



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***ERYNGIUM CAMPESTRE* L. BİTKİSİNİN  
TOPRAK ÜSTÜ KISIMLARI ÜZERİNDE  
FARMAKOĞNOZİK ARAŞTIRMALAR**

**Tunahan Süleyman TEKİN**

**FARMAKOĞNOZİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Doç. Dr. Sinem ASLAN ERDEM**

**ANKARA  
2023**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*ERYNGIUM CAMPESTRE* L. BİTKİSİNİN  
TOPRAK ÜSTÜ KISIMLARI ÜZERİNDE  
FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR

Tunahan Süleyman TEKİN

FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Sinem ASLAN ERDEM

ANKARA

2023

## ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “*Eryngium campestre* L. Bitkisinin toprak üstü kısımları üzerinde farmakognozik araştırmalar” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Tunahan Süleyman TEKİN

Tarih: 07.09.2023

İmza:

## KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakognozi Anabilim Dalında Tunahan Süleyman TEKİN tarafından hazırlanan  
'*Eryngium campestre* L. Bitkisinin toprak üstü kısımları üzerinde farmakognozik  
araştırmalar' adlı tez çalışması aşağıdaki  
jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile  
kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:07.09.2023

Doç. Dr. Sinem Aslan ERDEM  
Ankara Üniversitesi  
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Aslı CEYLAN  
Ankara Yıldırım Beyazıt  
Üniversitesi  
Üye

Prof. Dr. Özlem BAHADIR  
ACIKARA  
Ankara Üniversitesi  
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen AKTAN  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

# İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	x
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Genel Bilgiler	3
1.2. Apiaceae (Umbelliferae) Familyası	4
1.2.1. <i>Eryngium</i> L. Cinsinin Botanik ve Genel Özellikleri	6
1.2.2. <i>Eryngium campestre</i> L. Türünün Sistematikteki Yeri ve Botanik Özellikleri	7
1.3. <i>Eryngium campestre</i> Türünün Geleneksel Kullanımı	8
1.4. Fitokimyasal çalışmalar	10
1.4.1. Fenolik bileşikler	11
1.4.2. Flavonoidler	15
1.4.3. Uçucu yağlar	18
1.4.4. Kumarinler	19
1.4.5. Saponinler	20
1.4.6. Diğer Bileşikler	21
1.5. Biyolojik aktivite çalışmalar	21
1.5.1. Antioksidan aktivite	22
1.5.2. Antimikrobiyal aktivite	25
1.5.3. Anti-Alzheimer aktivite	28
1.5.4. Antienflamatuvar aktivite	29
1.5.5. Diğer Aktiviteler	32
1.6. Toksikite	33
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>35</b>
2.1. Gereçler	35
2.1.1. Deneyleerde Kullanılan Kimyasal Maddeler	35
2.1.2. Deneyleerde Kullanılan Araçlar	35
2.1.3. Deneyleerde Kullanılan Ortam ve İçeriği	36
2.2. Yöntem	37
2.2.1. Ekstraksiyon	37
2.2.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK/HPLC)	37
2.2.2.1. YPSK Validasyon yöntemi	37
2.2.2.2. YPSK Analizleri İçin Bitkisel Materyalin Ekstraksiyonu Örnek Hazırlanması	38
2.2.3. Miktar Tayini Yöntemleri	39
2.2.3.1. Total Rozmarinik Asit Miktar Tayini	39
2.2.4. <i>In vitro</i> sitotoksikite Testleri	40
2.2.4.1. Hücre Kültürü	40

2.2.4.2. Hücre toksisite testi (LDH)	40
2.2.4.3. Hücre proliferasyon testi (XTT)	41
<b>3. BULGULAR</b>	43
3.1. Bitkinin Toplanması	43
3.2. Ekstraksiyon Bulguları	43
3.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntem ve Analizlere Ait Validasyon Bulguları	44
3.3.1. Kalibrasyon Denkleminin ve Grafiği Oluşturulması	44
3.3.2. Analitik Validasyon Parametreleri	46
3.3.3.1. Sistem Uygunluk Testleri	46
3.2.2.2. Özgüllük	48
3.2.2.3. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı	48
3.2.2.4. Teşhis Sınırı (TS, LOD) ve Tayin Alt Sınırı (TAS, LOQ)	49
3.2.2.5. Doğruluk	50
3.2.2.6. Kesinlik	52
3.2.2.7. Sağlamlık	53
3.2.3. <i>Eryngium campestre</i> 'nin etanol ekstresinden YPSK ile rozmarinik asit miktar tayini	54
3.4. <i>In vitro</i> sitotoksosite Testleri	55
3.4.1. Hücre toksisite testi (LDH) sonuçları	55
3.4.2. Hücre proliferasyon testi (XTT) sonuçları	56
<b>4. TARTIŞMA</b>	58
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	60
<b>ÖZET</b>	61
<b>SUMMARY</b>	62
<b>KAYNAKLAR</b>	63
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	69

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışması, Türkiye’de yetişen *Eryngium campestre* bitkisinin toprak üstü kısmından Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) ile rozmarinik asit miktar tayini analizini gerçekleştirerek bitki ekstresinin kondrosit hücreleri üzerine etkisini araştırma amacı ile planlanmıştır.

Tez çalışmamın konu seçiminden tamamlanmasına kadar her aşamasında her türlü konuda yardımını benden esirgemeyen, hep yol gösterici olan, ilgisini ve desteğini hep hissettiren, bilgi ve tecrübelerini her zaman cömertlikle paylaşan değerli danışman hocam Doç. Dr. Sinem ASLAN ERDEM’a ve Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalındaki tüm saygıdeğer hocalarıma ve araştırma görevlilerine,

*In vitro* aktivite deneylerini gerçekleştirmede destek sağlayan Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Translasyonel Tıp Anabilim Dalından sayın Uzm. Kübra KAYA’ya ve Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim dalı öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Aslı F. CEYLAN’a,

Bu tez çalışmasında YPSK analiz verilerini analiz etmeme, sonuçları değerlendirmeme yardımcı olan, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim dalı öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Sevinç KURBANOĞLU’na ve Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi doktora öğrencisi sayın Uzm.Biol. Derya ALTAY’a,

Bitki materyalini sağlayan Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim dalı öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Gülderen YILMAZ’a ve İstanbul Medipol Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Gülnur EKŞİ BONA’ya,

Tez çalışmalarımda ve hayatımda her zaman destek olan, motivasyonumu arttıran sevgili eşim Öznur TEKİN’e ve aileme teşekkürlerimi sunarım.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	Derece Santigrad (Celcius)
A40	beta-Amyloid Peptide A 40
A42	beta-Amyloid Peptide A 42
AChE	Asetilkolinesteraz
AlCl <sub>3</sub>	Alüminyum Klorür
CAT	Katalaz
CGA	Klorojenik asit
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Eagle Ortamı
DMSO	Dimetil sülfoksit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DTD	Doğrudan Isısal Desorpsiyon
ECABU	<i>Eryngium campestre</i> toprak üstü kısımlarının n-bütanol ekstresi
ECRBU	<i>Eryngium campestre</i> köklerinin n-bütanol ekstresi
EP	Avrupa Farmakopesi
GAE/L	Gallik Asit Eşdeğeri
GC	Gaz kromatografisi
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GST	Glutasyon S-transferazlar
HC	İnsan Kondrositi (Human chondrocyte)
ICH	Uluslararası Uyum Konferansı
IC50	%50 İnhibisyon Oluşturan Konsantrasyon
ICH	Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu (The International Council on Harmonisation of Technical Requirements For Registration of Pharmaceuticals for Human Use)
IL-1	İnterlökin-1
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
JNK	Jun N-terminal Kinaz
LDH	Laktat Dehidrogenaz

LOD	Teşhis Sınırı (Limit of Detection)
LOQ	Tayin Alt Sınırı (Limit of Quantification)
LPS	Lipaz
MA	Molekül Ağırlığı
MAPK	Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz
MDA	Metilendioksiamfetamin
Na <sub>2</sub> CO <sub>2</sub>	Sodyum Karbonat
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotit - okside
NADH	Nikotinamid Adenin Dinukleotid
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa B
Nm	Nanometre
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
NO	Nitrik oksit
RA	Rosmarinik asit
RA-HEX	Rosmarinik asit heksozit
RPM	Dakikada Devir Sayısı (Revolutions Per Minute)
sp.	Tür
SS	Standart Sapma
ssp.	Alttür
TAS	Tayin Alt Sınırı
TNF-α	Tümör nekroz faktörü
TPA	12-O-tetradekanoilforbol-13-asetat
TS	Teşhis Sınırı
USP	Amerikan Farmakopesi
UV	Ultraviyole
VCAM1	Vasküler hücre adezyon molekülü-1
XTT	2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid
YPSK	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

## ŞEKİLLER

Şekil 1.1. <i>Eryngium campestre</i> türünün doğadaki görünümü	8
Şekil 1.2. Rozmarinik asit formülü	15
Şekil 1.3. Klorojenik asit formülü	15
Şekil 1.4. Kafeik asit formülü	15
Şekil 1.5. Saponin formülleri	20
Şekil 2.1. <i>Eryngium campestre</i> L. herbaryum numunesi	36
Şekil 3.1. <i>Eryngium campestre</i> türünün doğadaki görünümü	43
Şekil 3.2. <i>E. campestre</i> 'ye ait YPSK kromatogramı DAD-UV spektrumu	44
Şekil 3.3. 0,03 mg/mL'lik konsantrasyonda rozmarinik asit YPSK kromatogramı	45
Şekil 3.4. Rozmarinik asite ait 0,0005-0,25 mg/mL derişim aralığında elde edilen kalibrasyon grafiğı ve denklemi	45
Şekil 3.5. <i>E. campestre</i> 'ye ait YPSK kromatogramı	51
Şekil 3.6. <i>E. campestre</i> 'ye %200 oranında madde ilavesi sonrası ait YPSK kromatogramı	51
Şekil 3.7. Hücre toksisite testi (LDH) farklı konsantrasyondaki sonuçları	56
Şekil 3.8. Hücre proliferasyon testi (XTT) kullanılarak farklı konsantrasyondaki sonuçları	57

## ÇİZELGELER

<b>Çizelge 1.1.</b> Bitkinin içerdiği flavonoit içeriği çizelgesi	17
<b>Çizelge 1.2.</b> Bitkinin içerdiği uçucu yağ çizelgesi	19
<b>Çizelge 2.1.</b> YPSK cihazının özellikleri	38
<b>Çizelge 3.1.</b> <i>Eryngium campestre</i> bitkisinin kuru ekstresinin miktarları ve % verimi	43
<b>Çizelge 3.2.</b> Sistem uygunluk testleri sonuçları	48
<b>Çizelge 3.3.</b> Geliştirilen YPSK yöntemi ile rozmarinik asit tayini için validasyon parametreleri ve kalibrasyon sonuçları	50
<b>Çizelge 3.4.</b> Geliştirilen YPSK yöntemi ile rozmarinik asit tayini için geri kazanım çalışmasından elde edilen sonuçlar	52
<b>Çizelge 3.5.</b> Rozmarinik asit standart çözeltisi gün içi kesinlik parametresi sonuçları	52
<b>Çizelge 3.6.</b> Rozmarinik asit standart çözeltisi günler arası kesinlik parametresi sonuçları	53
<b>Çizelge 3.7.</b> Rozmarinik asit standart çözeltisi YPSK analizi için sağlamlık parametresi sonuçları	54
<b>Çizelge 3.8.</b> <i>E. campestre</i> bitkisinde YPSK ile ölçülen rozmarinik asit miktarı	55
<b>Çizelge 3.9.</b> Hücre toksisite testi (LDH) farklı konsantrasyondaki sonuçları	55
<b>Çizelge 3.10.</b> Hücre proliferasyon testi (XTT) farklı konsantrasyondaki sonuçları	56

# 1. GİRİŞ

Tıbbi bitkilerden, antik çağlardan günümüze kadar farklı hastalıkların hafifletilmesinde, önlenmesinde ve tedavisinde yararlanılmıştır. Son yıllarda hastalıkların tedavisinde doğal kaynaklardan elde edilen ürünlere karşı bir talep artışı olmuştur. Bu talep artışında; modern tedavi ile tüm hastalıkların etkili bir şekilde tedavi edilememesi, dikkatlerin son yıllarda sentetik ilaçların güvenilirlik ve emniyetleri üzerinde yoğunlaşması, sentetik ilaçların olası yan etkileri, bitkilerle tedavinin yan etkilerinin sentetik ilaçlara oranla daha az olduğu görüşü ve doğal ürünlerle tedavinin kayda değer sonuçlar verdiği yapılan çalışmalarla gösterilmesinin gibi nedenlerin etkili olduğu düşünülmektedir. Bitki ekstralarının kimyasal bileşimlerinin kalitatif ve kantitatif olarak araştırılması ve geleneksel kullanımlarının doğruluğunun incelenmesi amacıyla çok sayıda çalışma geçtiğimiz yüzyılda gerçekleştirilmiştir. 1800'lü yılların başından itibaren modern bilimin gelişmesi ile bitkilerin içerisinde bulunan tıbbi etkilere sahip kimyasal maddeler tanımlanmaya, izole edilmeye, yapıları tayin edilmeye ve sonrasında da ekstralar standardize edilmeye başlanmıştır. Yeni ve alternatif terapötik ajanlar arayışında bitkilere çok büyük ilgi duyulmaktadır. Günümüzde de tıbbi bitkiler ve aktif bileşenleri çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanılmaktadır (Al-askar ve ark., 2023; Ekşi ve ark., 2020; Lu ve ark., 2019; Oloumi ve ark., 2011; Poursalehi ve ark., 2018; Raeiszadeh ve ark., 2018).

Bitkiler arasında tür çeşitliliği olarak en zengin ve araştırılmaya en cazip familyalardan biri olan Apiaceae (eski adıyla Umbelliferae) familyasının Türkçe adı Maydonozgillerdir (Hançer ve ark., 2017). *Eryngium* L., Apiaceae familyasının en geniş cinsidir ve bu familyanın Saniculoideae alt familyasının da büyük kısmını oluşturmaktadır. *Eryngium* cinsi Avrupa ve Asya kıtalarında ılıman bölgelerde yayılış gösterir. Ülkemizde *Eryngium planum* L., *Eryngium campestre* L., *Eryngium kotschy* Boiss. ve *Eryngium maritimum* L. gibi türlerin en yaygın yöresel adı 'boğadikeni'dir. Deveci diken, hölemez, geke diken, şeker diken, deve elması,

eşek diken, tengel diken, guga diken, yılan diken, göz diken gibi isimlerle de bilinmektedirler (Baytop, 1999).

*Eryngium* cinsinin pek çok türü yüzyıllardır birçok hastalığın tedavisinde geleneksel tıpta kullanılmaktadır. Orta Çağ'da insanların *Eryngium* türlerinin yapraklarını, tohumlarını ve köklerini ereksiyonu uyarmak ve spazm (gaz) giderici olarak kullandıkları tespit edilmiştir (Kikowska ve ark., 2020). Eski zamanlarda Şam bölgesinde hemoroid hastalığında zührevi hastalıklarda, yara ve yanıklarda, ağrı kesici olarak kullanıldığı tespit edilmiştir (Lev, 2002).

*Eryngium* türleri üzerinde gerçekleştirilen fitokimyasal çalışmalarda: toprak altı kısımlarında monoterpenik glikozitler, kumarin türevi bileşikler (furano-piranokumarinler), fitosteroller, triterpenik saponinler, terpen aldehit esterleri, fenolik bileşikler (flavonoidler, fenolik asitler), yağ asitleri (poliasetlenler), uçucu yağ ve oligosakkaritler gibi biyoaktif bileşikler, toprak üstü kısımlarında ise saponinler, flavonoidler ve uçucu yağ gibi biyoaktif bileşik gruplarının varlığı belirlenmiştir (PDR for Herbal Medicines, 2004; Ramawat ve ark., 2020).

*Eryngium* türlerinin toprak üstü kısımları yara tedavisinde, balgam söktürücü, idrar söktürücü, iştah kesici ve uyarıcı olarak kullanılmaktadır, toprak altı kısımları ise şişlik, sinüs enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları, guatr, hayvan ısırıklarında, yapraklar; kısırlıkta, (Hawas ve ark., 2013; Medbouhi ve ark., 2018). Prof. Dr. Murat Kartal'ın kişisel deneyimi olarak "*Eryngium campestre*'nin köklerinin sulu ekstresinin ise, Edremit-Balıkesir bölgesinde akrep sokmalarında dahilen kullanıldığı" saptanmıştır (Kartal ve ark., 2006).

Yapılan literatür incelemesinde, Portekiz'de, *Eryngium duriaei* subsp. *juresianum* bitkisinden elde edilen uçucu yağın kondrositler üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmıştır. *Eryngium* türlerinin ekstrelerinin kondrosit hücrelerine etkilerinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasında, Türkiye’de yetişen *Eryngium campestre* bitkisinin toprak üstü kısmında rozmarinik asit miktar tayininin gerçekleştirilmesi ve yine toprak üstü kısmından hazırlanan %70’lik etanol ekstresinin kondrosit hücreleri üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Kondrositler, kıkırdak dokunun ana hücreleridir; kıkırdak dokunun olgun hücrelerine kondrosit, genç hücrelerine ise kondroblast adı verilir. Kondrositler, vücutta kıkırdak bütünlüğünü ve küçük veya akut hasara bağlı olarak matrikse verilen zararı onararak korumakla görevli hücrelerdir. Aynı zamanda kollajen oluşumundan sorumludurlar. Burun ve kulak kepçesi gibi organlarımızda bulunan hücrelere sağlamlık ve esneklik kazandırır (Junqueira ve ark., 2005).

Kıkırdakta oluşan biyomekanik hasarlar veya biyokimyasal ortamındaki değişimler kondrositlerin davranışlarında karakteristik değişimlere ve osteoartrit hastalığının ilerlemesine neden olabilmektedir. Osteoartrit dejeneratif eklem hastalıklarından en yaygın görülen türlerindedir. Böyle bir ortamda reaktif oksijen türevlerinde (ROS) yükseliş ve enflamasyonun indüksiyonu gözlenir; kondrositlerde yaşlanma görülür ve bu durum kıkırdak bütünlüğüne zarar verebilmektedir (Ortner, 2003).

Hipotezimiz: *Eryngium campestre* bitkisinin toprak üstü kısımlarının fenolik bileşenlerce zengin olması sebebiyle bu kısımlardan hazırlanan ekstrenin yaşlanmış kondrosit hücrelerini ortamdan uzaklaştıracağı ve geriye kalan hücrelerin yaşamlarına daha etkili devam etmesine katkı sağlayacağıdır.

## 1.1. Genel Bilgiler

Türkiye’de tür ve tür altı seviyesindeki doğal takson sayısı yaklaşık 11.224 olup bunların yaklaşık 4001 tanesi endemik taksondur. Ülkemizin endemizm oranı ise %35,6 olarak belirtilmiştir (Şenkul, 2017). Yapılan bu araştırmalar ülkemizin bitki çeşitliliği bakımından zenginliğini göstermektedir ve bunun temelinde Türkiye’nin coğrafî konumu, çeşitli yapıda toprak türlerine sahip olması, iklim

çeşitliliği, çok farklı coğrafya koşullarının etkisinde oluşu ve farklı anakaya tiplerinden oluşması gibi nedenler yatmaktadır. Türkiye'nin coğrafyasının doğusu ve batısında ekolojik farklılıklar yer almaktadır. Ülkemizdeki bitki çeşitliliği pek çok botanikçinin ilgisini çekmiş ve ülkemizde çalışmaların artmasına ve yeni çalışmalar üzerinde yoğunlaşılmasına sebep olmuştur. İsviçre'li botanikçi E. Boissier'in "Flora Orientalis" adlı eseri Türkiye florasını içeren ilk önemli yayındır (Web 3: Erişim Tarihi: 17.06.2023).

Ülkemizin florası hakkında en kapsamlı yayın Flora Orientalis'den yıllar sonra tamamlanan ve editörlüğünü P.H. Davis'in yaptığı "Flora of Turkey and the East Aegean Islands" adlı toplam 10 ciltlik eserdir. 2000 yılında Türk botanikçileri tarafından bir ek cilt daha eklenmiştir. Son eklenen ciltten sonraki yıllarda yeni pekçok sayıda takson tanımlanmakta, yapılan çalışmalar varyasyonları tamamen tespit edilmektedir. Bu durum bize Türkiye florası çalışmalarının tam anlamıyla bitirilemediğini ve çalışmaların devam etmesi gerektiğini göstermektedir (Güner ve ark., 2000).

