstitüe aromatik halkanın (A) göstergesidir. Ayrıca 4.92 (1H, *ddd*, *J* = 1.6, 3.6, 17.1 Hz, H_b-14') ve 4.86 ppm'de (1H, *ddd*, *J* = 1.04, 3.1, 10.1 Hz, H_a-14') gözlenen *ddd* pikleri ile 5.75 ppm'de (1H, *ddd*, *J* = 6.7, 17.1 Hz, H-13') gözlenen *ddd* piki; CH₂=CH- (vinil) grubunun kanıtı olmuştur. Bunun yanında 1.26 ppm'deki (6H, *s*, H-11' ve H-12') singlet ile 1.14-1.63 ppm arasındaki multipler pik grubu da benzene halkasına bağlı olan alkil grubunun varlığını göstermektedir. Ayrıca aromatik bölgede 8.04 ppm'deki (1H, *dd*, *J* = 1.3, 8.3 Hz) H-6" protonunun 7.41 ppm'deki (1H, *t*, *J* = 8.08 Hz) H-5" protonuyla olan orto etkileşimi ile 7.55 ppm'deki (1H, *tt*, *J* = 1.2, 8.7 Hz) H-4" protonuyla olan meta etkileşimi, spektrumda gözlenmiştir. Aromatik bölgede bunun yanı sıra 7.40 ppm'deki (1H, *dd*, *J* = 1.5, 1.6 Hz) H-2" protonunun, 8.04 ppm'deki H-6" ve 7.55 ppm'deki H-4" protonlarıyla meta etkileşimleri de tespit edilmiştir. Bu durumda 1,3 disüstitüe olan, ikinci bir aromatik halkanın (B) varlığını kanıtlamıştır.

¹³C NMR, APT, HSQC spektrumunda (CDCl₃, δ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.77; Şekil 4.78), 138.58 ppm (C-4), 123.97 ppm (C-5), 124.51 ppm (C-3), 119.16 ppm'de (C-6) aromatik karbon gözlenirken; 147.14 ppm (C-1) ve 147.72 ppm'de (C-2) ise oksijene bağlı iki aromatik

karbon gözlenmiştir. Vinil grubunun karbonları 139.34 ppm (C-13') ve 114.19 ppm'de (C-14') belirlenirken, sp^3 hibritleşmesi yapmış 12 karbon 14.16-35.37 ppm aralığında; 3 metil karbonu [30.24 (C-11'/12'), 14.16 (C-10')], 1 metin karbonu [31.48 (C-2')], 1 kuarterner karbonu [35.37 (C-4')], 7 metilen karbonu [34.92 (C-1'), 34.56 (C-3'), 33.82, 31.97, 29.74, 29.41, 22.74 (C-5'/6'/7'/8'/9')] gözlenmiştir. Bileşikteki ikinci aromatik halka karbonları ise 138.51 ppm (C-1''), 133.73 ppm (C-4''), 130.23 ppm (C-2'' ve C-5''), 128.47 ppm'de (C-6'') gözlenirken, 147.12 ppm de (C-3'') ve 159.12 ppm (C-7'') oksijene bağlı aromatik karbonlar tespit edilmiştir.

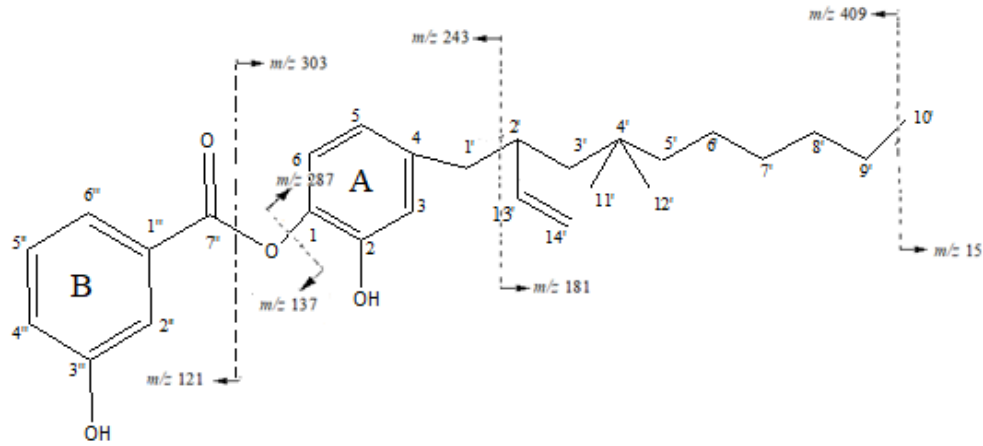
^1H - ^1H COSY spektrumunda ($CDCl_3$, δ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.79; Şekil 4.80; Şekil 4.81; Şekil 4.82) aromatik halkada bulunan 7.06 ppm'deki (1H, *dd*, J = 2.5, 8.6 Hz) H-5 protonunun, 7.46 ppm'deki (1H, *d*, J = 8.6 Hz) H-6 protonuyla ve 7.28 ppm'deki (1H, *t*, J = 2.1 Hz) H-3 protonuyla etkileştiği görülmüştür. Ayrıca 5.75 ppm'deki (1H, *ddd*, J = 17.1, 10.3, 6.7 Hz) vinilik metin protonu H-13' 'nün 4.86 ppm'deki (1H, *ddd*, J =1.04, 3.1, 10.1 Hz) H_a -14', 4.92 ppm'deki (1H, *ddd*, J = 1.6, 3.6, 17.1 Hz) H_b -14' ve 1.96 ppm'deki (1H, *q*, J = 6.8 Hz) H-2' protonları ile etkileşimi kanıtlanmıştır. Bununla birlikte 0.8-2.29 ppm aralığında da birbirine komşu metil, metilen, metin protonlarının etkileşimi de görülmektedir. İkinci aromatik halkada bulunan 7.40 ppm'deki H-2'' protonunun, 8.04 ppm'deki H-6'' ve 7.55 ppm'deki H-4'' protonuyla etkileşimi gözlenmiştir. Ayrıca yine aynı halkada 8.04 ppm'deki H-6'' protonunun 7.41 ppm'deki H-5'' ile ve 7.55 ppm'deki H-4'' protonlarıyla etkileşimleri de COSY spektrumunda gözlenmiştir.

5 numaralı bileşiğin HMBC spektrumuna ($CDCl_3$, δ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.83; Şekil 4.84) bakıldığında; aromatik A halkasındaki, 7.46 ppm'deki H-6, 7.06 ppm'deki (H-5) ve 7.28 ppm'deki H-3 protonlarının etkileşimleri gözlenmiştir (Şekil 4.84) Bunun yanında, 2.29 ppm'deki H-1' protonunun 147.72 ppm'deki C-2, 139.34 ppm'deki C-13', 123.97 ppm'deki C-5, 124.51 ppm'deki C-3 ve 114.19 ppm'deki C-14' karbonlarıyla etkileşimi gözlenmiştir. Bu etkileşimler de alkil grubunun 4 konumunda aromatik halkaya (A) bağlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca 5.75 ppm'deki H-13' protonunun 138.58 ppm'deki C-4 karbonuyla etkileşimi tespit edilmiştir. 5 numaralı bileşikte benzoil grubunun aromatik halkaya bağlanma konumu HMBC etkileşimleri ile tespit edilmiştir. 8.04 ppm'deki H-6'' protonunun 159.12 ppm'deki (C-1'') karbonil karbonuyla etkileşimi, 7.46 ppm'deki (H-6) ve 7.28 ppm'deki (H-3) protonunun, 159.12 ppm'deki (C-7'') karbonuyla etkileşiminin olması da, benzoil yapısının A halkasına C-1 konumundan bağlı olduğunu desteklemiştir. Moleküldeki diğer HMBC etkileşimleri Şekil 4.73'de gösterilmiştir.



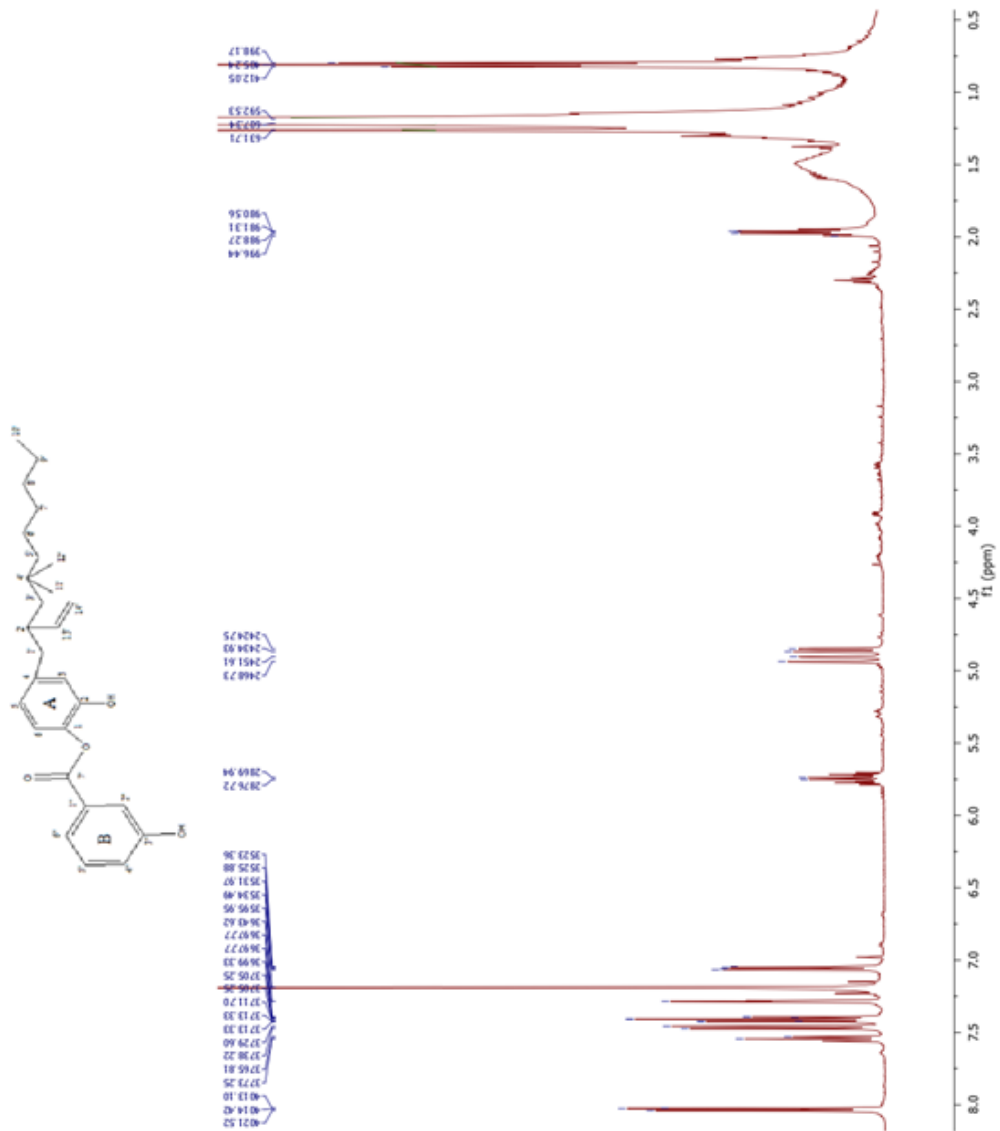
Şekil 4. 73. 5 Numaralı bileşiğin HMBC etkileşimleri

Bileşiğin ESI kütle spektrumunda (Şekil 4.85) moleküler iyon piki m/z 424 $[M+1]^+$ (%100) vererek, bileşiğin $C_{27}H_{36}O_4$ kapalı formülüne sahip olduğunu göstermiştir. Bileşikteki aromatik A halkasına 1 konumundan bağlı olan grup m/z 120 (%28) $[OH-Ar_B-CO-]^+$ parçalanma ürünü ve m/z 136 (%34) $[OH-Ar_B-COO-]^+$ parçalanma ürünü ile kanıtlanmıştır. Ayrıca m/z 302 (%28) piki de $[M-C_5H_7O_2]^+$ moleküldeki 3-hidroksi benzoil grubunun ayrılışıyla yapıyı da desteklemiştir. Bununla birlikte m/z 181 (%27) $[M-C_{14}H_{11}O_4 (Ar_B-COO-Ar_A-CH_2)]^+$ piki de moleküldeki benzilik karbondan kopma sonucunda meydana gelen parçalanma ürününü desteklemiştir. 5 numaralı bileşiğin kütle spektrumunda gözlenen bölünmeler Şekil 4.74'de gösterilmiştir.

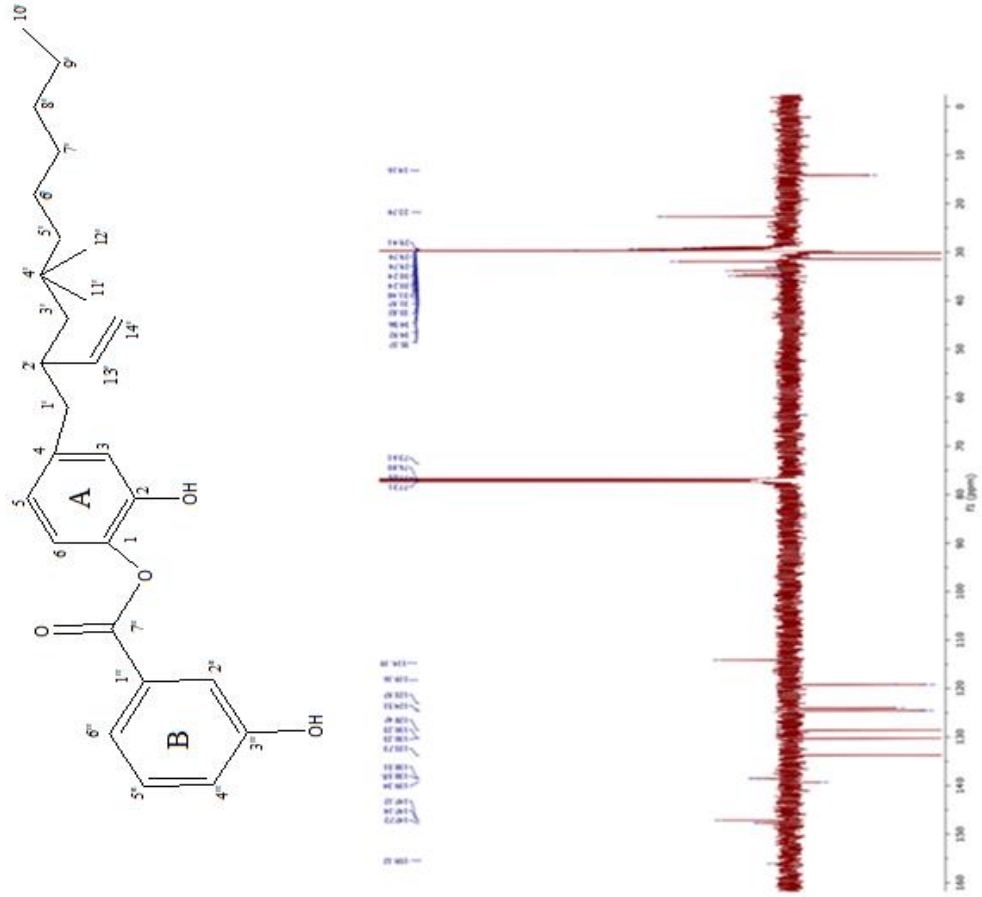


Şekil 4. 74. 5 numaralı bileşiğin kütle spektrumunda gözlenen bölünmeler

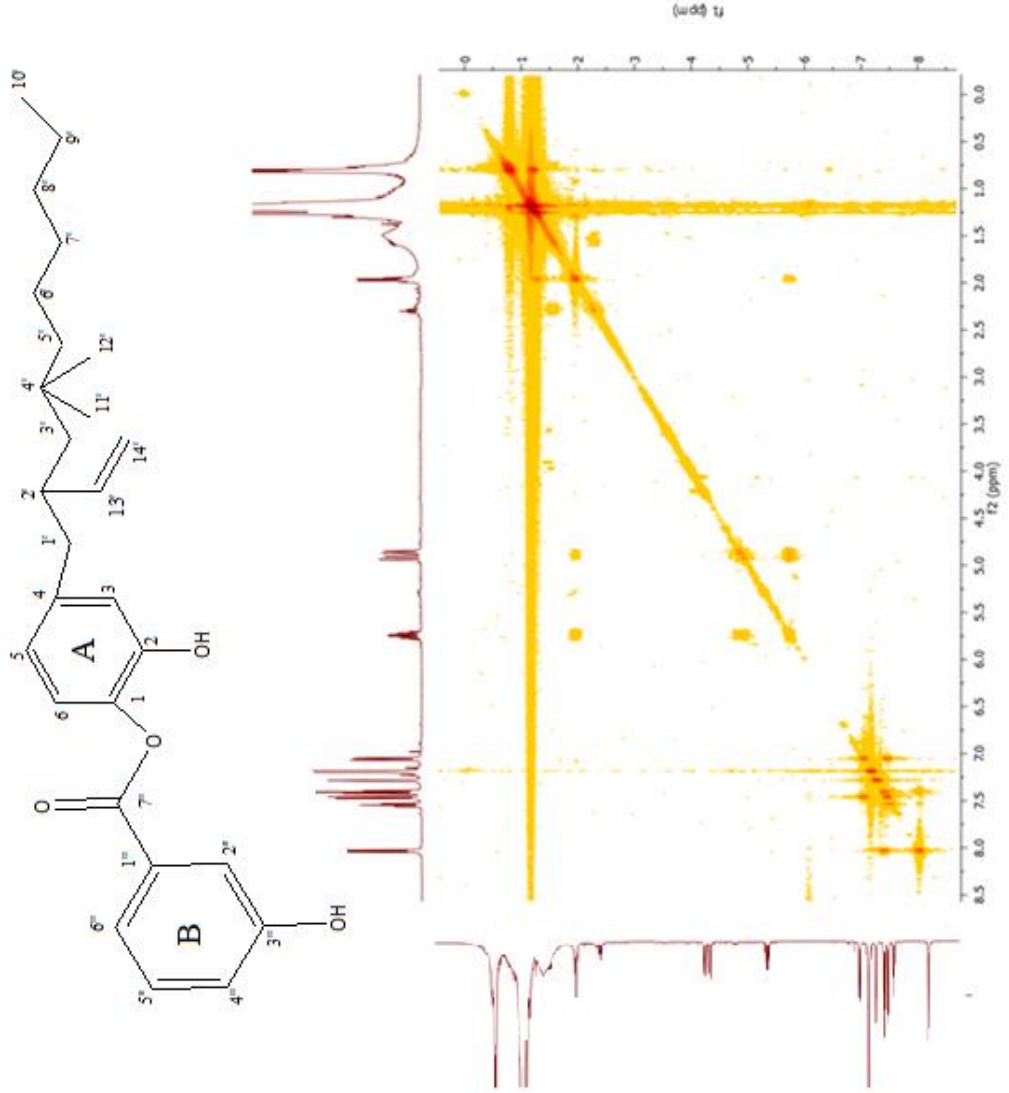
Tüm spektroskopik veriler ve literatür çalışmaları sonucunda, 5 numaralı bileşiğin yapısının; 2-hidroksi-4-(4',4'-dimetil-2'-vinil-desil)fenil-3-hidroksi benzoat olduğunu ispatlamıştır (Koopel vb. 2009). Bu bileşik *C. creticum* bitkisinden ilk defa izole edilen bir bileşiktir.



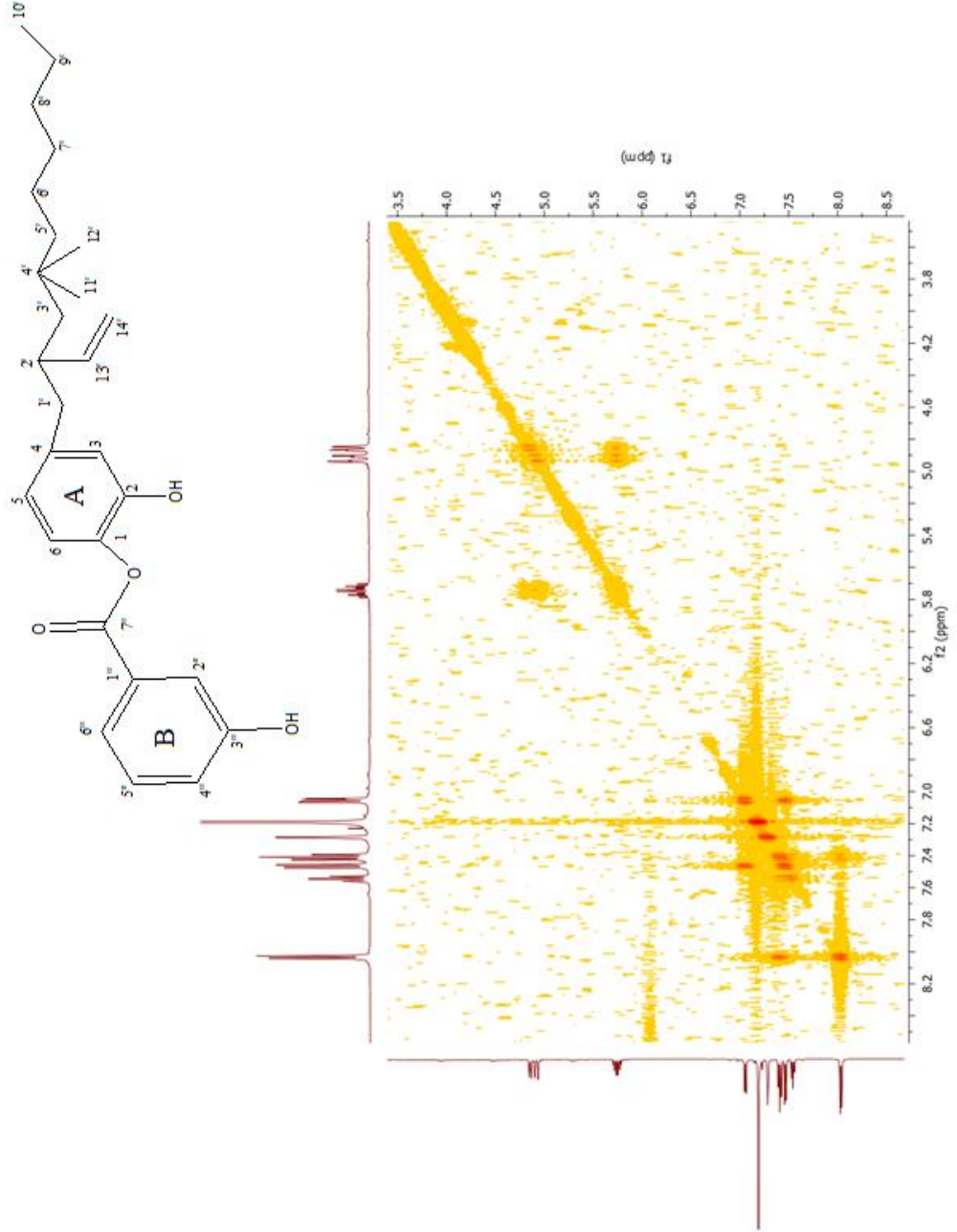
Şekil 4. 75. 5 Numaralı bileşiğin ^1H NMR spektrumu



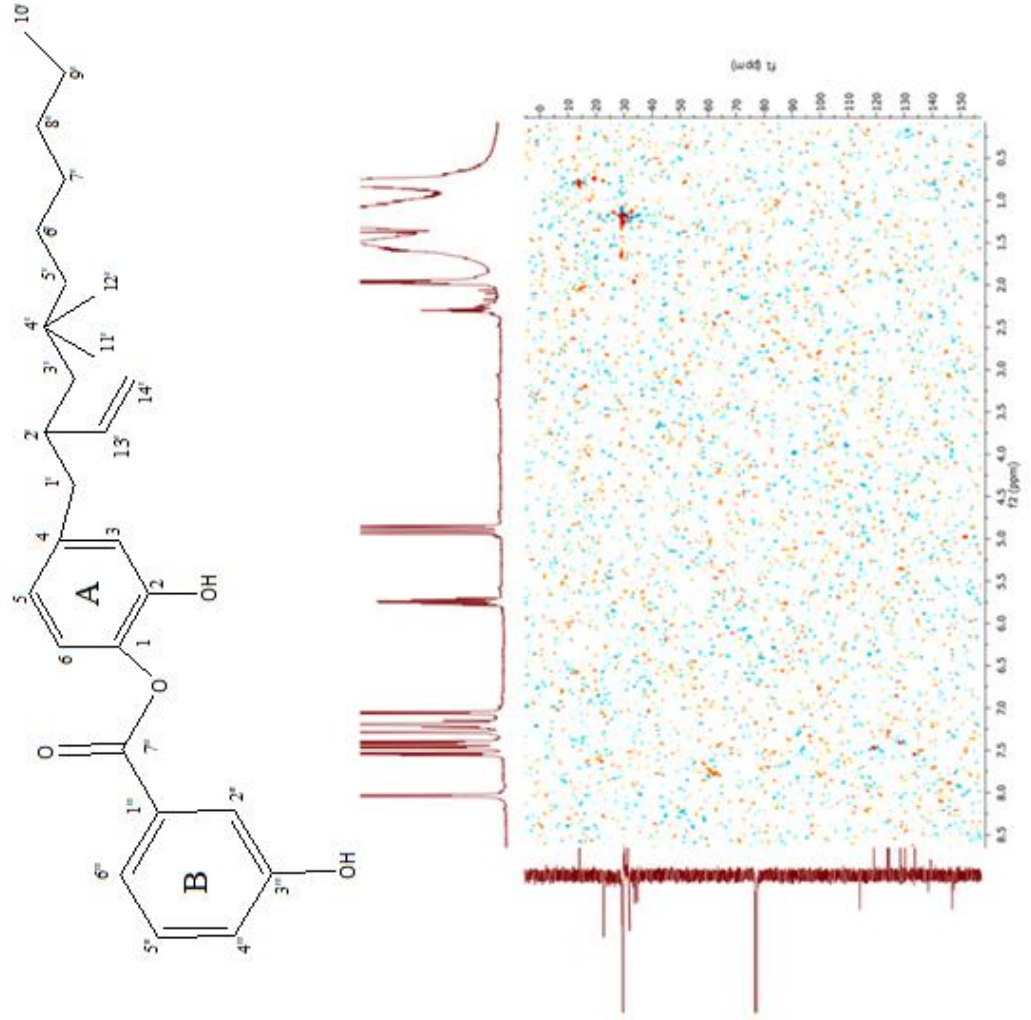
Şekil 4. 77. 5 Numaralı bileşiğin APT spektrumu (CDCl₃)



