

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

CRATAEGUS X BORNMUELLERI ZABEL TÜRÜ ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR

MERYEM ŞEYDA ERBAY

DANIŞMAN
PROF. DR. GÜLAY MELİKOĞLU

FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI
FARMAKOGNOZİ PROGRAMI

İSTANBUL-2022

TEZ ONAYI

İTHAF

Tüm aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Öncelikle engin akademik bilgisini, desteğini, yardımlarını, güleryüzünü, anlayışını ve bilgeliğini esirgemeden sunan ve akademik hayatını örnek aldığım değerli hocam Prof. Dr. Gülay Melikoğu'na,

Destek ve yardımlarıyla çalışmamızda emeği olan değerli hocalarım Prof. Dr. Şükran Kültür'e, Prof. Dr. Ali Aslan Dönmez'e, Prof. Dr. Nurten Özsoy'a, Sezin Kurtoğlu'na ve meslektaşlarım Meltem Güleç, Zeynep Büşra Erarslan, Memnune Eruçar, Sarab Awadi, Fadıl Kaan Kuran'a,

İhtiyaç duyduğum her an yanımda olan sevgili babam Prof. Dr. Ahmet Zeki Ünal'a, annem Fatma Ünal'a kardeşlerim Zeynep ve Sueda'ya,

Hayatımı paylaştığım, desteğini her daim hissettiğim değerli eşim Burak'a ve onun kıymetli ailesine,

Tezimi hazırlamamda yardımı dokunan tüm arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: TSA-2020-34521) ve TÜBİTAK (Proje No: 117Z750) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI 2
BEYAN 3
İTHAF 4
TEŞEKKÜR 5
İÇİNDEKİLER 6
TABLOLAR LİSTESİ 9
ŞEKİLLER LİSTESİ 10
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ 12
ÖZET 13
ABSTRACT 14
1. GİRİŞ VE AMAÇ 15
2. GENEL BİLGİLER 17
2.1. *Crataegus* Türlerinin Botaniği 17
2.1.1. Rosaceae Familyası 17
2.1.2. *Crataegus* L. Cinsi 17
2.1.3. *Crataegus x bornmuelleri* Zabel 19
2.2. *Crataegus* Türlerinin Fitokimyası 20
2.2.1. Fenolik Bileşikler 21
2.2.1.1. Organik ve fenolik asitler 21
2.2.1.2. Lignanlar 21
2.2.1.3. Antosiyaninler 22
2.2.1.4. Flavonoitler 22
2.2.2. Şeker ve şeker alkolleri 23
2.2.3. Terpenler 23
2.2.4. Uçucu yağ 24
2.3. *Crataegus* Türleri Üzerinde Yapılan Biyoaktivite Çalışmaları 25
2.3.1. Kardiovasküler Sistem Üzerinde Yapılmış Aktivite Çalışmaları 25
2.3.2. Antioksidan Aktivite Çalışmaları 31
2.3.3. Antibakteriyel Aktivite Çalışmaları 33
2.3.4. Antikanser Aktivite Çalışmaları 34

2.3.5. Antidiyabetik Aktivite Çalışmaları 36
2.3.6. Nöroprotektif Aktivite Çalışmaları 37
2.3.7. Diğer Çalışmalar 38
3. GEREÇ VE YÖNTEM 39
3.1. Bitkisel Materyal 39
3.2. Ekstraksiyon 39
3.3. Bileşiklerin İzolasyonu 40
3.3.1. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) 40
3.3.2. Sütun Kromatografisi 40
3.4. Elde Edilen Saf Maddelerin Yapı Tayini 41
3.4.1. UV Spektrumu 41
3.4.2. ^{1}H-NMR ve ^{13}C-NMR Spektrumu 42
3.4.3. IR Spektrumu 42
3.4.4. Kütle Spektrumu 42
3.5. Biyolojik Aktivite Çalışmaları 43
3.5.1. Antioksidan Aktivitenin Araştırılması 43
3.5.1.1. Antioksidan Bileşiklerin Miktar Tayini 43
3.5.1.2. Antioksidan Aktivitenin Tayini 45
3.5.2. Antienflamatuar Aktivitenin Araştırılması 48
3.5.3. Anjiotensin Dönüştürücü Enzim (ACE) İnhibitörü Etkisinin Araştırılması 49
4. BULGULAR 51
4.1. Ekstraksiyon 51
4.2. İzolasyon 52
4.2.1. Yaprak Ekstresi İzolasyonu 52
4.2.2. Ham Meyve Ekstresi İzolasyonu 54
4.2.3. Olgun Meyve Ekstresi İzolasyonu 54
4.2.4. Çiçek Ekstresi İzolasyonu 55
4.3. İzole Edilen Bileşiklerin Yapı Tayinleri 57
4.3.1. Hiperozit (YE2-GM2) 57
4.3.2. Astragalin (YE4-GM3) 69
4.3.3. Eupafolin (6-Metoksiluteolin) (YT4-GM4) 82
4.3.4. Kersetin (ME1-GM1) 89
4.3.5. Viteksin (YE5-GM5) 101

4.3.6. Rutin (ME3) 109
4.3.7. Şaftozit (YE10) 123
4.3.8. Kemferol (ÇM3) 131
4.3.9. Spireozit (ÇM12) 140
4.3.10. Klorojenik asit (YK2) 147
4.4. Biyolojik Aktivite Çalışmaları 150
4.4.1. Antioksidan Aktivitenin Araştırılması 150
4.4.1.1. Antioksidan Bileşiklerin Miktar Tayini 150
4.4.1.2. Antioksidan Aktivitenin Tayini 151
4.4.2. Antienflamatuar Aktivitenin Araştırılması 157
4.4.3. Anjiotensin Dönüştürücü Enzim (ACE) İnhibitörü Etkisinin Araştırılması 159
5. TARTIŞMA 160
5.1. Fitokimyasal Analiz 160
5.2. Antioksidan Aktivite 163
5.3. Antienflamatuar Aktivite 164
5.4. Anjiotensin Dönüştürücü Enzim (ACE) İnhibisyonu 165
KAYNAKLAR 166
HAM VERİLER 176
FORMLAR 177
ETİK KURUL KARARI 178
PATENT HAKKI İZNİ 179
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 180
ÖZGEÇMİŞ 181

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Türkiye'de doğal olarak yetişen *Crataegus* türleri……18

Tablo 4-1: *C. x bornmuelleri* türünün ham meyve (CB1), olgun meyve (CB2), yaprak (CB3) ve çiçeklerinden (CB4) hazırlanan metanol ekstrelerinin içerdikleri total fenolik bileşik (gallik asit ekivalanı) ve flavonoit (kateşin ekivalanı) miktarları……..150

Tablo 4-2: *C. x bornmuelleri* türünün ham meyve (CB1), olgun meyve (CB2), yaprak (CB3) ve çiçeklerinden (CB4) hazırlanan metanol ekstrelerinin EC_{50}, TEAC ve FRAP değeri olarak antioksidan aktiviteleri……151

Tablo 4-3: Ekstrelerin COX-1 inhibe edici aktiviteleri……....158
Tablo 4-4: Ekstrelerin COX-2 inhibe edici aktiviteleri……158
Tablo 4-5: Ekstrelerin ACE inhibe edici aktiviteleri ……..…..159

Tablo 5-1: *Crataegus x bornmuelleri* yaprak, çiçek, ham ve olgun meyvelerinden izole edilen bileşikler……..160

Tablo 5-2: *C. x bornmuelleri, C. tanacetifolia* ve *C. orientalis* var. *orientalis* bitkilerinden izole edilen bileşikler……...160

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: *Crataegus x bornmuelleri* Zabel…….....20
Şekil 3-1: Gallik asit standart eğrisi ve regresyon denklemi……...43
Şekil 3-2: Kateşin standart eğrisi ve regresyon denklemi……...44
Şekil 3-3: Troloks standart eğrisi ve regresyon denklemi……...47
Şekil 3-4: $FeSO_4.7H_2O$ standart eğrisi ve regresyon denklemi……...48
Şekil 3-5: Prostaglandin standart eğrisi……...49
Şekil 4-1: Hiperozit'e ait kaydırma belirteçleri ile çekilmiş UV spektrumu……..58
Şekil 4-2: Hiperozit'e ait DMSO-d6 ile çekilmiş ^{1}H-NMR spektrumu……..61
Şekil 4-3: Hiperozit'e ait CD_3OD ile çekilmiş ^{13}C-NMR spektrumu…….64
Şekil 4-4: Hiperozit'e ait KBr ile çekilmiş IR spektrumu……...65
Şekil 4-5: Hiperozit'e ait kütle spektrumu……..67
Şekil 4-6: Maddenin şahit Hiperozit ile 366 nm dalga boyunda NA belirteci ile renklendirilmiş İTK görüntüsü…….……...69
Şekil 4-7: Astragalin'e ait kaydırma belirteçleri ile çekilmiş UV spektrumu…….71
Şekil 4-8: Astragalin'e ait CD_3 OD ile çekilmiş ^{1}H-NMR spektrumu……73
Şekil 4-9: Astragalin'e ait DMSO-d6 ile çekilmiş ^{13}C-NMR spektrumu……...77
Şekil 4-10: Astragalin'e ait KBr ile çekilmiş IR spektrumu……...78
Şekil 4-11: Astragalin'e ait kütle spektrumu……...80
Şekil 4-12: Maddenin şahit astragalin ile 366 nm dalga boyunda NA belirteci ile renklendirilmiş İTK görüntüsü (Mobil faz: Diklorometan: Metanol (7:3))……82
Şekil 4-13: Eupafolin'e ait kaydırma belirteçleri ile çekilmiş UV spektrumu……83
Şekil 4-14: Eupafolin'e ait D_2O ile çekilmiş ^{1}H-NMR spektrumu……85
Şekil 4-15: Eupafolin'e ait kütle spektrumu……...87
Şekil 4-16: Maddenin şahit Eupafolin ile 366 nm dalga boyunda NA belirteci ile renklendirilmiş İTK görüntüsü (Mobil faz: Toluen:Aseton (1:1))……..89
Şekil 4-17: Kersetin'e ait kaydırma belirteçleri ile çekilmiş UV spektrumu……..90
Şekil 4-18: Kersetin'e ait MeOD ile çekilmiş ^{1}H-NMR spektrumu……...93
Şekil 4-19: Kersetin'e ait DMSO-d6 ile çekilmiş ^{13}C-NMR spektrumu……95
Şekil 4-20: Kersetin'e ait KBr ile çekilmiş IR spektrumu……..97
Şekil 4-21: Kersetin'e ait kütle spektrumu……..99
Şekil 4-22: Maddenin şahit kersetin ile 366 nm dalga boyunda NA belirteci ile renklendirilmiş İTK görüntüsü (Mobil faz: Toluen:Aseton (1:2))……....101
Şekil 4-23: Viteksin'e ait kaydırma belirteçleri ile çekilmiş UV spektrumu……102
Şekil 4-24: Viteksin'e ait D_2O ile çekilmiş ^{1}H-NMR spektrumu……105
Şekil 4-25: Viteksin'e ait kütle spektrumu……107
Şekil 4-26: Maddenin şahit Viteksin ile 366 nm dalga boyunda NA belirteci ile renklendirilmiş İTK görüntüsü (Mobil faz: Toluen:Aseton (1:4))……109
Şekil 4-27: Rutin'e ait kaydırma belirteçleri ile çekilmiş UV spektrumu…….110

Şekil 4-28: Rutin'e ait CD_3 OD ile çekilmiş ^{1}H-NMR spektrumu……113
Şekil 4-29: Rutin'e ait CD_3 OD ile çekilmiş ^{13}C-NMR spektrumu……...116
Şekil 4-30: Rutin'e ait KBr ile çekilmiş IR spektrumu……..118
Şekil 4-31: Rutin'e ait kütle spektrumu……121
Şekil 4-31: Maddenin şahit rutin ile 366 nm dalga boyunda NA belirteci ile renklendirilmiş İTK görüntüsü (Mobil faz: Toluen:Metanol (1:3))……...123
Şekil 4-32: Şaftozit'e ait kaydırma belirteçleri ile çekilmiş UV spektrumu……124
Şekil 4-32: Şaftozit'e ait kaydırma belirteçleri ile çekilmiş UV spektrumu……126
Şekil 4-33: Şaftozit'e ait D_2O ile çekilmiş ^{1}H-NMR sprketrumu……127
Şekil 4-34: Şaftozit'e ait kütle spektrumu……129
Şekil 4-35: Maddenin şahit şaftozit ile 366 nm dalga boyunda NA belirteci ile renklendirilmiş İTK görüntüsü (Mobil faz: Toluen:Metanol (1:3))……...131
Şekil 4-36: Kempferol'e ait kaydırma belirteçleri ile çekilmiş UV spektrumu……132
Şekil 4-37: Kempferol'e ait DMSO-d6 ile çekilmiş ^{1}H-NMR spektrumu……....135
Şekil 4-38: Kempferol'e ait CD_3OD ile çekilmiş ^{13}C-NMR spektrumu……...137
Şekil 4-39: Kempferol'e ait kütle spektrumu……138
Şekil 4-40: Maddenin şahit Kempferol ile 366 nm dalga boyunda NA belirteci ile renklendirilmiş İTK görüntüsü (Mobil faz: Toluen:Aseton (1:2))……140
Şekil 4-41: Spireozit'in kaydırma belirteçleri ile çekilmiş UV spektrumu……...141
Şekil 4-42: Spireozit'e ait ^{1}H-NMR spektrumu……144
Şekil 4-43: Spireozit'in kütle spektrumu……..146
Şekil 4-44: Maddenin 254 nm dalga boyunda NA belirteci ile renklendirilmiş İTK görüntüsü (Mobil faz: Toluen:Aseton (1:2))……147
Şekil 4-45: Klorojenik asit'e ait UV spektrumu……148
Şekil 4-46: Klorojenik asitin kütle spektrumu değerleri……...149
Şekil 4-47: Maddenin şahit klorojenik asit ile 366 nm dalga boyunda NA belirteci ile renklendirilmiş İTK görüntüsü (Mobil faz: Etil asetat:Su:Formik asit (8:1:1))……159
Şekil 4-48: CB1, CB2, CB3 ve CB4 ekstrelerinin farklı konsantrasyonlardaki DPPH radikali giderme aktivite yüzdeleri……152
Şekil 4-49:CB1, CB2, CB3 ve CB4 ekstrelerinin DPPH radikali giderici aktiviteleri.153
Şekil 4-50: CB1, CB2, CB3 ve CB4 ekstrelerinin farklı konsantrasyonlardaki superoksid radikali giderme aktivite yüzdeleri……..154
Şekil 4-51: CB1, CB2, CB3 ve CB4 ekstrelerinin superoksid radikali giderici aktivitesi……154
Şekil 4-52: CB1, CB2, CB3 ve CB4 ekstrelerinin farklı konsantrasyonlardaki ABTS radikali giderme aktivite yüzdeleri……155
Şekil 4-53: CB1, CB2, CB3 ve CB4 ekstrelerinin ABTS radikali giderici aktivitesi……156
Şekil 4-54: CB1, CB2, CB3 ve CB4 ekstrelerinin FRAP değeri olarak redükleme güçleri……157
Şekil 5-1: *C. x bornmuelleri, C. tanacetifolia* ve *C. orientalis* var. *orientalis* bitkilerinin DAB10'a göre hesaplanmış total flavonoit miktar tayinleri……..……...162

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein

LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein

VLDL: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein

TC: Total kolesterol

İTK: İnce tabaka kromatografisi

UV: Ultraviyole

^{1}H-NMR: Proton manyetik rezonans

^{13}C-NMR: Karbon 13 manyetik rezonans

MASS: Kütle spektrumu

IR: Infrared

DPPH: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

ABTS: 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiozin-6-sulfonik asit)

TEAC: Troloks ekivalanı antioksidan kapasitesi

FRAP: Ferri iyonu redükleyici antioksidan potansiyeli

COX: Siklooksijenaz

NA belirteci: Naturstof-freagenz A; difenil borik asit β amino etil esteri

ACE: Anjiotensin Dönüştürücü Enzim

FAPGG: N-[3-(2-Furil)akriloil]-L-fenilalanil-glisil-glisin

FAP: N-[3-(2-Furil)akriloil]-L-fenilalanil

ÖZET

Erbay, M.Ş. (2022). *Crataegus x bornmuelleri* Zabel Türü Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Bu tez çalışmasında, Türkiye'de endemik olarak yetişen ve 'kızlar yemişi' olarak bilinen *Crataegus x bornmuelleri* Zabel türünün yaprak, çiçek, ham meyve ve olgun meyvelerinden flavonoit bileşiklerin izole edilmesi ve ekstrelerin biyoaktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır. Kurutulmuş droglar Soxhlet apareyi ve perkolatör kullanılarak ekstre edilmiş ve ardından flavonoit bileşikleri izole edilmiştir. Ekstrelerden elde edilen 10 bileşik Hiperozit, Kersetin, Rutin, Astragalin, Eupafolin, Viteksin, Şaftozit, Kempferol, Spireozit ve Klorojenik asit olarak tanımlanmıştır. Ayrıca drogların perkolasyonda metanol ile hazırlanan ekstreleri üzerinde biyoaktivite araştırmaları yapılmıştır. Total flavonoit ve fenolik bileşik miktarları hesaplanmış ve antioksidan, antienflamatuar ve anjiotensin dönüştürücü enzim inhibisyonu aktiviteleri incelenmiştir. Tüm miktar tayini ve aktivite testlerinde yaprak ve çiçek ekstrelerinin meyve ekstrelerinden daha yüksek potansiyele sahip olduğu görülmüştür. Yaprak ve çiçek ekstreleri standart olarak kullanılan maddelerden daha yüksek dozlarda iyi bir aktivite sergilemiş olsa da, *Crataegus* türlerinin yan etki açısından güvenilir bitkiler olduğu göz önüne alındığında, elde ettiğimiz sonuçlar C. *x bornmuelleri* yaprak ve çiçek ekstrelerinin tedaviye yardımcı potansiyele sahip olduklarını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Crataegus x bornmuelleri* Zabel, Flavonoit, Antioksidan aktivite, antienflamatuar aktivite, ACE inhibisyonu

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından (Proje No: TSA-2020-34521) ve TÜBİTAK (Proje No: 117Z750) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Erbay, M.Ş. (2022). Pharmacognostical Studies on *Crataegus x bornmuelleri* Zabel. Istanbul University Institute of Health Sciences, Department of Pharmacognosy. Doctoral Thesis. Istanbul.

In this thesis, it was aimed to isolate flavonoid compounds from leaves, flowers, raw fruits and ripe fruits of the *Crataegus x bornmuelleri* Zabel species, which is endemic in Turkey and known as 'kızlar yemişi', and to investigate the bioactivity of the extracts. Dried drugs were extracted using Soxhlet apparatus and percolator, and then flavonoid compounds were isolated. The 10 compounds obtained from the extracts were identified as Hyperoside, Quercetin, Rutin, Astragalin, Eupafolin, Vitexin, Shaftoside, Kaempferol, Spireoside and Chlorogenic acid. In addition, bioactivity studies were carried out on the extracts of drogs prepared with methanol in percolation. Total flavonoid and phenolic compounds were calculated and their antioxidant, anti-inflammatory and angiotensin converting enzyme inhibition activities were investigated. Leaf and flower extracts were found to have higher potency than fruit extracts in all assay and activity tests. Although leaf and flower extracts exhibited good activity at higher doses than standard substances, given that *Crataegus* species are safe plants in terms of side effects, our results show that *C. x bornmuelleri* leaf and flower extracts have therapeutic potential.

Keywords: *Crataegus x bornmuelleri* Zabel, Flavonoid, Antioxidant activity, anti-inflammatory activity, ACE inhibition

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University (Project No: TSA-2020-34521) and TUBITAK (Project No: 117Z750).

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Türkiye'de "alıç" olarak bilinen *Crataegus* türleri fitoterapide kullanılan en önemli bitkilerdendir. Tarihte tıbbi amaçlarla kullanımı 1. yüzyıla kadar dayanmaktadır. Kalp ilacı olarak kullanımı ise 16. yüzyıla kadar takip edilebilmektedir. 18. yüzyılın sonlarında Avrupa'da *Crataegus* drogları kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde denenmeye başlanmıştır. 19. yüzyılın sonlarından sonra aritmi, kalp yetmezliği, angina pectoris, ileri yaşa bağlı dolaşım yetmezliğinin erken tedavisi gibi çeşitli kalp hastalıklarının tedavisinde ve dolaşımı düzenlemek için kullanılmıştır. Günümüzde *Crataegus* droglarını içeren preparatlar hafif ve kronik kalp yetmezliklerinde, anjina pektoris ve ateroskleroz tedavisinde, miyokard yetmezliğinde, taşikardi ve hipertansiyonda, hafif sedatif olarak ve ayrıca soğuk algınlığı tedavisinde kullanılmaktadır (Barnes ve ark. 2007; Bisset 1994; Bone ve Mills 2013; Ebadi 2007; Ramawat 2009). Fitoterapide kullanılan bitkiler içinde *Crataegus* türleri önemli bir yan etkilerinin olmaması ve güvenli terapötik etkinliğe sahip olması nedeniyle özel bir yere sahiptir (Aronson 2009).

İlk kez Teofrast tarafından kullanılan *Crataegus* isminin Grekçe "Krataigos: sağlam, kuvvet verici" kelimesinden geldiği düşünülmektedir. İngilizce'de Hawthorn, ülkemizde Alıç, Alican çalısı, Ayva alıcı, Beyaz diken, Cadı dikeni, Çakır alıcı, Edran, Ekşi muşmula, Eloş, Enişen, Haluç, Halıç, İt alıcı, Galagun, Geviş, Gırgat, Godon alıcı, Kocakarı yemişi, Kotan alıcı, Öküz göbeği, Sürsülük, Yemişgen, Yemişen, Yemşen isimleri ile bilinmektedirler (Baytop 1997; 1999). *Crataegus* türlerinin drog olarak kullanılan kısımları Crataegi flos (çiçek), Crataegi folium (yaprak), Crataegi folium cum flores (çiçekli yaprak) ve Crataegi fructus (meyve)dir. Monograflarda yer alan tıbbi türler: *Crataegus monogyna* Jack. Lindm., *C. laevigata* (Poiret) DC. veya hibritleri , *C. pentagyna* Waldst. et Kit. ex Willd., *C. nigra* Waldst. Et Kit., *C. azarolus* L.. Bu türlerin uygun koşullarda işlenmiş çiçekli yapraklı dalları drog olarak kullanılmaktadır (Bisset 1994).

Crataegus türlerinin fitokimyasını flavonoit bileşikler, oligomer prosiyanidinler, kardiotonik aminler, fenolik asitler gibi bileşikler oluşturmaktadır (Bisset 1994).

Flavonoitler bitkiler aleminde yaygın olarak rastlanan sekonder metabolitlerdir. Serbest olarak bulunabildikleri gibi O- ve C- glikoziti olarak da saptanmışlardır. Başlıca

antioksidan, diüretik, antidiyabetik, antienflamatuar, antibakteriyel, antifungal ve antiparazit, antitümor, antikolinesteraz, antikoagülan ve antiplatelet, immünomodülatör, antitüberküloz, antirotavirüs, antiallerjik, influenza virüs nöraminidaz inhibitörü, antistres, antiobezite aktiviteleri gösterirler (Xiao ve ark. 2014).

Türkiye'de "kızlar yemişi" olarak bilinen ve endemik olarak yetişen *Crataegus x bornmuelleri* Zabel, "alıç" olarak bilinen *C. orientalis* M. Bieb ile "kotan alıcı" olarak bilinen ve yine endemik olan *C. tanacetifolia* (Poir.) Pers türlerinin bir hibritidir. Her iki ata tür de kimyasal içerik açısından incelenmiş, biyolojik aktivite testleri gerçekleştirilmiş ve özellikle *C. tanacetifolia* kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kullanımını destekleyecek şekilde sonuçlar vermiştir (Meriçli ve Ergezen 1994; Melikoğlu ve ark. 1999; Tamer ve ark. 1999; Birman ve ark. 2001; 2003; Koçyıldız ve ark. 2006).

Bu çalışmada, *C. x bornmuelleri* bitkisinin yaprak, çiçek, ham meyve ve olgun meyvelerinde flavonoit bileşiklerin izolasyonu, yapılarının aydınlatılması ve ayrıca yaprak, çiçek, ham ve olgun meyvelerinden hazırlanan metanol ekstreleri üzerinde antioksidan, antienflamatuar ve Anjiotensin Dönüştürücü Enzim (ACE) inhibisyonu aktivite çalışmalarının yapılması amaçlanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda bitki, hibriti olduğu iki tür (*C. tanacetifolia* ve *C. orientalis*) ile kimyasal olarak karşılaştırılmış, benzerlikleri ve farklılıkları ortaya konmuştur. Elde edilen olumlu sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda, tür üzerinde yapılacak ileri *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar önem kazanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Crataegus* Türlerinin Botaniği

2.1.1. Rosaceae Familyası

Bitkiler odunlu veya otsu, bazen dikenlidirler. Yapraklar alternan, genellikle stipulalı (kulakçıklı), basit veya bileşik, genellikle dişli kenarlıdır. Çiçek durumu çeşitli şekillerde, ağaç ve çalılarda dalların kısa sürgünlerindedir. Çiçekler hermafrodit veya tek eşeyli, aktinomorf, perigin veya epigindir, ekseriya hipantiyum bulunur. Sepaller 4-5 adet, serbest, bazen epikaliks bulunur. Petaller 4-5 adet, serbest, veya petal yoktur. Stamenler bir veya daha çok sayıda olabilir. Ovaryum üst durumludan alt durumluya kadar, bir veya daha çok karpelli olabilir, karpeller genellikle serbesttir. Meyve etli veya kuru aken, nuks, drupa ya da folikül tipindedir. Çoğunlukla agregat meyve taşırlar. Tohumlarda genelde endosperma yoktur (Davis 1972).

2.1.2. *Crataegus* L. Cinsi

Yaprak döken ağaç veya çalılardır ve genellikle dikenlidir. Yapraklar çok sıralı sarmal, basit, loblu veya hemen hemen teleksi, kenarı düz veya dişlidir. Çiçek durumu yalancı şemsiye (korimboz) şeklindedir. Çiçeklerde çanak ve taç yapraklar 5'lidir. Üst çanak (epikaliks) yoktur. Hipantiyum meyve yapraklarına bitişiktir. Taç yapraklar beyaz veya pembemsi, genellikle çanak yapraklardan daha uzundur. Erkek organlar 5-25 adettir. Meyve yaprakları 1-5 adettir. Meyve eriksi, sarımsı, kırmızı, siyahımsı mor veya siyah, genellikle etlidir. Meyve çekirdekleri 1-5 adet ve serttir (Davis 1972).

Endemizim oranı %37 olan *Crataegus* türleri orman kenarlarında, çalılıklarda, koruluklarda ve dağların alçak veya yüksek kesimlerinde yetişir. Süs ve çit bitkisi olarak da kullanımı vardır (Akkemik ve ark. 2014).

Crataegus cinsi, Rosaceae familyasına ait Maleae altfamilyasında sınıflandırılır. Kuzey yarım kürede geniş bir yayılım gösteren *Crataegus* cinsini yaklaşık 150 tür temsil etmektedir (Dönmez 2014). Melezlenme ve cinsin botanik özelliklerinin polimorf oluşu sebebiyle taksonomisi hakkında çeşitli görüşler bildirilmiştir. Flora of Turkey'de (Browicz, 1972) 17 tür, 1 alttür ve 3 varyete; Christensen tarafından hazırlanan derlemede (1992) 19 tür, 1 alttür ve 2 varyete; Dönmez tarafından hazırlanan derlemede (2004) 23 tür tanımlanmıştır. Türkiye Bitkileri Listesi'nde (2012) ise 24 tür 3 alttür ve 6

varyete bulunmaktadır (Güner, Ed. 2012). Dönmez tarafından yapılan son çalışma ile (2014) bu sayı 26 tür, 4 alttür ve 6 varyete olmak üzere güncellenmiştir. Bunlardan 10 tanesi endemiktir.

Tablo 2-1: Türkiye'de doğal olarak yetişen *Crataegus* türleri

Takson adı	**Türkçe adı**	**Endemizm**
1. *C. ambigua* A.K. Becker	Kuşyemişi	
2. *C. azarolus* L. *C. azarolus* var. *azarolus* *C. azarolus* var. *pontica* (K.Koch) K.I.Chr.	Müzmüldek	
3. *C. x bornmuelleri* Zabel	Kızlar yemişi	Endemik
4. *C. x browicziana* K.I.Chr.	Haziran ağacı	Endemik
5. *C. caucasica* K.Koch	Sülsülük	
6. *C. christensenii* Dönmez	Pek sülsülük	Endemik
7. *C. heterophylloides* Pojark. ex K.I.Chr.	Yar yemişeni	Endemik
8. *C. x lavallei* Hérincq ex Lavallée		
9. *C. laevigata* (Poir.) DC.	Bahçe alıcı	
10. *C. longipes* Pojark.	Sülün yemişen	
11. *C. meyeri* Pojark.	Roğuk	
12. *C. micropyhlla* K.Koch *C. micropyhlla* subsp. *microphylla*	Kocakarı armudu	
13. *C. monogyna* Jacq. *C. monogyna* var. *lasiocarpa* (Lange) K.I.Chr.	Yemişen	

C. monogyna var. *monogyna*		
14. *C. orientalis* Pall. ex M. Bieb	Alıç	
C. orientalis subsp. *orientalis*	Alıç	
C. orientalis subsp. *szovitsii* (Pojark.) K.I.Chr.	Koyun alıcı	
15. *C. pentagyna* Waldst. & Kit. ex Willd.	Kömüş dikeni	
16. *C. petrodavisii* Dönmez		Endemik
17. *C. peshmenii* Dönmez	Peşmen alıcı	Endemik
18. *C. pseudoazarolus* Popov		
19. *C. pseudoheterophylla* Pojark.	Öküzgötü	
C. pseudoheterophylla subsp. *turcomanica* (Pojark.)		
20. *C. riphidophylla* Gand.	Kızılcırık	
C. riphidophylla var. *kutahyaensis* Dönmez		Endemik
C. riphidophylla var. *rhiphidophylla*		
21. *C. x rubrinervis* Lange	Kızıldamar	
22. *C. x sinacia* Boiss.	Çöl alıcı	
23. *C. x subsphaerica* Gand.	Topuz alıcı	
24. *C. tanacetifolia* (Poir.) Pers.	Kotan alıcı	Endemik
25. *C. turcicus* Dönmez	Türk alıcı	Endemik
26. *C. yaltirikii* Dönmez	Efe alıcı	Endemik

2.1.3. *Crataegus x bornmuelleri* Zabel

C. tanacetifolia ile *C. orientalis* türlerinin hibritidir. *C. orientalis* ile farkı brahtelerinin salgı bezeli oluşu, *C. tanacetifolia* ile farkı ise meyve olgunlaştığında brahtelerin dökülmesi ve 3-5 cm boyundaki ince, uzun, yumuşak tüylü yapraklarıdır.

Çiçeklenme zamanı mayıs-haziran aylarıdır (Browicz 1972; Dönmez, 2004). Ülkemizde endemik olarak yetişir. Genellikle İç Anadolu Bölgesi'nde Ankara, Çankırı ve Kastamonu'da ve ayrıca Malatya'da yayılış gösterir (Akkemik ve ark. 2014).



Şekil 2-1: *Crataegus x bornmuelleri* Zabel

2.2. *Crataegus* Türlerinin Fitokimyası

Alıç yaprak, çiçek ve meyvelerinde genel olarak flavonoitler, oligomerik proantosiyanidinler, triterpen asitler, organik asitler, steroller bulunmaktadır (Caliskan 2015). Bunlara ilaveten alıçlar kardiotonik aminler (feniletilamin, o-metoksifeniletilamin, tiramin, isobutilamin), kolin ve asetilkolin, purin türevleri (adenozin, adenin, guanin), amigdalin ve pektinler içermektedir (Murray, 2020). Alıç meyveleri mineraller açısından da zengindir. Özellikle potasyum, kalsiyum, magnezyum ve fosfor olmak üzere sodyum, bor, krom, demir, kobalt, manganez ve çinko alıç türlerinde tespit edilen minerallerdir (Attard ve Attard 2019).

Çeşitli *Crataegus* türlerinden izole edilen başlıca fitokimyasal bileşikler aşağıda listelenmiştir.

2.2.1. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler bitkiler aleminde geniş yayılış gösteren sekonder metabolit sınıfıdır. Antioksidan özellikleri sayesinde *Crataegus* türlerinin çeşitli aktivitelerinden büyük oranda sorumlu tutulabilirler.

2.2.1.1. Organik ve fenolik asitler

Malik, sitrik, askorbik, suksinik, kinik, tartarik, protokateşik, 3- ve 4-hidroksibenzoik, salisilik protokateşik ve şiringik asitler ile hidroksisinnamik asit türevlerinden kumarik, klorojenik, kafeik, sinapik, ferulik kafeoiltreonik, kafeoilşikimik, kumaroilkinik, kumaroilmalik ve dekafeoilkinik asitler, eugenil-O-β-D-glukopiranozit, sasankuin, eugenil-O-β-D-apiofuranozil-(1→6)-O-β-D-glukopiranozit asitler çeşitli *Crataegus* türlerinde saptanmıştır. Organik ve fenolik asit türevleri antioksidan özellik taşır. Bitkiyi oksijen radikallerine karşı korur. İnsan sağlığı açısından da oksidatif stresten kaynaklanan kardiovasküler hastalıklar ve kansere karşı koruması açısından önem taşır. Ayrıca *Crataegus* türlerinde yaygın olarak bulunan klorojenik asidin DNA hasarını inhibe ettiği gösterilmiştir (Edwards ve ark. 2012; Bujor ve ark. 2020).

2.2.1.2. Lignanlar

2 fenilpropan molekülünün β-karbonlarından birleşmesiyle oluşan dimerik bileşiklerdir. Bitkilerde fizyolojik işlemlerin düzenlenmesinde rol oynayan bu bileşikler insanlarda fitoöstrojenik etki gösterir. Hormonlarla ilişkili kanser, osteoporoz ve kardiovasküler hastalıklara karşı etkilidir. *C. pinnatifida* yaprakları üzerinde yapılan araştırmada 7 lignan glikoziti tespit edilmiştir: verbaskozit, (−)-2α-O-(β-d-glukopiranozil)-lioniresinol, tortozit A, acernikol-4″-O-β-d-glukopiranozit, (7S,8R)-urolignozit, eritro-1-(4-O-β-d-glukopiranozil-3-metoksifenil)-2-[4-(3-hidroksipropil)-2,6-dimetoksifenoksi]-1,3-propandiol, (7S,8R)-5-metoksidihidrodehidrodikoniferil alkol-4-O–β-d-glukopiranoziti (Gao ve ark. 2020; Edwards ve ark. 2012; Chu ve ark. 2019). *C. pinnatifida* meyvelerinde ise 4 seskinorlignan, 6 seskineolignan (Cratatifida A-J) tespit edilmiştir (Zhao ve ark. 2020). Bir başka çalışmada ise iki çift nadir 8,9′-epoksi tipi norlignan enantiomeri olan (±)-Crataegusnorin A (1a/1b) ve B (2a/2b) izole edilmiştir (Guo ve ark. 2019). *C. pinnatifida* çekirdeklerinden izole edilen 14 fenilpropanoit türevi bileşik ise şunlardır: Pinnatifidanin A, 3-hidroksi-1-(4-hidroksi-3-

metoksifenil)-propan-1-on, 2,3-dihidroksi-1-(4-hidroksi-3-mehoksifenil)-propan-1-on, , 7'-metoksilarisiresinol, epipinoresinol, 3-hidroksi-1-(4-hidroksi-3,5-dimetoksifenil)-propan-1-on, 7,8-eritro-7-metoksisiringilgliserol, (-)-dehidrodikoniferil alkol, 7,8-treo-1-O-metil-guaiasilgliserol, (+)-pinoresinol, 7,8-eritro-1-O-metil-guaiasilgliserol, 7,8-treo-7-metoksisiringilgliserol, larisiresinol (7S,8S)-3-metoksi-3',7-epoliksi-8,4'-oksineoligna-4,9',9'-triol ve Pinnatifidanin A I (Huang ve ark. 2013a; 2014). Yine *C. pinnatifida* çekirdeklerinden Pinnatifidanin C I-VIII, (+)-balanofonin, (7S, 8S)-4-[2-hidroksi-2-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1-(hidroksimetil)etoksi]-3,5-dimetoksibenzaldehid, buddlenol A, (7R,8S)-dihidrodehidrokoniferil alkol, eritro-guaiasilgliserol-β-koniferil aldehit eter, (7R,8S)-balanofonin elde edilmiştir (Li ve ark. 2013; Huang ve ark. 2013b).

2.2.1.3. Antosiyaninler

Birçok çiçek ve meyvenin rengini veren, suda çözünür renk maddeleridir (Baytop 1970). *C. pinnatifida* meyveleri ile yapılan çalışmada saptanan 9 antosiyanin bileşikleri şunlardır: Siyanidin-3,5-diheksozit ve izomeri, Pelargonidin-3-rutinozit, Siyanidin-3-galaktozit, Siyanidin-3-glukozit, Siyanidin-3-rutinozit, Siyanidin-3-arabinozit, Pelargonidin-3-glukozit, Malvinidin-3-glukozit (Liu ve ark. 2016).

2.2.1.4. Flavonoitler

Doğada yaygın olarak rastlanan flavonoitler bitkiye sarı, kırmızı, turuncu gibi renk veren sekonder metabolit sınıfıdır. Bitkide O- ve C- glikoziti halinde veya serbest olarak bulunabilirler. Antioksidan, enzim inhibitörü, P-vitamini, diüretik, antibakteriyel, antifungal, antimikrobiyal, antienflamatuar, antiülserojen, antiviral, hepatoprotektif, hipolipidemik, antidiabetik, antikoagülan ve antiplatelet, immünomodülatör, antitüberküloz, antiallerjik, antistres, antiobezite, antimutajenik, antikarsinojenik, kalbi güçlendiren, nabzı düzenleyen, kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu ve tedavi edici etkilere sahiptirler (Bilaloğlu ve Harmandar 1999). *Crataegus* türlerinde en sık rastlanan flavonoitler Hiperozit (Kersetin-3-O-galaktozit), Viteksin, Viteksin-2''-O-ramnozit, Kersetin, İsokersitrin ve Rutin'dir. Bunlara ilaveten Apigenin türevlerinden Apigenin, Naringenin, Viteksin-2''-O-glukozit, Viteksin-4'-O-glukozit, Viteksin-4'-O-ramnozit, Asetilviteksin-2''-O-ramnozit, İsoviteksin, İsoviteksin ramnozit, Visenin 1-2-3, Şaftozit, İsoşaftozit, Neoşaftozit, İsoneoşaftozit, 4''-asetilviteksin-2''-O-ramnozit, Kratezit; Kersetin türevlerinden Rutin-4''-O-ramnozit,

Spireozit, İdeain, Kersetin dimetil eter, İsoramnetin, İsoramnetin 3-O-α-l-ramnopiranozil-7-O-β-d-glukopiranozit, Kersetin-3-O-β-D-galaktopiranozit; Eriodiktiol ve Kempferol türevlerinden Eriodiktiol, Hesperetin, Luteolin, Luteolin-7-O-glukozit, Orientin, İsoorientin, Orientin-2''-O-ramnozit, İsoorientin-2''-O-ramnozit, (R) ve (S)-eriodiktiol-7-O-β-D-glukronit, Luteolin-7-O-β-D-glukronit, 8-Metoksikempferol-3-O-glukozit, Dihidromirsetin izole edilen diğer flavonoitlerdir. (+)-Kateşin ve (-)-Epikateşin *Crataegus* türlerinde bulunan flavan-3-ol bileşikleridir. Bu iki bileşiğin C4→C8 veya C4→C6 şeklinde bağlanmasıyla meydana gelen kondanse prosiyanidinler önemli biyoaktiviteye sahip flavonoit türevleridir. Prosiyanidin B2, B4, B5 dimer; C1 trimer, D1 tetramer, E1 pentamer *Crataegus* türlerinde rastlanan prosiyanidinlerdir (Edwards ve ark. 2012; Bujon ve ark. 2020; Chu ve ark. 2019; Wang ve ark. 2018).

2.2.2. Şeker ve şeker alkolleri

Glukoz, sukroz, fruktoz ve ksiloz *Crataegus* türlerinde özellikle meyvede bulunan şekerlerden; sorbitol ve mio-inositol şeker alkollerindendir (Edwards ve ark. 2012; Bujon ve ark. 2020).

2.2.3. Terpenler

Terpenik bileşikler bitkiler aleminde geniş yayılım gösteren sekonder metabolit sınıfıdır. Genel olarak antioksidan, antispazmodik, antimikrobiyal etkilere sahip terpenik bileşikler bitkiye koku ve aroma verirler. Çeşitli *Crataegus* türlerinde oleanolik asit, ursolik asit, euskapik asit, korosolik asit, krataegolik asit, kuneataol, arjungenin, arjunglukozit, 2α,3α,19α-trihidroksiurs-12-en-28-oik asit, tormentik asit-28-O-β-D-glukopiranozit, sitosterol, ursolik aldehit, uvaol, pomolik asit, 2α-hidroksi oleanolik asit, tormentik asit, 3-epi-2-oksopomolik asit, 2α,19α-dihidroksi-3-okso-urs-12-en-28-oik asit, fupenzik asit, daukosterol; *C. pinnatifida* yaprakları üzerinde yapılan bir çalışmada ise 3β-glukopiranoziloksi-β-ionon, linarionozit A, B, C; ikarizit B6, (3S,5R,6R,7E,9R)-3,6-epoksi-7-megastigmen-5,9-diol-9-O-β-D-glukopiranozit, pisumionozit, (6S,7E,9R)-roseozit, (6R,9R)-3-okso-α-ionol-9-O-β-D-glukopiranozit, (6S,7E,9R-vomifoliol-9-O-β-D-glukopiranozit), (5Z)-6-[5-(2-hidroksipropan-2-il)-2-metilltetrahidrofuran-2-il]-3-metilheksa-1,5-dien-3-ol, 5-etenil-2-[2-O-β-D-glukopiranozil-(1''→6')-β-D-glukopiranozil-propan-2-il]-5-metiltetrahidrofuran-2-ol, (5Z)-6-[5-(2-O-β-D-glukopiranozil-propan-2-il)-2-metiltetrahidrofuran-2-il]-3-

metilhekza-1,5-dien-3-ol, (Z)-3-hekzenil, O-β-D-glukopiranozil-(1''→6')- β-D-glukopiranozit, 4-[4β-O-β-D-ksilopiranozil-(1''→6')-β-D-glukopiranozil-2,6,6-trimetil-1-sikloheksen-1-il]-butan-2-on, (Z)-3-hekzenil-O-β-D-ramnopiranozil-(1''→6')-β-D-glukopiranozit, (3R,5S,6S,7E,9S)-megastiman-7-en-3,5,6,9-tetrol, (Z)-3-hekzenil O-β-D-ksilopiranozil-(1''→6')-β-D-glukopiranozit, (3R,5S,6S,7E,9S)-megastigman-7-en-3,5,6,9-tetrol-9-O-β-D-glukopiranozit, (3S,9R)-3,9-dihidroksi-megastigman-5-en 3-O-primeverozit ve (6S,7E,9R)-6,9-dihidroksi-4,7-megastigmadien-3-on 9-O-[β-D-ksilopiranozil-(1''→6')-β-D-glukopiranozit] izole edilmiştir (Edwards ve ark. 2012; Chu ve ark. 2019; Wang ve ark. 2018). Başka bir çalışmada ise 3-hidroksi-β-damaskon, Pinnatifidanoid A, Pinnatifidanozit A-E, 9-hidroksi-4,7-megastigmadien-3-on, 3-okso-α-ionon, 9-hidroksi-4-megastigmen-3-on, 6-hidroksil-3-okso-α-ionol, (+)-dehidrovomifoliol, 9-hidroksi-5,7-megastigmadien-4-on, (4S*,2R*)-4-hidroksi-4,8,8-trimetil-9-okdabisiklo[4.2.1]-non-1-en-3-on, 4-hidroksi-2,3-dimetil-2-nonen-4-olid, 3-hidroksimegastigm-5-en-9-on, linaool oksit-β-D-glukozit ve Bizantionozit monoterpenik bileşikleri elde edilmiştir (Huang ve ark. 2013a; Li ve ark. 2015). *C. pinnatifida* meyvelerinden ise 3β,19α,23-trihidroksi-olean-12-en-28-oik asit, 3β,6β,18β,23-tetrahidroksi-olean-12-en-28-oik asit, 3β,6β,18β-trihidroksi-olean-12-en-28-oik asit, 2α,3β,6β,18β,23-pentahidroksi-olean-12-en-28-oik asit, 2α,3β,6β,18β-tetrahidroksi-olean-12-en-28-oik asit, 2α,3β-dihidroksi-urs-12-en-28-oik asit, 3β,23-dihidroksi-olean-12-en-28-oik asit, 2α,3β,23-trihidroksi-olean-12-en-28-oik asit, 2α,3β-dihidroksi-olean-12-en-28-oik asit, 2α,3β,6β-trihidroksi-urs-12-en-28-oik asit, 2α,3β,19α-trihidroksi-olean-12-en-28-oik asit, 3β,19α-dihidroksi-olean-12-en-28-oik asit, 2α,3β,19α,23-tetrahidroksi-olean-12-en-28-oik asit izole edilmiştir (Qiao ve ark. 2015).

2.2.4. Uçucu yağ

Terpenik ve aromatik bileşikler, düz zincirli hidrokarbürler ve azotlu ve kükürtlü bileşiklerden oluşan uçucu yağlar bitkinin herhangi bir organında bulunabilir. Kuzey Amerika'da yetişen 3 *Crataegus* türünün (*C. jackii*, *C. flabellata* ve *C. robesoniana*) çiçekleri üzerinde yapılan araştırmada uçucu yağın içerisinde monoterpenoit, seskiterpenoit, norterpenoit ve triterpenoit yapıda 46 bileşik tespit edilmiştir (Edwards ve ark. 2012).

2.3. *Crataegus* Türleri Üzerinde Yapılan Biyoaktivite Çalışmaları

Türkiye'de *Crataegus* türlerinin yaprağı, çiçeği, meyvesi, filizi ve kökü geleneksel tıpta grip, öksürük, astım, romatizmal ağrı, mide ağrısı, nefrit, hemoroid ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Caliskan 2015).

Crataegus drogları koroner arter kan akışını ve kalp kasının kasılmalarını iyileştirerek aritmi, miyokard enfarktüsü ve konjestif kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler bozuklukları tedavi edebilmektedir. Ayrıca toplam kolesterol, triaçilgliseritler ve düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL) ve çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) miktarlarını azaltarak hipolipidemik aktivite gösterir. Bunlara ilaveten anti-inflamatuar, gastroprotektif, antimikrobiyal veya hepatoprotektif ajan olarak kullanılabilir. Aynı zamanda, anjiyotensin dönüştürücü enzimi (ACE) hafifçe inhibe ederek, güçlü vasokonstrüktör madde anjiyotensin II'nin üretimini azaltır, böylece hipotansif ve diüretik aktivite sağlar. *Crataegus*, yüksek antioksidan ve immünostimülan etkilere de sahiptir (Caliskan 2015).

Son yıllarda *Crataegus* türlerinin biyoaktivitesi hakkında yapılan araştırmalar, kardiyovasküler sistem üzerindeki etkileri başta olmak üzere antikanser, antibiyotik ve nöroprotektif etki üzerine yoğunlaşmıştır. Nanopartiküler ilaç teknolojisinden yararlanılarak hazırlanan alıç preparatlarının yüksek performans göstermesi de göze çarpmaktadır.

2.3.1. Kardiovasküler Sistem Üzerinde Yapılmış Aktivite Çalışmaları

C. tanacetifolia bitkisi üzerinde yapılan farmakolojik çalışmalarda, yaprak ve çiçek ekstrelerinin kan basıncını ve kalp frekansını düşürdüğü tespit edilmiştir (Tamer ve ark. 1999). Türün yaprak ekstresinin kan basıncı ve kalp frekansı üzerine etkisinin incelendiği bir başka çalışmada ekstrenin tansiyon düşürücü etkisi bulunduğu tespit edilmiştir (Birman ve ark. 2001).

C. tanacetifolia sulu yaprak ekstresi normal sıçanlara uzun süreli olarak uygulanmış ve total vücut iyon konsantrasyonlarına olan etkisi incelenmiştir. Hayvanlara 50 mg/kg *C. tanacetifolia* ekstresinden mide gavajı yoluyla 1 ay süre ile uygulandığında, potasyum, inorganik fosfat ve kalsiyum iyonlarının kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuç bitkinin gösterdiği hipotansif

etkide, iyon değişikliklerinin de rolü olabileceğini düşündürmüştür (Birman ve ark. 2003).

C. tanacetifolia yaprak ekstresinin ve özellikle içerdiği Hiperozit'in eNOS aktivitesini artırarak hipertansiyonlu sıçanlarda görülen yüksek kan basıncını düşürdüğü, ayrıca hiperlipidemiyi, arter duvar kalınlaşmasını, damar lümeninin daralmasını belirgin düzeyde önlediği saptanmıştır (Koçyıldız ve ark. 2006).

C. pentagyna yaprak, çiçek ve meyvelerinden hazırlanan etil asetat ekstrelerinin Sprague Dawley sıçanlarından izole edilmiş aort endoteli ve sığır karaciğerinden elde edilmiş arginaz I enzimi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Her üç ekstre de endotel ve nitrik oksit sentaz bağımlı olduğu kanıtlanan vazorelaksan etkiler göstermiş, çiçek ekstresi ek olarak sarkoplazmik retikuluma Ca^{2+} girişini ve daha az ölçüde Ca^{2+} salınımını azaltmıştır. *C. pentagyna* ekstrelerinin endotel disfonksiyonunda potansiyel faydaları olan arginaz inhibitörlerinin önemli bir kaynağı olduğu gösterilmiştir (Bujor ve ark. 2020).

Cloud ve arkadaşlarının 370 araştırmayı derlediği bir çalışmada, *Crataegus* ekstrelerinin en az 12 hafta süreyle uygulandığında hafif hipertansiyonu olan kişilerde kan basıncını önemli ölçüde düşürebileceği sonucuna varılmıştır (Cloud ve ark. 2020).

Alıcın aterosklerozise karşı etki mekanizmasının araştırıldığı bir derlemede, alıç ekstraktlarının kan lipid düşürücü, antioksidan, antiinflamatuar ve vasküler endotelyal koruma olmak üzere dört ana mekanizmayla kardiyovasküler koruyucu özelliklere sahip olduğu ve bu sayede özellikle anti-aterosklerotik aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Wu ve ark. 2020).

C. songarica meyvelerinden sulu metanol maserasyonu ile ana ekstre hazırlanımış ve daha sonra sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile ekstre fraksiyonlandırılmıştır. Ana ekstre, su ekstresi ve n-butanol ekstresi ile tedavi edilen normotensif sıçanlarda önemli hipotansif ve diüretik etki gözlenmiştir. Su ekstresi normotansif sıçanlarda en güçlü ve anlamlı doza bağımlı hipotansiyon etki üretmiş ve ayrıca oldukça yüksek sodyum atımı ve diüretik etki göstermiştir. Elektrolitlerin idrarla atılımındaki değişikliklere rağmen, plazmatik sodyum ve potasyum seviyeleri değişmemiştir. Ayrıca su ekstresi ile 7 günlük tedavi de önemli ACE inhibitör aktivitesi ile sonuçlanmıştır (Younis ve ark. 2020).

İnsan kan plazması üzerinde *in vitro* testlerle incelenen *C. monogyna* çiçek ve meyvelerinden hazırlanmış alkali ekstrelerin Heparin'e göre daha az olsa da plazma pıhtılaşma süresini uzattıkları gözlenmiştir. Bu antikoagülan aktiviteden ekstrelerden izole edilen polifenolik polisakkarit yapıda biopolimerler olduğu saptanmış, çiçekten elde edilen bir biopolimerin tromboz oluşumunda rol alan antitrombinin aracılık ettiği Faktör Xa'nın inhibitörü olduğu saptanmıştır (Pawlaczyk-Graja, 2018).

C. oxyacantha ekstresinin diyabetik sıçanlarda kardioprotektif etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, 50 Wistar sıçanı 5 gruba ayrılmış ve direnç eğitimi ve alıç takviyesinin iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine etkisi incelenmiştir. Sonuçlar diyabetik sıçanlarda iskemi reperfüzyonundan sonra artmış miyokardiyal hasar ve oksidatif stres tepkisi gözlenmiş; ancak 10 haftalık direnç eğitimi ve *C. oxyacantha* takviyesi iskemi reperfüzyon hasarını sinerjistik olarak azaltmıştır. Bu mekanizmanın normalde iskemi reperfüzyonu ile ilişkili olan oksidatif stresteki azalma ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür (Ranjbar ve ark. 2018).

C. pinnatifida var. *major* meyvelerinin sulu etanol ekstresi hazırlanmış ve aterosklerotik yüksek yağlı beslenen sıçanlarda serum kolesterol, interlökin IL-1β, IL-8, IL-18, nitrik oksit (NO), endotelin (ET), 6-keto-prostaglandin F1α (6-keto-PGF1α) ve tromboksan B2 (TXB2), ve CRP düzeyleri ölçülmüştür. Ekstre total kolesterol, trigliserid ve LDL düzeylerini düşürmüş, HDL düzeyini artırmıştır. Ayrıca CRP, IL-1β, IL-8, IL-18 düzeylerini de azaltmıştır. ET, TXB2 ve 6-keto-PGF1α düzeylerini ise artırmıştır. Bu veriler, alıç ekstresinin yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanlarda aterosklerozis ilerlemesini engelleyebileceğini düşündürmektedir. Olası etki mekanizmaları arasında lipid metabolizmasının iyileştirilmesi, inflamatuar sitokin yanıtlarında azalma ve endotelin korunması yer alır (Zhang ve ark. 2013).

Yüksek yağlı beslenen farelerde alıç pektin pentasakaritinin (HPPS) hiperkolesterolemi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmada, HPPS, serum toplam kolesterol (TC) ve düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (LDL-c) ve hepatik TC düzeylerini ve ayrıca karaciğerdeki 3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA redüktaz (HMGCR) ve açil-koenzim A: kolesterol açil-transferazın (ACAT) aktivitelerini önemli ölçüde azaltmıştır. HPPS uygulaması ile serum yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol (HDL-c), fekal safra asitleri ve kolesterol 7α-hidroksilazın (CYP7A1) aktivitesi ise

büyük ölçüde artmıştır. *C. pinnatifida* var. *major* ekstresinden elde edilen HPPS kolesterol metabolizmasını düzenleyici etki göstermektedir (Zhu ve ark. 2013).

Yüksek kolesterollü diyetle beslenen hiperkolesterolemik hamsterlerde, *C. pinnatifida* meyvelerinden elde edilmiş alıç pektini (HP), alıç pektini hidrolizatları (HPH) ve alıç pektin pentasakkarit (HPPS) desteğinin etkilerini karşılaştırmayı amaçlayan çalışmada, hayvanlar 4 hafta boyunca standart bir diyet (SD), yüksek kolesterol diyeti (HCD) veya HCD + günlük 300 mg/kg dozunda HP, HPH veya HPPS ile beslenmiştir. Sonuçlar HPPS'in vücut ağırlığı artışını (%38,2), karaciğer ağırlığını (%16,4) ve plazma ve hepatik toplam kolesterolü (TC; sırasıyla %23,6 ve %27,3) azaltmada HP ve HPH'den daha etkili olduğunu göstermiştir. Ek olarak, HPH ve HPPS gruplarında dışkıdaki safra asidi seviyeleri HCD grubuna göre %39.8 ve %132.8 anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. HP grubunda bu tür değişiklikler kaydedilmemiş ancak HP grubunun, diyette kolesterol emilimini inhibe ederek, TC atılımında %21.7'lik bir artış ve TC emiliminde %31.1'lik bir azalma ile HPH ve HPPS gruplarından daha yüksek kolesterol atılım kapasitelerine sahip olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre, HPPS'in kolesterol metabolizmasını iyileştirmek için fonksiyonel gıdaların geliştirilmesi için umut verici bir anti-aterojenik diyet bileşeni olabileceği sonucuna varılmıştır (Zhu ve ark. 2015).

C. pinnatifida yaprak flavonoit ekstresinin aterosklerozis üzerine etkilerini incelemeyi amaçlayan bir çalışmada, yüksek yağlı diyetle beslenen farelere günlük 5 veya 20 mg/kg dozda ekstre verilmiştir. Flavonoit ekstresi kolesterol, LDL, VLDL oranlarını düşürmüştür. Antioksidan aktivitelerde yer alan genlerin indüklemiş, köpük hücre oluşumunu inhibe etmiş ve ateroskleroz gelişimini ve aort lezyon alanını azaltmıştır (Dong ve ark. 2017).

