

T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Verbascum leiocarpum BİTKİSİNDEN İZOLE EDİLEN
SEKONDER METABOLİTLERİN ANTİPROLİFERATİF,
ANTİDİYABETİK VE ANTİOKSİDAN POTANSİYELLERİNİN
İNCELENMESİ

Samed ŞİMŞEK

Danışman: Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL

KİMYA
ANABİLİM DALI

ERZİNCAN
2022
Her Hakkı Saklıdır.

ÖZET

Doktora Tezi

***Verbascum leiocarpum* BİTKİSİNDEN İZOLE EDİLEN SEKONDER METABOLİTLERİN ANTİPROLİFERATİF, ANTİDİYABETİK VE ANTİOKSİDAN POTANSİYELLERİNİN İNCELENMESİ**

Samed ŞİMŞEK

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin AKŞİT

Bu çalışmada, Erzincan'a endemik 4 farklı *Verbascum* türünün (*V. alyssifolium*, *V. leiocarpum*, *V. ozturkii* ve *V. tuna-ekimii*) antiproliferatif, antioksidan ve antidiyabetik aktiviteleri incelendi. Bu dört bitkiden en yüksek antiproliferatif ve antidiyabetik aktiviteye sahip olan *V. leiocarpum* türü, aktiviteden sorumlu moleküllere ulaşmak amacıyla kromatografik (kolon, ince tabaka, flash ve prep HPLC) işlemlere tabi tutuldu. İzolasyon çalışmaları sonucunda bitkinin toprak üstü kısmından; katalpol (S-1), ajugol (S-2), eriodiktiyol (S-3), luteolin (S-4) ve 10-O-sinnameoil-katalpol (S-5), kök kısmından ise apigenin (S-6), 6-deoksi melittozit (S-7), poliumozit (S-8), verbaskozit (S-9), izoverbaskozit (S-10), ferruginozit C (S-11), ferruginozit D (S-12), harpagozit (S-13), *trans*-sinnameik asit (S-14) ve ursolik asit (S-15) molekülleri izole edildi. İzole edilen moleküllerin yapıları spektroskopik (NMR) yöntemlerle aydınlatıldı. Ferruginozit D (S-12) bileşiğinin doğal kaynaklarda bulunduğu ilk defa rapor edildi. İzole edilen bileşiklerin Beas2B (normal akciğer hücresi), RPE (normal retinal hücresi), HSF (normal deri hücresi), A172 (beyin kanseri), C6 (beyin kanseri), HeLa (serviks kanseri), A2780 (over kanseri), SW620 (kolon kanseri) ve HT29 (kolon kanseri) hücre hatlarına karşı antiproliferatif aktivitesi, antioksidan aktivitesi (DPPH, ABTS, FRAP) ve antidiyabetik (α -glukozidaz enzim inhibisyonu) aktivitesi değerlendirildi.

2022, 188 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Antidiyabetik, antioksidan, antiproliferatif, izolasyon, *Verbascum*

ABSTRACT

PhD Thesis

INVESTIGATION OF ANTIPROLIFERATIVE, ANTIDIABETIC AND ANTIOXIDANT POTENTIALS OF SECONDARY METABOLITES ISOLATED FROM THE PLANT *Verbascum leiocarpum*

Samed ŞİMŞEK

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

Supervisor: Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL

Second Supervisor: Assist. Prof. Dr. Hüseyin AKŞİT

In this study, the antiproliferative, antioxidant and antidiabetic activities of 4 different *Verbascum* species (*V. alyssifolium*, *V. leiocarpum*, *V. ozturkii* ve *V. tuna-ekimii*) endemic to Erzincan were investigated. *V. leiocarpum* species, which has the highest antiproliferative and antidiabetic activity among these four plants, was subjected to chromatographic (column, thin layer, flash and prep HPLC) processes in order to isolate compounds responsible for the activities. As a result of the chromatographic studies on the above-ground part of the plant; catalpol (S-1), ajugol (S-2), eriodictyol (S-3), luteolin (S-4) and 10-O-cinnamoyl-catalpol (S-5), on the root part, apigenin (S-6), 6-deoxy melittoside (S-7), poliumoside (S-8), verbascoside (S-9), isoverbascoside (S-10), ferruginoside C (S-11), ferruginoside D (S-12), harpagoside (S-13), *trans*-cinnamic acid (S-14) and ursolic acid (S-15) were isolated. The structures of the isolated molecules were elucidated by spectroscopic techniques (NMR). Ferruginoside D (S-12) was reported for the first time in a natural source. Antiproliferative activity against Beas2B (normal lung cell), RPE (normal retinal cell), HSF (normal skin cell), A172 (brain cancer cell), C6 (brain cancer cell), HeLa (cervical cancer), A2780 (ovarian cancer), SW620 and HT29 (colon cancer) cell lines, antioxidant activity (DPPH, ABTS, FRAP) and antidiabetic (α -glucosidase enzyme inhibition) activity of isolated compounds were evaluated.

2022, 188 Pages

Keywords: Antidiabetic, antioxidant, antiproliferative, isolation, *Verbascum*

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince üzerimde büyük emeği olan, çalışmalarımın her aşamasında gerekli yardım ve desteğini esirgemeyen, yaptığım ve yapacağım çalışmalar için bilgisini ve deneyimlerini paylaşmaktan kaçınmayan, her zaman ve her konuda desteğini gördüğüm değerli bilim insanı danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL'a ve değerli ikinci danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin AKŞİT'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Araştırma materyallerinin toplanılmasında ve teşhisinde verdikleri desteklerden ötürü Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Ali KANDEMİR ve Sayın Arş. Gör. Halil İbrahim TÜRKOĞLU'na,

Antiproliferatif aktivite testlerinde yardımcı olan Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Araştırma Merkezi Müdürü Sayın Doç. Dr. Ahmet ALTAY ve Yozgat Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Ali AYDIN'a,

Enzim aktivite testlerinde yardımcı olan Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Şevki ADEM'e,

NMR analizlerinin yapıldığı Gaziosmanpaşa Üniversitesi ile Çankırı Karatekin Üniversitesi NMR laboratuvarı çalışanlarına,

Tez çalışmalarım için her türlü imkânı sağlayan ve desteklerini esirgemeyen Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürü Sayın Doç. Dr. Kemal Volkan ÖZDOKUR ve kıymetli ekibine,

Hayatımın her aşamasında bana maddi ve manevi yönden her türlü desteği sağlayan, hedeflerime ulaşmamda en büyük destekçilerim olan ve haklarını hiçbir zaman ödeyemeceğim kıymetli aileme sabırlarından dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Samed ŞİMŞEK

Mayıs, 2022

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	8
2.1. Botanik Bilgiler	8
2.1.1. Scrophulariaceae familyası	8
2.1.2. <i>Verbascum</i> L. (Sığırkuyruğu) cinsi	8
2.1.3. <i>Verbascum leiocarpum</i> (Gülbüz sığırkuyruğu).....	10
2.1.4. <i>Verbascum tuna-ekimii</i> (Ekim sığırkuyruğu).....	11
2.1.5. <i>Verbascum alyssifolium</i> (Kuduz kuyruk).....	11
2.1.6. <i>Verbascum ozturkii</i> (Öztürk sığırkuyruğu)	12
2.2. <i>Verbascum</i> L. Türlerinin Kimyasal İçerikleri	14
2.2.1. Flavonoidler	14
2.2.2. Saponinler	17
2.2.3. İridoidler.....	20
2.2.4. Feniletanoidler.....	22
2.3. <i>Verbascum</i> L. Türlerinin Farmakolojik Özellikleri.....	25
2.3.1. <i>Verbascum</i> L. türlerinin tıbbi kullanımı	25
2.3.2. <i>Verbascum</i> L. türleri üzerinde biyoaktivite çalışmaları.....	25
2.3.2.1. Antiviral aktivite.....	25
2.3.2.2. Antimikrobiyal aktivite.....	26
2.3.2.3. Antioksidan aktivite.....	27
2.3.2.4. Antinosiseptif ve antiinflamatuvar aktivite	28
2.3.2.5. Antitümör ve antikanser aktivite	29
2.3.2.6. Gastrik ülser aktivite.....	29
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	30

3.1. Bitkisel Materyaller.....	30
3.2. Bitkisel Materyallerin Kurutulması ve Ekstraksiyon İşlemi	30
3.3. Ham Ekstrelerin ve İzole Edilen Bileşiklerin Biyolojik Aktiviteleri	32
3.3.1. Antioksidan aktivite.....	32
3.3.1.1. DPPH* serbest radikal giderme aktivitesi	32
3.3.1.2. ABTS ^{•+} katyonik radikal giderme aktivitesi.....	33
3.3.1.3. Ferrik iyonlarını (Fe ³⁺) ferröz iyonlarına (Fe ²⁺) indirgeme gücü aktivitesi (FRAP).....	33
3.3.1.4. Toplam fenolik madde miktarı	34
3.3.1.5. Toplam flavonoid miktarı	35
3.3.2. Antidiyabetik aktivite	36
3.3.3. Antiproliferatif aktivite	37
3.3.3.1. Hücre proliferasyon ölçümü ve NCI-60 yaşam parametrelerinin (GI ₅₀ , TGI ve LC ₅₀) belirlenmesi	39
3.3.3.2. Sitotoksikite testi.....	39
3.4. Kromatografik Analizler	40
3.4.1. Kolon kromatografisi.....	40
3.4.1.1. Normal faz silika jel kolon kromatografisi.....	41
3.4.1.2. Sefadeks LH-20 kolon kromatografisi.....	41
3.4.2. İnce tabaka kromatografisi (İTK)	42
3.4.3. Flash kromatografisi	42
3.4.4. Preperatif HPLC	43
3.5. Spektroskopik Analizler	43
3.5.1. Nükleer manyetik rezonans (NMR)	43
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	44
4.1. Ham Ekstrelerin Biyolojik Aktiviteleri	44
4.1.1. DPPH* serbest radikal giderme aktivitesi	44
4.1.2. Ferrik iyonlarını (Fe ³⁺) ferröz iyonlarına (Fe ²⁺) indirgeme gücü aktivitesi (FRAP).....	44
4.1.3. Toplam fenolik miktarı.....	45
4.1.4. Toplam flavonoid miktarı	45
4.1.5. Antidiyabetik aktivite	46
4.1.6. Antiproliferatif aktivite	47

4.2. <i>V. leiocarpum</i> Bitikisi Üzerinde Yapılan İzolasyon Çalışmaları	48
4.3. İzole Edilen Bileşiklerin Yapı Tayini.....	57
4.4. İzole Edilen Bileşiklerin Biyolojik Aktiviteleri	84
4.4.1. Antioksidan aktivite.....	84
4.4.2. Antidiyabetik aktivite	85
4.4.3. Antiproliferatif aktivite.....	87
4.4.3.1. Bileşiklerin NCI-60 metodolojisine göre değerlendirilmesi	87
4.4.3.2. Bileşiklerin sitotoksik aktivitesi	92
5. SONUÇLAR.....	94
KAYNAKLAR	100
EKLER.....	116
Ek-1. Katalpol (Catalpol, S-1) bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	116
Ek-2. Katalpol (Catalpol, S-1) bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	117
Ek-3. Katalpol (Catalpol, S-1) bileşiğinin DEPT spektrumu.....	118
Ek-4. Katalpol (Catalpol, S-1) bileşiğinin HETCOR spektrumu.....	119
Ek-5. Katalpol (Catalpol, S-1) bileşiğinin COSY spektrumu	120
Ek-6. Ajugol (Ajugol, S-2) bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	121
Ek-7. Ajugol (Ajugol, S-2) bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	122
Ek-8. Ajugol (Ajugol, S-2) bileşiğinin DEPT spektrumu	123
Ek-9. Ajugol (Ajugol, S-2) bileşiğinin HETCOR spektrumu	124
Ek-10. Ajugol (Ajugol, S-2) bileşiğinin COSY spektrumu	125
Ek-11. Eriodiktiyol (Eriodictyol, S-3) bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	126
Ek-12. Eriodiktiyol (Eriodictyol, S-3) bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	127
Ek-13. Eriodiktiyol (Eriodictyol, S-3) bileşiğinin DEPT spektrumu.....	128
Ek-14. Eriodiktiyol (Eriodictyol, S-3) bileşiğinin HETCOR spektrumu.....	129
Ek-15. Eriodiktiyol (Eriodictyol, S-3) bileşiğinin COSY spektrumu	130
Ek-16. Luteolin (Luteolin, S-4) bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	131
Ek-17. Luteolin (Luteolin, S-4) bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	132
Ek-18. Luteolin (Luteolin, S-4) bileşiğinin HETCOR spektrumu	133
Ek-19. 10-O-sinamoil-katalpol (10-O-cinnamoyl-catalpol, S-5) bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	134
Ek-20. 10-O-sinamoil-katalpol (10-O-cinnamoyl-catalpol, S-5) bileşiğinin ¹³ C- NMR spektrumu	135

Ek-21. 10- <i>O</i> -sinnamoil-katalpol (10- <i>O</i> -cinnamoyl-catalpol, S-5) bileşığının DEPT spektrumu	136
Ek-22. 10- <i>O</i> -sinnamoil-katalpol (10- <i>O</i> -cinnamoyl-catalpol, S-5) bileşığının HETCOR spektrumu	137
Ek-23. 10- <i>O</i> -sinnamoil-katalpol (10- <i>O</i> -cinnamoyl-catalpol, S-5) bileşığının COSY spektrumu	138
Ek-24. Apigenin (Apigenin, S-6) bileşığının ¹ H-NMR spektrumu.....	139
Ek-25. Apigenin (Apigenin, S-6) bileşığının ¹³ C-NMR spektrumu.....	140
Ek-26. Apigenin (Apigenin, S-6) bileşığının DEPT spektrumu	141
Ek-27. Apigenin (Apigenin, S-6) bileşığının HETCOR spektrumu	142
Ek-28. Apigenin (Apigenin, S-6) bileşığının COSY spektrumu.....	143
Ek-29. 6-Deoksi melittozit (6-Deoxy melittoside, S-7) bileşığının ¹ H-NMR spektrumu	144
Ek-30. 6-Deoksi-melittozit (6-Deoxy-melittoside, S-7) bileşığının ¹³ C-NMR spektrumu	145
Ek-31. 6-Deoksi-melittozit (6-Deoxy-melittoside, S-7) bileşığının DEPT spektrumu	146
Ek-32. 6-Deoksi-melittozit (6-Deoxy-melittoside, S-7) bileşığının HETCOR spektrumu	147
Ek-33. 6-Deoksi-melittozit (6-Deoxy-melittoside, S-7) bileşığının COSY spektrumu....	148
Ek-34. Poliumozit (Poliumoside, S-8) bileşığının ¹ H-NMR spektrumu	149
Ek-35. Poliumozit (Poliumoside, S-8) bileşığının ¹³ C-NMR spektrumu.....	150
Ek-36. Poliumozit (Poliumoside, S-8) bileşığının DEPT spektrumu.....	151
Ek-37. Poliumozit (Poliumoside, S-8) bileşığının HETCOR spektrumu.....	152
Ek-38. Poliumozit (Poliumoside, S-8) bileşığının COSYspektrumu	153
Ek-39. Poliumozit (Poliumoside, S-8) bileşığının HMBC spektrumu.....	154
Ek-40. Verbaskozit (Verbascoside, S-9) bileşığının ¹ H-NMR spektrumu.....	155
Ek-41. Verbaskozit (Verbascoside, S-9) bileşığının ¹³ C-NMR spektrumu.....	156
Ek-42. Verbaskozit (Verbascoside, S-9) bileşığının DEPT spektrumu	157
Ek-43. Verbaskozit (Verbascoside, S-9) bileşığının HETCOR spektrumu	158
Ek-44. Verbaskozit (Verbascoside, S-9) bileşığının COSY spektrumu.....	159
Ek-45. İzoverbaskozit (Izoverbascoside, S-10) bileşığının ¹ H-NMR spektrumu	160

Ek-46. İzoverbaskozit (Izoverbascoside, S-10) bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu ...	161
Ek-47. İzoverbaskozit (Izoverbascoside, S-10) bileşiğinin DEPT spektrumu	162
Ek-48. İzoverbaskozit (Izoverbascoside, S-10) bileşiğinin HETCOR spektrumu ...	163
Ek-49. İzoverbaskozit (Izoverbascoside, S-10) bileşiğinin COSY spektrumu	164
Ek-50. İzoverbaskozit (Izoverbascoside, S-10) bileşiğinin HMBC spektrumu	165
Ek-51. Ferruginozit C (Ferruginoside C, S-11) bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	166
Ek-52. Ferruginozit C (Ferruginoside C, S-11) bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu ...	167
Ek-53. Ferruginozit C (Ferruginoside C, S-11) bileşiğinin DEPT spektrumu	168
Ek-54. Ferruginozit C (Ferruginoside C, S-11) bileşiğinin HETCOR spektrumu ...	169
Ek-55. Ferruginozit C (Ferruginoside C, S-11) bileşiğinin COSY spektrumu	170
Ek-56. Ferruginozit C (Ferruginoside C, S-11) bileşiğinin HMBC spektrumu	171
Ek-57. Ferruginozit D (Ferruginoside D, S-12) bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	172
Ek-58. Ferruginozit D (Ferruginoside D, S-12) bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu ...	173
Ek-59. Ferruginozit D (Ferruginoside D, S-12) bileşiğinin HETCOR spektrumu ..	174
Ek-60. Ferruginozit D (Ferruginoside D, S-12) bileşiğinin COSY spektrumu	175
Ek-61. Ferruginozit D (Ferruginoside D, S-12) bileşiğinin HMBC spektrumu	176
Ek-62. Harpagozit (Harpagosome, S-13) bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	177
Ek-63. Harpagozit (Harpagosome, S-13) bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	178
Ek-64. Harpagozit (Harpagosome, S-13) bileşiğinin DEPT spektrumu	179
Ek-65. Harpagozit (Harpagosome, S-13) bileşiğinin HETCOR spektrumu	180
Ek-66. Harpagozit (Harpagosome, S-13) bileşiğinin COSY spektrumu	181
Ek-67. <i>trans</i> -Sinnamik asit (<i>trans</i> -Cinnamic acid, S-14) bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	182
Ek-68. <i>trans</i> -Sinnamik asit (<i>trans</i> -Cinnamic acid, S-14) bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	183
Ek-69. Ursolik asit (Ursolic acid, S-15) bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	184
Ek-70. Ursolik asit (Ursolic acid, S-15) bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	185
Ek-71. Ursolik asit (Ursolic acid, S-15) bileşiğinin DEPT spektrumu	186
Ek-72. Ursolik asit (Ursolic acid, S-15) bileşiğinin HETCOR spektrumu	187
Ek-73. Ursolik asit (Ursolic acid, S-15) bileşiğinin COSY spektrumu	188

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Hastalıklara bağlı olarak insan ölümlerinin nedenleri	6
Şekil 2.1. <i>Verbascum leiocarpum</i> bitkisinin Türkiye’deki yayılış haritası.....	10
Şekil 2.2. <i>Verbascum leiocarpum</i> bitkisinin habitatındaki genel görünümü	10
Şekil 2.3. <i>Verbascum tuna-ekimii</i> bitkisinin Türkiye’deki yayılış haritası.....	11
Şekil 2.4. <i>Verbascum tuna-ekimii</i> bitkisinin habitatındaki genel görünümü	11
Şekil 2.5. <i>Verbascum alyssifolium</i> bitkisinin Türkiye’deki yayılış haritası.....	12
Şekil 2.6. <i>Verbascum alyssifolium</i> bitkisinin habitatındaki genel görünümü	12
Şekil 2.7. <i>Verbascum ozturkii</i> bitkisinin Türkiye’deki yayılış haritası.....	13
Şekil 2.8. <i>Verbascum ozturkii</i> bitkisinin habitatındaki genel görünümü	13
Şekil 2.9. Flavonoidlerin biyosentezi.....	15
Şekil 3.1. Bitkilerin ön deneme biyolojik aktiviteleri için ekstraksiyonu.....	31
Şekil 3.2. <i>Verbascum leiocarpum</i> bitkisinin ekstraksiyonu	32
Şekil 3.3. DPPH’ radikalının yapısı ve antioksidanlar ile olan kimyasal reaksiyonu	32
Şekil 3.4. Troloks standart eğrisi.....	34
Şekil 3.5. Gallik asit standart eğrisi	35
Şekil 3.6. Kuersetin genel yapısı.....	35
Şekil 3.7. Kuersetin standart eğrisi	36
Şekil 3.8. Tetrazolyumun indirgenmesiyle oluşan renkli formazan türevi	37
Şekil 4.1. Ön ayırım sonucunda elde edilen fraksiyonların genel İTK görünümü.....	49
Şekil 4.2. <i>Verbascum leiocarpum</i> toprak üstü izolasyon prosesi.....	51
Şekil 4.3. Ham ekstrenin ön ayırımında Flash cihazında elde edilen spektrum.....	52
Şekil 4.4. Ham ekstrenin C-18 kolon uygulaması İTK görseli.....	52
Şekil 4.5. <i>Verbascum leiocarpum</i> bitkisinin kök izolasyon prosesi	56
Şekil 4.6. Katalpol (S-1) bileşiğinin kimyasal yapısı.....	56
Şekil 4.7. Ajugol (S-2) bileşiğinin kimyasal yapısı	58
Şekil 4.8. Eriodiktiyol (S-3) bileşiğinin kimyasal yapısı	59
Şekil 4.9. Luteolin (S-4) bileşiğinin kimyasal yapısı.....	60
Şekil 4.10. 10-O-sinamoil-katalpol (S-5) bileşiğinin kimyasal yapısı.....	62
Şekil 4.11. Apigenin (S-6) bileşiğinin kimyasal yapısı	64
Şekil 4.12. 6-deoksi melittozit (S-7) bileşiğinin kimyasal yapısı	65
Şekil 4.13. Poliumozit (S-8) bileşiğinin kimyasal yapısı.....	67
Şekil 4.14. Verbaskozit (S-9) bileşiğinin kimyasal yapısı	70

Şekil 4.15. İzoverbaskozit (S-10) bileşiğinin kimyasal yapısı.....	72
Şekil 4.16. Ferruginozit C (S-11) bileşiğinin kimyasal yapısı.....	74
Şekil 4.17. Ferruginozit D (S-12) bileşiğinin kimyasal yapısı.....	76
Şekil 4.18. Harpagozit (S-13) bileşiğinin kimyasal yapısı.....	80
Şekil 4.19. <i>trans</i> -sinnamik asit (S-14) bileşiğinin kimyasal yapısı.....	82
Şekil 4.20. Ursolik asit (S-15) bileşiğinin kimyasal yapısı.....	83
Şekil 5.1. İzole edilen bileşiklerin kimyasal yapıları	96



TABLÖLER LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1. Kanser neden olan etmenler ve oranları.....	6
Tablo 2.1. Türkiye florasındaki endemik bitki taksonlarının cinslere göre dağılımı.....	9
Tablo 2.2. <i>Verbascum</i> türlerinden izole edilen flavonoidler.....	16
Tablo 2.3. <i>Verbascum</i> türlerinden izole edilen saponinler.....	18
Tablo 2.4. <i>Verbascum</i> türlerinden izole edilen iridoid ve iridoid glukozitleri.....	21
Tablo 2.5. <i>Verbascum</i> türlerinden izole edilen feniletanoid ve glukozitleri.....	23
Tablo 4.1. Bitki ekstraktlarının ve Trolox'un DPPH radikal giderme aktiviteleri	44
Tablo 4.2. Bitki ekstraktlarının FRAP aktiviteleri	45
Tablo 4.3. Bitki ekstraktlarının toplam fenolik miktarları	45
Tablo 4.4. Bitki ekstraktlarının toplam flavonoid miktarları	46
Tablo 4.5. Bitki ekstraktlarının antidiyabetik aktiviteleri	47
Tablo 4.6. Bitki ekstraktlarının MDA-MB-453 (meme kanseri) hücre hattına karşı antiproliferatif aktiviteleri	47
Tablo 4.7. Bitki ekstraktlarının HT-29 (kolon kanseri) hücre hattına karşı antiproliferatif aktiviteleri	48
Tablo 4.8. Bitki ekstraktlarının A549 (akciğer kanseri) hücre hattına karşı antiproliferatif aktiviteleri	48
Tablo 4.9. Ferruginozit D bileşiğinin ¹ H ve ¹³ C-NMR verileri.....	79
Tablo 4.10. Bileşiklerin antioksidan aktivite değerleri	85
Tablo 4.11. Bileşiklerin α -glukozidaz inhibisyon değerleri.....	86
Tablo 4.12. Bileşiklerin normal hücre hatlarına karşı MTT testiyle belirlenen yaşam parametreleri (GI ₅₀ , TGI ve LC ₅₀) ve IC ₅₀ değerleri	89
Tablo 4.13. Bileşiklerin glioma kanser hücre hatlarına karşı MTT testi ile belirlenen yaşam parametreleri (GI ₅₀ , TGI ve LC ₅₀) ve IC ₅₀ değerleri.....	90
Tablo 4.14. Bileşiklerin serviks ve over kanser hücre hatlarına karşı MTT testi ile belirlenen yaşam parametreleri (GI ₅₀ , TGI ve LC ₅₀) ve IC ₅₀ değerleri.....	91
Tablo 4.15. Bileşiklerin kolon kanser hücre hatlarına karşı MTT testi ile belirlenen yaşam parametreleri (GI ₅₀ , TGI ve LC ₅₀) ve IC ₅₀ değerleri.....	92
Tablo 4.16. IC ₅₀ konsantrasyonlarında bileşiklerin % sitotoksik değerleri	93

SİMGELER ve KISALTMALAR

%	Yüzde Değer
<i>Brs</i>	Geniş Singlet
<i>d</i>	Dublet
<i>dd</i>	Dubletin Dubleti
<i>IC₅₀</i>	%50 İnhibisyon Konsantrasyonu
<i>m</i>	Multiplet
<i>S</i>	Standart Sapma
<i>s</i>	Singlet
<i>t</i>	Triplet
δ	Kimyasal Kayma
<i>j</i>	Etkileşme Sabiti
¹³ C-NMR	¹³ C-Nükleer Manyetik Rezonans
1D-NMR	Tek Boyutlu Nükleer Manyetik Rezonans
¹ H-NMR	¹ H-Nükleer Manyetik Rezonans
2D-NMR	İki Boyutlu Nükleer Manyetik Rezonans
CoA	Koenzim A
COSY	Korelasyon Spektroskopisi
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DPPH [•]	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikali
FRAP	Demir (III) İndirgeme Antioksidan Gücü
HMBC	Farklı Çekirdeklerin Çoklu Bağ Korelasyonu
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
Hz	Hertz
IR	İnfrared Spektroskopisi
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
pNPG	<i>p</i> -Nitrofenil- α -D-glukopiranozit
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

İnsanlar, hayatlarını sürdürebilmek için doğadaki bitkilerden, hastalıklara karşı hem koruyucu hem de tedavi edici olarak faydalanmışlardır. İnsanlar önceleri bu durumu içgüdüleriyle, daha sonraki yıllarda ise etraflarındaki biyotik ve abiyotik faktörleri kendi tedavileri için uygulamışlardır. Ancak günümüzde bitkilerin kullanımı içgüdüsel bir yaklaşım olarak değil, bilinçli olarak yapılmaktadır (Yücel ve Tülükoğlu, 2000; Tulukcu ve Sağdıç, 2011). İnsanoğlu bitkileri önce hayatta kalabilmek için besin kaynağı olarak, daha sonra da yaralanmalara ve hastalıklara karşı kullanmışlardır. Bu durum bitkilerin iyileştirici özelliklerinin de olduğunun anlaşılmasını sağlamıştır. İlk yazılı kaynaklar da bitkilerin sağlığı korumak ve tedavi amacı ile yaygın bir şekilde kullanıldığını göstermektedir. Mitolojik bilgiler, bir insan için en değerli ödülün bitkiler olduğunu söylemektedir. İnsan ve bitki türleri arasında kurulan ilişki günümüzde etnobotanik adı verilen bir bilim dalının doğuşuna ve çalışmaların önem kazanmasını sağlamıştır (Koçyiğit, 2005; Kendir ve Güvenç, 2010; Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011).

Dünya üzerinde 750.000 ile 1.000.000 arasında bitki türü olduğu düşünülmekte olup bunların 500.000 kadarı tanımlanmıştır. Modern ve geleneksel tıp kapsamında dünya genelinde 50.000-70.000 civarında bitkinin kullanımı bulunmaktadır (Korkmaz ve Karakurt, 2014). Çoğu ülkenin sağlık alanındaki en temel yapı taşı tıbbi bitkilerdir. Dünya nüfusunun %80'i sağlık ihtiyaçları için geleneksel ilaçları kullanmaktadır (Tiware, 2008). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 91 ülkenin farmakopelerine dayandığı bir araştırmaya göre, yaklaşık 20.000 bitki tıbbi amaçla kullanılmaktadır. Şifalı bitkilerin bu denli önemli olmasının ve talep edilmesinin birden fazla nedeni bulunmaktadır. İnsan vücudunda doğal kaynaklı olmayan ilaçların istenmeyen bazı yan etkileri vardır. Sentetik maddelerin sanayi, tıp ve tarım gibi her alanda kullanılması çevreyi ve insan sağlığını tehdit etmektedir. Bu nedenle kaynağı bilinsin veya bilinmesin birçok hastalık ekosistemde ve canlı organizmada kontrolsüz bir şekilde gelişmektedir. Bu durum insanları canlı organizma üzerindeki olumsuz etkiyi ortadan kaldırmak için geleneksel yöntemleri kullanmaya yöneltmiş ve bitkiler bu geleneksel yöntemlerin ana omurgasını oluşturmuştur. Çok eski dönemlerden itibaren bitkisel kaynaklı ilaçların kullanılıyor olması, yan etkileri hakkında detaylı bilgilere ulaşılmasını sağlamıştır. Ayrıca bitkisel ilaçların birden çok etkisi varken, yapay ilaçların genel

olarak tek tip etkisi bulunmaktadır. Bu durum sentetik ilaçlardan yeterli oranda verim alınmasını da olumsuz yönde etkilemiştir (Ertürk ve Demirbağ, 2003).

Modern bilimlerin gelişmesi ve biyoloji, kimya, farmakoloji, toksikoloji gibi disiplinlerin kombine çalışmasıyla, şifalı bitki olarak kullanılan birçok bitkinin, yapısında bulunan doğal bileşiklerin kimyasal yapıları aydınlatılmakta ve izole edilen bileşiklerin biyolojik aktiviteleri incelenmektedir (Baykal, 1997; Dülger vd., 1999; Tadeğ, 2005). Yapılan araştırmalar sonucunda bitkilerin, ekosistemle olan ilişkisinde, savunma, korunma, çevreye uyum sağlamada, hayatta kalma ve nesillerini devam ettirme gibi olaylarda önemli faydalar sağlayan, sekonder metabolit olarak tanımlanan kimyasal bileşikler içermektedir (Bourgauud vd., 2001). Sekonder metabolitler, çok büyük yapısal çeşitliliğe sahip olmakla birlikte bitkilerde sekonder metabolizma yollarının ara ürünlerinden yolaklarla meydana gelmektedir. Sekonder metabolitlerin izolasyonu, yapılarının belirlenmesi ve çeşitli biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi ile ilgili araştırmalar son 50 yılda ivme kazanmıştır ve bilim camiasında halen popülerliğini korumaktadır. Özellikle bitkilerden izole edilen bazı bileşiklerin çeşitli hastalıklara karşı ilaç formülasyonlarında kullanılıyor olması ve ilaç etken madde arayışlarının tüm hızıyla devam etmesi bu tür çalışmaların önemini göstermektedir. Bugüne kadar bitkilerden yaklaşık 100.000 sekonder metabolit izole edilip, yapıları belirlenmiş olup her yıl yaklaşık olarak 4.000 yeni bileşik keşfedilmektedir (Verpoorte vd., 1999). Bunlar arasında bitkiyi patojenlerden koruyan antifungal, antibakteriyel, antiviral ajanlar, çimlenmeyi önleyici maddeler, doğal yaşamda rekabet gücünü artıran maddeler, zararlı çevresel faktörlerin neden olduğu stresli koşullara karşı direnci artıran maddeler, zararlı hayvanlar ve otlara karşı koruma sağlayan herbisit ve insektisit gibi maddeler ve ayrıca tozlaşma ve tohum dağılımını sağlamak için hayvanların ilgisini çeken metabolitler yer almaktadır (Charwood, 1990). Bugüne kadar birçok sekonder metabolitin kimyasal yapısı ve bunlardan birçoğunun da biyolojik aktiviteleri (antioksidan, antikanser, antibakteriyel, antifungal, insektisidal, enzim inhibitörü vb.) belirlenmiştir.

Avrupa ülkelerinde kalp-damar hastalıkları, soğuk algınlığı, solunum yolu rahatsızlıkları, sindirim sistemi rahatsızlıkları için bitkisel ilaçlar öncelikli olarak kullanılmaktadır (Hartleb ve Seifert, 1995). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) istatistiklerine göre, modern dünyanın en önemli sağlık sorunlarından biri olan ve ölümcül hastalıklar

arasında 3. sırada yer alan diyabet hastalığının tedavisinde kan şekeri düzeyini düzenleyici etkilerinden dolayı bitkisel ilaçlar destek tedavi olarak kullanılmaktadır (IDF, 2014; IDF, 2015). Halk arasında şeker hastalığı olarak bilinen diyabet; insülin hormonunun kısmi veya tamamen eksikliği nedeniyle ortaya çıkan ve kan şekeri düzeylerinin yükselmesiyle meydana gelen kronik bir hastalıktır. Vücutta pek çok sayıda kimyasal bileşik ve hormonun korelasyonu ile kan şekerinin düzenlenmesi sağlanmaktadır. Pankreasın beta hücrelerinden salgılanan insülin, şeker metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynayan en önemli hormondur. Son veriler bize dünyadaki yetişkin nüfusunun yüzde 8,4'ünün diyabetli olduğunu ve mevcut hastaların yüzde 45'inin de bu hastalıktan habersiz yaşadığını göstermektedir (Khuroo vd., 1988; McCutcheon vd., 1995). Dünya genelindeki artışa paralel olarak ülkemizde de diyabet insidansı ve hasta sayısı hızla artmaktadır. Türkiye Diyabet Epidemiyolojisi (TURDEP-2) çalışmasına göre, ülkemizde diyabet insidansı 12 yılda (1998-2010) %90 oranında artarak %7'den %13,7'ye çıkmıştır (Satman vd., 2013). IDF'nin 2014 yılı verilerine göre ise ülkemizde diyabet insidansı %14,7 civarında olduğu belirtilmektedir (IDF, 2014). Dünya sağlık örgütü, Türkiye'de 2000 yılında yaklaşık 3 milyon olan diyabetli hasta sayısının 2030 yılında 6,5 milyona ulaşacağını tahmin etmiş, fakat 2030 için ön görülen bu rakam 2014 yılında aşılmış ve ülkemizdeki diyabetli hasta sayısı 7 milyondan fazla kişiye ulaşmıştır (Satman vd., 2013; IDF, 2014). Dünya çapında önemli bir sağlık sorunu haline gelen diyabet, bilim dünyasında en çok çalışılan konulardan biridir. Tip 1 diyabet tedavisinde insülinin alternatifsiz olması, tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan oral antidiyabetik ilaçların ise karaciğer ve böbreklerde ciddi hasarlara yol açması nedeniyle yeni alternatif ilaç keşif araştırmaları hızlanmış ve bu ilaçların keşfedilmesi için de en önemli kaynak bitkiler olmuştur (Pieroni ve Quave, 2005). Günümüzde hipoglisemi tedavisinde kullanılan yaklaşık 800-1200 bitki bulunmaktadır. Bu bitkilerden flavonoidler, steroidler, bazı alkaloidler, glikanlar, triterpenler ve müsilajlar gibi antidiyabetik aktiviteye sahip bileşikler izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır (Klimek vd., 1992; Robbers ve Tyler, 1999).

Oksidatif stres, diyabet oluşumunda ve diyabetten kaynaklanan bazı doku hasarlarında önemli rol oynamaktadır. Oksidatif stresin oluşması vücutta antioksidan savunma sisteminin yetersizliğinden kaynaklanmaktadır. Antioksidanlar; serbest radikal oluşumunu engelleyen, serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonu önleyen ve serbest radikalleri yakalayıp stabilize etme özelliğine sahip maddelerdir (Elliot, 1999).

Organizmada sürekli reaktif oksijen (ROS) ve azot türlerinin (RNS) üretimi olurken, antioksidan sistem tarafından ise istenilmeyen bu etkiler ortadan kaldırılmaktadır. Bu durum bir denge halinde süreklilik arz etmektedir. Oksidan ve antioksidanlar arasındaki bu dengenin bozulması oksidatif stresin oluşmasına imkan sağlamaktadır (Cross vd., 1987). Oksidatif stres sonucunda proteinlerin, lipidlerin, nükleik asitlerin ve enzimlerin yapı ve işlevleri bozulmaktadır (McCord, 1993). ROS ve RNS'nin başta kanser, diyabet, otoimmün bozukluklar, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar olmak üzere birçok hastalığın oluşmasında büyük rolü bulunmaktadır (Ratnam vd., 2006; Cemeli vd., 2009; Pellegrini vd., 2009). Antioksidanlar ise serbest radikallerin oluşumunu engeller, çoğalan radikalleri temizler ve oluşan hasarları onarır. Antioksidanlar doğal ve sentetik olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadır. Günümüzde sentetik antioksidan olarak, BHT (bütilenmiş hidroksitoluen), PG (propil gallat), BHA (bütilenmiş hidroksianisol) ve TBHQ (t-bütil hidrokinon) kullanılmaktadır. Ancak sentetik antioksidanların çeşitli hastalıklara yol açması, doğal kaynaklardan yeni antioksidan maddelerin bulunmasına yönelik çalışmaların artmasını (Yi vd., 2007; Kil vd., 2009) ve ayrıca doğal kaynaklı antioksidanların daha güvenilir olması, istenmeyen yan etkilerinin de olmaması veya az olması nedeniyle de sentetik antioksidanlara karşı daha fazla tercih edilmesini sağlamıştır (Pellegrini vd., 2009; Tozoğlu, 2011). Doğal antioksidanlar bitkilerin bütün kısımlarında sentezlenmekte ve günümüzde doğal antioksidanlar olarak tokoferol, flavonoid, fenolik asit, vitamin C ve karotenoidler kullanılmaktadır (Madhavi, 1996). Bitki kaynaklı antioksidanlar, singlet ve triplet oksijen söndürücü, serbest radikal giderici, enzim inhibitörleri ve sinerjistler gibi işlevleri yerine getirmektedir (Larson, 1988). Doğal antioksidan bileşikler sebzelerde, meyvelerde, tohumlarda, yapraklarda, çiçeklerde, köklerde ve ağaç kabuklarında bol miktarda mevcuttur (Pratt ve Hudson, 1990). Bu nedenle bol miktarda sebze ve meyve tüketimi, hastalıklara ve kansere yakalanma riskini azalttığı gibi, ölüm oranının da düşmesini katkı sağlamaktadır (Ames vd., 1993).

Canlıların temel yapı taşı olan hücreler bir araya gelerek dokuları, dokular da bir araya gelerek organları meydana getirirler. Sağlıklı hücreler, belirli diziliş ve düzen içinde bir araya gelerek, belirli bir hız ve kontrol altında çoğalmaktadır. Bu durumun yanlış işlemesi, hücrelerin çoğalmasını ve büyümesini kontrol eden mekanizmalarda hatalar meydana gelmesine neden olmaktadır. Canlı vücudundaki hücre gruplarının farklılaşıp aşırı ve kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıyla da kanser oluşmaktadır. Kanser, tarih

boyunca insan ve hayvanlarda sık görülen bir problem olmuştur ve olmaya da devam etmektedir. Kanser hakkında bilinen en eski kayıtlar MÖ 3000 yılına kadar dayanmaktadır.

Günümüzde birçok toplumda kalp ve damar hastalıklarından sonra en fazla ölüme neden olan, hücre ve dokuları etkileyen hastalık kanserdir (Klug ve Cummings, 2002). Kalp ve damar hastalıklarında meydana gelen ölüm oranlarında azalma olurken, buna karşılık kanser hastalığı sonucunda meydana gelen ölümler tüm toplumlarda artmaktadır ve artmaya da devam etmektedir (Ruacan, 2003). Dünya Sağlık Örgütü'nün raporuna göre, 2000 yılında yaklaşık 10 milyon kişinin kanser hastası olduğu, bu rakamın da giderek artacağı ve bunun 2025'te 19 milyon, 2030'da 22 milyon ve 2035'te ise 24 milyon kişinin kanser hastalığına yakalanacağı tahmin edilmektedir. Türkiye'de kanserli hastalar üzerine istatistiki veriler, Sağlık Bakanlığı'na bağlı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Dairesi Başkanlığı'nın 2008 yılına ait olup bu verilere göre kadınlarda meme kanseri ilk sırada, bunu tiroit ve kolorektal kanserler takip etmekte ve 10. sırada ise serviks kanseri bulunmaktadır. Erkeklerde ise en sık karşılaşılan kanser türü akciğer kanseri olup daha sonra ise prostat ve mesane kanserleri gelmektedir (HSGM, 2013). Kanser hastalığının yüksek ölümlere neden olmasının yanında, tedavide kullanılan kemoterapi ve radyoterapinin ciddi yan etkilerinin olması, kanser hastalarının çoğunun alternatif veya tamamlayıcı tedavi metotlarına yönelmelerini sağlamıştır. Doğal kaynakların antikanser ajanlar olarak kullanılma potansiyeli ilk olarak 1950'lerde ABD Ulusal Kanser Enstitüsü'nde (NCI), Dr. Jonathan Hartwell liderliğindeki ekip tarafından belirlenmiştir (Cragg vd., 2011). Bu kurumun, doğal kaynaklı antikanser ajanların keşfinde, tıbbi bitkilerden yeni antikanser ilaçların keşfinde ve antikanser ilaç geliştirilmesinde çok önemli katkıları bulunmaktadır (Shah vd., 2013). Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların büyük bir çoğunluğu ya bitkilerden izole edilen bileşiklerden ya doğal moleküllerin modifikasyonu ya da doğal kökenli bileşiklerin ana yapıları model alınarak elde edilmiştir. Bundan dolayı yeni moleküllerin bulunmasında, antikanser aktiviteye sahip bitkiler üzerinde araştırmaların yapılmasının önemi çok büyüktür (Csapi vd., 2010). Bugün kullanılsa dahi birçok bitki ya da bileşik gelecekte kanser tedavisinde kullanılabilir.

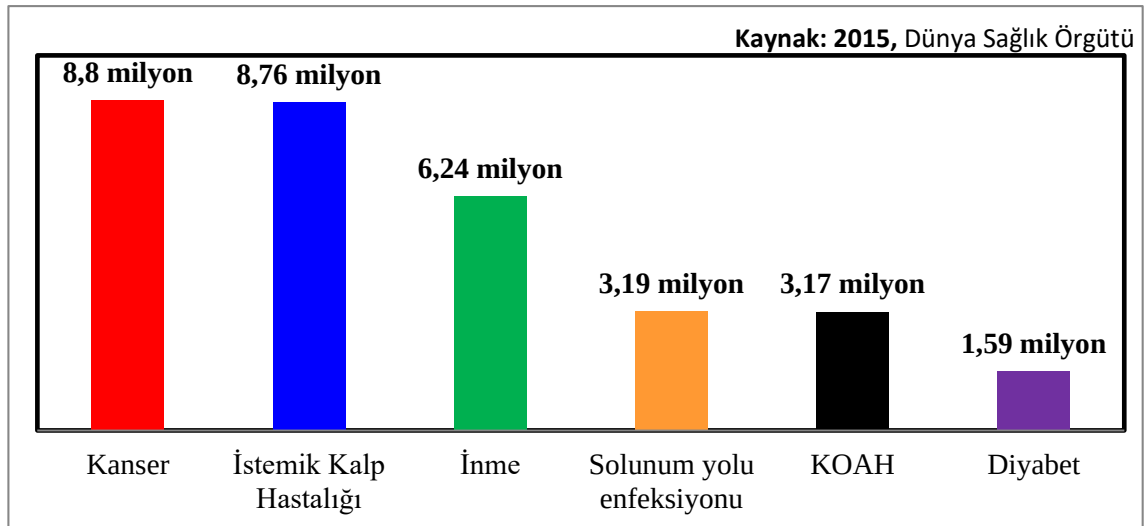
Kanser hastalığı için iki grup risk faktörü bulunmaktadır. Birincisi; yaşam şekillerine, yaşa, cinsiyete ve aile geçmişine bağlı olarak değişirken, diğeri çevresel faktörlere bağlı

olarak değişmektedir. Kansere neden olan etmenler Tablo 1.1’de detaylı bir şekilde gösterilmiştir.

Tablo 1.1. Kansere neden olan etmenler ve oranları

Kanser Sebebi	Oran %
Beslenme yanlışlıkları	35
Sigara, alkol kullanımı	33
Enfeksiyonlar	10
Meslek hastalıkları	4
Çevre kirliliği	2
Besin katkı maddeleri	1
İdiyopatik (diğer)	15

Bu risk faktörlerinin hepsi, sağlıksız yaşam şartlarından, insanların yaşadığı sosyal ortamdan ve alınmayan önlemlerden meydana gelmektedir. Diğer birçok hastalıklar gibi, kanserin ivmesinin hızlı bir şekilde artması kentleşmenin, çevre kirliliğinin ve yaşam tarzındaki değişikliklerin bir sonucu olduğu öne sürülmektedir (Chen vd., 2017; Pedersen vd., 2017). Kanser ve diğer hastalıklara bağlı olarak dünyadaki insan ölümlerinin nedenleri Şekil 1.1’de özetlenmiştir.



Şekil 1.1. Hastalıklara bağlı olarak insan ölümlerinin nedenleri (Tüfekçi, 2020)

Ülkemizin doğal bileşik kaynaklarının, özellikle de bitki örtüsünün zenginliği üzerinde durulması gereken önemli bir konudur. İç Anadolu bölgesi özellikle tıbbi özelliğe olan bitki türlerine ev sahipliği yapmaktadır. Sayısız endemik bitki türlerinin varlığı bu

önemi açıkça ortaya koymaktadır. Gelecekte ülkemiz kaynaklarından elde edilen doğal bileşiklerin daha etkin ve verimli kullanımını hedefleyen çalışmaların yapılması, ülkemizin ekonomik ve sosyal gelişimine katkıda bulunacaktır. Bu kadar önemli bir alanda çalışmak aslında pek çok insanın ilgisini çekmiştir ve çekmektedir. *Verbascum* L. ülkemizde yaygın olarak bulunan bitki cinslerinden biridir. Türkiye'de 246 türle temsil edilen *Verbascum* cinsi üzerinde yapılmış birçok fitokimyasal ve biyolojik aktivite çalışması bulunmaktadır. Bu nedenle *Verbascum* cinsi tıp, tarım, kozmetik ve eczacılık gibi çeşitli endüstrilerde kullanılan bitki grubudur. Aynı zamanda içerdiği sekonder metabolitler ile antimitojenik, antioksidan, antikanser, antimikrobiyal gibi özelliklere sahip olan bu cins Türkiye'de taşıdığı yüksek orandaki çeşitliliği ile önemli bir tıbbi bitkidir. Bundan dolayı *Verbascum* L. türlerindeki sekonder metabolitlerin belirlenmesi ve biyolojik aktivitelerinin incelenmesi, hem bitkiye bilimsel kimlik kazandırılması hem de bitkinin insan yararına kullanılabilirliği açısından çok büyük öneme sahiptir.

Bu kapsamda; kimyasal içerikleri henüz belirlenmemiş, Erzincan iline lokal endemik Scrophulariaceae familyasında yer alan *V. leiocarpum* (Gülbüz sığırkuyruğu), *V. alyssifolium* (Kuduzkuyruk), *V. ozturkii* (Öztürk sığırkuyruğu) ve *V. tuna-ekimii* (Ekim sığırkuyruğu) türleri çalışmaya konu olarak seçilmiştir. Çalışma kapsamında bitkilerden elde edilen ham ekstraların antidiyabetik ve antiproliferatif aktivite bakımından hangilerinin etkili olduğunun *in vitro* yapılacak olan deneylerle tespit edilmesi, etkili olan ekstralarda bulunan bileşiklerin kromatografik yöntemlerle izole edilmesi ve spektral metotlarla bu bileşiklerin yapılarının belirlenmesi ve etkinin bileşik kaynaklı mı yoksa sinerjik kaynaklı mı olduğunun tespit edilmesi amacıyla elde edilen bileşiklerin *in vitro* biyolojik aktivitelerinin tespit edilerek elde edilen sonuçların literatüre kazandırılması bu tez çalışmasının kapsamını teşkil etmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Botanik Bilgiler

2.1.1. Scrophulariaceae familyası

Scrophulariaceae familyası, ilk olarak Jussieu tarafından tanımlanmış olup, Spermatophyta bölümü, Angiospermae alt bölümü, Dicotyledonae sınıfı, Sympetalae alt sınıfı, Scrophulariales takımı içinde yer alan, 306 cins ve 5850 tür ile dünyanın en zengin familyalarından biridir. Bu familyaya ait cinsler Kuzey Yarıküre'nin ılıman bölgelerinde geniş yayılış göstermektedir. Ülkemizde bu familyaya ait 30 cins ve 246 tür bulunmaktadır (Vesper vd., 1994; Seçmen vd., 1998)

Scrophulariaceae familyasının bitkileri genellikle tek yıllık veya çok yıllık, otsu, çalı veya nadiren ağaç benzeri olup ototrof, yarı veya nadiren tam parazittir ve internal floemleri yoktur. Yaprakları oppozit veya dairesel dizilişli, basit veya parçalı olup alternan ve stipuları yoktur. Scrophulariaceae familyasında yer alan bitkilerin çiçekleri hermafrodit, yaprak koltuklarında tek, rasemoz, spika veya panikulattır. Korolla petalleri birleşik, genellikle zigomorfik ve bilabiata bazen mahmuzlu veya tabanda keseli, bazen neredeyse aktinomorf; korolla lobları daima tomurcukta yapraklar üst üste kiremit şeklinde dizilmiş şeklindedir. Ovaryum üst durumlu, uçta bir stilus ile genellikle yatay septumlu iki gözlü; ovüller çok sayıda veya genellikle şişkin plesanta koltuğunda birkaç tane, ovaryum nadiren tek gözlü 2 çepersel bifit plesantalıdır. Meyve genellikle kapsüldür, bazen açılmayan kapsül de olabilir. Tohumları çok sayıda (nadiren az) ve çoğunlukla süslüdür (Davis, 1978; Seçmen vd., 1997).

2.1.2. *Verbascum* L. (Sığırkuyruğu) cinsi

Latince 'püsküllü sakal ve kaba tüylü yapraklı' anlamına gelen 'barba' kelimesinden türeyen 'barbascum' sözcüğünün modifikasyonu ile Linneous tarafından *Verbascum* ismi bu cinse verilmiştir (Davis, 1978; Davis, 1988). *Verbascum* cinsine ait türler yabani olarak Avrasya'nın birçok bölümüne yayılmıştır. Scrophulariaceae familyasında yer alan *Verbascum* L. cinsinin dünyada yaklaşık 350 türü; Avrupa'da, 45'i Balkan Yarımadası'nda endemik olmak üzere yaklaşık 80 türü; Türkiye'de 188'i endemik olmak üzere 246 türü bulunmaktadır (Davis, 1978; 1988, Güner vd., 2000, Özhatay vd., 2006;

2009; 2011). Endemizm oranı bakımından Türkiye’deki cinsler arasında en yüksek olanı *Verbascum*’a aittir ve dağılımı Tablo 2.1’de detaylandırılmıştır.

Tablo 2.1. Türkiye florasındaki endemik bitki taksonlarının cinslere göre dağılımı (Şenkul ve Kaya, 2017)

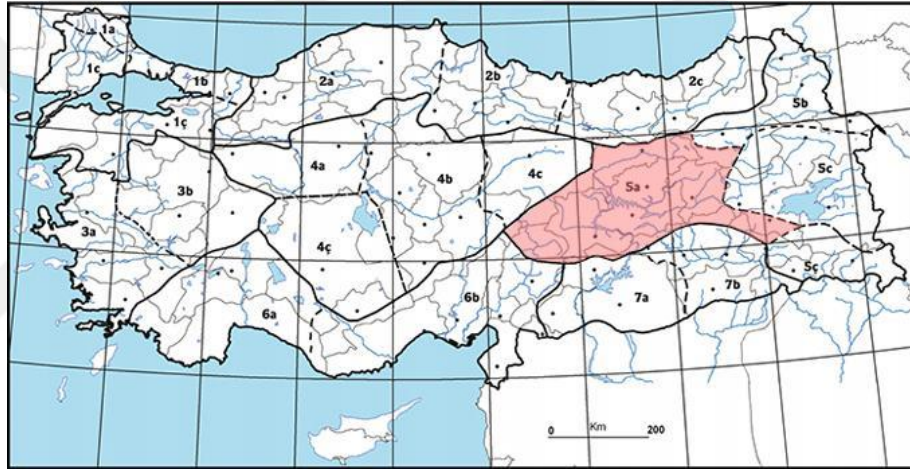
Cins	Tür Sayısı	Cins Lokasyon Sayısı	Cins	Tür Sayısı	Cins Lokasyon Sayısı
<i>Verbascum</i>	174	498	<i>Onosma</i>	46	189
<i>Astragalus</i>	145	455	<i>Campanula</i>	56	153
<i>Centaurea</i>	87	274	<i>Stachys</i>	43	150
<i>Salvia</i>	46	240	<i>Silene</i>	53	148
<i>Alyssum</i>	55	217	<i>Veronica</i>	35	146
<i>Galium</i>	54	209	<i>Scrophularia</i>	32	125
<i>Allium</i>	60	193	<i>Hieracium</i>	59	117
<i>Minuartia</i>	34	112	<i>Achillea</i>	25	107
<i>Asperula</i>	26	112	<i>Dianthus</i>	33	103
<i>Crocus</i>	31	110	<i>Sideritis</i>	37	101

Verbascum L. cinsine ait türler tek, iki veya çok yıllıktır ve nadiren küçük çalılar şeklindedir. Yaprakları alternan veya nadiren karşılıklı dizilmiş olup, bazal yapraklar rozet şeklindedir. Bitkiler genellikle tüysüz, basit veya dallı tüylüdür. Çiçeklenme uçta bulunan rasemoz, spika ya da panikullarda toplanır. Kaliks düzenli veya çok nadiren düzensiz bir şekilde ayrılmıştır. Korolla rotat, hemen hemen aktinomorf veya bazen zigomorftur, sarı, menekşe, mor renkli, kahverengi, sarımsı veya mavimsi yeşil rengindedir. Stamenler 4 ya da 5 tane olup, bazen stamenlerin 4’ü verimli 1’i verimsizdir. Flamentler, genellikle sarımsı veya mor-menekşe gibi renkli tüyler ile kaplı olup, hepsi eşit olduğu üyelerin olduğu gibi iki ön flamentin daha uzun ve daha kalın olduğu üyeler de vardır. Arkadaki 2 ya da 3 stamenin anterleri her zaman reniform ve enine şekilde ortaya bağlıyken, diğer iki ön stamen ise hemen hemen benzer veya uzun ve dekurvent veya tabanda meyilli olarak uzanmıştır. Stilusları tek, basit ipliksi veya hemen hemen çomak şeklindedir. Stigma yarıküresimsi, obovat ya da spatulattır. Kapsüller septumlar boyunca yarılan, küresimsi veya oblong-ovoid veya silindriktir.

Tohumlar çok sayıda ve küçük, Türkiye'deki türlerde obkonik-prizmatik, enine çukurludur (Davis vd., 1978).

2.1.3. *Verbascum leiocarpum* (Gürbüz sıgırkuyruğu)

Tohumlar az çok eliptik, sırtlardan dışarıya doğru bombeli, yüzeyler enine derin eliptik ve oyuklu olup yüzeyleri dağınık ve siyah benekli ve yaklaşık 1,2 mm x 0,8 mm boylarındadır. Ayrıca kahverengimsi siyah, yüzey deseni, genellikle diktörtgenimsi bazen kare biçimli petekler biçiminde, antiklinal hücre duvarları iplikler şeklinde ağsı görümlü, konveks, periklinal hücre duvarları konkav ve granülsüzdür. Bitkinin yayılışı Şekil 2.1'de, arazi görüntüsü ise Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



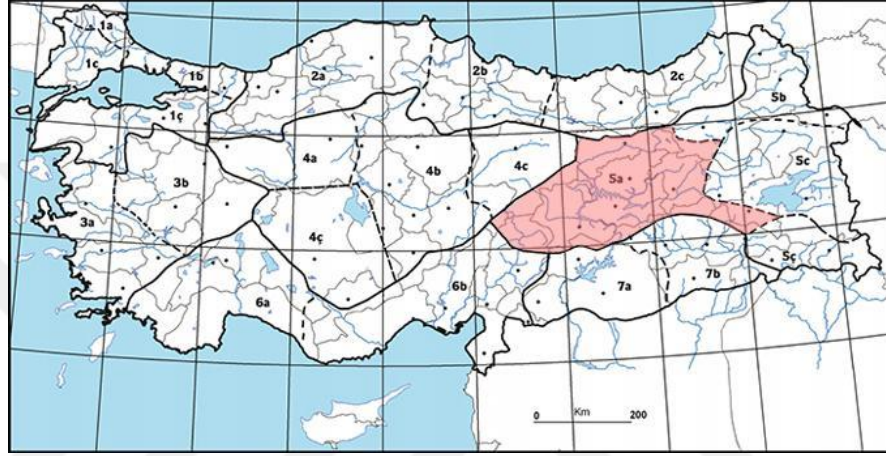
Şekil 2.1. *Verbascum leiocarpum* bitkisinin Türkiye'deki yayılış haritası



Şekil 2.2. *Verbascum leiocarpum* bitkisinin habitatındaki genel görünümü

2.1.4. *Verbascum tuna-ekimii* (Ekim sığırkuyruğu)

Tohumlar sırt görünüşü dikdörtgenimsi, yüzeyler enine dar eliptik oyuklu ve yaklaşık 1,1 mm x 0,6 mm boylarındadır. Ayrıca kahverengimsi siyah, yüzey deseni, genellikle dikdörtgenimsi bazen kare biçimli petekler biçiminde, antiklinal hücre duvarları iplikler şeklinde ağsı görünümlü, konveks, periklinal hücre duvarları konkav ve granülsüzdür. Bitkinin yayılışı Şekil 2.3'te, arazi görüntüsü ise Şekil 2.4'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3. *Verbascum tuna-ekimii* bitkisinin Türkiye'deki yayılış haritası

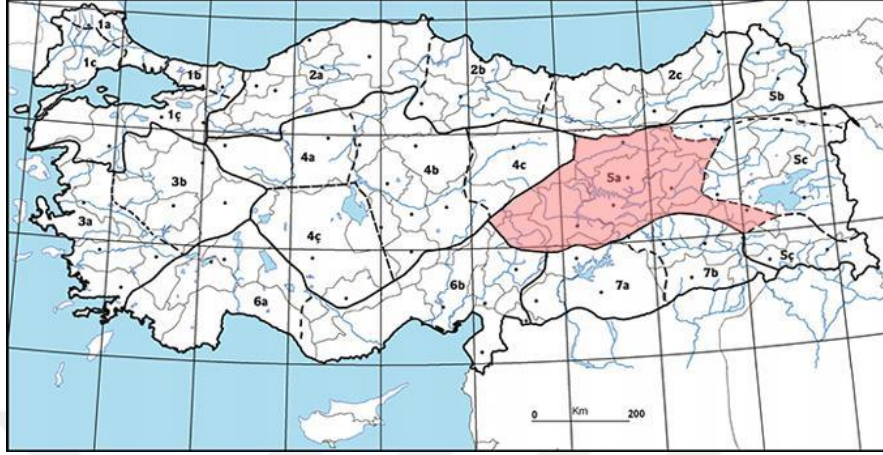


Şekil 2.4. *Verbascum tuna-ekimii* bitkisinin habitatındaki genel görünümü

2.1.5. *Verbascum alyssifolium* (Kuduz kuyruk)

Tohumlar sırt görünüşü dikdörtgenimsi, yüzeyler enine yarık-oyuk çukurlu olup yaklaşık 0,7 mm x 0,4 mm boylarındadır. Ayrıca kahverengimsi siyah, yüzey deseni, genellikle dikdörtgenimsi bazen kare biçimli petekler biçiminde, antiklinal hücre duvarları iplikler şeklinde ağsı görünümlü, konveks, periklinal hücre duvarları konkav

ve granülsüzdürler. Bitkinin yayılışı Şekil 2.5'te, arazi görüntüsü ise Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.5. *Verbascum alyssifolium* bitkisinin Türkiye'deki yayılış haritası



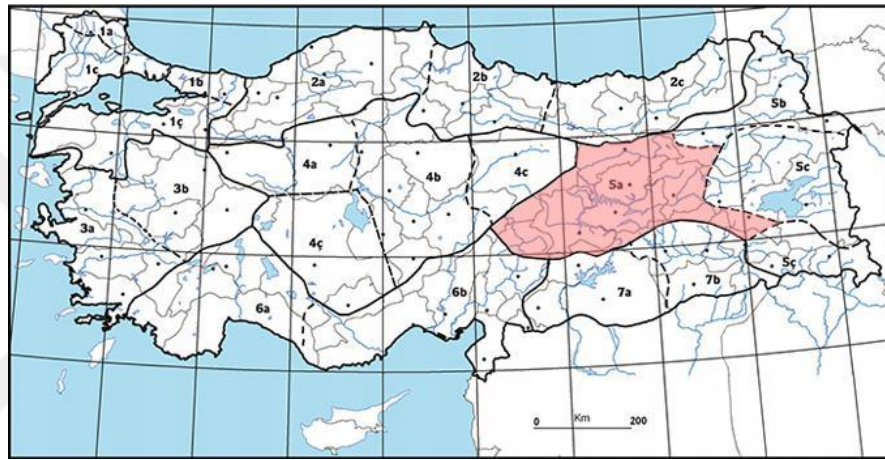
Şekil 2.6. *Verbascum alyssifolium* bitkisinin habitatındaki genel görünümü

2.1.6. *Verbascum ozturkii* (Öztürk sığırkuyruğu)

Genellikle iki yıllık, 30-60 cm boyunda olup yoğun yıldız ve seyrek saplı tüylerle kaplıdır. Gövde dik, dallanmış ve enine kesitte yuvarlaktır. Bitkinin taban yaprakları 5-10 x 2-4 cm, çoğunlukla tabanda yoğunlaşmış, mızraksı veya dikdörtgen-mızraksı şeklindedir. Yaprak sapları 4-10 cm'dir ve bitkinin gövde yaprakları 3-6 x 2-5 cm, mızraksı şeklinde, uçta sivridir. Çiçek durumu gevşek, basit veya dallı; çiçekler kümelerde 1-10 çiçeklidirler. Brakteeler 5-10 x 1-2 mm, mızraksı, bütün ve uçta sivridir. Çiçek sapları 2-10 mm olup brakteoller 3-5, 2-3 x 1-2 mm, mızraksı ve uçta sivridir.

Çanak yaprakları 5-10 mm, neredeyse tabana kadar bölünmüş, mızraksı ile yumurtamsı mızraksı ve uçta sivridir. Taç çapları 10-20 mm, sarı; tüp 2 mm, loblar eşit değil, yuvarlak ve dışta yıldızsı tomentoz tüylüdür. Erkek organ 5, 4-7 mm; filamentler 5-6 mm, mor-pembe renginde yünsü tüylü, öndeki iki filament uçlarda tüysüz olup anterler böbrek şeklindedir. Ovaryumları yuvarlağımsı, sitilusları ise 5-7 mm ve ipliksidir. Ayrıca stigma 2-3 x 0,5 mm, kaşıkı olup kapsülleri 2-6 x 1-5 mm, küresel ve yoğun yıldız tüylüdür (Karavelioğulları vd., 2008).

Bitkinin yayılışı Şekil 2.7’de, arazi görüntüsü ise Şekil 2.8’de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. *Verbascum ozturkii* bitkisinin Türkiye’deki yayılış haritası



Şekil 2.8. *Verbascum ozturkii* bitkisinin habitatındaki genel görünümü

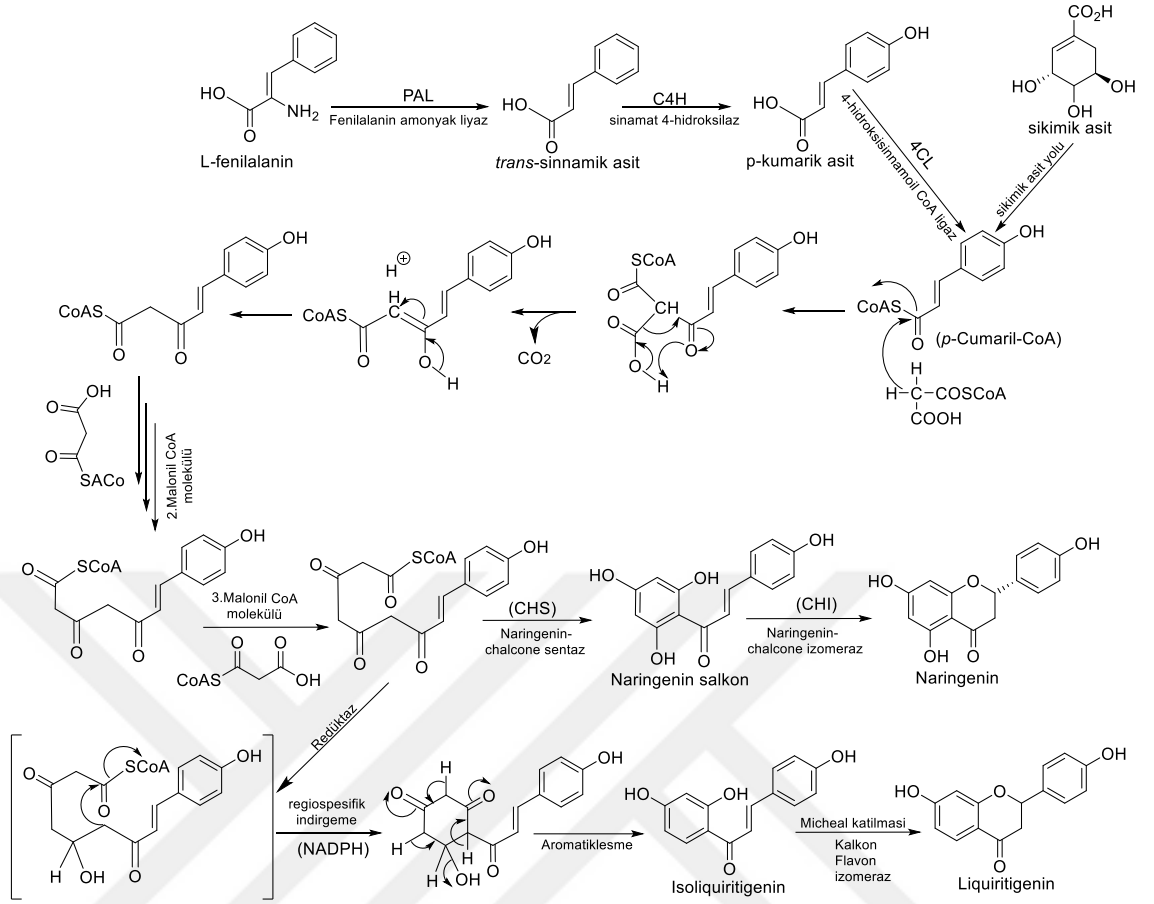
2.2. *Verbascum* L. Türlerinin Kimyasal İçerikleri

Literatür verilerine göre, geleneksel tıpta çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan *Verbascum* cinsine ait türlerin çok zengin sekonder metabolit içeriğine sahip olduğu yapılan çalışmalar sonucu belirlenmiştir. *Verbascum* türlerinde zengin sekonder metabolit çeşitliliğinin olması, farklı aktivitelerin olabileceğini ve bu cinse ait türlerin potansiyel tıbbi bitkiler olarak değerlendirilebileceğini düşündürmektedir. Bu durum bitkinin halk arasında kullanımını artırmanın yanında bilimsel açıdan da önemini artırmaktadır. Literatürde *Verbascum* türlerinin saponozid, flavonoid, iridoid, feniletanoid ve fenilpropanoid glukozitler, steroidler, seskiterpen asit, makrosiklik dimer lakton, alkaloidler ve basit yapılı pek çok bileşik grubuna sahip olduğu bildirilmektedir (Mohamed vd., 1996).

2.2.1. Flavonoidler

Sahip oldukları sarı renkten dolayı Latince'de 'sarı' anlamına gelen 'flavus' sözcüğünden türetilip bu isim verilmiştir. Flavonoidler fenolik bileşiklerin en geniş ve en önemli grubu olup, günümüze kadar bitkilerden 4000'den fazla flavonoid izole edilmiştir (Acar, 1998; Guliyev ve Harmandar, 1999). Bitkilerde genellikle karışım halinde bulunur ve ilk çalışma 1936'da Rusznyak ve Szent-Gyorgyi tarafından insanların kalp sağlığını korumak için yapılmıştır. Flavonoidler, 2-fenil benzopiran (C6-C3-C6) yapısında olup, ana iskeletinde 15 karbon atomu bulunmaktadır (Huvaere ve Skibsted 2015, Kahraman vd., 2002). İskelet bir heterosiklik halka (C) ve iki fenil (A, B) halkasından meydana gelmektedir.

Flavonoidler, bitkilerin fotosentez yapmasıyla meydana gelen ve canlıların yaşaması için gerekli olan sekonder metabolitlerden oluşmaktadır (Burbulis vd., 1996). Glukoz metabolizması sonucunda oluşan asetil koenzim A'dan meydana gelen malonil koenzim A'nın üç molekülünün kondenzasyonu ile A halkası, yine glukoz metabolizması sonucu oluşan şikimik asit üzerinden sinamik asit gibi fenil propanoit bileşiklerinden de B ve C halkaları oluşmaktadır (Kahraman vd., 2002). Flavonoidlerin karakteristik özelliklerini yapılarındaki heterosiklik halka belirlemektedir (Kocabaş, 2008). Şekil 2.9'da flavonoidlerin sentez şeması detaylı olarak verilmiştir.



Şekil 2.9. Flavonoidlerin biyosentezi (Austin ve Noel, 2003; Luhata ve Luhata, 2017)

Flavonoidler bitkilerde antioksidan, enzim inhibitörü ve aynı zamanda ışıktan koruma gibi önemli özelliklere sahiptirler (Harborne vd., 1975; Harborne ve Mabry, 1982). Ayrıca bitkilerde enerjinin dönüşümüne ve büyüme hormonlarına etkileri olduğu gibi, solunumu ve fotosentezi düzenleme ve bulaşıcı hastalıklara karşı da savunma gibi önemli fonksiyonlara da sahiptirler (Cody vd., 1986). Flavonoidlerin kılcal damarlarda kan sızmasının önlenmesi, kırılgenlik ve geçirgenliği ortadan kaldırması, zayıf kalbi kuvvetlendirmesi, kalp ritimlerinin kısılmasını sınırlaması, nabızı normalleştirilmesi, karaciğerin barbiturat ve arsenik gibi bileşiklere karşı detoksikasyonunu sağlaması ve safra salgılamasını hızlandırması gibi fonksiyonlara sahip olmasının yanında antioksidan özellik göstermeleri ve tanenlerin bileşenine katılmalarından dolayı besin, tekstil, deri, metalurji, tıp, ziraat gibi alanlarda, kremlerde katkı maddesi olarak kullanımı bulunmaktadır (Jeney ve Uri, 1954; Harmandar ve Bilaloğlu, 1999). Literatürde, *Verbascum* türleri üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar sonucu izole edilen ve yapıları belirlenen flavonoidler Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2.2. *Verbascum* türlerinden izole edilen flavonoidler

Bileşik	Bitkinin ismi	Referanslar
Luteolin	<i>V. thapsus</i>	Zhao vd., 2011, Mihailović vd., 2016
	<i>V. densiflorum</i>	Gvazava ve Kikoladze, 2012
	<i>V. caesareum</i>	Anil vd., 2016
	<i>V. sublobatum</i>	Shakeri ve Farokh, 2015
	<i>V. lagurus</i>	Sen vd., 2015
	<i>V. phlomoides</i>	Mihailović vd., 2016, Gvazava ve Kikoladze, 2012
Luteolin-7-O-glukozit	<i>V. lagurus</i>	Sen vd., 2015
	<i>V. caesareum</i>	Anil vd., 2016
	<i>V. phlomoides</i>	Paun vd., 2016
	<i>V. nobile</i>	Dimitrova vd., 2018
Apigenin	<i>V. phlomoides</i>	Grigore vd., 2013, Mihailović vd., 2016)
	<i>V. densiflorum</i>	Gvazava ve Kikoladze, 2012
	<i>V. cheiranthifolium</i>	Dalar vd., 2014
	<i>V. sublobatum</i>	Shakeri ve Farokh, 2015
Apigenin-7-O-glukozit	<i>V. thapsus</i>	Zhao vd., 2011
	<i>V. phlomoides</i>	Gvazava ve Kikoladze, 2012
	<i>V. caesareum</i>	Anil vd., 2016
	<i>V. densiflorum</i>	Gvazava ve Kikoladze, 2012
Nepetin	<i>V. caesareum</i>	Anil vd., 2016
Narsisin	<i>V. phlomoides</i>	Paun vd., 2016
Kuersetin	<i>V. densiflorum</i>	Gvazava ve Kikoladze, 2012
	<i>V. phlomoides</i>	Grigore vd., 2013, Gvazava ve Kikoladze, 2012
Diosmin	<i>V. phlomoides</i>	Paun vd., 2016
Diosmetin-7- O-glukozit	<i>V. lagurus</i>	Sen vd., 2015
Kemferol	<i>V. phlomoides</i>	Gvazava ve Kikoladze, 2012
Viteksin	<i>V. cheiranthifolium</i>	Manav Yalçın, 1989
Swertisin	<i>V. cheiranthifolium</i>	Manav Yalçın, 1989
3',4'-dimetoksiorobol-7-O-ramnozit	<i>V. sinaiticum</i>	Eldingi vd., 1999
Orientin	<i>V. eremobium</i>	Nawal ve Abeer, 2010

Tablo 2.2. *Verbascum* türlerinden izole edilen flavonoidler (devam)

Krizoeriyol-7-O-glukozit	<i>V. eremobium</i>	Kawashty, 1997
3',4',7- trimetoksiluteolin	<i>V. eremobium</i>	Nawal ve Abeer, 2010
Viteksin	<i>V. eremobium</i>	Nawal ve Abeer, 2010
Akasetin	<i>V. fruticulosum</i>	Serdyuk vd., 1976
Akasetin-7- glukozit	<i>V. lychnitis</i>	Kawashty, 1997
Apigenin-4'-O-ramnozid	<i>V. thapsus</i>	Souleles ve Geronikaki, 1989
Patuletin	<i>V. lychnitis</i>	Serdyuk vd., 1976
Tamariksetin-7-O-glukozit	<i>V. phlomoides</i>	Tschesche vd., 1979
İzoramnetin	<i>V. thapsus</i>	Souleles ve Geronikaki 1989
Hesperidin	<i>V. phlomoides</i>	Tschesche vd., 1979
Eriodiktiyol	<i>V. phlomoides</i>	Papay vd., 1980
Orobol	<i>V. sinaiticum</i>	Eldingi vd., 1999
Orobol-7-O-glukozit	<i>V. sinaiticum</i>	Eldingi vd., 1999

2.2.2. Saponinler

Saponinler, birçok bitki türünde bulunan doğal bileşiklerin en geniş sınıfından biridir (Oleszek ve Bialy, 2006). Genellikle triterpenik veya steroidal bir aglikona sahip sulu çözeltileri çalkalandığında kalıcı köpük verdiği için Latince sabun anlamına gelen “sapo” kelimesinden türetilerek “saponin” ismi verilmiştir (Vincken vd., 2007). Saponinler, yapısal olarak aglikon ve glikon olmak üzere iki kısımdan meydana gelmektedir. Aglikon, glukozitin şeker olmayan bileşeni, glikon ise glukozitin şeker bileşenidir (Robbers vd., 1996).

Saponin içeren bitkilerin başta hipokolesterolemik, anti-karsinojenik, antioksidan, anti-inflamatör, anti-mikrobiyal, anti-protozoal ve anti-hipertansif gibi etkilerinin yanında birçok biyolojik aktiviteye de sahip oldukları bilinmektedir (Aslan vd., 2005). Ayrıca kolesterol ile kompleks oluşturmaları, antifungal ve antibiyotik aktiviteye sahip olmaları ve balıklar gibi soğukkanlı hayvanlar üzerinde toksik etki göstermeleri saponinlerin önemini artırmaktadır (Fidan ve Dündar, 2007).

Saponinler, yapılarında bulunan aglikon türüne göre; steroidal, triterpenik ve steroidal alkaloid saponinler olarak, şeker grubu sayısına göre; monodesmosidik, bidesmosidik ve Tridesmosidik saponinler olarak sınıflandırılmaktadır (Sparg vd., 2004; Oleszek,

2002). Triterpen ve steroidler, 6 izopren (5 karbonlu) biriminden meydana gelir ve her ikisi de skualenden elde edilmektedir. Literatürde, *Verbascum* türleri üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar sonucu izole edilen ve yapıları belirlenen saponinler Tablo 2.3'te verilmiştir.

Tablo 2.3. *Verbascum* türlerinden izole edilen saponinler

Bileşik	Bitkinin ismi	Referanslar
Verbaskosaponin	<i>V. ballii</i>	Arrif vd., 2006
	<i>V. phlomoides</i>	Anıl, 1980
	<i>V. nigrum</i>	Tschesche vd., 1980
Tapsuin B	<i>V. lychnitis</i>	De Pascual Teresa vd., 1982
	<i>V. thapsus</i>	De Pascual Teresa vd., 1980
Songarosaponin C	<i>V. densiflorum</i>	Miyase vd., 1997
	<i>V. songaricum</i>	Seifert vd., 1991
Songarosaponin D	<i>V. densiflorum</i>	Miyase vd., 1997
	<i>V. songaricum</i>	Hartleb vd., 1994
Ursolik asit	<i>V. lychnitis</i>	De Pascual Teresa vd., 1982
Rosamultin	<i>V. thapsus</i>	Abou Gazar vd., 2003b
Saponin II	<i>V. nigrum</i>	Anıl, 1980
Saikosaponin I	<i>V. densiflorum</i>	Miyase vd., 1997
Songarosaponin B	<i>V. songaricum</i>	Seifert vd., 1991
Songarosaponin E	<i>V. songaricum</i>	Seifert vd., 1991
Songarosaponin F	<i>V. songaricum</i>	Hartleb vd., 1995
Saikosaponin A	<i>V. roripifolium</i>	Miyase vd., 1997
Hidroksitapsuin B	<i>V. thapsus</i>	De Pascual Teresa vd., 1980
Hidroksitapsuin A	<i>V. thapsus</i>	De Pascual Teresa vd., 1980
Tapsuin A	<i>V. lychnitis</i>	De Pascual Teresa vd., 1982
	<i>V. thapsus</i>	De Pascual Teresa vd., 1980
Tapsuin B	<i>V. lychnitis</i>	De Pascual Teresa vd., 1982
	<i>V. thapsus</i>	De Pascual Teresa vd., 1980

Tablo 2.3. *Verbascum* türlerinden izole edilen saponinler (devam)

İlvensisaponin A	<i>V. ballii</i>	Arrif vd., 2006
	<i>V. dudleyanum</i>	Tatlı vd., 2004
	<i>V. lasianthum</i>	Tatlı vd., 2006; Küpeli vd., 2007
	<i>V. pterocalycinum</i>	Tatlı vd., 2004
	<i>V. thapsus</i>	Türker vd., 2004
	<i>V. mucronatum</i>	Kahraman vd., 2010
	<i>V. nigrum</i>	Klimek vd., 1992
	<i>V. roripifolium</i>	Miyase vd., 1997
	<i>V. sinaiticum</i>	Miyase vd., 1997
	<i>V. densiflorum</i>	Miyase vd., 1997
İlvensisaponin C	<i>V. dudleyanum</i>	Tatlı vd., 2008
	<i>V. pterocalycinum</i>	Tatlı vd., 2004
	<i>V. mucronatum</i>	Kahraman vd., 2010
	<i>V. nigrum</i>	Klimek vd., 1992
Desramnozil-verbaskosaponin	<i>V. densiflorum</i>	Miyase vd., 1997
	<i>V. phlomoides</i>	Klimek vd., 1996b
Verbaskosaponin B	<i>V. densiflorum</i>	Miyase vd., 1997
	<i>V. fruticosum</i>	Miyase vd., 1997
	<i>V. songaricum</i>	Hartleb vd., 1995
	<i>V. roripifolium</i>	Miyase vd., 1997
	<i>V. sinaiticum</i>	Miyase vd., 1997
Levigatanozit A	<i>V. wiedemannianum</i>	Abou Gazar vd., 2003b
Mulleinsaponin I	<i>V. sinaiticum</i>	Miyase vd., 1997
Mulleinsaponin II	<i>V. sinaiticum</i>	Miyase vd., 1997
Mulleinsaponin III	<i>V. sinaiticum</i>	Miyase vd., 1997
Mulleinsaponin IV	<i>V. sinaiticum</i>	Miyase vd., 1997
Mulleinsaponin V	<i>V. sinaiticum</i>	Miyase vd., 1997
Mulleinsaponin VI	<i>V. sinaiticum</i>	Miyase vd., 1997
Mulleinsaponin VII	<i>V. sinaiticum</i>	Miyase vd., 1997
Prosaikogenin F	<i>V. roripifolium</i>	Miyase vd., 1997

2.2.3. İridoidler

İridoitler, sayısız bitki ailesinde bulunan, yapılarında siklopenta-[c]-piran halkası içeren monoterpenlere ait bir grup doğal bileşiktir. Siklopentanopiran halkası, iridoitlerin temel iskelet halkası olarak bilinir ve bir oksijen atomu içeren altı elemanlı bir halkanın, bir siklopentan halkasına kaynaşması ile oluşur (Oszmiański ve Kucharska, 2018; Nagatoshi vd., 2011; Saraçoğlu ve Harput, 2012). 8-, 9- ve 10- karbonlu olan iridoitler 3. ve 4. karbon atomları arasında bir ikili bağ taşırlar ve 9- karbonlu iridoitler, 4. veya 8. karbon atomunda birer substitüent içerebilirler (Tanker ve Tanker, 1985).

İridoit bileşikler ilk olarak 1800'lü yıllarda bitkilerden izole edilmiş olsa da, bu bileşiklerin yapılarının aydınlatılması ve isimlendirilmeleri, 1950'lerin ortalarında, 51 *Iridomyrmex* cinsi karınca türünden izole edilen ve böceklerin savunma mekanizmalarında yer alan iridomirmesin ve diğer iridodial bileşikler üzerinde gerçekleştirilmiş çalışmalara dayanmaktadır (Ghisalberti, 1998; Bruneton, 1999). İridoitler, çift çenekli bitki familyasının özellikle Apocynaceae, Scrophulariaceae, Verbenaceae, Lamiaceae, Loganiaceae ve Rubiaceae gibi Sympetalae alt sınıfında bol miktarda bulunur (Viljoen vd., 2012).

