

**T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***CENTAUREA CADMEA*'NİN SEKONDER
METABOLİTLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Farmasötik Botanik Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

**Eczacı
Kaveh ALIZADEH ASTARI**

**Danışman
Doç. Dr. Canan KARAALP**

**İZMİR
2012**

**T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***CENTAUREA CADMEA*'NİN SEKONDER
METABOLİTLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Farmasötik Botanik Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

**Eczacı
Kaveh ALIZADEH ASTARI**

**Danışman
Doç. Dr. Canan KARAALP**

**İZMİR
2012**

ÖNSÖZ

Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ulvi Zeybek'e teşekkür ediyorum.

Bu yüksek lisans tez çalışmasında değerli katkıları, ilgisi ve desteğinden dolayı tez danışmanım Doç. Dr. Canan Karaalp'e, NMR spektrumlarının yorumlanması sırasında bana değerli vaktini ayıran Prof. Dr. Erdal Bedir'e teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan Yrd. Doç. Dr. Şüra Baykan Erel ve Arş. Gör. Uzm. Ecz. Serdar Demir'e sonsuz teşekkürler.

Anabilim Dalındaki tüm öğretim üyesi hocalarıma ilgilerinden dolayı çok teşekkür ediyorum.

Ayrıca hayatım boyunca bana her zaman destek olan değerli aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma, Ege Üniversitesi 11/ECZ/005 no'lu proje ile desteklenmiştir. Adı geçen kuruma katkılarından dolayı teşekkür ederim.

İzmir 2012

Ecz. Kaveh ALIZADEH ASTARI

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLolar DİZİNİ	III
ŞEKİLLER DİZİNİ	III
RESİMLER DİZİNİ.....	III
BÖLÜM I.....	1
GİRİŞ ve AMAÇ	1
1 GENEL BİLGİLER	3
1.1 Taksonomik Genel Bilgiler	3
1.1.1 Asteraceae Familyası	3
1.1.2 <i>Centaurea</i> L. Cinsi.....	3
1.1.3 <i>Centaurea cadmea</i> Boiss.	5
1.2 <i>Centaurea</i> L. Cinsinin Genel Kimyasal Özellikleri	7
1.3 <i>Centaurea</i> L. Taksonlarının Halk Arasında Tıbbi Amaçla Kullanımları.....	8
1.4 <i>Centaurea</i> L. Taksonları Üzerinde Yapılan Biyoaktivite Çalışmaları	9
BÖLÜM II	11
2 GEREÇ VE YÖNTEM	11
2.1 Kullanılan Gereçler	11
2.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler	12
2.3 Kullanılan Yöntemler.....	13
2.3.1 Bitkisel Materyal.....	13
2.3.1.1 <i>Centaurea cadmea</i> Boiss.	13
2.3.2 Kromatografik Yöntemler.....	13
2.3.2.1 İnce tabaka kromatografisi (İTK).....	13
2.3.2.2 Açık kolon kromatografisi (AKK)	16
2.3.3 Spektroskopik Yöntemler	19
2.4 <i>C. cadmea</i> Üzerinde Yapılan Ekstraksiyon Çalışmaları	19
2.5 <i>C. cadmea</i> Üzerinde Yapılan Fraksiyonlama ve İzolasyon Çalışmaları	22
BÖLÜM III	28
3 BULGULAR.....	28
3.1 Bileşik 1 (β -sitosterol).....	28
3.2 Bileşik 2 (Klorojenik asit).....	30
3.3 Bileşik 3 (Skutellarin)	36
3.4 Bileşik 4 (Siringin).....	41
3.5 Bileşik 5 [(6S, 9R-Rozeozit)].....	46
3.6 Bileşik 6 (β -sitosterol-3-O- β -D-glukopiranozit).....	56
BÖLÜM IV	58
TARTIŞMA ve SONUÇ	58
ÖZET	62
ABSTRACT.....	63
KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	73

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Ekstre miktarları ve verim yüzdeleri	22
Tablo 2. Klorojenik asit'in ^1H ve ^{13}C NMR spektral değerleri (D_2O).	35
Tablo 3. Skutellarin'in ^1H (CD_3OD) ve ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) spektral değerleri	40
Tablo 4. Rozeozit'in ^1H ve ^{13}C NMR spektral değerleri (CD_3OD).	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. <i>C. cadmea</i> üzerinde yapılan ekstraksiyon işlemleri.....	21
Şekil 2. <i>C. cadmea</i> üzerinde gerçekleşen kromatografik çalışmalar-1	26
Şekil 3. <i>C. cadmea</i> üzerinde gerçekleşen kromatografik çalışmalar-2	27
Şekil 4. Klorojenik asit ESI kütle spektrumu	32
Şekil 5. Klorojenik asit ^1H NMR spektrumu	33
Şekil 6. Klorojenik asit ^{13}C NMR spektrumu	34
Şekil 7. Skutellarin ESI kütle spektrumu	37
Şekil 8. Skutellarin ^1H NMR spektrumu.....	38
Şekil 9. Skutellarin ^{13}C NMR spektrumu.....	39
Şekil 10. Siringin ESI kütle spektrumu.....	43
Şekil 11. Siringin ^1H NMR spektrumu-1	44
Şekil 12. Siringin ^1H NMR spektrumu-2	45
Şekil 13. Rozeozit ESI kütle spektrumu	48
Şekil 14. Rozeozit ^1H NMR spektrumu	49
Şekil 15. Rozeozit ^{13}C NMR spektrumu-1.....	50
Şekil 16. Rozeozit ^{13}C NMR spektrumu-2.....	51
Şekil 17. Rozeozit COSY spektrumu.....	52
Şekil 18. Rozeozit HMBC spektrumu.....	53
Şekil 19. Rozeozit HMQC spektrumu	54

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. <i>Centaurea cadmea</i> Boiss.	6
Resim 2. <i>Centaurea cadmea</i> Boiss.	6
Resim 3. Fr 11-12 ve β -sitosterol'ün İTK profili.....	29
Resim 4. Bileşik 2 ve klorojenik asit'in İTK profili.	31
Resim 5. Bileşik 4 ve siringin'in İTK profili	42
Resim 6. Bileşik 6 ve β -sitosterol-3-O- β -D-glukopiranozit'in İTK profili	57

BÖLÜM I

GİRİŞ ve AMAÇ

Asteraceae familyasının *Cardueae* tribusunda yer alan *Centaurea* L. cinsi, dünyada yaklaşık 500 tür ile temsil edilmektedir. Asya, Avrupa, Kuzey Afrika ve Amerika’da yayılış gösteren bu türlerin büyük bir çoğunluğu Batı Asya ve Akdeniz Bölgesi’nde yoğunlaşmıştır (19, 20). *Centaurea* L. Türkiye florasında %61.1’i endemik olmak üzere 192 taksonla temsil edilmekte ve özellikle Batı, Güneybatı ve Orta Anadolu’da doğal yayılış göstermektedir (8, 20, 65, 66). Tür sayısının ve endemizm oranının yüksek olması, Anadolu’nun *Centaurea* cinsi için gen merkezi olabileceğini düşündürmektedir.

Centaurea türleri, ülkemizde halk arasında peygamber çiçeği, zerdali diken, çoban kaldıran, timur diken gibi isimlerle bilinmekte ve çok uzun yıllardır mideyi, göğüs yumuşatıcı, ateş düşürücü, ishal kesici, adet getirici ve iştah açıcı olarak kullanılmaktadır (5, 7). Bazı türlerin sıtmada, hemoroit, abse ve yara tedavisinde kullanıldığı da kayıtlıdır (30, 55, 56). Dünyada da çeşitli *Centaurea* türleri geleneksel halk tıbbında antienflamatuvar, antipiretik ve antibakteriyel olarak kullanılmaktadır (5, 32).

Yapılan çeşitli araştırmalarla, *Centaurea* türlerinin antimikrobiyal (12, 33, 55, 70), antioksidan (34, 61, 62), antienflamatuvar (28, 33, 46), antiülserojenik (70), sitotoksik (41, 44, 59) ve antiprotozoal (33) aktivite gösterdiği saptanmıştır.

Centaurea türleri ile yapılan fitokimyasal çalışmalarda elde edilen ana bileşik grupları farklı türlerde seskiterpenler (9, 10, 11, 13, 35, 36), flavonoidler (4, 21, 24, 29, 32), lignanlar (45, 57, 58) ve bunların glikozitleridir. Bununla birlikte indol alkaloidleri (53), triterpenler

(47), monoterpenler (23, 37), steroidal glikozitler (52) ve antosiyaninler (60) de izole edilmiştir.

Bu çalışma, endemik *C. cadmea* kök ve topraküstü kısımlarının sekonder metabolitlerinin kromatografik ve spektroskopik yöntemler kullanılarak belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür.

1 GENEL BİLGİLER

1.1 Taksonomik Genel Bilgiler

1.1.1 Asteraceae Familyası

Asteraceae familyası çok karakteristik özellikleri ile kolayca ayırt edilebilen, dünya üzerinde hemen her yerde rastlanabilen, yaklaşık 1100 cins ve 25000 kadar türe sahip geniş bir familya olup, Angiosperm alt bölümünün yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır. Asteraceae familyası, Türkiye florasında 133 cinsle temsil edilen 2. büyük familyadır. Tür sayısı açısından ise 1156 türle 1. sırada yer alır ve bunların yaklaşık %38'i endemiktir (54).

Asteraceae familyası, 2 alt familyaya [*Asteraceae (Tubuliflorae)*, *Cichoriaceae (Liguliflorae)*] ve 11 tribusa ayrılmaktadır (19). Bu tribuslar aşağıda belirtilmektedir:

- | | |
|-----------------------|-----------------------|
| 1. <i>Heliantheae</i> | 7. <i>Anthemideae</i> |
| 2. <i>Inulae</i> | 8. <i>Arctoteae</i> |
| 3. <i>Astereae</i> | 9. <i>Cardueae</i> |
| 4. <i>Senecioneae</i> | 10. <i>Mutisieae</i> |
| 5. <i>Calenduleae</i> | 11. <i>Lactuceae</i> |
| 6. <i>Eupatorieae</i> | |

1.1.2 *Centaurea* L. Cinsi

Asteraceae familyasının *Cardueae* tribusunda yer alan *Centaurea* L. cinsi, Türkiye florasında %61.1'i endemik olmak üzere 192 taksonla temsil edilmekte ve özellikle Batı, Güneybatı ve Orta Anadolu'da doğal yayılış göstermektedir (8, 20, 66). Tür sayısının ve endemizm oranının yüksek olması Anadolu'nun *Centaurea* için gen merkezi olabileceğini düşündürmektedir.

Centaurea L. cinsinin sistematik durumu aşağıda belirtilmiştir:

Bölüm:	Spermatophyta
Altbölüm:	Angiospermae
Sınıf:	Dicotyledonae
Altsınıf:	Asteridae
Takım:	Asterales
Aile:	Asteraceae (Compositae)
Tribus:	Cardueae
Genus:	<i>Centaurea</i> L.

Türkiye florasında kayıtlı olan *Centaurea* türleri 34 seksiyonda toplanmıştır (66).

Phalolepis seksiyonunda aşağıdaki türler bulunmaktadır:

<i>C. cadmea</i>	<i>C. lycaonica</i>
<i>C. aphrodisea</i>	<i>C. wagenitzii</i>
<i>C. amaena</i>	<i>C. tossiensis</i>
<i>C. lycia</i>	<i>C. hierapolitana</i>
<i>C. luschaniana</i>	

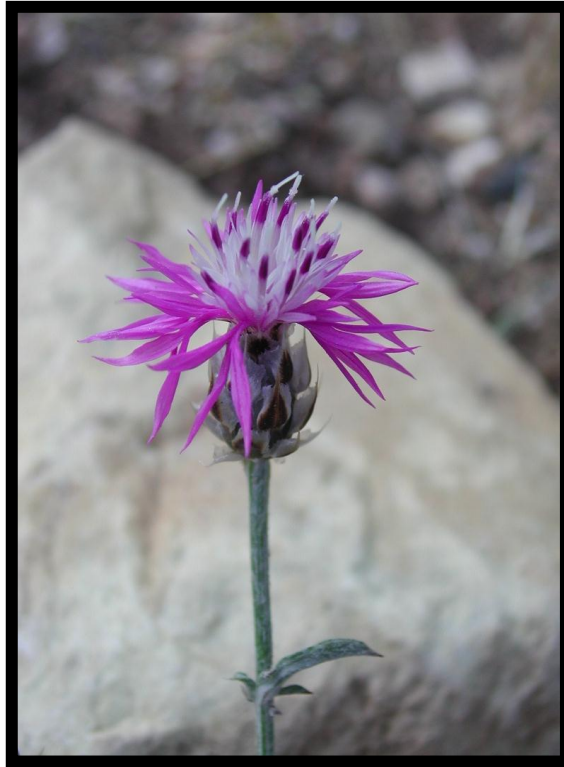
Morfolojik yapılardaki çeşitlilik ve değişkenliklerden dolayı *Centaurea* L., taksonomik olarak tanımlanması ve sınıflandırılması zor olan, modern kimyasal ve sitolojik teknikler kullanılarak ileri araştırmalar yapılması gereken bir cinstir (25). *Centaurea* L. cinsini oluşturan türler, tek, iki veya çok yıllık otsular, nadiren dikenli dalları olan çalılar veya herdem yeşil yapraklı, daha büyük yarı çalılardır.

Centaurea türlerinin taksonomisi ve tanımlanması için diğer karakterlerle birlikte ele alındığında en önemli özellik, involukrum braktelerinin uç kısımlarında bulunan ek yapıların şeklidir. Bununla birlikte bu özellik, popülasyonda, bireylerde, hatta aynı kapitulumda, büyük değişkenlikler göstermektedir (66).

Tür sayısının fazlalığı, sınıflandırmadaki zorluklar, halk arasındaki yaygın kullanımı ve zengin kimyasal içeriği nedeniyle *Centaurea* cinsi giderek önem kazanmış ve son yıllarda taksonomik, kimyasal ve biyolojik aktivite açısından oldukça fazla araştırmaya kaynak oluşturmuştur.

1.1.3 *Centaurea cadmea* Boiss.

C. cadmea (Resim 1 ve 2), çok yıllık, odunsu, rizomu rozet yapraklarla sonlanan, dik veya yükselici birkaç yan gövdeli, 10-35 cm boyunda, üst kısmı dallanmış, 2-12(-20) kapitulumlu endemik bir taksondur. Yaprakları tabansal ve altta 1-2 pinnatisekt'li, en uçtaki bölümler 2-5 mm genişliğinde, uçları biraz daha büyük, ortadaki yapraklar pinnatisekt, yukarıdakiler ise basittir. İnvolukrum 11-16 x 9-12(-15) mm boyutunda, yumurtamsı veya küre şeklindedir. Ek yapıları büyük ve braktelerin taban kısmını gizlemekte olup, diktörtgensel veya hemen hemen dairemsi, geniş ve samansı kenarlı, sert kahverengi merkezli, genellikle düzensiz kentikli, 1.5-3 mm uzunluğunda ince dikenciklerle sonlanır. Çiçekleri pembemsi-mor renktedir. Akenler 3-3.5 mm, papuslar 3.5-4.5 mm uzunluğundadır. Çiçeklenme dönemi 6-7. aylar arasında olan bitki, kireçtaşı kayalıklarında, 500-2200 m.'de yayılış göstermektedir. (66).



Resim 1. *Centaurea cadmea* Boiss.



Resim 2. *Centaurea cadmea* Boiss.

1.2 *Centaurea* L. Cinsinin Genel Kimyasal Özellikleri

Centaurea türleri üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar sonucunda, elde edilen ana bileşik grupları farklı türlerde seskiterpenler (9, 10, 11, 13, 35, 36), lignan bileşikleri (45, 57, 58), flavonoidler (4, 29, 32) ve bunların glikozitleridir. Bununla birlikte indol alkaloidleri (53), monoterpenler (23, 37), ditiyofenler (63), triterpenler (47), antosiyaninler (60) ve steroidal glikozitler (52) de izole edilmiştir.

Seskiterpenler, bugüne kadar yayınlanan pek çok makale ile *Centaurea* türlerinin karakteristik bileşik grupları olarak ortaya çıkmaktadır (9, 10, 11). Bu çalışmaların bir kısmı, Türkiye’de yayılış gösteren *Centaurea* türleri üzerinde gerçekleştirilmiştir (6, 18, 35, 36, 38).

Flavonoidler, *Centaurea* türlerinden izole edilen sekonder bileşiklerin önemli bir kısmını oluşturmaktadırlar. Bugüne kadar 80’in üzerinde *Centaurea* türü flavonoidleri bakımından araştırılmıştır. Çoğunlukla yaprak ve çiçeklerden, bazı çalışmalarda ise köklerinden, flavon ve flavonoller ile bunların metil sübtitüe türevleri ile O ve C-glikozitleri elde edilmiştir (4).

C. cadmea üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar sonucunda bitkinin toprak üstü kısımlarından bir seskiterpen lakton; 2 α -hidroksi-5 α H-ödesma-4(15),11(13)-dien-12,8 β -olid (ivalin), iki polimetoksiflavon; 5,3'-dihidroksi-6,7,4'-trimetoksi-flavon (öpatorin) ve 5-hidroksi-3',4',6,7-tetra-metoksiflavon (5-desmetilsinenasetin) ve iki genel fitosterol; β -sitosterol ve β -sitosterol-3-O- β -D-glukopiranozit izole edilmiştir (35).

C. cadmea’nın toprak üstü kısımlarından mikrodistilasyon yöntemiyle elde edilen uçucu yağın GC ve GC/MS analizi ile ana bileşenlerinin; Denizli, Evrantepe’den toplanan örneklerde; hekzadekanoik asit (%23.1), karvakrol (%14.7), dodekanoik asit (%4.4), fitol (%4.1), tetradekanoik asit (%4.1) ve heptakozan (%3.8), Denizli, Servergazi’den toplanan örneklerde ise hekzadekanoik asit (%19.5), karvakrol (%16.6), fitol (%6.0), dodekanoik asit (%5.3), tetradekanoik asit (%4.1) ve heptakozan (%4.1) olduğu saptanmıştır (37).

Bir diğerk çalışmada ise, ana bileşenlerin hekzadekanoik asit (%29.5) ve dodekanoik asit (%11.2) olduğu belirlenmiştir (39).

1.3 *Centaurea* L. Taksonlarının Halk Arasında Tıbbi Amaçla Kullanımları

Ülkemizde yayılış gösteren *Centaurea* cinsine ait birçok taksonun, geleneksel olarak çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde kullanıldığı kayıtlıdır. Batı ve Güneybatı Anadolu’da yaygın olan *C. cyanus*’un kurutulmuş çiçekleri, halk arasında %5’lik infüzyonları halinde ishal kesici, kuvvet verici, iştah açıcı ve göğüs yumuşatıcı olarak, haricen ise oküler enflamasyonlarda göz banyosu olarak kullanılmaktadır. Doğu Anadolu’da yetişen *C. behen*, “ak behmen” ve “zerdali diken” olarak bilinmekte ve çiçekleri midevi ve adet söktürücü olarak kullanılmaktadır. Kuzeybatı Anadolu’da yetişen ve “çobankaldıran”, “timur diken” olarak bilinen *C. calcitrapa*’nın ve Anadolu’da yaygın olan *C. iberica*’nın %2-6’lık infüzyonları, dahilen ateş düşürücü olarak, Kuzeydoğu Anadolu’da yayılış gösteren ve “çayır peygamberi” ismiyle bilinen *C. jacea* ise ateş düşürücü, adet söktürücü, kabız yapıcı ve iştah açıcı olarak kullanılmaktadır (7).

