



T.C.

**ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***VİNCA SONERİ* BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL İÇERİĞİ VE
ANTİOKSİDANT AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ**

Mustafa Servet DALTABAN

Danışman: Dr.Öğr.Üyesi Hüseyin AKŞİT

FARMASÖTİK BİLİMLER ANABİLİM DALI

ERZİNCAN

Şubat 2023

Her hakkı saklıdır

T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANSTEZİ

VİNCA SONERİ BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL İÇERİĞİ VE
ANTİOKSİDANT AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Mustafa Servet DALTABAN

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin AKŞİT

FARMASÖTİK BİLİMLER ANABİLİM DALI

ERZİNCAN
Şubat 2023
Her hakkı saklıdır

Bilimsel Etiğe Uygunluk

“*Vinca soneri* bitkisinin fitokimyasal iğeriği ve antioksidant aktivitesinin belirlenmesi.” isimli “Yüksek Lisans” tezim tarafımca intihal tespit programı ile incelenmiştir. Buna göre tezimde bilimsel etik ihlali ve intihal olarak nitelendirilebilecek herhangi bir durum olmadığını taahhüt ederim.

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir biçimde elde edildiğini; aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiğı gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi beyan ederim. 08/02/2023

(İmza)

Mustafa Servet
DALTABAN

ÖZET

Yüksek Lisans

***VİNCA SONERİ* BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL İÇERİĞİ VE ANTIOKSİDANT AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ**

Mustafa Servet DALTABAN

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Bilimler Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin AKŞİT

Amaç: Bu çalışma ile endemik bir bitki olan *Vinca soneri* bitkisinin fitokimyasal içeriği ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Bitkinin metanol ekstraktı farklı kromatografik teknikler (sefadeks LH-20, Flash kromatografi ve p-HPLC) ile ayırma ve saflaştırma işlemine tabi tutuldu.

Bulgular: Bitki içerisinde üç flavon türevi; rutin-7-*O*-glukozit, rutin-7-*O*-ramnozit, kaemferol-3-*O*-rutinozit-7-*O*-ramnozit, bir benzoik asit türevi, 2-hidroksi-3-*O*-glukozil-benzoik asit ve bir iridoid glikoziti, loganik asit izole edilmiştir. Bitki ham ekstraktının ve izole edilen moleküllerin antioksidan kapasitesi DPPH, ABTS ve FRAP yöntemleri ile değerlendirilmiştir.

Sonuç: Rutin-7-*O*-glukozit ve rutin-7-*O*-ramnozit DPPH ve ABTS radikalleri giderme aktivitesinde troloks'dan daha aktif bulunurken kaemferol-3-*O*-rutinozit-7-*O*-ramnozit, 2-hidroksi-3-*O*-glukozil-benzoik asit troloks'a göre düşük aktivite göstermiştir. Loganik asit ise yapılan bütün testlerde aktif bulunmamıştır. Loganik asit dışında bütün bileşenler, *Vinca soneri* bitkisindeki varlığı ilk defa rapor edilmiştir. Bulgular bitki örneğinin kimyasal içeriği hakkında literatüre önemli katkı sağlamaktadır.

2023, 38 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Flavonlar, İridoid glikozitleri, *Vinca soneri*.

ABSTRACT

MSc Thesis

DETERMINATION OF PHYTOCHEMICAL CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *VINCA SONERI* PLANT

Mustafa Servet DALTABAN

Erzincan Binali Yıldırım University
Graduate School of Health Sciences
Department of Pharmaceutical sciences

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Hüseyin AKŞİT

Objective: The aim of this study was to determine the phytochemical content and antioxidant activities of the endemic plant *Vinca soneri*.

Material and Method: The methanol extract of the plant was subjected to separation and purification by different chromatographic techniques (Sephadex LH-20, Flash chromatography, and p-HPLC).

Results: Three flavone derivatives in the plant; rutin-7-*O*-glucoside, rutin-7-*O*-rhamnoside, kaemferol-3-*O*-rutinoside-7-*O*-rhamnoside, a benzoic acid derivative, 2-hydroxy-3-*O*-glucosyl-benzoic acid, and an iridoid glycoside, loganic acid, has been isolated. The antioxidant capacity of isolated molecules was evaluated by DPPH, ABTS, and FRAP methods.

Conclusion: Rutin-7-*O*-glucoside and rutin-7-*O*-rhamnoside were found to be more active than Trolox in DPPH and ABTS radical scavenging activities, while kaemferol-3-*O*-rutinoside-7-*O*-rhamnoside, 2-hydroxy-3-*O*-glucosyl-benzoic acid showed lower activity compared to Trolox. Loganic acid was not found to be active in all tests. All components except loganic acid have been reported for the first time in *Vinca soneri* plant. The findings make an important contribution to the literature about the chemical content of the plant sample.

2023, 38 Pages

Keywords: Antioxidant, Flavones, Iridoid glycosides, *Vinca soneri*.

İÇİNDEKLER

	Sayfa
Kabul ve Onay.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Bilimsel Etiğe Uygunluk.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
İÇİNDEKLER.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
3. MATERYAL ve METOT.....	7
3.1. Genel Analiz Şartları ve Cihazlar	7
3.2. Bitkisel Materyal.....	8
3.3. Sekonder Metabolitlerin İzolasyonu.....	9
3.4. Antioksidan Aktivite Testleri	13
3.4.1. Serbest Radikal (DPPH) Giderme Aktivitesi	13
3.4.2. Katyonik Radikal (ABTS ⁺) Giderme Aktivitesi	14
3.4.3. İndirgeme Gücü (FRAP) Aktivitesi	15
4. BULGULAR.....	16
4.1. Sekonder Metabolitlerin Yapı Tayini	16
4.2. İzole Edilen Sekonder Metabolitlerin Antioksidan Aktiviteleri	28
5. TARTIŞMA	30
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	35
KAYNAKLAR.....	36
ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 3. 1. <i>Vinca soneri</i> Bitkisinin Görüntüsü	8
Şekil 3. 2. <i>Vinca soneri</i> Metanol Ekstresi Sefadeks LH-20 Kolonu İTK Görseli	9
Şekil 3. 3. AF-33 Flash Kromatogramı (330, 280, 254 nm).....	10
Şekil 3. 4. AF3 FK İşleminden Elde Edilen Fraksiyonların İTK Görseli.....	10
Şekil 3. 5. Fraksiyon 17-22 Prep- HPLC Kromatogramı (330 nm)	11
Şekil 3. 6. Fraksiyon 23-31 Prep- HPLC Kromatogramı (330 nm)	11
Şekil 3. 7. 17-22A Fraksiyonunun Sefadeks LH-20 Kolonu İTK Görüntüsü	12
Şekil 3. 8. 17-22B Fraksiyonunun Sefadeks LH-20 Kolonu İTK Görüntüsü	12
Şekil 3. 9. 17-22A ve 23-31B'nin İTK görseli.....	13
Şekil 3. 10. AF2 Sefadeks LH-20 Kolonu İTK Görüntüsü	13
Şekil 4. 1. Bitki Ham Ekstraktı ve İzole Edilen Bileşenlerin HPLC Kromatogramları .	16
Şekil 4. 2. Bileşik 1'in ¹ H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-d ₆).....	17
Şekil 4. 3. Bileşik 1'in ¹³ C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-d ₆).....	17
Şekil 4. 4. Bileşik 1'in COSY Spektrumu	18
Şekil 4. 5. Bileşik 1'in HETCOR Spektrumu.....	18
Şekil 4. 6. Bileşik 1'in HMBC Spektrumu	19
Şekil 4. 7. Bileşik 2'nin ¹ H-NMR Spektrumu.....	20
Şekil 4. 8. Bileşik 3'ün ¹ H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-d ₆).....	21
Şekil 4. 9. Bileşik 3'ün ¹³ C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-d ₆)	21
Şekil 4. 10. Bileşik 3'ün ¹³ C-DEPT135 NMR Spektrumu	22
Şekil 4. 11. Bileşik 3'ün ¹³ C-DEPT90 NMR Spektrumu.....	22
Şekil 4. 12. Bileşik 3'ün HETCOR Spektrumu	23
Şekil 4. 13. Bileşik 3'ün COSY Spektrumu.....	23
Şekil 4. 14. Bileşik 4'ün ¹ H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-d ₆).....	24
Şekil 4. 15. Bileşik 4'ün ¹³ C-NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-d ₆)	25
Şekil 4. 16. Bileşik 4'ün ¹³ C-DEPT135 NMR Spektrumu.....	25
Şekil 4. 17. Bileşik 4'ün HETCOR Spektrumu	26
Şekil 4. 18. Bileşik 4'ün COSY Spektrumu.....	26
Şekil 4. 19. Bileşik 5'in ¹ H-NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-d ₆).....	27
Şekil 4. 20. <i>Vinca soneri</i> Bitkisinden İzole Edilen Moleküllerin Kimyasal Yapıları (1-5).	28

Şekil 5. 1. İzole Edilen Bileşiklerin DPPH Radikali Giderme Aktiviteleri	30
Şekil 5. 2. İzole Edilen Bileşiklerin ABTS Radikali Giderme Aktiviteleri	31
Şekil 5. 3. İzole Edilen Bileşiklerin FRAP Aktiviteleri.....	32



TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 3. 1. DPPH Aktivitesi İçin 96 Kuyucuk Bazlı Test Tasarımı	14
Tablo 3. 2. ABTS Aktivitesi İçin 96 Kuyucuk Bazlı Test Tasarımı.....	14
Tablo 3. 3. FRAP Aktivitesi İçin 96 Kuyucuk Bazlı Test Tasarımı.....	15
Tablo 4. 1. <i>Vinca soneri</i> Bitkisinden İzole Edilen Bileşiklerin Antioksidan Aktiviteleri	29

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

%	Yüzde
<i>fr</i>	Frekans
<i>nm</i>	Nanometre
<i>Hz</i>	Hertz

Kısaltmalar

KK	Kolon Kromatoğrafisi
p-HPLC	Preparatif Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
FK	Flash Kromatoğrafisi
UV	Ultraviyole
ELSD	Evopotive Işın Saçımlı Dedektör
İTK	İnce Tabaka Kromatoğrafisi
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans

1. GİRİŞ

Tıbbi bitkiler, çoğu ülkenin sağlık alanındaki en temel yapı taşıdır. Dünya nüfusunun %80'i sağlık gereksinimleri için geleneksel ilaçları kullanmaktadır(Twari, 2008). Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO)'nın 91 ülkenin farmakopelerine dayanarak yaptığı bir araştırmaya göre 20.000 civarında bitki tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Şifalı bitkilerin bu denli önemli olmasının ve talep edilmesinin birden fazla nedeni bulunmaktadır. Doğal kaynaklı olmayan ilaçlar, insan vücudunda istenmeyen bazı yan etkilere sahiptir. Sentetik maddelerin sanayi, tıp ve tarım gibi her alanda kullanılması, insan sağlığını ve çevreyi tehdit etmektedir. Bundan dolayı canlı bünyesinde ve ekosistemde, kaynağı bilinsin ya da bilinmesin birçok hastalık kontrolsüz bir şekilde çoğalmaktadır. Bu durum, canlı vücudundaki olumsuz etkileri yok etmek için insanları geleneksel yöntemleri kullanmaya itmiş ve bu geleneksel yöntemlerin de ana iskeletini bitkiler oluşturmuştur. Bitkisel kaynaklı ilaçların çok eski dönemlerden itibaren kullanılıyor olması, yan etkileri hakkında detaylı bilgiye ulaşmamızı sağlamıştır. Ayrıca bitkisel drogların birden çok etkisi bulunurken, yapay ilaçlar genel olarak tek tip bir etki göstermektedir. Bu durum sentetik ilaçlardan yeterli verim almayı da engellemiştir (Ertürk ve Demirbağ, 2003).

Yapılan araştırmalar sonucunda bitkilerin, ekosistemle olan ilişkisinde, savunma, korunma, ortama uyum, hayatta kalma ve nesillerini devam ettirme gibi önemli olaylar açısından çeşitli avantajlar sağlayan, sekonder metabolit olarak tanımlanan oldukça karmaşık mekanizmaların ürünleri olan kimyasal maddeler içerdikleri belirlenmiştir (Bourgaurd ve Ark). Çok büyük yapısal çeşitliliğe sahip olan sekonder metabolitler, bitkide sekonder metabolizma yollarının ara ürünlerinden, özel yollarla üretilmektedirler. Sekonder metabolitler üzerinde yapılan araştırmalarda bu bileşiklerin bitkiler tarafından çok az miktarlarda üretildiği belirlenmiştir. Buna karşılık doğal gıda ve ilaç ham maddeleri (farmasötikler, gıda katkı maddeleri, tatlan-

dırıcılar, boyalar, koku vericiler, yapıştırıcılar, insektisitler, pestisitler vb.) bulmak üzere bu metabolitler üzerinde yapılan araştırmalar gün geçtikçe artmakta ve bunun sonucunda da ekonomik olarak önem kazanmaktadırlar(Başer, 1990; Baytop, 1999; Ahıskalioğlu, 2007).Bitki sekonder metabolitleri geniş moleküler çeşitliliğe sahip olması ile birlikte birçok biyolojik aktivitelere de sahip organik moleküllerdir. Günümüzde birçok bitki sekonder metabolitinin kimyasal yapısı belirlenmiş ve bunlardan pek çoğunun biyolojik aktiviteleri (antioksidan, antikanser, anti bakteriyel, anti fungal, insektisidal vb.) tespit edilmiştir. Bitki sekonder metabolitlerinin izole edilmesi, yapı tayinlerinin yapılması ve değişik biyolojik aktivitelerinin belirlenmesini kapsayan çalışmalar son 50 yıl içinde ivme kazanmış ve halen de bilim camiasında popülerliğini koruyan konulardan biridir. Özellikle bitkilerden izole edilen bazı bileşiklerin değişik hastalıklara karşı ilaç formülasyonlarına girmesi ve ilaç adayı moleküllerin tespit çalışmalarının halen ve tüm hızıyla devam etmesi bu tür çalışmaların önemini göstermektedir. 2001 yılı verilerine göre, bitki kaynaklı ilaç hammaddeleri listesi 122 etken maddeyi kapsamaktadır (Fabricant, 2001). Bitkilerden bugüne kadar yaklaşık olarak 100.000 sekonder metabolit izole edilip tanımlanmıştır ve her yıl bu sayıya 4.000 kadar yeni bileşik eklenmektedir.

Bunlar arasında bitkiyi, patojenlere karşı koruyan antibakteriyel, antifungal, antiviral maddeler (fitoaleksinler), çimlenmeyi önleyici maddeler, doğal yaşamda rekabet gücünü (allelpati) artıran ve toksik maddeler; UV ışınlar, tuzluluk, kuraklık gibi zararlı çevresel etmenlerin neden olduğu stres koşullarında direnç arttırıcı metabolitler; zararlı hayvanlar ve otlara karşı korunmayı sağlayan insektisit, herbisitler; tozlaşma ve tohum dağılımını sağlamak üzere hayvanları cezbedecek renkli ve güzel kokulu metabolitler bulunmaktadır (Charwood, 1990). Sekonder metabolitlerin çoğu bazı bitkiler tarafından üretilmezken, bir bitki cinsine ve hatta bazen tek bir bitki türüne de özgü olabilirler(Ramachandra, 2002). Bitkilerin değişik kısımları (kökleri, yaprakları, dalları/gövdeleri, kabukları, çiçekleri ve meyveleri) genellikle fenolik bileşikler (flavonoidler, fenolik asitler, stilbenler, tanninler, kumarinler, lignanlar ve ligninler) açısından zengin olup, pek çok hastalığın yok edilmesinde de önemlidirler.

Bu bağlamda bu çalışmada ülkemize endemik bir tür olan *Vinca soneri* bitkisinin sekonder metabolit profilinin ortaya konulması ve bitkiden izole edilen moleküllerin antioksidan aktivitelerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2023 yılı itibarı ile <https://scifinder-n.cas.org/> ve <https://www.sciencedirect.com/> veri tabanlarında yapılan taramada “*Vinca soneri*” terimlerinin herhangi bir sonuç vermediği görülmüştür. <https://dergipark.org.tr/> veri tabanında yapılan taramada ise 3 çalışmaya rastlanmıştır. Çalışmalardan ilki bitkinin Türkiye florasındaki ilk kaydını içermekte (Koyuncu, 2012), *Vinca soneri* bitkisinden izole edilip tanımlanan loganik asidin (bir iridoid glikozit) izolasyonunu ve probiyotik bakteriler üzerine etkisini özetlemektedir (Çelebi ve ark., 2020). Üçüncü çalışma ise *Vinca soneri* bitkisinin uçucu organik bileşiklerin ve metanol ekstraktının HPLC(Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) tekniği ile analizini içermektedir (Sezer ve Uysal, 2018). Çalışmaya göre, kafeik asit, klorojenik asit ve rutin analiz edilen standartlar içinde 24.6-40.1 mg/kg aralığında değişen miktarlarda majör fenolikler olarak belirlenmiştir. Çalışmada paylaşılan HPLC kromatogramında bitki ekstraktının birçok majör bileşeni tanımlanamamıştır. <https://tez.yok.gov.tr/> veri tabanında ise *Vinca soneri* bitkisinin de yer aldığı bir tezde bitkiden α ve β -yohimbin (indol alkaloid türevleri) izole edilmiştir (Bahadori, 2011). Ancak tez bulguları herhangi bir bilimsel makaleye dönüştürülmemiştir.

