

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PLANTAGO LAGOPUS L.
ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR

Ecz. Yasin GENÇ

Farmakognozi Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2011

TC.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PLANTAGO LAGOPUS L.
ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR

Ecz. Yasin GENÇ

Farmakognozi Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Ü. Şebnem HARPUT

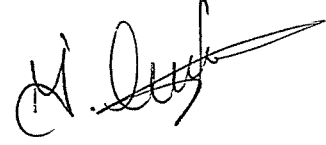
ANKARA

2011

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü' ne:

Bu çalışma tez jürimiz tarafından Farmakognozi Programında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı : Prof. Dr. İclal Saraçoğlu
Hacettepe Üniversitesi



Danışmanı : Doç. Dr. Ü. Şebnem Harput
Hacettepe Üniversitesi



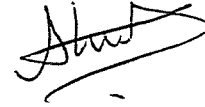
Üye : Prof. Dr. L. Ömür Demirezer
Hacettepe Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Gülçin Saltan
Ankara Üniversitesi

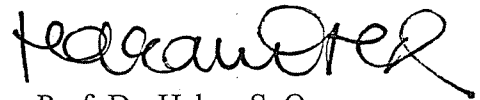


Üye : Prof. Dr. Ayşe Uz
Hacettepe Üniversitesi



ONAY:

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



Prof. Dr. Hakan S. Orer

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bana yardımcı olan, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, güleryüzü ve pozitif düşüncesi hiçbir zaman eksik olmayan değerli hocam Doç. Dr. Ü. Şebnem HARPUT'a,

Tez çalışmalarım sırasında sürekli ilgi ve yardımlarını gördüğüm, her konuda bize yardımcı olan Sayın Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. İclal SARAÇOĞLU'na,

Akademik kariyer yapma konusunda; son derece ilgili ve güleryüzlü tavırlarıyla bana yol gösteren ve araştırma görevlisi olmamda emeği geçen Sayın Dekanımız Prof. Dr. L. Ömür DEMİREZER'e

Tez yazımı sırasında bilgisayarda teknik destek ve kaynak sağlamada yardımcı olan tüm çalışma ARKADAŞLARIM'a,

İzole edilen bileşiklerin NMR ve kütle analizlerinin yapılmasını sağlayan Prof. Dr. Akito NAKATSU'ya (College of Pharmacy, Kinjo Gakuin University, Nagoya, Japan),

Tez bitkimin toplanmasına yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Asuman KARADENİZ'e, (Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Burdur)

Bitki teşhisini sağlayan Prof. Dr. Zeki AYTAÇ'a, (Gazi Üniversitesi, Ankara)

Aktivite çalışmalarımız sırasında gerekli olan bazı materyallere ulaşmamızı sağlayan Doç. Dr. İmran VURAL'a, (Hacettepe Üniversitesi, Ankara)

Çalışmalarım sırasında yardımını gördüğüm FARMAKOGNOZİ ve FARMASÖTİK BOTANİK ailesindeki tüm öğretim üye ve yardımcılara,

Bugünlerde olmamı sağlayan AİLEM'e, en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında kaybettiğim BABAANNEM'e sevgilerimle....

Ecz. Yasin GENÇ

ÖZET

Genç, Y., *Plantago lagopus* L. Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2011. *Plantago* türleri (Plantaginaceae) Türkiye’de 2’si endemik toplam 21 tür ile temsil edilen ve Anadolu’da yaygın olarak kullanılan bitkilerdir. *Plantago* türleri üzerinde yapılan çalışmalarda; bazı türlerinin antitümör, antienflamatuar, antifungal ve antibakteriyel etkileri olduğu gösterilmiştir. *Plantago* türlerinin halk arasında yaygın kullanılışlarından ve aktivitelerinden yola çıkılarak Türkiye’de özellikle Akdeniz ve Ege Bölgelerinde bulunan *Plantago lagopus* L. bitkisi biyoaktivite rehberli olarak incelenmiştir. Ekstre, fraksiyon ve maddelerin biyoaktivitesi; DPPH, nitrik oksit ve süperoksit radikali süpürücü etkinlikleri ve HEP-2, RD ve MCF-7 kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktivitelerinin araştırılması ile izlenmiş, bununla birlikte *Plantago lagopus* L. bitkisinin sulu ekstresinin total fenolik madde içeriği de incelenmiştir. *Plantago lagopus* L. bitkisinin gölgede kurutulmuş toprak üstü kısımları MeOH ile 40 °C’ de ekstre edilmiş, ekstre düşük ısı ve alçak basınçta yoğunlaştırılmıştır. Ekstre lipofilik bileşiklerinden kurtarıldıktan sonra, taşıdığı fenolik ve fenolik olmayan bileşiklerin ayrılması amacıyla, poliamit kolon kromatografisi ile bir ön ayırım işlemine tabi tutulmuş, sulu ekstre ile birlikte toplanan fraksiyonların aktiviteleri araştırılmıştır. En aktif bulunan fraksiyondan iki feniletanoit glukoziti, akteozit (**PL-1**) ve kalkeoriozit (**PL-2**), izole edilmiş; her iki maddenin de kuvvetli radikal süpürücü ve sitotoksik etkisi olduğu saptanmıştır. Diğer taraftan *Plantago* türleri için kemotaksonomik açıdan önem taşıyan iridoit yapısında bileşiklerin tespiti amacıyla poliamit kolonun iridoit fraksiyonundan hareketle izolasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş; okubin (**PL-5**) ve katalpol (**PL-6**) olmak üzere iki iridoit glukoziti, bir non-glukozidik iridoit rehmaglutin D (**PL-4**) ve bir megastigman glukoziti olan filomurozit (**PL-3**) izole edilmiştir. İzole edilen bileşiklerin yapıları spektral yöntemler (UV, IR, 1D NMR, 2D NMR, kütle spektroskopisi) kullanılarak aydınlatılmıştır. Çalışmamızın sonucunda; antioksidan ve antikanser ilaç araştırmalarına öncülük edebilecek maddeler tespit edilirken, diğer taraftan da *Plantago* cinsi üzerinde devam eden kemotaksonomik araştırmalara katkıda bulunulmaya çalışılmıştır.

Anahtar Kelimeler : *Plantago* türleri, sitotoksik aktivite, radikal süpürücü aktivite, süperoksit, nitrik oksit, DPPH.

ABSTRACT

Genç, Y., Pharmacognostical Investigations on *Plantago lagopus* L., Hacettepe University, Institute of Health Sciences, Pharmacognosy Program, Master Thesis, Ankara, 2011. The genus *Plantago* (Plantaginaceae) is represented by 21 species in Turkey, 2 of them are endemic and widely used in Anatolia. Antitumoral, antiinflammatory, antibacterial and antifungal effects of some *Plantago* species were reported in literature. Bioactivity guided studies were performed on *Plantago lagopus* L. which is distributed especially Mediterranean and Aegean Regions on the basis of popular usage of *Plantago* species in traditional medicine and their activities. Bioactivity was monitorized by investigating of radical scavenging effects against DPPH, nitric oxide and superoxide radicals and cytotoxic activities against HEP-2, RD and MCF-7 cell lines. Besides all of these, total phenolic compound of water extract of *P. lagopus* was investigated. Air dried aerial parts of *Plantago lagopus* were extracted with MeOH at 40 °C and extract was concentrated under pressure in low temperature. After removing lypophilic compounds, it was subjected to polyamide column chromatography to separate phenolic and non-phenolic compounds, and bioactivity of water extract and fractions were investigated. Two phenylethanoid glycosides, acteoside (**PL-1**) and calceorioside (**PL-2**) were isolated from the most active fraction and both compounds showed strong radical scavenging and cytotoxic activity. On the other hand, isolation studies were performed on iridoid fraction of polyamide column to determine iridoid derivatives which were important for chemotaxonomic research of *Plantago* species and two iridoid glucosides, aucubin (**PL-5**) and catalpol (**PL-6**), one non-glucosidic iridoid rehmaglutin D (**PL-4**) and megastigman glucoside, phlomuroside (**PL-3**) were isolated. Structures of isolated compounds were determined by using different spectral methods [UV, IR, 1D NMR, 2D NMR (COSY, HMQC, HMBC), Mass spectra]. At the end of this study, on the one hand lead compounds for antioxidative and anticancer researches were determined and on the other hand contribution for the chemotaxonomic researches on genus *Plantago* have been provided.

Key Words: *Plantago* species, cytotoxic activity, radical scavenging activity, superoxide, nitric oxide, DPPH.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
TABLolar DİZİNİ	xii
ŞEMALAR DİZİNİ	xiv
SPEKTRUMLAR DİZİNİ	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
RESİMLER DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. TEORİK BİLGİLER	3
2.1. Botanik Bilgiler	3
2.1.1. Plantaginaceae Familyası	3
2.1.2. <i>Plantago</i> L. Cinsi	3
2.1.2.1. <i>Plantago lagopus</i> L.	5
2.1.3. Yayılış ve Habitat	5
2.2. <i>Plantago</i> Türleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar	6
2.2.1. Fitokimyasal Çalışmalar	7
2.2.1.1. İridoit Glukozitleri	8
2.2.1.2. Feniletanoit Glikozitleri	15
2.2.1.3. Flavonlar ve Flavon Glikozitleri	19
2.2.1.4. Triterpenler	23
2.2.1.5. Steroidal Bileşikler	24
2.2.1.6. Organik Asitler	26
2.2.1.7. Diğer Bileşikler	29
2.2.2. Biyolojik Aktivite Çalışmaları	31

	Sayfa
3. DENEYSEL KISIM	37
3.1. Fitokimyasal Çalışmalar	37
3.1.1. Gereç ve Yöntem	37
3.1.1.1. Bitkisel Materyal	37
3.1.1.2. Kromatografik Yöntemler	37
3.1.2. Kullanılan Aletler	42
3.1.3. Ekstraksiyon ve İzolasyon Çalışmaları	43
3.1.3.1. <i>Plantago lagopus</i> L. Üzerinde Yürütülen Ekstraksiyon ve İzolasyon Çalışmaları	43
3.2. Aktivite Çalışmaları	47
3.2.1. Serbest Radikal Süpürücü (Antioksidan) Aktivite Tayini	47
3.2.2. Sitotoksik Aktivite (<i>In vitro</i> Antikanser Aktivite) Tayini	50
3.2.3. Total Fenolik Bileşik Miktar Tayini	51
4. BULGULAR	52
4.1. Fitokimyasal Çalışmalara Ait Bulgular	52
4.1.1. İzole Edilen Bileşiklerin Yapı Tayinleri	53
OKUBİN [PL-5]	53
KATALPOL [PL-6]	62
REHMAGLUTİN D [PL-4]	71
FİLOMUROZİT [PL-3]	80
AKTEOZİT (VERBASKOZİT) [PL-1]	89
KALKEORİOZİT (DESRAMNOZİLAKTEOZİT) [PL-2]	98
4.2. Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular	107
4.2.1. Serbest Radikal Süpürücü (Antioksidan) Aktivite Tayini	107
Sonuçları	
4.2.2. Sitotoksik Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular	111
4.3. Total Fenolik Bileşik Miktar Tayini Sonuçları (Folin-Ciocalteu Metodu)	120
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	121
KAYNAKLAR	132
ÖZGEÇMİŞ	144

SİMGELER VE KISALTMALAR

AA	Askorbik asit
Ara	Arabinoz
BHA	3- <i>ters</i> -butil-4-hidroksianizol
CD ₃ OD	Dötero Metanol
CH ₃	Metil
CHCl ₃	Kloroform
CH ₃ OH	Metanol
cm	Santimetre
¹³ C NMR	¹³ C-Nuclear Magnetic Resonance
CO ₂	Karbondioksit
COSY	Correlated Spectroscopy
d	Dublet
dd	Dublet dublet
DEPT	Distortionless Enhancement By Polarization Transfer
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
DMSO	Dimetil sülfoksit
EtOAc	Etil asetat
FAB-MS	Fast Atomic Borbardment Mass Spectroscopy
Fr	Fraksiyon
g	Gram
gd	Geniş dublet
GluA	Glukuronik asit
Glu	Glukoz
HEP-2	Human Epidermoid Carcinoma
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HR ESI-MS	High Resolution Electron Spray Ionization Mass Spectrometry

^1H NMR	^1H -Nuclear Magnetic Resonance
H_2O	Su
H_2SO_4	Sülfürik asit
Hz	Herz
IC_{50}	Half Maximal Inhibitory Concentration
IR	Infra-red
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
J	Kenetlenme Sabiti
KBr	Potasyum Bromür
KK	Kolon Kromatografisi
k.m.	Kâfi miktar
m	Multiplet
mM	Milimolar
MCF-7	Michigan Cancer Foundation - 7
MEM	Minimum Essential Medium
MeOH	Metanol
mg	Miligram
MHz	Megahertz
MTT	3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
ml	Mililitre
μl	Mikrolitre
μg	Mikrogram
Na_2CO_3	Sodyum karbonat
NBT	Nitroblue Tetrazolium
nm	Nanometre
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NO	Nitrik oksit
OBSK	Orta Basıncılı Sıvı Kromatografisi
OCH_3	Metoksil

OH	Hidroksil
PBS	Phosphate Buffered Saline
ppm	Milyonda bir kısım
Ram	Ramnoz
RD	Human Rhabdomyosarcoma
s	Singlet
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SO	Süperoksit
t	Triplet
UV	Ultra-violet
VSK	Vakumlu Sıvı Kromatografisi

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1. <i>Plantago</i> Türlerinde Tespit Edilen İridoit Glukozitleri-I	8
Tablo 2. <i>Plantago</i> Türlerinde Tespit Edilen İridoit Glukozitleri-II	11
Tablo 3. <i>Plantago</i> Türlerinde Tespit Edilen İridoit Glukozitleri-III	12
Tablo 4. <i>Plantago</i> Türlerinde Tespit Edilen İridoit Glukozitleri-IV	13
Tablo 5. <i>Plantago</i> Türlerinde Tespit Edilen Feniletanoit Glikozitleri-I	15
Tablo 6. <i>Plantago</i> Türlerinde Tespit Edilen Feniletanoit Glikozitleri-II	17
Tablo 7. <i>Plantago</i> Türlerinde Tespit Edilen Flavon ve Flavon Glikozitleri	19
Tablo 8. <i>Plantago</i> Türlerinde Tespit Edilen Flavonol ve Flavonol Glikozitleri	21
Tablo 9. <i>Plantago</i> Türlerinde Tespit Edilen Triterpenler	23
Tablo 10. <i>Plantago</i> Türlerinde Tespit Edilen Steroidal Bileşikler	24
Tablo 11. <i>Plantago</i> Türlerinde Tespit Edilen Organik Asitler-I	26
Tablo 12. <i>Plantago</i> Türlerinde Tespit Edilen Organik Asitler-II	27
Tablo 13. Okubin [PL-5] 'in ^{13}C ve ^1H NMR Spektroskopik Değerleri (CD_3OD ; ^{13}C :125 MHz; ^1H : 500 MHz); Önemli HMBC Korelasyonları	56
Tablo 14. Katalpol [PL-6] 'ün ^{13}C ve ^1H NMR Spektroskopik Değerleri (CD_3OD ; ^{13}C :125 MHz; ^1H : 500 MHz); Önemli HMBC Korelasyonları	65
Tablo 15. Rehmaglutin D [PL-4] 'nin ^{13}C ve ^1H NMR Spektroskopik Değerleri CD_3OD ; ^{13}C :125 MHz; ^1H : 500 MHz); Önemli HMBC Korelasyonları	74
Tablo 16. Filomurozit [PL-3] 'in ^{13}C ve ^1H NMR Spektroskopik Değerleri (CD_3OD ; ^{13}C :125 MHz; ^1H : 500 MHz); Önemli HMBC Korelasyonları	83
Tablo 17. Akteozit [PL-1] 'in ^{13}C ve ^1H NMR Spektroskopik değerleri (CD_3OD ; ^{13}C :125 MHz; ^1H : 500 MHz); Önemli HMBC Korelasyonları	92

	Sayfa
Tablo 18. Kalkeoriozit [PL-2] 'in ^{13}C ve ^1H NMR Spektroskopik Değerleri (CD_3OD ; ^{13}C :125 MHz; ^1H : 500 MHz); Önemli HMBC Korelasyonları	101
Tablo 19. <i>P. lagopus</i> Poliamit Kolon Fraksiyonlarının DPPH, NO ve SO Radikali Süpürücü Aktiviteleri	111
Tablo 20. PL-1, PL-2 ve PL-3'ün, DPPH, NO ve SO Radikallerini Süpürücü Aktivitesi	111
Tablo 21. <i>P.lagopus</i> Poliamit Kolon Fraksiyonlarının HEP-2 Hücrelerine Karşı Sitotoksik Aktivitesi	114
Tablo 22. <i>P. lagopus</i> Poliamit Kolon Fraksiyonlarının RD Hücrelerine Karşı Sitotoksik Aktivitesi	114
Tablo 23. Akteozit, Kalkeoriozit ve Standart Antioksidanların DPPH, NO ve SO Radikallerine Karşı Radikal Süpürücü Etkinlikleri	126
Tablo 24. Akteozit ve Kalkeoriozit'in HEP-2, RD ve MCF-7 Hücrelerine Karşı Sitotoksik Aktiviteleri	126

ŞEMALAR DİZİNİ

	Sayfa
Şema 1. <i>P. lagopus</i> L.' nin Toprak Üstü Kısımları Üzerinde Yürütülen İzolasyon Çalışmaları	46

SPEKTRUMLAR DİZİNİ

Spektrum 1.	Okubin [PL-5] 'in ^1H NMR Spektrumu (CD_3OD ; ^1H : 500 MHz)	57
Spektrum 2.	Okubin [PL-5] 'in ^{13}C NMR ve DEPT Spektrumları (CD_3OD ; ^{13}C : 125 MHz)	58
Spektrum 3.	Okubin [PL-5] 'in 2D ^1H , ^1H -Homonükleer Korelasyonlu NMR Spektrumu (COSY)	59
Spektrum 4.	Okubin [PL-5] 'in 2D ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (yakın mesafe) NMR Spektrumu (HMQC)	60
Spektrum 5.	Okubin [PL-5] 'in 2D ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) NMR Spektrumu (HMBC)	61
Spektrum 6.	Katalpol [PL-6] ' ün ^1H NMR Spektrumu (CD_3OD ; ^1H : 500 MHz)	66
Spektrum 7.	Katalpol [PL-6] 'ün ^{13}C NMR ve DEPT Spektrumları (CD_3OD ; ^{13}C : 125 MHz)	67
Spektrum 8.	Katalpol [PL-6] ' ün 2D ^1H , ^1H Homonükleer Korelasyonlu Spektrumu (COSY)	68
Spektrum 9.	Katalpol [PL-6] ' ün 2D ^1H , ^{13}C Heteronükleer Korelasyonlu (yakın mesafe) Spektrumu (HMQC)	69
Spektrum 10.	Katalpol [PL-6] 'ün 2D ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) NMR Spektrumu (HMBC)	70
Spektrum 11.	Rehmaglutin D [PL-4] 'nin ^1H NMR Spektrumu (CD_3OD ; ^1H : 500 MHz)	75
Spektrum 12.	Rehmaglutin D [PL-4] 'nin ^{13}C NMR ve DEPT Spektrumları (CD_3OD ; ^{13}C : 125 MHz)	76

	Sayfa
Spektrum 13. Rehmaglutin D [PL-4] ' nin 2D ^1H , ^1H -Homonükleer Korelasyonlu NMR Spektrumu (COSY)	77
Spektrum 14. Rehmaglutin D [PL-4] 'nin 2D ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (yakın mesafe) NMR Spektrumu (HMQC)	78
Spektrum 15. Rehmaglutin D [PL-4] 'nin 2D ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) NMR Spektrumu (HMBC)	79
Spektrum 16. Filomurozit [PL-3] 'in ^1H NMR Spektrumu (CD_3OD ; ^1H : 500 MHz)	84
Spektrum 17. Filomurozit [PL-3] 'in ^{13}C NMR ve DEPT Spektrumları (CD_3OD ; ^{13}C : 125 MHz)	85
Spektrum 18. Filomurozit [PL-3] 'in 2D ^1H , ^1H -Homonükleer Korelasyonlu NMR Spektrumu (COSY)	86
Spektrum 19. Filomurozit [PL-3] 'in 2D ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (yakın mesafe) NMR Spektrumu (HMQC)	87
Spektrum 20. Filomurozit [PL-3] 'in 2D ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) NMR Spektrumu (HMBC)	88
Spektrum 21. Akteozit [PL-1] 'in ^1H NMR Spektrumu (CD_3OD ; ^1H : 500 MHz)	93
Spektrum 22. Akteozit [PL-1] 'in ^{13}C NMR ve DEPT Spektrumları (CD_3OD ; ^{13}C : 125 MHz)	94
Spektrum 23. Akteozit [PL-1] 'in 2D ^1H , ^1H -Homonükleer Korelasyonlu NMR Spektrumu (COSY)	95
Spektrum 24. Akteozit [PL-1] 'in 2D ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (yakın mesafe) NMR Spektrumu (HMQC)	96
Spektrum 25. Akteozit [PL-1] 'in 2D ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) NMR Spektrumu (HMBC)	97
Spektrum 26. Kalkeoriozit [PL-2] 'in ^1H NMR Spektrumu (CD_3OD ; ^1H : 500 MHz)	102

	Sayfa
Spektrum 27. Kalkeoriozit [PL-2] 'in ^{13}C NMR ve DEPT Spektrumları (CD_3OD ; ^{13}C : 125 MHz)	103
Spektrum 28. Kalkeoriozit [PL-2] 'in 2D ^1H , ^1H -Homonükleer Korelasyonlu NMR Spektrumu (COSY)	104
Spektrum 29. Kalkeoriozit [PL-2] 'in 2D ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (yakın mesafe) NMR Spektrumu (HMQC)	105
Spektrum 30. Kalkeoriozit [PL-2] 'in 2D ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) NMR Spektrumu (HMBC)	106

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	<i>P. lagopus</i> Sulu Ekstresinin DPPH Radikali Süpürücü Aktivitesi	108
Şekil 2.	<i>P. lagopus</i> Sulu Ekstresinin NO Radikali Süpürücü Aktivitesi	109
Şekil 3.	<i>P. lagopus</i> Sulu Ekstresinin SO Radikali Süpürücü Aktivitesi	110
Şekil 4.	<i>P. lagopus</i> Sulu Ekstresinin HEP-2 Hücrelerine Karşı Sitotoksik Aktivitesi	112
Şekil 5.	<i>P. lagopus</i> Sulu Ekstresinin RD Hücrelerine Karşı Sitotoksik Aktivitesi	112
Şekil 6.	PL-1 (Akteozit) ve PL-2 (Kalkeoriozit) Bileşiklerinin HEP-2 Hücrelerine Karşı Sitotoksik Aktivitesi	115
Şekil 7.	PL-1 (Akteozit) ve PL-2 (Kalkeoriozit) Bileşiklerinin RD Hücrelerine Karşı Sitotoksik Aktivitesi	115
Şekil 8.	PL-1 (Akteozit) ve PL-2 (Kalkeoriozit) Bileşiklerinin MCF-7 Hücrelerine Karşı Sitotoksik Aktivitesi	116
Şekil 9.	Gallik Asit Standart Eğrisi ve Doğru Denklemi	120
Şekil 10.	<i>P. lagopus</i> Sulu Ekstresinin ve Standart Antioksidan Bileşiklerin; DPPH, NO ve SO Radikali Süpürücü Aktivitesi	123

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
Resim 1. <i>Plantago lagopus</i> L.	xvii
Resim 2. Akteozit ve Kalkeoriozit Bileşiklerinin HEP-2 Hücrelerine Karşı Sitotoksik Aktivitesi	113
Resim 3. Akteozit ve Kalkeoriozit Bileşiklerinin RD Hücrelerine Karşı Sitotoksik Aktivitesi	117
Resim 4. Akteozit ve Kalkeoriozit Bileşiklerinin MCF-7 Hücrelerine Karşı Sitotoksik Aktivitesi	118
Resim 5. <i>P. lagopus</i> Sulu Ekstresinin HEP-2 ve RD Hücrelerine Karşı Sitotoksik Aktivitesi	119
Resim 6. <i>P. lagopus</i> Sulu Ekstresinin HEP-2 ve RD Hücrelerine Karşı Sitotoksik Aktivitesi	122



Resim 1. *Plantago lagopus* L.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Plantago cinsi (Plantaginaceae) Türkiye’de 2’si endemik olmak üzere 21 tür ile temsil edilmektedir (1). Türkiye’de yaygın olarak bulunan başta *P. major* ve *P. lanceolata* olmak üzere halk arasında sık kullanımı olan *Plantago* türleri; çıban, sivilce, yanık ve yaralarda haricen kullanılırken; hemoroit ve ishale karşı, şeker hastalığında ve idrar arttırıcı olarak da dahilen kullanılmaktadır (2,3). *Plantago psyllium* (karnıyarık otu) Anadolu’da yaygın olarak yetişen bir diğer *Plantago* türüdür ve kurutulmuş olgun tohumlarının dahilen müshil olarak halk arasında kullanıldığı bilinmektedir (3).

Yapılan çalışmalarda *Plantago* türlerinin bazılarının antitümör, antienflamatuvar, antifungal, antibakteriyel, analjezik, antispazmodik, antiviral, analeptik ve hepatoprotektif etkileri olduğu gösterilmiştir (4-10).

Plantago major (sinirli ot, sinir otu, altıparmak otu) başta olmak üzere birçok *Plantago* türü çok eski zamanlardan beri dünya üzerinde halk ilacı olarak kullanılan tıbbi bitkiler arasında yer almaktadır (4,8). *Plantago major* yaprakları yara iyileştirici, ödem giderici ve ateş düşürücü olarak haricen; üriner enfeksiyonlarda ve kanserde dekoksasyon şeklinde; soğuk algınlığı ve gribe karşı ise infüzyon şeklinde kullanılmaktadır (11-13).

Plantago türleri üzerinde daha önce yapılan fitokimyasal araştırmalarda; iridoit glukozitleri, flavonlar ve flavon glikozitleri, feniletanoit glikozitleri, terpenoitler, saponinler ve polisakkaritler izole edilmiştir (14-16).

Bu tez çalışmasında Türkiye’de özellikle Akdeniz ve Ege Bölgelerinde yaygın olarak bulunan ve diğer *Plantago* türlerine göre üzerinde daha az çalışma yapılan *Plantago lagopus* L. bitkisinin etkili bileşiklerinin fraksiyonlama ile elde edilmesi ve familyanın kemotaksonomisi açısından önemli bir grup olan iridoit glukozitlerinin izole edilmesi amaçlanmıştır. Biyoaktivite rehberli çalışma, radikal süpürücü etkinliğin ve sitotoksik aktivitenin araştırılması suretiyle yapılmıştır. Bu amaçla; bitkinin sulu ekstresinin, ön fraksiyonlama aşamasında toplanan fraksiyonların ve izole edilen bileşiklerin; DPPH, süperoksit (SO) ve nitrik oksit (NO) radikallerine karşı süpürücü etkinliği ile HEP-2, RD ve MCF-7 gibi değişik kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktiviteleri araştırılmış ve elde edilen sonuçlar mevcut çalışmalarla karşılaştırılarak yorumlanmıştır.

Hücrelerin kontrolsüzce hızlı bir şekilde çoğalması ve organizmadaki temel işlevlerini gerçekleştirememesi şeklinde ifade edilen kanser hastalığı günümüzde insan sağlığını ciddi bir şekilde tehdit eden hastalıkların başında yer almaktadır. Kansere neden olan birçok faktör arasında ise; sigara, çevre kirliliği, dengesiz beslenme nedeniyle oluşan, ayrıca bağışıklık sistemi ve mitokondrilerdeki enerji üretimi sırasında meydana gelen serbest radikaller; önemli bir yer tutmaktadır (17).

Dolayısıyla; antikanser veya sitotoksik etkili bileşikler ile antioksidan etkiye sahip bileşikler günümüzde klinik olarak çok önemli bir yere sahiptirler. *Plantago* türleri feniletanoit, flavonoit gibi fenolik yapıda bileşikleri fazla oranda içerdiği ve bu yapıdaki bileşiklerin de antioksidan etkilerinin yüksek olduğu bilindiği için tez çalışmamızda serbest radikal süpürücü etkinin araştırılmasına geniş yer verilmiştir. Bununla birlikte; hücre kültürlerinde insan ve hayvan kaynaklı kanser hücre dizileri kullanılarak (HEP-2, RD, MCF-7) MTT yöntemiyle sitotoksik aktivite tayinleri de yapılmıştır. İleri klinik çalışmalar yapılmasına gerek duyulacak kadar aktivite gösteren ekstre veya saf bileşikler, kanser tedavisinde yeni bir umut ışığı olacaklardır.

2. TEORİK BİLGİLER

2.1. Botanik Bilgiler

2.1.1. Plantaginaceae Familyası

Otsu veya kısa boylu çalimsı. Yapraklar basit, dallanmamış, genellikle tabanda rozet, bazen karşılıklı, demetimsi ya da alternat. Çiçekler brakteli ve ana eksene sapsız olarak bağlı durumda, (2-) 4 parçalı, hipogin, çoğunlukla hermafrodit. Sepaller meyvede devamlı kalıcı. Korollada petaller birleşik, zarımsı. Stamenler korolla tüpü üzerine tutunmuş; filamentler korolla boyunu uzun olarak aşmış. Ovaryum 1-4 gözlü; plasentasyon eksensel ya da tabansal. Ovüller 1 veya daha fazla sayıda. Meyve çoğunlukla enine bir daire boyunca yarılan kapsül, ya da açılmayan akendir. Tohumlar endospermalı, embriyo düz (1).

2.1.2. *Plantago* L. Cinsi

Tek yıllık ya da çok yıllık karasal otlar veya kısa boylu çalılar. Yapraklar alternat olup sık rozetler teşkil eder (gövdesiz bitkilerde) ya da karşılıklı (gövdeli bitkilerde), şeritsi ve oval-dairemsi olabilirler. Çiçek durumu sapsız. Çiçekler 4 parçalı, protogin ve polenleri rüzgar yardımıyla taşınabilir (anemofil). Sepaller kiremitsi, omurgalı. Korolla yayık laminalı boru şeklinde veya tekerleksi. Ovaryum 2-4 gözlü, plasentalanma eksensel; ovüller 1 veya daha fazla sayıda. Meyve enine bir daire boyunca yarılan zarımsı kapsüldür (1).

1. Bitkiler gövdeli; yapraklar karşılıklı (Seksiyon *Psyllium*)

2. Bodur çalı

20. *sempervirens*

2. Çok yıllık veya tek yıllık otsu bitkiler

3. Çok yıllık: spikalar 1 - 3 cm

21. *euphratica*

3. Tek yıllık: spikalar 0.5 – 1.5 cm

4. Gövde, dik bir şekilde dallanmış; aşağı doğru kıvrık – kısa tüylü,

ön sepaller arka sepallerden daha uzun; korolla tüpü kırışık değil veya

sadece biraz kırışık

17. squarrosa

4. Gövde, yükselici dallara sahip, dik veya yükselici kısa yumuşak tüylü; ön sepaller arka sepallerle eşit uzunlukta, korolla tüpü kuvvetlice kırışık
5. En alttaki brakteler geniş damarlı ve tabanda oval – dairemsi, şeritsi – subulat; daha üstteki brakteler geniş spatula şeklinde; bitki sert tüylü ve kısa saplı sık salgı tüyleri var

18. scabra

5. Bütün brakteler benzer şekle sahip; bitki çoğunlukla üst kısımlarında kısa saplı sık salgı tüylü

19. afra

1. Bitkiler genellikle gövdesiz; yapraklar tabanda rozet oluşturur ya da alternattır
6. Korolla tüpü tüylü; ovüller 3-5 adet (Seksiyon Coronopus)
7. Gövdenin odunlaşmış kısmı dallanmamış veya çok nadir dallanmış; yapraklar dişli veya pinnat, nadiren bütün; kapsül 3 gözlü

2. coronopus

7. Gövdenin odunlaşmış kısmı dallanmış, bir veya birkaç tane rozet yapısı oluşmuş; yapraklar bütün ya da çok nadir dişli; kapsül 2 gözlü
8. Yapraklar etli, arkadaki sepaller zarımsı
8. Yapraklar etli değil, arkadaki sepaller çok dar kanatlı
9. Yapraklar şeritsi, kalın, düz, sert değil; kenarlar kirpikli değil, gövdenin odunlaşmış kısmı gevşek olarak dallanmış

4. maritima

9. Yapraklar dar bir biçimde şeritsi, yaklaşık 1mm genişliğinde, tepede trigonal, sert, venler arası oluklu, kenarlar kısa setalı – kirpiksi; gövdenin odunlaşmış kısmı yoğun olarak dallanmış

5. holosteum

6. Korolla tüpü tüysüz, ovül 2 veya daha fazla sayıda
10. Öndeki sepaller uzunluklarının yarısından daha fazla oranda birleşik, skapus boyuna oluklu (Seksiyon Arnoglossum)
11. Brakteler ve sepaller yoğun olarak ince uzun yumuşak tüylü

12. lagopus

2.1.2.1. *Plantago lagopus* L.

Plantago lanceolata'ya benzer fakat boyu 5-45 cm kadardır, bazen tek yıllık; yapraklar 2-22(25) x 0.4-4.5 cm boyutlarında, yumuşak kılsı, 4-5 damarlı ve saplı, dişli yaprak hemen hemen hiç yok; skapus 6.5-40 cm, çizgili, yatık tüylü; spikalar silindirik, yumurtamsı ya da küre gibi; alttaki brakteler 5 mm, üsttekiler 2.5-4.5 mm, lanseolat ya da ovat, ana damar belirgin, dar, yeşil ya da kahverengi, üstteki brakteler kısmen yumuşak kılsı ya da uzun tüylü, böylece tüm spika yoğun olarak ince uzun yumuşak tüylü ya da kılsı bir görünüme sahip, öndeki sepaller 2-2.5 mm, birleşik, uzun tüylü, arkadaki sepaller 2-3 mm, ovat, ana damar dar ve uzun tüylü; korolla lobları 2-2.5 mm, ovat, akuminat ya da akut, orta damarın alt kısmı seyrek olarak tüylü; anterler yaklaşık 2 mm, tepe kısmı trigonal, apikulat; kapsül elipsoit, tohumlar kayık şeklinde, açık kahverengi ve parlak (1).

2.1.3. Yayılış ve Habitat

A1 Tekirdağ: Marmara Ereğlisi, Yeniçiftlik'in 8 km batısı, Aellen 544.* **A1** Çanakkale: Lapseki'den Biga'ya giderken 31. km, Demiriz (ISTF 24713).* **A2** İstanbul: Terkos Gölü, 50-60 m, Dudley (D. 34543).* **A2** Bursa: Mudanya, deniz seviyesi, Tutel (ISTF 23628).* **A3** Sakarya: Karasu, deniz seviyesi, Tutel (ISTF 28017).* **A6** Tokat: Yeşilırmak Vadisi Fidanlık Mevkii 29.05.1963 (AUF 1105!). **B1** İzmir: Değirmendere, Gümüldür, deniz seviyesi, Tutel (ISTF 24965).* **B2** İzmir: Ödemiş, Boz Dağı, Regel (EGE 1795).* **B4** Ankara: Elmadağ Ovası, Güzlük Ekin Tarlası, 05.06.1988, (GAZI 11158!). **B5** Kayseri: Erciyes Dağı, A. Heilbronn&Başarman (ISTF 1088).* **C1** Muğla: Datça, 30 m (D. 41217).* **C1** Muğla: Milas-Bodrum Arası Güvercinlik Mevkii, 0-30 m, 18.04.1981 (HUB 3324!). **C2** Aydın: Sultanhisar, Nazilli, 30 m, 03.04.1956 (ANK 25597!). **C2** Denizli: Çardak, Dazkırı-Çardak Karayolu, Devrent Mevkii, 1000m, 07.05.1984 (GAZI 107!). **C2** Denizli: Pamukkale, Alava 5287&Bocquet.* **C2** Muğla: Marmaris, 30 m, 24.03.1956 (ANK 25301!). **C2** Muğla: Köyceğiz, Çayiçi Mahallesi, Taşlı Tarla, 30 m, 18.03.1991 (HUB 8264!). **C2** Muğla: Köyceğiz, Ekincik Köyü, 30 m, 19.03.1991 (HUB 8306!). **C3** Antalya: Düdenbaşı, Antalya'nın 13 km. kuzeyi, 50 m, Kuş & Delice, (ISTF 27570).* **C3 Antalya: Düden Şelalesi'nin doğu tarafında bulunan ağaçlık alan, 16.05.2009 (HUEF 09325!).** **C4** Antalya: Alanya Kalesi, Çetlik 112.*

C4 İçel: Anamur, kıyı şeridi, 18.05.1984 (HUB 6166!). **C4** Konya: Çumra-Bozkır yolu, Akvıran kavşağı civarı nohut tarlası, 29.05.1990 (AEF 11178!). **C5** Adana: Bakır dağı, Akoluk Yaylası, 2000m, 29.06.1952 (ANK 19649!). **C5** İçel: Tarsus Barajı, Deaver T 129.* **C6** Gaziantep: Fevzipařa, 1800m, 15.04.1935 (ANK 2131!). **C6** Hatay: Belen-Kırıkhan yolu, 100 m, Coode&Jones 550.* **C6** Hatay: Topboğazı-Kırıkhan, 200 m, 14.04.1967 (ANK 7929!). **C6** K.Marař: Marař'ın 10 km. güneyi, 01.05.1957 (ANK 27348!). **C9** Mardin: Cizre-Dicle boyunca sınıra doğıru 400 m, 14.04.1983 (HUB 4670!). **C9** Mardin: Cizre, 350 m (D. 42699).*

2000 m yüksekliğe kadar yol kenarlarında, kayalık alanlarda, ayırlıklarda ve kumlu sahillerde yetişebilmektedir*.

* "Flora of Turkey and the East Aegean Islands" Cilt 7'den alınmıştır (1).

2.2. *Plantago* Türleri Üzerinde Yapılan alışmalar

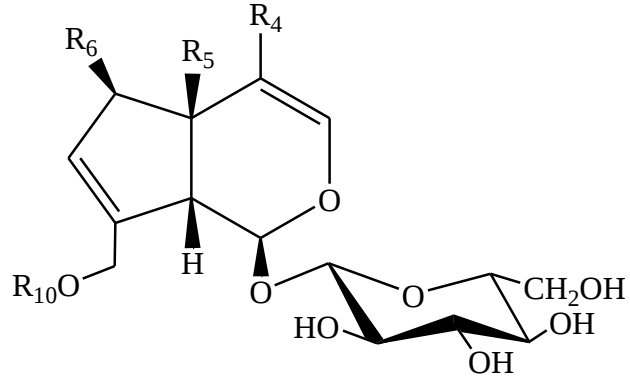
Plantago L. (Plantaginaceae) türleri üzerinde yapılan kemotaksonomik çalışmalara göre; *Plantago* cinsi 5 farklı altcins (subgenus) içermektedir : Subgenus *Plantago*, *Coronopus*, *Littorella*, *Psyllium* ve *Albicans* (14). *Plantago major* başta olmak üzere *Plantago* L. cinsi genel olarak; iridoit glukozitleri, feniletanoit glikozitleri, flavonoitler, terpenoitler, polisakkaritler, organik asitler ve bazı alkaloitleri taşımaktadır (16). Sorbitol, üzerinde çalışma yapılan tüm türlerde bulunan temel karbonhidrat bileşiğidir (14). Okubin ise, *Plantago* L. cinsinin genellikle bütün türlerinde bulunan başlıca iridoit glukozitidir (14). Çalışılan türler arasında sadece *P. nivalis* okubin içermemektedir (15). Yapılan literatür çalışmaları, iridoit glukozitlerinin *Plantago* türleri için kemotaksonomik açıdan önem taşıdığını göstermektedir.

2.2.1. Fitokimyasal Çalışmalar

Bu kısımda, *Plantago* türleri üzerinde yapılmış olan fitokimyasal çalışmalara ait bulgular, çalışılan madde gruplarına göre “**İridoit Glukozitleri, Feniletanoit Glikozitleri, Flavonlar ve Flavon Glikozitleri, Triterpenler, Steroitler, Organik asitler ve Diğer bileşikler** olmak üzere yedi ana başlık altında derlenerek, çoğunlukla tablolar halinde sunulmaya çalışılmıştır.

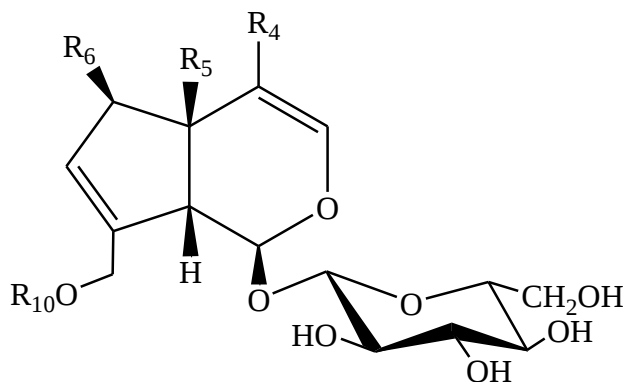
Tablolar oluşturulurken aynı temel yapıya sahip bileşikler için ortak bir iskelet kullanılmış, tablolardaki ana iskeletlere uymayan bileşikler ise kendi özgün yapıları ile akış sırasında metin içerisinde verilmiştir. Bileşiklerin isimlendirilmesinde literatürdeki isimlendirilmeleri esas alınmış ve Türkçe isimler kullanılmaya çalışılmıştır.

2.2.1.1. İridoit Glukozitleri



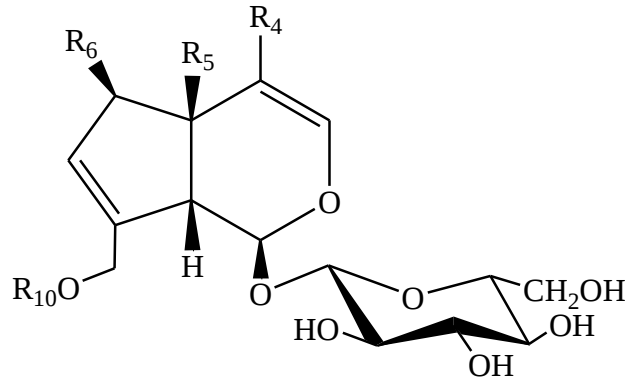
Tablo 1. *Plantago* Türlerinde Tespit Edilen İridoit Glukozitleri - I

Bileşik	R ₄	R ₅	R ₆	R ₁₀	Bitki	Kaynak
Okubin	H	H	OH	H	<i>P. major</i> subsp. <i>major</i> <i>P. palmata</i> <i>P. major</i> subsp. <i>pleiosperma</i> <i>P. rugelii</i> <i>P. maxima</i> <i>P. tenuiflora</i> <i>P. camtschatica</i> <i>P. debilis</i> <i>P. spathulata</i> <i>P. tomentosa</i> <i>P. serraria</i> <i>P. crassifolia</i> <i>P. tandilensis</i> <i>P. aristata</i> <i>P. afra</i> <i>P. amplexicaulis</i> <i>P. arborescens</i> <i>P. atrata</i> <i>P. australis</i> <i>P. bellardi</i> <i>P. coronopus</i> <i>P. cretica</i> <i>P. lundborgii</i> <i>P. maritima</i> <i>P. ovata</i> <i>P. patagonica</i> <i>P. raoulii</i> <i>P. reniformis</i> <i>P. sempervirens</i> <i>P. stauntonii</i> <i>P. subulata</i> <i>P. uniflora</i> <i>P. webbii</i> <i>P. alpina</i> <i>P. altissima</i> <i>P. argentea</i> <i>P. asiatica</i>	(14-16,18,19) (14) (14) (14) (14) (14) (14) (14) (14) (14) (14) (14) (14) (14) (14) (15,19) (15) (15) (15) (15) (15) (15) (15,19) (15) (15) (15) (15) (15) (15) (15) (15) (15) (15,19) (15) (15) (15,20) (15,19,20) (15,19) (15,21-23)



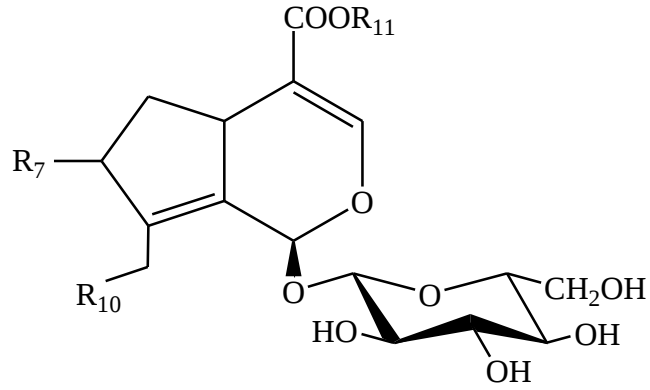
Tablo 1. *Plantago* Türlerinde Tespit Edilen İridoit Glukozitleri (Devam)

[illegible]



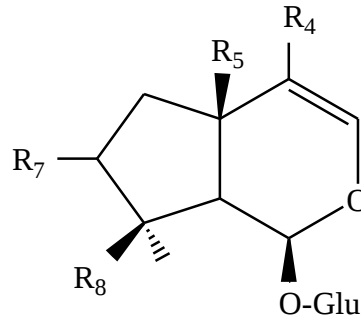
Tablo 1. *Plantago* Türlerinde Tespit Edilen İridoit Glukozitleri (Devam)

Bileşik	R ₄	R ₅	R ₆	R ₁₀	Bitki	Kaynak
Melittozit	H	O-Glu	OH	H	<i>P. major</i> subsp. <i>major</i> <i>P. media</i> <i>P. subulata</i> <i>P. cornuti</i> <i>P. maritima</i> <i>P. alpina</i>	(14,16) (14,19,26,31) (14,15,19) (14) (14,15) (14,15,20)
Monomelittozit	H	OH	OH	H	<i>P. media</i> <i>P. alpina</i> <i>P. subulata</i> <i>P. major</i> <i>P. cornuti</i> <i>P. gentianoides</i>	(14,15,26) (14,15,20) (14,15) (19) (19) (19)
6-Deoksimelittozit	H	O-Glu	H	H	<i>P. subulata</i>	(14,15)
10-Asetilmonomelittozit	H	OH	OH	COCH ₃	<i>P. media</i> <i>P. subulata</i>	(14,15,19,26) (19)
10-O-Asetilgenipozidik asit	COOH	H	H	COCH ₃	<i>P. alpina</i> <i>P. tomentosa</i>	(14,15,20) (14)
Genipozit	COOCH ₃	H	H	H	<i>P. asiatica</i>	(21)
6- α -Hidroksigenipozit	COOCH ₃	H	OH	H	<i>P. lagopus</i>	(25)
Rehmanniozit D	H	O-Glu-Glu	OH	H	<i>P. maritima</i> <i>P. major</i> <i>P. media</i>	(14,15) (15) (15)



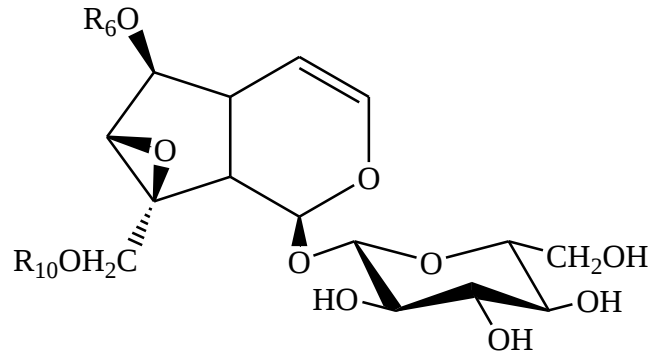
Tablo 2. *Plantago* Türlerinde Tespit Edilen İridoit Glukozitleri – II

Bileşik	R ₇	R ₁₀	R ₁₁	Bitki	Kaynak
Majorosit	OH	H	CH ₃	<i>P. major</i> <i>P. camtschatica</i> <i>P. cornuti</i>	(14-16,18,20,32) (14) (14,15)
10-Hidroksimajorosit	OH	OH	CH ₃	<i>P. major</i> <i>P. cornuti</i> <i>P. rugelii</i>	(14-16) (14,15,18,20) (14)
10-Asetoksimajorosit	OH	OCOCH ₃	CH ₃	<i>P. major</i> <i>P. cornuti</i>	(14-16,18) (14,18)
Arboreskozidik asit	H	OH	H	<i>P. tenuiflora</i> <i>P. stauntonii</i> <i>P. subulata</i> <i>P. maritima</i> <i>P. atrata</i>	(14) (14,15) (14,15) (14,15) (14,15)
Arboreskozit	H	OH	CH ₃	<i>P. palmata</i> <i>P. spathulata</i> <i>P. arborescens</i> <i>P. webbii</i> <i>P. ovata</i>	(14) (14) (14,15) (14,15) (14,15)
Alpinozit	H	OCOCH ₃	H	<i>P. alpina</i> <i>P. debilis</i> <i>P. lundborgii</i>	(14,15,20) (14) (14,15)
Hookeriozit	H	OCOCH ₃	Glu	<i>P. hookeriana</i> <i>P. altissima</i> <i>P. tandilensis</i> <i>P. tomentosa</i>	(15,24) (14,15,20) (14) (14)
Desasetilhookeriozit	H	OH	Glu	<i>P. tenuiflora</i> <i>P. serraria</i> <i>P. crassifolia</i> <i>P. subulata</i> <i>P. altissima</i>	(14) (14) (14) (14,15) (14,15,20)



Tablo 3. *Plantago* Türlerinde Tespit Edilen İridoit Glukozitleri-III

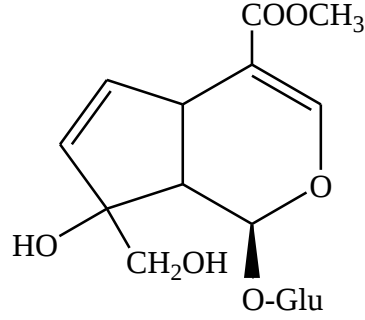
Bileşik	R ₄	R ₅	R ₇	R ₈	Bitki	Kaynak
Mussenozidik asit	COOH	H	H	OH	<i>P. alpina</i> <i>P. maxima</i> <i>P. sarcophylla</i> <i>P. arborescens</i> <i>P. sempervirens</i> <i>P. nivalis</i> <i>P. webbii</i>	(14,15,20) (14) (14) (14,15) (14,15) (14,15) (15)
Mussenozit	COOCH ₃	H	H	OH	<i>P. maxima</i> <i>P. ovata</i>	(14) (33)
Iksorozit	CHO	H	H	OH	<i>P. major subsp. major</i>	(14,15,28)
Karyoptozit	COOCH ₃	H	OH	OH	<i>P. maxima</i> <i>P. sempervirens</i>	(14) (15)
Aurozit	COOCH ₃	OH	OH	H	<i>P. maxima</i> <i>P. sempervirens</i>	(14) (14)
Plantarenalozit	CHO	OH	H	H	<i>P. major subsp. major</i> <i>P. coronopus</i> <i>P. webbii</i> <i>P. sempervirens</i> <i>P. arenaria</i> <i>P. afra</i> <i>P. lagopus</i> <i>P. scabra</i>	(14,15) (14,15) (14,15) (14,15,29) (14,15) (14,15,19) (14,15) (19)
Epiloganik asit	COOH	H	OH	H	<i>P. alpina</i> <i>P. altissima</i> <i>P. hookeriana</i> <i>P. palmata</i> <i>P. rugelii</i> <i>P. tenuiflora</i> <i>P. camtschatica</i> <i>P. debilis</i> <i>P. spathulata</i> <i>P. tomentosa</i> <i>P. crassifolia</i> <i>P. tandilensis</i> <i>P. reniformis</i> <i>P. stauntonii</i> <i>P. arborescens</i> <i>P. webbii</i> <i>P. atrata</i> <i>P. ovata</i> <i>P. lundborgii</i>	(14,15,20) (14,15,20) (15,24) (14) (14) (14) (14) (14) (14) (14) (14) (14,15) (14,15) (14,15) (14,15) (14,15) (14,15) (14,15)
Epiloganin	COOCH ₃	H	OH	H	<i>P. maxima</i>	(14)



Tablo 4. *Plantago* Türlerinde Tespit Edilen İridoit Glukozitleri -IV

Bileşik	R ₆	R ₁₀	Bitki	Kaynak
Katalpol	H	H	<i>P. lagopus</i> <i>P. lanceolata</i> <i>P. asiatica</i> <i>P. tandilensis</i> <i>P. aristata</i> <i>P. uniflora</i> <i>P. atrata</i> <i>P. nivalis</i> <i>P. altissima</i> <i>P. argentea</i> <i>P. amplexicaulis</i> <i>P. ovata</i> <i>P. lundborgii</i> <i>P. patagonica</i> <i>P. cornuti</i> <i>P. hookeriana</i> <i>P. major</i>	(14,15,19,25) (14,15,19,34) (22) (14) (14) (14,15) (14,15) (14,15) (14,15,19,20) (14,15,19) (14,15) (14,15) (14,15) (15) (15) (15,24) (15,16)
Metilkatalpol	CH ₃	H	<i>P. lanceolata</i>	(34)
10-Benzoilkatalpol	H	Benzoil	<i>P. lagopus</i> <i>P. tandilensis</i> <i>P. aristata</i> <i>P. patagonica</i> <i>P. hookeriana</i>	(14,25) (14) (14) (15) (15,24)
10-Sinnoililkatalpol (Globularin)	H	<i>trans</i> -sinnoil	<i>P. lagopus</i> <i>P. tandilensis</i> <i>P. lanceolata</i> <i>P. altissima</i> <i>P. argentea</i>	(14) (14) (14,15) (14) (14)
Globularisisin	H	<i>cis</i> -sinnoil	<i>P. tandilensis</i>	(14)
6-O-Benzoilkatalpol (Veronikozit)	Benzoil	H	<i>P. crassifolia</i>	(35)

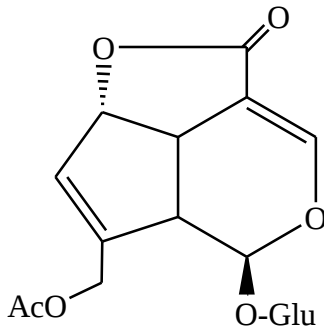
Bu bileşiklere ilave olarak *P. asiatica*'dan gardenozit izole edilmiştir (21). Bununla birlikte, diğer bileşiklere göre farklı yapılar gösteren asperulozit ve gardozitin *Plantago* türlerindeki dağılımı ise; aşağıda gösterildiği gibidir.



