



**NEOCRYPTODISCUS PAPILLARIS (BOISS.) HERRNST. & HEYN  
BİTKİSİ ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR**

**Feyyaz MIHOĞLUGİL**

**DOKTORA TEZİ  
FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HAZİRAN 2016**

Feyyaz MIHOĞLUGİL tarafından hazırlanan "*Neocryptodiscus papillaris* (Boiss.) Herms & Heyn. Bitkisi Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Farmakognози Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

**Danışman:** Prof. Dr. Fatma TOSUN

Farmakognози Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



**Başkan :** Prof. Dr. Bilge ŞENER

Farmakognози Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



**Üye :** Prof. Dr. Mahmut MİSKİ

Farmakognози Anabilim Dalı, İstanbul Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



**Üye :** Prof. Dr. Ayşe UZ

Farmakognози Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



**Üye :** Prof. Dr. Uğur TAMER

Analitik Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Tez Savunma

Tarihi: 24/06/2016

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

Doç. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Feyyaz MIHOĞLUGİL  
24/06/2016



*NEOCRYPTODISCUS PAPILLARIS* (BOISS.) HERRNST. & HEYN BİTKİSİ  
ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR

(Doktora Tezi)

Feyyaz MIHOĞLUGİL

GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Haziran 2016

ÖZET

Bu çalışmada Şanlıurfa Aşağı Dilimli köyünden toplanmış olan *Neocryptodiscus papillaris* (Boiss.) Herrnst. & Heyn bitkisinin sitotoksik aktivite yönünden incelenmesi ve bu aktiviteden sorumlu bileşiklerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla bitkide bulunan bileşikler bitkinin kök ve meyvesinden hazırlanan ekstrelerden kromatografik yöntemler ile izole edilmiş ve spektroskopik yöntemler ile teşhis edilmiştir. Ekstreler ve izole bileşiklerden üç tanesi MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile sitotoksikite yönünden değerlendirilmiştir. Bitkinin kök ve meyvelerinden toplam onsekiz bileşik izole edilmiştir. Beş bileşik ilk kez bu çalışmada izole edilmiştir. Bir bileşik ise daha önce bilinmekle beraber bitkilerden ilk defa izole edilmiştir. İzole edilen bileşiklerden beş tanesi ostol türevidir. Ostol bitkide en yüksek miktarda bulunan ve en aktif bileşiktir. *Neocryptodiscus papillaris* bitkisi sitotoksik yönden aktiftir ve ostol yönünden değerlendirilebilir.

Bilim Kodu : 1017  
Anahtar Kelimeler : *Neocryptodiscus papillaris*, ostol, MTT, kumarin  
Sayfa Adedi : 168  
Danışman : Prof. Dr. Fatma TOSUN

PHARMACOGNOSIC RESEARCHES ON *NEOCRYPTODISCUS PAPILLARIS*

(BOISS.) HERRNST. &amp; HEYN

(Ph. D. Thesis)

Feyyaz MIHOĞLUGİL

GAZI UNIVERSITY  
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

June 2016

## ABSTRACT

The aim of this study is to investigate cytotoxic activity and active compounds of the *Neocryptodiscus papillaris* (Boiss.) Herrnst. & Heyn collected from Şanlıurfa Aşağı Dilimli village. Active compounds of the plant were isolated from extracts of the root and fruit by using chromatographic methods. Isolated active compounds were identified by using spectroscopic methods. All extracts and three isolated compounds were investigated for cytotoxic activity by using MTT method on MCF-7 cell lines. Eighteen compounds were isolated from root and fruit extracts of the plant. Five of the isolated compounds were the first reported in this study. One compound although previously known, was isolated from the plants for the first time. Five of the isolated compounds were osthole derivatives. Osthole was the most abundant and most active compound. *Neocryptodiscus papillaris* has cytotoxic activity and can be used as source of osthole.

Science : 1017

Code

Key Words : *Neocryptodiscus papillaris*, osthole, MTT, coumarin

Page : 168

Number

Advisor : Prof. Dr. Fatma TOSUN

**TEŞEKKÜR**

Tez konumu belirleyip çalışmalarımın her anında beni destekleyen, hiçbir yardımını esirgemeyen ve her türlü yardımı sunan, her zor anımda varlığını hissettiren değerli hocam sayın Prof. Dr. Fatma TOSUN'a çok teşekkür ederim.

Gösterdiği ilgi ve destekten dolayı Farmakognozi Anabilim Dalı Başkanı ve tez izleme komitesi üyesi hocam sayın Prof. Dr. Bilge ŞENER'e çok teşekkür ederim. Çalışmalarımda engin bilgilerini her zaman gösteren tez izleme komitesi üyesi hocam sayın Prof. Dr. Mahmud MİSKİ'ye çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında yardımlarını gördüğüm Fakültemiz Farmakognozi Anabilim Dalı'ndaki hocalarıma ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Deneylem için maddi destek sağlayan Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Birimine (Proje No: 02/2014-01) çok teşekkür ederim.

Maddi ve manevi destekleriyle beni yalnız bırakmayan değerli aileme teşekkürlerimi sunarım.





**İÇİNDEKİLER**

	<b>Sayfa</b>
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	v
TEŞEKKÜR .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ .....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ .....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ .....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xvii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>5</b>
2.1. Botanik Bilgiler.....	5
2.1.1. Apiaceae (Umbelliferae) familyası.....	5
2.1.2. <i>Neocryptodiscus</i> cinsi.....	6
2.1.3. <i>Neocryptodiscus papillaris</i> (Boiss.) Herrnst. & Heyn. ....	7
2.2. Kumarinler.....	9
2.2.1. Kimyasal yapıları .....	9
2.2.2. Biyosentezleri.....	14
2.2.3. Özellikleri, ayırma yöntemleri, miktar tayinleri.....	16
2.2.4. Biyolojik aktiviteleri.....	17
2.2.5. Kumarinlerin kullanılışları .....	29
2.2.6. Fototoksisite .....	30
2.3. <i>Neocryptodiscus</i> Türleri Üzerinde Yapılmış Olan Çalışmalar.....	33

	<b>Sayfa</b>
2.4. Sitotoksik Aktivite Tayini .....	33
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>35</b>
3.1. Materyal .....	35
3.2. Yöntem.....	39
3.2.1. Ekstraksiyon .....	39
3.2.2. Ayırma ve saflaştırma için kullanılan yöntemler.....	40
3.2.3. Sitotoksik aktivite tayini .....	45
3.2.4. Biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlandırma çalışmaları .....	46
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>57</b>
4.1. Biyoaktivite Rehberliğinde İzolasyon Çalışması Bulguları .....	57
4.2. İzolasyon ile Elde Edilen Bileşiklere Ait Bulgular .....	60
4.2.1. NP-1 kodlu bileşiğe ait bulgular.....	60
4.2.2. NP-2 kodlu bileşiğe ait bulgular.....	63
4.2.3. NP-3 kodlu bileşiğe ait bulgular.....	68
4.2.4. NP-4 kodlu bileşiğe ait bulgular.....	72
4.2.5. NP-5 kodlu bileşiğe ait bulgular.....	85
4.2.6. NP-6 kodlu bileşiğe ait bulgular.....	90
4.2.7. NP-7 kodlu bileşiğe ait bulgular.....	93
4.2.8. NP-8 kodlu bileşiğe ait bulgular.....	98
4.2.9. NP-9 kodlu bileşiğe ait bulgular.....	102
4.2.10. NP-10 kodlu bileşiğe ait bulgular.....	114
4.2.11. NP-11 kodlu bileşiğe ait bulgular.....	119
4.2.12. NP-12 kodlu bileşiğe ait bulgular.....	125
4.2.13. NP-13 kodlu bileşiğe ait bulgular.....	127

	<b>Sayfa</b>
4.2.14. NP-14 kodlu bileşige ait bulgular.....	131
4.2.15. NP-15 kodlu bileşige ait bulgular.....	136
4.2.16. NP-16 kodlu bileşige ait bulgular.....	140
4.2.17. NP-17 kodlu bileşige ait bulgular.....	142
5. TARTIŞMA.....	147
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	149
KAYNAKLAR.....	151
ÖZGEÇMİŞ.....	167

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

<b>Çizelge</b>	<b>Sayfa</b>
Çizelge 2.1. Kumarin türevi bileşiklerin doğal kaynaklardaki yayılışı .....	10
Çizelge 3.1. İTK ve Preperatif İTK analizlerinde kullanılan çözücü sistemleri.....	41
Çizelge 3.2. Kolon kromatografisinde kullanılan çözücü sistemleri.....	43
Çizelge 3.3. NMR ve Kütle spektrumu için kullanılan cihazlar .....	45
Çizelge 3.4. Kök petrol eteri ekstresinin ana kolon fraksiyonları .....	47
Çizelge 3.5. Sitotoksik aktivite gösteren fraksiyonlarda bulunan bileşiklerin izolasyonu .....	48
Çizelge 3.6. Meyvenin petrol eteri ve diklorometan ekstresinin ana kolon fraksiyonları .....	52
Çizelge 3.7. Meyvenin petrol eteri ekstresi ve diklorometan ekstresinden bileşiklerin izolasyonu.....	53
Çizelge 4.1. Ekstre, fraksiyon ve bileşiklerin hücre canlılığı % inhibisyon oranları	57

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1. Basit kumarin örnekleri .....	11
Şekil 2.2. Piranokumarin örnekleri.....	12
Şekil 2.3. Linear furanokumarin örnekleri .....	13
Şekil 2.4. Açısız furanokumarin örnekleri .....	13
Şekil 2.5. Dimerkumarin örneği .....	14
Şekil 2.6. Kumarin biyosentezi .....	15
Şekil 2.7. Furanokumarin biyosentezi.....	16
Şekil 2.8. Kumarik asidin oluşumu.....	17
Şekil 2.9. Fototoksik kumarinlerin DNA'nın pirimidin halkasına bağlanması.....	31
Şekil 4.1. D kodlu fraksiyonun sitotoksosite grafiği .....	58
Şekil 4.2. NP-2 kodlu bileşiğin sitotoksosite grafiği.....	59
Şekil 4.3. NP-3 kodlu bileşiğin sitotoksosite grafiği.....	59
Şekil 4.4. NP-11 kodlu bileşiğin sitotoksosite grafiği.....	60
Şekil 4.5. Stigmasterol.....	61
Şekil 4.6. İzoperimperatorin .....	63
Şekil 4.7. Ostol .....	68
Şekil 4.8. 4'-senesioiloksi-ostol.....	73
Şekil 4.9. NP-5 .....	86
Şekil 4.10. NP-6 .....	90
Şekil 4.11. 4'-asetoksi-ostol.....	94
Şekil 4.12. Oksipösedanin hidrat .....	98
Şekil 4.13. Ostol-4'-nikotinat.....	103

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 4.14. 4'-hidroksi-ostol.....	115
Şekil 4.15. Oksipösedanin .....	119
Şekil 4.16. Skoparon .....	125
Şekil 4.17. Bergapten .....	128
Şekil 4.18. Psoralen.....	128
Şekil 4.19. Pranferol .....	131
Şekil 4.20. Skopoletin .....	136
Şekil 4.21. Suberozin.....	140
Şekil 4.22. İmperatorin.....	142

## RESİMLERİN LİSTESİ

<b>Resim</b>	<b>Sayfa</b>
Resim 2.1. <i>Neocryptodiscus papillaris</i> .....	8
Resim 3.1. <i>Neocryptodiscus papillaris</i> bitkisinin doğadaki görünüşü.....	35
Resim 3.2. <i>Neocryptodiscus papillaris</i> bitkisinin herbaryum örneği-1.....	36
Resim 3.3. <i>Neocryptodiscus papillaris</i> bitkisinin herbaryum örneği-2.....	37
Resim 3.4. Deneyde kullanılan kök.....	38
Resim 3.5. Deneyde kullanılan meyve.....	38
Resim 3.6. Kök ve meyvenin petrol eteri ekstreleri ve diklorometan ekstrelerinin karşılaştırmalı İTK analizi.....	42
Resim 4.1. NP-1 kodlu bileşiğin <sup>1</sup> H NMR spektrumu .....	62
Resim 4.2. NP-2 kodlu bileşiğin <sup>1</sup> H NMR spektrumu .....	64
Resim 4.3. NP-2 kodlu bileşiğin furanokumarin iskeletine ait protonları içeren genişletilmiş alt alan <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	65
Resim 4.4. NP-2 kodlu bileşiğin yan zincir proton sinyallerini içeren genişletilmiş üst alan <sup>1</sup> H NMR spektrumu .....	66
Resim 4.5. NP-2 kodlu bileşiğin H-1'a,b ve H-2' sinyallerini içeren genişletilmiş <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	67
Resim 4.6. NP-3 kodlu bileşiğin <sup>1</sup> H NMR spektrumu .....	69
Resim 4.7. NP-3 kodlu bileşiğin kumarin iskeletinin protonlarını içeren genişletilmiş alt alan <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	70
Resim 4.8. NP-3 kodlu bileşiğin izoprenil zincirinin protonlarını içeren genişletilmiş üst alan <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	71
Resim 4.9. NP-4 kodlu bileşiğin <sup>1</sup> H NMR spektrumu .....	74
Resim 4.10. NP-4 kodlu bileşiğin kumarin iskeletine ait protonları içeren genişletilmiş alt alan <sup>1</sup> H NMR spektrumu .....	75
Resim 4.11. NP-4 kodlu bileşiğin 7-metoksil grubunun, izoprenil zincirinin ve senesioik asidin esterinin metil protonlarını içeren genişletilmiş üst alan <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	76

<b>Resim</b>	<b>Sayfa</b>
Resim 4.12. NP-4 kodlu bileşiğin senesioik asit esterindeki ve izoprenil zincirindeki vinilik protonlar ile H-4'-metilenoksi protonlarını içeren genişletilmiş orta alan $^1\text{H}$ NMR spektrumu .....	77
Resim 4.13. NP-4 kodlu bileşiğin yüksek rezolüsyonlu kütle spektrumu.....	78
Resim 4.14. NP-4 kodlu bileşiğin COSY spektrumu .....	78
Resim 4.15. NP-4 kodlu bileşiğin ROESY spektrumu .....	80
Resim 4.16. NP-4 kodlu bileşiğin $^{13}\text{C}$ NMR spektrumu.....	81
Resim 4.17. NP-4 kodlu bileşiğin genişletilmiş üst alan $^{13}\text{C}$ NMR spektrumu .....	82
Resim 4.18. NP-4 kodlu bileşiğin genişletilmiş alt alan $^{13}\text{C}$ NMR spektrumu .....	83
Resim 4.19. NP-4 kodlu bileşik ile ostol $^1\text{H}$ NMR spektrumlarının karşılaştırılması.....	84
Resim 4.20. NP-5 kodlu bileşiğin $^1\text{H}$ NMR spektrumu .....	87
Resim 4.21. NP-5 kodlu bileşiğin aromatik bölgesinin genişletilmiş $^1\text{H}$ NMR spektrumu.....	88
Resim 4.22. NP-5 kodlu bileşiğin alifatik bölgesinin genişletilmiş $^1\text{H}$ NMR spektrumu.....	89
Resim 4.23. NP-6 kodlu bileşiğin $^1\text{H}$ NMR spektrumu .....	91
Resim 4.24. NP-6 kodlu bileşiğin alifatik bölgesinin genişletilmiş $^1\text{H}$ NMR spektrumu .....	92
Resim 4.25. NP-7 kodlu bileşiğin $^1\text{H}$ NMR spektrumu .....	95
Resim 4.26. NP-7 kodlu bileşiğin alifatik bölgesinin genişletilmiş $^1\text{H}$ NMR spektrumu .....	96
Resim 4.27. NP-7 ile ostol $^1\text{H}$ NMR spektrumlarının karşılaştırılması.....	97
Resim 4.28. NP-8 kodlu bileşiğin $^1\text{H}$ NMR spektrumu .....	99
Resim 4.29. NP-8 kodlu bileşiğin aromatik bölgesinin genişletilmiş $^1\text{H}$ NMR spektrumu .....	100
Resim 4.30. NP-8 kodlu bileşiğin alifatik bölgesinin genişletilmiş $^1\text{H}$ NMR spektrumu .....	101



<b>Resim</b>	<b>Sayfa</b>
Resim 4.31. NP-9 kodlu bileşiğin $^1\text{H}$ NMR spektrumu .....	104
Resim 4.32. NP-9 kodlu bileşiğin alifatik bölgesinin genişletilmiş $^1\text{H}$ NMR spektrumu .....	105
Resim 4.33. NP-9 kodlu bileşiğin aromatik bölgesinin genişletilmiş $^1\text{H}$ NMR spektrumu .....	106
Resim 4.34. NP-9 kodlu bileşiğin COSY spektrumu .....	107
Resim 4.35. NP-9 kodlu bileşiğin ROESY spektrumu .....	108
Resim 4.36. NP-9 kodlu bileşiğin yüksek rezolüsyonlu kütle spektrumu .....	109
Resim 4.37. NP-9 kodlu bileşiğin $^{13}\text{C}$ NMR spektrumu .....	110
Resim 4.38. NP-9 kodlu bileşiğin genişletilmiş üst alan $^{13}\text{C}$ NMR spektrumu...	111
Resim 4.39. NP-9 kodlu bileşiğin genişletilmiş alt alan $^{13}\text{C}$ NMR spektrumu....	112
Resim 4.40. NP-9 ile ostol $^1\text{H}$ NMR spektrumlarının karşılaştırılması .....	113
Resim 4.41. NP-10 kodlu bileşiğin $^1\text{H}$ NMR spektrumu .....	116
Resim 4.42. NP-10 kodlu bileşiğin aromatik ve alifatik bölgesinin genişletilmiş $^1\text{H}$ NMR spektrumu.....	117
Resim 4.43. NP-10 ile ostol $^1\text{H}$ NMR spektrumlarının karşılaştırılması.....	118
Resim 4.44. NP-11 kodlu bileşiğin $^1\text{H}$ NMR spektrumu .....	120
Resim 4.45. NP-11 kodlu bileşiğin ait aromatik bölgesinin genişletilmiş $^1\text{H}$ NMR spektrumu .....	121
Resim 4.46. NP-11 kodlu bileşiğin alifatik bölgesinin genişletilmiş $^1\text{H}$ NMR spektrumu .....	122
Resim 4.47. NP-11 kodlu bileşiğin H1', H2', H4' ve H5' protonlarına ait sinyallerin genişletilmiş $^1\text{H}$ NMR spektrumu .....	123
Resim 4.48. NP-11 kodlu bileşiğin H1' ve H2' protonlarına ait sinyallerin genişletilmiş $^1\text{H}$ NMR spektrumu.....	124
Resim 4.49. NP-12 kodlu bileşiğin $^1\text{H}$ NMR spektrumu .....	126
Resim 4.50. NP-13 kodlu bileşiğin $^1\text{H}$ NMR spektrumu .....	129

<b>Resim</b>	<b>Sayfa</b>
Resim 4.51. NP-13 kodlu bileşiğin aromatik bölgesinin genişletilmiş $^1\text{H}$ NMR spektrumu .....	130
Resim 4.52. NP-14 kodlu bileşiğin $^1\text{H}$ NMR spektrumu .....	132
Resim 4.53. NP-14 kodlu bileşiğin aromatik bölgesinin genişletilmiş $^1\text{H}$ NMR spektrumu.....	133
Resim 4.54. NP-14 kodlu bileşiğin alifatik bölgesinin genişletilmiş $^1\text{H}$ NMR spektrumu .....	134
Resim 4.55. NP-14 kodlu bileşiğin H1" ve H2" proton sinyallerinin genişletilmiş $^1\text{H}$ NMR spektrumu .....	135
Resim 4.56. NP-15 kodlu bileşiğin $^1\text{H}$ NMR spektrumu .....	137
Resim 4.57. NP-15 kodlu bileşiğin $^1\text{H}$ NMR spektrumu-2.....	138
Resim 4.58. NP-15 kodlu bileşiğin aromatik bölgesinin genişletilmiş $^1\text{H}$ NMR spektrumu.....	139
Resim 4.59. NP-16 kodlu bileşiğin $^1\text{H}$ NMR spektrumu .....	141
Resim 4.60. NP-17 kodlu bileşiğin $^1\text{H}$ NMR spektrumu .....	143
Resim 4.61. NP-17 kodlu bileşiğin $^1\text{H}$ NMR spektrumu-2.....	144
Resim 4.62. NP-17 kodlu bileşiğin aromatik bölgesinin genişletilmiş $^1\text{H}$ NMR spektrumu.....	145

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

### Simgeler

hz	Hertz
kg	Kilogram
MHz	Megahertz
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
µg	Mikrogram
µM	Mikromolar
nm	Nanometre
ppm	Milyonda bir birim

### Kısaltmalar

AChe	Asetilkolinesteraz
AKT	Protein kinaz B
AMPK	Aktive edilmiş protein kinaz
BChE	Butirikolinesteraz
BMP-2	Kemik morfojeniik protein 2
c-MET	Hepatosit büyüme faktörü reseptörü
COSY	Correlation spectroscopy
DMAPP	Dimetilallilpirofosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EPM	Yükseltilmiş artı labirent testi
HCC	Hepatoselüler karsinom
HIV-1	İnsan bağışıklık güçsüzleştirici virüs

### Kısaltmalar

HPLC(YBSK)	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HRMS	Yüksek rezolüsyonlu kütle spektrumu
HSP	Isı şok protein
IC50	İnhibisyon konsantrasyonunun yarısı
IL-2	İnterlökin 2
IR	Infrared
İTK	İnce Tabaka kromatografisi
JNK1/2	c-jun N-terminal kinaz ½
LD50	Letal dozun yarısı
MCL-1	Myeloid lösemi hücresi farklılaştırılmış proteini

<b>MİK</b>	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
<b>MMP-2</b>	Matriks metalloproteinaz
<b>MPLC</b>	Orta basınçlı sıvı kromatografisi
<b>MS</b>	Kütle spektrumu
<b>mTOR</b>	Atipik serin/treonin kinaz enzimi
<b>MTT</b>	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difenil tetrazolium bromid]
<b>NFAT</b>	Aktive T hücresi nükleer faktörü
<b>NF-κB</b>	Nükleer faktör kappa B
<b>NMR</b>	Nükleer manyetik rezonans
<b>NO</b>	Nitrik oksit
<b>OSTERIX</b>	Kemik transkripsiyon faktör
<b>P38 MAP</b>	Mitojen-aktiveded protein
<b>PDE</b>	Fosfodiesteraz
<b>PİTK</b>	Preperatif ince tabak kromatografisi
<b>PKC</b>	Protein kinaz
<b>PPAR</b>	Proliferator aktive edici reseptör
<b>PUVA</b>	Psoralen+ultraviyoleA
<b>Rf</b>	Retensiyon faktörü
<b>ROS</b>	Reaktif oksijen türleri
<b>ROESY</b>	Rotatin-frame nuclear overhause effect spectroscopy
<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklamalar</b>
<b>RUNX-2</b>	Kemik transkripsiyon faktör proteini
<b>TNF-α</b>	Tümör nekroz faktör alfa
<b>TRAP-</b>	Tartarat-rezistans asit fosfataz
<b>UV</b>	Ultraviyole
<b>VSV</b>	Veziküler stomatit virüs

## 1. GİRİŞ

*Neocryptodiscus* Hedge & Lamond (Apiaceae) türleri çok yıllık, otsu ve dik gövdeli bitkilerdir [1]. Yeryüzünde beş [2] ülkemizde ise bir *Neocryptodiscus* türü yetişmektedir [3, 4].

*Neocryptodiscus papillaris* (Boiss.) Herrnst. & Heyn 40-60 cm boyunda, gövdesi sert kıllarla kaplı bir bitki olup ülkemizde Mardin ve civarında yetişmektedir [3, 4].

*N. papillaris* bitkisi Boissier tarafından Mezopotamya'dan toplanmış örneğe göre *Cachrys papillaris* Boiss. olarak isimlendirilmiştir. Bitki Türkiye florasında *Prangos* cinsi altında kayıtlı olmakla beraber *Prangos* monografını hazırlayan Herrnstadt ve Heyn *Cachrys papillaris* örneklerinin olgunlaşmamış meyve taşıdığını, olgun meyve boyutunun *Prangos* meyvelerinden belirgin şekilde daha küçük olacağını düşündüklerini ayrıca stilopodyumun merikarpların arasına gizlenmiş olması nedeniyle bu türün *Prangos* cinsine dahil olmasının şüpheli olduğunu belirtmişlerdir [3].

Herrnstadt ve Heyn inceledikleri holotip ile Türkiye (Mardin) ve Irak (Musul)'dan toplanan *Cachrys papillaris* örneklerinin çiçekli ve olgunlaşmamış meyve taşıyan bitkiler olduğunu, bu üç örneğin yaprak ve infloresans özelliklerinin benzer olduğunu, yapraklar ve gövde üzerinde papil taşıdıklarını, olgun meyve boyutlarının *Prangos* meyvelerinden belirgin şekilde daha küçük olacağını düşündüklerini, ayrıca stilopodyumun merikarpların arasına gizlenmiş olduğunu belirtmişlerdir. Herrnstadt ve Heyn daha sonra Suriye'den toplanan ve Cenova herbaryumunda *Cachrys papillaris* olarak kayıtlı iki örneği incelemişlerdir. Bu örnekler de papil taşımaktadır ve meyveleri olgunlaşmıştır. Şizokarp iki eşit merikap taşımakla birlikte çoğunlukla bir merikap daha az gelişmiştir. Stilopodyum her zaman merikarpların arasına gizlenmiştir ve bu daha çok *Cryptodiscus* cinsinin karakteristik özelliğidir. *Cryptodiscus*'un bu durumu *Prangos* monografında tartışılmamıştır. Pimenov ve Tikhomirov 1983 de yaptıkları yayında *Cryptodiscus*'u *Prangos* cinsi içinde ve *Cryptodiscus* seksiyonunda vermişlerdir. Pimenov ve Tikhomirov'a göre meyve şekli ve gizlenmiş stilopodyum cins farklılığı oluşturma seviyesinde değildir, ayrıca

*Prangos* ve *Cryptodiscus*' un kimyasal profillerini de benzer bulmuşlardır [5].

Hedge ve Lamond bu sınıflandırma yaklaşımını takip etmemişler, İran'dan toplanan ve *Cryptodiscus* olarak kabul edilen üç türü *Prangos*'lardan ayrı ve yeni bir cins olarak belirtmişler ve *Cryptodiscus* Fisch & C. A. Mey.'in 1838 de yayınlanmış olan *Cryptodiscus corda*'nın homonimi olduğunu gördükleri için bu üç türü *Neocryptodiscus* Hedge & Lamond cins adı altında *N. persicus* (Boiss.) Hedge & Lamond, *N. ammophilus* (Bunge) Hedge & Lamond ve *N. didymus* (Regel) Hedge & Lamond olarak yayınlamışlardır [1, 5]. *Neocryptodiscus*'un merikarları *Prangos*'larınkinden daha küçüktür, yaprakları da değişik oranlarda pennatisektir ve bu iki özellik Pimenov ve Tikhomirov tarafından yapılan *Cryptodiscus* tanımında kullanılmamıştır. Herrstadt ve Heyn, Cenova herbaryumunda inceledikleri iki örneğin olgun meyvelerinin bazı *Prangos* türlerinininkine yakın boyutta (10-14 x 11-17 mm) ancak Hedge ve Lamond tarafından tanımlanan *Neocryptodiscus didymus* meyvelerine çok daha yakın boyutta olduğunu belirtmişlerdir. Sonuç olarak meyve şekli ve gizlenmiş stilopodyumun farklı cins özelliği olarak yeterli olduğunu ve *Cachrys papillaris* Boiss.'in *Neocryptodiscus* cinsine transfer edilmesi gerektiğini belirtmişlerdir [5].

Apiaceae familyası bitkileri kumarin, seskiterpen, seskiterpen kumarin vb. yapıda bileşikler taşımaktadırlar [6-10]. Kumarinlerin antibakteriyel, antienflamatuar, spazmolitik, sitotoksik aktivitelerinin olduğu, furanokumarinlerin ise vitiligo tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir [6-9, 11]. Seskiterpen kumarinlerin ise antibakteriyel, antienflamatuar, antiviral, asetilkolinesteraz inhibitörü, sitotoksik ve antitümör aktivite gösterdikleri saptanmıştır [10, 12].

Sitotoksik aktivitelerinden dolayı kumarin türevi bileşiklerden yeni kanser ilacı geliştirilmesi konusunda pek çok araştırma yapılmıştır [12-16].

*Neocryptodiscus* türleri üzerinde yapılmış olan fitokimyasal çalışmaları araştırdığımızda *N. didymus* bitkisinin meyvelerinden ve köklerinden kumarin yapısında bileşiklerin izole edildiği, *N. papillaris* bitkisinin ise meyvelerinden elde edilen uçucu yağın GC-MS analizinin yapıldığı görülmüştür [17-19].

Literatür araştırması ile sadece meyvelerinin uçucu yağ analizinin [17] yapılmış olduğunu belirlediğimiz *N. papillaris* bitkisinin kök ve meyvelerinden hazırladığımız ekstrelerde sitotoksik aktivite saptanmış ve bu aktiviteden sorumlu bileşiklerin belirlenmesi için biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlandırma çalışmaları yapılması planlanmıştır. Böylece hem *N. papillaris* bitkisinin kök ve meyvelerinde bulunan sekonder metabolitler izole edilip kimyasal yapıları aydınlatılmış hem de bu bileşiklerin biyolojik aktiviteleri saptanmış olacaktır.







## 2. GENEL BİLGİLER

*Neocryptodiscus papillaris* (Boiss.) Herrnst. & Heyn bitkisi üzerinde farmakognozok araştırmalar isimli çalışmamızla ilgili genel bilgiler, botanik bilgiler, kumarinler hakkında genel bilgiler, *Neocryptodiscus* türleri üzerinde yapılmış olan çalışmalar, sitotoksik aktivite tayini hakkında bilgiler olmak üzere dört bölümden oluşmaktadır.

### 2.1. Botanik Bilgiler

#### 2.1.1. Apiaceae (Umbelliferae) familyası

Spermatophyta bölümünün Angiospermae alt bölümü, Dicotyledonae sınıfı, Apiales takımında yer alan Apiaceae familyası 300 cins ve 3000 kadar türü kapsamaktadır [4, 20-23]. Ülkemizde 99 cins ve 419 türü bulunmaktadır [3, 20].