İridoitler, tüm terpenoidlerin evrensel yapı taşları olarak kabul edilen mevalonik asid yolu aracılığı ile oluşan biyokimyasal olarak aktif izopren birimlerinden (dimetilallil pirofosfat; DMAPP veya izopentenil pirofosfat; IPP) türetilmiştir (Waser ve Rinner, 2016). İridoit biyosentezindeki ilk adım, geraniolün bir allilik oksidasyonu sonucu, 10-hidroksigeraniolün oluşumudur. Bu molekül daha sonra oksidoredüktaz aracılığıyla 10-oksogeraniol okside edilir (Waser ve Rinner, 2016). Bu dialdehit, iridodiali oluşturan siklopentan halkasının siklizasyon aşaması için substrat görevi görür (Villasenor, 2007). İridodial daha sonra oksidasyona uğrayarak iridotriali oluşturur. Iridotrial oksidasyon, metilasyon ve glukozilasyon dahil olmak üzere çeşitli reaksiyonlar yoluyla deoksiloganik asid üzerinden loganik asidi oluşturur. Çoğu iridoitin öncüsü olan loganin birçok reaksiyon sonucunda iridoit bileşiğine dönüştürülür (Bruneton, 1999; Nagatoshi vd., 2011). Literatürde, *Verbascum* türleri üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar sonucu izole edilen ve yapıları belirlenen iridoid bileşikler Tablo 2.4'te detaylı olarak verilmiştir.

Tablo 2.4. *Verbascum* türlerinden izole edilen iridoid ve iridoid glukozitleri

Bileşik	Bitkinin ismi	Referanslar
Sinuatol	<i>V. lasianthum</i>	Tatlı vd., 2006
	<i>V. sinuatum</i>	Senatore vd., 2007
Odontozit	<i>V. oreophilum</i>	Danchul vd., 2006)
Katalpol	<i>V. cilicicum</i>	Tatlı vd., 2003a
	<i>V. dudleyanum</i>	Tatlı vd., 2008
	<i>V. lasianthum</i>	Tatlı vd., 2006
	<i>V. cheiranthifolium</i>	Eribekyan vd., 1989
Verbaspinozit	<i>V. cilicicum</i>	Tatlı vd., 2003a
	<i>V. salviifolium</i>	Akdemir vd., 2004b
Sakkatozit	<i>V. cilicicum</i>	Tatlı vd., 2003a
	<i>V. dudleyanum</i>	Tatlı vd., 2008
	<i>V. nigrum</i>	Danchul vd., 2006
Okubozit	<i>V. chaixi</i>	Swiatek, 1973
Katalpozit	<i>V. chaixi</i>	Swiatek, 1973
Genipozidik asit	<i>V. lasianthum</i>	Tatlı vd., 2006
Skrospiozit A	<i>V. ballii</i>	Arrif vd., 2006
Skrospiozit B	<i>V. ballii</i>	Arrif vd., 2006
Skrospiozit A8	<i>V. salviifolium</i>	Akdemir vd., 2004b
Angelozit	<i>V. dentifolium</i>	Arrif vd., 2008
Ajugozit	<i>V. pycnostachyum</i>	Tatlı vd., 2007
Lateriozit	<i>V. thapsus</i>	Hussain vd., 2009
	<i>V. densiflorum</i>	Swiatek vd., 1984
Pulverulentozit I	<i>V. dentifolium</i>	Arrif vd., 2008
	<i>V. salviifolium</i>	Akdemir vd., 2004b
Pikrozit IV	<i>V. pterocalycinum</i>	Tatlı vd., 2004
	<i>V. thapsus</i>	Hussain vd., 2009
Harpagozit	<i>V. thapsus</i>	Hussain vd., 2009
	<i>V. pycnostachyum</i>	Tatlı vd., 2007
	<i>V. densiflorum</i>	Swiatek vd., 1984

Tablo 2.4. *Verbascum* türlerinden izole edilen iridoid ve iridoid glukozitleri (devam)

6-O-[(2"-O- <i>p</i> -metoksi- <i>cis</i> -sinamoil-3"-O-asetil)- α -L-ramnopiranozil] katalpol	<i>V. dentifolium</i>	Arrif vd., 2008
Ajugol	<i>V. dudleyanum</i>	Tatlı vd., 2008
	<i>V. pterocalycinum</i>	Tatlı vd., 2004
	<i>V. thapsus</i>	Hussain vd., 2009
	<i>V. sinuatum</i>	Senatore vd., 2007
	<i>V. lasianthum</i>	Tatlı vd., 2006
	<i>V. pycnostachyum</i>	Tatlı vd., 2007
	<i>V. sinaiticum</i>	Mahmoud vd., 2007
6-O- β -D-glukopiranozilokubin	<i>V. salviifolium</i>	Akdemir vd., 2005
6-O-(<i>p</i> -metoksisinamoil)-okubin	<i>V. cheiranthifolium</i>	Eribekyan vd., 1989
Okubin	<i>V. conocarpum</i>	Ramunno vd., 2006
	<i>V. dudleyanum</i>	Tatlı vd., 2008
	<i>V. lasianthum</i>	Akdemir vd., 2004a
	<i>V. pycnostachyum</i>	Tatlı vd., 2006
	<i>V. sinaiticum</i>	Mahmoud vd., 2007
	<i>V. sinuatum</i>	Senatore vd., 2007
	<i>V. songaricum</i>	Kobaisy vd., 2006
6-O-(3"-O- <i>trans</i> -sinamoil)- α -L-ramnopiranozilkatalpol	<i>V. cilicicum</i>	Tatlı vd., 2003a
6-O-(4"-O- <i>trans</i> -sinamoil)- α -L-ramnopiranozilkatalpol	<i>V. cilicicum</i>	Tatlı vd., 2003a
6'-O-vaniloilangelozit	<i>V. dentifolium</i>	Arrif vd., 2008

2.2.4. Feniletanoidler

Feniletanoid glukozitler; tıbbi bitkilerin köklerinde, gövdelerinde, kabuğunda, yapraklarında, çiçeklerinde, meyvelerinde ve tohumlarında bulunan ve suda çözünebilen fenolik bileşiklerdir (Cai vd., 2016; Xue ve Yang, 2016). Daha önce yapılan fitokimyasal çalışmalarda Acanthaceae, Asteraceae, Berberidaceae, Gesneriaceae, Lamiaceae, Loganiaceae, Magnoliaceae, Oleaceae, Orobanchaceae, Plantaginaceae, Portulacaceae, Rosaceae, Scrophulariaceae ve Verbenaceae familyalarının feniletanoid

içerdiği ve bitkilerden elde edilen bazı feniletanoid glukozitlerinin hepatoprotektif, antioksidan, sitotoksik, antienflamatuvar, α -glukozidaz inhibitörü, nöroprotektif, antibakteriyel, antiviral, immunomodulator aktivite gösterdikleri çeşitli çalışmalar ile tespit edilmiştir (Xue vd., 2018; Xue ve Yang, 2016). Literatürde, *Verbascum* türleri üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar sonucu izole edilen ve yapıları belirlenen feniletanoit glukozitleri Tablo 2.5’te verilmiştir.

Tablo 2.5. *Verbascum* türlerinden izole edilen feniletanoid ve glukozitleri

Bileşik	Bitkinin ismi	Referanslar
Verbaskozit	<i>V. pterocalycinum</i>	Tatlı vd., 2004
	<i>V. salviifolium</i>	Akdemir vd., 2004b
	<i>V. thapsus</i>	Hussain vd., 2009
	<i>V. sinuatum</i>	Senatore vd., 2007
	<i>V. pycnostachyum</i>	Tatlı vd., 2007
	<i>V. conocarpum</i>	Ramunno vd., 2006
	<i>V. phlomoides</i>	Gvazava ve Kikoladze, 2007
	<i>V. georgicum</i>	Agababyan vd., 1985
	<i>V. lasianthum</i>	Akdemir vd., 2004b
	<i>V. macrurum</i>	Aligiannis vd., 2003
	<i>V. mucronatum</i>	Kahraman vd., 2010
	<i>V. nigrum</i>	Klimek, 1991b
	<i>V. sinaiticum</i>	Eldingi vd., 1999
	<i>V. undulatum</i>	Skaltsounis vd., 1996
	<i>V. xanthophoeniceum</i>	Georgiev vd., 2011
	<i>V. densiflorum</i>	Klimek, 1991b
	<i>V. lychnitis</i>	
β -hidroksiakteozit	<i>V. salviifolium</i>	Akdemir vd., 2004b
Forsitozit B	<i>V. salviifolium</i>	Akdemir vd., 2004b
Angorozit A	<i>V. salviifolium</i>	Akdemir vd., 2004b
Martinozit	<i>V. salviifolium</i>	Akdemir vd., 2004b
Pulverulentozit I	<i>V. dentifolium</i>	Arrif vd., 2008
	<i>V. salviifolium</i>	Akdemir vd., 2004b

Tablo 2.5. *Verbascum* türlerinden izole edilen feniletanoid ve glukozitleri (devam)

Poliumozit	<i>V. boerhavii</i>	Roussel, 1983
	<i>V. lasianthum</i>	Akdemir vd., 2004b
	<i>V. sinuatum</i>	Roussel, 1983
	<i>V. thapsus</i>	Roussel, 1983
	<i>V. blattaria</i>	Roussel, 1983
	<i>V. chaixi</i>	Roussel, 1983
	<i>V. phlomoides</i>	Roussel, 1983
Ferruginozit C	<i>V. thapsus</i>	Kuroda vd., 2017
İzoverbaskozit	<i>V. thapsus</i>	Kuroda vd., 2017
	<i>V. sinuatum</i>	Scarpatti, 1963
	<i>V. olympicum</i>	Dimitrova vd., 2019
Forsitozit B	<i>V. densiflorum</i>	Klimek, 1991a
	<i>V. lychnitis</i>	Klimek, 1991a
	<i>V. phlomoides</i>	Klimek, 1996a
	<i>V. salviifolium</i>	Tatlı vd., 2008
	<i>V. thapsus</i>	Warashina vd., 1992
	<i>V. xanthophoeniceum</i>	Georgiev vd., 2011
6'-O- α -L-arabinopiranozilmartinozit	<i>V. macrurum</i>	Aligiannis vd., 2003
6'-O- β -D-ksilopiranozilmartinozit	<i>V. macrurum</i>	Aligiannis vd., 2003
Videmanniozit A	<i>V. undulatum</i>	Magiatis vd., 1998
	<i>V. wiedemannianum</i>	Abou Gazar vd., 2003a
Alisonozit	<i>V. thapsus</i>	Warashina vd., 1992
β -Hidroksiakteozit	<i>V. salviifolium</i>	Tatlı vd., 2008
Videmanniozit B	<i>V. wiedemannianum</i>	Abou Gazar vd., 2003a
Videmanniozit C	<i>V. wiedemannianum</i>	Abou Gazar vd., 2003a
Videmanniozit D	<i>V. wiedemannianum</i>	Abou Gazar vd., 2003a
2'-O-asetilakteozit	<i>V. sinaiticum</i>	Eldingi ve Mabry, 2000
Angorozit C	<i>V. spinosum</i>	Kalpoutzakakis vd., 1999
Eukovozit	<i>V. letourneuxii</i>	Emam, 2010

2.3. *Verbascum* L. Türlerinin Farmakolojik Özellikleri

Ülkemizin önemli bitki kaynaklarından biri olan *Verbascum* cinsinin geleneksel tıpta çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanımı bulunmaktadır. Sığırkuyruğu olarak bilinen bu türün ekstre, dekoksasyon ve infüzyonlarının hemen hemen tüm dünyada halk ilacı olarak kullanımı mevcuttur. *Verbascum* türlerinin ekspektoran, diüretik, demulsan, sedatif etkilerinin bulunduğu ve bu etkileri nedeniyle geleneksel olarak dahilen ve haricen kullanılmalarının yanı sıra antibakteriyel, antiviral, antifungal, antiülserojenik, antioksidan, sitotoksik, antitümör, antihepatoma, immunomodülatör ve antiülserojenik etkilerinin çeşitli araştırmalarla belirlenmiş olması bilimsel açıdan önemini artırmaktadır (Türker ve Camper, 2002; Abougazar vd., 2003).

2.3.1. *Verbascum* L. türlerinin tıbbi kullanımı

Verbascum türlerinin yaprak ve çiçekleri geleneksel Türk tıbbında astım, tüberküloz, kuru öksürük, bronşit, ishal, yaralar, yüzeysel mantar enfeksiyonları, romatizmal ağrılar ve hemoroid gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Tatlı ve Akdemir, 2006; Kahraman vd., 2012). Çiçeklerinden elde edilen yağ, kulak ağrısını hafifletmede ve egzama ile diğer tür iltihaplı cilt durumlarında el üzerinde çıkan siğil ya da vücut üzerindeki dermayı gidermek için kullanılmaktadır (Kahraman vd., 2012). Ayrıca *Verbascum* türlerinin yaprakları, kökleri ve çiçekleri kanama durdurucu, sakinleştirici, yumuşatıcı, yara iyileştirici, ağrı kesici, sinir ilacı, antioksidan, antikanser, antiviral, antihistaminik, bakterisit ve mantar öldürücü gibi etkilere de sahiptir (Kahraman vd., 2012).

2.3.2. *Verbascum* L. türleri üzerinde biyoaktivite çalışmaları

2.3.2.1. Antiviral aktivite

Zgorniak-Nowosielska vd. (1991) yapmış oldukları çalışmada, *Verbascum thapsiforme* bitkisinin çiçeklerinden elde edilen ekstrenin, *Fowl plague* virüsüne, influenza virüslerine ve *Herpes simplex* virüsüne karşı etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda ekstrenin, *Herpes simplex* üzerine 300 µg/ml dozda virüsidal aktivite gösterdiği fakat influenza virüsüne karşı herhangi bir aktivite göstermediği belirlenmiştir.

V. thapsiform'un çiçeklerinden elde edilen ekstrenin, doku kültürlerinde influenza virüslerinin oluşturduğu enfeksiyon alanı hemagglütasyonunu azalttığı belirlenmiştir. Ekstre ile amantadin türevlerinin birlikte uygulanmalarında da, hücre kültürlerinde influenza A virüsünün replikasyonunu inhibe edici etkilerinin arttığı belirlenmiştir ve en fazla etkinin, bitkinin çiçeklerinden elde edilen ekstrenin adamantanamin glukronit ile kombinasyonu ile elde edildiği rapor edilmiştir (Serkedjieva, 2000).

2.3.2.2. Antimikrobiyal aktivite

Dülger vd. (2002) yaptıkları çalışma kapsamında, endemik *V. olympicum*, *V. prusianum* ve *V. bombyciferum* bitkilerinin metanol ekstrelerinin gram pozitif ve gram negatif bakterilerine karşı etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda bitkilere ait metanol ekstrelerinin gram pozitif bakterilere karşı etkili, gram negatif bakterilere karşı ise etkili olmadıklarını belirlemişlerdir.

V. flavidum bitkisinin aseton, petrol eteri, metanol ve su ekstrelerinin beş mikroorganizmaya karşı in vitro disk difüzyon ve broth dilüsyon yöntemleriyle antimikrobiyal aktivitelerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, bitkilerden elde edilen petrol eteri ve su ekstrelerinin herhangi bir mikroorganizma üzerinde etki göstermediği, metanol ekstresinin ise *E. coli*'ye karşı (30 mg/ml konsantrasyonda 15 mm inhibisyon zon çapıyla ve $250 \pm 0,3$ MİK değeriyle) çok az aktivite gösterdiği, ancak bütün ekstrelerin *P. aeruginosa* ve *C. albicans*'a karşı da etkisiz olduğu rapor edilmiştir (Boğa vd., 2016).

V. dudleyanum, *V. latisepalum*, *V. mucronatum*, *V. olympicum*, *V. stachydifolium*, *V. uschackense* bitkilerinin toprak üstü; *V. lasianthum*'un ise çiçek kısmı metanol ile ekstrakte edilmiştir ve elde edilen ekstrelerin *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus* standart bakteri suşları ve *C. krusei*, *C. parapsilosis* ve *C. albicans* standart mantar suşları üzerindeki etkisi disk difüzyon metodu ile incelenmiştir. Çalışma sonucunda; *V. mucronatum* ve *V. olympicum* bitkilerinin metanol ekstrelerinin gram pozitif bakteri *S. aureus*'a karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği, *V. latisepalum* bitkisinin metanol ekstresinin *C. krusei*'ye karşı antifungal aktivite gösterdiği ve diğer bitki ekstrelerinin ise herhangi bir aktivite göstermediği belirlenmiştir (Kahraman vd., 2011).

Halk arasında enflamatuvar hastalıkları, astım, spazmodik öksürük ve diğer pulmoner problemlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan *V. thapsus*'un metanol, etanol, su ekstraktları ve uçucu yağının *E. coli*, *C. albicans*, *S. pyogenes*, *A. fumigatus* ve *S. aureus* mikroorganizmaları üzerinde antimikrobiyal aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada disk difüzyon ve mikrodilüsyon metotları ile ekstraktların inhibisyon zon çapları ve MİK değerleri belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, *V. thapsus* metanol ekstresinin *E. coli* ve *S. pyogenes* üzerindeki inhibitör etkisinin su ve etanol ekstresine göre daha yüksek olduğu, metanol ve su ekstraktlarının ise *S. aureus* üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Metanol ekstresine duyarlı mikroorganizmaların maksimum inhibisyon zon çapı; 7-16,8 mm ve MİK değeri 31,25 µg/ml, etanol ekstresinin maksimum inhibisyon zon çapı 5,3-11 mm ve MİK değeri 62,5- 125 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Ayrıca *C. albicans* ve *A. fumigatus*'un metanol, etanol ve su ekstraktlarına karşı duyarsız olduğu, *V. thapsus* uçucu yağının da bu mikroorganizmalara karşı aktif olmadığı bildirilmiştir (Ghasemi vd., 2015).

V. caesareum bitkisinin toprak üstü kısmının su, kloroform, metanol ve etil asetat ile ekstraksiyonu ile hazırlanan ekstraktların in vitro antimikrobiyal aktiviteleri mikrobrot dilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir. *K. pneumoniae* gram negatif bakterileri, *S. epidermidis* ve *S. aureus* gram-pozitif bakterileri ve *E. coli*, *Aeruginosa* üzerinde MİK değerleri, *C. albicans* üzerinde ise antifungal aktiviteleri test edilmiştir. Bu işlemler sonucunda etil asetat ekstresinin 1250 µg/ml, su ekstresinin *E. coli*, *S. epidermidis* ve *S. aureus*'a karşı 2500 µg/ml ve *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *C. albicans* ve *P. mirabilis*'e karşı ise 1250 µg/ml MİK değeri gösterdiği bildirilmiştir (Anıl vd., 2016).

2.3.2.3. Antioksidan aktivite

V. bottae bitkisinin toprak üstü kısmı metanol ve su ile ekstraksiyon edilerek metanol ve su ekstraktları elde edilmiştir. Bu ekstraktların farklı konsantrasyonları kullanılarak radikal giderme aktiviteleri DPPH• radikali kullanılarak incelenmiştir. Bitkinin su ekstresi 10, 50, 100, 500 ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarında sırasıyla %0,0, %4,02, %13,00, %23,51 ve %29,00 inhibisyon görülürken, metanol ekstresinde aynı konsantrasyonlardaki inhibisyonları sırasıyla %40,50; %46,70; %53,40; %89,78 ve %93,30 şeklinde olduğu tespit edilmiştir (Mothana vd., 2010).

Akdemir vd. (2003b; 2005) yapmış olduğu iki ayrı çalışmada, *V. salviifolium*'un toprak üstü kısmından 4-flavon glukoziti (apigenin- 7-O- β -glukopiranozit, luteolin-7-O- β -glukopiranozit, luteolin-3"-O- β -glukopiranozit ve krizoeriyol-7-O- β -glukopiranozit), 5 feniletanoit glukoziti (verbaskozit, β -hidroksiakteozit, forsitozit B, angorozit A ve martinozit) ve 2 neolignan glkozit (dihidrokoniferilalkol-9-O- β -D-glukopiranozit, dihidrokoniferilalkol 9-O- β -D-glukopiranozit) bileşikleri izole edilmiştir. İzole edilen bu bileşiklerin serbest radikal giderme aktiviteleri DPPH radikali kullanılarak araştırılmış ve bileşiklerin aktif olduğu belirlenmiştir.

V. cilicicum, *V. lasianthum*, *V. pterocalycinum* ve *V. salviifolium* bitkilerinin toprak üstü kısımlarının metanol ekstrelerinden 36 sekonder metabolit izole edilmiş olup bu bileşiklerin serbest radikal giderme aktiviteleri ve hücre agregasyonunu inhibe edici aktiviteleri araştırılmıştır. İzole edilen bu bileşiklerden verbaskozit ve ilvensisaponin A pozitif yönde etki gösterdiği ve bununla beraber diğer bileşiklerin aktivite göstermediği rapor edilmiştir (Tatlı vd., 2007).

Boğa vd. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, *V. flavidum* bitkisinden petrol eteri, aseton, metanol ve su ekstreleri hazırlanmıştır ve ekstrelerin antioksidan aktivitesi β -karoten-linoleik asit test yöntemi, DPPH $\cdot$ serbest radikal giderme, ABTS $^{++}$ katyonik radikal giderme ve bakır indirgeme yöntemleriyle test edilmiştir. *V. flavidum* bitkisinin metanol ekstresi DPPH $\cdot$ serbest radikal giderme çalışmasında 100 μ g/ml konsantrasyonda %72,62 inhibisyon, metanol ve su ekstreleri ABTS $^{++}$ katyon radikal giderme çalışmasında 100 μ g/ml konsantrasyonda sırasıyla %86,01 ve %87,39 inhibisyon, petrol eteri ve metanol ekstreleri β -karoten-linoleik asit test sisteminde sırasıyla %40,26 ve %40,51 inhibisyon aktivitesine sahip olduğu ve ayrıca ekstrelerin bakır indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) yönteminde aktivite göstermedikleri bildirilmiştir.

2.3.2.4. Antinosiseptif ve antiinflamatuvar aktivite

Ülkemizin çeşitli bölgelerinde antinosiseptif ve antiinflamatuvar etkisinden dolayı halk arasında tıbbi kullanımı olan endemik *V. pycnostachyum*, *V. dudleyanum*, *V. latisepalum*, *V. salviifolium*, *V. pycnostachyum*, *V. chionophyllum* ve *V. splendidum* bitkilerinin bu etkileri incelenmiştir. Çalışma sonucunda, *V. chionophyllum* ve *V. cilicicum*'un çiçeklerinden ve *V. latisepalum*'un toprak üstü kısmından elde edilen

metanol ekstrelerinin 200 mg/kg oral dozunun antinosiseptif ve antienflamatuar etkisinin olduğu ve bununla beraber diğerk türlerden elde edilen ekstrelerin dikkate değerk oranda antinosiseptif ve antienflamatuar aktivite göstermediğı rapor edilmiştir (Tatlı vd., 2008).

Hemoroid tedavisinde kullanılan *V. lasianthum* bitkisinin toprak üstü kısmı metanol ile ekstraksiyon yapılp bu ekstreden 8 bileşik izole edilmiştir. Hem ekstrenin hem de izole edilen bileşiklerin antinosiseptif ve antienflamatuar etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda bitkinin metanol ekstresinin aktivite gösterdiği, ekstreden izole edilen bileşiklerden ise okübin ve ilvensisaponin A, hiçbir toksisiteye yol açmadan antinosiseptif ve antienflamatuar etkiye sahip olduğı rapor edilmiştir (Küpeli ve ark. 2007).

2.3.2.5. Antitümör ve antikanser aktivite

V. thapsiforme bitkisinin çiçek kısmından elde edilen su ekstresinin protein biyosentezi üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmada, *V. thapsiforme* türüne ait su ekstresinin izole sıçan karaciğerinde protein biyosentezi üzerinde güçlü inhibisyon gösterdiği ve bu etkinin bitkide bulunan saponinlerden kaynaklandığı rapor edilmiştir (Paszkievicz-Gadek vd., 1990).

V. chionophyllum, *V. cilicicum*, *V. pterocalycinum*, *V. pycnostachyum* ve *V. splendidum* türlerinin SK-MEL, KB, BT-549 ve SK-OV-3 kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktiviteleri araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda bitki türlerine ait metanol ve etil asetat ekstrelerinin sitotoksik aktiviteleri karşılaştırılmıştır ve *V. pterocalycinum* bitkisinin çiçek kısmından elde edilen metanol ekstresi, SK-MEL kanser hücrelerine karşı zayıf sitotoksik aktiviteye sahip olduğı rapor edilmiştir (Tatlı ve Akdemir 2006).

2.3.2.6. Gastrik ülser aktivite

V. cheiranthifolium türünden elde edilen su ekstresinin, farelerde etanol ile oluşturulmuş gastrik ülsera karşı oral yoldan verilmiş ve ülser gelişimini %86,2 oranında inhibe ettiğı belirlenmiştir (Gürbüz vd., 2005).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışmaya konu olan bitkisel materyallerinin toplanılması, hazırlanması, ekstraksiyonu, test numunelerinin hazırlanması, fraksiyonlandırma, ayırma, saflaştırma, yapı tayini işlemleri, ekstrelerin antioksidan, antiproliferatif ve antidiyabetik aktivite testleri Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi ve Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Araştırma Merkezi Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. İzole edilen bileşiklerin, antiproliferatif aktivite testleri Yozgat Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde, *in vitro* enzim aktivite testleri ise Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde gerçekleştirildi.

3.1. Bitkisel Materyaller

Bitkisel materyaller Erzincan ili sınırlarındaki lokasyonlardan toplanmıştır. *V. leiocarpum* bitkisi, 20 Mayıs 2020 tarihinde, İliç, Doğanköy mevkinde, Uluyamaç arasında, 1383 m yükseklikte, B7 (37 S 453896 D, 4360587 K, 24.05.2014, Herbaryum no: Kandemir 10519) koordinatlarından toplanmıştır. *V. tuna-ekimii* bitkisi, 20 Mayıs 2020 tarihinde, İliç, Bağıştaş mevkinde, 1128 m yükseklikte, B7 (37 S 527775 D, 4387981 K, 25.5.2014, Herbaryum no: Kandemir 10538) koordinatlarından toplanmıştır. *V. alyssifolium* bitkisi, 9 Haziran 2020 tarihinde, Kemah Yücebelen'den, Bekiroğlu Yaylası'na doğru, 1338 m yükseklikte, B7 (37 S 484537 D, 4380797 K, 18.06.2014, Herbaryum no: Kandemir 10379) koordinatlarından toplanmıştır. *V. ozturkii* bitkisi, 16 Haziran 2020 tarihinde, İliç, Bağıştaş mevkinde, B7 (39 S 466821 D, 4399204 K, 1509 m, 25.5.2014, Herbaryum no: Kandemir 10574) koordinatlarından toplanmıştır. *V. leiocarpum*, *V. tuna-ekimii*, *V. alyssifolium* ve *V. ozturkii* türleri Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim üyesi Pof. Dr. Ali KANDEMİR tarafından teşhis edilmiştir.

3.2. Bitkisel Materyallerin Kurutulması ve Ekstraksiyon İşlemi

Çiçeklenme döneminde doğal yaşam alanlarına ve üremelerine zarar vermeyecek şekilde ve sınırlı miktarda temin edilen bitkiler, farklı kısımlara ayrılarak (gövde-yaprak ve kök) oda sıcaklığında, havalandırma problemi olmayan, güneş ışığından uzak ve nem içermeyen serin yerlerde kurumaya bırakıldı. Kurutulan bitkilerin farklı kısımları (gövde ve kök) blender ile öğütülüp toz haline getirildi ve kese kağıtları içinde güneş

görmeyen yerlerde muhafaza edildi. Ön deneme biyolojik aktivite testleri ve doğal ürünlerin izolasyonu için öğütölüp toz haline getirilen bitkilerin kök ve toprak üstü kısımları 70:30 MeOH: su çözücü sistemi ile ekstrakte edildi. Her bir bitkinin toprak üstü kısmı için 100 g alınıp 800 ml 70:30 MeOH: su, kök kısımları için ise her bir bitkiden 4 g alınıp 100 ml 70:30 MeOH: su karışımı eklenip 24 saat bekletilerek süzölldü (Bkz. Şekil 3.1). Bu işlem 5 kez tekrarlandı. Süzölntöler birleştirilerek MeOH evaporatör ile uçuruldu. Geriye kalan sulu kısım 72 saat liyafilizatörde kurutularak biyolojik aktivite testlerinde çalışılacak ekstreler elde edildi.



Şekil 3.1. Bitkilerin ön deneme biyolojik aktiviteleri için ekstraksiyonu

İzolasyon çalışması için ise tez çalışmasında kullanılacak *V. leiocarpum*'un toprak üstü (1,5 kg) ve toprak altı (294 g) kısımları blenderde öğütölldü. Bitkinin polar içeriğinin özölntlenmesi için tercih edilen metanol-su çözölcü sistemi eklenerek 24 saat boyunca oda şartlarında maserasyona bırakıldı. Maserasyon süresinin sonunda çözölte filtre kâğıdı ile süzölldü ve tekrar metanol-su solvent sistemi eklendi (Bkz. Şekil 3.2). Bu işlem aynı şekilde 5 kez tekrarlandı. Filtrasyon işleminden sonra elde edilen süzölntöler birleştirildi ve metanol evaporatörde (50°C'de) sulu kısım ise liyafilizatörde 72 saat bekletilerek uzaklaştıırıldı. İşlemler sonucunda izolasyon aşaması için bitkinin toprak üstü ekstraksiyonu sonucunda 90 g, kök kısmı ekstraksiyonu sonucunda 25 g ekstre elde edildi.



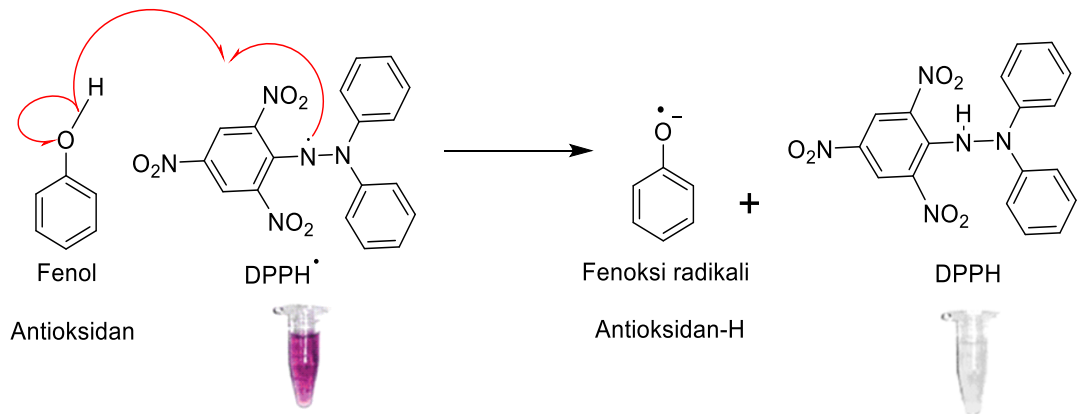
Şekil 3.2. *Verbascum leiocarpum* bitkisinin ekstraksiyonu

3.3. Ham Ekstrelerin ve İzole Edilen Bileşiklerin Biyolojik Aktiviteleri

3.3.1. Antioksidan aktivite

3.3.1.1. DPPH[•] serbest radikal giderme aktivitesi

Antioksidanlar, DPPH[•] ile etkileşime girip elektronlarını ya da hidrojen atomlarını vererek DPPH[•]'ın serbest radikal özelliğini azaltmaktadır (Archana vd., 2005). DPPH[•] serbest radikal giderme aktivitesi yöntemi, DPPH çözeltisinin koyu menekşe renginin ortamdaki antioksidanlar tarafından elektron transferi ile açılması (Bkz. Şekil 3.3) ve meydana gelen bu renk değişikliğinin spektrofotometre ile ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Antioksidanlar tarafından DPPH radikali indirgendiği zaman absorbans azalmaktadır. DPPH çözeltisinin koyu menekşe rengindeki açılma ve karışımın absorbansındaki azalma ne kadar yüksek olursa serbest radikali giderme aktivitesi de o kadar yüksek olmaktadır (Mathew ve Abraham, 2006).



Ön deneme biyolojik aktivite için bitkilerden elde edilen ekstrelerin ve izole edilen bileşiklerin serbest radikal (DPPH[•]) giderme aktiviteleri (Blois, 1958) tarafından rapor edilen yöntemde bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirildi. DPPH[•] (2,2-difenil-1-pikril hidrazil) çözeltisi 0,26 mM konsantrasyonda metanol ile çözülerek hazırlandı. Test için ekstrelerin ve standartların stok çözeltileri (1 mg/ml) hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltilerden 20, 40, 80, 120, 160, 240, 320 ve 400 µg/ml konsantrasyonlarında numuneler hazırlandı ve son hacimleri metanol ile 3 ml'ye tamamlanarak üzerine 1 ml DPPH[•] çözeltisi ilave edildi. Karışım vorteks yardımı ile karıştırılarak karanlık ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda her bir reaksiyon karışımının absorbansı 517 nm'de ölçüldü ve elde edilen absorbans değerleri % aktiviteye dönüştürülüp her bir ekstre için IC₅₀ (µg/ml) hesaplandı ve sonuçlar standart antioksidan olan troloks ile karşılaştırıldı.

3.3.1.2. ABTS^{•+} katyonik radikal giderme aktivitesi

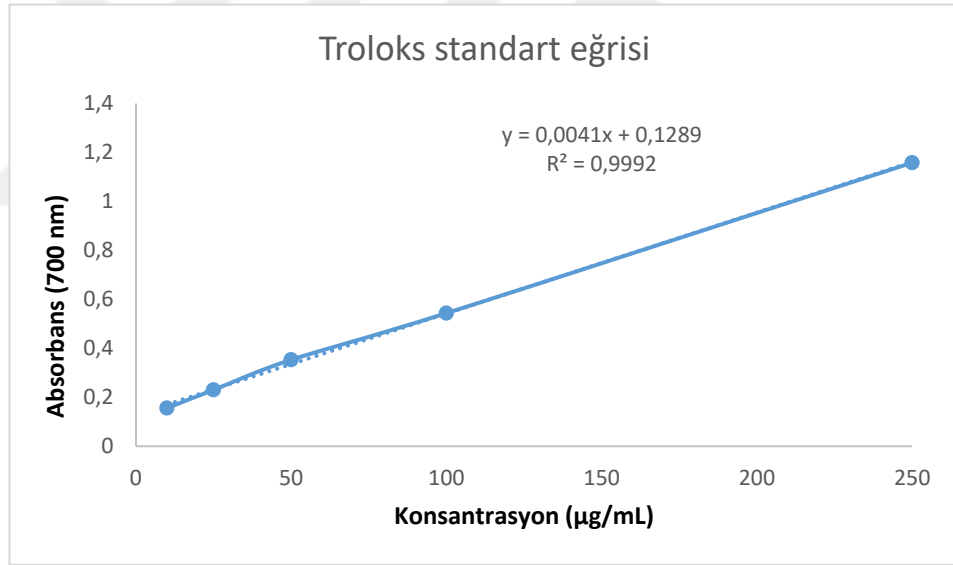
Bitkiden izole edilen bileşiklerin katyonik radikal giderme aktiviteleri (Re vd., 1999) tarafından rapor edilen yöntemde bazı modifikasyonlar yapılarak belirlendi. Kısaca, 0,1 M pH:7,4 fosfat tamponu hazırlandı. 2 mM ABTS (2,2'-Azino-bis 3- etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) çözeltisi ve 2.45 mM K₂S₂O₈ (potasyumpersülfat) çözeltisi 0,1 M pH:7,4 fosfat tamponu ile hazırlanarak bu iki çözelti 1:2 oranında karıştırılıp karanlık ortamda 12 saat bekletildi. Test edilecek bileşiklerin ve standartların stok çözeltileri (1 mg/ml) hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltilerden 20, 40, 80, 120, 160, 240, 320 ve 400 µg/ml konsantrasyonlarında numuneler hazırlandı ve son hacimleri fosfat tamponu ile 3 ml'ye tamamlanarak üzerine 1 ml ABTS^{•+} çözeltisi ilave edildi. Karışım vorteks yardımı ile karıştırılarak karanlık ve oda sıcaklığında 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda her bir reaksiyon karışımının 734 nm'deki absorbansı ölçüldü ve elde edilen absorbans değerleri % aktiviteye dönüştürülüp her bir ekstre için IC₅₀ (µg/ml) hesaplandı ve sonuçlar standart olarak kullanılan troloks ile karşılaştırıldı.

3.3.1.3. Ferrik iyonlarını (Fe³⁺) ferröz iyonlarına (Fe²⁺) indirgeme gücü aktivitesi (FRAP)

Antioksidan aktivite çalışmalarının FRAP metotunda, antioksidan maddelerin indirgeme aktivitelerinden dolayı test çözeltisinin sarı rengi yeşil renk olmaktadır (Gülçin vd., 2006). Fe⁺³ iyonunun indirgenmesi, antioksidan aktivitesi için önemli olan

ve diğer antioksidan mekanizmalarla yakından ilişkili olan, bileşiğin elektron verme yeteneğinin bir göstergesidir. Standart olarak kullanılan troloks'un farklı derişimleri ile elde edilen kalibrasyon eğrisi (Bkz. Şekil 3.4) oluşturulup sonuçlar µg TE/g ekstre olarak verilmiştir.

İndirgeme gücü aktivite testi (Oyaizu, 1986) tarafından rapor edilen yöntemde bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirildi. Test için ekstrelerin, izole edilen bileşiklerin ve standartların stok çözeltileri (1 mg/ml) hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltilerden 100 µl test tüplerine alınarak fosfat tamponu (0.2 M, pH 6,6) ile hacmi 1,25 ml'ye tamamlandı. Bu karışıma 1,25 ml potasyum ferrik siyanür [$K_3Fe(CN)_6$] (%1) eklendi ve karışım 50 °C'de 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, reaksiyon ortamına sırasıyla 1,25 ml %10'luk trikloroasetik asit (TCA) ve 0,25 ml %0,1'lik $FeCl_3$ solüsyonu eklendi ve son karışımın absorbansı 700 nm'de kaydedildi.



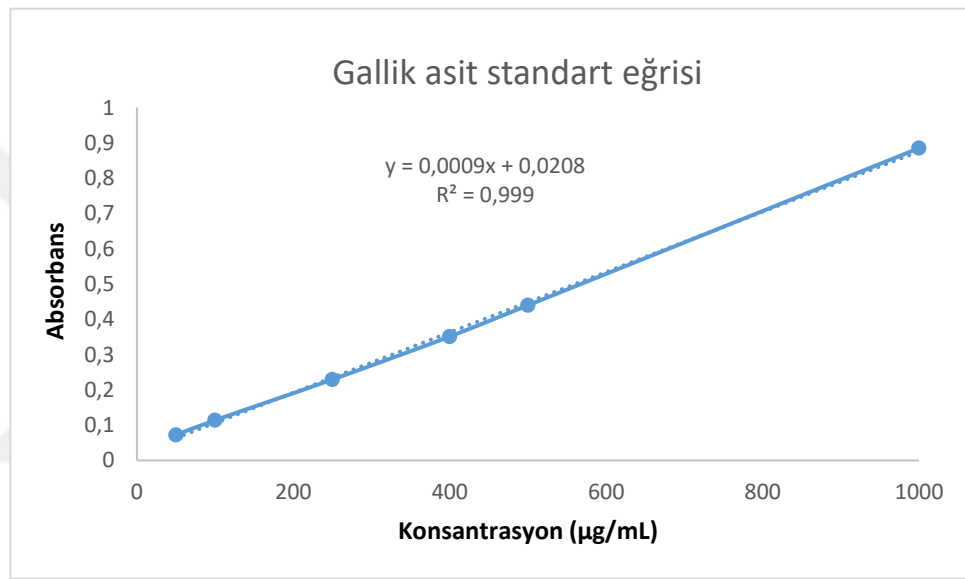
Şekil 3.4. Troloks standart eğrisi

3.3.1.4. Toplam fenolik miktarı

Fenolik bileşiklerin antioksidan çalışmalarının temelinde olmasını, antioksidan özellikleri başta olmak üzere antikanser, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar gibi birçok biyolojik özelliğe sahip olması sağlamıştır. Bundan dolayı bitkisel ekstrelerin toplam fenolik içeriklerinin belirlenmesi önemlidir.

Ekstrelerin toplam fenolik madde içeriği, Folin-Ciocalteu reaktifi ile spektrofotometrik olarak belirlendi (Slinkard ve Singleton, 1977). Bu amaçla, 1 mg/ml derişimlerindeki

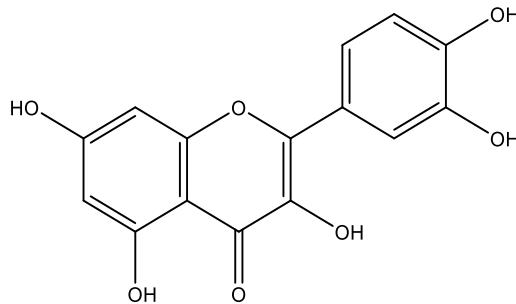
numunelerin stok çözeltilerinden 100 µl test tüplerine alınarak üzerine 4,5 ml distile su eklendi. Daha sonra karışıma 100 µl Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edildi ve oda koşullarında 10 dakika bekletildi, ardından 300 µl %2'lik Na₂CO₃ çözeltisi ilave edildi. Bu karışım daha sonra vortekslendi ve oda koşullarında 120 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra karışımın absorbensları 760 nm'de ölçüldü. Standart olarak kullanılan gallik asitin farklı derişimleri ile kalibrasyon eğrisi (Bkz. Şekil 3.5) oluşturuldu ve ekstrelerin fenolik madde içeriği mg gallik aside eşdeğer fenolik madde/g ekstre olarak verildi (Slinkard ve Singleton, 1977).



Şekil 3.5. Gallik asit standart eğrisi

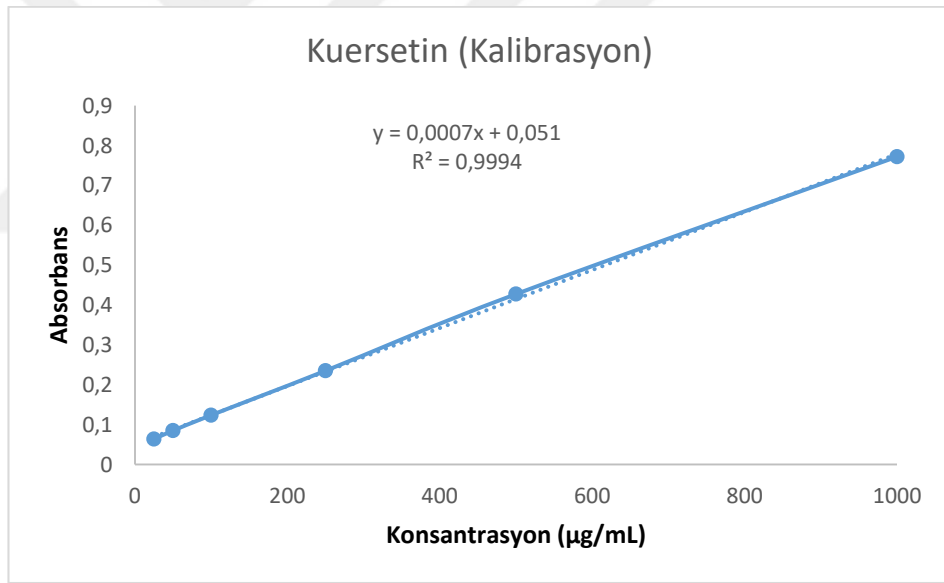
3.3.1.5. Toplam flavonoid miktarı

Birçok çalışmada standart antioksidan olarak kullanılan ve Şekil 3.6'da açık yapısı verilen kuersetin bitki ekstralarının flavonoid miktarlarının belirlenmesinde standart flavonoid olarak kullanıldı (Türkoğlu vd., 2006).



Şekil 3.6. Kuersetin bileşiğinin genel yapısı

Örneklerdeki toplam flavonoid miktarının belirlenmesi, bileşiklerin AlCl_3 reaktifi ile reaksiyonu sırasında oluşan renkli kompleks bileşenlerin absorbans değerlerinin belirlenmesine dayanmaktadır (Chang vd., 2002). Bitkilerden elde edilen ekstrelerin toplam flavonoid içeriği alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi ile gerçekleştirildi (Chang vd., 2002). Test için ekstrelerin ve standartların metanol içinde hazırlanan (1 mg/ml) stok çözeltilerden 100 μl test tüplerine alınarak son hacim metanol ile 4,8 ml'ye tamamlandı. Daha sonra karışıma 100 μl 1 M $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ solüsyonu ve 100 μl %10'luk AlCl_3 solüsyonu eklenip vortekslenerek elde edilen son karışım oda koşullarında 45 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra karışımın absorbansları 415 nm'de spektrofotometrede ölçüldü. Standart olarak kullanılan kuersetinin farklı derişimleri ile kalibrasyon eğrisi (Bkz. Şekil 3.7) oluşturuldu ve ekstrelerin flavonoid madde içeriği mg kuersetin eşdeğeri/g ekstre olarak verildi.



Şekil 3.7. Kuersetin standart eğrisi

3.3.2. Antidiyabetik aktivite

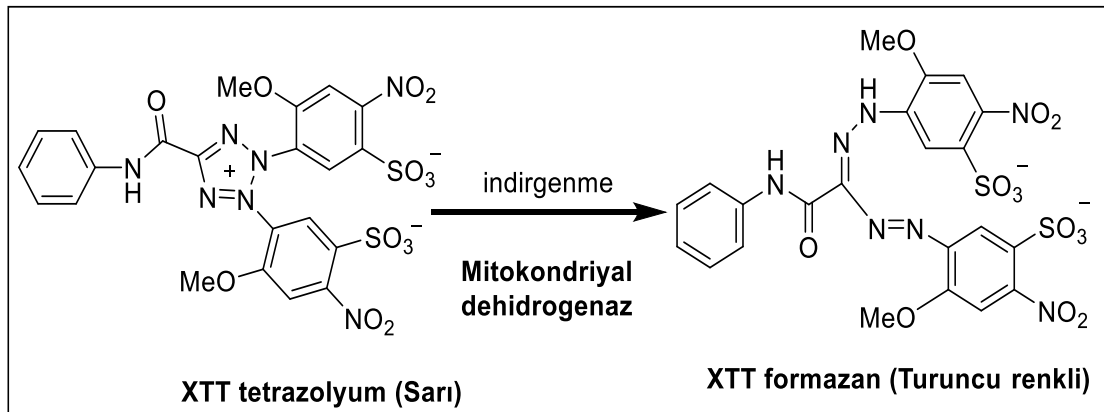
Ham ekstrelerin ve izole edilen bileşiklerin α -glukozidaz inhibitör etkisi Tao ve arkadaşlarının yöntemine (2013) göre belirlendi. İlk olarak α -glukozidaz enzimi (0,1 Ünite/ml) 0,1 M fosfat tamponu ile çözüldü ve bu çözelti enzim solüsyonu olarak çalışmada kullanıldı. Daha sonra substrat olan *p*-nitrofenil-D-glukopiranozit (pNPG 0,375 mM) aynı tampon ile hazırlandı. İncelenecek ekstreler tampon veya dimetilsülfoksitte (DMSO) çözülerek her bir örnekten (20 μl) ve enzim solüsyonundan 10 μl alınarak karıştırıldı. Karışıma daha sonra 20 μl substrat ilavesi ile reaksiyon

başlatılarak karışım 37°C'de 30 dk. inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra ortama 0,1 M potasyum fosfat tamponu içinde hazırlanan 50 µl (0,2 M) sodyum karbonat ilave edildi ve 96 kuyucuklu mikrolaka okuyucuda 405 nm'de numunelerin absorbansları ölçüldü. Elde edilen değerler pozitif kontrol olan akarboz ile kıyaslanıp sonuçlar IC₅₀ cinsinden hesaplandı.

3.3.3. Antiproliferatif aktivite

Ham ekstrelerin antiproliferatif aktivitesine yönelik testler Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Uygulama ve Araştırma Merkezi Hücre Kültür laboratuvarında, izole edilen bileşiklerin antiproliferatif aktivitesine yönelik testler ise Yozgat Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

Bitkilerden elde edilen ekstrelerin antiproliferatif aktiviteleri XTT [(2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide)] yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. XTT analizi, formazon boyalarının ya da XTT azalmasına bağlı olarak enzimatik aktivitenin kolorimetrik ölçümüne dayanan hücre çoğalma miktarının tespit edildiği bir yöntemdir. Bu yöntemde, XTT tuzu, proliferasyonu artmış hücreler tarafından kullanılmakta ve artan dehidrojenaz enzim aktivitesine bağlı olarak XTT tuzunu turuncu renkli suda çözünebilen formazan ürününe dönüştürmektedir (Bkz. Şekil 3.8). Hücre proliferasyonundaki değişimler, meydana gelen renk değişiminin ELISA okuyucu veya spektrofotometre ile ölçülmesiyle belirlenmektedir (Scudiero vd., 1988).



Şekil 3.8. Tetrazolyumun indirgenmesiyle oluşan renkli formazan türevi

Tez kapsamında ekstraksiyonu yapılan bitkilerden elde edilen ekstrelerin MDA-MB-453 (insan meme kanseri), HT-29 (kolorektal adenokarsinoma) ve A549 (Akciğer

kanseri) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif etkileri incelenmiştir. HT-29 hücreleri, %10 fetal bovin serumu (FBS) ve penisilin-streptomisin (Pen-Strep) solüsyonu içeren McCoy's 5A ortamında, A-549 hücre hattı ise %10 fetal bovin serumu (FBS) ve penisilin-streptomisin (Pen-Strep) solüsyonu içeren DMEM ortamında kültüre edildi.

Sayımı yapılan 5×10^3 hücre 100 µl kültür medyum içerisinde hazırlandı ve 96 kuyucuklu plakalara ekimi yapılarak hücrelerin yüzeye yapışmaları için 37°C ve %5'lik CO₂ ayarlı inkübatörde bekletildi. İnkübasyon sonrasında plak içerisindeki kültür medyumunu uzaklaştırılarak PBS tamponu ile her bir kuyucuk yıkandı ve yıkama tamponu ortamdan uzaklaştırıldı. Test için her bir ekstrenin kültür ortamında hazırlanan konsantrasyonda (250-500 µg/ml) 96'lık plak içerisine 100 µl ilave edildi ve 37°C'de %5'lik CO₂ ayarlı inkübatörde zamana bağımlı olarak (24, 48 ve 72 saat) inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda, her bir kuyucuğa 50 µl hazırlanan XTT solüsyonundan (5 ml XTT için 100 µl aktivatör) eklendi ve %5'lik CO₂ ayarlı inkübatörde 5 saat inkübe edildi. İnkübe edilen hücreler, mikropate okuyucu spektrofotometre kullanılarak absorban değerleri 470/490 nm'de ölçüldü.

Hücre proliferasyonundaki azalma aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$\% \text{ inhibisyon} = 100 - \frac{[\text{Abs(izole edilen molekül ile muamele görmüş hücreler)} - \text{Abs(hücresiz ortamdaki izole molekül)}]}{[\text{Abs(kontrol grubu hücreler)} - \text{Abs(hücresiz ortam)}]} \times 100$$

Tez kapsamında izole edilen bileşiklerin antiproliferatif aktivitelerinin belirlenmesinde Beas2B (CRL-9609) normal akciğer hücre hattı, RPE (CRL-4000) normal retinal hücre hattı ve HSF (CRL-7449) normal deri hücre hattı ile A172 (CRL-1620) ve C6 (CCL-107) beyin kanseri hücre hatları, HeLa (CCL-2) ve A2780 (CVCL_0134) serviks ve over kanseri hücre hatları, SW620 (CCL-227) ve HT29 (HTB-38) kolon kanseri hücre hatları kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan bütün hücrelerin hazırlanma işlemleri laminar kabinde steril ortamda gerçekleştirilmiştir. Hücre hatları 37 °C, %5 CO₂ şartlarında, %2 PenStrep (Penisilin-Streptomisin) ve %10 FBS (Fetal Bovine Serum) solüsyonu içeren katkılı RPMI1640 ya da DMEM besi yerinde yeterli çoğunluğa (konfluent) ulaşması sağlandıktan sonra kullanılmıştır. Hücre hazırlama prosedürünün tamamlanmasından sonra, kuyu başı 10.000 hücre olacak şekilde ölçüm plakalarına ekim yapıldıktan sonra plaklar inkübatörde bekletildi. Yaklaşık 16 saatlik ön

inkübasyondan sonra, test bileşikleri eklenmiş ve 24 saatlik inkübasyon sonrasında ölçümler alınmıştır.

3.3.3.1. Hücre proliferasyon ölçümü ve NCI-60 yaşam parametrelerinin (GI₅₀, TGI ve LC₅₀) belirlenmesi

V. leiocarpum bitkisinden elde edilen bileşiklerin hücre proliferasyonuna olan etkileri ve NCI-60 yaşam parametre değerlerini belirlemek için MTT [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid] testi kullanıldı. Kanseri hücre hatları ile aktiviteleri test edilecek bileşikler 24 saat inkübe edildikten sonra test prosedürü uygulandı. Çözücü (DMSO) ile muamele edilmiş hücrelerin optik dansitesi %100 olarak alındı ve çalışma sonucunda elde edilen veriler % hücre inhibisyonu olarak hesaplandı. Buna göre hücre proliferasyonundaki azalma % inhibisyon $[1 - (A \text{ test maddesi} / A \text{ çözücü kontrol}) \times 100]$ eşitlik kullanılarak belirlendi. Her bir bileşiğin artan konsantrasyonları (1,96; 3,91; 7,81; 12,0; 15,63; 31,25 ve 62,5 µg/ml) hücreler üzerinde MTT yöntemi ile test edildi ve çalışma sonrasında elde edilen absorbans değerlerinden logaritmik eğri hazırlandı. Bu eğri üzerinden Excel® programı yardımıyla logaritmik fonksiyon kullanılarak numunelerin IC₅₀ konsantrasyonları (ortamdaki hücrelerin %50'sinin proliferasyonunu inhibe eden konsantrasyon) belirlendi. NCI-60 yaşam parametrelerinin (GI₅₀, TGI ve LC₅₀) ölçülmesi için aşağıdaki denklemler kullanılarak hesaplandı.

Hücre proliferasyonu: $[(Ti - Tz) / (C - Tz)] \times 100$ eğer $Ti \geq Tz$ (sitositativ etki) ya da $[(Ti - Tz) / Tz] \times 100$ eğer $Ti < Tz$ (sitosidal ya da sitotoksik etki) (Tz; sıfır noktası, C; kontrol büyüme, Ti; test maddesinin neden olduğu inhibisyon). GI₅₀: Büyümeyi %50 oranında azaltan konsantrasyon değerini $[(Ti - Tz) / (C - Tz)] \times 100 = 50$, TGI: Büyüme %100 oranında azaltan konsantrasyon değerini $(Ti = Tz)$, LC₅₀: Ortamdaki hücreleri %50 oranında öldüren konsantrasyon değerini $[(Ti - Tz) / Tz] \times 100 = -50$ göstermektedir.

3.3.3.2 Sitotoksikite testi

Aktiviteleri incelenen numunelerin sitotoksik mi yoksa sitostatik mi oldukları LDH yöntemi ile belirlenmiştir. Test edilen örneklere bağlı olarak inkübasyon süresinde ölen hücre miktarındaki artmanın olması, kültür süpernatantında LDH artışıyla sonuçlanacaktır. Laktat dehidrogenaz (LDH), çoğu hücrede bulunan ve stabil olan sitoplazmik bir enzimdir. Bu nedenle, LDH hücrelerinin sitotoksikitesini belirlemeye

yönelik kit, üreticinin prosedürüne göre kullanılmıştır. LDH enzim aktivitesinden dolayı meydana gelen formazan miktarındaki değişim ölçülüp aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

% Sitotoksosite = [(Madde Absorbans - Düşük Kontrol / Yüksek Kontrol - Düşük Kontrol) x 100].

3.4. Kromatografik Analizler

Tez çalışmasında izolasyona tabi tutulan *Verbascum leiocarpum* bitkisinin toprak üstü ve kök kısımlarından elde edilen ekstrelerdeki bileşiklerin izolasyonunda; Sefadeks LH-20, Flash Kromatografisi, HPLC ve İnce Tabaka Kromatografisi yöntemlerinden yararlanılmıştır. Ayırma ve saflaştırma basamağında; özütün miktarına göre, değişik ebatlarda kolonlar kullanılmıştır.

3.4.1. Kolon kromatografisi

Kolon kromatografisi, bir karışımdaki kimyasal bileşenlerin ayrı ayrı elde edilmesi, tanımlanması ve belirlenmesi için yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir. Karışımlar, hareketli fazın (elüent) kolon içine doldurulmuş sabit bir faz (adsorban) üzerinden geçirilmesiyle ayrılmaktadır. Sabit faz olarak silikajel, alümina, florisil, aktif kömür, kil, komposit gibi adsorban maddeler kullanılırken, hareketli faz olarak uygun bir solvent veya solvent karışımı kullanılmaktadır. Materyal kolona yüklendikten sonra, karışımdaki kimyasal bileşikler hareketli faz tarafından sabit faz boyunca sürüklenir ve maddeler özelliklerine göre ayrılarak kolonda farklı zamanlarda gelir. Kolon kromatografisinde maddeler sabit fazda ne kadar uzun tutulurlarsa kolonu o kadar geç terk ederler. Bu tutulma sabit faz ve ayrılacak maddenin polaritesindeki dengeye bağlıdır.

Bu çalışmada ekstreleri fraksiyonlandırmak ve bu fraksiyonlardan bileşikleri saflaştırmak amacıyla, silika jel (Merck, Kiesegel 60, 70-230 Mesh), sefadeks LH-20 ve C18 gibi farklı kolon dolgu maddeleri kullanıldı. Ayırma ve saflaştırma basamağında; ekstre miktarına göre, çeşitli genişlik ve uzunluklardaki kolonlar kullanıldı.

3.4.1.1. Normal faz silika jel kolon kromatografisi

Silika jel ve alümina, kolon kromatografisinde en sık kullanılan dolgu maddeleridir. Her ikisi de polardır ve apolar bileşenlerin kolondan önce ayrılmalarını sağlamaktadır. Alümina kadar güçlü olmasa da silikajel, çok çeşitli polaritelere sahip maddelerin ayrılmasını sağlamaktadır ve kimyasal reaksiyon verme olasılığı alüminadan daha düşüktür.

Bu çalışmada, ilk olarak karışımdaki maddeleri izole etmek için İTK ile uygun hareketli faz sistemi belirlendi. Daha sonra, kullanılacak ekstre miktarına ve kullanılan cam kolonun boyutuna bağlı olarak, istenilen miktarda silika jel tartıldı ve elüsyona başlanacak hareketli faz sisteminde süspanse edildi. Süspansiyon haline getirilen silikajel, hiçbir hava kabarcığı kalmayacak şekilde bir cam kolona yüklendi ve kolonu şartlandırmak için bir süre hareketli faz sisteminden geçirildi. Sonrasında adsorban üzerinde 1-2 mm yüksekliğinde çözücü kalacak şekilde ayarlanarak numune tatbikine hazır duruma getirildi. İzolasyona tabi tutulacak karışım, elüsyona başlanacak çözücü sistemi ile çözülerek kolona tatbik edildi. Kolon başlangıç çözücüsünde çözünmeyen karışımları ise silikaya emdirilip çözücü uçurulduktan sonra kuru ve homojen bir karışım haline getirilerek kolona tatbik edildi. Düşük polariteye sahip çözücü sistemi ile başlanılarak polarite belirli oranlarda artırıldı ve izolasyon işlemleri en yüksek polarite ile sonlandırıldı. Çalışma sonucunda elde edilen fraksiyonlar İTK ile incelendi ve fraksiyonlar R_f (yürüme hızı) değerlerine göre birleştirildi. Karışım olarak elde edilen fraksiyonlar, daha küçük boyuttaki kolonlarda silika jel ve ters faz silika jel kullanıldı.

3.4.1.2. Sefadeks LH-20 kolon kromatografisi

Sefadeks LH-20 hem lipofilik hem de hidrofobik maddelerin fraksiyonlandırılmasında ve izole edilmesinde kullanılan yöntemlerden biridir. Bitki ekstralarında bulunan yağ, streoid, terpen ve fenolik gibi değişik polaritelere sahip bileşiklerin izolasyonunda ve ekstraların molekül kütesine göre fraksiyonlandırılmasında önemli bir yeri vardır. Büyük miktarlardaki bitki ekstralarının fraksiyonlandırılmasında aynı şartlarda tekrarlama gerekebileceğinden kolon stabilitesinin olması gerekmektedir ve bunun yapılabilmesi için de kolon akış hızı sabit ve oldukça yavaş olmalıdır. Yüksek molekül ağırlığa sahip klorofiller, sefadeks LH-20 ile polar içerik ile etkileşimi olmadan ve kolay bir şekilde ekstreden ayrılabilirler.

Tez çalışması kapsamında; izolasyona tabi tutulacak ekstrelerin fraksiyondırılmasında ve sekonder metabolitlerin saflaştırılmasında Sefadeks LH-20 kolon kromatografisi kullanıldı. Mobil faz olarak metanol ve MeOH: su (1:1) kullanılacağından dolayı 50-100 g dolgu maddesi yeterli miktarda metanol ve MeOH: su (1:1) eklenerek gece boyu şişirildi ve hava kabarcığı kalmayacak şekilde kolonların şartlanması için bir süre çözücü geçirildi. Adsorban üzerinde 1-2 mm yüksekliğinde çözücü kalacak şekilde ayarlanarak numunelerin tatbiki için hazır hale getirildi. İzolasyona tabi tutulacak fraksiyonlar yeterli miktarda metanol ve MeOH: su (1:1) ile çözülerek adsorban yüzeyine tatbik edildi.

3.4.2. İnce tabaka kromatografisi (İTK)

Bitkisel materyalin izolasyon çalışmasında elde edilen fraksiyonların işlenmesinde, saflaştırılan maddelerin saflık kontrollerinde ve kromatografik çalışmalar için uygun çözücü sisteminin bulunmasında ticari olarak mevcut İTK tabakaları (Merck, Kiesegel 60 F₂₅₄) kullanılmıştır. Fraksiyonlar cam pastör pipet yardımıyla, plakaların alt kenarının 1 cm yukarısından tatbik edilip uygun çözücü sistemlerinde kromatografi tankında plaklar 5-7 cm boyunca yürütülerek incelenmiştir. Alüminyum plakada ilerleyen UV aktif maddeler, UV ışık altında (254 ve 366 nm dalga boyunda), daha düşük dalga boylarında absorbans veren, UV aktif olmayan maddelerin gözlemlenebilmesi için ise alüminyum plakların üzerine sülfürik asit ve etanol karışımı (9:1) püskürtülüp lekeler ve bantlar görünür hale gelene kadar ısıtılarak belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre benzer olan fraksiyonlar birleştirildi ve karışım halinde olan fraksiyonlar tekrar izolasyon işlemlerine tabi tutuldu.

3.4.3. Flash kromatografisi

Oldukça hidrofobik özelliğe sahip olan C18, rejenere edilebilmesi, mobil faz olarak suyun kullanabilmesi ve yüksek ayırım kapasitesine sahip olmasından dolayı yüksek polariteye sahip bileşiklerin izolasyonunda sıklıkla kullanılmaktadır. Tez konusunda izolasyon çalışması yapılacak bitkisel materyalin toprak üstü ve kök kısımlarından elde edilen ekstrelerin kaba ayrımı ve ilk fraksiyonlandırma işlemi Flash kromatografisi cihazında C18 kolon ile yapıldı. Karışım halindeki numuneler, kullanılacak kolona ve mobil faza göre kuru tatbik şeklinde veya hareketli fazda çözülerek kolona yüklendi. Elüsyona gradient olarak ayarlanan pompalardan mobil faz akıtılarak başlandı ve cihaz

programında hacim 50 ml olacak şekilde ayarlanarak fraksiyonlar toplandı. Çalışma %100 su ile başlanılarak %100 metanol ile sonlandırıldı. Fraksiyonlardaki mobil faz evaporatör ile uzaklaştırıldıktan sonra metanol ya da metanol:formik asit ile çözülerek uygun temiz kaplara aktarıldı.

3.4.4. Preperatif HPLC

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile yapılan çalışmada, izolasyonu yapılacak örnekler cihaza verilmeden önce uygun çözücüde çözüldükten sonra 0.45 µm por büyüklüğündeki filtrelerden geçirilerek kolona enjeksiyon için hazır hale getirildi. Çalışmalarda mobil faz olarak; ultra saf su, asetonitril veya metanol kullanılmıştır. Uygun kolon seçimi yapıp, uygun yöntem geliştirildikten sonra hacmi 2 ml olan loop kullanılarak manuel olarak enjeksiyonlar yapıldı ve ayırma işlemlerinde C18 ters faz dolgu maddesi içeren Intersil Prep C-18 2025 (10 µm) ve Intersil Prep C-18 2025 (5 µm) kolonları kullanıldı. Çalışma sonucunda elde edilen fraksiyonlar İTK ile incelendi ve karışım halinde olan fraksiyonlar tekrar izolasyon işlemlerine tabi tutuldu.

3.5. Spektroskopik Analizler

3.5.1. Nükleer manyetik rezonans (NMR)

Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi, belirli çekirdeklerin manyetik alandaki hareketlerini temel alan, doğal ürünlerin yapılarının aydınlatılmasında kullanılan önemli bir tekniktir. Uygun çekirdeğe sahip bütün atomlara uygulanmasıyla birlikte, NMR dataları diğer spektral yöntemlere göre daha fazla ve birçok değerli bilgi sunmaktadır.

Bu çalışmada; kromatografik yöntemlerle izole edilen bileşiklerin; ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, HETCOR, COSY ve HMBC spektrumları uygun döterolu çözücüler kullanılarak Bruker Avance II (400 MHz, ¹H ve 100 MHz, ¹³C) NMR cihazında Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi'nde alınmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Ham Ekstrelerin Biyolojik Aktiviteleri

4.1.1. DPPH' serbest radikal giderme aktivitesi

Bitki ekstralarının serbest radikal giderme aktiviteleri 8 farklı konsantrasyonda, DPPH radikali üzerinden, standart olarak kullanılan troloks ile mukayese edilerek belirlendi. Yapılan analiz sonucunda bitkilere ait inhibisyon ve standart sapma değerleri Tablo 4.1'de verilmiştir. Tablo 4.1'de ekstralara göre kıyaslama yapıldığında, toprak üstü ile kök ekstralarında en yüksek ve en düşük DPPH radikali giderme aktivitesini sırasıyla *V. leiocarpum* ($79,65 \pm 2,02$ ve $58,82 \pm 1,45$) ve *V. tuna-ekimii* ($97,07 \pm 1,29$ ve $100,60 \pm 1,68$) bitkileri sergilemiştir. Türlerle ait ekstraların aktivite değerleri standart ile kıyaslandığında, ekstraların troloks'tan daha düşük aktiviteye sahip oldukları görülmektedir.

Tablo 4.1. Bitki ekstralarının ve Troloks'un DPPH radikal giderme aktiviteleri

Örnek	Toprak Üstü DPPH IC ₅₀ (µg ml ⁻¹)	Kök DPPH IC ₅₀ (µg ml ⁻¹)	Troloks IC ₅₀ (µg ml ⁻¹)
<i>V. leiocarpum</i>	$79,65 \pm 2,02$	$58,82 \pm 1,45$	$8,25 \pm 1,16$
<i>V. alyssifolium</i>	$82,62 \pm 0,58$	$93,23 \pm 2,89$	
<i>V. ozturkii</i>	$92,01 \pm 1,93$	$74,41 \pm 2,82$	
<i>V.tuna-ekimii</i>	$97,07 \pm 1,29$	$100,60 \pm 1,68$	

4.1.2. Ferrik iyonlarını (Fe³⁺) ferröz iyonlarına (Fe²⁺) indirgeme gücü aktivitesi (FRAP)

Çalışma kapsamında bitki türlerinden elde edilen metanol:su ekstralarının Fe³⁺ indirgeme gücü aktiviteleri, standart antioksidan troloks'un farklı derişimleri ile hazırlanan kalibrasyon eğrisinin denklemi kullanılarak µg TE/g ekstre olarak verildi. Çalışma sonucunda elde edilen aktivite değerleri Tablo 4.2'de verilmiştir. Tablo 4.2'de ekstralara göre kıyaslama yapıldığında, demir iyonlarını indirgeme gücü bakımından, toprak üstü ile kök ekstralarında en yüksek ve en düşük aktiviteyi sırasıyla *V. leiocarpum* ($119,00 \pm 0,85$ ve $124,16 \pm 0,21$) ve *V. tuna-ekimii* ($87,78 \pm 0,82$ ve $73,18 \pm 1,92$) bitkileri sergilemiştir.

Tablo 4.2. Bitki ekstralarının FRAP aktiviteleri

Örnek	Toprak Üstü İndirgeme Gücü $\mu\text{g TE g}^{-1}$ Ekstre	Kök İndirgeme Gücü $\mu\text{g TE g}^{-1}$ Ekstre
<i>V. leiocarpum</i>	119,00 $\pm$ 0,85	124,16 $\pm$ 0,21
<i>V. alyssifolium</i>	108,59 $\pm$ 0,96	97,57 $\pm$ 0,95
<i>V. ozturkii</i>	95,46 $\pm$ 1,47	98,91 $\pm$ 1,48
<i>V. tuna-ekimii</i>	87,78 $\pm$ 0,82	73,18 $\pm$ 1,92

4.1.3. Toplam fenolik miktarı

Ekstrelerin sahip oldukları fenolik madde miktarları Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak belirlendi. Çalışmada standart fenolik bileşik gallik asitin farklı derişimleri ile hazırlanan kalibrasyon eğrisinin denklemi kullanılarak ekstraların fenolik madde içerikleri mg gallik aside eşdeğer fenolik madde/g ekstre olarak verildi. Yapılan analiz sonucunda bitki ekstralarının toplam fenolik içerikleri Tablo 4.3'te verilmiştir. Tablo 4.3'te ekstrele göre kıyaslama yapıldığında, fenolik madde içeriği bakımından toprak üstü ile kök ekstralarında en zengin ve en düşük olanı sırasıyla *V. leiocarpum* (48,48 $\pm$ 1,49 ve 50,89 $\pm$ 1,19) ve *V. tuna-ekimii* (29,59 $\pm$ 0,16 ve 28,04 $\pm$ 0,70) bitkilerine ait olduğu görülmektedir. Ekstrelerin içerdikleri toplam fenolik madde miktarları ile demir indirgeme gücü (FRAP) ve DPPH·radikalini giderme aktiviteleri arasında korelasyon bulunmaktadır.

Tablo 4.3. Bitki ekstralarının toplam fenolik miktarları

Örnek	Toprak Üstü TFM mg GAE g ⁻¹ Ekstre	Kök TFM mg GAE g ⁻¹ Ekstre
<i>V. leiocarpum</i>	48,48 $\pm$ 1,49	50,89 $\pm$ 1,19
<i>V. alyssifolium</i>	38,67 $\pm$ 1,92	36,91 $\pm$ 1,40
<i>V. ozturkii</i>	29,96 $\pm$ 1,79	43,48 $\pm$ 2,16
<i>V. tuna-ekimii</i>	29,59 $\pm$ 0,16	28,04 $\pm$ 0,70

4.1.4. Toplam flavonoid miktarı

Bitkilerden elde edilen ekstraların sahip oldukları flavonoid madde miktarları, standart flavonoid bileşiği kuersetinin farklı derişimleri ile hazırlanan kalibrasyon eğrisinin

denklemleri kullanılarak mg kuersetine eşdeğer flavonoid/g ekstre olarak verildi. Yapılan analiz sonucunda bitki ekstraktlarının toplam flavonoid içerikleri Tablo 4.4'te verilmiştir. Tablo 4.4'te ekstraktlara göre kıyaslama yapıldığında, flavonoid madde miktarı bakımından toprak üstü ile kök ekstraktlarında en zengin ve en düşük olanı sırasıyla *V. alyssifolium* ($10,12 \pm 1,44$ ve $5,00 \pm 0,18$) ve *V. tuna-ekimii* ($5,83 \pm 0,74$ ve $0,83 \pm 0,30$) bitkilerine ait olduğu görülmektedir.

Tablo 4.4. Bitki ekstraktlarının toplam flavonoid miktarları

Örnek	Toprak Üstü	Kök
	TF mg QE g ⁻¹ Ekstre	TF mg QE g ⁻¹ Ekstre
<i>V. leiocarpum</i>	$8,57 \pm 0,36$	$3,00 \pm 0,55$
<i>V. alyssifolium</i>	$10,12 \pm 1,44$	$5,00 \pm 0,18$
<i>V. ozturkii</i>	$7,38 \pm 1,09$	$2,38 \pm 0,21$
<i>V. tuna-ekimii</i>	$5,83 \pm 0,74$	$0,83 \pm 0,30$

4.1.5. Antidiyabetik aktivite

Bitkilerde etkiden sorumlu bileşiklerin tespiti ve sonrasında izolasyon işlemlerinin yürütülebilmesi için bitkilerin toprak üstü ve kök kısımlarından hazırlanan metanol-su ekstraktlarının α -glukozidaz enzim inhibitör etki çalışmaları tamamlandı ve en yüksek etkiye sahip ekstre/ekstreler tespit edildi. İnhibisyon denemelerinde klinik diyabet tedavisinde kullanılan, bir α -glukozidaz inhibitörü olan akarboz pozitif kontrol olarak kullanıldı. Analiz sonucunda bitki ekstraktlarının antidiyabetik aktiviteleri Tablo 4.5'te özetlendi. Çalışmada α -glukozidaz enziminin inhibitörü olarak kullanılan akarboz'un IC₅₀ değeri $0,71 \pm 1,5$ mg/ml olarak belirlendi. Tablo 4.5'te ekstraktlara göre kıyaslama yapıldığında, bitkilerin toprak üstü ekstraktlarında kayda değer aktivite görülmezken kök ekstraktlarında en yüksek antidiyabetik aktiviteyi *V. leiocarpum* ($0,59 \pm 0,25$ mg/ml), en düşük aktiviteyi ise *V. tuna-ekimii* ($17,9 \pm 1,8$) bitkisinin sergilediği gözlemlendi. Türlerin toprak üstü ve kök ekstraktlarının antidiyabetik aktivite değerleri standart ile kıyaslandığında, bitkilerin toprak üstü ekstraktları standart inhibitör akarbozdan düşük, kök ekstraktlarında ise *V. leiocarpum* bitkisinin aktivitesi akarbozdan daha yüksek olup diğer bitkilere ait ekstraktlar düşük aktivite sergiledi.

Tablo 4.5. Bitki ekstralarının antidiyabetik aktiviteleri

Örnek	Toprak Üstü IC ₅₀ (mg ml ⁻¹)	Kök IC ₅₀ (mg ml ⁻¹)	Akarboz IC ₅₀ (mg ml ⁻¹)
<i>V. leiocarpum</i>	7,15 ± 0,16	0,59 ± 0,25	0,71 ± 1,5
<i>V. alyssifolium</i>	>100	1,87 ± 0,6	
<i>V. ozturkii</i>	>100	1,93 ± 1,10	
<i>V. tuna-ekimii</i>	>100	17,9 ± 1,8	

4.1.6. Antiproliferatif aktivite

Ekstrelerin 250 µg/ml’de MDA-MB-453 (insan meme kanseri) hücre hattı üzerinde yapılan XTT çalışması sonucunda bitkisel materyaller arasında en iyi aktiviteyi *V. leiocarpum* bitkisinin toprak üstü ve kök ekstraları sergilerken *V. tuna-ekimii* bitkisi düşük aktivite göstermiştir. Diğer ekstralarda ise herhangi bir inhibisyon gözlemlenmemiştir. Analiz sonucu bitki ekstralarının MDA-MB-453 hücre hattı üzerindeki antiproliferatif aktivite değerleri Tablo 4.6’da verilmiştir.

Tablo 4.6. Bitki ekstralarının MDA-MB-453 (meme kanseri) hücre hattına karşı antiproliferatif aktiviteleri

Örnek	Toprak üstü (% İnhibisyon)	Kök (% İnhibisyon)
<i>V. leiocarpum</i>	18	69
<i>V. alyssifolium</i>	-	-
<i>V. ozturkii</i>	-	-
<i>V. tuna-ekimii</i>	4	-

*(-) ile gösterilenlerde herhangi bir inhibisyon gözlemlenmemiştir.

Ekstrelerin 250 µg/ml’de HT-29 hücre hattı üzerinde yapılan XTT çalışması sonucunda en iyi aktiviteyi *V. leiocarpum* bitkisinin toprak üstü ile kök ekstraları sergilerken diğer bitkilerde ise çok düşük aktivite görülmüştür. Türlerin toprak üstü ve kök ekstralarının HT-29 hücre hattı üzerindeki % inhibisyon sonuçları Tablo 4.7’de verilmiştir.

Tablo 4.7. Bitki ekstralarının HT-29 (kolon kanseri) hücre hattına karşı antiproliferatif aktiviteleri

Örnek	Toprak Üstü (% İnhibisyon)	Kök (% İnhibisyon)
<i>V. leiocarpum</i>	20	18
<i>V. alyssifolium</i>	6	3
<i>V. ozturkii</i>	2	1
<i>V. tuna-ekimii</i>	7	7

Bitkisel materyallerin 250 µg/ml’de A549 hücre hattı üzerinde yapılan XTT çalışması sonucunda en iyi aktiviteyi *V. leiocarpum* bitkisinin toprak üstü ile kök ekstraları sergilerken diğer bitkilerin ekstralarında düşük aktivite görülmüştür. Bitkisel materyallerin toprak üstü ve kök ekstralarının A549 hücre hattı üzerindeki % inhibisyon sonuçları Tablo 4.8’de verilmiştir.

Tablo 4.8. Bitki ekstralarının A549 (akciğer kanseri) hücre hattına karşı antiproliferatif aktiviteleri

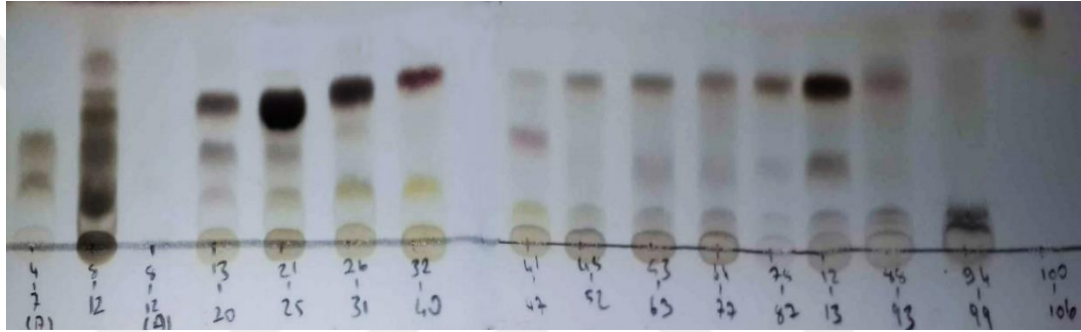
Örnek	Toprak Üstü (% İnhibisyon)	Kök (% İnhibisyon)
<i>V. leiocarpum</i>	30	85
<i>V. alyssifolium</i>	9	2
<i>V. ozturkii</i>	11	14
<i>V. tuna-ekimii</i>	13	9

Yukarıda verilen antiproliferatif ve antidiyabetik aktivite sonuçlarına göre *V. leiocarpum* aktivitelerden sorumlu bileşikleri saflaştırmak üzere kromatografik yöntemlerle izolasyon işlemlerine tabi tutuldu.

4.2. *V. leiocarpum* Bitkisi Üzerinde Yapılan İzolasyon Çalışmaları

Tez çalışması, biyolojik aktivite yönlendirmeli izolasyon çalışmasını metodolojik olarak ilke edinip bu yöntem ile ilerlediğinden; bitkiler üzerinde yapılan ön deneme biyolojik aktivite test sonuçlarına göre, genel olarak en yüksek aktiviteyi *V. leiocarpum* bitkisi gösterdiğinden izolasyon çalışmaları için bu bitki seçilip çalışmalar bu bitki üzerinden yürütüldü. Kromatografik ayırım için, bitkinin toprak üstü ham metanol-su ekstresinin (20 g) ilk fraksiyonlandırılması ve ön ayırımı için flash kromatografi ile C18 kolon kullanılarak yapıldı. Analizde Ecoflex 330 g hazır C18 kolon, mobil faz olarak ise su-

metanol (100:0→0:100) çözücü sistemi kullanıldı ve UV 330, 280 ve 254 nm’de pik deteksiyonu yapıldı. Çalışma sonucunda yaklaşık 106 fraksiyon toplandı ve her bir tüpün içeriği, hareketli faz olarak ön denemelerle belirlenmiş olan polar içerik için etil asetat: asit karışımı: metanol (7:2:1) çözücü sisteminde İTK ile analizleri yapıldı ve benzer R_f değerine sahip olan fraksiyonlar birleştirildi (Bkz. Şekil 4.1). Hareketli faz sisteminde kullanılan asit karışımı; 250 ml için; 11 ml formik asit+10 ml asetik asit+26 ml su+203 ml etil asetat ile elde edilmiştir. Bu işlemler sonucunda; Fr. 4-7 (VG-1), 8-12 (VG-2), 13-31 (VG-3), 32-40 (VG-4), 41-77 (VG-5), 78-87 (VG-6) ve 88-106 (VG-7) birleştirilerek toplam 7 alt fraksiyon elde edildi.



Şekil 4.1. Ön ayırım sonucunda elde edilen fraksiyonların genel İTK görünümü

Flash kromatografisi cihazında ilk fraksiyonlandırma işlemi sonucunda elde edilen VG-3 (300 mg) fraksiyonuna Sefadeks LH-20 uygulandı. Mobil faz olarak metanol kullanılacağından dolayı dolgu maddesi gece boyu metanol ile şişirildi ve hava kabarcığı kalmayacak şekilde kolonun şartlanması için bir süre çözücü geçirildi. İzolasyona tabi tutulacak VG-3 fraksiyonu yeterli miktarda metanol ile çözülerek kolona tatbik edildi. Hareketli fazın akış hızı sabit ve yavaş olacak şekilde ayarlanarak 20 ml’lik hacimlerde 49 fraksiyon toplandı. Mobil faz evaporatör ile uzaklaştırıldıktan sonra fraksiyonlar metanol ya da metanol: formik asit ile çözülerek uygun temiz kaplara aktarıldı. Her bir fraksiyonun etil asetat: asit karışımı: metanol (7:2:1) çözücü sisteminde İTK ile kontrolleri yapıldı ve benzer R_f değerine sahip olan fraksiyonlar birleştirildi. Çalışma sonucunda UV sinyallerine göre; Fr. 1-19 (VG3-1), 20-30 (VG3-2), 31-42 (VG3-3) ve 43-49 (VG3-4) birleştirilerek toplam 4 alt fraksiyon elde edildi. VG3-2 alt fraksiyonu haricindeki diğer fraksiyonlarda kayda değer bir şey görülmediğinden dolayı izolasyona Fr. 20-30 (VG3-2) üzerinden devam edildi. Kirli olarak elde edilen VG3-2 fraksiyonundaki safsızlığın giderilmesi için numune silikajel kolona tatbik edildi. Hareketli faz olarak EtOAc: MeOH (9:1) izokratik sistemi

kullanılarak fraksiyonlar toplandı. Elde edilen fraksiyonların İTK kontrolü yapıldıktan sonra benzer R_f değerine sahip olanlar birleştirildi. VG3-2 fraksiyonundan bir iridoit glikozit bileşiği olan **S-1** "Katalpol (32 mg)" saf olarak elde edildi.