Bileşik
Gardenozit

Bitki
P. asiatica

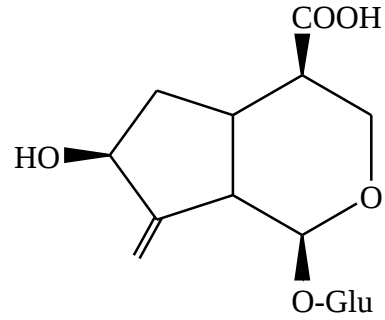
Kaynak
(21)



Bileşik
Asperulozit

Bitki
P. major subsp. *major*
P. lagopus
P. lanceolata
P. altissima
P. cretica
P. bellardii
P. ovata

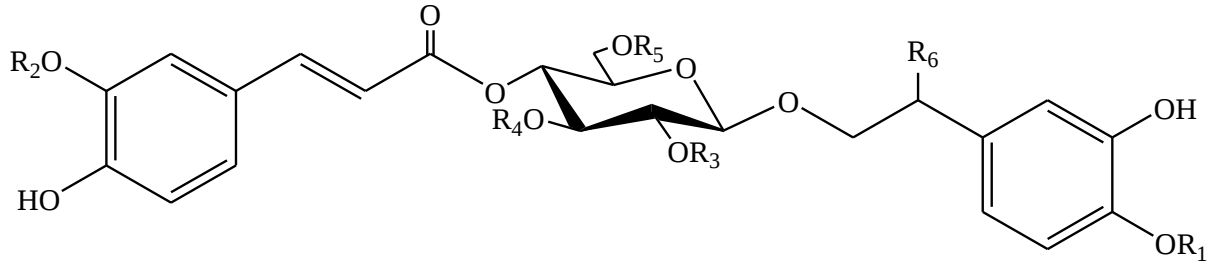
Kaynak
(14-16,28)
(14,15,28)
(14,15)
(14,15)
(14,15)
(14,15)
(14,15)
(14,15)



Bileşik
Gardozit

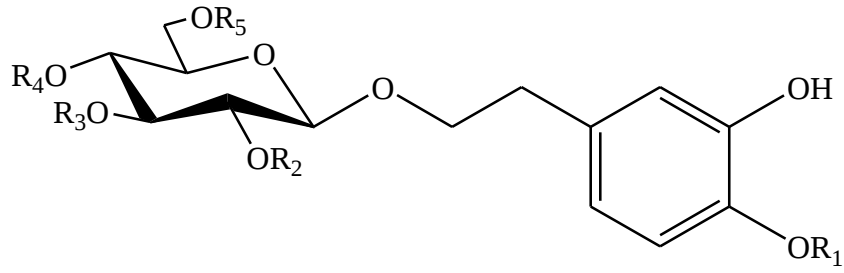
Bitki
P. major
P. alpina
P. altissima
P. palmata
P. maxima
P. tenuiflora
P. camtschatica
P. spathulata
P. serraria
P. tandilensis
P. reniformis
P. arborescens
P. webbii
P. atrata
P. nivalis
P. ovata
P. lundborgii
P. stauntonii

Kaynak
(14-16)
(14,15,20)
(14,15,20)
(14)
(14)
(14)
(14)
(14)
(14)
(14)
(14,15)
(14,15)
(14,15)
(14,15)
(14,15)
(14,15)
(14,15)
(14,15)



Tablo 5. *Plantago* Türlerinde Tespit Edilen Feniletanoit Glikozitleri (Devam)

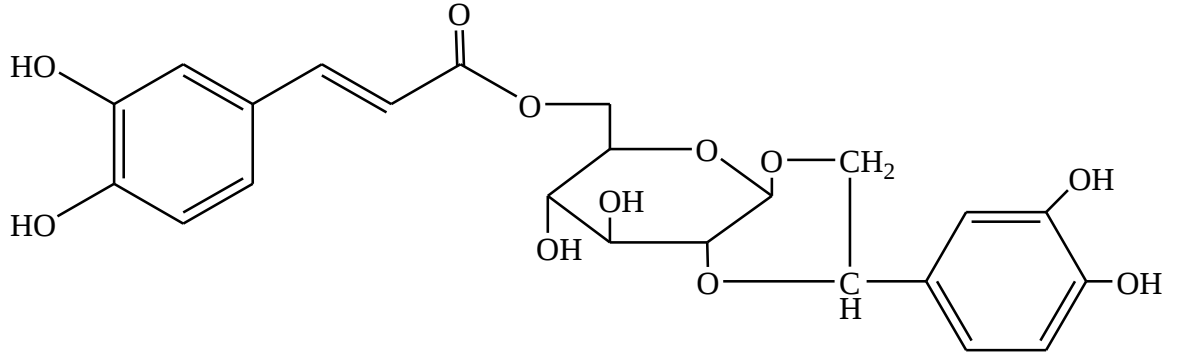
Bileşik	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Bitki	Kaynak
Plantamajozit	H	H	H	Glu	H	H	<i>P. palmata</i> <i>P. tenuiflora</i> <i>P. debilis</i> <i>P. asiatica</i> <i>P. media</i> <i>P. arborescens</i> <i>P. webbii</i> <i>P. sarcophylla</i> <i>P. lagopus</i> <i>P. lanceolata</i> <i>P. ovata</i> <i>P. major</i> subsp. <i>major</i> <i>P. major</i> subsp. <i>pleiosperma</i>	(14) (14) (14) (14,16,31-36,39) (14,16) (14,16) (14,16) (14) (14,43) (14,16) (14,16) (14-16,31) (14)
Plantallozit	H	H	H	Alloz	H	H	<i>P. myosuros</i> <i>P. crassifolia</i>	(14,16,26) (14)
Lavandufoliozit	H	H	H	Ram-Ara	H	H	<i>P. lanceolata</i>	(14,16)
Ekinakozit	H	H	H	Ram	Glu	H	<i>P. maritima</i>	(14,16)
Poliumozit	H	H	H	Ram	Ram	H	<i>P. tandilensis</i> <i>P. crassifolia</i> <i>P. ovata</i>	(14) (42) (33)
Hellikozit	H	H	H	Glu	H	OH	<i>P. major</i> <i>P. asiatica</i>	(36) (35,37)
Desramnozilakteozit (Kalkeoriozit)	H	H	H	H	H	H	<i>P. asiatica</i>	(37)
Krassifoliozit	H	H	Ram	Ram	H	H	<i>P. crassifolia</i>	(41,44)
Lökoseptozit A	H	CH ₃	H	Ram	H	H	<i>P. asiatica</i> <i>P. squarrosa</i>	(37) (44)
Martinozit	CH ₃	CH ₃	H	Ram	H	H	<i>P. asiatica</i> <i>P. depressa</i>	(37) (45)
Krassoit (Verpektozit B)	H	H	Glu	Ram	H	H	<i>P. crassifolia</i>	(35)



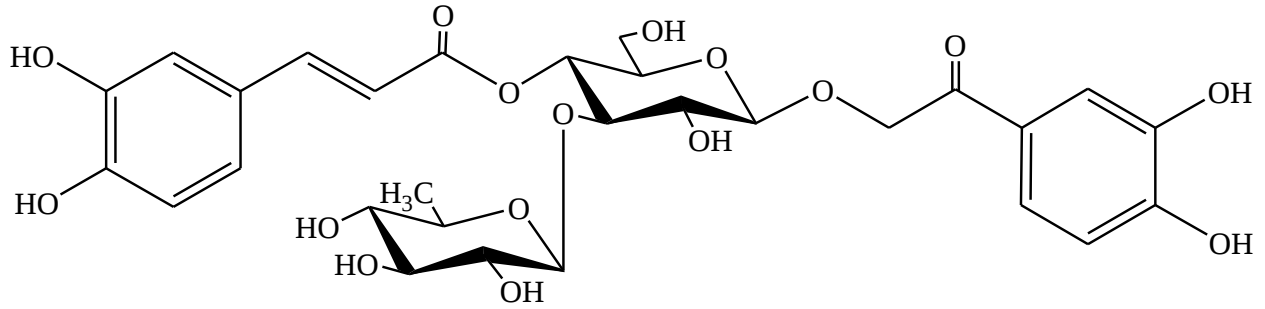
Tablo 6. *Plantago* Türlerinde Tespit Edilen Feniletanoit Glikozitleri - II

Bileşik	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Bitki	Kaynak
İzoakteozit	H	H	Ram	H	Kafeoil	<i>P. asiatica</i> <i>P. altissima</i>	(38-40) (20)
Kalkeoriozit B	H	H	H	H	Kafeoil	<i>P. asiatica</i>	(37)
İzomartinozit	CH ₃	H	Ram	H	Feruloil	<i>P. asiatica</i>	(37)
Plantainozit A	H	H	Kafeoil	H	H	<i>P. asiatica</i>	(37)
Plantainozit B	H	Kafeoil	H	H	H	<i>P. asiatica</i>	(37)
Plantainozit C	H	H	Ram	H	Feruloil	<i>P. asiatica</i>	(37)
Plantainozit D (İzoplantamajosit)	H	H	Glu	H	Kafeoil	<i>P. asiatica</i> <i>P. depressa</i>	(36,39) (30)
Plantainozit E	CH ₃	H	Glu	H	Feruloil	<i>P. asiatica</i>	(37)
Plantainozit F	CH ₃	H	Alloz	H	Feruloil	<i>P. asiatica</i>	(37)

Tablo 5 ve 6’da verilen bileşiklerin yanı sıra, *P. asiatica*’dan farklı bir feniletanoit olan, plantasiozit elde edilmiştir. β konumunda okso grubu taşıyan β -oksoakteozit ise, *P. depressa*’dan izole edilmiştir (43, 46).

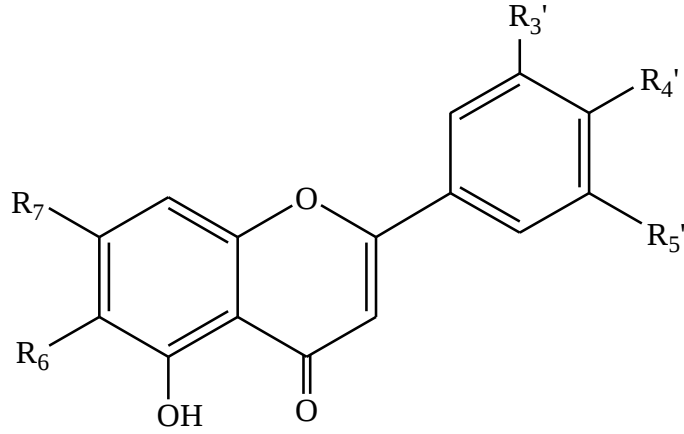


Bileşik	Bitki	Kaynak
Plantasiozit	<i>P. asiatica</i>	(46)



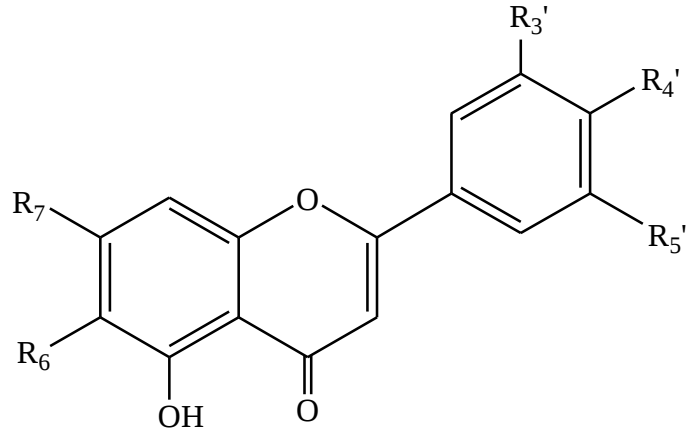
Bileşik	Bitki	Kaynak
β -oksoakteozit	<i>P. depressa</i>	(43)

2.2.1.3. Flavonlar ve Flavon Glikozitleri



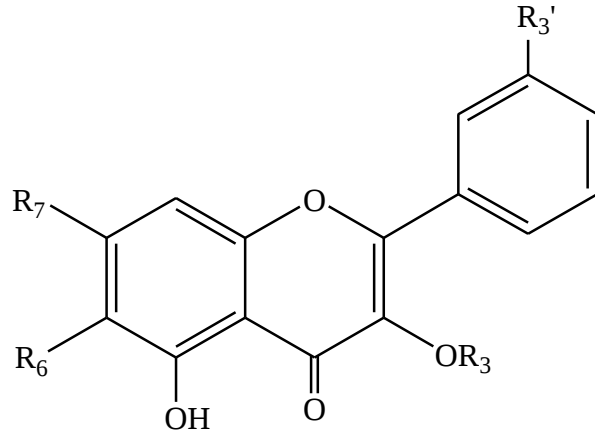
Tablo 7. *Plantago* Türlerinde Tespit Edilen Flavon ve Flavon Glikozitleri

Bileşik	R ₆	R ₇	R _{3'}	R _{4'}	R _{5'}	Bitki	Kaynak
Apigenin	H	OH	H	OH	H	<i>P. hakusanensis</i> <i>P. ovata</i>	(47) (33)
Apigenin 7-O- glukozit	H	O-Glu	H	OH	H	<i>P. major</i>	(15)
Apigenin 7-O- arabinozit	H	O-Ara	H	OH	H	<i>P. lagopus</i>	(48)
Apigenin 7- metileter (Genkvanin)	H	OCH ₃	H	OH	H	<i>P. ovata</i>	(33)
Luteolin	H	OH	OH	OH	H	<i>P. ovata</i>	(33)
6-hidroksiluteolin (Nornepetin)	OH	OH	OH	OH	H	<i>P. lagopus</i> <i>P. major</i>	(48) (48)
6-hidroksiluteolin 7- O- glukozit	OH	O-Glu	OH	OH	H	<i>P. major</i> <i>P. asiatica</i>	(36) (36)
6-hidroksiluteolin 7-O- arabinozit	OH	O-Ara	OH	OH	H	<i>P. lagopus</i>	(48)
Luteolin 7-O-arabinozit	H	O-Ara	OH	OH	H	<i>P. lagopus</i>	(48)
Luteolin 7-O-glukozit	H	O-Glu	OH	OH	H	<i>P. major</i> <i>P. lagopus</i>	(15) (49)
Luteolin 7-diglukozit	H	OGlu-Glu	OH	OH	H	<i>P. major</i>	(15)
Luteolin 7-O-glukuronit	H	O-GluA	OH	OH	H	<i>P. hakusanensis</i>	(47)
Luteolin 6-hidroksi-4'-metoksi 7-O- galaktozit	OH	OGal	OH	OCH ₃	H	<i>P. major</i>	(15)
Luteolin 3'-metileter (Krizoeriyol)	H	OH	OCH ₃	OH	H	<i>P. squarrosa</i>	(44)
Krizoeriyol 7-O-glukozit	H	O-Glu	OCH ₃	OH	H	<i>P. squarrosa</i>	(44)
Baikalein	OH	OH	H	H	H	<i>P. major</i>	(15)



Tablo 7. *Plantago* Türlerinde Tespit Edilen Flavon ve Flavon Glikozitleri (devam)

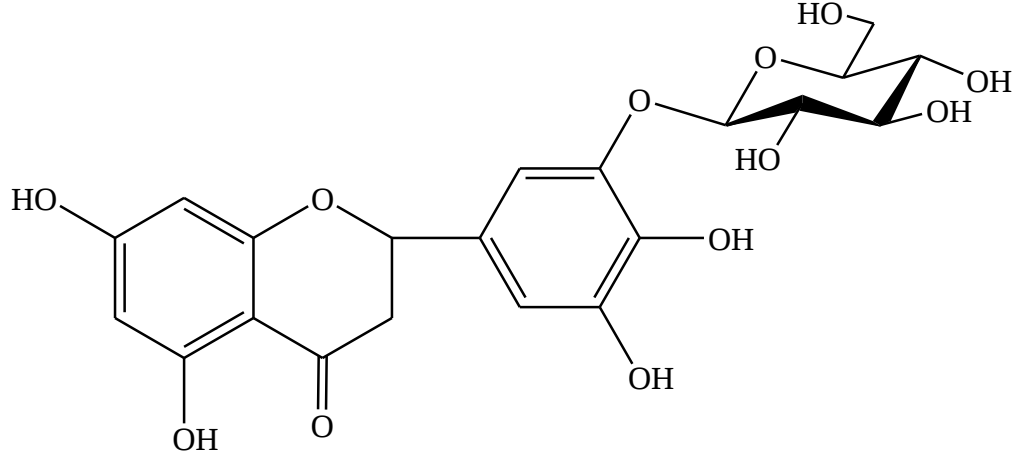
Bileşik	R ₆	R ₇	R _{3'}	R _{4'}	R _{5'}	Bitki	Kaynak
Hispidulin	OCH ₃	OH	H	OH	H	<i>P. major</i> <i>P. hakusanensis</i> <i>P. depressa</i>	(15) (47) (45)
Hispidulin 7-O-glukuronit	OCH ₃	O-GluA	H	OH	H	<i>P. major</i>	(15)
Plantagin	OH	O-Glu	H	OH	H	<i>P. major</i> <i>P. asiatica</i>	(15,35) (35,37)
Homoplantagin	OCH ₃	O-Glu	H	OH	H	<i>P. major</i> <i>P. depressa</i>	(15) (45)
Skutellarein	OH	OH	H	OH	H	<i>P. major</i>	(15)
Nepetin 7-O- glukoze	OCH ₃	O-Glu	OH	OH	H	<i>P. major</i>	(15)
Nepetin 7-O-glukuronit	OCH ₃	O-GluA	OH	OH	H	<i>P. hakusanensis</i>	(47)
Trisin	H	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	<i>P. asiatica</i> <i>P. major</i> <i>P. lanceolata</i>	(47) (47) (47)
Trisin 7-O-glukoze	H	O-Glu	OCH ₃	OH	OCH ₃	<i>P. crassifolia</i>	(35)
Trisin 7-O- glukuronit	H	O-GluA	OCH ₃	OH	OCH ₃	<i>P. asiatica</i> <i>P. major</i> <i>P. lanceolata</i>	(47) (47) (47)



Tablo 8. *Plantago* Türlerinde Tespit Edilen Flavonol ve Flavonol Glikozitleri

Bileşik	R ₃	R ₆	R ₇	R _{3'}	Bitki	Kaynak
Kersetin	H	H	OH	OH	<i>P. asiatica</i> <i>P. major</i> <i>P. lanceolata</i>	(47) (47) (47)
Kersetin 3'-metileter (İzoramnetin)	H	H	OH	OCH ₃	<i>P. lagopus</i>	(50)
Kersetin 3-O-rutinozit	Glu-Ram	H	OH	OH	<i>P. asiatica</i> <i>P. major</i> <i>P. lanceolata</i>	(47) (47) (47)
İzoramnetin 3-O-rutinozit	Glu-Ram	H	OH	OCH ₃	<i>P. asiatica</i> <i>P. major</i> <i>P. lanceolata</i>	(47) (47) (47)
Kemferol 3-O-β-D-glukozit	Glu	H	OH	H	<i>P. amplexicaulis</i>	(51)
Kemferol 3,7-di-O-β-D-glukozit	Glu	H	OGlu	H	<i>P. amplexicaulis</i>	(51)

Bu flavon ve flavonollere ilave olarak, bir flavanon glukoziti olan plantagozit, *P. asiatica*'dan elde edilmiştir.

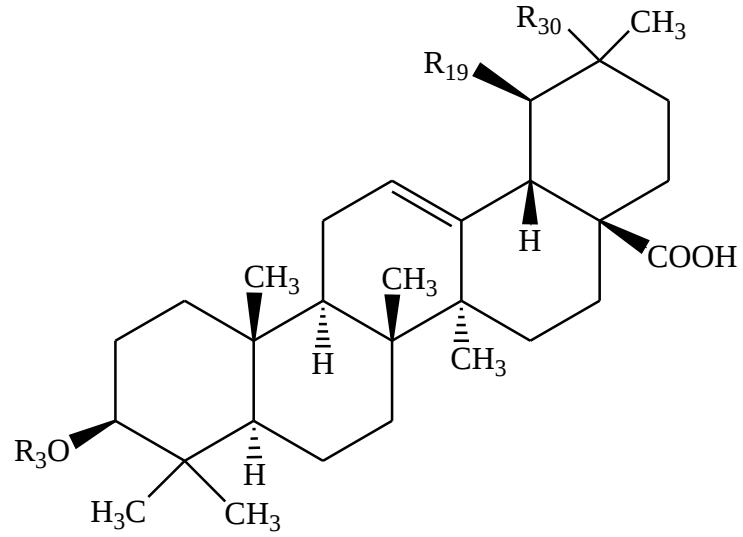


Bileşik
Plantagozit

Bitki
P. asiatica

Kaynak
(52,53)

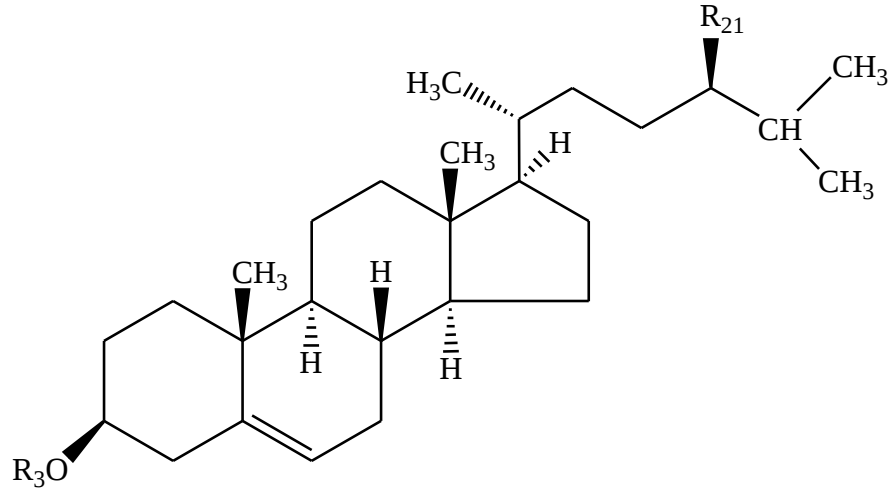
2.2.1.4. Triterpenler



Tablo 9. *Plantago* Türlerinde Tespit Edilen Triterpenler

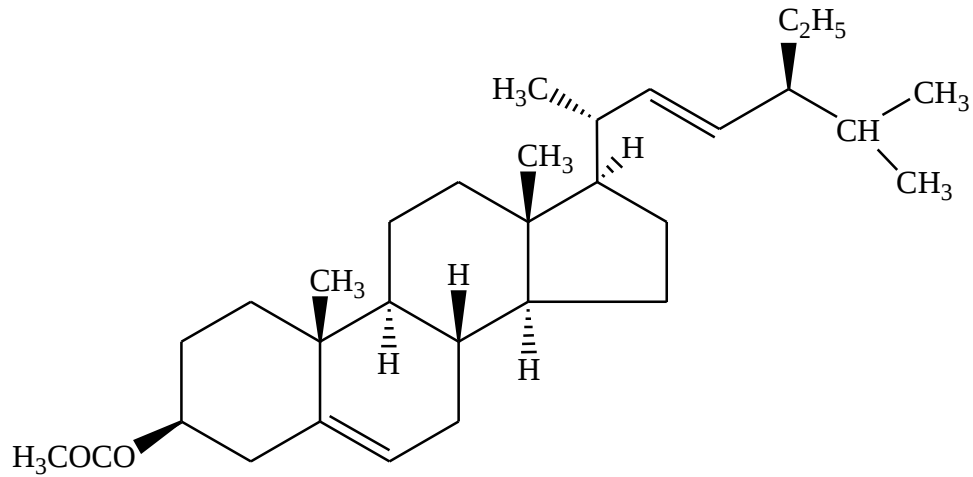
Bileşik	R ₃	R ₁₉	R ₃₀	Bitki	Kaynak
β-Ursolik asit	H	CH ₃	H	<i>P. depressa</i> <i>P. crassifolia</i> <i>P. major</i>	(30) (54) (55)
Oleanolik asit	H	H	CH ₃	<i>P. cynops</i> <i>P. ovata</i> <i>P. lagopus</i> <i>P. major</i> <i>P. crassifolia</i>	(56) (33) (48) (55) (54)
Oleanolik asit 3-O-asetat	COCH ₃	H	CH ₃	<i>P. lagopus</i> <i>P. major</i>	(48) (48)

2.2.1.5. Steroidal Bileşikler



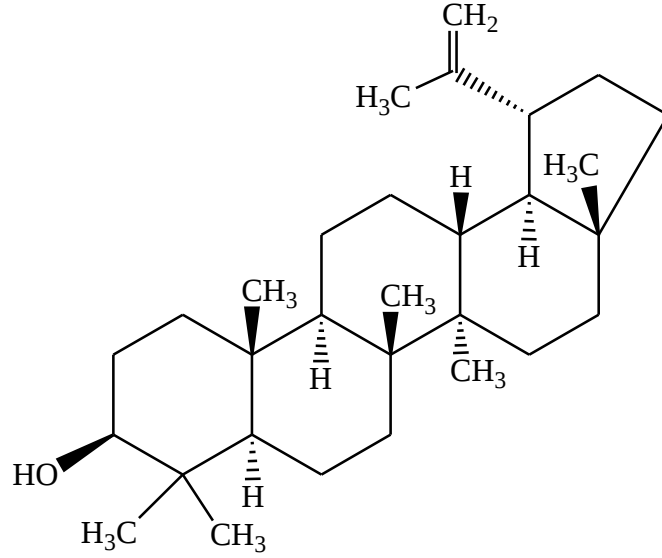
Tablo 10. *Plantago* Türlerinde Tespit Edilen Steroidal Bileşikler

Bileşik	R_3	R_{21}	Bitki	Kaynak
β -sitosterol	H	C_2H_5	<i>P. depressa</i> <i>P. lagopus</i> <i>P. major</i>	(45) (48) (48)
β -sitosterol 3-asetat	$COCH_3$	C_2H_5	<i>P. lagopus</i> <i>P. major</i>	(48) (48)
β -sitosterol -3-O-glukozit (Dakosterin)	Glu	C_2H_5	<i>P. depressa</i> <i>P. ovata</i> <i>P. crassifolia</i>	(45) (33) (54)
Kampesterol	$COCH_3$	CH_3	<i>P. lagopus</i> <i>P. major</i>	(48) (48)



Bileşik	Bitki	Kaynak
Stigmasterol asetat	<i>P. lagopus</i> <i>P. major</i>	(48) (48)

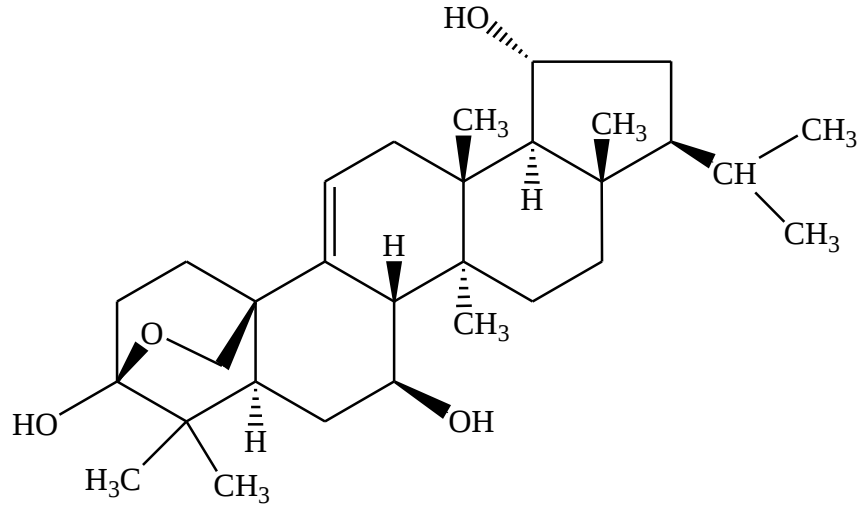
P. crassifolia'dan 2 farklı triterpen izole edilerek yapıları lupeol ve plantakrassin olarak belirlenmiştir .



Bileşik
Lupeol

Bitki
P. crassifolia

Kaynak
(54)



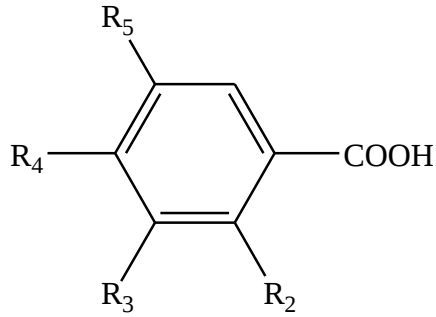
Bileşik
Plantakrassin

Bitki
P. crassifolia

Kaynak
(54)

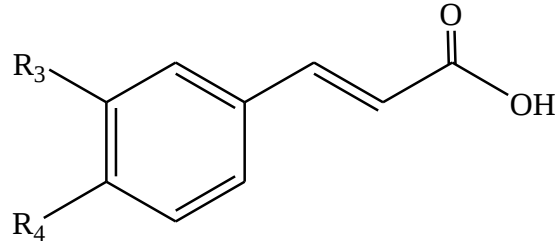
2.2.1.6. Organik Asitler

İridoitler, feniletanoitler, flavonlar ve steroidal bileşiklerin yanı sıra başta *P. major* olmak üzere *Plantago* türlerinden çok sayıda organik asit yapısında bileşik elde edilmiştir.



Tablo 11. *Plantago* Türlerinde Tespit Edilen Organik Asitler - I

Bileşik	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Bitki	Kaynak
Benzoik asit	H	H	H	H	<i>P. major</i>	(16)
p-hidroksibenzoik asit	H	H	OH	H	<i>P. major</i>	(16)
Vanilik asit	H	OCH ₃	OH	H	<i>P. major</i>	(16)
Salisilik asit	OH	H	H	H	<i>P. major</i>	(16)
Gentisik asit	OH	H	H	OH	<i>P. major</i>	(16)
Siringik asit	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	<i>P. major</i>	(16)

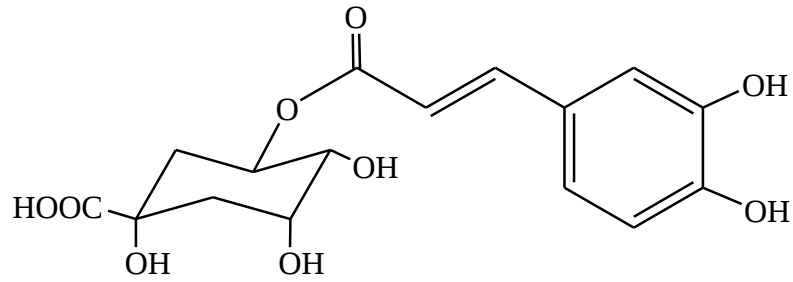


Tablo 12. *Plantago* Türlerinde Tespit Edilen Organik Asitler - II

Bileşik	R ₃	R ₄	Bitki	Kaynak
Kafeik asit	OH	OH	<i>P. major</i>	(16)
Sinamik asit	H	H	<i>P. major</i>	(16)
p-kumarik asit	H	OH	<i>P. major</i>	(16)
Ferulik asit	OCH ₃	OH	<i>P. major</i>	(16)

Tablo 11 ve 12'deki organik asitlere ilave olarak; klorojenik asit, rozmarinik asit ve rozolik asit gibi bileşikler farklı *Plantago* türlerinden izole edilmişlerdir.

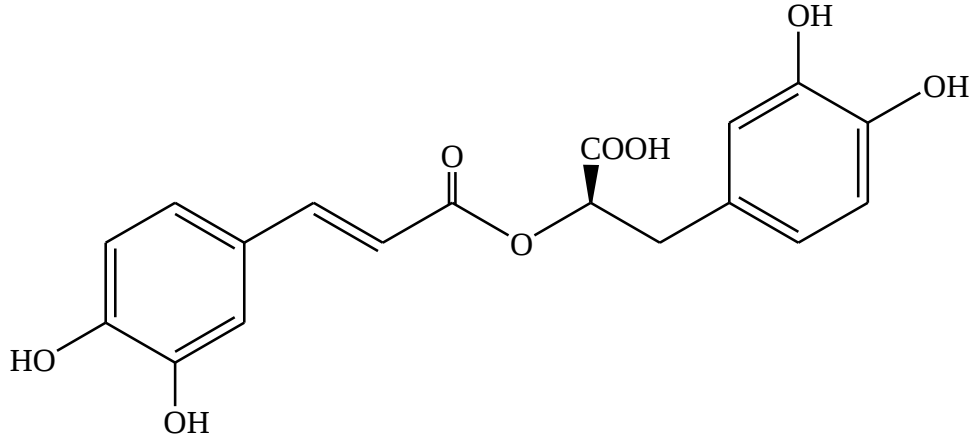
Yapıları ve elde edildikleri bitkiler aşağıda verilmiştir.



Bileşik
Klorojenik asit

Bitki
P. lagopus
P. major
P. cretica
P. bellardii

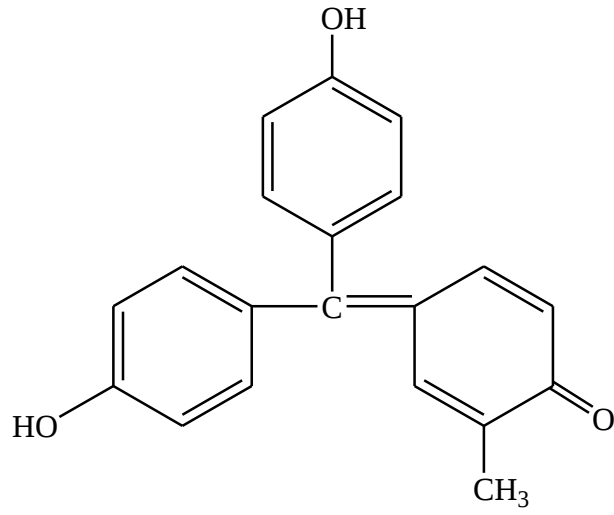
Kaynak
(14)
(16)
(14)(15)
(14)(15)



Bileşik
Rozmarinik asit

Bitki
P. lagopus

Kaynak
(49)

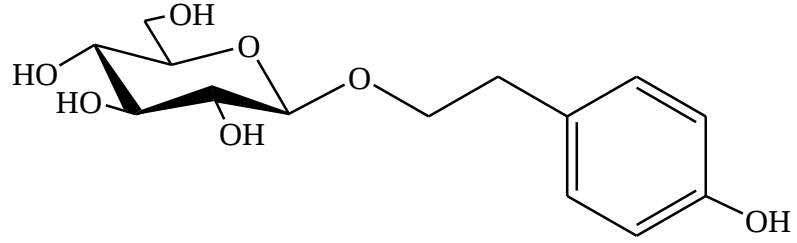


Bileşik
Rozolik asit

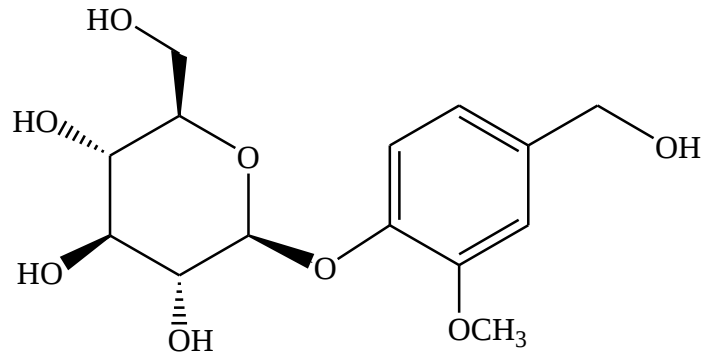
Bitki
P.asiatica

Kaynak
(57)

2.2.1.7. Diğer Bileşikler

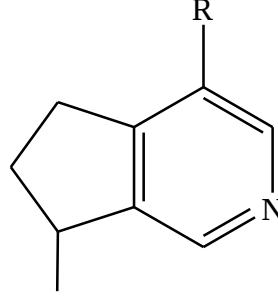


Bileşik	Bitki	Kaynak
Salidrozin	<i>P. maxima</i>	(14)
	<i>P. tandilensis</i>	(14)
	<i>P. australis</i>	(14)(15)
	<i>P. coronopus</i>	(14)(15)



Bileşik	Bitki	Kaynak
Vanillozin	<i>P. crassifolia</i>	(35)

P. major bitkisinden alkaloit yapısında 2 bileşik elde edilmiştir :



Bileşik	R	Bitki	Kaynak
İndikain	CHO	<i>P. major</i>	(16)
Plantagonin	COOH	<i>P. major</i>	(16)

2.2.2. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Plantago Türlerinin Kullanılışları ve Biyolojik Etkileri

Plantago cinsi, 265 tür ile dünya üzerinde yaygın bir dağılışı gösteren ve özellikle ılıman iklime sahip bölgelerde bulunan bir cinstir. *Plantago* cinsi içermiş olduğu kimyasal bileşiklerin (polisakkaritler, flavonoidler, lipitler, iridoit glikozitleri, terpenoidler, steroller) çeşitliliği nedeniyle halk arasında yaygın kullanımı olan bitkileri taşımaktadır (4). Bu bitkilerden en iyi bilineni *Plantago major* bitkisidir ve yüzyıllardır tedavi amacıyla kullanılmaktadır (8). *P. major* türünün; antiviral, antienflamatuvar, antitümör, analjezik, antihelmentik, antihistaminik ve antiülser kullanımları olduğu bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada, *P. major*'un antitümör aktivitesi; meme kanser hücresi olan Ehrlich ascites tümörü taşıyan farelerde *in vivo* olarak araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, *P. major* ekstresi verilen farelerde tümör hücrelerinin gelişiminin durduğu gözlemlenmiştir. Bu etkiden, başta baicalein ve luteolin 7-O-glukozit olmak üzere genel olarak flavonoidlerin topoizomera I ve II bağlantılı "DNA cleavage kompleks" yapısı oluşturmalarının sorumlu olduğu düşünülmektedir (6,8).

Plantago türlerinin farklı ülkelerde kanser tedavisindeki kullanımına yönelik NAPRALERT veritabanında çok sayıda bilgi bulunmaktadır. Bu amaçla 7 farklı *Plantago* türü renal adenokarsinoma (TK-10) ve melanoma (UACC-62) hücrelerine karşı sitotoksik aktiviteleri yönünden araştırılmıştır. Çalışmanın sonunda TK-10 hücrelerine karşı daha az etki gözlenirken UACC-62 melanoma hücrelerine karşı kuvvetli bir sitotoksik aktivite gözlenmiştir. Bu da ekstrelerinin selektivitesi açısından önemlidir (6).

Plantago türlerinin halk arasında yaygın kullanımının nedenlerinden birisi de antioksidan etki göstermeleridir. *P. bellardii*'nin metanol ekstresinin antioksidan özelliği; 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) süpürücü etkisi ve dana beyin ekstraktından hazırlanan lipozomların lipit peroksidasyonunu inhibe edici etkisinin incelenmesi suretiyle araştırılmış ve kuvvetli aktivite bulunmuştur. Antioksidan etkinin, rutin ve verbaskozit gibi fenolik bileşiklerden kaynaklandığı, okubin ve genipozit gibi iridoit glikozitlerinin etkisinin olmadığı belirlenmiştir (58).

P. major' un etanol ekstresi süperoksit radikaline karşı radikal süpürücü etki göstermiş (IC_{50} 1.21 mg/ml) ve bu etki konsantrasyona bağımlı olarak gerçekleşmiştir. *P. major* ekstresi aynı zamanda yüksek polifenolik bileşik içeriği nedeniyle lipid peroksidasyonunu inhibe edici etki de göstermiştir (IC_{50} 3.4 mg/ml) (59).

P. lanceolata' dan izole edilen nötral bir polisakkarit olan ramnoarabinogalakton, soya lesitin lipozomlarının OH radikalleri ile peroksidasyonunu inhibe etmiştir. Aynı bitkiden izole edilen fruktofuranan ise herhangi bir etki göstermemiştir (60).

P. major bitkisinin ultrasonik yöntem ve maserasyon ile hazırlanan iki farklı ekstresinin total fenolik bileşik içeriklerinin farklı olduğu, ultrasonik yöntem ile hazırlama esnasında bazı biyoaktif bileşiklerin parçalanması veya oksidasyonu söz konusu olduğu için bu yöntemle hazırlanan ekstrenin total fenolik madde içeriğinin daha az olduğu bulunmuştur; fakat her iki ekstrenin antioksidan aktiviteleri arasında belirgin bir fark tespit edilememiştir. Benzer şekilde bu iki farklı ekstrenin antimikrobiyal aktiviteleri araştırıldığında, her iki ekstre arasında etki açısından bir fark görülmezken, her iki ekstrenin de mayalara karşı Gram (+) ve Gram (-) bakterilerden daha fazla etki gösterdiği bulunmuştur (4).

P. major' un antioksidan aktivitesi peroksinitrit ve ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) radikallerine karşı da incelenmiştir (61). *P. major* ABTS radikaline karşı kuvvetli antioksidan aktivite göstermesine rağmen, peroksinitrite karşı yüksek aktivite gösterememiştir (61).

P. major' un yaprak ve tohum ekstrelerinin antinosiseptif etkisi farelerde asetik asit ile indüklenen kıvrınma ve tail-flick (kuyruk çekme) metotları ile incelenmiştir. Tohumların ve yaprakların metanol ekstresinin 400 mg/kg dozda her iki metot ile de antinosiseptif etki gösterdiği bulunmuştur. Bu etkinin doymamış steroller, triterpenoitler ve flavonoitler tarafından gerçekleştirildiği düşünülmektedir (10). Bitkinin yaprak ekstresinin vazelin ile hazırlanan preparatlarının aynı zamanda *in vivo* yara iyileştirici etki de gösterdiği bulunmuştur (62); ancak bitkinin hem halk arasında yara iyi edici ve analjezik kullanımlarına hem de yukarıda bahsedilen antinosiseptif ve yara iyi edici araştırmaların yanında, 36 yaşında bir vakada, *P. major* yapraklarının akut irritan kontakt dermatite neden olduğu bildirilmiştir (63).

Yapılan bir antioksidan aktivite çalışmasında; *P. afra*, *P. coronopus*, *P. lagopus*, *P. lanceolata* ve *P. serraria*'nın DPPH radikali süpürücü aktivitesi ve dana beyin lipozomlarının lipit peroksidasyonunu inhibe edici aktiviteleri araştırılmıştır. Çalışma sonunda, *P. serraria* DPPH radikale karşı en güçlü süpürücü aktiviteyi gösterirken; lipit peroksidasyonu deneyinde *P. serraria* ve *P. lanceolata* metanol ekstreleri en fazla inhibisyon yapan ekstreler olmuşlardır (64).

Çeşitli *Plantago* türlerinden izole edilen flavonoidlerin; lipopolisakkarit ile aktive edilmiş RAW 264.7 murin makrofaj hücrelerinde siklooksijenaz 2 (COX-2) ve nitrik oksit sentaz (iNOS) enzimi inhibe edici aktiviteleri incelenmiştir. Apigenin, genistein ve kemferol COX-2'nin transkripsiyonal aktivasyonunu inhibe ederken, apigenin ve kemferol iNOS enziminin transkripsiyonal aktivasyonunu inhibe etmiştir. Dolayısıyla; apigenin ve benzer flavonoidlerin COX-2 ve iNOS üzerindeki etkileri kanser ve enflamasyonun önlenmesinde önemli rol oynayabilmektedir (65).

P. major kloroform ekstresinden biyoaktivite rehberli olarak izole edilen linoleik asit ve α -linoleik asitin, COX-2 ve COX-1 üzerine etkileri üzerinden antienflamatuar aktiviteleri incelenmiş ve selektif COX-2 inhibisyonu yaptıkları belirlenmiştir (66). Diğer taraftan yine başka bir çalışmada; *P. major* ve *P. lanceolata* metanol ekstrelerinin ise COX-1 ve 12-LOX (12-lipoksijenaz) inhibisyonu yapmak suretiyle antienflamatuar aktivite gösterdikleri bulunmuştur (67).

P. lanceolata etanol ekstresinin ve izole edilen bileşenlerin kobay ileum ve trakesinde antispazmodik etkisi incelenmiştir. Ekstrenin ileumda asetilkolin, histamin, potasyum ve baryum iyonlarının neden olduğu kontraksiyonları inhibe ederek antispazmodik aktivite gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca baryum ile indüklenen trake kontraksiyonları da inhibe edilmiştir. İzole edilen bileşiklerden luteolin, akteozit, plantamajozit, katalpol perasetat, izoakteozit, lavandulifoliozit ve okubin bileşikleri de ince bağırsak üzerinde antispazmodik etki gösterirken; katalpol, luteolin-3',7-diglukuronit ve β -hidroksiakteozit herhangi bir aktivite göstermemiştir (9).

2009 yılında Türel ve arkadaşlarının, karbontetraklorür (CCl₄) tarafından indüklenmiş karaciğer hasarı meydana getirilen deney hayvanları üzerinde yaptıkları çalışmalarda; *P. major* metanol ekstresi (25 mg/kg), serum alanin aminotransferaz

(ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) düzeylerinde belirgin derecede azalma sağlayarak hepatoprotektif etki göstermiştir ve histopatolojik incelemeler de bu sonucu desteklemiştir (7). Diğer taraftan başka bir çalışmada; *P. laciniata*'nın yine CCl₄ ile indüklenen karaciğer hasarında koruyucu etkinliği bulunamamıştır (68).

P. major etanol ekstresi; *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *L. innocua* ve *L. murrayi* üzerinde antilisterial aktivite göstermiştir. Sonuçlar Bauer-Kirby disk difüzyon yöntemine göre değerlendirilmiş ve ekstrenin en fazla aktiviteyi (15 mm inhibisyon zonu) *L. innocua*'ya karşı gösterdiği belirlenmiştir (69).

P. lanceolata'nın antihelmentik aktivitesi; inek ve koyunların midelerinde bulunan *Ostertagia ostertagi* parazitinine karşı araştırılmış ve pozitif sonuç elde edilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda antihelmentik etkinin okubin aglikonundan veya okubinin glukozitinden kaynaklanmadığı, okubin haricindeki başka bir maddenin helmintlere karşı aktivite gösterdiği belirlenmiştir (70).

P. major bitkisinin *Helicobacter pylori* bakterisine karşı aktivitesi incelenmiş ve sonuçlar disk difüzyon yöntemine göre değerlendirilmiştir. Sonuçlara göre *P. major*'de belirgin bir aktivite gözlenememiştir (71).

Plantago türlerinden elde edilen iridoit yapısındaki bileşiklerin analjezik, sedatif ve bakterisit etkilerinin incelendiği çalışma sonucunda; iridoitleri içeren alkol ekstresinin intraperitoneal uygulandığı farelerde; asetik asit ile indüklenen kıvrınma sayısı 30 ve 60. dakikalarda anlamlı olarak azalmış, etki uygulamadan 30 dk. sonra hızla ortaya çıkmıştır. Ayrıca iridoit ekstresinin sedatif etkisi lökomotor aktivitede 30. ve 60. dakikalardaki azalma ile belirlenmiştir. Bu etki ekstrenin okubin ve katalpol içeriğine bağlanmaktadır. Bunun yanında iridoit ekstresi; *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. ve *Staphylococcus aureus* bakterilerine karşı belirgin bakterisit etki göstermiştir (72). *Plantago* türlerinden hazırlanan polisakkarit ekstresinin de analjezik, sedatif ve bakterisit etkileri incelenmiştir. Polisakkarit ekstresi (D-ksiloz, L-arabinoz, ramnoz, D-galakturonik asit); uygulamadan 30 dk. sonra sedatif etki göstermiş; fakat bu etki 60 dk. sonra kaybolmuştur; analjezik etki ise kullanılan doza bağımlı olarak artmıştır. Polisakkarit ekstresi *Escherichia coli*'ye karşı sülfonamid ve sefaklor benzeri etki göstermiştir (73).

P. ovata'nın tohum kabukları ile tavşanlar üzerinde yapılan *in vivo* bir çalışmada; bitkinin tohum kabuklarının, levodopa ve karbidopa gibi bileşiklerin farmakokinetiğini olumlu yönde değiştirdiği saptanmıştır. Buna göre; levodopa bileşiğinin absorpsiyonu ve plazma yarılanma ömrü artarken, vücuttan elimine edilme hızı azalır. Dolayısıyla; parkinson hastalarında levodopa ile birlikte *P. ovata* tohum kabuklarının kullanılması ilacın etkisini pozitif yönde değiştirebilmektedir (74).

P. ovata; sigara, beslenme, kabızlık ve fiziksel hareket gibi faktörlerin kontrol altına alındığı durumlarda kolon kanserine karşı koruyucu etki göstermektedir. Bu koruyucu etkinin, laksatif etki göstererek bağırsak hareketlerini artırmasına bağlı olduğu düşünülmektedir (75). Kardiyovasküler hastalığı olan 28 erkek hasta üzerinde yapılan bir klinik çalışmada *P. ovata* tohum kabuklarının besin desteği olarak kullanıldığı durumda, HDL kolesterol düzeyini artırdığı, safra asitlerinin enterohepatik dolaşımını engelleyerek LDL kolesterol düzeyinin düşürülmesine yardımcı olduğu, kolesterol ve lipoprotein metabolizması üzerinde etkiyerek hipokolesterolemik aktivite gösterdiği bulunmuştur. Dolayısıyla; *P. ovata*'nın kardiyovasküler hastalıklara karşı koruma sağlayabileceği düşünülmektedir (76,77).

P. asiatica tohumlarının, memeli bağışıklık sisteminin önemli bir elemanı olan dendritik hücrelerin gelişimini hızlandırıcı etki gösterdiği bulunmuştur. *P. asiatica* tohum ekstresi ile muamele edilen dendritik hücrelerde MHC sınıf II moleküllerin ve CD80 ve CD86 gibi major stimulatör moleküllerin yüksek seviyelerde olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde *P. asiatica* tohumlarından izole edilen akteozit, izoakteozit ve polisakkaritler de dendritik hücrelerde bu molekülleri eksprese etmiştir. Ayrıca T hücrelerinin uyarılmasını da stimüle ederek bağışıklık sistemini güçlendirici etki gösterdikleri bulunmuştur (78,79).

Immünomodülatör aktivitenin araştırıldığı bir diğer çalışmada *P. palmata* yapraklarının farklı şekillerde hazırlanan sulu ekstresi de, interferon gama (IFN- γ) tarafından aktive edilmiş fare makrofajlarında; nitrik oksit (NO), tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) ve interleukin-10 (IL-10) sentezini arttırarak immünomodülatör etki göstermiştir (80).

P. psyllium kan glukoz seviyesini düşüren önemli bir polisakkarit kaynağıdır. *P. psyllium* müsilajının modifiye edilmesiyle hazırlanan ve insülin içeren hidrojel formülasyonda, insülinin hidrojelden vücut ortamına difüze olması ve absorpsiyonu daha hızlı ve verimli bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Böylece; *P. psyllium*'un hem kendisi kan glukoz düzeyini düşürücü etki göstererek hem de insülinin biyoyararlanımını arttırarak diyabet tedavisine yardımcı olduğu bulunmuştur (81).

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Fitokimyasal Çalışmalar

3.1.1. Gereç ve Yöntem

3.1.1.1. Bitkisel Materyal

Plantago lagopus L. bitkisi, 16.05.2009 tarihinde Antalya Düden şelalesinin doğu tarafında bulunan ağaçlık alandan toplanmıştır. Bitkinin tür tayini, Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Zeki Aytaç tarafından yapılmıştır. Toplanan bitkisel materyale ait herbaryum örneği, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'nda saklanmaktadır (HUEF 09325).

Bu tez kapsamında yapılan fitokimyasal çalışmalarda, bitkinin açık havada ve gölgede kurutulmuş toprak üstü kısımları kullanılmıştır.

3.1.1.2. Kromatografik Yöntemler

Çalışmalarımızda, hazırlanan ekstrelerin ön fraksiyonlanması ve bu fraksiyonlarda bulunan maddelerin ayırım ve saflaştırılması amacıyla poliamit, normal faz silika jel, ters faz silikajel ve sephadex gibi, değişik dolgu materyallerinin kullanıldığı kolon kromatografisi yöntemlerinden yararlanılmıştır. Ön fraksiyonlama işlemlerinde 50-100 ml olarak toplanan fraksiyonlar, saflaştırma kademesindeki işlemlerde 5-20 ml' ye düşürülmüştür. Fraksiyonların izlenmesinde ise; farklı solvan sistemlerinde ince tabaka kromatografisi (İTK) kullanılmıştır.