Genellikle bir veya çok yıllık otsu bitkilerdir. Yapraklar alternan, nadiren sub-opozit veya halka dizilişli, genellikle stipulasız, basitten çok paralıya kadar, petioller genellikle geniş ve tabanda okrealıdır. iek durumu genellikle bileşik umbella, nadiren basit umbella, kapitulum ve simozdur. Ana umbellanın tabanında brakteler ve ikincil umbellanın tabanında brakteoller bulunabilir veya bulunmayabilir. Çiçekler epigin, hermafrodit veya tek eşeylidir, bitki nadiren dioktir. Sepal yoktur veya küçüktür, bazen sepaller eşit büyüklükte olmayan beş küçük diş şeklinindedir. Beş tane petal taşımaktadır, petaller genellikle tepede ikiye atallanmaktadır, bütün petaller eşittir veya diş tarafta dizili olanlar ieridekilerden daha geniştir. Petaller beyaz, sarı, sarımsı-yeşil, açık mavi veya pembe renklidir. Beş tane stamen taşımaktadır. Ovaryum iki karpellidir, her lokulusta bir ovül yer alır, iki stilus taşır, stilus tabanları stilopodyum şeklinindedir ve ovaryumun tepesini örter. Meyveler olgunlukla her biri tek tohumlu iki merikarpa ayrılan şizokarptır. Merikarplar karpoforla dorsal veya lateral olarak birbirine bağlıdır. Her merikarpta beş tane kosta ve dört tane valekulum bulunmaktadır. Mezokarpta valekulumların hizasında ve merikarpların birbirine bakan yüzlerinde salgı kanalları vardır. Umbelliferae familyası bitkilerinde her merikarptaki salgı kanalının sayısı ve düzenlenişi farklıdır. Dorsal yüzeyde genellikle altı, bazen dört; birleşme yüzeyinde ise iki salgı kanalı

bulunmaktadır. Benzer kanallar bitkinin kök ve gövdesinde de oluşmaktadır. Merikarplar üzerindeki dorsal ve lateral kostalar uzayarak birer kanat şeklini alabilir. Kostalar, Umbelliferae familyasındaki cins ve türlerin teşhisi için çok önemlidir. Teşhiste yaprakların alternan, pennat, bipennat veya tripennat olması da önem taşımaktadır [3, 20-24].

### 2.1.2. *Neocryptodiscus* cinsi

Hedge ve Lamond, Pimenov ve Tikhomirov tarafından *Prangos* cinsi içinde verilmiş olan *Cryptodiscus* cinsini meyve şekli ve stilopodyumun merikarpların arasına gizlenmiş olması nedeniyle *Prangos* cinsinden ayrı ve yeni bir cins olarak belirtmişler, ayrıca *Cryptodiscus* Fisch & C. A. Mey.'in 1838 de yayınlanmış olan *Cryptodiscus corda*'nın homonimi olduğunu gördükleri için de *Cryptodiscus* olarak bilinen üç türü *Neocryptodiscus* Hedge & Lamond cins adı ile *N. persicus* (Boiss.) Hedge & Lamond, *N. ammophilus* (Bunge) Hedge & Lamond ve *N. didymus* (Regel) Hedge & Lamond olarak yayınlamışlardır [1, 5].

*Neocryptodiscus* türleri çok yıllık otsu bitkilerdir. Gövdesi tek, sert ve diktir. Yapraklar tabanda büyük, saplı ve tripennattır. Terminal kısmı şemsiye şeklindedir. Kaliks dişleri tam olarak görülmemektedir. Brakteler ve brakteoller yuvarlaktır, nadiren yoktur. Petaller yeşilimsi ve emarginat değildir, tepe kısmı kavislidir. Meyve perikarpı kalın süngerimsidir. Merikarp tabandan uca burulmuş gibidir. Stilopodyum olgun meyvelerde görünmez gizlenmiştir. Çok sayıda şerit vardır. 5 halkalı ve gizlenmiştir. Tohumlar enine bölmelidir, birleşme yerleri konkavdır [1].

Günümüzde ise *Neocryptodiscus* cinsine ait *Neocryptodiscus persicus*, *Neocryptodiscus ammophilus*, *Neocryptodiscus didymus*, *Neocryptodiscus papillaris* ve *Neocryptodiscus cachroides* olmak üzere beş tür bulunmaktadır [2].

### 2.1.3. *Neocryptodiscus papillaris* (Boiss.) Herrnst. & Heyn

(Syn: *Cachrys papillaris* Boiss.)

Bitki Türkiye florasında *Prangos* cinsi altında *Cachrys papillaris* Boiss. olarak kayıtlı olmakla beraber *Prangos* monografını hazırlayan Herrnstadt ve Heyn *Cachrys papillaris* örneklerinin olgunlaşmamış meyve taşıdığını, olgun meyve boyutunun *Prangos* meyvelerinden belirgin şekilde daha küçük olacağını düşündüklerini ayrıca stilopodyumun merikarpların arasına gizlenmiş olması nedeniyle bu türün *Prangos* cinsine dahil olmasının şüpheli olduğunu belirtmişlerdir [3].

Herrnstadt ve Heyn daha sonra Suriye'den toplanan ve Cenova herbaryumunda *Cachrys papillaris* olarak kayıtlı iki örneği incelemişlerdir. Bu örneklerin papil taşıdığını, meyvelerinin olgunlaşmış olduğunu, bazı *Prangos* türlerinin meyvesine yakın boyutta (10-14 x 11-17 mm) ancak Hedge ve Lamond tarafından tanımlanan *Neocryptodiscus didymus* meyvelerine çok daha yakın boyutta olduğunu belirtmişlerdir. Şizokarp iki eşit merikap taşımakla birlikte çoğunlukla bir merikap daha az gelişmiştir. Stilopodyum her zaman merikarpların arasına gizlenmiştir. Tüm bu özellikleri nedeniyle *Cachrys papillaris* Boiss.'i *Neocryptodiscus* cinsine transfer ederek *Neocryptodiscus papillaris* (Boiss.) Herrnst. & Heyn olarak isimlendirip yayınlamışlardır [5].

*N. papillaris* bitkisinin yayılışı literatürden [3-5] aldığımız bilgilere ve çalışmamızda kullandığımız örneğin toplandığı yöreye göre aşağıdaki gibidir:

Tip: Mezopotamya, *Aucher* 3582

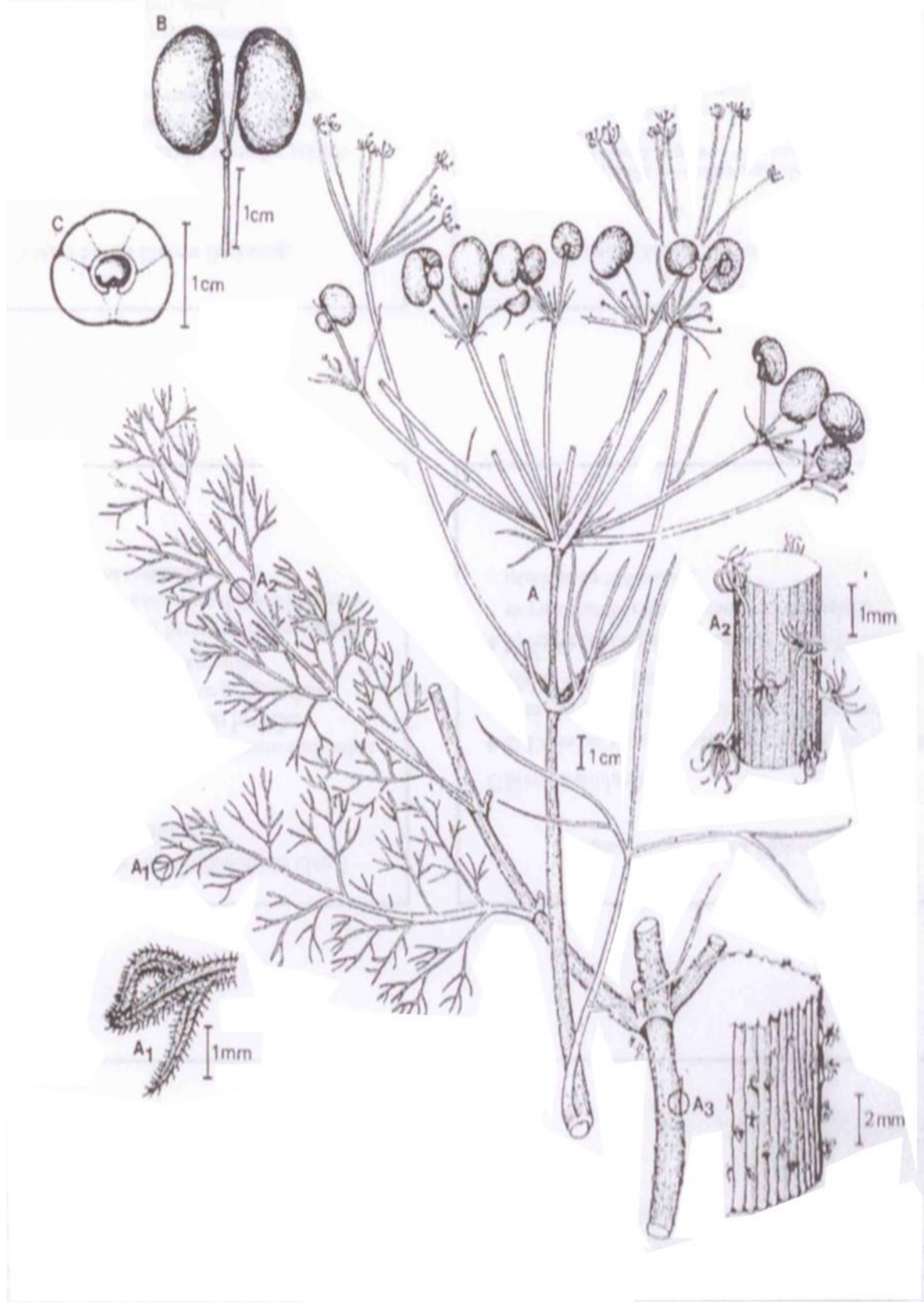
Irak: Musul'un kuzeyi, 25. 4. 1933, *Eig & Zohary* (HUJ)

Suriye: Tell Qotchek'in kuzeyi, 13. 5. 1955, *Pabot*

Suriye: Gatatchak dağının Güney-Doğusu, 13. 5. 1955, *Pabot*

Türkiye: Mardin ve Kotschassar arasında, *Hausknecht* 515 (G-Boiss.)

Şanlıurfa: Viranşehir-Aşağı Dilimli Köyü, 16. 06. 2013 , A Duran



Resim 2.1. *Neocryptodiscus papillaris* (Herrnstadt, 1997) A: Işın; B: Şizokarp; C: Merikarpın kesiti

## 2.2. Kumarinler

Kumarin ilk kez A. Vogel tarafından 1820 yılında Fabaceae familyası bitkisi olan *Dipteryx odorata* (*Coumarouna odorata*)'nın tohumlarından (Tonca Semen, Tonka bean) izole edilmiş ve bitkinin yöresel isminden (cumaru/coumarou) yararlanarak adlandırılmıştır. Tohumları parfümeride kullanılan bitki Venezuela, Kolombiya, Brezilya ve Guyana'da yetişmektedir [6, 7, 25].

Kumarin 2H-1-benzopiran-2-on yapısındadır [7, 25, 26]. Bitki, bakteri ve mantarlardan sekonder metabolit olarak 1300'den fazla kumarin türevi bileşik izole edilip yapısı aydınlatılmıştır. Kumarin türevi bileşikler Apiaceae ve Rutaceae familyaları başta olmak üzere yaklaşık 30 farklı familyada 150'nin üzerinde türde bulunmaktadır [26, 27]. Kumarinler, bitkilerin tüm kısımlarında bulunmakla beraber en çok meyve ve tohumda bulunur. Bunu kök, gövde, yapraklar ve lateks kısımları takip eder. Bazı uçucu yağlarda da kumarin bulunmaktadır [27, 28]. Miktarları çevre koşulları ve mevsimlere göre değişmektedir. Kumarinlerin fonksiyonları tam olarak açıklanamasa da bitkinin büyümesini düzenlediği, bakteriyostatik ve fungostatik olarak etki yaptığı düşünülmektedir [27, 29].

Kumarin türevi bileşiklerin doğal kaynaklardaki yayılışı [6] Çizelge 2.1'de verilmektedir.

### 2.2.1. Kimyasal yapıları

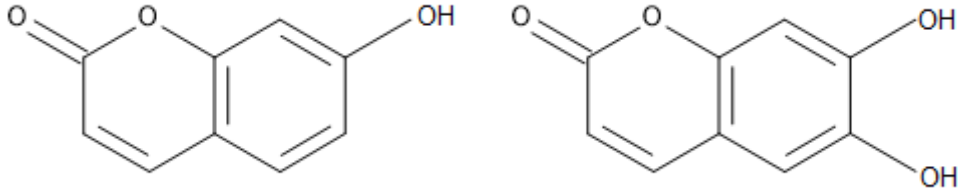
Hemen hemen tüm doğal kaynaklı kumarin türevi bileşikler 7. konumda hidroksil grubu taşır (umbelliferon), 6,7-di- ve 6,7,8-trihidroksi kumarinler de vardır. Hidroksil grupları metileteri oluşturarak metoksilli kumarinleri ya da oz bağlanması ile kumarin heterozitlerini meydana getirirler. 6. ve/veya 8. konumdan ya da fenolik hidroksil üzerinden eter bağı ile prenil grubu katarak daha kompleks kumarinleri oluştururlar. 6. ya da 8. konumdan prenilenmiş kumarinler komşu fenolik hidroksille eter bağı oluşturarak düz (linear) ya da açısız (angular) furano- veya pirano-kumarinleri meydana getirirler ve dimerkumarinlere de rastlanmaktadır [7].

Çizelge 2.1. Kumarin türevi bileşiklerin doğal kaynaklardaki yayılışı

Bacteriophyta	Actinomycetes, Streptomyces, Phycomycetes
Mycophyta	Ascomycetes, Basidiomycetes
Pteridophyta	Polypodiaceae, Lindsayioideae
Spermatophyta	<p>Gymnospermae Cupressaceae, Pinaceae</p> <p>Angiospermae Monocotyledonae Araceae, Cyperaceae, Graminae, Iridaceae, Juncaceae, Liliaceae, Musaceae, Orchidaceae, Palmae</p> <p>Dicotyledonae Acanthaceae, Aceraceae, Amaranthaceae, Anacardiaceae, Apiaceae, Apocynaceae, Araliaceae, Aristolochiaceae, Asclepiadaceae, Balsaminaceae, Berberidaceae, Bignoniaceae, Burseraceae, Calycanthaceae, Campanulaceae, Capparidaceae, Caprifoliaceae, Caryophyllaceae, Chenopodiaceae, Chloranthaceae, Cneoraceae, Combretaceae, Compositae, Convolvulaceae, Coriariaceae, Crassulaceae, Cruciferae, Cunoniaceae, Diapensiaceae, Dipsacaceae, Dipterocarpaceae, Ebenaceae, Ericaceae, Euphorbiaceae, Fagaceae, Fouquieriaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Glaucidiaceae, Goodeniaceae, Guttiferae, Hamamelidaceae, Hippocastanaceae, Hippuridaceae, Labiatae, Lauraceae, Lecythidaceae, Leguminosae, Loasaceae, Loganiaceae, Lythraceae, Magnoliaceae, Malvaceae, Melastomaceae, Maliaceae, Moraceae, Myrtaceae, Nepenthaceae, Ochnaceae, Olacaceae, Oleaceae, Papaveraceae, Passifloraceae, Pittosporaceae, Platanaceae, Polemoniaceae, Polygonaceae, Ranunculaceae, Rhizophoraceae, Rosaceae, Rubiaceae, Rutaceae, Salicaceae, Samydaceae, Sapindaceae, Sapotaceae, Saxifragaceae, Scrophulariaceae, Simaroubaceae, Solanaceae, Sonneratiaceae, Sterculiaceae, Tamaricaceae, Theaceae, Thymelaeaceae, Tiliaceae, Ulmaceae, Violaceae, Vitaceae, Zygophyllaceae</p>

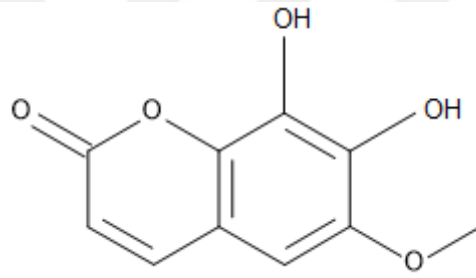
### Basit kumarinler

Kumarin halkasına mono, di, tri sübstitüentlerin bağlanması ile meydana gelen kumarinlerdir.



Umbelliferon

Eskuletin

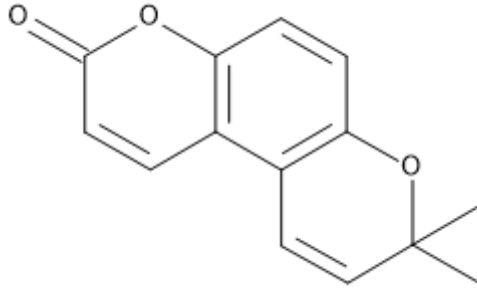


Fraksetin

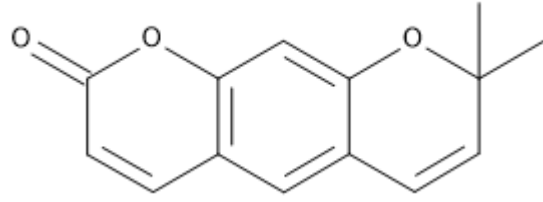
Şekil 2.1. Basit kumarin örnekleri

### Piranokumarinler

Kumarin halkasının piran halkası ile kondensasyonu sonucu meydana gelen kumarin türevleri bu grubu oluşturmaktadır.



Seselin



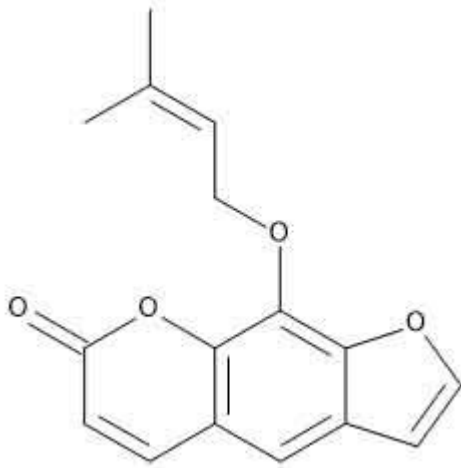
Ksantiletin

## Şekil 2.2. Piranokumarin örnekleri

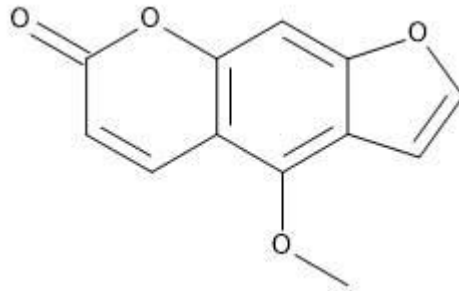
### Furanokumarinler

Kumarin halkasının furan halkası ile kondensasyonu sonucu meydana gelen kumarin türevleridir. Furan halkasının kumarin halkasına bağlanma yerine göre ( $C_6/C_7$ ) linear (düz) ve ( $C_7/C_8$ ) angular (açısal) furanokumarinler olmak üzere iki gruba ayrılırlar [6, 7, 31].

### *Linear (Düz) furankumarinler*

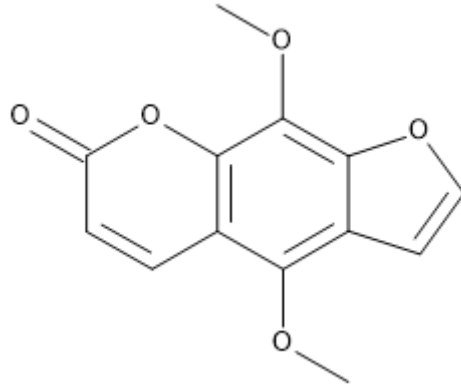


İmperatorin



Bergapten

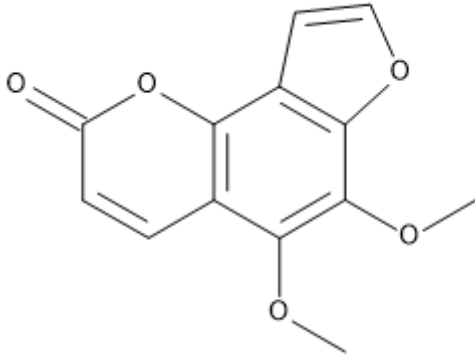




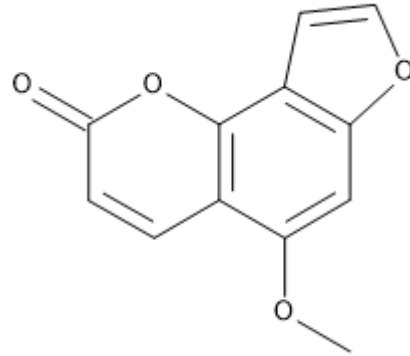
İzopimpinellin

Şekil 2.3. Linear furanokumarin örnekleri

*Açısal (Angular) furanokumarinler*



Pimpinellin

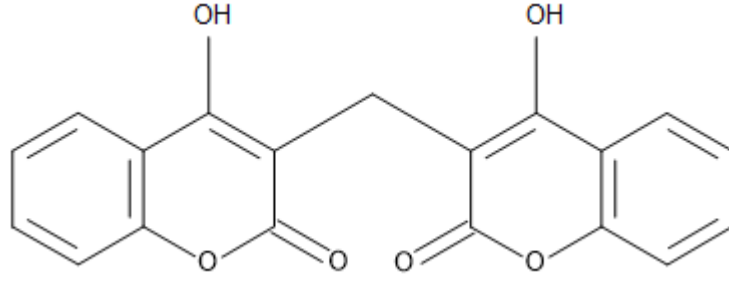


İzobergaptin

Şekil 2.4. Açısal furanokumarin örnekleri

### Dimerkumarinler

İki kumarin halkasının aktif olan 3. konumundan birleşmesi ile dimer yapıda kumarin türevi bileşikler meydana gelmektedir.



Bishidroksikumarin

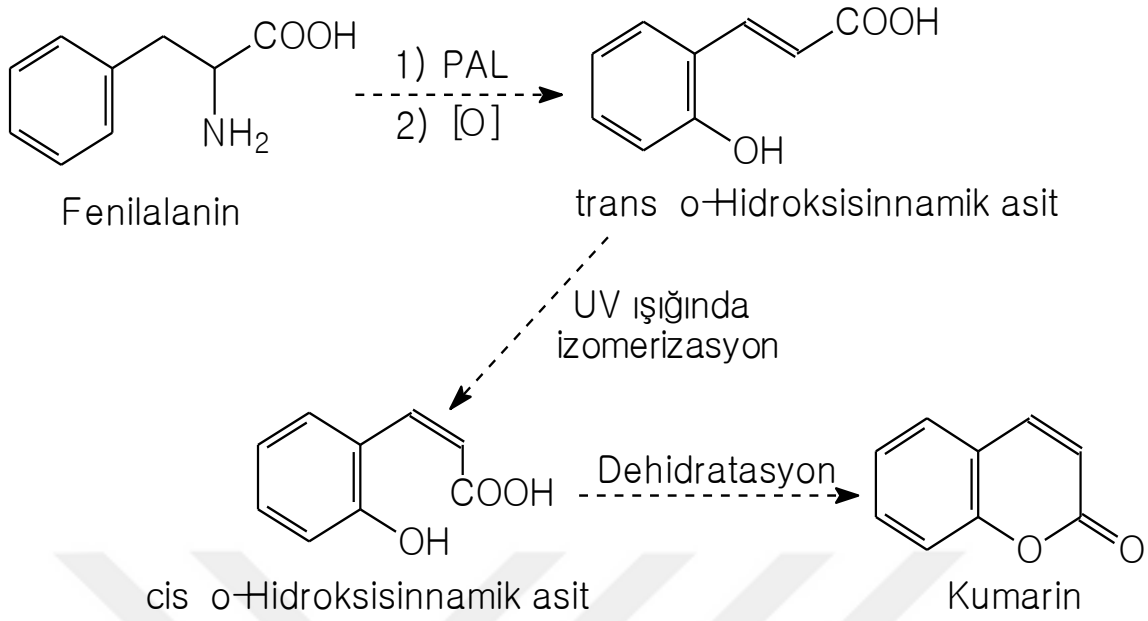
Şekil 2.5. Dimerkumarin örneği

### 2.2.2. Biyosentezleri

#### Kumarin biyosentezi

Fenilalanin'in önce enzimatik deaminasyonu ve sonra orto konumundan oksidasyonu ile *trans*-orto-hidroksisinnamik asit oluşmaktadır. *Trans*-orto-hidroksisinnamik asitin UV ışık katalizörlüğünde izomerizasyon ile *cis* formuna dönüşmesi neticesinde fenol ve asit grupları birbirine yakın olan *cis*-orto-hidroksisinnamik asit meydana gelmektedir. *Cis*-hidroksisinnamik asidin dehidratasyonu ile de kumarin yapısı oluşmaktadır (Şekil 2.6) [8, 30].

Önce para daha sonra orto konumunda oksidasyondan sonra izomerizasyon ve dehidratasyon olursa 7-hidroksi kumarinler meydana gelmektedir [8].

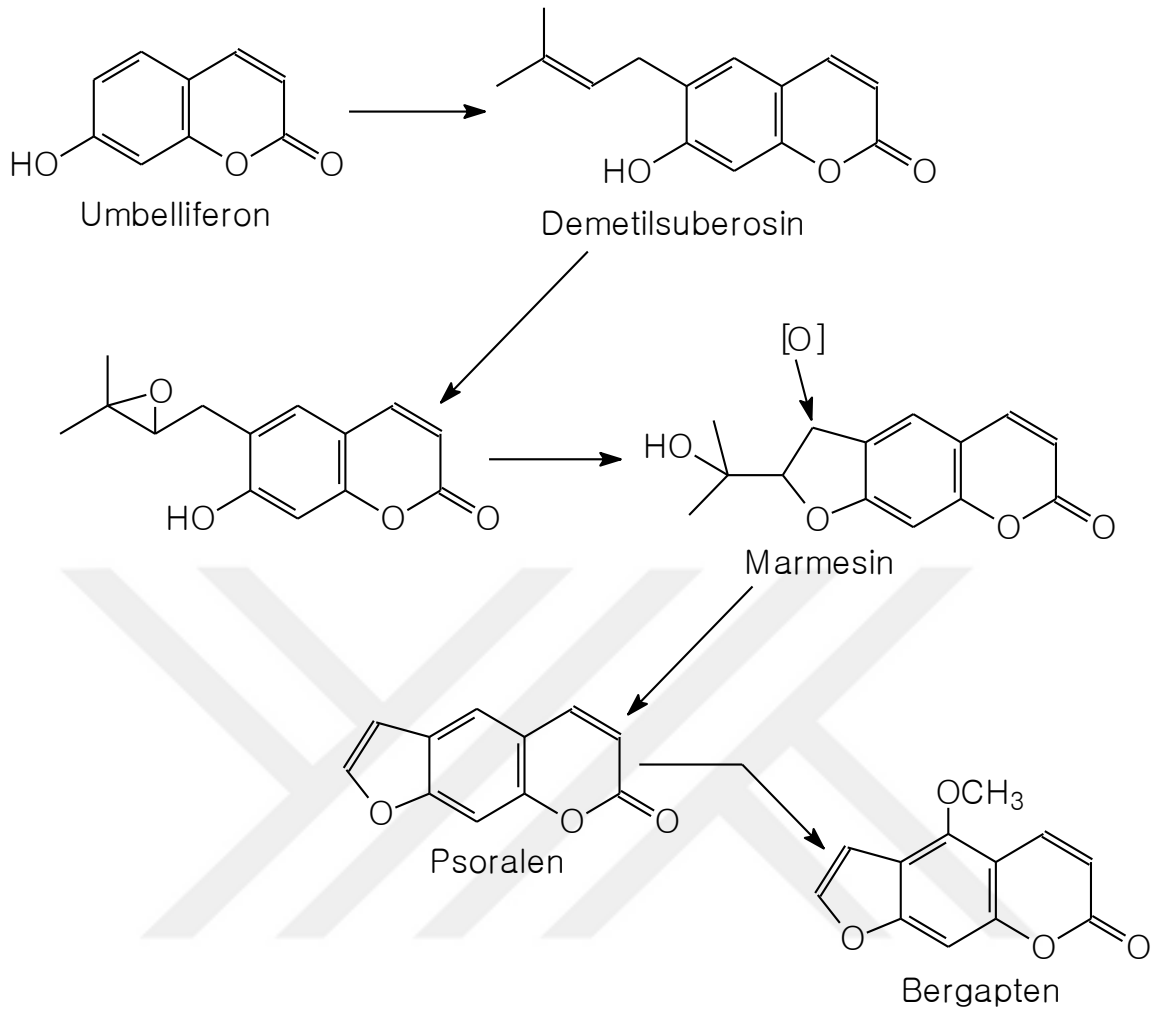


PAL: Fenil alanin liyaz enzimi

Şekil 2.6. Kumarin biyosentezi

### Furanokumarin biyosentezi

Furan halkasının oluşumu 7-hidroksikumarin'in benzen halkasının 6. veya 8. pozisyonundan dimetilallil pirofosfat (DMAPP) ile prenilasyonuyla gerçekleşmektedir. 6. konumdaki prenilasyon ile linear furanokumarinler, 8. konumdaki prenilasyon ile de angular furanokumarinler meydana gelmektedir [6, 7, 31]. 6. veya 8. izoprenilkumarin'in siklizasyonu muhtemelen 7. konumdaki hidroksilin, izopentenil zincirindeki çifte bağın oksidasyonu ile oluşan epoksite nükleofilik atağı ile meydana gelmektedir. Oluşan hidroksiizopropildihydrofuranokumarin'in oksidatif dealkilasyonu neticesinde furanokumarin yapısı meydana gelmektedir. Daha sonra 5. veya 8. ya da her iki pozisyonda oksidazlar ve O-metiltransferazların katalizlemesi ile süstitüsyon olmaktadır (Şekil 2.7) [31, 32].



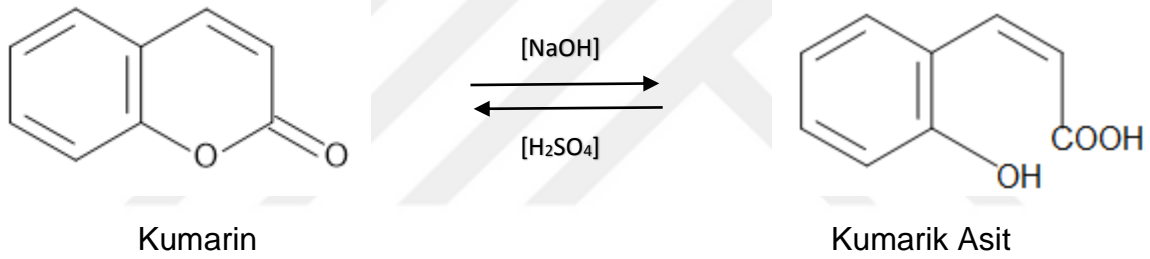
Şekil 2.7. Furanokumarin biyosentezi

### 2.2.3. Özellikleri, ayırma yöntemleri, miktar tayinleri

Kumarinler serbest halde alkolde ve apolar çözücülerde, heterozit halinde ise metanolde ve suda çözünürler. Bu özelliklerinden ekstraksiyon işlemlerinde yararlanır [7, 33]. Taze veya kurutulmuş bitki materyalinin petrol eteri, benzen, kloroform, eter, aseton ve metanol gibi çeşitli solvanlarla ekstraksiyonu ile kumarin karışımı elde edilmektedir [6]. Kumarinlerin tüketilmesinde klasik ekstraksiyon yöntemleri kullanıldığı gibi süperkritik sıvı ekstraksiyonu, mikrodalga yardımcı solvan ekstraksiyonu, orta basınçlı katı-sıvı ekstraksiyonu, basınçlı sıvı ekstraksiyonu gibi modern ekstraksiyon yöntemleri de kullanılmaktadır [33]. Ekstraksiyonla elde edilen kumarin karışımından kumarin türevi bileşiklerin ayırımında kağıt kromatografisi [6], İTK (İnce Tabaka Kromatografisi) [6-8, 33-42], PİTK (Preperatif İnce Tabaka

Kromatografisi) [6, 8, 33, 43], kolon kromatografisi [6, 39, 44, 45], MPLC (orta basınçlı sıvı kromatografisi) [38, 42, 45], HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) [6-8, 36, 38, 39, 42, 44, 46, 47-50] ve fraksiyonlu kristallendirme [6]'den yararlanılmaktadır.