C. pinnatifida kuru meyvelerinden hazırlanan ekstrenin, yüksek kolesterollü diyetle beslenen sıçanlarda hipokolesterolemi ve vasküler koruyucu etkisi araştırılmıştır. 4 hafta boyunca 30 ve 100 mg/kg günlük dozda ekstre verilen hiperkolesterolemik sıçanlarda plazma toplam kolesterolü azalmış, HDL belirgin şekilde yükselmiştir. Ayrıca karaciğerdeki lipid içeriği azalarak iyi bir hepatoprotektif fonksiyon gelişmiştir. Yüksek yağlı beslenen sıçanlarda aort gevşemesi yüksek dozda ekstre tedavisi ile restore edilmiştir. Ekstrenin gelişmiş safra asidi biyosentezine yol açan hepatik CYP7A1 mRNA ekspresyonunu yükselterek hipokolesterolemik aktivite sağlayabildiği

gösterilmiştir. Araştırma sonuçlarına göre alıç ekstresi, hiperkolesterolemi ile ilgili komplikasyonların giderilmesinde önemli olabilecek hepatik ve vasküler sistemler üzerinde genel bir iyileşme sağlayabilir (Kwok ve ark. 2013).

C. monogyna ve *C. laevigata* çiçek ve yapraklarından hazırlanmış WS® 1442 isimli preparatın insan endotelindeki hücre içi kalsiyum konsantrasyonları [Ca^{2+}]i üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmada, WS® 1442'nin cAMP ve Ca^{2+} sinyalini etkileyerek endotelyal bariyer bozulmasına karşı koruma sağladığı ve bariyeri bozan uyaranlarla (trombin, histamin) kalsiyumun yükselmesini ve kalsiyuma bağlı sinyalleşmeyi inhibe ettiği gözlenmiştir. Bu şekilde endotel bariyer düzenleyici etki sağlayan WS® 1442, vasküler bariyer disfonksiyonu, yani endotel hiperpermeabilitesi ve müteakip ödem oluşumu, sepsis, ateroskleroz, diyabet veya kanser gibi birçok hastalığın başlamasını veya ilerlemesini engelleyici ajan olarak kullanılabilir (Willer ve ark. 2012).

Yine WS® 1442'nin yaşlanmaya bağlı vasküler endotel disfonksiyonuna karşı etkilerini incelemek üzere tasarlanan bir araştırmada, yaşlı ve genç Wistar sıçanları kullanılmış ve 100 veya 300 mg/kg/gün dozda WS® 1442 verilen yaşlı sıçanlarda doza bağlı olarak endotelyal yıpranmanın azaldığı gözlenmiştir. Yaşlı sıçanların mezenterik arterinde genç sıçanlara kıyasla aşırı vasküler oksidatif stres ve COX-1 ve COX-2 artmış, ancak bu etkiler *Crataegus* tedavisi ile iyileştirilmiştir. Sonuç olarak, düzenli *Crataegus* alımı, büyük olasılıkla artan oksidatif stresi ve COX-1 ve COX-2'nin aşırı ekspresyonunu iyileştirerek, prostanoid aracılı kasılma tepkilerini azaltarak yaşlanmaya bağlı endotelyal disfonksiyonu önlemektedir (Khodja ve ark. 2012).

WS® 1442'nin *in vitro* ve *in vivo* olarak test edildiği başka bir çalışmada, endotelyal bariyer disfonksiyonuna karşı etkili bir şekilde koruma sağladığı bulunmuştur. Bunu Ca^{2+}/PKC/RhoA'yı bloke ederek ve cAMP/Epac1/Rap1 yolunu aktive ederek özellikle endotelyal geçirgenliği düzenleyici sistemlerle etkileşime girerek sağlamaktadır. Kanıtlanmış güvenli bir bitkisel ilaç olarak WS® 1442, aşırı geçirgenlikle ilişkili hastalıkları tedavi etmek için iyi bir ajan olarak kabul edilebilir (Bubik ve ark. 2012).

C. pinnatifida yapraklarından izole edilen monoterpen ve flavon türevi bileşiklerin hem transgenik zebra balığında *in vitro*, hem de sıçandan alınan plazmada *in vivo* antikoagülan aktiviteleri incelenmiştir. Etanol ekstresi, %55 etanol elüsyon

fraksiyonu ve tüm bileşikler, sıçan plazmasında güçlü antiplatelet agregasyonu sergilemiştir. Transgenik zebra balığı sistemindeki *in vitro* testte ise (6S,7Z,9R)-roseozit, eriodektiyol ve 2″-O-ramnozil viteksin'de yüksek antitrombotik aktivite gözlenmiştir. (6S,7Z,9R)-roseozit'in hem antiplatelet, hem antitrombin aktivite göstermesi dikkat çekicidir (Li ve ark. 2015).

C. oxyacantha etanolik ekstresinin kardiyomiyosit kültüründe antiaritmik aktivitesi bilinen diğer kardiyoaktif ilaçlarla (ouabain, epinefrin, milrinon ve propranolol) karşılaştırmalı şekilde incelenmiştir. Ekstrenin hareketsiz kardiyomiyositlerde ritmikliği indükleyebildiği ve negatif kronotropik etkilerle birlikte antiaritmik potansiyel gösterdiği ve β-adrenerjik reseptör blokajına neden olmadığı gözlenmiştir (Kashyap ve ark. 2012).

C. oxyacantha ekstresinden fraksiyone edilen prosiyanidinlerin izole sıçan aortunda ortaya çıkardığı endotel bağımlı gevşemenin araştırıldığı çalışmada, ekstre vasküler tonusu gevşetmiş ve siklik GMP üretimini artırarak kalp koruyucu potansiyeli göstermiştir (Kashyap ve ark. 2012).

Sıçanlarda deneysel olarak indüklenen miyokard enfarktüsü sırasında *C. oxyacantha* alkol ekstresinin mitokondriyal fonksiyon üzerindeki etkisini araştıran çalışmada erkek albino sıçanlara 30 gün boyunca günlük 5 μL/g ekstre uygulanmış, deney süresinin sonunda hayvanlara 24 saat ara ile 2 gün süreyle izoproterenol verilmiş ve 48 saat sonra sıçanlara anestezi uygulanmış ve öldürülmüştür. Kalpler biyokimyasal ve elektron mikroskobik analiz için homojenize edilmiş ve incelenmiştir. Alıç ekstresi ile ön tedavi, mitokondriyal antioksidan durumunu korumuş, sıçan kalbinde izoproterenol tarafından indüklenen Kreb döngüsü enzimlerini azaltmış ve mitokondriyal lipid peroksidatif hasarını önlemiştir. Başka bir çalışmada, *C. oxyacantha* tozu ile ön tedavinin iskemi ve reperfüzyon sırasında laktat dehidrojenaz (LDH) salınımı üzerindeki etkisi, izole edilmiş bir sıçan kalp modelinde incelenmiştir. *C. oxyacantha* ön tedavisi ile LDH salınımının azaltılması, hücre zarının korunması ve miyokardiyal hasardan korunma sağlanmıştır (Kashyap ve ark. 2012).

Plasebo kontrollü, randomize, paralel gruplu ve çok merkezli yürütülen bir çalışmada, *C. oxyacantha* ve *C. monogyna* taze meyvelerinden hazırlanmış standart ekstraktın (Crataegisan®) etkinliği incelenmiş, kalp yetmezliği olan 143 hasta 8 hafta boyunca günde 3 kez 30 damla ekstrakt veya plasebo ile tedavi edilmiştir. Sonuçlar,

Crataegisan® ile uzun süreli tedavi altında kalp yetmezliği durumlarında önemli bir iyileşme gerçekleştiğini göstermiştir (Kashyap ve ark. 2012).

C. oxyacantha yapraklarının sulu ekstraktının hipotansif etkisi, normal anestezi uygulanmış sıçanlar kullanılarak *in vivo* olarak incelenmiştir. 31 mg/kg doz ekstrenin sistolik, diyastolik ve ortalama kan basıncında önemli bir düşüş ürettiği bulunmuştur. Başka bir çalışmada, yetişkin erkeklerde dirençli hipertansiyon tedavisinde *C. oxyacantha*'nın etkinliği ölçülmüş ve hafif antihipertansif aktivite gözlenmiştir (Kashyap ve ark. 2012).

42 erkek Wistar sıçanı 7 gruba ayrılmış, bir gruba distile su, bir gruba aspirin, diğer gruplara sırasıyla 100, 200, 500, 1.000 ve 2.000 mg/kg dozlarında *C. aronia* ekstresi verilmiş ve 7 günlük deney sürecinin sonunda platelet fonksiyonları incelenmiştir. *C. aronia* sulu ekstresinin 100, 200 ve 500 mg/kg gibi düşük dozlarda etkili antitrombosit aktiviteye sahip olduğu, kanama süresindeki artış ve trombositteki azalma ile kanıtlanmıştır. Bununla birlikte agregasyon ve tromboksan B2 serum seviyelerinde azalma gözlenmiştir. Ancak ekstrenin daha yüksek dozları (2.000 mg/kg), kontrol grubuna kıyasla kapanma süresinin (CT) önemli ölçüde kısalması ve trombosit sayısında bir artış ile daha yüksek TXB2 seviyeleri üretmiştir (Shatoor ve ark. 2012).

2.3.2. Antioksidan Aktivite Çalışmaları

Rababa'h ve arkadaşlarının (2020) *C. monogyna* yaprak ve çiçek ekstresinin kardiyak hemostaz ve oksidasyon parametreleri üzerine etkilerini araştırdığı çalışmada, biri kontrol grubu olmak üzere 4 gruba ayrılmış Sprague Dawley sıçanları kullanılmıştır. Kontrol grubuna plasebo olmak üzere, üç gruba sırasıyla günlük 100, 200, 500 mg/kg *C. monogyna* ekstresi 3 hafta boyunca oral yolla verilmiş ve karaciğer ve kan değerleri üzerine etkileri incelenmiştir. Alıç ekstresi alan sıçanlarda trombosit sayısı, WBC, RBC, HB, HCT gibi hematolojik değerlerde bir değişiklik olmamış, ancak karaciğer ağırlığında azalma, tiyobarbütirik asit reaktif maddelerin miktarının azaldığı, alıç ekstresinin kardiyak hemostazı koruyarak kan inceltici, hepatoprotektif ve lipid peroksidasyonunu engelleme yoluyla antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Rababa'h ve ark. 2020).

Bardakçı ve arkadaşlarının (2019) gerçekleştirdiği çalışmada *C. monogyna, C. orientalis, C. pontica, C. rhiphidphylla* ve *C. turcicus* türlerinin fenolik içerik ve antioksidan aktiviteleri karşılaştırılmıştır. *C. monogyna* en iyi antioksidan aktiviteyi

göstermiş ve en yüksek hiperozit, klorojenik asit, total prosiyanidin miktarına sahip olduğu belirlenmiştir. *C. turcicus* ise total fenolik bileşik ve flavonoit miktarı en yüksek olan tür olarak tespit edilmiştir. Ayrıca fenolik bileşik miktarı ve antioksidan aktivite arasında pozitif bir ilişki olduğu ortaya konmuştur (Bardakçı ve ark. 2019).

Bosna'dan endemik tür *C. microphylla* Koch. subsp. *malyana* çiçekli yaprak ve meyvenin Soxhlet apareyi ve ultrasonik banyo kullanılarak hazırlanan etanolik ekstrelerinin antioksidan aktivitesi üzerine yapılan bir çalışmada, Soxhlet ekstraksiyonu ile hazırlanan çiçekli yaprak ekstresinin, en yüksek fenolik ve flavonoit bileşiklerin yanı sıra hiperozit, gallik asit ve kafeik asit içeriğine sahip olduğu bulunmuştur. Bu esktre DPPH yöntemine göre en iyi antioksidan aktiviteyi gösterirken, ABTS yöntemine göre en iyi antioksidan aktivite, ultrasonik ekstraksiyon kullanılarak elde edilen meyve ekstresinde gözlenmiştir. Araştırma sonucuna göre *C. microphylla* subsp. *malyana* gıda ve ilaç endüstrisinde potansiyel uygulama ile değerli bir doğal antioksidan kaynağı olarak kabul edilebilir (Copra-Janicevic 2018).

C. pinnatifida meyvelerinden izole edilen triterpenoit yapıda bileşiklerin peroksil radikal süpürme kapasitesi (PSC) ve süperoksit anyon serbest radikal tahlili incelenen çalışmada, 3β,6β,18β-trihidroksi-olean-12-en-28-oik asit, 3β,19α-dihidroksi-olean-12-en-28-oik asit ve 2α,3β,19α-trihidroksi-olean-12-en-28-oik asit askorbik asitten çok daha yüksek antioksidan aktivite göstermiştir (Qiao ve ark. 2015).

C. pinnatifida çekirdeklerinden izole edilen neolignan bileşikleri ile (Pinnatifidanin C I-VIII, (7R,8S)-dihidrodehidrokoniferil alkol, (7R,8S)-balanofonin) pozitif kontrol olarak E vitamini kullanılarak DPPH ve ABTS testleri uygulanmış ve tüm bileşikler serbest OH sayısındaki artışa bağlı olarak artan antioksidan aktivite göstermiştir (Huang ve ark. 2013b).

C. pinnatifida çiçek polenlerinin oksidatif stresin sebep olduğu DNA hasarı üzerindeki koruyucu etkisi araştırılmış ve toplam fenolik içerik, toplam flavonoit içeriği, bireysel fenolik bileşikler, antioksidan aktiviteler (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), radikal süpürücü aktivite, FRAP ve şelatlama aktivitesi) de belirlenmiştir. Sonuçlar, polen ekstresinin DNA'yı hidroksil radikalleri tarafından hasar görmekten korumak için güçlü bir yeteneğe sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca fare lenfositlerinde H_2O_2'nin neden olduğu DNA hasarına karşı bir sitoproteksiyon etkisi sergilemiştir. Bu koruyucu etkilerin, yüksek toplam fenolik içeriği (17.65 ± 0.97 mg GAE/g), toplam

flavonoit içeriği (8.04 ± 0.97 mg rutin/g), güçlü serbest radikal temizleme aktivitesi ve önemli demir iyonu şelatlama kabiliyeti ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür (Cheng ve ark. 2013).

C. monogyna taze çiçeklerinin etanol ekstresinin antioksidan kapasitesinin ölçüldüğü bir çalışmada, rutin içeriği 2.68 µg/ml, ekstraktın % ABTS· radikal süpürücü aktivitesi 78.80±4.09 ve CUPRAC yönteminde 1.080±0.08 µg trolox/mg ekstrakt olarak belirlenmiştir (Konyalioglu ve ark. 2017).

2.3.3. Antibakteriyel Aktivite Çalışmaları

C. microphylla meyve ekstresinden hazırlanan gümüş nanopartiküler ilaç (CME@Ag-NPs) çeşitli bakteri suşlarında denenmiş (*Acinetobacter baumannii, Staphylococcus aureus, Pseudomonas, Enterococcus, Klebsiella, Escherichia coli* ve *Proteus mirabilis*) ve geniş spektrumlu antibiyotiklere karşı dirençli suşlarda ve başta *Proteus mirabilis*'e olmak üzere tüm bakterilere karşı çok önemli antibakteriyel aktivite sergilemiştir (Mortazavi ve ark. 2020).

C. microphylla meyve ekstresinden hazırlanan $CoFe_2O_4$@ZnO-CeO_2 manyetik nanokompozit *E. coli, P. aeruginoss* ve *S. aureus* suşlarına karşı denenmiş ve gram pozitif *S. aureus'*a karşı güçlü bir antibakteriyel etki gözlenmiştir (Naghizadeh ve ark. 2020).

C. pentagyna meyve ekstresinden hazırlanan gümüş nanopartiküllerin (CP-AgNPs) *Acinetobacter baumannii, Enterococcus, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Klebsiella, Pseudomonas* ve *Proteus mirabilis*'e karşı antibakteriyel aktivitesi MIC ve MBC testleri ile araştırılmış ve CP-AgNP'ler, *S. aureus, P. aeruginosa, E. faecalis, A. baumannii* ve *E. coli*'ye karşı yüksek aktivite göstermiştir (Ebrahimzadeh ve ark. 2020).

C. monogyna yaprak ekstresinden soy metal nanopartiküller hazırlanmış (CML@X-NPs, X=Ag, Au) ve nanopartiküllerin çoklu ilaç direnci gösteren bakterilere karşı antibakteriyel aktivitesi incelenmiştir. Gümüş ve altın nanopartiküller çeşitli gram negatif ve pozitif suşlarda (*A. baumannii, E. faecalis, S. aureus, P. aeruginosa, K. pneumonia, E. coli* ve *P. mirabilis*) iyi antibakteriyel aktivite göstermiştir. Çoklu ilaca karşı direnç gösteren suşlarda da yüksek aktivite gözlenmiştir (Shirzadi-Ahodasti ve ark. 2019).

C. douglasii meyve ekstresinden hazırlanmış gümüş nanopartiküller *S. aureus* ve *E. coli* suşlarında denenmiş ve iyi antibakteriyel etki gözlenmiştir (Ghaffari-Moghaddam ve Hadi-Dabanlou 2014).

C. pinnatifida sulu ekstresinden hazırlanan Ag-Fe_3O_4 nanokompozitler ile gerçekleştirilen antimikrobiyal aktivite çalışmalarında, nanokompozitlerin mikroorganizmalar için toksik olduğu ve hem Gram pozitif *S. aureus* hem de Gram negatif *E. coli* üzerinde sürdürülebilir antibakteriyel aktivite sergilediği gösterilmiştir. Ayrıca bu metotla nanokompozitler bir mıknatıs ile ortamdan kolayca ayrılabilir ve geri dönüştürülebilir antibakteriyel aktivite sergileyebilirler (Li ve Yang 2016).

2.3.4. Antikanser Aktivite Çalışmaları

C. microphylla meyve ekstresinden hazırlanan gümüş nanopartiküllerin (CME@Ag-NPs) meme (MCF-7) ve mide kanseri (AGS) hücre hatları üzerinde *in vitro* sitotoksisitesi, pozitif kontrol olarak doksorubisine karşı test edilmiştir. CME@Ag-NP'ler, hücre hatlarının büyümesini engellemede mükemmel derecede etkili bulunmuştur (Mortazavi ve ark. 2020).

C. pinnatifida meyvelerinden izole edilen enantiomerik 2 çift (1a/1b ve 2a/2b) 8-O-4'-tip neolignan bileşiğinin karaciğer hücre hattı Hep3B üzerindeki etkisi araştırılmış ve 1a/1b bileşiğinin daha sitotoksik aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. 1b bileşiği ise otofaji ve apoptozu 1a'dan daha iyi şekilde indüklemiştir (Shang ve ark. 2020).

C. pinnatifida meyvelerinden izole edilen dihidrobenzofuran tipi 6 enantiomerik neolignan bileşiği izole edilmiş (1a/1b, 2a/2b, 3a, 4a) ve karaciğer kanser hücre kültüründe (Hep3B ve HepG2) antikanser aktiviteleri incelenmiştir. Sonuçlar 2a ve 2b'nin konfigürasyonlarının sitotoksisiteleri üzerinde dikkate değer etkilere sahip olduğunu göstermiştir. 2a'nın hücre apoptozu üzerinde enantiyomeri 2b'ye kıyasla daha önemli bir etki gösterdiği bulunmuştur (Guo ve ark. 2019a).

C. pinnatifida meyvelerinden izole edilen 4 fenilpropanoit ve 2 dibenzofuran (1a/1b-4a/4b ve 5-7) tipi bileşik izole edilmiş ve hepatoselüler kanser hücre kültürlerinde (Hep3B ve HepG2) sitotoksisite testleri yapılmıştır. Bileşik 7 (Crataekinon A), Hep3B ve HepG2 hücrelerine karşı belirgin sitotoksik aktivite sergilemiş ve apoptoz indüksiyonu yoluyla hepatoma hücrelerine karşı antiproliferatif aktivitelere sahip olabileceği ortaya konmuştur (Zhao ve ark. 2019b).

C. pinnatifida meyvelerinden yapılan izolasyonda 4 çift fenilpropanoit enantiomer türevi (1a/1b-4a/4b) ve 2 neolignan bileşiği izole edilmiş ve Crataegusnaoid A-F olarak isimlendirilmiştir. Tüm bileşikler HepG2 karaciğer kanseri hücre kültüründe test edilmiştir. (±)-Crataegusanoid A ve B enantioselektif sitotoksisite göstermiş ve yapı-aktivite ilişkilerinin analizi (E)-2-stiril parçasının varlığının, bileşiklerin sitotoksisitesini önemli ölçüde artırabildiğini göstermiştir. Hem 1b hem de 2b, enantiyomerleri 1a ve 2a ile karşılaştırıldığında hücre apoptozu, otofaji ve hücre döngüsü ilerlemesi üzerinde daha üstün aktivite göstermiştir. Ayrıca sonuçlar, 1a/1b-2a/2b enantiyomerlerinin HepG2 hücrelerinde koruyucu otofajiyi indüklediğini ortaya koymuştur. Araştırmacılar (±)-Crataegusanoid A ve B'nin hepatoselüler kanser tedavisi için umut verici bir kemoterapötik lider adayı olduğunu düşünmektedir (Guo ve ark. 2019b).

C. monogyna yaprak ekstresinden altın ve gümüş nanopartiküller hazırlanmış (CML@X-NPs, X=Ag, Au) ve mide (AGS) ve meme (MCF-7) kanser hücre kültürüne karşı sitotoksisitesi araştırılmıştır. Test sonuçları gümüş nanopartüküller daha iyi olmak üzere, nanopartüküllerin önemli antikanser etkileri olduğunu göstermiştir (Shirzadi-Ahodasti ve ark. 2019).

C. pinnatifida var. *majo*r meyvelerinden yarı preparatif HPLC ile hazırlanan triterpenik bileşiklerce zengin ekstre ve major bileşen ursolik asitin HepG2 (karaciğer) MCF-7 (meme) ve MDA-MB-231(meme) hücre kültürlerinde sitotoksik etkileri incelenmiş ve her ikisinin de özellikle MDA-MB-231 hücre hattında apoptozu indükleyerek önemli antikanser aktivite gösterdiği kanıtlanmıştır (Wen ve ark. 2017).

C. pinnatifida çekirdeklerinden izole edilen norlignan bileşiklerinin ((7S, 8S)-4-[2-hidroksi-2-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1-(hidroksimetil)etoksi]-3,5-dimetoksibenzaldehid, (+)-balanofonin, eritro-guaiasilgliserol-β-koniferil aldehit eter, buddlenol A) OPM2 ve RPMI-8226 multiple miyeloma kanser hücre kültürlerinde iyi bir antikanser aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir (Li ve ark. 2013).

C. pinnatifida çekirdeklerinden izole edilen neolignan bileşikleri (Pinnatifidanin C I-VIII, (7R,8S)-dihidrodehidrokoniferil alkol, (7R,8S)-balanofonin) 5-fluorouracil ile mukayeseli olarak HeLa (servikal karsinom), HepG2 (karaciğer), HT-1080 (fibrosarkom) , A375-S2 (malign melanom), MCF-7 (meme), U-937 (lenfoma), K562

(myleoid lösemi) ve HL60 (lösemi) hücre hatlarında denenmiş ve (7R,8S)-balanofonin belirgin sitotoksik aktivite sergilemiştir (Huang ve ark. 2013b).

C. pinnatifida meyvelerinden izole edilen triterpenoid bileşiklerin (3β,6β,18β-trihidroksi-olean-12-en-28-oik asit (1), 3β,6β,18β,23-tetrahidroksi-olean-12-en-28-oik asit (2), 2α,3β,6β,18β-tetrahidroksi-olean-12-en-28-oik asit (3), ve 2α,3β,6β,18β,23-pentahidroksi-olean-12-en-28-oik asit (4)) HepG2 karaciğer ve MCF-7 meme kanser hücre kültürlerindeki etkileri araştırılmış ve bileşik 2, 3 ve 4 HepG2 ve MCF-7 hücrelerinin proliferasyonuna karşı yüksek güçlü inhibitör aktivite göstermişlerdir (Qiao ve ark. 2015).

C. monogyna çiçek tomurcukları ve meyvelerinden hazırlanan sulu metanol ekstreleri insan kanser hücre hatları MCF-7 (meme), NCI-H460 (küçük hücreli akciğer kanseri), HeLa (servikal karsinoma) ve HepG2 (karaciğer)'de test edilmiştir. Tomurcuklar tüm hücre kültürlerinde en iyi antiproliferatif etkiyi göstermiştir. Bunun içerdiği yüksek fenolik bileşik miktarından kaynaklandığı düşünülmüştür. Ayrıca ekstrelerin tümör olmayan hücreler üzerindeki toksisitesi domuz karaciğer hücre kültüründe incelenmiş ve herhangi bir toksisite gözlenmemiştir (Rodrigues ve ark. 2012).

C. azarolus ekstresi ve bu ekstreden izole edilen viteksin-2'-O-ramnozit bileşiği B16F10 malign melanom hücre kültüründe denenmiş ve ekstre daha iyi olmak üzere her ikisi de iyi antikanser aktivite göstermiştir. Ayrıca her ikisinin de B16F10 hücrelerinin tirozinaz aktivitesini inhibe ederek melanin içeriğini azaltma yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir (Mustapha ve ark. 2015).

Alıçtan ekstrakte edilen homojen bir polisakkaritin (HPS) kolon kanseri hücreleri (HCT116) üzerinde antikanser aktivitesi test edilmiş ve akış sitometrisi çalışmaları, HPS'nin S ve G2/M fazlarında hücre döngüsünü durdurabildiğini ve apoptoz oranını artırabildiğini ortaya koymuştur (Ma ve ark. 2020).

2.3.5. Antidiyabetik Aktivite Çalışmaları

Pirmoghani ve arkadaşlarının (2019) gerçekleştirdiği çalışmada diyabetik Wistar sıçanlarına 2 hafta boyunca 3 farklı günlük dozda (100, 300, 1000 mg/kg) *Crataegus* ekstresi verilmiş ve kanda glukoz, trigliserit, kolesterol, LDL ve HDL düzeyleri ölçülmüştür. *Crataegus* ekstresi alan sıçanlarda, kontrol ve tedavi almayan diyabetik

sıçan gruplarına göre LDL düzeylerinde önemli bir farklılık gözlenmezken glukoz, trigliserit, kolesterol düzeyleri düşmüş, HDL düzeyleri artmıştır. Bu sonuçlar *Crataegus* ekstresinin hipoglisemik ve hipolipidemik etkilere sahip olduğunu göstermiştir (Pirmoghani ve ark. 2019).

2.3.6. Nöroprotektif Aktivite Çalışmaları

C. pinnatifida meyvelerinden izole edilen 10 seskineolignan (Cratatifida A-J) bileşiği insan nöroblastom SH-SY5Y hücrelerinde H_2O_2 ile indüklenen hücre hasarına karşı nöroprotektif aktiviteleri açısından incelenmiştir. Bunlardan Cratatifida F ve H, 25 uM'de pozitif kontrol Trolox (%78.64) ile karşılaştırıldığında %79.36 ve %80.72 hücre canlılığı ile koruyucu etki göstermiştir (Zhao ve ark. 2020).

Başka bir çalışmada *C. pinnatifida* meyvelerinden hazırlanan etanol ekstresinin Alzheimer hastası fareler üzerinde nöroprotektif etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Ekstre Amiloid-β ile indüklenen hafıza bozukluğu modelinde hafıza açığını önlemiş, Amiloid-β enjekte edilen modelin hipokampüsünde glial aktivasyonu önlemiş, *in vitro* testte ise konsantrasyona bağlı şekilde Amiloid-β fibril oluşumunu inhibe etmiş ve ayrıca fibrillerin ayrışmasına neden olmuştur. Bununla birlikte Amiloid-β tarafından indüklenen nöronal hücre ölümünü bloke ettiği gözlenmiştir (Lee ve ark. 2019).

C. pinnatifida meyvelerinden bir γ-bütirolakton halkasına sahip iki çift nadir 8,9′-epoksi tipi norlignan enantiomeri izole edilmiş ((±)-Crataegusnorin A (1a/1b) ve B (2a/2b)) ve bileşilkler SH-SY5Y hücrelerinde H_2O_2 ile indüklenen oksidatif hasara karşı nöroprotektif etkileri açısından değerlendirilmiştir. Bileşik 2a'nın en güçlü nöroprotektif etki gösterdiği ve iki çift enantiyomer la/1b ve 2a/2b'nin nöroprotektif aktivite üzerinde farklı etkiler gösterdiği bulunmuştur. 2a'nın hücre apoptozunu inhibe ederek SH-SY5Y hücrelerini oksidatif hasardan koruyabildiği gösterilmiştir (Guo ve ark. 2020).

C. pinnatifida çekirdeklerinden izole edilen 7 adet 8-O-4'-tipi seskineolignan bileşiğinin (Craseskineolignan A-G) H_2O_2 ile indüklenen insan nöroblastoma SH-SY5Y hücrelerinde oluşan hasara karşı etkileri araştırılmış ve en etkili bileşik Craseskineolignan D olmak üzere, tüm lignanların önemli nöroprotektif etkilere sahip oldukları gösterilmiştir (Cheng ve ark. 2019).

Yine *C. pinnatifida* meyvelerinden izole edilen 5 enantiomer neolignan bileşiğinin (1a/1b, 2a, 3a, 4a/4b, 5b) insan nöroblastom SH-SY5Y hücrelerinde H_2O_2

ile indüklenen oksidatif hasara karşı nöroprotektif aktiviteleri araştırılmıştır. Sonuçlar, 3b'nin en iyi nöroprotektif etkileri sergilediğini göstermiş, bu da metoksi gruplarının ve bunun konfigürasyonunun nöroprotektif aktivitedeki artışla ilişkili olabileceğini düşündürmüştür (Zhao ve ark. 2019a).

C. oxyacantha ekstresinin içerdiği yüksek polifenolik bileşik miktarı sayesinde sahip olduğu antioksidan aktivitenin yetişkin Wistar sıçanlarında deltametrin ve klorpirifos insektisit karışımının neden olduğu nörodavranışsal eksiklikler ve beyin dokusu hasarları üzerindeki etkileri incelenmiş ve *C. oxyacanta* ekstresinin insektisitlerin neden olduğu oksidatif beyin hasarı üzerinde potansiyel antioksidan etkilere sahip olduğu ortaya konmuştur (Saoudi ve ark. 2019).

2.3.7. Diğer Çalışmalar

C. pinnatifida meyveleri ve *Panax ginseng* karışımının insan cildi üzerinde yaşlanma karşıtı etkileri incelenmiş ve karışım prokollajen tip I ekspresyonunu iyileştirmiş ve matris metaloproteinaz-1 salgısını azaltmıştır. Bu sayede cilt nem kaybını azaltarak anti-aging aktivite sergilemiştir (Hwang ve ark. 2017).

Diyabetik gastroparezi (mide felci) (DGP), diabetes mellitusun yaygın bir kronik komplikasyonudur. Bir çalışmada, *C. pinnatifida* tohumlarından elde edilen etil asetat ekstresinin DGP sıçanları üzerindeki terapötik etkisini ve potansiyel mekanizmasını araştırılmış ve sonuçlar alıç tohumunun DGP sıçanlarında gastrointestinal motiliteyi iyileştirdiğini ve potansiyel mekanizmasının, hipergliseminin neden olduğu oksidatif stres hasarının inhibisyonunda, midelerinde salgısının düzenlenmesinde ve gastrointestinal hormonların düzenlenmesinde rol oynayabileceğini göstermiştir (Niu ve rak. 2020).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Bitkisel Materyal

Crataegus x bornmuelleri Zabel türüne ait drog örnekleri Ankara'nın Beypazarı ilçesi Karaşar mahallesi civarından getirilmiş, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Şükran Kültür tarafından teşhis edilmiş, ardından yaprak ve ham meyveleri 29.07.2017, olgun meyveleri 23.09.2017 tarihlerinde toplanmıştır. Bitki örneği İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'nda ISTE 115747 no ile kayıt altına alınmıştır. Daha sonra Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ali Dönmez tarafından yaprak ve çiçekleri 08.06.2018 tarihinde, ham ve olgun meyveleri 04.09.2018 tarihinde Yozgat Akmağdeni bölgesinden toplanmıştır. Bitki örneği Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı Herbaryumu'nda AAD 20215 no ile kayıt altına alınmıştır. Bitki drogları oda sıcaklığında serin yerde kurutulmuştur.

3.2. Ekstraksiyon

C. x bornmuelleri bitkisinin yaprak, ham ve olgun meyveleri ayrı ayrı değirmende toz edildikten sonra Soxhlet apareyinde önce petrol eteri, ardından etanol ile muamele edilmiştir. Soxhletten alınan petrol eteri ve etanol ekstreleri rotavaporda alçak basınç altında yoğunlaştırılmıştır. Daha sonra sıvı-sıvı ekstraksiyon metodu kullanılarak petrol eteri ekstresi %60'lık etanol ile tüketildikten sonra etanolde çözünen kısım ayırma hunisi içine alınmış, diklorometan ile tüketilmiş ve petrol eteri (A ekstresi) ile diklorometan (B ekstresi) ekstreleri elde edilmiştir. Etanol ekstresi ise, üzerine bir miktar su eklendikten sonra ayırma hunisinde sırasıyla toluen (C ekstresi), diklorometan (D ekstresi) ve etilasetat (E ekstresi) ile tüketilmiş ve kalan sulu etanollü kısım (F ekstresi) da dahil olmak üzere 4 fraksiyona ayrılmıştır. Her bir fraksiyon alçak basınç altında rotavaporda yoğunlaştırılmış ve buzdolabında +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Toplanan çiçek miktarı az olduğundan (kuru drog ağırlığı 170 gr) metanolde perkolasyon yöntemi kullanılarak ekstre hazırlanmıştır.

3.3. Bileşiklerin İzolasyonu

Soxhlet apareyi ve ardından ayırma hunisinde sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ekstreler öncelikle ince tabaka kromatografisi (İTK) plağına uygulanmış ve flavonoit lekeri gözlenen ekstrelerde, sütun kromatografisi ve preparatif İTK yöntemleri kullanılarak izolasyon gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

Ekstrelerin ve fraksiyonların kimyasal içeriklerinin incelenmesi amacıyla ince tabaka kromatorafisi yönteminden yararlanılmıştır.

Hazır plak: TLC Silica gel 60 F_{254} Aluminium Sheets (Merck, 105554.0001)

Belirteç: NA belirteci

Hazırlanışı: 100 mg difenil borik asit 2-amino etil ester (Sigma-Aldrich, D9754-5G) + 100 ml metanol (Merck, 106009.2500)

Çözücü sistemleri: Farklı oranlarda Toluen:Aseton, Diklorometan:Metanol, Sikloheksan:Etilasetat, Toluen:Etilasetat:Metanol, Toluen:Diklorometan:Metanol

Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi

İTK plağına uygulandığında diğer maddelerden ayrılabilen maddelerin saflaştırılması için preparatif İTK yönteminden yararlanılmıştır. Adsorban olarak hazır silikajel İTK plakları ve mobil faz olarak çeşitli çözücü sistemleri kullanılmıştır. Ekstre ince bir şerit halinde plağın alt kısmına uygulanmış, tabanında çözücü sistemi bulunan cam tank içine yerleştirilmiştir. Sürüklenme tamamlandıktan sonra plak çeker ocakta kurutulmuştur. Maddeye ait bandın sınırları 254 ve 366 nm UV ışık altında belirlendikten sonra bant plaktan kazınmıştır. Kazınan madde diklorometan:metanol karışımı ile pastör pipeti veya ince kısa sütunlar kullanılarak elüe edilmiş, tekrar İTK plağına uygulanmış, saf olup olmadığı kontrol edilmiştir. Saf olan maddeler azot gazı altında kuruluğa kadar uçurulmuş ve +4°C buzdolabına kaldırılmıştır.

3.3.2. Sütun Kromatografisi

Ana ekstrelerin kaba ayrımı için adsorban olarak büyük partiküllü silikajel (Silica gel 60 / 0.2-0.5 mm, Merck, 1.07733); ana ekstreden alınmış çok miktardaki alt

fraksiyonlar için ince partiküllü silikajel (Silica gel 60 /0.063-0.2 mm, Merck 107734), gradient mobil faz sistemleri ve çeşitli çapta ve boyda sütunlar kullanılmıştır.

Gradient mobil faz sistemleri:

- Toluen→Aseton→Metanol (Toluen ekstreleri için)
- Toluen→Etilasetat→Metanol (Diklorometan ekstreleri için)
- Diklorometan→Metanol (Etilasetat ekstreleri için)

Bu sütunlarda, ekstre miktarının 20-30 katı kadar silikajel başlangıç çözücüsü ile ıslatılarak şişirilmiş, ardından sütunun musluğu açık bırakılarak adsorban yüklenmiş ve sütunun iyice oturması sağlanmıştır. Bir miktar silikajele emdirilen ekstre kuru usül ile sütuna yüklenmiş ve çözücü sistemi yavaş yavaş polaritesi artırılarak sütundan geçirilmiş, fraksiyonlar eşit miktarlarda toplanmıştır. İTK'da kontrolü yapıldıktan sonra benzer fraksiyonlar birleştirilmiştir. Ardından maddeleri saflaştırmak için preparatif İTK veya sefadeks sütun uygulanmıştır.

Adsorban olarak sefadeks (Sigma Chem. Co., Sephadex LH-20, 25-100 µm, 124H0053) kullanılan sütunlarda, sabit oranda mobil faz (aseton veya metanol) kullanılmış ve ince sütunlar tercih edilmiştir. Ekstre miktarının 100 katı kadar sefadeks, mobil faz ile ıslatılarak bir gece boyunca bekletilmiştir. Ertesi gün cam sütuna yüklenmiş ve adsorbanın oturması beklenmiştir. Sütun hazır olduktan sonra da yaş usüle göre ekstre bir miktar çözücü ile çözündükten sonra sütuna yüklenmiş ve fraksiyonlar toplanmıştır. Yine İTK'da kontrolü yapılan benzer fraksiyonlar birleştirilmiştir. Çeker ocakta kuruluğa kadar uçurulduktan sonra +4°C buzdolabına kaldırılmıştır.

Çalışma boyunca elde edilen tüm maddeler, spektral analizlerinden önce sefadeks sütundan geçirilerek kirliliklerinden arındırılmıştır.

3.4. Elde Edilen Saf Maddelerin Yapı Tayini

Saflaştırılan maddelerin yapıları spektral yöntemlerle (UV, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, MASS ve IR) aydınlatılmıştır.

3.4.1. UV Spektrumu

Shimadzu UV-1700 PharmaSpec UV-VIS Spektrofotometresi kullanılmıştır. Maddeler metanolde çözündükten sonra 1 cm'lik kuvartz küvetlere alınmış ve

spektrumları çekilmiştir. Flavon türevlerinin spektrumları kaydırma belirteçleri ile 3 aşamada alınmıştır.

1. Aşama:

- Maddenin metanoldeki çözeltisinin spektrumu alınmıştır.
- Çözeltinin üzerine 3 damla NaOMe çözeltisi damlatılarak spektrum alınmıştır.

2. Aşama:

- Maddenin metanoldeki çözeltisine 6 damla $AlCl_3$ çözeltisi ilave edilip spektrum alınmıştır.
- $AlCl_3$ içeren çözeltiye 3 damla HCl çözeltisi damlatılıp spektrum alınmıştır.

3. Aşama:

- Maddenin metanollü çözeltisi üzerine küvette 2 mm NaOAc tabakası kalana kadar NaOAc ilave edilmiş, ardından spektrum alınmıştır.
- NaOAc içeren çözeltiye H_3BO_3 ilave edilmiş, spektrum alınmıştır.

Flavon türevi dışındaki maddelerin yalnızca metanoldeki spektrumları alınmıştır.

3.4.2. ^{1}H-NMR ve ^{13}C-NMR Spektrumu

Maddeler Giresun Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne (cihaz: Bruker AVANCE III 400 MHz NMR Spektrometresi) ve Bezmialem Vakıf Üniversitesi İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne (cihaz: Bruker 500 MHz NMR Spektrometresi) gönderilmiştir. Maddenin çözünürlük özelliklerine göre çözücü olarak CD_3OD, D_2O ve DMSO-d6 kullanılmıştır.

3.4.3. IR Spektrumu

IR spektrumları ise Shimadzu IR Affinity-1 cihazı kullanılarak çekilmiştir.

3.4.4. Kütle Spektrumu

Maddeler kütle spektrumları için de yine Bezmialem Vakıf Üniversitesi İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne (cihaz: Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi (HRMS)) gönderilmiştir.

3.5. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

30’ar g yaprak, çiçek, ham ve olgun meyve tartılmış, her biri bir perkolatöre yüklenmiş ve metanol ile 1 gece maserasyona bırakılmıştır. Ertesi gün perkolat alınmış ve rotavaporda alçak basınçta kuruluğa kadar uçurulmuştur. Her bir droga ait ekstre üzerinde aşağıdaki biyolojik aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

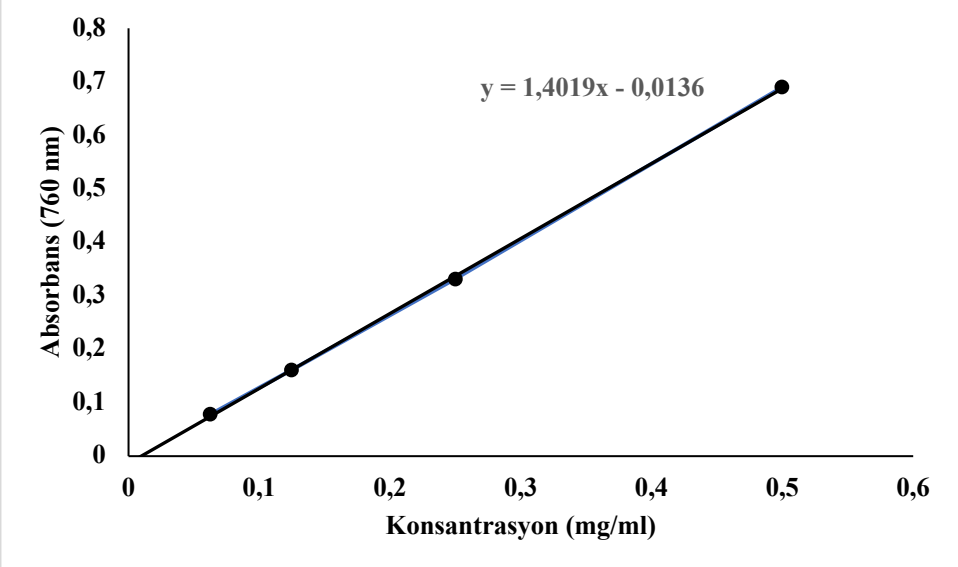
3.5.1. Antioksidan Aktivitenin Araştırılması

Antioksidan aktivite tayininde drogların antioksidan bileşik miktar tayini ve radikal süpürücü aktiviteleri araştırılmıştır. Antioksidan bileşik miktar tayini, gallik asit ekivalanı fenolik bileşiklerin miktar tayini ve kateşin ekivalanı flavonoit miktar tayini yapılarak ölçülmüştür. Ayrıca Alman Farmakopesi DAB10’a göre total flavonoit miktar tayini de hesaplanmıştır.

3.5.1.1. Antioksidan Bileşiklerin Miktar Tayini

Fenolik Bileşiklerin Miktar Tayini

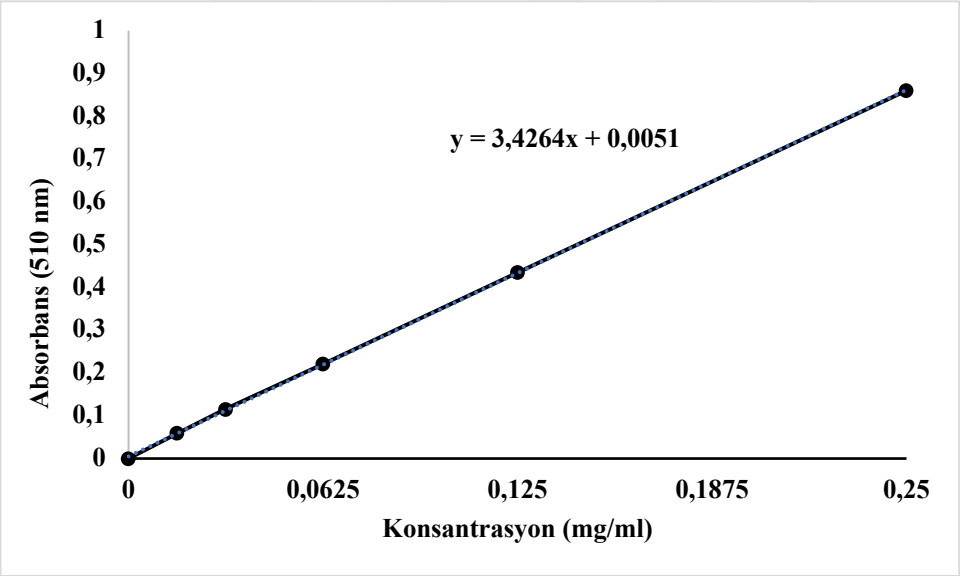
Deney, Folin-Ciocalteu ayıracı ilavesiyle gallik asit ekivalanı fenolik bileşiklerin miktarının kolorimetrik olarak ölçülmesine dayanır (Slinkard ve Singleton 1977). 10 - 0,625 mg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda hazırlanan ekstrelere Folin-Ciocalteu ayıracı ilave edildikten sonra oluşan mavi renk 760 nm’de spektrofotometrede ölçülmüştür. Deney 3 defa tekrarlanmış ve sonuçların ortalaması alınmıştır. Aynı prosedür gallik asit (50 - 400 µg/ml) için 5 kez uygulandıktan ve ortalama alındıktan sonra elde edilen veriler ile gallik asit standart eğrisi çizilmiş ve regresyon denklemi elde edilmiştir.



Şekil 3-1: Gallik asit standart eğrisi ve regresyon denklemi

Flavonoit Miktar Tayini

Sanaka ve arkadaşlarının (2005) geliştirdiği metoda göre değişen konsantrasyonlarda hazırlananan (10 mg/ml-0.625 mg/ml) ekstrelerin ve standart olarak kullanılan kateşin çözeltisi üzerine $NaNO_2$ (7.5 µl %5'lik) ilavesinden 6 dk sonra $AlCl_3$ (15 µl %10'luk) ve ondan 5 dk sonra da NaOH (50 µl 1M) ilave edilmiş ve oluşan rengin absorbansı 510 nm'de ayıraç körüne karşı ölçülmüştür. Sonuçlar mg kateşin ekivalanları/g ekstre olarak ifadelendirilmiştir. Proses üç defa tekrarlanmış ve ortalaması alınmıştır. Aynı deney prosesi kateşinin değişen konsantrasyonlarda (0.125mg/ml-0.016 mg/ml) çözeltileri için uygulanmıştır. Deney 5 kez tekrarlanmış ve ortalaması alınmıştır. Kateşin standart eğrisi çizilmiş ve regresyon denklemi hesaplanmıştır.



Şekil 3-2: Kateşin standart eğrisi ve regresyon denklemi

DAB 10 Metoduna Göre Total Flavonoit Miktar Tayini

Alman Farmakopesi DAB 10'da yer alan metoda göre ekstrelerin hiperozit üzerinden flavonoit miktarı hesaplanmıştır. 0.3 g toz halindeki drog üzerine 0.5 ml methenamin'in %0.5'lik çözeltisi, 10 ml aseton ile HCl (1 ml %25'lik) eklenmiştir. Geri çeviren soğutucu altında kaynar su banyosunda 30 dk bekletildikten sonra sıcakken pamuk yardımıyla 50 ml'lik bir balon jojeye süzülmüştür. Drog bakiyesi ve pamuk 2 defa daha 10'ar ml aseton ile 10 dk geri çeviren soğutucu altında kaynatılmıştır.

Çözeltiler sıcakken pamuktan süzülerek balon jojeye alınmış ve sonra asetonla 50 ml'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltiden 10 ml bir ayırma hunisine alınmış ve üzerine 10 ml su ilave edilmiştir. Ardından 1 kez 10 ml, 3 kez de 5 ml EtAc ile tüketilmiştir. Etil asetatlı kısımlar alınarak birleştirilmiş, bu karışım tekrar ayırma hunisinde 25 ml su ile yıkanmıştır. Karışım 25 ml'lik balon jojeye alındıktan sonra EtAc ile 25 ml'ye tamamlanmıştır.

Bu karışımın 5 ml'si üzerine 0.5 ml $AlCl_3$ reaktifi ilave edilmiş, %5'lik asetik asitli metanollü çözelti ile 12.5 ml'ye tamamlanarak incelenecek çözelti elde edilmiştir. Aynı şekilde 5 ml çözeltiye %5'lik asetik asitli metanollü çözelti ilave edilmiş, 12.5 ml'ye tamamlanarak ise şahit çözelti elde edilmiştir.

30 dk bekletildikten sonra incelenecek çözeltideki absorbsiyon 425 nm'de şahite karşı okunmuştur.

Alüminyum klorür çözeltisi: 5 g. $AlCl_3$, 100 ml metanoldeki çözeltisi

Metanol glasiyal asetik asit çözeltisi: 5 ml glasiyal asetik asit alınmış, metanolle 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Hesaplama: % hiperozit = 2 x A/T

A: Analiz Çözeltisinin Absorbsiyonu

T: g olarak tartım

3.5.1.2. Antioksidan Aktivitenin Tayini

DPPH Radikali Giderici Aktivite Tayini

Brand-Williams ve arkadaşları (1995) tarafından geliştirilen metoda göre çalışılmıştır. 10 µl ekstre (10-0.625 mg/ml) ve kersetin (0.31-0.02 mg/ml)'e 240 µl $DPPH^{\bullet}$'ın metanoldeki çözeltisi ($6x10^{-5}$ M) ilave edilmiştir. Karışım 30 dakika karanlıkta bekletildikten sonra absorbanslar 517 nm'de spektrofotometrede metanole karşı okunmuştur. Pozitif ve negatif kontroller paralel olarak çalışılmıştır. Pozitif kontrolde ekstrenin yerine standart (gallik asit), negatif kontrolde ise çözücü (metanol) kullanılmıştır. Deney üç defa tekrarlanmış ve ortalaması alınmıştır. Aşağıdaki denklem ile ekstrelerin DPPH radikali giderici aktivitesi hesaplanmıştır.

$$\text{DPPH radikali giderici aktivitesi}\,(\%) = (1 - \frac{\text{Ekstrenin 517nm'deki absorbansı}}{\text{Kontrolün 517 nm'deki absorbansı}}) \times 100$$

Süperoksit Anyonu Giderici Aktivitesi Tayini

Metod fenazin metasülfat-nikotinamid dinükleotid (PMS-NADH) oksidasyonu ile meydana gelen süperoksitin nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgemesi sonucu oluşan renkli formazonların 560 nm'deki absorbansların ölçülmesine dayanmaktadır (Nishikimi, Rao ve Yagi 1972). Ortamda süperoksit anyon giderici bir antioksidan varsa bu indirgeme olmaz ve mavi-mor renk gözlenmez.

10 µl ekstre (0.625 – 5 mg/ml) ve standart olarak kullanılan rutin (0.08 – 1.5 mg/ml)'e 100 µl NBT çözeltisi ve 100 µl NADH çözeltisi ilave edilmiştir. Reaksiyon 10 µl PMS çözeltisinin ilavesi ile başlatılmış ve karışımlar 25^{o}C de 5 dk inkübe edilmiştir. Oluşan rengin absorbansı 560 nm'de köre (sadece NBT ve NADH çözeltileri içerir) karşı okunmuştur. Pozitif ve negatif kontroller paralel olarak çalışılmıştır. Pozitif kontrolde ekstrenin yerine standart (rutin), negatif kontrolde ise çözücü (metanol) kullanılmıştır. Deney üç kez tekrarlanmış ve ortalaması alınmıştır. Aşağıdaki denklemden yararlanılarak süperoksit anyonu giderici aktivitesi hesaplanmıştır.

$$\text{Süperoksit radikali giderici aktivitesi (\%)} = (1 - \frac{\text{Ekstrenin 560 nm'deki absorbansı}}{\text{Kontrolün 560 nm'deki absorbansı}}) \times 100$$

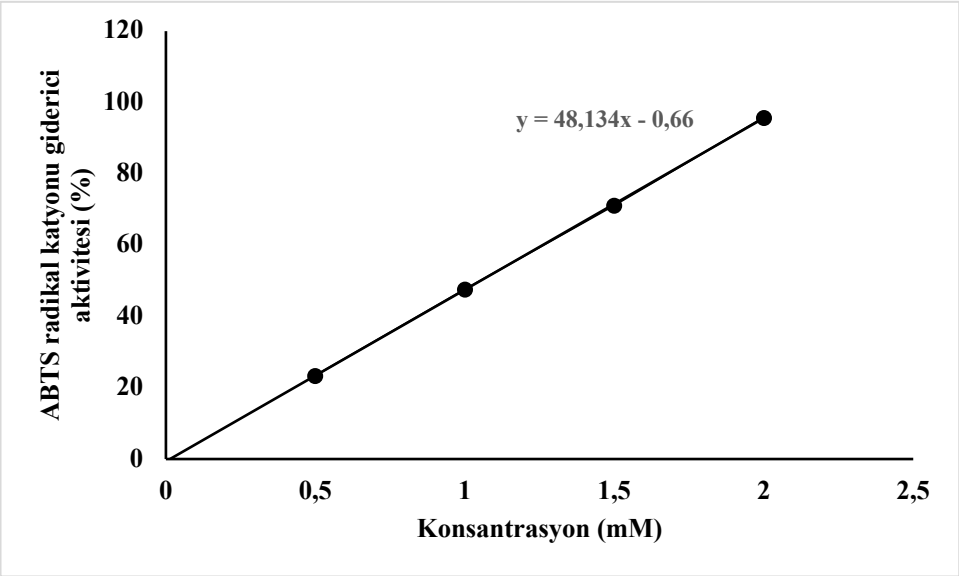
Troloks Ekivalan Antioksidan Kapasitesi (TEAC) Deneyi

2,2-azinobis-(3-etilbenzotiozin-6-sulfonik asit) amonyum tuzu ($ABTS^{2-}$)'nun persülfatla oksidasyonu sonucu oluşan mavi-yeşil renkli ABTS radikal katyonu ($ABTS^{\bullet+}$)'nun giderilmesine dayanan deney prosesi uygulanmıştır (Re ve ark. 1999). Antioksidan varlığında azalan renk spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

245 µl $ABTS^{\bullet+}$ çalışma çözeltisine 5 µl ekstre (10-0.625 mg/ml), kersetin (0,02-0,31 mg/ml) veya Troloks (suda çözünen sentetik vitamin) ilavesiyle renkte görülen azalma spektrofotometrik olarak 6. dakikada 734 nm'de ölçülmüştür. Ekstre veya standart çözeltiler yerine aynı miktarda %96'lık etanol kullanılmasıyla negatif kontrol deneyleri gerçekleştirilmiştir. Deneyler üç defa tekrarlanmış ve ortalaması alınmıştır. Ekstrelerin ABTS radikal katyonu giderici aktivitesi aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır.

$$\text{ABTS radikal katyonu giderici aktivitesi (\%)} = (1 - \frac{\text{Ekstrenin 734 nm'deki absorbansı}}{\text{Kontrolün 734 nm'deki absorbansı}}) \times 100$$

Deney prosesi Troloks için uygulanmış ve renkte gözlenen azalma 6. dk'da 734 nm'de ölçülmüş ve Troloks'un yüzde ABTS radikal katyonu giderici aktivitesi hesaplanmıştır. Deney beş defa tekrarlanmıştır. Bulunan değerlerden, en küçük kareler yöntemi ile Troloks standart eğrisi çizilmiş ve böylece regresyon denklemi elde edilmiştir. EC_{50} değeri regresyon denklemi ile hesaplanmıştır.



Şekil 3-3: Troloks standart eğrisi ve regresyon denklemi

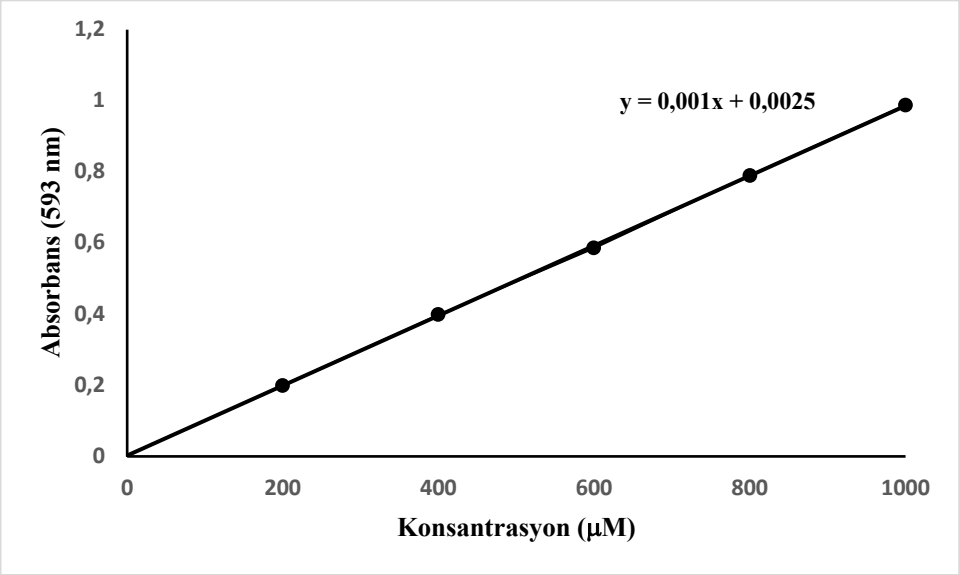
Ferri İyonu Redükleyici Antioksidan Potansiyeli (FRAP) Deneyi

Deney asidik ortamda, oksidan ferrik tripiridil triazin (TPTZ) kompleksinin antioksidan etkisi ile Fe^{+2}'ye indirgenmesi sonucu oluşan rengin absorbansının 593 nm'de ölçülmesine dayanır.