Yapılan etnobotanik araştırmalar sonucu Batı Anadolu’da, Afyonkarahisar yöresinde yayılış gösteren *C. drabifolia*’nın (basurotu) yaprak ve çiçeklerinin, hemoroit tedavisinde kurutulup sigara şeklinde sarılarak içildiği veya çay olarak tüketildiği belirtilmiştir. Yine aynı yörede “sıtma otu”, “güllüdüken”, “zerdali diken” olarak bilinen *C. solstitialis* subsp. *solstitialis* çiçekleri, sıtmada ve soğuk algınlığında çay olarak tüketilmektedir. Aynı bitki Kütahya yöresinde “çakırdiken” ismi ile bilinmekte ve yine sıtma hastalığında kullanılmaktadır (30). Bir başka çalışmada yine *C. solstitialis* subsp. *solstitialis*’in Samsun, Vezirköprü, Karaköy’de çocukların uçuk yaralarının tedavisi için kullanıldığı belirtilmiştir (27). Kars yöresinde *C. balsamita* (kılıçotu) yapraklarının haricen abse tedavisinde, Erzurum

ve Erzincan yörelerinde ise *C. iberica* (çakırdikeni) ve *C. pterocaula* (çoruşbozan) yapraklarının havanda dövülerek haricen yara tedavisinde kullanıldığı saptanmıştır (55). *C. pulchella* Niğde’de boğadikeni olarak bilinmekte ve abse tedavisinde kullanılmaktadır (56).

Centaurea türleri dünyada halk arasında yıllardır tek başına veya diğer bitkilerle kombinasyon halinde antidiyabetik, antidiyareik, antiromatizmal, antienflamatuvar, kolagog, koleretik, stomaşik, diüretik, adet söktürücü, astrenjan, hipotansif, antipiretik ve antibakteriyel amaçlarla kullanılmaktadır (5).

Yapılan literatür taramalar sonucu *C. cadmea*’nın halk arasında kullanımı ile ilgili herhangi bir kayda rastlanmamıştır.

1.4 *Centaurea* L. Taksonları Üzerinde Yapılan Biyoaktivite Çalışmaları

Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar sonucunda, çeşitli *Centaurea* türlerinin antimikrobiyal (12, 33, 48, 64), antioksidan (33, 61, 62), antienflamatuvar (28, 46), antiülserojenik (70), sitotoksik (41, 44, 59) ve antiprotozoal (33) aktivite gösterdiği saptanmıştır.

Karamenderes ve arkadaşları tarafından 2006 yılında yapılan bir çalışma ile Batı ve Güneybatı Anadolu’dan toplanan 10 *Centaurea* taksonunun (*C. calolepis*, *C. cariensis* subsp. *maculiceps*, *C. cariensis* subsp. *microlepis*, *C. hierapolitana*, *C. cadmea*, *C. reuterana* var. *reuterana*, *C. cyanus*, *C. depressa*, *C. urvillei* subsp. *urvillei* ve *C. ensiformis*), *Plasmodium falciparum* ve *Leishmania donovani*’ye karşı *in vitro* antiprotozoal ve *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *Cryptococcus neoformans*, *Mycobacterium intracellulare*, *Aspergillus fumigatus* ve metisiline rezistan *Staphylococcus aureus*’a karşı antimikrobiyal etkinliği araştırılmıştır. Denizli Evraneppe’den toplanan *C. cadmea* toprak üstü kısımlarının kloroform

ekstresi (IC₅₀: 50 µg/ml) ve köklerinin kloroform ekstresi (IC₅₀: 55 µg/ml) antileşmanyal aktivite göstermiştir. (33).

C. calolepis, *C. cariensis* subsp. *maculiceps*, *C. cariensis* subsp. *microlepis*, *C. hierapolitana*, *C. cadmea*, *C. depressa*, *C. urvillei* subsp. *urvillei* ve *C. ensiformis* taksonlarının, DPPH yöntemi ile serbest radikal süpürücü etkisi, NF-κB aktivasyonunun inhibisyonu testi ile antienflamatuvar etkinliği ve total fenolik içerikleri araştırılmıştır. *C. urvillei*, *C. cadmea* ve *C. ensiformis* metanol ekstralarında yüksek antioksidan etki gözlenmiştir (sırasıyla %90.41, %86.66 ve %86.19). Antioksidan kapasite, total fenolik içerikleri ile uyumlu bulunmuştur. *C. hierapolitana*, *C. calolepis* ve *C. cadmea* kloroform ekstraları güçlü antienflamatuvar aktivite göstermiştir (IC₅₀: 2.5, 4.4 ve 6.2 µg/ml) (34).

BÖLÜM II

2 GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Kullanılan Gereçler

- Hassas terazi (OHAUS Adventurer AR 3130)
- Mekanik öğütücü (Waring Commercial Blender HGB2WT)
- Ultrasonik su banyosu (Ultrasonic LC-30, Elma)
- Kromatografi tankı (Camag)
- KFE vakum manifoldu (Alltech)
- UV lamba (Spectroline ENF-260C/FE)
- Vakum pompası (Büchi Vac-500)
- Evaporatör (Büchi RE-111)
- Su banyosu (Büchi 461)
- Fraksiyon toplayıcı (Spectra Chrom CF-1)
- Vakum kontrolörü (Büchi B-721)
- Vakum konsantratör sistemi
 - Vakumlu santrifüj (Christ RVC 2-25)
 - Soğutucu (Christ LT-105)
 - Vakum pompası (Vacuubrand RZ 2.5)
- Vorteks (IKA Yellow-Line TTS-2)

- Flash kromatografi sistemi
 - Cam kolon (GE Healthcare XK 26)
 - Pompa (GE Healthcare Peristaltic Pump P-1)
- Liyofilizatör (Christ)
- Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektrometresi (Varian, 400 MHz)
- LC-MS-MS (ESI) (Thermo-Quantum Access-Max)
- FT-IR (Perkin Elmer 100)

2.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Asetik asit: CH_3COOH (Merck)

Etanol: EtOH (Merck)

Etilasetat: EtOAc (Merck)

Formik asit: HCOOH (Merck)

Kloroform: CHCl_3 (Merck)

Metanol: MeOH (Merck)

n-butanol: *n*-BuOH (Merck)

n-hekzan: (Merck)

Sülfürik asit: H_2SO_4 (Merck)

Vanilin: (Sigma)

Natural Products Reagent (Naturstoffreagenz A): (Roth)

İnce tabaka Kromatografisi (İTK) hazır alüminyum plakları:

Silika gel 60 F₂₅₄ (Merck, EMD Chemicals Inc.), LiChroprep RP-18 (Merck).

Açık Kolon Kromatografisi (AKK) kolon dolgu materyalleri:

Silika gel 60, 40-63µm (Merck), LiChroprep RP-18, 25-40 µm (Merck), Sephadex™
LH-20 (GE Healthcare)

2.3 Kullanılan Yöntemler

2.3.1 Bitkisel Materyal

2.3.1.1 *Centaurea cadmea* Boiss.

Centaurea cadmea, çiçeklenme döneminde (2004-Haziran), Denizli, Evrantepe, 1512 m'den (37°41'18.6"N, 29°00'07"E) toplanmış, herbaryum örnekleri hazırlanarak, Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'na kaydedilmiştir (İZE 5670).

2.3.2 Kromatografik Yöntemler

2.3.2.1 İnce tabaka kromatografisi (İTK)

Çalışmamız süresince İTK yöntemi; izolasyon çalışmalarının izlenmesi, bilinen standartlarla kıyaslayarak fraksiyonlarda maddelerin tespiti ve preparatif İTK ile saf madde elde edilmesi amaçları ile kullanılmıştır.

Elde edilen fraksiyonlar, İTK yöntemi ile Silika jel 60 F₂₅₄ ve LiChroprep RP-18 hazır alüminyum plaklar kullanılarak incelenmiştir.

İTK plaklarında UV aktif maddelere ait leke ve bantlar, UV altında (254 ve 366 nm) belirlenmiştir, UV aktif olmayan maddelerin belirlenmesi amacıyla vanilin-sülfürik asit reaktifi kullanılarak lekeler görünür hale gelene kadar ısıtılmıştır.

Fenolik asit kıyaslama çalışmasında Natural Products (Roth)-Polietilen glikol (NP/PEG) reaktifi kullanılmış ve plaklar UV’de (366 nm) incelenmiştir.

A. İzolasyon çalışmalarının izlenmesi

Tüm izolasyon ve saflaştırma işlemleri süresince normal ve ters faz silika jel ile kaplı hazır plaklardan faydalanılmıştır. Numune tatbiki, kılcal borular yardımı ile plağın alt ucunun 1 cm yukarısına ve tatbik noktaları arasında 1’er cm aralık bırakılarak yapılmıştır. Hareketli faz çözümleri Merck marka kullanılmıştır.

Adsorbanlar:

- 1) Normal faz silika jel 60 F₂₅₄ hazır alüminyum plak (Merck, 105554)
- 2) Ters faz silika jel (Lichroprep RP-18) hazır alüminyum plak (Merck, 105559)

Hareketli faz sistemleri:

Adsorban 1 için: Hekzan-CHCl₃ (10:90, 5:95)
 CHCl₃-MeOH (95:5, 90:10, 85:15, 80:20)
 CH₂Cl₂-Aseton (95:5)
 CHCl₃-MeOH-H₂O (80:20:2, 70:30:3, 61:32:7, 64:50:10)
 EtOAc-MeOH-H₂O (100:17.5:13.5, 100:20:15)

Adsorban 2 için: MeOH-H₂O (0:100, 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30,
 80:20, 90:10, 100:0)

Belirteç: İTK plaklarında UV aktif maddelere ait leke ve bantlar, UV kabinde (254 ve 366 nm) belirlenmiştir. Tüm maddelerin gözlenebilmesi amacıyla vanilin-sülfürik asit (V/S) belirteci kullanılmıştır.

Vanilin-sülfürik asit (V/S) belirteci: %5 etanolik sülfürik asit (Çözelti I), %1 etanolik vanilin (Çözelti II). Tabaka üzerine I nolu çözelti, hemen ardından II no’lu çözelti püskürtülür. Plak 5-10 dakika süreyle, 110 °C’de ısıtılarak lekeler görünür hale getirilir.

B. Standart saf örnek ile karşılaştırma

İzolasyon çalışmaları esnasında elde edilen bazı fraksiyonlarda, fitosterol yapısındaki maddelerin ve fenilpropanoit glikozitlerin varlığının belirlenebilmesi amacı ile standart bileşikler ile kıyaslama yapılmıştır. Numune tatbiki, kılcal borular yardımı ile plağın alt ucunun 1 cm yukarısına ve tatbik noktaları arasında 1'er cm aralık bırakılarak yapılmıştır.

Adsorbanlar:

1) Normal faz silika jel 60 F₂₅₄ hazır alüminyum plak, 20x20 cm (Merck, 105554)

Hareketli faz sistemleri:

Adsorban 1 için: EtOAc-HCOOH-CH₃COOH-H₂O (100:11:11:26)

Hekzan-CHCl₃ (5:95)

CHCl₃-MeOH (95:5, 85:15)

CHCl₃-MeOH- H₂O (61:32:7)

Belirteç: İTK plaklarında UV aktif maddelere ait leke ve bantlar, UV kabin altında (254 ve 366 nm) belirlenmiştir. Tüm maddelerin gözlenebilmesi amacıyla V/S belirteci ve Natural Products (Roth)-Polietilen glikol belirteci kullanılmıştır.

Natural Products (Roth)-Polietilen glikol Belirteci (NP/PEG): %1 metanolik difenilborik asit-etilamino esteri (difenilboriloksietilamin) (NP) (Çözelti I), %5 etanolik polietilen glikol (PEG 4000) (Çözelti II). İTK plak üzerine I nolu çözelti, hemen ardından II nolu çözelti püskürtülür. Hemen veya 15 dak sonra, UV altında, 366 nm'de yapıya bağlı olarak değişen floresans gözlenir. PEG kullanımı, hassasiyeti artırır.

C. Preparatif İTK yöntemi

Ön fraksiyonlama işlemleri ile elde edilen fraksiyonlarda, İTK sistemlerinde birbirinden iyi ayrılmış metabolitlerin saflaştırılması amacıyla kullanılmıştır. Numune tatbiki plağın alt ucunun 2.5 cm yukarısına ve yanlarda 2'ser cm boşluk bırakacak şekilde yapılmıştır. Plak

tank içerisinde sürüklendikten sonra kurutulmuş ve UV altında 254 veya 366 nm’de bantlar işaretlenmiştir. İşaretli bantlar keskin, ince bir spatül yardımıyla banttardan kazınmış ve altına pamuk yerleştirilen pastör pipeti içerisine doldurulmuştur. Üzerinden geçirilen uygun hareketli faz ile pastör pipetinden süzülen madde çözgünden arındırılarak kurutulmuştur.

Adsorban:

Normal Faz silika jel 60 F₂₅₄ hazır cam plak, 20x20 cm (Merck, Art.5715)

Hareketli faz sistemleri:

Hekzan-CHCl₃ (20:80, 50:50)

CHCl₃-MeOH (80:20)

CHCl₃-MeOH-H₂O (61:32:7)

2.3.2.2 Açık kolon kromatografisi (AKK)

Fraksiyonlama ve ileri saflaştırma işlemleri Açık Kolon Kromatografisi (AKK) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Bu yöntemde, Silika gel 60, LiChroprep RP-18 ve Sephadex™ LH-20 kolon dolgu materyalleri kullanılmıştır.

A. Silika jel kolon kromatografisi

Ana ekstrenin fraksiyonlanması ve elde edilen fraksiyonların saflaştırılması amacı ile kullanılmıştır. Yeterli miktar silika jel (Kiesel gel 60 F254, 0.040-0.063 mm, Merck Art: 1.09385), elüsyona başlanacak çözgen sistemi ile süspansiyon haline getirilmiş ve alt ucuna pamuk yerleştirilmiş çeşitli boyutlardaki cam kolona aktarılmıştır. Aynı sistem geçirilerek kolon şartlandırılmıştır. Numune uygun miktar elüsyona başlanacak çözgen içerisinde çözülerek veya silikaya emdirilip çözgen uçurulduktan sonra kuru ve homojen bir karışım haline getirilerek kolona tatbik edilmiştir. Yüzeyin bozulmasını önlemek amacıyla üzerine

pamuk koyularak yüzeyin bozulması önlenmiştir. Elüsyon, polarite artacak şekilde çeşitli hareketli faz sistemleri ile sağlanmıştır. Ayrılan fraksiyonlar tüplere toplanmıştır.

Hareketli faz sistemleri:

Aşağıda belirtilen çözügenler çeşitli oranlarda karıştırılarak her kolon için farklı polarite geçişleri sağlanmıştır. Hareketli faz sistemleri fraksiyonlama işlemlerinin anlatıldığı bölümde detaylandırılmıştır.

CHCl₃-MeOH

Hekzan-CHCl₃

B. Vakum sıvı kromatografisi (VSK)

VSK, ön fraksiyonlama işlemleri için kullanılmıştır. 5x80 cm'lik cam kolon'un altına pamuk yerleştirilmiş, yeterli miktarda MeOH ile süspanse edilmiş adsorban (Lichroprep RP-18, Merck, 25-40 µm) kolona aktarılmıştır. Elüsyona başlanacak hareketli faz sistemi (%100 H₂O) ile kolon şartlandırılmış ve hazır hale getirilmiştir. Numune bir miktar adsorban ile karıştırılarak MeOH içerisinde çözülmüş ve çözügen uzaklaştırıldıktan sonra bir havan yardımı ile homojen olana kadar karıştırılmıştır. Kuru ve homojen haldeki adsorban/madde karışımı kolona tatbik edilmiştir. Adsorban yüzeyinin bozulmaması amacıyla üzerine pamuk yerleştirilmiştir. Elüsyona başlanmış ve hareketli faz polaritesi azalacak şekilde devam edilmiştir. Hareketli fazın adsorban yüzeyinde ilerlemesi, bir vakum pompası yardımı ile hızlandırılmıştır.

Hareketli faz sistemi: %100 H₂O → %100 MeOH (%10'luk artışlar ile)

Fraksiyon hacmi: 100 ml

C. Katı faz ekstraksiyon (KFE)

Çeşitli yöntemlerle elde edilen fraksiyonlardan maddelerin saflaştırılması amacı ile kullanılmıştır. İçerisinde adsorban madde bulunan üstü açık bir şırınga kabı şeklinde hazır

kartuşlara, elüsyona başlanacak çözgen ile şartlandırıldıktan sonra, aynı çözgende çözünen numune tatbik edilmiş ve farklı çözgenlerle elüsyon gerçekleştirilmiştir. Akış, kartuş bir vakum manifolduna oturtulup vakum uygulanarak hızlandırılmış veya kendi akış hızında bırakılarak fraksiyonlar toplanmıştır.

Adsorban:

- 1) Normal faz silika jel (Supelclean LC-SI; SP 2123F, Varian SI; 125-6018)
- 2) Ters faz silika jel (Supelclean LC-18; 57117, Varian C-18; 1225-6015)

Kolon Boyutu: 60 ml, 20 ml, 12 ml

Hareketli faz sistemleri:

Aşağıda belirtilen çözgenler çeşitli oranlarda karıştırılarak her kolon için farklı polarite geçişleri sağlanmıştır. Hareketli faz sistemleri fraksiyonlama işlemlerinin anlatıldığı bölümde detaylandırılmıştır.

$\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$

$\text{H}_2\text{O-MeOH}$

D. Jel filtrasyon

Ana ekstrelerden elde edilen fraksiyonların saflaştırılması amacı ile kullanılmıştır. Kolon dolgu materyali olan Sephadex LH-20 (Ge Healthcare 17-0090) kolon hazırlanmadan bir gün önce, uygun miktar MeOH ile karıştırılarak şişmesi sağlanmıştır. Karışım, alt ucuna pamuk yerleştirilen cam kolona aktarılmıştır. Kolondan çözgen geçirilerek adsorbanın oturması sağlanmıştır. Numune, yeterli miktar çözgen içerisinde çözülerek adsorban yüzeyine pastör pipeti ile tatbik edilmiştir. Sabit sistemde çözgen geçirilerek maddeler fraksiyonlanmıştır.

Hareketli faz sistemi: MeOH (%100)

Fraksiyon hacmi: 5 ml

2.3.3 Spektroskopik Yöntemler

İzole edilen maddelerin 1D ve 2D NMR spektrumları, DMSO- d_6 , D₂O ve CD₃OD içerisinde, tetrametilsilan (TMS) standardı kullanılarak, Varian 400 MHz NMR cihazı ile alınmıştır.