Kumarinler yapılarına, taşıdıkları sübstitüentlere ve KOH ya da NaOCH<sub>3</sub> ile alkalilendirildiklerindeki durumlarına göre karakteristik UV spektrumu verirler. Kumarinler, İTK'da elde edilen kromatogram UV ışıkta incelendiğinde, revelatör olarak püskürtülen amonyak ile renk şiddeti artan, mavi, sarı ve mor renkte görülürler. Kumarinler alkali ile muamele edildiği zaman lakton halkasının açılması ile kumarik asit meydana gelmektedir. Kumarik asit de UV ışığı altında kuvvetli mavi-yeşil fluoresans göstermektedir [7, 33, 51].



Şekil 2.8. Kumarik asidin oluşumu

Miktar tayinleri spektrofotometrik olarak ya da HPLC ile yapılabilir [6, 7, 50].

Kumarin türevi bileşiklerin yapılarının aydınlatılmasında Ultraviyole (UV) [6, 7, 25, 45, 52], Infrared (IR) [6, 25, 45, 52], Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) [6, 25, 45, 53-56] ve Kütle Spektrumlarından (MS) [6, 25, 53, 55-57] yararlanılmaktadır.

#### 2.2.4. Biyolojik aktiviteleri

##### Antienflamatuar aktivite

İmperatorin'in *in vitro* olarak lipopolisakkarit stimülasyonlu fare makrofaj artışında ve *in vivo* olarak karragen indüklemesi ile oluşan fare ayak ödeminde antienflamatuar

aktivite gösterdiği ayrıca lipopolisakkarit stimülasyonu ile oluşan fare makrofajlarında indüklenebilir NO (nitrik oksit) sentaz ve siklooksijenaz-2 enzimlerinin protein yapımını bloke ettiği bildirilmiştir [27].

İmperatorin'in, NFAT (aktive T hücresi nüklear faktörü) inhibisyonu ile IL-2 (interlökin) gen transkripsiyonu ve T hücrelerinin antijen stimülasyonunu engelleyerek antienflamatuar etki gösterdiği rapor edilmiştir [58].

Moon ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada izoimperatorin'in insan endotel hücrelerinde enflamatuar sitokin olan TNF- $\alpha$ 'nın (tümör nekroz faktör-*alfa*) indüklediği vasküler hücre adhezyon molekülü-1 ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [59].

8'-asetoksi-5'-S-hidroksiumbelliprenin'in NF- $\kappa$ B'yi (nüklear faktör kappa-B) inhibe ederek antienflamatuar aktivite gösterdiği bildirilmiştir [10].

İranshahi ve arkadaşları umbelliprenin'in, soya fasülyesi lipooksijenaz enzim aktivitesini belirgin şekilde inhibe ettiğini ayrıca *in vivo* olarak yaptıkları çalışmada karragen tarafından indüklenen sıçan ayak ödemi modelinde umbelliprenin'in, enflamasyonu kontrol grubuna göre %39 oranında inhibe ettiğini, indometazin'de ise bu oranın %47 olduğunu belirtilmişlerdir [12].

Karragen tarafından indüklenen enflamasyonda kumarin ve umbelliferon'un nonsteroidal antienflamatuar ilaçlarla benzer etkiye sahip olduğu belirtilmiştir. Kumarin'in ise aynı zamanda dekstran tarafından indüklenen sıçan ayak ödeminde de antienflamatuar etkili olduğu gösterilmiştir [60].

Eskuletin trinitrobenzensülfonik asit tarafından indüklenen sıçanlarda antienflamatuar aktivite göstermiştir. Eskuletin'in bu aktiviteyi siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimlerini inhibe ederek gösterdiği bildirilmiştir [28]. Fraksetin, eskuletin, 4-metileskuletin, dafnetin ve 4-metildafnetin lökotrien B<sub>4</sub>'ü inhibe ederek antienflamatuar aktivite göstermiştir [61].

*Seseli indicum* tohumlarından elde edilen bir kumarin olan seselin'in, karragen tarafından indüklenen sıçan ayak ödeminde antienflamatuar aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir [62].

Liao ve arkadaşları tarafından, Ostol'ün lipopolisakkarit tarafından indüklenen TNF- $\alpha$ , NO ve siklooksijenaz-2 üretimini, makrofajlarda p38, JNK1/2 (c-jun N-terminal kinaz 1/2), PKC (protein kinaz)- $\alpha$  ve PKC- $\epsilon$  fosforilasyonunu, ayrıca NF- $\kappa$ B (nükleer faktör kappa B) aktivasyonunu ve ROS (reaktif oksijen türleri) salımını inhibe ederek antienflamatuar aktivite gösterdiği belirtilmiştir [63].

Ostol'ün, TNF- $\alpha$ , interferon gamma ve interlökinleri modüle ederek artrit ve hepatit gibi immün enflamatuar hastalıklarda etkili olduğu tespit edilmiştir [64].

#### Antitümör ve sitotoksik aktivite

Kumarin, 4-OH kumarin, 7-OH kumarin ile o-, m- ve p-kumarik asit'in P-388 ve P-815 tümör hücrelerine karşı *in vitro* etkileri araştırılmıştır. Tüm bileşikler, P-388 ve P-815 tümör hücrelerine 100  $\mu$ g/mL'den başlayan konsantrasyonlarda az veya çok sitotoksik etki göstermiştir [11].

Eskuletin ve 7-OH kumarin HL-60 (lösemi) tümör hücresinde antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu ve bu iki kumarinin de tirozin fosforilasyonunu inhibe ederek etki gösterdiği belirtilmiştir [65].

*Ferula vesceritensis*'den izole edilen ferulenol'ün sıçan karaciğer mitokondirilerinde oksidatif fosforilasyonu azaltarak sitotoksik aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Düşük konsantrasyonlarda adenin nükleotit translokaz inhibisyonu sonucu ATP sentezini, yüksek dozlarda ise oksijen tüketimini inhibe ederek etki göstermektedir [66].

Umbellipren'in, hücre siklusunu G1 fazında durdurarak metastatik pigmentasyonlu malign melanom hücrelerinin proliferasyonunu inhibe edip sitotoksik etki gösterdiği, cisplatin ile karşılaştırıldığında cisplatin'den iki kat daha etkili olduğu rapor edilmiştir [67]. Umbelliprenin'in, fibrosarkoma hücre hattında doz bağımlı olarak sitotoksik aktivite gösterdiği belirtilmiştir [68].

Jarzaþ ve arkadaşları TE671 (medulloblastoma), A549 (insan akciğer karsinomu) ve RK33 (insan larinks karsinomu) hücre hatları üzerinde ostol'ün etkilerini incelemişler ve ostol'ün 10 µg/mL dozda TE671, 100 µg/mL dozda A549 ve RK33 hücre hatlarında hücre canlılığını inhibe ettiğini görmüşlerdir. Ostol tümör proliferasyonunu doz bağımlı olarak inhibe etmiş, TE671 ve RK33 hücre hatlarında apoptozisi indüklemiş ve tüm hücre hatlarında hücre siklusunu S fazında durdurmuştur. Ostol'ün bu aktivitelerinin C-7'deki metoksil grubuna C-8'deki prenil grubuna ve C-3 ile C-4 arasındaki çift bağa bağılı olduğu belirtilmiştir [69].

Yang ve arkadaşlarının MCF-7 ve MDA-MB 231 hücre hatları üzerinde ostol'ün etkisini inceledikleri çalışmada, MDA-MB 231 (meme kanseri) hücre hattında MMP-2 (matriks metalloproteinaz-2) enzim aktivitesini inhibe ederek bu hücrelerin invazyonunun engellendiği, MCF-7 (meme kanseri) hücre hattının metastazının önlediği belirtilmiştir [13]. Hung ve arkadaşları ostol'ün meme kanseri üzerindeki etkisini araştırmışlar ve ostol'ün MCF-7 hücre hattında hepatosit büyüme faktörünün indüklediği epitelyal-mezenkimal geçişi, hücre göçünü ve hücre invazyonunu c-Met/Akt/mTOR yolağını baskılayarak engellediğini belirtmişlerdir [14].

Ostol, hepatoselüler karsinomda (HCC) *in vitro* olarak HCC hücre çoğalmasını, *in vivo* olarak HCC tümör büyümesini inhibe etmektedir. Yapılan çalışmada ostol'ün, HCC hücrelerinde NF-κB aktivitesini inhibe ederek apoptozisi indüklediği ve G2/M safhasında hücre bölünmesini önlediği görülmüştür [15].

*Prangos ferulacea*'dan izole edilen kumarinlerden ostol'ün, A2780S hücre hattında MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difenil tetrazolium bromid] yöntemi ile sitotoksik aktivitesi incelenmiş ve IC<sub>50</sub> değeri 0,54 mM olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada ostol'ün kanser hücrelerine karşı toksik olduğu ve normal hücreler üzerinde toksik olmadığı belirtilmiştir. *P. ferulacea*'dan elde edilen izoimperatorin de aynı yöntem ile ve aynı hücre hattında ostol'ün aktivitesinden daha az olmak üzere sitotoksik aktivite göstermiştir [16].

*Prangos ferulacea*'dan elde edilen dört kumarin (ostol, izoimperatorin, oksipösedanin ve braylin), SKNMC (beyin kanseri), PC3 (prostat kanseri) ve H1299 (küçük hücreli olmayan akciğer kanseri) hücre hatları üzerindeki sitotoksik aktivitesi



incelenmiş sonuç olarak ostol ile izoimperatroin'in aktivite gösterdiği, oksipösedanın ve braylin'in ise etkisiz olduğu açıklanmıştır. Ayrıca ostol'ün proapoptotik protein olan Bax proteininin üretimini artırarak apoptotik hücre ölümünü indüklediği belirtilmiştir [70].

You ve arkadaşları hazırladıkları bazı ostol türevlerinin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde antitümör aktivitelerini test etmişlerdir. Antitümör aktivite için 7-metoksil ve 3-aril gruplarının gerekli olduğunu ve bu yapıya sahip iki ostol türevinin çalışılan hücre hatlarında ostol'den daha yüksek aktivite gösterdiğini açıklamışlardır [71].

İmperatorin'in insan serviks karsinom hücresi olan HeLa hücre hattında programlı hücre ölümünü indüklemesini incelemek için yapılan çalışmada imperatorin'in 100 µM dozda 24 saat veya 150 µM dozda 48 saat inkübasyonu sonucu hücre ölümü çeşidi olan otofajiyi indüklediği belirtilmiştir. Aynı çalışmada HeLa hücre hattında imperatorin'in apoptosisi indükleme etkisinin çok daha az olduğu görülmüştür [72].

Luo ve arkadaşları tarafından imperatorin'in HepG2 hücre hattında apoptosisi indüklediği, bu indüklemenin kaspaz-8 ve kaspaz-9 spesifik inhibitörleri tarafından kısmen baskılanabildiği ve *in vivo* çalışmada imperatorin'in herhangi bir yan etkisinin olmadığı belirtilmiştir [73]. İnsan beyin glioblastoma multiform hücre hattı olan T98G hücre hattında imperatorin'in etkisinin incelendiği başka bir çalışmada, imperatorin'in ısı şok proteinleri (HSP) olan HSP27 ve HSP72'nin ekspresyonunu kuvvetli şekilde azaltarak ve kaspaz-3 ve kaspaz-9'un aktivitesini artırarak apoptosisi indüklediği belirtilmiştir [74].

İmperatorin'in, HL-60 (promiyelositik lösemi hücresi) hücre hattında apoptozisi, sırasıyla kaspaz-9 ve kaspaz-3'ü aktivite eden ve poly(ADP-riboz) polimeraz ayrımını sağlayan, sitokrom-c bağımlı yolak ile indüklediği gösterilmiştir [75].

İmperatorin'in çoklu ilaç direnci olan karaciğer kanser hücresinde intrinsik apoptosis yolağını tetikleyen Mcl-1 degradasyonunu arttırarak apoptosisi indüklediği açıklanmıştır [76].

Oksipösedanin'in, insan prostat kanseri hücresi DU145 hücre hattında kaspaz-3 aktivitesini doz ve zaman bağımlı şekilde artırarak apoptosisi indüklediği ve G2-M aşamasında hücre döngüsünü durdurarak hücre çoğalmasını inhibe ettiği belirtilmiştir [77].

Yang ve arkadaşları tarafından bergapten'in lösemi hücre hattı P-388, kolon adenokarsinom hücre hattı Colo-205 ve serviks karsinom hücre hattı HeLa üzerine sitotoksik aktivite gösterdiği ve IC<sub>50</sub> değerlerinin sırasıyla 36,6 µg/mL, 40,8 µg/mL ve 24,7 µg/mL olduğu belirtilmiştir [78].

#### Antibakteriyel ve antifungal aktivite

Sardari ve arkadaşları kumarin türevi bileşikler üzerinde yaptıkları çalışmalar neticesinde serbest 6-OH grubunun antifungal, serbest 7-OH grubunun ise antibakteriyel aktivite için önemli olduğunu belirtmişlerdir [79].

Shahverdi ve arkadaşları *Ferula persica* var. *persica* bitkisinin kloroform ekstresinin 13 mikroorganizmaya karşı antibakteriyel etkisini araştırmışlar, aktiviteden sorumlu ana maddenin umbelliprenin olduğunu ve bu bileşiğin daha çok *B. subtilis*, *B. cereus*, *K. pneumoniae*, *S. typhi*, *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *E. coli*'ye karşı aktif olduğunu bildirmişlerdir [80].

Shahverdi ve arkadaşları tarafından *Ferula szowitsiana* bitkisinin kökünden elde edilen galbanik asitin 120 µg/mL'nin altındaki konsantrasyonlarda antimikrobiyal aktivite göstermediği ancak 100 µg/mL konsantrasyonda, penisilin G veya sefaleksine ile kombinasyonunun bu antibiyotiklerin minimum inhibisyon konsantrasyonlarını düşürdüğü belirtilmiştir [81]. Bir başka çalışmada da yine aynı bitkinin kökünden elde edilen galbanik asitin *Staphylococcus aureus*'un dirençli suşlarına karşı siprofloksasin, metisilin ve tetrasiklinin minimum inhibisyon konsantrasyonlarını azalttığı belirtilmiştir [82].

Eskuletin'in, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* ve *Salmonella enterica*'ya karşı zayıf antimikrobiyal etki gösterirken *Staphylococcus aureus*'a karşı iyi bir antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirtilmiştir [83].

*Aegle marmelos* bitkisinden izole edilen imperatorin *Shigella dysenteriae* bakterisine karşı antibakteriyel etkilidir [84]. İmperatorin'in, *Bacillus subtilis* (MİK: 128 µg/mL), *Pseudomonas aeruginosa* (MİK: 64 µg/mL), *Proteus mirabilis* (MİK: 32 µg/mL), *Staphylococcus typhi* (MİK: 64 µg/mL) ve *E. coli* (MİK: 32 µg/mL) bakterilerine karşı etkili olduğu tespit edilmiştir [85].

İmperatorin, isoimperatorin, oksipösedanin hidrat, heraklenol ve heraklenin *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *E. coli*'ye karşı aktivite göstermiş ancak üç *Candida* türüne karşı antifungal aktivite göstermemiştir [86].

Ostol'ün, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* ve *Fusarium graminearum* gibi bitki patojenlerine karşı geniş spektrumlu antifungal aktivite gösterdiği belirtilmiştir [87].

*Prangos platyclaena* bitkisinden elde edilen kumarinlerin *Escherichia coli* bakterisi ve *Candida albicans* mantarı üzerinde antibakteriyel ve antifungal aktivitelerinin incelendiği çalışmada imperatorin ve oksipösedaninin zayıf olarak antibakteriyel ve antifungal aktivite gösterdikleri belirtilmiştir [88].

*Fatoua pilosa* bitkisinden izole edilen kumarinlerden skopoletin ve umbelliferon'un sırasıyla 42,1 µg/mL ve 58,3 µg/mL minimum inhibisyon konsantrasyonlarında *Mycobacterium tuberculosis*'e karşı etkili olduğu belirtilmiştir [89].

### Antiviral aktivite

İmperatorin'in HIV-1 replikasyonu ve hücre siklusu devamlılığı için önemli rol oynayan transkripsiyon faktör Sp1'in transkripsiyonel aktivitesini inhibe ederek antiviral etki gösterdiği belirtilmiştir [90].

8'-Asetoksi-5'-hidroksiumbelliprenin influenza A virüsüne (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) karşı antiviral aktivite göstermiştir. Yine aynı çalışmada metil galbanat diğer kumarinlere göre en güçlü etkiyi göstermiştir. Galbanik asit ve metil galbanatın aktivitesinin antiviral ilaç olan adamantinin aktivitesinden çok daha fazla olduğu açıklanmıştır [91].

*Amni majus* bitkisinin meyvelerinden izole edilen 6-hidroksi-7-metoksi-4-metil kumarin, 6-hidroksi-7-metoksi kumarin ve ksantotoksin, veziküler stomatit virüse (VSV) karşı konsantrasyona bağılı olarak antiviral aktivite göstermiştir [92].

#### Antioksidan aktivite

Naseri ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Ferulago subvelutina* bitkisinin kökünden elde edilen etil asetat ekstresinde ostol, oksipösedanın, ksantotoksin, izoimperatorin, oksipösedanın hidrat ve meranzin hidrat kumarinleri tespit edilmiş ve bunların DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yöntemi ile antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. En yüksek antioksidan aktivite gösteren kumarinin oksipösedanın hidrat olduğu tespit edilmiştir. En düşük antioksidan aktivite ise ostolde görülmüştür [93].

Fraksin yüksek konsantrasyonda serbest radikal süpürücü etki göstermektedir. Ayrıca H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nedenli oksidatif strese karşı hücre koruyucu etkisi vardır [94].

Eskuletin DPPH yönteminde 69,1 µM konsantrasyonda antioksidan etki göstermektedir [95]. Skopoletin 1,24 µg/mL konsantrasyonda DPPH serbest radikal süpürücü etki göstermektedir. Bu konsantrasyon aynı deneysel şartlarda referans madde olan C vitamini (1,22 µg/mL) ile neredeyse aynı değerdir [96].

*Casimiroa* türlerinden izole edilen imperatorin DPPH yöntemi ile elde edilen sonuçlar incelendiğinde antioksidan aktivite sıramasına göre yine aynı bitkilerden izole edilen ve en yüksek aktiviteyi gösteren 8-geraniloksipsoralen'den sonra gelmektedir [97].

#### Antikoagülan aktivite

İmperatorin 3 ve 10 mg/kg dozda sıçanlarda protrombin zamanını uzatarak antikoagülan aktivite göstermiştir [85].

*Ferulago carducorum* bitkisinin topraküstü kısımlarından elde edilen ekstreden suberozin ve suberenol bileşikleri izole edilmiştir. Sıçanlar üzerinde yapılan toksisite

ayını çalışmasında bitki ekstresinin LD<sub>50</sub> değerinin 2000 mg/kg dozun üzerinde olduğu ve dolayısı ile herhangi bir toksik etkisinin olmadığı belirtilmiştir. İzole edilen suberozin ve suberenol'ün antikoagülan etkili olduğu, kontrol ile karşılaştırıldığında 3 ve 6 mg/kg dozda protrombin zamanını uzattıkları, en uzun protorombin zamanının suberozin de ve 6 mg/kg dozda olduğu belirtilmiştir [98].

*Peucedanum japonicum* bitkisinden elde edilen kumarinlerden öjenin, selinidin, pteriksin, imperatorin, bergapten, knidilin ve visaminol'ün kuvvetli antiplatelet aktivite gösterdiği belirtilmiştir [99].

4-Hidroksi kumarin dimeri olan dikumarol antikoagülan etkilidir, tek başına veya heparin ile birlikte venöz tromboz ve akciğer embolisinin profilaksi ve tedavisinde kullanılır [6, 7]. 1924 yılında uygun olmayan koşullarda kurutulmuş olan *Mellilotus officinalis* yiyen sığırlarda meydana gelen kanamalara sebep olan bileşik ancak 1941 yılında izole edilip yapısı aydınlatılmış ve dikumarol olduğu görülmüştür [6]. Dikumarol, normal protrombin sentezi için gerekli olan K vitamininin kan pıhtılaşmasındaki rolünü engeller ve kan pıhtılaşma kabiliyetini kaybeder. Kumarin türevi antikoagülanlar vitamin K'nın kompetitif inhibitörleridirler. Dikumarol yapısından hareketle varfarin ve nikumalon gibi antikoagülan etkili bileşikler sentezlenmiştir [8, 9].

#### Antikolinesteraz aktivite

*Angelica officinalis* (L.) bitkisinin meyvelerinden elde edilen metanol ekstresi, furanokumarin fraksiyonu ve 3 majör kumarinin (imperatorin, ksantotoksin, bergapten) asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesteraz (BChE) enzim inhibisyonu aktivitesi incelenmiş ve ekstrenin 100 µg/mL konsantrasyonda BChE inhibitör aktivitesi %85,65, AChE inhibitör aktivitesi ise %27,49 olarak hesaplanmıştır. İmperatorin (%83,98), ksantotoksin (%88,04) ve bergapten (86,69%)'in BChE inhibisyonu aktivitelerinin ekstrenin butirilkolinesteraz enzim inhibisyonu aktivitesi gibi çok yüksek olduğu yapılan çalışmada gösterilmiştir [100]. *Angelica dahurica* bitkisinin köklerinden elde edilen metanol ekstresinin 100 µg/mL konsantrasyonda asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz enzim inhibisyonu gösterdiği ve IC<sub>50</sub> (inhibisyon konsantrasyonu) değerlerinin sırasıyla 26,40 ve 14,71

$\mu\text{g/mL}$  olduğu tespit edilmiştir. Yine bu ekstrenin analizi sonucu içeriğinde izoimperatorin, imperatorin, senbyakangelikol, oksipösedanin, byakangelikol, t-OMe-oksipösedanin hidrat, t-OMe-byakangelisin, angelol H, byakangelisin ve oksipösedanin hidrat tespit edilmiştir. En güçlü inhibisyonu byakangelikol, t-OMe-byakangelisin ve byakangelisin göstermiştir [101].

#### Antiosteoporotik aktivite

Ostol'ün, sıçan osteoblast kültürlerinde kemik morfojenik protein 2 (BMP-2)/p38MAPK/Runx-2/osterix yolağı ile osteoblastik farklılaşmayı stimüle ettiği görülmüş ve yeni antiosteoporoz ilaç geliştirmek için önemli bir bileşik olduğu açıklanmıştır [102]. Ostol'ün, *in vitro* çalışmalarda Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağını aktive ettiği, *Bmp2* ekspresyonunu artırdığı ve osteoblast hücrelerinin farklılaşmasını stimüle ettiği gösterilmiştir.  $\beta$ -katenin ve *Bmp2* genlerinde hedeflendirilmiş kromozom değişikliği sonucu ostolün osteoblast hücrelerinde farklılaşmayı stimüle etme etkisi durmuştur. Ostol'ün, osteoblast farklılaşmasını uyarıcı etkisini  $\beta$ -katenin-BMP sinyal yolağını aktive ederek gösterdiği ve kemik oluşumunu stimüle edecek, östrojen bağımlı kemik kaybını önleyebilecek anabolizan bir ajan olabileceği belirtilmiştir [103]. *Cnidium monnieri* bitkisinden elde edilen ostol'ün proliferasyonu, alkalin fosfataz aktivitesini ve osteoblasttaki kollajen sentezini artırarak osteoblastik kemik oluşumunu belirgin şekilde desteklediği görülmüştür. Kemik iliği ve osteoblast hücrelerinin ko-kültüründe 1,25-dihidroksivitamin D<sub>3</sub> ve deksametazonu indükleyerek, TRAP-(+) (tartarat-rezistans asit fosfataz negatif) aktivitesini inhibe edip osteoklast oluşumunu azaltarak kemik resorpsiyonunu inhibe etmiştir. Bitkiden izole edilmiş olan imperatorin ve bergapten, ostol'e göre çok daha zayıf aktivite göstermiştir [104].

#### Anksiyolitik aktivite

Budzynska ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada imperatorin, intraperitoneal enjeksiyondan 30 dakika sonra yapılan EPM (yükseltilmiş artı labirent) testine göre 10 ve 20 mg/kg dozda anksiyolitik etki göstermiştir [105]. *Angelica archangelica* Linn. bitkisinden elde edilen petrol eteri ekstresinden ayrılan kumarin karışımı, imperatorin ve izoimperatorin sıçanlara oral yoldan 5 ve 10 mg/kg dozda verilmiş ve

EPM testi ile anksiyolitik etkisi incelenmiştir. En yüksek etki kumarin karışımında olmakla beraber imperatorin ve izoimperatorin de anksiyolitik etki göstermiştir [106].

### Antiallerjik aktivite

*Cnidium monnieri* meyvelerinden elde edilen etanol ekstresinin ve bu ekstrenin majör bileşeni ostol'ün, deney hayvanlarında 2,4-dinitroflorobenzen ile indüklenen kontakt dermatit, pikril klorit tarafından indüklenen kontakt dermatit ve pasif deri anafilaksisi üzerinde anti-alerjik etkisi incelenmiş ve hem ekstrenin hem de ostol'ün anti-alerjik etkili olduğu tespit edilmiştir [107].

### Antikonvulzan aktivite

Maksimal elektroşok ile uyarılmış nöbet modeli uygulanarak yapılan testten 15, 30, 45, 60 ve 120 dakika önce farelere intraperitoneal yoldan verilen ostol belirgin şekilde nöbetleri engellemiştir. Maksimum antikonvülsan etkinin testten 15 ve 30 dakika önce uygulanan ostol ile olduğu tespit edilmiştir [108]. Ostol ve imperatorin'in klasik antikonvülsan ilaç olan valproat ile karşılaştırmalı antikonvulzan etki araştırmasında maksimal elektroşok ve chimney testi kullanılmış, sonuçlara göre imperatorin'in 167-290 mg/kg, ostol'ün 253-639 mg/kg, valproat'ın ise 189-255 mg/kg doz aralığında etkili olduğu tespit edilmiştir [109].

Dört linear furanokumarinin (bergapten, imperatorin, oksipösedanin ve ksantotoksin) antikonvülsan etkisinin farelerde maksimal elektroşok testi ile araştırıldığı karşılaştırmalı çalışmada bileşikler intraperitoneal olarak verildikten 15, 30, 45, 60 ve 120 dakika sonra yapılan değerlendirmede imperatorin ve ksantotoksin'in 300 mg/kg dozda tüm zaman dilimlerinde çok güçlü antikonvülsan aktivite gösterdiği, aynı dozda bergapten'in hiç etki göstermediği ve oksipösedanin'in ise testten 30 dakika önce 300 mg/kg dozda uygulandığında antikonvülsan aktivite gösterdiği belirtilmiştir [110].

### Diğer aktiviteler

Ostol'ün, yağlı karaciğer sendromu olan sıçanlarda karaciğer üzerine etkisi histolojik değerlendirme ile tespit edilmiştir. Ostol sıçanlarda peroksim proliferator aktive edici reseptör (PPAR) $\alpha/\gamma$  mRNA ekspresyonunu artırıp hedef genlerin mRNA ekspresyonunu düzenleyerek yağlı karaciğer üzerinde terapötik etki göstermiştir [111]. Ostol farelerde alkol tarafından indüklenen yağlı karaciğer oluşumunu inhibe etmiştir. Etki mekanizmasının ostol'ün antioksidan aktivitesi ve TNF- $\alpha$  oluşumunu baskılamasıyla ilgili olabileceği belirtilmiştir [112].

Ostol'ün, *in vitro* olarak PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  ve AMPK'yı (aktive edilmiş protein kinaz) aktive ederek antidiyabetik aktivite gösterdiği belirtilmiştir [113].

Ostol, vasküler Ca<sub>v</sub> 1.2 kanalına inaktif halde yüksek afinite göstererek kanalı bloke etmiş ve antihipertansif etki göstermiştir [114].

İmperatorin farklılaştırılmış NG108-15 hücrelerinde voltaj kapılı potasyum kanallarını inhibe etmektedir. Ayrıca 100  $\mu$ M gibi yüksek konsantrasyonda K<sub>ATP</sub> kanalını baskılamaktadır [115].

İmperatorin, hipotansif aktivitesini muskarinik ve histaminik reseptörlerden bağımsız olarak göstermektedir. İmperatorin'in vasorelaksan aktivitesini PDE4A (fosfodiesteraz 4A) ve PDE4B'yi inhibe ederek gösterdiği düşünülmektedir [97].

Farelere intraperitoneal yerine oral yolla verilen imperatorin ile yapılan Kaplan-Meier log rank testi neticesinde imperatorin belirgin şekilde hafıza güçlendirici etki göstermiştir [116].

*Cnidium monnieri* (L.) Cusson bitkisinden elde edilen ostol ve imperatorin'in sıçanlarda N- ve P/Q-tip Ca<sup>2+</sup> kanalının aktivasyonunu pozitif olarak modüle etmek suretiyle sinir uçlarından glutamat salımını kolaylaştırdığı ve erektil disfonksiyon tedavisinde yeni bir seçenek olarak kullanılabileceği belirtilmiştir [117].



Sıçanlarda intestinal iskemi ve reperfüzyon kaynaklı akciğer hasarında ostol'ün, reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırarak, süperoksit dismutaz aktivitesini düzenleyerek ve inflamatuvar cevabı baskılayarak koruyucu etki gösterdiği belirtilmiştir [118].

İyi koşullarda saklanmayan besinlerde üreyen *Aspergillus flavus*'ların meydana getirdiği furanokumarin türevi bileşikler olan karsinojenik etkili aflatoksinlerin hepatotoksik etkileri nedeniyle besin zehirlenmesine yol açtıkları bildirilmiştir [6].

Furanokumarinler, bitkilerde doğal büyüme regülatörüdür. Ayrıca herbisid ve fungusid olarak kullanılırlar [34, 119].

Furanokumarinler, antilökodermik ajanlardır, bakteri, mantar, protozoa ve böceklere karşı fototoksisite göstermektedir [34, 45, 120]. Furanokumarinlerin kalsiyum antagonisti etkisi vardır ve non spesifik spazmolitiktirler [121].

Multiple skleroz hastalığı ve bunun mekanizması için kullanılan deneysel otoimmün ensefalomyelit yöntemiyle ostolün etkisi incelenmiş, sinir büyüme faktörü redüksiyonunu bloke ettiği ve interferon-gamma artışını baskıladığı dolayısı ile multiple skleroz hastalığında kullanılması için araştırılabileceği belirtilmiştir [64].

### **2.2.5. Kumarinlerin kullanılışları**

Furanokumarinler oral ve topik olarak uygulandığında deride pigmentasyonun arttığı görülmüştür. Bu özelliklerinden dolayı az dozlarda vitiligo tedavisinde kullanılmışlardır [7, 8, 32, 120].

Ksantotoksin uzun dalga boyundaki UV ışık varlığında, psoriasis'in fotokemoterapisinde kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir [8, 119-123].