Fe^{+3} konsantrasyonu 1.67 mM, TPTZ konsantrasyonu ise 0.83 mM olan FRAP ayıracı hazırlandıktan sonra 37ºC'de inkübe edilmiş ve 270 µl'si, 20 µl distile su ve 10 µl ekstre (10-0.625 mg/ml) veya standart olarak kullanılan kersetin (0.31-0.02 mg/ml) ile karıştırılarak 4. dakikada absorbans artışı 593 nm'de spektrofotometrede ayıraç körüne karşı ölçülmüştür. Ekstrenin $\triangle A_{593nm}$ değeri, $FeSO_4.7H_2O$ (200 - 1000 µM) ile hazırlanan standart eğrisine ait $\triangle A_{593nm}$ değerlerle karşılaştırılmıştır. Deney üç kez tekrarlanmış ve ortalaması alınmıştır (Benzie ve Strain 1996).

Daha sonra $FeSO_4.7H_2O$'ın değişen konsantrasyonlarda (800 µM-200 µM) hazırlanan çözeltilerine FRAP deneyi uygulanmış, deney beş defa tekrarlanmış ve

bulunan absorbans değerlerinden, en küçük kareler yönteminin uygulanmasıyla $FeSO_4.7H_2O$ standart eğrisi çizilmiş ve regresyon denklemi elde edilmiştir.



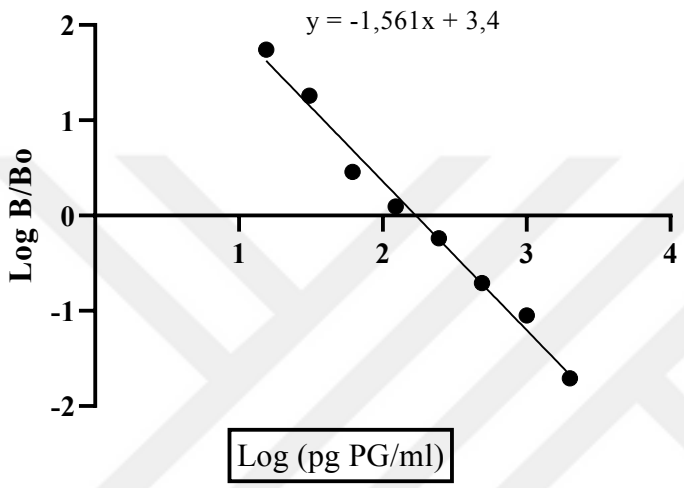
Şekil 3-4: $FeSO_4.7H_2O$ standart eğrisi ve regresyon denklemi

3.5.2. Antienflamatuar Aktivitenin Araştırılması

Deney, drogların COX-1 ve COX-2 enzimlerinin inhibisyonu yoluyla prostaglandin sentezini engellemesi esasına dayanır. Siklooksijenaz I ve II enzimleri araşidonik asitten prostaglandin H2 (PGH_2) oluşumunu sağlayarak enflamasyon oluşumunu sağlar. Deneyde Prostaglandin H2'nin kalay klorür (SnCl2) tarafından indirgenmesi sonucu oluşan $PGF_{2\alpha}$ ölçülmektedir. Çalışmada COX Enzyme immunoassay (EIA) kit (Cayman Europe) ile çalışılmış olup kitte yazılan deney basamakları uygulanmıştır. 160 µl 5 mM EDTA ve 2 mM fenol içeren 0.1 M Tris-HCl tamponu (pH 8.0), 10 µl COX-1 veya COX-2 enzimleri ve 10 µl hem'den oluşan karışımın üzerine 20 mg/ml konsantrasyonda 10 µl ekstre ilave edilmiştir. 10 dk 37ºC'de inkübe edilen karışıma, 10 µl substrat olarak kullanılan 100 µM araşidonik asit ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır. 2 dk sonra reaksiyon 1 M HCl'de çözünen doymuş stannous klorür çözeltisinin (PGH_2'i $PGF_{2\alpha}$'a indirger) ilavesiyle durdurulmuştur. Ellman ayıracı ilavesinden sonra oluşan rengin absorbansı 412 nm'de ölçülmüştür. Prostaglandin standart eğrisi çizilmiş ve regresyon denklemi elde edilerek oluşan $PGF_{2\alpha}$ miktarı hesaplanmıştır.

- **Prostaglandin Standart Eğrisinin Çizilmesi**

Prostaglandin (PG) standart eğri denkleminin elde edilmesi için önce kit içerisinde verilen PG standardı 1 ml ELISA tamponunda çözülmüş ve stok çözeltisi (10 ng/ml) hazırlanmıştır. Bu çözeltinin ELISA tamponu ile seyreltilmesiyle 2.000 pg/ml, 1.000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml, 31.3 pg/ml ve 15.6 pg/ml konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmıştır. Çözeltilere ELISA metodu uygulandıktan sonra oluşan renklerin absorbansları 412 nm'de ölçülmüş ve en küçük kareler yöntemi ile PG standart eğrisi çizilmiştir ve regresyon denklemi elde edilmiştir.



Şekil 3-5: Prostaglandin standart eğrisi

3.5.3. Anjiotensin Dönüştürücü Enzim (ACE) İnhibitörü Etkisinin Araştırılması

ACE inhibisyon analizi Shalaby metodundan yararlanılarak spektofotomerik olarak tayin edilmiştir (Shalaby ve ark. 2006). Anjiotensin dönüştürücü enzim (Angiotensin Converting Enzyme from rabbit lung, Sigma A6778-2UN), substrat olarak FAPGG (N- [3-(2-Furil)akriloil]-L-fenilalaninil-glisil-glisin, Sigma F7131-100MG), hidroklorik asit, sodyum klorür, tris-tampon kimyasalları (Tris Hydroxymethyl Aminomethane, Merck 108387.0500), organik madde olarak merkapto metil propanil prolin (kaptopril) kullanılmıştır.

FAPGG ⟶ FAP + Gly-Gly

ACE aktivitesi, *in vitro* koşullarda substrat olarak kullanılan FAPGG (N-[3-(2-furil)-acryloil]-L-phenylalanine-glycyl-glycine)'nin FAP'e dönüştürmesine bağlı olarak FAPGG'nin 340 nm'de verdiği absorbansın zamanla azalması incelenerek ölçülmüştür. Ekstrenin 5 µl'si 5 µl ACE (1U) ile 37ºC'de 15 dk inkübe edildikten sonra, üzerlerine 100 µl FAPGG (0.9 mM) substratı eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Başlangıçta ve 10

dk sonunda 340 nm'deki absorbans değerleri kaydedilmiştir. Deneyler 3 kez tekrarlanmıştır. Yapılan çalışmada farklı konsantrasyonda hazırlanan örneklerin ACE üzerine inhibisiyon değerleri aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır.

% İnhibisyon = [1-(Δ Aörnek/Δ Akontrol)] x 100

Δ Akontrol : Kontrol çözeltisinin 340 nm'de köre karşı ilk 5 dakikada okunan absorbans değeri farkı

Δ Aörnek : Numune çözeltisinin 340 nm'de köre karşı okunan ilk 5 dakikada okunan absorbans değeri farkı

4. BULGULAR

4.1. Ekstraksiyon

C. x bornmuelleri kuru yaprakları değirmende toz edildikten sonra 900 g drog Soxhlet apareyinde önce petrol eteri, ardından etanol ile muamele edilmiştir. Soxhletten alınan petrol eteri ve etanol ekstraktları ayrı ayrı rotavaporda alçak basınç altında yoğunlaştırılmıştır. Petrol eteri kuru ekstre ağırlığı 16 g, etanol ekstresi 175 g olarak tartılmıştır. Petrol eteri ekstresi %60'lık etanol ile tüketildikten sonra etanolde çözünen kısım ayırma hunisi içine alınmış, kloroform ile tüketilmiş ve kloroformda çözünen kısım kloroform ($CHCl_3$ ekstresi, 15 g); çözünmeden kalan kısım petrol eteri (PE ekstresi, 0,05 g) ekstresi olarak elde edilmiştir. Petrol eteri ve PE/kloroform ekstrelerinde flavonoit bileşik saptanmamıştır. Etanol ekstresi ise, üzerine bir miktar su eklendikten sonra ayırma hunisinde sırasıyla toluen (Tol. ekstresi, 70 g), diklorometan (DM ekstresi, 8 g) ve etil asetat (EA ekstresi, 61 g) ile tüketilmiş ve kalan sulu etanollü kısım (F ekstresi, 36 g) de dahil olmak üzere 4 fraksiyona ayrılmıştır. Bu 6 ekstre İTK plağına tatbik edilmiş ve flavonoit lekeri gözlenen Tol, DM ve EA ekstreleri sütun kromatografisi ve preparatif ince tabaka kromatografisi yöntemleri uygulanarak izolasyon gerçekleştirilmiştir.

C. x bornmuelleri kuru ham meyveleri değirmende toz edildikten sonra 900 g drog Soxhlet apareyinde önce petrol eteri, ardından etanol ile muamele edilmiştir. Soxhletten alınan petrol eteri ve etanol ekstreleri ayrı ayrı rotavaporda alçak basınç altında yoğunlaştırılmıştır. Petrol eteri kuru ekstre ağırlığı 3 g, etanol ekstresi 31 g olarak tartılmıştır. Petrol eteri ekstresi miktarının çok az olması sebebiyle önce İTK'da kontrolü yapılmış, herhangi bir flavonoit lekesi gözlenmediği için sıvı-sıvı ekstraksiyona tabii tutulmamıştır. Etanol ekstresi ise, üzerine bir miktar su eklendikten sonra ayırma hunisinde sırasıyla toluen (Tol. ekstresi, 8 g), diklorometan (DM ekstresi, 6 g) ve etil asetat (EA ekstresi, 14 g) ile tüketilmiş ve kalan sulu etanollü kısım (Kalan EtOH ekstresi, 3 g) de dahil olmak üzere 4 fraksiyona ayrılmıştır. Bu 4 ekstre İTK plağına tatbik edilmiş ve flavonoit lekeleri gözlenen DM ve EA ekstreleri kolon

kromatografisi ve preparatif ince tabaka kromatografisi yöntemleri uygulanarak izolasyon gerçekleştirilmiştir.

Kurutulmuş ve değirmende öğütülmüş 1300 g olgun meyve sırasıyla Soxhlet apareyinde önce petrol eteri, ardından etanol ile ekstre edilmiştir. Elde edilen ekstreler rotavaporda alçak basınç altında yoğunlaştırılmıştır. Petrol eteri ekstresi 22 g, etanol ekstresi 254 g olarak tartılmıştır. Petrol eteri ekstresi için önce İTK kontrolü yapılmış, herhangi bir flavonoit lekesi gözlenmediği için sıvı-sıvı ekstraksiyona tabii tutulmamıştır. Etanol ekstresi ise, üzerine bir miktar su eklendikten sonra ayırma hunisinde sırasıyla toluen (Tol. ekstresi, 12 g), diklorometan (DM ekstresi, 7 g) ve etil asetat (EA ekstresi, 34 g) ile tüketilmiş ve kalan sulu etanollü kısım (Kalan EtOH ekstresi, 201 g) de dahil olmak üzere 4 fraksiyona ayrılmıştır. Bu 4 ekstre İTK plağına tatbik edilmiş ve flavonoit lekeleri gözlenen DM ve EA ekstreleri sütun kromatografisi ve preparatif ince tabaka kromatografisi yöntemleri uygulanarak izolasyon gerçekleştirilmiştir.

170 gr kurutulmuş çiçek metanolde perkolasyon yöntemi ile ekstre edilmiştir. 9 gr metanol ekstresi 270 gr silika gel 60 (Merck 0.2-0.5 mm) üzerinden sütun kromatografisi yöntemi ile fraksiyonlara ayrılmıştır. Sütundan önce toluen ve sonra artan polaritede toluen:etanol çözücü sistemleri geçirilmiştir. 100'er ml olarak kazanılan fraksiyonlar İTK yöntemi ile (Toluen:Aseton-2:1 ve Toluen:Aseton-1:2) kontrol edilmiş ve benzer fraksiyonlar birleştirilmiştir. İTK plaklarına uygulanan fraksiyonlarda gözlenen flavonoit lekelerinin ileri saflaştırma çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

4.2. İzolasyon

4.2.1. Yaprak Ekstresi İzolasyonu

- **Toluen ekstresi (15 g)**

Toluen ekstresinin izolasyonu için kolon kromatografisinden yararlanılmış ve stasyoner faz olarak 450 g silika jel (Silica gel 60/0.2-0.5 mm) mobil faz olarak gradient toluen $\rightarrow$ aseton $\rightarrow$ metanol çözücü sistemi kullanılmıştır. İTK'da flavonoit olduğu düşünülen maddeler kolonun metanol ile yıkandığı bölümde elde edilmiştir. Son fraksiyonlardan 5 mg kadar izole edilen madde 6-Metoksiluteolin (YT4) olarak tanımlanmıştır.

- **Diklorometan ekstresi (8 g)**

Yöntem: Kolon kromatografisi

Adsorban: Silika jel (Silica gel 60 / 0.2-0.5 mm), 500 g

Mobil faz: Gradient Toluen:Metanol (9:1) → Metanol

Birleştirilen fraksiyonlar	Elde edilen madde	Saf madde miktarı
1-3 (T:M; 9:1)		
4-22 (T:M; 8:2)		
23-41 (T:M; 7:3)	YK2 – Klorojenik asit	5,2 mg
42-61 (T:M; 6:4)		
62-71 (T:M; 5:5)		
72-82 (T:M; 4:6)		
83-98 (T:M; 3:7)		
99-110 (T:M; 2:8)		
111-123 (T:M 1:9; %100 M)		

- **Etil asetat ekstresi (16 g)**

Yöntem: Kolon kromatografisi

Adsorban: Silika jel (Silica gel 60 / 0.2-0.5 mm), 400 g

Mobil faz: Gradient diklorometan → metanol

Birleştirilen fraksiyonlar	Elde edilen madde	Saf madde miktarı
1-20 (%100 DM, DM:M; 9:1, 8:2)		
21-24 (DM:M; 7:3)	YE4 - Astragalin	2 mg
25-28 (DM:M; 6:4)	YE2 - Hiperozit	11,3 mg
	YE5 - Viteksin	2 mg
29-31 (DM:M; 6:4)		
32-37 (DM:M; 5:5)	YE10 - Şaftozit	0,8 mg
38-52 (DM:M; 5:5, 4:6, 3:7)		
53-72 (DM:M; 3:7, 2:8, 1:9)		
73-74 (%100 M)		

4.2.2. Ham Meyve Ekstresi İzolasyonu

- **Diklorometan ekstresi (6 g)**

Yöntem: Kolon kromatografisi

Adsorban: Silika jel (Silica gel 60 / 0.2-0.5 mm), 200 g

Mobil faz: Gradient toluen → etil asetat (T:EA), ardından etil asetat → metanol (EA:M)

Birleştirilen fraksiyonlar	Elde edilen madde	Saf madde miktarı
1-19 (%100 T, T:EA; 9:1, 8:2, 7:3, 6:4)		
20-23 (T:EA; 5:5)	HK1 - Kersetin	11,8 mg
24-29 (T:EA; 4:6, 3:7)		
30-43 (T:EA; 2:8, 1:9, %100 EA)		
44-48 (EA:M; 9:1, 8:2)	HK3- Hiperozit	21,5 mg
49-53 (EA:M; 7:3, 6:4)		
54-66 (EA:M; 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, %100 M)		

Kaba sütunun ardından maddelerin saflaştırması alüminyum silika jel plak ile HK1 için DM:M (9:1) ve HK3 için T:DM:M (3:3:2) çözücü sistemleri kullanılarak preparatif İTK ile sağlanmıştır.

- **Etil asetat ekstresi (14 g)**

Yöntem: Kolon kromatografisi

Adsorban: Silika jel (Silica gel 60 / 0.2-0.5 mm), 400 g

Mobil faz: Gradient diklorometan → metanol (DM:M)

Birleştirilen fraksiyonlar	Elde edilen madde	Saf madde miktarı
1-8 (%100 DM, DM:M; 9:1)		
9-21 (DM:M; 8:2, 7:3, 6:4)	HE1 - Hiperozit	
22-49 (DM:M; 5:5, 4:6, 3:7, 2:8)		
50-63 (DM:M; 1:9, %100 M)		

HE1'in HK3 ile aynı madde olduğu İTK üzerinde görüldükten sonra ileri saflaştırma işlemleri uygulanmamıştır.

4.2.3. Olgun Meyve Ekstresi İzolasyonu

- **Etil asetat ekstresi (14 g)**

Yöntem: Kolon kromatografisi

Adsorban: Silika jel (Silica gel 60 / 0.2-0.5 mm), 440 g

Mobil faz: Gradient diklorometan → metanol (DM:M)

Birleştirilen fraksiyonlar	Elde edilen madde	Saf madde miktarı
1-3 (%100 DM, DM:M; 9:1, 8:2)		
4-5 (DM:M; 7:3)	ME1 - Kersetin	5,1 mg
6-7 (DM:M; 7:3)		
8-15 (DM:M; 6:4, 5:5)	ME3-Rutin	1,3 mg
	ME5-Hiperozit	
16-39 (DM:M; 5:5, 4:6, 3:7,2:8, 9:1, %100 M)		

8-15 nolu fraksiyon sephadex kolona metanol kolona yüklenmiş, hiperozit ve rutin bu şekilde elde edilmiştir. ME5 isimli maddenin şahitle İTK kontrolü ile hiperozit olduğu anlaşılınca ileri saflaştırma işlemleri uygulanmamıştır.

DM ekstresinin miktarı az ve İTK plağında EA ekstresi ile çok benzer sonuç verdiği için izolasyon uygulanmamıştır.

4.2.4. Çiçek Ekstresi İzolasyonu

- **Metanol ekstresi (9 g)**

Yöntem: Kolon kromatografisi

Adsorban: Silika jel (Silica gel 60 / 0.2-0.5 mm), 270 g

Mobil faz: Gradient toluen → etanol (Tol:EtOH)

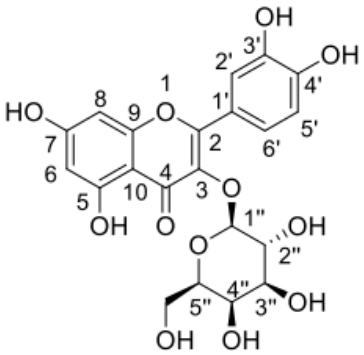
Birleştirilen fraksiyonlar	Elde edilen madde	Saf madde miktarı
1-15 (%100 Tol)		
16 (Tol:EtOH; 4:1)		
17-23(Tol:EtOH; 4:1)		
24-25 (Tol:EtOH; 4:1)		
26-28(Tol:EtOH; 4:2)	ÇM3-Kemferol	7 mg
29-30(Tol:EtOH; 4:2)	ÇM3-Kemferol	2 mg
31(Tol:EtOH; 4:2)		
32-37(Tol:EtOH; 4:3)	ÇM5-Kersetin	3,5 mg
38-39(Tol:EtOH; 4:3)		

40(Tol:EtOH; 4:3)	ÇM 12- Spireozit ÇM13-Hiperozit	
41-47(Tol:EtOH; 4:4)	ÇM 12- Spireozit ÇM13-Hiperozit	
48-56(Tol:EtOH; 4:4)	ÇM 12- Spireozit ÇM13-Hiperozit	Toplam 9 mg Toplam: 22 mg
57-58(Tol:EtOH; 4:4)		
59-65(Tol:EtOH; 3:4)		
66-74(Tol:EtOH; 3:4)		
75-80(Tol:EtOH; 2:4)		
81-91(Tol:EtOH; 2:4)	ÇM28-Rutin	5 mg
92(Tol:EtOH; 2:4)		
93-94(Tol:EtOH; 2:4)		
95-99(Tol:EtOH; 1:4)		
100-110(Tol:EtOH; 1:4)		
111-126(Tol:EtOH; 1:4)		
127-140(%100 EtOH)		
141-143(%100 EtOH)		

26-30 nolu fraksiyonlarda bulunan kemferol, 32-37 nolu fraksiyonlarda bulunan kersetin, 40-56 nolu fraksiyonlarda bulunan hiperozit ve spireozit ile 81-91 nolu fraksiyonlarda bulunan rutin preparatif İTK yöntemi ile saflaştırılmıştır.

4.3. İzole Edilen Bileşiklerin Yapı Tayinleri

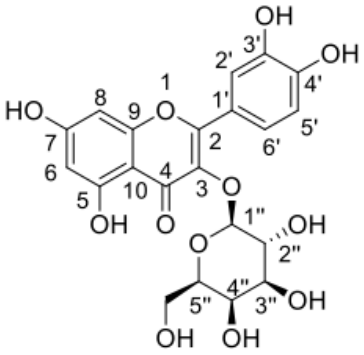
4.3.1. Hiperozit (YE2-GM2)



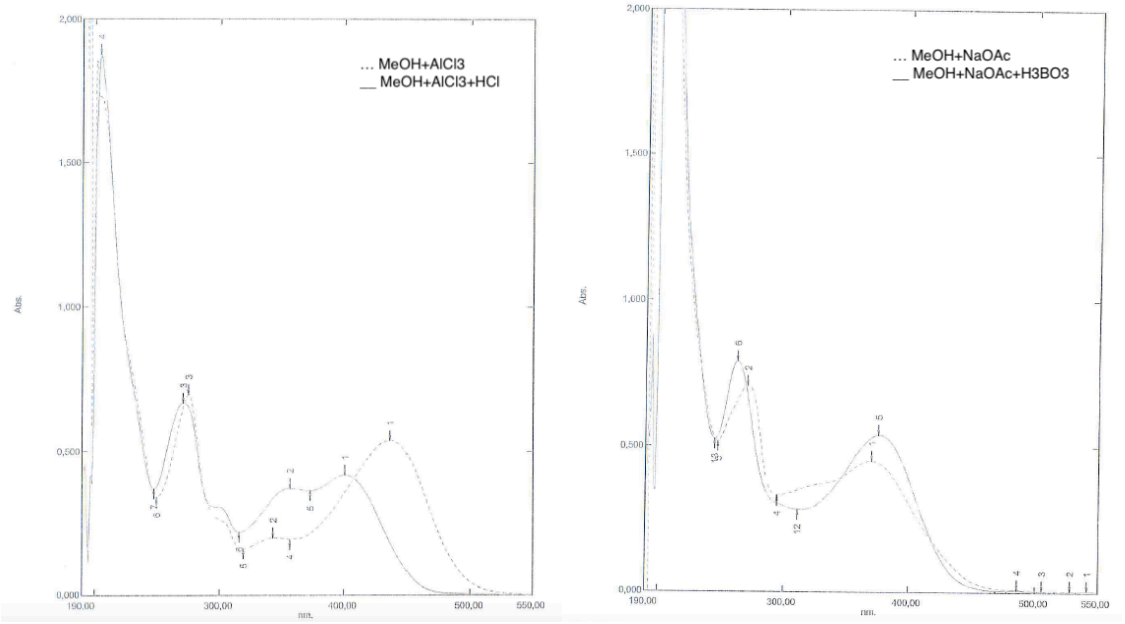
Hiperozit (Kersetin-3-O-galaktozit)

UV spektrum verileri

Kullanılan çözücü ve kaydırma reaktifleri	**Bant II (λ_{max} nm)**	**Bant I (λ_{max} nm)**	**Yorum**
MeOH	259	356	Flavonol
MeOH+NaOMe	273	331, 404 ↑	4'-OH, 7-OH
MeOH+$AlCI_3$	275	304, 343, 437	5-OH
MeOH+$AlCI_3$+HCI	271	301, 357, 401	Orto di- OH var
MeOH+NaOAc	271	329, 370	7-OH
MeOH+NaOAc+H_3BO_3	263	376	Orto di- OH var



Hiperozit



Şekil 4-1: Hiperozit'e ait kaydırma belirteçleri ile çekilmiş UV spektrumu

UV değerlerinin analizi

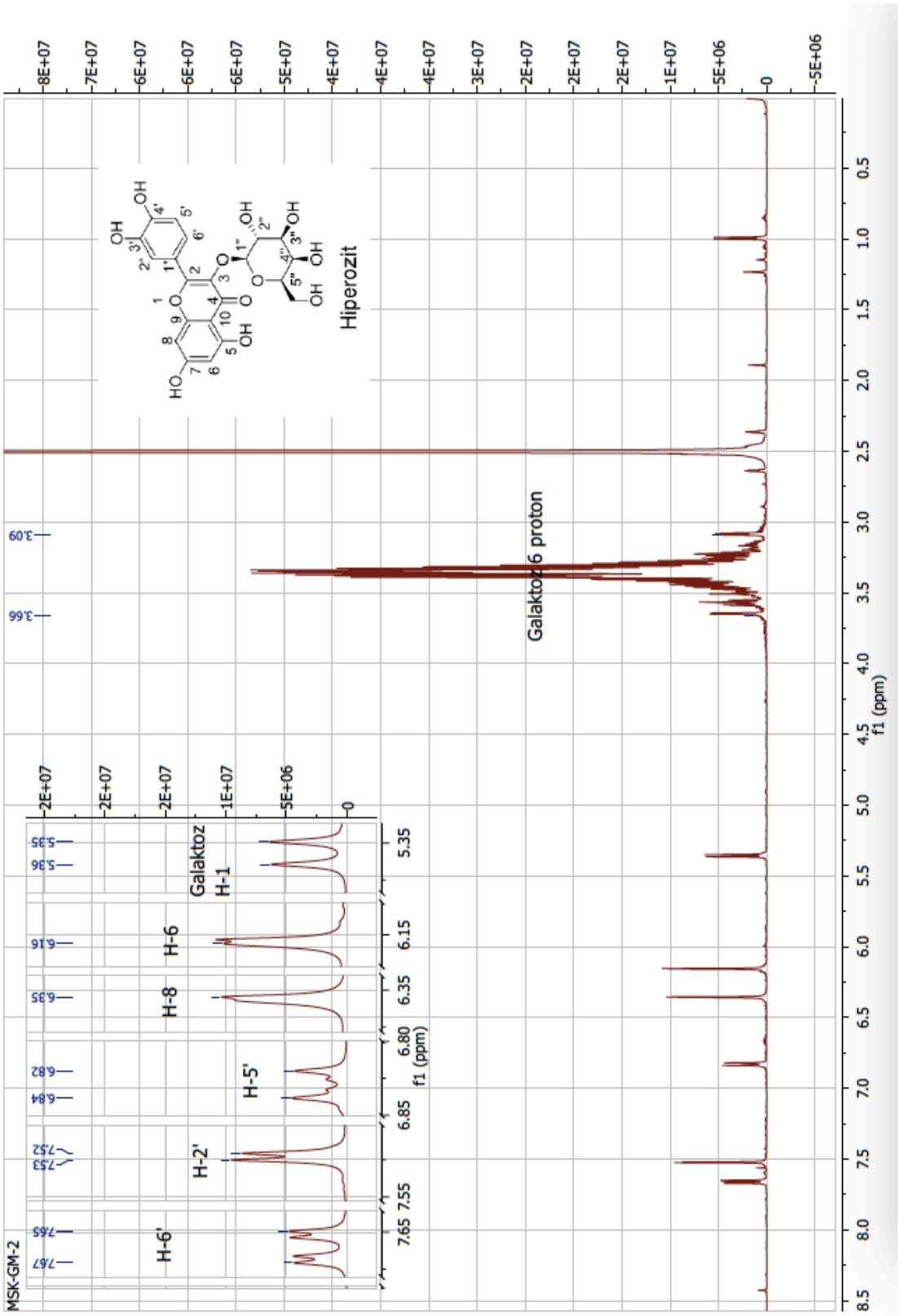
- Moleküle ait MeOH spektrumunda 356 nm'de çıkan Bant I, molekülde 3-(O) fonksiyonunun bulunduğunu ve büyük ihtimalle bir flavonol olduğunu gösterir.

- NaOMe spektrumunda absorpsiyon şiddetinde bir artışla beraber 48 nm'lik bir batokromik kayma gözlenmesi, yapının C-4' pozisyonunda OH'in serbest olduğunu gösterir. Bir süre beklendikten sonra çekilen NaOMe spektrumunda herhangi bir bozunma olmaması, C-3 pozisyonunda OH'in kapalı olduğunu gösterir (Şeker, metoksi vb. sübstitüentler olabilir). Spektrumda görülen 331 nm'deki bant 7 konumunda OH grubunun olabileceğine işaret eder.
- $AlCl_3$ spektrumuna ait Bant I'in, $AlCl_3$/HCl spektrumunun Bant I'i ile kıyaslandığında 36 nm'lik bir hipsokromik kayma göstermesi, bileşiğin B halkasında bir orto dihidroksi olduğunu gösterir. MeOH Bant I'ine göre $AlCl_3$ spektrumunun Bant I'inde görülen bir batokromik kaymaya ilaveten, HCl eklenmesi ile spektrumun MeOH spektrumundan farklı olması 5-OH'in serbest olduğuna işaret eder.
- $AlCl_3$/HCl spektrumuna ait Bant I'in MeOH spektrumuna ait Bant I'e göre 45 nm'lik bir batokromik kayma yaptığı gözlenmiştir, bu durum molekülün 5-OH ve 3-OR yapısında bir flavonol olduğuna işaret eder.
- Molekülün NaOAc spektrumuna ait Bant II'nin, MeOH Bant II'sine göre 12 nm'lik bir batokromik kayma göstermesi, C-7 konumundaki OH grubunun serbest olduğunu gösterir.
- NaOAc/H_3BO_3 ve MeOH spektrumlarının Bant I değerlerine bakıldığında; MeOH'ün Bant I'inin, NaOAc/H_3BO_3 varlığında 20 nm'lik bir batokromik kayma yapması, flavonoitin B halkasında orto dihidroksi gruplarının olduğunu gösterir.

Bu veriler Hiperozit'in literatürde yer alan UV değerleri ile uygunluk göstermiştir (Mabry ve ark. 1970).

^{1}H-NMR verileri (DMSO-d6, 500 MHz)

Pozisyon	**H**	**δ H ppm, J Hz**
2	-	
3	-	
4	-	
5	-	
6	H-6	6.16 (d, j=2.0 Hz, 1 H)
7	-	
8	H-8	6.35 (d, j=2.0 Hz, 1 H)
9	-	
10	-	
1’	-	
2’	H-2’	7.52(d, j=2.0 Hz, 1 H)
3’	-	
4’	-	
5’	H-5’	6.82 (d, j=8.0 Hz, 1 H)
6’	H-6’	7.65 (dd, j= 2.0 ve 8.0 Hz, 1H)
Galaktozil	H-1’’	5.35 (d, j=7.0 Hz, 1 H)
Galaktozil	6 proton (H-2’’,3’’,4’’,5’’,2H-6’’)	3.08-3.66 (m, 6H)



Şekil 4-2: Hiperozit'e ait DMSO-d6 ile çekilmiş ^{1}H-NMR spektrumu

^{1}H-NMR spektrumu yorumu

- 6.16 ve 6.35 ppm'de çıkan dubletler A halkasında bulunan H-6 ve H-8 protonlarının j değeri 2 Hz olan meta etkileşmesinden kaynaklanmaktadır.
- 7.65 ppm'de çıkan dubletin dubleti H-6' protonunun H-2' protonu ile yaptığı meta etkileşimi sonucu verdiği j değeri 2.0 Hz olan dublet ile 5' protonu ile yaptığı orto etkileşimi sonucu verdiği j değeri 8.0 Hz olan dublettir.
- 7.52 ppm'de çıkan dublet H-2' protonunun H-6' protonu ile yaptığı meta etkileşmesi sonucu verdiği j değeri 2.0 Hz olan dublettir.
- 6.82 ppm'de çıkan dublet H-5' protonunun H-6' protonu ile yaptığı orto etkileşmesi sonucu verdiği j değeri 8.0 Hz olan dublettir.
- 5.35 ppm'de çıkan j değeri 7.0 Hz olan dublet galaktozun 1'' protonuna aittir ve şekerin 3 konumundaki C atomundan β-glikozit bağı oluşturduğunu göstermektedir.
- Galaktozun H-2'', H-3'', H-4'', H-5'' ve H-6'' (2H) protonları 3.08 -3.66 ppm'de multiplet olarak çıkmıştır.

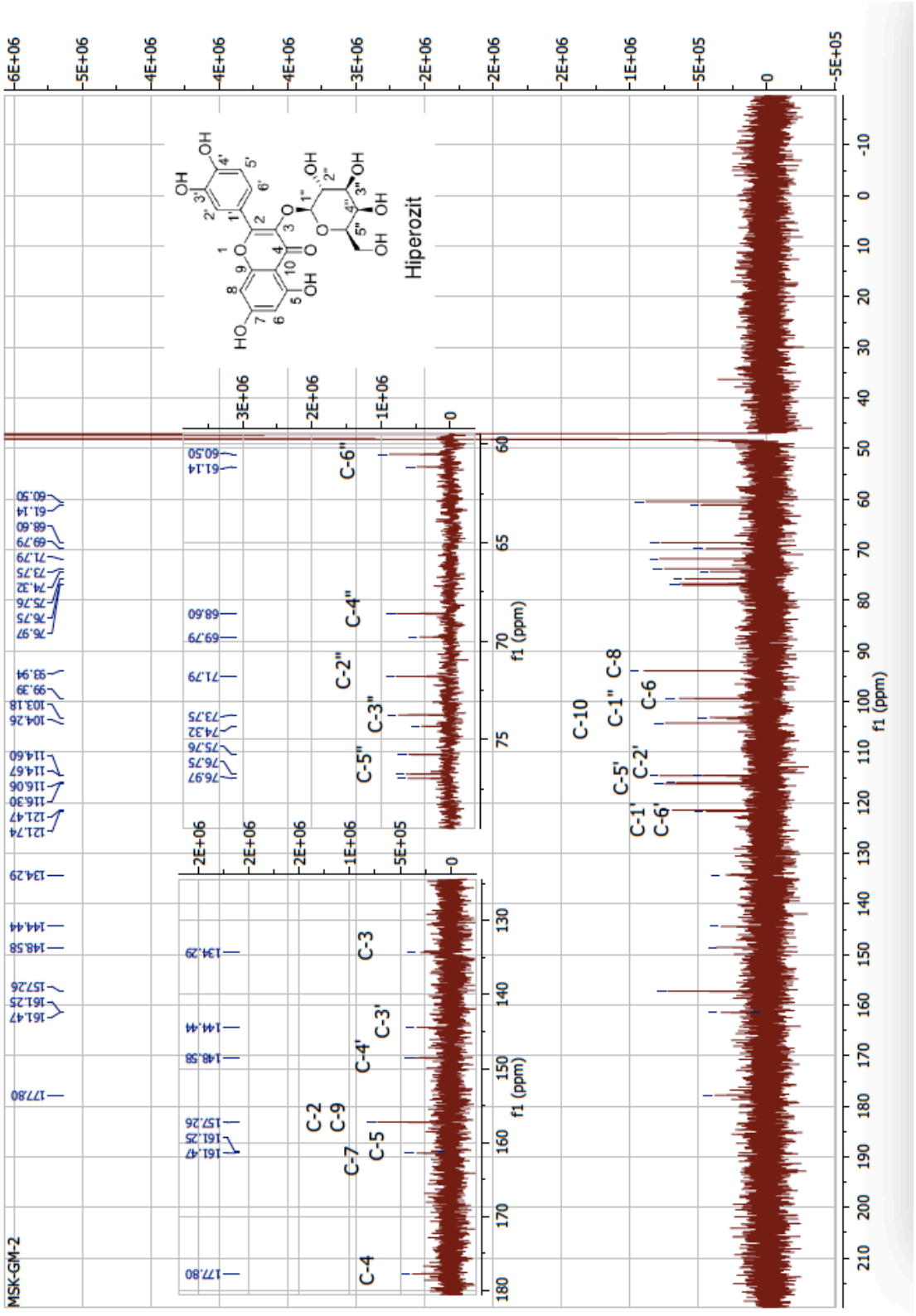
Spektrum değerleri Hiperozit'in literatürdeki nmr verileri ile uygunluk göstermektedir (Long ve ark. 2020).

^{13}C-NMR verileri (CD_3OD, 125 MHz)

Pozisyon	**δ_c (ppm)**
2	157.2
3	134.2
4	177.8
5	161.2
6	99.3
7	161.4
8	93.9
9	157.2
10	104.2
1'	121.4
2'	114.6
3'	144.4

4’	148.5
5’	116.0
6’	121.4
Galaktoz	
1’’	103.1
2’’	71.7
3’’	73.7
4’’	68.6
5’’	76.7
6’’	60.5

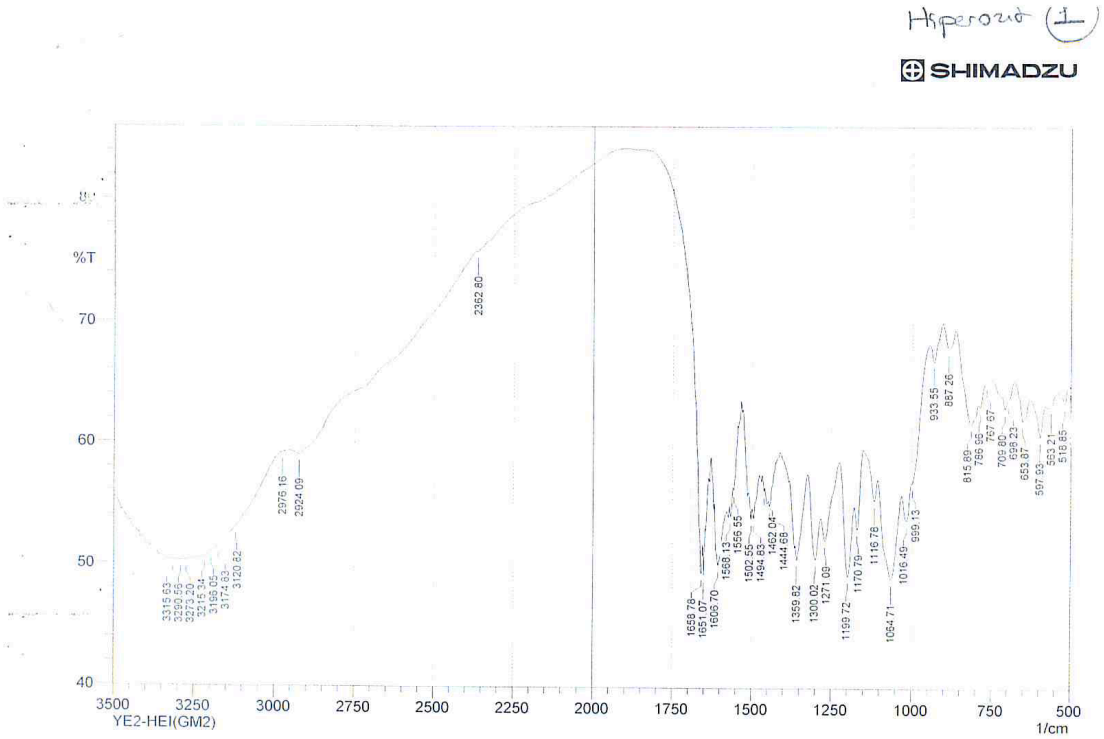
^{13}C-NMR değerleri Hiperozit’in literatür verileri ile uygunluk göstermiştir (Sukito ve Tachibana 2014).



Şekil 4-3: Hiperozit'e ait CD_3OD ile çekilmiş ^{13}C-NMR spektrumu

IR spektrum verileri (KBr)

3315.63-3120.82 (OH), 2976.16, 2924.09 (C-H), 1656.78, 1606.70 (C=O), 1502.55, 1462.04 (C=C), 1192.72, 1170.79, 1116.78, 1064.49, 933.55, 698.87cm^{-1}



	Peak	Intensity	Corr. Intensity	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Area
1	501.49	64.709	0.14	503.42	499.56	0.727	0.002
2	518.85	63.407	1.215	540.07	505.35	6.703	0.112
3	563.21	63.137	0.283	569	542	5.286	0.023
4	597.93	60.672	2.798	628.79	580.57	9.859	0.361
5	653.87	61.971	2.588	677.01	630.72	9.203	0.395
6	698.23	63.654	0.154	700.16	678.94	4.047	0.02
7	709.8	62.968	0.852	717.52	700.16	3.439	0.049
8	767.67	65.041	0.071	769.6	752.24	3.222	0.006
9	786.96	63.101	0.651	792.74	769.6	4.474	0.036
10	815.89	61.705	3.457	864.11	794.67	13.41	0.975
11	887.26	67.928	1.848	904.61	866.04	6.305	0.264
12	933.55	66.802	1.985	945.12	906.54	6.414	0.24
13	999.13	56.779	0.879	1002.98	947.05	11.358	0.154
14	1016.49	53.743	2.652	1031.92	1002.98	7.55	0.353
15	1064.71	48.937	7.407	1105.21	1033.85	20.371	2.625
16	1116.78	55.373	2.3	1151.5	1107.14	10.641	0.253
17	1170.79	53.024	3.274	1178.51	1153.43	6.392	0.334
18	1199.72	49.145	7.349	1224.8	1180.44	12.31	1.353
19	1271.09	52.084	2.812	1282.66	1226.73	14.531	0.579
20	1300.02	50.575	4.759	1323.17	1284.59	10.678	0.835
21	1359.82	50.511	7.787	1409.96	1325.1	21.946	2.14
22	1444.68	54.882	0.906	1448.54	1411.89	8.812	0.047
23	1462.04	56.124	0.579	1467.83	1460.11	1.897	0.012
24	1494.83	53.876	1.289	1498.69	1477.47	5.406	0.094
25	1502.55	53.838	1.071	1512.19	1500.62	3.004	0.032
26	1556.55	56.2	1.368	1560.41	1541.12	4.411	0.064
27	1568.13	54.027	1.189	1570.06	1560.41	2.508	0.068
28	1606.7	50.051	1.393	1610.56	1579.7	8.687	0.145
29	1651.07	49.228	3.731	1654.92	1637.56	4.735	0.191
30	1658.78	49.358	3.098	1826.59	1654.92	21.798	0.156
31	2362.8	75.748	0.047	2364.73	2183.42	19.545	0.002
32	2924.09	58.986	1.184	2954.95	2366.66	104.613	2.516
33	2976.16	59.155	0.037	2980.02	2964.59	3.511	0.002

Hiperozit (2)

SHIMADZU

34	3120.82	52.988	0.106	3122.75	2987.74	34.132	0.139
35	3174.83	51.323	0.15	3178.69	3122.75	15.84	0.05
36	3196.05	50.931	0.057	3197.98	3186.4	3.381	0.004
37	3215.34	50.582	0.037	3217.27	3197.98	5.678	0.004
38	3273.2	50.227	0.123	3277.06	3265.49	3.454	0.007
39	3290.56	50.232	0.043	3292.49	3278.99	4.032	0.004
40	3315.63	50.285	0.06	3327.21	3309.85	5.176	0.004

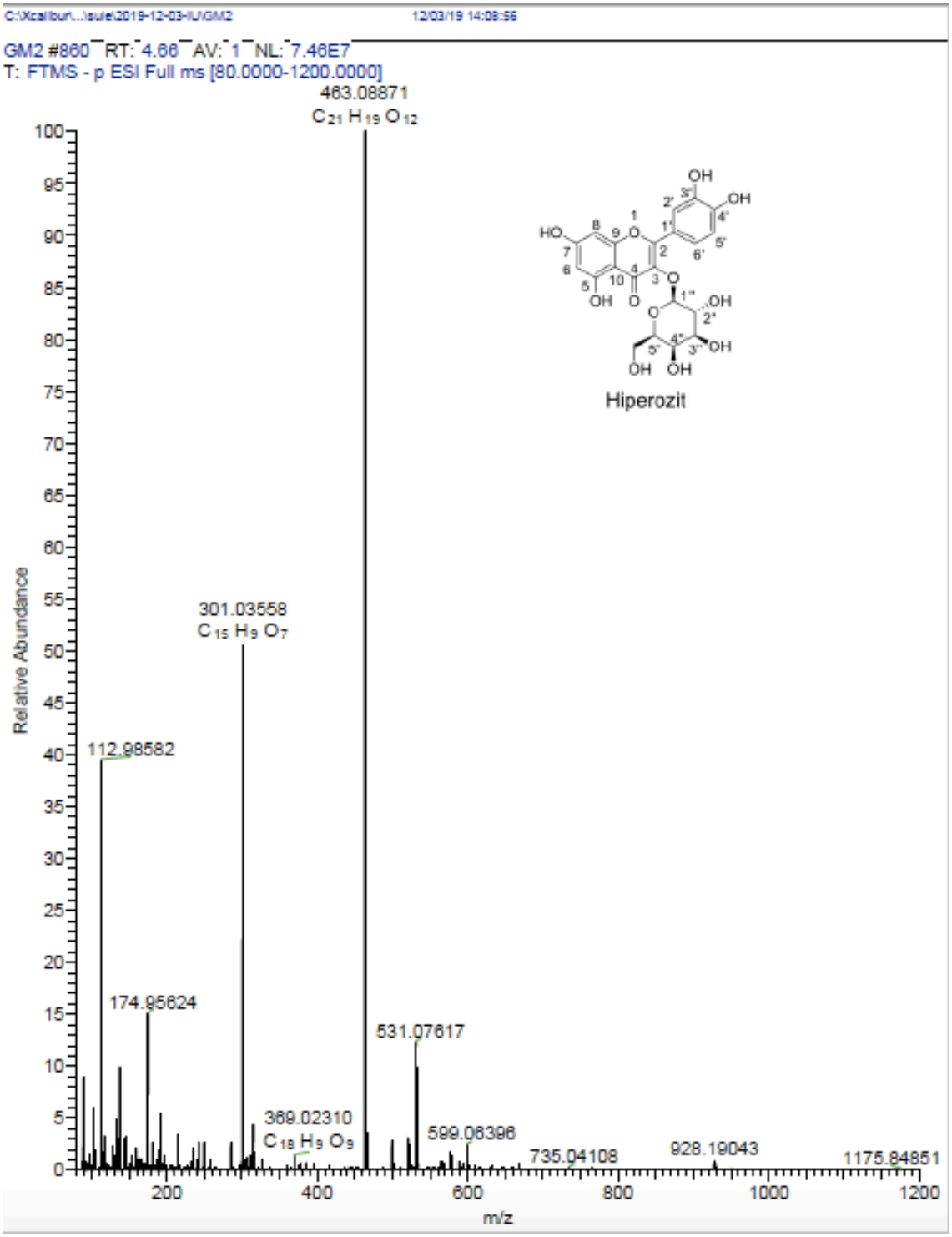
Comment;
YE2-HEI(GM2)

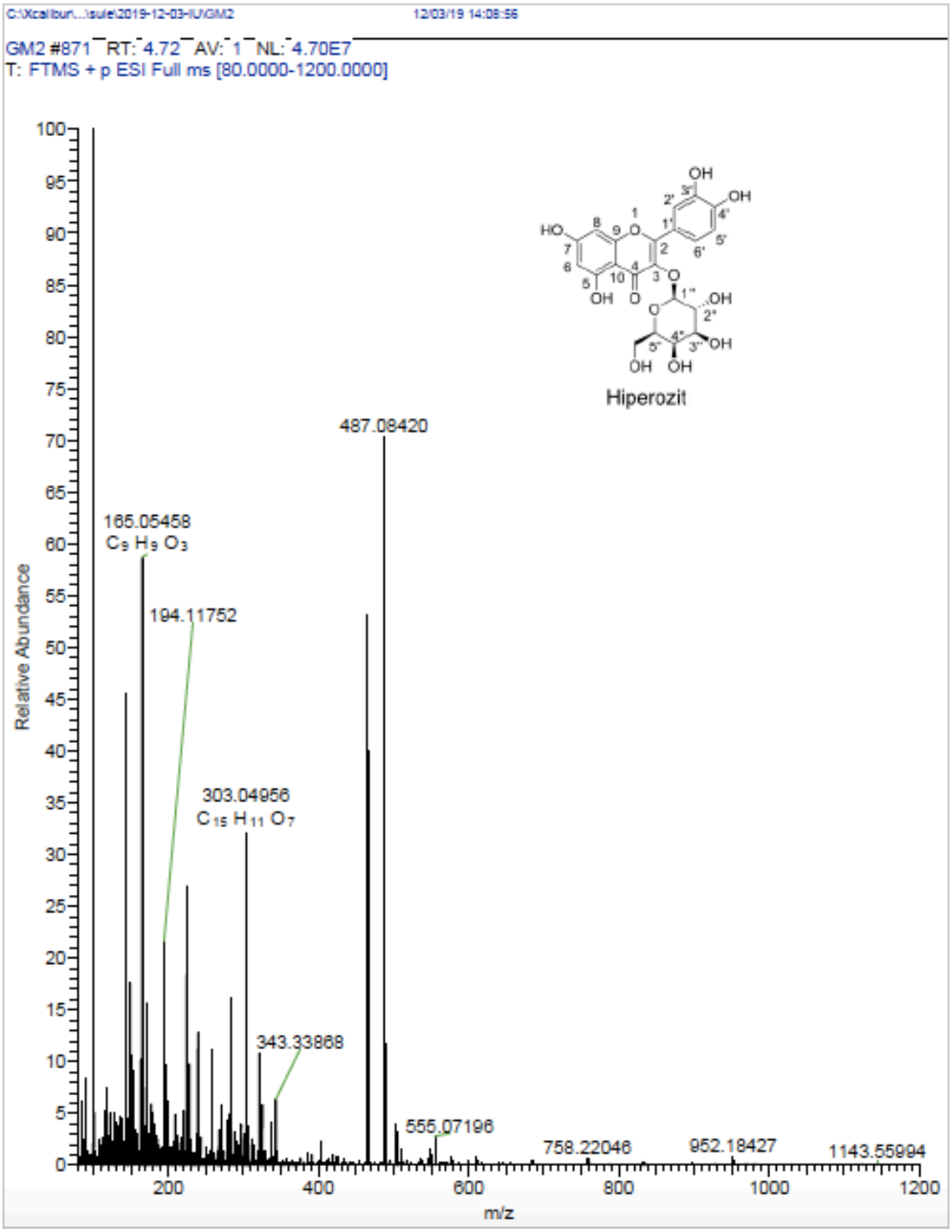
Date/Time; 1/8/2020 12:42:33 PM
No. of Scans; 10
Resolution; 4 [1/cm]
Apodization; Happ-Genzel
User; Administrator

Şekil 4-4: Hiperozit'e ait KBr ile çekilmiş IR spektrumu

Kütle spektrumu verileri

Bileşiğin molekül ağırlığı (C_{21} H_{20} O_{12}) 464.38 g/mol iken negatif modda bir protonun kopmuş iyonu spektrumda 463.0887 g/mol (C_{21} H_{19} O_{12}) olarak görüldü. Glikozitten şeker (galaktoz) kopması ile oluşan aglikona ait parçalanma iyonu (C_{15} H_{17} O_7) pozitif modda 303.0449 g/mol iken negatif modda 301.0355 g/mol olarak görüldü.





Şekil 4-5: Hiperozit'e ait kütle spektrumu

İnce tabaka kromatografisi verileri

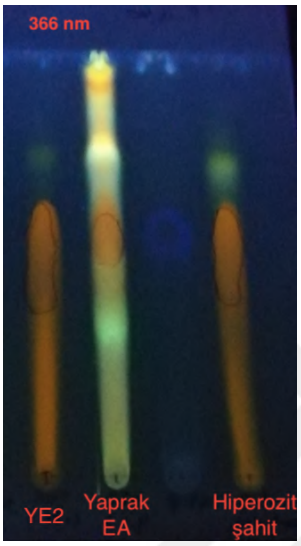
Gün ışığı: Sarı

UV – 254 nm: Mor

UV – 366 nm: Mor

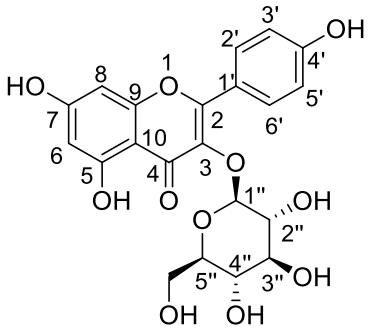
UV (+NA belirteci) - 366 nm: Turuncu

Maddenin şahit Hiperozit ile yapılan İTK analizi yapısını doğruladı.



Şekil 4-6: Maddenin şahit Hiperozit ile 366 nm dalga boyunda NA belirteci ile renklendirilmiş İTK görüntüsü (Mobil faz: Toluen:Aseton (1:4))

4.3.2. Astragalin (YE4-GM3)



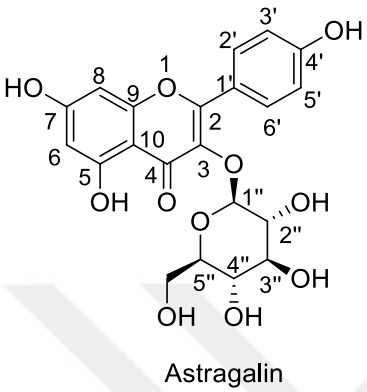
Astragalin

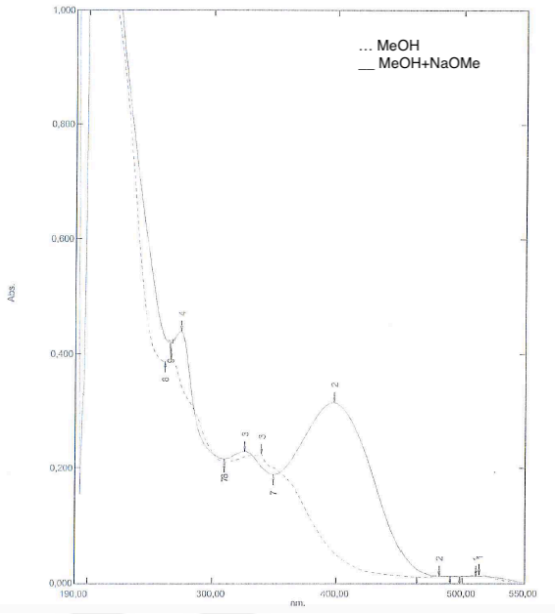
(Kempferol-3-O-glukozit)

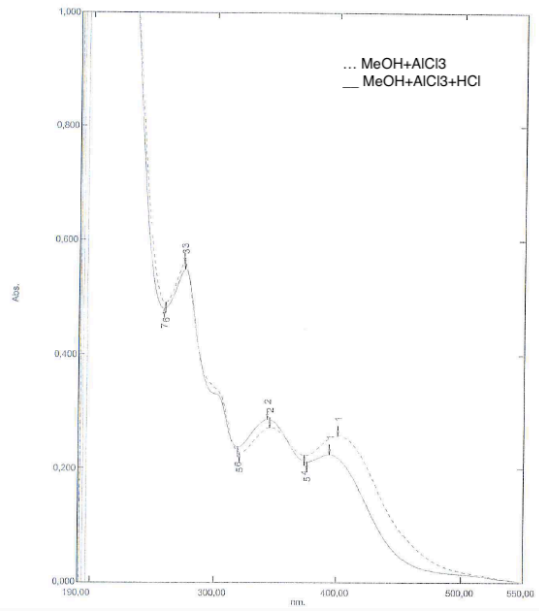
UV spektrum verileri

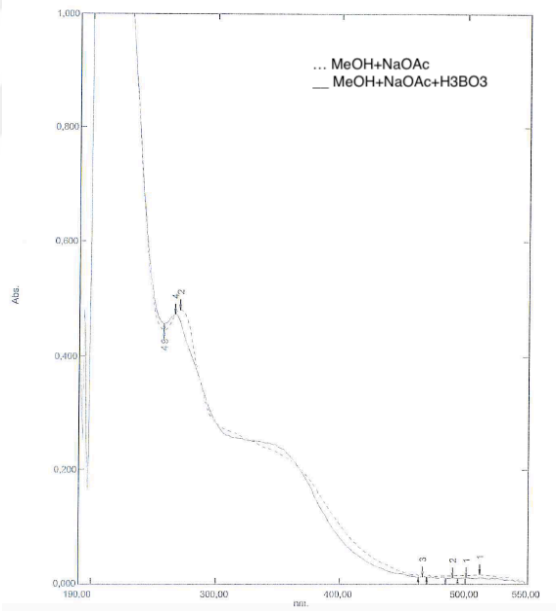
Kullanılan çözücü ve kaydırma reaktifleri	Bant II (λ_{max} nm)	Bant I (λ_{max} nm)	Yorum
MeOH	267	340	3 konumu kapalı

MeOH+NaOMe	275	326, 398↑	4’-OH, 7-OH
MeOH+$AlCI_3$	275	304, 345, 401	5-OH
MeOH+$AlCI_3$+HCI	276	306, 343, 394	Orto di-OH yok
MeOH+NaOAc	271	348	7-OH
MeOH+NaOAc+H_3BO_3	267	346	Orto di_OH yok









Şekil 4-7: Astragalin'e ait kaydırma belirteçleri ile çekilmiş UV spektrumu

UV değerlerinin analizi

- Moleküle ait MeOH spektrumunun Bant I değerinin 340 nm'de çıkması yapının muhtemelen 3 konumu kapalı bir flavonol olabileceğini gösterir.