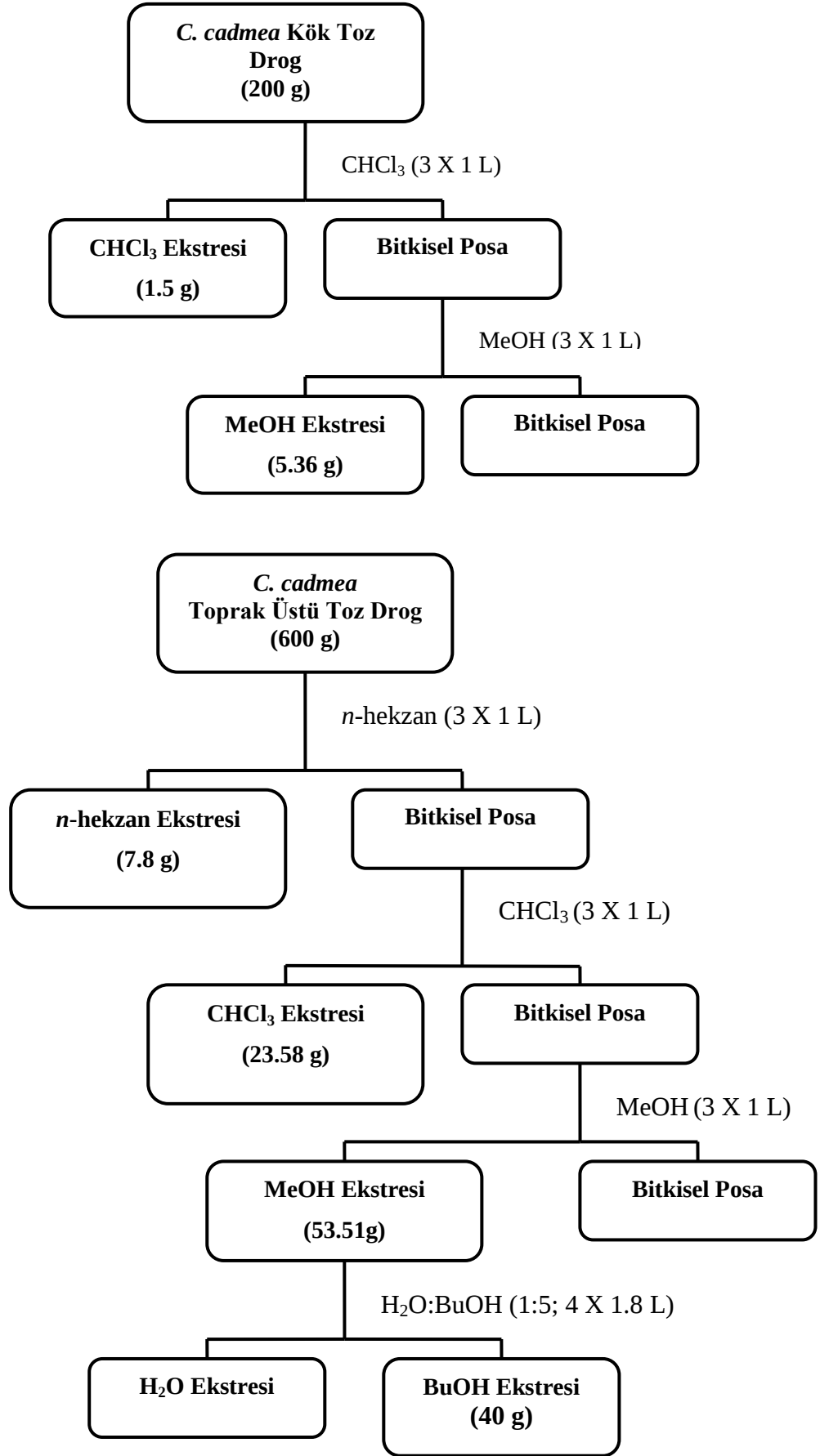
Maddelerin kütle spektrumları LC-MS-MS (ESI) cihazında 10 ppm konsantrasyonda metanol içerisinde çözülerek çekilmiştir.

2.4 *C. cadmea* Üzerinde Yapılan Ekstraksiyon Çalışmaları

C. cadmea kök ve toprak üstü kısımları, havadar ve gölge bir alanda kurutularak, mekanik öğütücüde toz edilmiştir. Kurutulmuş kökler (200 g), sırası ile, CHCl₃ ve MeOH (3x1 L) ile oda sıcaklığında, ultrasonik su banyosunda 24 saat süre ile ekstre edilmiştir. Ekstreler süzülerek birleştirilmiştir, 40°C altındaki su banyosunda evaporatörde vakum kontrolörü kullanılarak kuruluğa kadar yoğunlaştırılmıştır. Ekstre miktarları sırasıyla 1.5 ve 5.36 g olarak bulunmuştur. Kurutulmuş topraküstü kısımlar (600 g) sırası ile, n-hekzan, CHCl₃ ve MeOH (3x1 L) ile oda sıcaklığında, ultrasonik su banyosunda 24 saat süre ile ekstre edilmiştir. Ekstreler süzülerek birleştirilmiş, 40°C altında evaporatörde kuruluğa kadar yoğunlaştırılmıştır. Ekstre miktarları sırasıyla 7.8, 23.58 ve 53.51 g olarak bulunmuştur. *C. cadmea* ekstrelerinin İTK profilleri farklı sistemlerde incelenmiş olup, zengin bulunan topraküstü MeOH ekstresinin *n*-butanol ile partisyonlanması yoluna gidilmiştir. Bu işlem için MeOH ekstresi, 300 ml distile su ile süspanse edildikten sonra, 2 L'lik ayırma hunisinde 1500 mL *n*-butanol ile partisyona tabi tutulmuştur. İşlem 4 kez tekrarlanarak *n*-butanol ve su fazları

deriştirilmiştir. Evaporasyon ve liyofilizasyon işlemleri sonucunda 40 g *n*-butanol ekstresi elde edilmiştir.

Ekstraksiyon işlemleri şekil 1’de, elde edilen ekstre miktarları ve verimleri ise Tablo 1’de sunulmuştur.



Şekil 1. *C. cadmea* üzerinde yapılan ekstraksiyon işlemleri

Tablo 1. Ekstre miktarları ve verim yüzdeleri

Çözgen	Ekstre Miktarı (g)	Verim (%)
Kök CHCl ₃	1.5	0.75
Kök MeOH	5.36	2.68
Toprak üstü n-hekzan	7.8	1.3
Toprak üstü CHCl ₃	23.58	3.93
Toprak üstü MeOH	53.51	8.91

2.5 *C. cadmea* Üzerinde Yapılan Fraksiyonlandırma ve İzolasyon

Çalışmaları

C. cadmea ekstreleri üzerinde yapılan izolasyon çalışmalarının yanı sıra, bu ekstrelerden elde edilen fraksiyonlarda zaman kaybını önlemek amacı ile İTK'da saf örneklerle kıyaslama yapılarak bazı maddelerin varlığı belirlenmiştir.

C. cadmea kök CHCl₃ ekstresi (1.5 g) (Şekil 2) kuru tatbik şeklinde, silika jel kolon (3x30 cm, 120 g) kromatografisine uygulanmıştır. Elüsyona %100 *n*-hekzan ile başlanmış, Hekzan-CHCl₃ (100:0→%10 CHCl₃ artışları→0:100) ve CHCl₃-EtOAc (95:5→%10 EtOAc artışları→0:100) ile devam edilen sistem CHCl₃-MeOH (90:10→%5 MeOH artışları→0:100) ile sonlandırılmıştır. On ana fraksiyon toplanmış. Fraksiyon (11-12) birleştirilerek **Bileşik 1** (227 mg) elde edilmiştir.

İTK (Silika jel ve RP-C18 silika jel) sonuçları incelenerek, topraküstü MeOH ekstresinden partisyonlama ile ayrılmış olan 40 g BuOH ekstresi, kuru tatbik şeklinde, RP C-18 silika jel kolona (5x50 cm, 241 g) uygulanmıştır. Vakum sıvı kromatografisi (VSK) ile

fraksiyonlama işleminde %100 H₂O ile başlanan elüsyon, MeOH-H₂O (0:100→%10 MeOH artışları→100:0) ile bitirilmiştir. Bu işlem sonunda 18 ana fraksiyon elde edilmiştir.

Fraksiyon 7-16 BuOH ekstresini liyofilize ettikten sonra (4758 mg), *n*-butanol ile partisionlanması yoluna gidilmiştir. İşlem 3 kez tekrarlanarak *n*-butanol ve su fazları değiştirilmiştir. Evaporasyon işlemleri sonucunda (1534 mg) butanol ekstresi elde edilmiştir. Bu fraksiyon Sephadex LH-20 ile hazırlanmış (3x50 cm, 78 g) kolona uygulanmış, %100 MeOH geçirilerek 15 fraksiyon elde edilmiştir. Fraksiyon (97-113) (43 mg) katı faz ekstraksiyon (KFE) yöntemi ile RP-18 (60 ml) kartuşa uygulanmış, %100 H₂O elüsyonu ile 4 fraksiyon elde edilmiştir. Fraksiyon (3-7) (33 mg)'ye CHCl₃-MeOH-H₂O (61:32:7) sistemi ile preparatif İTK uygulanmış ve **Bileşik 2** (19 mg) elde edilmiştir.

Fraksiyon 7-16 BuOH ekstresi, Sephadex LH-20 ile hazırlanmış kolona uyguladıktan sonra elde edilen 15 fraksiyondan, (114-127) no'lu fraksiyona (8 mg), CHCl₃-MeOH-H₂O (61:32:7) sistemi ile preparatif İTK uygulanmış ve **Bileşik 3** (4 mg) elde edilmiştir.

Fraksiyon 7-16 BuOH ekstresinden elde edilen (39-45) no'lu fraksiyon (367 mg), silika jel kolona (2.5x35 cm, 65 g) uygulanmıştır. Elüsyona CHCl₃-MeOH (95:5) ile başlanmış ve (95:5→%5 MeOH artışları→80:20) ile devam edilen sistemden %100 MeOH geçirilerek 11 fraksiyon elde edilmiştir. Fraksiyon (80-87) (12 mg)'ye CHCl₃-MeOH-H₂O (61:32:7) sistemi ile preparatif İTK uygulanmış ve **A** kodlu bileşik elde edilmiştir. Elde edilen 11 fraksiyondan (63-79) no'lu fraksiyon (28 mg), silika jel kolon (2x25 cm, 35 g) kromatografisine uygulanmıştır. Elüsyona CHCl₃-MeOH (90:10→%2 MeOH artışları→88:12) sistemi ile devam edilmiş ve %100 MeOH geçirilerek 4 fraksiyon elde edilmiştir. Fraksiyon (21-45) (18 mg) Sephadex LH-20 ile hazırlanmış (1.5x20 cm, 5 g) kolona uygulanmış, %100 MeOH geçirilerek 2 fraksiyon elde edilmiştir. Fraksiyon (6-7)'ye (10 mg), CHCl₃-MeOH-H₂O (61:32:7) sistemi ile preparatif İTK uygulanmış ve saf **B** kodlu bileşik elde edilmiştir. **A** ve **B**

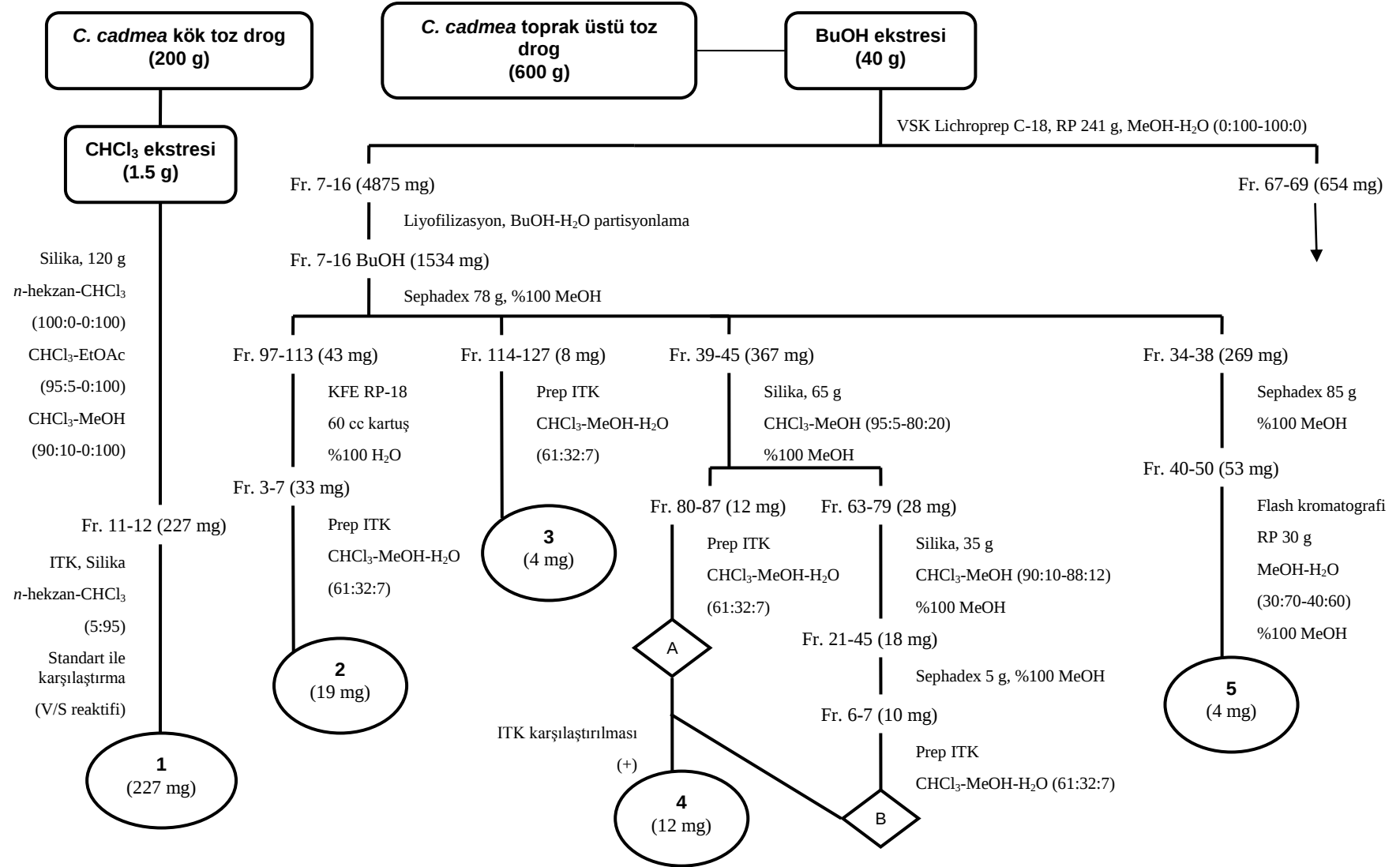
kodlu fraksiyonların İTK karşılaştırması sonucu aynı bileşikler olduğuna karar verilmiştir ve birleştirilerek **Bileşik 4** (12 mg) elde edilmiştir.

Fraksiyon 7-16 BuOH ekstresinden elde edilen (34-38) no'lu fraksiyon (269 mg), Sephadex LH-20 ile hazırlanmış (3x55 cm, 85 g) kolona uygulanmış, %100 MeOH geçirilerek 8 fraksiyon elde edilmiştir. Fraksiyon (40-50) (53 mg), RP-18 (30 g) ile hazırlanmış Flash kromatografisine tabi tutulmuştur. Elüsyona MeOH-H₂O (30:70) ile başlanmış ve (30-70→%5 MeOH artışları→40:60) ile devam edilen sistem %100 MeOH geçirilerek sonlandırılmıştır. Bu işlemler sonucunda **Bileşik 5** (4 mg) elde edilmiştir.

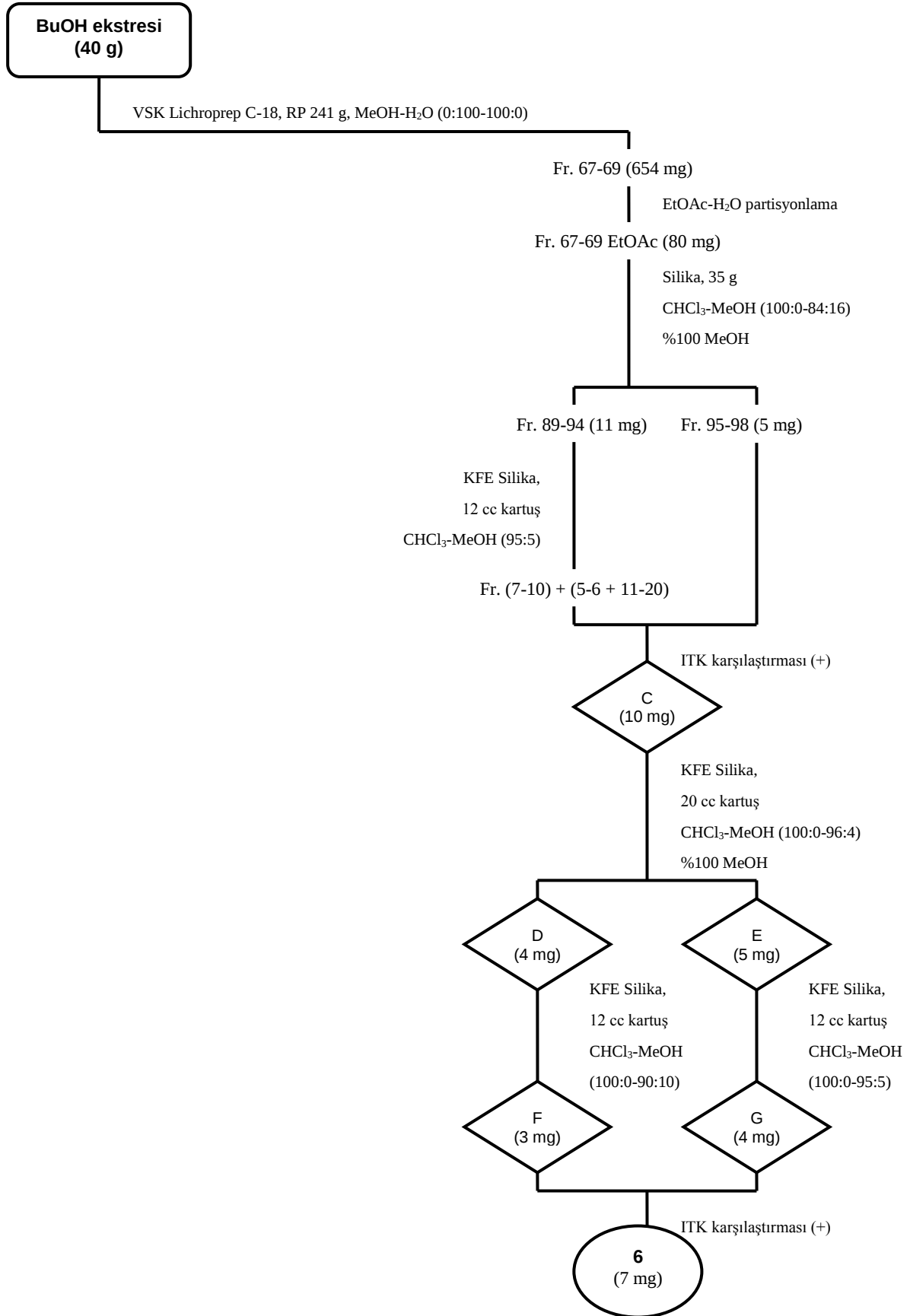
Fraksiyon 67-69 BuOH ekstresinin (654 mg) EtOAc/H₂O ile partisionlanması yoluna gidilmiştir. İşlem 3 kez tekrarlanarak EtOAc ve su fazları değiştirilmiştir. Evaporasyon işlemleri sonucunda 80 mg EtOAc ekstresi elde edilmiştir. Bu fraksiyon silika jel (2x30 cm, 35 g) ile hazırlanmış kolona uygulanmıştır. Elüsyona CHCl₃-MeOH (100:0) ile başlanmış (100:0→%2 MeOH artışları→84:16) ve %100 MeOH geçirilerek 5 fraksiyon elde edilmiştir. Fraksiyon (89-94) (11 mg), KFE yöntemi ile silika jel (12 ml) kartuşa uygulanmış, CHCl₃-MeOH (95:5) elüsyonu ile 2 fraksiyon elde edilmiştir. Bu işlemde elde ettiğimiz (7-10) ve (5-6 + 11-20) fraksiyonları ile, 67-69 EtOAc ekstresinden elde ettiğimiz (95-98) no'lu fraksiyonun (5 mg) İTK karşılaştırması sonucu aynı bileşikler olduğuna karar verilmiştir ve birleştirilerek **C** kodlu fraksiyon (10 mg) elde edilmiştir. Bu fraksiyon, KFE yöntemi ile silika jel kartuşa (20 ml) uygulanmış, elüsyona CHCl₃ ile başlanmış (CHCl₃-MeOH, 100:0→%1 MeOH artışları→96:4) ve %100 MeOH geçirilerek 4 fraksiyon elde edilmiştir. Buradan elde edilen fraksiyon (34-55) (4 mg)'e **D** kodu ve fraksiyon (56-119) (5 mg)'a **E** kodu verilmiştir. Fraksiyon **D** KFE yöntemi ile silika jel kartuşa (12 ml) uygulanmış, CHCl₃-MeOH (100:0) sistemi ile başlatılan elüsyon CHCl₃-MeOH (90:10) sistemi ile sonlandırılmış ve 4 fraksiyon elde edilmiştir. Buradan elde edilen fraksiyon (12-17) (3 mg)'ye **F** kodu verilmiştir. Ayrıca

fraksiyon **E**, KFE yöntemi ile silika jel kartuşa (12 ml) uygulanmış, CHCl_3 ile başlatılan elüsyon CHCl_3 -MeOH (95:5) sistemi ile sonlandırılmış ve 6 fraksiyon elde edilmiştir. Fraksiyon 11 ve 23-35 birleştirilerek (11 + 23-35) (4 mg) **G** koduyla isimlendirilmiştir. **F** ve **G**'nin İTK karşılaştırması sonucu aynı bileşikler olduğuna karar verilmiş ve birleştirilerek **Bileşik 6** (7 mg) elde edilmiştir.

