

**TRAKYA BÖLGESİNDE *YETİŞEN CIRSİUM*  
*İTALİCUM* (SAVİ) DC. (ASTERACEAE)  
BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL  
İNCELENMESİ, ANTİBAKTERİYEL VE  
ANTİFUNGAL AKTİVİTESİNİN TAYİNİ**

**Hilmican ÇALIŞKAN**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Temine ŞABUDAK  
2018**

**T.C.**

**TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TRAKYA BÖLGESİNDE YETİŞEN *CIRSİUM ITALICUM* (SAVİ) DC.  
(*ASTERACEAE*) BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL İNCELENMESİ,  
ANTİBAKTERİYEL VE ANTİFUNGAL AKTİVİTESİNİN TAYİNİ**

**Hilmican ÇALIŞKAN**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN: Prof. Dr. Temine ŞABUDAK**

**TEKİRDAĞ-2018**

**Her hakkı saklıdır.**

Bu tez TÜBİTAK tarafından 116Z450 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Prof.Dr. Temine ŞABUDAK danışmanlığında, Hilmican ÇALIŞKAN tarafından hazırlanan “Trakya Bölgesinde Yetişen *Cirsium italicum* (Savi) DC. (*Asteraceae*) Bitkisinin Fitokimyasal İncelenmesi, Antibakteriyel ve Antifungal Aktivitesinin Tayini” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Juri Başkanı : Doç. Dr. Özlem DEMİRKIRAN

*İmza :*

Üye : Prof. Dr. Temine ŞABUDAK

*İmza :*

Üye : Doç. Dr. H. Hülya ORAK

*İmza :*

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU  
**Enstitü Müdürü**

**ÖZET**  
Yüksek Lisans Tezi

TRAKYA BÖLGESİNDE YETİŞEN *CIRSİUM İTALİCUM* (SAVİ) DC. (ASTERACEAE)  
BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL İNCELENMESİ, ANTİBAKTERİYEL VE ANTİFUNGAL  
AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

**Hilmican ÇALIŞKAN**

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Temine ŞABUDAK

Bu çalışmada, Trakya bölgesinde yetişen *Cirsium italicum* (Savi) DC. (Asteraceae) bitkisinin ham ekstrelerinde antibakteriyel ve antifungal aktivite tayini ile fitokimyasal incelenmesi, sekonder metabolitlerinin izolasyonu ve izole edilen moleküllerin yapı tayini amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında çalışılan *C. italicum* bitkisi Temmuz 2017 tarihinde Trakya bölgesinden toplanmıştır. *C. italicum* bitkisi kurutulduktan sonra metanol ile maserasyon yöntemiyle ekstraksiyon yapılmış, metanol buharlaştırıldıktan sonra ham ekstre elde edilmiştir. Daha sonra, ham ekstre polarite sırasına göre n-hekzan, diklorometan, etilasetat ve n-bütanol ile geri ekstraksiyon yapılmıştır. Elde edilen dört ekstre için antibakteriyel ve antifungal aktivite araştırılmıştır. Ham ekstrelerde yapılan antibakteriyel ve antifungal aktivite sonuçlarına göre en yüksek aktivite gösteren ekstre, etilasetat ekstresi olduğu belirlenmiş ve izolasyon çalışması için etilasetat ekstresi seçilmiştir. Etilasetat ekstresinin yanı sıra maserasyon işlemi sırasında kullanılan metanol uçurulurken oluşan kristallerde, toplanmış ve bu kristallerde izolasyon çalışması uygulanmıştır. İzolasyon çalışmasında bitki ekstreleri, silika jel içeren kolonlarda ilk ayırma işlemine tabi tutulmuştur. Buradan elde edilen fraksiyonların ince tabaka kromatografisiyle (TLC) kontrolü yapılarak, benzer fraksiyonlar birleştirilmiştir. Elde edilen alt fraksiyonlar; kolon kromatografisi (CC), TLC ve ters faz kolonlu preparatif HPLC’de saflaştırılmıştır. İzole edilen saf maddelerin kimyasal yapıları, 1D ve 2D NMR (APT, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMBC, HSQC) ve kütle spektroskopisi (MS) yöntemleri kullanılarak tayin edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, *C. italicum* bitkisinden 2 fenolik asit türevi, 2 izoflavonoid, 2 biflavonoid ve 1 flavonoid olmak üzere 7 bileşik izole edilmiştir. İzole edilen bileşikler *C. italicum* bitkisinden ilk defa izole edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Cirsium italicum*, flavonoid, antibakteriyel aktivite, antifungal aktivite, izoflavonoid, biflavonoid.

**2018, 106 Sayfa**

## ABSTRACT

MSc. Thesis

### PHYTOCHEMICAL INVESTIGATION OF *CIRSIUM ITALICUM* (SAVİ) DC. (*ASTERACEAE*) PLANT WICH GROWING IN TRAKYA REGION AND DETERMINATION OF ITS ANTIMICROBIAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITY

**Hilmican ÇALIŞKAN**

Namik Kemal University in Tekirdağ

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Prof.Dr. Temine SABUDAK

In this study, *Cirsium italicum* (Savi) DC. (*Asteraceae*), which grows in Trakya region. Phytochemical examination, antimicrobial and antifungal activity determinations in the crude extracts isolation of secondary metabolites and determination of molecular structures. *C. italicum* plant, in the scope of the study was collected from Trakya region on July 2017. After the *C. italicum* plant was dried, it was extracted with methanol by maceration, and the crude extract was obtained after the methanol was evaporated. The crude extract was then back-extracted with n-hexane, dichloromethane, ethylacetate and n-butanol according to the polarity order. Antimicrobial and antifungal activity was investigated for the four extracts obtained. According to the results of antimicrobial and antifungal activity in crude extracts, the highest activity of extract was found to be ethylacetate and ethyl acetate extract was selected for isolation study. In addition to the ethylacetate extract, the crystals formed when the methanol used for the maceration process was evaporated were collected and this crystallized isolation study was applied. Fractions obtained therefrom were checked by thin layer chromatography (TLC) and similar fractions were combined. Obtained lower fractions; column chromatography (CC), TLC and reverse phase column preparative HPLC. The chemical structures of the isolated pure substances were determined using 1D and 2D NMR (APT, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COZY, HMBC, HSQC) and mass spectroscopy (MS) methods. As a result of this study, 7 compounds were isolated, 2 phenolic acids, 2 isoflavonoids, 2 biflavonoids and 1 flavonoid from *C. italicum* plant. The isolated compounds were first isolated from *C. italicum* plant.

**Keywords:** *Cirsium*, *Cirsium italicum*, flavonoid, antimicrobial activity, antifungal activity, isoflavonoid, biflavonoid.

2018, 106 Pages

## ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Namık Kemal Üniversitesi Kimya Bölümü Organik Kimya Ana Bilim Dalı, Organik Kimya Araştırma Laboratuvarında ve Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın başından sonuna kadar benden bilgi birikimini, fikirlerini ve desteğini esirgemeyen her türlü konuda yardımcı olan yanında çalışmaktan mutlu olduğum değerli hocam Sayın Prof.Dr. Temine ŞABUDAK'a,

Antibakteriyel ve antifungal aktivite çalışmaları boyunca laboratuvar imkanı ve her türlü yardımlarından dolayı Sayın Doç.Dr. Dumrul GÜLEN ve Arş.Gör.Dr. Mine AYDIN KURÇ'a,

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini ve bilgi birikimlerini benden esirgemeyen Sayın Doç.Dr. Yelda YALÇIN GÜRKAN ve Doç.Dr. H. Hülya ORAK'a,

Laboratuvar çalışmaları sırasında yardımlarını benden esirgemeyen yüksek lisans arkadaşlarım Merve ÖZER ve İlayda BAHRİSEFİT'e,

Hayatım ve eğitimim boyunca benden maddi ve manevi desteklerinden her kararında arkamda ve bugünlere gelmemde büyük payı olan annem Şaziye ÇALIŞKAN ve dayım Şeref MERTEL'e sonsuz teşekkür ederim.

TÜBİTAK tarafından 116Z450 numaralı proje kapsamında sağlanan maddi destek için teşekkür ederim.

Temmuz, 2018

Hilmican ÇALIŞKAN

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

brs	: Brodonsinglet
CC	: Kolon Kromatografisi
COSY	: Correlation Spectroscopy
$\delta$	: Kimyasal kayma
d	: Dublet
dd	: Double dublet
ddd	: Triple dublet
DMSO	: Dimetil sülfoksit
g	: Gram
GC	: Gaz kromatografisi
HMBC	: Heteronuclear Multi Bond Coherence
HPLC	: Yüksek performans sıvı kromatografisi
Hz	: Hertz
IR	: İnfrared (Kızıl ötesi)
J	: Yarılma sabiti
$\lambda$	: Dalga boyu
m	: Multiplet
mg	: Miligram
MHz	: Megahertz
MHB	: Mueller Hinton Broth
MİK	: Minimal inhibitör konsantrasyon
mL	: Mililitre
$\mu$ l	: Mikrolitre
MS	: Kütle spektroskopisi
$\nu$	: Frekans
NA	: Naturstoffreagenz reaktifi
nm	: Nanometre
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
ppm	: Per part million
SDA	: Sabouraud Dextrose Agar



t : Triplet  
TLC : İnce tabaka kromatografisi  
UV : Ultraviyole (Mor ötesi)

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>iv</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>vi</b>
<b>ŞEKİL DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>ÇİZELGE DİZİNİ</b> .....	<b>xiii</b>
<b>1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI</b> .....	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER VE ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR</b> .....	<b>3</b>
2.1. Bitkinin Tanımı, Yayılışı ve Üzerinde Yapılan Çalışmalar .....	3
2.1.1. <i>Asteraceae</i> Familyasının Özellikler ve Yayılışı .....	3
2.1.2. <i>Cirsium</i> Cinsinin Genel Özellikleri .....	3
2.1.3. <i>Cirsium italicum</i> (Savi) DC. ( <i>Asteraceae</i> ) Bitkisinin Genel Özellikleri .....	4
2.1.4. <i>Cirsium</i> Türleri Üzerine Yapılan Çalışmalar .....	5
2.1.4.1. <i>Cirsium</i> Türleri Üzerine Yapılan Antibakteriyel ve Antifungal Aktivite Çalışmaları ..	6
2.1.4.2. <i>Cirsium</i> Türleri Üzerine Yapılan İzolasyon Çalışmaları .....	6
2.2. Flavonoidler.....	9
2.2.1. Flavonoidlerin Doğada Bulunuşları ve Kullanım Alanları .....	9
2.2.1. Flavonoidlerin Özellikleri ve Sınıflandırılması .....	9
2.2.2. Flavonoidlerin Biyosentezi.....	11
2.2.3. Flavonoidlerin Yapı Çeşitliliği .....	12
2.2.4. İzoflavonoidler.....	13
2.2.5. Flavonoid Glikozitler.....	14
2.2.6. Biflavonoidler .....	15
2.3. Flavonoidlerin Spektroskopik Yapı Aydınlatma Metotları .....	16
2.3.1. Ultraviyole (UV) Spektroskopisi.....	16
2.3.2. Infrared (IR) Spektroskopisi .....	17
2.3.3. <sup>1</sup> H-NMR Spektroskopisi.....	17
2.3.4. <sup>13</sup> C-NMR Spektroskopisi.....	18

2.3.5. Kütle Spektroskopisi.....	19
2.4. Fenolik Asitler .....	20
2.5. Antibakteriyel ve Antifungal Aktivite.....	21
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>23</b>
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	23
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	23
3.3. Kullanılan Belirteçler ve Çözeltiler.....	24
3.4. Deneysel Bölüm .....	25
3.4.1. <i>Cirsium italicum</i> Bitkinin Toplanması .....	25
3.4.2. <i>Cirsium italicum</i> Bitkinin Ekstraksiyonu .....	25
3.4.3. <i>Cirsium italicum</i> Bitkisinin Ham Ekstrelerinde Antibakteriyel ve Antifungal Aktivite Tayini.....	25
3.4.3.1. Antibakteriyel Aktvite Tayini.....	25
3.4.3.2. Antifungal Aktivite Tayini .....	26
3.4.4. <i>Cirsium italicum</i> Bitkisinde Kromatografik Ayırma ve Saflaştırma İşlemleri .....	28
3.4.4.1. <i>C. italicum</i> Bitkisinin Metanol Ektresinde Çözücü Uçurulması Sırasında Oluşan Kristallerin İzolasyonu ve Saflaştırılması.....	28
3.4.4.2. <i>C. italicum</i> Bitkisinin Etilasetat Ekstresindeki Bileşiklerin İzolasyonu ve Saflaştırılması.....	31
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>33</b>
4.1. <i>C. italicum</i> Bitkisinin Ham Ekstrelerini Antibakteriyel ve Antifungal Aktivite Tayini Sonuçları.....	33
4.1.1. <i>C. italicum</i> Bitkisinin Ham Ekstrelerinde Antibakteriyel Aktivite Tayini Sonuçları ....	33
4.1.2. <i>C. italicum</i> Bitkisinin Ham Ekstrelerinde Antifungal Aktivite Tayini Sonuçları .....	36
4.2. <i>C. italicum</i> Bitkisinden İzole Edilen Bileşikler .....	38
4.2.1. 1 Numaralı Bileşik (IE-10-1): 5, 3', 4'-trihidroksi-7-metoksi izoflavonon.....	38
4.2.2. 2 Numaralı Bileşik (K-1-2-1): 6,2'-dihidroksi-5-metoksi-4'- <i>O</i> - $\alpha$ -glikozil izoflavonon .	45
4.2.3. 3 Numaralı Bileşik (IE-7-1): 5,7,4'-trihidroksi flavonon (Apigenin) .....	52
4.2.4. 4 Numaralı Bileşik (IE-10-2): 5,5",7"-trihidroksi-3,7-dimetoksi-4',4'"- <i>O</i> -biflavon .....	56
4.2.5. 5 Numaralı Bileşik (K-2-3): (8,3',4',5'-tetrahidroksi-7- <i>O</i> - $\alpha$ -glukosil izoflavon)-6-8"-(4'"-hidroksi-7"- <i>O</i> - $\alpha$ -glukosil izoflavon) biflavon.....	67
4.2.6. 6 Numaralı Bileşik (K-2-2-1): Gentisik asit-5- <i>O</i> - $\beta$ -ksilopiranosit.....	77

4.2.7. 7 Numaralı Bileşik (K-1-1): Etil-(2,3-dihidroksi-5,6-dimetoksi-4-asetil) benzoat .....	82
4.3. İzole edilen Bileşiklerin Spektral Özellikleri .....	90
4.3.1. 1 Numaralı Bileşik (IE-10-1): 5, 3', 4'-trihidroksi-7-metoksi izoflavonon.....	90
4.3.2. 2 Numaralı Bileşik (K-1-2-1): 6,2'-dihidroksi-5-metoksi-4'- <i>O</i> - $\alpha$ -glikozil izoflavonon .	91
4.3.3. 3 Numaralı Bileşik (IE-7-1): 5,7,4'-trihidroksi flavonon (Apigenin) .....	92
4.3.4. 4 Numaralı Bileşik (IE-10-2): 5,5'',7''-trihidroksi-3,7-dimetoksi-4',4'''- <i>O</i> -biflavon .....	93
4.3.5. 5 Numaralı Bileşik (K-2-3): (8,3',4',5'-tetrahidroksi-7- <i>O</i> - $\alpha$ -glukosil izoflavon)-6-8''-(4'''-hidroksi-7''- <i>O</i> - $\alpha$ -glukosil izoflavon) biflavon.....	94
4.3.6. 6 Numaralı Bileşik (K-2-2-1): Gentisik asit-5- <i>O</i> - $\beta$ -ksilopiranosit.....	95
4.3.7. 7 Numaralı Bileşik (K-1-1): Etil-(2,3-dihidroksi-5,6-dimetoksi-4-asetil) benzoat .....	96
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>97</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>100</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>106</b>

## ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. Tez çalışmasında kullanılan <i>Cirsium italicum</i> bitkisinin gövde, yaprak ve çiçekleri. ....	5
Şekil 2.2. Tez çalışmasında kullanılan <i>Cirsium italicum</i> bitkisinin çiçek ve yapraklar. ....	5
Şekil 2.3. Hispidulin 7-neohesperidosit bileşiğinin yapısı. ....	7
Şekil 2.4. Pektolinarigenin (I) ve pektolinarinin (II) bileşiğinin yapısı. ....	7
Şekil 2.5. Luteolin 5-O-glukosid bileşiğinin yapısı. ....	8
Şekil 2.6. Pektolinarigenin bileşiğinin yapısı. ....	9
Şekil 2.7. Genel flavonoid iskeleti. ....	10
Şekil 2.8. Flavonoidlerin alt sınıfları. ....	10
Şekil 2.9. Flavonoidleri biyosentezi ....	11
Şekil 2.10. Flavonoid yapılarında substituentlerin en yaygın yerleşme pozisyonları. ....	12
Şekil 2.11. 3-Fenilkroman iskeletini yapısı. ....	13
Şekil 2.12. İzoflavonoidlerin alt birimleri. ....	13
Şekil 2.13. Avicularin ve Guaijaverin bileşiğinin yapısı. ....	14
Şekil 2.14. Quercetin 3-O- $\alpha$ -L-arabinofuranozit ve Quercetin 3-O- $\beta$ -L-arabinofuranozit bileşiğinin yapısı. ....	15
Şekil 2.15. Biflavonoid bileşik örnekleri. ....	16
Şekil 2.16. Flavonoidlerde Retro-Diels Alder parçalanması. ....	19
Şekil 2.17. Flavonoidlerin ikinci parçalanma yolu. ....	19
Şekil 2.18. Hidroksisünamik asit. ....	20
Şekil 2.19. Hidroksibenzoik asit. ....	20
Şekil 2.20. Fenolik asit türevi örnekleri (Sağıroğlu 2003). ....	20
Şekil 3.1. Antibakteriyel ve antifungal aktivite tayininde kullanılan mikrodilüsyon plakaları. ....	28
Şekil 3.2. K-2 fraksiyonunun beherdeki görüntüsü. ....	29
Şekil 3.3. K-2 fraksiyonunun kolon kromatografisi. ....	30
Şekil 3.4. Etilasetat ekstresinin kolon kromatografisi. ....	31
Şekil 4.1. 5, 3', 4'-trihidroksi-7-metoksi izoflavonon bileşiğinin yapısı. ....	38
Şekil 4.2. 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksi izoflavonon bileşiğinin moleküler bölünme pikleri. ..	39
Şekil 4.3. 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksi izoflavonon bileşiğinin <sup>1</sup> H NMR spektrumu. ....	40

Şekil 4.4. 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksi izoflavonon bileşiğinin APT spektrumu.....	41
Şekil 4.5. 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksi izoflavonon bileşiğinin <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY spektrumu.....	42
Şekil 4.6. 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksi izoflavonon bileşiğinin HMBC spektrumu. ....	43
Şekil 4.7. 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksi izoflavonon bileşiğinin ESI-MS spektrumu. ....	44
Şekil 4.8. 6, 2'-dihidroksi-5-metoksi-4'- <i>O</i> - $\alpha$ -glikozil izoflavonon bileşiğinin yapısı.....	45
Şekil 4.9. 6,2'-dihidroksi-5-metoksi-4'- <i>O</i> - $\alpha$ -glikozil izoflavonon bileşiğinin kütle spektrumunda gözlenen bölünmeleri.....	46
Şekil 4.10. 6,2'-dihidroksi-5-metoksi-4'- <i>O</i> - $\alpha$ -glikozil izoflavonon bileşiğinin <sup>1</sup> H NMR spektrumu. ....	47
Şekil 4.11. 6,2'-dihidroksi-5-metoksi-4'- <i>O</i> - $\alpha$ -glikozil izoflavonon bileşiğinin APT spektrumu. ....	48
Şekil 4.12. 6,2'-dihidroksi-5-metoksi-4'- <i>O</i> - $\alpha$ -glikozil izoflavonon bileşiğinin <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY spektrumu. ....	49
Şekil 4.13. 6,2'-dihidroksi-5-metoksi-4'- <i>O</i> - $\alpha$ -glikozil izoflavonon bileşiğinin HMBC spektrumu. ....	50
Şekil 4.14. 6,2'-dihidroksi-5-metoksi-4'- <i>O</i> - $\alpha$ -glikozil izoflavonon bileşiğinin ESI-MS spektrumu. ....	51
Şekil 4.15. 5,7,4'-trihidroksi flavonon bileşiğinin molekül yapısı. ....	52
Şekil 4.16. 5,7,4'-trihidroksi flavonon bileşiğinin moleküler bölünmesi. ....	52
Şekil 4.17. 5,7,4'-trihidroksi flavonon bileşiğinin <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	54
Şekil 4.18. 5,7,4'-trihidroksi flavonon bileşiğinin ESI-MS spektrumu. ....	55
Şekil 4.19. 5,5'',7''-trihidroksi-3,7-dimetoksi-4',4'''- <i>O</i> -biflavon bileşiğinin yapısı. ....	56
Şekil 4.20. 7,5'',7''-trihidroksi-5,4'-dimetoksi-3,4'''- <i>O</i> -biflavon bileşiğinin kütle spektrumunda gözlenen moleküler bölünmeler. ....	58
Şekil 4.21. 5,5'',7''-trihidroksi-3,7-dimetoksi-4',4'''- <i>O</i> -biflavon bileşiğinin <sup>1</sup> H NMR spektrumu. ....	59
Şekil 4.22. 5,5'',7''-trihidroksi-3,7-dimetoksi-4',4'''- <i>O</i> -biflavon bileşiğinin APT spektrumu. ...	60
Şekil 4.23. 5,5'',7''-trihidroksi-3,7-dimetoksi-4',4'''- <i>O</i> -biflavon bileşiğinin <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY spektrumu. ....	61
Şekil 4.24. 5,5'',7''-trihidroksi-3,7-dimetoksi-4',4'''- <i>O</i> -biflavon bileşiğinin HMBC spektrumu. ....	62
Şekil 4.25. 5,5'',7''-trihidroksi-3,7-dimetoksi-4',4'''- <i>O</i> -biflavon bileşiğinin 6.00-7.90 ile 90-200 arası HMBC spektrumu.....	63
Şekil 4.26. 5,5'',7''-trihidroksi-3,7-dimetoksi-4',4'''- <i>O</i> -biflavon bileşiğinin 6.05-6.40 ile 50-60 arası HMBC spektrumu.....	64

Şekil 4.27. 5,5'',7''-trihidroksi-3,7-dimetoksi-4',4'''- <i>O</i> -biflavon bileşiğinin 3.64-3.90 ile 0-200 arası HMBC spektrumu.....	65
Şekil 4.28. 5,5'',7''-trihidroksi-3,7-dimetoksi-4',4'''- <i>O</i> -biflavon bileşiğinin ESI-MS ve QTOF-MS spektrumu. ....	66
Şekil 4.29. (8,3',4',5'-tetrahidroksi-7- <i>O</i> - $\alpha$ -glukosil izoflavon)-6-8''-(4'''-hidroksi-7''- <i>O</i> - $\alpha$ -glukosil izoflavon) biflavon bileşiğinin yapısı.....	67
Şekil 4.30. (8,3',4',5'-tetrahidroksi-7- <i>O</i> - $\alpha$ -glukosil izoflavon)-6-8''-(4'''-hidroksi-7''- <i>O</i> - $\alpha$ -glukosil izoflavon) biflavon bileşiğinin HMBC etkileşimleri.....	68
Şekil 4.31. (8,3',4',5'-tetrahidroksi-7- <i>O</i> - $\alpha$ -glukosil izoflavon)-6-8''-(4'''-hidroksi-7''- <i>O</i> - $\alpha$ -glukosil izoflavon) biflavon bileşiğinin kütle spektrumunda gözlenen bölünmeleri. ....	69
Şekil 4.32. (8,3',4',5'-tetrahidroksi-7- <i>O</i> - $\alpha$ -glukosil izoflavon)-6-8''-(4'''-hidroksi-7''- <i>O</i> - $\alpha$ -glukosil izoflavon) biflavon bileşiğinin <sup>1</sup> H NMR spektrumu. ....	70
Şekil 4.33. (8,3',4',5'-tetrahidroksi-7- <i>O</i> - $\alpha$ -glukosil izoflavon)-6-8''-(4'''-hidroksi-7''- <i>O</i> - $\alpha$ -glukosil izoflavon) biflavon bileşiğinin APT spektrumu. ....	71
Şekil 4.34. (8,3',4',5'-tetrahidroksi-7- <i>O</i> - $\alpha$ -glukosil izoflavon)-6-8''-(4'''-hidroksi-7''- <i>O</i> - $\alpha$ -glukosil izoflavon) biflavon bileşiğinin <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY spektrumu. ....	72
Şekil 4.35. (8,3',4',5'-tetrahidroksi-7- <i>O</i> - $\alpha$ -glukosil izoflavon)-6-8''-(4'''-hidroksi-7''- <i>O</i> - $\alpha$ -glukosil izoflavon) biflavon bileşiğinin HMBC spektrumu.....	73
Şekil 4.36. (8,3',4',5'-tetrahidroksi-7- <i>O</i> - $\alpha$ -glukosil izoflavon)-6-8''-(4'''-hidroksi-7''- <i>O</i> - $\alpha$ -glukosil izoflavon) biflavon bileşiğinin 4.60-7.00 ile 91-104 arası HMBC spektrumu. ....	74
Şekil 4.37. (8,3',4',5'-tetrahidroksi-7- <i>O</i> - $\alpha$ -glukosil izoflavon)-6-8''-(4'''-hidroksi-7''- <i>O</i> - $\alpha$ -glukosil izoflavon) biflavon bileşiğinin 4.30-5.50 ile 110-200 arası HMBC spektrumu. ....	75
Şekil 4.38. (8,3',4',5'-tetrahidroksi-7- <i>O</i> - $\alpha$ -glukosil izoflavon)-6-8''-(4'''-hidroksi-7''- <i>O</i> - $\alpha$ -glukosil izoflavon) biflavon bileşiğinin ESI-MS spektrumu. ....	76
Şekil 4.39. Gentisik asit-5- <i>O</i> - $\beta$ -ksilopiranosit bileşiğinin yapısı. ....	77
Şekil 4.40. Gentisik asit-5- <i>O</i> - $\beta$ -ksilopiranosit bileşiğinin kütle spektrumunda gözlenen moleküler bölünmeler.....	78
Şekil 4.41. Gentisik asit-5- <i>O</i> - $\beta$ -ksilopiranosit bileşiğinin <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	79
Şekil 4.42. Gentisik asit-5- <i>O</i> - $\beta$ -ksilopiranosit bileşiğinin APT spektrumu. ....	80
Şekil 4.43. Gentisik asit-5- <i>O</i> - $\beta$ -ksilopiranosit bileşiğinin ESI-MS spektrumu. ....	81
Şekil 4.44. Etil-(2,3-dihidroksi-5,6-dimetoksi-4-asetil) benzoat bileşiğinin yapısı. ....	82
Şekil 4.45. Etil-(2,3-dihidroksi-5,6-dimetoksi-4-asetil) benzoat bileşiğinin kütle spektrumunda gözlenen moleküler bölünmeler. ....	83

Şekil 4.47. Etil-(2,3-dihidroksi-5,6-dimetoksi-4-asetil) benzoat bileşiğinin $^{13}\text{C}$ NMR spektrumu. ....	85
Şekil 4.48. Etil-(2,3-dihidroksi-5,6-dimetoksi-4-asetil) benzoat bileşiğinin $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY spektrumu. ....	86
Şekil 4.49. Etil-(2,3-dihidroksi-5,6-dimetoksi-4-asetil) benzoat bileşiğinin HMBC spektrumu. ....	87
Şekil 4.50. Etil-(2,3-dihidroksi-5,6-dimetoksi-4-asetil) benzoat bileşiğinin HMBC spektrumu. ....	88
Şekil 4.51. Etil-(2,3-dihidroksi-5,6-dimetoksi-4-asetil) benzoat bileşiğinin QTOF-MS spektrumu. ....	89



## ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 2.1. Flavonoid sınıflarının UV bölge absorpsiyon değerleri. ....	17
Çizelge 4.1. <i>C. italicum</i> bitkisinin ham ekstrelerinin antibakteriyel aktivitesi MİK değerleri.	35
Çizelge 4.2. <i>C. italicum</i> bitkisinin ham ekstrelerinin antifungal aktivitesi MİK değerleri. ....	37

## 1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI

Doğadaki tüm hayvanlar, bitkiler ve insanlar bir dengeyi ürünlerdir. Mitolojide bitkiler tanrıların insana verdiği en değerli armağan olarak ele alınmıştır. Tüm bitkiler insanın hizmetindedir ve insanın varoluşundan itibaren bitkilerle olan ilişkisi başlamıştır (Gezgin 2006). İlk çağlardan kalan arkeolojik bulgulara göre insanların, besin elde etmek ve sağlık sorunlarını gidermek için öncelikle bitkilerden faydalandığı belirtilmiştir (Koçyiğit 2005).

Yüzyıllardan beri süregelen insan ve bitki arasındaki bağ sonucunda, günümüzde tüm dünyanın önemini kabul ettiği ve ciddi araştırmaların yapıldığı etnobotanik bilim dalı doğmuştur (Koçyiğit 2005). Etnobotanik bilgi birikimi, deneme yanılma yoluyla edinilmiş ve uzun bir zaman süreci sonucunda nesilden nesile aktararak günümüze kadar ulaşan çok değerli bilgileri yansıtan içerikleri ile bitkilerin bilimsel olarak değerlendirilmelerine önemli katkıda bulunmaktadır.

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre gelişmekte olan ülkelerde yaşayan insanların %80'i geleneksel tedavi yöntemlerini kullanmaktadır. Geleneksel tıbbın temel taşı tıbbi bitkilerden oluşup yaklaşık 4 milyar insan, tıbbi bitkileri kullanıyor demektir. Bu nedenden dolayı geleneksel tıpta kullanılan tıbbi bitkiler güvenli ve yararlı olmasından dolayı araştırılmaktadır (Farnsworth 1994).

Bitkilerin ürettiği doğal ürünler olan primer ve sekonder metabolitler doğrudan ve dolaylı olarak endüstrinin en temel ürünleridir. Bitkiler, topraktan aldıkları su, mineral ve bazı öğeleri kendi metabolizmalarında insan vücudunun özümleyebileceği bileşimlere dönüştürürler. Temel besin öğelerinden, karbonhidratlar, proteinler, yağlar, vitaminler ve mineraller bunlara örnektir. Bunlar bitki metabolizmasında oluşan ağırlıklı olarak kullanılan etken maddelerdir (Örneğin eterik yağlar (uçucu yağlar, esanslar), alkaloidler, flavonoidler ve acı maddeler) (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu 2011).

Bitki, antibakteriyel, antifungal, antiallerjenik, antikarsinojenik, antioksidan gibi etkiler göstermesinden dolayı bilim insanlarının ilgisini çekmektedir. Bu nedenle günümüzde bitkisel doğal ürünlere olan rağbet her zamankinden daha fazla artış göstermiştir.

İsoflavon bileşikleri en çok kurubaklagillerde bulunmaktadır. İsoflavonlar arasında en çok bilinenleri; daidzein, geistein ve glisiteindir (Büyüktuncer ve Başaran 2005). İsoflavonların etkisi genellikle insanların bağırsak florasına bağlı olarak klimakterik

semptomları azaltmasına yararlı olmaktadır (Yeşilada 2013). Flavonlar ise genellikle bitkide bulunan sarı renkli bileşikler olup; apigenin, luteolin, tangeritin, krsin, baikalein ve vagonin başlıca flavonlardır (Kolaç ve ark. 2017). Apigenin, saç spreyleri ve şampuanlarda kullanıldığı gibi lösemi tedavisinde de kullanılabileceği bulunmuştur (Huh ve ark. 2009). Diğer bir flavon olan baikalein ise kas gevşetici ve sakinleştiricilerde kullanılmaktadır (Hui 2002).

Çalışmamıza konu olan *Asteraceae* familyasına ait, *Cirsium* türü üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalara göre flavonoidler, steroller, triterpenler, alkaloidler ve benzeri bileşimler içerdiği ortaya konulmuştur (Syrchina ve ark. 2000, Aquino ve ark. 1987, Takano ve Kawaminami 1988, Negi ve ark. 1989). Bu bileşikler antimikrobiyal, antioksidan, antitümör, antihemorajik, antidepresan ve hepatoprotektif aktiviteler dahil olmak üzere çeşitli aktiviteler göstermiştir (Loizzo ve ark. 2004, Ku ve ark. 2008, Park ve ark. 2006, Orhan ve ark. 2007, Liu ve ark. 2007).

Çalışmamızda, Trakya bölgesinde yetişen *Cirsium italicum* (Savi) DC. (*Asteraceae*) bitkisinin ham ekstrelerinde antibakteriyel ve antifungal aktivite tayini ile fitokimyasal incelenmesi, sekonder metabolitlerinin izolasyonu ve izole edilen bileşiklerin yapılarının tayini amaçlanmıştır. Yapılan literatür araştırmasına göre, *C. italicum* bitkisi üzerinde tez konusu içeren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma ile Türkiye’de yetişen *Cirsium* türlerinin, kemotaksonomik bakımdan değerlendirilmesi yapılacağı gibi, izole edilen yeni bileşiklerin kimyasal yapılarının tayini ile Organik Kimya bilim dalına katkı sağlanmış olacaktır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER VE ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. Bitkinin Tanımı, Yayılışı ve Üzerinde Yapılan Çalışmalar

#### 2.1.1. *Asteraceae* Familyasının Özellikler ve Yayılışı

*Asteraceae* familyası, odunsu ve ağaçsı tipleri de içine alarak büyük oranda otsu bitkilerden oluşmaktadır. *Asteraceae* familyası 1.600 cins ve 23.000'den fazla tür ile bitkilerin en büyük ailesinden biri olup, Antartika hariç dünyanın hemen hemen her bölgesinde dağılım göstermektedir. Familya özellikle Amerika Birleşik Devleti'nin güneybatısı, Brezilya'nın güneyi, Meksika, Güney Afrika, Orta ve Güneybatı Asya ile Avustralya'da yoğun olarak dağılım göstermektedir. Özellikle otsu, otsu-odunsu alanlar ile dağ vejetasyonlarında yoğun olarak, nemli tropik orman bölgelerinde ise dar yayılışa sahiptir (Bremer 1994, Kadereit ve Jeffrey 2007). Ülkemizde *Asteraceae* familyası 136 cins ve 1.195 tür ile en zengin familyalardan birisidir. *Cirsium* cinsi (57 tür), *Centaurea* L. (180 tür) ve *Hieracium* L.'den (103 tür) sonra, familyanın üçüncü büyük cinsidir. *Asteraceae*, 446 endemik tür (% 37.3) ile Türkiye'de en çok endemik türe sahip olan familyadır (Davis 1965-1985, Güner ve ark. 2000).

*Asteraceae* familyası 5 alt familyaya ayrılmaktadır. Bunlar; *Barnadesioideae*, *Mutisioideae*, *Cichorioideae*, *Asteroideae* ve *Carduoideae*'dir. *Cirsium* cinsi, 241 cins ve yaklaşık 2.600 türe sahip *Carduoideae* alt familyasında yer almaktadır (Kadereit ve Jeffrey 2007).

#### 2.1.2. *Cirsium* Cinsinin Genel Özellikleri

*Cirsium* adı Yunanca "kirsos" adından türetilmiş olup damar hastalıkları anlamına gelmektedir. Dioscorides'in verdiği bilgiye göre; Tournefort, eski kaynaklardan elde ettiği bilgiye dayanarak bitkinin köklerinin damar hastalıklarına iyi geldiğini söylemektedir (Charadza 1963).

*Cirsium* cinsinin sınıflandırma sistemine göre sistematik yeri; Kingdom: Plantae, Subkingdom: Tracheobionta, Divisio: Magnoliophyta, Classis: Magnoliopsida, Subclassis: Asteridae, Superorder: Asteranae, Order: Asterales, Family: Asteraceae, Subfamily: Carduoideae, Tribe: Cynareae, Subtribe: Carduinae, Genus: *Cirsium* şeklinde gösterilmektedir (Bremer 1994, Kadereit ve Jeffrey 2007).

*Cirsium* cinsine ait olan birçok taksonun halk arasında değişik amaçlar için yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir. Genellikle tohum, kök, gövde ve çiçeklerin kaynatılması ile hazırlanan ekstraksiyonlar, varis, hemoroid, peptik ülser, öksürük ve bronşit gibi başlıca rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Loizzo ve ark. 2004, Orhan ve ark. 2007).

Çok yıllık ya da nadiren tek yıllık bir cins olan *Cirsium* cinsi bitkilerin boyu 20-100 cm'ye kadar çıkmaktadır. Gövde kısmı dikenli ya da dikensiz olup yaprak kenarları dikenli, yaprak üst yüzeyinde genelde ufak dikenler bulunur ve yapraklarının şekli tamdan derin parçalıya kadar olmaktadır. Çiçek kısmı, başları tek ya da yoğun olarak bir araya toplanmış olup çiçeği çevreleyen çiçek sapından gövdeye bağlandığı yerde bulunan yaprakçıklar çok serili ve uçları dikenli olmaktadır. Çiçeklerinin rengi beyazdan morumsu-kırmızıya bazen de sarımsı görünmektedir. Temmuz-ağustos ayları gibi çiçek açar ve 1-2 ay çiçekli şekilde kalmaktadır. *Cirsium* cinsi bitkiler genellikle yol kenarlarında, kayalık alanlarda, kültüre alınmış arazilerde, çam, meşe ve göknar ormanlarının içerisinde bulunmaktadır (Seçmen ve ark. 1995, Yıldız ve ark. 2010).

### **2.1.3. *Cirsium italicum* (Savi) DC. (Asteraceae) Bitkisinin Genel Özellikleri**

30-80 cm uzunluğunda tek ya da çift yıllık bir bitki olup, gövdesi yaprakların gövdeye bağlandığı yerin yarısına kadar kanatlı, örümcek ağı tüylü ve tabandan başlayarak çok dallıdır. Gövde yaprakları dikdörtgen şeklinde olup yanal kısımlar iki parçalı, 3-9 çift yanal ve terminal kısımlar 2-5 mm uç dikenlidir. Bitki, Temmuz-Eylül ayları arası çiçeklenme zamanı olup tarla kenarlarında, meşelik açıklarda ve deniz seviyesinin 700 m yukarısında yetişmektedir (Yıldız ve ark. 2010). Yeşilada ve ark. (1999) ülkemizin kuzeybatı bölgesinde, *C. italicum* (Savi) DC. tohumlarının kaynatılarak hazırlanan ekstraksiyonları sabahları aç karnına içildiğinde hemorid tedavisinde kullanıldığı belirtilmiştir.



Şekil 2.1. Tez çalışmasında kullanılan *Cirsium italicum* bitkisinin gövde, yaprak ve çiçekleri.



Şekil 2.2. Tez çalışmasında kullanılan *Cirsium italicum* bitkisinin çiçek ve yapraklar.

#### 2.1.4. *Cirsium* Türleri Üzerine Yapılan Çalışmalar

Yapılan literatür çalışmalarında *C. italicum* (Savi) DC. (*Asteraceae*) bitkisinde antibakteriyel ve antifungal aktivite çalışmaları ile fitokimyasal izolasyon çalışmasına

rastlanmamıştır. Diğer *Cirsium* türleri üzerinde yapılan biyolojik aktivite ve izolasyon çalışmaları aşağıda verilmiştir.

#### **2.1.4.1. *Cirsium* Türleri Üzerine Yapılan Antibakteriyel ve Antifungal Aktivite Çalışmaları**

Nazaruk ve Jakoniuk'un (2005) *C. rivulare* bitkisinin çiçek ve yapraklarından elde ettikleri su, metanol ve %70'lik etanol ekstraktlarının, *M. luteus*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *E. coli* (B1+) ve *K. pneumoniae* bakterileri ile *C. albicans* üzerinde antimikrobiyal aktiviteleri araştırdıkları çalışmada, tüm ekstraktların bakteriyel aktivite gösterdiği belirlenmiştir. En yüksek aktivite yaprakların su ekstraktlarında ve gram-pozitif bakterilere karşı bulunmuştur.

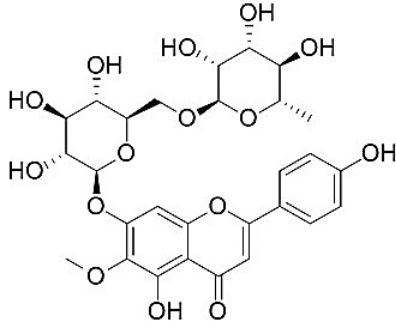
Borawska ve arkadaşları (2010), 5 *Cirsium* türünün (*C. arvense*, *C. oleraceum*, *C. palustre*, *C. rivulare* ve *C. vulgare*) metanol ekstraktlarında, *S. aureus*, *B. subtilis*, ve *P. aeruginosa* olmak üzere 3 mikroorganizma üzerinden antimikrobiyal aktiviteyi araştırılmışlardır. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) sonuçları, elde edilen ekstraktların Gram pozitif bakteriler üzerine (1.56–25.0 mg/mL), gram negatif bakterilerden (12.5–50.0 mg/mL) daha yüksek inhibisyon etkisi olduğunu göstermiştir.

Khan ve arkadaşları (2011) tarafından yapılan bir araştırmada *C. arvense* bitkisinin, n-hekzan, kloroform, etilasetat ve n-bütanol ekstraktlarında *S. aureus* ve *M. luteus* olmak üzere 2 Gram pozitif mikroorganizma ile *E. coli*, *E. pseudomonas*, *E. aeruginosa*, *Enterobacter* ile *K. pneumoniae* olmak üzere 4 Gram negatif mikroorganizma üzerinde, antibakteriyel ve antifungal aktivite araştırılmış ve MİK değerleri hesaplandığında en aktif ekstrenin kloroform olduğu bulunmuştur.

Kenny ve arkadaşları (2014) tarafından, *C. arvense*, *C. vulgare* ve *C. palustre* bitkilerinin etanol ekstraktlarında antimikrobiyal aktivite tayini çalışılmıştır. Gram pozitif mikroorganizmaları üzerinde MİK değeri hesaplandığında, 187.5-365 mg/mL bulunurken; Gram negatif mikroorganizmalar (*E. coli* ve *S. typhimurium*) üzerinde de *C. palustre* bitkisinin en iyi aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra bu çalışmada bitkilerin fenolik madde miktarı ile antioksidan aktivite tayinide gerçekleştirilmiştir.

#### **2.1.4.2. *Cirsium* Türleri Üzerine Yapılan İzolasyon Çalışmaları**

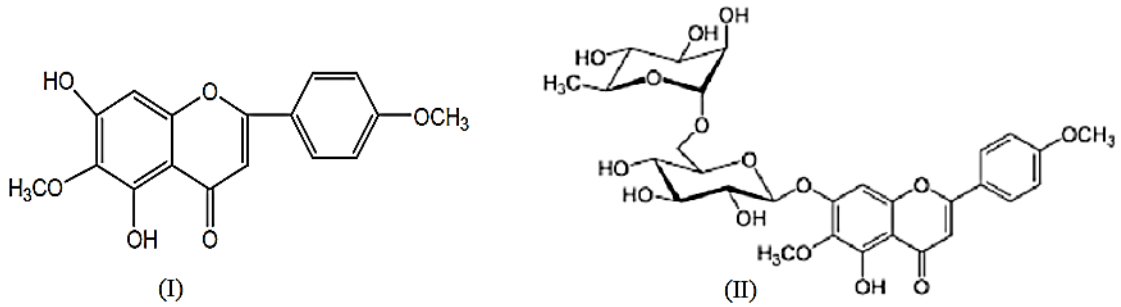
Park ve arkadaşları (1995) tarafından *C. japonicum* var. *ussuirense* bitkisinin bütanol ekstresinden hispidulin 7-neohesperidosit bileşiği izole edilmiştir.