## 1.2. Apiaceae (Umbelliferae) Familyası

Türkçe adı Maydanozgiller, İngilizce adı Parsley family, adını *Apium* L. (kereviz) cinsinden almaktadır (Amiri ve ark., 2016; Heywood ve ark., 2007). Bu aile, birçoğu iyi bilinen ve mutfak, tıbbi ve süs amaçlı kullanım için önemli olan çok çeşitli bitkileri içermektedir. Familyanın temsilcileri ılıman dağlık alanlarda yaygındır ve bu familyaya ait bazı türler nadiren tropikal enlemlerde dağılmaktadır. Dünyadaki genel dağılıma bakıldığında, farklı türler ve cinsler, farklı bölgelerde doğal olarak yetişebilmektedir. Bu familyanın bazıları tropik bölgelerde yoğunlaşırken, her iki kutupta da geniş bir coğrafi alanı kapsamaktadır. Genel olarak, Kuzey Yarımküre'de daha fazla yayılış gösterirler (Thiem ve ark., 2010).

Apiaceae familyası yaklaşık 464 cins, 3000 tür olduğu düşünülen familyanın ülkemizde yaklaşık 109 cinsi 450 türü doğal olarak yetişmektedir. Endemizm oranı %31 olan familyanın 140 tane türü endemiktir (Yılmaz ve ark., 2016). Familyanın

Ülkemizdeki dağılımları homojenize olmayıp Doğu bölgesinde yoğunlaşmıştır. Bu bölge de familya olarak toplamda 242 tür ile çeşitlilik gösterip 15 cinse ait toplam 23 tür endemik olarak yetişmektedir (Heywood ve ark., 2007; Yılmaz ve ark., 2016).

Apiaceae familyasının en ayırt edici özelliği, umbel adı verilen iek salkımıdır. Bir umbel, tek tek iek saplarının bir şemsiyenin parmaklıklarına benzeyen ortak bir noktadan çıktığı düz veya yuvarlak bir iek kümesidir. Bitkilerin sapları ise gövdeleri genellikle içi boş ve eklemlidir, bu da tanımlayıcı özelliklerindedir. Genellikle otsu bitkiler olup tek veya çok yıllıktır (Amiri ve ark., 2016).

Apiaceae familyasındaki birçok tür aromattiktir ve karakteristik kokuları ve tatları vardır. Apiaceae familyası ekonomik anlamda büyük paya sahip olan esansiyel yağların elde edilmesinde kullanılan bitkilerin en önemlilerindedir. Familyadaki bitkilerden elde edilen esanslar parfüm ve kozmetik endüstrisinde hoş kokularından dolayı kullanılmaktadır (Başer, 2014). Ülkemizde Doğu Anadolu'daki taksonları genellikle gıda ve hayvan yemi olarak, birçoğu da geleneksel olarak insan ve hayvanlarda çeşitli hastalıklara karşı kullanılmaktadır (Heywood ve ark., 2007; zelik ve ark., 2016).

Familyanın sekonder metabolitleri arasında fenolik bileşikler, kumarin türevleri, uçucu yağlar, triterpenik saponinler, yağ asitleri (poliasetlen) ve bir çok biyoaktif bileşenler yer almaktadır (Bogucka-Kocka ve ark., 2008; Heywood ve ark., 2007; Singh, 2010).

Halk arasına galaktogog, gaz giderici, ateş düşürücü, sakinleştirici, mide-bağısak rahatsızlığında, iştah açıcı, dekonjestan ajan olarak ve hazımsızlık, deri hastalıklarının tedavisinde, ocuk kulak ağrısı, yeni doğum yapmış kadınların iyileşmesi, antiseptik, üriner system, antelmintik, soğuk algınlığı ve zayıflıkların tedavisinde kullanılmıştır (Amiri ve ark., 2016; Heywood ve ark., 2007; Singh, 2010).

Apiaceae familyasına ait bitkilerin yiyecek, baharat olarak ve eczacılık, kozmetik ve tarım alanlarında kullanıldığı görülmektedir. *Eryngium* türleri Apiaceae familyasında yer alan bitkilerdir. *Eryngium* ismi eski Yunancadan Latinceye geçen ve 'geçirtmek, kusturmak' anlamını taşıyan "eruggarein" sözcüğünden gelmektedir (Aslan Erdem, 2009; Wörz, 2004).

### 1.2.1. *Eryngium* L. Cinsinin Botanik ve Genel Özellikleri

*Eryngium* cinsi 300'den fazla türü içerisinde barındırmaktadır. Farklı ülkelerde yenilebilir bitki ve tıbbi bitki olarak yaygın olarak kullanılan çiçekli bitki türlerindedir (Bylebyl ve ark., 2008; Pimenov ve Leonov 2004; Worz, 2010).

*Eryngium* cinsi *Apiaceae* familyasının diğer cinslerinden, kapitulum şeklindeki genellikle dallanmış çiçek durumu, dikenli braketlerle çevrilmiştir. Bu cins morfolojik olarak çok çeşitlidir. Bu cins içindeki bazı türlerin boyları çok kısa iken bazılarının ki ise 3 metreye kadar uzanabilir. Bir, iki veya çok yıllık olabilirler. Yaprak morfolojisi ve yapraklardaki damarlanması çok değişkenlik gösterir. Köklere yakın çiçeklere ait çiçek yapraklarının küçükbaşları diğer çiçek yapraklarında ayırt edilebilir. Dikenli brakteleler tarafından çevrilmiş bir kapitulumda, sapsız çiçekler yoğun bir şekilde toplanmıştır. Brakteoller tam veya üç parçalıdır; uçları batıcıdır; bazı türlerde gösterişli bir şekle sahiptirler. Petaller, beyazımsı, mavi veya yeşilimsi, sepaller belirgin, serttir. Petaller, sepallerden daha kısadır. Meyveler, değişik boyutlarda olabilir. Meyve 2 merikarptan oluşan bir şizokarptır. Merikarplar genellikle ovoid, oblong veya elipsoit şekildedir. Merikarpların iç yüzeyi düz, diğer tarafı dışbükeydir, etrafı pullarla kaplıdır, genellikle yanlarda 2 belirgin kosta bulunur, merikarplarda 5 adet iletim demeti bulunur, iletim demetlerinin üzerinde birer salgı kanalı bulunur (Aslan ve ark., 2009; Calvino ve ark., 2008; Worz, 2010).

### 1.2.2. *Eryngium campestre* L. Türünün Sistematikteki Yeri ve Botanik Özellikleri

Bölüm	: Spermatophyta
Altbölüm	: Angiospermae
Sınıf	: Dicotyledonae
Altsınıf	: Dialypetaleae
Takım	: Umbellales, Apiales, Umbelliflorae
Familya	: Umbelliferae, Apiaceae
Alt familya	: Saniculoideae
Cins	: <i>Eryngium</i> L.
Tür	: <i>Eryngium campestre</i> L.

*Eryngium campestre* ülkemizde yaygın olarak “boğa dikenini” olarak bilinmektedir. Boğa dikenini, çok yıllık ve dikenli bir bitkidir. Kök kısmı ağaçsı ve soğanımsı şekilde toprağın 20 cm derinlerine nüfuz edebilmektedir. Gövde ve yaprakları serttir ve bükülmezler. Beyazımsı yeşil renktedir. Yaprakları derimsi, dip yaprakları derin tüysü parçalı, çok dikenli, dişli, kısa saplıdır. Toprak üstü kısmı 15-60 cm boylarındadır. Taban yaprakları üçgen-ovattır, kalıcıdır, 10-25 x 10-18 cm boyutlarında olabilir, derimsi, genellikle yayık bipennatifit primer üç parçadan meydana gelmiştir. Gövde üzerindeki yapraklar daha küçük, dikenli ve gövde etrafında kıvrıktır. Çiçekler sarımsı yeşil veya donuk mavimsi yeşil renkli olup, genişçe yayvandır; yalancı şemsiye yapısında bileşik salkım şeklindedir; 7–13 mm çapında, oval küremsi çok sayıda kapituladan oluşur. Çiçekler bir mızrak gibi yaprakçıkların arasına yerleştirilmiştir. Çiçeklenme zamanı Haziran-Eylül aylarıdır. Meyve eliptiktir. 1800 metre rakıma kadar olan yüksekliklerde yetişir. Taşlı yamaçlar, bozulmuş stepler, orman açıklıkları, nadasa bırakılmış tarlalar ve kumullarda yetişebilir (Baytop, 1999; Calvinove ark., 2008).

*Eryngium campestre*, ülkemizin coğrafi konum olarak her bölgesinde yetişebilen bir türdür. Ancak bazı bölgeler ve şehirlerde görülme sıklığı daha fazladır. Örnek verecek olursak Hatay, Mersin, Bursa, Trabzon, Bolu, Konya,

Afyonkarahisar, Mardin, Ankara, Çanakkale, Elazığ, İstanbul, Kayseri, İzmir, Kütahya, Sivas gibi illerimiz verilebilir (Web 1, Erişim Tarihi: 28.11.2022).



Şekil 1.1. *Eryngium campestre* türünün doğadaki görünümü.

### 1.3. *Eryngium campestre* Türünün Geleneksel Kullanımı

*Eryngium* cinsi bitkiler, geleneksel tıpta ve bazı kültürlerde tedavi amaçlı uzun yıllardır kullanılmıştır. Bu bitkilerin tıbbi ve diğer geleneksel kullanımları, farklı bölgeler ve kültürler arasında değişiklik gösterebilmektedir. *Eryngium campestre* türlerinden bazıları geleneksel tıpta ilaç olarak uygulanmıştır. Ana hammaddeler otlar (*Eryngii herba*) ve köklerdir (*Eryngii radix*) (Gruenwald ve ark., 2000). Orta çağda *E. campestre* yaraları, yanıkları, ağrıları ve hemoroidleri tedavi etmek için kullanılmıştır (Lev, 2002). *E. campestre* böbrek ve idrar yolu iltihaplarına karşı önerilmektedir (Gruenwald ve ark., 2000). Cinsel işlev bozukluğunda,

menstrüasyonun yokluğunda ve prostat hipertrofinde endikedir. Acı tadı nedeniyle sindirimi uyarmaktadır (Kikowska ve ark., 2020). Modern geleneksel tıpta, sonbaharda toplanan ve doğal koşullarda kurutulan *E. campestre* kökleri ve ilkbaharda toplanan otlar ateş düşürücü ve terletici tedavi olarak infüzyon, kaynatma ve tentür şeklinde kullanılmaktadır (Küpeli ve ark., 2006).

*E. campestre* L., Kosova ve Türkiye'de halk hekimliğinde öksürük, idrar enfeksiyonları, böbrek fonksiyonlarının bozulması, idrar salgısının artması ve prostat fonksiyonlarının düzenlenmesi için infüzyon olarak ve bu türün köklerinden elde edilen sulu ekstraler akrep sokmalarına karşı ilaç olarak kullanılmaktadır. İtalya ve Bulgaristan'da, köklerin infüzyonu prostatit, diüretik, spazmolitik, anti-ödem, kolagog ve koleretik olarak ve terlemeyi teşvik etmek için kullanılır. Cezayir halk tıbbında ise *Eryngium campestre* L. yerel adıyla "Tabelwadha" üriner enfeksiyonlara, öksürüğe, bademcik iltihabına ve boğmacaya karşı kullanılır (Soumia, 2018). *E. campestre* L. kök ekstraleleri, anti-enflamatuar, antinosiseptif, uyarıcı ve antitüssif aktivite göstermiştir (Kikowska ve ark., 2020).

Ülkemizin Doğu Anadolu bölgesi dışında pek bilinmeyen boğa dikenini Avrupa'nın birçok yerinde, sebze olarak kullanılmak üzere tarımı yapılmaktadır. Bazı Avrupa ülkelerinde ise, taze iken haşlanan sürgünleri kuşkonmaz (*Asparagus*) yerine kullanılmaktadır. Demleme yöntemi ile bitki kökü ve toprak üstü kısımları antitüssif, diüretik, iştah açıcı ve afrodizyak olarak halk hekimliğinde kullanılmaktadır (Baytop., 1999).

Boğa dikenini toprak üstü ve toprak altı kısımları, karın bölgesinde ödem durumunda, idrara gitmede yaşanan zorlukta, cilt ve deri hastalıkları, verem ve solunum yollarında meydana gelen iltihaplı nezleler gibi hastalıklara karşı halk tarafından kullanımı yaygınlaşmıştır. Ayrıca, harici olarak gözde çapaklanma, ışığa karşı aşırı hassasiyet gibi rahatsızlıklarda kompres olarak uygulanmaktadır (Özer, 2002).

Özet olarak *Eryngium campestre* cinsi öksürük, boğmaca, idrar yolu enfeksiyonları, böbreğin işlev bozuklukları, idrar salgısının artması, böbrek ve mesanedeki taş ve kumların atılması, su tutulmasına, ateş düşürücü ve terletici tedavi olarak, idrar yollarındaki problemler ve prostat fonksiyonunun düzenlenmesinde diğer rahatsızlıklara karşı halk hekimliğinde demlenerek kullanılmaktadır (Kikowska ve ark., 2020; Nebija ve ark., 2009).

Yapraklarının hayvan yemi olarak (Kargioğlu, 2008) ve gıda olarak ; çiçek durumlarının çibaneleri olgunlaştırmada kullanıldığı belirtilmiştir (Özkan ve ark., 2005).

#### **1.4. Fitokimyasal çalışmalar**

*Eryngium campestre* bitkisinin toprak üstü ve toprak altı kısımları üzerinde gerçekleştirilen fitokimyasal çalışmalarla farklı gruplardan etken maddelerin bitkide bulunduğu ya analitik yöntemler kullanılarak tespit edilmiş ve miktar tayini yapılmış ya da izolasyon ve yapı tayini çalışmaları ile etken maddeler saptanmıştır.

*Eryngium* türlerinin fitokimyasal çalışmalarında, toprak üstü kısımlarında fenolik asitler, triterpenik saponinler, flavonoidler, poliasetilenler ve uçucu yağlar; toprak altı kısımlarında triterpenik saponinler, kumarin türevleri, monoterpen glikozitler, uçucu yağlar, fenolik asitler, flavonoidler, aldehit esterleri, asetilenler oligosakkaritler gibi etken madde grupları bulunmaktadır (Al-askar ve ark., 2023; Gruenwald ve ark., 2000; Kartal ve ark., 2005; Kikowska ve ark., 2019; Kikowska ve ark., 2020; Nebijave ark., 2009; Suci ve ark. 2006).

Bitkinin kimyasal bileşimi, bitkinin yetiştiği coğrafi bölge, toprak koşulları ve mevsimsel değişimler gibi faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir (Kikowska ve ark., 2020).

Köklerde; sikloheksanol tipi monoterpenik heterozitler, fenolik bileşikler (klorojenik asit, rozmarinik asit v.b), flavonoidler, triterpenik sapanozitler,

füranokumarinler ve püranokumarinler (ejeliol ve ejelinolün benzil ve agasilin), poliasetilenler ve oligosakkarit (1-kestoz) tespit edilmiştir. Toprak üstü kısımlarda ise; flavonoidler, fenolik bileşikleri, kafeik asit esterleri (klorojenik asit ve rozmarinik asit), poliasetilenler, triterpenik saponozitler bulunduğu belirtilmiştir (Abu-Asaker, 2005; Al-askar ve ark.. 2023; Fleming, 2000; Gruenwald ve ark., 2000; Kikowska ve ark., 2020; Nebija ve ark., 2009).

Ayrıca Kürek tarafından 2007'de yapılan bir çalışmada *Eryngium campestre*'nin kurutulan ve toz haline getirilen, 120 gr ağırlığındaki toprak üstü kısımları (yaprak, çiçek, gövde), 6-8 saat boyunca, %30'luk DMSO (dimetilsülfoksit) ile ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Bu ekstre buharlaştırılarak elde edilen kuru ekstratlar, DMSO ile son konsantrasyon %30 olacak şekilde çözülmüştür. Bu ekstre ile DTD (Doğrudan Isısal Desorpsiyon) metodu kullanılarak 55 adet bileşen bulunmuştur. Bileşenlerden majör olanları izolede (%14,89), (S)-cis-verbenol (%8,52), karyofilen (7,25),  $\gamma$ -gurjunen (5,57), 1R- $\alpha$ -pinen (%5,01) şeklinde sıralanmıştır (Kürek, 2007).

#### 1.4.1. Fenolik bileşikler

Aromatik halkaya bağlı olan hidroksil grubu sayısı bir tane ise fenol, iki veya daha fazlaysa polifenol olarak adlandırılmaktadır. Fenolik bileşikler bitkilerde doğal olarak en fazla bulunan ve antioksidan özelliğine sahip çok önemli sekonder metabolitlerdir.

*Eryngium* türlerinin *in vitro* sürgün ve kök kültürleri, fenolik asitler ve flavonoidler gibi değerli biyoaktif bileşikler açısından zengin, değerli bir alternatif biyokütle kaynağı olarak kabul edilebilmektedir (Al-Askar ve ark., 2023).

*Eryngium*'da bulunan baskın fenolik asitler, başta rozmarinik ve klorojenik asitler olmak üzere kafeik asit türevleridir. Rosmarinik asit (RA; 3,4-dihidroksifenilaktik asidin bir kafeik asit esteri) antiviral, antibakteriyel, antiseptik, antiflojistik ve anti-inflamatuar gibi birçok biyolojik ve farmakolojik aktiviteye sahip

olduğu görülmüştür (Atay Balkan ve ark., 2020; Bulgakov ve ark., 2012; Kikowska ve ark., 2016b;).

Rosmarinik asit (RA), *Eryngium sp*'nin test edilen tüm sürgün ve kök *in vitro* kültürlerinde en yüksek konsantrasyonda bulunan fenolik asit çıkmıştır. Tahminlere göre en zengin RA kaynağı, *E. planum*'un kök (694,58 mg/100 g k.a.) ve sürgün (388,95 mg/100 g k.a.) kültürleriydi. Tespit edilen tüm fenolik bileşikler içinde RA, *E. maritimum* (181,27 mg/100 g k.a.-kök; 174,51 mg/100 g k.a.-sürgün kültürleri) ve *E. campestre*'de (100,91 mg/100 g k.a.-kök; 325,85 mg/100 g k.a.-sürgün kültürleri) de kantitatif olarak baskın çıkmıştır (Kikowska ve ark., 2022). *Eryngium* türünün *in vitro* kültürlerinden sağlam bitki ve organların (sürgünler ve kökler) ham maddeleri için Folin-Ciocalteu reaktifinin kullanımıyla karşılaştırmalı olarak gerçekleştirilmiştir. Ekstrelerdeki fenolik asitlerin ve flavonoidlerin analizleri için valide edilmiş YPSK-DAD yöntemi kullanılmıştır (Ellnain-Wojtaszek ve ark., 1999; Kikowska ve ark., 2022).

*Eryngium* türleri için rozmarinik asit (ayrıca rozmarinik asit heksozidi), klorojenik asit ve kafeik asitlerin kantitatif analizleri yapılmıştır. YPSK ve UYPSK'yi uygulayan fitokimyasal analiz, bireysel *Eryngium* türleri için çalışılan metabolitlerin kalite profillerinde ve kantitatif bileşiminde farklılıklar göstermiştir. Saponine benzer bir şekilde, *in vitro* üretilen bitkilerin biyokütlesinde daha yüksek fenolik içeriği gözlenmiştir. Seçilmiş fenolik asitlerin en yüksek içeriği *E. campestre* ve *E. maritimum*'da kaydedilirken, en düşük *E. planum*'da kaydedilmiştir. *In vitro* olarak kültürlen bitki kökleri, tarlada yetiştirilen bitkilerin köklerinden daha yüksek seçilmiş fenolik asit içeriği sergilemiştir. *E. campestre* 3,92 kat ve *E. maritimum* 12 kat daha fazla fenolik asit içerdiği göstermiştir. *E. campestre* durumunda, RA, RA-HEX ve CGA toplamı, toprakta yetişen bitkilerden alınan rozetlere göre 1,1 kat daha düşük olduğu kanıtlanmıştır. Toprakta yetişen bitkilerin sürgünlerinde rozmarinik asit ve klorojenik asit içeriği açısından en zengin ham maddeler, RA+CGA toplamının 16,883 mg/g k.a. olduğu *in vitro* yetiştirilen *E. campestre* kökleri çıkmıştır. Çoğu (klorojenik ve rozmarinik asit dışında) *in vitro* kültüre alınan bu türlerde ilk kez saptanmıştır (Kikowska ve ark., 2020).

Al-askar ve ark., tarafından yapılan çalışmada toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstrede tanımlanan bileşikler, çeşitli fenolik asitler, flavonoidler ve diğer ilgili bileşikleri içerdiği gözlenmiştir. Tanımlanan fenolik asitler arasında siringik asit, gallik asit, klorojenik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, vanilik asit, ferulik asit, o-kumarik asit ve sinamik asit yer almaktadır. Tanımlanan flavonoidler arasında rutin, naringenin, kersetin, mirisetin ve kemferol bulunmuştur. Diğer tanımlanmış bileşikler arasında pirogallol, kinol, kateşol, benzoik asit ve ellajik asit bulunmuştur. Ekstre de tanımlanan bileşiklerin miktarları, bazı bileşiklerin büyük miktarlarda (örn., benzoik asit ve kateşol) ve diğerlerinin daha küçük miktarlarda (örn., kafeik asit ve kemferol) bulunmasıyla, büyük ölçüde değişiklik göstermiştir. (Al-Askar ve ark., 2023).