TÜBİVES verilerine göre ülkemizde *Vinca soneri* 'den başka üç farklı *Vinca* türü (*V. major*, *V. minor* ve *V. herbacea*) yayılış göstermektedir. *Vinca soneri* ise hâlihazırda TÜBİVES kayıtlarına geçirilmemiştir. *Vinca* türlerinin, alkaloidler (Sultana ve ark, 1995), iridoidler (Bianco ve ark, 2005), flavonoidler (Szostak ve Kowalewski, 1975), organik asitler gibi sekonder metabolit profiline sahip olduğu rapor edilmiştir (Şöhretoğlu ve ark, 2013).

Bir serbest radikal, atomik yörüngelerinde eşleşmemiş bir elektron içeren, serbest halde bulunabilme yeteneğine sahip herhangi bir moleküler tür olarak tanımlanabilir.

Eşlenmemiş bir elektronun varlığından dolayı, radikaller oldukça kararsızdır ve reaktiftir. Diğer moleküllere bir elektron verebilir veya onlardan bir elektron alabilirler, bu nedenle oksidan veya indirgeyici gibi davranırlar. Farklı birçok hastalık serbest radikallerin biyolojik sistemlere verdiği hasardan kaynaklanmaktadır. Yaygın olarak bulunan radikaller; hidroksil radikali, süperoksit anyon radikali, hidrojen peroksit, singlet oksijen, hipoklorit, nitrik oksit radikali ve peroksinitrit radikalidir. Bunlar, hücrelerin çekirdeğinde ve zarlarında DNA, proteinler, karbonhidratlar ve lipitler gibi biyolojik moleküllere zarar verme yeteneğine sahip oldukça reaktif türlerdir. Serbest radikaller, hücre hasarına ve homeostatik bozulmaya yol açarak yaşayan sistemler için önemli olan her türlü makromoleküllere saldırır. Bunlar arasında lipitler, nükleik asitler ve proteinler ana hedeflerdir.

Serbest radikaller ya insan vücudundaki normal temel metabolik süreçlerden ya da X-ışınlarına maruz kalma, ozon, sigara içimi, hava kirleticiler ve endüstriyel kimyasallar gibi dış etmenlerden kaynaklanmaktadır. Serbest radikal oluşumu hem enzimatik hem de enzimatik olmayan reaksiyonların bir sonucu olarak hücrelerde sürekli olarak meydana gelir. Serbest radikaller ile vücutta bulunan antioksidan mekanizmasının serbest radikaller lehine bozulması oksidatif stres olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikal üretimi ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengesizliğin bir sonucu olarak ortaya çıkan oksidatif stres, lipitler, proteinler ve nükleik asitler dahil olmak üzere çok çeşitli moleküler türlerin hasar görmesi ile sonuçlanır. Oksidatif stresin oluşması ve devamlı hale gelmesi özellikle diyabet, kanser, yaşa bağlı göz hastalıkları ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların indüksiyonunda ve komplikasyonlarında rol oynamaktadır.

Vücudun antioksidan mekanizmasının yetersiz kaldığı durumlarda serbest radikaller ve verdiği zararların minimize edilmesi için diyetle alınan antioksidanların önemini ortaya artmaktadır. Bitkilerin tedavi edici/tedaviye yardımcı özelliklerinden dolayı bütün dünyada yüzyıllar boyunca kullanılmaktadır. Birçok bitki sekonder metaboliti ya direkt olarak ya da bitki metabolitleri temel alınarak yarı sentetik ilaç etken maddeleri geliştirilmiştir. Doğada yayılış gösteren bitkilerin sekonder metabolitlerinin tanımlanması ve profilendirilmesi bitkinin farmakolojik olarak kullanılabilirliğini ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada bilim dünyasına yeni kazandırılmış ülkemizin endemik türlerinden biri olan *Vinca soneri* bitkisinin fitokimyasal içeriği belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmada bitkinin toprak şt kısımlarının metanol ekstraktı değişik kromatografik ayırma işlemlerine tabi tutularak bitkinin sekonder metabolit profili ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bitkiden saflaştırılan sekonder metabolitlerin kimyasal yapıları spektroskopik yöntemlerle belirlenmiştir. İzole edilen ve yapıları aydınlatılan bileşenlerin antioksidan kapasiteleri değerlendirilmiştir.



3. MATERYAL ve METOT

3.1. Genel Analiz Şartları ve Cihazlar

Çalışmada kolon kromatografisinde (KK) kullanılan çözücüler (metanol, etil asetat) teknik kalitede tedarik edilip distile edildikten sonra kullanıldı. Preperatif-HPLC (p-HPLC) ve flash kromatografide (FK) ise HPLC-grade çözücüler (metanol ve asetonitril) kullanıldı. KK işlemlerinde sefadeks LH-20 dolgu maddesi olarak kullanıldı. P-HPLC çalışmalarında Shimadzu Prominence model LC-20AR dual pompa, LC-20AT ultraviyole (UV) detektör ve FRC-20A fraksiyon kolektörüne sahip yarı preperatif HPLC cihazı kullanıldı. Prep-HPLC çalışmalarında 20x250 mm, 5µm partikül büyüklüğüne sahip EMR marka kolon kullanıldı. FK ayırma işlemlerinde ise Buchi Reveleris X2 model UV ve ELSD (Evaporative ışın saçılımlı detektör) bulunan cihaz kullanıldı. FK cihazında kolon olarak Buchi Ecoflex C18 (120 g ve 40 g) hazır dolgulu kolonlar kullanıldı. KK, p-HPLC ve FK işlemlerinde elde edilen fraksiyonların ve saf maddelerin ince tabaka kromatografisi (İTK) işlemlerinde kullanıma hazır alüminyum plakalar (GF₂₅₄) kullanıldı. İTK'ların izlenmesinde UV 254 ve 366 nm ışık altında ve/veya 90:10 etanol: sülfürik asit karışımı sprey edildikten sonra 110 °C'de ısıtılması ile yapıldı. İzole edilen moleküllerin NMR spektrumları Bruker Avance II (¹H için 400 MHz, ¹³C için 100 MHz) cihazda kaydedildi. Antioksidan aktivite testlerinde absorbans ölçümleri Epoch 2 Eliza Reader cihazında yapıldı.

3.2. Bitkisel Materyal

Vinca soneri bitkisi bilim dünyasına yeni kazandırılmış Türkiye'ye (Erzincan ve Sivas) endemik yeni bir *Vinca* türüdür (Bahadori,2011). 1992 yılında Kemaliye İlçesi Sarıkonaklar köyüne yapılan botanik gezisi sırasında Prof. Dr. Osman SONER ve arkadaşları tarafından keşfedilip ilk kaydı yapılmıştır. Türkiye'de kaydedilen üç *Vinca* türünden (*V. major*, *V. minor* ve *V. herbacea*) farklı görünüme sahip, koyu yeşil yaprakları ve mavi-beyazımsı çiçekleri olan dik çalılıklar olarak ilk örnekleri Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumunda (AEF) saklanmıştır.(Koyuncu, 2012). Bu çalışmada kullanılan bitki örnekleri de ilk kaydın yapıldığı yerden toplanarak kurutulup öğütülerek çalışmaya hazırlanmıştır. Şekil 3.1'de bitkinin arazide çekilmiş görseli verilmiştir.

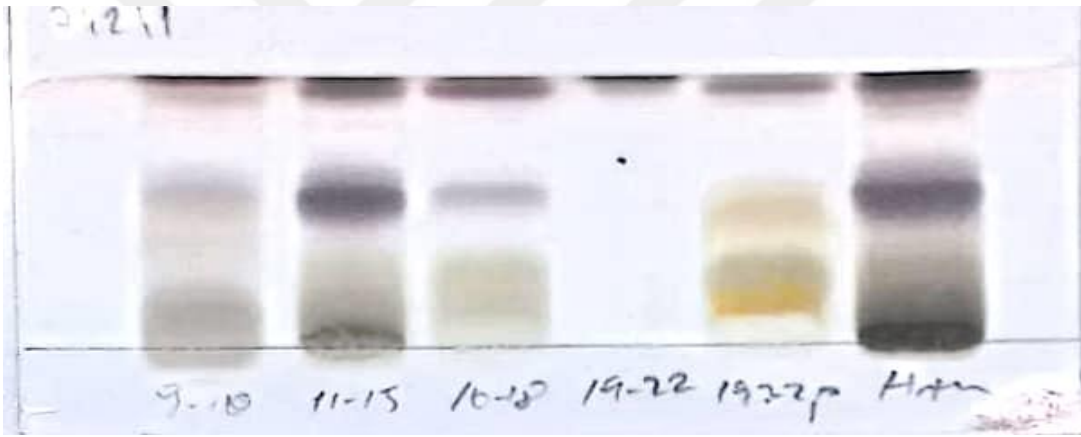


Şekil 3. 1. *Vinca soneri* Bitkisinin Görüntüsü

3.3. Sekonder Metabolitlerin İzolasyonu

Bitkinin fitokimyasal içeriğinin ortaya konulması için 500 g bitki örneği 3 L metanol ile 24 saatlik periyotlarda maserasyona tabi tutuldu. Maserasyondan sonra çözücüler filtre kağıdından süzülerek toplandı. Maserasyona işlemi 3 defa tekrar edildi ve her periyotta elde edilen çözücüler birleştirilerek evapore edildi. Elde edilen koyu yeşil yarı akışkan ekstrakt (60 g) ayırma ve saflaştırma işlemlerinde kullanıldı.

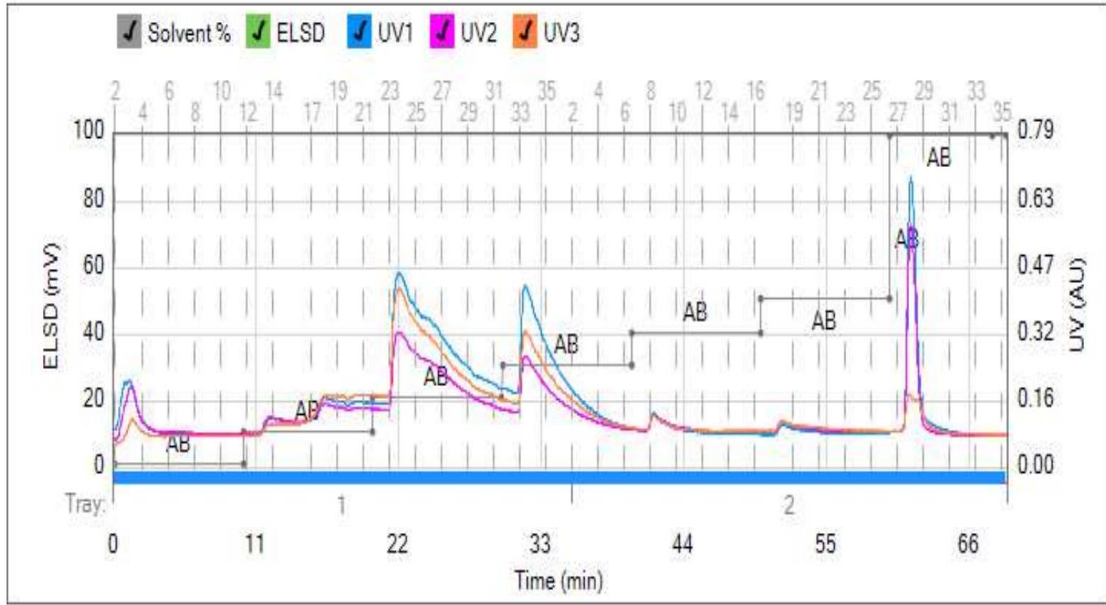
Öncelikle ham ekstrakt 5'er gramlık parçalara ayrılarak Sefadeks LH-20 üzerinden metanol hareketli faz olarak kullanılarak fraksiyonlandırıldı. Uygulama 5 kez tekrar edilerek her uygulamadan elde edilen fraksiyonlar benzer İTK profiline sahip olanlar kombine edilerek dört alt fraksiyonlar elde edildi (AF1: fr 9-10, AF2: fr 11-15, AF3: fr 16-18, AF4:19-22). İTK görseli Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3. 2. *Vinca soneri* Metanol Ekstresi Sefadeks LH-20 Kolonu İTK Görseli

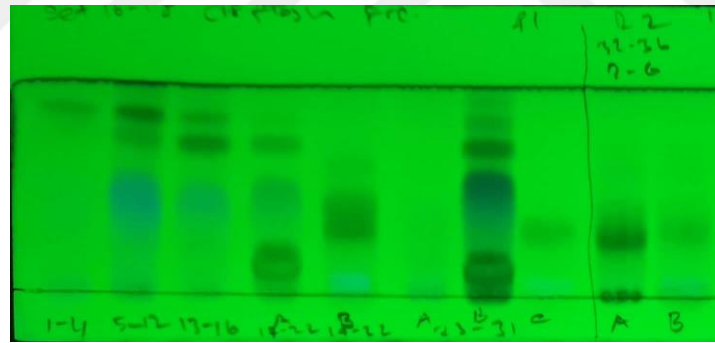
AF4 metanolde çözülerek oda şartlarında 24 saat bekletildikten sonra sarı renkli kristaller gözlemlendi. Kristaller ortamdan ayrıldı metanol ile yıkandı. Parlak sarı renkli ve belirli şekillere sahip kristaller bileşik 4'ü verdi (280 mg).

AF3, Flash Kromatografisi kullanılarak C18 kolon üzerinden fraksiyonlandırıldı. Hareketli faz olarak su: metanol karışımı 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5 ve 0:10 oranlarında kullanıldı. Toplamda 36 fraksiyon toplandı ve benzer İTK görüntüsüne sahip olanlar birleştirildi (1-4, 5-12, 13-16, 17-22, 23-31 ve 32-36). AF3'ün Flash Kromatografisi Şekil 3.3.'de gösterilmiştir.



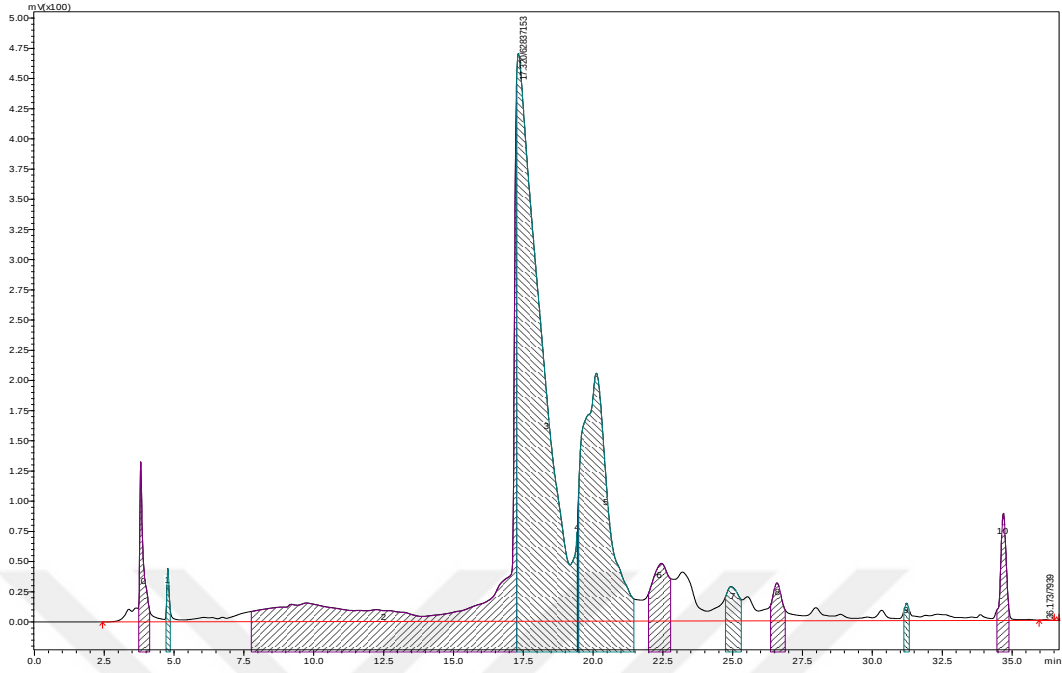
Şekil 3. 3.AF-33 Flash Kromatogramı (330, 280, 254 nm)

Birleştirtme işlemi sonucu elde edilen fraksiyonların İTK görüntüsü Şekil 3.4’de verilmiştir.