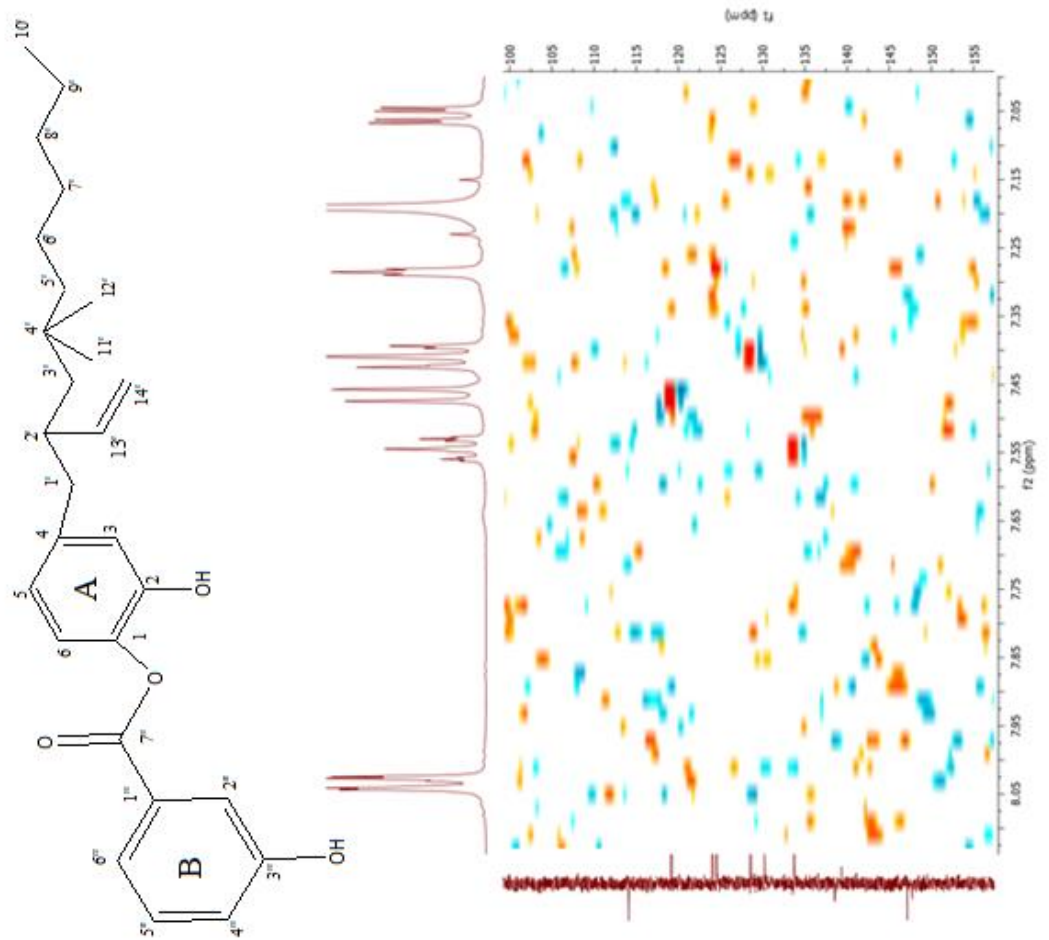
Şekil 4. 79. 5 Numaralı bileşiğin ^1H - ^1H COSY spektrumu



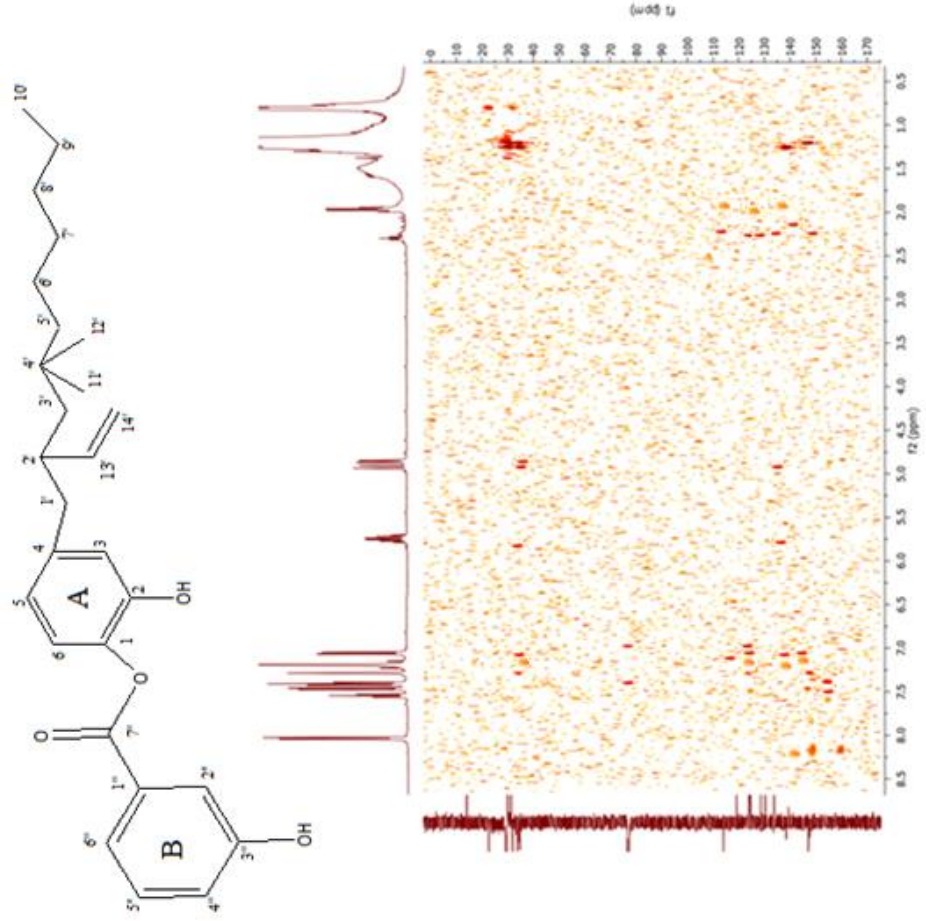
Şekil 4. 80. 5 Numaralı bileşiğin ^1H - ^1H COSY spektrumu



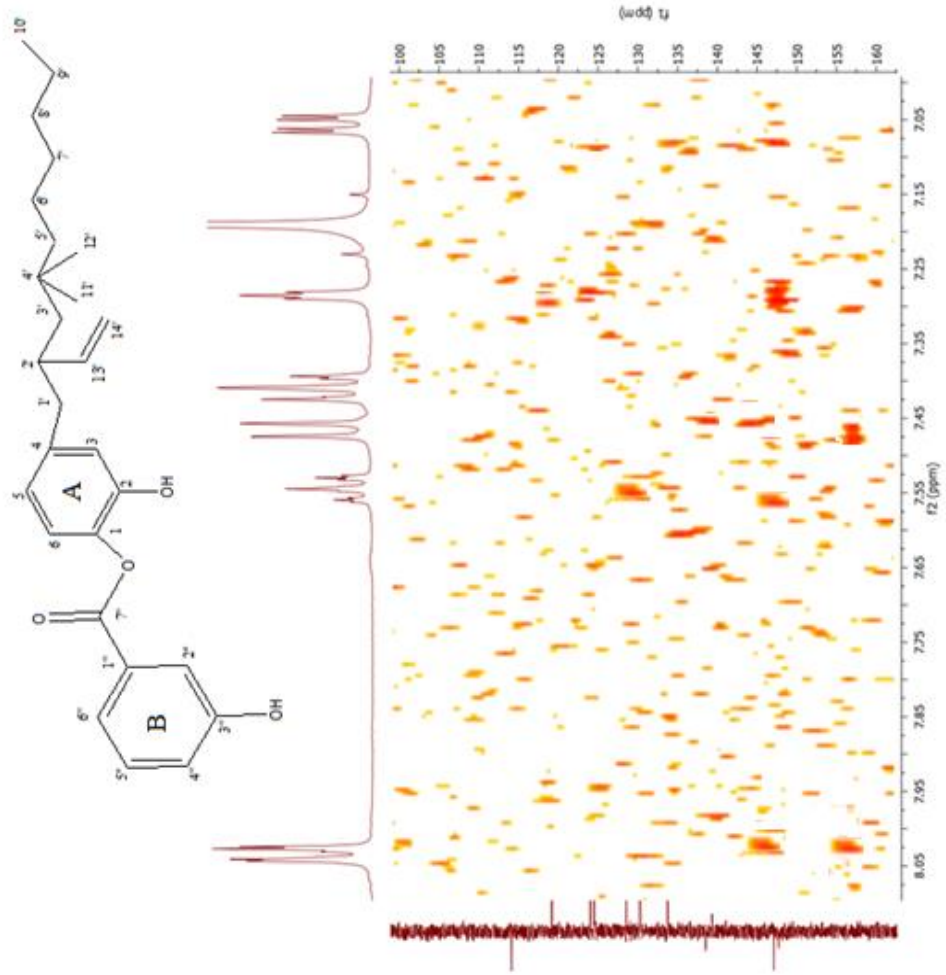
Şekil 4. 81. 5 Numaralı bileşiğin HSQC spektrumu



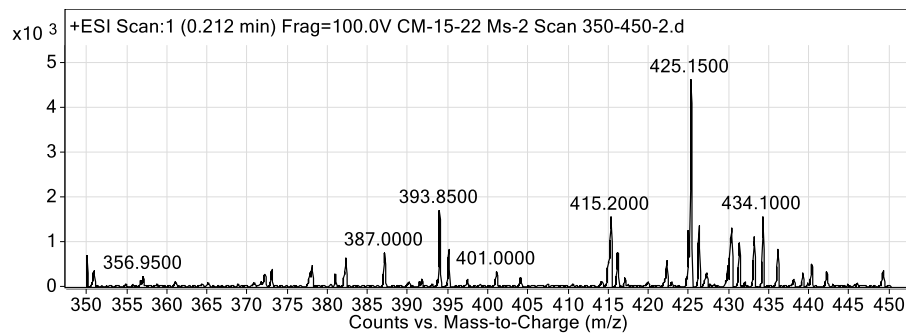
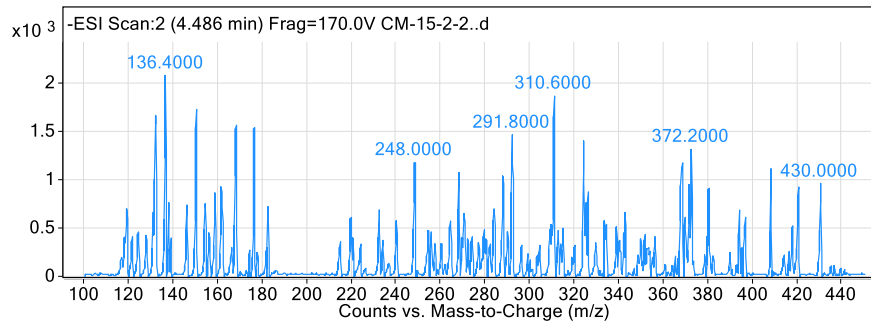
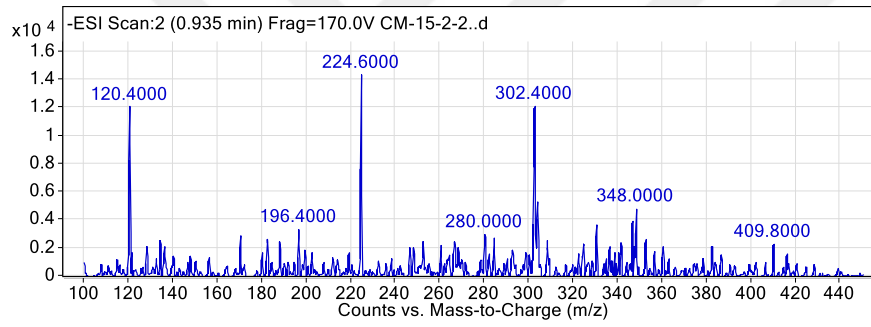
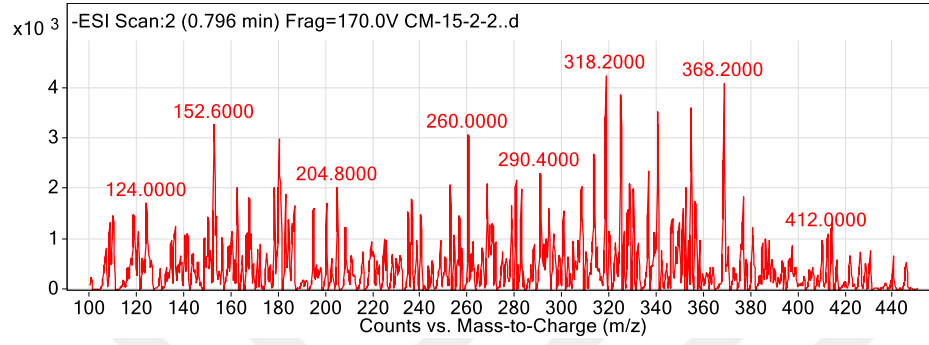
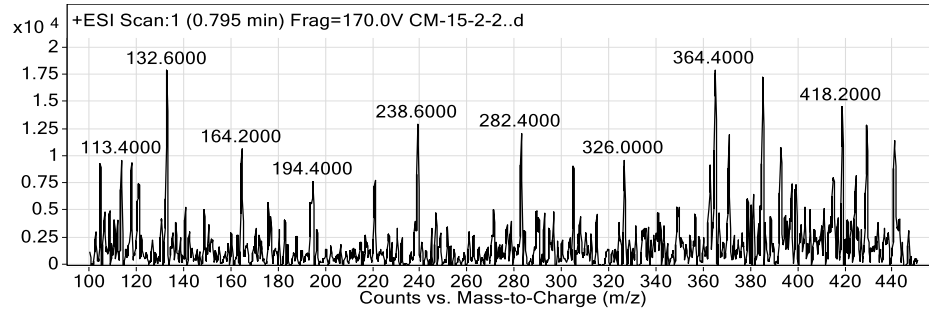
Şekil 4. 82. 5 Numaralı bileşiğin HSQC spektrumu



Şekil 4. 83. 5 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumu



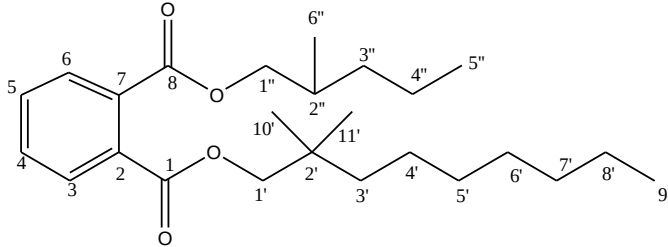
Şekil 4. 84. 5 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumu



Şekil 4. 85. 5 Numaralı bileşiğin ESI-MS spektrumu

4.2.2. Ftalik esterler

4.2.2.1. 6 Numaralı Bileşik (CM-9-1): Ftalik asit (2''-metil-pentil)-(2',2'-dimetil-nonil) esteri



Şekil 4. 86. Ftalik asit (2''-metil-pentil)-(2',2'-dimetil-nonil) esteri yapısı

6 Numaralı bileşik; beyaz renkli katı halde olup TLC plakasında 254 nm UV ışık altında görülmemiş, 366 nm UV ışık altında koyu mor renkli olarak görülmüştür. İlk önce NH₃ buharıyla muamele edilmiş, ardından NA belirteci püskürtülmüş ve 366 nm ışık altında koyu mor renginde değişme görülmemiştir. TLC çözücü sistemi olarak Hekzan:CHCl₃ (1:1) kullanılmıştır.

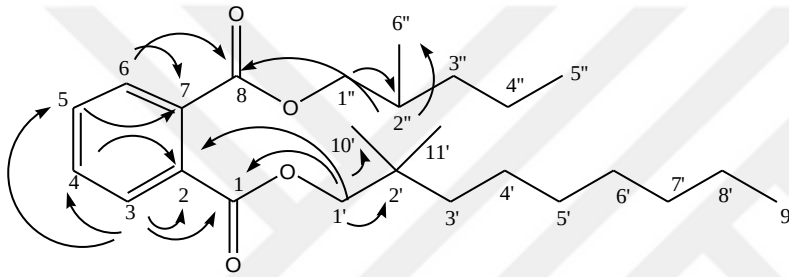
¹H NMR spektrumunda (CDCl₃, δ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.90; Şekil 4.91; Şekil 4.92; Şekil 4.93) bileşiğin 4.15 ppm'de (2H, *dd*, *J*= 10.9, 5.7 Hz, H-1'') ve 4.15 ppm'de (2H, *d*, *J*= 14.4 Hz, H-1') piklerinin gözlenmesi, 2 adet metilen oks (-CH₂O-) grubunun varlığını göstermiştir. 7.46 (2H, *dd*, *J*=3.3, 5.7 Hz, H-3/H-6) ve 7.63 (2H, *dd*, *J*= 3.3, 5.7 Hz, H-4/H-5) pikleri 1,2-disüstitüe aromatik halkayı göstermiştir.

¹³C NMR, APT ve HSQC spektrumları (CDCl₃, δ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.94; Şekil 4.95; Şekil 4.96; Şekil 4.97) 6 numaralı bileşiğin 25 karbon sinyalinden; 17'sinin sp³ karbonu, 6'sının aromatik karbon [132.51 (C-2, C-7), 130.92 (C-3, C-6), 128.85 (C-4, C-5)] ve 2'sinin ester karbonu [167.80 (C-1, C-8)] olduğunun kanıtıdır. sp³ hibritleşmesi yapan 17 karbon sinyali incelendiğinde, 11.00-68.20 ppm aralığında; 5 metil karbonu [11.00 (C-9'), 31.48 (C-10' ve C-11'), 14.08 (C-5''), 30.24 (C-6'')], 1 metin karbonu [38.78 (C-2'')], 1 kuarterner karbonu [31.97 (C-2')], 8 metilen karbonu [30.41, 29.74, 29.74, 29.71, 28.97, 23.80, 23.03, 22.75 (C-3', C-4', C-5', C-6', C-7', C-8', C-3'', C-4'')] ve oksijene bağlı 2 metilen karbonu [68.20 (C-1'', C-1')] gözlenmiştir.

¹H-¹H COSY spektrumunda (CDCl₃, δ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.98; Şekil 4.99; Şekil 4.100) aromatik halkada bulunan 7.46 ppm'deki (2H, *dd*, *J*= 3.3, 5.7 Hz) H-3 protonunun, 7.63

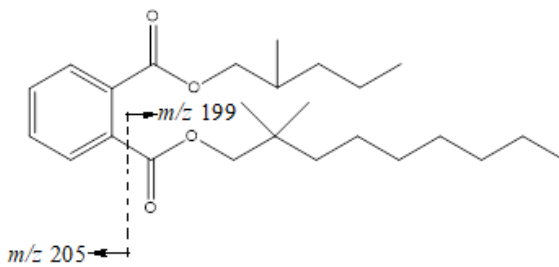
ppm'deki (2H, *dd*, $J = 3.3, 5.7$ Hz) H-4 protonuyla etkileşimi görülmüştür. Ayrıca 0.85 ppm'deki H-6" protonunun; 1.62 ppm'deki H-2" protonuyla ve 1.16-1.40 ppm aralığındaki metilen karbonlarıyla ilişkisi bulunmuştur.

6 numaralı bileşiğin HMBC spektrumuna (CDCl₃, δ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.101; Şekil 4.102; Şekil 4.103) bakıldığında 7.63 ppm'deki H-4 ve H-5 protonunun 167.80 ppm'deki C-1 ve C-8, 132.51 ppm'deki C-2 ve C-7, 130.92 ppm'deki C-3 ve C-6 karbonlarıyla etkileşimi gözlenmiştir. Ayrıca 4.15 ppm'deki H-1' ve H-1" protonu 167.80 ppm'deki C-1, 132.51 ppm'deki C-2 ve 22.75-30.41 ppm aralığındaki metilen karbonları ile etkileşimleri tespit edilmiştir. Diğer HMBC etkileşimleri, spektral datalar bölümünde ve Şekil 4.87'de gösterilmiştir.

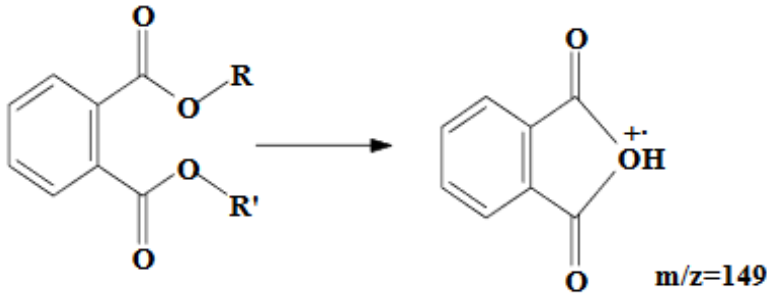


Şekil 4. 87. 6 Numaralı bileşiğin HMBC etkileşimleri

ESI-TOF-MS cihazıyla alınan kütle spektromunda (Şekil 4.104) moleküler iyon piki m/z 427 (45 %) molekül iyon piki $[M+Na]^+$ göstermiş ve bileşiğin C₁₂H₂₃O₂ kapalı formülüne sahip olduğunu kanıtlamıştır. Bileşiğin diğer parçalanma ürünlerinden, m/z 149 (60 %) [C₈H₅O₃]⁺ iyon piki molekülde ftalik ester grubunun varlığının kanıtıdır. Diğer önemli kütle parçalanması, 199 (45 %) [M-C₁₃H₁₇O₂]⁺ piki, aromatik halkadaki; [-COOCH₂C(CH₃)₂(CH₂)₆CH₃] grubunun varlığını göstermiştir. 6 numaralı bileşiğin kütle spektromunda gözlenen bölünmeler Şekil 4.88'da gösterilmiştir. Ayrıca ESI-TOF-MS iyonizasyonunda, ftalik esterlerin ana kütle bölünmesi Şekil 4.89'da verilmiştir (Rothenbacher ve ark. 2009).

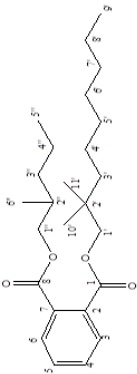


Şekil 4. 88. 6 numaralı bileşiğin kütle spektrumunda gözlenen bölünmeler

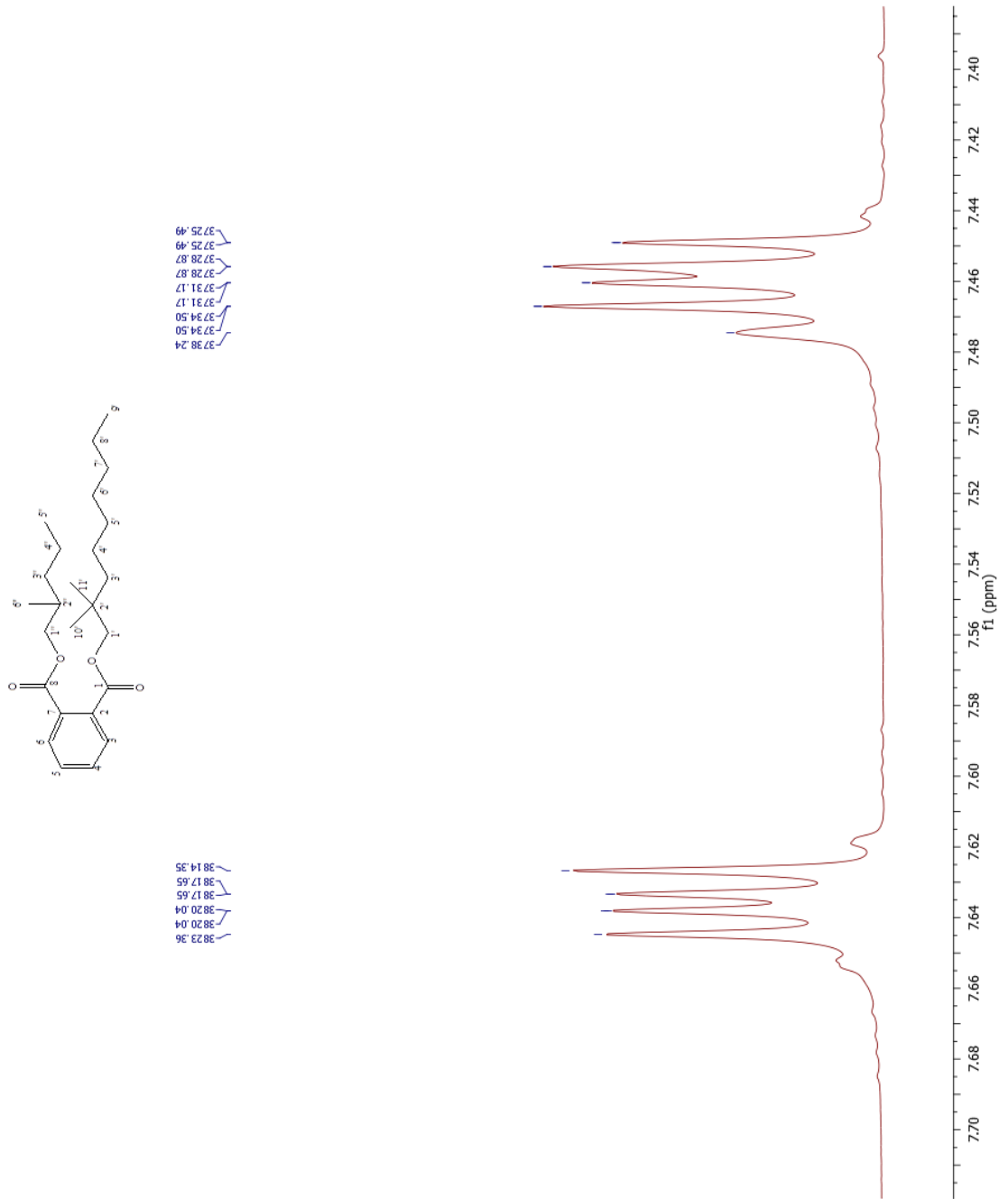


Şekil 4. 89. Ftalik esterlerin ana kütle bölünmesi

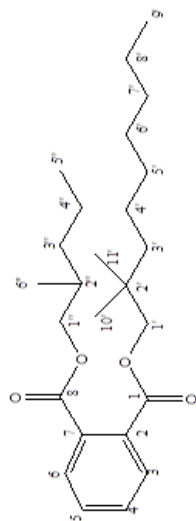
Tüm spektroskopik veriler ve yapılan literatür çalışmaları sonucunda 6 numaralı bileşiğin yapısının; ftalik asit (2''-metil-pentil)-(2',2'-dimetil-nonil) esteri olduğuna karar verilmiştir (Orjala 1998, Rothenbacher ve ark. 2009, Smaoui vb. 2012). Bu bileşik *C. creticum* bitkisinden ilk defa izole edilen bir bileşiktir.