1. Poliamit Kolon Kromatografisi (Poliamit KK)

Çalışmalarımız sırasında ekstrelerin ön fraksiyonlanması amacıyla poliamit kolon kromatografisi kullanılmıştır.

Dolgu Materyali : Poliamit (Polyamide 6, Fluka, 50-160 μm)
Solvan Sistemleri : $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MeOH}$

Kolonun Hazırlanması : 50 - 100 g poliamit yeterli miktarda distile su ile süspansiyon halinde edilmiş ve manyetik karıştırıcıda 1 saat karıştırılarak şişmesi sağlanmıştır. Süspansiyon halindeki karışım, alt ucuna pamuk yerleştirilmiş cam kolona aktarılmıştır. Kolondan yeterli miktarda distile su geçirilerek dolgu materyalinin iyice yerleşmesi sağlanmıştır.

Numune Tatbiki : Numune uygun miktarda distile su içinde çözülmüş ve bir pipet yardımıyla adsorban üzerine aktarılmıştır. Kolonun musluğu açılarak çözeltinin tamamının adsorbana geçmesi sağlanmıştır. Adsorban yüzeyine pamuk yerleştirilmiş ve distile su ile fraksiyonlama başlatılmıştır.

2. Silika jel Kolon Kromatografisi (Silika jel KK)

Poliamit kolondan alınan fraksiyonların daha ileri ayrımında ve taşıdıkları maddelerin saflaştırılmasında normal faz silika jel kolon kromatografisi kullanılmıştır.

Dolgu Materyali : Silika jel (Kieselgel 60, 70-230 mesh, 0.063-0.2 mm, Merck 7734)

Solvan Sistemleri : $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (100:0, 97.5:12.5, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 70:30, 75:25, 60:40, 50:50)

Kolonun Hazırlanması : Yeterli miktarda silika jel, elüsyona başlanacak solvan sistemi ile süspansiyon haline getirilmiş ve bu karışım, alt ucuna pamuk yerleştirilmiş olan cam kolona aktarılmıştır. Kolondan yeterli miktarda solvan sistemi geçirilerek, dolgu materyalinin yerleşmesi sağlanmış ve adsorbanın üzerinde birkaç mm solvan kalıncaya kadar beklenerek, kolon numunenin tatbik edilmesi için hazır duruma getirilmiştir.

Numune Tatbiki

a) Yaş (Çözücü Yardımı ile) Tatbik : Numune, elüsyona başlanacak solvan sisteminin uygun miktarı içinde çözülmüş ve bir pastör pipeti yardımıyla kolona uygulanmıştır. Kolonun musluğu açılarak çözeltinin tamamının adsorbana geçmesi sağlanmıştır. Yüzeyin bozulmasını önlemek amacıyla, tatbikten sonra silika jelin üzerine pamuk yerleştirilmiş ve yavaşça solvan sistemi ilave edilerek elüsyona başlanmıştır.

b) Kuru Tatbik : Numune; çok iyi çözündüğü bir solvanın 1-2 ml'si içinde çözülüp, kolondaki adsorban ve tatbik edilecek numune miktarları da göz önünde tutularak, yeterli miktarda adsorban ile karıştırılmıştır. Adsorbanın çözeltiyi iyice adsorbe etmesi ve etüvde tam olarak kuruyarak tamamen toz halde olması sağlandıktan sonra, karışım üzerinde birkaç cm solvan bırakılan kolona kuru halde aktarılmıştır. Kolonun üzerine, adsorban yüzeyinin bozulmasını engellemek için pamuk yerleştirilmiş ve yeterli miktarda solvan sistemi ilave edilerek elüsyona başlanmıştır.

3. Sefadeks Kolon Kromatografisi (Jel Filtrasyon) (Sefadeks KK)

Çalışmalarımız sırasında, özellikle iridoit glukozitlerini fenolik bileşiklerden ayırabilmek amacıyla sefadeks kolon kromatografisi (jel filtrasyon) kullanılmıştır.

Dolgu Materyali : Sephadex LH-20 (Pharmacia)
Solvan Sistemleri : MeOH

Kolonun Hazırlanması : 10-20 g Sephadex LH-20 uygun miktarda MeOH ile karıştırılarak kısa bir süre şişmeye bırakılmıştır. Karışım, alt ucuna pamuk yerleştirilmiş olan cam kolona aktarılmış ve adsorban tamamen yerleşinceye kadar kolondan MeOH geçirilmiştir.

Numune Tatbiki : Yeterli miktarda MeOH içinde çözülen numune bir pastör pipeti yardımıyla üzerinde birkaç mm solvan bırakılan kolona aktarılmıştır. Yüzeyin bozulmasını önlemek amacıyla tatbikten sonra pamuk yerleştirilmiş ve MeOH ilave edilerek elüsyona başlanmıştır.

4. Vakumlu Sıvı Kromatografisi (VSK)

Poliamit kolon kromatografisi ile ön fraksiyonlamaya tabi tutulan fraksiyonlardaki polariteleri birbirine çok yakın olan bileşiklerin ayrımını sağlamak amacıyla; Vakumlu Sıvı Kromatografisi (VSK) yönteminden yararlanılmıştır.

Dolgu Materyali	: LiChroprep C ₁₈ (40-63 µm, Merck)
Kolonlar	: Cam kolon (5x25 cm)
Solvan Sistemleri	: MeOH:H ₂ O (%0-100 MeOH)

Kolonun Hazırlanması : Yeterli miktarda adsorban, G₄ filtre taşıyan cam kolona (5 x 25 cm) kuru olarak doldurulmuş ve vakum yardımıyla sıkıştırılmıştır. Kolondan 150-200 ml metanol geçirilerek adsorbanın doygunluğu sağlanmıştır. Kolon, önce yeterli miktarda su, sonra da elüsyona başlanacak solvan sistemi geçirilerek şartlandırılmıştır.

Numune Tatbiki : Numune, 1-2 ml elüsyona başlanacak solvanda çözülerek bir pastör pipeti yardımıyla kolona tatbik edilmiştir. Kolonun alt ucu vakum erleninin kapak mantarının içinden geçirilmiş ve mantar kapatılarak kolonun erlene tam olarak oturtulması sağlanmıştır. Vakum açılarak numune adsorbana emdirilmiştir. Daha sonra kolonun üst tarafına pamuk yerleştirilmiş ve kolona solvan sistemi eklenmiştir. Vakum erleni içerisine fraksiyon toplamak için bir tüp yerleştirilmiş ve vakum açılarak elüsyona başlanmıştır.

5. Orta Basıncılı Sıvı Kromatografisi (OBSK)

Adsorban	: LiChroprep C ₁₈ (40-63 µm, Merck)
Kolon	: Büchi, 2,5 x 45 cm
Peristaltik Pompa	: Dionex P680 HPLC Pumps
Enjektör	: Rheodyne (Loop 2 ml)
Solvan Sistemi	: MeOH – Su (% 0- 100 MeOH)
Akış Hızı	: 5 ml/dk.
Basınç	: 5 – 15 bar

Fraksiyon Hacmi : 5 – 10 ml
Fraksiyon Toplayıcı : Büchi C-660

Kolonun Hazırlanması : Yeterli miktarda adsorban metanolde çözülmüş ve 5 dk. sonikatörde tutulduktan sonra azot hunisi yardımıyla kolona aktarılmıştır. Silikajelin kendi başına çökmesi bittikten sonra, ön kolonun üst kısmına pompa takılmış ve böylece silikajelin kolona iyice yerleşmesi sağlanmıştır. Ön kolonda hiç boşluk kalmaması için pastör pipeti ile biraz silikajel (metanollü) daha ilave edilmiştir. Sırasıyla % 100, % 50, % 25 metanol ve en son % 100 su geçirilerek kolon numune tatbiğine hazır hale getirilmiştir. Tatbikten önce kolon elüsyona başlanacak solvan sistemi ile şartlandırılmıştır. Numune, 1-2 ml solvan sistemi içinde çözülerek bir enjektör yardımıyla kolona enjekte edilmiştir.

6. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

Kolon kromatografisi çalışmaları sırasında, toplanan fraksiyonların izlenmesi ve bileşiklerin standart maddeler ile karşılaştırılmasında, alüminyum tabanlı, normal faz silika jel ile kaplanmış hazır plaklar üzerinde uygulanan, ince tabaka kromatografisi kullanılmıştır.

Adsorban : Silika jel (Alüminyum tabanlı hazır plak, Kieselgel 60 F₂₅₄, 0.20 mm, Merck, Art. 5554)

Solvan Sistemleri : CHCl₃:MeOH:H₂O (80:20:2, 70:30:3, 61:32:7)
 EtOAc:MeOH:H₂O (100:16.5:13.5)

Numune Tatbiki : Numuneler, pastör pipeti yardımı ile plağın alt ucunun 1 cm yukarısına ve tatbik noktaları arasında en fazla 1 cm olacak şekilde tatbik edilmiştir.

Sürüklenme Mesafesi : 7-10 cm

Lekelerin Belirlenmesi :

- 1) UV 254 ve 366 nm’de (Camag UV lambası) gözlenen floresans
- 2) Vanilinin derişik sülfürik asitteki %1’lik çözeltisi püskürtüldükten sonra 105 °C’de 1-2 dakika ısıtma

3.1.2. Kullanılan Aletler

CO ₂ İnkübatörü	: Sanyo MCO-18AIC (UV)
Diyafram Pompa	: Herkules 200/10/24 Air Compressor
Etüv	: Elektro-mag
IR Spektrofotometresi	: Perkin Elmer FTIR 1720 X
Inverted Mikroskop	: Leica DMIL LED
Kütle Spektrometresi	
HR ESI-MS	: Bruker Daltonics APEX III
FAB-MS/EI-MS	: JEOL JMS-DX300
Kromatografi Tankı	: Camag (cam küvet, 22 x 23 x 8 cm)
Laminar Air Flow Kabini	: Cyto-Baby CB 1204
Liyofilizatör	: Virtis Freezemobile 5
Manyetik Karıştırıcı	: Heidolph
Mikroplaka Okuyucu	: BIO-TEK , µQuant (MQX 200)
NMR Spektrometresi (1D ve 2D)	
¹ H NMR	: JEOL JNM-A 500 (500 MHz)
¹³ C NMR	: JEOL JNM-A 500 (125 MHz)
Otoklav	: Autoclave HS 9041
Rotavapor	: Büchi RE 111, Büchi EL 131 ve Heidolph 5111
Santrifüj	: UniGen 15D, Herolab
Ultrasonik Banyo	: Transsonic 570
UV Lamba	: Camag
UV Spektrofotometresi	: BIO-TEK , µQuant (MQX 200)

3.1.3. Ekstraksiyon ve İzolasyon Çalışmaları

3.1.3.1. *Plantago lagopus* L. Üzerinde Yürütülen Ekstraksiyon ve İzolasyon Çalışmaları

EKSTRAKSİYON

Plantago lagopus L. bitkisinin açık havada ve gölgede kurutulan toprak üstü kısımları (118 g) toz edildikten sonra 1 l metanol ile 40°C’ de rotavaporda 3 kez ekstre edilmiştir. Birleştirilen ekstreler darası alınmış balona aktarılarak alçak basınç altında ve düşük ısıda (40°C), rotavaporda kuruluğa kadar yoğunlaştırılmıştır (Metanol Ekstresi: 22.41 g). Kuru MeOH ekstresi 100 ml su ile çözülerek ayırma hunisinde petrol eteri (100 ml) ile 3 kez ekstre edilmiştir. Böylece klorofil gibi polar olmayan maddeler uzaklaştırılmış ve sulu faz kuruluğa kadar yoğunlaştırılarak sulu ekstre hazırlanmıştır (Sulu Ekstre: 18.36 g).

Petrol eteri fazı da düşük ısıda (40°C) vakum altında kuruluğa kadar uçurulmuştur (Petrol eterli ekstre: 3.72 g). Sulu ekstre az miktarda su ile çözülerek liyofilize edilmiştir. Liyofilize ekstrenin belirli bir kısmı (2 g) aktivite çalışmaları için ayrıldıktan sonra, kalan ekstre üzerinde fitokimyasal çalışmalara başlanmıştır.

ÖN FRAKSİYONLAMA

Plantago lagopus L. bitkisinin liyofilize sulu ekstresi bir miktar distile suda çözülerek, fenolik ve fenolik olmayan bileşiklerin birbirinden ayrılması amacıyla, poliamit ile hazırlanmış kolon kromatografisine tatbik edilmiştir. Elüsyona % 100 su (%0 metanol) ile başlanmış ve sırasıyla % 25, % 50, % 75 ve % 100 metanol oranlarıyla devam edilmiştir. Elüsyonun sonucunda, sulu ekstreden toplam 7 ana fraksiyon elde edilmiştir.

***Plantago lagopus* L.' nin Poliamit Kolon Fraksiyonları**

Fraksiyon 2-8	: 11.7 g	}	%100 H ₂ O
Fraksiyon 9-12	: 232.5 mg	}	%25 MeOH
Fraksiyon 13-16	: 615.4 mg	}	
Fraksiyon 17-20	: 375.3 mg	}	%50 MeOH
Fraksiyon 21-26	: 1.33 g	}	
Fraksiyon 27-35	: 227.6 mg	}	%75 -100 MeOH
Fraksiyon 36-43	: 364.8 mg	}	

***n*-Butanol ile ekstraksiyon :** Fr. 2-8 (11.703 g)'in liyofilize tozu bir miktar suda (~ 50 ml) çözüldükten sonra, aynı miktarda *n*-BuOH (50 ml) ile ayırma hunisinde ekstre edilmiştir. Ekstraksiyon sonucunda, şekerler sulu fazda kalırken diğer organik maddeler daha az polar olan *n*-BuOH fazına geçmiştir. Sulu faz 4-5 kez *n*-BuOH ile ekstre edildikten sonra, birleştirilen *n*-BuOH fazları rotavaporda kuruluğa kadar uçurulmuştur (*n*-BuOH ekstresi : 1.2852 g)

İZOLASYON

Plantago lagopus L.'nin poliamit kolon fraksiyonları (toplam 7 fraksiyon) üzerinden yürütülen izolasyon çalışmaları sonucunda **PL** kodu verilen toplam 6 bileşik izole edilmiştir. Bu bileşiklerden; **PL-1** ve **PL-2**'nin feniletanoit glikoziti; **PL-3**'ün megastigman glukoziti; **PL-4**, **PL-5** ve **PL-6**'nın ise; iridoit yapısında oldukları tespit edilmiştir.

***Plantago lagopus* L.'den İzole Edilen Bileşikler**

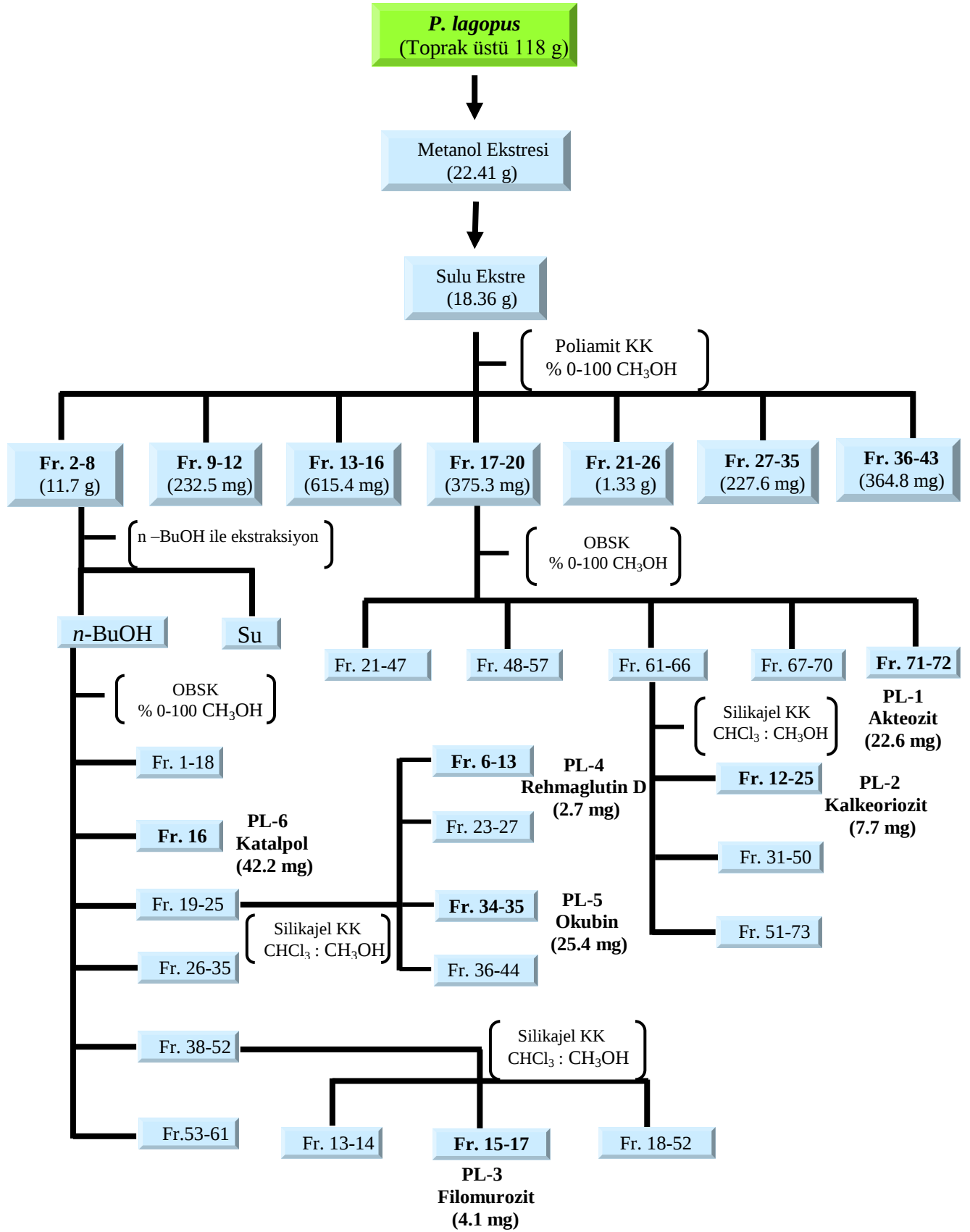
PL – 1 : Poliamit KK'dan elde edilen Fr. 17-20, OBSK sistemine tatbik edilmiş ve metanol-su solvan sisteminde artan metanol konsantrasyonu kullanılarak toplam 5 fraksiyon toplanmıştır. Bu fraksiyonlardan 71-72 numaralı fraksiyonun saf olduğu belirlenmiş ve fraksiyon PL-1 (22.6 mg) maddesi olarak tanımlanmıştır.

PL – 2 : Poliamit KK'dan elde edilen Fr. 17-20'nin OBSK sistemine tatbik edilmesiyle toplanan fraksiyonlardan birisi de 61-66 numaralı fraksiyondur. Fr. 61-66'nın CHCl₃:MeOH (95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 70:30, 75:25) solvan sistemi kullanılarak silikajel kolona uygulanmasıyla elde edilen 12-25 numaralı fraksiyon PL-2 (7.7 mg) maddesi olarak tanımlanmıştır.

PL – 3 : Poliamit KK'dan elde edilen Fr. 2-8'in n-BuOH ile ekstraksiyonu sonucu hazırlanan butanol ekstresi, OBSK sistemine tatbik edilmiştir. OBSK sisteminden elde edilen 6 ana fraksiyondan biri olan Fr. 38-52; silikajel kolona tatbik edilmiş ve CHCl₃:MeOH solvan sistemi kullanılarak 3 farklı fraksiyon toplanmıştır. Bu fraksiyonlardan Fr. 15-17 (4.1 mg) PL-3 maddesi olarak tanımlanmıştır.

PL – 4 ve PL - 5 : n-BuOH ekstresinin OBSK sistemine tatbik edilmesiyle elde edilen fraksiyonlardan biri olan Fr. 19-25; silikajel kolona uygulanmış ve CHCl₃:MeOH solvan sistemi kullanılarak 4 farklı fraksiyon toplanmıştır. Saf olduğu belirlenen Fr. 6-13 (2.7 mg) PL-4 ve Fr. 34-35 (25.4 mg) PL-5 olarak tanımlanmıştır.

PL – 6 : n-BuOH ekstresinin OBSK sistemine (% 0-100 MeOH) uygulanmasıyla elde edilen 16 numaralı fraksiyonun İTK analizi sonucu saf olduğu anlaşılmış ve Fr. 16 (42.2 mg) PL-6 maddesi olarak tanımlanmıştır.



Şema 1. *P. lagopus* L.'nin Toprak Üstü Kısımları Üzerinde Yürütülen İzolasyon Çalışmaları

3.2. Aktivite Çalışmaları

3.2.1. Serbest Radikal Süpürücü (Antioksidan) Aktivite Tayini

Tez çalışmamızda, *Plantago lagopus* L. bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan sulu ekstrenin, poliamit fraksiyonlarının ve aktif fraksiyonlardan elde edilen saf bileşiklerin ; DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), NO (Nitrik Oksit) ve SO (Süperoksit) radikallerini süpürücü etkinlikleri araştırılmıştır.

Deneylerin sonunda, konsantrasyona karşı % inhibisyon grafikleri çizilmiş ve IC_{50} değerleri, eğrilerin doğrusal regresyon denklemine göre hesaplanarak belirlenmiştir. Tüm antioksidan aktivite çalışmaları, deneysel hataları en aza indirmek amacıyla en az 3 paralelli olarak çalışılmıştır.

a) DPPH Radikali Süpürücü Aktivite:

DPPH radikalinin antioksidan bir madde aracılığı ile indirgenmesi esasına dayanır. Ekstre, fraksiyon ve saf bileşiklerin metanol ile değişik konsantrasyonlarda (25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml) çözeltileri hazırlandıktan sonra, her bir konsantrasyondan 200'er µl alınarak mikropipet vasıtasıyla 96 kuyucuklu plakalardaki kuyucuklara aktarılmış ve üzerlerine de 50'şer µl 1mM DPPH ilave edilerek vortex cihazında iyice çalkalanmıştır. 30 dakika sonra 517 nm'de absorbansları ölçülmüştür (82-85).

Radikal süpürücü etki, sadece DPPH ve metanol içeren çözeltinin (kör) absorbansının, bileşikleri içeren çözeltilerin absorbanslarıyla karşılaştırılması sonucu tayin edilmiştir.

Çalışmamızda standart olarak, sentetik bir antioksidan olan 3-*ters*-butil-4-hidroksianizol (BHA) ve doğal bir antioksidan olan askorbik asit (AA) kullanılmıştır. Standartlar; denenen ekstreler ile aynı şartlarda ve konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

b) NO Radikali Süpürücü Aktivite:

Deney ortamında oluşturulan nitrik oksitin, antioksidan madde ile teması sonucu kalan konsantrasyonunun spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bu ölçüm nitrik oksitin en stabil dönüşüm ürünü olan nitrit (NO_2^-) konsantrasyonu üzerinden yapılmaktadır. Ekstrenin 5 farklı konsantrasyonda (25 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$ ve 800 $\mu\text{g/ml}$) hazırlanan sulu çözeltilerinin her birinden 60'şar μl 96 kuyucuklu plakalardaki kuyucuklara aktarılmış ve üzerlerine yine 60 μl 10 mM sodyum nitroprussid (PBS'de çözülmüş) ilave edilmiştir. 150 dk. inkübasyondan sonra kuyucuklara 120 μl Griess reaktifi eklenerek 577 nm'de absorbansları ölçülmüştür (85,86).

Griess Reaktifi:	Sülfanilamit	% 1
	Naftiletilendiamin dihidroklorit	% 0.1
	Fosforik asit (H_3PO_4)	% 2.5
	Distile Su	k.m. 100 ml

Çalışmamızda; Na Nitroprussid, nitrik oksit sentez kaynağı olarak; Griess Reaktifi ise, antioksidan madde ile temas sonucunda ortamda kalan nitrit konsantrasyonunun spektroskopik olarak ölçümünü sağlamak amacıyla kullanılmıştır.

NO radikali süpürücü etki, Na Nitroprussid, Griess Reaktifi ve su içeren çözeltinin (kör) absorbansının, bileşikleri içeren çözeltilerin absorbanslarıyla karşılaştırılması sonucu tayin edilmiştir.

Çalışmamızda standart olarak, sentetik bir antioksidan olan 3-*ters*-butil-4-hidroksianizol (BHA) ve doğal bir antioksidan olan kersetin kullanılmıştır. Standartlar; denenen ekstreler ile aynı şartlarda ve konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

c) SO Radikali Süpürücü Aktivite :

Deney ortamında, DMSO (Dimetil sülfoksit) tarafından oluşturulan süperoksit radikali, NBT (Nitroblue tetrazolium) ile renkli diformazan bileşiği oluşturur. Deney; antioksidan madde ile teması sonucunda süperoksit radikalinin azalan konsantrasyonunun renkli diformazan bileşiği üzerinden ölçülmesi esasına dayanır. NBT'nin DMSO'daki 1 mg/ml çözeltisinden 0.1 ml, 96 kuyucuklu plakalardaki kuyucuklara aktarıldıktan sonra üzerine ekstrenin 5 farklı konsantrasyonda (25 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml ve 800 µg/ml) DMSO ile çözülerek hazırlanan çözeltilerinden 0.3'er ml ilave edilmiştir. Daha sonra 1 ml alkalın DMSO (0.9 ml DMSO + 0.1 ml 5 mM NaOH) ilavesiyle son hacmin 1.4 ml olmasına dikkat edilerek 560 nm'de absorbans ölçülmüştür (85,87).

SO radikali süpürücü etki; DMSO, NBT, ve alkalın DMSO içeren çözeltinin (kör) absorbansının, bileşikleri içeren çözeltilerin absorbanslarıyla karşılaştırılması sonucu tayin edilmiştir.

Çalışmamızda standart olarak, sentetik bir antioksidan olan 3-*ters*-butil-4-hidroksianizol (BHA) ve doğal bir antioksidan olan kersetin kullanılmıştır. Standartlar; denenen ekstreler ile aynı şartlarda ve konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

3.2.2. Sitotoksik Aktivite (*In vitro* Antikanser Aktivite) Tayini

MTT Yöntemi

Plantago lagopus ekstresinin, fraksiyonların ve elde edilen bileşiklerin sitotoksik aktivite tayininde; Mossman tarafından geliştirilmiş MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür] tayin yöntemi kullanılmıştır (88,89).

Aktivite çalışmaları, insan kaynaklı kanser hücreleri olan HEP-2 (Human Epidermoid Carcinoma = İnsan Epidermoid Karsinoma), RD (Human Rhabdomyosarcoma = İnsan Rabdomiyosarkoma) ve MCF-7 (Human Breast Adenocarcinoma = İnsan Meme Adenokarsinoma) hücre serileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

HEP-2 ve RD hücre kültürlerinden (% 10 dana serumu ve % 1 penisilin + streptomisin çözeltisi ihtiva eden MEM vasatında) 1×10^5 hücre/ml hücre süspansiyonu hazırlanmış ve 100'er µl olarak 96 kuyucuklu plakalara aktarılmıştır. Hücre süspansiyonları; % 5 CO₂, % 95 nem ve 37 °C sıcaklığa sahip inkübatörde 24 saat bekletildikten sonra, kuyucuklardaki vasat aspire edilmiş ve 100'er µl değişik konsantrasyonlardaki (800, 400, 200, 100, 50, 25 µg/ml) ekstre çözeltilerini içeren vasat ilave edilerek 48 saat daha inkübatörde bekletilmiştir. Süre sonunda her bir çukurdaki ekstre, fraksiyon ve saf bileşik çözeltileri aspire edilmiş, 100 µl vasat ile çukurlar yıkanarak temizlenmiş ve daha sonra hücrelerin üzerlerine tekrar 100'er µl taze vasat ilave edilmiştir. 5 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde PBS'de (phosphate buffered saline) hazırlanan MTT çözeltisinden her bir kuyucuğa 10'ar µl ilave edilmiş ve 4-6 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sırasında canlı hücrelerdeki dehidrogenaz enzimi MTT'yi mor renkli formazan yapısına indirgemıştır. Süre sonunda çukurlara 100'er µl % 10 SDS (Sodyum dodesil sülfat) çözeltisi ilave edilerek, oluşan formazan kristallerinin çözünmesini sağlamak amacıyla 20 saat daha inkübe edildikten sonra 577/655 nm'de absorbanlar okunmuştur.

3.2.3. Total Fenolik Bileşik Miktar Tayini

Folin – Ciocalteu Metodu

Plantago türlerinin; iridoit glukozitleri, alkaloidler, triterpenoidal bileşikler ve polisakkaritler ile birlikte; flavon glikozitleri ve feniletanoit glikozitleri gibi fenolik yapıda bileşikler taşıdığı bilinmektedir. Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitelerinin yüksek olmasından yola çıkılarak, *P. lagopus* bitki ekstresinin 3 farklı radikale karşı süpürücü etkinliği araştırılmış ve ekstre 3 radikale karşı da aktif bulunmuştur.

Sonuçlara göre, *P. lagopus* bitkisinin total fenolik madde içeriği merak edilmiş ve Folin-ciocalteu metoduyla fenolik içerik miktar tayini yapılmıştır (90).

Bu yöntemde fenolik bileşik miktar tayini; bitkilerde çok sık bulunan gallik asit veya kateşin gibi fenolik bileşikler dikkate alınarak, gallik asit ekivalan (GAE) ya da kateşin ekivalan (KE) olarak değerlendirilir ve sonuçlar kuru bitki ekstresinin 1 gramında bulunan total fenolik madde miktarının mg cinsinden hesaplanmasıyla mg GAE / g olarak verilir.

Çalışmamızda, gallik asit standart olarak kullanılmış ve gallik asidin 0, 50, 100, 200, 400 mg/L konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmıştır.

P. lagopus sulu ekstresinden 2.7 mg tartılmış ve 1 ml distile suda çözülmüştür. 10'ar µl gallik asit ve numune kuyucuklara mikropipet vasıtasıyla aktarıldıktan sonra, 150 µl folin (fosfomolibdat + fosfotungstat) reaktifi (1:4 folin: su) ve 3 dk. sonra 50 µl Na₂CO₃ (2:3 Na₂CO₃ : su) ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 2 saat inkübasyonun ardından 725 nm'de absorbansları ölçülmüştür

Gallik asidin farklı konsantrasyonlarına karşı absorbans değerlerini içeren gallik asit standart eğrisi çizilmiş ve doğru denkleminde yararlanılarak total fenolik madde miktarı hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

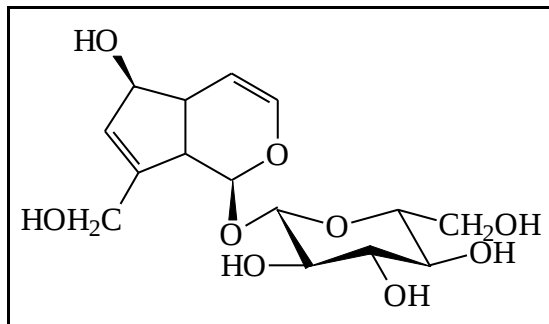
Çalışmamızın bulguları; önce izole edilen bileşiklerin yapı tayinleri olmak üzere daha sonra sırasıyla; ekstre, fraksiyonlar ve saf bileşiklerin değişik serbest radikallere (DPPH, NO, SO) karşı antioksidan aktivite sonuçları; ekstre ile fraksiyonların HEP-2 ve RD kanser hücrelerine karşı, saf bileşiklerin ise; HEP-2, RD ve MCF-7 kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktivite sonuçları ve son olarak da *P. lagopus* sulu ekstresinin total fenolik bileşik miktar tayini sonuçları şeklinde; fitokimyasal çalışmalara ait bulgular ve aktivite çalışma bulguları olarak 2 kısımda verilecektir.

4.1. Fitokimyasal Çalışmalara Ait Bulgular

P. lagopus L. bitkisinin toprak üstü kısımlarının sulu ekstresinin poliamit kolon fraksiyonları üzerinde gerçekleştirdiğimiz biyoaktivite rehberli izolasyon çalışmaları sonucunda; aktif fraksiyondan 2 feniletanoit glikoziti (**Akteozit** ve **Kalkeoriozit**), diğer fraksiyonlardan ise; 3'ü iridoit (**Okubin**, **Katalpol** ve **Rehmaglutin D**) ve 1'i megastigman glukoziti (**Filomurozit**) olmak üzere toplam 6 bileşik izole edilmiştir. İzole edilen bileşiklerin yapıları spektroskopik yöntemler (UV, IR, 1D-, 2D-NMR ve kütle spektroskopisi) kullanılarak aydınlatılmıştır.

Biyolojik olarak aktif bulunmayan fraksiyonlardan iridoit fraksiyonu; familyanın kemotaksonomik açıdan değerlendirilmesinde önemli bir anahtar grup olan iridoit glukozitlerinin elde edilmesi amacıyla fitokimyasal olarak çalışılmıştır.

4.1.1. İzole Edilen Bileşiklerin Yapı Tayinleri



OKUBİN [PL-5]

C₁₅H₂₂O₉ (Mol.Ağ.: 346)

UV λ_{maks} (MeOH) nm	202
IR ν_{maks} (KBr) cm ⁻¹	3284 (OH), 1605 (C=C)
HR ESI-MS (m/z)	369.1168 [M+Na] ⁺ , 715.2454 [2M+Na] ⁺
¹ H NMR	Tablo 13 Spektrum 1
¹³ C NMR ve DEPT	Tablo 13 Spektrum 2
COSY	Spektrum 3
HMQC	Spektrum 4
HMBC	Tablo 13 Spektrum 5

OKUBİN [PL-5]

P. lagopus sulu ekstresinin poliamit kolon ile fraksiyonlanması esnasında su ile elue edilen fraksiyondan dört farklı maddenin izolasyonu gerçekleştirilmiştir (PL-4, PL-5, PL-6 ve PL-7). Bu bileşiklerden ilki olan PL-6 bileşiği renksiz, amorf bir katı olarak elde edilmiştir. İTK analizinde vanilin/H₂SO₄ reaktifi püskürtüldükten sonra plağın 105 °C’de 1-2 dakika ısıtılması ile bileşiğe ait lekenin önce pembe-kırmızı bir renk alması ve daha sonra da siyaha yakın koyu-mor renge dönmesi bir iridoit glukoziti olabileceğini düşündürmüştür. Bileşiğin HR ESI-kütle spektrumunda m/z 369.1168 [M+Na]⁺ ve 715.2454 [2M+Na]⁺’de gözlenen pikler ¹³C NMR bulguları (Tablo 13, Spektrum 2) ile birlikte değerlendirildiğinde, bileşiğin C₁₅H₂₂O₉ moleküler formüle sahip olduğu bulunmuştur. UV spektrumunda 202 nm’de gözlenen absorpsiyon bandı iridoit enol-eter sistemi için karakteristiktir ve C-4’ün süstitüe olmadığını işaret etmektedir. IR spektrumunda hidroksil (3284 cm⁻¹) ve olefinik çifte bağlara ait (1605 cm⁻¹) absorpsiyon bantları görülmektedir.

Bileşiğin ¹H ve ¹³C NMR spektrumlarında (Tablo 13, Spektrum 1 ve 2) δ_H 4.67 (d, $J = 7.9$ Hz, H-1’) ve δ_C 99.98 (CH, C-1’)’deki anomerik proton ve karbon sinyalleri, diğer oz sinyalleri ile birlikte değerlendirildiğinde, bileşiğin monoglikozidik bir yapıya sahip olduğu ve anomerik protonun kenetlenme sabitinden ($J = 7.9$ Hz), bağ konfigürasyonunun β olduğu anlaşılmaktadır. 62.71-78.33 ppm arasında gözlenen 5 karbon rezonansı ve 3.21-3.85 ppm arasında gözlenen proton sinyalleri yapıda bir heksoz varlığını doğrulamaktadır. COSY (Spektrum 3) ve HMQC (Spektrum 4) spektrumlarının birlikte değerlendirilmesi sonucunda uzun β -glukoz olduğu anlaşılmıştır.

Bileşiğin ¹³C NMR spektrumu incelendiğinde (Tablo 13, Spektrum 2) 15 C rezonansı görülmektedir. Bu sinyaller DEPT-135 spektrumunda incelendiğinde 15 C rezonansının 1 katerner (C), 12 metin (CH) ve 2 metilen (CH₂) C’una ait olduğu anlaşılmıştır. Bu rezonanslardan glukoza ait 6 sinyal çıkarıldığında, aglikonun 9 karbonlu siklopentan-piran iridoit iskeletine sahip olduğu bulunmuştur.

¹H NMR spektrumunda (Tablo 13, Spektrum 1) δ_H 6.30, 5.76 ve 5.09’ da gözlenen birer proton şiddetindeki sinyallerin kimyasal kayma değerlerine bakıldığında, bileşikte 3 olefinik proton olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca 1 asetal (δ_H

4.95, d, $J = 7.3$ Hz), 1 oksimetin (δ_H 4.43, m), 2 metin (δ_H 2.65, m; 2.89, t, $J = 7.5$ Hz) ve AB sistemi şeklinde gözlenen hidroksimetilen sinyalleri (δ_H 4.34, gd, $J = 15.2$ Hz ve 4.16, dd, $J = 15.2/0.9$ Hz) görülmektedir.

Bileşikte δ_H 4.95' de (1H, d, $J = 7.3$ Hz) gözlenen H-1 asetal sinyali ve COSY spektrumunda (Spektrum 3) δ_H 2.89 (1H, t , $J = 7.5$ Hz, H-9) metin protonuyla, H-9 protonu (δ_H 2.89) ise; δ_H 2.65 (1H, m, H-5) metin protonuyla korelasyon göstermektedir. H-5 protonunun (δ_H 2.65) δ_H 5.09 (1H, dd, $J = 6.1/4.0$ Hz, H-4) 'daki olefinik proton ve 4.43 (1H, m, H-6)'deki oksimetin protonuyla; H-4'ün (δ_H 5.09) ise δ_H 6.30 (1H, dd, $J = 6.2/2.0$ Hz, H-3)' daki olefinik proton ile korelasyonları ilk çifte bağın C-3 ve C-4 arasında bulunduğunu doğrulamıştır. H-6 protonuna ait oksimetin sinyalinin (δ_H 4.43), δ_H 5.76 (1H, t, $J = 1.5$ Hz, H-7) olefinik protonuyla korelasyonu ve H-9 sinyalinin triplet şeklinde görünmesi C-8'in katerner olduğuna ve 2. çifte bağın C-7 ile C-8 arasında bulunduğuna işaret etmektedir. HMQC spektrumu (Spektrum 4) incelenerek yukarıda bahsedilen protonların bağlı olduğu C atomları bulunmuştur (Tablo 13). ^{13}C NMR ve DEPT 135 spektrumlarında (Spektrum 2) aromatik sahada 148.07 (C, C-8), 130.30 (CH, C-7), 141.63 (CH, C-3) ve 105.76 (CH, C-4)' da gözlenen sinyaller C-3 ve C-4; C-7 ve C-8 arasında çifte bağ olduğunu doğrulamaktadır.

HMBC spektrumunda (Tablo 13, Spektrum 5); H-1'/C-1 korelasyonu β -glukoz ünitesinin C-1 pozisyonundan bağlı olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan H₂-10/C-8, H₂-10/C-7 ve H₁-10/C-9 korelasyonları gözlenmektedir. Bu korelasyonlar C-8' den süstitüe hidroksimetilen grubunun varlığına işaret etmektedir.

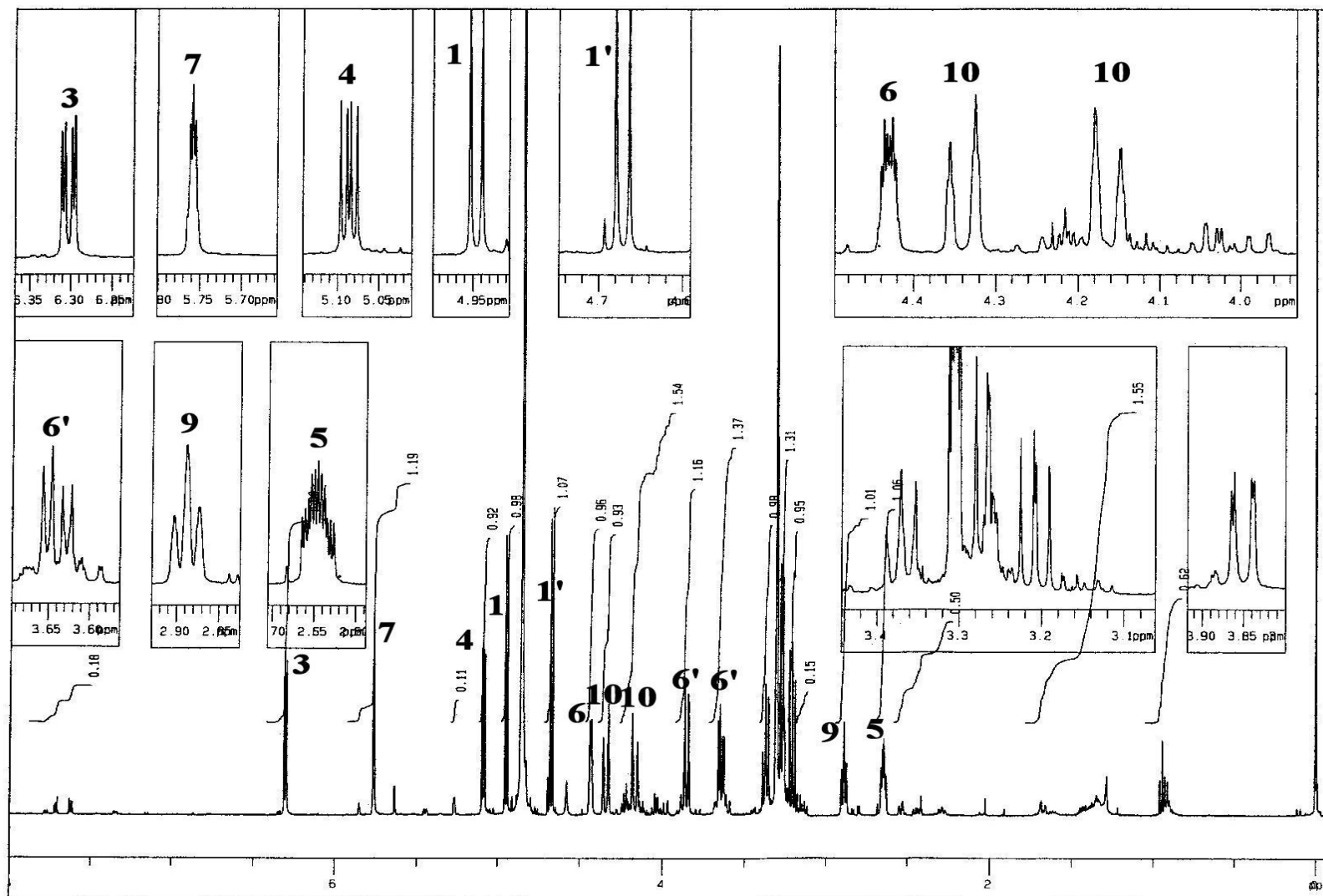
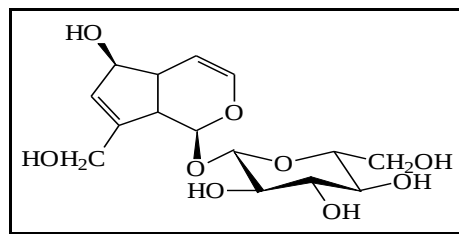
PL-5 bileşiğinin yapısı, COSY, HMQC, HMBC ve HR ESI-kütle spektrumları yardımıyla okubin olarak aydınlatılmıştır ve tüm spektroskopik bulgular literatürde okubin için verilen değerlerle uyum göstermektedir (91-93).

Tablo 13. Okubin **[PL-5]**'in ^{13}C ve ^1H NMR Spektroskopik Değerleri*
(CD_3OD ; ^{13}C :125 MHz; ^1H : 500 MHz); Önemli HMBC Korelasyonları

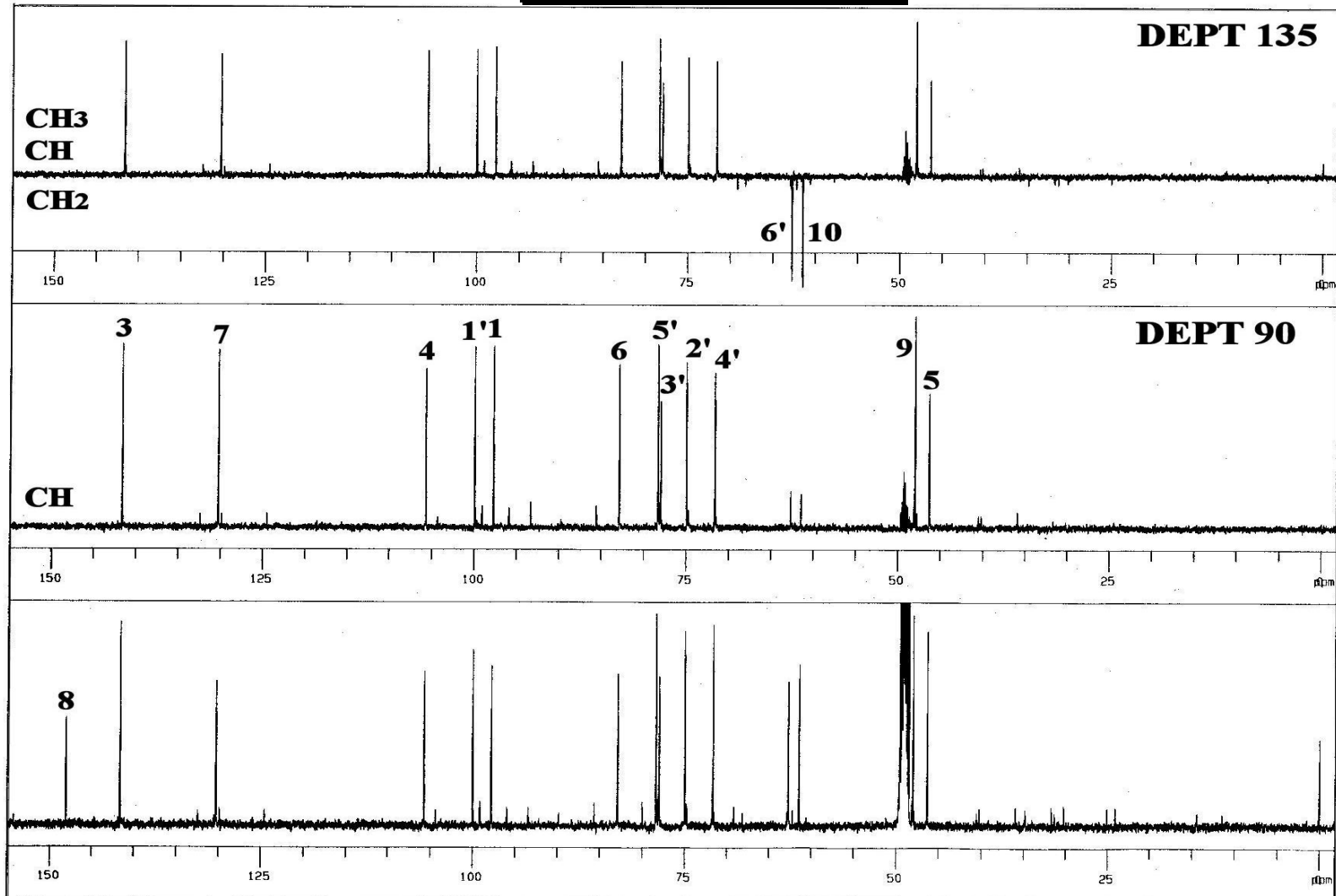
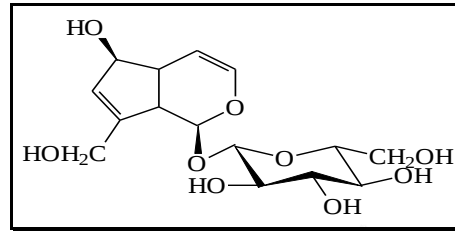
C/H Atom	DEPT	δ_{C} ppm	δ_{H} ppm	J (Hz)	HMBC (H→C)
Aglikon					
1	CH	97.78	4.95 d	(7.3)	C-1', C-3, C-5, C-8, C-9
3	CH	141.63	6.30 dd	(6.2/2.0)	C-1, C-4, C-5
4	CH	105.76	5.09 dd	(6.1/4.0)	C-3, C-5, C-6, C-9
5	CH	46.34	2.65 m		C-1, C-3, C-4, C-6, C-9
6	CH	82.90	4.43 m		C-4, C-7, C-8
7	CH	130.30	5.76 t	(1.5)	C-5, C-6, C-8, C-9, C-10
8	C	148.07			
9	CH	47.99	2.89 t	(7.5)	C-1, C-5, C-6, C-7, C-8
10	CH ₂	61.46	4.34 gd	(15.2)	C-7, C-8, C-9
			4.16 dd	(15.2/0.9)	C-7, C-8
Glukoz					
1'	CH	99.98	4.67 d	(7.9)	C-1, C-2', C-3'
2'	CH	74.97	3.21 dd	(9.1/7.9)	C-1', C-3'
3'	CH	77.95	3.37 t	(9.0)	C-2', C-4'
4'	CH	71.62	3.27 [†]		C-6'
5'	CH	78.33	3.27 [†]		C-3'
6'	CH ₂	62.71	3.85 dd	(11.9/1.8)	C-4'
			3.64 dd	(11.9/5.5)	C-4', C-5'

*Rezonanslar 2D NMR (COSY, HMQC ve HMBC) yardımıyla yorumlanmıştır.

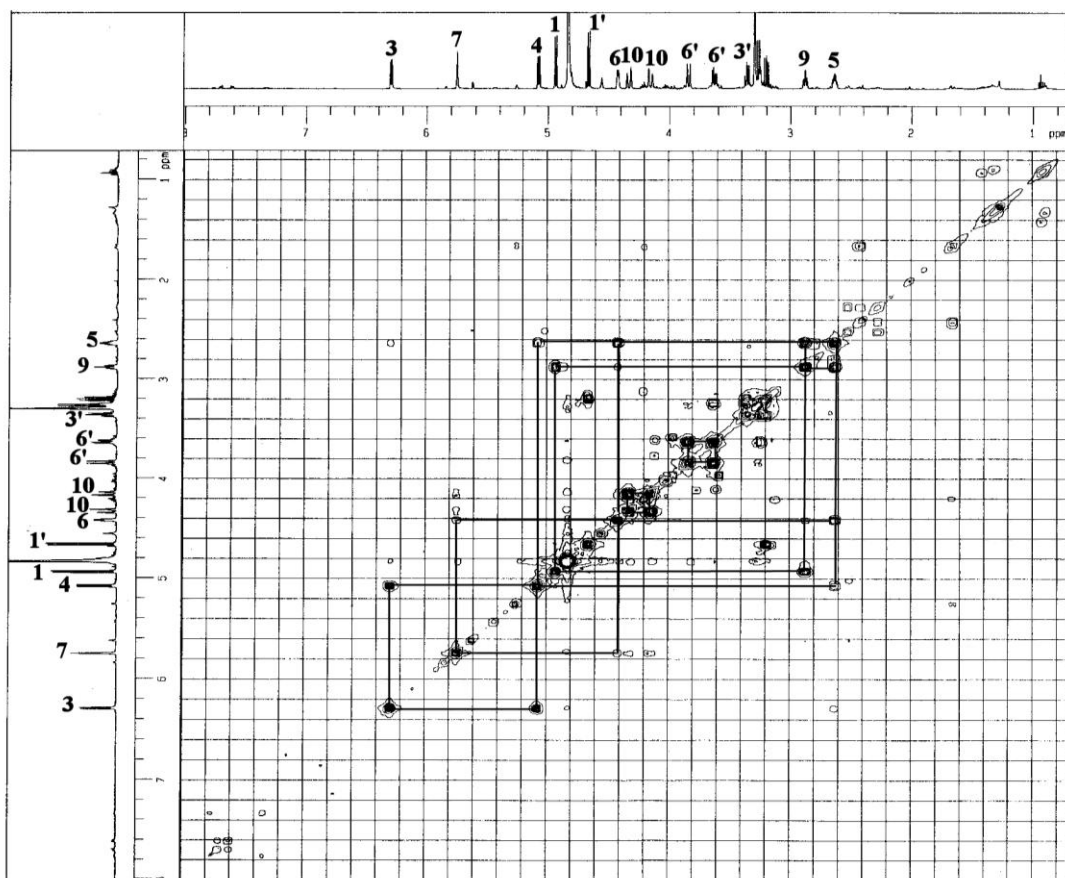
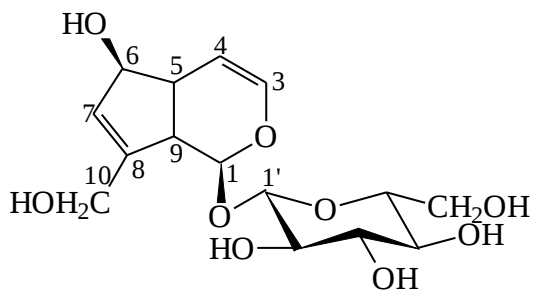
[†]Girişim nedeniyle J değerleri hesaplanamamıştır.