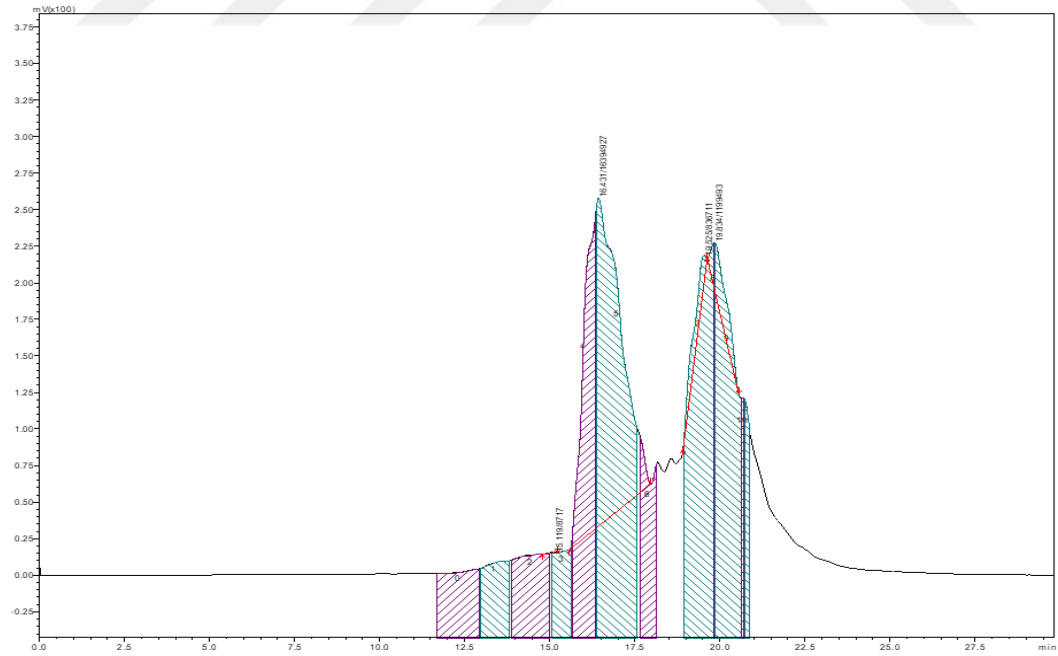
Şekil 3. 4.AF3 FK İşleminden Elde Edilen Fraksiyonların İTK Görseli

Fraksiyon 17-22 ve 23-31 aralıkları p-HPLC ile fraksiyonlandırılarak 17-22A, 17-22B olmak üzere alt fraksiyona ayrıldı. Şekil 3. 5.’de verilmiştir.



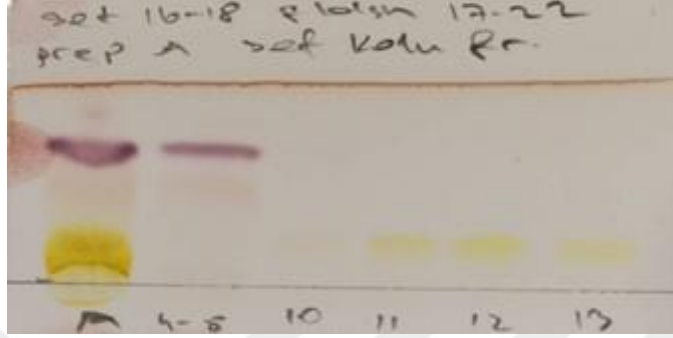
Şekil 3. 5.Fraksiyon 17-22 Prep- HPLC Kromatogramı (330 nm)

Fraksiyon, Şekil 3. 6.'de Prep-HPLC ile ayırma tabi tutularak 23-31A ve 23-31B olmak üzere iki alt fraksiyona ayrıldı.



Şekil 3. 6.Fraksiyon 23-31 Prep- HPLC Kromatogramı (330 nm)

17-22A sefadeks LH-20 ile metanol kullanılarak tekrar ayrıldı. Kolondan elde edilen fraksiyonların İTK görüntüsü Şekil 3.7’de verilmiştir. Toplamda 13 fraksiyon toplandı. Fraksiyon 4-8 aralığından bileşik 1 (4 mg), fraksiyon 10-13 aralığından ise bileşik 2 (12 mg) elde edildi.



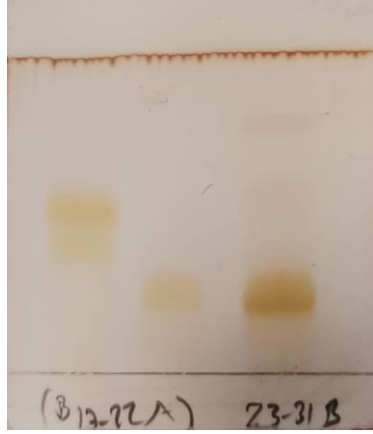
Şekil 3. 7.17-22A Fraksiyonunun Sefadeks LH-20 Kolonu İTK Görüntüsü

17-22B aralığı ise 17-22A’nın fraksiyonlandırılması işlemindeki şartlar kullanılarak tekrar ayırma ve saflaştırma işlemine tabi tutuldu. Toplanan fraksiyonların İTK görüntüsü aşağıda verilmiştir. Buradan elde edilen fraksiyon 10-12 aralıkları bileşik 5’i (13 mg) verdi.



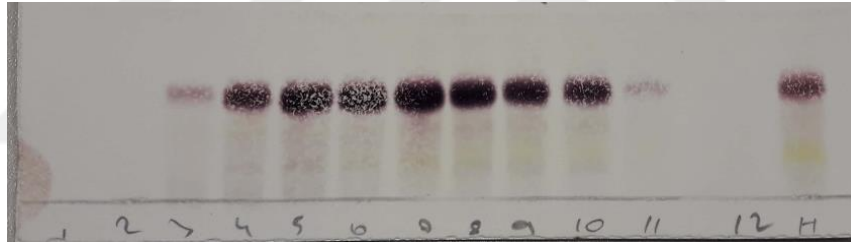
Şekil 3. 8.17-22B Fraksiyonunun Sefadeks LH-20 Kolonu İTK Görüntüsü

23-31B aralığı yukarıdaki şartlarda sefadeks LH-20 ile fraksiyonlandırıldı. Buradan 17-22A’dan elde edilen bileşik 4 tekrar elde edildi. 17-22A ve 23-31B’den ayrılan bileşik 4’ün İTK görseli Şekil 3.9’de verilmiştir.



Şekil 3. 9.17-22A ve 23-31B'nin İTK görseli

AF2 sefadeks LH-20 üzerinden tekrar KK işlemine tabi tutuldu. Mobil faz olarak 1:1 oranında metanol: su kullanıldı. Toplanan 12 fraksiyonun İTK görseli Şekil 3.10'da verilmiştir. Buradantoplanan fr3-10 aralıkları birleştirildi. Çözücüler uzaklaştırıldıktan sonra metanol: su(8:1) içinde tekrar kristallendirilerek Bileşik 3 (450 mg) elde edildi.



Şekil 3. 10.AF2 Sefadeks LH-20 Kolonu İTK Görüntüsü

3.4. Antioksidan Aktivite Testleri

3.4.1. Serbest Radikal (DPPH•) Giderme Aktivitesi

İzole edilen moleküllerin serbest radikal (DPPH•) giderme aktiviteleri (Blois, 1958) tarafından rapor edilen metot temel alınarak yapıldı. DPPH• (2,2-difenil-1-pikril hidrazil) çözeltisi 0,26 mM konsantrasyonunda etanol içinde hazırlandı. Teste tabi tutulan izole edilmiş moleküllerin ve standardın (Troloks) 1 mg/mL olacak şekilde hazırlanan stok çözeltileri hazırlandı. Deney tasarımı Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3. 1. DPPH Aktivitesi İçin 96 Kuyucuk Bazlı Test Tasarımı

Stok miktarı (μ l)	çözelti Metanol Miktarı (μ l)	DPPH Radikali (μ l)	Konsantrasyon (μ g/ml)
1	149	50	5
2	148	50	10
5	145	50	25
10	140	50	50
15	135	50	75
20	130	50	100
40	110	50	200
50	100	50	250

Tablo3.1'deki eklemeler yapıldıktan sonra son karışım 30 dakika karanlık ortamda, oda şartlarında inkübe edildi. İnkübasyondan sonunda 517 nm'deki absorbans Eliza Reader ile kaydedildi. Okunan absorbans değerleri % aktiviteye çevrilerek saflaştırılan moleküller ve standart için IC₅₀değerleri μ M olarak ifade edildi.

3.4.2. Katyonik Radikal (ABTS^{•+})Giderme Aktivitesi

İzole edilen moleküllerin katyonik radikal giderme aktiviteleri (Re ve ark., 1999) tarafından rapor edilen metot temel alınarak 96-kuyucuklu sisteme uyarlanarak yapıldı. Kısaca, ABTS radikali, 2 mM ABTS'nin (2,2'-Azino-bis 3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) 0,1 M pH:7,4 fosfat tamponunda hazırlanmış çözeltisi ile 2.45 mM K₂S₂O₈ (potasyumpersülfat) çözeltisi 1:2 oranında karıştırılıp karanlık ortamda 6 saat reaksiyona tabi tutularak elde edildi. Test edilecek materyallerin 1 mg/mL olacak şekilde hazırlandı. Test tasarımı Tablo3.2'de verilmiştir.

Tablo 3. 2. ABTS Aktivitesi İçin 96 Kuyucuk Bazlı Test Tasarımı

Stok (μ l)	çözelti Metanol (μ l)	miktarı ABTS Radikali (μ l)	Konsantrasyon (μ g/ml)
1	149	50	5
2	148	50	10
5	145	50	25
10	140	50	50
15	135	50	75
20	130	50	100
40	110	50	200
50	100	50	250

Tabloda verilen eklemeler yapıldıktan sonra karışım oda şartlarında ve karanlık ortamda 1 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra son karışımların absorbansı 734 nm’de kaydedildi ve absorbanslar % aktiviteye çevrildikten sonra sonuçlar $IC_{50}(\mu M)$ cinsinden ifade edildi.

3.4.3. İndirgeme Gücü (FRAP) Aktivitesi

İndirgeme gücü aktivite testi (Oyaizu, 1986) temel alınarak test tasarımı 96-kuyucuk sistemine uyarlanarak yapıldı. Deney tasarım şeması Tablo3.3’te verilmiştir. İzole edilen moleküllerin 1 mg/mL derişimlerdeki stok çözeltilerinden ve çizelgede verilen reaktiflerin ilavesi ve inkübasyondan sonra karışımın absorbansı 700 nm’de kaydedildi. Okunan absorbans değerleri Troloks (10–100 $\mu mol/L$) kalibrasyon grafiği ($y=0,0256x-0,0012$) kullanarak izole edilen bileşikler için ise μM Troloks eşdeğeri olarak hesaplandı.

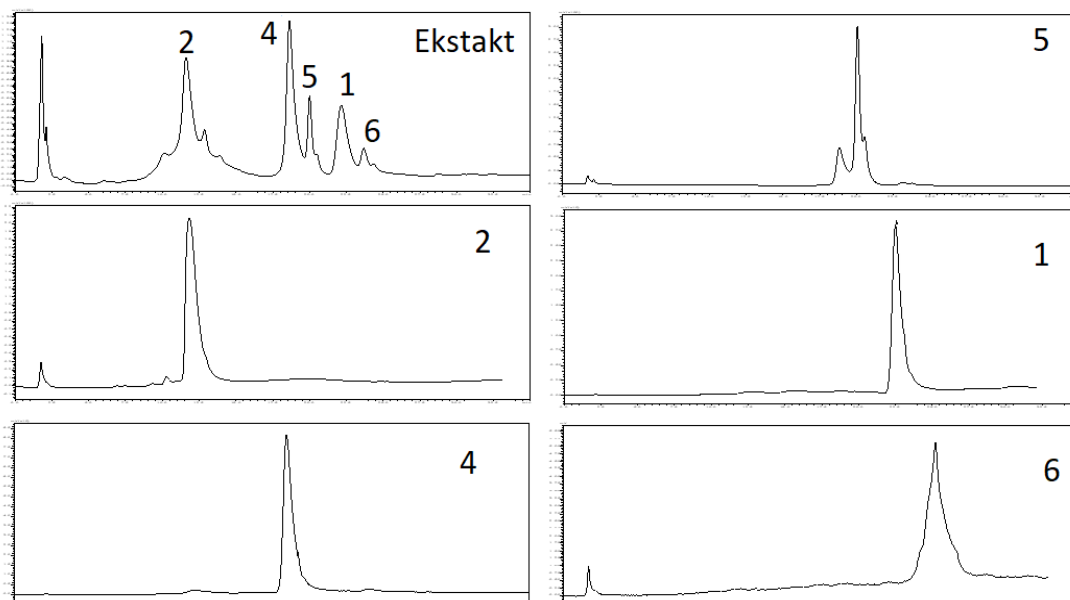
Tablo 3. 3. FRAP Aktivitesi İçin 96 Kuyucuk Bazlı Test Tasarımı

	Pipetleme miktarı (μL)
Stok Çözelti Miktar (1mg/ml)	15.0
0.2 M (pH=6.6 Fosfat Tamponu)	62.5
Potasyum ferrisiyanür $[K_3Fe(CN)_6]$ (%1)	78.25
İnkübasyon (50 °C’de 20 dakika)	
Trikloroasetik asit (TCA) (%10)	78.25
Demir(III) klorür ($FeCl_3$) (%0.1)	15.0

4. BULGULAR

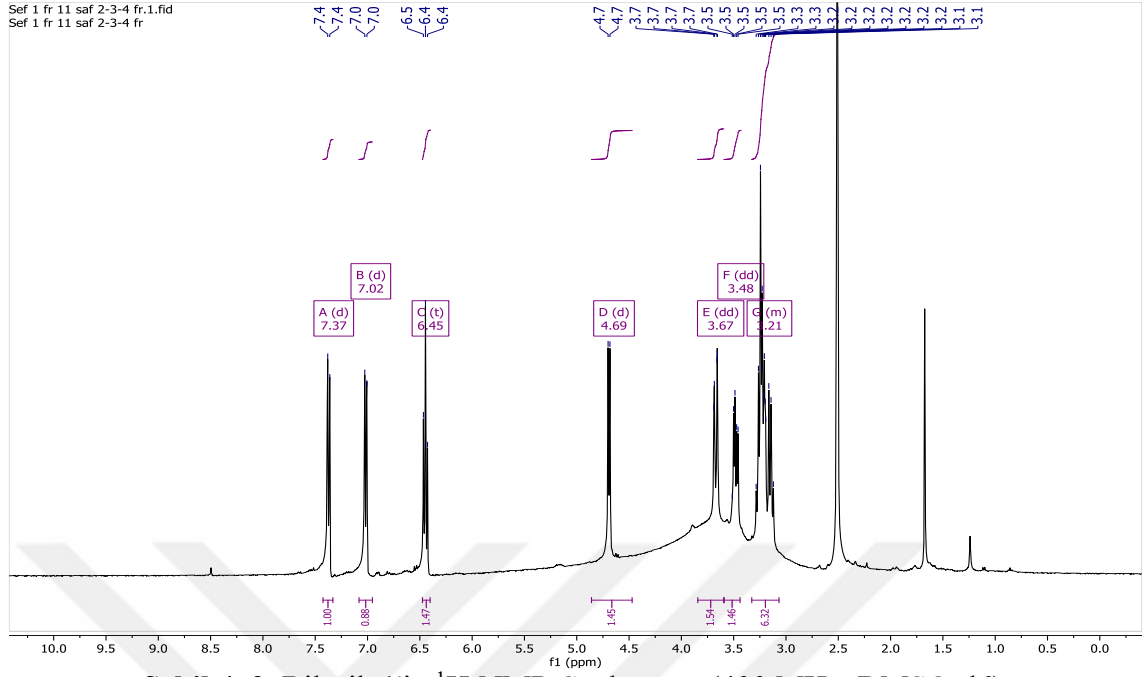
4.1. Sekonder Metabolitlerin Yapı Tayini

Bölüm 3.1’de detaylı olarak verilen yöntemlerle izole edilen moleküller DMSO- d_6 ile çözülerek 1H ve ^{13}C -NMR spektrumları kaydedildi. Bitki ham ekstraktı ve izole edilen bileşenlerin bireysel HPLC kromatogramı Şekil 4. 1.’de verilmiştir.