*E. campestre* kökleri, *E. planum* ve *E. maritimum* köklerinden daha yüksek fenolik asit birikimi ile karakterize edilmektedir (Kikowska ve ark., 2014b; Thiem ve ark., 2013). Bitki kök ekstralarının toplam fenolik içeriği Folin-Ciocalteu yöntemine göre belirlenmiştir. Folin-Ciocalteu reaktifi ekstre ve gallik asit çözeltilerine eklenmiştir (Bouzidi ve ark., 2017).

*E. campestre* ekstralarında tanımlanan polifenolik bileşikler, Conea ve ark. tarafından p-kumarik asit, fenolik asitler, ferulik asit, klorojenik asit ve kafeik asit şeklinde belirlenmiştir (Conea ve ark., 2015). Başka bir çalışma da fenolik asitlerden klorojenik asit, p-kumarik asit, kafeik asit, rozmarinik asit ve ferulik asit taşıdığı yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Al-Askar ve ark., 2023; Kikowska ve ark., 2020).

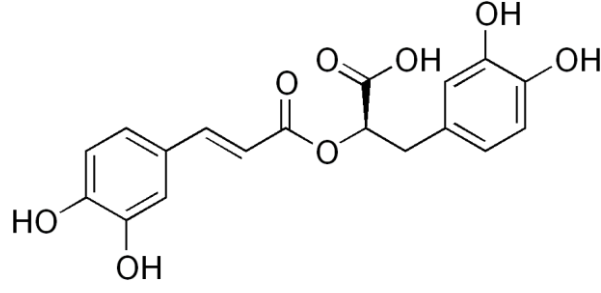
*E. campestre* bitkisinin birçok yöntemle üretilen biyokütlelerinden elde edilen ekstraların fenolik bileşikleri Le Claire ve ark. tarafından araştırılmıştır. *Eryngium* türlerinin kalitatif tarama analizinde, *E. campestre* kökünde rozmarinik asit (RA) ve bunun türevi R-(+)-3-O- $\beta$ -D glukopiranosil rozmarinik asidin varlığını ortaya çıkarmıştır. Le Claire tarafından gerçekleştirilen kantitatif analiz, aşağıdaki konsantrasyonlarda RA içeriğini göstermiş, *E. campestre*' de  $0,6 \pm 0,0$  mg/g R-(+)-3-O- $\beta$ -D-glukopiranozil rozmarinik asit tespit edilmiştir. *Eryngium* türleri için incelenen metabolitlerin kalite profillerinde ve kantitatif kompozisyonlarında

farklılıklar göstermiştir. *E. campestre* bazal yaprakları, köklerden 1,6 kat daha fazla RA üretmiş olduğunu göstermiştir (Kikowska ve ark., 2020; Le Claire 2005).

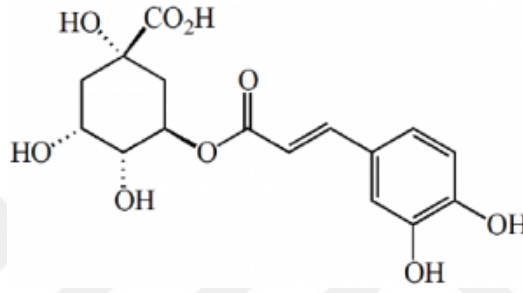
İTK ile yapılan deneyde plakalar etil asetat-asetik asit su (8:1:1 v/v/v) karışımı ile haznelerde geliştirilmiş, kurutulmuş ve aşağıdaki reaktifler püskürtülmeden önce ve sonra UV366 nm veya gün ışığı altında görüntülenmiştir. Fenolik asitlerin (UV altında mavi bantlar) ve flavonoidlerin (UV altında sarı bantlar) tespiti için 2-difenilboraniloksi etanamin (NA; Roth) etanol içinde %0,1'lik çözelti flavonoidlerin tespiti için alüminyum klorür (AlCl<sub>3</sub>) etanol içinde %1'lik çözelti (ardından ısıtma) kullanılmıştır. (Kikowska ve ark., 2017).

Metanollü ekstraların kalitatif UYPSK analizleri, tarlada yetiştirilen bitkilerden elde edilen test edilmiş tüm materyallerde ve *in vitro* kültürlerden elde edilen biyokütlerde RA (rozmarinik asit), RA-HEX (rozmarinik asit heksozit) ve CGA (Klorojenik asit) gibi fenolik asitlerin varlığını doğrulamıştır. Kalitatif analizler ana fenolik bileşiğin RA olduğunu göstermiştir. En yüksek seviyede, *in vitro* türetilmiş köklerdeki RA içeriği, sağlam bitkilerin köklerinden neredeyse 6 kat daha yüksek çıkmıştır. *In vitro* rejenere fiduciklerin ve tarlada yetiştirilen bitkilerin köklerinde tatmin edici bir RA-HEX içeriği bulunmuştur. *E. campestre*'deki CGA içeriği, sağlam bitkilerin bazal yapraklarında *in vitro* rejenere bitkiciklerden daha yüksek çıkmış, ancak köklerde tersi bir eğilim gözlemlenmiştir. Köklerin sürgünlerden daha yüksek fenolik asit içeriğine sahip olması nedeniyle, biyolojik aktivite analizi için seçilmiştir (Kikowska ve ark., 2014a; Kikowska ve ark., 2016b; Thiem ark., 2013).

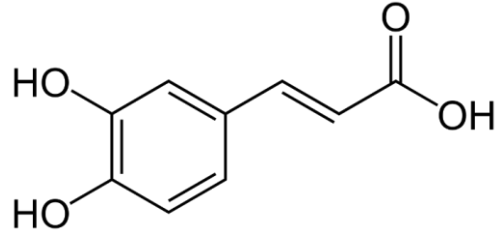
*E. campestre*'nin çiçeklerinden elde edilen metanol ekstresinde bulunan toplam fenolik bileşik miktarı 116,69 mg GAE/L, yapraklardaki toplam fenolik içerik 109,62 mg GAE/L bitki ekstresi çıkmıştır. Mevcut çalışmada, *E. campestre* çiçek ekstresi daha yüksek fenolik içeriğe sahip olduğu ve GST inhibitör aktivitesi üzerinde belirgin bir etki sergilemiştir. (Güneş ve ark, 2014).



Şekil 1.2. Rozmarinik asit formülü.



Şekil 1.3. Klorojenik asit formülü.



Şekil 1.4. Kafeik asit formülü.

#### 1.4.2. Flavonoitler

Polifenoller içinde en önemli flavonoit grubu flavan (2fenolbenzodihidropiran) türevleridir. Bunlar; antosiyanidinler, flavonoller, flavonlar, flavanonlar, kateşinler ve izoflavonoitler olmak üzere ve yapısal olarak altı gruba ayrılmaktadırlar. Günümüzde flavonoitlerin insan sağlığına olan yararlı etkileri kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır. Antioksidan, antiinflamatuvar, antialerjik,

antiviral ve antibakteriyel ve ayrıca sitotoksik özellikleri ile karakterize edilmektedir. Yapısal çeşitliliklerine bağlı olarak flavonoidlerin çeşitli farmakolojik aktiviteleri, ilaç endüstrisindeki uygulamalarını arttırmıştır (Brodowska, 2017).

*Eryngium* L. cinsine ait türlerin yer üstü kısımlarında bulunan flavonoidler küçük miktarlarda bulunsalar da 1980'lerde Hiller ekibi tarafından başlatılan ön fitokimyasal araştırma mevcuttur (Kikowska ve ark., 2020). Flavonoidlerden izoramnetin glikozitleri, mirsetin glikozitleri, kersetin glikozitleri (rutin), kemferol glikozitleri içerdiği kanıtlanmıştır (Al-Askar ve ark., 2023).

Flavonoid tayini için kolorimetrik alüminyum klorür yöntemi kullanılmıştır. Kısaca, her bir bitki toprak üstü ve kök ekstresinin metanoldeki 1 ml'lik çözeltisi ayrı ayrı 1 ml %2'lik alüminyum klorür (AlCl<sub>3</sub>) ile karıştırılmış ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir (Bouzidi ve ark., 2017).

Flavonoidler açısından zengin türler olan daha geniş çapta çalışılan *E. campestre*'de bulunan bileşikler: kersetin, isokersetin, rutin, luteolin 7-*O*- $\beta$ -D-glukopiranosit, kemferol 3-*O*- $\beta$ -D-(20 -pE-hidroksisinamoil)- glukopiranozit ve kemferol 3-*O*- $\beta$ -D-(20-p-Z-hidroksisinamoil)-glukopiranozit içermektedir (Kikowska ve ark., 2020).

Bir çalışmada *E. campestre*'nin çiçek ve yapraklarından elde edilen metanollü ekstrelerdeki toplam flavonoid konsantrasyonu alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Ekstrelerin toplam flavonoid içerikleri, kersetin grafiğinin standart eğrisinden elde edilen denklem kullanılarak hesaplanmıştır ( $y = 0,0429x + 0,153$ ,  $R^2 = 0,998$ ). Bitkinin çiçek ve yapraklarından elde edilen metanol ekstrelerinde bulunan flavonoid içeriklerinin toplam miktarı sırasıyla 110,58 ve 108,37 mg QE/L bitki ekstresi çıkmıştır (Güneş ve ark., 2014).

*Eryngium campestre*'nin luteolin, kemferol, isoramnetin, ve kersetin glikozitleri ve flavanolaçil glikozitleri taşıdığı görülmektedir (Nebija ve ark., 2009).

Kantitatif analizler genellikle, *in vitro* kültürlerden alınan sürgünlerin, aynı koşullar altında yetiştirilen köklerden daha yüksek flavonoit içeriğine sahip olduğunu göstermiştir. *E. campestre* için ana flavonoit bileşiği kaynağı astragalin olarak bilinmektedir (Kikowska ve ark., 2022).

Hawas ekibinin çalışmasında, *E. campestre*'nin toprak üstü kısmından 11 flavonol bileşiği izole edilmiş ve UV-görünür spektrofotometre, MS ve NMR spektrometre ile tanımlanmıştır (Hawas ve ark., 2013). Toplam flavonoitlerin yüzdeleri (%0,12-0,14) olarak ifade edilmiştir. Literatür verileriyle karşılaştırıldığında, toplam flavonoitlerin içeriği, daha önce diğer araştırmacılar tarafından bildirilenlerden daha düşüktü. Böylece, Romanya'dan *E. campestre* kurutulmuş toprak üstü kısımlarında rutin olarak ifade edilen flavonoitlerin toplam %0,32 – 0,56'sı bulunmuştur (Kikowska ve ark., 2020; Nebija ve ark., 2009).

**Çizelge 1.1.** Bitkinin içerdiği flavonoit içeriği çizelgesi.

<i>Eryngium campestre</i>	topraküstü kısımları	kersetin-3-0-rutinozit (rutin) (Aslan Erdem, 2009; Hawas ve ark., 2013)
		kersetin-3-0- $\alpha$ -L-ramnozid (kersitrin) (Aslan Erdem, 2009)
		kersetin-3-0- $\beta$ -D-glikozit (isokersetin)(Aslan Erdem, 2009; Hawas ve ark., 2013)
		kersetin-3-0-di-p-kumaroilglikozit (Aslan Erdem, 2009)
		kemferol-3-0- $\beta$ -D-glikozit (astragalin) (Aslan Erdem, 2009; Kikowska ve ark., 2022)
		kemferol-3-0-kaffeoil-glikozit (Aslan Erdem, 2009)
		kemferol-3,7-0-diramnozid (kempferitrin) (Aslan Erdem, 2009)
		kemferol-3-0-di-p-kumaroilglikozit (Aslan Erdem, 2009)
		kemferol-7-0- $\alpha$ -L-ramnozid (Aslan Erdem, 2009)
		luteolin-7-0- $\beta$ -D-glikozit (Nebija ve ark., 2009)
		isoramnetin (Aslan, 2009; Hawas ve ark., 2013)

### 1.4.3. Uçucu Yağlar

Uçucu yağlar, uçucu ve doğal kompleks bileşikler, antifungal, antibakteriyel ve antiviral, antiparazitik, insektisidal ve sitotoksik aktiviteler için yüzyıllardan beri yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüzde kozmetik, tarım ve gıda endüstrileri tarafından kullanılmaktadır (Kikowska ve ark., 2020).

Kubeczka ve ark. *E. campestre*'den elde edilen uçucu yağ içeriği ve oranları germakren D (%11,9), mirsen (%11,2) ve  $\alpha$ -pinen (%8,1) dahil seski ve monoterpen hidrokarbonların (%44,9 ve %23,4) varlığını bildirmişler. Ayrıca, saplardan (%14,1) ve yapraklardan (%10,4) elde edilen yağda önemli miktarlarda  $\beta$ -elemen tespit edilmiştir. Germakren D'nin en yüksek miktarları saplardan (%22,4) ve meyvelerden (%20,7) elde edilen uçucu yağda bulunduğunu bildirmişlerdir (Kikowska ve ark., 2020; Medhoudi ve ark., 2019).

*E. campestre*'nin toprak üstü kısımlarının uçucu yağ bileşimi Pala-Paul ve ark. tarafından GC ve GC-MS kullanılarak analiz edilmiş ve çiçek salkımları, gövdeler ve yapraklar arasında kalitatif ve kantitatif farklılıklar bulunmuştur (Pala-Paul ve ark., 2008). Çiçek ve yapraklardan elde edilen uçucu yağlarda %56,5, %45,3 ve %43,5 oranında ve köklerden hazırlanan uçucu yağda daha yüksek oranlarda (%60,3) bulunmuştur. Germakren D, tüm organlarda (%29,1–38,3) ana bileşiktir (Medhoudi ve ark., 2019).

**Çizelge 1.2.** Bitkinin içerdiği uçucu yağ çizelgesi.

<i>Eryngium campestre</i>	çiçek durumları	apiol $\alpha$ -himaklen germakren $\beta$ -kurkumen $\beta$ -farnesen	(Aslan Erdem, 2009; Pala Paul ve ark., 2008; Medhoudi ve ark., 2019)
	topraküstü kısımları	$\delta$ -kadinen spatulen	(Aslan Erdem, 2009; Medhoudi ve ark., 2019)
	Gövde	germakren	(Aslan Erdem, 2009; Medhoudi ve ark., 2019)
	Yaprak	germakren $\beta$ -elemen	(Aslan Erdem, 2009; Medhoudi ve ark., 2019)

#### 1.4.4. Kumarinler

Kumarin, vanilyaya benzer tatlı kokuya ve acı tada sahip, renksiz olan katı kristallerdir. Bitkinin kendini hayvanlara karşı kendisini korumak amacıyla kimyasal bir savunma görevi görebilmektedir.

*Eryngium campestre* 'nin kökleri yağdan arındırıldıktan sonra kloroform ile ekstre edilmiştir. Köklerden elde edilen ekstre çok farklı kromatografik uygulamaları ile agelinol, agasilin, grandi-vitin, agelinol benzoat izole edilmiştir (Soumia, 2018).

Bitki kaynaklı bileşikler olan kumarinler, antioksidan, antibakteriyel, antifungal ve antiviral, antiinflamatuvar, antihipertansif, antitüberküler, nöroprotektif ve anti-adipojenik gibi biyolojik ve farmakolojik özellikleriyle bilinmektedir (Venugopala ve ark., 2013).

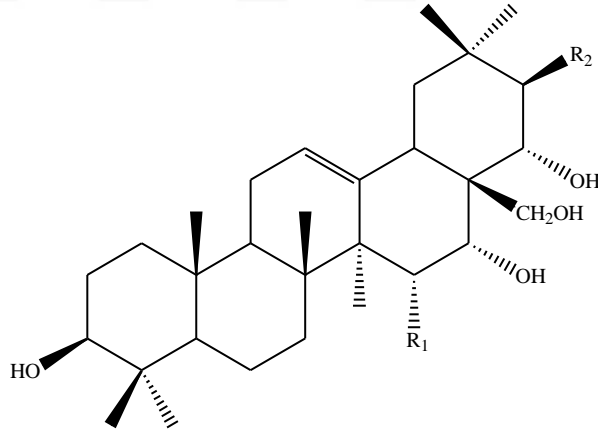
*E. campestre*'nin meyvelerinde ve köklerinde bulunan kumarinler: umbeliferon (7-hidroksikumarin), scoparon (6,7-dimetoksikumarin), skopoletin (6-

metoksi-7-hidroksikumarin), agasilin, agasilin benzoat, angeloyl-senecionyl-agasilin, grandvitin ve egelinol olarak bildirilmiştir (Kikowska ve ark., 2020).

#### 1.4.5. Saponinler

*Eryngium campestre* köklerinde araştırılan sekonder metabolitlerin en önemli sınıfı biri de triterpenik saponinlerdir. İzole edilebilen saponinlerin aglikonları temel olarak barringtonenol C, A1-barrigenol, R1-barrigenol veya cameliagenin A yapısındadır; Ayrıca eringinol A, eringinol B, betulinik asit ve bir oleik aglikon içeren saponinler izole edilmiştir (Aslan ve ark., 2009)

Araştırmacılar Romanya'daki yerel *Eryngium* türlerinin (*E. planum*, *E. campestre* ve *E. maritimum*) kimyasal bileşimini araştırdığında ve triterpen saponinlerin (gravimetrik yöntemle belirlenen) %3,7-10,1 oranında bitkilerin toprak üstü kısımlarında bulunduğu bulunmuştur. (Kikowska ve ark., 2020; Nebija ve ark., 2009).



Aglikon	R1	R2
A1-barrigenol	OH	H
R1-barrigenol	OH	OH
Barringtonenol	H	OH

Şekil 1.5. Saponin formülleri.

#### 1.4.6. Diğer Bileşikler

Poliasetilenler *Eryngium* cinsi bitkilerde bulunmaktadır; bireysel türler falcarinol, falcarinone, falcarinolon ve falcarindiol içermektedir. Falkarinon ve heptadeka-1,8-dien-5,6-di-3,9- diol gibi diğer poliasetilenlerin varlığı da aynı türde Erdelmeier ve Sticher tarafından bulunmuştur (Palá-Paúl ve ark., 2008).

*Eryngium campestre* cinsine ait türler fitosteroller ve stigmasterol içermektedir (Madej ve ark., 2006).

*Eryngium campestre* materyallerindeki (yaprak ve kök) makro elementler (Na ve Ni) ve mikro elementler (Pb, Co, Cr, Fe, Mn, K, Cd, Zn ve Cu) Nebija ve ark. atomik absorpsiyon spektrometrisinin (AAS) uygulanması ile belirlenmiştir (Kikowska ve ark., 2020).

#### 1.5. Biyolojik aktivite çalışmaları

Bazı *Eryngium* türlerinin geleneksel tıpta halk hekimliğinde halen ilaç olarak kullanılmaktadır. Kültürümüzde halk hekimliğinde kullanılan *E. campestre* L., kök içeriği nedeniyle öksürük yatıştırıcı ve kesici, iştah tetikleyici ve afrodisyak olarak kullanılmaktadır (Wang ve ark., 2012). Ancak çeşitli kültürlerde boğmaca tedavisinde, idrar söktürücü olarak, böbrek taşlarını ve kumu düşürmede, öksürük ilacı olarak, terlemeyi düzenleyici, prostat fonksiyonunu düzenleyici, şişkinlikleri gidermede kullanılmıştır. Toksik etkisi olmadığı bilinen bu bitkinin yeni çıkan sürgünleri ve kökleri kaynatılarak yenilebilmektedir (Nebija ve ark., 2009). Pek çok *Eryngium* türü eski Amerikan halkı tarafından kullanılmıştır (Wang ve ark., 2012).

Küpeli ve arkadaşları tarafından 2006 yılında Türkiye’de doğal olarak yetişen *E. campestre*, *E. trisectum*, *E. creticum*, *E. maritimum*, *E. davisii*, *E. isauricum* ve *E. kotschyi* türlerinin köklerinden ve topraküstü kısımları hazırlanan etanollü ekstraktlarla fareler üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda iltihap giderici ve ağrı kesici etkisi olduğu bildirilmiştir (Küpeli ve ark., 2007).

Cinsin biyoaktif bileşenlerinden olan poliasetilenlerin mantarlara, bakterilere ve memeli hücrelerine karşı toksik oldukları, nörotoksik ve antiinflamatuvar aktivite gösterdikleri gösterilmiştir (Christensen ve ark., 2006).

Kikowska ve ark. *Eryngium* cinslerinde yaygın olarak bulunan fitosterollerin hipokolesterolemik, immünomodülatör, antiinflamatuvar ve antidiyabetik gibi çok yönlü aktivitelerini göstermiştir (Kikowska ve ark., 2020).