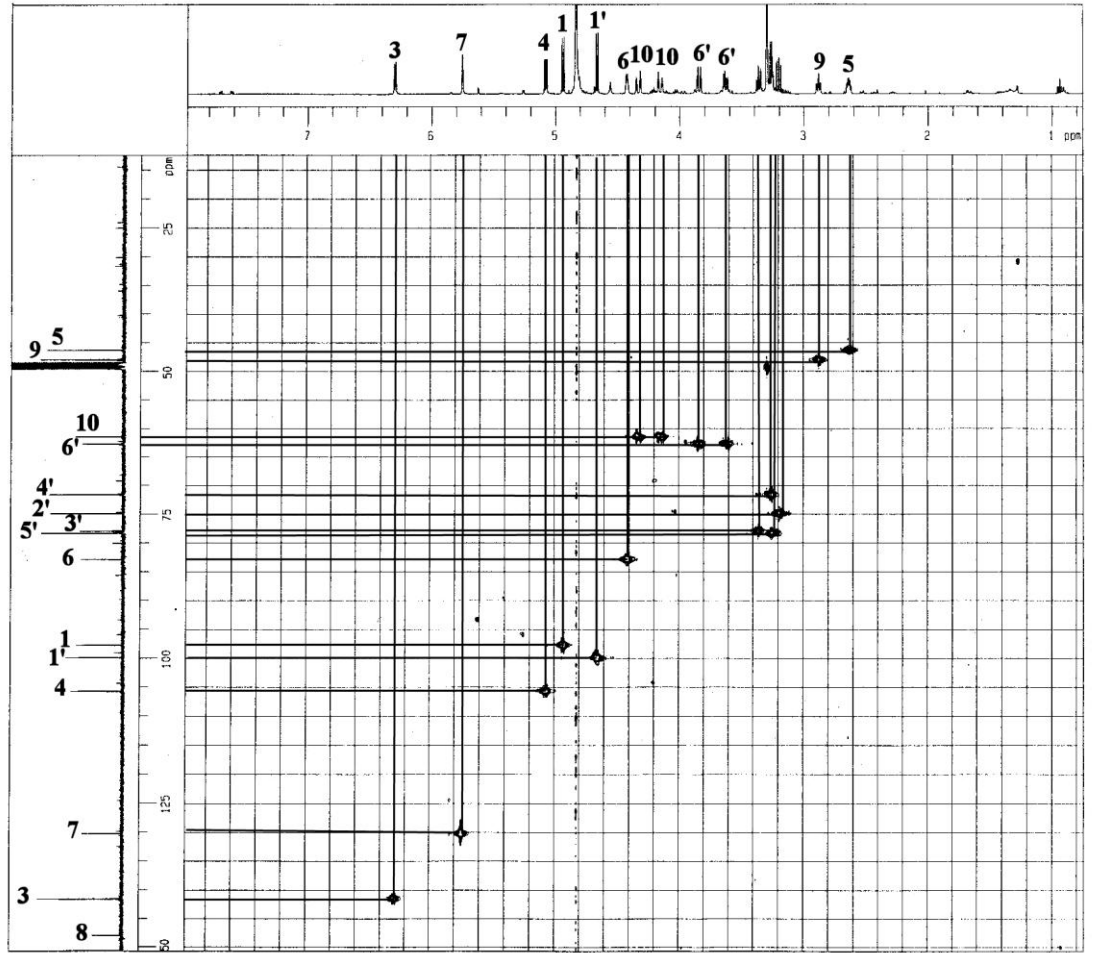
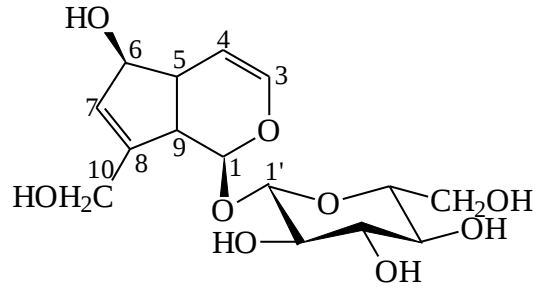
Spektrum 1. Okubin [PL-5] in ¹H NMR Spektrum (CD₃OD; ¹H: 500 MHz)



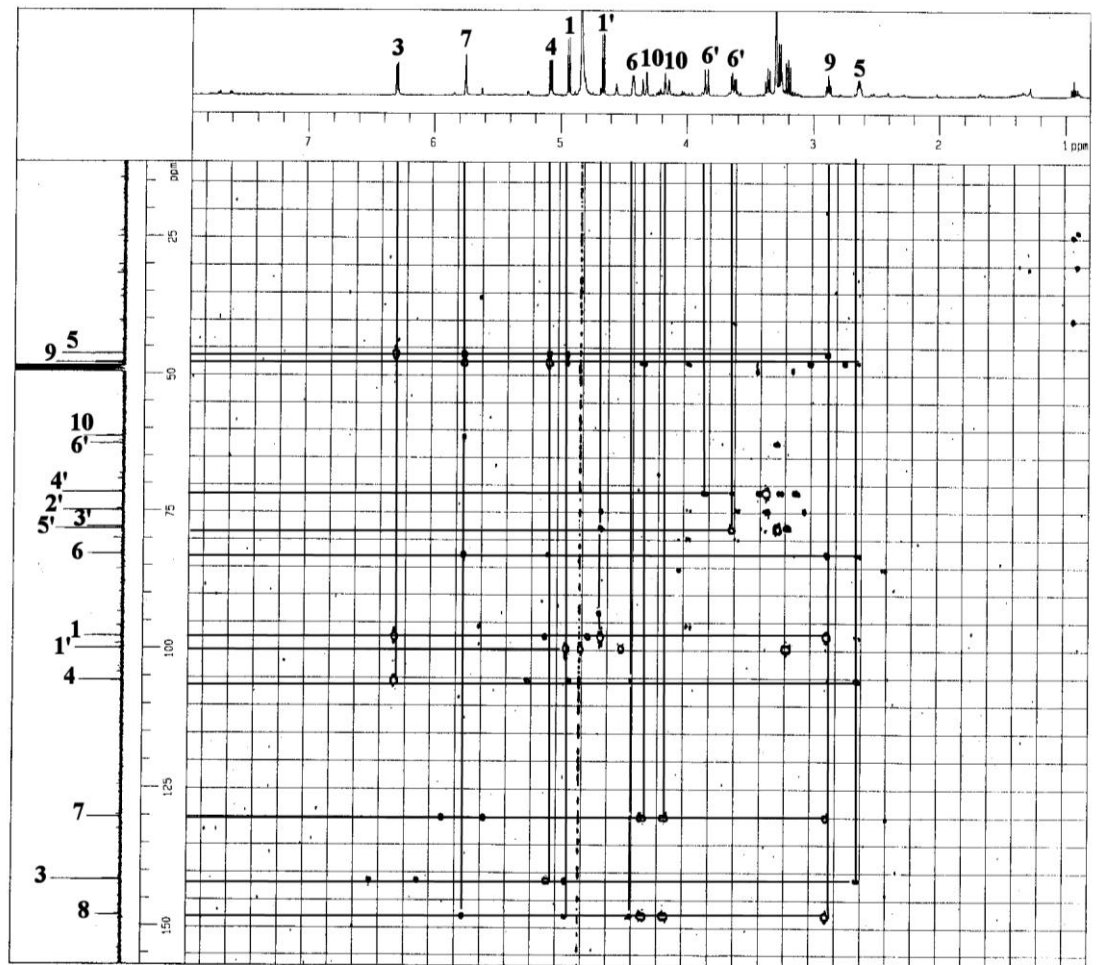
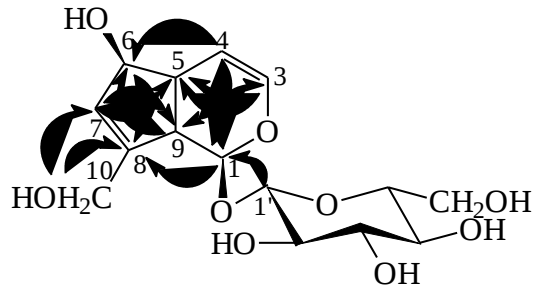
Spektrum 2. Okubin [PL-5]'in ^{13}C NMR ve DEPT Spektrumları (CD_3OD ; ^{13}C : 125 MHz)



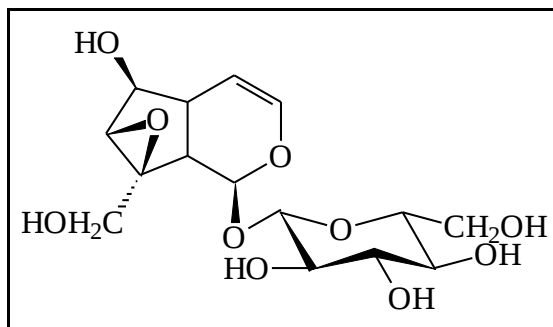
Spektrum 3. Okubin [PL-5]'in 2D ^1H , ^1H -Homonükleer Korelasyonlu NMR Spektrumu (COSY)



Spektrum 4. Okubin [PL-5]'in 2D ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (yakın mesafe) NMR Spektrumu (HMQC)



Spektrum 5. Okubin [PL-5]'in 2D ¹H, ¹³C-Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) NMR Spektrumu (HMBC)



KATALPOL [PL-6]

C₁₅H₂₂O₁₀ (Mol. Ağ.: 362)

UV λ_{maks} (MeOH) nm	205
IR ν_{maks} (KBr) cm^{-1}	3400 (OH), 1640 (C=C)
HR ESI-MS (m/z)	385.1110 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 747.2344 $[2\text{M} + \text{Na}]^+$
^1H NMR	Tablo 14 Spektrum 6
^{13}C NMR ve DEPT	Tablo 14 Spektrum 7
COSY	Spektrum 8
HMQC	Spektrum 9
HMBC	Tablo 14 Spektrum 10

KATALPOL [PL-6]

PL-6 bileşiği renksiz, amorf bir katı olarak elde edilmiştir. Bileşiğin İTK analizindeki davranışları PL-5 bileşiğinde olduğu gibi iridoit glukoziti olabileceğini düşündürmüştür. UV spektrumunda 205 nm’ de gözlenen absorpsiyon bandı konjuge olmayan iridoit enol-eter sistemi için karakteristiktir ve C-4’ün süstitüe olmadığını işaret etmektedir.

PL-6 bileşiğinin HR ESI-kütle spektrumunda 385.1110 $[M + Na]^+$ ve 747.2344 $[2M + Na]^+$ ’de gözlenen pikler ^{13}C NMR bulguları (Tablo 14, Spektrum 7) ile birlikte değerlendirildiğinde, bileşiğin $C_{15}H_{22}O_{10}$ moleküler formülüne sahip olduğu bulunmuştur.

1H ve ^{13}C NMR spektrumlarında gözlenen (Tablo 14, Spektrum 6 ve 7) δ_H 4.76 (d, $J = 7.9$ Hz, H-1’) ve δ_C 99.68 (CH, C-1’)’deki sinyaller anomerik proton ve karbon sinyallerine atfedilmiş ve diğer oz sinyalleri ile birlikte değerlendirildiğinde, bileşiğin monoglikozidik bir yapıya sahip olduğunu göstermiştir. Anomerik protonun kenetlenme sabitinden ($J = 7.9$ Hz), bağ konfigürasyonunun β olduğu anlaşılmaktadır. 62.89-78.59 ppm arasında gözlenen 5 karbon rezonansı ve 3.24-3.90 ppm arasında gözlenen proton sinyalleri yapıda bir heksoz varlığını doğrulamaktadır. COSY ve HMQC spektrumlarının birlikte değerlendirilmesi sonucunda uzun β -glukoz olduğu anlaşılmıştır.

Bileşiğin karbon sinyallerinin anlaşılabilmesi amacıyla ^{13}C NMR ve DEPT-135 spektrumları (Tablo 14, Spektrum 7) incelendiğinde 1 katerner (C), 12 metin (CH) ve 2 metilen (CH_2) olmak üzere toplam 15 C rezonansı görülmüştür. Toplam karbon rezonansından glukoza ait olan 6 sinyal çıkarıldığında, aglikonun 9 karbonlu siklopentan-piran iskeletinden meydana geldiği saptanmıştır. 1H NMR spektrumunda (Spektrum 6) δ_H 6.34, 5.07, 5.03, 3.90, 3.44, 2.53 ve 2.27’de gözlenen birer proton değerindeki sinyaller, siklopentan-piran halkasında 7 metin fonksiyonunun varlığını göstermektedir. δ_H 4.13 ve 3.79 (1H, d, $J = 13.1$ Hz)’daki sinyaller AB sistem şeklinde gözlenmiştir ve bir hidroksimetilen fonksiyonunun varlığını işaret etmektedir. H-1 asetal sinyali δ_H 5.03’de (1H, d, $J = 9.7$ Hz) gözlenmekte ve COSY spektrumunda (Spektrum 8) δ_H 2.53 (1H, dd, $J = 9.7/7.6$ Hz, H-9) metin protonuyla, H-9 protonu ise δ_H 2.27’deki (1H, m, H-5) metin protonuyla korelasyon

göstermektedir. H-5 protonunun (δ_H 2.27) δ_H 5.07 (1H, dd, $J = 5.8/4.6$ Hz, H-4)'deki olefinik proton ve 3.90 (1H, H-6)'daki oksi metin protonuyla; H-4'ün (δ_H 5.07) ise δ_H 6.34 (1H, dd, $J = 6.1/1.8$ Hz, H-3)' deki olefinik proton ile korelasyonları çift bağın C-3 ve C-4 arasında bulunduğunu göstermiştir. H-3 ve H-4 sinyallerinin dublet dublet şeklinde gözlenmeleri C-5'in süstitüe olmadığını doğrulamıştır. H-6 protonuna ait oksimetin sinyalinin (δ_H 3.90) δ_H 3.44 (1H, d, $J = 0.9$ Hz, H-7)'deki oksimetin protonuyla korelasyonu, H-7 ve H-9 protonlarının başka korelasyon göstermemesi ve H-9'un dd olarak gözlenmesi C-8 konumunda proton olmadığına işaret etmektedir. HMQC spektrumu (Spektrum 9) incelendiğinde ise yukarıda bahsedilen protonların bağlı olduğu C atomları bulunmuştur (Tablo 14). C-6 ve C-7'ye ait δ_C 79.57 ve 62.52'deki karbon rezonanslarının kimyasal kayma değerlerinden, siklopentan halkasında 2 oksimetin fonksiyonunun varlığı doğrulanmıştır ve bu değerler C-7 ile C-8 arasında epoksit taşıyan katalpol'un rezonanslarıyla uyum göstermiştir. C-8'in δ_C 66.18'de katerner olarak gözlenmesi hidroksimetilen grubunun buradan bağlı olabileceğini düşündürmüştür. HMBC spektrumunda (Tablo 14, Spektrum 10) H_2 -10/C-7 H_2 -10/C-8, ve H_1 -10/C-9, korelasyonları bu düşüncüyü doğrulamıştır. H-1'/C-1 korelasyonu β -glukoz ünitesinin C-1 pozisyonundan bağlı olduğunu göstermektedir. ^{13}C NMR ve DEPT-135 spektrumlarında (Tablo 14, Spektrum 7) aromatik sahada 141.78 (CH, C-3) ve 103.99 ppm (CH, C-4)'de gözlenen sinyaller C-3 ve C-4 arasında çift bağ olduğunu doğrulamaktadır.

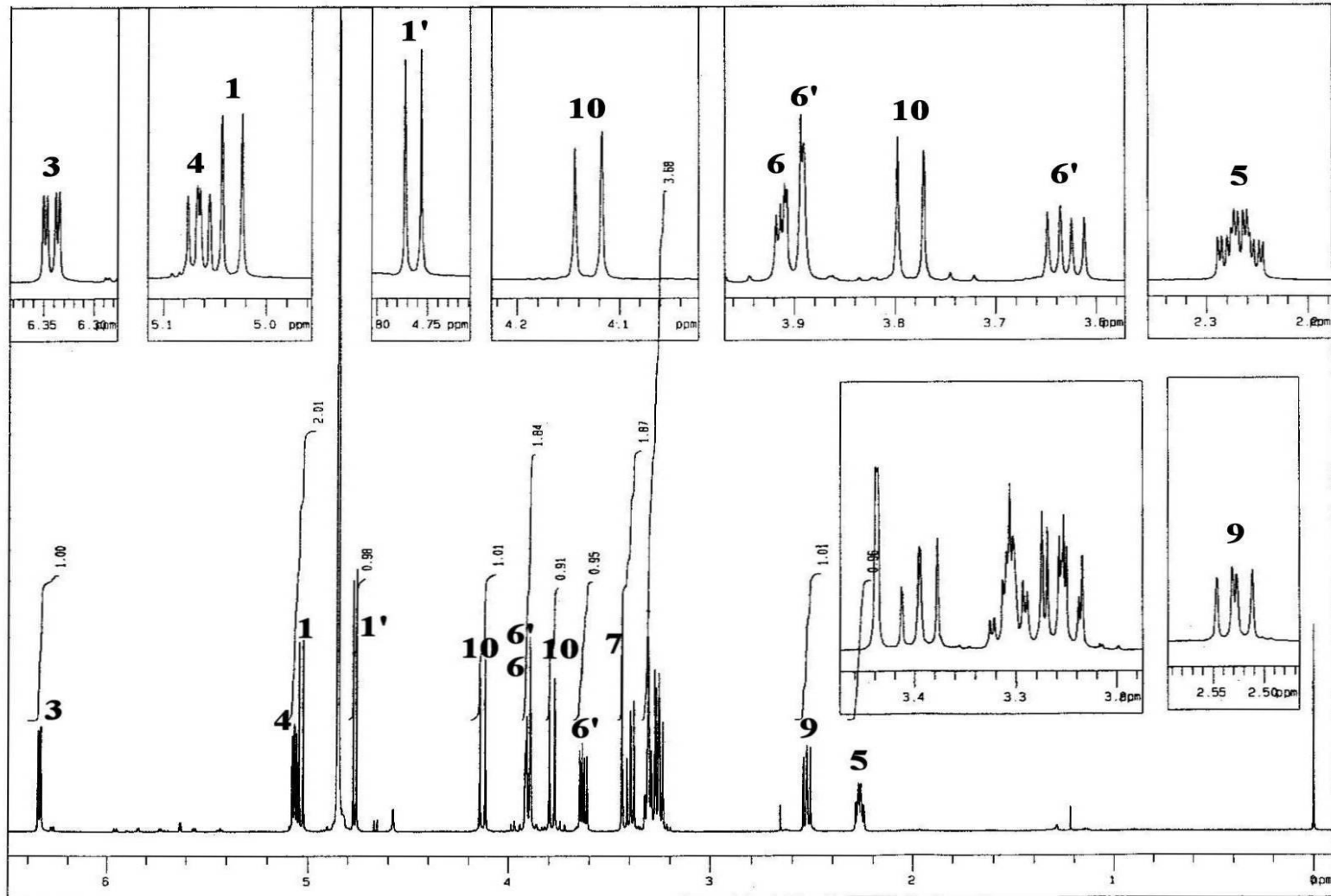
PL-6 bileşiğinin yapısı, COSY, HMQC, HMBC ve HR ESI-kütle spektrumları yardımıyla katalpol olarak aydınlatılmıştır ve tüm spektroskopik bulgular literatürde katalpol için verilen değerlerle uyum göstermektedir (92-95).

Tablo 14. Katalpol [**PL-6**]' ün ^{13}C ve ^1H NMR Spektroskopik Değerleri*
(CD_3OD ; ^{13}C :125 MHz; ^1H : 500 MHz); Önemli HMBC Korelasyonları

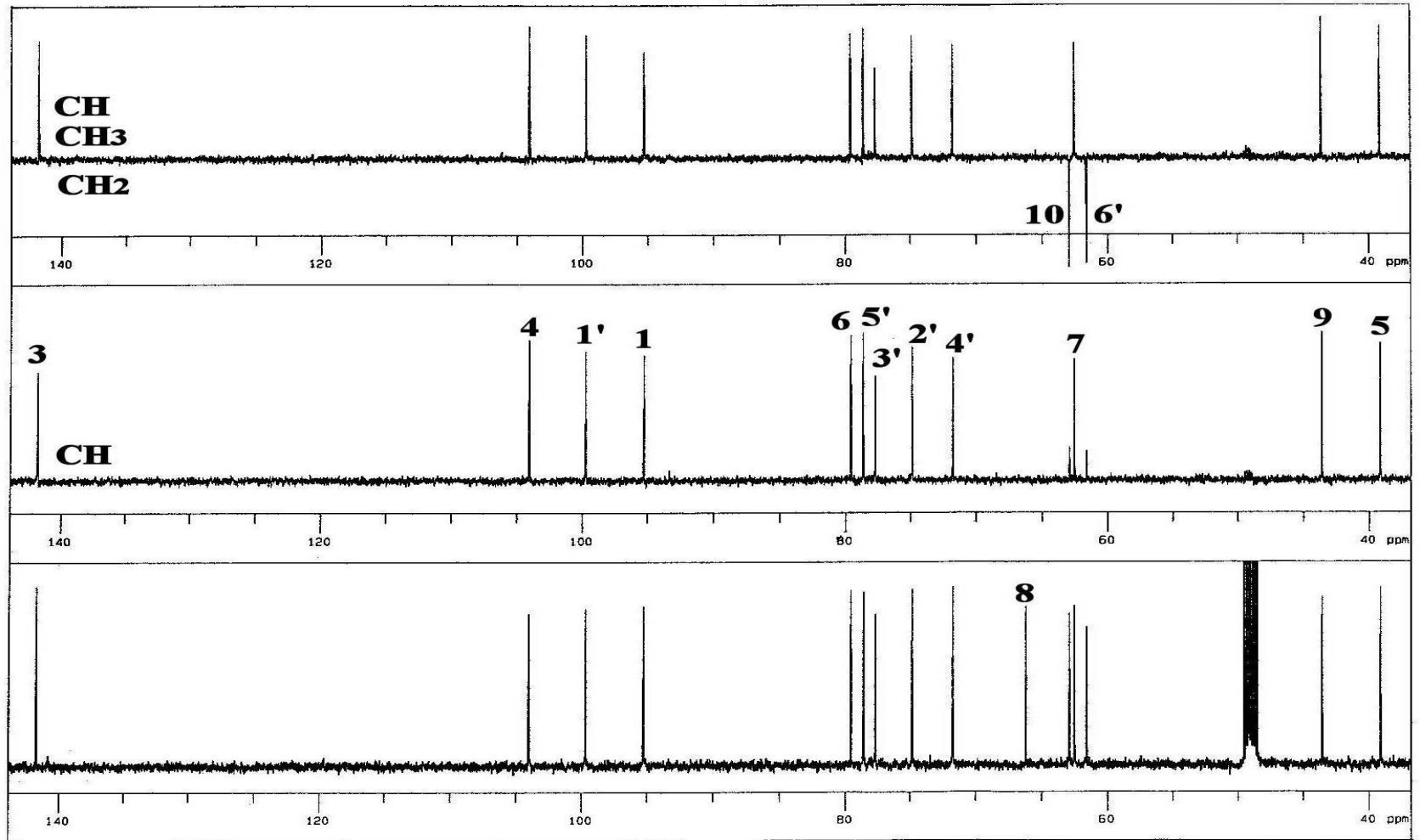
C/H Atom	DEPT	δ_{C} ppm	δ_{H} ppm	J (Hz)	HMBC (H→C)
Aglikon					
1	CH	95.26	5.03 d	(9.7)	C-1', C-9
3	CH	141.78	6.34 dd	(6.1/1.8)	C-1, C-4, C-5
4	CH	103.99	5.07 dd	(5.8/4.6)	C-1, C-3, C-5, C-6, C-9
5	CH	39.08	2.27 m		C-1, C-3, C-4, C-6, C-9
6	CH	79.57	3.90†		C-4, C-5, C-7, C=O†
7	CH	62.52	3.44 d	(0.9)	C-5, C-6
8	C	66.18			
9	CH	43.55	2.53 dd	(9.7/7.6)	C-1, C-5, C-6, C-7, C-8
10	CH ₂	61.58	4.13 d	(13.1)	C-7, C-8
			3.79 d	(13.1)	C-7, C-8, C-9
Glukoz					
1'	CH	99.68	4.76 d	(7.9)	C-1, C-2', C-3'
2'	CH	74.82	3.24 dd	(9.4/7.9)	C-1', C-3'
3'	CH	77.67	3.40 t	(9.1)	C-2', C-4'
4'	CH	71.74	3.27 dd	(9.5/7.0)	C-3', C-5', C-6'
5'	CH	78.59	3.31 m		C-4', C-6'
6'	CH ₂	62.89	3.90 dd	(12.1/1.8)	C-4'
			3.63 dd	(11.9/6.4)	C-4', C-5'

*Rezonanslar 2D NMR (COSY, HMQC ve HMBC) yardımıyla yorumlanmıştır.

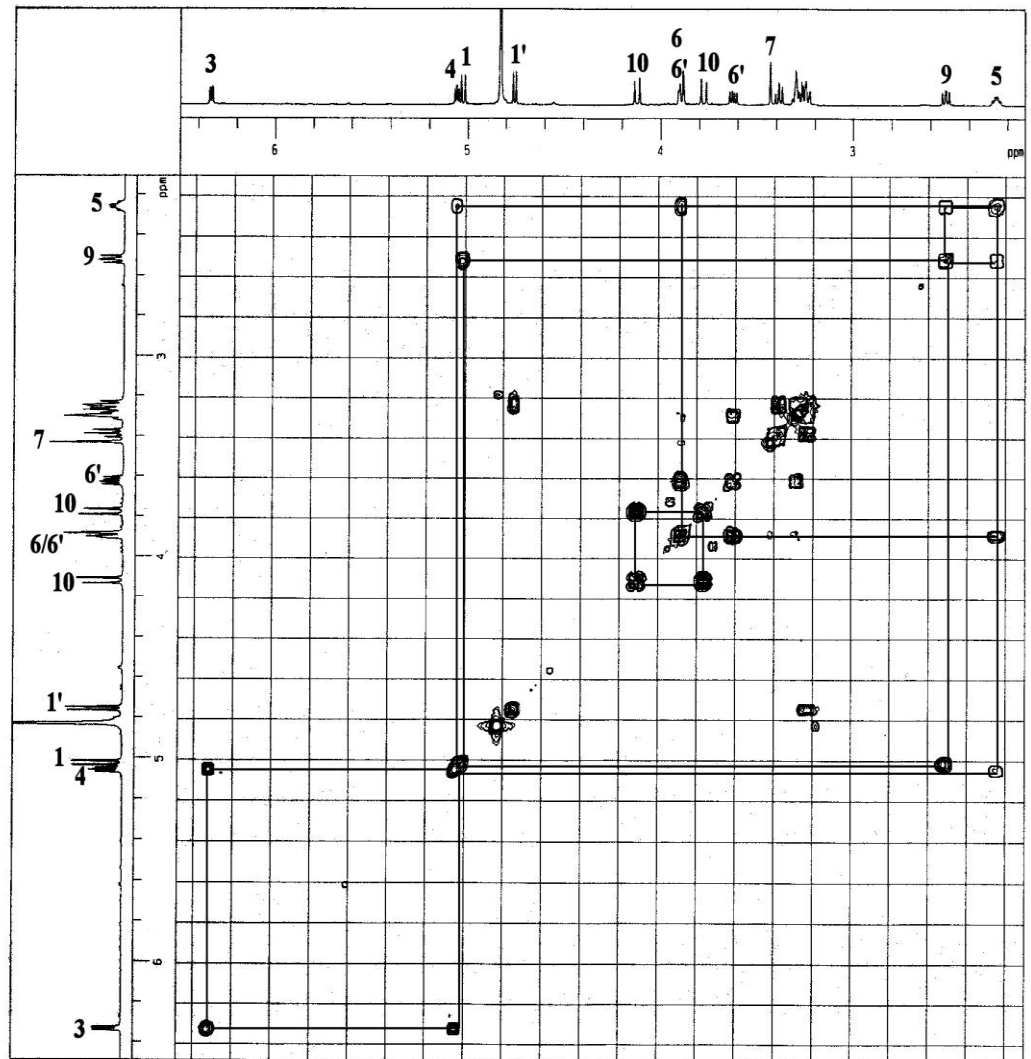
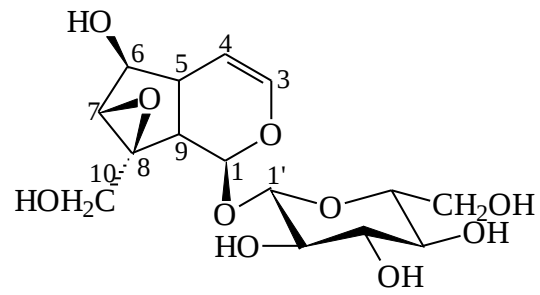
†Girişim nedeniyle J değerleri hesaplanamamıştır.



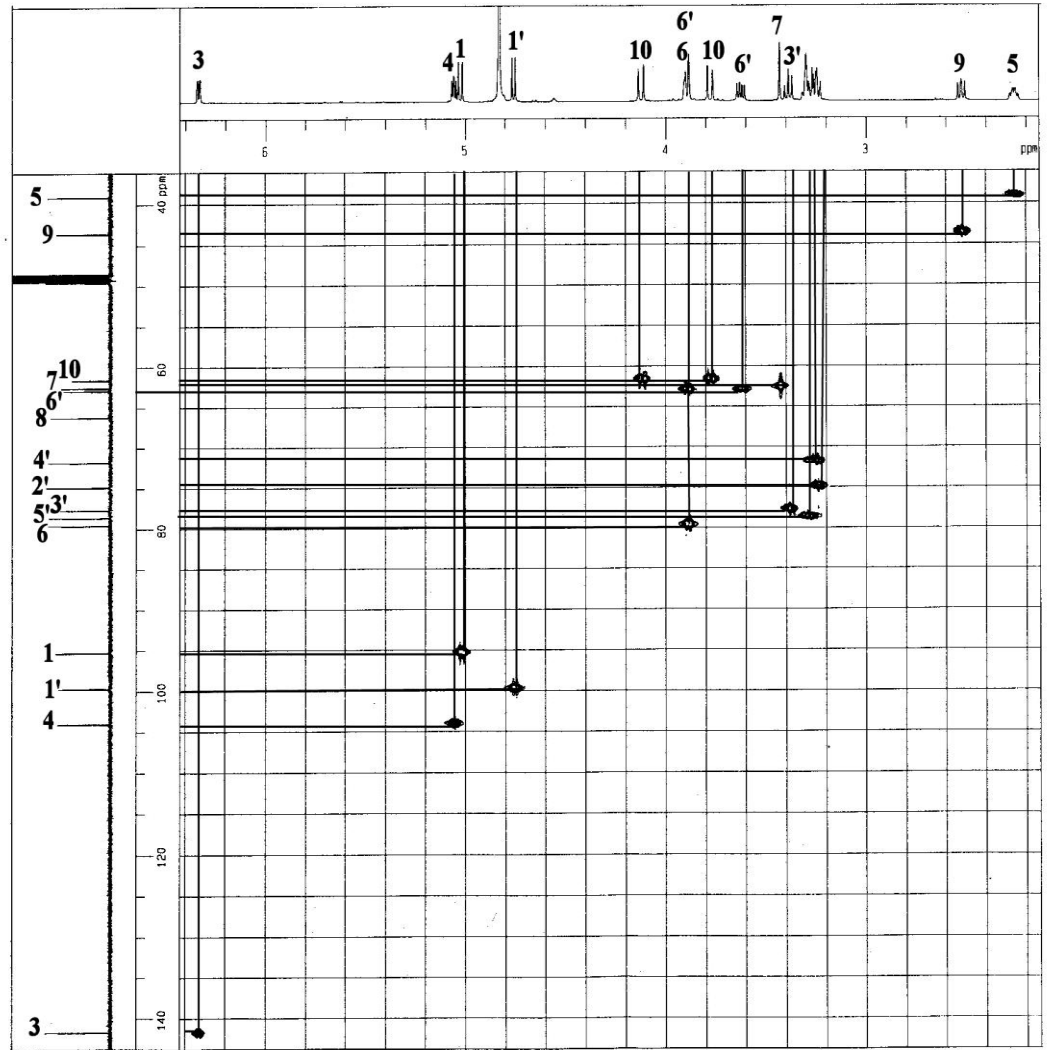
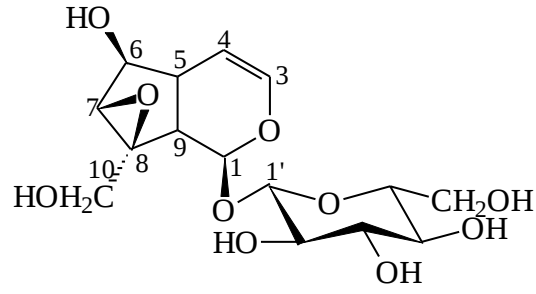
Spektrum 6. Katalpol [PL-6]' ün ^1H NMR Spektrumu (CD_3OD ; ^1H : 500 MHz)



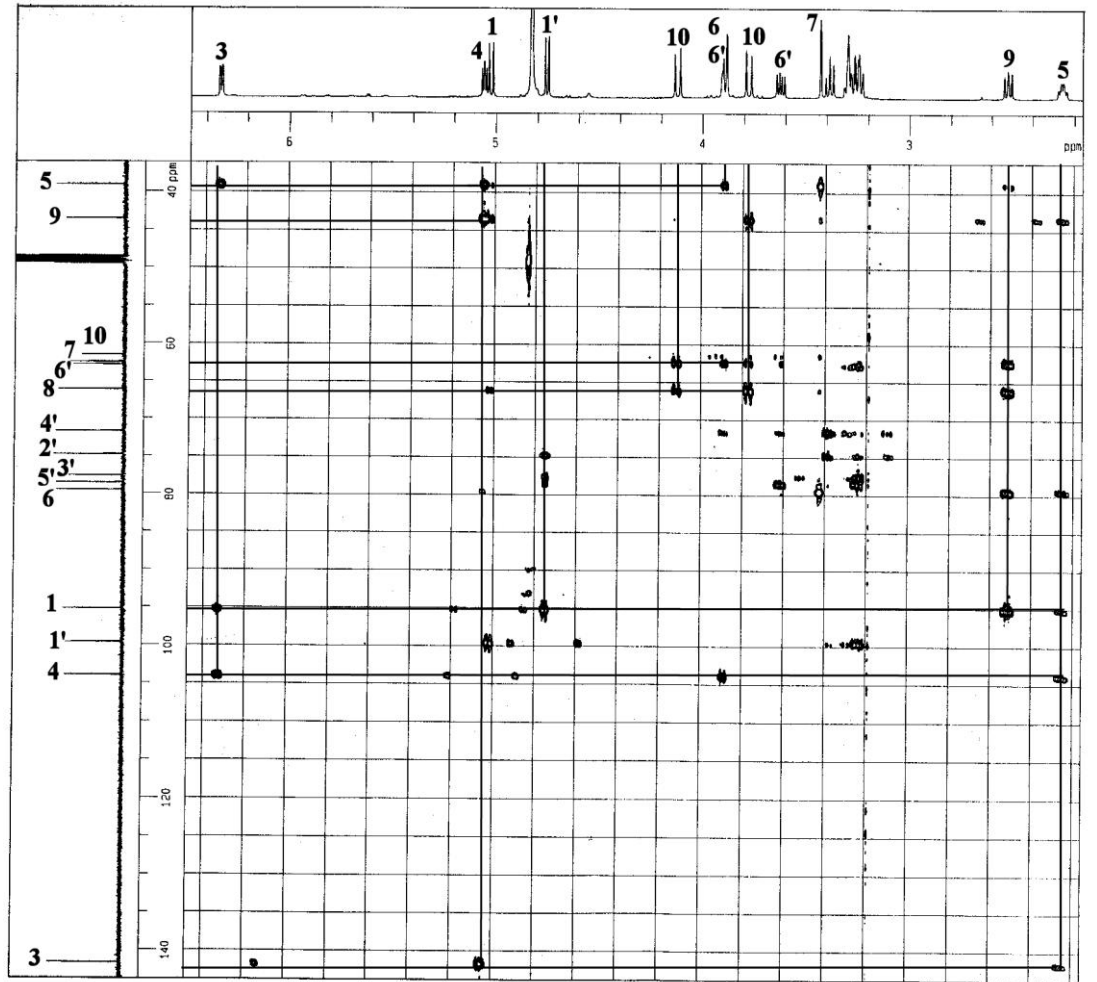
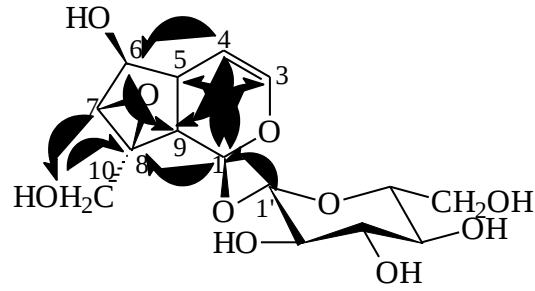
Spektrum 7. Katalpol [PL-6]'ün ^{13}C NMR ve DEPT Spektrumları (CD_3OD ; ^{13}C : 125 MHz)



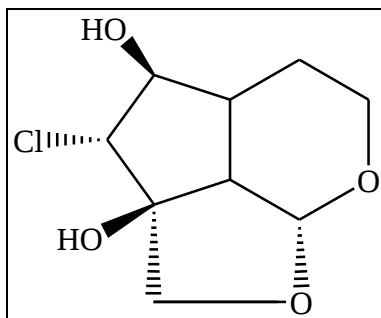
Spektrum 8. Katalpol [PL-6]' ün 2D ^1H , ^1H Homonükleer Korelasyonlu Spektrumu (COSY)



Spektrum 9. Katalpol [PL-6]' ün 2D ^1H , ^{13}C Heteronükleer Korelasyonlu (yakın mesafe) Spektrumu (HMQC)



Spektrum 10. Katalpol [PL-6]'ün 2D ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) NMR Spektrumu (HMBC)



REHMAGLUTİN D [PL-4]

C₉H₁₃O₄Cl Mol. Ağ. (220)

UV λ_{maks} (MeOH) nm	202
IR ν_{maks} (KBr) cm ⁻¹	3400 (OH), 1030 (C-O-C)
¹ H NMR	Tablo 15 Spektrum 11
¹³ C NMR ve DEPT	Tablo 15 Spektrum 12
COSY	Spektrum 13
HMQC	Spektrum 14
HMBC	Tablo 15 Spektrum 15

REHMA GLUTİN D [PL-4]

PL-4 bileşiği renksiz, amorf bir katı olarak elde edilmiştir. İTK analizinde vanilin/H₂SO₄ reaktifi püskürtüldükten sonra plağın 105 °C’de 1-2 dakika ısıtılması ile bileşiğe ait lekenin önce pembe-kırmızı bir renk alması ve daha sonra da siyaha yakın koyu-mor renge dönmesi bir iridoit olabileceğini düşündürmüştür. UV spektrumunda 202 nm’ de gözlenen absorpsiyon bandı, C-4’ün sübstitüe olmadığını işaret etmektedir. IR spektrumunda hidroksil (3400 cm⁻¹) ve eter (1030 cm⁻¹) absorpsiyon bantları görülmektedir.

Bileşiğin ¹H ve ¹³C NMR spektrumlarında; anomerik proton ve karbon sinyallerinin ayrıca oz bölgesi sinyallerinin bulunmaması, yapının glikozidik olmadığını göstermiştir. ¹³C NMR spektrumunda (Tablo 15, Spektrum 12) 9 C rezonansı görülmektedir. DEPT-135 spektrumunda 9 C rezonansının 1 katerner (C), 5 metin (CH) ve 3 metilen (CH₂) sinyaline ait olduğu anlaşılmıştır. Gözlenen 9 C rezonansı da yapıda glukoz veya başka bir şeker bulunmadığını ispatlamaktadır.

¹H-NMR spektrumunda (Spektrum 11) δ_H 5.30 (d, $J = 5.1$ Hz) da gözlenen bir proton değerindeki sinyal H-1 yariasetal sinyali olarak düşünülmüş ve COSY spektrumunda (spektrum 13) δ_H 3.42 (d, $J = 9.3$ Hz, H₂-10) ve δ_H 4.38 (d, $J = 9.3$ Hz, H₂-10) dışında tüm protonlar ile aynı spin sistemi içinde gözlenmiştir. COSY spektrumunda H-1 yariasetal sinyalinin (δ_H 5.30), δ_H 2.99 (H-9) daki metin protonuyla, H-9 protonunun δ_H 2.14 (m, 1H) de gözlenen H-5 metin protonu ile korelasyon göstermesi 5. ve 9. pozisyonların serbest olduğuna işaret etmiştir.

¹³C-NMR spektrumunda (Spektrum 12) gözlenen 3 metilen sinyalinin (δ_C 56.61; 72.73 ve 22.03) HMQC spektrumu (Spektrum 14) incelendiğinde 2 oksimetilen (δ_H 3.86 / 3.52 ve δ_H 3.42 / 4.38) ve bir metilen (δ_H 1.65 / 1.77) şeklinde oldukları anlaşılmıştır. Bu sinyallerden δ_H 3.42 ve 4.38 de AB sistem şeklinde gözlenen ve COSY de kendileri dışında herhangi bir spin sistemi içine girmeyen sinyaller bir hidroksimetilen varlığına işaret etmektedir. HMBC spektrumunda (Spektrum 15) δ_H 3.42 ile δ_C 85.23 (C-8) arasında korelasyon gözlenmesi bu grubun C-8 den bağlı olduğunu düşündürmüştür. Ayrıca δ_C 72.73 (CH₂, C-10) ile δ_H 4.06 (d, $J = 8.6$ Hz, H-7) ve δ_H 2.29 (dd, $J = 10.4/5.2$ Hz, H-9) protonları arasında

korelasyonlar görülmesi, oksimetilen fonksiyonunun (CH₂, C-10) C-8'e bağlı olduğunu doğrulamıştır.

Diğer taraftan δ_C 101.44 (CH, C-1) yarıasetal karbon rezonansının; δ_H 3.42 (d, $J = 9.3$ Hz, H₂-10) ve δ_H 4.38 (d, $J = 9.3$ Hz, H₂-10) ile korelasyon göstermesi C-1 ve C-10 arasında bir eter köprüsünün varlığına ve dolayısıyla trisiklik bir iridoit yapısına işaret etmektedir.

COSY spektrumunda; δ_H 2.14 (1H, m, H-5) protonunun δ_H 1.65 (m, H₂-4) ve δ_H 1.77 deki (m, H₂-4) metilen protonlarıyla; H-4'ün δ_H 3.86 (dd, $J = 12.0/2.8$ Hz, H₂-3) ve δ_H 3.52 (dd, $J = 10.6/4.3$ Hz, H₂-3) deki metilen protonları ile korelasyon göstermesi C-3 ve C-4 arasında çift bağ olmadığını göstermektedir. Diğer taraftan H-5 (δ_H 2.14) protonunun δ_H 3.81 (t, $J = 10.3$ Hz, H-6) deki oksimetin protonuyla, H-6'nın δ_H 4.06 (d, $J = 8.6$ Hz, H-7) daki oksimetin protonu ile korelasyon göstermesi; H-7 (δ_H 4.06) nin ise başka bir korelasyon göstermemesi H-8 konumunda proton olmadığını doğrulamaktadır.

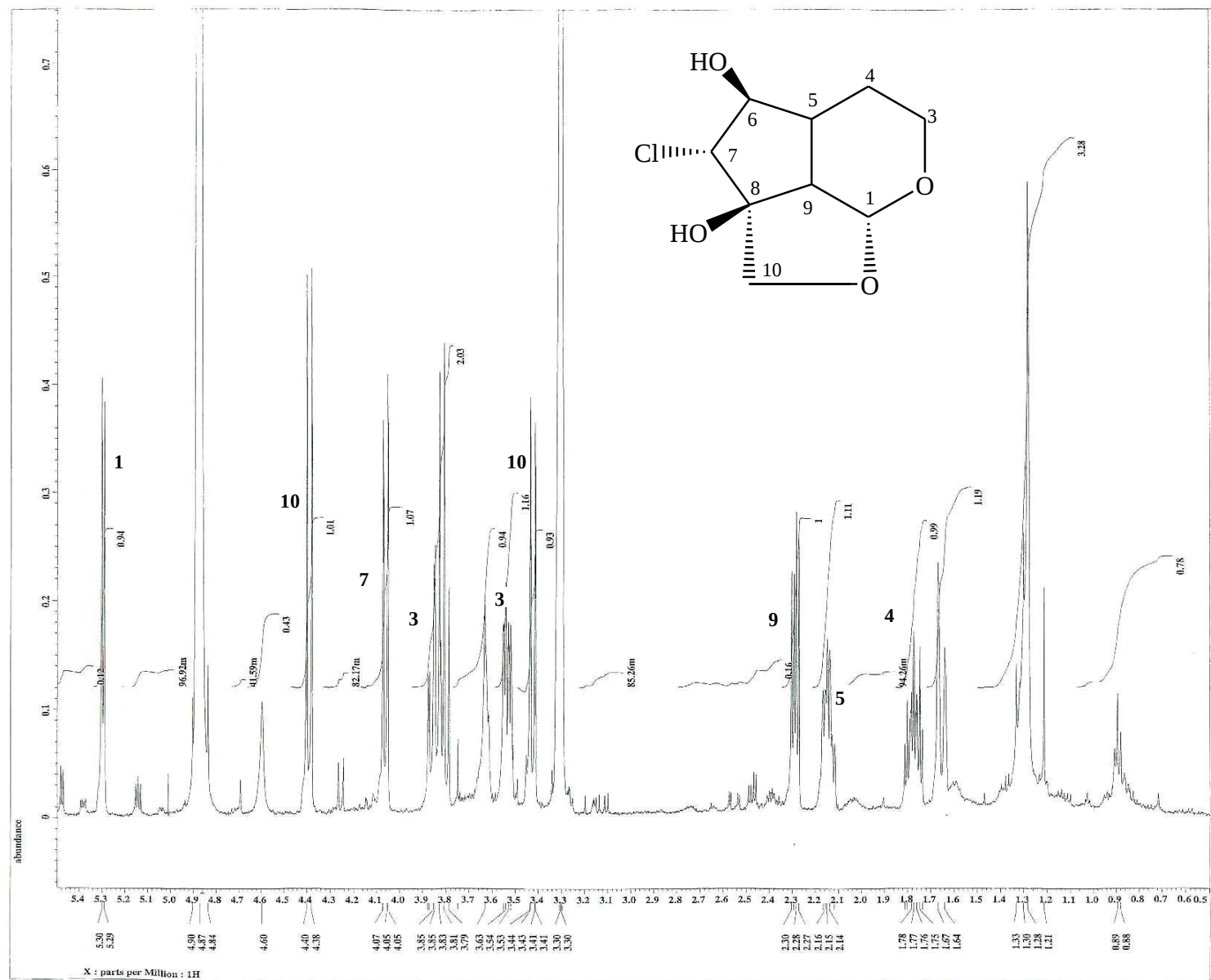
C-7 ye atfedilen karbon sinyalinin (δ_C 74.15), C-7 de OH taşıyan türevler ile karşılaştırıldığına (C-7 δ_C 84.6) yaklaşık 10 ppm yüksek alana kayması bu pozisyonda hidroksil yerine klor olabileceğini düşündürmüştür (96,97).

PL-4 bileşiğinin yapısı; COSY, HMQC, HMBC spektrumları yardımıyla rehmaglutin D olarak aydınlatılmıştır ve tüm spektroskopik bulgular literatürde rehmaglutin D için verilen değerlerle uyum göstermektedir. Rehmaglutin D, *Plantago* türlerinde ilk defa bu çalışma ile tanımlanmış ve yapısı aydınlatılmıştır (96,98).

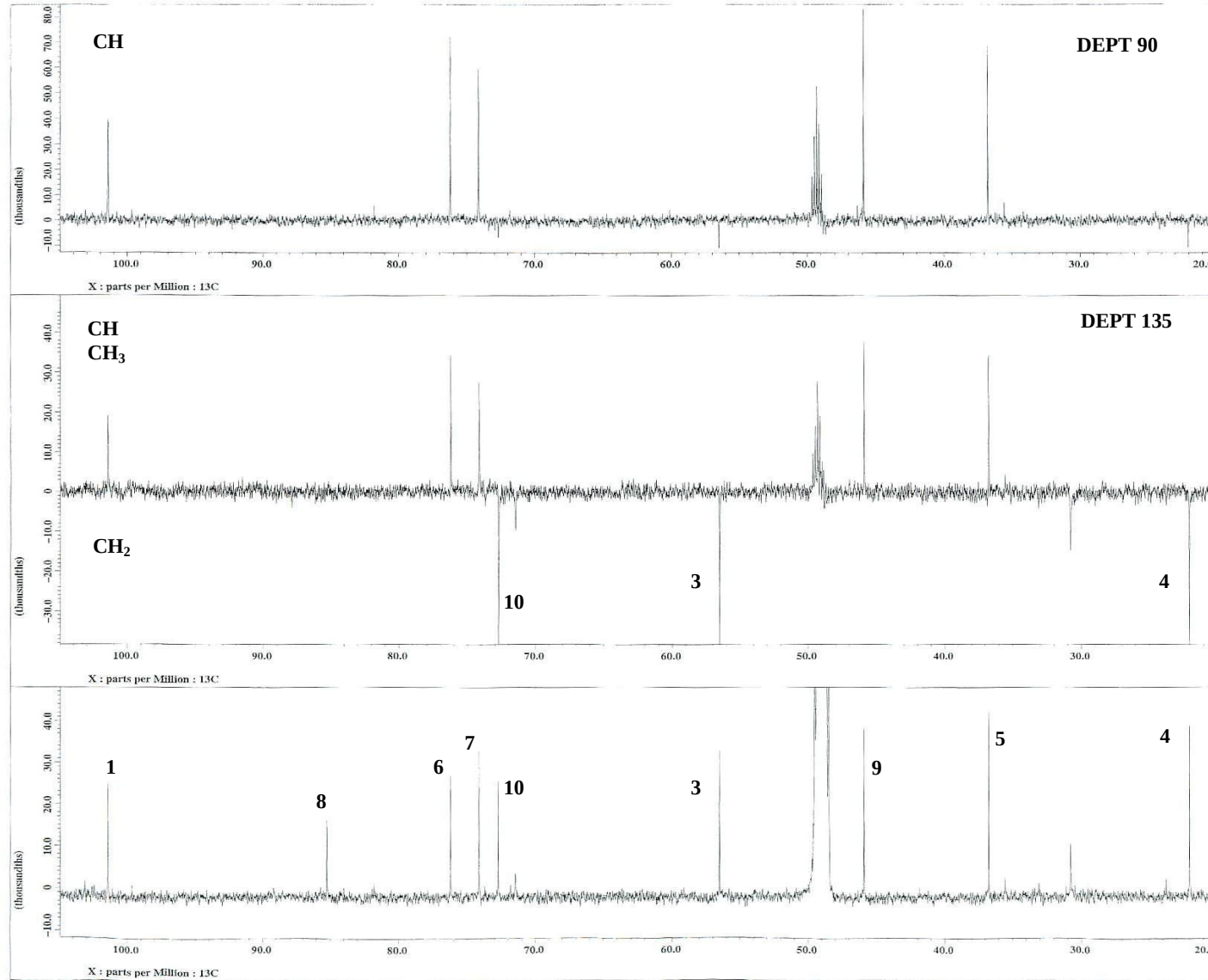
Tablo 15: Rehmaglutin D **[PL-4]**'nin ^{13}C ve ^1H NMR Spektroskopik Değerleri* (CD_3OD ; ^{13}C :125 MHz; ^1H : 500 MHz); Önemli HMBC Korelasyonları

C/H Atom	DEPT	δ_{C} ppm	δ_{H} ppm	J (Hz)	HMBC (H→C)
Aglikon					
1	CH	101.44	5.30 d	(5.1)	C-3, C-5, C-9
3	CH ₂	56.51	3.86 dd	(12.0/2.8)	C-4
			3.52 dd	(10.6/4.3)	C-1, C-5
4	CH ₂	22.03	1.65 m		C-3, C-6
			1.77 m		
5	CH	36.73	2.14 m		C-1, C-3, C-4, C-6
6	CH	76.23	3.81 t	(10.3)	C-5, C-7, C-9
7	CH	74.15	4.06 d	(8.6)	C-6, C-8, C-10
8	C	85.23			
9	CH	45.92	2.29 dd	(10.4/5.2)	C-1, C-6, C-10
10	CH ₂	72.73	3.42 d	(9.3)	C-7, C-8
			4.38 d	(9.3)	C-1, C-7, C-9

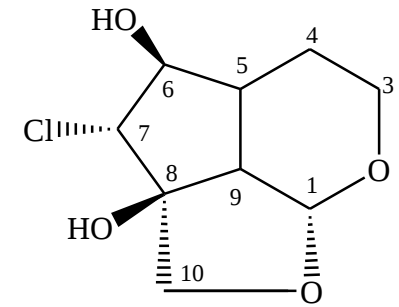
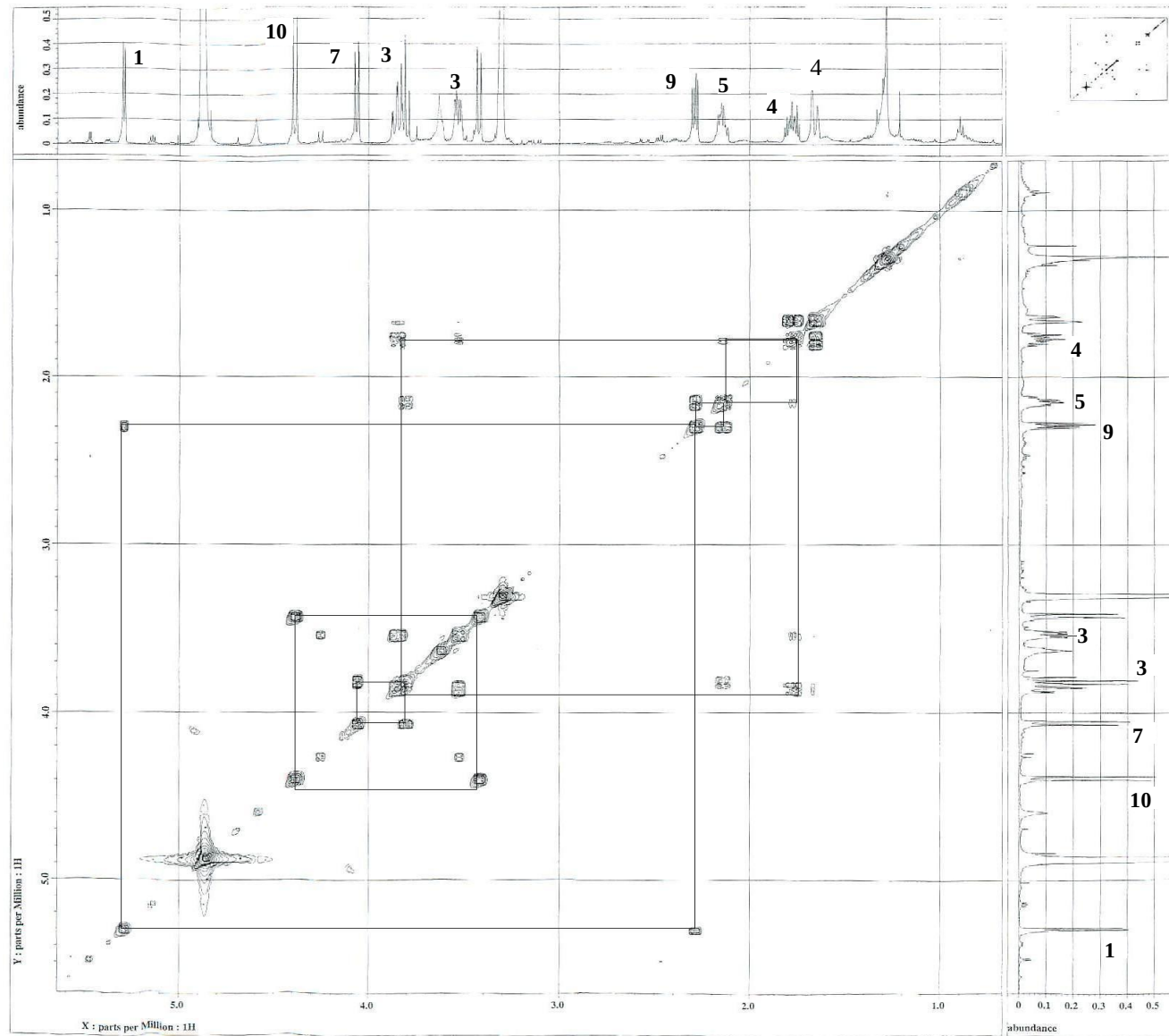
*Rezonanslar 2D NMR (COSY, HMQC ve HMBC) yardımıyla yorumlanmıştır.