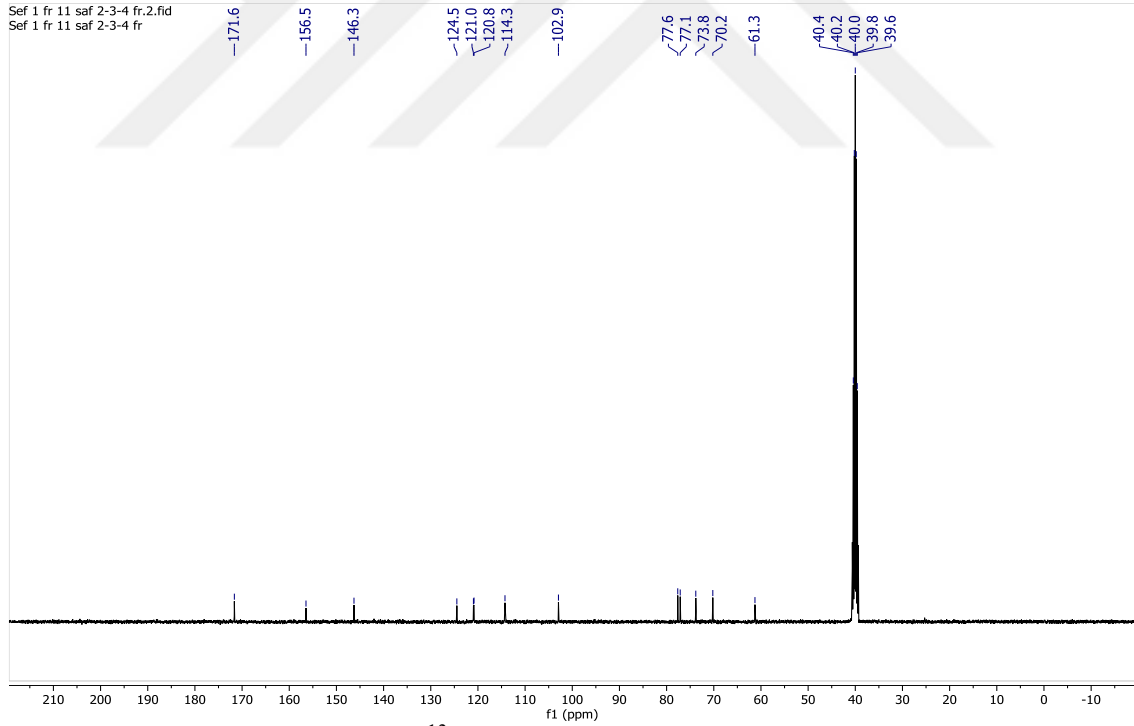


Şekil 4. 1. Bitki Ham Ekstraktı ve İzole Edilen Bileşenlerin HPLC Kromatogramları

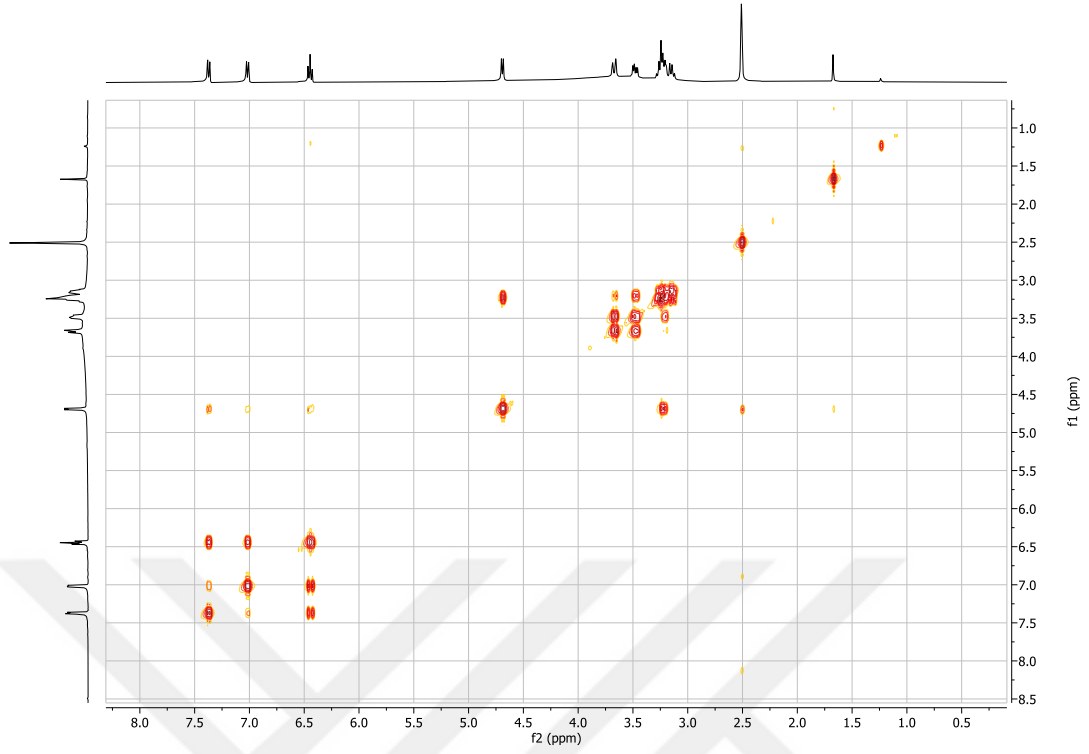
1 (2-hidroksi-3-*O*-glukozil benzoik asit): 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.37 (dd, $J = 7.8, 1.6$ Hz, 1H), 7.02 (dd, $J = 7.8, 1.6$ Hz, 1H), 6.45 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 4.69 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 3.67 (dd, $J = 11.9, 2.0$ Hz, 1H), 3.48 (dd, $J = 11.8, 5.4$ Hz, 1H), 3.40 – 2.76 (m, 4H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 171.6, 156.5, 146.3, 124.5, 121.0, 120.8, 114.3, 102.9, 77.6, 77.1, 73.8, 70.2, 61.3. Bileşiğe ait 1H , ^{13}C -NMR, COSY, HETCOR, ve HMBC spektrumu sırasıyla Şekil 4.2-4.6’da verilmiştir.



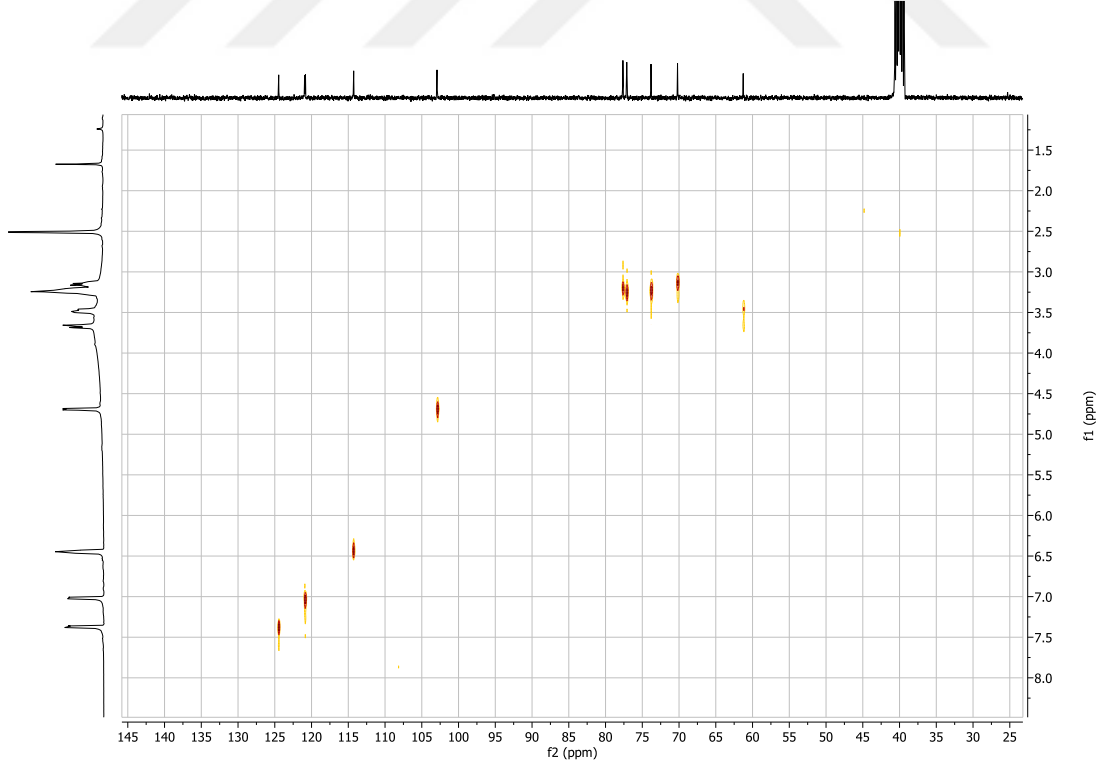
Şekil 4. 2. Bileşik 1'in ^1H -NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO- d_6)



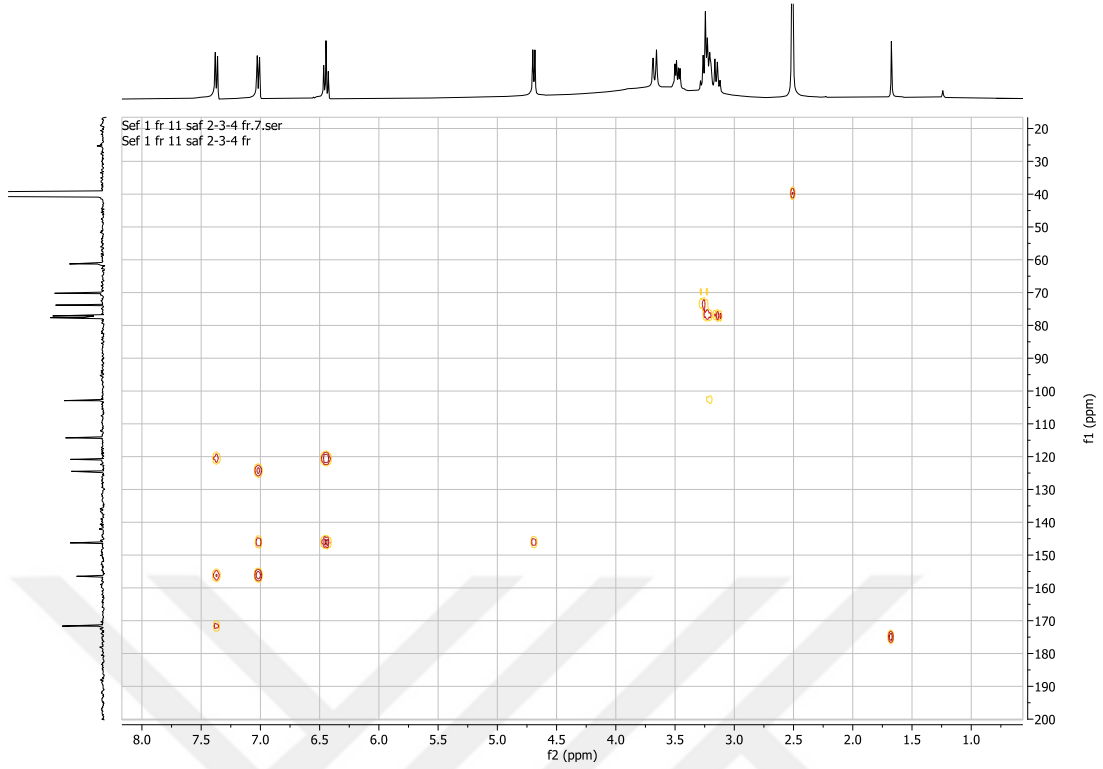
Şekil 4. 3. Bileşik 1'in ^{13}C -NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO- d_6)



Şekil 4. 4. Bileşik 1'in COSY Spektrumu

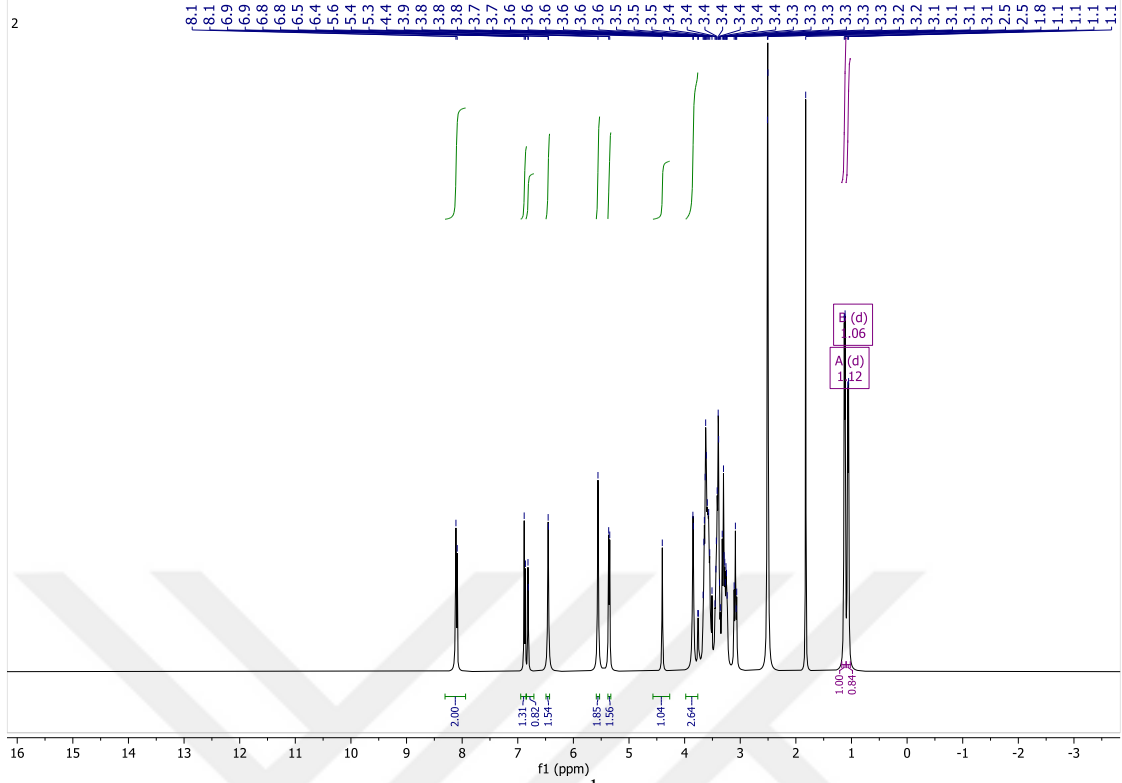


Şekil 4. 5. Bileşik 1'in HETCOR Spektrumu



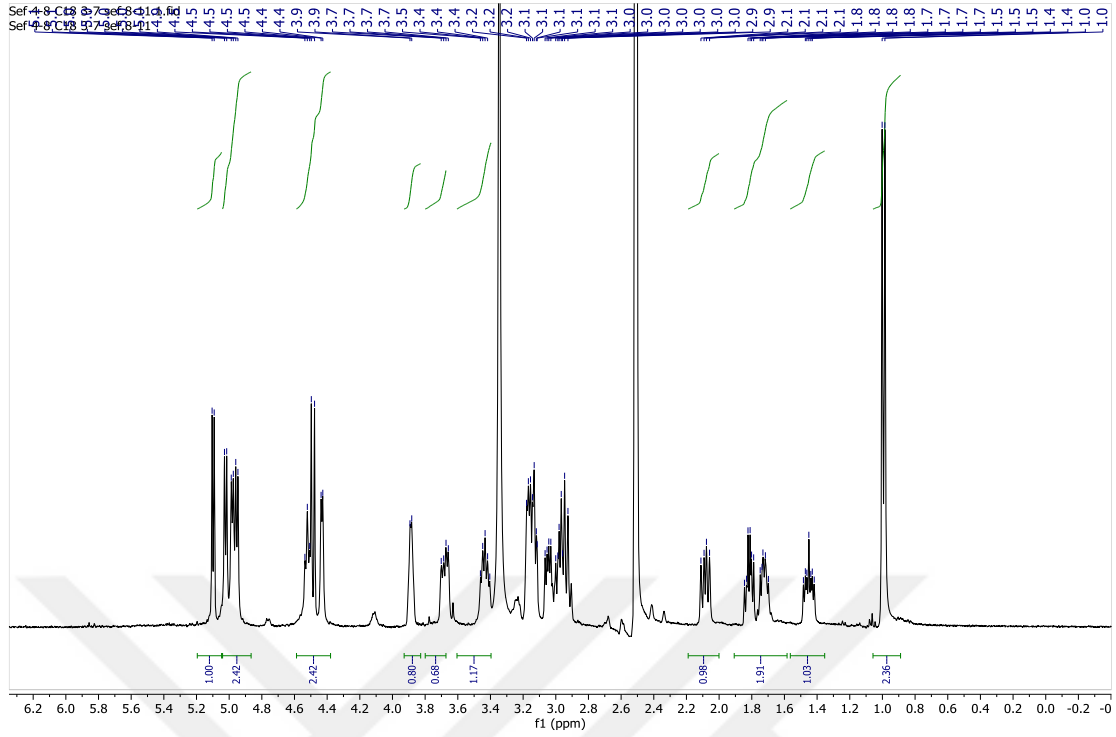
Şekil 4. 6. Bileşik 1'in HMBC Spektrumu

2(Kaemferol-3-*O*-rutinozit-7-*O*-ramnozit): ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.10 (d, $J = 9.2$ Hz, 0H), 6.87 (d, $J = 8.8$ Hz, 0H), 6.81 (d, $J = 2.2$ Hz, 0H), 6.45 (d, $J = 2.1$ Hz, 0H), 5.56 (s, 0H), 5.36 (d, $J = 7.5$ Hz, 0H), 4.40 (s, 0H), 3.89 – 3.82 (m, 0H), 3.76 (d, $J = 3.8$ Hz, 0H), 3.69 – 3.49 (m, 2H), 3.41 (qd, $J = 12.7, 11.2, 6.0$ Hz, 1H), 3.35 – 3.21 (m, 1H), 3.09 (t, $J = 9.3$ Hz, 0H), 1.12 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 1.06 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 178.1, 163.3, 161.4, 157.5, 156.4, 149.1, 145.3, 134.2, 122.5, 121.4, 116.7, 115.7, 106.0, 102.3, 100.5, 100.3, 99.8, 94.9, 77.6, 76.9, 74.1, 73.6, 73.5, 72.4, 71.6, 71.1, 70.9, 70.0, 68.7, 68.5, 65.6, 61.1, 18.4. Bileşiğe ait ^1H -NMR spektrumu Şekil 4.7'de verilmiştir.