Bergapten ve metoksalen, psoriasis ve vitiligo gibi dermatolojik hastalıkların fotokemoterapisinde [PUVA (psoralen+UV-A) tedavisi] kullanılır. 20-40 mg furanokumarin tek dozda ve dahilen alınır, iki saat sonra güneş ışığına veya uzun dalga UV radyasyonuna (UVA, 320-380 nm) maruz kalmak gerekir. UVA ya maruz

kalma ilk seferde 10-15 dakika olmalı, süre yavaş yavaş uzatılmalıdır. Genellikle 20 uygulamada netice elde edilir. PUVA tedavisi hamilelere, çocuklara, böbrek ve kalp yetersizliği olanlara uygulanmamalıdır [7]. PUVA tedavisi sindirim rahatsızlıklarına, katarakt ve kansere (cilt, akciğer) sebep olabilir [7, 9].

Bergapten, derinin bronzlaşmasında kullanılan güneş yağlarının bileşimine girmektedir [46, 120]. Güneş losyonlarının bileşimine giren bergamot yağı gibi doğal ürünler, melanositlerin sayısını ve melanin üretimini artırır, cildin tipine, nem miktarına, ürünün tatbiki ile güneşe çıkma zamanı arasında geçen süreye, güneşte kalma süresine ve sıklığına bağlı olan fototoksik reaksiyonlara sebep olabilirler [7].

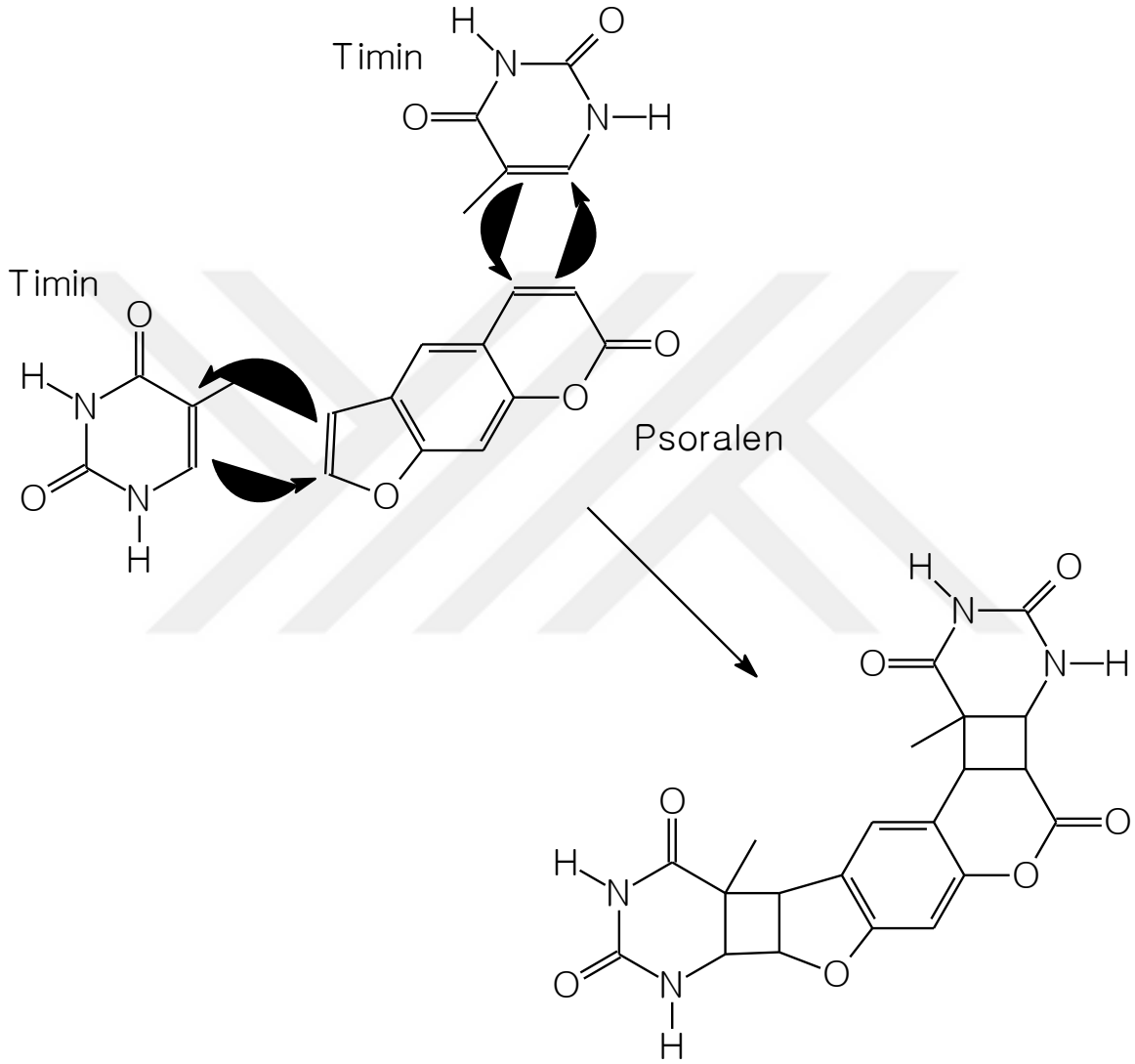
Kumarin ve kumarin türevlerinin en çok kullanıldığı alan çeşitli analizlerdir [124]. Kumarinlerin floresan özellikleri bir çok deneyde uygulamada anahtar rol oynamaktadır. Enzim aktivite tayininde, proteinler, DNA ve antibodilerin işaretlenmesi işlemlerinde, hücre içi iyon analizlerinde, pH ve gaz dedektörlerinde kullanılmaktadır [125].

Kumarinler sanayide de çok kullanılmaktadır. Parfümlerde koku fiksatorü olarak (3,4-dihidroksükumarin), lavanta gibi doğal yağları zenginleştirmek, sigarada kokuyu stabilize etmek, boyaların kokusunu maskeleyerek, nikel gibi bazı maddeleri kaplamak ve parlaklığını artırmak için kullanılmaktadır [125].

### **2.2.6. Fototoksisite**

Cilt bazı bitkiler ile temas ettikten sonra güneş ışığına maruz kaldığında ortaya çıkan orta deceli eritem ve hiperpigmentasyondan içi sıvı dolu kabarcıkların oluşumuna kadar değişen reaksiyonları tanımlamak için 1942 yılında Robert Klüber tarafından fitofotodermatit terimi kullanılmıştır. Fitofotodermatit ilk kez 1897 de White ve Stowers tarafından güneş ışığına bağlı olduğunun farkında olmadan *Parstinaca sativa* ile temas neticesinde ortaya çıkan dermatit şeklinde klinik olarak tanımlamıştır. Bitki ile temastan sonra güneş ışığına maruz kalındığında ortaya çıkan bu reaksiyonlardan furanokumarinlerin sorumlu olduğu 1938 yılında belirlenmiştir [119].

Fototoksik kumarinler 3,4 veya 4',5' pozisyonlarından ya da her iki pozisyondan (sikloaddition) DNA'nın pirimidin halkasına bağlanır. Hem 3,4 hem 4',5' pozisyonlarından bağlandığında nükleik asitlerin baz çiftlerine (pirimidin halkalarına) çapraz bağla bağlanarak genomda lezyon oluşturmaktadır [7, 8].



Şekil 2.9. Fototoksik kumarinlerin DNA'nın pirimidin halkasına bağlanması

Yapı-aktivite araştırmaları neticesinde doğal furanokumarinler arasında en yüksek fototoksik aktivite psoralen de görülmüş bunu sırasıyla ksantotoksin, bergapten ve anjelisin izlemiştir [6]. Fotosensitizer aktivite için furanokumarin yapısı gereklidir. Ancak aktivite açısıl furanokumarinlerde az, linear furanokumarinlerde ise oldukça yüksektir. 5. veya 8. konumlarda ya da her iki konumda birden hidoksil fonksiyonu

varsa aktivite görülmez ancak bu hidroksil gruplarından sadece bir tanesi metillendiğinde aktivite tekrar ortaya çıkar. 4., 5' veya 8. konumdaki metil sübstitüenti aktiviteyi azaltmaz ancak 3 veya 4' konumdaki sübstitüsyon aktiviteyi azaltmaktadır. 5. ve 8. konumlardaki metoksil grupları da aktiviteyi azaltmaktadır. 3., 4., 5. ve ilave olarak 8. konum kovalen bağlar yapar ve psoralen yapısına sübstitüentler ilave olduğunda molekülün dokulara absorpsiyonu engellenmektedir [6].

Tavşan derisi üzerinde yapılan bir çalışmada denenen furanokumarinlerden bergapten'in en güçlü fototoksin olduğu, limettin'in, bergapten'in etkisinin 1/200 i kadar etkili olduğu görülmüştür. Yine araştırmalarda izopimpinellin ile fotosensibilite görülmemiştir [119]. Bergapten, izobergapten, sfondin, izopimpinellin ve pimpinellin'in fototoksik aktivitesi çalışılmış, en güçlü fototoksik etki bergaptende görülmüş, pimpinellin de kayda değer aktivite göstermiştir. Sfondin zayıf etki göstermiş, izobergapten ve izopimpinellin ise aktivite göstermemiştir [126].

Kobaylarda 16 kumarin türevi bileşiğin 7'si oral yolla alındığında ve deriye lokal olarak uygulandığında UV radyasyonu ile hayvanların derisinde hassasiyete neden olmuştur. En etkili bileşikler minimum etkili dozları ile ksantotoksin (10 gamma/cm<sup>2</sup>), bergapten (20 gamma/cm<sup>2</sup>) ve imperatorin (40 gamma/cm<sup>2</sup>)'dir. Tavşanlar üzerinde yapılan deneylerde ise ksantotoksol, izopimpinellin ve anjelisin fotosensitivite göstermemiştir [127].

Shimmer ve arkadaşları arjinin bağımlı mutant *Chlamydomonas reinhardtii*'yi kullanarak furanokumarinlerin fototoksik ve fotomutajenik etkilerini benzer yapıdaki bileşiklerinki ile karşılaştırmışlar bileşiklerdeki fototoksik aktivite şiddetinin sırasıyla bergapten>ksantotoksin>5'-metilanjelisin>visnagin>imperatorin>rutamarin>anjelisin şeklinde olduğu saptanmıştır. Bileşiklerde saptanan fotomutajenik etki ise sırasıyla bergapten>ksantotoksin>imperatorin olarak açıklanmıştır. 5'-metil anjelisin ve visnagin de ise zayıf aktivite görülmüştür [128].

### 2.3. *Neocryptodiscus* Türleri Üzerinde Yapılmış Olan Çalışmalar

*N. papillaris* meyvelerinden %0.12 verim ile elde edilen uçucu yağ GC-MS ile analiz edilmiş ve uçucu yağın başlıca bileşikler olarak  $\alpha$ -humulen (%20.0),  $\beta$ -karyofillen (%17.1), germakren B (%6.7), karyofillen oksit (%6.0), hekzadekanoik asit (%5.7), bisiklogermakren (%4.7),  $\alpha$ -pinen (%4.0) ve  $\beta$ -pinen (%3.2) taşıdığı saptanmıştır [17].

*N. didymus* bitkisinin meyvelerinden umbelliprenin, bergapten, ksantotoksol, prangenin hidrat ve izoimperatorin, köklerinden ise izoimperatorin, imperatorin, oksipösedanin ve prançimgin isimli kumarin yapısında bileşikler elde edilmiştir [18, 19].

### 2.4. Sitotoksik Aktivite Tayini

MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difenil tetrazolium bromid] yöntemi sitotoksitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan enzimatik bir test yöntemidir. MTT indirekt olarak hücre büyümesi ve/veya hücre ölümünü değerlendirmeyi amaçlayan, hücre kültürü esasına dayanan bir ilaç duyarlılığı testidir. Bu yöntem, MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde, MTT canlı hücrelere aktif olarak absorbe olur ve reaksiyon mitokondriyal süksinat dehidrogenaz tarafından katalize edilerek mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenir. Formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir. Bu da hücre canlılığının bir belirteci olarak kabul edilmekte ve spektrofotometrik olarak belirlenen değer yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilmektedir. Sitotoksosite arttıkça formazan oluşumu azalmakta, yani renk açılmaktadır [129, 130].



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Bu çalışmada kullanılan *Neocryptodiscus papillaris* (Boiss.) Herrnst. & Heyn bitkisi Şanlıurfa ili Viranşehir ilçesi Aşağı Dilimli Köyü girişinden 16/06/2013 tarihinde meyveli iken toplanmıştır.



Resim 3.1. *Neocryptodiscus papillaris* bitkisinin doğadaki görünüşü

Prof. Dr. Ahmet Duran tarafından teşhis edilen bitkinin herbarium örnekleri Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümü Herbariumunda (A. Duran 7780) kayıtlıdır. Herbarium örneğinin fotoğrafları Resim 3.2 ve Resim 3.3'te görülmektedir.



Resim 3.2. *Neocryptodiscus papillaris* bitkisinin herbarium örneği-1

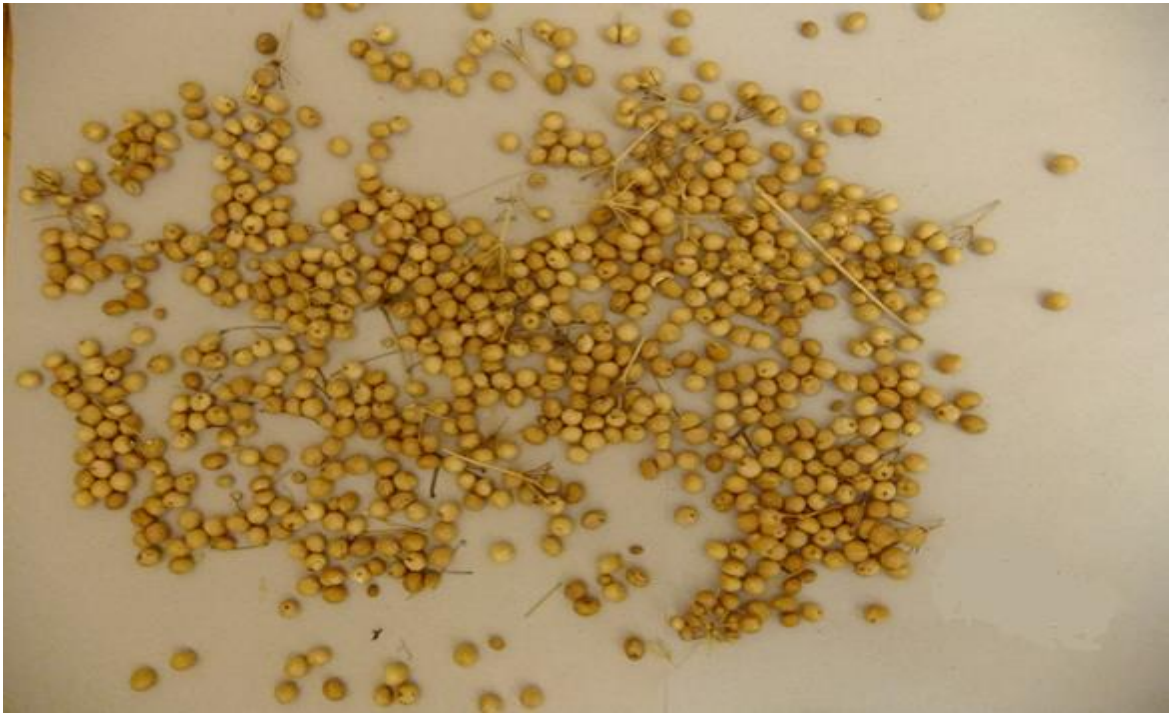




Resim 3.3. *Neocryptodiscus papillaris* bitkisinin herbariyum örneği-2



Resim 3.4. Deneyde kullanılan kök



Resim 3.5. Deneyde kullanılan meyve

Deneylerde standart bileşik olarak kullandığımız bergapten, skopoletin, skoparon ve stigmasterol Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

### 3.2. Yöntem

*Neocryptodiscus papillaris* bitkisinin meyvesi ve parçalara ayrılan kökü oda sıcaklığında, gölgede kurutulmuştur.

Bitki materyali kurutma işlemi ardından toz edildikten sonra artan polaritede çözücüler kullanılarak tüketilmiştir.

#### 3.2.1. Ekstraksiyon

Bitkinin kökü ve meyvesi ayrı ayrı önce petrol eteri ile sonra diklorometan ve en son metanol ile oda sıcaklığında maserasyon yöntemi ile tüketilmiştir. Tüketme sonrası süzgeç kağıdından süzülen ekstreler 40°C'de rotavapor yardımı ile yoğunlaştırılmıştır. Yoğunlaştırılmış olan metanol ekstresi 90:10 (su:metanol) karışımında çözüldükten sonra etil asetat ile tüketilmiştir.

Uygun incelikte toz haline getirilmiş 200 g bitki kökünden petrol eteri ile ekstraksiyon sonucu toplam 8,5 g petrol eteri ekstresi, diklorometan ile ekstraksiyonundan toplam 0,9547 g diklorometan ekstresi ve metanol ile tüketilerek 16,7019 g metanol ekstresi elde edilmiştir. Metanol ekstresinden etil asetat ile tüketme sonucu elde edilen etil asetat ekstresi 1,8331 g ve kalan sulu metanolü ekstre miktarı ise 14,8688 g dır. Ekstreler Çizelge 3.1'de verilen çözücü sistemleri kullanılarak ince tabaka kromatografisine uygulanmış ve elde edilen kromatogram önce UV 254 nm ve 366 nm dalga boylu ışık altında sonra %10'luk anisaldehit revelatörü püskürtülerek incelenmiştir.

Uygun incelikte toz haline getirilmiş 100 g meyveden, kök ekstraksiyonunda uygulanmış olan yöntem kullanılarak toplam 0,829 g petrol eteri ekstresi, 0,761 g diklorometan ekstresi ve metanol ile tüketilerek 4,215 g metanol ekstresi elde edilmiştir. Metanol ekstresinden etil asetat ile tüketme sonucu elde edilen etil asetat ekstresi 0,926 g ve kalan sulu metanolü ekstre miktarı ise 3,273 g dır. Ekstreler

Çizelge 3.1’de verilen çözücü sistemleri kullanılarak ince tabaka kromatografisine uygulanmış ve elde edilen kromatogramlar önce UV 254 nm ve 366 nm dalga boylu ışık altında sonra %10’luk anisaldehit revelatörü püskürtülerek incelenmiştir.

Kök ve meyve materyalinden yukarıda anlatılan yöntemle elde edilen ekstreler üzerinde sitotoksik aktivite tayini çalışmaları yapılmıştır.

### 3.2.2. Ayırma ve saflaştırma için kullanılan yöntemler

#### İnce tabaka kromatografisi (İTK)

İnce tabaka kromatografisi yönteminden, ekstrelerin incelenmesi, sütun kromatografisi sırasında elde edilen fraksiyonlardan benzer olanlarının birleştirilmesi, elüsyonun bittiğinin anlaşılması, preparatif ince tabaka kromatografisi için uygun çözücü sisteminin geliştirilmesi ve izole edilen bileşiklerin saflıklarının kontrolü için yararlanılmıştır.

İTK şartları:

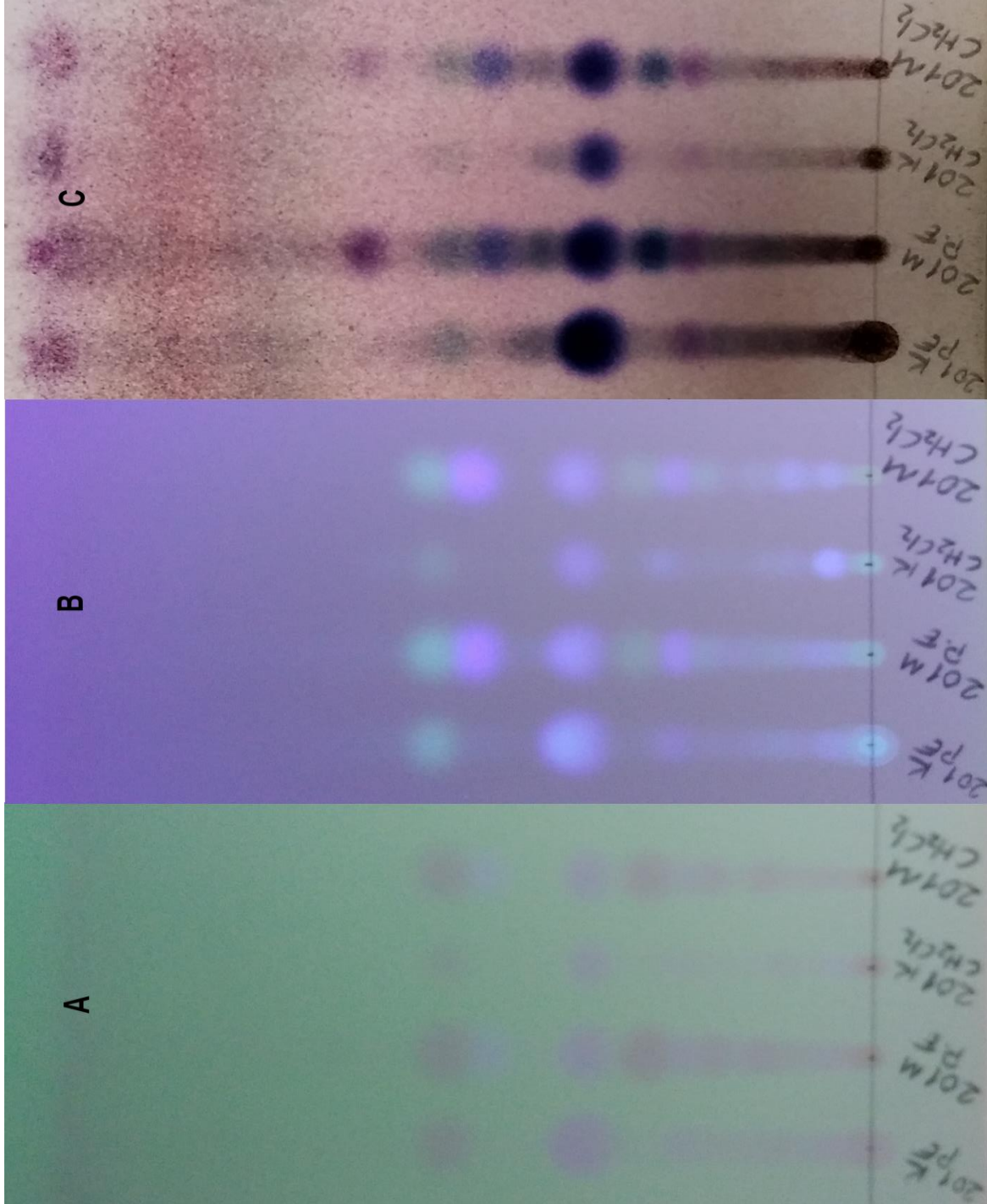
Plak:	Silika jel 60 F <sub>254</sub> adsorbantı ile kaplanmış 0,20 mm kalınlığında hazır alüminyum plak (Merck No:5554)
Çözücü sistemi:	(Bkz. Çizelge 3.1)
Revelatör:	%10’luk anisaldehit çözeltisi
Laboratuvar sıcaklığı:	21°C

Örnekler uygun çözücü ile çözülerek kromatografi plaklarına ince cam kapillerler yardımıyla uygun konsantrasyonda ve plağın alt kenarından 1,5 cm yükseklikteki start çizgisine 1 cm aralıklarla tatbik edilmiş tamamen kurutulduktan sonra içinde 1 cm yükseklikte çözücü sistemi bulunan ve atmosferi çözücü sistemi buharı ile doyurulmuş kromatografi tankında developpe edilmiştir. İTK analizi deneysel olarak saptanmış çözücü sistemleri ile yapılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. İTK ve Preperatif İTK analizlerinde kullanılan çözücü sistemleri

No	Çözücü sistemi	Oranı
S1	Siklohekzan: Etil asetat	30:10
S2	Siklohekzan: Etil asetat	20:10
S3	Siklohekzan: Etil asetat	30:20
S4	Siklohekzan: Etil asetat	10:10
S5	Toluen: Diklorometan: Asetonitril: Etil asetat	10:10:1:1
S6	Toluen: Etil asetat	90:10

Kromatografi tankında develope edilen plaklar developman işleminden sonra tanktan alınmış ve kurumaya bırakılmıştır. Plaklar kurduktan sonra önce UV 254 nm ve 366 nm dalga boylu ışık altında incelenmiş daha sonra revelatör püskürtülerek 120°C'deki etüvde 5 dakika bekletilmiştir.



Resim 3.6. Kök ve meyvenin petrol eteri ekstreleri ve diklorometan ekstrelerinin karşılaştırmalı İTK analizi (S3 çözücü sisteminde)

A: UV 254 nm'de görünüm

B: UV 366 nm'de görünüm

C: Anisaldehit reaktifi ile reaksiyon sonucu görünüm

201K PE: Kökün petrol eteri ekstresi

201K CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: Kökün diklorometan ekstresi

201M PE: Meyvenin petrol eteri ekstresi

201M CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: Meyvenin diklorometan ekstresi

## Kolon kromatografisi

Hazırlanan ekstrelerin fraksiyonlandırılmasında ve elde edilen ana fraksiyonların daha ileri fraksiyonlandırılma işleminde kolon kromatografisi yönteminden yararlanılmıştır.

Kolon kromatografisi şartları:

Kolon:	4,5 cm çapında 100 cm uzunluğunda cam kolon 2,5 cm çapında 40 cm uzunluğunda cam kolon 1,5 cm çapında 40 cm uzunluğunda cam kolon
Adsorban:	Sephadex™ LH-20 (GE Healthcare) Silika jel 60 (0,04-0,063 mm, Merck No:9385)
Çözücü sistemi:	(Bkz. Çizelge 3.2)
Laboratuvar sıcaklığı:	21°C
Elüsyon Hızı:	4 ml/dk

Fraksiyonlandırılacak ekstreler için uygun adsorbanlar tercih edilmiş ve uygun boyutlarda cam kolonlar kullanılmıştır. Ana kolonda kullanılan sefadeks elüsyona başlamak için kullanılacak çözücü sistemi ile şişirildikten sonra kolona doldurulmuştur. Fraksiyonlandırılacak ekstre kolona yüklenmiş ve elüsyon işlemine başlanmıştır. Toplanan fraksiyonlar ince tabaka kromatografisine uygulanmıştır. Kromatogramlar incelendiğinde benzer leke veren fraksiyonlar birleştirilmiştir.

Çizelge 3.2. Kolon kromatografisinde kullanılan çözücü sistemleri

No	Çözücü sistemi	Oranı
S7	n-Hekzan: Diklorometan: Metanol	7:4,5:0,5
S8	n-Hekzan: Diklorometan: Metanol	7:4:1
S9	n-Hekzan: Diklorometan: Metanol	7:3:2
S10	n-Hekzan: Diklorometan: Metanol	7:2:3
S11	n-Hekzan: Etil asetat	100:0 → 50:50

### Preperatif ince tabaka kromatografisi (PİTK)

Kolon kromatografisinden elde edilen ve ince tabaka kromatografisinde birden fazla leke içerdği belirlenen fraksiyonlardaki bileşiklerin ayırımı için preperatif ince tabaka kromatografisi yöntemi kullanılmıştır.

PİTK şartları:

Plak:	Silika jel 60 F254 (Merck No: 5744) ile kaplanmış 20x20 cm boyutunda cam plak
Çözücü sistemi:	(Bkz. Çizelge 3.1)
Revelatör:	%10'luk anisaldehit çözeltisi
Laboratuvar sıcaklığı:	21°C

Ayrımı yapılacak fraksiyon uygun çözücü ile belirli konsantrasyonda çözülmüş, kapiler yardımıyla plağın alt kenarından 1.5 cm yükseklikteki start çizgisine şerit halinde tatbik edilmiş ve kurutulduktan sonra içerisinde 1 cm yükseklikte çözücü sistemi bulunan ve atmosferi çözücü sistemi buharı ile doyurulmuş olan kromatografi tankında develope edilmiştir. Developman sonrası tanktan alınan plaklar kurutulduktan sonra UV 254 nm ve 366 nm dalga boylu ışık altında incelenmiştir. Bileşiklerin bulunduğu yerler plak üzerinde işaretlenerek adsorban bantlar halinde kazınmış ve toz edilmiştir. Adsorbandan bileşikleri ayırmak için kloroform:metanol (90:10) çözücü sistemi kullanılmıştır. Bu çözücü sistemi ile elüsyon, süzme ve yoğunlaştırma işleminden sonra İTK ile saflık kontrolü yapılmıştır.

### Spektroskopik yöntemler

Uygulanan kromatografik yöntemlerle saf halde elde edilen bileşiklerin yapılarının aydınlatılması için NMR<sup>1</sup> ve Kütle<sup>2</sup> spektroskopisi gibi spektroskopik yöntemlerden

<sup>1</sup> NMR spektrumları Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez laboratuvarında çekilmiştir. NMR spektrumlarını çeken Sayın Prof. Dr. Hakan GÖKER'e teşekkür ederiz.

<sup>2</sup> Kütle spektrumları Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarında çekilmiştir.



yararlanılmıştır. Verilerin değerlendirilmesinde mevcut literatür bilgilerinden yararlanılmıştır. Cihazlara ait teknik bilgiler Çizelge 3.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. NMR ve Kütle spektrumu için kullanılan cihazlar

Yöntem	Cihaz
<sup>1</sup> H NMR <sup>13</sup> C NMR	Varian Mercury 400 MHz FT-NMR Spektrometre
Kütle	Waters Synapt G1

### 3.2.3. Sitotoksik aktivite tayini

Sitotoksik aktivite tayini MTT yöntemi ile yapılmıştır<sup>1</sup>. Elde edilen ekstreler ve saf bileşikler RPMI-1640 besiyerinde çözülerek stok çözelti ve bu stok çözülden de sıvı besiyeri ile seyreltilerek beş farklı konsantrasyonda (1, 5, 25, 100, 250 µg/ml) test çözeltisi hazırlanmıştır. MTT, PBS (fosfat tampon çözeltisi) içinde 5 mg/ml olacak şekilde çözülerek süzölmüştür. Ekstraksiyon tamponu olarak %45'lik N,N-dimetil formamid içinde çözülmüş %23 sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi (pH 4.7) hazırlanmıştır. 96 kuyulu plaklara 50 µl besiyeri içine MCF-7 hücresi ekimi yapılmış ve üzerine 50 µl test çözeltileri (her konsantrasyon için ayrı ayrı ve 4 kuyu olarak) eklenmiş ve 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Aynı şartlarda saf bileşik veya ekstre eklenmeden inkübe edilen hücreler kontrol olarak kullanılmıştır. 48 saat sonunda kuyulara 25 µl MTT çözeltisi eklenerek 4 saat daha inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası kuyulara 80 µl tampon çözeltisi (SDS) ilave edilmiş ve 1 gece 37°C de inkübasyona bırakılmıştır. 12 saat sonra 540 nm'de absorbans değerleri belirlenmiştir.

Hücre inhibisyonu aşağıda Eş. 3.1'de verilen formüle göre hesaplanmıştır.

% inhibisyon =  $[1 - (\text{ortalama test çözeltisinin bulunduğu kuyudaki canlı hücre sayısı} / \text{kontrol kuyusundaki canlı hücre sayısı}) \times 100]$  (3.1).

<sup>1</sup> Sitotoksik aktivite tayininin Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoloji Bölümü laboratuvarında yapılmasını sağlayan Doç. Dr. Serdar ÖZTUZCU'ya teşekkür ederiz.