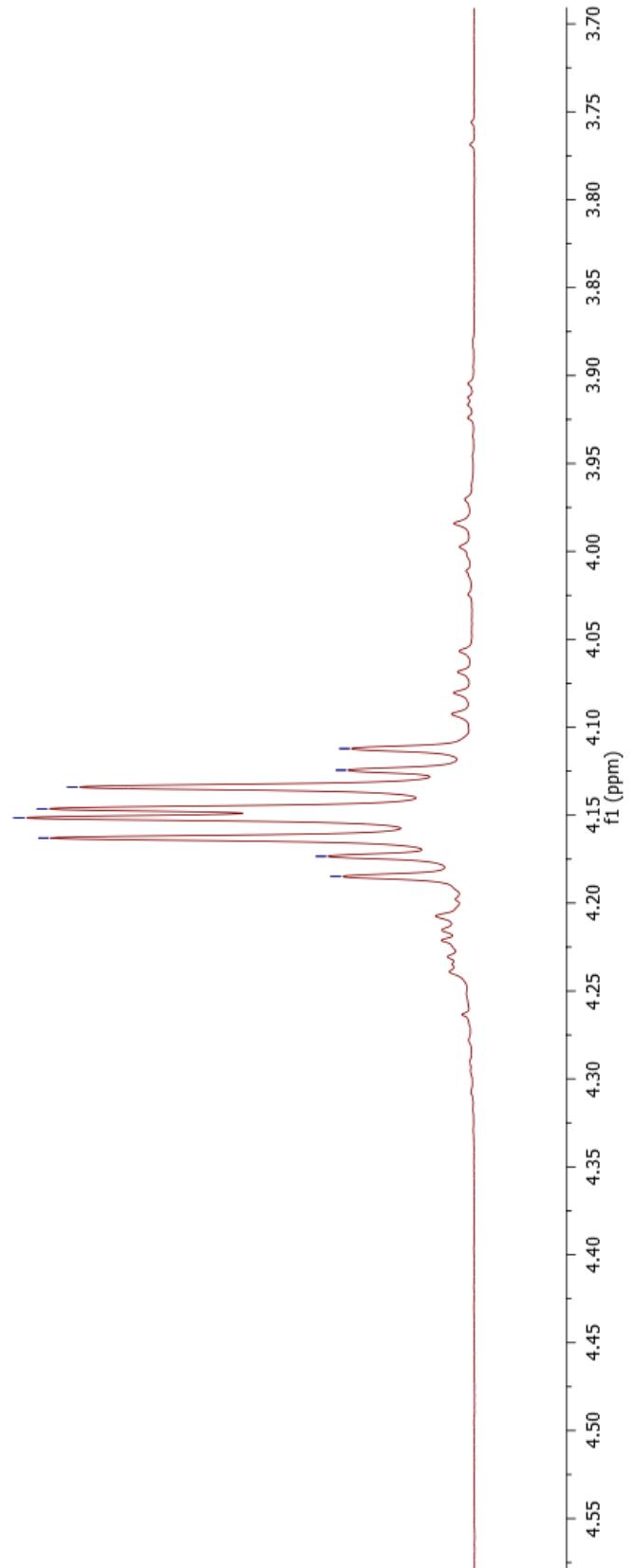
135



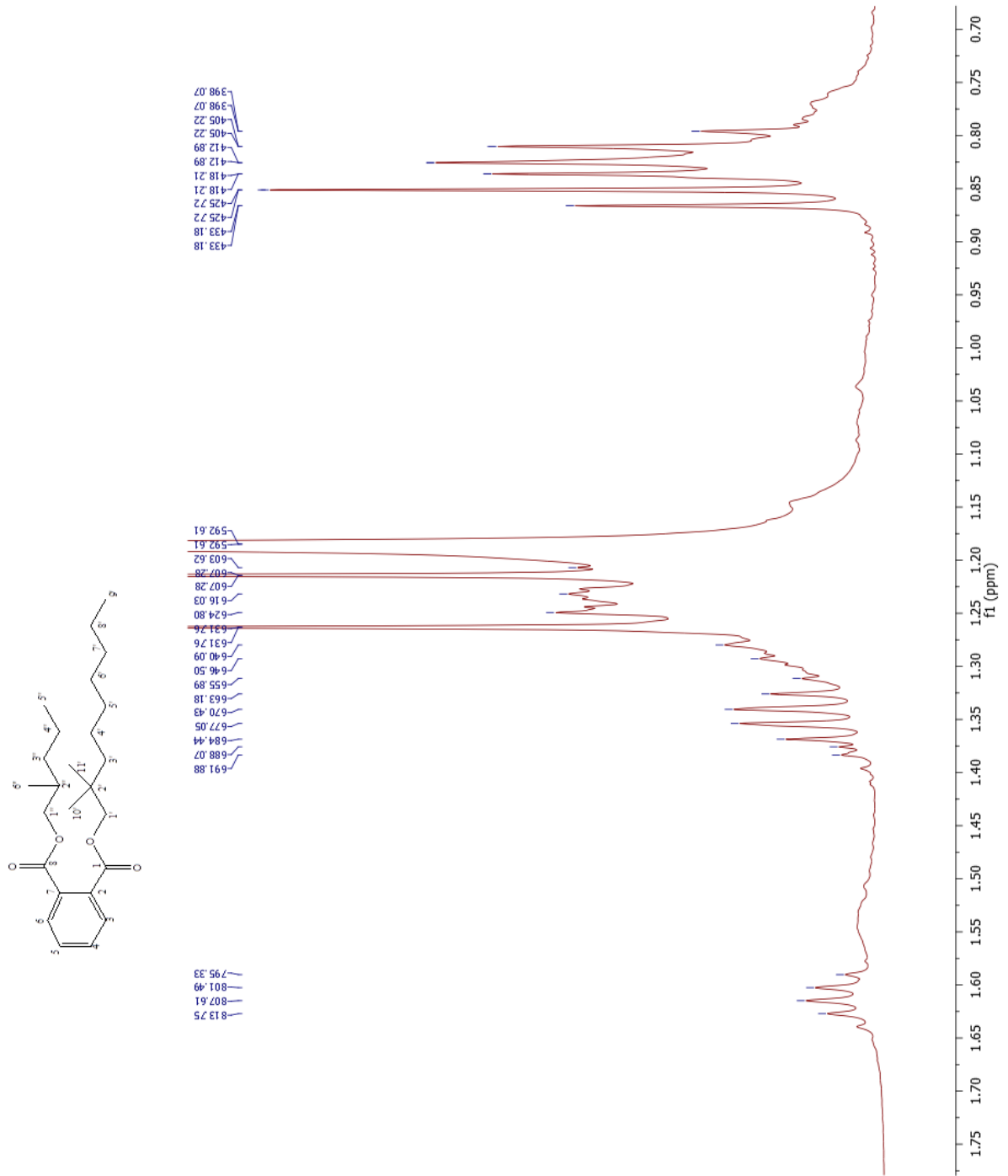
Şekil 4. 91. 6 Numaralı bileşiğin ^1H NMR spektrumu



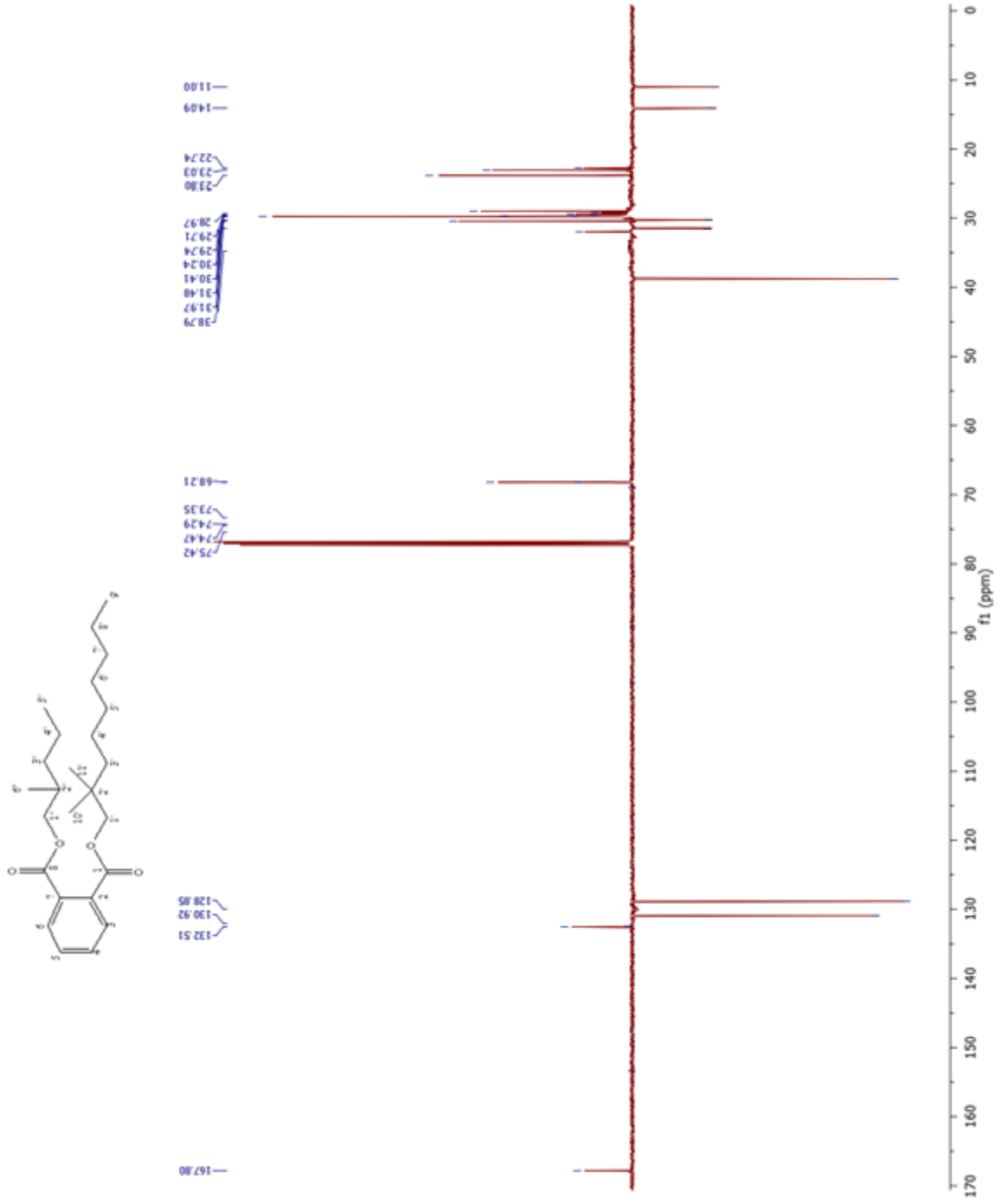
2092.99
2092.99
2087.25
2087.25
2082.04
2082.04
2076.29
2076.29
2073.75
2073.75
2067.57
2067.57
2062.75
2062.75
2056.61
2056.61



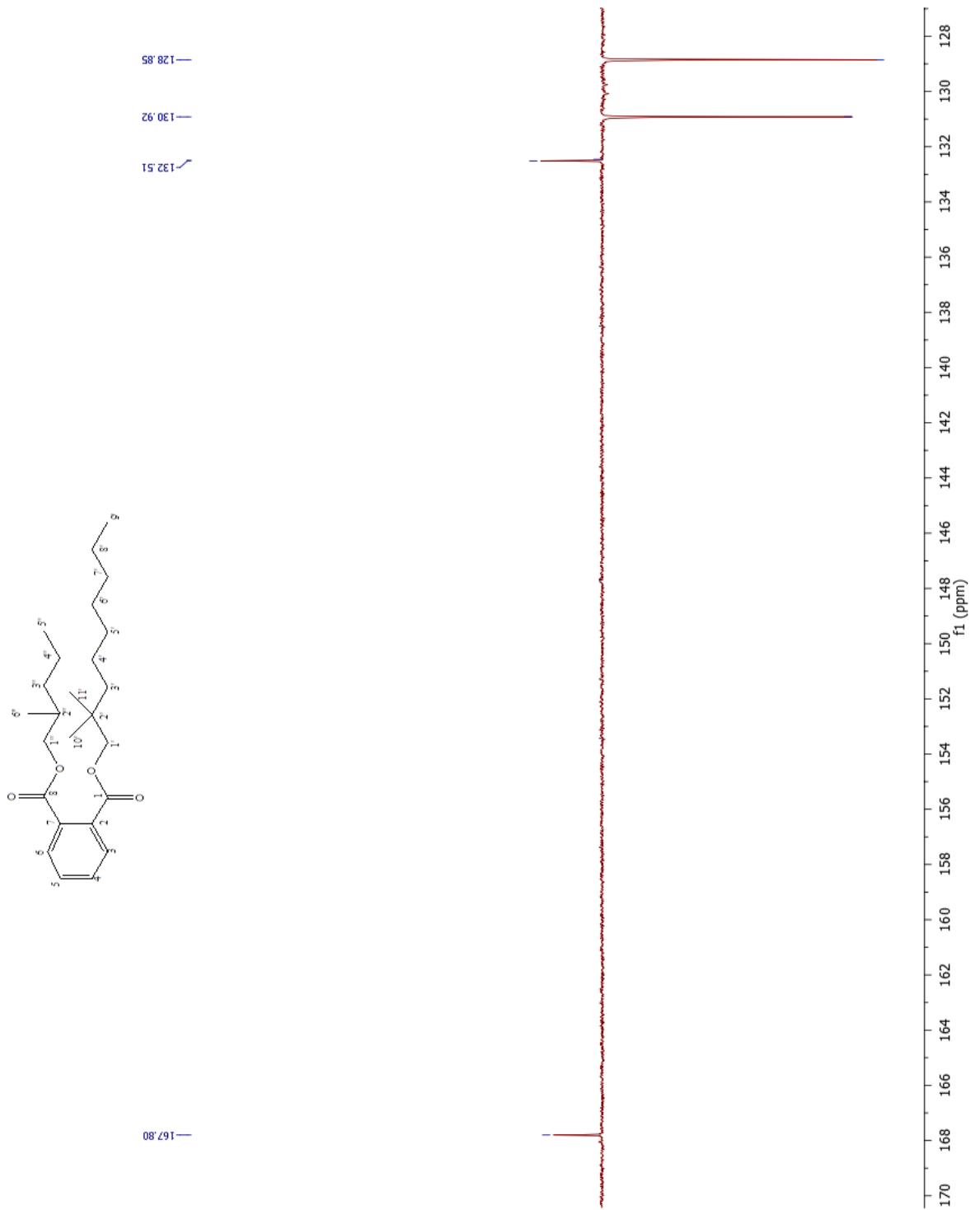
Şekil 4. 92. 6 Numaralı bileşiğin ^1H NMR spektrumu



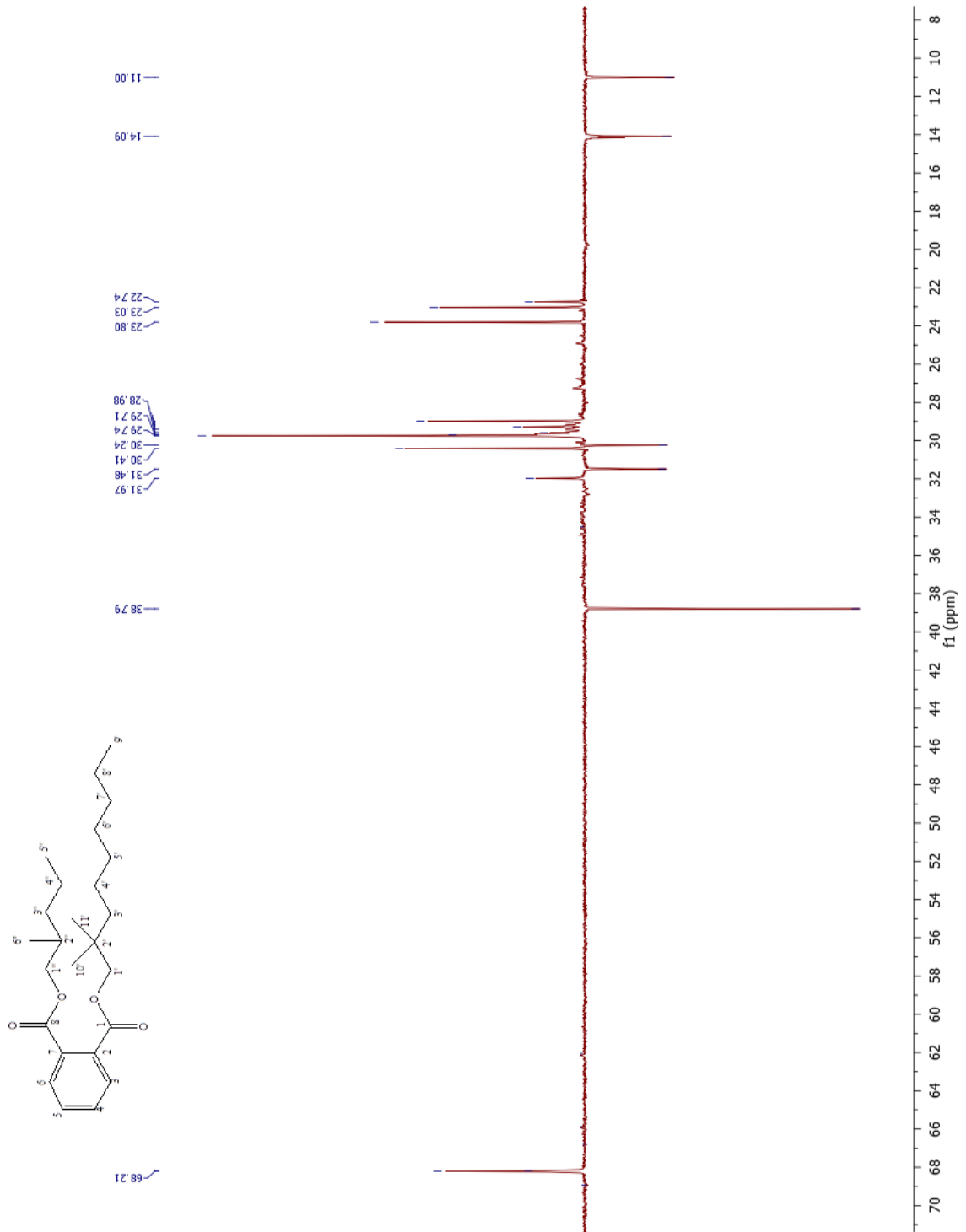
Şekil 4. 93. 6 Numaralı bileşiğin ^1H NMR spektrumu



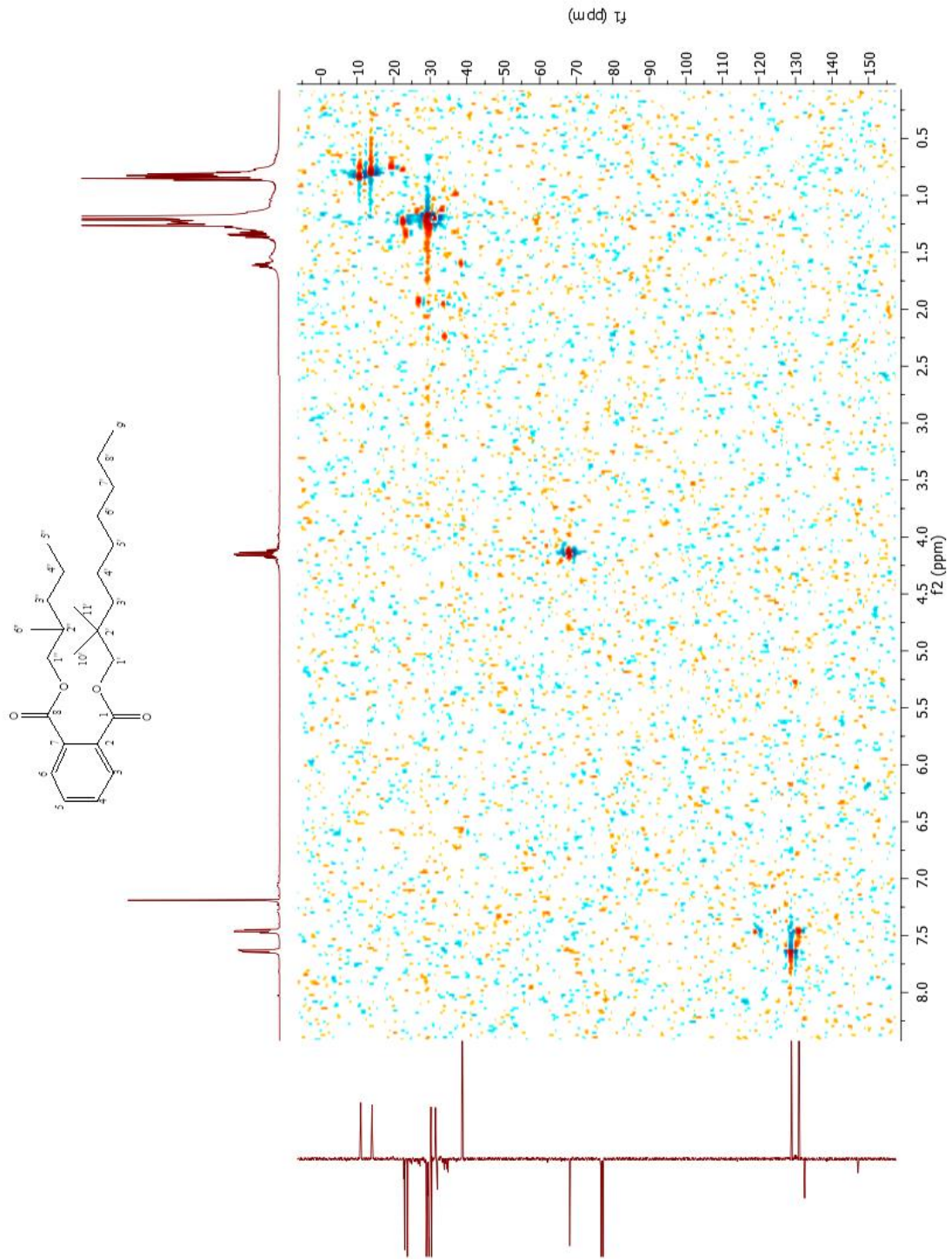
Şekil 4. 94. 6 Numaralı bileşiğin APT spektrumu (CDCl₃)



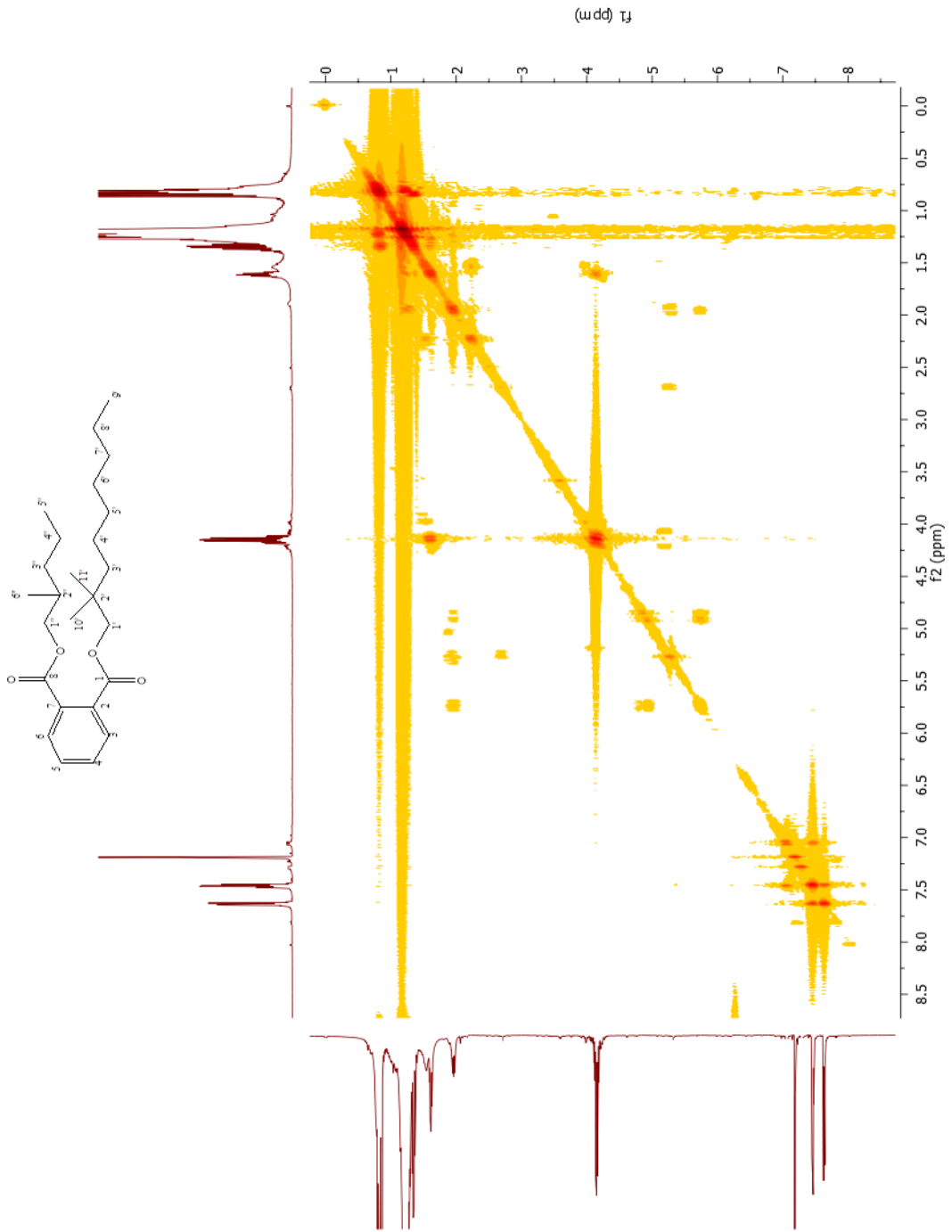
Şekil 4. 95. 6 Numaralı bileşiğin APT spektrumu (CDCl₃)