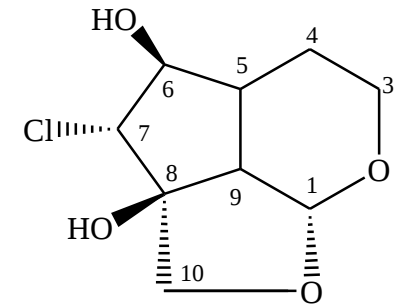
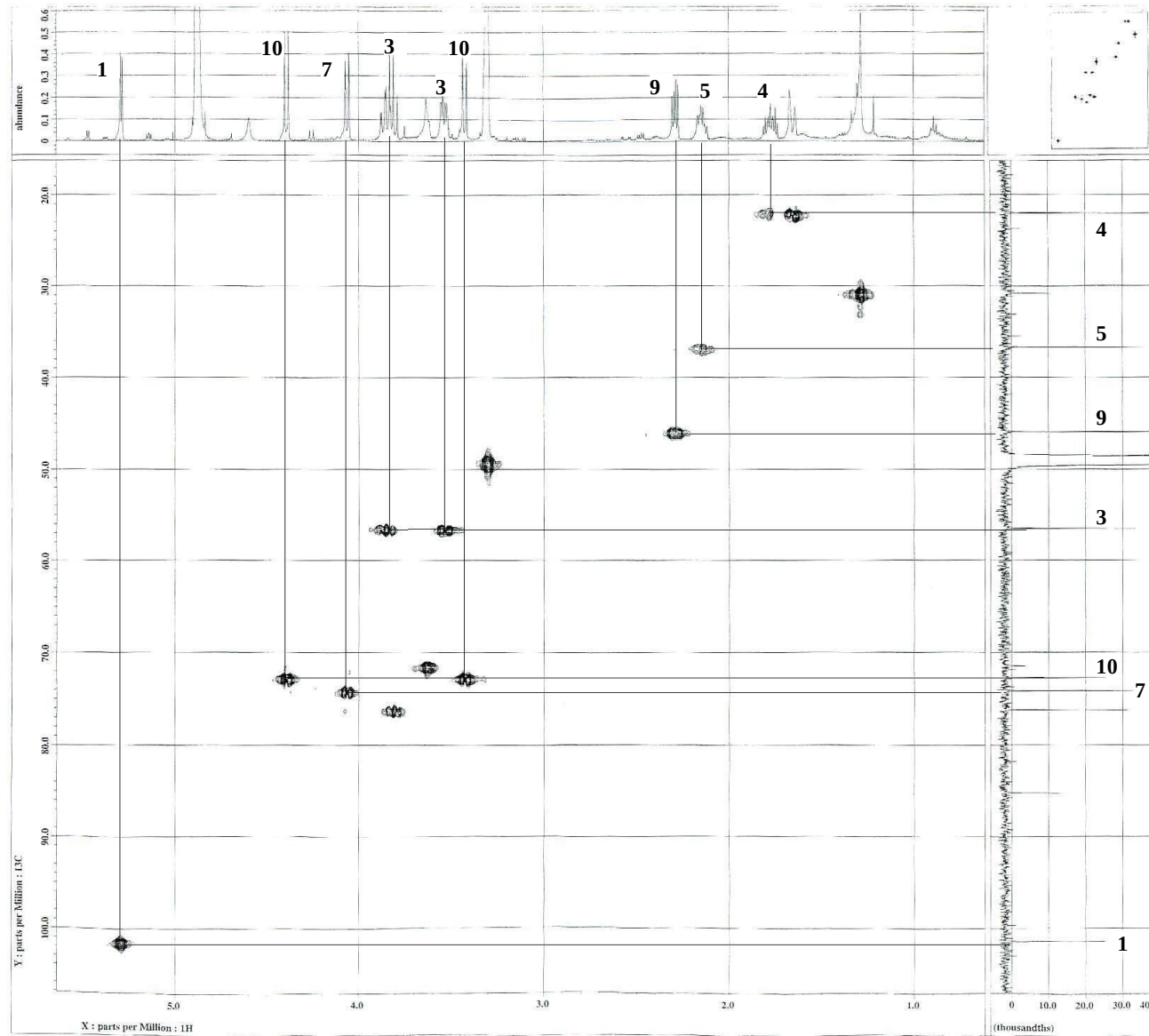
Spektrum 11. Rehmaglutin D [PL-4]'nin ^1H NMR Spektrumu (CD_3OD ; ^1H : 500 MHz)



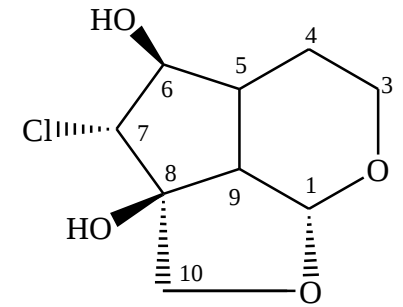
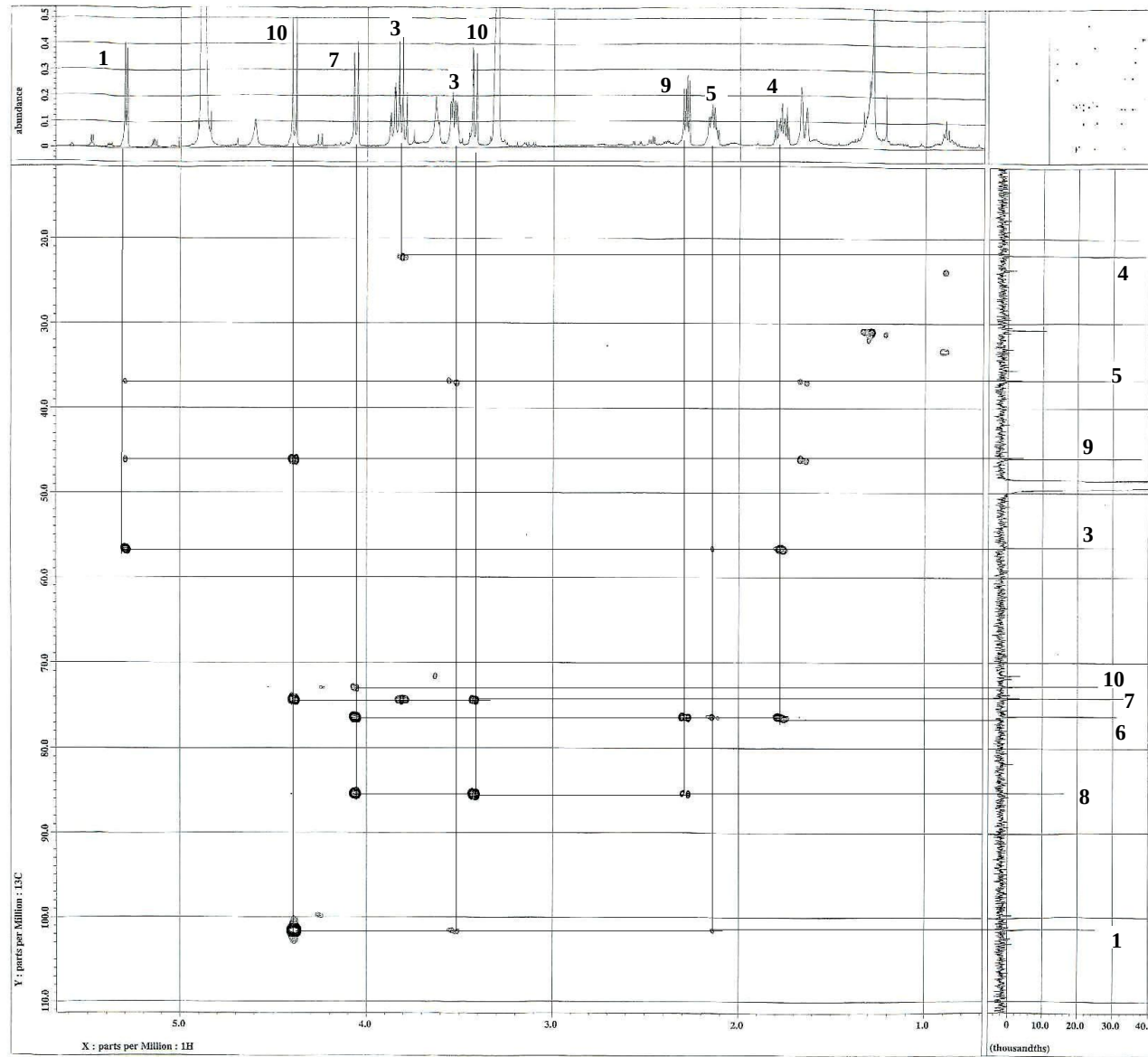
Spektrum 12. Rehmaglutin D [PL-4]'nin ^{13}C NMR ve DEPT Spektrumları (CD_3OD ; ^{13}C : 125 MHz)



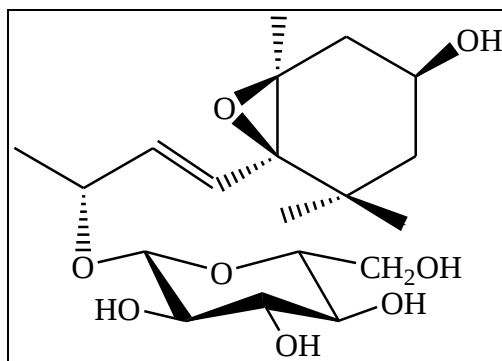
Spektrum 13. Rehmaglutin D [PL-4]' nin 2D ^1H , ^1H -Homonükleer Korelasyonlu NMR Spektrumu (COSY)



Spektrum 14. Rehmaglutin D [PL-4]'nin 2D ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (yakın mesafe) NMR Spektrumu (HMQC)



Spektrum 15. Rehmaglutin D [PL-4]'nin 2D ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) NMR Spektrumu (HMBC)



FİLOMUROZİT [PL-3]

C₁₉H₃₂O₈ (Mol. Ağ. 388)

UV λ_{maks} (MeOH) nm	210
IR ν_{maks} (KBr) cm ⁻¹	3400 (OH), 2950 (CH), 1640 (C=C), 1250 (C-O)
EI-MS (m/z)	389 [M+1] ⁺
¹ H NMR	Tablo 16 Spektrum 16
¹³ C NMR ve DEPT	Tablo 16 Spektrum 17
COSY	Spektrum 18
HMQC	Spektrum 19
HMBC	Tablo 16 Spektrum 20

FİLOMUROZİT [PL-3]

PL-3 bileşiği renksiz, amorf bir katı olarak elde edilmiştir. Bileşiğin EI-kütle spektrumunda m/z 389 $[M+1]^+$ de gözlenen pik ^{13}C NMR bulguları (Tablo 16 , Spektrum 17) ile birlikte değerlendirildiğinde, bileşiğin $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_8$ moleküler formülüne sahip olduğu bulunmuştur. UV spektrumu 210 nm’de maksimum absorbands gösterirken, IR spektrumunda serbest OH (3400 cm^{-1}) , CH (2950 cm^{-1}), C=C (1640 cm^{-1}) ve C-O (1250 cm^{-1}) absorpsiyon bantları gözlenmiştir.

^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarında (Tablo 16 , Spektrum 16 ve 17) δ_{H} 4.34 (d, $J = 8.0\text{ Hz}$, H-1') ve δ_{C} 102.6 (CH, C-1')' deki anomerik proton ve karbon sinyalleri, bileşiğin monoglikozidik bir yapıya sahip olduğu ve anomerik protonun kenetlenme sabitinden ($J = 8.0\text{ Hz}$), bağ konfigürasyonunun β olduğu anlaşılmaktadır. 62.57-78.13 ppm arasında gözlenen 5 karbon rezonansı ve 3.17-3.81 ppm arasında gözlenen proton sinyalleri yapıda bir heksoz varlığını doğrulamaktadır. COSY (Spektrum 18) ve HMQC (Spektrum 19) spektrumlarının birlikte değerlendirilmesi sonucunda uzun β -glukoz olduğu anlaşılmıştır.

^{13}C NMR spektrumunda (Tablo 16, Spektrum 17) 19 C rezonansı görülmektedir. DEPT-135 spektrumunda 19 C rezonansının 3 katerner (C), 9 metin (CH), 3 metilen (CH_2) ve 4 metil (CH_3) C'una ait olduğu anlaşılmıştır. Bu rezonanslardan glukoza ait 6 sinyal çıkarıldığında, aglikonun 13 karbona sahip olduğu bulunmuştur.

^1H NMR ve ^{13}C NMR spektrumlarında (Tablo 16 , Spektrum 16 ve 17); δ_{H} 1.18 (s, H_3 -11); δ_{H} 1.11 (s, H_3 -12) ve δ_{H} 0.96 (s, H_3 -13) olmak üzere 3 tersiyer metil ve δ_{H} 1.27 (d, $J = 6.2\text{ Hz}$, H_3 -10) rezonansında 1 sekonder metil sinyali gözlenmiştir. δ_{C} 64.57 (CH, C-3), δ_{C} 68.05 (C, C-5) ve δ_{C} 71.2 (C, C-6)'deki düşük alana kaymış rezonanslar siklik yapıda yer alan oksijene komşu karbonları düşündürmüştür. ^1H NMR ve ^{13}C NMR spektrumlarında, δ_{H} 5.95 (d, $J = 16.0\text{ Hz}$); δ_{H} 5.71 (dd, $J = 16.0/6.8\text{ Hz}$) ve δ_{C} 127.75 (CH, C-7); δ_{C} 137.14 (CH, C-8)'de gözlenen proton ve karbon sinyalleri; C-7 ile C-8 arasında *trans*-çifte bağ varlığını göstermiştir. Bileşiğin COSY spektrumunda δ_{H} 1.22 ve δ_{H} 1.54 gözlenen metilen protonlarının, δ_{H} 3.73 (1H, m, H-3) de gözlenen oksimetin protonu ile, H-3 ün de δ_{H} 1.59 ve δ_{H} 2.25 deki metilen protonları ile aynı spin sisteminde olması, diğer taraftan δ_{H} 5.95 (d, $J =$

16.0, H-7) da gözlenen olefinik proton ile δ_H 5.71 (dd, $J = 16.0/6.8$, H-8) deki olefinik protonun, H-8 ile 4.41 (t, $J = 6.3$, H-9) de gözlenen oksimetin protonunun ve bu oksimetin ile de δ_H 1.27 de dublet ($J = 6.2$) şeklinde gözlenen sekonder metil grubunun korelasyonu ile megastigman yapısı ortaya çıkmıştır (Spektrum 18). Tersiyer metil grupları da HMBC de gösterdikleri korelasyonlar ile 1. ve 5. konumlara yerleştirilmişlerdir (Spektrum 20).

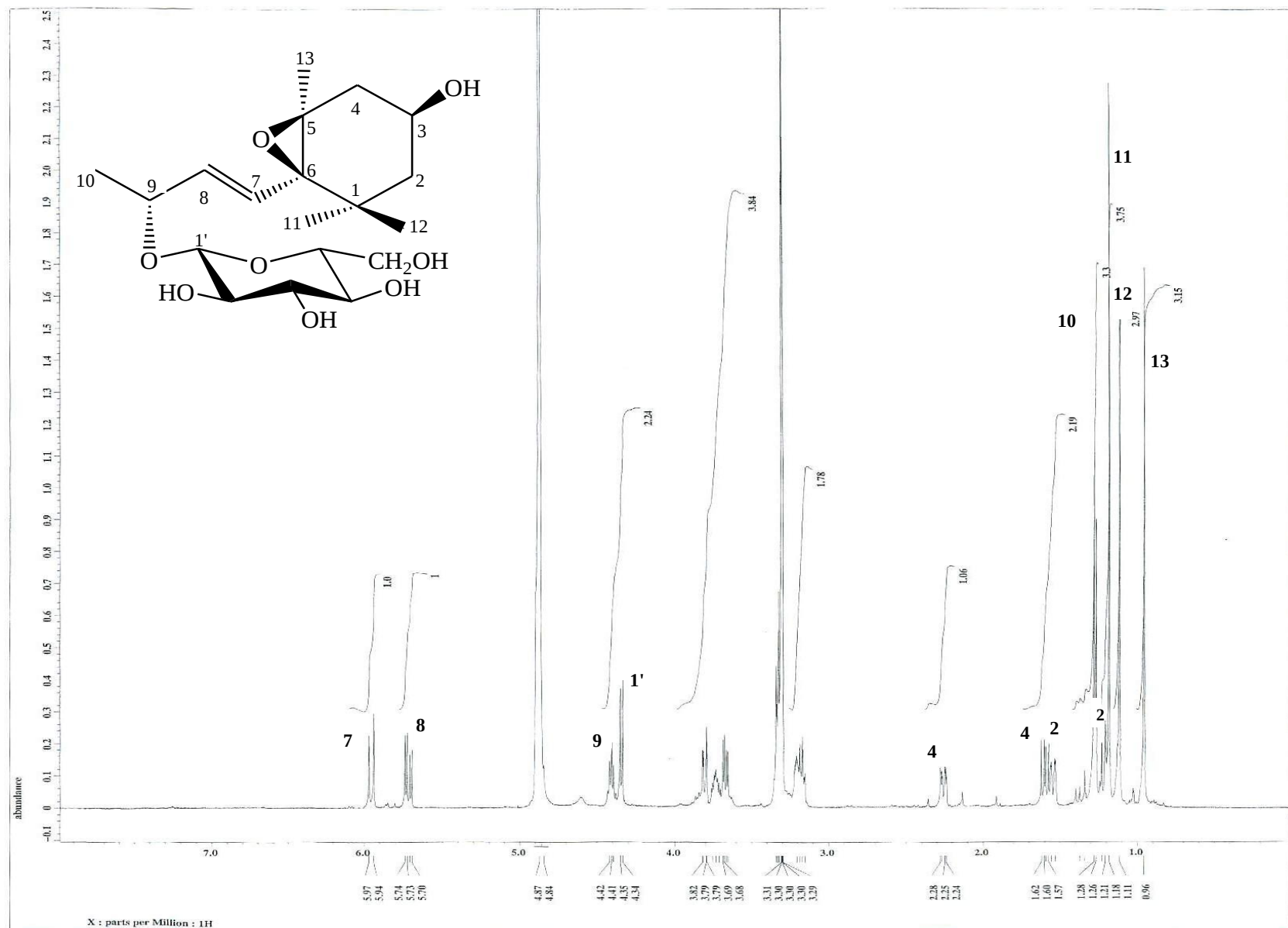
HMBC spektrumunda glukozun anomerik protonu (δ_H 4.34 d, $J = 8.0$) ile δ_C 76.93 (CH, C-9) arasında gözlenen korelasyon glukozun aglikona bu noktadan bağlı olduğunu göstermektedir.

PL - 3 bileşiğinin yapısı, COSY, HMQC, HMBC ve HR ESI-kütle spektrumları yardımıyla megastigman glukoziti (filomurozit) olarak aydınlatılmıştır ve tüm spektroskopik bulgular literatürde bu bileşik için verilen değerlerle uyum göstermektedir (99,100).

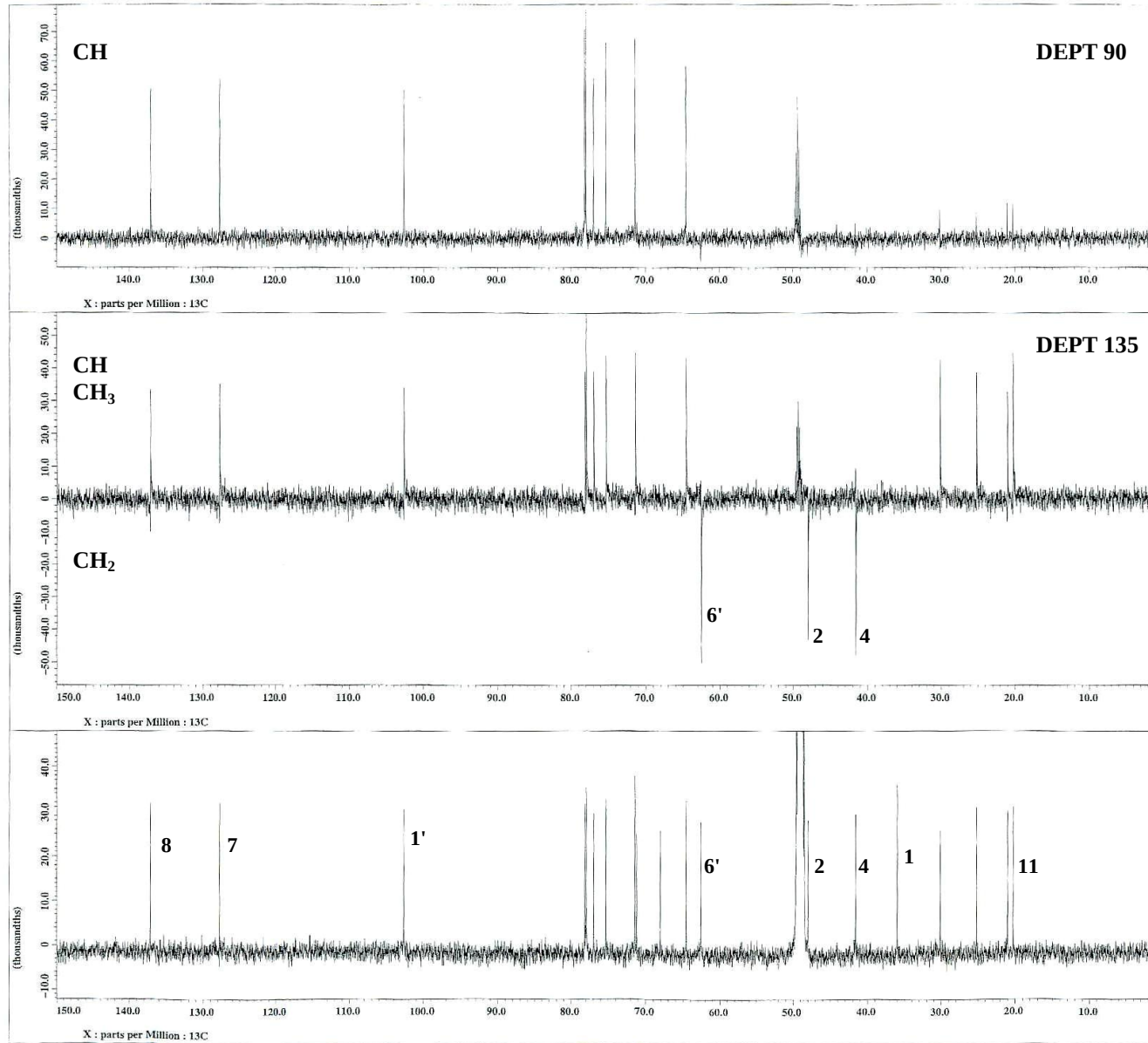
Tablo 16: Filomurozit [PL-3]'in ^{13}C ve ^1H NMR Spektroskopik Değerleri*
(CD_3OD ; ^{13}C :125 MHz; ^1H : 500 MHz); Önemli HMBC Korelasyonları

C/H Atom	DEPT	δ_{C} ppm	δ_{H} ppm	J (Hz)	HMBC (H→C)
Aglikon					
1	C	35.96			
2	CH_2	48.68	1.22 dd	(10.9/2.6)	
			1.54 dd	(12.6/2.6)	C-3, C-4
3	CH	64.57	3.73 m		C-2, C-4
4	CH_2	41.60	1.59 dd	(9.2/14.2)	
			2.25 dd	(4.8/14.0)	C-2, C-3, C-5
5	C	68.05			
6	C	71.20			
7	CH	127.75	5.95 d	(16.0)	C-6, C-9
8	CH	137.14	5.71 dd	(16.0/6.8)	C-6, C-9
9	CH	76.93	4.41 t	(6.3)	C-1', C-7, C-8, C-10
10	CH_3	21.00	1.27 d	(6.2)	C-9
11	CH_3	20.22	1.18 s		
12	CH_3	30.12	1.11 s		C-2, C-13
13	CH_3	25.14	0.96 s		C-2, C-12
Glukoz					
1'	CH	102.64	4.34 d	(8.0)	C-2', C-9
2'	CH	75.30	3.17 dd	(8.0/9.1)	C-1', C-3'
3'	CH	77.95	3.20 m	(9.0)	C-5', C-6
4'	CH	71.40	3.33 dd	(3.4/6.3)	
5'	CH	78.13	3.33		
6'	CH_2	62.57	3.81 dd	(2.5/11.6)	
			3.67 dd	(5.1/12.0)	

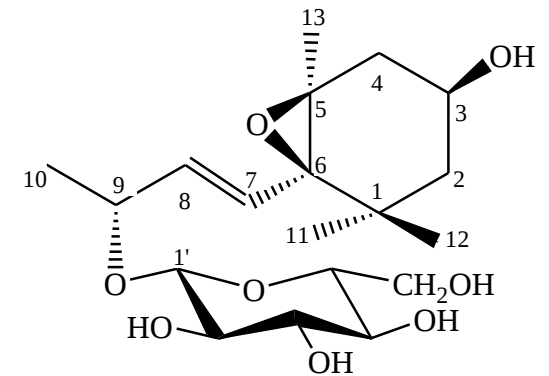
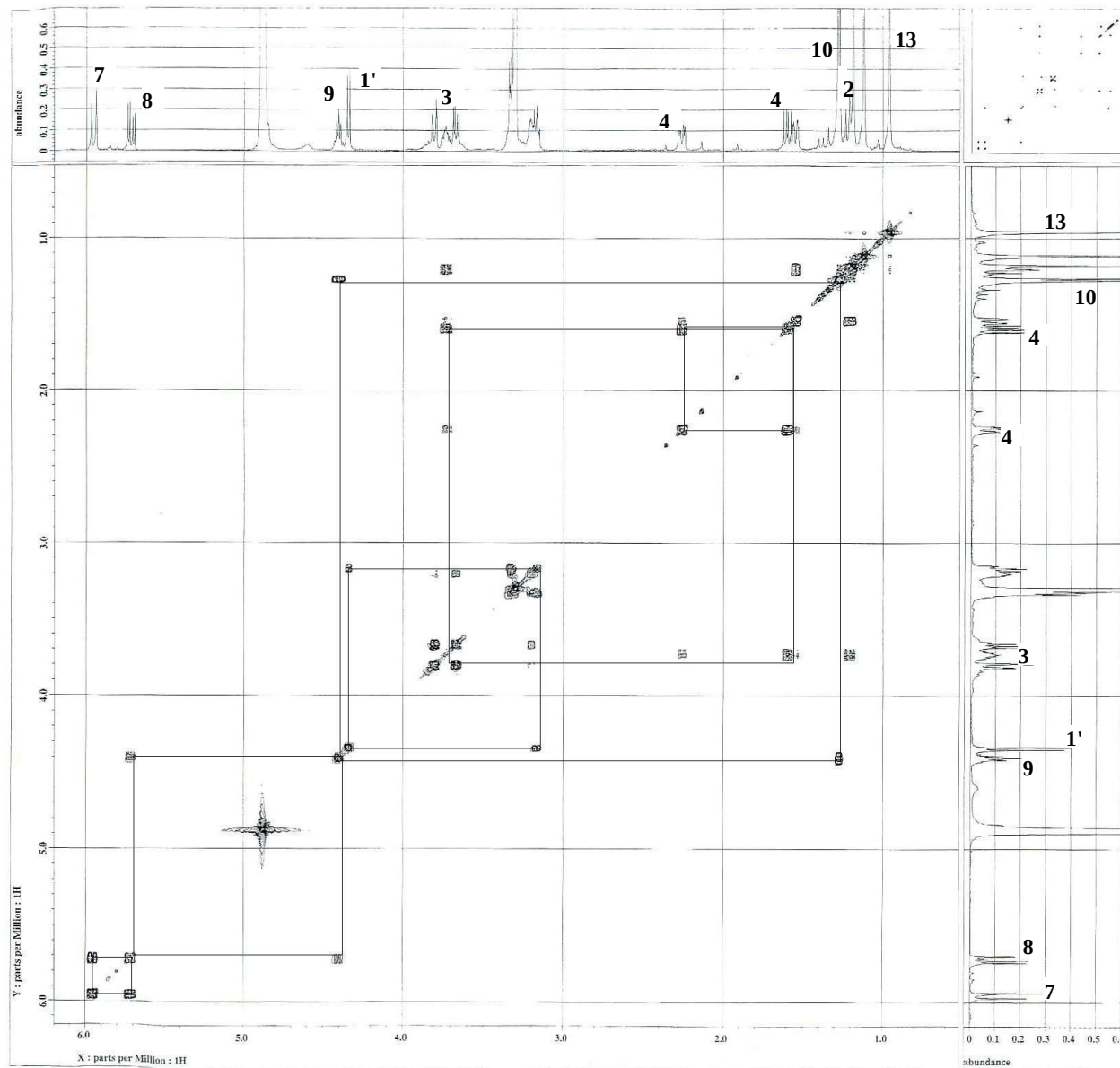
*Rezonanslar 2D NMR (COSY, HMQC ve HMBC) yardımıyla yorumlanmıştır.



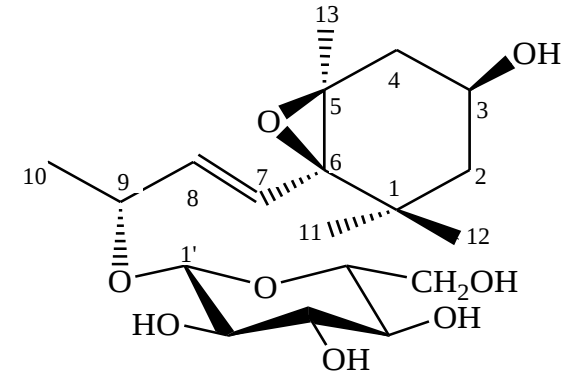
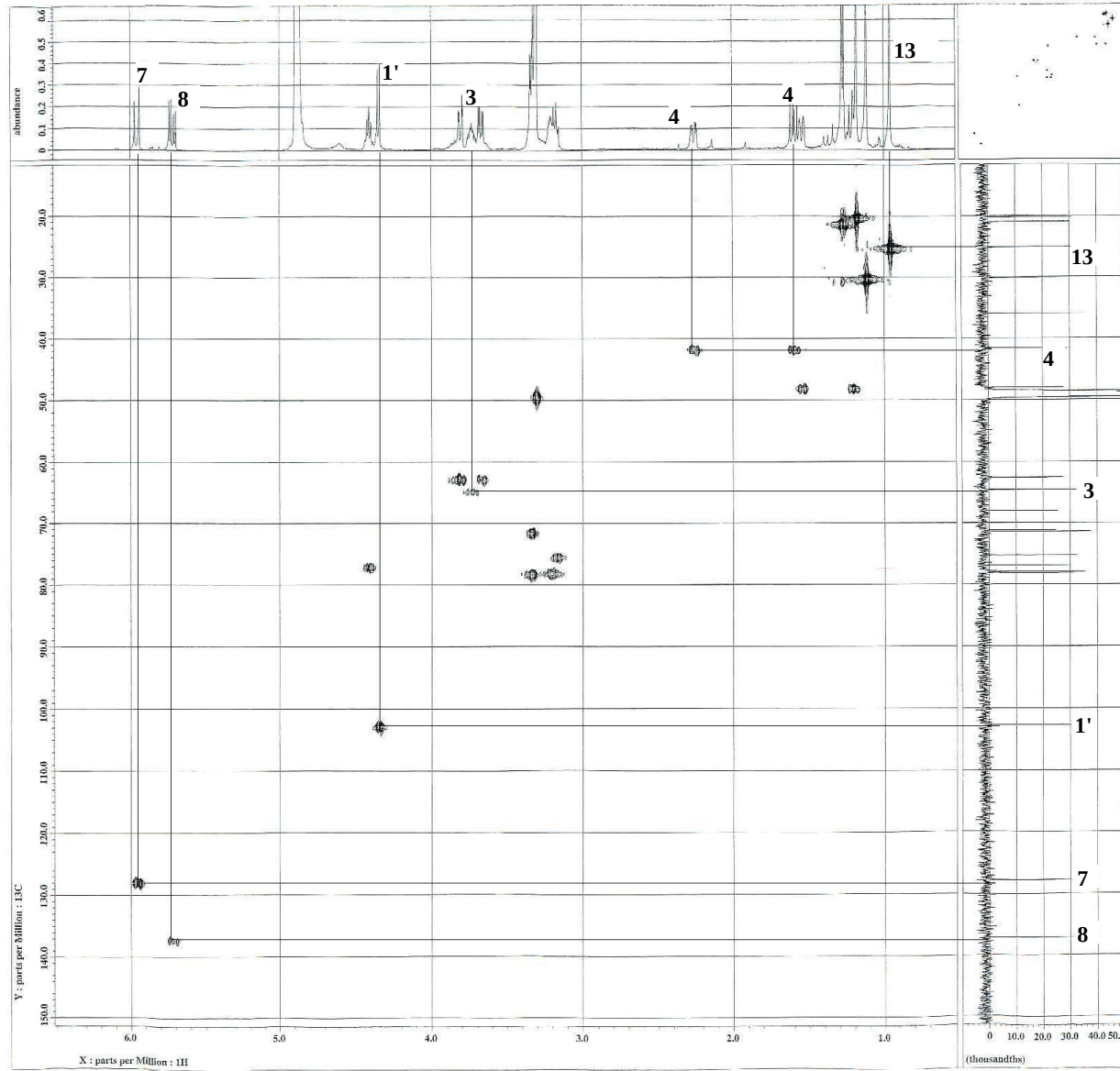
Spektrum 16. Filomurozit [PL-3]'in ^1H NMR Spektrumu (CD_3OD ; ^1H : 500 MHz)



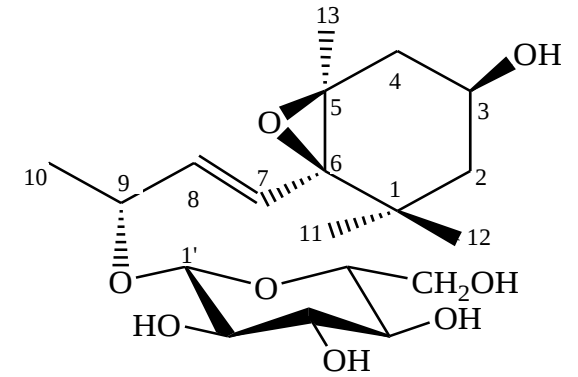
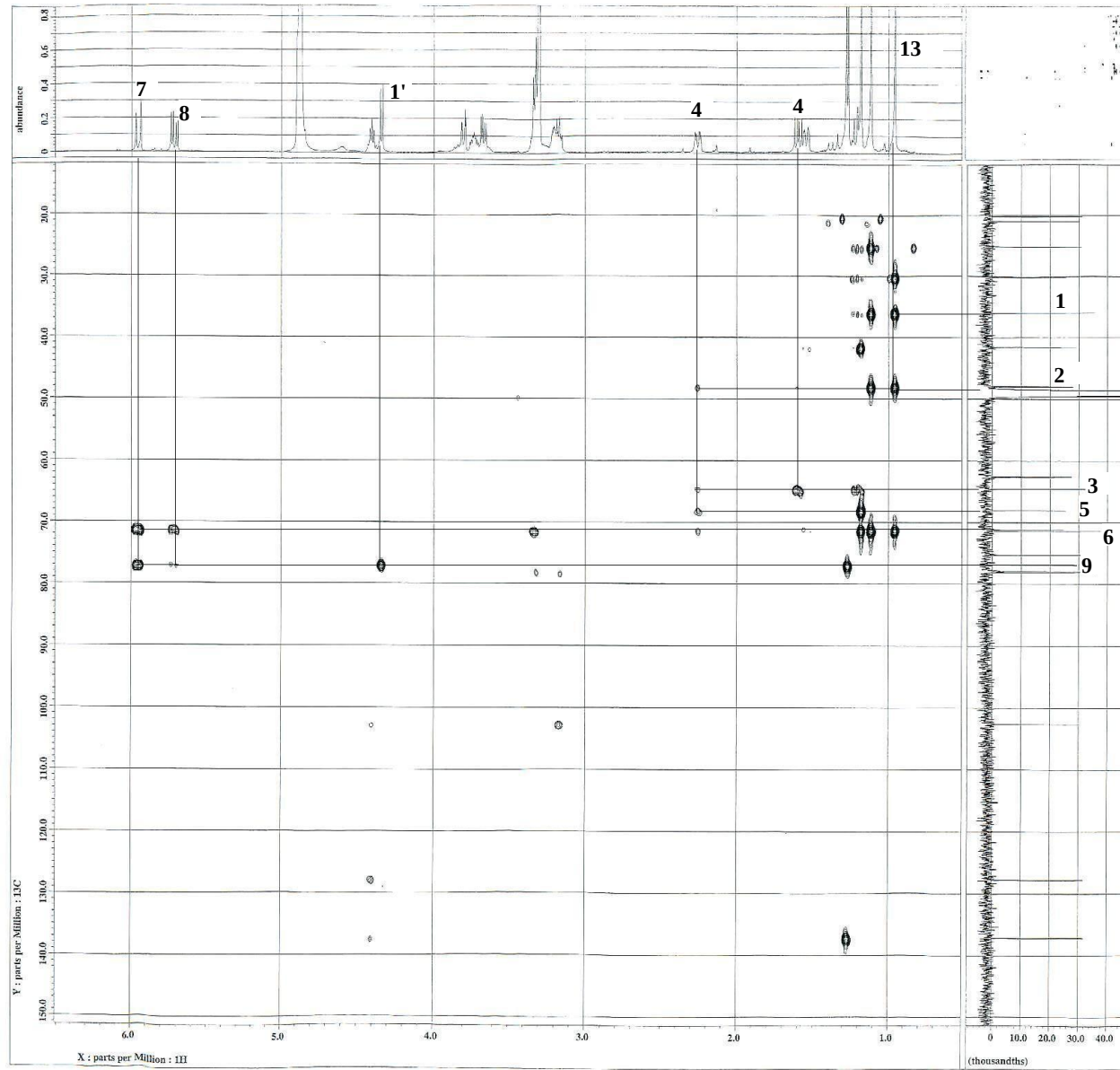
Spektrum 17. Filomurozit [PL-3]'in ^{13}C NMR ve DEPT Spektrumları (CD_3OD ; ^{13}C : 125 MHz)



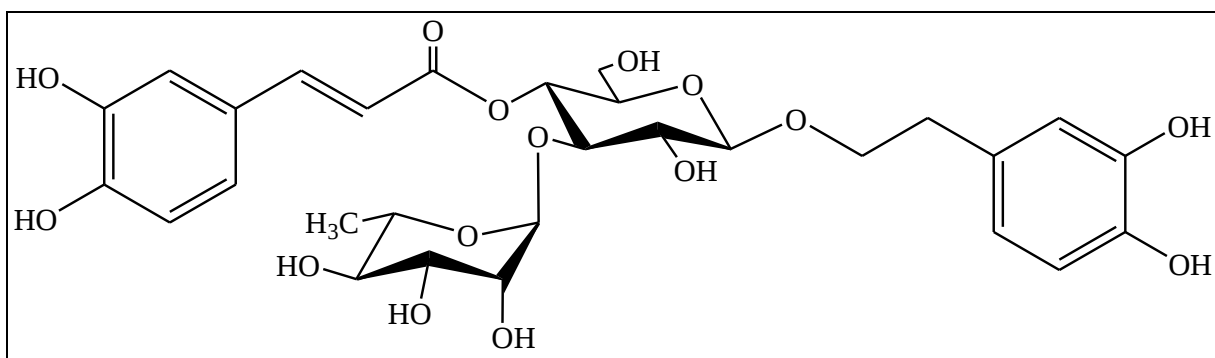
Spektrum 18. Filomurozit [PL-3]' in 2D ^1H , ^1H -Homonükleer Korelasyonlu NMR Spektrumu (COSY)



Spektrum 19. Filomurozit [PL-3]'in 2D ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (yakın mesafe) NMR Spektrumu (HMQC)



Spektrum 20. Filomurozit [PL-3]'in 2D ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) NMR spektrumu (HMBC)



AKTEOZİT (VERBASKOZİT) [PL-1]
C₂₉H₃₆O₁₅ (Mol. Ağı. 624)

UV λ_{maks} (MeOH) nm	220, (235), (250), 332
IR ν_{maks} (KBr) cm^{-1}	3400 (OH), 1695 (C=O), 1630 (C=C), 1610, 1520 (Aromatik Halka)
^1H NMR	Tablo 17 Spektrum 21
^{13}C NMR ve DEPT	Tablo 17 Spektrum 22
COSY	Spektrum 23
HMQC	Spektrum 24
HMBC	Tablo 17 Spektrum 25

AKTEOZİT [PL-1]

PL-1 bileşiği renksiz ve amorf bir katı olarak elde edilmiştir. İTK analizinde vanilin/H₂SO₄ reaktifi püskürtüldükten sonra plağın 105 °C’de 1-2 dakika ısıtılması ile önce pembe kırmızı, sonra açık kahverengiye dönen rengi ve UV’de reaktif kullanmadan önce ve sonraki özellikleri bu bileşiğin feniletanoit glikoziti olabileceğini düşündürmüştür. UV absorpsiyonları (203, 220 ve 332 nm) polifenolik bir yapıyı düşündürmektedir. IR spektrumunda ise; hidroksil (3400 cm⁻¹), α,β -doymamış ester (1695 cm⁻¹ konjuge ester, 1630 cm⁻¹ konjuge çifte bağ) ve aromatik halkaya ait absorpsiyon bantları (1610, 1520 cm⁻¹) gözlenmiştir.

¹H ve ¹³C NMR spektrumlarında (Tablo 17, Spektrum 21 ve 22) δ_H 4.36 (d, $J = 8.0$ Hz, H-1') ve δ_C 104.24 (CH, C-1') ile δ_H 5.17 (d, $J = 1.7$ Hz, H-1'') ve δ_C 103.06 (CH, C-1'') anomerik proton ve karbon sinyalleri; diglikozidik bir yapıyı işaret etmekte ve şekerlerden birinin glukoz, diğerinin ise ramnoz olabileceğini belirtmektedir. δ_H 1.08 (d, $J = 6.3$ Hz, H-6'') ve δ_C 18.47 (CH₃, C-6'')’de gözlenen sekonder metil sinyalleri de ikinci şekerin ramnoz olduğu düşüncesini desteklemektedir. Glukozun kenetlenme sabitinden ($J = 8.0$ Hz) bağ konfigürasyonunun β olduğu ve ramnozun kenetlenme sabitinden ise ($J = 1.7$ Hz) bağ konfigürasyonunun α olduğu anlaşılmaktadır. COSY (Spektrum 23) ve HMQC (Spektrum 24) spektrumlarının birlikte değerlendirilmesi sonucunda da; ozların β -glukoz ve α -ramnoz olduğu doğrulanmıştır.

¹³C NMR spektrumunda (Tablo 17, Spektrum 22) 29 C rezonansı görülmektedir. DEPT-135 (Spektrum 22) spektrumunda 29 C rezonansının 6 katerner (C), 18 metin (CH), 3 metilen (CH₂), 1 metil (CH₃) ve 1 karbonil (C=O) C’una ait olduğu anlaşılmıştır.

¹H NMR spektrumunda δ_H 7.04-6.76 ve δ_H 6.68-6.55 bölgesinde 2 ABX sistemi şeklinde toplam 6 aromatik proton sinyali ile δ_H 6.26 (d, $J = 16.0$ Hz) ve δ_H 7.58 (d, $J = 16.0$ Hz)’de AB sistem şeklindeki 2 olefinik proton sinyali gözlenmiştir. ¹³C NMR spektrumunda da olefinik karbonlar δ_C 114.70 ve 148.04’de gözlenmiştir. ABX sistemi şeklinde gözlenen proton sinyalleri kafeik asit ve 3,4 – dihidroksifeniletıl alkol gruplarının varlığını işaret etmektedir. Olefinik protonların

kenetlenme sabiti değerlerinden ($J = 16.0$ Hz) aromatik asitin *trans*-kafeik asit olduğu belirlenmiştir.

^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarında (Tablo 17, Spektrum 21 ve 22) δ_{H} 4.92 (t, $J = 9.1$ Hz) ve δ_{C} 70.74 (CH, C-4') olarak gözlenen sinyaller, glukozun (H-4')'ne ve C-4' konumuna aittir. Glukozun H-4' sinyalinin (δ_{H} 4.92) yaklaşık 1 ppm düşük alana kaymış olması kafeik asit grubunun C-4' konumundan esterleşmiş olduğunu göstermiştir. Oz protonlarına ait diğer sinyallerin kimyasal kayma değerleri COSY spektrumu (Spektrum 23) yardımıyla, bu protonlara karşılık gelen karbon sinyalleri ise HMQC spektrumu (Spektrum 24) ile yorumlanmıştır. Bu değerlere göre glikozidasyonun 3. karbon üzerindeki hidroksil grubundan olduğu anlaşılmaktadır. Bu karbon rezonansının (δ_{C} 81.6) glikozidasyon etkisi ile yaklaşık 4-5 ppm düşük alanda gözlenmesi, ramnoz molekülünün C-3' üzerinden bağlı olduğunu göstermektedir.

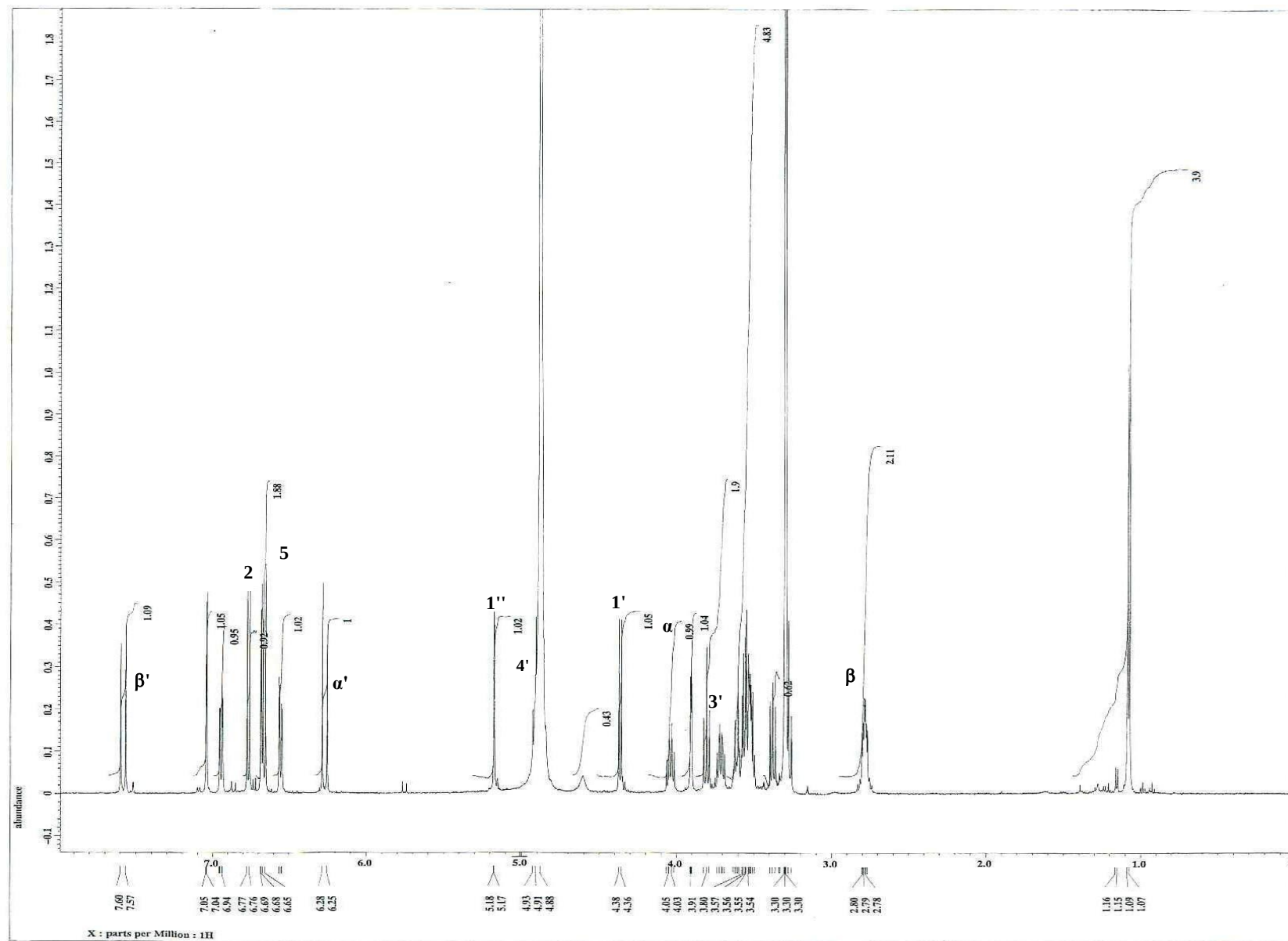
HMBC spektrumunda (Spektrum 25), δ_{H} 4.92 (t, $J = 9.1$ Hz, H-4') ile δ_{C} 168.31 (C=O); δ_{H} 4.36 (d, $J = 8.0$ Hz, H-1') ile δ_{C} 72.3 (CH₂, C- α) ve δ_{H} 5.17 (d, $J = 1.7$ Hz, H-1'') ile δ_{C} 81.6 (CH, C-3') arasındaki korelasyonlar; glukoz, ramnoz ve kafeik asit moleküllerinin bağlanma yerlerini doğrulamaktadır.

PL-1 bileşiğinin yapısı; COSY, HMQC, HMBC spektrumları yardımıyla 3,4-dihidroksi- β -feniletoksi-*O*- α -L-ramnopiranozil-(1 $\rightarrow$ 3)-4-*O*-kafeoil- β -D-glukopiranozit yapısında olan akteozit (verbaskozit) olarak aydınlatılmıştır ve tüm spektroskopik bulgular literatürde akteozit için verilen değerlerle uyum göstermektedir (101,102).