**Şekil 2.3.** Hispidulin 7-neohesperidosit bileşiğinin yapısı.

Liu ve arkadaşları (2006) tarafından *C. japonicum* var. *ussuriense* bitkisinden HPLC yöntemi kullanılarak, pektolarin ve 5,7-dihidroksi-6-4'-dimetoksi flavon bileşiği tayin edilmiştir. Bitkinin ham ekstresi ve izole edilen iki bileşiği fareler üzerinde antikanser aktivitesi araştırılmıştır. Bu araştırmanın sonucunda ham ekstrenin antikanser etkisinin, iki bileşikten daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Lim ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan bir çalışmada, *C. chanroenicum* bitkisinin n-hekzan, diklorometan, etilesat ve bütanol ekstralarının çeşitli kromatografik yöntemler kullanılarak pektolarin ve pektolarin izole edilmiştir. İzole edilen bu bileşiklerin fareler üzerinde anti-inflamatuar etkisi araştırılmıştır. Bu araştırmanın sonucunda, pektolarin ve pektolarin bileşiğinin anti-inflamatuar aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

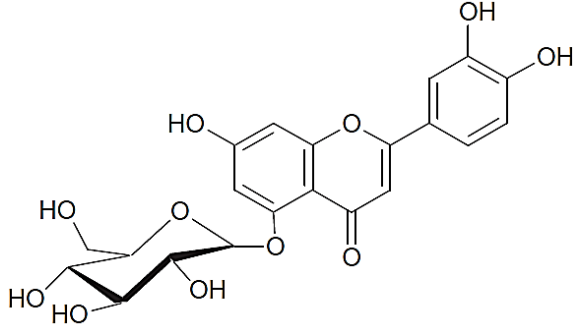


**Şekil 2.4.** Pektolarinigenin (I) ve pektolarinin (II) bileşiğinin yapısı.

Yoo ve arkadaşları (2008) tarafından, *C. setidens* bitkisinin metanol ekstresinden pektolarin ve pektolarinigenin flavonoidleri izole edilip, spektroskopik metotlar kullanılarak yapıları tanımlanmıştır. İzole edilen bileşiğin fareler üzerinde hepatoprotektif aktiviteleri araştırılmıştır. Bu aktivite sonucuna göre iki bileşiğin hepatoprotektif aktiviteye sahip olduğu ve süperoksit dismutaz seviyesinin yüksek olduğu gözlemlenmiştir.



Jung ve arkadaşları (2012) tarafından, *C. maackii* bitkisinden çeşitli kromatografik yöntemler kullanılarak bir flavonoid glikozit olan luteolin 5-O-glukosid bileşiği izole edilmiştir. Ayrıca bitkinin metanol ekstresinin ve izole edilen bileşiğin, anti-inflamatuar etkisi fareler üzerinde araştırılmıştır. Yapılan çalışmanın sonucunda luteolin 5-O-glukosid bileşiğinin anti-inflamatuar aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir.

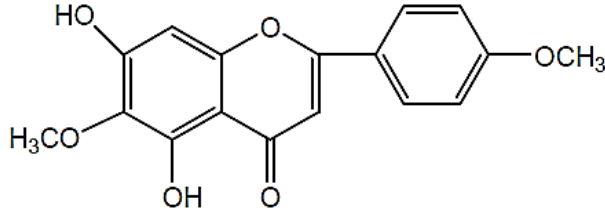


**Şekil 2.5.** Luteolin 5-O-glukosid bileşiğinin yapısı.

Hai ve arkadaşları (2013) *C. setosum* bitkisinin metanol ekstresinden (7E,9R)-9-hidroksi-5,7-megastigmadien-4-on-9-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glukopiranosit, (6R, 7E,9R)-9-hidroksi-4,7-megastigmadien-3-on-9-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glukopiranozit, ürolignosid, 4,9,9'-trihidroksi-3,3'-dimetoksi-8-O-4'-neolignan-7-O- $\beta$ -D-glukopiranozit, sitosid A, salidroside ve adenosin olmak üzere, yedi bileşik kromatografik metotlar kullanılarak izole edilmiş, spektroskopik metotlar kullanılarak yapıları tanımlanmıştır.

Loizzo ve arkadaşları (2014). *C. tenoreanum* bitkisinin metanol ve etilasetat ekstraktlarından, üç flavonoid (apigenin, quersetin-3-O-galaktosid ve kamferol-3-O-ramnosid) bileşiğini izole edip, bitki ekstresinde sitotoksik ve antimikrobiyal aktivite araştırmışlardır. Bu araştırma sonucunda, metanol ekstresinde, sitotoksik ve antimikrobiyal aktivite gözlenmezken; etilasetat ekstresinde hem sitotoksik aktivite hemde antimikrobiyal aktivite (MİK= 0.5-1 mg/mL) tayin edilmiştir.

Lu ve arkadaşları (2014) yaptıkları bir çalışmada, *C. japonicum* bitkisinin kloroform ekstresinden kromatografik yöntemleri kullanarak pektolinarigenin bileşiğini izole edip bu bileşiğin meme kanser hücrelerinin çoğalmasını önleyici etkisini araştırmışlardır. Yapılan bu araştırmanın sonucunda, pektolinarigenin maddesinin güçlü bir şekilde anti-proliferasyon aktivite gösterdiği bulunmuştur.



Şekil 2.6. Pektolinarigenin bileşiğinin yapısı.

## 2.2. Flavonoidler

### 2.2.1. Flavonoidlerin Doğada Bulunuşları ve Kullanım Alanları

Flavonoidler bitkilerin sekonder metabolitlerinin önemli bir sınıfıdır. Bitkilerde rastlanan bu bileşikler, bitkilere sarı, kırmızı, turuncu, lacivert ve benzeri renkleri veren pigmentler olarak bilinmekte ve genellikle meyve, sebze, tohum, çiçek, yaprak ve dallarda bulunmaktadır.

Ryzsnyak ve Szent-Georgy (1936) tarafından limon kabuğundan izole edilen flavon bileşikleri, P vitamini adı altında kılcal damarların geçirgenliğini ve kırılgenliğini düşürmek için kullanılması flavonoidlere verilen önemi arttırmıştır. Yapılan flavonoid araştırmaları sonucu, flavonoidlerin farmakolojik ve biyolojik aktivitelere sahip oldukları bulunmuştur. Flavonoidlerin antimikrobiyal (Pratt ve Hudson 1990), antiviral, antiülserojenik, hipolidemik, hepatoprotektif, (Wagner 1989, Wagner ve ark. 1991, Hikino ve Kiso 1988) ve antioksidan (Bors ve Saran 1987, Larson 1988) aktivitelere sahip oldukları açıklanmıştır.

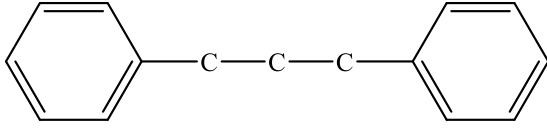
Flavonoidlerin çeşitli özelliklerinden dolayı son yıllarda, besin, tekstil, deri, metalürji, tıp, ziraat gibi endüstri alanlarda kullanımları yönelik çalışmaların sayısı artmaktadır. Bazı flavonoidlerin UV-ışınlardan korumasından dolayı bazı kremlerde katkı maddesi olarak kozmetik sektöründe de kullanılmaktadır (Bilaloğlu ve Harmandar 1999).

Flavonoidlerin, laboratuvar ortamında sentez yoluyla üretimi günümüzde olmadığından ya da zor olduğundan dolayı tek kaynak flavonoid içeren bitkilerdir. Bu sebepten dolayı yeni flavonoid kaynaklarının, yapılarının ve özelliklerinin belirlenmesi yanı sıra kullanım yerlerinin çoğaltılması gerekmektedir.

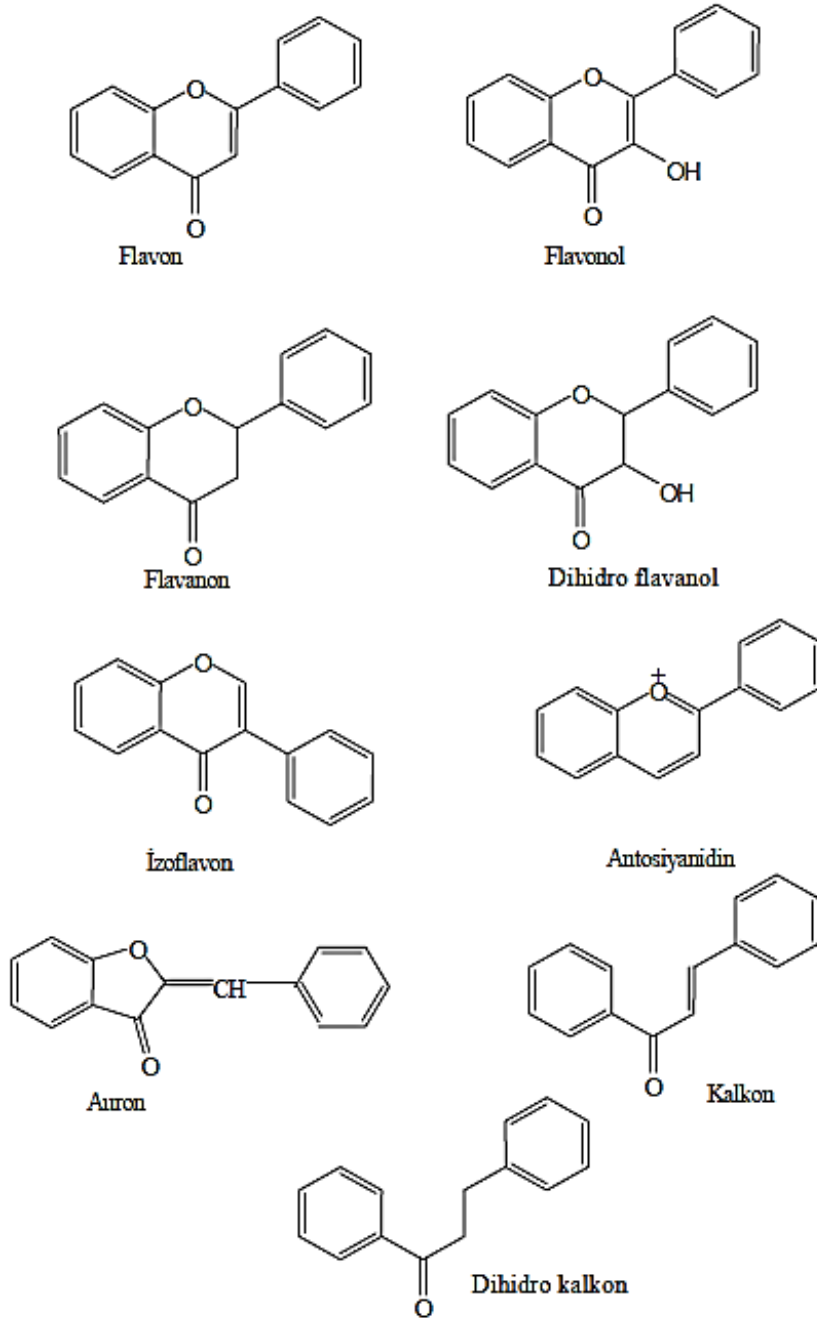
### 2.2.1. Flavonoidlerin Özellikleri ve Sınıflandırılması

Flavonoidlerin karbon iskeletini, iki fenil halkasının, propan zinciri ile birleşmesiyle 15 karbon atomu içeren, difenilpropan ( $C_6 - C_3 - C_6$ ) yapısı oluşturmaktadır (Şekil 2.7). Fenil

halkalarının propan zincirine farklı pozisyonlarda bağlanmasıyla, flavonoidler alt sınıflara ayrılır (Şekil 2.8) (Bilaloğlu ve Harmandar 1999).



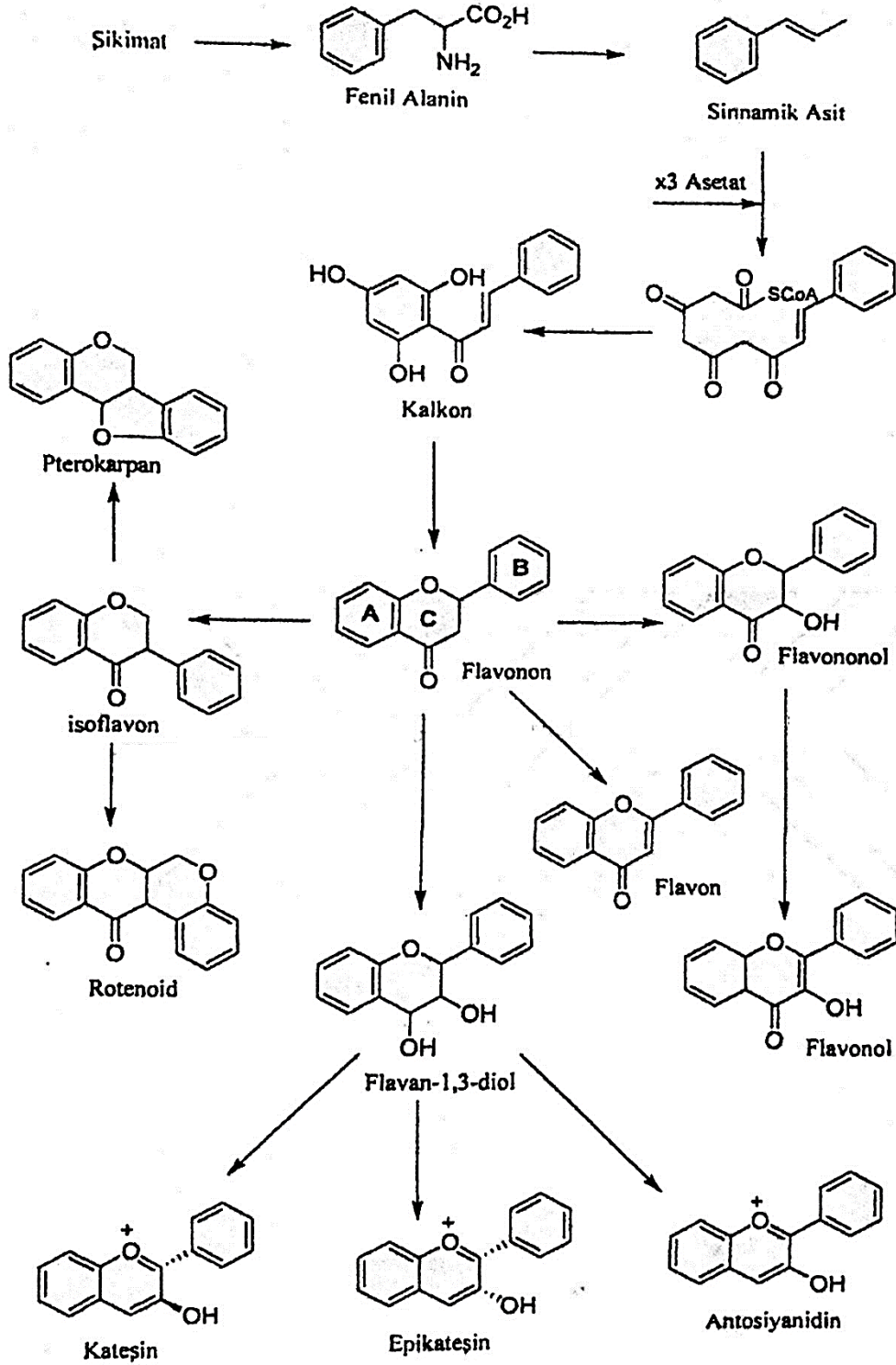
Şekil 2.7. Genel flavonoid iskeleti.



Şekil 2.8. Flavonoidlerin alt sınıfları.

## 2.2.2. Flavonoidlerin Biyosentezi

Sekunder metabolit olan flavonoidlerin bitkilerdeki biyosentezi Şekil 2.9'de verilmiştir.



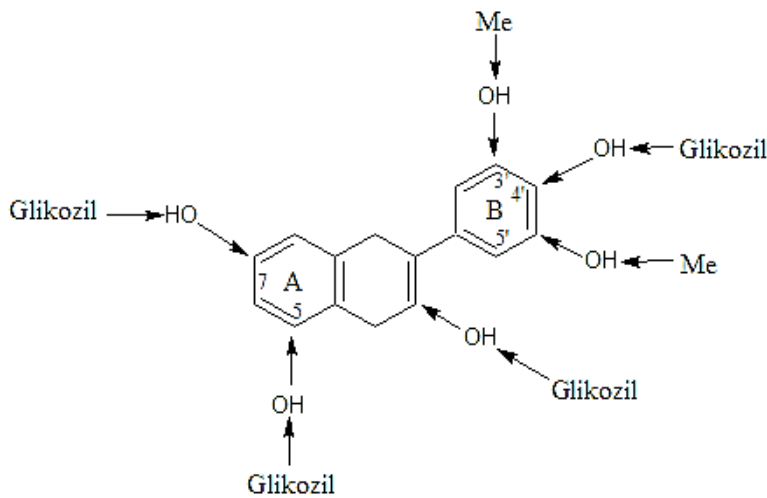
Şekil 2.9. Flavonoidleri biyosentezi

### 2.2.3. Flavonoidlerin Yapı Çeşitliliği

Flavonoidlerin yapı çeşitliliği difenilpropan iskeletinin farklı yapılarda düzenleme özelliği ile sınırlı değildir. Her sınıf içinde, molekülün aromatik halkalarına bağlanan substituentlerin sayısı, özelliği ve bağlanma pozisyonları flavonoidlerin yapı çeşitliliğine neden olan faktörler bulunmaktadır.

Flavonoid yapılarında en çok yer alan substituentler hidroksil gruplarıdır. Flavonoidlerin yapısında hidroksil gruplarının bulunması biyosentetik yolun bir sonucudur. Doğal flavonoidlerin yapısında en fazla yedi hidroksil grubu bulunmaktadır. A halkasının genellikle C-5 ve C-7 pozisyonlarında hidroksillenmeye yatkın olduğu gözlenmektedir. A halkasının C-6 ve C-8 pozisyonlarının da hidroksillendiği flavonoidler çeşitli bitki türlerinde bulunmaktadır. B halkasında ise genellikle C-4' pozisyonu, çoğu zaman ise C-3' ve C-5' pozisyonları hidroksillenmektedir. C-3' ve C-5' pozisyonundaki hidroksil grupları çoğu zaman metillenmiş halde bulunabilirler. Aromatik halkalarda hidroksil grubu içermeyen ve C-2' pozisyonu hidroksillenmiş flavonoidler çok az bulunmaktadır.

Flavonoidlerin yapısında bulunan hidroksil grupları, reaktif özelliklerinden dolayı, kolaylıkla alkilenir veya glikozillenir. Bu nedenle, flavonoidlerin metoksi ve glikozil türevleri sık rastlanılmaktadır. Metoksi flavonoidlerin yapılarında birden yediye kadar metoksi grubuna rastlanmakta ve doğada mono-, di- veya trimetoksi flavonoidlere daha sık rastlanmaktadır. Flavonoidlerin C-5 ve C-7 pozisyonlarındaki hidroksil grupları nadir hallerde metillenmiş şekilde bulunmaktadır. Flavonoid yapılarındaki substituentlerin genel yerleşme pozisyonları **Şekil 2.10**'de verilmiştir (Bilaloğlu ve Harmandar 1999).

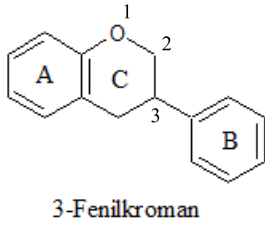


**Şekil 2.10.** Flavonoid yapılarında substituentlerin en yaygın yerleşme pozisyonları.

Bitkilerde flavonoidler çoğunlukla mono-O-glikozitler halinde rastlanmaktadır. Ancak di- ve trisakkaritlerle glikozillenmiş flavonoidler de doğada yaygın bulunmaktadır. Flavonoidler, özellikle antosiyanidin ve flavonollerin, 3-O-glikozitlerine daha sık rastlanmaktadır. Ancak C-7, C-4' ve C-5' pozisyonlarında glikozillenmiş flavonoidlere de doğada rastlanmaktadır. Bitkilerde rastlanan flavonoid glikozitlerin diğer bir türü ise C-glikozitlerdir (Bilaloğlu ve Harmandar 1999).

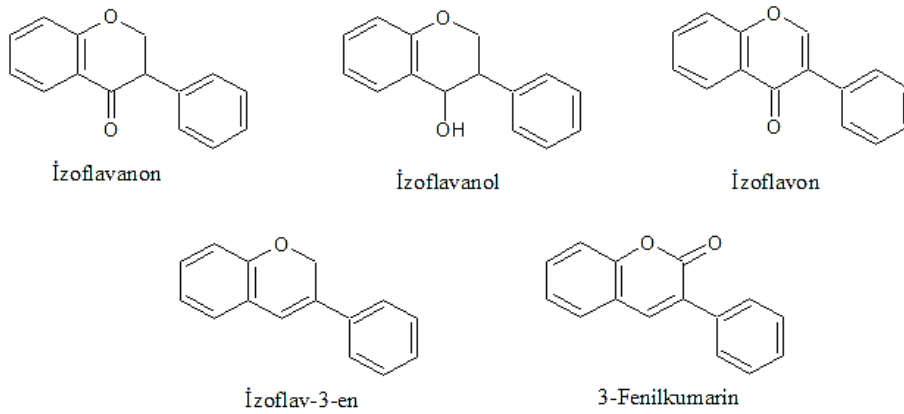
#### 2.2.4. İzoflavonoidler

İzoflavonoidler, 1,2-difenilpropan iskeleti içerirler ve bu iskelet yapısındaki propan zincirinin uçtaki karbon atomu üzerinden, A aromatik halkasıyla siklikleşmeye yatkındırlar. Böyle bir siklikleşme sonucu heterohalkalı trisiklik 3-fenilkroman sistemi oluşturmaktadırlar. Kroman çekirdeğindeki aril halkası A, C-3 pozisyonundaki halka B ve hetero halka ise C ile gösterilmektedir (Bilaloğlu ve Harmandar 1999).



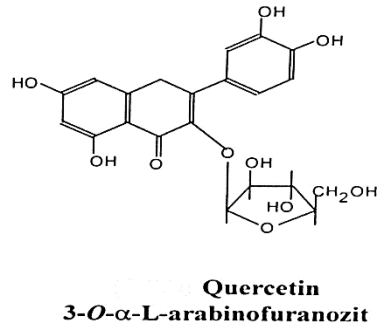
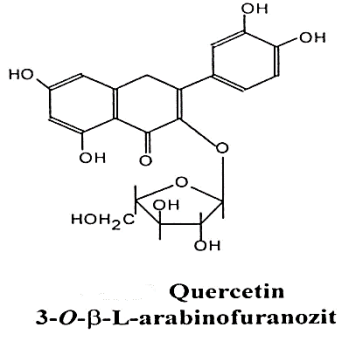
Şekil 2.11. 3-Fenilkroman iskeletini yapısı.

İzoflavonoidler; 3-fenilkroman iskeletine keto-, hidroksil grubu ve/veya olefinik bağın bağlanmasıyla modifiye olan izoflavan, izoflavanon, izoflavanol, izoflavon, izoflav-3-en ve fenilkumarin gibi alt birimler içermektedirler (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. İzoflavonoidlerin alt birimleri.





**Şekil 2.14.** Quercetin 3-O-α-L-arabinofuranozit ve Quercetin 3-O-β-L-arabinofuranozit bileşiğinin yapısı.

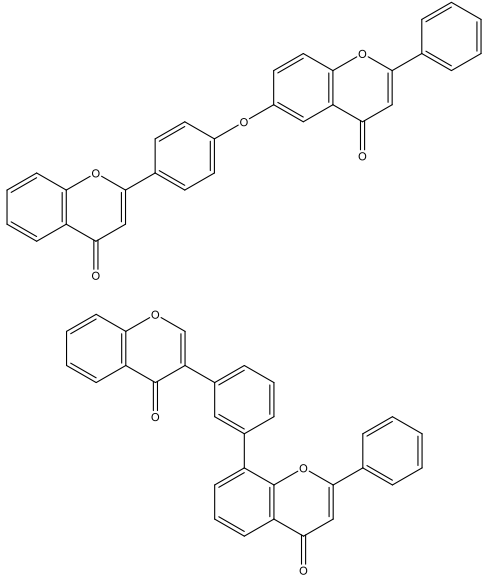
- 3) Flavonoid glikozitler yapılarında bulunan şeker kalıntısının yapısına göre pentozitler (arabinozitler, ksilozitler vb.) ve heksozitler (glukozitler, galoktozitler, fruktozitler vb.) olarak gruplandırılmaktadır.

Doğada rastlanan flavonoid glikozitlerin çoğunluğu monosakkarit kalıntıları içermektedir. Ancak, yapılarında oligosakkaritlerin yer aldığı glikozitler de bulunmaktadır (Bilaloğlu ve Harmandar 1999).

### 2.2.6. Biflavonoidler

Bitkilerde flavonoid bileşiklerinin monomerlerinin yanı sıra dimer olarakta yaygın olup bu bileşiklere “biflavonoid” bileşikler denilmektedir. Biflavonoidler, iki monomer flavonoid molekülünün kondenzasyonu sonucu oluşmaktadırlar. Biflavonoid yapıları, flavonoid moleküllerinin birbiriyle -O-C- veya -C-C- bağı ile bağlanmaktadırlar (Şekil 2.15). Biflavonoid yapılarında, iki flavonoid molekülün değişik şekillerde bağlanabilirler; A-A, B-B, C-C halkalarının yanı sıra farklı halkaları birbiriyle bağlanmasıyla da oluşmaktadırlar. -C-C- ve -O- bağlı biflavonoidlere ait örnekler aşağıda verilmiştir (Harmandar ve Bilaloğlu 1999).





**Şekil 2.15.** Biflavonoid bileşik örnekleri.

## 2.3. Flavonoidlerin Spektroskopik Yapı Aydınlatma Metotları

### 2.3.1. Ultraviyole (UV) Spektroskopisi

Ultraviyole (UV) spektroskopisi flavonoid yapılarının belirlenmesinde ve yapı özellikleri hakkında bilgiler vermektedir. Flavonoidler ve fenolik bileşikler UV bölgede 230-290 nm'de bir veya daha fazla absorpsiyon göstermektedir.

Basit fenoller ve fenolik asitler 230-290 nm arasında bir veya iki güçlü bant gösterirken, hidroksi sinamik asitler 310-332 nm'de keskin bir absorpsiyon piki vermektedirler. Flavonoidler hem 255-285 nm aralığında hem de 310-390 nm aralığında olmak üzere iki bant vermektedir. 6 ve 8-hidroksiflavonoller, kalkon ve auronlar 380-430 nm aralığında görünürken antosiyaninler 500 nm üzerinde bir bant görünmektedir. Kinon yapıları diğer fenolik bileşiklerden UV bölgede karmaşık spektral bantları ve uzun dalga boylarında zayıf absorpsiyon pikleri ile ayrılmaktadır (Tekpetek 2011). Flavonoid sınıflarının UV bölgedeki absorpsiyon değerler **Çizelge 2.1**'de verilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Flavonoid sınıflarının UV bölge absorpsiyon değerleri (Bilaloğlu ve Harmandar 1999).

Flavonoid sınıfı	Şerit II (nm)	Şerit I (nm)
Flavonlar	250-280	310-350
Flavonoller (3-OH substitüe)	250-280	330-360
Flavonoller (3-OH serbest)	250-280	350-385
İzoflavonlar	245-275	310-330 "omuz"
İzoflavonlar (5-deoksi-6,7-dioksijenlenmiş)		320 pik
Flavanon ve dihidroflavonoller	275-295	300-330 "omuz"
Kalkonlar	230-270 (düşük şiddetli)	340-390
Auronlar	230-270 (düşük şiddetli)	380-430
Antosiyanidin ve antosiyaninler	270-280	465-560

### 2.3.2. Infrared (IR) Spektroskopisi

Apolar fenolik bileşikler infrared spektroskopisi metodundaki ölçümleri de genellikle kloroformda çözülmektedirler. Diğer pek çok fenolik bileşik ise KBr ile karıştırılarak diskler halinde hazırlanmakta ve ölçüm yapılmaktadır. IR spektroskopisi fenolik bileşiklerin karakterizasyonunda pek fazla kullanılmaz. Ancak karbonil grubu içeren fenolik bileşikler için kullanılmaktadır. Çünkü karbonil absorpsiyon bandının serbest bir hidroksil grubuna bağlı olup olmadığı anlaşılmaktadır (Dey ve Harborne 1989).

### 2.3.3. <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopisi

<sup>1</sup>H-NMR spektrumu fenolik bileşiklerin aromatik halka protonlarını ve substitüentlerin durumunu gösterir. Aromatik halka protonları 5.00-8.00 ppm arasında gözlenirler. Orto etkileşimlerde  $J= 2.9$  Hz, meta etkileşimlerinde  $J= 2-3$  Hz'dir. Metoksi grupları 3.8-3.9 ppm civarında singlet olarak görülür. Eğer bir şeker grubu bağlı ise monoglikozitlerde şeker protonları 3.0-4.0 ppm arasında gözlenirken şekerin H-1' protonu daha aşağı alanda 4.8-6.0 ppm arasında dublet olarak görülür. Birbirine bağlı iki şeker varsa, halkaya bağlı şekerin H-1' protonu aromatikliğin etkisi ile aşağı alana kayar (5.1-5.9 ppm). İkinci şekerin H-1" protonu

daha alifatik karakter gösterdiğinden 4.5-5.0 ppm civarında multiplere benzer pik verir. H-1' / H-2' etkileşme sabiti poliglukozit aynı zamanda  $\beta$  ve  $\alpha$  glikozit bağının işaretidir. Örneğin;  $\beta$ -glukopironozitlerin H-1' / H-2' etkileşme sabiti 7.8 Hz,  $\alpha$ -glukopironozitlerin ise 3-4 Hz olduğundan  $\alpha$ - veya  $\beta$ - bağlı glukopiranozitler birbirinden kolayca ayırt edilebilirler. Sinamik asit türevlerinde, sinamoil grubunun varlığı 6.15-6.64 ppm ve 7.43-7.81 ppm civarında  $J=16$  Hz'lik yarımlama sabitleri ile (E),  $\alpha$ ,  $\beta$ - çift bağa karşılık gelen bir çift dublet ile belirlenmektedir.

#### 2.3.4. $^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopisi

$^{13}\text{C}$ -NMR spektroskopisi, genellikle glikozitlerde, şekerlerin sırası ve bağlanma yerleri ya da glikozil grubundaki açıl gruplarının türlerini ve yerlerini incelemek amacıyla kullanılmaktadır. 250 ppm'lik geniş bir alanda karbon sinyalleri gözlenmekte olup genellikle diğer spektrumlar yeterli bilgi vermediğinde kullanılmaktadır. Polisakkaritlerde; şekerlerin sırası ve bağlanma noktaları ya da glikozil grubundaki açıl gruplarının türü ve yerlerini incelemede yararlıdır.

$^{13}\text{C}$ -NMR spektroskopisi, özellikle glikozidlerde, şekerlerin sırası ve bağlanma noktaları ya da glikozil grubundaki açıl gruplarının cinsi ve yerlerini incelemede yararlıdır. 250 ppm'lik geniş bir alanda karbon sinyalleri gözlenmektedir.  $^{13}\text{C}$ -NMR spektroskopisi; genellikle diğer veriler yeterli bilgi vermediğinde kullanılır. Spektrumda;  $\text{sp}^3$  karbonları 0-70 ppm'de,  $\text{sp}^2$  karbonları 100-170 ppm'de,  $\text{sp}$  karbonları 70-100 ppm'de soğurma yaparlar. Aromatik karbon atomları 100-160 ppm ve karbonil karbonları 140-220 ppm aralığında soğurma yaparlar (Erdik 1993). Fenolik bileşiklerin çoğunluğu aromatik halkalarında OH,  $\text{OCH}_3$ ,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_3$ , izoprenil ve şeker fonksiyonları içerdiği için yeni karbon rezonanslarının ortaya çıkmasına neden olur. Bu nedenle, sübstitüentin sayısına bağlı olarak aromatik kuarterner karbon sinyallerinin sayısında artma olur. O-glukozillenme bağlandığı karbon sinyalinin 2 ppm civarında yukarı çıkarken, orto ve özellikle para pozisyonlarında bulunan karbon sinyallerinin ise aşağı alana 1-4 ppm kaymasına neden olur.

Flavonoid bileşikleri genellikle aromatik halkalarında OH,  $\text{OCH}_3$ ,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_3$ , izoprenil ve şeker gibi fonksiyonel gruplar içermektedir. Flavonoid çekirdeğine bu tür farklı grupların bağlanması yeni karbon rezonanslarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu yüzden bağlanan grupların sayısına göre aromatik kuarterner karbon sinyallerinin sayısında artmaya neden olmaktadır. O-glukozillenme bağlandığı karbon sinyalinin 2 ppm civarında yukarı, orto ve özellikle para pozisyonlarında bulunan karbon sinyallerinin ise aşağı alana 1-4

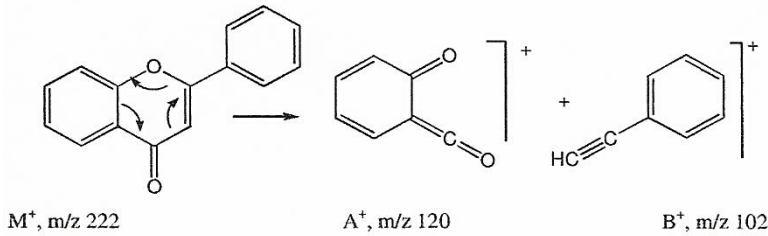
ppm kaymasına neden olmaktadır. C-glikozillenme ise aglikona bağlandığı karbon atomu sinyalinin 10 ppm aşağı alana kaymasına neden olduğu halde diğer atom sinyallerini etkilememektedir.

### 2.3.5. Kütle Spektroskopisi

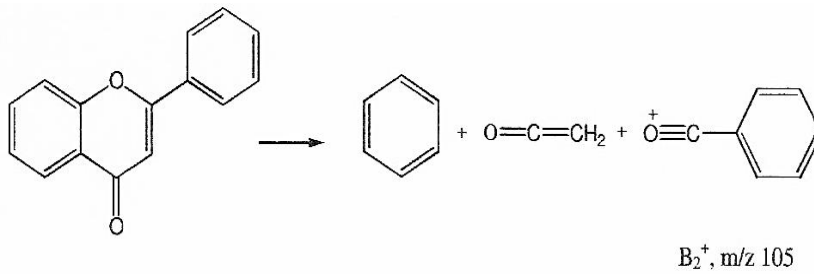
Kütle spektroskopisi, flavonoid bileşiklerinin molekül ağırlığının belirlenmesinde önemli bir metottur.

Kütle spektrumunda flavonoid aglikon ve glikozidlerinin yapıları belirlenmesinde yardımcı olurken flavonoid aglikonlarının çoğu şiddetli moleküler iyon piki olan  $[M]^+$  vermektedir. Buna ek olarak, flavon aglikonları  $[M-H]^+$  ve  $[M-CO]^+$  piki verirken metoksi flavon olması halinde  $[M-CH_3]^+$  ve  $[M-CO-CH_3]^+$  piklerini vermektedirler (Harborne ve ark. 1975).

Flavonoidlerin parçalanma ürünü Retro-Diels Alder reaksiyonu **Şekil 2.16**'da verilirken, ikinci parçalanma ürünü de **Şekil 2.17**'de verilmiştir. **Şekil 2.16**'da verilen reaksiyonda iki yüklü iyon oluşken (A1 ve B1). **Şekil 2.17**'de verilen reaksiyonda tek yüklü iyon oluşmaktadır (B2) (Bilaloğlu ve Harmandar 1999).



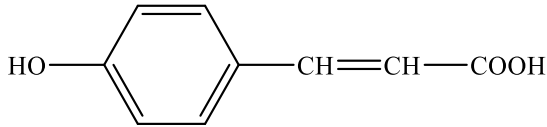
**Şekil 2.16.** Flavonoidlerde Retro-Diels Alder parçalanması.



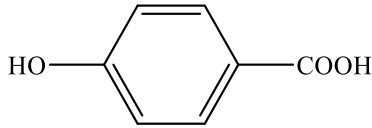
**Şekil 2.17.** Flavonoidlerin ikinci parçalanma yolu.

## 2.4. Fenolik Asitler

Fenolik asitler, hidroksibenzoik asit (Şekil 2.19) ve hidroksisinamik asit (Şekil 2.18) olmak üzere iki temel yapıdan oluşmaktadır (Huang ve ark. 1992). Hidroksibenzoik asit, C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> fenilmetan yapısında; hidroksisinamik asit, C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> fenilpropan yapısına sahiptirler (Maier ve ark. 1990, Cemeroglu ve ark. 2001, Acar 1998).



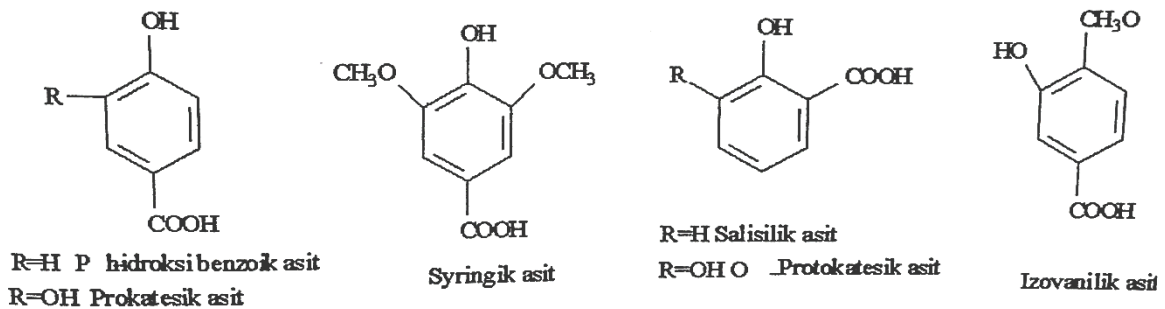
Şekil 2.18. Hidroksisinamik asit



Şekil 2.19. Hidroksibenzoik asit

Fenolik asitler, genellikle serbest halde bulunmamaktadır. Alkollerle fenol esterler, amino bileşiklerle amidleri bunun yanı sıra, karboksil grupları da karbonhidratlar, glikozitler, aminoasitler veya proteinlerle reaksiyona girebilirler. Fenolik asitlerin, fenolik hidroksil grupları çok aktif olup, şekerlerle birleşerek glikozitleri oluşturmaktadırlar (Maier ve ark. 1990, Acar 1998).

Fenolik asitlere hidroksi ve metoksi bağlanarak oluşturdukları fenolik asit türevlerine ait örnekler Şekil 2.20’te verilmiştir.



Şekil 2.20. Fenolik asit türevi örnekleri (Sağiroğlu 2003).

## 2.5. Antibakteriyel ve Antifungal Aktivite

Antimikrobiyal madde, mikroorganizmaların çoğalmasını engelleyen veya öldüren, doğal veya sentetik yolla elde edilen bileşikler olarak tanımlanır. Bitkilerin mikroorganizmaların çoğalmasını engelleyici ve insan sağlığı için önemli olan özellikleri 1900'lü yıllarda araştırılmaya başlanmıştır. Böylece sentetik üretilen ilaçların yanında seçenek olarak antimikrobiyal özellik gösteren bitkilerin kullanılabilceği bilim insanları tarafından belirtilmiştir (Tekerlek 2013). Bitkiler yapılarında bulunan bazı kimyasal maddeler sayesinde antimikrobiyal aktivite göstermektedirler. Antimikrobiyal aktivite gösteren bazı biyoaktif bileşikler kimyasal yapılarına göre sınıflandırıldığında;

Fenolikler, basit fenoller, fenolik asitler, flavonoidler, terpenoidler, yağlar, alkaloidler vb.

Lektinler ve polipeptitler

Poliasetilenler şeklinde sıralanabilir (Altuner 2008).

Antifungal madde ise vücutta, cilt ve mukozalardaki fungal enfeksiyonlarına karşı etkili olan kimyasal maddelere denir. Antifungal maddeler, genellikle antibakteriyel maddelere göre daha kuvvetli maddelerdir. Bunun sebebi mantarların, bakterilerin aksine belli çekirdek yapısına ve zarlı zarsız organellere sahip olmalarıdır (Yalçın 2006).

Antibakteriyel ve antifungal aktivite belirlenmesinde birçok metot kullanılmaktadır. Bu çalışmada *C. italicum* bitkisinden elde edilen n-hekzan, diklorometan, etilasetat ve bütanol ekstralarında antibakteriyel ve antifungal aktivitenin belirlenmesi için sıvı mikrodilüsyon metodu kullanılmıştır.

Mikrodilüsyon metodu mikroorganizmanın değişen yoğunluklarda antimikrobik ajan ya da etken maddeye direncini belirlemek amacıyla geliştirilmiş bir metot olup, bitki ekstralarının veya uçucu yağların da antimikrobiyal aktivitesini belirlemek amacıyla yaygın kullanılan bir metottur. Bu metot için ticari olarak geliştirilmiş 96 kuyucuğa sahip mikropalakalar kullanılıyorsa buna mikrodilüsyon metodu denir. Mikropalakadaki, kuyucuk dizilerinde madde dilüsyonları hazırlanıp mikroorganizma süspansiyonların eklenmesiyle maddenin aktivitesi belirlenmektedir (Çelik 2007).

İnkübasyon sonunda test edilen antibakteriyel ve antifungal maddenin mikroorganizmaya karşı aktif olduğu konsantrasyon mikroorganizma üremesinin olup olmadığına göre belirlenmektedir. Üremenin olup olmadığı bulanıklık tayini ile belirlenir ve

mikroorganizma gelişmesinin olmadığı en düşük konsantrasyon değerine ise minimal inhibisyon konsantrasyon (MİK) değeri denir. MİK değeri, duyarlılığı mı yoksa direnci mi temsil ettiğini belirlemek ise bulunan konsantrasyondaki madde miktarı duyarlılık sınırı adı verilen bir değer ile karşılaştırılmaktadır. MİK değerinin bu sınırdan düşük değerde ise mikroorganizma söz konusu olan ajana ya da etken maddeye “duyarlı” olarak değerlendirilmektedir (Gülay 2002).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Silika jel 60 (0,063-0,200 mm; 70-230 mesh ASTM, Merck-1.07734.1000), ince tabaka plakaları (Merck-1.05554.0001), metanol (Teknik), n-hekzan (Merck-1.04374.2500), diklorometan (VWR-23366.327), etilasetat (Honeywell-10303884), n-butanol (Teknik), metanol (VWR-20864.320), benzen (Carlo Erba Reagenti-426113), sephadex LH-20 (Sigma-LH20100-100G)), metanol (Merck-1.06007.2500), DMSO (Merck-1.02952.2500), NA (Difenil borik asit- $\beta$ -aminoetil ester)(Fluka-42810-56), NH<sub>3</sub> (Merck-1.05422.2500), Mueller Hinton Broth besiyeri (Merck-1.10293.0500), Nurient Agar besiyeri (Merck-1.05450.0500), Sabouraud Dekstroz Agar besiyeri (BD Difco-210950), RPMI-1640 (Sigma-R7509-500ML) ve MOPS (Sigma-M3183-500G) kimyasal maddeleri kullanılmıştır.

#### 3.2. Kullanılan Cihazlar

**Evaporatör:** Ekstraksiyondan sonra çözücüyü uçurmak için Buchi marka; B-491 su banyosu, R-210 rotavapor, V-700 vakum pompası ve V-855 vakum kontrol paneline sahip cihaz kullanılmıştır.