*Eryngium* türlerinden elde edilen ekstreler, çeşitli insan tümör hücre hatlarına karşı sitotoksikite, anti-enflamatuvar, yılan ve akrep zehirlerine karşı, antibakteriyel, antifungal ve antimalarial, antioksidan ve antihiperglisemik etkiler gibi *in vitro* ve *in vivo* aktiviteler göstermiştir (Al-askar ve ark., 2023).

Rozmarinik asit (RA), kafeik asit esteri (CA) ve 3,4 dihidroksifenillaktik asit gibi fenolik bileşikler; ve bir CA esteri ve kinik asit olan klorojenik asit (CGA); büzücü, antiviral, antibakteriyel, antiinflamatuvar ve antimutajenik özellikleriyle bilinmektedir (Matkowski, 2008).

### **1.5.1. Antioksidan aktivite**

Antioksidanlar, hücre zararını önleyen ve serbest radikalleri ortadan kaldıracak maddelerdir. İnsan vücudunda üretilen antioksidanların yanı sıra dışarıdan ek olarak da alınabilmektedir. Gıdaların içerisinde bulunan başlıca antioksidan bileşikler fenoliklerdir (Pham-Huy ve ark., 2008).

Bitkinin toprak üstü kısmından elde edilen *E. campestre* ekstresi ve ayrıca izole edilmiş flavonol bileşikleri Hawas ve arkadaşları tarafından antioksidan aktiviteleri için incelenmiştir. DPPH serbest radikal yakalama aktivitesi ve indirgeme gücü deneyleri uygulanmıştır. DPPH aktivitesi, ham ekstre (%66,3) için nispeten yüksek ve test edilen tüm flavonoidler arasında en yüksek olan olarak çıkmıştır (Atay Balkan ve ark., 2020; Kikowska ve ark., 2020).

Nebija ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, toprak üstü kısımlardan ve köklerden elde edilen etanol ekstraları, dört farklı test sistemi ile *in vitro* antioksidan aktivite açısından test edilmiştir. DPPH deneyi, hidroksil radikali üretiminin engellenmesi,  $\beta$ -karoten ağartma deneyi ve lipid peroksidasyonunun engellenmesi gibi testler yapılmıştır. Bitki ekstraları için DPPH testinde elde edilen değerler, en yüksek süpürme etkisi kersetin iken, en düşük etki ise *E. campestre* kök ekstresi ile elde edilmiştir. Sonuçlar, *E. campestre* ekstralarının, DPPH tahlilinde hidrojen atomları veya elektronlar için spesifik olmayan donörler olarak hareket ettiğini göstermiştir. Referans maddelerle karşılaştırıldığında *Eryngium* ekstralarının daha az etkili olduğu görülmüştür (Nebija ve ark., 2009). Araştırmalar sonucu, toprak üstü kısımlarının bütanol ekstresi en düşük IC50 değerini (16,140 $\mu$ g/mL) göstermiştir. Bununla birlikte, köklerin sulu ekstresi en yüksek oksidasyon inhibisyonunu göstermiştir (%89,78) (Soumia, 2018).

*E. campestre*'nin toprak üstü kısımlarından elde edilen sulu metanollü ekstresi DPPH'ye karşı en yüksek süpürme aktivitesini göstermiştir. Bu aktivite, bu türün flavonoit içeriğinin varlığına bağlanmıştır. Hawas ve ark., yaptığı çalışmada, kimyasal yapı-aktivite, kersetin diglikozitinin güçlü bir peroksil radikal süpürücü olduğunu ve bunu *O*-metillenmiş türevlerin izlediğini göstermiştir. Bu bulgu Borsand ortak çalışmaları tarafından bildirilen sonuçlarla uyumlu çıkmıştır ve halkasındaki *O*-dihidroksi yapısının gelişmiş radikal süpürme aktivitesi için önemli olduğunu doğrulamaktadır. Halkadaki 4'-monohidroksil grubu içeren flavonoller daha az güçlü antioksidan olarak ortaya çıkmıştır (Hawas ve ark., 2013).

Nebija ve ark.'nın 2009 yılındaki çalışmasında *E. campestre*'nin toprak üstü kısmı ve kökündeki etanol ekstralarının antioksidan aktivitesi, sıçan karaciğer homojenatında da spontan lipid peroksidasyonunun inhibisyonu üzerinden incelenmiş ve oluşan MDA içeriği TBA tahlili (TBARS) ile ölçülmüştür. Verilen sonuçlar, oluşan MDA içeriğinin, sisteme kök veya toprak üstü kısım ekstraları eklendiğinde daha düşük olduğunu ancak yine de MDA düzeylerinin olduğunu göstermiştir. MDA, kersetin bir antioksidan olarak kullanıldığında elde edilenlerden

( $3,12 \pm 0,04 \text{ nmol ml}^{-1}$ ) önemli ölçüde daha yüksek olduğu görülmüştür (Kikowska ve ark., 2022).

Farklı çalışmalar, elektron verme kapasitesinin biyoaktif bileşiklerin indirgeme gücünü yansıttığını ve antioksidan aktivite ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada, elektron bağışının bir göstergesi olarak Fe (III) indirgemisini kullanan indirgeme gücü deneyi, numunedeki antioksidanların varlığının bir elektron bağışlayarak Fe (III)'ü Fe (II)'ye indirgediğini göstermiştir. Fe (II) kompleksinin miktarı daha sonra 700 nm'de Perl'in Prusya mavisini (Fe<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]<sub>3</sub>) oluşumu ölçülerek izlenebilmektedir. *E. campestre*'nin toprak üstü kısmından elde edilen metanollü ekstresi ve izole edilen flavonol glikozitlerden bazıları standart antioksidan bütillenmiş hidroksi toluen (BHT) ile karşılaştırılabilir orta derecede indirgeme gücü sergilemiştir. Sonuçlar, bu ekstrelerin toplam A $\beta$  (A $\beta$ <sub>40</sub>+A $\beta$ <sub>42</sub>) seviyelerinde önemli bir azalma olmaksızın çok düşük konsantrasyonda A $\beta$ -42 seviyesini azalttığını göstermiştir (Hawas ve ark., 2013).

*E. campestre*'nin serbest radikal süpürme aktivitesi 2,2-difenil 1-pikrilhidrazil (DPPH) deneyi ile *in vitro* olarak ölçülmüştür. DPPH çözeltisi, 2,4 mg DPPH'nin 100 ml metanol ile çözülmesiyle hazırlanmıştır. Bu çözeltiden 975  $\mu$ l, çeşitli konsantrasyonlarda 25  $\mu$ l numune ile karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımı iyice çalkalanmış ve oda sıcaklığında 30 dakika boyunca karanlıkta inkübe edilmiştir. Ardından, absorbans 517 nm'de ölçülmüştür, reaksiyon karışımının düşük absorbansı daha yüksek serbest radikal süpürme aktivitesini göstermiştir. Serbest radikal DPPH'nin indirgenmesi ve 517 nm'de absorbansın azalmasına dayanarak, DPPH radikal süpürme yöntemi antioksidan özelliği değerlendirmek için kullanılmış ve standart antioksidan kersetin ile karşılaştırılmıştır. DPPH'yi temizlemek için gereken bitki ekstrelerinin konsantrasyonları doza bağlı bir yanıt göstermiştir. Her bir numunenin antioksidan aktivitesi IC<sub>50</sub> cinsinden ifade edilmiştir. Toprak üstü kısımlarının n-bütanol ekstresi (ECABU) 30 dakikalık inkübasyondan sonra en düşük IC<sub>50</sub> değeri (16,140  $\mu$ g/ml) ile iyi bir antioksidan aktivite göstermiştir. Kersetinin IC<sub>50</sub> değeri 1,149  $\mu$ g/ml iken ECABU'nunki 16,140  $\mu$ g/ml'dir, bu da

ECABU'nun antioksidan aktivitesinin kontrol grubuna göre çok daha zayıf olduğunu göstermektedir (Bouzidi ve ark., 2017).

DPPH ve beta-karoten linoleik asit analizlerinin verileri, *E. campestre*'nin kökleri ve toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstralarının, polifenol bileşiklerinin varlığı nedeniyle iyi bir antioksidan aktiviteye sahip olduğunu açıkça göstermiştir. Flavonoidler, fenolik asitler ve tanenler gibi polifenollerin reaktif oksijen türlerine karşı savunma sisteminde hayati bir rol oynadığı görülmüştür (Bouzidi ve ark., 2017).

Le Claire ve ark., yaptığı İTK DPPH Radikalinin İndirgenmesi Örneklerin metanol çözeltileri önceden kaplanmış silika jel 60 F<sub>254</sub> İTK plakaları (Merck) üzerinde EtOAc/MeOH/H<sub>2</sub>O (60/25/15) kullanılarak kromatografiye tabi tutulmuştur. Kuruduktan sonra, İTK plakalarına Cuendet ve arkadaşlarının modifiye ettiği bir yöntemle MeOH içinde taze hazırlanmış %0,1 DPPH (SigmaAldrich) çözeltisi püskürtülmüştür. Mor üzerine sarı bir alan gösteren bileşikler antioksidan olarak kabul edilmiştir (Le Claire ve ark., 2005).

Yukarıda belirtilen sonuçlardan, *Eryngium campestre* köklerden elde edilen ekstralarının, DPPH ve OH- radikallerine karşı kersetin ve Beta Hidroksi Asitler (BHA)'nın aktivitesi ile karşılaştırılabilir güçlü serbest radikal süpürme aktivitesi gösterdiği elde edilmiştir. Linoleik asit/  $\beta$ -karoten sisteminde *Eryngii* ekstraları, ilk 60 dakikalık periyot için kersetin aktivitesi ile karşılaştırılabilir düzeyde bir antioksidan etki göstermiştir (Kikowska ve ark., 2020; Nebija ve ark., 2009).

### **1.5.2. Antimikrobiyal aktivite**

Antibiyotiklere ve antifungal ajanlara karşı artan direnç nedeniyle, ham bitki ekstraları, fraksiyonları ve izole saf bileşikler, antibakteriyel ve antifungal ajanlar olarak yeni bir ilgi alanı haline gelmiştir. Araştırmacıların daha önce ortaya çıkan ve daha sonra yayınlanan çalışmalarından elde edilen sonuçlar ile *Eryngium* cinsinin türlerinin antimikrobiyal aktivitesini gösterdiği doğrulanmıştır.

*Eryngium*' dan elde edilen etanolik ekstreler, *S. aureus*'a karşı orta derecede antibakteriyel aktivite göstermiş ve *B. subtilis*'e karşı zayıf bir etki gösterirken, incelenen ekstreler önemli antimikotik aktiviteye sahip olduğu kanıtlanmıştır. İncelenen ekstrelerin en yüksek antifungal etkisi *C. albicans* ve *C. glabrata*, *T. mentagrophytes* ve *C. neoformans*'a karşı elde edilmiştir (Kikowska ve ark., 2020).

*E. campestre*'nin etanollü ve metanollü ekstreleri test edilen Gram-negatif bakterilerden en az birine karşı güçlü antibakteriyel aktivite göstermiştir; *P. aeruginosa*, *E. campestre*'nin etanollü ekstrelerine karşı en hassas olanıyken. *E. coli*, *E. campestre*'nin etanollü ekstresine karşı en iyi hassasiyeti göstermiştir. Bu çalışmada test edilen *E. campestre* ekstreleri *S. epidermidis*, *P. Aeruginosa*, *S. pyogenes*, ve *E. coli*'ye karşı antibakteriyel aktivite sergilemiştir. İncelenen *Eryngium* türlerinin hem yapraklarının hem de köklerinin ham etanollü ekstreleri önemli bir antifungal aktivite ve sadece *Staphylococcus aureus*'a karşı orta derecede antibakteriyel aktivite göstermiştir (Soumia, 2018).

Antimikrobiyal aktivite taraması, *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* üzerinde orta düzeyde bir etkinin yanı sıra *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde yüksek bir bakteriyostatik etki olduğunu doğrulamıştır. *E. campestre* ekstresinin etkisi en belirgin özellikte olduğu ortaya çıkmıştır (Al-askar ve ark., 2023).

*E. campestre* köklerinden elde edilen her iki metanollü ekstresi ve yapraklar iyi bir antimikrobiyal aktivite göstermiştir. En güçlü antibakteriyel aktivite köklerin %80'lik fraksiyonu tarafından sergilenmiştir (Bouzidi ve ark., 2017).

*E. campestre* Gram-pozitif ve Gram-negatif mikroorganizmalara karşı geniş bir aktivite spektrumu göstermiştir, ancak Gram-pozitif bakterilere, özellikle de birinci ve ikinci ekstrelerde (18 mm) ve (14 mm) en büyük çaplı inhibisyon bölgesine sahip olan *Bacillus subtilis*'e karşı daha fazla aktivite göstermiştir. Sonuç olarak, çalışma, *Eryngium campestre* bütün bitkisinin metanollü ekstrenin

fitopatojenik mikroorganizmalara karşı etkinliğini araştırmıştır. *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Ralstonia solanacearum*, *Dickeya solani* ve *Pectobacterium carotovorum* gibi farklı bitki mantar ve bakteri izolatları tanımlanmış ve test edilmiştir. Ekstre, konsantrasyona bağlı olarak değişen inhibisyon derecesi ile bu patojenlerin büyümesi üzerinde inhibitör etkiler sergilemiştir. Bakteriyel patojenler arasında *Dickeya solani* özüne karşı en hassas gösteren grup olmuştur. Ekstrenin, antimikrobiyal özelliklerine katkıda bulunabilecek benzoik asit, katekol, kersetin, vanilik asit, resveratrol, naringenin ve kinol dahil olmak üzere çeşitli polifenolik bileşikler içerdėi bulunmuştur. Bulgular *E. campestre* ekstresinin bitki patojenlerini kontrol etmek için doğal bir antimikrobiyal ajan olarak hizmet etme potansiyeline sahip olduğunu ve mevcut bitki hastalığı yönetimi yöntemlerine daha güvenli bir alternatif saėladėını göstermektedir (Al-askar ve ark., 2023).

Sağlam bitkilerin köklerinden ve *E. campestre*'nin *in vitro* türetilmiş bitkiciklerinden elde edilen metanollü ekstreler, test edilen mikroorganizmaya bağlı olarak değişen derecelerde antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Ekstrelerin en yüksek inhibitör etkisi Gram-pozitif bakteri *S. aureus* ve deri enfeksiyonlarının yaygın bir nedeni olan dermatofit *T. metagrophytes* ve *T. rubrum*'a karşı bulunmuştur. Ayrıca, ekstreler *C. Albicans* ve *P. Aeruginosa*'a karşı orta derecede antimikrobiyal aktivite göstermiştir. *In vitro* türetilmiş bitki köklerinden elde edilen metanollü ekstreler, sağlam bitkilerin köklerinden elde edilen ekstrelele göre daha yüksek antibakteriyel (*S. aureus*, *P. aeruginosa*) ve antifungal (*T. metagrophytes* ve *T. rubrum*) aktivite göstermiştir (Kıkowska ve ark., 2016a).

Uçucu yağın antimikrobiyal aktivitesi, kağıt disk difüzyon ve seyreltme agar deneyleri kullanılarak gıda kaynaklı ve nozokomiyal enfeksiyonlara karışan on iki bakteri türüne ve iki mayaya karşı değerlendirilmiştir. *In vitro* çalışma, *S. aureus*, *B. cereus* ve *E. faecalis* gibi Gram-pozitif suşlara karşı güçlü bir aktivite göstermiştir (Medhoudi ve ark., 2019).

*E. campestre* çiçeklerinin ve yapraklarının metanollü ekstreleri, Moghaddam ve arkadaşları tarafından difüzyon ve mikro seyreltme disk yöntemlerinin uygulanması ile antibakteriyel ve antifungal aktivite açısından araştırılmıştır. Dört bakteri suşu arasında *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* ve bir mantar suşu, *Candida albicans*, *E. campestre* ekstreleri Gram-pozitif bakterilere karşı yeterli antibakteriyel aktivite göstermiştir ancak antifungal aktivite göstermemiştir (Moghaddam ve ark., 2019).

### 1.5.3. Anti-Alzheimer aktivite

Hawas ve arkadaşları, *Eryngium campestre* L.'nin toprak üstü kısımlarının metanollü ekstresini anti-alzheimer aktivitesi açısından incelemiştir. İnsan APP'sinin (APPsw) çift İsveç mutasyonunu (K595N/M596L) ifade eden H4 insan nörogloma hücreleri kullanılmış ve *E. campestre* ekstresinin artan konsantrasyonları ile muamele edilmiş ve hassas sandviç enzim bağlantı immünosorbent testi (ELISA) ile kültür ortamında A40 ve A42 seviyeleri için analiz edilmiştir. *Eryngium campestre* ekstresi, insan H4 hücre hattında toplam A(A40+A42) seviyelerinde önemli bir azalma olmaksızın  $\beta$ -amiloid A 42'nin (IC<sub>50</sub>¼155.757.43ng/mL) önemli ölçüde inhibisyonunu göstermiştir (Hawas ve ark., 2013).

Araştırmacılar tarafından ilk kez, kültürü yapılan *Eryngium* türlerinin bazılarının köklerinden elde edilen etanol-su (%70) ekstrelerinin nöroprotektif aktivite göstermiştir. Wistar farelerinin uzun süreli hafıza gelişimi çalışması için uygulanmıştır. Arka arkaya 28 gün boyunca uygulanan kök ekstresi (200 mg/kg), sıçanların frontal korteks ve hipokampuslarında modifiye spektrofotometrik Ellman's yöntemi ile ölçülen asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesteraz (BuChE) aktivitesini inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Araştırmacılar, AChE aktivitesini azaltma olasılığı ile Alzheimer hastalığının gelişiminin önlenmesi arasındaki ilişkiyi görmekte ve yeni bir nöroprotektif bitki kökenli ilaç arayışına girmişlerdir (Kikowska ve ark., 2020).

Sonuçlar *E. campestre* ekstresinin Alzheimer hastalığının tedavisi için güçlü bir aday ilaç olarak kullanılabileceğini veya en azından bu hastalığın kötü etkilerini iyileştirebileceğini veya geciktirebileceğini gösterdiğini öne sürmüşlerdir (Kikowska ve ark., 2022).

#### 1.5.4. Antienflamatuvar aktivite

Bir sıçan periodontitis modelinde anti-enflamatuvar etkilerin incelenmesi için, tarlada yetiştirilen *E. campestre* köklerinden elde edilen ekstreler (%20) Conea ve arkadaşları tarafından uygulanmıştır. Etanol ile maserasyon yoluyla hazırlanan ekstreler, lökosit infiltrasyonunu ve nitro-oksidatif stresi azaltmıştır (Kikowska ve ark., 2020). Diğer bir çalışma da, *E. campestre* toprak üstü ve kök kısımlarının etanollü ve sulu ekstreleri, karra geenan kaynaklı arka ayak ödemi ve TPA kaynaklı kulak ödemi testleri kullanılarak anti-enflamatuvar aktiviteleri açısından değerlendirilmiştir. *E. campestre*'nin toprak üstü ve kök kısımlarının en yüksek aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Atay Balkan ve ark., 2020; Küpeli ve ark., 2006).

Yapılan bir çalışmada *E. campestre*, *E. creticum*, *E. davisii*, *E. falcatum*, *E. isauricum*, *E. kotschy*, *E. maritimum* ve *E. trisectum* bitkilerinin toprak üstü kısımlarından ve köklerinden etanol (%90) ve su ekstreleri hazırlanmıştır. Antienflamatuvar etkinin araştırılması için 12-*O*-tetradekanoilforbol-13-asetat (TPA) kaynaklı fare kulak ödemi ve karragenan kaynaklı arka pençe ödemi testleri uygulanmıştır. Hazırlanan ekstreler erkek albino farelere oral 200 mg/kg dozunda verilmiştir. Antinosisseptif etkileri incelemek için p-benzokinon ile indüklenen abdominal konstriksiyon testi uygulanmıştır. Sonuç olarak, *E. campestre* türleri kullanılan ekstre türüne ve bitki kısımlarına bağlı olarak çeşitli derecelerde antienflamatuvar ve antinosisseptif aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Aslan, 2009; Kartal ve ark., 2006; Küpeli ve ark., 2006).

*E. campestre*'nin etanollü ekstresinin antienflamatuvar aktivitesi, murin beyin endotel hücreleri kullanılarak biyolojik deneyde gerçekleştirilmiştir (sitokinle aktive

edilmiş murin endotel hücrelerinde nitrik oksit sentezinin inhibisyonu); *E. campestre*'nin etanollü ekstresi (100 mg/mL), ortamdaki nitrit birikimini tamamına yakın inhibe etme kabiliyeti göstermiştir. Ayrıca, bitkinin antiinflamatuvar etkisi murin monosit/makrofaj benzeri hücre hattı P388D1 üzerinde incelenmiştir. *E. campestre* ekstresi LPS ile uyarılmış P388D1 hücrelerinde nitrit birikimini önemli ölçüde inhibe etmiştir. Ayrıca, bitki etanol ekstresi TNF $\alpha$  sentezinde çok güçlü bir inhibisyon göstermiştir. *Eryngium campestre* ekstreleri MBE-SV hücrelerinin yüzeyinde TNF $\alpha$  ile uyarılmış VCAM1 ekspresyonunu inhibe etmiştir (Soumia, 2018).

