

T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Scorzonera aucheriana Bitkisinin Fitokimyasal ve Biyolojik Aktivite
Açısından Araştırılması

Sibel TAŞTI

Danışman: Doç. Dr. Ahmet ALTAY

İkinci Danışman: Doç. Dr. Hüseyin AKŞİT

Kimya
ANABİLİM DALI

ERZİNCAN

2024

Her Hakkı Saklıdır.

ÖZET

Yüksek Lisans

***Scorzonera aucheriana* Bitkisinin Fitokimyasal ve Biyolojik Aktivite Açısından Araştırılması**

Sibel TAŞTI

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ahmet ALTAY
İkinci Danışman: Doç. Dr. Hüseyin AKŞİT

Bu çalışmada ülkemize endemik bitki türlerinden biri olan *Scorzonera aucheriana* bitkisi fitokimyasal ve biyolojik aktivite bakımından incelenmiştir. Bitkinin hekzan, diklorometan, metanol ve su ekstraktları elde edilmiş ve her bir ekstre antioksidan ve antiproliferatif aktivite yönünden testlere tabi tutulmuştur. Biyolojik aktivite testlerini takiben en güçlü etkiye sahip ekstrelerden sekonder metabolitlerin izolasyonu ve her bir metabolitin benzer biyolojik aktiviteleri için kromatografik işlemler gerçekleştirilmiştir. Bitki ekstraktlarıyla yapılan çalışmalar sonucunda metanol ekstraktının DPPH ve ABTS katyon radikallerini süpürme ve Demir (III) iyonlarını indirgenme yönünden tüm ekstraller arasında en güçlü etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. XTT yöntemiyle gerçekleştirilen antiproliferatif aktivite deneyleri ile ekstraller HeLa, HT29 ve LnCap hücre hatlarına karşı test edilmiş ve bu ekstraller arasında en yüksek antiproliferatif aktiviteyi HeLa hücrelerine karşı en düşük IC₅₀ değeri (17,16 µg/mL) ile su ekstresi sergilemiştir. Ayrıca, tüm ekstrallere karşı en hassas olan hücre hattının HeLa hücrelerinin olduğu ve ekstrallere karşı en dirençli olanın ise LnCap hücrelerinin olduğu görülmüştür. Bitkinin metanol ekstresi üzerinden gerçekleştirilen kromatografik çalışmalar sonucunda üçü bilinen (1,3-dikafeoyil kinik asit, klorojenik asit scorzopigmaekozit), ikisi yeni (Scorzopigmaekozit A ve Aucherianoside) olmak üzere 5 molekül izole edilerek spektroskopik yöntemlerle yapıları tayin edildi. İzole edilen bileşikler antioksidan ve antiproliferatif aktiviteleri ayrıca tabi tutuldu. Özellikle 1,3-dikafeoyil kinik asit ve klorojenik asit bileşiklerinin kuvvetli antioksidan aktivite gösterdiği, yeni bileşiklerin ise diğerlerine kıyasla göreceli olarak zayıf aktivite sergilediği belirlenmiştir. İzole edilen bileşikler A549 ve MCF-7 hücre hatlarına karşı test edilmiş ve 4 nolu bileşik olan Scorzopigmaekozit A'nın tüm bileşikler arasında A549 ve MCF-7 hücrelerine karşı sırasıyla 32,08 ve 37,27 µM olan en düşük IC₅₀ değerleri ile en güçlü antiproliferatif etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

2022, 61 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Antioksidan aktivite, antiproliferatif aktivite, *Scorzonera aucheriana*, sekonder metabolitler

ABSTRACT

MSc Thesis

Investigation of *Scorzonera aucheriana* in Terms of Phytochemical and Biological Activity

Sibel TAŞTI

Erzincan Binali Yıldırım University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ahmet ALTAY
Second Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hüseyin AKŞİT

In this study, *Scorzonera aucheriana*, one of the endemic plant species to our country, was examined in terms of phytochemical and biological activity. Hexane, dichloromethane, methanol and water extracts of the plant were obtained, and each extract was tested for antioxidant and antiproliferative activity. Following the biological activity tests, chromatographic processes were carried out for the isolation of secondary metabolites from the extract with the strongest effect. As a result of studies conducted with plant extracts, it was determined that methanol extract had the strongest effect among all extracts in terms of scavenging DPPH and ABTS cation radicals and reducing Iron (III) ions. In antiproliferative assays using the XTT method, the extracts were tested against the HeLa, HT29 and LnCap cell lines, and among these extracts, the water extract showed the highest antiproliferative activity against HeLa cells with the lowest IC₅₀ value (17.16 µg/mL). In addition, it was observed that the cell line most sensitive to all extracts was HeLa cells and the most resistant to extracts was LnCap cells. As a result of chromatographic studies carried out on the methanolic extract of the plant, 5 molecules have been isolated, three of which are known (1,3-dicafeoylquinic acid, chlorogenic acid, scorzopygmaecoside) and two of which are new (scorzopygmaecoside A and aucherianoside), and their structures have been determined by spectroscopic methods. The isolated compounds were further subjected to antioxidant and antiproliferative activities. It was found that 1,3-dicafeoylquinic acid and chlorogenic acid compounds in particular exhibited strong antioxidant, while the new compounds showed relatively weak activity compared to the others. The isolated compounds were tested against A549 and MCF-7 cell lines and compound 4, scorzopygmaecoside A, was found to be the most potent antiproliferative compound among all compounds with the lowest IC₅₀ values of 32.08 and 37.27 µM against A549 and MCF-7 cells respectively.

2022, 61 Pages

Keywords: Antioxidant activity, Antiproliferative activity, *Scorzonera aucheriana*, secondary metabolites

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca destekleri esirgemeyen bilgi ve becerilerini benimle paylaşan danışman hocalarım Doç. Dr. Ahmet ALTAY ve Doç. Dr. Hüseyin AKŞİT'e, antioksidan ve antiproliferatif aktivite aşamalarında verdiği destekten dolayı Dr. Esmâ Kübra KAĞAN YENİÇERİ'ye, NMR analizleri boyunca sabrından ve özverisinden dolayı Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden Özlem POLAT'a, çalışmanın tamamlanabilmesi için her türlü imkanı sunan Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi çalışanlarına, Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL'a, Sevgi ALTIN'a, Öğr. Gör. Dr. Samed ŞİMŞEK'e ve son olarak aileme teşekkürü borç bilirim.

Sibel TAŞTI

Şubat, 2024

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1. <i>Scorzonera L.</i> Cinsi	4
2.2. <i>Scorzenera aucherina</i> Türü.....	4
3. MATERYAL ve YÖNTEM	7
3.1. Materyal.....	7
3.1.1. Bitkisel materyal	7
3.1.2. Kullanılan kimyasallar	7
3.1.3. Cihazlar.....	8
3.2. Yöntem	8
3.2.1. Antioksidan aktivite tayin metotları.....	8
3.2.1.1. DPPH• radikalini giderme aktivitesi tayini	8
3.2.1.2. ABTS.+ radikal giderme aktivitesi tayini	8
3.2.1.3. FRAP aktivitesi	9
3.2.2. Hücre kültürü	9
3.2.2.1. Hücre kültürü koşulları	9
3.2.2.2. Hücrelerin çözdürülmesi	9
3.2.2.3. Hücrelerin pasajlanması.....	9
3.2.2.4. Hücrelerin dondurulması.....	10
3.2.2.5. Hücre sayımı.....	10
3.2.2.6. Test Örneklerin hazırlanması	11
3.2.2.7. Hücre canlılığının ölçülmesi	11
3.3. Ekstraksiyon.....	12

3.4. Ayırma ve Saflaştırma	13
4. BULGULAR.....	19
4.1. <i>Scorzonera aucheriana</i> Bitkisinden İzole Edilen Moleküllerin Yapı Tayini	19
4.1.1. Molekül 1'in yapı tayini.....	19
4.1.2. Molekül 2'nin yapı tayini.....	23
4.1.3. Molekül 3'ün yapı tayini.....	27
4.1.4. Molekül 4'ün yapı tayini.....	33
4.1.5. Molekül 5'in yapı tayini.....	38
4.2. <i>Scorzonera aucheriana</i> Bitkisinin Ekstraktları ve İzole Edilen Moleküllerin Antioksidan Aktiviteleri	42
4.3. <i>Scorzonera aucheriana</i> Bitki Ekstraktları ve İzole Edilen Moleküllerin Antiproliferatif Aktiviteleri.....	45
5. SONUÇ	53
KAYNAKLAR.....	54

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Scorzenera aucheriana bitkisinin ülkemizde yayılış coğrafyası.	5
Şekil 2.2. Scorzonera aucheriana bitkisinin görünümü	5
Şekil 3.1. XTT tetrazolyumun fenazin meto sülfat varlığında mitokondriyal dehidrogenaz ile XTT formazan'a indirgenmesi	11
Şekil 3.2. Test örneklerini 96 kuyucuklu plakanın gösterimi	12
Şekil 3.3. B alt fraksiyonu prep-HPLC kromatogramı	14
Şekil 3.4. C alt fraksiyonu prep-HPLC kromatogramı	15
Şekil 3.5. D alt fraksiyonu prep-HPLC kromatogramı	15
Şekil 3.6. S. aucherina bitkisinden sekonder metabolitlerin izolasyon şeması	16
Şekil 3.7. S. aucherina bitkisi ham metanol ekstraktı HPLC kromatogramı (280 nm) .	17
Şekil 3.8. Molekül 1'in HPLC kromatogramı (330 nm)	17
Şekil 3.9. Molekül 2'nin HPLC kromatogramı (330 nm)	17
Şekil 3.10. Molekül 3'ün HPLC kromatogramı (280 nm)	18
Şekil 3.11. Molekül 4'ün HPLC kromatogramı (280 nm)	18
Şekil 3.12. Molekül 5'in HPLC kromatogramı (280 nm)	18
Şekil 4.1. Molekül 1'in kimyasal yapısı	19
Şekil 4.2. Molekül 1'in (1,3-dikafeoyil künik asit) ¹ H-NMR spektrumu	20
Şekil 4.3. Molekül 1'in (1,3-dikafeoyil künik asit) ¹³ C-NMR spektrumu	20
Şekil 4.4. Molekül 1'in (1,3-dikafeoyil künik asit) COSY spektrumu (MeOD-d3)	21
Şekil 4.5. Molekül 1'in (1,3-dikafeoyil künik asit) COSY spektrumu	21
Şekil 4.6. Molekül 1'in (1,3-dikafeoyil künik asit) HMBC spektrumu	22
Şekil 4.7. Molekül 2'nin (klorojenik asit) kimyasal yapısı	23
Şekil 4.8. Molekül 2'nin (klorojenik asit) ¹ H-NMR spektrumu (400 MHz, DMSO-d6)	24
Şekil 4.9. Molekül 2'nin (klorojenik asit) ¹³ C-NMR spektrumu (100 MHz, DMSO-d6)	24
Şekil 4.10. Molekül 2'nin (klorojenik asit) HETCOR spektrumu (DMSO-d6)	25
Şekil 4.11. Molekül 2'nin (klorojenik asit) COSY spektrumu (DMSO-d6)	25
Şekil 4.12. Molekül 2'nin (klorojenik asit) HMBC spektrumu (DMSO-d6)	26
Şekil 4.13. Molekül 3'ün (scorzopigmaekozit) kimyasal yapısı	28

Şekil 4.14. Molekül 3'ün (scorzopigmaekozit) ^1H -NMR spektrumu (600 MHz, DMSO-d6)	28
Şekil 4.15. Molekül 3'ün (scorzopigmaekozit) ^{13}C -NMR spektrumu (125 MHz, DMSO-d6)	29
Şekil 4.16. Molekül 3'ün (scorzopigmaekozit) ^{13}C -DEPT135 spektrumu (100 MHz, MeOD-d4)	29
Şekil 4.17. Molekül 3'ün (scorzopigmaekozit) ^{13}C -DEPT135 spektrumu (100 MHz, MeOD-d4)	30
Şekil 4.18. Molekül 3'ün (scorzopigmaekozit) ^{13}C -DEPT90 spektrumu (MeOD-d4) ...	30
Şekil 4.19. Molekül 3'ün (scorzopigmaekozit) HETCOR spektrumu (100 MHz, MeOD-d4)	31
Şekil 4.20. Molekül 3'ün (scorzopigmaekozit) HMBC spektrumu (DMSO-d6)	31
Şekil 4.21. Molekül 4'ün (scorzopigmaekozit A) kimyasal yapısı ile anahtar..... HMBC(siyah) COSY (kırmızı) etkileşimleri	33
Şekil 4.22. Molekül 4'ün (scorzopigmaekozit A) ^1H -NMR spektrumu (600 MHz, DMSO-d6).....	34
Şekil 4.23. Molekül 4'ün (scorzopigmaekozit A) ^{13}C -NMR spektrumu (125 MHz, DMSO-d6).....	34
Şekil 4.24. Molekül 4'ün (scorzopigmaekozit A) ^{13}C -DEPT135 spektrumu (100 MHz, MeOD-d4)	35
Şekil 4.25. Molekül 4'ün (scorzopigmaekozit A) HETCOR spektrumu (MeOD-d4)....	35
Şekil 4.26. Molekül 4'ün (scorzopigmaekozit A) COSY spektrumu (MeOD-d4)	36
Şekil 4.27. Molekül 4'ün (scorzopigmaekozit A) HMBC spektrumu (MeOD-d4)	36
Şekil 4.28. Molekül 5'in (aucherianoside) kimyasal yapısı	38
Şekil 4.29. Molekül 5'in (aucherianoside) ^1H -NMR spektrumu (400 MHz, DMSO-d6)	39
Şekil 4.30. Molekül 5'in (aucherianoside) ^{13}C -NMR spektrumu (100 MHz, DMSO-d6)	39
Şekil 4.31. Molekül 5'in (aucherianoside) ^{13}C -DEPT135 spektrumu (100 MHz, DMSO-d6)	40
Şekil 4.32. Molekül 5'in (aucherianoside) ^{13}C -DEPT90 spektrumu (100 MHz, DMSO-d6)	40

Şekil 4.33. Molekül 5'in (aucherianoside) COSY spektrumu (DMSO-d6).....	41
Şekil 4.34. Molekül 5'in (aucherianoside) HETCOR spektrumu (DMSO-d6)	41
Şekil 4.35. A549 akciğer kanseri hücre hattı üzerine sekonder metabolitler (1-5) ve standart kemoterapötik ilaçların (karboplatin ve dosetaksel) doz-bağımlı antiproliferatif aktiviteleri.	48
Şekil 4.36. MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerine sekonder metabolitler (1-5) ve standart kemoterapötik ilaçlar (karboplatin ve dosetaksel)'in doz-bağımlı antiproliferatif aktiviteleri.	48



TABLÖLER LİSTESİ

Sayfa

Tablo 4.1. Molekül 1'in (1,3-dikafeoyil künik asit) NMR verileri (600 MHz, MeOD-d3)	22
Tablo 4.2. Molekül 2'nin (klorojenik asit) NMR verileri	26
Tablo 4.3. Molekül 3'ün (scorzopigmaekozit) NMR verileri (MeOD-d4)	32
Tablo 4.4. Molekül 4'ün (scorzopigmaekozit A) NMR verileri (MeOD-d4)	37
Tablo 4.5. Molekül 5'in (aucherianoside) NMR verileri (400 MHz, DMSO-d6)	42
Tablo 4.6. Bitkiden izole edilen ekstraktların antioksidan aktiviteleri	42
Tablo 4.7. Bitkiden izole edilen bileşiklerin antioksidan aktiviteleri	43
Tablo 4.8. Bitki ekstraktlarının antiproliferatif etkisi	45
Tablo 4.9. Sekonder metabolitler (1-5) ve standart kemoterapötik ilaçların (karboplatin ve dosetaksel) A549 ve MCF-7 kanser hücre hatları üzerine IC ₅₀ (µM) değerleri	49

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

δ_H	Protonların kimyasal kayma değeri
δ_C	Karbonların kimyasal kayma değeri

Kısaltmalar

ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
COSY	Korelasyon Spektroskopisi
DMSO	Dimetilsülfoksit
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
HETCOR	Heteronükleer Korelasyon
HMBC	Heteronükleer Çoklu Bağ Korelasyonu
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
HSQC	Heteronükleer Tek Kuantum Koherans
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
PBS	Fosfatlı Tuz Çözeltisi
RT	Alıkonma süresi
TE	Troloks eşdeğeri
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
UV	Ultraviyole
XTT	2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid

1. GİRİŞ

Yüzyıllardır, doğal ürünler değerli terapötik ajanlar ve yapısal çeşitlilik kaynağı olarak kabul edilmektedir (Lahlou, 2013). Bu ürünler, insanlık tarihinin farklı aşamalarında ve klinik denemelerde kullanılarak ilaç keşfinde önemli bir rol oynamışlardır (Butler vd., 2014). Doğal ürün kaynaklı ilaçların geliştirilmesi ve bu bileşiklerin klinik deneylerde kullanılması ve bir çoğunun halihazırda ilaç olarak raflarda yer alması, doğal ürünlerin ilaç keşfindeki önemini açıkça ortaya koymaktadır (Butler, 2004). Ayrıca, son teknolojik gelişmelerle beraber, doğal ürünlerden ilaç keşfi serüveninde yeni bir altın çağ başlamıştır (Shen, 2015).

Bitkiler, benzersiz yapısal özelliklere ve farklı biyolojik aktivitelere sahip sekonder metabolitler üretmeleri ile ön plana çıkmaktadır. Yeni bileşiklerin doğal kaynaklardan izole edilmesi, tanımlanması ve biyolojik aktivitelerinin incelenmesi, yeni ilaç ham maddelerinin keşfinde bitki sekonder metabolitlerinin önemini gün geçtikçe arttırmaktadır (Blunt vd., 2018). Bitki sekonder metabolitlerinin sahip olduğu geniş spektrumlu farmakolojik ve biyolojik aktiviteler sayesinde nörodejeneratif, kanser, Alzheimer, diyabet, viral ve bakteriyel hastalıkların tedavisinde umut verici alternatifler olarak konumlandırmaktadır. Bu olgu bitki sekonder metabolitlerini, ilaç geliştirme ve yeni ajanların keşfi için potansiyel adaylar haline getirmektedir (Angeloni ve Vauzour, 2019). Dahası, sekonder metabolitlerin üretiminden sorumlu biyosentetik gen kümelerinin tanımlanması ve bazı spesifik genlerin manipüle edilerek doğal kaynağın belli bir metabolitin üretimine yönlendirilmesi, doğal ürün kimyası alanını yeni bir aşamaya taşıyan 'Doğal Ürünler Versiyon 2.0'ın ortaya çıkmasına neden olmuştur (Barrow, 2016).

Bitki sekonder metabolitleri, bitkiler tarafından üretilen doğal bileşiklerdir ve biyotik ve abiyotik streslere karşı savunma mekanizmalarında önemli bir rol oynarlar (Kumar vd., 2021). Bitki metabolizmasının ara veya son ürünü olarak üretilen bitki sekonder metabolitleri, bitkiyi enfeksiyonlara, yaralanma ve UV ışınları gibi streslere karşı koruyan sinyalizasyon ve savunma fonksiyonlarının yanında (Xue vd., 2014), otçullara, zararlılara ve bitki patojenlerine karşı savunma gibi rolleri de üstlenir (Bennett ve Wallsgrove, 1994). Bitkiler aleminde çok sayıda fizyolojik olayda görev alan sekonder metabolitler aynı

zamanda bitkilerin biyolojik aktivitelerinden de sorumludur (Gulnaz ve Savitha, 2013; Srinivasan, 2022). Bitki sekonder metabolitleri, her biri kendi içinde farklı gruplara da ayrılan alkaloidler, fenolikler, terpenoidler ve steroidler olarak sınıflandırılır (Roy vd., 2022). Sekonder metabolitlerin en fazla üyesi olan fenolik bileşikler, antioksidan, antimikrobiyal, antidiyabetik, antiproliferatif aktivite gibi insan sağlığına pozitif katkıları bulunan birçok biyolojik aktivitelere sahiptir (Jacobo-Velázquez ve Cisneros-Zevallos, 2020). Bazı sekonder metabolitler, sahip oldukları antimikrobiyal aktiviteden dolayı insanlar ve bitkiler için oldukça bulaşıcı olan ve antibiyotiklere karşı dirençli patojenlerin kontrolünde alternatif ajanlar olarak kabul edilmektedir (Shirsat vd., 2021). Ayrıca bitki kaynaklı sekonder metabolitlerin, diyabet, Alzheimer ve tüberküloz gibi çok çeşitli kronik insan hastalıklarının tedavisi de dahil olmak üzere birçok yararlı kullanımları yaygın olarak bilinmektedir (Kumar vd., 2021).

Sekonder metabolitler kimyasal çeşitlilik bakımından oldukça zengindir. Bitki aleminde 50.000 kadar sekonder metabolitin bulunduğu rapor edilmiştir ve bu sayı günbegün artmaktadır (Harnly, 2016). Bu kimyasal yapı çeşitliği ve geniş biyoaktivite yelpazesinden dolayı bitki kaynaklı sekonder metabolitler gıda, ilaç, tarım ve kozmetik gibi çeşitli alanlarda önemli bir paya sahiptir (Yang vd., 2014). Özetle, bitkiler; yapısal çok yönlülük ve biyoaktivite çeşitliliğinden dolayı ilaç keşfi ve geliştirilmesinde kaynak ve taslak oluşturması bakımından, kanser başta olmak üzere farmakoloji ve tıbbın geleceği için büyük bir potansiyel barındırmaktadır.

Kanser, yüksek morbidite ve mortalite oranlarıyla önemli bir küresel sağlık sorunudur. Kanserın görölme sıklığı ve ölüm oranları küresel olarak sürekli artmasından dolayı dünya çapındaki başlıca ölüm nedenlerinden biri olarak sayılmaktadır (Yang vd., 2022). Akciğer ve kolorektal kanserinin yaygınlık ve ölüm oranı açısından dünya çapında en üst sıralarda yer alması daha iyi tedavi stratejilerine acil ihtiyaç olduğunu göstermektedir (Sawayama vd., 2020). Araştırmalar, ayrıca, tüm kanser türleri için etkili tedavi stratejilerine olan kritik ihtiyacın altını çizmektedir (Chan vd., 2016).

Kanserle mücadelede doğal ürünler, bulunabilirlikleri, düşük toksisiteleri ve ekonomik olarak karşılanabilirlikleri nedeniyle potansiyel antikanser ajan kaynakları olarak dikkat çekmektedir (Ren vd., 2017). Araştırmalar, agresif tarama, translasyonel araştırma ve doğal ajanların terapötik seçenekler olarak kullanımına odaklanması kanser tedavisinin

gidişatını önemli ölçüde geliştirilebileceğini göstermiştir (Ahmad vd., 2013; Ahmad vd., 2016). Ayrıca, yumurtalık kanseri ve erken kolon kanseri gibi kanser türleri için etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesi, hedeflenen terapi ve multidisipliner yaklaşımların hasta sonuçlarını iyileştirmede umut vaat ettiği de rapor edilmiştir (Lee vd., 2019b; Son vd., 2022). Bu bağlamda doğal ürünlerin anti-kanser ajanlar olarak kullanım potansiyellerini değerlendirmek üzere yapılan çalışmalar hâlihazırda popülerliğini korumaktadır. Örneğin, *Plumbago zeylanica* bitkisinden izole edilen plumbagin (2-metil juglon) ve analoglarının antikanser ajanları olarak kanser tedavisinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar mevcuttur (Asma vd., 2022; Cui vd., 2023; Padhye vd., 2012).

Türkiye, İran-Turan, Akdeniz ve Avrupa-Sibirya fitocoğrafik bölgenin kesiştiği bir coğrafyada yer almaktadır. Topoğrafik, jeolojik ve toprak yapısı bakımından farklılıklara sahip olmasının yanında, farklı iklim tiplerinin de etkisindedir. Bundan dolayı, bitki çeşitliliği bakımından komşu ülkelerden daha zengindir (Savcı vd., 2018).

Erzincan ili, coğrafi konumu ve jeolojik özellikleriyle ön plana çıkan bir bitki çeşitliliğine sahiptir. Erzincan'ın büyük bir kısmının 850-3550 rakımlı dağlarla kaplı olması lokal düzeyde iklim farklılıklarına neden olur. Bu iklimsel çeşitlilik, bitki florasında çeşitlenmeye ve adaptasyon mekanizmalarının gelişimine yol açtığından Erzincan ili ülkemizde endemik bitkilerin yoğunlaştığı alanlardan biridir. Yapılan floristik araştırmalara göre Erzincan'da 2500 civarında bitki yetişmektedir ve bunların 60 kadarı da lokal endemik türleri içermektedir (Kandemir vd., 2022).

Scorzenera aucherina bitkisi ülkemizde sadece Sivas ve Erzincan illerinde yayılış gösteren endemik türlerimizden biridir. Bu çalışmada; Erzincan ilinden toplanan *Scorzenera aucherina* bitkisinin fitokimyasal içeriğinin ortaya konulması ve bitkiden izole edilen bileşiklerin antioksidan ve antiproliferatif aktivitelerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla bitki ekstraktının kromatografik ayırma tabi tutulması, bitkide major olarak bulunan beş molekülün saflaştırılması ile sonuçlanmıştır. Bu moleküllerden ikisinin ilk defa rapor edilmesi hem bitkinin fitokimyasal içeriğine hem de doğal ürünler kimyası alanına yeni moleküller kazandırmıştır. Buna ilaveten izole edilen moleküllerin antioksidan ve antiproliferatif aktiviteleri de değerlendirilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. *Scorzonera L. Cinsi*

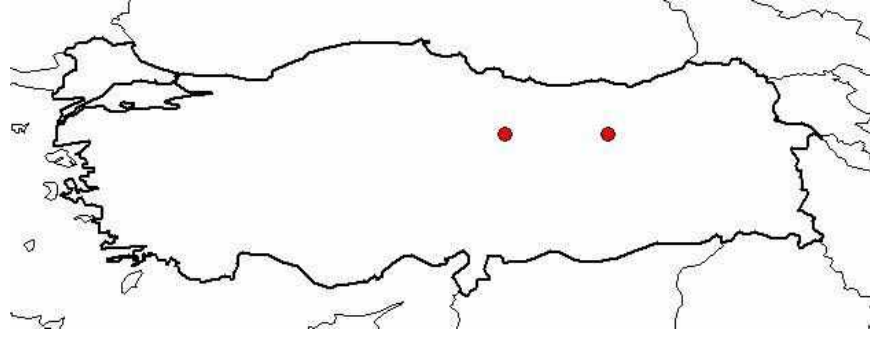
Scorzonera L. (Tekesakalı) cinsi dünya üzerinde Avrupa, Asya ve Afrika kıtalarında yayılış gösteren 105 tür ile temsil edilmektedir. Ülkemiz sınırları içinde 49 türü yetişmekte olup bu türlerden 29'u Türkiye florasına endemiktir. *Scorzonera L.* türleri dünya genelinde ve Türkiye'de sebze olarak tüketildiği gibi şeker hastalığı, kalp-damar hastalıkları, hipertansiyon, romatizma, soğuk algınlığı, akciğer hastalıkları, ülserler, böbrek hastalıkları, yılan ısırıkları, mide tümörleri ve akciğer ödemi gibi rahatsızlıklara karşı tamamlayıcı tıpta da kullanılmaktadır (Baytop, 1984; Tsevegsuren vd., 2007).

Scorzonera türlerinin ağrı kesici (Açıkara vd., 2012), iltihap giderici (Akkol vd., 2012) ve yara iyileştirici (Sutar vd., 2012) etkilerinin yanında antioksidan (Milella vd., 2014), antimikrobiyal (Mohammed vd., 2020), anti-tümör (Wang vd., 2009), diüretik (Lendzion vd., 2021a), mukolitik ve mide düzenleyici (Sutar vd., 2012) özellikleri gibi bazı aktiviteleri daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir.

Scorzonera türlerinin fitokimyasal içeriği incelendiğinde, bugüne kadar türün üyelerinden flavonoidler (Benabdelaziz vd., 2014; Xie vd., 2016), fenolik asit türevleri (Erik vd., 2021a), dihidroizokumarinler (Erik vd., 2021b; Paraschos vd., 2001), laktonlar (Jiang vd., 2007), lignanlar (Meng vd., 2020), neolignanlar (Khobrakova vd., 2003), bibenzil türevleri (Zidorn vd., 2002), benzil ftalatlar (Dall'Acqua vd., 2020), triterpenler (Benabdelaziz vd., 2014; Öksüz vd., 1990) ve seskiterpenler (Tsevegsuren vd., 2007) sınıfına dahil edilen bir çok bileşik izole edilmiştir.

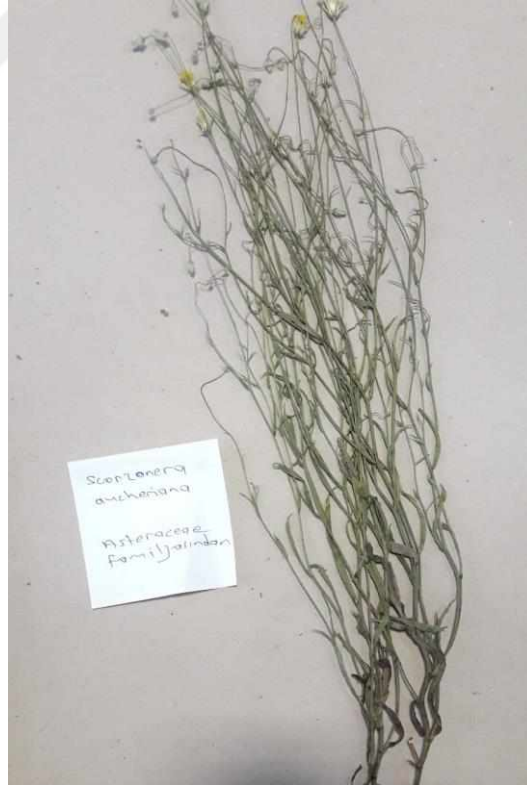
2.2. *Scorzenera aucherina* Türü

Scorzenera aucherina türü ülkemizde yetişen tek yıllık bitki türlerden birisidir. Halk arasında buz tekesakalı olarak bilinmektedir. *Scorzonera aucherana* bitkisi, Sivas ve Erzincan jipslerine özgü endemik bir bitkidir. Bitkinin ülkemiz florasındaki yayılış haritası Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2. 1. *Scorzonera aucheriana* bitkisinin ülkemizde yayılış coğrafyası.