**Ultrasonik Banyo:** Elde edilen ekstraktları homojen şekilde çözmek için Wisd marka WUC-D06H model cihaz kullanılmıştır.

**UV Lambası:** İnce plaka kromatografi plağındaki spotlar Wilber CN-6 UV lambası kullanılarak tayin edilmiştir.

**RP-HPLC:** Preparatif HPLC çalışmaları, Shimadzu Prominence LC-8AD/20A marka; 2025B14 (15  $\mu$ m particle diameter, 100 Å pore diameter) kolon numarsına sahip Shim-Pack Prep-ODS (C18) kolon; part no: 228-00815-91; A pompası: LC-8A, B pompası: LC-8A; toplam akış hızı: 10 mL/min özelliklerine, SPD-M20A model PDA dedektör ve FRC-10A toplayıcıya sahip cihazla yapılmıştır. HPLC çalışmalarında kolondan geçirilen çözücü sistemi olarak su ve metanol karışımı kullanılmıştır.

**NMR Spektrometresi:** <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C-NMR spektrumları Bruker Avance III 500 MHz Spektrometresi, 1.74 Tesla alan gücünde Ultrashield Plus™ magnete sahip cihaz kullanılmıştır. NMR çalışmalarında CD<sub>3</sub>OD çözücüsü kullanılmıştır.



**Kütle Spektrometresi:** Kütle spektrumlarını almak için; LCMS QTOF Agilent 6530 + Agilent HPLC, LC-MS-MS Zivak Tandem Gold, LC-Q-TOF Abi-Sciex 4600 Triple Quadrupol TOF cihazları kullanılmıştır.

**Densitometre:** Bakteri süspansiyonlarının yoğunluğunu bakmak için Biosan marka  $565 \pm 15$  nm dalga boyunda 0.1 McFarland hassasiyetinde 0.3-15 McFarland arasında ölçüm alabilen cihaz kullanılmıştır.

**Otoklav Cihazı:** Sterilizasyon işlemleri için BioBase marka BKQ-Z75 model 388x740 mm hücre boyutunda 75 L hücre hacmine sahip 5-126 °C arasında sterilizasyon yapabilen cihaz kullanılmıştır.

### 3.3. Kullanılan Belirteçler ve Çözeltiler

**NA Belirteci:** (Naturstoffreagenz A: Difenil borik asit-b-aminoetil ester) 100 mg toz NA bileşiği 100 mL metanolde çözülerek hazırlanmıştır.

**Amonyak (NH<sub>3</sub>) Buharları:** Kromatografi plakları NH<sub>3</sub> şişesinin ağzı açılarak NH<sub>3</sub> buharında birkaç dakika bekletilmiştir.

**Mueller Hinton Broth (MHB) Hazırlanışı:** 21 g toz besiyer distile su ile çözüldükten sonra çözülüp 1000 mL hacme tamamlanıp, otoklavda 121 °C'de 15 dakika 1 atmosfer basınçta steril edilmiştir.

**Nurient Agar Hazırlanışı:** 20 g toz besiyer distile su ile çözüldükten sonra 1000 mL hacme tamamlanıp, otoklavda 121°C'de 15 dakika 1 atmosfer basınçta steril edilmiştir.

**Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) Hazırlanışı:** 65 g besiyer distile su çözüldükte sonra 1000 mL hacme tamamlanıp, otoklavda 121°C' de 15 dakika 1 atm basınçta sterilize edilmiştir.

**RPMI-1640 Besiyerinin Hazırlanışı:** 10.4 g L-glutaminli ve bikarbonatsız RPMI-1640 besiyeri distile suda çözünmüştür. Tampon olarak kullanılan 34.53 g MOPS eklenmiş distile su ile 1000 mL tamamlanmıştır (pH: 7.0). Besiyer filtrasyon yöntemi ile sterilize edilerek 100 mL'lik kapaklı şişelere konularak, kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklanmıştır (Pfaller ve ark. 2007).

### 3.4. Deneysel Bölüm

#### 3.4.1. *Cirsium italicum* Bitkinin Toplanması

*Cirsium italicum* Savi DC. (Asteraceae) bitkisinin yerlerinin tespiti için, Trakya bölgesinde arazi çalışmaları yapılmıştır. Yapılan arazi çalışması sonucunda, belirlenen bölgelerden *Cirsium italicum* bitkisi Temmuz 2017 tarihinde toplanmıştır.

Bitkinin tanımlanma işlemi, Namık Kemal Üniversitesi Biyoloji Bölümü Botanik Ana Bilim Dalı'nda yapılmıştır ve bitkiye Herbaryum numarası verilmiştir (NGBB 6807).

#### 3.4.2. *Cirsium italicum* Bitkinin Ekstraksiyonu

*C. italicum* bitkisi toplandıktan sonra gölgede, oda sıcaklığında kurtulmuştur (696 g). Kurutulan bitki küçük parçalara ayrıldıktan sonra, %80 metanol içinde, her seferinde 3 gün bekletilerek, toplam 4 defa maserasyon yöntemiyle ekstraksiyon yapılmıştır. Çözücü evaporatörde buharlaştırıldıktan sonra, ham ekstre elde edilmiştir. Elde edilen ham ekstreye az miktarda su ilave edilerek, polarite sırasına göre, n-hekzan, diklorometan, etilasetat ve n-bütanol ile geri ekstraksiyon yapılmıştır. Daha sonra çözücüler uçurularak, her bir çözücüye ait ham ekstratlar elde edilmiştir. Bu ekstratların miktarları tartılarak belirlenmiştir. Ham ekstrat miktarları;

*C. italicum* (n-hekzan) ekstresi: 7.598 g

*C. italicum* (diklorometan) ekstresi: 0.677 g

*C. italicum* (etilasetat) ekstresi: 1.615 g

*C. italicum* (n-bütanol) ekstresi: 3.092 g

#### 3.4.3. *Cirsium italicum* Bitkisinin Ham Ekstrelerinde Antibakteriyel ve Antifungal Aktivite Tayini

##### 3.4.3.1. Antibakteriyel Aktivite Tayini

*C. italicum*, antibakteriyel aktivite tayini için:

1.449 g n-hekzan ekstresi alınarak, 1mL n-hekzan + 1 mL DMSO'da,

0.583 g diklorometan ekstresi alınarak, 500 µl diklorometan + 500 µl DMSO'da,

0.304 g etilasetat ekstresi alınarak, 500 µl etilasetat + 500 µl DMSO'da,

0.756 g n-bütanol ekstresi alınarak, 500 µl metanol + 500 µl DMSO'da çözünerek hazırlanmıştır.

Yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan *C. italicum* ekstrelerinin antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi için; *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300), *Bacillus subtilis* (NRRL NRS-744), *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus mirabilis* (ATCC 12453), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) bakterileri kullanılmıştır.

Bakteri stok kültürleri canlandırılmak üzere içinde Nutrient Agar bulunan petrilere ekilmiş, 37°C de 16-18 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra besiyeri üzerinde gelişen kolonilerden alınarak Mueller Hinton Broth (MHB) bulunan tüplere aktarılmış 0.5 Mc Farlanda göre, yani yaklaşık olarak  $10^8$  CFU/mL yoğunlukta olan bakteriyel süspansiyonların bulanıklığı densitometre kullanılarak ayarlanmıştır.

Bu test için, steril U tabanlı ve 96 kuyucuklu mikropaklar kullanılmıştır. Yatay sıranın sonundaki kuyucuklardan biri sterilite kontrol kuyucuğu olarak, diğeri ise üreme kontrol kuyucuğu olarak belirlenmiştir. Sterilite kontrolü olan kuyucuğa 200 µl MHB, üreme kontrol kuyucuğuna ise 100 µl MHB ve 100 µl mikroorganizma süspansiyonundan konulmuştur. İlk olarak ekstrakt dilüsyonlarının yapılması için hazırlanan MHB besiyerinden mikroplağın her bir kuyucuğuna 100'er µl dağıtılmış, ilk kuyucuğa konulan 100 µl ekstrenin 10. kuyucuğa kadar dilüsyonu yapılmıştır. Mikropaklar hazırlandıktan sonra bakteri süspansiyonlarından 100' er µl eklenmiş ve  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ ' de 16-20 saatlik inkübasyondan sonra minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri belirlenmiştir. Kontrol için *S. aureus* için Penisilin G, diğer bakteriler için Gentamisin antibiyotiği kullanılmıştır (CLSI, M07-A9 2012).

### **3.4.3.2. Antifungal Aktivite Tayini**

*C. italicum*, antifungal aktivite tayini için:

1.411 g n-hekzan ekstresi alınarak, 500 µl n-hekzan + 500 µl DMSO'da,

0.571 g diklorometan ekstresi alınarak, 500µl diklorometan + 500 µl DMSO'da,

0.253 g etilasetat ekstresi alınarak, 500 µl etilasetat + 500 µl DMSO'da,

1.054 g n-bütanol ekstresi alınarak, 500 µl metanol + 500 µl DMSO'da çözünerek hazırlanmıştır.

Yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan *C. italicum* ekstrelerinin antifungal aktivitelerinin belirlenmesi için; *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida krusei* (ATCC 6258) mayaları, *Aspergillus fumigatus* (ATCC 204305) ve *Penicillium chrysogenum* (ATCC 48271) küfleri test izolatları olarak kullanılmıştır.

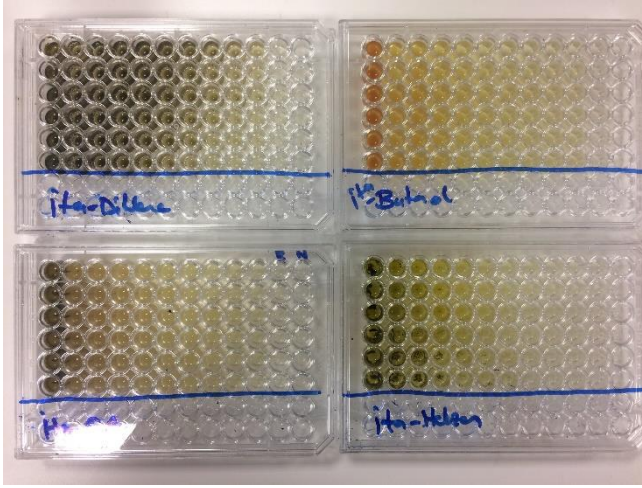
Besiyeri olarak RPMI-1640 L-glutaminli ve bikarbonatsız kullanılmış, tampon madde olarak 34.53 g/L MOPS eklenerek, pH: 7' ye ayarlanmıştır. Hazırlanan besiyeri filtrasyon yöntemiyle sterilize edilip, kullanılıncaya kadar +4°C'de saklanmıştır.

Mayaların antifungal duyarlılığının belirlenmesinde; maya süspansiyonlarının hazırlanması için 24 saatlik Sabouraud Dextrose Agar (SDA)'da geliştirilmiş izolatların 5 mL steril serum fizyolojik içinde homojen süspansiyonları hazırlanarak, 0.5 McFarland'a göre bulanıklığı ayarlanmıştır. Bu işlemle mililitresinde  $1-5 \times 10^6$  hücre içeren stok maya süspansiyonları elde edilmiştir. Stok maya süspansiyonu; RPMI-1640 besiyeri ile önce 1/50 ve ardından 1/20 oranlarında seyreltilerek, testte kullanılacak olan  $1-5 \times 10^3$  hücre/mL'lik son konsantrasyon elde edilmiştir.

Bu test için, steril U tabanlı ve 96 kuyucuklu mikropalaklar kullanılmıştır. Yatay sıranın sonundaki kuyucuklardan biri sterilite kontrol kuyucuğu olarak, diğeri ise üreme kontrol kuyucuğu olarak belirlenmiştir. Sterilite kontrolü için belirlenen kuyucuğa 200 µl RPMI, üreme için belirlenen kontrol kuyucuğuna ise 100 µl RPMI ve 100 µl mikroorganizma süspansiyonundan konulmuştur. İlk olarak ekstrakt dilüsyonlarının yapılması için hazırlanan RPMI-1640 besiyerinden mikroplağın her bir kuyucuğuna 100' er µl dağıtılmış, ilk kuyucuğa konulan 100 µl ekstrenin 10. kuyucuğa kadar dilüsyonu yapılmıştır. Mikropalaklar hazırlandıktan sonra maya süspansiyonlarından 100'er µl eklenmiş ve 35°C'de 48 saatlik inkübasyondan sonra MİK değerleri belirlenmiştir. Kontrol için; CLSI M27-S3 önerileri doğrultusunda flukonazol antifungalinin dilüsyonları (0.0625-64 µg/mL) hazırlanarak, *C. krusei* (ATCC 6258) için MİK değeri 16 µg/mL olarak belirlenmiştir (CLSI, M27-A3 2008).

Küflerin antifungal duyarlılık testinde; SDA'da üreyen 7 günlük küf kolonilerinin üzerine 1 mL steril serum fizyolojik eklendikten sonra, koloniler öze ile kazınıp, pastör pipeti ile steril tüpe alınmıştır. Ağır partiküllerin çökmesi için 3-5 dakika beklenmiş ve üstte kalan

süspansiyon yeni bir steril tüpe aktarılarak, 15 saniye vortekslenmiştir. Konidyal süspansiyonların yoğunlukları Thoma lamında sporlar sayılarak  $1-5 \times 10^6$  olacak şekilde ayarlanmış, ardından süspansiyonların yoğunluğunun  $0.4 \times 10^4 - 5 \times 10^4$  CFU/mL olabilmesi için RPMI-1640 ile 1/ 50 oranında dilüe edilmiştir. Ekstrelerin dilüsyonları yapılan mikropalak kuyucuklarına süspansiyonlardan 100'er µl eklenmiş, 35°C'de 48 saatlik inkübasyondan sonra MİK değerleri belirlenmiştir.



Şekil 3.1. Antibakteriyel ve antifungal aktivite tayininde kullanılan mikrodilüsyon plakaları.

#### 3.4.4. *Cirsium italicum* Bitkisinde Kromatografik Ayırma ve Saflaştırma İşlemleri

Yapılan biyolojik aktivite sonuçları değerlendirildiğinde; izolasyon çalışması için, en aktif ekstre olarak, *C. italicum* bitkisinin etilasetat ekstresi seçilip, kromatografik ayırma ve saflaştırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bunun yanı sıra maserasyon işlemi kullanılan metanol uçurulurken oluşan kristallerde saflaştırma ve izolasyon işlemleri uygulanmıştır.

##### 3.4.4.1. *C. italicum* Bitkisinin Metanol Ektresinde Çözücü Uçurulması Sırasında Oluşan Kristallerin İzolasyonu ve Saflaştırılması

*C. italicum* bitkisi, ilk önce metanol ile maserasyon işlemine göre ekstrakte edilmiştir. Metanol uçurulurken, oluşan kristallerin bir kısmı alınarak n-hekzan ile yıkanıp ayrılmış ve bu ayrılan kısım K-1 fraksiyonu olarak, geri kalan kısım da K-2 fraksiyonu olarak adlandırılmıştır. K-1 kristali metanol ile çözünüp sephadex dolgu kullanarak kolon kromatografisi uygulanmıştır (kolon boy: 65 cm; kolon çapı: 1 cm). Kolonda elüsyon işlemi %100 metanol ile gerçekleştirilmiştir. Kolon kromatografisi sonucu, elüsyon işlemi 25 mL'lik tüplerde 10 mL çözücü toplanarak yapılmış ve 22 tüp toplanmıştır. Toplanan tüplere TLC yapıp, UV lambasında kontrol edilmiştir. Her bir TLC plakası, amonyak buharına tutulup

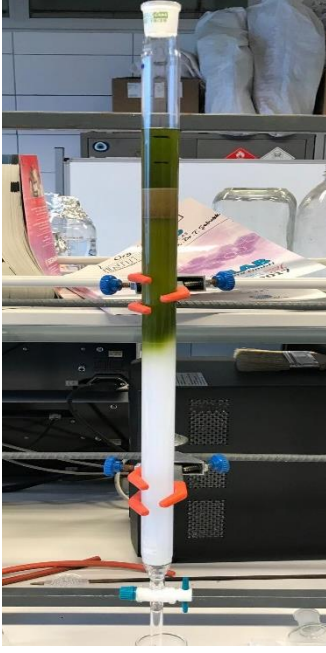
ardından, NA belirteci püskürtülerek UV ışık altında tekrar bakılmış ve renkli spotlar belirlenmiştir. Bunun sonucunda, benzer olan fraksiyonlar birleştirilerek 4 alt fraksiyon (K-1-1, K-1-2, K-1-3, K-1-4) elde edilmiştir. Elde edilen alt fraksiyonlara tekrar kolon kromatografisi, preparatif ince tabaka kromatografisi ve preparatif RP-HPLC cihazında (Shimadzu, Prominence LC-8AD/20A) ayırma işlemi uygulanmıştır. Preparatif RP-HPLC’de yapılan izolasyon işlemlerinde %100’lük MeOH çözücü sisteminde 30 dk’lık metot ile ayırma işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlemler sonucunda K-1-1 numaralı fraksiyondan EtOAc:MeOH (5:1) çözücü sistemi kullanılarak 7 numaralı bileşik; etil-(2,3-dihidroksi-5,6-dimetoksi-4-asetil) benzoat (135 mg) bileşiği, K-1-2-1 numaralı fraksiyondan EtOAc:MeOH (5:2) çözücü sistemi kullanılarak 2 numaralı bileşik; 6, 2'-dihidroksi-5-metoksi-4'-*O*-glikozil izoflavonon (42 mg ) bileşiği izole edilmiştir.

Diğer fraksiyon olan K-2 fraksiyonu metanol ile çözülüp silikagel dolgu maddesi kullanılarak kolon kromatografisine tabi tutulmuştur (kolon boy: 60 cm; kolon çapı: 2 cm).



**Şekil 3.2.** K-2 fraksiyonunun beherdeki görüntüsü.

Kolon elüsyon işlemine, ilk önce EtOAc:MeOH (3:1) çözücü sistemi ile başlanmıştır. Daha sonra, EtOAc:MeOH (3:2) çözücü sistemi ile devam edilip, bu çözücü sistemi ile sonlandırılmıştır.



**Şekil 3.3.** K-2 fraksiyonunun kolon kromatografisi.

Kolon kromatografisi sonucunda, 50 mL'lik erlenlerde 20 mL elüsyon çözücüsü toplanarak yapılmış ve 146 erlen toplanmıştır. Toplanan tüm elüsyon çözümleri buharlaştırıldıktan sonra, her bir fraksiyonun içeriği TLC yapılarak, UV lambasında kontrol edilmiştir. TLC spotları ilk önce  $\text{NH}_3$ , daha sonra NA belirteci püskürtülerek, spotlar UV ışığı altında, flavonoid/fenolik bileşiklere ait olan renkli spotlar belirlenmiştir. Yapılan ince tabaka kromatografisine göre, benzer olan bu fraksiyonlar birleştirilerek, 3 alt fraksiyon (K-2-1, K-2-2, K-2-3) elde edilmiştir. Elde edilen bu fraksiyonlarda; özellikler mor, koyu mor, mavi, turuncu ve sarı renk gözlenen lekelerin bulunduğu ve miktarı yeterli olan fraksiyonlar seçilerek, kromatografik ayırma ve saflaştırma işlemleri uygulanmıştır. Bunun için bu alt fraksiyonların her biri, tekrar kromatografik ayırma (kolon kromatografisi, preparatif ince tabaka kromatografisi, Sephadex ile kolon kromatografisi, RP-HPLC) işlemlerine tabi tutulmuştur. Bu işlemler sonucunda K-2-2-1 numaralı alt fraksiyondan, EtOAc:MeOH:Benzen (3:2:1) çözücü sistemi kullanılarak 6 numaralı bileşik, gentisik asit-5-O- $\beta$ -ksilopiranosit (41 mg) bileşiği; K-2-3 numaralı alt fraksiyondan EtOAc:MeOH (3:2) çözücü sistemi kullanılarak 5 numaralı bileşik, (8,3',4',5'-tetrahidroksi-7-O- $\alpha$ -glukosil izoflavon)-6-8''-(4'''-hidroksi-7''-O- $\alpha$ -glukosil izoflavon) biflavon (15 mg) bileşiği izole edilmiştir.

### 3.4.4.2. *C. italicum* Bitkisinin Etilasetat Ekstresindeki Bileşiklerin İzolasyonu ve Saflaştırılması

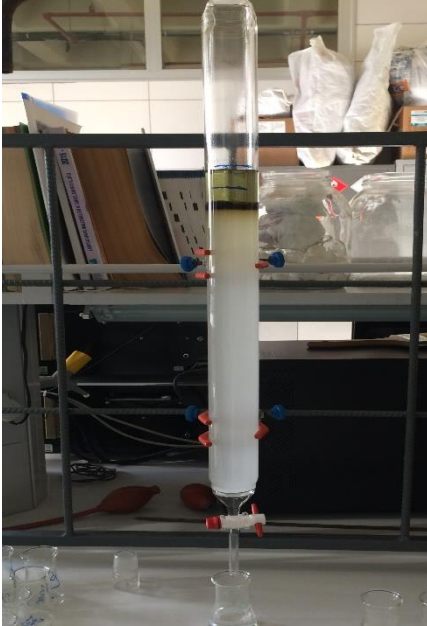
Etilasetat ekstresine, silikagel dolgu maddesi kullanarak kolon kromatografisi uygulanmıştır (kolon boy: 70 cm; kolon çapı: 5 cm). Kolona eklenecek ekstre; diklormetanda çözüldükten sonra silikagel ile karıştırılıp, oda sıcaklığında, bir gece bekletilmiş ve çözücü uçtuktan sonra silika jel kolona tatbik edilmiştir. Kolon elüsyon işlemine ilk önce %100 diklorometandan başlamıştır. Daha sonra polarite artacak şekilde, aşağıda belirtilen çözücü sistemleri kullanılmıştır.

%10'a kadar %1'lik artışlarla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : EtOAc çözücü sistemi,

%100 EtOAc'e kadar %5'lik artışlarla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : EtOAc çözücü sistemi eluent olarak kullanılmıştır. %100 EtOAc 'dan sonra;

%10'a kadar %2'lik artışlarla EtOAc: MeOH çözücü sistemi,

%100 MeOH'e kadar %5'lik artışlarla EtOAc: MeOH çözücü sistemi eluent olarak kullanılmıştır.



**Şekil 3.4.** Etilasetat ekstresinin kolon kromatografisi.

Kolon kromatografisi sonucunda, elüsyon çözücüsü 50 mL'lik erlenler kullanılarak toplanmış ve 40 mL elüsyon çözücü toplanarak 669 erlen elde edilmiştir. Toplanan tüm elüsyon çözücülerini buharlaştırıldıktan sonra, her bir fraksiyonun içeriği TLC ile UV



lambasında kontrol edilmiştir. TLC spotları ilk önce NH<sub>3</sub>, daha sonra NA belirteci püskürtülerek, UV ışığı altında, flavonoid/fenolik bileşiklere ait olan renkli spotlar belirlenmiştir. Yapılan TLC'ne göre, benzer olan bu alt fraksiyonlar birleştirilerek, 19 alt fraksiyon (IE-1 - IE-19) elde edilmiştir. Elde edilen bu fraksiyonlarda; özellikler mor, koyu mor, mavi, turuncu ve sarı renk gözlenen lekelerin bulunduğu ve miktarı yeterli olan fraksiyonlar seçilerek, kromatografik ayırma ve saflaştırma işlemleri uygulanmıştır. Bunun için, bu alt fraksiyonların her biri, tekrar kromatografik ayırma (kolon kromatografisi, preparatif TLC, Sephadex ile kolon kromatografisi, RP-HPLC) işlemlerine tabi tutulmuştur. Bu işlemler sonucu; IE-7-1 numaralı alt fraksiyondan CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOAc (9:1.5) çözücü sistemi kullanılarak, 3 numaralı bileşik 5, 7, 4'-trihidroksi flavonon (6 mg) bileşiği; IE-10-1 numaralı alt fraksiyondan plakasında CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOAc (2:1) çözücü sistemi kullanılarak, 1 numaralı bileşik 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksi izoflavonon (7 mg) bileşiği ve IE-10-2 numaralı alt fraksiyondan CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOAc (2:1) çözücü sistemi kullanılarak, 4 numaralı bileşik 5,5'',7''-trihidroksi-3,7-dimetoksi-4',4'''-*O*-biflavon (9 mg) bileşiği izole edilmiştir.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu tez çalışması kapsamında, *C. italicum* bitkisinin ham ekstralarında antibakteriyel ve antifungal aktivite tayini gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, etilasetat ekstresi ile maserasyon işleminde kullanılan metanol uçurulurken oluşan kristallerin fitokimyasal incelenmesi gerçekleştirilmiştir. Literatürde *C. italicum*'un antibakteriyel/antifungal aktivitesi ve fitokimyasal incelenmesiyle ilgili bir çalışma bulunmamakta olup, bu tez çalışmasıyla literatüre ilk defa sunulacaktır.

### 4.1. *C. italicum* Bitkisinin Ham Ekstrelerini Antibakteriyel ve Antifungal Aktivite Tayini Sonuçları

#### 4.1.1. *C. italicum* Bitkisinin Ham Ekstrelerinde Antibakteriyel Aktivite Tayini Sonuçları

Antibakteriyel aktivite çalışması için *C. italicum* bitkisinin ham ekstralarının miktarları ve dilüsyon değerleri aşağıda verilmiştir;

Etilasetat bitki ekstresi miktarı: 304 mg/mL

Dilüsyonlar: 1.Kuyucuk: 72 mg/mL; 2.Kuyucuk: 38 mg/mL; 3.Kuyucuk: 19 mg/mL; 4.Kuyucuk: 9,5 mg/mL; 5.Kuyucuk: 4,75 mg/mL; 6.Kuyucuk: 2,38 mg/mL; 7.Kuyucuk: 1,19 mg/mL; 8.Kuyucuk: 0,595 mg/mL; 9.Kuyucuk: 0,2975 mg/mL; 10.Kuyucuk: 0,1487 mg/mL; 11.Kuyucuk: Pozitif Kontrol; 12.Kuyucuk: Negatif Kontrol.

Diklorometan bitki ekstresi miktarı: 583 mg/mL

Dilüsyonlar: 1.Kuyucuk: 145,75 mg/mL; 2.Kuyucuk: 72,87 mg/mL; 3.Kuyucuk: 36,44 mg/mL; 4.Kuyucuk: 18,22 mg/mL; 5.Kuyucuk: 9,11 mg/mL; 6.Kuyucuk: 4,56 mg/mL; 7.Kuyucuk: 2,28 mg/mL; 8.Kuyucuk: 1,14 mg/mL; 9.Kuyucuk: 0,57 mg/mL; 10.Kuyucuk: 0,285 mg/mL; 11.Kuyucuk: Pozitif Kontrol; 12.Kuyucuk: Negatif Kontrol.

Bütanol bitki ekstresi miktarı: 756 mg/mL

Dilüsyonlar: 1.Kuyucuk: 189 mg/mL; 2.Kuyucuk: 94,5 mg/mL; 3.Kuyucuk: 47,25 mg/mL; 4.Kuyucuk: 23,63 mg/mL; 5.Kuyucuk: 11,81 mg/mL; 6.Kuyucuk: 5,90 mg/mL; 7.Kuyucuk: 2,95 mg/mL; 8.Kuyucuk: 1,475 mg/mL; 9.Kuyucuk: 0,7375 mg/mL; 10.Kuyucuk: 0,3687 mg/mL; 11.Kuyucuk: Pozitif Kontrol; 12.Kuyucuk: Negatif Kontrol.

Hekzan bitki ekstresi miktarı: 724,5 mg/mL

Dilüsyonlar: 1.Kuyucuk: 181,25 mg/mL; 2.Kuyucuk: 90,56 mg/mL; 3.Kuyucuk: 45,28 mg/mL; 4.Kuyucuk: 22,64 mg/mL; 5.Kuyucuk: 11,32 mg/mL; 6.Kuyucuk: 5,66 mg/mL; 7.Kuyucuk: 2,83 mg/mL; 8.Kuyucuk: 1,415 mg/mL; 9.Kuyucuk: 0,7075 mg/mL; 10.Kuyucuk: 0,3537 mg/mL; 11.Kuyucuk: Pozitif Kontrol; 12.Kuyucuk: Negatif Kontrol.

*C. italicum* bitkisinden farklı solventler kullanılarak elde edilen ekstrelerinin antibakteriyel aktivitelerine ilişkin sonuçlar **Çizelge 4.1**'de verilmiştir. Çizelgeden de görüldüğü gibi, *C. italicum* bitkisinden elde edilen etilasetat, diklorometan ve hekzan ekstrelerin, en yüksek antibakteriyel etkisinin en düşük MİK değerleri ile (sırasıyla: 2.38 mg/mL; 4.56 mg/mL; 22.64 mg/mL) *B. subtilis* üzerine olduğu belirlenmiştir. Bütanol ekstresi is en yüksek antibakteriyel aktiviteyi 23.63 mg/mL MİK değeri ile Gram-negatif *P. aeruginosa*'ye karşı göstermiştir. Çalışmada hekzan ekstrelerinin sadece iki bakteriyel suşa (*B. subtilis* ve *E. coli*) karşı aktivite gösterirken etilasetat ve bütanol ekstrelerinin tüm bakteri suşlarına karşı inhibisyon etkisine sahip olduğu bulunmuştur.

**Çizelge 4.1.** *C. italicum* bitkisinin ham ekstrelerinin antibakteriyel aktivitesi MİK değerleri.

EKSTRE	BAKTERİ	MİK (mg/mL)
<i>C. italicum</i> Etilasetat	<i>S. aureus</i>	9.5 mg/mL
	<i>B. subtilis</i>	2.38 mg/mL
	<i>E. coli</i>	19 mg/mL
	<i>P. aeruginosa</i>	19 mg/mL
	<i>P. mirabilis</i>	19 mg/mL
	<i>S. typhimurium</i>	19 mg/mL
<i>C. italicum</i> Diklorometan	<i>S. aureus</i>	-(*)
	<i>B. subtilis</i>	4.56 mg/mL
	<i>E. coli</i>	145.75 mg/mL
	<i>P. aeruginosa</i>	-
	<i>P. mirabilis</i>	145.75 mg/mL
	<i>S. typhimurium</i>	-
<i>C. italicum</i> Bütanol	<i>S. aureus</i>	94.5 mg/mL
	<i>B. subtilis</i>	47.25 mg/mL
	<i>E. coli</i>	47.25 mg/mL
	<i>P. aeruginosa</i>	23.63 mg/mL
	<i>P. mirabilis</i>	47.25 mg/mL
	<i>S. typhimurium</i>	47.25 mg/mL
<i>C. italicum</i> n-Hekzan	<i>S. aureus</i>	-
	<i>B. subtilis</i>	22.64 mg/mL
	<i>E. coli</i>	90.56 mg/mL
	<i>P. aeruginosa</i>	-
	<i>P. mirabilis</i>	-
	<i>S. typhimurium</i>	-

\*(-) Antibakteriyel etki gözlenmedi

#### 4.1.2. *C. italicum* Bitkisinin Ham Ekstrelerinde Antifungal Aktivite Tayini Sonuçları

Antifungal aktivite çalışması için *C. italicum* bitkisinin ham ekstrelerinin miktarları ve dilüsyon değerleri aşağıda verilmiştir;

Etilasetat bitki ekstresi miktarı: 253 mg/mL

Dilüsyonlar: 1.Kuyucuk: 63,25 mg/mL; 2.Kuyucuk: 31,63 mg/mL; 3.Kuyucuk: 15,81 mg/mL; 4.Kuyucuk: 7,90 mg/mL; 5.Kuyucuk: 3,95 mg/mL; 6.Kuyucuk: 1,98 mg/mL; 7.Kuyucuk: 0,99 mg/mL; 8.Kuyucuk: 0,495 mg/mL; 9.Kuyucuk: 0,2475 mg/mL; 10.Kuyucuk: 0,1237 mg/mL; 11.Kuyucuk: Pozitif Kontrol; 12.Kuyucuk: Negatif Kontrol.

Diklorometan bitki ekstresi miktarı: 571 mg/mL

Dilüsyonlar: 1.Kuyucuk: 142,75 mg/mL; 2.Kuyucuk: 71,38 mg/mL; 3.Kuyucuk: 35,69 mg/mL; 4.Kuyucuk: 17,84 mg/mL; 5.Kuyucuk: 8,92 mg/mL; 6.Kuyucuk: 4,46 mg/mL; 7.Kuyucuk: 2,23 mg/mL; 8.Kuyucuk: 1,115 mg/mL; 9.Kuyucuk: 0,5575 mg/mL; 10.Kuyucuk: 0,2787 mg/mL; 11.Kuyucuk: Pozitif Kontrol; 12.Kuyucuk: Negatif Kontrol.

Bütanol bitki ekstresi miktarı: 1054 mg/mL

Dilüsyonlar: 1.Kuyucuk: 263,5 mg/mL; 2.Kuyucuk: 131,75 mg/mL; 3.Kuyucuk: 65,88 mg/mL; 4.Kuyucuk: 32,94 mg/mL; 5.Kuyucuk: 16,47 mg/mL; 6.Kuyucuk: 8,23 mg/mL; 7.Kuyucuk: 4,12 mg/mL; 8.Kuyucuk: 2,06 mg/mL; 9.Kuyucuk: 1,03 mg/mL; 10.Kuyucuk: 0,515 mg/mL; 11.Kuyucuk: Pozitif Kontrol; 12.Kuyucuk: Negatif Kontrol.

Hekzan bitki ekstresi miktarı: 1411 mg/mL

Dilüsyonlar: 1.Kuyucuk: 352,75 mg/mL; 2.Kuyucuk: 176,38 mg/mL; 3.Kuyucuk: 88,19 mg/mL; 4.Kuyucuk: 44,09 mg/mL; 5.Kuyucuk: 22,05 mg/mL; 6.Kuyucuk: 11,02 mg/mL; 7.Kuyucuk: 5,51 mg/mL; 8.Kuyucuk: 2,755 mg/mL; 9.Kuyucuk: 1,3775 mg/mL; 10.Kuyucuk: 0,6887 mg/mL; 11.Kuyucuk: Pozitif Kontrol; 12.Kuyucuk: Negatif Kontrol.

*C. italicum* bitkisinden elde edilen ekstrelerin en yüksek antifungal etkisinin, *C. parapsilosis* üzerine olduğu gözlemlenmiş ve MİK değeri 1.98 mg/mL olarak bulunmuştur. *C. italicum* bitkisinden elde edilen ekstrelerinin antifungal aktivitelerine ilişkin sonuçlar **Çizelge 4.2**'de görülmektedir.

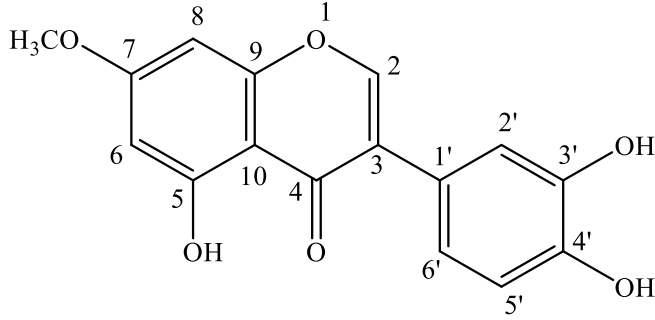
**Çizelge 4.2.** *C. italicum* bitkisinin ham ekstrelerinin antifungal aktivitesi MİK değerleri.

EKSTRE	İZOLATLAR	MİK (mg/mL)
<i>C. italicum</i> Etilasetat	<i>C. albicans</i>	15.81 mg/mL
	<i>C. parapsilosis</i>	1.98 mg/mL
	<i>C. glabrata</i>	31.63 mg/mL
	<i>C. krusei</i>	3.95 mg/mL
	<i>A. fumigatus</i>	15.81 mg/mL
	<i>P. chrysogenum</i>	31.63 mg/mL
<i>C. italicum</i> Diklorometan	<i>C. albicans</i>	71.38 mg/mL
	<i>C. parapsilosis</i>	8.92 mg/mL
	<i>C. glabrata</i>	142.75 mg/mL
	<i>C. krusei</i>	8.92 mg/mL
	<i>A. fumigatus</i>	35.69 mg/mL
	<i>P. chrysogenum</i>	17.84 mg/mL
<i>C. italicum</i> Bütanol	<i>C. albicans</i>	32.94 mg/mL
	<i>C. parapsilosis</i>	4.12 mg/mL
	<i>C. glabrata</i>	32.94 mg/mL
	<i>C. krusei</i>	8.23 mg/mL
	<i>A. fumigatus</i>	16.47 mg/mL
	<i>P. chrysogenum</i>	32.94 mg/mL
<i>C. italicum</i> n-Hekzan	<i>C. albicans</i>	352.75 mg/mL
	<i>C. parapsilosis</i>	176.38 mg/mL
	<i>C. glabrata</i>	352.75 mg/mL
	<i>C. krusei</i>	88.19 mg/mL
	<i>A. fumigatus</i>	176.38 mg/mL
	<i>P. chrysogenum</i>	176.38 mg/mL

*C. italicum* bitkisinin, antibakteriyel ve antifungal aktivite sonuçlarına bakıldığında; en yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip ekstrenin etilasetat ekstresi olması nedeniyle izolasyon ve yapı tayini çalışmaları için etilasetat ekstresi seçilmiştir.

#### 4.2. *C. italicum* Bitkisinden İzole Edilen Bileşikler

##### 4.2.1. 1 Numaralı Bileşik (IE-10-1): 5, 3', 4'-trihidroksi-7-metoksi izoflavonon



Şekil 4.1. 5, 3', 4'-trihidroksi-7-metoksi izoflavonon bileşiğinin yapısı.

Bileşik beyaz renkli olup, 254 nm UV ışık altında kahverengi, 366 nm UV ışık altında koyu mor olarak gözlenmiştir. Amonyak buharına tutulup ardından NA belirteci püskürtüldüğünde 254 nm'de kahverengi, 366 nm'de mor renk gözlenmiştir. TLC plakasında CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOAc (2:1) çözücü sistemi kullanılarak tespit edilmiştir.

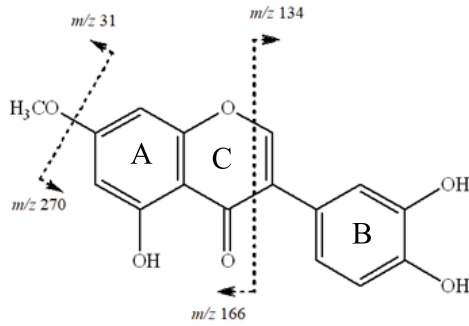
<sup>1</sup>H NMR spektrumuna (CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  (ppm), 500 MHz, Şekil 4.3) bakıldığında A halkasında yer alan 7.459 ppm'deki (1H, brs) H-6 protonunun 7.19 ppm'deki (1H, d,  $J= 0.7$  Hz) H-8 protonu ile meta etkileşimi; B halkasındaki 7.443 ppm'deki (1H, dd,  $J= 1.9, 8.1$  Hz) H-6' protonunun, 7.461 ppm'deki (1H, d,  $J= 1.8$  Hz) H-2' protonu ile meta, 6.72 ppm'deki (1H, d,  $J= 8.1$  Hz) H-5' protonu ile orto etkileşimi yaptığı gözlenmiştir. Bunun yanı sıra 7.79 ppm'de (1H, s) H-2 protonu ile 3.79 ppm'de (3H, s) metoksi protonları da gözlenmiştir. <sup>1</sup>H NMR etkileşimi göz önüne alındığında; A halkasının 5,7 disubstitue, B halkasının ise 3',4' disubstitue olduğunu kanıtlamaktadır.

<sup>13</sup>C NMR, APT ve HSQC spektrumunda (CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  (ppm), 500 MHz, Şekil 4.4) 110.69 ppm'de (C-6), 96.83 ppm'de (C-8), 115.77 ppm'de (C-2'), 113.89 ppm'de (C-5'), 125.13 ppm'de (C-6') aromatik karbonlar gözlenirken 184.87 ppm'de (C-4) karbonil karbonu ile 56.43 ppm'de metoksi karbonu gözlenmiştir.

Bileşğin  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spektrumunda ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm), 500 MHz, Şekil 4.5) A halkasında 7.45 ppm'de H-6 protonu, 7.18 ppm'deki H-8 protonuyla; B halkasındaki 7.443 ppm'deki H-6' protonunun 6.72 ppm'deki H-5' protonuyla etkileşimleri gözlenmiştir.

HMBC spektrumuna ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm), 500 MHz, Şekil 4.6) bakıldığında 3.79 ppm'deki metoksi protonlarının 96.83 ppm'deki C-8 karbonuyla etkileşimi metoksi grubunun A halkasında C-7 konumunda olduğunu kanıtlamıştır. Diğer HMBC etkileşimleri "spektroskopik veriler" kısmında verilmiştir.

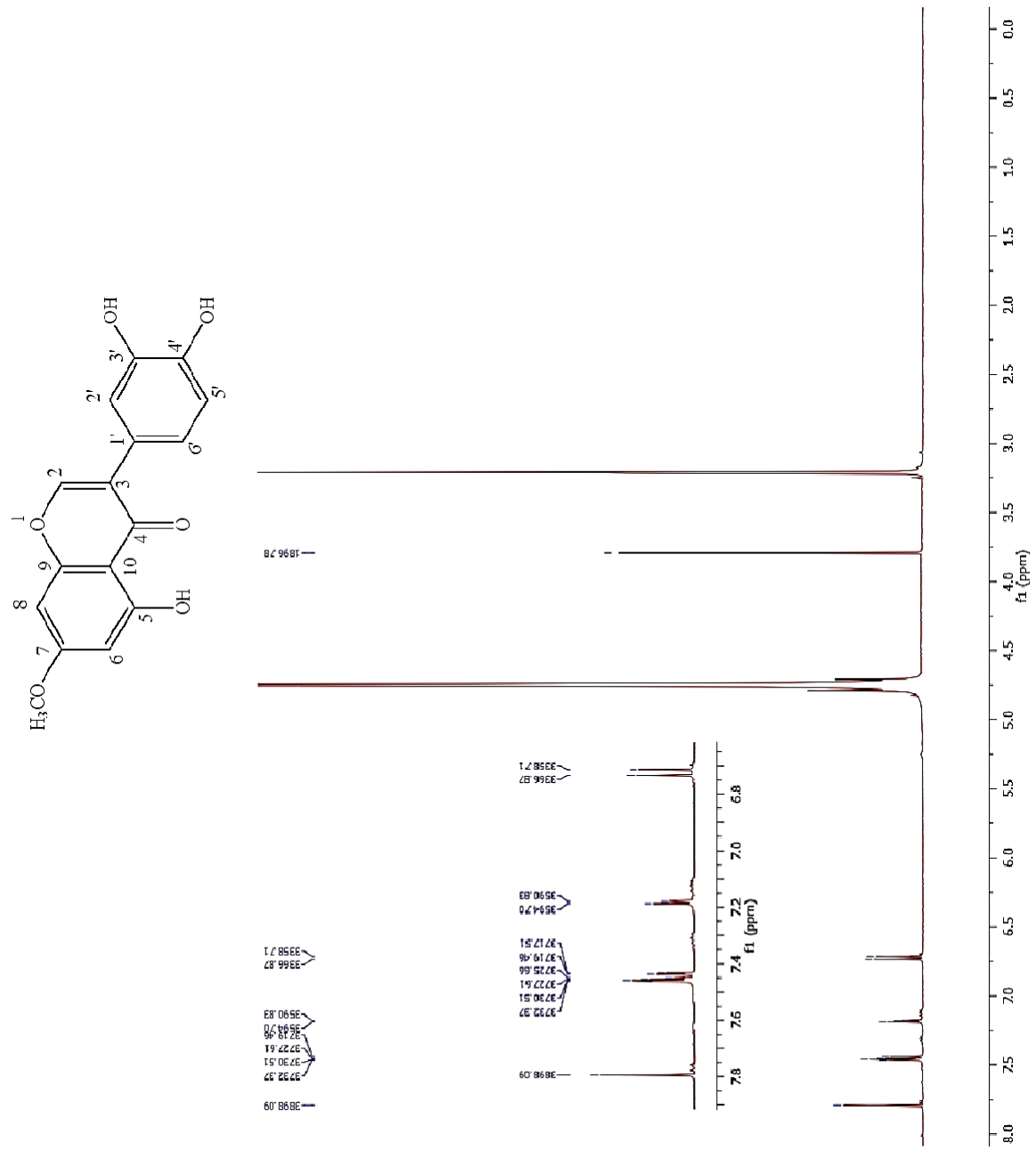
Bileşğin ESI-MS spektrumunda (Şekil 4.7)  $m/z$  301  $[\text{M}+1]^+$  (% 26.21) pikinin görülmesi molekülün  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$  kapalı formülüne sahip olduğu göstermiştir. Molekülün diğer önemli parçalanma ürünleri  $m/z$  167  $[(\text{M}+1)-\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2]^+$  (% 11.94) piki, flavonoid yapısındaki A ve B halkasının parçalanma ürünlerini desteklerken;  $m/z$  221  $[(\text{M}+3)-(3\times\text{OH})-(\text{OCH}_3)]^+$  (% 11.70) piki yapıdan üç adet hidroksi ve bir adet metoksi varlığını ispatlamıştır.