*Eryngium campestre*'nin etanollü ekstre edilen toprak üstü kısımlarından antiinflamatuvar aktivitesi, terebentin yağı ile akut inflamasyon oluşturulan sıçanlarda rapor edilmiştir. Etkiler serum nitrit ve nitratları, toplam oksidatif durum, oksidatif durumun toplam antioksidan aktivite indeksi, toplam lökosit sayısı ve diferansiyel lökosit sayısına bakılarak ölçümlerle değerlendirilmiştir. *E. campestre* ekstresi, nötrofil yüzdesi lenfositleri ve monositleri azaltarak toplam lökosit sayısını düşürerek kemik iliği akut faz yanıtı üzerinde önemli bir antiinflamatuvar etki göstermiştir. NO sentezi diklofenak ile benzer bir etki ile azalmıştır. Ayrıca, etanol ekstresi toplam antioksidan durumunu artırarak oksidatif stresi önemli ölçüde azaltmıştır (Soumia, 2018).

Küpeli ve arkadaşları *Eryngium campestre*'nin toprak üstü kısımlarından ve köklerinden elde edilen iki farklı ekstrelerin farelerde karragenan kaynaklı arka pençe ödemi ve TPA kaynaklı kulak ödemiye karşı antiinflamatuvar potansiyellerini incelemişlerdir. Kullanılan her iki testte de, *E. campestre* ekstrelerinin mütevazı bir antiinflamatuvar aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir; kök etanollü ekstresi daha iyi bir antiinflamatuvar etki göstermiştir (Küpeli ve ark., 2006).

Toprak üstü kısımlarından elde edilen etanollü ekstre, Conea ve arkadaşları tarafından değerlendirilen bir çalışmanın konusu olmuştur. *In vivo* antiinflamatuvar etkiler, erkek Wistar sıçanlarında sıçan ligatürü ile indüklenen periodontitis üzerinde periodontal biyopsinin histopatolojik incelemesi ve serum total nitrit ve nitratları, total oksidatif durum, total antioksidan yanıt ve oksidatif stres indeksi ile

değerlendirilmiştir. Sonuçlar, *Eryngium campestre* ekstresi deneysel sıçan periodontitisinde lökosit infiltrasyonunu ve nitro-oksitatif stresi azaltarak antiinflamatuvar aktivite gösterdiğine dair kanıtlar sunmaktadır. *E. campestre*, nötrofil ve monositlerin azalmasına bağlı olarak toplam lökosit sayısını önemli ölçüde düşürmüştür ( $p<0,01$ ). NO sentezi de *E. campestre* ekstresi ile azalmıştır ( $p<0,05$ ) (Conea ve ark., 2015).

Başka bir antiinflamatuvar testte (taze yumurta albümini ile indüklenen akut enflamasyon) kullanarak, *E. campestre*'nin hem köklerinden hem de toprak üstü kısımlarından elde edilen bütanol ekstralarının (250 ve 500 mg/kg vücut ağırlığı) doz seviyesinde antiinflamatuvar etkilerini değerlendirilmiştir; çalışma, her iki ekstre de enflamasyon üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu ve enflamasyonu açıkça azalttığını göstermiştir (Bouzidi ve ark., 2017).

Son zamanlarda, geleneksel Akdeniz diyetine özgü 121 bitkinin ekstraları üzerinde yapılan bir antiinflamatuvar aktivite taramasında *E. campestre* L., LPS ile aktive edilen monosit kökenli murin endotel hücrelerinde nitrik oksit ve TNF-alfa sentezini azaltmış, her iki hücre tipinde de sitokin veya LPS ile uyarılan İnos Mrna seviyelerini düşürmüştür (Wang, 2012).

Başka bir çalışmada, *E. campestre*'nin n-bütanol ekstresi anti-enflamatuvar aktivitesi, sıçan pençesinde yumurta albümini ile indüklenen pençe ödemeine karşı test edilmiştir. Bu enflamatuvar model bifazik bir olaydır; ödemin ilk fazı (0-2 saat) muhtemelen histamin ve serotonin salınımına bağlıdır ve ödemin ikinci fazı (3-5 saat) prostaglandin salınımına bağlı olduğu ortaya çıkmıştır (Thiem ve ark., 2010). ECRBU ve ECABU, sıçan pençesi ödemi erken ve sonraki aşamalarda önemli ölçüde baskılamıştır. Gelecekteki deneylerde farklı *E. campestre* ekstralarının kimyasal bileşenlerinin izole edilmesi ve tanımlanması gerektiğini belirtmek çok önem taşımaktadır. Bu fitokimyasallar ayrıca antiinflamatuvar aktiviteye de tabi tutulması gerekmektedir. Sonuçlar ise: Toprak üstü kısımların n-bütanol ekstresi, 16,140 µg/ml IC50 değeri ile oldukça yüksek antiradikal aktiviteye ve standart ilaç diklofenak ile karşılaştırılabilir iyi bir anti-enflamatuvar aktiviteye sahiptir. Ayrıca, köklerin n-

bütanol ekstresi, toprak üstü kısımların *n*-bütanol ekstresi ile karşılaştırıldığında daha iyi bir antipiretik etkiye (hem 250 mg/kg hem de 500 mg/kg dozunda) sahip olduğu ortaya çıkmıştır (Bouzidi ve ark., 2017).

### 1.5.5. Diğer Aktiviteler

Güneş ve ark. tarafından yapılan çalışmada, *E.campestre* çiçek ve yapraklarından elde edilen ekstraların inhibitör etkisi araştırılmış, çiçek ekstresi 363 ng/mL IC50 değeri ile GST enzimi üzerinde yapraklardan daha iyi inhibitör etki göstermiş. Bu çalışmada değerlendirilen ekstraların hiçbiri makul bir GPx ve CAT inhibisyonu göstermemiştir. Glutasyon-S transferaz, glutasyon peroksidaz ve katalaz enzim aktiviteleri üzerindeki inhibitör potansiyellerini belirlenmeye çalışılmış. Literatür verileri, yüksek miktarda fenolik bileşik içeren bitki ekstralarının glutasyon-S transferaz üzerinde önemli inhibitör potansiyele sahip olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, tümör hücrelerinde kemoterapiye karşı çoklu ilaç direnci geliştirmede önemli bir rol oynayabilmektedir (Güneş ve ark, 2014).

Yapılan bir biyolojik aktivite çalışmasında *E. campestre* bitkisinin insektisit ve anti kanserojen aktiviteye sahip olup olmadığı araştırılmıştır. Deney sonucu olarak *E. campestre* bitkisinin buğday biti üzerine insektisit aktivitesi ve anti kanserojen aktivitesi olduğu belirlenmiştir (Akşit, 2008).

Bir derleme çalışmasında ise elde edilen sonuçlar, maksimum glutasyon-S-transferaz enzim inhibisyon aktivitelerinin IC50 değeri 363 ng/mL olan *E. campestre* çiçeklerinden elde edilen metanol ekstresi ile gözlenmiştir. Çalışmada, değerlendirilen ekstraların hiçbiri makul bir glutasyon peroksidaz ve katalaz inhibisyonu göstermemiştir. *In vitro* ve *in vivo* farmakolojik çalışmalar çok sayıda biyolojik aktivite sağlamıştır (Soumia, 2018).

Toplam polifenol içeriği, her bir türün sağlam bitkilerinin benzer organlarına kıyasla *in vitro* kültürlerden elde edilen biyokütlerde her zaman artmıştır. Elde edilen ekstralar *Acanthamoeba* sp'ye karşı antiprotozoal aktivite açısından *in vitro* olarak

değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonuçları, ekstrelerin trofozoitlerin büyümesini değişen derecelerde engellediğini göstermiştir. Etkinin ekstre konsantrasyonuna ve maruz bırakma süresine göre bağımlılık kaydedilmiştir. Biyoteknolojik yöntemlerle üretilen biyokütleden elde edilen *E. campestre* ekstrelerinin amip öldürücü etkisinin fenolik bileşiklerden kaynaklandığı ortaya çıkmıştır. Fenolik bileşiklerin sinerjik etkisinin, amip öldürücü ajanlar olarak iyi bilinen klorojenik asit, rozmarinik asit ve kersetin gibi bitki materyallerindeki varlığına bağlı olabileceği görülmüştür (Kikowska ve ark., 2022).

Subkütan enjeksiyondan 18 saat sonra, normal vücut sıcaklığı (rektal sıcaklık) tüm gruplar için belirgin şekilde yükselmiştir. *Eryngium campestre* L.'nin hem ECRBU hem de ECABU n-butanol ekstreleri normal vücut sıcaklığının korunmasında önemli bir antipiretik etkiye sahiptir, aktivite zamana ve konsantrasyona bağlı olduğu ortaya çıkmıştır. İlaçların veya bileşiklerin bir özelliği olarak sıkça bahsedilen ateş düşürücü aktivitenin, siklooksijenazın enzimatik aktivitesini inhibe ederek ve sonuç olarak hipotalamik bölgedeki PGE2 seviyelerini azaltarak etkilerini göstermektedir. Bu nedenle, *E. campestre* L.'nin n-butanol ekstrelerinin antipiretik aktivitesi muhtemelen hipotalamusta prostaglandin biyosentezinin inhibisyonundan kaynaklanmaktadır. Ayrıca, sonuçlar *E. campestre*'nin iltihaplı hastalıklara karşı korunmada ve özellikle toprak üstü kısımlarının ateş basması tedavisinde yararlı olabileceğini göstermektedir (Bouzidi ve ark. 2017).

*E. campestre* ekstrelerinin ve/veya biyoaktif bileşiklerinin güvenliğini ve etkinliğini belirlemek için insanlarda daha fazla deney yapılması gerekmektedir.

## 1.6. Toksikite

Bir oral akut toksisite testinde, her biri beşer hayvandan oluşan gruplara ayrılmış on beş sağlıklı sıçan kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Oral uygulamadan 12 saat öncesinden 4 saat sonrasına kadar hayvanlar aç bırakılmış (hayvanlara su verilmiş ancak yemek verilmemiştir) ve tartılmıştır. Deney, OECD (Ekonomik

İşbirliği ve Kalkınma Örgütü) Kılavuzu 420 (OECD, 2001) uyarınca gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubuna oral yolla 10 ml/kg vücut ağırlığı normal serum fizyolojik verilirken, maruz kalan gruplara (grup 2 ve 3) sırasıyla 2000 mg/kg *E. campestre* L. kök ve toprak üstü kısımlarını n-butanollü ekstraları verilmiştir. Hayvanlar ilk 30 dakika boyunca, ardından tedaviden 2, 4 ve 6 saat sonra ve daha sonra toplam 14 gün boyunca her gün kilo kaybı, ölüm oranı, davranış, deri, göz ve kürk değişiklikleri açısından gözlemlenmiştir. 15. günde hayvanlar kan alındıktan sonra feda edilmiştir. ve iç organlar çıkarılmış. Tek doz ECRBU ve ECABU 2000 mg/kg oral uygulaması herhangi bir toksisite veya ölüm belirtisi oluşturmamıştır. Çalışmanın 14 günü boyunca kontrol ve tedavi grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiş. Gözlem süresi boyunca hayvanların görünüşü ve davranışları tüm gruplarda benzer olduğu görülmüştür. İki parçanın n-butanol ekstresinin 2000 mg/kg'lık en yüksek dozda yapılan ön akut oral toksisite testinde, her ikisi de güvenli bulunmuştur (Bouzidi ve ark., 2017).

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Gereçler

*Eryngium campestre* L. üzerine yaptığımız bu çalışma kaynak araştırması, derleme ve deneysel kısımlarından oluşmaktadır. Araştırma konusu öncelikli olarak Ankara Üniversitesi Elektronik Kütüphanesi olmak üzere, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi kütüphanesi, Pubmed, Sciencedirect, Google Akademik arama motoru ve internet kaynakları kullanılarak ve daha önce yapılmış deney ve bulgular incelenerek gerçekleştirilmiştir. Tüm bu kaynaklardan elde edilen veriler ve bilgiler ışığında bu tez hazırlanmıştır.

#### 2.1.1. Deneyslerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneyslerin gerçekleştirilmesinde metanol, asetonitril (YPSK), etanol, kloroform, distile su, Na<sub>2</sub>CO<sub>2</sub> (hepsi Merck) kullanılmıştır.

#### 2.1.2. Deneyslerde Kullanılan Araçlar

Analizlerin gerçekleştirilmesinde malzeme olarak Cam malzemeler (İldam), Rotavapor C18; 15 ve 25 cm YPSK kolonu (25,0 x 4,0 mm x 5µm) (Agilent, Zorbax Eclipse Plus), Hububat Öğütücü (Lavion HR-04A), Vortex, Filtrasyon düzeneği (Merck Millipore), Etüv, Hassas terazi (Radwag), Termometre (Prima long LCD Digital), Pileli Süzgeç kağıdı, Manyetik karıştırıcı (Heidolph), Mikropipetler (Socorex), pH-metre (Inolab) Plastik enjektör (Ayset), Serolojik pipet (Sarstedt), Su arıtma sistemi (Millipor Mili-Q Gradient A10), Termostatlı yatay çalkalayıcı su banyosu (Memmert), Ultrasonik su banyosu (Bandelin electronic RK 510 H) ve Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) (Agilent 1100 Series) kullanılmıştır.



## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Ekstraksiyon

Çalışmalarda kullanılmak üzere uygun koşullarda kurutulan ve toz edilen *Eryngium campestre*'nin toprak üstü kısımlarından 20 g tartılarak 200 mL %70'lik etanol ile 6 saat çalkalıyıcı, 18 saat sabit maserasyon olmak üzere oda sıcaklığında 24 saat boyunca ekstre edildi. 24 saat sonunda 1 saat ultrasonik banyoda ekstre edildikten sonra pileli süzgeç kağıdından süzölmüştür. Bu işlem 5 gün süreyle her defasında taze çözücü ilave edilerek tekrar edilmiştir. Süzüntüler birleştirilerek düşük basınç altında rotavaporda 35-40°C'de uçurulmuştur. Elde edilen ekstre bir miktar distile su ile çözülerek, liyofilize edildi. Ekstrelerin % verimleri hesaplanmıştır.

### 2.2.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK/HPLC)

YPSK, uçucu olmayan bileşikleri tespit etmek için yaygın olarak kullanılan bir cihazdır. Bu yöntem bitkideki fenolik maddelerin belirlenmesinde kullanılmıştır.

#### 2.2.2.1. YPSK Validasyon yöntemi

*E. campestre* toprak üstü kısımlarında rozmarinik asit varlığını belirlemek ve ölçmek için hazırlanan ekstre YPSK ile analiz edilmiştir. YPSK analizinde cihaz ve yöntem ile ilgili bilgiler aşağıda Çizelge 2.1'de verilmiştir.

**Çizelge 2.1.** YPSK cihazının özellikleri.

<b>Cihaz:</b>	<b>Agilent 1100 Series</b>
<b>Dedektör:</b>	DAD-UV (Diode Array Detector-Ultraviolet)
<b>Dalga boyu:</b>	325 nm
<b>Enjeksiyon hacmi:</b>	10 µL
<b>Kolon:</b>	Agilent, Eclipse (4,6×150 mm) XDB-C18, 5 µm,
<b>Mobil Faz-A:</b>	% 0,2 <i>o</i> -fosforik asit
<b>Mobil Faz-B:</b>	MeOH

#### 2.2.2.2. YPSK Analizleri İçin Bitkisel Materyalden Örnek Hazırlanması

**Çizelge 2.2.** YPSK analizlerinde kullanılan gradient elüsyon sistemi.

Zaman (dk)*	%0,2 <i>o</i> -fosforik asit (%)	MeOH	Akış (mL/dak)	Hızı	Kolon sıcaklığı (°C)
<b>0,00</b>	20,0	80,0	0,6		25°C
<b>25,00</b>	40,0	60,0	0,6		25°C
<b>35,00</b>	70,0	30,0	0,6		25°C
<b>40,00</b>	90,0	10,0	0,6		25°C
<b>45,00</b>	20,0	80,0	0,6		25°C
<b>*post time: 2 dk</b>					

Standart olarak seçilen rozmarinik asit miktar tayini için stok çözelti (1 mg/mL) hazırlanmıştır. Stok çözeltinin seyreltilmesi ile 0,5, 0,25, 0,1, 0,05, 0,03, 0,01, 0,005, 0,003, 0,001 ve 0,0005 mg/mL'lik konsantrasyonlarda dilüsyonlar hazırlanmış, belirlenen metotla YPSK sisteminde analiz edilmiştir.

### 2.2.3. Miktar Tayini Yöntemleri

#### 2.2.3.1. Rozmarinik Asit Miktar Tayini

Türkiye’de yetişen *Eryngium campestre* bitkisinin toprak üstü kısmından hareketle % 70 etanollü ekstre hazırlanmıştır.

Elde edilen ekstrede kafeik asit türevlerinden rozmarinik asit miktar tayini Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi YPSK ile gerçekleştirilmiştir. Analizde ters faz (C18) YPSK kolonu kullanılmıştır. Mobil faz olarak % 0,2 *o*-fosforik asit ve metanol karışımının gradient elüsyon şeklinde uygulanmıştır.

Yukarıda bahsedilen yöntemler Conea ve ark. (2016), Aslan Erdem ve ark. (2016), Vaseghi ve ark. (2019) yaptıkları analizler üzerinden veya yöntemler modifiye edilerek uygulanmıştır.

Aktivite çalışmaları kondrosit hücre hattı (Human chondrocytes (HC)) üzerinde, Avcioğlu ve ark. (2020) ve Kozacı ve ark. (2019) yaptıkları çalışmalarda uygulanan yöntemler modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir.

Standart olarak seçilen rozmarinik asitin miktar tayini için 1mg/1mL stok çözeltisi elde edilmiştir. Stok çözeltiden seyreltilerek 0,5, 0,25, 0,1, 0,05, 0,03, 0,01, 0,005, 0,003, 0,001 ve 0,0005 mg/mL’lik konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanmış, belirlenen uygun metotla YPSK sisteminde analiz edilmiştir.

## 2.2.4. *İn vitro* sitotoksisite Testleri

### 2.2.4.1. Hücre Kültürü

Çalışma, insan kondrosit (HC) hücreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücreler, kültür ortamında steril L-Glutamin (4,0 mM), yüksek glukoz (4,5 g/L), %1 penisilin/streptomisin ve %10 FBS taşıyan DMEM (MULTiCELL, Cat:319-015-CL) besiyeri kullanılarak çoğaltılmıştır. Dondurulmuş halde saklanan hücreler, hazırlanan besiyeri vasatları içerisine ekilmiş, %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub> içeren 37 °C inkübatörde %80-90 konfluense ulaşana kadar çoğalmaya bırakılmıştır. Kültüre edilip çoğaltılan hücreler, üzerlerindeki besiyerinden kurtarılmış, PBS (fosfat tamponlu salin) kullanılarak 1 defa yıkanmıştır; üzerine tripsin-EDTA (Capricorn, *Trypsin-EDTA* %0,05 in DPBS, Cat No: TRY-1B) damla damla eklenmiş, 3 dk 37°C'de bekletilerek kültüre edildiği kabın tabanına tutunmuş hücrelerin yüzeyden kalkması sağlanmıştır. Sonraki aşamada besiyeri hücre ve tripsin karışımı üzerine eklenmiştir ve böylece tripsinin inhibisyonu sağlanmıştır. Hücreler steril bir falkona aktarılıp 25 °C'de, 1500 rpm'de 5 dk santrifüjlenerek hücre pelleti elde edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra pellet 1 mL taze besiyeri karışımı ilave ile resüspanse edilmiştir. Resüspanse edilen kondrosit hücreleri, 1:1 oranında tripan mavisi (Sigma-Aldrich) ile iyice karıştırılmış, Thoma lamı ile mikroskop altında sayılarak, 1 mL besiyeri içinde bulunan hücre sayısı hesaplanmıştır. Her çalışma kuyucuğunda 5x10<sup>3</sup> hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır.

### 2.2.4.2. Hücre toksisite testi (LDH)

Toksisite değerlendirmesi, laktat dehidrogenaz (LDH) enziminin aktivitesinin ölçümüne dayanan yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. LDH, sitoplazmada çözünebilir bir enzimdir ve birçok ökaryotik hücrede bulunur. Hücre membranında bir hasar meydana gelmesi ile oluşan hücre ölümünden sonra, hücre kültürü ortamına salınır. LDH aktivitesinin ölçümü laktatın pirüvata dönüşümünü katalizyen LDH enziminin yardımıyla nikotinamid adenin dinükleotit (NAD)'in (okside), nikotinamid

adenin dinükleotide (NADH) redüklenmesi ve 2 NADH molekülünün diaforaz enzimini katalizlediği reaksiyonda hidrojenlerini tetrazolyum tuzuna aktararak formazon tuzuna indirgenmesi ile prensibine dayanarak gerçekleşir. Bu reaksiyon sonucu meydana gelen renk değişiminin yoğunluğu LDH aktivitesi ve lizise uğramış ya da membranı hasarlı hücre miktarı ile doğru orantılıdır.