Prof. Dr. Ali Kandemir ve ekibinin Erzincan florasında yaptığı gözlemlere göre; 2020 yılında Kemah ilçesi sınırları içinde bulunan Çay mezrası civarındaki bulunan jipsli yamaçlarda, 2021 yılında Kemah-Erzincan yolu 1. km'sindeki steplerde seyrek bireyler şeklinde yetiştiği rapor edilmiştir (Kandemir vd., 2022). Bitkinin doğal ortamından toplanarak herbaryum için hazırlanan tanık örneğinin resmi Şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2. 2. *Scorzonera aucheriana* bitkisinin görünümü

2.2.1. *Scorzenera aucherina* türü üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar

Bitkinin fitokimyasal içeriği hakkında literatürde iki çalışma mevcuttur. Bunlardan ilki, Sivas ilinden toplanan *Scorzonera aucherena* bitkisinin metanol ekstresinden üç yeni dihidroizokumarin glikozit (izo-skorzopigmakekozit, skorzoaucheriosit I ve skorzoaucheriosit II) ile beş bilinen bileşik (skorzopigmakekozit, skorzokretikozit II, 3,5-O-dikafeoil-epi-kinik asit, 3,5-O-dikafeoilkinik asit ve 3,4-dihidroksifenil kafeat) izole edilmiştir. İzole edilen bileşiklerin antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirilmiş ve dihidroizokumarin türevlerinden izo-skorzopigmakekozit ve Skorzoaucheriosit II bileşiklerinin *Mycobacterium smegmatis*'e karşı güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Erik vd., 2021b).

İkinci çalışma ise; bitkinin ham metanol özütünün hekzan ve etil asetat fraksiyonlarından iki yeni 3-kafeoil-kinik asit türevi, bir yeni taraksasterol oleat ve altı bilinen triterpenoid olan taraksasterol (4), taraksasterol asetat, ptilipoxid, lupeol, lupeol asetat ve β -sitosterol bileşikleri izole edilmiştir (Erik vd., 2021a). Bu çalışmada izole edilen bileşiklere herhangi bir biyolojik aktivite testi uygulanmamıştır.

2.2.2. *Scorzenera aucherina* türü üzerinde yapılan biyolojik aktivite çalışmaları

Literatürde bitki ekstraktlarının biyolojik aktivitesi üzerinde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu açıdan bu çalışmada bitki ekstraktlarının ve bitkinin metanol ekstraktından kromatografik metotlar ile elde edilen bileşiklerin antioksidan ve antiproliferatif aktivitelerinin rapor edilmesi literatüre bitki içeriği biyolojik aktivite profili hakkında yeni bilgiler sunmuştur.

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitkisel materyal

S. aucheriana bitki örnekleri, Kemah-Erzincan yolu üzerindeki alçı taşı içeren bölgelerden toplandı. Örnekler, Prof. Dr. Ali Kandemir tarafından doğrulandı. Örnekler, doğrudan güneş ışığına maruz kalmadan gölgede kurutuldu. Kurutma işleminden sonra bitkiler küçük parçalara kesildi ve laboratuvarımıza depo edildi.

3.1.2. Kullanılan kimyasallar

Antioksidan aktivite testlerinde kullanılan, DPPH, ABTS, $K_2S_2O_8$, $FeCl_2$, Trolox Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından alındı.

Ayırma saflaştırma ve ekstraksiyon işlemlerinde kullanılan hekzan, etil asetat, metanol çözücülerini teknik kalitede Tekkim firmasından (Türkiye) satın alınıp kullanılmadan önce destile edildi. HPLC-grade metanol Honeywell (ABD) firmasından, kolon kromatografisi ve prep-HPLC çalışmalarında kullanılan Sefadeks LH-20; Sigma-Aldrich ve C18 preparatif kolon; EMR Science (Almanya), TLC plakaları Merck (Almanya) firmalarından tedarik edildi.

Hücre kültürü çalışmalarında; insan meme kanseri hücre hattı (MCF-7), kolon kanseri hattı (HT-29) ve hepatokarsinoma hattı (HepG2) kullanılmıştır. Bu hücre hatları, ATCC (American Type Culture Collection, LGC Promochem, UK) firmasından tedarik edilmiştir. Büyüme ortamı olarak Eagle's Minimum Essential Medium 21 (EMEM) ve McCoy's 5A besiyerleri kullanılmıştır. Bu besiyerlerinde kullanılan L-Glutamin ve fetal bovin serumu, %1 penisilin-streptomisin takviyeleri ile yıkama işlemlerinde kullanılan PBS Lonza Bioscience (Amerika) firmasından satın alınmıştır. 5-Fluorourasil Sigma-Aldrich (Almanya), Tripan mavisi boyası ve testlerde kullanılan XTT kiti Biological Industries (İsrail) firmasından tedarik edildi.

3.1.3. Cihazlar

Bruker Avance II 400 MHz NMR spektroskopi cihazı, LC-20AT pompa, LC-20AR UV detektörlü, FRC-20A fraksiyon toplayıcılı Shimadzu Prominence p-HPLC cihazı, Perkin-Elmer Lambda 35 UV spektrofotometri, Epoch-2 Eliza plaka okuyucu, Nüve EC160 CO₂ inkübatörü, Nikon Eclips Tİ-U inverted mikroskop, Haier DW-86L628 -80 °C dondurucu, Bilser BLF 200 Class II biyogüvenlik kabini.

3.2. Yöntem

3.2.1. Antioksidan aktivite tayin metotları

3.2.1.1. DPPH• radikalini giderme aktivitesi tayini

Bitki ekstralarının ve izole edilen bileşiklerin DPPH radikal giderme aktivitesi, Blois (1958) metoduna göre değerlendirildi. Öncelikle, 96 kuyucuklu plakalara 210 µL DPPH radikali eklenmiş ve ardından ekstrakt ve izole edilen bileşiklerin farklı konsantrasyonlarda 15 µL (kontrol için 15 µL metanol) eklenip 30 dakika karanlık ortamda ve oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, 517 nm dalga boyunda absorbanstaki azalış, tüp içinde kalan DPPH• miktarını, yani ekstrenin serbest radikal giderme kapasitesini göstermektedir. Bu çalışmada, askorbik asit ve Trolox standart antioksidan kullanıldı. Elde edilen sonuçlar, IC₅₀ (µg/mL) değerleri olarak ifade edildi.

3.2.1.2. ABTS.+ radikal giderme aktivitesi tayini

Bitki ekstralarının ve izole edilen bileşiklerin ABTS^{•+} radikal giderme kapasiteleri Re ve ekibinin (1999) metoduna göre değerlendirildi. İlk olarak, ABTS^{•+} radikalinin oluşturması için 7 mM ABTS çözeltisi ile 2.45 mM potasyum persülfat (K₂S₂O₈) çözeltisi hazırlanarak eşit oranda karıştırıldı ve oluşan radikal, kullanımdan önce 16 saat boyunca oda sıcaklığında karanlık bir ortamda bekletildi. Daha sonra, 96 kuyucuklu plakalara test numunelerinden 2.5 µL alınıp üzerlerine seyreltilmiş ABTS^{•+} radikali çözeltisinden 250 µL eklenerek karıştırıldı ve 6 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 734 nm dalga boyunda absorbanstaki azalış ölçümleri yapıldı. Elde edilen

sonuçlar, IC₅₀ (µ/mL) değerleri olarak ifade edildi. Bu testte, standart antioksidanlar olarak Troloks kullanıldı.

3.2.1.3. FRAP aktivitesi

Bitki ekstralarının ve izole edilen bileşiklerin metal şelatlama kapasitesi, Dinis ve ekibinin (1994) metoduna göre belirlendi. 96 kuyucuklu plakaların her birine 50 µL ekstre/EDTA eklenerek başlandı. Üzerlerine 185 µL saf su ve 5 µL 2 mM FeCl₂ eklenerek karışım, 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 10 µL 5 mM K₃FeCN₆ eklendikten sonra 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyonun ardından 562 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapıldı. Sonuçlar Troloks' un farklı değişimleri (0.1-100 µg/mL) ile çizilen konsantrasyon-cevap eğrisinin eğimi kullanılarak mg Troloks Eşdeğeri aktivite (TE)/g ekstrakt veya saf madde olarak ifade edildi

3.2.2. Hücre kültürü

3.2.2.1. Hücre kültürü koşulları

Hücre kültürü, hücrelerin laboratuvar koşullarında kontrollü olarak çoğaltılmasıdır. Bu yöntemle hücrelerin daha hızlı bir şekilde yetiştirilmesi ve çoğalması sağlanmakta ve birçok moleküler ve biyokimyasal çalışmanın da çoğaltılan bu hücreler üzerinde uygulanması sağlanmaktadır.

3.2.2.2. Hücrelerin çözündürülmesi

Sıvı azottan alınan kriyo tüpler, 37 °C'lik su banyosunda çözülerek T75 hücre kültürü flasklarına aktarıldı. Üzerlerine büyüme ortamını sağlamak için 7-8 mL taze besi yeri ekledikten sonra, CO₂ inkübatöründe (37°C) inkübasyona bırakıldılar.

3.2.2.3. Hücrelerin pasajlanması

Hücrelerin %80'ine ulaşılan belirli bir konfluensta, içerdikleri besi ortamı uzaklaştırıldıktan sonra 4-5 mL PBS tamponuyla yıkandı. Daha sonra, flask içinde tabana yapışmış olan büyüyen hücreleri çıkarmak için 3-4 mL tripsin/EDTA eklenip, 5-10 dakika boyunca CO₂ inkübatöründe inkübasyona bırakıldı. Tripsin etkisini gidermek için

inkübasyon süresi sonunda 8 mL taze besiyeri eklenerek işlem tamamlandı. 800 x g'de 5 dakika santrifüj edilen hücre süspansiyonundan üstteki sıvı kısmı uzaklaştırıldı ve pelet üzerine 10 mL taze besiyeri eklenip, 4 adet yeni T75 flaska dağıtıldı. Pasajlanan bu hücre kültürleri 37 °C'de, %95 nem içeren %5 CO₂ inkübatöründe inkübasyona alındı.

3.2.2.4. Hücrelerin dondurulması

Hücreler belirli bir doluluğa (%80) ulaştıklarında, deney aşamalarında kullanılmak üzere dondurma işlemine tabi tutuldu. Bu amaçla, CO₂ inkübatöründen alınan flasklardaki besiyeri uzaklaştırıldı ve 4-5 mL PBS tamponuyla yıkandı. Flask içinde tabana yapışmış olan büyümekte olan hücrelerin tabandan kalkması için üzerlerine hücre tipine bağlı olarak 2-3 mL tripsin/EDTA solüsyonu eklendi ve 5-10 dakika boyunca CO₂ inkübatöründe inkübasyona alındı. Inkübasyon süresi tamamlandığında, tripsin etkisini durdurmak için flaska 8-10 mL taze besi yeri ortamı eklendi. Ardından, hücre süspansiyonu 15 mL'lik falkon tüplerine aktarıldı ve 37 °C'de, 800 × g hızında 5 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra, pelet tam bir büyüme ortamında (3 mL, %10 DMSO içeren dondurma ortamı) yeniden süspanse hale getirildi ve 1.5 mL'lik kriyotüplere aktarıldı. Hemen -80 °C dondurucuya konuldu. Bir gün sonra, kriyotüpler sıvı azot buharında bekletilerek -196 °C'de bulunan sıvı azot tankına aktarıldı.

3.2.2.5. Hücre sayımı

Canlı ve cansız hücreleri ayırt etmek ve hücre sayısını belirlemek için kullanılan tripan mavisi boya dışlama tekniğinde, cansız hücreler boyayı içine aldığından mavi renkte görünürken canlı hücreler bu boyayı dışladığından parlak renkli görünürler. Sayımı yapılacak hücre süspansiyonundan küçük bir miktar alınıp, 2 mL'lik ependorf tüpe aktarıldı ve tripan boyası ile belirli bir yoğunluktaki oranda karıştırıldı. Sonrasında, hemositometrenin her iki odacığına da 10 µL aktararak, inverted mikroskop altında hücre sayımı yapıldı. Hücre konsantrasyonu aşağıdaki formül kullanılarak belirlendi.

$$\text{Hücre sayısı} / \text{mL} = \text{Odacıklardaki ortalama hücre sayısı} \times \text{DF} \times 104$$

DF : Seyreltme faktörü.

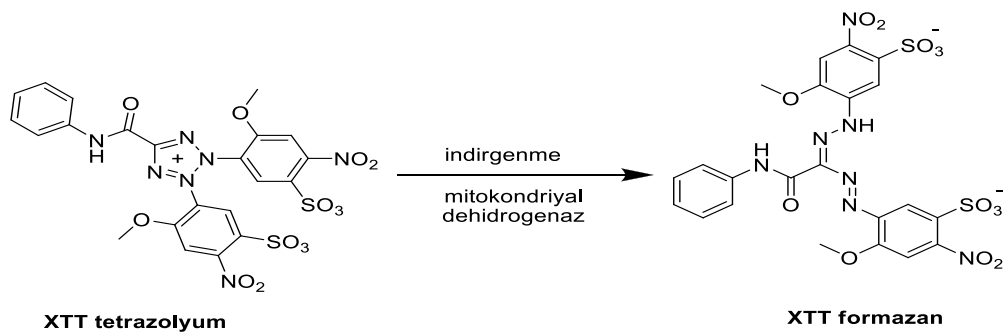
104 : Toma lamındaki odacık boyutlarından kaynaklanan faktör. (Hemositometredeki her odanın boyutları 1 cm uzunluğunda, 1 cm eninde ve 0,1 cm yüksekliktedir. Hacim 0,1 cm³ veya 1 mm³ tür.)

3.2.2.6. Test Örneklerin hazırlanması

Tez kapsamında bitki ekstraktlarının 1 mg/mL lik stok çözeltileri ve bitkiden izole edilen sekonder metabolitlerin (1-5) ile standart kemoteröpatik ilaçların (karboplatin ve dosetaksel) 1 mM'lık ana stok çözeltileri (% 0.2'lik DMSO içeren) besiyeri ortamında hazırlandı. Daha sonra bu stoklardan örneklerin farklı derişimlerde çözeltileri hazırlandı ve tatbik edilecek hücrelere ilave edilmek üzere hazır hale getirildi.

3.2.2.7. Hücre canlılığının ölçülmesi

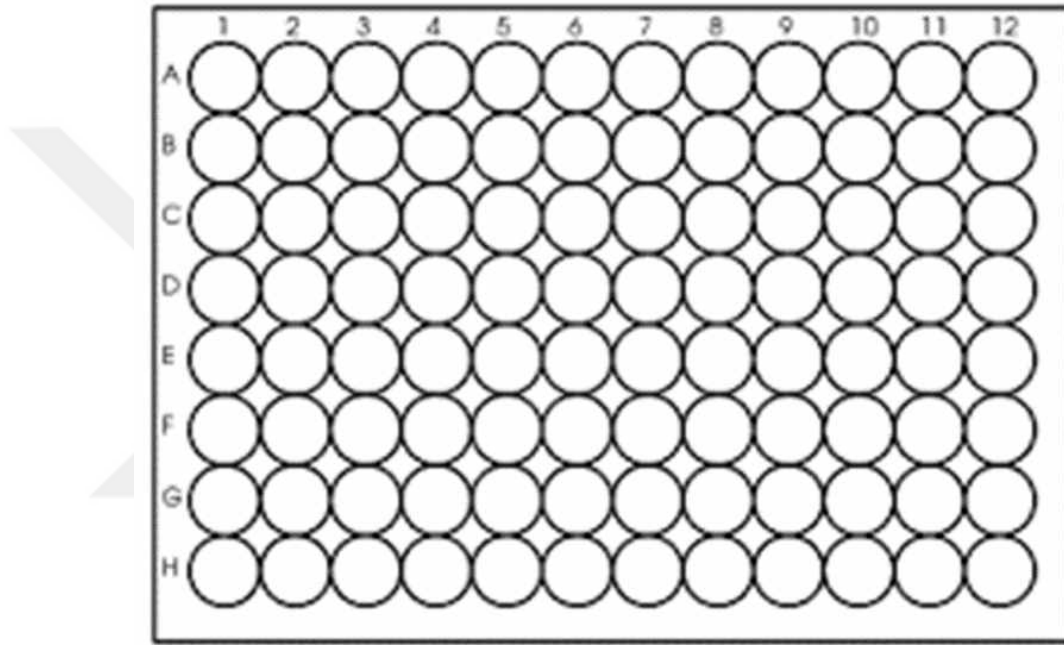
S. aucheriana bitkisinden elde edilen ekstrelerin antiproliferatif aktiviteleri HT29, LnCap ve Hela hücreleri üzerinde, bitki ekstreden izole edilen sekonder metabolitlerin ve standart kemoterapötik ilaçların antiproliferatif aktiviteleri ise MCF-7 ve A549 kanser hücre hatları üzerinde XTT metodu ile üretici firmanın talimatlarına göre gerçekleştirildi (XTT Kiti, BI). Bu yöntemde metabolik olarak aktif olan hücrelerde mitokondriyal enzim aktivitesiyle suda çözünmeyen XTT tetrazolyum tuzu suda çözünebilen turuncu renkli formazan bileşiğine indirgenmektedir. Oluşan bu ürün 450-490 nm'de Eliza okuyucuda kolaylıkla belirlenmektedir.



Şekil 3. 1. XTT tetrazolyumun fenazin meto sülfat varlığında mitokondriyal dehidrogenaz ile XTT formazan'a indirgenmesi

Ekimi yapılacak olan hücrelerden 200'er µL (100.000 hücre/mL) 96 kuyucuklu plakalara eklenip 24 saat inkübasyon süreci için bırakıldı. İnkübasyon süreci tamamlandıktan sonra

kuyucuklardaki besi yeri ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra 50 µL PBS tamponuyla kuyucuklar yıkanıp bu tampon tekrar uzaklaştırıldı. Bu hücrelerin üzerine 50'şer µL taze besi yeri ilave edildi. Üzerlerine test örneklerinden 50'şer µL olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda (0-250 µM) ekleme yapıldı. Kontrol kuyucuklarına da 100 µL %0,2 DMSO içeren tam besi yeri ilave edildi. Daha sonra plakalar 24 saat inkübasyon süreci için tekrar 37°C'de %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatör içersine bırakıldı. Bu süreçten sonra plakalar Elisa okuyucuda 450 nm'de kolorimetrik olarak okundu.



Şekil 3. 2. Test örneklerini 96 kuyucuklu plakanın gösterimi

Test örneklerinin 96 kuyucuklu plakalara tatbiki şu şekilde gerçekleştirilmiştir. 96 kuyucuklu plakada A1-A12, A1-H1, H1-H12 ve A12-H12 kuyucukları boştur. B2-B11 ve C2-C11 aralığındaki kuyucuklar hücrelidir ve D2-D11, G2-G11 aralığındaki kuyucuklar hücreli ortamdır. B2-C2 kuyucuklarda kontrol hücreleri içermekte ve kuyucuklara 100 µL, %0,2'lik DMSO içeren besi yeri ilave edildi. B3-B11 aralığındaki kuyucuklara ise 100 µL örneklerinin farklı konsantrasyonları mevcuttur.

3.3. Ekstraksiyon

Bitki örneği (400 g) metanol (2.5 L) ile 12 saatlik periyotlarda maserasyona tabi tutuldu. Her periyodun sonunda metanol filtre kâğıdı ile süzüldü ve bitki örneklerine metanol

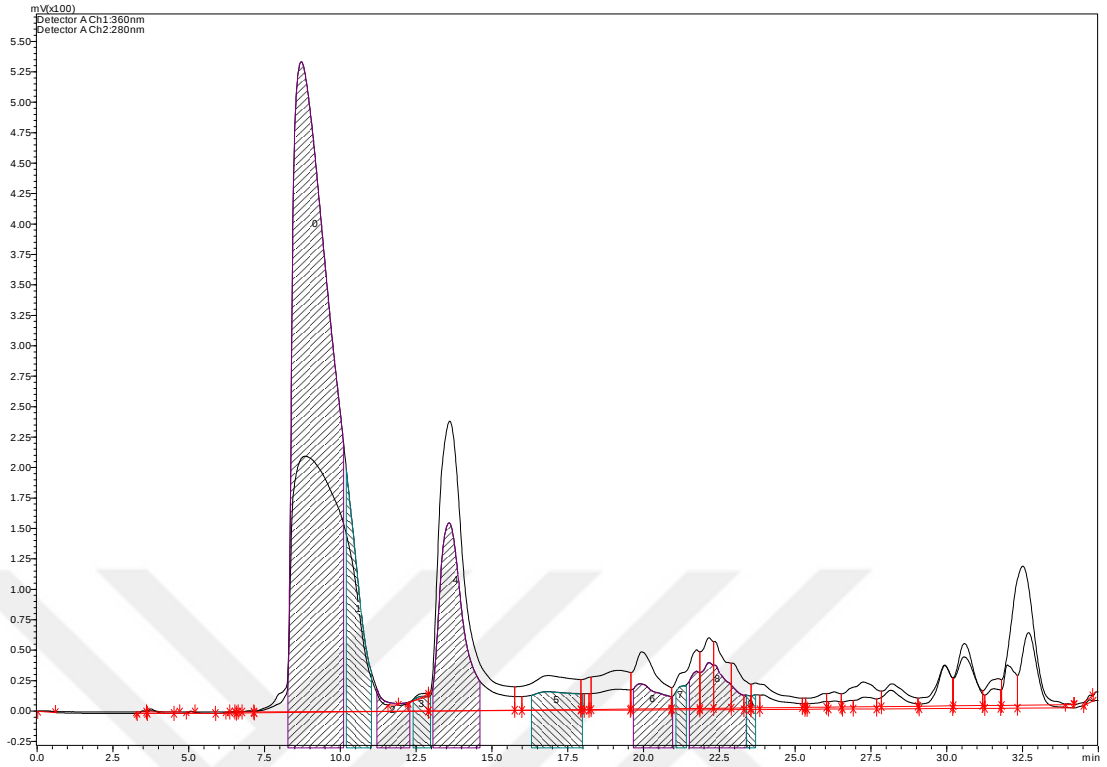
eklendi. Maserasyona işlemi 3 defa tekrar edildi. Çözücüler birleştirilerek düşük basınçta evaporatör ile 40 °C’de uzaklaştırıldı. Ekstraksiyon işleminde koyu yeşil renkli, yarı akışkan sıvı olarak 32.1 g ham ekstrakt elde edildi. Ekstraksiyon verimi %8.02 olarak hesaplandı. Ham metanol ekstraktı %50’lik metanol (500 mL) ile çözüldükten sonra +4 °C’de gece boyu bekletildi. Çözelti filtre kâğıdı ile süzülerek çözünmeyen kısımlar uzaklaştırıldı. Çözücü evaporatörde uzaklaştırılarak koyu sarı renkli katı ekstrakt elde edildi (22.3 g).

3.4. Ayırma ve Saflaştırma

Bitki sekonder metabolitlerinin saflaştırılması için ekstrakt (5 g) metanolde çözülerek önceden metanol ile şartlandırılmış sefadeks LH-20 üzerinden fraksiyonlandırıldı. Hareketli faz olarak metanol kullanıldı her biri 20 mL olacak şekilde 54 fraksiyon toplandı. İTK analizine göre benzer maddeleri içeren fraksiyonlar 1-15 (A), 16-21 (B), 22-30 (C), 31-44 (D) ve 49-54 (E) şeklinde birleştirilerek beş alt fraksiyon elde edildi (A-E).

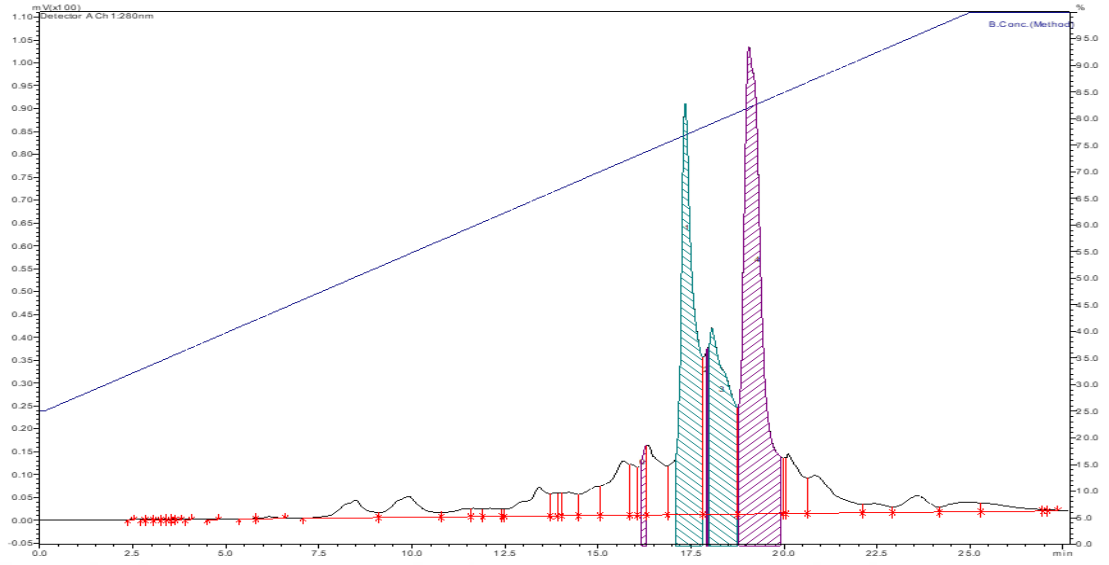
A (fr. 1-15) karbonhidratları içerdiğinden ayırma saflaştırma işlemine tabi tutulmadı.

B (16-21): Alt fraksiyon B’nin içerdiği maddelerin saflaştırılması prep-HPLC ile yapıldı. Analizde 50x300 mm boyutlarında 5 µm partikül büyüklüğüne sahip yarı preparatif HPLC kolonu kullanıldı. Analiz hareketli faz olarak 10 mL/dakika akış hızı ile 70:30 su:metanol karışımı izokratik olarak kullanıldı. RT 7.90-10.40 dakika aralığında kolondan elüe olan ve 280 ve 330 nm’de gözlenen sinyaller toplandı. Çözücüler uçurulduğunda kahverengi amorf yapıda katı elde edildi. Kromatogram Şekil 3.2’de verilmiştir. Madde metanolde çözülerek sefadeks LH-20 üzerinden tekrar saflaştırma işlemine tabi tutuldu. Buradan molekül **1** (32 mg) saf olarak elde edildi.



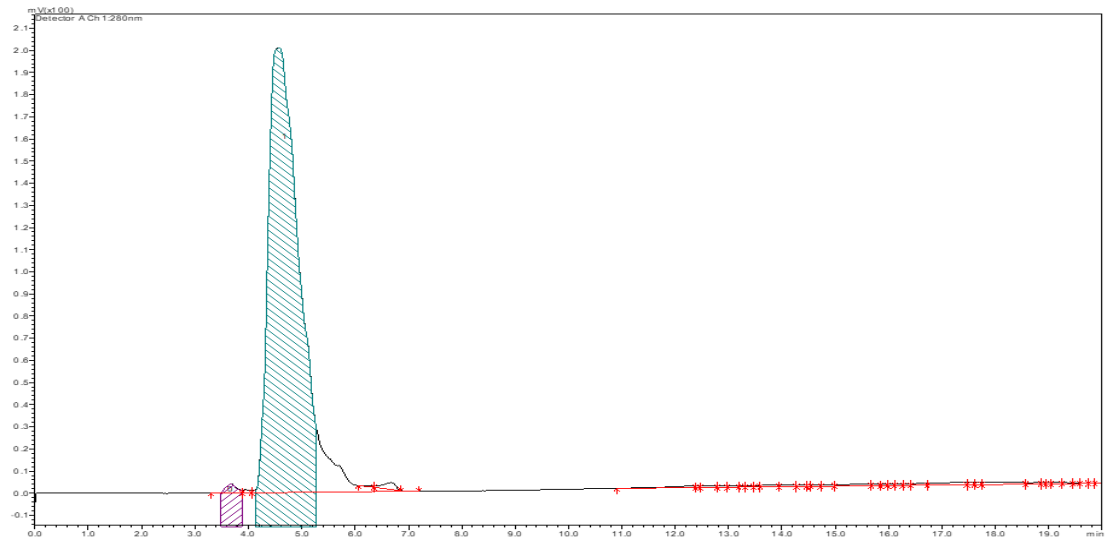
Şekil 3. 3. B alt fraksiyonu prep-HPLC kromatogramı

C (22-30): aralığı preparatif HPLC işlemi ile tekrar ayırma ve saflaştırma işlemine tabi tutuldu. 94 mg olarak elde edilen C alt fraksiyonu 1 ml su ile çözülerek her seferinde 100 µL olacak şekilde on enjeksiyonda aşağıdaki şartlarda ayrıldı. Mobil fazlar 8 mL/dakika akış hızı ile su (A) ve metanol (B). Pompa programı şu şekilde ayarlandı: 25 dakika 70 (A):30 (B)→0 (A):100 (B), 5 dakika 0 (A):100 (B). Deteksiyon dalga boyu 280 nm’de gözlenen sinyallere göre yapıldı. Kromatogramda 16.21-17.46 dakika ve 18.11-19.80 dakika aralığında gelen sinyaller fraksiyon kolektörü ile otomatik olarak toplandı. Her enjeksiyon sonunda aynı dakikalarda gelen fraksiyonlar birleştirildi ve çözücüler evapore edildi. RT 16.21-17.46 arasından molekül 2 (18 mg), RT 18.11-19.80 arasından ise molekül 3 (22 mg) saflaştırıldı. Çalışmada elde edilen kromatogram Şekil 3.3’te verilmiştir.