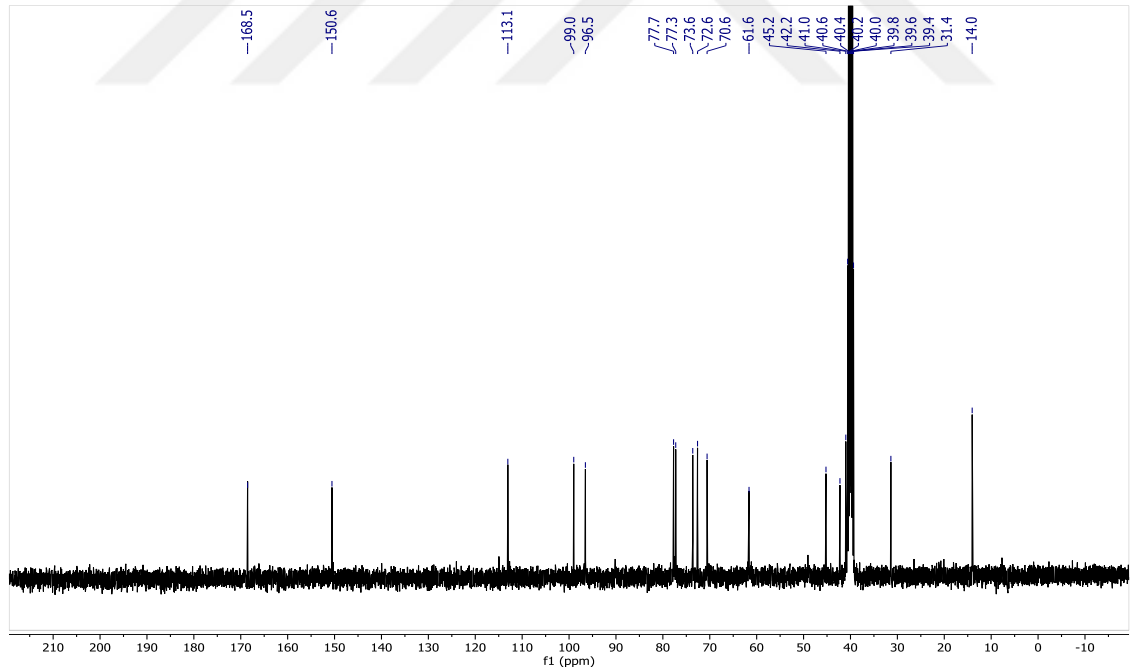


Şekil 4. 7.Bileşik 2'nin ^1H -NMR Spektrumu

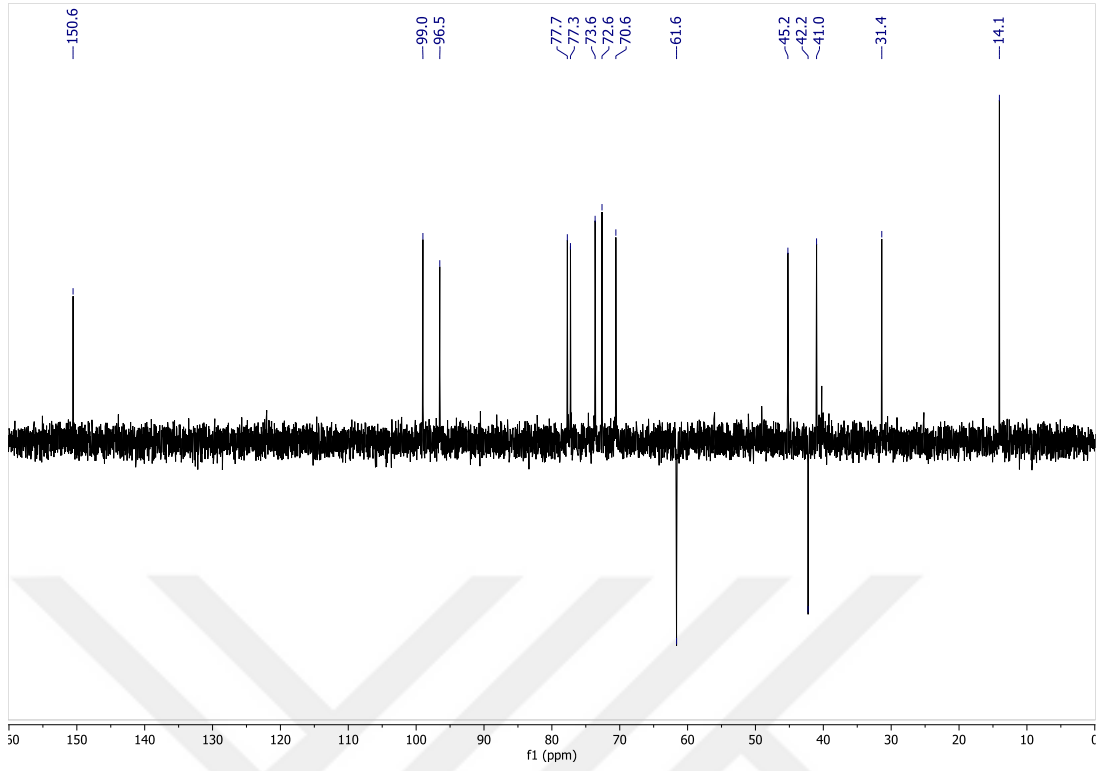
3 (Loganik asit) ^1H NMR: (400 MHz, MeOD) δ_{H} 7.31 (s, 1H, H3), 5.10 (d, $J=5.1$, 1H, H1), 4.49 (d, $J=7.6$, 1H, H1'), 3.89 (m, 1H, H7), 3.67 (dd, $J=10.9$, 5.5, 1H, H6'a), 3.44 (m, 1H, H6'b), 3.15 (m, 1H, H3'), 3.24 (m, 1H, H5'), 3.05 (m, 1H, H4'), 2.98 (m, 1H, H2'), 2.92 (m, 1H, H5), 2.09 (ddd, $J=13.5$, 7.70, 4.5, 1H, H6a), 1.81 (m, 1H, H9), 1.72 (m, 1H, H8), 1.45 (ddd, $J=13.5$, 7.7, 4.5, 1H, H6b), 0.99 (d, $J=6.9$, 3H, H10). ^{13}C NMR (100 MHz, MeOD) δ_{C} 168.5 (C11), 150.6 (C3), 113.1 (C4), 99.0 (C1), 96.5 (C1'), 77.7 (C5'), 77.3 (C3'), 73.6 (C2'), 72.6 (C7), 70.6 (C4'), 61.6 (C6'), 45.2 (C9), 42.2 (C6), 41.0 (C8), 31.4 (C5), 14.0 (C10). Bileşiğe ait ^1H ve ^{13}C -NMR spektrumları Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da verilmiştir. Bileşiğe ait ^{13}C -DEPT135, ^{13}C -DEPT90, HETCOR, COSY Spektrumları Şekil 4.10-4.13'de verilmiştir.



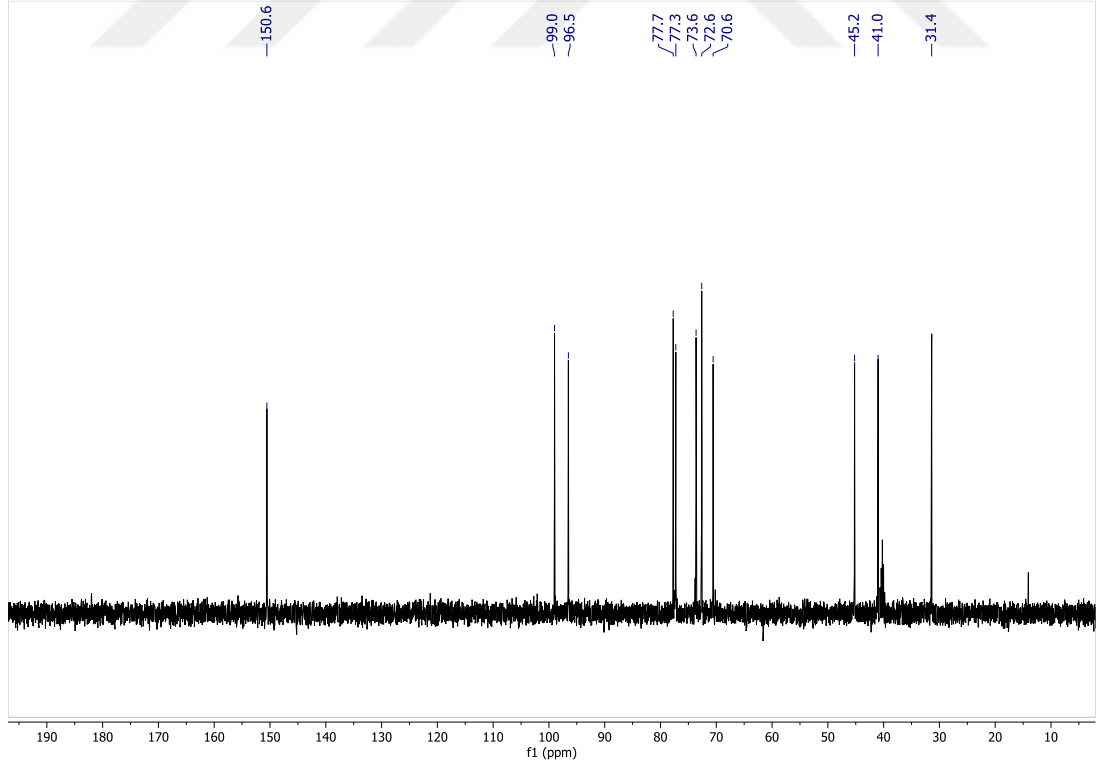
Şekil 4. 8.Bileşik 3'ün ^1H -NMR Spektrumu (400 MHz, DMSO-d₆)



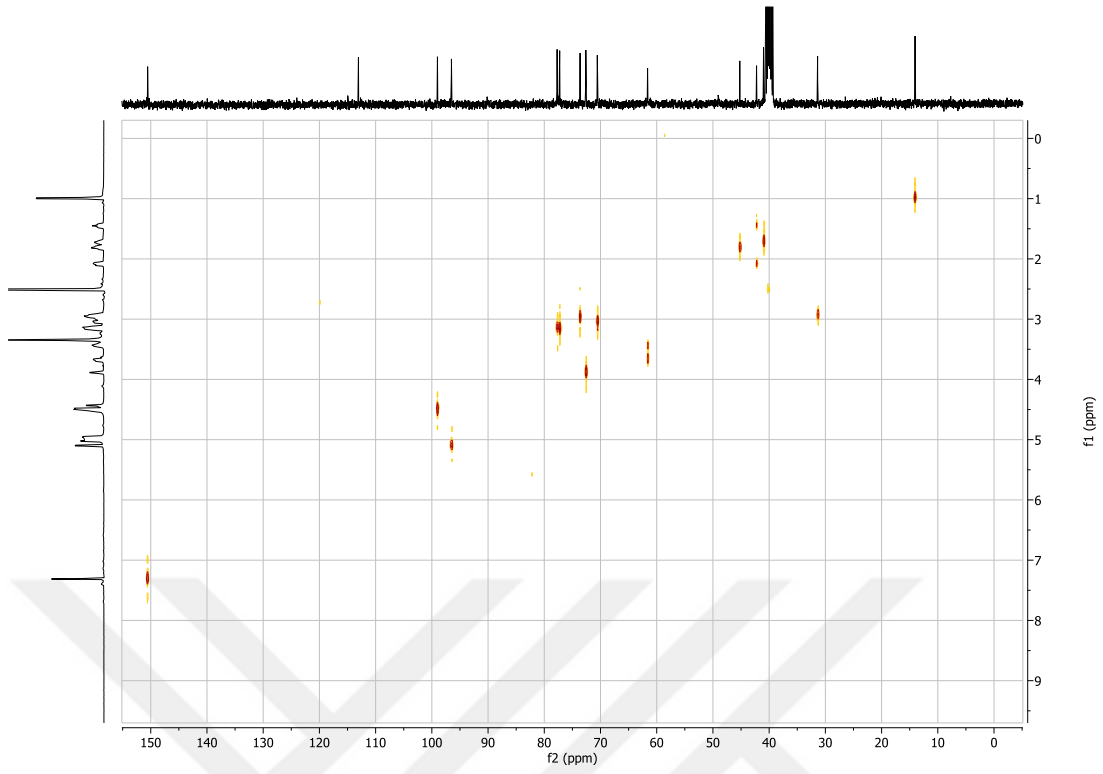
Şekil 4. 9.Bileşik 3'ün ^{13}C -NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-d₆)



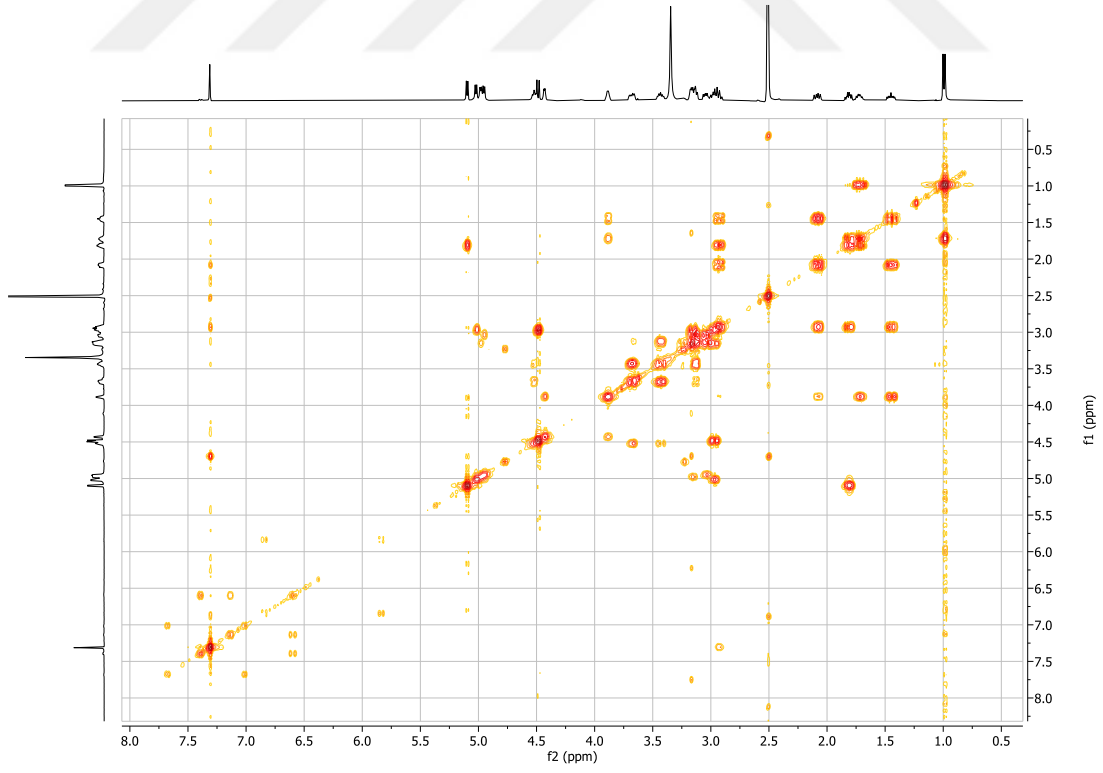
Şekil 4.10.Bileşik 3'ün ^{13}C -DEPT135 NMR Spektrumu