*E. campestris* ekstresinin farklı dozlarının (0,1, 0,5, 10, 20 ve 30 µg/mL), kondrosit hücreleri üzerine toksik etkisini değerlendirmek için  $5 \times 10^3$  hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara ekilmiştir. Hücrelerin plaklara tutunması için 24 saat ön bekleme yapılmıştır. Tutunmanın ardından belirlenen dozlar uygulanmış, 24 saat inkübasyona (%95 nem, %5 CO<sub>2</sub>, 37°C) bırakılan hücrelerin tedavi uygulama sürelerinin sonlarında üzerlerinde bulunan besiyerleri toplanmıştır. Besiyerlerindeki LDH aktivitesinin belirlenmesi için Roche Cytotoxicity Detection Kit (Cat no: 11644793001)'i kullanılmıştır. Spektrofotometrede 492 nm'de elde edilen absorbans verileri ile ekstraların toksisitesi değerlendirilmiştir.

#### **2.2.4.3. Hücre proliferasyon testi (XTT)**

Hücre proliferasyon Kiti II (XTT), hücresel proliferasyonun, canlılığın ve sitotoksitenin radyoaktif olmayan ölçümüne yönelik kolorimetrik bir testtir. Test, tetrazolyum tuzu XTT'nin bir elektron bağlama reaktifi varlığında bölünmesine ve çözünebilir bir formazan tuzu üretilmesine dayanmaktadır. Bu dönüşün yalnızca canlı hücrelerde gerçekleşmektedir. XTT çözeltisi ile 2-20 saat inkübe edilen hücrelerde oluşan formazan boyasının miktarı spektrofotometre kullanılarak belirlenir. Ölçülen absorbans doğrudan canlı hücrelerin sayısı ile ilişkilendirilir.

*E. campestris* ekstresinin farklı dozlarının (0,1, 0,5, 10, 20 ve 30 µg/mL), kondrosit hücreleri üzerinde proliferasyon ve canlılığa etkisini değerlendirmek için  $5 \times 10^3$  hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara ekilmiştir. Hücrelerin plaklara tutunması için ön bekleme 24 saat yapılmıştır. Tutunmanın ardından belirlenen dozlar uygulandı ve 24 saat inkübasyona (%95 nem, %5 CO<sub>2</sub>, 37 °C) bırakılan hücrelerin tedavi uygulama sürelerinin sonlarında hücrelerin üzerine XTT çözeltisi eklendi. 2 saat %95 nem, %5 CO<sub>2</sub>, 37°C'lik ortamda ışıktan korunmalı bir

şekilde inkübe edilen hücreler XTT hücre proliferasyon (Cat. No: 11465015001, Roche) testi kullanılarak spektrofotometrik ölçümü 450 nm'de gerçekleştirilmiştir.



### 3. BULGULAR

#### 3.1. Bitkinin Toplanması



Şekil 3.1. *Eryngium campestre* türünün doğadaki görünümü

*Eryngium campestre* türü 11.07.2017 tarihinde B3 Eskişehir mihalıççık-yunusemre arası yol kenarlarından toplanan, herbaryum örneği hazırlanarak Ankara Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'na AEF-27042 numarası ile kaydedilmiştir.

#### 3.2. Ekstraksiyon Bulguları

Elde edilen ekstre liyofilize edilerek ve % verim Çizelge 3.1'de verilmiştir.

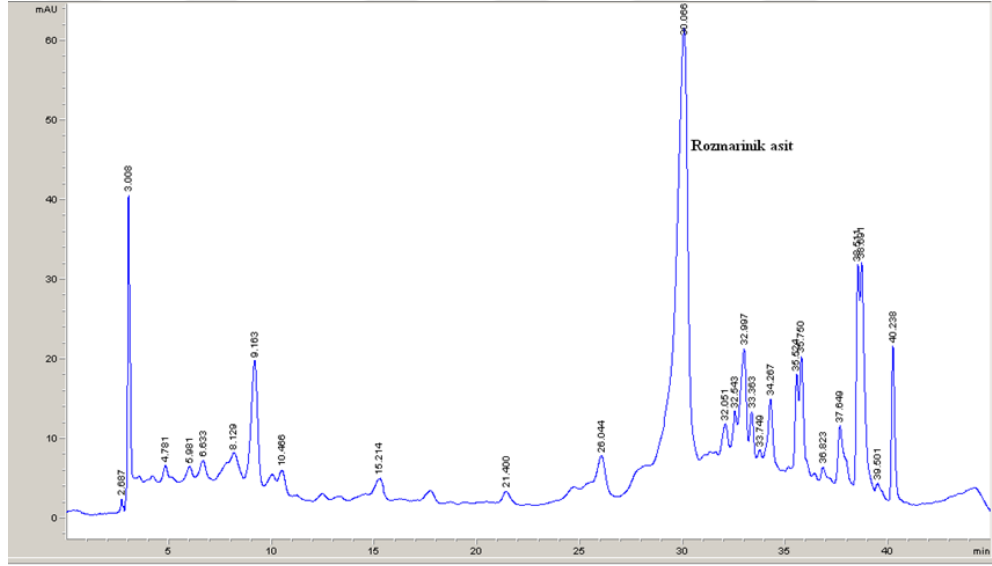
Çizelge 3.1. *Eryngium campestre* bitkisinin kuru ekstresinin miktarları ve % verimi.

Tür Adı	Kuru Ekstre Miktarı (gram)	% Verim (g/g)
<i>Eryngium campestre</i>	3,86 g	19,3

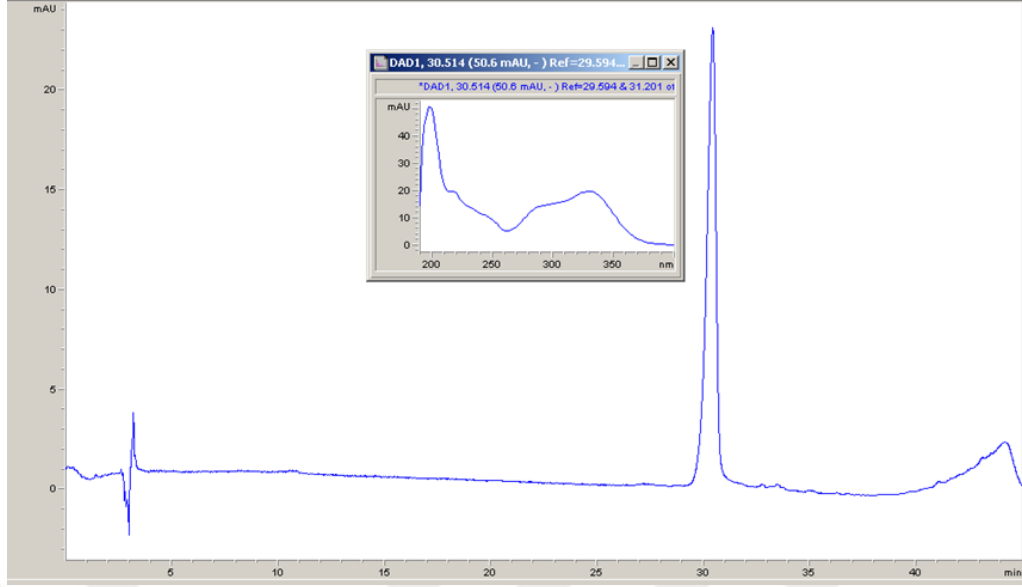
### 3.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntem ve Analizlere Ait Validasyon Bulguları

#### 3.3.1. Kalibrasyon Denkleminin ve Grafiği Oluşturulması

*Eryngium campestre*'nin toprak üstü kısmından hazırlanan %70 Etanol ekstresinin rosmarinik asit miktarının YPSK ile tayini için hazırlanan stok çözeltilerden 10 değişik derişimin hazırlanarak, 3'er kez sisteme uygulanmıştır. Kalibrasyon denklemi, analitik sonuçların hazırlanan çözeltilerin konsantrasyonuna göre grafiğinin çizilmesiyle oluşturulmuştur.

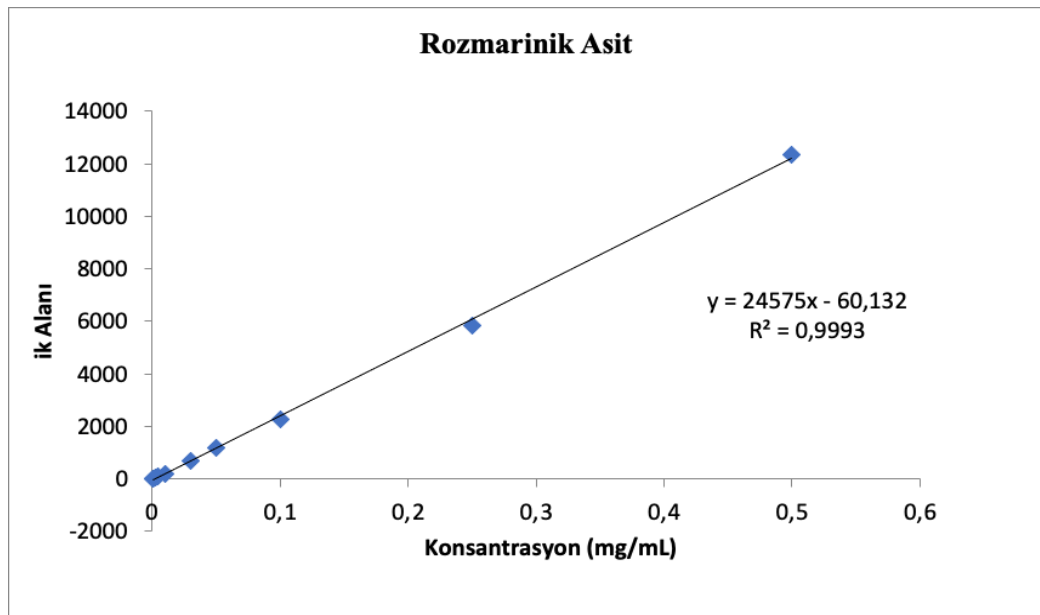


Şekil 3.2. *E. campestre*'ye ait kromatogram.



Şekil 3.3. 0,03 mg/mL'lik konsantrasyonda rozmarinik asit YPSK kromatogramı.

Dilüsyonlardaki rozmarinik asit piklerine ait alanlar kaydedilmiştir. Analiz sonucunda saptanan eğri altı alan verileri ilgili konsantrasyonlarına karşı regresyon analizi Microsoft Excel ile yapılmış ve kalibrasyon denklemi elde edilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Rozmarinik asite ait kalibrasyon denklemi ve grafiği.

### 3.3.2. Analitik Validasyon Parametreleri

Uygulanan YPSK metodunun geçerliliğini ortaya koymak maksadıyla aşağıda verilen parametreler hesaplanmıştır (ICH Q2(R1), 2015).

#### 3.3.2.1. Sistem Uygunluk Testleri

Sistem yeterlilik testi, YPSK cihazının yeteneklerini ve kabul edilebilir kalitede veri elde etmek için uygulanan yöntemi değerlendirmek amacıyla doğrulama sürecinin erken veya sonraki aşamasında gerçekleştirilebilir (Shabir, 2003). Kullanılan cihazın çeşitli bileşenleri, nitelikli olmalı ve analizi yürütmek için gereken başarıyı elde etme yeteneğine sahip olmalıdır. Sistem uygunluk testleri, yöntemin ayrılmaz bir parçasını temsil eder ve kromatografik sistemin başarımının yeterli olduğunu kesinleştirmek için kullanılır (Türk Farmakope Dergisi, 2017).

Bu amaçla hesaplanan parametreler: kuyruklanma faktörü ( $T$ ), enjeksiyon kesinliği (% bağıl standart sapma (BSS)), ayırım gücü (Resolution,  $R_s$ ), kapasite faktörü ( $k'$ ) ve teorik plaka sayısı ( $N$ ).

Analiz edilen madde kolonda iyi tutunması ve yavaş ilerlemesi, kapasite faktörünün yüksek olduğu durumlarda gerçekleşmektedir. Ancak kapasite faktörü çok büyük olursa analiz süresi uzamaktadır. Kapasite faktörü çok düşük olduğu zaman, madde çözücü pikinden ayrılamamaktadır. İdeal kapasite faktörü 2' den büyük olması uygun görülmüştür (ICH Q2(R1), 2015). Kromatogramdaki her bir pikin kapasite faktörü ayrıdır. Kromatogramda, analizi gerçekleştirilen maddenin alıkonma zamanı ( $t_R$ ) ve ilk pikin ( $t_0$ ) alıkonma zamanı kullanılarak hesaplanabilir.

$k' = (t_R - t_0) / t_0$  kapasite faktörünü bu denklem ile hesaplanır.

Seçiciliği, hareketli ve sabit fazın özellikleri etkilemektedir. Seçicilik ( $\alpha$ ) değerinin 1'den büyük olması uygundur. (ICH Q2(R1), 2015).

Bir örneğin en az 3 ( $n \geq 3$ ) enjeksiyonu ile elde edilen sonuçların tekrar edilebilirliği enjeksiyon kesinliğini gösterir. Sonuçların %BSS değeri ile değerlendirilir.

Ayırma faktörü (rezolüsyon), art arda elüe edilen iki analiti ayırma yeteneğinin kantitatif bir ölçümünü gösteren parametredir. Kromatografik sistemlerde sonuçların güvenilirliği için iyi ayrılmış piklerin elde edilmesi ön koşuldur. Ayırımın tam olarak sağlanması için ayırma gücü (RS) en az 1,5 olmalıdır. İki pik arasındaki zaman farkının pik genişlikleri ( $w$ ) ortalamasına bölünmesi ile hesaplanır.

$Rs = (t_2 - t_1) / ((w_2 + w_1) / 2)$  Ayırma faktörü (rezolüsyon), bu denklem ile hesaplanır.

Asimetri faktörü, ilgili pikin şekil olarak ne kadar düzgün olduğunu (asimetrisini) belirler. Pik asimetrisindeki yükseliş, rezolüsyonun ve analiz hassasiyetinin azalmasına neden olmaktadır. Kolon ömrü azaldıkça pik asimetrisi artar. Hesaplanması için  $As = B/A$  formülü kullanılır. 1,0 değerindeki  $As$  simetriyi belirtir.  $As > 1,0$  olduğunda, pik kuyruklanmıştır.  $As < 1,0$  olduğunda, pik ön kuyruklanmıştır. Asimetri faktörünü YPSK yazılımı otomatik hesaplamıştır.

En önemli parametre teorik tabaka sayısı olarak değerlendirilebilir. Çünkü teorik tabaka sayısı, analiz verimi ile doğrudan ilgilidir. Teorik tabaka sayısını etkileyen parametreler; analiz edilen maddenin türü, kolon sıcaklığı, hareketli faz akış hızı, tampon çözeltinin türü ve kolon ömrüdür. Kolon etkinliğini gösteren bir parametredir.

$N = 16 \times (tR / w)^2$  teorik tabaka sayısı bu denklem ile hesaplanır.

Sistem uygunluk testleri gerçekleştirilmiştir ve elde edilen sonuçlar verilen değer aralıkları ile karşılaştırma yoluyla değerlendirilmiştir (Çizelge 3.2).

**Çizelge 3.2.** Sistem uygunluk testleri sonuçları.

Parametre	Sonuç	Kabul kriteri
Kapasite faktörü (k)	10,305	>2
Enjeksiyon kesinliği	1,64	<2
Önceki pikten Seçiciliği ( $\alpha$ )	53,897	>1
Sonraki pikten Seçiciliği ( $\alpha$ )	-	>1
Önceki pikten ayırma faktörü (RS)	42,259	>2
Sonraki pikten ayırma faktörü (RS)	-	>2
Kuyruklanma faktörü (T)	0,73	<2
Pik Asimetrisi		$\leq 2$
Teorik plaka sayısı (N)	12025	>2000

\*Art arda yapılan 5 enjeksiyon sonuçlarıdır.

### 3.3.2.2. Özgüllük

Yöntemin, analiz edilen bileşiğin dışında kromatogramda bulunabilecek diğer maddeleri tespit edebilme yeteneği özgüllük olarak ifade edilir (ICH Q2(R1), 2015). Uygulanan YPSK yöntemi için farklı dalga boylarında çalışılarak yöntemin özgüllüğünü doğrulamıştır.

### 3.3.2.3. Çalışma Aralığı ve Doğrusallık

Uygulanan yöntemin, analizlerin gerçekleştirildiği konsantrasyon aralığındaki konsantrasyonla orantılı test sonuçları elde etme yeteneğini ifade eder (ICH Q2(R1), 2015). Doğrusallık, analit konsantrasyonunun ya da içeriğinin bir fonksiyonu olarak sinyallerin grafiksel olarak gözlemlenmesiyle değerlendirilir. Eğim (m), kesişim (n) ve korelasyon katsayısı (r) veya regresyon katsayısı (R2) doğrusallığı sağlayan

parametrelerdir. Korelasyon katsayısı 0,999'a eşit veya daha büyükse doğrusallık sağlanmış demektir.

Analitik numunenin sonuçlarına göre kalibrasyon solüsyonunun alt limit ve üst limit konsantrasyonları belirlenerek hazırlandı ve analizlerin aralıklar dahilinde yapılması sağlanmıştır. Doğrusallığın belirlenmesi için stok çözeltilerden 10 farklı konsantrasyon hazırlanmış ve analitik sonuçların hazırlanan çözeltilerin konsantrasyonuna karşı grafiği çizilerek bir kalibrasyon tablosu oluşturulmuştur.

#### 3.3.2.4. Tayin Alt Sınırı (TAS, LOQ) ve Teşhis Sınırı (TS, LOD)

Bir numune içinde analizi yapılacak bileşenin (analit) teşhis edilebilen, ancak kabul edilebilir bir belirsizlikle miktar tayini yapılamayan en düşük derişimi Teşhis Sınırı (TS, LOD) olarak ifade edilir. Tayin Alt Sınırı (TAS, LOQ) ise doğru bir şekilde tayin edilebilen cevabı veren en küçük analit derişimini ifade eder (ICH Q2(R1), 2015). LOD ve LOQ hesaplanmasında kromatogramlardaki sinyal/gürültü oranları kullanılır. Sinyalin gürültüye oranının 3,3 olduğu derişim LOD ve 10 olduğu derişim LOQ olarak kabul edilir ve aşağıda verilen denklem ile hesaplanır (ICH Q2(R1), 2015).  $m$  kalibrasyon doğrusunun eğimini,  $s$  ise standart sapmayı ifade etmektedir.

$LOD = (3,3 \times s)/m$  ve  $LOQ = (10 \times s)/m$  denklem ile hesaplanır.

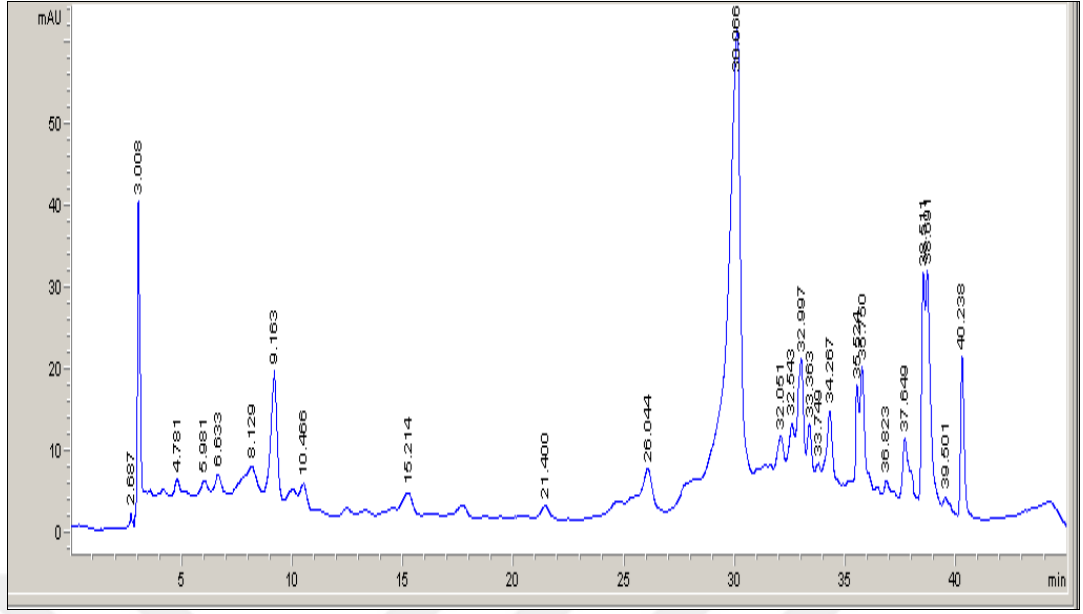
**Çizelge 3.3.** Geliştirilen YPSK yöntemi ile rozmarinik asit tayini için validasyon parametreleri ve kalibrasyon sonuçları.