Şekil 3. 4. C alt fraksiyonu prep-HPLC kromatogramı

D (31-44): fraksiyon aralığı preparatif HPLC ile C18 kolon üzerinden su (A): metanol (B) hareketli fazı kullanılarak saflaştırıldı. Ayırma 330 nm’de izlendi. Analizde kullanılan hareketli faz programı şu şekildedir: 100 (A):0 (B)→70 (A):30 (B) 10 dakika 70 (A):30 (B)→0 (A):100 (B) 5 dakika ve 0 (A):100 (B) 5 dakika. İlgili kromatogram Şekil 3.4’te verilmiştir. 53 mg D alt fraksiyonu 300 µL su: DMSO (70:30, v:v) çözülerek her enjeksiyonda 100 µL olacak şekilde üç tekrarlı enjeksiyon yapıldı.

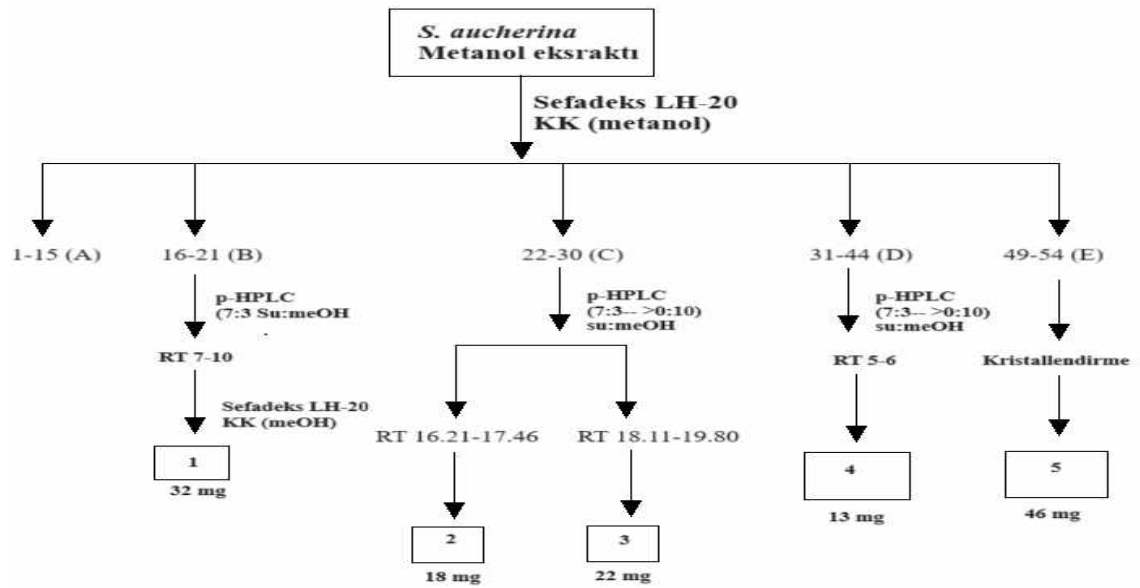


Şekil 3. 5. D alt fraksiyonu prep-HPLC kromatogramı

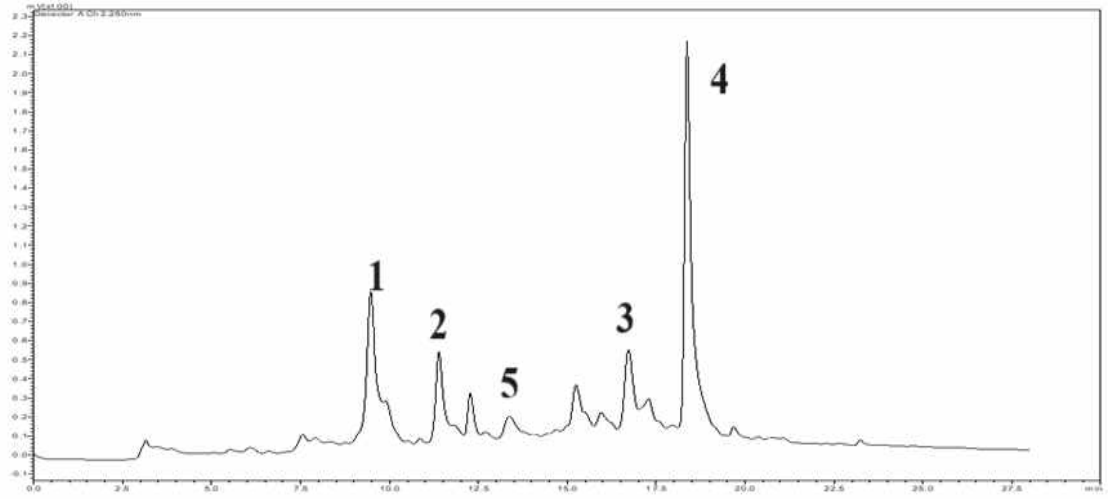
Şekil 3.4'teki kromatogramda gözlenen 5-6 dakikada gelen sinyal fraksiyon kolektörü yardımıyla toplandı. Her enjeksiyonda toplanan fraksiyonlar birleştirilerek çözücülerini uzaklaştırıldı. Kirli beyaz renkli katı halinde molekül 4 (13 mg) elde edildi.

E (49-54): alt fraksiyonu metanolde çözülerek oda sıcaklığında beklemeye alındığında balon çeperinde iğne şeklinde kristaller gözlemlendi. Kristal oluşumu tamamlandıktan sonra sıvı kısım dekante edilerek uzaklaştırıldı. Kristaller soğuk metanol ile yıkandı. İTK analizinde saf olduğu gözlenen E alt fraksiyonu molekül 5'i (45 mg) verdi.

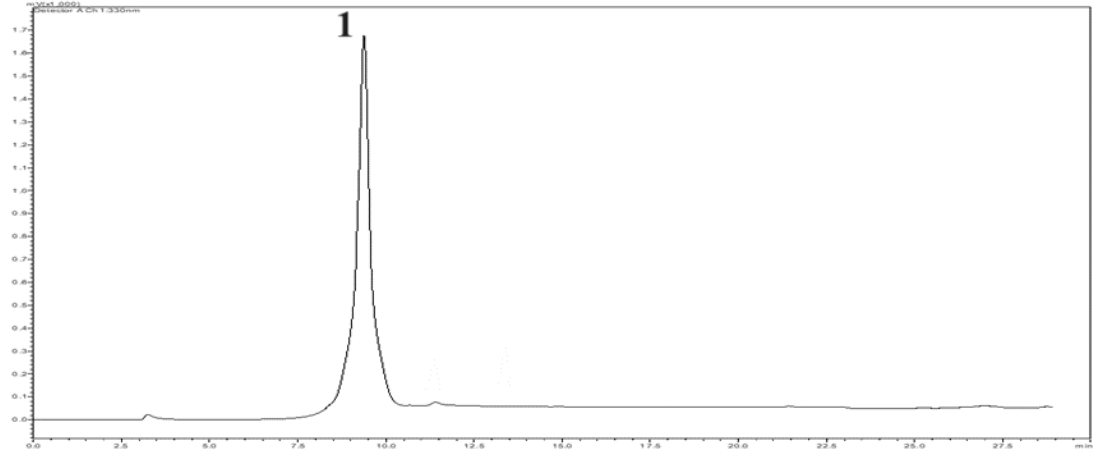
Yapılan izolasyon çalışmalarında bitkinin metanol ekstraktı sefadeks LH-20 üzerinden fraksiyonlandırıldı. Buradan elde edilen alt fraksiyonlar prep-HPLC ile ayırma ve saflaştırma işlemlerine tabi tutuldu. Ayırma işleminin sonucunda bitkiden beş farklı molekül elde edildi. İzolasyon şeması Şekil 3.5'te verilmiştir. İzole edilen moleküllerin saflık kontrolleri analitik HPLC ile yapıldı. Analizde 4.6x150 mm ebatlarında 5 µm partikül büyüklüğüne sahip C18 kolon kullanıldı. Analizde hareketli faz olarak su (A) ve metanol (B) mobil fazları 1 mL/dakika akış hızı ile, 3 dakika 70 (A):30 (B), 15 dakika 70 (A):30 (B) → 50 (A):50 (B), 10 dakika 50 (A):50 (B) → 0 (A):100 (B) mobil faz programı kullanıldı. Elüe olan maddeler 280 ve 330 nm'de izlendi. Şekil 3.4'te ham metanol ekstresi ve izole edilen moleküllerin HPLC kromatogramları (Şekil 3.6-Şekil 3.11) verilmiştir.



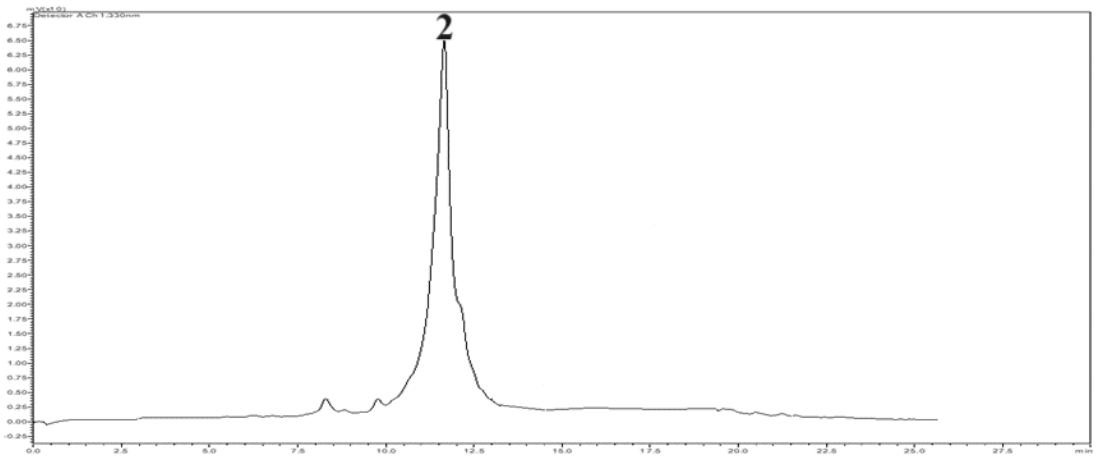
Şekil 3. 6. *S. aucherina* bitkisinden sekonder metabolitlerin izolasyon şeması



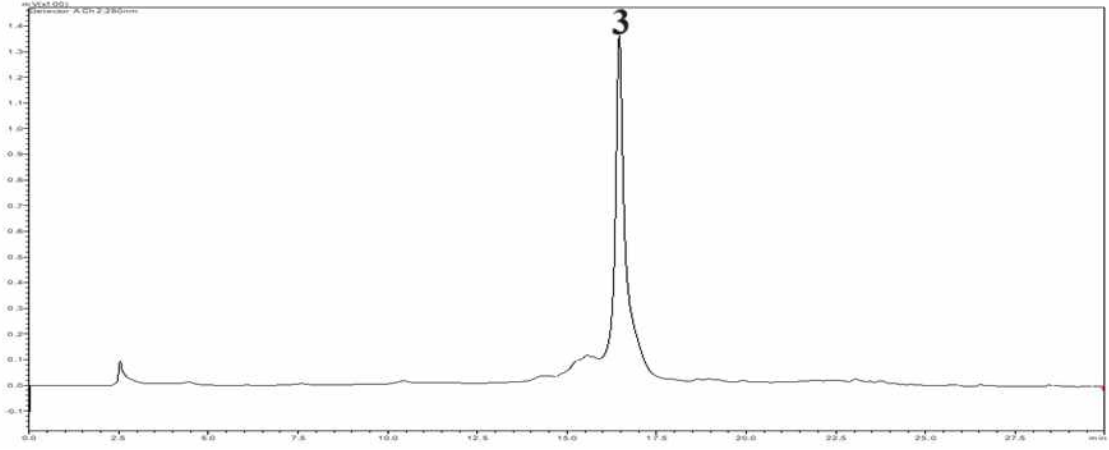
Şekil 3. 7. *S. aucherena* bitkisi ham metanol ekstraktı HPLC kromatogramı (280 nm)



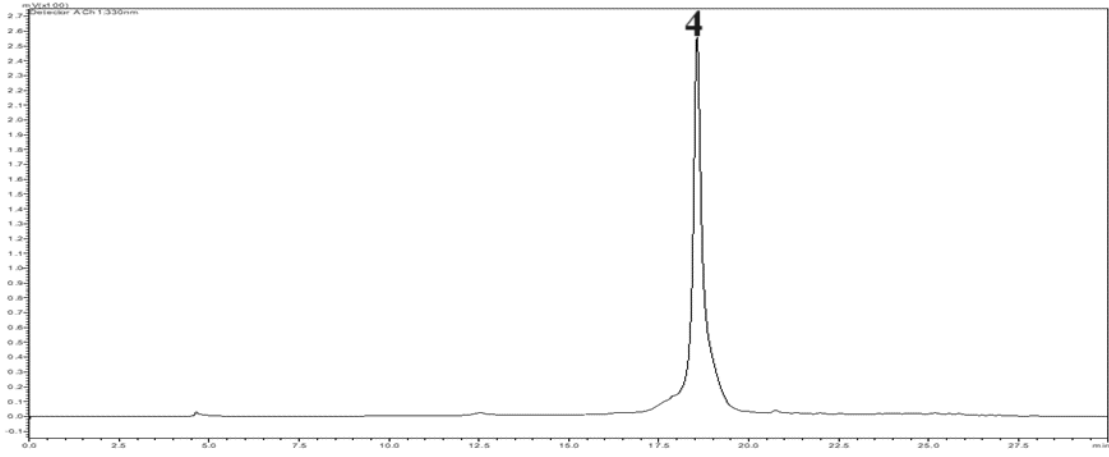
Şekil 3. 8. Molekül 1'in HPLC kromatogramı (330 nm)



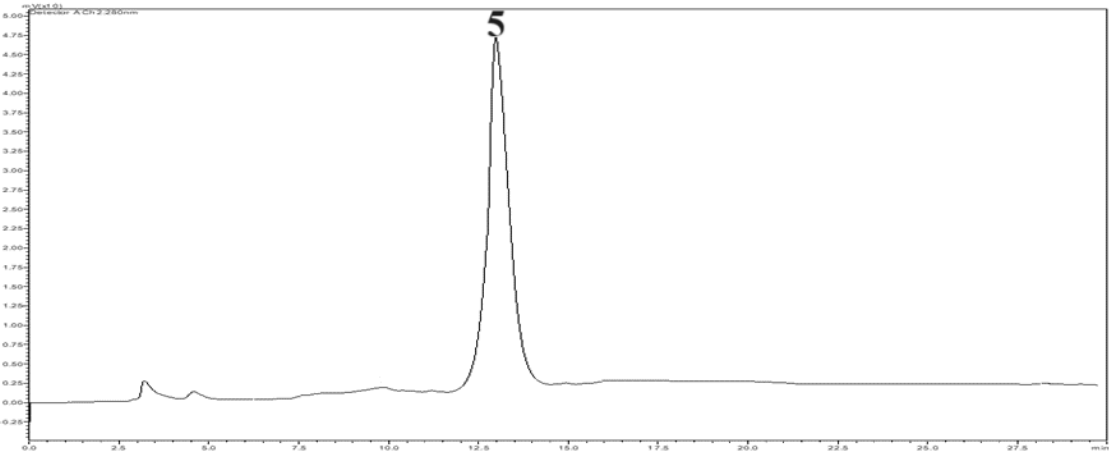
Şekil 3. 9. Molekül 2'nin HPLC kromatogramı (330 nm)



Şekil 3. 10. Molekül 3'ün HPLC kromatogramı (280 nm)



Şekil 3. 11. Molekül 4'ün HPLC kromatogramı (280 nm)



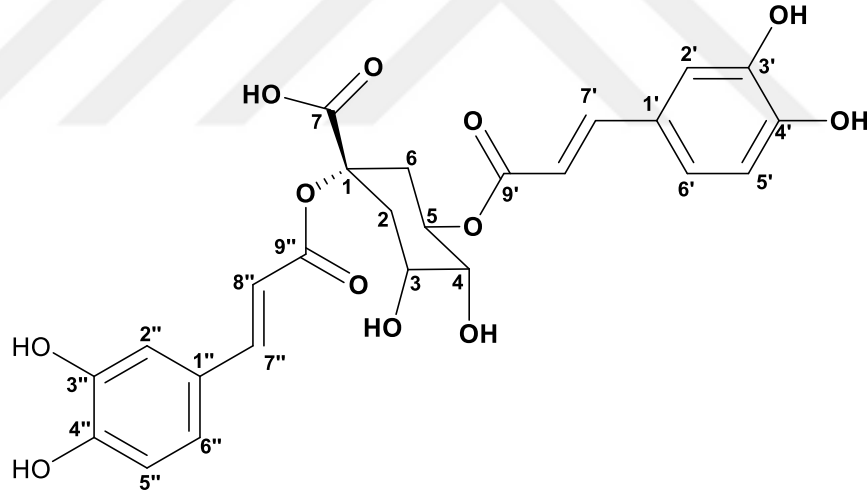
Şekil 3. 12. Molekül 5'in HPLC kromatogramı (280 nm)

4. BULGULAR

4.1. *Scorzonera aucheriana* Bitkisinden İzole Edilen Moleküllerin Yapı Tayini

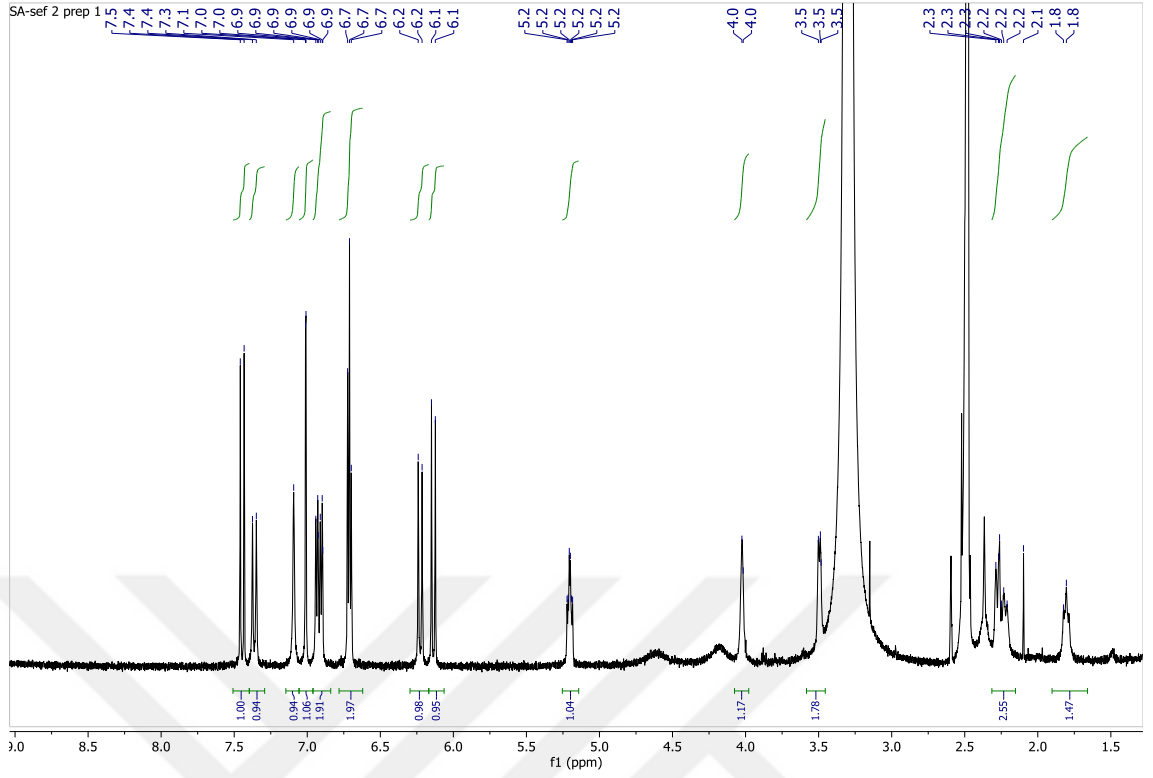
4.1.1. Molekül 1'in yapı tayini

Bileşiğe ait ^{13}C NMR spektrumu incelendiğinde δ_{C} 174.3 ppm'de bir karbonil karbonu, üç oksijenli karbon (δ_{C} 69.1, 71.0 ve 72.6 ppm), bir kuarterner karbon (δ_{C} 82.5) ve iki metilen karbonu (δ_{C} 35.4 ve 37.9) bir künik asit biriminin varlığı gösterdi. Bileşiğin ^1H NMR (Şekil 4.68) spektrumuna göre; δ_{H} 7.02 (s), 6.70 (d, $J=7.9$ Hz), 6.90 (dd, $J=7.9/2.0$ Hz) ve δ_{H} 7.09 (s), 6.72 (d, $J=8.28$ Hz), 6.92 (dd, $J=8.28/1.8$ Hz) iki farklı ABX sisteminin yanında δ_{H} 7.39 ppm (d, $J=15.6$ Hz) ve δ_{H} 6.15 (d, $J=15.6$ Hz) ve δ_{H} 7.39 (d, $J=15.6$ Hz), 6.15 (d, $J=15.6$ Hz) şeklinde rezonans olan iki farklı trans-olefinik protonun bulunması molekülde iki adet kafeoyil grubunun varlığını gösterdi. İki farklı kafeoyil grubunun ^1H -NMR verileri COSY ve HSQC etkileşimleri değerlendirilerek ortaya konulmuştur.

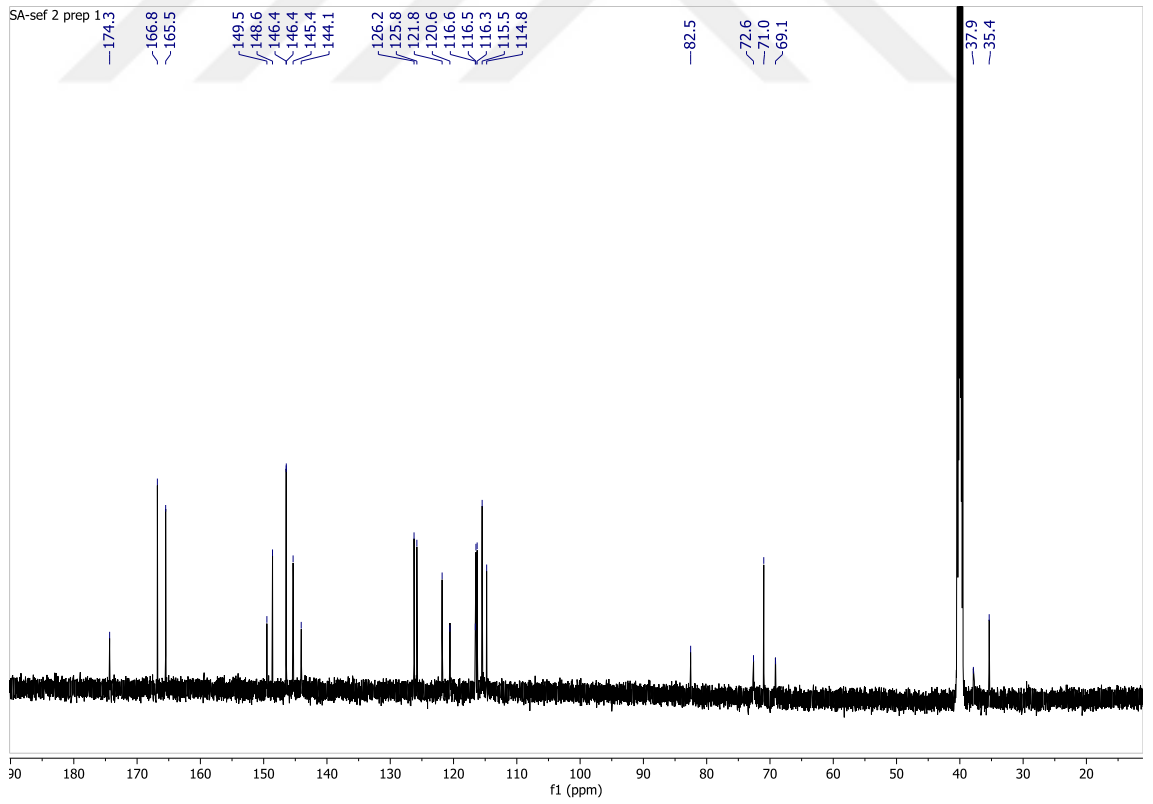


Şekil 4. 1. Molekül 1'in kimyasal yapısı

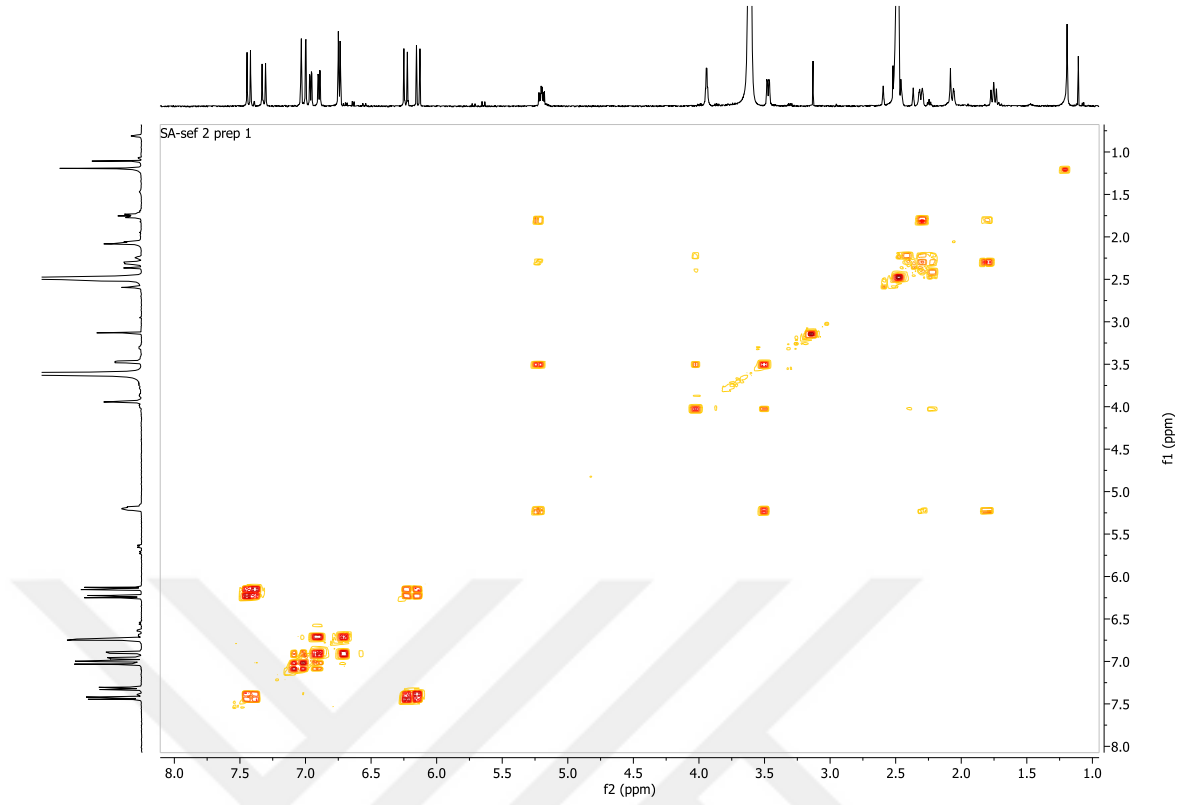
^{13}C -NMR spektrumunda gözlenen kafeoyil gruplarına ait iki karbonil karbonundan δ_{C} 166.8 ppm'de gözlenen sinyalle hiçbir künik asit protonu ile korale olmaması ve δ_{C} 165.5 sinyali ile δ_{H} 5.22 (H-5) sinyalinin HMBC korelasyonu kafeoyil-künik asit bağlantı noktalarının 1,5 şeklinde olduğunu gösterdi. Bileşiğe ait NMR verileri çizelge 4.1'de verilmiştir veriler literatür ile uyum içindedir (Tüfekçi vd., 2024). Elde edilen NMR ve literatüre göre molekül 1'in 1,3-dikafeyoil künik asit olduğu belirlenmiştir.