- Molekülün NaOMe spektrumuna bakıldığında, absorpsiyon şiddetinde bir artışla beraber 58 nm'lik bir batokromik kayma, yapının C-4' pozisyonunda OH'in serbest olduğuna işaret eder. Ve bir süre sonra çekilen NaOMe spektrumunda bir bozunma

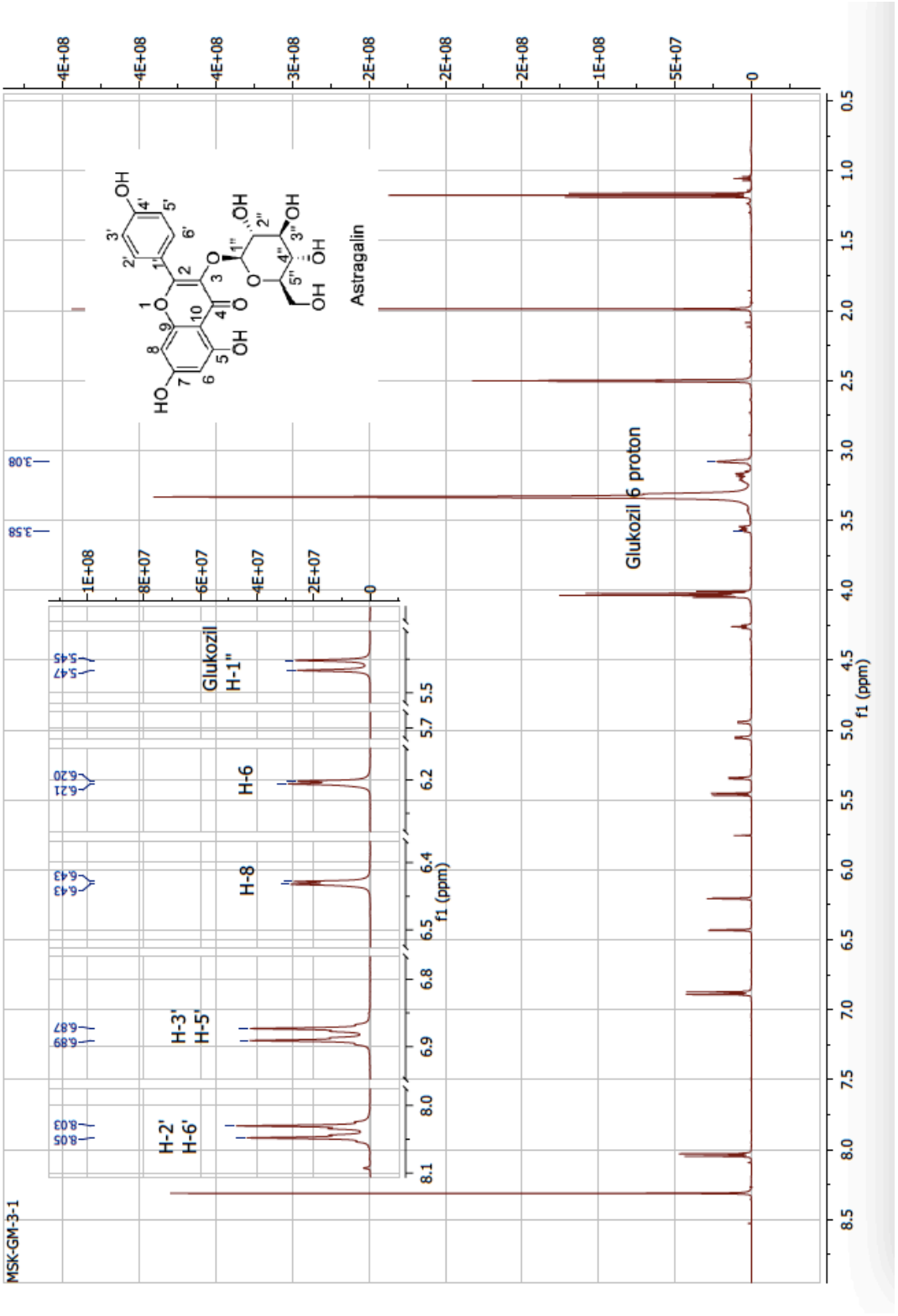
olmaması, C-3'teki OH'in serbest olmadığını gösterir (Şeker, metoksi vb. sübstitüentler bağlı olabilir).

- $AlCl_3$ spektrumuna ait Bant I'in, $AlCl_3$/HCl spektrumunun Bant I'i ile kıyaslandığında 7 nm'lik bir hipsokromik kayma göstermesi, bileşiğin B halkasında bir orto dihidroksi grubunun olmadığını gösterir. MeOH Bant I'ine göre $AlCl_3$ spektrumunun Bant I'in de gözlenen bir batokromik kayma ve HCl ilavesi ile alınan spektrumun MeOH spektrumundan farklı olması 5-OH'in serbest olduğuna işaret eder.
- Molekülün NaOAc spektrumuna ait Bant II'nin, MeOH Bant II'sine göre 4 nm'lik bir batokromik kayma göstermesi, C-7'deki OH grubunun serbest olduğunu gösterir.
- NaOAc/H_3BO_3 ve MeOH spektrumlarının Bant I değerleri karşılaştırıldığında belirgin bir değişiklik gözlenmemesi, flavonoitin B halkasında orto dihidroksi gruplarının olmadığını gösterir.

Bu değerler Astragalin'in litertürdeki UV değerleri ile uygunluk göstermiştir (Nowak ve Krzaczek 1994).

^{1}H-NMR değerleri (CD_3 OD, 500 MHz)

Pozisyon	**H**	**δ H ppm, J Hz**
2	-	
3	-	
4	-	
5	-	
6	H-6	6.20 (d, J=2.0Hz, 1H)
7	-	
8	H-8	6.43 (d, J=2.0Hz, 1H)
9	-	
10	-	
1'	-	
2', 6'	H-2', H-6'	8.04 (d, J=8.0Hz, 2H)
3', 5'	H-3', H-5'	6.88 (d, J=8.0Hz, 2H)
4'	-	
Glukozil	H-1''	5.46 (d, J=8.0Hz,1H)
Glukozil	6 proton (H-2'',3'',4'',5'',2H-6'')	3.08-3.58 (m, 6H)



Şekil 4-8: Astragalin'e ait CD_3OD ile çekilmiş ^{1}H-NMR spektrumu

^{1}H-NMR spektrumu yorumu

- 6.20 ve 6.43 ppm'de çıkan dubletler A halkasında bulunan H-6 ve H-8 protonlarının meta etkileşmesinden kaynaklanmaktadır.
- 8.04 ve 6.88 ppm'de 2H'lik aşağı alanda çıkan pikler, B halkası 1,4-disübstitüe (p-sübstitüe) bir flavonoit olduğunu gösterir. Bu pikler aynı kimyasal çevreye sahip olup H-6' ve H-2' ile H-3' ve H-5' protonlarına aittir ve aralarında orto etkileşimleri görülür.
- 5.46 ppm'de j değeri 8 Hz plan 1H'lik dublet glukozun 1'' protonuna aittir ve şekerin 3. konumdaki OH üzerinden β-glikozit bağı oluşturduğunu göstermektedir.
- 3.11-3.74 ppm arasında görülen multiplet glukozun 6H'a aittir. (H-2'',3'',4'',5'',2H-6'')

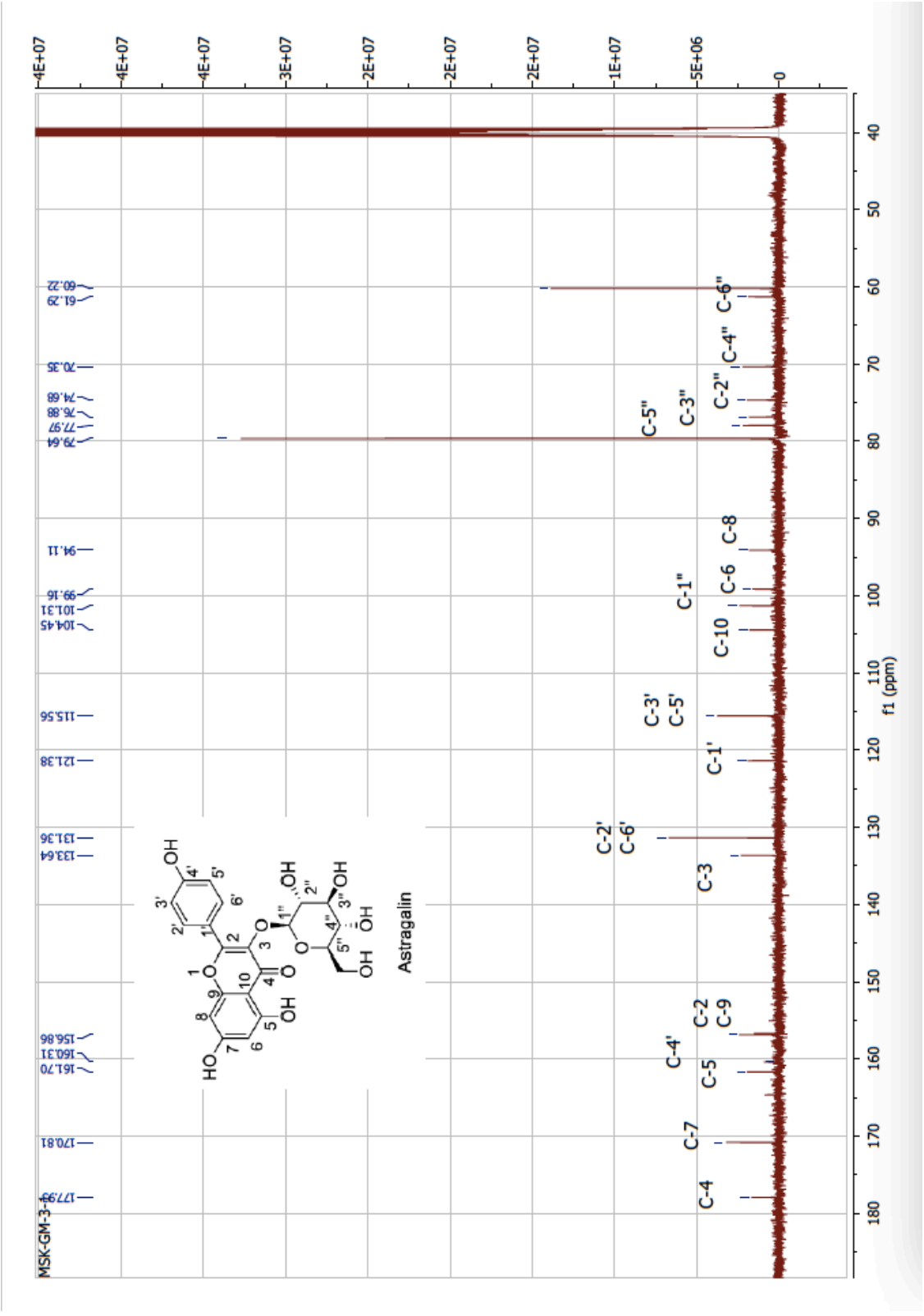
^{1}H-NMRdeğerleri literatür ile uygunluk göstermiştir (Nowak ve Krzaczek 1994).

^{13}C-NMR değerleri (DMSO-d6, 125 MHz)

Pozisyon	**δ_{c} (ppm)**
2	156.8
3	133.6
4	177.9
5	161.7
6	99.1
7	170.9
8	94.1
9	156.8
10	104.4
1'	121.3
2'	131.3
3'	115.5
4'	160.3
5'	115.5
6'	131.3
Glukoz	
1''	101.3
2''	74.6

3’’	76.8
4’’	70.3
5’’	77.9
6’’	61.29

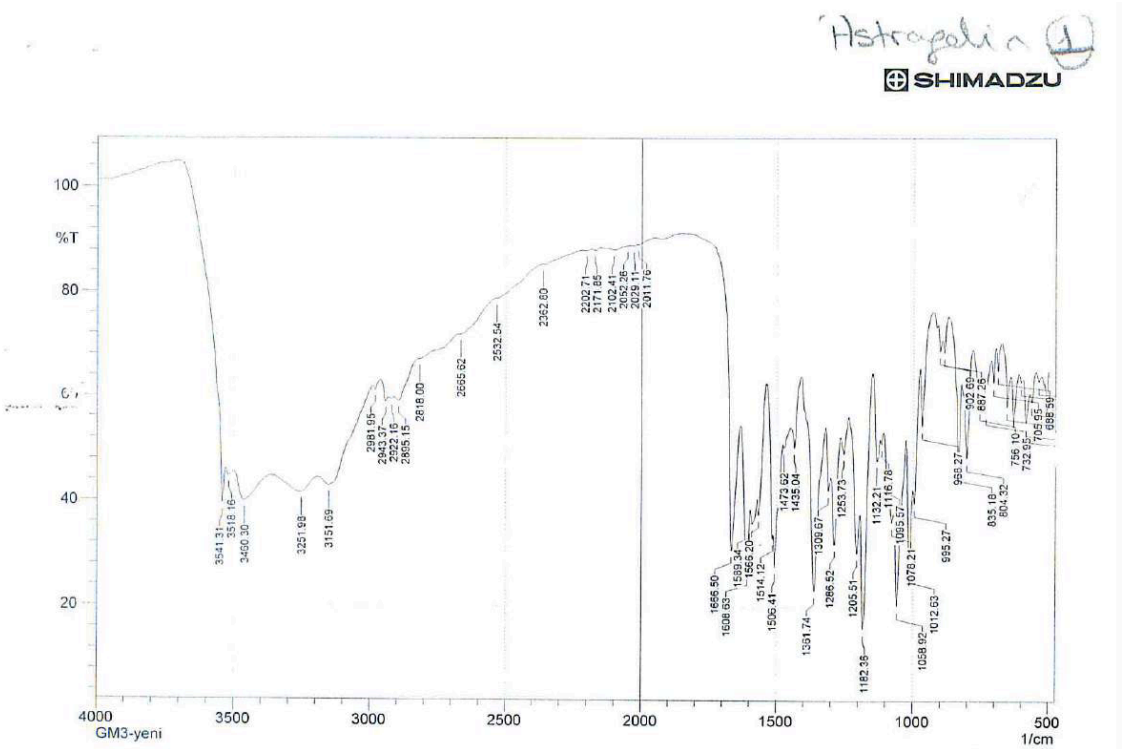
^{13}C-NMR değerleri literatür ile uygunluk göstermiştir (Kuruüzüm ve ark. 2013).



Şekil 4-9: Astragalin'e ait DMSO-d6 ile çekilmiş ^{13}C-NMR spektrumu

IR spektrumu verileri (KBr)

3541.31, 3516.16, 3460.30 (OH), 2961.95, 2943.37, 2922.16, 2895.15 (C-H), 1666.50, 1589.34 (C=O), 1506.41, 1435.04 (C=C), 1182.36, 1058.92, 1012.63,968.27, 756.10, 668.59 cm^{-1}.



	Peak	Intensity	Corr. Intensity	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Area
1	507.28	59.333	5.378	524.64	499.56	5.176	0.41
2	536.21	63.014	1.286	545.85	530.42	3.025	0.071
3	563.21	59.164	2.744	569	547.78	4.403	0.16
4	584.43	55.116	7.193	594.08	570.93	5.375	0.562
5	601.79	62.848	1.091	609.51	596	2.674	0.051
6	630.72	54.281	9.878	640.37	611.43	6.304	0.752
7	655.8	58.182	8.658	673.16	642.3	5.93	0.555
8	688.59	65.043	4.578	694.37	675.09	3.189	0.188
9	705.95	62.767	5.269	711.73	696.3	2.763	0.226
10	732.95	57.256	6.878	736.81	713.66	4.558	0.298
11	756.1	58.118	7.964	781.17	738.74	8.706	1.155
12	804.32	48.432	17.278	823.6	783.1	9.353	2.028
13	835.18	46.604	18.28	871.82	825.53	9.044	1.499
14	887.26	68.555	3.722	893.04	873.75	2.77	0.175
15	902.69	68.766	3.693	908.47	894.97	2.071	0.15
16	968.27	54.445	11.781	974.05	927.76	7.662	0.861
17	995.27	39.728	7.955	1001.06	975.98	7.254	0.548
18	1012.63	27.197	18.877	1026.13	1002.98	10.491	2.734
19	1058.92	20.187	21.297	1070.49	1028.06	19.774	4.83
20	1078.21	36.166	4.23	1089.78	1072.42	7.134	0.431
21	1095.57	44.258	3.149	1107.14	1091.71	5.061	0.249
22	1116.78	51.107	1.34	1120.64	1109.07	3.27	0.06
23	1132.21	47.957	8.638	1147.65	1122.57	6.969	0.894
24	1182.36	15.849	27.911	1192.01	1149.57	19.311	6.597
25	1205.51	30.229	12.702	1234.44	1193.94	15.66	1.923
26	1253.73	49.223	4.705	1265.3	1236.37	8.154	0.506
27	1286.52	31.93	15.944	1300.02	1267.23	12.835	2.568
28	1309.67	42.115	6.793	1319.31	1301.95	5.965	0.54
29	1361.74	22.987	35.736	1409.96	1321.24	31.789	11.356
30	1435.04	50.312	7.446	1448.54	1411.89	9.021	0.665
31	1473.62	50.414	1.103	1477.47	1450.47	7.624	0.124
32	1506.41	27.526	9.172	1512.19	1477.47	14.346	1.106
33	1514.12	33.074	2.964	1537.27	1512.19	7.995	-0.458

Astragalin (2)

SHIMADZU

34	1566.2	37.55	5.89	1570.06	1541.12	9.249	0.854
35	1589.34	35.84	3.146	1595.13	1571.99	9.908	0.593
36	1608.63	26.567	17.362	1631.78	1597.06	15.391	3.513
37	1666.5	30.803	35.865	1726.29	1633.71	20.863	7.008
38	2011.76	89.247	0.153	2017.54	1957.75	2.763	0.017
39	2029.11	89.017	0.162	2036.83	2019.47	0.869	0.007
40	2052.26	89.009	0.018	2054.19	2044.54	0.485	0
41	2102.41	88.284	0.46	2127.48	2056.12	3.763	0.085
42	2171.85	88.189	0.332	2183.42	2152.56	1.656	0.029
43	2202.71	88.13	0.08	2206.57	2185.35	1.15	0.003
44	2362.8	85.485	0.041	2364.73	2222	8.718	0.017
45	2532.54	78.816	0.186	2536.39	2364.73	14.689	0.143
46	2665.62	71.939	0.114	2667.55	2538.32	15.996	0.209
47	2818	67.147	0.148	2821.86	2677.2	23.166	0.333
48	2895.15	59.06	2.203	2912.51	2823.79	17.93	0.482
49	2922.16	59.445	0.391	2933.73	2914.44	4.329	0.027
50	2943.37	58.958	1.713	2962.66	2935.66	5.873	0.138
51	2981.95	61.228	1.069	2989.66	2964.59	5.182	0.072
52	3151.69	42.965	4.911	3190.26	2991.59	59.571	4.134
53	3251.98	41.628	0.121	3253.91	3197.98	20.498	0.07
54	3460.3	39.932	5.299	3496.94	3367.71	48.214	3.5
55	3518.16	44.664	1.147	3529.73	3504.66	8.677	0.163
56	3541.31	39.496	10.328	3682.11	3531.66	17.065	0.78

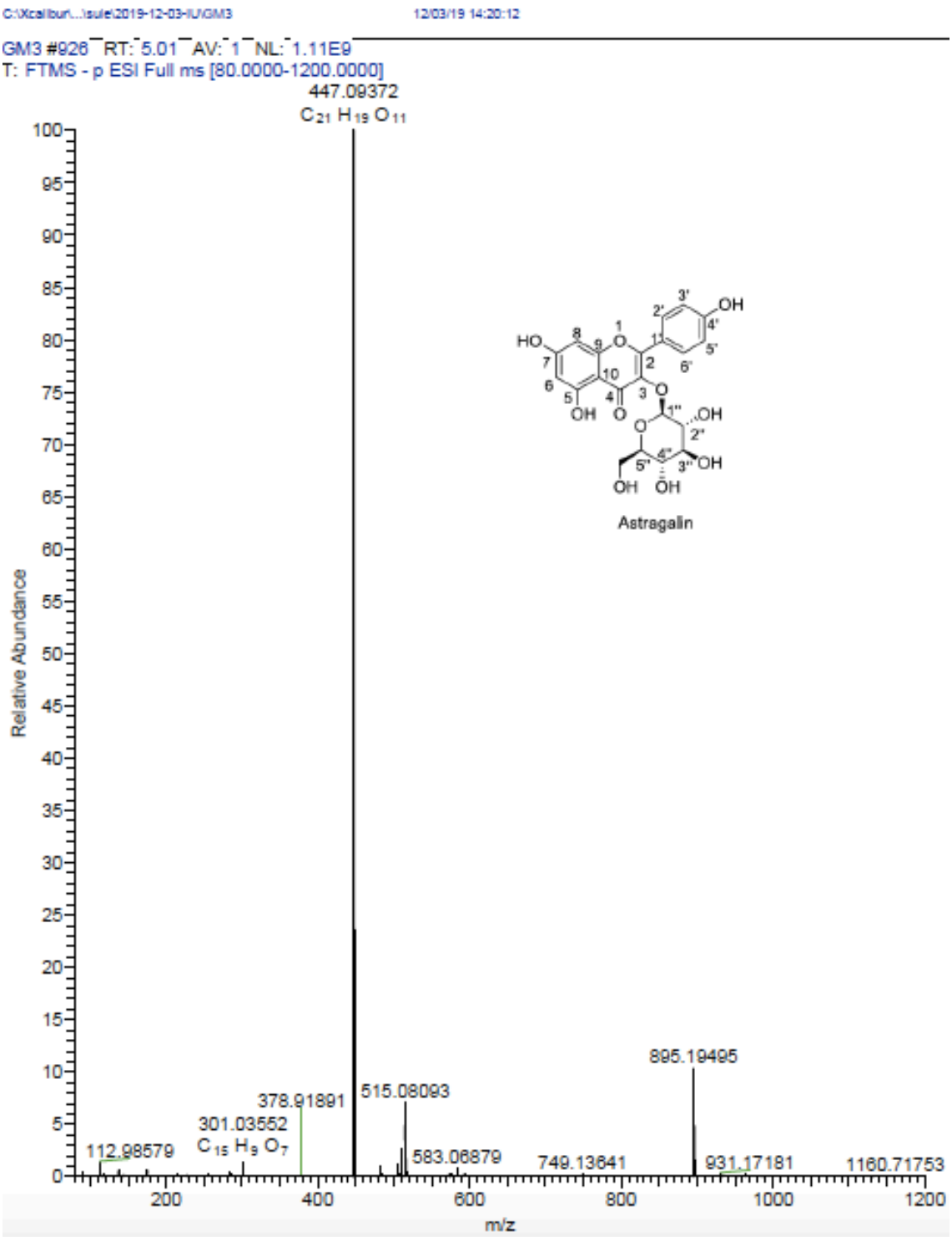
Comment;
GM3-yeni

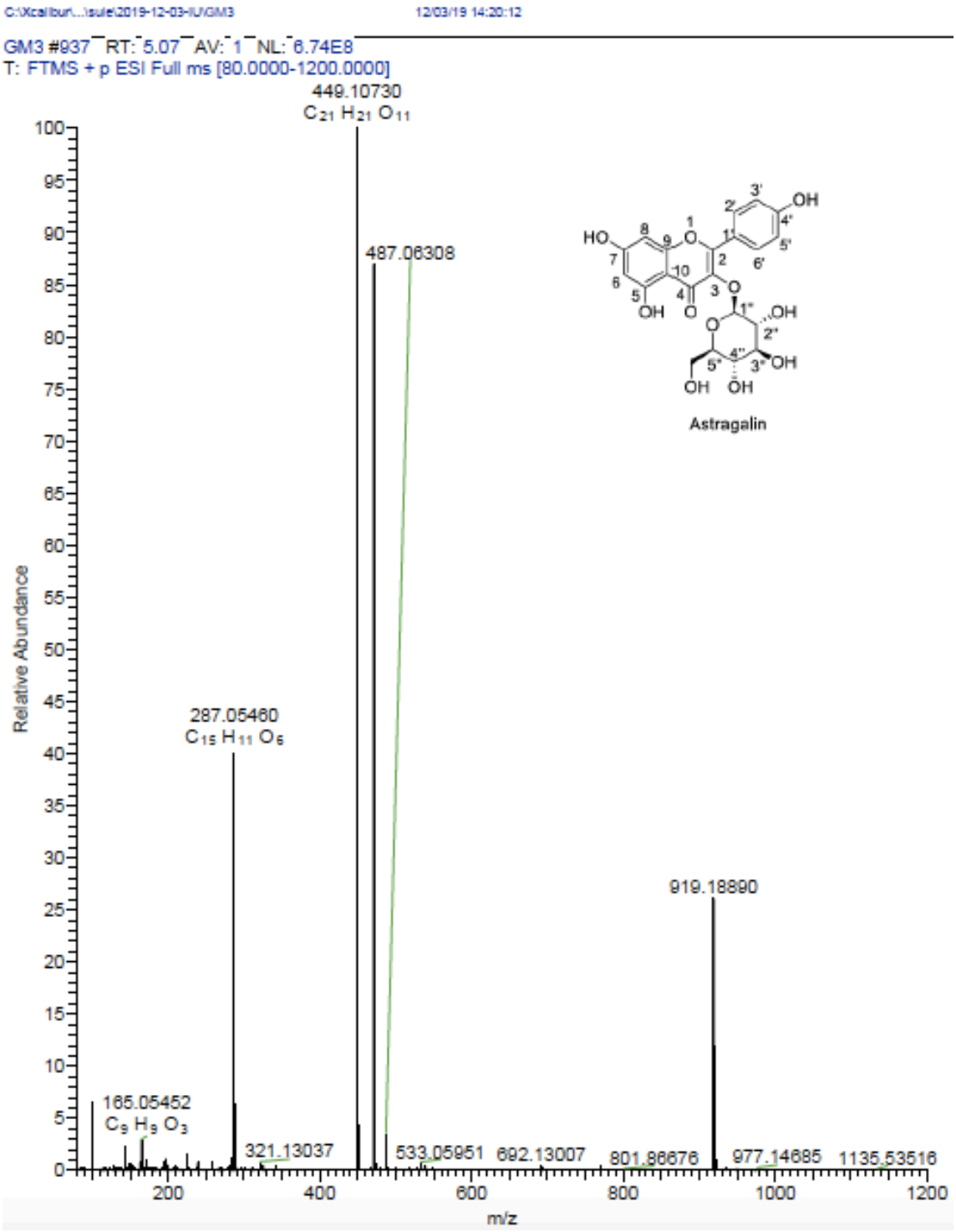
Date/Time; 12/10/2019 3:24:54 PM
No. of Scans; 10
Resolution; 4 [1/cm]
Apodization; Happ-Genzel
User; Administrator

Şekil 4-10: Astragalin'e ait KBr ile çekilmiş IR spektrumu

Kütle spektrumu verileri

Bileşiğin molekül ağırlığı (C_{21} H_{20} O_{11}) 448.37 g/mol iken negatif modda bir protonun kopmuş iyonu spektrumda 447.0937 g/mol (C_{21} H_{19} O_{11}) olarak görüldü. Pozitif modda bir elektron kopması ile oluşan iyon 449.1073 g/mol olarak görüldü. Glikozitten şeker (glukoz) kopması ile oluşan aglikona ait parçalanma iyonu (C_{15} H_{10} O_6) pozitif modda 287.0546 g/mol olarak görüldü.


C:\Xcalibur\...\sule\2019-12-03-IU\GM3
12/03/19 14:20:12
GM3 #926 RT: 5.01 AV: 1 NL: 1.11E9
T: FTMS - p ESI Full ms [80.0000-1200.0000]
447.09372
C21 H19 O11
Astragalin
Relative Abundance
m/z
895.19495
515.08093
378.91891
301.03552
C15 H9 O7
112.98579
583.06879
749.13641
931.17181
1160.71753



Şekil 4-11: Astragalin'e ait kütle spektrumu

İnce tabaka kromatografisi verileri

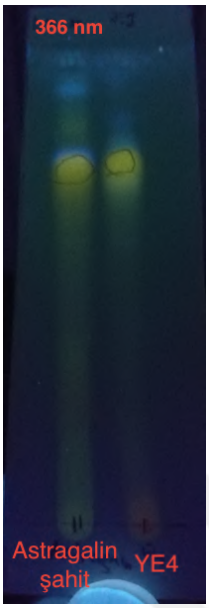
Gün ışığı: Sarı

UV – 254 nm: Mor

UV – 366 nm: Mor

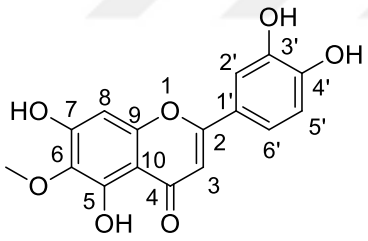
UV (+NA belirteci) - 366 nm: Sarı

Maddenin şahit astragalin ile yapılan İTK analizi yapısını doğruladı.



Şekil 4-12: Maddenin şahit astragalin ile 366 nm dalga boyunda NA belirteci ile renklendirilmiş İTK görüntüsü (Mobil faz: Diklorometan: Metanol (7:3))

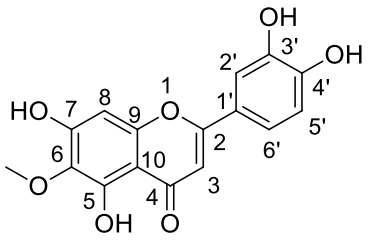
4.3.3. Eupafolin (6-Metoksiluteolin) (YT4-GM4)



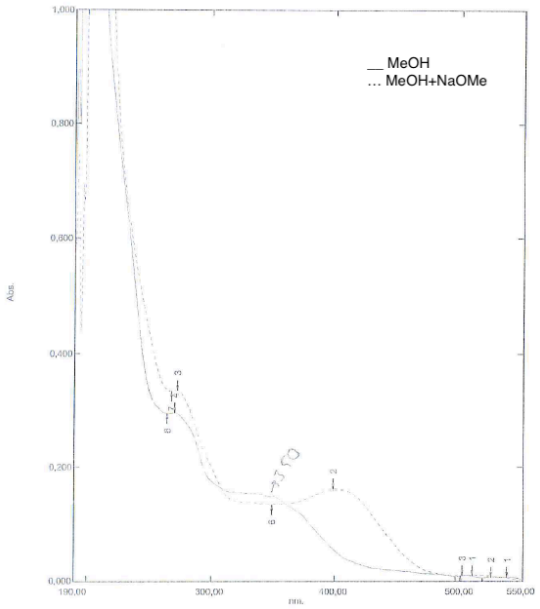
6-OCH_3-luteolin

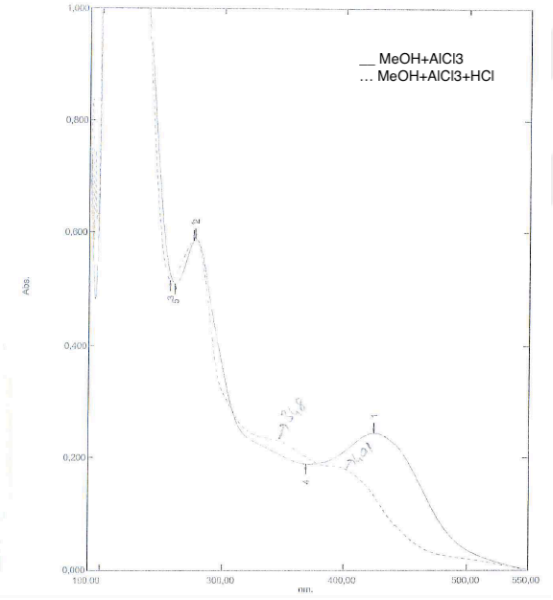
UV spektrum verileri

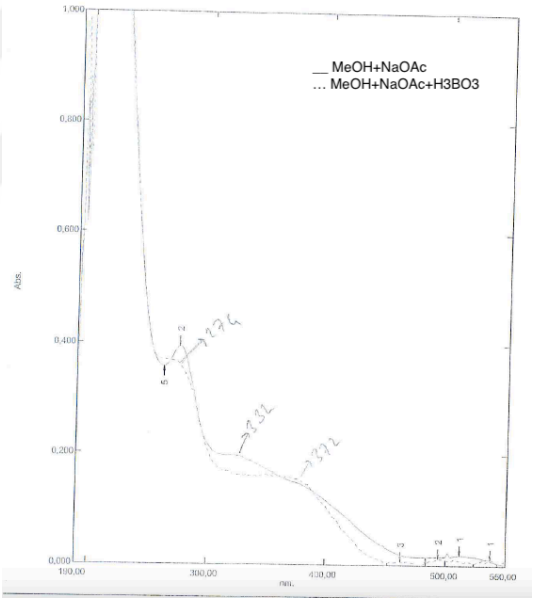
Kullanılan çözücü ve kaydırma reaktifleri	**Bant II (λ_{max} nm)**	**Bant I (λ_{max} nm)**	**Yorum**
MeOH	271	350	Flavon
MeOH+NaOMe	273	399	4'-OH
MeOH+$AlCI_3$	277	332, 425	5-OH
MeOH+$AlCI_3$+HCI	276	348, 401	Orto di- OH var
MeOH+NaOAc	276	332	7-OH
MeOH+NaOAc+H_3BO_3	274	372	Orto di- OH var



6-OCH3-luteolin







Şekil 4-13: Eupafolin'e ait kaydırma belirteçleri ile çekilmiş UV spektrumu

UV değerlerinin analizi

- Moleküle ait MeOH spektrumunun Bant I değerinin 350 nm'de çıkması yapının muhtemelen bir flavon olabileceğini gösterir.

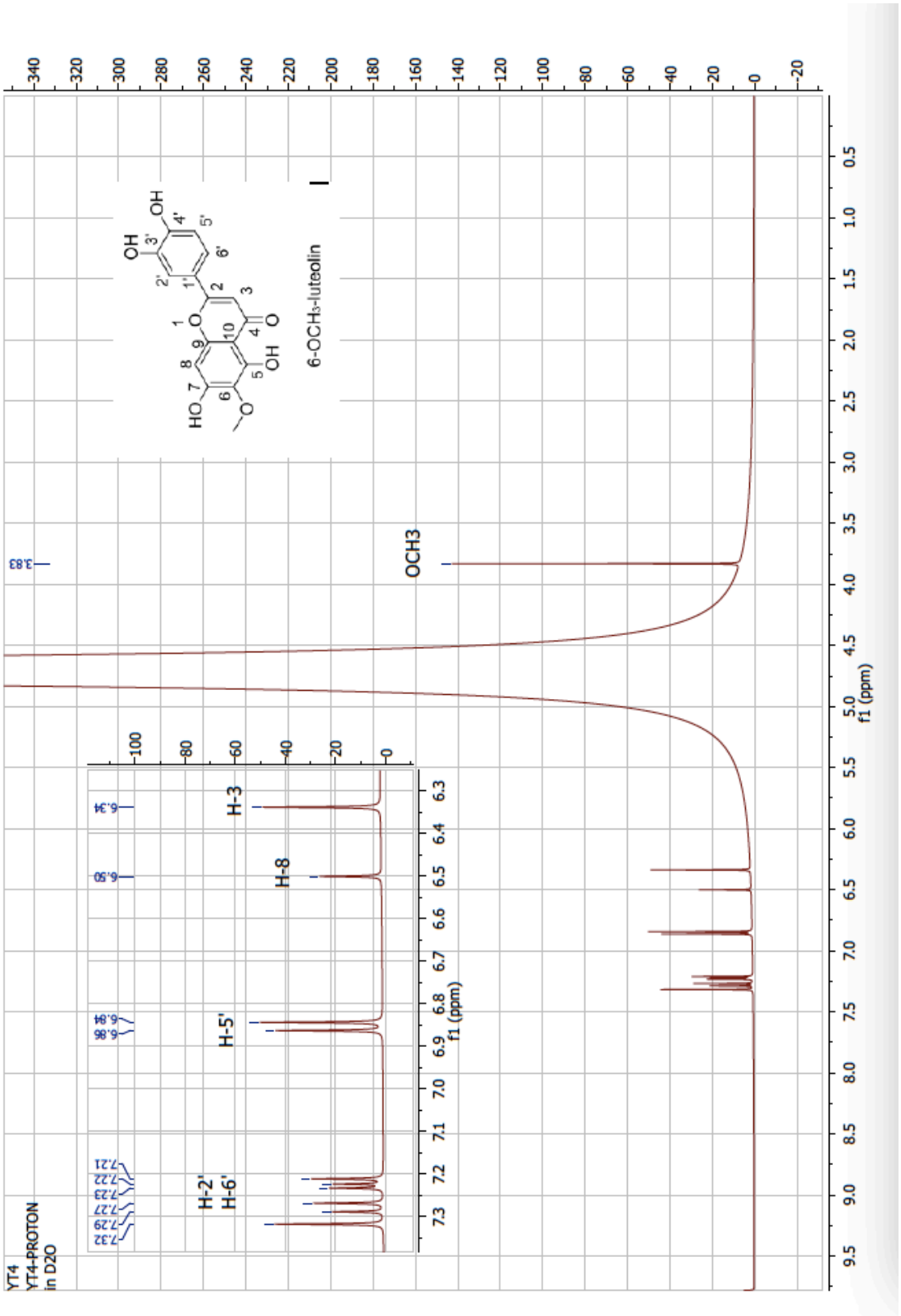
- Molekülün NaOMe spektrumunda absorpsiyon şiddetinde artış ve 49 nm'lik bir batokromik kayma görülmesi, yapının C-4' pozisyonunda serbest OH olduğuna işaret eder.

- $AlCl_3$ spektrumuna ait Bant I'in, $AlCl_3$/HCl spektrumunun Bant I'i ile kıyaslandığında 24 nm'lik bir hipsokromik kayma görülür, bu B halkasında bir orto diOH olduğunu gösterir. MeOH Bant I'i ile kıyaslandığında $AlCl_3$ spektrumunun Bant I'inde batokromik kayma gözlenir. HCl ilavesi sonucunda spektrumun MeOH spektrumuna benzememesi yapıda serbest 5-OH olduğunu gösterir.
- $AlCl_3$/HCl spektrumu Bant Ia'nın MeOH spektrumu Bant I'e göre 41 nm'lik bir batokromik kayma göstermesi, yapıda 5-OH olduğunu gösterir.
- Molekülün NaOAc spektrumuna ait Bant II'nin, MeOH Bant II'sine göre 5 nm'lik bir batokromik kayma göstermesi, C-7 konumundaki OH'in serbest olduğuna işaret eder.
- NaOAc/H_3BO_3 ve MeOH spektrumlarının Bant I değerlerine bakıldığında; MeOH'ün Bant I'inin, NaOAc/H_3BO_3 varlığında 22 nm'lik bir batokromik kayma yapması, B halkasında orto diOH varlığını gösterir.

Bu değerler Eupafolin'in literatürde yer alan UV değerleri ile uygunluk göstermiştir (Mues ve ark. 1979).

^{1}H-NMR verileri (D_2O, 400 MHz)

Pozisyon	**H**	**δ H ppm, J Hz**
2	-	
3	H-3	6.34 (s, 1H)
4	-	
5	-	
6	-	
7	-	
8	H-8	6.50 (s, 1H)
9	-	
10	-	
1'	-	
2', 6'	H-2', H-6'	7.21-7.32 (m, 2H)
3'	-	
4'	-	
5'	H-5'	6.85 (d, J=10Hz, 1H)
	OCH_3	3.83 (s, 3H)



Şekil 4-14: Eupafolin'e ait D_2O ile çekilmiş ^{1}H-NMR spektrumu

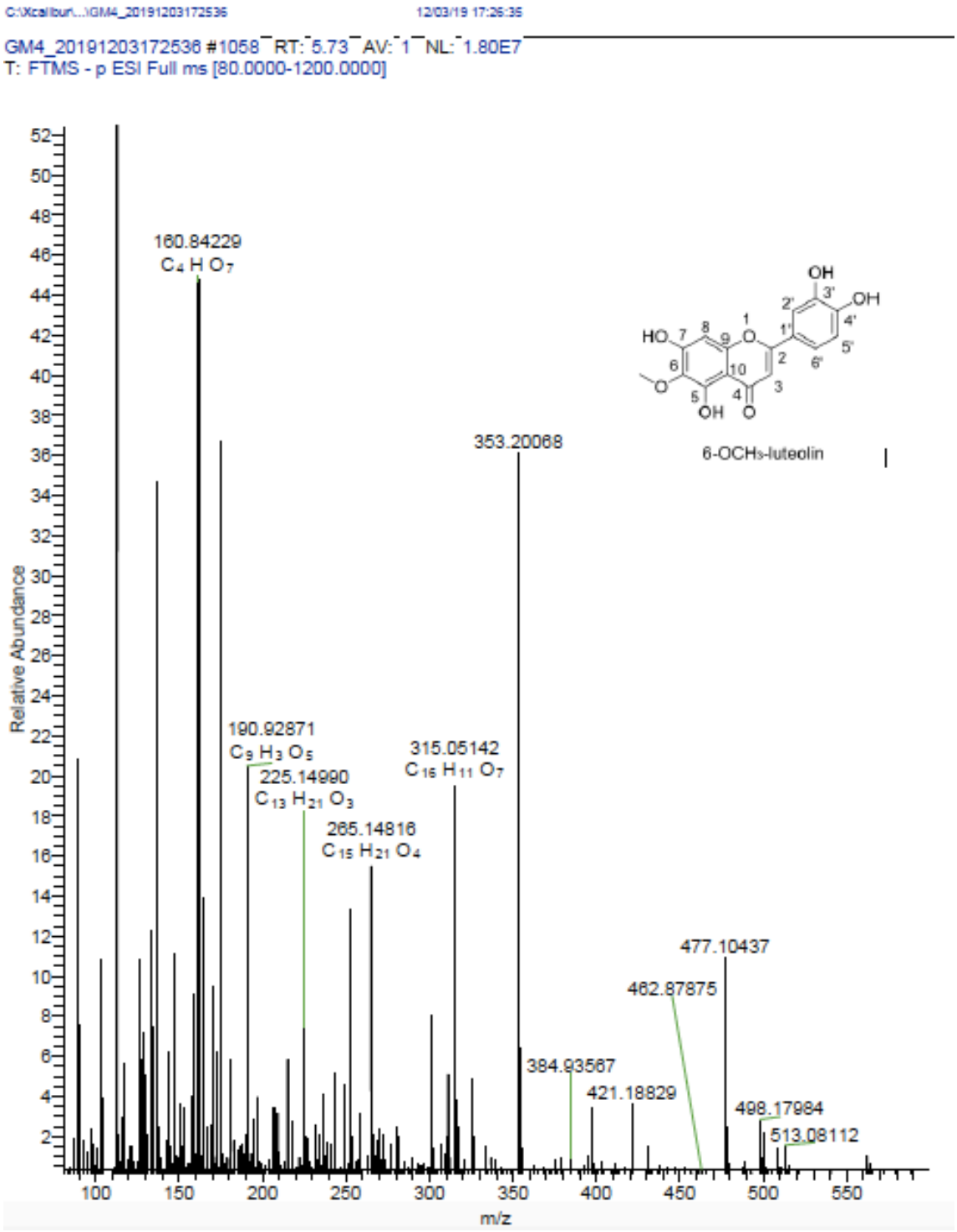
^{1}H-NMR spektrumu yorumu

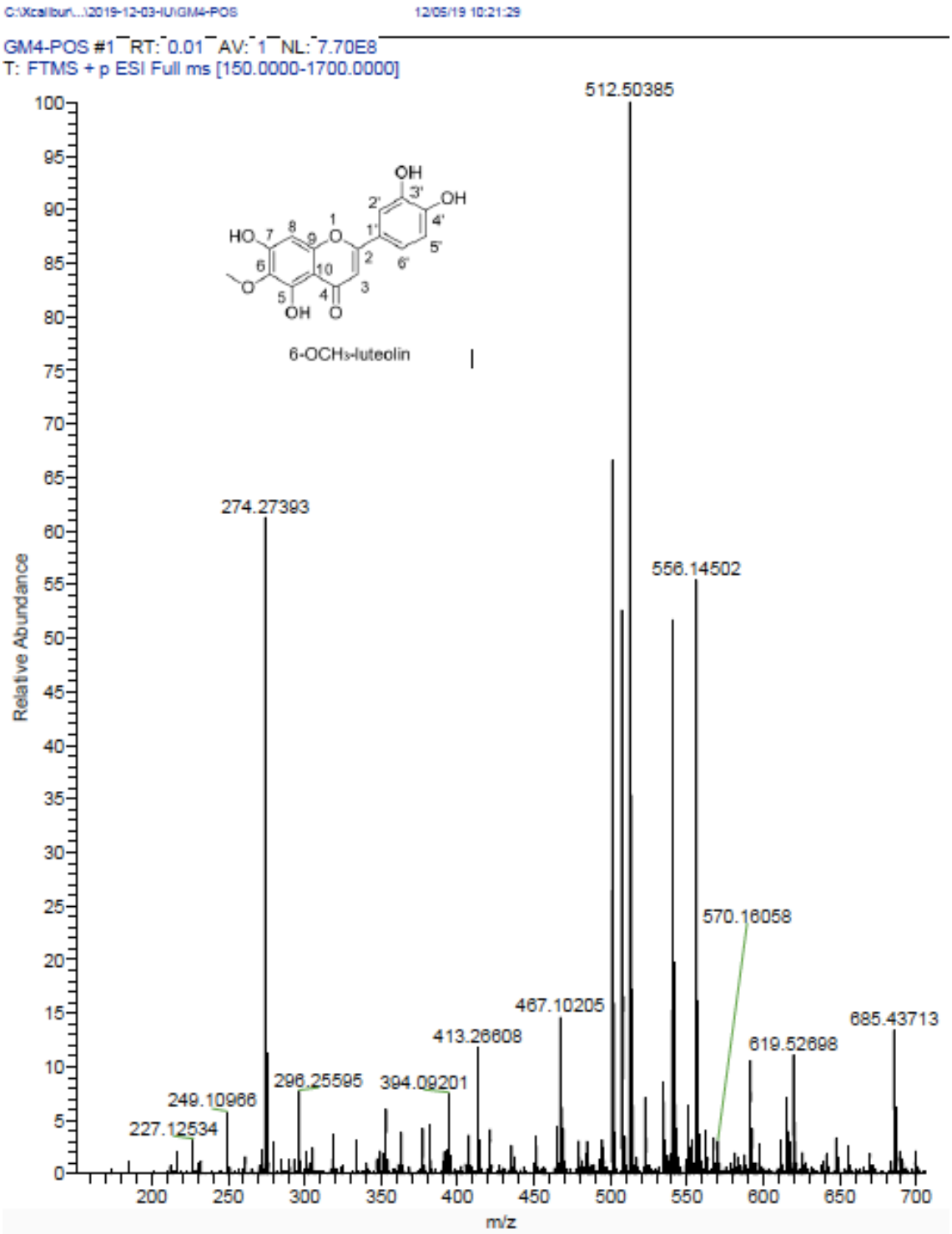
- 6.34 ve 6.50 ppm'de çıkan 1H integral değerine sahip pikler sırasıyla A halkası (H-3) ve C halkası (H-8) protonlarına aittir.
- 7.21-7.32 ppm arasında çıkan multipl pikler B halkasında H-2' ve H-6' protonlarına ait piklerdir. H-2' protonu H-6' protonu ile meta, H-5' protonu ile orto etkileşimi yapmıştır.
- 6.85 ppm'de çıkan B halkasının H-5' protonuna ait dublet H-6' protonu ile orto etkileşimi yaptığını göstermektedir. Bu etkileşimin j değeri 10 Hz'dir.
- 3.83 ppm'de çıkan 3H integral değerindeki sinyal O atomuna bağlı bir CH_3 grubunu işaret etmektedir.

^{1}H-NMRdeğerleri literatür ile uygunluk gösterdi (Liu ve Mabry 1981).

Kütle spektrumu verileri

Bileşiğin molekül ağırlığı (C_{16} H_{12} O_7) 316.26 g/mol iken negatif modda bir protonun kopmuş iyonu spektrumda 315.0514 g/mol (C_{16} H_{11} O_7) olarak görüldü.


C:\Xcalibur\...\GM4_20191203172536 12/03/19 17:26:35
GM4_20191203172536 #1058 RT: 5.73 AV: 1 NL: 1.80E7
T: FTMS - p ESI Full ms [80.0000-1200.0000]
160.84229
C4 H O7
353.20068
190.92871
C9 H3 O5
225.14990
C13 H21 O3
315.05142
C16 H11 O7
265.14816
C15 H21 O4
477.10437
462.87875
384.93567
421.18829
498.17984
513.08112
6-OCH3-luteolin
Relative Abundance
m/z



Şekil 4-15: Eupafolin'e ait kütle spektrumu

İnce tabaka kromatografisi verileri

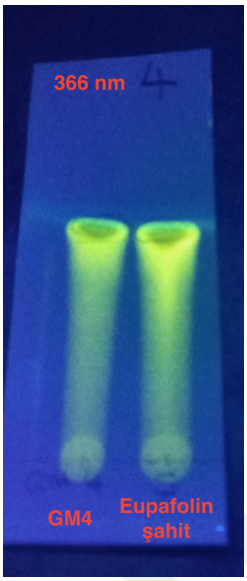
Gün ışığı: Sarı

UV – 254 nm: Mor

UV – 366 nm: Mor

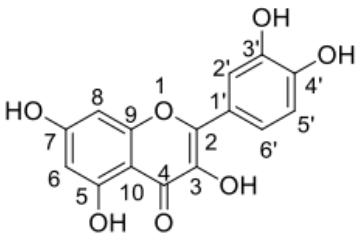
UV (+NA belirteci) - 366 nm: Sarımsı yeşil

Maddenin şahit eupafolin ile yapılan İTK analizi yapısını doğruladı.



Şekil 4-16: Maddenin şahit Eupafolin ile 366 nm dalga boyunda NA belirteci ile renklendirilmiş İTK görüntüsü (Mobil faz: Toluen:Aseton (1:1))

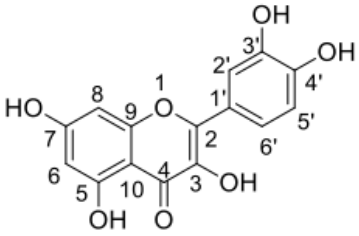
4.3.4. Kersetin (ME1-GM1)



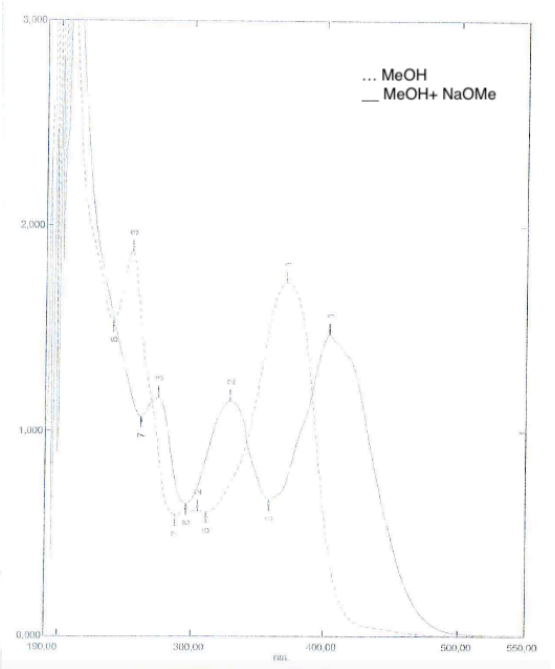
Kersetin

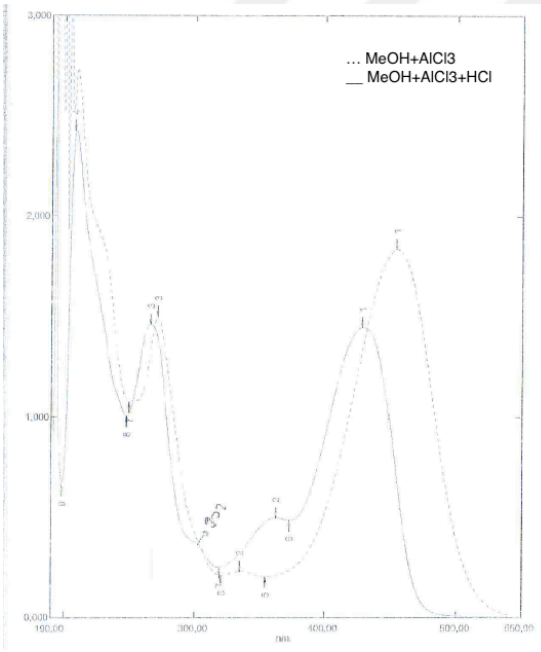
UV spektrum verileri

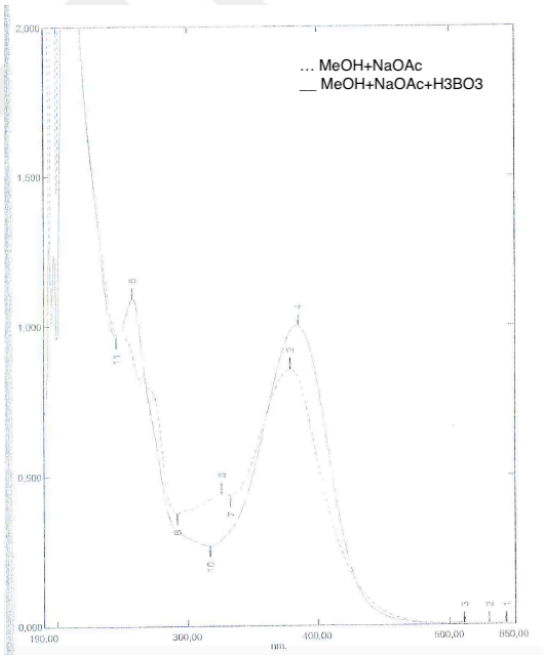
Kullanılan çözücü ve kaydırma reaktifleri	**Bant II (λ_{max} nm)**	**Bant I (λ_{max} nm)**	**Yorum**
MeOH	255	305, 371	Flavonol
MeOH+NaOMe	275	329, 404↓ (Bozunma)	4'-OH, 7-OH
MeOH+$AlCI_3$	272	333, 454	5-OH
MeOH+$AlCI_3$+HCI	266	302, 363, 429	Orto di- OH var
MeOH+NaOAc	253, 272	326, 379	7-OH
MeOH+NaOAc+H_3BO_3	258	385	Orto di- OH var



Kersetin







Şekil 4-17: Kersetin'e ait kaydırma belirteçleri ile çekilmiş UV spektrumu

UV değerlerinin analizi

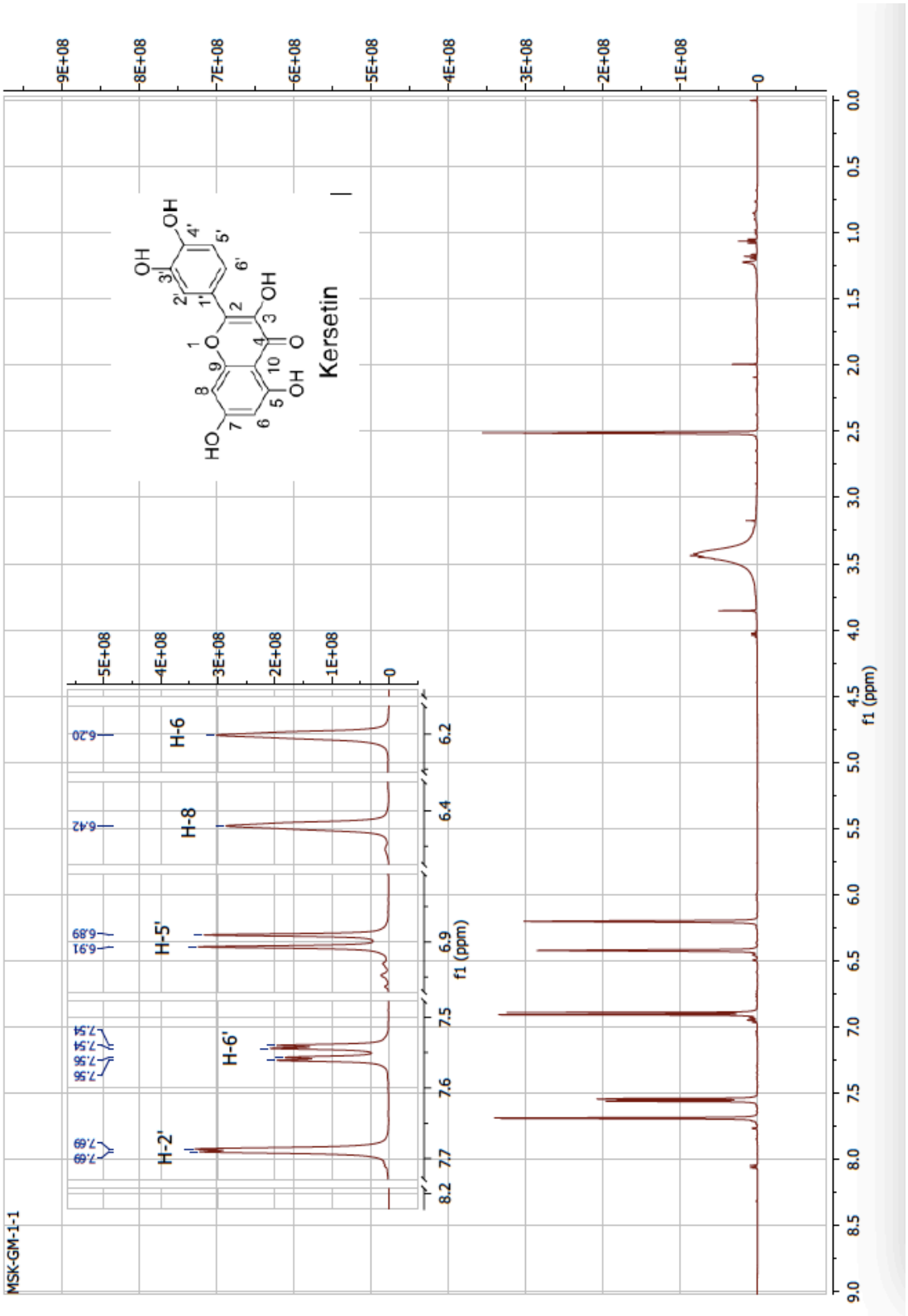
- Moleküle ait MeOH spektrumu Bant I'in 371 nm olması, yapının bir flavonol olduğunu ve –OH'in serbest olduğunu göstermektedir.