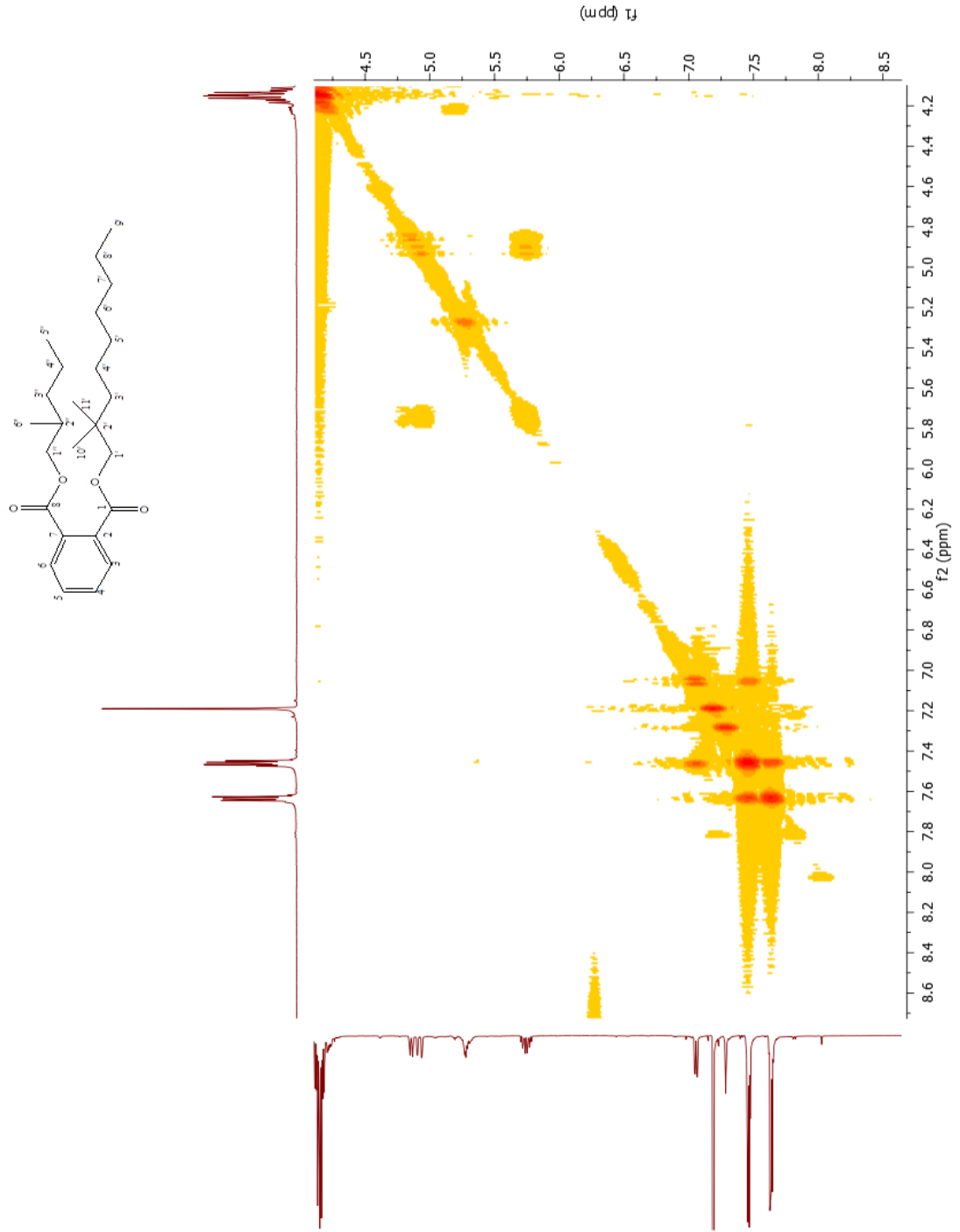
Şekil 4. 96. 6 Numaralı bileşiğin APT spektrumu (CDCl₃)



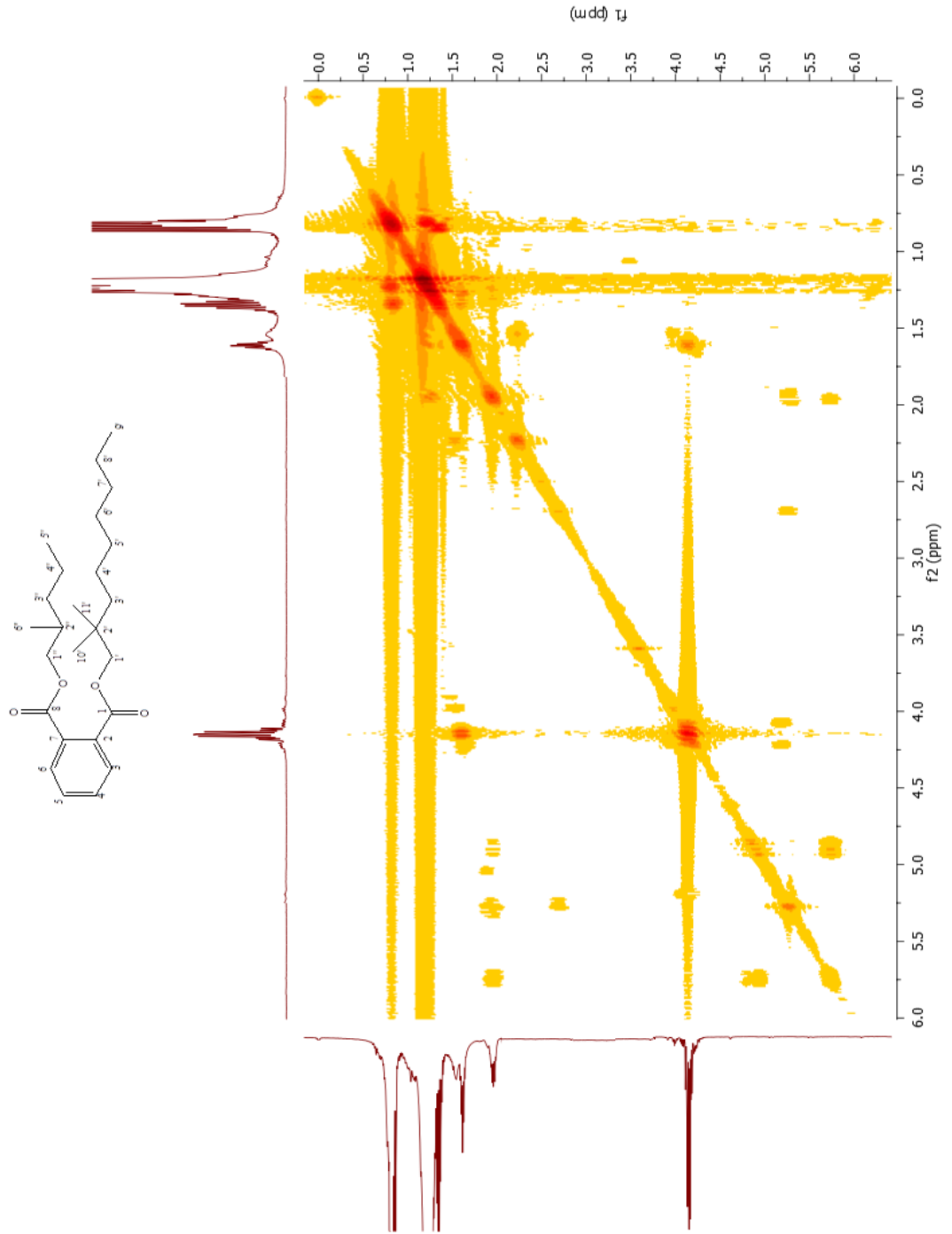
Şekil 4. 97. 6 Numaralı bileşiğin HSQC spektrumu



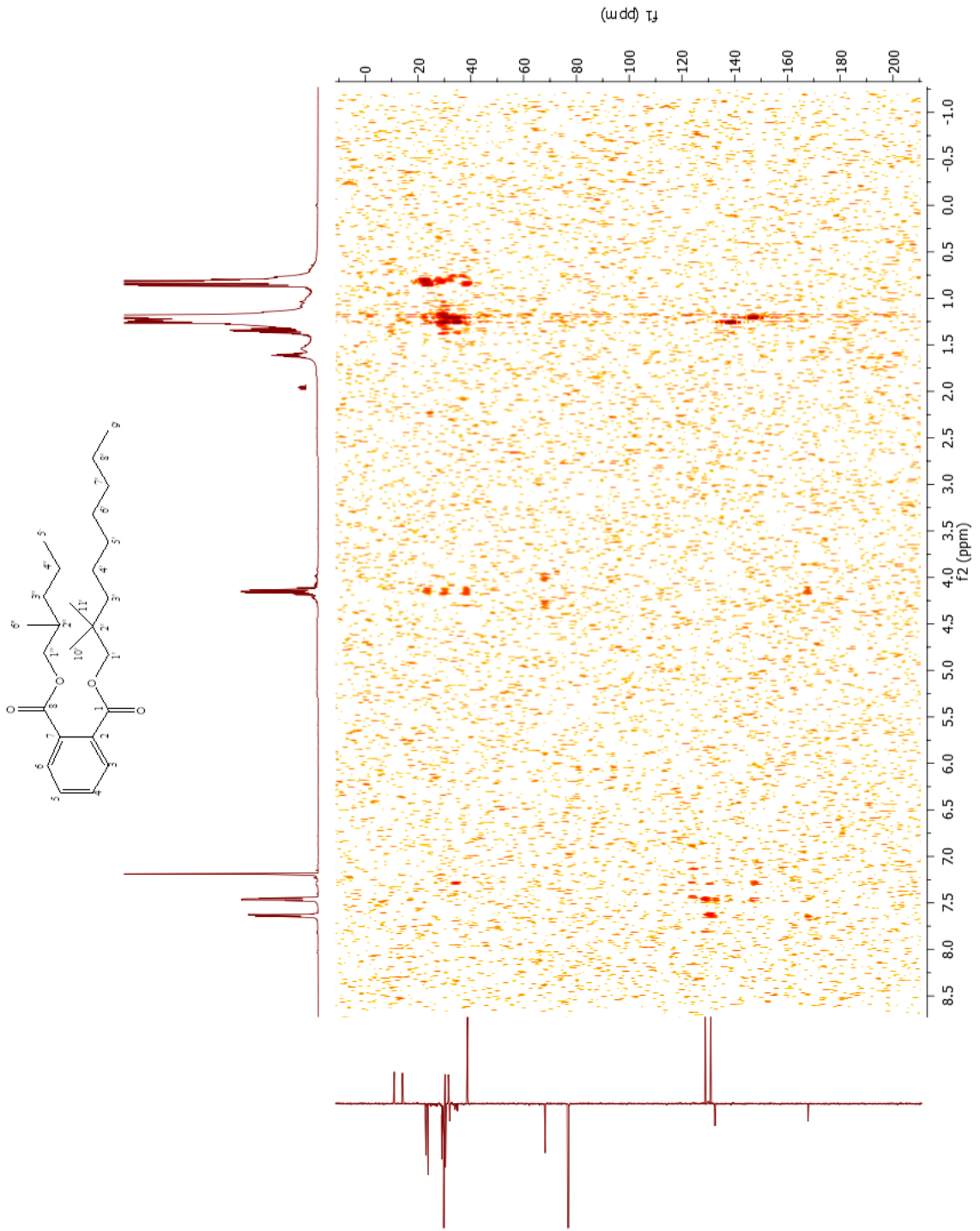
Şekil 4. 98. 6 Numaralı bileşiğin ^1H - ^1H COSYspektrumu



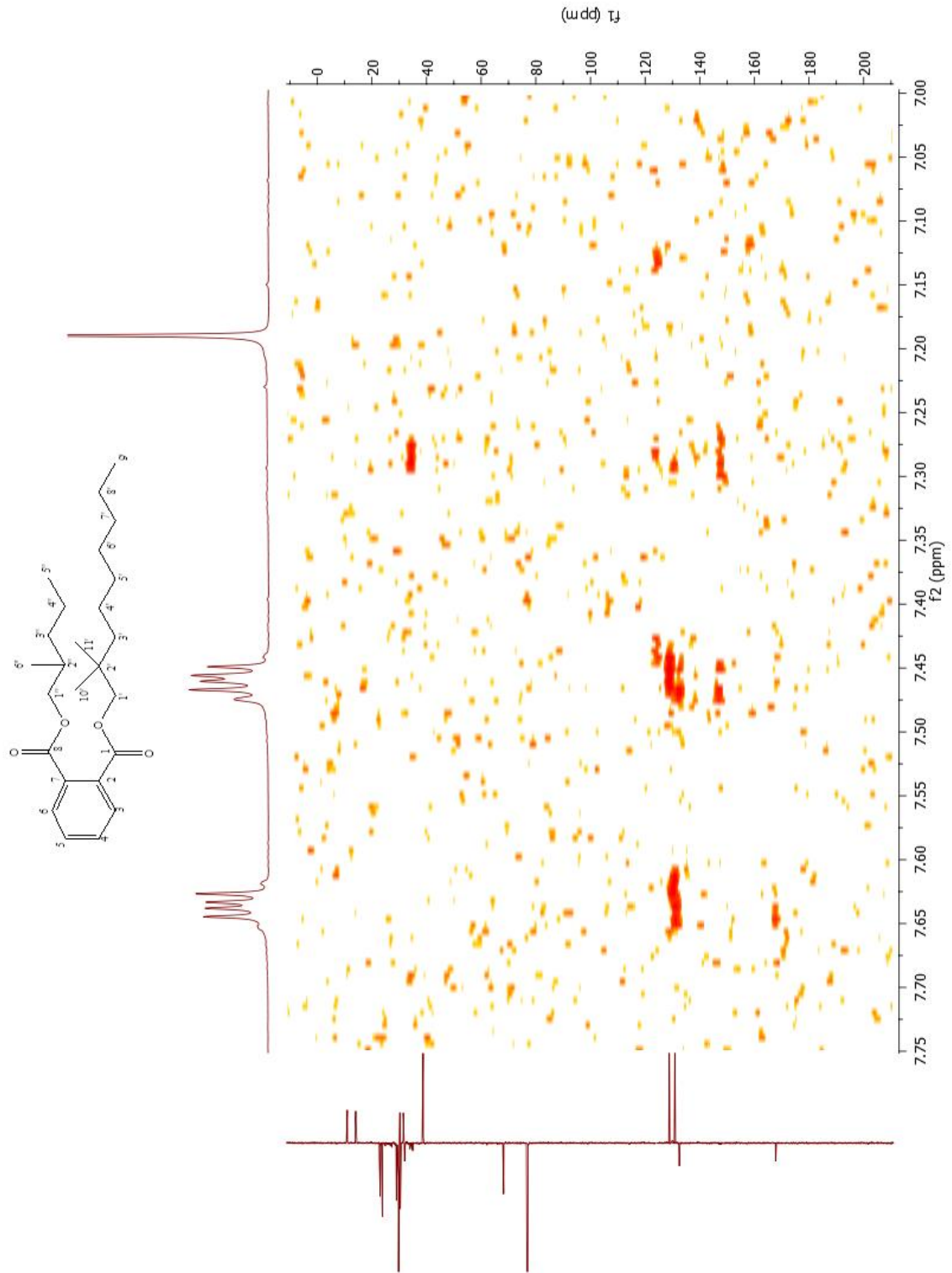
Şekil 4. 99. 6 Numaralı bileşiğin ^1H - ^1H COSYspektrumu



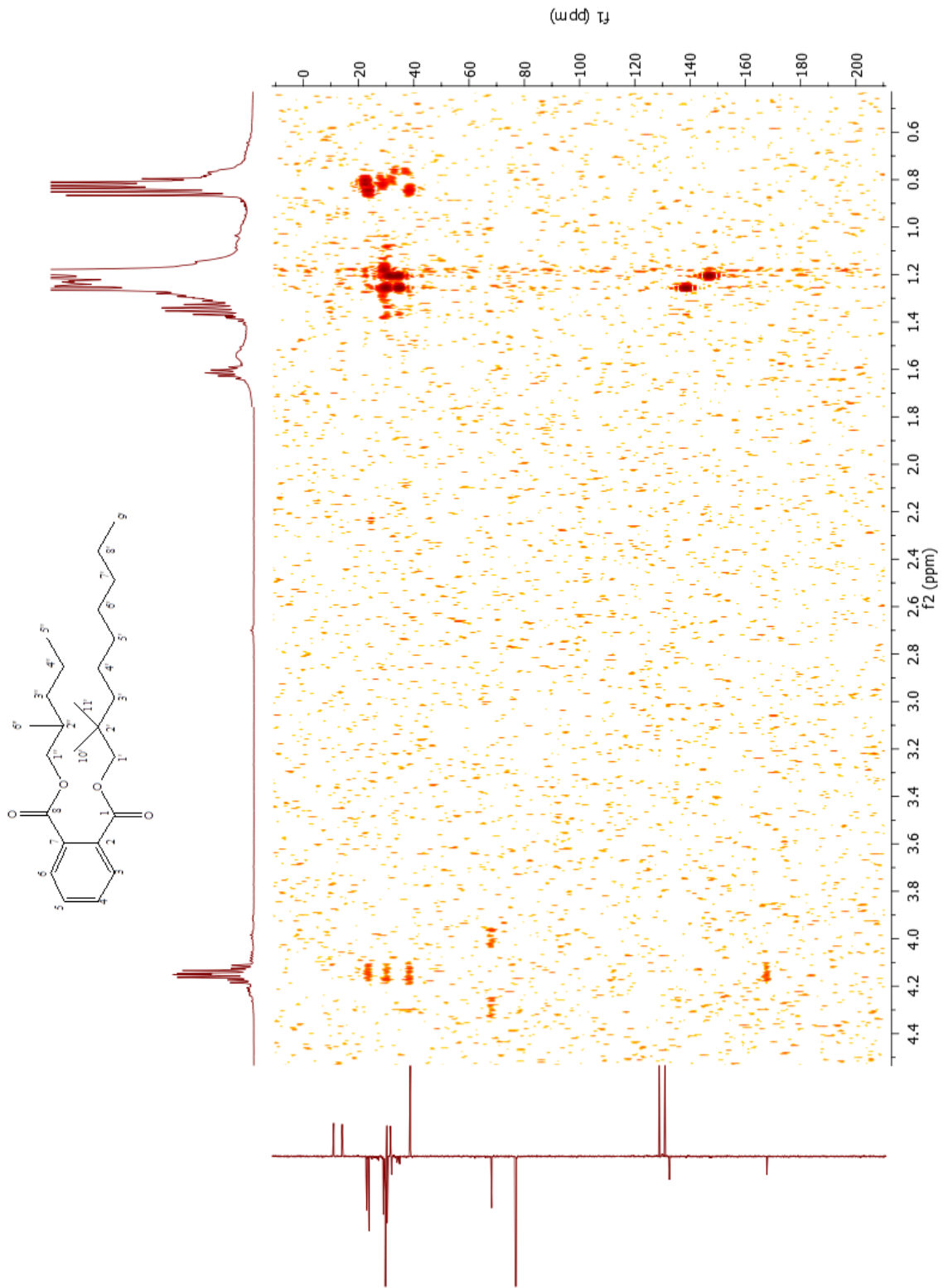
Şekil 4. 100. 6 Numaralı bileşiğin ^1H - ^1H COSYspektrumu



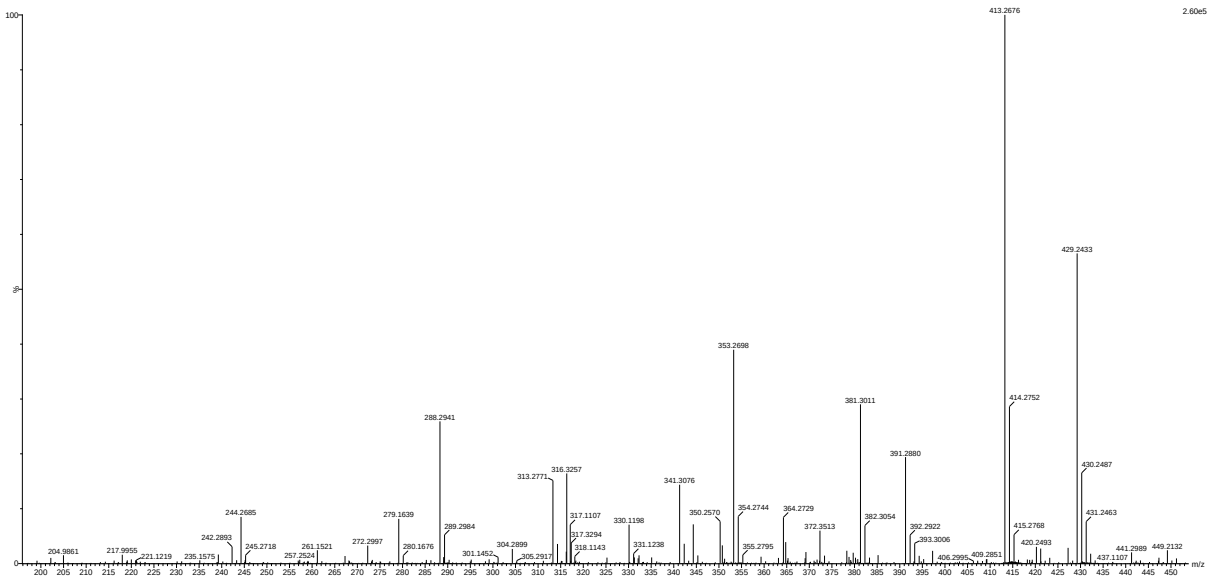
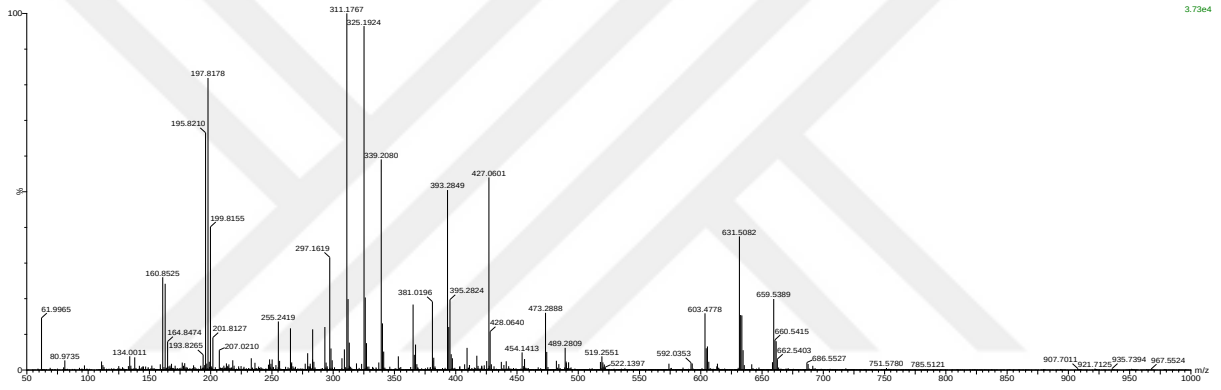
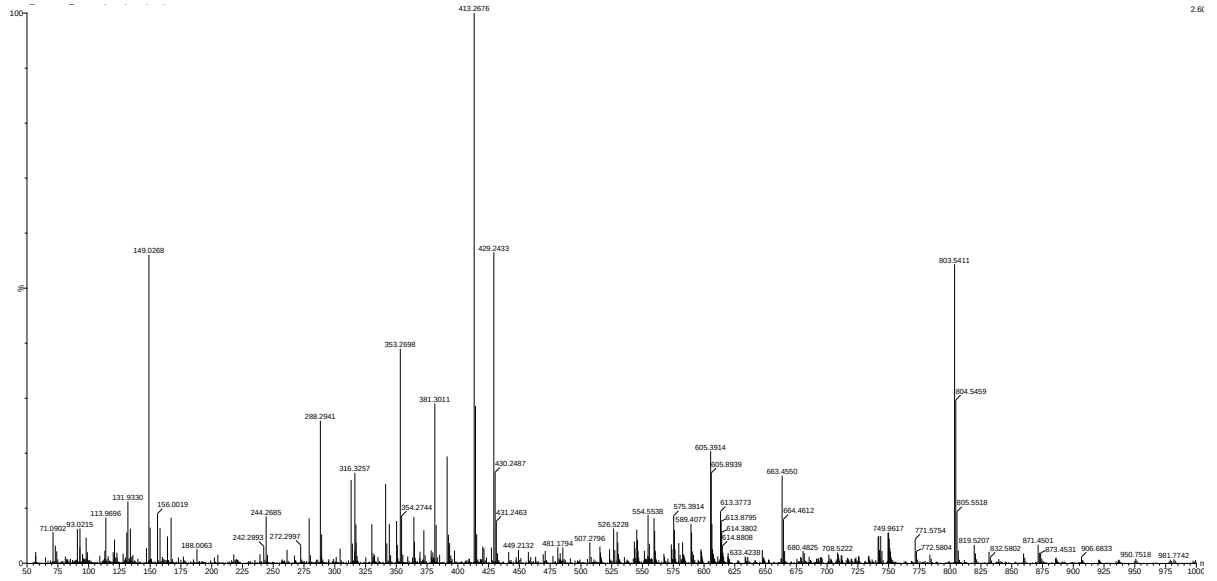
Şekil 4. 101. 6 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumu



Şekil 4. 102. 6 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumu



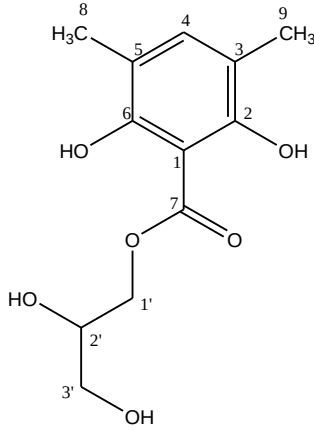
Şekil 4. 103. 6 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumu



Şekil 4. 104. 6 Numaralı bileşiğin LC-QTOF/MS spektrumu

4.2.3. Fenolik Asit Esterleri (Resorsinolik Asit Esterleri)

4.2.3.1. 7 Numaralı Bileşik (CM-3-1): (2'-3'-dihidroksipropil)-2,6-dihidroksi-3,5-dimetil benzoat



Şekil 4. 105. (2'-3'-dihidroksipropil)-2,6-dihidroksi-3,5-dimetil benzoat

7 numaralı bileşik; beyaz renkli katı halde olup TLC plakasında 254 nm UV ışık altında görünmemiş, 366 nm UV ışık altında mavi renkli olarak görünmüştür. İlk önce NH_3 buharıyla muammele edilmiş, ardından NA belirteci püskürtülmüş ve 366 nm ışık altında renginde değişme gözlenmemiştir. TLC çözücü sistemi olarak CHCl_3 kullanılmıştır.