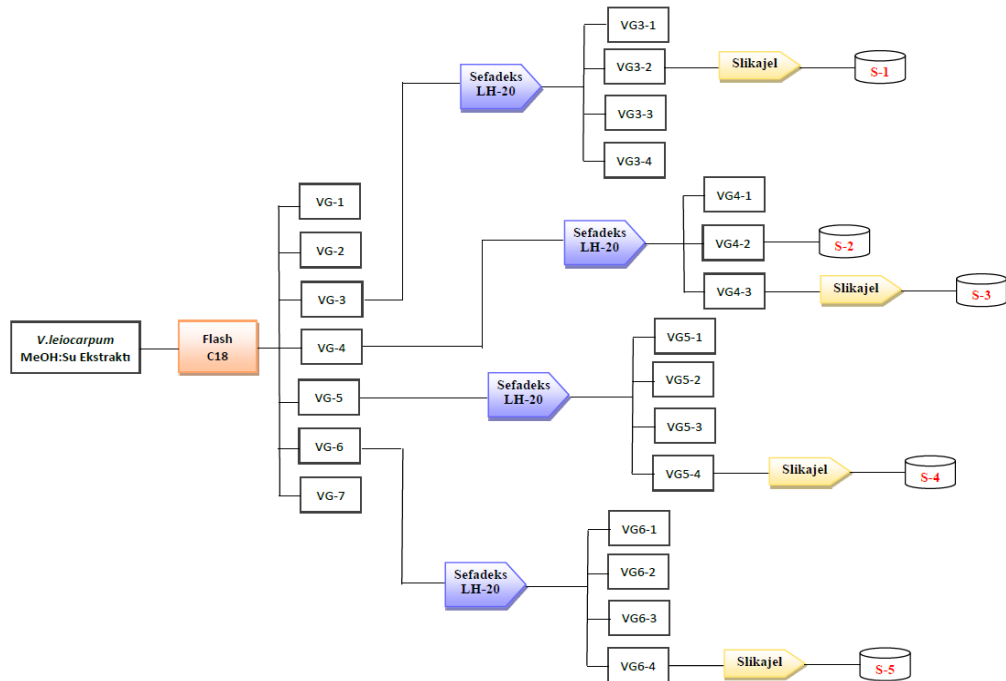
VG-4 (Fr. 32-40) fraksiyonu sefadeks LH-20 kolonuna hareketli faz olarak MeOH: su (1:1) çözücü sistemi kullanılacağından dolayı metanol-su ile çözülerek adsorban yüzeyine tatbik edildi. Mobil fazın akış hızı sabit ve yavaş olacak şekilde ayarlanarak 10 ml'lik hacimlerde 37 fraksiyon toplandı. Elde edilen her fraksiyonun etil asetat: asit karışımı: metanol (7:2:1) çözücü sisteminde serik sülfat belirteci kullanılarak yapılan İTK incelemeleri yapıldıktan sonra benzer R_f değerine sahip olan fraksiyonlar birleştirildi ve Fr. 1-11 (VG4-1), 12-21 (VG4-2) ve 29-37 (VG4-3) aralıkları elde edildi. Bu aralıklardan Fr. 12-21, den yine bir iridoit glikozit bileşiği **S-2** "Ajugol (78 mg)" saf olarak elde edildi. VG4-3 alt fraksiyonu silika jel kullanılarak tekrar saflaştırma işlemine tabi tutuldu. Numune metanolde çözüldükten sonra silika jel ile yavaş yavaş karıştırıldı ve metanol tamamen uzaklaşana kadar kurutuldu. Silika jel numuneyi tamamen emdikten ve tam bir kuruma sağlandıktan sonra iyice homojenize edilip kuru tatbik için hazır hale getirildi. Kolon dolgu maddesi olarak kullanılacak olan silika jel, etil asetat: metanol: kloroform (4:2:2) mobil faz sisteminde çözülerek kolona aktarıldı ve hava kabarcığı kalmayacak şekilde kolonun şartlanması için bir süre hareketli faz sistemi geçirildi. Silika jele emdirilmiş haldeki numune, kolona kuru olarak tatbik edildi ve 10 ml'lik hacimlerde 60 fraksiyon toplandı. Fraksiyonların İTK ile kontrolleri yapılarak benzer R_f değerine sahip olanlar birleştirildi. Çalışma sonucunda; bu aralıktan bir aglikon flavonoid bileşiği **S-3** "Eriodiktiyol (3',4',5,7-tetrahidroksiflavonon) (15 mg)" saf olarak elde edildi.

VG-5 (Fr. 41-77) fraksiyonu yeterli miktarda metanol ile çözülerek aynı sistem ile hazırlanan sefadeks LH-20 kolonuna tatbik edilerek yaklaşık 5 ml hacimlerde fraksiyonlandırıldı. Fraksiyonların İTK incelemeleri yapıldı ve İTK profiline göre birbirine benzer olanlar birleştirildi. Bu işlem sonucunda Fr. 1-17 (VG5-1), 18-33 (VG5-2), 36-49 (VG5-3) ve 50-54 (VG5-4) aralıkları elde edildi. Fraksiyonlama işleminden elde edilen Fr. 50-54 alt fraksiyonu silika jel kullanılarak tekrar saflaştırma işlemine tabi tutuldu. Numune metanolde çözüldükten sonra silika jel ile karıştırılarak metanol tamamen uzaklaştırıldı ve saflaştırılacak fraksiyon kuru tatbik için hazır hale getirildi. Kolon dolgu maddesi olarak kullanılacak olan silika jel, etil asetat: metanol:

kloroform (4:2:2) mobil faz sisteminde çözülerek kolona tatbik edildi ve etil asetat: metanol: kloroform (4:2:2) izokratik sistemi alt fraksiyonlar toplandı. Elde edilen fraksiyonların İTK analizi sonucunda VG-5 fraksiyonundan **S-4** kodlu yine bir flavonoid molekülü olan "Luteolin (12 mg)" bileşiği saflaştırıldı.

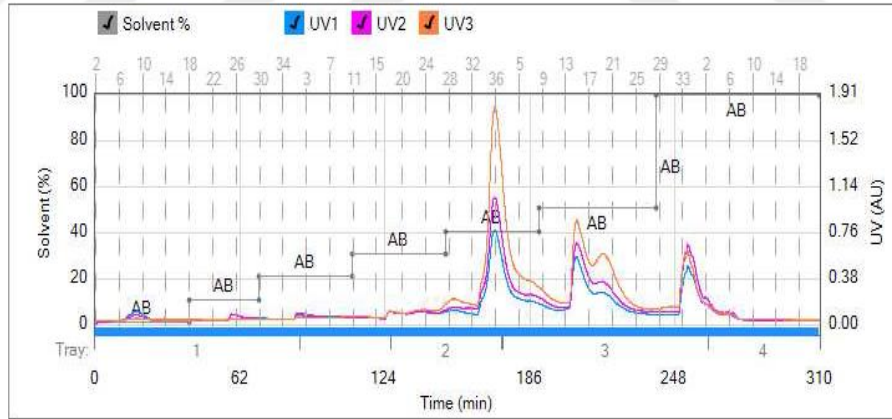
VG-6 (Fr. 78-87) fraksiyonu yeterli miktarda metanol ile çözüldü ve aynı çözücü sistemiyle şartlanmış sefadeks LH-20 kolonuna tatbik edilerek yaklaşık 5 ml hacimde olacak şekilde fraksiyonlandırma işlemi yapıldı. Toplam 33 fraksiyon ele edilmiş olup her bir fraksiyonun İTK kontrolleri yapılarak İTK profiline göre fraksiyonlar birleştirildi. Bu işlem sonucunda Fr. 1-8 (VG6-1), 9-13 (VG6-2), 15-26 (VG6-3) ve 27-33 (VG6-4) aralıkları elde edildi. Fraksiyonlama işleminden elde edilen Fr. 27-33 alt fraksiyonu silika jel kullanılarak tekrar saflaştırma işlemine tabi tutuldu. Numune metanolde çözüldükten sonra silika jele emdirildi ve metanol tamamen kurutuldu. Etil asetat: metanol: kloroform (4:2:2) hareketli faz sistemi ile kolon şartlandırıldı ve numune kolona kuru tatbik olarak yüklenilip fraksiyonlandırıldı. Bu işlem sonucunda fenilpropan halkası içeren bir iridoit glikozit bileşiği **S-5** "10-O-sinamoil-katalpol (30 mg)" izole edildi.

V. leiocarpum bitkisinin toprak üstünün MeOH-su ekstresinden bilinen 3 iridoid ve 2 flavonoid izole edildi. İzolasyon prosesinin özeti Şekil 4.2’de verilmiştir.

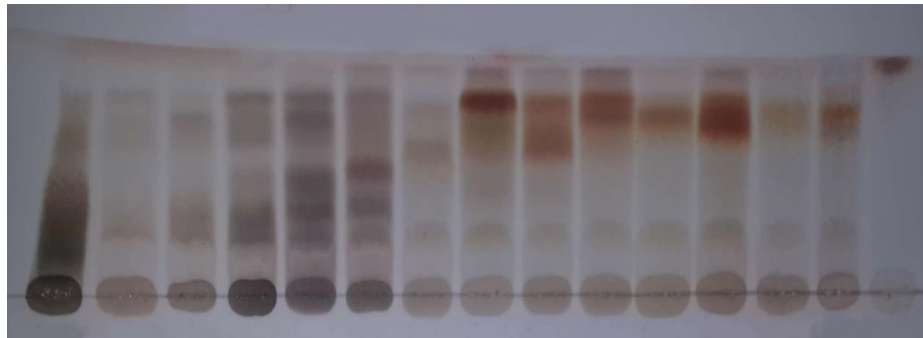


Şekil 4.2. *Verbascum leiocarpum* toprak üstü izolasyon prosesi

V. leiocarpum bitkisinin kök kısmından elde edilen ham metanol-su ekstresinin (24 g) ilk fraksiyonlandırılması ve ön ayrımı için flash kromatografi ile C18 kolon kullanılarak yapıldı. Ekstre metanol-su çözücü sisteminde çözülüp, çözülmeyen kısımlar filtrasyonla uzaklaştırıldıktan sonra flash kromatografi cihazında Ecoflex C-18 330 g hazır C18 kolonuna enjekte edildi. Analiz için uygun metot geliştirildikten sonra (akış hızı: 20 ml/dk, analiz süresi: 252 dakika, UV 330, 280 ve 254 nm) mobil faz olarak su-metanol (100:0→0:100) çözücü sistemi kullanılarak dedektör yardımıyla elüatlar fraksiyon hacmi 50 ml olacak şekilde toplandı. Çalışma sonucunda 126 fraksiyon elde edildi ve her bir tüpün içeriği, hareketli faz olarak ön denemelerle belirlenmiş olan etil asetat: asit karışımı: metanol (7:2:1) çözücü sisteminde İTK ile analizleri yapıldı ve İTK profiline göre birbirlerine benzer olan fraksiyonlar birleştirildi. UV sinyallerine göre bu elüsyon sonucunda; Fr. 1-6 (VK-1), 7-17 (VK-2), 18-28 (VK-3), 29-33 (VK-4), 34-44 (VK-5), 45-54 (VK-6), 55-61 (VK-7), 62-74 (VK-8), 75-93 (VK-9), 94-104 (VK-10) ve 105-126 (VK-11) birleştirilerek toplam 11 alt fraksiyon elde edildi. Çalışmaya ait flash cihazından elde edilen kromatogram Şekil 4.3'te, fraksiyonların İTK profili ise Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.3. Ham ekstrenin ön ayrımında Flash cihazında elde edilen spektrum



Şekil 4.4. Ham ekstrenin C18 kolon uygulaması İTK görseli

İlk 5 fraksiyonun çalışmasından elde edilen bileşiklerin İTK ve NMR incelemesi sonucunda kayda değer bir madde bulunmadığı belirlendiğinden dolayı izolasyon VK-6 (Fr. 45-54) üzerinden devam edildi. VK-6 fraksiyonu yeterli miktarda metanol ile çözünerek aynı çözücü sistemiyle şartlanmış sefadeks LH-20 kolonuna tatbik edildi. İzolasyon işlemi tamamlanıncaya kadar aynı çözücü sistemi ile devam edilerek fraksiyonlandırma yapıldı. Çalışma sonucunda Toplam 18 fraksiyon ele edildi ve her bir fraksiyonun İTK kontrolleri yapılarak İTK profiline göre fraksiyonlar birleştirildi. Elüsyon sonucunda; Fr. 1-7 (VK6-1), 9-12 (VK6-2) ve 13-18 (VK6-3) birleştirilerek 3 alt fraksiyon elde edildi. Fraksiyonlama işleminden elde edilen Fr. 13-18 alt fraksiyonu silika jel kullanılarak tekrar saflaştırma işlemine tabi tutuldu. Numune metanolde çözüldükten sonra silika jele emdirildi ve metanol tamamen kurutuldu. Kloroform: etil asetat (8:2) hareketli faz sistemi ile kolon şartlandırıldı ve numune kolona kuru tatbik olarak yüklenilip fraksiyonlandırıldı. Bu işlem sonucunda **S-6** kodlu bir flavonoid aglikon bileşiği olan "Apigenin (50 mg)" bileşiği izole edildi.

VK-7 (Fr. 55-61) fraksiyonuna MeOH: su (1:1) çözücü sisteminde sefadeks LH-20 uygulandı. Mobil fazın akış hızı sabit ve yavaş olacak şekilde ayarlanarak 10 ml'lik hacimlerde 25 fraksiyon toplandı. Elde edilen fraksiyonların İTK kontrolleri yapıldı ve İTK profiline göre; 9-16 (VK7-1), 18-21 (VK7-2) ve 22-25 (VK7-3) alt fraksiyonları elde edildi. Bu aralıklardan Fr. 18-21 (VK7-2)'den, **S-7** olarak kodlanan ve bir iridoid glikozit bileşiği olan "6-Deoksi melittozit (15 mg)" saf olarak elde edildi.

VK-8 (Fr. 62-74) fraksiyonu yeterli miktarda metanol ile çözüldü ve daha önceden metanol ile şartlandırılan sefadeks LH-20 kolonuna tatbik edildi. Hareketli faz olarak metanol kullanıldı. Bu elüsyonda toplam 30 adet fraksiyon elde edildi ve her bir fraksiyonun İTK analizleri yapılarak İTK profiline göre benzer olanlar birleştirildi. Bu çalışma sonucunda Fr. 12-22 (VK8-1) ve 23-30 (VK8-2) alt fraksiyonları elde edildi. Safsızlıkların giderilmesi için her iki fraksiyonda tekrardan izolasyon işlemine tabi tutuldu. Fr. 12-22 ve 23-30 prep-HPLC cihazında C-18 kolon kullanılarak preparatif ayrımı yapıldı. Her iki fraksiyonun izolasyon çalışması içinde cihazda uygun metot geliştirildikten sonra (akış hızı: 8 ml/dk, analiz süresi: 60 dakika, UV 235 ve 280 nm, kolon sıcaklığı: 25 °C) prep-HPLC cihazına son hacim 2 ml olacak şekilde metanol: su sisteminde çözülüp 0,45 µ'luk gözenek büyüklüğüne sahip filtrelerde süzülerek cihaza enjekte edildi ve çalışmada izokratik olarak su: metanol (65:35) çözücü sistemi

kullanıldı. Cihazın programında hacim 15 ml olacak şekilde ayarlanarak fraksiyonlar tüplere toplandı. Tüplerdeki mobil faz evaporatör ile uzaklaştırıldıktan sonra fraksiyonlar metanol ya da metanol: formik asit ile çözülerek uygun temiz kaplara aktarıldı. Her bir fraksiyonun etil asetat: asit karışımı: metanol (7:2:1) çözücü sisteminde İTK ile kontrolleri yapılarak benzer R_f değerine sahip olanlar birleştirildi. Bu işlemler sonucunda VK-8 fraksiyonundan fenilpropan türevi moleküller olan **S-8** "Poliumozit (β -(3,4-dihidroksifenil)-etil-(3'-6'-O- α -L-diramnopiranozil)-(4'-O-kafeil)- β -D-glukopiranozit, 10 mg)" ve **S-9** "Verbaskozit (β -(3,4-dihidroksifenil)-etil-(3'-O- α -L-ramnopiranozil)-(4'-O-kafeil)- β -D-glukopiranozit, 100 mg)" bileşikleri izole edildi.

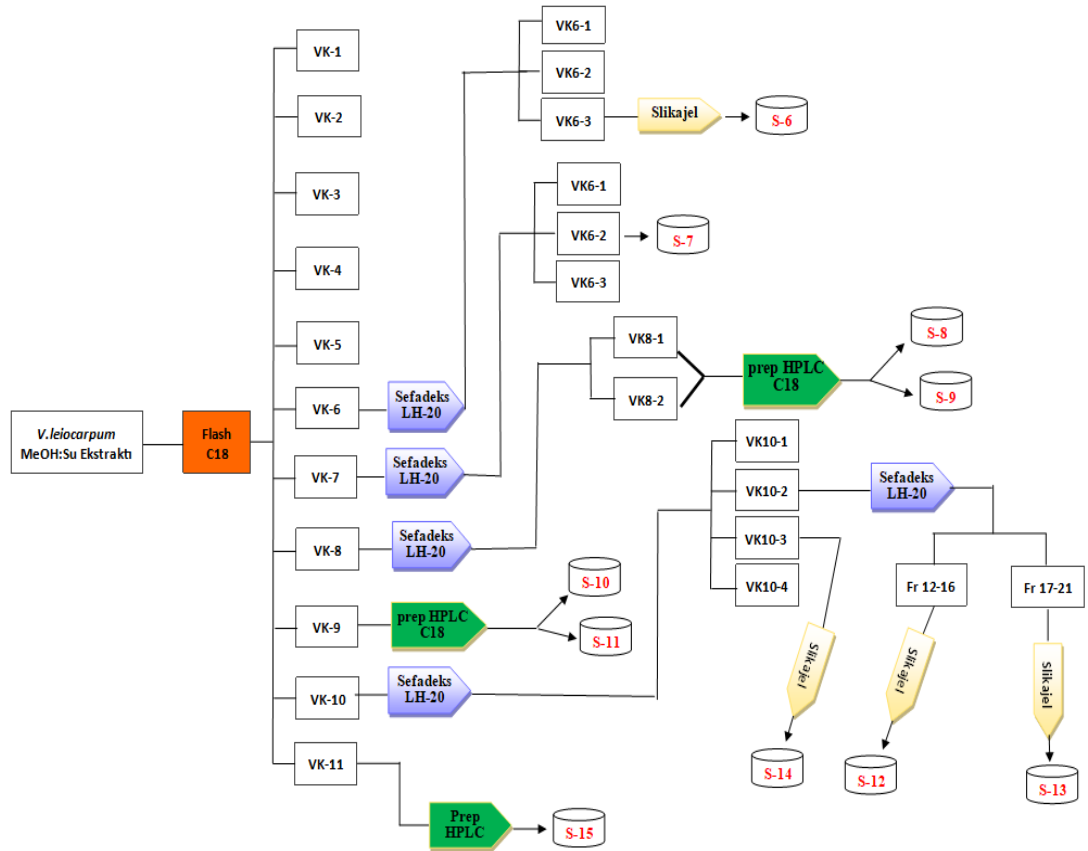
VK-9 (Fr. 75-93) fraksiyonu preparatif HPLC cihazında C-18 kolon kullanılarak preparatif ayrımı yapıldı. Numune prep-HPLC cihazına son hacim 2 ml olacak şekilde metanol: su sisteminde çözülüp 0,45 μ 'luk gözenek büyüklüğüne sahip filtrede süzüldü. Uygun metot geliştirildikten sonra (akış hızı: 8 ml/dk, analiz süresi: 80 dakika, UV 280 ve 330 nm, kolon sıcaklığı: 25 °C) fraksiyon cihaza enjekte edildi ve çalışmada izokratik olarak su: metanol (65:35) çözücü sistemi kullanıldı. Cihazın programında hacim 15 ml olacak şekilde ayarlanarak fraksiyonlar tüplere toplandı ve elde edilen fraksiyonların İTK ile analizleri yapıldı. Analiz sonucunda VK-9 fraksiyonundan fenilpropan türevi moleküller olan **S-10** "İzoverbaskozit (35 mg)" ve bir önceki fraksiyondan saflaştırılan **S-9** "Verbaskozit (50 mg)" bileşiği tekrar izole edildi. Fraksiyonların İTK analizi sonucunda kirli olduğu belirlenen numune (çalışmada elde edilen 2-11 fraksiyonu) silika jel kullanılarak tekrar saflaştırma işlemine tabi tutuldu. Numune metanolde çözüldükten sonra silika jele emdirildi ve metanol evaporatör ile tamamen uçuruldu. Etil asetat: kloroform: (9:1) çözücü sistemi ile silika kolon şartlandırıldı ve numune kolona kuru tatbik olarak yüklendi. Buradan toplam 11 fraksiyon alındı ve elde edilen fraksiyonların İTK analizi sonucunda bir fenilpropan türevi olan **S-11** "Ferruginozit C (11 mg)" bileşiği izole edildi.

VK-10 (Fr. 94-104) fraksiyonu sefadeks LH-20 kolonuna tatbik edilerek yaklaşık 10 ml hacimlerde fraksiyonlandırma işlemi yapıldı. Fraksiyonların İTK ile incelemeleri yapıldı ve İTK profiline göre birbirine benzer olanlar birleştirildi. Bu işlem sonucunda Fr. 10-20 (VK10-1), 21-28 (VK10-2), 29-35 (VK10-3) ve 36-45 (VK10-4) aralıkları elde edildi. Fraksiyonlama işleminden elde edilen Fr. 21-28 ve 29-35 ve alt fraksiyonları tekrar saflaştırma işlemine tabi tutuldu. Fr. 21-28 alt fraksiyonu metanolde

özölerek tekrar sefadeks LH-20 kolonuna uygulanarak fraksiyonlandırıldı. Elde edilen fraksiyonların İTK ile analizleri yapıldı ve İTK profiline göre benzer olanlar birleştirildi. Bu elüsyon sonucunda; Fr 12-16 ve 17-21 alt fraksiyonları elde edildi. Fr. 12-16 etil asetat: kloroform (9:1) özücü sistemi ile şartlandırılmış silika kolona tatbik edildi ve izolasyon işlemi bitinceye kadar aynı çözücü sistemi ile devam edildi. Elde edilen fraksiyonların analizi sonucunda fenilpropan türevi **S-12** "Ferruginozit D (6 mg)" bileşiğı saf olarak elde edildi. Fr. 17-21 numunesi etil asetat ile şartlandırılmış silika kolonuna yüklenerek fraksiyonlandırıldı. Kolonda mobil faz olarak sadece etil asetat kullanıldı. Elde edilen fraksiyonların İTK ile analizleri sonucunda bir iridoid sınıfı molekülü olan **S-13** "Harpagozit (9 mg)" izole edildi. Fr. 29-35 numunesi metanolde çözöldükten sonra silika jele emdirildi ve metanol evaperatör ile tamamen uzaklaştırıldı. Silika kolonu hekzan: etil asetat (8:2) hareketli faz sistemi ile şartlandırıldı ve numune kolona kuru tatbik olarak yüklenip fraksiyonlandırıldı. Bu işlem sonucunda **S-14** "trans-sinamik asit (15 mg)" bileşiğı izole edildi.

VK-11 (Fr. 105-126) fraksiyonu, prep-HPLC cihazında silika kolon kullanılarak ayrımı yapıldı. Uygun metot geliştirildikten sonra (akış hızı: 8 ml/dk, analiz süresi: 60 dakika, UV 225 ve 235 nm, kolon sıcaklığı: 25 °C) fraksiyon cihaza enjekte edildi ve çalışmada izokratik olarak hekzan: etil asetat (6:4) özücü sistemi kullanıldı. Cihazın programında hacim 15 ml olacak şekilde ayarlanarak fraksiyonlar tüplere toplandı. Elde edilen bazı fraksiyonlarda kristallenme oldu ve kristaller fraksiyonlardan temizlenerek alındı. VK-11 fraksiyonunun elüsyonu sonucunda **S-15** olarak kodlanan bir triterpen molekülü "Ursolik asit (45 mg)" bileşiğı izole edildi.

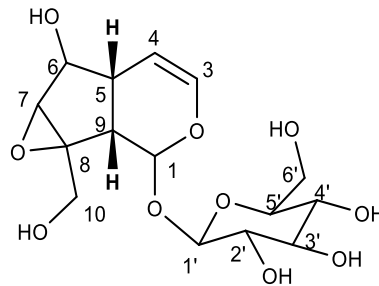
Verbascum leiocarpum bitkisinin kök kısmına ait MeOH-su ekstresinden 2 iridoid glikozit, 1 flavonoid, 1 fenolik asit, 1 triterpen ve 5 feniletanoid olmak üzere 10 bileşik izole edildi. İzolasyon prosesinin özeti Şekil 4.5'te verildi. İzole edilen feniletanoid türevi bileşiklerden Ferruginozit D bileşiğı yeni bir bileşik olup varlığı ilk defa bu bitki türünde rapor edildi.



Şekil 4.5. *Verbascum leiocarpum* bitkisinin kök ekstresinin izolasyon prosesi

4.3. İzole Edilen Bileşiklerin Yapı Tayini

Katalpol (Catalpol, S-1): Bileşik beyaz ve amorf katı halinde elde edildi ve DMSO- d_6 ile çözülerek NMR spektrumları kaydedildi. Katalpol *Verbascum* L. türlerinde yaygın olarak bulunmaktadır (Tatlı ve Akdemir, 2004). Bileşiğe ait spektrumlar EK-(1-5)'te, bileşiğin kimyasal yapısı Şekil 4.6'da, kimyasal kayma değerleri ise aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.6. Katalpol (S-1) bileşiğinin kimyasal yapısı

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ_{H} 6,37 (dd, $J = 6,0, 1,8$ Hz, 1H, H-3), 5,26 (d, $J = 5,6$ Hz, 1H, C-6-OH), 5,12 (d, $J = 4,9$ Hz, 1H, C-2'-OH), 5,02 (d, $J = 4,9$ Hz, 1H, H-4), 4,90 (d, $J = 9,7$ Hz, 1H, H-1), 4,58 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, H-1'), 4,18 (dd, $J = 7,8; 5,0$ Hz, 1H, C-

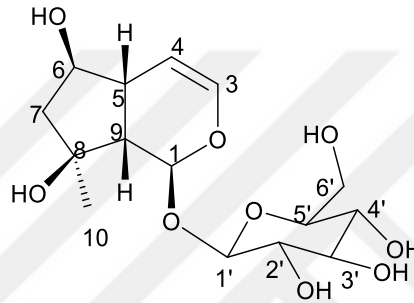
10-OH), 3,86 (d, $J = 4,2$ Hz, 1H, H-10b), 3,77 (dd, $J = 8,3; 3,9$ Hz, 1H, H-6), 3,69 - 3,59 (m, 2H, H-10a, H-6'b), 3,47 - 3,24 (m, 2H, H-7 ve H-6'a), 3,21 - 3,09 (m, 2H, H-3' ve H-5'), 3,01 (dd, $J = 9,1; 3,0$ Hz, 2H, H-2' ve H-4'), 2,31 (t, 7,6 Hz, 1H, H-9), 2,17 - 2,07 (m, 1H, H-5).

^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ_{C} 140,7 (C-3), 103,8 (C-4), 98,3 (C-1'), 93,7 (C-1), 77,9 (C-5'), 77,6 (C-6), 76,9 (C-3'), 73,9 (C-2'), 70,7 (C-4'), 65,3 (C-8), 61,8 (C-6'), 61,2 (C-7), 59,5 (C-10), 42,6 (C-9), 37,9 (C-5).

Bileşiğin ^1H ve ^{13}C -NMR spektrumları incelendiğinde (EK-1 ve EK-2) δ_{H} 4,58 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, H-1') ve δ_{C} 98,3 (CH, C-1')'deki anomerik proton ve karbon sinyalleri şeker grubu sinyalleri ile birlikte değerlendirildiğinde, bileşiğin monoglukozidik bir yapıya sahip olduğu ve anomerik protonun etkileşme sabiti değerinden de şekerin ($J = 7,9$ Hz) bağ konfigürasyonunun β olduğu belirlendi. Spektrumda 61,2-77,9 ppm arasında gözlenen 5 karbon rezonansı ve 3,01-3,74 ppm arasında gözlenen proton sinyalleri yapıda bir heksoz olduğunu göstermektedir. ^{13}C -NMR ve DEPT spektrumları incelendiğinde bileşikte 1 kuaterner (C), 12 metin (CH) ve 2 metilen (CH_2) olmak üzere toplam 15 karbon rezonansı bulunmaktadır. Toplam karbon rezonansından glukoza ait olan 6 sinyal çıkarıldığında, aglikonun 9 karbonlu siklopentan-piran iskeletine sahip olduğunu, δ_{H} 6,37; 5,01; 4,90; 3,77; 3,39; 2,31 ve 2,11'de gözlenen birer proton değerindeki sinyaller siklopentan-piran halkasında 7 metin fonksiyonunun olduğunu ve ayrıca δ_{H} 3,86 ve 3,77' deki sinyallerin diastropik bir hidroksimetilen fonksiyonunun varlığını göstermektedir. δ_{H} 6,37 ve 5,26'da gözlenen sinyaller ile C3 ve C4 arasında bir ikili bağ olduğu, H-3 sinyalinin dubletin dubleti şeklinde olması ve 2,31'deki H-9 sinyalinin triplet şeklinde gözlenmesinden dolayı C-5 konumunun süstitüe olmadığı anlaşılmıştır. Bundan dolayı spektrumda en yüksek alandaki sinyalin (δ_{H} 2,10) H-5'e, yüksek alandaki diğer sinyalin (δ_{H} 2,31) H-9'a olduğu ait olduğu, bu durumda da δ_{H} 4,90'daki asetal sinyali, piran halkasındaki H-1'e ait olduğu belirlenmiştir. δ_{H} 3,77 ve 3,33'teki proton sinyalleri, δ_{C} 77,6 ve 61,2'deki karbon sinyalleri, siklopentan halkasında 2 oksimetin fonksiyonunun olduğunu, ayrıca δ_{C} 65,3'teki karbon sinyalinin kimyasal kayma değeri, C-8'de tersiyer hidroksil varlığını dolayısıyla da kuaterner karbonun C-8 olduğunu göstermektedir. Elde edilen spektroskopik veriler literatürdeki değerlerle karşılaştırılarak S-1 bileşiğinin katalpol (catalpol) olduğu belirlendi ve bu

veriler literatürdeki spektral verilerle doğrulandı (Akdemir ve Çalış, 1991; Tatlı vd., 2003a).

Ajugol (S-2): Bileşik beyaz toz halinde elde edildi ve MeOH- d_4 ile çözülerek NMR spektrumları kaydedildi. Ajugol *Verbascum* L. türlerinde yaygın olarak bulunup daha önce *V. thapsus* ve *V. xanthophoeniceum* gibi türlerde varlığı rapor edilmiştir (Khuroo vd., 1988; Tatlı ve Akdemir, 2004; Georgiev vd., 2012). Bileşiğe ait spektrumlar EK-(6-10)'da, bileşiğin kimyasal yapısı Şekil 4.7'de, kimyasal kayma değerleri ise aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.7. Ajugol (S-2) bileşiğinin kimyasal yapısı

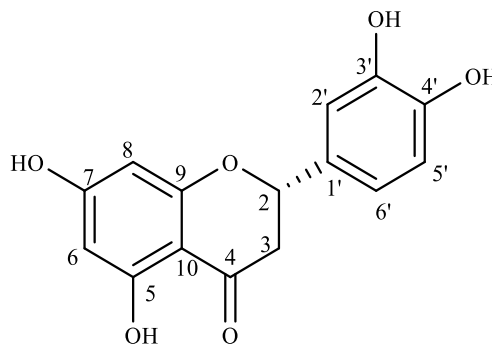
^1H -NMR (400 MHz, MeOH- d_4) δ_{H} 6,18 (dd, $J = 6,3; 2,1$ Hz, 1H, H-3), 5,48 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H, H-1), 4,80 (dd, $J = 6,3; 2,3$ Hz, 1H, H-4), 4,66 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, H-1'), 3,94 - 3,92 (m, 1H, H-6), 3,75 - 3,57 (m, 2H, H-6'), 3,40 - 3,16 (m, 4H, H-2', H-3', H-4', H-5'), 2,75 (dd, $J = 9,5; 2,8$ Hz, 1H, H-5), 2,57 (dd, $J = 9,4; 2,4$ Hz, 1H, H-9), 2,06 (dd, $J = 13,4; 5,6$ Hz, 1H, H-7a), 1,81 (dd, $J = 13,4; 4,7$ Hz, 1H, H-7b), 1,34 (s, 3H, H-10).

^{13}C -NMR (100 MHz, MeOH- d_4) δ_{C} 139,1 (C-3), 104,5 (C-4), 98,1 (C-1'), 92,4 (C-1), 78,1 (C-8), 76,8 (C-5'), 76,7 (C-3'), 76,4 (C-6), 73,4 (C-2'), 70,3 (C-4'), 61,5 (C-6'), 50,4 (C-9), 48,6 (C-7), 39,9 (C-5), 23,8 (C-10).

Bileşiğin ^1H ve ^{13}C -NMR spektrumları incelendiğinde (EK-6 ve EK-7) δ_{H} 4,66 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, H-1') ve δ_{C} 98,1 (CH, C-1')'deki anomerik proton ve karbon sinyalleri şeker grubu sinyalleri ile birlikte değerlendirildiğinde, bileşiğin monoglukozidik bir yapıya sahip olduğu ve anomerik protonun etkileşme sabiti değerinden de şekerin bağ konfigürasyonunun β olduğu belirlendi. ^{13}C -NMR ve DEPT spektrumlarının incelenmesi sonucunda aglikona ait 1 metil (δ_{C} 23,8), 1 metilen (δ_{C} 48,6), 6 metin (δ_{C} 139,1; 104,5; 92,4; 76,4; 50,4 ve 39,9) ve bir tane de kuaterner (δ_{C} 78,1) karbon

rezonanslarının olduğu tespit edildi. Bu bulgular izole edilen bileşğin C-4 süstitüe olmayan 9 karbonlu siklopentan-piran iskeletine sahip bir iridoid olduğunu göstermektedir. $^1\text{H-NMR}$ spektrumu incelendiği zaman metil (δ_{H} 1,33, s) grubuna ait sinyalin yanında oksimetin (δ_{H} 3,92) ve metilen gruplarına (δ_{H} 2,06 ve 1,81) ait sinyallerden oluşan bir ABX sistemi olduğu ve ayrıca δ_{H} 6,18 (dd, $J = 6,3; 2,1$ Hz, 1H), ve 4,80 (dd, $J = 6,3; 2,3$ Hz, 1H)'deki olefinik H-3 ve H-4 sinyallerinden piran halkasında C-3 ile C-4 arasında ikili bağın olduğu belirlendi. Ayrıca H-3, H-4 ve H-9 protonlarının dubletin dubleti şeklinde rezonans olması C-5 konumunun süstitüe olmadığını, bundan dolayı da spektrumdaki δ_{H} 2,75 sinyalinin H-5'e, 5,48'deki asetal sinyalinin piran halkasındaki H-1'e ait olduğunu ve ayrıca metil rezonansının da singlet olması kuaterner karbon rezonansının (δ_{C} 78,1) C-8'e ait olduğunu göstermektedir. HMBC spektrumunda 1,34 (s, H-10) sinyalinin δ_{C} 48,6 (C-7) ve 78,1 (C-8) karbonları ile korelasyonları, metil grubunun oksijenlenmiş quarterner karbona bağlı olduğunu göstermektedir. H-7a ve H-7b'nin COSY spektrumunda sadece H-6 protonu ile korelasyonun olması da C-6 konumuna bağlı hidroksi grubunun yerini doğrulamış oldu. Elde edilen spektroskopik veriler literatürdeki değerlerle karşılaştırılarak **S-2** bileşğinin ajugol olduğu belirlendi ve bu veriler literatürdeki spektral verilerle doğrulandı (Bianco vd., 1981; Pardo vd.,1998).

Eriodiktiyol (Eriodictyol, S-3): Bileşik renksiz kristaller halinde elde edildi ve $\text{DMSO-}d_6$ ile çözülerek NMR spektrumları kaydedildi. Bileşiğe ait spektrumlar EK-(11-15)'de, bileşğinin kimyasal yapısı Şekil 4.8'de, kimyasal kayma değerleri ise aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.8. Eriodiktiyol (S-3) bileşğinin kimyasal yapısı

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ_{H} 12,15 (s, 1H, 5-OH), 6,88 (brs, 1H, H-2'), 6,75 (brs, 2H, H-5' ve H-6'), 5,88 (d, 1H, $J = 2,34$ Hz, H-8), 5,87 (d, 1H, $J = 2,34$ Hz, H-6), 5,38

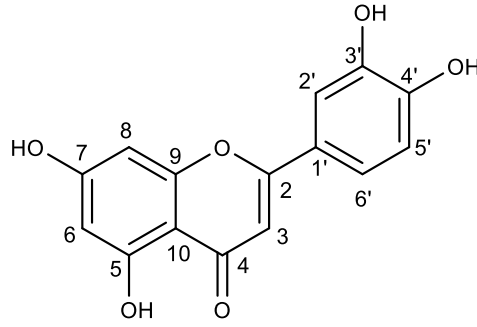
(dd, $J = 12,6, 3,1$ Hz, 1H, H-2), 3,19 (dd, $J = 17,1; 12,6$ Hz, 1H, H-3a), 2,68 (dd, $J = 17,1; 3,1$ Hz, 1H, H-3b).

^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ_{C} 197,6 (C-4), 167,9 (C-7), 164,8 (C-5), 164,2 (C-9), 146,9 (C-3'), 146,5 (C-4'), 130,7 (C-1'), 119,2 (C-6'), 116,6 (C-5'), 115,6 (C-2'), 103,1 (C10), 97,0 (C-6), 96,2 (C-8), 79,7 (C-2), 43,4 (C-3).

S-3 numaralı bileşiğin ^1H -NMR spektrumu incelendiğinde (EK-11) δ_{H} 6,75 (d, $J = 1,2$ Hz) ppm'de görülen sinyaller B halkasının H-2' ve H-6' protonlarına, 6,88 (d, 1H) ppm'de görülen sinyal B halkasının H-5' protonuna, δ_{H} 5,88 (brs,1H) ve 5,87 (brs,1H) ppm'de görülen sinyaller ise A halkasının H-6 ve H-8 protonlarına ait olduğu belirlendi.

^{13}C -NMR spektrumu incelendiği zaman 15 karbon sinyali görülmektedir. δ_{C} 115,6 ve 119,2 ppm'de görülen sinyallerin sırasıyla, C-2' ve C-6' karbonlarına, δ_{C} 116,6 ppm C-5' karbonuna, δ_{C} 97,0 ve 96,2 ppm'de C-6 ve C-8 konumlarına ait olduğu belirlendi. ^{13}C -NMR ve DEPT spektrumlarının incelenmesi sonucunda 1 metilen (CH_2 , δ_{C} 43,4), 6 metin (CH , δ_{C} 119,2; 116,6; 115,6; 97,0; 96,2 ve 79,7) ve 8 tane de kuaterner (C, δ_{C} 197,6; 167,9; 164,8; 164,2; 146,9; 146,5; 130,7 ve 103,1) karbon rezonansının olduğu tespit edildi. Bileşiğe ait HETCOR spektrumundan, flavonoid halkasında δ_{C} 43,4 ppm'deki C-3 karbonunun δ_{H} 3,19 ve 2,68 ppm'deki sinyallerle etkileştiği, flavonoidin B halkasındaki δ_{C} 115,6 ve 119,2 ppm'deki C-2', C-6' karbon sinyallerinin δ_{H} 6,75 ppm'deki proton sinyalleri, δ_{C} 116,6 ppm'deki C-5' karbon sinyalinin δ_{H} 6,80 ppm'deki proton sinyali ile etkileştiği, δ_{C} 79,7; 96,2 ve 97,0 ppm' deki C-2, C-8 ve C-6 karbon sinyallerinin sırasıyla δ_{H} 5,38; 5,87 ve 5,88 ppm'deki proton sinyalleri ile etkileştiği belirlendi. Elde edilen spektroskopik veriler literatürdeki değerlerle karşılaştırılarak S-3 bileşiğinin eriodiktiyol (3',4',5,7-tetrahidroksiflavonon) olduğu belirlendi ve bu veriler literatürdeki spektral verilerle doğrulandı (Geissman vd., 1940; Encarnacion vd., 1999; Klimek, 1996).

Luteolin (S-4): Bileşik sarı renkli amorf toz halinde elde edildi ve DMSO- d_6 ile çözülerek NMR spektrumları kaydedildi. Bileşik daha önce *V. thapsus*, *V. densiflorum* ve *V. sublobatum* gibi türlerde varlığı rapor edilmiştir (Gvazava ve Kikoladze, 2012; Shakeri ve Farokh, 2015; Zhao vd., 2015; Mihailović vd., 2016). Bileşiğe ait spektrumlar EK-(16-18)'de, bileşiğin kimyasal yapısı Şekil 4.9'da, kimyasal kayma değerleri ise aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.9. Luteolin (S-4) bileşiğinin kimyasal yapısı

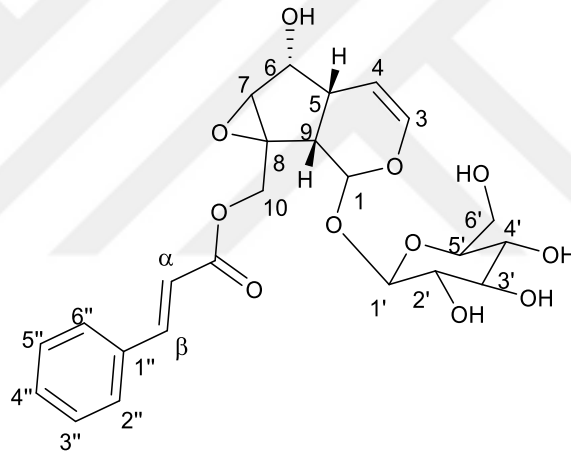
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ_{H} 12,99 (s, 1H, 5-OH), 7,42 (dd, $J = 8,2$; 2,3 Hz, 1H, H-6'), 7,41 (brs, 1H, H-2'), 6,90 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H-5'), 6,68 (s, 1H, H-3), 6,45 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, H-8), 6,20 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, H-6).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ_{C} 182,1 (C-4), 164,6 (C-7), 164,4 (C-2), 161,9 (C-5), 157,8 (C-9), 150,2 (C-4'), 146,2 (C-3'), 121,9 (C-1'), 119,5 (C-6'), 116,5 (C-5'), 113,9 (C-2'), 104,2 (C10), 103,4 (C-3), 99,3 (C-6), 94,3 (C-8).

S-4 numaralı bileşiğin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu incelendiğinde (EK-16) δ_{H} 6,20 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H) ve 6,45 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H), ppm'de görülen sinyaller A halkasının H-6 ve H-8 protonlarına, δ_{H} 7,41 (brs, 1H), 6,90 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H) ve 7,42 (dd, $J = 8,2$; 2,3 Hz, 1H) ppm'de görülen sinyaller ise sırasıyla B halkasının H-2', H-5' ve H-6' protonlarına ait olduğu belirlendi. δ_{H} 6,68 ppm'de singlet olarak görülen sinyal H-3 protonuna ait olup, izole edilen bileşiğin flavon olduğunu göstermektedir. Bileşiğin $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu incelendiğinde 15 karbon sinyali görülmektedir. δ_{C} 113,9 ve 119,5 ppm'de görülen sinyaller B halkasındaki C-2' ve C-6' karbonlarına, $\delta_{\text{C}} = 146,2$; 150,2 ve 119,5 ppm'de görülen sinyaller ise sırasıyla C-3', C-4' ve C-6' karbonlarına ait olduğu belirlendi. C-3' ve C-4' karbonlarında iki serbest hidroksil grubunun bulunmasından dolayı bu karbonlara ait sinyaller, C-2' ve C-5' sinyallerine göre daha aşağı alanda gelmiştir. $^{13}\text{C-NMR}$ ve DEPT spektrumlarının incelenmesi sonucunda 6 metin (CH, δ_{C} 119,5; 116,5; 113,9; 103,4; 99,3 ve 94,3) ve 9 tane de kuaterner (C, δ_{C} 182,1; 164,6; 164,4; 161,9; 157,8; 150,2; 146,2 121,9; ve 104,2) karbon rezonansının olduğu tespit edildi. Ayrıca bileşiğin HETCOR spektrumundan, B halkasında δ_{C} 119,5 ppm'deki C-6' karbon sinyalinin δ_{H} 7,42 ppm'deki proton sinyali ile, δ_{C} 113,9 ppm'deki C-2' karbon sinyalinin δ_{H} 7,41 ppm'deki proton sinyaliyle ve δ_{C} 116,5 ppm'deki C-6' karbon sinyalinin δ_{H} 6,90 ppm'deki proton sinyali ile etkileştiği; A halkasında δ_{C} 103,4

ppm'deki C-3 karbon sinyalinin δ_H 6,68 ppm'deki proton sinyali ile, δ_C 99,4 ppm'deki C-6 karbon sinyalinin δ_H 6,20 ppm'deki proton sinyaliyle ve δ_C 94,3 ppm'deki C-8 karbon sinyalinin δ_H 6,45 ppm'deki proton sinyali ile etkileşmesi de yapı ile uyumludur. Elde edilen spektroskopik veriler literatürdeki değerlerle karşılaştırılarak **S-4** bileşiğinin luteolin olduğu belirlendi ve bu veriler literatürdeki spektral verilerle doğrulandı (Mabry, 1970; Markham vd., 1978; Agrawal, 1989; Malikov ve Yuldashev, 2002; Nissler vd., 2004).

10-O-sinamoil-katalpol (10-O-cinnamoyl-catalpol, S-5): Bileşik kirli beyaz renkli, amorf katı halinde elde edildi ve MeOH-*d*₄ ile çözülerek NMR spektrumları kaydedildi. Bileşiğe ait spektrumlar EK-(19-23)'de, bileşiğin kimyasal yapısı Şekil 4.10'da, kimyasal kayma değerleri ise aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.10. 10-O-sinamoil-katalpol (S-5) bileşiğinin kimyasal yapısı

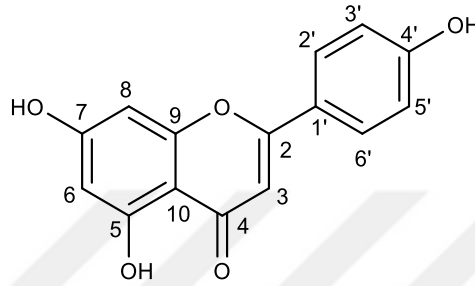
¹H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*₄) δ_H 7,74 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H, H- β), 7,64 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H, H-2'' ve H-6''), 7,45 - 7,40 (m, 3H, H-3'', H-4'' ve H-5''), 6,59 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H, H- α), 6,38 (dd, *J* = 6,0; 2,0 Hz, 1H, H-3), 5,11 (d, *J* = 10,0 Hz, 1H, H-1), 5,09 (dd, *J* = 10,5; 4,7 Hz, 1H, H-4), 5,05 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H, H-10b), 4,77 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H, H-1'), 4,28 (d, *J* = 12,7 Hz, 1H, H-10a), 4,04 - 3,90 (m, 1H, H-6 ve H-6'b), 3,68 (dd, *J* = 11,9; 6,3 Hz, 2H, H-7 ve H-6'b), 3,37 (dd, *J* = 3,7; 2,9 Hz, 1H, H-3'), 3,34 - 3,29 (m, 1H, H-5'), 3,26 - 3,18 (m, 2H, H-2' ve H-4'), 2,69 (dd, *J* = 9,8; 7,6 Hz, 1H, H-9), 2,32 (m, 1H, H-5).

¹³C-NMR (100 MHz, MeOH-*d*₄) δ_C 167,0 (C=O), 145,3 (C- β), 140,4 (C-3), 134,4 (C-1''), 130,2 (C-4''), 128,6 (C-3'' ve C-5''), 128,0 (C-2'' ve C-6''), 117,3 (C- α), 102,3 (C-4),

98,9 (C-1'), 94,2 (C-1), 78,1 (C-6), 77,1 (C-5'), 76,5 (C-3'), 73,4 (C-2'), 70,1 (C-4'), 63,1 (C-10), 62,2 (C-8), 61,6 (C-6'), 61,4 (C-7), 42,2 (C-9), 37,6 (C-5).

S-5 numaralı bileşiğin ^1H ve ^{13}C -NMR spektrumları incelendiğinde (EK-19 ve EK-20); δ_{H} 7,64 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H) ve 7,45 - 7,40 (m, 3H) ppm'de görülen sinyaller sırasıyla H-2', H-6' ve H-3', H-4', H-5' aromatik protonlarına, δ_{H} 7,74 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H) ve 6,59 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H) ppm'de görülen sinyaller ise olefinik protonlar olduğu ve bunların da sırasıyla H- β ile H- α protonlarına ait olduğu belirlendi. H-2', H-6' ve H-3', H-4', H-5' sinyalleri benzen halkasının monosüstitüe olduğunu, H- β ve H- α sinyalleri ise benzen halkasına bağlı yan zincirin olduğunu göstermektedir. δ_{H} 4,77 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, H-1') ve δ_{C} 98,9 (CH, C-1')'deki anomerik proton ve karbon sinyalleri şeker grubu sinyalleri ile birlikte değerlendirildiğinde, bileşiğin monoglukozidik bir yapıya sahip olduğu ve anomerik protonun etkileşme sabiti değerinden de şekerin bağ konfigürasyonunun β olduğu belirlendi. ^{13}C -NMR spektrumu incelendiği zaman 24 karbon sinyali görüldü ve DEPT spektrumlarından üç kuaterner (C, δ_{C} 167,0; 134,4 ve 62,2), on yedi metin (CH, δ_{C} 140,4; 130,2; 128,6; 128,6; 128,0; 128,0; 102,3; 98,9; 94,2; 78,1; 77,1; 76,5; 73,4; 70,1; 61,4; 42,2 ve 37,6) ve 4 metilen (CH_2 , δ_{C} 145,3; 117,3; 63,1 ve 61,6) karbon rezonansının olduğu belirlendi. Bu rezonanslardan δ_{C} 134,4; 130,0; 128,6 ve 128,0 ppm'dekiler aromatik karbon, δ_{C} 145,3; 140,4; 117,3 ve 102,3 ppm'de olanlar ise olefinik karbon sinyalleridir. δ_{H} 61,6 - 98,9 ppm arasında gözlenen 5 karbon rezonansı ve δ_{H} 3,18 - 4,78 ppm arasında gözlenen proton sinyalleri yapıda bir heksoz olduğunu göstermektedir. δ_{H} 6,38 ve 5,09'da gözlenen sinyaller ile C3 ve C4 arasında bir ikili bağ olduğu, H-3 sinyalinin dd şeklinde olması ve δ_{H} 2,69'daki H-9 sinyalinin de dd şeklinde olmasından dolayı C-5 konumunun süstitüe olmadığı anlaşılmıştır. Bundan dolayı spektrumda en yüksek alandaki sinyalin (δ_{H} 2,32) H-5'e, yüksek alandaki diğer sinyalin (δ_{H} 2,69) H-9'a olduğu ait olduğu, bu durumda da δ_{H} 5,11'deki asetal sinyali, piran halkasındaki H-1'e ait olduğu belirlenmiştir. δ_{H} 3,96 ve 3,68'deki proton sinyalleri, δ_{C} 78,1 ve 61,4'teki karbon sinyalleri, siklopentan halkasında 2 oksimetin fonksiyonunun olduğunu, ayrıca δ_{C} 62,2'deki karbon sinyalinin kimyasal kayma değeri, C-8'de tersiyer hidroksil varlığını dolayısıyla da C-8 karbonun kuaterner olduğunu göstermektedir. Tüm spektroskopik veriler literatürdeki değerlerle karşılaştırılarak S-5 bileşiğinin 10-O-sinnameoil-katalpol olduğu belirlendi ve bu veriler literatürle uyum içinde olup bileşik daha önce *Gentiana kurroo royle* türünde varlığı rapor edilmiştir (Sarg vd., 1991).

Apigenin (S-6): Bileşik sarı renkli amorf toz halinde elde edildi ve DMSO-*d*₆ ile çözülerek NMR spektrumları kaydedildi. İzole edilen apigenin daha önce *V. phlomoides*, *V. densiflorum* ve *V. cheiranthifolium* gibi türlerde varlığı rapor edilmiştir (Gvazava ve Kikoladze, 2012; Dalar vd., 2014; Mihailović vd., 2016; Grigore vd., 2013). Bileşiğe ait spektrumlar EK-(24-28)'de, bileşiğin kimyasal yapısı Şekil 4.11'de, kimyasal kayma değerleri ise aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.11. Apigenin (S-6) bileşiğinin kimyasal yapısı

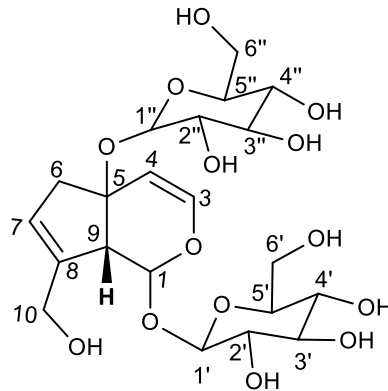
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,96 (s, 1H, 5-OH), 7,93 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, H-2' ve H-6'), 6,93 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, H-3' ve H-5'), 6,78 (s, 1H, H-3), 6,49 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H, H-8), 6,20 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H, H-6).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 182,2 (C-4), 164,6 (C-7), 164,2 (C-2), 161,9 (C-5), 161,6 (C-9), 157,8 (C-4'), 128,9 (C-2' ve C-6'), 121,6 (C-1'), 116,4 (C-3' ve C-5'), 104,2 (C-10), 103,3 (C-3), 99,3 (C-6), 94,5 (C-8).

Molekülün ¹H-NMR spektrumu incelendiğinde (EK-24) δ_H 7,93 (d, *J* = 8,80 Hz) ppm'de görülen sinyaller B halkasının H-2' ve H-6' protonlarına, δ_H 6,93 (d, *J* = 8,80 Hz) ppm'de görülen sinyaller B halkasının H-3' ve H-5' protonlarına, δ_H 6,20 (d, *J* = 2,1 Hz) ile 6,49 (d, *J* = 2,1 Hz) ppm'de görülen sinyaller ise A halkasının H-6 ve H-8 protonlarına ait olduğu belirlendi. δ_H 6,78 ppm'de singlet olarak görülen sinyal izole edilen bileşiğin flavon türevi olduğunu göstermektedir. ¹³C-NMR spektrumu incelendiğinde 15 karbon sinyali görülmektedir. δ_C 128,9 ve 116,4 ppm'de görülen sinyallerin sırasıyla, C-2' ve C-6' ile C-3' ve C-5' karbonlarına, δ_C 103,3 ppm'de gözlenen sinyalin C-3 karbonuna, δ_C 99,3 ve 94,4 ppm'de gözlenen sinyallerin ise sırasıyla C-6 ve C-8 karbonlarına ait olduğu belirlendi. ¹³C-NMR ve DEPT spektrumlarının incelenmesi sonucunda 7 metin (CH, δ_C 128,9; 128,9; 116,4; 116,4; 103,3; 99,3 ve 94,5) ve 8 tane de kuaterner (C, δ_C 182,2; 164,6; 164,2; 161,9; 161,6;

157,8; 121,6 ve 104,2) karbon rezonansının olduğu tespit edildi. Bileşiğe ait HETCOR spektrumundan, flavonoid halkasında δ_C 103,3 ppm'deki C-3 karbonunun δ_H 6,78 ppm'deki protonla korele olduğu, flavonoidin B halkasındaki δ_C 128,9 ve 116,4 ppm'deki C-2', C-6' ve C-3', C-5' karbon sinyallerinin sırasıyla δ_H 7,93 ve 6,93 ppm'deki proton sinyalleriyle, δ_C 99,31 ve 94,45 ppm'deki C-6 ve C-8 karbon sinyallerinin δ_H 6,20 ve 6,49 ppm'deki proton sinyalleri ile korele olduğu belirlendi. Bileşikteki proton-proton korelasyonlarını gösteren COSY spektrumu δ_H 7,93 ppm'de H-2' ve H-6' proton sinyallerinin δ_H 6,93 ppm'de rezonans olan H-3' ve H-5' proton sinyalleri ve H-6 ile H-8 δ_H 6,19; δ_H 6,49 ppm'de sinyallerde ve şeker protonlarının birbirleriyle korelasyonları görüldü. Elde edilen spektroskopik veriler literatürdeki değerlerle karşılaştırılarak S-6 bileşiğinin apigenin olduğu belirlendi ve bu veriler literatür verileri ile desteklendi (Owen vd., 2003).

6-Deoksi melittozit (6-Deoxy-melittoside, S-7): Bileşik amorf toz halinde elde edildi ve MeOH-*d*₄ ile çözülerek NMR spektrumları kaydedildi. 6-Deoksi melittozit molekülünün varlığı daha önce *P. subulata* türünde rapor edilmiştir (Ronsted vd., 2000 ve 2003). Bileşiğin İTK analizinde Etanol/H₂SO₄ belirteci püskürtüldükten sonra plağın ısıtılması sonucunda bileşiğe ait lekenin önce pembe-kırmızı, daha sonra da siyaha yakın koyu-mor renge dönüşmesi bu bileşiğin bir iridoit glukoziti olabileceğine işaret etmiştir. Moleküle ait spektrumlar EK-(29-33)'de, bileşiğin kimyasal yapısı Şekil 4.12'de, kimyasal kayma değerleri ise aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.12. 6-deoksi melittozit (S-7) bileşiğinin kimyasal yapısı

¹H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*₄): 6,48 (d, *J* = 6,2 Hz, 1H, H-3), 5,77 (brs, 1H, H-7), 5,29 (d, *J* = 6,2 Hz, H-1), 5,14 (d, *J* = 6,2 Hz, H-4), 4,70 (d, *J* = 8,0 Hz, H-1'), 4,62 (d, *J* = 8,0 Hz, H-1''), 4,26 (d, *J* = 14,1 Hz, 1H, H-10b), 4,19 (d, *J* = 14,1 Hz, 1H, H-10a), 3,99 -

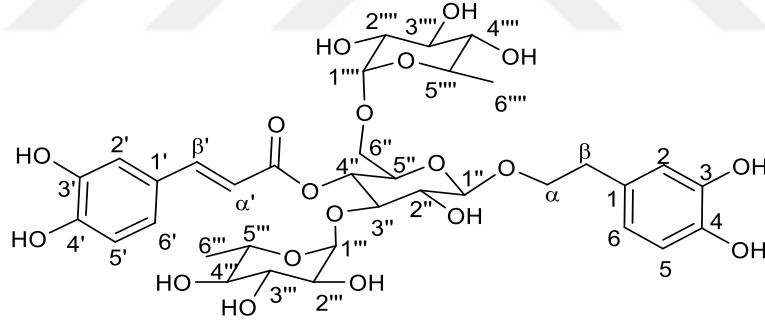
3,78 (m, 2H, H-6'b ve H6''b), 3,78 - 3,60 (m, 2H, H-6'a ve H6''a), 3,35-3,65 (m, 6H, H-3', H-4', H-5', H-3'', H-4''ve H-5''), 3,33 (brs, $J = 6,4$, H-9), 3,31 - 3,16 (m, 2H, H-2' ve H-2''), 2,83 (d, $J = 16,6$ Hz, 1H, H-6).

^{13}C -NMR (100 MHz, MeOH- d_4): 142,3 (C-3), 140,8 (C-8), 125,9 (C-7), 107,7 (C-4), 98,4 (C-1'), 98,2 (C-1''), 96,0 (C-1), 83,0 (C-5), 76,7 (C-5'), 76,2 (C-3'), 76,1 (C-3''), 76,0 (C-5''), 73,5 (C-2''), 73,2 (C-2'), 69,9 (C-4'), 69,8 (C-4''), 61,1 (C-6'), 61,0 (C-6''), 59,9 (C-10), 52,1 (C-9), 45,6 (C-6).

Molekölün ^1H ve ^{13}C -NMR spektrumları (Ek-29 ve Ek-30) incelendiğinde, δ_{H} 4,70 (d, $J = 8,0$ Hz, H-1') ve δ_{C} 98,4 (CH, C-1') ile δ_{H} 4,62 (d, $J = 8,0$ Hz, H-1'') ve δ_{C} 98,2 (CH, C-1'') ppm'deki anomerik proton ve karbon sinyalleri, şeker grubu sinyalleri ile birlikte değerlendirildiğinde, bileşiğin diglukozidik bir yapıya sahip olduğu ve anomerik protonların etkileşme sabitlerinden bağ konfigürasyonlarının β olduğu belirlendi. Ayrıca δ_{C} 61,0 - 76,7 ppm arasında görülen karbon sinyalleri ile 3,20 - 3,47 ppm arasında gözlenen yoğun proton sinyalleri, yapıda bulunduğu düşünülen, diglukozidik yapı ile uyumlu olarak heksoz gruplarının varlığına işaret etmektedir. COSY ve HETCOR (Ek-7) spektrumlarındaki kimyasal kayma ve etkileşme sabitlerinden molekülün, diglukozidik yapıyı oluşturan ozların ikisinin de β -glukoz olduğu belirlenmiştir. ^{13}C -NMR spektrumundan 21 karbon rezonansı görülüp bu sinyaller DEPT spektrumunda incelendiğinde; 2 kuaterner (C), 15 metin (CH) ve 4 metilen (CH_2) karbonuna ait olduğu ve bu rezonanslardan glukozlara ait 12 sinyal çıkarılarak, aglikonun 9 karbonlu siklopentan-piran iridoit iskeletine sahip olduğu anlaşıldı. δ_{H} 6,48; 5,14 ve 5,77 ppm'deki birer proton şiddetindeki sinyallerin kimyasal kayma değerleri molekülde 3 olefinik proton olduğu göstermektedir. Bileşiğin ^1H -NMR spektrumunda H-5'e ait sinyal bulunmaması ve ^{13}C -NMR spektrumunda δ_{C} 83,0 (C, C-5)'in kuaterner olarak görülmesi, C-5'te sübstitüent olduğuna işaret etmektedir. δ_{C} 52,1 (CH, C-9) rezonansının daha aşağı alana kayması ve δ_{H} 3,33 (brs, H-9) sinyalinin geniş singlet olarak daha aşağı alanda olması da C-5 karbonunda β -glukoz varlığını göstermektedir. COSY spektrumunda (Ek-33); δ_{H} 5,29 (d, $J = 6,2$ Hz, H-1) asetal sinyali ile δ_{H} 3,33 (brs, H-9) metin protonu arasında korelasyon olduğu belirlenmiştir. δ_{H} 5,14 (d, $J = 6,2$ Hz, H-4) ile δ_{H} 6,48 (d, $J = 6,2$ Hz, 1H, H-3) olefinik protonları arasında olan korelasyon ilk ikili bağın C-3 ve C-4 arasında olduğunu göstermektedir. H-6 protonuna ait sinyalinin (δ_{H} 2,83), δ_{H} 5,77 (brs, 1H, H-7) olefinik protonuyla korelasyonu ve δ_{H}

3,33 (brs, H-9) sinyalinin geniş singlet olması, C-8'in kuaterner olduğunu ve ikinci ikili bağın C-7 ile C-8 arasında bulunduğunu göstermektedir. Bununla birlikte; C-6 rezonansının (δ_c 45,6) monomelittozite (δ_c 80,5) ve melittozite (δ_c 79,8) göre oldukça yüksek alana kaymış olması ve HETCOR spektrumundan iki ptoron sinyali gözlenmesi, C-6 karbonunda hidroksil grubunun olmadığını, yerine bir hidrojen atomu içerdiğini göstermektedir. Sonuç olarak elde edilen spektroskopik veriler literatürdeki değerlerle karşılaştırılarak S-7 bileşiğinin 6-deoksi melittozit olduğu belirlendi ve bu veriler literatür biligileri ile desteklendi (Ronsted vd., 2000).

Poliumozit (Poliumoside, S-8): Bileşik sarı renkli, amorf katı olarak elde edildi ve MeOH-*d*₄ ile çözülerek NMR spektrumları kaydedildi. Poliumozit bileşiği *Verbascum* L. türlerinde yaygın olarak bulunup daha önce *V. blattaria*, *V. boerhavii*, *V. chaixi*, *V. lasianthum*, *V. phlomoides*, *V. sinuatum* ve *V. thapsus* gibi türlerde varlığı rapor edilmiştir (Roussel, 1983; Akdemir vd., 2004b). Bileşiğe ait spektrumlar EK-(34-39)'de, bileşiğin kimyasal yapısı Şekil 4.13'te, kimyasal kayma değerleri ise aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.13. Poliumozit (S-8) bileşiğinin kimyasal yapısı

¹H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*₄) δ_H 7,62 (d, J = 15,8 Hz, 1H, H- β'), 7,08 (d, J = 2,0 Hz, 1H, H-2'), 6,98 (dd, J = 8,3; 2,1 Hz, 1H, H-6'), 6,80 (d, J = 8,1 Hz, 1H, H-5'), 6,71 (d, J = 2,1 Hz, 1H, H-2), 6,69 (d, J = 8,1 Hz, 1H, H-5), 6,59 (dd, J = 8,1; 2,0 Hz, 1H, H-6), 6,30 (d, J = 16,0 Hz, 1H, H- α'), 5,20 (d, J = 1,7 Hz, 1H, H-1'''), 5,06 - 4,98 (m, 1H, H-5'''), 4,64 (d, J = 1,7 Hz, 1H, H-1'''), 4,39 (d, J = 7,8 Hz, 1H, H-1''), 3,97 - 3,89 (m, 2H, H-2''' ve H- α a), 3,89 - 3,81 (m, 3H, H-3''', H-3'' ve H- α b), 3,80 - 3,66 (m, 3H, H-6''a, H-5'' ve H-3'''), 3,64 - 3,54 (m, 3H, H-5''', H-4'' ve H-2'''), 3,49 (dd, J = 11,7; 5,8 Hz, 1H, H-6''b), 3,39 - 3,35 (m, 2H, H-2'', H-4'''), 3,34 - 3,31 (m, 1H, H-4'''), 2,96 - 2,66 (m, 2H, H- β), 1,22 (d, J = 6,1 Hz, 3H, H-6'''), 1,10 (d, J = 6,2 Hz, 3H, H-6''').

¹³C-NMR (101 MHz, MeOH-*d*₄) δ_c 166,6 (C=O), 148,4 (C- β'), 146,7 (C-4'), 145,4 (C-3'), 144,7 (C-3), 143,3 (C-4), 130,0 (C-1), 126,3 (C-1'), 121,8 (C-6'), 119,9 (C-6), 115,7, (C-2), 115,1 (C-5'), 114,9 (C-5), 113,9 (C-2'), 113,3 (C- α'), 102,9 (C-1''), 101,7 (C-1'''), 100,9 (C-1'''), 80,2 (C-3''), 74,8 (C-2''), 73,3 (C-5''), 72,6 (C-4'''), 72,4 (C-4'''), 71,0 (C-2''), 70,9 (C- α), 70,89 (C-3'''), 70,7 (C-2'''), 70,6 (C-3'''), 69,0 (C-4''), 68,9 (C-5'''), 68,5 (C-5'''), 66,2 (C-6''), 35,3 (C- β), 17,0 (C-6'''), 16,6 (C-6''').

Moleküle ait ¹H-NMR spektrumunda (EK-34) aromatik bölgede (δ_H 7,08 - 6,59) iki ABX sistemi şeklinde tanımlanan 6 aromatik proton sinyali yapıda iki trisüstitüe benzen halkasının varlığını, δ_H 7,62 (H- β') ve 6,30 (H- α')’de AB sistemi şeklindeki sinyaller ise olefinik protonların varlığını göstermektedir. Aglikonun yan zinciri üzerindeki ekivalan olmayan oksimetilen sinyalleri δ_H 3,95 ve 3,70 ppm’de, benzilik metilen proton sinyali ise δ_H 2,81 ppm’de görüldü. Bu veriler, yapıda bir hidroksitirosol varlığını ortaya göstermektedir. Ayrıca AB sistemi şeklinde gözlenen olefinik protonların etkileşme sabiti değerlerinden de aromatik asitin *trans*-kafeik asit olduğu belirlendi. δ_H 5,20 (d, J = 1,7 Hz, 1H, H-1'') ve 4,64 (d, J = 1,7 Hz, 1H, H-1''')’de görülen anomerik proton sinyalleri ile δ_H 1,22 (d, J = 6,1 Hz, 3H, H-6'') ve 1,10 (d, J = 6,2 Hz, 3H, H-6''')’de görülen metil grupları yapıda iki 6-deoksi şeker biriminin (ramnoz) varlığını, δ_H 4,39 (d, J = 7,8 Hz, 1H, H-1'')’de görülen anomerik proton sinyalinden de yapıda üçüncü bir şeker biriminin varlığı belirlendi. δ_H 5,20 (d, J = 1,7 Hz, 1H, H-1''), 4,64 (d, J = 1,7 Hz, 1H, H-1''') ve 4,39 (d, J = 7,8 Hz, 1H, H-1'') ’de görülen üç anomerik proton sinyali, bunların etkileşme sabitleri ve şeker grubu sinyallerine ait karbon rezonansları ve δ_H 1,22 (d, J = 6,1 Hz, 3H, H-6'') ve 1,10 (d, J = 6,2 Hz, 3H, H-6''') de gözlenen sekonder metil rezonansı ile birlikte değerlendirildiğinde molekülde triglukozidik yapıda sırasıyla bir heksoz olan β -glukoz ve metilpentoz olan iki α -ramnoz bulunduğu tespit edildi. Ramnozlara ait rezonanslarda herhangi bir kimyasal kayma gözlenmemiş olması, ramnozların terminal şeker olduğuna işaret etmiştir. Aglikonun α -karbon atomunun kimyasal kayma değeri (δ_c 70,9) merkezi konumda yer alan glukoz için glukozun aglikona bağlandığı konumu yani glukozidasyon noktasını, glukozun H-4'' sinyalinin (δ_H 3,55) düşük alanda görülmesi ise *trans*-kafeik asitin, glukozun C-4'' (OH) konumu üzerinden esterleştiğini göstermiştir. Ayrıca glukozun C-3'' (δ_c 80,2) ve C-6'' (δ_c 66,2) karbon rezonanslarının da glukozidasyon etkisi ile düşük alanda gözlenmesi; yapıdaki ramnozlardan birinin

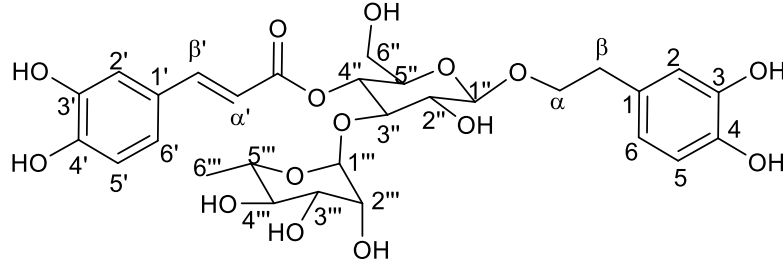
glukoza C-3" (OH) konumundan, diğzerinin ise C-6" (OH) konumundan bağı olduğunu göstermektedir.

Bileşğin ¹³C-NMR spektrumu incelendiğı zaman (EK-35) 35 karbon rezonansı tespit edildi ve DEPT spektrumundan bu rezonansların 6 kuaterner (C), 23 metin (CH), 3 metilen (CH₂), 2 metil (CH₃) ve 1 karbonil (C=O) karbonuna ait oldukları belirlendi. ¹³C-NMR spektrumunda δ_C 102,9 (C-1"), 101,7 (C-1'") ve 100,9 (C-1''")'de görülen üç anomerik karbon rezonansları, δ_C 66,2 (C-6'")'deki oksimetilen ve δ_C 17,0 (C-6''") ile 16,6 (C-6''")'de görülen iki metil gruplarının rezonanslarından molekülün kimyasal yapısında bir glukoz ve iki ramnoz olduğunu göstermektedir.

HMBC spektrumundan (EK-39) H-1" (δ_H 4,39) ve C-α (δ_C 70,9) korelasyonu feniletoksi grubunun C-1" konumundan, H-4" (δ_H 3,55) ve karbonil karbonu (δ_C 166,6) korelasyonu kafeil grubunun glukoz C-4" konumundan, H-1'"" (δ_H 5,20) ve C-3" (δ_C 80,2) korelasyonu yapıdaki ramnoz gruplarından birinin glukoz C-3" konumundan, diğzerinin ise H-1'"" (δ_H 4,64) ve C-6" (δ_C 66,2) korelasyonu ile glukoz C-3" bağı olduğu doğrulandı. Kafeil grubu üzerindeki δ_H 7,62 (H-β')'deki olefinik protonunun δ_C 166,6 (C=O) karbonil karbonu ve δ_C 121,8 (C-6') ve 113,9 (C-2') iki aromatik metin ile δ_H 6,30 (H-α')'deki diğzer olefinik protonun δ_C 130,0 (C-1)'deki kuaterner karbon ve δ_C 166,6 (C=O) karbonil karbonu ile δ_H 7,08 (H-2') ve 6,98 (H-6')'deki protonların ise δ_C 146,7 (C-4') ve 145,4 (C-3')'deki kuaterner karbonları ile korelasyonlar gösterdiği belirlendi. Hidroksitirosol üzerindeki 2,81 (H-β) metilen protonları yapıyla uyumlu olarak δ_C 130,0 (C-1), 115,7, (C-2), 119,9 (C-6) ve 70,95 (C-α) karbonları ile korelasyon gösterdiği belirlendi. δ_H 4,39'deki (H-1'") anomerik proton ile δ_C 70,9'daki (C-α) oksimetilen karbonu arasındaki korelasyon, hidroksitirosol grubunun glukoz C-1" konumundan bağı olduğunu göstermektedir. Elde edilen spektroskopik veriler literatürdeki değerlerle karşılaştırılarak S-8 bileşğinin poliumozit [β -(3,4-dihidroksifenil)-etil-(3'-6'-O- α -L-diramnopiranozil)-(4'-O-kafeil)- β -D-glukopiranozit] olduğu belirlendi ve bu veriler literatürdeki ayrıca desteklendi (Boghrati vd., 2016).

Verbaskozit (Verbascoside, S-9): Bileşik sarı renkli amorf toz olarak elde edildi ve MeOH-d₄ ile çözülerek NMR spektrumları kaydedildi. Verbaskozit (akteozit) bileşğı *Verbascum* L. türlerinde yaygın olarak bulunup daha önce *V. pterocalycinum*, *V. salviifolium*, *V. thapsus* ve *V. sinuatum* gibi türlerde varlığı rapor edilmiştir (Tatlı vd.,

2004; Akdemir vd., 2004b; Tatlı vd., 2007; Hussain vd., 2009). Bileşiğe ait spektrumlar EK-(40-44)'de, bileşiğin kimyasal yapısı Şekil 4.14'te, kimyasal kayma değerleri ise aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.14. Verbaskozit (S-9) bileşiğinin kimyasal yapısı

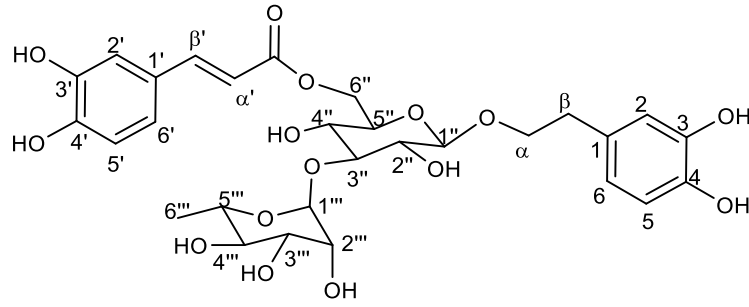
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) δ_{H} 7,62 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H, H- β'), 7,09 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, H-2'), 6,97 (dd, $J = 8,2$; 2,0 Hz, 1H, H-6'), 6,81 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H-5'), 6,73 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, H-2), 6,69 (brs 1H, H-5), 6,58 (dd, $J = 8,2$; 2,0 Hz, 1H, H-6), 6,31 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H, H- α'), 5,22 (d, $J = 1,8$ Hz, H-1'''), 4,91 (m, 1H, H-4''), 4,40 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, H-1''), 4,13 - 4,02 (m, 1H, H- $\alpha\alpha$), 3,97-3,90 (m, 1H, H-2'''), 3,88-3,80 (m, 1H, H-3''), 3,74 (m, 1H, H- $\alpha\beta$), 3,67 - 3,52 (m, 5H, H-3'', H-5'', H-5', H-6''a ve H-6''b), 3,50-3,39 (m, 1H, H-2''), 3,32 (m, 1H, H-4'''), 2,84 (t, $J = 7,3$; 3,8 Hz, 2H, H- β), 1,12 (d, $J = 6,1$ Hz, 3H, H-6''').

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) δ_{C} 167,0 (C=O), 148,4 (C-4'), 146,7 (C- β'), 145,4 (C-3'), 144,7 (C-3), 143,2 (C-4), 130,2 (C-1), 126,3 (C-1'), 121,9 (C-6'), 120,0 (C-6), 115,8 (C-2), 115,3 (C-5'), 115,1 (C-5), 114,0 (C-2'), 113,4 (C- α'), 102,8 (C-1''), 101,7 (C-1'''), 80,4 (C-3''), 74,8 (C-2''), 74,6 (C-5''), 72,5 (C-4'''), 71,0 (C- α), 70,9 (C-2'''), 70,7 (C-3'''), 69,2 (C-4''), 69,1 (C-5''), 61,0 (C-6''), 35,2 (C- β), 17,1 (C-6''').

Moleküle ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda (EK-40) aromatik bölgede (δ_{H} 7,09 - 6,58) iki ABX sistemi şeklinde belirlenen 6 aromatik proton sinyali yapıda iki trisüstitüe benzen halkasının varlığını, δ_{H} 7,62 (H- β') ve 6,31 (H- α')'de AB sistemi şeklindeki sinyaller ise olefinik protonların varlığını göstermektedir. Aglikonun yan zinciri üzerindeki ekivalan olmayan oksimetilen sinyalleri δ_{H} 4,06 ve 3,74 ppm'de, benzilik metilen protonuna ait sinyal ise δ_{H} 2,84 ppm'de görüldü. Bu veriler, yapıda bir hidroksitirosol varlığını ortaya koymaktadır. Ayrıca AB sistemi şeklinde gözlenen olefinik protonların etkileşme sabiti değerlerinden de aromatik asitin *trans*-kafeik asit olduğu belirlendi. Spektrumda görülen iki anomerik proton sinyali, bileşiğin diglukozidik yapıda olduğuna işaret

etmektedir. δ_H 4,40 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, H-1'') ve δ_H 5,22 (d, $J = 1,8$ Hz, H-1''')'de görülen iki anomerik proton sinyali, bunların etkileşme sabitleri ve şeker grubu sinyallerine ait karbon rezonansları ve δ_H 1,12 (d, $J = 6,1$ Hz, 3H, H-6''')'de gözlenen sekonder metil rezonansı ile birlikte değerlendirildiğinde molekülde diglukozidik yapıda sırasıyla bir heksoz olan β -glukoz ve bir metilpentoz olan α -ramnoz bulunduğu işaret etmektedir. İki anomerik proton sinyali DEPT ve ^{13}C -NMR spektrumlarında δ_C 102,8 (β -glukoz) ve 101,7 (α -ramnoz) ppm'de gözlemlendi. Ramnoza ait rezonanslarda herhangi bir kimyasal kayma gözlenmemiş olması, ramnozun terminal şeker olduğuna işaret etmektedir. Aglikonun α -karbon atomunun kimyasal kayma değeri (δ_C 71,0) merkezi konumda yer alan glukoz için glukozun aglikona bağlandığı konumu yani glukozidasyon noktasını, glukozun H-4'' sinyalinin (δ_H 4,91) düşük alanda görülmesi ise *trans*-kafeik asitin, glukozun C-4'' (OH) konumu üzerinden esterleştiğini göstermektedir. Ayrıca glukozun C-3'' (δ_C 80,4) karbon rezonansının da glukozidasyon etkisi ile düşük alanda gözlenmesi, ramnozun glukozu C-3'' (OH) konumundan bağlı olduğunu işaret etmektedir. ^{13}C , COSY ve HETCOR spektrumlarından; 3,4-dihidroksi- β -feniletoksil grubunun glukozu C-1'' konumundan, *trans*-kafeil grubunun C-4'' konumundan, ramnoz grubunun ise C-3'' konumundan bağlı olduğu doğrulanmıştır. HMBC spektrumundan H-1'' (δ_H 4,40) ve C- α (δ_C 71,0) korelasyonu feniletoksi grubunun C-1'' konumundan, H-4'' (δ_H 4,91) ve karbonil karbonu (δ_C 167,0) korelasyonu kafeil grubunun C-4'' konumundan, H-1''' (δ_H 5,22) ve C-3'' (δ_C 80,4) korelasyonu ise ramnoz grubunun C-3'' konumundan glukozu bağlı olduğu belirlendi. Elde edilen spektroskopik veriler literatürdeki değerlerle karşılaştırılarak S-9 bileşiğinin verbaskozit [β -(3,4-dihidroksifenil)-etil-(3'-O- α -L-ramnopiranozil)-(4'-O-kafeil)- β -D-glukopiranozit]] olduğu belirlendi ve bu veriler literatürdeki spektral verilerle doğrulandı (Akdemir vd., 2003b; Badami vd., 2003; Akdemir vd., 2004b; Akdemir vd., 2005; Tatlı vd., 2007; Tatlı vd., 2008).

İzoverbaskozit (Isoverbascoside, S-10): Bileşik sarı renkli amorf katı olarak izole edildi ve MeOH- d_4 ile çözülerek NMR spektrumları kaydedildi. İzoverbaskozit (izoakteozit) daha önce *V. sinuatum*, *P. asiatica*, *P. altissima* ve *P. depressa* gibi türlerde varlığı rapor edilmiştir (Scarpati ve Monache, 1963; Jensen vd., 1996; Li vd., 2009; Olennikov vd., 2011). Bileşiğe ait spektrumlar EK-(45-50)'da, bileşiğin kimyasal yapısı Şekil 4.15'te, kimyasal kayma değerleri ise aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.15. İzoverbaskozit (S-10) bileşiğinin kimyasal yapısı

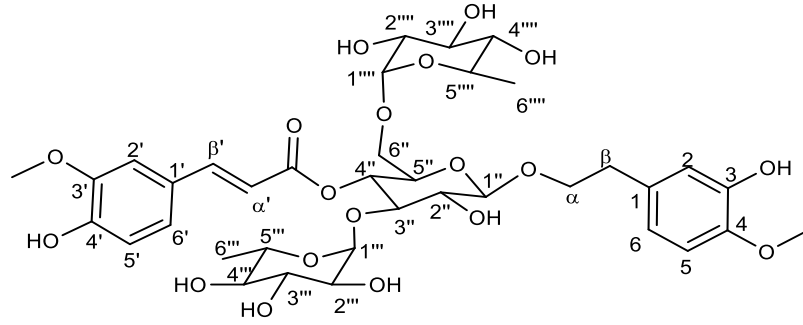
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) δ_{H} 7,58 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H, H- β'), 7,06 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, H-2'), 6,91 (dd, $J = 8,2$; 2,0 Hz, 1H, H-6'), 6,79 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H-5'), 6,69 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, H-2), 6,65 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H-5), 6,55 (dd, $J = 8,2$; 2,0 Hz, 1H, H-6), 6,31 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H, H- α'), 5,20 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H, H-1'''), 4,52 (dd, $J = 11,8$; 2,0 Hz, 1H, H-6''b), 4,37 (dd, $J = 11,8$; 6,0 Hz, 1H, H-6''a), 4,35 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, H-1''), 4,08 - 3,94 (m, 3H, H- α b, H-2''' ve H-5'''), 3,77 - 3,70 (m, 2H, H- α a ve H-3'''), 3,59 - 3,52 (m, 2H, H-3'' ve H-5''), 3,47 - 3,39 (m, 3H, H-2'', H-4'' ve H-4'''), 2,80 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, H- β), 1,27 (d, $J = 6,2$ Hz, 3H, H-6''').