- Molekülün NaOMe spektrumuna bakıldığında, absorpsiyon şiddetinde bir azalışla beraber 33 nm'lik bir batokromik kayma gözlenmesi, C-4' pozisyonundaki OH'in serbest olabileceğini gösterir. Spektrumda görülen bozunma 3,3',4' konumlarında oksijenasyona işaret etmektedir. 329 nm' deki pik 7 konumunda OH grubunun olabileceğini gösterir.
- $AlCl_3$ spektrumuna ait Bant I'in, $AlCl_3$/HCl spektrumunun Bant I'i ile kıyaslandığında 25 nm'lik bir hipsokromik kayma göstermesi, bileşiğin B halkasında bir orto diOH varlığını gösterir. MeOH Bant I'ine göre $AlCl_3$ Bant I'inde görülen bir batokromik kayma ve HCl ilavesi ile elde edilen spektrumun MeOH spektrumundan farklı olması 5-OH'in serbest olduğunu gösterir.
- $AlCl_3$/HCl spektrumuna ait Bant I'in MeOH spektrumuna ait Bant I'e göre 58 nm'lik bir batokromik kayma göstermesi, maddenin 5-OH ve 3-OH yapısında bir flavonol olduğunu gösterir.
- Molekülün NaOAc spektrumuna ait Bant II'nin, MeOH Bant II'sine göre 7 nm'lik bir batokromik kayma göstermesi, 7. karbonda serbest OH varlığını gösterir.
- NaOAc/H_3BO_3 ve MeOH spektrumları karşılaştırıldığında, MeOH'ün Bant I'inin, NaOAc/H_3BO_3 varlığında gözlenen 14 nm'lik bir batokromik kayma, flavonoitin B halkasında orto diOH olduğuna işaret eder.

UV değerleri literatür ile uygunluk göstermiştir (Mabry ve ark. 1970).

^{1}H-NMR verileri (MeOD, 400 MHz)

Pozisyon	**H**	**δ H ppm, J Hz**
2	-	
3	-	
4	-	
5	-	
6	H-6	6.20 (geniş s, 1H)
7	-	
8	H-8	6.42 (geniş s, 1H)
9	-	
10	-	
1’	-	
2’	2’	7.69 (d, J=2.0Hz, 1H)
3’	-	
4’	-	
5’	H-5’	6.90 (d, J=8.0Hz, 1H)
6’	H-6’	7.55 (dd, J=2.0Hz ve 8.0Hz, 1H)



Şekil 4-18: Kersetin'e ait MeOD ile çekilmiş ^{1}H-NMR spektrumu

^{1}H-NMR spektrumu yorumu

-6.20 ve 6.42 ppm'de çıkan her biri 1H integral değerine sahip geniş singletler A halkasında H-6 ve H-8 protonuna ait meta etkileşmesinden kaynaklanmıştır. (Bu protonlar j değeri 2.0Hz olan dubletler olması gerekirken bizim spektrumumuzda yarılma gözlenmemektedir.)

- 7.69 ppm'de çıkan dublet H-2' protonunun H-6' ile yaptığı meta etkileşmesinden kaynaklı yaklaşık 2.0Hz küçük yarılma gösteren dublettir.

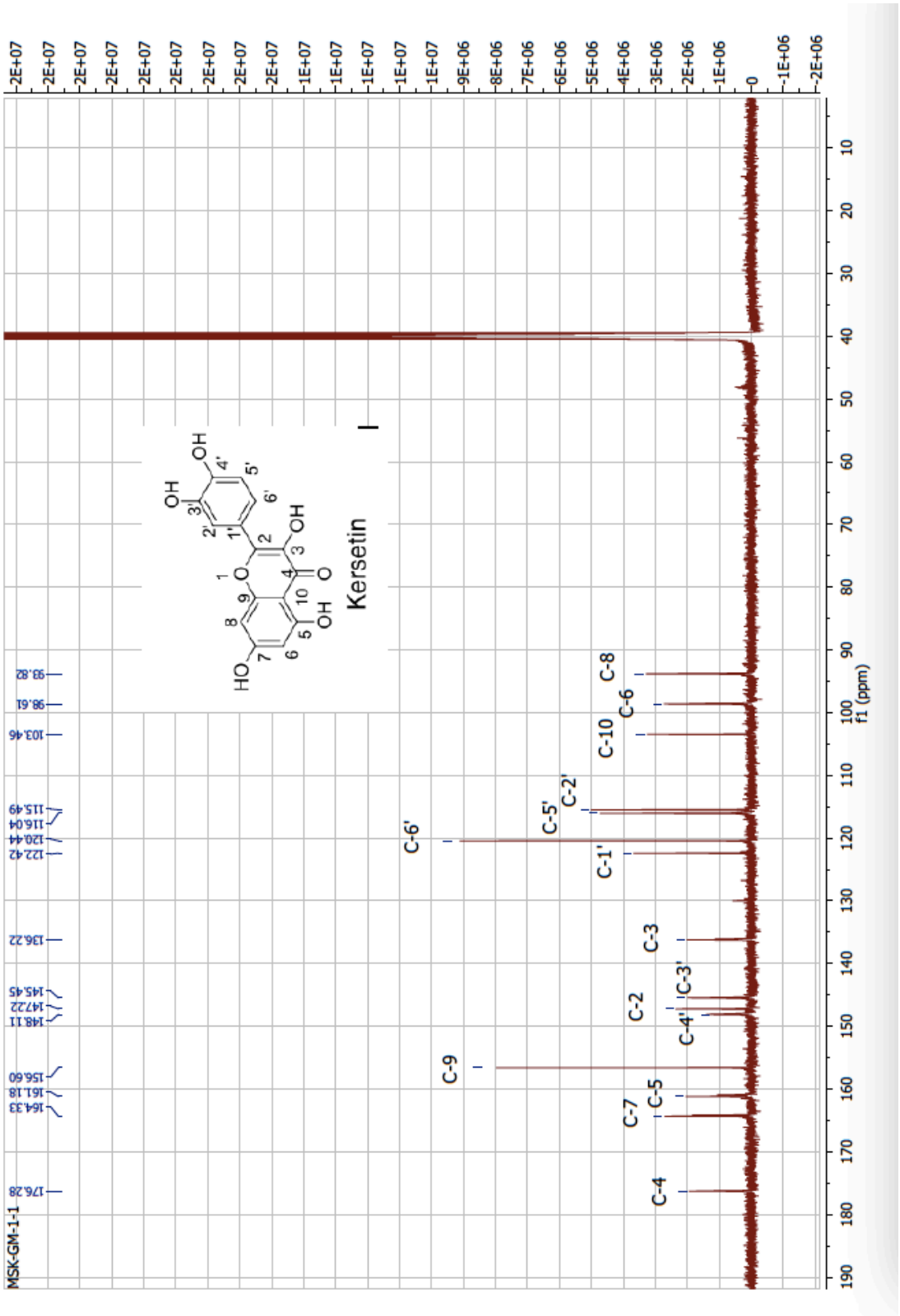
-7.55 ppm'de çıkan doubletin dubleti H-6' protonunun H-5' ile yaptığı orto ve H-6' protonunun H-2' ile yaptığı meta etkileşmesinden kaynaklıdır. Orto etkileşimi yaklaşık 8.0 Hz, meta etkileşimi yaklaşık 2.0Hz olan yarılmalar göstermiştir.

-6.90 ppm'de çıkan dublet H-5' protonunun H-6' ile yaptığı orto etkileşmesinden kaynaklı yaklaşık 8.0 Hz olan büyük yarılma göstermiştir.

^{1}H-NMRdeğerleri literatür ile uygunluk gösterdi (Fathiazad ve ark. 2006).

^{13}C-NMR verileri (DMSO-d6, 125 MHz)

Pozisyon	**δ_c (ppm)**
2	147.2
3	136.2
4	176.2
5	161.1
6	98.6
7	164.3
8	93.8
9	156.6
10	103.4
1'	122.4
2'	115.4
3'	145.4
4'	148.1
5'	116.0
6'	120.4



Şekil 4-19: Kersetin'e ait DMSO-d6 ile çekilmiş ^{13}C-NMR spektrumu

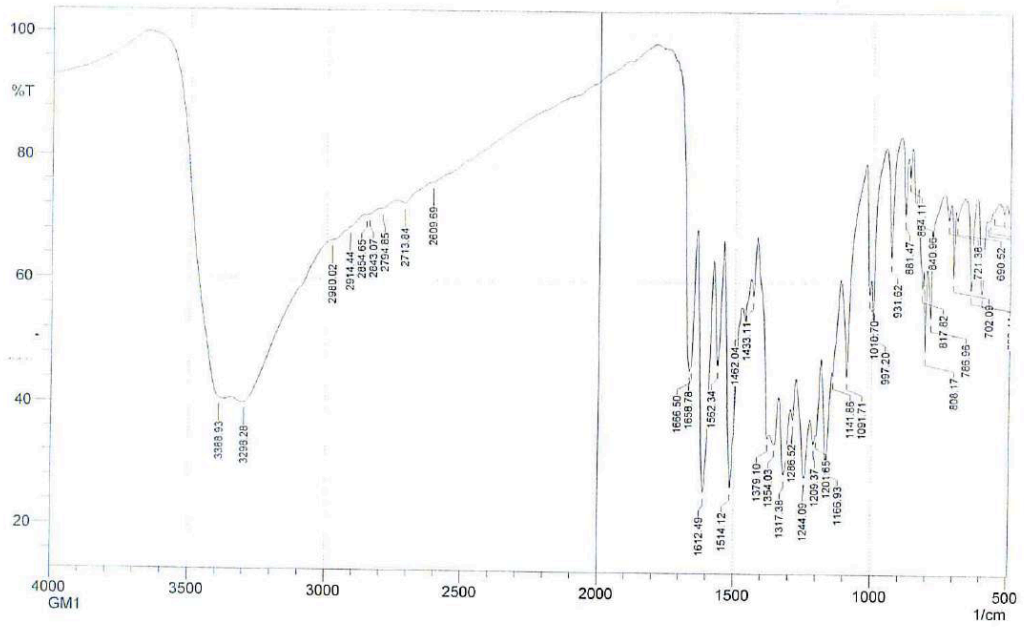
^{13}C-NMR değerleri literatür ile uygunluk göstermiştir (Cuong ve ark. 2019).

IR spektrumu verileri (KBr)

3388.93, 3298.28 (OH), 2980.02, 2609.69 (C-H), 1666.50, 1612.49, 1562.34 (C=O), 1514.12, 1379.10, 1354.03(C=C), 1201.65, 1141.86, 1010.70, 931.62, 808.17, 690.52 cm^{-1}

Quercetin (1)

SHIMADZU



	Peak	Intensity	Corr. Intensity	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Area
1	516.92	71.358	1.425	522.71	507.28	2.189	0.061
2	553.57	71.739	0.337	557.43	536.21	2.978	0.023
3	567.07	70.396	0.545	570.93	559.36	1.723	0.02
4	574.79	70.025	0.414	580.57	570.93	1.481	0.013
5	597.93	58.654	13.331	615.29	582.5	6.041	1.357
6	638.44	59.103	14.942	661.58	617.22	7.156	1.366
7	690.52	70.193	1.783	694.37	663.51	4.34	0.111
8	702.09	61.035	11.102	711.73	696.3	2.622	0.44
9	721.38	70.3	3.035	734.88	713.66	3.017	0.178
10	786.96	54.633	10.289	798.53	736.81	10.254	0.646
11	808.17	49.21	12.178	812.03	800.46	2.945	0.536
12	817.82	59.303	5.459	833.25	813.96	3.727	0.464
13	840.96	71.756	5.416	856.39	835.18	2.584	0.337
14	864.11	77.121	4.021	869.9	858.32	1.15	0.107
15	881.47	71.029	10.727	894.97	871.82	2.553	0.544
16	931.62	64.098	18.452	948.98	896.9	5.87	1.628
17	997.2	53.249	9.681	1002.98	950.91	7.149	0.42
18	1010.7	58.295	8.664	1022.27	1004.91	3.344	0.494
19	1091.71	45.106	20.415	1114.86	1024.2	17.225	2.991
20	1141.86	45.216	2.759	1145.72	1116.78	8.219	0.306
21	1166.93	31.15	15.735	1184.29	1147.65	15.382	3.275
22	1201.65	35.396	1.425	1203.58	1186.22	6.89	0.303
23	1209.37	34.041	2.231	1222.87	1203.58	8.687	0.277
24	1244.09	28.473	12.156	1273.02	1224.8	22.111	3.454
25	1286.52	37.938	3.349	1292.31	1274.95	6.771	0.295
26	1317.38	28.911	11.882	1336.67	1294.24	19.719	3.13
27	1354.03	33.892	4.666	1369.46	1338.6	13.751	1.002
28	1379.1	34.795	5.979	1417.68	1371.39	14.461	0.566
29	1433.11	57.888	5.322	1440.83	1419.61	4.439	0.379
30	1462.04	53.905	4.02	1473.62	1442.75	7.549	0.383
31	1514.12	26.752	35.121	1539.2	1475.54	23.746	9.878
32	1562.34	46.715	17.661	1575.84	1541.12	9.078	2.557
33	1612.49	25.941	40.545	1637.56	1577.77	23.113	12.309

Quercetin (2)

SHIMADZU

34	1658.78	46.481	1.975	1660.71	1639.49	5.088	0.1
35	1666.5	45.877	33.447	1707	1637.56	13.334	6.772
36	2609.69	75.823	0.133	2613.55	2083.12	42.033	0.048
37	2713.84	72.401	1.221	2744.71	2619.33	16.463	0.344
38	2794.85	71.515	0.247	2802.57	2752.42	7.131	0.04
39	2843.07	70.563	0.048	2845	2804.5	5.998	0.004
40	2854.65	70.424	0.138	2860.43	2848.86	1.757	0.005
41	2914.44	68.439	0.086	2916.37	2862.36	8.523	0.018
42	2980.02	66.363	0.082	2981.95	2916.37	11.303	0.084
43	3298.28	40.025	0.34	3302.13	2981.95	86.648	0.218
44	3388.93	40.713	0.658	3556.74	3387	33.989	-0.309

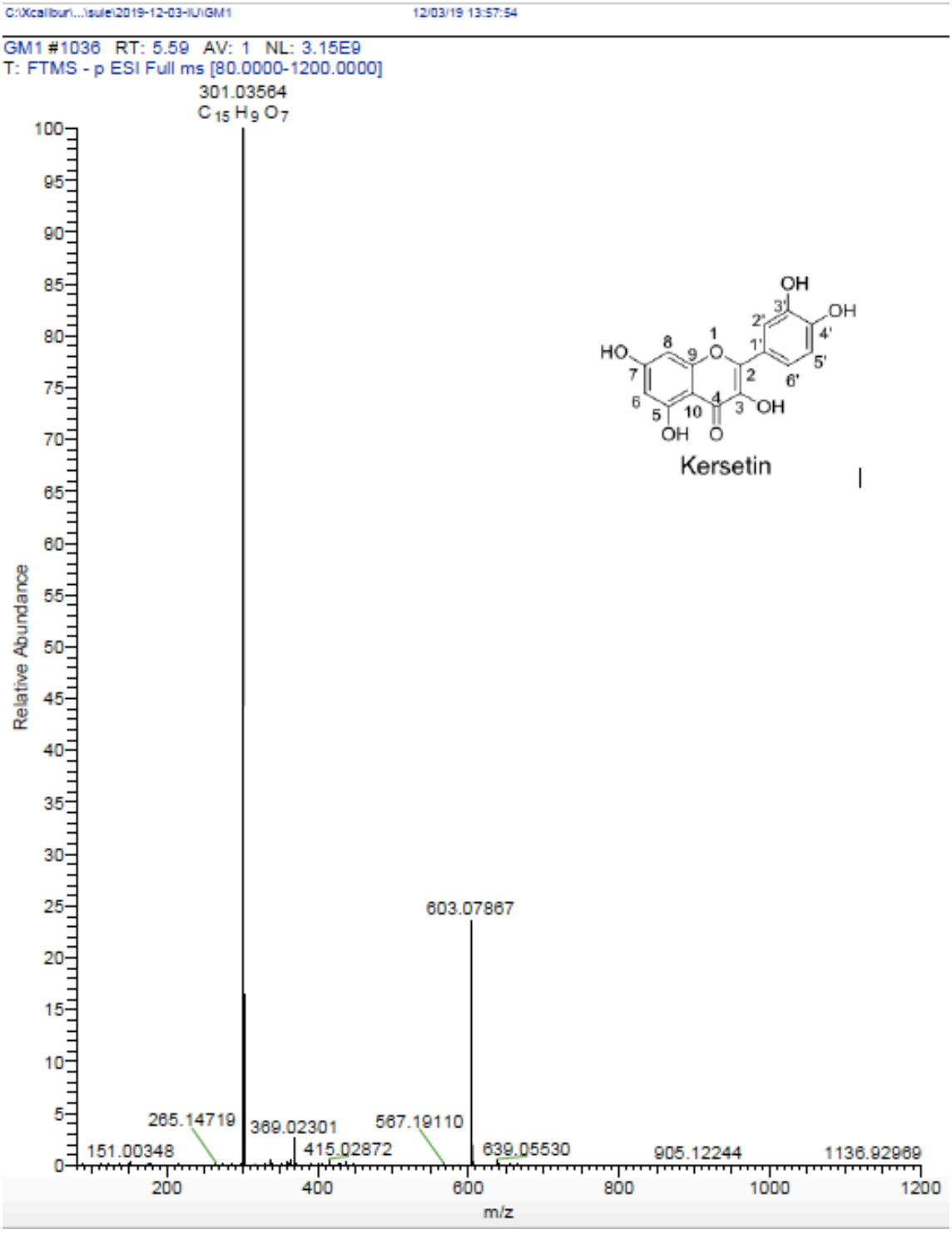
Comment:
GM1

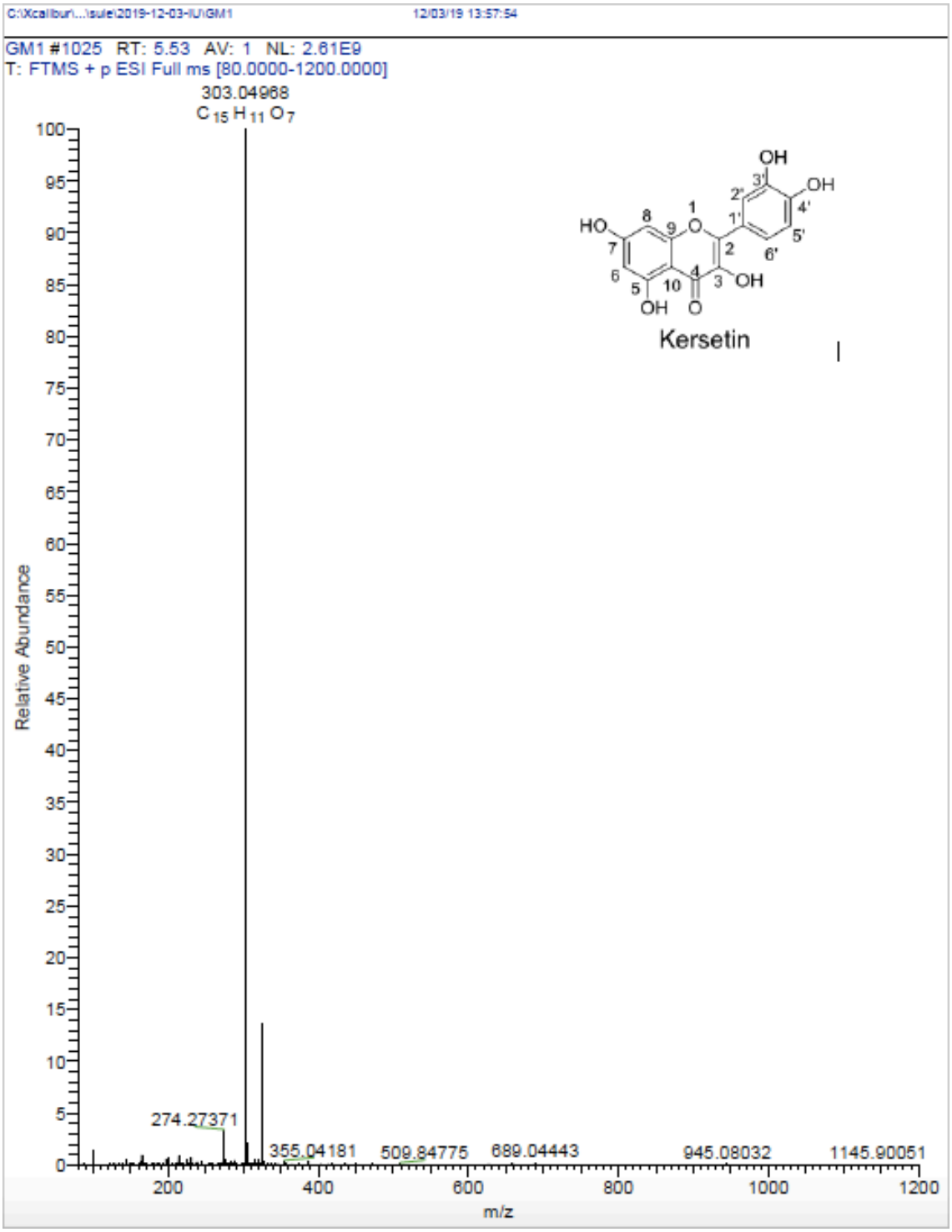
Date/Time: 12/9/2019 3:32:29 PM
No. of Scans: 10
Resolution: 4 [1/cm]
Apodization: Happ-Genzel
User: Administrator

Şekil 4-20: Kersetin'e ait KBr ile çekilmiş IR spektrumu

Kütle spektrumu verileri

Bileşiğin molekül ağırlığı ($C_{15}H_{10}O_7$) 302.25 g/mol iken negatif modda bir protonun kopmuş molekülü spektrumda 301.0356 g/mol ($C_{15}H_9O_7$) olarak görüldü. Pozitif modda bir elektron kopması ile oluşan iyon ($C_{15}H_{11}O_7$) 303.0496 g/mol olarak görüldü. Molekülden karbonil (-C=0; -28) ayrılması ile oluşan iyon pozitif modda 274.2737 olarak görüldü.





Şekil 4-21: Kersetin'e ait kütle spektrumu

İnce tabaka kromatografisi verileri

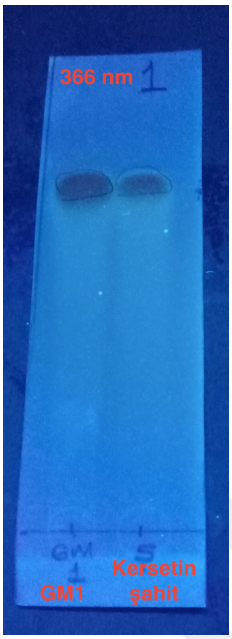
Gün ışığı: Sarı

UV – 254 nm: Sarı

UV – 366 nm: Sarı

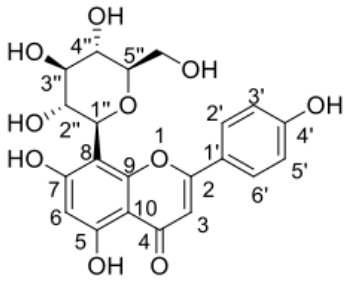
UV (+NA belirteci) - 366 nm: Turuncu

Maddenin şahit kersetin ile yapılan İTK analizi yapısını doğruladı.



Şekil 4-22: Maddenin şahit kersetin ile 366 nm dalga boyunda NA belirteci ile renklendirilmiş İTK görüntüsü (Mobil faz: Toluen:Aseton (1:2))

4.3.5. Viteksin (YE5-GM5)



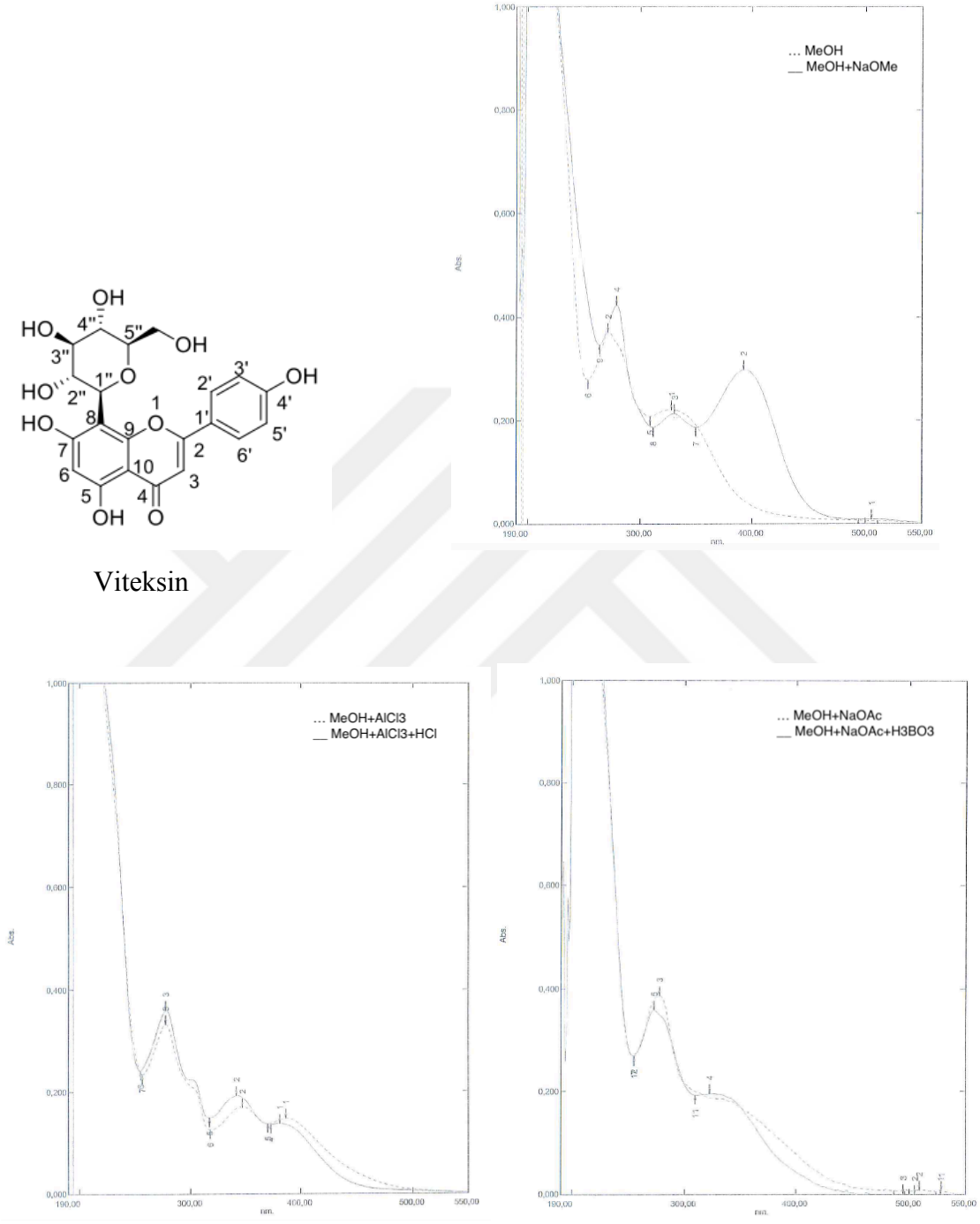
Viteksin

UV spektrum verileri

Kullanılan çözücü ve kaydırma reaktifleri	**Bant II (λ_{max} nm)**	**Bant I (λ_{max} nm)**	**Yorum**
MeOH	272	328	Flavon
MeOH+NaOMe	279	331, 393↑	4'-OH, 7-OH
MeOH+$AlCI_3$	278	303, 347, 387	5-OH
MeOH+$AlCI_3$+HCI	278	303, 342, 381	Orto di- OH yok
MeOH+NaOAc	278	-	7-OH

MeOH+NaOAc+H_3BO_3	273	323	Orto di- OH yok

Viteksin



Şekil 4-23: Viteksin'e ait kaydırma belirteçleri ile çekilmiş UV spektrumu

UV değerlerinin analizi

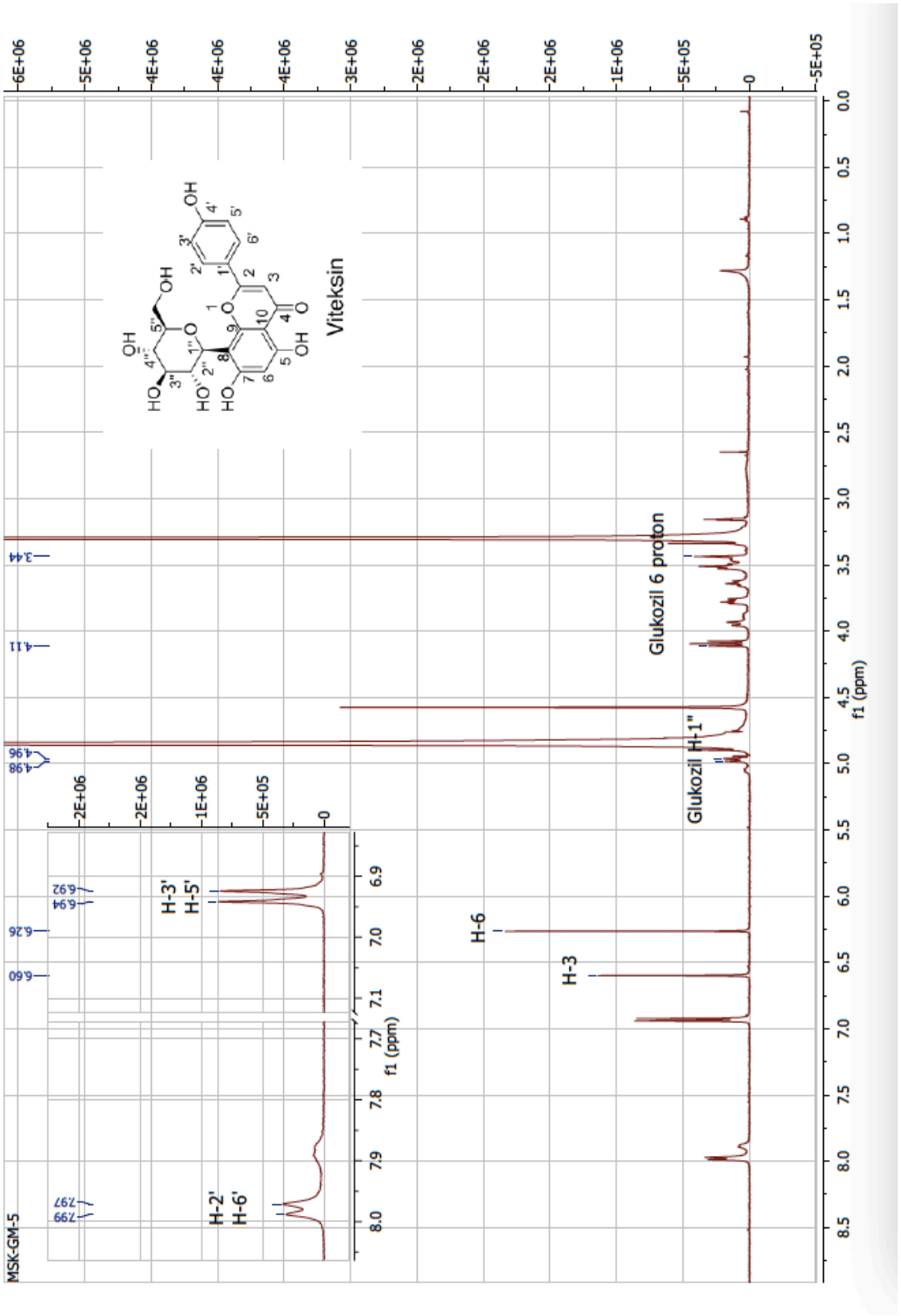
- Moleküle ait MeOH spektrumunun Bant I değerinin 328 nm'de çıkması yapının bir flavon olduğuna işaret eder.

- NaOMe spektrumuna bakıldığında MeOH spektrumuna göre absorpsiyon şiddetinde bir artışla birlikte 65 nm'lik bir batokromik kayma, molekülün C-4' pozisyonunda serbest OH varlığını gösterir.
- $AlCl_3$ spektrumuna ait Bant I'i, $AlCl_3$/HCl spektrumunun Bant I ile kıyaslandığında 6 nm'lik bir hipsokromik kayma görülmesi, B halkasında bir orto diOH olmadığını gösterir. MeOH Bant I'ine göre $AlCl_3$ Bant I'inde gözlenen batokromik kayma ve HCl eklendikten sonra alınan spektrumun MeOH spektrumundan farklı olması serbest 5-OH varlığına işaret eder.
- $AlCl_3$/HCl Bant I'inin MeOH Bant I'ine göre 43 nm'lik bir batokromik kayma yapması, yapıda 5-OH olduğunu gösterir.
- Molekülün NaOAc spektrumu Bant II'sinin, MeOH Bant II'sine göre 6 nm'lik bir batokromik kayma göstermesi, C-7'de serbest OH olduğunu gösterir.
- NaOAc/H_3BO_3 ve MeOH spektrumlarının Bant I verilerine bakıldığında; MeOH Bant I'inin, NaOAc/H_3BO_3 eklenmesiyle sadece 5 nm'lik bir batokromik kayma yapması, flavonoitin B halkasında orto dihidroksi gruplarının olmadığını gösterir.

UV değerleri literatür ile uygunluk göstermiştir (Mabry ve ark. 1970).

^{1}H-NMR verileri (D_2O, 400 MHz)

Pozisyon	**H**	**δ H ppm, J Hz**
2	-	
3	H-3	6.60 (s, 1H)
4	-	
5	-	
6	H-6	6.26 (s, 1H)
7	-	
8	-	
9	-	
10	-	
1’	-	
2’, 6’	2’ ,6’	7.98 (d,J=8.0 Hz, 2H)
3’	3’, 5’	6.93 (d,j=8.0 Hz, 2H)
4’	-	
5’	-	
Glukozil	H-1’’	4.96 (d, J=8.0 Hz,1 H)
Glukozil	6 proton (H-2’’,3’’,4’’,5’’,2H-6’’)	3.44-4.11(m, 6H)



Şekil 4-24: Viteksin'e ait D_2O ile çekilmiş ^{1}H-NMR spektrumu

^{1}H-NMR spektrumu yorumu

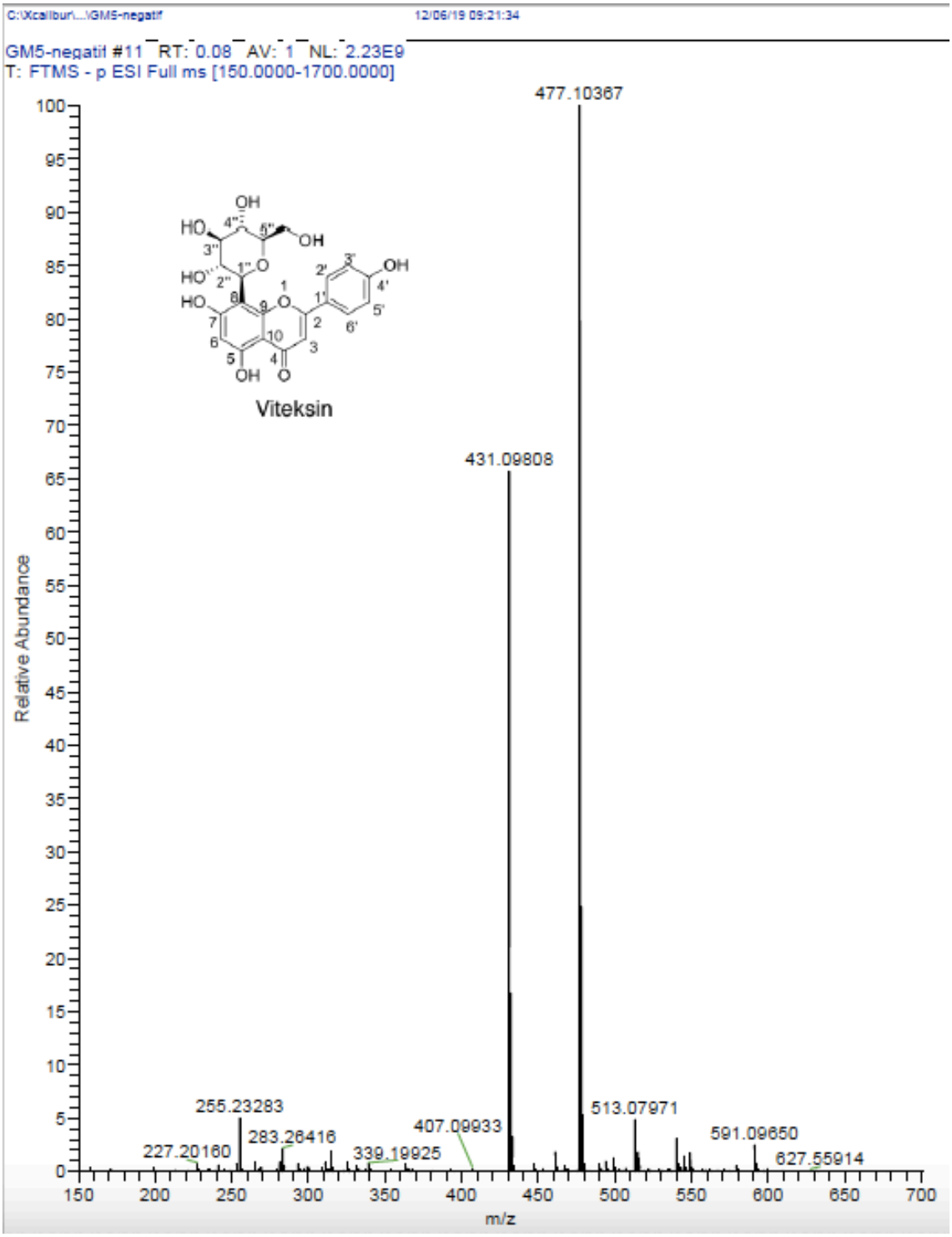
- 6.60 ppm'de çıkan singlet H-3 protonuna aittir.

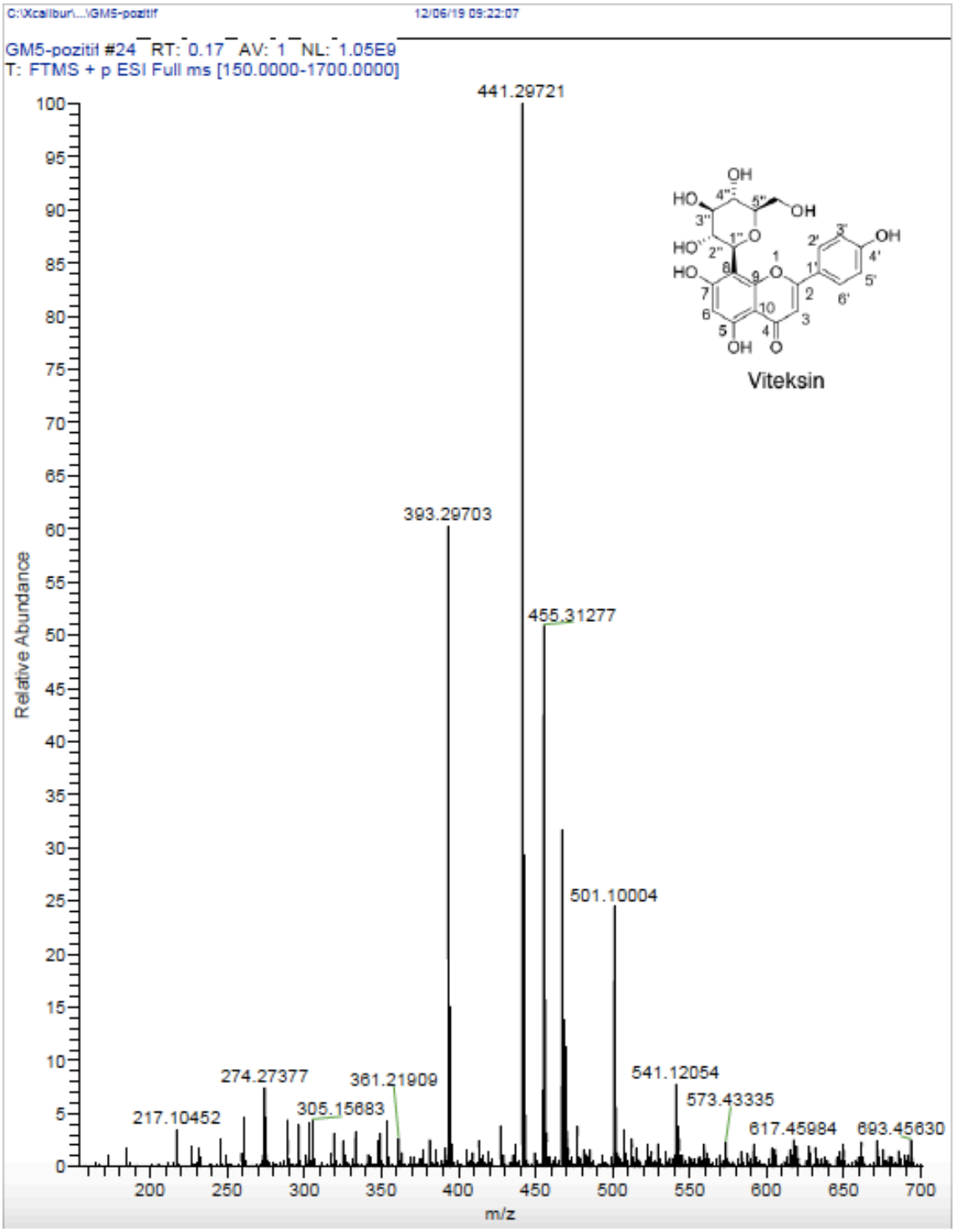
- 6.26 ppm'de çıkan singlet H-6 protonuna aittir.
- H-2' ve H-6' protonları 7.98'de j=8.0 Hz olan dublet, H-3' ve H-5' protonları 6.93'te j=8.0 Hz olan dublet olarak çıkmıştır.
- Meta H-3' ile H-5' protonları özdeştir (sinyaller örtüşmüştür).
- 3.44-4.11 ppm arasında görülen multiplet glukozun 6H'una aittir (H-2'',3'',4'',5'',2H-6'').
- 4.96 ppm'de görülen j değeri 8.0 Hz olan dublet Glukozun 1' protonuna aittir.

^{1}H-NMR değerleri Viteksin'in literatürdeki verileri ile uygunluk göstermiştir (Mabry ve ark. 1970).

Kütle spektrumu verileri

Bileşiğin molekül ağırlığı ($C_{21}H_{20}O_{10}$) 432.38 g/mol iken negatif modda bir protonun kopmuş molekülü spektrumda 431.0980 g/mol (C_{15} H_9 O_7) olarak görüldü.


C:\Xcalibur\...\GM5-negatif
12/06/19 09:21:34
GM5-negatif #11 RT: 0.08 AV: 1 NL: 2.23E9
T: FTMS - p ESI Full ms [150.0000-1700.0000]
Viteksin
477.10367
431.09808
255.23283
283.26416
227.20160
339.19925
407.09933
513.07971
591.09650
627.55914
Relative Abundance
m/z



Şekil 4-25: Viteksin'e ait kütle spektrumu

İnce tabaka kromatografisi verileri

Gün ışığı: Sarı

UV – 254 nm: Mor

UV – 366 nm: Mor

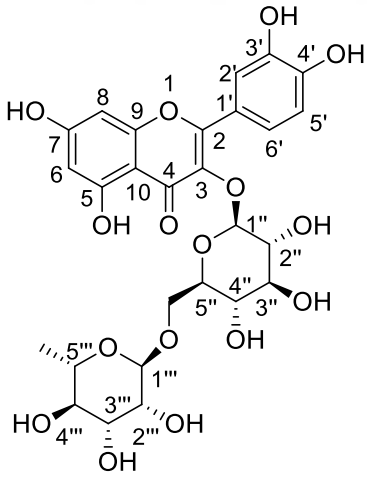
UV (+NA belirteci) - 366 nm: Sarı

Maddenin şahit viteksin ile yapılan İTK analizi yapısını doğruladı.



Şekil 4-26: Maddenin şahit Viteksin ile 366 nm dalga boyunda NA belirteci ile renklendirilmiş İTK görüntüsü (Mobil faz: Toluen:Aseton (1:4))

4.3.6. Rutin (ME3)

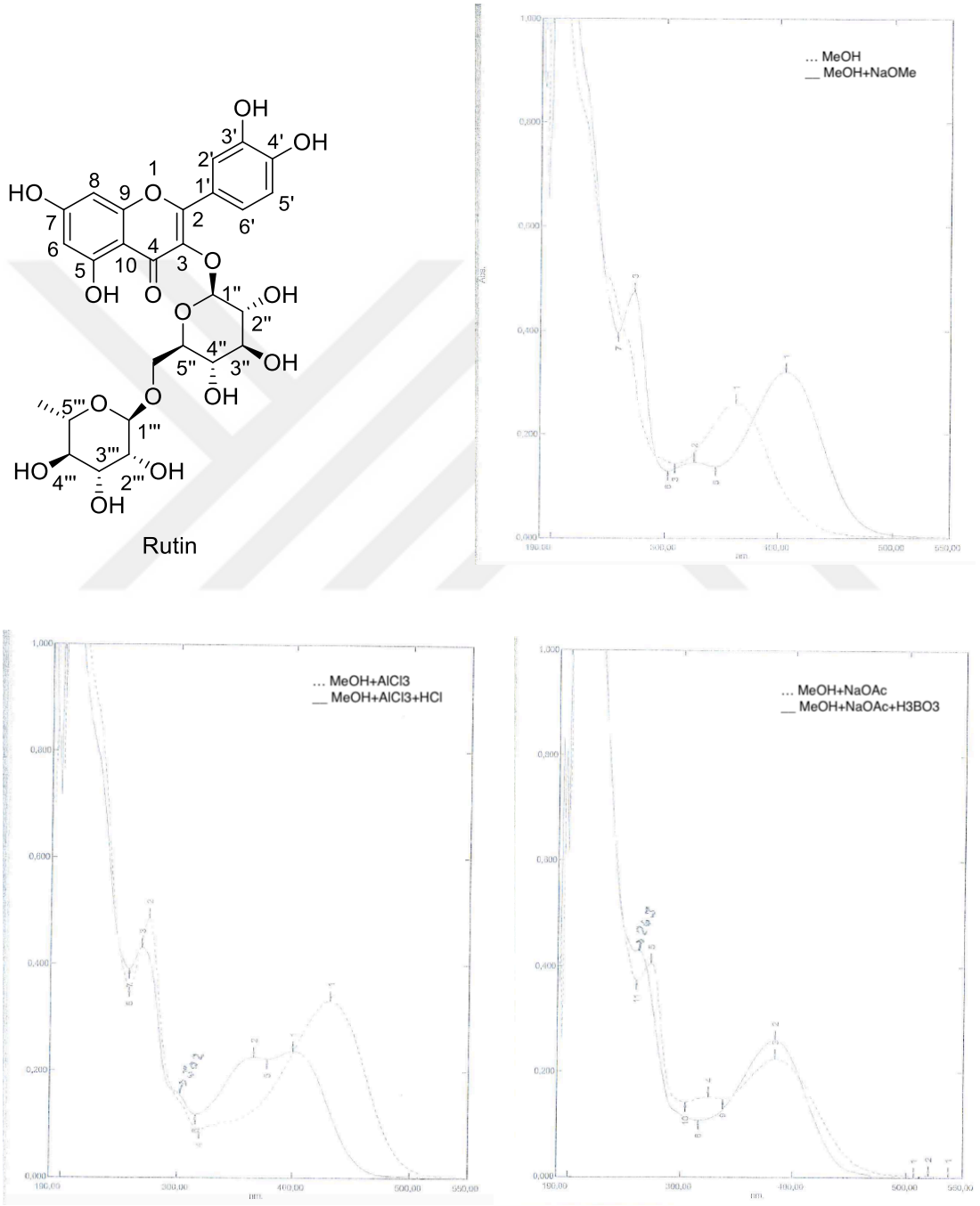


Rutin

UV spektrum verileri

Kullanılan çözücü ve kaydırma reaktifleri	**Bant II (λ_{max} nm)**	**Bant I (λ_{max} nm)**	**Yorum**
MeOH	258, 278	363	Flavonol
MeOH+NaOMe	273	326, 407↑	4'-OH, 7-OH
MeOH+$AlCl_3$	275	432	5-OH

MeOH+$AlCI_3$+HCI	269	302, 366, 400	Orto di- OH var
MeOH+NaOAc	273	325,384	7-OH
MeOH+NaOAc+H_3BO_3	263	384	Orto di- OH var



Şekil 4-27: Rutin'e ait kaydırma belirteçleri ile çekilmiş UV spektrumu

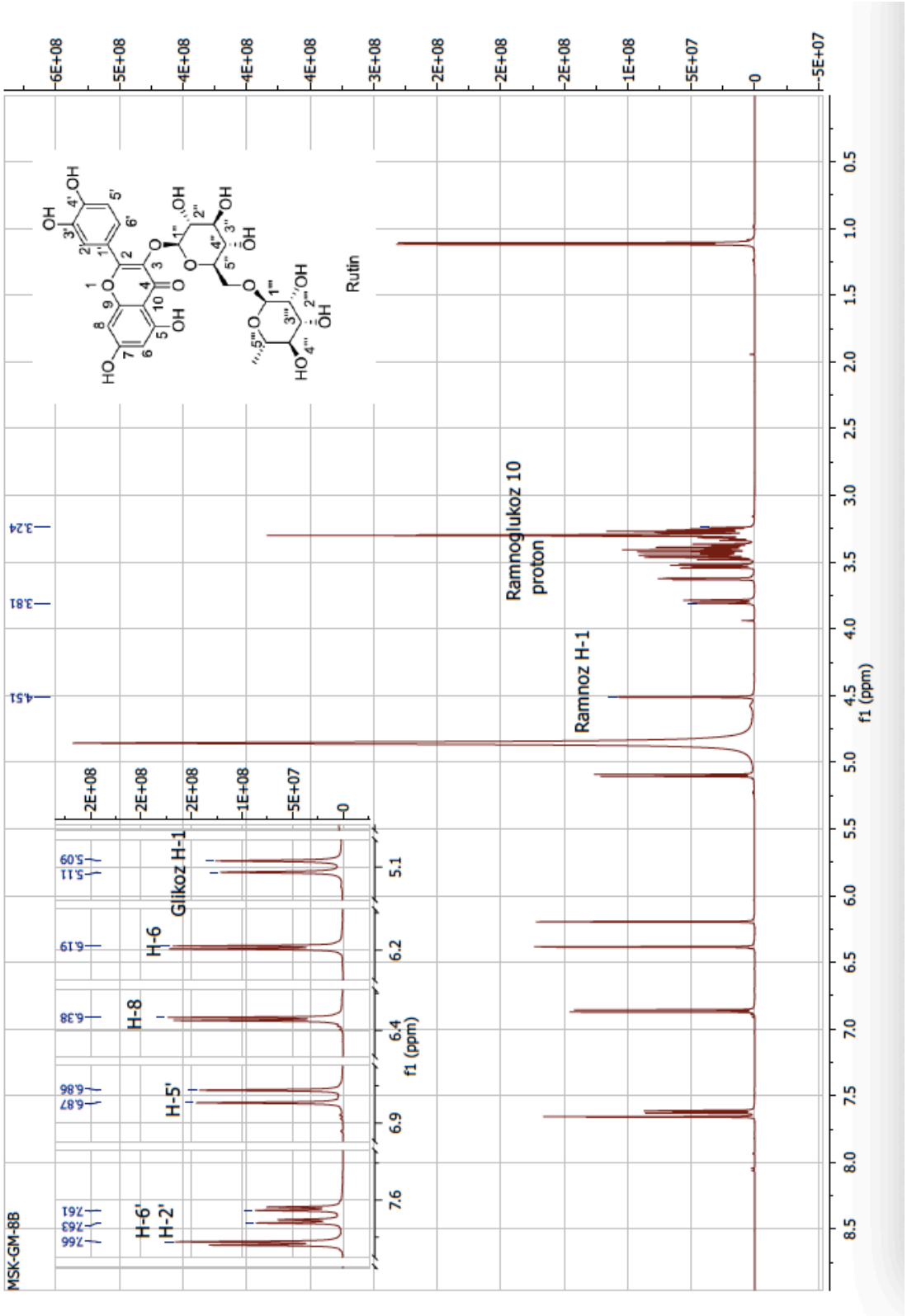
UV değerlerinin analizi

- MeOH spektrumu 363 nm'de Bant I görülmesi maddenin bir flavonol olduğunu gösterir.
- NaOMe spektrumunda görülen absorpsiyon şiddetinde bir artış ve 44 nm'lik bir batokromik kayma, maddenin C-4' konumunda serbest OH olduğunu gösterir. 326 nm'de görülen değer ise 7 konumunda serbest OH olabileceğini gösterir.
- $AlCl_3$ spektrumuna ait Bant I ile, $AlCl_3$/HCl spektrumunun Bant I'i arasında 32 nm'lik bir hipsokromik kayma gözlenmesi, B halkasında bir orto diOH varlığını gösterir. MeOH Bant I'i ile $AlCl_3$ Bant I'i kıyaslandığında görülen batokromik kayma ve $AlCl_3$/HCl spektrumunun MeOH spektrumuna benzememesi maddenin serbest 5-OH taşıdığını gösterir.
- NaOAc spektrumu Bant II'sinin, MeOH Bant II'sine göre 5 nm'lik bir batokromik kayma göstermesi, C-7'deki OH grubunun serbest olduğuna işaret eder.
- NaOAc/H_3BO_3 ve MeOH spektrumlarının Bant I verilerinde 21 nm'lik bir batokromik kayma görülmesi, flavonoitin B halkasında orto dihidroksi gruplarının varlığını gösterir.

UV değerleri literatür verileri ile uygunluk göstermiştir (Mabry ve ark. 1970).