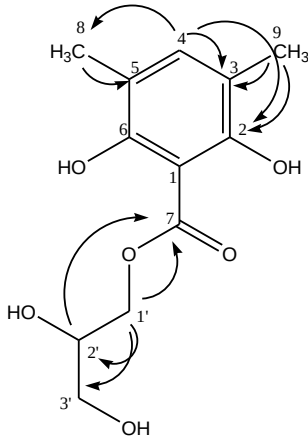
^1H NMR spektrumunda (CDCl_3 , δ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.108; Şekil 4.109) bileşiğin 8.15 ppm'de (1H, s, H-5) bir aromatik proton gözlenmiştir. Ayrıca 4.65 ppm (2H, dd, J = 4.5, 8.6 Hz, H-1'), 4.54 ppm (1H, dd, J = 5.4, 10.8 Hz, H-2'), 4.33 ppm (1H, dd, J = 5.8, 10.9 Hz, H_a -3') ve 4.31 ppm'de (1H, t, J = 5.63 Hz, H_b -3') oksijene komşu 1 metin (H-2'), 2 metilen (H-1' ve H-3') protonu gözlenmiştir. 2.1 ppm (6H, s, H-8 ve H-9) gözlenen singlet piklerde aromatik halkaya bağlı metil gruplarının (H-8 ve H-9) varlığını göstermiştir.

^{13}C NMR, APT ve HSQC spektrumlarında (CD_3OD , δ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.110; Şekil 4.111) 154.61 ppm'de (C-2 ve C-6) oksijene bağlı 2 aromatik karbon, 170.98 ppm'de (C-7) karbonil karbonu tespit edilmiştir. 67.81 ppm'de (C-1'), 80.99 ppm'de (C-2'), 67.78 ppm'de (C-3') oksijene bağlı karbonlar gözlenirken, 24.04 ppm'de (C-8 ve C-9) aromatik halkaya bağlı metil karbonları tespit edilmiştir.

^1H - ^1H COSY spektrumunda (CDCl_3 , δ (ppm), 500 MHz) ise H-1', H-2' ve H-3' protonlarının arasındaki etkileşim, sağlamıştır.

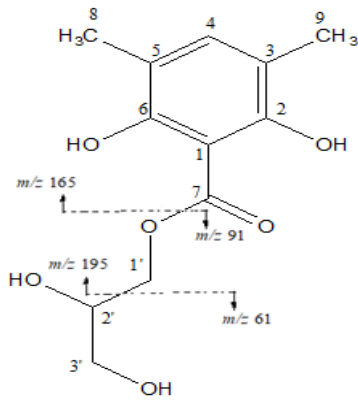
7 numaralı bileşiğin HMBC spektrumundaki (CDCl_3 , δ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.112; Şekil 4.113) etkileşimler aşağıdaki Şekil 4.106'de gösterilmiştir. Spektrumunda gözlenen

HMBC etkileşimler, (2',3'-di hidroksi propil) format grubunun, C-1 konumundan aromatik halkaya bağlı olduğunu kanıtlamıştır.



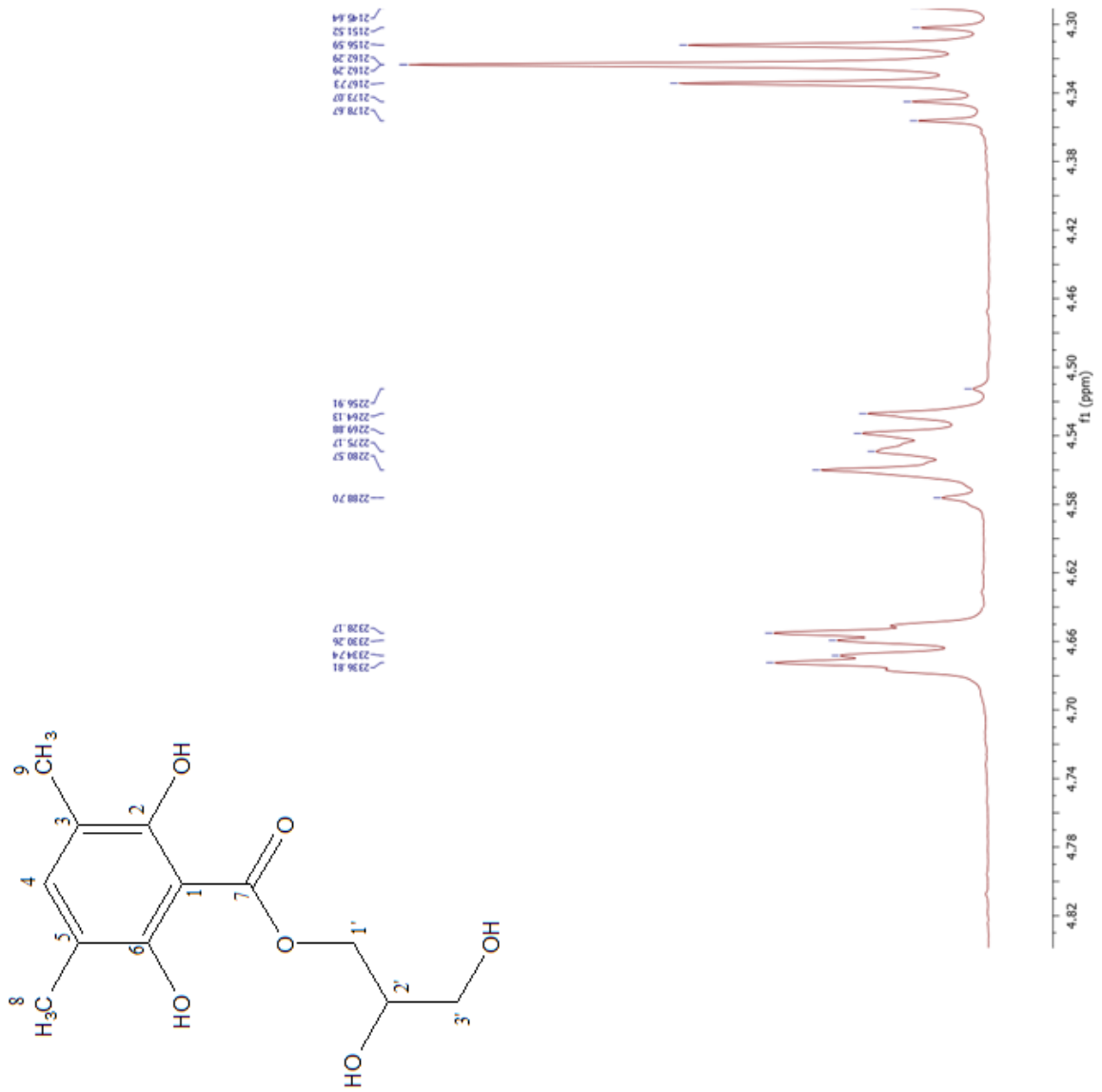
Şekil 4. 106. 7 Numaralı bileşiğin HMBC etkileşimleri

Bileşiğin LC-QTOF-MS cihazıyla alınan kütle spektromunda (Şekil 4.114) moleküler iyon piki m/z 256 $[M]^+$ (%40) pikinin gözlenmesi ile bileşiğin kapalı formülünün $C_{12}H_{16}O_6$ olduğunu göstermiştir. Molekülün diğer önemli parçalanma ürünleri m/z 213 (%76) $[(M+Na)-2xCH_3-2xH_2O]^+$ piki, moleküldeki 2 hidroksil ve 2 metil grubunun varlığını, m/z 165 (%8) $[M-(O-CH_2CH(OH)CH_2OH)]^+$ piki, moleküldeki bir benzoil grubunun varlığını gösterirken; m/z 62 (%60) $[(M-1-(C_{10}H_{11}O_4))]$ piki moleküldeki glikol yapısını desteklemiştir. 7 numaralı bileşiğin kütle spektromunda gözlenen bölünmeler Şekil 4.107’de gösterilmiştir.

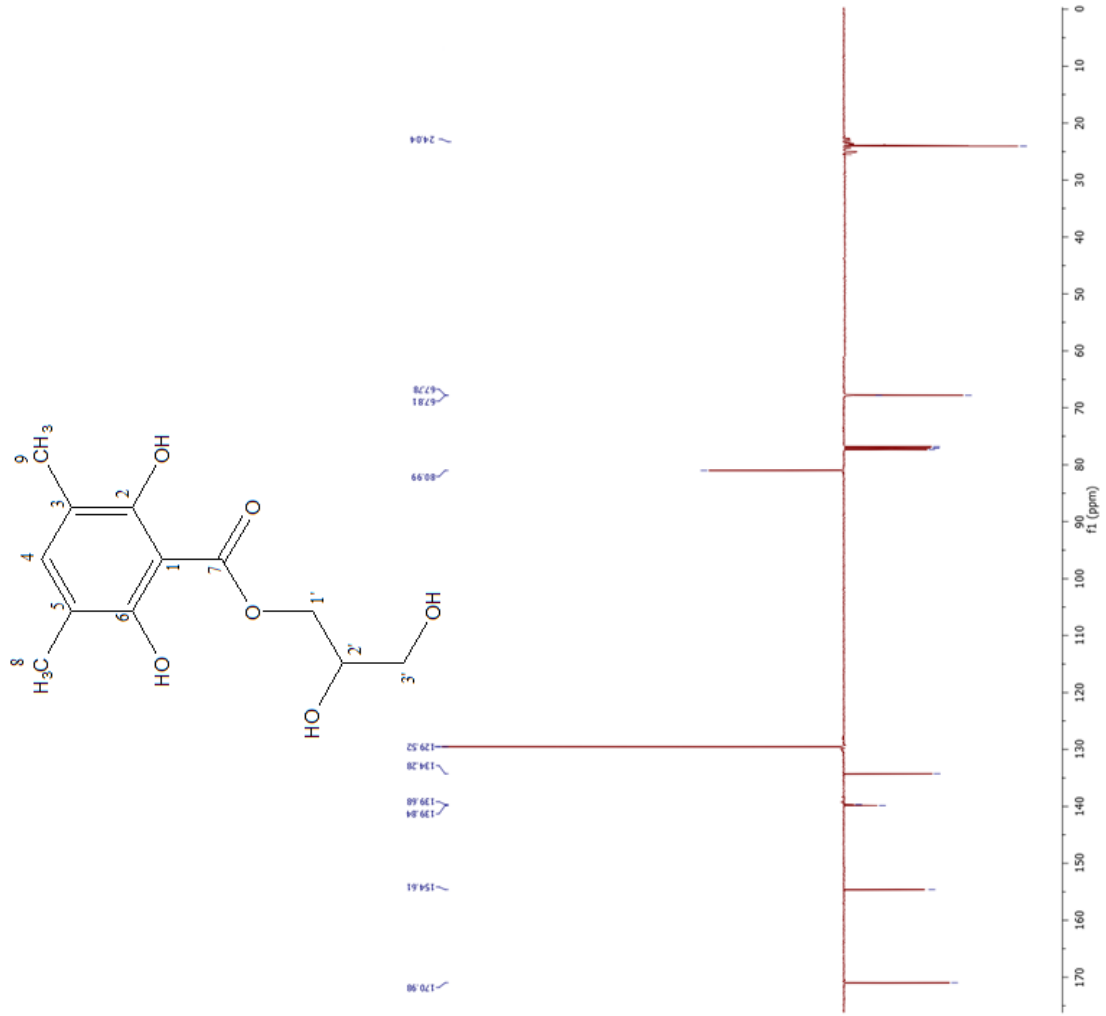


Şekil 4. 107. 7 numaralı bileşiğin kütle spektromunda gözlenen bölünmeler

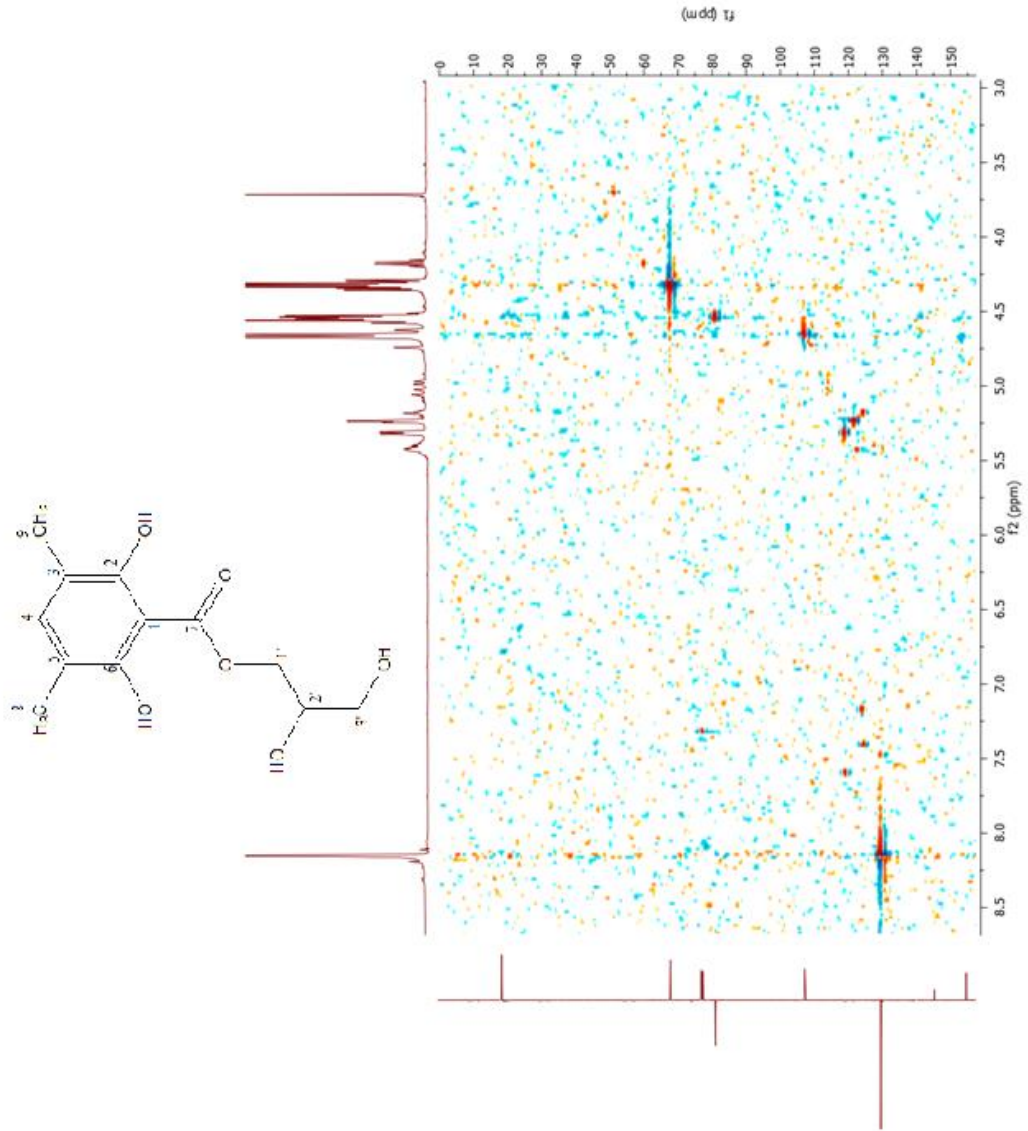
Bu bulgular, literatür araştırmaları ile kıyaslanarak, bileşiğin (2'-3'-dihidroksipropil)-2,6-dihidroksi-3,5-dimetil benzoat isimli fenolik asit esteri olduğunu kanıtlamıştır (Fujita ve ark. 1984, Ahad vd. 1991, Kumar ve ark. 2003, Saito vd. 2004). Bu bileşik *C. creticum* bitkisinden ilk defa izole edilen bir bileşiktir.



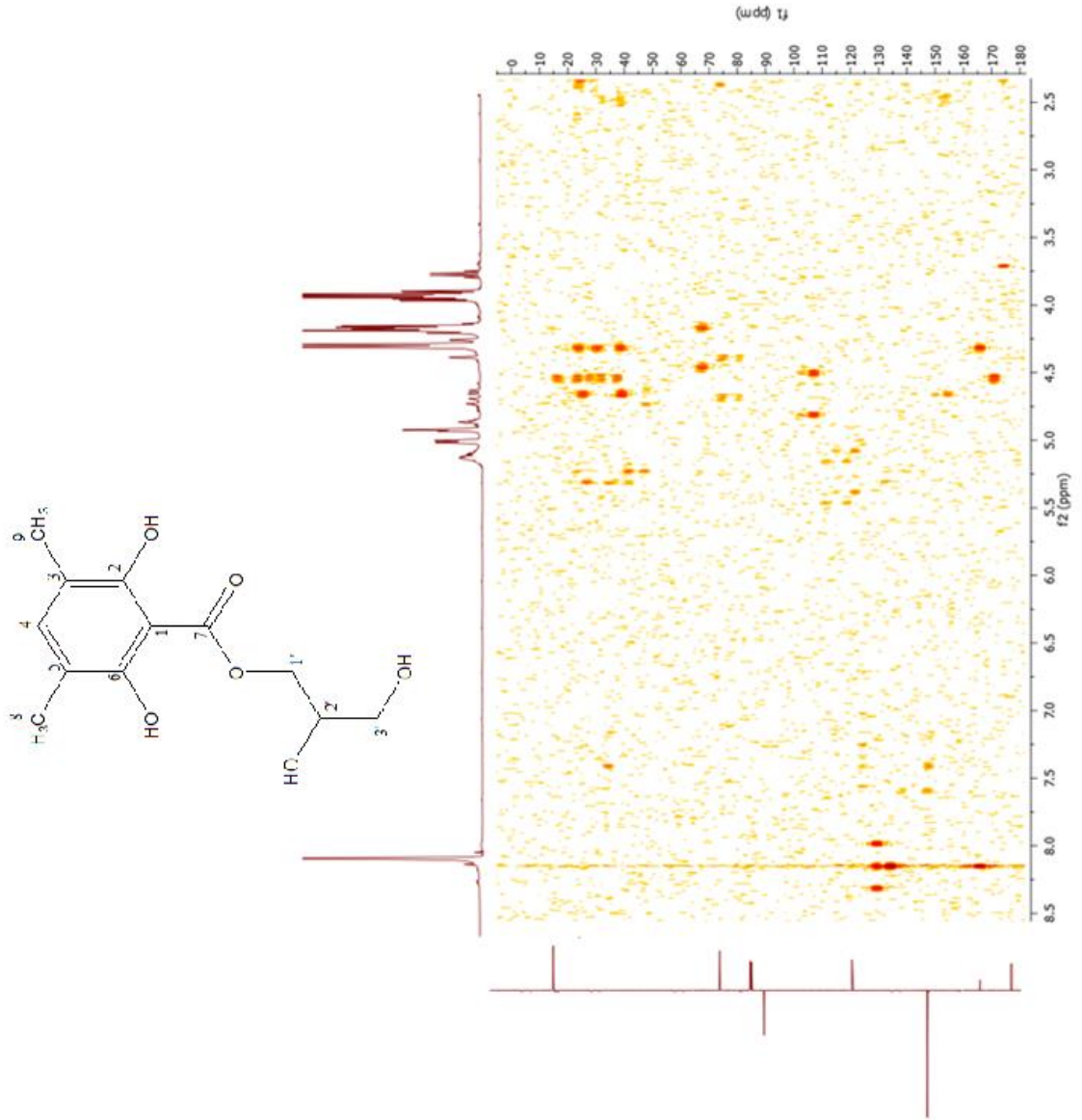
Şekil 4. 109. 7 Numaralı bileşiğin ^1H NMR spektrumu



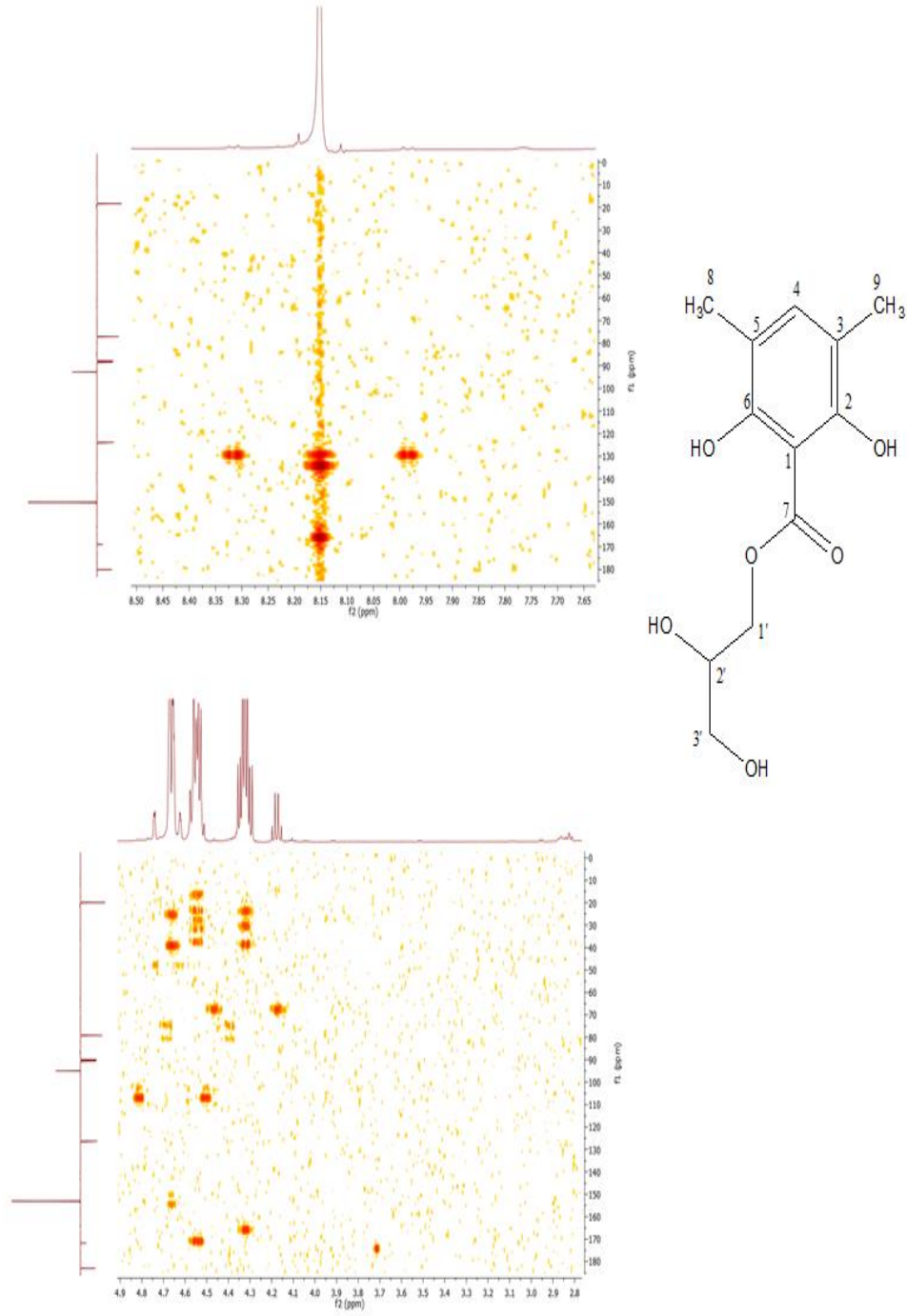
Şekil 4. 110. 7 Numaralı bileşiğin APT spektrumu (CD₃OD)