Test edilen çözültisinin etkinliği % inhibisyon oranına göre değerlendirilmektedir. Hatok ve arkadaşlarına göre % inhibisyon oranı %75 ve üzerinde olduğunda hücreler test çözültisine çok duyarlı, %50 ile %75 arasında olduğunda orta derecede duyarlı olarak değerlendirilmiştir [130]. Biz de çalışmamızda aktivite görülen en düşük konsantrasyon olan 25 µg/ml konsantrasyonda %50 ve daha yüksek oranlarda inhibisyon sağlayan ekstre, fraksiyon ve bileşiklerin aktiviteden sorumlu olacağını düşünerek değerlendirme yaptık.

Kök materyalinden elde edilen ekstrelerin gösterdikleri biyolojik aktiviteye göre sıralamasının petrol eteri ekstresi > diklorometan ekstresi > metanol ekstresi şeklinde olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle aktiviteden sorumlu bileşik/bileşiklerin belirlenebilmesi için çalışmaya petrol eteri ekstresi üzerinden devam edilmiştir. Meyve materyalinden elde edilen petrol eteri ve diklorometan ekstreleri İTK profiline göre birbirine benzer lekeler içerdiği görüldüğü için ve ekstre miktarını çoğaltmak amacıyla birleştirilmiş ve izolasyon çalışmalarına başlanmıştır.

### **3.2.4. Biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlandırma çalışmaları**

#### Kök petrol eteri ekstresi üzerinde yapılan çalışmalar

4,5 cm çapında, 100 cm uzunluktaki cam kolona, S8 çözücü sistemi ile şişirilmiş sefadeks 80 cm yükseklikde doldurulmuştur. Petrol eteri ekstresinin 4 g'ı tartılarak S8 çözücü sistemi ile çözündürülmüş ve kolona ilave edilmiştir. Daha sonra S8 çözücü sistemi ile ve 4 ml/dk hızda 10 ml'lik fraksiyonlar alınarak elüsyona başlanmıştır. 50. fraksiyondan itibaren S9 çözücü sistemi ile ve 25 ml'lik fraksiyonlar toplanarak elüsyona devam edilmiştir. 60. fraksiyondan sonra S10 çözücü sistemi kullanılmış ve 50 ml'lik fraksiyonlar toplanmıştır. Toplanan fraksiyonlar İTK analizine tabii tutulmuş ve benzer fraksiyonlar birleştirilmiştir. Birleştirilen fraksiyonlara verilen kodlar ve miktarları Çizelge 3.4'te gösterilmiştir. Çizelgede görülen fraksiyonlar üzerinde sitotoksik aktivite tayini çalışması yapılmıştır. Sitotoksik aktivite görülen fraksiyonlardaki bileşikler izole edilip sitotoksik aktiviteleri tayin edilerek aktiviteden sorumlu bileşikler belirlenmeye çalışılmıştır.

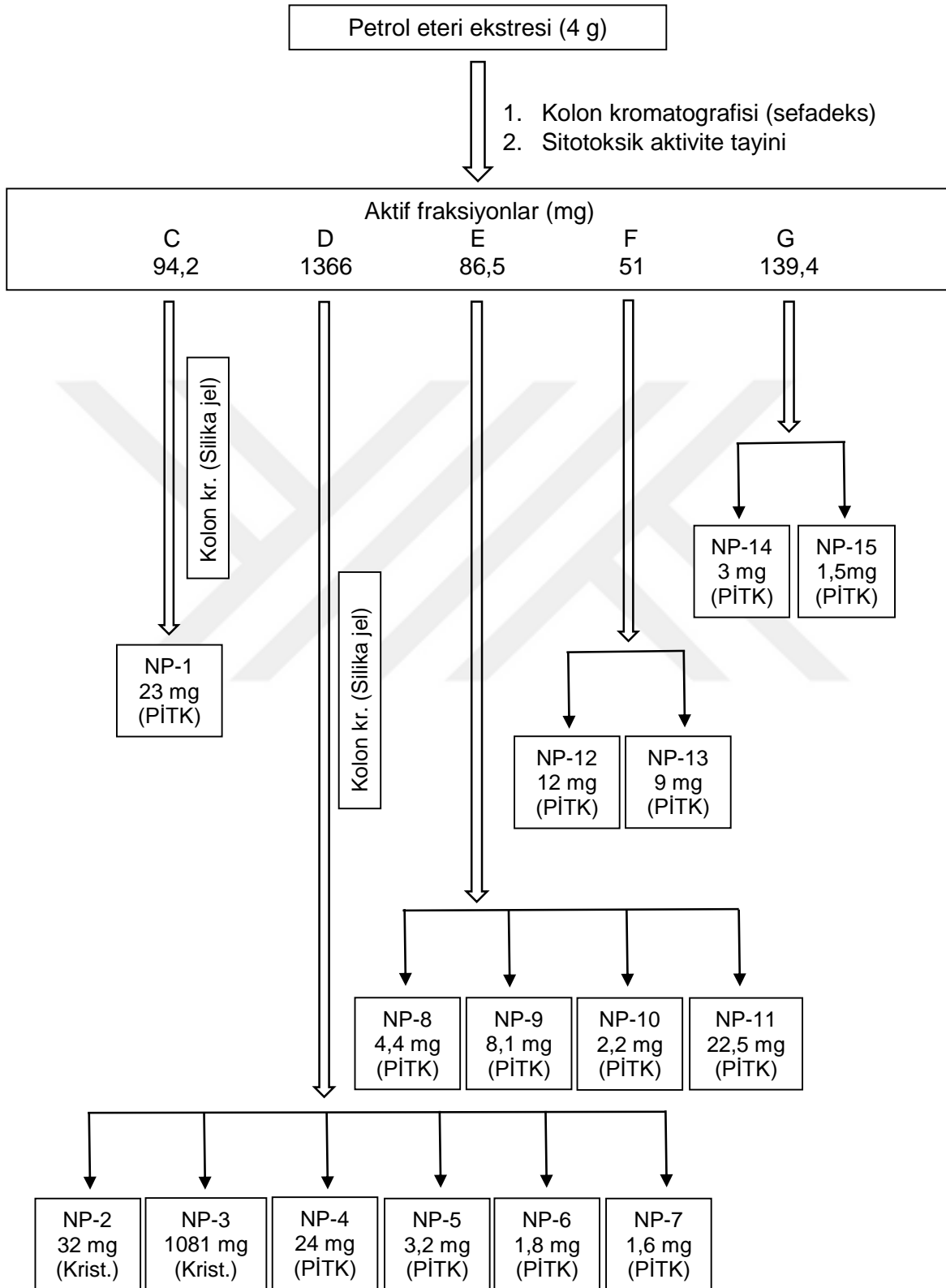
Çizelge 3.4. Kök petrol eteri ekstresinin ana kolon fraksiyonları

Fraksiyon	Fraksiyon kodu	Miktarı (g)
1-3	A	1,1550
4-14	B	0,6390
15-26	C	0,0942
27-47	D	1,3660
48-52	E	0,0865
53-62	F	0,0510
63-73	G	0,1394

#### Sitotoksik aktivite gösteren fraksiyonlar üzerinde yapılan çalışmalar

Ana kolon fraksiyonları üzerinde yapılmış olan sitotoksik aktivite tayini çalışması sonuçlarına baktığımızda 25 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığını D fraksiyonunun % 75,58 oranında inhibe ettiği görülmektedir. C, E, F ve G fraksiyonları ise 100 µg/ml ve daha yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığını % 50 ve daha yüksek oranlarda inhibe etmiştir. Fraksiyon miktarlarına baktığımızda D fraksiyonunun aktivite görülen fraksiyonlar içindeki oranı % 80,69'dur. En yüksek aktivitenin görülmüş olduğu D fraksiyonundaki bileşiklerin izole edilerek aktivitelerinin tayin edilmesi ve bu şekilde aktiviteden sorumlu bileşiklerin saptanması için izolasyon çalışmaları yapılmış ancak bunun yanı sıra bitki üzerinde şimdiye kadar yapılmış olan herhangi bir fitokimyasal çalışmaya rastlamadığımız için 100 µg/ml ve daha yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığını % 50 ve daha yüksek oranlarda inhibe etmiş olan C, E, F ve G fraksiyonları üzerinde de izolasyon çalışmaları yapılmıştır.

Çizelge 3.5. Sitotoksik aktivite gösteren fraksiyonlarda bulunan bileşiklerin izolasyonu



### *C Kodlu fraksiyon üzerinde çalışmalar*

C kodlu fraksiyonda izolasyon ve saflaştırma işlemleri için kolon kromatografisi uygulanmıştır. Silika jel 60 (0,04–0,063 mm, Merck No: 9385) adsorbanı n-hekzan ile süspansiyon haline getirilmiş ve 1,5 cm çapındaki cam kolona 20 cm yükseklikte doldurulmuştur. Yeterli miktarda n-hekzanda çözündürülüp 1 g kolon adsorbanı ilave edildikten sonra ara sıra karıştırılarak çözücüsünden kurtarılmış olan C kodlu fraksiyon+adsorban karışımı kolona yüklenmiştir. Elüsyon S11 çözücü sistemi ile ve 30 ml'lik fraksiyonlar toplanarak gerçekleştirilmiştir. Fraksiyonlar S1 çözücü sistemi kullanılarak İTK ile kontrol edilmiş, aynı Rf'de leke veren ve C kodlu fraksiyonun majör bileşiğini taşıyan fraksiyonlar birleştirilmiştir. Birleştirilen fraksiyonlarda oluşan kristaller bir flakona alınmış ve İTK analizi ile saflığı kontrol edilmiştir. Elde edilen bileşiğe NP-1 (23 mg) kodu verilmiştir.

### *D Kodlu fraksiyon üzerinde çalışmalar*

Sitotoksik aktivite gösteren D kodlu fraksiyondan bileşiklerin izolasyonu için kolon kromatografisi tercih edilmiştir. Silika jel 60 (0,04–0,063 mm, Merck No: 9385) adsorbanı n-hekzan ile süspansiyon haline getirildikten sonra 2,5 cm çapındaki cam kolona 40 cm yükseklikte doldurulmuştur. Yeterli miktarda S8 çözücü sisteminde çözündürülüp 1 g kolon adsorbanı ilave edildikten sonra ara sıra karıştırılarak çözücüsünden kurtarılmış olan D kodlu fraksiyon+adsorban karışımı kolona yüklenmiştir. S11 kodlu çözücü sistemi ile yapılan elüsyonda dakikada 4 ml hızla 50 ml'lik fraksiyonlar alınmıştır. Toplanan fraksiyonlar S1, S2 ve S3 çözücü sistemlerinin kullanıldığı İTK'ne uygulanmıştır. Aynı Rf'de leke veren fraksiyonlar birleştirilmiştir.

Birleştirilen 21.-24. fraksiyonlarda oluşan kristallerin İTK ile kontrolünde saf olduğu tespit edilmiş ve bu bileşiğe NP-2 (32 mg) kodu verilmiştir.

Birleştirilen 25.-31. fraksiyonda oluşan kristallerin İTK analizi yapılmış, saf olduğu tespit edilmiş ve 1081 mg olan bu bileşiğe NP-3 kodu verilmiştir.

İTK analizlerine göre benzer leke veren 40.-42. fraksiyonlar birleştirilmiş ve S1 çözücü sistemi ile preparatif ince tabaka kromatografisi yapılmasına karar verilmiştir. PİTK'de majör maddeyi taşıyan bant kazınıp kloroform:metanol (90:10) karışımı ile elüe edilerek alınan bileşiğin saflığı İTK analizi ile kontrol edilmiştir. 24 mg ağırlığındaki bileşiğe NP-4 kodu verilmiştir.

İTK analizine göre birleştirilen 43. ve 44. fraksiyonlarda bulunan 2 majör bileşiğin izolasyonu için preparatif ince tabaka kromatografisi tercih edilmiştir. S1 çözücü sistemi kullanılarak yapılan PİTK'den alınan bantlar kloroform:metanol (90:10) karışımı ile elüe edilmiş, elüatlar İTK analizine tabi tutulmuş ve tek leke verdikleri görüldükten sonra bu bileşiklerden birine NP-5 (3,2 mg), diğerine ise NP-6 (1,8 mg) kodu verilmiştir.

İTK'de aynı R<sub>f</sub>'de leke veren 46. ve 47. fraksiyonlar birleştirilmiş S1 çözücü sistemi kullanılarak preparatif ince tabaka kromatografisine uygulanmıştır PİTK'de majör maddeyi taşıyan bant kazınıp kloroform:metanol (90:10) karışımı ile elüe edilerek alınan bileşiğin saflığı İTK analizi ile kontrol edilmiştir. 1,6 mg ağırlığı olan bileşiğe NP-7 kodu verilmiştir.

#### *E Kodlu fraksiyon üzerinde çalışmalar*

E kodlu fraksiyon oluşturulmadan önce ana kolonun 51. fraksiyonunda oluşan kristaller temiz bir flakona alınmıştır. Sonra 48.-52. fraksiyonlar birleştirilmiştir. E kodlu fraksiyondaki bileşiklerin ayrılması için S4 çözücü sistemi ile preparatif ince tabaka kromatografisi yapılmasının uygun olduğuna karar verilmiştir. PİTK'den alınan bantlar ayrı ayrı kloroform:metanol (90:10) karışımı ile elüe edilmiş, elüatlar İTK analizine tabi tutulmuş ve saflıkları anlaşıldıktan sonra elde edilmiş olan bileşiklere NP-8 (4,4 mg), NP-9 (8,1 mg), NP-10 (2,2 mg) kodu verilmiştir. Ana kolonun 51. fraksiyonundan alınan ve İTK de saf olduğu belirlenen 22,5 mg ağırlığındaki bileşiğe ise NP-11 kodu verilmiştir.

### *F Kodlu fraksiyon üzerinde çalışmalar*

F kodlu fraksiyondaki bileşiklerin izolasyonu için S4 çözücü sistemi kullanılarak preperatif ince tabaka kromatografisi uygulanmasına karar verilmiştir. PİTK plağından 2 bant kazınarak alınmıştır. Bantlar ayrı ayrı kloroform:metanol (90:10) karışımı ile elüe edilmiş ve adsorbanından ayrılan bileşikler saflık kontrolü için S4 çözücü sistemi ile İTK analizine tabi tutulmuştur. Saf olarak elde edilen bileşiklere NP-12 (12 mg) ve NP-13 (9 mg) kodu verilmiştir.

### *G Kodlu fraksiyon üzerinde çalışmalar*

G kodlu fraksiyonda görülen bileşikleri elde edebilmek için preperatif ince tabaka kromatografisi yöntemi uygulanmasına karar verilmiştir. PİTK'de S4 çözücü sistemi kullanılmıştır. PİTK ile izole edilen 2 bileşiğin saflık kontrolü İTK ile S4 çözücü sisteminde yapılmıştır. Saf olarak ve 3 mg ağırlığında elde edilen bileşiğe NP-14, 1,5 mg olarak elde edilen bileşiğe de NP-15 kodu verilmiştir.

### Meyvenin petrol eteri ve diklorometan ekstresi üzerinde yapılan çalışmalar

Meyve petrol eteri ve diklorometan ekstresinin 25 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığını sırasıyla % 32,75 ve %31,90 oranında inhibe ettiği görülmüştür. Bu oran kök petrol eteri ve diklorometan ekstresinin 25 µg/ml konsantrasyonda gösterdiği inhibisyon oranları ile karşılaştırıldığında oldukça düşüktür. O nedenle meyve petrol eteri ve diklorometan ekstresinin kolon kromatografisi fraksiyonları üzerinde aktivite tayini çalışması yapılmamıştır. Ancak bitkinin meyvesi üzerinde uçucu yağ analizi dışında şimdiye kadar yapılmış olan herhangi bir fitokimyasal çalışmaya rastlamadığımız için meyve petrol eteri ve diklorometan ekstesi üzerinde izolasyon çalışmaları yapılmıştır.

Meyve materyalinden elde edilen petrol eteri ve diklorometan ekstreleri, İTK profiline göre birbirine benzer lekeler içerdikleri görüldüğü için ve ekstre miktarını çoğaltmak amacıyla birleştirildikten sonra izolasyon çalışmalarına başlanmıştır.

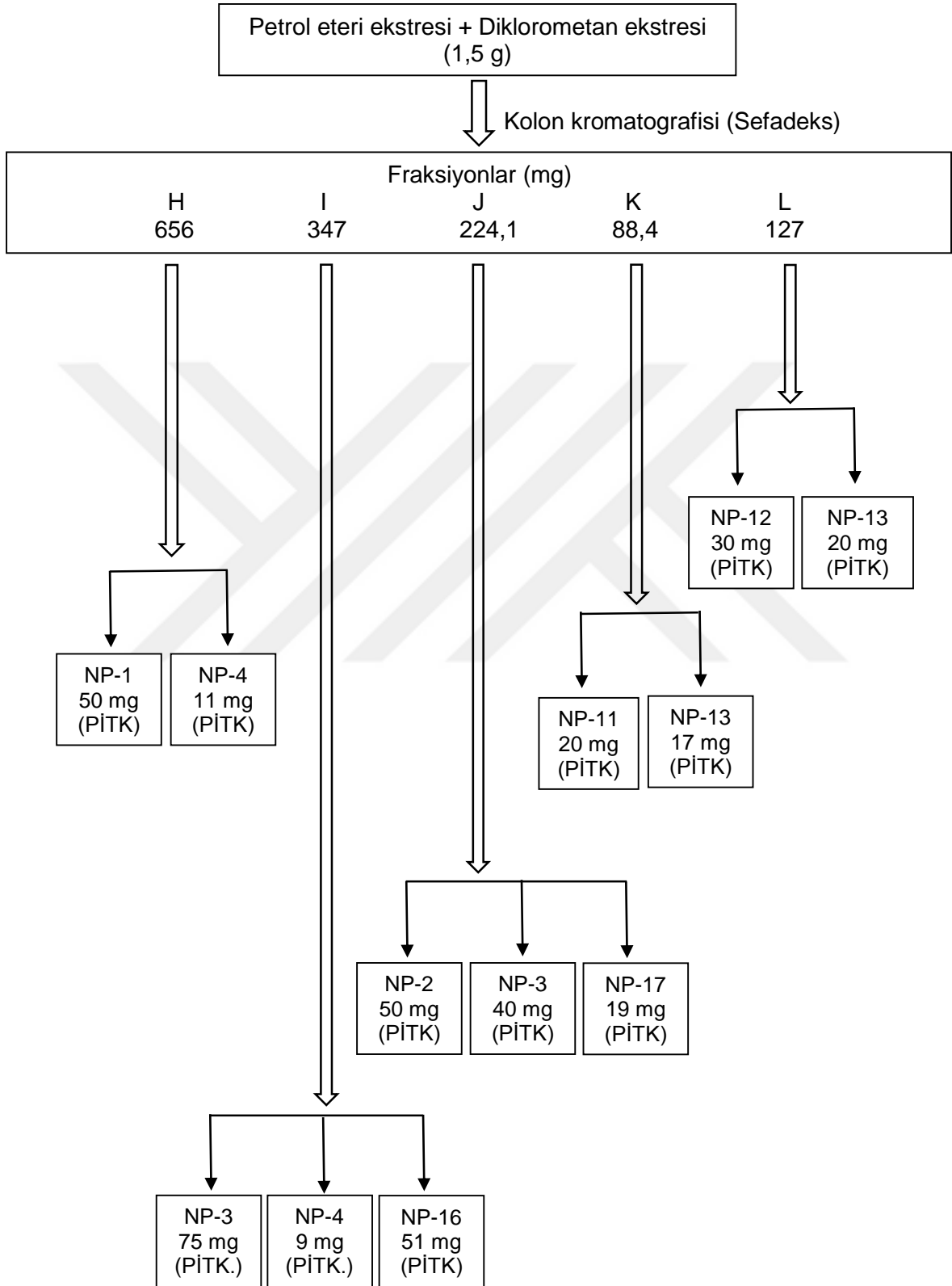
S7 çözücü sisteminde şişirilmiş olan sefadeks ve 2,5 cm çapındaki cam kolona 40 cm yükseklikte doldurulmuştur. Birleştirilmiş olan petrol eteri ve diklorometan ekstresi (1,5 g) S7 çözücü sistemi ile çözülmüş ve kolona ilave edilmiştir. Daha sonra S7 çözücü sistemi ile 4 ml/dk hızda 10 ml'lik fraksiyonlar alınmaya başlanmıştır. 20. fraksiyondan sonra S9 çözücü sistemi kullanılmıştır. 25. fraksiyondan sonra S10 çözücü sistemleri kullanılmıştır. İTK analizine göre birbirine benzer profildeki fraksiyonlar birleştirilmiştir. Birleştirilen fraksiyonlar ve isimlendirilmesi Çizelge 3.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. Meyve petrol eteri ve diklorometan ekstresinin ana kolon fraksiyonları

Fraksiyon	Fraksiyon kodu	Miktarı (g)
1-4	H	0,6560
5-7	I	0,3470
8-13	J	0,2241
14-19	K	0,0884
20-30	L	0,1270



Çizelge 3.7. Meyve petrol eteri ekstresi ve diklorometan ekstresinden bileşiklerin izolasyonu



### *H Kodlu fraksiyon üzerinde çalışmalar*

İlk 4 fraksiyonun birleştirilmesi ile elde edilen H kodlu fraksiyonda majör olan bileşikler elde edebilmek için S1 çözücü sistemi kullanılarak preparatif ince tabaka kromatografisi yapılmasına karar verilmiştir. PİTK sonrası 2 bant işaretlenerek kazanmıştır. Bileşikler klorofom:metanol (90:10) çözücü sistemi ile adsorbanından ayrılmış, saflığı İTK analizi ile kontrol edilmiş ve NMR spektrumları çektirilmiştir. NMR spektrumları incelendiğinde izole edilen bileşiklerden birinin (50 mg) kökten izole edilen NP-1 bileşiği, diğerinin (11 mg) ise kökten izole edilen NP-4 bileşiği ile aynı bileşik olduğu anlaşılmıştır.

### *I Kodlu fraksiyon üzerinde çalışmalar*

Bu fraksiyonda İTK analizine göre 3 majör bileşik olduğu ve bunlardan 2 tanesinin kökte bulunan bileşiklerle aynı Rf değerlerinde olduğu için aynı bileşik olabileceği düşünülmüştür. Bu bileşikler izole etmek için preparatif ince tabaka kromatografisi yöntemi ve S1 çözücü sistemi kullanılmasına karar verilmiştir. PİTK sonucu 3 bant işaretlenerek kazanmış ve uygun çözücü sistemi ile adsorbanından kurtarılmıştır. Saflık kontrolleri S1 çözücü sisteminin kullanıldığı İTK analizi ile yapılmış ve NMR spektrumları çektirilmiştir. NMR spektrumu incelendiğinde izole edilen bileşiklerden 9 mg olanın kökten izole edilen NP-4 bileşiği, 75 mg olarak izole edilen bileşiğin ise kökten izole edilen NP-3 bileşiği ile aynı bileşik olduğu anlaşılmıştır. 51 mg olarak izole edilen bileşiğe ise NP-16 kodu verilmiştir.

### *J Kodlu fraksiyon üzerinde çalışmalar*

Majör olarak 3 bileşik tespit ettiğimiz bu fraksiyonda iyi bir ayırım için preparatif ince tabaka kromatografisi yöntemi uygulanmasına karar verilmiştir. S1 çözücü sistemi kullanılarak uygulanan PİTK sonucu kazınan bantlardaki bileşikler kloroform:metanol (90:10) çözücü sistemi ile adsorbanından kurtarılmış ve S1 çözücü sisteminin kullanıldığı İTK analizi ile saflıkları kontrol edilmiştir. NMR spektrumları çektirilmiş ve sonuçlar incelendiğinde 50 mg ağırlığında izole edilen bileşiğin kökten izole edilen NP-2 bileşiği, 40 mg olan bileşiğin ise kökten izole edilen

NP-3 bileşigi ile aynı bileşik olduğu anlaşılmıştır. İzole edilen üçüncü bileşiğe (19 mg) ise NP-17 kodu verilmiştir.

#### *K Kodlu fraksiyon üzerinde çalışmalar*

Bu fraksiyonda majör olan iki bileşigi izole etmek için preperatif ince tabaka kromatografisi uygulanmış ve S1 çözücü sistemi kullanılmıştır. İki bant kazanmış ve adsorbanından kurtarılan bileşiklerin NMR spektrumu incelendiğinde bileşiklerden birinin (20 mg) kökten izole edilen NP-11 bileşigi ile, diğerinin (17 mg) ise kökten izole edilen NP-13 bileşigi ile aynı bileşik olduğu anlaşılmıştır.

#### *L Kodlu fraksiyon üzerinde çalışmalar*

Bu fraksiyonda majör 2 bileşik belirlenmiştir. Bu bileşikleri izole etmek için S4 çözücü sistemi kullanılarak PİTK yöntemi uygulanmıştır. PİTK sonunda 2 bant işaretlenerek kazanmış ve bileşikler adsorbanından uygun yöntemle ayrılmıştır. Saflık kontrolü İTK ile yapıldıktan sonra NMR spektrumları çektirilmiştir. 30 mg ağırlığında olan bileşigin kökten izole edilen NP-12 bileşigi ile, 20 mg ağırlığında olan bileşigin ise kökten izole edilen NP-13 bileşigi ile aynı bileşik olduğu NMR spektrumundan anlaşılmıştır.

Meyve petrol eteri ve diklorometan ekstresinden, kök petrol eteri ekstresinden izole ettiğimiz NP-1, NP-2, NP-3, NP-4, NP-11, NP-12, NP-13 kodlu bileşiklerin yanı sıra NP-16 ve NP-17 kodlu bileşikler izole edilmiştir.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Biyoaktivite Rehberliğinde İzolasyon Çalışması Bulguları

*Neocryptodiscus papillaris* bitkisinden elde edilen ekstrelerin, fraksiyonların ve bileşiklerin sitotoksik aktivitesini tayin etmek için MCF-7 hücre hatları üzerinde MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difenil tetrazolium bromid] testi uygulanmıştır.

Biyolojik aktivite tayinine göre *Neocryptodiscus papillaris* bitkisinin kök ekstrelerinden petrol eteri ekstresi 25 µg/ml ve daha yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığını inhibe etmiştir. Diklorometan ekstresi ise yine 25 µg/ml ve daha yüksek konsantrasyonlarda petrol eteri ekstresine göre % inhibisyon oranı daha az olmak üzere hücre canlılığını inhibe etmiştir. Etil asetat ekstresinde ise 100 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığı inhibisyonu görülmektedir. Meyve ekstrelerinden petrol eteri ve diklorometan ekstresi ise 100 µg/ml ve daha yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığını inhibe etmiştir (Çizelge 4.1)

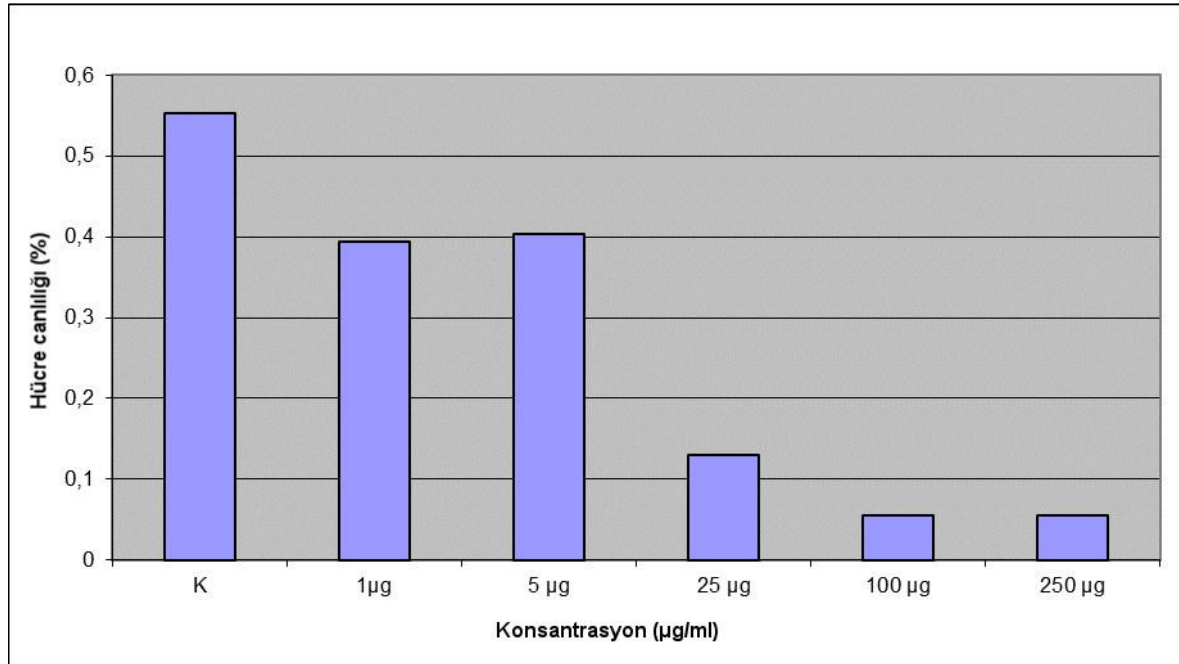
Çizelge 4.1. Ekstre, fraksiyon ve bileşiklerin hücre canlılığı % inhibisyon oranları

	Ekstreler	Konsantrasyon (µg/ml)					% inhibisyon
		1	5	25	100	250	
1	Kök – Petrol eteri	-	29,15	<b>65,36</b>	75,67	75,68	
2	Kök – Diklorometan	-	25,30	<b>64,39</b>	74,91	73,76	
3	Kök – Metanol	16,62	21,70	32,95	55,87	61,52	
4	Kök – Etilasetat	-	-	14,50	64,89	80,88	
5	Meyve – Petrol eteri	-	-	32,75	63,09	77,41	
6	Meyve – Diklorometan	-	-	31,90	63,50	77,13	
	<b>Fraksiyonlar</b>						
1	A	-	-	-	15,04	19,96	
2	B	-	3,55	7,28	39,07	81,86	
3	C	7,63	12,09	49,50	57,03	61,78	
4	D	28,86	27,01	<b>75,58</b>	90,01	90,10	
5	E	5,96	18,35	30,86	85,48	85,01	
6	F	-	-	-	80,84	81,03	
7	G	-	8,33	47,37	84	85,28	
	<b>Bileşikler</b>						
1	NP-2	-	18,51	22,27	36,02	86,85	
2	NP-3	-	6,29	<b>71,85</b>	83,84	85,33	
3	NP-11	13,58	15,94	25,13	49,53	90,82	

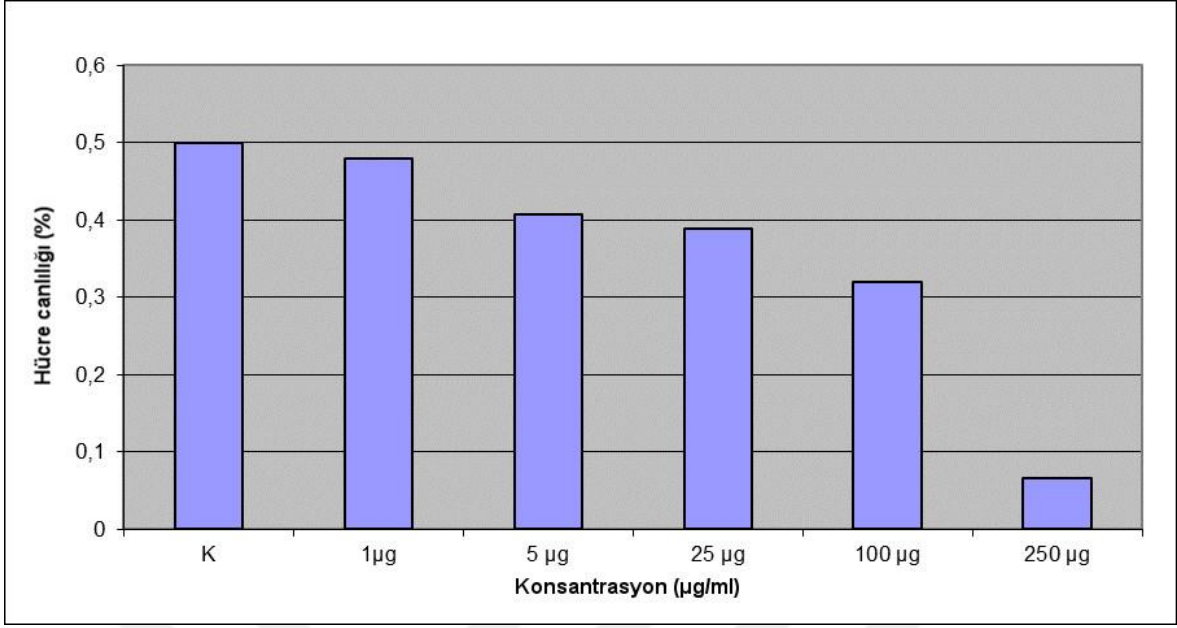
D kodlu fraksiyon ile NP-3 kodlu bileşiminin 25 µg/ml konsantrasyonda %50'den daha yüksek oranda inhibisyon gösterdiği Çizelge 4.1'den anlaşılmaktadır. A fraksiyonunda hiçbir aktivite görülmezken B fraksiyonunda aktivite 250 µg/ml konsantrasyonda, E, F ve G fraksiyonlarında ise 100 µg/ml konsantrasyonda başlamaktadır. En aktif fraksiyon ise D fraksiyonudur. 25 µg/ml konsantrasyonda %75,58 inhibisyon göstermiş ve artan konsantrasyonlarda inhibisyon oranları da artmıştır.