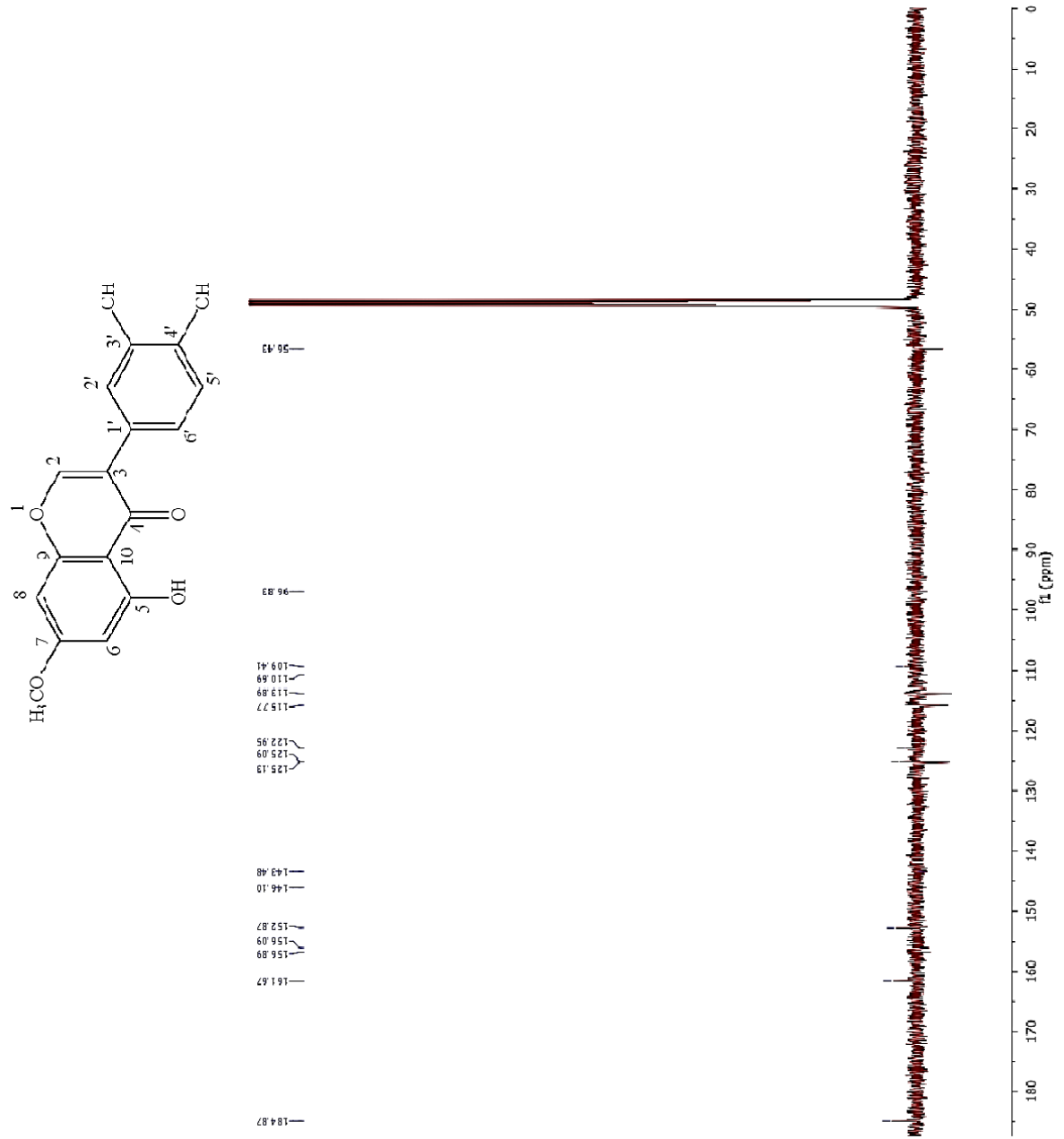
**Şekil 4.2.** 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksi izoflavonon bileşğinin moleküler bölünme pikleri.

Tüm spektroskopik verilere ve yapılan literatür (Rahman ve ark. 2015, Allaoui ve ark. 2015) araştırmalarına bakıldığında bileşğın 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksi izoflavonon olduğunu kanıtlamıştır. Bu bileşik *C. italicum* bitkisinden ilk defa izole edilmiştir.

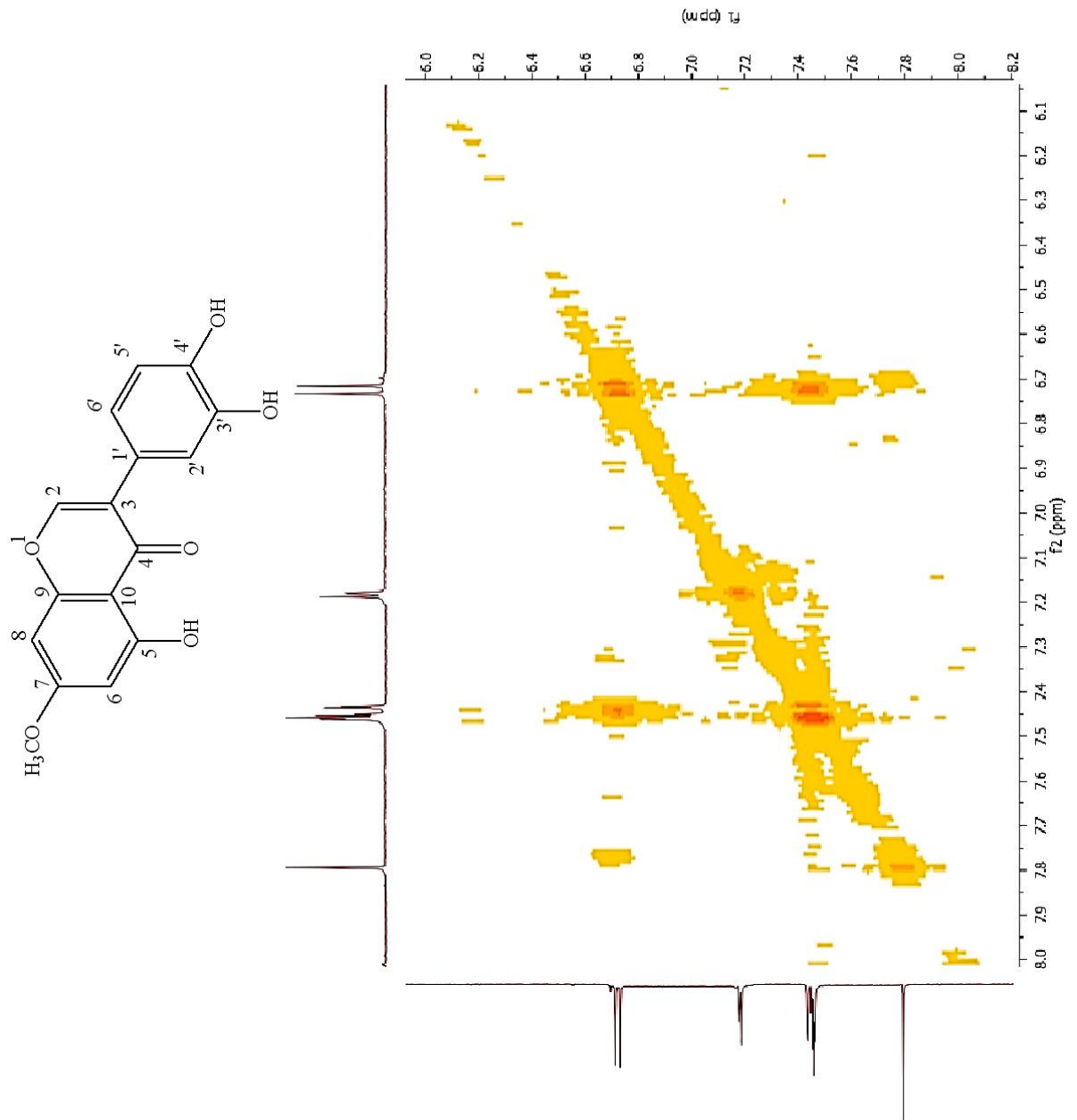




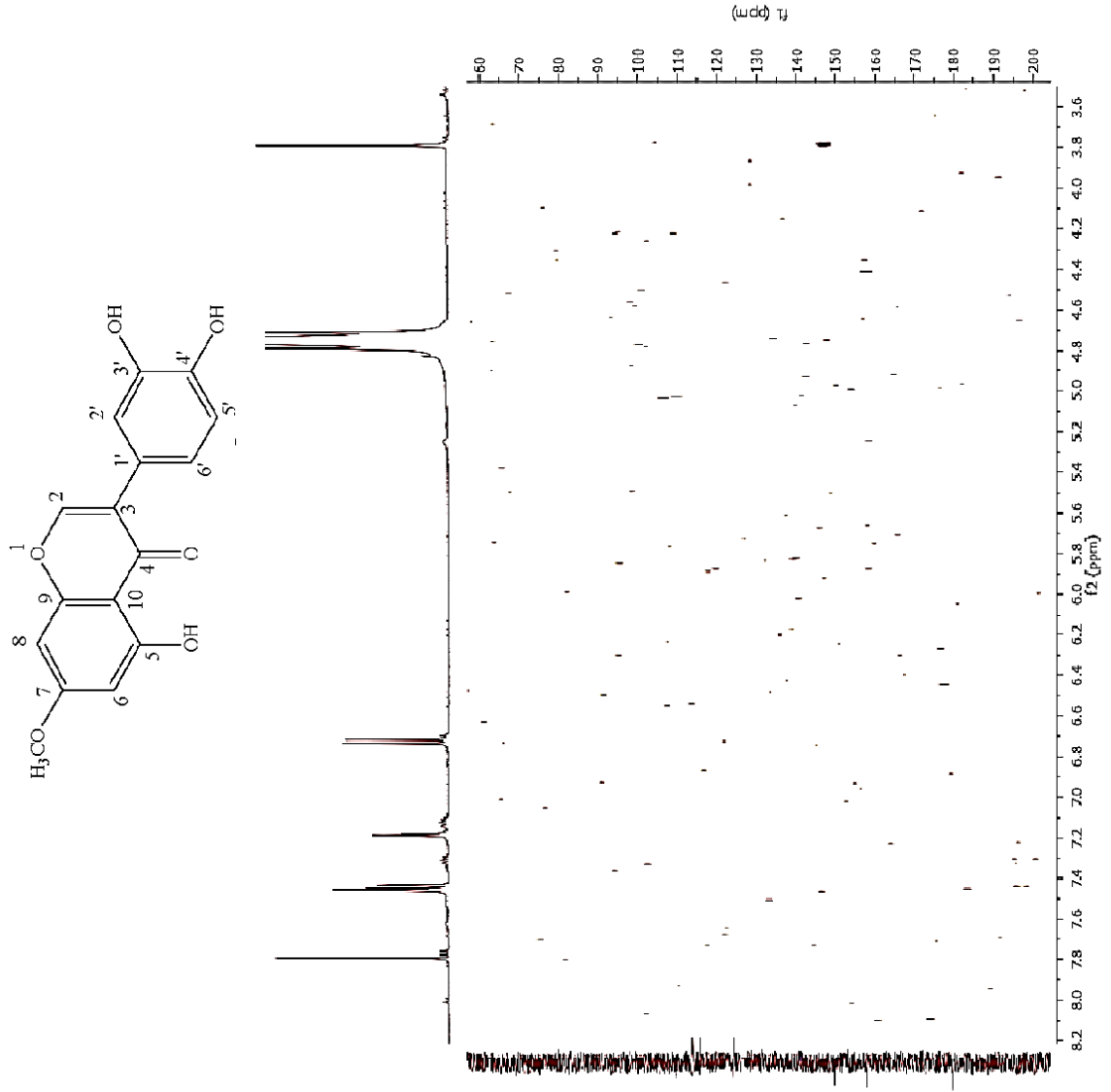
Şekil 4.3. 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksi izoflavonon bileşiğinin <sup>1</sup>H NMR spektrumu.



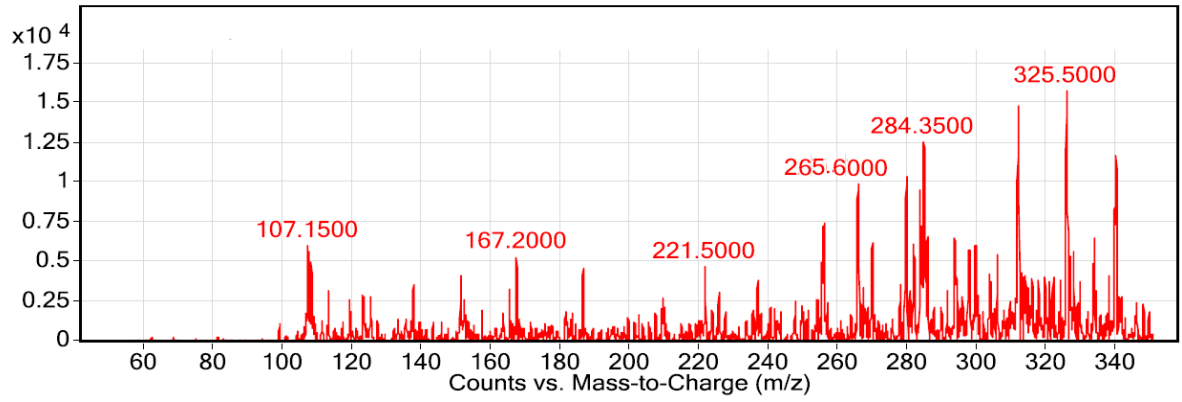
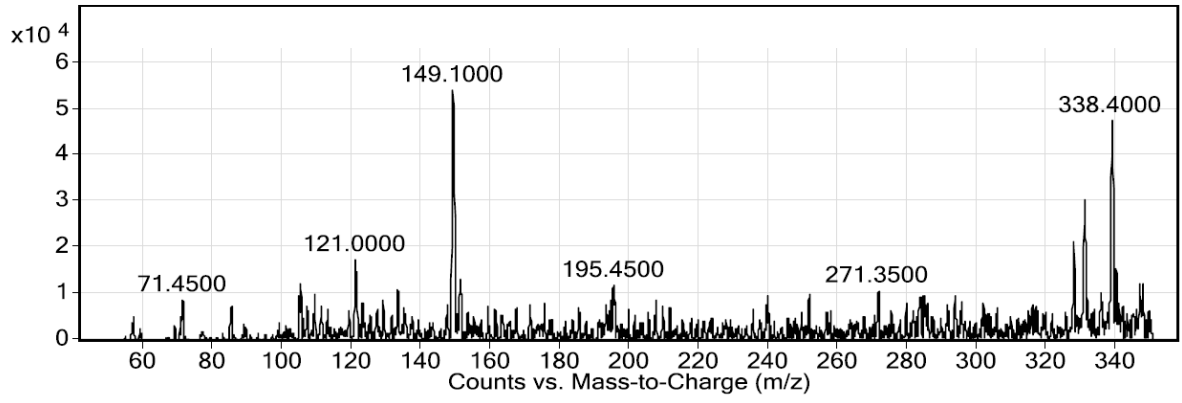
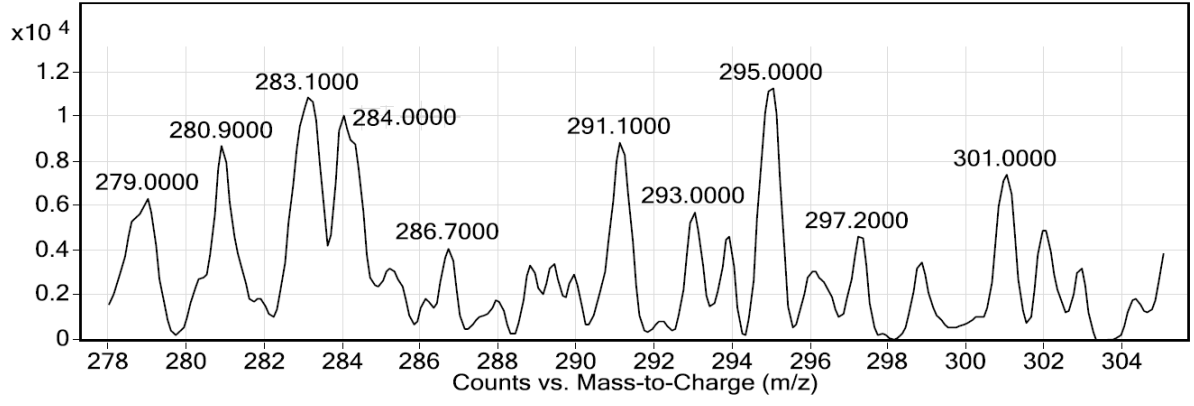
Şekil 4.4. 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksi izoflavonon bileşiğinin APT spektrumu.



Şekil 4.5. 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksi izoflavonon bileşiğinin  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spektrumu.

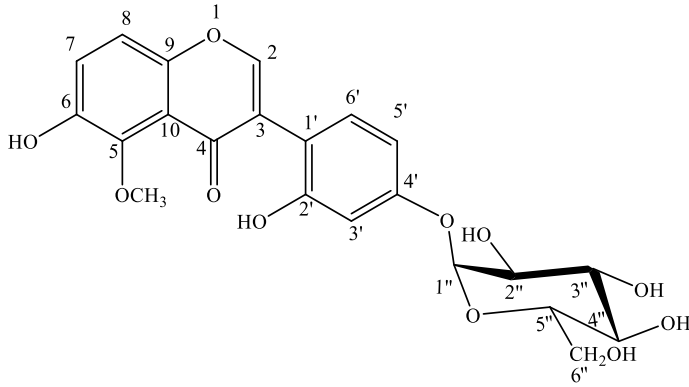


Şekil 4.6. 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksi izoflavonon bileşiğinin HMBC spektrumu.



Şekil 4.7. 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksi izoflavonon bileşığının ESI-MS şpektrumu.

#### 4.2.2. 2 Numaralı Bileşik (K-1-2-1): 6,2'-dihidroksi-5-metoksi-4'-O- $\alpha$ -glikozil izoflavonon



Şekil 4.8. 6, 2'-dihidroksi-5-metoksi-4'-O- $\alpha$ -glikozil izoflavonon bileşiğinin yapısı.

Bileşik sarı renkte yağmsı olup, 254 nm UV ışık altında kahverengi, 366 nm UV ışık altında koyu mor olarak gözlenmiştir. Amonyak buharına tutulup ardından NA belirteci püskürtüldüğünde, 254 nm'de kahverengi, 366 nm'de koyu sarı renk gözlenmiştir. TLC plakasında ki çözücü sistemi EtOAc:MeOH (5:2)'dür.

$^1\text{H}$  NMR spektrumunda ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm), 500 MHz, Şekil 4.10) A halkasında 6.73 ppm'deki (1H, d,  $J= 8.8$  Hz) H-7 protonu ile 7.18 ppm'deki (1H, d,  $J= 8.8$  Hz) H-8 protonunun orto etkileşimi gözlenirken, B halkasında 7.45 ppm'deki (1H, t-like,  $J= 8.1$  Hz) H-5' protonunun 7.40 ppm'deki (1H, d,  $J= 7.5$  Hz) H-6' protonuyla orto etkileşimi ve 7.45 ppm'deki (1H, d,  $J= 1.4$  Hz) H-3' protonu ile meta etkileşimi gözlenmiştir. Bunun yanı sıra 7.79 ppm'de (1H, brs) H-2 protonu ile 3.80 ppm'de (3H, s) metoksi protonları da gözlenmiştir. Ayrıca 4.51 ppm'de (1H, brs) anomerik H-1'' protonu gözlenirken, 3.40-4.10 ppm aralığında (H-2'', H-3'', H-4'', H-5'' ve H-6'') altı şeker protonu gözlenmiştir.

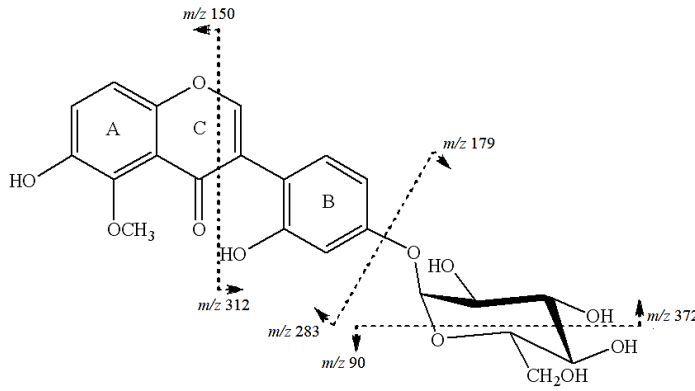
$^{13}\text{C}$  NMR, APT ve HSQC spektrumuna ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm), 500 MHz, Şekil 4.11) bakıldığında 157.81 ppm'de (C-5), 148.14 ppm'de (C-6), 165.82 ppm'de (C-2') ve 162.26 ppm'de (C-4') oksijene bağlı aromatik karbonlar gözlenirken, 183.95'de (C-4) karbonil karbonu ve 49.87 ppm'de metoksi karbonu gözlenmiştir. Bunun yanı sıra 114.80 (C-7), 112.56 (C-8), 134.37 (C-3'), 130.35 (C-5') ve 128.39 (C-6') aromatik karbonlarıyla birlikte, 97.96 ppm'de (C-1'') anomerik karbon ile 57.98-71.02 ppm aralığında (C-2'', C-3'', C-4'', C-5'', C-6'') beş şeker karbonu gözlenmiştir.

HMBC spektrumunda ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm), 500 MHz, Şekil 4.13) 7.18 ppm'deki H-8 protonunun, 114.80 ppm'deki C-7 karbonuyla, 157.80 ppm'deki C-9 karbonuyla ve 103.94 ppm'deki C-10 karbonuyla etkileşimi gözlenirken; 6.73 ppm'deki H-7 protonunun 49.87

ppm'deki metoksi karbonuyla, 148.14 ppm'deki C-6 karbonuyla, 112.56 ppm'deki C-8 karbonuyla etkileşimi gözlenmiştir. 3.80 ppm'deki metoksi protonları 103.94 ppm'deki C-10 karbonuyla, 148.14 ppm'deki C-6 karbonuyla ve 114.80 ppm'deki C-7 karbonuyla yaptığı etkileşim metoksi grubunun A halkasında ve C-5 konumundan bağlı olduğunu kanıtlamıştır. 4.51 ppm'deki anomerik H-1" protonunun, 134.37 ppm'deki C-3' karbonuyla ve 162.26 ppm'deki C-4' karbonuyla yaptığı etkileşim, şeker grubunun B halkasında ve C-4' konumundan bağlı olduğunu göstermiştir.

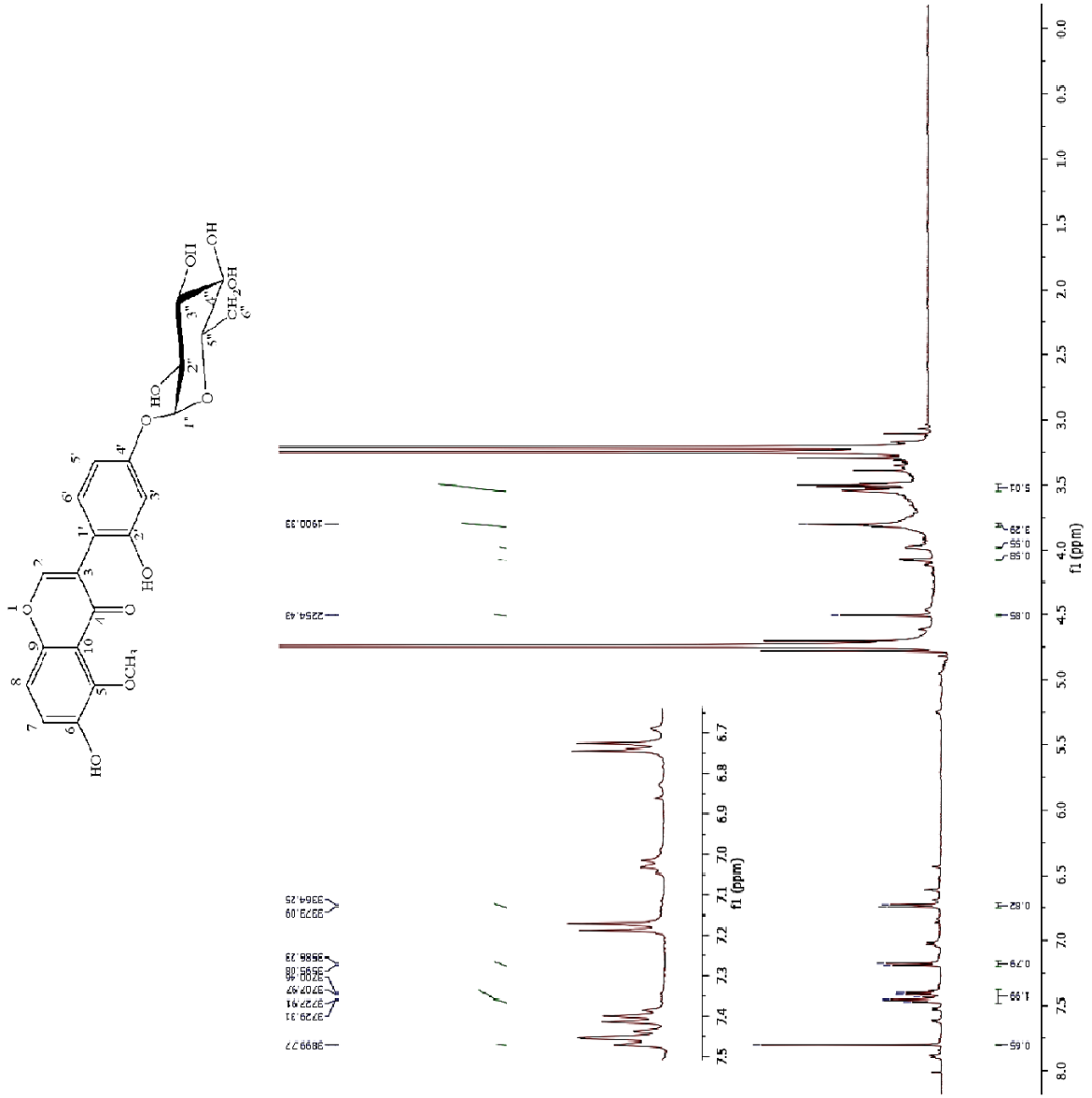
Bileşiğin  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spektrumunda ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm), 500 MHz, Şekil 4.12) 7.45 ppm'de H-5' protonunun, 7.40 ppm'deki H-6' protonuyla, 7.45 ppm'deki H-3' protonunun etkileşimiyle birlikte; 6.73 ppm'deki H-7 protonunun, 7.18 ppm'deki H-8 protonuyla etkileşimi de gözlenmiştir.

Bileşiğin ESI-MS spektrumunda (Şekil 4.14)  $m/z$  461 (% 100)  $[\text{M}-1]^+$  pikinin görülmesi molekülün  $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$  kapalı formülüne sahip olduğunu göstermiştir. Molekülün diğer önemli parçalanma ürünleri  $m/z$  283 (% 42.07)  $[\text{M}-(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_6)]^+$  piki moleküldeki altı karbonlu şekerin ayrılışını ispatlarken;  $m/z$  313 (% 15.45)  $[(\text{M}+1)-(\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_3)]^+$  piki moleküldeki flavonoid yapısının A ve B halka parçalanması ürünlerini göstermiştir.



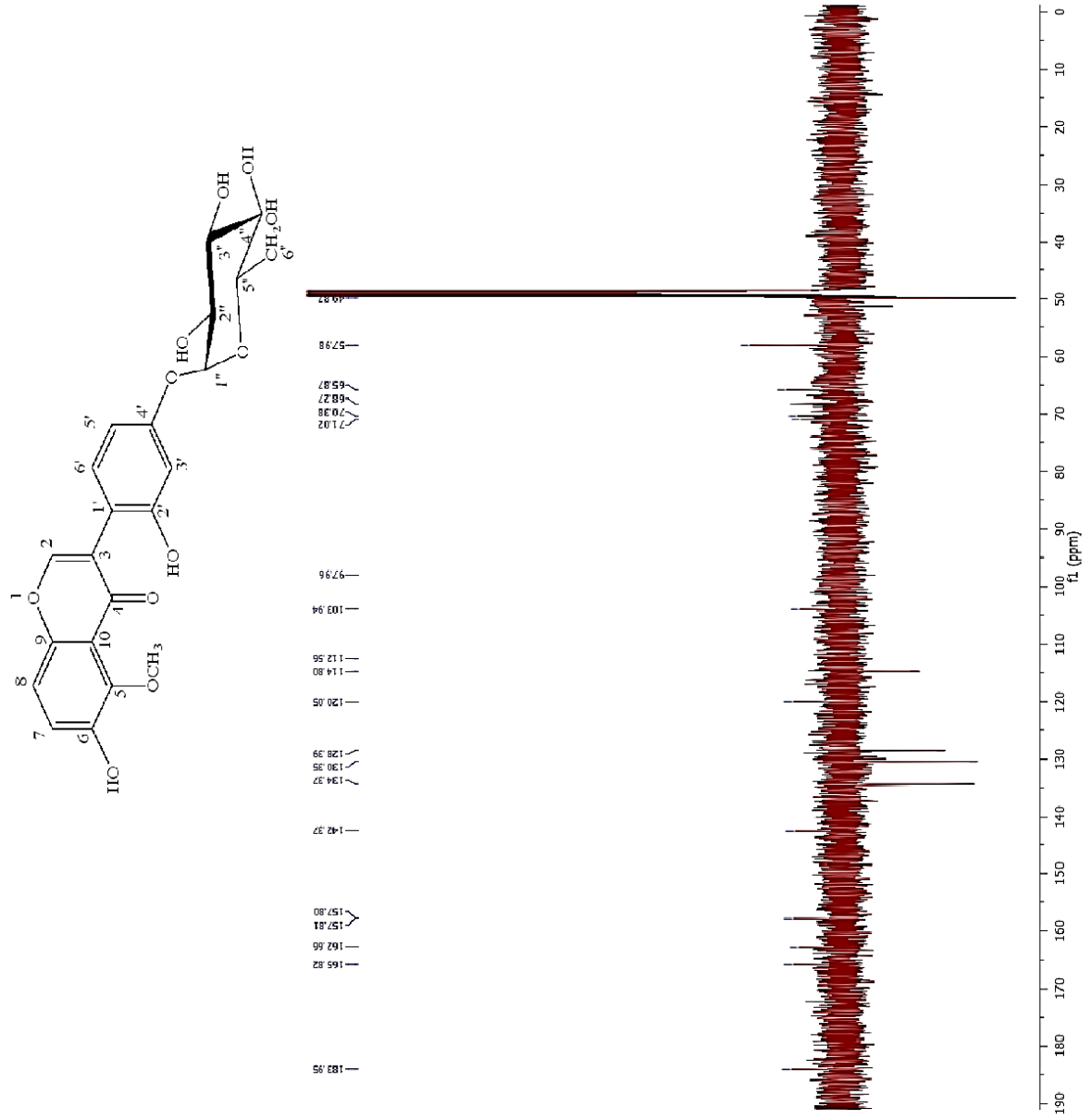
**Şekil 4.9.** 6,2'-dihidroksi-5-metoksi-4'-O- $\alpha$ -glukozil izoflavonon bileşiğinin kütle spektrumunda gözlenen bölünmeleri.

Elde edilen tüm verilere ve yapılan literatür (Pinheiro ve ark. 2012, Ritchie ve ark. 1975, Cuycken ve Claeys 2004) araştırmalarına göre yapının; 6,2'-dihidroksi-5-metoksi-4'-O- $\alpha$ -glukozil izoflavonon olduğu kanıtlanmıştır. Bu bileşik *C. italicum* bitkisinden ilk defa izole edilmiştir.

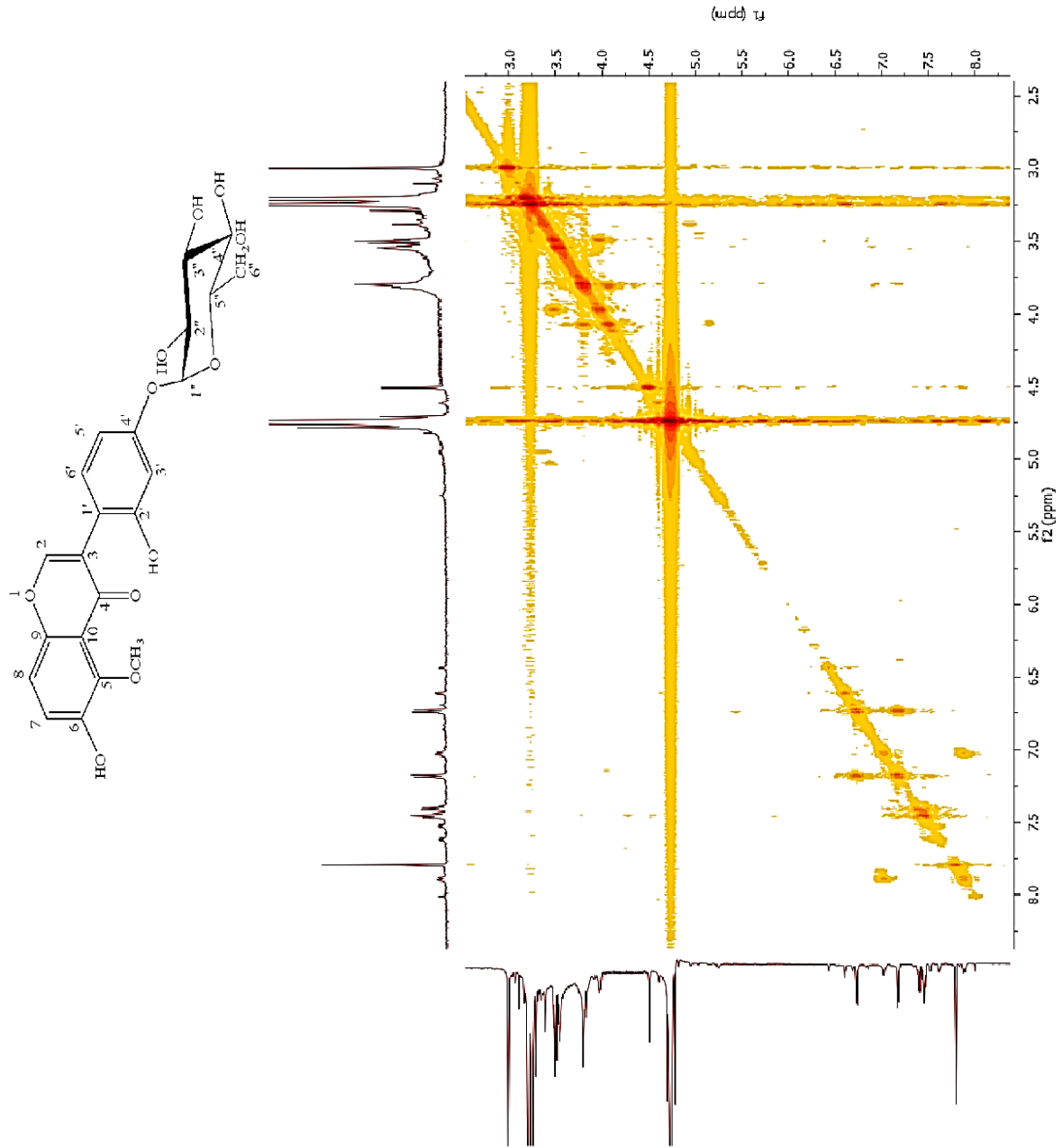


Şekil 4.10. 6,2'-dihidroksi-5-metoksi-4'-O- $\alpha$ -glikozil izoflavonon bileşiğinin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu.

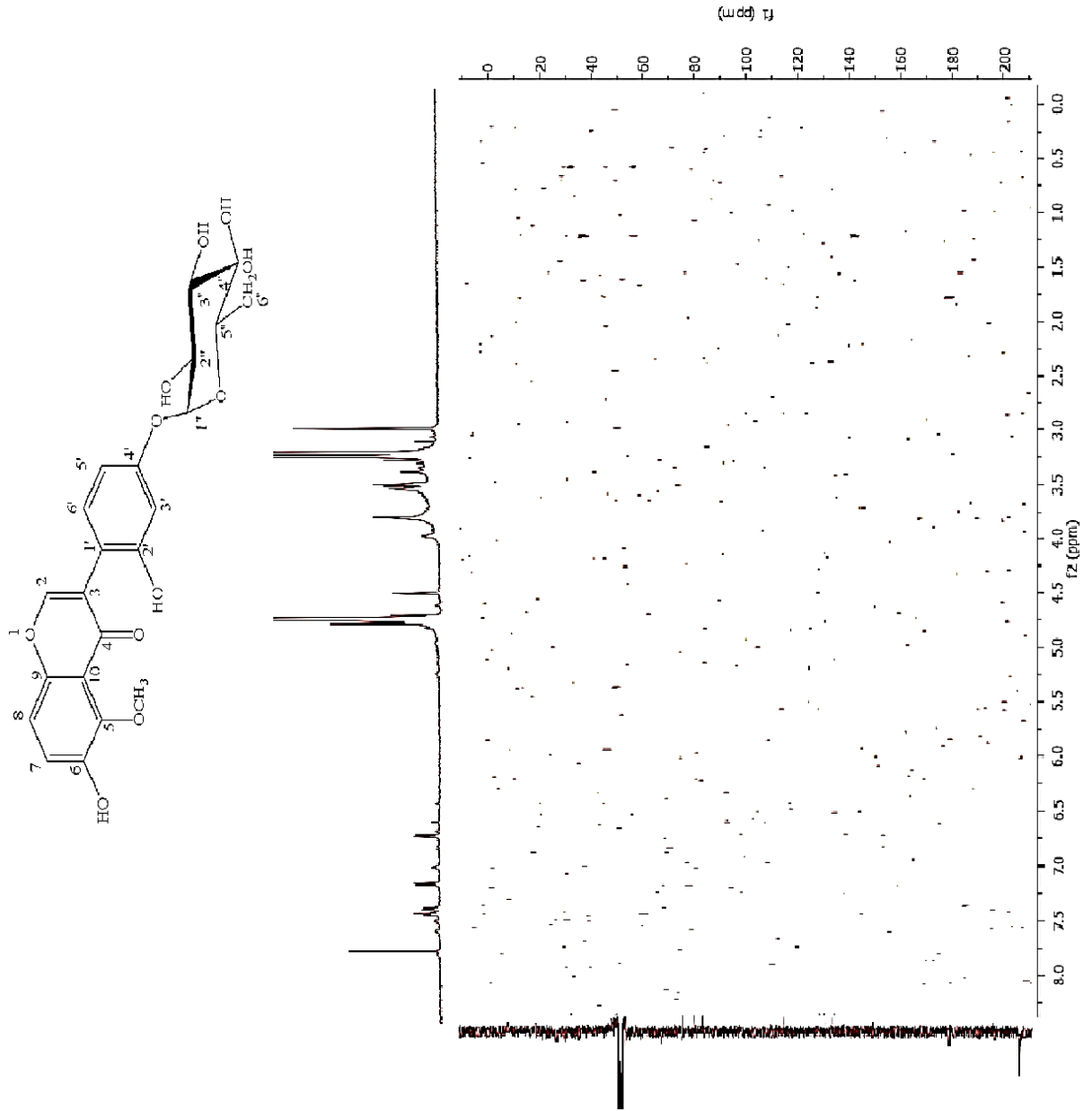




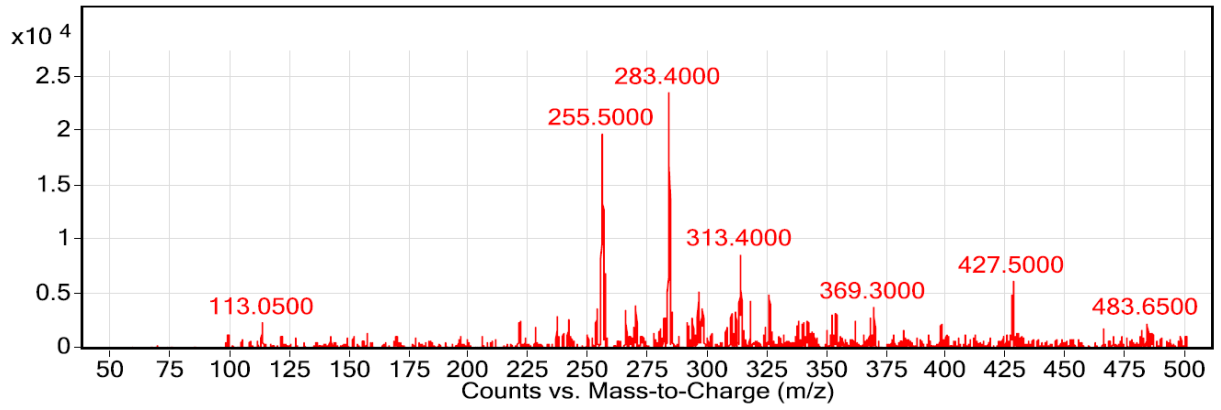
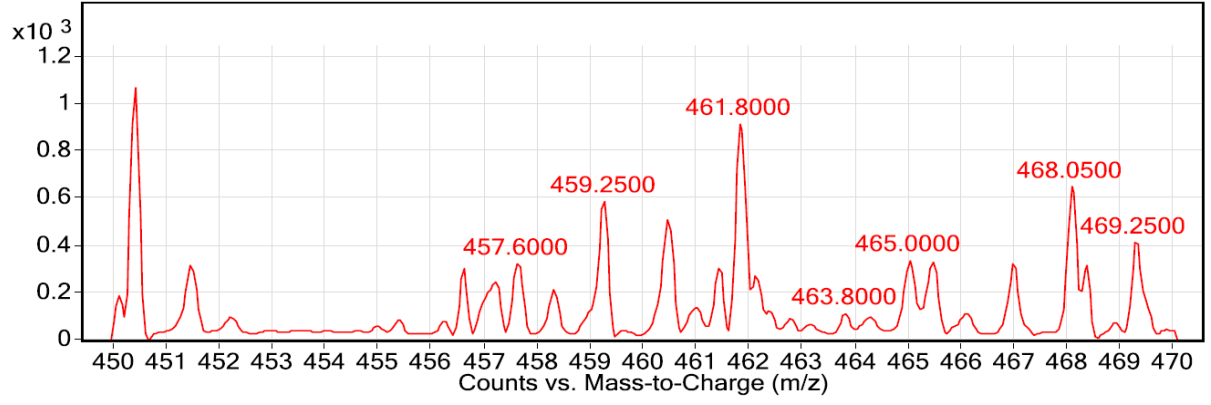
Şekil 4.11. 6,2'-dihidroksi-5-metoksi-4'-O- $\alpha$ -glikozil izoflavonon bileşiğinin APT spektrumu.