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) δ_{C} 167,8 (C=O), 148,3 (C-4'), 145,9 (C- β'), 145,4 (C-3'), 144,7 (C-3), 143,3 (C-4), 130,0 (C-1), 126,3 (C-1'), 121,8 (C-6'), 119,9 (C-6), 115,7 (C-2), 115,2 (C-5'), 115,0 (C-5), 113,7 (C-2'), 113,5 (C- α'), 103,0 (C-1''), 101,3 (C-1'''), 82,6 (C-3''), 74,3 (C-2''), 74,0 (C-5''), 72,6 (C-4'''), 71,0 (C- α), 70,9 (C-2'''), 70,8 (C-3'''), 69,0 (C-4''), 66,7 (C-5'''), 63,3 (C-6''), 35,3 (C- β), 16,5 (C-6'').

Moleküle ait NMR spektrumları (EK 45-49) incelendiğinde; δ_{H} 4,35 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, H-1'') ve δ_{C} 103,0 (CH, C-1'') ile δ_{H} 5,20 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H, H-1''') ve δ_{C} 101,3 (CH, C-1''') ppm'de görülen anomerik proton ve karbon sinyalleri; bileşiğin biri glukoz diğeri de ramnoz olmak üzere diglukozidik yapıda olduğunu göstermektedir. δ_{H} 1,27 (d, $J = 6,2$ Hz, 3H, H-6''') ve δ_{C} 16,5 (C-6'') ppm'de görülen sekonder metil sinyalleri de ikinci şekerin ramnoz olduğuna delil oluşturmaktadır. Glukozun etkileşme sabitinden bağ konfigürasyonunun β olduğu ve ramnozun etkileşme sabitinden de bağ konfigürasyonunun α olduğu belirlendi. COSY ve HETCOR spektrumlarının birlikte değerlendirilmesi ile; şeker gruplarının β -glukoz ve α -ramnoz olduğu doğrulanmıştır. $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu incelendiği zaman 29 karbon rezonansı tespit edildi ve DEPT spektrumundan bu rezonansların 6 kuaterner (C), 18 metin (CH), 3 metilen (CH_2), 1 metil (CH_3) ve 1 karbonil (C=O) karbonuna ait oldukları belirlendi.

Molekölün ^1H -NMR spektrumundan δ_{H} 7,06 - 6,79 ve δ_{H} 6,69 - 6,55 bölgesinde iki ABX sistemi şeklinde 6 aromatik proton sinyali ile δ_{H} 6,31 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H, H- α') ve δ_{H} 7,62 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H, H- β') ppm'de AB sistem şeklinde iki olefinik proton sinyalinin olduğunu ve ^{13}C -NMR spektrumundan da olefinik karbonların δ_{C} 113,5 ve 145,9 ppm'de olduğu belirlenmiştir. Olefinik protonlar ile ABX sistemi şeklinde gözlenen proton sinyalleri birlikte değerlendirildiğinde; yapıda kafeik asit olduğunu, olefinik protonların etkileşme sabiti değerlerinden de aromatik asitin *trans*-kafeik asit olduğu belirlenmiştir. δ_{H} 2,81 ppm'de triplet şeklinde, iki proton şiddetinde benzilik protonlar ile δ_{H} 3,94 ve 3,73 ppm'de multiplet şeklinde ekivalan olmayan iki oksimetilen protonu görülmüştür. Belirtilen tüm protonlara ait δ_{C} değerleri HETCOR spektrumundan tespit edilerek, bu bilgiler diğer ABX sistemi ile birlikte değerlendirildiğinde; yapıda 3,4-dihidroksifeniletıl alkol bulunduğu anlaşılmıştır. Şeker grubu protonlarına ait sinyallerin kimyasal kayma değerleri COSY spektrumundan, bu protonlara karşılık gelen karbon rezonansları ise HETCOR spektrumu kullanılarak belirlendi. ^1H ve ^{13}C -NMR spektrum dataları, genel olarak verbaskozit (akteozit) bileşğine benzerlik göstermekle beraber; H-4" sinyali, verbaskozit (akteozit) bileşğinin H-4" sinyaline göre daha yüksek alanda gözlenmiştir. Bu durum; kafeik asitin verbaskozit bileşğinde olduğu gibi C-4" konumundan bağılı olmadığını göstermektedir. Ayrıca ^1H -NMR spektrumunda δ_{H} 4,37 (H-6"a) ve δ_{H} 4,52 (H-6"b) sinyalleri ile ^{13}C -NMR spektrumunda görülen δ_{C} 63,3 (C-6") sinyallerinin düşük alana kaymış olması, kafeik asit molekülünün C-6" konumundan esterleşmiş olduğunu göstermektedir. Glukozun C-3" konumundaki karbon rezonansının (δ_{C} 82,6) daha düşük alanda görülmesi; glukozidasyonun bu karbon üzerindeki hidroksil grubundan gerçekleşmiş olabileceğini, dolayısıyla da ramnoz molekülünün glukozun C-3" konumundan bağılı olduğunu göstermektedir. Elde edilen spektroskopik veriler literatürdeki değerlerle karşılaştırılarak S-10 bileşğinin 3,4-dihidroksi- β -feniletoksi-*O*- α -ramnopiranozil-(1 $\rightarrow$ 3)-6-*O*-*trans*-kafeil- β -glukopiranozit yapısında olan izoverbaskozit (izoakteozit) olduğu belirlendi ve bu veriler literatür ile de desteklendi (Schlauer vd., 2004).

Ferruginozit C (Ferruginoside C, S-11): Bileşik sarı renkli amorf katı olarak elde edildi ve MeOH-*d*4 ile çözülerek NMR spektrumları kaydedildi. Ferruginozit bileşğı daha önce *Digitalis ferruginea* türünde varlığı rapor edilmiştir (Çalış vd., 1999). Bileşğe ait spektrumlar EK-(51-56)'de, bileşğın kimyasal yapısı Şekil 4.16'da, kimyasal kayma değerleri ise aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.16. Ferruginozit C (S-11) bileşiğinin kimyasal yapısı

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) δ_{H} 7,65 (d, $J = 15,9$ Hz, 1H, H- β'), 7,19 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H, H-2'), 7,07 (dd, $J = 8,3; 2,0$ Hz, 1H, H-6'), 6,82 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H-5), 6,80 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, H-5'), 6,72 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H, H-2), 6,68 (dd, $J = 8,1, 2,4$ Hz, 1H, H-6), 6,36 (d, $J = 15,9$ Hz, 1H, H- α'), 5,18 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H, H-1'''), 5,03 - 4,88 (m, 1H, H-5'''), 4,61 (d, $J = 1,5$ Hz, 1H, H-1'''), 4,36 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, H-1''), 4,02 - 3,90 (m, 2H, H-2''' ve H- α), 3,87 (s, 3H, 4-OCH₃), 3,80 (s, 3H, 3'-OCH₃), 3,82 - 3,66 (m, 4H, H-3'', H-6''a, H-3''' ve H- α b), 3,67 - 3,60 (m, 2H, H-5'' ve H-3'''), 3,60 - 3,53 (m, 3H, H-4'', H-5'', H-2'''), 3,46 (dd, $J = 11,8; 5,6$ Hz, 1H, H-6''b), 3,43 - 3,29 (m, 3H, H-2'', H-4'', H-4'''), 2,86 - 2,77 (m, 2H, H- β), 1,18 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H, H-6'''), 1,08 (d, $J = 6,2$ Hz, 3H, H-6''').

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) δ_{C} 166,5 (C=O), 149,4 (C-3), 147,9 (C-3'), 146,5 (C- β'), 146,1 (C-4'), 145,9 (C-4), 131,4 (C-1), 126,2 (C-1'), 122,9 (C-6'), 119,7 (C-6), 115,6 (C-2), 115,1 (C-5'), 113,7 (C- α'), 111,5 (C-5), 110,4 (C-2'), 102,9 (C-1''), 101,6 (C-1'''), 100,9 (C-1'''), 80,1 (C-3''), 74,7 (C-2''), 73,3 (C-5''), 72,5 (C-4''), 72,3 (C-4'''), 70,9 (C-2''), 70,9 (C- α), 70,8 (C-3'''), 70,6 (C-2'''), 70,6 (C-3'''), 69,00 (C-4''), 68,9 (C-5'''), 68,5 (C-5'''), 66,2 (C-6''), 55,1 (4-OCH₃), 55,0 (3'-OCH₃), 35,2 (C- β), 17,0 (C-6'''), 16,6 (C-6''').

Moleküle ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda (EK-50) aromatik bölgede (δ_{H} 7,19 - 6,68) iki ABX sistemi şeklinde belirlenen 6 aromatik proton sinyali yapıda iki trisüstitüe benzen halkasının varlığını, δ_{H} 7,65 (H- β') ve 6,36 (H- α')'de AB sistemi şeklindeki sinyaller ise olefinik protonların varlığını göstermektedir. Aglikonun yan zinciri üzerindeki ekivalan olmayan oksimetilen sinyalleri δ_{H} 3,92 ve 3,72 ppm'de, benzilik metilen protonuna ait sinyal ise δ_{H} 2,80 ppm'de görüldü. Ayrıca spektrumdan feruloil ve 3-hidroksi-4-metoksi-feniletanol grupları için tipik olan δ_{H} 3,87 (s, 3H) ve 3,80 (s, 3H) ppm'de 2

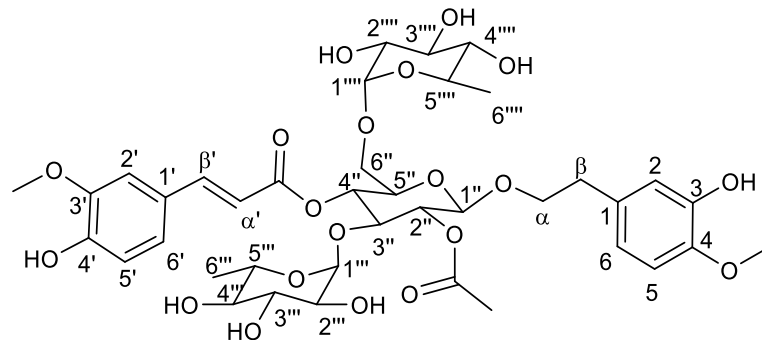
metoksi (OCH₃) sinyallerinin olduğu ve bu gruplarında HETCOR, ¹³C ve HMBC spektrumlarından δ_C 147,9 (C-3') ve 145,9 (C-4) karbonlarında bağlı olduğu belirlendi. C-3' ve C-4' karbonlarının kimyasal kayma değerleri de bunu doğrulamaktadır. δ_H 5,18 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H, H-1''') ve 4,61 (d, $J = 1,5$ Hz, 1H, H-1''')'de görülen anomerik proton sinyalleri ile δ_H 1,18 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H, H-6''') ve 1,08 (d, $J = 6,2$ Hz, 3H, H-6''')'de görülen metil grupları yapıda iki 6-deoksi şeker (ramnoz) biriminin varlığını, δ_H 4,36 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, H-1'')'de görülen anomerik proton sinyalinden de yapıda üçüncü bir şeker biriminin varlığı belirlendi. δ_H 5,18 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H, H-1'''), 4,61 (d, $J = 1,5$ Hz, 1H, H-1''') ve 4,36 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, H-1'') 'de görülen üç anomerik proton sinyali, bunların etkileşme sabitleri ve şeker grubu sinyallerine ait karbon rezonansları ve δ_H 1,18 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H, H-6''') ve 1,08 (d, $J = 6,2$ Hz, 3H, H-6''') de gözlenen sekonder metil rezonansı ile birlikte değerlendirildiğinde molekülde diglukozidik yapıda sırasıyla bir heksoz olan β -glukoz ve metilpentoz olan iki α -ramnoz bulunduğu tespit edildi. Ramnozlara ait rezonanslarda herhangi bir kimyasal kayma gözlenmemiş olması, ramnozlara terminal şeker olduğuna işaret etmektedir. Aglikonun α -karbon atomunun kimyasal kayma değeri (δ_C 70,9) merkezi konumda yer alan glukoz için glukozun aglikona bağlandığı konumu yani glukozidasyon noktasını, glukozun H-4'' sinyalinin (δ_H 3,55) düşük alanda görülmesi ise *trans*-kafeik asitin, glukozun C-4'' (OH) konumu üzerinden esterleştiğini göstermiştir. Ayrıca glukozun C-3'' (δ_C 80,1) ve C-6'' (δ_C 66,2) karbon rezonanslarının da glukozidasyon etkisi ile düşük alanda gözlenmesi; yapıdaki ramnozlardan birinin glukoz C-3'' (OH) konumundan, diğerinin ise C-6'' (OH) konumundan bağlı olduğunu göstermektedir.

Bileşiğin ¹³C-NMR spektrumu incelendiğinde (EK-51) 37 karbon rezonansı tespit edildi ve DEPT spektrumundan bu rezonansların 6 kuaterner (C), 23 metin (CH), 3 metilen (CH₂), 2 metil (CH₃), 1 karbonil (C=O) ve 2 metoksi (OCH₃) karbonuna ait oldukları belirlendi. Ayrıca spektrumdan δ_C 102,9 (C-1''), 101,6 (C-1''') ve 100,9 (C-1''')'de görülen üç anomerik karbon rezonansları, δ_C 66,2 (C-6'')'deki oksimetilen ve δ_C 17,0 (C-6''') ile 16,6 (C-6''')'de görülen iki metil gruplarının rezonansları yapıda bir glukoz ve iki ramnoz varlığını doğrulamaktadır.

HMBC spektrumundan (Ek-55) H-1'' (δ_H 4,36) ve C- α (δ_C 70,9) korelasyonu 3-hidroksi-4-metoksi-feniletanol grubunun C-1'' konumundan, H-4'' (δ_H 3,55) ve karbonil karbonu (δ_C 166,5) korelasyonu feruloil grubunun glukoz C-4'' konumundan, H-1''' (δ_H 5,18) ve

C-3" (δ_C 80,1) korelasyonu yapıdaki ramnoz gruplarından birinin glukoza C-3" konumundan, H-1"" (δ_H 4,61) ve C-6" (δ_C 66,2) korelasyonları ise diğer ramnozun glukoza C-3" pozisyonundan bağlı olduğunu göstermektedir. Feruloil grubu üzerindeki δ_H 7,65 (H- β')'deki olefinik protonunun δ_C 166,5 (C=O) karbonil karbonu ve δ_C 122,9 (C-6') ve 110,4 (C-2') iki aromatik metin ile, δ_H 6,36 (H- α')'deki diğer olefinik protonun δ_C 131,4 (C-1)'deki kuarterner karbon ve δ_C 166,5 (C=O) karbonil karbonu ile, δ_H 7,19 (H-2') ve 7,07 (H-6')'deki protonların ise δ_C 146,1 (C-4') ve 149,4 (C-3')'deki kuarterner karbonları ile korele oldukları belirlendi. 3-Hidroksi-4-metoksi-feniletanol üzerindeki 2,80 (H- β) metilen protonları, δ_C 131,4 (C-1), 115,6, (C-2), 119,7 (C-6) ve 70,9 (C- α) karbonları ile korelasyon göstermiştir. δ_H 4,36'daki (H-1'') anomerik proton ile δ_C 70,9'daki (C- α) oksimetilen karbonu arasındaki korelasyon, 3-hidroksi-4-metoksi-feniletanol grubunun glukoza C-1" konumundan bağlı olduğunu göstermektedir. Elde edilen spektroskopik veriler literatürdeki değerlerle karşılaştırılarak S-11 bileşiğinin Ferruginozit C [2-(3-hidroksi-4-metoksi-fenil)-etil-O-(alfa-L-ramnozil)-(1 $\rightarrow$ 3)-O-(alfa-L-ramnozil)-(1 $\rightarrow$ 6)-4-O-E-feruloil- β -D-glukopiranozit] olduğu belirlendi ve bu veriler literatürdeki spektral verilerle doğrulandı (Çalış vd., 1999; Tin vd., 2019).

Ferruginozit D (Ferruginoside D, S-12): Bileşik sarı renkli amorf katı olarak elde edildi ve MeOH-*d*4 ile çözülerek NMR spektrumları kaydedildi. Ferruginozit D bileşiği daha önce hiçbir bitki türünde varlığı rapor edilmemiş olup ilk defa bu bitki türünden izole edilmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır. Kimyasal yapısı Ferruginozit C'ye benzediği ve sadece glukoza bağlı asetil grubu ile fark ettiği için Ferruginozit D (Ferruginoside D) olarak isimlendirilmiştir. Bileşiğe ait spektrumlar EK-(57-61)'da, bileşiğin kimyasal yapısı Şekil 4.17'de, kimyasal kayma değerleri ise aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.17. Ferruginozit D (S-12) bileşiğinin kimyasal yapısı

^1H -NMR (600 MHz, MeOH- d_4) δ_{H} 7,65 (d, $J = 15,9$ Hz, 1H, H- β'), 7,17 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, H-2'), 7,06 (dd, $J = 8,2$; 2,0 Hz, 1H, H-6'), 6,80 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H-5), 6,78 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, H-5'), 6,66 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, H-2), 6,62 (dd, $J = 8,2$; 2,0 Hz, 1H, H-6), 6,35 (d, $J = 15,9$ Hz, 1H, H- α'), 5,10 - 4,94 (m, 1H, H-2''), 4,77 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H, H-1'''), 4,60 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H, H-1'''), 4,52 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H-1''), 4,05 - 3,91 (m, 2H, H- $\alpha\alpha$ ve H-3''), 3,86 (s, 3H, 4-OCH₃), 3,84 - 3,81 (m, 1H, H-3'''), 3,79 (s, 3H, 3'-OCH₃), 3,76 - 3,72 (m, 1H, H-6''a), 3,68 - 3,62 (m, 2H, H-5'' ve H-2'''), 3,62 - 3,55 (m, 3H, H- $\alpha\beta$, H-2''' ve H-5'''), 3,51 - 3,43 (m, 3H, H-6''b, H-5''' ve H-3'''), 3,35 - 3,28 (m, 1H, H-4'''), 3,26 - 3,21 (m, 1H, H-4'''), 2,74 - 2,68 (m, 3H, H- β), 1,96 (s, 3H, CH_3CO), 1,18 (d, $J = 6,2$ Hz, 3H, H-6'''), 1,05 (d, $J = 6,2$ Hz, 3H, H-6''').

^{13}C -NMR (150 MHz, MeOH- d_4) δ_{C} 169,4 (CH_3CO) 165,8 (C=O), 148,9 (C-3), 147,4 (C-3'), 146,1 (C- β'), 145,5 (C-4'), 145,3 (C-4), 131,2 (C-1), 125,6 (C-1'), 122,4 (C-6'), 119,2 (C-6), 115,1 (C-2), 114,5 (C-5'), 113,0 (C- α'), 110,9 (C-5), 109,8 (C-2'), 101,4 (C-1'''), 100,3 (C-1'''), 99,8 (C-1''), 78,5 (C-3''), 73,1 (C-2''), 72,8 (C-5''), 71,9 (C-4'''), 71,6 (C-4'''), 70,6 (C-2'''), 70,3 (C-2'''), 70,0 (C-3'''), 69,9 (C-5'''), 69,8 (C- α), 68,8 (C-3'''), 68,5 (C-4''), 67,9 (C-5'''), 65,3 (C-6''), 54,5 (4-OCH₃), 54,4 (3'-OCH₃), 34,4 (C- β), 18,9 (CH_3CO), 16,5 (C-6'''), 16,0 (C-6'').

Moleküle ait ^1H -NMR spektrumunda (EK-56) aromatik bölgede (δ_{H} 7,17 - 6,62) iki ABX sistemi şeklinde belirlenen 6 aromatik proton sinyali yapıda iki trisüstitüe benzen halkasının varlığını, δ_{H} 7,65 ve 6,35 ppm'de AB sistemi şeklindeki sinyaller ise olefinik protonların varlığını göstermektedir. Aglikonun yan zinciri üzerindeki ekivalan olmayan oksimetilen sinyalleri δ_{H} 4,01 ve 3,62 ppm'de, benzilik metilen protonuna ait sinyal ise δ_{H} 2,71 ppm'de görüldü. Ayrıca spektrumdan feruloil ve 3-hidroksi-4-metoksi-feniletanol grupları için tipik olan δ_{H} 3,86 (s, 3H) ve 3,79 (s, 3H) ppm'de 2 metoksi (OCH₃) sinyallerinin olduğu ve bu gruplarında HETCOR, ^{13}C ve HMBC spektrumlarından δ_{C} 147,4 (C-3') ve 145,3 (C-4) karbonlarında bağlı olduğu belirlendi. C-3' ve C-4 karbonlarının kimyasal kayma değerleri de bunu doğrulamaktadır. δ_{H} 4,77 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H, H-1''') ve 4,60 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H, H-1''')'de görülen anomerik proton sinyalleri ile δ_{H} 1,18 (d, $J = 6,2$ Hz, 3H, H-6''') ve 1,05 (d, $J = 6,1$ Hz, 3H, H-6''')'de görülen metil grupları yapıda iki 6-deoksi şeker biriminin varlığını, δ_{H} 4,52 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H-1'')'de görülen anomerik proton sinyalinden de yapıda üçüncü bir şeker biriminin varlığı belirlendi. δ_{H} 4,77 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H, H-1'''), 4,60 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H,

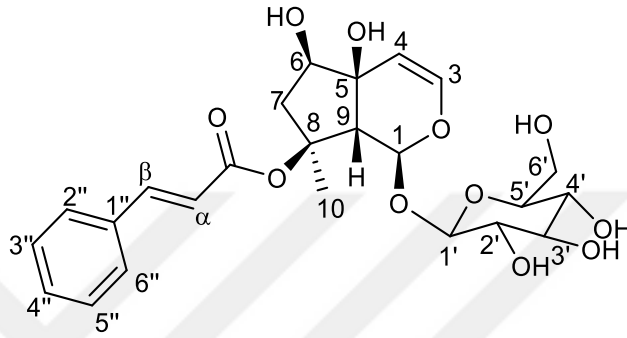
H-1''') ve 4,52 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H-1'')'de görülen üç anomerik proton sinyali, bunların etkileşme sabitleri ve şeker grubu sinyallerine ait karbon rezonansları ve δ_H 1,18 (d, $J = 6,2$ Hz, 3H, H-6'') ve 1,05 (d, $J = 6,1$ Hz, 3H, H-6''')'de de gözlenen sekonder metil rezonansı ile birlikte değerlendirildiğinde molekülde bir heksoz olan β -glukoz ve metilpentoz olan iki α -ramnoz bulunduğu tespit edildi. Ramnozlara ait rezonanslarda herhangi bir kimyasal kayma gözlenmemiş olması, ramnozların terminal şeker olduğuna işaret etmektedir. Aglikonun α -karbon atomunun kimyasal kayma değeri (δ_C 69,8) merkezi konumda yer alan glukoz için glukozun aglikona bağlandığı konumu yani glukozidasyon noktasını, glukozun H-4'' sinyalinin düşük alanda görülmesi (δ_H 3,49) ise *trans*-kafeik asitin, glukozun C-4'' (OH) konumu üzerinden esterleştiğini göstermiştir. Ayrıca glukozun C-3'' (δ_C 78,5) ve C-6'' (δ_C 65,3) karbon rezonanslarının da glukozidasyon etkisi ile düşük alanda gözlenmesi; yapıdaki ramnozlardan birinin glukozu C-3'' (OH) konumundan, diğerinin ise C-6'' (OH) konumundan bağlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca spektrumda 1,96 (s, 3H) ppm' bir metil sinyali daha gözlemlendi ve bu durum yapıda 3 metil (CH₃) grubunun varlığına işaret etmektedir. Bileşiğin ¹³C-NMR spektrumu incelendiğinde (EK-57) 39 karbon rezonansı tespit edildi ve DEPT spektrumundan bu rezonansların 6 kuaterner (C), 23 metin (CH), 3 metilen (CH₂), 3 metil (CH₃), 2 karbonil (C=O) ve 2 metoksi (OCH₃) karbonuna ait oldukları belirlendi. δ_C 169,4 ppm'de gözlenen sinyal yapıda asetil grubunun varlığına işaret etmektedir. 1,96 (s, 3H) ppm' bir metil sinyalinin daha olması bu durumu doğrulamaktadır. δ_C 99,8 (C-1'') ppm'deki anomerik karbonunun yukarı alana doğru kayması asetil grubunun glukozu bağlı olduğu, δ_C 73,1 (C-2'') ppm'deki karbon rezonansındaki değişimden de asetil grubunun glukozu (C-2'') karbonundan bağlı olduğu belirlendi. Ayrıca spektrumdan δ_C 101,4 (C-1'''), 100,3 (C-1''') ve 99,8 (C-1'') ppm'de görülen üç anomerik karbon rezonansları, δ_C 65,3 (C-6'')'deki oksimetilen ve δ_C 16,5 (C-6''') ile 16,0 (C-6''')'de görülen iki metil gruplarının rezonanslarından yapıda bir glukoz ve iki ramnoz varlığı doğrulandı. HMBC spektrumundan (EK-12) H-1'' (δ_H 4,52) ve C- α (δ_C 69,8) korelasyonu 3-hidroksi-4-metoksi-feniletanol grubunun C-1'' konumundan, H-4'' (δ_H 3,55) ve karbonil karbonu (δ_C 165,8) korelasyonu feruloil grubunun glukozu C-4'' konumundan, H-1''' (δ_H 4,77) ve C-3'' (δ_C 78,5) korelasyonu yapıdaki ramnoz gruplarından birinin glukozu C-3'' konumundan, diğerinin ise H-1''' (δ_H 4,60) ve C-6'' (δ_C 65,3) korelasyonu ile glukozu C-3'' karbonundan bağlı olduğu doğrulandı. Feruloil grubu üzerindeki δ_H 7,65 (H- β)'deki olefinik protonunun δ_C 165,8

(C=O) karbonil karbonu ve δ_C 122,4 (C-6') ve 109,8 (C-2') iki aromatik metin ile δ_H 6,35 (H- α')'deki diğer olefinik protonun δ_C 131,2 (C-1)'deki kuaterner karbon ve δ_C 165,8 (C=O) karbonil karbonu ile δ_H 7,17 (H-2') ve 7,06 (H-6')'deki protonların ise δ_C 145,5 (C-4') ve 147,4 (C-3')'deki kuaterner karbonları ile korele oldukları belirlendi. 3-Hidroksi-4-metoksi-feniletanol grubuna ait 2,71 (H- β) metilen protonları, δ_C 131,2 (C-1), 115,1 (C-2), 119,2 (C-6) ve 69,8 (C- α) karbonları ile korelasyon göstermiştir. δ_H 4,52'deki (H-1'') anomerik proton ile δ_C 69,8'deki (C- α) oksimetilen karbonu arasındaki korelasyonu, 3-hidroksi-4-metoksi-feniletanol grubunun glukoza C-1'' konumundan bağlı olduğunu göstermektedir. Elde edilen spektroskopik veriler sonucunda (Bkz. Tablo 4.9) S-12 bileşiğinin Ferruginozit C bileşiğinden farklı olarak asetil grubu içerdiği tespit edildi. Bu bileşik literatür için yeni bir bileşik olup kimyasal yapısı Ferruginozit C bileşiğine benzediği için Ferruginozit D olarak isimlendirilmiştir.

Tablo 4.9. Ferruginozit D bileşiğinin 1H ve ^{13}C -NMR verileri

Atom no	DEPT	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	Atom no	DEPT	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)
1	C	131,2	-	1''	CH	99,8	4,52 (d, 8,2)
2	CH	115,1	6,66 (d, 2,1)	2''	CH	73,1	5,10 - 4,84 (m)
3	C	148,9	-	3''	CH	78,5	4,04 - 3,91 (m)
4	C	145,5	-	4''	CH	68,5	5,10 - 4,84 (m)
5	CH	110,9	6,80 (d, 8,2)	5''	CH	72,8	3,68 - 3,62 (m)
6	CH	119,2	6,62 (dd,8,2; 2,0)	6''	CH ₂	65,3	3,75 - 3,69 (m) 3,51-3,43 (m)
α	CH ₂	69,8	4,05 - 3,91 (m) 3,62 - 3,55 (m)	1'''	CH	101,4	4,77 (d, 1,8)
β	CH ₂	34,4	2,79 - 2,53 (m)	2'''	CH	70,6	3,62 - 3,55 (m)
OCH ₃	CH ₃	54,5	3,79 (s, 3H)	3'''	CH	70,0	3,84 - 3,81 (m)
1'	C	125,6	-	4'''	CH	71,9	3,35 - 3,28 (m)
2'	CH	109,8	7,17 (d, 2,0)	5'''	CH	69,9	3,51 - 3,43 (m)
3'	C	147,4	-	6'''	CH ₃	16,0	1,18 (d, 6,2)
4'	C	145,3	-	1''''	CH	100,3	4,60 (d, 1,8)
5'	CH	114,5	6,78 (d, 8,2)	2''''	CH	70,3	3,68 - 3,62 (m)
6'	CH	122,4	7,06 (dd, 8,2; 2,0)	3''''	CH	68,8	3,51 - 3,43 (m)
α'	CH	113,0	6,35 (d, 15,9)	4''''	CH	71,6	3,26 - 3,21 (m)
β'	CH	146,1	7,65 (d, 15,9)	5''''	CH	67,9	3,62 - 3,55 (m)
C=O	C	165,8	-	6''''	CH ₃	16,5	1,05 (d, 6,1)
OCH ₃	CH ₃	54,5	3,86 (s, 3H)				
CH ₃ CO	C	169,4	-				
CH ₃ CO	CH ₃	18,9	1,96 (s, 3H)				

Harpagozit (Harpagoside, S-13): Bileşik beyaz renkli ve amorf katı halinde elde edildi ve MeOH-*d*₄ ile çözülerek NMR spektrumları kaydedildi. Harpagozit bileşiği daha önce *V. thapsus*, *V. pycnostachyum* ve *V. densiflorum* gibi türlerde varlığı rapor edilmiştir (Swiatek vd., 1984; Akdemir vd., 2004; Tatlı vd., 2007; Hussain vd., 2009). Bileşiğe ait spektrumlar EK-(62-66)'de, bileşiğin kimyasal yapısı Şekil 4.18'de, kimyasal kayma değerleri ise aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.18. Harpagozit (S-13) bileşiğinin kimyasal yapısı

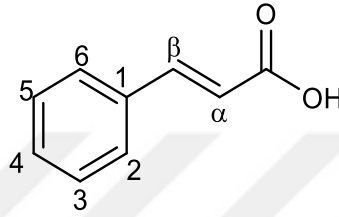
¹H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*₄) δ_H 7,70 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H, H- β), 7,64 - 7,60 (m, 2H, H-2'' ve H-6''), 7,46 - 7,40 (m, 3H, H-4'' ve H-3'', H-5''), 6,54 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H, H- α), 6,44 (d, $J = 6,5$ Hz, 1H, H-3), 6,20 (d, $J = 1,4$ Hz, 1H, H-1), 4,96 (dd, $J = 6,4; 1,7$ Hz, 1H, H-4), 4,65 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, H-1'), 3,96 (dd, $J = 12,0; 2,2$ Hz, 1H, H-6'a), 3,84 - 3,78 (m, 1H, H-6), 3,75 (dd, $J = 12,1; 5,7$ Hz, 1H, H-6'b), 3,57 - 3,38 (m, 1H, H-5' ve H-3'), 3,30 - 3,16 (m, 2H, H-2' ve H-4'), 2,93 (brs, 1H, H-9), 2,30 (d, $J = 15,2$ Hz, 1H, H-7a), 2,04 (dd, $J = 15,2; 4,5$ Hz, 1H, H-7b), 1,56 (s, 3H, H-10).

¹³C-NMR (100 MHz, MeOH-*d*₄) δ_C 167,4 (C=O), 144,7 (C- β), 142,6 (C-3), 134,4 (C-1''), 130,1 (C-4''), 128,6 (C2'' ve C-6''), 127,8 (C-3'' ve C-5''), 118,8 (C- α), 105,5 (C-4), 98,6 (C-1'), 93,3 (C-1), 87,4 (C-8), 76,8 (C-3'), 76,3 (C-5'), 76,3 (C-6), 73,2 (C-2'), 72,1 (C-5), 70,4 (C-4'), 61,6 (C-6'), 54,2 (C-9), 44,9 (C-7), 21,3 (C-10).

Moleküle ait ¹H ve ¹³C-NMR spektrumları incelendiği zaman (EK-61 ve EK-62); δ_H 7,64 - 7,60 (m, 2H) ve 7,46 - 7,40 (m, 3H) ppm'de görülen sinyaller sırasıyla H-2', H-6' ve H-3', H-4', H-5' aromatik protonlarına, δ_H 7,70 (d, $J = 16,1$ Hz, 1H) ve 6,54 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H) ppm'de AB sistemi şeklinde görülen sinyaller ise olefinik protonlar olduğu ve bunların da sırasıyla H- β ile H- α protonlarına ait olduğu belirlendi. H-2', H-6' ve H-3', H-4', H-5' sinyalleri benzen halkasının monosüstitüe olduğunu, H- β ve H- α

sinyalleri ise bu benzen halkasına bağlı yan zincirin olduğunu göstermektedir. Olefinik protonlar ile ABX sistemi şeklinde gözlenen proton sinyalleri birlikte değerlendirildiğinde; yapıda kafeik asit olduğunu, olefinik protonların etkileşme sabiti değerlerinden de aromatik asitin *trans*-kafeik asit olduğu belirlenmiştir. Bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumu incelendiği zaman 24 karbon sinyali tespit edildi ve DEPT spektrumlarından bunların altısı kuaterner (C , δ_{C} 167,4; 134,4; 87,4; 72,1; 54,2 ve 21,3), on altı metin (CH , δ_{C} 144,7; 142,6; 130,1; 128,6; 128,6; 127,8; 127,8; 118,8; 105,5; 98,6; 93,3; 76,8; 76,3; 76,3; 73,2 ve 70,4) ve iki sinyalin ise metilen (CH_2 , δ_{C} 61,6 ve 44,9) karbon rezonansının olduğu belirlendi. Bu rezonanslardan δ_{C} 134,4 (C-1"), 130,1 (C-4"), 128,6 (C2" ve C-6") ve 127,82 (C-3" ve C-5") ppm'dekiler aromatik karbon, δ_{C} 144,7 ve 118,8 ppm'de olanlar ise olefinik karbon sinyalleridir. δ_{H} 4,65 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, H-1') ve δ_{C} 98,6 (CH , C-1')'deki anomerik proton ve karbon sinyalleri şeker grubu sinyalleri ile birlikte değerlendirildiğinde, bileşiğin monoglukozidik bir yapıya sahip olduğu ve anomerik protonun etkileşme sabiti değerinden de şekerin bağ konfigürasyonunun β olduğu belirlendi. ^{13}C -NMR ve DEPT spektrumlarının incelenmesi sonucunda aglikona ait 1 metil (δ_{C} 21,3), 1 metilen (δ_{C} 44,9), 4 metin (δ_{C} 142,6; 105,5; 93,3 ve 76,3) ve üç tane de kuaterner (δ_{C} 87,9; 72,1 ve 54,2) karbon rezonansının olduğu tespit edildi. Bu bulgular sonucunda izole edilen bileşiğin C-4 süstitüe olmayan 9 karbonlu siklopentan-piran iskeletine sahip bir iridoid olduğunu göstermektedir. Ayrıca spektrumdan metil (δ_{H} 1,56, s) grubuna ait sinyalin yanında oksimetin (δ_{H} 3,80) ve metilen gruplarına (δ_{H} 2,30 ve 2,04) ait sinyallerden oluşan bir ABX sistemi olduğu ve ayrıca δ_{H} 6,44 (d, $J = 6,5$ Hz, 1H) ve 4,96 (dd, $J = 6,4$; 1,7 Hz, 1H)'deki olefinik H-3 ve H-4 sinyallerinden piran halkasında C-3 ile C-4 arasında ikili bağın olduğu belirlendi. COSY spektrumunda δ_{H} 6,44 (d, $J = 6,5$ Hz, 1H, H-3) ile 4,96 (dd, $J = 6,4$; 1,7 Hz, 1H, H-4) olefinik protonları arasında olan korelasyon ikili bağın C-3 ve C-4 arasında olduğunu doğrulamaktadır. HMBC spektrumunda δ_{H} 1,56 (s, H-10) sinyalinin δ_{C} 44,9 (C-7) ve 87,4 (C-8) karbonları ile korelasyonları, metil grubunun oksijenlenmiş quarterner karbona bağlı olduğunu göstermektedir. H-7 α ve H-7 β 'nin COSY spektrumunda sadece H-6 protonu ile korelasyonun olması da C-6 konumuna bağlı hidroksi grubunun yerini doğrulamaktadır. Tüm spektroskopik veriler literatürdeki değerlerle karşılaştırılarak S-13 bileşiğinin harpagozit olduğu belirlendi ve bu veriler literatürdeki spektral verilerle doğrulandı (Bianco, 1981; Pardo vd., 1998).

trans-sinamik asit (trans-cinnamic acid, S-14): Bileşik beyaz renkli ve amorf katı halinde elde edildi ve MeOH-*d*₄ ile çözülerek NMR spektrumları kaydedildi. Bileşik ile ilgili spektrumlar EK-15'te verilmiştir. *trans*-Sinamik asit daha önce *Rheum tanguticum*, *Radix scrophulariae* ve *Pinus densiflora* gibi türlerde varlığı rapor edilmiştir (Kuk vd., 1997; Jing vd., 2011; Gao vd., 2012). Bileşiğe ait spektrumlar EK-(67-68)'da, bileşiğin kimyasal yapısı Şekil 4.19'da, kimyasal kayma değerleri ise aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.19. *trans*-Sinamik asit (S-14) bileşiğinin kimyasal yapısı

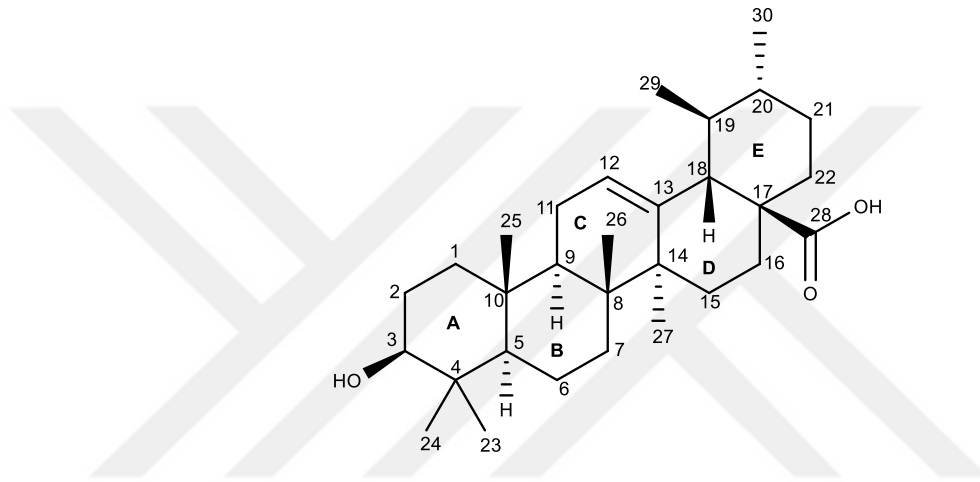
¹H-NMR (600 MHz, MeOH-*d*₄) δ_H 7,65 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H, H- β), 7,57 - 7,53 (m, 2H, H-2 ve H-6), 7,40 - 7,34 (m, 3H, H-3, H-4 ve H-5), 6,45 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H, H- α).

¹³C-NMR (100 MHz, MeOH-*d*₄) δ_C 168,9 (C=O), 144,9 (C- β), 134,4 (C-1), 130,0 (C-4), 128,6 (C-3 ve C-5), 127,8 (C-2 ve C-6), 117,9 (C- α).

S-14 numaralı bileşiğin ¹H-NMR spektrumu incelendiğinde (EK-66) δ_H 7,57 - 7,53 (m, 2H) ve 7,40 - 7,34 (m, 3H) ppm'de görülen sinyaller sırasıyla H-2, H-6 ve H-3, H-4, H-5 aromatik protonlarına, δ_H 7,65 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H), 6,45 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H) ppm'de görülen sinyaller ise olefinik protonlar olduğu ve bunların da sırasıyla H- β ile H- α protonlarına ait olduğu belirlendi. H-2, H-6 ve H-3, H-4, H-5 sinyalleri benzen halkasının monosüstitüe olduğunu, H- α ve H- β sinyalleri ise bu benzen halkasına bağlı yan zincirin olduğunu göstermektedir. Bileşiğin ¹³C-NMR spektrumu incelendiği zaman (EK-69) 7 karbon sinyali görüldü ve DEPT spektrumlarından bunların iki kuaterner (C, δ_C 168,9 ve 134,4) ve yedi metin (CH, δ_C 144,9; 130,0; 128,6; 128,6; 127,8; 127,8 ve 117,9) karbon rezonansının olduğu tespit edildi. Bu rezonanslardan δ_C 134,4 (C-1), 130,0 (C-4), 128,6 (C-3 ve C-5) ve 127,8 (C-2 ve C-6) ppm'dekiler aromatik karbon, δ_C 144,9 ve 117,9 ppm'de olanlar ise olefinik karbon sinyalleridir. Tüm spektroskopik veriler literatürdeki değerlerle karşılaştırılarak S-14 bileşiğinin *trans*-sinamik asit (3-fenil-2-

propenoik asit) olduğu belirlendi ve bu veriler literatürle de ayrıca desteklendi (Kuk vd., 1997; Kalinowska vd., 2007; Jing vd., 2011; Gao vd., 2012).

Ursolik asit (Ursolic acid, 3 β -hidroksi-urs-12-en-28-oik asit, S-15): Bileşik renksiz kristal halinde elde edildi ve DMSO-*d*₆ ile çözülerek NMR spektrumları kaydedildi. Ursolik asit bileşiği daha önce *V. lychnitis* türünde varlığı rapor edilmiştir (De Pascual Teresa vd., 1982). Bileşiğe ait spektrumlar EK-(69-73)’te, bileşiğin kimyasal yapısı Şekil 4.20’de, kimyasal kayma değerleri ise aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.20. Ursolik asit (S-15) bileşiğinin kimyasal yapısı

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H 11,96 (s, 1H, OH), 5,13 (t, *J* = 3,6 Hz, 1H, H-12), 3,04 - 2,96 (m, 1H, H-3), 2,11 (d, *J* = 11,3 Hz, 1H, H-18), 1,99 - 1,89 (m, 2H, H-2a, H-11), 1,60 - 1,38 (m, 10H, H-1, H-2b, H-6a, H-7a, H-9, H-15, H-16, H-17, H-20, H-22a), 1,37 - 1,23 (m, 5H, H-6b, H-7b, H-19, H-21, H-22b), 1,06 (s, 3H, H-23), 1,04 (s, 3H, H-27), 0,91 (d, *J* = 6,5 Hz, 3H, H-30), 0,87 (s, 3H, H-25), 0,82 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H, H-29), 0,75 (s, 3H, H-26), 0,68 (s, 3H, H-24).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C 178,8 (C=O, C-28), 138,7 (C-13), 125,0 (C-12), 77,3 (C-3), 55,2 (C-5), 52,8 (C-18), 47,5 (C-9), 47,3 (C-17), 42,1 (C-14), 39,0 (C-8), 38,9 (C-4), 38,8 (C-19), 38,7 (C-20), 37,0 (C-1), 36,8 (C-10), 33,2 (C-22), 30,7 (C-7), 28,7 (C-21), 28,00 (C-23), 27,5 (C-15), 24,3 (C-2), 23,7 (C-16), 23,3 (C-27), 21,6 (C-11), 19,0 (C-30), 18,5 (C-6), 17,5 (C-26), 17,4 (C-29), 16,6 (C-24), 15,7 (C-25).

Moleküle ait ¹H ve ¹³C-NMR spektrumları incelendiği zaman (EK-68 ve EK-69); δ_H 0,68-1,06 ppm arasında görülen beş metil singleti ile δ_H 0,82 ve 0,91 ppm’deki iki dublet metilinin varlığı bileşiğin ursan yapısında olduğunu göstermektedir. δ_H 3,0 (dd, *J*

= 10,5; 5,3 Hz, 1H) ppm'de hidroksil grubuna komşu proton (H-3) ve 5,15 ppm'de (t, J = 3,6 Hz, 1H) görülen vinilik proton (H-12) pikleri ursan tipi triterpenler için karakteristiktir. δ_C 125,0 (C-12) ve 138,7 (C-13) ppm'deki sinyaller iskeletteki ikili bağ varlığını doğrulamaktadır. Bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumu incelendiği zaman 30 karbon sinyali tespit edildi ve DEPT spektrumlarından bunların 7 kuaterner (C, δ_C 178,8; 138,7; 42,1; 39,0; 38,9; 36,8 ve 23,3), 7 metin (CH, δ_C 125,0; 77,3; 55,2; 52,8; 47,5; 38,8 ve 38,7), 9 metilen (CH₂, δ_C 37,0; 33,2; 30,7; 28,7; 27,5; 24,3; 23,7; 21,6 ve 18,5) ve 7 metil (CH₃, δ_C 28,00; 23,3; 19,0; 17,5; 17,4; 16,6 ve 15,7) karbon rezonansının olduğu belirlendi. δ_H 2,11 (d, J = 11,3 Hz, 1H) ppm'de görülen pikin H-18 protonuna ait olduğu belirlendi ve bu sinyalin bu kadar aşağı alanda izlenmesi de C-17'ye bağlı bir (-COOH) asit grubunun varlığından dolayı olabileceği tahmin edildi. Bunun doğrultusunda spektrumda δ_C 178,8 ppm'deki sinyal görüldüğünde yapıda bir asit grubunun olduğu kesinleştirildi. Tüm spektroskopik veriler literatürdeki değerlerle karşılaştırılarak S-15 bileşiğinin ursolik asit (3- β -hidroksi-urs-12-en-28-oik asit) olduğu belirlendi ve bu veriler literatürdeki spektral verilerle doğrulandı (Seebacher vd., 2003; Güvenalp vd., 2006).

4.4. İzole Edilen Bileşiklerin Biyolojik Aktiviteleri

4.4.1. Antioksidan aktivite

Bitkisel ürünlerin antioksidan etkileri sinamik asit türevleri, kumarinler ve özellikle flavonoidler gibi fenolik bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Fenolik bileşiklerin otooksidasyonun önlenmesindeki etkisi oldukça fazladır. Bu doğrultuda *V. leiocarpum* türünden elde edilen bileşiklerin antioksidan aktiviteleri araştırılmış ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.10'da verilmiştir. Tablo 4.10 incelendiğinde luteolin (S-4), verbaskozit (S-9) ve izoverbaskozit (S-10) bileşiklerinin serbest radikal giderme (DPPH) ve katyonik radikal giderme (ABTS) aktiviteleri bakımından standart antioksidan trolokstan daha fazla radikalleri giderdiği görülmektedir. Poliumozit (S-8) bileşiği ABTS⁺ katyonik radikallerini gidermede trolokstan daha fazla, DPPH serbest radikallerini gidermede ise trolokstan daha düşük aktivite sergilemiştir. Diğer bileşikler ise her iki yöntemde de trolokstan daha düşük aktivite göstermiştir. İzole edilen bileşiklerin indirgeme gücü (FRAP) tayininde en iyi aktiviteyi luteolin (S-4), poliumozit (S-8), verbaskozit (S-9) ve izoverbaskozit (S-10) bileşikler sergilerken diğer bileşikler

düşük aktivite göstermiştir. Bileşikler indirgeme gücü kapasiteleri bakımından genel olarak Verbaskozit (S-9) > İzoverbaskozit (S-10) > Luteolin (S-4) > Poliumozit (S-8) > Eriodiktiyol (S-3) > Apigenin (S-6) > Ferruginozit C (S-11) > Ferruginozit D (S-12) > Harpagozit (S-13) > 10-O-sinnameoil-katalpol (S-5) > Katalpol (S-1) > Ajugol (S-2) > *trans*-sinnameik asit (S-14) > Ursolik asit (S-15) > 6-deoksi melittozit (S-7) şeklinde sıralanmaktadır. Fenolik bileşik sınıfına dahil olmayan iridoitler beklenildiği gibi düşük ABTS ve DPPH radikal giderme aktivitesi sergilemişlerdir. Bu veriler Fenolik bileşiklerdeki -OH gruplarının radikal gidermede etkili olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.10. Bileşiklerin antioksidan aktivite değerleri

	Bileşikler	DPPH (μ M)	IC ₅₀	
			ABTS (μ M)	FRAP μ g TE/g Madde)
İridoidler	Katalpol (S-1)	>250	>250	15,88 $\pm$ 0,21
	Ajugol (S-2)	>250	>250	13,44 $\pm$ 0,24
	10-O-sinnameoil-katalpol (S-5)	181,05 $\pm$ 1,11	161,38 $\pm$ 1,81	27,83 $\pm$ 0,12
	6-deoksi melittozit (S-7)	>250	>250	2,46 $\pm$ 0,32
	Harpagozit (S-13)	>250	>250	26,28 $\pm$ 0,55
Feniletanoidler	Eriodiktiyol (S-3)	68,09 $\pm$ 3,68	30,05 $\pm$ 1,95	88,32 $\pm$ 0,56
	Luteolin (S-4)	24,03 $\pm$ 1,72	14,53 $\pm$ 1,60	153,52 $\pm$ 0,49
	Apigenin (S-6)	69,05 $\pm$ 0,57	33,70 $\pm$ 2,84	71,41 $\pm$ 0,75
	Poliumozit (S-8)	58,49 $\pm$ 0,20	20,93 $\pm$ 1,30	111,08 $\pm$ 0,74
	Verbaskozit (S-9)	17,08 $\pm$ 1,66	10,72 $\pm$ 2,80	258,32 $\pm$ 0,37
	İzoverbaskozit (S-10)	20,83 $\pm$ 1,67	12,90 $\pm$ 2,28	179,05 $\pm$ 0,68
	Ferruginozit C (S-11)	85,28 $\pm$ 2,21	42,43 $\pm$ 2,12	57,83 $\pm$ 1,00
	Ferruginozit D (S-12)*	78,99 $\pm$ 1,31	53,45 $\pm$ 2,36	38,15 $\pm$ 0,71
	<i>trans</i> -sinnameik asit (S-14)	>250	>250	9,46 $\pm$ 0,67
	Ursolik asit (S-15)	>250	>250	3,93 $\pm$ 0,61
	Troloks	25,01 $\pm$ 1,12	26,72 $\pm$ 0,84	

* Yeni bileşik

4.4.2. Antidiyabetik aktivite

Tez çalışmasında bitkilerden elde edilen ekstraktların α -glukozidaz enzim inhibitör etki çalışmaları tamamlanmış ve en yüksek etkiye sahip bitkiler belirlenerek sonuçlar Tablo 4.5'te verilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak en iyi aktivite gösteren bitkinin

estresinde bu etkiden sorumlu bileşiklerin tespiti için saflaştırma işlemleri yürütüldü. Kromatografik yöntemlerle bitkiden elde edilen toplam 16 farklı molekülün α -glukozidaz enzim inhibisyonu yöntemiyle hipoglisemik etkileri test edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda ham ekstraların toplam flavonoid madde miktar sonuçları Tablo 4.11’de detaylı olarak verilmiştir. Tablo 4.11 incelendiğinde en etkili enzim inhibisyonu bitkinin kök kısmından izole edilen bileşiklerde olduğu görülmüştür. İzole edilen saf bileşikler arasında en düşük aktiviteyi; standart madde olan akarboza (22,82 μ M) kıyasla iridoidler ve organik asit olan *trans*-sinamik asit göstermiştir. Aktivite görülen bileşikler antidiyabetik aktivite bakımından genel olarak Verbaskozit (S-9) > İzoverbaskozit (S-10) > Ursolik asit (S-15) > Luteolin (S-4) > Poliumozit (S-8) > Ferruginozit D (S-12) > Ferruginozit C (S-11) > Apigenin (S-6) > Eriodiktiyol (S-3) şeklinde sıralanmaktadır. Bu sonuçlar flavonoidler ve fenil etanoidlerin α -glukozidaz enzim inhibitörü olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.11. Bileşiklerin α -glukozidaz inhibisyon değerleri

	Bileşikler	IC ₅₀ (μ M)
Iridoidler	Katalpol (S-1)	>250
	Ajugol (S-2)	>250
	10-O-sinamoil-katalpol (S-5)	>250
	6-deoksi melittozit (S-7)	>250
	Harpagozit (S-13)	>250
Flavonoidler	Eriodiktiyol (S-3)	32,05 $\pm$ 1,95
	Luteolin (S-4)	13,93 $\pm$ 0,40
	Apigenin (S-6)	28,20 $\pm$ 1,75
Feniletanoidler	Poliumozit (S-8)	15,93 $\pm$ 1,30
	Verbaskozit (S-9)	3,12 $\pm$ 0,80
	İzoverbaskozit (S-10)	5,60 $\pm$ 0,28
	Ferruginozit C (S-11)	19,93 $\pm$ 1,30
	Ferruginozit D (S-12)*	17,43 $\pm$ 2,12
	<i>trans</i> -sinamik asit (S-14)	>250
	Ursolik asit (S-15)	6,60 $\pm$ 0,50
	Troloks	22,82 $\pm$ 0,84

4.4.3. Antiproliferatif aktivite

4.4.3.1. Bileşiklerin NCI-60 metodolojisine göre değerlendirilmesi

Kanser tedavisi için geliştirilen ve çok çeşitli kimyasal yapılara sahip olabilen kemoterapötik ajanların önemli bir kısmı halen beklenen terapötik etkiyi göstermemektedir. Ayrıca çeşitli nedenlerden dolayı kemoterapötik ajanlara karşı meydana gelen direnç mekanizmaları ve bunların istenmeyen yan etkileri nedeniyle de yeterli derecede olmayan terapötik etkinlikleri gün geçtikçe daha da azalmaktadır. Bu nedenle kanser tedavisinde kullanılabilecek yeni antitümör ilaçların geliştirilmesi konusundaki araştırmalar günümüzde halen yoğun bir şekilde devam etmektedir. Bu noktada, çeşitli kaynaklardan izole edilebilen doğal kaynaklı metabolitlerin olası antikanser ya da adjuvan etkilerini değerlendirilmesi, kanser tedavisinde kullanılabilecek umut vadeden moleküllerin sayısının artması açısından oldukça önemlidir. Bu kapsamda, tez çalışmasında izolasyona tabi tutulan bitkiden elde edilen toplam 16 farklı molekülün hücre proliferasyonuna olan etkilerini (NCI-60 tarama metodolojisi) ve IC₅₀ değerlerini belirlemek için MTT testi yapılmıştır. Buna göre, kontrol hücre hatlarından Beas2B üzerinde bileşiklerin tamamına yakını yüksek LC₅₀ değeri gösterirken sadece poliumozit (S8) bileşiği düşük LC₅₀ değeri göstermiştir (860,46 µg/ml). Bu istenmeyen bir durum olmasına karşın kontrol antikanser ilaç 5-FU (417,72 µg/ml) ile karşılaştırıldığında çok düşük olmadığı anlaşılmaktadır. Bileşiklerin tamamı kontrol antikanser ilacı 5-FU'dan daha düşük LC₅₀ değerine sahip olmadığı için test edilen kontrol hücreleri üzerinde istenmeyen toksik etki göstermemiştir. Bileşiklerin kontrol hücreleri üzerindeki TGI değerleri göz önünde bulundurulduğunda, Beas2B normal hücreleri için luteolin (S-4), apigenin (S-6), harpagozit (S-13), *trans*-sinnamik asit (S-14) ve ursolik asit (S-15) maddeleri, RPE normal hücreleri için katalpol (S-1), ajugol (S-2), eriodiktiyol (S-3), luteolin (S-4), 10-O-sinamoil-katalpol (S-5), apigenin (S-6), 6-deoksi melittozit (S-7), poliumozit (S-8), izoverbaskozit (S-10), ferruginozit C (S-11), ferruginozit D (S-12) ve harpagozit (S-13) bileşikleri ve HSF normal hücreleri için katalpol (S-1), ajugol (S-2), eriodiktiyol (S-3), luteolin (S-4), 10-O-sinamoil-katalpol (S-5), 6-deoksi melittozit (S-7), poliumozit (S-8), verbaskozit (S-9), ferruginozit C (S-11) ve ferruginozit D (S-12) bileşikleri kontrol ilaç olan 5-FU'dan daha düşük Total Büyüme İnhibiyonu (TGI) gösterdiğinden, normal hücreler üzerinde toksik olmayan moleküller olarak değerlendirilebilirler. Kontrol hücreleri üzerinde

bileşiklerin GI_{50} değerleri kontrol antikanser ilaç 5-FU ile benzer seviyededir [RPE hücrelerinde düşük GI_{50} gösteren 10-O-sinamoil-katalpol (S-5) hariç]. İnhibitör konsantrasyonu (IC_{50}) bakımından kontrol hücreleri üzerinde bileşiklerin etkisi kontrol antikanser ilaç 5-FU baz alınarak değerlendirildiği zaman katalpol (S-1), eriodiktiyol (S-3), luteolin (S-4), apigenin (S-6), 6-deoksi melittozit (S-7), izoverbaskozit (S-10), harpagozit (S-13), *trans*-sinamik asit (S-14) ve urolük asit (S-15) bileşikleri Beas2B için, katalpol (S-1), ajugol (S-2), eriodiktiyol (S-3), luteolin (S-4), 10-O-sinamoil-katalpol (S-5), apigenin (S-6), 6-deoksi melittozit (S-7), poliumozit (S-8), ferruginozit C (S-11), ferruginozit D (S-12) ve harpagozit (S-13) bileşikleri RPE için ve ajugol (S-2), eriodiktiyol (S-3), luteolin (S-4), 10-O-sinamoil-katalpol (S-5), apigenin (S-6), 6-deoksi melittozit (S-7), poliumozit (S-8), verbaskozit (S-9), ferruginozit C (S-11) ve ferruginozit D (S-12) bileşikleri HSF için düşük olduğundan, bu bileşiklerin normal hücrelere etkileri sınırlıdır denilebilir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.12’de verilmiştir.

Glioma kanser hücre hatları A172 ve C6 üzerinde bileşiklerin antiproliferatif etkisi incelendiği zaman GI_{50} büyüme inhibisyonlarının kontrol antikanser ilaç olan 5-FU’ya yakın olduğu görülmüştür [A172 hücrelerinde düşük GI_{50} gösteren *trans*-sinamik asit (S-14) hariç]. Bileşiklerin glioma hücreleri üzerinde sergiledikleri Total Büyüme İnhibisyonu (TGI) değerlendirildiği zaman katalpol (S-1), ajugol (S-2), luteolin (S-4), apigenin (S-6), izoverbaskozit (S-10), ferruginozit D (S-12), harpagozit (S-13) ve ursolik asit (S-15) bileşiklerinin kontrol antikanser ilaç olan 5-FU’dan daha yüksek inhibisyon değerleri göstermiştir. Bulunan yüksek inhibisyon değerleri saf bileşiklerin kanser hücrelerini kontrol ilaca göre daha etkili bir şekilde öldürdüğünü göstermektedir. 6-Deoksi melittozit (S-7) bileşiği TGI değerleri bakımından sadece C6 glioma hücreleri üzerinde etki göstermiştir. Her iki glioma kanser türü üzerinde saf bileşiklerin antiproliferatif etkileri IC_{50} bakımından incelendiği zaman sadece apigenin (S-6), izoverbaskozit (S-10) ve harpagozit (S-13) bileşikleri daha etkili olmuştur. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.13’te verilmiştir.

Tablo 4.12. Bileşiklerin normal hücre hatlarına karşı MTT testiyle belirlenen yaşam parametreleri (GI₅₀, TGI ve LC₅₀) ve IC₅₀ değerleri

	(µg/ml)	Beas2B				RPE				HSF			
		GI ₅₀	TGI	LC ₅₀	IC ₅₀	GI ₅₀	TGI	LC ₅₀	IC ₅₀	GI ₅₀	TGI	LC ₅₀	IC ₅₀
<i>İridoidler</i>	Katalpol (S-1)	1,03	3,63	>1000	101,39	1,33	>1000	>1000	92,86	1,18	>1000	>1000	89,03
	Ajugol (S-2)	1,01	1,85	>1000	10,13	1,48	>1000	>1000	100,05	1,23	113,23	>1000	66,65
	10-O-sinamoil-katalpol (S-5)	1,13	2,94	>1000	7,62	11,89	>1000	>1000	152,23	1,11	>1000	>1000	75,42
	6-deoksi melittozit (S-7)	1,23	6,12	>1000	38,51	1,15	>1000	>1000	132,84	1,16	>1000	>1000	80,19
	Harpagozit (S-13)	1,03	518,53	>1000	110,31	1,10	>1000	>1000	91,64	1,08	20,75	>1000	20,75
<i>Flavonoidler</i>	Eriodiktiyol (S-3)	1,04	5,52	>1000	85,48	1,40	577,66	>1000	94,85	1,13	113,43	>1000	57,32
	Luteolin (S-4)	1,10	41,45	>1000	100,28	2,25	>1000	>1000	124,24	1,84	>1000	>1000	91,68
	Apigenin (S-6)	1,35	125,27	>1000	116,20	1,12	>1000	>1000	104,64	1,29	17,01	>1000	45,20
<i>Feniletanoidler</i>	Poliumozit (S-8)	1,11	2,29	860,46	4,36	2,64	>1000	>1000	98,93	1,10	>1000	>1000	134,57
	Verbaskozit (S-9)	1,55	5,91	>1000	11,97	1,16	43,74	>1000	66,58	1,08	146,26	>1000	5,30
	İzoverbaskozit (S-10)	1,16	13,17	>1000	60,72	1,75	>1000	>1000	286,87	1,00	1,40	>1000	11,40
	Ferruginozit C (S-11)	1,13	4,62	>1000	5,15	1,30	>1000	>1000	85,62	1,14	>1000	>1000	70,42
	Ferruginozit D (S-12)*	1,09	1,50	>1000	3,20	1,13	>1000	>1000	78,45	1,15	>1000	>1000	55,78
	trans-sinamik asit (S-14)	2,97	252,05	>1000	79,63	1,14	3,05	>1000	57,57	1,00	1,06	>1000	41,14
	Ursolik asit (S-15)	1,80	97,96	>1000	74,78	1,50	35,35	>1000	25,39	1,13	3,78	>1000	3,78
	5-FU	1,54	34,71	417,72	30,08	1,48	57,02	409,61	69,38	1,11	28,19	347,02	30,53

Tablo 4.13. Bileşiklerin glioma kanser hücre hatlarına karşı MTT testi ile belirlenen yaşam parametreleri (GI₅₀, TGI ve LC₅₀) ve IC₅₀ değerleri

	(µg/ml)	A172				C6			
		GI ₅₀	TGI	LC ₅₀	IC ₅₀	GI ₅₀	TGI	LC ₅₀	IC ₅₀
İridoidler	Katalpol (S-1)	1,55	29,30	>1000	65,45	1,36	8,57	>1000	52,09
	Ajugol (S-2)	1,66	22,05	>1000	68,55	1,63	10,84	>1000	58,61
	10-O-sinamoil-katalpol (S-5)	2,32	332,24	>1000	93,48	1,87	80,02	>1000	81,55
	6-deoksi melittozit (S-7)	1,87	348,92	>1000	80,92	1,42	21,14	>1000	61,46
	Harpagozit (S-13)	1,85	14,30	>1000	41,72	1,59	7,71	>1000	8,41
Flavonoidler	Eriodiktiyol (S-3)	2,27	88,20	>1000	80,31	1,72	21,08	>1000	64,44
	Luteolin (S-4)	1,44	23,16	>1000	64,37	1,25	8,91	>1000	54,74
	Apigenin (S-6)	1,16	4,54	>1000	38,02	1,10	2,53	>1000	19,20
Feniletanoidler	Poliumozit (S-8)	1,39	251,72	>1000	79,96	1,25	20,97	>1000	60,62
	Verbaskozit (S-9)	1,53	646,04	>1000	27,22	1,20	68,59	>1000	66,40
	İzoverbaskozit (S-10)	1,15	3,47	>1000	17,22	1,01	1,46	>1000	1,56
	Ferruginozit C (S-11)	2,11	48,74	>1000	64,43	1,86	75,03	>1000	70,36
	Ferruginozit D (S-12)*	2,01	45,22	>1000	60,37	1,86	61,30	>1000	63,03
	trans-sinamik asit (S-14)	20,74	>1000	>1000	271,18	2,49	>1000	>1000	163,82
	Ursolik asit (S-15)	1,92	33,72	>1000	54,26	1,61	14,36	>1000	16,76
	5-FU	1,22	44,28	210,07	46,94	1,18	41,73	177,61	44,61

Serviks ve over kanser hücre hatları HeLa ve A2780 üzerinde moleküllerin antiproliferatif etkisi incelendiği zaman GI₅₀ büyüme inhibisyonlarının kontrol antikanser ilaç olan 5-FU'ya yakın değer göstermişlerdir (A2780 hücrelerinde düşük GI₅₀ gösteren eriodiktiyol ve apigenin bileşikleri hariç). Moleküllerin serviks ve over kanser hücre hatları üzerinde sergiledikleri Total Büyüme İnhibisyonu (TGI) değerlendirildiği zaman ajugol (S-2), luteolin (S-4), 6-deoksi melittozit (S-7), verbaskozit (S-9), izoverbaskozit (S-10) ve ursolik asit (S-15) bileşikleri kontrol antikanser ilaç olan 5-FU'dan daha yüksek inhibisyon değerleri göstermişlerdir. Ayrıca katalpol (S-1) ve 6-deoksi melittozit (S-7) bileşikleri TGI değerleri bakımından sadece HeLa serviks hücre hattı üzerinde etki göstermişlerdir. Serviks ve over kanser hücre hatları üzerinde moleküllerin antiproliferatif etkileri IC₅₀ bakımından incelendiği zaman luteolin (S-4) ve ursolik asit (S-15) bileşikleri HeLa, ursolik asit (S-15) bileşiği sadece A2780 üzerinde daha etkili olduğu anlaşılmaktadır. Serviks ve over kanser hücre hatları üzerinde moleküllerin neden olduğu LC₅₀ değerleri (>1000) kontrol antikanser ilaç 5-FU'dan daha yüksek olduğundan, kullanım emniyet aralıkları geniştir denebilir. Bu nedenle konsantrasyon ayarlamaları çok zor olan dar bir alanda değil daha kolay olan

geniş bir alanda yapılabilir. Bununla birlikte pozitif kontrol 5-FU'ya (383,94 µg/ml) kıyasla ursolik asit (S-15) bileşiğinin sahip olduğu yüksek LC₅₀ değeri nedeniyle oldukça kısıtlı konsantrasyon aralığı vermektedir. Bu nedenle ursolik asitin (S-16) HeLa kanser tedavisinde kemoterapötik olarak kullanımı oldukça zordur (Bkz. Tablo 4.14).

Tablo 4.14. Bileşiklerin serviks ve over kanser hücre hatlarına karşı MTT testi ile belirlenen yaşam parametreleri (GI₅₀, TGI ve LC₅₀) ve IC₅₀ değerleri

	(µg/ml)	A2780				HeLa			
		GI ₅₀	TGI	LC ₅₀	IC ₅₀	GI ₅₀	TGI	LC ₅₀	IC ₅₀
İridoidler	Katalpol (S-1)	2,32	62,50	>1000	62,97	2,08	21,07	>1000	55,40
	Ajugol (S-2)	1,45	27,67	>1000	66,50	1,55	12,66	>1000	58,07
	10-O-sinnameoil-katalpol (S-5)	2,89	>1000	>1000	50,37	2,56	787,65	>1000	82,73
	6-deoksi melittozit (S-7)	2,06	45,91	>1000	75,29	1,77	10,99	>1000	55,31
	Harpagozit (S-13)	2,99	>1000	>1000	86,37	2,93	>1000	>1000	78,59
Flavonoidler	Eriodiktiyol (S-3)	28,52	>1000	>1000	153,27	9,98	>1000	>1000	127,67
	Luteolin (S-4)	1,47	13,39	>1000	44,51	1,34	7,42	>1000	32,50
	Apigenin (S-6)	12,70	>1000	>1000	114,39	7,33	>1000	>1000	107,01
Feniletanoidler	Poliumozit (S-8)	2,56	491,25	>1000	78,38	2,72	81,88	>1000	67,67
	Verbaskozit (S-9)	1,20	13,49	>1000	43,88	1,88	20,27	>1000	59,13
	İzoverbaskozit (S-10)	1,14	12,81	>1000	44,94	1,18	8,69	>1000	42,47
	Ferruginozit C (S-11)	1,34	>1000	>1000	54,23	1,74	66,39	>1000	84,17
	Ferruginozit D (S-12)*	1,12	>1000	>1000	44,68	1,36	57,13	>1000	72,43
	trans-sinnameik asit (S-14)	3,55	>1000	>1000	135,87	1,62	79,15	>1000	108,48
	Ursolik asit (S-15)	1,54	4,10	>1000	28,09	1,55	3,76	54,67	25,47
	5-FU	1,43	53,69	329,08	57,24	1,09	38,20	183,47	38,21

Kolon kanser hücre hatları HT29 ve SW620 üzerinde saf moleküllerin antiproliferatif etkisi incelendiği zaman GI₅₀ büyüme inhibisyonlarının kontrol antikanser ilaç olan 5-FU'ya yakın olduğu görülmüştür (SW620 hücrelerinde düşük GI₅₀ gösteren trans-sinnameik asit bileşiği hariç). Moleküllerin kolon kanser hücre hatları üzerinde sergiledikleri Total Büyüme İnhibisyonu (TGI) değerlendirildiği zaman eriodiktiyol (S-3), luteolin (S-4) ve ursolik asit (S-15) bileşikleri kontrol antikanser ilaç olan 5-FU'dan daha yüksek inhibisyon değerleri göstermiştir. Bulunan yüksek inhibisyon değerleri moleküllerin kanser hücrelerini kontrol ilaca göre daha etkili bir şekilde öldürdüğü anlamına gelmektedir. Kolon kanseri hücre hatları üzerinde moleküllerin antiproliferatif etkileri IC₅₀ bakımından incelendiği zaman eriodiktiyol (S-3), luteolin (S-4), apigenin (S-6) ve ursolik asit (S-16) bileşikleri HT29, eriodiktiyol (S-3) ayrıca sadece SW620 üzerinde daha etkili olduğu görülmüştür. Kolon kanseri hücre hatları üzerinde

moleküllerin neden olduğu L₅₀ değerleri (809,55 µg/ml >1000 µg/ml) kontrol antikanser ilaç 5-FU'dan daha yüksek olduğundan, kullanım emniyet aralıkları geniştir denebilir. Bu nedenle konsantrasyon ayarlamaları çok zor olan dar bir alanda değil daha kolay olan geniş bir alanda yapılabilir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.15'te verilmiştir.

Tablo 4.15. Bileşiklerin kolon kanser hücre hatlarına karşı MTT testi ile belirlenen yaşam parametreleri (GI₅₀, TGI ve LC₅₀) ve IC₅₀ değerleri

	(µg/ml)	SW620				HT29			
		GI ₅₀	TGI	LC ₅₀	IC ₅₀	GI ₅₀	TGI	LC ₅₀	IC ₅₀
<i>Iridoidler</i>	Katalpol (S-1)	4,91	>1000	>1000	119,53	2,47	>1000	>1000	99,01
	Ajugol (S-2)	2,44	>1000	>1000	221,72	2,05	>1000	>1000	160,85
	10-O-sinamoil-katalpol (S-5)	4,11	>1000	>1000	92,62	2,31	>1000	>1000	95,86
	6-deoksi melittozit (S-7)	5,45	>1000	>1000	208,84	1,83	>1000	>1000	150,90
	Harpagozit (S-13)	2,74	992,71	>1000	80,32	1,82	71,06	>1000	65,29
<i>Flavonoidler</i>	Eriodiktiyol (S-3)	1,15	5,73	>1000	37,44	1,14	2,95	>1000	14,17
	Luteolin (S-4)	1,69	8,01	>1000	43,87	1,47	5,00	809,55	33,19
	Apigenin (S-6)	1,05	43,77	>1000	65,19	1,02	3,98	>1000	27,87
<i>Feniletanoidler</i>	Poliumozit (S-8)	2,94	>1000	>1000	141,56	2,43	542,03	>1000	97,86
	Verbaskozit (S-9)	3,91	>1000	>1000	74,01	2,20	>1000	>1000	75,97
	İzoverbaskozit (S-10)	3,34	>1000	>1000	75,86	2,71	>1000	>1000	71,67
	Ferruginozit C (S-11)	5,30	>1000	>1000	85,02	2,82	>1000	>1000	92,43
	Ferruginozit D (S-12)*	6,74	>1000	>1000	84,03	2,76	>1000	>1000	85,32
	<i>trans</i> -sinnamik asit (S-14)	14,31	>1000	>1000	153,67	3,84	>1000	>1000	134,70
	Ursolik asit (S-15)	1,64	17,79	>1000	49,71	1,70	10,59	>1000	45,52
	5-FU	1,14	40,86	246,54	41,99	1,57	48,37	307,63	51,67

4.4.3.2. Bileşiklerin sitotoksik aktivitesi

Çalışma sonucunda elde edilen moleküllerin sitotoksik aktivitelerini dolaylı olarak belirlemek için hücre membranı bütünlük analizi yapılmıştır. Bu çalışmada, bileşiklerin IC₅₀ konsantrasyonları kullanılarak neden oldukları sitotoksikite ölçülmüştür. Buna göre, MTT proliferasyon testinde etkili olduğu anlaşılan bileşiklerin IC₅₀ konsantrasyonda normal hücre hatlarına (Beas2B, RPE ve HSF) karşı yaklaşık %13-16 aralığında değişen farklı sitotoksikite değerleri gösterirken daha az etkili olanlar sadece %9-12 aralığında sitotoksikite ortaya koymuştur. Test edilen izolatların kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri incelendiği zaman, MTT proliferasyon testinde etkili olduğu anlaşılan bileşiklerin IC₅₀ konsantrasyonda kanser hücre hatlarına (A172, C6,

HeLa, A2780, SW620 ve HT29) karşı yaklaşık %14-16 aralığında değişen farklı sitotoksikite değerleri gösterirken daha az etkili olanlar sadece %9-13 aralığında sitotoksikite ortaya koymuştur. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.16’da verilmiştir.

Tablo 4.16. IC₅₀ konsantrasyonlarında bileşiklerin % sitotoksik değerleri

		Normal Hücre Hatları			Kanser Hücre Hatları					
		Beas2B	RPE	HSF	A172	C6	HeLa	A2780	SW620	HT29
Iridoidler	Katalpol (S-1)	10,3	10,0	11,3	15,6	15,1	12,9	13,2	10,6	12,1
	Ajugol (S-2)	14,7	10,7	11,7	15,4	15,7	13,1	15,7	13,2	11,3
	10-O-sinnameoil-katalpol (S-5)	13,3	11,3	10,2	11,7	13,2	9,7	11,4	11,9	12,7
	6-deoksi melittozit (S-7)	10,2	11,2	10,2	10,6	16,0	14,0	11,7	10,9	12,9
	Harpagozit (S-13)	9,4	9,7	13,9	14,9	15,9	11,1	12,8	11,4	13,7
Flavonoidler	Eriodiktioyl (S-3)	11,7	10,4	11,4	11,0	10,6	10,6	9,9	15,9	15,8
	Luteolin (S-4)	12,1	11,6	11,6	16,0	16,3	15,3	16,7	16,0	14,9
	Apigenin (S-6)	10,8	11,1	9,9	14,1	15,8	10,4	11,6	16,3	15,1
Feniletanoidler	Poliumozit (S-8)	14,8	9,9	9,6	12,1	15,9	15,7	15,4	12,0	10,7
	Verbaskozit (S-9)	15,1	14,0	12,0	9,5	11,5	14,8	16,2	13,5	10,1
	İzoverbaskozit (S-10)	9,9	9,3	14,3	15,2	16,1	14,9	14,9	13,9	13,4
	Ferruginozit C (S-11)	12,4	11,2	10,2	11,7	13,4	11,8	11,4	11,7	12,3
	Ferruginozit D (S-12)*	11,3	10,4	9,7	11,5	12,8	11,7	11,2	10,8	12,1
	trans-sinnameik asit (S-14)	9,5	13,6	14,2	12,7	10,8	11,3	10,8	12,3	12,9
Ursolik asit (S-15)		11,8	14,8	15,2	14,7	15,8	14,6	14,7	15,2	14,7
5-FU		12,4	11,9	12,1	13,4	14,1	12,8	14,3	14,6	13,8

5. SONUÇLAR

Tıp ve teknolojinin gelişmediği zamanlarda yüzyıllar boyunca insanlar hastalıkları tedavi etmenin doğal yollarını aramışlardır. Günümüzde tıp ve teknolojinin gelişmesine rağmen insanlar bitkisel tedavi deneyimlerini sürdürmeye devam etmektedir. Yeryüzünde mevcut olan birçok doğal bileşiğin en temel kaynağı, besin zincirinde birincil üreticiler olarak görev yapan bitkilerdir. Bitkilerin doğal ürünlerin ilaç keşfinde ve ilaç prosesi geliştirilmesinde büyük rolleri vardır. Doğal ürünlerin doğrudan kullanılması, moleküllerin etkinliğini artıracak şekilde modifikasyonu (yarı sentetik ürünler) ve etkili doğal ürünlerin sentezi açısından bitkiler, ilaç önemli bir yere sahiptir (Newman vd., 2007).

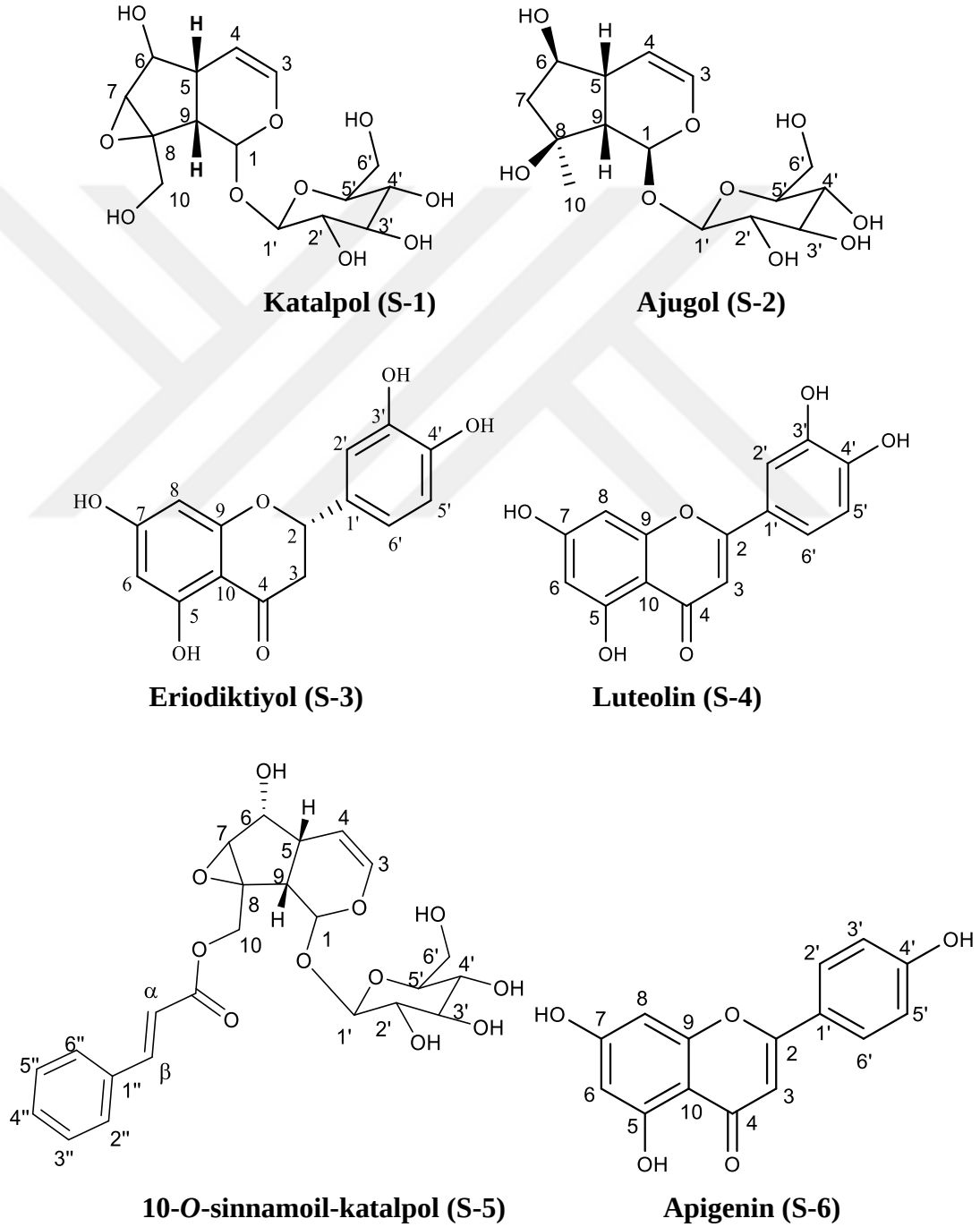
Biyoaktif moleküllerin bitkisel ilaç olarak kullanımı neredeyse insanlık tarihi ile başlamasına rağmen; modern ilaçların keşfi ve geliştirilmesi için doğal kaynaklardan izole edilmiş ve karakterizasyonu yapılmış bileşiklerin kullanımı 19. yüzyılda başlamıştır. Ayırma teknikleri geliştikçe, ayırmaya yönelik cihazların da yardımıyla doğal kaynakların ilaç hammaddelerine dönüşmesi gün geçtikçe hızlanmıştır. Sentetik ilaçların insanlar üzerindeki zararlı etkilerinin son yıllarda bilinmesi ve bazı durumlarda bu tür ilaçların ağrı ya da iltihabı tedavi etmede yetersiz kalması nedeniyle, sentetik ilaçların yerine kullanılabilecek bitkisel ilaçlar ya da bitkisel hammadde arayışları devam etmektedir. Bundan dolayı ilaç uygulama sistemleri hala doğal ve daha etkili olabilecek ilaç ve tedavi protokollerini aramaktadır. Türkiye'nin bitki hazinesinin tıbbi ve aromatik bitkiler açısından büyük çeşitliliğe sahip olması ülkemizi önemli bir konuma getirmiştir. İç Anadolu bölgesi özellikle tıbbi özelliğe sahip bitki türlerine ev sahipliği yapmaktadır. Sayısız endemik bitki türlerinin varlığı bu önemi açıkça göstermektedir. Gelecekte ülkemiz kaynaklarından elde edilen doğal bileşiklerin daha etkin ve verimli kullanımına yönelik çalışmaların yapılması, ülkemizin ekonomik ve sosyal gelişimine katkı sağlayacaktır. Bu kadar önemli bir alanda çalışmak aslında pek çok insanın ilgisini çekmiştir ve çekmektedir.