C. cadmea üzerinde gerçekleştirilen kromatografik çalışmalar Şekil 2 ve Şekil 3'de gösterilmiştir.



Şekil 2. *C. cadmea* üzerinde gerçekleştirilen kromatografik çalışmalar-1

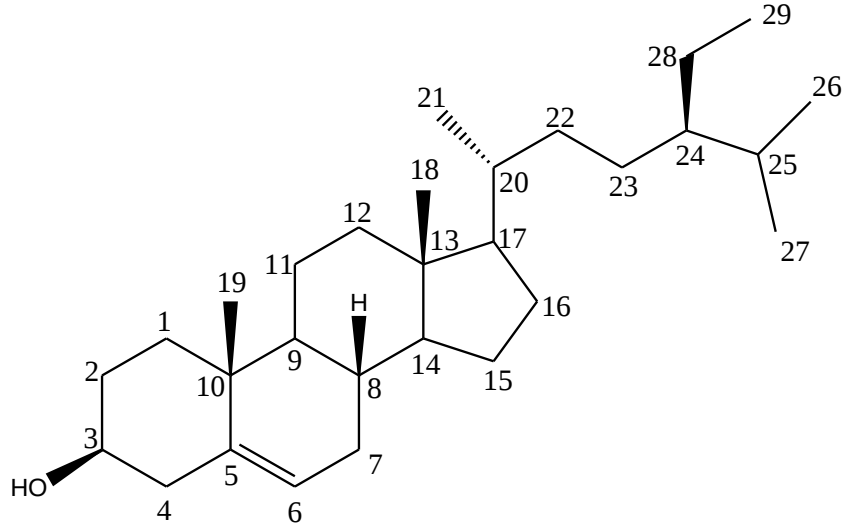


Şekil 3. *C. cadmea* üzerinde gerçekleştirilen kromatografik çalışmalar-2

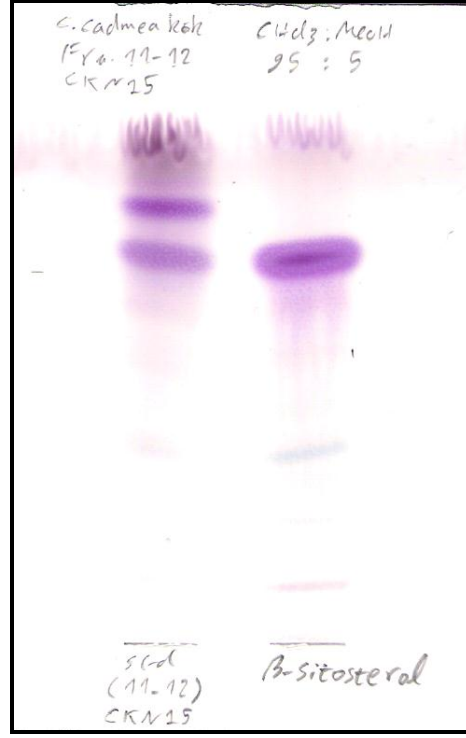
BÖLÜM III

3 BULGULAR

3.1 Bileşik 1 (β -sitosterol)

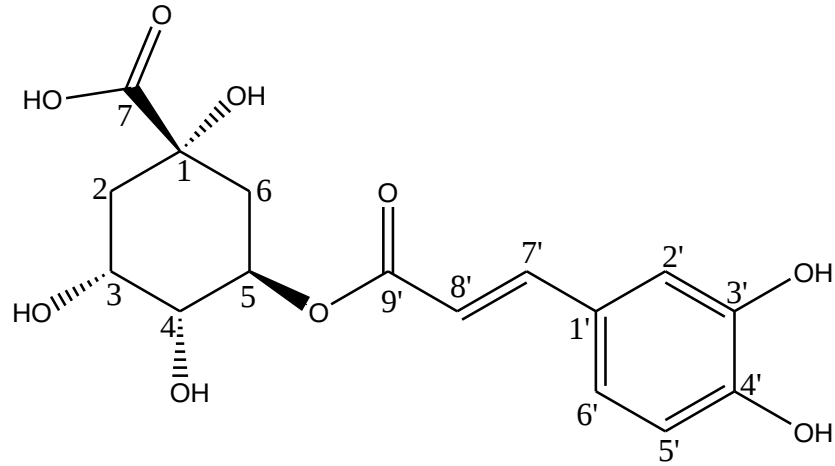


Fr 11-12 (227 mg)'nin İTK profilinde, V/S belirteci ile ısıtma sonucunda, zamanla kahverengiye dönen mor bir renk gözlenmiştir. Maddenin polaritesi ve İTK profilinde verdiği renklenme göz önüne alınarak daha önce *C. ensiformis*'ten izole edilen β -sitosterol maddesi olabileceği düşünülmüştür. İTK'da CHCl_3 -MeOH (95:5) hareketli faz sistemi kullanılarak kıyaslama yapılmış ve fraksiyonda bir fitosterol olan β -sitosterol (**Bileşik 1**) varlığı doğrulanmıştır (Resim 3).



Resim 3. Fr 11-12 ve β -sitosterol'ün İTK profili

3.2 Bileşik 2 (Klorojenik asit)



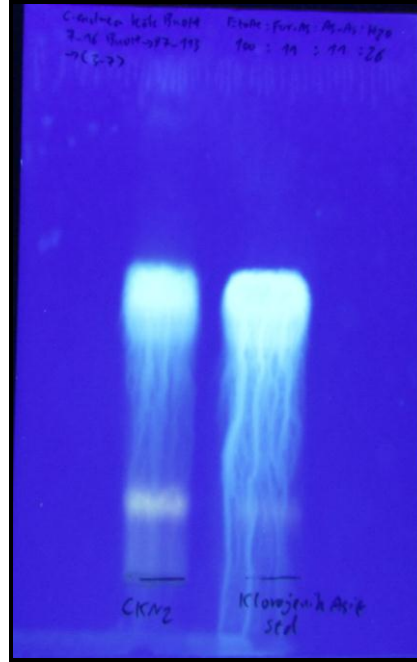
Kromatografik tekniklerle yapılan saflaştırma işlemleri sonucunda izole edilen bileşiğin (**Bileşik 2**, 19 mg), spektral analizleri yapılarak ^1H ve ^{13}C -NMR spektrumları elde edilmiştir. ESI-Kütle spektrumunda pozitif iyon m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 377.09'da, $[\text{M}+\text{H}]^+$ 355.08'de gözlenmiştir. Kütle spektrumu (Şekil 4), ^1H NMR (Şekil 5) ve ^{13}C NMR (Şekil 6) sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde, bileşiğin kapalı formülü $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$ olarak tespit edilmiştir.

Bileşiğe ait ^1H NMR spektrumunda, aromatik bölgede bir singlet ($\text{H}2'$, δ 6.97) ve birbiriyle orto etkileşim gösteren ($\text{H}5'$, δ 6.76, d , $J=8$ Hz ve $\text{H}6'$, δ 6.92, d , $J=8.8$ Hz) iki proton trisübstitüe bir benzen halkası olduğunu göstermiştir. Ayrıca spektrumda görülen ve aralarındaki etkileşim sabitinden hareketle trans konumunda oldukları belirlenen iki protonun ($\text{H}8'$, δ 6.17, d , $J=16$ Hz ve $\text{H}7'$, δ 7.43, d , $J=16$ Hz) varlığı, molekülün bir fenil-propanoit türevi olduğunu göstermiştir. ^{13}C NMR spektrumunda δ 169.31'de görülen karbon sinyali, molekülde bir karboksilik asit grubunun bulunduğunu gösterirken, diğer karbon sinyalleri ile yüksek alandaki proton sinyalleri (δ 1.70-4.50 ppm aralığında) birlikte değerlendirilerek, bu grubun altı üyeli siklik bir yapıya bağlı olduğu belirlenmiştir. Kütle spektrumu, ^1H NMR ve

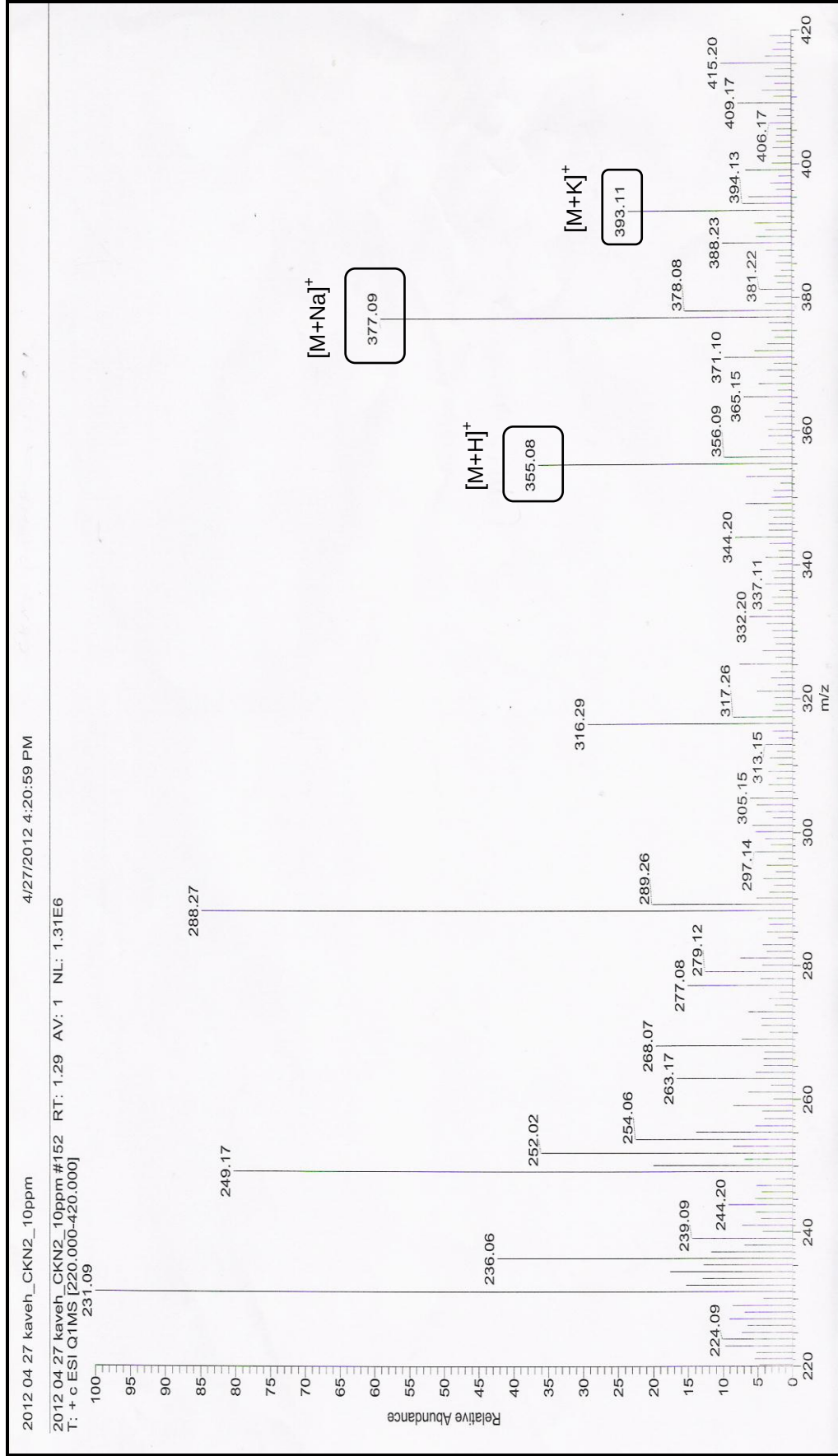
^{13}C NMR sonuçları ve UV 366 nm’de gözlenen parlak mavi bant, bileşiğin kafeoilkinik asit türevi olan klorojenik asit olabileceğini düşündürmüştür.

Bileşik 2, klorojenik asit standardı ile İTK plakta karşılaştırılmıştır [NP/PEG reaktifi, hareketli faz: EtOAc-HCOOH-CH₃COOH-H₂O (100:11:11:26), UV 366 nm] (Resim 4).

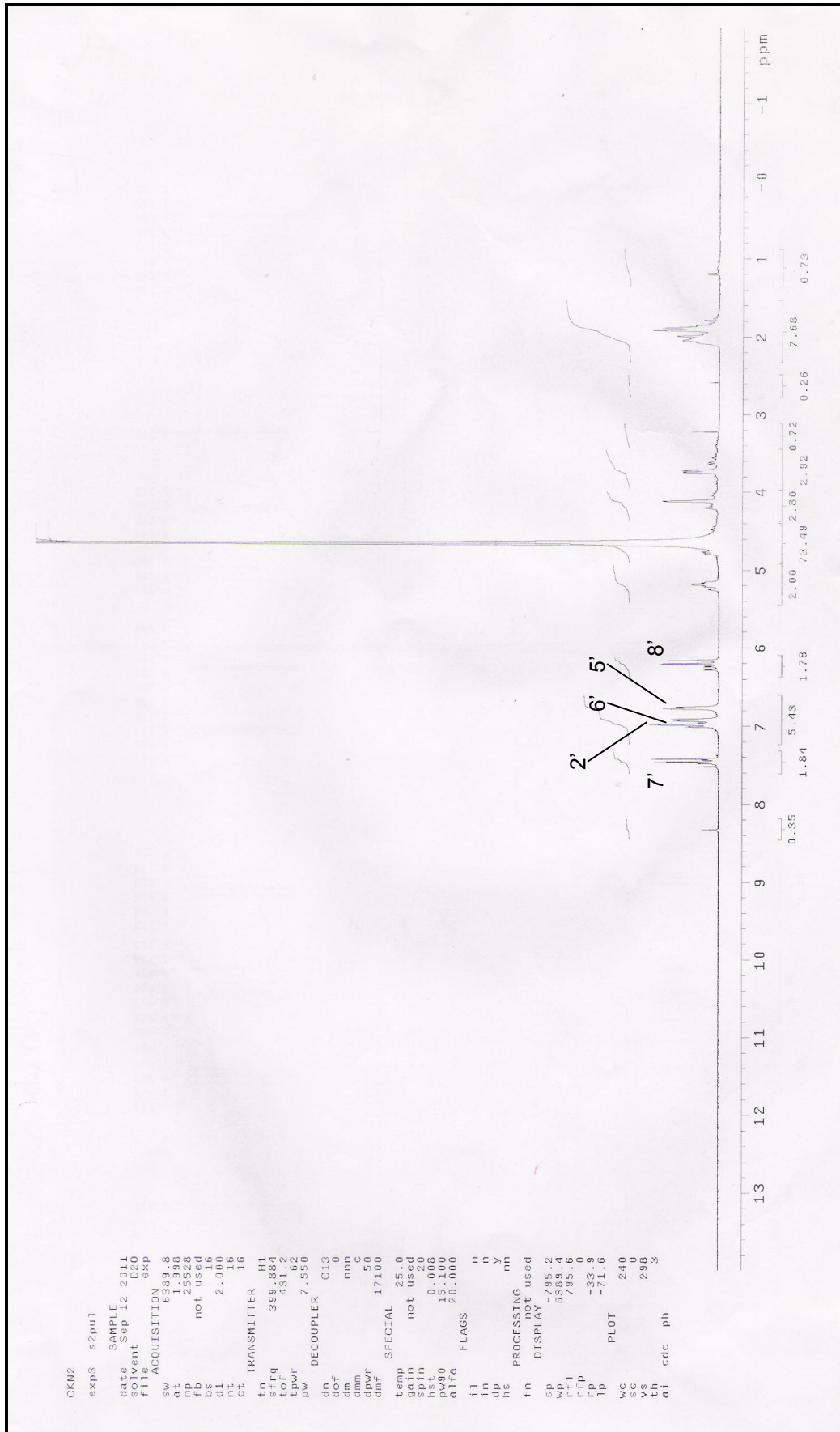
^1H ve ^{13}C datalarının (Tablo 2) literatür verileri ile karşılaştırılması ile (2) bu maddenin klorojenik asit olduğu belirlenmiştir.



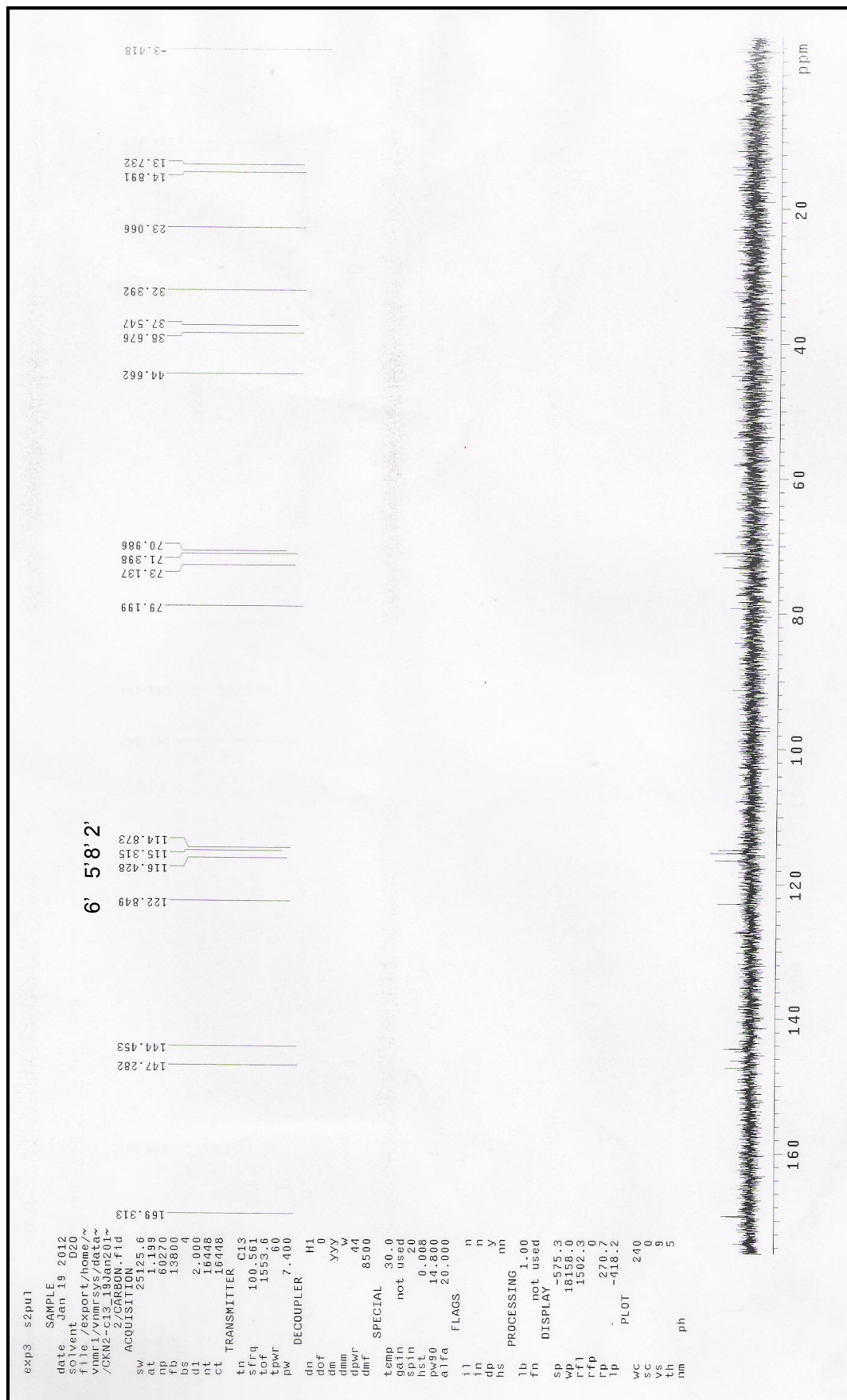
Resim 4. Bileşik 2 ve klorojenik asit’in İTK profili.