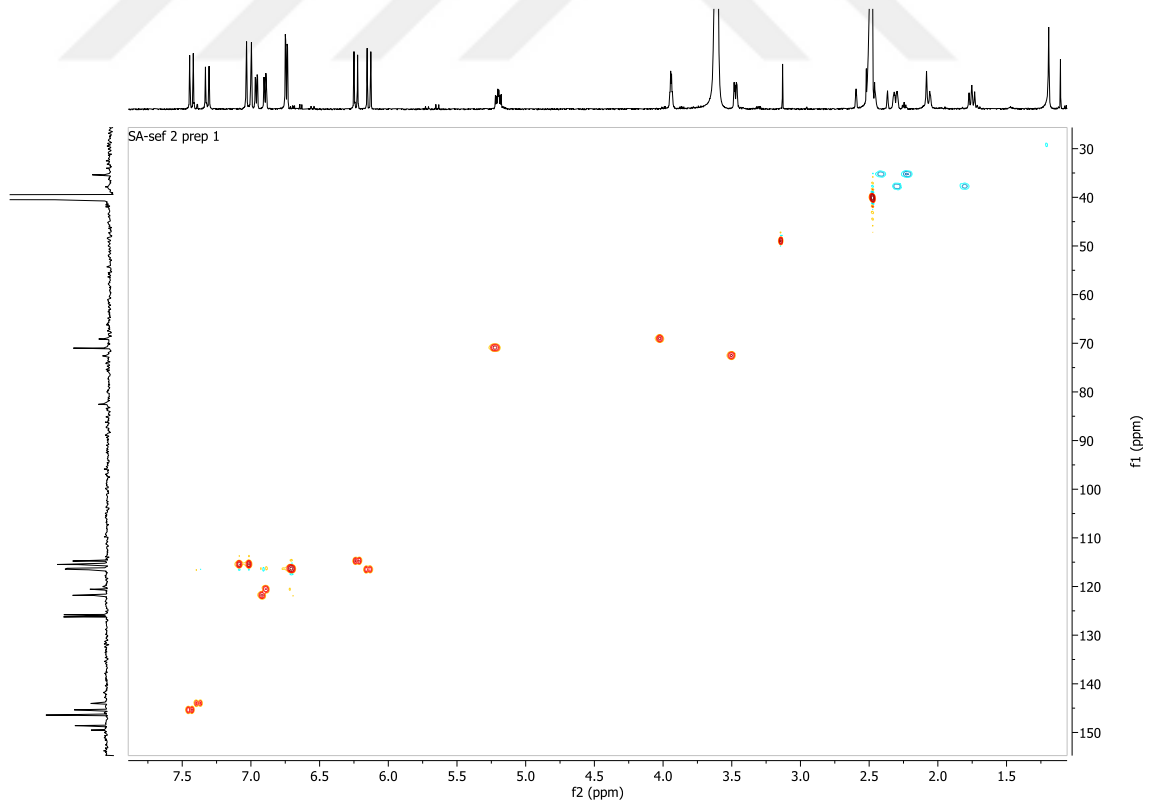
Şekil 4. 2. Molekül 1'in (1,3-dikafeoyil künik asit) ^1H -NMR spektrumu



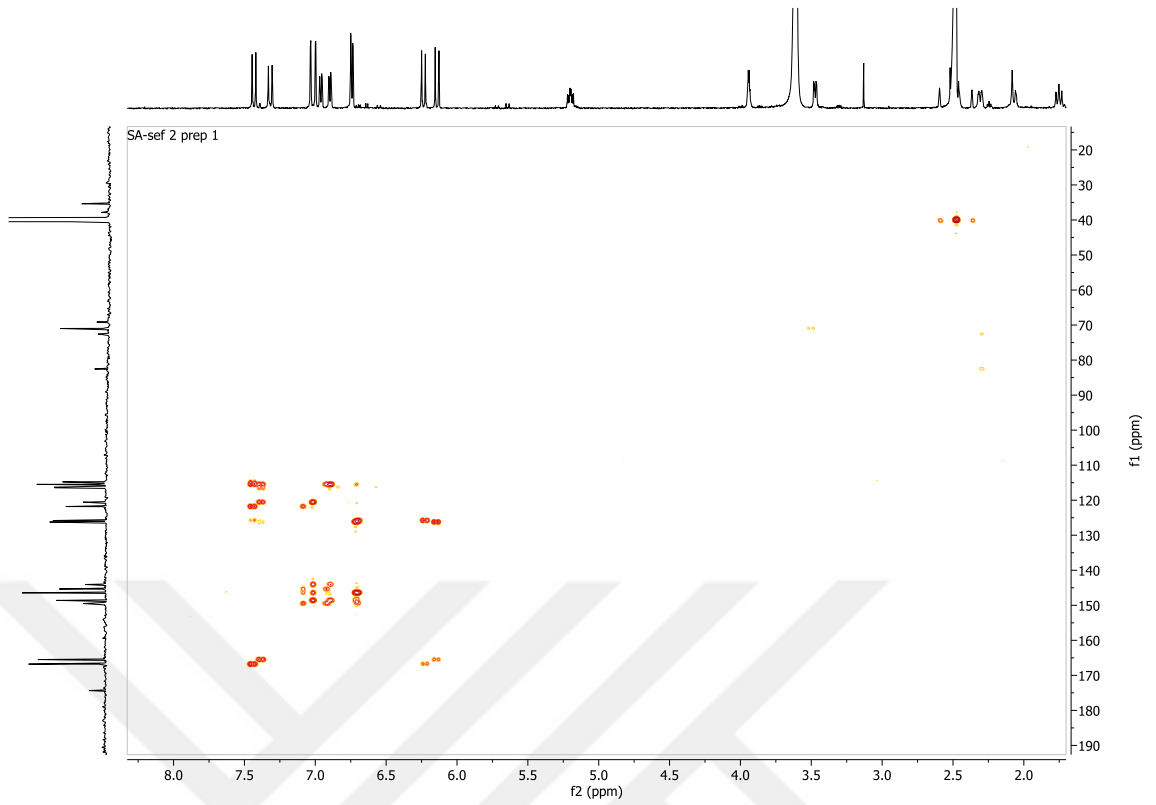
Şekil 4. 3. Molekül 1'in (1,3-dikafeoyil künik asit) ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 4. 4. Molekül 1'in (1,3-dikafeoyil küinik asit) COSY spektrumu (MeOD-d3)



Şekil 4. 5. Molekül 1'in (1,3-dikafeoyil küinik asit) COSY spektrumu



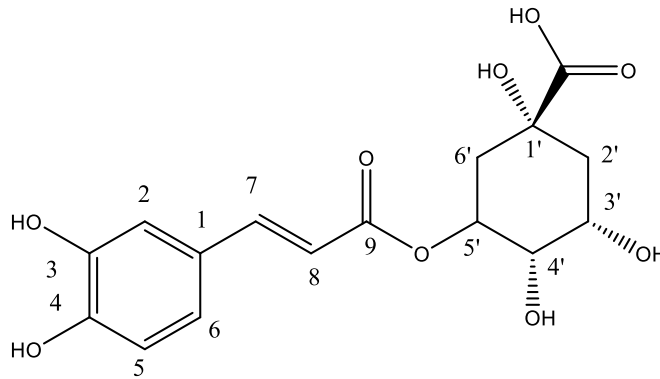
Şekil 4. 6. Molekül 1'in (1,3-dikafeoyil künik asit) HMBC spektrumu

Tablo 4. 1. Molekül 1'in (1,3-dikafeoyil künik asit) NMR verileri (600 MHz, MeOD-d3)

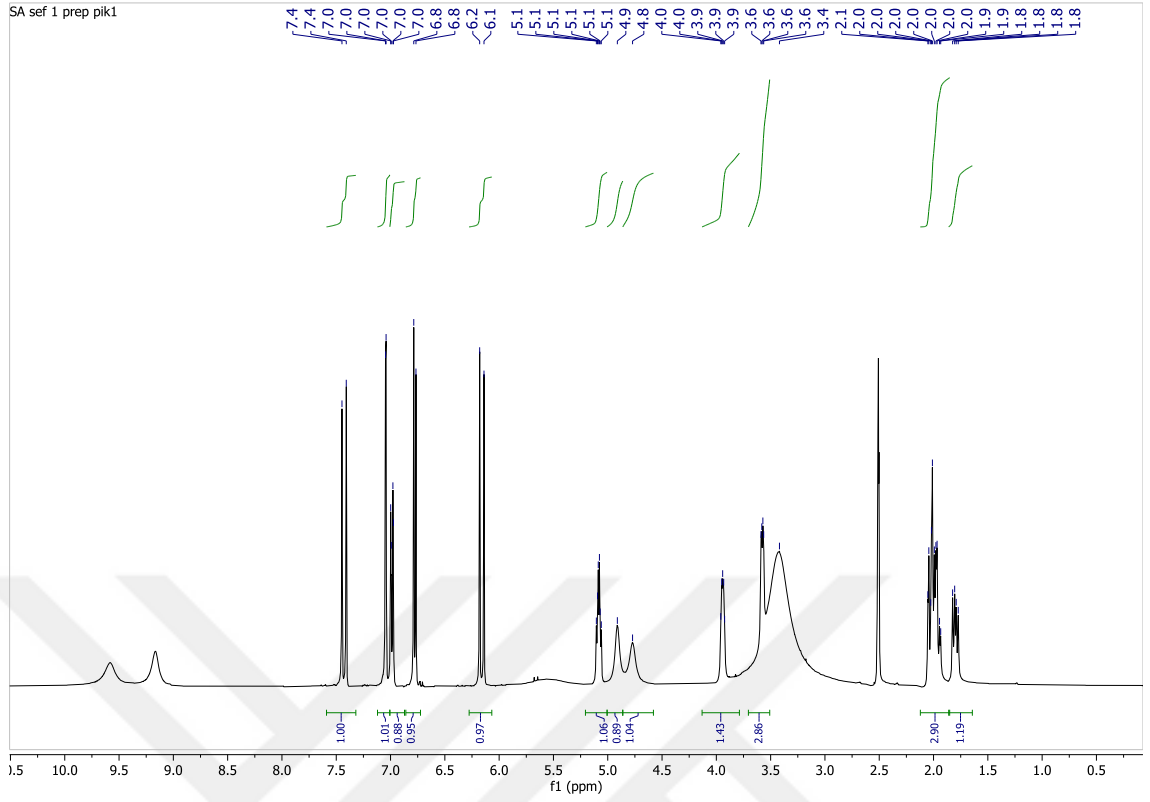
Konum	¹ H (ppm)	¹³ C	HMBC
1	-	82.5	
2	2.25-2.17 (m, 1H) 2.37-2.36 (m, 1H)	35.4	C3, C1
3	4.05-4.01 (m, 1H)	69.1	C4, C2
4	3.52-3.47 (m, 1H)	72.6	C3, C5
5	5.20 (td, <i>J</i> =9.1, 4.3 Hz, 1H)	71.0	C4, C3, C9'
6	1.90-1.69 (m, 1H) 2.41-2.31 (m, 1H)	37.8	C5
7	-	174.3	
1'	-	126.2	
2'	7.01 (d, <i>J</i> =2.1 Hz, 1H)	115.5	
3'	-	146.4	
4'	-	148.6	
5'	6.70 (d, <i>J</i> =7.3 Hz, 1H)	116.4	
6'	6.90 (dd, <i>J</i> =7.3, 2.1 Hz)	120.6	
7'	7.36 (d, <i>J</i> =15.9 Hz, 1H)	144.1	
8'	6.14 (d, <i>J</i> =15.9 Hz, 1H)	116.5	
9'	-	165.5	
1''	-	125.8	
2''	7.09 (brs, 1H)	115.5	
3''	-	146.4	
4''	-	149.6	
5''	6.72 (d, <i>J</i> =7.9 Hz, 1H)	116.3	
6''	6.90 (dd, <i>J</i> =7.9, 1.8 Hz, 1H)	121.8	
7''	7.45 (d, <i>J</i> =15.8 Hz, 1H)	145.3	
8''	6.23 (d, <i>J</i> =15.9 Hz, 1H)	114.8	
9''	-	166.8	

4.1.2. Molekül 2'nin yapı tayini

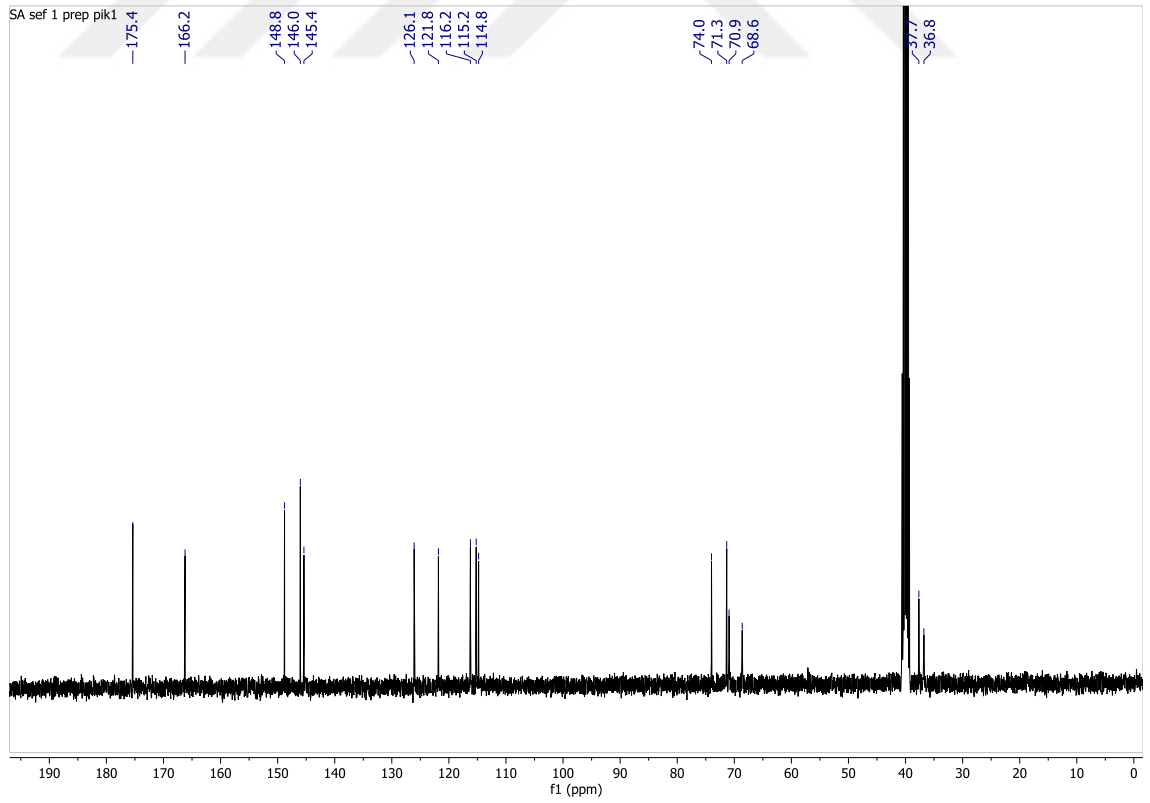
Molekül 2 beyaz renkli amorf katı olarak elde edildi. Yapı tayini amacıyla molekül DMSO-d₆ ile çözülerek NMR spektrumları kaydedildi. Spektrumlar Şekil 4.8-4.14'te verilmiştir. ¹H-NMR spektrumu incelendiğinde, δ_H 6.13 ve 7.40 ppm'de gözlenen 15.8 Hz'lik etkileşimle dublet olarak gözlenen iki sinyal molekülde bulunan trans- α,β sistemini, 7.01, 6.96, 6.74 ppm'de gözlenen sırasıyla dubletin dubleti ($J=8.2/2.0$), dublet ($J=8,2$ Hz) ve dublet ($J=2.0$ Hz) şeklinde gözlenen ve COSY spektrumunda (Şekil 4.11) birbirileri ile etkileşim içinde olan üç sinyal, moleküldeki ABX sistemini gösterdiğinden molekülün 3,4-disübstitüe benzen halkası ve trans olefinik grupları içeren bir *trans*-kafeoyil grubunun varlığını gösterdi. Bileşiğe ait ¹³C-NMR spektrumunda (Şekil 4.9) 16 karbon sinyali gözlenmiştir. Bunlardan altısı kuarterner karbon, yedisi metin ve ikisi ise metilen karbonudur. Gözlenen iki metilen sinyali (δ_C 36.8 ve 37.7 ppm) δ_C 175.4 ppm karbonil sinyali ve alifatik bölgede gözlenen 3 metin sinyali ve bunların HETCOR spektrumundaki (Şekil 4.10) etkileşimleri, molekülde bir küinik asit grubunun bulunduğunu göstermiştir. HMBC spektrumunda ise δ_H 5.03 $\rightarrow$ δ_C 165.2 sinyallerinin etkileşimi küinik asidin *trans*-kafeoyil grubuna 5' konumundan bağlı olduğunu gösterdi. Eldeki veriler literatür ile karşılaştırıldığında molekülün klorojenik asit (5-kafeoyil küinik asit) olduğu belirlendi. Spektral veriler literatürle örtüşmektedir (Tüfekçi vd., 2024). Molekülün kimyasal yapısı Şekil 4.7'de NMR verileri ise Çizelge 4.2'de verilmiştir.



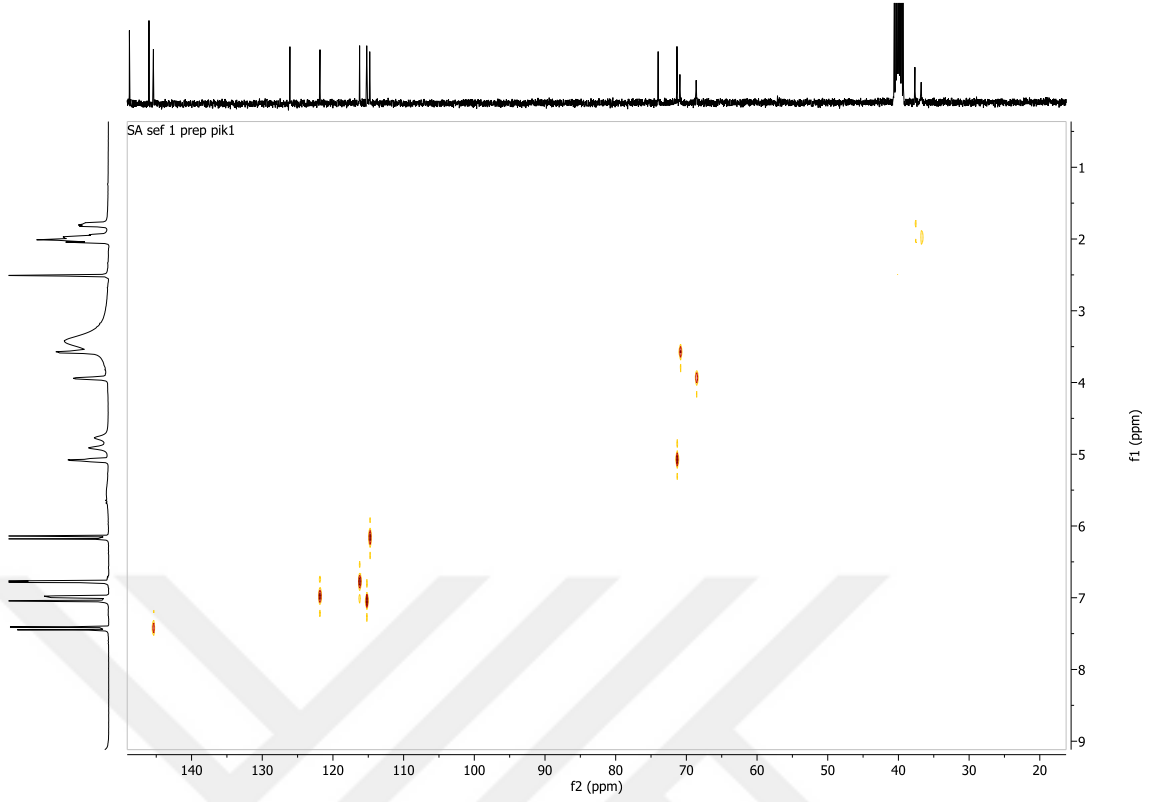
Şekil 4. 7. Molekül 2'nin (klorojenik asit) kimyasal yapısı



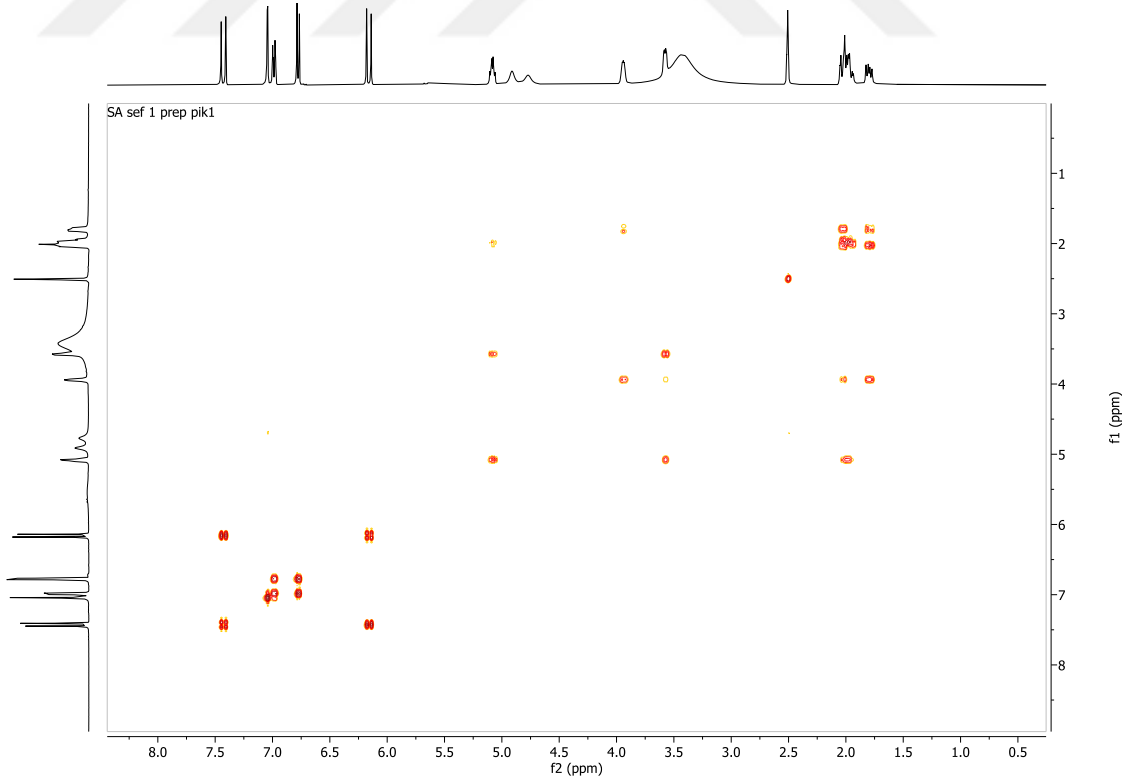
Şekil 4. 8. Molekül 2'nin (klorojenik asit) ^1H -NMR spektrumu (400 MHz, DMSO-d6)



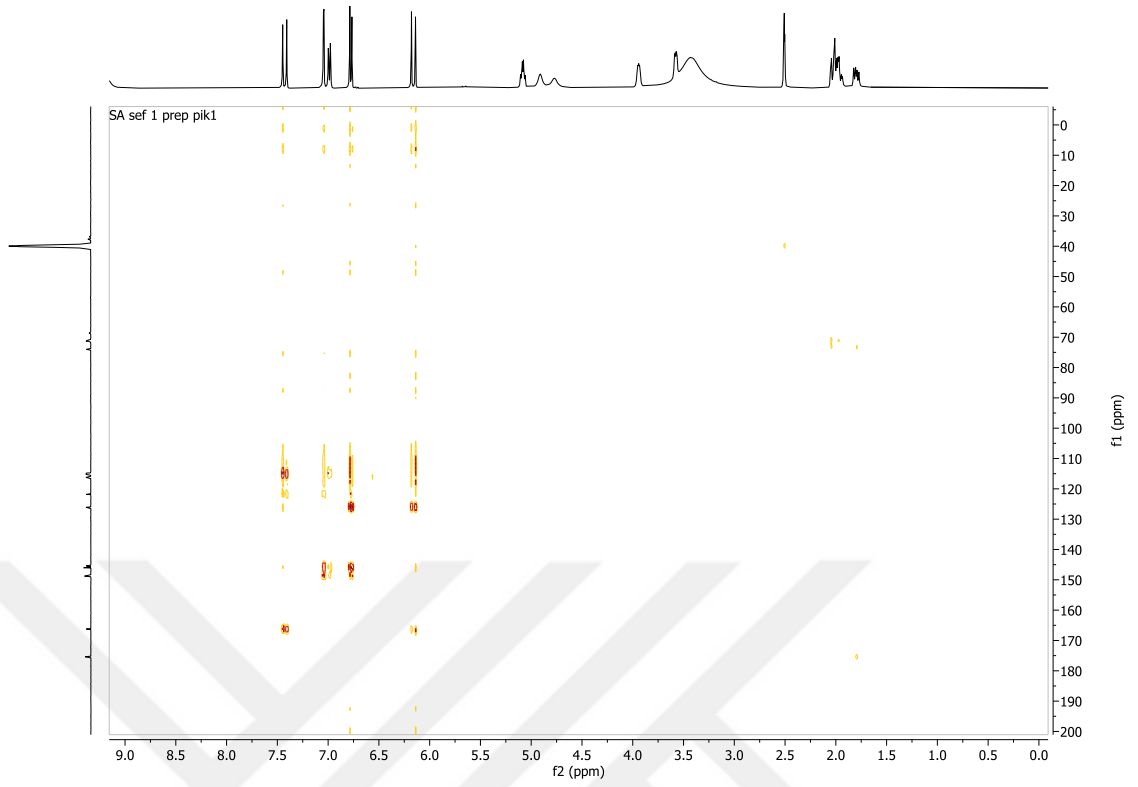
Şekil 4. 9. Molekül 2'nin (klorojenik asit) ^{13}C -NMR spektrumu (100 MHz, DMSO-d6)



Şekil 4. 10. Molekül 2'nin (klorojenik asit) HETCOR spektrumu (DMSO-d6)



Şekil 4. 11. Molekül 2'nin (klorojenik asit) COSY spektrumu (DMSO-d6)



Şekil 4. 12. Molekül 2'nin (klorojenik asit) HMBC spektrumu (DMSO-d6)

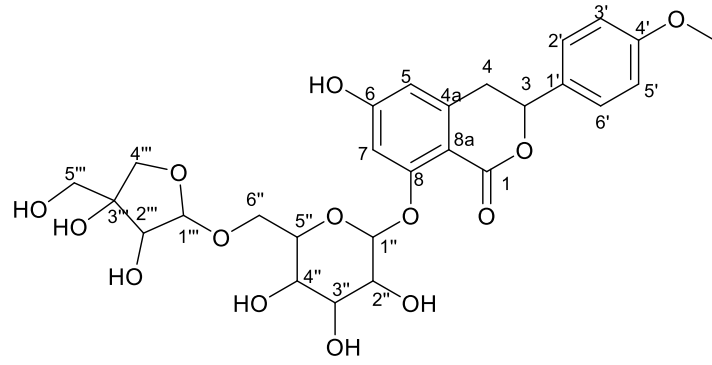
Tablo 4. 2. Molekül 2'nin (klorojenik asit) NMR verileri

Konum	Kafeoyil grubu			Küinik asit grubu		
	¹ H	¹³ C	HMBC	¹ H	¹³ C	HMBC
1 (1')	-	126.0		-	73.9	-
2 (2')	7.05 (d, <i>J</i> =2.1 Hz)	115.2	C1, C3, C4	1.78 (dd, <i>J</i> =13.2, 7.4 Hz) 2.06-1.89 (m)	36.8	C1'
3(3')	-	148.8		3.97-3.84 (m)	68.6	C2', C4'
4 (4')	-	145.4		3.57 (q, <i>J</i> = 4.2, 3.3 Hz)	71.33	
5 (5')	6.78 (d, <i>J</i> =8.1 Hz, 1H)	115.2	C3, C2, C4	5.13-5.04 (m)	70.9	C9
6 (6')	6.99 (dd, <i>J</i> =8.3, 2.1 Hz)	121.8	C1, C4, C7	2.06-1.89 (m)	37.2	C5', C4'
7 (7')	7.43 (d, <i>J</i> =15.8 Hz)	146.0	C1, C8, C9	-	175.4	
8	6.17 (d, <i>J</i> =15.8 Hz)	114.8	C1, C7, C9			
9	-	166.2				

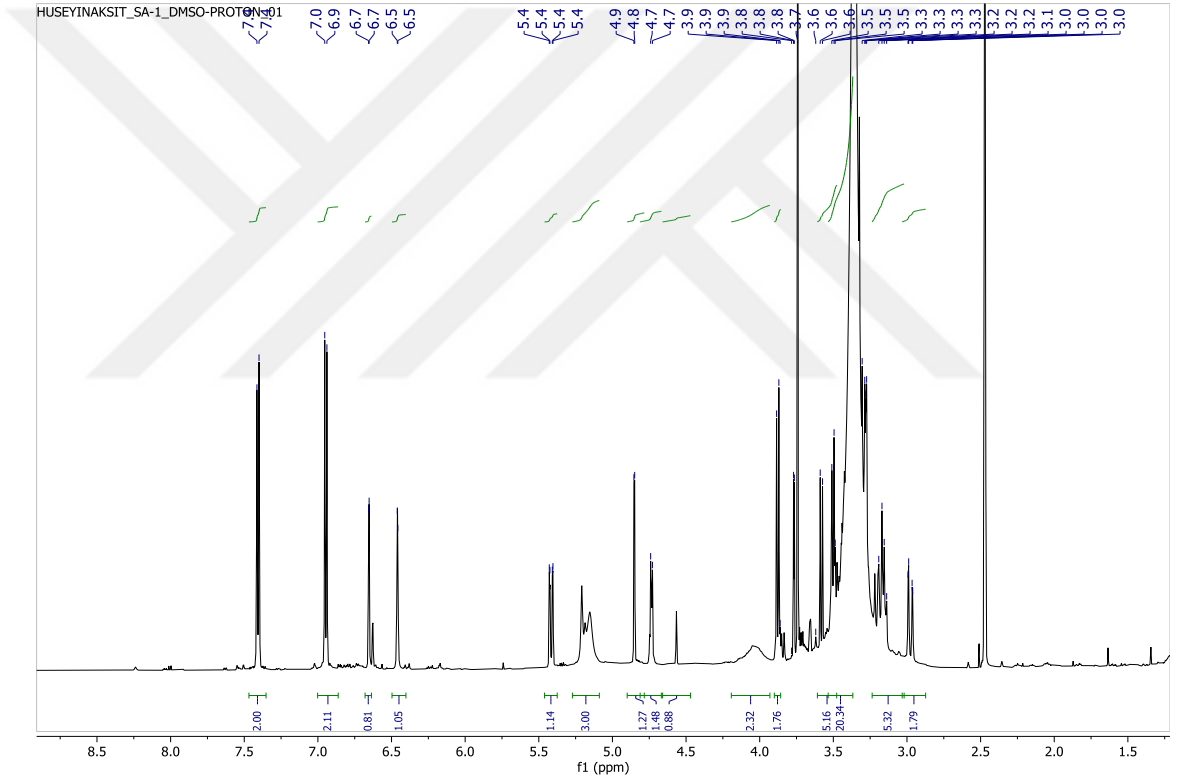
4.1.3. Molekül 3'ün yapı tayini

Molekül 3, p-HPLC kullanılarak sarı-kirli beyaz renkte amorf katı olarak izole edildi. Saflaştırılan bileşiğin 280 nm'de kaydedilen HPLC kromatogramı Şekil 3. 8'de verilmiştir. Bileşiğe ait pozitif modda kaydedilen LC-Q-TOF-MS spektrumunda $[M+H]^+$ m/z 581.1858 sinyali $C_{27}H_{32}O_{14}$ (hesaplanan 581,1865) ile uyumludur. Bileşiğe ait 1H -NMR spektrumları Şekil 4.14-4.20'da verilmiştir. Bileşiğe ait 1H -NMR spektrumu incelendiğinde; AB sitemine sahip bir 1,4-disübstite aromatik halka [δ_H 7.41, d, $J=8.7$ Hz, 2H) ve 6,95 (d, $J=8.7$ Hz, 2H)], bir AX sistemine sahip tetrasübstitüe aromatik halka [δ_H 6.46 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), δ_H 6.65 (d, $J=2.2$ Hz, 1H)] sinyalleri gözlenmiştir. Bunun yanında δ_H 5,42 ppm'de dubletin dubleti ($J=12.5$, 2.6 Hz) şeklinde rezonans bir alifatik proton, δ_H 2.98 ppm'de dubletin dubleti ($J=16.6$, 2.6 Hz) şeklinde rezonans olan bir alifatik proton ve δ_H 3.20 ppm'de dubletin dubleti ($J=12.5$, 16,6 Hz) şeklinde rezonans olan bir alifatik proton molekülün dihidroizokumarin halkasının varlığını gösterdi. Ayrıca δ_H 3.74 (s, 3H) ppm'de singlet olarak gözlenen sinyal bir metoksi grubunun varlığını gösterdi. 1H -NMR spektrumunda, δ_H 4.73 ppm'de (d, $J=7.3$ Hz, 1H) β -glikozil grubunun ve δ_H 5.06 ppm'de (d, $J=2.4$ Hz, 1H) α -apiosil grubunun anomerik protonlarına ait sinyaller gözlemlendi. Bileşiğe ait DEPT135 spektrumunda birisi aglikona ait olmak üzere 4 adet $-CH_2$ sinyali gözlemlendi (Şekil 4.16 negatif sinyaller). Şeker bölgesinde 3 adet $-CH_2$ sinyalinin olması şeker gruplarının bir glukoz bir apioz'dan oluştuğunu gösterir. Ayrıca Şekil 4.20'da verilen HMBC spektrumunun detaylı incelenmesinden sonra δ_H 4.73 $\rightarrow$ δ_C 161.5 etkileşimi glukoz grubunun 8 konumundan aglikona bağlandığını ve δ_H 5.06 $\rightarrow$ δ_C 66.3 etkileşimi ise apioz grubunun glukoz 6-konumundan bağlı olduğunu gösterir. Şeker grubu α -apiosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -glikozit olan bazı doğal bileşikler daha önceden saflaştırılıp tanımlanmıştır. Elde edilen NMR verileri aynı şeker grubu bağlı olan moleküllerle uyum içindedir (Nebieridze vd., 2017).