Günümüzde tıbbi bitkiler, geleneksel tedavi yöntemlerinin en aktif unsurlarıdır. Kullanılan tıbbi ve aromatik bitkilere bakıldığında içerdikleri etken maddelere göre çok fazla sayıda kullanım alanı bulunmaktadır (Ceylan, 1995). Ülkemizin önemli bitki zenginliklerinden biri olan *Verbascum* cinsi, geleneksel tıpta çeşitli hastalıkların

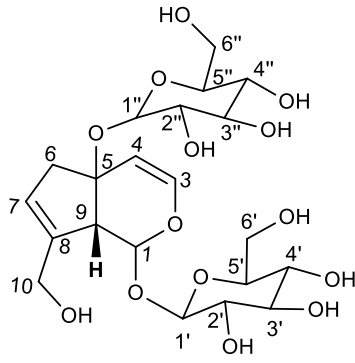
tedavisinde kullanılan bitki türlerinden biridir. Sığırkuyruğu olarak bilinen bu türün ekstre, dekoksion ve infüzyonları, hemen hemen tüm dünyada halk ilacı olarak kullanımı mevcuttur. *Verbascum* türlerinin ekspektoran, diüretik, demulsan, sedatif etkilerinin bulunduğu ve bu etkileri nedeniyle geleneksel olarak dahilen ve haricen kullanılmalarının yanı sıra antibakteriyel, antiviral, antifungal, antiülserojenik, antioksidan, sitotoksik, antitümör, antihepatoma ve immunomodülatör etkilerinin çeşitli araştırmalarla belirlenmiş olması bilimsel açıdan önemini artırmaktadır (Türker ve Camper, 2002; Abougazar vd., 2003a). Türkiye’de ve dünyanın çeşitli bölgelerinde geleneksel tıpta halk ilacı olarak kullanımları yanında, içeriği itibariyle de önemli bir bitki grubunu oluşturan *Verbascum* cinsinin büyük bir kısmı ülkemizde doğal olarak yetişmektedir. Bundan dolayı ülkemiz *Verbascum* cinsi için gen merkezi olarak kabul edilmektedir. Buna rağmen *Verbascum* türlerinin içerdiği etken madde grupları ile ilgili çalışmaların sayısı çok azdır. Çalışmaya konu olan *V. alyssifolium* (Kuduzkuyruk), *V. leiocarpum* (Gülbüz sığırkuyruğu), *V. ozturkii* (Öztürk sığırkuyruğu) ve *V. tuna-ekimii* (Ekim sığırkuyruğu) türleri Erzincan yöresine lokal endemik olup bitkilerin hem ekstre hem de kimyasal içerik bakımından literatürde herhangi bir bilgi yer almamaktadır. *V. leiocarpum*, *V. alyssifolium*, *V. ozturkii* ve *V. tuna-ekimii* türleri üzerinde yapılan bu çalışmada; izolasyon çalışmalarına rehberlik etmek üzere her bitkinin toprak üstü ve kök kısımlarının metanol-su ekstraktları elde edilerek, ekstraktların MDA-MB-453 (insan meme kanseri), HT-29 (kolorektal adenokarsinoma) ve A549 (Akciğer kanseri) hücre hatları üzerinde antiproliferatif, DPPH, FRAP, toplam fenolik miktarı ve toplam flavonoid miktarı yöntemleriyle antioksidan ve α -glukozidaz enzim inhibisyonu yöntemiyle de antidiyabetik aktiviteleri belirlendi. Bu dört bitkiden en yüksek antiproliferatif, antidiyabetik ve antioksidan aktiviteye sahip olan *Verbascum leiocarpum* türü aktiviteden sorumlu moleküllere ulaşmak amacıyla kromatografik işlemlere tabi tutuldu.

Bitkinin kimyasal içeriğinin belirlenmesi ve bileşiklerin bireysel biyolojik aktivitelerinin ortaya konulması için farklı kromatografik yöntemler kullanılarak yapılan izolasyon çalışması sonucu *V. leiocarpum* bitkisinin gövde kısmına ait ekstrelerden 5, kök kısmına ait ekstrelerden ise 10 bileşik izole edildi (Bkz. Şekil 5.1) ve ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, COSY, HETCOR ve HMBC gibi spektroskopik yöntemler kullanılarak moleküllerin yapıları belirlendi. Gövde ve kök kısmından izole edilen bileşikler sırasıyla; katalpol (S-1), ajugol (S-2), eriodiktiyol (S-3), luteolin (S-4), 10-O-sinamoil-

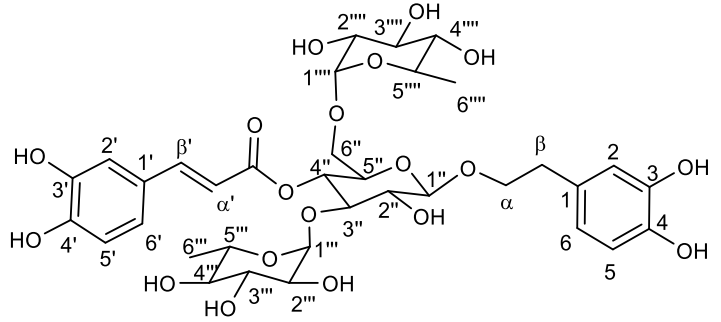
katalpol, apigenin (S-6), 6-deoksi melittozit (S-7), poliumozit (S-8), verbaskozit (S-9), izoverbaskozit (S-10), ferruginozit C (S-11), ferruginozit D (S-12), harpagozit (S-13), *trans*-sinnamik asit (S-14) ve ursolik asit (S-15) şeklindedir. Elde edilen bileşikler bu bitki türünde ilk defa rapor edildi. Kök kısmından izole edilen ferruginozit D (S-12) molekülü ise literatür için yeni bir bileşik olup bitki örneğinde doğal olarak bulunduğu ilk defa bu çalışmada rapor edildi.



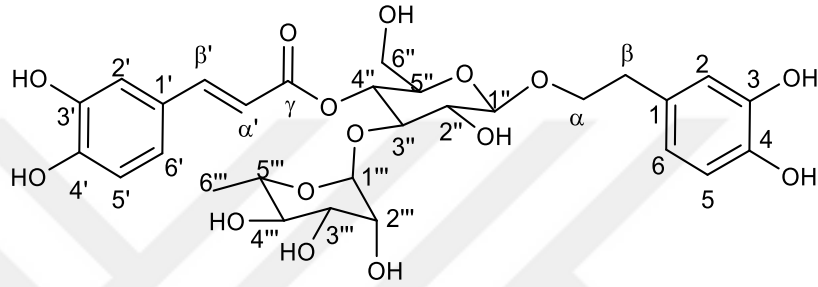
Şekil 5.1. İzole edilen bileşiklerin kimyasal yapıları



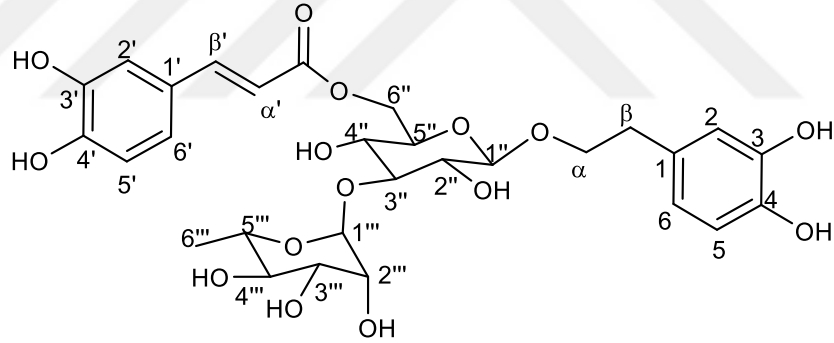
6-deoksi-melittozit (S-7)



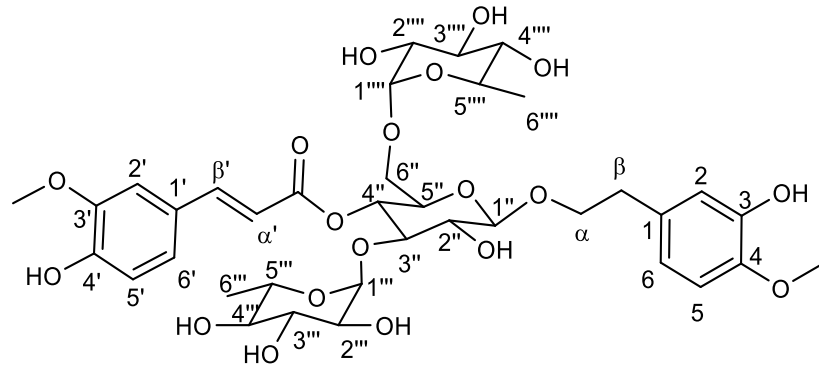
Poliumozit (S-8)



Verbaskozit (S-9)

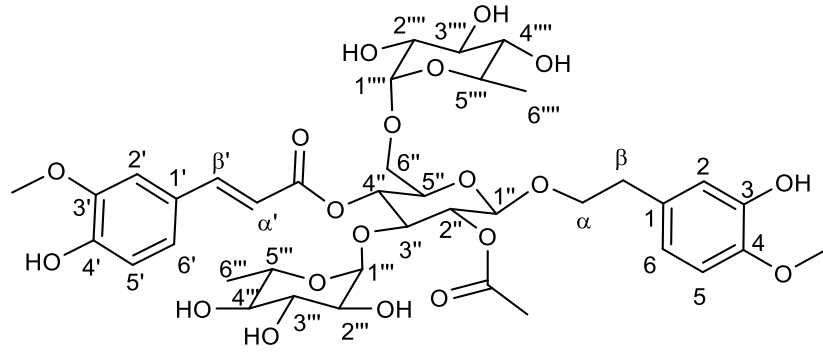


İzoverbaskozit (S-10)

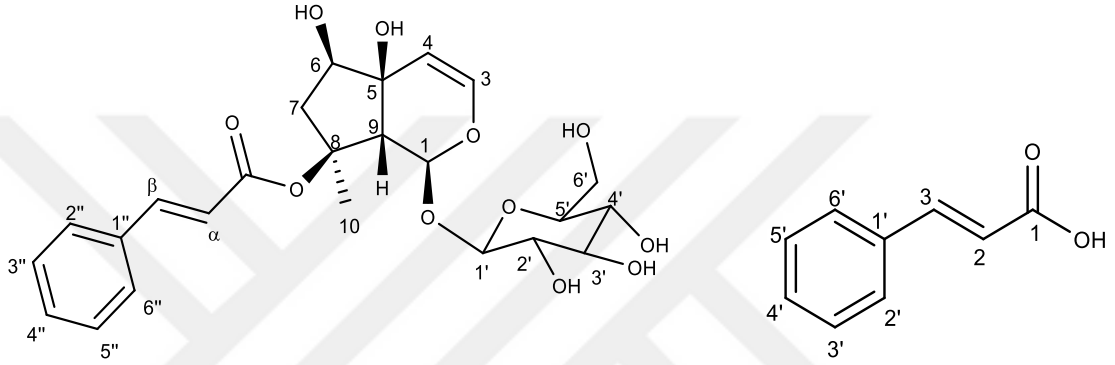


Ferruginozit C (S-11)

Şekil 5.1. İzole edilen bileşiklerin kimyasal yapıları (devam)

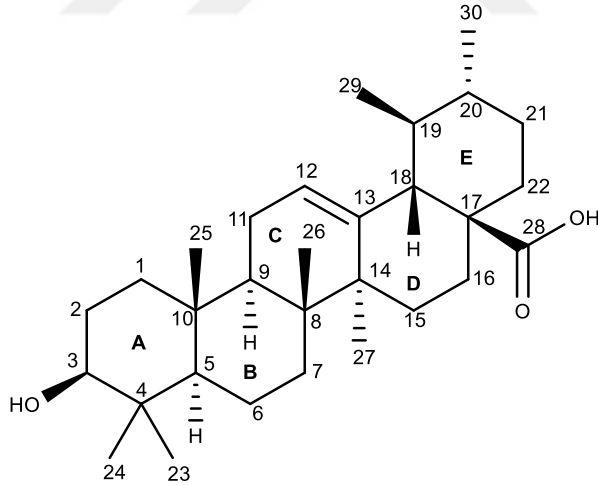


Ferruginozit D (S-12)



Harpagozit (S-13)

trans-sinamik asit (S-14)



Ursolik asit (S-15)

Şekil 5.1. İzole edilen bileşiklerin kimyasal yapıları (devam)

İzole edilen bileşiklerin DPPH, ABTS ve FRAP yöntemleriyle antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Serbest radikalleri giderme bakımından (DPPH) verbaskozit (S-9, $17,08 \pm 1,66$), izoverbaskozit (S-10, $20,83 \pm 1,67$) feniletanoid glukozitleri ve flavonoid yapısındaki luteolin (S-4, $24,03 \pm 1,72$) bileşikleri diğerlerine kıyasla daha yüksek

aktiviteye sahip olduğu görüldü. Katyonik radikalleri gidermede (ABTS) ise yine flavonoid yapısındaki luteolin (S-4, $14,53 \pm 1,60$) ve poliumozit (S-8, $20,93 \pm 1,30$), verbaskozit ($10,72 \pm 2,80$), izoverbaskozit ($12,90 \pm 2,28$) feniletanoid glukozitleri trolokstan daha iyi aktiviteye sahip oldukları belirlendi. İridoid glukozitleri, fenolik ve terpenoid bileşikleri (*trans*-sinnamik asit ve ursolik asit) ise serbest ve katyonik radikalleri gidermede aktivite göstermedi.

Farklı polariteye sahip saf bileşiklerin *in vitro* α -glukozidaz enzim inhibisyonu yöntemiyle hipoglisemik etkileri test edilmiştir ve referans bileşik olarak akarboz kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre en etkili enzim inhibisyonunu bitkinin kök kısmından izole edilen bileşikler göstermiştir. *Verbascum leiocarpum* türünden izole edilen feniletanoid glukozitleri (poliumozit, verbaskozit, izoverbaskozit, ferruginozit C ve ferruginozit D), flavonoid ve terpenoid yapısındaki bileşiklerin (luteolin ve ursolik asit) IC₅₀ değerleri bakımından akarbozdan çok daha etkili oldukları tespit edilmiştir. Bileşikler arasında en düşük aktiviteyi ise iridoidler (>250) ve organik asit olan *trans*-sinnamik asit (>250) göstermiştir.

Genel olarak NCI-60 yaşam parametreleri incelendiğinde izole edilen moleküllerin tamamının kanser hücre hattına karşı düşük GI₅₀ (1-2 $\mu\text{g/ml}$ aralığında) değerine ve yüksek LC₅₀ (>1000 $\mu\text{g/ml}$) oranına sahip olması, onların ileri farmakolojik testler için uygun bir aday olduklarını göstermektedir (Bkz. Tablo 4.12, 4.13, 4.14 ve 4.15). Bununla beraber bileşiklerin normal hücre hatları olan Beas2B, RPE ve HSF üzerindeki etkisine baktığımız zaman hem GI₅₀ (~ 2 $\mu\text{g/ml}$), TGI (>1000 $\mu\text{g/ml}$) ve LC₅₀ (>1000 $\mu\text{g/ml}$) değerlerinin hem de IC₅₀ değerlerinin (~ 100 $\mu\text{g/ml}$) istenilen ölçülerde olduğu görülmektedir (Bkz. Tablo 4.12). Öyle ki, bu değerler kontrol ilaç olan 5-FU'da çok daha iyidir. Bu durumda, izole edilen bileşiklerin kanser araştırmalarında kullanılabilecek molekülleri içerdiklerinden daha ileri çalışmalara yönlendirilmesi gerekmektedir.

Çalışmamızda elde edilen verilerin; *Verbascum* türlerinin kimyasal içerikleri, kemotaksonomileri ve biyolojik aktiviteleri bakımından yapılacak olan araştırmalara yol göstererek katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abou Gazar, H., Bedir, E., Khan, I. A. and Çalış, İ. (2003a) “Wiedemanniosides A-E: new phenylethanoid glycosides from the roots of *Verbascum wiedemannianum*”, **Planta Medica**, 69(09), 814-819.
- Abou Gazar, H., Taşdemir, D., Ireland, C. M. and Çalış, İ. (2003b) “Iridoids and triterpene saponins from *Verbascum wiedemannianum* (Scrophulariaceae)”, **Biochemical Systematics and Ecology**, 31, 433-436.
- Acar, J. (1998) “Fenolik bileşikler ve doğal renk maddeleri”, Gıda Kimyası, pp., **Hacettepe Üniversitesi yayınları**, Ankara, 435-452.
- Agababyan, É. Yu., Arutyunyan, L. S., Mnatsakanyan, V. A., Gacs-Baitz, E. and Radics, L. (1985) “Verbascoside from *Verbascum georgicum* Benth.”, **Armianskii Khimicheskii Zhurnal**, 38, 709-712.
- Agrawal, P. K. (1989) “Carbon-13 NMR of Flavonoids”, **Amsterdam**, 130-320.
- Akdemir, Z., Çalış, İ. (1991) “İridoid and phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis comasa* var. *acmodonta* Boiss.”, **Turkish Journal of Pharmacy**, 2, 63-70.
- Akdemir, Z., Tatlı, İ. İ., Bedir, E. and Khan, I. A. (2003b) “Antioxidant flavonoids from *Verbascum salviifolium* Boiss.”, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 28(2), 71-75.
- Akdemir, Z., Tatlı, İ. İ., Bedir, E. and Khan, I. A. (2004a) “Iridoid and phenylethanoid glycosides from *Verbascum lasianthum* Boiss.”, **Turkish Journal of Chemistry**, 28, 227-234.
- Akdemir, Z., Tatlı, İ. İ., Bedir, E. and Khan, I. A. (2004b) “Neolignan and phenylethanoid glycosides from *Verbascum salviifolium* Boiss.”, **Turkish Journal of Chemistry**, 28, 621-628.
- Akdemir, Z. Ş., Tatlı, İ. İ., Bedir, E. and Khan, I. A. (2004c) “Iridoid and phenylethanoid glycosides from *Verbascum lasianthum*”, **Turkish Journal of Chemistry**, 28, 227-234.
- Akdemir, Z., Tatlı, İ. İ., Bedir, E. and Khan, I. A. (2005) “Two new iridoid glucosides from *Verbascum salviifolium* Boiss.”, **Zeitschrift für Naturforschung B: Chemical Sciences**, 60(1), 113-117.
- Aliannis, N., Mitaku, S., Tsitsa-Tsardis, E., Harvala, C., Tsaknis, I., Lalas, S. (2003) “Methanolic extract of *Verbascum macrurum* as a source of natural preservatives against oxidative rancidity”, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 7308-7312.
- Ames, B. M., Shigena, M. K., Hagen, T. M. (1993) “Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of ageing”, **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, 90, 7915-7922.

- Anıl, H. (1980) "Elucidation of the structure of saponins from the leaves of *Verbascum nigrum* L.", **Doğa Seri A**, 4, 1-5.
- Anıl, S., Dosler, S., Mericli, A. H. (2016) "Chemical composition and antimicrobial activity of *Verbascum caesareum*", **Chemistry of Natural Compounds**, 52(1), 125-6.
- Archana, B., Dasgupta, N., De, B. (2005) "In vitro study of antioxidant activity of *syzygium cumini* fruit", **Food Chemistry**, 90, 727-733.
- Arrif, S., Benkhaled, M., Long, C., Lavaud, C. and David, B. (2006) "Glycosylated iridoids and a triterpene saponin from *Verbascum ballii*", **Biochemical Systematics and Ecology**, 34, 259-262.
- Arrif, S., Lavaud, C. and Benkhaled, M. (2008) "Iridoids from *Verbascum dentifolium*", **Biochemical Systematics and Ecology**, 36, 669-673.
- Aslan, R., Dündar, Y., Eryavuz, A., Bülbül, A., Küçükkurt, İ., Fidan, A. F., Akıncı, Z. (2005) "Effects of Different Dietary Levels of *Yucca shidigera* powder (deodorase) added to diets on performance, some hemotological and biochemical blood parameters and total antioxidant capacity of layinghens", **Revue de Medecine Veterinaire**, 156 (6), 350-355.
- Austin, M. B. ve Noel, J. P. (2003) "The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases", **Natural Product Reports**, 20 (1), 79-110.
- Badami, S., Gupta, M. K. and Suresh, B. (2003) "Antioxidant activity of the ethanolic extract of *Striga orobanchioides*", **Journal of Ethnopharmacology**, 85, 227-230.
- Baykal, T. (1997) "Doğal kaynaklı bileşiklerin biyolojik aktivite yönünden değerlendirilmesi ve tedavideki yeri", **Güncel Eczacılık**, 46, 21-22.
- Baysal, A., Aksoy, M., Besler, H. T., Bozkurt, N., Keçecioğlu, S., Mercanlıgil, S. M., Yıldız, E. (2013) "Diyet El Kitabı", **Hatiboğlu Yayınları**, 7. Baskı, 2013, s. 259-272, Ankara.
- Bianco, A., Caciola, P., Guiso, M., Lavarone, C. ve Trogolo, C. (1981) "Carbon-13 nuclear magnetik resonance spektroskopu of free iridoit glucosides in D₂O solution", **Gazette Chimica Italiana**, 111, 201-206.
- Blois, M. S. (1958) "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical", **Nature**, 181, 1199-1200.
- Boghratia, Z., Naseri, M., Rezaie, M., Pham, N., Quinn, R. J., Tayaranı-Najaran, Z., Iranshahı, M. (2016b) "Tyrosinase inhibitory properties of phenylpropanoid glycosides and flavonoids from *Teucrium polium* L. var. gnaphalodes", **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, 19, 804-811.
- Boğa, M., Ertaş, A., Haşimi, N., Demirci, S., Yılmaz, M. A., Temel, H. (2016) "Phenolic profile, fatty acid and essential oil composition analysis and

- antioxidant, antialzheimer and antibacterial activities of *Verbascum flavidum* extracts”, *Chiang Mai Journal of Science*, 43(5), 1090-101.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. (2001) “Production of plant secondary metabolites; a historical perspective”, *Plant Science*, 161, 839-851.
- Bruneton, J. (1999) “Pharmacognosy: Phytochemistry, Medicinal Plants”, *Lavoisier Publishing*, Paris.
- Burbulis, I. E., Iacobucci, M., Shirley, B. W. (1996) “A null mutation in the first enzyme of flavonoid biosynthesis does not affect male fertility in arabidopsis, *The Plant Cell*”, (8), 1013-1025.
- Büyükokuroğlu, M. E., Gülçin, İ., Oktay, M., Küfrevioğlu, Ö. İ., (2001) “In vitro antioxidant properties of dantrolene sodium”, *Pharmacological Research*, 44, 491–495.
- Cai, T., Verze, P., Massenio, P., Tiscione, D., Malossini, G., Cormio, L., Carrieri, G., Mirone, V. (2016) “Rhodiola rosea, folic acid, zinc and biotin (EndEP®) is able to improve ejaculatory control in patients affected by lifelong premature ejaculation: results from a phase I-II study”, *Experimental and Therapeutic Medicine*, 12(4), 2083-2087.
- Cemeli, E., Baumgartner, A., Anderson, D. (2009) “Antioxidants and the Comet assay”, *Mutation Research*, 681(1), 51-67.
- Ceylan, A. (1995) “Tıbbi Bitkiler I”, Ege Üniversitesi, *Ziraat Fakültesi Yayınları (III. Basım)*, No:312, Bornova/İzmir.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M. and Chern, J. C. (2002) “Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods”, *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 10, Iss. 3, Article 3.
- Charwood, B. V., Rhodes, M. J. C. (1990) “Secondary Products from Plant Tissue Culture”, ISBN: 0-19-857717-6, *Clarendon Press*, Oxford.
- Chen, W., Zheng, R., Zhang, S., Zeng, H., Zuo, T., Xia, C., Yang, Z. and He, J. (2017) “Cancer incidence and mortality in China in 2013: an analysis based on urbanization level”, *Chinese Journal of Cancer Research*, 29 (1), 1-10.
- Cragg, G. M., Kingston, D. G. I., Newman, D. J. (2011) “Anticancer Agents from Natural Products”, *CRC Press*, p: 1.
- Cross, C. E., Halliwell, B., Borish, E. T., Pryor, W. A., Ames, B. N., Saul, R. L., Mccord, J. M., Harman, D. (1987) “Oxygen Radicals and Human-Disease”, *Annals of Internal Medicine*, 107(4), 526-545.
- Csapi, B., Hajdú, Z., Zupkó, I., Berényi, Á., Forgo, P., Szabó, P., Hohmann, J. (2010) “Bioactivity-guided Isolation of Antiproliferative Compounds from *Centaurea arenaria*”, *Phytotherapy Research*, 24: 1664-1669.

- Çalış, İ., Akbay, P., Uz, A., Yalçın, F. N., Türkmenoğlu, F. P., Pauli, G. (1999) "Phenylethanoid and cardioactive glycosides from *Digitalis ferruginea*", *Pharmazie*, 54, 926-930.
- Dalar, A., Guo, Y., Konczak, I. (2014) "Phenolic composition and potential antiinflammatory properties of *Verbascum cheiranthifolium*", *Journal of Herbal Medicine*, 4(4), 195-200.
- Danchul, T. Y., Khanin, V. A. and Shagova, L. I. (2006). "Iridoids of some species of the genus *Verbascum* (Scrophulariaceae)", *Rastitel'nye Resursy*, 42(3), 48-59.
- Davis, P. H., Mill, R. R., Tan, K. (1988) "Flora of Turkey and The East Aegean Island", *Edinburgh University Press*, 10, 191-193, Edinburgh.
- Davis, P. H. (1978) "Scrophulariaceae, Flora of Turkey and The East Aegean Islands", *Edinburgh University Press*, Volume 6, 458-603, Edinburgh.
- De Pascual Teresa, J., Diaz, F. and Grande, M. (1980). "Components of *Verbascum thapsus* L. III. contribution to the study of saponins", *Anales de Quimica Serie C*, 76, 107-110.
- De Pascual Teresa, J., Hernandez, J. M., Diaz, F. and Grande, M. (1982). "Chemical compounds of *Verbascum lychnitis* L. Lychnitoside", *Anales de Quimica Serie C, Quimica Organica y Bioquimica*, 78, 108-111.
- Dimitrova, P., Alipieva, K., Grozdanova, T., Simova, S., Bankova, V., Georgiev, M. I., (2018), "New iridoids from *Verbascum nobile* and their effect on lectin-induced T cell activation and proliferation", *Food and Chemical Toxicology*, 111, 605-15.
- Dimitrova, P., Alipieva, K., Stojanov, K., Milanova, V., Georgiev, M. I. (2019) "Plant-derived verbascoside and isoverbascoside regulate Toll-like receptor 2 and 4-driven neutrophils priming and activation", *Phytomedicine*, 55, 105-118.
- Dülger, B., Ceylan, M., Alıtsaous, M., Ugurlu, E. (1999) "*Artemisia absinthium* l. (pelin)'un antimikrobiyal aktivitesi", *Turkish Journal of Biology*, 23(3), 377-384.
- Dülger, B., Kırmızı, S., Arslan, H. and Güteryüz, G. (2002). "Antimicrobial activity of three endemic *Verbascum* species.", *Pharmaceutical Biology*, 40(8), 587-589.
- Eldingi, M. R. and Mabry, T. J. (2000) "Phenylethanoid glycosides from *Verbascum sinaiticum*", *Asian Journal of Chemistry*, 12, 127-130.
- Eldingi, M. R., Mabry, T. J., Melek, F. R. and Miyase, T. (1999) "Isoflavones and phenylethanoid from *Verbascum sinaiticum*", *Asian Journal of Chemistry*, 11, 1534-1536.
- Elliot, J. G. (1999) "Application of antioxidant vitamins in foods and beverages", *Food Technology*, 53(2), 46-48.

- Emam, S. (2010) “Glycosides of *Verbascum letourneuxii* and its antioxidant activity”, ***Australian Journal of Basic and Applied Sciences***, 4, 5038-5050.
- Encarnacion, D. R., Nogueiras, C. L., Salinas, V. H. A., Anthoni, U., Nielsen, P. H., Christophersen, C. (1999) “Isolation of eriodictyol identical with huazhongilexone from *Solanum hindsianum*”, ***Acta Chemica Scandinavica***, 53(5), 375–377.
- Eribekyan, M. I., Arutyunyan, L. S. and Mnatsakanyan, V. A. (1989) “Iridoid glycosides of *Verbascum cheiranthifolium*”, ***Khimiya Prirodnykh Soedinenii***, 5, 727-728.
- Ertürk, Ö., Demirbağ, Z. (2003) “*Scorzonare mollis* Bieb (Compositae) Bitkisinin Antimikrobiyal Aktivitesi”, ***Ekoloji Çevre Dergisi***, 12, 27-31.
- Faydaoğlu, E. and Sürücüoğlu, M. S. (2011) “Geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi”, Kastamonu Üniversitesi, ***Orman Fakültesi Dergisi***, 11(1), 52-67.
- Fidan A. F., DüNDAR, Y. (2007) “*Yucca schidigera* ve İçerdiği Saponinler ile Fenolik Bileşiklerinin, Hipokolesterolemik ve Antioksidan Etkileri”, ***Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi***, 47 (2), 31-39.
- Gao, L., Xu, X., Nan, H., Yang, J., Sun, G., Wu, H., Zhong, M. (2012) “Isolation of cinnamic acid derivatives from the root of *Rheum tanguticum* Maxim.ex Balf. and its significance”, ***Journal of Medicinal Plants Research***, 6, 929-931.
- Geissman, T, A. (1940) “The isolation of eriodictyol and homoeriodictyol”, An improved procedure, ***Journal of the American Chemical Society***, 62(11), 3258-3259.
- Georgiev, M., Alipieva, K., Orhan, İ., Abrashev, R., Denev, P. and Angelova, M. (2011) “Antioxidant and cholinesterases inhibitory activities of *Verbascum xanthophoeniceum* Griseb. and its phenylethanoid glycosides”, ***Food Chemistry***, 128, 100-105.
- Georgiev, M., Pastore, S., Lulli, D. (2012) “*Verbascum xanthophoeniceum*-derived phenylethanoid glycosides are potent inhibitors of inflammatory chemokines in dormant and interferon-gamma-stimulated human keratinocytes”, ***Journal of Ethnopharmacology***, 144(3), 754-760.
- Ghasemi, F., Rezaei, F., Araghi, A., Tabari, M. A. (2015) “Antimicrobial activity of aqueousalcoholic extracts and the essential oil of *Verbascum thapsus* L.”, ***Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products***, 10(3), 1-5.
- Ghisalberti, E. L. (1998) “Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids”, ***Phytomedicine***, 5, 147-163.
- Grigore, A., Colceru Mihul, S., Litescu, S., Panteli, M., Rasit, I. (2013) “Correlation between polyphenol content and anti-inflammatory activity of *Verbascum phlomoides* (mullein)”, ***Pharmaceutical Biology***, 51(7), 925-9.

- Guliyev, V. B., Harmandar, M. (1999) "Flavonoidler", **Bakanlar Matbaacılık**, İstanbul.
- Gülçin, İ. (2002) "Isırgan otunun (*Urtica dioica*) antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, oksidatif enzimlerinin karakterizasyonu ve bazı in vivo etkilerinin incelenmesi", **Fen Bilimleri Enstitüsü**, Atatürk Üniversitesi, s114.
- Gülçin, İ., Şat, İ. G., Beydemir, Ş., Elmastaş, M., Küfrevioğlu, Ö. İ., (2004) "Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.)", **Food Chemistry**, 87, 393–400.
- Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., Boyer, L. (2006) "Antioxidant activity of lignans from fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.)", **European Food Research and Technology**, 223, 759–767.
- Güner, A., Ekim, T., Özhatay, N. ve Başer, K. H. C. (2000) "Flora of Turkey and the East Aegean Islands 11", Suppl. II . **Edinburgh University Press**, 44-43
- Gürbüz, İ., Özkan, A. M., Yeşilada, E. and Kutsal, O. (2005) "Anti-ulcerogenic, activity of some plants used in folk medicine of Pinarbaşı (Kayseri, Turkey)", **Journal of Ethnopharmacology**, 101, 313-318.
- Güvenalp, Z., Kilic, N., Kazaz, C., Kaya, Y., Demirezer, L.O. (2006) "Chemical Constituents of *Galium tortumense*", **Turkish Journal of Chemistry**, 30, 515-523.
- Gvazava, L. N., Kikoladze, V. S. (2012) "Orobanchoside and flavonoids from *Verbascum phlomoides* and *V. densiflorum*", **Chemistry of Natural Compounds**, 47(6), 991-992.
- Harborne, J. B., Marby, T. J., Marby, H. (1975). "The Flavonoids", **Chapman and Hall**, London.
- Harborne, J. B. and Marby, T. J. (1982) "The Flavonoids: Advances in Research", **Chapman and Hall**, London.
- Harmandar, M., Bilaloğlu, G. V. (1999) "Flavonoidler", **Aktif Yayınevi**, Ankara, 190.
- Hartleb, I. and Seifert, K. (1994) "Songarosaponin d-a, triterpenoid saponin from *Verbascum songaricum*", **Phytochemistry**, 35, 1009-1011.
- Hartleb, I. and Seifert, K. (1995) "Triterpenoid saponins from *Verbascum songaricum*", **Phytochemistry**, 38, 221-224.
- HSGM, (2013) "Türkiye Kanseri İstatistikleri", <http://www.kanser.gov.tr/kanser-istatistikleri>, Erişim Tarihi: 01.03.2022.
- Hussain, H., Aziz, S., Miana, G. A., Ahmad, V. U., Anwar, S. and Ahmed, I. (2009) "Minor chemical constituents of *Verbascum thapsus*", **Biochemical Systematics and Ecology**, 37, 124-126.

- Huvaere, K. and Skibsted, L. H. (2015) "Flavonoids protecting food and beverages against light", *Journal of the Science of Food Agriculture*, Ecosystems and Environment, 95 (1), 20-35.
- IDF, (2014) "Online version of IDF Diabetes Atlas", www.idf.org/diabetesatlas, Erişim Tarihi: 03.03.2022.
- IDF, (2015) "Online version of IDF Diabetes Atlas", www.idf.org/diabetesatlas, Erişim Tarihi: 10.03.2022.
- Ito, K., Bernstein, H. J. (1956) "The Vibrational Spectra of the Formate, Acetate, And Oxalate Ions", *Canadian Journal of Chemistry*, 34(2), 170–178.
- Jeney, E., Uri, J. (1954) "The Flavonoids", *Die Pharmazie*, 9, 553-546.
- Jensen, S. R., Olsen, C. E., Rahn, K., Rasmussen, J. H. (1996) "Iridoid glucosides in *Plantago alpina* and *P. altissima*", *Phytochemistry*, 42(6), 1633-6.
- Jing, J., Chan, C., Xu, L., Jin, D., Cao, X., Mok, D. K. W., Parekh, H. S., Chen, S. (2011) "Development of an in-line HPLC fingerprint ion-trap mass spectrometric method for identification and quality control of *Radix scrophulariae*", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56, 830- 835.
- Kahraman, A., Serteser, M. and Koken, T. (2002) "Flavonoidler", *Kocatepe Tip Dergisi*, 3 (1), 1-8.
- Kahraman, Ç., Tatlı, İ. İ., Erdoğan Orhan, İ. and Akdemir, Z. Ş. (2010) "Cholinesterase inhibitory and antioxidant properties of *Verbascum mucronatum* Lam. and its secondary metabolites", *Zeitschrift für Naturforschung C*, 65, 667-674.
- Kahraman, C., Ekizoglu, M., Kart, D., Akdemir, Z. Ş., Tatlı İ. İ. (2011) "Antimicrobial activity of some *Verbascum* species growing in Turkey", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 36, 11-5.
- Kahraman, Ç., Akdemir, Z. Ş., Tatlı, İ. İ. (2012) "Promising Cytotoxic Activity Profile, Biological Activities and Phytochemical Screening of *Verbascum* L. Species", *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 6(2), 63-75.
- Kalpoutzakis, E., Aligiannis, N., Mitakou, S. and Skaltsounis, A. L. (1999) "Verbaspinoside, a new iridoid glycoside from *Verbascum spinosum*", *Journal of Natural Products*, 62, 342-344.
- Kalinowska, M., Świsłocka, R., Lewandowski, W. (2007) "The spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, and ¹H-, ¹³C-NMR) and theoretical studies of cinnamic acid and alkali metal cinnamates", *Journal of Molecular Structure*, 834–836, 572–80.
- Karavelioğulları, F. A., Uzunhisarcıklı, M. E., Çelik, S. (2008) "*Verbascum ozturkii* (Scrophulariaceae), a New Species From East Anatolia, Turkey", *Pakistan Journal of Botany*, 40(4), 1595-1599.

- Kawashty, S. A. (1997) "Flavonoids of *Verbascum* species in Egypt", **Bulletin of the National Research Centre (Egypt)**, 22, 11-17.
- Kendir, G. ve Güvenç, A. (2010) "Etnobotanik ve Türkiye’de yapılmış etnobotanik çalışmalara genel bir bakış", Hacettepe Üniversitesi, **Eczacılık Fakültesi Dergisi**, 30(1), 49-80.
- Khuroo, M. A., Qureshi, M. A., Razdak, T. K., Nichols, P. (1988) "Sterones, iridoids and a sesquiterpene from *Verbascum thapsus*", **Phytochemistry**, 27(11), 3541-3544.
- Kil, H. Y., Seong, E. S., Ghimire, B. K., Chung, M., Kwon, S., Goh, E. J., Heo, K., Kim, M. J., Lim, J. D., Lee, D., Yu, C. Y. (2009) "Antioxidant and antimicrobial activities of crude *sorghum* extract", **Food Chemistry**, 115 1234-1239.
- Klimek, B. (1991a) "6-O-p-Coumaroylcatalpol from *Verbascum lychnitis*", **Planta Medica**, 57, 298.
- Klimek, B. (1991b) "Verbascoside in the flower of some *Verbascum* species", **Acta Poloniae Pharmaceutica**, 48, 51-54.
- Klimek, B., Lavaud, C. and Massiot, G. (1992) "Saponins from *Verbascum nigrum*", **Phytochemistry**, 31, 4368-4370.
- Klimek, B. (1996) "Hidroxicinnamoyl ester glycosides and phenyl ethanoid from flowers of *Verbascum phlomoides*", **Phytochemistry**, 43(1), 1281-1284.
- Klimek, B. (1996a) "6'-O-Apiosyl-verbascoside in the flowers of mullein (*Verbascum* species)", **Acta Poloniae Pharmaceutica**, 53, 137-140.
- Klimek, B. (1996b) "Hydroxicinnamoyl ester glycosides and saponins from flowers of *Verbascum phlomoides*", **Phytochemistry**, 43, 1281-1284.
- Klug, W. S., Cummings, M. R. (2002) "Genetik", 6. Baskı, **Palme Yayıncılık**, 24, 28, 635-651, Ankara.
- Kobaisy, M., Tellez, M. R., Schrader, K. K., Wedge, D. E., Sitpaeva, G. T., Gemejeva, N. G., *et al.* (2006) "Phytotoxic, antialgal, and antifungal activity of constituents from selected plants of Kazakhstan", ACS Symposium Series, 927, 142-151.
- Kocabaş, N., (2008) "Homosisteinin indüklediği oksidatif stres üzerinde quercetinin koruyucu etkisi", Yüksek Lisans Tezi, Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi, **Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Biyokimya A.B.D., Afyonkarahisar.
- Koçyiğit, M. (2005) "Yalova İli’nde Etnobotanik Bir Araştırma", İstanbul Üniversitesi, **Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- Korkmaz, M. ve Karakurt, E. (2015) "An ethnobotanical investigation to determine plants used as folk medicine in Kelkit Gümüşhane/Turkey district", **Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma**, 8 (3) , 290-303.

- Kuk, J. H., Ma, S. J., Park, K. H. (1997) "Isolation and characterization of cinnamic acid with antimicrobial activity from needle of *Pinus densiflora*", **Korean Journal of Food Science and Technology**, 29, 823-826.
- Kuroda, M., Iwabuchi, K., Usui, S., Akiyama, N., & Mimaki, Y. (2017) "Chemical Compounds from the Leaves of *Verbascum thapsus* and Their Xanthine Oxidase Inhibitory Activity", **Shoyakugaku Zasshi**, 71(1), 49-50.
- Küpelı, E., Tatlı, İ. İ., Akdemir, Z. Ş. and Yeşilada, E. (2007) "Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory and antinociceptive glycoterpenoids from the flowers of *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benthām", **Journal of Ethnopharmacology**, 110, 444–450.
- Larson, R. A. (1988) "The antioxidants of higher plants", **Phytochemistry**, 27, 969–978.
- Li, L., Liu, C., Liu, Z., Rong, T., Liu, S. (2009) "Identification of phenylethanoid glycosides in plant extract of *Plantago asiatica* L. by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry", **Chinese Journal of Chemistry**, 27(3), 541-5.
- Luhata, L. P. and Luhata, W. G. (2017) "Tiliroside: biosynthesis, bioactivity and structure activity relationship (SAR)-A review", **Phytophatmacol**, 6 (6), 343-348.
- Mabry, T. J. (1970) "The Systematic Identification of Flavonoids", **Springer Verlag**, Berlin.
- Madhavi, D. L., Deshpande, S. S. and Salunkhe, D. K. (1996) "Food antioxidants: technological, toxicological and health perspectives", **Markel Dekker**, 41-50, Newyork.
- Magiatis, P., Mitaku, S., Tsitsa, E., Skaltsounis, A. L. and Harvala, C. (1998) "Verbascoside derivatives and iridoid glycosides from *Verbascum undulatum*", **Natural Product Letters**, 12, 111-115.
- Mahmoud, S. M., Abdel-Azim, N. S., Shahat, A. A., Ismail, S. I. and Hammouda, F. M. (2007) "Phytochemical and biological studies on *Verbascum sinaiticum* growing in Egypt", **Natural Product Sciences**, 13(3), 186-189.
- Malikov, V. M., Yuldashev, M. P. (2002) "Phenolic compounds of plants of the *Scutellaria* L. Genus. Distrubition, structure and properties", **Chemistry of Natural Products**, 38, 358-402.
- Manav Yalçın, S. (1989) "Flavonoids from *Verbascum cheiranthifolium* Boiss", Marmara Üniversitesi, **Eczacılık Dergisi**, 5, 93-97.
- Markham, K. R., Ternai, B., Stanley, R., Geiger, H., Mabry, T. J. (1978) "Carbon-13 NMR Studies of Flavonoids III. Naturallyoccurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives" **Tetrahedron**, 34, 1389-1397.

- Mathew, S., Abraham, T. E. (2006) "Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various in vitro models", **Food Chemistry**, 94, 520-528.
- McCord, J. M. (1993) "Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance", **Clinical Biochemistry**, 26(5), 351-357.
- McCutcheon, A. R., Roberts, T. E., Gibbons, E., Ellis, M. S., Babiuk, A. L., Hancock, W. E. R., Towers, N. H. G. (1995) "Antiviral screening of British Columbian medicinal plants", **Journal of Ethnopharmacology**, 49, 101-110.
- Melikoğlu, G., Kurtoğlu, S., Kültür, Ş. (2015) "Türkiye’de Astım Tedavisinde Geleneksel Olarak Kullanılan Bitkiler", **Marmara Pharmaceutical Journal**, 19, 1-11.
- Mihailović, V., Kreft, S., Benković, E. T., Ivanović, N., Stanković, M. S. (2016) "Chemical profile, antioxidant activity and stability in stimulated gastrointestinal tract model system of three *Verbascum* species", **Industrial Crops and Products**, 89, 141-51.
- Miyase, T., Horikoshi, C., Yabe, S., Miyasaka, S., Melek, F. R., Kusano, G. (1997) "Saikosaponin homologs from *Verbascum* spp. the structures of mulleinsaponins I-VII", **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, 45, 2029-2033.
- Mohamed, I. I., Tolba, I. M., Youssef, A. K., Imam, S. S. (1996) "Phytochemical studies on *Verbascum fruticosum* Post.", **Bulletin of Faculty of Agriculture**, University of Cairo, 47(3), 435-447.
- Mothana, R. A. A., Abdo, S. A. A., Hasson, S., Althawab, F. M. N., Alaghbari, S. A. Z., Lindequist, U., (2010) "Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical screening of some yemeni medicinal plants", **eCAM**, 7(3), 323-330.
- Nagatoshi, M., Terasaka, K., Nagatsu, A. (2011) "Iridoid-specific glucosyltransferase from *Gardenia jasminoides*", **Journal of Biological Chemistry**, 286, 32866-32874.
- Nawal, H. M. and Abeer, M. E. (2010) "Studies of biologically active constituents of *Verbascum eremobium* Murb. and its induction resistance against some diseases of cucumber", **Recent Progress in Medicinal Plants**, 27, 141-159.
- Newman, D. J., Cragg, G. M. (2007) "Natural products as sources of new drugs over the last 25 years", **Journal of Natural Products**, 70, 461-77.
- Nissler, L., Gebhardt, R., Berger, S. (2004) "Flavonoid binding to a multi-drug-resistance transporter protein : A STD-NMR study", **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 379, 1045-1049.
- Olennikov, D. N., Tankhaeva, L. M., Stolbikova, A. V., Petrov, E. V. (2011) "Phenylpropanoids and polysaccharides from *Plantago depressa* and *P. media* growing in Buryatia", **Chemistry of Natural Compounds**, 47(2), 165-9.

- Oleszek, W. (2002) "Chromatographic determination of plant saponins", *Journal of Chromatography A*, 967, 147-162.
- Oleszek, W., Bialy, Z. J. (2006) "Chromatographic determination of plant saponins - an update (2002-2005)", *Journal of Chromatography A*, 1112, 78-91.
- Oszmiański, J. and Kucharska, A. Z. (2018) "Effect of pre-treatment of blue honeysuckle berries on bioactive iridoid content", *Food Chemistry*, 240, 1087-1091.
- Owen, R. W., Haubner, R., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W. E., Spiegelhalder, B., (2003) "Isolation, structure and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes", *Food and Chemical Toxicology*, 41, 703-717.
- Oyaizu, M. (1986) "Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine", *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.
- Özhatay, N., Kültür, Ş. (2006) "Checklist of additional taxa to the Supplement Flora of Turkey III", *Turkish Journal of Botany*, 30, 281-316.
- Özhatay, N., Kültür, Ş., Aslan, S. (2009) "Checklist of additional taxa to the Supplement Flora of Turkey IV", *Turkish Journal of Botany*, 33, 191-226.
- Özhatay, N., Kültür, Ş., Gürdal, M. B. (2011) "Checklist of additional taxa to the Supplement Flora of Turkey V" *Turkish Journal of Botany*, 35: 589-624.
- Pardo, F., Perich, F., Torres, R., Monache, F. D. (1998) "Phytotoxic iridoid glucosides from the roots of *Verbascum thapsus*", *Journal of Chemical Ecology*, 24 (4), 645-653.
- Papay, V., Toth, L., Osvath, K. and Bujtas, G. (1980) "Flavonoids from *Verbascum phlomoides* L.", *Pharmazie*, 35, 334-335.
- Paszkiewicz-Gadek, A., Grochowska, K., & Gałasiński, W. (1990) "Effect of the aqueous extract and saponin fraction from the flowers of *Verbascum thapsiforme* on protein biosynthesis in a rat liver ribosomal system", *Phytotherapy Research*, 4(5), 177-181.
- Paun, G., Neagu, E., Albu, C., Radu, G. L. (2016) "*Verbascum phlomoides* and *Solidago virgaureae* herbs as natural source for preventing neurodegenerative diseases", *Journal of Herbal Medicine*, 6, 180-6.
- Pedersen, M., Andersen, Z. J., Stafoggia, M., Weinmayr, G., Galassi, C., Sørensen, M., Eriksen, K. T., Tjønneland, A., Loft, S. and Jaensch, A. (2017) "Ambient air pollution and primary liver cancer incidence in four European cohorts within the ESCAPE project", *Environmental Research*, 154, 226-233.
- Pellegrini, N., Miglio, C., Del Rio, D., Salvatore, S., Serafini, M., Brighenti, F. (2009) "Effect of domestic cooking methods on the total antioxidant capacity of

vegetables”, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60, Suppl 2, 12-22.

- Pieroni, A., Quave, C. L. (2005) “Tradional pharmacopoeias and medicines among Albanians and Italians in southern Italy:A comparison”, *Journal of Ethnopharmacology*, 101, 258-270.
- Pratt, D. E., Hudson, B. J. F. (1990) “Natural antioxidants not exploited commercially in food antioxidants”, Hudson B. J. F., Ed., *Elsevier*, pp 17-192, Amsterdam.
- Ramunno, A., Serrilli, A. M., Piccioni, F., Serafini, M. and Ballero, M. (2006) “Taxonomical markers in two endemic plants of Sardinia: *Verbascum conocarpum* and *Scrophularia trifoliata*”, *Natural Product Research*, 20(5), 511-516.
- Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K., Kumar, M. N. (2006) “Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective”, *Journal of Controlled Release*, 113(3), 189-207.
- Re, R., N. Pellegrini, A., Proteggente, A., Pannala, M., Yang and Rice-Evans, C. (1999) “Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay”, *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- Robbers, J. E., Speedie, M. K., Tyler, V. E. (1996) “Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology”, Williams & Wilkins, Baltimore, 1-144.
- Robbers, J. E., Tyler, V. E. (1999) “Tyler’s Herbs of Choice (The therapeutic Use of Phytomedicinals)”, *The Harworth Herbal Press*, 119, New York.
- Ronsted, N., Franzyk, H., Molgaard, P., Jaroszewski, J. W., Jensen, S. R. (2003) “Chemotaxonomy and evolution of *Plantago* L.”, *Plant Systematics and Evolution*, 242(1-4), 63-82.
- Roussel, J. L. (1983) “Thèse Doct. Ès Sci. Pharm.”, *Montpellier*, France.
- Ronsted, N., Gobel, E., Franzyk, H., Jensen, S. R., Olsen, C. E. (2000) “Chemotaxonomy of *Plantago*. Iridoid glucosides and caffeoyl phenylethanoid glycosides”, *Phytochemistry*, 55(4), 337-348.
- Ruacan, S., (2003) “Klinik Onkolojinin Biyolojik Temelleri”, *XV. Ulusal Kanser Kongresi*, Nisan, 23, 5–11, Antalya.
- Saraçoğlu, I. and Harput, U. S. (2012) “In vitro cytotoxic activity and structure activity relationships of iridoid glucosides derived from *Veronica* species”, *Phytotherapy Research*, 26, 148-152.
- Sarg, T., Salama, O., El-Domiaty, M., Bishr, M., Mansour, E. S. S., Weight, E. (1991) “Iridoid glucosides from *Gentiana kurroo* Royle”, *Alexandria Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5, 82-86.

- Satman, I., Omer, B., Tutuncu, Y. *et al.* (2013) "Twelve-year trends in the prevalence and risk factors of diabetes and prediabetes in Turkish adults", *European Journal of Epidemiology*, 28, 169-180.
- Scarpati, M., Monache, F. D. (1963) "Isolation, from *Verbascum sinuatum* of two new glucosides: Verbascoside and isoverbascoside", *Annales de Chimie*, 53(4), 356-367.
- Schlauer, J., Budzianowski, J., Kukulczanka, K., Ratajczak, L. (2004) "Acteoside and related phenylethanoid glycosides in *Byblis liniflora* Salisb. plants propagated in vitro and its systematic significance", *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 73(1), 9-15.
- Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Kenneth, D. P., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D., Boyd, M. R. (1988) "Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines", *Cancer Research*, 48, 4827-4833.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L., Leblebici, E. (1998) "Tohumlu Bitkiler Sistematiği", 5. Baskı, *Ege Üniversitesi Basımevi*, 283-284, İzmir.
- Seebacher, W., Simic, N., Weis, R., Saf, R. and Kunert, O. (2003) "Complete assignment of ^1H and ^{13}C -NMR resonance of oleanolic acid, 18α -oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxoderivatives", *Magnetic Resonance in Chemistry*, 41, 636-638.
- Seifert, K., Preiss, A., Johne, S., Schmidt, J., Lien, N. T., Lavaud, C., & Massiot, G. (1991) "Triterpene saponins from *Verbascum songaricum*", *Phytochemistry*, 30, 3395-3400.
- Sen, B., Dosler, S., Mericli, A. H. (2015) "Chemical constituents and antimicrobial activity of *Verbascum lagurus*", *Chemistry of Natural Compounds*, 51(1), 139-40.
- Senatore, F., Rigano, D., Formisano, C., Grassia, A., Basile, A. and Sorbo, S. (2007) "Phytogrowth-inhibitory and antibacterial activity of *Verbascum sinuatum*", *Fitoterapia*, 78, 244-247.
- Serdyuk, L. I., Dzhumyrko, S .F. and Kompantsev, V. A. (1976) "Iridoids and flavonoids of *Verbascum lychnitis*", *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 4, 545-546.
- Serkedjieva, J. (2000) "Combined antiinfluenza virus activity of Flos verbasci infusion and amantadine derivatives", *Phytotherapy Research*, 14, 571-574.
- Shah, U., Shah, R., Acharya, S., and Acharya, N. (2013) "Novel anticancer agents from plant sources", *Chinese Journal of Natural Medicines*, 11(1), 16-23.
- Shakeri, A. R., Farokh, A. (2015) "Phytochemical evaluation and antioxidant activity of *Verbascum sublobatum* Murb. leaves", *Research Journal of Pharmacognosy*, 2(3), 43-7.

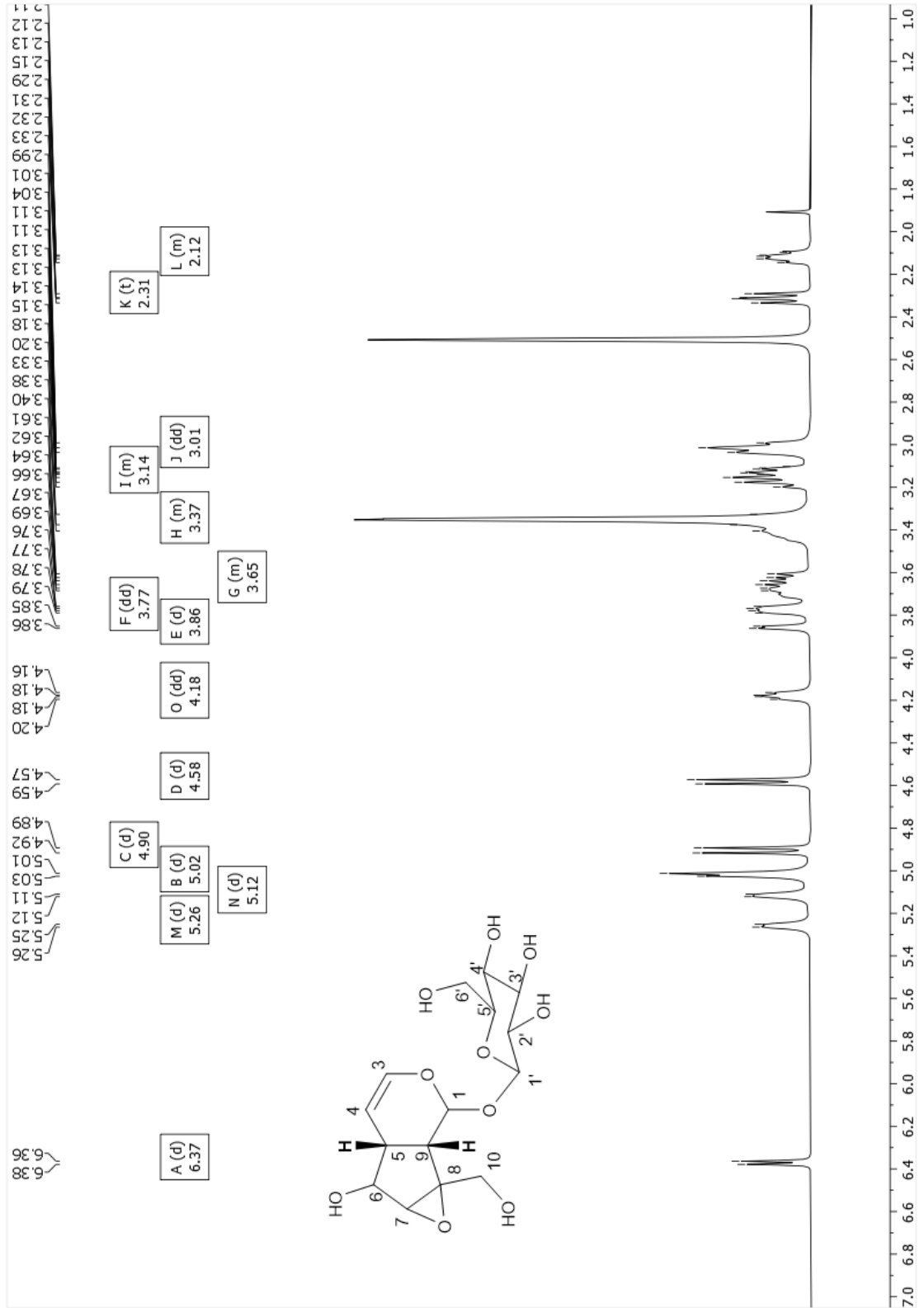
- Skaltsounis, A. L., Tsitsa-Tzardis, E., Demetzos, C. and Harvala, C. (1996) "Unduloside, a new iridoid glycoside from *Verbascum undulatum*", **Journal of Natural Products**, 59, 673-675.
- Slinkard, K., Singleton, V. L. (1977) "Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods", **American Journal of Enology and Viticulture**, 28(1), 49-55.
- Cody, V., Middleton, E., & Harborne, J. B. (1986) "Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological, and structure-activity relationships: proceedings of a symposium held in Buffalo", **New York**, July 22-26, 1985. Liss.
- Sparg, S. G., Light, M. E., Van Staden, J. (2004) "Biological activities and distribution of plant saponins", **Journal of Ethnopharmacology**, 94, 219-243.
- Swiatek, L. (1973) "Iridoid glycosides in the Scrophulariaceae family", **Acta Poloniae Pharmaceutica**, 30, 203-212.
- Swiatek, L., Luczak, S. and Grabias, B. (1984) "Occurrence of iridoids in various organs of *Verbascum phlomoides* L. and *Verbascum thapsiforme* Schrad.", **Farmacja Polska**, 40, 415-418.
- Şenkul, Ç. ve Kaya, S. (2017) "Türkiye’de Endemik Bitkilerin Coğrafî Dağılışı", **Türkiye Coğrafya Dergisi**, 69, 109-120.
- Tadeg, H., Mohammed, E., Asres, K. and Gebre-Mariam, T. (2005) "Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders", **Journal of Ethnopharmacology**, 100, 168-175.
- Tanker, M. and Tanker, N. (1985) "Farmakognozi", Ankara Üniversitesi, **Eczacılık Fakültesi Yayınları**, No: 58.
- Tatlı, İ. İ., Akdemir, Z., Bedir, E. and Khan, I. A. (2003a) "6-O- α -L-Rhamnopyranosylcatalpol derivative iridoids from *Verbascum cilicicum*", **Turkish Journal of Chemistry**, 27(6), 765-772.
- Tatlı, İ. İ. ve Akdemir, Z. Ş. (2004) "Chemical constituents of *Verbascum* species", **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 29, 93107.
- Tatlı, İ. İ., Akdemir, Z., Bedir, E. and Khan, I. A. (2004) "Saponin, iridoid, phenylethanoid and monoterpene glycosides from *Verbascum pterocalycinum* var. *mutense*.", **Turkish Journal of Chemistry**, 28, 111-122.
- Tatlı, İ. İ., Akdemir, Z. Ş., (2006) "Traditional Uses and Biological Activities of *Verbascum* Species", **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 31, 85-96.
- Tatlı, İ. İ., Khan, I. A. and Akdemir, Z. (2006) "Acylated iridoid glycosides from the flowers of *Verbascum lasianthum* Boiss. Ex Benth.", **Zeitschrift für Naturforschung B: Chemical Sciences**, 61(9), 1183-1187.

- Tatlı, İ. İ., Schuhly, W. and Akdemir, Z. (2007) “Secondary metabolites from bioactive methanolic extract of *Verbascum pycnostachyum* Boiss. & Helder flowers”, Hacettepe Üniversitesi, **Eczacılık Fakültesi Dergisi**, 27(1), 23-32.
- Tatlı, İ. İ., Schuhly, W., Kunert, O., Bedir, E. and Akdemir, Z. (2008) “Secondary metabolites from the aerial parts of *Verbascum dudleyanum* and their biological activities”, **Chemistry of Natural Compounds**, 44(3), 292-295.
- Tin, N. N. T., Truc, N. D. T., Hang, H. T. T., Trinh, P. T. N., Lam, T. D., Dung, L. T. (2019) “2nd International Conference on Mechanical Engineering and Applied Composite Materials”, **Lop Publishing**, Bristol.
- Tiwari, S. (2008) “Plants: A rich source of herbal medicine”, **Journal of Natural Products**, 1, 27 35.
- Tozoğlu, F. (2011) “Erzincan kirazı (*Cerasus erzincanica*; Ş. Yıldırım) sap ve tohum kısımlarının antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, **Fen Bilimleri Enstitüsü**, Erzincan Üniversitesi, s7.
- Tschesche, R., Delhvi, S. and Sepulveda, S. (1979) “Tamarixetin glycosides from the flowers of *Verbascum phlomoides*”, **Phytochemistry**, 18, 1248-1249.
- Tschesche, R., Sepulveda, S. and Braun, T. M. (1980) “Triterpenes XXXIII. Saponin of *Verbascum phlomoides* blossoms”, **Chemische Berichte**, 113, 1754-1760.
- Tulukcu, E. ve Sağdıç, O. (2011) “Konya’da Aktarlarda satılan tıbbi bitkiler ve kullanılan kısımları”, Erciyes Üniversitesi, **Fen Bilimleri Dergisi**, 27 (4) , 304-308.
- Tüfekçi, A. R. (2020) “Asteraceae familyasına ait bazı bitki türlerinin fitokimyasal ve biyolojik aktivitelerinin incelenmesi”, Doktora Tezi, **Fen Bilimleri Enstitüsü**, Çankırı Karatekin Üniversitesi, s4.
- Türker, A. U., Camper, N. D. (2002) “Biological activity of common mullein, a medicinal plant”, **Journal of Ethnopharmacology**, 82(2-3), 117-125.
- Türker, A. U., Camper, N. D. and Guerel, E. (2004) “High-performance liquid chromatographic determination of a saponin from *Verbascum thapsus* L.”, **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 18(1), 54-59.
- Türkoğlu A., Duru M. E., Mercan, N., Kivrak İ., Gezer, K. (2006) “Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill”, **Food Chemistry**, 267–273.
- Verpoorte, R., Van Der Heijden, R., Ten Hoopen, H. J. G., Memelink, J. (1999) “Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolite Pathways for the Production of Fine Chemical”, **Biotechnology Letters**, 21, 467-479.
- Vesper, T., Seifert, K. (1994) “Iridoids from *Verbascum nigrum*”, **Liebigs Annaelen Der Chemie**, 751-753.

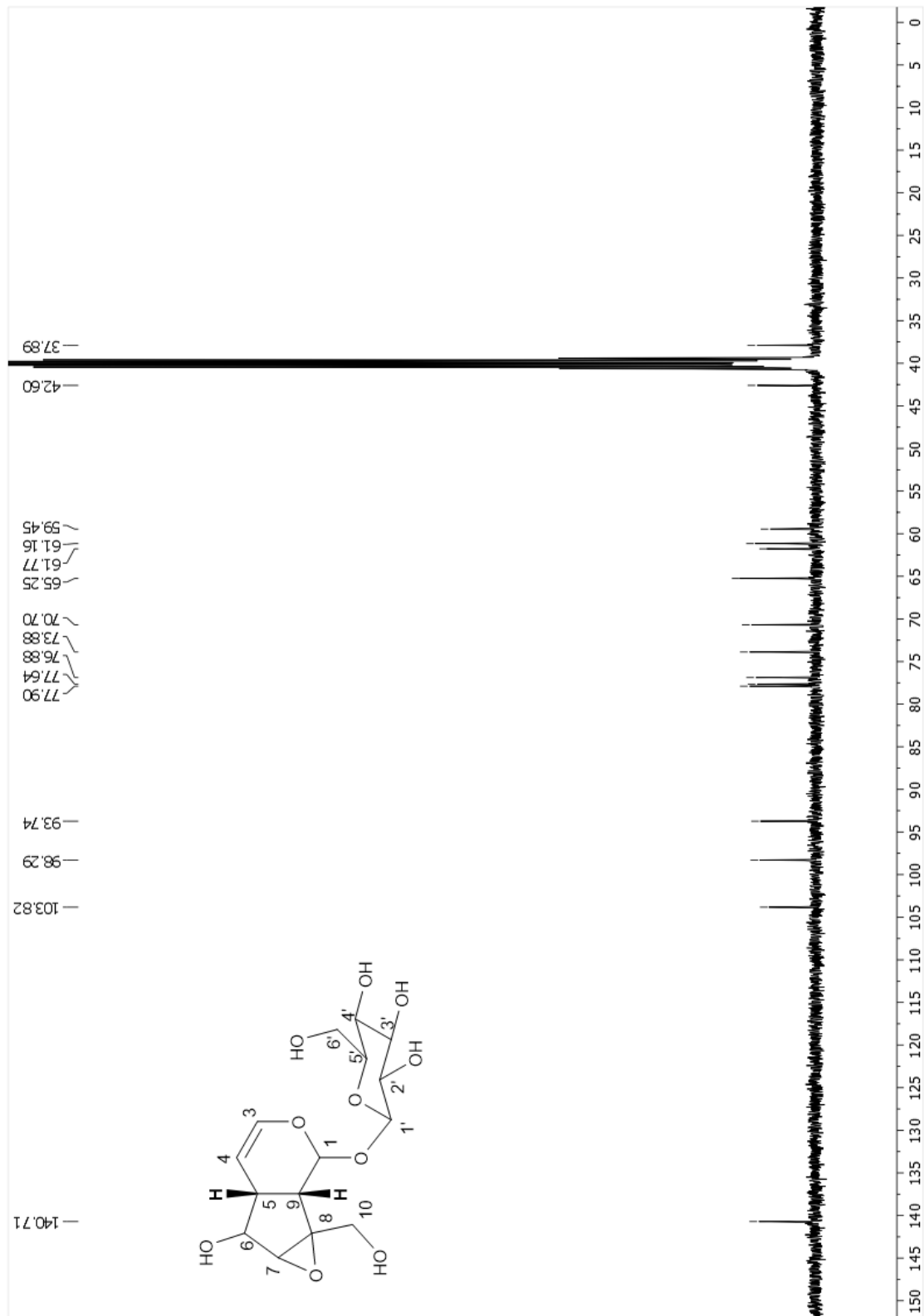
- Viljoen, A., Mncwangi, N., Vermaak, I. (2012) "Anti-inflammatory iridoids of botanical origin", **Current Medicinal Chemistry**, 19, 2104-2127.
- Villasenor, I. M. (2007) "Bioactivities of iridoids", **Anti-Inflammatory & AntiAllergy Agents in Medicinal Chemistry**, 6, 307-314.
- Vincken, J. P., Heng, L., de Groot, A., Gruppen, H. (2007) "Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom", **Phytochemistry**, 68, 275-297.
- Warashina, T., Miyase, T. and Ueno, A. (1992) "Phenylethanoid and lignan glycosides from *Verbascum thapsus* L.", **Phytochemistry**, 31, 961-965.
- Waser, M. and Rinner, U. (2016) "Section II Mevalonate Biosynthetic Pathway, Monoterpenes and iridoids", **A.L. Zografos (Ed.). From Biosynthesis to Total Synthesis: Strategies and Tactics for Natural Products**, Hoboken: John Wiley & Sons.
- Woo, E. R., Piao, M. S. (2004) "Antioxidative Constituents from *Lycopus lucidus*", **Archives of Pharmacal Research**, 27, 173-176.
- Xue, Z., Yang, B. (2016) "Phenylethanoid glycosides: research advances in their phytochemistry, pharmacological activity and pharmacokinetics", **Molecules**, 21(8), 991.
- Xue, J., Wang, Y., Jia, X., Du, C., Tang, W. (2018) "Classification and research progress on phenylethanoid glycosides", **Journal of Research in Pharmacy**, 37(5), 282-289.
- Yücel, E., Tülükoğlu, A. (2000) "Gediz (Kütahya) çevresinde halk ilacı olarak kullanılan bitkiler", **Ekoloji Çevre Dergisi**, 9(36), 12-14.
- Yi, O., Jovel, E. M., Towers, G. H., Wahbe, T. R., Cho, D. (2007) "Antioxidant and antimicrobial activities of native *Rosa* sp. from British Columbia", **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 58(3), 178-189.
- Zgorniak-Nowosielska, I., Gryzbek, J., Manolova, N., Sekedjiev, J. and Zawilinska, B. (1991) "Antiviral activity of Flos verbasci infusion against influenza and *Herpes simplex* viruses", **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, 39(1-2), 103-108.
- Zhao, Y. L., Wang, S. F., Li, Y., He, Q. X., Liu, K. C., Yang, Y. P., & Li, X. L. (2011) "Isolation of chemical constituents from the aerial parts of *Verbascum thapsus* and their antiangiogenic and antiproliferative activities", **Archives of Pharmacal Research**, 34(5), 703-7.

EKLER

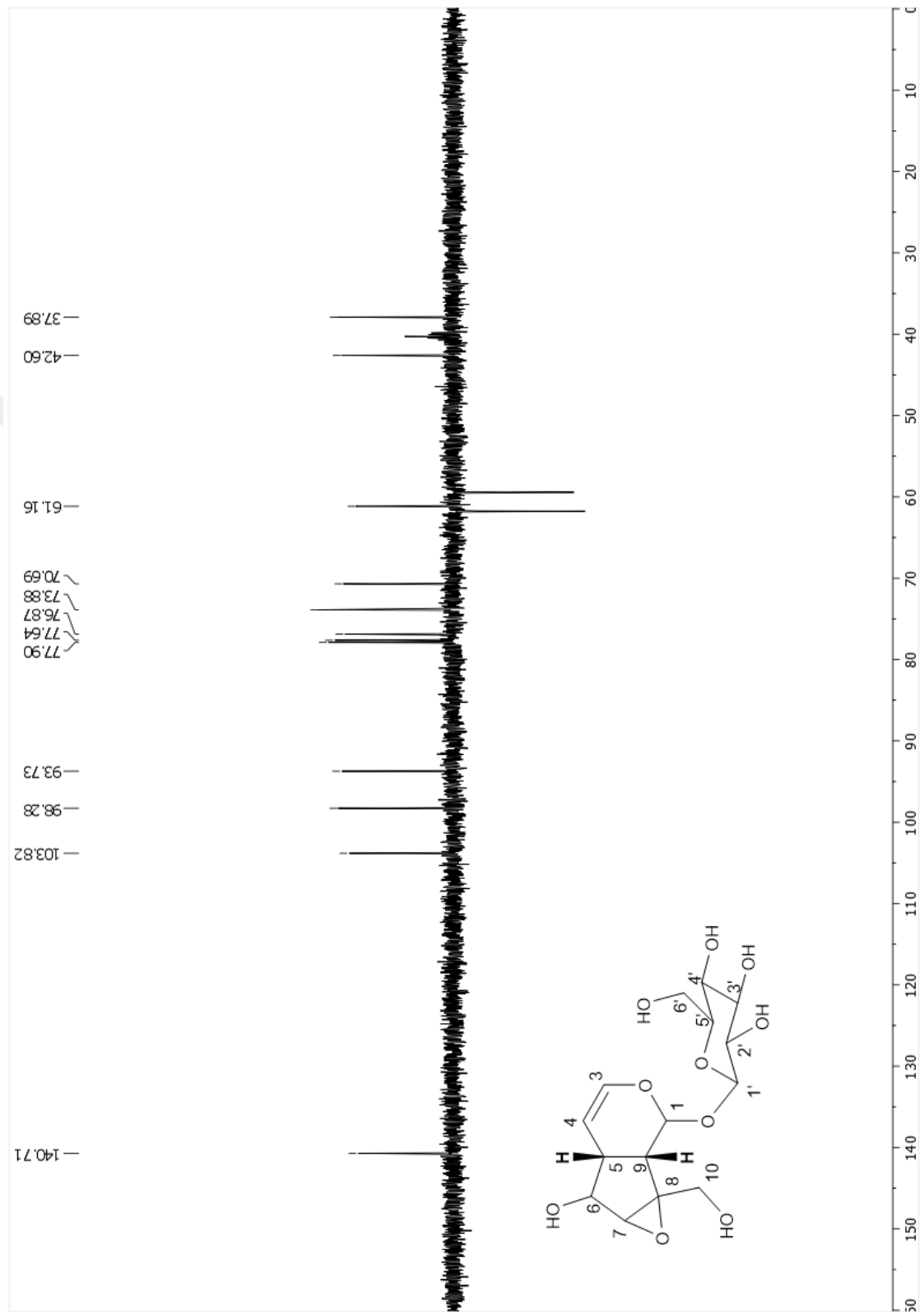
Ek-1. Katalpol (Catalpol, S-1) bileşığının ^1H -NMR spektrumu



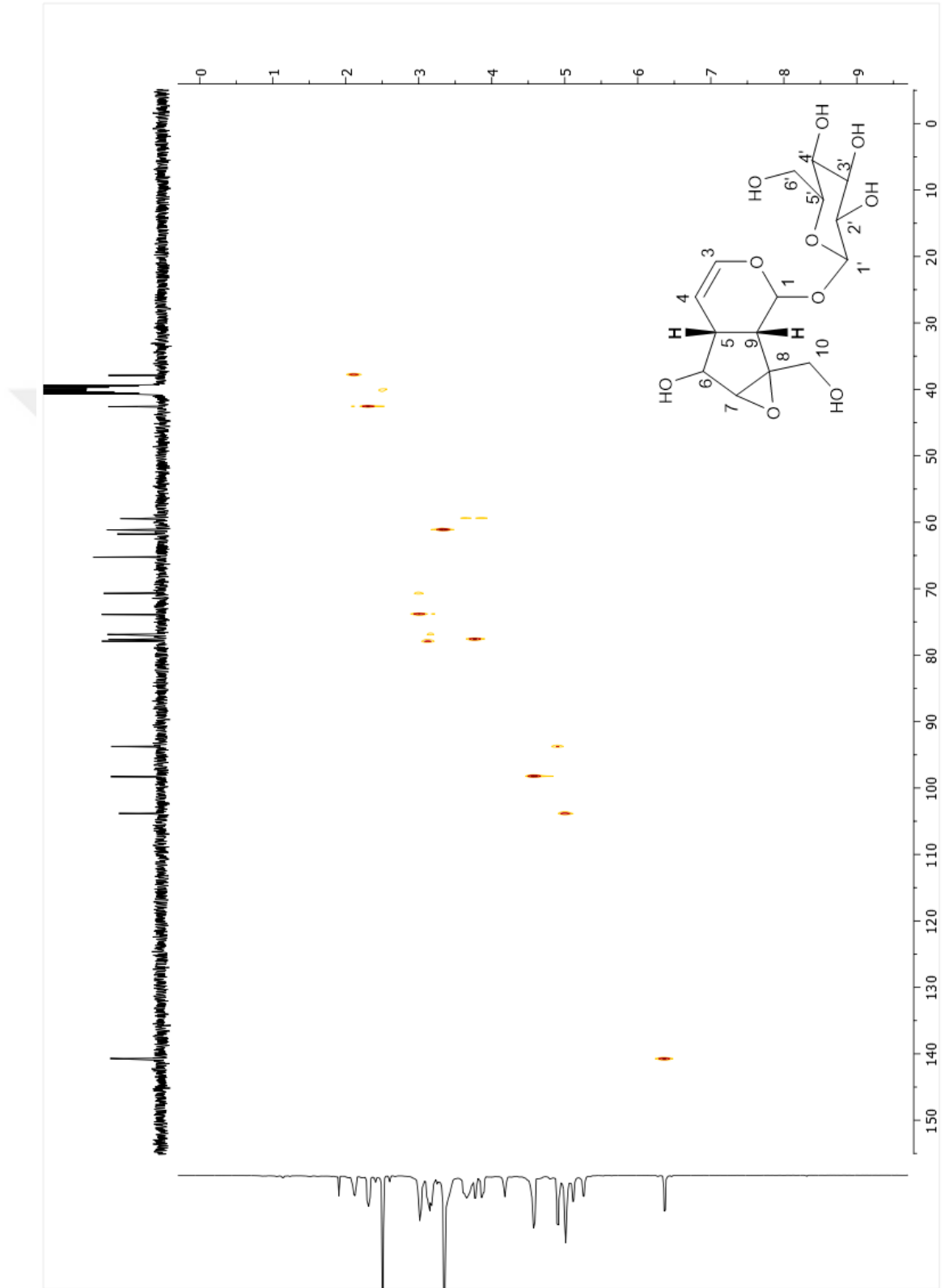
Ek-2. Katalpol (Catalpol, S-1) bileşğinin ^{13}C -NMR spektrumu



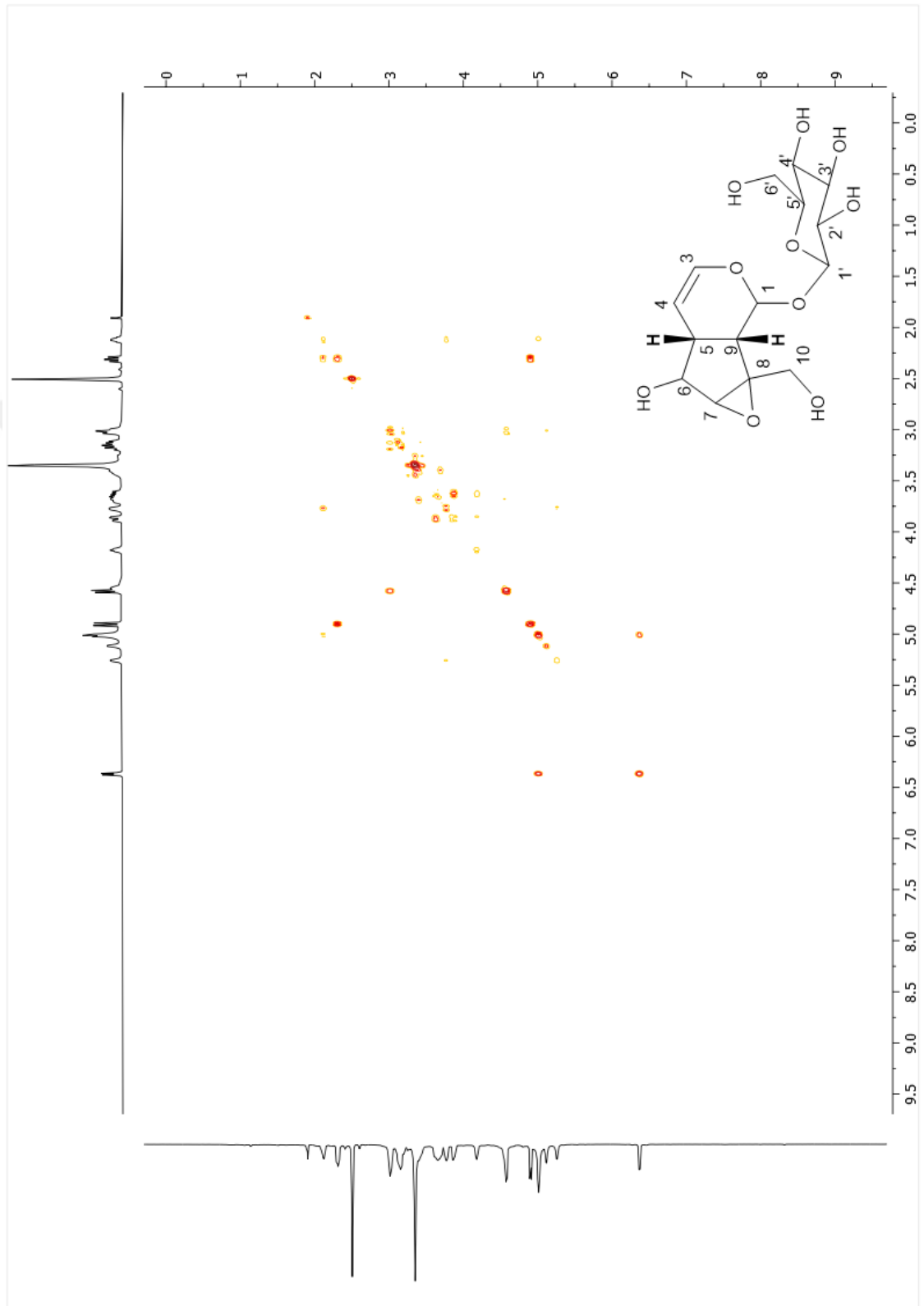
Ek-3. Katalpol (Catalpol, S-1) bileşğinin DEPT spektrumu



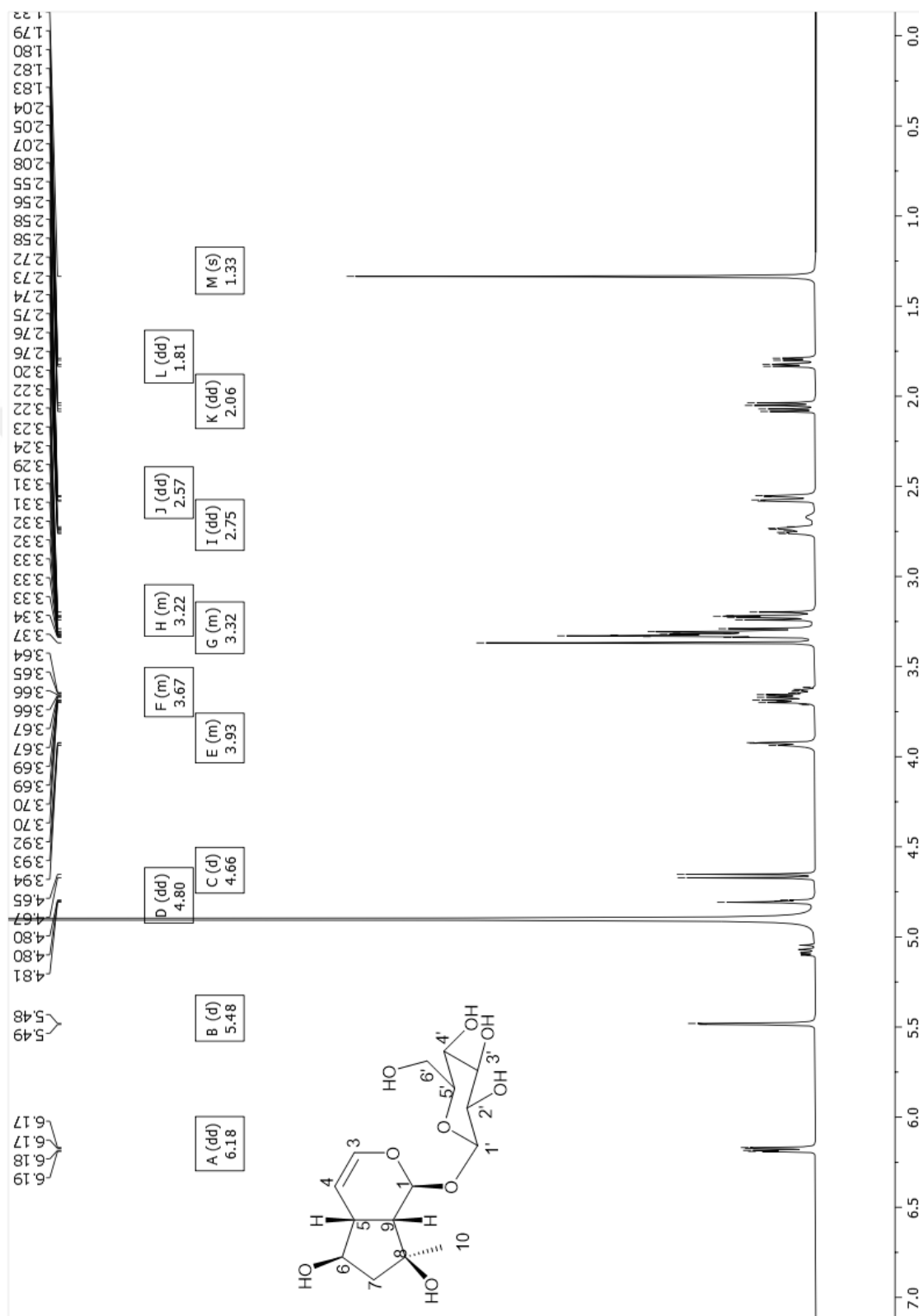
Ek-4. Katalpol (Catalpol, S-1) bileşğinin HETCOR spektrumu