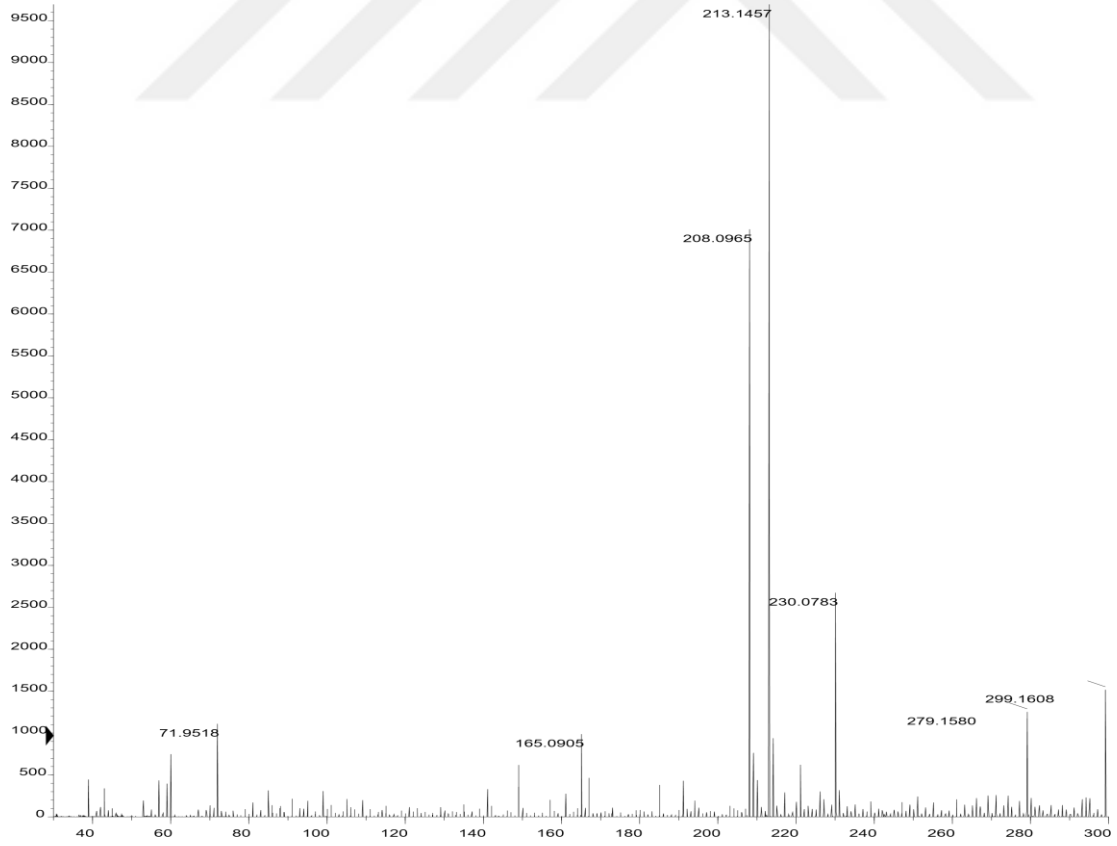
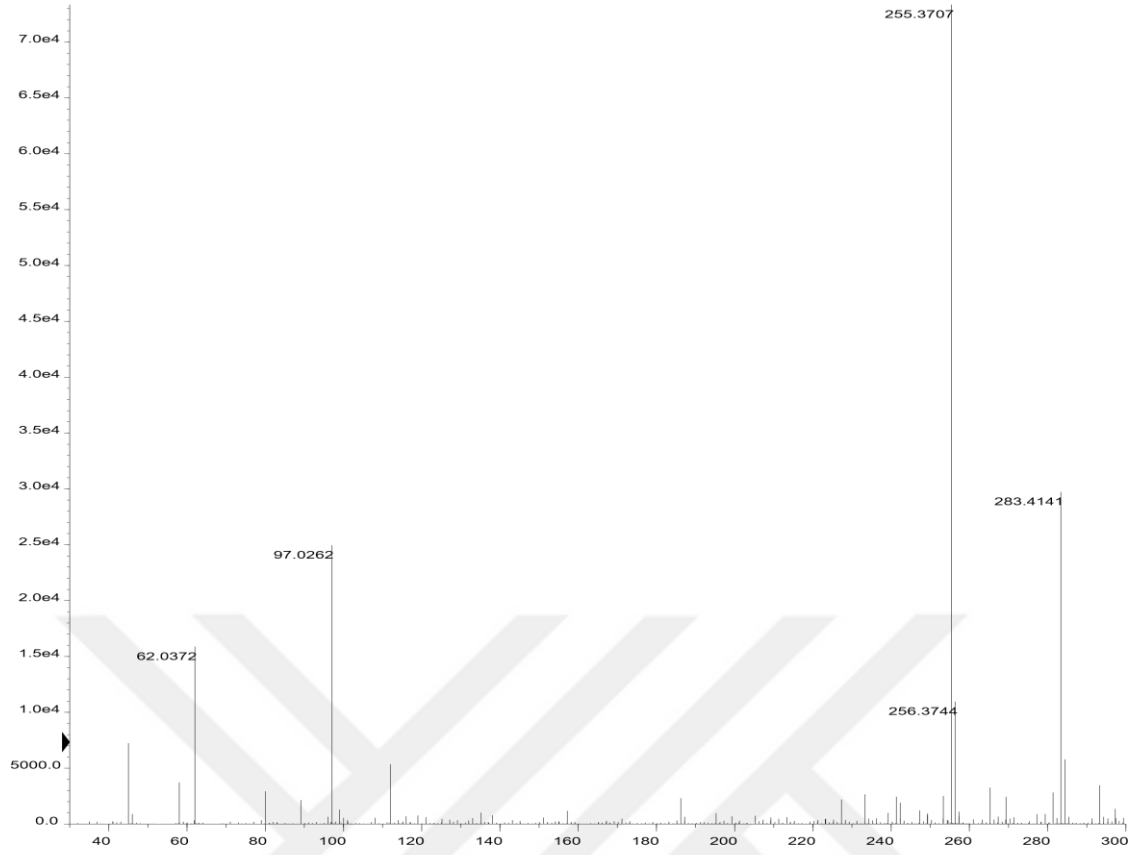
Şekil 4. 111. 7 Numaralı bileşiğin HSQC spektrumu



Şekil 4. 112. 7 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumu



Şekil 4. 113. 7 Numaralı bileşiğin HMBC spektrumları



Şekil 4. 114. 7 Numaralı bileşiğin LC-QTOF spektrumları

4.3. Elde Edilen Bileşiklerin Spektral Özellikleri

4.3.1. 1 Numaralı Bileşik CM-13-1-1-2

¹H NMR (CDCl₃, δ (ppm), 500 MHz): δ 7.46 (1H, *d*, *J*= 8.6 Hz, H-6), 7.28 (1H, *t*, *J*= 2.1 Hz, H-3), 7.06 (1H, *dd*, *J*= 2.5, 8.6 Hz, H-5), 5.74 (1H, *ddd*, *J*= 17.1, 10.3, 6.7 Hz, H-13'), 4.92 (1H, *ddd*, *J*= 1.6, 3.6, 17.1, H_b-14'), 4.86 (1H, *ddd*, *J*=1.04, 3.1, 10.1 Hz, H_a-14'), 2.27 (2H, *ddd*, *J*= 10.02, 7.1, 13.9 Hz, H-1'), 1.96 (1H, *q*, *J*= 6.8 Hz, H-2'), 1.64 (2H, *m*, H-3'), 1.14-1.63 (10H, *m*, H-5'/6'/7'/8'/9'), 1.26 (6H, *s*, H-11' ve H-12'), 0.81 (3H, *t*, *J*= 6.99 Hz, H-10').

¹³C NMR, APT and HSQC spektrum (CDCl₃, δ (ppm), 500 MHz): δ 147.72 (C-1), 147.67 (C-2), 139.34 (C-13'), 138.58 (C-4), 124.50 (C-5), 124.02 (C-3), 119.15 (C-6), 114.11 (C-14'), 37.34 (C-4'), 34.92 (C-1'), 33.87 (C-3'), 31.48 (C-2'), 30.24 (C-11' ve C-12'), 31.97, 29.74, 29.56, 29.41, 22.74 (C-5'/C-6'/C-7'/C-8'/C-9'), 14.16 (C-10').

¹H-¹H COSY spektrum (CDCl₃, δ (ppm), 500 MHz): δ 7.06 (H-5) /7.46 (H-6), 7.28 (H-3); 5.74 (H-13')/ 4.86 (H_a-14'), 4.92 (H_b-14'), 1.96 (H-2'); 4.92 (H_b-14') ve 4.86 (H_a-14') / 5.74 (H-13'), 1.96 (H-2').

HMBC spektrum (CDCl₃, δ (ppm), 500 MHz): δ 7.46 (H-6)/ 147.72 (C-1), 147.67 (C-2), 138.58 (C-4), 124.50 (C-5), 124.02 (C-3), 34.92 (C-1'); 7.28 (H-3)/ 147.67 (C-2), 147.72 (C-1), 119.15 (C-6), 34.92 (C-1'), 31.48 (C-2'); 7.06 (H-5)/ 147.72 (C-1), 147.67 (C-2), 124.02 (C-3), 119.15 (C-6), 34.92 (C-1'); 5.74 (H-13')/ 138.58 (C-4), 37.34 (C-4'), 34.92 (C-1'), 31.48 (C-2'); 4.86-4.92 (H_a-14' ve H_b-14')/ 139.34 (C-13'), 34.92 (C-1'), 31.48 (C-2'); 2.27 (H-1')/147.67 (C-2), 139.34 (C-13'), 138.58 (C-4), 124.50 (C-5), 124.02 (C-3), 114.11 (C-14'); 1.96 (H-2')/ 139.34 (C-13'), 138.58 (C-4), 124.50 (C-5), 124.02 (C-3), 114.11 (C-14'), 37.34 (C-4'), 30.24 (C-11' ve C-12'); 1.26 (H-11' ve H-12')/ 37.34 (C-4'), 31.48 (C-2'), 29.75 (C-5'-9').

ESI-TOF-MS m/z (Rel. Int. %, Şekil 4.35; Şekil 4.36): 304 (%17) [M]⁺, 268 (%100) [M-2xH₂O]⁺, 270(%83) [(M+Na)-C₄H₉]⁺, 220 (%46) [(M+1)-C₆H₁₃]⁺, 132 (%32) [(M+Na)-C₁₄H₂₇]⁺.

4.3.2. 2 Numaralı Bileşik CM-12-2-1

¹H NMR (CDCl₃, δ (ppm), 500 MHz): δ 7.46 (1H, *d*, *J*= 8.6 Hz, H-6), 7.28 (1H, *t*, *J*= 2.1 Hz, H-3), 7.06 (1H, *dd*, *J*= 2.5, 8.6 Hz, H-5), 5.75 (1H, *ddd*, *J*= 17.1, 10.3, 6.7 Hz, H-13'), 4.90 (1H, *ddd*, *J*= 1.6, 3.6, 17.1, H_b-14'), 4.86 (1H, *ddd*, *J*=1.04, 3.1, 10.1 Hz, H_a-14'), 4.61 (1H, *brs*, H-1"), 4.14 (1H, *dd*, *J*= 4.7, 11.6, H_a-6"), 4.08 (1H, *dd*, *J*= 6.2, 11.6, H_b-6"), 3.77 (1H, *t like*, *J*= 4.7, H-3"), 3.63 (1H, *dd*, *J*= 4.0, 11.4, H-5"), 3.58 (1H, *dd*, *J*= 6.08, 10.4, H-4"), 3.53 (1H, *dd*, *J*= 5.8, 11.3, H-2"), 2.27 (2H, *ddd*, *J*= 3.8, 7.5 Hz, H-1'), 1.96 (1H, *q*, *J*= 6.8 Hz, H-2'), 1.55 (2H, *d*, *J*= 6.5 Hz, H-3'), 1.2-1.50 (10H, *m*, H-5'/6'/7'/8'/9'), 1.26 (6H, *s*, H-11' ve H-12'), 0.81 (3H, *t*, *J*= 6.99 Hz, H-10').

¹³C NMR, APT and HSQC spektrum (CDCl₃, δ (ppm), 500 MHz): δ 147.66 (C-1), 147.13 (C-2), 139.33 (C-13'), 138.50 (C-4), 124.50 (C-5), 124.02 (C-3), 119.15 (C-6), 114.11 (C-14'), 106.63 (C-1"), 73.70 (C-3"), 71.33 (C-5"), 65.20 (C-2"), 63.38 (C-4"), 58.54 (C-6"), 37.47 (C-4'), 34.91 (C-1'), 33.86 (C-3'), 31.47 (C-2'), 30.24 (C-11' ve C-12'), 31.97, 29.74, 29.41 26.75, 22.74 (C-5'/C-6'/C-7'/C-8'/C-9'), 14.15 (C-10').

¹H-¹H COSY spektrum (CDCl₃, δ (ppm), 500 MHz): δ 7.06 (H-5) /7.46 (H-6), 7.28 (H-3); 5.75 (H-13')/ 4.86 (H_a-14'), 4.90 (H_b-14'), 1.96 (H-2'); 4.90 (H_b-14') ve 4.86 (H_a-14') / 5.75 (H-13'), 1.96 (H-2').

HMBC spektrum (CDCl₃, δ (ppm), 500 MHz): δ 7.46 (H-6)/ 147.66 (C-1), 147.13 (C-2), 138.50 (C-4), 124.50 (C-5), 34.91 (C-1'); 7.28 (H-3)/ 147.66 (C-1), 147.13 (C-2), 119.15 (C-6), 34.91 (C-1'), 31.47 (C-2'), 106.63 (C-1"); 7.06 (H-5)/ 147.66 (C-1), 147.13 (C-2), 124.02 (C-3), 119.15 (C-6), 34.91 (C-1'); 5.75 (H-13')/ 138.50 (C-4), 37.47 (C-4'), 33.86 (C-3'), 34.91 (C-1'), 31.47 (C-2'); 4.86-4.90 (H_a-14' ve H_b-14')/ 139.33 (C-13'), 34.91 (C-1'), 31.47 (C-2'); 4.61 (H-1")/ 147.66 (C-1), 147.13 (C-2), 124.02 (C-3), 73.70 (C-3"); 2.27 (H-1')/ 147.13 (C-2), 139.33 (C-13'), 138.50 (C-4), 124.50 (C-5), 124.02 (C-3), 114.11 (C-14'); 1.96 (H-2')/ 139.33 (C-13'), 138.50 (C-4), 124.50 (C-5), 124.02 (C-3), 114.11 (C-14'), 37.47 (C-4'), 33.86 (C-3'); 1.26 (H-11' ve H-12')/ 37.47 (C-4'), 33.86 (C-3'), 31.47 (C-2'), 29.55 (C-5'-9').

ESI-TOF-MS m/z (Rel. Int. %, Şekil 4.50): 466 (%100) [M+1]⁺, 272 (%28) [(M+1)-C₁₄H₂₇]⁺, 304 (%21) [(M+1)- C₆H₁₁O₅]⁺, 392 (%34) [(M+1)-C₄H₉-H₂O], 423 (%28) [M-C₃H₇]⁺.

4.3.3. 3 Numaralı Bileşik CM-12-4-1

¹H NMR (CDCl₃, δ (ppm), 500 MHz): δ 7.46 (1H, *d*, *J*= 8.6 Hz, H-6), 7.28 (1H, *t*, *J*= 2.1 Hz, H-3), 7.06 (1H, *dd*, *J*= 2.5, 8.6 Hz, H-5), 5.74 (1H, *ddd*, *J*= 17.1, 10.3, 6.7 Hz, H-13'), 4.93 (1H, *ddd*, *J*= 1.6, 3.6, 17.1, H_b-14'), 4.85 (1H, *ddd*, *J*=1.04, 3.1, 10.1 Hz, H_a-14'), 4.61 (1H, *brs*, H-1"), 3.67 (1H, *m*, H_a-5"), 3.61 (1H, *dd*, *J*= 4.8, 9.8 Hz, H-4"), 3.59 (1H, *dd*, *J*= 3.8, 10.4, Hz, H-3"), 3.57 (1H, *t like*, *J*= 4.8 Hz, H_b-5"), 3.24 (1H, *t like*, *J*= 4.9 Hz, H-2"), 2.27 (2H, *t*, *J*= 7.4 Hz, H-1'), 1.96 (1H, *q*, *J*= 6.8 Hz, H-2'), 1.2-1.7 (12H, *m*, H-3' ve H-5'/6'/7'/8'/9'), 1.26 (6H, *s*, H-11' ve H-12'), 0.81 (3H, *t*, *J*= 6.99 Hz, H-10').

¹³C NMR, APT and HSQC spektrum (CD₃OD, δ (ppm), 500 MHz): δ 151.40 (C-1), 151.29 (C-2), 143.20 (C-13'), 142.55 (C-4), 128.50 (C-5), 127.90 (C-3), 122.88 (C-6), 117.90 (C-14'), 111.11 (C-1"), 78.95 (C-3"), 83.67 (C-4"), 81.31 (C-2"), 61.66 (C-5"), 38.77 (C-4'), 37.60 (C-1'), 35.82 (C-3'), 34.06 (C-2'), 35.27 (C-11' ve C-12'), 33.58, 33.25, 30.59, 27.06, 26.57 (C-5'/C-6'/C-7'/C-8'/C-9'), 17.92 (C-10').

¹H-¹H COSY spektrum (CDCl₃, δ (ppm), 500 MHz): δ 7.06 (H-5) /7.46 (H-6), 7.28 (H-3); 5.74 (H-13')/ 4.86 (H_a-14'), 4.90 (H_b-14'), 1.96 (H-2'); 4.90 (H_b-14') ve 4.86 (H_a-14') / 5.74 (H-13'), 1.96 (H-2'), 1.26 (H-11' ve H-12').

HMBC spektrum (CDCl₃, δ (ppm), 500 MHz): δ 7.46 (H-6)/ 151.40 (C-1), 151.29 (C-2), 142.550 (C-4), 128.5 (C-5), 127.90 (C-3), 37.60 (C-1'); 7.28 (H-3)/ 151.40 (C-1), 151.29 (C-2), 122.88 (C-6), 111.11 (C-1"), 37.60 (C-1'); 7.06 (H-5)/ 151.40 (C-1), 151.29 (C-2), 127.90 (C-3), 122.88 (C-6), 37.60 (C-1'); 5.74 (H-13')/ 142.55 (C-4), 38.77 (C-4'), 37.60 (C-1'), 34.06 (C-2'); 4.85-4.93 (H_a-14' ve H_b-14')/ 143.20 (C-13'), 37.60 (C-1'), 34.06 (C-2'); 4.61 (H-1")/ 151.40 (C-1), 127.90 (C-3), 61.66 (C-5"); 3.61 (H-4")/ 111.11 (C-1"), 81.31 (C-2"); 3.59 (H-3")/ 111.11 (C-1"), 83.67 (C-4"), 81.31 (C-2"); 3.24 (H-2")/ 111.11 (C-1"), 61.66 (C-5"); 2.27 (H-1')/ 143.20 (C-13'), 142.55 (C-4), 128.5 (C-5), 117.90 (C-14'); 1.96 (H-2') / 143.20 (C-13'), 142.55 (C-4), 128.5 (C-5), 127.90 (C-3), 122.88 (C-6), 117.90 (C-14'), 38.77 (C-4'); 1.26 (H-11' ve H-12')/ 38.77 (C-4'), 34.06 (C-2'), 30.59 (C-5'-9').

ESI-TOF-MS m/z (Rel. Int. %, Şekil 4.59): 436 (%100) [M+1]⁺, 418 (%54) [M-H₂O]⁺, 133 (%25) [C₅H₉O₄]⁺, 268 (%25) [(M-1)-(O-C₅H₉O₄)-H₂O]⁺, 254 (%50) [(M-1)-C₁₃H₂₅]⁺.

4.3.4. 4 Numaralı Bileşik CM-13-4-1

¹H NMR (CDCl₃, δ (ppm), 500 MHz): δ 7.45 (1H, *d*, *J*= 8.6 Hz, H-6), 7.28 (1H, *t*, *J*= 2.1 Hz, H-3), 7.05 (1H, *dd*, *J*= 2.5, 8.6 Hz, H-5), 5.74 (1H, *ddd*, *J*= 17.1, 10.3, 6.7 Hz, H-13'), 4.92 (1H, *ddd*, *J*= 1.6, 3.6, 17.1, H_b-14'), 4.86 (1H, *ddd*, *J*=1.04, 3.1, 10.1 Hz, H_a-14'), 3.86 (1H, *d*, *J*= 2.7, H-2''), 3.57 (2H, *m*, H-4''), 3.48 (1H, *dt*, *J*= 2.8, 8.2, H-3''), 2.27 (2H, *t*, *J*= 7.4 Hz, H-1'), 1.96 (1H, *m*, *J*= 6.8 Hz, H-2'), 1.64 (2H, *m*, H-3'), 1.2-1.63 (10H, *m*, H-5'/6'/7'/8'/9'), 1.26 (6H, *s*, H-11' ve H-12'), 0.81 (3H, *t*, *J*= 6.99 Hz, H-10').

¹³C NMR, APT and HSQC spektrum (CDCl₃, δ (ppm), 500 MHz): δ 176.89 (C-1''), 147.66 (C-1), 147.13 (C-2), 139.33 (C-13'), 138.58 (C-4), 124.50 (C-5), 124.01 (C-3), 119.13 (C-6), 114.10 (C-14'), 77.24 (C-3''), 73.71 (C-2''), 58.50 (C-4''), 34.91 (C-4'), 33.86 (C-1'), 33.70 (C-3'), 31.48 (C-2'), 30.24 (C-11' ve C-12'), 31.96, 29.74, 29.40, 24.82, 22.84 (C-5'/C-6'/C-7'/C-8'/C-9'), 14.16 (C-10').

¹H-¹H COSY spektrum (CDCl₃, δ (ppm), 500 MHz): δ 7.05 (H-5) /7.45 (H-6), 7.28 (H-3); 5.74 (H-13')/ 4.92 (H_b-14'), 4.86 (H_a-14'), 1.96 (H-2'); 3.86 (H-2'')/ 3.48 (H-3''); 3.48 (H-3'')/ 3.57 (H-4''); 1.96 (H-2') / 5.74 (H-13'), 4.86 (H-14').

HMBC spektrum (CDCl₃, δ (ppm), 500 MHz): δ 7.45 (H-6)/ 147.66 (C-1), 147.13 (C-2), 138.58 (C-4), 124.50 (C-5), 33.86 (C-1'); 7.28 (H-3)/ 147.66 (C-1), 147.13 (C-2), 138.58 (C-4), 119.13 (C-6), 33.86 (C-1'); 7.05 (H-5)/ 147.66 (C-1), 147.13 (C-2), 124.01 (C-3), 33.86 (C-1'); 5.74 (H-13')/ 138.58 (C-4), 33.70 (C-3'), 33.86 (C-1'), 31.48 (C-2'); 4.86-4.92 (H_a-14' ve H_b-14')/ 139.33 (C-13'), 33.86 (C-1'), 31.48 (C-2'); 3.86 (H-2'')/ 176.89 (C-1''), 147.66 (C-1), 77.24 (C-3''), 58.50 (C-4''); 3.57 (H-4'')/ 176.89 (C-1''), 77.24 (C-3''); 3.48 (H-3'')/ 176.89 (C-1''), 58.50 (C-4''); 2.27 (H-1')/ 147.13 (C-2), 139.33 (C-13'), 138.58 (C-4), 124.50 (C-5), 124.01 (C-3), 114.10 (C-14'); 1.96 (H-2')/ 139.33 (C-13'), 138.58 (C-4), 124.50 (C-5), 124.01 (C-3), 119.13 (C-6), 114.10 (C-14'), 33.70 (C-3'); 1.26 (H-11' ve H-12')/ 33.70 (C-3'), 31.48 (C-2'), 29.74 (C-5'-9').

ESI-MS m/z (Rel. Int. %, Şekil 4.70; Şekil 4.71): 422 (%100) [M+1]⁺, 448 (%6) [M+3+Na]⁺, 379 (%9) [M-C₃H₇]⁺, 338 (%16) [(M-1)-C₆H₁₃]⁺, 286 (%25) [(M-1)-C₄H₇O₅]⁺, 282 (%20) [(M+1)-C₁₀H₂₁]⁺, 240 (%13) [(M-1)-C₁₃H₂₅]⁺, 193 (%16) [(M-2)-C₁₀H₁₁O₆]⁺, 160 (%16) [(M+2+Na)-C₂₀H₃₁O]⁺, 136 (%37) [M-C₂₀H₃₂O]⁺, 119 (%27) [M-C₂₀H₃₁O₂]⁺.

4.3.5. 5 Numaralı Bileşik CM-15-2-2

¹H NMR (CDCl₃, δ (ppm), 500 MHz): δ 8.04 (1H, *dd*, *J*= 1.3,8.3 Hz, H-6"), 7.55 (1H, *tt*, *J*= 1.2, 8.7 Hz, H-4"), 7.46 (1H, *d*, *J*= 8.6 Hz, H-6), 7.41 (1H, *t*, *J*= 8.08 Hz, H-5"), 7.40 (1H, *dd*, *J*= 1.5,1.6 Hz, H-2"), 7.28 (1H, *t*, *J*= 2.1 Hz, H-3), 7.06 (1H, *dd*, *J*= 2.5, 8.6 Hz, H-5), 5.75 (1H, *ddd*, *J*= 6.7, 10.3, 17.1 Hz, H-13'), 4.92 (1H, *ddd*, *J*= 1.6, 3.6, 17.1 Hz, H_b-14'), 4.86 (1H, *ddd*, *J*=1.04, 3.1, 10.1 Hz, H_a-14'), 2.29 (2H, *t*, *J*= 7.58 Hz, H-1'), 1.96 (1H, *m*, H-2'), 1.64 (2H, *d*, *J*= 7.6 Hz, H-3'), 1.14-1.63 (10H, *m*, H-5'/6'/7'/8'/9'), 1.26 (6H, *s*, H-11' ve H-12'), 0.81 (3H, *t*, *J*= 6.99 Hz, H-10').