Parametre	Rozmarinik asit
Doğrusallık aralığı (mg mL <sup>-1</sup> )	0,0005 - 0,5
Eğim	24575
Kesişim	-60,132
Korelasyon katsayısı	0,9993
Determinasyon katsayısı	0,9993
Teşhis sınırı (µg mL <sup>-1</sup> )	0,000036
Tayin alt sınırı (µg mL <sup>-1</sup> )	0,000109
Gün içi tekrar edilebilirlik(RSD %)*	0,5341
Günler arası tekrar edilebilirlik (RSD %)*	0,4966

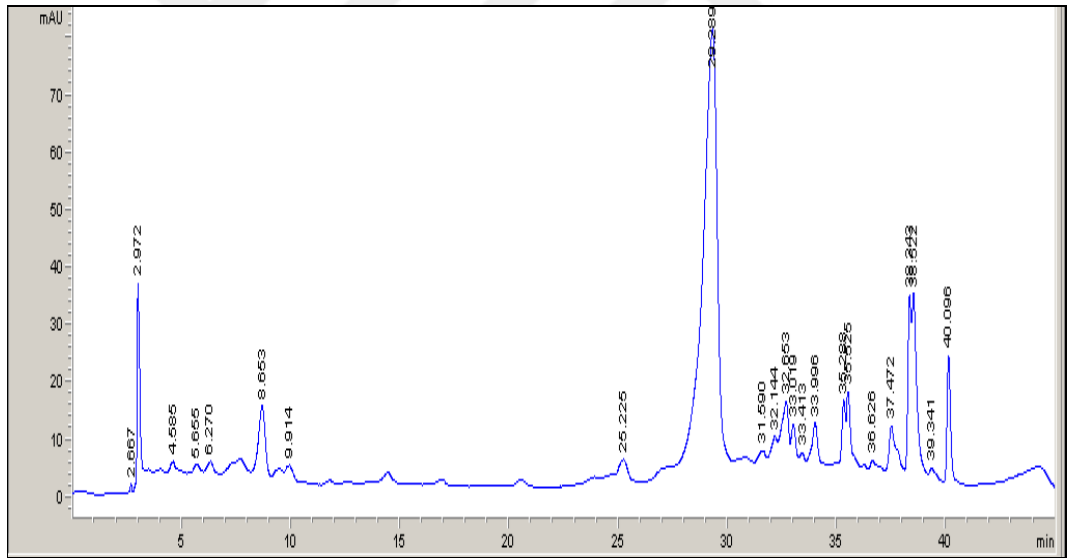
\*Art arda yapılan 3 enjeksiyon sonuçlarıdır.

### 3.3.2.5. Doğruluk

Doğruluk analitik bir uygulamada, bilinen değer ile hesaplanan değer in yakınlığını ifade eder (ICH Q2(R1), 2015). *Eryngium campestre*'nin etanol ekstresinden hazırlanan 10 mg/1,5mL'lik çözelti 3 kez analiz edilmiştir. Kalibrasyon denklemini kullanılarak ekstre içerisinde bulunan rozmarinik asitin ortalama miktarı hesaplandıktan sonra (0,0879 mg/mL), rozmarinik asitin hazırlanan 0,03 mg/mL konsantrasyonu eklenerek geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. %50 ve 200 oranında madde ilavesi yapılarak ve her seviyede en az 3'er ölçüm yapılmıştır. Sonuçlar % geri kazanım olarak ifade edilmiştir ve % bağıl hata (% Bias) ile beraber raporlanmıştır.



Şekil 3.5. *E. campestre*'ye ait YPSK kromatogramı.



Şekil 3.6. *E. campestre*'ye %200 oranında madde ilavesi sonrası ait YPSK kromatogramı.

**Çizelge 3.4.** Geliştirilen YPSK yöntemi ile rozmarinik asit tayini için geri kazanım çalışmasından elde edilen sonuçlar.

	<b>Parametre</b>	<b>Doğruluk</b>
<b>%50</b>	<b>Eklenen (mg mL<sup>-1</sup>)</b>	0,017
	<b>Bulunan (mg mL<sup>-1</sup>)</b>	0,094
	<b>Geri kazanım (%)</b>	89,734
	<b>Geri kazanıma ait</b>	1,6038
	<b>BSS (%) *</b>	
	<b>Bias (%)</b>	10,27
<b>%200</b>	<b>Eklenen (mg mL<sup>-1</sup>)</b>	0,067
	<b>Bulunan (mg mL<sup>-1</sup>)</b>	0,136
	<b>Geri kazanım (%)</b>	88,274
	<b>Geri kazanıma ait</b>	0,206
	<b>BSS (%) *</b>	
	<b>Bias (%)</b>	11,730

\*Art arda yapılan 5 enjeksiyon sonuçlarıdır.

### 3.3.2.6. Kesinlik

Ölçüm sonuçlarının tekrarlanabilirliğini göstermektedir (ICH Q2(R1), 2015). Yöntemlerin kesinliği için, gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik çalışmaları yapılmıştır. Gün içi çalışmalarda, 0,03 mg/mL seviyesinde çözelti hazırlanmış ve bu çözeltiler aynı gün içinde analiz edilmiştir. Önce gün içi tekrarlanabilirlik ölçümleri yapılmıştır (Çizelge 3.5).

**Çizelge 3.5.** Rozmarinik asit standart çözeltisi gün içi kesinlik parametresi sonuçları.

<b>Enjeksiyon Sayısı</b>	<b>0,03 mg/mL'deki alan</b>
<b>1</b>	679,9
<b>2</b>	679,2
<b>3</b>	680,9
<b>Ortalama</b>	680,3
<b>SS</b>	0,854
<b>%BSS</b>	0,126

Günler arası çalışmalar, gün içi çalışmaların aynı şartlarla farklı günde tekrarlanması ile yapılmıştır. Kesinlik sonuçları Bağıl Standart Sapma (BSS) değerlerinin hesaplanması ile değerlendirilmiştir. Yöntemin doğruluğu daha sonra ortalama (gün arası) hassas ölçümler yapılarak kontrol edilmiştir (Çizelge 3.6).

**Çizelge 3.6.** Rozmarinik asit standart çözeltisi günler arası kesinlik parametresi sonuçları.

<b>Enjeksiyon Sayısı</b>	<b>0,03 mg/mL'deki alan</b>
<b>1</b>	669,2
<b>2</b>	668,3
<b>3</b>	663,1
<b>Ortalama</b>	666,87
<b>SS</b>	3,92
<b>%BSS</b>	0,494

### **3.3.2.7. Sağlamlık**

Sağlamlık çalışmalarında optimum deney koşullarındaki geliştirilen bir kromatografik yöntemin, analiz parametrelerindeki küçük değişikliklerin cevap üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu parametreler organik çözücü yüzdesi, pH, iyonik güç, dalga boyu, akış hızı ve kolon sıcaklığı gibi etkenlerdir. %109,12-95,64 arasında değişim ile sağlamlık elde edilmiştir.

**Çizelge 3.7.** Rozmarinik asit standart çözeltisi YPSK analizi için sağlamlık parametresi sonuçları.

<b>Dalga Boyu Değişikliği</b>	<b>323 nm</b>	<b>325 nm</b>	<b>327 nm</b>
<b>Alan Ort</b>	684,18	695,13	696,44
<b>Fark (%)</b>	<b>- 1,57</b>	-	<b>0,19</b>
<b>Kolon Sıcaklığı Değişikliği</b>	<b>24,9°C</b>	<b>25°C</b>	<b>25,1°C</b>
<b>Alan Ort</b>	686,9	666,87	691,26
<b>Fark (%)</b>	<b>3,003</b>	-	<b>3,65</b>
<b>Akış Hızı Değişikliği</b>	<b>0,55 mL / dk</b>	<b>0,6 mL / dk</b>	<b>0,65 mL/k</b>
<b>Alan Ort</b>	727,691	666,87	637,77
<b>Fark (%)</b>	<b>9,12</b>	-	<b>-4,36</b>
<b>Enjeksiyon Hacmi Değişikliği</b>	<b>9,9 µL</b>	<b>10 µL</b>	<b>10,1 µL</b>
<b>Alan Ort</b>	684,839	666,87	686,37
<b>Fark (%)</b>	<b>2,69</b>	-	<b>2,92</b>

### **3.3.3. *Eryngium campestre*'nin etanol ekstresinden YPSK ile rozmarinik asit miktar tayini**

*E. campestre* bitkisinin toprak üstü kısımlarında YPSK yöntemi ile hesaplanan rozmarinik asit miktarı %0,0879 mg/mL olarak hesaplanmıştır.

Ekstrede maddeye ait pik alanları kalibrasyon denklemlerinde yerine konularak ekstredeki maddelerin miktarı hesaplandı.

Doğru denklemleri, R<sup>2</sup> değerleri, % miktar, LOQ ve LOD değerleri Çizelge 3.8'de verilmiştir.

**Çizelge 3.8.** *E. campestre* bitkisinde YPSK ile ölçülen rozmarinik asit miktarı.

<b>Regresyon Denklemi</b>	$y = 24575.x - 60,132$
<b>Determinasyon Katsayısı (<math>R^2</math>)</b>	0,9993
<b>Çalışma Aralığı (mg/mL)</b>	0,0005-0,5 mg/mL
<b><i>E. campestre</i> etanol ekstresi rozmarinik asit miktarı (%a/a)</b>	%1,7
<b>Teşhis limiti (LOD)</b>	0,000036
<b>Tayin alt limiti (LOQ)</b>	0,000109

### 3.4. *In vitro* sitotoksosite Testleri

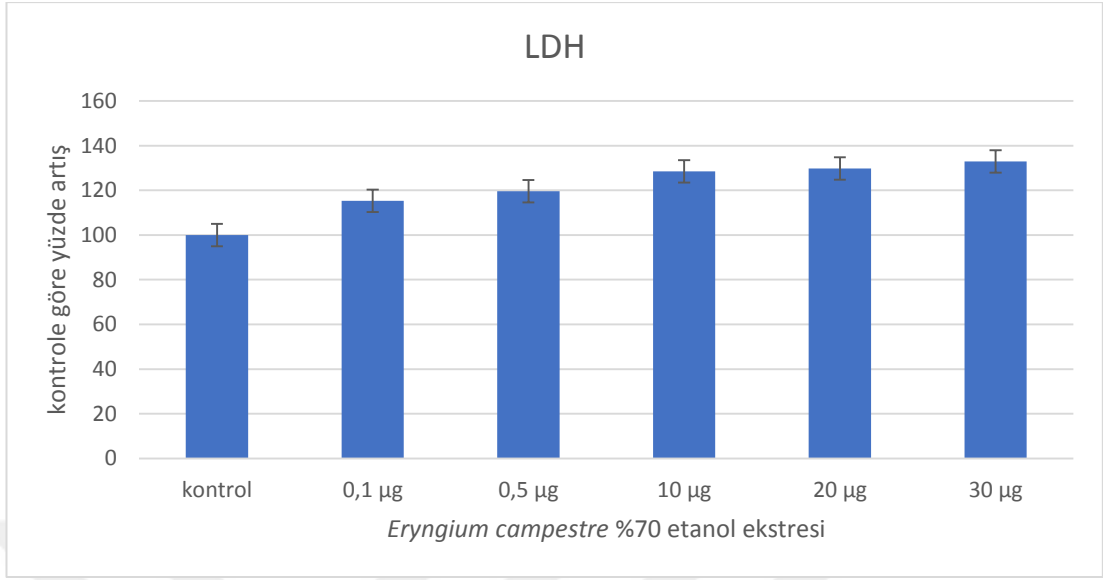
#### 3.4.1. Hücre toksisite testi (LDH) sonuçları

LDH testi sonuçları tablo ve grafik olarak verilmiştir (Çizelge 3.9; Şekil 3.7). Tablolar incelendiğinde ekstrenin doza bağlı toksisite gösterdiği saptanmıştır. Kullanılan dozlar bu hücreler için yüksek bulunmuş olup, en düşük konsantrasyonda bile (0,1 µg/mL) kontrole göre LDH miktarını artırmıştır.

**Çizelge 3.9.** Hücre toksisite testi (LDH) farklı konsantrasyondaki sonuçları.

Uygulanan <i>Eryngium campestre</i> %70 etanol ekstre miktarı	Kontrole göre % artış ± SS (LDH)	Ortalamanın standart hatası (SEM)
kontrol	100	3,5829
0,1 µg	115,3321 ± 0,0199	2,1207
0,5 µg	119,5645 ± 0,0051	0,5436
10 µg	128,5402 ± 0,0103	1,0946
20 µg	129,7633 ± 0,0110	1,1692
30 µg	132,957 ± 0,0046	0,4903

SS: Standart Sapma ; SEM: Standard error of mean



**Şekil 3.7.** Hücre toksisite testi (LDH) farklı konsantrasyondaki sonuçları.

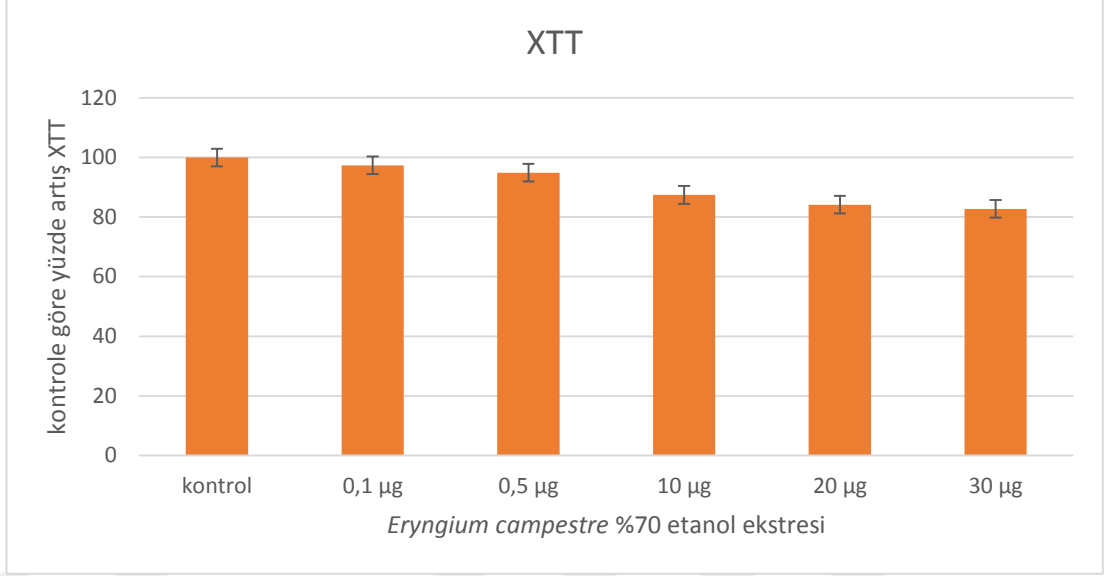
### 3.4.2. Hücre proliferasyon testi (XTT) sonuçları

XTT testi sonuçları tablo ve grafik olarak verilmiştir (Çizelge 3.10; Şekil 3.8).

**Çizelge 3.10.** Hücre proliferasyon testi (XTT) farklı konsantrasyondaki sonuçları.

Uygulanan <i>Eryngium campestre</i> %70 etanol ekstre miktarı	Kontrolle göre % ± SS (XTT)	Ortalamanın standart hatası (SEM)
kontrol	100	1,4877
0,1 µg	97,38408 ± 0,0034	0,2066
0,5 µg	94,89686 ± 0,0059	0,3531
10 µg	87,46161 ± 0,0064	0,3883
20 µg	84,16706 ± 0,0038	0,2276
30 µg	82,7373 ± 0,0131	0,7921

SS: Standart Sapma ; SEM: Standard error of mean



**Şekil 3.8.** Hücre proliferasyon testi (XTT) kullanılarak farklı konsantrasyondaki sonuçları.

*E. campestre* ekstresi, hücre proliferasyonunu doz bağımlı olarak azaltmıştır. Çok düşük konsantrasyonlarda bile etki görülmüştür.

## 4. TARTIŞMA

*E. campestre* L. bitkisi Anadolu'da ve dünyada çok geniş yayılış gösteren, geleneksel olarak ateş düşürücü, terletici, öksürük yatıştırıcı ve akrep sokmalarına karşı kullanılan bir bitkidir. Bu geleneksel kullanımlara dayanarak yapılan çeşitli biyolojik aktivite çalışmalarında (antiinflamatuvar aktivite, analjezik etki, antioksidan etki, vb.) halk arasında kullanımını doğrular nitelikte sonuçlar bulunmuştur.

*Eryngium* cinsi üzerinde yapılan fitokimyasal araştırmalar triterpenik saponinler, fenolik asitler, flavonoidler, uçucu yağ, kumarin türevleri taşıdıklarını göstermektedir.

Çalışmamızda Türkiye'de yetişen *Eryngium campestre* bitkisinin toprak üstü kısımları üzerinde rozmarinik asit miktar tayini gerçekleştirilmesi, yine toprak üstü kısmından kondrosit hücreleri üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

*E. campestre* L. yapraklarının sulu ekstresi kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerin incelendiği bir çalışmada, 5 g bitki materyalinden hazırlanan total ekstrede 13,5 mg rozmarinik asit saptanmıştır (Vaseghi ve ark., 2019). Kikowska ve ark. (2016), *E. campestre* L. bazal yapraklarının %70'lik etanollü ekstresinde 4,229 mg/g rozmarinik asit saptamıştır. Le Claire ve arkadaşlarının (2005), aralarında *E. campestre*'nin toprak altı kısımlarının da yer aldığı, çalışmasında rozmarinik asit ve glikoziti olan *R-(+)-3'-O-β-D-glukopiranozil* rozmarinik asitin miktar tayini gerçekleştirilmiş, toprak altı kısımlarında 0,6 mg/g rozmarinik asit taşıdığı saptanmıştır.

Çalışmamızda *E. campestre* L. bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan %70'lik etanollü ekstrede rozmarinik asit %1,7 olarak bulunmuştur. Bulunan miktar önceki çalışmalarla karşılaştırıldığında daha düşük değerdedir. Bitki materyalinin fitokimyasal içeriği ışık, sıcaklık, kuraklık, hasat zamanı, vb. koşullara bağlı olarak

değişiklik gösterebilmektedir (Li ve ark., 2020; Ncube ve ark., 2012). Önceki çalışmalarla aradaki fark bahsedilen koşullara bağlı olarak ortaya çıkmış olabilir.

*Eryngium* türlerinin kondrositler üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya literatürde rastlanmamış olup, Portekiz’de, *Eryngium duriaei* subsp. *juresianum* bitkisinden elde edilen uçucu yağın kondrositler üzerine etkisinin araştırıldığı görülmüştür. Sonuç olarak, *E. duriaei* subsp. *juresianum* uçucu yağının hem IL-1 ile indüklenen NF-kB hem de MAPK aktivasyonunu azalttığı, bununla beraber NF-kB ve JNK inhibisyonuna karşı daha etkili olduğu ortaya konmuştur. Birlikte ele alındığında, elde edilen sonuçlar antienflamatuvar ve antkatabolik özellikler ve dolayısıyla potansiyel hastalık modifiye edici anti-osteoartritlik aktivite sunabilecek bileşikler içerdiği sonucuna varılmıştır. *E. duriaei* subsp. *juresianum* uçucu yağının geniş bir konsantrasyon aralığında bağırsak hücrelerinde iNOS ekspresyonunu önemli ölçüde engelleyemediği, ancak çok daha düşük konsantrasyonlarda bile insan kondrositlerinde etkili oldu ortaya çıkmıştır (Rufino ve ark., 2015).

Gerçekleştirilen tez çalışmasında *Eryngium campestre* toprak üstü kısımlarının %70 etanollü ekstresi kullanılırken yukarıda bahsedilen çalışmada farklı bir tür üzerinde çalışmanın gerçekleştirilmiş, ayrıca ekstre değil, bitkiden elde edilen uçucu yağın aktivitesinin incelendiği görülmektedir. Aktivite çalışmaları önçalışma niteliğinde olup sonraki çalışmalar için yol gösterici sonuçlar elde edilmiştir. Bitkinin kondrositler üzerine yapılacak ileri çalışmalarında daha düşük konsantrasyonlar kullanılarak deneylerin tasarlanması sonucuna varılmıştır.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Literatür verileri *Eryngium* cinsinin potansiyel terapötik öneme sahip olduğunu göstermiştir. *Eryngium* türlerinin fitokimyasal incelemeleri, triterpenoid saponinler, fenolik asitler, flavonoidler, kumarinler, uçucu yağ, poliasetilenler, fitosteroller ve ekdisteroidler gibi ikincil metabolitlerin varlığını göstermiştir.

Çeşitli *Eryngium* türlerinin Orta Çağ'da tanımlanan bazı özellikleri modern araştırmalarda doğrulanmıştır, örneğin antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antiamebik ve nöroprotektif aktiviteleri teyit edilmiştir (Kikowska ve ark., 2020).