Şekil 4. Klorojenik asit ESI kütle spektrumu



Şekil 5. Klorojenik asit ^1H NMR spektrumu (D_2O , 400 MHz)

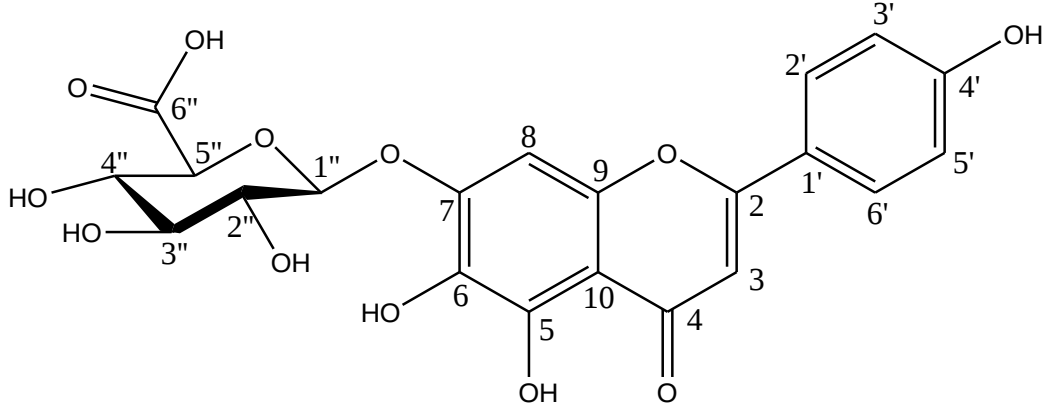


Şekil 6. Klorojenik asit ^{13}C NMR spektrumu (D_2O , 100 MHz)

Tablo 2. Klorojenik asit'in ^1H ve ^{13}C NMR spektral değerleri (D_2O).

	$^1\text{H}-\delta(\text{ppm})$	$^{13}\text{C}-\delta(\text{ppm})$
1		79.19
2	1.75-2.07 (<i>m</i>)	37.54
3	4.10 (1H, <i>m</i>)	70.98
4	3.73 (1H, <i>dd</i> , $J=12.4\text{-}2.8\text{ Hz}$)	73.13
5	5.20 (1H, <i>m</i>)	71.39
6	1.75-2.07 (<i>m</i>)	38.67
7		~ 173.00
1'		--
2'	6.97 (1H, <i>s</i>)	114.87
3'		144.45
4'		147.28
5'	6.76 (1H, <i>d</i> , $J=8\text{ Hz}$)	116.42
6'	6.91 (1H, <i>d</i> , $J=8.8\text{ Hz}$)	122.84
7'	7.43 (1H, <i>d</i> , $J=16\text{ Hz}$)	~ 146.00
8'	6.17 (1H, <i>d</i> , $J=16\text{ Hz}$)	115.31
9'		169.31

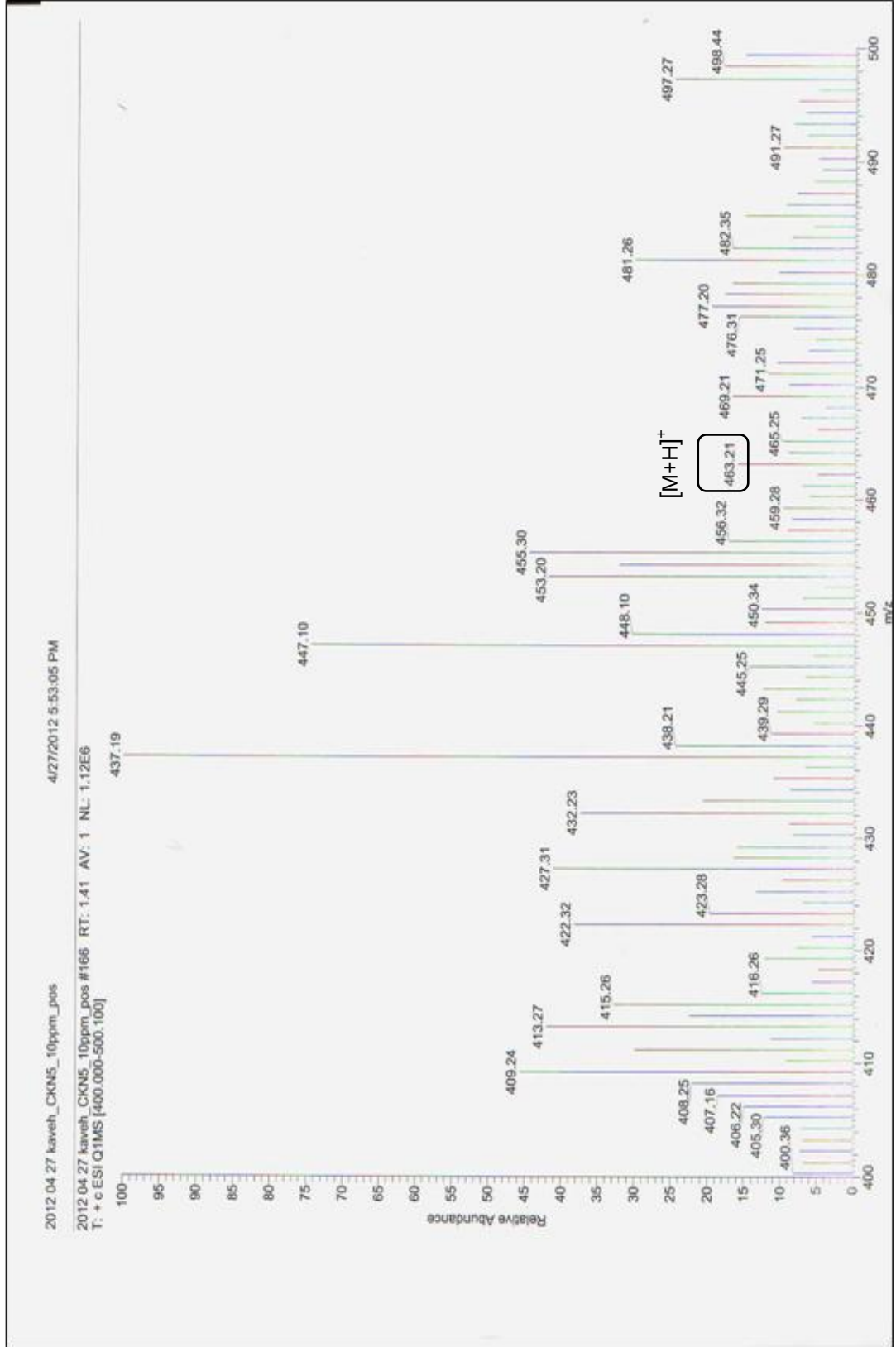
3.3 Bileşik 3 (Skutellarin)



Kromatografik tekniklerle yapılan saflaştırma işlemleri sonucunda izole edilen **Bileşik 3**'ün (4 mg), spektral analizleri yapılarak ^1H ve ^{13}C -NMR spektrumları elde edilmiştir. ESI-Kütle spektrumunda moleküler iyon m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 463.21'de gözlenmiştir. Kütle spektrumu (Şekil 7), ^1H NMR (Şekil 8) ve ^{13}C NMR (Şekil 9) sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde, bileşiğin kapalı formülü $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{12}$ olarak tespit edilmiştir.

Bileşiğe ait ^1H NMR spektrumunda, aromatik bölgede, AA'BB' sisteminine sahip dört adet proton ($\text{H}2'-6'$, δ 7.87 d, $J=8.8$ Hz ve $\text{H}3'-5'$, δ 6.90 d, $J=9.2$ Hz) ve iki singlet proton ($\text{H}3$, δ 6.63; $\text{H}8$, δ 6.97) belirlenmesi, ayrıca ^{13}C NMR spektrumunda aromatik bölgede 14 adet sinyal ile birlikte 1 adet keton grubuna ait (δ 183.03) sinyalin bulunması, molekülün dört süstitüentli bir flavon yapısında olduğunu göstermiştir. Ayrıca ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarında düşük alanda gözlenen sinyaller bir şeker varlığına işaret etmiştir. Şekerin anomerik protonu δ 5.08'de (d, $J=7.6$ Hz), anomerik karbonu δ 101.13'de gözlenirken, δ 171.54'de saptanan bir karboksilik asit sinyali, yapıda glukuronik asit olabileceğini düşündürmüştür. Nitekim şekerin diğer karbon sinyallerinin glukuronik asit ile tam uyumu bu yargıyı doğrulamıştır.

Kütle spektrumu, ^1H ve ^{13}C datalarının literatür verileri ile karşılaştırılması sonucunda (1, 49) bu maddenin skutellarin olduğu belirlenmiştir.

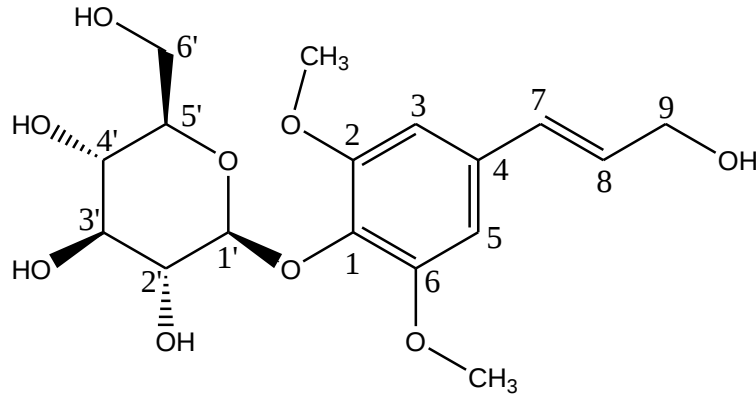


Şekil 7. Skutellarin ESI kütle spektrumu

Tablo 3. Skutellarin'in ^1H (CD_3OD) ve ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) spektral değerleri

	$^1\text{H}-\delta$ (ppm)	$^{13}\text{C}-\delta$ (ppm)
1		
2		164.79
3	6.63 (1H, s)	103.09
4		183.03
5		147.46
6		131.23
7		151.90
8	6.97 (1H, s)	94.61
9		149.67
10		106.53
1'		121.85
2'	7.87 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =8.8 Hz)	129.05
3'	6.90 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =9.2 Hz)	116.68
4'		162.00
5'	6.90 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =9.2 Hz)	116.68
6'	7.87 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =8.8 Hz)	129.05
1''	5.08 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =7.6 Hz)	101.13
2''		73.59
3''		76.21
4''		72.34
5''	4.21 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =7.6 Hz)	75.54
6''		171.54

3.4 Bileşik 4 (Siringin)



Kromatografik tekniklerle yapılan saflaştırma işlemleri sonucunda izole edilen **Bileşik 4**'ün, 254 nm'de UV aktif olduğu ve V/S reaktifi ile mor renk verdiği gözlenmiştir. ESI-Kütle spektrumunda (Şekil 10) moleküler iyon m/z $[M+Na]^+$ 395.09'da gözlenmiştir. Bileşiğin, spektral analizleri yapılarak 1H NMR spektrumu (Şekil 11 ve 12) elde edilmiştir.

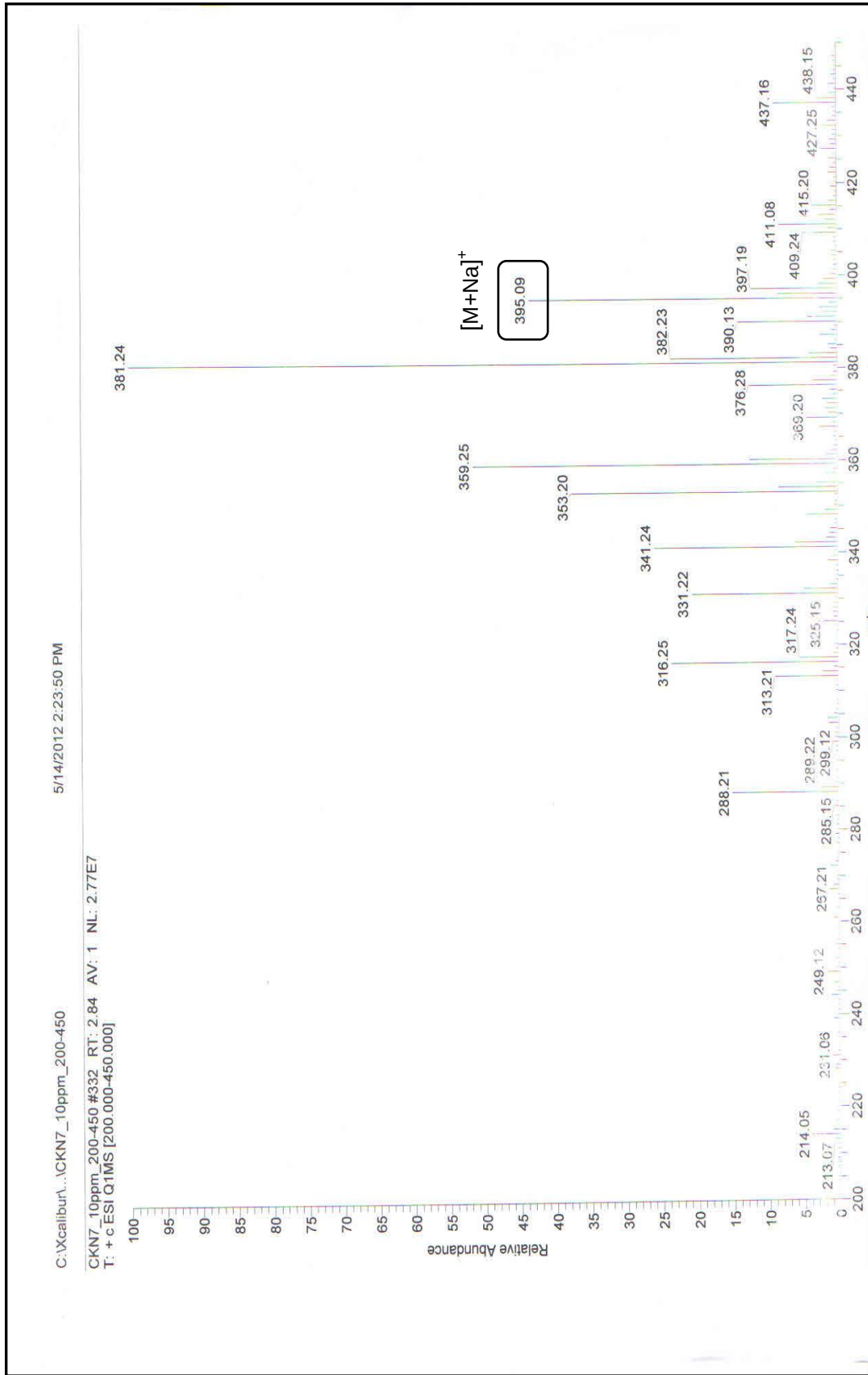
Bileşiğe ait 1H NMR spektrumunda, aromatik bölgede, iki protonluk singlet bir sinyal görülmesi (H3 ve H5, 2H δ 6.74, s) özdeş iki hidrojen atomu taşıyan, dört süstitüsyonlu bir benzen halkası olduğunu düşündürmüştür. Bunun yanında, 1H -NMR spektrumunda görülen ve aralarındaki etkileşim sabitinden hareketle trans konumunda oldukları belirlenen iki protonun (H7, δ 6.54, d, $J=16$ Hz ve H8, δ 6.31, d, $J=16$ Hz) ve şeker grubuna ait sinyallerin varlığı, molekülün bir fenil-propan glukoziti olduğunu düşündürmüştür. Ayrıca δ 3.29'da altı protonluk singlet bir sinyalin görülmesi, benzen halkası üzerinde iki adet metoksi ($-OCH_3$) grubunun varlığına işaret etmiştir.

V/S reaktifi ile mor renk veren bu bileşik [**Bileşik 4** (12 mg)], laboratuvarımızda daha önce elde edilen ve bir fenil-propan glukoziti olan siringin maddesi ile, silika plak üzerine uygulanarak, $CHCl_3:MeOH:H_2O$ (61:32:7) çözgen sisteminde

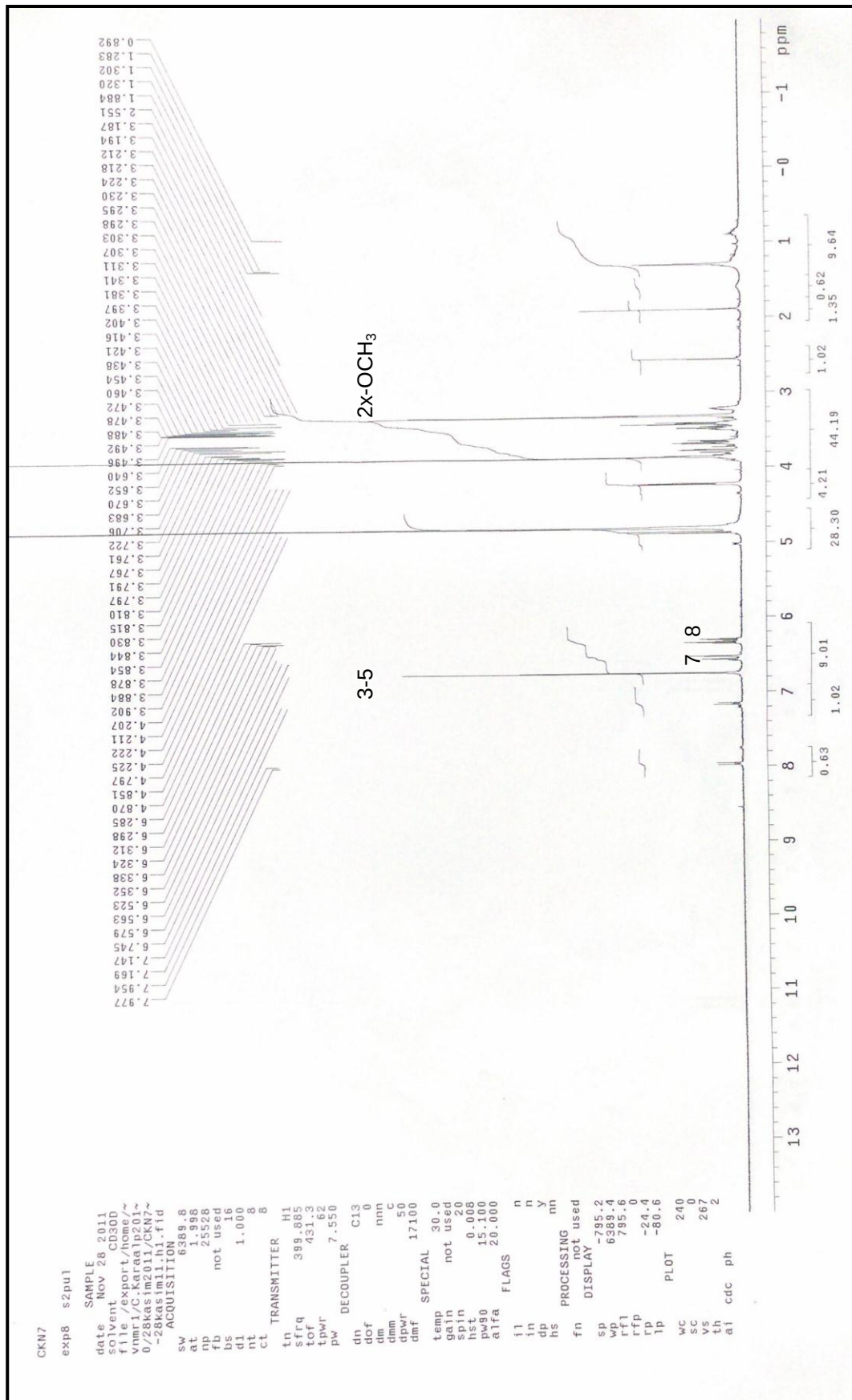
sürüklenmiş ve İTK karşılaştırması yapılmıştır. Sonuç olarak fraksiyonun bileşiminde siringin varlığı belirlenmiştir (Resim 5).