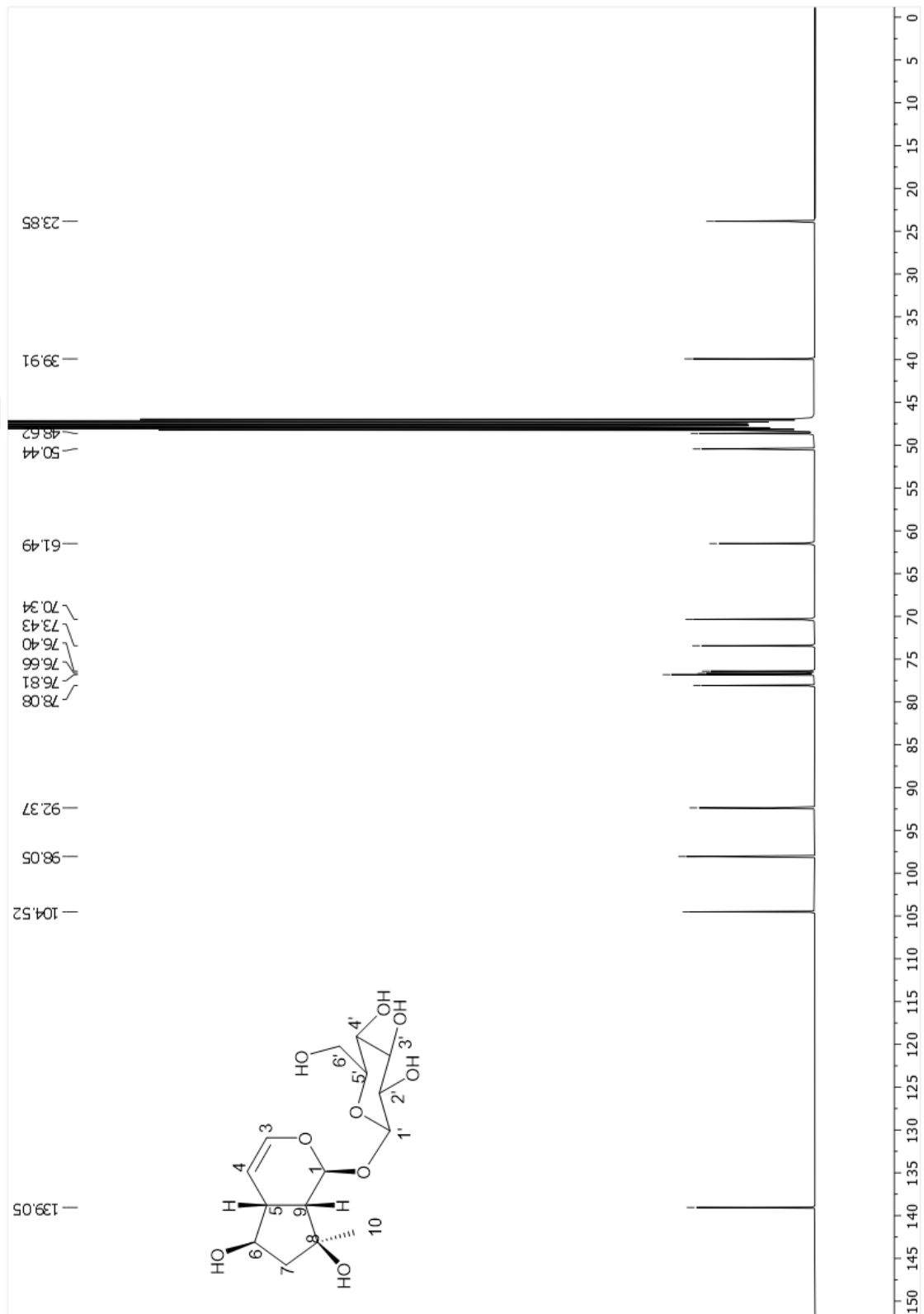
Ek-5. Katalpol (Catalpol, S-1) bileşğinin COSY spektrumu



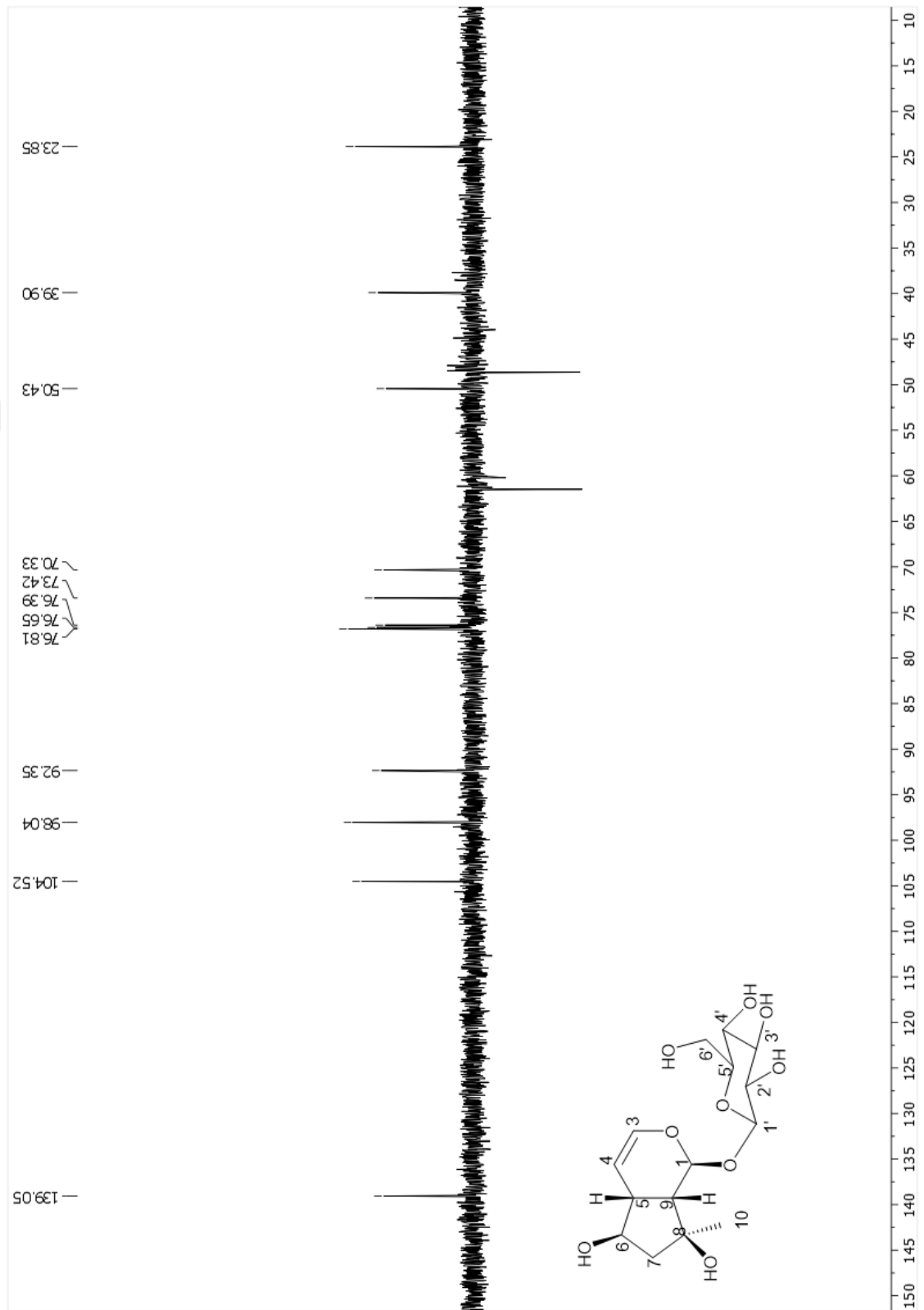
Ek-6. Ajugol (Ajugol, S-2) bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu



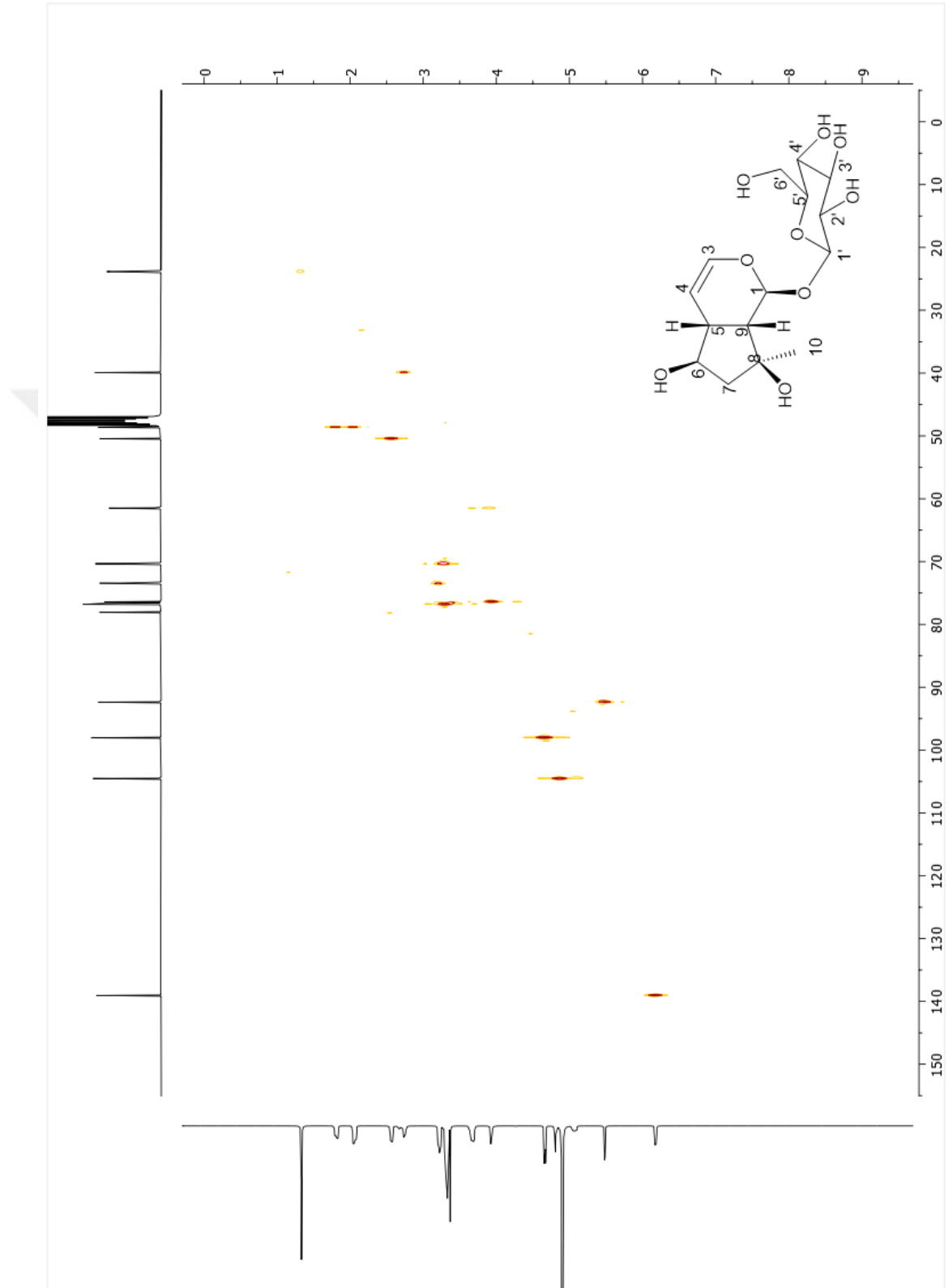
Ek-7. Ajugol (Ajugol, S-2) bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu



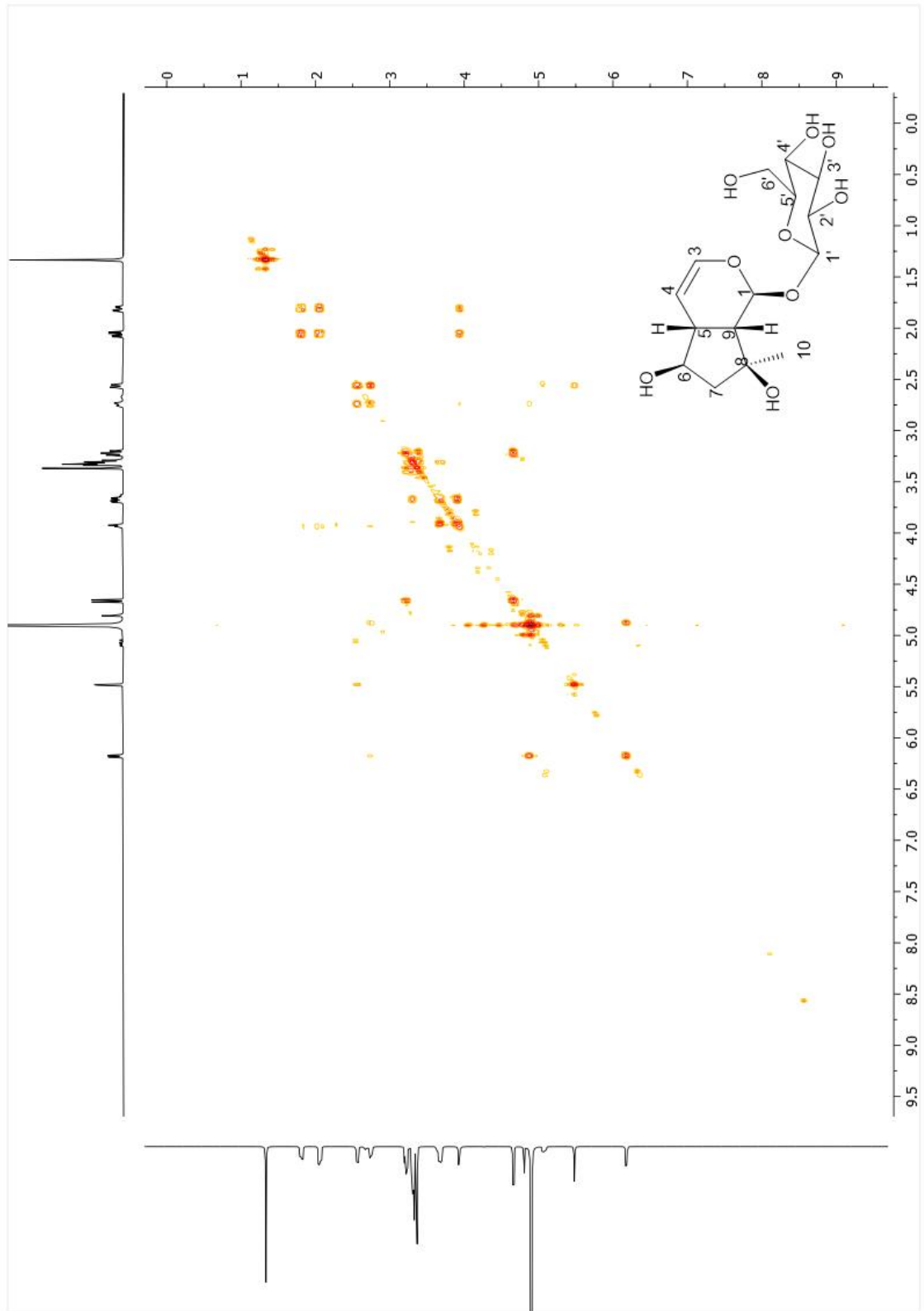
Ek-8. Ajugol (Ajugol, S-2) bileşiğinin DEPT spektrumu



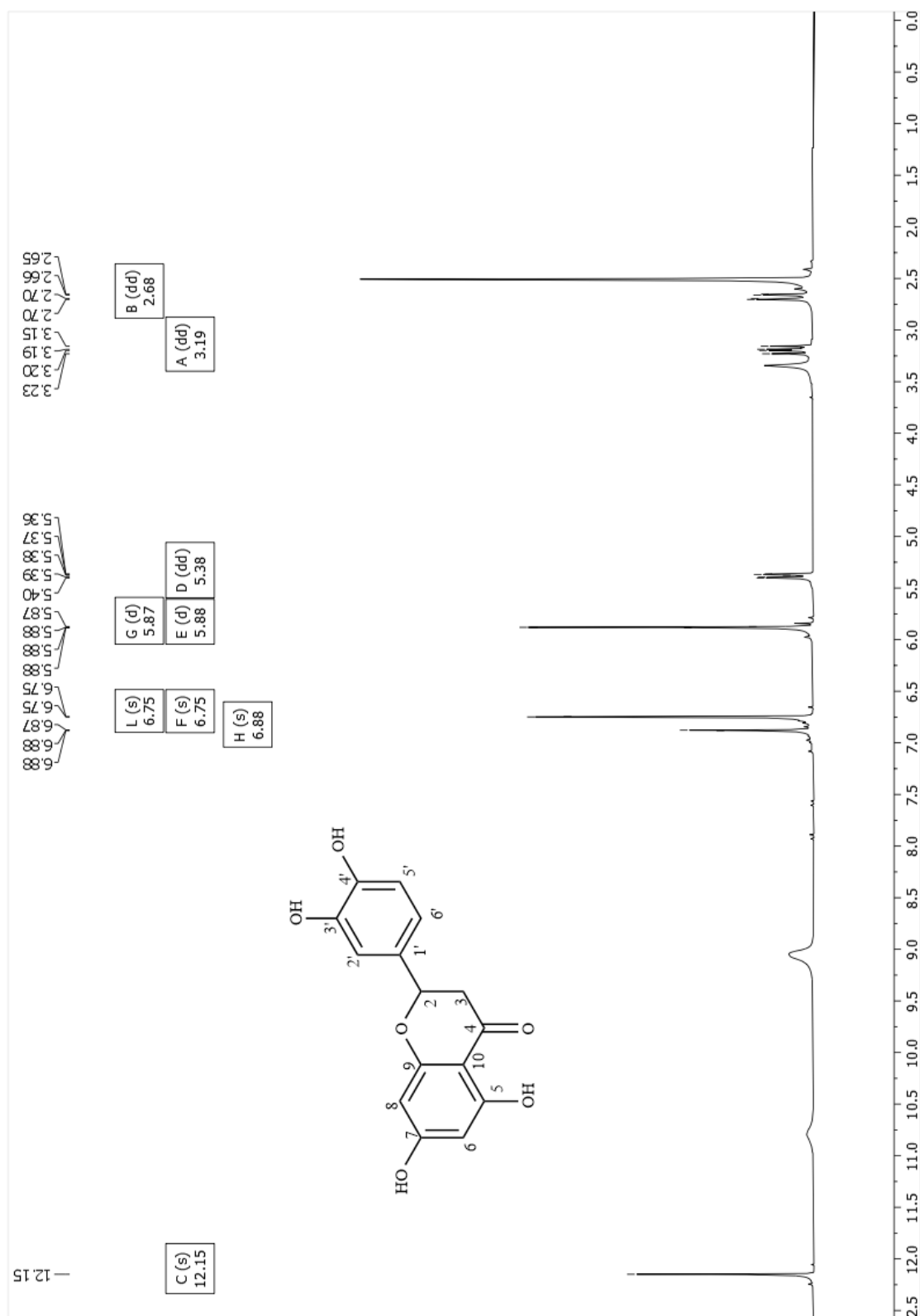
Ek-9. Ajugol (Ajugol, S-2) bileşiğinin HETCOR spektrumu



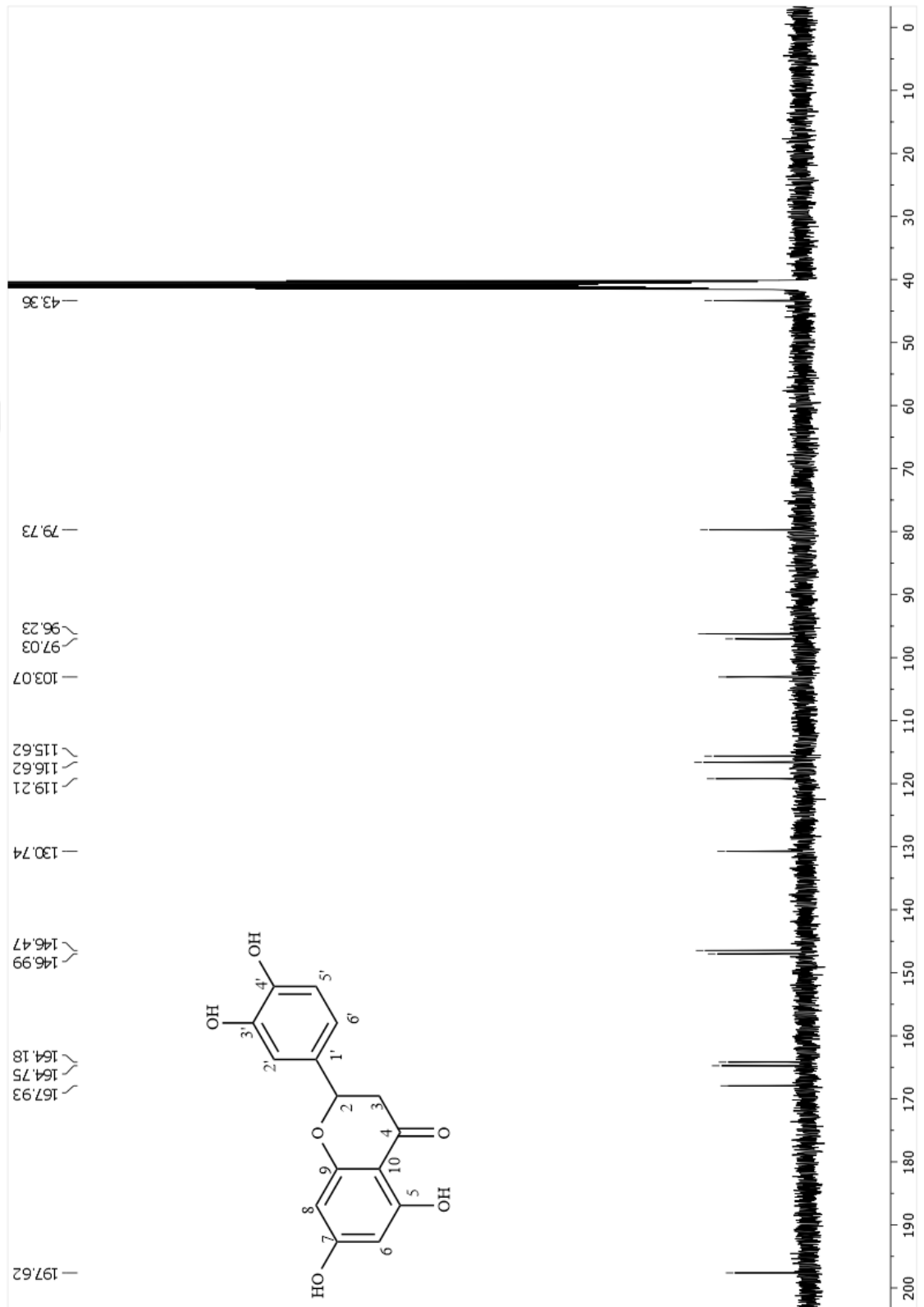
Ek-10. Ajugol (Ajugol, S-2) bileşiğinin COSY spektrumu



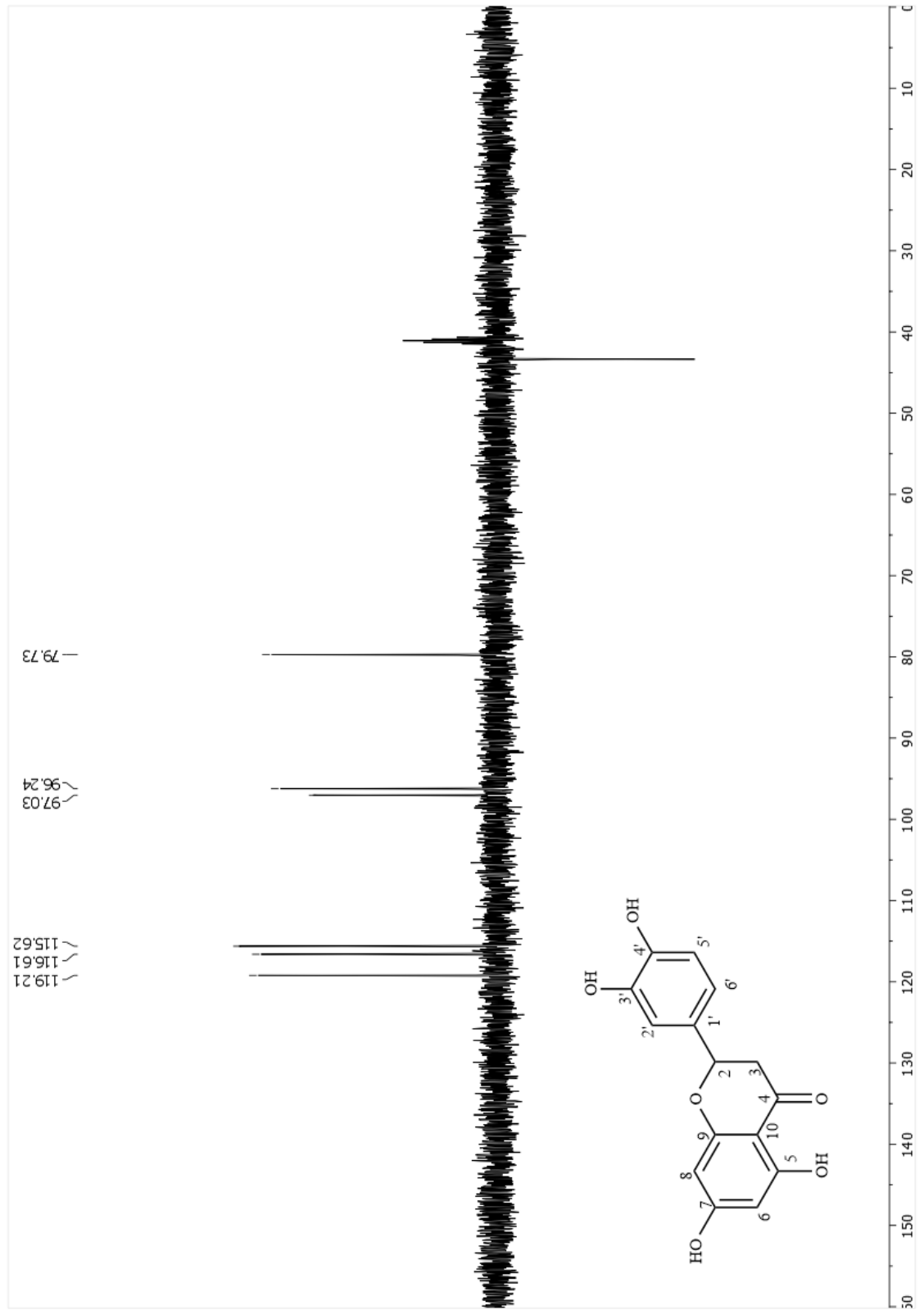
Ek-11. Eriodiktiyol (Eriodictyol, S-3) bileşığının ^1H -NMR spektrumu



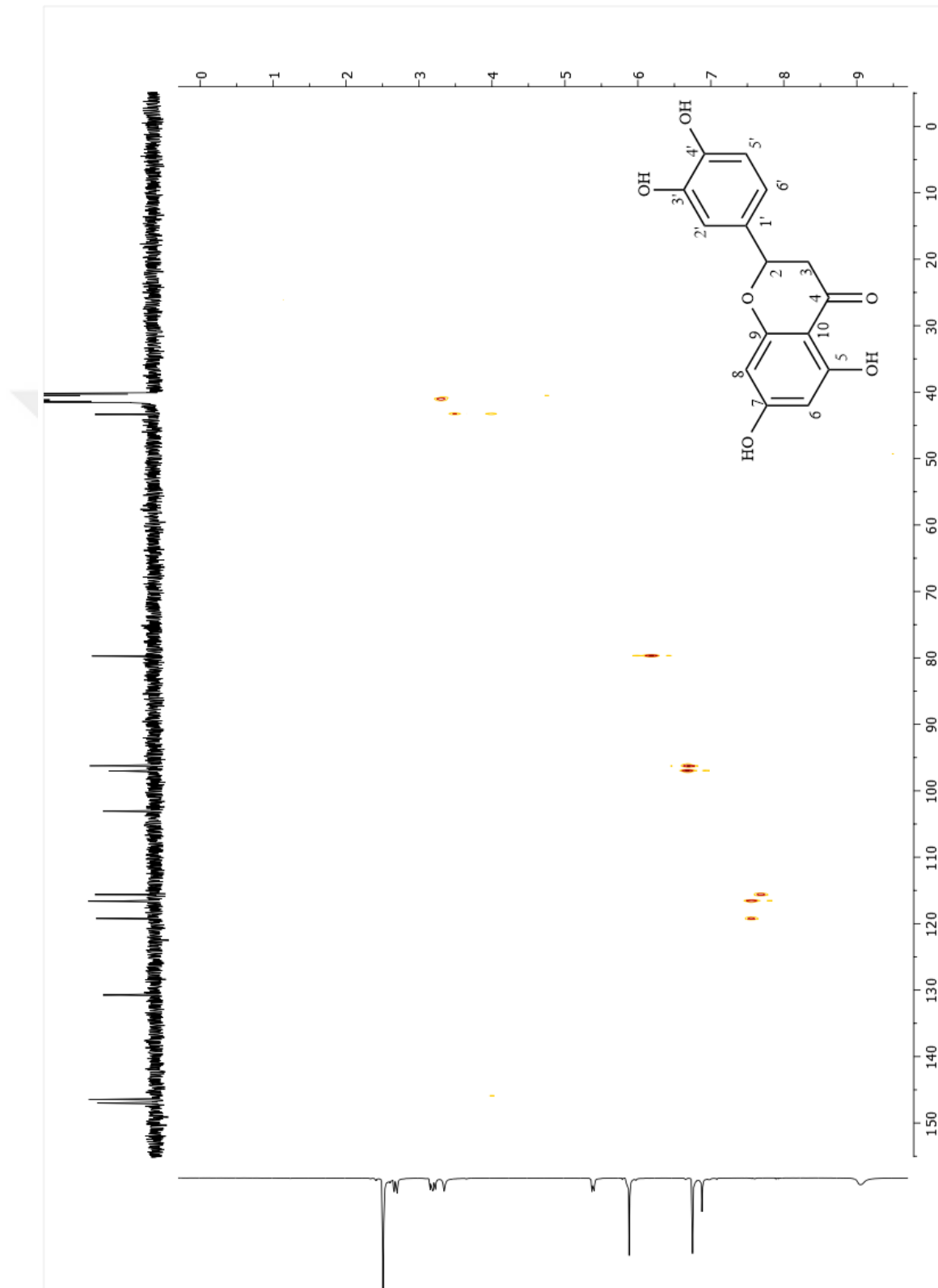
Ek-12. Eriodiktiyol (Eriodictyol, S-3) bileşğinin ^{13}C -NMR spektrumu



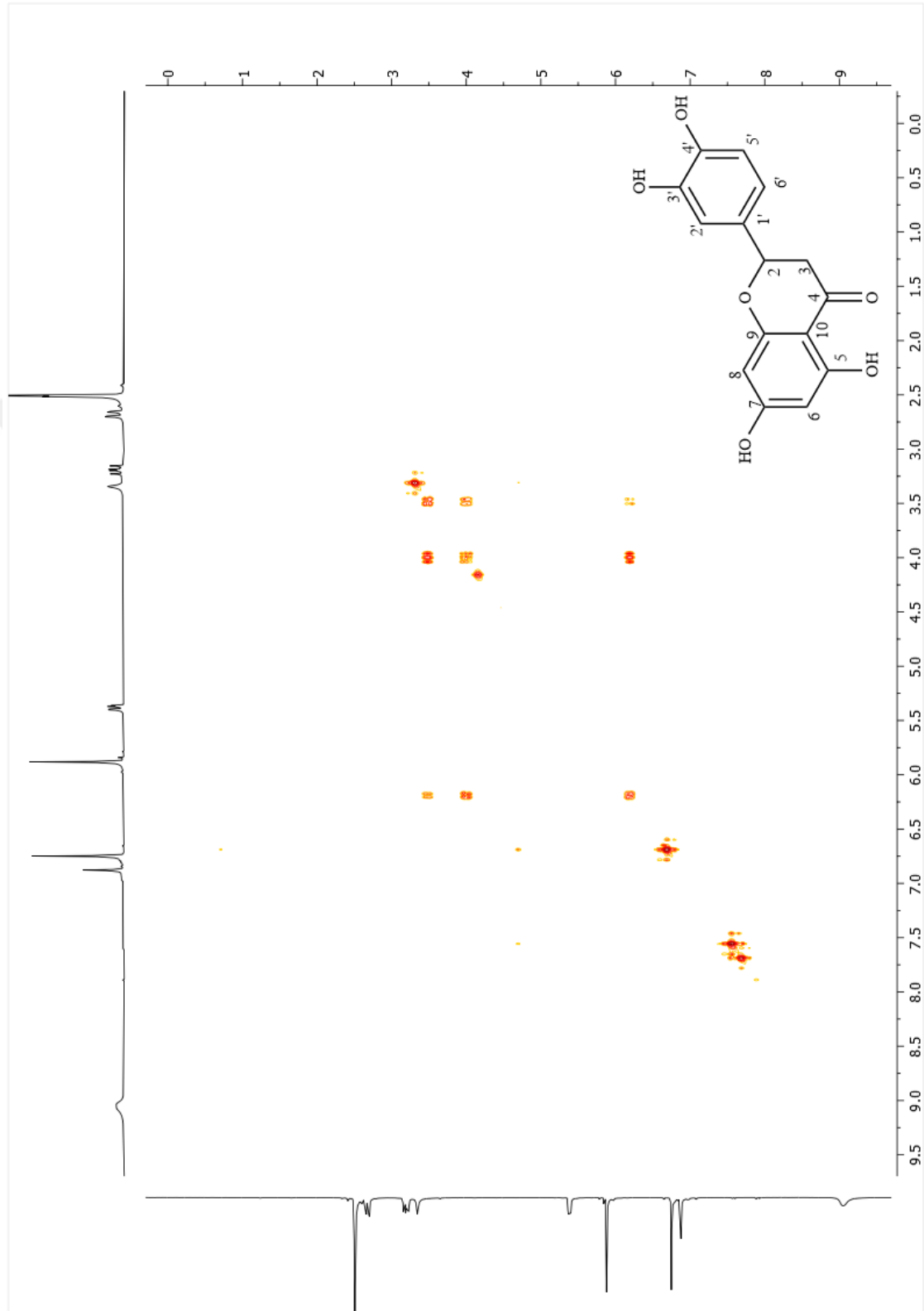
Ek-13. Eriodiktiyol (Eriodictyol, S-3) bileşğinin DEPT spektrumu



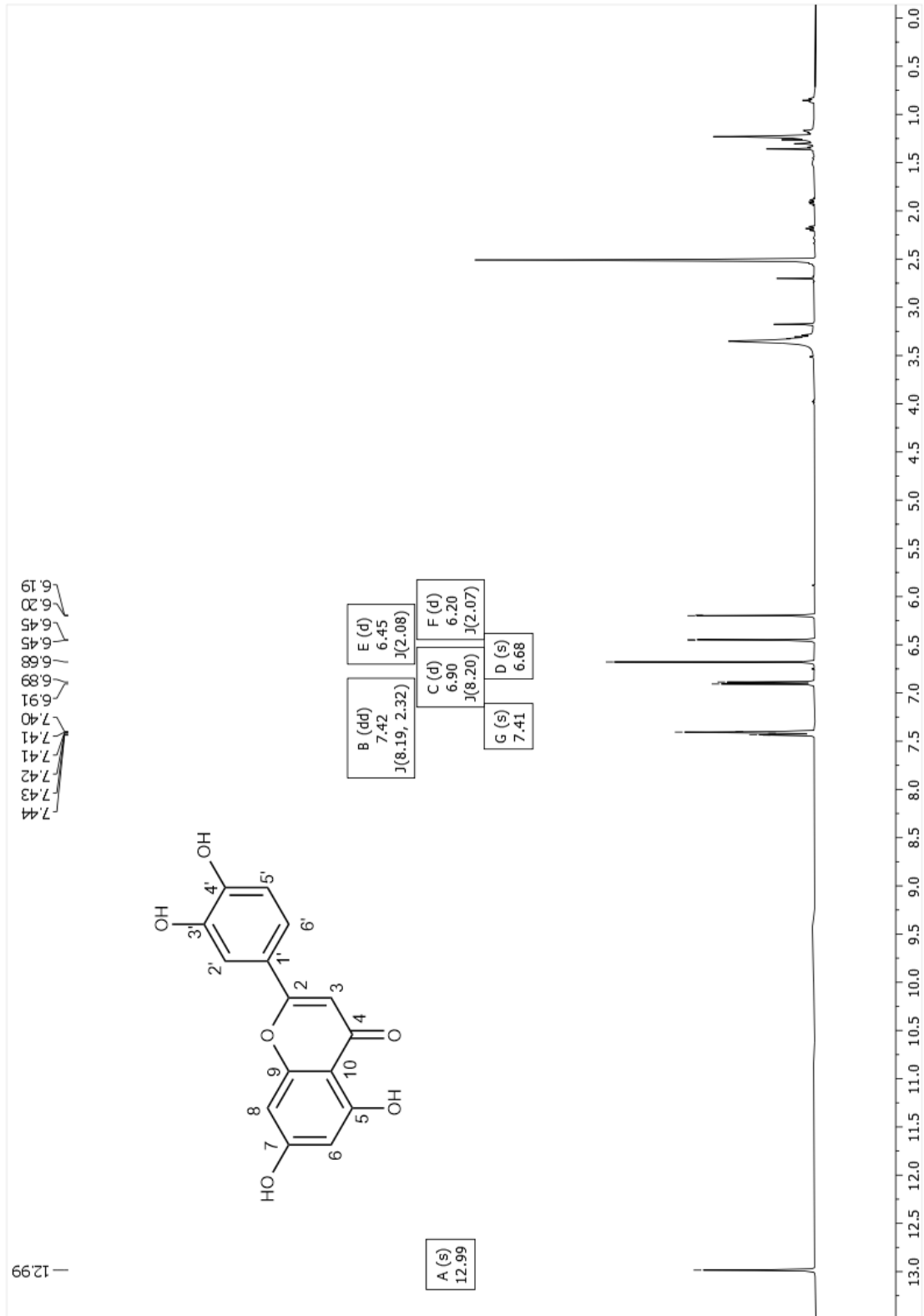
Ek-14. Eriodiktiyol (Eriodictyol, S-3) bileşğinin HETCOR spektrumu



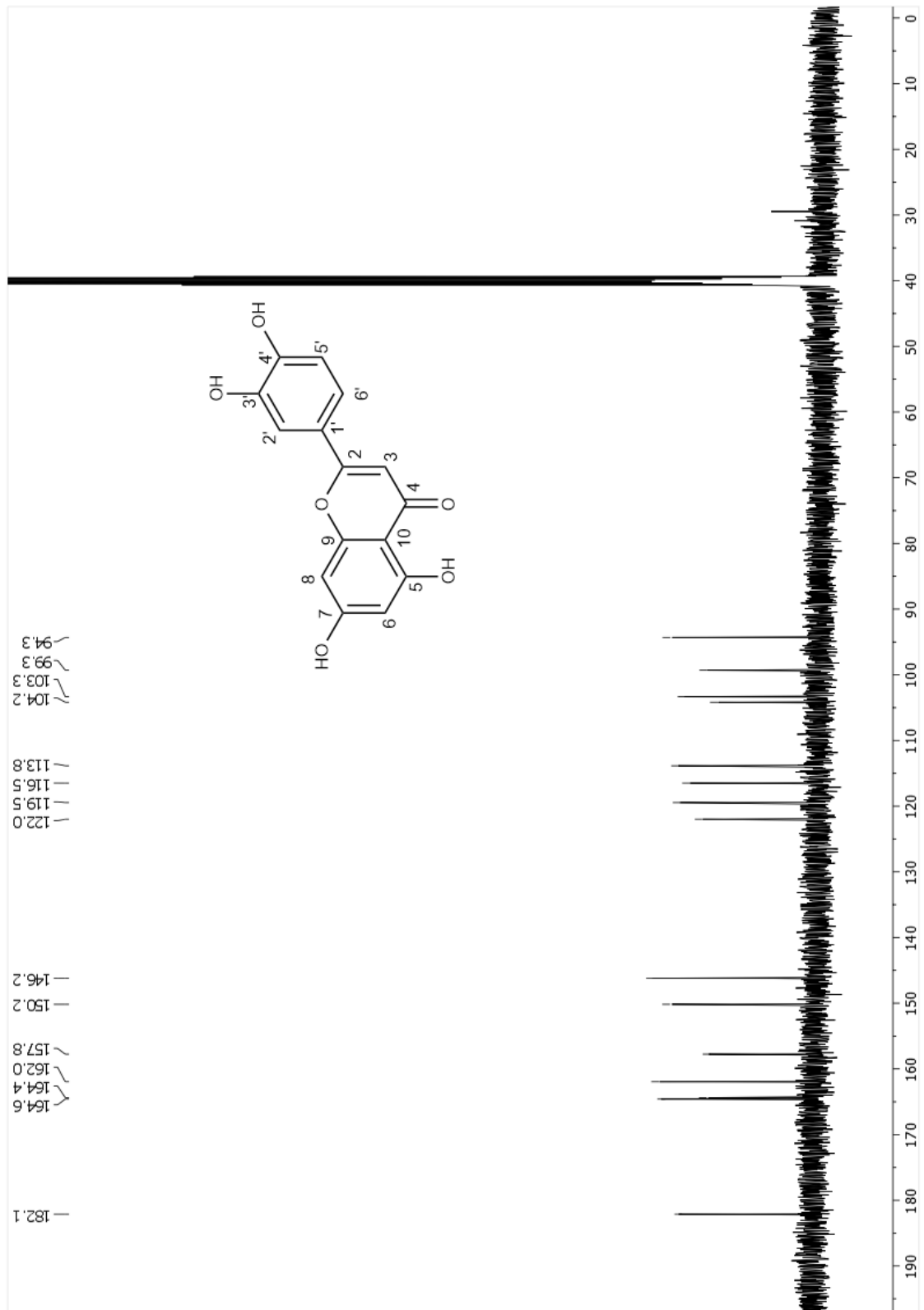
Ek-15. Eriodiktiyol (Eriodictyol, S-3) bileşığının COSY spektrumu



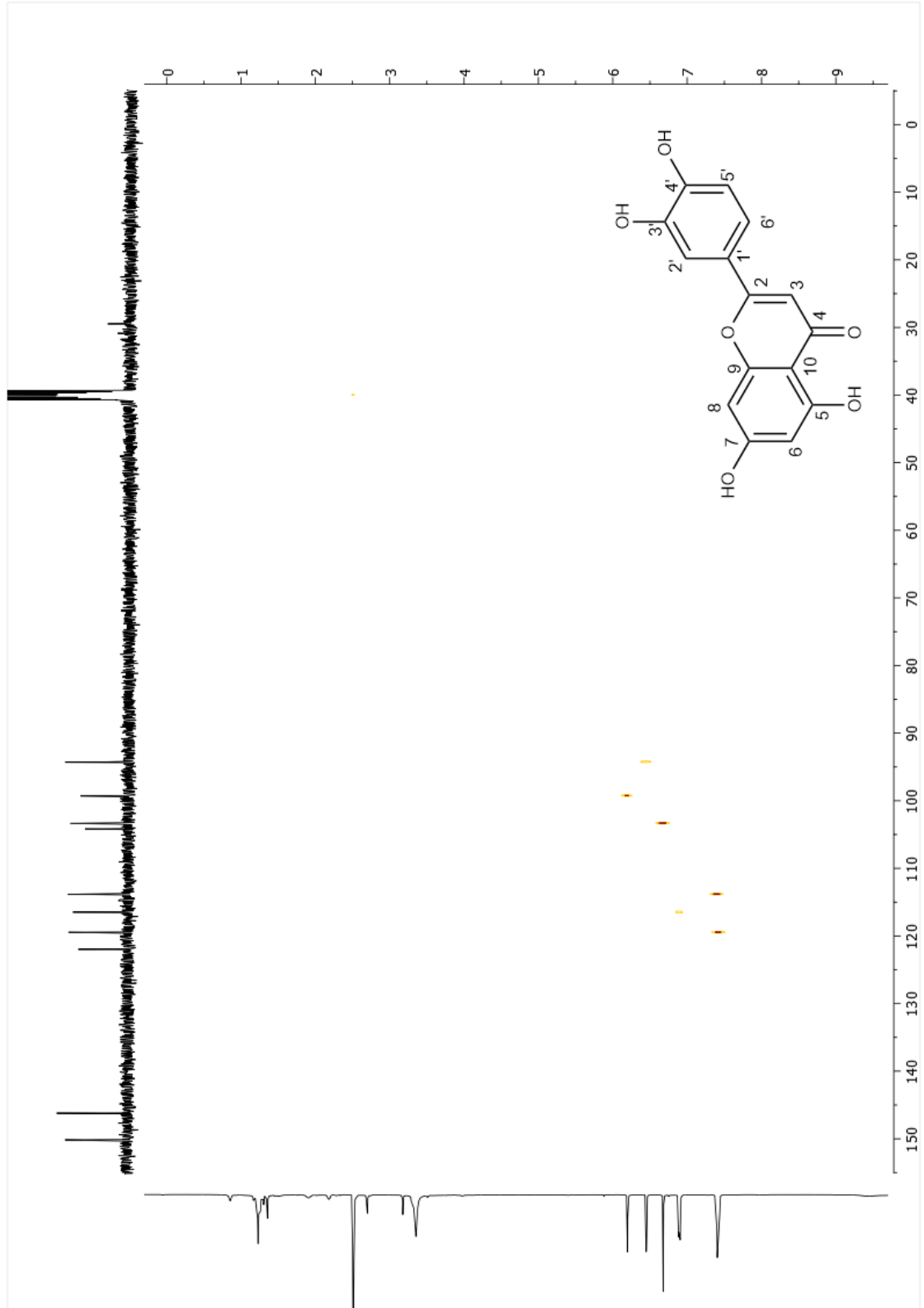
Ek-16. Luteolin (Luteolin, S-4) bileşığının ^1H -NMR spektrumu



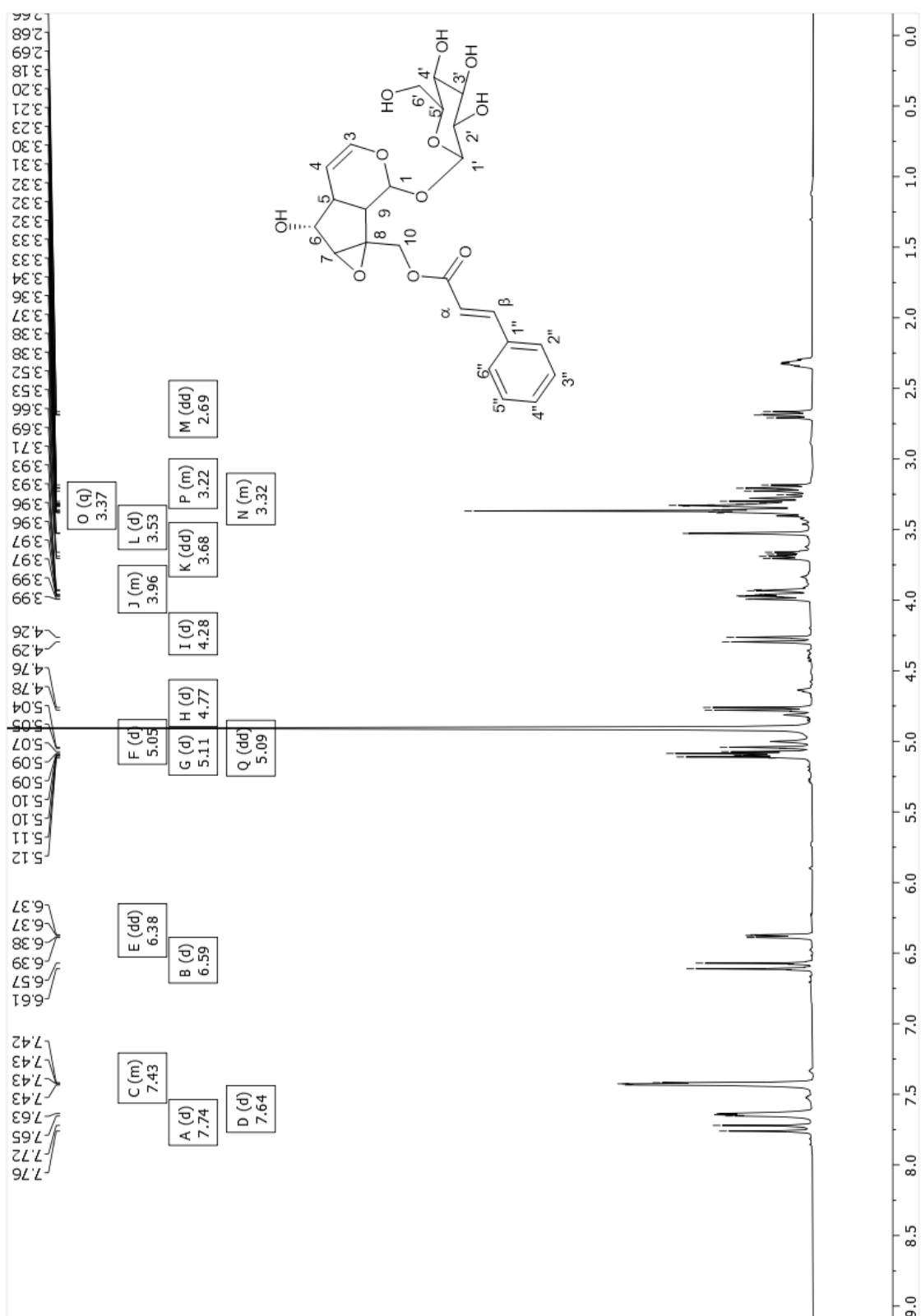
Ek-17. Luteolin (Luteolin, S-4) bileşığının ^{13}C -NMR spektrumu



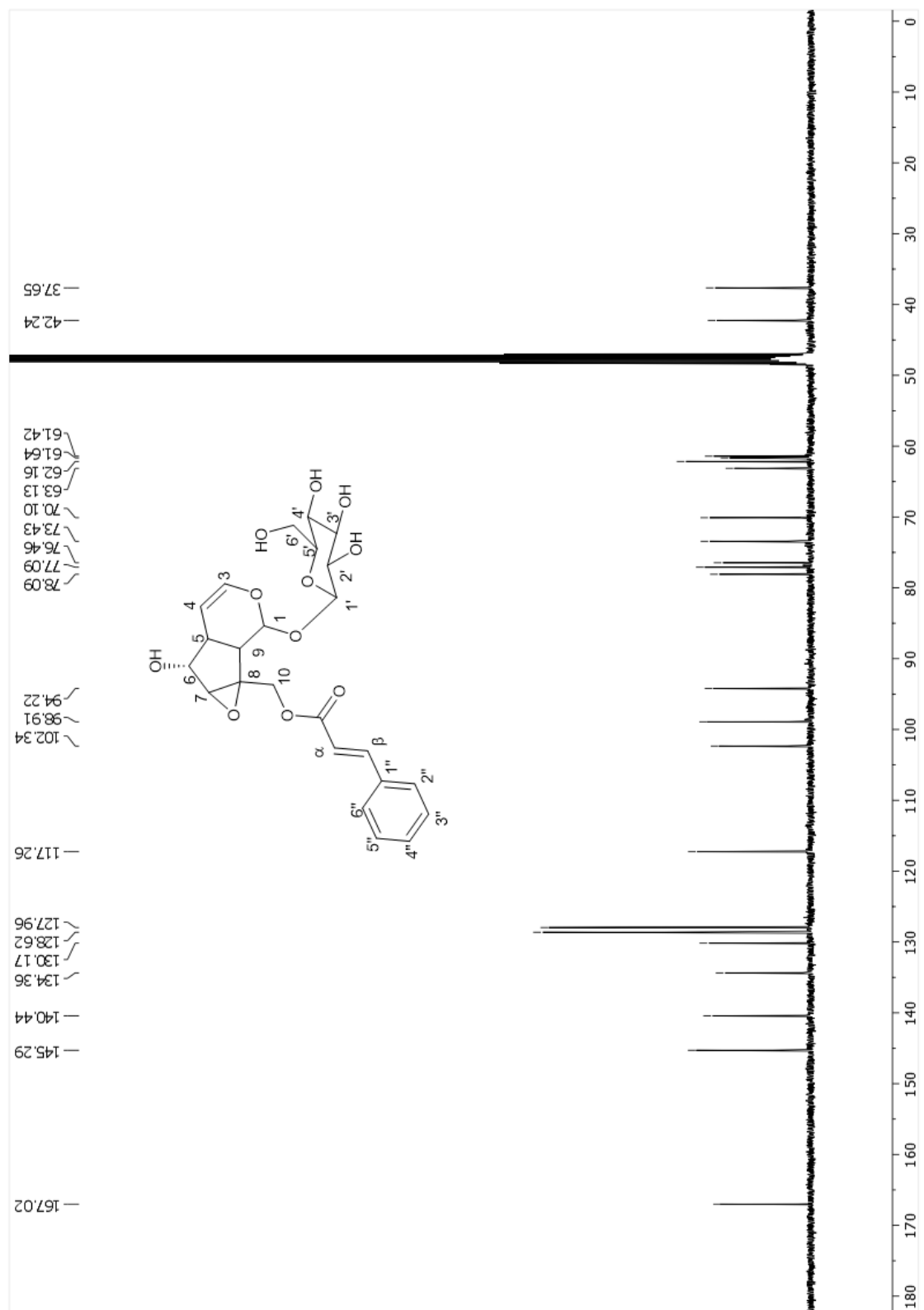
Ek-18. Luteolin (Luteolin, S-4) bileşğinin HETCOR spektrumu



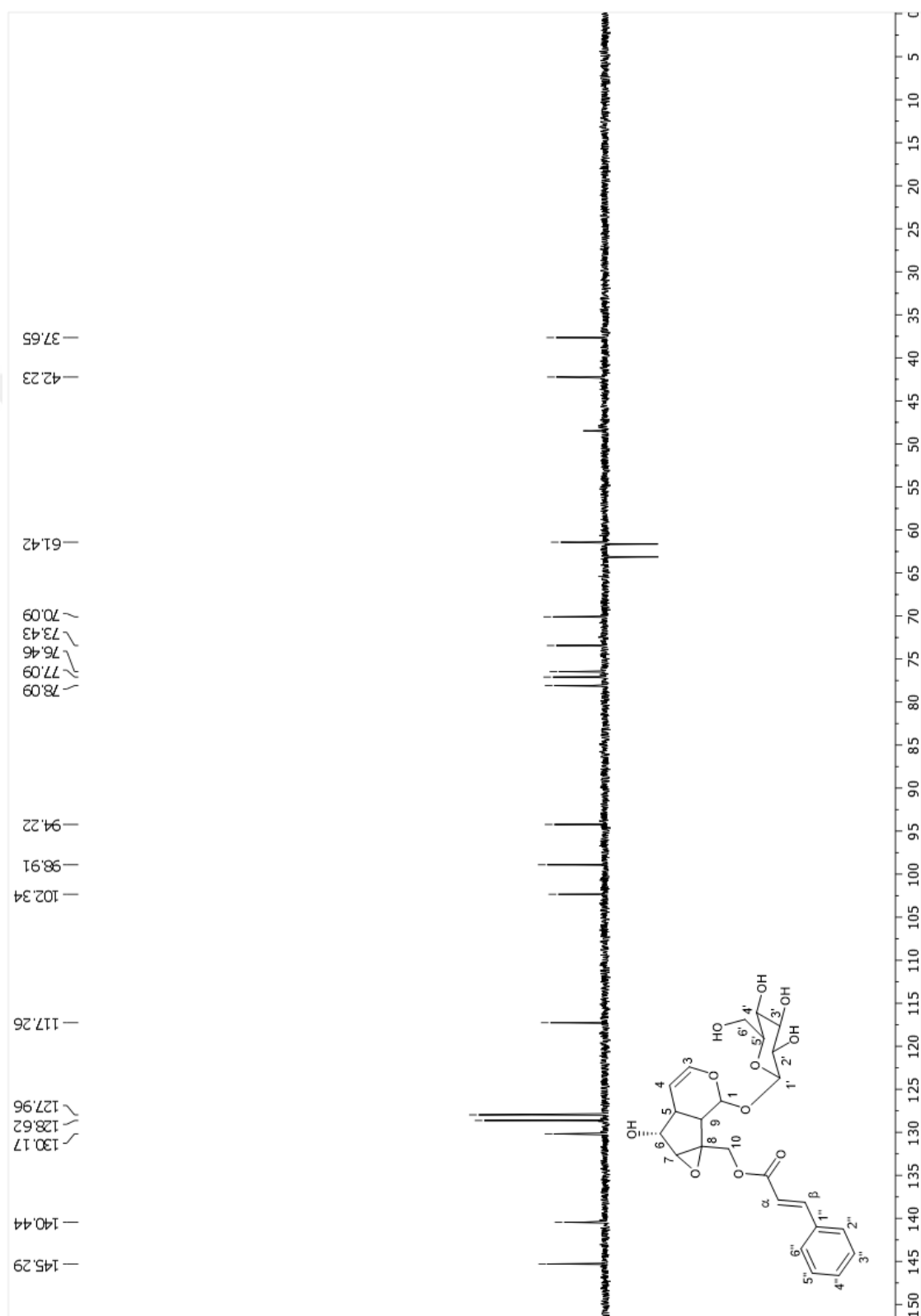
Ek-19. 10-*O*-sinnamoil-katalpol (10-*O*-cinnamoyl-catalpol, S-5) bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu



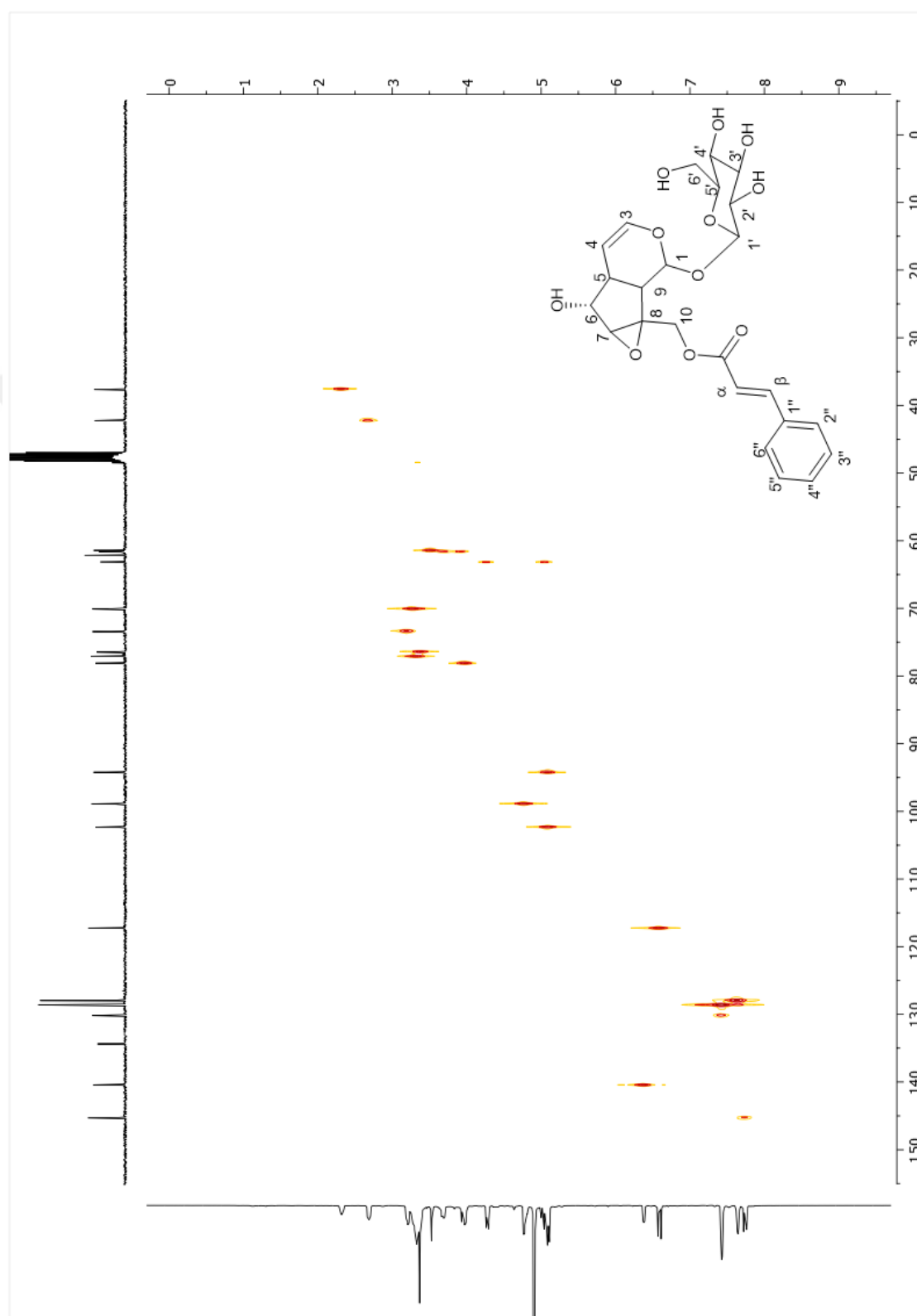
Ek-20. 10-*O*-sinnamoil-katalpol (10-*O*-cinnamoyl-catalpol, S-5) bileşğinin ^{13}C -NMR spektrumu



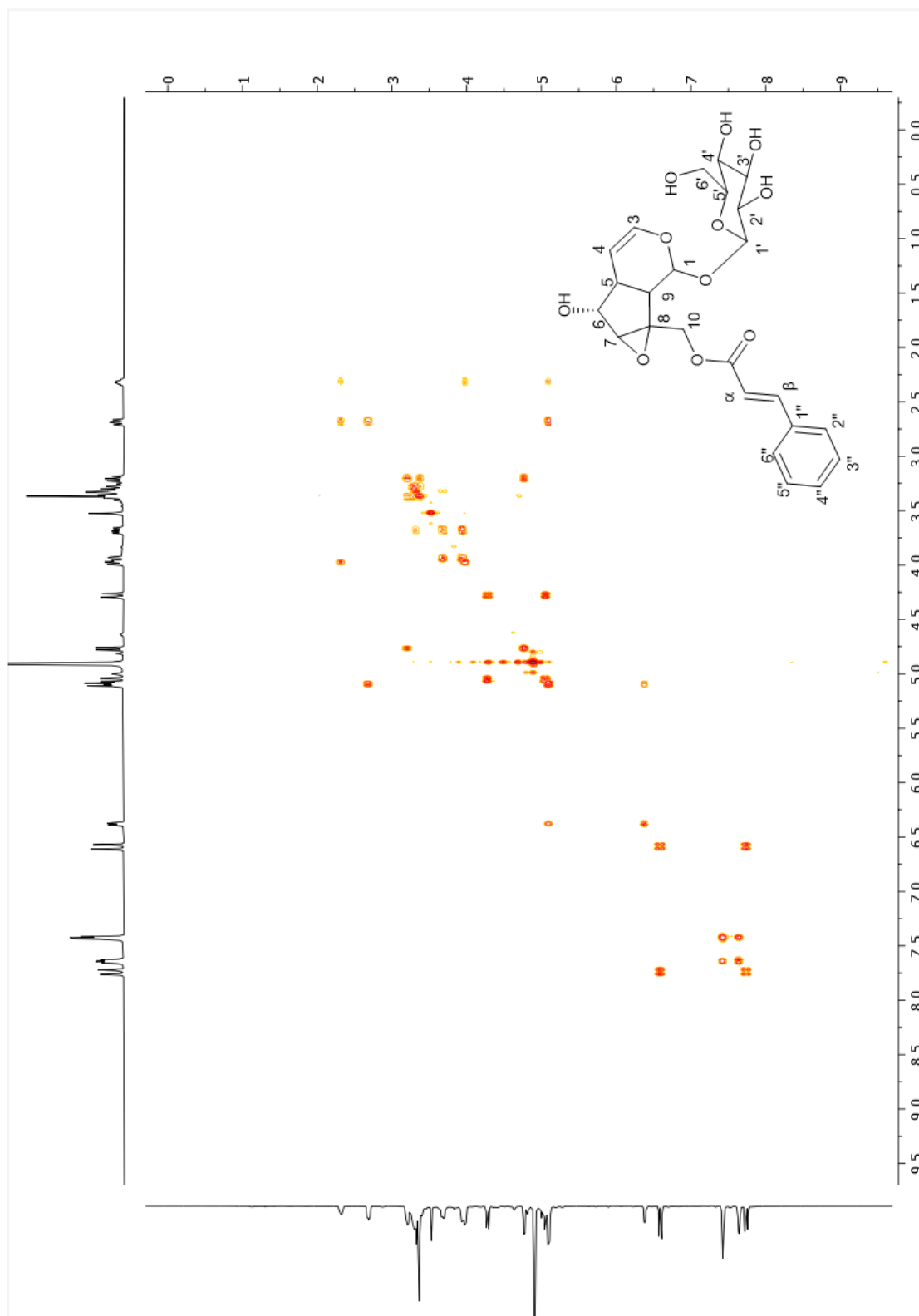
Ek-21. 10-*O*-sinnamoil-katalpol (10-*O*-cinnamoyl-catalpol, S-5) bileşiğinin DEPT spektrumu



Ek-22. 10-*O*-sinnamoil-katalpol (10-*O*-cinnamoyl-catalpol, S-5) bileşğinin HETCOR spektrumu



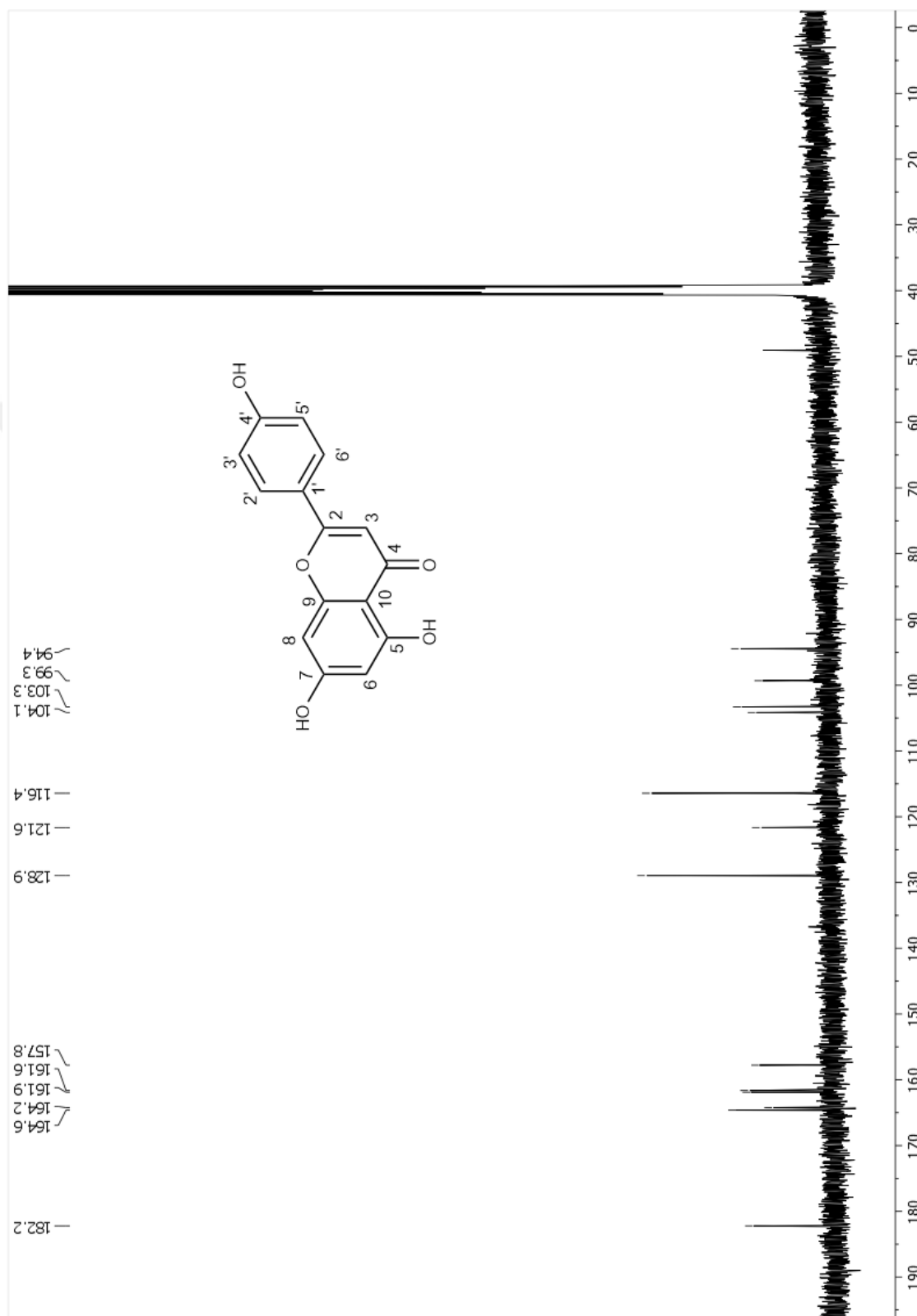
Ek-23. 10-*O*-sinnamoil-katalpol (10-*O*-cinnamoyl-catalpol, S-5) bileşığının COSY spektrumu



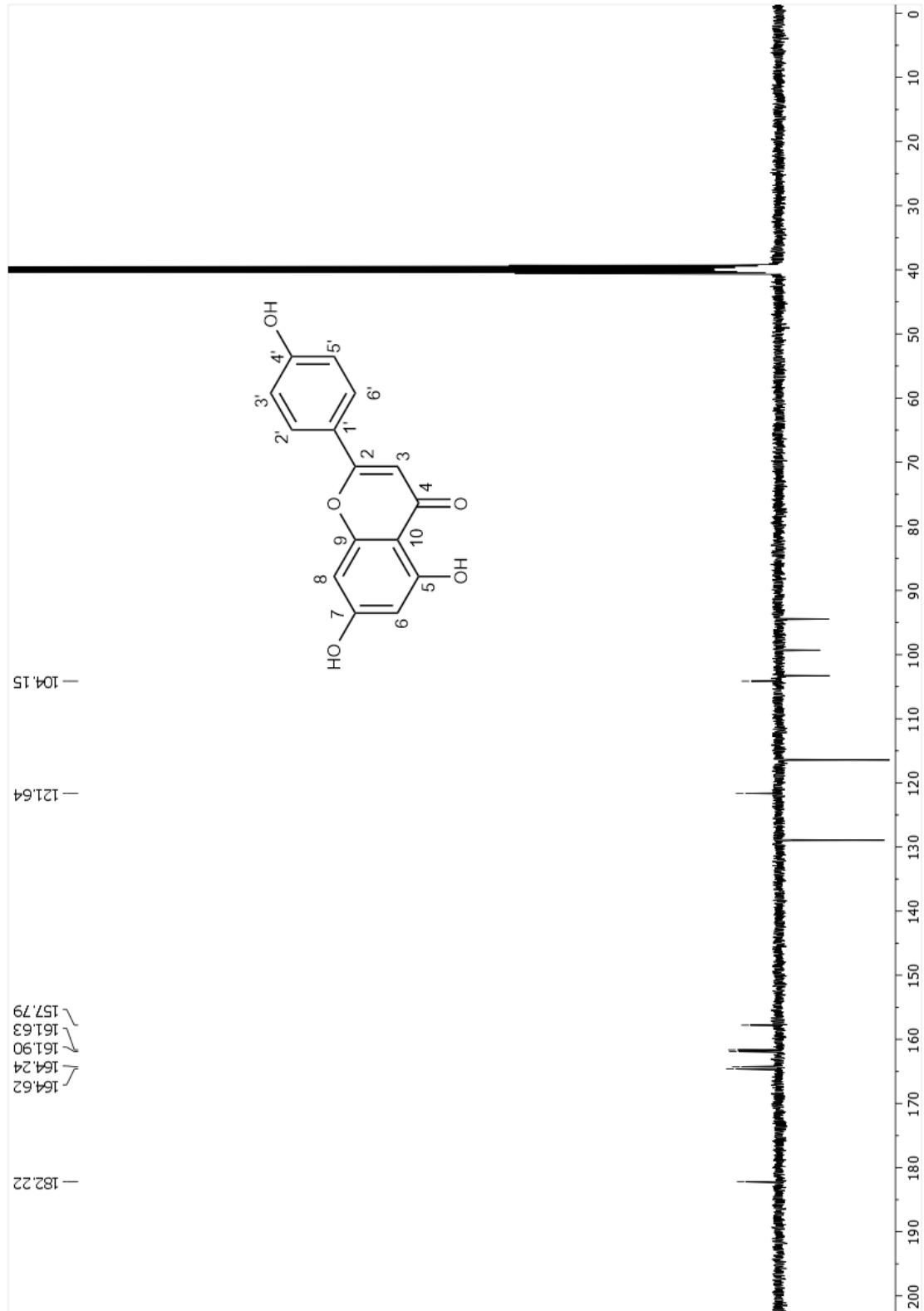
Ek-24. Apigenin (Apigenin, S-6) bileşığının ^1H -NMR spektrumu



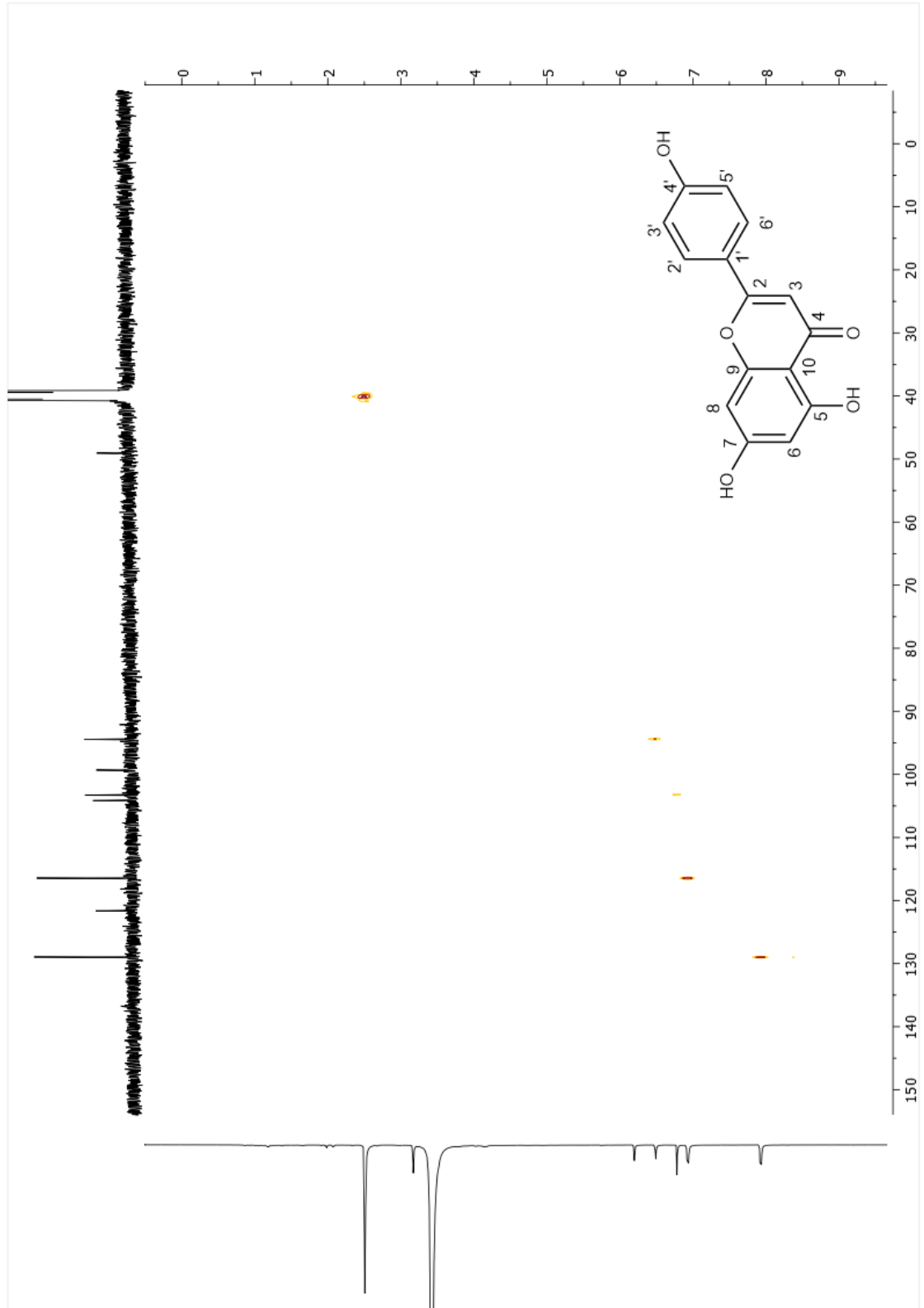
Ek-25. Apigenin (Apigenin, S-6) bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu



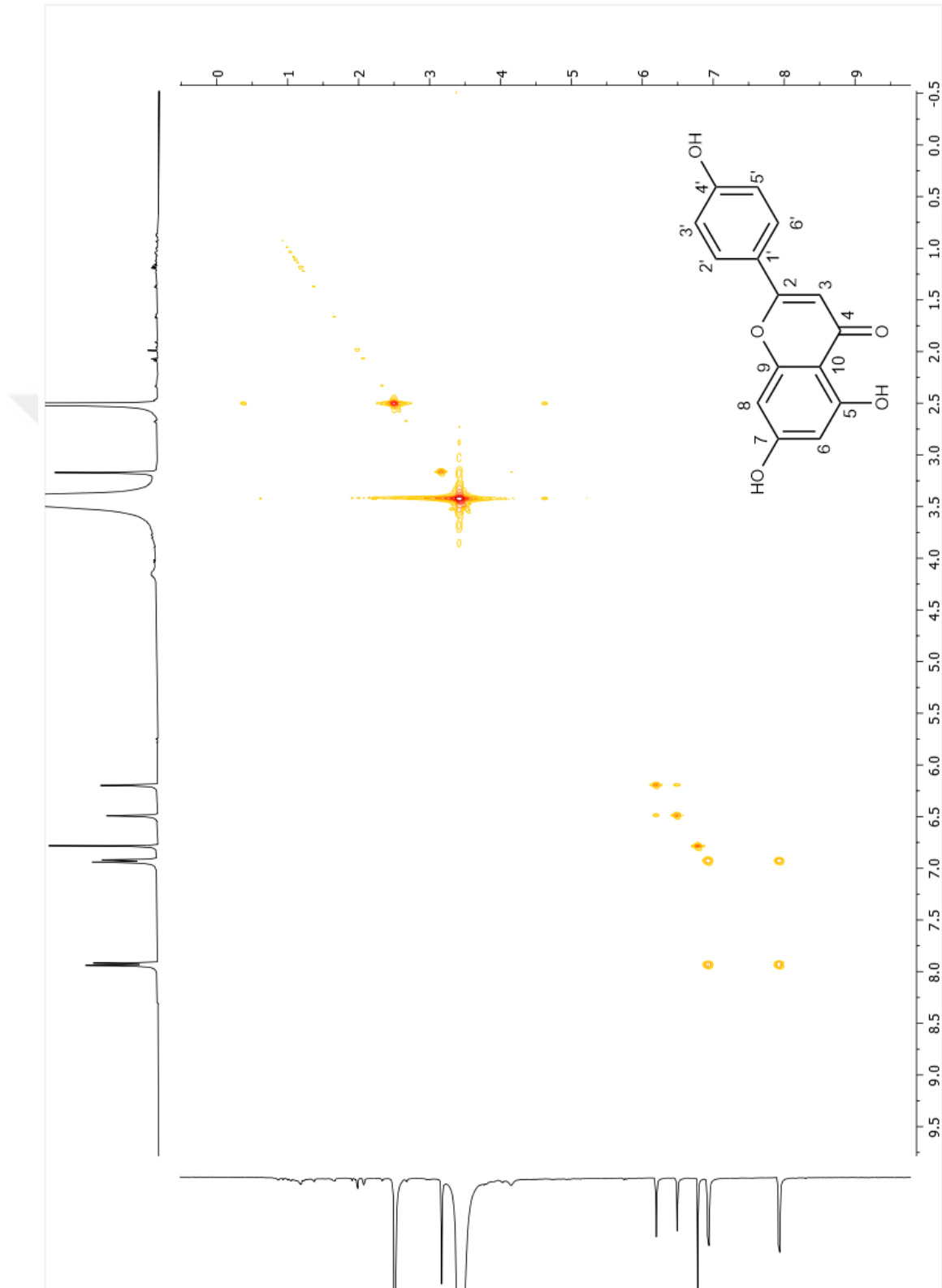
Ek-26. Apigenin (Apigenin, S-6) bileşığının DEPT spektrumu