^{1}H-NMR verileri (CD_3 OD, 500 MHz)

Pozisyon	**H**	**δ H ppm, J Hz**
2	-	
3	-	
4	-	
5	-	
6	H-6	6.19 (d, J=2.0Hz, 1 H)
7	-	
8	H-8	6.38 (d, J=2.0Hz, 1 H)
9	-	
10	-	
1’	-	
2’, 6’	H-2’, H-6’	7.63 (dd, J=2.0Hz, 8.0Hz, 2 H)
5’	H-5’	6.87 (d, J=8.0Hz, 1 H)
Glukoz	H-1’’	5.10 (d, J=8.0Hz, 1 H)
Ramnoz	H-1’’	4.51 (s, 1 H)
Ramno glukoz	10 proton	3.24-3.81 (m, 10H)
Ramnoz	$-CH_3$	1(s, 3 H)



Şekil 4-28: Rutin'e ait CD_3OD ile çekilmiş ^{1}H-NMR spektrumu

^{1}H-NMR spektrumu yorumu

- 6.19 ppm'de çıkan dublet A halkasının 6. karbonunda bulunan protona aittir. 8. karbonda bulunan proton ile yaptığı meta etkileşimi nedeniyle j değeri 2.0Hz olan dublet olarak görülmektedir.
- 6.38 ppm'de çıkan dublet A halkasının 8. karbonunda bulunan protona aittir. 6. karbonda bulunan proton ile yaptığı meta etkileşimi nedeniyle j değeri 2.0Hz olan dublet olarak görülmektedir.
- 6.87 ppm'de çıkan dublet B halkasında 5' konumda bulunan protonun 6' proton ile yaptığı orto etkileşimi nedeniyle j değeri yüksek (8.0Hz) çıkmıştır.
- 7.63 ppm'de çıkan dd B halkasında 2' ve 6' karbonda bulunan protonlara aittir. 2' protonu 6' proton ile meta etkileşimi yapmış ve j değeri küçük (2.0Hz dublet olarak görünmektedir. 6' proton 2' proton ile meta etkileşimi yapmış ve j değeri küçük (2.0Hz) dublet olarak, 5' proton ile orto etkileşimi yapmış ve j değeri yüksek (8.0Hz) etkileşim sabiti göstererek görünmüştür.
- 5.10 ppm'de görünen dublet glukozun 1. protonuna aittir. Etkileşim sabiti yüksek (8.0Hz) olarak görünmektedir.
- 4.51 ppm'de çıkan singlet ramnozun 1. protonuna aittir.
- 3.81-3.24 ppm arasında çıkan multiplet ramnoglukozun 10 protonuna aittir.

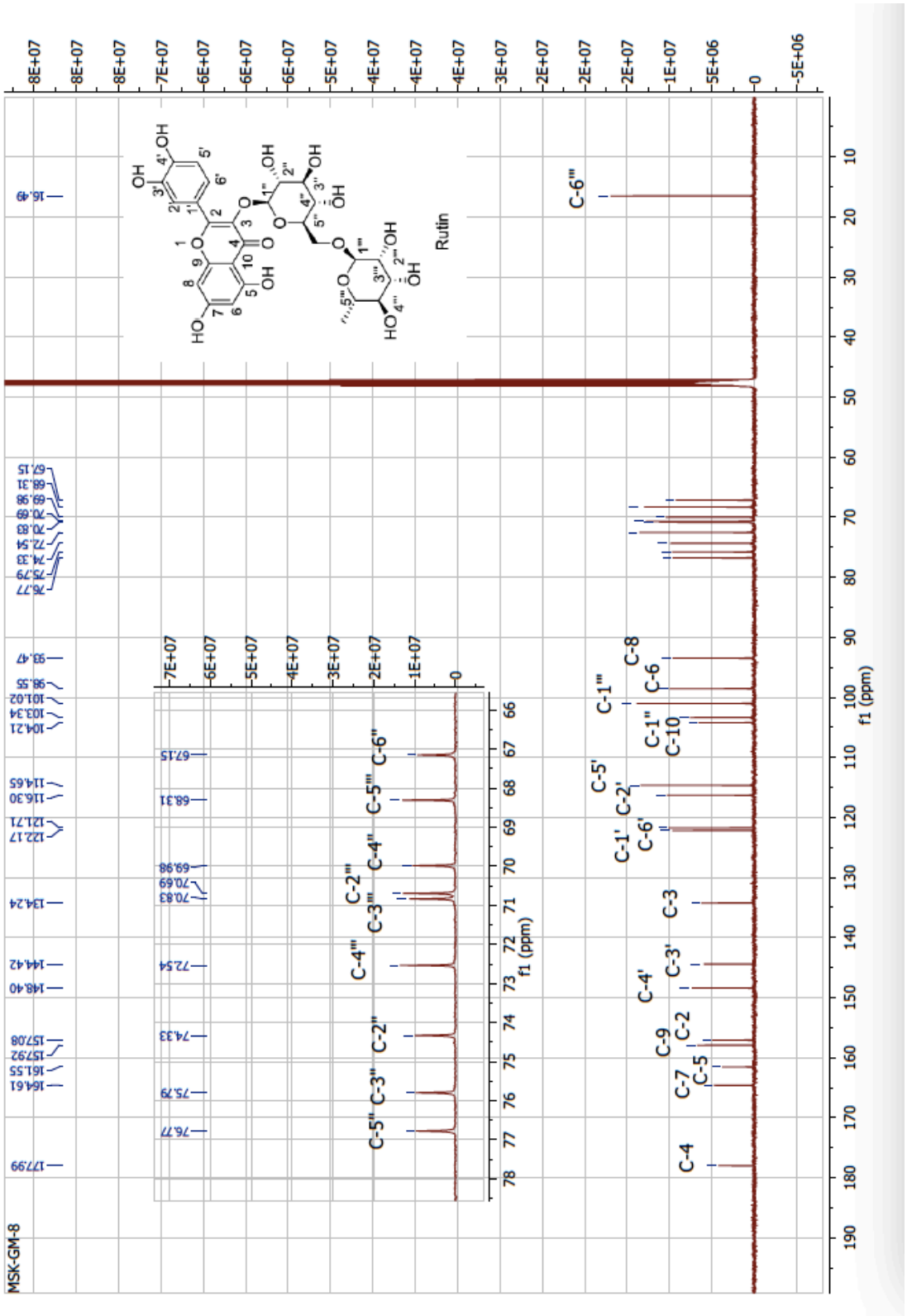
^{1}H-NMR değerleri literatür ile uygunluk göstermiştir (Mabry ve ark. 1970).

^{13}C-NMR verileri (CD_3OD, 125 MHz)

Pozisyon	**δ_c (ppm)**
2	157.0
3	134.2
4	177.9
5	161.5
6	98.5
7	164.6
8	93.4
9	157.9
10	104.2
1'	122.1

2’	116.3
3’	144.4
4’	148.4
5’	114.5
6’	121.7
Glukoz	
1’’	103.3
2’’	74.3
3’’	75.7
4’’	69.9
5’’	76.7
6’’	67.1
Ramnoz	
1’’’	101.0
2’’’	70.6
3’’’	70.8
4’’’	72.5
5’’’	68.3
6’’’	16 4

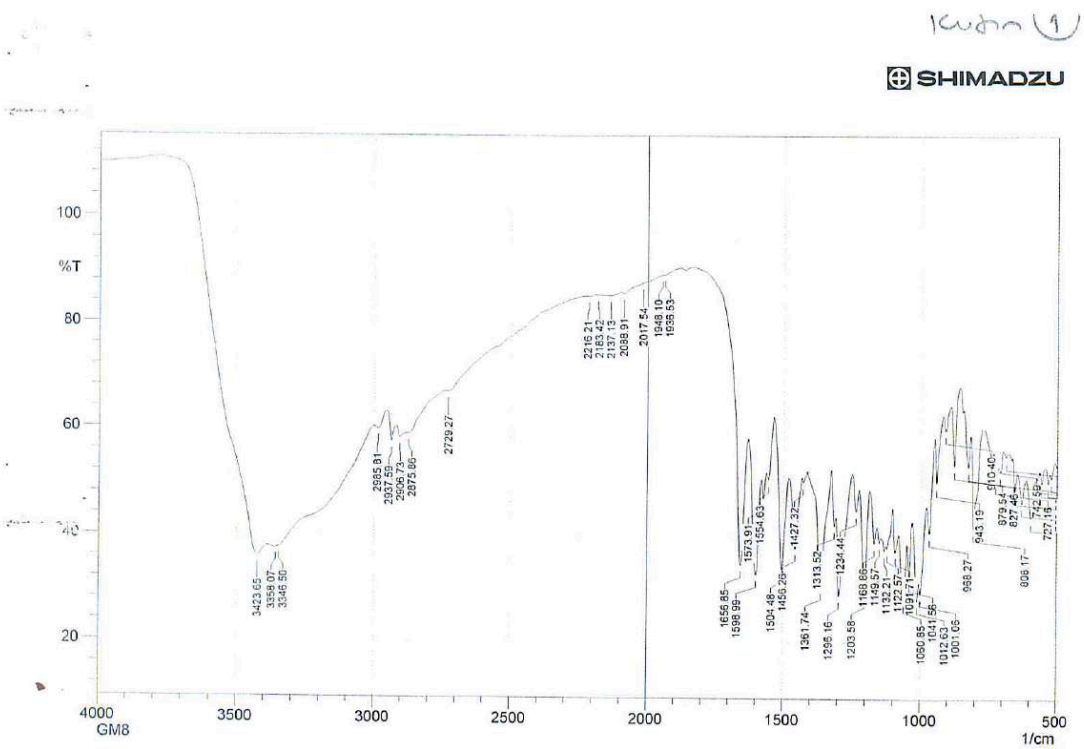
^{13}C-NMR değerleri literatür ile uygunluk göstermiştir (Küpeli Akkol ve ark. 2015).



Şekil 4-29: Rutin'e ait CD_3OD ile çekilmiş ^{13}C-NMR spektrumu

IR spektrumu verileri (KBr)

3423.65, 3358.07- 3345.50 (OH), 2985.81, 2937.59, 2906.73, 2875.86, 2729.27 (C-H), 1656.85, 1596.99 (C=O), 1504.46, 1456.26, 1361.74 (C=C), 1203.58, 1012.63, 968.27, 808.17, 727.16 cm^{-1}



	Peak	Intensity	Corr. Intensity	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Area
1	520.78	51.001	1.333	524.64	507.28	4.835	0.065
2	532.35	50.074	2.286	540.07	526.57	3.918	0.124
3	557.43	50.042	2.391	563.21	542	6.06	0.147
4	572.86	50.881	0.458	574.79	565.14	2.787	0.032
5	596	43.644	7.329	611.43	576.72	11.234	1.088
6	630.72	46.437	5.071	646.15	613.36	10.102	0.634
7	655.8	48.566	4.831	663.51	648.08	4.507	0.28
8	688.59	54.978	0.96	698.23	680.87	4.436	0.056
9	709.8	52.214	1.949	715.59	700.16	4.178	0.139
10	727.16	50.614	3.973	734.88	717.52	4.85	0.242
11	742.59	54.749	1.544	771.53	736.81	8.431	0.167
12	808.17	41.647	17.173	817.82	773.46	12.879	2.843
13	827.46	53.071	7.455	842.89	819.75	5.708	0.75
14	879.54	53.293	12.511	891.11	860.25	6.494	0.995
15	910.4	59.87	3.213	918.12	893.04	5.184	0.241
16	943.19	50.009	8.988	948.98	920.05	7.061	0.745
17	968.27	40.667	9.441	977.91	950.91	8.651	0.987
18	1001.06	29.218	4.127	1004.91	979.84	11.079	0.651
19	1012.63	27.842	6.307	1029.99	1006.84	11.126	0.899
20	1041.56	32.18	7.39	1047.35	1031.92	6.762	0.693
21	1060.85	28.05	11.163	1078.21	1049.28	14.167	2.434
22	1091.71	37.171	5.959	1101.35	1080.14	8.611	0.753
23	1122.57	37.757	1.769	1126.43	1103.28	9.092	0.376
24	1132.21	37.338	1.591	1138	1126.43	4.835	0.093
25	1149.57	38.893	1.604	1157.29	1145.72	4.638	0.113
26	1168.86	38.75	5.666	1184.29	1159.22	9.337	0.598
27	1203.58	28.912	19.885	1222.87	1186.22	15.076	3.656
28	1234.44	44.733	5.266	1247.94	1224.8	7.514	0.568
29	1296.16	28.751	16.552	1307.74	1249.87	23.101	4.511
30	1313.52	42.039	4.583	1325.1	1307.74	5.919	0.37
31	1361.74	30.439	21.778	1411.89	1327.03	30.995	7.028
32	1427.32	50.211	1.072	1431.18	1413.82	5.071	0.099
33	1456.26	37.758	13.253	1479.4	1433.11	16.204	2.672

Rutin(G)

SHIMADZU

34	1504.48	33.866	21.957	1535.34	1481.33	18.336	4.801
35	1554.63	50.575	4.582	1562.34	1537.27	6.543	0.484
36	1573.91	47.059	4.04	1579.7	1564.27	4.771	0.294
37	1598.99	32.71	20.688	1627.92	1581.63	17.07	4.689
38	1656.85	34.59	29.091	1788.01	1629.85	25.099	6.117
39	1936.53	89.272	0.107	1938.46	1899.88	1.786	0.008
40	1948.1	89.193	0.054	1950.03	1940.39	0.477	0.001
41	2017.54	87.644	0.107	2021.4	1951.96	3.73	0.031
42	2088.91	85.619	0.55	2098.55	2021.4	4.8	0.067
43	2137.13	85.205	0.037	2139.06	2100.48	2.624	0.016
44	2183.42	85.303	0.077	2193.06	2175.7	1.195	0.004
45	2216.21	85.084	0.117	2223.92	2194.99	2.013	0.011
46	2729.27	66.899	0.096	2731.2	2391.73	43.014	-1.281
47	2875.86	58.916	0.36	2881.65	2736.99	28.51	0.085
48	2906.73	58.139	1.695	2920.23	2883.58	8.438	0.205
49	2937.59	57.413	4.217	2954.95	2922.16	7.241	0.35
50	2985.81	59.774	1.524	3001.24	2956.87	9.541	0.261
51	3346.5	37.595	0.179	3348.42	3003.17	114.087	3.461
52	3358.07	37.445	0.067	3360	3350.35	4.104	0.006
53	3423.65	35.916	8.772	3739.97	3390.86	59.499	3.535

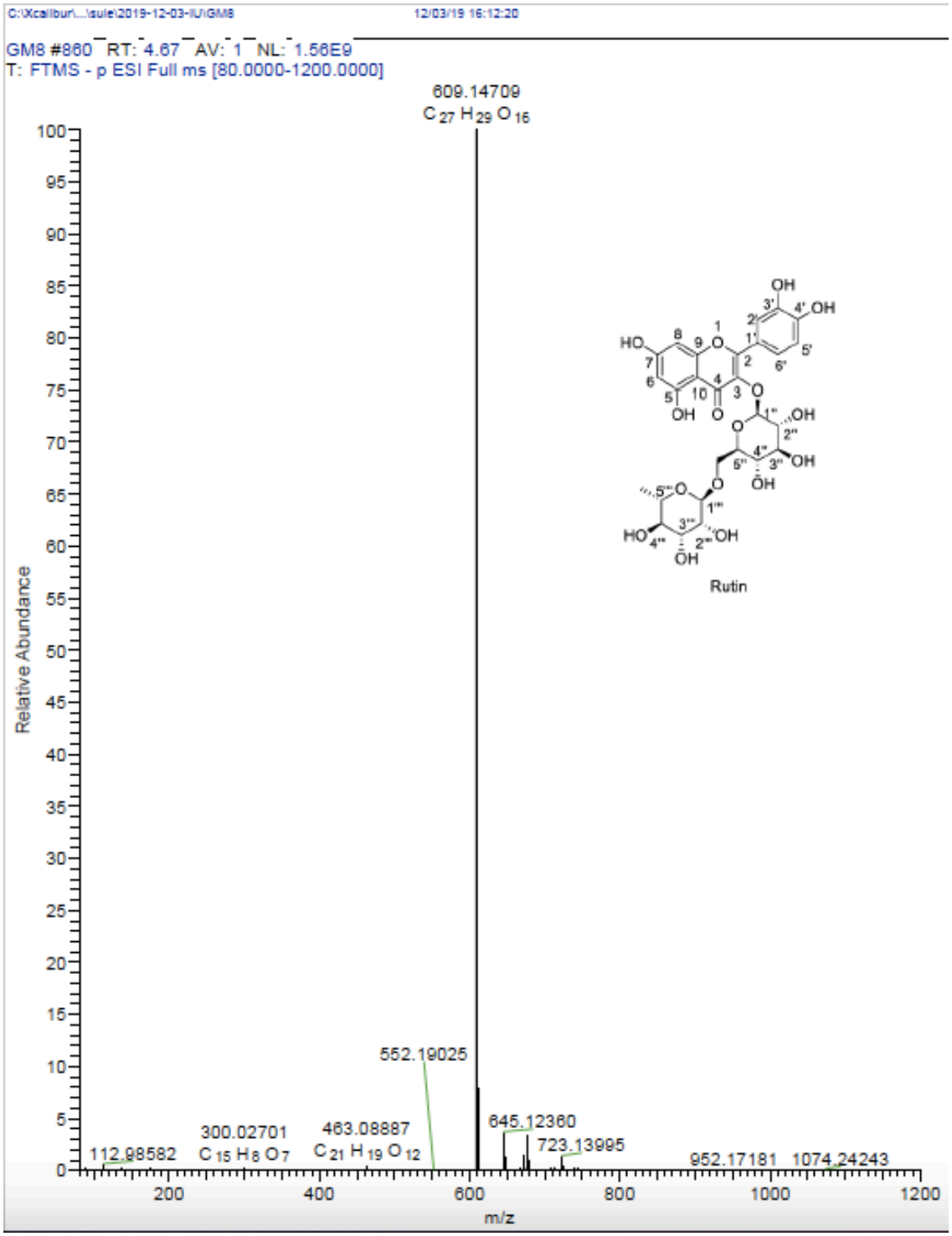
Comment;
GM8

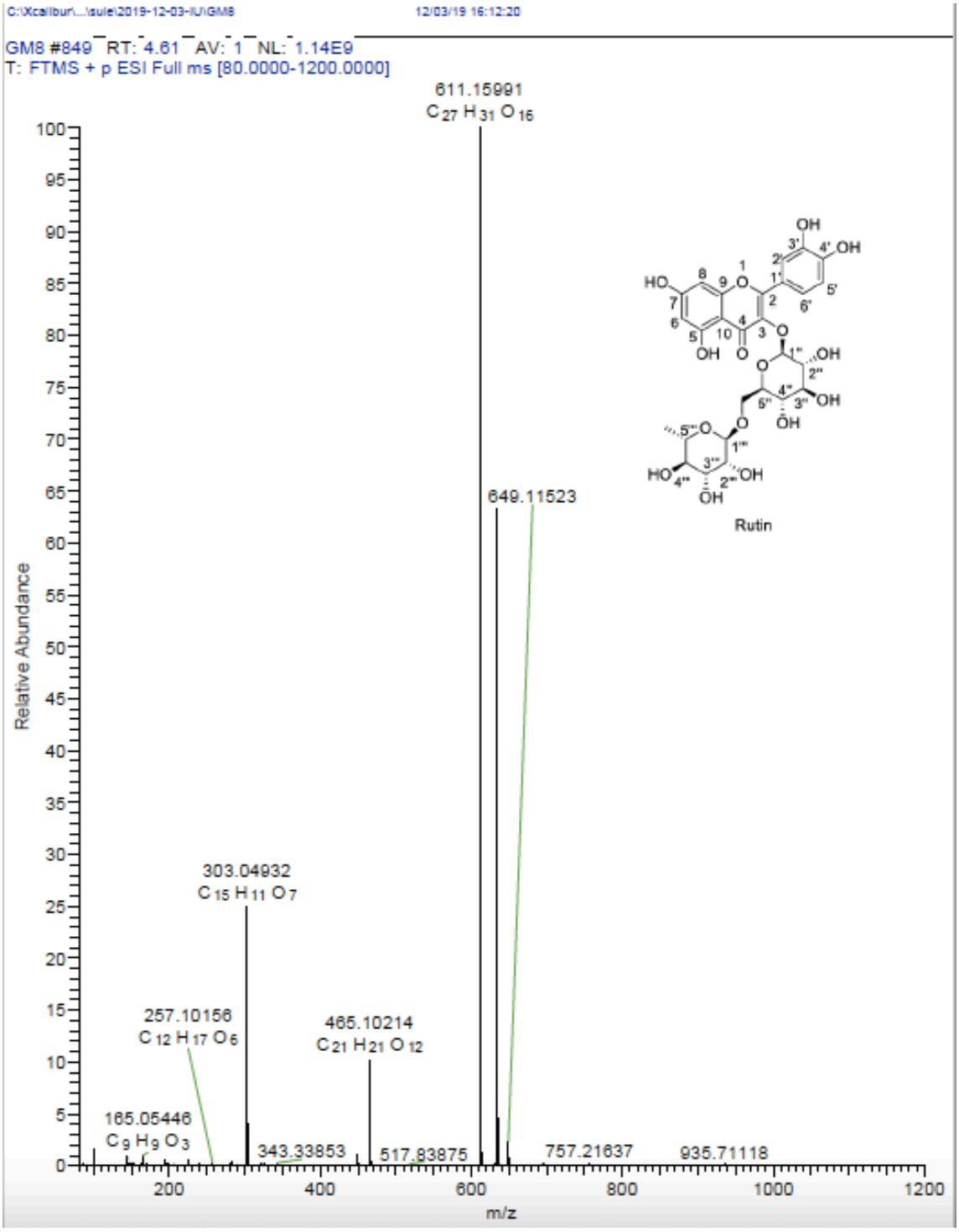
Date/Time; 12/9/2019 3:33:20 PM
No. of Scans; 10
Resolution; 4 [1/cm]
Apodization; Happ-Genzel
User; Administrator

Şekil 4-30: Rutin'e ait KBr ile çekilmiş IR spektrumu

Kütle spektrumu verileri

Bileşiğin molekül ağırlığı ($C_{27}H_{30}O_{16}$) 610.52 g/mol iken negatif modda bir protonun kopmuş molekülü spektrumda 609.1470 g/mol ($C_{27}H_{29}O_{16}$) olarak görüldü. Pozitif modda bir elektron kopması ile oluşan moleküler yapıya ait pik 611.1599 g/mol ($C_{27}H_{31}O_{16}$) olarak görüldü. Glikozitten şeker (glukoz ve ramnoz) kopması ile oluşan aglikona ait parçalanma iyonu ($C_{15}H_{10}O_7$) pozitif modda 303.0493 g/mol olarak görüldü.


C:\Xcalibur\...\sule\2019-12-03-IU\GM8
12/03/19 16:12:20
GM8 #860 RT: 4.67 AV: 1 NL: 1.56E9
T: FTMS - p ESI Full ms [80.0000-1200.0000]
609.14709
C 27 H 29 O 16
552.19025
300.02701
C 15 H 8 O 7
463.08887
C 21 H 19 O 12
645.12360
723.13995
112.98582
952.17181
1074.24243
Relative Abundance
m/z
Rutin



Şekil 4-31: Rutin'e ait kütle spektrumu

İnce tabaka kromatografisi verileri

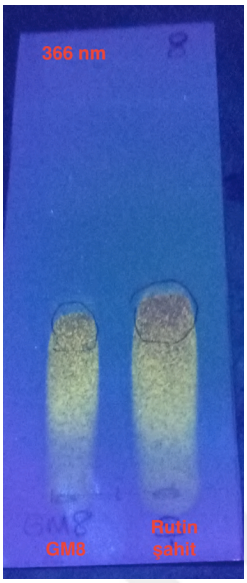
Gün ışığı: Sarı

UV – 254 nm: Mor

UV – 366 nm: Mor

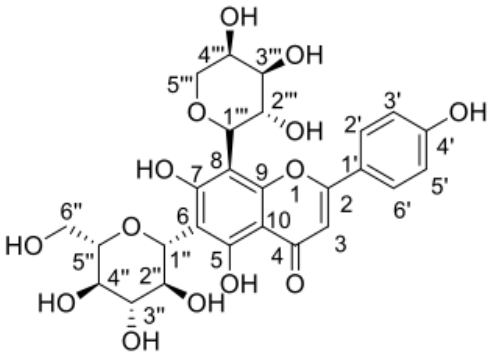
UV (+NA belirteci) - 366 nm: Sarı-Turuncu

Maddenin şahit rutin ile yapılan İTK analizi yapısını doğruladı.



Şekil 4-31: Maddenin şahit rutin ile 366 nm dalga boyunda NA belirteci ile renklendirilmiş İTK görüntüsü (Mobil faz: Toluen:Metanol (1:3))

4.3.7. Şaftozit (YE10)

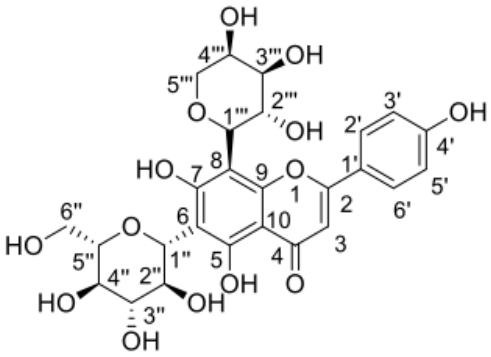


Şaftozit

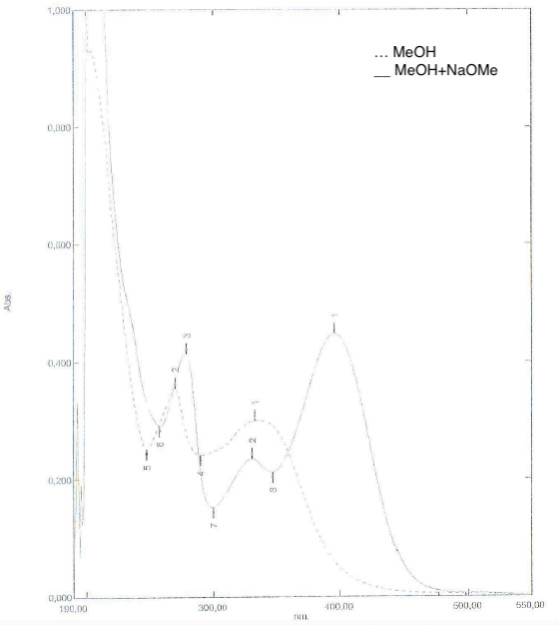
UV spektrum verileri

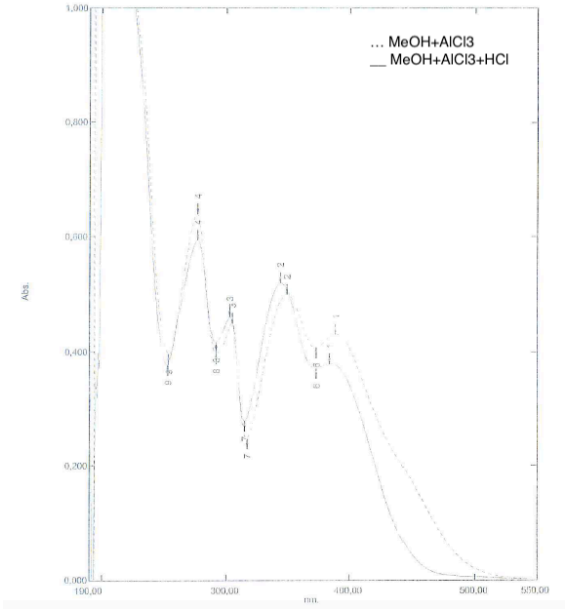
Kullanılan çözücü ve kaydırma reaktifleri	**Bant II (λ_{max} nm)**	**Bant I (λ_{max} nm)**	**Yorum**
MeOH	270	333	Flavon
MeOH+NaOMe	279	331, 396↑	4'-OH, 7-OH
MeOH+$AlCl_3$	277	305, 349, 389	5-OH
MeOH+$AlCl_3$+HCl	277	303, 344, 384	Orto di- OH yok
MeOH+NaOAc	273	Yaygın band	7-OH? (6 ve 8

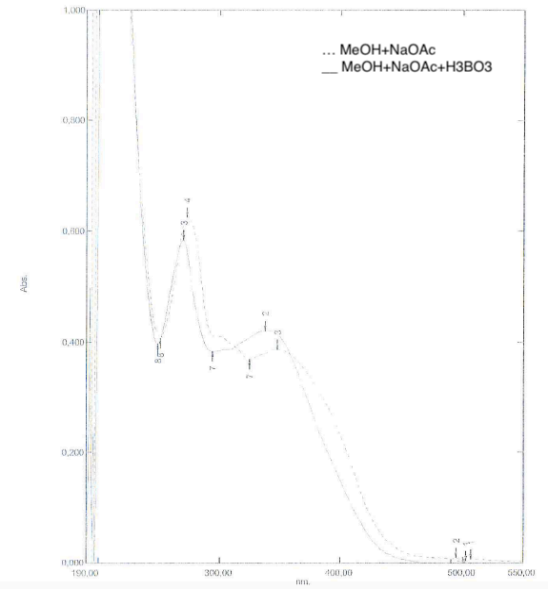
			konumu kapalı)
MeOH+NaOAc+H_3BO_3	270	338	Orto di- OH yok



Şaftozit







Şekil 4-32: Şaftozit'e ait kaydırma belirteçleri ile çekilmiş UV spektrumu

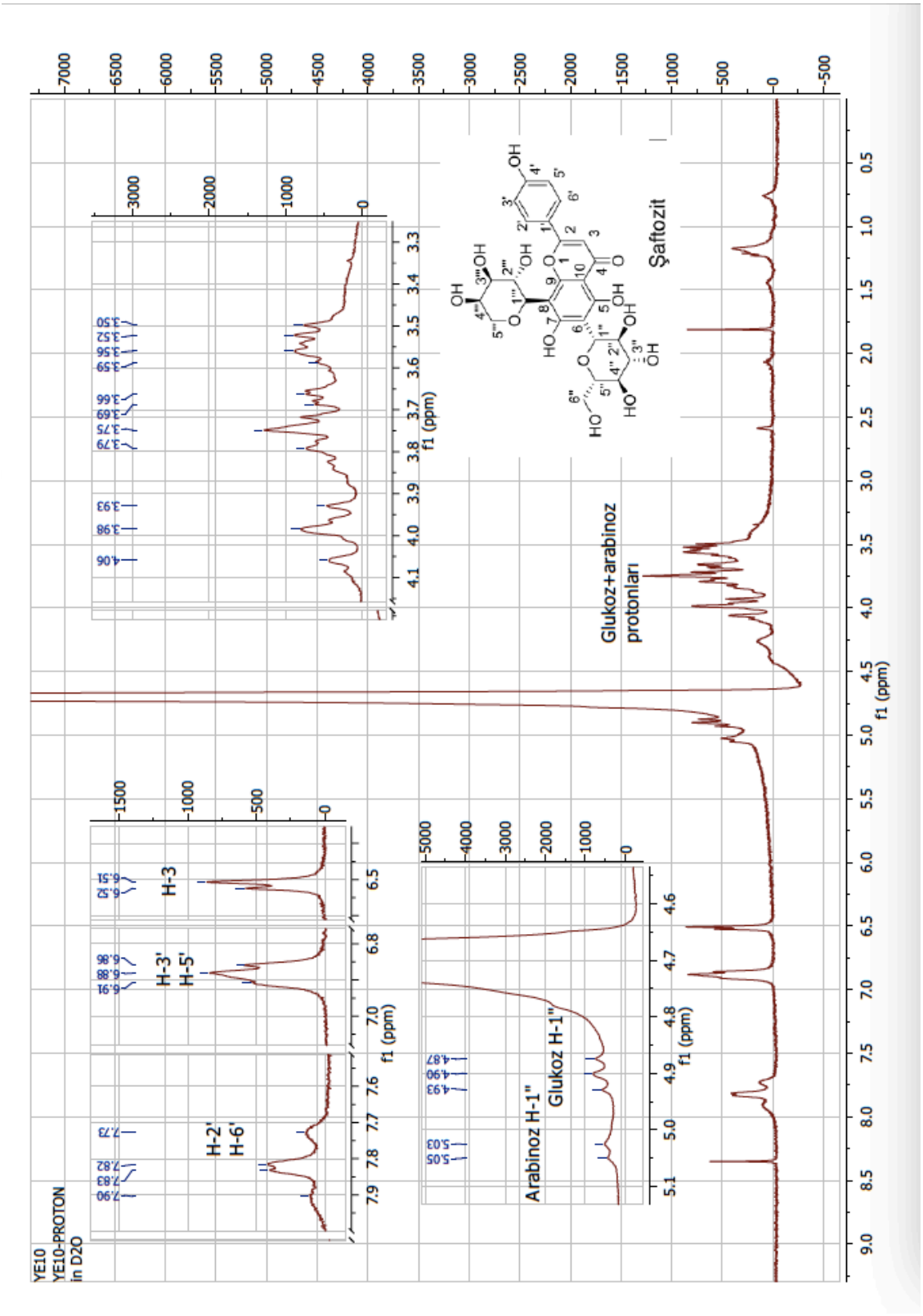
UV değerlerinin analizi

- MeOH spektrumunda 333 nm'de Bant I piki vermesi molekülün bir flavon olduğunu gösterir.
- NaOMe spektrumunda absorpsiyon şiddetinin artışıyla beraber 63 nm'lik bir batokromik kayma, 4' karbonunda serbest bir OH olduğunu gösterir. Spektrumda görülen 331 nm'deki bant 7 konumunda OH grubunun olabileceğine işaret eder.
- $AlCl_3$ spektrumuna ait Bant I'in, $AlCl_3$/HCl spektrumunun Bant I'i ile kıyaslandığında 5 nm'lik bir hipsokromik kayma göstermesi, molekülün B halkasında orto dihidroksi olmadığını gösterir. MeOH Bant I'ine göre $AlCl_3$ Bant I'indeki batokromik kaymaye ilaveten $AlCl_3$/HCl spektrumunun MeOH spektrumundan farklı olması serbest 5-OH varlığını gösterir.
- MeOH Bant II'sinden farklı olarak NaOAc Bant II'sinde görülen 3 nm'lik bir batokromik kayma, C-7'ye bağlı olan OH grubunun kapalı olabileceğini ya da açık ve 6 veya 8 konumunun sübstitüe olabileceğini gösterir.
- MeOH spektrumu Bant I'inde, NaOAc/H_3BO_3 varlığında belirgin bir değişiklik olmaması, flavonoitin B halkasında orto dihidroksi gruplarının olmadığını gösterir.

Bu değerler Şaftozit'in literatürde yer alan UV değerleriyle uygunluk göstermiştir (Österdahl 1979; Bouillant ve ark.1975).

^{1}H-NMR verileri (D_2O, 400 mHz)

Pozisyon	**H**	**δ H ppm, J Hz**
2	-	
3	H-3	6.51 (s, 1H)
4	-	
5	-	
6	-	
7	-	
8	-	
9	-	
10	-	
1’	-	
2’, 6’	H-2’, H-6’	7.73 (dd, J=2.0 Hz ve 9.0 Hz, 1H)
5’	H-3’, H-5’	6.88 (d, J=9.0 Hz, 1H)
Glukoz	H-1’’	4.87 (d, J=8.5 Hz, 1H)
Arabinoz	H-1’’	5.03 (d, J=9.0 Hz, 1H)
Glukoz+ Arabinoz	9H	3.50-4.06 (m)



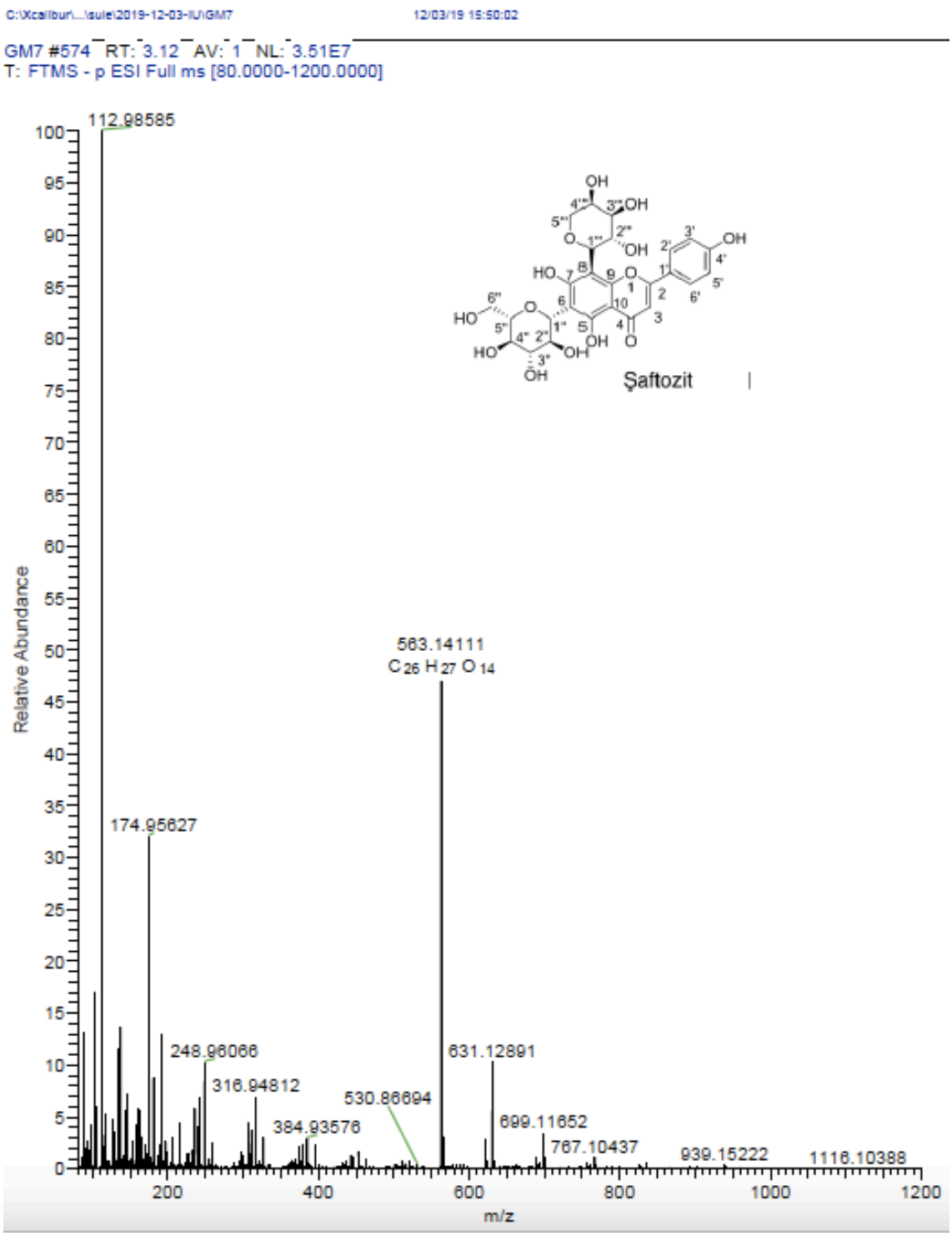
Şekil 4-33: Şaftozit'e ait D_2O ile çekilmiş ^{1}H-NMR sprketrumu

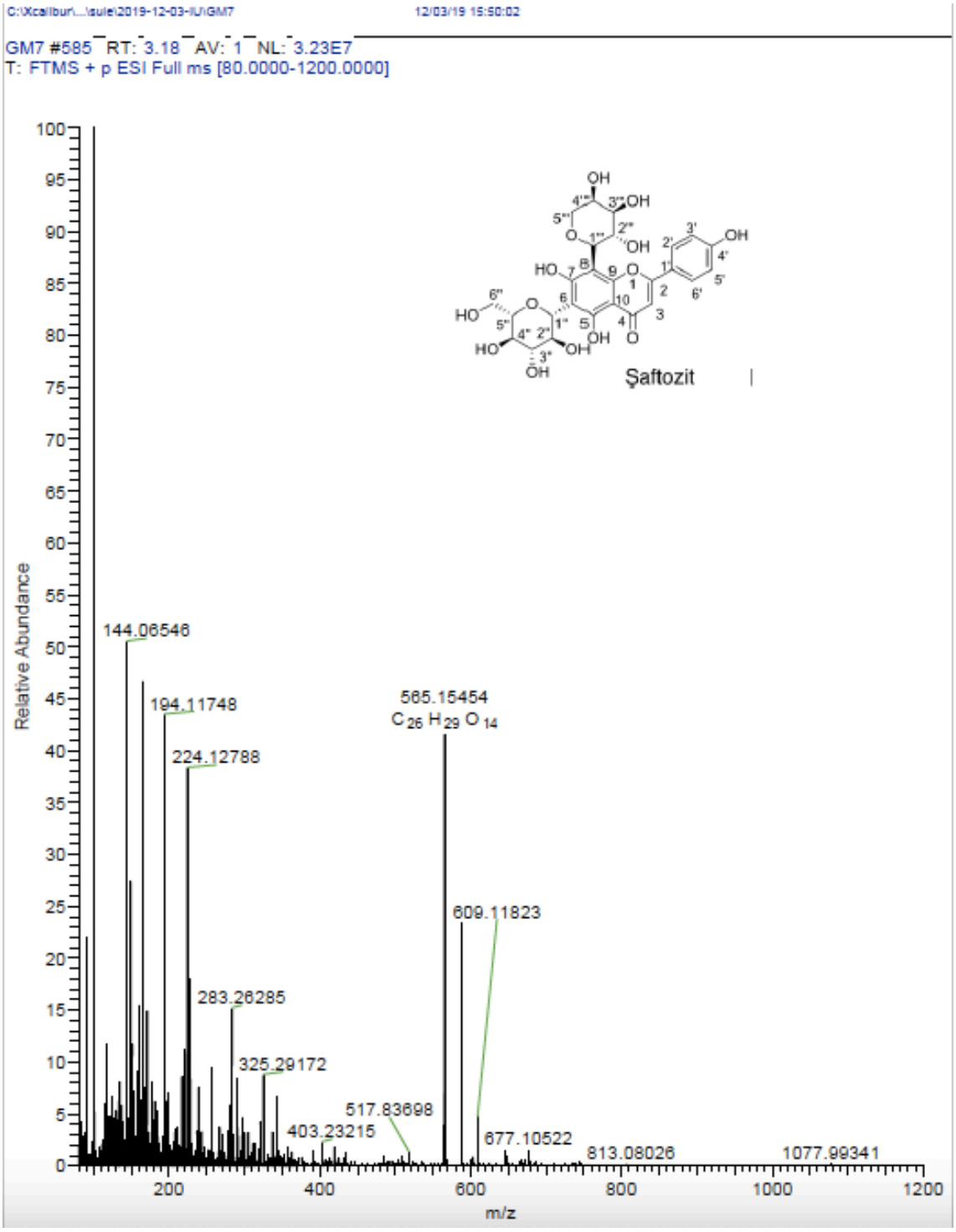
^{1}H-NMR spektrum verileri literatür ile benzerlik göstermektedir. (Österdahl 1979; Bouillant ve ark.1975). Ancak yorum için uygun değildir. Madde miktarı yetersiz

olduğundan tekrar ^{1}H-NMR spektrumu alınamamıştır. UV, Mass spektrum verileri, İTK ile desteklenmiş ve maddenin Şaftozit olduğu belirlenmiştir.

Kütle spektrumu verileri

Bileşiğin molekül ağırlığı ($C_{26}H_{28}O_{14}$) 564.4921 g/mol iken negatif modda bir protonun kopmuş molekülü spektrumda 563.1411 g/mol ($C_{26}H_{27}O_{14}$) olarak görüldü. Pozitif modda bir elektron kopması ile oluşan moleküler yapıya ait pik 565.1545 g/mol ($C_{26}5H_{29}O_{14}$) olarak görüldü. Molekülden 6 konumdan bağlı olan glukozun kopması ile oluşan iyon negatif modda 384.9357 g/mol olarak görüldü.


C:\Xcalibur\...\sule\2019-12-03-IU\GM7
12/03/19 15:50:02
GM7 #574 RT: 3.12 AV: 1 NL: 3.51E7
T: FTMS - p ESI Full ms [80.0000-1200.0000]
Şaftozit
Relative Abundance
m/z
112.98585
563.14111
C26 H27 O14
174.95627
248.96066
316.94812
384.93576
530.86694
631.12891
699.11652
767.10437
939.15222
1116.10388



Şekil 4-34: Şaftozit'e ait kütle spektrumu

İnce tabaka kromatografisi verileri

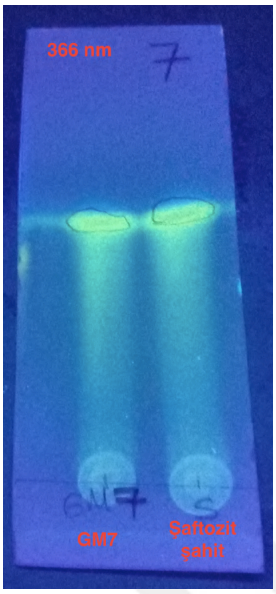
Gün ışığı: Sarı

UV – 254 nm: Mor

UV – 366 nm: Mor

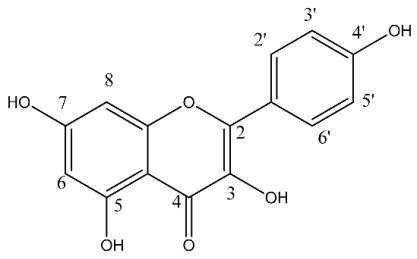
UV (+NA belirteci) - 366 nm: Sarı

Maddenin şahit şaftozit ile yapılan İTK analizi yapısını doğruladı.



Şekil 4-35: Maddenin şahit şaftozit ile 366 nm dalga boyunda NA belirteci ile renklendirilmiş İTK görüntüsü (Mobil faz: Toluen:Metanol (1:3))

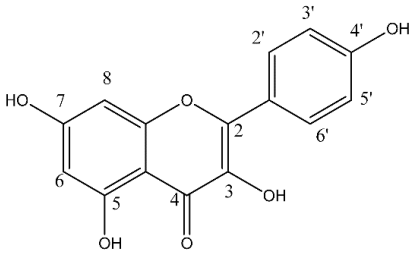
4.3.8. Kemferol (ÇM3)



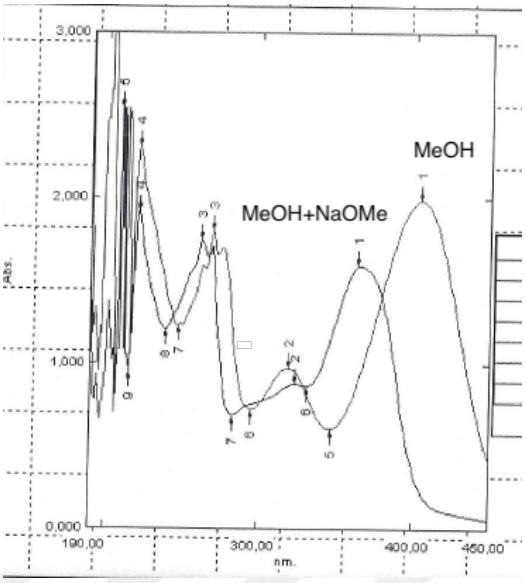
Kemferol

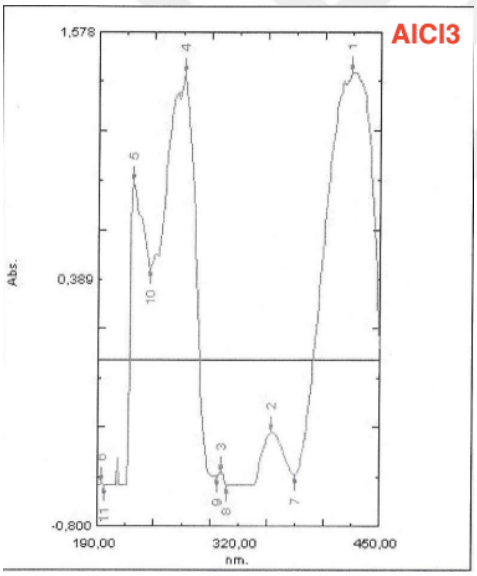
UV spektrum verileri

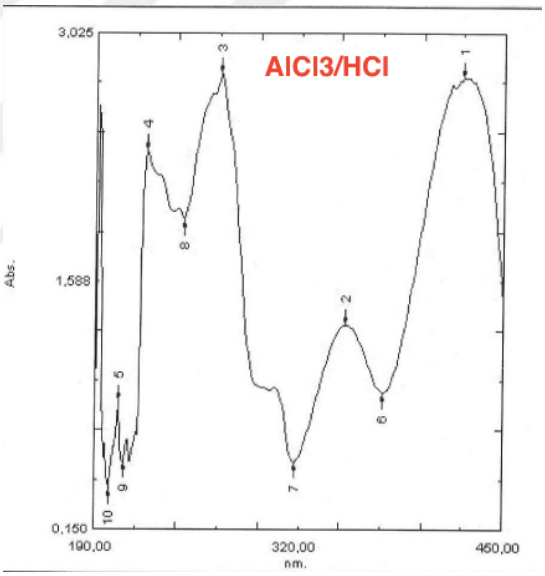
Kullanılan çözücü ve kaydırma reaktifleri	**Bant II (λ_{max} nm)**	**Bant I (λ_{max} nm)**	**Yorum**
MeOH	263	323, 364	Flavonol
MeOH+NaOMe	269	319, 404 ↑	4'-OH, 7-OH
MeOH+$AlCI_3$	270	304, 350, 423	5-OH
MeOH+$AlCI_3$+HCI	269	349, 423	Orto di- OH yok
MeOH+NaOAc	272	306, 379	7-OH
MeOH+NaOAc+H_3BO_3	262	323, 362	Orto di- OH yok

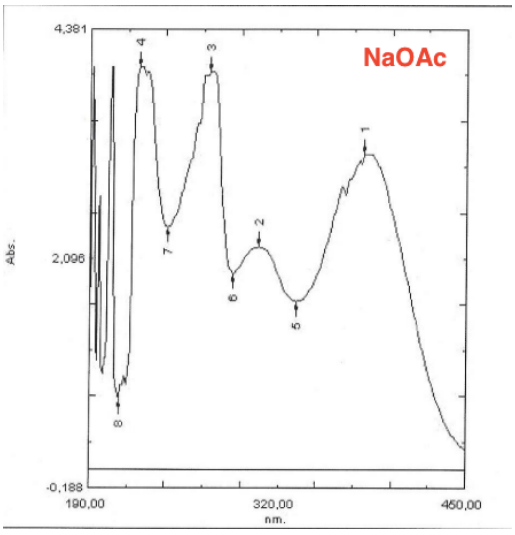

HO
OH
OH
OH
O
O
2'
3'
4'
5'
6'
2
3
4
5
6
7
8

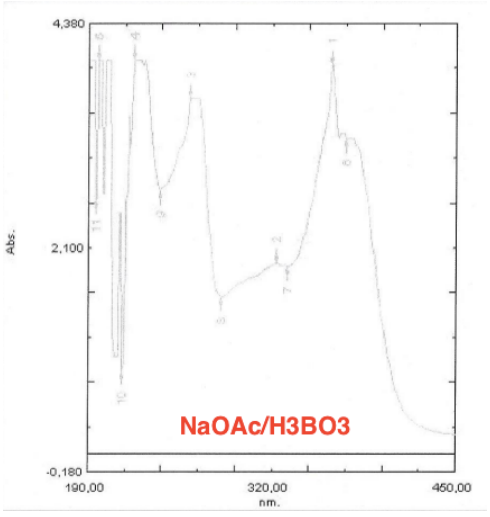
Kempferol


MeOH
MeOH+NaOMe
Abs.
nm.
3,000
2,000
1,000
0,000
190,00
300,00
400,00
450,00


AlCl3
Abs.
nm.
1,578
0,389
-0,800
190,00
320,00
450,00


AlCl3/HCl
Abs.
nm.
3,025
1,588
0,150
190,00
320,00
450,00


NaOAc
Abs.
nm.
4,381
2,096
-0,188
190,00
320,00
450,00


NaOAc/H3BO3
Abs.
nm.
4,380
2,100
-0,180
190,00
320,00
450,00

Şekil 4-36: Kempferol'e ait kaydırma belirteçleri ile çekilmiş UV spektrumu

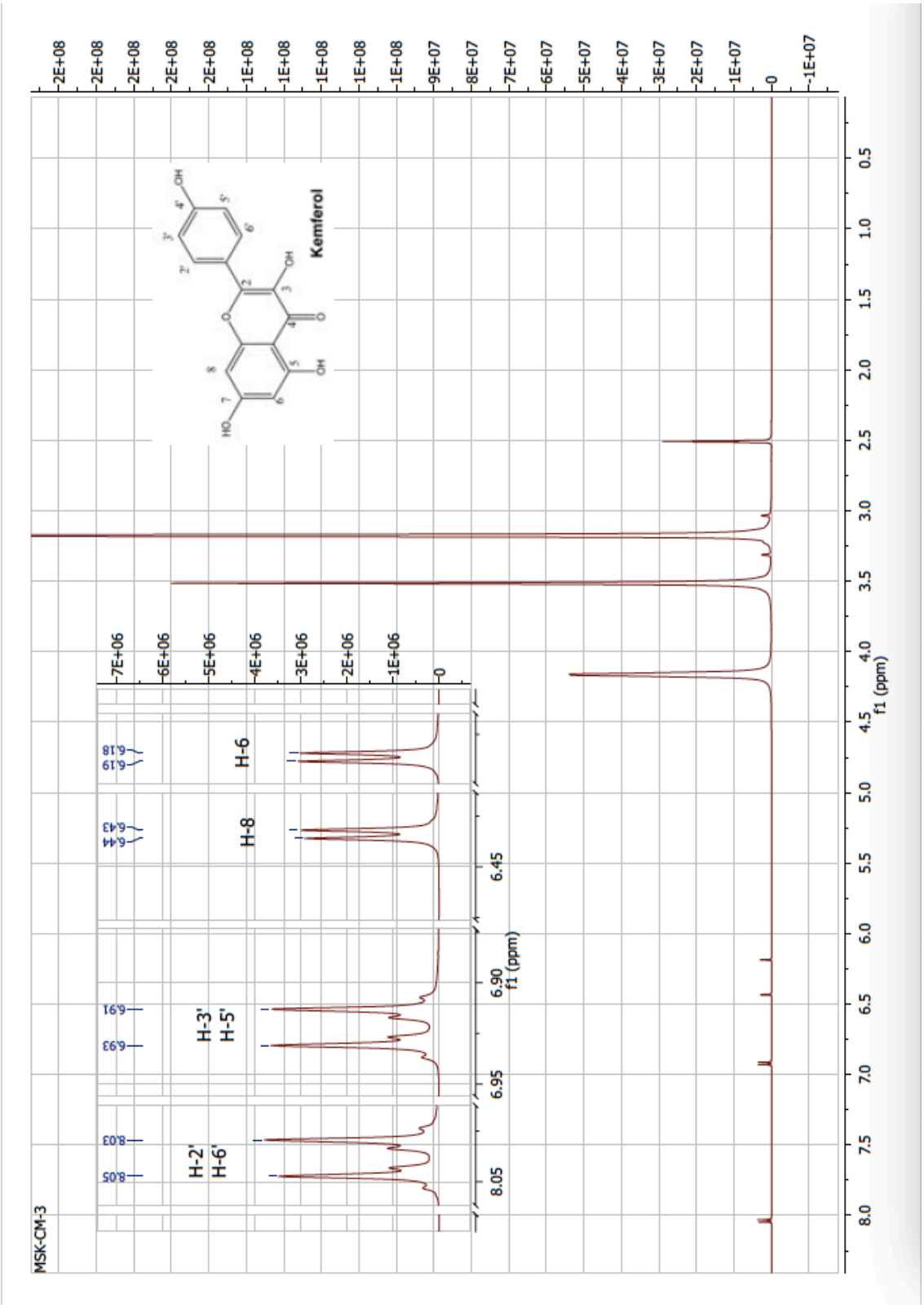
UV değerlerinin analizi

- MeOH spektrumunun Bant I değeri 364 nm olduğuna göre molekül flavonol yapısındadır.
- Molekülün NaOMe spektrumuna ait verilere bakıldığında, MeOH spektrumu ile kıyaslandığında Bant 1'deki absorpsiyon şiddetinde bir artış ve 40 nm'lik bir batokromik kayma, 4' karbonunda serbest OH olduğunu gösterir. Spektrumda görülen 319 nm'de ki pik 7 konumunda OH grubunun olabileceğine işaret eder.
- $AlCl_3$ spektrumuna ait Bant I'in, $AlCl_3$/HCl spektrumunun Bant I'i ile kıyaslandığında pik değerlerinde bir değişiklik olmaması bileşiğin B halkasında bir orto dihidroksi grubunun olmadığını gösterir.
- $AlCl_3$/HCl spektrumuna ait Bant I a'nın MeOH Bant I'e göre 59 nm'lik bir batokromik kayma yapması, molekülün 5-OH ve 3-OH yapısında bir flavonol olduğunu gösterir.
- Molekülün NaOAc Bant II'sinin, MeOH Bant II'sine göre 9 nm'lik bir batokromik kayma göstermesi, C-7 konumunda serbest OH varlığına işaret eder.
- NaOAc/H_3BO_3 ve MeOH spektrumlarının Bant I değerlerini kıyaslandığında; MeOH'ün Bant I'inin, NaOAc/H_3BO_3 varlığında 2 nm'lik bir hipsokromik kayma göstermesi, flavonoitin B halkasında orto diOH gruplarının olmadığını gösterir.