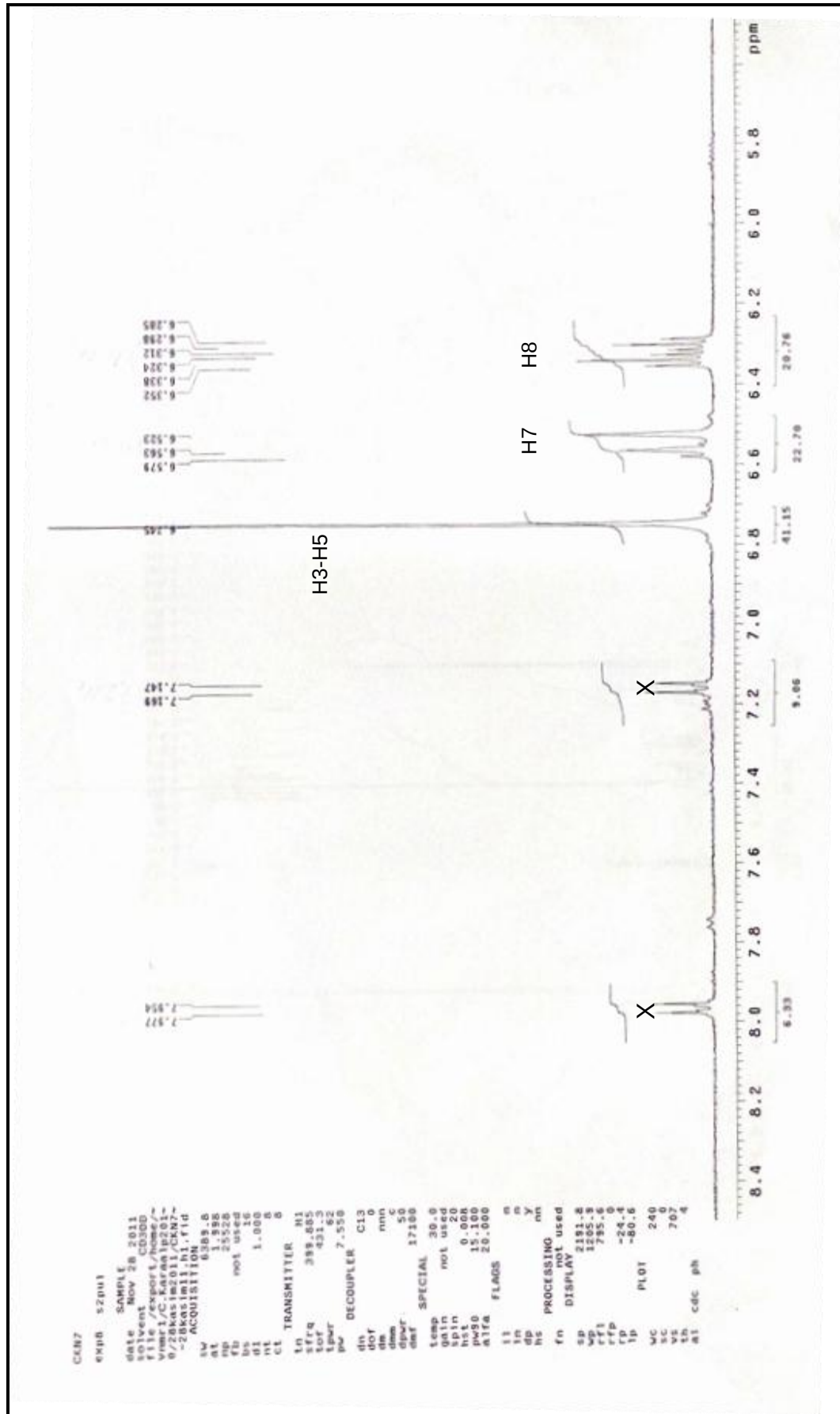
Resim 5. Bileşik 4 ve siringin'in İTK profili



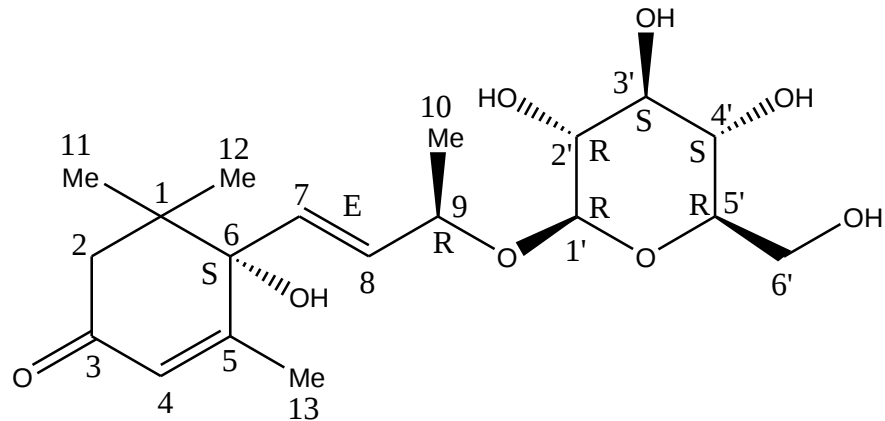
Şekil 10. Siringin ESI kütle spektrumu



Şekil 11. Siringin ¹H-NMR spektrumu-1 (CD₃OD, 400 MHz)



3.5 Bileşik 5 [(6S, 9R-Rozeozit)]



Bileşik 5 (4 mg), amorf bir toz olarak elde edilmiştir. Bileşiğin pozitif iyon ESI-kütle spektrumunda m/z 409.13 $[M+Na]^+$ 'da gözlenen sinyal (Şekil 13), 1H NMR (Şekil 14) ve ^{13}C NMR (Şekil 15 ve 16) verileri ile birlikte değerlendirildiğinde (Tablo 4), bileşiğin molekül formülü $C_{19}H_{30}O_8$ olarak hesaplanmıştır.

Bileşiğin IR spektrumunda ν_{max} :3284 (OH), 1694 (C=O) ve 1598-1616 (C=C) bantları gözlenmiştir.

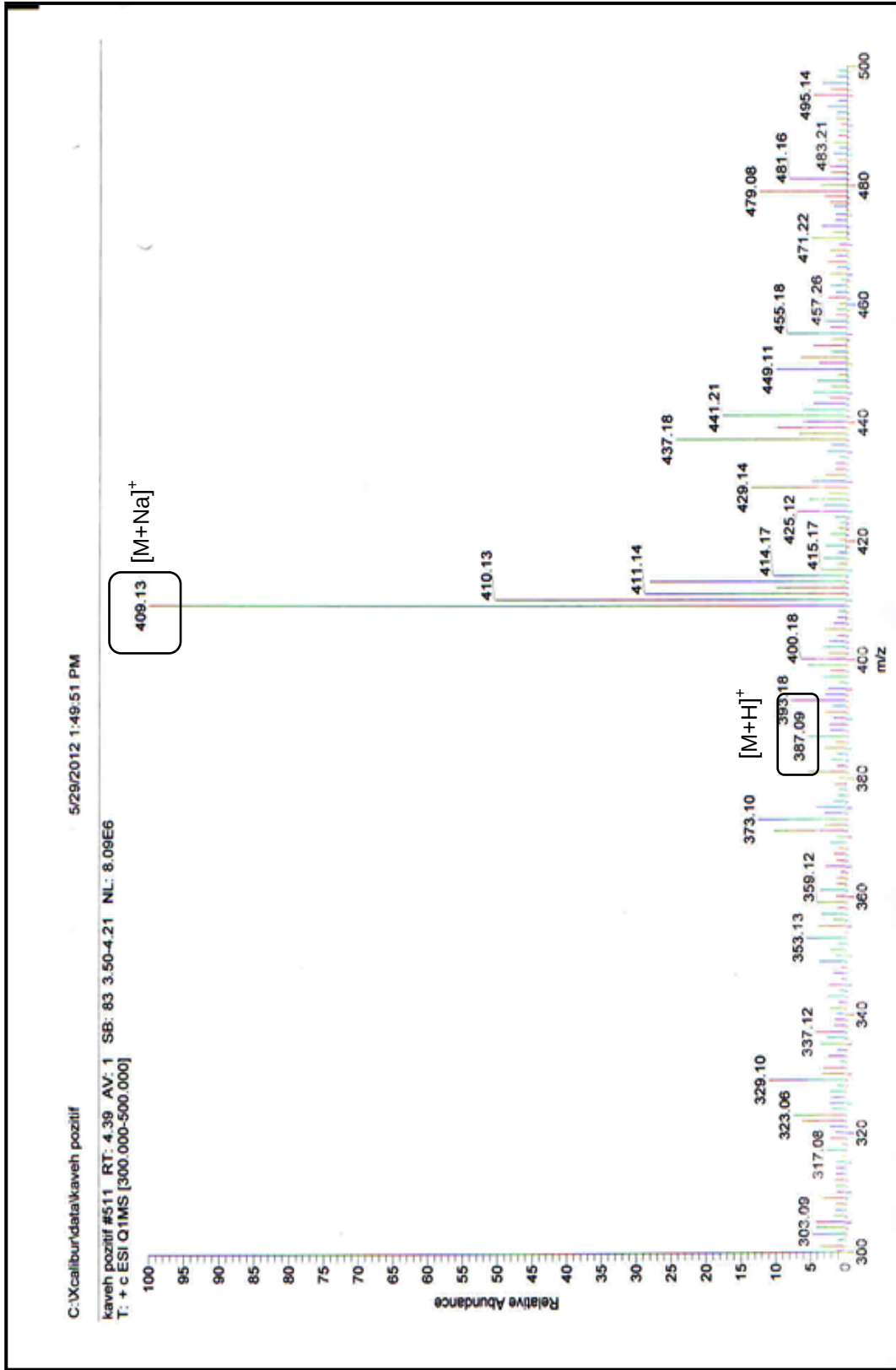
1H NMR spektrumunda anomerik protona ait sinyal (δ_H 4.34 d, $J=8$ Hz) ve ^{13}C NMR spektrumunda oz ünitesine ait karakteristik sinyaller, bileşikte β konfigürasyona sahip bir glukoz varlığını göstermiştir. Glukoz ünitesine ait sinyaller çıkarıldığında geriye 13 karbon sinyali kalmıştır. Bu sinyallerin 3'ü singlet ve 1'i dublet olmak üzere 4 metil, 1 metilen, 1 oksijen taşıyan, 1 halka içi çift bağ ve 2 cis çift bağ olmak üzere 4 metin ve 1 katerner karbon atomundan oluştuğu ve dolayısıyla bir megastigman olabileceği düşünülmüştür.

1H NMR spektrumunda 1.14 (d, $J=6$ Hz)'de gözlenen dublet metilin COSY spektrumunda (Şekil 17) gözlenen korelasyonundan hareketle, C9 nolu karbona bağlı

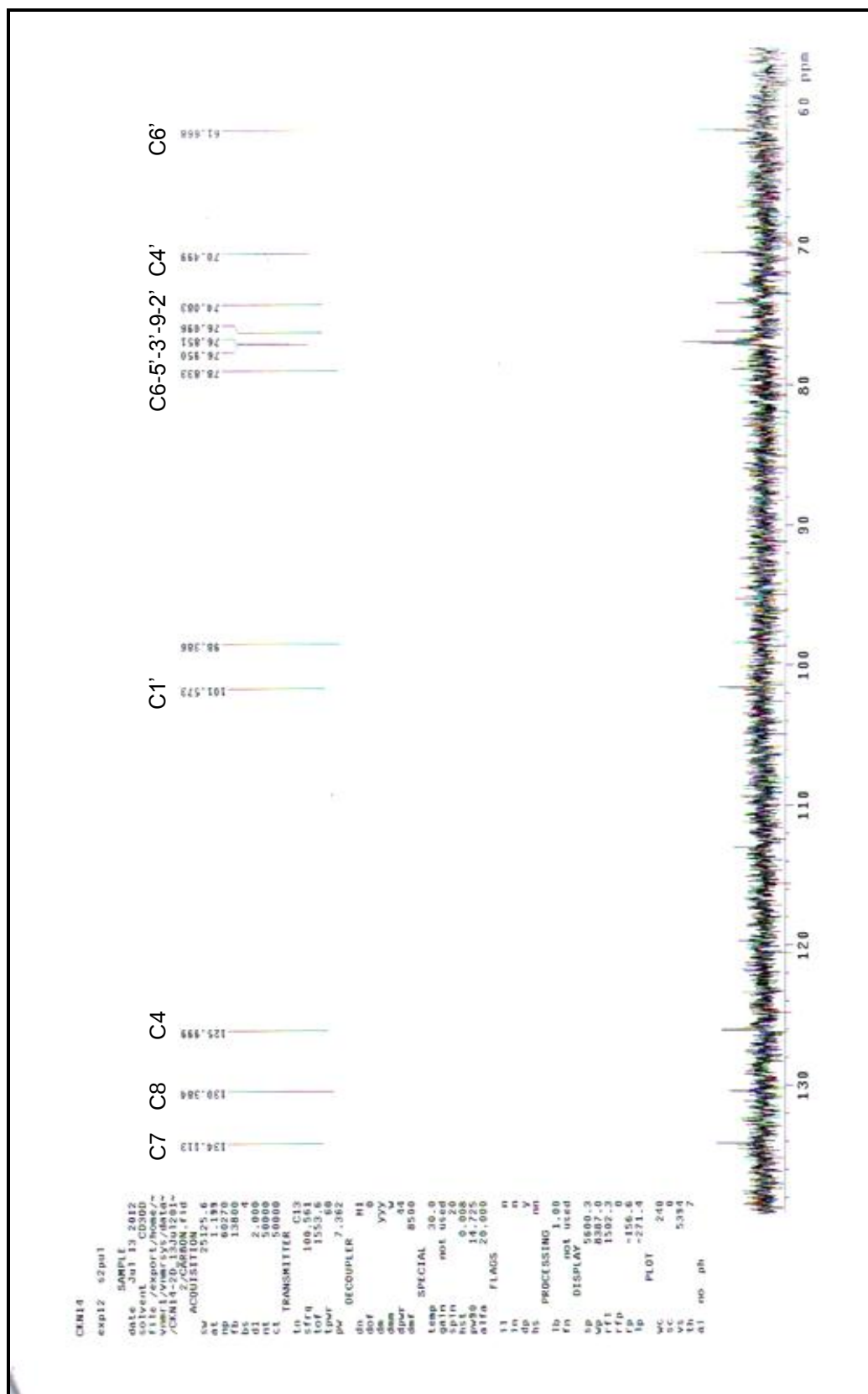
olduğu düşünölmüş, aralarında gözlenen etkileşim sabiti bu tezi doğrulamıştır. HMBC spektrumunda aynı dublet metilin etkileşiminden hareketle C-9 rezonansı 76.1 olarak saptanmıştır (Şekil 18). Aynı zamanda aynı protonun COSY spektrumunda anomerik protona ait sinyallerle etkileşimden glukoz ünitesinin C-9 pozisyonunda olduğu anlaşılmıştır. δ_H 1.01 (s), 1.02 (s) ppm’de gözlenen metil sinyallerinin C1 nolu karbona, 1.28 (s) sinyalinin ise C5 nolu karbona bağılı olduğu, HMBC (Şekil 18) spektrumunda gözlenen korelasyondan anlaşılmıştır. δ_H 5.84 (d, 4.4 Hz) ve 5.86 (d; 4.4 Hz)’da gözlenen olefinik protonlar (H-7 ve H-8), δ_H 5.86 (s)’da gözlenen halka içi metin protonu (H-4) ve ait oldukları karbon rezonans değerleri HMQC spektrumunda gözlenmiştir (Şekil 19).

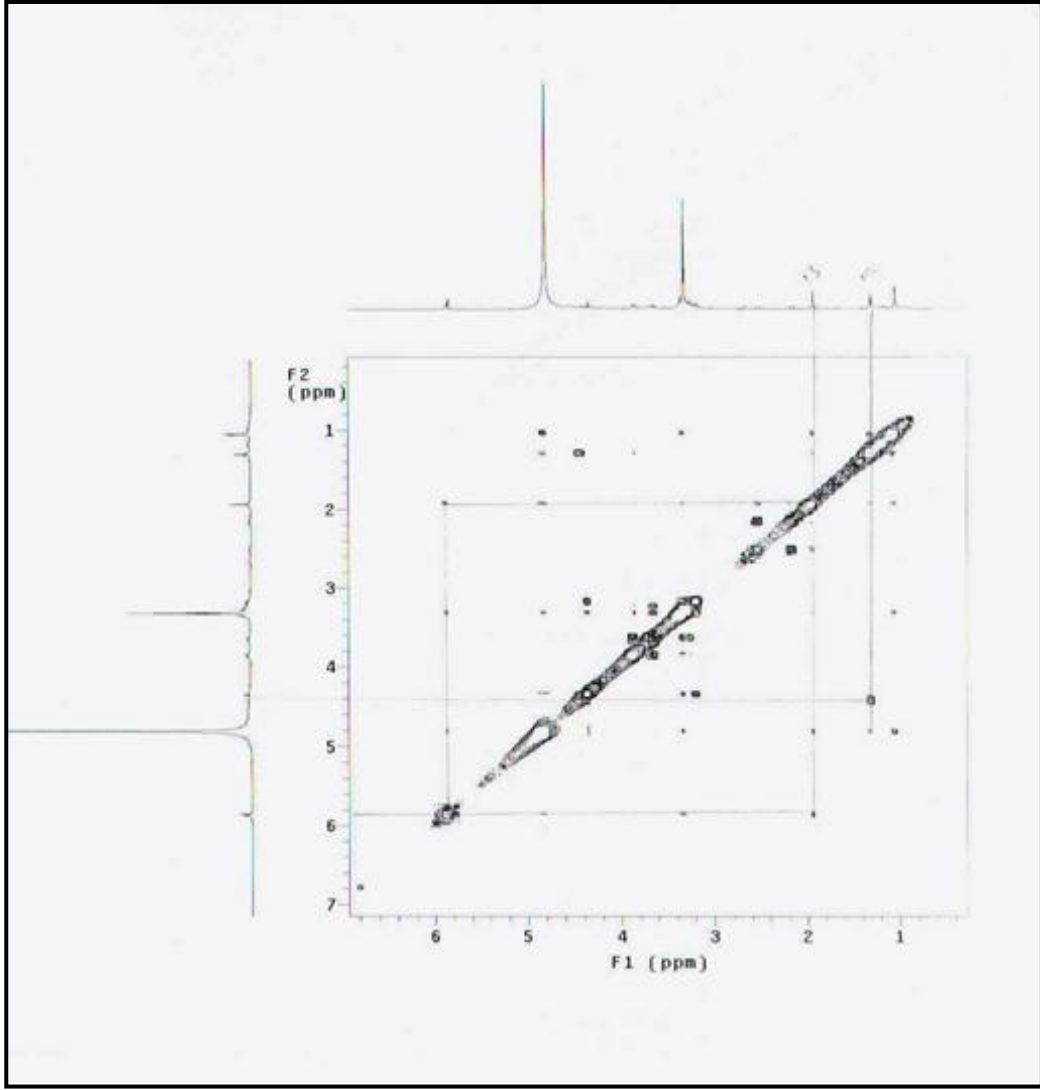
Yapıda bulunan şiral karbonlara ait absolüt konfigürasyonlar 1H ve ^{13}C NMR değerlerinin literatür dataları ile kıyaslanması sonucu tespit edilmiştir (68).