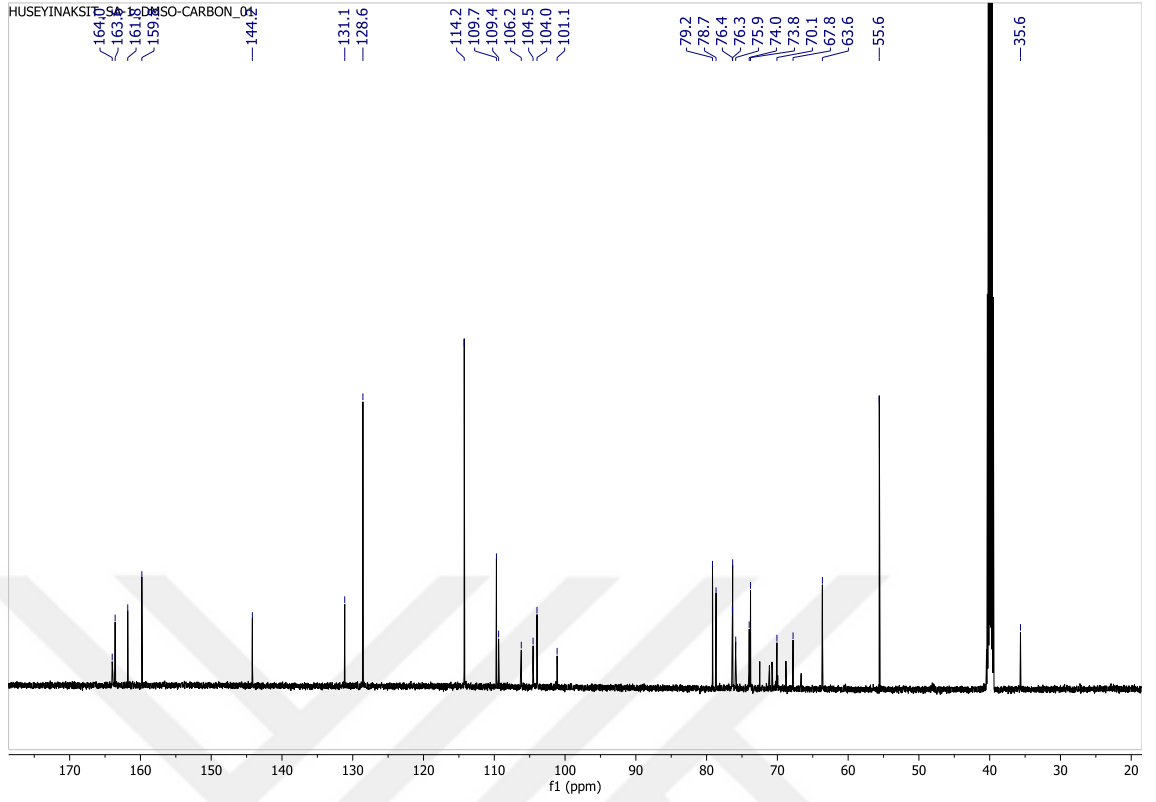
Yukarıdaki bilgiler doğrultusunda molekül 3'ün scorzopigmaekozit olduğu belirlendi. Bileşik daha önce *Scorzonera pygmaea* bitkisinden saflaştırılıp tanımlanmıştır (Şahin vd., 2020). NMR verileri literatür ile tam bir uyum içindedir. Molekül 3'ün kimyasal yapısı şekil 4. 13'te NMR verileri ise Çizelge 4.3'te verilmiştir.



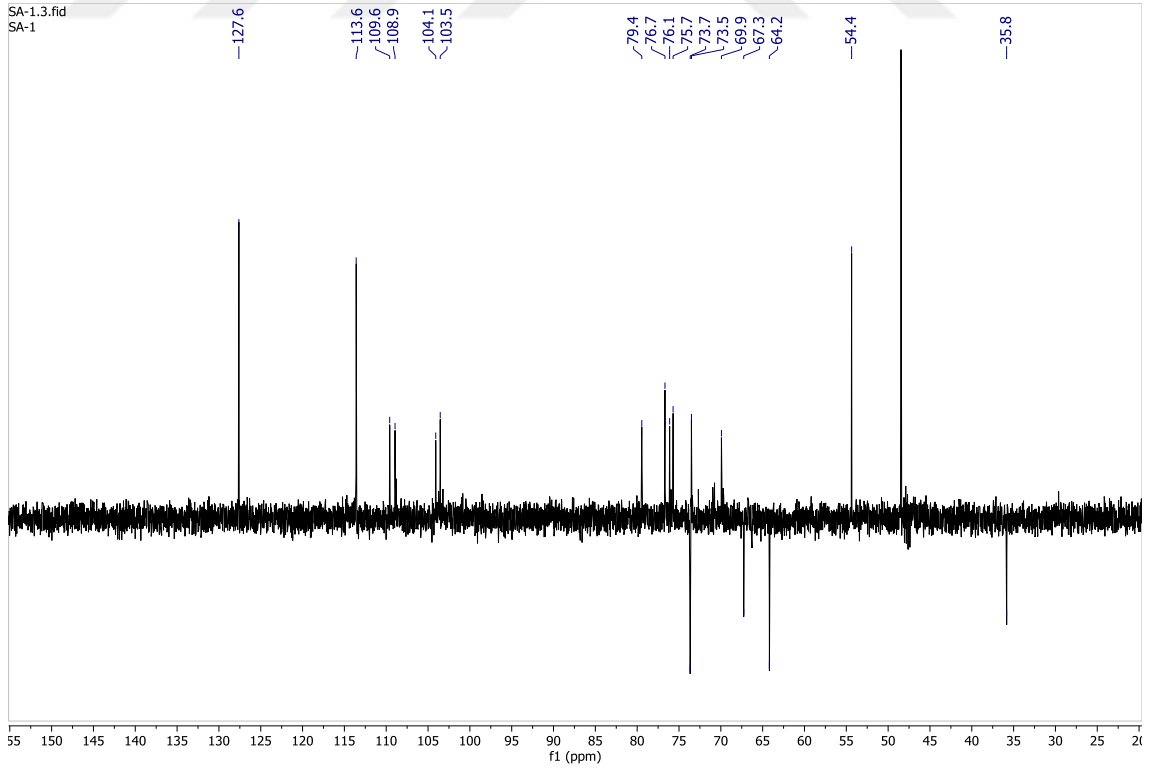
Şekil 4. 13. Molekül 3'ün (scorzopigmaekozit) kimyasal yapısı



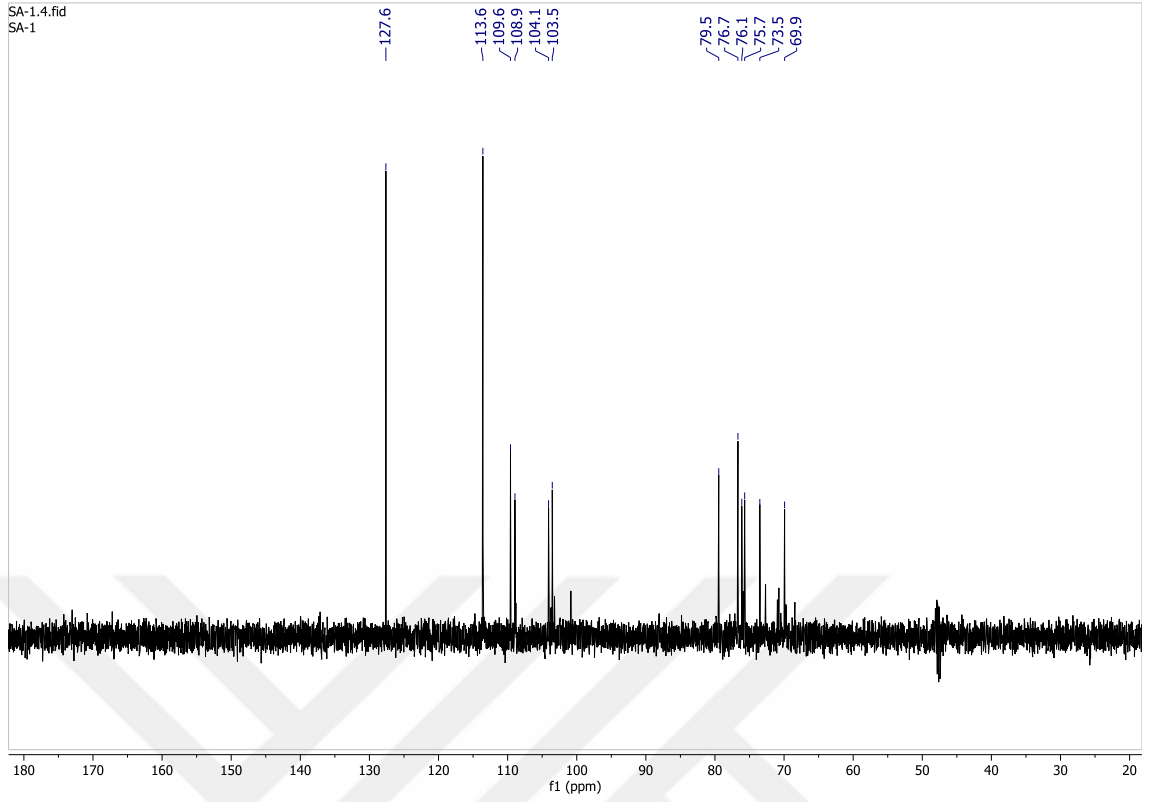
Şekil 4. 14. Molekül 3'ün (scorzopigmaekozit) ¹H-NMR spektrumu (600 MHz, DMSO-d₆)



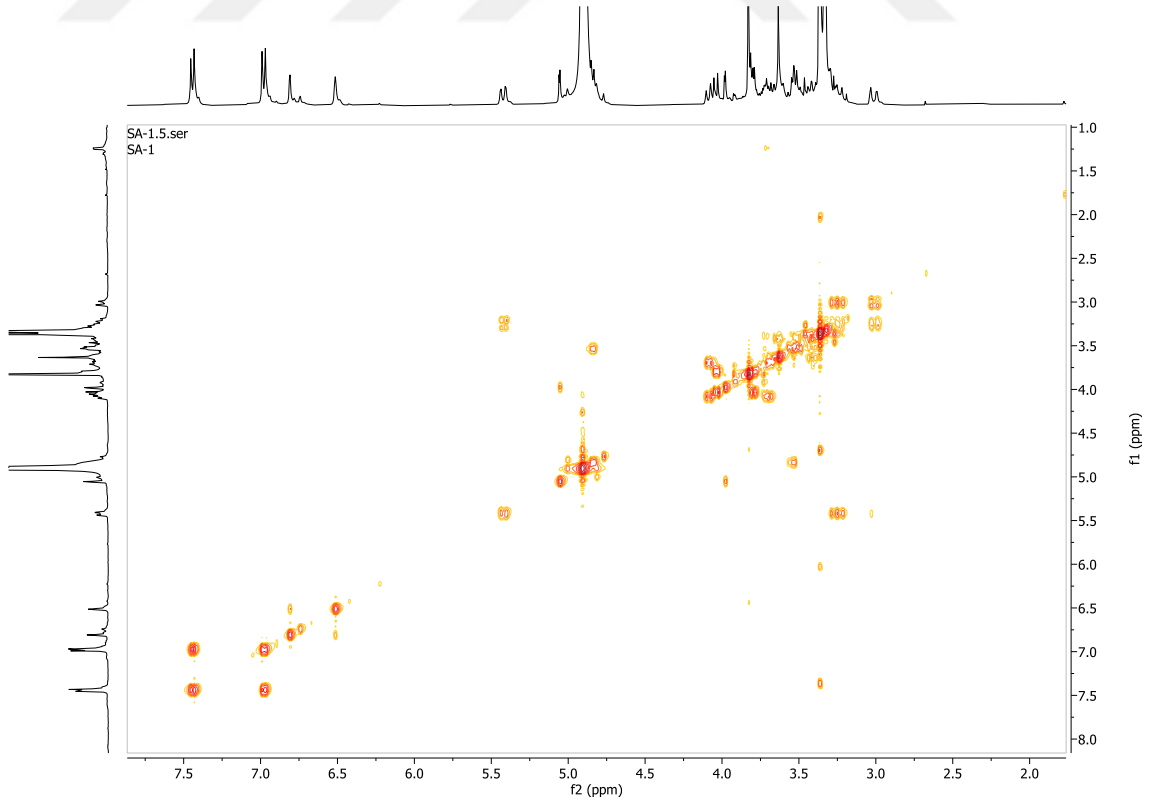
Şekil 4. 15. Molekül 3'ün (scorzopigmaekozit) ^{13}C -NMR spektrumu (125 MHz, DMSO-d₆)



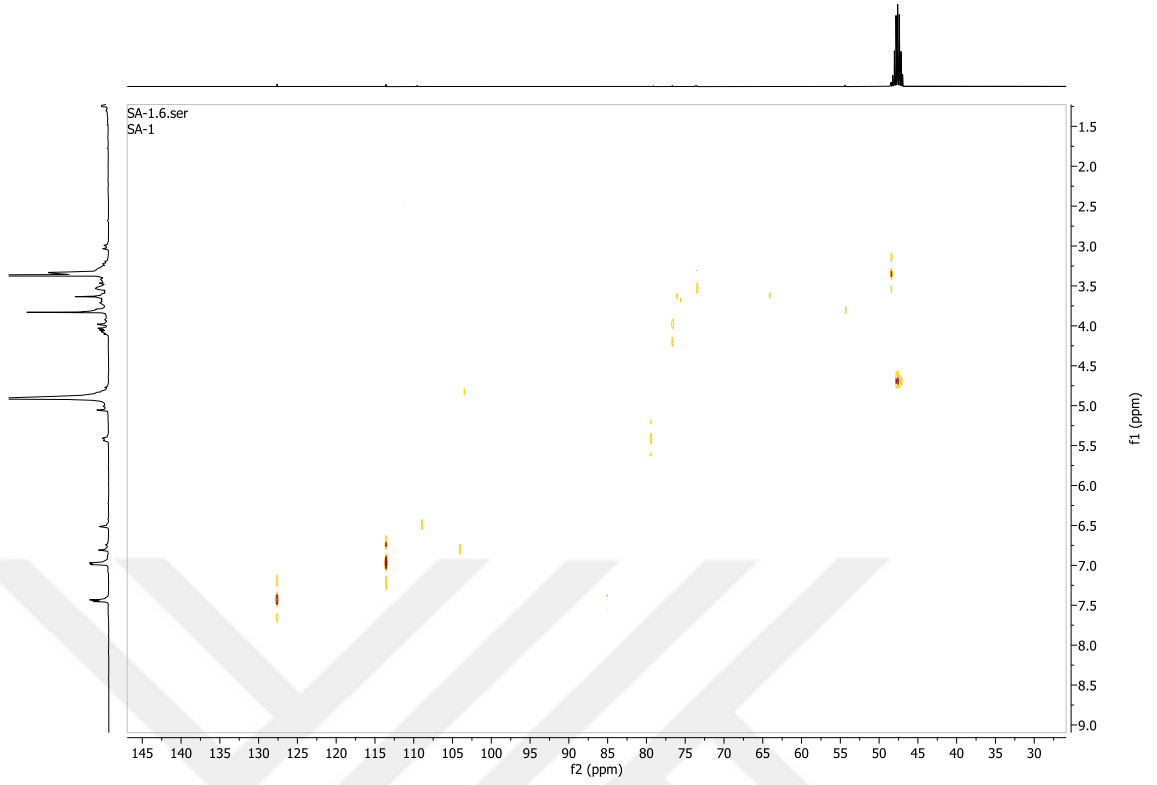
Şekil 4. 16. Molekül 3'ün (scorzopigmaekozit) ^{13}C -DEPT135 spektrumu (100 MHz, MeOD-d₄)



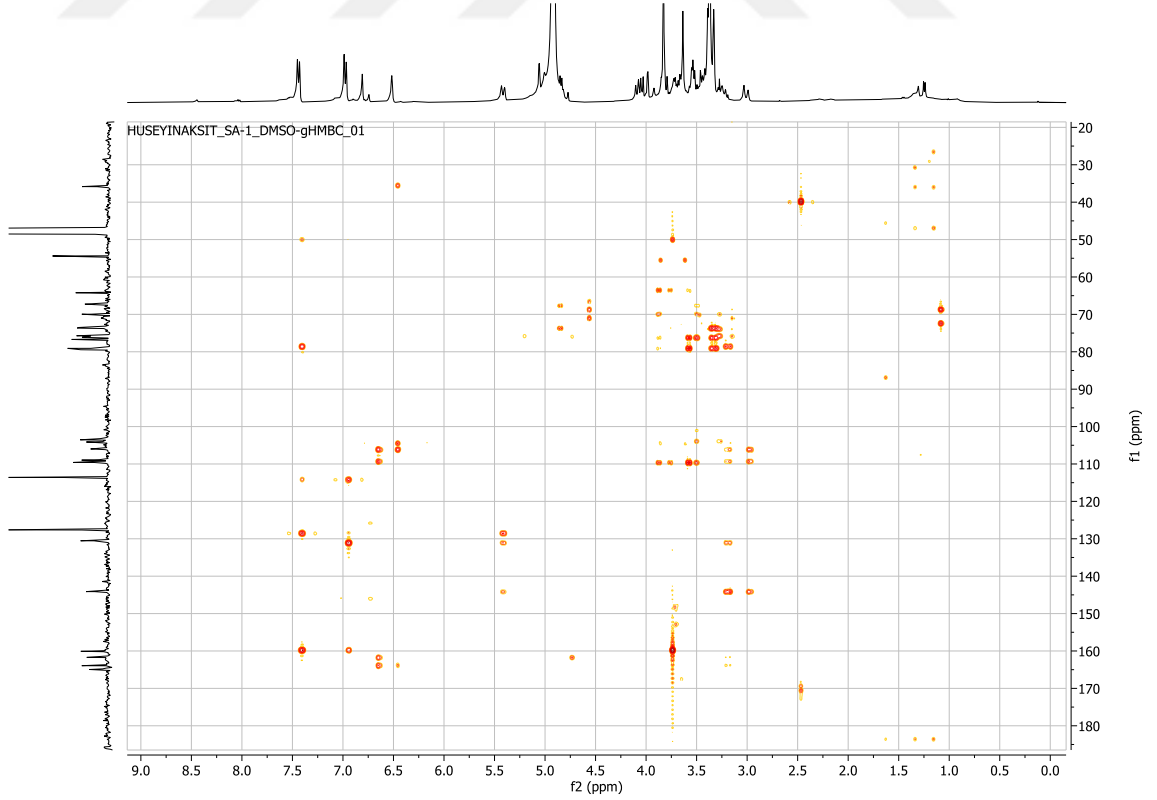
Şekil 4. 17. Molekül 3'ün (scorzopigmaekozit) ^{13}C -DEPT135 spektrumu (100 MHz, MeOD-d4)



Şekil 4. 18. Molekül 3'ün (scorzopigmaekozit) ^{13}C -DEPT90 spektrumu (MeOD-d4)



Şekil 4. 19. Molekül 3'ün (scorzopigmaekozit) HETCOR spektrumu (100 MHz, MeOD-d4)



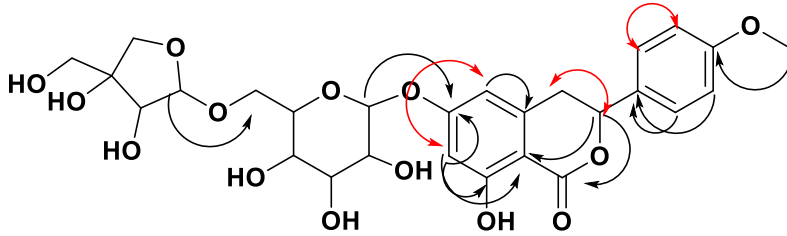
Şekil 4. 20. Molekül 3'ün (scorzopigmaekozit) HMBC spektrumu (DMSO-d6)

Tablo 4. 3. Molekül 3'ün (scorzopigmaekozit) NMR verileri (MeOD-d4)

	¹ H	¹³ C	HMBC
1	-	163.4	
3	5.42 (dd, <i>J</i> = 12.5, 2.6 Hz, 1H)	79.5	C1, C4, C1'
4	2.98 (dd, <i>J</i> = 16.6, 2.6 Hz, 1H) 3.20 (dd, <i>J</i> = 16.6, 12.5 Hz, 1H)	35.6	C4a, C8a C3, C1, C1'
4a	-	144.2	
5	6.46 (d, <i>J</i> = 2.2 Hz, 1H)	109.4	C4a, C6, C7
6	-	164.0	
7	6.65 (d, <i>J</i> = 2.2 Hz, 1H)	104.0	C8, C8a, C6
8	-	161.8	
8a	-	106.2	
1'	-	131.1	
2' ve 6'	7.41 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H)	128.6	C3, C4', C1'
4'	-	159.8	
4'-OCH ₃	3.74 (s, 3H)	55.6	C4'
3' ve 5'	6.95 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H)	114.2	C4', C1'
1''	4.73 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 1H)	104.0	C8, C2''
2''	3.58 (d, <i>J</i> = 9.3 Hz, 1H)	75.9	C1'', C3'', C4''
3''	3.50 (d, <i>J</i> = 9.3 Hz, 1H)	73.8	C2'', C4''
4''	3.44 (dd, <i>J</i> = 9.3, 4.1 Hz, 1H)	70.0	C3'', C5''
5''	3.68 – 3.61 (m, 1H)	76.3	C4'', C6''
6''	3.77 (d, <i>J</i> = 3.2 Hz, 1H) 4.06-4.01(m, 1H)	67.8	C5'', C1'''
1'''	4.85 (d, <i>J</i> = 3.2 Hz, 1H)	109.7	C6'', C2'''
2'''	3.86 (d, <i>J</i> = 6.2 Hz, 1H)	76.4	C3''', C1'''
3'''	-	78.7	
4'''	3.50 (d, <i>J</i> = 9.1 Hz, 1H) 3.31 – 3.26 (m, 1H)	74.0	C3''', C5'''
5'''	3.59 (s, 2H)	63.6	C3'''

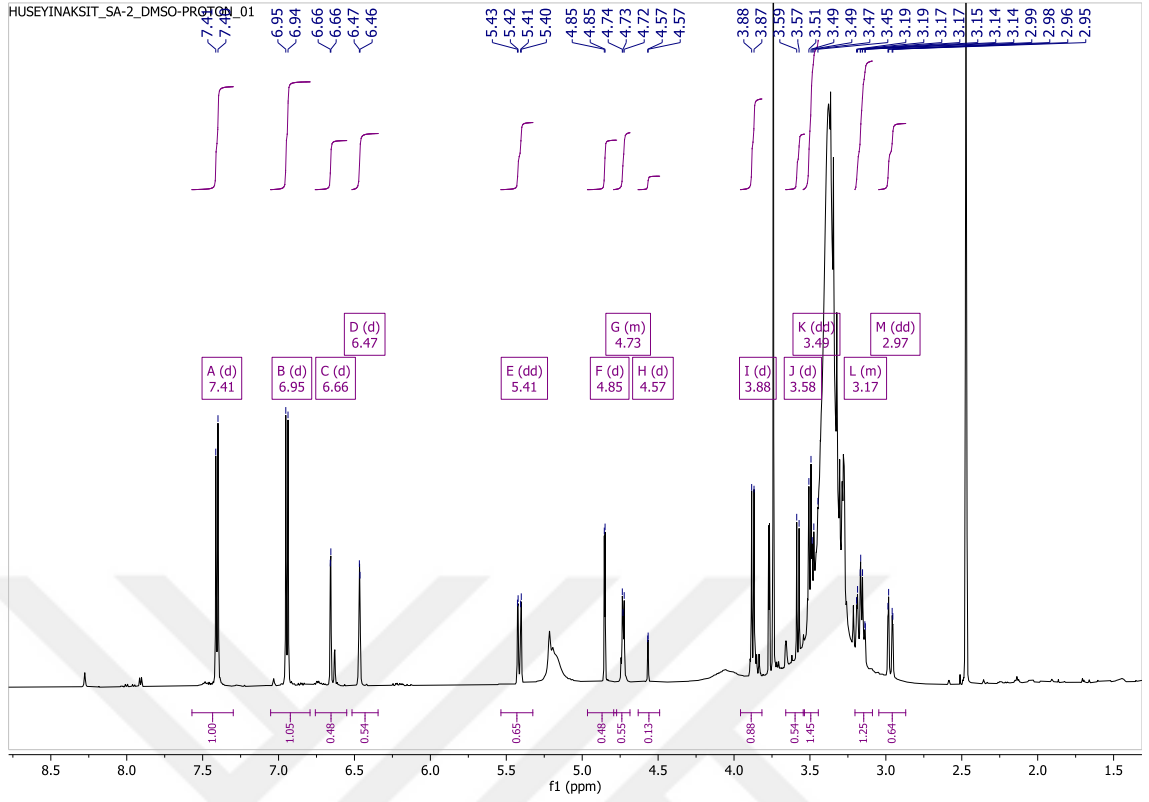
4.1.4. Molekül 4'ün yapı tayini

Molekül açık sarı renkte amorf katı olarak izole edildi. Bileşiğe ait LC-Q-TOF-MS spektrumunda molekül 3 ile benzer moleküler iyon ve parçalanma ürünleri verdi ($[M+H]^+$ m/z 581.1861). Buradan molekül 4'ün kapalı formülü $C_{27}H_{32}O_{14}$ olarak belirlendi. Molekül 3 ve 4'ün 1H -NMR (Şekil 4.14 ve Şekil 4.22) spektrumu incelendiğinde her iki molekülde de benze aglikon ve şeker gruplarının olduğu söylenebilir. Yani bir adet AB sistemi, bir adet AX sisteminin yanında üç adet dd sisteminin yer aldığı alifatik grup sinyalleri, bir metoksi sinyali, iki anomerik proton sinyali, kimyasal kayma değerleri ve etkileşim sabitleri ile molekül 3 ile çok benzerdir. Ancak molekül 4'e ait ^{13}C -NMR spektrumu incelendiğinde (Şekil 4. 22) C6 karbonunun yaklaşık 1 ppm aşağı alana kayması, ayrıca glukozu grubunun anomerik protonun bu karbonla HMBC etkileşimi içinde bulunması şeker grubunun aglikona bu konumdan bağlı olduğunu gösterir. Diğer bütün kimyasal kaymalar molekül 3 ile uyum içindedir. Buradan hareketle molekül 4 ile molekül 3 aynı aromatik ve aromatik iskelete sahip olmasından dolayı bu çalışmada ilk defa rapor edilen molekül 4 scorzopigmaekozit A olarak isimlendirilmiştir. Moleküle ait NMR spektrumları Şekil 4.22-Şekil 4.28'da verilmiştir. Bileşiğe ait NMR verileri ise Çizelge 4.4'te verilmiştir. Molekülün kimyasal yapısı Şekil 4.21'de verilmiştir.