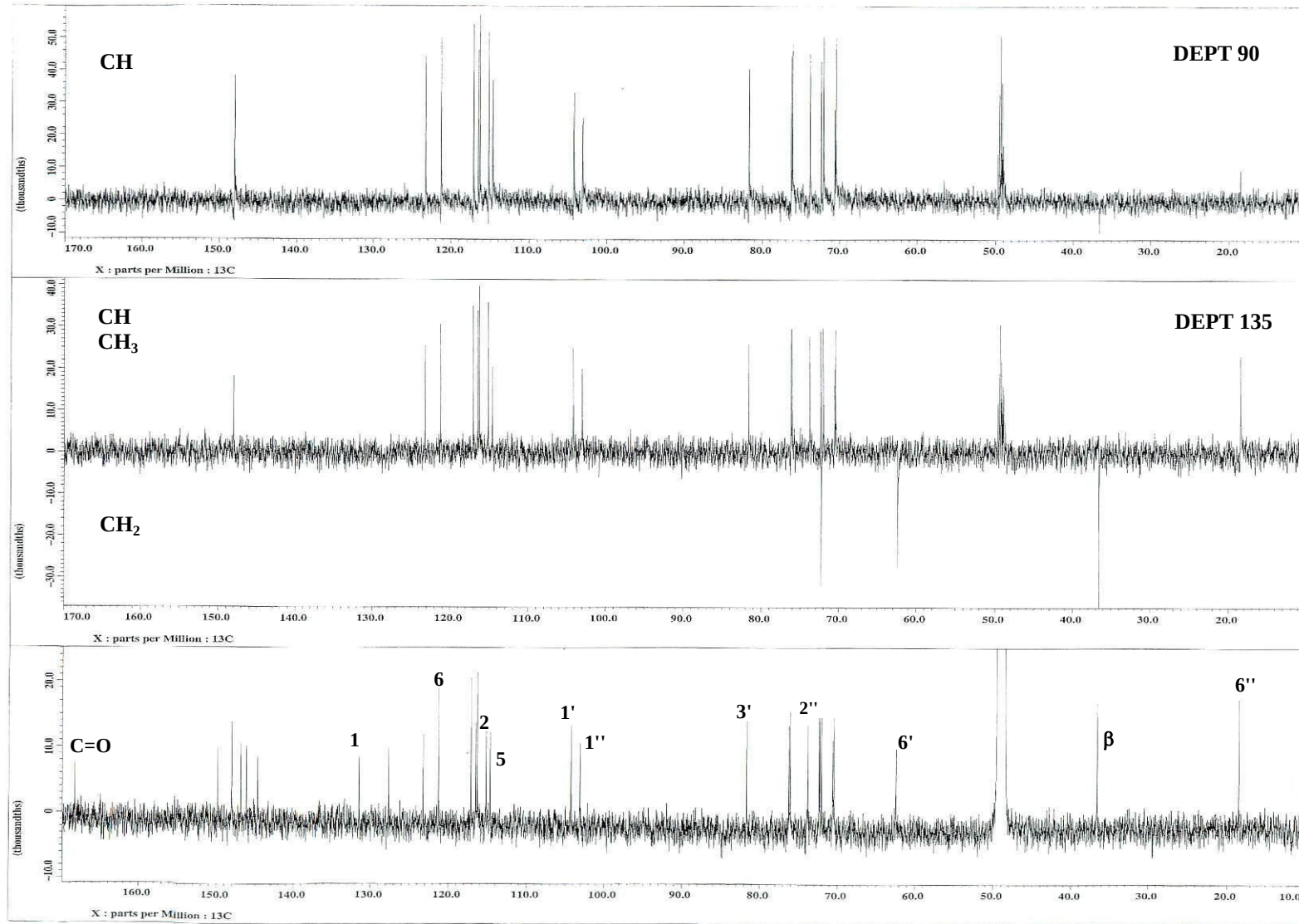
Tablo 17. Akteozit [PL-1]'in ^{13}C ve ^1H NMR Spektroskopik Değerleri*
(CD_3OD ; ^{13}C :125 MHz; ^1H : 500 MHz); Önemli HMBC Korelasyonları

C/H Atom	DEPT	δ_{C} ppm	δ_{H} ppm	J (Hz)	HMBC (H→C)
Aglikon					
1	C	131.4			
2	CH	117.1	6.68 d	(1.8)	C-3, C-4, C-6
3	C	146.1			
4	C	144.7			
5	CH	116.3	6.66 d	(8.0)	C-1, C-4, C-6
6	CH	121.2	6.55 dd	(8.0/1.8)	C-2, C-4
α	CH_2	72.3	4.04 m		C-1
			3.72 m		C-1, C-1'
β	CH_2	36.6	2.79 t	(7.2)	C-1, C-2, C-6
Glukoz					
1'	CH	104.2	4.36 d	(8.0)	C- α
2'	CH	76.3	3.37 dd	(9.1/8.0)	C-3'
3'	CH	81.6	3.80 t	(9.0)	C-2', C-4'
4'	CH	70.7	4.92 t	(9.1)	C=O
5'	CH	76.08	3.54 m		
6'	CH_2	62.4	3.61 dd	(12.2/6.4)	
			3.53 dd	(12.2/2.2)	
Ramnoz					
1''	CH	103.06	5.17 d	(1.7)	C-3', C-4'
2''	CH	72.4	3.90 dd	(3.7/2.1)	
3''	CH	72.07	3.56 dd	(9.7/3.3)	
4''	CH	73.8	3.28 t	(9.8)	
5''	CH	70.4	3.55 m		
6''	CH_3	18.5	1.08 d	(6.3)	C-4', C-4''
Açıl Grubu					
1'''	C	127.6			
2'''	CH	115.2	7.04 d	(2.3)	C-3''', C-4''', C-6'''
3'''	C	146.8			
4'''	C	149.8			
5'''	CH	116.5	6.76 d	(8.0)	C-3''', C-4''', C-6'''
6'''	CH	123.2	6.94 dd	(8.0/2.3)	C-3''', C-4''', C-5'''
α'	CH	114.7	6.26 d	(16.0)	C-1''', C=O
β'	CH	148.04	7.58 d	(16.0)	C-2''', C-6''', C=O
C=O	C	168.3			

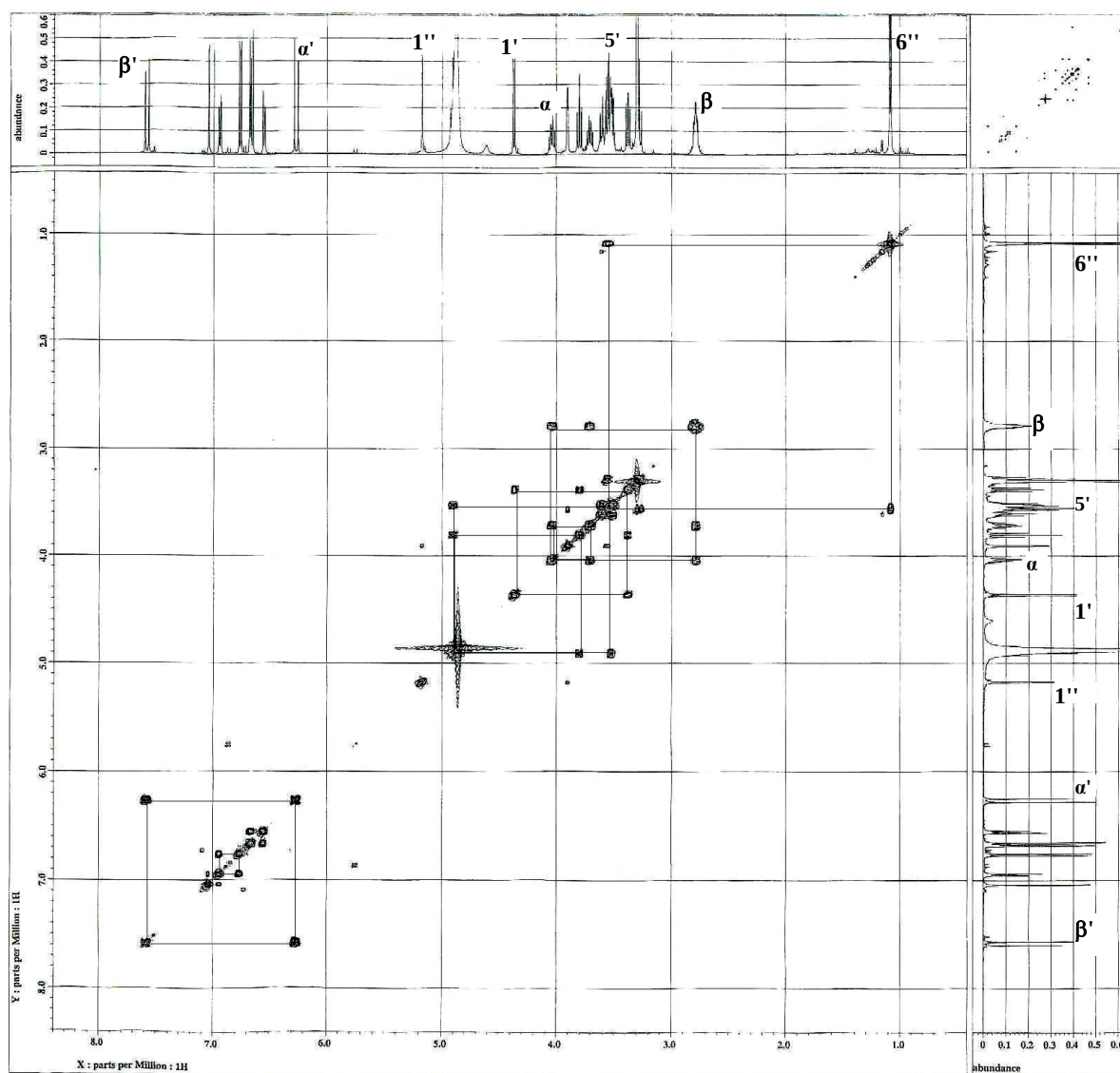
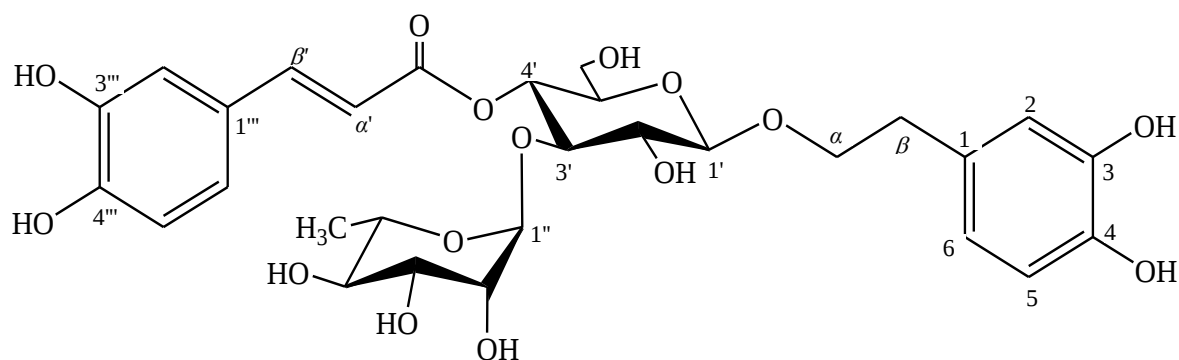
*Rezonanslar 2D NMR (COSY, HMQC ve HMBC) yardımıyla yorumlanmıştır



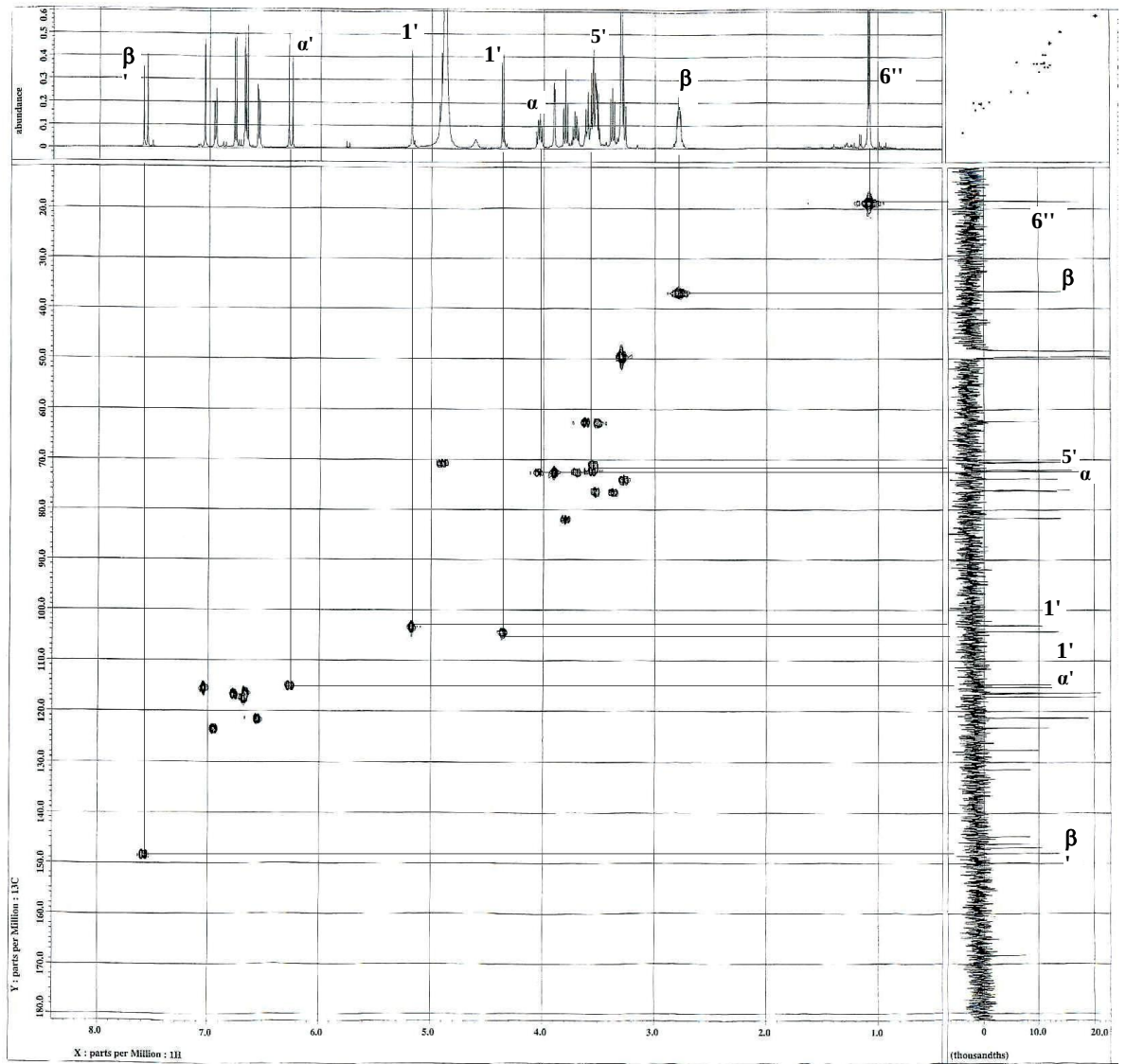
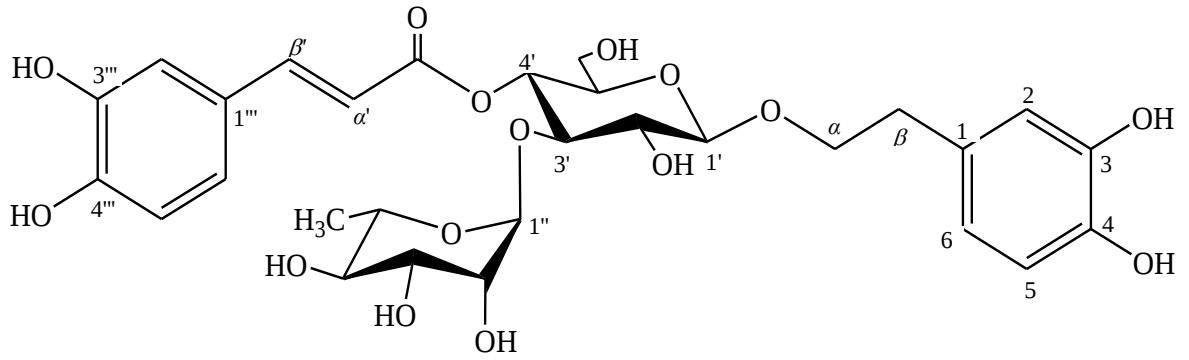
Spektrum 21. Akteozit [PL-1]'in ^1H NMR Spektrumu (CD_3OD ; ^1H : 500 MHz)



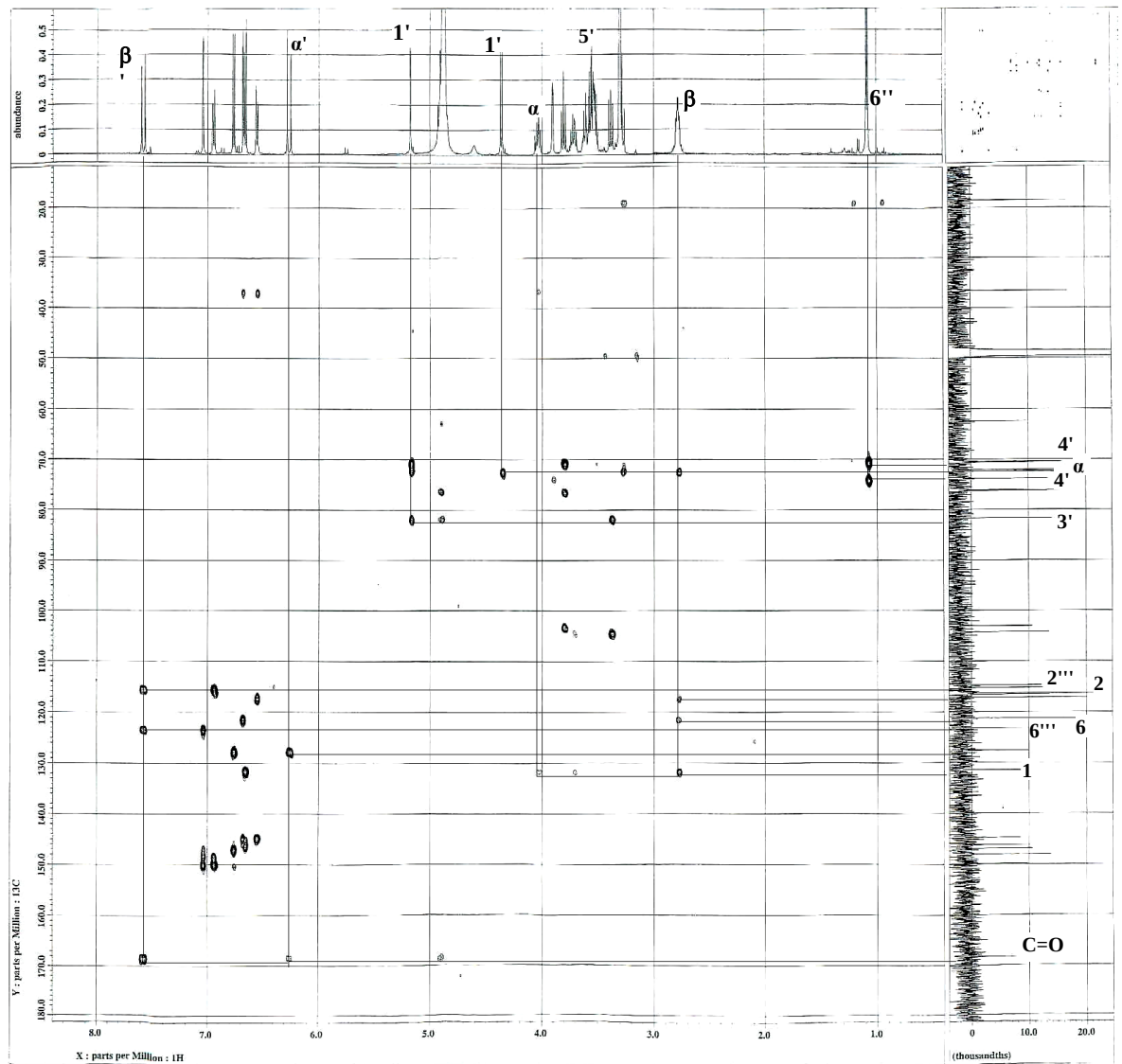
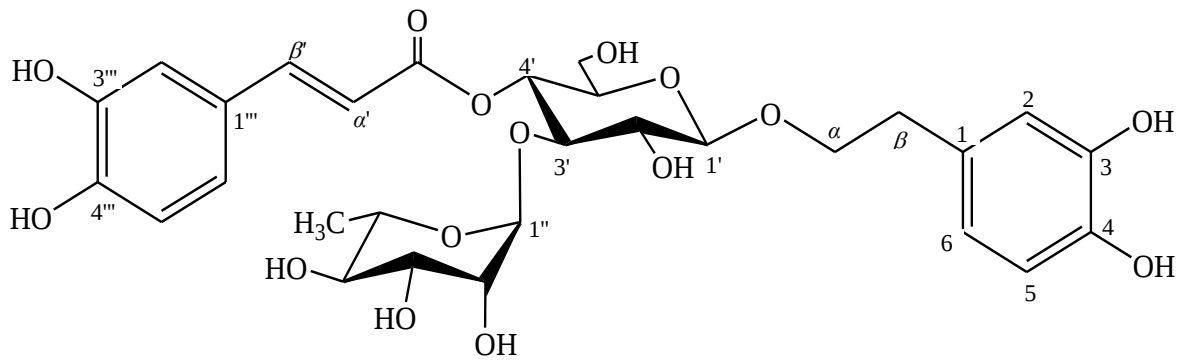
Spektrum 22. Akteozit [PL-1]'in ^{13}C NMR ve DEPT Spektrumları (CD_3OD ; ^{13}C : 125 MHz)



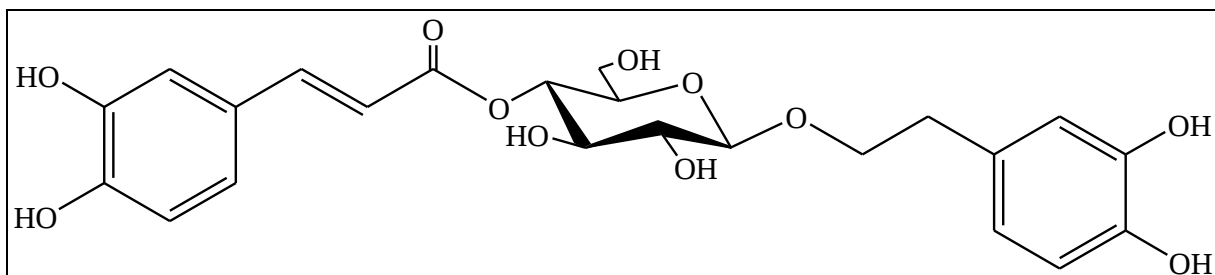
Spektrum 23. Akteozit [PL-1]'in 2D ^1H , ^1H -Homonükleer Korelasyonlu NMR Spektrumu (COSY)



Spektrum 24. Akteozit [PL-1]'in 2D ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (yakın mesafe) NMR Spektrumu (HMQC)



Spektrum 25. Akteozit [PL-1]'in 2D ^1H , ^{13}C -Heteronükleer Korelasyonlu (uzak mesafe) NMR Spektrumu (HMBC)



KALKEORİOZİT (DESRAMNOZİLAKTEOZİT) [PL-2]
C₂₃H₂₆O₁₁ (Mol. Ağı. 478)

UV λ_{maks} (MeOH) nm	220, (235), (250), 332
IR ν_{maks} (KBr) cm^{-1}	3400 (OH), 1695 (C=O), 1630 (C=C), 1610,1520 (Aromatik Halka)
^1H NMR	Tablo 18 Spektrum 26
^{13}C NMR ve DEPT	Tablo 18 Spektrum 27
COSY	Spektrum 28
HMQC	Spektrum 29
HMBC	Tablo 18 Spektrum 30

KALKEORİOZİT [PL-2]

PL-2 bileşiği renksiz ve amorf bir katı olarak elde edilmiştir. İTK analizinde vanilin/H₂SO₄ reaktifi püskürtüldükten sonra plağın 105 °C’de 1-2 dakika ısıtılması ile önce pembe kırmızı, sonra açık kahverengiye dönen rengi bu bileşiğin feniletanoit glikoziti olabileceğini düşündürmüştür. UV absorpsiyonları (203, 220 ve 332 nm) polifenolik bir yapıyı düşündürmektedir. IR spektrumunda ise; hidroksil (3400 cm⁻¹), α,β-doymamış ester (1695 cm⁻¹ konjuge ester, 1630 cm⁻¹ konjuge çifte bağ) ve aromatik halkaya ait absorpsiyon bantları (1610, 1520 cm⁻¹) gözlenmiştir.

¹H ve ¹³C NMR spektrumlarında (Tablo 18, Spektrum 26 ve 27) δ_H 4.35 (d, *J* = 8.0 Hz, H-1') ve δ_C 104.09 (CH, C-1')' deki anomerik proton ve karbon sinyalleri, bileşiğin monoglikozidik bir yapıya sahip olduğu ve anomerik protonun kenetlenme sabitinden (*J* = 8.0 Hz), bağ konfigürasyonunun β olduğu anlaşılmaktadır. 62.18-75.85 ppm arasında gözlenen 5 karbon rezonansı ve 3.27-3.62 ppm arasında gözlenen proton sinyalleri yapıda bir heksoz varlığını doğrulamaktadır. COSY (Spektrum 28) ve HMQC (Spektrum 29) spektrumlarının birlikte değerlendirilmesi sonucunda uzun β-glukoz olduğu anlaşılmıştır.

¹³C NMR spektrumunda (Tablo 18, Spektrum 27) 23 C rezonansı görülmektedir. DEPT-135 spektrumunda (Spektrum 27) 23 C rezonansının 6 katerner (C), 13 metin (CH), 3 metilen (CH₂) ve 1 karbonil (C=O) C'una ait olduğu anlaşılmıştır. Glukoz ve kafeik aside ait C'lar çıkarılınca, aglikonun 3,4 – dihidroksifeniletıl alkol olabileceği düşünülmüştür.

¹H NMR spektrumunda δ_H 7.04-6.76 ve δ_H 6.68-6.55'de 2 ABX sistemi şeklinde toplam 6 aromatik proton sinyali ile δ_H 6.28 (d, *J* = 16.0 Hz) ve δ_H 7.58 (d, *J* = 16.1 Hz)'de AB sistem şeklinde 2 olefinik proton sinyali gözlenmiştir. ¹³C NMR spektrumunda da olefinik karbonlar δ_C 114,40 ve 147.34'de gözlenmiştir. ABX sistemi şeklinde gözlenen proton sinyalleri kafeik asit ve 3,4 – dihidroksifeniletıl alkol gruplarının varlığını düşündürmektedir. Olefinik protonların kenetlenme sabiti değerlerinden (*J* = 16.0 Hz) aromatik asitin *trans*-kafeik asit olduğu belirlenmiştir.

¹H ve ¹³C NMR spektrumlarında (Tablo 18, Spektrum 26 ve 27) glukozun (H-4')'ne ve C-4' konumuna ait olan sinyaller δ_H 4.82 (t, *J* = 9.1 Hz) ve δ_C 72.93 (CH, C-4') olarak gözlenmiş ve H-4' sinyalinin (δ_H 4.82) yaklaşık 1 ppm düşük

alana kaymış olması kafeik asit grubunun C-4' konumundan esterleşmiş olabileceğini göstermektedir. Oz protonlarına ait diğer sinyallerin kimyasal kayma değerleri COSY spektrumu (spektrum 28) yardımıyla, bu protonlara karşılık gelen karbon sinyalleri ise HMQC spektrumu (spektrum 29) ile yorumlanmıştır.

^{13}C NMR spektrumunda δ_{C} 75.5' de gözlenen sinyal, glukozun 3 numaralı C'una aittir. Akteozit bileşiğinde; bu karbon rezonansının ramnoz molekülünün bağlı olmasından dolayı 5-6 ppm kadar düşük alanda (δ_{C} 81.6) gözlenmiş olması; PL-6 bileşiğinde ramnoz olmadığını ispatlamaktadır. Ayrıca; karbon sayısının akteozitten 6 C eksik olması da ramnoz olmadığını doğrulamaktadır.

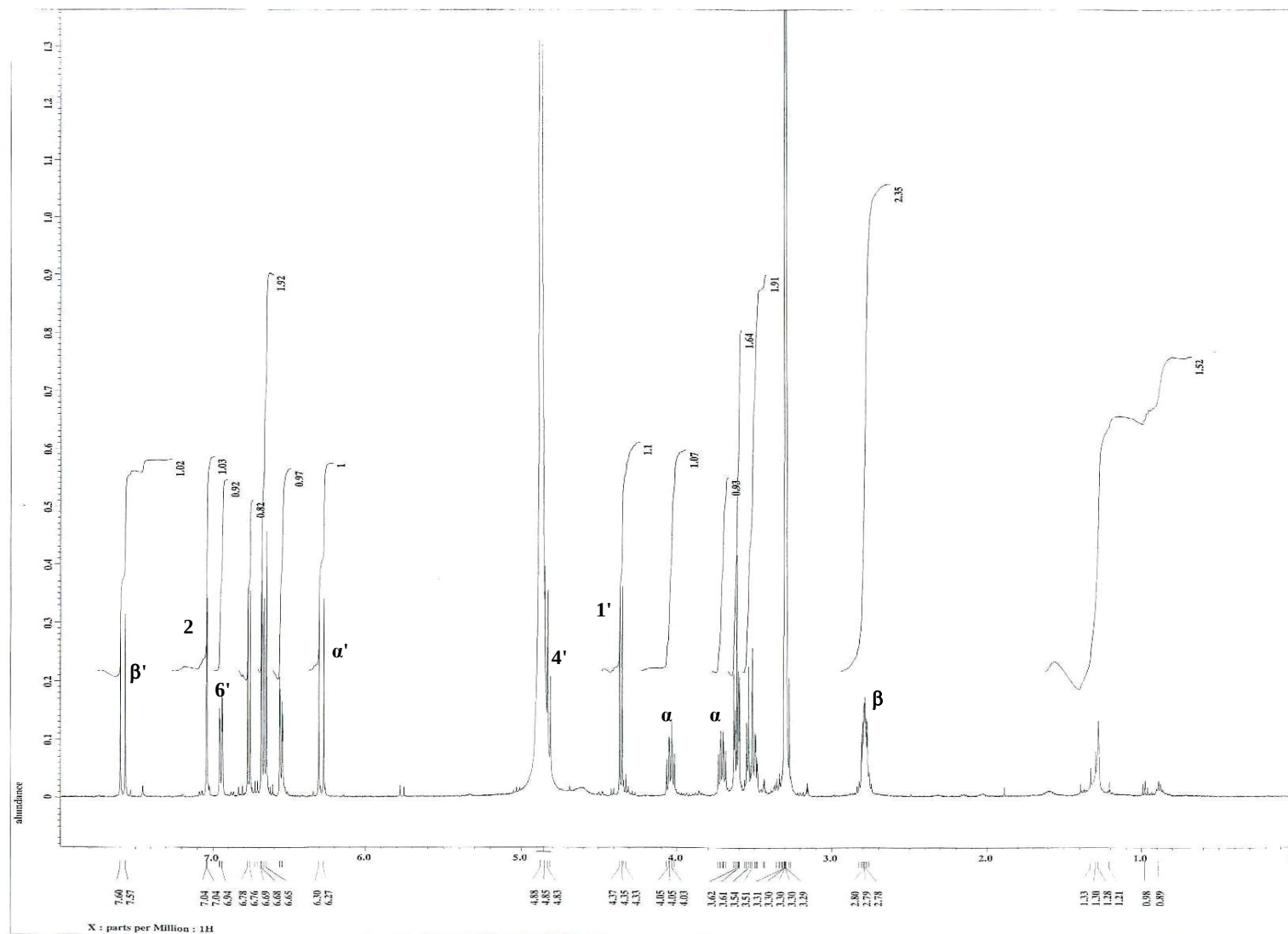
HMBC spektrumunda (Tablo 18, spektrum 30), δ_{H} 4.82 (t, $J = 9.1$ Hz, H-4') ile δ_{C} 168.30 (C=O); δ_{H} 4.35 (d, $J = 8.0$ Hz, H-1') ile δ_{C} 71.93 (CH_2 , C- α); δ_{H} 7.58 (d, $J = 16.1$ Hz) ile δ_{C} 168.30 (C=O) ve δ_{H} 7.58 (d, $J = 16.1$ Hz) ile δ_{C} 116.82 (CH, C-6") arasındaki korelasyonlar; glukoz ve kafeik asit moleküllerinin bağlanma yerlerini ve molekülün genel yapısını doğrulamaktadır.

PL-2 bileşiğinin yapısı; COSY, HMQC, HMBC ve HR ESI-kütle spektrumları yardımıyla 3,4-dihidroksi- β -feniletoksi-4-O-kafeoil- β -D-glukopiranozit yapısında olan kalkeoriozit (desramnozilakteozit) olarak aydınlatılmıştır ve tüm spektroskopik bulgular literatürde kalkeoriozit için verilen değerlerle uyum göstermektedir (37).

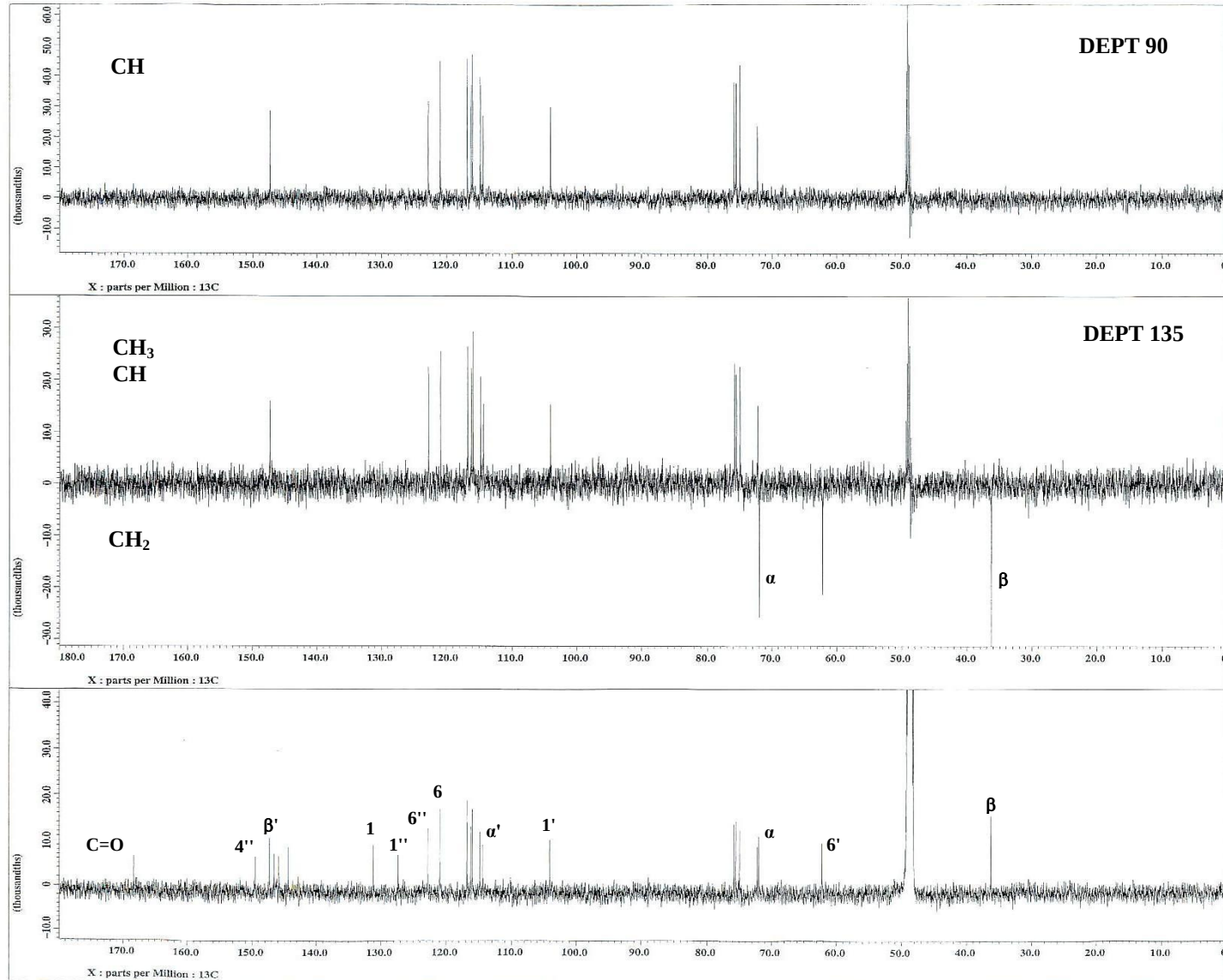
Tablo 18: Kalkeorizit [**PL-2**]'in ^{13}C ve ^1H NMR Spektroskopik değerleri*
(CD_3OD ; ^{13}C :125 MHz; ^1H : 500 MHz); Önemli HMBC Korelasyonları

C/H Atom	DEPT	δ_{C} ppm	δ_{H} ppm	J (Hz)	HMBC (H→C)
Aglikon					
1	C	131.1			
2	CH	114.8	6.68 d	(1.8)	C-3, C-4, C-6
3	C	145.8			
4	C	144.4			
5	CH	116.0	6.66 d	(8.0)	C-1, C-4, C-6
6	CH	120.96	6.55 dd	(8.0/1.7)	C-2, C-4
α	CH_2	71.9	4.02 dd	(14.9/8.0)	C-1
			3.72 dd	(15.4/8.0)	C-1, C-1'
β	CH_2	36.3	2.81 t	(6.9)	C-1, C-2, C-6
Glukoz					
1'	CH	104.09	4.35 d	(8.0)	C- α
2'	CH	74.95	3.27 dd	(9.8/8.0)	C-1', C-3'
3'	CH	75.5	3.62 t	(9.1)	C-2', C-4'
4'	CH	72.9	4.82 t	(9.1)	C=O
5'	CH	75.8	3.52 m		
6'	CH_2	62.18	3.61 dd	(12.2/6.4)	
			3.53 dd	(12.2/2.2)	
Açıl Grubu					
1''	C	127.35			
2''	CH	116.8	7.04 d	(2.2)	C-3'', C-4'', C-6''
3''	C	146.6			
4''	C	149.5			
5''	CH	116.2	6.76 d	(8.3)	C-3'', C-4'', C-6''
6''	CH	122.8	6.94 dd	(8.3/2.2)	C-3'', C-4'', C-5''
α'	CH	114.4	6.28 d	(16.0)	C-1'', C=O
β'	CH	147.34	7.58 d	(16.1)	C-2'', C-6'', C=O
C=O	C	168.3			

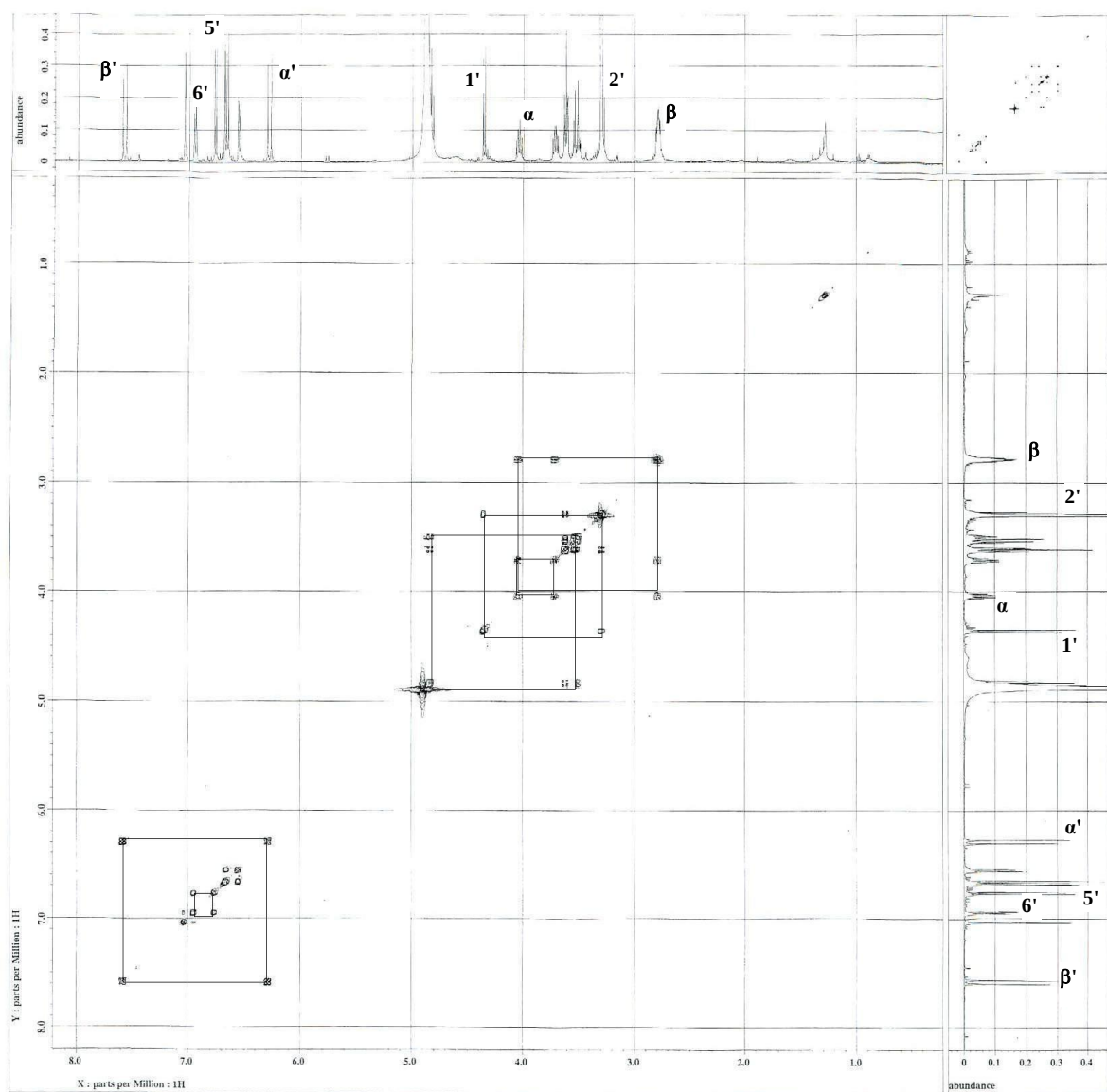
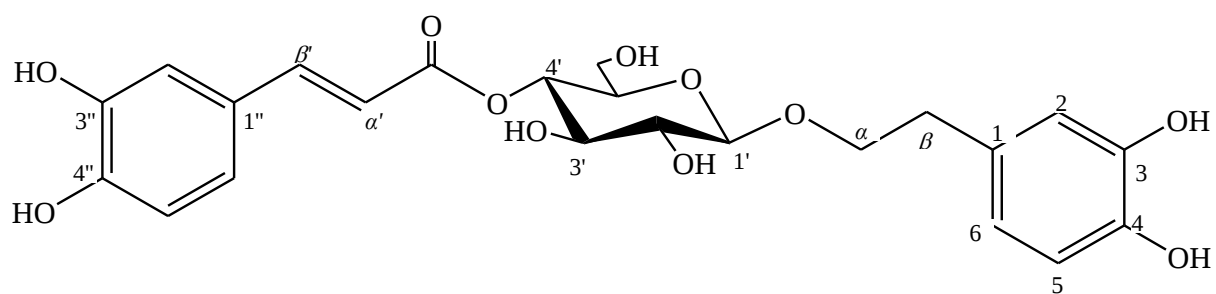
*Rezonanslar 2D NMR (COSY, HMQC ve HMBC) yardımıyla yorumlanmıştır.



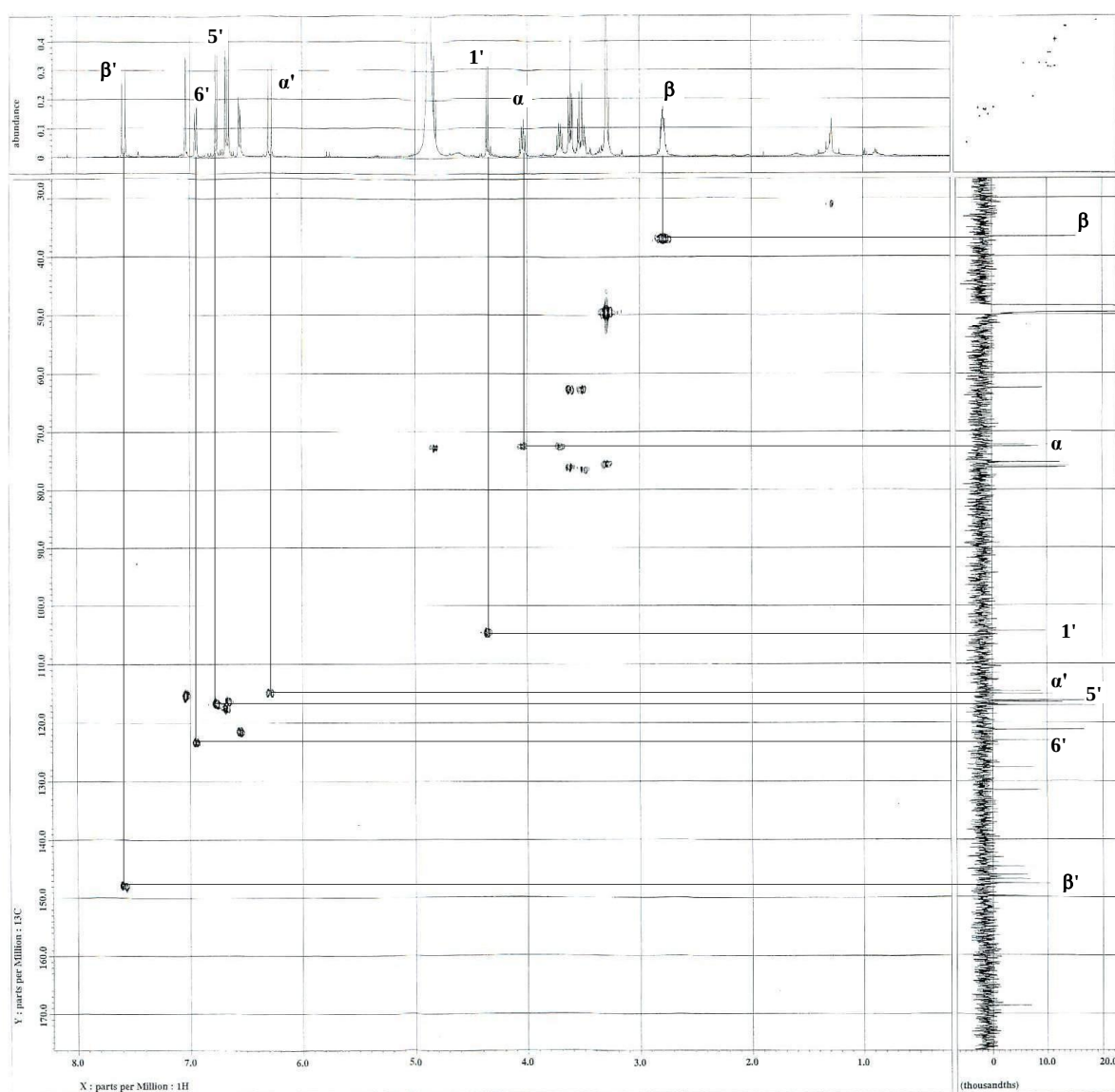
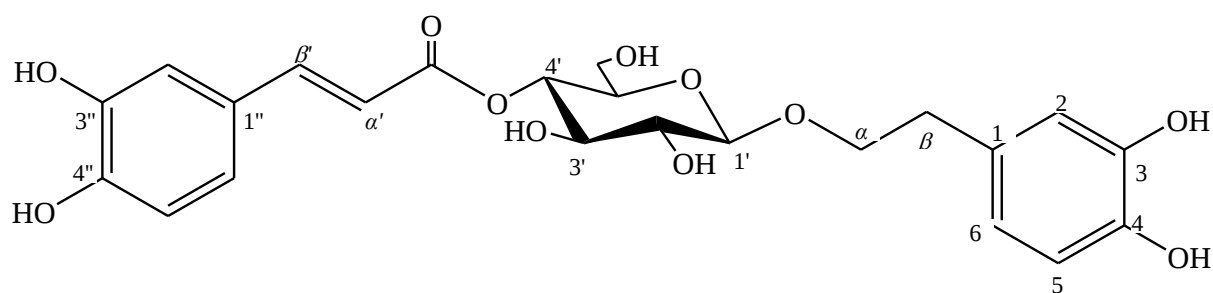
Spektrum 26. Kalkeorizit [PL-2]'in ^1H NMR Spektrum (CD₃OD; ^1H : 500 MHz)



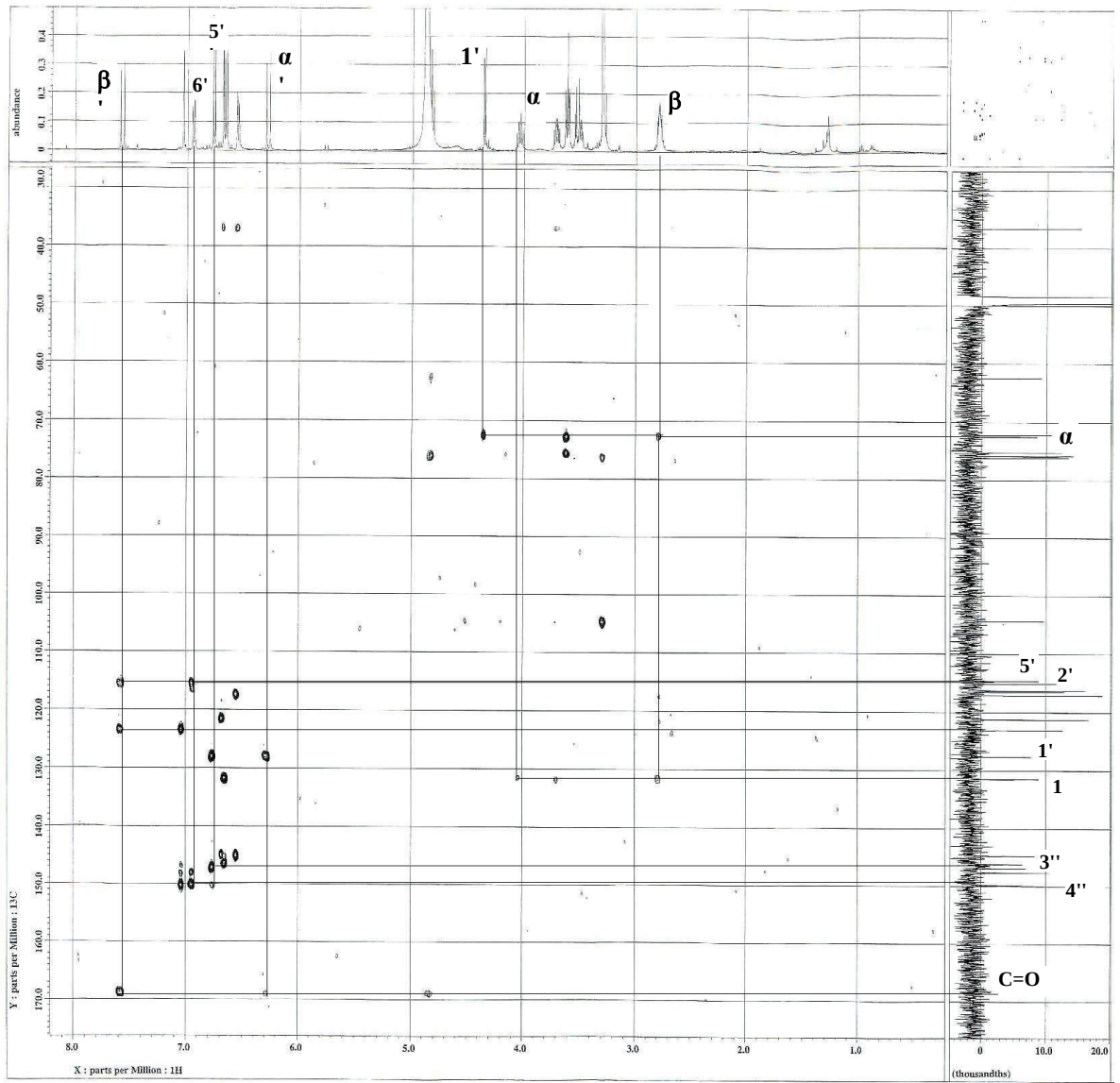
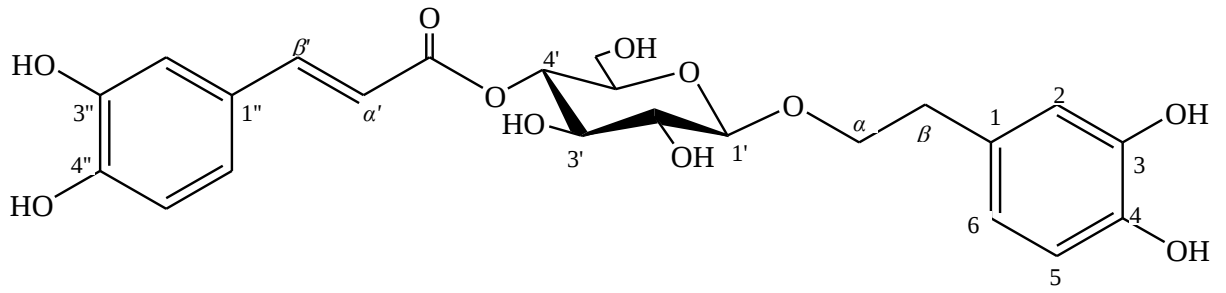
Spektrum 27. Kalkeoriozit [PL-2]'in ^{13}C NMR ve DEPT Spektrumları (CD_3OD ; ^{13}C : 125 MHz)



Spektrum 28. Kalkeoriozitol [PL-2]'in 2D ^1H , ^1H -Homonükleer Korelasyonlu NMR Spektrumu (COSY)



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



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

4.2. Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular

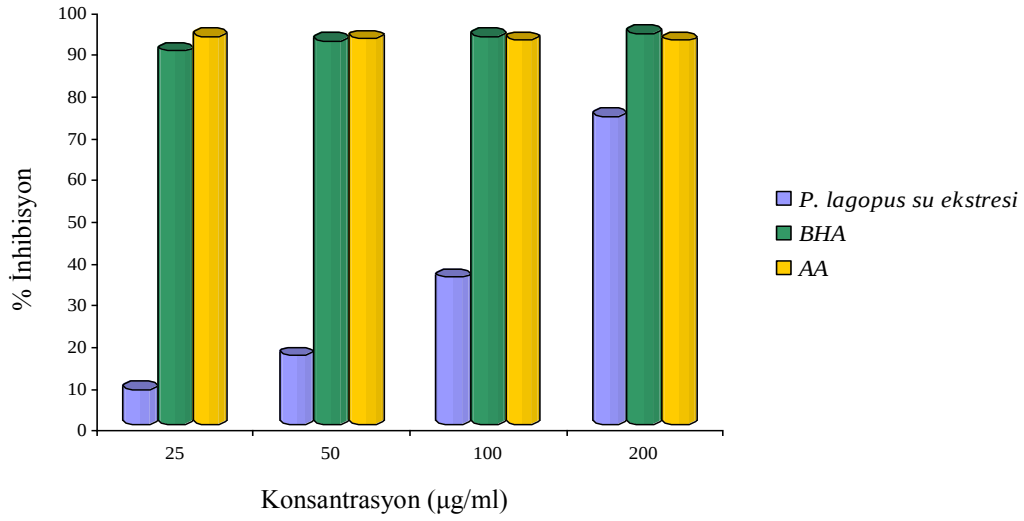
Biyoaktivite rehberli izolasyon çalışmaları doğrultusunda, değişik serbest radikallere karşı serbest radikal süpürücü aktivite ile farklı insan kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktivite esas alınarak, aktif bileşiklere ulaşılmaya çalışılmıştır. *P. lagopus*'un sulu ekstresi aktif bulunduktan sonra poliamit kolona tatbik edilmiş ve poliamit kolondan toplanan fraksiyonların da aktiviteleri araştırılmıştır. Aktif bulunan fraksiyondan, ileri kromatografik teknikler kullanılarak **PL-1** ve **PL-2** kodlu 2 bileşik elde edilmiştir. İzole edilen ve yapıları aydınlatılan bu saf bileşikler ile birlikte *P. lagopus* L.'nin sulu ekstresi ve poliamit kolon fraksiyonlarının DPPH, NO ve SO radikali süpürücü aktiviteleri araştırılmıştır. Ayrıca; ekstre ve fraksiyonların HEP-2 ve RD, saf bileşiklerin ise HEP-2, RD ve MCF-7 kanser hücre kültürlerinde sitotoksik aktiviteleri araştırılmıştır.