*Eryngium campestre* üzerindeki biyolojik, fitokimyasal ve toksikolojik araştırmalar hala sınırlıdır ve daha fazla çalışma yapılması gereklidir. Bitkinin potansiyel tıbbi kullanımları ve sağlık yararları hakkında daha kapsamlı ve güvenilir bilgiler için ileri düzeyde araştırmaların devam etmesi önemlidir. Gerçekleştirdiğimiz çalışmanın daha sonraki araştırmalar için yol gösterici olacağı öngörülmektedir.

## ÖZET

### ***Eryngium campestre* L. Bitkisinin Toprak Üstü Kısımları Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar**

Bitkiler ve bitkilerden hazırlanan ekstreler çeşitli hastalıkların tedavisinde çok eski zamanlardan beri kullanılmaktadır. Apiaceae familyasından olan *Eryngium* cinsi dünyada 317 takson ülkemizde ise 26 takson ile temsil edilmektedir. *Eryngium campestre* L. bitkisi, Türkiye’de boğa dikenini, deveci dikenini, deve elması, göz dikenini, tengel dikenini gibi isimlerle bilinmektedir. Bitkinin kurutulmuş yaprakları, çiçekleri ve kökleri tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır. *Eryngium campestre*’nin toprak üstü kısımları fenolik asitler, triterpenik saponinler, kumarinler, uçucu yağ, flavonoid ve asetilenleri taşımaktadır. Flavonoidlerden izoramnetin glikozitleri, mirsetin glikozitleri, kersetin glikozitleri (rutin), kemferol glikozitleri; fenolik asitlerden klorojenik asit, *p*-kumarik asit, kafeik asit, rozmarinik asit ve ferulik asit taşıdığı yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır.

Çalışmanın amacı Türkiye’de yetişen *Eryngium campestre* bitkisinin toprak üstü kısmından Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) ile rozmarinik asit miktar tayini analizini gerçekleştirerek bitki ekstresinin kondrosit hücreleri üzerine etkisini *in vitro* XTT ve LDH testleri ile araştırmaktır.

*Eryngium campestre*’nin toprak üstü kısımlarında %1,7 a/a rozmarinik asit bulunmuştur. Kondrosit hücrelerinin canlılığını azaltmış ve LDH testi sonucuna göre çalışılan konsantrasyonlarda toksik etki gösterdiği belirlenmiştir. İleri çalışmaların planlanmasında daha düşük doz uygulamaları ile devam edilebileceği sonucuna varılmıştır. Gerçekleştirilen çalışmanın daha sonraki araştırmalar için yol gösterici olacağı öngörülmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Apiaceae, boğadikenini, *Eryngium campestre* , kondrosit, rozmarinik asit

## SUMMARY

### Pharmacognostic Investigations on Aerial Parts of *Eryngium campestre* L.

Plants and extracts prepared from plants have been used since ancient times in the treatment of various diseases. The genus *Eryngium*, belonging to the Apiaceae family, is represented with 317 taxa in the world, of which 26 taxa in our country. *Eryngium campestre* L. is known as boğa diken, deveci diken, deve elması, göz diken, tengel diken in Türkiye. The flowers, dried leaves and roots of the plant are used for medicinal purposes. The aerial parts of *Eryngium campestre* is known to contain phenolic acids, essential oil, flavonoids, acetylenes, saponins and coumarins. Quercetin glycosides (rutin), isorhamnetin glycosides, myricetin glycosides, kaempferol glycosides from flavonoids; studies have shown that it contains *p*-coumaric acid, chlorogenic acid, caffeic acid, rosmarinic acid and ferulic acid among phenolic acids.

The aim of the study is to analyze the rosmarinic acid amount determination by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) from the above-ground part of *Eryngium campestre* growing in Turkey and to investigate the effect of the plant extract on chondrocyte cells by *in vitro* XTT and LDH assays.

In the above-ground parts of *Eryngium campestre*, 1.7% a/a rosmarinic acid was found. It decreased the viability of chondrocyte cells and according to the results of LDH test, it was determined that it showed toxic effect at the concentrations studied. It was concluded that lower dose applications can be continued in the planning of further studies. It is predicted that the study will be a guide for further research.

**Keywords:** Apiaceae, chondrocyte, *Eryngium campestre*, eryngo, rosmarinic acid

## KAYNAKLAR

- AKŞİT, H. (2008). Boğa dikenini (*Eryngium campestre*) bitki ekstraktlarının biyolojik aktivitesinin araştırılması ve bitkinin kimyasal bileşenlerinin karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, GaziOsmanPaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Tokat.
- AL-ASKAR, A. A., BASHİR, S., MOHAMED, A. E., SHARAF, O. A., NABİL, R., SU, Y., ... & BEHİRİ, S. I. (2023). Antimicrobial Efficacy and HPLC Analysis of Polyphenolic Compounds in a Whole-Plant Extract of *Eryngium campestre*. *Separations*, **10**(6): 362.
- AMIRI, M. S., & JOHARCHI, M. R. (2016). Ethnobotanical knowledge of Apiaceae family in Iran: A review. *Avicenna journal of phytomedicine*, **6**: 621.
- ASLAN ERDEM S. Türkiye’de Yetişen Bazı *Eryngium* Türlerinde Farmakognozik Araştırmalar. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2009: 7-128.
- ATAY BALKAN, İ., TAŞKIN, T., ACAR ŞAH, E., AKAYDIN, G., & YEŞİLADA, E. (2020). Comparative study of the anti-inflammatory, antioxidant and urease inhibitory activities of *Eryngium kotschy* Boiss. and *E. campestre* L. var. *virens* (Link) Weins extracts. *Journal of Research in Pharmacy*.
- BASER, K. H. C., & KİRİMER, N. (2014). Essential oils of Anatolian Apiaceae-A profile. *Nat. Vol. Essent. Oils*, **1**(1): 1-5.
- BAYTOP T. Türkiyede bitkiler ile tedavi (geçmişte ve bugün). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 1999; ss 169.
- BOGUCA-KOCKA A, SMOLARZ HD, KOCKI J (2008) Apoptotic activities of ethanol extracts from some Apiaceae on human leukaemia cell lines. *Fitoterapia* **79**: 487–497.
- BOUZİDİ, S., BENKİKİ, N., HACHEMİ, M., & HABA, H. (2017). Investigation of *In Vitro* Antioxidant Activity and *In Vivo* Antipyretic and Anti-Inflammatory Activities of Algerian *Eryngium campestre* L. *Current Bioactive Compounds*, **13**(4): 340-346.
- BRODOWSKA KM (2017) Natural flavonoids: classification, potential role, and application of flavonoid analogues. *Eur J Biol Res* **7**(2):108–123.
- BROPHY JJ, GOLDSACK RJ, COPELAND LM, PALA-PAUL J (2003) Essential oil of *Eryngium* L. species from New South Wales (Australia). *J Essent Oil Res* **15**: 392–397.

- BYLEBYL, K., POSCHLOD, P., & REISCH, C. (2008). Genetic variation of *Eryngium campestre* L.(Apiaceae) in central Europe. *Molecular Ecology*, **17**: 3379-3388.
- CALVINO, C. I., MARTÍNEZ, S. G., & DOWNIE, S. R. (2008). The evolutionary history of *Eryngium* (Apiaceae, Saniculoideae): Rapid radiations, long distance dispersals, and hybridizations. *Molecular phylogenetics and evolution*, **46**(3): 1129-1150.
- CHRISTENSEN LP, BRANDT K (2006) Bioactive polyacetylenes in food plants of the Apiaceae family: occurrence, bioactivity and analysis. *J Pharm Biomed Anal* **41**: 683–693.
- CONEA S, PARVU AE, TAULESCU MA, VLASE L (2015) Effects of *Eryngium planum* and *Eryngium campestre* extracts on ligature-induced rat periodontitis. *Dig J Nanomater Biostruct* **10**: 693–704.
- CONEA S, VLASE L, CHIRILA I (2016) Comparative study on the polyphenols and pectin of three *Eryngium* species and their antimicrobial activity. *Cellulose Chem Technol* **50**(3–4): 473–481.
- ELLNAİN-WOJTASZEK M, ZGORKA G (1999) High-performance liquid chromatography and thin layer chromatography of phenolic acids from *Ginkgo biloba* L. leaves collected within vegetative period. *J Liq Chromatogr Relat Technol* **22**: 1457–1471.
- ERDEM SA, NABAVI SF, ORHAN IE, DAGLIA M, IZADI M, NABAVI SM (2015) Blessings in disguise: a review of phytochemical composition and antimicrobial activity of plants belonging to the genus *Eryngium*. *DARU J Pharm Sci* **23**: 23–53.
- GUIDELINE, I. H. T. (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology. *Q2 (R1)*, **1**(20): 05.
- GRUENWALD J, BRENDLER T, JAENICKE C (2000) PDR for Herbal Medicines, 2<sup>nd</sup> edn. Medical Economics Company, Montvale, pp 729–733.
- GÜNER, A., ÖZHATAY, N., EKİM, T., BAŞER, K.H.C. (EDS). 2000. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol. **11** (Supplement), Edinburgh Üniv. Press, Edinburgh.
- GÜNEŞ, M. G., İŞGÖR, B. S., İŞGÖR, Y. G., MOGHADDAM, N. S., GEVEN, F., & YİLDİRİM, Ö. (2014). The effects of *Eryngium campestre* extracts on glutathione-s-transferase, glutathione peroxidase and catalase enzyme activities. *Turk J Pharm Sci*, **11**(3): 339-346.
- HANÇER, Ç. K., & URUŞAK, E. A. (2017). Apiaceae familyası meyve anatomisindeki “Vitta” terimi ve yerleşimleri. *Avrasya Terim Dergisi*, **5**: 19-24.
- HEYWOOD, V. H., BRUMMITT, R. K., CULHAM, A., & SEBERG, O. (2007). Flowering Plant Families of the World (Vol. 88). Ontario: Firefly books.

- JUNQUEIRA, L. AND CARNEIRO, J. (2005). Basic Histology (Eleventh Edition). Brazil: McGraw-Hill Medical.
- KARTAL M, MITAINE-OFFER AC, ABU-ASAKER M, MIYAMOTO T, CALIS I, WAGNER H, LACAÏLLE-DUBOIS MA (2005) Two new triterpene saponins from *Eryngium campestre* . Chem Pharm Bull **53**(10): 1318–1320.
- KARTAL M, MITAINE-OFFER AC, PAULULAT T, ABU-ASAKER M, WAGNER H, MIRJOLET JF, GUILBAUD N, LACAÏLLE-DUBOIS MA (2006) Triterpene saponins from *Eryngium campestre* . J Nat Prod **69**(7): 1105–1108.
- KARGIOĞLU M. 2008. An Ethnobotanical Survey of Inner-West Anatolia, Turkey. Hum Ecol. **36**: 763-777.
- KHOLKHAL W, ILIAS F, BEKHECHI C, BEKKARA FA (2012) *Eryngium maritimum*: a rich medicinal plant of polyphenols and flavonoids compounds with antioxidant, antibacterial and antifungal activities. Curr Res J Biol Sci **4**(4): 437–443.
- KIKOWSKA M, BUDZIANOWSKI J, KRAWCZYK A, THIEM B (2012) Accumulation of rosmarinic, chlorogenic and caffeic acid in *in vitro* of *Eryngium planum* L. Acta Physiol Plant **34**(6): 2425–2433.
- KIKOWSKA M (2014a) *In vitro* cultures of Polish *Eryngium* L. species – micropropagation, organ cultures, phytochemical investigation and biological activity. Doctoral thesis, Faculty of Pharmacy, Poznan University of Medical Sciences.
- KIKOWSKA M, THIEM B, SLIWINSKA E, REWERS M, KOWALCZYK M, STOCHMAL A, OLESZEK W (2014b) The effect of nutritional factors and plant growth regulators on micropropagation and production of phenolic acids and saponins from plantlets and adventitious root cultures of *Eryngium maritimum* L. J Plant Growth Regul **33**(4): 809–819.
- KIKOWSKA M, KĘDZIORA I, KRAWCZYK A, THIEM B (2015) Methyl jasmonate, yeast extract and sucrose stimulate phenolic acid accumulation in *Eryngium planum* L. shoot cultures. Acta Biochim Pol **62**(2): 197–200.
- KIKOWSKA M, DŁUGASZEWSKA J, KUBICKA MM, KĘDZIORA I, BUDZIANOWSKI J, THIEM B (2016a) *In vitro* antimicrobial activity of extracts and their fractions from three *Eryngium* L. species. Herba Pol **62**(2): 67–77.
- KIKOWSKA M, THIEM B, SLIWINSKA E, REWERS M, KOWALCZYK M, STOCHMAL A, DŁUGASZEWSKA J (2016b) Micropropagation of *Eryngium campestre* L. via shoot culture provides valuable uniform plant material with enhanced content of phenolic acids and antimicrobial activity. Acta Biol Cracov Ser Bot **58**(1): 43–56.

- KIKOWSKA M, THIEM B, SZOPA A, KLIMEK-SZCZYKUŁOWICZ M, REWERS M, SLIWINSKA E, EKIERT H (2019) Comparative analysis of phenolic acids and flavonoids in shoot cultures of *Eryngium alpinum* L.– an endangered and protected species with medicinal value. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **139**(1): 167–175.
- KIKOWSKA, M., CHANAJ-KACZMAREK, J., DERDA, M., BUDZIANOWSKA, A., THIEM, B., EKIERT, H., & SZOPA, A. (2022). The evaluation of phenolic acids and flavonoids content and antiprotozoal activity of *Eryngium* species biomass produced by biotechnological methods. *Molecules*, **27**(2): 363.
- KUBECZKA, K. H., AYOUB, N., NAWWAR, M., & SALEH, M. (1999). The essential oil and polyacetylenes from *Eryngium campestre* L.(Apiaceae). In *30th international symposium on essential oils (30th ISEO)* (pp. 05-08).
- KUPELİ E, KARTAL M, ASLAN S, YESİLADA E (2006) Comparative evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive activity of Turkish *Eryngium* species. *J Ethnopharmacol* **107**(1): 32–37.
- KÜREK, N. (2007). Denizli ve çevresinde yayılış gösteren eryngium cinsine ait (*Eryngium campestre* L., *E creticumlam.*, *E thoriifolium* boiss.) saf ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi (Doctoral dissertation, Pamukkale Üniversitesi).
- LE CLAIRE E, SCHWAIGER S, BANAIGS B, STUPPNER H, GAFNER F (2005) Distribution of a new rosmarinic acid derivative in *Eryngium alpinum* L. and other Apiaceae. *J Agric Food Chem* **53**: 4367–4372.
- LEV, E. (2002) Reconstructed materia medica of the Medieval and Ottoman al-Sham. *J Ethnopharmacol* **80**: 167–179.
- MATKOWSKI A (2008) Plant *in vitro* culture for the production of the antioxidants – a review. *Biotechnol Adv* **26**(6): 548–560.
- MEDBOUHI, A., TINTARU, A., BEAUFAY, C., NAUBRON, J. V., DJABOU, N., COSTA, J., ... & MUSELLI, A. (2018). Structural elucidation and cytotoxicity of a new 17-membered ring lactone from Algerian *Eryngium campestre*. *Molecules*, **23**(12): 3250.
- MOGHADDAM NS, ERYİLMAZ M, ALTANLAR N, YİLDİRİM O (2019) Antimicrobial screening of some selected Turkish medicinal plants. *Pak J Pharm Sci* **32**(3): 947–951.
- NEBIJA F, STEFKOV G, KARAPANDZOVA M, STAFILOV T, KADIFKOVA PANOVSKA T, KULEVANOVA S (2009) Chemical characterization and antioxidant activity of *Eryngium campestre* L., Apiaceae from Kosovo. *Maced Pharm Bull* **55**(1, 2): 22–32.

- ÖZER, Z., TURSUN, N., ÖNEN, H., 2002. Yabancı Otlarla Sağlıklı Yaşam-Gıda ve Tedavi. Renk Yayıncılık, 58-59, Ankara.
- ÖZÇELİK, H., ÇİNBİLGEL, İ., MUCA, B., TAVUÇ, İ., KOCA, A., & BEBEKLİ, Ö. (2016). Burdur ili bitki envanteri (ekonomik, nadir ve endemik bitkileri). *Burdur Belediyesi, Sistem Ofset ve Matb., Ankara.*
- ORTNER, D. (2003). Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains. Natiniol Museum of Natural History: New York.
- ÖZKAN G.A.M., KOYUNCU M. (2005). Traditional Plants Used in Pınarbaşı Area (KayseriTurkey). Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences. **2(2)**: 63-82.
- PALÁ-PAÚL J, USANO-ALEMANY J, SORIA AC, PÉREZ-ALONSO MJ, BROPHY JJ (2008) Essential oil composition of *Eryngium campestre* L. growing in different soil types. A preliminary study. Nat Product Communications. **3(7)**: 1121–1126.
- PIMENOV, M.G. VE LEONOV, M.V. (2004). The Asian Umbelliferae biodiversity database (ASIUM) with particular reference to south-west Asian taxa. Turkish Journal of Botany, **28**: 139-145.
- PHAM-HUY, L. A., HE, H., & PHAM-HUY, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. International Journal of Biomedical Science: IJBS, **4(2)**: 89.
- RAMAWAT, K. G., EKIERT, H. M., & GOYAL, S. (2020). Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites. Springer International Publishing.
- RUFİNO, A. T., FERREIRA, I., JUDAS, F., SALGUEIRO, L., LOPES, M. C., CAVALEIRO, C., & MENDES, A. F. (2015). Differential effects of the essential oils of *Lavandula luisieri* and *Eryngium duriaei* subsp. *juresianum* in cell models of two chronic inflammatory diseases. *Pharmaceutical Biology*, **53(8)**: 1220-1230.
- SHABİR, G. A. (2003). Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of chromatography A*, **987(1-2)**: 57-66.
- SİNGH, G., (2010). "Plant systematics", Science Publishers, Enfield, New Hampshire, USA, **20**: 70,132,178, 644-646.
- SOUMIA, B. (2018). *Eryngium campestre* L.: Polyphenolic and flavonoid compounds; Applications to health and disease. Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease, 69-79.

- ŞENKUL, Ç., & SEDA, K. A. Y. A. (2017). Türkiye endemik bitkilerinin coğrafi dağılışı. *Türk Coğrafya Dergisi*, **69**: 109-120.
- TANKER, M., & TANKER, N. (2003). *Farmakognozi Kitabı cilt 1*. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara.
- THIEM B, GOŚLIŃSKA O, KIKOWSKA M, BUDZIANOWSKI J (2010) Antimicrobial activity of three *Eryngium* L. species (Apiaceae). *Herba Pol* **56**(4): 52–59.
- THIEM B, KIKOWSKA M, KUROWSKA A, KALEMBA D (2011) Essential oil composition of the different parts and *in vitro* shoot cultures of *Eryngium planum* L. *Molecules* **16**(8): 7115–7124.
- THIEM B, KIKOWSKA M, KRAWCZYK A, WIĘCKOWSKA B, SLIWIŃSKA E (2013) Phenolic acid and DNA contents of micropropagated *Eryngium planum* L. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **114**(2): 197–206.
- TÜRK FARMAKOPE DERGİSİ. 2017 Cilt:2 Sayı:1 Yıl
- W HAWAS, U., T EL-KASSEM, L. A., M AWAD, H., & AA TAIE, H. (2013). Anti-Alzheimer, antioxidant activities and flavonol glycosides of *Eryngium campestre* L. *Current Chemical Biology*, **7**(2): 188-195.
- WANG P, SU Z, YUAN W, DENG G, LI S (2012) Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Eryngium* L. (Apiaceae). *Pharm Crops* **3**: 99–120.
- WANG, P., SU, Z., YUAN, W., DENG, G., & LI, S. (2012). Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Eryngium* L.(Apiaceae).
- Web 1: <http://www.tubives.com>, Erişim Tarihi: 28.11. 2022
- Web 2: <http://www.ipni.org> The International Plant Names Index. Erişim Tarihi: 17.10.2022.
- Web 3:<https://www.zdergisi.istanbul/makale/turkiye-florasi-yeniden-ve-turkce-olarak-yazilirken-4> Erişim Tarihi: 17.06.2023.
- WORZ, A. (2004). On the distribution and relationships of the South-West Asian species of *Eryngium* L.(Apiaceae-Saniculoideae). *Turkish Journal of Botany*, **28**(1): 85-92.
- WORZ, A. VE DIEKMANN, H. (2010). Classification and evolution of the genus *Eryngium* L. (apiaceae saniculoideae): Results of fruit anatomical and petal morphological studies. *Plant Diversity and Evolution* **128**(3): 387-408.
- YILMAZ, G., AYLA, K. A. Y. A., & ö, M. (2016). Fruit morphology and anatomy of *Heptaptera marg. & reuter* (Apiaceae) species grown in Turkey. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, **40**(2): 26-42.