Bileşik 5’in yapısı tüm spektral veriler birlikte değerlendirildiğinde, 6-hidroksi-1,1,5-trimetil-6-[(E)-3-(2’,3’,4’-trihidro-piran-1’-iloksi)-büt-1-enil]-sikloheks-4-en-3-on [(6S,9R)-Rozeozit] olarak saptanmıştır. Bileşik, *Centaurea* taksonları için ilk kez bu çalışma ile rapor edilmektedir.

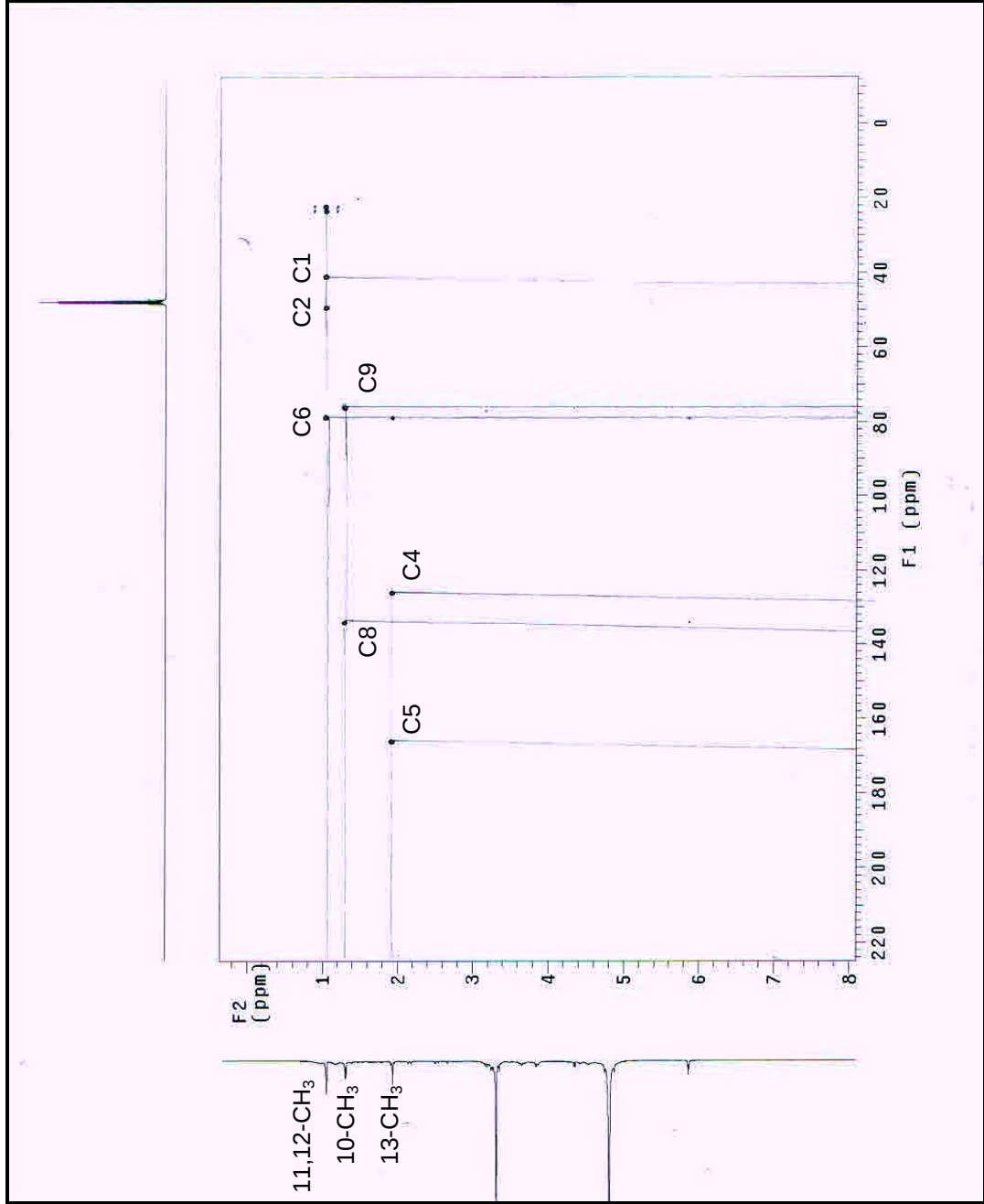


Şekil 13. Rozeozit ESI-kütle spektrumu

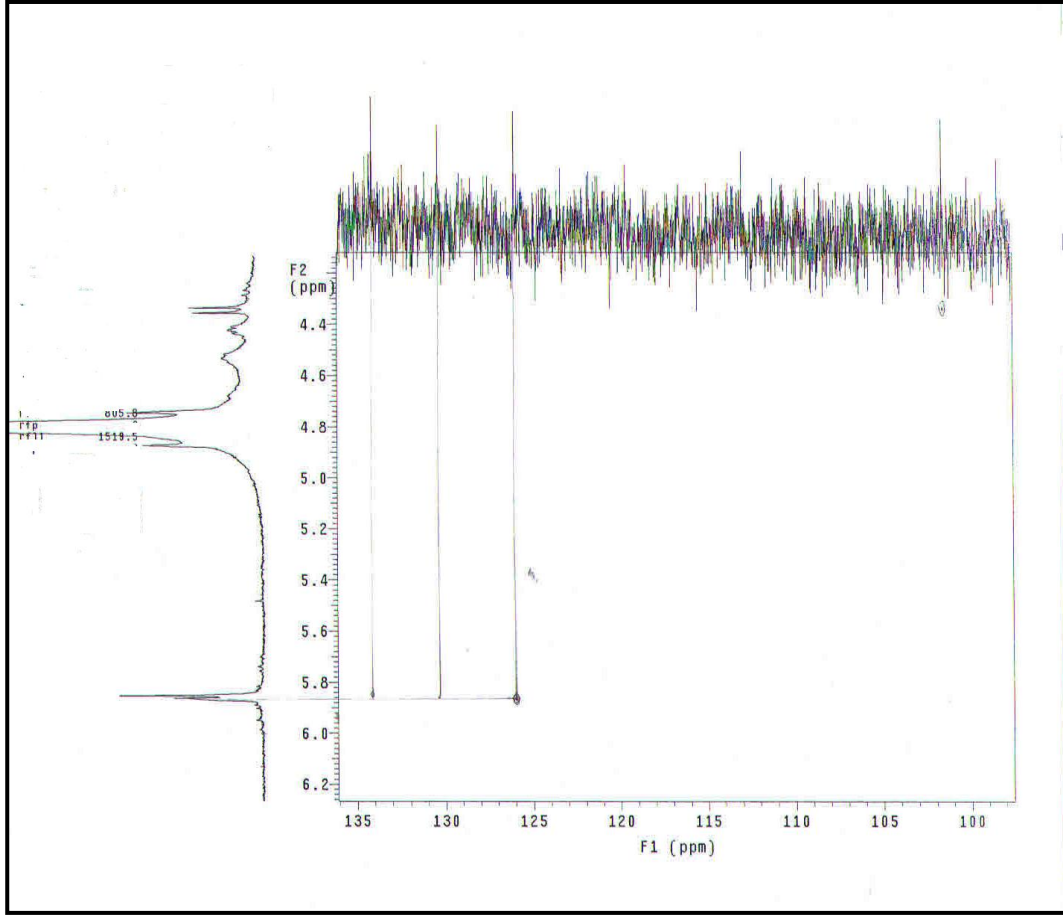




Şekil 17. Rozeozit COSY spektrumu



Şekil 18. Rozeozit HMBC spektrumu

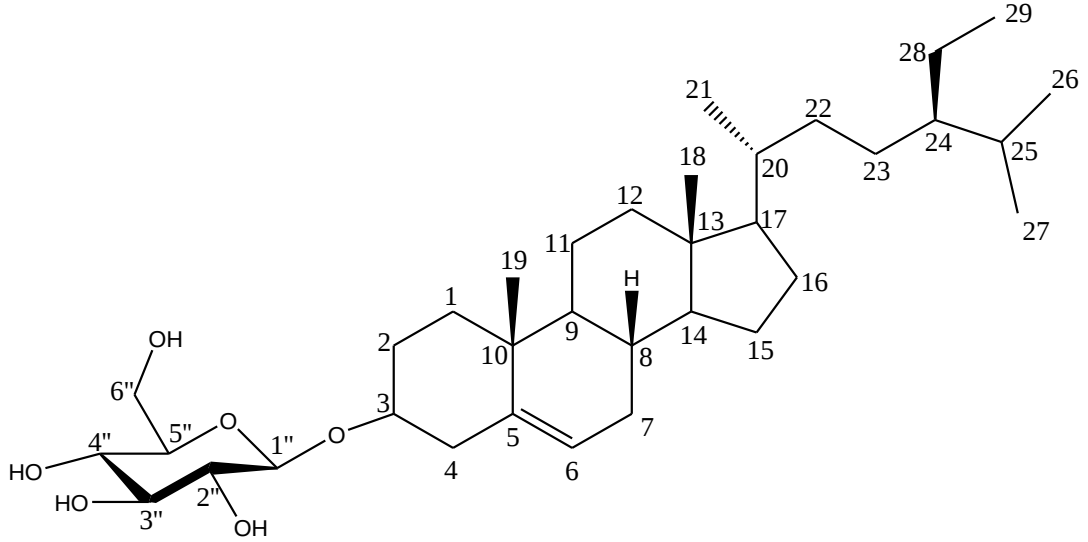


Şekil 19. Rozeozit HMQC spektrumu

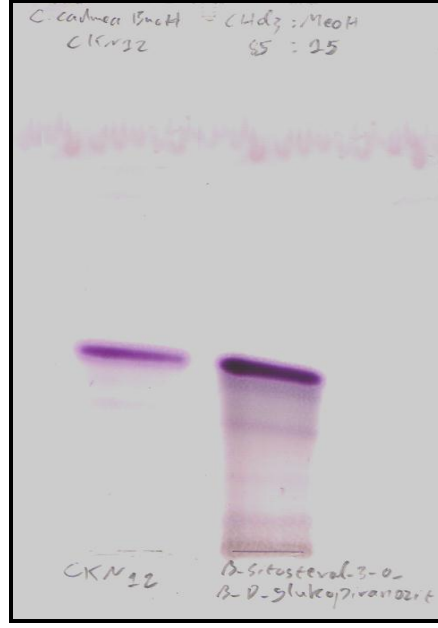
Tablo 4. Rozeozit'in ^1H ve ^{13}C NMR spektral değerleri (CD_3OD).

H/C	Mult.	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	δ_{C} (ppm)
Aglikon				
1	C			41.23
2	CH_2	2.16	d (16.8)	48.4
		2.50	d (16.8)	
3	C			200.0
4	CH	5.86	s	125.9
5	C			166.0
6	C			78.8
7	CH	5.84	d (4.4)	134.1
8	CH	5.84	d (4.4)	130.3
9	CH	4.41	m	76.1
10	CH_3	1.28	d (6)	19.9
11	CH_3	1.01	s	22.2
12	CH_3	1.02	s	23.5
13	CH_3	1.91	d (1.2)	18.3
Glukoz				
1'	CH	4.34	d (8)	101.5
2'	CH	3.17	d (8)	74.0
3'	CH	3.2-3.4	†	76.8
4'	CH	3.2-3.4	†	70.5
5'	CH	3.2-3.4	†	76.9
6'	CH_2	3.63	dd (5.6/15.6)	61.7
		3.85	dd (2/15.6)	

3.6 Bileşik 6 (β -sitosterol-3-O- β -D-glukopiranozit)



Kromatografik tekniklerle yapılan saflaştırma işlemleri sonucunda **Bileşik 6** (7 mg), $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$ (85:15) hareketli faz sistemi ile silika plakta sürüklendiğinde, UV aktif olmayan ve V/S reaktifi ile pembe-mor renk veren bir leke gözlenmiştir. İTK profili incelendiğinde, bu maddenin bir fitosterol olabileceği düşünülmüştür. Maddenin $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$ (85:15) çözgen sistemi ve V/S reaktifi kullanılarak β -sitosterol-3-O- β -D-glukopiranozit standardı ile karşılaştırılması sonucunda (Resim 6), β -sitosterol-3-O- β -D-glukopiranozit olduğu belirlenmiştir.



Resim 6. Bileşik 6 ve β -sitosterol-3-O- β -D-glukopiranozit'in İTK profili

BÖLÜM IV

TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızda endemik *Centaurea cadmea*, çiçeklenme döneminde (2004-Haziran), Denizli, Evrantepe, 1512 m'den (37°41'18.6"N, 29°00'07"E) toplanmış, herbaryum örnekleri hazırlanarak, Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'na kaydedilmiştir.

Bitkinin kurutulmuş kökleri kloroform ve metanol ile, topraküstü kısımları ise sırasıyla *n*-hekzan, kloroform ve metanol ile ekstre edilmiştir. Zengin İTK profili gösteren topraküstü metanol ekstresi, *n*-butanol ile partisionlanmıştır. Çeşitli kromatografik yöntemler kullanılarak kök kloroform ve topraküstü *n*-butanol ekstreleri üzerinde sekonder madde izolasyonları gerçekleştirilmiştir. *C. cadmea*'dan β -sitosterol, klorojenik asit, skutellarin, siringin, rozeozit ve β -sitosterol-3-*O*- β -D-glukopiranozit bileşikleri izole edilmiş, bu maddelerin yapı tayinleri 1-D (^1H ve ^{13}C NMR) ve 2-D NMR (COSY, HMQC ve HMBC), MS ve IR gibi spektroskopik yöntemlerin yardımıyla aydınlatılmıştır. Bazı fraksiyonlarda saf standartlar ile İTK karşılaştırmaları yapılarak tespit çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

C. cadmea'nın toprak üstü kısımlarından mikrodistilasyon yöntemiyle elde edilen uçucu yağın GC ve GC/MS analizi ile ana bileşeninin hekzadekanoik asit olduğu saptanmıştır (34). Bir diğer çalışmada ise, ana bileşenlerin hekzadekanoik asit (%29.5) ve dodekanoik asit (%11.2) olduğu belirlenmiştir (37).

Daha önce yapılmış olan bir çalışma ile bitkinin toprak üstü kısımlarından bir seskiterpen lakton; 2 α -hidroksi-5 α H-ödesma-4(15),11(13)-dien-12,8- β -olid (ivalin),

iki polimetoksiflavon; 5,3'-dihidroksi-6,7,4'-trimetoksi-flavon (öpatorin) ve 5-hidroksi-3',4',6,7-tetra-metoksiflavon (5-desmetilsinensetin) ve iki genel fitosterol; β -sitosterol ve β -sitosterol-3-O- β -D-glukopiranozit izole edilmiştir (35).

β -sitosterol ve β -sitosterol-3-O- β -D-glukopiranozit bitkiden daha önce izole edilmiş olmakla birlikte, bu çalışma ile, *C. cadmea*'da klorojenik asit, skutellarin, siringin ve rozeozit varlığı ilk kez rapor edilmektedir. Rozeozit aynı zamanda *Centaurea* türlerinden ilk kez izole edilmiştir.

C. cadmea, *Centaurea* cinsine ait toplam 9 türün dahil olduğu Phalolepis seksiyonuna ait bir taksondur. Bu seksiyonda yer alan diğer *Centaurea* türleri üzerinde az sayıda fitokimyasal çalışma bulunmaktadır.

C. aprodisia uçucu yağının GC ve GC/MS analizi yapılarak germakren-D ve β -karyofillenin ana komponentler olduğu belirlenmiştir (22).

C. luschaniana, *C. wagenitzii* ve *C. tossiensis* uçucu yağlarının ana bileşeninin hekzadekanoik asit olduğu saptanmıştır (41).

C. hierapolitana üzerinde yapılan bir fitokimyasal çalışma ile bitkiden 2 elemanolit seskiterpen ve 2 ödesman-tip seskiterpen glikozitler (hierapolitanin A-D) ve 5 bilinen bileşik (hispidulin, yakeosidin, şaftosit, kemferol-3-O-rutinosit ve dehidrodikoniferil alkol) izole edilerek yapıları aydınlatılmıştır (35).

Phalolepis seksiyonunda bulunan diğer taksonlar üzerinde de (*C. amaena*, *C. lycia*, ve *C. lycaonica*) kapsamlı fitokimyasal çalışmaların yapılmasına gereksinim duyulmaktadır.

β -sitosterol, fitosterol grubundan beyaz yağimsı bir maddedir. Bitkilerin çoğunda serbest veya glikozitleri şeklinde bulunabilmektedir. β -sitosterol, kolesterol ile yapısal benzerlik göstermesi nedeni ile, vücutta kolesterol absorpsiyonunu inhibe

edebilmekte, bu şekilde plazmadaki kolesterol değerlerini düşürebilmektedir (70). β -sitosterol ve glikozitleri, *Centaurea* türlerinde daha önce rapor edilmiştir (38).

Kafeik ve kinik asidin esterleşmesi ile meydana gelen ve bir hidroksisinnamik asit türevi olan klorojenik asit, insan diyetindeki en önemli polifenollerdendir. Antioksidan, antikanserojenik, antienflamatuvar, analjezik ve antipiretik aktiviteleri yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (51, 67). *Centaurea* türlerinden daha önce izole edilmiştir (38).

Skutellarin, *C. calcitrapa*, *C. depressa*, *C. scabiosa*, *C. orientalis* türlerinden daha önce izole edilmiştir (30). Çin tıbbi bitkilerinden *Erigeron breviscapus* (Vant). ekstresi, breviskapin adı ile nöroprotektif ve antikoagülan olarak Çin'de yaygın kullanılmaktadır. Çeşitli preparatları, klinikte serebral yetersizliklerde ve periferel dolaşım bozukluklarında tedavi edicidir. Bu ekstrenin ana biyoaktif flavonoidlerinden biri olan skutellarin (skutellarein-7-O-D-glukronit)'in, kardiyovasküler hastalıklarda, uyku bozukluklarında, depresyon, migren, ağrı ve hafıza kaybı terapisinde kullanım bulunduğu kayıtlıdır (14). Yapılan bir araştırma ile skutellarinin, kardiyovasküler ve serebrovasküler iskemide breviskapinden daha yüksek oranda protektif etki gösterdiği saptanmıştır (43).

Siringin biyoaktif bir fenilpropanoit bileşiği olup, yapılan çalışmalarda, antinositif (16), bağışıklık sistemini düzenleyici (15), antienflamatuvar (16, 42) ve hipotansif (3) etkilere sahip olduğu belirlenmiştir. *Centaurea* türlerinden daha önce izole edilmiştir (17, 38).

Rozeozit'in antidiabetik (26), antitümöral (36), antibakteriyel (50) ve lökotrien salınımını inhibe edici (68) aktivite gösterdiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Rozeozit bu çalışma ile *Centaurea* taksonlarında ilk kez rapor edilmektedir.

Biyoaktif sekonder metabolitler içeren endemik *C. cadmea*'nın yeni terapötik ajanların geliştirilmesinde önemli bir kaynak olabileceği düşünülmektedir. Bitkide bulunan sekonder metabolitlerin biyoaktiviteleri yönünde ileri çalışmalar yapılmasına gereksinim duyulmaktadır.