**Şekil 4.12.** 6,2'-dihidroksi-5-metoksi-4'-O- $\alpha$ -glukozil izoflavonon bileşiğinin  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spektrumu.

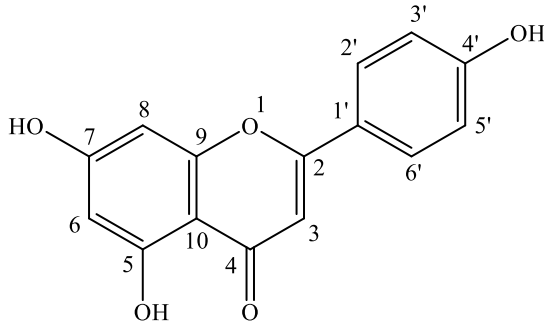


Şekil 4.13. 6,2'-dihidroksi-5-metoksi-4'-O- $\alpha$ -glikozil izoflavonon bileşiğinin HMBC spektrumu.



**Şekil 4.14.** 6,2'-dihidroksi-5-metoksi-4'-O- $\alpha$ -glikozil izoflavonon bileşğinin ESI-MS spektrumu.

### 4.2.3. 3 Numaralı Bileşik (IE-7-1): 5,7,4'-trihidroksi flavonon (Apigenin)

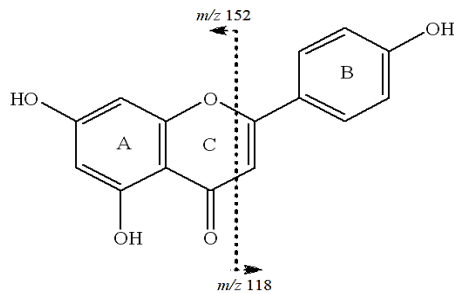


Şekil 4.15. 5,7,4'-trihidroksi flavonon bileşiğinin molekül yapısı.

Bileşik sarı renkli olup, 254 nm UV ışık altında kahverengi, 366 nm UV ışık altında koyu mor olarak gözlenmiştir. Amonyak buharına tutulup ardından NA belirteci püskürtüldüğünde 254 nm'de kahverengi, 366 nm'de sarı renk gözlenmiştir. TLC plakasında  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{EtOAc}$  (9:1.5) çözücü sistemi kullanılarak gözlenmiştir.

$^1\text{H}$  NMR spektrumuna ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm), 500 MHz, Şekil 4.17) bakıldığında A halkasında yer alan 6.11 ppm'deki (1H, d,  $J= 2.08$  Hz) H-6 protonunun 6.35 ppm'deki (1H, d,  $J= 2.09$  Hz) H-8 protonu ile meta etkileşimi; B halkasındaki 7.75 ppm'deki (2H, d,  $J= 8.8$  Hz) H-2' protonunun 6.83 ppm'deki (2H, d,  $J= 8.8$  Hz) H-3' protonunun ile orto, 7.75 ppm'deki H-6' protonunun 6.83 ppm'deki H-5' protonuyla orto etkileşimi yaptığı gözlenmiştir. Bunun yanı sıra 6.48 ppm'de (1H, s) H-3 protonu da singlet olarak gözlenmiştir.  $^1\text{H}$  NMR etkileşimi göz önüne alındığında A halkasının 5,7 disubstitue yapıda olduğu kanıtlanmıştır.

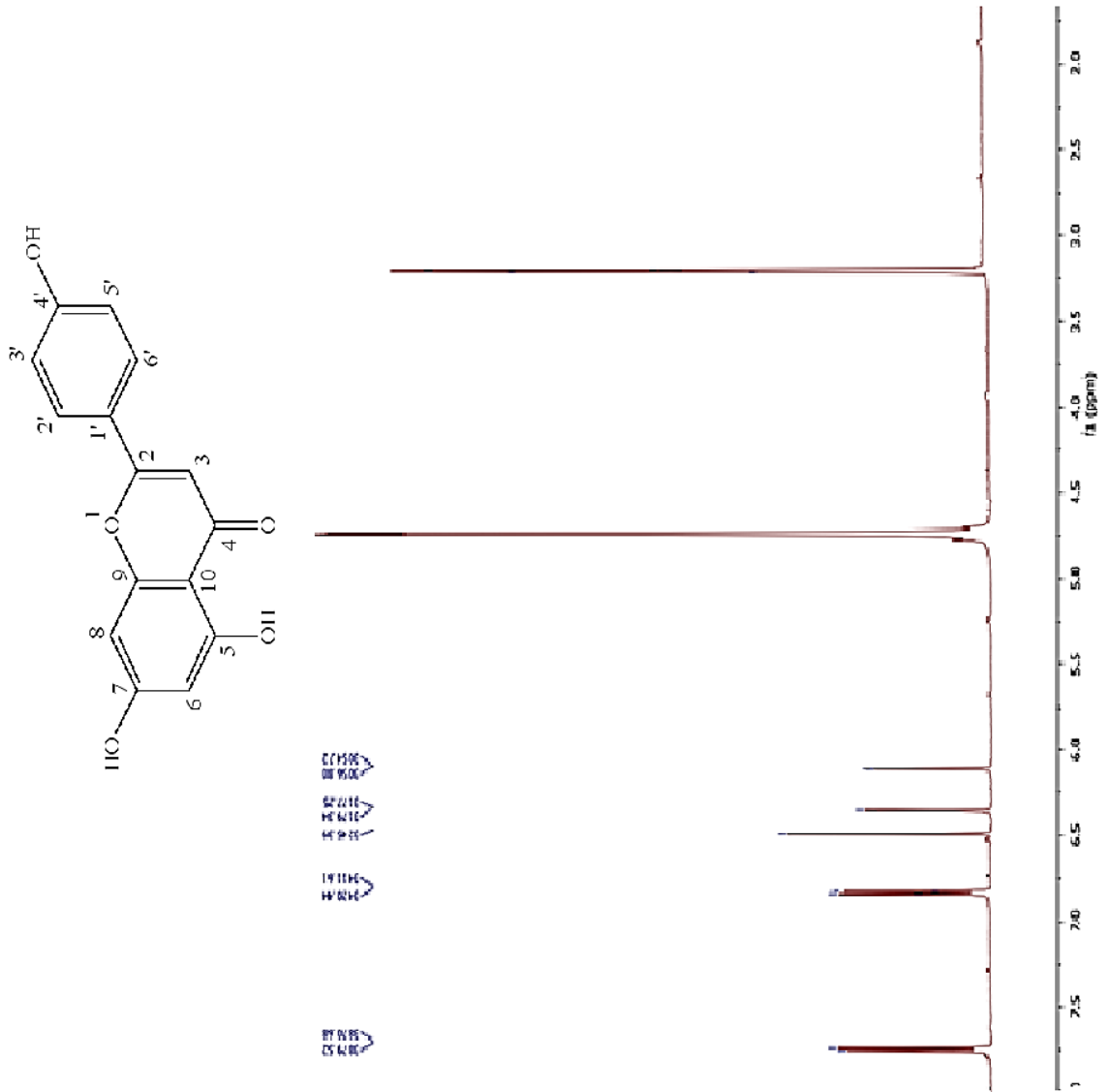
Bileşiğin ESI-MS spektrumunda (Şekil 4.18)  $m/z$  271  $[\text{M}+1]^+$  (% 66.83) pikinin görülmesi, molekülün  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$  kapalı formülüne sahip olduğunu göstermiştir. Molekülün diğer önemli parçalanma ürünleri;  $m/z$  153  $[(\text{M}+1)-(\text{C}_8\text{H}_6\text{O})]^+$  (% 20.67) ve  $m/z$  119  $[(\text{M}+1)-(\text{C}_7\text{H}_4\text{O}_4)]^+$  (% 12.48) piki flavonoid molekülünün A ve B halkalarının parçalanması sonucu oluşan A1 ve B1 yapısını kanıtlamaktadır.



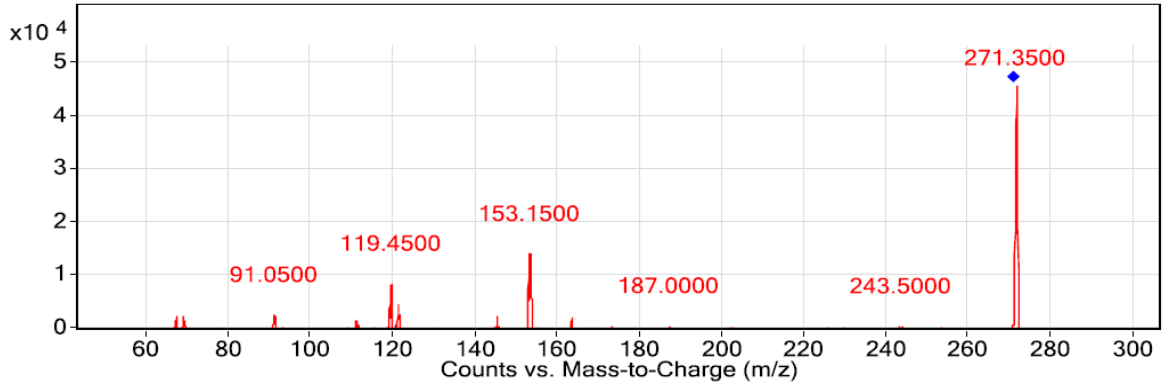
Şekil 4.16. 5,7,4'-trihidroksi flavonon bileşiğinin moleküler bölünmesi.

<sup>1</sup>H NMR spektrumu ve ESI-MS spektrumu verilerine ve yapılan literatür (Biavatti ve ark. 2015, Chari ve ark. 1977, Markham ve ark. 1977) araştırmaları yapının 5, 7, 4'-trihidroksi flavonon (apigenin) olduğunu kanıtlamıştır.

Apigenin molekölü *C. italicum* bitkisinden ilk defa izole edilmiştir. Ancak yapılan literatür çalışmaları sonucu, apigenin bileşiği Nazaruk ve Gudej (2003) tarafından *Cirsium rivulare* bitkisinden, Loizzo ve ark. (2004) tarafından *Cirsium tenoreanum* bitkisinden Seliwoniuk ve ark. (2012) tarafından *Cirsium oleraceum* bitkisinden, Jung ve ark. (2012) tarafından *Cirsium maackii* bitkisinden, Kozyra ve ark. (2015) tarafından *Cirsium canum* bitkisinden, Rodriguez ve ark. (2018) tarafından *Cirsium japonicum* bitkisinden izole edildiği bulunmuştur.



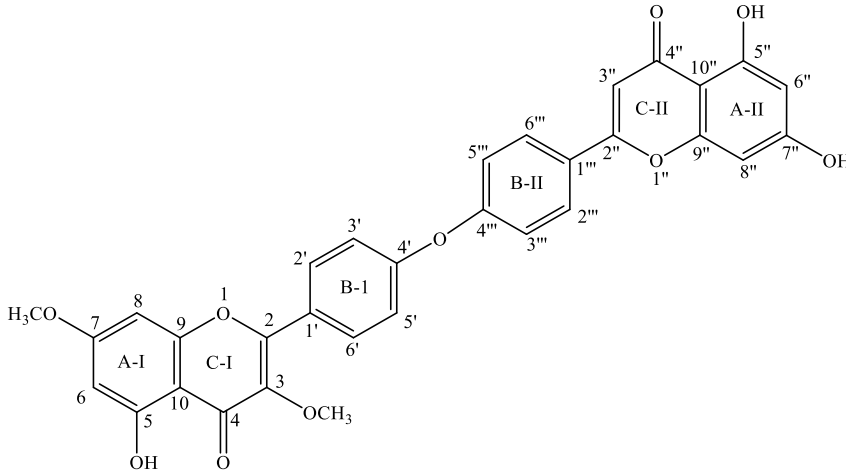
Şekil 4.17. 5,7,4'-trihidroksi flavonon bileşiğinin <sup>1</sup>H NMR spektrumu.



Şekil 4.18. 5,7,4'-trihidroksi flavonon bileşiğinin ESI-MS spektrumu.



#### 4.2.4. 4 Numaralı Bileşik (IE-10-2): 5,5'',7''-trihidroksi-3,7-dimetoksi-4',4''-O-biflavon



Şekil 4.19. 5,5'',7''-trihidroksi-3,7-dimetoksi-4',4''-O-biflavon bileşiğinin yapısı.

Bileşik sarı renkli olup, 254 nm UV ışık altında kahverengi, 366 nm UV ışık altında koyu mor olarak gözlenmiştir. Amonyak buharına tutulup ardından NA belirteci püskürtüldüğünde 254 nm'de kahverenk, 366 nm'de sarı renk gözlenmiştir. TLC plakasında CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOAc (2:1) çözücü sistemi kullanılarak gözlenmiştir.

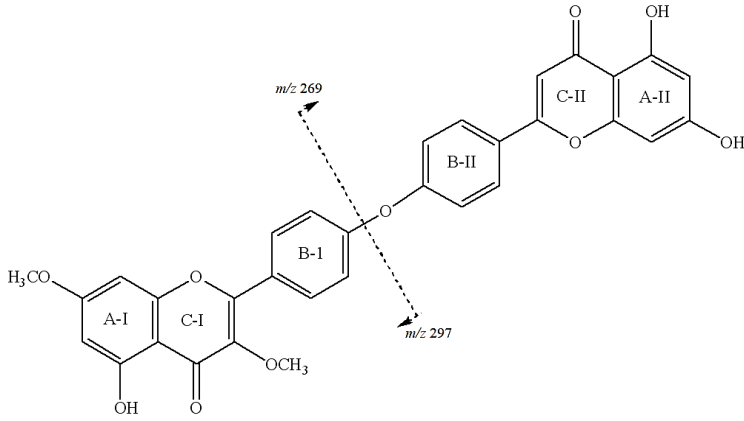
<sup>1</sup>H NMR spektrumunda (CD<sub>3</sub>OD, δ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.21) bileşiğin A-I halkasında 6.36 ppm'deki (1H, d, J= 2.1 Hz) H-8 protonu, 6.11 ppm'deki (1H, d, J= 2.08 Hz) H-6 protonu ile meta etkileşimi; B-I ve B-II halkasında 7.75 ppm'deki (4H, d, J= 8.8 Hz) H-2' ve H-6' protonun 6.83 ppm'deki (4H, d, J= 8.8 Hz) H-3' ve H-5' protonu ile orto etkileşimi ve A-II halkasında 6.50 ppm'deki (2H, d, J= 3.4 Hz) H-6'' ve H-8'' protonunun meta etkileşimi gözlenmiştir. Bunun yanında 3.78 ppm'de (6H, s) metoksi protonları ile birlikte, 6.47 ppm'de (1H, s) H-3'' singlet olarak gözlenmiştir. <sup>1</sup>H NMR spektrumunda aromatiklik bölgede gözlenen çok sayıdaki proton etkileşimi, iki flavonoid halkasının birbirine bağlı olduğu, biflavonoid yapısını düşündürmüştür. Yapıdaki <sup>1</sup>H NMR etkileşimleri göz önüne alındığında, A-I ve A-II halkasının 5, 7 disubstitue; B-I ve B-II halkasının ise 1,4 disubstitue yapıda olduğunu kanıtlamaktadır.

<sup>13</sup>C NMR, APT ve HSQC spektrumunda (CD<sub>3</sub>OD, δ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.22) bileşiğin 95.36 ppm'de (C-6), 96.29 ppm'de (C-8), 129.48 ppm'de (C-2', C-6', C-2'' ve C-6''), 117.06 ppm'de (C-3', C-5', C-3''' ve C-5'''), 95.08 ppm'de (C-6'' ve C-8'') 100.17 ppm'de (C-3'') aromatik karbonlar gözlenirken 193.65 ppm'de (C-4 ve C-4'') karbonil karbonları ile 55.37 (2x-OCH<sub>3</sub>) metoksi karbonları gözlenmiştir.

Bileşğin  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spektrumunda ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm), 500 MHz, Şekil 4.23) A-I halkasında 6.36 ppm'de H-8 ve 6.11 ppm'deki H-6 protonlarının; A-II halkasındaki 6.50 ppm'de H-6'' ve H-8'' protonlarının etkileşimi ile B-I ve B-II halkasındaki 7.75 ppm'deki (H-2', H-6', H-2''' ve H-6''') protonlarının 6.83 ppm'deki (H-3', H-5', H-3''' ve H-5''') protonlarıyla etkileşimi gözlenmiştir.

HMBC spektrumuna ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm), 500 MHz, Şekil 4.24, Şekil 4.25, Şekil 4.26, Şekil 4.27) bakıldığında A-I halkasındaki 6.11 ppm'deki H-6 ve 6.36 ppm'deki H-8 protonlarının, 55.37 ppm'deki metoksi karbonuyla etkileşmesi; 3.78 ppm'deki metoksi protonlarının, 95.36 ppm'deki C-6 ve 96.29 ppm'deki C-8 karbonlarıyla etkileşmesi molekülde C-7 konumunda, bir metoksi grubunun varlığını göstermiştir. Bunun yanında, 3.78 ppm'deki metoksi protonlarının, 193.65 ppm'deki C-4 karbonuyla ve 136.15 ppm'deki C-3 karbonuyla etkileşimi, molekülde C-3 konumunda bulunan ikinci bir metoksi grubunun varlığını kanıtlamıştır. Ayrıca, 6.47 ppm'deki H-3'' protonunun, 193.65 ppm'deki C-4'' karbonuyla, 132.32 ppm'deki C-1'' karbonuyla ve 105.77 ppm'deki C-5'' karbonuyla olan etkileşimleri ile birlikte; 6.83 ppm'deki (H-3', H-5', H-3''' ve H-5''') ve 7.75 ppm'deki (H-2', H-6', H-2''' ve H-6''') protonlarının 163.07 ppm'deki C-4'/C-4''' karbonlarıyla olan etkileşimlerinde HMBC spektrumunda gözlenmiştir. Bununla birlikte, A-II halkasındaki, 6.50 ppm'deki H-6''/H-8'' protonlarının, 95.08 ppm'deki C-6''/C-8'', 105.77 ppm'deki C-10'', 164.58 ppm'deki C-5'' ve 166.33 ppm'deki C-7'' karbonlarıyla etkileşimlerinde gözlenmiştir. Gözlenen tüm HMBC etkileşimleri değerlendirildiğinde ve moleküldeki  $^1\text{H}$  NMR spektrum verileri (kimyasal kayma, yarımlama, kapling sabiti) incelendiğinde; moleküldeki simetrik B-I ve B-II halkasının varlığını ve bu iki flavon grubunun birbirine C-4'-O-C-4''' konumunda bağlı olduğunu kanıtlamıştır.

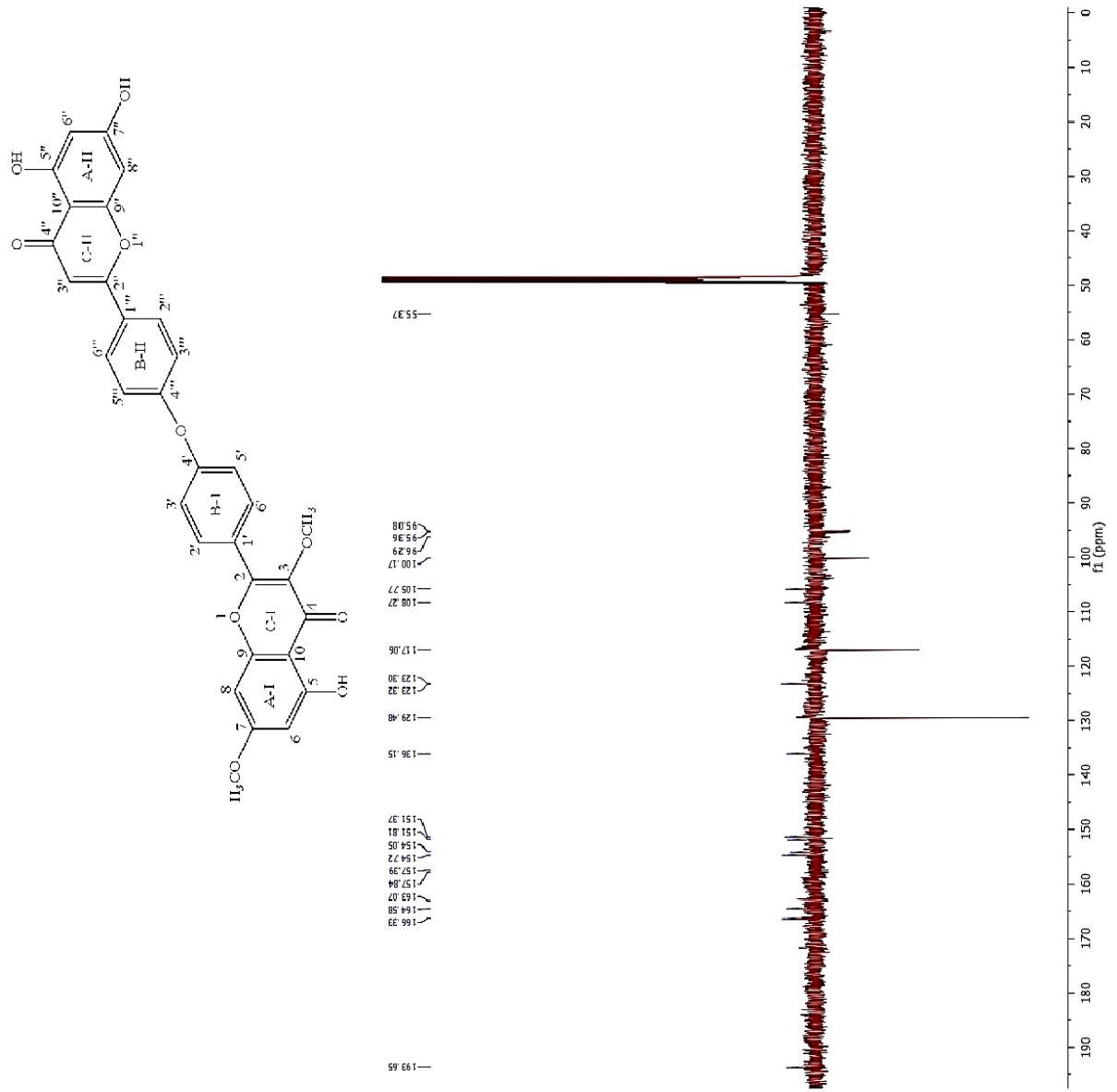
Bileşğin ESI-MS ve QTOF MS spektrumuna (Şekil 4.28) bakıldığında moleküler iyon piki  $m/z$  569  $[\text{M}+3]^+$  (% 100) olarak gözlenmesi kapalı formülün  $\text{C}_{32}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$  olduğunu desteklemiştir. Bununla birlikte  $m/z$  269  $[\text{M}-(\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{O}_5)]^+$  (% 57.60) pikinin gözlenmesi I. flavonoid yapısının (A-I, B-I, C-I) ayrılışını,  $m/z$  299  $[(\text{M}+2)-(\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_5)]^+$  (% 35.20) pikinin II. flavonoid yapısının (A-II, B-II, C-II) ayrılışını göstermiştir. Diğer önemli moleküler bölünme pikleri, spektral veriler kısmında gösterilmiştir.



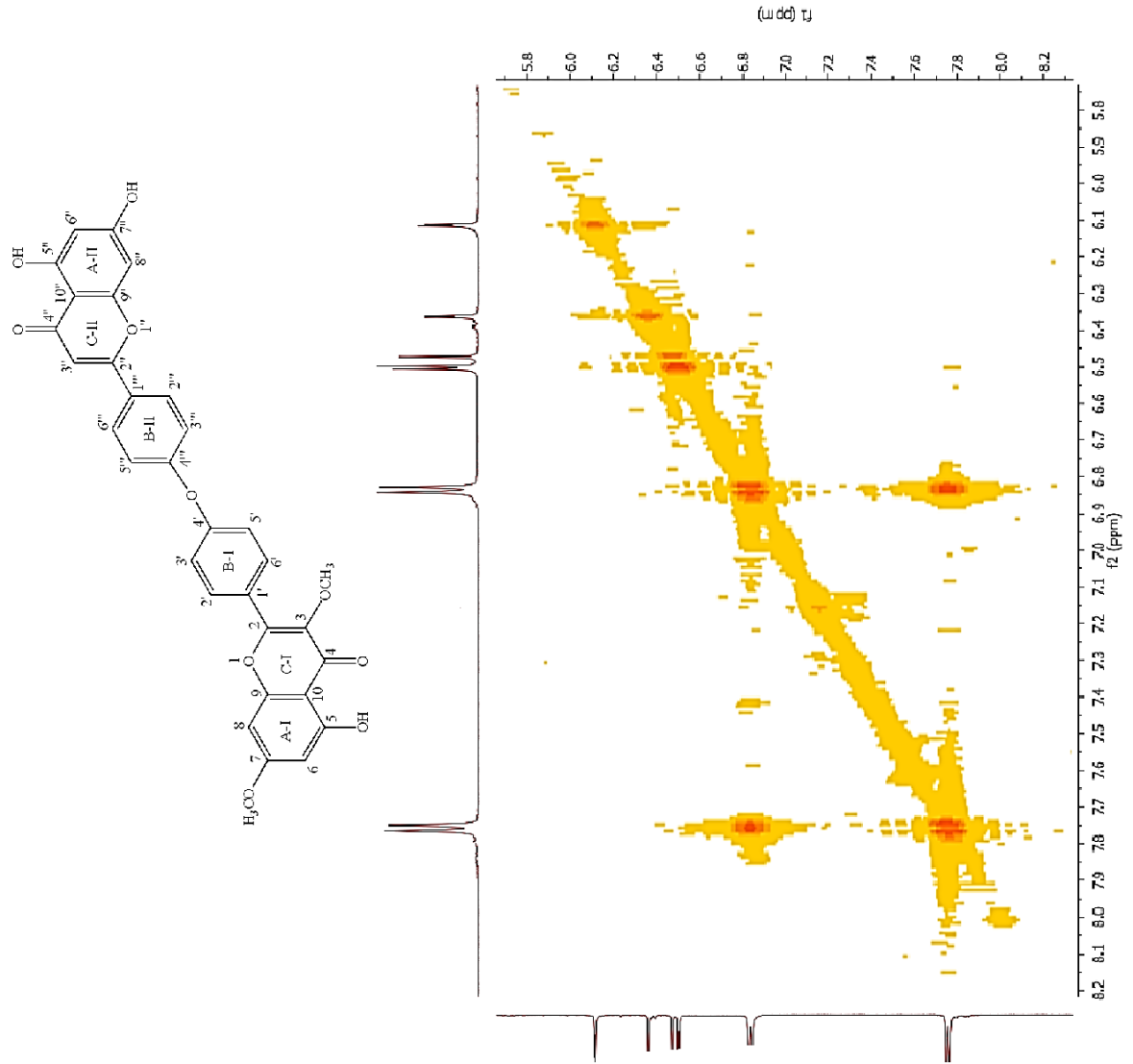
**Şekil 4.20.** 7,5'',7''-trihidroksi-5,4'-dimetoksi-3,4'''-O-biflavon bileşiğinin kütle spektrumunda gözlenen moleküler bölünmeler.

Tüm spektroskopik verilere ve yapılan literatür (Lee ve ark. 2008, Kumar ve ark. 2005) araştırmalarına bakıldığında bileşiğin 7,5'',7''-trihidroksi-5,4'-dimetoksi-3,4'''-O-biflavon olduğunu kanıtlamıştır. Bu bileşik *C. italicum* bitkisinden ilk defa izole edilmiştir.

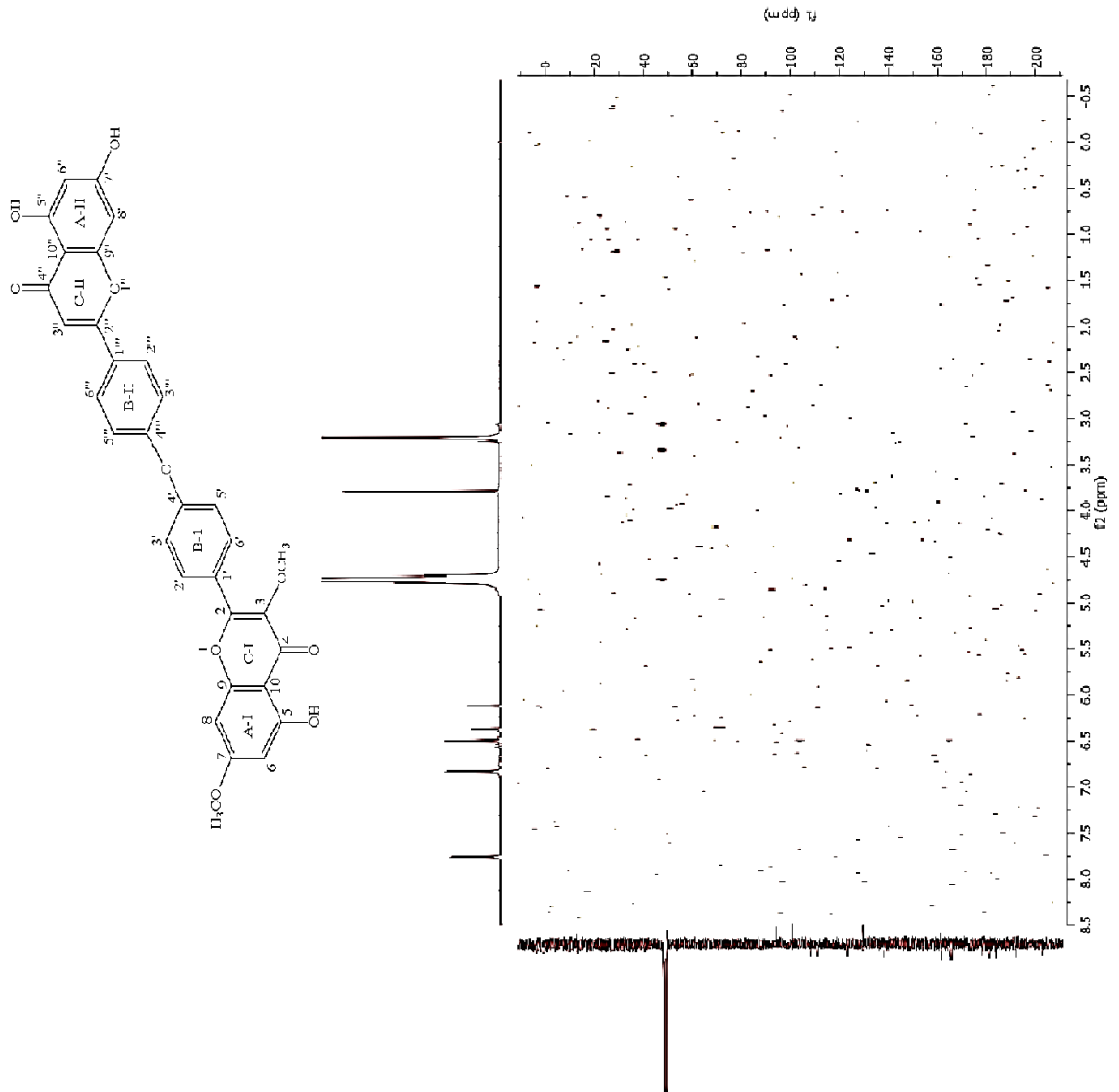




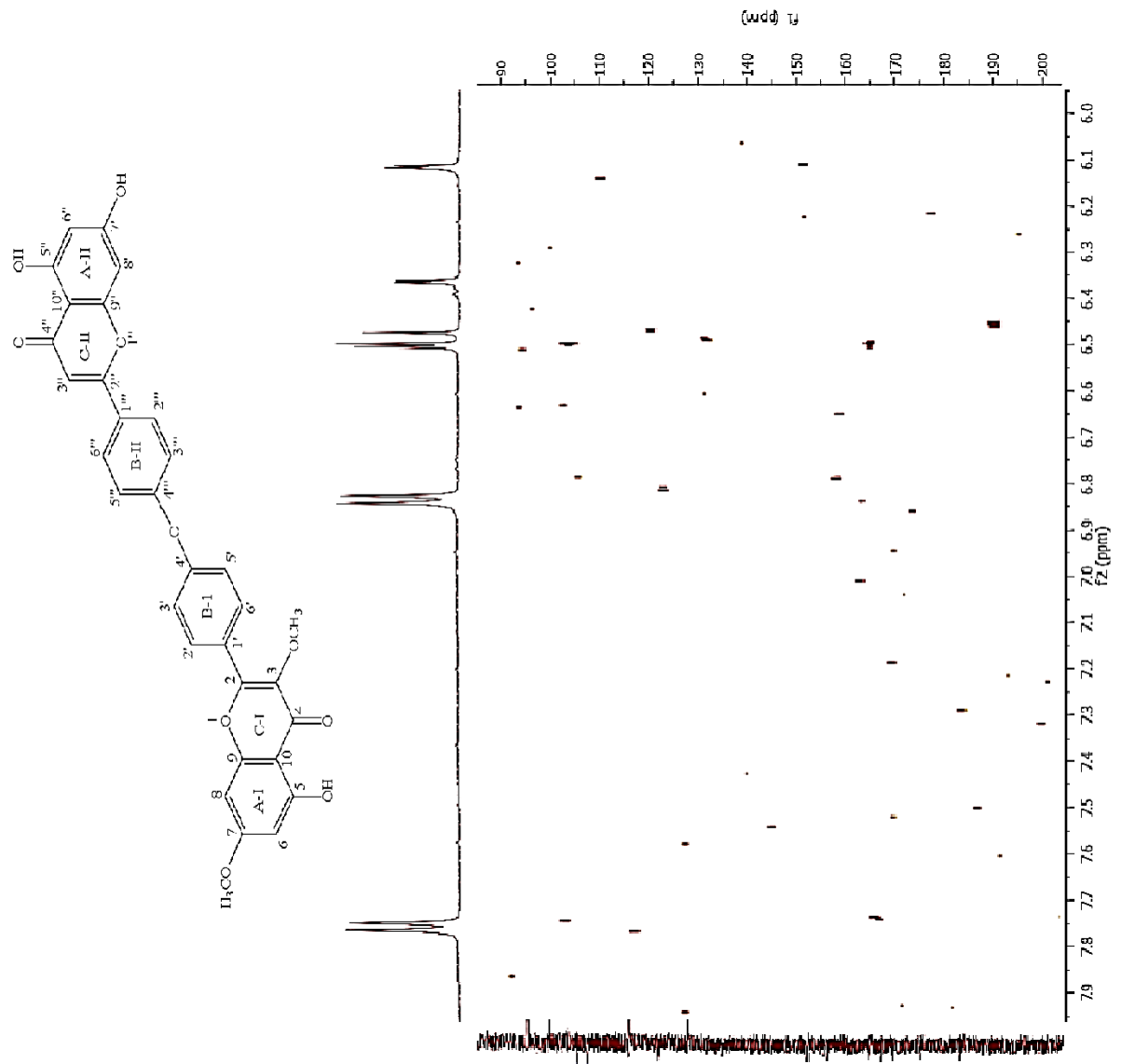
Şekil 4.22. 5,5'',7''-trihidroksi-3,7-dimetoksi-4',4'''-O-biflavon bileşiminin APT spektrumu.



**Şekil 4.23.** 5,5',7'-trihidroksi-3,7-dimetoksi-4',4'''-O-biflavon bileşiğinin  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spektrumu.

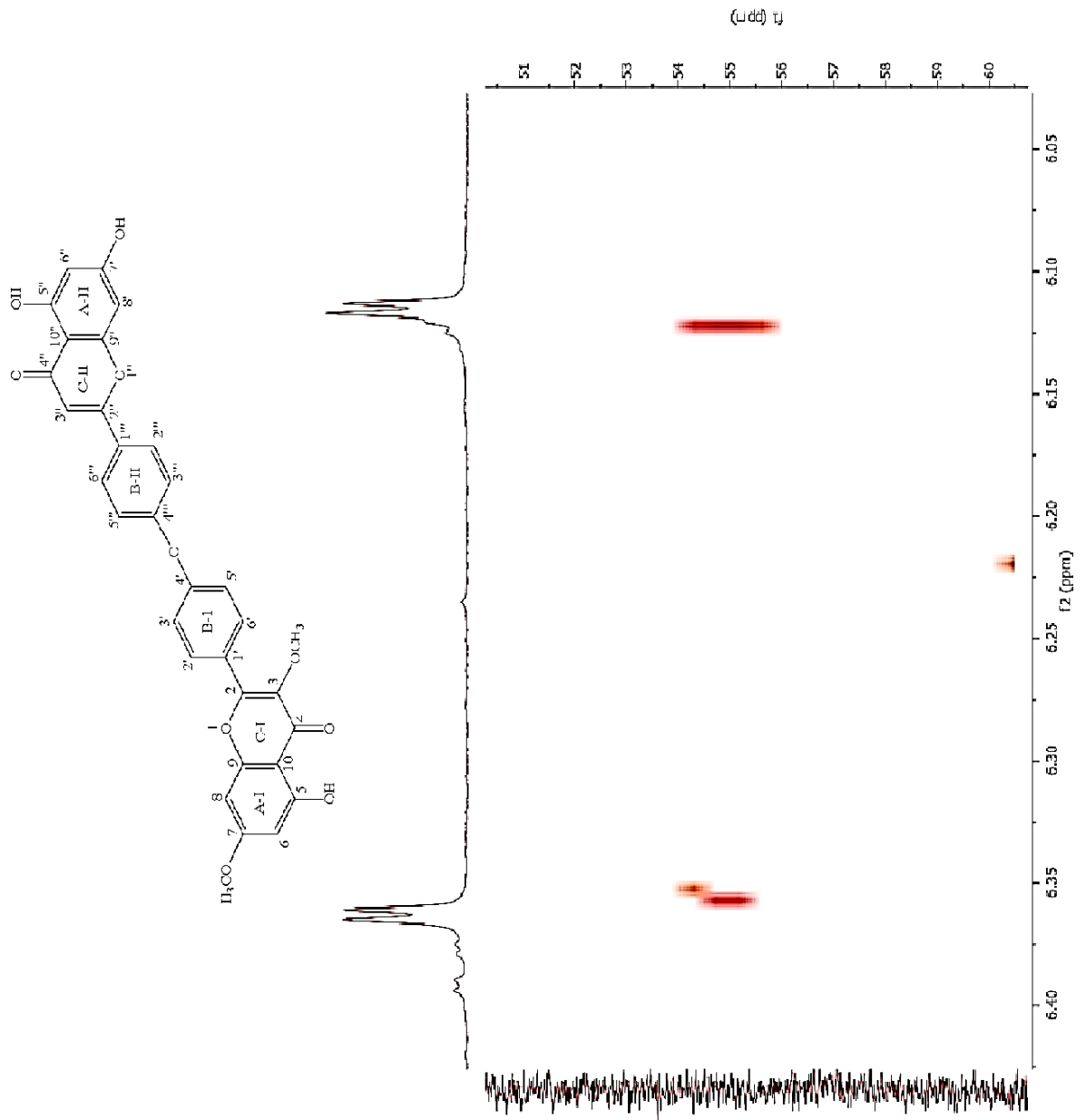


Şekil 4.24. 5,5'',7''-trihidroksi-3,7-dimetoksi-4',4'''-O-biflavon bileşiğinin HMBC spektrumu.

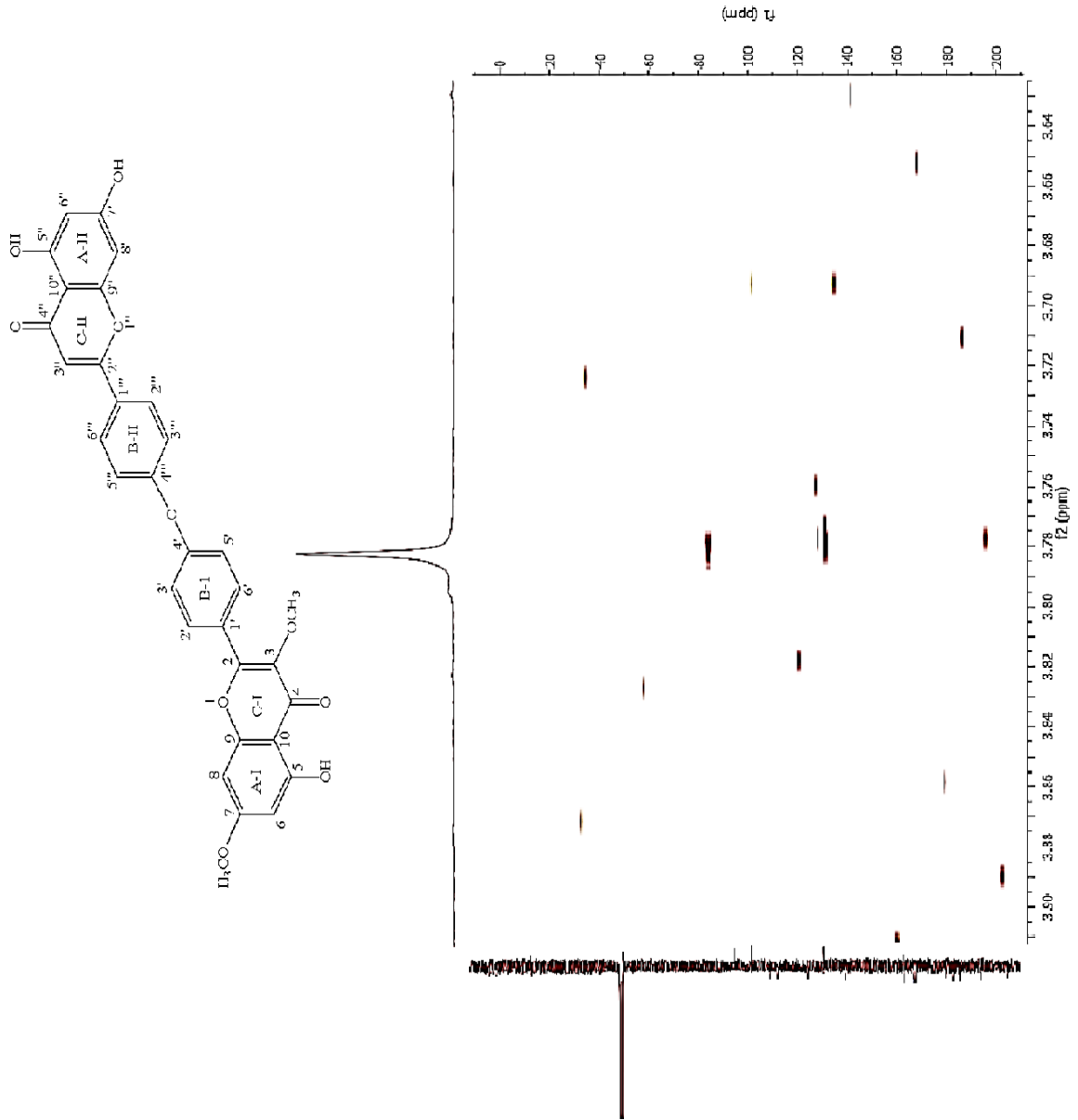


Şekil 4.25. 5,5",7"-trihidroksi-3,7-dimetoksi-4',4''-O-biflavon bileşiğinin 6.00-7.90 ile 90-200 arası HMBC spektrumu.