Şekil 4.11.Bileşik 3'ün ^{13}C -DEPT90 NMR Spektrumu

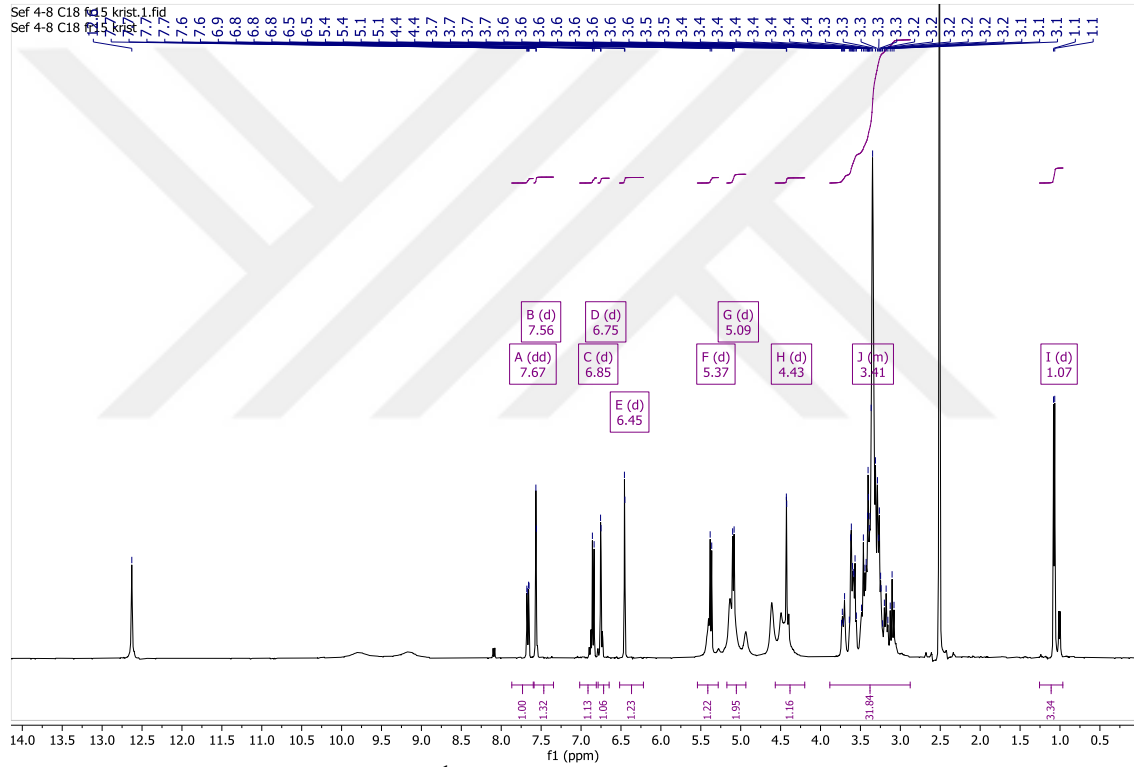


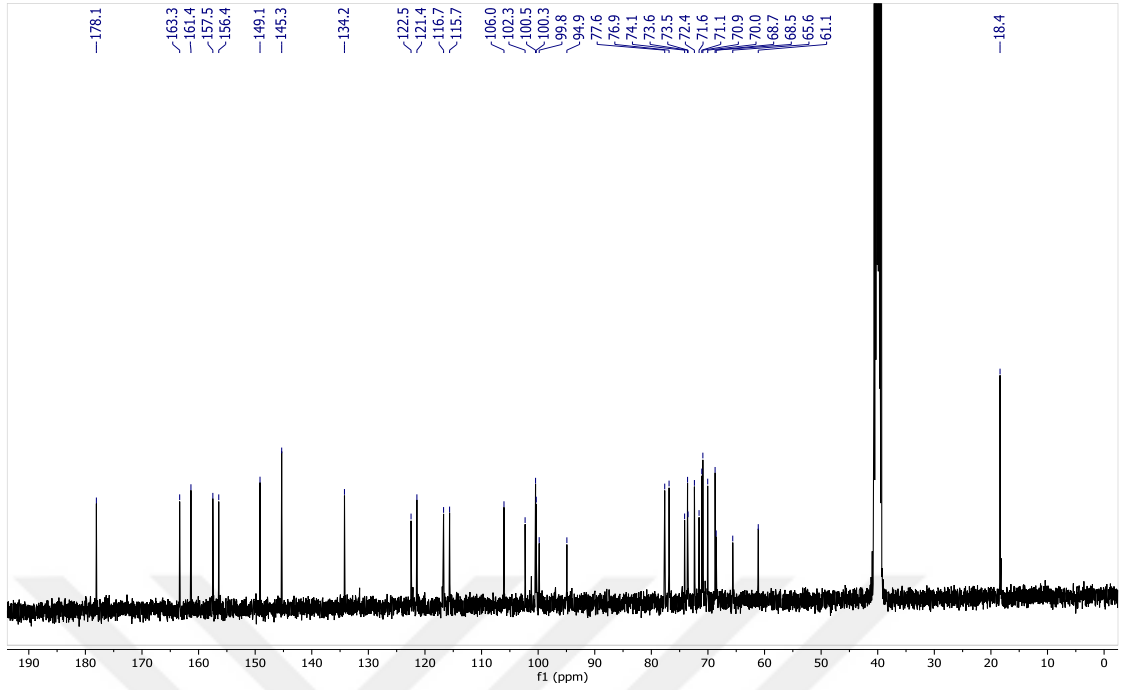
Şekil 4.12.Bileşik 3'ün HETCOR Spektrumu



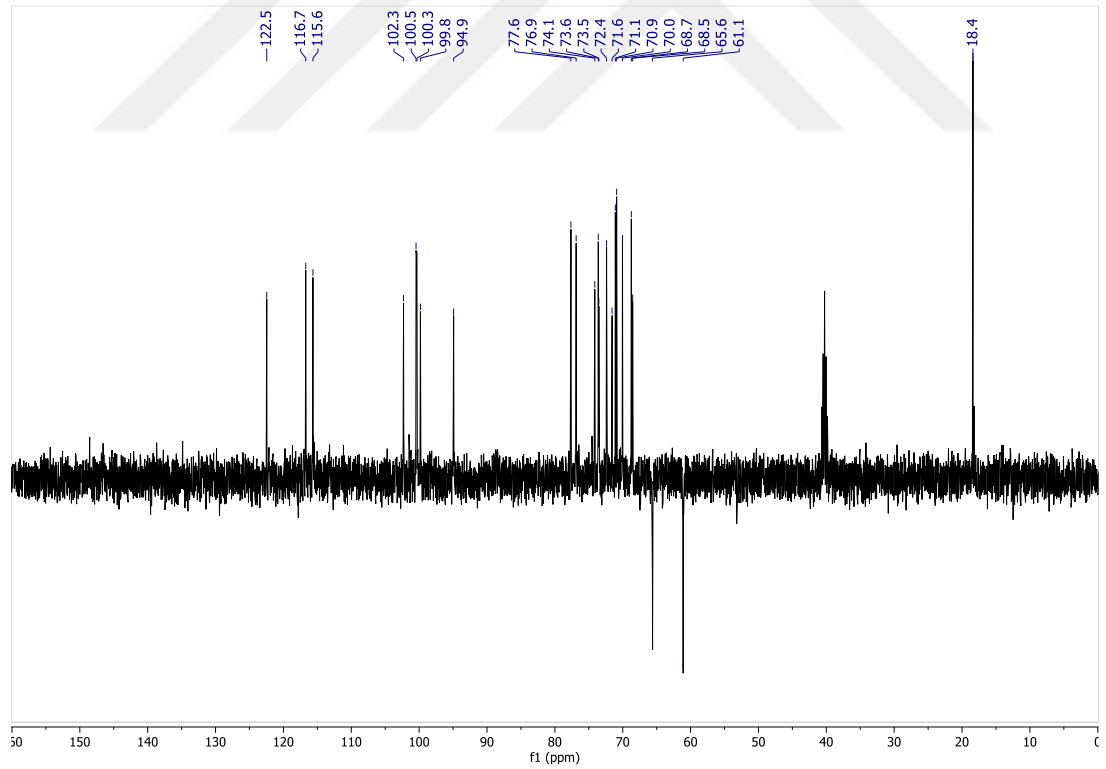
Şekil 4.13.Bileşik 3'ün COSY Spektrumu

4 (Rutin-7-*O*-glikozit): ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.67 (dd, $J = 8.5, 2.3$ Hz, 1H), 7.56 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.75 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 6.45 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 5.37 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 5.09 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 4.43 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 3.88 – 2.88 (m, 32H), 1.07 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 178.1, 163.3, 161.4, 157.5, 156.4, 149.1, 145.3, 134.2, 122.5, 121.4, 116.7, 115.7, 106.0, 102.3, 100.5, 100.3, 99.8, 94.9, 77.6, 76.9, 74.1, 73.6, 73.5, 72.4, 71.6, 71.1, 70.9, 70.0, 68.7, 68.5, 65.6, 61.1, 18.4. Bileşiğe ait NMR spektrumları Şekil 4.14 ve Şekil 4.15’de verilmiştir. Bileşiğe ait ^{13}C -DEPT135, HETCOR, COSY Spektrumları Şekil 4.16-4.18’ de verilmiştir.

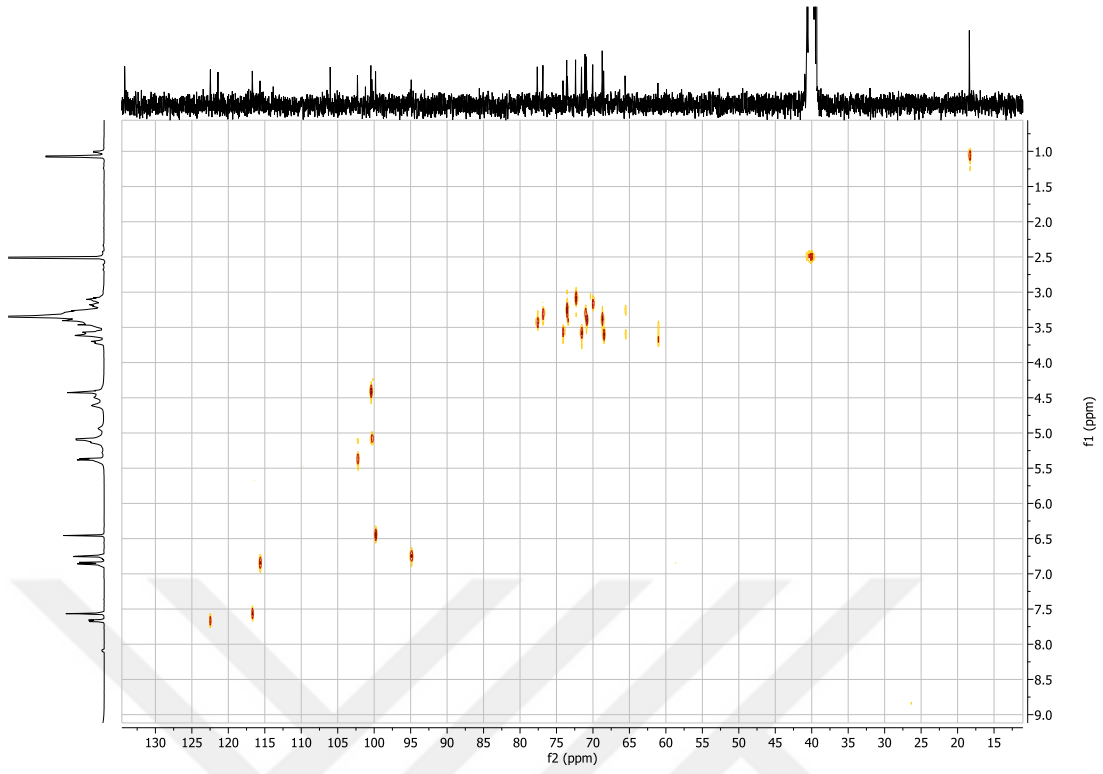




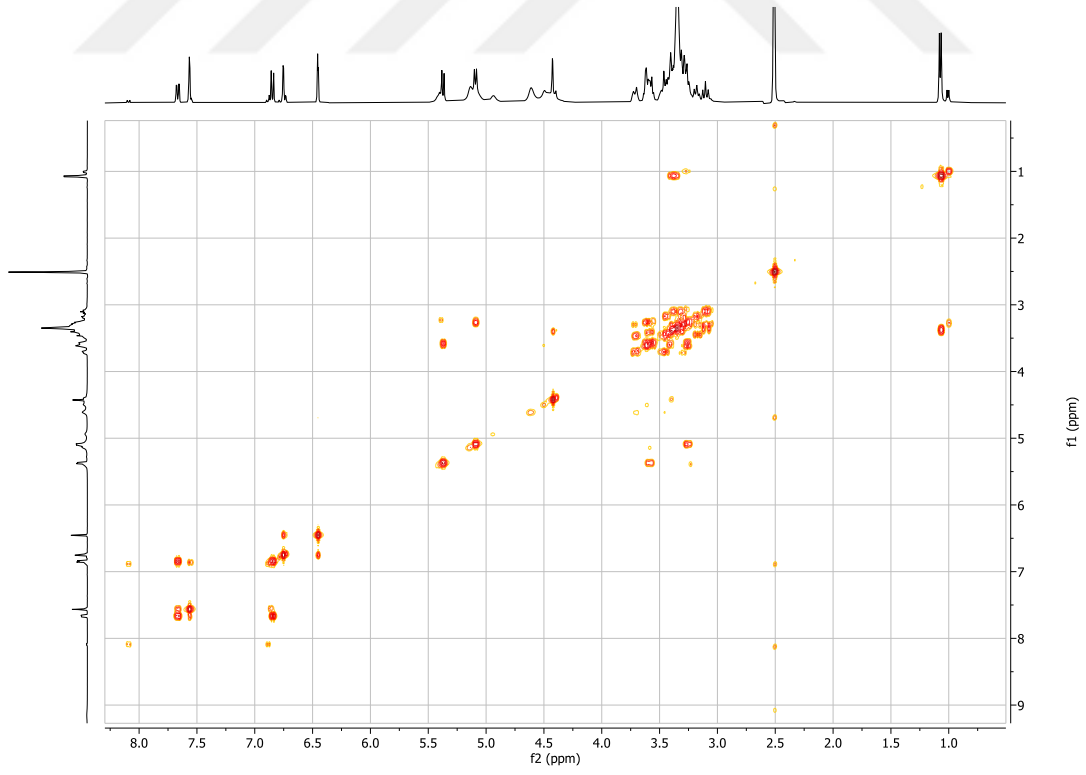
Şekil 4.15.Bileşik 4'ün ^{13}C -NMR Spektrumu (100 MHz, DMSO-d₆)