ÖZET

***Centaurea cadmea*'nın Sekonder Metabolitlerinin Araştırılması**

Bu çalışmada, Denizli-Evrantepe'den toplanmış olan endemik *Centaurea cadmea*'nın kurutularak toz edilmiş köklerinden CHCl_3 ve MeOH, topraküstü kısımlarından da sırasıyla *n*-hekzan, CHCl_3 ve MeOH ekstraktları hazırlanmıştır. Çeşitli kromatografik yöntemler kullanılarak, kök kloroform ve topraküstü *n*-butanol ekstraktları üzerinde fraksiyonlama ve izolasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Saf maddelerin yapı tayinleri spektroskopik yöntemler [1-D (^1H ve ^{13}C NMR) ve 2-D NMR (COSY, HMQC ve HMBC), MS ve IR] kullanılarak yapılmıştır. Bazı fraksiyonlarda saf standartlar kullanılarak İTK karşılaştırması ile yapılar belirlenmiştir.

Sonuç olarak, *C. cadmea*'dan β -sitosterol, klorojenik asit, skutellarin, siringin rozeozit ve β -sitosterol-3-*O*- β -D-glukopiranozit bileşikleri izole edilmiştir. Klorojenik asit, skutellarin, siringin ve rozeozit *C. cadmea*'da ilk kez rapor edilmektedir. Ayrıca, rozeozit *Centaurea* türlerinden daha önce izole edilmemiştir.

Anahtar sözcükler: *Centaurea cadmea*, β -sitosterol, klorojenik asit, skutellarin, siringin, rozeozit ve β -sitosterol-3-*O*- β -D-glukopiranozit, İTK, NMR.

ABSTRACT

Investigation on Secondary Metabolites of *Centaurea cadmea*

In this study, the CHCl₃ and MeOH extracts from the roots and the *n*-hexane, CHCl₃ and MeOH extracts from the aerial parts of *C. cadmea*, collected from Denizli-Evrantepe, were prepared. Fractionation and isolation studies were performed on the CHCl₃ extract of the roots and the *n*-BuOH extract of the aerial parts by using several chromatographical methods. Structures of the pure compounds were elucidated by using spectroscopic methods [1-D (¹H ve ¹³C NMR) and 2-D NMR (COSY, HMQC ve HMBC), MS and IR]. By using pure reference compounds, some of the isolates were identified based on TLC comparison studies.

As a result, β-sitosterol, chlorogenic acid, scutellarin, siringin, roseoside and β-sitosterol-3-*O*-β-D-glucopyranoside were isolated from *C. cadmea*. Chlorogenic acid, scutellarin, siringin and roseoside were reported for the first time in *C. cadmea*. Besides, roseoside had not been isolated from *Centaurea* species, before this study.

Key Words: *Centaurea cadmea*, β-sitosterol, chlorogenic acid, scutellarin, siringin, roseoside and β-sitosterol-3-*O*-β-D-glucopyranoside, TLC, NMR.

KAYNAKLAR

1. Agrawal, P.K. (1989). Carbon-13 NMR of Flavonoids, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, s:132
2. Ahmad, B., (2010). Antioxidant activity and phenolic compounds from *Colchicum luteum* Baker (Liliaceae), *Afr. J. Biotechnol.*, 9(35): 5762-66
3. Ahmad, M., Aftab, K. (1995). Hypotensive action of syringin from *Syringa vulgaris*, *Phytother Res* 9(6): 452-54
4. Akkal, S., Benayache, F., Bentamene, A., Medjroubi, K., Seguin, E., Tillequin, F., (2003). Flavonoid aglycones from *Centaurea napifolia*, *Chem Nat Comp*, 39(2): 219-20
5. Arif, R., Küpeli, E., Ergun, F. (2004). The biological activity of *Centaurea L.* species, *G.U. J Science*, 17(4): 149-64
6. Aslan, Ü., Öksüz, S. (1998). Chemical constituents of *Centaurea cuneifolia*, *Turk J Chem*, 23: 15-20
7. Baytop, T. (1999). Türkiye’de Bitkilerle Tedavi (Geçmişte ve Bugün), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2.baskı, s:316
8. Bona, B., Aras, A. (2008). Numerical taxonomic study on some *Centaurea L.* species, *IUFS J Biol*, 67(1): 55-63
9. Bruno, M., Maggio, A., Paternostro, M.P., Rosselli, S., Arnold, N.A., Herz, W. (2001). Sesquiterpene lactones and other constituents of three Carduae from Cyprus, *Biochem Syst Ecol*, 29(4): 433-35
10. Bruno, M., Maggio, A., Rosselli, S., Gedris, T.E., Herz, W. (2002). Sesquiterpene lactones and other constituents of *Centaurea paniculata* subsp. *castellana*, *Biochem Sys Ecol*, 30(4): 379-81

11. Bruno, M., Rosselli, S., Maggio, A., Raccuglia, R.A., Arnold, N.A. (2005).
Guaianolides from *Centaurea babylonica*, *Biochem Syst Ecol*, 33(8): 817-25
12. Buruk, K., Sökmen, A., Aydın, F., Ertürk, M. (2006). Antimicrobial activity
of some endemic plants growing in the Eastern Black Sea Region Turkey,
Fitoterapia, 77: 388-91
13. Cardona, M.L., Fernandez, I., Pedro, J.R., Beatriz, P. (1991). Sesquiterpene
lactones and flavonoids from *Centaurea aspera*, *Phytochemistry*, 30(7):
2331-3
14. Chen, X., Cui, L., Duan, X., Ma, B., Zhong, D. (2006). Pharmacokinetics and
metabolism of the flavonoid scutellarin in human after single oral
administration, *Drug Met Dispos* 34 (8): 1345-52
15. Cho, J.Y., Nam, K.H., Kim, A.R., Park, J., Yoo, E.S., Baik, K.U., Yu, Y.H.,
Park, M.H. (2001). *In-vitro* and *in-vivo* immunomodulatory effects of
syringin, *J Pharm Pharmacol*, 53(9): 1287-94
16. Choi, J., Shin, K.M., Park, H.J., Jung, H.J., Kim, H.J., Lee, Y.S., Rew, J.H.,
Lee, K.T. (2004). Anti-inflammatory and antinociceptive effects of sinapyl
alcohol and its glucoside syringin, *Planta Medica*, 70(11): 1027-32
17. Cis, J. Nowak, G., Horoszkiewicz-Hassan, M., Kisiel, W. (2003) Syringin in
some species of the subtribe Centaureinae of the Asteraceae, *Acta Soc Bot
Polonie*, 72(2), 105-7
18. Çelik, S., Rosselli, S., Maggio, A.M., Raccuglia, R.A., Uysal, I., Kisiel, W.,
Michalska, K., Bruno, M. (2006). Guaianolides and lignans from the aerial
parts of *Centaurea ptosimopappa*, *Biochem Syst Ecol*, 34(4): 349-52
19. Davis, P.H. (1975). Flora of Turkey and The East Aegean Islands, Edinburgh
University Press, Edinburgh, Vol: 5. s: 465-585

20. Davis, P.H. (1988). Flora of Turkey and The East Aegean Islands, Edinburgh University Press, Edinburgh, Vol: 10. s:431-463
21. Djeddi, S., Argyropoulou, C., Skaltsa, H. (2008). Secondary metabolites from *Centaurea grisebachii* subsp. *grisebachii*, *Biochem Sys Ecol*, 36: 336-9
22. Erel Baykan S., Demirci B., Demir S, Karaalp C, Baser KHC. (2011). Composition of the essential oils of *Centaurea aphrodisea*, *C. polyclada*, *C. athoa*, *C. hyalolepis* and *C. iberica*, *Planta Med*, 77: 1302 (
23. Esmaeili, A., Rustaiyan, A., Nadimi, M. (2005). Volatile constituents of *Centaurea depressa* M.B. and *Carduus pynoccephalus* L. Two *Compositae* herbs growing wild in Iran. *J. Essent. Oil Res*, 17: 539-541
24. Flamini, G., Pardini, M., Morelli, I. (2001). A flavonoid sulphate and other compounds from the roots of *Centaurea bracteata*, *Phytochemistry*, 58: 1229-33
25. Flamini, G., Tebano, M., Cioni, P.L., Bagci, Y., Dural, H., Ertugrul, K., Uysal, T., Savran, A. (2006). A multivariate statistical approach to *Centaurea* classification using essential oil composition data of some species from Turkey, *Plant Syst Evol*, 261: 217-28
26. Frankish N, de Sousa Menezes F, Mills C, Sheridan H. (2010) Enhancement of insulin release from the beta-cell line INS-1 by an ethanolic extract of *Bauhinia variegata* and its major constituent roseoside. *Planta Med*, 76(10): 995-7
27. Fujita, T., Sezik, E., Tabata, M., Yesilada, E., Honda, G., Takeda, Y., Tanaka, T., Takaishi, Y. (1995). Traditional medicine in Turkey. VII. Folk medicine in Middle and West Black Sea Regions, *Eco Bot*, 49(4): 406-22

28. Garbacki, N., Gloaguen, V., Damas, J., Bodart, P., Tits, M., Angeno, L. (1999). Anti-inflammatory and immunological effects of *Centaurea cyanus* flower-heads, *J Ethnopharmacol*, 68: 235-41
29. Gonnet, J.F. (1993). Flavonoid glycoside variation in wild specimens of *Centaurea triumfetti* (Compositae) and comments on its relationships with *Centaurea montana* based on flavonoid fingerprints, *Bio Syst Ecol*, 21(3): 389-96
30. Honda, G., Yesilada, E., Tabata, M., Sezik, E., Fujita, T., Takeda, Y., Takaishi, Y., Tanaka, T. (1996). Traditional medicine in Turkey VI. Folk medicine in West Anatolia: Afyon, Kütahya, Denizli, Muğla, Aydın provinces, *J Ethnopharmacol*, 68: 235-41
31. Ito, H., Kobayashi, E. Li, S.H., Hatano, T., Sugita, D., Kubo, N., Shimura, S., Itoh, Y., Tokuda, H, Nishino, H. et al (2002) Antitumor activity of compounds isolated from leaves of *Eriobotrya japonica*. *J Agric Food Chem*, 50(8): 2400-3
32. Kaij-a Kamb, M., Amaros, M., Gire, L. (1992). Chemistry and biological activity of the genus *Centaurea*, *Pharm Acta Helv*, 67(7): 178-88
33. Karamenderes, C., Khan, S., Tekwani, B.L., Jacob, M.R., Khan, I.A. (2006). Antiprotozoal and antimicrobial activities of *Centaurea* species growing in Turkey, *Pharm Bio*, 44(7): 534-9
34. Karamenderes, C., Konyalıoğlu, S., Khan, S., Khan, I.A. (2007). Total phenolic contents ,free radical scavenging activities and inhibitory effects on the activation of NF-kappa B of eight *Centaurea* L. species, *Phytother Res*, 21: 488-91

35. Karamenderes, C., Bedir, E., Abou-Gazar, H., Khan, I.A. (2007). Chemical constituents of *Centaurea cadmea*, *Chem Nat Comp*, 43(6): 694-5
36. Karamenderes, C., Bedir, E., Pawar, R., Baykan, S., Khan, I.A. (2007). Elemanolide sesquiterpenes and eudesmane sesquiterpene glycosides from *Centaurea hierapolitana*, *Phytochemistry*, 68: 609-15
37. Karamenderes, C., Demirci, B., Baser, K.H.C. (2008). Composition of essential oils of ten *Centaurea* L. taxa from Turkey, *J Ess Oil Res*, 20(4): 342-9
38. Karamenderes, C., Alankuş Çalışkan, Ö., Baykan Erel, Ş., Karabay Yavaşoğlu, Ü., Avunduk, S. (2009) Batı Anadolu’da yayılış gösteren bazı *Centaurea* L. türlerinin biyoaktif sekonder bileşiklerin araştırılması, TÜBİTAK, 106S197 no’lu araştırma projesi.
39. Kose, Y.B. (2006).Taxonomical and ecological characteristics of the genus *Centaurea* L. Section Phalolepis (Cass.) DC. Ph.D. Thesis, Ankara, Turkey.
40. Kose, Y.B., Demirci, B., Başer, K.H.C., Yücel, E. (2008). Composition of the essential oil of three endemic *Centaurea* species from Turkey *J Ess Oil Res*, 20(4):, 335-8
41. Koukoulitsa, E., Skaltsa, H., Karioti, A., Demetzos, C., Dimas, K. (2002). Bioactive sequiterpene lactones from *Centaurea* species and their cytotoxic/cytostatic activity against human cell lines in vitro, *Planta Med*, 68(7): 649-52
42. Lanza, A.M.D., Martinez, M.J.A., Matellano, L.F., Carretero, C.R., Castillo, L.V., Sen, A.M.S., Benito, P.B. (2001). Lignan and phenylpropanoid glycosides from *Phillyrea latifolia* and their *in vitro* anti-inflammatory activity, *Planta Med*, 67(3): 219-23

43. Lin, L.L., Liu, A.J., Liu, J.G., Yu, X.H., Qin, L.P., Su, D.F. (2007). Protective effects of scutellarin and breviscapine on brain and heart ischemia in rats, *J Cardiovasc Pharmacol*, 50(3): 327-32
44. Medjroubi, K., Benayache, F., Bermejo, J. (2005). Sesquiterpene lactones from *Centaurea musimomum*: Antiplasmodial and cytotoxic activities, *Fitoterapia*, 76: 744-6
45. Middleton, M., Cox, P.J., Jaspars, M., Kumarasamy, Y., Nahar, L., Reid, R., Sarker, S.D. (2003). Dibenzylbutyrolactone lignans and indole alkaloids from the seeds of *Centaurea nigra* (Asteraceae), *Biochem Syst Ecol*, 31(6): 653-6
46. Negrete, R.E., Backhouse, N., Cajigal, I., Delporte, C., Cassels, B.K., Breitmaier, B., Eckhardt, G. (1993). New antiinflammatory elemanolides from *Centaurea chilensis*, *J Ethnopharmacol*, 40: 149-53
47. Öksüz, S., Serin, S. (1997). Triterpenes of *Centaurea ptosimopappoides*, *Phytochemistry*, 46(3): 545-8
48. Özçelik, B., Gürbüz, İ., Karaoğlu, T., Yeşilada, E. (2009). Antiviral and antimicrobial activities of three sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. subsp. *solstitialis*, *Microbiological Res*, 164(5): 545-52
49. Qiu, F., Xia, H., Zhang, T., Di, X., Qu, G., Yao, X. (2007). Two major urinary metabolites of scutellarin in rats, *Planta Med*, 73: 363-5
50. Quílez A, Berenguer B, Gilardoni G, Souccar C, de Mendonça S, Oliveira LF, Martín-Calero MJ, Vidari G. (2010). Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-*Helicobacter pylori* activities of several fractions isolated from *Piper carpunya* Ruiz & Pav. *J Ethnopharmacol*, 128(3): 583-9

51. Santos, M. D., Almeida, M.C., Lopes, N.P, Souza G.E.P. (2006). Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid, *Biol Pharm Bull* 29(11): 2236-40
52. Sarker, S.D., Dinan, L., Sık, V., Rees, H.H. (1998). Moschatine: An unusual steroidal glycoside from *Centaurea moschata*, *Phytochemistry*, 48(6): 1039-43
53. Sarker, S.D., Laird, A., Nahar, L., Kumarasamy, Y., Jaspars, M. (2001). Indole alkaloids from the seeds of *Centaurea cyanus* (Asteraceae), *Phytochemistry*, 57: 1273–6
54. Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L., Leblebici, E. (1995). Tohumlu Bitkiler Sistematigi, E.Ü. Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, No:116, E.Ü. Basımevi, Bornova-İzmir
55. Sezik, E., Yesilada, E., Tabata, M., Honda, G., Takaishi, Y., Fujita, T., Tanaka, T., Takeda, Y. (1997). Traditional medicine in Turkey VIII. Folk medicine in East Anatolia; Erzurum, Erzincan, Ağrı, Kars, Iğdır provinces, *Econ Bot*, 51(3): 195-211
56. Sezik, E., Yesilada, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y., Tanaka, T. (2001). Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in Central Anatolia *J Ethnopharmacol*, 75: 95-115
57. Shoeb, M., Jaspars, M., MacManus, S.M., Mjinda, R.R.T., Sarker, S.D. (2004). Epoxy lignans from the seeds of *Centaurea cyanus* (Asteraceae), *Biochem Syst Ecol*, 32: 1201-4
58. Shoeb, M., Macmanus, S.M., Kumarasamy, Y., Jaspars, M., Nahar, L., Thoo-Lin, PK., Nazemiyeh, H., Sarker, S.D. (2006). Americanin, a bioactive

- dibenzylbutyrolactone lignan, from the seeds of *Centaurea americana*, *Phytochemistry*, 67(21): 2370-5
59. Shoeb, M., Çelik, S., Nahar, L., MacManus, S.M., Kong-Thu-Lin, P., Jaspar, S. M., Sarker, S.D. (2007). Two salonitenolide derivatives from the aerial parts of *Centaurea gigantea* inhibit the growth of colorectal cancer cells *in vitro*, *Nat Prod Com*, 2(2): 121-5
60. Takeda, K., Osakabe, A., Saito, S., Furuyama, D., Tomita, A., Kojima, Y., Yamadera, M., Sakuta, M. (2005). Components of protocyanin, a blue pigment from the blue flowers of *Centaurea cyanus*, *Phytochemistry*, 66(13): 1607-13
61. Tekeli, Y., Sezgin, M. (2007). *Centaurea carduiformis* (Peygamber çiçeği)'nin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, *SDÜ Fen Edebiyat Dergisi*, *Fen Dergisi*, 2(2): 204-9
62. Tekeli, Y., Sezgin, M., Aktümsek, A. (2008). Antioxidant property of *Centaurea solstitialis* L. from Konya, Turkey, *Asian J Chem*, 20(6): 4831-5
63. Tesevic, V., Milosavljevic, S., Vajs, V., Janackovic, P., Popsavin, M. (2003). Ditiophenes and other constituents of roots of *Centaurea nicolai*, *Biochem Syst Ecol*, 31(1): 89-90
64. Uysal, İ., Çelik, S., Oldaçay, M. (2005) Antibacterial activity of *Centaurea* species having ethnobotanical features, *Pakistan J Bio Sci*, 8(12): 1812-3
65. Uysal, T. (2008). *Centaurea ertugruliana* (Asteraceae), a new species from Turkey, *Ann Bot Fennici*, 45: 135-7
66. Wagenitz G., Flora of Turkey and the East Aegean Islands,. ed: Davis P.H., Vol: 5, Edinburgh University Press, Edinburgh, (1975). Pp: 465-585.

67. Wu L. (2007). Effect of chlorogenic acid on antioxidant activity of Flos Lonicerae extracts, *J Zhejiang Univ Sci B*, 8(9): 673-9.
68. Yajima A, Oono Y, Nakagawa R, Nukada T, Yabuta G. (2009). A simple synthesis of four stereoisomers of roseoside and their inhibitory activity on leukotriene release from mice bone marrow-derived cultured mast cells. *Bioorg Med Chem*.17(1):189-94
69. Ye, J.C., Chang, W.C., Hsieh D.J.Y, Hsiao, M.W. (2010). Extraction and analysis of β -sitosterol in herbal medicines. *J. Med. Plants Res.*, 4(7): 522-7
70. Yeşilada E., Sezik E., Fujita T., Tanaka S., Tabata, M. (1993). Screening of some Turkish medicinal plants for their anti-ulserogenic activities, *Phytother Res*, 7: 263-5

ÖZGEÇMİŞ

1971 yılında İran-Tabriz’de doğdum. 1997 yılında İran Shabestar Üniversitesinde Ziraat Mühendisliği-Zooteknik bölümünden mezun oldum. 2002 yılında başladığım Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’nden Temmuz 2009’da mezun oldum. Ocak 2010’da Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı’nda yüksek lisans çalışmalarına başladım.