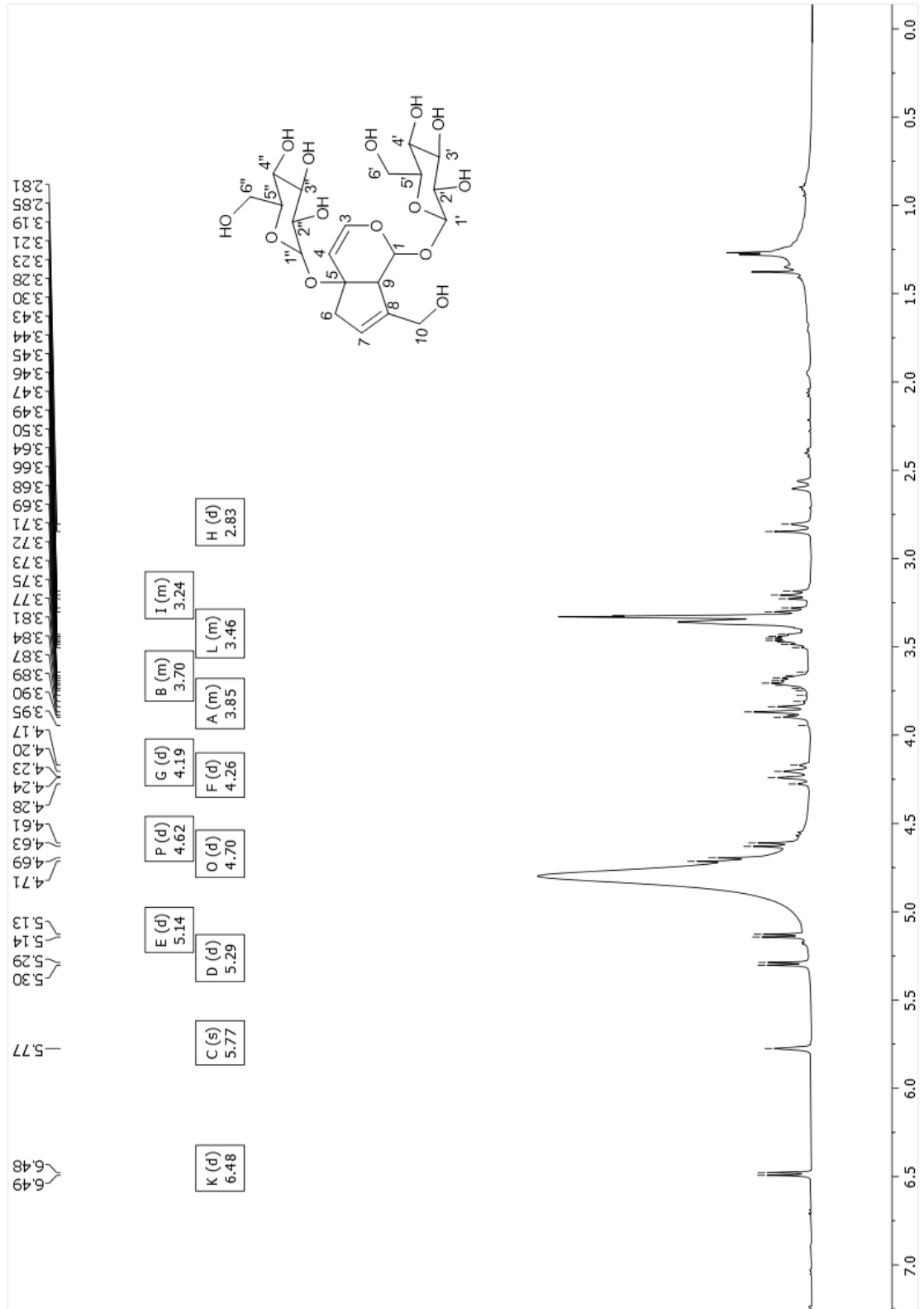
Ek-27. Apigenin (Apigenin, S-6) bileşığının HETCOR spektrumu



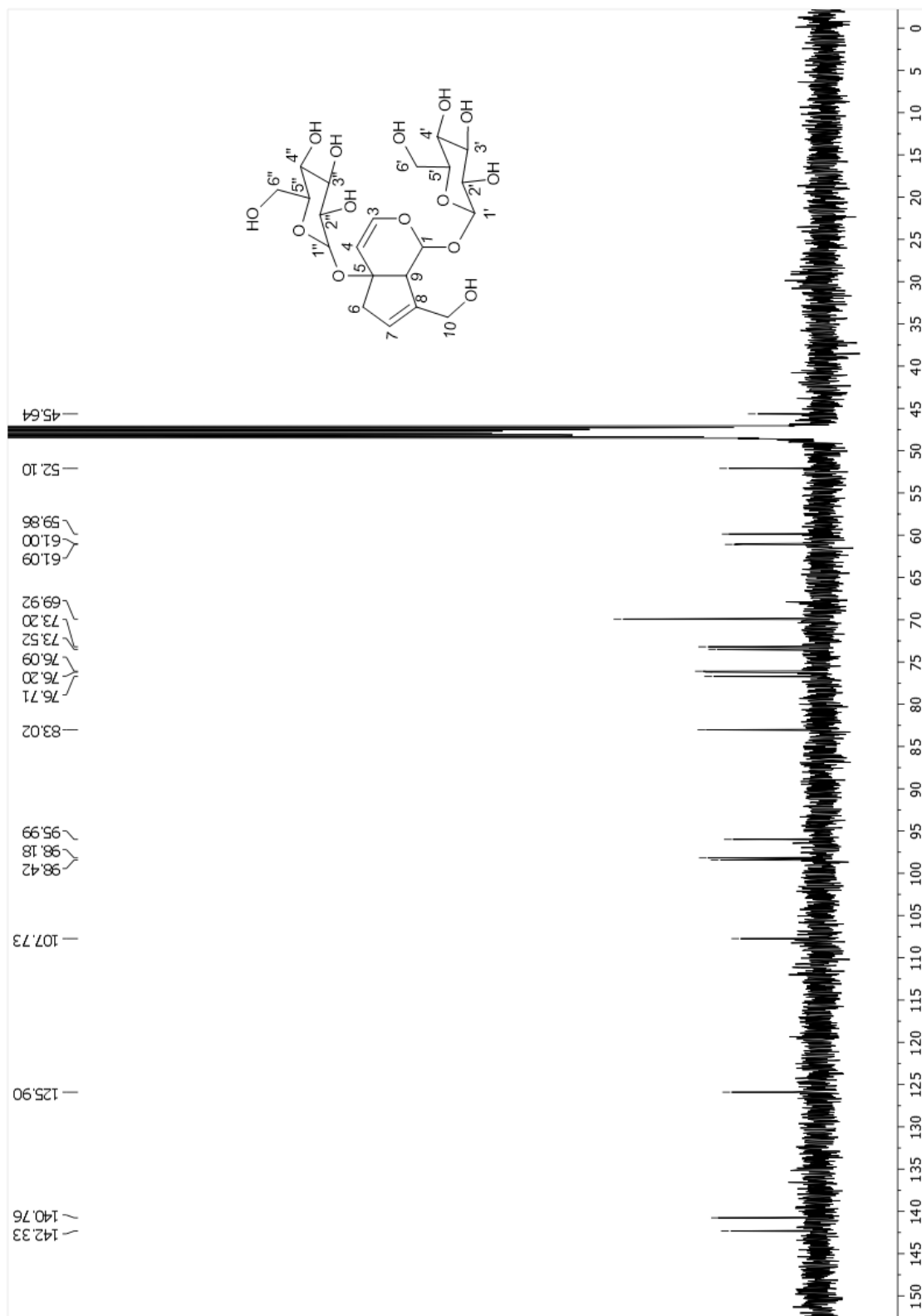
Ek-28. Apigenin (Apigenin, S-6) bileşığının COSY spektrumu



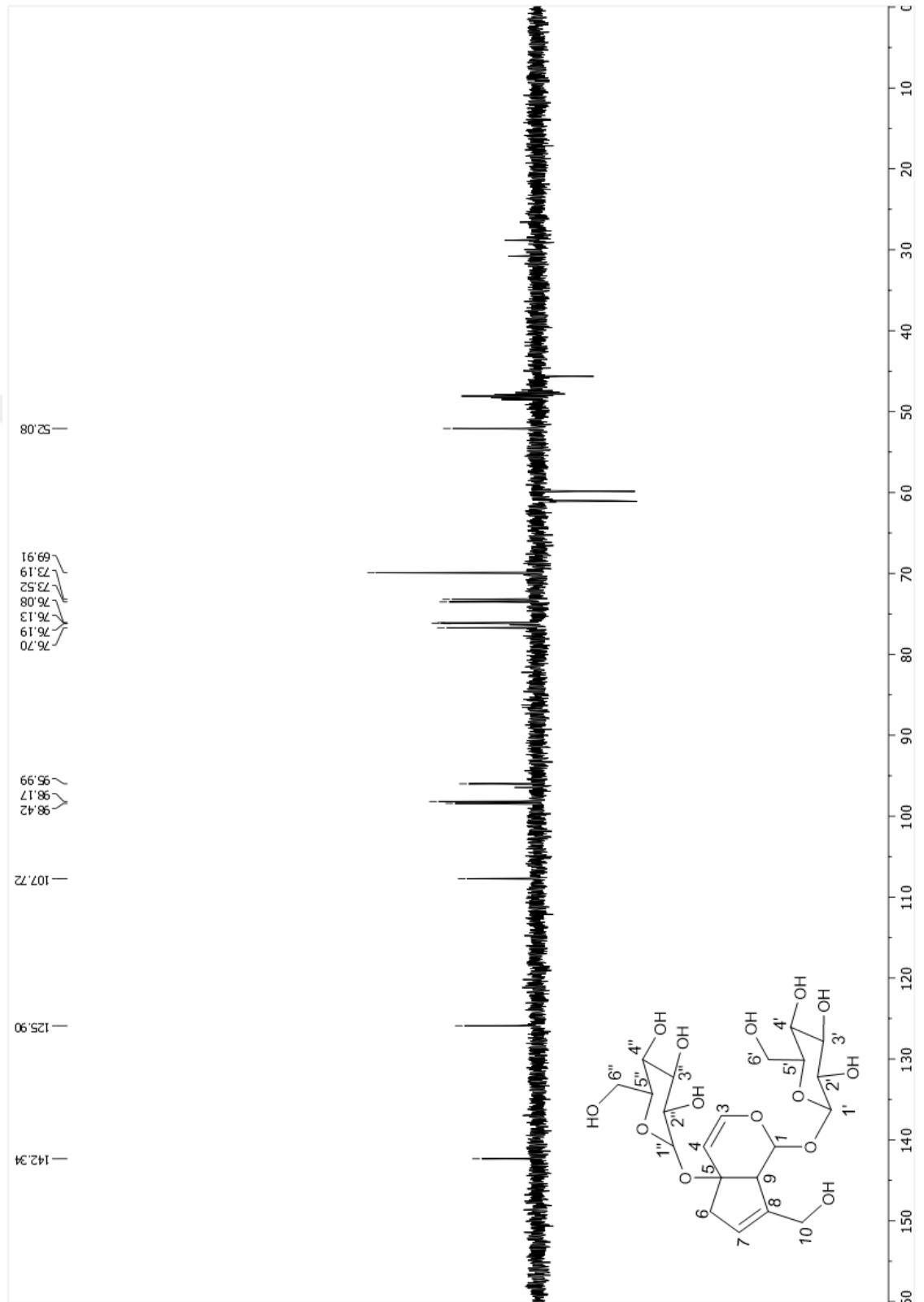
Ek-29. 6-Deoksi-melittozit (6-Deoxy-melittoside, S-7) bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu



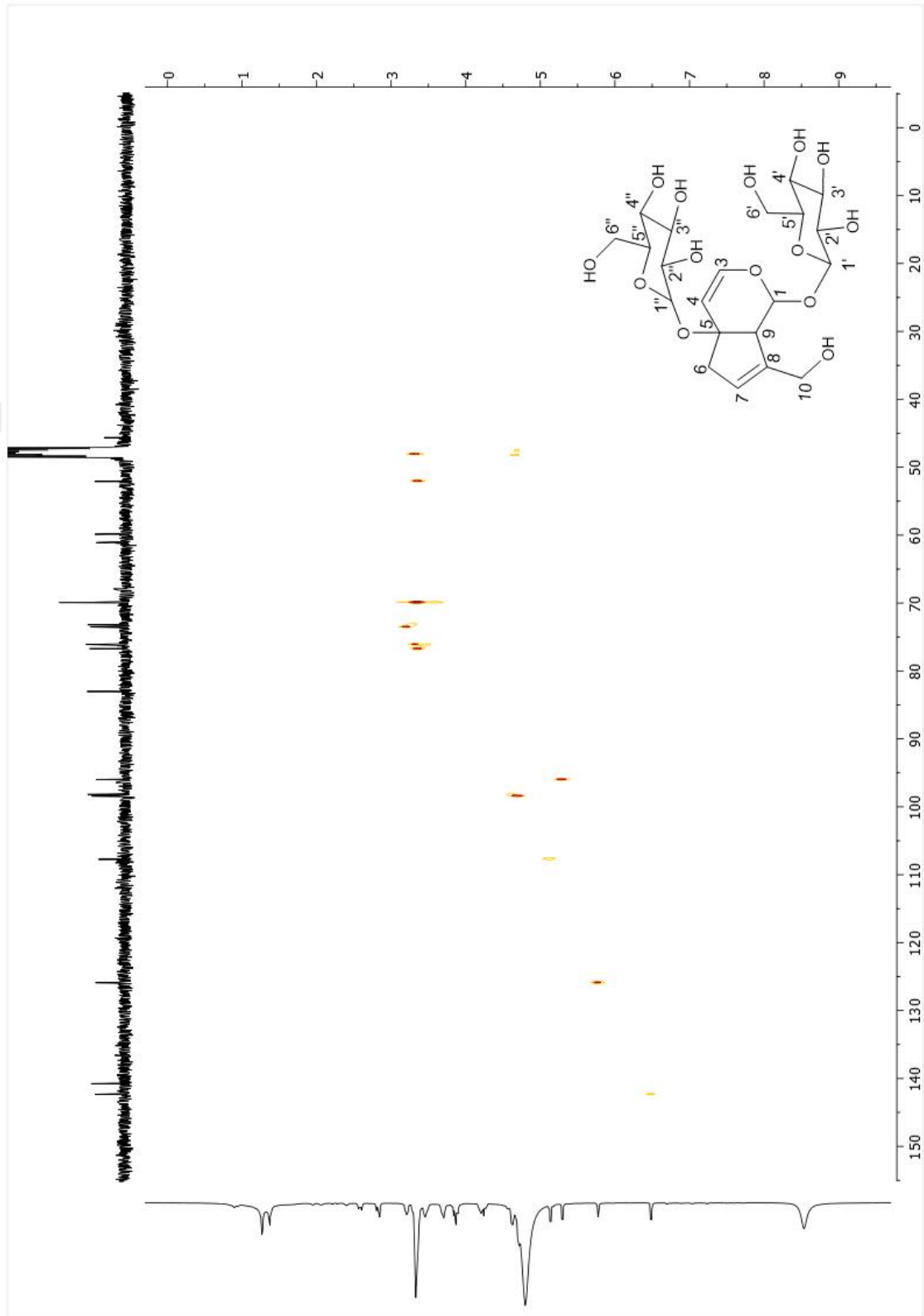
Ek-30. 6-Deoksi-melittozit (6-Deoxy-melittoside, S-7) bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu



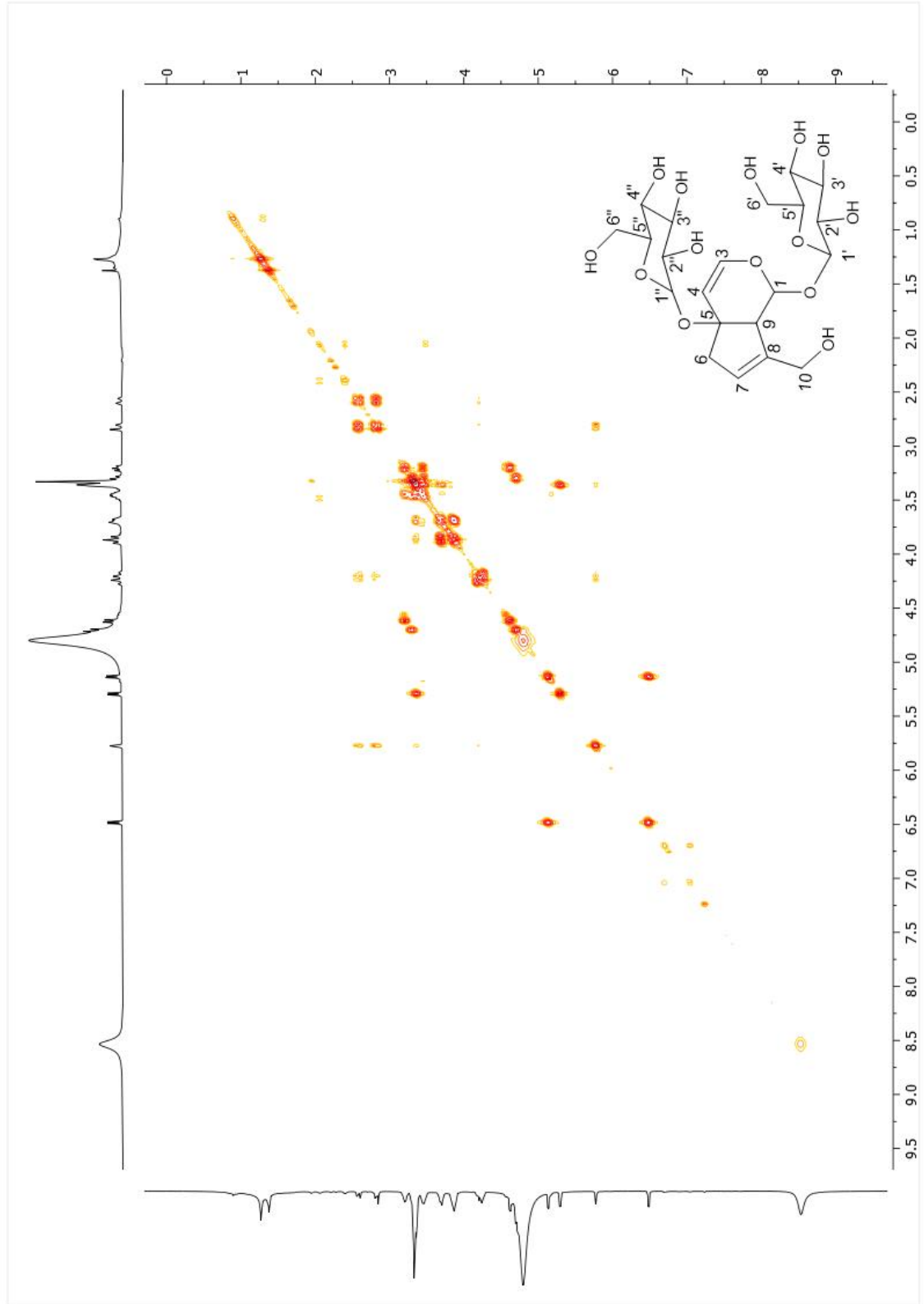
Ek-31. 6-Deoksi-melittozit (6-Deoxy-melittoside, S-7) bileşiğinin DEPT spektrumu



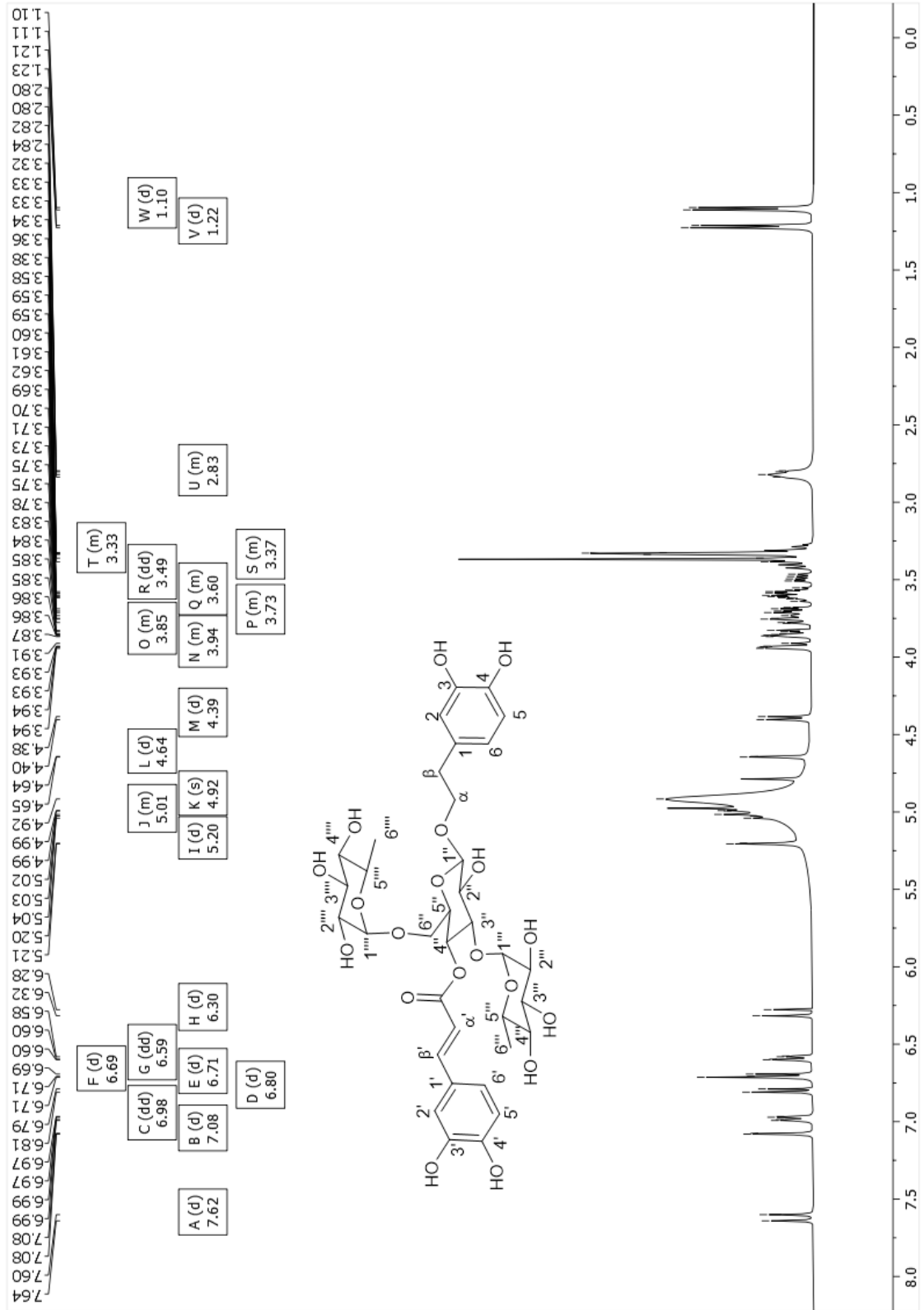
Ek-32. 6-Deoksi-melittozit (6-Deoxy-melittoside, S-7) bileşiğinin HETCOR spektrumu



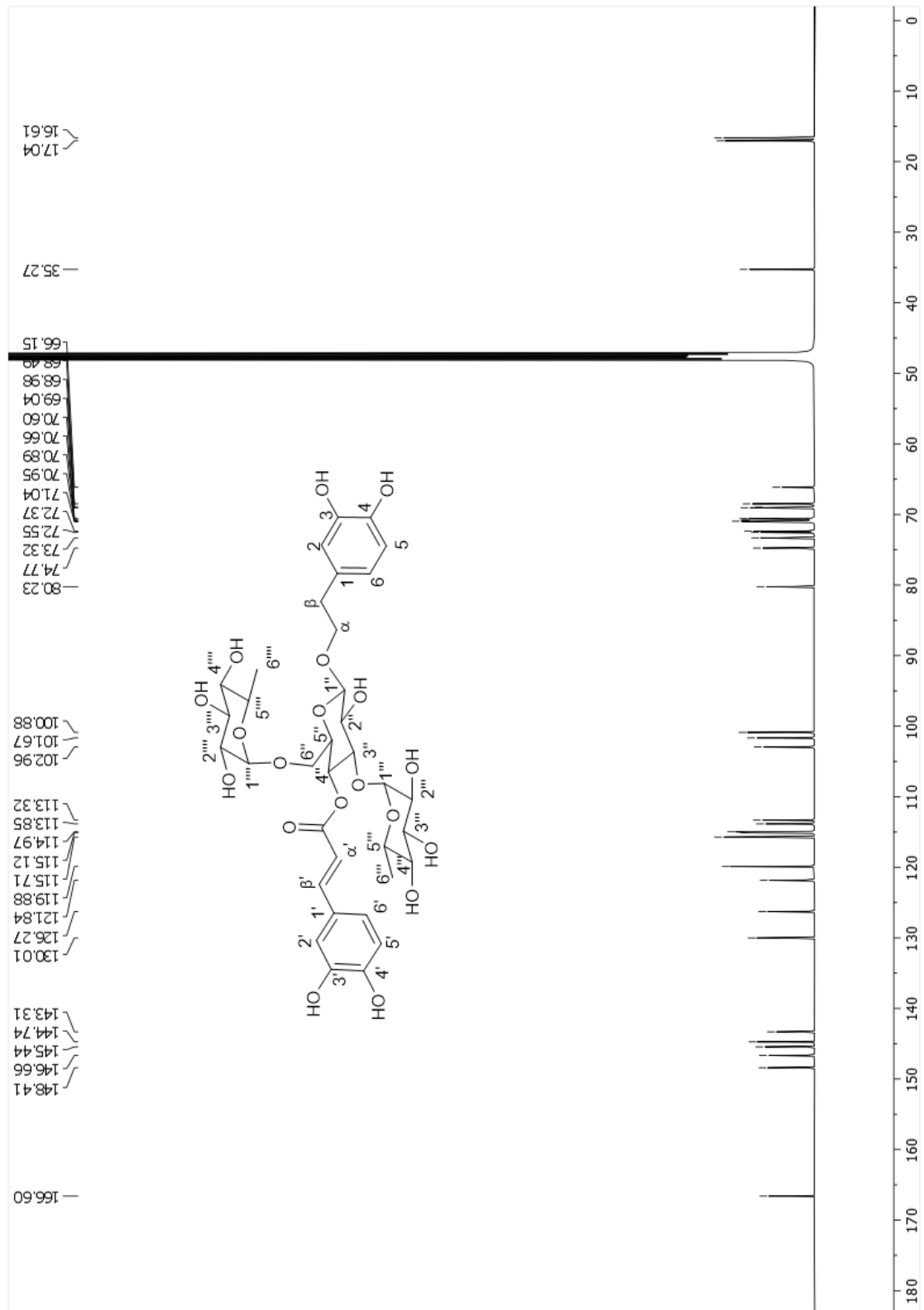
Ek-33. 6-Deoksi-melittozit (6-Deoxy-melittoside, S-7) bileşığının COSY spektrumu



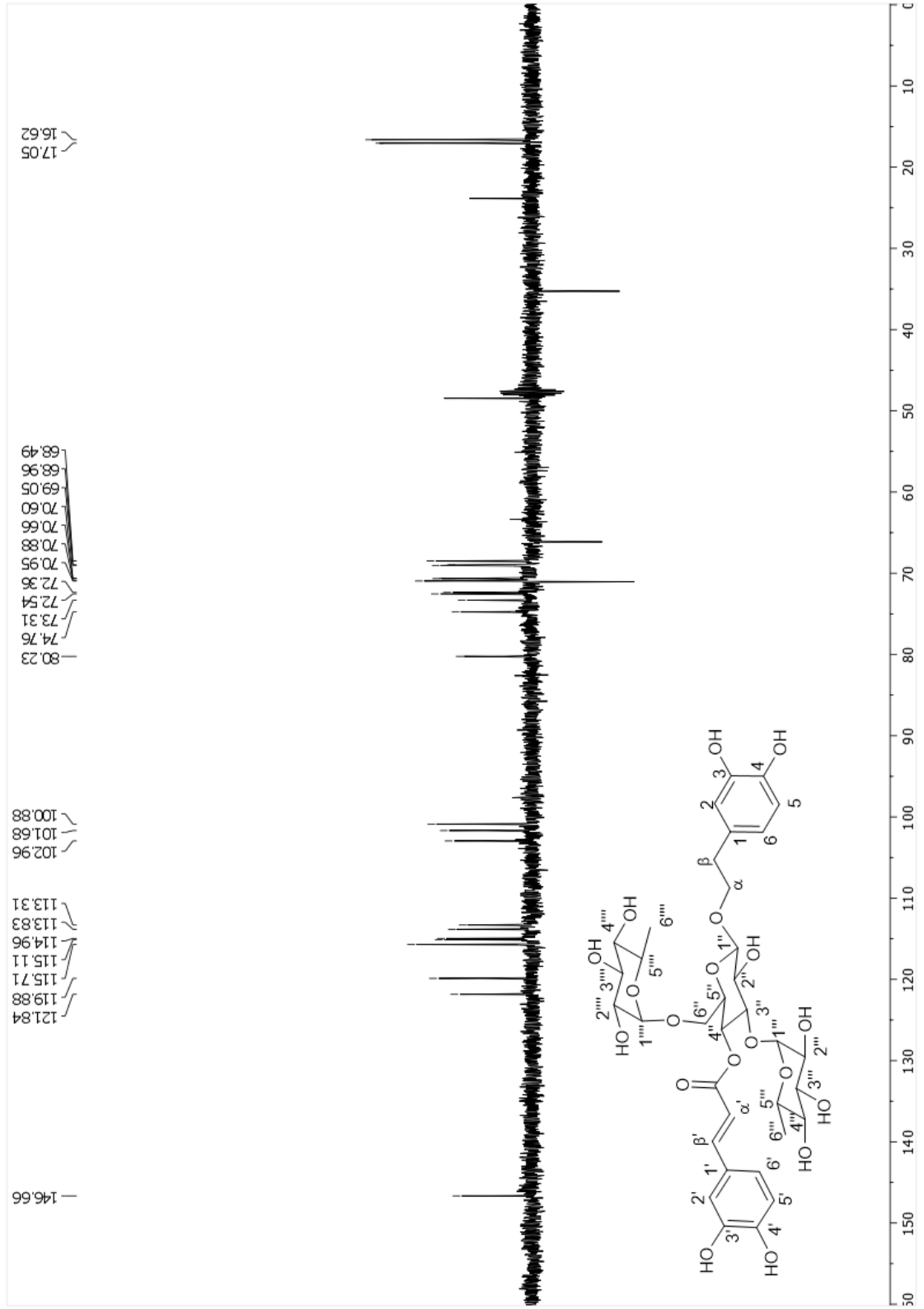
Ek-34. Poliumozit (Poliumoside, S-8) bileşığının ^1H -NMR spektrumu



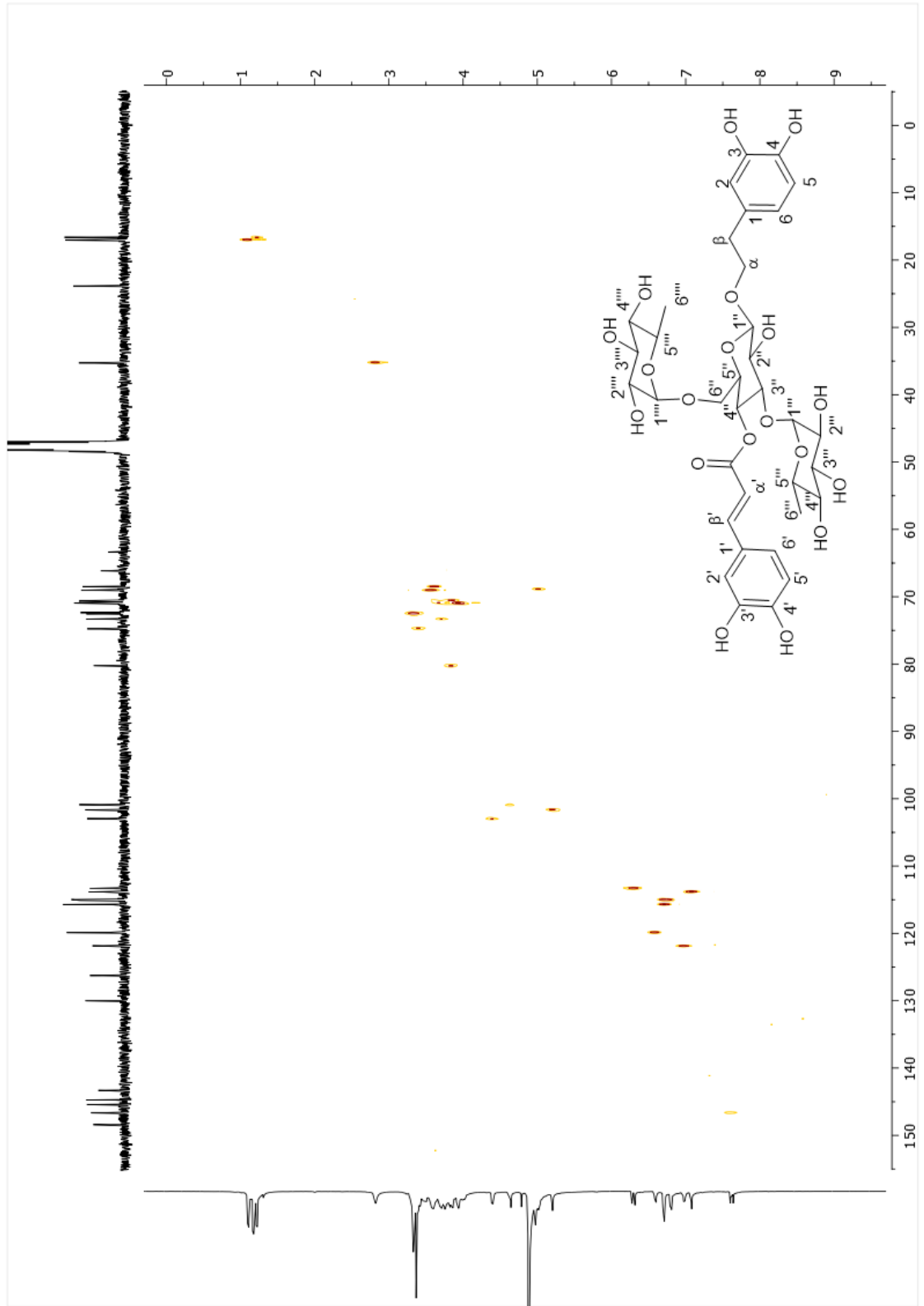
Ek-35. Poliumozit (Poliumoside, S-8) bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu



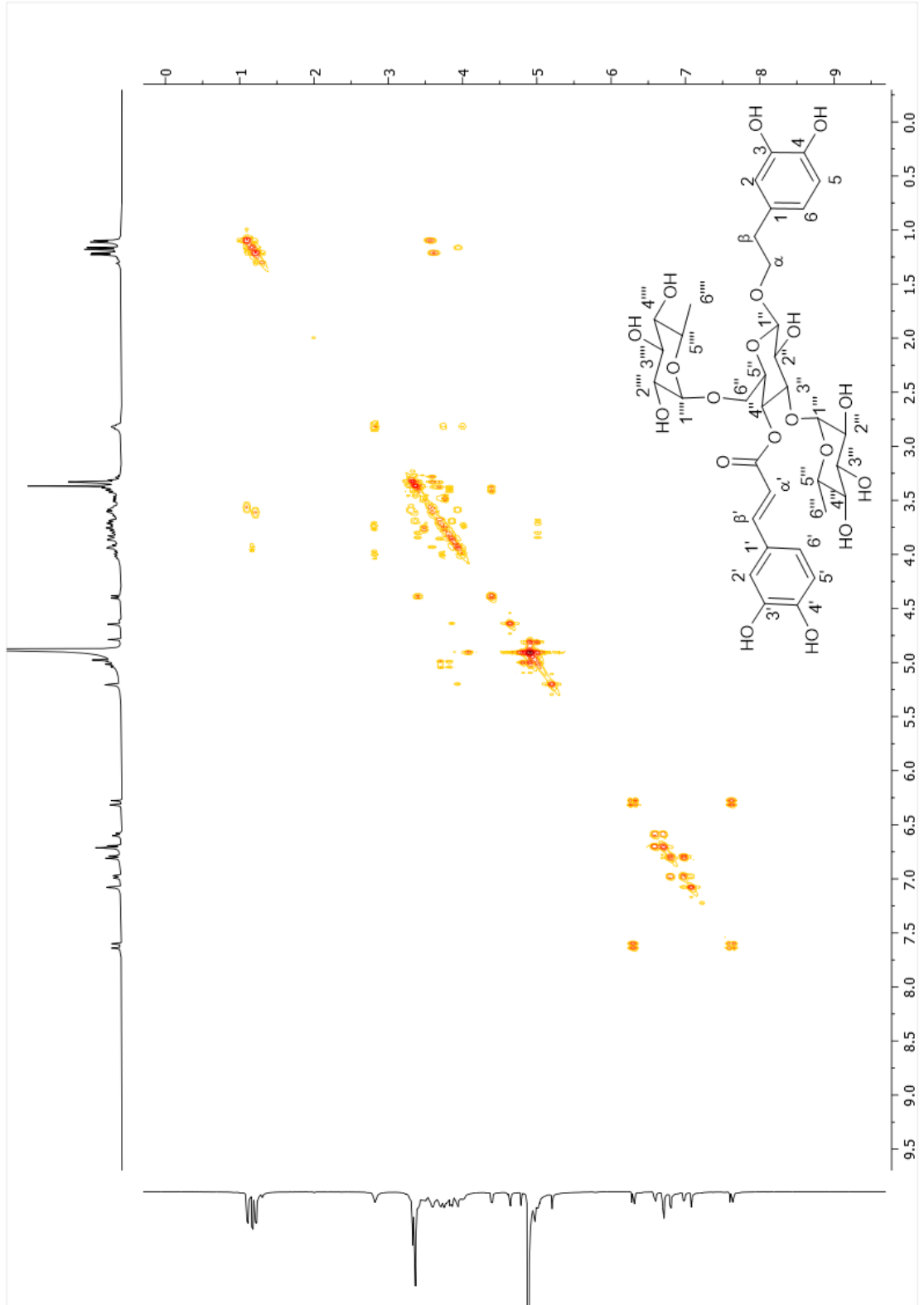
Ek-36. Poliumozit (Poliumoside, S-8) bileşiğinin DEPT spektrumu



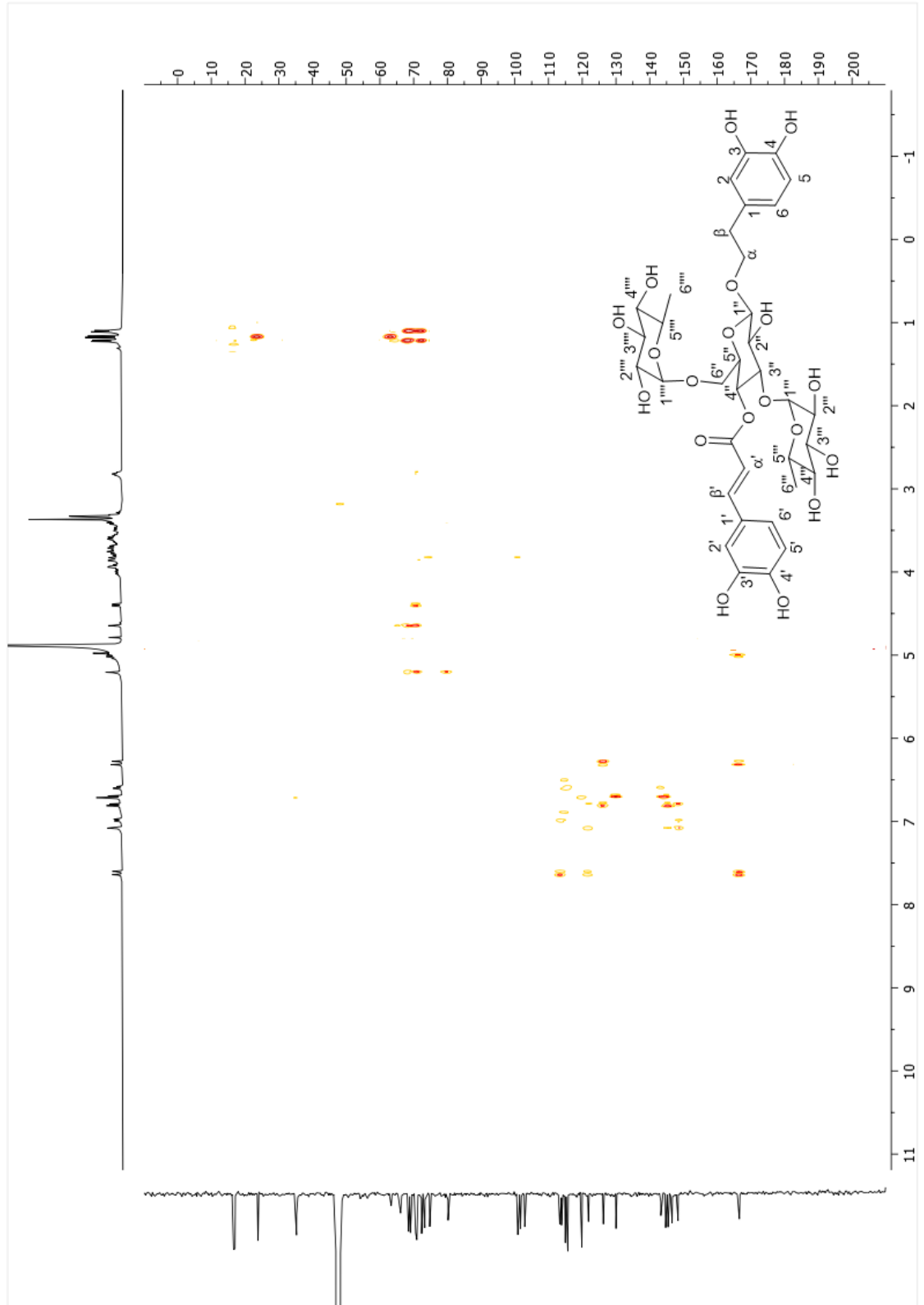
Ek-37. Poliumozit (Poliumoside, S-8) bileşığının HETCOR spektrumu



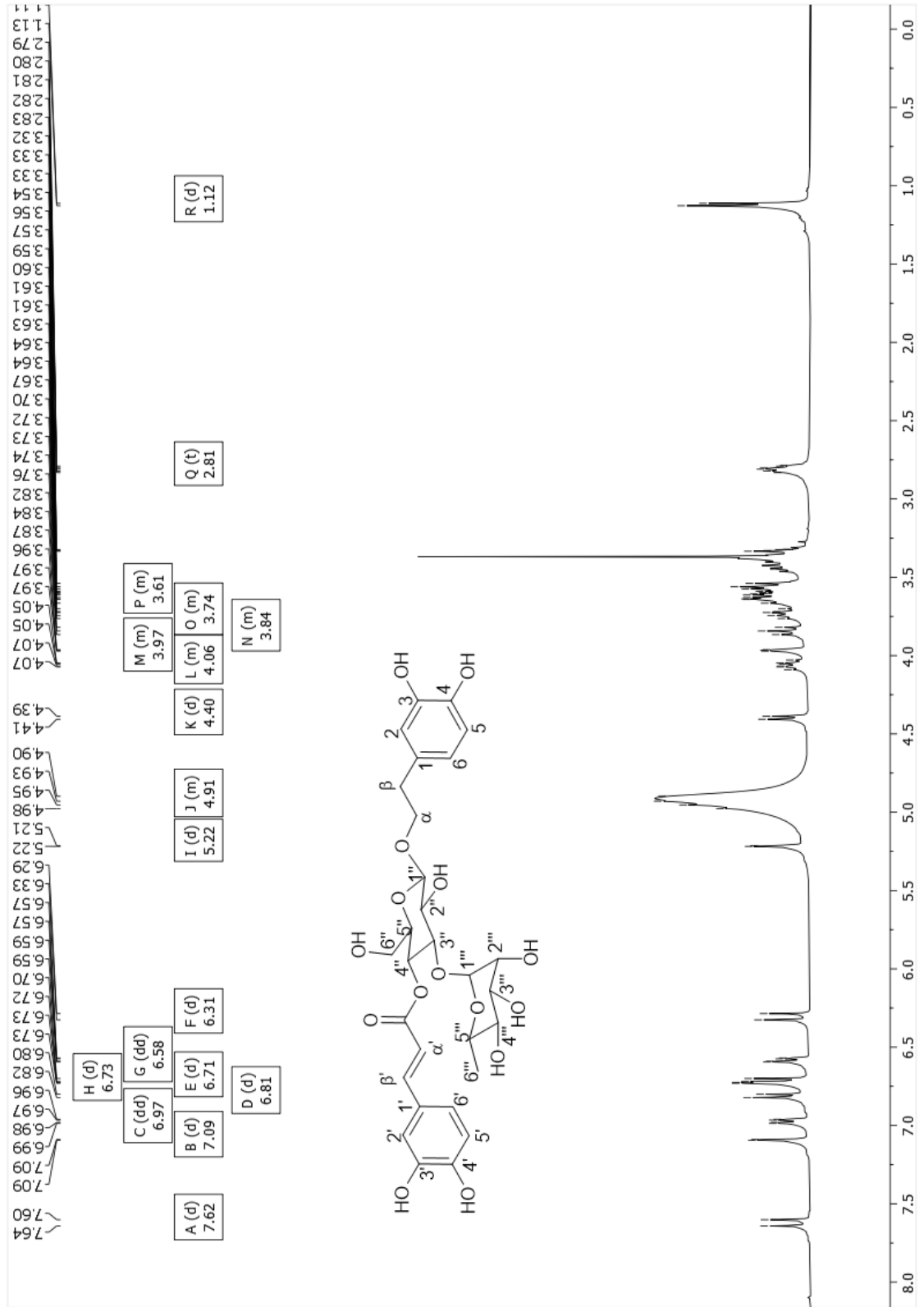
Ek-38. Poliumozit (Poliumoside, S-8) bileşiğinin COSYspektrumu



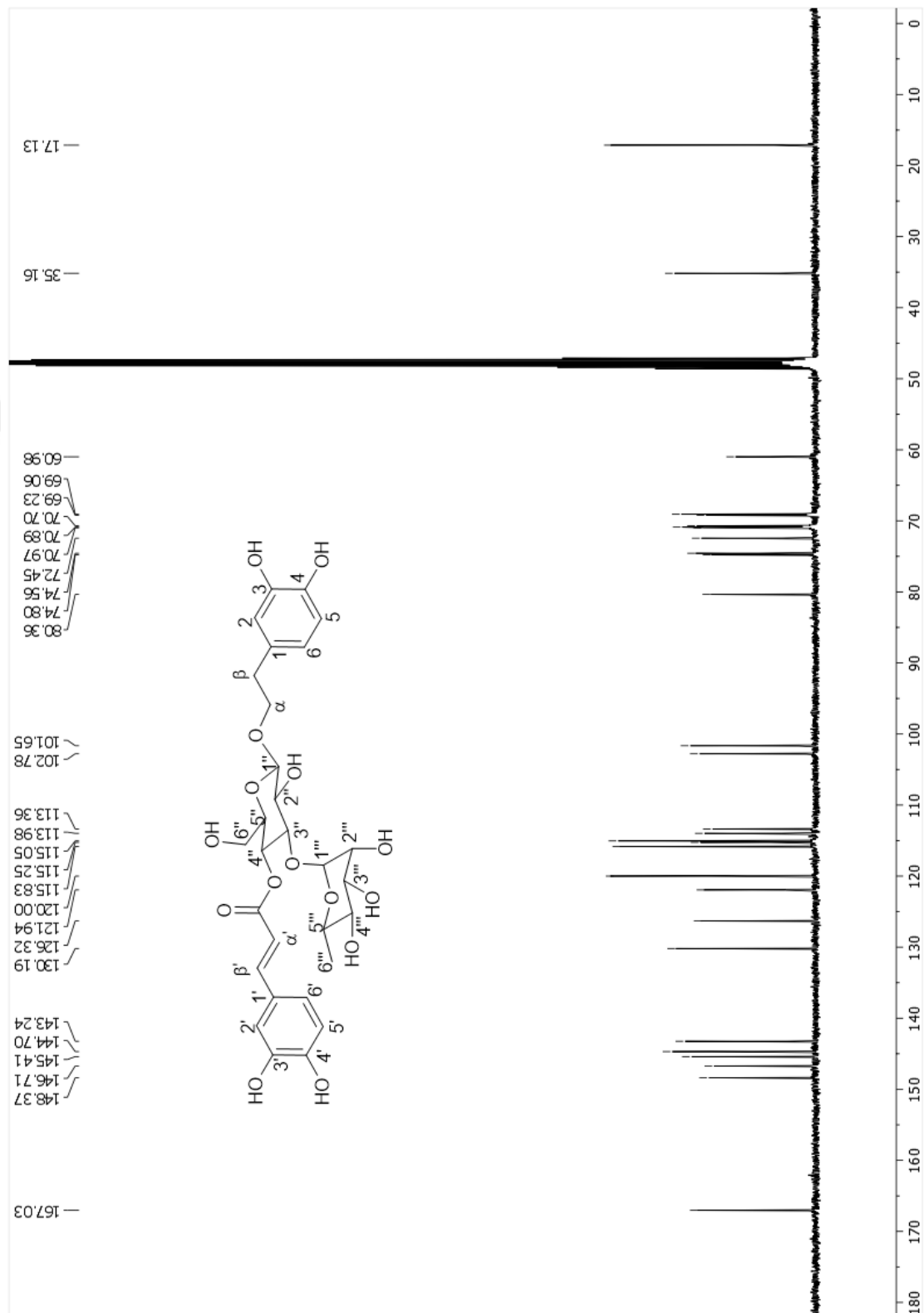
Ek-39. Poliumozit (Poliumoside, S-8) bileşiğinin HMBC spektrumu



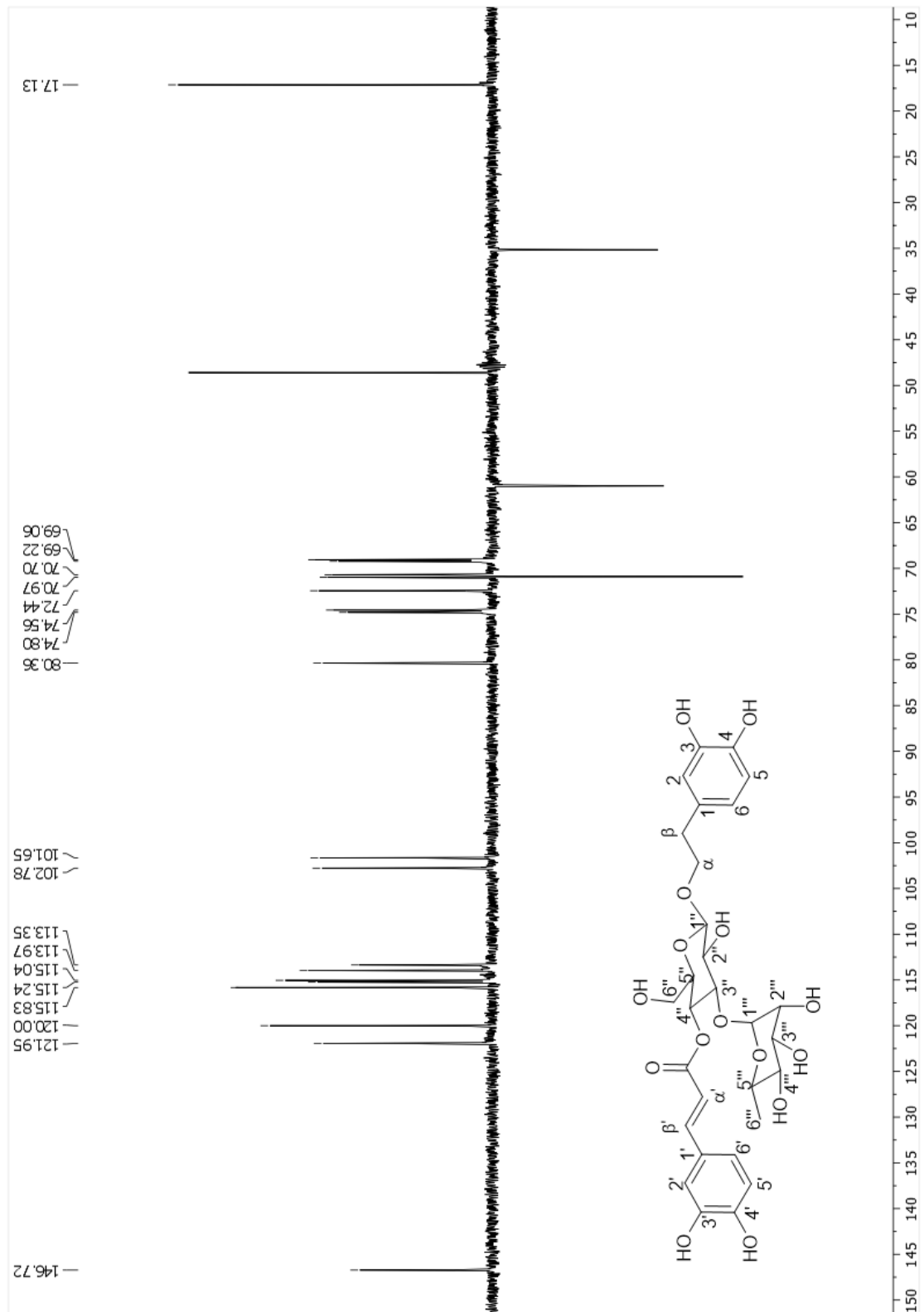
Ek-40. Verbaskozit (Verbascoside, S-9) bileşığının $^1\text{H-NMR}$ spektrumu



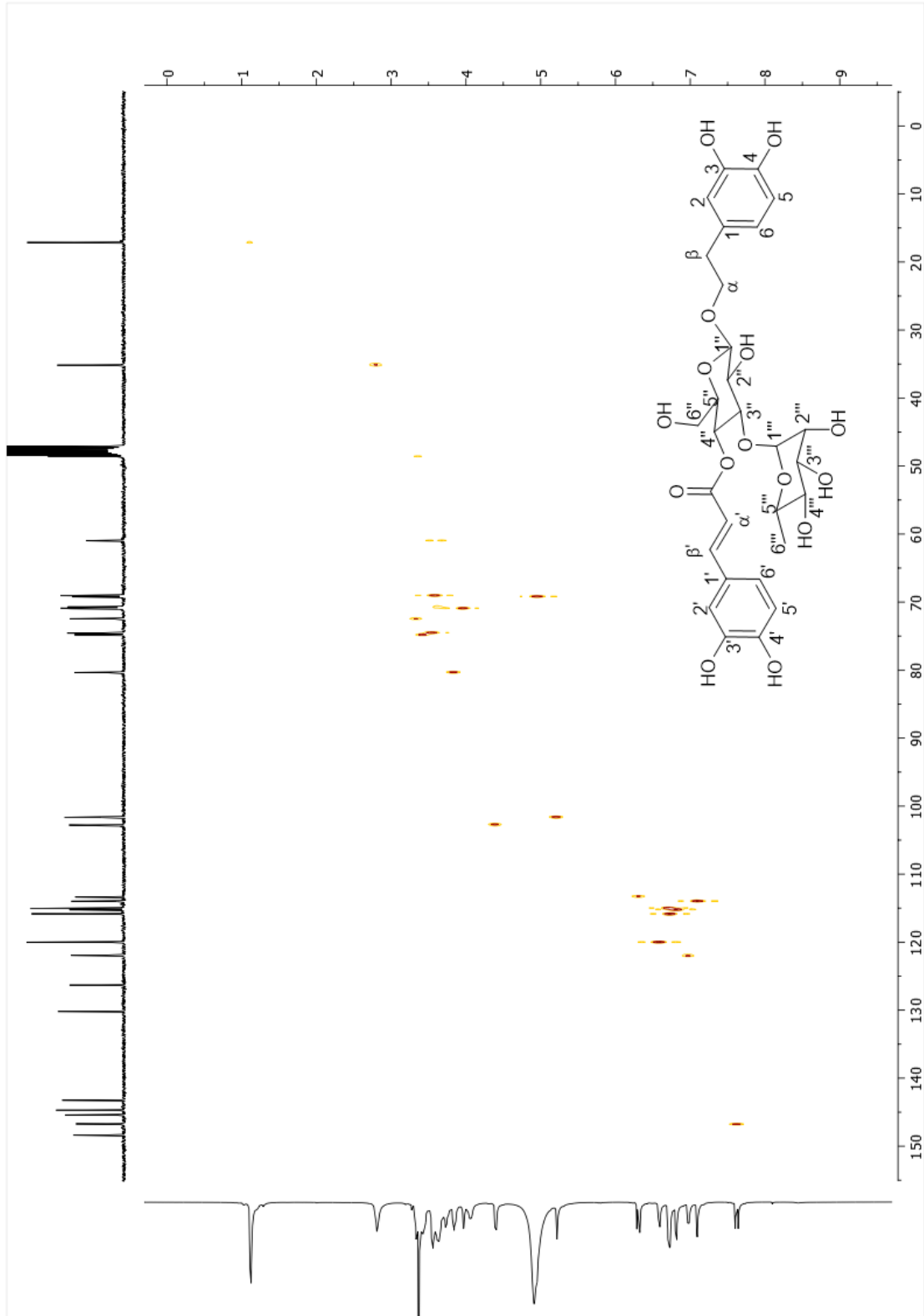
Ek-41. Verbaskozit (Verbascoside, S-9) bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu



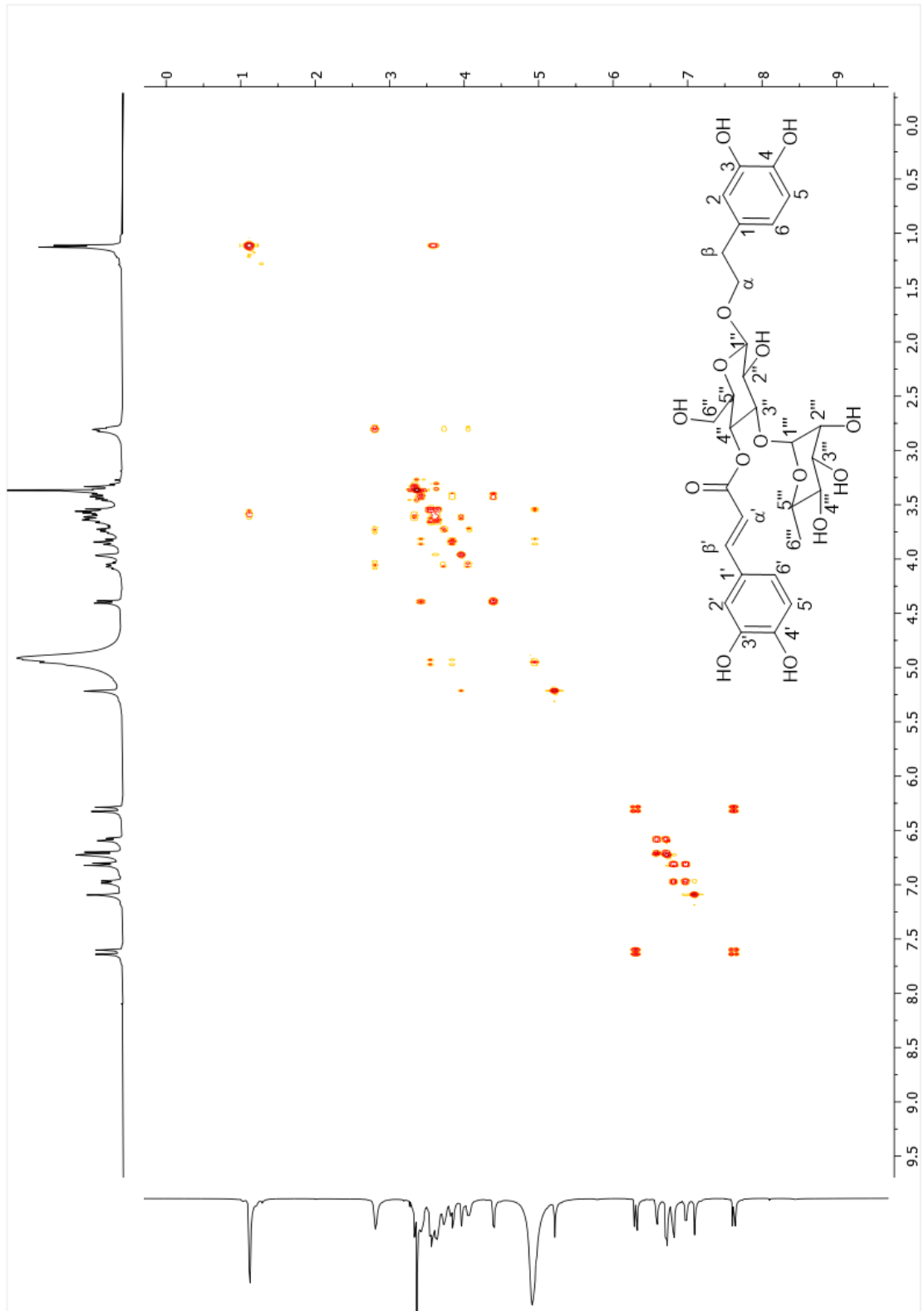
Ek-42. Verbaskozit (Verbascoside, S-9) bileşiğinin DEPT spektrumu



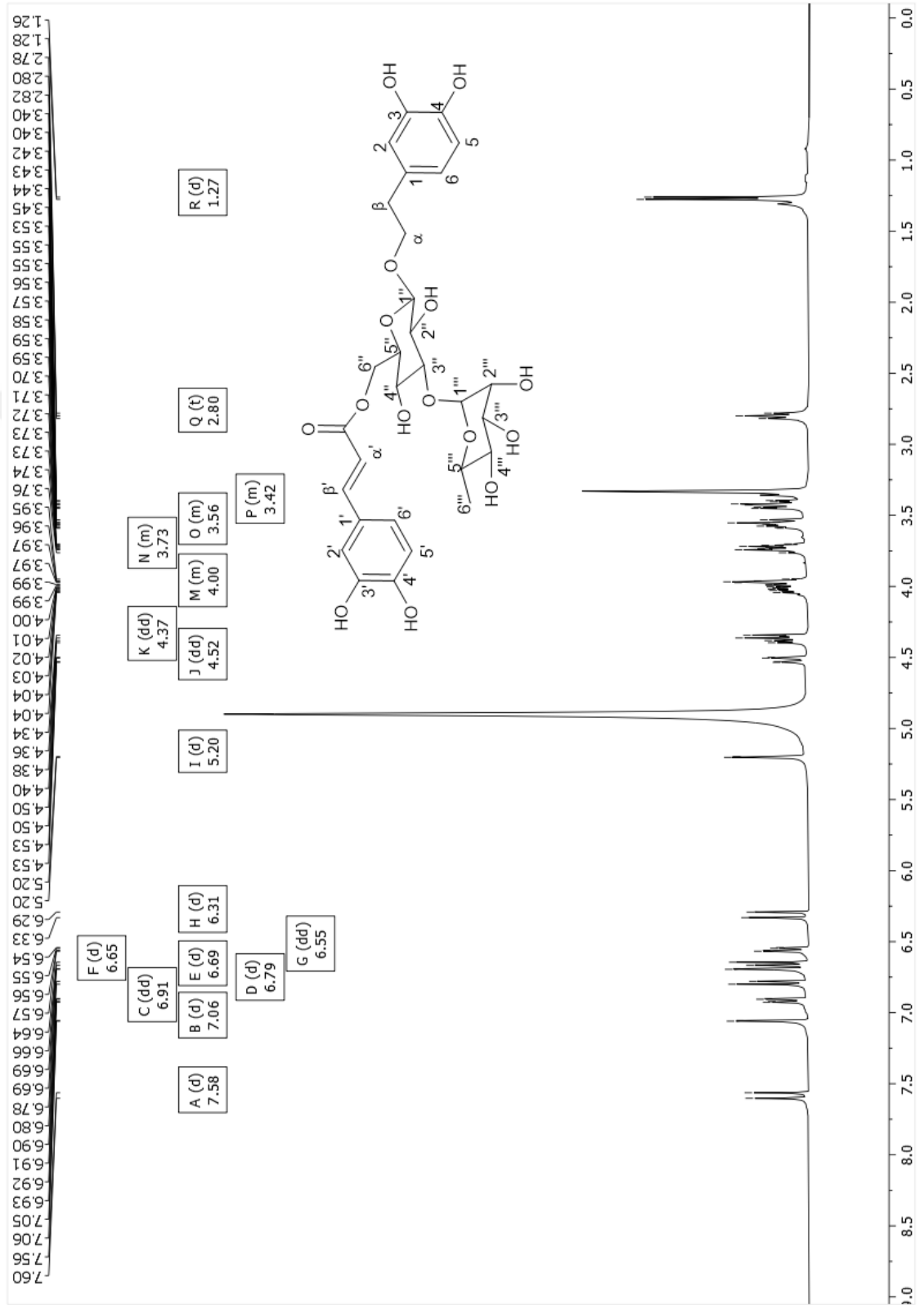
Ek-43. Verbaskozit (Verbascoside, S-9) bileşiğinin HETCOR spektrumu



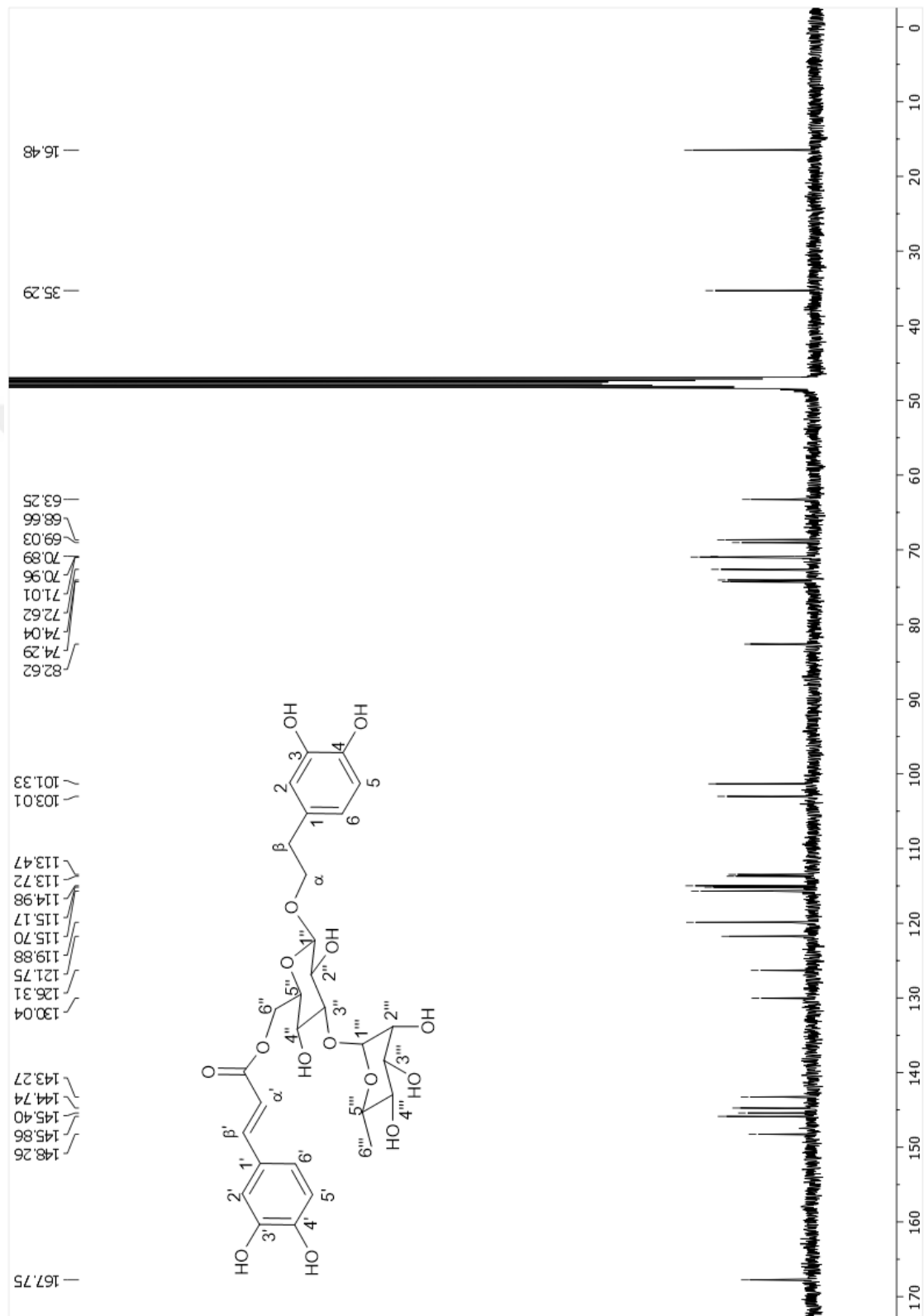
Ek-44. Verbaskozit (Verbascoside, S-9) bileşiğinin COSY spektrumu



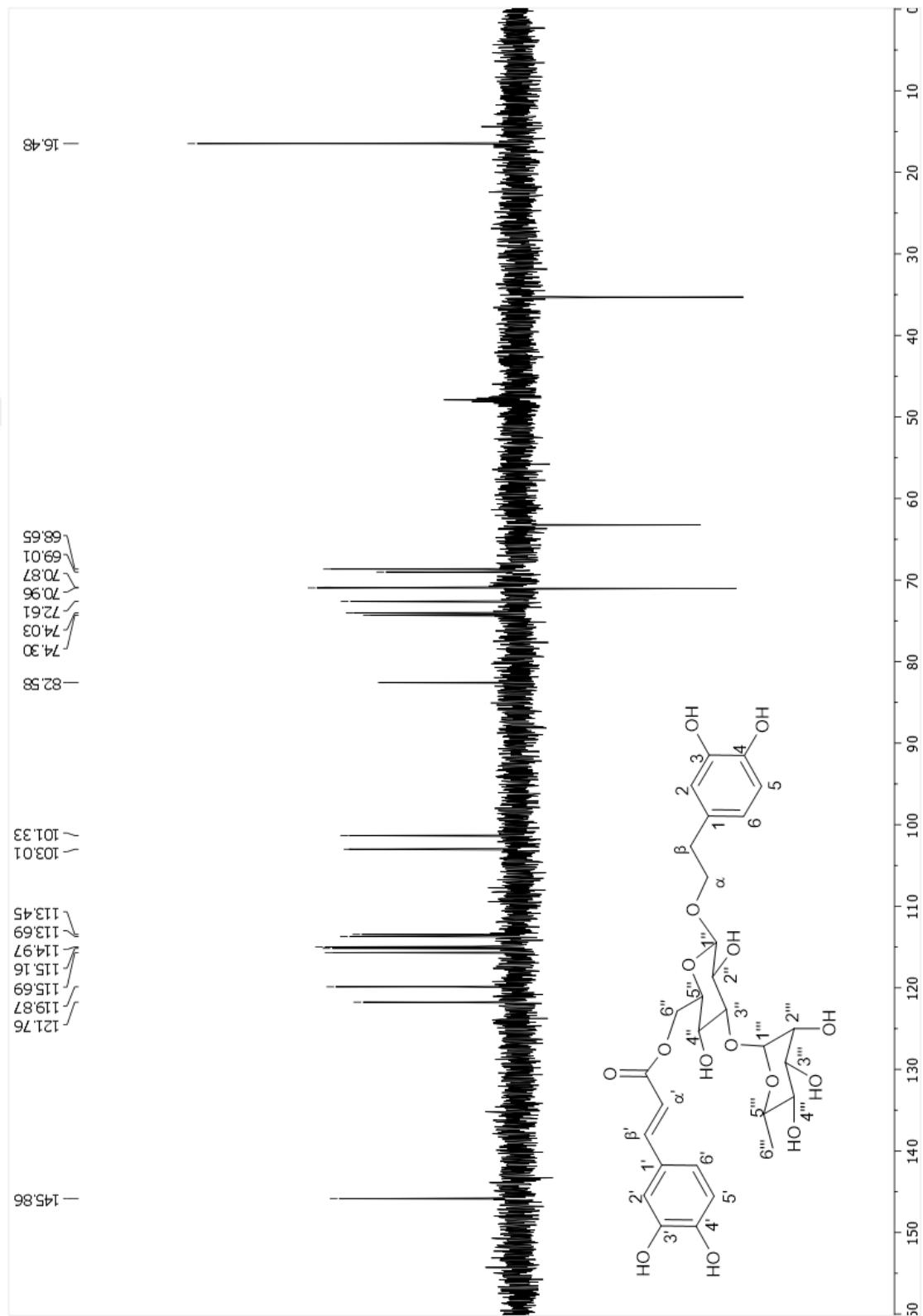
Ek-45. İzoverbaskozit (Izoverbascoside, S-10) bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu



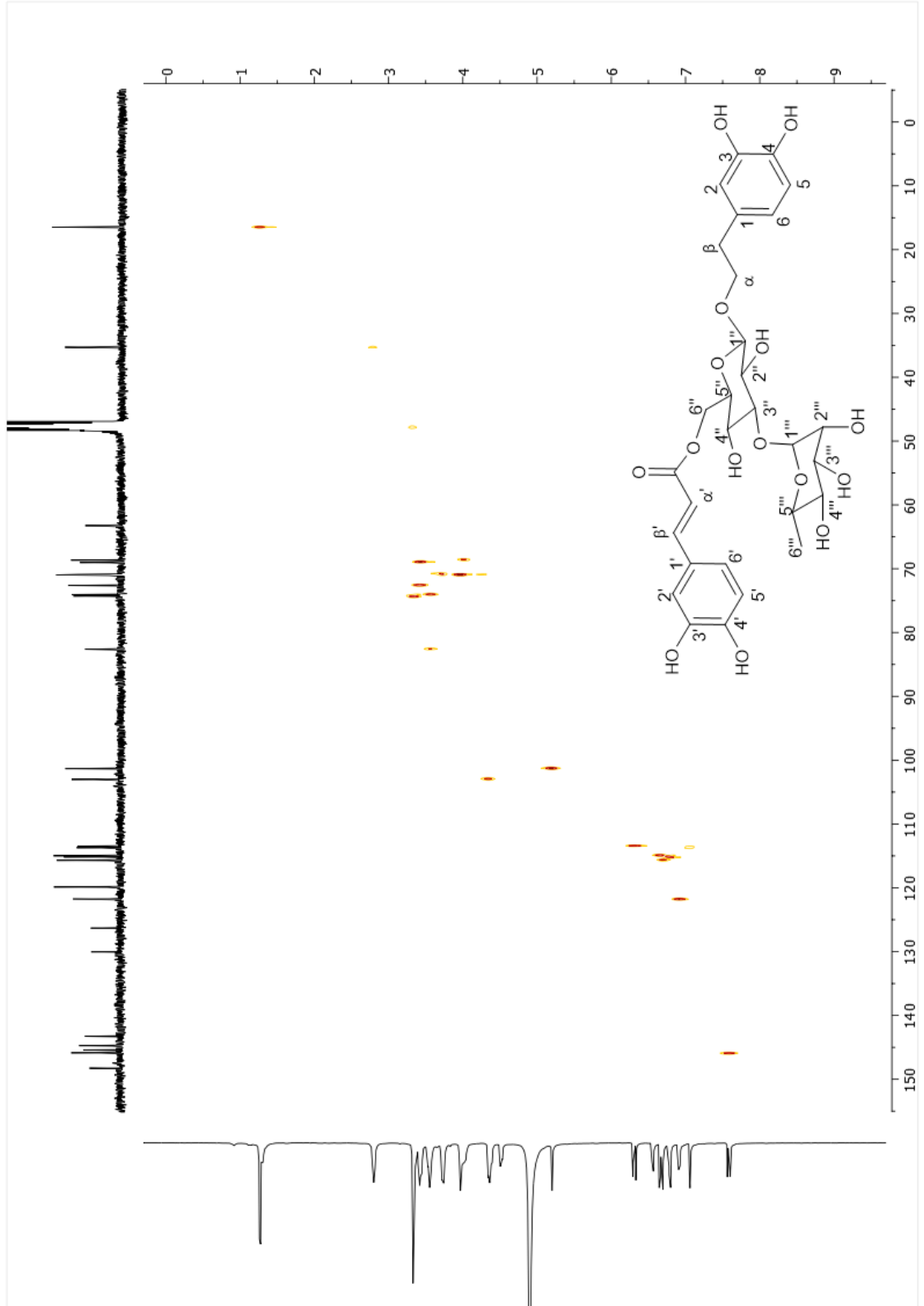
Ek-46. İzoverbaskozit (Izoverbascoside, S-10) bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu



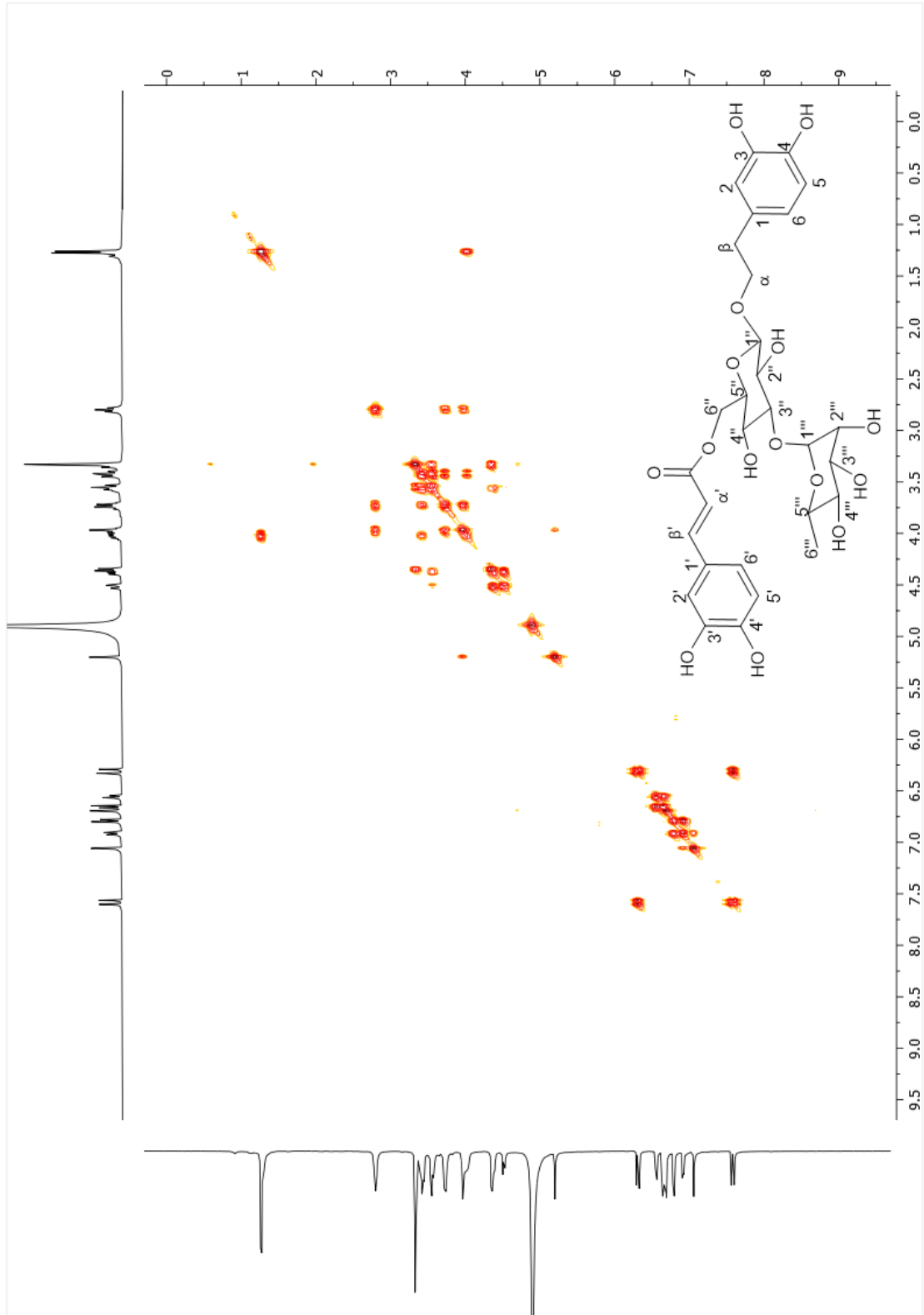
Ek-47. İzoverbaskozit (Izoverbascoside, S-10) bileşiğinin DEPT spektrumu



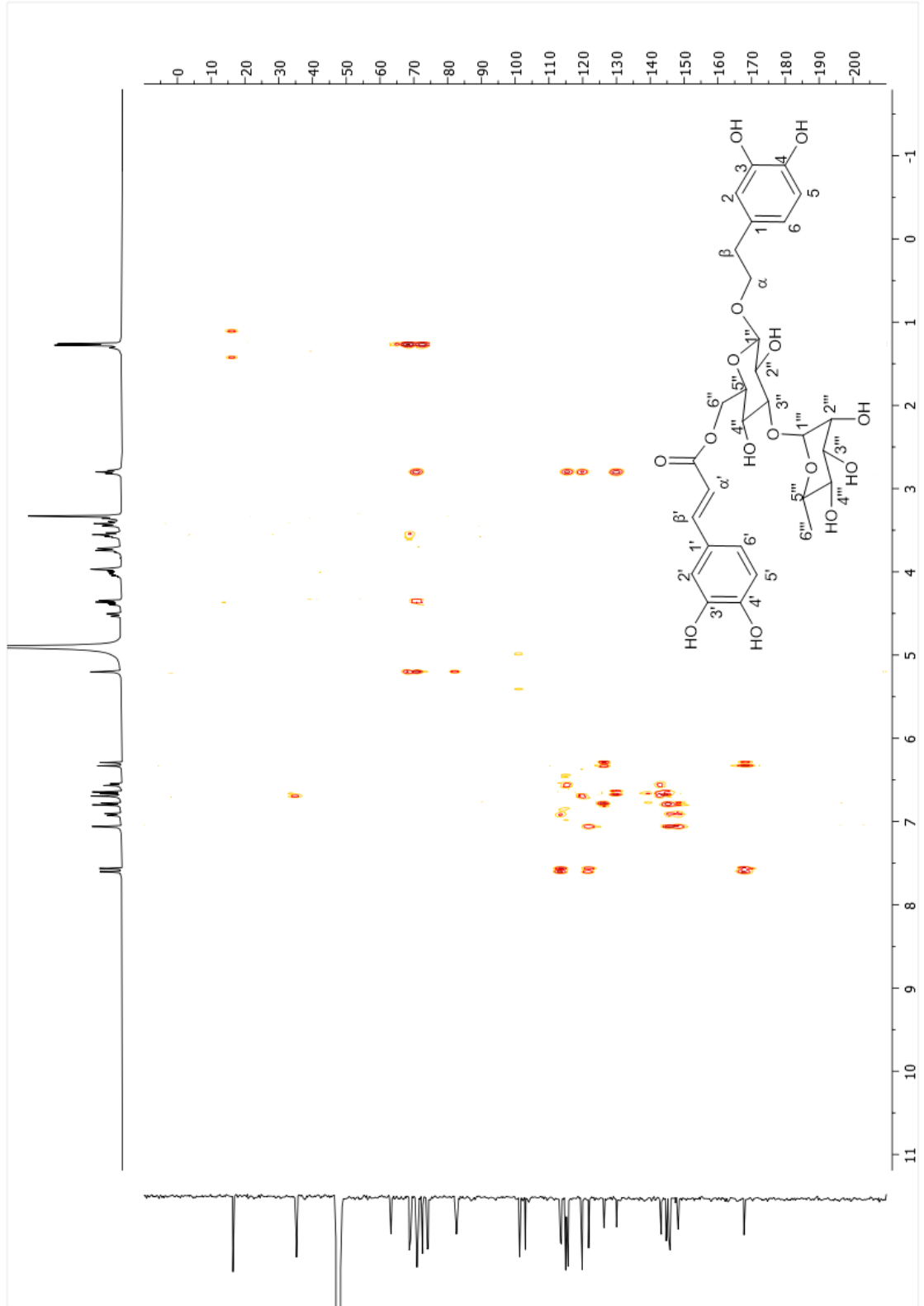
Ek-48. İzoverbaskozit (Izoverbascoside, S-10) bileşiğinin HETCOR spektrumu