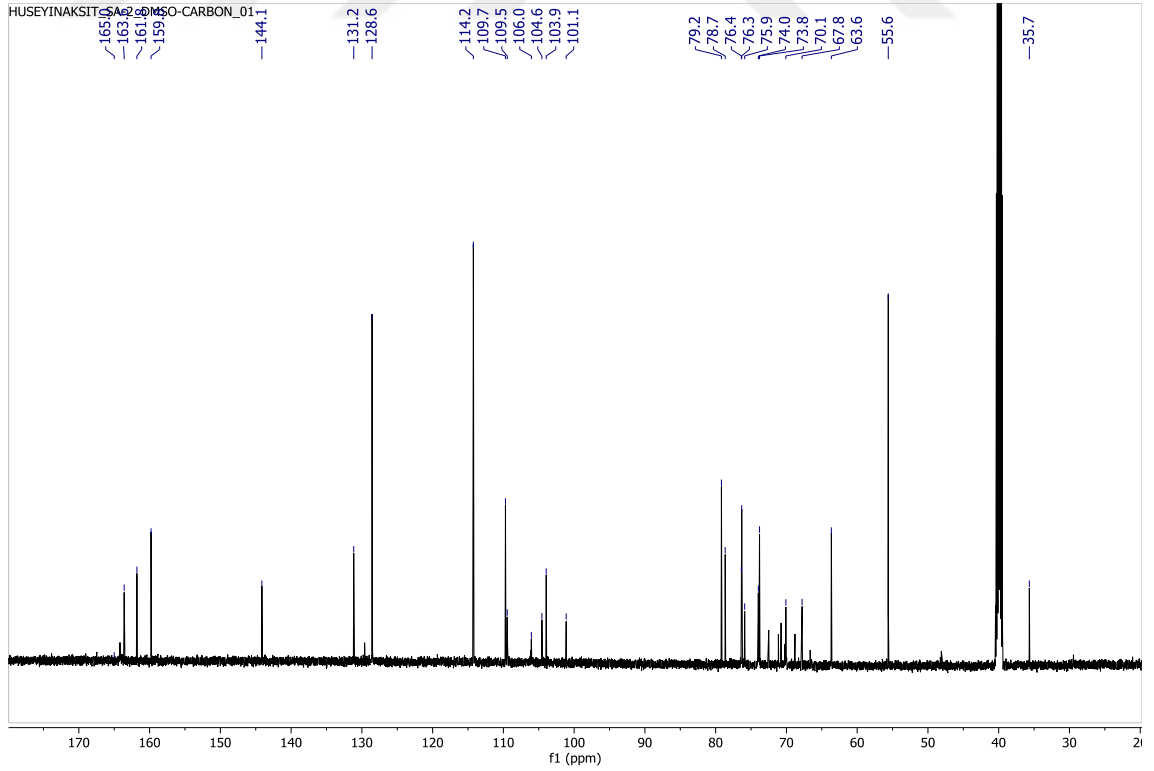


Şekil 4. 21. Molekül 4'ün (scorzopigmaekozit A) kimyasal yapısı ile anahtar HMBC(siyah) COSY (kırmızı) etkileşimleri

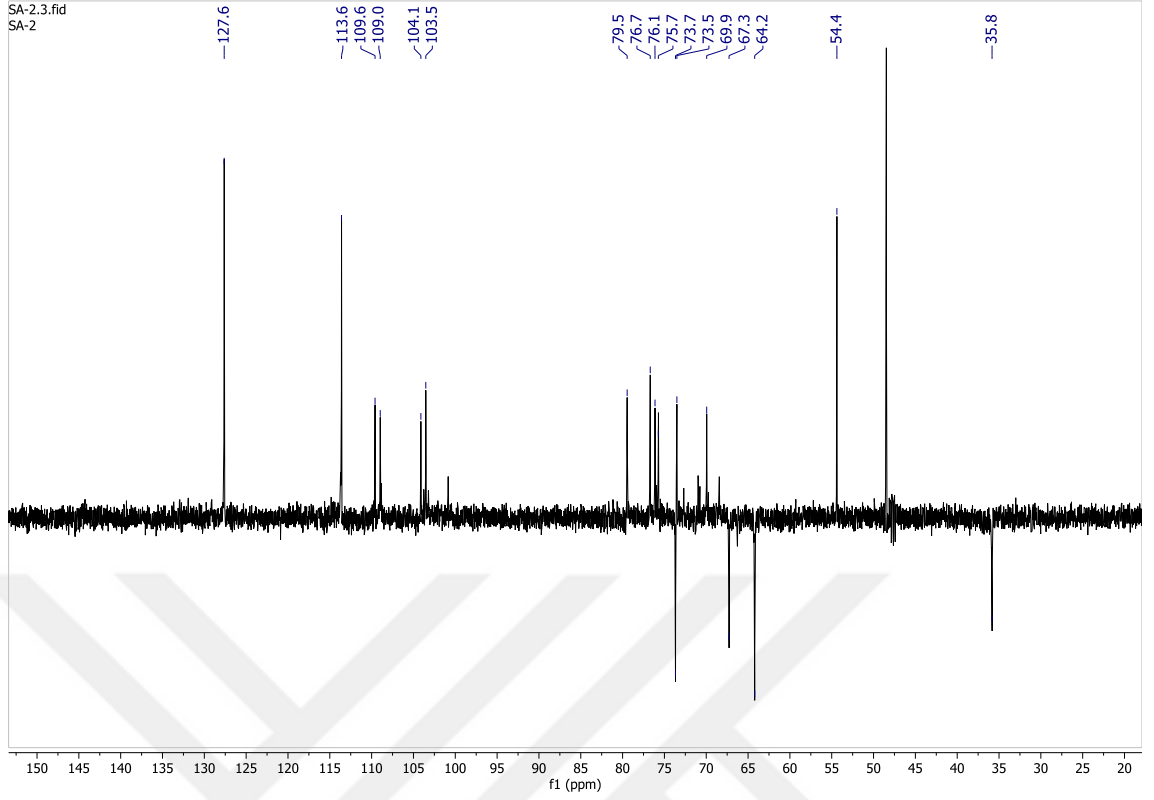
Molekül 4 (scorzopigmaekozit A), daha önceden *Scorzenera* türlerinden izole edilmemiştir. Dolayısı ile bileşiğin hem *Scrophularia* familyası hem de *Scorzonera* türlerinde bulunduğu ilk defa bu çalışmada rapor edilmiştir. Molekül *Scorzonera aucherana* bitkisinin kemotaksonomisi için bir belirteç olabilir. Molekülün ilk defa bu çalışmada rapor edilmesi nedeniyle bitkinin fitokimyasal içeriği hakkında literatüre yeni bilgiler kazandırılmış oldu. Ayrıca molekülün antioksidan ve antiproliferatif aktivitesi de ilk olarak bu çalışmada ortaya konulmuştur.



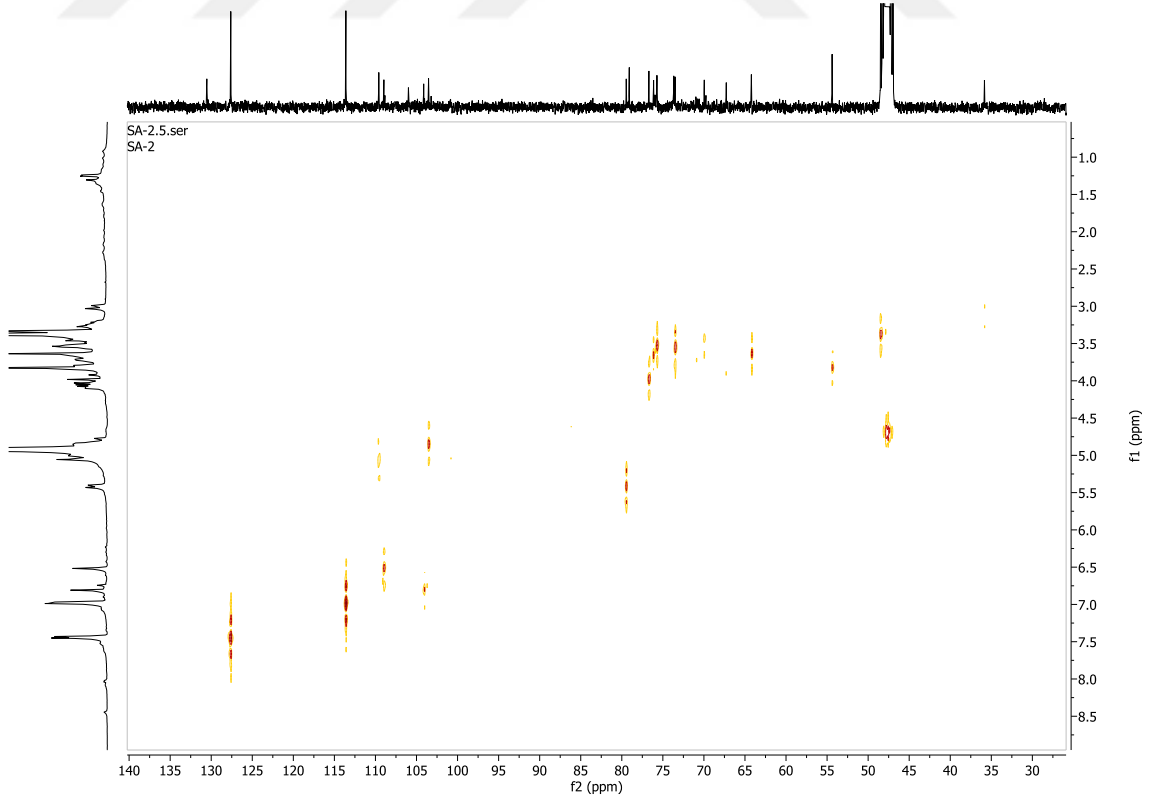
Şekil 4. 22. Molekül 4'ün (scorzopigmaekozit A) ^1H -NMR spektrumu (600 MHz, DMSO- d_6)



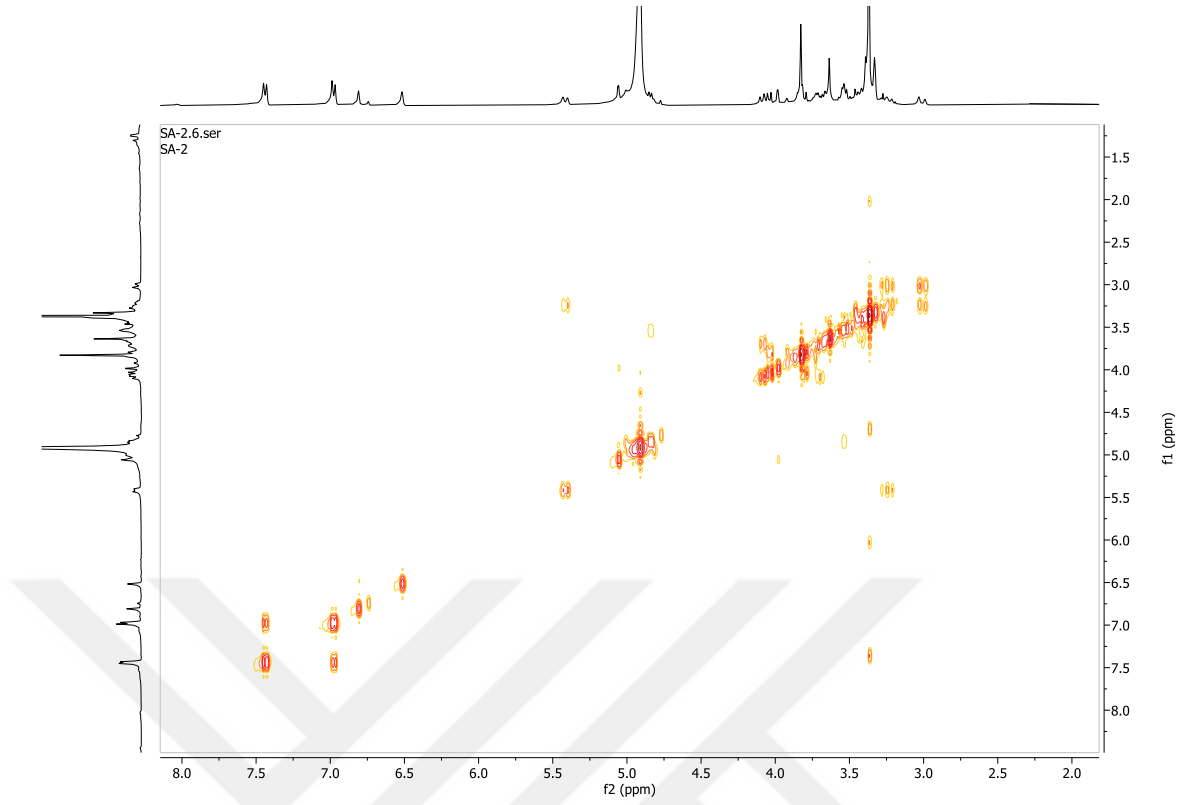
Şekil 4. 23. Molekül 4'ün (scorzopigmaekozit A) ^{13}C -NMR spektrumu (125 MHz, DMSO- d_6)



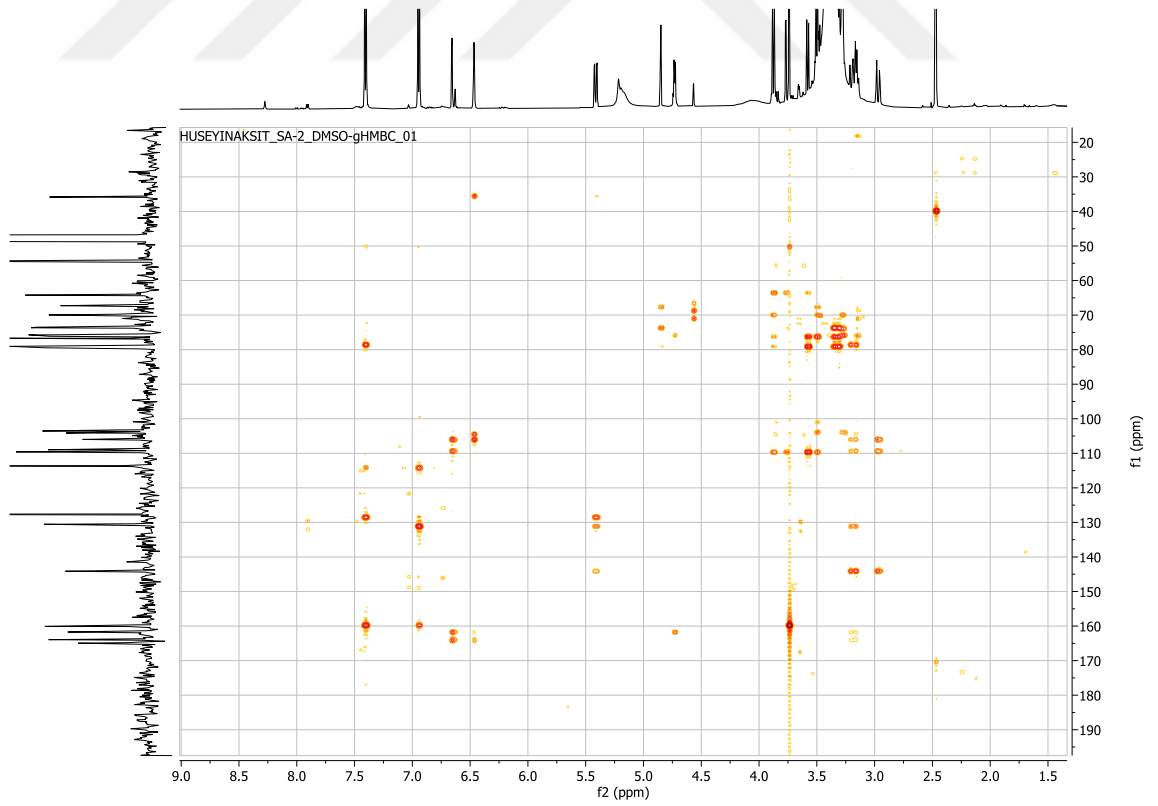
Şekil 4. 24. Molekül 4'ün (scorzopigmaekozit A) ^{13}C -DEPT135 spektrumu (100 MHz, MeOD-d4)



Şekil 4. 25. Molekül 4'ün (scorzopigmaekozit A) HETCOR spektrumu (MeOD-d4)



Şekil 4. 26. Molekül 4'ün (scorzopigmaekozit A) COSY spektrumu (MeOD-d4)



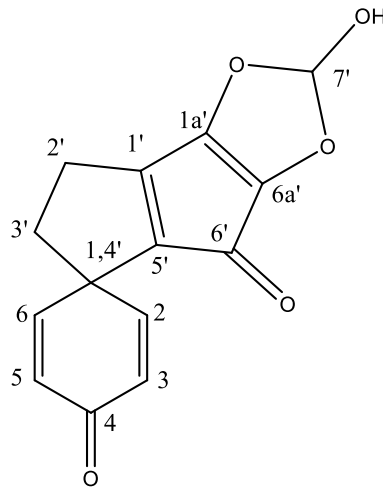
Şekil 4. 27. Molekül 4'ün (scorzopigmaekozit A) HMBC spektrumu (MeOD-d4)

Tablo 4. 4. Molekül 4'ün (scorzopigmaekozit A) NMR verileri (MeOD-d4)

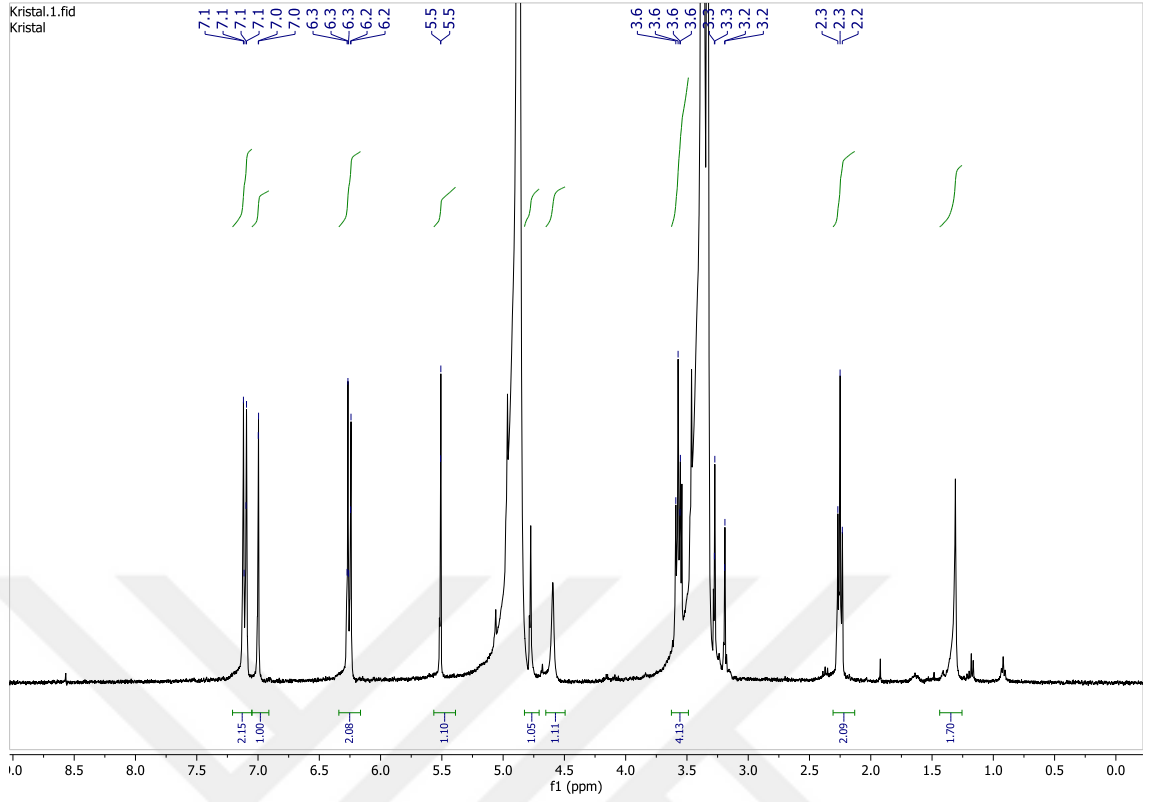
	¹ H	¹³ C	HMBC
1	-	163.6	
3	5.42 (dd, <i>J</i> = 12.5, 2.6 Hz, 1H)	79.2	C1, C4, C1'
4	2.98 (dd, <i>J</i> = 16.6, 2.6 Hz, 1H) 3.20 (dd, <i>J</i> = 16.6, 12.5 Hz, 1H)	35.7	C4a, C8a C3, C1, C1'
4a	-	144.1	
5	6.46 (d, <i>J</i> = 2.2 Hz, 1H)	109.5	C4a, C6, C7
6	-	165.0	
7	6.66 (d, <i>J</i> = 2.2 Hz, 1H)	103.9	C8, C8a, C6
8	-	161.8	
8a	-	106.0	
1'	-	131.2	
2' ve 6'	7.40 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H)	128.6	C3, C4', C1'
4'	-	159.8	
4'-OCH ₃	3.74 (s, 3H)	55.6	C4'
3' ve 5'	6.94 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H)	114.2	C4', C1'
1''	4.73 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 1H)	103.9	C6, C2'', C3''
2''	3.58 (d, <i>J</i> = 9.3 Hz, 1H)	75.9	C1'', C3'', C4''
3''	3.50 (d, <i>J</i> = 9.3 Hz, 1H)	73.8	C2'', C4''
4''	3.44 (dd, <i>J</i> = 9.3, 4.1 Hz, 1H)	70.1	C3'', C5''
5''	3.68 – 3.61 (m, 1H)	76.3	C4'', C6''
6''	3.77 (d, <i>J</i> = 3.2 Hz, 1H) 4.06-4.01(m, 1H)	67.8	C5'', C1'''
1'''	4.85 (d, <i>J</i> = 3.2 Hz, 1H)	109.7	C6'', C2'''
2'''	3.87 (d, <i>J</i> = 6.2 Hz, 1H)	76.3	C3''', C1'''
3'''	-	78.7	
4'''	3.50 (d, <i>J</i> = 9.1 Hz, 1H) 3.31 – 3.26 (m, 1H)	74.0	C3''', C5'''
5'''	3.54-8 (s, 2H)	63.6	C3'''

4.1.5. Molekül 5'in yapı tayini

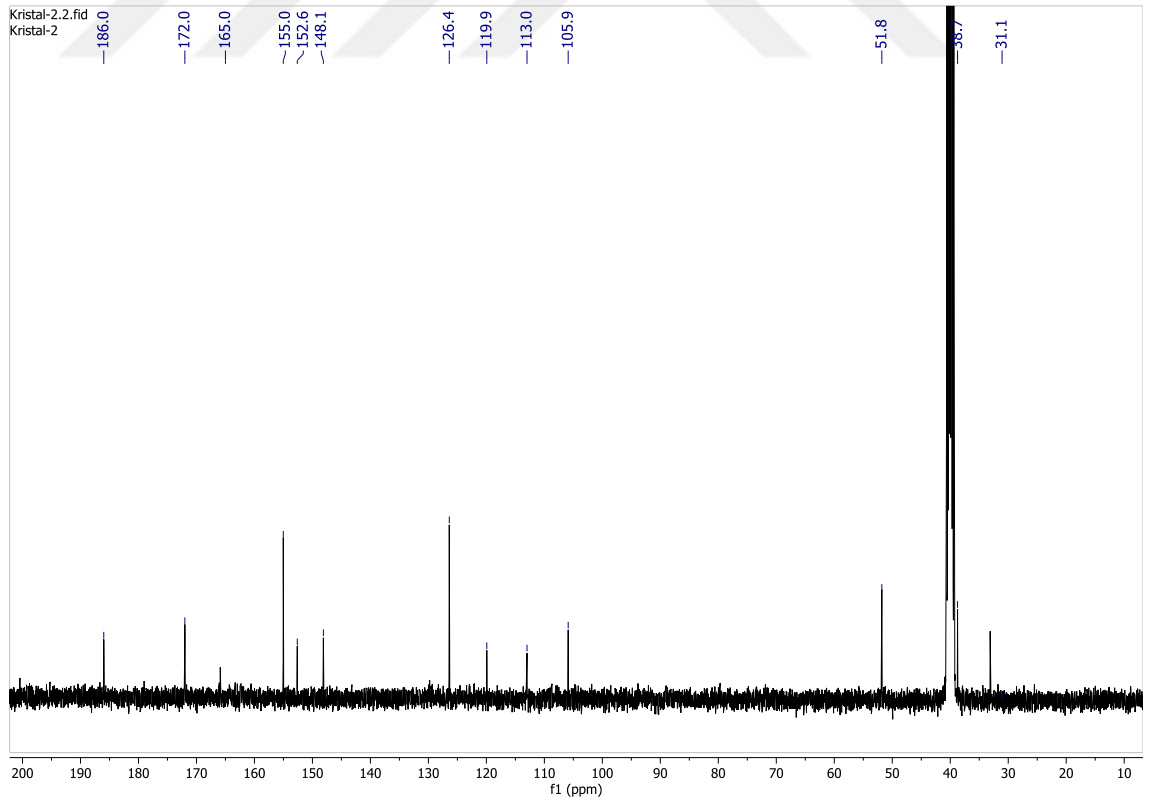
Molekül 5 metanol içinde kristallenebilen iğne şeklinde kristaller şeklinde elde edildi. Metanol içinde oluşan kristaller çözücü dekante edildikten sonra kristaller cam çeperinden kazınarak elde edildi. DMSO-d₆ ile çözülerek kaydedilen NMR spektrumlar Şekil 4. 30-Şekil 4. 35'te verilmiştir. ¹H -NMR spektrumu incelendiğinde δ_H 6.92 ppm (d, *J* = 10.0 Hz, 1H) ve δ_H 6.03 ppm'de (d, *J* = 10.0 Hz, 1H) olmak üzere COSY (Şekil 4.33) spektrumunda birbirileri ile etkileşim içinde olan iki tane AB sistemindeki dublet sikloheksadienon yapısının =CH protonlarına aittir. Alifatik kısımda ise δ_H 2.04 ppm (t, *J* = 7.3 Hz, 2H) ve δ_H 3.38 ppm'de (t, *J* = 7.4 Hz, 2H) iki triplet sinyali bileşikte siklopentenil yapısını doğruladı. Bunu yanında δ_H 6.69 ppm'de (s, 1H) bir singlet sinyali ise asetal protonu ile ilişkilendirildi. Bileşiğe ait ¹³C-NMR (Şekil 4.30) spektrumunda ise toplamda 12 sinyal gözlenmiştir. Bunlardan iki tanesi -CH₂ (Şekil 4. 31'de negatif sinyaller), 3 tanesi -CH (Şekil 4. 31'de pozitif sinyaller, Şekil 4.43'teki sinyaller), ve 7 tanesi de kuarterner karbon sinyallerdir. δ_C 51.8 ppm'de gözlenen kuarterner karbon sinyali 2,5-sikloheksadien-4-on ve siklopentenin C-1 ile C-4' arasında birbirine bağlandığına işaret etmektedir (Granica vd., 2015). Bileşiğe ait 1D ve 2D-NMR spektrumlarının incelenmesi ile Şekil 4.28'de verilen yapıya ulaşılmıştır. Bileşik Scifinder (erişim tarihi Ocak 2023) arama motorunda herhangi bir sonuç vermemiştir. Dolayısı ile izole edilen bu bileşik yenidir ve ilk defa bu çalışmada rapor edilmiştir. Bileşik çalışmaya konu olan *S. aucheriana* bitkisinin ismine ithafen *aucherianoside* olarak isimlendirilmiştir.