¹³C NMR, APT and HSQC spektrum (CDCl₃, δ (ppm), 500 MHz): δ 159.12 (C-7"), 147.72 (C-2), 147.14 (C-1), 147.12 (C-3"), 139.34 (C-13'), 138.58 (C-4), 138.51 (C-1"), 133.73 (C-4"), 130.23 (C-2" ve C-5"), 128.47 (C-6"), 123.97 (C-5), 124.51 (C-3), 119.16 (C-6), 114.19 (C-14'), 35.37 (C-4'), 34.92 (C-1'), 34.56 (C-3'), 31.48 (C-2'), 30.24 (C-11' ve C-12'), 33.82, 31.97 29.74, 29.41, 22.74 (C-5'/C-6'/C-7'/C-8'/C-9'), 14.16 (C-10').

¹H-¹H COSY spektrum (CDCl₃, δ (ppm), 500 MHz): δ 8.04 (H-6")/ 7.55 (H-4"), 7.41 (H-5"), 7.40 (H-2"); 7.40 (H-2")/ 8.04 (H-6"), 7.55 (H-4"); 1.96 (H-2')/ 5.75 (H-13'), 4.92-4.86 (H_a-14' ve H_b-14'), 2.29 (H-1'); 7.06 (H-5) /7.46 (H-6), 7.28 (H-3); 5.75 (H-13') / 4.92-4.86 (H_a-14' ve H_b-14').

HMBC spektrum (CDCl₃, δ (ppm), 500 MHz): δ 8.04 (H-6")/ 159.12 (C-7"), 147.12 (C-3"), 133.73 (C-4"), 130.23 (C-2" ve C-5"); 7.55 (H-4")/ 147.12 (C-3"), 130.23 (C-2" ve C-5"), 128.47 (C-6"); 7.40 (H-2")/ 159.12 (C-7"), 147.12 (C-3"), 128.47 (C-6"); 7.46 (H-6)/ 159.12 (C-7"), 147.72 (C-2), 147.14 (C-1), 138.58 (C-4), 124.51 (C-3), 123.97 (C-5), 34.92 (C-1'); 7.28 (H-3)/ 147.72 (C-2), 147.14 (C-1), 123.97 (C-5), 119.16 (C-6); 7.06 (H-5) / 147.72 (C-2), 147.14 (C-1), 124.51 (C-3), 34.92 (C-1'); 5.75 (H-13')/ 138.58 (C-4), 34.92 (C-1'); 4.86-4.92 (H_a-14' ve H_b-14')/ 139.34 (C-13'), 34.92 (C-1'); 2.29 (H-1')/ 147.72 (C-2), 139.34 (C-13'), 138.58 (C-4), 124.51 (C-3), 123.97 (C-5), 114.19 (C-14'); 1.96 (H-2') / 139.34 (C-13'), 138.58 (C-4), 124.51 (C-3), 123.97 (C-5), 114.19 (C-14'); 1.26 (H-11' ve H-12')/ 31.97, 29.74, 29.41, 22.73 (C-5'/C-6'/C-7'/C-8'/C-9').

ESI-TOF-MS m/z (Rel. Int. %, Şekil 4.85): 424 [M+1]⁺ (%100), 409 (%4) [M-CH₃]⁺, 302 (%28) [M-C₅H₇O₂]⁺, 364 (%30) [(M-C₃H₂)-H₂O]⁺, 310 (%30) [(M+Na)- C₇H₅O₃ (OH-Ar_B-COO-)]⁺, 224 (%33) [(M-1)-C₁₃H₂₅-H₂O]⁺, 204 (%18) [(M+Na)-C₁₄H₁₁O₄ (Ar_B-COO-Ar_A-

$\text{CH}_2)^+]$, 181 (%27) $[\text{M}-\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{O}_4 (\text{Ar}_\text{B}-\text{COO}-\text{Ar}_\text{A}-\text{CH}_2)]^+$, 136 (%34) $[\text{OH}-\text{Ar}_\text{B}-\text{COO}-]^+$, 120 (%28) $[\text{OH}-\text{Ar}_\text{B}-\text{CO}-]^+$.



4.3.6. 6 Numaralı Bileşik CM-9-1

IR $\nu_{\max}$ (nujol) cm^{-1} : 3027, 2930, 2870, 1725, 1650, 1580, 1220.

^1H NMR (CDCl_3 , δ (ppm), 500 MHz): 7.63 (2H, *dd*, $J = 3.3, 5.7$ Hz, H-4/H-5), 7.46 (2H, *dd*, $J = 3.3, 5.7$ Hz, H-3/H-6), 4.15 (2H, *dd*, $J = 10.9, 5.5$ Hz, H-1"), 4.15 (2H, *d*, $J = 14.4$, H-1'), 1.62 (1H, *m*, H-2"), 1.26 (6H, *s*, H-10' ve H-11'), 1.16-1.40 (16H, 8 x CH_2), 0.85 (3H, *d*, $J = 7.4$, H-6"), 0.83 (3H, *t*, $J = 7.5$, H-5"), 0.82 (3H, *t*, $J = 7.5$, H-9').

^{13}C NMR, APT and HSQC (CDCl_3 , δ (ppm), 500 MHz): δ 167.80 (C-1, C-8), 132.51 (C-7, C-2), 130.92 (C-3, C-6), 128.85 (C-4, C-5), 68.20 (C-1", C-1'), 38.78 (C-2"), 31.97 (C-2'), 31.48 (C-10' ve C-11'), 30.24 (C-6"), 30.41, 29.74, 29.74, 29.71, 28.97, 23.80, 23.03, 22.75 (C-3', C-4', C-5', C-6', C-7', C-8', C-3", C-4"), 14.08 (C-5"), 11.00 (C-9').

^1H - ^1H COSY (CDCl_3 , δ (ppm), 500 MHz): δ 7.46 (H-3 ve H-6)/7.63 (H-5 ve H-4); 4.15 (H-1")/1.62 (H-2"); 0.85 (H-6")/1.62 (H-2"), 1.16-1.40 ($-\text{CH}_2$); 0.83 (H-5")/1.16-1.40 ($-\text{CH}_2$); 0.82 (H-9')/1.16-1.40 ($-\text{CH}_2$).

HMBC spektrum (CDCl_3 , δ (ppm), 500 MHz): δ 7.63 (H-4 ve H-5)/ 167.80 (C-1 ve C-8), 132.51 (C-2 ve C-7), 130.92 (C-3 ve C-6); 7.46 (H-3 ve H-6)/ 167.80 (C-1 ve C-8), 132.51 (C-2 ve C-7), 128.85 (C-4 ve C-5); 4.15 (H-1')/ 167.80 (C-1), 132.51 (C-2), 31.97 (C-2'), 31.48 (C-10' ve C-11'), 22.75-30.41 (metilen karbonları civarı); 4.15 (H-1")/ 167.80 (C-8), 132.51 (C-7), 38.78 (C-2"), 30.24 (C-6"), 22.75-30.41 (metilen karbonları civarı); 1.62 (H-2") / 167.80 (C-8), 68.20 (C-1"), 30.24 (C-6"); 1.26 (H-10' ve H-11')/ 68.20 (C-1'), 31.97 (C-2'); 0.85 (H-6")/ 38.79 (C-2"); 0.83 (H-5")/ 38.79 (C-2").

ESI-TOF-MS m/z (Rel. Int. %, Şekil 4.104): 427 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (45 %), 149 $[\text{C}_8\text{H}_5\text{O}_3]^+$ (60 %), 199 $[\text{M}-\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_2]^+$ (45 %), 205 $[\text{M}-199 (\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{O}_2)]^+$ (5 %).

4.3.7. 7 Numaralı Bileşik CM-3-1

¹H NMR (CDCl₃, δ (ppm), 500 MHz): δ 8.15 (1H, s, H-5), 4.65 (2H, dd, J = 4.5, 8.6, H-1'), 4.54 (1H, dd, J = 5.4, 10.8 Hz, H-2'), 4.33 (1H, dd, J = 5.8, 10.9 Hz, H_a-3'), 4.31 (1H, t, J = 5.63 Hz, H_b-3'), 2.1 (6H, s, H-8 ve H-9).

¹³C NMR, APT and HSQC spektrum (CD₃OD, δ (ppm), 500 MHz): δ 170.98 (C-7), 154.61 (C-2 ve C-6), 139.84 (C-1), 134.28 (C-3 ve C-5), 129.52 (C-4), 80.99 (C-2'), 67.81 (C-1'), 67.78 (C-3'), 24.04 (C-8 ve C-9).

¹H-¹H COSY spektrum (CDCl₃, δ (ppm), 500 MHz): δ 4.54 (H-2')/ 4.65 (H-1'), 4.33-4.31 (H_a-3' ve H_b-3').

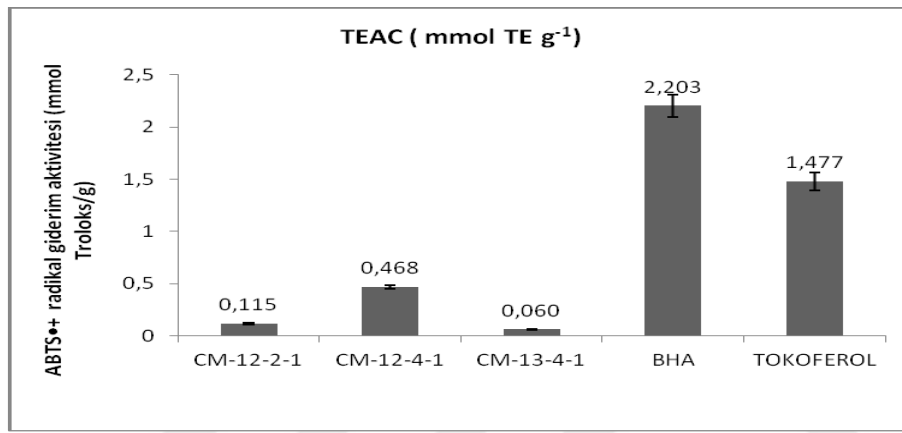
HMBC spektrum (CDCl₃, δ (ppm), 500 MHz): δ 8.15 (H-4)/ 154.61 (C-2 ve C-6), 139.84 (C-1), 134.28 (C-3 ve C-5), 24.04 (C-8 ve C-9); 4.65 (H-1') / 139.84 (C-1), 80.99 (C-2'), 67.78 (C-3'); 2.1 (H-8 ve H-9)/ 154.61 (C-2 ve C-6), 134.28 (C-3 ve C-5).

ESI-TOF-MS m/z (Rel. Int. %, Şekil 4.114): 256 (%40) [M]⁺, 279 (%11) [M+Na]⁺, 213 (%76) [(M+Na)-.2xCH₃-2xH₂O]⁺, 165 (%8) [M-(O-CH₂CH(OH)CH₂OH)]⁺, 91 (%3) [M-(CH₂CH(OH)CH₂OH)]⁺, 62 (%60) [(C₂H₆O₂)]⁺.

4.4. *C. creticum* Bitkisinden İzole Edilen ve Miktarı Yeterli Olan Bileşiklerin Antioksidan Aktivite Tayini

C. creticum bitkisinden izole edilen 7 bileşikten, miktarı yeterli olan 2,3 ve 4 numaralı bileşiklerin (CM-12-2-1, CM-12-4-1, CM-13-4-1) antioksidan aktivite tayini yapılmıştır. Antioksidan aktivite tayini için; ABTS, FRAP ve CUPRAC yöntemleri seçilmiştir.

4.4.1. *C. creticum* Bitkisinden İzole Edilen ve Miktarı Yeterli Olan Bileşiklerin ABTS^{•+} Katyon Radikali Giderim Aktiviteleri

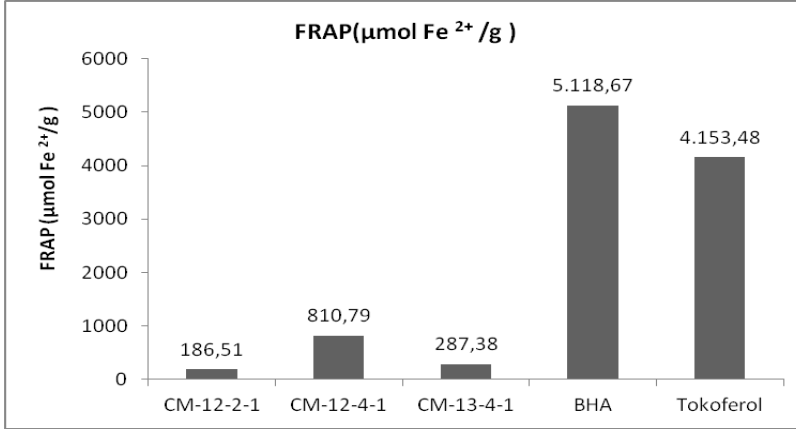


Şekil 4. 115. İzole edilen bileşiklerin ABTS^{•+} radikali giderme aktiviteleri

Yapılan analiz çalışmaları sonucunda; 3 numaralı bileşik (CM-12-4-1) 0.468 mmol Trolox g⁻¹ aktivite gösterirken, CM-12-2-1 bileşiğinde aktivite 0.115 mmol Trolox g⁻¹, CM-13-4-1 bileşiğinde ise en düşük ve 0.060 mmol Trolox g⁻¹ olarak belirlenmiştir (Şekil 4.115). Aktivite sonuçları standart bileşikler olan BHA ve Tokoferolle karşılaştırıldığında, BHA'nın en yüksek aktivite gösteren 3 numaralı bileşiğin (CM-12-4-1)'ya göre 4,7 katı daha fazla ABTS^{•+} kasyon radikali giderim aktivitesine sahip iken, Tokoferolün ise 3,16 kat daha fazla aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

4.4.2. *C. creticum* Bitkisinden İzole Edilen ve Miktarı Yeterli Olan Bileşiklerin Ferik İyon İndirgeme Kapasiteleri (FRAP)

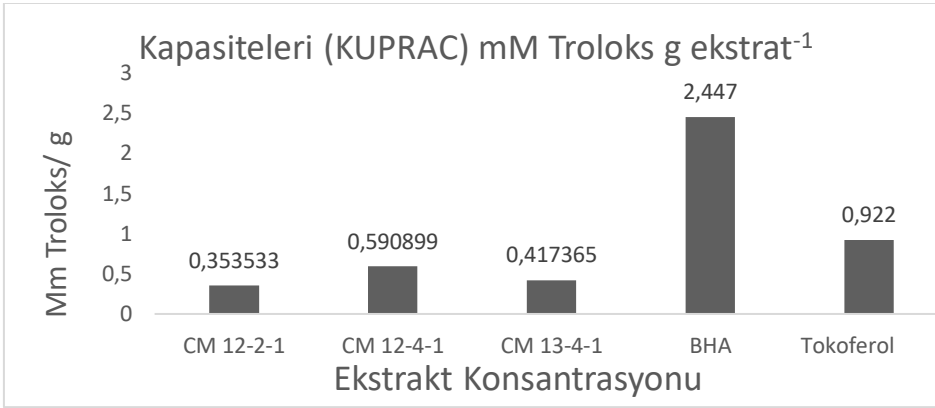
Yapılan analiz çalışmaları sonucunda, farklı konsantrasyonlardaki üç izole bileşiğin FRAP aktivite değerleri, ABTS'de olduğu gibi en yüksek 3 numaralı bileşikte (CM-12-4-1) görülmektedir. Bu üç izole bileşikten en düşük aktivitenin 2 numaralı bileşik (CM-12-2-1) olduğu bulunmuştur (Şekil 4.116).



Şekil 4. 116. İzole edilen bileşiklerin Ferik İyon İndirgeme Kapasiteleri (μmol Fe²⁺/g)

İzole bileşiklerin Frap aktiviteleri standart BHA ve tokoferol aktiviteleri ile karşılaştırıldığında en yüksek aktivite gösteren 3 numaralı bileşikte (CM-12-4-1) görülürken, BHA 5118,67 ve Tokoferol 4153,48 μmol Fe⁺² g⁻¹ aktivite göstermiştir.

4.4.3. *C. creticum* Bitkisinden İzole Edilen ve Miktarı Yeterli Olan Bileşiklerin Kuprik İyon İndirgeme Kapasiteleri (KUPRAK)



Şekil 4. 117. İzole edilen bileşiklerin Kuprik İyon İndirgeme Kapasiteleri (KUPRAK)

Yapılan analiz çalışmaları sonucunda; 3 numaralı bileşik (CM-12-4-1) 0,590899 mM Trolox g⁻¹ aktivite gösterirken, CM-13-4-1 bileşiğinde aktivite 0,417365 mM Trolox g⁻¹, CM-12-2-1 bileşiğinde ise en düşük ve 0,353533 mM Trolox g⁻¹ olarak belirlenmiştir (Şekil 4.117). BHA ve Tokoferol ile karşılaştırıldığında; BHA 2.47 ve 0.922 mM Trolox g⁻¹ olduğu bulunmuştur.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, Trakya bölgesinde yetişen daha önce kimyasal içeriği ve biyolojik aktivitesi araştırılmamış olan, *Cirsium creticum* (Lam.) d'Urv. subsp. *creticum* (Asteraceae) bitkisinin fitokimyasal bakımdan incelenmesi yapılarak, sekonder metabolitlerin moleküler yapılarının tayini amaçlanmıştır. Bunun yanında, bitkinin farklı çözücülerde alınmış ham ekstralarında ve izole edilen saf maddelerde 6 yöntemle göre antioksidan aktivite tayini gerçekleştirilmiştir.

Literatür araştırmaları incelendiğinde, *Cirsium* türleri üzerinde bugüne kadar çok sayıda fitokimyasal ve biyolojik aktivite çalışmaları yapıldığı görülmüştür. Ancak, tez konusu *C. creticum* türü üzerine yapılmış fitokimyasal bir çalışmaya ve antioksidan aktivite çalışmasına literatürde rastlanmamıştır.

Bitkiden elde edilen ham ekstralarda, toplam fenolik/flavonoid miktarı tayini ve antioksidan aktivite tayini çalışmaları gerçekleştirilmiştir. *C. creticum* ham ekstralarının toplam fenolik madde miktarı en yüksek metanol ekstresinde bulunmuştur (Tablo 4.1).

C. creticum ham ekstralarının hekzan ve etil asetat ekstralarında bütün eşdeğerlerine bakıldığında toplam flavonoid madde içeriği belirlenememiştir. En yüksek toplam flavonoid madde içeriği metanol ekstresinde, daha sonra da dietileter ekstresinde bulunmuştur (Tablo 4.2).

Ham ekstraların antioksidan aktiviteleri; DPPH radikali giderim aktivitesi, ABTS^{•+} katyon radikali giderim aktivitesi, FRAP, β -Karoten renk giderim aktivitesi, KUPRAK, süperoksit anyon radikali giderim aktivitesi yöntemleriyle tayin edilmiştir.

DPPH[•] radikali giderim aktivitesi tayini sonuçlarına göre; metanol ekstralarının diğer çözücülere nazaran çok daha yüksek antioksidan aktivite potansiyeline sahip olduğu görülmektedir (Tablo 4.3).

ABTS^{•+} radikali giderim aktivitesine ilişkin sonuçlara bakıldığında; *C. creticum* metanol ekstraları diğer çözücülere nazaran çok daha yüksek ABTS^{•+} radikali giderme aktivitesine sahip olduğu görülmektedir. En düşük aktivite etilasetat ekstresinde bulunmuştur (Tablo 4.4).

C. creticum ekstralarındaki FRAP aktivite değerlerine ilişkin EC₅₀ değerlerine bakıldığında metanol ekstralarının EC₅₀ değerleri en düşük iken; etilasetat ekstresinde en

yüksek olarak saptanmıştır. Yapılan analiz çalışmaları sonucunda, farklı konsantrasyonlardaki *C. creticum* bitkisinin ham ekstrelerinde FRAP aktivite değerleri, konsantrasyon arttıkça yükselirken, en yüksek aktivitenin metanol ekstresinde olduğu görülmektedir (Tablo 4.6; Şekil 4.10; Şekil 4.11).

C. creticum bitkisinin ham ekstrelerinin linoleik asit ve β -karoteninin oksidasyon hızına ve renk ağarmasına karşı en yüksek inhibisyon etkisinin metanol ve dietileter ekstrelerinde olduğu; buna karşılık n-hekzan ekstrelerinin aktivite göstermediği görülmektedir (Tablo 4.7).

KUPRAK aktivite tayini sonuçlarına göre; konsantrasyona bağlı önemli düzeyde aktivite artışı bulunmaktadır. Metanol eksresinin kuprak aktivitesi düşük konsantrasyonlarda daha yüksek iken, yüksek konsantrasyonda etilasetat ekstresi ile benzer sonuç vermiştir (Tablo 4.10).

Süperoksit anyon radikali giderim aktivitesi değerlerine göre dietileter ekstresinde en yüksek aktivite saptanmış olup, bu değeri sırasıyla metanol ekstresi ve etilaset ekstresi izlemiştir. n-hekzan ekstresinde süperoksit anyon radikali giderim aktivitesi ise belirlenememiştir (Tablo 4.11).

Elde edilen sonuçlara göre; özellikle toplam fenolik madde içeriği ve toplam flavonoid madde miktarı yüksek olan metanol ekstresinde kromatografik ayırma ve saflaştırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler sonucunda; *C. creticum* bitkisinin metanol ekstresinden 7 madde izole edilip, spektroskopik yöntemlerle (IR, 1D (^1H ve ^{13}C NMR, APT) ve 2D NMR (^1H - ^1H COSY, HMBC, HSQC) ve MS (ESI-MS/MS ve ESI-TOF/MS)) yapıları aydınlatılmıştır. Bu maddelerden 5 tanesi alkil fenol (alkil kateşol) türevi bileşiklerdir; 4-(4',4'-dimetil-2'-vinil-desil) benzen-1,2-diol (1); 2-O- α -D-glukopiranozil-4-(4',4'-dimetil-2'-vinil-desil) fenol (2); 2-O- α -D-arabinofuranosil-4-(4',4'-dimetil-2'-vinil-desil) fenol (3); 2-hidroksi-4-(4',4'-dimetil-2'-vinil-desil)-fenil-2",3",4"-trihidroksi bütanoat (4); 2-hidroksi-4-(4',4'-dimetil-2'-vinil-desil) fenil-3-hidroksi benzoat (5). İzole edilen bileşiklerden bir diğeri, ftalik ester olup, Ftalik asit (2"-metil-pentil), (2',2'-dimetil- nonil) esteri, 6 numaralı bileşiktir. İzole edilen 7. bileşik ise, (2'-3'-dihidroksipropil)-2,6-dihidroksi-3,5-dimetil benzoat (7), bir fenolik asit esteridir. Bu bileşikler; *C. creticum* türünden, ilk defa bu çalışmada izole edilmişlerdir.

Literatürde, *C. creticum* türüyle yapılmış bir fitokimyasal çalışma olmamakla birlikte; *Cirsium* cinsinin, diğer türleriyle ilgili fitokimyasal çalışmalar literatürde mevcuttur. Bu çalışmalar; özellikle bizim çalışmamızda izole ettiğimiz bileşiklere (alkil fenol/ alkil kateşol) benzerlik açısından incelendiğinde, literatürde çeşitli *Cirsium* türlerinden flavonoidlerin

(Shelyuto ve ark. 1971, Ke ve ark. 2006, Nazaruk 2009) ve fenolik asitlerin (Palade 1971, Miyaichi ve ark. 1995, Nazaruk ve ark. 2008) izolasyonunun olduğu görülmektedir.

Diğer taraftan literatüre *Cirsium* cinsi dışındaki doğal ürünlerden izole edilen alkil fenol (alkil kateşol) bileşikleri açısından bakıldığında, pek çok çalışmaya rastlanmış bulunmaktadır (Kitahara ve Kanda 1975, Juch ve Rüedi 1997, Suzuki ve ark. 1999, Feresin ve ark. 2003, Tyman ve ark. 2003, Rong ve ark. 2007, Megawati ve Darmawan 2017). Gustofon ve ark. (1992), *Pothomorphe peltato* bitkisinden alkil kateşol monomer ve dimerlerini izole etmişler ve bu maddelerin HIV-inhibitör etkisini araştırmışlardır. Kim ve ark. (1997), Kore’de *Rhus vernicifera* bitkisinden izole ettikleri alkil kateşol türevlerinin antifungal aktivitesini tayin etmişlerdir. Feresin ve ark. (2003), *Oxalis erythrorhiza* bitkisinden biyoaktif alkil fenol bileşiklerini izole etmişlerdir. Juch ve Rüedi (1997), *Plectranthus sylvestris* bitkisinden izole ettikleri uzun zincirli alkil kateşollerin, antioksidan aktivitesini araştırmışlardır. Cardoso ve ark. (2005), Brezilya’da yetişen *Schinopsis brasiliensis* ağacının gövdesinden yeni bir alkil fenol izole etmişlerdir.

Ayrıca tez çalışmamızda, izole edilip, yapısı aydınlatılan ve miktarı fazla olan maddelerin antioksidan aktivitesine de bakılmıştır. Bu amaçla; izole edilen, 2,3 ve 4 numaralı bileşikler, antioksidan aktivite tayini için seçilmiş; 1, 5, 6 ve 7 numaralı bileşikler ise, proje kapsamında antifungal/antimikrobiyal aktivite çalışmak üzere ayrılmıştır.

2,3 ve 4 numaralı bileşiklere ABTS, FRAP ve KUPRAK yöntemlerine göre antioksidan aktivite tayini yapılmıştır. Yapılan analiz çalışmaları sonucunda, farklı konsantrasyonlardaki üç bileşiğin ABTS, FRAP ve KUPRAK aktivite değerlerinin hepsinde, en yüksek antioksidan aktivite 3 numaralı bileşikte (CM-12-4-1) görülmektedir (Şekil 4.115; Şekil 4.116; Şekil 4.117). ABTS ve CUPRAC’ta en düşük antioksidan aktivite 2 numaralı bileşikte, FRAP’ta ise en düşük aktivite 4 numaralı bileşikte bulunmuştur.