UV değerleri literatür ile uygunluk göstermiştir (Mabry ve ark. 1970).

^{1}H-NMR verileri (DMSO-d6, 500 MHz)

Pozisyon	**H**	**δ H ppm, J Hz**
2	-	
3	-	
4	-	
5	-	
6	H-6	6.18 (d, J=2.0Hz, 1H)
7	-	
8	H-8	6.43 (d, J=2.0Hz, 1H)
9	-	
10	-	
1’	-	
2’, 6’	H-2’, H-6’	8.04 (dd, J=2.0 ve 9.0Hz, 2H)
3’, 5’	H-3’, H-5’	6.92 (dd, J=2.0 ve 9.0Hz, 2H)



Şekil 4-37: Kempferol'e ait DMSO-d6 ile çekilmiş ^{1}H-NMR spektrumu

^{1}H-NMR spektrumu yorumu

- 6.18 ppm'de çıkan dublet 6. karbona bağlı protona aittir. H-8 ile meta etkileşmesi yapmış ve j değeri 2 Hz olan bir protonluk dublet olarak görünmektedir.

-6.43 ppm'de çıkan dublet H-8'e aittir. H-6 ile meta etkileşmesi yapmış ve etkileşim sabiti 2.0Hz olarak görünmektedir. H-8 protonunun H-6 protonundan daha aşağı alanda çıkmasının nedeni H-6'nın H-5 ve H-7 de bulunan OH gruplarının gölgeleyici etkisinde kalmış olmasıdır.

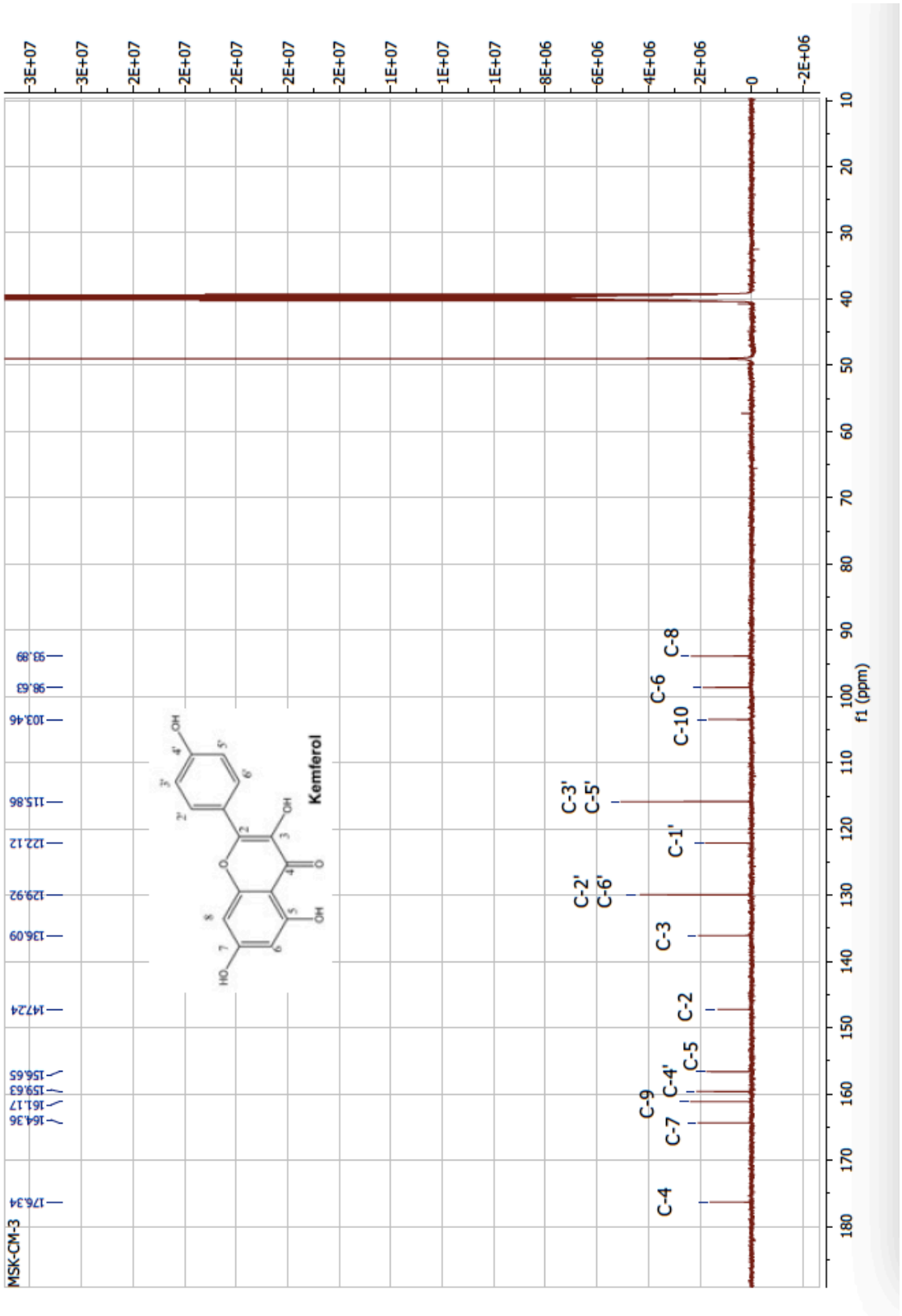
- 6.92 ppm'de görülen iki ikili pik H-3' ile H-5' protonunun birbiri ile yaptığı meta etkileşmesi (J= 2.0Hz) ve H-3' protonununH-2' ile yaptığı orto ve H-5' protonununH-6' ile yaptığı orto (J=9.0Hz)etkileşmeleri sonucu görülen iki ikili piklerdir.

- 8.04 ppm'de çıkan doubletin doubleti H-2' ve H-6' protonunun birbiri ile yaptığı meta etkileşmeleri (J=2.0 Hz) ve H-2' protonunun H-3' ile yaptığı orto etkileşmesi, H-6' protonunun H-5' ile yaptığı orto etkileşmeleri (J=9.0Hz) sonucu görülen piklerdir.

^{1}H-NMRdeğerleri literatür ile uygunluk gösterdi (Mabry ve ark. 1970).

^{13}C-NMR verileri (CD_3OD, 125MHz)

Pozisyon	**δ_c (ppm)**
2	147.24
3	136.09
4	176.34
5	156.65
6	98.63
7	164.36
8	93.89
9	161.17
10	103.46
1'	122.12
2'	129.92
3'	115.86
4'	159.63
5'	115.86
6'	129.92

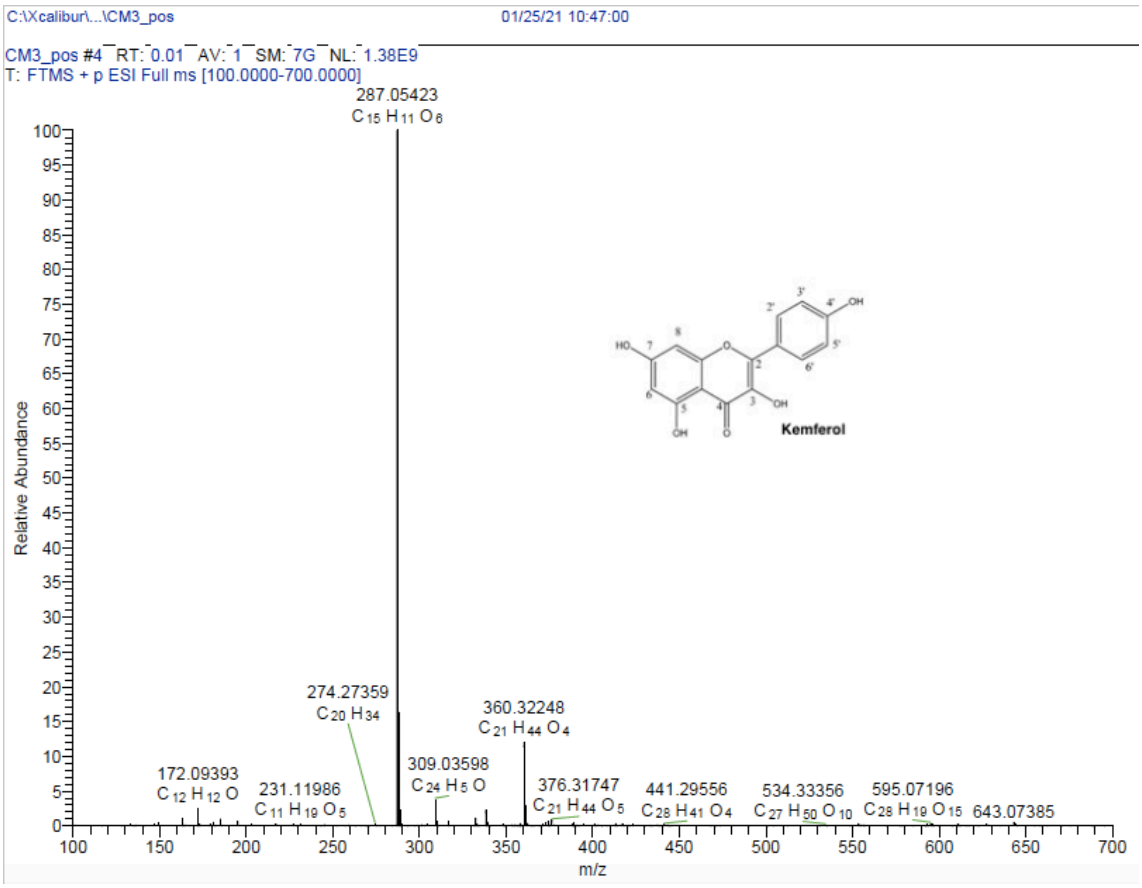


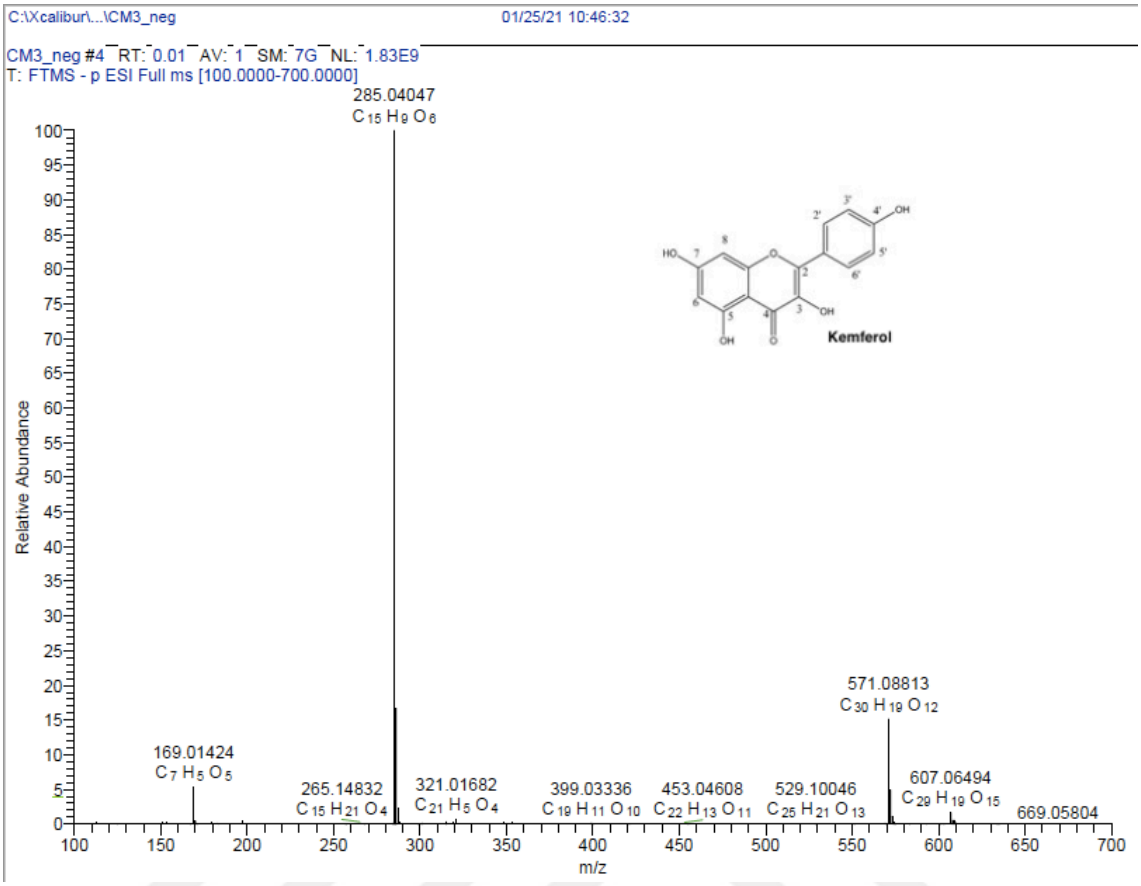
Şekil 4-38: Kempferol'e ait CD_3OD ile çekilmiş ^{13}C-NMR spektrumu

^{13}C-NMR değerleri literatür ile uygunluk göstermiştir (Scotti ve ark. 2011).

Kütle spektrumu verileri

Bileşiğin molekül ağırlığı (C_{15} H_{10} O_6) 286.23 g/mol iken negatif modda bir protonun kopmuş iyonu spektrumda 285.04 g/mol (C_{15} H_9 O_6) olarak görüldü. Pozitif modda bir elektron ayrılması ile oluşan iyon 287.05 g/mol (C_{15} H_{11} O_6) olarak görüldü.





Şekil 4-39: Kempferol'e ait kütle spektrumu

İnce tabaka kromatografisi verileri

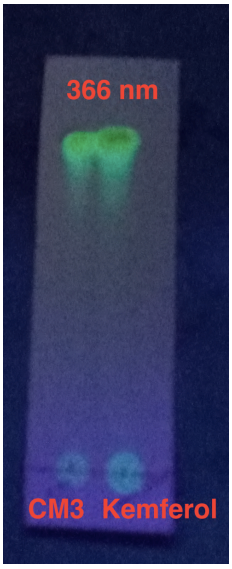
Gün ışığı: Sarı

UV – 254 nm: Sarı

UV – 366 nm: Sarı

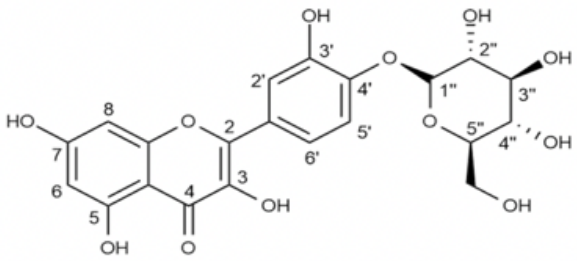
UV (+NA belirteci) - 366 nm: Sarımsı yeşil

Maddenin şahit kempferol ile yapılan İTK analizi yapısını doğruladı.



Şekil 4-40: Maddenin şahit Kempferol ile 366 nm dalga boyunda NA belirteci ile renklendirilmiş İTK görüntüsü (Mobil faz: Toluen:Aseton (1:2))

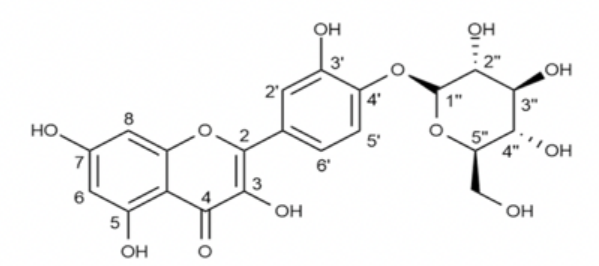
4.3.9. Spireozit (ÇM12)



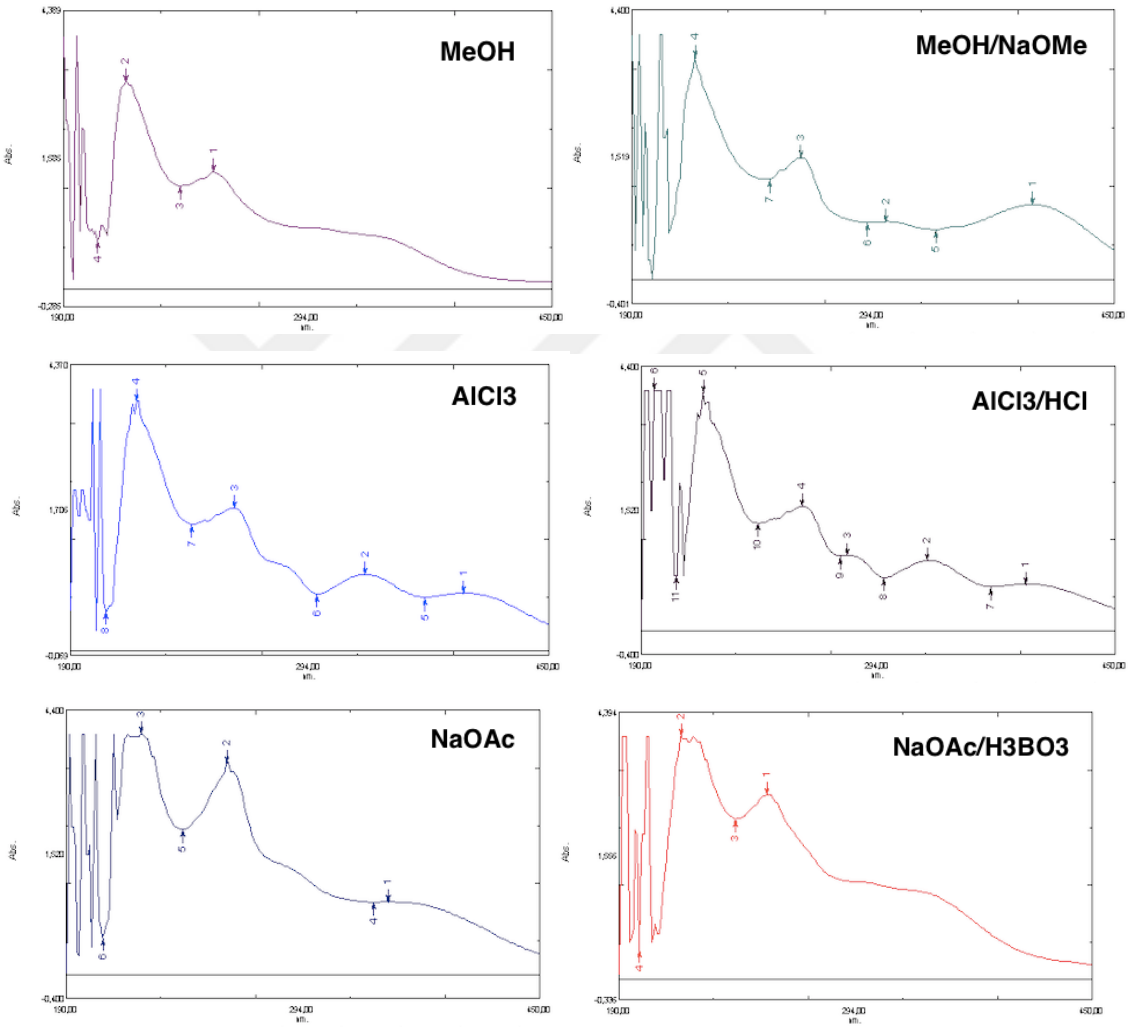
Spireozit

UV spektrum verileri

Kullanılan çözücü ve kaydırma reaktifleri	**Bant II (λ_{max} nm)**	**Bant I (λ_{max} nm)**	**Yorum**
MeOH	270	325, 356	Flavonol
MeOH+NaOMe	281	327, 406↑	4'- oksijenasyon, 7-OH
MeOH+$AlCl_3$	279	350, 404	5-OH
MeOH+$AlCl_3$+HCl	278	303, 347, 401	Orto di- OH yok
MeOH+NaOAc	278	367	7-OH
MeOH+NaOAc+H_3BO_3	271	355	Orto di- OH yok



Spireozit



Şekil 4-41: Spireozit'in kaydırma belirteçleri ile çekilmiş UV spektrumu

UV değerlerinin analizi

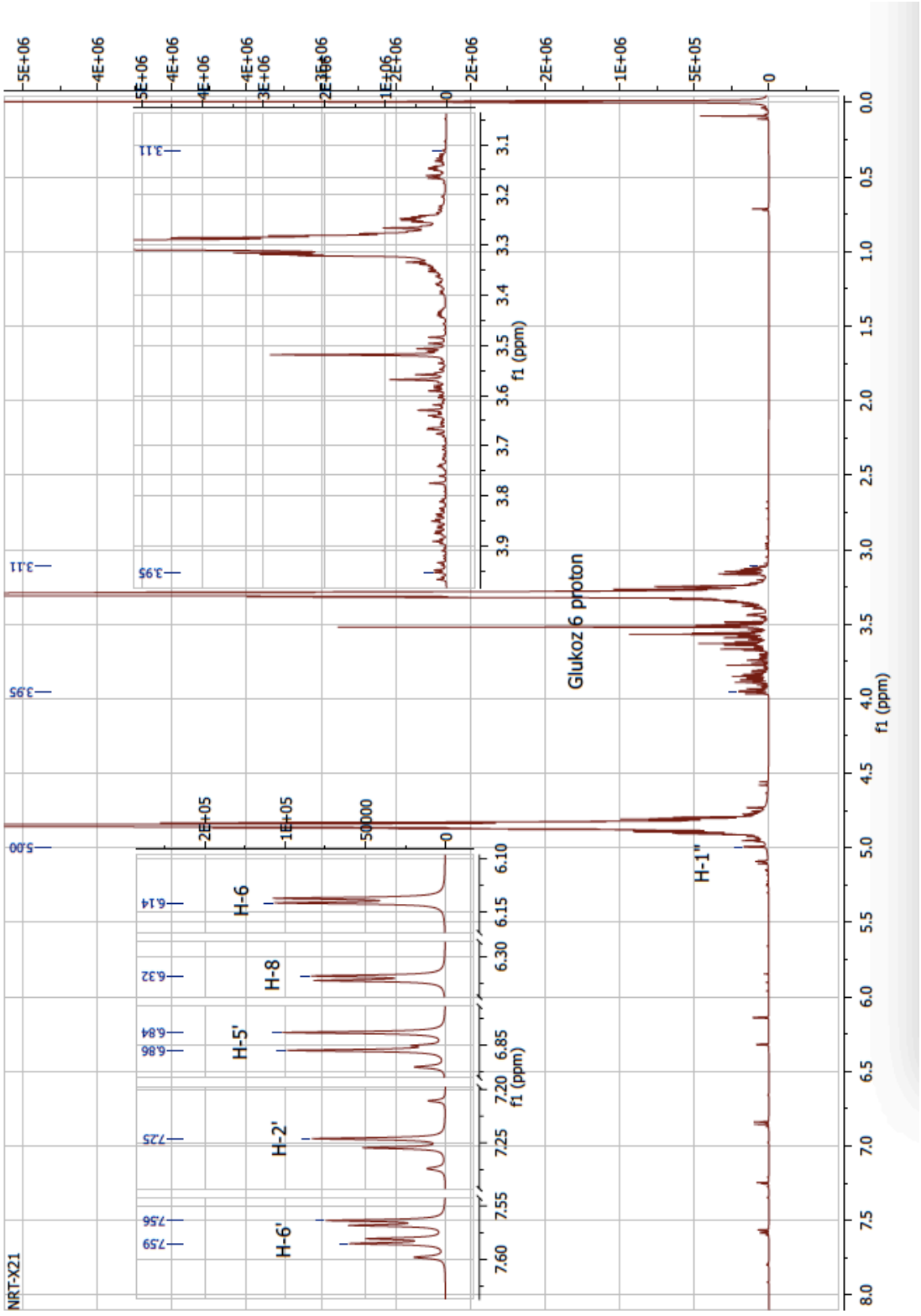
- MeOH spektrumunda 356 nm'de Bant I görülmesi bileşiğin flavonol olduğunu gösterir.

- Molekülün NaOMe spektrumuna ait verilere bakıldığında, Bant I de görülen 50 nm' lik batokromik kayma C-4' pozisyononda oksijenasyon olduğuna işaret eder (Yapılan İTK ve KK sonrası kullanılan NA belirteci ile yapılan kontrollerde maddenin 366 nm'de kahverengi olarak görülmesi 4'- konumunun kapalı olduğuna işaret eder). Spektrumda görülen 325 nm' deki bant 7 konumunda OH grubunun olabileceğini gösterir.
- $AlCl_3$ spektrumuna ait Bant I'in, $AlCl_3$/HCl spektrumunun Bant I'i ile kıyaslandığında 3 nm'lik bir hipsokromik kayma göstermesi, bileşiğin B halkasında orto diOH grubunun olmadığını gösterir. MeOH Bant I'ine göre $AlCl_3$ spektrumunun Bant I'inde görülen batokromik kayma ve HCl ilavesi sonucunda elde edilen spektrumun MeOH spektrumundan farklı oluşu molekülün serbest 5-OH taşıdığını gösterir.
- Molekülün NaOAc spektrumuna ait Bant II'sinin, MeOH spektrumu Bant II'sine göre 8 nm'lik batokromik kayma gözlenmesi C-7 konumunda serbest OH varlığını gösterir.
- MeOH Bant I'inin NaOAc/H_3BO_3 Bant I'i ile belirgin bir farklılık göstermemesi, flavonoitin B halkasında orto dihidroksi olmadığını gösterir

Bu değerler Spireozit'in literatürde yer alan UV değerleri ile uygunluk göstermiştir (Mabry ve ark. 1970).

^{1}H-NMR değerleri (CD_3 OD, 500 MHz)

Pozisyon	H	δ H ppm, J Hz
2	-	
3	-	
4	-	
5	-	
6	H-6	6.14 (d, j=2.0Hz, 1 H)
7	-	
8	H-8	6.32 (d, j=2.0 Hz, 1 H)
9	-	
10	-	
1’	-	
2’	H-2’	7.25 (d, j=2 Hz, 1 H)
6’	H-6’	7.56 (dd, J=2 ve 7Hz, 2H)
5’	H-5’	6.84 (d, j=7 Hz, 1 H)
4’	-	
Glukozil	H-1’’	5.0 (d, j= 7Hz, 1 H)
Glukozil	6 proton H-2’’, 3’’, 4’’, 5’’, 2H-6’’	3.10-3.95 (m, 6H)



Şekil 4-42: Spireozit'e ait ^{1}H-NMR spektrumu

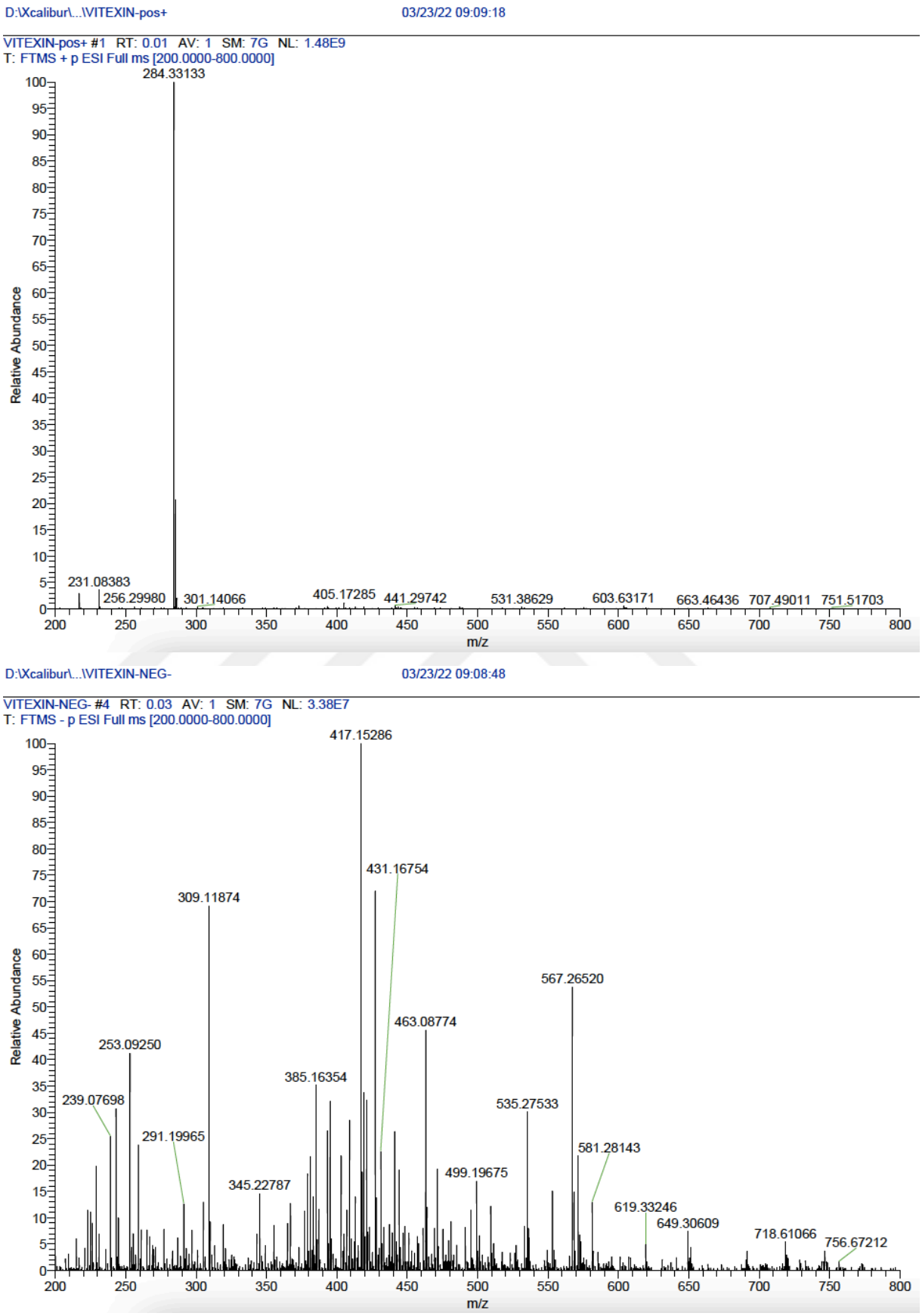
^{1}H-NMR spektrumu yorumu

- 6.14 ve 6.32 ppm'de çıkan dubletler A halkasında bulunan H-6 ve H-8 protonlarının j değeri 2 Hz olan meta etkileşmesinden kaynaklanmaktadır.
- 7.56 ppm'de çıkan dubletin dubleti H-6' protonunun H-2' protonu ile yaptığı meta etkileşimi sonucu verdiği j değeri 2.0 Hz olan dublet ile 5' protonu ile yaptığı orto etkileşimi sonucu verdiği j değeri 7.0 Hz olan dublettir.
- 7.25 ppm'de çıkan dublet H-2' protonunun H-6' protonu ile yaptığı meta etkileşmesi sonucu verdiği j değeri 2.0 Hz olan dublettir.
- 6.84 ppm'de çıkan dublet H-5' protonunun H-6' ile yaptığı orto etkileşmesi sonucu verdiği j değeri 7.0 Hz olan dublettir.
- 5.0 ppm'de çıkan j değeri 7.0 Hz olan dublet glukozun 1'' protonuna aittir ve şekerin 4' konumundaki OH üzerinden β-glikozit bağı oluşturduğunu göstermektedir.
- Glikozun H-2'', H-3'', H-4'', H-5'' ve H-6'' (2H) protonları 3.10-3.95 ppm' de multiplet olarak çıkmıştır.

Sonuçlar literatür ile uygunluk göstermiştir (Mabry 1970).

Kütle spektrumu verileri

Bileşiğin molekül ağırlığı (C_{21} H_{20} O_{12}) 464.37 g/mol iken negatif modda bir protonun kopmuş iyonu spektrumda 463.0877 g/ mol (C_{21} H_{19} O_{12}) olarak görüldü. Molekülden karbonil (CO) ve hidroksil ayrılması ile oluşan iyon negatif modda 417.1528 g/ mol olarak görüldü. B-1 iyonu negatif modda 309.1187 g/mol olarak görüldü. Pozitif modda molekülden şeker (glukoz) ayrılması ile oluşan iyon 284.3313 g/ mol olarak görüldü.



Şekil 4-43: Spireozit'in kütle spektrumu

İnce tabaka kromatografisi verileri

Gün ışığı: Sarı

UV – 254 nm: Sarı

UV – 366 nm: Sarı

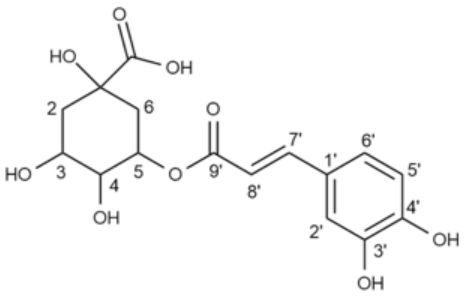
UV (+NA belirteci) - 366 nm: Kahverengi

Maddenin 254 nm de NA belirteci ile verdiği görüntü:



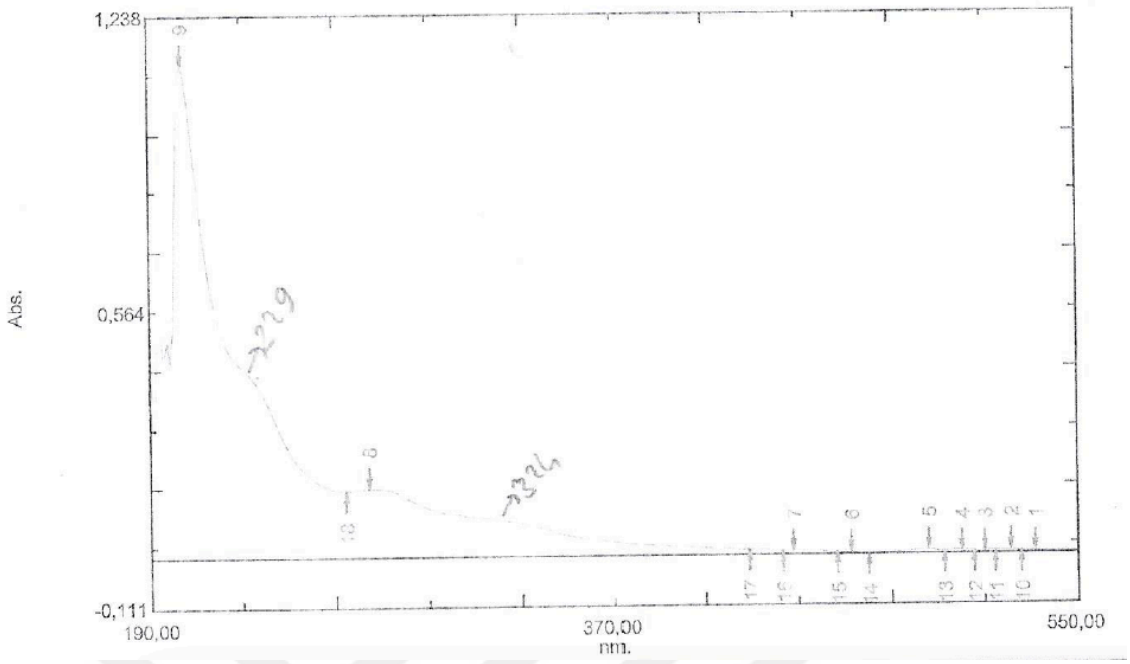
Şekil 4-44: Maddenin 254 nm dalga boyunda NA belirteci ile renklendirilmiş İTK görüntüsü (Mobil faz: Toluen:Aseton (1:2))

4.3.10. Klorojenik asit (YK2)



Klorojenik asit

UV Spektrum verileri



No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	↑	534.00	0.006	
2	↑	524.00	0.007	
3	↑	514.00	0.006	
4	↑	505.00	0.006	
5	↑	492.00	0.008	
6	↑	462.00	0.003	
7	↑	440.00	0.010	
8	↑	275.00	0.158	
9	↑	203.00	1.126	
10	↓	528.00	0.003	

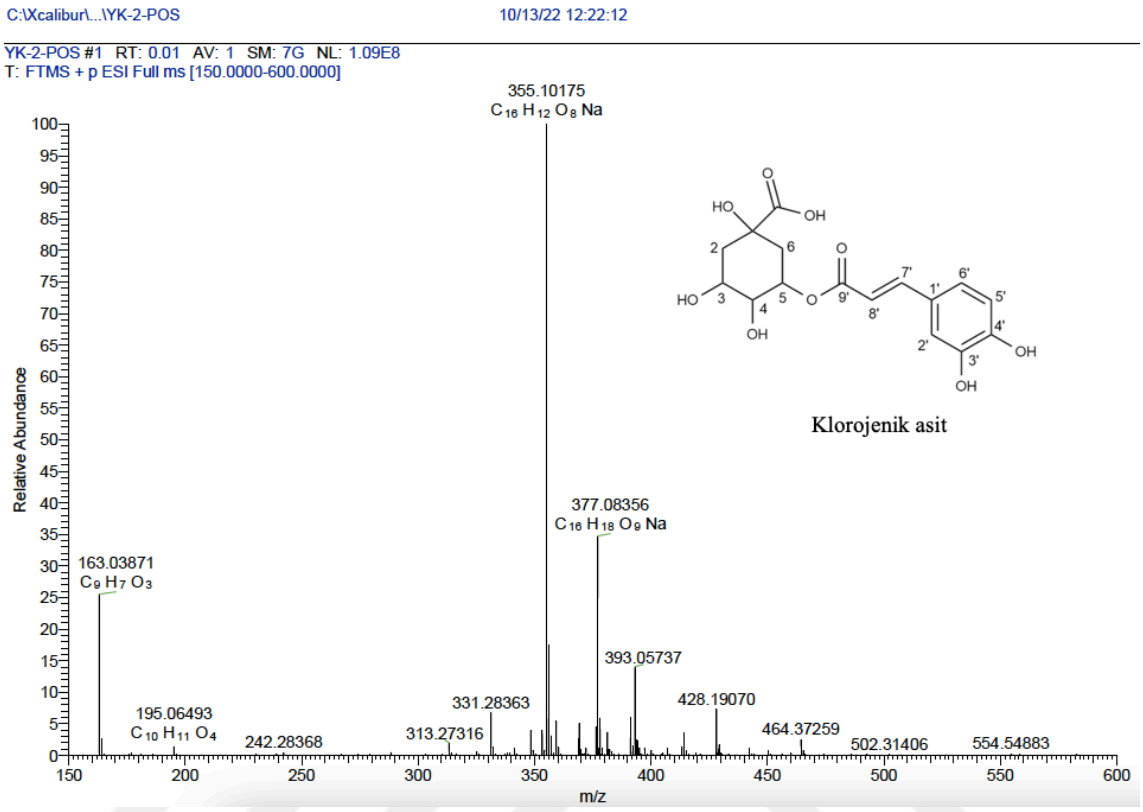
Şekil 4-45: Klorojenik asit'e ait UV spektrumu

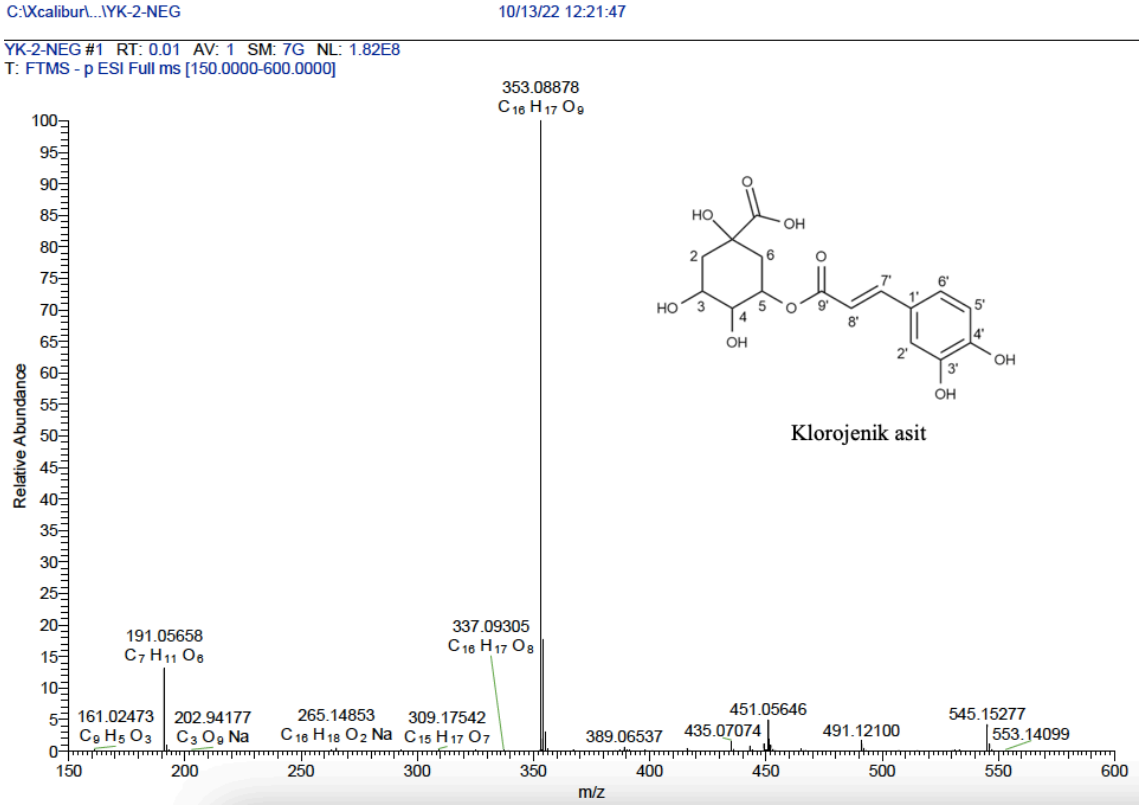
275 ve 324 nm de verdiği değerler literatür ile uygunluk göstermiştir. (Belay ve Gholap 2009).

Kütle spektrumu verileri

Bileşiğin molekül ağırlığı (C_{16} H_{18} O_9) 354.31 g/mol iken negatif modda bir protonun kopmuş iyonu spektrumda 353.0877 g/ mol olarak görüldü. Yine negatif modda görülen 191.0568 g/mol değerindeki pik maddeyi oluşturan iki asitten biri olan kinik asitin (192.17 g/ mol) bir proton kopmuş iyonuna ait olmalı. Bileşiğin bir elektron kaybetmiş iyonu pozitif modda 355.1017 g/ mol olarak görüldü. Yine pozitif modda

görülen 163.0387 g/ mol değerindeki pik molekülden kinik asitin ayrılması ile oluşan iyona ait olmalı.





Şekil 4-46: Klorojenik asitin kütle spektrumu değerleri

İnce tabaka kromatografisi verileri

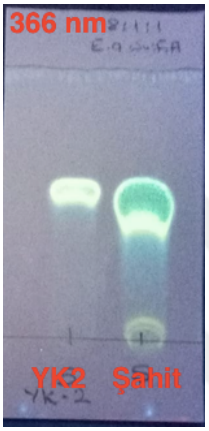
Gün ışığı: Beyaz

UV – 254 nm: Mavi

UV – 366 nm: Mavi

UV (+NA belirteci) - 366 nm: Beyaz-Yeşil

Maddenin şahit klorojenik asit ile yapılan İTK analizi yapısını doğruladı.



Şekil 4-47: Maddenin şahit klorojenik asit ile 366 nm dalga boyunda NA belirteci ile renklendirilmiş İTK görüntüsü (Mobil faz: Etil asetat:Su:Formik asit (8:1:1))

4.4. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

4.4.1. Antioksidan Aktivitenin Araştırılması

4.4.1.1. Antioksidan Bileşiklerin Miktar Tayini

C. x bornmuelleri türünün ham meyve (CB1), olgun meyve (CB2), yaprak (CB3) ve çiçeklerinden (CB4) hazırlanan metanol ekstrelerinin total fenolik bileşik miktarı (gallik asit ekivalanı) ve flavonoit miktar tayini (kateşin ekivalanı) kolorimetrik olarak tayin edilmiştir. Gallik asit ve kateşin standart eğri denklemleri kullanılarak hesaplanan fenolik bileşik ve flavonoit miktarları Tablo 4-1'de verilmiştir.

Tablo 4-1: *C. x bornmuelleri* türünün ham meyve (CB1), olgun meyve (CB2), yaprak (CB3) ve çiçeklerinden (CB4) hazırlanan metanol ekstrelerinin içerdikleri total fenolik bileşik (gallik asit ekivalanı) ve flavonoit (kateşin ekivalanı) miktarları

Ekstre	**PC (mg GAE/g ekstre)**	**Flavonoid (mg CE/g ekstre)**
CB1	$23,19 \pm 2,64^{a}$	$21,93 \pm 1,61^{a}$

CB2	18,75 ± 1,74[b]	16,93 ± 1,10[b]
CB3	56,12 ± 1,36[c]	51,52 ± 4,99[c]
CB4	53,03 ± 3,94[c]	51,97 ± 0,91[c]

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Anlamlık sınırı olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir. Aynı sütun içindeki farklı harfler verilerin birbirinden anlamlı farklı olduklarını göstermektedir.

Alman Farmakopesi DAB10'a Göre Total Flavonoit Miktar Tayini

Deney prosesi her drog için iki kez tekrarlanmış ve sonuçların ortalaması alınmıştır. Drogların total flavonoit miktarı hiperozit üzerinden yaprakta %3.62, çiçekte %2.88, olgun meyvede %0.28, ham meyvede ise %0.48 bulunmuştur.

4.4.1.2. Antioksidan Aktivitenin Tayini

Bu çalışmada ham meyve (CB1), olgun meyve (CB2), yaprak (CB3) ve çiçeklerin (CB4) metanol ekstrelerinin indirgeyici güçleri sırasıyla DPPH serbest radikali ve superoksid anyon radikali giderici aktiviteleri, ferri iyonu redükleme antioksidan potansiyeli (FRAP), $ABTS^{\bullet+}$ radikal katyonu kullanılarak total radikal antioksidan potansiyeli (TRAP) ve Troloks ekivalanı antioksidan kapasitesi tayin edilerek antioksidan aktiviteleri incelenmiştir.

Ekstrelerin ve standardın antioksidan aktivitelerinin konsantrasyonla orantılı olarak attığı gözlenmiştir. Ekstrelerin ve pozitif kontrol olarak seçilen Rutin'in antioksidan aktiviteleri Tablo 4-2'de karşılaştırılmıştır.

Tablo 4-2: *C. x bornmuelleri* türünün ham meyve (CB1), olgun meyve (CB2), yaprak (CB3) ve çiçeklerinden (CB4) hazırlanan metanol ekstrelerinin EC_{50}, TEAC ve FRAP değeri olarak antioksidan aktiviteleri

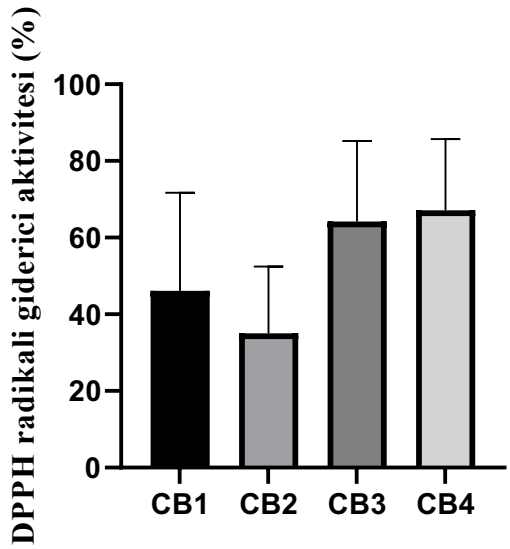
Drog	**EC_{50} (mg/ml)**			**TEAC (mM Troloks/L)**	**FRAP (mM Fe^{2+}/L)**
	DPPH	**ABTS**	**Superoksid**		
CB1	2,05 ± 0,04[a]	2,57 ± 0,09	1,59 ± 0,13[a]	1,20 ± 0,07[a]	1,45 ± 0,07[a]
CB2	2,28 ± 0,18[a]	2,52 ± 0,12	1,75 ± 0,05[a]	1,18 ± 0,03[a]	1,43 ± 0,07[a]
CB3	0,49 ± 0,06[b]	0,63 ± 0,02	0,76 ± 0,02[b]	1,97 ± 0,01[b]	3,92 ± 0,02[b]
CB4	0,43 ± 0,02[b]	0,67 ± 0,01	0,78 ± 0,03[b]	1,95 ± 0,01[b]	3,96 ± 0,01[b]
Rutin	0,12 ± 0,01[c]	0,56 ± 0,07	0,25 ± 0,04[c]	2,11 ± 0,05[c]	3,98 ± 0,01[c]

EC_{50}: %50 DPPH, superoksid anyon ve ABTS radikal katyonu giderici aktivitesi göstermesi için gerekli olan antioksidan miktarı.

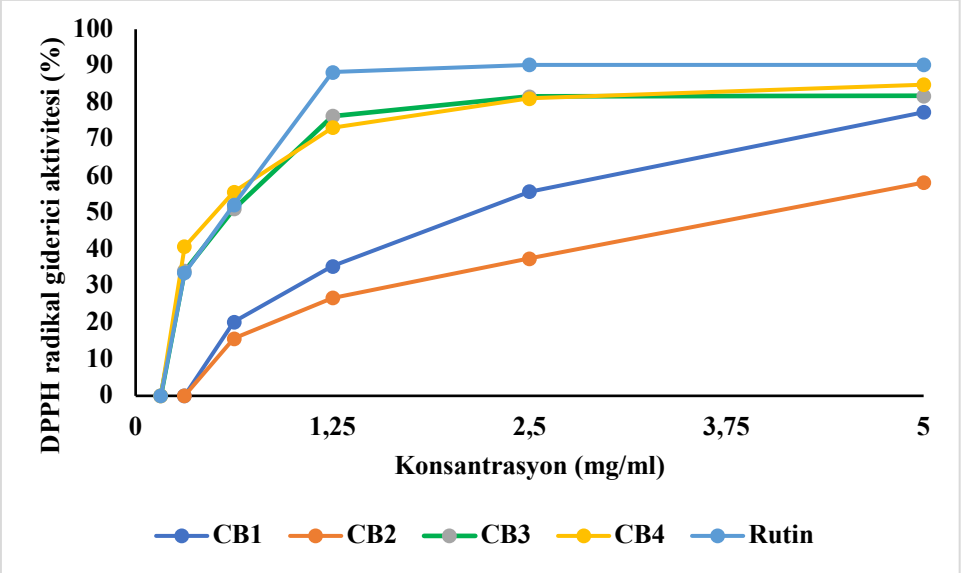
FRAP değeri: mM Fe (II) iyonları ekivalanı.
TEAC değeri: mM Troloks ekivalanı.
Ekstrelerin 5 mg/ml, rutinin ise 1.25 mg/ml konsantrasyonundaki TEAC ve FRAP değerleri gösterilmiştir.
Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiş, anlamlık sınırı olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir. Aynı sütundaki farklı harfler verilerin anlamlı olarak farklı olduklarını gösterir.

- **DPPH Radikali Giderici Aktivitesinin İncelenmesi**

CB1, CB2, CB3 ve CB4 ekstrelerinin 0.625-5 mg/ml konsantrasyonları arasında maksimum antioksidan aktivitelerine ulaştıkları gözlenmiştir. 2.5 mg/ml de CB1, CB2, CB3 ve CB4 ekstrelerinin DPPH radikali giderici aktiviteleri sırasıyla %55,72±0,81, %37,43±0,87, %81,69±2,37 ve %81,15±2,20 olduğu belirlenmiştir. Aralarında anlamlı fark bulunmayan ($p > 0.05$) ve 2.5 mg/ml'de maksimum inhibisyon aktivitesine ulaşan CB3 (yaprak) ve CB4 (çiçek) ekstrelerinin DPPH radikali giderici aktivitesi, rutinin (90,27±0,35) 1.25 mg/ml konsantrasyonunda gösterdiği aktiviteye yakın ($p > 0.05$) olduğu görülmüştür. Fakat CB1 (ham meyve) ve CB2 (olgun meyve) ekstreleri, CB3 ve CB4 ekstrelerinin aktivitelerine göre daha düşük ($p < 0.05$) DPPH giderici aktivite göstermiştir. İncelenen ekstrelerinin doza bağlı olarak DPPH giderici aktiviteleri Şekil 4-48 ve 4-49'da verilmiştir.



Şekil 4-48: CB1, CB2, CB3 ve CB4 ekstrelerinin farklı konsantrasyonlardaki DPPH radikali giderme aktivite yüzdeleri
Ekstrelerin 0,625-2,5 mg/ml arasındaki aktivite yüzdeleri

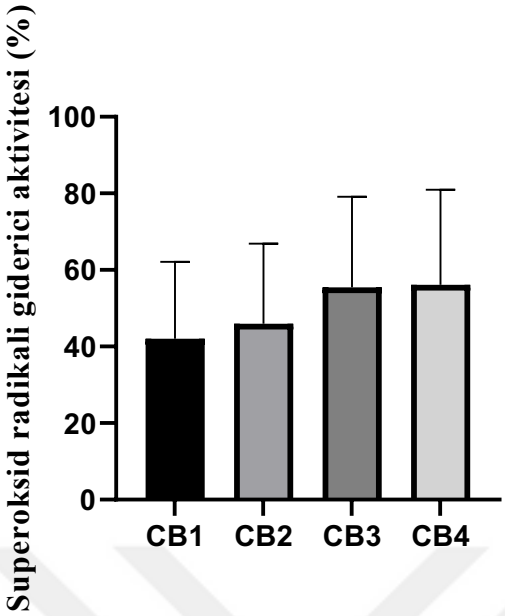


Şekil 4-49: CB1, CB2, CB3 ve CB4 ekstrelerinin DPPH radikali giderici aktiviteleri
Rutin pozitif kontrol olarak seçilmiştir. Deneyler üçer defa tekrarlanmış ve elde edilen veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir (n = 3).

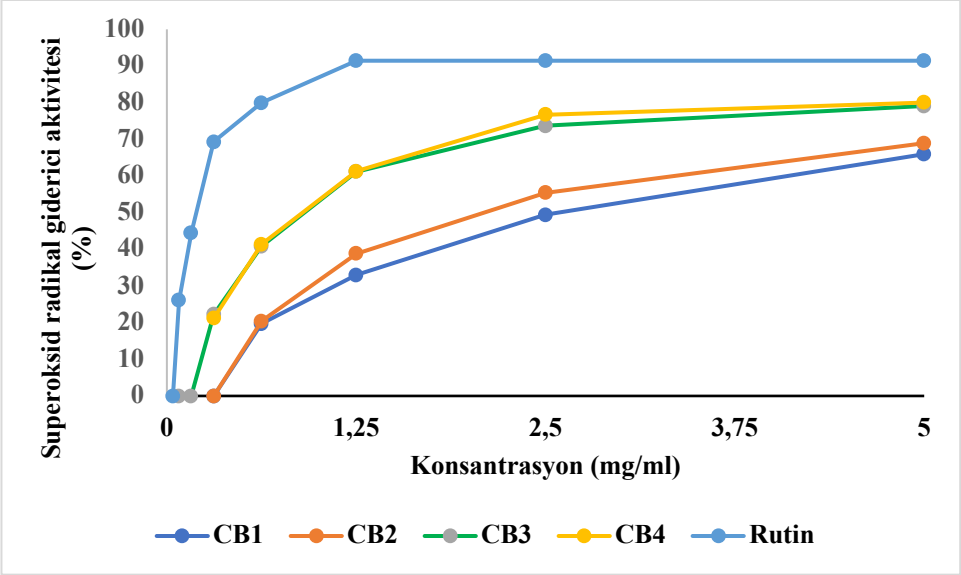
Bu sonuçlara göre, aralarında anlamlı bir farklılık bulunmayan ($p > 0.05$) ve EC_{50} değerleri sırasıyla 0,49 ± 0,06 ve 0,43 ± 0,02 mg/ml olan yaprak ve çiçek ekstrelerinin, aralarında anlamlı bir farklılık bulunmayan ($p > 0.05$) ham ve olgun meyve ekstresinden daha etkili bulunmuştur. Ekstrelerin ve rutinin EC_{50} değerlerine bakıldığında ise Rutin'in aktivitesinin ekstrelerinkinden daha yüksek olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$).