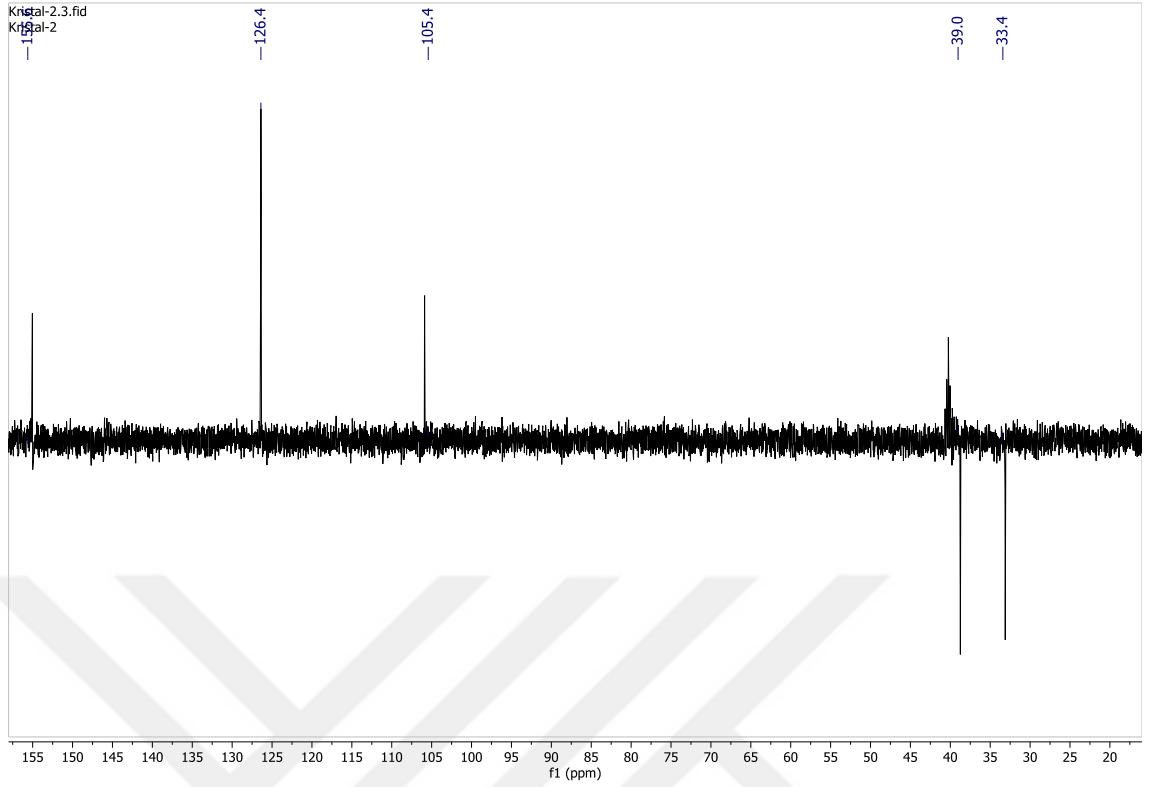
Şekil 4. 28. Molekül 5'in (aucherianoside) kimyasal yapısı



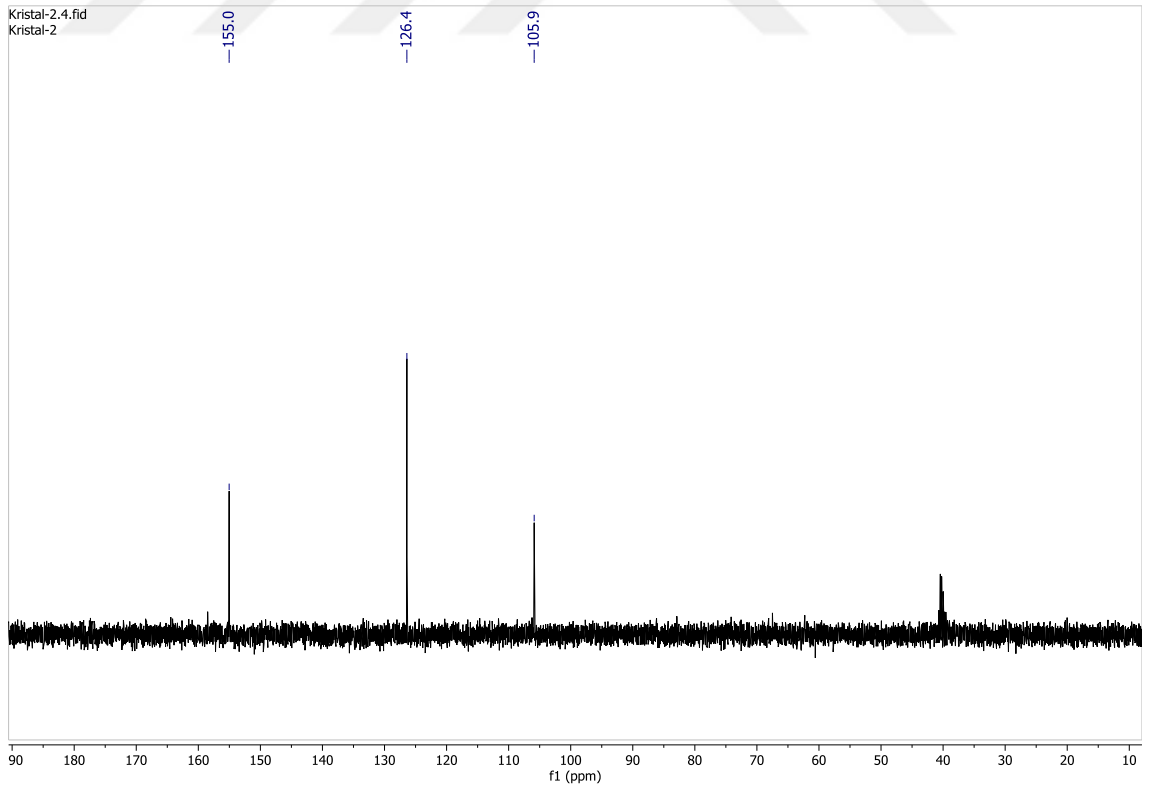
Şekil 4. 29. Molekül 5'in (aucherianoside) ^1H -NMR spektrumu (400 MHz, DMSO-d₆)



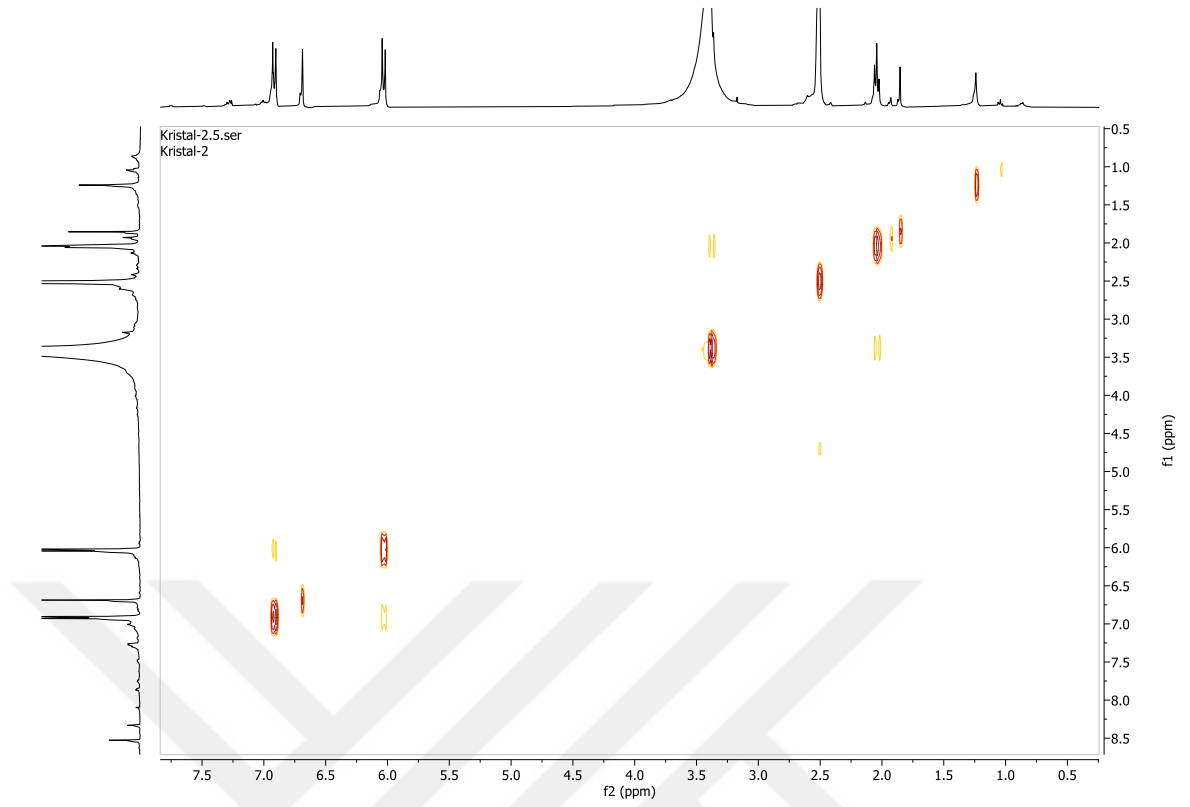
Şekil 4. 30. Molekül 5'in (aucherianoside) ^{13}C -NMR spektrumu (100 MHz, DMSO-d₆)



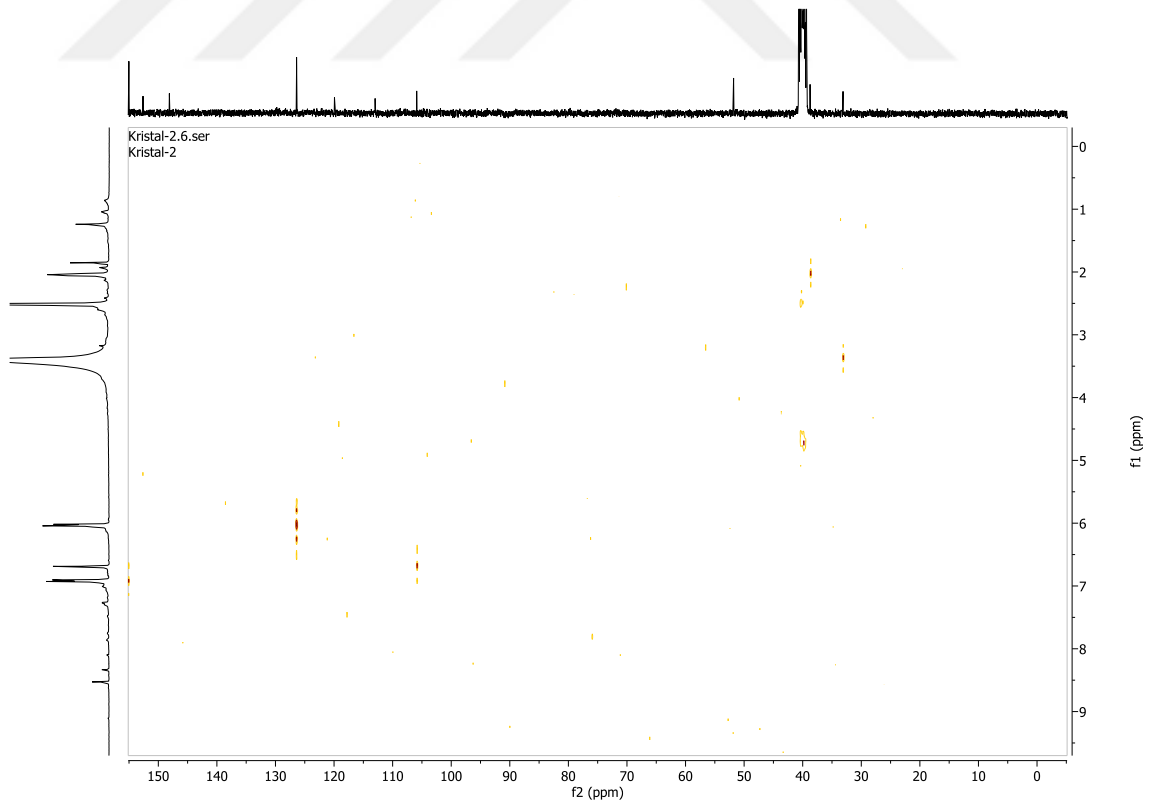
Şekil 4. 31. Molekül 5'in (aucherianoside) ^{13}C -DEPT135 spektrumu (100 MHz, DMSO-d₆)



Şekil 4. 32. Molekül 5'in (aucherianoside) ^{13}C -DEPT90 spektrumu (100 MHz, DMSO-d₆)



Şekil 4. 33. Molekül 5'in (aucherianoside) COSY spektrumu (DMSO-d6)



Şekil 4. 34. Molekül 5'in (aucherianoside) HETCOR spektrumu (DMSO-d6)

Tablo 4. 5. Molekül 5'in (aucherianoside) NMR verileri (400 MHz, DMSO-d6)

Konum	¹ H	¹³ C
1 (4')	-	51.8
2 ve 6	6.92 (d, <i>J</i> =10.0 Hz, 2H)	155.0
4	-	186.0
3 ve 5	6.03 (d, <i>J</i> =10.0 Hz, 2H)	126.4
1'	-	148.1
1a'	-	152.6
2'	3.38 (t, <i>J</i> =7.3 Hz, 2H)	31.1
3'	2.04 (t, <i>J</i> =7.3 Hz, 2H)	38.7
5'	-	119.9
6'	-	172.0
6a'	-	113.0
7'	6.69 (s, 1H)	105.9

4.2. *Scorzonera aucheriana* Bitkisinin Ekstraktları ve İzole Edilen Moleküllerin Antioksidan Aktiviteleri

S. aucheriana bitkisinin toprak üstü kısımlarının antioksidan aktivitesinin belirlenmesi amacıyla bitki örnekleri sırasıyla hekzan, diklorometan, etil asetat, metanol ve su ile ekstrakte edildi. Elde edilen ekstraktlar, DPPH ve ABTS radikalleri giderme aktivitesi ile FRAP aktivite testlerine tabi tutuldu. 1 mg/mL stok çözeltiler üzerinden yapılan antioksidan test sonuçları Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4. 6. Bitkiden izole edilen ekstraktların antioksidan aktiviteleri

Örnekler ve standartlar	DPPH [•] Giderme aktivitesi IC ₅₀ (µg/mL)	ABTS ^{•+} Giderme aktivitesi IC ₅₀ (µg/mL)	FRAP Aktivitesi mg TE/g ekstre
Hekzan	207.56±10.67	>250	5.95±1.46
Diklorometan	232.17±0.75	>250	< 1
Etil asetat	181.48±12.58	>250	46.77±5.81
Metanol	6.14±0.42	9.52±0.89	91.25±3.37
Su	88.3±5.55	84.74±5.14	60.11±4.88
Troloks	11.95±1.16 ^a	7.07±0.82	-
Askorbik Asit	-	-	383.66±0.98

Çizelge 4.6 incelendiğinde nispeten apolar çözücülerle elde edilen ekstraktların uygulanan her üç testte de aktivitelerinin hem polar çözücü (metanol ve su) ekstraktlarına göre hem de standart antioksidanlar olan askorbik asit ve troloks'a göre düşük olduğu görülmektedir. Özellikle metanol ekstraktı DPPH ve ABTS giderme aktivitelerinde sırasıyla 6.14 ± 0.42 ve 9.52 ± 0.89 IC₅₀ değerleriyle ve FRAP testinde ise 91.25 ± 3.37 mg TE/g aktivitesi ile en yüksek aktiviteye sahiptir. Su ekstraktının ise orta seviyede antioksidan aktiviteye sahip olduğu söylenebilir.

Tablo 4. 7. Bitkiden izole edilen bileşiklerin antioksidan aktiviteleri

Örnekler ve standartlar	DPPH [•] Giderme aktivitesi IC ₅₀ (µg/ml)	ABTS ^{•+} Giderme aktivitesi IC ₅₀ (µg/ml)	FRAP Aktivitesi mg TE/g madde
1	15.33 ± 1.67^a	12.92 ± 0.48^a	276.85 ± 1.46^a
2	12.17 ± 0.75^a	10.57 ± 0.57^a	308.67 ± 1.86^b
3	314.85 ± 2.62^b	51.48 ± 1.19^b	96.77 ± 2.50^c
4	322.30 ± 1.66^b	53.01 ± 2.15^b	94.25 ± 0.37^c
5	486 ± 8.82^c	117.74 ± 1.74^c	47.91 ± 0.86^d
Troloks	11.95 ± 1.16^a	7.07 ± 0.82^d	-
Askorbik Asit	-	-	383.66 ± 0.98^e

Bitkiden izole edilen moleküllerin antioksidant aktiviteleri Çizelge 4.7’de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde; izole edilen bileşiklerin DPPH radikali giderme aktiviteleri (IC₅₀= µg/ml) 12.17 ± 0.75 - 486 ± 8.82 arasında değişmektedir. **1** ve **2** molekülleri istatistiksel olarak standart olarak kullanılan Trolox ile benzer aktiviteye sahiptirler ($p < 0.005$). Literatürde, klorojenik asit ve türevlerinin, özellikle DPPH radikal giderme aktivitesi gösterdiği birçok çalışmada gösterilmiştir (Sato vd., 2011). Aromatik bir halka üzerinde komşu iki hidroksil grubu taşıyan klorojenik asit, serbest radikalleri ve reaktif oksijen türlerini (ROS) temizleme yeteneğine sahiptir. Klorojenik asit, antioksidan aktivitesinin yanında antimutajenik, anti-kanserojen aktiviteler de göstermektedir (Sato vd., 2011). Ayrıca, bitki ekstraktlarının da antioksidan aktivitelerinin klorojenik asit varlığı ve miktarı ile pozitif korelasyon içinde olduğu rapor edilmiştir (Lee vd., 2019a). Ek olarak, klorojenik asidin DPPH radikal aktivitesinin rutin ve ferulik asitten daha etkili olduğu ancak kafeik asit ve epikateşin gallattan daha az etkili olduğu bulunmuştur (Chan

vd., 2014). Bu çalışmada bitkiden izole edilen klorojenik asit (1) ve 1,3-diffooyil küinik asit (2) bileşiklerinin DPPH radikali giderme aktivitesi oldukça yüksek bulunmuştur. Bulgular literatür tarafından desteklenmektedir.

Benzer kimyasal yapıya sahip molekül 3 ve 4 DPPH radikali giderme aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. Bu moleküllerin aktivitesi standart olarak kullanılan Troloks ile karşılaştırıldığında oldukça düşük seviyelerdedir. Molekül 3 ve 4'ün DPPH aktivitesi hakkında literatürde herhangi bir bilgiye rastlanmadığından bu bileşiklerin serbest radikallere karşı ilk defa bu çalışmada değerlendirilmiştir. Moleküllerin aktiviteleri düşük olduğundan bitki ham ekstraktının antioksidan aktivitesine katkısı olmadığı düşünülmektedir.

Molekül 5'in doğal kaynaklarda bulunduğu ilk defa bu çalışmada ortaya konulmuş olması nedeniyle molekülün DPPH aktivitesi ile ilgili bilgi literatürde yer almamaktadır. Molekülün kimyasal yapısı incelendiğinde ise serbest radikallerle etkileşerek onları sönmleyecek herhangi bir fonksiyonel bir gruba sahip olmadığı görülmektedir.

İzole edilen moleküllerin ABTS radikali giderme aktiviteleri incelendiğinde; ABTS radikalinin moleküllere karşı daha duyarlı olduğu söylenebilir. Yine standarda göre en yakın aktiviteyi molekül 1 ve 2 sergilemiştir. Molekül 3 ve 4 ise DPPH radikali aktivitesinde olduğu gibi yakın aktiviteler göstermiştir. Ancak DPPH aktivitesinde gözlenen IC₅₀ değerlerine göre ABTS aktivitesinde gözlenen değerler oldukça yüksektir (yaklaşık 6 kat). Buradan hareketle molekül 3 ve 4 için iyi birer katyonik radikal gidericileri oldukları söylenebilir. Molekül 5 ise DPPH aktivitesinde olduğu gibi ABTS radikali giderme aktivitesinde de oldukça düşük aktivite sergilemiştir.

FRAP aktivitesinde ise yine en yüksek aktiviteyi fenolik hidroksiler taşıyan molekül 1 ve 2 göstermiştir (sırasıyla 276.85±1.46 ve 308.67±1.86 mg TE/g madde). Bu testte standart olarak kullanılan askorbik asidin değeri ise 383.66±0.98 mg TE/g madde olarak bulunmuştur. Sonuçlara göre; molekül 2 istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05) olmasa da test edilen moleküller içinde en yüksek FRAP aktivitesine sahiptir. Molekül 1 ve molekül 2'nin yapıları karşılaştırıldığında, molekül 2'nin iki farklı kafeoyil grubu taşıması diğer iki testte de olduğu gibi aktiviteye büyük katkı sağladığı sonucuna varılabilir. Molekül 3, 4 ve 5'in FRAP aktiviteleri de ilk defa bu çalışmada ortaya konulmuştur.

4.3. *Scorzonera aucheriana* Bitki Ekstraktları ve İzole Edilen Moleküllerin Antiproliferatif Aktiviteleri

S. aucheriana bitkisinin ekstraktlarının antiproliferatif aktiviteleri HeLa (rahim ağzı kanseri) , HT29 (kolon kanseri) ve LnCap (prostat kanseri) hücre hatlarına üzerinde XTT yöntemi ile test edilmiş ve elde edilen IC₅₀ (hücrelerin %50 inhibisyonu için gereken konsantrasyon) değerleri Çizelge 4.8’de verilmiştir.

Tablo 4. 8. Bitki ekstraktlarının antiproliferatif etkisi

Ekstraktlar	HeLa IC ₅₀ (µg/mL)	HT29 IC ₅₀ (µg/mL)	LnCap IC ₅₀ (µg/mL)
Diklorometan	114.14	N.D.	>250
Etil asetat	67.56	140.96	>250
Metanol	55.99	171.90	>250
Su	17.16	188.02	>250

Sonuçlara göre bitkinin farklı çözücüler ile elde edilen her bir ekstraktın LnCap hücre hattına karşı 250 µg/mL’den büyük IC₅₀ değeriyle kayda değer bir sitotoksik etkiye sahip olmadığı gözlenmiştir. Bitkinin diklorometan ekstraktı HT29 hücre hattına karşı sitotoksik etkisi belirlenemezken (N.D.), etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının IC₅₀ değerleri sırasıyla 140.96 µg/mL, 171.90 µg/mL ve 188.02 µg/mL olarak belirlenmiştir. HT29 hücre hattına karşı test edilen ekstraktlar içerisinde en yüksek sitotoksik aktiviteyi etil asetat ekstraktının gösterdiği saptanmıştır. Öte yandan, bitki ekstraktları en güçlü sitotoksik aktivitelerini HeLa hücrelerine karşı sergilemişlerdir. Ekstreler arasında en yüksek sitotoksik etkiyi 17.16 µg/mL IC₅₀ değeri ile su ekstresi gösterirken, bunu sırasıyla metanol (IC₅₀: 55.99 µg/mL), etil asetat (IC₅₀: 67,56 µg/mL) ve diklorometan (IC₅₀: 114.14 µg/mL) ekstraktları izlemiştir. Bu veriler test edilen hücre hatları arasında *S. aucheriana* ekstraktlarına karşı en hassas olanın HeLa hücreleri ve en dirençli olanın ise LnCap hücrelerinin olduğu belirlenmiştir.

Literatürde *Scorzonera* bitkisinin farklı türleri çeşitli kanser hücre hatları üzerinde test edilmiş ve antiproliferatif etkileri belirlenmiştir (Lendzion vd., 2021b). *S. mollis* subsp. *szowitzii* bitkisinin metanol ekstraktının HT29 hücre hatları üzerinde güçlü antiproliferatif aktivite sergilediği rapor edilmiştir (Deveci, 2022). Ayrıca, *Scorzonera*

türlerinden elde edilen bazı ekstraktların NF- κ B aktivasyonu ve sitokin salgısının inhibisyonunu ile anti-inflamatuar etkileri de ortaya konulmuştur (Bahadır Acikara vd., 2015). Wang vd. (2009) yapılan çalışmada; *S. mongolica* bitkisinin metanol ekstraktından izole edilen 12 farklı bileşiğin (dehidrokostus lakton, β -sitosterol, kolesterol, 5 α , 8 α -epidioksi-(22E,24R)-ergosta-6,22-dien-3 β -ol, gliserol-1-oktadekanoat, 1-linoleygliserol, stearik asit, palmitik asit, sakaroz, luteolin-5,3'-dimetil eter, diizobütil-O-ftalat ve dibütil-O-ftalat) A-549 hücre hattına karşı antiproliferatif aktiviteleri değerlendirmiştir. Dehidrokostus lakton ve 5 α , 8 α -epidioksi-(22E,24R)-ergosta-6,22-dien-3 β -ol, gliserol-1-oktadekanoat, 1-linoleygliserol bileşiklerinin 50 μ g/mL konsantrasyonda hücre büyümesinin %66,8 ve %69,8 oranında inhibe ettiği rapor edilmiştir.

Keser ve Kak tarafından (2020) *Scorzonera semicana* bitkisinden elde edilen su, etanol, metanol ve aseton ekstraktlarının antiradikal ve antimikrobiyal aktivitelerinin yanında antikanser aktiviteleri de değerlendirilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında MCF-7, LnCaP, ve HCT-116 hücre hatları kullanılmış ve su ekstraktı; MCF-7, LnCaP, ve HCT-116 hücre hatlarına karşı sırasıyla 18.56, 58.37 ve 48.82 μ g/mL, etanol ekstraktı 13.86, 16.61 ve 11.79 μ g/mL, metanol ekstraktı 20.35, 7.97 ve 7.82 μ g/mL, aseton ekstraktı ise 7.18, 22.56 ve 25.97 μ g/mL IC₅₀ değerlerine sahip olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlara göre *Scorzonera semicana* bitki ekstrelerinin doza bağlı olarak artan bir antikanser aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir (Keser ve Kak, 2021).

Lenzion vd. (2022) tarafından rapor edilen bir çalışmada ise *Scorzonera hispanica* bitkisinin tohumlarının yağ asitleri ve fenolik profili ile tohumdan farklı çözücülerle elde edilen ekstraktların meme kanseri hücre hatları üzerine sitotoksikite çalışmaları yapılmıştır. Bitki tohumlarının özellikle metanol, dietil eter ve kloroform ekstraktlarının ve bunlardan elde edilen fraksiyonların MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarına karşı sitotoksik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. En yüksek aktivite ise, metanol ekstraktının seperatif kolondan elüe edilmesi ile elde edilen, yağ asitleri ve 3,4-dimetoksisinnamat açısından zengin fraksiyonda gözlenmiştir (IC₅₀: MCF-7 için 399,18 μ g/mL, MDA-MB-231 için 781,26 μ g/mL). Ayrıca bu fraksiyonun MCF-7 hücrelerinde %52,4 oranında apoptozu indüklediği de gözlemlendi. Bunun yanı sıra aynı ekstrakttan elde edilen diğer fraksiyonların ise 1 mg/mL'ye kadar konsantrasyonlarda kanserli veya normal hücre

hatlarına karşı toksik olmadığı görülmüştür. Yazarlar elde ettikleri bulgular ışığında *S. hispanica* tohumlarının, meme kanserinin tamamlayıcı tedavisi için biyoaktif bileşik kaynağı olarak geniş bir potansiyel kullanım yelpazesi sergilediğini gösterdiğini bildirmişlerdir.

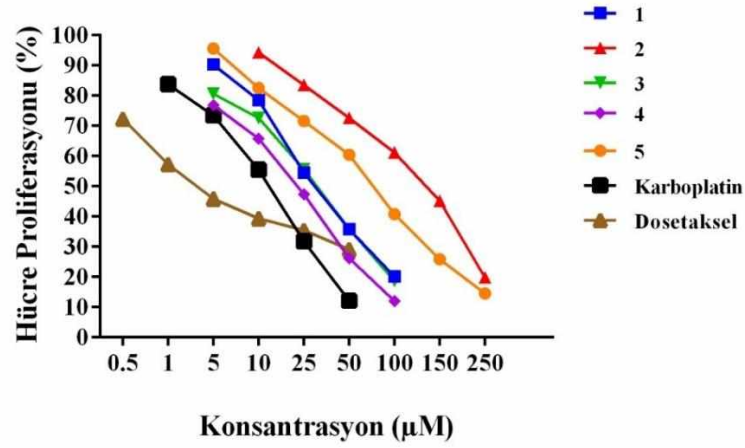
Wu ve arkadaşları, *Scorzonera divaricata* 'nın toprak üstü kısımlarından izole edilen beş bileşiği, kanser hücre hatlarından (HepG2, HeLa ve K562) karşı potansiyel aktiviteleri açısından değerlendirmiştir. İzole edilen bileşiklerden sulfoskorzonin E'nin IC₅₀ değerleri HepG2 için 4,21 µg/mL (10,59 µM), HeLa için 8,15 µg/mL (20,5 µM) ve K562 hücre hattı için 6,53 µg/mL (16,43 µM) olduğu bulunmuştur (Wu vd., 2017).

Yapılan başka bir çalışmada; *Scozonera judaica* bitkisinin kök ekstraktlarından dokuz yeni fenolik bileşik ve bilinen dokuz fenolik türevi izole etmişlerdir. Yeni elde edilen bileşikler, insan lenfosit T hücrelerinin yanı sıra MCF-7 ve HeLa hücre hatlarına karşı sitotoksik aktiviteleri açısından test değerlendirilmiştir. Bitkiden elde edilen bu bileşiklerin 100 µM'nin altındaki konsantrasyonlarda sitotoksik aktivite sergilemediği belirlenmiştir (Bader vd., 2011).

Bu bulgular, *Scorzonera* türlerinden elde edilen ekstraktların kanser hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivite potansiyeli olduğunu desteklemektedir. Bulguların çoğu mevcut çalışma ile paralellik göstermektedir. Sonuç olarak, *S. aucherina* su ve metanol ekstraktlarının HeLa hücre hattı üzerindeki antiproliferatif aktivitesi, diğer bitki kaynaklarından elde edilen ekstrakt ve doğal bileşiklerin literatürde özetlenen antiproliferatif etkileri ile desteklenmektedir.

S.aucheriana ekstresinden izole edilen bileşiklerin (1-5) ve standart kemoterapötik ajanlar (karboplatin, dosetaksel ve mitoksantron)'ın ayrı ayrı A-549 akciğer kanser hücre hattı üzerinde 24 saat inkübasyonları sonucunda 1 nolu bileşiğin 5 ile 100 µM aralığında, 2 nolu bileşiğin 10 ile 250 µM aralığında, 3 nolu bileşiğin 5 ile 100 µM aralığında, 4 nolu bileşiğin 5 ile 100 µM aralığında, 5 nolu bileşiğin 5 ile 250 µM aralığında, kemoterapötik ilaçlardan dosetaksel'in 0,5 ile 50 µM aralığında ve karboplatin'in 1 ile 50 µM aralığında kanser hücrelerinin çoğalmasını doz bağımlı olarak engellediği gözlemlendi (Şekil 4.35).

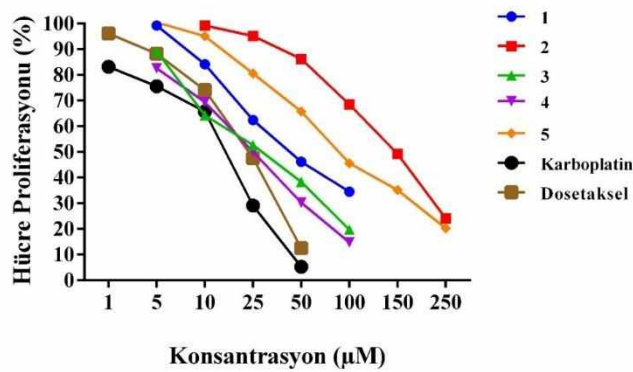
A549



Şekil 4. 35. A549 akciğer kanseri hücre hattı üzerine sekonder metabolitler (1-5) ve standart kemoterapötik ilaçların (karboplatin ve dosetaksel) doz-bağımlı antiproliferatif aktiviteleri.

Benzer şekilde MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerinde sekonder metabolitlerin (1-5) ve standart kemoterapötik ajanlar (karboplatin ve dosetaksel)'in ayrı ayrı 24 saat süreyle inkübasyonları neticesinde 1 nolu bileşiğin 5 ile 100 µM aralığında, 2 nolu bileşiğin 10 ile 250 µM aralığında, 3 nolu bileşiğin 5 ile 100 µM aralığında, 4 nolu bileşiğin 5 ile 100 µM aralığında, 5 nolu bileşiğin 5 ile 250 µM aralığında, kemoterapötik ilaçlardan dosetaksel'in 0,5 ile 50 µM aralığında ve karboplatin'in 1 ile 50 µM aralığında kanser hücrelerinin çoğalmasını doz bağımlı olarak engellediği gözlemlendi (Şekil 4.36).

MCF-7



Şekil 4. 36. MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerine sekonder metabolitler (1-5) ve standart kemoterapötik ilaçlar (karboplatin ve dosetaksel)'in doz-bağımlı antiproliferatif aktiviteleri.