D kodlu fraksiyondan 6 bileşik izole edilmiştir. Miktarı en fazla olan bileşik ise D fraksiyonunun % 63,32 sini oluşturan ostol isimli bileşiktir. Ostol 25 µg/ml konsantrasyonda % 71,85 inhibisyon göstermiştir. Aynı fraksiyondan izole edilen NP-2 kodlu bileşik 250 µg/ml konsantrasyonda % 86,85 inhibisyon göstermiştir. E kodlu fraksiyondan izole edilen NP-11 kodlu bileşik 100 µg/ml konsantrasyonda % 49,53 ve 250 µg/ml konsantrasyonda ise % 90,82 inhibisyon göstermiştir.

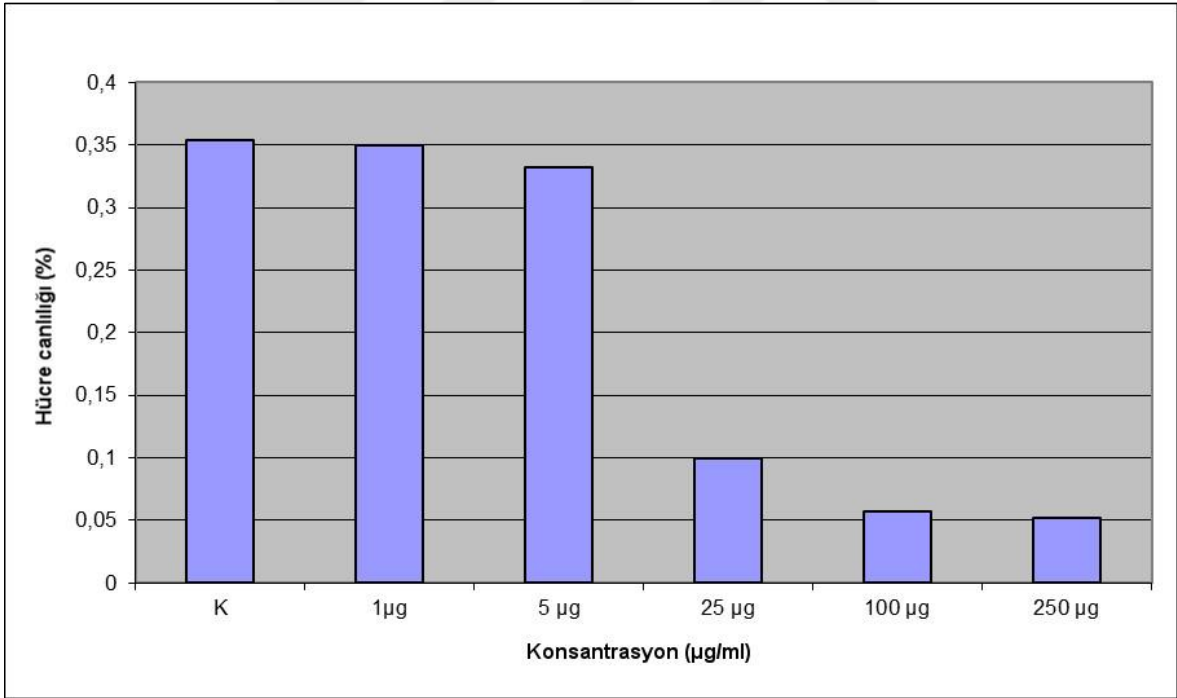
25 µg/ml konsantrasyonda aktivite gösteren D fraksiyonunun ve izole edilen bileşiklerin sitotoksosite grafikleri aşağıda gösterilmiştir.



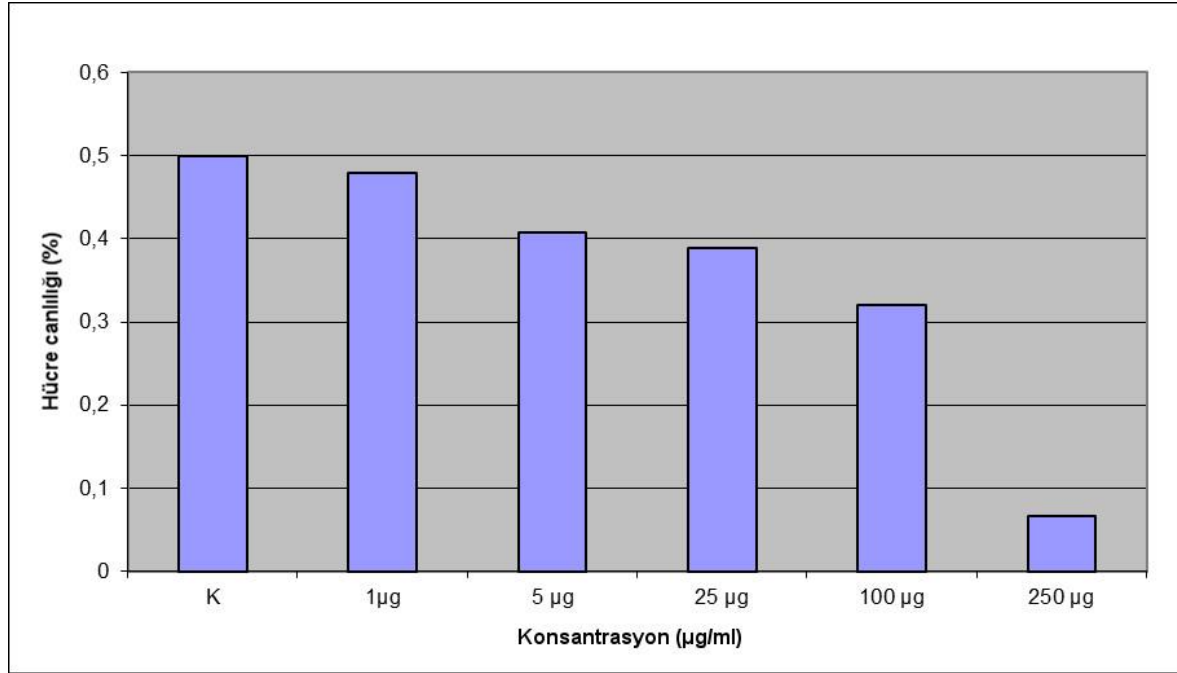
Şekil 4.1. D kodlu fraksiyonun sitotoksosite grafiği



Şekil 4.2. NP-2 kodlu bileşiğin sitotoksosite grafiği



Şekil 4.3. NP-3 kodlu bileşiğin sitotoksosite grafiği



Şekil 4.4. NP-11 kodlu bileşiğin sitotoksiste grafiği

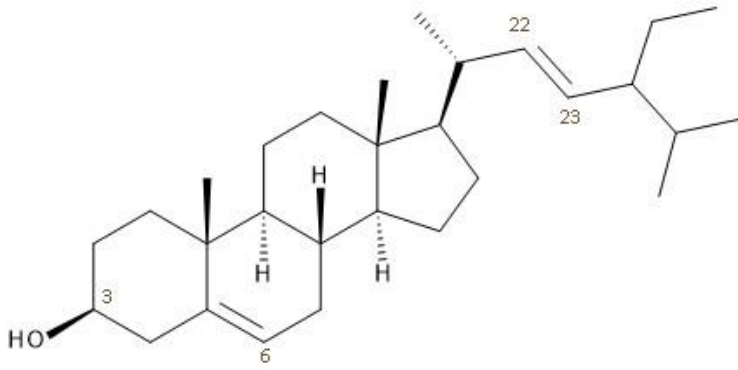
## 4.2. İzolasyon ile Elde Edilen Bileşiklere Ait Bulgular

### 4.2.1. NP-1 kodlu bileşiğe ait bulgular

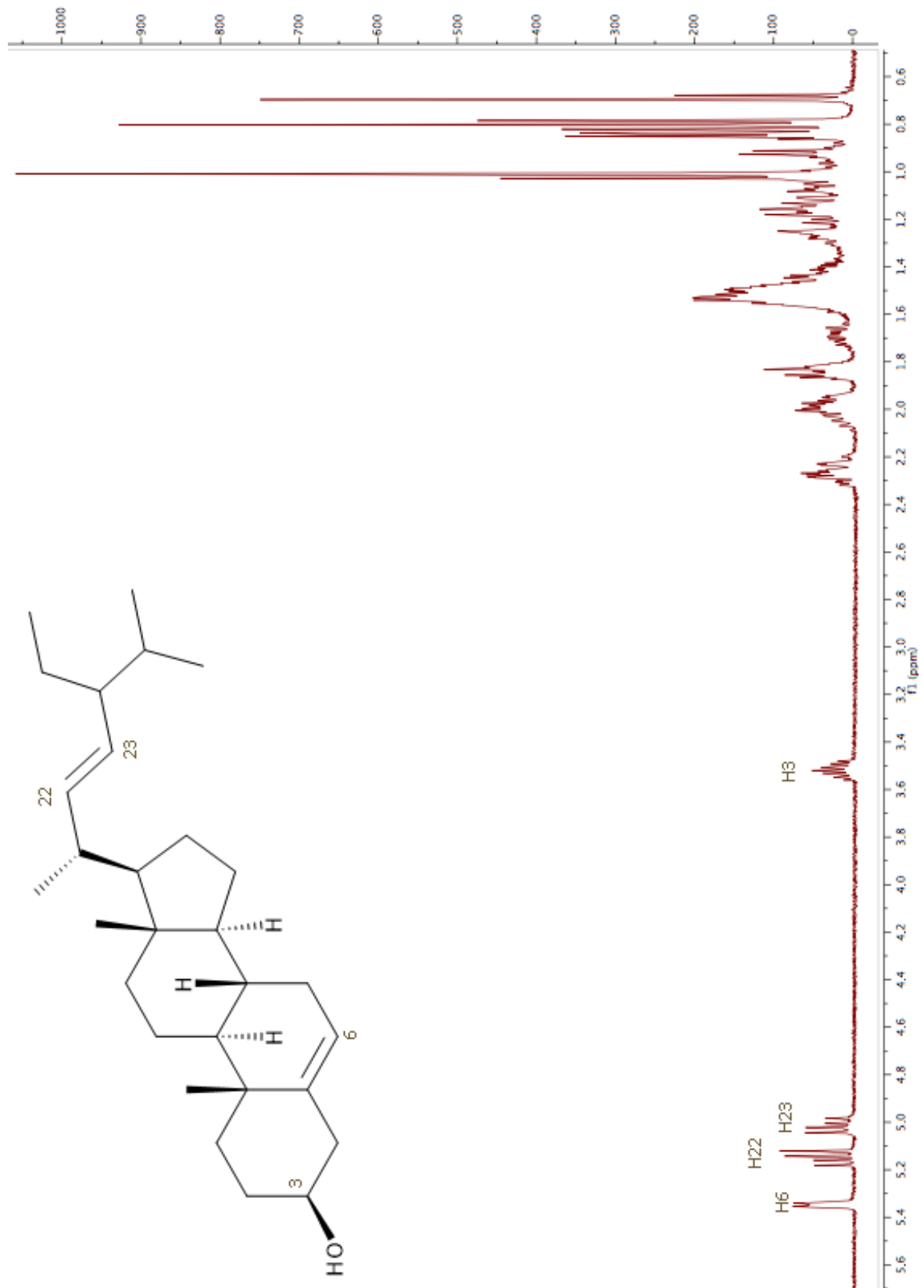
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).  $\delta$  ppm: 5,34 (1H, *m*,  $J = 5,3$  ve  $1,9$  Hz, H-6); 5,17 (1H, *dd*,  $J = 15,22$  Hz, H-22); 5,04 (1H, *dd*,  $J = 8,6$  Hz, H-23); 3,51 (1H, *m*,  $J = 4,8$  ve  $11,2$  Hz, H-3); 2,30 (1H, *m*,  $J = 13,2$  ve  $2,1$  Hz, H-4 $\alpha$ ); 2,23 (1H, *m*,  $J = 1,9, 2,6$  ve  $2,6$  Hz, H-4 $\beta$ ); 2,06 (1H, *m*,  $J = 6,2$  ve  $8,6$  Hz, H-20); 2,00 (1H, *m*,  $J = 13,2$  ve  $3,2$  Hz, H-12 $\beta$ ); 1,97 (1H, *m*,  $J = 14,5$  ve  $2,1$  Hz, H-7 $\beta$ ); 1,84 (1H, *m*,  $J = 14,5, 3,6$  ve  $3,6$  Hz, H-1 $\beta$ ); 1,83 (1H, *m*,  $J = 15,4$  ve  $4,6$  Hz, H-2 $\alpha$ ); 1,72 (1H, *m*,  $J = 10,8$  ve  $8,7$  Hz, H-16 $\alpha$ ); 1,56 (1H, *m*); 1,55 (1H, *m*,  $J = 6,4$  ve  $6,4$  Hz, H-25); 1,54 (1H, *m*, H-24); 1,51 (1H, *m*,  $J = 11,2$  Hz, H-2 $\beta$ ); 1,50 (1H, *m*,  $J = 14,3$  Hz, H-7 $\alpha$ ); 1,50 (2H, *m*,  $J = 13,2$  ve  $3,4$  Hz, H-11); 1,46 (1H, *m*,  $J = 11,3$  ve  $11,2$  Hz, H-8); 1,43 (1H, *m*,  $J = 13,4, 7,3$  ve  $3,6$  Hz, H-28 $\alpha$ ); 1,28 (1H, *m*,  $J = 10,7$  Hz, H-16 $\beta$ ); 1,18 (1H, *m*,  $J = 3,1$  Hz, H-12 $\alpha$ ); 1,18 (1H, *m*,  $J = 7,3$  ve  $5,7$  Hz, H-28 $\beta$ ); 1,15 (1H, *q*,  $J = 9,9$  Hz, H-17); 1,08 (1H, *m*,  $J = 14,9$  ve  $4,9$  Hz, H-1 $\alpha$ ); 1,06 (1H, *m*, H-15); 1,03 (3H, *s*, H-21); 1,01 (3H, *s*, H-19); 1,01 (1H, *m*,  $J = 10,6$  ve  $8,3$  Hz, H-14); 0,94 (1H, *m*,  $J = 11,4$  ve  $4,9$  Hz, H-9); 0,85 (3H, *d*, H-26); 0,81 (3H, *t*, H-29), 0,80 (3H, *d*, H-27); 0,70 (3H, *s*, H-18).



$^1\text{H}$  NMR spektrumuna bakıldığında üst alanda çok sayıda hidrojen atomuna ait sinyal görülmektedir. Daha alt alanda görülen sinyal sayısı ise 4 tanedir. Birçok bitkide hücre membranında bulunan bir fitosterol olan [131] stigmasterol için belirleyici sinyaller ise daha büyük kimyasal kayma değerinde bulunan bu sinyallerdir. Olefinik H-6 sinyali, yan zincirdeki H-22 ve H-23 sinyalleri ve hidroksile komşu H-3 sinyali stigmasterol için ayırt edici sinyallerdir.  $\delta$  5,34, 5,17 ile  $\delta$  5,04 ve 3,51'de bulunan bu sinyaller maddenin stigmasterol olduğunu göstermektedir. Spektrum verileri literatürdeki veriler ile uyumluluk göstermektedir [131-134].



Şekil 4.5. Stigmasterol

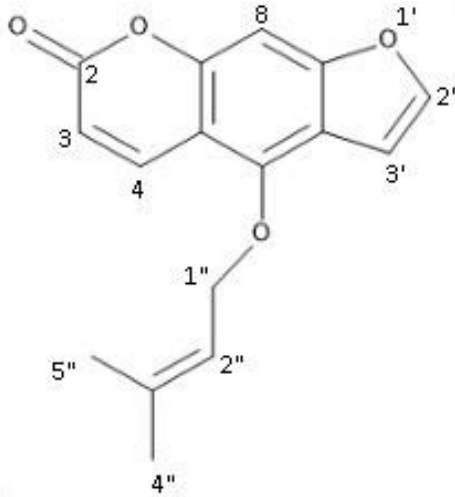


Resim 4.1. NP-1 kodlu bileşimin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

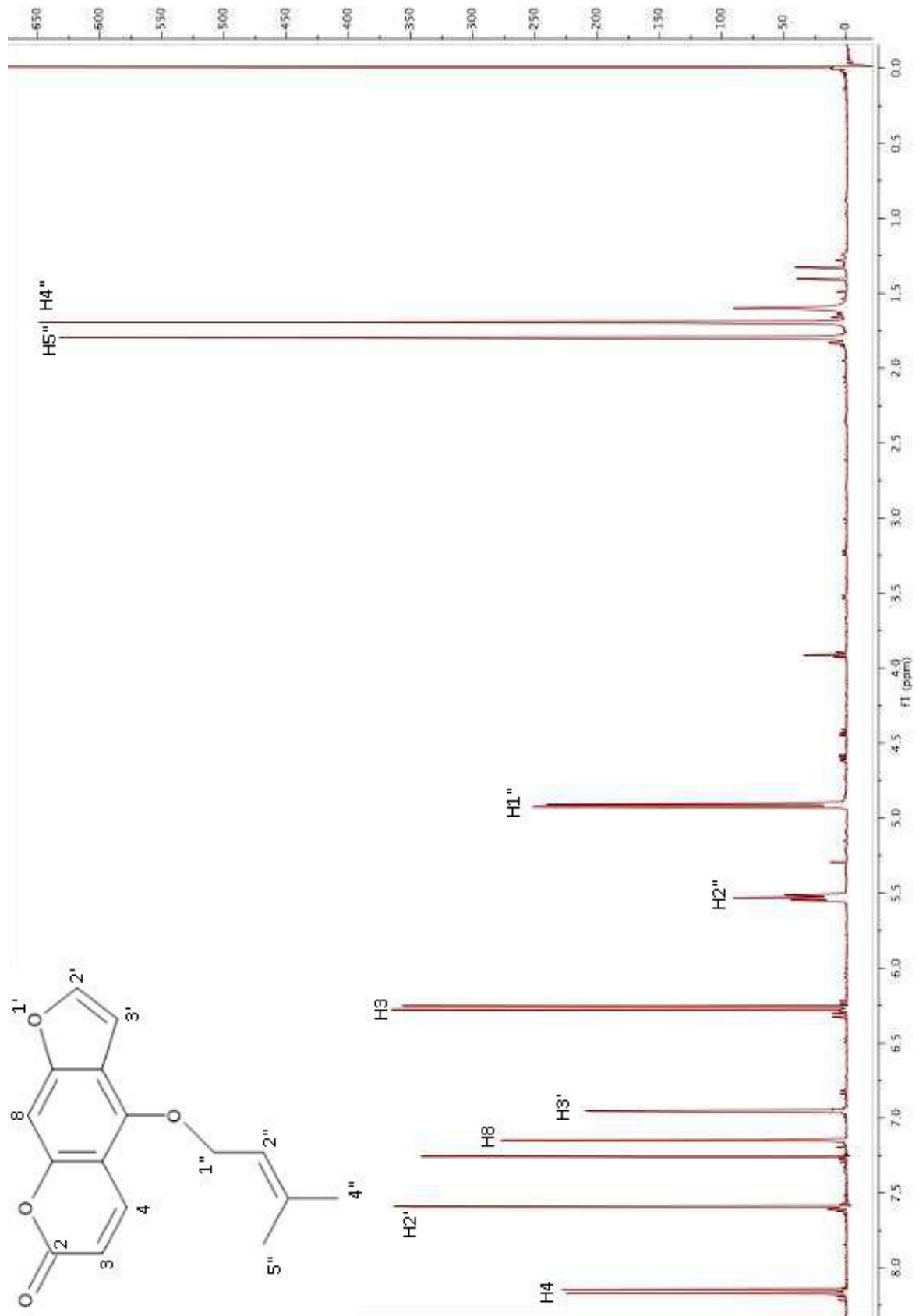
#### 4.2.2. NP-2 kodlu bileşiğe ait bulgular

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).  $\delta$  ppm: 8,16 (1H, *d*,  $J = 9,6$  Hz, H-4); 7,60 (1H, *d*,  $J = 2,4$  Hz, H-2'); 7,15 (1H, *s*, H-8); 6,95 (1H, *d*,  $J = 2,4$  Hz, H-3'); 6,26 (1H, *d*,  $J = 9,6$  Hz, H-3); 5,53 (1H, *t*,  $J = 7,0$  Hz, H-2''); 4,91 (2H, *d*,  $J = 7,0$  Hz, H-1''); 1,80 (3H, *s*, H-4''); 1,65 (3H, *s*, H-5'').

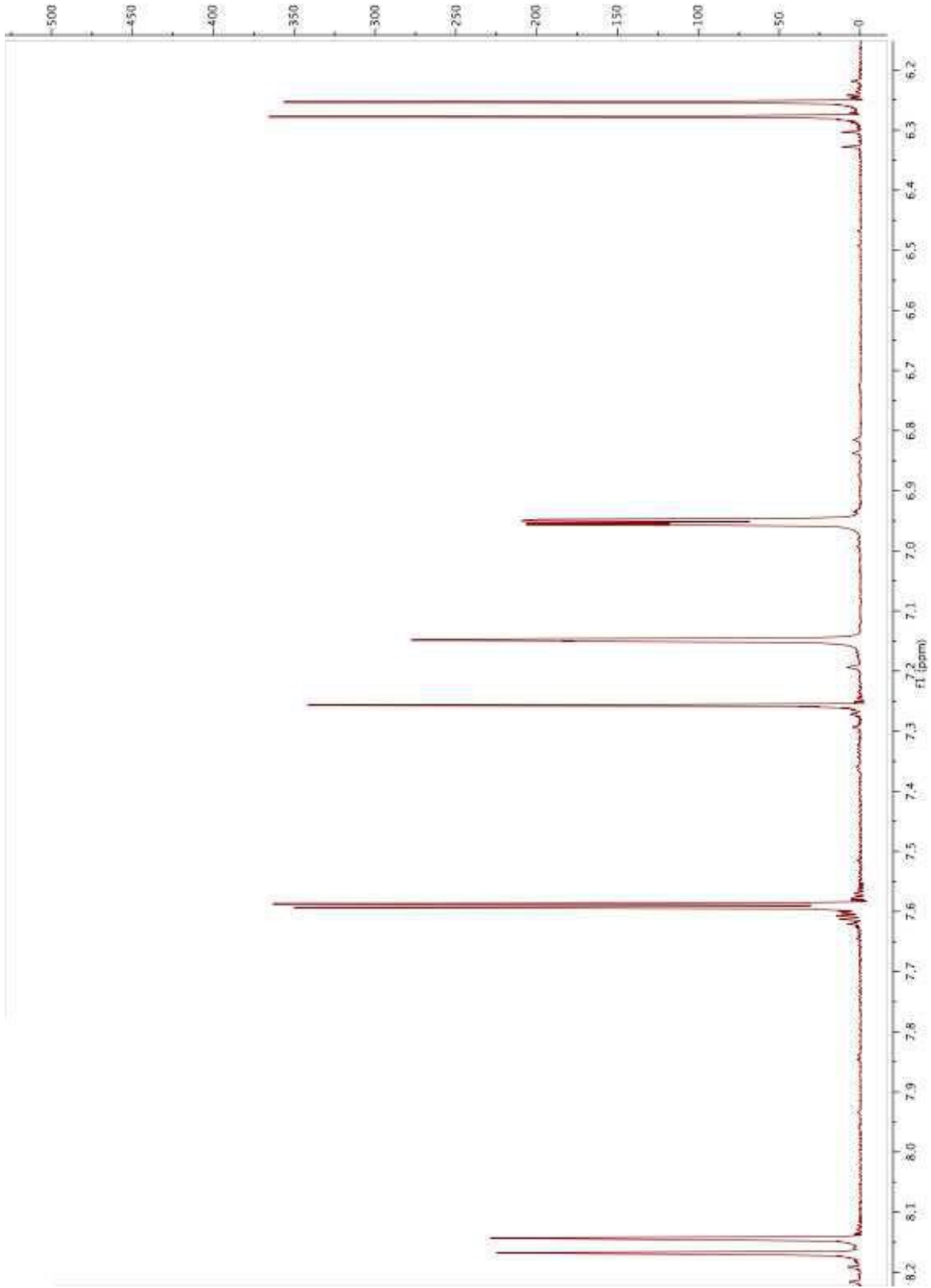
NP-2 kodlu bileşiğin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu incelendiğinde 2 tane AB sistem görülmektedir.  $\delta$  8,16 ve 6,26 (sırasıyla H-4 ve H-3) ile  $\delta$  7,60 ve 6,95 (sırasıyla H-2' ve H-3') furanokumarin iskeleti için karakteristiktir.  $\delta$  7,15'te görülen singlet proton (H-8) ve H-4'ün alt alana kayması linear furanokumarin olduğunu düşündürmektedir.  $\delta$  1,65 ve 1,80'de bulunan üçer protonluk singletler iki tane vinilik metil grubunun varlığını göstermektedir. Yine  $\delta$  4,91 ve 5,53'te ABX yarılması gözlenmektedir. ABX yarılmasında 4,91 ppm'de bulunan sinyalin alt alana kayması bu yan zincirin benzen halkasına direkt bağlı olmadığını oksijen atomuna bağlı olduğunu göstermektedir. Bütün bu bilgilerin literatürde izoimperatorin için verilen değerlerle uyumlu olması elde ettiğimiz bileşiğin izoimperatorin olduğunu göstermektedir [123, 134-137].