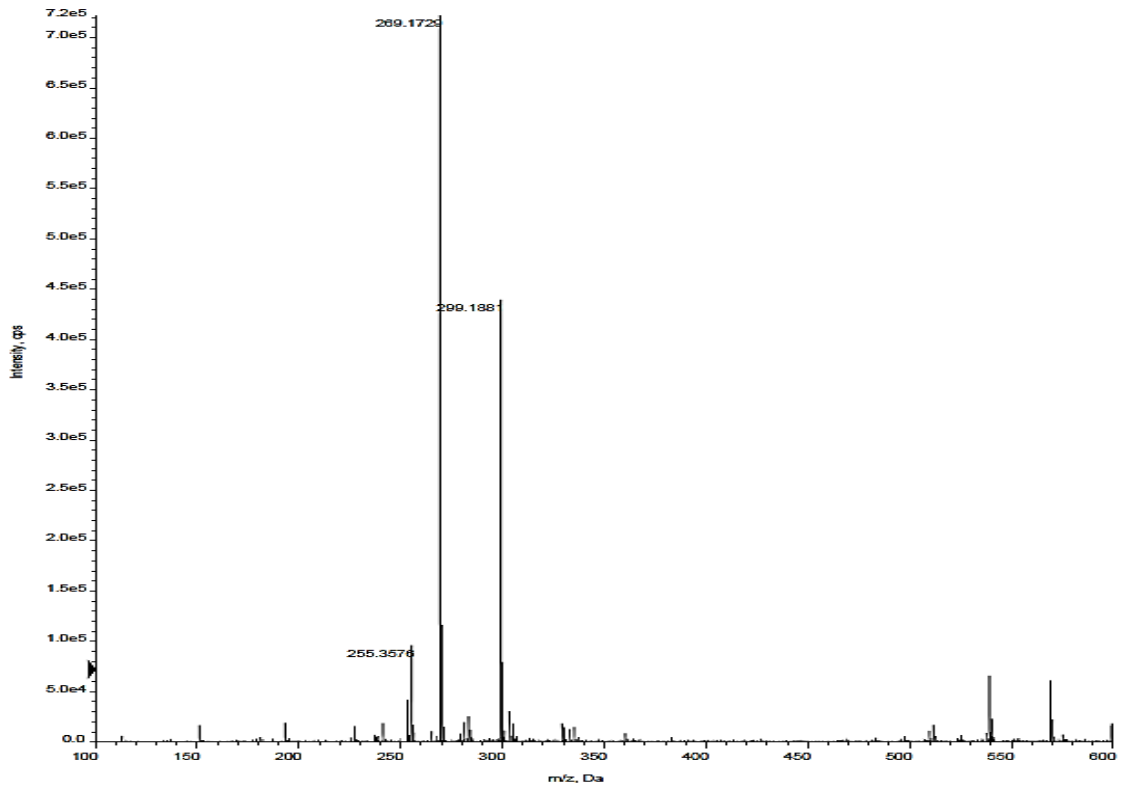
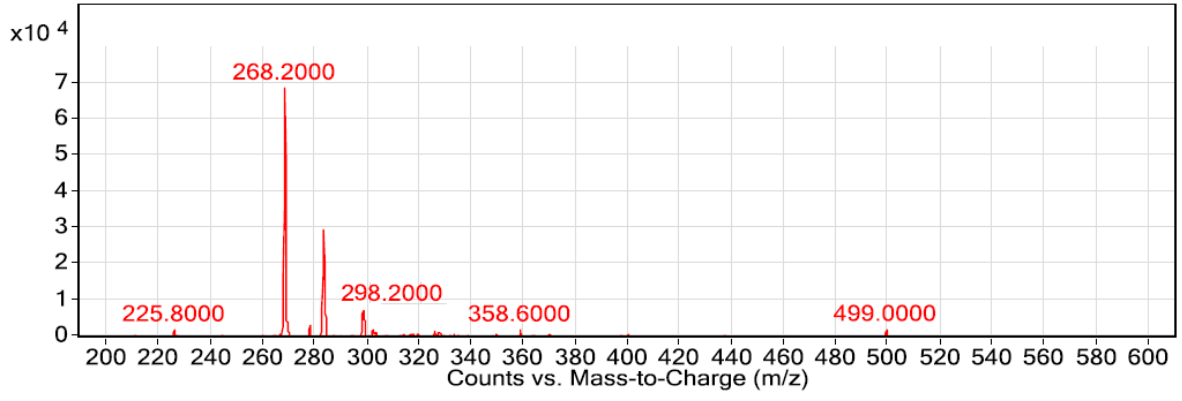




**Şekil 4.26.** 5,5'',7''-trihidroksi-3,7-dimetoksi-4',4''-O-biflavon bileşiğinin 6.05-6.40 ile 50-60 arası HMBC spektrumu.

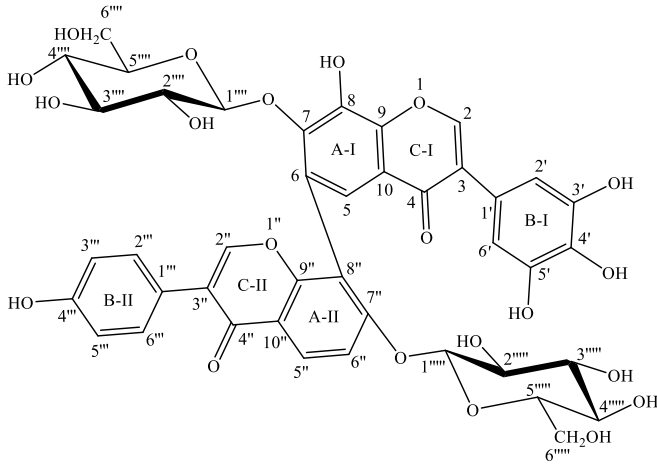


Şekil 4.27. 5,5'',7''-trihidroksi-3,7-dimetoksi-4',4'''-*O*-biflavon bileşiğinin 3.64-3.90 ile 0-200 arası HMBC spektrumu.



**Şekil 4.28.** 5,5'',7''-trihidroksi-3,7-dimetoksi-4',4'''-*O*-biflavon bileşiğinin ESI-MS ve QTOF-MS spektrumu.

**4.2.5. 5 Numaralı Bileşik (K-2-3): (8,3',4',5'-tetrahidroksi-7-O- $\alpha$ -glukosil izoflavon)-6-8''-(4'''-hidroksi-7''-O- $\alpha$ -glukosil izoflavon) biflavon**



**Şekil 4.29.** (8,3',4',5'-tetrahidroksi-7-O- $\alpha$ -glukosil izoflavon)-6-8''-(4'''-hidroksi-7''-O- $\alpha$ -glukosil izoflavon) biflavon bileşiğinin yapısı.

Bileşik sarı renkli olup, 254 nm UV ışık altında kahverengi, 366 nm UV ışık altında mor olarak gözlenmiştir. Amonyak buharına tutulup ardından NA belirteci püskürtüldüğünde 254 nm'de kahverengi, 366 nm'de sarı renk gözlenmiştir. TLC plakasında EtOAc:MeOH (3:2) çözücü sistemi kullanılarak gözlenmiştir.

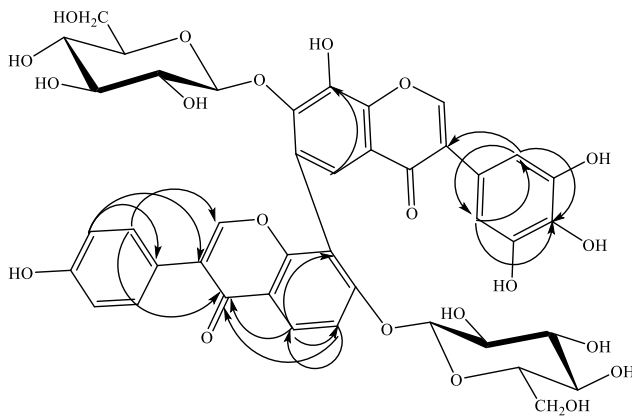
Bileşiğin  $^1\text{H}$  NMR spektrumunda ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm), 500 MHz, Şekil 4.32) A-I halkasında 6.74 ppm'de (1H, brs) H-5 protonu singlet şeklinde, B-I halkasında 6.56 ppm'de (1H, brs) H-2' protonu singlet ve 6.41 ppm'de (1H, d,  $J= 1.4$  Hz) H-6' protonu da doublet şeklinde gözlenmiştir. Bileşiğin A-II halkasındaki 7.88 ppm'deki (1H, d,  $J= 8.7$  Hz) H-5'' protonu 6.99 ppm'deki (1H, d,  $J= 8.8$  Hz) H-6'' proton ile orto etkileşimi, 7.78 (1H, d,  $J= 8.6$  Hz) H-2''' protonu 6.84 ppm'deki (1H, d,  $J= 8.6$  Hz) H-3''' protonu ile orto etkileşimi ve 7.78 (1H, d,  $J= 8.6$  Hz) H-6''' protonu 6.84 ppm'deki (1H, d,  $J= 8.6$  Hz) H-5''' protonu ile orto etkileşimi yaptığı gözlenmiştir.  $^1\text{H}$  NMR spektrumunun aromatik bölgesinde gözlenen çok sayıda proton etkileşimi yapının biflavonoid yapısı olduğunu düşündürmüştür.  $^1\text{H}$  NMR etkileşimleri göz önüne alındığında A-I halkası 6-7-8 trisubstitue, A-II halkası 7''-8'' disubstitue, B-I halkasında 3'-4'-5' trisubstitue ve B-II halkasında ise 1'''-4''' disubstitue yapıda olduğunu kanıtlamaktadır. Bunun yanı sıra 5.31 ppm'de (1H, d,  $J= 3.7$  Hz) anomerik H-1''' protonu ve 5.02 ppm'de (1H, d,  $J= 4.7$  Hz) anomerik H-1'''' protonu gözlenirken, 3.30-4.05 ppm aralığında şeker protonları gözlenmiştir. Anomerik H-1''' protonunun 3.7 Hz'lik bir

yarılma ile dublet ve anomerik H-1<sup>''''</sup> protonunun 4.7 Hz'lik bir yarılma ile dublet olarak gözlenmesi, moleküle bağlı iki şeker grubunun;  $\alpha$ -şeker yapısında olduğunu desteklemiştir.

<sup>13</sup>C NMR, APT ve HSQC spektrumuna (CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  (ppm), 500 MHz, Şekil 4.33) bakıldığında, 110.56 ppm'de (C-5), 132.36 ppm'de (C-2'), 128.34 ppm'de (C-6'), 121.24 ppm'de (C-5''), 106.57 ppm'de (C-6''), 130.13 ppm'de (C-2''' ve C-6''') ve 116.53'de (C-3''' ve C-5''') aromatik karbonlar gözlenirken, 179.19 ppm'de (C-4) ve 179.18 ppm'de (C-4'') karbonil karbonları gözlenmiştir. Bunun yanı sıra 93.90 ppm'de (C-1''') ve 93.84 ppm'de (C-1''''') anomerik karbon, 69.33-74.51 ppm (C-2''', C-3''', C-4''', C-5''', C-6''', C-2''''', C-3''''', C-4''''', C-5'''''' ve C-6''''') aralığında şeker karbonları gözlenmiştir.

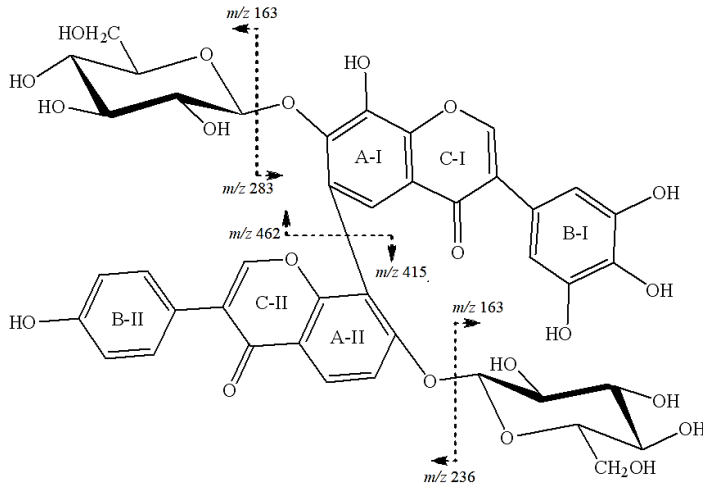
Bileşiğin <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spektrumunda (CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  (ppm), 500 MHz, Şekil 4.34) B-I halkasında 6.56 ppm'de H-2' protonunun 6.41 ppm'deki H-6' protonuyla; A-II halkasındaki 7.88 ppm'de H-5'' protonlarının 6.99 ppm'deki H-6'' etkileşimi ile 7.78 ppm'deki (H-2''' ve H-6''') protonlarının 6.84 ppm'deki (H-3''' ve H-5''') protonlarının etkileşimi gözlenmiştir.

HMBC spektrumuna (CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  (ppm), 500 MHz, Şekil 4.35) bakıldığında, 5.31 ppm'deki H-1'''' anomerik protonun, 99.29 ppm'deki C-6 karbonuyla yaptığı etkileşim şeker moleküllerinin birinin A-I halkasına 7 konumundan bağlı olduğunu göstermiştir. Ayrıca, 6.99 ppm'deki H-6'' protonunun, 93.84 ppm'deki C-1'''' anomerik karbonla HMBC etkileşiminin gözlenmesi, yapıdaki diğer şeker molekülünün A-II halkasına 7'' konumundan bağlı olduğunu kanıtlamıştır. Bununla birlikte, 6.99 ppm'deki H-6'' protonunun 99.29 ppm'deki C-6 karbonuyla olan etkileşimide; iki flavonoid yapısının C-6-C-8'' konumlarından birbirine bağlı olduğunu desteklemiştir. Molekülün diğer etkileşimleri Şekil 4.30'da gösterilmiştir.



**Şekil 4.30.** (8,3',4',5'-tetrahidroksi-7-O- $\alpha$ -glukosil izoflavon)-6-8''-(4'''-hidroksi-7''-O- $\alpha$ -glukosil izoflavon) biflavon bileşiğinin HMBC etkileşimleri.

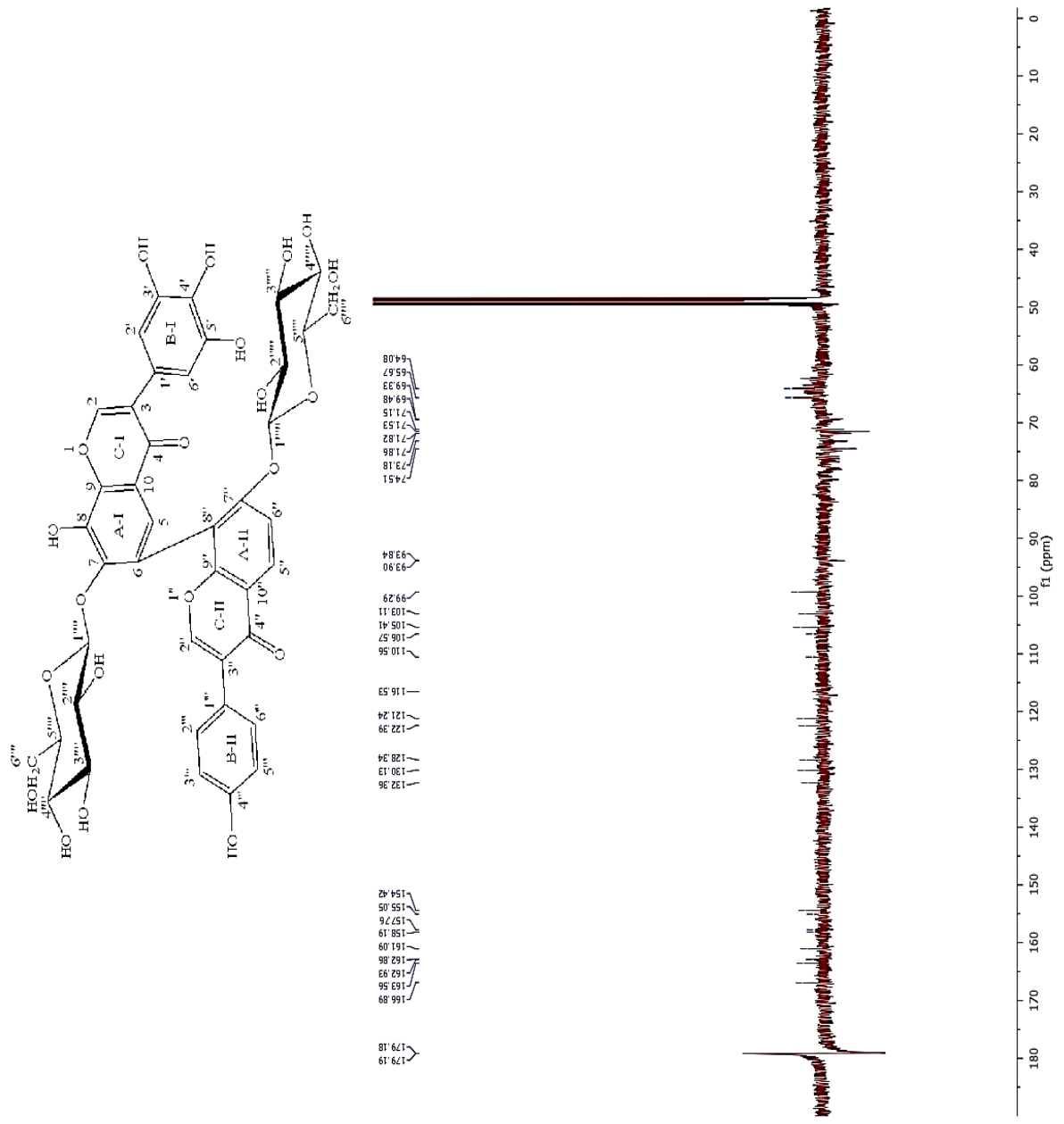
Bileşğin ESI-MS spektrumuna (Şekil 4.36) bakıldığında moleküler iyon piki  $m/z$  877  $[M-1]^+$  (% 100) olarak gözlenmesi bileşğin kapalı formülünün  $C_{42}H_{38}O_{21}$  olduğunu desteklemiştir. Bununla birlikte  $m/z$  551  $[(M-1)-(2xC_6H_{11}O_5)]^+$  (% 29.77) pikinin gözlenmesi iki şeker molekülünün ayrılışını göstermiştir. Bunun yanı sıra  $m/z$  463  $[(M+1)-(C_{21}H_{19}O_9)]^+$  (% 22.82) pikinin gözlenmesi şeker bağlı II. flavonoid yapısının (A-II, B-II, C-II) ayrılışının göstermiş ve bu pik önemli moleküler bölünme piki yapının biflavonoid yapısında olduğunu ispatlamıştır. Diğer önemli moleküler bölünme pikleri spektroskopik veriler kısmında gösterilmiştir.



**Şekil 4.31.** (8,3',4',5'-tetrahidroksi-7-O- $\alpha$ -glukosil izoflavon)-6-8''-(4'''-hidroksi-7''-O- $\alpha$ -glukosil izoflavon) biflavon bileşğinin kütle spektrumunda gözlenen bölünmeleri.

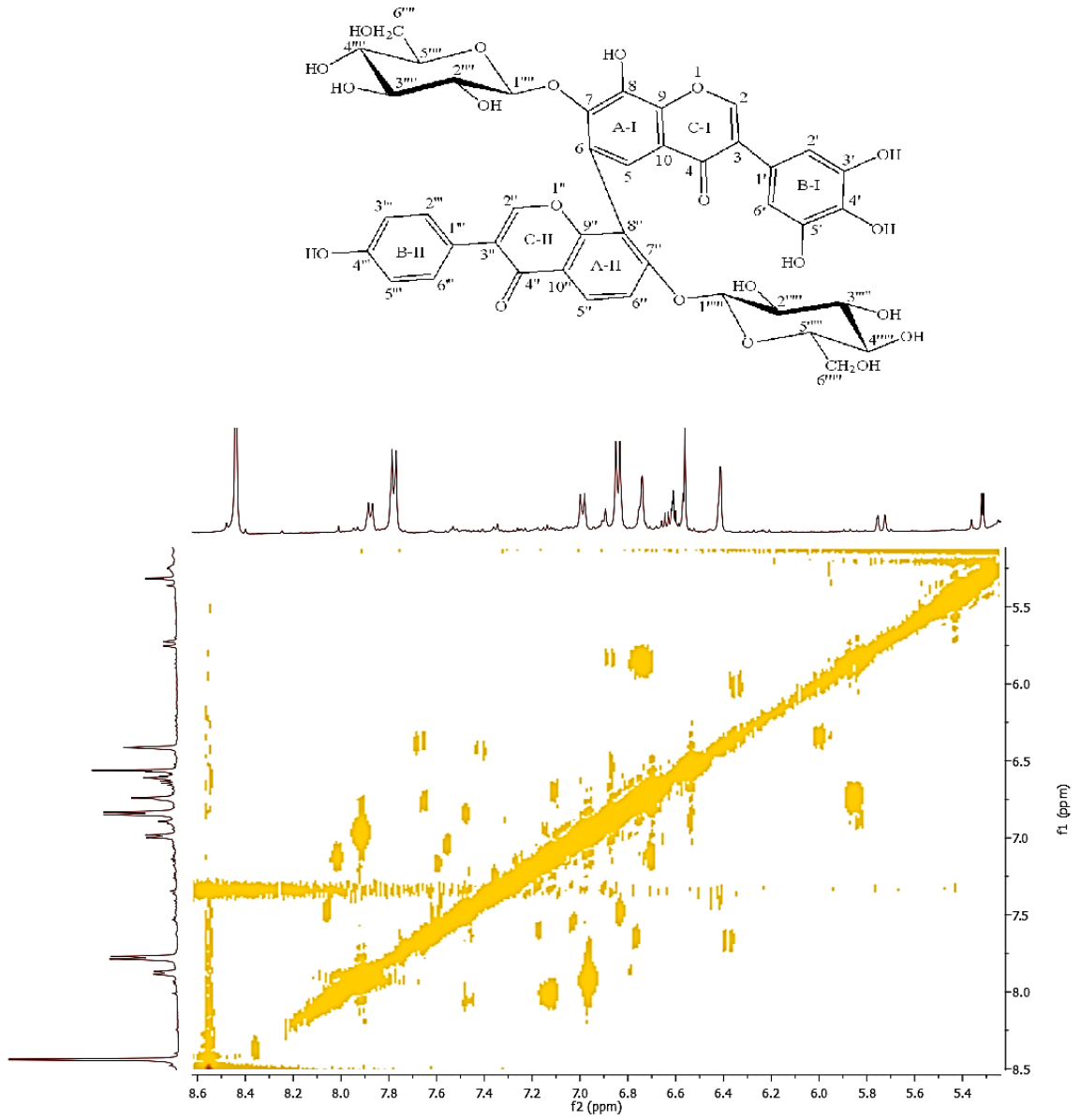
Tüm spektroskopik verilere ve literatür araştırmalarına (Mun ve Mun S 2015, Xiao ve ark. 2005, Rahman ve ark. 2002, Xu ve ark. 1999, Agrawal 1992) göre bileşğın (8,3',4',5'-tetrahidroksi-7-O- $\alpha$ -glukosil izoflavon)-6-8''-(4'''-hidroksi-7''-O- $\alpha$ -glukosil izoflavon) biflavon olduğu kanıtlanmıştır. Bu bileşik *C. italicum* bitkisinden ilk defa izole edilmiştir.



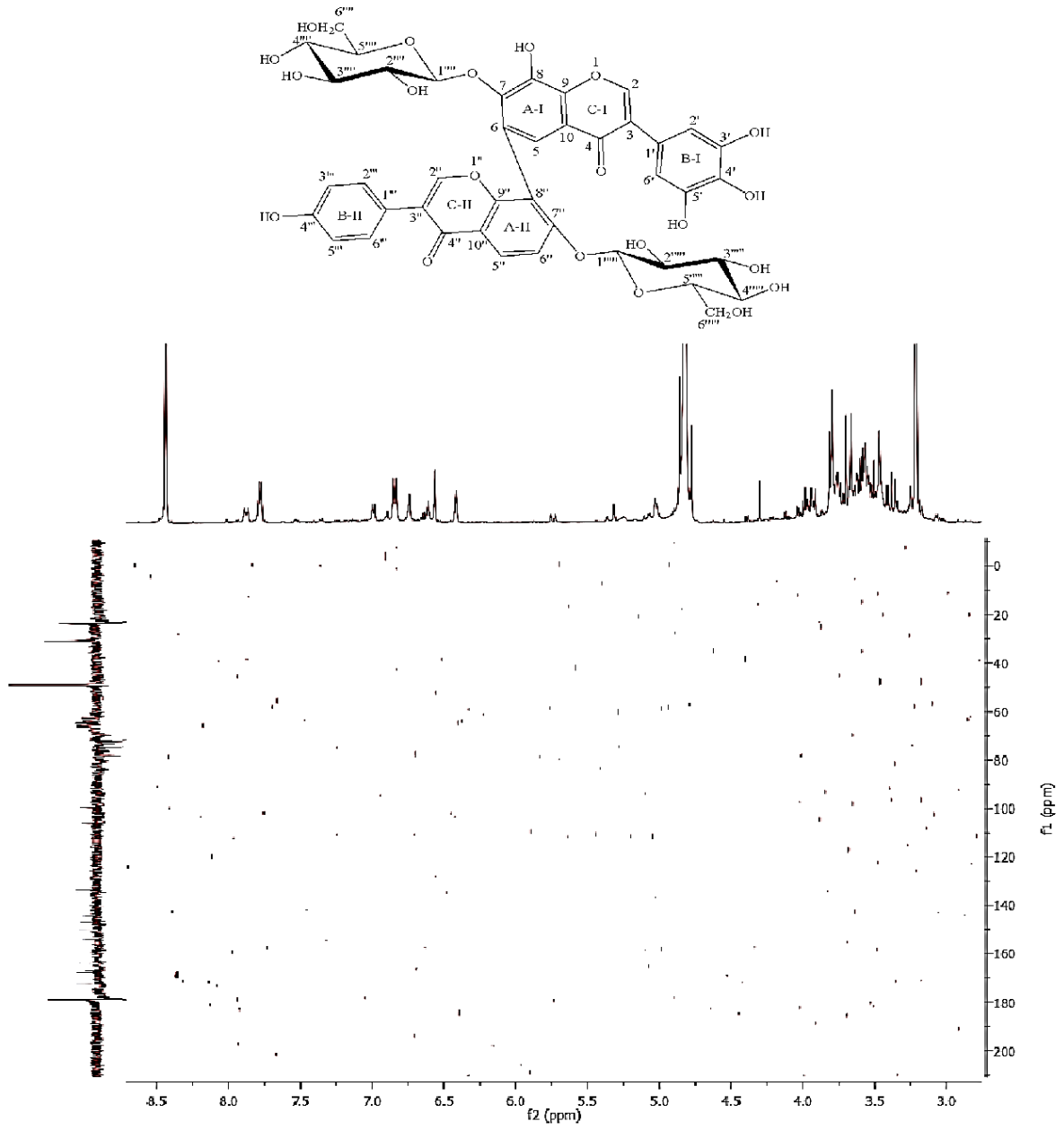


Şekil 4.33. (8,3',4',5'-tetrahidroksi-7-O- $\alpha$ -glukosil izoflavon)-6-8''-(4'''-hidroksi-7''-O- $\alpha$ -glukosil izoflavon) biflavon bileşiminin APT spektrumu.

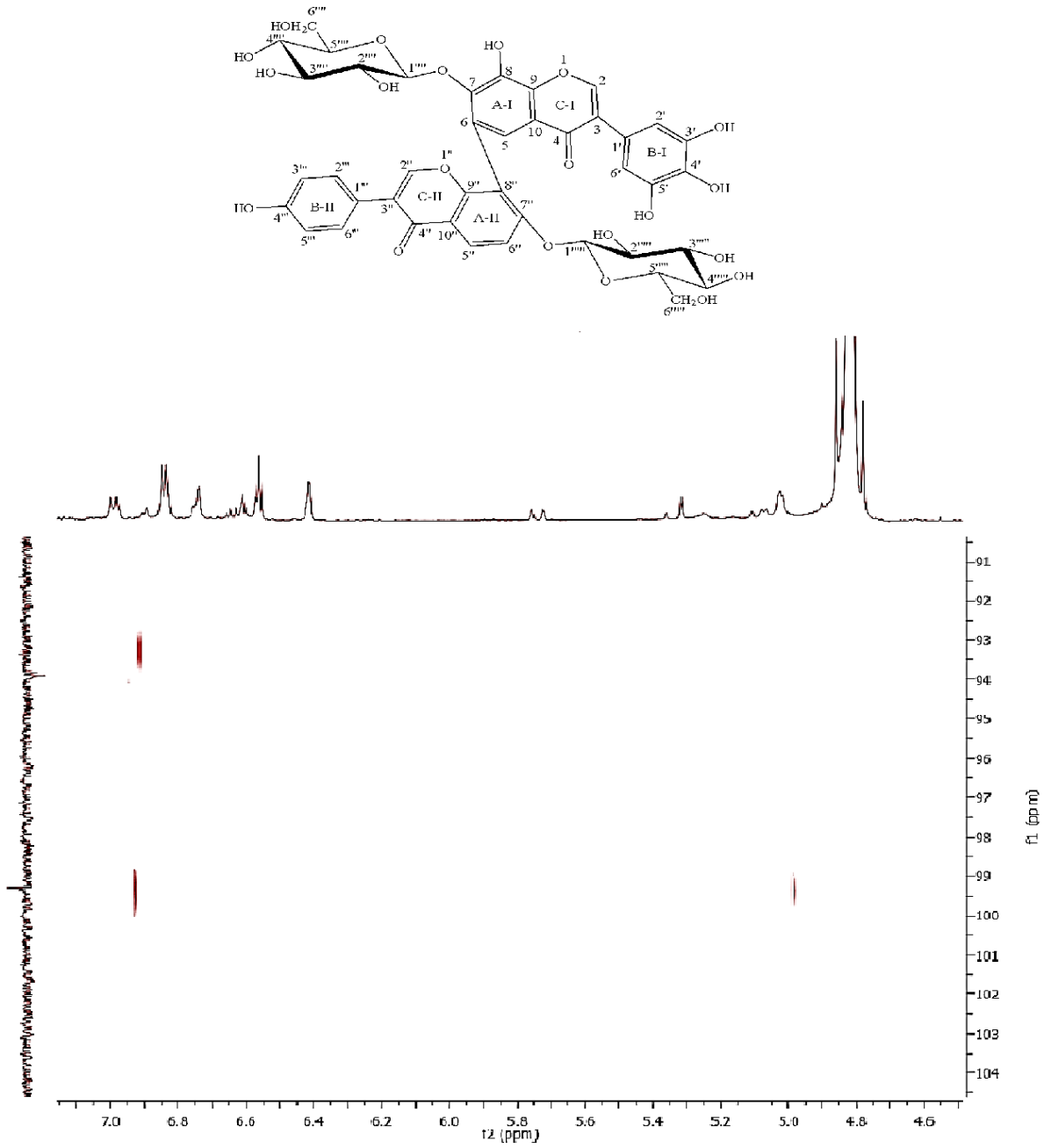




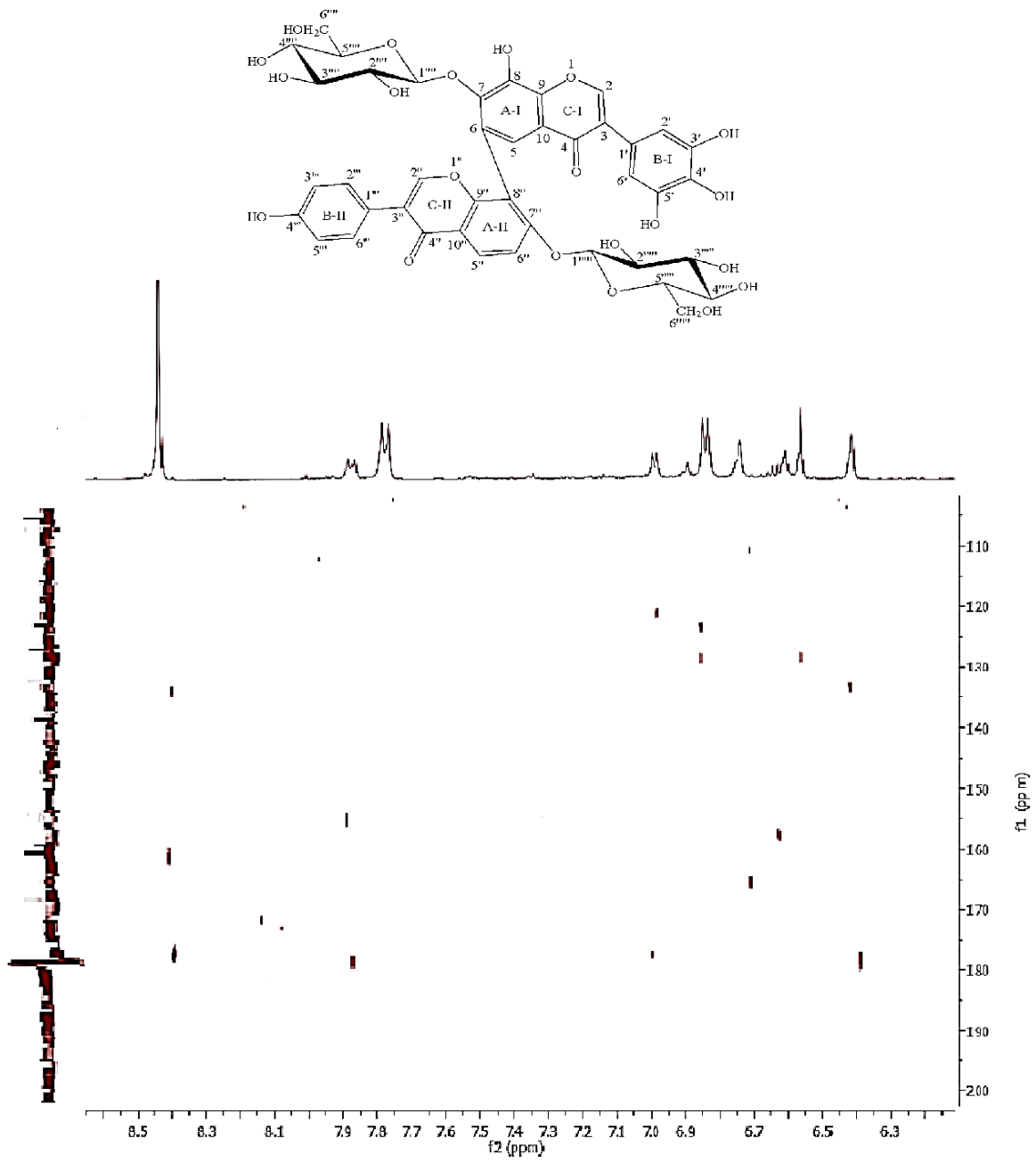
**Şekil 4.34.** (8,3',4',5'-tetrahidroksi-7-*O*- $\alpha$ -glukosil izoflavon)-6-8''-(4'''-hidroksi-7''-*O*- $\alpha$ -glukosil izoflavon) biflavon bileşiğinin  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spektrumu.



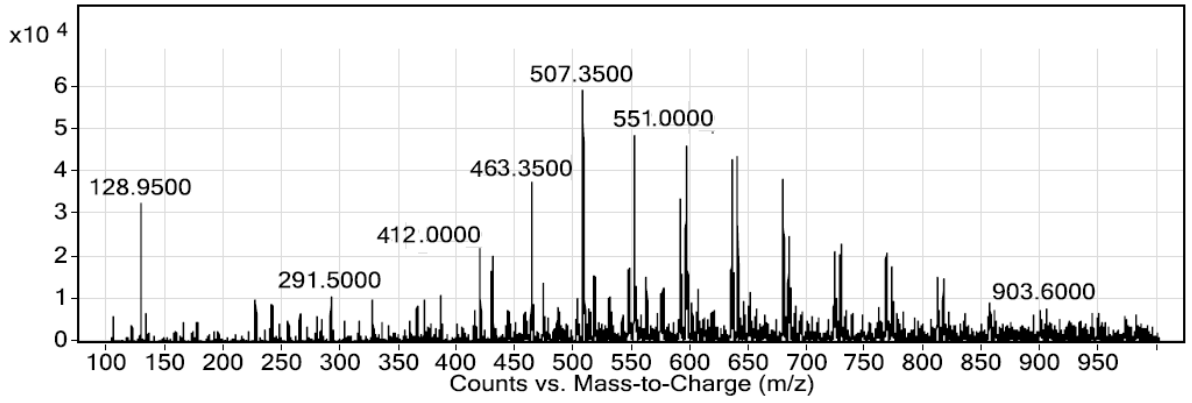
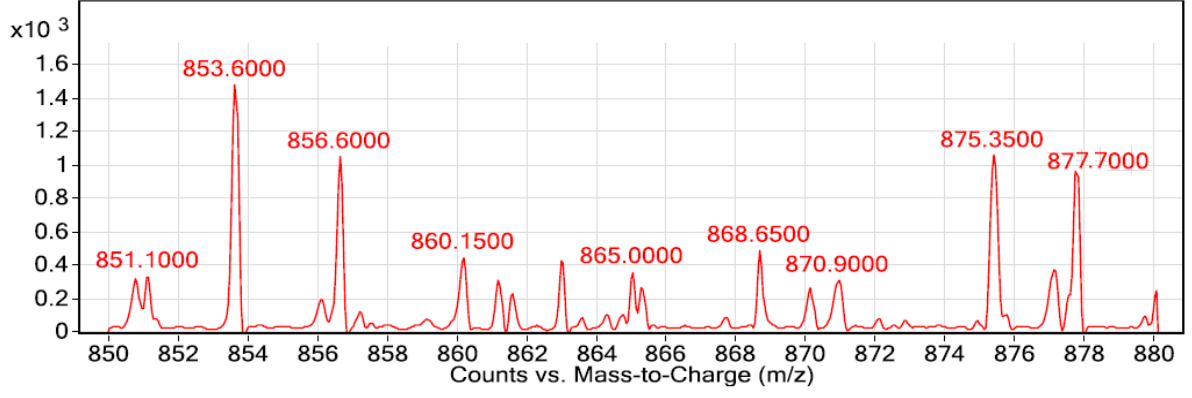
Şekil 4.35. (8,3',4',5'-tetrahidroksi-7-O- $\alpha$ -glukosil izoflavon)-6-8''-(4'''-hidroksi-7''-O- $\alpha$ -glukosil izoflavon) biflavon bileşiğinin HMBC spektrumu.



Şekil 4.36. (8,3',4',5'-tetrahidroksi-7-*O*- $\alpha$ -glukosil izoflavon)-6-8''-(4'''-hidroksi-7''-*O*- $\alpha$ -glukosil izoflavon) biflavon bileşiğinin 4.60-7.00 ile 91-104 arası HMBC spektrumu.

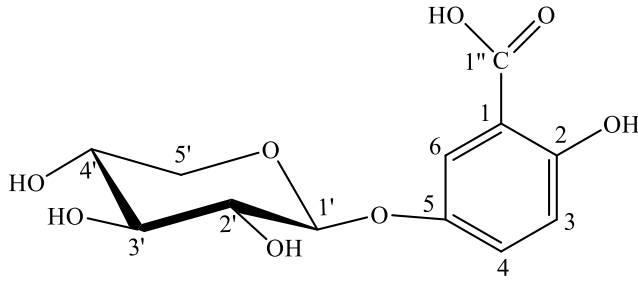


Şekil 4.37. (8,3',4',5'-tetrahidroksi-7-*O*- $\alpha$ -glukosil izoflavon)-6-8''-(4'''-hidroksi-7''-*O*- $\alpha$ -glukosil izoflavon) biflavon bileşiğinin 4.30-5.50 ile 110-200 arası HMBC spektrumu.



**Şekil 4.38.** (8,3',4',5'-tetrahidroksi-7-*O*- $\alpha$ -glukosil izoflavon)-6-8''-(4'''-hidroksi-7''-*O*- $\alpha$ -glukosil izoflavon) biflavon bileşiminin ESI-MS spektrumu.

#### 4.2.6. 6 Numaralı Bileşik (K-2-2-1): Gentisik asit-5-*O*- $\beta$ -ksilopiranosit



Şekil 4.39. Gentisik asit-5-*O*- $\beta$ -ksilopiranosit bileşiğinin yapısı.

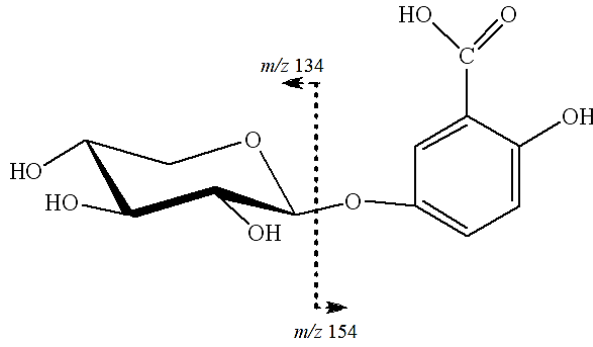
Bileşik beyaz renkli olup, 254 nm ve 366 nm UV ışık altında mavi olarak gözlenmiştir. Amonyak buharına tutulup ardından NA belirteci püskürtüldüğünde de 254 nm ve 366 nm'de mavi renk gözlenmiştir. TLC plakasında ki çözücü sistemi EtOAc:MeOH:Benzen (3:2:1)'dir.

Bileşiğin  $^1\text{H}$  NMR spektrumunda ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm), 500 MHz, Şekil 4.39) 7.12 ppm'deki (1H, dd,  $J= 3.1, 8.8$  Hz) H-4 protonun 6.75 ppm'deki (1H, d,  $J= 8.8$  Hz) H-3 protonu ile orto etkileşimi ve 7.61 ppm'deki (1H, d,  $J= 3.07$  Hz) H-6 protonu ile meta etkileşimi yaptığı görülmüştür. Ayrıca 6.75 ppm'deki H-3 protonunun 7.12 ppm'deki H-4 protonuyla yaptığı orto etkileşimi ile 7.61 ppm'deki H-6 protonunun 7.12 ppm'deki H-4 protonuyla yaptığı meta etkileşimi  $^1\text{H}$  NMR spektrumuyla tespit edilmiştir. Bu etkileşimlerin gözlemlenmesi yapıda 1,2,5 tri substitue aromatik halkanın varlığını kanıtlamıştır. Bunun yanı sıra 4.80 ppm'deki (1H, d,  $J= 7.4$  Hz) anomerik H-1' protonu gözlenirken, 3.40-4.15 ppm aralığında (H-2', H-3', H-4' ve H-5') dört şeker protonu gözlenmiştir.

$^{13}\text{C}$  NMR, APT ve HSQC spektrumuna ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm), 500 MHz, Şekil 4.40) bakıldığında, 119.57 ppm'de (C-3), 132.44 ppm'de (C-4), 119.59 ppm'de (C-6), 117.56 ppm'de (C-1) aromatik karbonları gözlenirken, 157.58 ppm'de (C-2) ve 143.06 ppm'de (C-5) oksijene bağlı aromatik karbonlar gözlenmiştir. Bunun yanında 103.74 ppm'de (C-1') anomerik karbon ile 64.26-78.01 ppm aralığında (C-2', C-3', C-4' ve C-5') dört şeker karbonu ve 179.77 ppm'de (C-1'') karbonil karbonu gözlenmiştir.