- **Süperoksid Anyon Radikali Giderici Aktivitesinin İncelenmesi**

CB1, CB2, CB3 ve CB4 ekstrelerinin nitroblue tetrazoliumu (NBT) 2.5 mg/ml konsantrasyonunda sırasıyla %59,44 ± 6,35, 55,45 ± 4,37, 73.7 ± 2,62 ve 76,74 ± 1,31 inhibisyon aktivitesi gösterdikleri bulunmuştur. Aralarında anlamlı fark bulunmayan ($p > 0.05$) ve 2.5 mg/ml'de maksimum inhibisyon aktivitesine ulaşan CB3 ve CB4 ekstrelerinin süperoksid anyon radikali giderici aktivitesinin, rutinin (91,44 ± 0,15) 1.25 mg/ml konsantrasyonunda gösterdiği aktiviteye yakın olduğu görülmüştür. CB1 ve CB2 ekstreleri maksimum superoksid radikal giderici aktivitelerine ise 5 mg/ml'de ulaştıkları görülmüştür. İncelenen ekstrelerinin doza bağlı olarak süperoksid radikali giderici aktiviteleri Şekil 4-50 ve 4-51'de gösterilmiştir.



Şekil 4-50: CB1, CB2, CB3 ve CB4 ekstrelerinin farklı konsantrasyonlardaki superoksid radikali giderme aktivite yüzdeleri
Ekstrelerin 0.625-2.5 mg/ml arasındaki aktivite yüzdeleri.



Şekil 4-51: CB1, CB2, CB3 ve CB4 ekstrelerinin superoksid radikali giderici aktivitesi
Pozitif kontrol olarak rutin kullanılmış olup deneyler üçer defa tekrarlanmış ve veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir (n = 3).

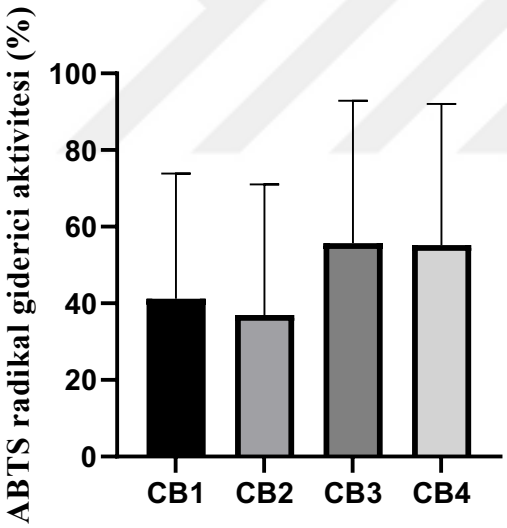
Ekstrelerin EC_{50} değerleri incelendiğinde, aralarında anlamlı bir farklılık bulunmayan ($p > 0.05$) ve sırasıyla 0,76 ± 0,02 ve 0,78 ± 0,03 mg/ml olan CB3 ve CB4 ekstrelerinin, aralarında anlamlı farklılık bulunmayan ($p > 0.05$) CB1 ve CB2

ekstresinden daha etkili superoksid radikal giderici aktiviteye sahip oldukları görülür. Rutin'in EC_{50} değerleri ise ekstrelerin superoksid radikali giderici aktivitelerinden anlamlı olarak daha yüksektir ($p < 0.05$).

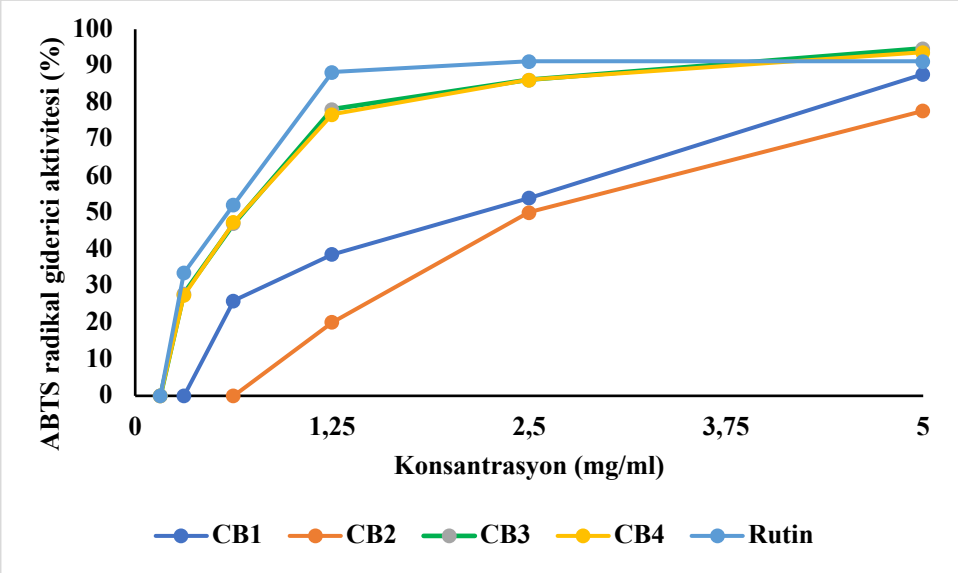
- **Troloks Ekivalan Antioksidan Kapasitesinin (TEAC Deneyi) İncelenmesi**

0.625-5 mg/ml sınırları arasında maksimum antioksidan aktivitelerine ulaştıkları görülen ekstrelerden, 2.5 mg/ml konsantrasyonda aralarında anlamlı farklılık ($p > 0.05$) bulunmayan CB3 (% 86,17 ± 3,37) ve CB4 (%86,03 ± 0,68) ekstrelerinin gösterdikleri ABTS radikal katyonu giderici aktiviteleri, rutinin 1.25 mg/de (% 92.07 ± 1.90) gösterdiği aktiviteye yakın oldukları belirlenmiştir. CB1 (% 87,75 ± 1,75) ve CB2 (%81,73 ± 1,15) ekstrelerinin ise maksimum ABTS radikal giderici aktivitelerine 5 mg/ml'de ulaştıkları gözlenmiştir.

İncelenen ekstrelerinin doza bağlı olarak ABTS radikali giderici aktiviteleri Şekil 4-52 ve 4-53'te gösterilmiştir.



Şekil 4-52: CB1, CB2, CB3 ve CB4 ekstrelerinin farklı konsantrasyonlardaki ABTS radikali giderme aktivite yüzdeleri
Ekstrelerin 0.625-2.5 mg/ml arasındaki aktivite yüzdeleri.



Şekil 4-53: CB1, CB2, CB3 ve CB4 ekstrelerinin ABTS radikali giderici aktivitesi
Pozitif kontrol olarak rutin kullanılmış olup deneyler üçer defa tekrarlanmıştır ve veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir (n = 3).

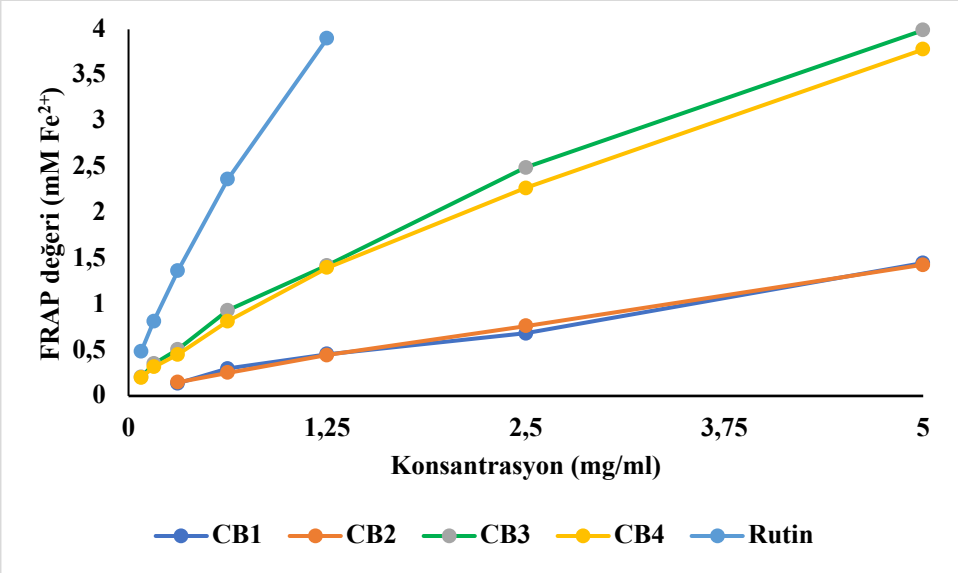
Bu verilere göre, aralarında anlamlı bir farklılık bulunmayan ($p > 0.05$) ve EC_{50} değerleri sırasıyla 0,63 ± 0,02 ve 0,67 ± 0,01 mg/ml olan CB3 ve CB4 ekstrelerinin, benzer aktiviteye sahip ($p > 0.05$) CB1 ve CB2 ekstresinden daha etkili ABTS radikal giderici aktiviteleri olduğu saptanmıştır. Rutin ile CB3 ve CB4 ekstrelerinin ABTS radikali giderici aktivitelerinin yakın olduğu saptandı ($p > 0.05$).

Ekstrelerin antioksidan kapasitesi TEAC değeri (Troloks Ekivalanı Antioksidan Kapasite) hidrojen veya elektron verici etkisini yansıttığı için yüksek TEAC değeri yüksek antioksidan aktivitesinin göstergesidir. 5 mg/ml'de aralarında anlamlı bir farklılık bulunmayan ($p > 0.05$) CB3 ve CB4 ekstreleri, Rutin'in 1.25 mg/ml'deki TEAC değerine yakın bulunurken, CB1 ve CB2 ekstreleri daha düşük ($p < 0.05$) antioksidan kapasite göstermiştir.

- **Ferri iyonu redükleyici (indirgeyici) gücü (FRAP)**

Ekstrelerinin redükleyici gücü, elektron verici yeteneklerini gösterir. İndirgeme gücü yüksek olan ekstreler serbest radikallere elektron vererek ve onları zararsız hale getirir ve böylece serbest radikal reaksiyonlarını önleyerek antioksidan aktivite gösterirler. İncelenen ekstrelerin doza bağlı olarak Fe^{+3}'ü Fe^{+2}'ye indirgediği ve CB3 ve CB4 ekstrelerinin yüksek, CB1 ve CB2 ekstrelerinin daha düşük indirgeyici güce sahip

oldukları görülmüştür. 5 mg/ml konsantrasyonda arasında anlamlı farklılık bulunmayan ($p > 0.05$) CB3 ve CB4 ekstrelerinin gösterdikleri indirgeme gücü, Rutin'in 1.25 mg/ml'de gösterdiği indirgeme gücüne yakın olduğu gözlendi ($p > 0.05$). İncelenen ekstrelerinin doza bağlı olarak redükleyici güçleri Şekil 4-54'te gösterilmiştir.



Şekil 4-54: CB1, CB2, CB3 ve CB4 ekstrelerinin FRAP değeri olarak redükleme güçleri Pozitif kontrol olarak rutin kullanılmış ve deneyler üç defa tekrarlanmıştır. Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir (n = 3).

4.4.2. Antienflamatuar Aktivitenin Araştırılması

Ekstrelerin COX-1 ve COX-2 enzimlerini inhibe edici aktiviteleri prostaglandin oluşumunun yüzde inhibisyonunun hesaplanmasıyla tayin edilmiştir.

Tablo 4-3: Ekstrelerin COX-1 inhibe edici aktiviteleri

Ekstre	**COX-1**			
	5 mg/ml, 2.5 mg/ml ve 1.25 mg/ml konsantrasyonlarda hazırlanan ekstrelerin 230 µl'lik reaksiyon ortamındaki konsantrasyonları			
	0.22 mg/ml	**0.11 mg/ml**	**0.055 mg/ml**	**EC_{50} (mg/ml)**
	İnhibisyon %			
CB1	76,17 ± 1,96	58,78 ± 2,87	33,78 ± 2,01	0,086 ± 0,003[a]
CB2	69,37 ± 1,07	51,47 ± 2,50	29,82 ± 1,31	0,108 ± 0,001[b]
CB3	97,47 ± 1,01	80,20 ± 1,53	59,51 ± 0,98	0,045 ± 0,002[c]
CB4	98,41 ± 1,21	79,86 ± 1,49	59,18 ± 1,08	0,045 ± 0,001[c]
Standart	**5 µg/ml, 2.5 µg/ml ve 1.25 µg/ml konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerin reaksiyon ortamındaki konsantrasyonları**			
	0.22 µg/ml	**0.11 µg/ml**	**0.055 µg/ml**	**EC_{50} (µg/ml)**
	% İnhibisyon			
İndometazin	80,24 ± 0,52	50.07 ± 0.70	34.21 ± 0.35	0,090 ± 0,004[g]

Tablo 4-4: Ekstrelerin COX-2 inhibe edici aktiviteleri

Ekstre	**COX-2**			
	5 mg/ml, 2.5 mg/ml ve 1.25 mg/ml konsantrasyonlarda hazırlanan ekstrelerin 230 µl'lik reaksiyon ortamındaki konsantrasyonları			
	0.22 mg/ml	**0.11 mg/ml**	**0.055 mg/ml**	**EC_{50} (mg/ml)**
	% İnhibisyon			
CB1	85,59 ± 0,63	64,31 ± 1,16	43,29 ± 1,13	0,068 ± 0,001[a,b]
CB2	81,48 ± 2,33	62,83 ± 2,39	41,64 ± 1,23	0,071 ± 0,003[a]
CB3	87,26 ± 1,85	79,48 ± 0,56	64,25 ± 1,01	0,030 ± 0,004[c]
CB4	84,16 ± 1,05	75,50 ± 0,64	60,98 ± 0,76	0,032 ± 0,002[c]
Standart	**40 µg/ml, 20 µg/ml ve 10 µg/ml konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerin reaksiyon ortamındaki konsantrasyonları**			
	1.74 µg/ml	**0.86 µg/ml**	**0.43 µg/ml**	**EC_{50} (µg/ml)**
	% İnhibisyon			
İndometazin	96,94 ± 1.50	60,97 ± 2,56	42,28 ± 3,44	0,55 ± 0,04[d]

Tüm ekstreler doza bağımlı olarak artan COX-1 ve COX-2 enzim inhibisyonu göstermiştir. EC_{50} değerleri incelendiğinde en yüksek aktiviteyi benzer etkiyi gösteren

($p > 0,05$) CB3 ve CB4'ün gösterdiği, ve onları yine benzer aktiviteye sahip ($p>0,05$) CB1 ve CB2 ekstrelerinin takip ettiği gözlenmiştir. İndometazinin aktivitesi ise ekstrelerinkinden anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$).

4.4.3. Anjiotensin Dönüştürücü Enzim (ACE) İnhibitörü Etkisinin Araştırılması

ACE inhibisyon aktivitesi, *in vitro* koşullarda substrat olarak kullanılan FAPGG'nin FAP'e dönüşmesine bağlı olarak 340 nm'de absorbansın zamanla azalması ölçülerek incelenmiştir. Ekstrelerin ve standart olarak kullanılan Kaptopril'in ACE inhibisyon aktiviteleri aşağıda verilmiştir (Tablo 4-5).

Tablo 4-5: Ekstrelerin ACE inhibe edici aktiviteleri

Ekstre	**40 mg/ml; 20 mg/ml; 10 mg/ml ve 5 mg/l konsantrasyonlarda hazırlanan ekstrelerin reaksiyon ortamındaki konsantrasyonları**				
	1.8 mg/ml	**0.9 mg/ml**	**0.45 mg/ml**	**0.225 mg/ml**	**EC_{50} (mg/ml)**
	İnhibisyon %				
CB1	70,08 ± 2,18	56,21 ± 2,92	38,81 ± 1,51	21,19 ± 2,36	0,73 ± 0,07[a]
CB2	71,69 ± 2,27	55,49 ± 2,41	36,93 ± 2,05	17,65 ± 1,75	0,76 ± 0,05[a]
CB3	95,76 ± 0,82	83,78 ± 1,35	60,49 ± 1,64	35,13 ± 1,98	0,33 ± 0,01[b]
CB4	95,37 ± 0,63	83,44 ± 1,14	58,15 ± 3,34	32,00 ± 2,83	0,35 ± 0,03[b,e]
	0.01 mg/ml, 0.005 mg/ml, 0.0025 mg/ml ve 0.00125 mg/ml konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerin reaksiyon ortamındaki konsantrasyonları				
Standart	**0.45 µg/ml**	**0.225 µg/ml**	**0.112 µg/ml**	**0.056 µg/ml**	**EC_{50} (µg/ml)**
	İnhibisyon %				
Kaptopril	87,65 ± 0,45	71,92 ± 0,99	54,50 ± 1,72	26,37 ± 3,12	0,10 ± 0,01[g]

Tüm ekstrelerin doza bağımlı olarak ACE enzimini inhibe ettikleri gözlenmiştir. EC_{50} değerleri karşılaştırıldığında CB3 ekstresi en yüksek aktiviteyi göstermiş, onu CB4 takip etmiş, en düşük inhibisyonu ise CB1 ve CB2 göstermiştir. Ekstrelerin ve standart olarak kullanılan kaptoprilin EC_{50} değerleri kıyaslandığında ise ekstrelerin inhibe edici aktiviteleri kaptoprilin aktivitesinden daha düşük olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$).

5. TARTIŞMA

5.1. Fitokimyasal Analiz

Bu çalışmada *C. x bornmuelleri* droglarından 9 farklı flavonoit elde edilmiştir. Her drogda ortak bulunan flavonoit Hiperozit'tir. Yapraktan 5, çiçekten 5, ham meyveden 2, olgun meyveden 3 flavonoit, yine yapraktan klorojenik asit izole edilmiş ve yapısı aydınlatılmıştır. Droglardan izole edilen bileşikler Tablo 5-1'de gösterilmiştir.

Tablo 5-1: *Crataegus x bornmuelleri* yaprak, çiçek, ham ve olgun meyvelerinden izole edilen bileşikler

Bileşik	Yaprak	Çiçek	Ham Meyve	Olgun Meyve
Hiperozit	+	+	+	+
Kersetin		+	+	+
Rutin		+		+
Viteksin	+			
Astragalin	+			
Eupafolin	+			
Şaftozit	+			
Kemferol		+		
Spireozit		+		
Klorojenik asit	+			

Ata türler ile *C. x bornmuelleri* bitkisi flavonoit içerikleri açısından Tablo 2'de karşılaştırılmıştır.

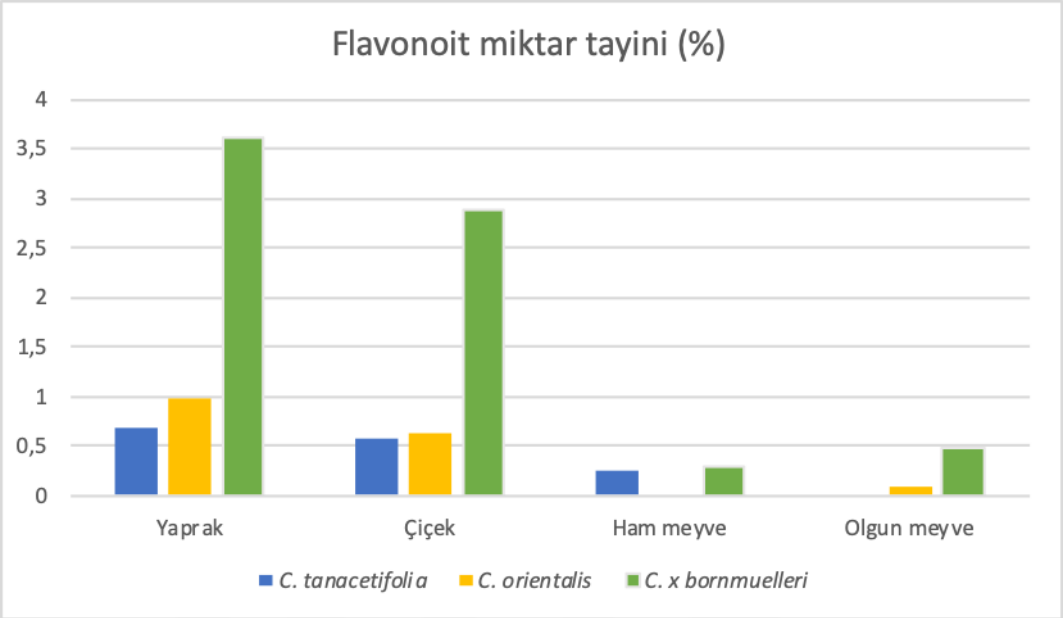
Tablo 5-2: *C. x bornmuelleri, C. tanacetifolia* ve *C. orientalis* var. *orientalis* bitkilerinden izole edilen bileşikler

Bileşik	*C. tanacetifolia*	*C. orientalis*	*C. x bornmuelleri*
Hiperozit	+	+	+

Kersetin	+	+	+
Rutin		+	+
Kemferol	+		+
Kemferol-3-O-galaktozit	+		
Viteksin	+	+	+
Viteksin-2''-O-ramnozit	+		
Viteksin-4'-O-ramnozit	+	+	
Apigenin	+	+	
Apigenin-7-O-glukozit	+	+	
Santin	+		
5-hidroksiauranetin	+		
Astragalin			+
Eupafolin			+
Şaftozit			+
Spireozit			+
Klorojenik asit	+	+	+

C. x bornmuelleri hibriti olduğu 2 taksonda da bulunmayan 4 farklı flavonoit içermektedir; Astragalin, Eupafolin, Şaftozit ve Spireozit. Eupafolin, *Crataegus* türlerinden ilk kez izole edilmiştir. Üç bitkide de ortak bulunan flavonoitler ise Hiperozit, Kersetin ve Viteksin'dir. Ayrıca tüm alıç türlerinde genellikle tespit edilen klorojenik asit 3 türde de bulunmaktadır. Kemferol *C. tanacetifolia* ile, Rutin ise *C. orientalis* ile ortak bulunan flavonoitler olmuştur. Bu sonuçlara bakıldığında hibritleşmenin *Crataegus* türlerinde sık rastlanan major bileşenlerde değişiklik yapmadığı, fakat botanik açıdan ata türlerden ayrılmasının yanı sıra kimyasal içerik bakımından da farklılık gösterdiği söylenebilir.

Üç bitki türünün hiperozit üzerinden hesaplanmış total flavonoit miktarları ise Şekil 5-1'de karşılaştırılmıştır.



Şekil 5-1: *C. x bornmuelleri, C. tanacetifolia* ve *C. orientalis* var. *orientalis* bitkilerinin DAB10'a göre hesaplanmış total flavonoit miktar tayinleri

C. tanacetifolia bitkisinin yaprakları %0.68, çiçekleri %0.58, olgunlaşmamış meyveleri %0.24 hiperozit üzerinden hesaplanmış flavonoit içermektedir (Meriçli ve Ergezen 1994). *C. orientalis* var. *orientalis* türünün yaprakları %0.98, çiçekleri %0.63, meyveleri ise %0.08 hiperozit üzerinden hesaplanmış flavonoit içermektedir (Melikoğlu ve ark. 1999). *C. x bornmuelleri* bitkisinin flavonoit miktarları yaprakta %3.62, çiçekte %2.88, olgun meyvede %0.28, ham meyvede ise %0.48 bulunmuştur. Bu yüksek yüzdeler ile tüm droglardan izole ettiğimiz hiperozit miktarları da paralellik göstermektedir.

Crataegus türlerinden hazırlanacak ilaçlarda kullanılacak materyallerin en az %1.5 hiperozit üzerinden hesaplanmış flavonoit taşıyor olmaları gerekmektedir. Bu şartı sağlamakla beraber *C. x bornmuelleri* yaprak ve çiçekleri içerdikleri hiperozit üzerinden flavonoit miktarıyla ata türlerine nazaran dikkat çekici bir üstünlük göstermiştir.

C. x bornmuelleri droglarının kateşin ekivalanı flavonoit miktarı ise yaprakta 51,52 ± 4,99 mg/g (%5.2), çiçekte 51,97 ± 0,91 mg/g (%5.2), ham meyvede 21,93 ± 1,61 mg/g (%2.2) ve olgun meyvede 16,93 ± 1,10 mg/g (%1.7) bulunmuştur. Gallik asit ekivalanı fenolik bileşik miktarları ise yaprakta 56,12 ± 1,36 mg/g (%5.6), çiçekte 53,03

± 3,94 mg/g (%5.3), ham meyvede 23,19 ± 2,64 mg/g (%2.3) ve olgun meyvede 18,75 ± 1,74 mg/g (%1.9) olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara bakıldığında yaprak ve çiçeklerin fenolik bileşik içerikleri ham ve olgun meyveden daha yüksektir.

5.2. Antioksidan Aktivite

Reaktif oksijen türleri, serbest radikal zincir reaksiyonları sonucu hücrede süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil gibi çeşitli oksijen radikallerini oluşturur. Bu radikaller, vücudun antioksidan savunma mekanizmaları tarafından ortadan kaldırılır. Antioksidan savunma sistemleri ile serbest radikal üretimi arasındaki dengesizlik, hücrelerin lipid tabakalarının peroksidasyona uğramasına, oksidatif stres olarak bilinen hücre hasarlarının meydana gelmesine yol açar. Antioksidan görevleri olan çeşitli mineral, vitamin ve enzimlerin dışarıdan vücuda alınmasının yanında, antioksidan bileşiklerce zengin bitkilerin tüketimi de bu hasarın önlenmesinde önem kazanmaktadır.

Bu çalışmada, DPPH serbest radikali ve süperoksid anyon radikali giderici aktiviteleri, ferri iyonu redükleme antioksidan potansiyeli (FRAP) ve $ABTS^{\bullet+}$ radikal katyonu kullanılarak total radikal antioksidan potansiyeli (TRAP) ile Troloks ekivalanı antioksidan kapasitesi (TEAC) tayin edilen ham meyve, olgun meyve, yaprak ve çiçeklerin metanol ekstrelerinin antioksidan aktiviteleri incelenmiştir.

Drogların %50 DPPH serbest radikali giderici etki göstermesi için gerekli olan ekstre miktarı (EC_{50}) yaprak için 0,49 ± 0,06 mg/ml, çiçek için 0,43 ± 0,02 mg/ml, ham meyve için 2,05 ± 0,04 mg/ml, olgun meyve için 2,28 ± 0,18 mg/ml ve pozitif kontrol olarak kullanılan rutin için ise 0,12 ± 0,01 mg/ml bulunmuştur. ABTS radikal katyonu, süperoksid anyon radikali süpürme ve ferri iyonu indirgeme kapasitesinde de yaprak ve çiçekte standarda yakın, meyvelerde ise daha düşük aktivite gözlenmiştir.

Afyon'dan toplanan *C. bornmuelleri* üzerinde yapılmış başka bir çalışmada başlangıçtaki DPPH konsantrasyonunu %50 azaltmak için gerekli ekstre miktarı (EC_{50}) 1,62 mg bulunmuştur. Ancak çalışmada bitkinin hangi kısmının kullanıldığı belirtilmemiştir (Serteser ve ark. 2008). Sonuçlarımız ile bu çalışmada bulunan EC_{50} değeri benzerlik göstermektedir.

Serteser ve arkadaşlarının yaptığı bu araştırmada (2008) *C. bornmuelleri* örneğine ait Fe^{+2} şelatlama kapasitesi %28.41±1.2, H_2O_2 inhibisyonu ise %18.65±2.3 olarak hesaplanmıştır.

Çalışmamızda, Ferri iyonu indirgeme gücünün test edildiği FRAP deneyinde ise 5mg/ml konsantrasyonda çiçek (3,96 ± 0,01 mM $Fe^{2+/}$L) ve yaprağın (3,92 ± 0,02 mM $Fe^{2+/}$L) indirgeme gücünün, 1.25 mg/ml konsantrasyondaki Rutin'e (3,98 ± 0,01 mM $Fe^{2+/}$L) yakın bulunması dikkat çekicidir.

TEAC değeri (Troloks Ekivalan Antioksidan Kapasite) de aynı şekilde 5 mg/ml yaprak (1,97 ± 0,01 mM Troloks/L) ve çiçek (1,95 ± 0,01 mM Troloks/L) ekstrelerinin 1.25 mg/ml kansantrasyonundaki Rutin'e (2,11 ± 0,05 mM Troloks/L) yakın, meyvelerin ise daha düşük antioksidan kapasiteye sahip olduğunu göstermiştir.

Tüm veriler değerlendirildiğinde *C. x bornmuelleri* yaprak ve çiçeklerinin içerdikleri yüksek flavonoit ve fenolik bileşik miktarına bağlı olarak, yüksek antioksidan aktiviteye sahip oldukları sonucuna varılmaktadır.

5.3. Antienflamatuar Aktivite

Araşidonik asitten prostaglandin sentezinde rol oynayan Siklooksijenaz 1 ve 2 enzimleri salgı artışı, enflamasyon, ağrı, şişlik gibi yanıtlara sebep olur. COX-1 ve 2 inhibisyonu ile bu semptomlarda azalma sağlanabilir.

Çalışmamızda ekstrelerin doza bağımlı olarak artan COX-1 ve COX-2 enzim inhibisyonu gösterdiği bulunmuştur. Yaprak ve çiçek ekstreleri 0.22 mg/ml konsantrasyonda çok iyi % COX-1 enzim inhibisyon göstermiştir (sırasıyla %97,47 ± 1,01 ve %98,41 ± 1,21). Ham ve olgun meyve ise aynı konsantrasyonda daha düşük inhbisyon göstermiştir. Standart olarak kullanılan İndometazin ise 0.22 μg/ml gibi çok daha düşük bir dozda %80,24 ± 0,52 COX-1 enzim inhibisyonu göstermiştir.

COX-2 inhibisyon yüzdelerine bakıldığında ise yine yaprak ve çiçeğin 0.22 mg/ml konsantrasyondaki ekstrelerinin inhibisyonu %87,26 ± 1,85 ve %84,16 ± 1,05 bulunmuştur. Meyve ekstreleri ise daha düşük aktiviteye sahiptir. İndometazin ise daha düşük dozda 1.74 μg/ml'de %96,94 ± 1.50 inhibisyon göstermiştir.

İndometazin daha düşük dozda yüksek aktivite gösterse de yan etki profili açısından değerlendirildiğinde alıç ekstresinin belirgin bir yan etki göstermemesi sebebiyle yüksek dozlarda kullanılarak İndometazin'in gösterdiği aktiviteyi gösterebilme potansiyeli taşıması oldukça önemlidir. Bu açıdan alıç yaprak ve çiçek ekstrelerinin enflamasyon tedavisinde kullanılması mümkün gözükmektedir.

5.4. Anjiotensin Dönüştürücü Enzim (ACE) İnhibisyonu

ACE, Anjiotensin I (pasif protein)'i damarları daraltarak kan basıncını artıran aktif protein Anjiotensin II'ye çeviren enzimdir. ACE inhibisyonu ile artmış kan basıncına bağlı kardiyovasküler şikayetler azaltılabilir.

Yaprak ve çiçek başta olmak üzere *C. x bornmuelleri* drogları doza bağımlı olarak artan ACE inhibisyonu göstermektedir. %50 ACE inhibisyonu sağlayan doz (EC_{50}), yaprak ekstresi için 0,33 ± 0,01 mg/ml, çiçek ekstresi için 0,35 ± 0,03 mg/ml ve kaptopril için 0,10 ± 0,01 μg/ml bulunmuştur. Meyvelerin aktivitesi ise yaprak ve çiçekten daha düşüktür. Yaprak ve çiçek ekstresinin 1.8 mg/ml konsantrasyondaki yüksek enzim inhibisyonu değerleri (sırasıyla %95,76 ± 0,82 ve %95,37 ± 0,63) dikkat çekicidir. Bu sonuçlar *C. x bornmuelleri* droglarının, özellikle yaprak ve çiçek ekstrelerinin, kardiyovasküler sistem hastalıklarında ACE inhibisyonu ile tedaviye fayda sağlayabileceğini göstermektedir.

Tüm bu sonuçlar göz önüne alındığında *Crataegus x bornmuelleri* çiçek ve yapraklarının oksidasyon, enflamasyon, kardiyovasküler sistem şikayetlerinde tedaviye destek olabilecek aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Çalışmamızın olumlu sonuçları, *C. x bornmuelleri* yaprak ve çiçeklerinin tedaviye kazandırılabilmesi için gerekli olan ileri *in vivo* ve *in vitro* çalışmalara bir kapı niteliği taşımaktadır.

KAYNAKLAR

Akkemik, Ü. (Ed.) (2014). *Türkiye'nin Doğal-Egzotik Ağaç ve Çalıları 1*. İstanbul: Türkiye İş Bankası Kültür Yayınları, pp.41-66.

Aronson, J.F. (2009). *Meyler's Side Effects of Herbal Medicines*. Oxford: Elsewier.

Attard, E., & Attard, H. (2018). *Hawthorn: Crataegus oxyacantha, Crataegus monogyna and related species. Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812491-8.00041-2

Bardakci, H., Celep, E., Gözet, T., Kan, Y., Kırmızıbekmez, H. (2019). Phytochemical characterization and antioxidant activities of the fruit extracts of several Crataegus taxa. *South African Journal of Botany*. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.04.012

Barnes, J., Anderson, L.A., Phillipson, J.D. (2007). *Herbal Medicines* (Third Edition). London: Pharmacautical Press.

Baytop, T. (1970). *Farmakognozi Ders Kitabı* Cilt 1. İstanbul: Baha Matbaası.

Baytop, T. (1997). *Türkçe Bitki Adları Sözlüğü* (İkinci baskı). Ankara: Türk Tarih Kurumu Basımevi.

Baytop, T. (1999). *Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün)* (İkinci baskı). İstanbul: Nobel Kitabevi.

Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, *239*, 70-76.

Bilaloğlu, G.V. ve Harmandar M. (1999). *Flavonoidler*. İstanbul: Bakanlar Matbaacılık Ltd. Şti.

Birman, H.,Tamer, Ş., Melikoğlu, G. ve Meriçli, A.H. (2001). Hypotensive activity of *Crataegus tanacetifolia*. *J.Fac.Pharm.Istanbul*. 34 (2), 23-26.

Birman, H., Salmayenli, N., Melikoğlu, G. ve Meriçli, A.H. (2003). Effect of *Crataegus tanacetifolia* Extract on Total Body Ion Concentration in Normal Rats. *Acta Pharm.Turc*. 45 (3), 213-217.

Birman, H., Akgün-Dar, K., Melikoğlu, G., Meriçli, A.H. (2008). *Crataegus tanacetifolia*: A Medicinal Plant from Turkey. Recent Progress in Medicinal Plants. Editörler: Govil, J.N., Singh, V.K.USA: Studium Press LLC. pp: 71-83.

Bisset, N.G. (1994). *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*. (2 nd Edition). London: CRC Press.

Bone, K. ve Mills, S. (2013). *Principles and Practice of Phytotheapy Modern Herbal Medicine*. (Second Edition). Churchill Livingstone Elsevier.

Bouillant, M.Z., Favre-Bonvin, J., Chopin, J. (1975). Structural determination of C-glycosylflavones by mass spectrometry of their permethyl ethers. *Phytochemistry 14*, 2267-2274.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, *28*, 25-30.

Browicz, K. (1972). *Crataegus*. In *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, (ed. Davis. P.H.). Vol 4. Edinburgh: University Press.

Bubik, M. F., Willer, E. A., Bihari, P., Jürgenliemk, G., Ammer, H., Krombach, F. ve ark. (2012). A novel approach to prevent endothelial hyperpermeability: The *Crataegus* extract WS® 1442 targets the cAMP/Rap1 pathway. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *52*(1), 196–205. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.10.020

Bujor, A., Miron, A., Luca, S. V., Skalicka-Wozniak, K., Silion, M., Trifan, A. ve ark. (2020). Vasorelaxant effects of *Crataegus pentagyna*: Links with arginase inhibition and phenolic profile. *Journal of Ethnopharmacology*, *252*(January). https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112559

Caliskan, O. (2015). Mediterranean Hawthorn Fruit (*Crataegus*) Species and Potential Usage. *The Mediterranean Diet*. 621-628.

Cheng, N., Wang, Y., Gao, H., Yuan, J., Feng, F., Cao, W., Zheng, J. (2013). Protective effect of extract of *Crataegus pinnatifida* pollen on DNA damage response to oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology*, *59*, 709–714. https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.015

Cheng, Z. Y., Lou, L. L., Yang, P. Y., Song, X. Y., Wang, X. B., Huang, X. X., Song, S. J. (2019). Seven new neuroprotective sesquineolignans isolated from the seeds of *Crataegus pinnatifida*. *Fitoterapia*. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.01.008

Christensen, K.I. (1992). Revision of *Crataegus* Sect. *Crataegus* and Nothosect. *Crataeguineae* (Rosaceae-Maloideae) in the Old World, *Systematic Botany Monographs*, 35: 1-199.

Chu, W., Gao, P., Li, L. (2019). Chemical constituents from the leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge. *Biochemical Systematics and Ecology*. https://doi.org/10.1016/j.bse.2019.103923

Cloud, A., Vilcins, D., McEwen, B. (2020). The effect of hawthorn (*Crataegus* spp.) on blood pressure: A systematic review. *Advances in Integrative Medicine*. Elsevier Australia. https://doi.org/10.1016/j.aimed.2019.09.002

Copra-Janicijevic, A., Culum, D., Vidic, D., Tahirovic, A., Klepo, L., Basic, N. (2018). Chemical composition and antioxidant activity of the endemic *Crataegus microphylla* Koch subsp. *malyana* K. I. Chr. & Janjić from Bosnia. *Industrial Crops and Products*, *113*(August 2017), 75–79. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.016

Cuong, D.T.D., Dat, H.T., Duan, N.T., Thuong, P.D., Phat, N.T., Tri, D.M., Son, D.V., Hoa, N.T., Tuyen, P.N.K., Phung, N.K.P. (2019). Isolation and characterization of six flavonoids from the leaves of *Sterculia foetida* Linn. *Vietnam J. Chem., 57(4),* 438-442.

DAB 10. Band 3. (1997). *Monographien (Weissdornblaetter mit Blüten)*. Stutgart: Deutscher Apotheker Verlag.

Davis, P.H. (1972). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* Cilt 4, İskoçya: Edinburgh University Press.

Dong, P., Pan, L., Zhang, X., Zhang, W., Wang, X., Jiang, M. Ve ark. (2017). Hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bunge) leave flavonoids attenuate atherosclerosis development in apoE knock-out mice. *Journal of Ethnopharmacology*, *198*, 479–488. https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.01.040

Dönmez, A.A. (2004). The Genus *Crataegus* L. (Rosaceae) with Special Reference to Hybridisation and Biodiversity in Turkey. *Turk J Bot. 28*, 29-37.

Dönmez, A.A. (2007). Taxonomic notes on the genus *Crataegus* (Rosaceae) in Turkey. *Bot. J. Linn. Soc., 155 (2)*, 231-240.

Dönmez, A.A. (2014). Nomenclatural, taxonomic and biogeographic novelties in the Turkish Crataegus L. (Rosaceae-Maleae) taxa. *Adansonia, 36(2)*, 245-253.

Ebadi, M. (2007). *Pharmacodynamic basis of herbal medicine* (2 nd edition). Boca Raton: Taylor & Francis Group.

Edwards, J. E., Brown, P. N., Talent, N., Dickinson, T. A., Shipley, P. R. (2012). A review of the chemistry of the genus *Crataegus*. *Phytochemistry*, *79*, 5–26. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.04.006

Fathiazad F., Delazar A., Amin R., Sarker S.D. (2006). Extraction of flavonoids and quantification of rutin from waste tobacco leaves. *Iranian Journal of Pharmaceutical Journal of Pharmaceutical Research, 3*, 222-227.

Ghaffari-Moghaddam, M., Hadi-Dabanlou, R. (2014). Plant mediated green synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles using *Crataegus douglasii* fruit extract. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, *20*(2), 739–744. https://doi.org/10.1016/j.jiec.2013.09.005

Gao, P. Y., Li, L. Z., Peng, Y., Li, F. F., Niu, C., Huang, X. X. Ve ark. (2010). Monoterpene and lignan glycosides in the leaves of *Crataegus pinnatifida*.

Biochemical Systematics and Ecology, *38*(5), 988–992. https://doi.org/10.1016/j.bse.2010.09.010

Guo, R., Lv, T. M., Shang, X. Y., Yao, G. D., Lin, B., Wang, X. B. ve ark. (2019a). Racemic neolignans from *Crataegus pinnatifida*: Chiral resolution, configurational assignment, and cytotoxic activities against human hepatoma cells. *Fitoterapia*, *137*, 104287. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104287

Guo, R., Shang, X. Y., Lv, T. M., Yao, G. D., Lin, B., Wang, X. B. ve ark. (2019b). Phenylpropanoid derivatives from the fruit of *Crataegus pinnatifida* Bunge and their distinctive effects on human hepatoma cells. *Phytochemistry*, *164*, 252–261. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.05.005

Guo, R., Lv, T., Han, F., Hou, Z., Yao, G., Lin, B. ve ark. (2020). New norlignan enantiomers from the fruit of *Crataegus pinnatifida* with neuroprotective activities. *Chinese Chemical Letters*, *31*(5), 1254–1258. https://doi.org/10.1016/j.cclet.2019.09.042

Güner A (Ed.). (2012). *Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)*, İstanbul: ANG Vakfı/Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları Flora Dizisi 1.

Havsteen BH. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Therapeut*., *96*, 67-202.

Huang, X. X., Guo, D. D., Li, L. Z., Lou, L. L., Li, D. M., Zhou, C. C. ve ark. (2013a). Monoterpene and sesquilignan compounds from the leaves of *Crataegus pinnatifida*. *Biochemical Systematics and Ecology*, *48*, 1–5. https://doi.org/10.1016/j.bse.2012.12.001

Huang, X. X., Zhou, C. C., Li, L. Z., Peng, Y., Lou, L. L., Liu, S. ve ark. (2013b). Cytotoxic and antioxidant dihydrobenzofuran neolignans from the seeds of *Crataegus pinnatifida*. *Fitoterapia*, *91*, 217–223. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.09.011

Huang, X. X., Liu, S., Lou, L. L., Liu, Q. B., Zhou, C. C., Li, L. Z. ve ark. (2014). Phenylpropanoids from *Crataegus pinnatifida* and their chemotaxonomic importance. *Biochemical Systematics and Ecology*, *54*, 208–212. https://doi.org/10.1016/j.bse.2014.01.018

Idris-Khodja, N., Auger, C., Koch, E., Schini-Kerth, V. B. (2012). *Crataegus* special extract WS®1442 prevents aging-related endothelial dysfunction. *Phytomedicine*, *19*(8–9), 699–706. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.04.005

Kashyap, C. P., Arya, V., Thakur, N. (2012). Ethnomedicinal and phytopharmacological potential of *Crataegus oxyacantha* Linn. - A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *2*(2 SUPPL.), S1194–S1199. https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60383-9

Koçyıldız, Z.Ç., Birman, H., Olgaç, V., Akgün-Dar, K., Melikoğlu, G., Meriçli, A.H. 2006. "*Cratageus tanacetifolia* Leaf Extract Prevents L-NAME-induced Hypertension in Rats: A Morphologial Study" *Phytotherapy Research, 20*, 66-70.

Konyalioglu, S., Cebe, G. E., Aktar, S. (2017). Antioxidant activity of *Crataegus monogyna* L flowers. *Free Radical Biology and Medicine*, *108*, 56. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.198

Kuruüzüm, Uz A., Güvenalp, Z., Kazaz, C., Demirezer, Ö. (2013). Phenolic compounds from the roots of *Anchusa azurea* var. *azurea*. *Turk J Pharm Sci 10(2),* 177-184.

Küpeli Akkol, E., Süntar, I., Keleş, H., Sezik, E., Gürler, G. (2015). Bioassay-guided isolation and characterization of wound healer compounds from *Morus nigra* L. (Moraceae). *Rec. Nat. Prod., 9(4)*, 484-495.

Kwok, C.-Y., Li, C., Cheng, H.-L., Ng, Y.-F., Chan, T.-Y., Kwan, Y.-W. ve ark. (2013). Cholesterol lowering and vascular protective effects of ethanolic extract of dried fruit of *Crataegus pinnatifida*, hawthorn (Shan Zha), in diet-induced hypercholesterolaemic rat model. *Journal of Functional Foods*, *5*(3), 1326–1335. https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.04.020

Lee, J., Cho, E., Kwon, H., Jeon, J., Jung, C. J., Moon, M. ve ark. (2019). The fruit of *Crataegus pinnatifida* ameliorates memory deficits in β-amyloid protein-induced Alzheimer's disease mouse model. *Journal of Ethnopharmacology*. https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112107

Li, L. Z., Gao, P. Y., Song, S. J., Yuan, Y. Q., Liu, C. T., Huang, X. X., Liu, Q. B. (2015). Monoterpenes and flavones from the leaves of *Crataegus pinnatifida* with anticoagulant activities. *Journal of Functional Foods*, *12*, 237–245. https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.11.012

Li, W.-H. ve Yang, N. (2016). Green and facile synthesis of Ag–Fe3O4 nanocomposites using the aqueous extract of *Crataegus pinnatifida* leaves and their antibacterial performance. *Materials Letters*, *162*, 157–160. https://doi.org/10.1016/j.matlet.2015.09.064

Liu, S., Chang, X., Liu, X., Shen, Z. (2016). Effects of pretreatments on anthocyanin composition, phenolics contents and antioxidant capacities during fermentation of hawthorn (*Crataegus pinnatifida*) drink. *Food Chemistry*. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.146

Liu, Y. L., ve Mabry, T. J. (1981). Flavonoids from *Artemisia frigida*. *Phytochemistry, 20(6),* 1389-1395.

Long R., Tang C., Yang Z., Fu Q., Xu J., Tong C., Shi S., Guo Y., Wang D. (2020). Natural hyperoside based novel light-up fluorescent probe with AIE and ESIPT characteristics for on-site and long-term imaging of β-galactosidase in living cells. *Journal of Materials Chemistry C, 8*, 11860-11865.

Lou, X., Xu, H., Hanna, M., Yuan, L. (2020). Identification and quantification of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolic compounds in hawthorn berry fruit (*Crataegus pinnatifida*) and antioxidant activity evaluation. *Lwt*, *130*(May), 109643. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109643

Ma, L., Xu, G. B., Tang, X., Zhang, C., Zhao, W., Wang, J., Chen, H. (2020). Anti-cancer potential of polysaccharide extracted from hawthorn (*Crataegus*.) on human colon cancer cell line HCT116 via cell cycle arrest and apoptosis. *Journal of Functional Foods*, *64*, 103677. https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103677

Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B. (1970). *The systematic Identification of Flavonoids*. New York-Heideberg- Berlin: Springer-Verlag.

Melikoğlu, G., Meriçli, A.H. ve Meriçli, F. (1999). Flavonoids of *Crataegus orientalis*. *Boll. Chim. Farmaceutica*, 138, 351-352.

Meriçli, A.H. ve Ergezen, K. (1994). Flavonoids of *Crataegus tanacetifolia* (Lam.) Pers. (Rosaceae), an Endemic Species from Turkey. *Sci. Pharm. 62*, 277-281.

Mues, R., Timmermann, B. N., Ohno, N., & Mabry, T. J. (1979). 6-Methoxyflavonoids from *Brickellia californica*. *Phytochemistry, 18(8)*, 1379-1383.

Mustapha, N., Bzéouich, I. M., Ghedira, K., Hennebelle, T., Chekir-Ghedira, L. (2015). Compounds isolated from the aerial part of *Crataegus azarolus* inhibit growth of B16F10 melanoma cells and exert a potent inhibition of the melanin synthesis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *69*, 139–144. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2014.11.010

Naghizadeh, A., Mohammadi-Aghdam, S., Mortazavi-Derazkola, S. (2020). Novel CoFe2O4@ZnO-CeO2 ternary nanocomposite: Sonochemical green synthesis using *Crataegus microphylla* extract, characterization and their application in catalytic and antibacterial activities. *Bioorganic Chemistry*, *103*, 104194. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104194

Nishikimi, M., Rao, N. A., Yagi, K. (1972). The occurence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *46*, 849-854.

Niu, Z., Yan, M., Zhao, X., Jin, H., & Gong, Y. (2020). Effect of hawthorn seed extract on the gastrointestinal function of rats with diabetic gastroparesis. *South African Journal of Botany*, *130*, 448–455. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.01.032

Nowak, R., Krzaczek, T., (1994). Flavonoids from *Rosa pomifera* var. *ciliato-petala* Bess. (Chrshan.). *Acta Poloniae Pharmaceutica, Drug Research*, *51(4-5),* 407-411.

Österdahl, B.G. (1979). Chemical studies on Bryophytes. 22. Flavonoid C-Glycosides of *Mnium undulatum*. *Acta.Chem.Scand B, 33(6),* 400-404.

Pawlaczyk-Graja, I. (2018). Polyphenolic-polysaccharide conjugates from flowers and fruits of single-seeded hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.): Chemical profiles and mechanisms of anticoagulant activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, *116*(2017), 869–879. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.101

Poitevin, B. (2014). *Crataegus oxyacantha*. *Revue d'Homeopathie*, *5*(3), 113–116. https://doi.org/10.1016/j.revhom.2014.07.005

Qiao, A., Wang, Y., Xiang, L., Zhang, Z., He, X. (2015). Novel triterpenoids isolated from hawthorn berries functioned as antioxidant and antiproliferative activities. *Journal of Functional Foods*, *13*, 308–313. https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.047

Rababa'h, A. M., Al Yacoub, O. N., El-Elimat, T., Rabab'ah, M., Altarabsheh, S., Deo, S. ve ark. (2020). The effect of hawthorn flower and leaf extract (*Crataegus* Spp.) on cardiac hemostasis and oxidative parameters in Sprague Dawley rats. *Heliyon*, *6*(8), e04617. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04617

Ramawat, K.G. (2009). *Herbal Drugs: Ethnomedicine to Modern Medicine*. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Ranjbar, K., Zarrinkalam, E., Salehi, I., Komaki, A., Fayazi, B. (2018). Cardioprotective effect of resistance training and *Crataegus oxyacantha* extract on ischemia reperfusion–induced oxidative stress in diabetic rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.021

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology, 26*, 1231-1237.

Rodrigues, S., Calhelha, R. C., Barreira, J. C. M., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Abreu, R. M. V. ve ark. (2012). *Crataegus monogyna* buds and fruits phenolic extracts: Growth inhibitory activity on human tumor cell lines and chemical characterization by HPLC-DAD-ESI/MS. *Food Research International*, *49*(1), 516–523. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.046

Sakanaka, S., Tachibana, Y., Okada, Y. (2005). Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *Food Chemistry, 89,* 569–575.

Saoudi, M., Salem, R.B.S.B., Salem, M.B., Brahmi, N., Badraoui, R., Nasri, M., El Feki, A. (2019). Beneficial effects of *Crataegus oxyacantha* extract on neurobehavioral deficits and brain tissue damages induced by an insecticide mixture of deltamethrin and chlorpyrifos in adult wistar rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *114*, 108795.

Scotti, L., Fernandes, M.B., Muramatsu, E., Emereciano, V.P., Tavares, J.F., Silva M.S., Scotti, M.T. (2011). 13C-NMR spectral data and molecular descriptors to

predict the antioxidant activity of flavonoids. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 47(2)*, 241-249. https://doi.org/10.1590/S1984-82502011000200005

Serteser, A., Kargioğlu, M., Gök, V., Bağci, Y., Özcan, M. M., Arslan, D. (2008). Determination of antioxidant effects of some plant species wild growing in Turkey. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *59*(7–8), 643–651. https://doi.org/10.1080/09637480701602530

Shalaby, M. S., Zakora, M., Otte, J. (2006). Performance of two commonly used angiotensin-converting enzyme inhibiton assays using FA-PGG and HHL as substrates. *Journal of Dairy Research*, 73, 178-186.

Shang, X. Y., Guo, R., Yu, X. Q., Lin, B., Huang, X. X., Yao, G. D., Song, S. J. (2020). Enantiomeric 8-O-4′-type neolignans from *Crataegus pinnatifida* exhibit cytotoxic effect via apoptosis and autophagy in Hep3B cells. *Bioorganic Chemistry*, *104*(September), 104267. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104267

Shatoor, A. S., Soliman, H., Al-Hashem, F., Gamal, B. El, Othman, A., El-Menshawy, N. (2012). Effect of Hawthorn (*Crataegus aronia* syn. *azarolus* (L)) on Platelet Function in Albino Wistar Rats. *Thrombosis Research*, *130*(1), 75–80. https://doi.org/10.1016/j.thromres.2012.01.001

Shirzadi-Ahodashti, M., Mortazavi-Derazkola, S., Ebrahimzadeh, M. A. (2020). Biosynthesis of noble metal nanoparticles using *Crataegus monogyna* leaf extract (CML@X-NPs, X= Ag, Au): Antibacterial and cytotoxic activities against breast and gastric cancer cell lines. *Surfaces and Interfaces*, *21*(September), 100697. https://doi.org/10.1016/j.surfin.2020.100697

Slinkard, K. ve Singleton, V.L. (1977). Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, *28,* 49–55.

Sukito A., Tachibana S. (2014). Isolation of Hyperoside and Isoquercitin from *Camellia sasanqua* as antioxidant agents. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, *17*, 999-1006.

Tamer, Ş., Birman, H., Melikoğlu, G. Meriçli, A.H. (1999). The Comparative Investigation of the Leaf, Flower and Fruit Extracts of *Crataegus tanacetifolia* and the Medicinal Species *C. monogyna* on Their Effects of the Cardiovascular System. *Acta Pharmaceutica Turcica,* XLI (3), 117-119.

Wang, X., Zhang, C., Peng, Y., Zhang, H., Wang, Z., Gao, Y. ve ark. (2018). Chemical constituents, antioxidant and gastrointestinal transit accelerating activities of dried fruit of *Crataegus dahurica*. *Food Chemistry*, *246*(76), 41–47. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.011

Wen, L., Guo, R., You, L., Abbasi, A. M., Li, T., Fu, X., Liu, R. H. (2017). Major triterpenoids in Chinese hawthorn "*Crataegus pinnatifida*" and their effects on cell

proliferation and apoptosis induction in MDA-MB-231 cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, *100*, 149–160. https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.12.032

Willer, E. A., Malli, R., Bondarenko, A. I., Zahler, S., Vollmar, A. M., Graier, W. F., Fürst, R. (2012). The vascular barrier-protecting hawthorn extract WS 1442 raises endothelial calcium levels by inhibition of SERCA and activation of the IP3 pathway. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *53*(4), 567–577. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.07.002

Wu, M., Liu, L., Xing, Y., Yang, S., Li, H., & Cao, Y. (2020). Roles and Mechanisms of Hawthorn and Its Extracts on Atherosclerosis: A Review. *Frontiers in Pharmacology*. https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00118

Xiao, J., Chen, T. ve Cao, H. (2014). Flavonoid glycosylation and biological benefits. *Biotechnology Advances* http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.05.004

Younis, W., Alamgeer, Schini-Kerth, V. B., Brentan da Silva, D., Junior, A. G., Bukhari, I. A., Assiri, A. M. (2020). Role of the NO/cGMP pathway and renin-angiotensin system in the hypotensive and diuretic effects of aqueous soluble fraction from *Crataegus songarica* K. Koch. *Journal of Ethnopharmacology*, *249*. https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112400

Zhang, J., Liang, R., Wang, L., Yan, R., Hou, R., Gao, S., Yang, B. (2013). Effects of an aqueous extract of *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N.E.Br. fruit on experimental atherosclerosis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *148*(2), 563–569. https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.04.053

Zhao, P., Zhang, H., Han, F. Y., Guo, R., Huang, S. W., Lin, B. ve ark. (2019a). Chiral resolution and neuroprotective activities of enantiomeric 8-O-4′ neolignans from the fruits of *Crataegus pinnatifida* Bge. *Fitoterapia*, *136*, 104164. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.05.003

Zhao, P., Guo, R., Zhang, Y. Y., Zhang, H., Yao, G. D., Lin, B. ve ark. (2019b). Phenylpropanoid and dibenzofuran derivatives from *Crataegus pinnatifida* with antiproliferative activities on hepatoma cells. *Bioorganic Chemistry*, *93*, 103354. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103354

Zhao, P., Qiu, S., Hou, Z. L., Xue, X. B., Yao, G. D., Huang, X. X., Song, S. J. (2020). Sesquineolignans derivatives with neuroprotective activity from the fruits of *Crataegus pinnatifida*. *Fitoterapia*, *143*(April), 104591. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104591

Zhu, R., Li, T., Dong, Y., Liu, Y., Li, S., Chen, G. ve ark. (2013). Pectin pentasaccharide from hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bunge. var. *major*) ameliorates disorders of cholesterol metabolism in high-fat diet fed mice. *Food Research International*, *54*(1), 262–268. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.010

Zhu, R. G., Sun, Y. Di, Li, T. P., Chen, G., Peng, X., Duan, W. Bin ve ark. (2015). Comparative effects of hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bunge) pectin and pectin hydrolyzates on the cholesterol homeostasis of hamsters fed high-cholesterol diets. *Chemico-Biological Interactions*, *238*, 42–47. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.06.006

HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

CRATAEGUS X BORNMUELLERİ ZABEL TÜRÜ ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR

ORİJİNALLİK RAPORU

%19	%17	%4	%6
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%11
2	Submitted to Middle East Technical University Öğrenci Ödevi	%1
3	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
4	dspace.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
5	1library.co İnternet Kaynağı	<%1
6	arastirma.tarimorman.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
7	file.zums.ac.ir İnternet Kaynağı	<%1
8	www.mdpi.com İnternet Kaynağı	<%1
9	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	<%1