Şekil 4.16.Bileşik 4'ün ^{13}C -DEPT135 NMR Spektrumu

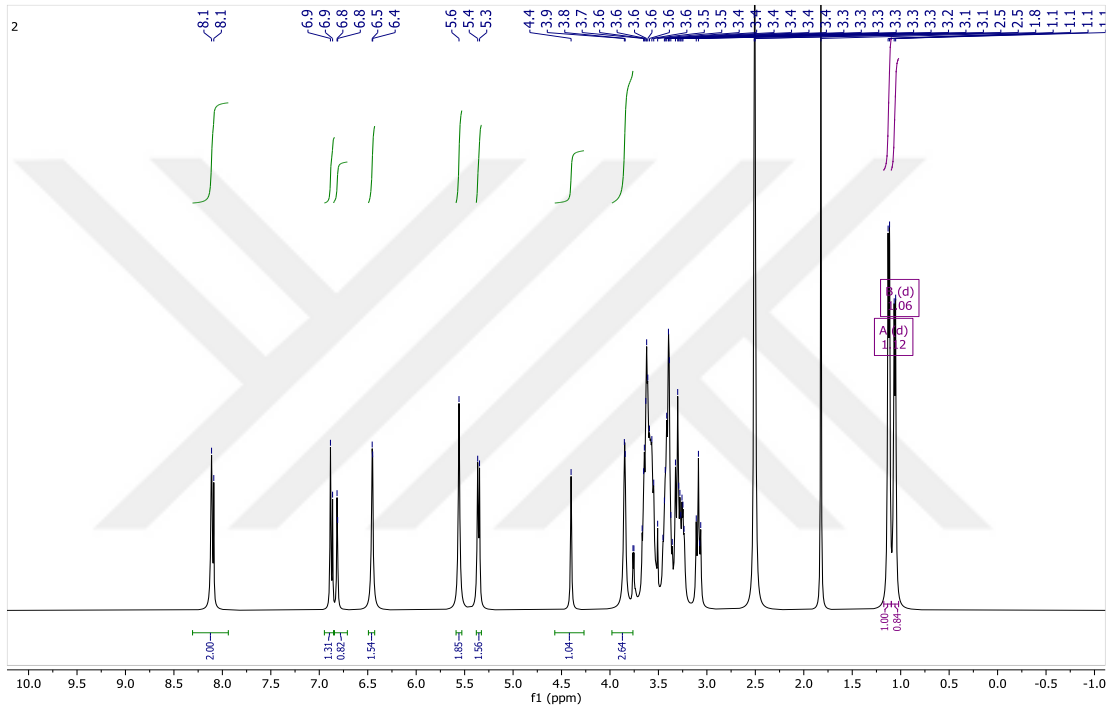


Şekil 4.17.Bileşik 4'ün HETCOR Spektrumu



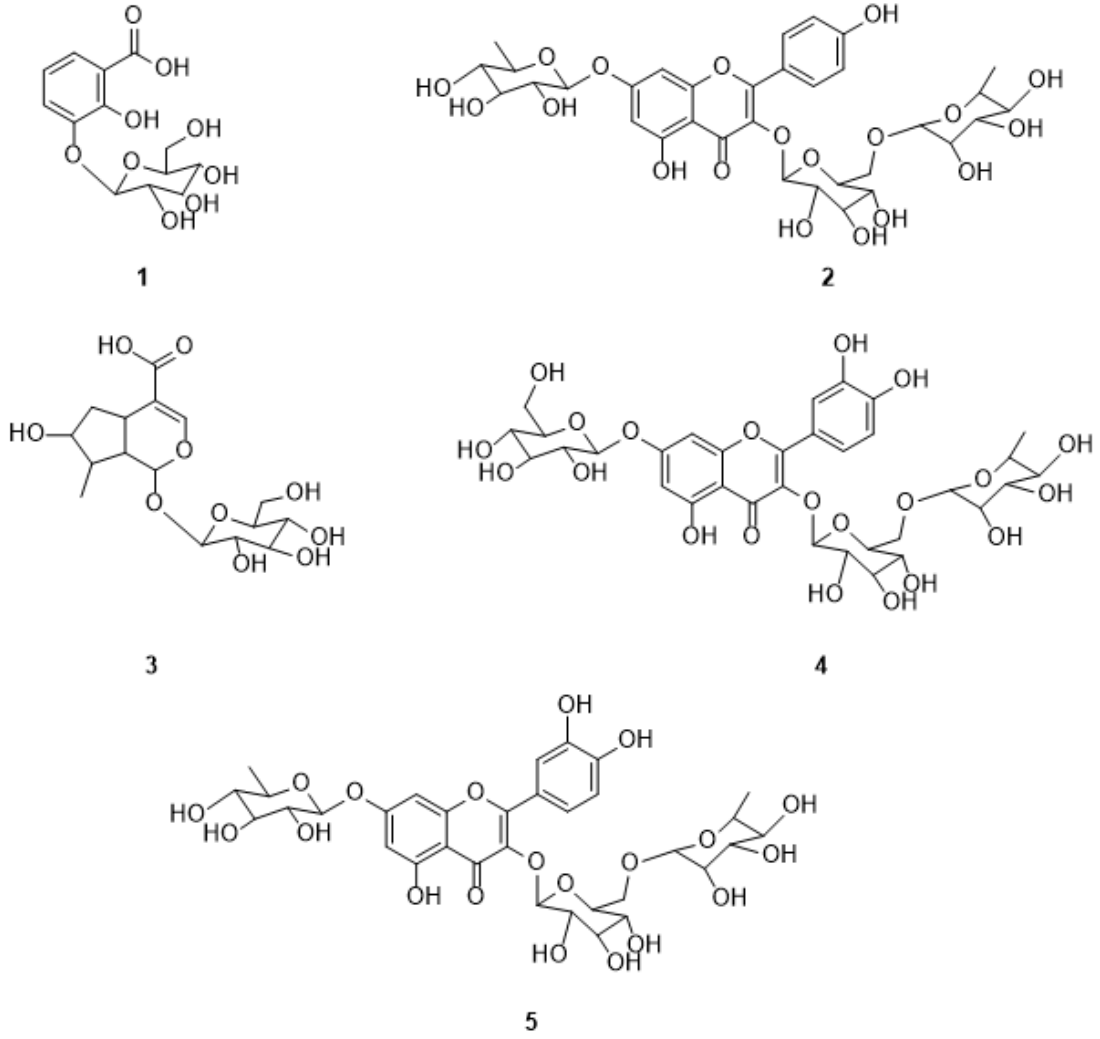
Şekil 4. 18.Bileşik 4'ün COSY Spektrumu

5 (Rutin-7-*O*-ramnozit): ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.70 (dd, $J = 8.6, 2.4$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.79 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 6.44 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 5.56 (s, 2H), 5.34 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.42 (s, 1H), 3.77 – 2.99 (m, 104H), 1.13 (d, $J = 6.1$ Hz, 4H), 1.07 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 178.1, 163.3, 161.4, 157.5, 156.4, 149.1, 145.3, 134.2, 122.5, 121.4, 116.7, 115.7, 106.0, 102.3, 100.5, 100.3, 99.8, 94.9, 77.6, 76.9, 74.1, 73.6, 73.5, 72.4, 71.6, 71.1, 70.9, 70.0, 68.7, 68.5, 65.6, 61.1, 18.4. Bileşiğe ait ^1H -NMR spektrumu Şekil 4.19’de verilmiştir.



Şekil 4.19. Bileşik 5'in ^1H -NMR Spektrumu (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

Vinca soneri bitkisinden izole edilen moleküllerin yapıları yukarıda verilen spektral verilere dayanılarak aydınlatılmış ve elde edilen veriler literatürle karşılaştırılmıştır. Moleküllerin kimyasal yapıları Şekil 4.20’de verilmiştir.



Şekil 4. 20. *Vinca soneri* Bitkisinden İzole Edilen Moleküllerin Kimyasal Yapıları (1-5).

4.2. İzole Edilen Sekonder Metabolitlerin Antioksidan Aktiviteleri

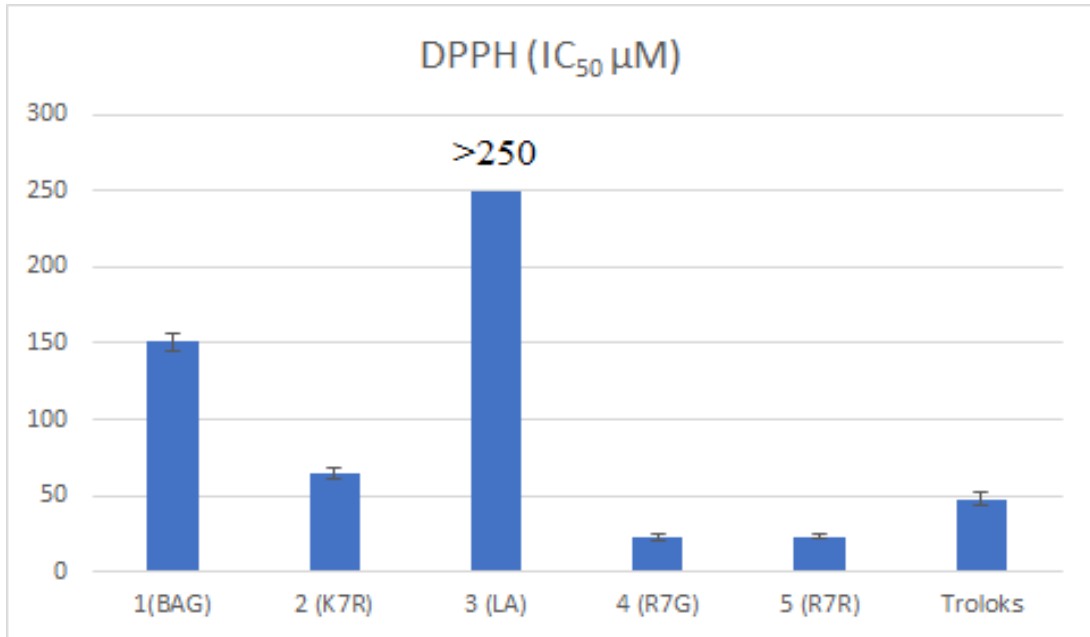
Vinca soneri bitkisinden farklı kromatografik tekniklerle izole edilip yapıları spektroskopik yöntemlerle aydınlatılan beş sekonder metabolitleri DPPH ve ABTS radikalleri giderme aktivitesi ve indirgeme gücü aktiviteleri Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4. 1.*Vinca soneri* Bitkisinden İzole Edilen Bileşiklerin Antioksidan Aktiviteleri

	DPPH (IC ₅₀ µM)	ABTS (IC ₅₀ µM)	FRAP (mg TE/g madde)
1(BAG)	150.79±5.41	251.17±10.84	147.40±3.24
2 (K7R)	64.68±3.89	43.28±4.02	117.80±6.12
3(LA)	>250	>300	7.80±1.52
4 (R7G)	22.93±2.24	15.54±2.78	221.06±5.71
5 (R7R)	23.25±1.42	17.77±188	196.50±5.51
Troloks	47.74±4.12	34.55±3.01	-

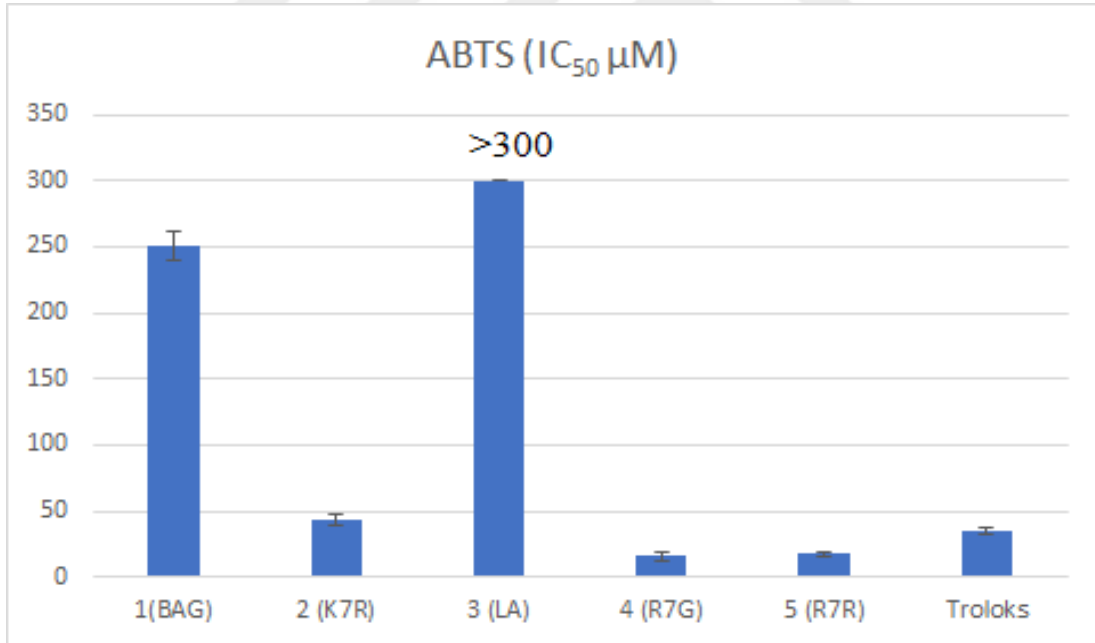
5. TARTIŞMA

Bu çalışmada Tablo 4.1 ve Şekil 5.1 incelendiğinde bileşik 4 ($IC_{50}=22,93 \mu M$) ve 5'in ($IC_{50}=23,25 \mu M$) DPPH radikali giderme aktivitesi standart olarak kullanılan Troloks'tan ($IC_{50}=47,74 \mu M$) daha yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bileşik 1 ($IC_{50}=150,79 \mu M$) ve 2'nin ($IC_{50}=150,79 \mu M$) DPPH orta derecede aktif bulunurken bileşik 3'ün $IC_{50}>250 \mu M$ serbest radikali giderme aktivitesinin olmadığı görülmüştür. Bu çalışmada bileşik 1'in DPPH radikali giderme aktivitesi ilk defa rapor edilmiştir. Bileşik 2 ile Bileşik 5'in yapıları karşılaştırıldığında; 2'nin B halkasında 4'-konumunda hidroksil grubu taşıırken 5'te ise B halkasında 3',4'-konumlarında iki hidroksi grubu taşımaktadır. Aktiviteleri göz önüne alındığında flavonların B halkasındaki hidroksil grubu sayısı arttıkça serbest radikalleri giderme aktivitesi artmaktadır. Benzer bir eğilim (Abreu ve ark, 2007) tarafından rapor edilmiştir. Bileşik 4 ve 5'in aktiviteleri incelendiğinde ise aynı flavon iskeletine 7-konumundan farklı şeker gruplarının bağlı olması ise DPPH radikali giderme aktivitesine kayda değer bir aktivite farkına neden olmadığı görülmektedir.



Şekil 5.1. İzole Edilen Bileşiklerin DPPH Radikali Giderme Aktiviteleri

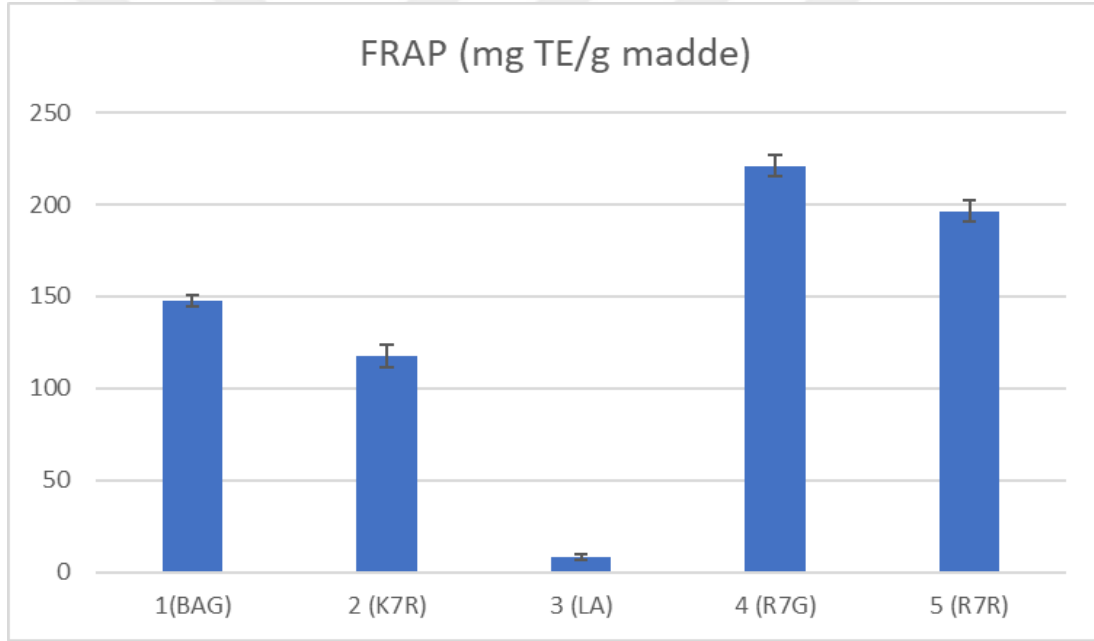
İzole edilen bileşiklerin ABTS radikali giderme aktiviteleri incelendiğinde (Tablo 4.1, Şekil 5.2) DPPH radikali giderme aktivitesi ile paralel sonuçlar elde edilmiştir. Bileşik 4 ve 5 standart antioksidan olan Troloks'tan daha yüksek aktiviteye sahiptir. İridoid glikoziti olan loganik asit (3) bileşiği DPPH testinde olduğu gibi ABTS testinde de aktif bulunmamıştır. Bu olgu, iridoidlerin serbest ve katyonik radikalleri nötralize edebilecek bir fenolik iskelete sahip olmaması ile açıklanabilir. Bileşik 1'in ABTS radikali giderme aktivitesi yine orta seviyede bulunmuştur. Kaemferol iskeletine sahip olan bileşik 2, kuersetin iskeletine sahip bileşik 4 ve 5'ten daha düşük aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. B halkasındaki hidroksi sayısı ile DPPH aktivitesinde olduğu gibi ABTS radikali giderme aktivitesi de paralellik göstermektedir. İzole edilen bileşiklerin DPPH ve ABTS radikali giderme aktivite sıralamaları $4 \cong 5 > \text{Troloks} > 2 > 1 > 3$ şeklindedir. Bileşik 1'in her iki radikal giderme aktivitesinde hesaplanan IC_{50} konsantrasyonları karşılaştırıldığında ABTS radikali karşı reaktivitesinin daha düşük olduğu söylenebilir.