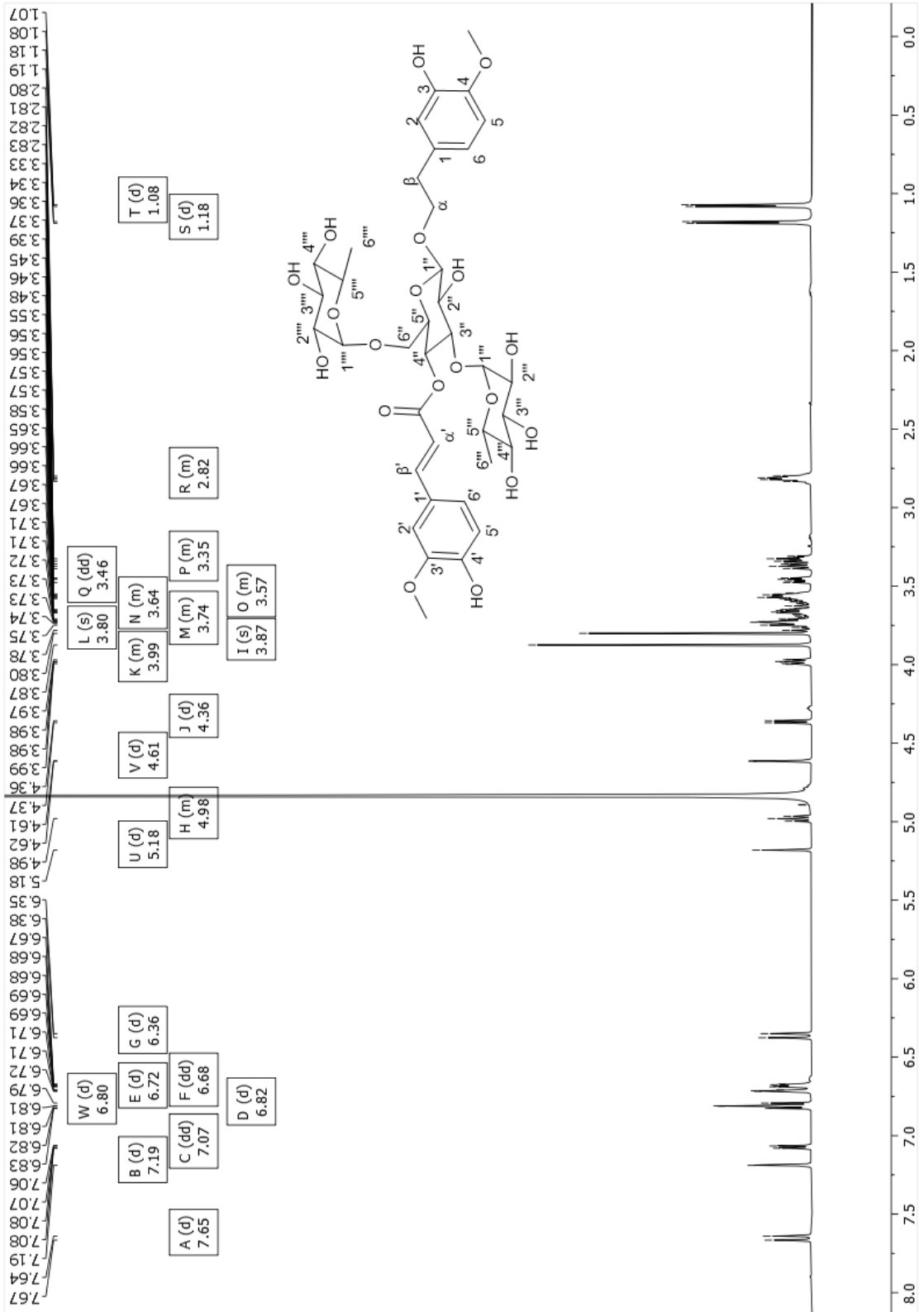
Ek-49. İzoverbaskozit (Izoverbascoside, S-10) bileşiğinin COSY spektrumu



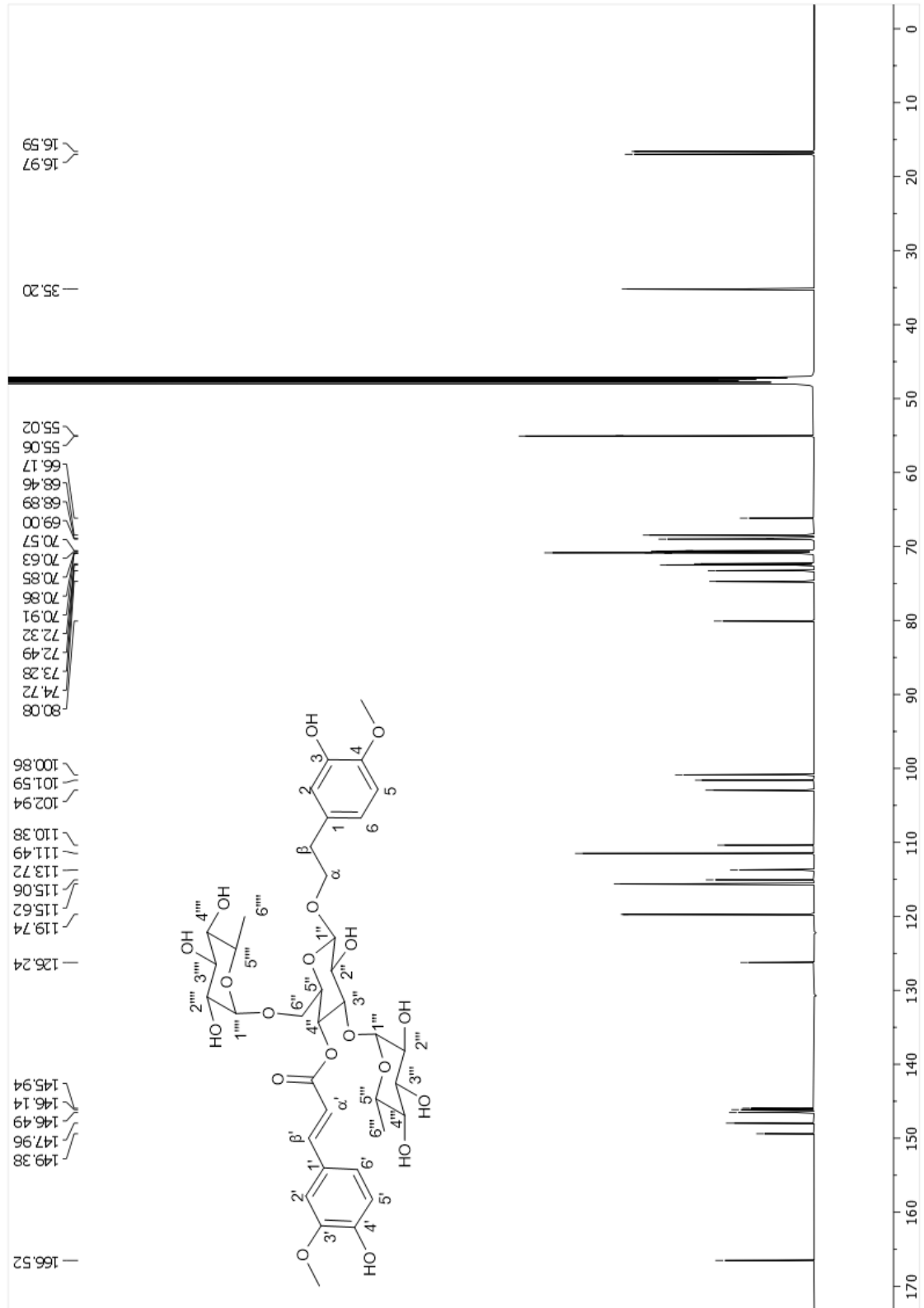
Ek-50. İzoverbaskozit (Izoverbascoside, S-10) bileşiğinin HMBC spektrumu



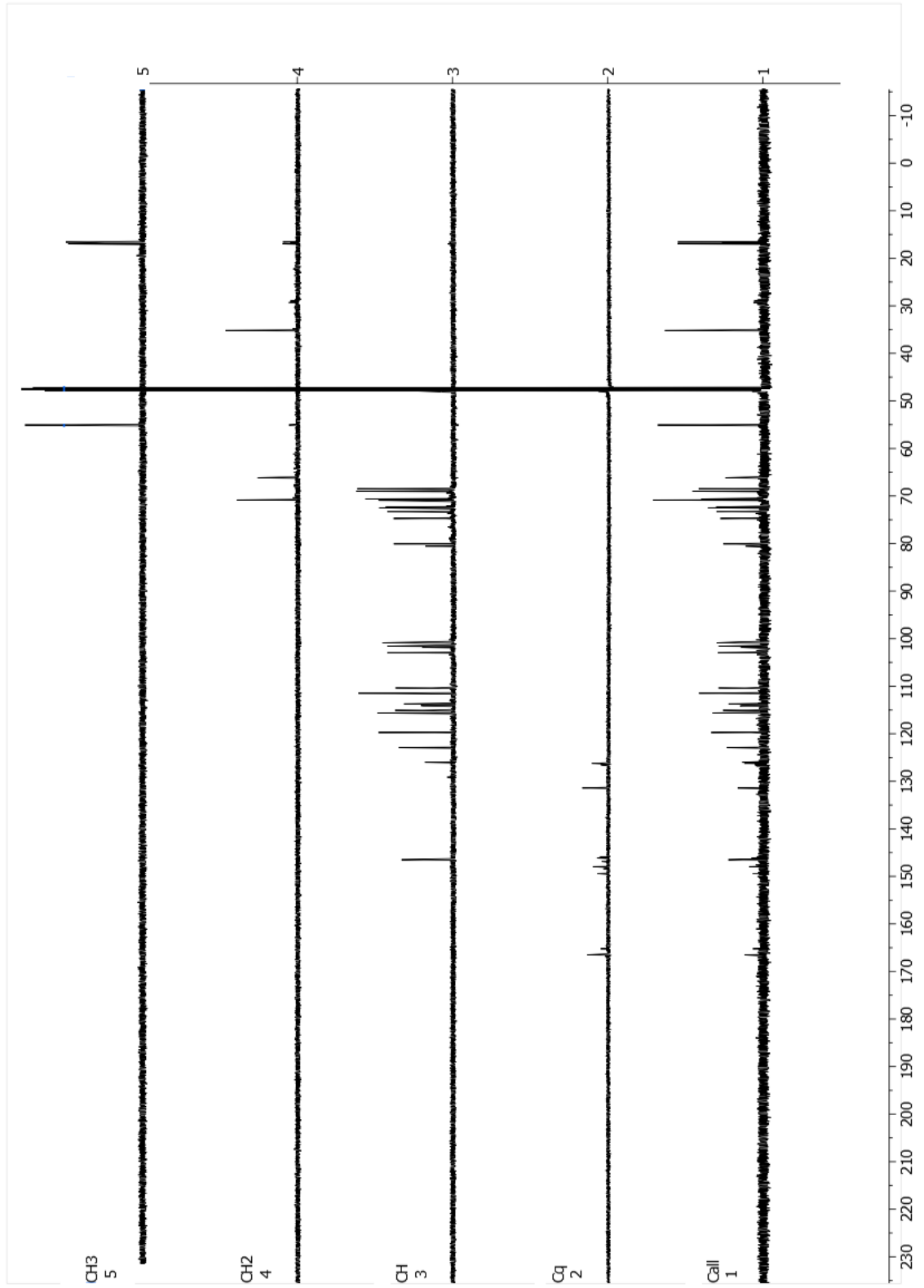
Ek-51. Ferruginozit C (Ferruginoside C, S-11) bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu



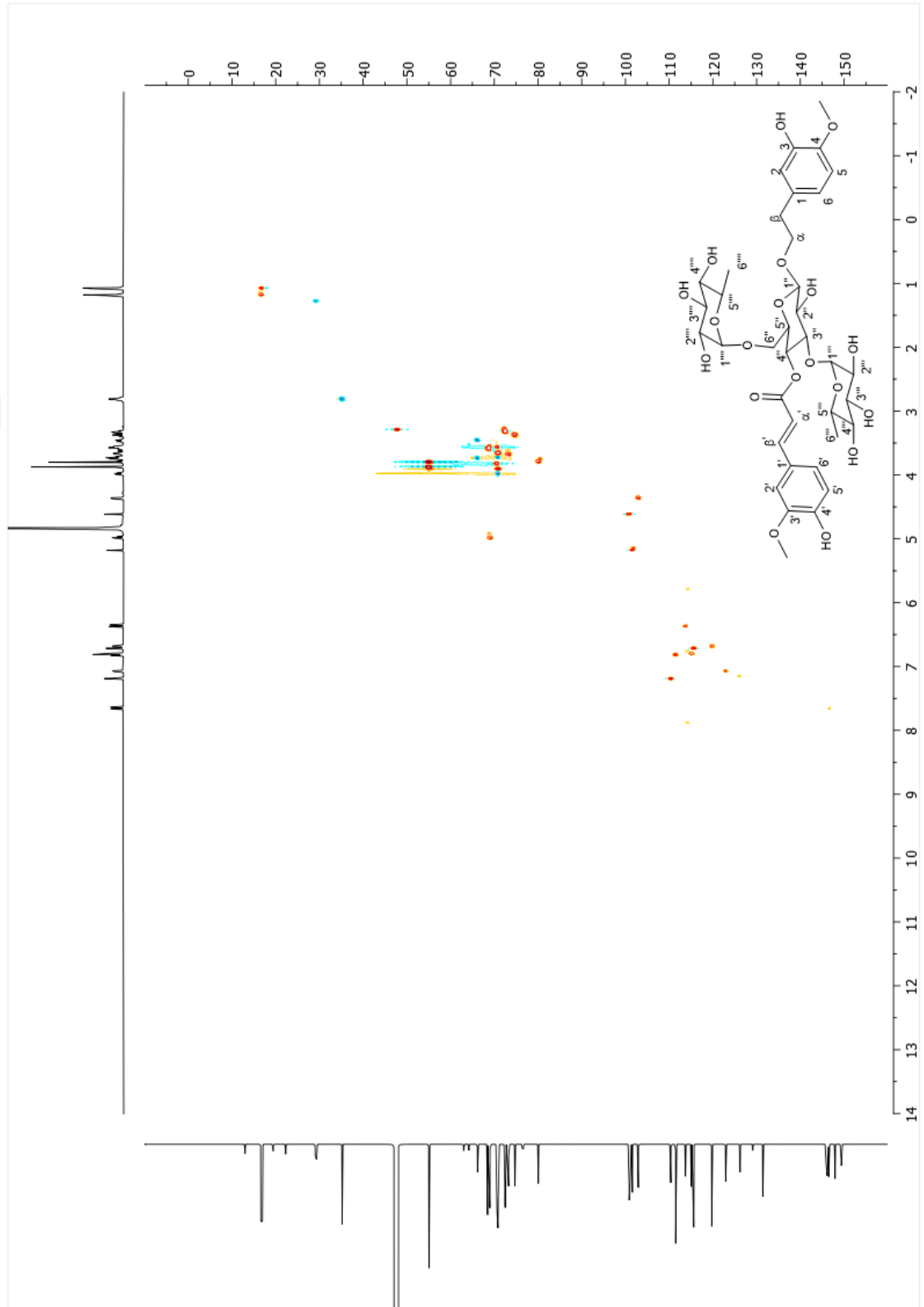
Ek-52. Ferruginozit C (Ferruginoside C, S-11) bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu



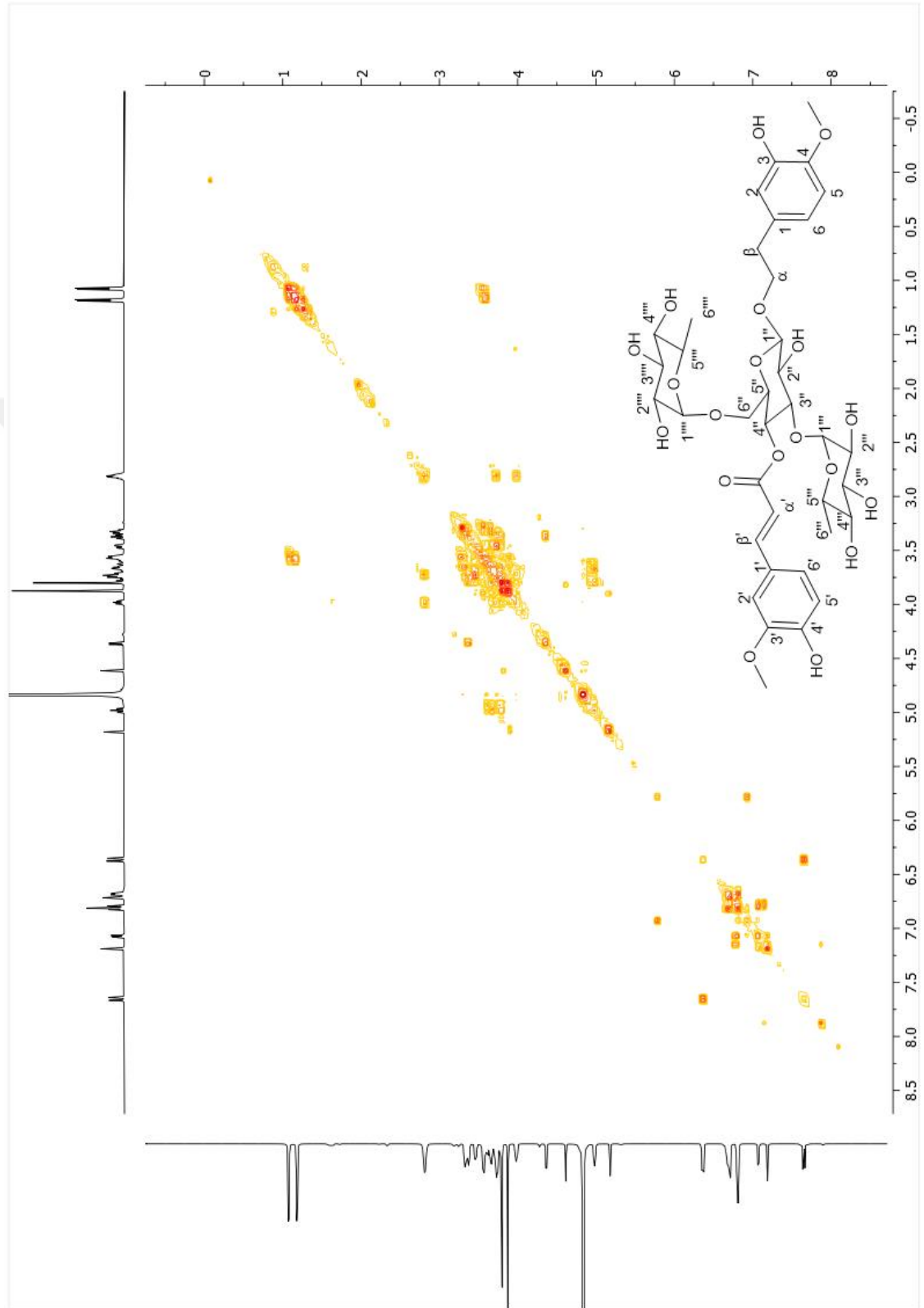
Ek-53. Ferruginozit C (Ferruginoside C, S-11) bileşığının DEPT spektrumu



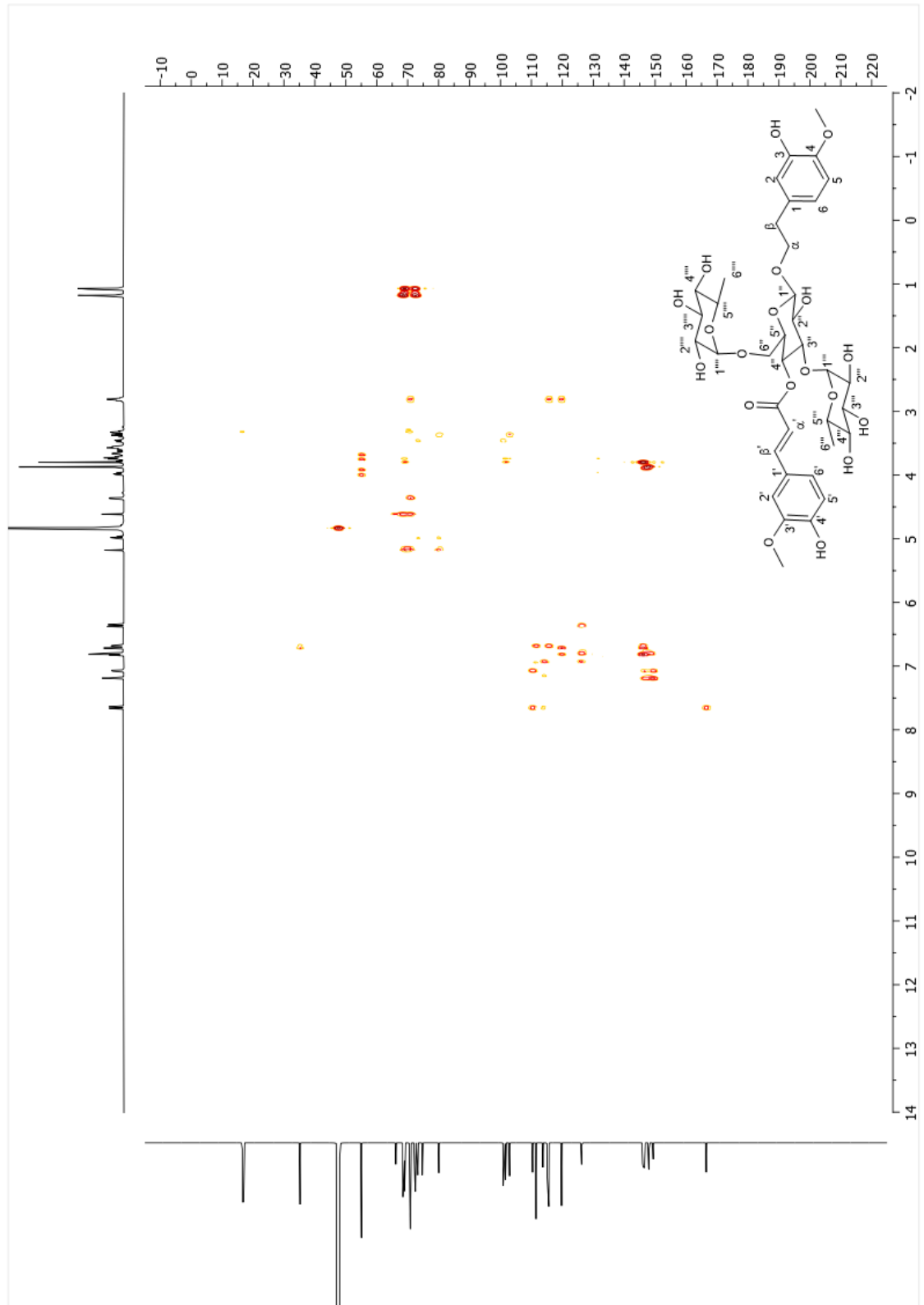
Ek-54. Ferruginozit C (Ferruginoside C, S-11) bileşiğinin HETCOR spektrumu



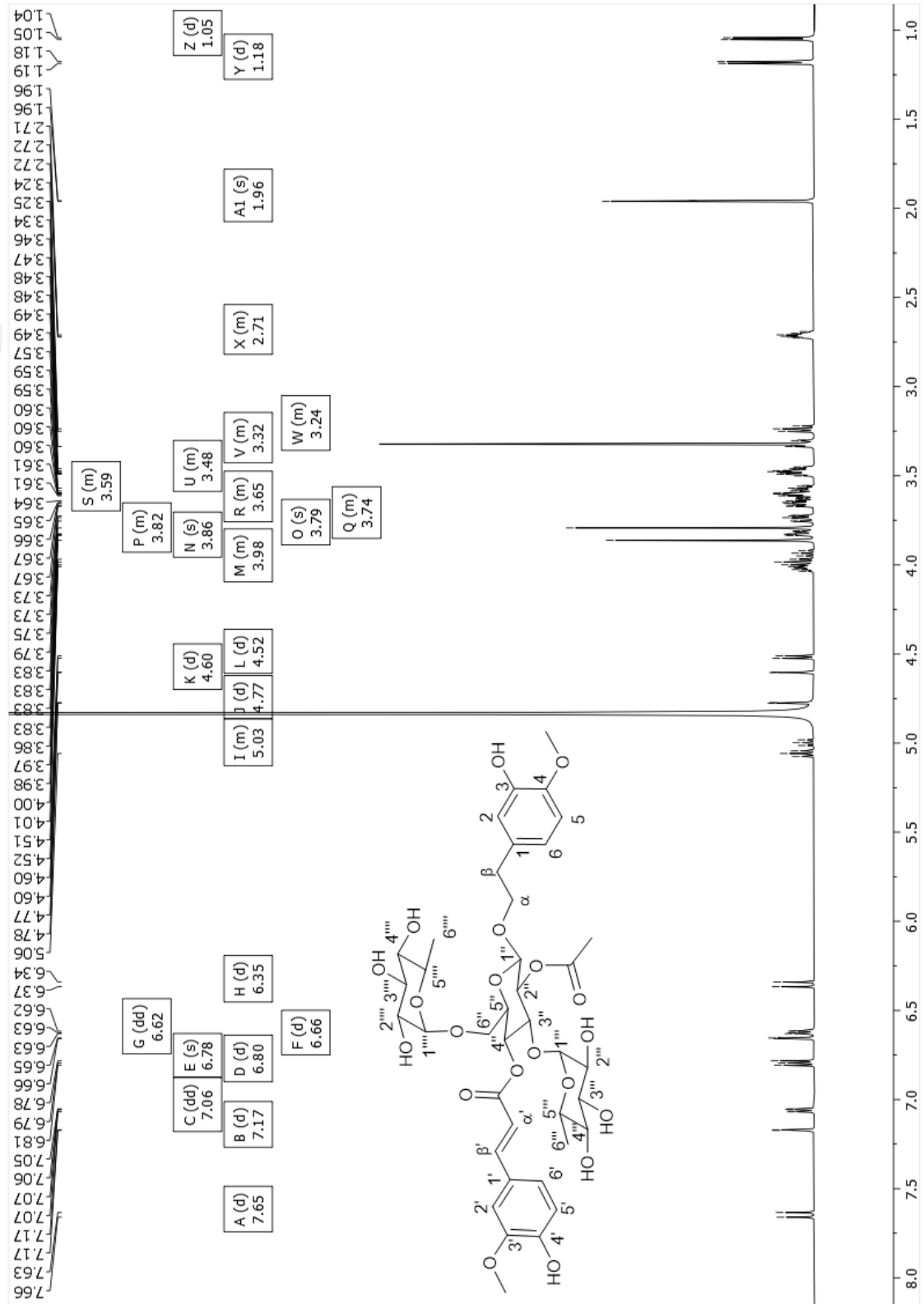
Ek-55. Ferruginozit C (Ferruginoside C, S-11) bileşiğinin COSY spektrumu



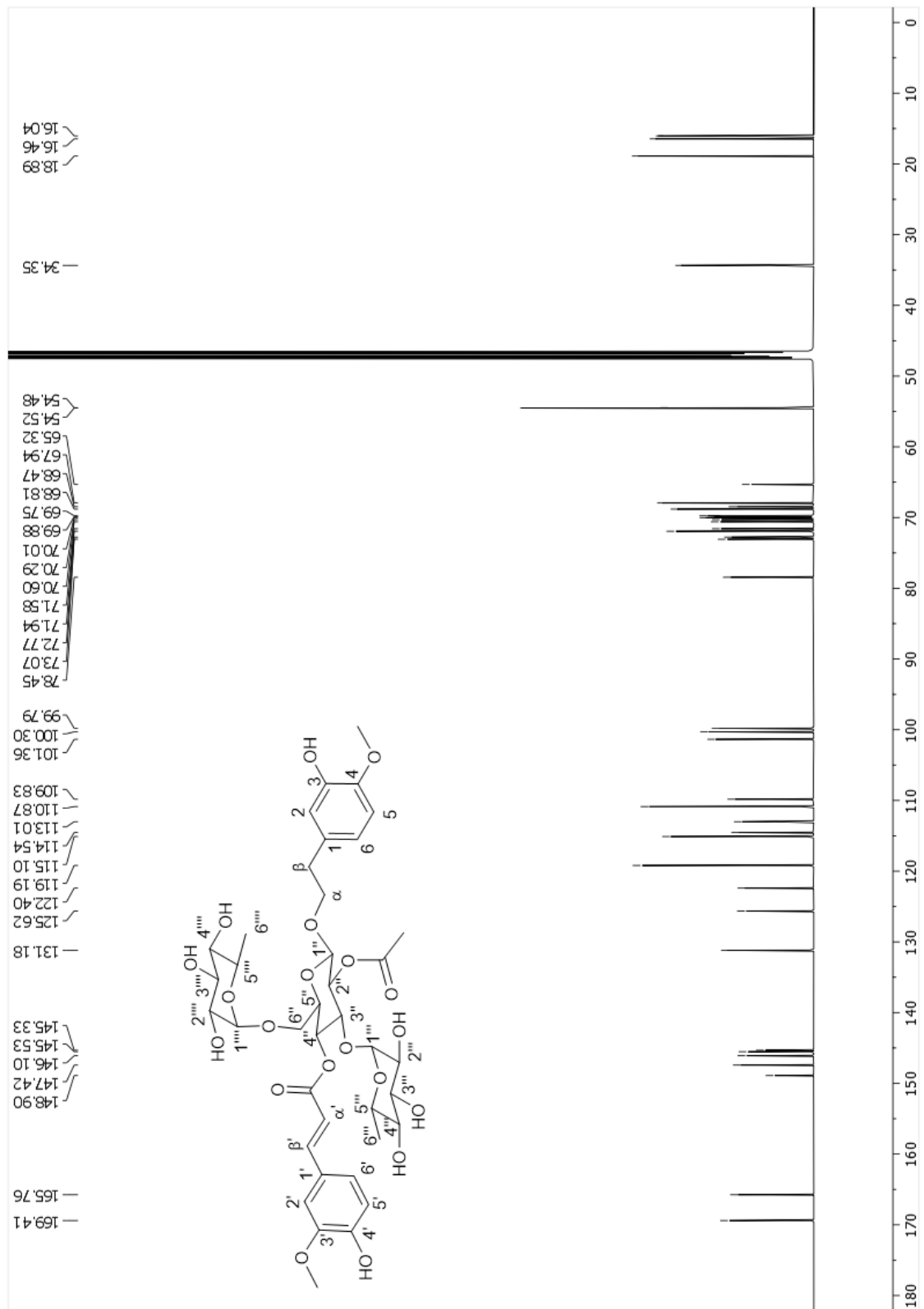
Ek-56. Ferruginozit C (Ferruginoside C, S-11) bileşiğinin HMBC spektrumu



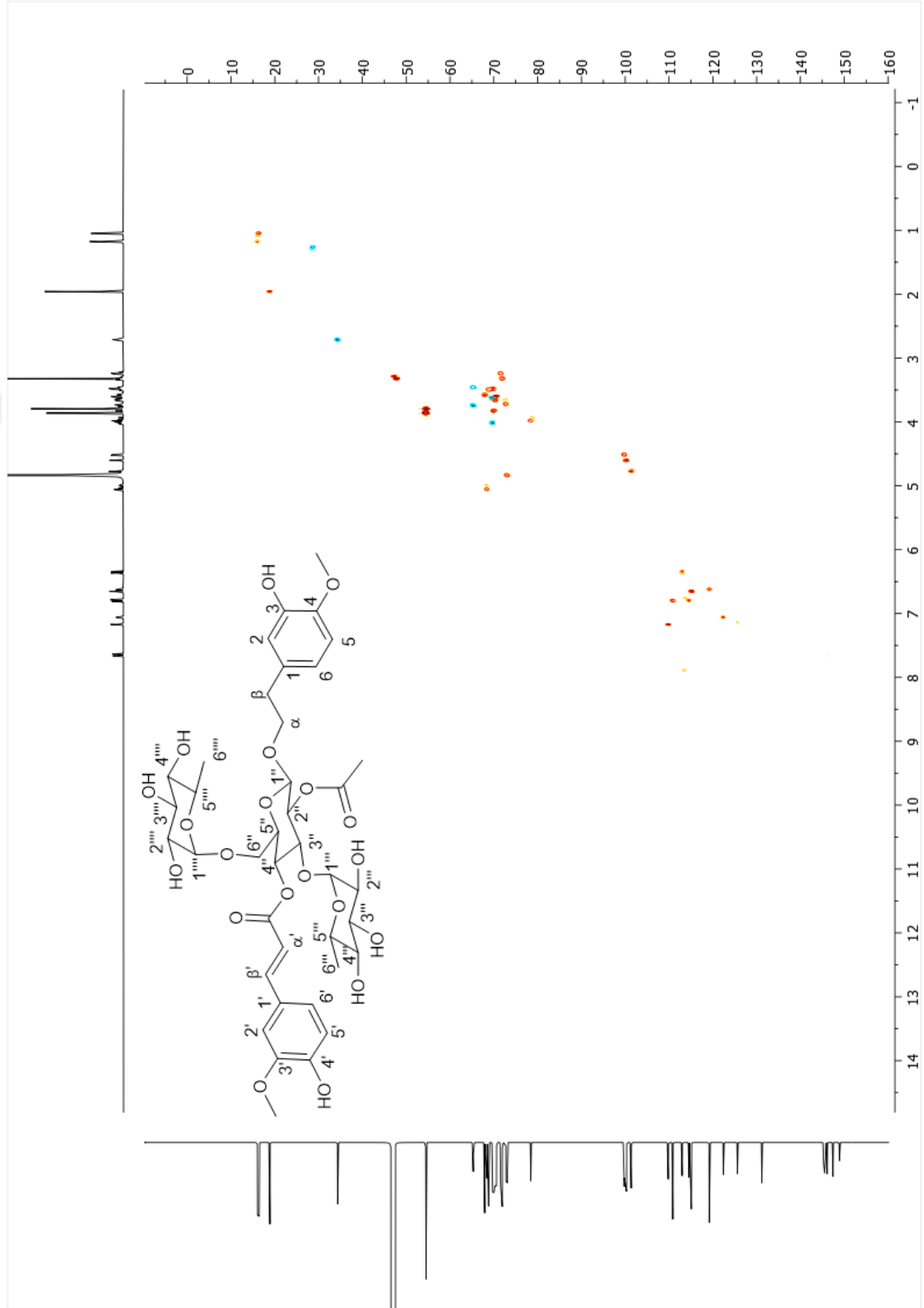
Ek-57. Ferruginozit D (Ferruginoside D, S-12) bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu



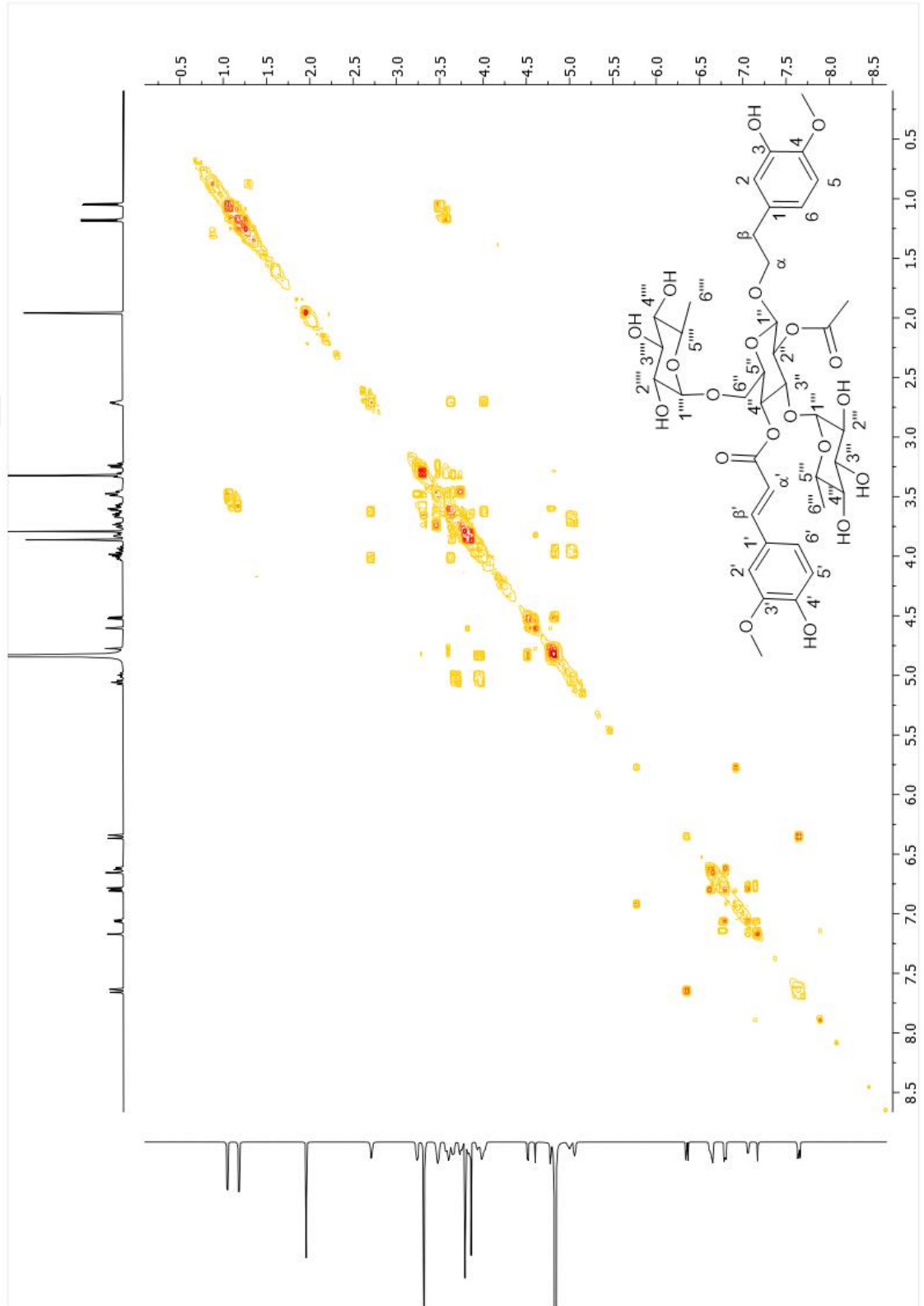
Ek-58. Ferruginozit D (Ferruginoside D, S-12) bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu



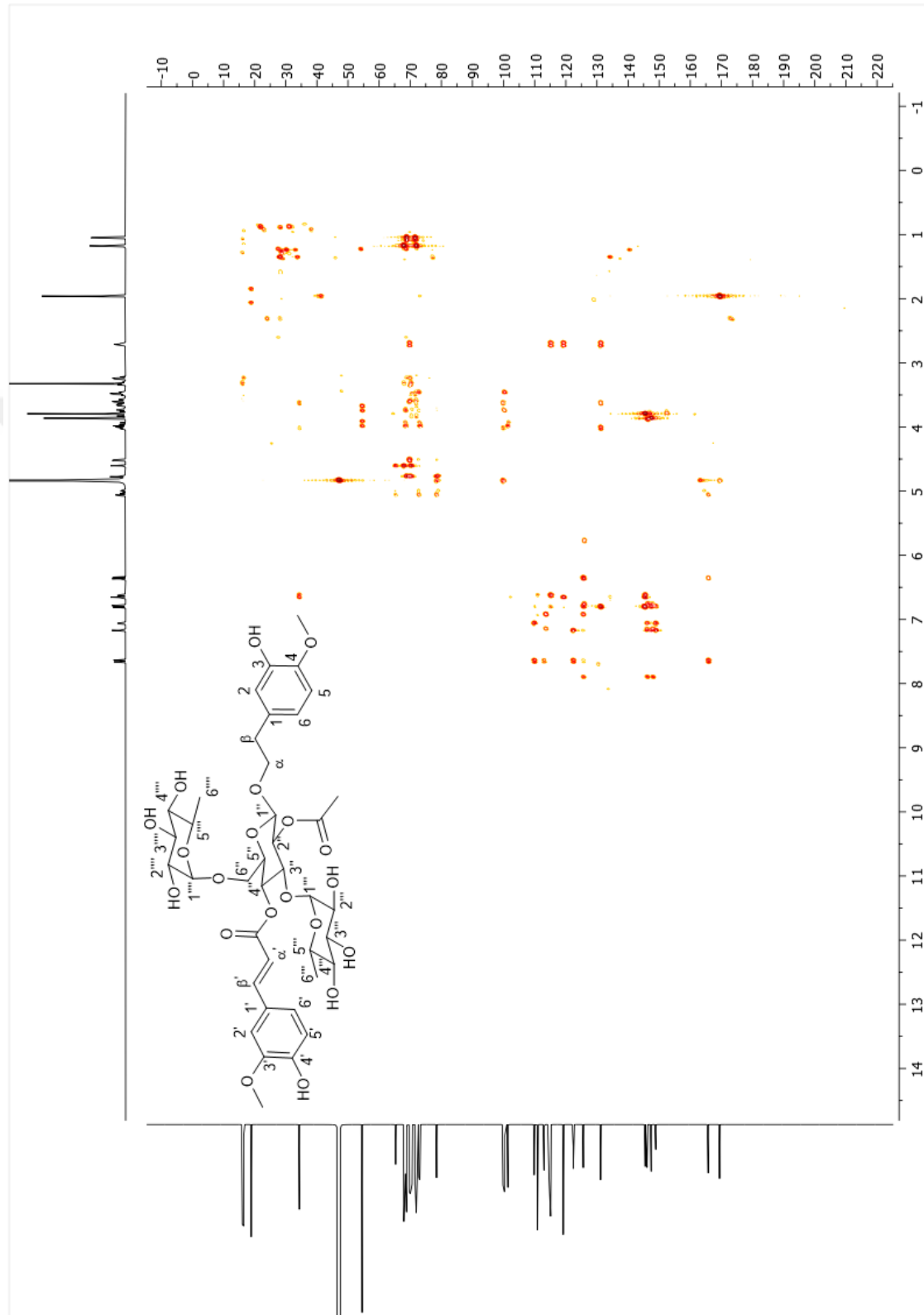
Ek-59. Ferruginozit D (Ferruginoside D, S-12) bileşiğinin HETCOR spektrumu



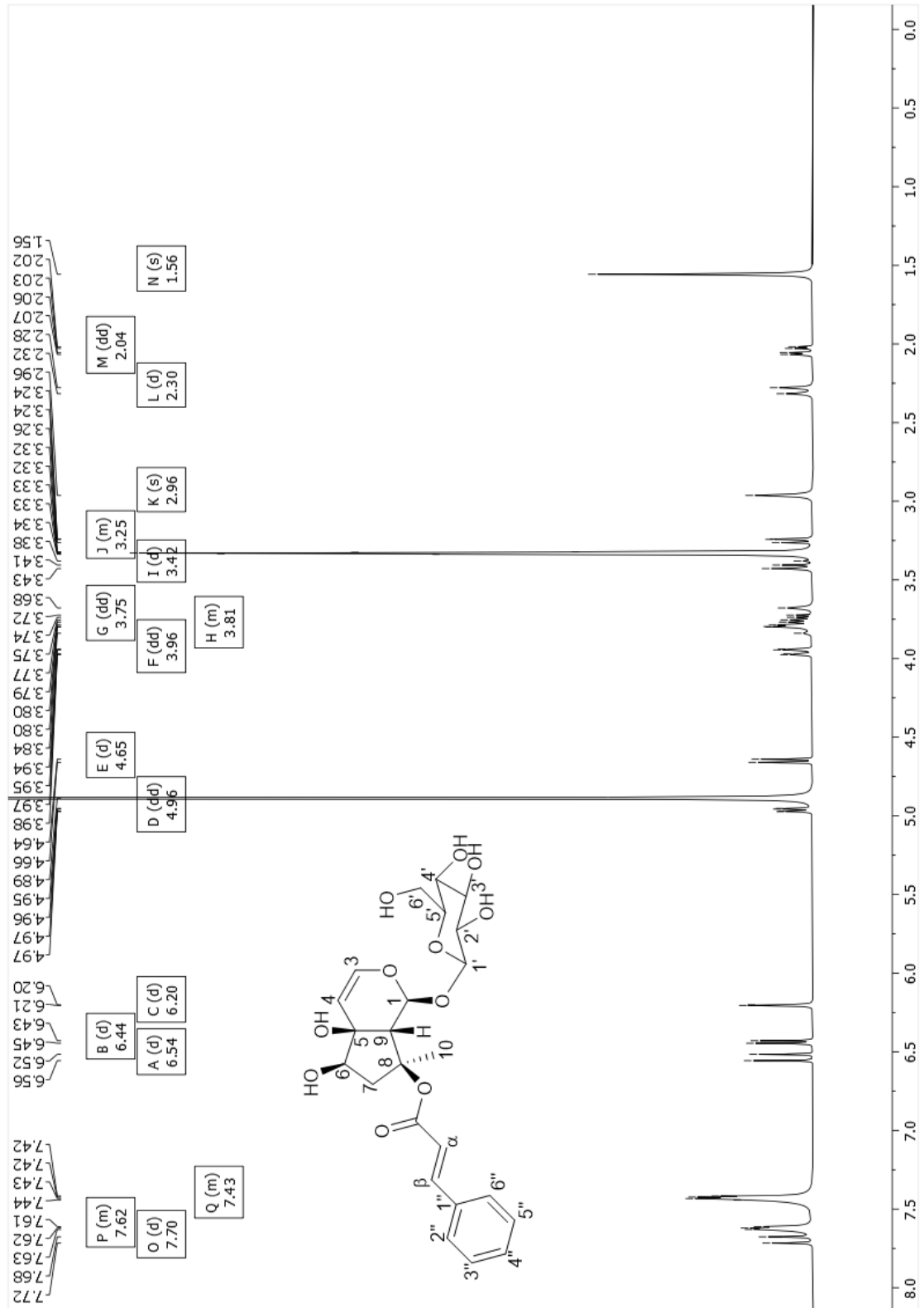
Ek-60. Ferruginozit D (Ferruginoside D, S-12) bileşiğinin COSY spektrumu



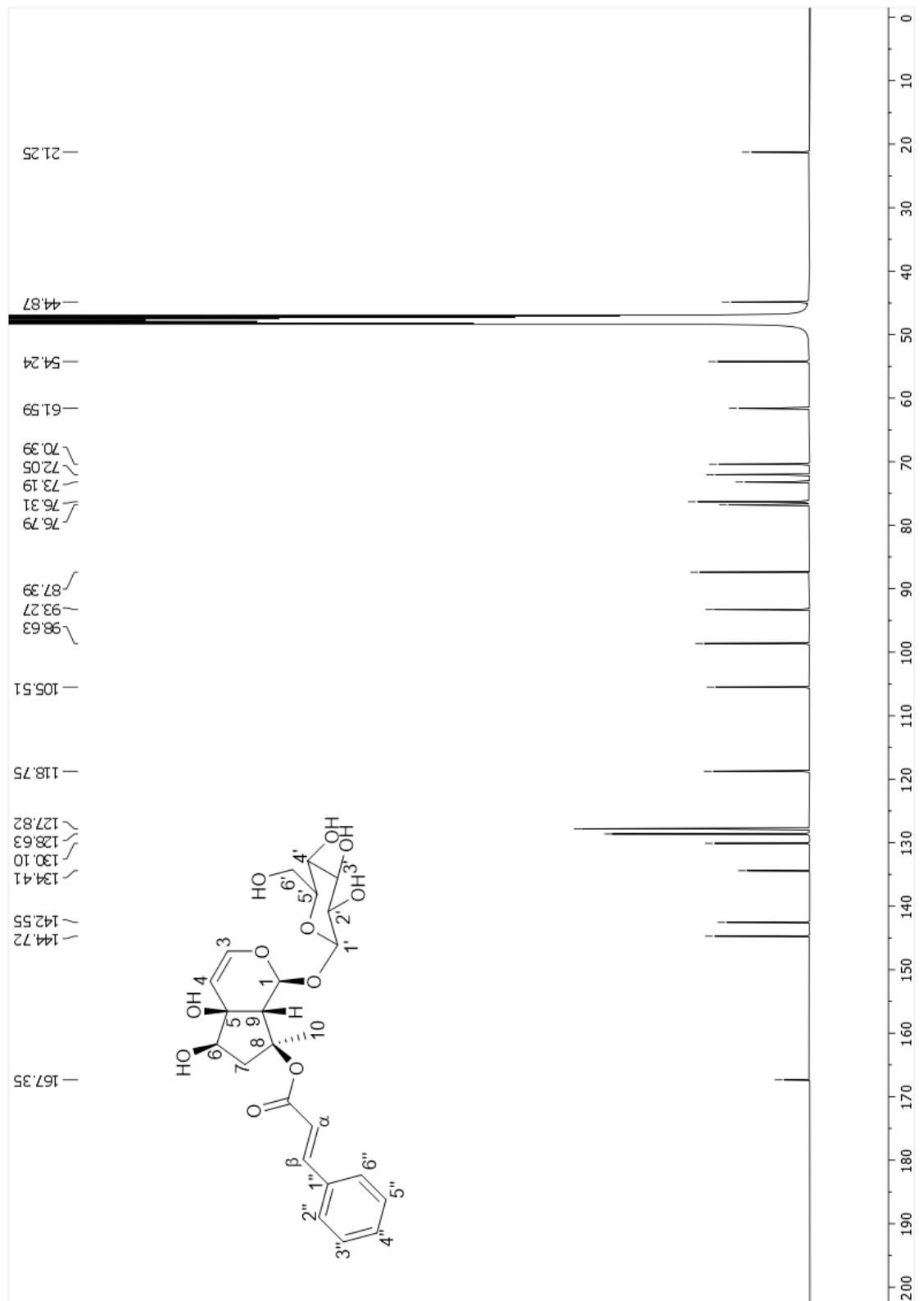
Ek-61. Ferruginozit D (Ferruginoside D, S-12) bileşiğinin HMBC spektrumu



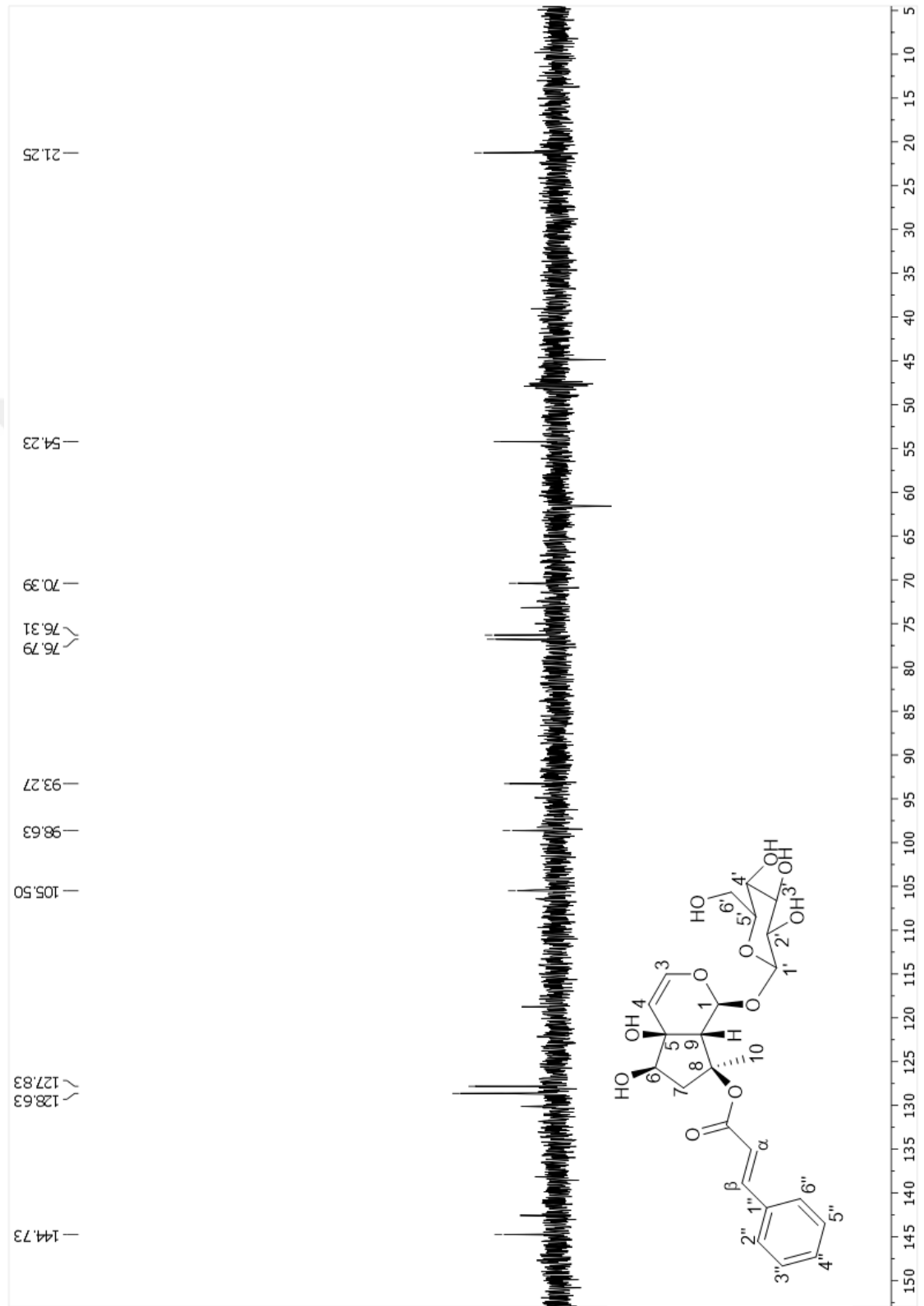
Ek-62. Harpagozit (Harpagoside, S-13) bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu



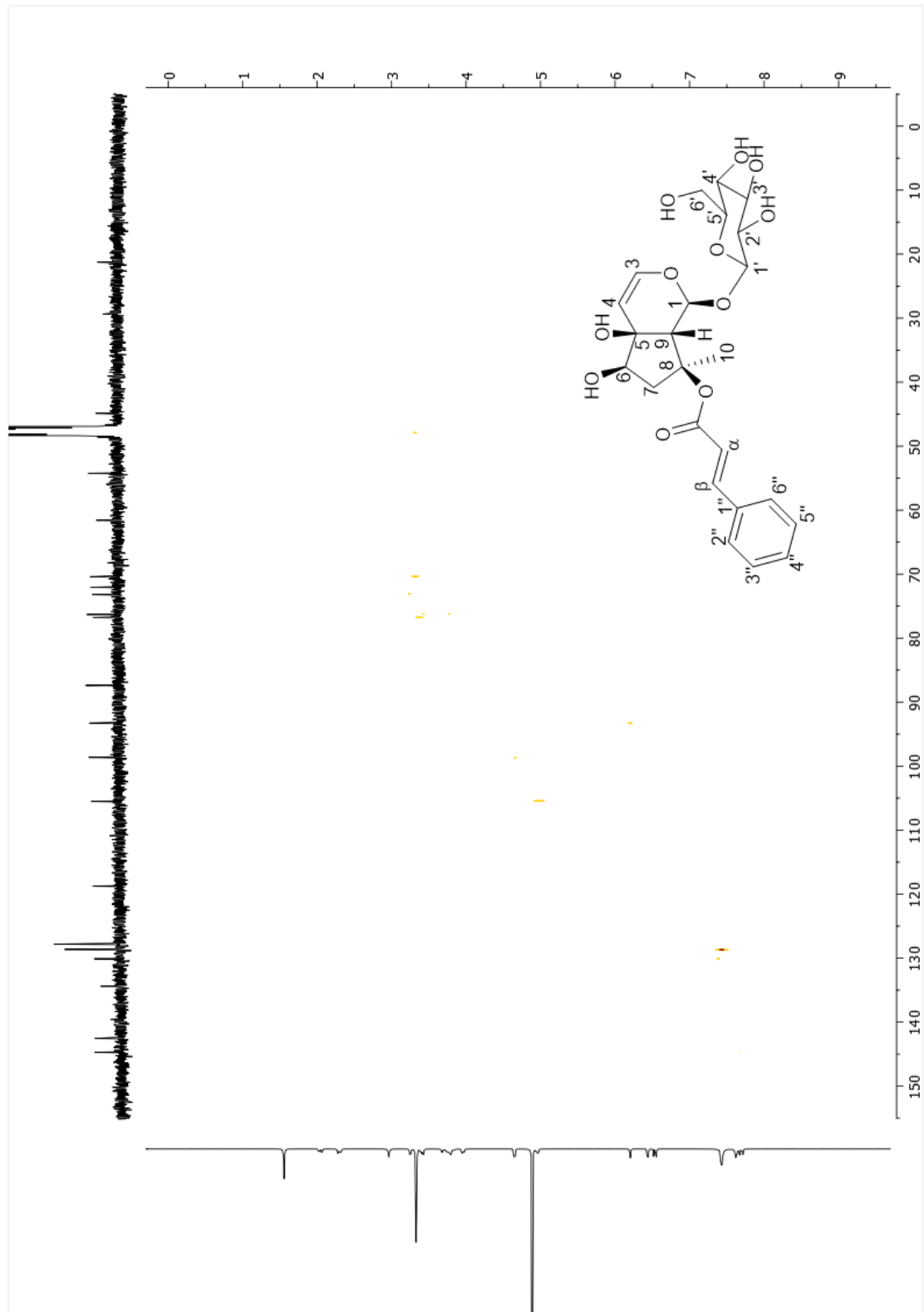
Ek-63. Harpagozit (Harpagoside, S-13) bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu



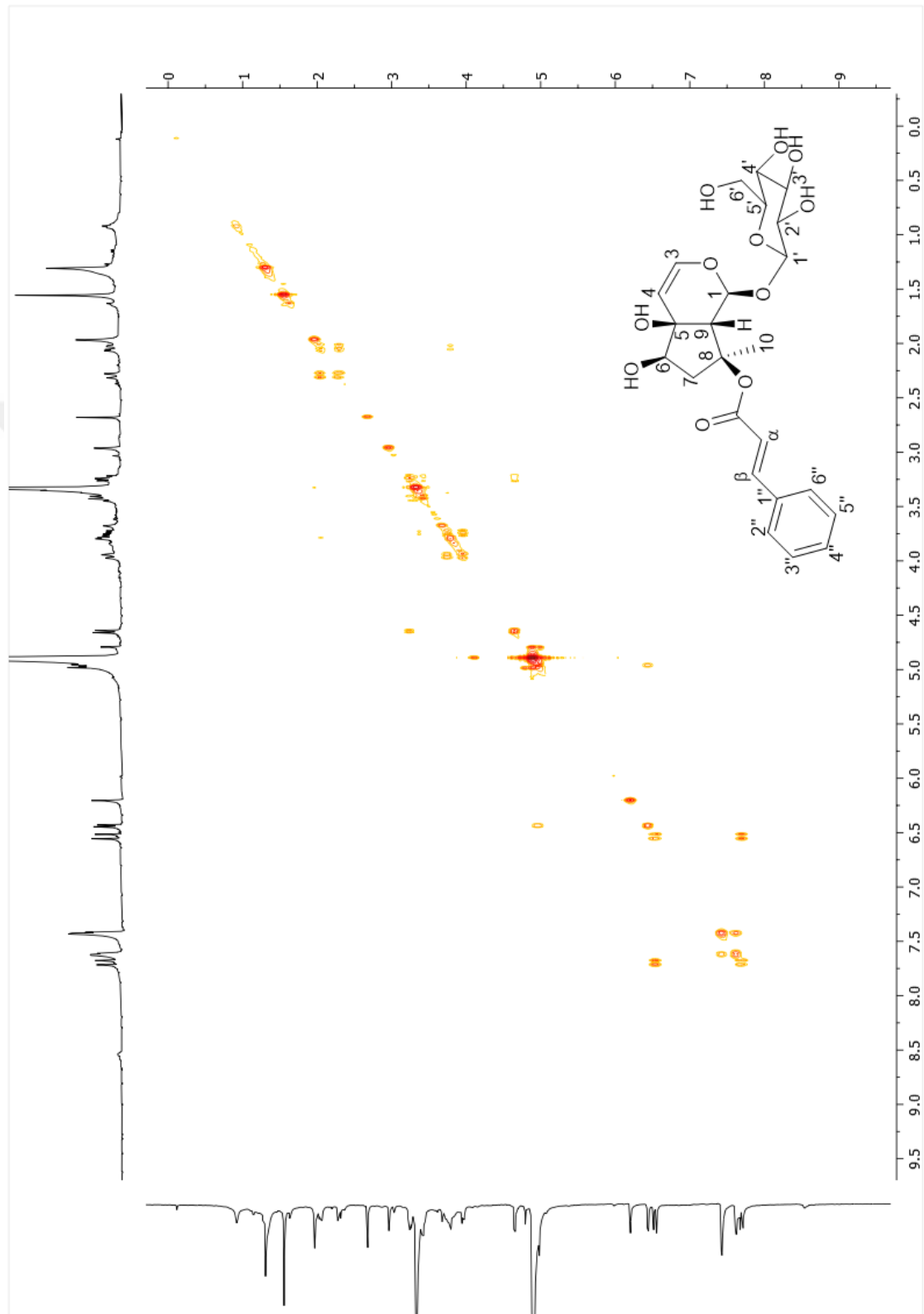
Ek-64. Harpagozit (Harpagoside, S-13) bileşiğinin DEPT spektrumu



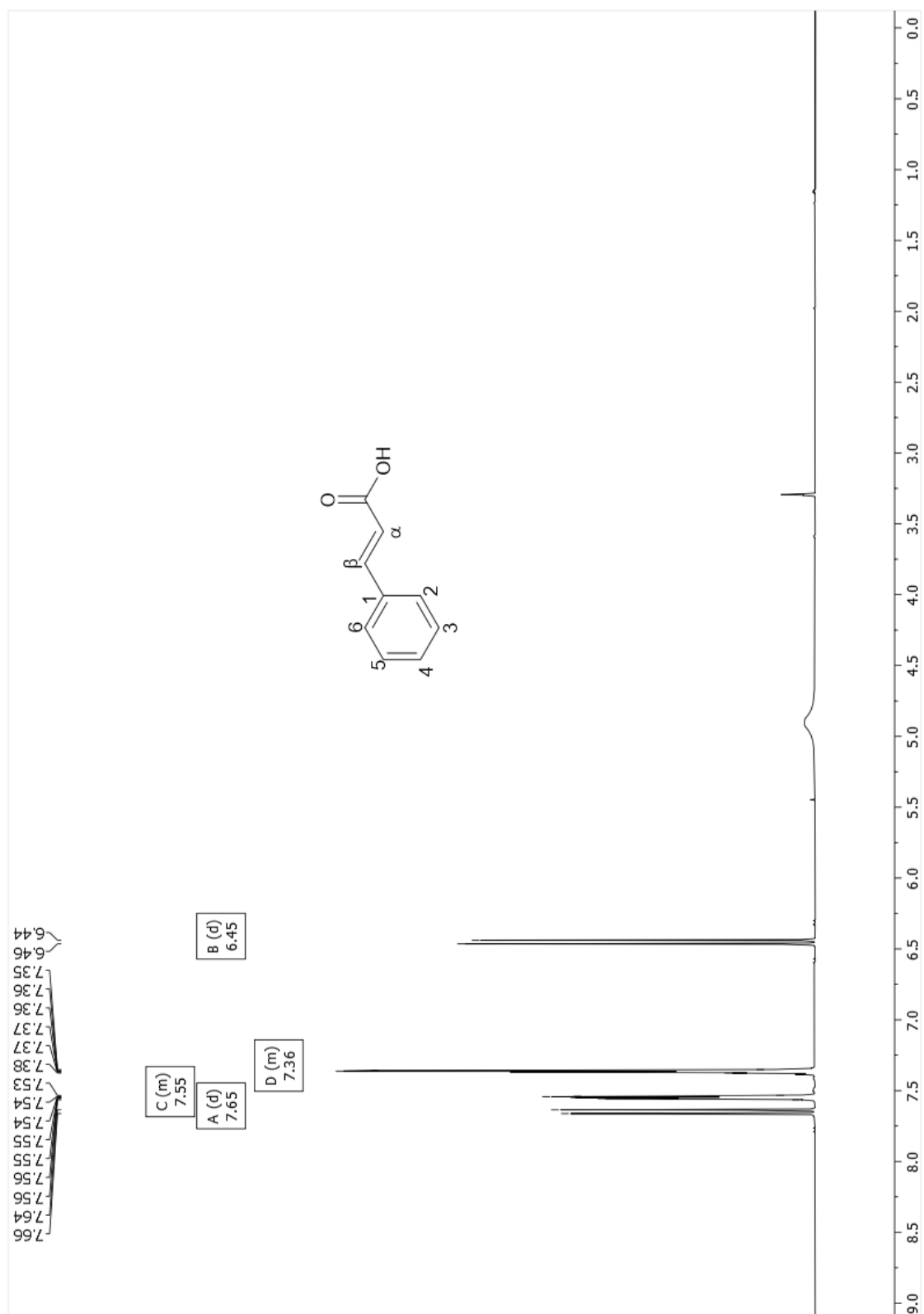
Ek-65. Harpagozit (Harpagoside, S-13) bileşiğinin HETCOR spektrumu



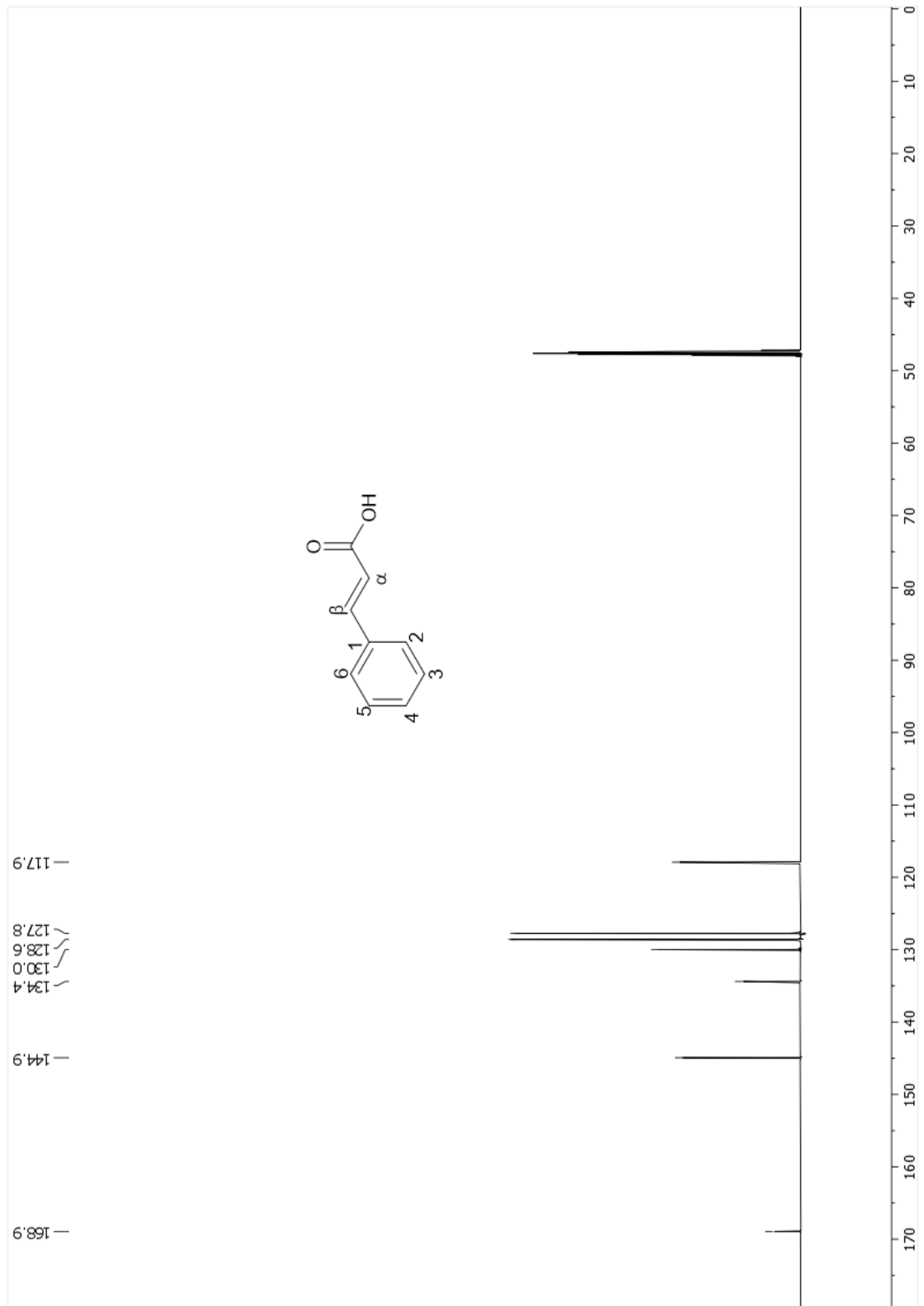
Ek-66. Harpagozit (Harpagoside, S-13) bileşiğinin COSY spektrumu



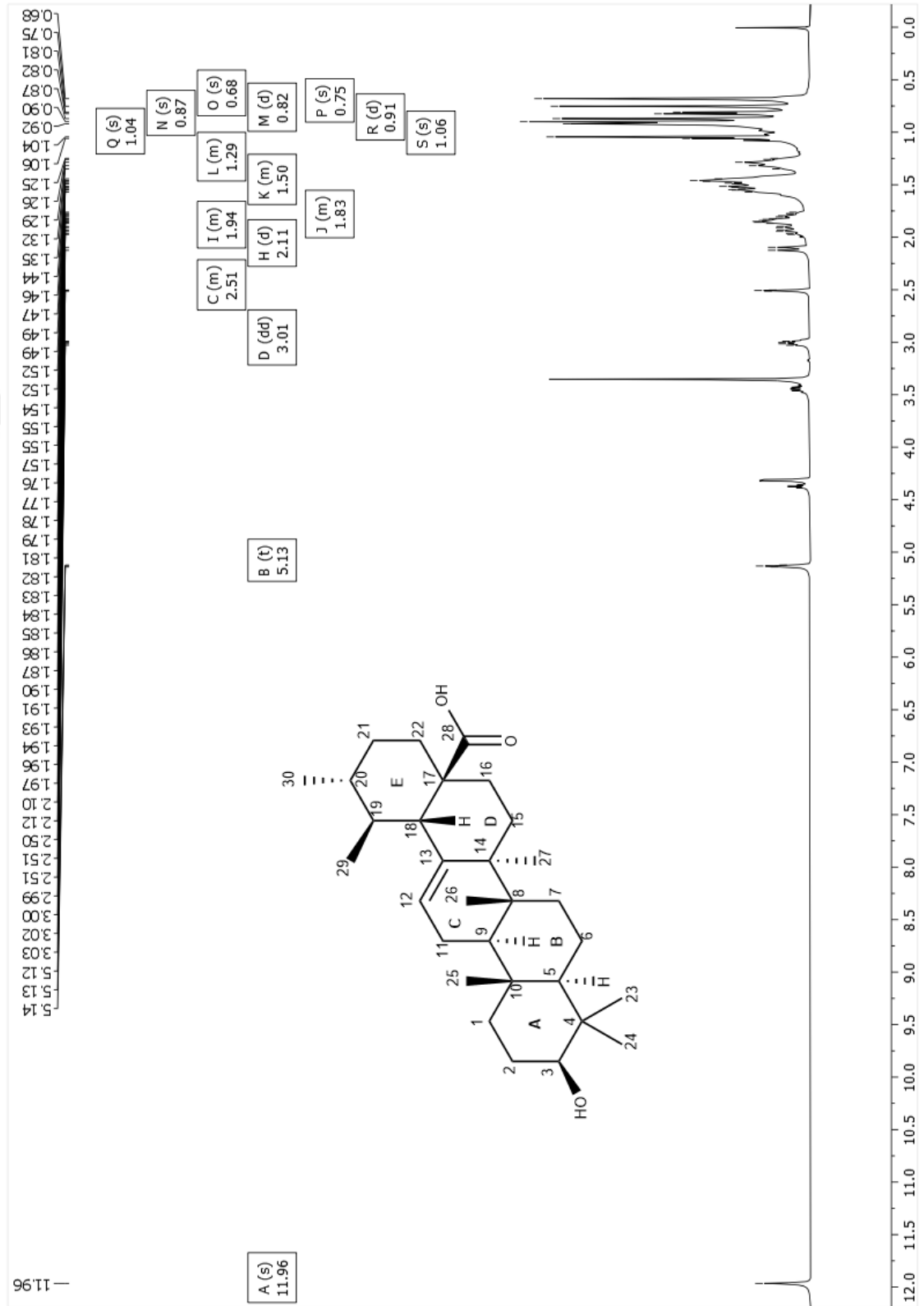
Ek-67. *trans*-Sinnamik asit (*trans*-Cinnamic acid, S-14) bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu



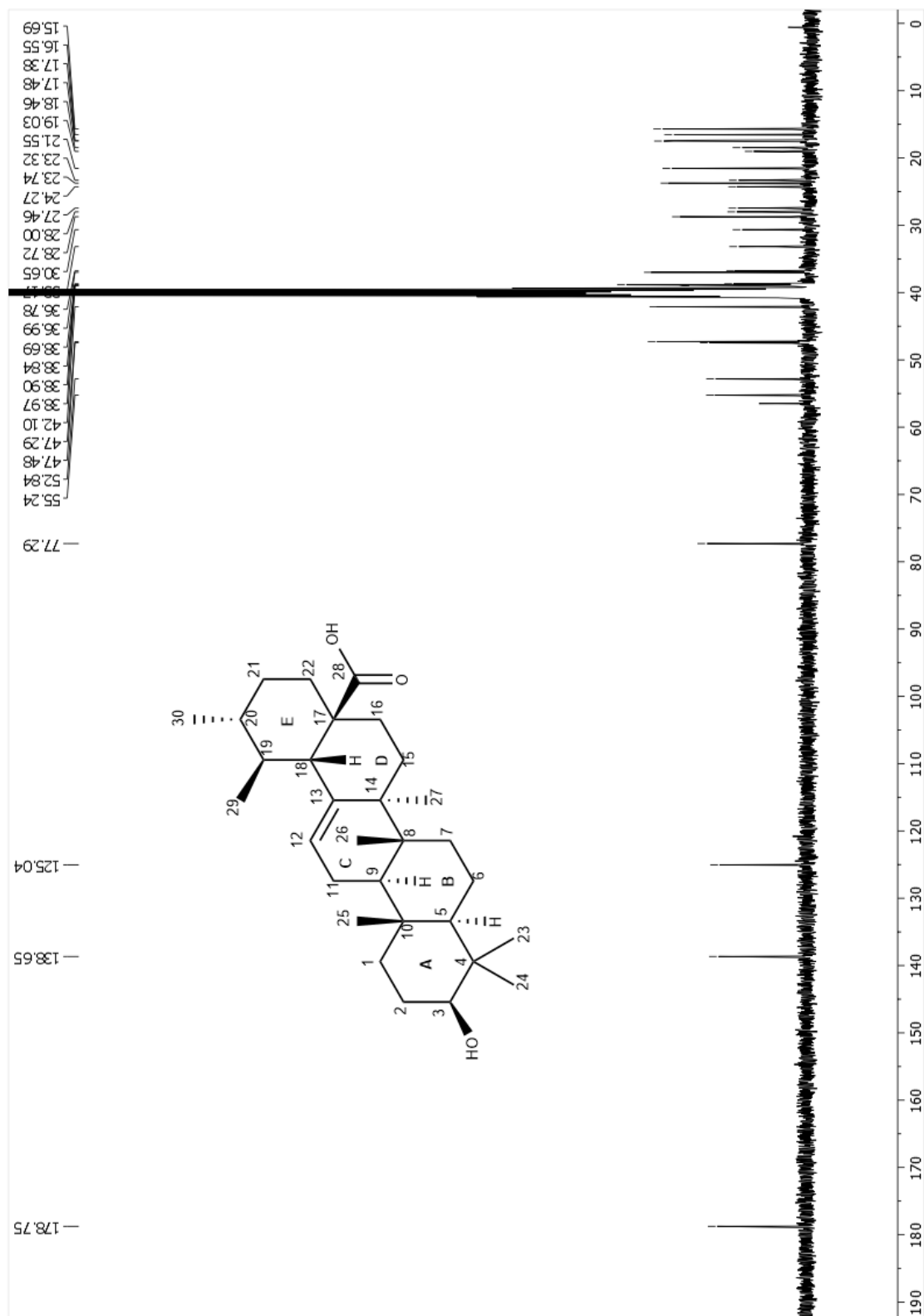
Ek-68. *trans*-Sinnamik asit (*trans*-Cinnamic acid, S-14) bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu



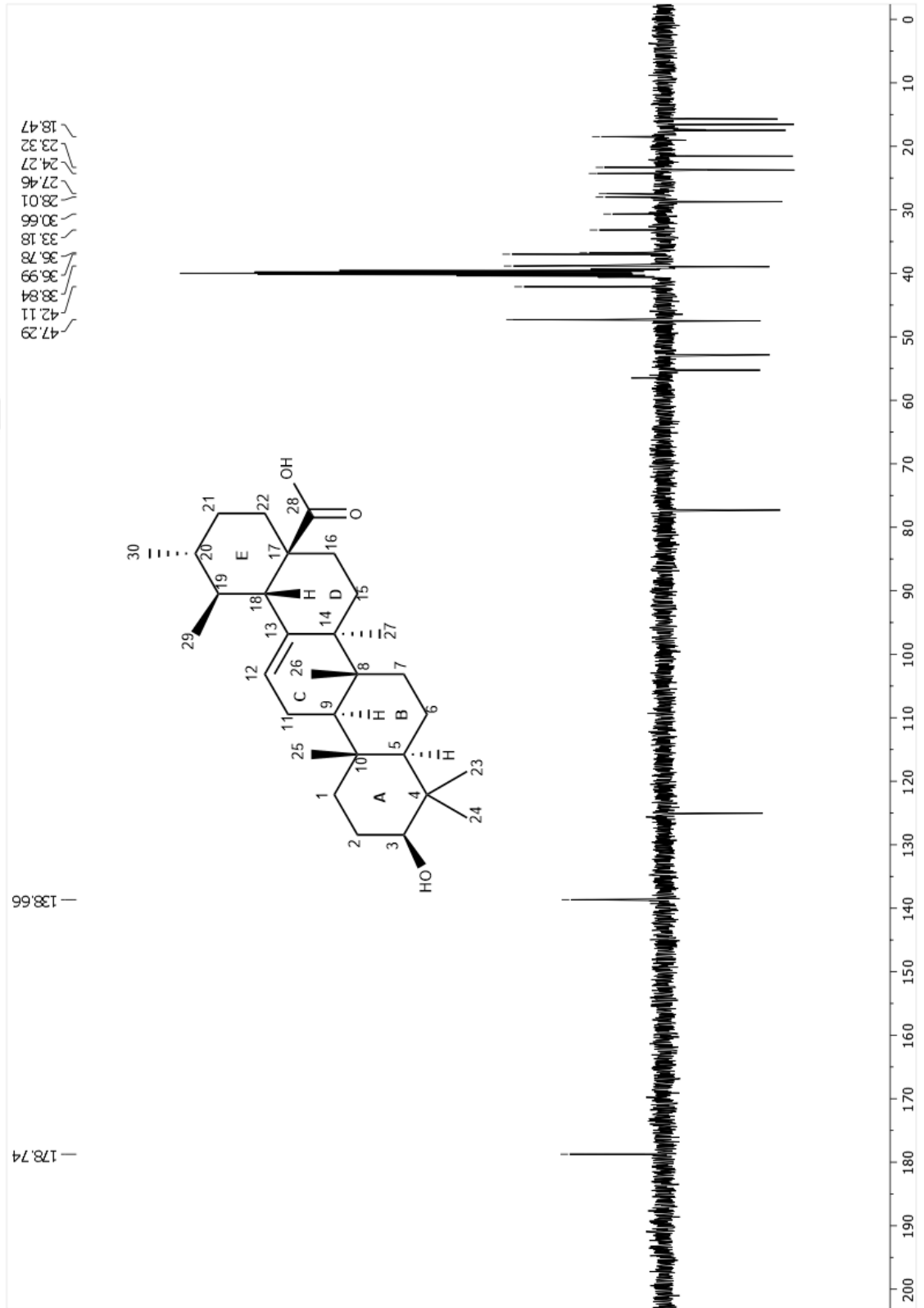
Ek-69. Ursolik asit (Ursolic acid, S-15) bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu



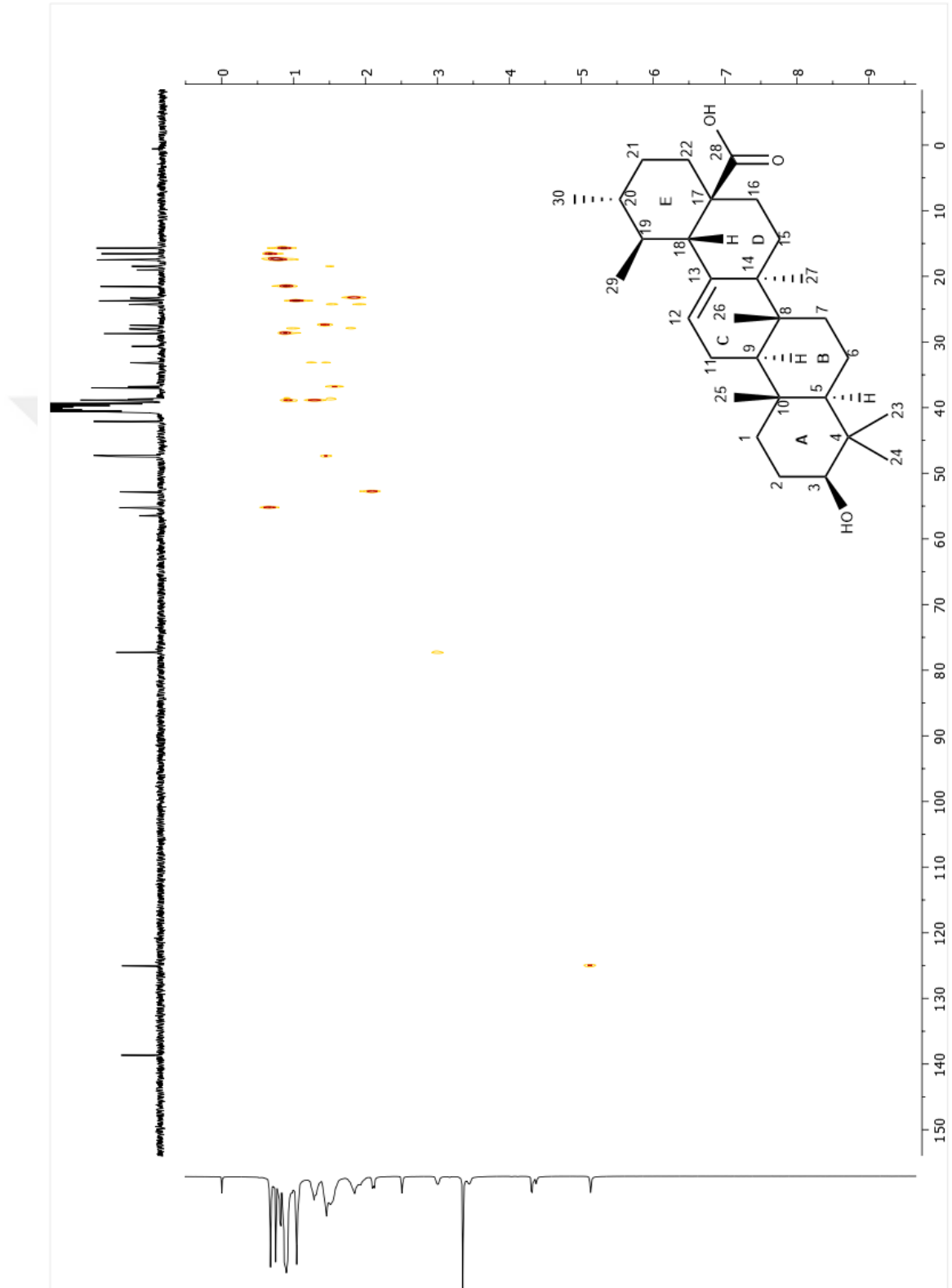
Ek-70. Ursolik asit (Ursolic acid, S-15) bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu



Ek-71. Ursolik asit (Ursolic acid, S-15) bileşğinin DEPT spektrumu



Ek-72. Ursolik asit (Ursolic acid, S-15) bileşğinin HETCOR spektrumu



Ek-73. Ursolik asit (Ursolic acid, S-15) bileşğinin COSY spektrumu