4.2.1. Serbest Radikal Süpürücü (Antioksidan) Aktivite Tayini Sonuçları

a) DPPH Radikali Süpürücü Aktivite Sonuçları

DPPH metodu; bileşiklerin antioksidan aktivitelerinin araştırılması için kullanılan çok yaygın bir yöntemdir. Ortaklanmamış bir elektron taşıyan DPPH radikaline; polifenoller ve antosiyaninler gibi fenolik yapıdaki bileşikler elektron transferinde bulunarak indirgenmiş DPPH – H yapısını oluştururlar. Bu redüksiyon esnasında DPPH radikalinin rengi mordan sarıya döner ve bu değişim spektroskopik olarak ölçülür (82).

P. lagopus sulu ekstresi, DPPH radikaline karşı doza bağımlı aktivite göstermiştir ve bu etkileri, iyi antioksidan özellik gösterdikleri bilinen 3-*ters*-butil-4-hidroksianizol (BHA) ve askorbik asit (AA) standartlarıyla karşılaştırılmıştır. Sulu ekstre; 200 µg/ml konsantrasyonda standartlara yakın aktivite göstermesine rağmen, daha düşük konsantrasyonlardaki aktivitesi standartlara göre oldukça az çıkmıştır (Şekil 1.)



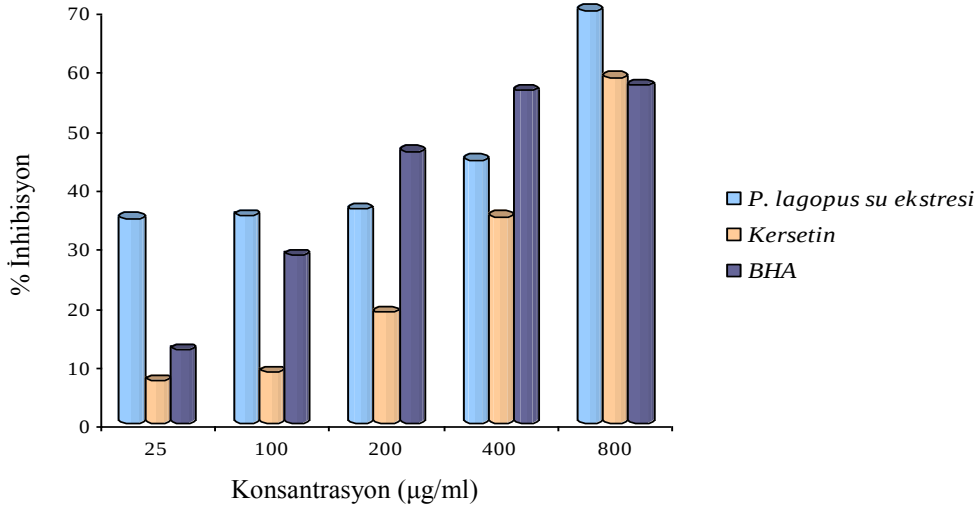
Şekil 1. *P. lagopus* Sulu Ekstresinin DPPH Radikali Süpürücü Aktivitesi

P. lagopus sulu ekstresinde DPPH radikeline karşı aktivite gözlenmesi nedeniyle; ekstrenin poliamit kolon fraksiyonlarının da DPPH radikeline karşı aktiviteleri araştırılmıştır. Fraksiyonların aktivitesi, ekstrenin IC₅₀ değerinden yola çıkılarak 50 µg/ml konsantrasyonda karşılaştırılmak amacıyla incelenmiş ve Fr. 17-20 diğer fraksiyonlar arasında en yüksek aktiviteyi göstermiştir (Tablo 19).

b) NO Radikali Süpürücü Aktivite Sonuçları

Nitrik oksit radikalının vücudumuzda fazla miktarda üretilmesi (özellikle enflamasyon durumlarında), oksidatif strese neden olur ve bu oksidatif stres; kanser, diyabet, renal fonksiyon bozuklukları gibi birçok hastalığın gelişiminde önemli rol oynar. Dolayısıyla; NO radikali süpürücü etkinin araştırılması, antioksidan aktivite çalışmalarında önemli bir yer tutmaktadır. Deney ortamında sodyum nitroprussid tarafından oluşturulan nitrik oksidin konsantrasyonundaki değişiklik, Griess reaksiyonu vasıtasıyla spektroskopik olarak ölçülmektedir (85,86).

P. lagopus sulu ekstresinin NO radikali süpürücü aktivitesi; BHA ve kersetin standartları ile karşılaştırılarak araştırılmıştır. Sonuçlara göre; incelenen bütün konsantrasyonlarda (25, 100, 200, 400, 800 µg/ml) ekstre, standartlardan (özellikle kersetin) daha yüksek aktivite göstermiştir ve bu aktivite doza bağımlı olarak gerçekleşmiştir (Şekil 2).



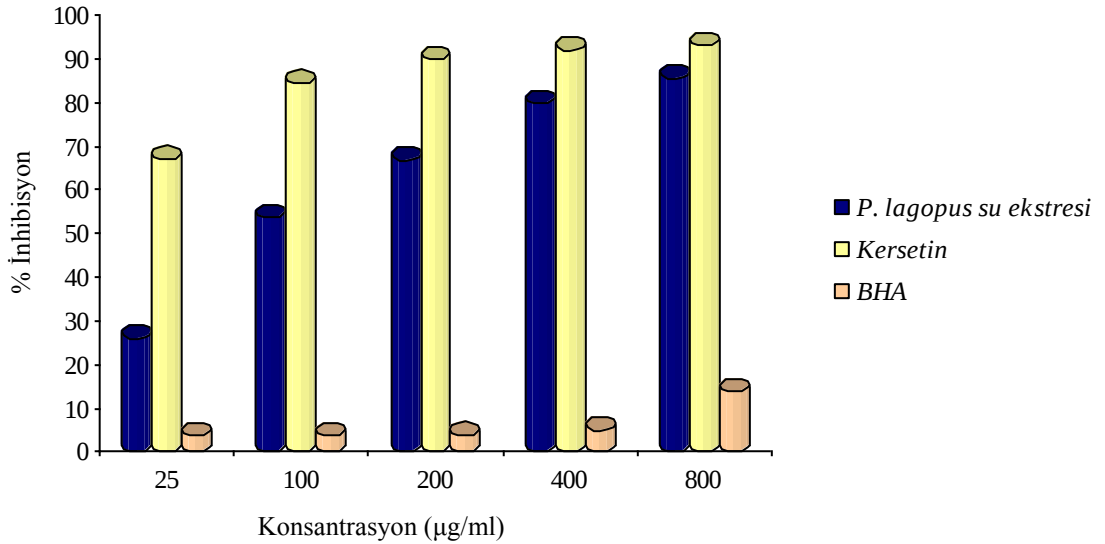
Şekil. 2. *P. lagopus* Sulu Ekstresinin NO Radikali Süpürücü Aktivitesi

P. lagopus sulu ekstresinde NO radikale karşı aktivite gözlenmesi nedeniyle; ekstrenin poliamit kolon fraksiyonlarının da NO radikale karşı aktiviteleri araştırılmıştır. Fraksiyonların aktivitesi, ekstrenin IC₅₀ değerinden yola çıkılarak 50 µg/ml konsantrasyonda karşılaştırılmak amacıyla incelenmiş ve Fr. 17-20, NO radikale karşı da diğer fraksiyonlar arasında en yüksek aktiviteyi göstermiştir (Tablo 19).

c) SO Radikali Süpürücü Aktivite Sonuçları

Süperoksit radikali de canlı organizmalarda oluşan temel radikallerden bir diğeridir ve hücre içeriğine karşı çok zararlı olduğu bilinmektedir. Yapılan SO radikali süpürücü aktivite tayini deneyinde; deney ortamında dimetil sülfoksit aracılığıyla oluşturulan süperoksit radikali, nitroblue tetrazolyum (NBT) ile renkli diformazan bileşiği oluşturur ve radikal konsantrasyonundaki değişim bu renkli bileşik üzerinden spektroskopik olarak ölçülür (85).

P. lagopus sulu ekstresinin SO radikali süpürücü aktivitesi; BHA ve kersetin standartları ile karşılaştırılarak araştırılmıştır. Sonuçlara göre; ekstre, kersetin ile kıyaslanabilecek oranlarda doza bağlı aktivite göstermiştir. BHA standardı ise, SO radikale karşı yeterli aktivite gösterememiştir (Şekil 3).



Şekil. 3. *P. lagopus* Sulu Ekstresinin SO Radikali Süpürücü Aktivitesi

P. lagopus sulu ekstresinde SO radikale karşı aktivite gözlenmesi nedeniyle; ekstrenin poliamit kolon fraksiyonlarının da SO radikale karşı aktiviteleri araştırılmıştır. Fraksiyonların aktivitesi, ekstrenin IC₅₀ değerinden yola çıkılarak 300 µg/ml konsantrasyonda karşılaştırılmak amacıyla incelenmiş ve Fr. 17-20, SO radikale karşı da diğer fraksiyonlar arasında en yüksek aktiviteyi göstermiştir (Tablo 19).

Fraksiyon 17-20'nin DPPH, NO ve SO radikallerine karşı en yüksek aktiviteyi göstermesinden yola çıkılarak, Fr. 17-20 orta basınçlı sıvı kromatografisine tatbik edilmiş ve bu kolonun fraksiyonlarından da PL-1 ve PL-2 saf bileşikler izole edilmiştir. Aktiviteden sorumlu bileşiğin bulunması amacıyla PL-1 ve 2'nin her 3 radikale karşı radikal süpürücü etkinliği araştırılmış ve IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca; PL-3 olarak kodlanan megastigman glukozitinin aktivitesi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmadığı için, bu bileşiğin de radikal süpürücü ve sitotoksik aktiviteleri araştırılmıştır (Tablo 20).

	% İnhibisyon		
Fraksiyon	DPPH*	NO*	SO**
2-8	10.93 ± 0.21	5.92 ± 0.03	11.18 ± 0.01
9-12	39.25 ± 0.07	16.75 ± 0.02	68.30 ± 0.01
13-16	72.55 ± 0.15	44.65 ± 0.01	74.48 ± 0.01
17-20	88.94 ± 0.05	55.18 ± 0.01	76.18 ± 0.01
21-26	86.88 ± 0.02	54.54 ± 0.01	75.64 ± 0.01
27-35	87.63 ± 0.05	49.09 ± 0.005	75.54 ± 0.004
36-43	58.42 ± 0.1	20.03 ± 0.01	68.66 ± 0.01

Tablo 19. *P. lagopus* Poliamit Kolon Fraksiyonlarının DPPH, NO ve SO Radikali Süpürücü Aktiviteleri

* DPPH ve NO süpürücü aktiviteler 50 µg/ml konsantrasyonda incelenmiştir.

** SO süpürücü aktivite 300 µg/ml konsantrasyonda incelenmiştir.

	IC ₅₀ (µg/ml)		
Bileşik	DPPH	NO	SO
Akteozit (PL-1)	21.71	100.75	31.56
Kalkeoriozit (PL-2)	22.45	100.27	33.5
Filomurozit (PL-3)	172.13	240.70	>300

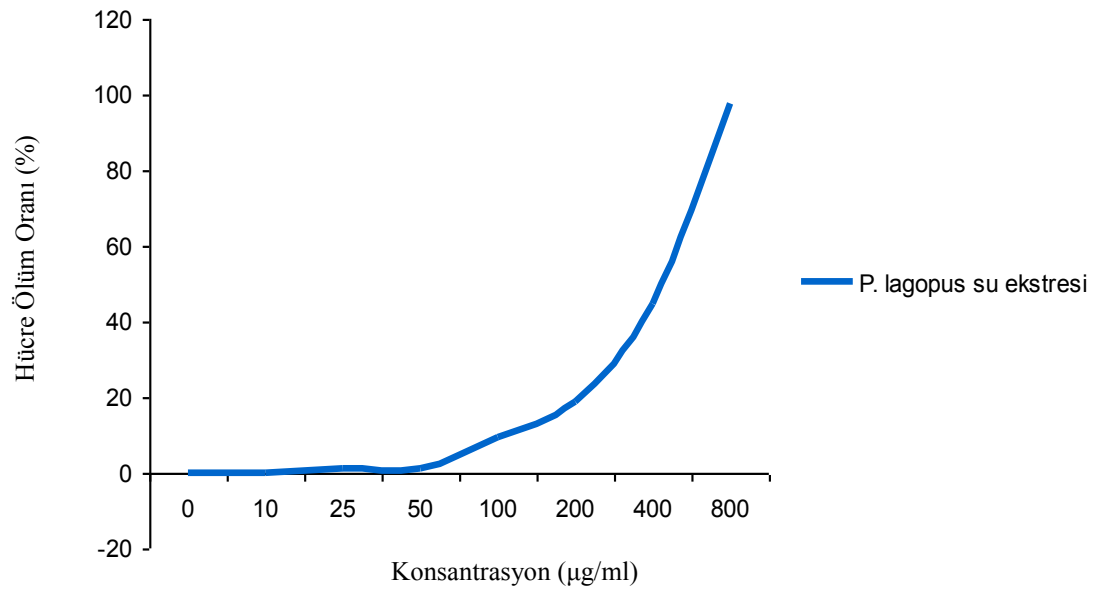
Tablo 20. PL-1, PL-2 ve PL-3'ün DPPH, NO ve SO Radikallerini Süpürücü Aktivitesi

Akteozit ve kalkeoriozit, her 3 radikale karşı da en aktif bileşikler iken; megastigman glukoziti en az aktivite gösteren bileşik olmuştur.

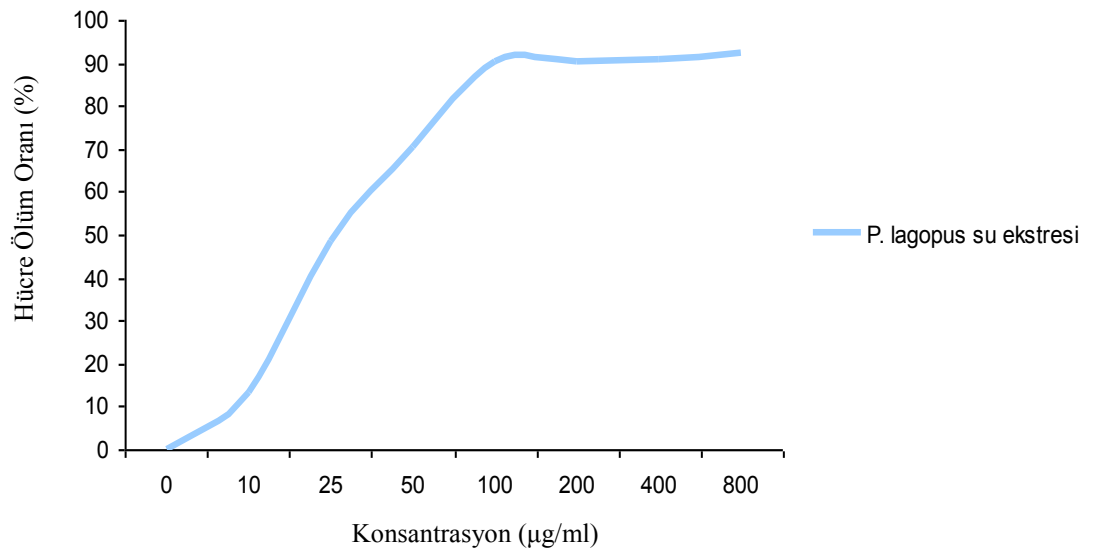
4.2.2. Sitotoksik Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular

P. lagopus L. bitkisinden elde edilen sulu ekstrenin, poliamit kolon fraksiyonlarının ve izole edilen saf bileşiklerden PL-1, PL-2 ve PL-3'ün sitotoksik aktiviteleri; MTT yöntemi kullanılarak, insan kaynaklı kanser hücre kültürlerinde (HEP-2, RD, MCF-7) tayin edilmiştir. Çalışmalar sırasında, antioksidan aktivite tayininde yapıldığı gibi, aktivitesi araştırılacak olan her madde veya konsantrasyon için 3 farklı kuyucuk kullanılarak çalışma şartlarından kaynaklanan hatalar en aza indirilmeye çalışılmıştır. Ayrıca tüm deneyler en az iki tekrarlı olarak çalışılmıştır.

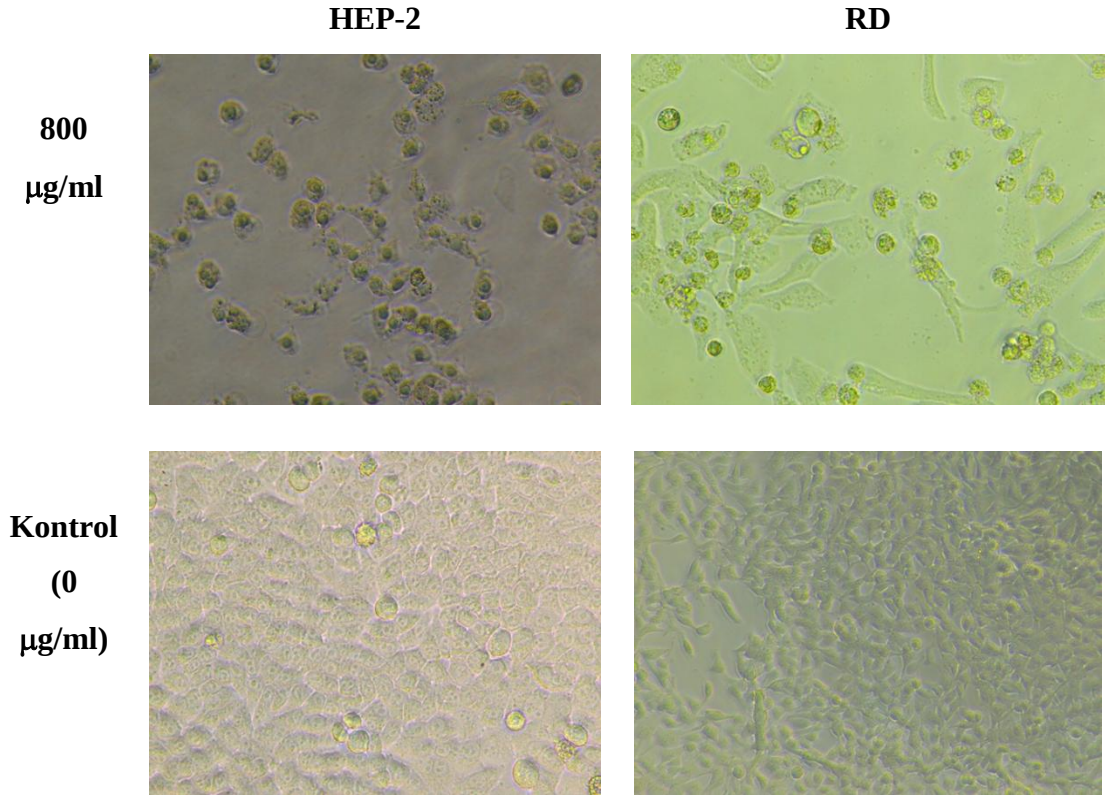
P. lagopus sulu ekstresi, HEP-2 ve RD kanser hücrelerinin ikisine karşı da sitotoksikite göstermiştir (Şekil 4 ve 5; Resim 2), ancak HEP-2 hücrelerine karşı 400 µg/ml'ye kadar belirgin bir aktivitesi olmamasına rağmen, RD hücresine daha düşük konsantrasyonlardan itibaren kuvvetli aktivite göstermiştir. IC₅₀ değerleri de ekstrenin RD'ye karşı daha duyarlı olduğunu ispatlamaktadır (HEP-2 IC₅₀ = 432.55 µg/ml, RD IC₅₀ = 21.31 µg/ml).



Şekil. 4. *P. lagopus* Sulu Ekstresinin HEP-2 Hücrelerine Karşı Sitotoksik Aktivitesi



Şekil. 5. *P. lagopus* Sulu Ekstresinin RD Hücrelerine Karşı Sitotoksik Aktivitesi



Resim 2. *P. lagopus* Sulu Ekstresinin HEP-2 ve RD Hücrelerine Karşı Sitotoksik Aktivitesi (1×10^5 hücre/ml)

P. lagopus sulu ekstresinin HEP-2 ve RD kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktivite göstermesinden dolayı, ekstrenin poliamit kolon fraksiyonlarının da aynı hücrelere karşı sitotoksik aktivitesine bakılmıştır. Fraksiyonların aktivitesini kontrol etmek amacıyla, 50 ve 200 µg/ml konsantrasyonlardaki etkileri araştırılmıştır. Sonuçlara göre; ekstrede olduğu gibi fraksiyonlarda da RD hücrelerine karşı daha yüksek aktivite bulunmuştur ve Fr. 17-20 her iki hücreye karşı da en yüksek aktiviteyi göstermiştir (Tablo 21 ve 22).

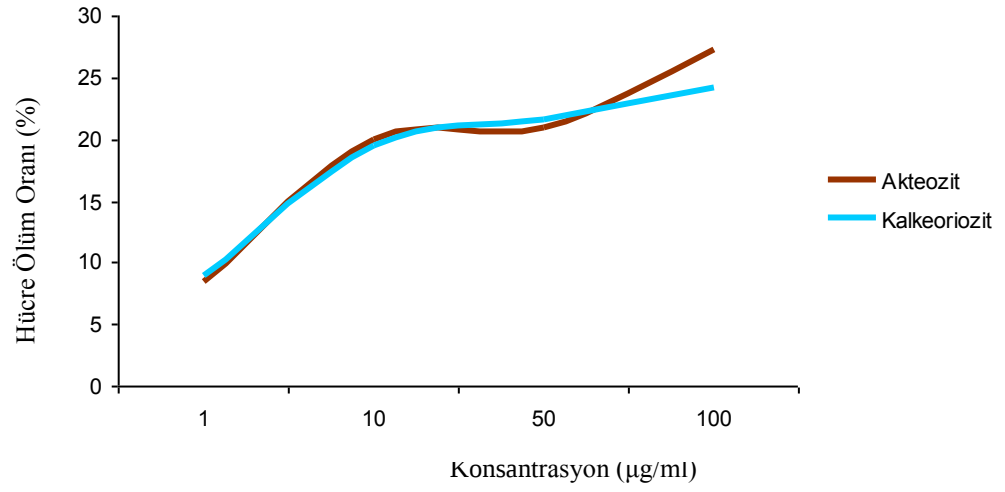
	% İnhibisyon	
Fraksiyon	50 µg/ml	200 µg/ml
2-8	3,91 ± 3,16	34,28±3,70
9-12	14,87 ± 3,24	46,98 ± 8,48
13-16	15,62 ± 2,45	91,78 ± 3,73
17-20	41,00 ± 2,69	95,02 ± 2,15
21-26	26,57 ± 3,25	93,52 ± 1,14
27-35	8,90 ± 3,28	94,27 ± 3,00
36-43	40,27 ± 3,15	54,44 ± 2,07

Tablo 21. *P. lagopus* Poliamit Kolon Fraksiyonlarının HEP-2 Hücrelerine Karşı Sitotoksik Aktivitesi

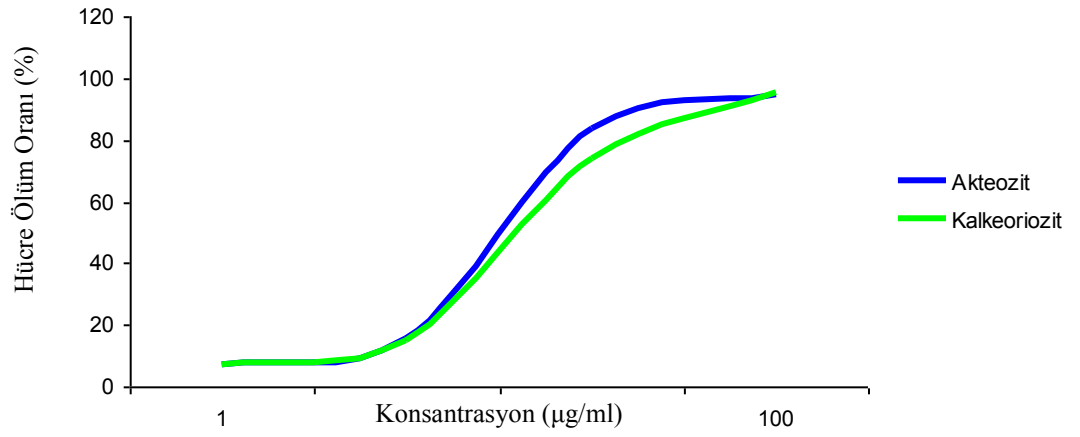
	% İnhibisyon	
Fraksiyon	50 µg/ml	200 µg/ml
2-8	11,94 ± 1,50	22,60 ± 0,05
9-12	36,08 ± 1,50	86,50 ± 1,20
13-16	79,40 ± 1,40	90,89 ± 1,23
17-20	90,18 ± 1,46	92,89 ± 1,46
21-26	90,60 ± 0,01	90,76 ± 1,23
27-35	88,92 ± 2,44	90,31 ± 1,23
36-43	30,40 ± 1,50	92,89 ± 1,20

Tablo 22. *P. lagopus* Poliamit Kolon Fraksiyonlarının RD Hücrelerine Karşı Sitotoksik Aktivitesi

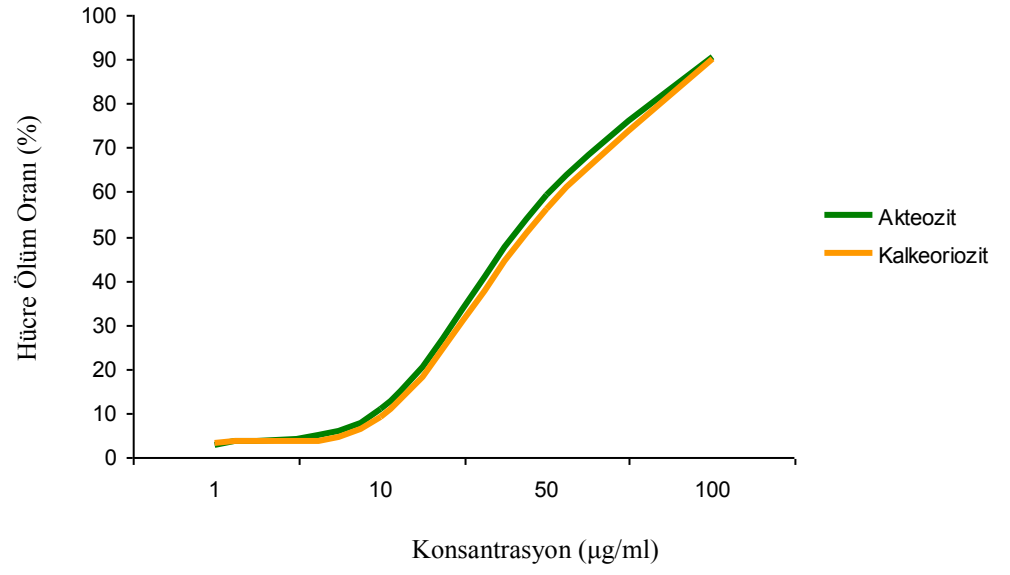
Fraksiyon 17-20 en yüksek aktiviteyi gösterdiği için bu fraksiyonun orta basınçlı sıvı kromatografisine tatbik edilmesiyle elde edilen **PL-1** ve **PL-2** kodlu saf bileşikler ile *n*-BuOH fraksiyonundan elde edilen **PL-3** kodlu bileşiğin; HEP-2, RD ve MCF-7 (meme kanser hücresi) hücrelerine karşı sitotoksik aktivitelerine bakılmıştır. **PL-3** (filomurozit) her üç hücreye karşı da sitotoksik etki göstermez iken; **PL-1** ve **PL-2** bütün hücrelerde karşı doza bağlı aktivite göstermiştir (Şekil 6, 7 ve 8; Resim 3, 4 ve 5).



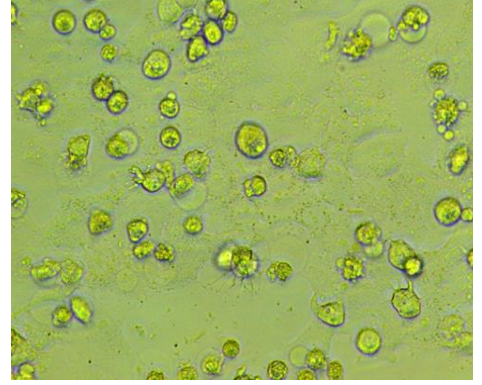
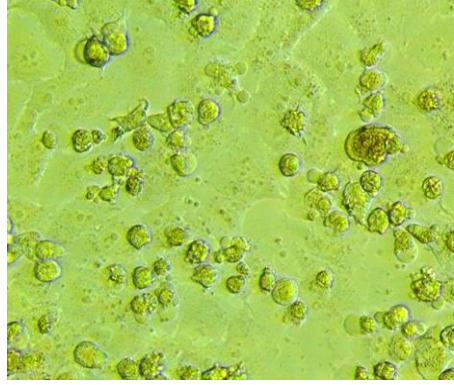
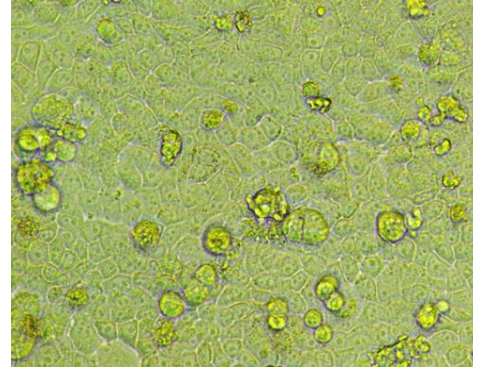
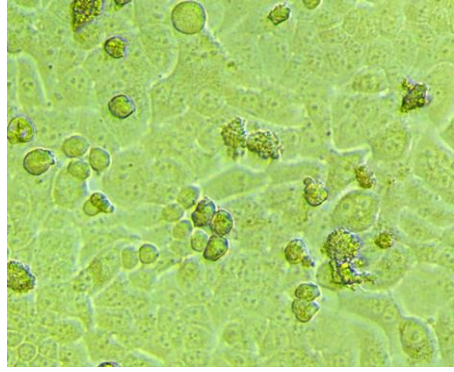
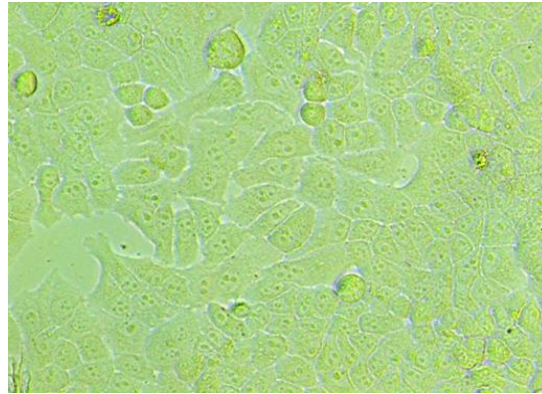
Şekil 6. PL-1 (Aktezit) ve PL-2 (Kalkeoriozit) Bileşiklerinin HEP-2 Hücrelerine Karşı Sitotoksik Aktivitesi



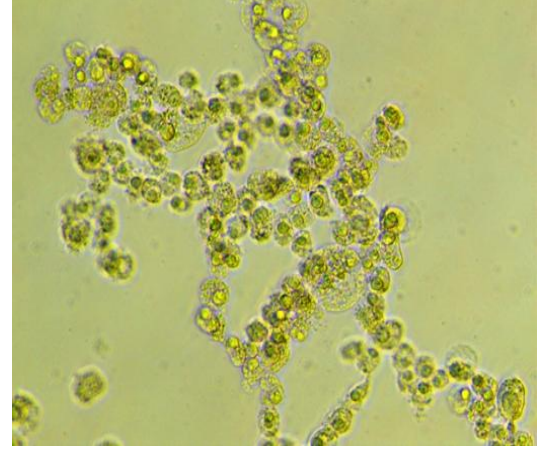
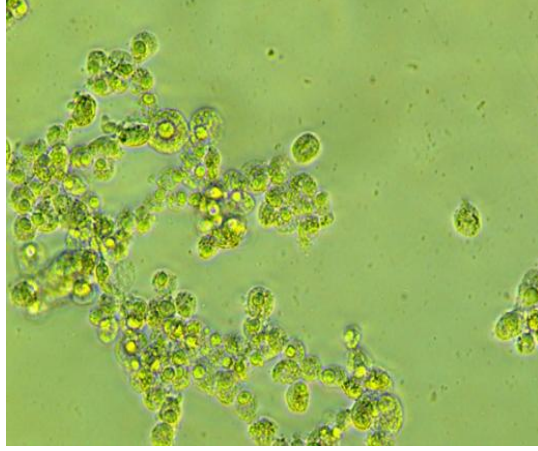
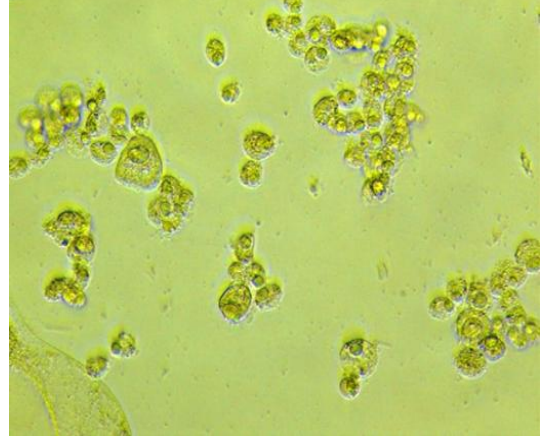
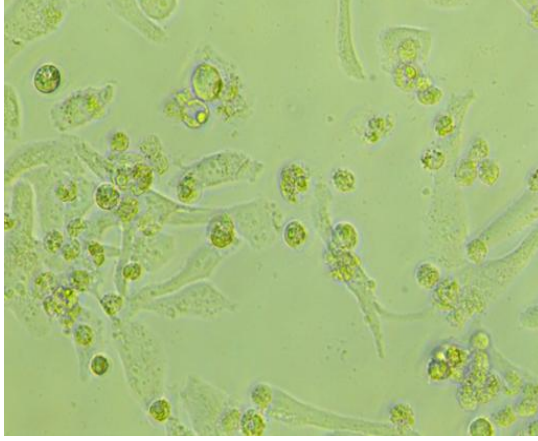
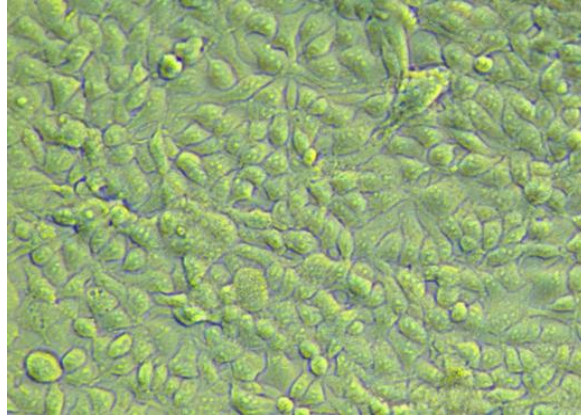
Şekil 7. PL-1 (Aktezit) ve PL-2 (Kalkeoriozit) Bileşiklerinin RD Hücrelerine Karşı Sitotoksik Aktivitesi



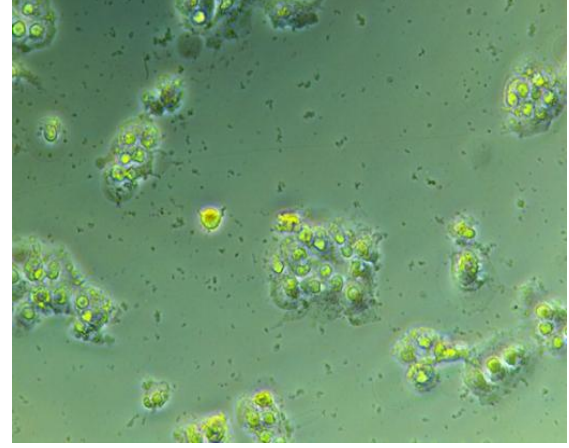
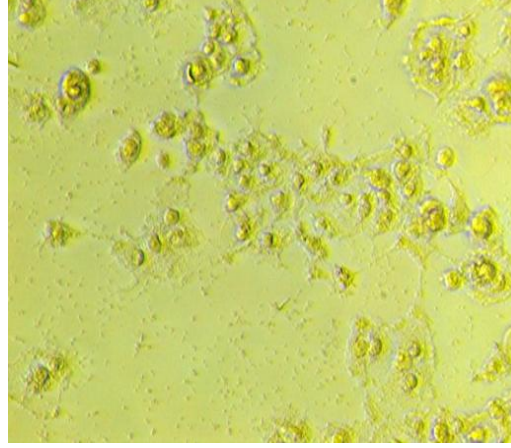
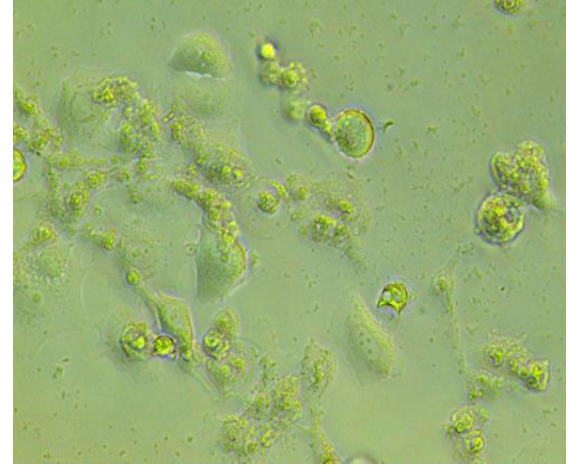
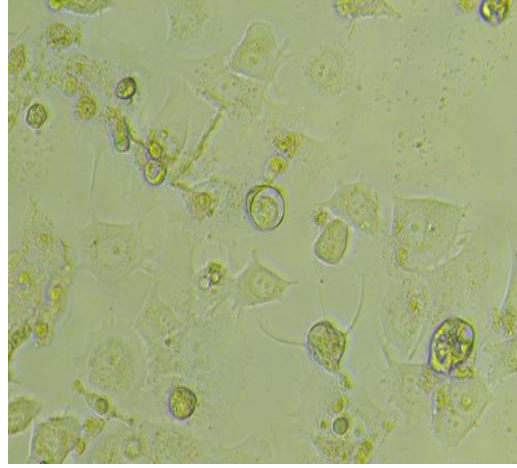
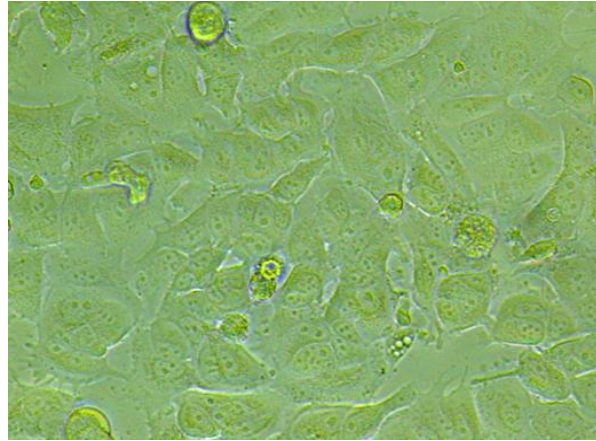
Şekil 8. PL-1 (Akteozit) ve PL-2 (Kalkeoriozit) Bileşiklerinin MCF-7 Hücrelerine Karşı Sitotoksik Aktivitesi

Konsantrasyon**Akteozit (PL-1)****Kalkeoriozit (PL-2)****100 µg/ml****50 µg/ml****Kontrol
(0 µg/ml)**

Resim 3. Akteozit ve Kalkeoriozit' in HEP-2 Hücrelerine Karşı Sitotoksik Aktivitesi

Konsantrasyon**Akteozit (PL-1)****Kalkeoriozit (PL-2)****100 µg/ml****50 µg/ml****Kontrol
(0 µg/ml)**

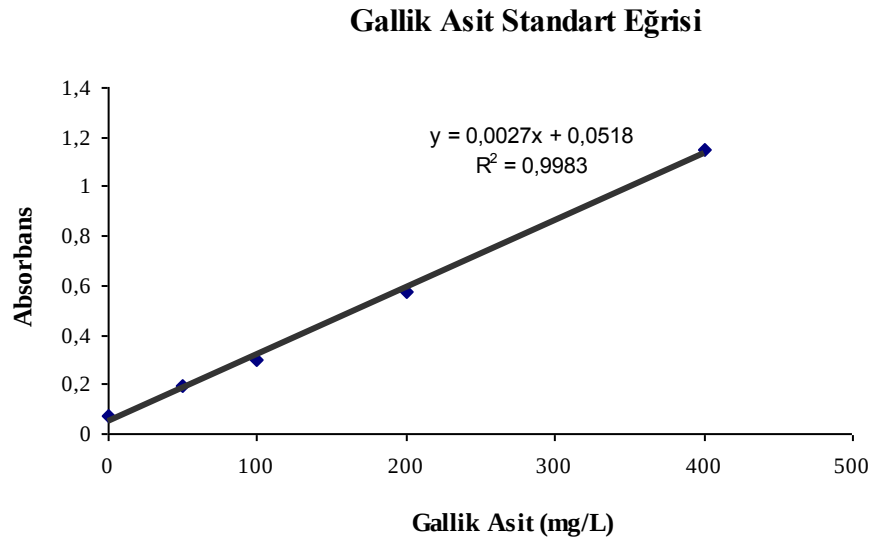
Resim 4. Akteozit ve Kalkeoriozit'in RD Hücrelerine Karşı Sitotoksik Aktivitesi

Konsantrasyon**Akteozit (PL-1)****Kalkeoriozit (PL-2)****100 µg/ml****50 µg/ml****Kontrol
(0 µg/ml)****Resim 5.** Akteozit ve Kalkeoriozit'in MCF-7 Hücrelerine Karşı Sitotoksik Aktivitesi

4.3. Total Fenolik Bileşik Miktar Tayini Sonuçları (Folin-Ciocalteu Metodu)

P. lagopus L. bitkisinin sulu ekstresinin total fenolik bileşik miktar tayini Folin-Ciocalteu metoduna göre gerçekleştirilmiştir. Çalışmada gallik asit standart olarak kullanılmış ve gallik asidin 0, 50, 100, 200, 400 mg/L konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmıştır. 725 nm’de gerçekleştirilen absorbans ölçümünden sonra, gallik asidin farklı konsantrasyonlarına karşı absorbans değerlerini içeren gallik asit standart eğrisi çizilmiştir (Şekil 9) ve doğru denkleminde yararlanılarak total fenolik madde miktarı hesaplanmıştır.

P. lagopus ekstresinin gallik asit ekivalan (GAE) total fenolik bileşik içeriği, 1 g kuru bitki ekstresinde **76.94 mg** olarak bulunmuştur.



Şekil 9. Gallik Asit Standart Eğrisi ve Doğru Denklemi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada Türkiye bitki örtüsünde doğal olarak yetişmekte olan *Plantago* türlerinden Akdeniz ve Ege bölgesinde yaygın olarak yetişen *Plantago lagopus* L. biyoaktivite rehberli olarak araştırılmıştır. Biyoaktivite rehberli çalışma, radikal süpürücü etkinliğin ve sitotoksik aktivitenin araştırılması suretiyle yapılmıştır. Bu amaçla; bitkinin sulu ekstresinin, ön fraksiyonlama aşamasında toplanan fraksiyonların ve aktif fraksiyondan izole edilen bileşiklerin; DPPH, süperoksit (SO) ve nitrik oksit (NO) radikallerine karşı süpürücü etkinliği ve değişik kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktiviteleri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar hem biyoaktivite hem de kemotaksonomik açıdan değerlendirilmiştir.

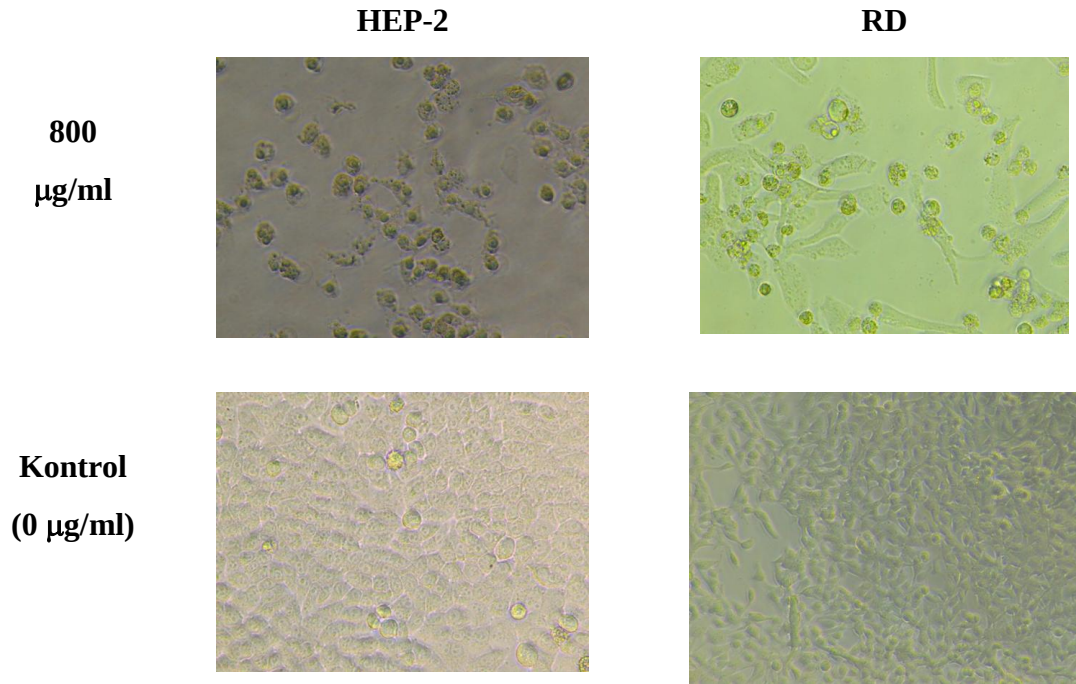
Ülkemizde 21 tür ile temsil edilen *Plantago* cinsi halk arasında hem gıda olarak hem de tedavi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadırlar (4). Yaygın kullanım alanları incelendiğinde başta *P. major* olmak üzere; farklı *Plantago* türlerinin çıban ve yaralarda yara iyi edici etkileri öne çıkmaktadır (62). Yara iyi edici etki antienflamatuvar, antiproliferatif ve antioksidan etkilerin kombinasyonları ile ortaya çıkan bir aktivite olarak bilinmektedir (103). Bunun yanında *P. lagopus*'un da dahil olduğu pek çok *Plantago* türünün antikanser olarak kullanıldığına dair kaynaklara da rastlanmıştır (6). Kullanım alanları bitkinin antioksidan etki gösterebileceğini aynı zamanda hücre proliferasyonunu da etkileyebileceğini düşündürmüştür.

Bitkinin gölgede kurutulmuş toprak üstü kısımları toz edildikten sonra, MeOH ile 40°C de ekstre edilmiş, ekstraksiyon işlemi üç kez tekrarlandıktan sonra ekstreler birleştirilmiş ve yoğunlaştırılmıştır. Yoğunlaştırılan ekstre suda çözöldükten sonra petrol eteri ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapılarak lipofilik bileşiklerden kurtarılmıştır. Kalan sulu ekstre üzerinden biyoaktivite ve izolasyon çalışmalarına devam edilmiştir. Sulu ekstrenin DPPH, SO ve NO radikallerine radikal süpürücü etkisi araştırılmış ve standartlar ile karşılaştırılabilir düzeyde bir etki gözlenmiştir (Şekil 10).