Şekil 5.2. İzole Edilen Bileşiklerin ABTS Radikali Giderme Aktiviteleri

FRAP(ferrik reducing antioxidant power)testi, çeşitli biyolojik numunelerin antioksidan kapasitesini ölçmek için hızlı, hassas ve kolay bir yöntemdir. FRAP testi yüksek verimli, hızlı sonuç veren bir antioksidan tayin yöntemi olan test, numunelerde bulunan antioksidanlar tarafından ferrik (Fe^{3+}) iyonunun ferröz iyonuna (Fe^{2+})

indirgenmesi yoluyla numunelerdeki antioksidan potansiyelini ölçer. Test ortamında Fe^{3+} iyonun antioksidanlar tarafından indirgenmesi ile spektrofotometrik olarak 594 nm'de okunan mavi bir renk oluşur. Ölçülen absorbanslar Troloks eşdeğer olarak hesaplanabilir. Elde edilen matematiksel değer ne kadar büyük ise aktivite o kadar iyidir anlamına gelir. Bu bağlamda Tablo 4.1 ve Şekil 5.3'te verilen FRAP testi sonuçları incelendiğinde; yapılan diğer iki testlerde (DPPH ve ABTS) olduğu gibi kuersetin iskeletine sahip Bileşik 4 ve 5 FRAP testinde en yüksek aktiviteye sahiptir. Bileşik 3 ($7,80 \pm 1,52$ mg TE/g madde) test edilen maddeler arasında en düşük aktiviteye sahiptir. Bileşik 1'in FRAP aktivitesi $147,40 \pm 3,24$ mg TE/g madde olarak bulunmuştur. Bileşiğin FRAP aktivitesi ilk defa bu çalışmada rapor edilmiştir. İzole edilen diğer bileşiklere nazaran orta derecede bir FRAP aktivitesine sahip olduğu görülmüştür.



Şekil 5.3. İzole Edilen Bileşiklerin FRAP Aktiviteleri

Bu çalışmada, Bileşik 1'in antioksidan kapasitesi aglikonu olan protokateşuik asitle karşılaştırıldığında (Li et al, 2011) oldukça düşük bulunmuştur. Protokateşuik asidin 3-konumuna glikozit grubunun bağlanması bileşik 1'in antioksidan kapasitesini zayıflatmış söylenebilir.

1(2-hidroksi-3-O-glukozil benzoik asit) ilk defa *Geniostoma antherotrichum* bitkisinde izole edilip tanımlanmıştır (Rashid ve ark, 1996). Aynı çalışmada bileşiğin anti-HIV aktivitesinin bulunmadığı rapor edilmiştir. Daha sonra bileşiğin *Strychnos*

cocculoides(Sunghwa ve ark, 2009), *Boreava orientalis*(Sakushima ve ark, 1995) ve *Aspidosperma pyrifolium*(Nogueira ve ark, 2014) bitkilerinde bulunduğu bildirilmiştir. Yukarıdaki çalışmalarda 1'in antioksidan aktivitesi çalışılmamıştır. Bileşiğin *Vinca* türlerinde bulunduğu ilk defa bu çalışmada rapor edilmiştir.

2 (Kaemferol-3-*O*-rutinozit-7-*O*-ramnozit) daha önce *Pueraria lobata*(Lau ve ark. 2005), *Asrtagalus falcatus*(Tsiklauri ve ark. 2021), *Melilotus elegans*(Asres ve ark, 2000), *Robinia pseudoacacia*(Song ve ark. 1992) gibi birçok bitkiden izole edilmiş ya da kromatografik yöntemlere belirlenmiştir. Bileşiğin bazı ne çıkan biyolojik aktiviteleri antioksidan (Lau ve ark. 2005), diüretik (Vasil'chenko ve Sokolova 1973), antienflamatuvar(Asres ve ark, 2000), antiazotemik (Drumev ve Pashov, 1970) ve tiroit kanserine karşı antiproliferatif aktivite (Shen ve ark. 2022) şeklinde sıralanabilir. Bileşiğin daha önce from *Vinca erecta*(Akhmedzhanova, 1986) ve *Vinca major*(şhretoğlu ve ark, 2013) bitkilerinde bulunduğu rapor edilmiştir. Bileşik 2'nin *Vinca soneri* bitkisinde bulunduğu ilk defa mevcut çalışmada rapor edilmiştir.

3 (Loganik asit) bileşiğinin *Vinca* türlerinde bulunduğu bilinmektedir(Guarnaccia ve ark, 1974).(Bianco, 1984) Bileşik daha önce *Vinca soneri* bitkisinden de izole edilmiş ve probiyotik bakteriler üzerine otoagregasyon özellikleri belirlenmiştir. (Çelebi ve ark., 2020). Bileşiğin biyoaktivite profili: antienflamatuvar, (şhretoğlu ve ark, 2013)antioksidan ve sitoprotektif (Abirami ve ark. 2022), α -glukozidaz inhibisyonu (Liu ve ark, 2015) şeklinde özetlenebilir.

4 (Rutin-7-*O*-glukozit)Bileşik birçok familyada doğal olarak bulunan bir flavon glukozittir. Daha nce *Onobrychis viciifolia*(Lu ve ark, 2000), *Physalis peruviana*(Elliger ve ark), *Paederia scandens*(Ishikura ve ark, 1990) ve *Atropa belladonna*(Cicek ve ark, 2020) gibi bazı bitkilerde varlığı tespit edilmiştir. Bileşiğin *Vinca major* türünde varlığı bilinmektedir (Szostak ve Kowalewski, 1975). Bileşiğin antioksidan(Suman ve Verma, 2010), antiproliferatif(Wang ve ark, 2019), lipit peroksidasyonu engelleyici (Zhang ve ark, 2004) ve tirozinaz inhibitörü (Jakimiuk ve ark, 2022) aktiviteleri de bilim insanları tarafından ortaya konulmuştur.

5 (Rutin-7-*O*-ramnozit)Bileşik daha önce *Litchi chinensis*(Su ve ark, 2014), *Bauhinia forficata*(Pizzolatti ve ark, 2003), *Delphinium hybridum*(Yoshimitsu ve ark, 2007)

bitkilerinden izole edilmiştir. *Vinca* türlerinde bulunduğu ise daha önce rapor edilmemiştir. Bileşik 5, *Vinca* soneri özelinde *Vinca* türlerinde doğal olarak bulunduğu ilk defa bu çalışmada rapor edilmiştir. Bileşiğin bireysel olarak sadece antioksidan ve nöroprotektif (Moliner ve ark, 2019) aktivitesi belirlenmiştir. Ancak bileşiği içeren bitki ekstraktlarının bazı biyolojik aktiviteleri rapor edilmiştir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma ile bilim dünyasına yeni kazandırılmış ülkemizin endemik türlerinden biri olan *Vinca soneri* bitkisinin fitokimyasal içeriği belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bitkinin toprak üstü kısımlarının metanol ekstraktı, değişik kromatografik ayırma işlemlerine tabi tutularak bitkinin sekonder metabolit profili ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bitkiden saflaştırılan sekonder metabolitlerin kimyasal yapıları spektroskopik yöntemlerle belirlenmiştir. İzole edilen ve yapıları aydınlatılan bileşenlerin antioksidan kapasiteleri değerlendirilmiştir.

Bitki içerisinde üç flavon türevi; rutin-7-*O*-glukozit, rutin-7-*O*-ramnozit, kaemferol-3-*O*-rutinozit-7-*O*-ramnozit, bir benzoik asit türevi, 2-hidroksi-3-*O*-glukozil-benzoik asit ve bir iridoid glikoziti, loganik asit izole edilmiştir. Bitki ham ekstraktının ve izole edilen moleküllerin antioksidan kapasitesi DPPH, ABTS ve FRAP yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Rutin-7-*O*-glukozit ve rutin-7-*O*-ramnozit DPPH ve ABTS radikalleri giderme aktivitesinde troloks'dan daha aktif bulunurken kaemferol-3-*O*-rutinozit-7-*O*-ramnozit, 2-hidroksi-3-*O*-glukozil-benzoik asit troloks'a göre düşük aktivite göstermiştir. Loganik asit ise yapılan bütün testlerde aktif bulunmamıştır.

KAYNAKLAR

- Abreu P., Braham, H., Jannet H., Mighri, Z.,and Matthew, S. (2007). Antioxidant compounds from *Ebenus pinnata*. *Fitoterapia*,78, 32-34.
- Akhmedzhanova, V. (1986). Robinin and kaempferol from *Vinca erecta*. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*,5, 638-638.
- Asres, A., Eder, U.and Bucar, F. (2000). Studies on the anti-inflammatory activity of extracts and compounds from the leaves of *Melilotus elegans*. *Ethiopian Pharmaceutic Journal*, 18, 15-24.
- Bianco A., Guiso M., Passacantilli, P.and Francesconi, A. (1984). Iridoid and phenylpropanoid glycosides from new sources. *Journal of Natural Product*,47: 901-902.
- Bahadori, F. (2011). *Isolation and structure elucidation of Vinca alkaloids from vinca species and investigation of cytotoxic activity of vinorelbine loaded nanodrug delivery systems*, Doktora tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi.
- Ahıskalıoğlu, A. (2007). *Anemone Narcissiflora bitkisinin karakterizasyonu ve biyolojik aktivitesinin incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Bianco, A., Guiso, M., Nicoletti, M., Foddai, S., Piccin, A., Serafini, M., and Poli, F.(2005). A comparative chemotaxonomic study on *Vinca sardoa* Stearn and *Vinca difformis* Pourret. *Natural Product Research*, 19(6), 615-617.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. (2001). Production of Plant Secondary Metabolites; a Historical Perspective, *Plant Science*,161,839-851.
- Charwood, B.V., Rhodes,(1990).Secondary Products from Plant Tissue Culture, ISBN: 0-19-857717-6. Clarendon Press. Oxford.
- Cicek S., Malek S.,and Zidorn, C. (2020). Flavonoids from *Atropa belladonna* (Solanaceae) leaves revisited. *Biochemical Systematics Ecology*, 88, 103990.
- Çelebi, B., Recep, T., Akşit, H., and Celebioglu, H. U. (2020). Effects of Loganic Acid isolated from *Vinca soneri* on Surface Hydrophobicityand Auto-Aggregation of Probiotic Bacteria, *Lactobacillus acidophilus*and *Lactobacillus rhamnosus*. *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 13 (1); 115-122.
- Drumev, D. and Pashov, D. (1970). Antiazotemic action of the flavonoid robinin. *Nauchni Vissih Veterinarnomed*, 22, 229-237.
- Elliger, C., Eash Ja and Waiss A. (1992). Kaempferol and quercetin di-and triglycosides from *Physalis peruviana* leaves. *Biochemical systematics ecology* 20 (3), 268-273.
- Ertürk, Ö. and Demirbağ, Z. (2003). *Scorzonare mollis* Bieb (Compositae) Bitkisinin Antimikrobiyal Aktivitesi, *Ekoloji Çevre Dergisi*, 12, 27-31.

- Fabricant, D. S., Farnsworth, N. R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery, *Environmental Health Perspectives*, 109(1), 69-78.
- Guarnaccia, R., Botta, L. and Coscia, C. (1974). Biosynthesis of acidic iridoid monoterpene glucosides in *Vinca rosea*. *Journal of the American Chemical Society*, 96, 7079-7084.
- Ishikura, N., Yang, Z. Q, Yoshitama, K. and Kurosawa, K. (1990). Flavonol glycosides from *Paederia scandens* var. *mairei*. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 45, 1081-1084.
- Jakimiuk, K., Sari, S., Milewski, R., Supuran, C., Şöhretoğlu, D. and Tomczyk, M. (2022). Flavonoids as tyrosinase inhibitors in in silico and in vitro models: Basic framework of SAR using a statistical modelling approach. *Journal of Enzyme Inhibition Medicinal Chemistry*, 37 (1), 427-436.
- Koyuncu, M. (2012). A new species of *Vinca* (Apocynaceae) from eastern Anatolia, Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 36(3), 247-251.
- Li, X., Wang, X., Chen, D. and Chen, S. (2011). Antioxidant activity and mechanism of protocatechuic acid in vitro. *Functional Foods in Health Disease*, 1(7), 232-244.
- Liu, Z.X, Liu, C.T., Liu, Q. B., Ren, J., Li, L.Z. Huang, X. X., Wang, Z. Z. and Song, S. J. (2015). Iridoid glycosides from the flower buds of *Lonicera japonica* and their nitric oxide production and α -glucosidase inhibitory activities. *Journal of Functional Foods*, 18, 512.
- Lu, Y., Sun, Y., Foo, L., McNabb, W. and Molan, A. (2000). Phenolic glycosides of forage legume *Onobrychis viciifolia*. *Phytochemistry*, 55, 67-75.
- Moliner, C., Barros, L., Dias, M., Reigada, I., Ferreira, I., López, V., Langa, E. and Rincón, C. (2019). *Viola cornuta* and *Viola x wittrockiana*: Phenolic compounds, antioxidant and neuroprotective activities on *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 27(4), 849-859.
- Nogueira, P., Araújo, R., Viana, G., Araújo, D., Braz, F. R. and Silveira, E. (2014). Plumeran alkaloids and glycosides from the seeds of *Aspidosperma pyrifolium* Mart. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25 2108-2120.
- Pizzolatti, M., Cunha J. A., Szpoganicz, B., Sousa, E., Braz-Filho, R. and Schripsema, J. (2003). Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae). *Química Nova*, 26, 466-469.
- Ramachandra, R., and Ravishankar, G.A. (2002). Plant Cell Cultures: Chemical Factories of Secondary Metabolites, *Biotechnology advances*, 20(2), 101-153.
- Rashid, M., Gustafson, K., Cardellina, I. J. and Boyd, M. (1996). A benzoic acid glycoside from *Geniostoma antherotrichum*. *Phytochemistry*, 41(4), 1205-1207.
- Sakushima, A., Coşkun, M. and Maoka, T. (1995). Hydroxybenzoic acids from *Boreava orientalis*. *Phytochemistry*, 40(1), 257-261.

- Su, D., Ti, H., Zhang, R., Zhang, M., Wei, Z., Deng, Y. and Guo, J. (2014). Structural elucidation and cellular antioxidant activity evaluation of major antioxidant phenolics in lychee pulp. *Food Chemistry*, 158, 385-391.
- Sultana, A., Nighat, F., Bhatti, M. K., Kurucu, S. and Kartal, M. (1995). Alkaloids from *Vinca major*. *Phytochemistry*, 38(4), 1057-1061.
- Suman, Y. and Verma, D. (2010). Antioxidative flavonoids from the leaves of *Bauhinia retusa* Roxb. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*, 32(1), 16-19.
- Sunghwa, F. and Koketsu, M. (2009). Phenolic and bis-iridoid glycosides from *Strychnos cocculoides*. *Natural Product Research*, 23(15), 1408-1415.
- Szostak, H. and Kowalewski, Z. (1975). The flavonoids in the leaves of *Vinca minor* L. (Apocynaceae). *Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy*, 27(6), 657-663.
- Tiwari, S. (2008). Plants: A rich source of herbal medicine. *Journal of natural products*, 1(0), 27-35.
- Verpoorte, R., van der Heijden, R. T. J. M., Ten Hoopen, H. J. G., and Memelink, J. (1999). Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnology letters*, 21, 467-479.
- Wang, L., Li, X., and Wang, B. (2019). The cytotoxicity activity of *Hohenbuehelia serotina* polyphenols on HeLa cells via induction of cell apoptosis and cell cycle arrest. *Food and Chemical Toxicology*, 124, 239-248.
- Yoshimitsu, H., Nishida, M., Hashimoto, F., Tanaka, M., Sakata, Y., Okawa, M. and Nohara, T. (2007). Chromone and flavonol glycosides from *Delphinium hybridum* cv. "Belladonna Casablanca". *Journal of Natural Medicines*, 61, 334-338.
- Zhang, Y., Cichewicz, R. H. and Nair, M. G. (2004). Lipid peroxidation inhibitory compounds from daylily (*Heemerocallis fulva*) leaves. *Life Sciences*, 75(6), 753-763.