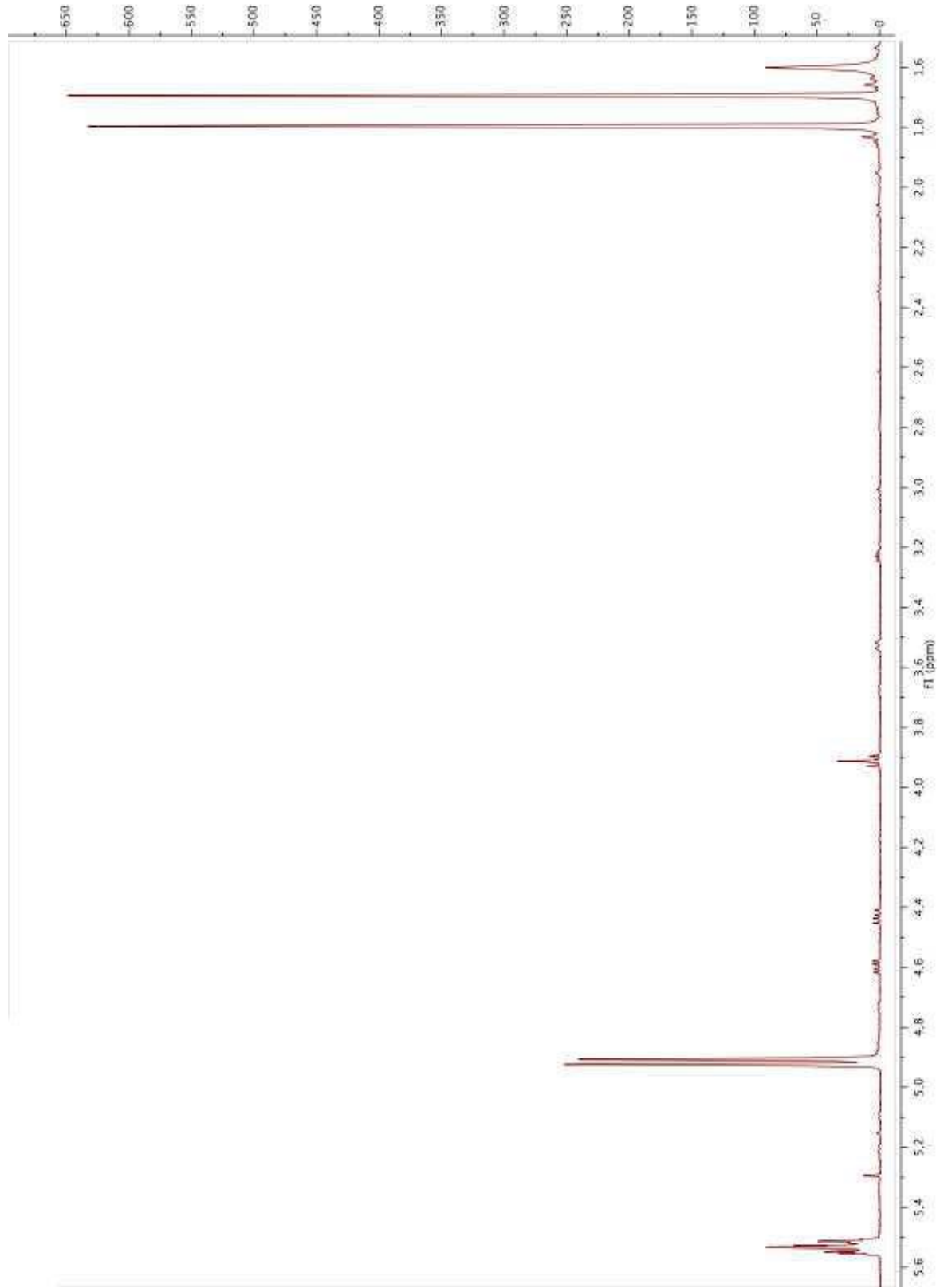
Şekil 4.6. İzoimperatorin



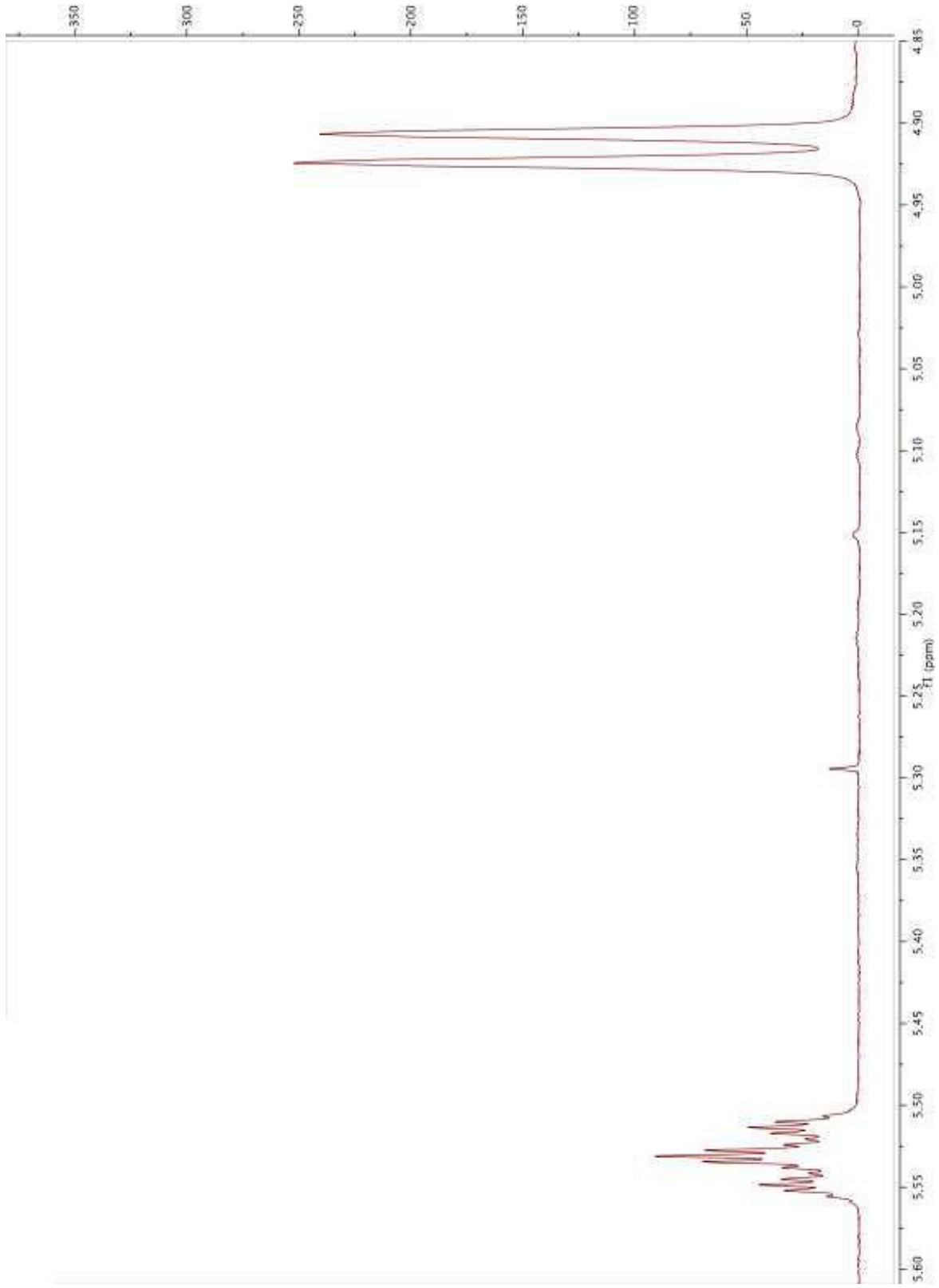
Resim 4.2. NP-2 kodlu bileşimin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



Resim 4.3. NP-2 kodlu bileşimin furanokumarin iskeletinin protonlarını içeren genişletilmiş alt alan <sup>1</sup>H NMR spektrumu



Resim 4.4. NP-2 kodlu bileşiğin yan zincir proton sinyallerini içeren genişletilmiş üst alan  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

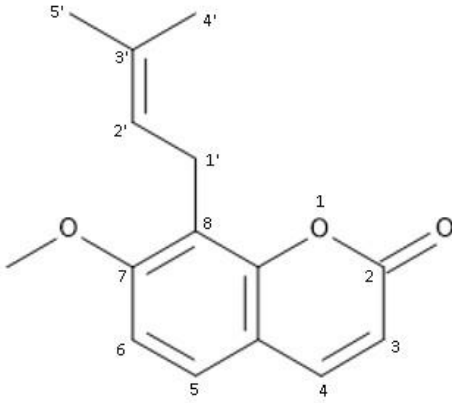


Resim 4.5. NP-2 kodlu bileşimin H1'a,b ve H2' sinyallerini içeren genişletilmiş  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

### 4.2.3. NP-3 kodlu bileşiğe ait bulgular

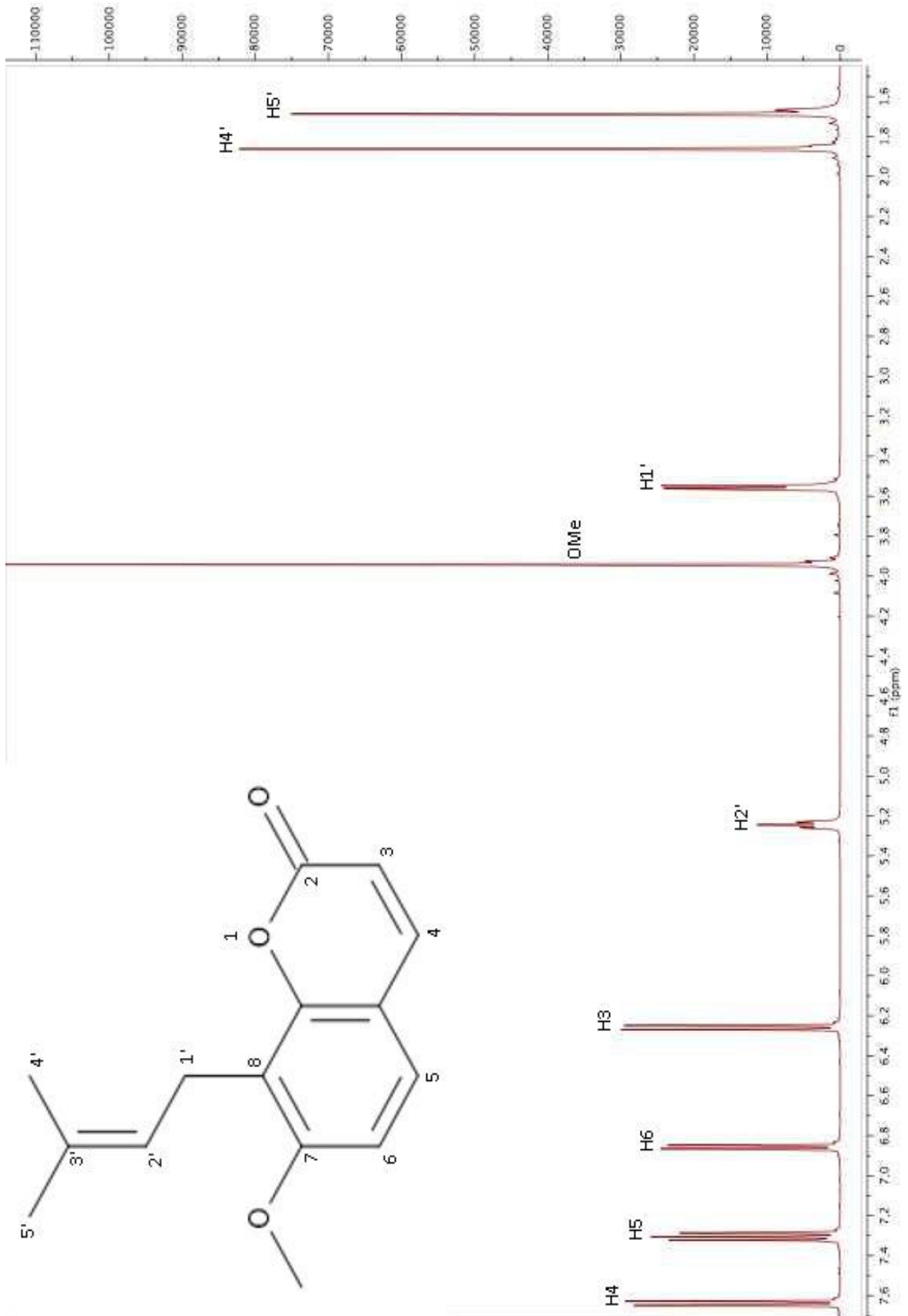
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).  $\delta$  ppm: 7,65 (1H, *d*,  $J = 9,5$  Hz, H-4); 7,31 (1H, *d*,  $J = 8,7$  Hz, H-5); 6,86 (1H, *d*,  $J = 8,7$  Hz, H-6); 6,25 (1H, *d*,  $J = 9,5$  Hz, H-3); 5,24 (1H, *t*,  $J = 7,6$  Hz, H-2'); 3,96 (3H, *s*, OMe); 3,60 (2H, *d*,  $J = 7,6$  Hz, H-1'); 1,87 (3H, *s*, H-4'); 1,69 (3H, *s*, H-5').

Aromatik alanda 4 proton sinyali bulunmaktadır.  $\delta$  7,65 ve 6,25'te bulunan bir protonluk dublet yarılan sinyaller ile  $\delta$  7,31 ve 6,86'da bulunan bir protonluk dublet yarılan sinyaller kumarin varlığını göstermektedir. Alifatik alanda ise  $\delta$  3,60 ve 5,24'te bulunan sırasıyla dublet ve triplet sinyaller ABX yarılanmasını işaret etmektedir.  $\delta$  3,60'ta bulunan hidrojenin benzilik hidrojen olduğu görülmektedir.  $\delta$  3,96'da bir protonluk singlet sinyali, karakteristik olarak kumarin halkasına bağlı metoksil grubunu göstermektedir.  $\delta$  1,69 ve 1,87'de üç protonluk singlet veren sinyaller ise vinilik metil gruplarını göstermektedir. Görülen sinyaller ve bu sinyallerin  $J$  değerlerine bakıldığında bileşiğin ostol ile uyumlu bir spektruma sahip olduğu görülmektedir. Literatür bilgileri ile karşılaştırdığımız zaman bu bileşiğin ostol olduğu anlaşılmaktadır [101, 134, 135, 138-142].

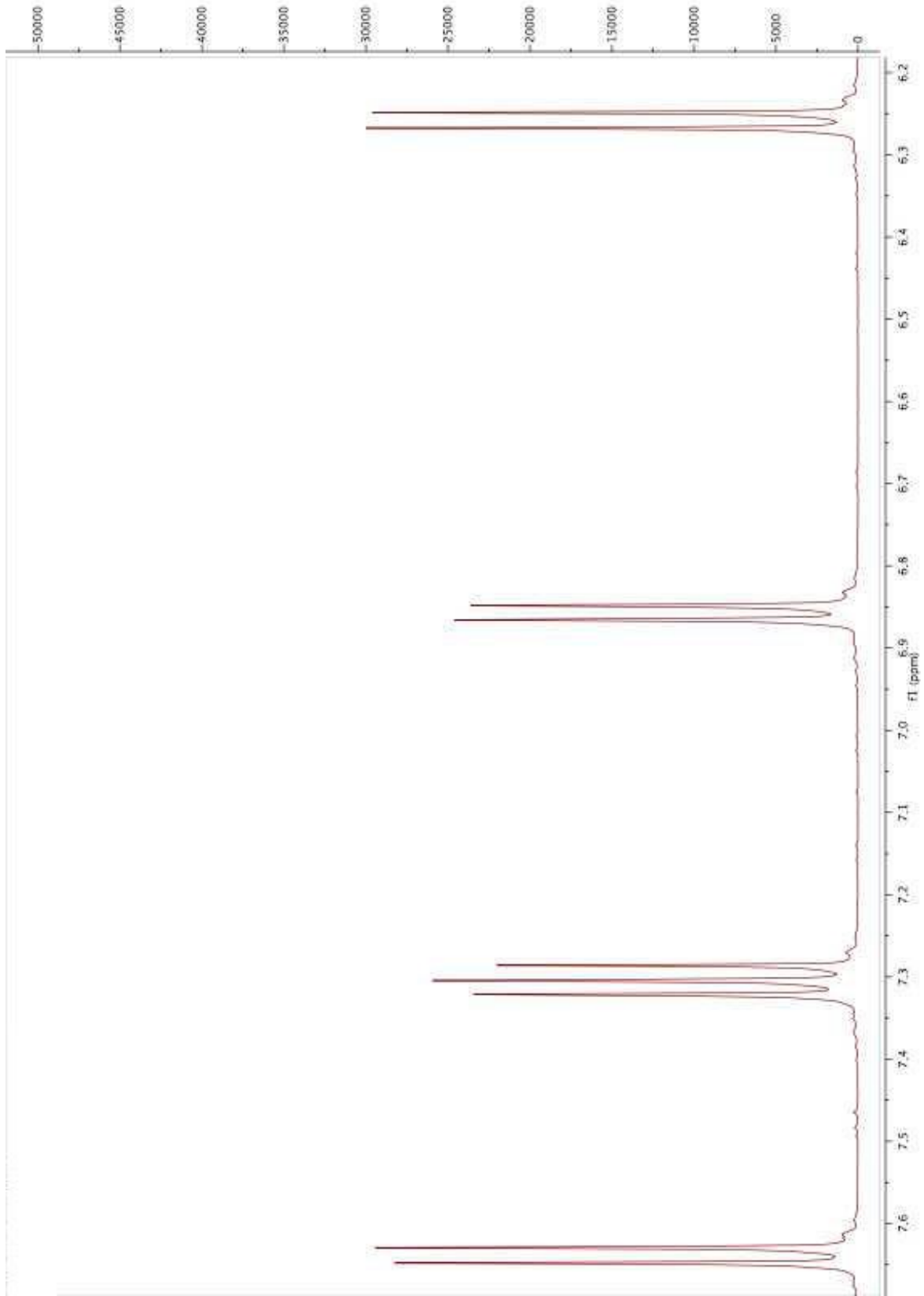


Şekil 4.7. Ostol

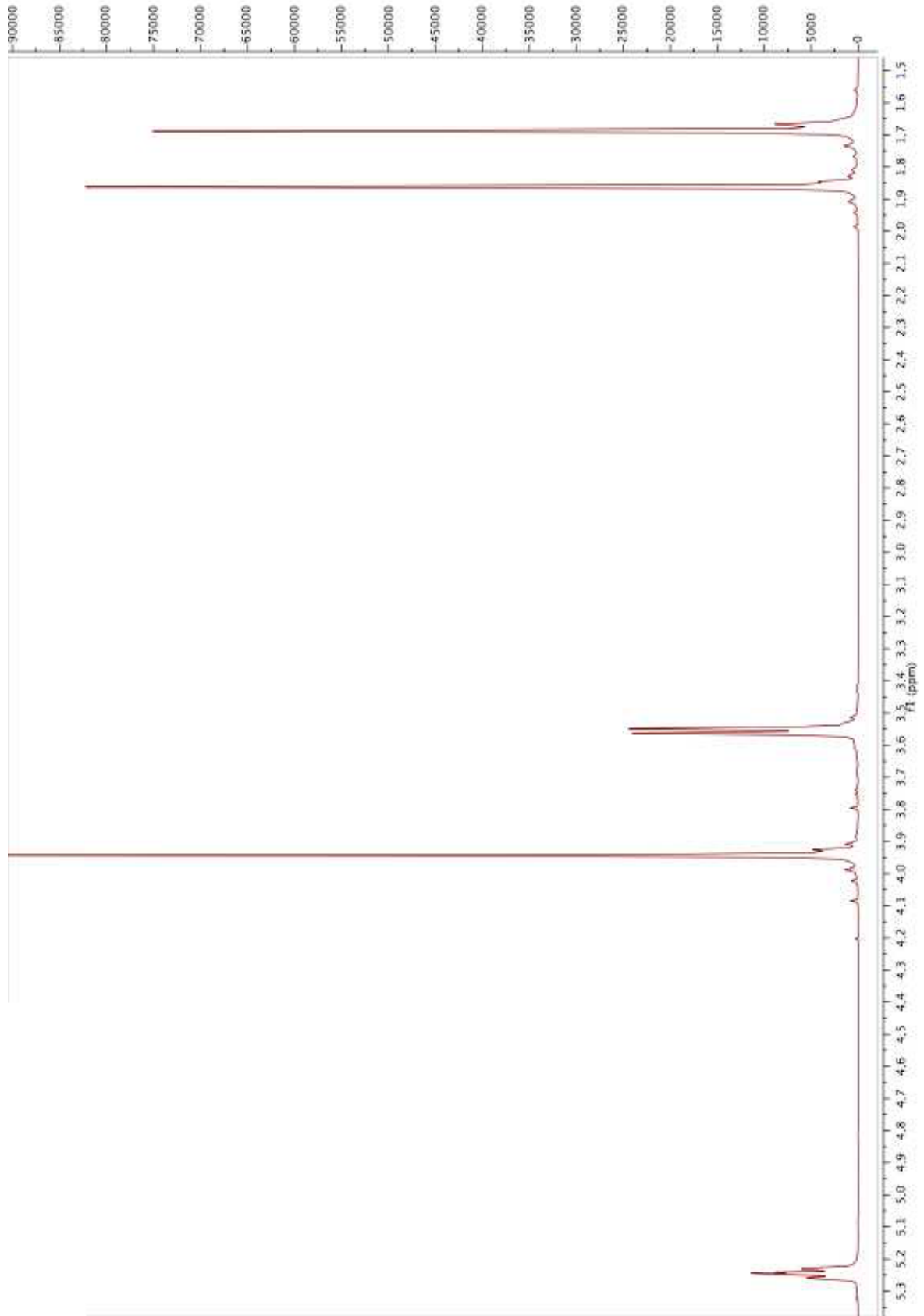




Resim 4.6. NP-3 kodlu bileşğin <sup>1</sup>H NMR spektrumu



Resim 4.7. NP-3 kodlu bileşimin kumarin iskeletinin protonlarını içeren genişletilmiş alt alan <sup>1</sup>H NMR spektrumu



Resim 4.8. NP-3 kodlu bileşimin izoprenil zincirinin protonlarını içeren genişletilmiş üst alan  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

#### 4.2.4. NP-4 kodlu bileşiğe ait bulgular

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).  $\delta$  ppm: 7,61 (1H, *d*,  $J = 9,5$  Hz, H-4); 7,30 (1H, *d*,  $J = 8,7$  Hz, H-5); 6,82 (1H, *d*,  $J = 8,7$  Hz, H-6); 6,23 (1H, *d*,  $J = 9,5$  Hz, H-3); 5,72 (2H, *q*,  $J = 1,0$  Hz, H-2''); 5,51 (1H, *br t*,  $J = 7,7$  Hz, H-2'); 4,87 (2H, *s*, H-4'); 3,90 (3H, *s*, OMe); 3,62 (2H, *d*,  $J = 7,7$  Hz, H-1'); 2,19 (3H, *d*,  $J = 1,0$  Hz, H-4''); 1,89 (3H, *d*,  $J = 1,0$  Hz, H-5''); 1,72 (3H, *s*, H-5').

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).  $\delta$  ppm: 166,8 *s* (C-1''); 161,14 *s* (C-2); 160,09 *s* (C-7); 156,41 *s* (C-3''); 152,86 *s* (C-9); 143,05 *d* (C-4); 131,24 *s* (C-3'); 126,51 *d* (C-5); 126,46 *d* (C-2'); 116,66 *s* (C-8); 116,08 *d* (C-2''); 113,04 *s* (C-10); 112,92 *d* (C-3); 107,30 *d* (C-6); 62,40 *q* (C-4''); 54,01 *q* (OMe); 27,39 *q* (C-5'); 21,61 *t* (C-1'); 21,43 *q* (C-5''); 20,20 *t* (C-4').

#### Yüksek Rezolüsyonlu Kütle Spektrum (HRMS) Analizi

(M+H)<sup>+</sup> için teorik hesaplanan; 343,1545

(M+H)<sup>+</sup> için bulunan; 343,1544

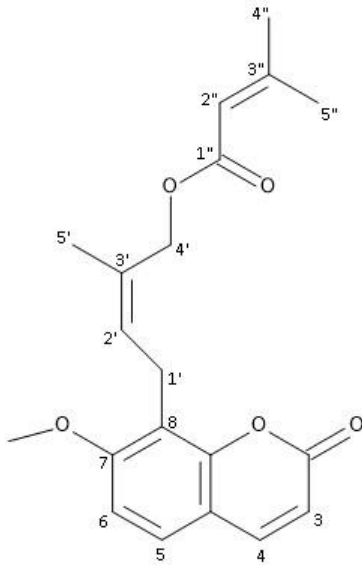
( $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{O}_5$ )

Yüksek rezolüsyonlu kütle spektrumu analizi sonucu yapılan tam kütle tayininde bileşiğin proton katılmış molekül ağırlığının 343,1544 olduğu bulunmuştur. Bu bulgu ile bileşiğin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu birlikte değerlendirildiğinde molekülün kapalı formülü  $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_5$  olarak tespit edilmiştir.  $^1\text{H}$  NMR spektrumu incelendiğinde aromatik bölgede 4 proton sinyali görülmektedir.  $\delta$  7,61 ve 6,23 (sırasıyla H-4 ve H-3.  $J = 9,5$  Hz) ile  $\delta$  7,30 ve 6,82 (sırasıyla H-5 ve H-6.  $J = 8,7$  Hz) sinyalleri kumarin varlığını göstermektedir. Alifatik alanda ise  $\delta$  3,90'da kumarin halkasına bağlı metoksile ait üç protonluk sinyal görülmektedir.  $\delta$  3,62 ve 5,51 sinyalleri ABX yarılmasını göstermektedir ve  $J$  değerleri 7,7 Hz'dir. Bu sinyallerin hepsi ostol ile benzerlik göstermektedir. Ancak üst alanda 3 tane metil protonuna bağlı singlet sinyal görülmektedir. Ayrıca ABX yarılmasında vinilik proton daha alt alana kaymıştır.  $\delta$  4,87'de bulunan 2H büyüklüğündeki singlet, ostol yan zincirinde bulunan metillerden birinin oksijen ile bağ yaptığı için alt alana kaydığını düşündürmektedir. Yine alifatik alanda ostol'e göre fazladan  $\delta$  5,72'de 2H

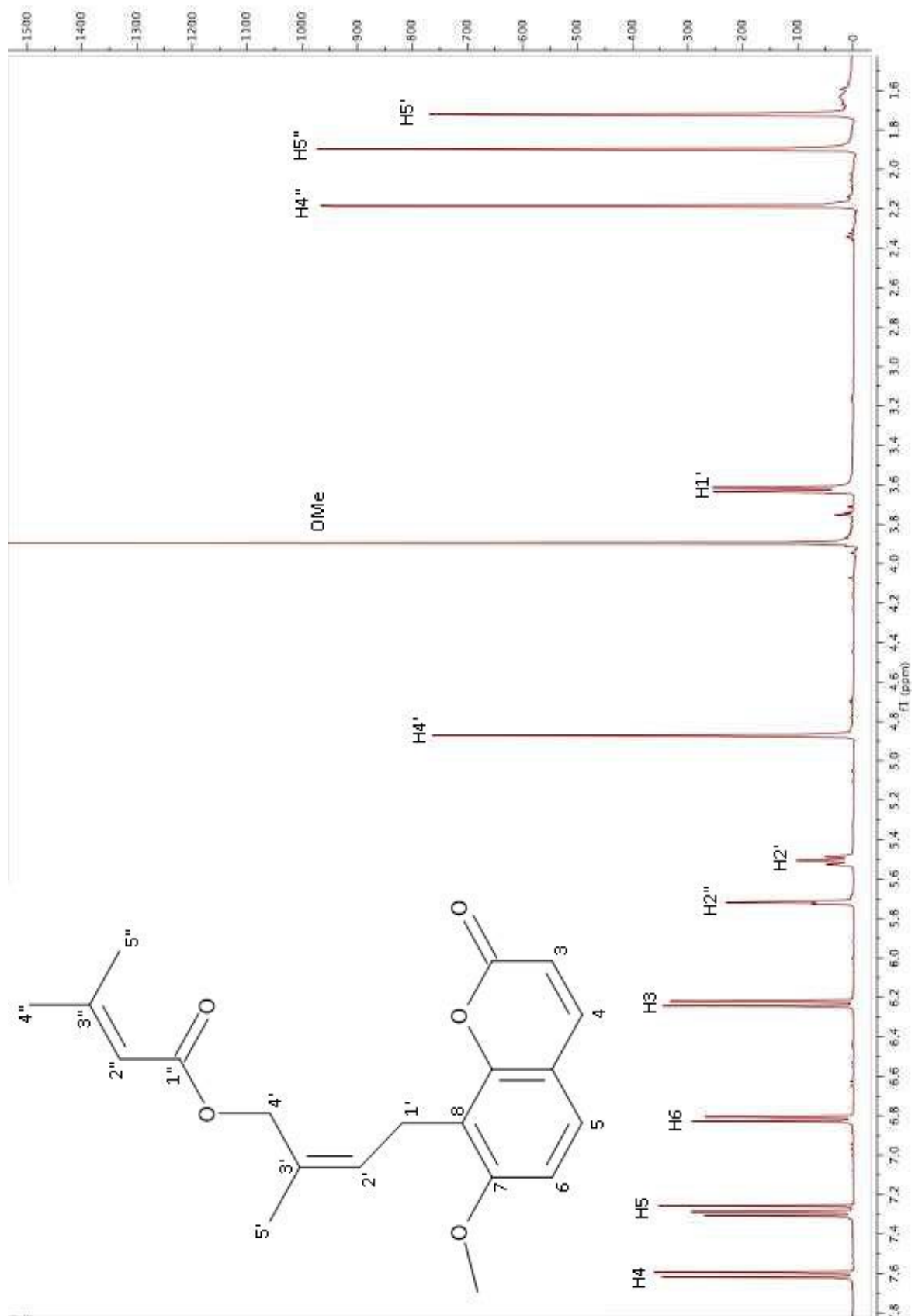
büyükliğünde  $J$  değeri 1,0 Hz olan kuartet bulunmaktadır.  $\delta$  1,89 ve 2,19'da bulunan metil protonuna ait sinyallerin  $J$  değerinin 1,0 Hz olduğu ve  $\delta$  5,72'deki proton ile etkileştiği görülmektedir. Ostol'de olmayan bu sinyallerin kimyasal kaymaları ve yarılmaları senesioik asit varlığını düşündürmektedir. Bileşiğin pozitif mod elektrosprey kütle spektrumunda (Resim 4.13) gözlenen  $m/z$  100 dalton ünitesi büyüklüğünde ve  $C_5H_8O_2$  kompozisyonuna sahip bir fragmentin kopması ile proton ve  $^{13}C$  NMR spektrumlarındaki bilgiler molekülün senesioik asit esteri olduğunu kanıtlamaktadır. Bu bilgiler literatür verileri ile karşılaştırıldığında bileşiğin yapısında senesioik asit'in bulunduğu anlaşılmıştır [135].

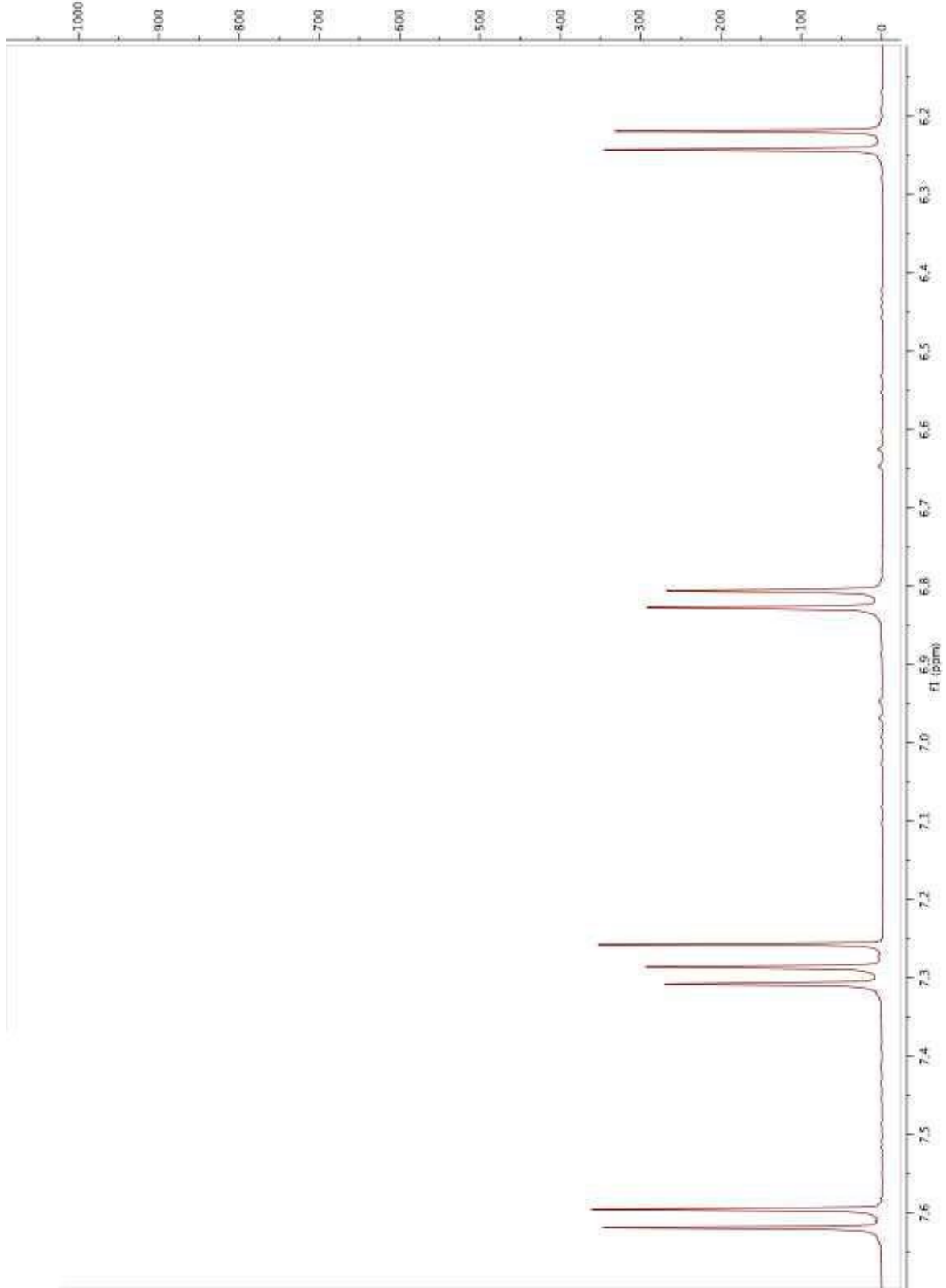
COSY spektrumunda  $\delta$  1,72 protonu ile  $\delta$  5,51 protonunun etkileştiği görülmektedir.  $\delta$  5,51 protonunun ayrıca  $\delta$  3,62 protonu ile de etkileştiği görülmektedir. Ayrıca  $\delta$  5,72'de senesioik asidin vinilik protonun,  $\delta$  1,89 ve 2,19'de herbiri 3H büyüklüğünde senesioik asit metilleri ile etkileştiği anlaşılmaktadır.