Bitki ekstraktından izole edilen bileşiklerin (1-5) ve standart kemoterapötik ilaçların (karboplatin ve dosetaksel) A-549 ve MCF-7 kanser hücre hatları üzerindeki 24 saat inkübasyonları neticesinde elde edilen IC₅₀ değerleri (hücre popülasyonunu %50 inhibe eden konsantrasyon) Çizelge 4.7’de gösterilmiştir.

A-549 kanser hücreleri üzerinde test edilen sekonder metabolitlerin IC₅₀ değerleri göz önüne alındığında en yüksek anti-proliferatif aktiviteyi en düşük IC₅₀ değerine (32,08 µM) sahip 4 numaralı bileşik gösterirken bunu sırasıyla 3 (IC₅₀: 41,91 µM), 1 (IC₅₀: 45,25 µM), 5 (IC₅₀: 84,85 µM) ve 2 (IC₅₀: 130,45 µM) nolu bileşikler takip etmiştir. Aynı kanser hücre hattı üzerinde test edilen kemoterapötik ilaçlardan karboplatin IC₅₀ değeri 19,05 µM ve dosetaksel’in de IC₅₀ değeri 8,32 µM olarak belirlenmiştir. Özetle, A-549 hücrelerine karşı test edilen örneklerin antiproliferatif güç sıralaması şu şekildedir; **Dosetaksel > Karboplatin > 4 > 3 > 1 > 5 > 2.**

Benzer şekilde MCF-7 hücre hattı üzerinde test edilen sekonder metabolitlerin IC₅₀ değerleri göz önüne alındığında en yüksek anti-proliferatif aktiviteyi en düşük IC₅₀ değerine (37,27 µM) sahip 4 numaralı bileşik gösterirken bunu sırasıyla 3 (IC₅₀: 45,02 µM), 1 (IC₅₀: 58,30 µM), 5 (IC₅₀: 74,07 µM) ve 2 (IC₅₀: 149,60 µM) nolu bileşikler takip etmiştir. Aynı kanser hücre hattı üzerinde test edilen kemoterapötik ilaçlardan karboplatin IC₅₀ değeri 16,25 µM ve dosetaksel’in IC₅₀ değeri 12,29 µM olarak belirlenmiştir. Özetle, MCF-7 hücrelerine karşı test edilen örneklerin antiproliferatif güç sıralaması şu şekildedir; **Dosetaksel > Karboplatin > 4 > 3 > 1 > 5 > 2.**

Tablo 4. 9. Sekonder metabolitler (1-5) ve standart kemoterapötik ilaçların (karboplatin ve dosetaksel) A549 ve MCF-7 kanser hücre hatları üzerine IC₅₀ (µM) değerleri

Sekonder metabolit/ Standart ilaçlar	A-549	MCF-7
1	45,25±0,85	58,30±2,15
2	130,45±2,24	149,60±3,44
3	41,91±1,52	45,02±1,70
4	32,08±1,40	37,27±1,94
5	74,07±1,64	84,85±2,40
Karboplatin	19,05±0,56	16,25±0,96
Dosetaksel	8,32±0,45	12,29±0,70

Kafeoyil künik asit türevleri olan **1** ve **2** hakkında literatürde farklı hücre hatlarına kar  şı antiproliferatif aktivitelerini değerlendiren çalışmalar mevcuttur. Örneğin; *Elephantopus mollis* bitkisinden izole edile 3,4-dikaffeyoil künik asit bileşiği Caov-3, T47-D ve NCI-H23 hücre hatlarına kar  şı sırasıyla 89.38, 49.14 3.26   g/ml EC₅₀ değerleriyle ılımlı bir antiproliferatif etki göstermiştir. Aynı çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan vinkristin sülfat bileşiğinin ise aynı hücre hatlarında EC₅₀ değerleri 0.0019, 0.0470 ve 0.0015   g/ml olarak bulunmuştur (Ooi vd., 2011).

Bir seri kafeoyil künik asit türevleri ve klorojenik 26-L5, HT-1080, B16-BL6 ve A549 hücre hatlarına kar  şı antiproliferasyon etkisinin incelendiği bir çalışmada; iki ve üç kafeik asit grubu taşıyan künik asit esterlerinin klorojenik asitten daha yüksek etki gösterdiği rapor edilmiştir (Nagaoka vd., 2001). Çalışmada; klorojenik asidin 26-L5 hücre hattına kar  şı aktivitesi 149   M olarak bulunurken diğer kafeoyil künik asit türevlerinin aktiviteleri ise 29.4 ve 76.3   M aralığında olduğu rapor edilmiştir. Benzer şekilde HT-1080, B16-BL6 ve A549 hücre hatlarına kar  şı klorojenik asit >280   M IC₅₀ değerine sahipken diğer kafeoyil künik asit türevlerinin 38.3-190   M aralığında IC₅₀ değerine sahip olduğu bulunmuştur. Bu deneysel verilere göre klorojenik asit ve diğer türevlerinin özellikle 26-L5 hücre hatlarına kar  şı seçici bir aktivite gösterdiğini vurgulamışlardır.

Murad vd. (2015) tarafından gerçekleştirilen ve kafeik asit ile 5-kafeoyil künik asidin MCF-7 hücre hattına kar  şı hücre canlılığının değerlendirildiği çalışmada; MCF-7 hücreleri 1.25 mM, 2.5 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM ve 80 mM konsantrasyonunda 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca kafeik asit ile 5-kafeoyil künik asidin ile inkübe edilmiş ve hücre canlılığı MTT testi ile takip edilmiştir. 5-kafeoyil künik uygulamadan sonraki 72 saat içinde hücresel büyüme profilini değiştirmediği ancak 96 saatte, 2.5 mM ile 80 mM arası konsantrasyonlara, hücre canlılığı üzerinde ortalama %26 oranında inhibe ettiği görülmüştür. Kafeik asitin ise 48 saat sonra 1.25 mM ile 20 mM konsantrasyonlar arasında HT-29 hücrelerinin ortalama %25.7, 40-80 mM aralığında ise yaklaşık %41 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir (Murad vd., 2015). Yapılan diğer çalışmalar, klorojenik asit ve türevlerinin yanı sıra 1,3-dikaffeyoil künik asidin kanser hücrelerine kar  şı g    li antiproliferatif özelliklere sahip olduğunu doğrulmaktadır (Filip vd., 2008; Kim ve Lee, 2005). Bu bilgiler çalışmamızı desteklemektedir.

Literatürde bazı izokumarin ve türevlerinin antiproliferatif aktiviteleri araştırılmış ve farklı tümör hücrelerinde hücre büyümesinin inhibe edilmesinde umut verici sonuçlar gösterilmiştir. Örneğin; Guimarães vd., (2016) bir seri 3,4-dihidroizokumarinleri sentezlemişler ve bunların çeşitli tümör hücreleri U251, MCF-7, NCI-ADR/RES, 786-0, NCI H460, PC-3 ve HT29 ve HaCaT hücre hatlarına karşı antiproliferatif aktivitelerini incelemişlerdir. Çalışmada elde edilen sonuçlar ise pozitif kontrol olarak doksorubisin kullanılmış ve sonuçlar hücre büyümesinde %50 inhibisyon veya sitostatik etki olarak ifade edilen GI₅₀ olarak ifade edilmiştir. Çalışmada test edilen bütün 3,4-dihidroizokumarin türevleri çalışılan hücre hatları üzerinde hücre büyümesini bir dereceye kadar inhibe ettiği ve bazı bileşiklerin doza bağımlı hücre proliferasyonunun inhibe ettiği rapor edilmiştir. Çalışmada dikkati çeken nokta ise moleküllerdeki C-3 ve C-4 arasındaki tekli bağ taşıyan türevlerin diğerlerine göre daha yüksek aktivite göstermesidir. Çalışmada C3-C4 tekli bağ içeren türevlerinin MCF-7 hücre hattına karşı GI₅₀ değerleri 6.0-45.7 µM aralığında iken C3-C4 arasında çiftli bağ içerenlerin ise aynı hücre hattına karşı aktivitesi GI₅₀ değerleri 18.6-80.8 µM aralığında bulunmuştur. Ayrıca izokumarin türevlerinin kanser hücre hatları ile etkileşimi moleküler doking teknikleri ile incelenmiş ve farklı hücre hatlarına karşı farklı farmakokinetik etkileşimler gösterdiği rapor edilmiştir. Özellikle, 3-arilizokumarin gibi spesifik izokumarin türevlerinin, potansiyel antikanser aktivitesinden dolayı, izokumarin bazlı doğal ürünlerin antikanser ajanı adayları olarak araştırılması için daha ileri çalışmalar gerekmektedir (Guimarães vd., 2016).

Higgins vd. (2009) yaptıkları çalışmada; farklı hidrokarbon zincir uzunluğuna ve doymamışlık derecesine sahip yağ asitleri, alkoller veya aminlerle konjuge edilmiş bir dizi dihidroizokumarin analogunun sentezlenmiş ve bu bileşiklerin, insan meme kanseri (MCF-7 ve MDA-MB-468) ve melanom hücrelerine (SK-MEL-28 ve Malme-3M) karşı antiproliferatif aktiviteleri MTT testi ile değerlendirilmiştir. γ-linolenil alkol (18:3 n-6) ile konjuge edilmiş iki bileşikten biri olan 4-hidroksi-3-oks-1,3-dihidro-izobenzofuran-5-karboksilik asit oktadeka-6,9,12-trienil ester, bir dizi hücre hattı üzerinde önemli antiproliferatif aktivite göstermiştir (IC₅₀ 4.2-23.9 µM). Sonuç olarak, bu çalışmalar, γ-linolenik asit yağ asidi ile dihidroizokumarin türevi olan kigelin arasında kanser hücre hatlarına karşı antiproliferatif aktivitede sinerjik bir etkileşimin gösterilmiştir. GLA yağ asidinin, doğal ürünlerden tespit edilen bir dihidroizokumarin olan kigelin ile sinerji

içinde hareket edebildiğini ve bu tür bileşiklerin insan melanom ve meme kanseri hücrelerine karşı antiproliferatif aktivitesini artırabildiğini gösterilmiştir (Higgins vd., 2009).



5. SONUÇ

Bu çalışmada, ülkemize endemik bir bitki türü olan *Scorzonera aucheriana* bitkisinin fitokimyasal bileşimi ve biyolojik aktiviteleri kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Bitkinin hekzan, diklorometan, metanol ve su ekstraktları antioksidan ve antiproliferatif özellikleri açısından sistematik olarak değerlendirildi. Özellikle, metanol ekstraktı güçlü bir antioksidan aktivite sergilerken, su ekstraktı orta derecede antioksidan potansiyel gösterdi. Diğer ekstraktlar (hekzan, diklorometan ve etil asetat) kayda değer bir antioksidan aktivite göstermedi. Metanol ve su ekstraktları özellikle HeLa ve HT29 hücre hatlarına antiproliferatif etkilere sahip iken LnCap hücre hattına karşı önemli bir aktivite sergilemedi.

Ayrıca, bitkinin metanol ekstraktına odaklanan fitokimyasal analizi, bilinen üç (1,3-dikafeoilkinik asit, klorojenik asit scorzopigmaekozit) ve iki yeni (scorzopigmaekozit A, aucherianoside) molekül dâhil olmak üzere beş bileşiğin izolasyonu ile sonuçlandı. Bu bileşiklerin yapıları spektroskopik yöntemlerle aydınlatıldı. İzole edilen bileşiklerin incelenmesi, 1,3-dikafeoilkinik asit ve klorojenik asidin, daha zayıf antioksidan özellikler sergileyen yeni bileşiklerin aksine, güçlü antioksidan aktivite sergilediğini ortaya gösterdi. Antiproliferatif aktiviteler açısından, scorzopigmaekozit A ve aucherianosit kayda değer etkinliğe sahip bileşikler olarak belirlendi.

Özetle, bu çalışmada yalnızca *S. aucheriana* bitkisinin biyolojik potansiyeline dair değerli bilgiler sağlamakla kalmamış, aynı zamanda farmasötik veya terapötik uygulamaların geliştirilmesinde daha fazla araştırma için ilgi çekici olabilecek scorzopigmaekozit A ve aucherianoside gibi yeni bileşikler de tanımlamıştır. Bulgular, bu endemik bitkinin hem fitokimyasal zenginliği hem de sağlıkla ilgili potansiyel faydaları açısından öneminin altını çizmektedir.

KAYNAKLAR

- Açıkara, Ö. B., Saltan, H. G., Özbek, H., (2012) "Antinociceptive activity of some *Scorzonera* L. species", *Turkish Journal of Medical Sciences*, 42 (5), 861-866.
- Ahmad, A., Biersack, B., Li, Y., Kong, D., Bao, B., Schobert, R., B Padhye, S., H Sarkar, F., (2013) "Targeted regulation of PI3K/Akt/mTOR/NF- κ B signaling by indole compounds and their derivatives: mechanistic details and biological implications for cancer therapy", *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 13 (7), 1002-1013.
- Ahmad, A., Li, Y., Sarkar, F. H., (2016) "The bounty of nature for changing the cancer landscape", *Molecular Nutrition Food Research*, 60 (6), 1251-1263.
- Akkol, E. K., Acıkara, Ö. B., Süntar, I., Ergene, B., Çitoğlu, G. S., (2012) "Ethnopharmacological evaluation of some *Scorzonera* species: In vivo anti-inflammatory and antinociceptive effects", *Journal of Ethnopharmacology*, 140 (2), 261-270.
- Angeloni, C., Vauzour, D., 2019. Natural products and neuroprotection. In: Sciences, I. J. o. M. (Ed.), vol. 20. *MDPI*, p. 5570.
- Asma, S. T., Acaroz, U., Imre, K., Morar, A., Shah, S. R. A., Hussain, S. Z., Arslan-Acaroz, D., Demirbas, H., Hajrulai-Musliu, Z., Istanbulgil, F. R., (2022) "Natural Products/Bioactive Compounds as a Source of Anticancer Drugs", *Cancers*, 14 (24), 6203.
- Bader, A., Tommasi, N. D., Cotugno, R., Braca, A., (2011) " Phenolic compounds from the roots of jordanian viper's grass, *Scorzonera judaica*. ", *Journal of Natural Products*, 1421–1426.
- Bahadır Acıkara, Ö., Hošek, J., Babula, P., Cvačka, J., Budešínský, M., Dračinský, M., Saltan Işcan, G., Kadlecová, D., Ballová, L., Šmejkal, K., (2015) "Turkish *Scorzonera* species extracts attenuate cytokine secretion via inhibition of NF- κ B activation, showing anti-inflammatory effect in vitro", *Molecules*, 21 (1), 43.
- Barrow, R. A., (2016) "Natural Products Version?", *Australian Journal of Chemistry*, 69 (2), 127-128.

- Baytop, T., (1984) Türkiye'de Bitkiler ile tedavi (Geçmişte ve Bugün). ***Istanbul Üniversitesi Basımevi***, İstanbul, 129-132.
- Benabdelaziz, I., Haba, H., Lavaud, C., Benkhaled, M., (2014) "Triterpenoids and Flavonoid from *Scorzonera undulata* ssp. *alexandrina*", ***Internationa Jorنال of Biological and Chemical Science***, 5 1-5.
- Bennett, R. N., Wallsgrove, R. M., (1994) "Secondary metabolites in plant defence mechanisms", ***New Phytologist***, 127 (4), 617-633.
- Blunt, J. W., Carroll, A. R., Copp, B. R., Davis, R. A., Keyzers, R. A., Prinsep, M. R., (2018) "Marine natural products", ***Natural Product Reports***, 35 (1), 8-53.
- Butler, M. S., (2004) "The role of natural product chemistry in drug discovery", ***Journal of Natural Products***, 67 (12), 2141-2153.
- Butler, M. S., Robertson, A. A., Cooper, M. A., (2014) "Natural product and natural product derived drugs in clinical trials", ***Natural Product Reports***, 31 (11), 1612-1661.
- Chan, C.-F., Huang, W.-Y., Guo, H.-Y., Wang, B. R., (2014) "Potent antioxidative and UVB protective effect of water extract of *Eclipta prostrata* L", ***The Scientific World Journal***, 2014 (1), 1-8.
- Chan, C. W., Tsui, S. K., Law, B. M., So, W. K., Tang, F. W., Wong, C.-L., (2016) "The utilization of the immune system in lung cancer treatment: beyond chemotherapy", ***International Journal of Molecular Sciences***, 17 (3), 286.
- Cui, T., Lan, Y., Yu, F., Lin, S., Qiu, J., (2023) "Plumbagin alleviates temporomandibular joint osteoarthritis progression by inhibiting chondrocyte ferroptosis via the MAPK signaling pathways", ***Aging***, 15 (22), 13452.
- Dall'Acqua, S., Ak, G., Sut, S., Zengin, G., Yıldızıtugay, E., Mahomoodally, M. F., Sinan, K. I., Lobine, D., (2020) "Comprehensive bioactivity and chemical characterization of the endemic plant *Scorzonera hieraciifolia* Hayek extracts: A promising source of bioactive compounds", ***Food Research International***, 137 109371.

- Deveci, E., (2022) "LC-ESI-MS/MS-based phytochemicals and cytotoxic, antioxidant, and enzyme inhibitory activities of *Scorzonera mollis* subsp. *szowitzii*: A new reserve of bioactive compounds", ***Journal of Food Processing Preservation***, 46 (4), e16478.
- Erik, İ., Coşkun Çelebi, K., Makbul, S., Yayli, N., (2021a) "New chlorogenic acid derivatives and triterpenoids from *Scorzonera aucheriana*", ***Turkish Journal of Chemistry***, 45 (1), 199-209.
- Erik, İ., Yaylı, N., Coşkunçelebi, K., Makbul, S., Karaoğlu, Ş. A., (2021b) "Three new dihydroisocoumarin glycosides with antimicrobial activities from *Scorzonera aucheriana*", ***Phytochemistry Letters***, 43 45-52.
- Filip, R., Ferraro, G., Manuele, M. G., Anesini, C., (2008) "*Ilex Brasiliensis*: phytochemical composition and mechanism of action against the proliferation of a lymphoma cell line", ***Journal of Food Biochemistry***, 32 (6), 752-765.
- Granica, S., Lohwasser, U., Jöhrer, K., Zidorn, C., (2015) "Qualitative and quantitative analyses of secondary metabolites in aerial and subaerial of *Scorzonera hispanica* L. (black salsify)", ***Food Chemistry***, 173 321-331.
- Guimarães, K. G., de Freitas, R. P., Ruiz, A. L., Fiorito, G. F., de Carvalho, J. E., da Cunha, E. F., Ramalho, T. C., Alves, R. B., (2016) "Synthesis, antiproliferative activities, and computational evaluation of novel isocoumarin and 3, 4-dihydroisocoumarin derivatives", ***European Journal of Medicinal Chemistry***, 111 103-113.
- Gulnaz, A., Savitha, G., (2013) "Phytochemical evaluation of leaf and stem extracts of siddha medicinal plant: *Sida cordata*", ***Journal of Evolution of Medical Dental Sciences***, 2 (15), 2514-2522.
- Harnly, J., (2016) "Importance of accurate measurements in nutrition research: dietary flavonoids as a case study", ***Advances in Nutrition***, 7 (2), 375-382.
- Higgins, C. A., Delbederi, Z., McGarel, K., Mills, T., McGrath, O., Feutren-Burton, S., Watters, W., Armstrong, P., Johnston, P. G., Waugh, D., (2009) "Synthesis and in vitro and in vivo evaluation of a series of dihydroisocoumarin derivatives conjugated with fatty acids, alcohols, and amines as potential anticancer agents", ***Bioconjugate chemistry***, 20 (9), 1737-1751.

- Jacobo-Velázquez, D. A., Cisneros-Zevallos, L., (2020) "Bioactive phenolics and polyphenols: current advances and future trends", *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (17), 6142.
- Jiang, T.-F., Wang, Y.-H., Lv, Z.-H., Yue, M.-E., (2007) "Determination of kava lactones and flavonoid glycoside in *Scorzonera austriaca* by capillary zone electrophoresis", *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, 43 (3), 854-858.
- Kandemir, A., Türkoğlu, H. İ., Yıldız, F., (2022) "Erzincan (Türkiye) Florasına Dair Bazı Gözlemler ve Öneriler", *Bağbahçe Bilim Dergisi*, 9 (1), 34-63.
- Keser, S., Kak, O., (2021) "In vitro antimicrobial, antiradical, anticancer evaluation, and phytochemical contents of endemic *Scorzonera semicana* DC", *Journal of Food Processing Preservation*, 45 (11), e15971.
- Khobrakova, V., Nikolaev, S., Tolstikhina, V., Semenov, A., (2003) "Immunomodulating Properties of Lignan Glucoside from Cultivated Cells of *Scorzonera Hispanica* L", *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 37 (7), 345-346.
- Kim, H. J., Lee, Y. S., (2005) "Identification of new dicaffeoylquinic acids from *Chrysanthemum morifolium* and their antioxidant activities", *Planta Medica*, 71 (09), 871-876.
- Kumar, M., Singh, S. K., Singh, P. P., Singh, V. K., Rai, A. C., Srivastava, A. K., Shukla, L., Kesawat, M. S., Kumar Jaiswal, A., Chung, S.-M., (2021) "Potential anti-mycobacterium tuberculosis activity of plant secondary metabolites: insight with molecular docking interactions", *Antioxidants*, 10 (12), 1990.
- Lahlou, M., (2013) "The success of natural products in drug discovery", *Pharmacology & Pharmacy*, 4 (03), 17-31.
- Lee, J., Park, G., Chang, Y. H., (2019a) "Nutraceuticals and antioxidant properties of *Lonicera japonica* Thunb. as affected by heating time", *International Journal of Food Properties*, 22 (1), 630-645.
- Lee, J. M., Minasian, L., Kohn, E. C., (2019b) "New strategies in ovarian cancer treatment", *Cancer Science*, 125 4623-4629.

- Lendzion, K., Gornowicz, A., Bielawski, K., Bielawska, A., (2021a) "Phytochemical composition and biological activities of Scorzonera species", ***International Journal of Molecular Sciences***, 22 (10), 5128.
- Lendzion, K., Gornowicz, A., Bielawski, K., Bielawska, A., (2021b) "Phytochemical composition and biological activities of Scorzonera species", ***International Journal of Molecular Sciences***, 22 (10), 5128.
- Meng, X.-H., Yang, Y.-J., Gong, Y., Zhu, Y., (2020) "Chemical constituents of the roots of *Scorzonera divaricata* and their chemotaxonomic significance", ***Biochemical Systematics and Ecology***, 93 104135.
- Milella, L., Bader, A., De Tommasi, N., Russo, D., Braca, A., (2014) "Antioxidant and free radical-scavenging activity of constituents from two *Scorzonera* species", ***Food Chemistry***, 160 298-304.
- Mohammed, F. S., Günal, S., Şabik, A. E., Akgül, H., Sevindik, M., (2020) "Antioxidant and Antimicrobial activity of *Scorzonera papposa* collected from Iraq and Turkey", ***Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi***, 23 (5), 1114-1118.
- Murad, L. D., Soares, N. d. C. P., Brand, C., Monteiro, M. C., Teodoro, A. J., (2015) "Effects of caffeic and 5-caffeoylquinic acids on cell viability and cellular uptake in human colon adenocarcinoma cells", ***Nutrition and Cancer***, 67 (3), 532-542.
- Nagaoka, T., BANskoTA, A. H., Xiong, Q., Tezuka, Y., Kadota, S., (2001) "Synthesis and antihepatotoxic and antiproliferative activities of di- and tri-O-caffeoylquinic acid derivatives", ***Journal of Traditional Medicines***, 18 (5), 183-190.
- Nebieridze, V., Skhirtladze, A., Kemertelidze, E., Ganzera, M., (2017) "New flavonoid glycosides from the leaves of *Tribulus terrestris*", ***Natural Product Communications***, 12 (7), 1934578X1701200714.
- Ooi, K. L., Muhammad, T. S. T., Tan, M. L., Sulaiman, S. F., (2011) "Cytotoxic, apoptotic and anti- α -glucosidase activities of 3, 4-di-O-caffeoyl quinic acid, an antioxidant isolated from the polyphenolic-rich extract of *Elephantopus mollis* Kunth", ***Journal of Ethnopharmacology***, 135 (3), 685-695.

- Öksüz, S., Gören, N., Ulubelen, A., (1990) "Terpenoids from *Scorzonera tomentosa*", ***Fitoterapia***, 61 (1), 92-93.
- Padhye, S., Dandawate, P., Yusufi, M., Ahmad, A., Sarkar, F. H., (2012) "Perspectives on medicinal properties of plumbagin and its analogs", ***Medicinal Research Reviews***, 32 (6), 1131-1158.
- Paraschos, S., Magiatis, P., Kalpoutzakis, E., Harvala, C., Skaltsounis, A.-L., (2001) "Three New Dihydroisocoumarins from the Greek Endemic Species *Scorzonera cretica*", ***Journal of Natural Products***, 64 (12), 1585-1587.
- Ren, M.-Y., Yu, Q.-T., Shi, C.-Y., Luo, J.-B., (2017) "Anticancer activities of C18-, C19-, C20-, and bis-diterpenoid alkaloids derived from genus *Aconitum*", ***Molecules***, 22 (2), 267.
- Roy, A., Khan, A., Ahmad, I., Alghamdi, S., Rajab, B. S., Babalghith, A. O., Alshahrani, M. Y., Islam, S., Islam, M. R., (2022) "Flavonoids a bioactive compound from medicinal plants and its therapeutic applications", ***BioMed Research International***, 2022.
- Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Sugawara, M., Iseki, K., (2011) "In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid", ***International Journal of Pharmaceutics***, 403 (1-2), 136-138.
- Savcı, G., İlçim, A., Karahan, F., (2018) "Hatay’da Yayılış Gösteren Bazı Geranium L.(Geraniaceae) Türlerinin Palinolojisi ve Tohum Mikromorfolojisi", ***Commagene Journal of Biology***, 2 (2), 28-34.
- Sawayama, H., Miyamoto, Y., Ogawa, K., Yoshida, N., Baba, H., (2020) "Investigation of colorectal cancer in accordance with consensus molecular subtype classification", ***Annals of Gastroenterological Surgery***, 4 (5), 528-539.
- Shen, B., (2015) "A new golden age of natural products drug discovery", ***Cell***, 163 (6), 1297-1300.
- Shirsat, R., Kengar, A., Rai, A., (2021) "HPTLC Profile and Screening of Antimicrobial Activity of *Pongamia pinnata pierre*", ***Journal of Pharmaceutical Research International***, 33 (30A), 205-215.

- Son, G. M., Park, S. B., Kim, T. U., Park, B.-S., Lee, I. Y., Na, J.-Y., Shin, D. H., Oh, S. B., Cho, S. H., Kim, H. S., (2022) "Multidisciplinary Treatment Strategy for Early Colon Cancer: A Review-An English Version", ***Journal of the Anus, Rectum Colon***, 6 (4), 203-212.
- Srinivasan, N., (2022) "Polyphenolic compounds - a promising leads for antiviral therapy", ***Pharmacophore***, 13 (1), 36-47.
- Sutar, I., Bahadır Acikara, O., Saltan Citoglu, G., Keles, H., Ergene, B., Kupeli Akkol, E., (2012) "In vivo and in vitro evaluation of the therapeutic potential of some Turkish Scorzonera species as wound healing agent", ***Current pharmaceutical design***, 18 (10), 1421-1433.
- Şahin, H., Sarı, A., Özsoy, N., Özbek Çelik, B., Koyuncu, O., (2020) "Two new phenolic compounds and some biological activities of Scorzonera pygmaea Sibth. & Sm. subaerial parts", ***Natural Product Research***, 34 (5), 621-628.
- Tsevegsuren, N., Edrada, R., Lin, W., Ebel, R., Torre, C., Ortlepp, S., Wray, V., Proksch, P., (2007) "Biologically active natural products from Mongolian medicinal plants Scorzonera divaricata and Scorzonera pseudodivaricata", ***Journal of Natural Products***, 70 (6), 962-967.
- Tüfekçi, A. R., Demirtaş, İ., Akşit, H., Arslan, Ş., Kocabıyık, K., Zeybek, S., Ozen, T., Köksal, E., (2024) "Two new compounds from endemic *Centaurea paphlagonica* (Bornm.) Wagenitz and their cytotoxic activities", ***Chemical Biology & Drug Design***, 103 e14409.
- Wang, B., Qiu, P., Li, G., Qu, Y., (2009) "Anti-tumor constituents from Scorzonera mongolica", ***Chinese Journal of Natural Medicines***, 7 (4), 283-286.
- Wu, Q.-X., He, X.-F., Jiang, C.-X., Zhang, W., Shi, Z.-N., Li, H.-F., Zhu, Y., (2017) "Two novel bioactive sulfated guaiane sesquiterpenoid salt alkaloids from the aerial parts of Scorzonera divaricata.", ***Fitoterapia***, 113-119.
- Xie, Y., Guo, Q.-S., Wang, G.-S., (2016) "Flavonoid glycosides and their derivatives from the herbs of Scorzonera austriaca Wild", ***Molecules***, 21 (6), 803.

- Xue, Y., Zhang, Y., Cheng, D., Daddy, S., He, Q., (2014) "Genetically engineering *Synechocystis* sp. pasteur Culture Collection 6803 for the sustainable production of the plant secondary metabolite p-coumaric acid", ***Proceedings of the National Academy of Sciences***, 111 (26), 9449-9454.
- Yang, D., Du, X., Yang, Z., Liang, Z., Guo, Z., Liu, Y., (2014) "Transcriptomics, proteomics, and metabolomics to reveal mechanisms underlying plant secondary metabolism", ***Engineering in Life Sciences***, 14 (5), 456-466.
- Yang, Y., Jiang, L., Wang, S., Chen, H., Yi, M., Wu, Y., Li, Z., Fang, X., (2022) "A comprehensive pan-cancer analysis on the immunological role and prognostic value of TYMP in human cancers", ***Translational Cancer Research***, 11 (9), 3187.
- Zidorn, C., Spitaler, R., Ellmerer-Müller, E.-P., Perry, N. B., Gerhäuser, C., Stuppner, H., (2002) "Structure of tyrollobibenzyl D and biological activity of tyrollobibenzyls from *Scorzonera humilis*", ***Zeitschrift für Naturforschung C***, 57 (7-8), 614-619.