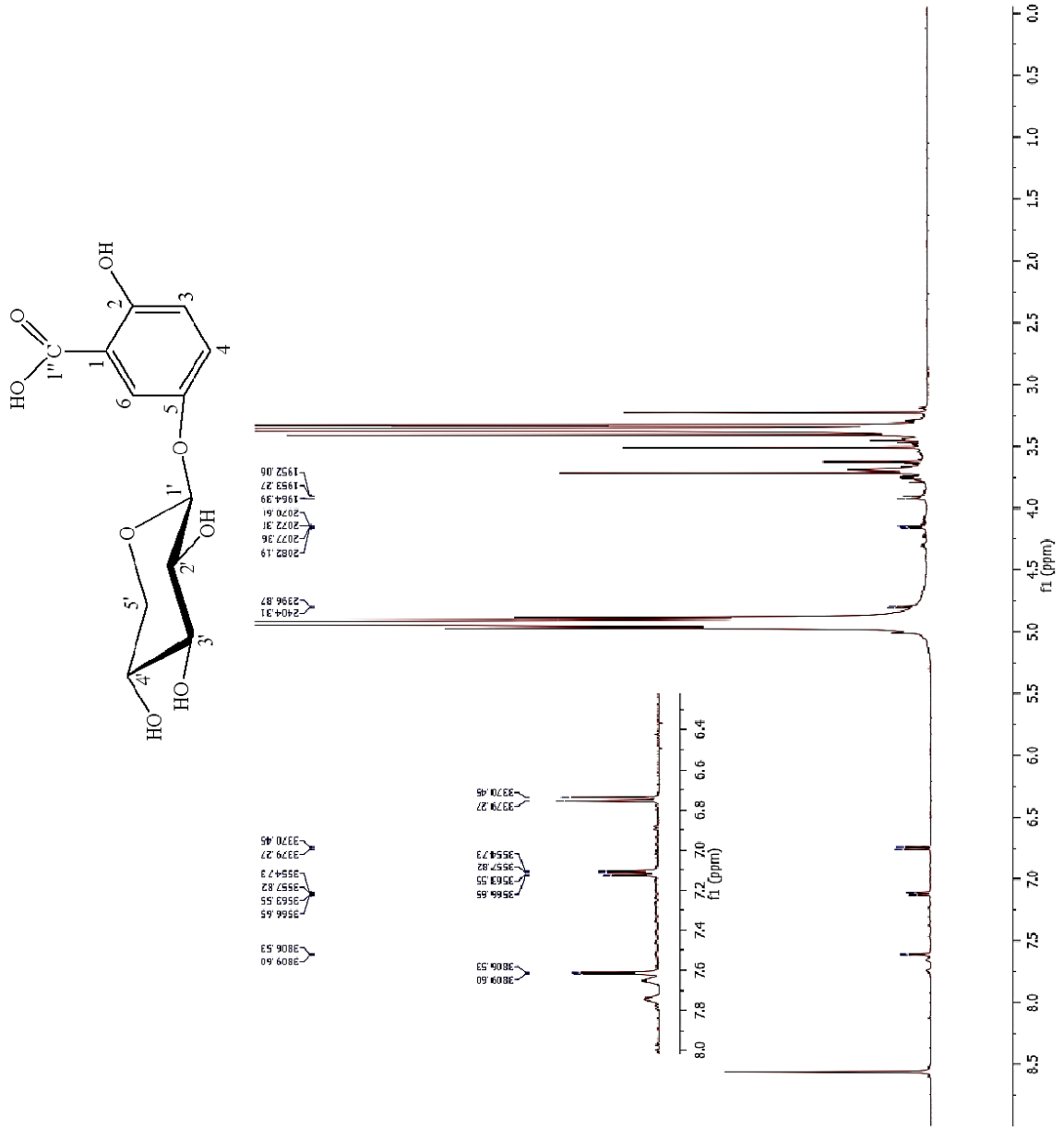
Bileşiğin ESI-MS spektrumunda (Şekil 4.41)  $m/z$  284  $[\text{M}-2]^+$  (% 64.84) pikinin görülmesi molekülün  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_8$  kapalı formülüne sahip olduğu gözlenmiştir. Molekülün diğer önemli parçalanma ürünleri  $m/z$  153  $[(\text{M}+1)-(\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_4)]^+$  (% 35.10) piki moleküldeki beş

karbonlu şekerin ayrılışını ispatlarken;  $m/z$  133  $[(M+1)-(C_7H_6O_4)]^+$  (% 48.95) piki moleküldeki beş karbonlu şekerin varlığını ispatlamıştır.



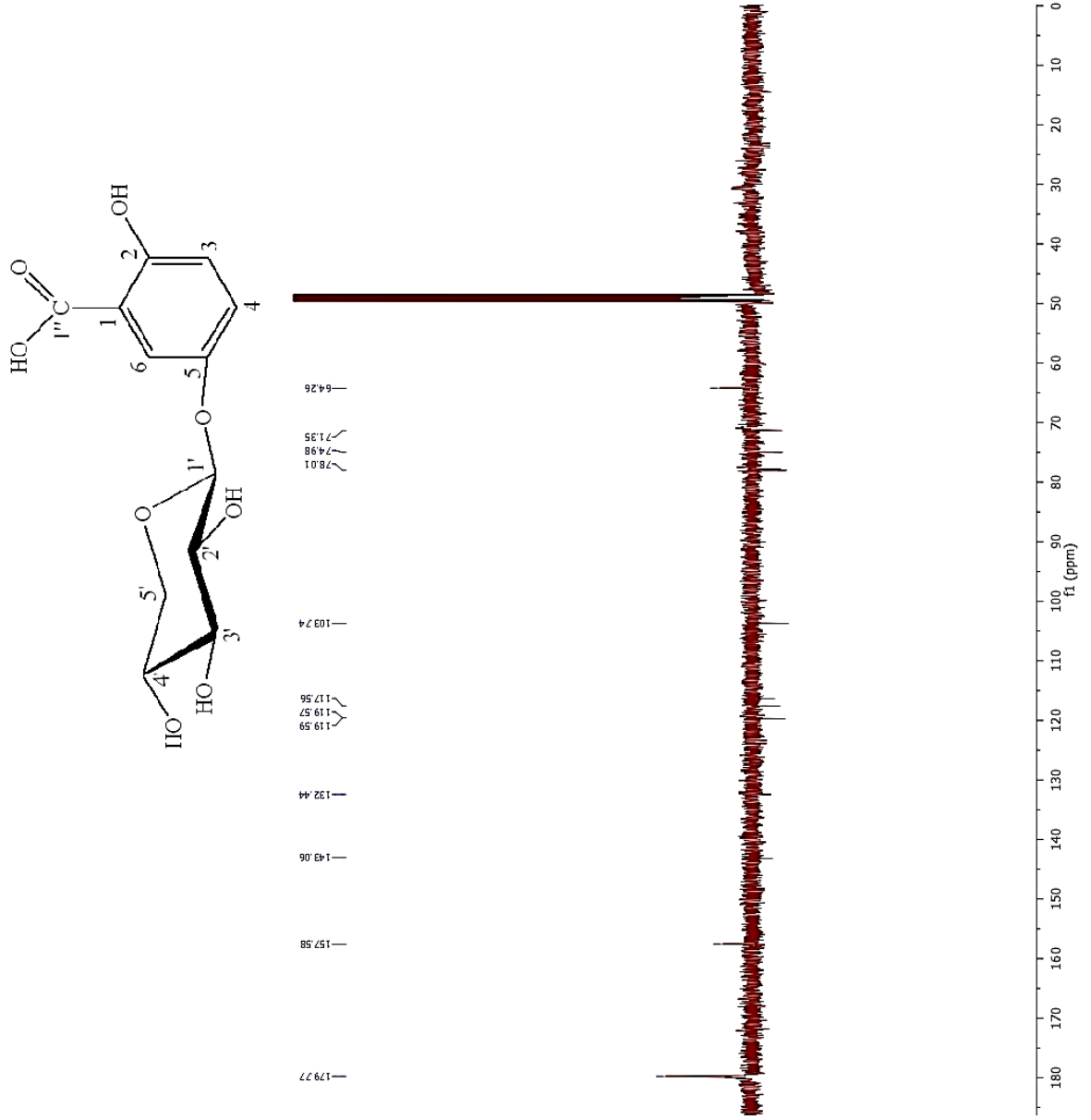
**Şekil 4.40.** Gentisik asit-5-*O*-β-ksilopiranosit bileşiğin kütle spektrumunda gözlenen moleküler bölünmeler.

Bütün spektroskopik veriler değerlendirildiğinde, bu bileşiğin gentisik asit-5-*O*-β-ksilopiranosit olduğu kanıtlanmıştır. Bu bileşik *C. italicum* bitkisinden ilk defa izole edilmiştir. Literatür araştırılması yapıldığında gentisik asit-5-*O*-β-ksilopiranosit bileşiği başka bitki türlerinden de daha önce izole edildiği görülmüştür (Li ve ark. 2014, Foyos ve ark. 2006). Bulduğumuz spektroskopik verileri belirtilen referanslardaki verilerle karşılaştırıldığında tamamen uyum içerisinde olduğu görülmüştür.

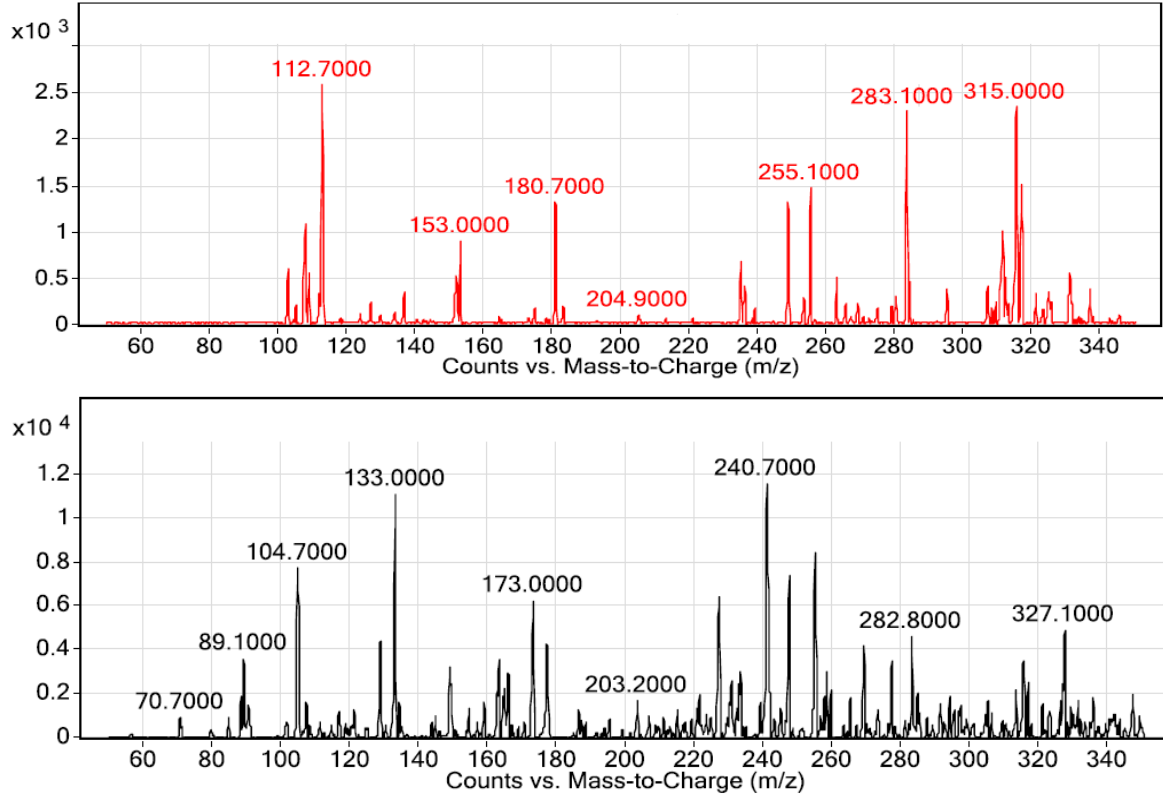


Şekil 4.41. Gentisik asit-5-O-β-ksilopiranosit bileşiğinin <sup>1</sup>H NMR spektrumu.



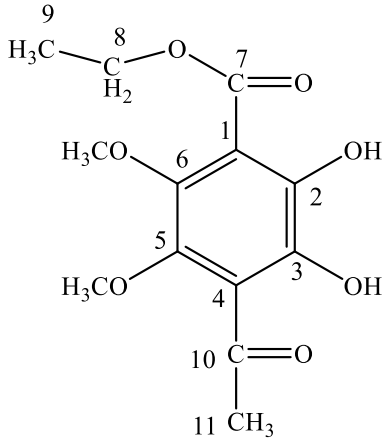


Şekil 4.42. Gentisik asit-5-O-β-ksilopiranosit bileşiğinin APT spektrumu.



Şekil 4.43. Gentisik asit-5-O- $\beta$ -ksilopiranosit bileşiğinin ESI-MS spektrumu.

#### 4.2.7. 7 Numaralı Bileşik (K-1-1): Etil-(2,3-dihidroksi-5,6-dimetoksi-4-asetil) benzoat



Şekil 4.44. Etil-(2,3-dihidroksi-5,6-dimetoksi-4-asetil) benzoat bileşiğinin yapısı.

Bileşik sarı renkli olup, 254 nm UV ışık altında kahverengi, 366 nm UV ışık altında koyu mor olarak gözlenmiştir. Amonyak buharına tutulup ardından NA belirteci püskürtüldüğünde 254 nm’de kahverengi, 366 nm’de sarı renk gözlenmiştir. TLC plakasında EtOAc:MeOH (5:1) çözücü sistemi kullanılarak tespit edilmiştir.

Bileşiğin  $^1\text{H}$  NMR spektrumunda ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm), 500 MHz, Şekil 4.44) 1.20 ppm’de (3H, t,  $J=7$  Hz) H-9 protonunun triplete yarılanması ve 3.63 ppm’de (2H, q,  $J=7$  Hz) H-8 protonunun quartete yarılanması, bu protonların komşu olduğunu düşündürmüştür. Bunun yanı sıra, 1.91 ppm’de (3H, s) karbonil karbonuna bağlı metil protonları ve 3.37 ppm’de (6H, s) aromatik halkaya bağlı metoksi protonları da gözlenmiştir.

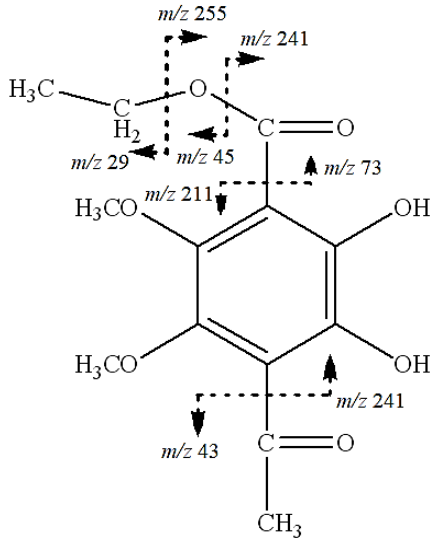
$^{13}\text{C}$  NMR, APT ve HSQC spektrumuna ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm), 500 MHz, Şekil 4.45) bakıldığında 115.88 ppm’de (C-1) ve 117.16 ppm’de (C-4) aromatik karbonları gözlenirken; 161.54 ppm’de (C-2 ve C-3) ve 154.68 ppm’de (C-5 ve C-6) oksijene bağlı aromatik karbonlar gözlenmiştir. Ayrıca 170.41 ppm’de (C-7) ve 180.42 ppm’de (C-10) karbonil karbonları, 24.24 ppm’de (C-9) ve 18.40 ppm’de (C-11) metil karbonları, 58.35 ppm’de (C-8) metilen ve 49.88 ppm’de ( $-\text{OCH}_3$ ) metoksi karbonları gözlenmiştir.

HMBC spektrumunda ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm), 500 MHz, Şekil 4.47) 3.37 ppm’de metoksi protonlarının 170.41 ppm’de C-7 ve 180.42 ppm’de C-10, 161.54 ppm’de C-2 ile C-3 ve 117.16 ppm’deki C-4 aromatik karbonları ile yaptığı etkileşim tespit edilmiştir. 1.91 ppm’de H-11 metil protonlarının 180.42 ppm’de C-10 karbonil karbonuyla etkileşimi metil grubunun karbonil grubuna bağlı olduğunu göstermiştir. Bunun yanında 1.20 ppm’de H-9 metil protonları 58.35 ppm’de C-8 ve 170.41 ppm’de C-7 karbonil karbonlarıyla yaptığı

etkileşimlerde HMBC spektrumunda gözlenmiştir. Bu etkileşimlerin gözlenmesi; aromatik halkada bağlı iki simetrik metoksi grubuyla, iki karbonil yapısını düşündürmüştür. Moleküldeki, diğer HMBC etkileşimleri spektral veriler kısmında belirtilmiştir.

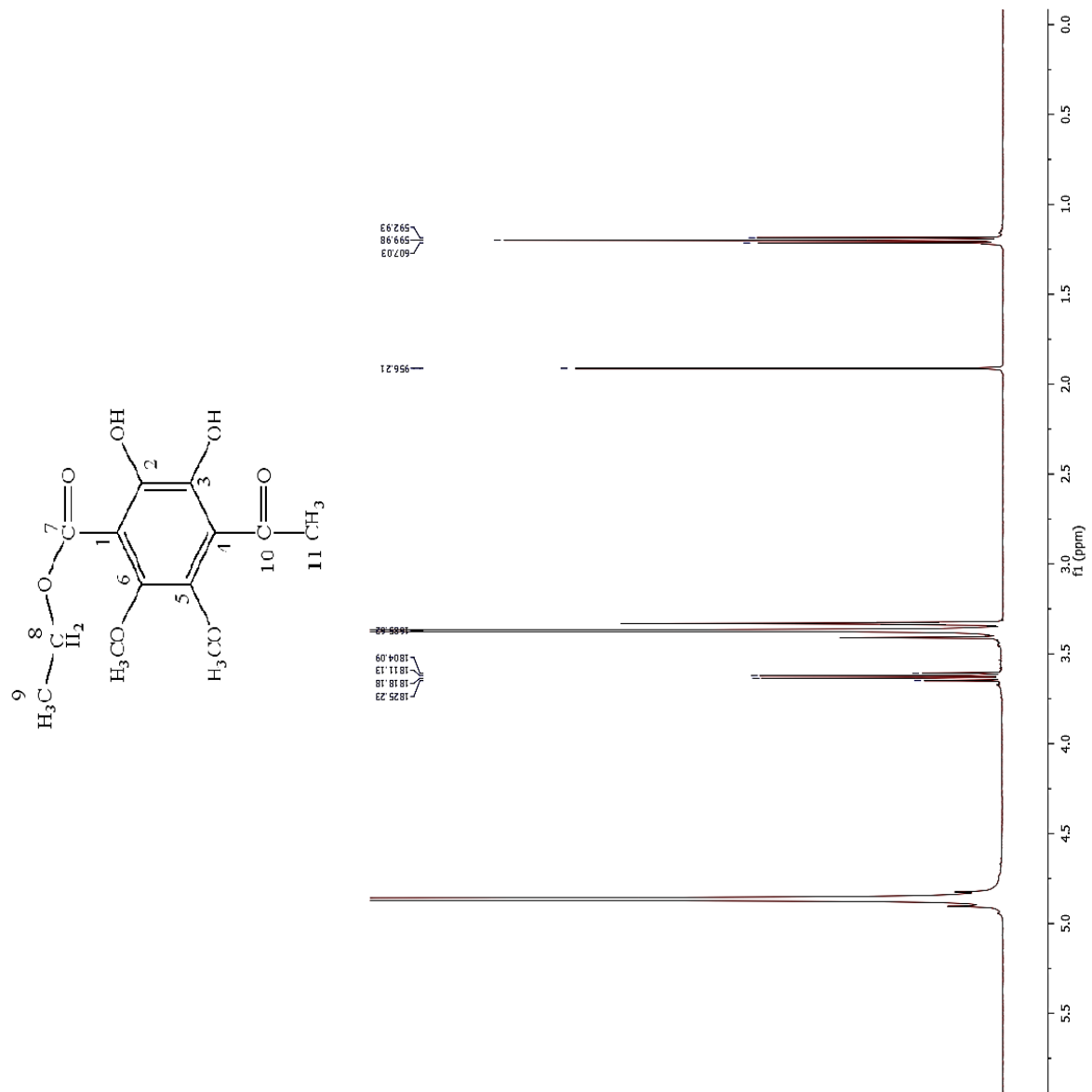
Bileşiğin  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spektrumunda ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm), 500 MHz, Şekil 4.46) 3.63 ppm'de H-8 protonlarının, 1.20 ppm'deki H-9 protonlarıyla etkileşimi gözlenmiştir.

Bileşiğin QTOF-MS spektrumuna (Şekil 4.48) bakıldığında moleküler iyon piki  $m/z$  283  $[\text{M}-1]^+$  (% 17.13) olarak gözlenmesi kapalı formülün  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_7$  olduğunu desteklemiştir. Bununla birlikte  $m/z$  255  $[(\text{M}+1)-(\text{CH}_2\text{CH}_3)]^+$  (% 55.67) pikinin gözlenmesi etil grubunun ayrılışını;  $m/z$  241  $[(\text{M}+2)-(\text{OCH}_2\text{CH}_3)]^+$  (% 7.49) pikinin gözlenmesi etoksit grubunun ve asetil grubunun ayrılışını desteklemiştir. Diğer önemli moleküler bölünme pikleri spektral verilerde verilmiştir.

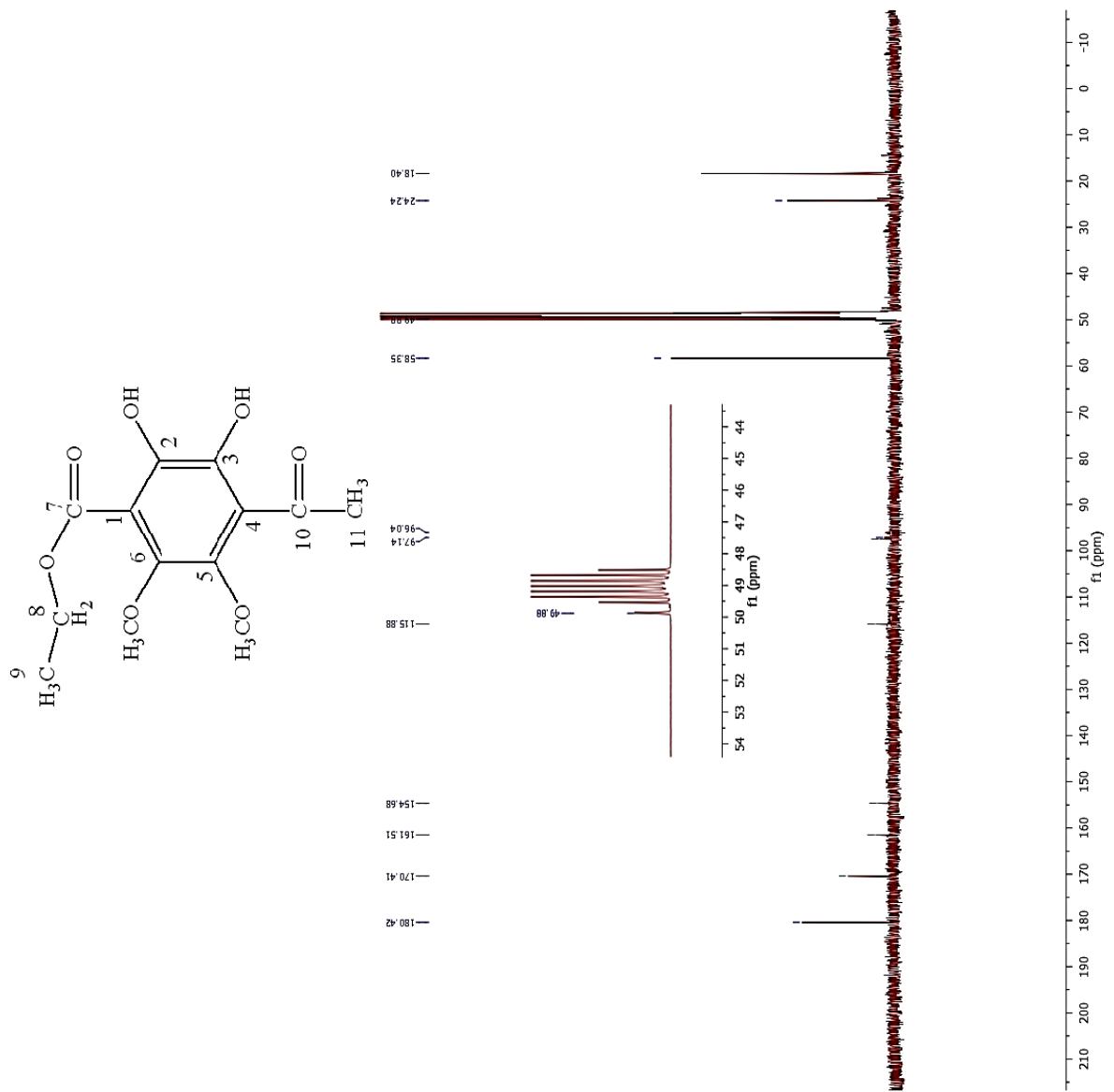


**Şekil 4.45.** Etil-(2,3-dihidroksi-5,6-dimetoksi-4-asetil) benzoat bileşiğinin kütle spektrumunda gözlenen moleküler bölünmeler.

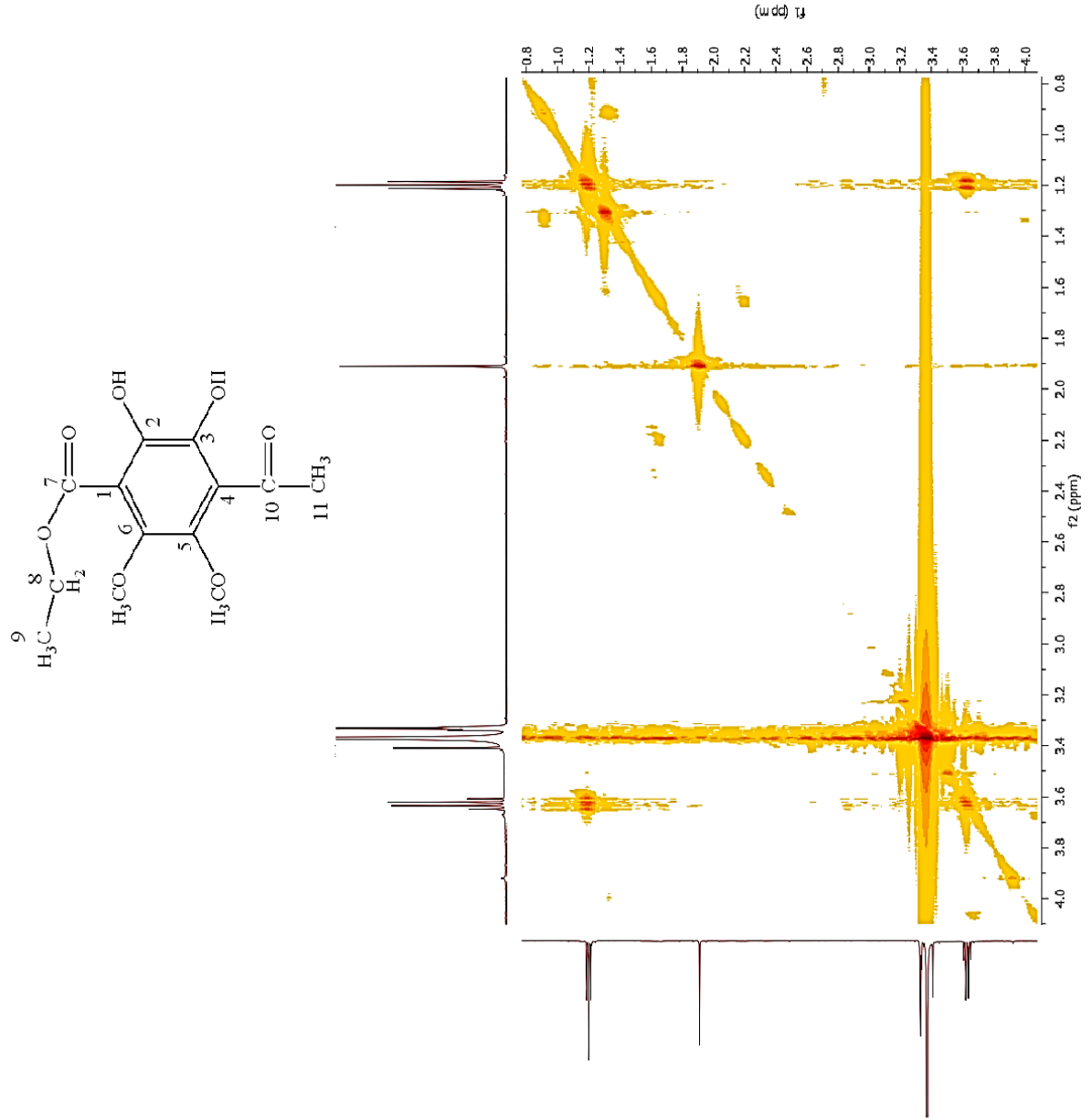
Tüm spektroskopik verilere ve yapılan literatür (Tanwar ve ark. 2015) araştırmalara göre bileşiğin, etil-(2,3-dihidroksi-5,6-dimetoksi-4-asetil) benzoat olduğunu kanıtlamıştır. Bu bileşik *C. italicum* bitkisinden ilk defa izole edilmiştir.



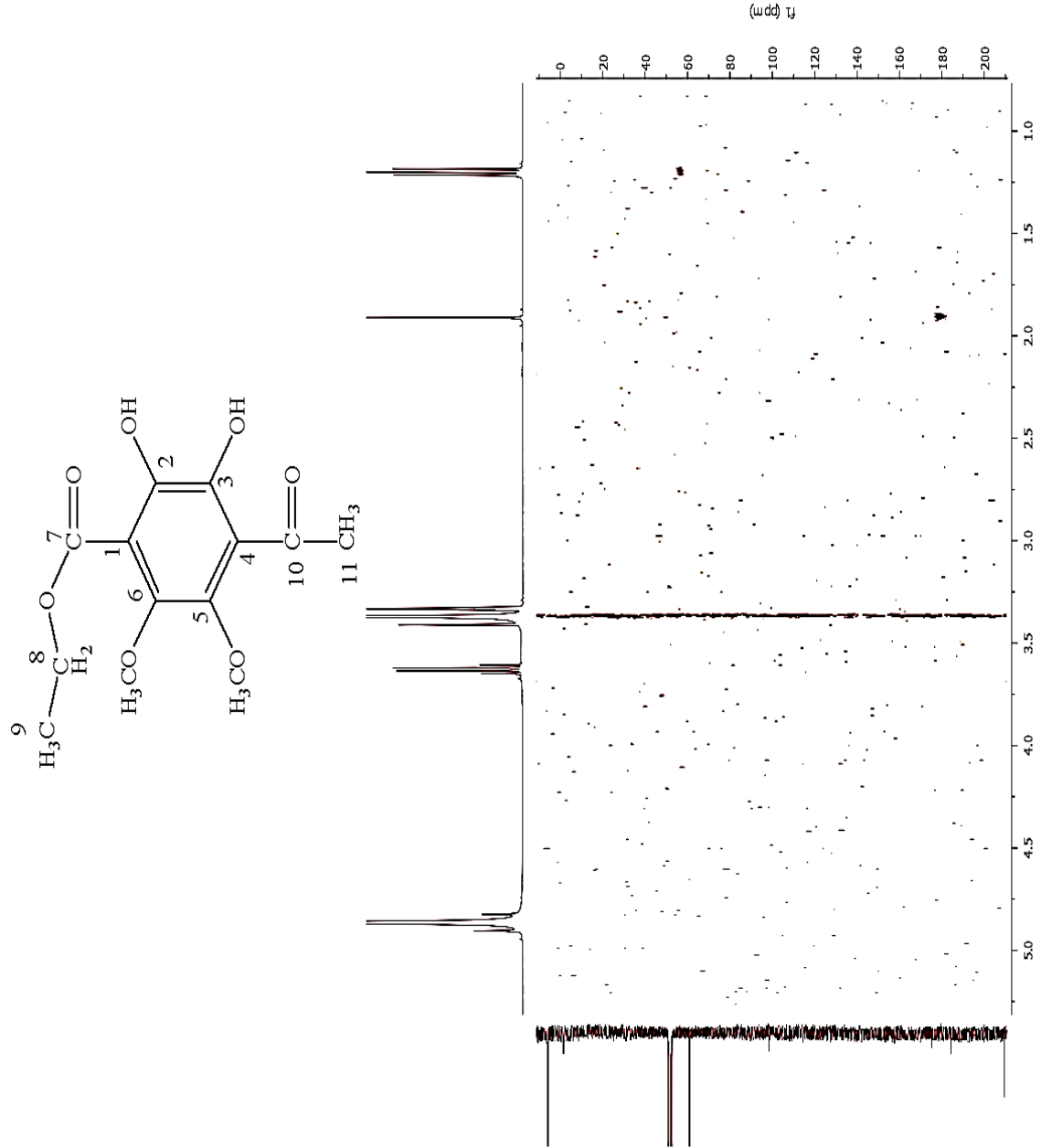
Şekil 4.46. Etil-(2,3-dihidroksi-5,6-dimetoksi-4-asetil) benzoat bileşiğinin <sup>1</sup>H NMR spektrumu.



Şekil 4.47. Etil-(2,3-dihidroksi-5,6-dimetoksi-4-asetil) benzoat bileşiğinin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu.

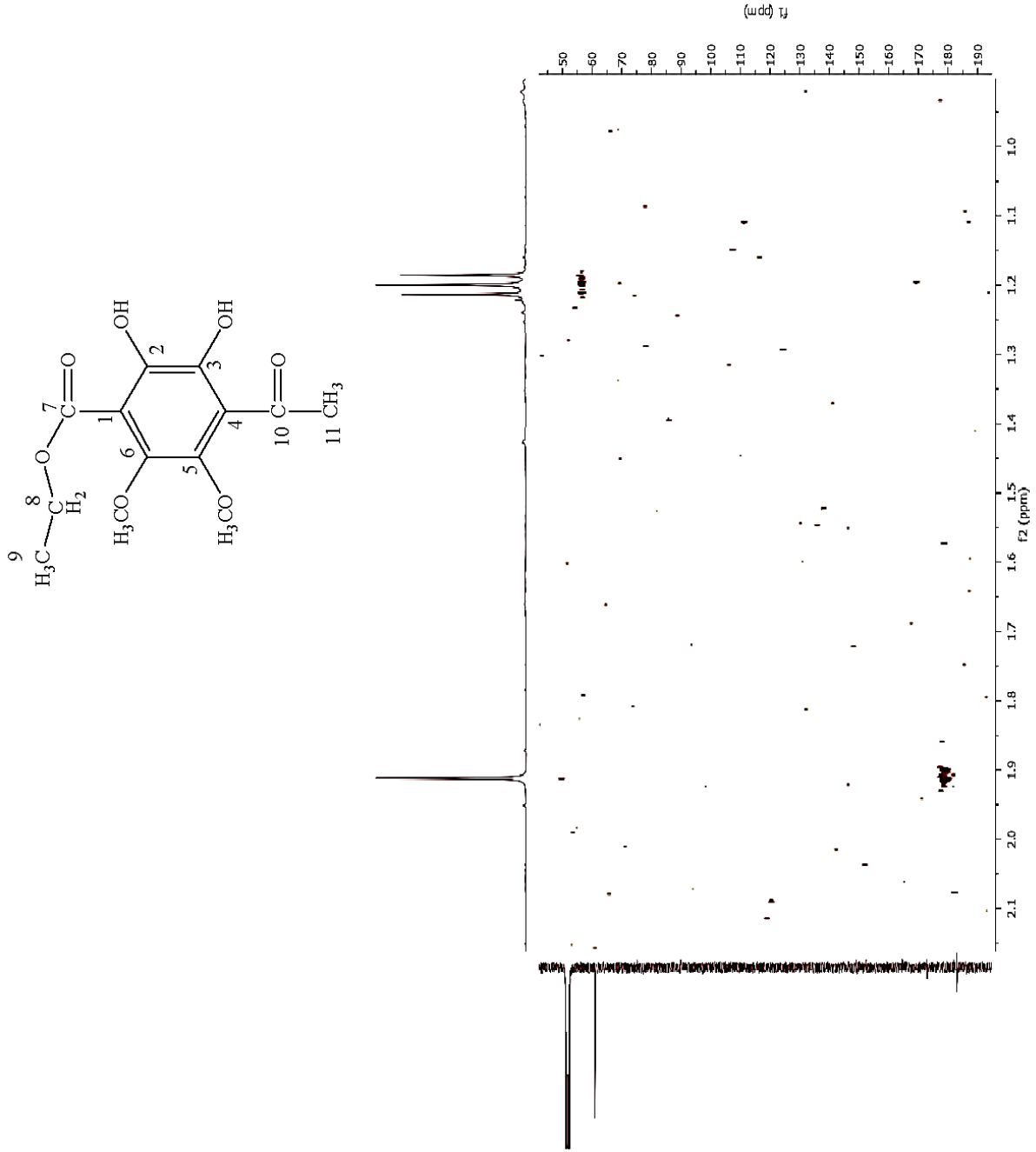


**Şekil 4.48.** Etil-(2,3-dihidroksi-5,6-dimetoksi-4-asetil) benzoat bileşiğinin  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spektrumu.

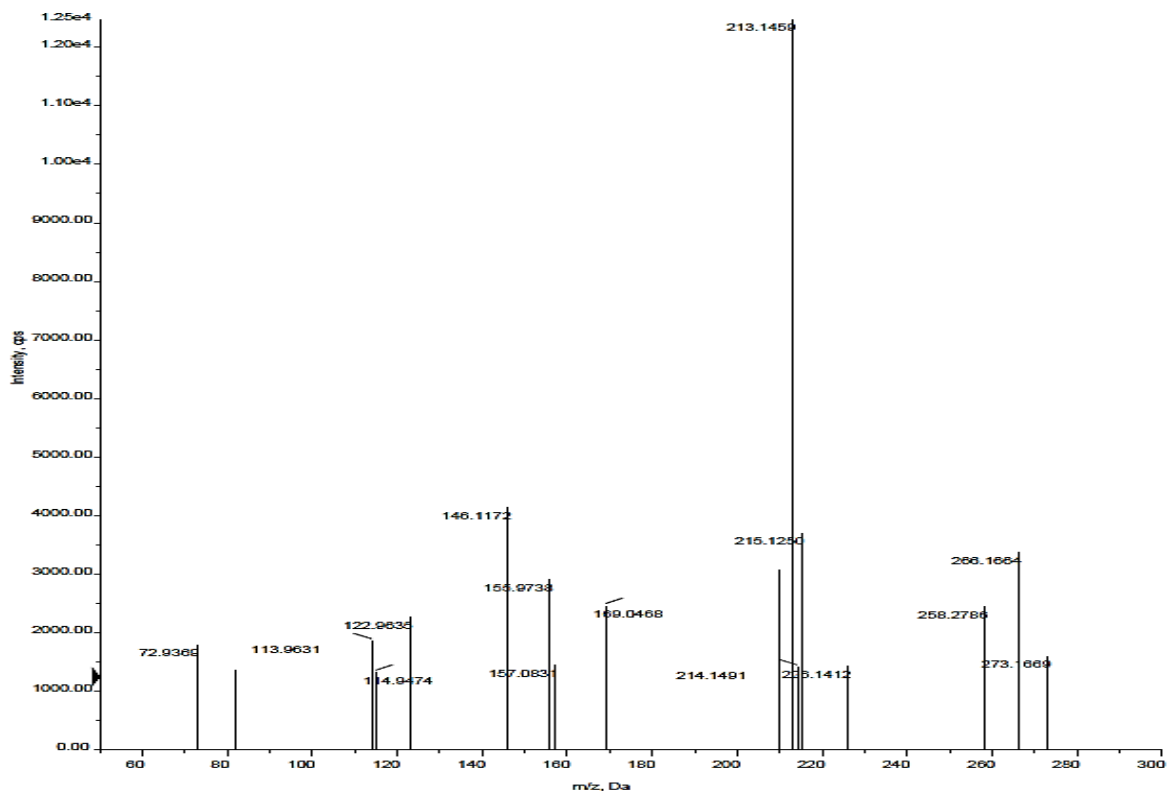
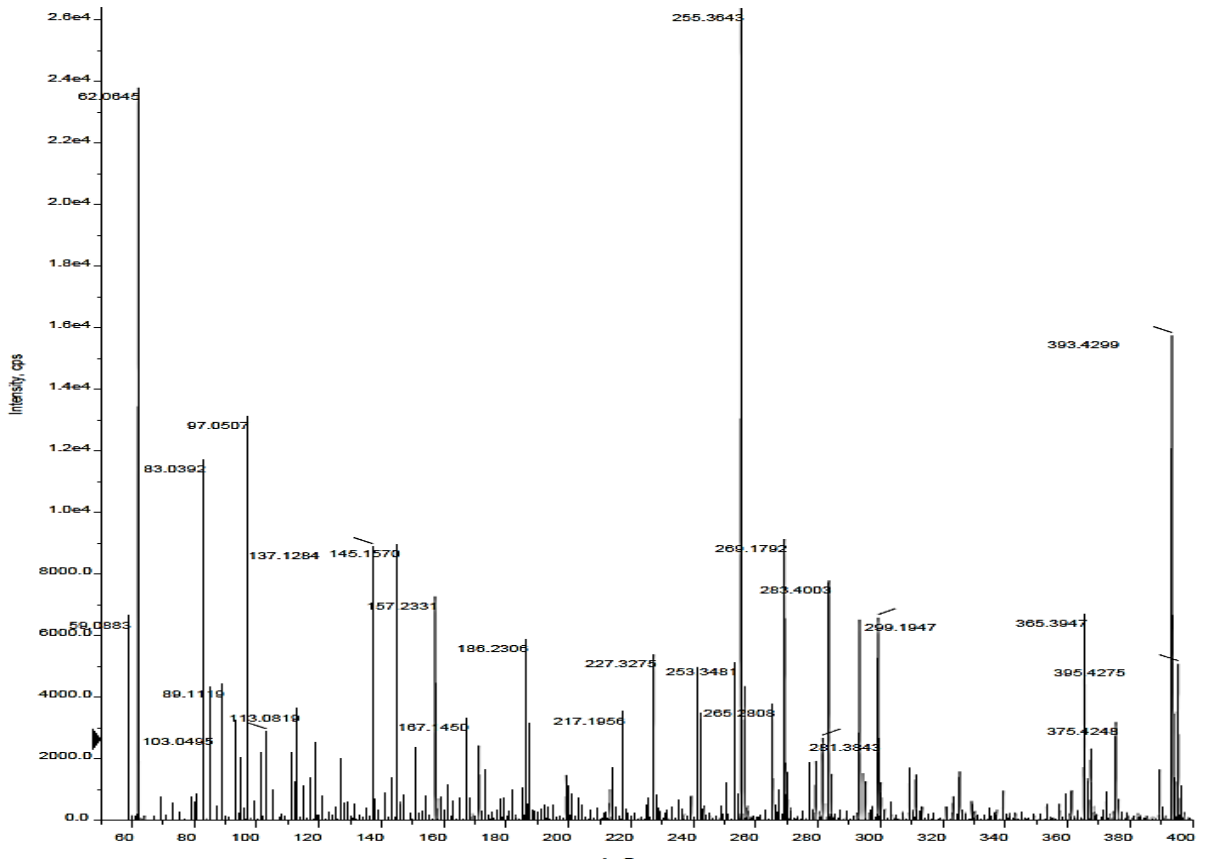


Şekil 4.49. Etil-(2,3-dihidroksi-5,6-dimetoksi-4-asetil) benzoat bileşiğinin HMBC spektrumu.