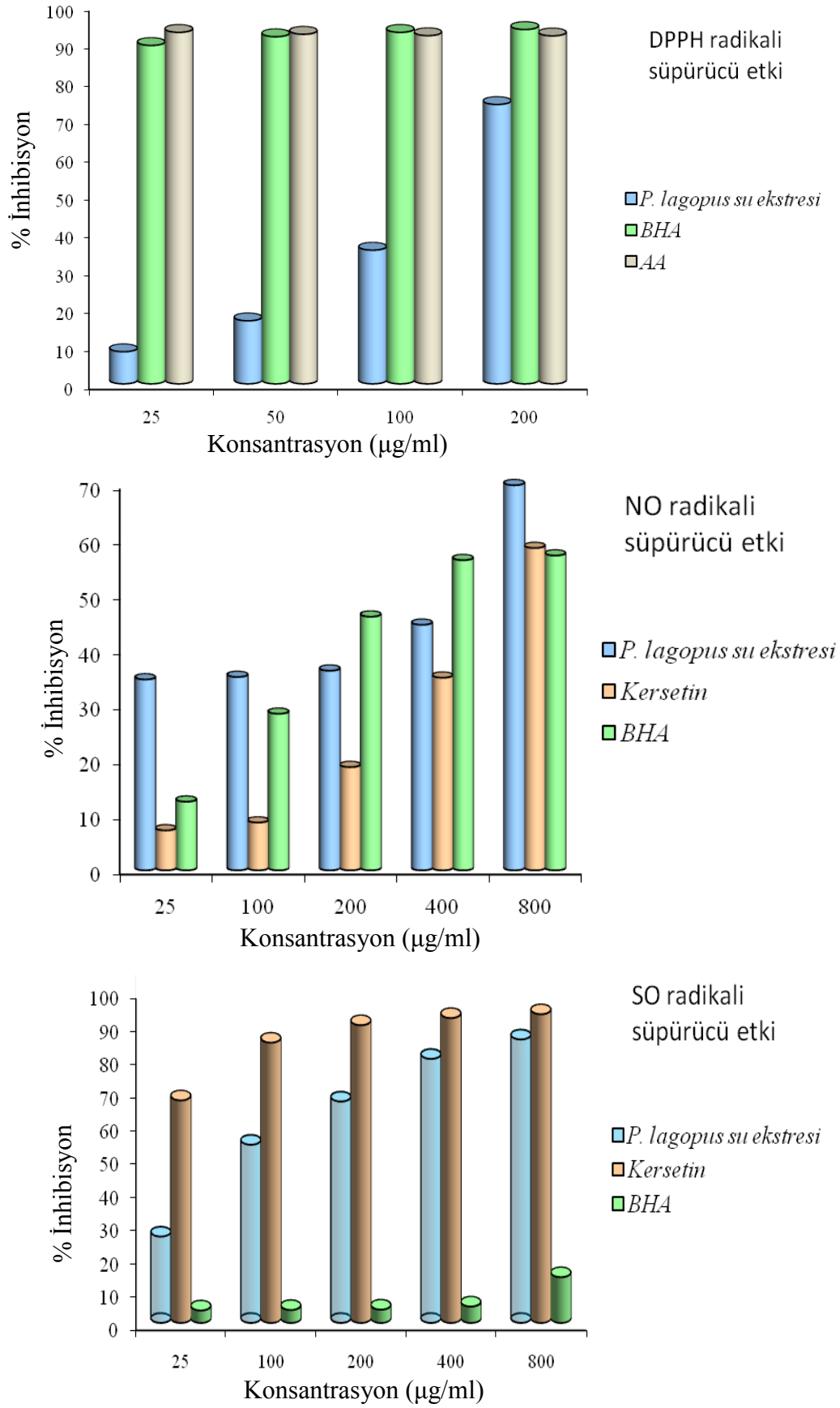
Antioksidan etkinin genellikle bileşiklerin taşımış oldukları fenolik yapı ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle ekstrelerin total fenolik madde içerikleri ile antioksidan etkinlikleri arasında korelasyon olduğu pek çok çalışma ile gösterilmiştir

(86). Ekstrelerin total fenolik madde miktarları uzun yıllardan beri Folin-Ciocalteu reaktifi yardımıyla ölçülmektedir. Bileşiklerin elektron transfer ve bununla birlikte redüksiyon kapasitelerine dayanan bu metot bitkisel ekstraların total fenol içeriklerinin hesaplanmasında rutin bir deney olarak yürütülmektedir (104). *P. lagopus* ekstresinin gallik asit ekivalan total fenolik bileşik içeriği, 1 g kuru bitki ekstresinde **76.94** mg/kuru ekstre (GAE) olarak bulunmuştur.

Diğer taraftan ekstrenin sitotoksik aktivitesi incelendiğinde HEP-2 ve RD hücrelerine karşı sitotoksik etki gösterdiği ve IC_{50} değerlerinin Hep-2 hücrelerine karşı 432.55 $\mu\text{g/ml}$ ve RD hücrelerine karşı 21.31 $\mu\text{g/ml}$ olduğu bulunmuştur (Resim 6). Bu sonuçlar; bizi ekstrenin fraksiyonlanarak etkiden sorumlu bileşiğe ulaşılması için araştırmalar yapmaya yöneltmiştir.



Resim 6. *P. lagopus* Sulu Ekstresinin HEP-2 ve RD Hücrelerine Karşı Sitotoksik Aktivitesi (1×10^5 hücre/ml)



Şekil 10. *P. lagopus* Sulu Ekstresinin ve Standart Antioksidan Bileşiklerin DPPH, NO ve SO Radikali Süpürücü Aktivitesi

Bu amaçla sulu ekstre taşıdığı fenolik ve fenolik olmayan bileşiklerin ayrılabilmesi için poliamit kolon kullanılarak fraksiyonlara ayrılmıştır. Elde edilen toplam 7 fraksiyonun hem radikal süpürücü hem sitotoksik aktiviteleri incelenmiştir. Her iki etkinin incelenmesinde poliamit kolonun %50 metanol ile elüe edilen 17-20 numaralı fraksiyonu en yüksek aktivite göstermiştir. Bu fraksiyonun hem İTK daki davranışları hem de %50 metanol ile alınmış olması feniletanoit glukozitlerince zengin olduğunu göstermektedir. Bu fraksiyonun çeşitli kromatografik metotlar kullanılarak çalışılması sonucu **PL-1** ve **PL-2** olarak kodlanan iki maddenin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu bileşiklerin UV spektrumları polifenolik bir yapıyı işaret etmiş ve IR spektrumlarında da hidroksil (3400), konjuge çifte bağ (1630) ve aromatik halka (1610) varlığını gösteren absorpsiyon bantları gözlenmiştir.

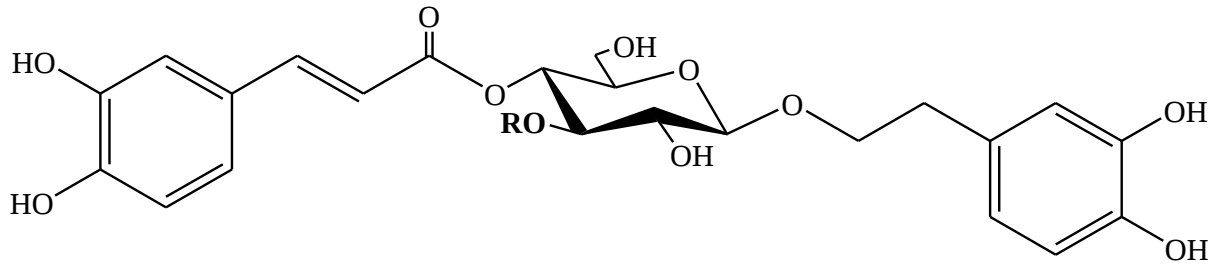
Bu iki bileşiğin ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları incelendiğinde her iki bileşiğin birbirine çok benzediği, her iki bileşikte de aromatik sahada açıl ve aglikon kısımlarından ileri gelen ve 2 ABX sistemi şeklinde gözlenen toplam 6 proton sinyali ile bir AB sistemi şeklinde gözlenen iki *trans*-olefinik proton sinyali olduğu anlaşılmıştır. Aromatik proton sinyallerine ek olarak δ_{H} 4.02-4.04 ve 3.72 bölgesinde görülen α metilen sinyalleri ile δ_{H} 2.79-2.81 bölgesinde görülen triplet β sinyali aglikon grubunda her iki bileşikte de bir feniletal alkol grubunun varlığına işaret etmektedir.

Bu sinyallere ilave olarak ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarında oz sinyalleri göze çarpmaktadır. Oz sinyalleri incelendiğinde **PL-1** bileşiğinin 4.36 d ($J = 8.0$ Hz) ve 5.17 d ($J = 1.7$ Hz) lik sinyaller ve ayrıca δ_{H} 1.08 (d, $J = 6.3$ Hz) de gözlenen sekonder metil sinyalleri ile glukoz ve ramnoz taşıdığı düşünülmüştür. Kenetlenme sabiti değerlerinden glukozun β ve ramnozun da α konfigürasyonda olduğu anlaşılmıştır. ^{13}C NMR spektrumunda δ_{C} 81.6' da gözlenen glukozun 3 numaralı karbon rezonansının glikozidasyon etkisi ile yaklaşık 4-5 ppm düşük alanda gözlenmesi, ramnoz molekülünün C-3' üzerinden bağlı olduğunu belirtmiştir. Ayrıca HMBC spektrumunda δ_{H} 5.17 (d, $J = 1.7$, H-1") sinyalinin glukoz molekülünün δ_{C} 81.6 (C-3') sinyali ile korelasyon göstermesi ramnozun konumunu doğrulamıştır. Diğer taraftan her iki bileşikte de glukozu ait H-4' protonunun düşük alanda gözlenmesi (δ_{H} 4.92 -4.82, t, $J = 9.1$ Hz) açılasyonun glukozun 4. pozisyonundan

olduğunu açıklamaktadır. Bu durum HMBC spektrumunda gözlenen korelasyonlar ile de doğrulanmıştır.

PL-1 ve **PL-2** numaralı bileşiklerin ^{13}C NMR spektrumları karşılaştırıldığında **PL-2** de 23 karbon gözlenmiş ve ramnoz sinyallerinin olmadığı göze çarpmıştır. ^1H NMR spektrumunda da ramnoza ait anomerik proton ve diğer sinyallerin gözlenmemesi **PL-2** numaralı bileşiğin ramnoz taşımadığına işaret etmektedir. Ayrıca glukozun 3 numaralı karbon rezonansında herhangi bir kayma olmaması da (δ_{C} 75.5) glikozidasyon olmadığını doğrulamaktadır.

Bu sonuçlardan **PL-1**'in akteozit **PL-2**'nin ise kalkeoriozit olarak adlandırılan desramnozilakteozit olduğu belirlenmiş ve sonuçlar literatürler ile karşılaştırılarak doğrulanmıştır (37,105).



	R
Akteozit (PL-1)	Ram
Kalkeoriozit (PL-2)	H

Etkiden sorumlu bileşiğin tespit edilmesi amacıyla elde edilen bu bileşiklerin radikal süpürücü ve sitotoksik aktiviteleri incelenmiş ve elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir (Tablo 23). Tablo incelendiğinde bu iki bileşiğin radikal süpürücü etkinliklerinin standartlar ile karşılaştırılabilir düzeyde yüksek olduğu, akteozit ve kalkeoriozit'in de birbirlerine çok yakın etki gösterdikleri anlaşılmaktadır. Bu sonuç feniletanoit glikozitlerinin radikal süpürücü etkinliğinde şeker substitüsyonunun etkili olmadığına işaret etmektedir.

	IC ₅₀ (µg/ml)		
Bileşik	DPPH	NO	SO
Akteozit (PL-1)	21.71	100.75	31.56
Kalkeoriozit (PL-2)	22.45	100.27	33.50
BHA	< 10	306.64	> 800
AA	< 10	< 900	13.36
Kersetin	< 10	658.85	13.66

Tablo 23. Akteozit, kalkeoriozit ve standart antioksidanların DPPH, NO ve SO radikallerine karşı radikal süpürücü etkinlikleri (BHA: Bütirilhidroksianizol, AA: Askorbik asit)

Bileşiklerin sitotoksik aktiviteleri HEP-2, RD ve MCF-7 hücrelerinde izlenmiştir. Yapılan literatür taramalarında *P. lagopus* sulu ekstresinin MCF-7 (insan meme adenokarsinoma) hücrelerine karşı sitotoksik aktivite gösterdiği ve IC₅₀ değerinin 114.45 µg/ml olduğu görülmüştür (6).

Bu nedenle aktif fraksiyondan elde edilen maddelerin sitotoksik aktiviteleri incelenirken MCF-7 hücrelerinin hücre kültürleri hazırlanarak bu hücrelere karşı da sitotoksik etki incelenmiştir. Sonuçlar izlendiğinde her iki bileşiğin de üç hücre grubuna karşı kuvvetli sitotoksik aktivite gösterdiği ve bu etkinin RD hücrelerine karşı en yüksek olduğu görülmüştür. Antioksidan etkinliğe benzer şekilde burada da akteozit ve kalkeoriozit arasında belirgin bir fark olmaması şeker süstitüsyonlarının aktiviteye etkisinin olmadığına işaret etmektedir.

	IC ₅₀ (µg/ml)		
Bileşik	HEP-2	RD	MCF-7
Akteozit (PL-1)	382	36.24	49.3
Kalkeoriozit (PL-2)	584.5	40.28	41.12

Tablo 24. Akteozit ve Kalkeoriozit'in HEP-2, RD ve MCF-7 Hücrelerine Karşı Sitotoksik Aktiviteleri

Plantago türleri halk arasında kullanımları ve biyolojik aktiviteleri dışında kemotaksonomik açıdan da önemli olan türlerdir. Son yıllarda yapılan kloroplast

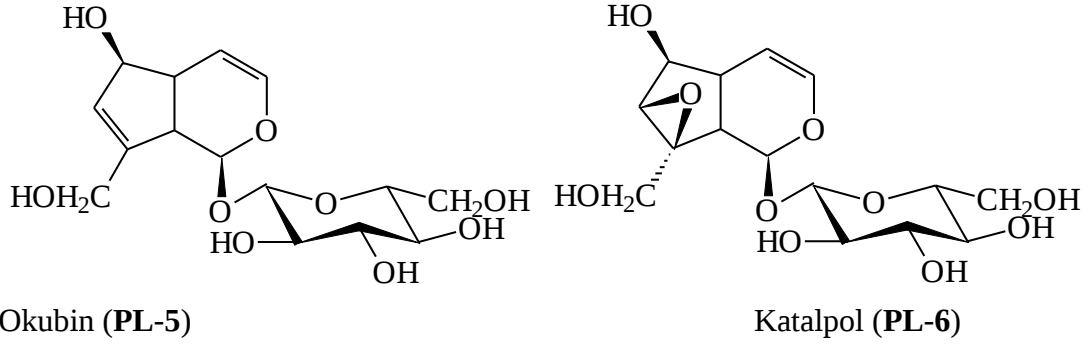
DNA sequence çalışmaları ve kemotaksonomik araştırmalar *Veronica*, *Digitalis* gibi bazı türlerinin Plantaginaceae familyasına geçmesi gerektiğini, bu türlerin *Verbascum*, *Scrophularia* gibi Scrophulariaceae bitkilerinden çok *Plantago* türleri ile yakınlık gösterdiğini ortaya koymaktadır (106,107). Kemotaksonomik açıdan özellikle iridoit glukozitlerinin Plantaginaceae familyası için önemi pek çok çalışma ile gösterilmiştir (108). Bu nedenle çalışmamızın devamında poliamit kolonun su ile alınan iridoit fraksiyonundan izolasyon çalışmaları yapılmış ve 4 maddenin izolasyonu gerçekleştirilmiştir [PL 3-6].

İridoit fraksiyonundan izole edilen **PL 4-6** kodlu maddeler İTK' da vanilin/H₂SO₄ reaktifi püskürtüldükten sonra 105 °C'de 1-2 dakika ısıtılması ile önce pembe kırmızı daha sonra kahverengiye dönen renk vermeleri ve UV'de reaktif kullanmadan önce ve sonraki davranışları, iridoit glukozitleri olabileceklerini göstermiştir.

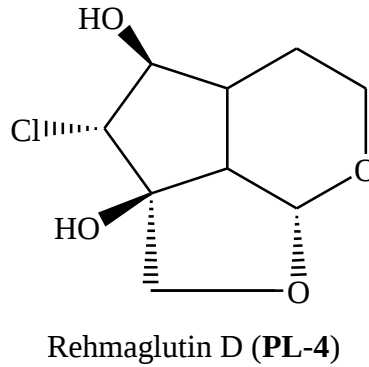
Bu bileşiklerin UV spektral bulguları incelendiğinde, konjuge olmayan iridoit enol-eter sistemi için (**PL-4** hariç) karakteristik absorpsiyon bantları (λ_{maks} 200-205 nm) vermiş olmaları, C-4 konumlarının süstitüe olmadığına işaret etmiştir. **PL-5** ve **PL-6** nın ¹H NMR spektrumlarında H-3 ve H-4 olefinik protonlarına ait sinyallerin dublet dublet şeklinde gözlenmesi bu durumu doğrulamıştır. **PL-4'** ün ise ¹H NMR spektrumunda olefinik protonların gözlenmemesi H-3 ve H-4 arasında çift bağ olmadığını göstermektedir. Diğer taraftan **PL-5** 'de, siklopentan-piran halkasında C-7 ile C-8 arasında bir çifte bağ bulunurken **PL-6** da bu çifte bağın yerini bir epoksit köprüsü almıştır. Bu nedenle **PL-5**'de H-7 olefinik protonu 5.76 ppm'de gözlenirken, **PL-6** da H-7 oksimetin protonları 3.44 ppm de gözlenmiştir. Tüm bileşiklerin ¹H NMR spektrumlarında 3.79 - 4.38 ppm'ler arasında AB sistem şeklinde gözlenen sinyaller bu bileşiklerin yapılarında oksimetilen gruplarının varlığını göstermiştir. C-8 karbon rezonanslarının katerner olarak gözlenmesi ve HMBC spektrumlarında gözlenen korelasyonlar oksimetilen gruplarının C-8'de yer aldığını doğrulamıştır.

PL 4-6'nın ¹H ve ¹³C NMR spektrumları incelendiğinde **PL-4**'te oz bölgesinde herhangi bir sinyalin gözlenmemesi **PL-4**'ün nonglikozidik bir yapıda olduğunu, **PL-5** ve **PL-6**' nın ise birer oz taşıdığını ve bu ozların da anomerik proton sinyallerinden (PL-5: 4.67 d, PL-6: 4.76 d , $J = 7.9$ Hz) glukoz olduğu anlaşılmıştır. 1D ve 2D NMR spektrumlarının ayrıntılı olarak incelenmesi ve elde edilen

bulguların literatürler ile karşılaştırılması sonucu **PL-5** ve **PL-6**'nın *Plantago* türlerinde yaygın olarak bulunan birer iridoit glukoziti olan okubin (**PL-5**) ve katalpol (**PL-6**) oldukları anlaşılmıştır (15).

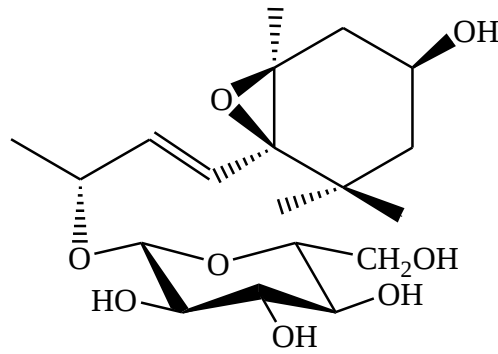


Nonglikozidik bir yapıya sahip olan **PL-4** bileşiğinde C-7'ye atfedilen karbon sinyalinin (δ_C 74.15) yaklaşık 10 ppm yüksek alanda gözlenmesi, yapıda bir Cl atomu olabileceğini ve klorun C-7 den bağlı olduğu sonucunu ortaya koymuştur. 1H ve ^{13}C NMR değerlerinin 2D NMR korelasyonları ile birlikte değerlendirilmesi ve sonuçların literatürler ile karşılaştırılması sonucu **PL-4**'ün yapısı rehmaglutin D olarak aydınlatılmıştır.



Poliamit kolonun iridoit fraksiyonundan elde edilen son bileşik olan **PL-3** ise ^{13}C NMR spektrumunda göstermiş olduğu 19 karbon sinyali ile diğer bileşiklerden ayrılmaktadır. Bu rezonanslardan glukoza ait olan 6 sinyal çıkarıldığında geriye 13 karbon kalmakta ve DEPT-135 spektrumunda bu sinyallerin incelenmesi sonucu 4 metil grubunun varlığı ortaya çıkmaktadır. Bileşiğin COSY ve HMBC korelasyonları

incelendiğinde bir 6 üyeli halka ve 4 karbonlu bir yan zincirden meydana geldiği, HMBC spektrumunda glukozun anomerik protonu (δ_H 4.38 d, $J = 8.0$) ile δ_C 76.9 (CH, C-9) arasında gözlenen korelasyon glukozun aglikona yan zincirden bağlı olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar; bileşiğin yapısının daha önce *Plantago* türlerinden elde edilmemiş megastigman yapısında bir bileşik olan filomurozit olduğunu göstermiştir.



Filomurozit (PL-3)

Bu tez kapsamında biyoaktivite rehberli izolasyon çalışmalarında en yüksek aktivite gösteren fraksiyondan elde edilen bileşiklerin [akteozit (PL-1) ve kalkeoriozit (PL-2)] aktivitesi araştırılmıştır. İridoit fraksiyonundan elde edilen bileşiklerden okubin ve katalpol'ün radikal süpürücü ve sitotoksik aktiviteleri ile ilgili daha önce tarafımızca yapılan çalışmalarda bu iki bileşiğin HEP-2, RD ve L-20B hücrelerine karşı sitotoksik etki göstermedikleri, yine bu bileşiklerin radikal süpürücü etkinliklerinin olmadığı gösterilmiştir (109,110). Yapılan literatür taramalarında megastigman glikoziti olan filomurozitin biyoaktivitesi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu nedenle bu bileşiğinde radikal süpürücü ve sitotoksik aktiviteleri incelenmiş ancak akteozit ve kalkeoriozite kıyasla çok düşük radikal süpürücü etki gözlenirken, denenen hücre gruplarına karşı herhangi bir sitotoksik etkiye de rastlanmamıştır. Bu sonuç biyoaktivite rehberli izolasyon çalışmalarının önemini bir

kez daha ortaya koymaktadır. Rehmaglutin D ise; çok düşük miktarda izole edildiği için aktivitesi incelenememiştir.

Çalışmamızın sonuçları kemotaksonomik açıdan değerlendirildiğinde *P. lagopus*'ta *Plantago* türleri için yaygın olduğu düşünülen bir feniletanoit glukoziti olan plantamajozit'in izole edilmemiş olması bu tür için ilginç bir sonuç olarak karşımıza çıkmıştır. Poliamit kolonun tüm fraksiyonları fitokimyasal açıdan çalışılmamış olmakla birlikte daha önce *P. major*'den izole etmiş olduğumuz plantamajozit ile ince tabaka kromatografisi ile karşılaştırıldığında bu maddeye rastlanamamıştır. Bu sonuçlar *P. lagopus* üzerinde Ronsted ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma ile uyum göstermektedir (15).

Yapılan literatür araştırmalarında *Plantago* türlerinden daha önce izole edilen klor taşıyan nonglikozidik bir iridoite rastlanmamıştır ancak C-7 de klor taşıyan iridoit yapısında bileşikler Scrophulariaceae bitkilerinde sıklıkla karşılaşılmaktadır. Örneğin *Rehmannia*, *Veronica*, *Myoporum* ve *Verbascum* türlerinden bu tip bileşikler izole edilmiştir (96,111,112). Bu türler incelendiğinde *Veronica* türlerinin son yapılan filogenetik ve kemotaksonomik araştırmalar ile Scrophulariaceae'den Plantaginaceae familyasına, *Myoporum* türlerinin Myoporaceae'den Schrophulariaceae familyasına transfer olduğu görülmektedir. *Rehmannia* türleri ise Schrophulariaceae familyasında olmakla birlikte Plantaginaceae familyası ile yakın ilişkili olduğuna dair moleküler sistematik ve fitokimyasal araştırmalar devam etmektedir (113,114). Bu nedenle *Plantago* türlerinden izole edilen Rehmaglutin D; bu cins ile diğer cinsler arasında bir kemotaksonomik anahtar rolü üstlenebilir.

Bu çalışmanın devamında kemotaksonomik araştırmalara katkıda bulunulması amacıyla aktif fraksiyonlardan başlanarak diğer fraksiyonların da fitokimyasal açıdan araştırılması ve izole edilen maddelerin diğer Plantaginaceae ve Scrophulariaceae familyası bitkileri ile karşılaştırılarak kemotaksonomik olarak değerlendirmesi amaçlanmaktadır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar Türkiye bitki örtüsünde yetişmekte olan *Plantago* türleri üzerinde yapılan çalışmalara ve Plantaginaceae familyasının kemotaksonomisini hedefleyen TÜBİTAK projemize katkıda bulunacak sonuçlar olarak değerlendirilebilir. Ancak kemotaksonomik açıdan kesin yargılara varabilmek için daha fazla sayıda türün araştırılmasına gerek vardır.

Çalışmamızın sonuçlarının kemotaksonomik katkılarının yanı sıra biyoaktif madde arayışlarındaki etkisi de oldukça önemlidir. Biyoaktivite rehberli olarak yürütülen bu araştırmanın sonucunda aktif fraksiyondan elde edilen bileşiklerin radikal süpürücü etkinlikleri ile birlikte sitotoksik aktivitelerinin yüksek çıkması bir taraftan hücreleri serbest radikal hasara karşı koruduklarını diğer taraftan da kanserli hücrelerde hücre proliferasyonunu engellediklerine işaret etmektedir. Bu durum *Plantago* türlerinin kanser tedavisinde ve yara iyi edici olarak kullanımlarına çok güzel bir açıklama getirmektedir.

Oksidatif stress vücutta bulunan antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz kalması durumunda hücre içinde reaktif oksijen radikallerinin artmasıyla ortaya çıkan bir durumdur. Enflamasyon, kanser, iskemik hasarlar, bunama ve yaşlanma gibi pek çok durumda reaktif oksijen radikallerinin ve dolayısıyla oksidatif stresin arttığı gözlenmiştir (115). İyonize ve noniyonize radyasyon, hava kirliliği, ozon gibi toksik gazlar, bazı kimyasal maddeler ve toksinler de ekzojen radikal kaynakları olarak bilinir. Bu nedenle etkin antioksidan bileşikleri elde etme arayışları hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde son yıllarda büyük önem kazanmıştır (116). Bu araştırmanın sonunda elde edilen akteozit ve kalkeoriozit standartlara göre oldukça yüksek etki göstermiş ve bu özellikleri ile ileri antioksidan araştırmalar için bir basamak oluşturmaktadırlar.

Feniletanoitler üzerinde yürütülen aktivite çalışmaları bu bileşiklerin çeşitli etkilerinin olduğunu ortaya koymuştur (89,117). Aktif fraksiyondan elde etmiş olduğumuz **PL-1** kodlu akteozitin kanser hücreleri üzerine apoptotik etkisi, antiproliferatif, sitotoksik, antimetastatik ve immünomodülatör potansiyelleri çok sayıda araştırma ile gösterilmiştir (118-120). Bu nedenle bitkinin aktivitesinden sorumlu bileşiğin akteozit olabileceği söylenebilir. Bu çalışmanın devamında akteozit üzerinde biyoaktivite çalışmalarına devam edilecektir. *Plantago* türleri hem ana ekstrelerinin göstermiş olduğu aktiviteler hem de etkili bileşikleri yönünden iyi bir ilaç kaynağı olarak değerlendirilebilir.

KAYNAKLAR

1. Davis, P.H. (1982). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, 7, 504-521.
2. Baytop, T. (1999). *Türkiye'de Bitkiler İle Tedavi (Geçmişte ve Bugün)*, (2. baskı) İstanbul : Nobel Tıp Kitabevleri, 338.
3. Demirezer, L.Ö., Ersöz, T., Saraçoğlu, İ., Şener, B. (2007). *Tedavide Kullanılan Bitkiler "FFD Monografları"*, (1. Baskı) İstanbul : Nobel Tıp Kitabevleri 219-228.
4. Stanisavljevic, I.T., Stojicevic, S.S., Velickovic, D.T., Lazic, M.L., Veljkovic, V.B. (2008). Screening the Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Extracts from Plantain (*Plantago major* L.) Leaves. *Separation Science and Technology*, 43(14), 3652-3662.
5. Velasco-Lezama, R., Tapia-Aguilar, R., Roman-Ramos, R., Vega-Avila, E., Perez-Gutierrez, M.S. (2006). Effect of *Plantago major* on cell proliferation in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, 103(1), 36-42.
6. Galvez, M., Martin-Cordero, C., Lopez-Lazaro, M., Cortes, F., Ayuso, M.J. (2003). Cytotoxic effect of *Plantago* spp. on cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 88(2-3), 125-130.
7. Turel, I., Ozbek, H., Erten, R., Oner, A.C., Cengiz, N., Yilmaz, O. (2009). Hepatoprotective and anti-inflammatory activities of *Plantago major* L. *Indian Journal of Pharmacology*, 41(3), 120-124.
8. Ozaslan, M., Karagoz, I.D., Kalender, M.E., Kilic, I.H., Sari, I., Karagoz, A. (2007). In vivo antitumoral effect of *Plantago major* L. extract on Balb/C mouse with Ehrlich ascites tumor. *American Journal of Chinese Medicine*, 35(5), 841-851.
9. Fleer, H., Verspohl, E.J. (2007). Antispasmodic activity of an extract from *Plantago lanceolata* L. and some isolated compounds. *Phytomedicine*, 14(6), 409-415.
10. Atta, A.H., El-Sooud, K.A. (2004). The antinociceptive effect of some Egyptian medicinal plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 95(2-3), 235-238.

11. Arıtuluk, Z.C. (2010). *Tefenni (Burdur) İlçesinin Florası Ve Halk İlaçları*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
12. Baytop, T. (1994). *Türkçe Bitki Adları Sözlüğü*, Ankara: Türk Dil Kurumu.
13. Elçi, B., Erik, S. (2006). Güdül (Ankara) ve Çevresinin Etnobotanik Özellikleri. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 26(2), 57-64.
14. Ronsted, N., Franzyk, H., Molgaard, P., Jaroszewski, J.W., Jensen, S.R. (2003). Chemotaxonomy and evolution of *Plantago* L. *Plant Systematics and Evolution*, 242(1-4), 63-82.
15. Ronsted, N., Gobel, E., Franzyk, H., Jensen, S.R., Olsen, C.E. (2000). Chemotaxonomy of *Plantago*. Iridoid glucosides and caffeoyl phenylethanoid glycosides. *Phytochemistry*, 55(4), 337-348.
16. Samuelsen, A.B. (2000). The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 71(1-2), 1-21.
17. Kleinsmith, L.J. (2005). *Principles of Cancer Biology*, Pearson International Edition.
18. Taskova, R., Handjieva, N., Evstatieva, L., Popov, S. (1999). Iridoid glucosides from *Plantago cornuti*, *Plantago major* and *Veronica cymbalaria*. *Phytochemistry*, 52(8), 1443-1445.
19. Taskova, R., Evstatieva, L., Handjieva, N., Popov, S. (2002). Iridoid patterns of genus *Plantago* L. and their systematic significance. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences*, 57(1-2), 42-50.
20. Jensen, S.R., Olsen, C.E., Rahn, K., Rasmussen, J.H. (1996). Iridoid glucosides in *Plantago alpina* and *P. altissima*. *Phytochemistry*, 42(6), 1633-1636.
21. Toda, S., Miyase, T., Arichi, H., Tanizawa, H., Takino, Y. (1985). Natural Antioxidants .2. Antioxidative Components Isolated from Seeds of *Plantago-Asiatica* Linne. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 33(3), 1270-1273.
22. Kim, B.H., Lee, N.K., Chang, I.M. (2009). Simultaneous Analysis of a Mixture of Iridoids in Water Extracts of *Plantago asiatica* L. by LC. *Chromatographia*, 69(11-12), 1397-1400.

23. Yukihiro Goda, N.K., Fumiyuki Kiuchi. (2009). A guanidine derivative from seeds of *Plantago asiatica*. *J.Nat.Med.*, 63(1), 58-60.
24. Damtoft, S., Falkesgaard, E., Jensen, S.R. (1994). Iridoid Glucosides from *Plantago-Hookeriana*. *Phytochemistry*, 35(5), 1367-1368.
25. Velazquez-Fiz, M.P., Diaz-Lanza, A.M., Fernandez-Matellano, L. (2000). Iridoids from *Plantago lagopus*. *Pharmaceutical Biology*, 38(4), 268-270.
26. Saadi, H., Handjieva, N., Popov, S., Evstatieva, L. (1990). Iridoids from *Plantago-Media*. *Phytochemistry*, 29(12), 3938-3939.
27. Franzyk, H., Husum, T.L., Jensen, S.R. (1998). A caffeoyl phenylethanoid glycoside from *Plantago myosuros*. *Phytochemistry*, 47(6), 1161-1162.
28. Afifi, M.S.S., O. M.; Maatooq, G. T. (1990). Phytochemical study of two *Plantago* species. Part II: Iridoid glucosides. *Mansoura Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(4), 16-25, Ref: C.A. 115:155014, 1991
29. Andrzejewskagolec, E., Ofterdingerdaegel, S., Calis, I., Swiatek, L. (1993). Chemotaxonomic Aspects of Iridoids Occurring in *Plantago* Subg *Psyllium* (Plantaginaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 185(1-2), 85-89.
30. Yan, P.L., Guiying; Zhao, Shimin; Song, Lili; Tan, Lina; Jin, Yongri; Li, Xuwen. (2009). Chemical constituents of *Plantago depressa* Willd. . *Zhongguo Yaoxue Zazhi (Beijing, China)* 44(1), 19-21, Ref: C.A. 152:128596, 2009.
31. Swiatek, L., Lehmann, D., Chaudhuri, R.K., Sticher, O. (1981). Occurrence of Melittoside in the Seeds of *Plantago-Media*. *Phytochemistry*, 20(8), 2023-2024.
32. Handjieva, N., Spassov, S., Bodurova, G., Saadi, H., Popov, S., Pureb, O. ve diğ erleri. (1991). Majoroside, an Iridoid Glucoside from *Plantago major*. *Phytochemistry*, 30(4), 1317-1318.
33. Afifi, M.S.Z., Mona G.; Hassan, Madiha A. (2000). Phytochemical investigation of the aerial parts of *Plantago ovata*. *Mansoura Journal of Pharmaceutical Sciences* 16(2), 178-190, Ref: C.A. 135:104999, 2001.

34. Duff, R.B., Bacon, J.S.D., Mundie, C.M., Farmer, V.C., Russell, J.D., Forrester, A. (1965). Catalpol and Methylcatalpol - Naturally Occurring Glycosides in *Plantago* and *Buddleia* Species. *Biochemical Journal*, 96(1), 1-&.
35. Zaghloul, M.G.Z., Ahmed M. (2000). A new phenylpropanoid glycoside from the aerial parts of *Plantago crassifolia*. *Mansoura Journal of Pharmaceutical Sciences* 16(1), 56-68, Ref: C.A. 133:347105, 2000.
36. Nishibe, S. (1994). Bioactive Phenolic-Compounds in Traditional Medicines. *Pure and Applied Chemistry*, 66(10-11), 2263-2266.
37. Miyase, T., Ishino, M., Akahori, C., Ueno, A., Ohkawa, Y., Tanizawa, H. (1991). Phenylethanoid Glycosides from *Plantago-Asiatica*. *Phytochemistry*, 30(6), 2015-2018.
38. Ravn, H., Nishibe, S., Sasahara, M., Li, X.B. (1990). Phenolic-Compounds from *Plantago-Asiatica*. *Phytochemistry*, 29(11), 3627-3631.
39. Li, L., Liu, C.M., Liu, Z.Q., Tsao, R., Liu, S.Y. (2009). Identification of Phenylethanoid Glycosides in Plant Extract of *Plantago asiatica* L. by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Chinese Journal of Chemistry*, 27(3), 541-545.
40. Geng, F., Yang, L., Chou, G.X., Wang, Z.T. (2010). Bioguided Isolation of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors from the Seeds of *Plantago asiatica* L. *Phytotherapy Research*, 24(7), 1088-1094.
41. Li, C.M.L. (2008). Isolation and purification of phenylethanoid glycosides from plant extract of *Plantago asiatica* by high performance centrifugal partition chromatography. *Chinese Chemical Letters*, 19, 1349-1352.
42. Andary, C., Ravn, H., Wylde, R., Heitz, A., Motteflorac, E. (1989). Crassifolioside, a Caffeic Acid Glycoside Ester from *Plantago-Crassifolia*. *Phytochemistry*, 28(1), 288-290.
43. Nishibe, S., Sasahara, M., Ying, J., Lu, Y.C., Tanaka, T. (1993). Phenylethanoid Glycosides from *Plantago-Depressa*. *Phytochemistry*, 32(4), 975-977.

44. Afifi, M.S.A.A., Mohammed M. A.; Zaghloul, Ahmed M.; Ahmad, Mamdouh M.; Kinghorn, A. D.; Zaghloul, Mona G. (2001). Chemical constituents of *Plantago squarrosa*. *Mansoura Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17(1), 65-84, Ref: C.A. 140:213996, 2003.
45. Wu, F.-H.L., Jing-Yu; Chen, Rong; Wang, Qi-Zhi; Li, Wei-Guang. (2006). Chemical constituents and hepatoprotective activity of *Plantago depressa*. . *Zhongguo Tianran Yaowu* 4(6), 435-439, Ref: C.A. 147:113794, 2007.
46. Nishibe, S., Tamayama, Y., Sasahara, M., Andary, C. (1995). A Phenylethanoid Glycoside from *Plantago-Asiatica*. *Phytochemistry*, 38(3), 741-743.
47. Murai, Y., Kanemoto, T., Iwashina, T. (2008). Flavone glucuronides from *Plantago hakusanensis* endemic to Japan. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36(10), 815-816.
48. Afifi, M.S.S., O. M.; Maatooq, G. T. (1990). Phytochemical study of two *Plantago* species. Part I: Sterols and flavonoids. *Mansoura Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(4), 1-15, Ref: C.A. 115:155013, 1991.
49. Fiz, M.P.V., Lanza, A.M.D., Matellano, L.F. (2000). Polyphenolic compounds from *Plantago lagopus* L. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences*, 55(11-12), 877-880, Ref: C.A. 134:234361, 2001.
50. Velazquez, M.P.D., A. M.; Fernandez, L.; Lapica, B. . (1992). Phytochemical study of *Plantago lagopus* L. *Ars Pharmaceutica* 33, 466.
51. Salama, H.M.H., Saffan, S.E. (2003). Triterpenoids and flavonoids from the air-dried aerial parts of *Plantago amplexicaulis*. *Kuwait Journal of Science & Engineering*, 30(2), 109-118.
52. Yamada, H., Nagai, T., Takemoto, N., Endoh, H., Kiyohara, H., Kawamura, H. ve diğ erleri. (1989). Plantagoside, a Novel Alpha-Mannosidase Inhibitor Isolated from the Seeds of *Plantago-Asiatica*, Suppresses Immune-Response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 165(3), 1292-1298.
53. Matsuura, N., Sasaki, C., Aradate, T., Ubukata, M., Kojima, H., Ohara, M. (2002). Plantagoside as Maillard reaction inhibitor - its inhibitory mechanism and application. *Maillard Reaction in Food Chemistry and Medical Science: Update for the Postgenomic Era*, 1245, 411-412.

54. Zaghloul, M.G. (2006). A new triterpenoidal compound from the roots of *Plantago crassifolia* Forssk. *Alexandria Journal of Pharmaceutical Sciences* 20(1), 50-55, Ref: C.A. 146:334055, 2006.
55. Tarvainen, M., Suomela, J.P., Kallio, H., Yang, B.R. (2010). Triterpene Acids in *Plantago major*: Identification, Quantification and Comparison of Different Extraction Methods. *Chromatographia*, 71(3-4), 279-284.
56. Debrauwer, L.M., C.; Babadjamian, A.; Vidal-Ollivier, E.; Laget, M.; Salmona, G.; Afzal-Raffi, Z. (1989). Study in the chemical constituents of *Plantago cynops* L. and antibacterial evaluation of verbascoside. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 64(7), 183-187.
57. Li, M.Z., Yonghe; Pu, Huishan; Li, Jingdao; Zheng, Yunhua. . (1995). Isolation and structure identification of liposoluble chemical constituents in rhizome of *Plantago asiatica* L. *Yanbian Yixueyuan Xuebao* 18(2), 85-87.
58. Marina Galvez, C.M.-C. (2005). Antioxidant Activity of *Plantago bellardii* All. *Phytotherapy Research*, 19, 1074-1076.
59. Coban, T., Citoglu, G.S., Sever, B., Iscan, M. (2003). Antioxidant activities of plants used in traditional medicine in Turkey. *Pharmaceutical Biology*, 41(8), 608-613.
60. Kardosova, A., Machova, E. (2006). Antioxidant activity of medicinal plant polysaccharides. *Fitoterapia*, 77(5), 367-373.
61. Hernan Speisky, C., Catalina Carrasco. (2006). Antioxidant Screening of Medicinal Herbal Teas. *Phytotherapy Research*, 20, 462-467.
62. Mahmood, A.A., M.E. Phipps. (2006). Wound healing activities of *Plantago major* Leaf Extract in Rats. *International Journal of Tropical Medicine* 1(1), 33-35.
63. Erdem, T., Sakat, S.C., Engin, R.I., Ozyigit, H., Atasoy, M., Kaya, Y. (2009). Acute irritant contact dermatitis caused by *Plantago major*. *Contact Dermatitis*, 60(4), 237-U267.
64. Galvez, M., Martin-Cordero, C., Houghton, P.J., Ayuso, M.J. (2005). Antioxidant activity of methanol extracts obtained from *Plantago* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1927-1933.

65. Yu-Chih Liang, Y.-T.H. (1999). Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis*, 20(10), 1945-1952.
66. T. Ringbom, U.H., A. Stenholm, S. Flock. (2001). COX-2 Inhibitory Effects of Naturally Occuring and Modified Fatty Acids. *Journal of Natural Products*, 64, 745-749.
67. Beara, I.N., Orcic, D.Z., Lesjak, M.M., Mimica-Dukic, N.M., Pekovic, B.A., Popovic, M.R. (2010). Liquid chromatography/tandem mass spectrometry study of anti-inflammatory activity of Plantain (*Plantago* L.) species. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52(5), 701-706.
68. Aktay, G., Deliorman, D., Ergun, E., Ergun, F., Yesilada, E., Cevik, C. (2000). Hepatoprotective effects of Turkish folk remedies on experimental liver injury. *Journal of Ethnopharmacology*, 73(1-2), 121-129.
69. Altanlar, N., Citoglu, G.S., Yilmaz, B.S. (2006). Antilisterial activity of some plants used in folk medicine. *Pharmaceutical Biology*, 44(2), 91-94.
70. D.L. Gustine, M.A.S. A Strategy For Detecting Natural Anthelmintic Constituents of The Grassland Species *Plantago lanceolata*.
71. Cogo, L.L., Monteiro, C.L.B., Miguel, M.D., Miguel, O.G., Cunico, M.M., Ribeiro, M.L. ve diğeri. (2010). Anti-Helicobacter pylori Activity Of Plant Extracts Traditionally Used For The Treatment Of Gastrointestinal Disorders. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(2), 304-309.
72. Radu, N., Ghita, I., Rau, I. (2010). Therapeutic Effect of Iridoidic Compounds from *Plantago* Species. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 523, 289-296.
73. Radu, N., Ghita, I., Rau, I. (2010). Therapeutic Effect of Polysaccharides from *Plantago* Species. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 523, 236-246.
74. Diez, M.J., Garcia, J.J., Prieto, C., Fernandez, N., Sahagun, A., Sierra, M. (2008). The hydrosoluble fiber *Plantago ovata* husk improves levodopa (with carbidopa) bioavailability after repeated administration. *Journal of the Neurological Sciences*, 271(1-2), 15-20.

75. Juarranz, M., Calle-Puron, M.E., Gonzalez-Navarro, A., Regidor-Poyatos, E., Soriano, T., Martinez-Hernandez, D. ve diğ erleri. (2002). Physical exercise, use of *Plantago ovata* and aspirin, and reduced risk of colon cancer. *European Journal of Cancer Prevention*, 11(5), 465-472.
76. Sola, R., Godas, G., Ribalta, J., Vallve, J.C., Girona, J., Anguera, A. ve diğ erleri. (2007). Effects of soluble fiber (*Plantago ovata* husk) on plasma lipids, lipoproteins and apolipoproteins in men with ischemic heart disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 85(4), 1157-1163.
77. Ana Lourdes Romero, K.L.W., Tosca Zern. (2002). The Seeds from *Plantago ovata* Lower Plasma Lipids by Altering Hepatic and Bile Acid Metabolism in Guinea Pigs. *American Society for Nutritional Sciences*.
78. Huang, D.F., Tang, Y.F., Nie, S.P., Wan, Y., Xie, M.Y., Xie, X.M. (2009). Effect of phenylethanoid glycosides and polysaccharides from the seed of *Plantago asiatica* L. on the maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells. *European Journal of Pharmacology*, 620(1-3), 105-111.
79. Huang, D.F., Xie, M.Y., Yin, J.Y., Nie, S.P., Tang, Y.F., Xie, X.M. (2009). Immunomodulatory activity of the seeds of *Plantago asiatica* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 124(3), 493-498.
80. Gabriel Biringanine, B.V. (2005). Polysaccharides extracted from the leaves of *Plantago palmata* Hook.f. induce nitric oxide and tumor necrosis factor- α production by interferon - γ -activated macrophages. *Nitric Oxide* 12, 1-8.
81. Baljit Singh, N.C. (2009). Modification of psyllium polysaccharides for use in oral insülin delivery. *Food Hydrocolloids*, 23, 928-935.
82. Saracoglu, I., Harput, U.S., Ogihara, Y. (2004a). Acylated Flavonone Glycosides from *Veronica pectinata* var. *glandulosa* and *V. persica*. *Turkish Journal of Chemistry* 28(6), 751-759.
83. Saracoglu, I., Varel, M., Harput, U.S., Nagatsu, A. (2004b). Acylated Flavonoids and Phenol Glycosides *Veronica thymoides* subsp. *pseudocinerea*. *Phytochemistry*, 65(16), 2379-2385.

84. Saracoglu, I., Harput, U.S., Inoue, M., Ogihara, Y. (2002). New phenylethanoid glycosides from *Veronica pectinata* var. *glandulosa* and their free radical scavenging activities. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 50, 665-668.
85. Jensen S.R., G.C.H., Harput U.S., & Saracoglu I. (2010). Chlorinated Iridoid Glucosides from *Veronica longifolia* and Their Antioxidant Activity. *Journal of Natural Products*, 73, 1593-1596.
86. Po-Jung Tsai , T.-H.T., Chun-Hsien Yu , Su-Chen Ho (2007). Comparison of NO-scavenging and NO-suppressing activities of different herbal teas with those of green tea. *Food Chemistry*, 103, 181-187.
87. R. Srinivasan , M.J.N.C., M.J. Nanjan, B. Suresh (2007). Antioxidant activity of *Caesalpinia digyna* root. *Journal of Ethnopharmacology* 113, 284-291.
88. Mossman, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *Journal of Immunological Methods* 65, 55-63.
89. Saracoğlu, İ., Inoue, M., Çalış, İ., Ogihara, Y. (1995). Studies on Constituents with Cytotoxic and Cytostatic Activity of Two Turkish Medicinal Plants, *Phlomis armeniaca* and *Scutellaria salviifolia*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 18(10), 1396-1400.
90. Carlos L. Ce'spedes, M.E.-H., Natalia Pavon , Julio Alarcon (2008). Antioxidant and cardioprotective activities of phenolic extracts from fruits of Chilean blackberry *Aristotelia chilensis* (Elaeocarpaceae), Maqui. *Food Chemistry* 820–829, 107, 820-829.
91. Bianco, A., Passacantilli, P., Polidori, G. (1983). NMR spectroscopy of epimeric pairs of glucosidic iridoids. *Gazzetta Chimica Italiliana*, 113, 829-834.
92. Varel, M. (2004). *Veronica thymoides* P. H. Davis subsp. *pseudocinerea* M. A. Fisher Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
93. Öztunca, F.H. (2009). *Veronica Cuneifolia* D. Don. Subsp. *Cuneifolia* ve *Veronica Cymbalaria* Bodard Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.

94. Akdemir, Z., Çalış, İ. (1991). Iridoid and phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis pontica*. *Doğa-Tr. Journal of Pharmacy*, 1, 65-75.
95. Ozipek, M., Saracoglu, I., Maruyama, M., Takeda, T., Calis, I. (1998). Catalpol derivative iridoids from *Veronica fuhsii* XIIth International symposium on plant originated crude drugs (Uluslararası Katılımlı XII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı) Bildiri Kitabı (Ed. İ.Çalış, T.Ersöz, A.Başaran) Ankara, 197-199.
96. Takashi Morota, H.N., Hiroshi Sasaki, Masao Chin (Chen Zhengxiong), K6 Sugama, Mitsuhashi, T.K.A.H. (1989). Five Cyclopentanoid Monoterpenes From *Rehmannia Glutinosa*. *Phytochemistry*, 28(9), 2385-2391.
97. U. Sebnem Harput, A.N., Yukio Ogihara, and Iclal Saracoglu. (2003). Iridoid Glucosides from *Veronica pectinata* var. *glandulosa*. *Z. Naturforsch*, 58c, 481-484.
98. Gazar, H.A. (2001). *Verbascum wiedemannianum* Fisch.& Mey. Üzerinde Fitokimyasal Araştırmalar. *Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara*.
99. Kamel, M., Mohamed K.M, Hassanen HA, Ohtani K., Ksai R, Yamasak, K. (2000). İridoid and Megastigman Glycosides from *Phlomis aurea*. *Phytochemistry*, 55, 353-357.
100. Sudo H.I.T., Otsuka H, Hirata E, Takushi A, Shinzato T, Takeda Y. (2000). Megastigmane, benzyl and phenethyl alcohol glycosides, and 4,4'-dimethoxy-beta-truxinic acid catalpol diester from the leaves of *Premna subscandens* Merr. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 48(4), 542-546.
101. Sticher O., L.M.F. (1982). Phenolic glycosides of *Paulownia tomentosa* Bark. *Planta Medica* 46, 145-148.
102. Harput, U., Saracoglu İ., Calis İ. (1999). Iridoid and Phenylethanoid Glycosides from *Phlomis bourgaei* Boiss. *Hacettepe University Journal of Faculty of Pharmacy*, 19(1), 1-11.
103. Singh M, G.R., Nath V, Rawat S, Mehrotra S. (2006). Antimicrobial, wound healing and antioxidant activity of *Plagiochasma appendiculatum* Lehm. et Lind. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(1), 67-72.

104. M. Dominguez, A.N., J.C. Marin, A.S. Keck, E. Jeffery and C.L. Cespedes (2005). Antioxidants activities of extracts from *Barkleyanthus salicifolius* (Asteraceae) and *Penstemon gentianoides* (Scrophulariaceae). *J. Agric. Food Chem.*, 53, 5889–5895.
105. Sticher O., L.M. (1982). Phenolic glycosides of *Paulownia tomentosa* Bark. *Planta Medica*, 46, 145-148.
106. Olmstead R.G., D.C.W., Wolfe A.D., Young N.D., Elisons W.J., & Reeves P.A. (2001). Disintegration of the Scrophulariaceae. *American Journal of Botany* 88, 348-361.
107. Taskova, R.M., Gotfredsen, C.H., Jensen, S.R. (2006). Chemotaxonomy of Veroniceae and its allies in the Plantaginaceae. *Phytochemistry* 67, 286-301.
108. Taskova, R.M., Gotfredsen, C.H., Jensen, S.R. (2005). Chemotaxonomic markers in Digitalideae (Plantaginaceae). *Phytochemistry*, 66(12), 1440-1447.
109. Saracoglu I., H.-H.U.S., Nagatsu A., & Varel M. . (2008). Cytotoxic Activity and Structural Aspects of Iridoids Isolated from *Veronica thymoides* subsp. *pseudocinerea*. *Planta Medica, Natural Products with Pharmaceutical, Nutraceutical, Cosmetic, and Agrochemical Interest, 7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, and PSE (49th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy), Athens*, 74, 1046.
110. Harput, U.S. (2002). *Phytochemical and Biological Studies On Some Turkish Medicinal Plants, Nagoya City Universty, Doktora Tezi, Japonya*.
111. Harput, U.S., Nagatsu, A., Ogihara, Y., Saracoglu, I. (2003). Iridoid glucosides from *Veronica pectinata* var. *glandulosa*. *Zeitschrift fur Naturforschung* 58c, 481-484.
112. Moe Kanemoto, K.M., Hideaki Otsuka, Takakazu Shinzato, Choken Ishigaki, Yoshio Takeda. (2008). Chlorine-containing iridoid and iridoid glucoside, and other glucosides from leaves of *Myoporum bontioides*. *Phytochemistry* 69(13), 2517-2522.
113. Oxelman, B., Kornhall, P., Olmstead, R. G., Bremer, B. (2005). Further disintegration of Scrophulariaceae. *Taxon* 54. 411-425.

114. Dirk C. Albach, H.-Q.L., Nan Zhao, Søren Rosendal Jensen. (2007). Molecular systematics and phytochemistry of *Rehmannia* (Scrophulariaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 35(5), 293-300.
115. Asongalem, E.A., Foyet H. S., Ekobo S., Dimo T., Kamtchouing P. (2004). Antiinflammatory, lack of central analgesia and antipyretic properties of *Acanthus montanus* (Ness). *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 63-68.
116. Aviram, M. (2000). Review of human studies on oxidative damage and antioxidant protection related to cardiovascular diseases. *Free Radical Research*, 33, S85-S97.
117. Andary, C. (1993). Caffeic acid glycoside esters and pharmacology. In: Scalbert, A. (Ed.), *Polyphenolic Phenomena*. Inra Editions, Paris., 237-255.
118. Saracoglu, I., Inoue, M., Calis, I., Ogihara, Y. (1997). Selective cytotoxic and cytostatic activity of some phenylpropanoid glycosides. *Fitoterapia LXVII*, 434-438.
119. P. Akbay, I.C., U. Undeger, N. Basaran, A.A. Basaran. (2002). In vitro immunomodulatory activity of verbascoside from *Nepeta ucrainica*. *Phytotherapy Research*, 16, 593-595.
120. T. Ohno, M.I., Y. Ogihara, I. Saracoglu. . (2002). Antimetastatic activity of acteoside, a phenylethanoid glycoside. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 25, 666-668.

ÖZGEÇMİŞ

06. 07. 1985 tarihinde Giresun’da doğdum. İlköğrenimimi Aksu – Seka İlköğretim Okulun’da, orta ve lise öğrenimimi Giresun Hamdi Bozbağ Anadolu Lisesi’nde bitirdim. 2003 yılında Eczacılık fakültesine girdim. 2007 yılında Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’nden mezun oldum ve 2009 yılında Farmakognozi Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak göreve başladım. Halen aynı göreve devam etmekteyim.