Yapılan bu tez çalışmasıyla, Türkiye’de yetişen *Cirsium* türlerinin, kemotaksonomik bakımdan değerlendirilmesine katkı sağlanacağı gibi bu türlerdeki biyoaktif bileşenlerin araştırılmasında bilimsel birikime önemli katkı sağlayacaktır. Ayrıca bu konuda hazırlanan projenin, literatüre başta kimya bilimi olmak üzere tıp, gıda, eczacılık gibi çalışma alanlarına ve yeni bitki droglarının hazırlanmasında doğal bileşikler/ilaç endüstrisine katkı sağlayabilecektir.

6. KAYNAKLAR

- Abbata C, Slacanin I, Corradia E, De Mieria M, Hamburgera M, Potterata O (2014). Comprehensive analysis of *Cirsium spinosissimum* Scop., a wild alpine food plant.
- Agrawal PK (1992). NMR spectroscopy in the structural elucidation of Oligosaccharides and Glycosides. *Phytochemistry*, Vol.31, No.10, 3307-3330.
- Amarowicz R, Wróbel M, Karamać M, Fraczek E, Weidner S (2005). Metabolism of phenolic compounds in *Vitis riparia* seeds during stratification and during germination under optimal and low temperature stress conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, Vol. 27, No. 3A. 2005: 313-320
- Anonim (2007). http://www.food.hacettepe.edu.tr/turkish/ouyeleri/gmu428/meyve_ve_sebzelerin_kurutularak_muhafazasi.pdf (Erişim tarihi: 25 Mart 2016).
- Anonim (2012). Papatyagiller (*Asteraceae*) Hakkında. Farmakognozi, <http://kognozi.blogspot.com/2012/07/papatyagiller-asteraceae-hakkında.html> (erişim tarihi, 25.06.2018).
- Anonim (2013). Fenolik Bileşikler ve Doğal Renk Maddeleri. Ankara, http://megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Fenolik%20Bile%20%9Fikler%20Ve%20Do%20%9Fai%20Renk%20Maddeleri.pdf (erişim tarihi, 25.06.2018).
- Anonim (2018). *Cirsium creticum* Taxon Page. Tubives, http://www.tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=5264 (erişim tarihi, 25.06.2018).
- Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamin C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981.
- Arumugam M, Mitra A, Jaisankar P, Dasgupta S, Sen T, Gachhui R, Mukhopadhyay UK, Mukherjee J (2010). Isolation of an unusual metabolite 2-allyloxyphenol from a marine actinobacterium, its biological activities and applications. *App. Microbiol biotechnol*, 86; 109-117.
- Ataç A, Yıldırım RV (2015). Osmanlı Hekimleri ve Dioskorides'in "De Materia Medica"sı. *Osmanlı Tarihi Araştırma ve Uygulama Merkezi Dergisi OTAM*, 15 (15), 257-269.
- Aydın SA, Üstün F (2007). Tannenler 1 Kimyasal Yapıları, Farmakolojik Etkileri, Analiz Yöntemleri. *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 33 (1), 21-31.
- Benzie IFF and Strain J (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Bilaloğlu GV, Harmandar M (2013). Flavonoidler, molekül yapıları, kimyasal özellikleri, belirleme teknikleri, biyolojik aktiviteleri. *Aktif Yayıncılık*, 369 s İstanbul.
- Boğa M (2012). *Cirsium leucopsis* ve *Cirsium siphyleum* bitkilerinden sekonder metabolitlerin saflaştırılması, antioksidan ve antiasetilkolinesteraz aktivitelerinin belirlenmesi. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.
- Boldizsar I, Kraszni M, Toth F, Toth G, Solyomvary A, Noszal B, Zaray Gy, Molnar-Perl I (2012). The role of harmonized, gas and liquid chromatography mass spectrometry in

- the discovery of the neolignan balanophonin in the fruit wall of *Cirsium vulgare*. Journal of Chromatography A, 1264, 143-147.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food Science and Technology, 28, 25–30.
- Bremer K (1994). *Asteraceae: Cladistics & Classification*, Timber Press, Oregon.
- Brenes M, Romero C, Garcia A, Hidalgo FJ, Mendez R (2004). Phenolic compounds in olive oils intended for refining: formation of 4-Ethylphenol during olive paste storage. J Agric Food Chem, (52), 8177-8181.
- Cardoso MP, David JM, David JP (2005). A new alkyl phenol from *Schinopsis brasiliensis*. Natural Product Research, Vol. 19, No. 5, 431-433.
- Cherchar H, Lehbili M, Berrehal D, Morjhani, H, Magid AA, Voutquenne-Nazabadioko L, Kabouche A and Z (2018). Natural Product Research, Vol.32, No.9, 1010-1016.
- Çapacı K (2018). Asteraceae–Compositae (Papatyagiller). Kazım Çapacı, http://www.kazimcapaci.com/cicek_asteraceae.htm (erişim tarihi, 25.06.2018).
- Davis PH, Tan K and Mill, RR (eds.) (1988). Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol. 10, Edinburgh Univ. Press, Edinburgh.
- Deliorman Orhan D, Ergun F, Yeşilada E, Tsuchiya K, Takaishi Y, Kawazor K (2007). Antioxidant activity of two flavonol glycosides from *Cirsium Hypoleucum* DC. through bioassay-guided fractionation. Turkish J. Pharm. Sci. 4 (1) 1-14.
- Dey PM, Harborne JB (1989). Methods in Plant Biochemistry, Vol.1, Academic Press, London.
- Doğan B (2007). Türkiye Jurinea cass. (*Asteraceae*) Cinsinin Revizyonu. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Ender E (1993). Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler. Gazi Kitabevi, s. 530, Ankara.
- Evidente A, Cimmino A, Andolfi A, Berestetskiy A, Motta A (2011). Phomachalasin A–D, 26-oxa [16] and [15] cytochalasins produced by *Phoma exigua* var. *exigua*, a potential mycoherbicide for *Cirsium arvense* biocontrol. Tetrahedron, 67, 1557-1563.
- Feresin GE, Tapi A, Sortino M, Zacchino S, Arias AR, Inchausti A, Yaluff G, Rodriguez J, Theoduloz C, Schmeda-Hirschmann G (2003). Bioactive alkyl phenols and embelin from *Oxalis erythrorhiza*. Journal of Ethnopharmacology, 88, 241–247.
- Formisano C, Rigano D, Senatore F, De Feo V, Bruno M, Roselli S (2007). Composition and allelopathic effect of essential oils of two thistles: *Cirsium creticum* (Lam.) D.'Urv. ssp. *triumfetti* (Lacaita) Werner and *Carduus nutans* L. Journal of Plant Interactions, 2(2): 115-120.
- Fujita M, Yamada M, Nakajima S, Kawai K-I, and Nagai M (1984). O-Methylation Effect on the Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Signals of ortho-disubstituted phenols and its application to structure determination of new phthalides from *Aspergillus silvaticus*. Chem. Phar. Bull. 32(7), 2622-2627.
- Gaca KZ, Parkinson JA, Sefcik J (2017). Kinetics of early stages of resorcinol-formaldehyde polymerization investigated by solution-phase nuclear magnetic resonance spectroscopy. Polymer, 110, 62-73.
- Genç GE ve Özhatay N (2006). An ethnobotanical study in Çatalca (European Part of İstanbul) II. Turkish J Pharm Sci, 3: 73-89.

- Gezen ES, Ay E (2016). Şebinkarahisar İlçesinde Üretilen Dut Pekmezi ve Karadut Pekmezi Örneklerinin Toplam Fenolik Madde ve Hidroksimetil Furfural (HMF) İçeriklerinin Spektrofotometre İle Belirlenmesi. Gıda Derneği, <http://www.gidadernegi.org/TR/Genel/dg.ashx?DIL=1&BELGEANAH=6152&DOSY AISIM=S177+%C5%9Eebinkarahisar+%C4%B0l%C3%A7esinde+%C3%9Cretilen.pdf> (28.06.2018).
- Gustafson KR, Cardellina II JH, McMahon JB, Pannell LK, Cragg GM, Boyd MR (1992). The peltatols, novel HIV-inhibitory catechol derivatives from *Pothomorphe peltata*. J. Org. Chem., 57 (10), pp 2809–2811.
- Günenç A (2014). Extraction, bioactivity, and stability of wheat bran alkylresorcinols. Phd. Thesis, Carleton University Ottawa, Ontario.
- Hai J, Yong-Hai M, Liu Y, Qiu-Hong W, Bing-You Y, Chang L, Hai-Xue K (2013). A new megastigmane glycoside from the aerial parts of *Cirsium setosum*. Chinese Journal of Natural Medicines, 11(5): 0534–0537.
- Harborne JB, Marby TJ, Marby H (1975). The Flavonoids. Chapman and Hall, London, s.82.
- Hartung WH, Alkyl Catechol. United States Patent Office, 2,298,291.
- Hassan AU, Ajaib M, Anjum M, Siddiqui SZ, Malik NZ (2016). Investigation of Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Cirsium wallichii* DC. Biologia (Pakistan), 62 (2), 297-304.
- Hengtrakul P, Lorenz K, Mathias M (1991). Alkylresorcinol homologs in cereal grains. Journal of Food Composition Analysis, 4, 52-57.
- Iwashina T, Kamenosono K, Ueno T (1999). Hispidulin and nepetin 4'-glucosides from *Cirsium oligophyllum*. Phytochemistry, 51; 1109-1111.
- Juch M and Rüedi P (1997). Isolation, Structure, and Biological Activities of Long-Chain Catechols of *Plectranthus sylvestris* (Labiatae). Helvetica Chemica Acta, Vol. 80, 436-448.
- Kadereit JW ve Jeffrey C (eds) (2007). Flowering Plants. Eudicots: Asterales. In: Kubitzki K. (ed.). The Families and Genera of Vascular Plants, vol.8, Springer, Berlin.
- Kadereit JW ve Jeffrey (2007). The Families and Genera of Vascular Plants, Vol.8, Springer Berlin Heidelberg New York.
- Kahraman A, Serteser M, Köken T (2002). Flavonoidler. Kocatepe Tıp Dergisi (2002), 3, 01-08.
- Kaneta M, Hikichi H, Endo S, Sugiyama N (1978). Identification of Flavones in Sixteen *Compositae* Species Agric. Bioi. Chem., 42 (2), 475~477.
- Karuncula C (2013). *Leucojum Aestivum* L. Bitkisinden Alkaloidlerin İzolasyonu, Yapılarının Aydınlatılması ve Asetilkolinesteraz ve Butirilkolinesteraz İnhibisyon Aktivitelerinin (Anti-Alzheimer) İncelenmesi. Y. Lisans Tezi, T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, Türkiye.
- Kasun Ş (2017). Tunceli Yöresinde Yetişen Kuşburnu (*Rosa canina*) ve Alıç (*Crataegus orientalis*) Yabani Meyvelerinin Toplam Fenolik Madde Miktarı, Fenolik Kompozisyonu, Antioksidan Kapasitesi ile Bazı Fizikokimyasal Özelliklerinin

- Belirlenmesi. Y. Lisans Tezi, Munzur Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tunceli, Türkiye.
- Ke P, Yongqin Y ve Lingyi K (2006). Chemical constituents of *Cirsium setosum* (Willd.) MB. *Zhongguo Xiandai Zhongyao*, 8, 7-9.
- Kıyak G (2013). *Solanum nigrum* L. (Solanaceae) Bitkisinin Yağ Asidi Kompozisyonu ve *Solanum dulcamara* L. (Solanaceae) Bitkisinin Diklormetan/Metanol Ekstrelerinin Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi. Y. Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ, Türkiye.
- Kızıllarslan Ç ve Özhatay N (2012). An ethnobotanical study of the useful and edible plants of İzmit. *Marmara Pharm J*, 16: 134-40.
- Kim SY, Gao JJ, Lee W-C, Ryu KS, Lee KR and Kim YC (1999). Antioxidative Flavonoids from the Leaves of *Morus alba*. *Arch Pharm Res* Vol 22, No1, 81-85.
- Kim MJ, Kim CJ, Kwak SS (1997). Antifungal Activity of Urushiol Components in the Sap of Korean Lacquer Tree (*Rhus vernicifera* Stokes). *Korean Journal of Plant Resources*, Vol. 10; 3, pp.231-234.
- Kitahara T, Kanda N (1975). DB-2073, a new alkylresorcinol antibiotic. II. The chemical structure of DB-2073. *The Journal Of Antibiotics*, Vol. XXVIII, No.12.
- Kolaç T, Gürbüz P, Yetiş G (2017). Doğal Ürünlerin Fenol İçeriği ve Antioksidan Özellikleri. *İ.Ü. Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi*, Cilt 5, Sayı 1.
- Koppel IA, Piirsalu M, Nummert V, Maemets V, Vahur S (2009). Effect of ortho substituents on carbonyl carbon ¹³C NMR chemical shifts in substituted phenyl benzoates. *Journal of Physical Organic Chemistry*, Wiley, 22 (12), pp.1155.
- Koz Ö (2007). Isolation, Structural, Determination and Biological Activities of Some Natural Products from *Campanula lyrata subsp. lyrata* (Campanulaceae) and *Anchusa undulata subsp. hybrida* (Boraginaceae). Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Eğitim Bilimleri ve Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye.
- Kozyra M, Los R, Malm A, Glowinski K (2010). Phenolic acids in the flowering herbs of *Cirsium oleraceum* (L.) Scop. growing in Poland. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin-Polonia*. Vol:23, N.4,12.
- Köstekçi S (2010). Türkiye’de Yayılış Gösteren *Cirsium* Mill. Sect. *Cirsium* Türleri Üzerinde Karşılaştırmalı Morfolojik Araştırmalar. Y. Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya, Türkiye.
- Lam TH, Shaw M (1970). Removal Of Phenolics From Plant Extracts By Grinding With Anion Exchange Resin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 39: 965-968.
- Li L, Peng Y, Liu Y, Xu LJ, Guo N, Shi RB, Xiao PG (2011). Two new phenethanol glycosides from *Ligustrum robustum*. *Chinese Chemical Letters*, 22, 326-329.
- Liu S, Zhang J, Li D, Liu W, Luo X, Zhang R, Li L. and Zhao J (August 2007). Anticancer activity and quantitative analysis of flavone of *Cirsium japonicum* DC. *Natural Product Research*, 21(10), 915–922.
- Loizzo MR, Statti GA, Tundis R, Conforti F, Ando S, Menichini F (2004). Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Cirsium tenoreanum*. *Fitoterapia*, 75, 577– 580.
- Lu R, Kamiya Y, Miyakoshi T (2007). Characterization of Lipid Components of *Melanorrhoea usitata* lacquer sap. *Talanta*, 71; 1536-1540.

- Markham KR (1975). Isolation Techniques for Flavonoides. (The Flavonoids. Ed. Harborne, J. B.). London.
- Markham KR (1982). Techniques of Flavonoid Identification. Academic Press, London.
- Mastelic J, Jerkovic I, Vinkovic M, Dzolic Z, Vikić-Topić D (2004) Synthesis of selected naturally occurring glucosides of volatile compounds. Their chromatographic and spectroscopic properties. *Croat Chem Acta* 77:491–500
- McDonald TA, Holland NT, Skibola C, Duramad P, Smith MT (2001). Hypothesis: phenol and hydroquinone derived mainly from diet and gastrointestinal flora activity are causal factors in leukemia. *Leukemia*, (15), 10-20.
- Megawati, Darmawan A (2017). Resorcinol compounds isolated from the bark of *Myristica fatua* houtt. *Indonesian J. Pharm.*, 28, 82-90.
- Miller P (1754) *The Gardens Dictionary*. Arb. Ed. 4, London.
- Miller HE (1971). A simplified method for the evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chemists' Soc* 48: 91.
- Miyaichi Y, Matsuura M ve Tomimori T (1995). Phenolic compounds from the roots of *Cirsium japonicum* DC. *Journal of Natural Medicines*, 49, 92-94.
- Montanari S, Faggi G, Maltoni A (2012). Nuove stazioni di *Cirsium creticum* (Lam.) d'Urv. subsp. *triumfetti* (Lacaita) K. Werner (*Cardo cretese*) per la Romagna. *Quaderno di Quad. Studi Nat. Romagna*, 36: 7-15.
- Nalewajko-Sieliwoniuk E, Nazaruk J, Kotowska J, Kojło A (2012). Determination of the flavonoids/antioxidant levels in *Cirsium oleraceum* and *Cirsium rivulare* extracts with cerium(IV)-rhodamine 6G chemiluminescence detection. *Talanta*, 96, 216-222.
- Nazaruk J, Czechowska SK, Markiewicz R, Borawska MH (2008). Polyphenolic compounds and in vitro antimicrobial and antioxidant activity of aqueous extracts from leaves of some *Cirsium* species. *Natural Product Research* Vol. 22, No. 18, 15, 1583–1588.
- Nazaruk J (2009). Flavonoid compounds from *Cirsium palustre* (L.) Scop. Flower heads. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37, 525-527.
- Nazaruk J, Wajs-Bonikowska A, Bonikowski R (2012). Components and antioxidant activity of fruits of *Cirsium palustre* and *C. rivulare*. *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 48, No. 1.
- Ndhlala AR, Moyo M, Van Staden (2010). J. Natural Antioxidants: Fascinating or Mythical Biomolecules *Molecules*, 15: 6905-30.).
- Nonaka G-I, Nishimura H, and Itsuo Nishioka (1982). Tannins and Related Compounds. IV. Seven New Phenol Glucoside Gallates from *Quercus stenophylla* Makino. *Chem. Pharm. Bull.*, 30(6)2061-2067.
- Orhan DD, Ergun F, Yeşilada E, Tsuchiya K, Takaishi Y, Kawazoe K (2007). Antioxidant activity of two flavonol glycosides from *Cirsium hypoleucum* DC. through bioassay-guided fractionation. *Turkish J Pharmaceut Sci*, 4:1 14.
- Orjala J, Mian P, Rali T, Sticher (1998). Gibbilibol A-D, Cytotoxic and Antibacterial Alkenylphenols from *Piper gibbilibol*, *J. Nat. Prod.*, 61, 939-941.
- Ozawa Tetsuo and Takino Y (1978). Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Phenolic Glycosides Isolated from *Chesnut Galls*. *Agric. Bio. Chem*, 43 (6), 1173~1177, 1179.

- Özcan HM (2010). Fenolik Bileşiklerin Tayinine Yönelik Amperometrik Esaslı Biyosensör Hazırlanması. Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, Türkiye.
- Özhatay N ve Kültür Ş (2006). Check-List of Additional Taxa to the Supplement Flora of Turkey III, Tr. J. Bot., 30:281-316.
- Palade M (1971). O-Dihydrophenolic derivatives from *Cirsium arvense*. Farmacia (Bucharest, Romania), 19, 233-240.
- Palade M ve Forstner S (1971). Pharmacognostic study of *Cirsium arvense*. Farmacia, , 19, 89-104, Bucharest, Romania.
- Parejo I, Jauregui O, Nchez-Rabaneda FS, Viladomat F, Bastida J, and Codina C (2004). Separation and Characterization of Phenolic Compounds in Fennel (*Foeniculum vulgare*) Using Liquid Chromatography–Negative Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. J. Agric. Food Chem., 52, 3679–3687.
- Park JC, Lee JH, Cho JS (1995). A Flavone Diglycoside from *Cirsium Japonicum* var. Ussuriense. Phytochemistry, Vol 39, No. 1, pp. 261-262.
- Pauli GF, Poetsch F, Nahrstedt A (1998). Structure Assignment of Natural Quinic Acid Derivates Using Proton Nuclear Magnetic Resonance Techniques. Phytochemical Analysis, Vol. 9, 177-185).
- Plock A, Beyer G, Hiller K, Grundemann E, Krause E, Nimtz M, Wray V (2001). Application of MS and NMR to the structure elucidation of complex sugar moieties of natural products: exemplified by the steroidal saponin from *Yucca filamentosa* L. Phytochemistry, 57, 489–496.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999). Antioxidant Activity Applying An Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. Free Radical Biology and Medicine, 26, 1231.
- Ritchie JM (1974). A revision of the grass-living genus *Podothrips* (Thysanoptera: Phlaeothripidae). Journal of entomology (B), 43: 261-282.
- Rothenbacher T, Schwack W (2009). Rapid and nondestructive analysis of phthalic acid esters in toys made of poly (vinyl chloride) by direct analysis in real time single-quadrupole mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2009; 23: 2829–2835.
- Saito H, Uchiyama T, Makino M, Katase T, Fujimoto Y, Hashizume D (2007). Optical Resolution and Absolute Configuration of Branched 4-Nonylphenol Isomers and Their Estrogenic Activities. Journal of Health Science, Vol.53; 2, 177-184.
- Schuster B, Winter M, and Herrman K (1986). 4-O-β-D-Glucosides of Hydroxybenzoic and Hydroxycinnamic Acids-Their Synthesis and Determination in Berry Fruit and Vegetable. Z. Naturforsch, 41c, 511-520.
- Shelyuto VL, Glyzin VI, Bankovskii AI and Bubon NT (1971). Flavonoid glycosides of *Cirsium oleraceum*. Khimiya Prirodnikh Soedinenii, 7, 372-373.
- Singh J, Gupta K, Arora SK (1994). Changes in the anti-nutritional factors of developing seeds and pod walls of fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.). Plant Foods Hum Nutr, (46), 77-84.
- Smaoui S, Mathieu F, Elleuch L, Coppel Y, Merlina G, Karray-Rebai I, Mellouli L (2012). World J. Microbial Biotechnol, 28,793-804.

- Solyomvary A, Toth G, Komjati B, Horvath P, Kraszni M, Noszal B, Molnár-Perl I, Boldizsar I (2015). Identification and isolation of new neolignan and sesqueneolignan species Their acid catalyzed ring closure and specific accumulation in the fruit wall of *Cirsium eriophorum*. *Process Biochemistry*, 50(5), 853-858.
- Sternitzke A, Legrum W, Netter KJ (1992). Effects of phenolic smoke condensates and their components on hepatic drug metabolizing systems. *Food Chem Toxicol*, 30(9), 771-781.
- Sun X, Lin Y, Huang Q, Yuan Q, Yan Y (2013). A Novel Muconic Acid Biosynthesis Approach by Shunting Tryptophan Biosynthesis via Anthranilate. *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 79 Number 13, p. 4024–4030.
- Suzuki Y, Esumi Y, Yamaguchi I (1999). Structures of 5-Alkylresorcinol-Related Analogues in Rye. *Phytochemistry*, 52, 281-289.
- Sütlüpinar N (1994). Türkiye’deki Doğal İlaçlarla Tedavinin Bugünkü Durumu. *Bitkilerle Tedavi MİSEP X*, İstanbul Eczacı Odası Yayınları/14.
- Takara K, Matsui D, Wada K, Ichiba T, and Nakasone Y (2002) New Antioxidative Phenolic Glycosides Isolated from Kokuto Non-centrifuged Cane Sugar. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66(1), 29-35.
- Tam TF and Fraser-Reid B (1979). A synthetic route to 4-C-methyl-xylo-furanose. *Can. J. Chem.* 57, 2818.
- Tyman JHP, Mehet SK (2003). The separation and synthesis of lipidic 1,2-and 1,3-diols from natural phenolic lipids for the complexation and recovery of boron. *Chemistry and Physics of Lipids*, 126, 177-199.
- Tütem E (2011). Bitkisel Gıdaların Toplam Antioksidan Kapasiteleri ve Başlıca Fenolik Bileşenleri. Prof. Dr. Mehmet Ay Çalıştayları Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, http://maycalistaylari.comu.edu.tr/calistay2011yibo5/sunumlar/danisman/esma_tutem.pdf (28.06.2018).
- Valcarcel J, Reilly K, Gaffney M, O’Brien NM (2015). Antioxidant Activity, Total Phenolic and Total Flavonoid Content in Sixty Varieties of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Grown in Ireland. *Potato Research*, 58: 221–244.
- Van de Catelle K, De Pooter H, Van Sumere, CF (1976). *J. Chromatogr.* 121: 49-63.
- Yin Y, Heo S-II, Wang M-H (2008). Antioxidant and anticancer activities of methanol and water extracts from leaves of *Cirsium japonicum*. *J. Appl. Biol. Chem.*, 51(4), 160-164.
- Yu D, Xu F, Y Zeng J, Zhan J (2012). Type III polyketide synthases in natural product biosynthesis. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 64, 285-295.
- Zhang H, Yang X (2009). Profiling and quantification of isoflavone-C-glycosides impurities in puerarin injection by liquid chromatography coupled to ESI-ion trap mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49, 843–847.
- Zhang YM, Xu J, Xiao L, Zeng G-ZZ, Sun-H and Tan N-H (2013). A New Phenolic Glycoside from *Chamaecyparis obsuta* var. *breviramea* f. *crippsii*. *Molecules*, 18, 1255-1261.
- Zindorn C (2016). Secondary metabolites of seagrasses (Alismatales and Potamogetonales; Alismatidae); Chemical diversity, bioactivity, and ecological function. *Phytochemistry*, 124, 5-28.

ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında İzmir’de doğdu. İlköğretim eğitimini Tekirdağ İlköğretim Okulu'nda tamamladı. Lise öğretimini Namık Kemal Lisesi’nde tamamladı. Lisans eğitimini Namık Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde 2.27/4 ortalama ile tamamladı.

Yüksek Lisansını Tekirdağ Namık Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Organik Kimya Ana Bilim Dalı'nda tamamladı. MESMAP-3 (2017) ve MESMAP-4 (2018) olmak üzere iki ayrı poster sunumu yaptı. Tübitak 1001 projesinde çalıştı.

Yayınlanan makaleleri;

Sabudak T, Gulen D, Orak HH, Ozer M, Caliskan H, Cabi E (2017). Free Radical Scavenging Capacity and Antibacterial Activity of Wild *C. creticum* from Turkey. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, Vol 51, Issue 3, S359-362.

Sabudak T, Gulen D, Orak HH, Ozer M, Caliskan H, Bahriselit I, Cabi E (2017). Investigation of Some Antibacterial and Antioxidant Properties of Wild *Cirsium vulgare* from Turkey. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, Vol 51, Issue 3, S363-367.