Şekil 4.50. Etil-(2,3-dihidroksi-5,6-dimetoksi-4-asetil) benzoat bileşiğinin HMBC spektrumu.



Şekil 4.51. Etil-(2,3-dihidroksi-5,6-dimetoksi-4-asetil) benzoat bileşiminin QTOF-MS spektrumu.

### 4.3. İzole edilen Bileşiklerin Spektral Özellikleri

#### 4.3.1. 1 Numaralı Bileşik (IE-10-1): 5, 3', 4'-trihidroksi-7-metoksi izoflavonon

**<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, δ (ppm), 500 MHz):** δ 7.19 (1H, d, *J*= 0.7 Hz, H-8), 7.45 (1H, brs, H-6), 7.79 (1H, s, H-2), 7.443 (1H, dd, *J*= 1.9, 8.1 Hz, H-6'), 6.72 (1H, d, *J*= 8.1 Hz, H-5'), 7.461 (1H, d, *J*= 1.8 Hz, H-2'), 3.79 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR, APT ve HSQC spektrum (CD<sub>3</sub>OD, δ (ppm), 500 MHz):** δ 156.09 (C-2), 122.95 (C-3), 184.87 (C-4), 161.67 (C-5), 110.69 (C-6), 152.84 (C-7), 96.83 (C-8), 156.89 (C-9), 109.41 (C-10), 125.09 (C-1'), 115.77 (C-2'), 146.10 (C-3'), 143.48 (C-4'), 113.89 (C-5'), 125.13 (C-6'), 56.43 (-CH<sub>3</sub>).

**HMBC spektrum (CD<sub>3</sub>OD, δ (ppm), 500 MHz):** δ 3.79 (-OCH<sub>3</sub>) / 152.84 (C-7), 110.69 (C-6), 96.83 (C-8); 6.72 (H-5') / 122.95 (C-3), 125.09 (C-1'), 125.13 (C-6'), 146.10 (C-3'); 7.18 (H-8) / 110.69 (C-6), 152.84 (C-7), 156.89 (C-9), 161.67 (C-5), 184.87 (C-4); 7.79 (H-2) / 184.87 (C-4); 7.46 (H-6') / 146.10 (C-3'), 184.87 (C-4), 125.09 (C-1'), 156.09 (C-2); 7.45 (H-6) / 96.83 (C-8), 184.87 (C-4), 109.41 (C-10); 7.43 (H-2') / 146.10 (C-3'), 184.87 (C-4), 122.95 (C-3).

**<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spektrum (CD<sub>3</sub>OD δ (ppm), 500 MHz):** δ 7.443 (H-6') / 6.72 (H-5'); 7.18 (H-8) / 7.45 (H-6).

**ESI-MS m/z (Rel. Int %):** 301 [M+1]<sup>+</sup> (% 26.21), 299 [M-1]<sup>+</sup> (% 15.79), 167 [(M+1)-C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (% 11.94), 284 [(M+1)-OH]<sup>+</sup> (% 46.01), 283 [M-OH]<sup>+</sup> (% 38.30), 265 [(M-1)-(2xOH)]<sup>+</sup> (% 23.70), 271 [(M+2)-OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (% 13.78), 149 [M-C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>-OH]<sup>+</sup> (% 74.63), 221 [(M+3)-(3xOH)-(OCH<sub>3</sub>)]<sup>+</sup> (% 11.70).

**4.3.2. 2 Numaralı Bileşik (K-1-2-1): 6,2'-dihidroksi-5-metoksi-4'-O- $\alpha$ -glikozil izoflavonon**

**$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm), 500 MHz):**  $\delta$  6.73 (1H, d,  $J$ = 8.8 Hz, H-7), 7.18 (1H, d,  $J$ = 8.8 Hz, H-8), 7.79 (1H, s, H-2), 7.40 (1H, d,  $J$ = 7.5 Hz, H-6'), 7.45 (1H, t-like,  $J$ = 8.1 Hz, H-5'), 7.45 (1H, d,  $J$ = 1.4 Hz, H-3'), 4.51 (1H, brs, H-1''), 3.40-4.10 (6H, m, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6''<sub>a</sub> ve H-6''<sub>b</sub>), 3.80 (3H, s,  $-\text{OCH}_3$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR, APT ve HSQC spektrum ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm), 500 MHz):**  $\delta$  142.37 (C-2), 125.74 (C-3), 183.95 (C-4), 157.81 (C-5), 148.14 (C-6), 114.80 (C-7), 112.56 (C-8), 157.80 (C-9), 103.94 (C-10), 120.05 (C-1'), 165.82 (C-2'), 134.37 (C-3'), 162.26 (C-4'), 130.35 (C-5'), 128.39 (C-6'), 97.96 (C-1''), 68.27, 70.38, 65.87, 71.02, 57.98 (C-2'', C-3'', C-4'', C-5'', C-6''), 49.87 ( $-\text{OCH}_3$ ).

**HMBC spektrum ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm), 500 MHz):**  $\delta$  7.79 (H-2) / 120.05 (C-1'), 183.95 (C-4); 7.40 (H-6') / 183.95 (C-4), 162.26 (C-4'), 165.82 (C-2'), 130.35 (C-5'); 7.45 (H-5') / 97.96 (C-1''), 134.37 (C-3'); 7.45 (H-3') / 162.26 (C-4'), 165.82 (C-2'), 120.05 (C-1'); 7.18 (H-8) / 157.80 (C-9), 114.80 (C-7), 103.94 (C-10), 183.95 (C-4); 6.73 (H-7) / 148.14 (C-6), 103.94 (C-10), 112.56 (C-8); 4.51 (H-1'') / 130.35 (C-5'), 134.37 (C-3'), 162.26 (C-4'), 68.27, 70.38, 65.87, 71.02, 57.98 (C-2'', C-3'', C-4'', C-5'', C-6''); 3.80 ( $-\text{OCH}_3$ ) / 103.94 (C-10), 148.14 (C-6), 157.81 (C-5), 183.95 (C-4).

**$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spektrum  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm), 500 MHz):**  $\delta$  6.73 (H-7) / 7.18 (H-8); 7.45 (H-5') / 7.40 (H-6'), 7.45 (H-3').

**ESI-MS  $m/z$  (Rel. Int %):**  $m/z$  461  $[\text{M}-1]^+$  (% 100), 313  $[(\text{M}+1)-(\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_3)]^+$  (% 15.45), 283  $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_6]^+$  (% 42.07), 369  $[(\text{M}-3)-(\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3)]^+$  (% 7.1), 255  $[(\text{M}+3)-(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_6)-(\text{OCH}_3)]^+$  (% 35.33).

**4.3.3. 3 Numaralı Bileşik (IE-7-1): 5,7,4'-trihidroksi flavonon (Apigenin)**

**<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, δ (ppm), 500 MHz):** δ 6.35 (1H, d, *J*= 2.09 Hz, H-8), 6.11 (1H, d, *J*= 2.08 Hz, H-6), 6.48 (1H, s, H-3), 7.75 (2H, d, *J*= 8.8. Hz, H-6' ve H-2'), 6.83 (2H, d, *J*= 8.8 Hz H-5' ve H-3').

**ESI-MS m/z (Rel. Int %):** 271 [M+1]<sup>+</sup> (% 66,83), 153 [(M+1)-(C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>O)]<sup>+</sup> (% 20.67), 119 [(M+1)-(C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>)]<sup>+</sup> (% 12.48).

#### 4.3.4. 4 Numaralı Bileşik (IE-10-2): 5,5'',7''-trihidroksi-3,7-dimetoksi-4',4'''-O-biflavon

**<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, δ (ppm), 500 MHz):** δ 6.11 (1H, d, *J*= 2.08 Hz, H-6), 6.36 (1H, d, *J*= 2.1 Hz, H-8), 7.75 (4H, d, *J*= 8.8, H-2', H-6', H-2''' ve H-6'''), 6.83 (4H, d, *J*=8.8 Hz, H-3', H-5', H-3''' ve H-5'''), 6.50 (2H, d, *J*= 3.4 Hz, H-6'' ve H-8''), 6.47 (1H, s, H-3''), 3.78 (6H, s, -OCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR, APT ve HSQC spektrum (CD<sub>3</sub>OD δ (ppm), 500 MHz):** δ 157.84 (C-2), 136.15 (C-3), 193.65 (C-4), 164.58 (C-5), 95.36 (C-6), 166.33 (C-7), 96.29 (C-8), 154.72 (C-9), 105.77 (C-10), 123.30 (C-1'), 129.48 (C-2', C-6', C-2''' ve C-6'''), 117.06 (C-3', C-5', C-3''' ve C-5'''), 163.07 (C-4'), 157.39 (C-2''), 100.17 (C-3''), 171.74 (C-4''), 151.69 (C-5''), 95.08 (C-6'' ve C-8''), 151.37 (C-7''), 154.05 (C-9''), 108.27 (C-10''), 123.32 (C-1'''), 163.07 (C-4'''), 55.37 (-OCH<sub>3</sub>).

**HMBC spektrum (CD<sub>3</sub>OD, δ (ppm), 500 MHz):** δ 7.75 (H-2' ve H-6') / 117.06 (C-3'), 163.07 (C-4'); 7.75 (H-2''' ve H-6''') / 100.17 (C-3''); 6.83 (H-3' ve H-5') / 163.07 (C-4'), 123.32 (C-1'''); 6.50 (H-6'' ve H-8'') / 95.08 (C-6''), 95.08 (C-8''), 166.33 (C-7), 164.58 (C-5); 6,36 (H-8) / 95.36 (C-6), 55.37 (-OCH<sub>3</sub>); 6.11 (H-6) / 55.37 (-OCH<sub>3</sub>), 108.27 (C-10''), 151.69 (C-5''), 151.37 (C-7''); 6.47 (H-3'') / 193.65 (C-4), 123.32 (C-1'''), 129.48 (C-2', C-6', C-2''' ve C-6'''), 105.77 (C-10); 3.78 (-OCH<sub>3</sub>) / 193.73 (C-4), 95.36 (C-6), 136.15 (C-3), 96.29 (C-8).

**<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spektrum (CD<sub>3</sub>OD, δ (ppm), 500 MHz):** δ 6.36 (H-8) / 6.11 (H-6); 6.50 (H-6'') / 6.50 (H-8''); 7.75 (H-2', H-6', H-2''' ve H-6''') / 6.83 (H-3', H-5', H-3''' ve H-5''').

**ESI-MS ve QTOF-MS m/z (Rel. Int %):** 569 [M+3]<sup>+</sup> (% 100), 269 [M-(C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>O<sub>5</sub>)]<sup>+</sup> (% 57.60), 299 [(M+2)-(C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>O<sub>5</sub>)]<sup>+</sup> (% 35.20), 311 [(M-3)-(C<sub>15</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>)]<sup>+</sup> (% 100), 255 [(M+3)-(C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>)]<sup>+</sup> (%7.2).

**4.3.5. 5 Numaralı Bileşik (K-2-3): (8,3',4',5'-tetrahidroksi-7-O- $\alpha$ -glukosil izoflavon)-6-8''-(4'''-hidroksi-7''-O- $\alpha$ -glukosil izoflavon) biflavon**

**$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm), 500 MHz):**  $\delta$  8.45 (2H, s, H-2 ve H-2''), 6.74 (1H, brs, H-5), 6.56 (1H, brs, H-2'), 6.41 (1H, d,  $J=1.4$  Hz, H-6'), 7.88 (1H, d,  $J=8.7$  Hz, H-5''), 6.99 (1H, d,  $J=8.8$  Hz, H-6''), 7.78 (2H, d,  $J=8.6$  Hz, H-2''' ve H-6'''), 6.84 (2H, d,  $J=8.6$  Hz, H-3''' ve H-5'''), 5.31 (1H, d,  $J=3.7$  Hz, H-1'''), 5.02 (1H, d,  $J=4.7$  Hz, H-1''''), 3.30-4.05 (12H, m, H-2''', H-3''', H-4''', H-5''', H-6''', H-2'''', H-3'''', H-4'''', H-5'''' ve H-6'''').

**$^{13}\text{C}$  NMR, APT ve HSQC spektrum ( $\text{CD}_3\text{OD}$   $\delta$  (ppm), 500 MHz):**  $\delta$  155.05 (C-2), 128.34 (C-3), 179.19 (C-4), 110.56 (C-5), 99.29 (C-6), 162.93 (C-7), 166.89 (C-8), 154.42 (C-9), 105.41 (C-10), 122.39 (C-1'), 132.36 (C-2'), 161.09 (C-3'), 157.76 (C-4'), 163.56 (C-5'), 128.34 (C-6'), 155.05 (C-2''), 128.34 (C-3''), 179.18 (C-4''), 121.24 (C-5''), 106.57 (C-6''), 162.86 (C-7''), 103.11 (C-8''), 154.42 (C-9''), 105.41 (C-10''), 122.39 (C-1'''), 130.13 (C-2''' ve C-6'''), 116.53 (C-3''' ve C-5'''), 158.19 (C-4'''), 93.90 (C-1''''), 93.84 (C-1''''), 69.33, 69.48, 71.15, 71.53, 71.82, 71.86, 73.18, 74.51 (C-2''', C-3''', C-4''', C-5''', C-2'''', C-3'''', C-4'''' ve C-5''''), 64.08 (C-6'''' ya da C-6'''''), 65.67 (C-6'''' ya da C-6''''').

**HMBC spektrum ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm), 500 MHz):**  $\delta$  8.45 (H-2) / 179.19 (C-4), 166.89 (C-8), 105.41 (C-10), 132.36 (C-2'); 6.74 (H-5) / 166.89 (C-8); 6.56 (H-2') / 128.34 (C-3), 157.76 (C-4'), 128.34 (C-6'); 6.41 (H-6') / 179.19 (C-4), 132.36 (C-2'); 7.88 (H-5'') / 179.18 (C-4''), 106.57 (C-6''), 103.11 (C-8''), 154.42 (C-9''); 6.99 (H-6'') / 99.29 (C-6), 179.18 (C-4''), 121.24 (C-5''), 93.84 (C-1'''''); 7.78 (H-2''') / 155.05 (C-2''), 179.18 (C-4''); 6.84 (H-3''') / 128.34 (C-3''), 122.39 (C-1''').

**$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spektrum ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm), 500 MHz):**  $\delta$  6.56 (H-2') / 6.41 (H-6'); 7.88 (H-5'') / 6.99 (H-6''); 7.78 (H-2''' ve H-6''') / 6.84 (H-3''' ve H-5''').

**ESI-MS m/z (Rel. Int %):** 877  $[\text{M}-1]^+$  (% 100), 551  $[(\text{M}-1)-(2\times\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5)]^+$  (% 29.77), 463  $[(\text{M}+1)-(\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_9)]^+$  (% 22.82), 298  $[(\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{12})-(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5)]^+$  (% 100), 412  $[(\text{M}-4)-(\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{12})]^+$  (% 12.76), 252  $[(\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_9)-(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5)]^+$  (% 3.03), 423  $[\text{M}-(2\times\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5)-(7\times\text{H}_2\text{O})]^+$  (% 12.15), 128  $[7\times\text{H}_2\text{O}]^+$  (% 19.44).

#### 4.3.6. 6 Numaralı Bileşik (K-2-2-1): Gentisik asit-5-O-β-ksilopiranosit

**<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, δ (ppm), 500 MHz):** δ 6.75 (1H, d, *J*= 8.8 Hz, H-3), 7.12 (1H, dd, *J*= 3.1, 8.8 Hz, H-4), 7.61 (1H, d, *J*= 3.07 Hz, H-6), 4.80 (1H, d, *J*= 7.4 Hz, H-1'), 3.91 (1H, dd, *J*= 1.2, 11.1 Hz, H<sub>a</sub>-5'), 4.15 (1H, dd, *J*= 1.7, 9.8 Hz, H<sub>b</sub>-5'), 3.40-3.75 (3H, m, H-2', H-3' ve H-4').

**<sup>13</sup>C NMR, APT ve HSQC (CD<sub>3</sub>OD, δ (ppm), 500 MHz):** δ 179.77 (C-1''), 117.56 (C-1), 157.58 (C-2), 119.57 (C-3), 132.44 (C-4), 143.06 (C-5), 119.59 (C-6), 103.74 (C-1'), 64.26 (C-5'), 71.35, 74.98, 78.01 (C-2', C-3' ve C-4').

**ESI-MS m/z (Rel. Int %):** 284 [M-2]<sup>+</sup> (% 64.84), 153 [(M+1)-(C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>)]<sup>+</sup> (% 35.10), 133 [(M+1)-(C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>)]<sup>+</sup> (% 48.95), 240 [(M-2)-(CO<sub>2</sub>)]<sup>+</sup> (% 51.04).



#### 4.3.7. 7 Numaralı Bileşik (K-1-1): Etil-(2,3-dihidroksi-5,6-dimetoksi-4-asetil) benzoat

**<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, δ (ppm), 500 MHz):** δ 1.20 (3H, t, *J*= 7 Hz, H-9), 3.63 (2H, q, *J*= 7 Hz, H-8), 1.91 (3H, s, H-11), 3.37 (6H, s, -OCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR, APT ve HSQC spektrum (CD<sub>3</sub>OD, δ (ppm), 500 MHz):** δ 115.88 (C-1), 161.54 (C-2 ve C-3), 154.68 (C-5 ve C-6), 117.16 (C-4), 170.41 (C-7), 58.35 (C-8), 24.24 (C-9), 180.42 (C-10), 18.40 (C-11), 49.88 (2x-OCH<sub>3</sub>)

**HMBC spektrum (CD<sub>3</sub>OD, δ (ppm), 500 MHz):** δ 3.63 (H-8) / 115.87 (C-1), 170.41 (C-7); 3.37 (-OCH<sub>3</sub>) / 180.42 (C-10), 170.41 (C-7), 161.51 (C-2 ve C-3), 115.87 (C-1), 117.16 (C-4); 1.91 (H-11) / 180.42 (C-10); 1.20 (H-9) / 58.35 (C-8), 170.41 (C-7).

**<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spektrum (CD<sub>3</sub>OD, δ (ppm), 500 MHz):** δ 3.63 (H-8) / 1.20 (H-9)

**QTOF-MS m/z (Rel. Int %):** 283 [M-1]<sup>+</sup> (% 17.13), 255 [(M+1)-(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)]<sup>+</sup> (% 55.67), 241 [(M+2)-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)]<sup>+</sup> (% 7.49), 213 [(M+2)-(COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)]<sup>+</sup> (% 89.28), 226 [(M+4)-(2xOCH<sub>3</sub>)]<sup>+</sup> (% 10.71), 186 [(M-2)-(2xOCH<sub>3</sub>)-(2xOH)]<sup>+</sup> (% 12.84), 187 [(M-1)-(2xOCH<sub>3</sub>)-(2xOH)]<sup>+</sup> (% 6.85).

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışma kapsamında, Trakya bölgesinde yetişen *C. italicum* (Savi) DC. (*Asteraceae*) bitkisinin antibakteriyel/antifungal aktivitesinin tayini ve sekonder metabolitlerin izolasyonu ve moleküllerin yapılarının tayini amaçlanmıştır.

*C. italicum* bitkisinin ekstrelerinde antibakteriyel ve antifungal aktivite mikrodilüsyon yöntemiyle araştırılmıştır. En yüksek inhibisyon etkisinin etilasetat ekstresinde ve *B. subtilis* mikroorganizmasına karşı olduğu bulunurken (MİK değeri 2.38 mg/mL); antifungal aktivite sonuçları açısından en yüksek inhibisyon etkisinin yine etilasetat ekstresinde ve *C. parasilosis* mikroorganizmasına karşı (MİK değerinin 1.98 mg/mL) olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, etilasetat ekstresinin diğer test edilen ekstrelerle karşılaştırıldığında en yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunun bulunması nedeniyle, izolasyon çalışmaları için etilasetat estresi seçilmiştir.

En yüksek biyolojik aktiviteyi gösteren etilasetat ekstresinin yanı sıra maserasyon işleminde kullanılan metanol uçurulurken oluşan kristallere de kromatografik ayırma ve saflaştırma işlemleri uygulanmıştır (Kolon kromatografisi, ince tabaka kromatografisi, preparatif-TLC, RP-HPLC). İzole edilen bileşiklerin yapıları 1D NMR ( $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR ve APT), 2D NMR ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HMBC ve HSQC) ve kütle (ESI-MS MS ve QTOF MS) spektroskopisi teknikleri kullanılarak açıklanmıştır. Kromatografik ayırma ve saflaştırma işlemlerinden sonra, *C. italicum* bitkisinden 7 bileşik izole edilmiştir. İzole edilen bu bileşiklerden; 2'si izoflavon, 1'i flavon, 2'si biflavon, 2'si fenolik asidi türevi olan bileşiklerdir. *C. italicum*'dan izole edilen bileşikler; 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksi izoflavonon; 6,2'-dihidroksi-5-metoksi-4'-*O*- $\alpha$ -glikozil izoflavonon; 5,7,4'-trihidroksi flavonon, 5,5'',7''-trihidroksi-3,7-dimetoksi-4',4'''-*O*-biflavon; (8,3',4',5'-tetrahidroksi-7-*O*- $\alpha$ -glukosil izoflavon)-6-8''-(4'''-hidroksi-7''-*O*- $\alpha$ -glukosil izoflavon) biflavon; gentisik asit-5-*O*- $\beta$ -ksilopiranosit ve etil-(2,3-dihidroksi-5,6-dimetoksi-4-asetil) benzoat bileşikleridir ve bu 7 bileşik ilk defa *C. italicum*'dan izole edilmiştir.

Literatür araştırmaları değerlendirildiğinde, farklı *Cirsium* türlerinde çok sayıda fitokimyasal ve biyolojik aktivite çalışmaları görülmüştür. *Cirsium* türlerinin fitokimyasal çalışmaları sonucunda, bu türlerden flavonoidler, fenolik asitler, steroller, terpenler ve lignanlar izole edildiği çalışmalar bulunmaktadır (Syrchina ve ark. 2000, Aquino ve ark. 1987, Takano ve Kawaminami 1988, Negi ve ark. 1989).

Miyaichi ve ark. (1995) tarafından, *C. japonicum* bitkisinin bütanol ekstresinden, bir flavonoid glikozit olan 5,7,4'-trihidroksi-6-metoksiflavon-7-O- $\alpha$ -L-ramnopiranozil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glukopiranozit bileşimini ve iki fenolik asit türevi olan klorojenik asit ve 1,5-di-O-kafeilkunik asit bileşiği izole edilmiştir.

Iwashina ve ark. (1999) tarafından, yapılan bir çalışmada *C. oligophyllum* bitkisinin yapraklarından iki flavonoid glikozit yapısında, hispudulin 4'-O- $\beta$ -D-glukopiranosit ve nepatin 4'-O- $\beta$ -D-glukopiranosit bileşikleri izole edilmiştir.

Singh S ve ark. (2006) tarafından, *Asteraceae* familyasına ait olan *Echinops echibatus* bitkisinin metanol ekstresinden bir izoflavonoid olan 7-hidroksi izoflavonon bileşimini izole edilmiştir.

Jung ve ark. (2012) yaptığı bir çalışmada *C. maackii* bitkisinden bir flavonoid glikozit yapısında olan luteolin-5-O-glukozit izole etmişlerdir.

Sieliwoniuk ve ark. (2012) tarafından *C. oleraceum* bitkisinin çiçeklerinden flavon yapısında olan apigenin molekülü, yapraklarından ise flavonoid glikozit yapısında olan linarin molekülü izole edilmiştir.

Nazaruk ve Galicka (2014) tarafından *C. palustre* bitkisinin metanol ekstresinden üç flavonoid glikozit yapısında olan luteolin-7-O-glukozit, naringenin-7-O-glukozit ve eriodictyol-7-O-glukozit bileşiklerini ve bir fenolik asit türevi olan klorojenik asit izole edilmiştir.

Yapılan literatür araştırmalarına göre, *Cirsium* türlerinden izole edilmiş biflavonoid yapısındaki bileşiklere restlanmamıştır. Bu bağlamda, ilk defa bu tez çalışmasında 2 biflavonoid bileşiği, *Cirsium* türlerinden izole edilmiş bulunmaktadır.

*C. italicum* bitkisinden izole edilen bileşiklerin miktarları yeterli olmadığından, bu bileşiklerde antibakteriyel ve antifungal aktivite tayini gerçekleştirilememiştir. Ancak, bu çalışmanın en yüksek antimikrobiyal aktivite gösteren ekstrenin belirlenmesi, ve izole edilen bileşikler açısından ileride yapılacak çalışmalara ışık tutacağı ve katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasıyla, *C. italicum* (Savi) DC. (*Asteraceae*) bitkisinin antibakteriyel ve antifungal aktivitesi ile bitkinin sekonder metabolitlerinin izolasyonu ve izole edilen moleküllerin yapı tayini ilk defa literatüre sunulmuş olacaktır.

Yapılan bu çalışma, Türkiye’de yetişen *Cirsium* türlerinin, kemotaksonomik bakımdan değerlendirilmesine katkı sağlanacağı gibi bu türlerdeki biyoaktif bileşenlerin araştırılması da bilimsel birikime önemli katkı sağlayacaktır.

## 6. KAYNAKLAR

- Acar J (1998). Fenolik Bileşikler ve Doğal Renk Maddeleri. Hacettepe Univ. Yayınları, 435-452, Ankara.
- Agrawal PK (1992). NMR Spectroscopy in the Structural Eludation of Oligosaccharides and Glycosides. *Phytochemistry*, 31(10): 3307-3330.
- Allaoui A, Rahmani S, Belboukhari N, Cheikh N, Cheriti A, Sekkoum K (2015). Isoflavone and flavone derivatives from aerial part of *Limoniastrum feei*. *Der Pharma Chemica* 7(8): 17-20.
- Altuner EM (2008). Bazı Karayosunu Türlerinin Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 300.
- Aquino R, Behar I, Simone DF, Menichini F (1987). Preliminary investigation on *Cirsium vallis demoni*. *Fitoterapia*, 58(6): 428-429.
- Biavatti MW, Lemas da Silva LA, Faquetia LG, Reginatto FH, Santos ADC, Barison A (2015). Phytochemical analysis of *Vernonanthura tweedieana* and a validated UPLC-PDA method for the quantification of eriodictyol. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 25: 375-381.
- Bilaloğlu GV, Harmandar M (1999). Flavonoidler. Aktif Yayınevi, 381, İstanbul.
- Bremer K (1994). *Asteraceae: Cladistics & Classification*. Timber Press, 752, Oregon.
- Borawska MH, Czechowska SK, Markiewicz R, Socha K, Nazaruk J, Pałka J, Isidorov VA (2010). Enhancement of antibacterial effects of extracts from *Cirsium* species using sodium picolinate and estimation of their toxicity. *Natural Product Research*, 24(6): 554-561.
- Bors W, Saran M (1987). *Free Radical Res. Commun.*, 2, 131.
- Büyüktuncer Z, Başaran A (2005). Fitoöstrajenler ve Sağlıklı Yaşamdaki Önemleri. Hacettepe Uni. Eczacılık Fakültesi Dergisi, 25(2): 79-94.
- Cemeroğlu B, Yemenicioğlu A, Özkan M (2001). Meyve ve Sebzelerin Bileşimi, Soğukta Depolanmaları. Gıda Tekn. Derneği Yayınları, 328, Ankara.
- Charadze AL (1963). *Cirsium* Mill. – In: Bobrov EG & Cherepanov SK (Eds.), *Flora of the USSR*. 28: 63-270. Izdatel'stvo Akademiï Nauk SSSR, Moscow, Leningrad. Translated from Russian in 1976 by Israel Program for Scientific Translation, Jerusalem.
- Chari VM, Wagner H, Neszmelyi A (1977). Carbon-13 NMR Spectroscopy of Flavonoids. *Proceedings of the 5th Hungarian Bioflavonoid Symposium, Matrafured, Hungary*, s. 49.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2012). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition (M07-A9)*. CLSI, 88, Amerika Birleşik Devletleri.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2018). *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third Edition (M27-A3)*. CLSI, 46, Amerika Birleşik Devletleri.
- Cuycken F ve Claeys M (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry* 39: 1-15.

- Çelik E, Çelik GY (2007). Bitki Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Özellikleri. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 5(2): 1-6.
- Davis PH (Ed.) (1965-1985). Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol.1-9, Edinb. Un. Press, Edinburgh.
- Dey PM, Harborne JB (1989). Methods in Plant Biochemistry, Vol.1, Academic Press, London.
- Dewick PM (1994). The Flavonoid. Springer, New York, s.11.
- Erdik E (1993). Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler. Gazi Büro Kitapevi, 234, Ankara.
- Farnsworth NR (1994). Ethnopharmacology and drug development. Ethnobotany and the Search for New Drugs. Chichester (Ciba Foundation Symposium 185), Wiley, s.42-59.
- Faydaoğlu E, Sürücüoğlu MS (2011). Geçmişten Günümüze Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanılması ve Ekonomik Önemi. Kastamonu Üni. Orman Fakültesi Dergisi, 11(1): 52-67.
- Fayos J, Belles JM, Lopez-Gresa MP, Primo J, Conejero V (2006). Induction of gentisic acid 5-O- $\beta$ -xylopyranoside in tomato and cucumber plants infected by different pathogens. Phytochemistry 67: 142-148.
- Gezgin D (2006). Bitki Mitosları. Sel Yayıncılık, 144, İstanbul.
- Gülây Z (2002). Antibiyotik duyarlılık testlerinin yorumu. Toraks Dergisi 3(1): 75-88.
- Güner A, Özhatay N, Ekim T, Başer KHC (Ed.) (2000). Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol.11 (supplement 2): 161-163, Edinb. Un. Press, Edinburgh.
- Hai J, Yong-Hai M, Liu Y, Qui-Hong W, Bing-You Y, Chang L, Hai-Xue K (2013). A new megastigmane glycoside from aerial part of *Cirsium setosum*. Chinese Journal of Natural Medicines, 11(5): 534-537.
- Harborne JB, Grayer RJ (1988). The Flavonoids, Chapman and Hall, London.
- Harborne JB, Marby TJ, Marby H (1975). The Flavonoids. Chapman and Hall, London, s.82
- Hikino H, Kiso Y (1988). Econ. And Medicinal Plant Research, 2(39): 698. Academic Press, London.
- Huang MT, Ho CT, Lee CY (1992). Antioxidants and Cancer Prevention. Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II. 507, New York, ABD.
- Huh S, Lee J, Jung E, Kim SC, Kang, J, Lee J, Kim YW, Kang HK, Park D (2009). A Cell Based System for Screening Hair Growth-Promoting Agents. Arch. Dermatol. Res., 301(5): 381-385.
- Hui KM (2002). Anxiolytic Effect of Wogonin A Benzodiazepine Receptor Ligand Isolated from *Scutellaria Baicalensis* Georgi. Biochem. Pharmacol., 64(9): 1415-1424.
- Iwashi T, Kamenoson K, Ueno T (1999). Hispidulin and nepetin 4'-glucosides from *Cirsium oligophyllum*. Phytochemistry, 51: 1109-1111.
- Jung HA, Jin ES, Min B, Kim B, Choi JS (2012). Anti-inflammatory activity of Korean thistle *Cirsium maackii* and its major flavonoid, luteolin 5-O-glucoside. Food and Chemical Toxicology, 50: 2171-2179.
- Kadereit JW, Jeffrey C (2007). The Families and Genera of Vascular Plants, Vol. 8, Springer, New York.

- Kenny O, Smyth TJ, Walsh D, Kelleher CT, Hewage CM, Brunton NP (2014). Investigating the potential of under-utilised plants from the *Asteraceae* family as a source of natural antimicrobial and antioxidant extracts. *Food Chemistry*, 161: 79-86.
- Khan A, Amin A, Khan MA, Ali I (2011). In vitro screening of *Cirsium arvense* for potential antibacterial and activities. *Pakistan Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 24(4): 519-522.
- Koçyiğit M (2005). Yalova İlinde Etnobotanik Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 82.
- Kolaç T, Gürbüz P, Yetiş G (2017). Doğan Ürünlerin Fenolik İçeriği ve Antioksidan Özellikleri. *İnönü Üni. Sağlık Hizmetleri MYO Dergisi*, 5(1): 1-17.
- Kozyra M, Biernasiuk A, Malm A, Chowaniec M (2015). Chemical compositions and antibacterial activity of extracts obtained from the inflorescences of *Cirsium canum* (L.) all. *Natural Product Research* 29(21): 2059-2063.
- Kumar N, Singh B, Bhandari P, Gupta AP, Uniyal SK, Kaul VK (2005). Biflavonoids from *Lonicera japonica*. *Phytochemistry* 66: 2740-2744.
- Ku KL, Tsai CT, Chang WM, Shen ML, Wu CT, Liao HF (2008). Hepatoprotective effect of *Cirsium arisanense* kitamura in tacrine-treated hepatoma Hep 3B cells and C57BL mice. *Am. J. Chin. Med.*, 36(2): 355–368.
- Larson RA (1988). *Phytochemistry*. 27: 969.
- Lee CW, Choi HJ, Kim HS, Kim DH, Chang IS, Moon HT, Lee SY, Oh WK, Woo ER (2008). Biflavonoids isolated from *Selaginella tamariscina* regulate the expression of matrix metalloproteinase in human skin fibroblasts. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 19: 732-738.
- Li X, Svedin E, Mo H, Atwell S, Dilkes BP, Chapple C (2014). Exploiting Natural Variation of Secondary Metabolism Identifies a Gene Controlling the Glycosylation Diversity of Dihydroxybenzoic Acids in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 198(3): 1267-1276.
- Lim H, Son KH, Chang HW, Bae K, Kang SS, Kim HP (2008). Anti-inflammatory Activity of Pectolinarigenin and Pectolinarin Isolated from *Cirsium chanroenicum*. *Biol. Pharm. Bull.*, 31(11): 2063-2067.
- Liu S, Luo X, Li D, Zhang J, Qui D, Liu W, She L, Yang Z (2006). Tumor inhibition and improved immunity in mice treated with flavone from *Cirsium japonicum* DC. *International Immunopharmacology*, 6: 1387-1393.
- Liu SJ, Zhang J, Li DX (2007). Anticancer activity and quantitative analysis of flavone of *Cirsium japonicum* DC. *Nat. Prod. Res.*, 21(10): 915-922.
- Loizzo MR, Statti GA, Tundis R, Conforti F, Ando S, Menichini F (2004). Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Cirsium tenoreanum*. *Fitoterapia*, 75(6): 577-580.
- Lu M, Kong Q, Xu X, Lu H, Lu Z, Yu Z, Zuo B, Su J, Guo R (2014). Pectolinarigenin - A Flavonoid Compound from *Cirsium Japonicum* with Potential Anti-proliferation Activity in MCF-7 Breast Cancer Cell. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13 (2): 225-228.
- Maier G, Mayer P, Dietrich H, Wucherpfennig K (1990). Polyphenoloxidasen und ihre Anwendung beider Stabisierung von Fruchtsäften. *Flussiges Obst*, 57(4): 230-239.

- Markham KR, Ternai B, Stanley R, Gieger H, Marbry TJ (1977). Carbon-13 NMR Studies of Flavonoids. *Tetrahedron* 34: 1389-1397.
- Miyaichi Y, Matsuura M, Tomimori T (1995). Phenolic Compounds from the Roots of *Cirsium japonicum* DC. *Natural Medicines* 49(1): 92-94.
- Mun SC, Mun GS (2015). Dynamics of phytoestrogen, isoflavonoids and its isolation from stems of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi growing in Democratic People's Republic of Korea. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23: 538-544.
- Nazaruk J, Galicka A (2014). The Influence of Selected Flavonoids from the leaves of *Cirsium palustre* (L.) Scop on Collagen Expression in Human Skin Fibroblasts. *Phytotherapy Research*, 28: 1399-1405.
- Nazaruk J, Gudej J (2003). Flavonoid Compounds from the Flowers of *Cirsium Rivulare* (JACQ.) All. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, 60(1): 87-89.
- Nazaruk J, Jakoniuk P (2005). Flavonoid composition and antimicrobial activity of *Cirsium rivulare* (Jacq.) All. Flowers. *Journal of Ethnopharmacology*, 102: 208–212.
- Negi RKS, Fakhir TM, Rajagopalan TR, (1989). A pyrrolizidine alkaloid from *Cirsium wallichii* DC. *Indian J. Chem. Sect. B*, 28B(6): 524-525.
- Orhan DD, Ergun F, Yesilada E, Tsuchiya K, Takaishi Y, Kawazoe K (2007). Antioxidant activity of two flavonol glycosides from *Cirsium hypoleucum* DC. through bioassay-guided fractionation. *Turkish J. Pharm. Sci.*, 4(1): 1-14.
- Park HK, Yoon SY, Choi JH, Ko HS, Suh YW, Lee YS, Kim GH, Chung MS, Cheong JH (2006). The antidepressant effects of *Cirsium japonicum* in ICR mice. *Yakhak Hoechi*, 50(6): 429-435.
- Park JC, Lee JH, Choi JS (1995). A flavone diglycoside from *Cirsium japonicum* var. *issuirense*. *Phytochemistry*, 39(1): 261-262.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW, Rinaldi MG (2007). Multicenter Comparison of the VITEK 2 Antifungal Susceptibility Test with the CLSI Broth Microdilution Reference Method for Testing Amphotericin B, Flucytosine and Voriconazole against *Candida* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(11): 3522-3528.
- Pinheiro PF ve Justino GC (2012). Structural Analysis of Flavonoids and Related Compounds - A Review of Spectroscopic Applications. *Phytochemicals*. 33-56.
- Pratt DE, Hundson BJB (1990). *Food Antioxidants*. Elsevier, London, s.171.
- Rahman A, Nasim S, Baig I, Ara-Jahan I, Sener B, Orhan I, Choudhary MI (2002). Isoflavonoid Glycosides from Rhizomes of *Iris germanica*. *Chem. Pharm. Bull.*, 50(8): 1100-1102.
- Rahman S, Yeasmin S, Saem ASM, Rahman S (2015). Studies on the Isolation of 5, 3', 4'-Trihydroxy 7-Methoxy Isoflavone. *International Research Journal of Pure & Applied Chemistry* 7(1): 34-41.
- Ritchie RGS, Cyr N, Korsch B, Koch HJ, Perlin AS (1974). Carbon-13 Chemical Shifts of Furanosides and Cyclopentanols Configurational and Conformational Influences. *Canadian Journal of Chemistry* 53(10): 1424-1433.
- Rodriguez JP, Lee YK, Woo DG, Shim JS, Geraldino PJJ, Jacinto SD, Lee S (2018). Flavonoids from *Cirsium japonicum* var. *maackii* pappus as inhibitors of aldose reductase and their simultaneous determination. *Chem. Pap.*, 72: 81-88.



- Ryzsnyak S, Szent-Greorgy A (1936). Nature, 138: 27.
- Sağıroğlu A (2003). Bitkisel Doğal Bileşikler Kimyası. Trakya Üni. Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, 229, Edirne.
- Saito N, Yokoi M, Ogawa M, Kamijo M, Honda T (1988). 6-hydroxyanthocyanidin glycosides in the flowers of *Alstroemeria*. Phytochemistry, 27: 1399.
- Seçmen Ö, Gemici Y, Görk G, Bekat L, Leblebici E (1995). Tohumlu Bitkiler Sistematığı. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi kitaplar Seri No:116, İzmir.
- Sieliwoniuk EN, Nazaruk J, Kotowska J, Kojlo A (2012). Determination of the flavonoids/antioxidant levels in *Cirsium oleraceum* and *Cirsium rivulare* extracts with cerium(IV)-rhodamine 6G chemiluminescence detection. Talanta, 96: 216-222.
- Singh S, Upadhyay RK, Pandey MB, Singh JP, Pandey VB (2006). Flavonoids from *Echinops echinatus*. Journal of Asian Natural Product Research 8(3): 197-200.
- Syrchina AI, Vereschagin AL, Kostyro YA, Gorshkov AG, Semenov AA (2000). Contents of some flavonoid compounds and syringin in different parts of *Cirsium setosum* (Willd.) Bess. Rastitel'nye Resursy, 36(2): 73-79.
- Takano S, Kawaminami S (1988). Cyperenyl acetate and cyperenal from *Cirsium dipsacolepis*. Phytochemistry, 27(4): 1197-1199.
- Tanwar K, Mathur J, Kachhawa JBS (2015). Phytochemical Investigation and Anti-Fertility Activity of Lichen *Parmelia Perlata*. International Journal of Recent Research and Review 8(4): 30-38.
- Tekerlek P (2013). Bazı bryofit türlerinin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Niğde, 75.
- Tekpetek T (2011). Fenolik Bileşikler ve Flavonoidler. Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ.
- Wagner GJ (1982). Cellular and Subcellular Lokalization in Plant Metabolism. Springer, New York.
- Wagner H (1989). Search for New Plant Constituents with Potential Antiphlogistic and Antiallergic Activity. Planta Med., 55: 235-238.
- Wagner H, Elbi G, Lotter H, Guinea N (1991). Pharm. Pharmacol., 1: 15.
- Willstätter R, Everest AE (1913), Liebigs Ann. Chem., Leipzig, s.189-232.
- Xiao YB, Krickler M, Putzbach K, Albert K (2005). Cappillary liquid chromatography – microcoil <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy and liquid chromatography – ion trap mass spectrometry for on-line structure elucidation of isoflavones in *Radix astragali*. Journal of Chromatography A, 1067: 135-143.
- Xu YL, Ma YB, Xiong J (1999). Isoflavonoids of *Iris tectorum*. Acta Botanica Yunnanica, 21(1): 125-130.
- Yeşilada E (2013). İzoflavonlar Menopoz Dönemi Şikayetlerinde Etkili ve Güvenilir Bir Çözüm Sağlayabilir Mi? İstanbul, [Http://www.Pharmetic.Org/Fitoterapi/İzoflavonlar.html](http://www.Pharmetic.Org/Fitoterapi/İzoflavonlar.html) (01.07.2018).
- Yeşilada E, Sezik E, Honda G, Takaishi TY, Tanaka T (1999). Traditional medicine in Turkey, IX Folk medicine in North-west Anatolia. J. Ethnopharmacol., 64: 195-210.
- Yalçın E (2006). Antifungal Bir Ajan Olan Terbinafin'in Deriden Geçiş Çalışmaları. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 64.

- Yıldız B, Şahin A, Dirmenci T, Arabacı T, Çelenk S, Kelch D (2010). Türkiye’de Yetişen *Cirsium* Mill. (*Asteraceae*) Türleri Üzerinde Taksonomik, Moleküler, Karyolojik ve Palinolojik Araştırmalar. TBAG-106T167 numaralı TÜBİTAK projesi, Balıkesir.
- Yoo YM, Nam JH, Kim MY, Choi J, Park HJ (2008). Pectolinarin and Pectolinarigenin of *Cirsium setidens* Prevent the Hepatic Injury in Rats Caused by D-Galactosamine *via* an Antioxidant Mechanism. Biol. Pharm. Bull., 31(4): 760-764.

## ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında İstanbul’da doğdu. İlköğretim eğitimini Gaziosmanpaşa İlköğretim Okulu’nda tamamladı. Orta öğretimini Plevne Lisesi’nde tamamladı. Lisans eğitimi Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’nü 2.74/4 ortalama ile tamamladı.

Yüksek Lisansını Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü Organik Kimya Anabilim Dalı’da tamamladı. 3th Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants (MESMAP-2017) kongresinde poster sunumu yaptı. “Free Radical Scavenging Capacity and Antibacterial Activity of Wild *Cirsium creticum* from Turkey” ve “Investigation of Some Antibacterial and Antioxidant Properties of Wild *Cirsium vulgare* from Turkey” başlıklı iki makalede yer aldı. Tübitak 1001 116Z450 numaralı projede çalıştı.