ROESY spektrumunda H-5' metil protonunun H-2' vinilik protonu ile etkileştiği görülmektedir. Bu etkileşmeden ostol'ün yan zincirinin 4' metil grubunun oksitlenerek hidrosillendiğini ve senesioik asidin bu hidroksil üzerinden esterleştiğini anlamaktayız. Bu veriler NP-4 kodlu bileşiğin bir ostol türevidir olan 4'-senesioiloksi-ostol olduğunu göstermektedir. Literatür taraması yapıldığında bileşiğin daha önce izole edilmediği anlaşılmıştır.

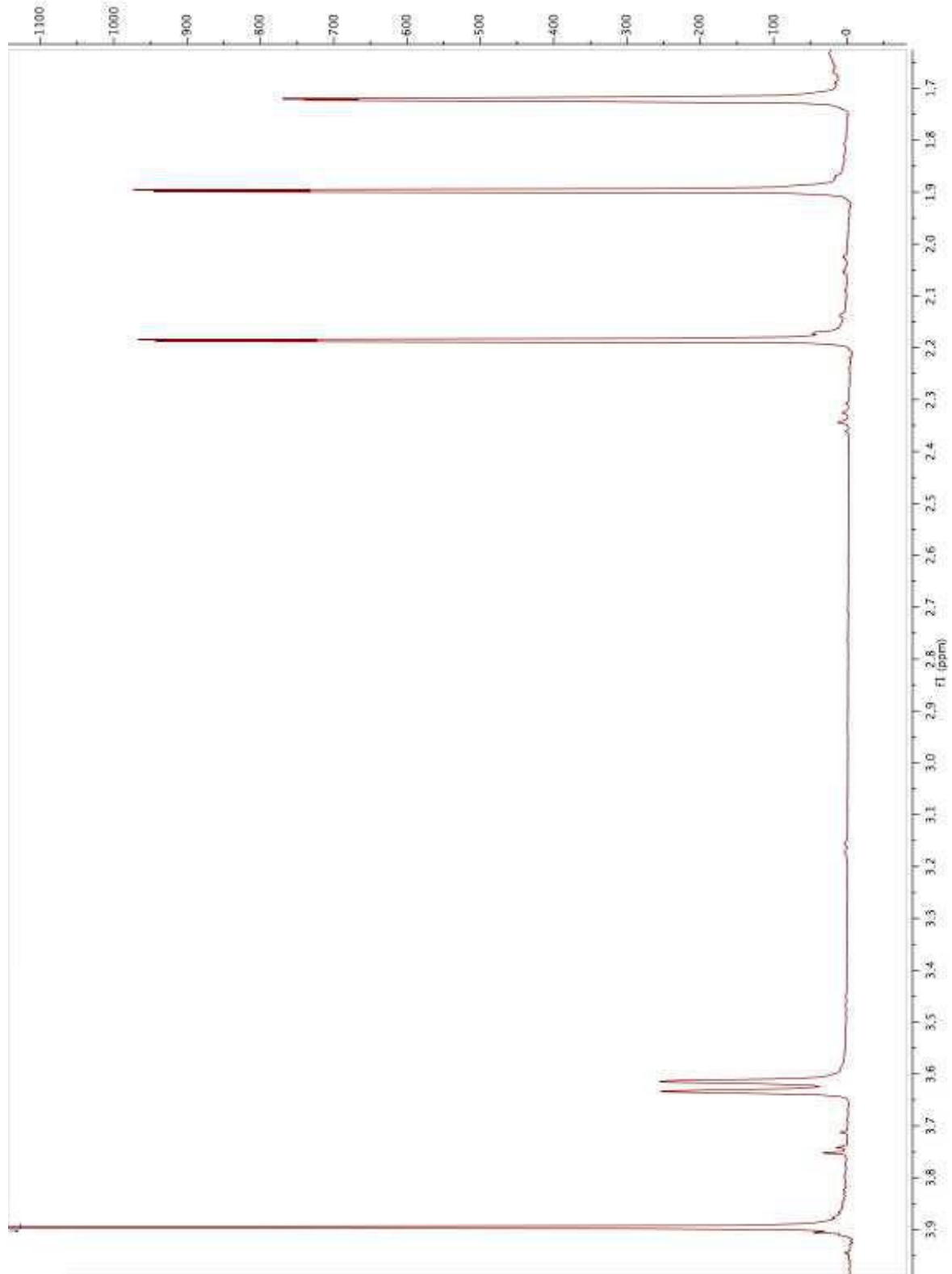


Şekil 4.8. 4'-senesioiloksi-ostol

Resim 4.9. NP-4 kodlu bileşiğin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

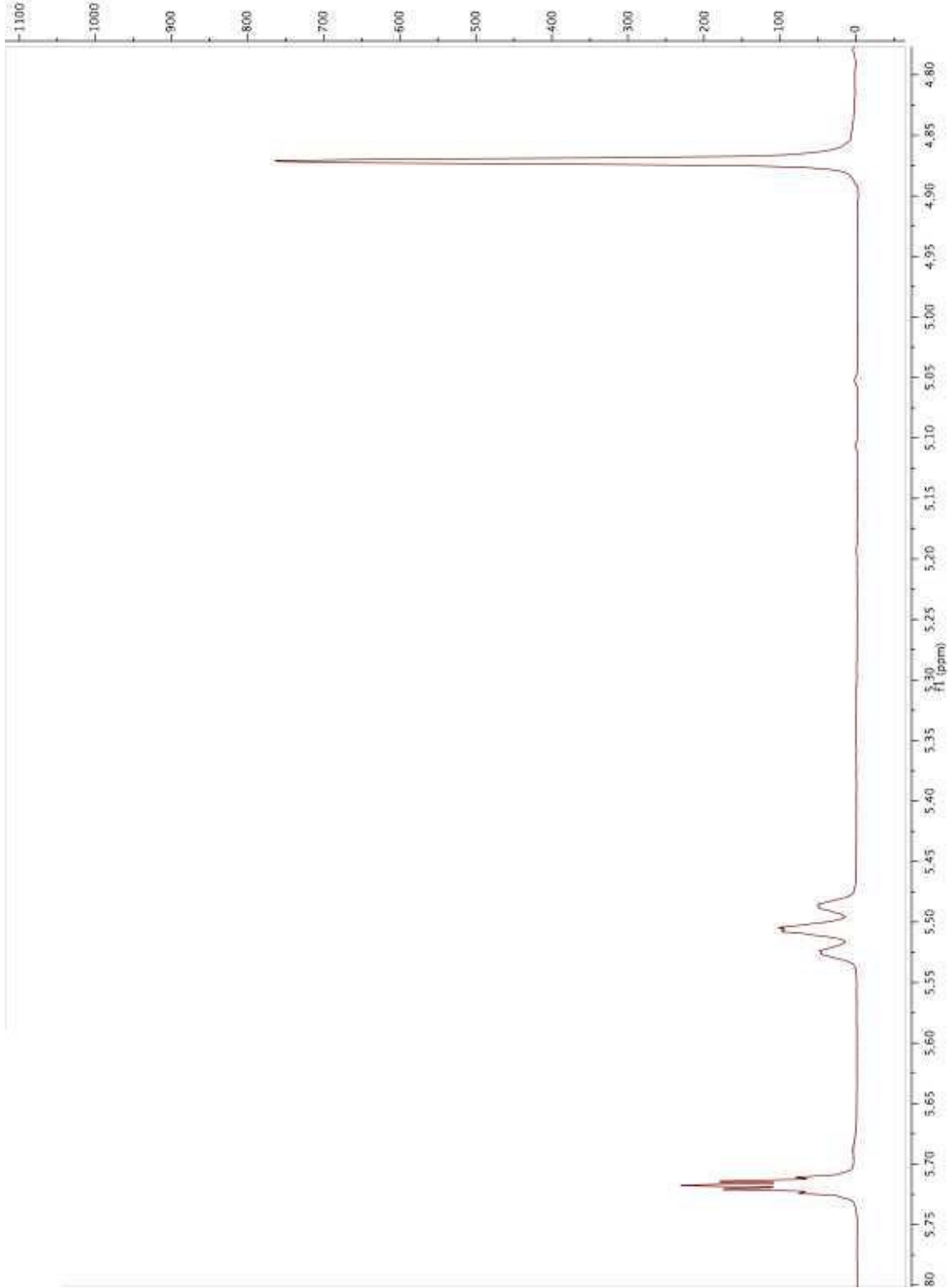


Resim 4.10. NP-4 kodlu bileşimin kumarin iskeletinin protonlarını içeren genişletilmiş alt alan <sup>1</sup>H NMR spektrumu

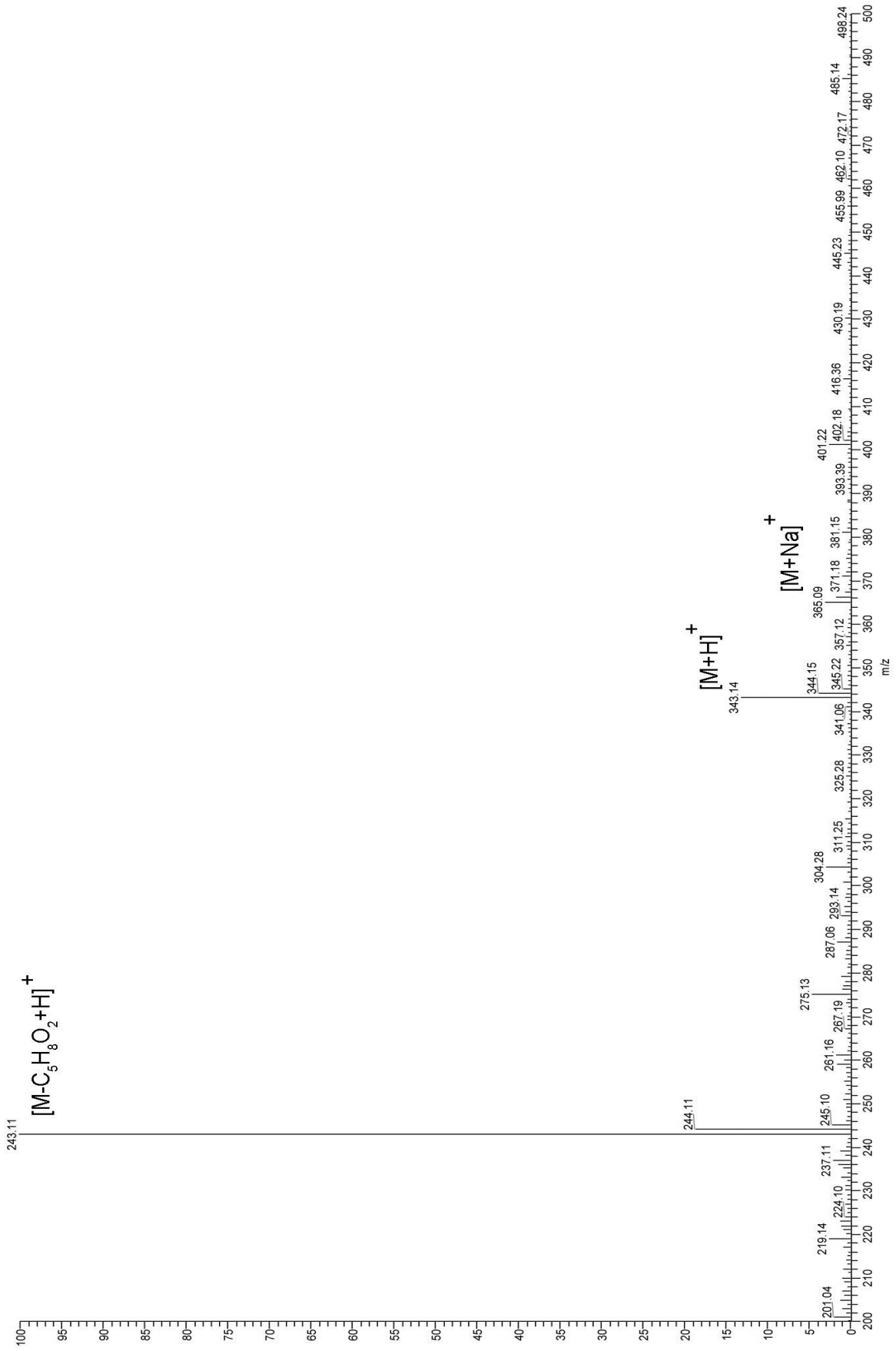


Resim 4.11. NP-4 kodlu bileşğin 7-metoksil grubunun, izoprenil zincirinin ve senesioik asidin esterinin metil protonlarını içeren genişletilmiş üst alan <sup>1</sup>H NMR spektrumu

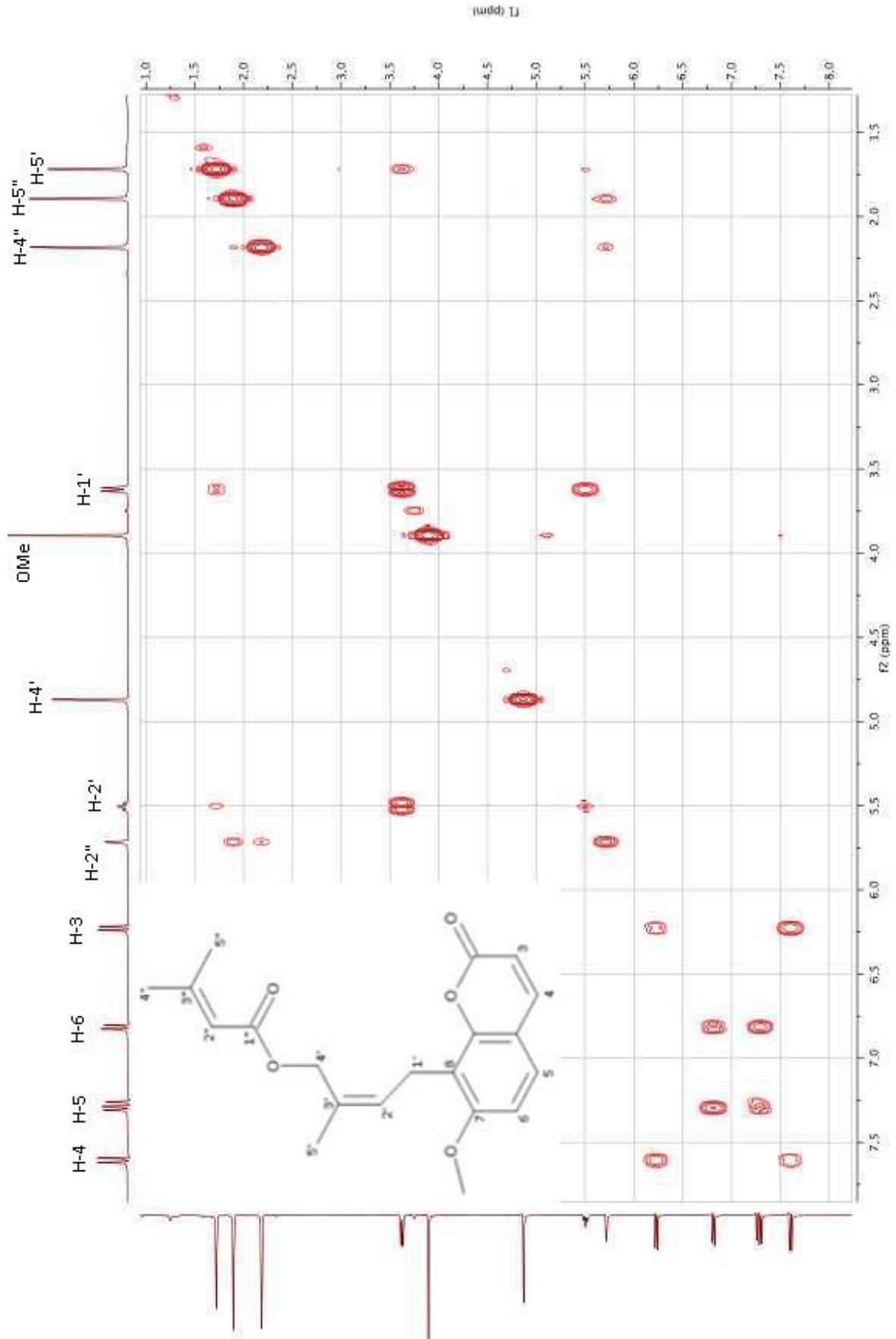




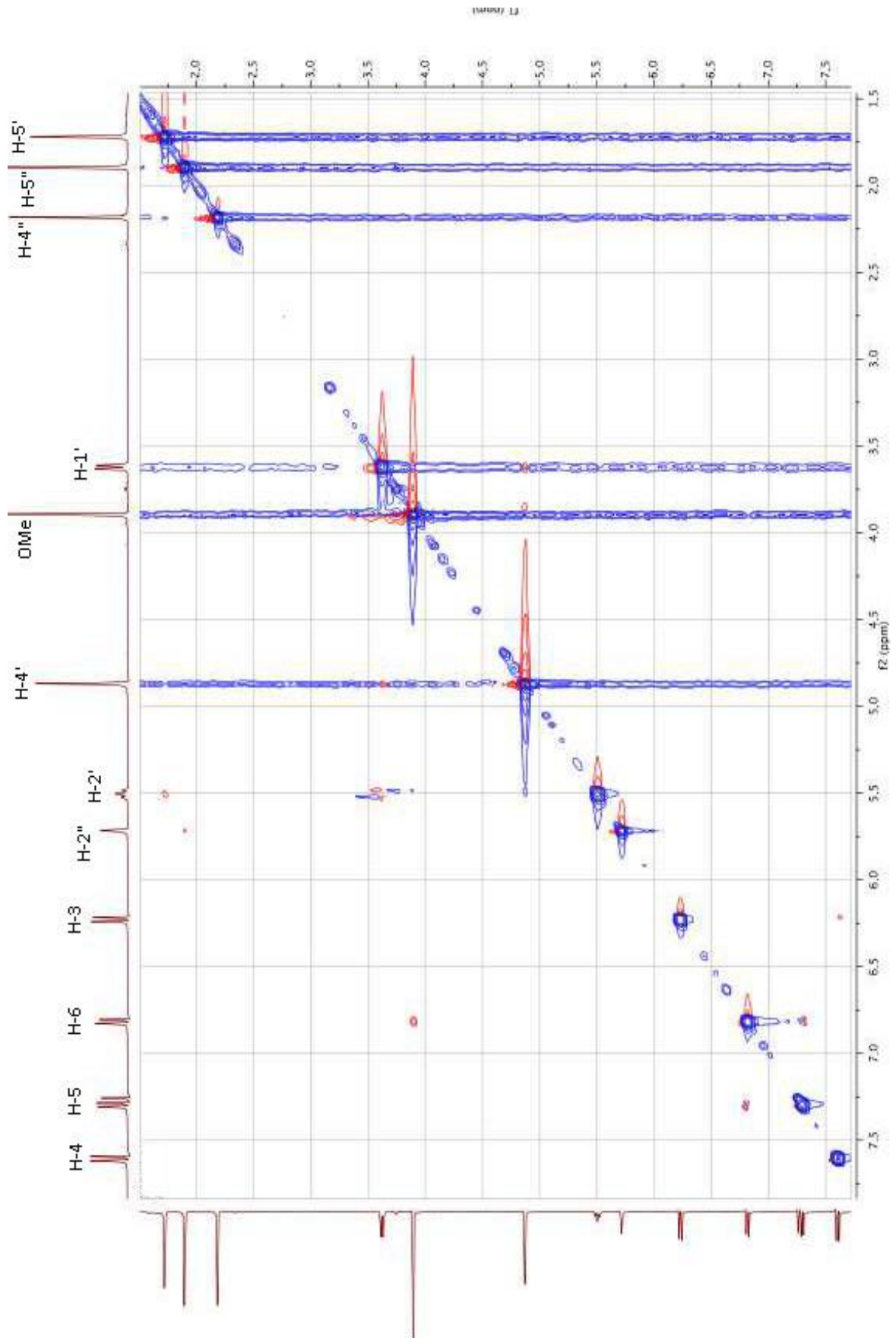
Resim 4.12. NP-4 kodlu bileşimin senesioik asit esterindeki ve izoprenil zincirindeki vinilik protonlar ile H-4'-metilenoksi protonlarını içeren genişletilmiş orta alan  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



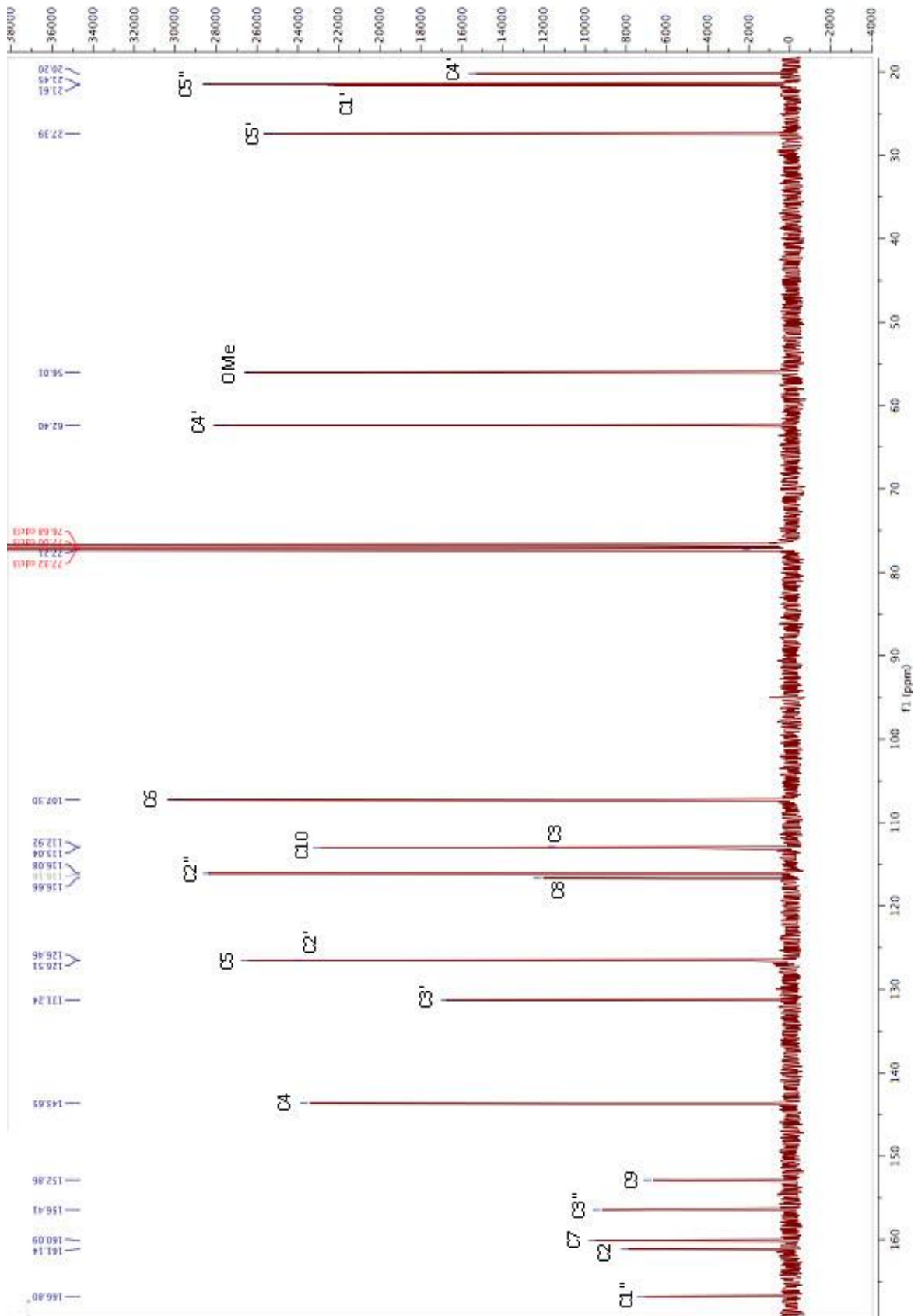
Resim 4.13. NP-4 kodlu bileşimin yüksek rezolüsyonlu kütle spektrumu



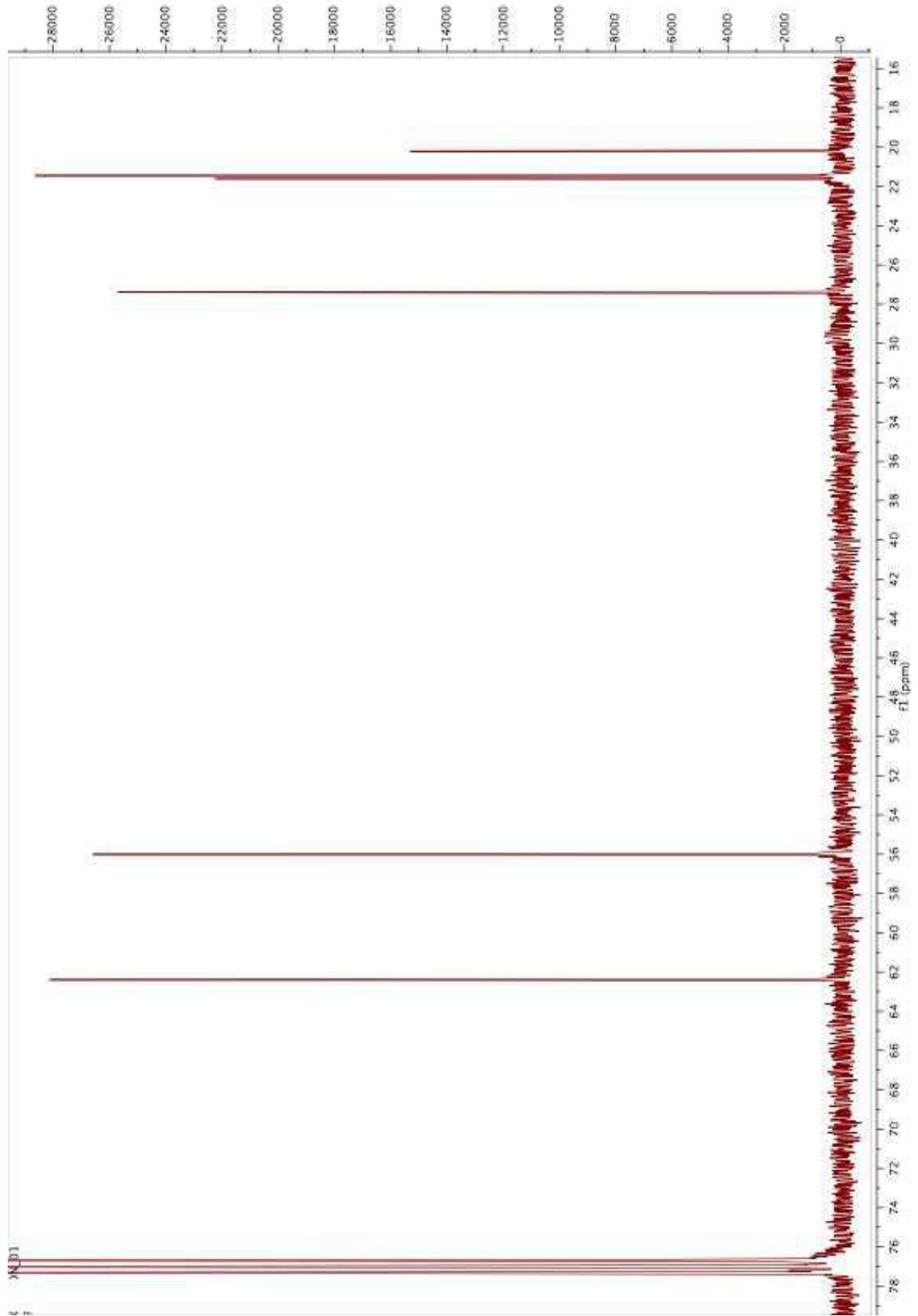
Resim 4.14. NP-4 kodlu bileşiğin COSY spektrumu



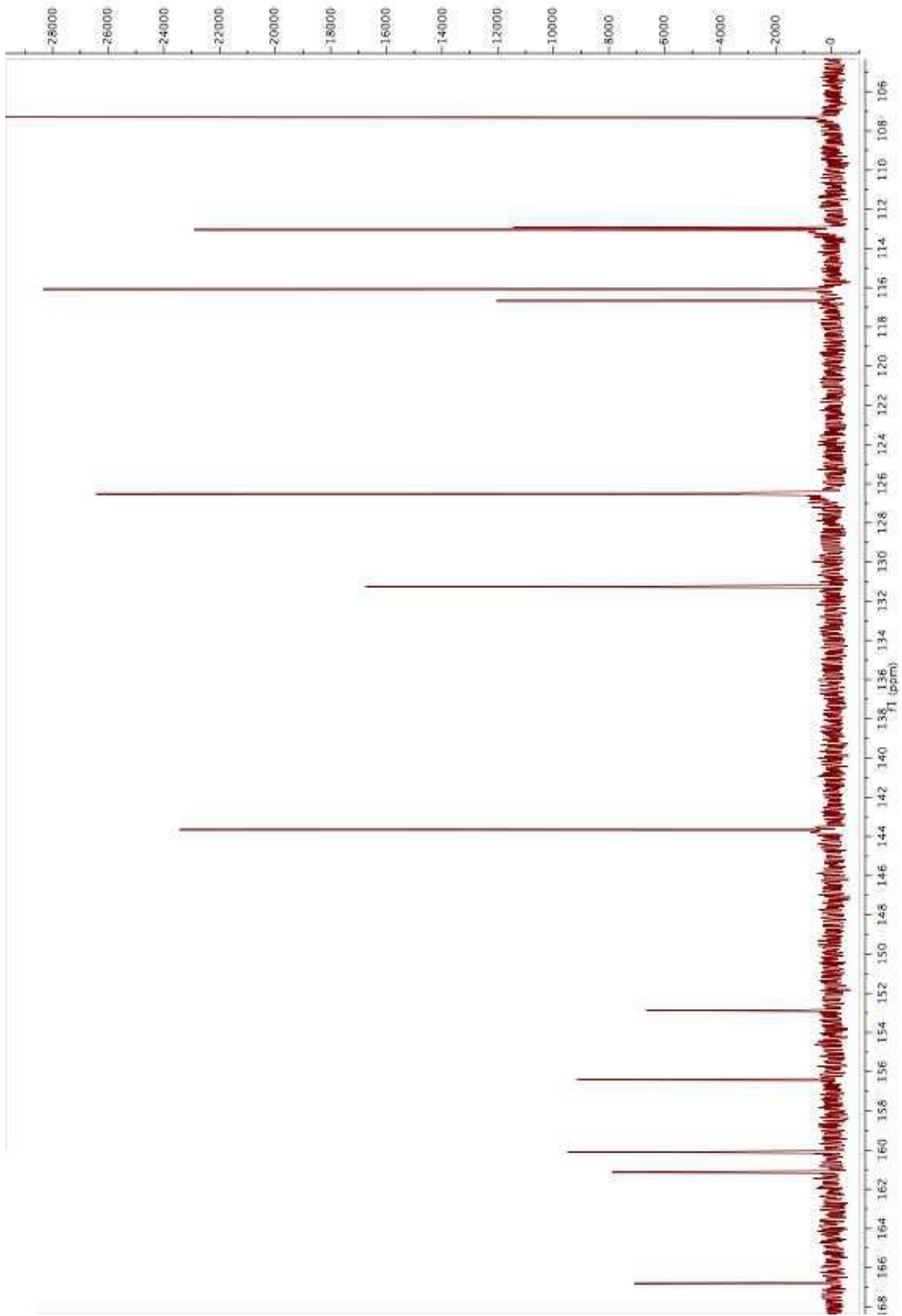
Resim 4.15. NP-4 kodlu bileşiğin ROESY spektrumu



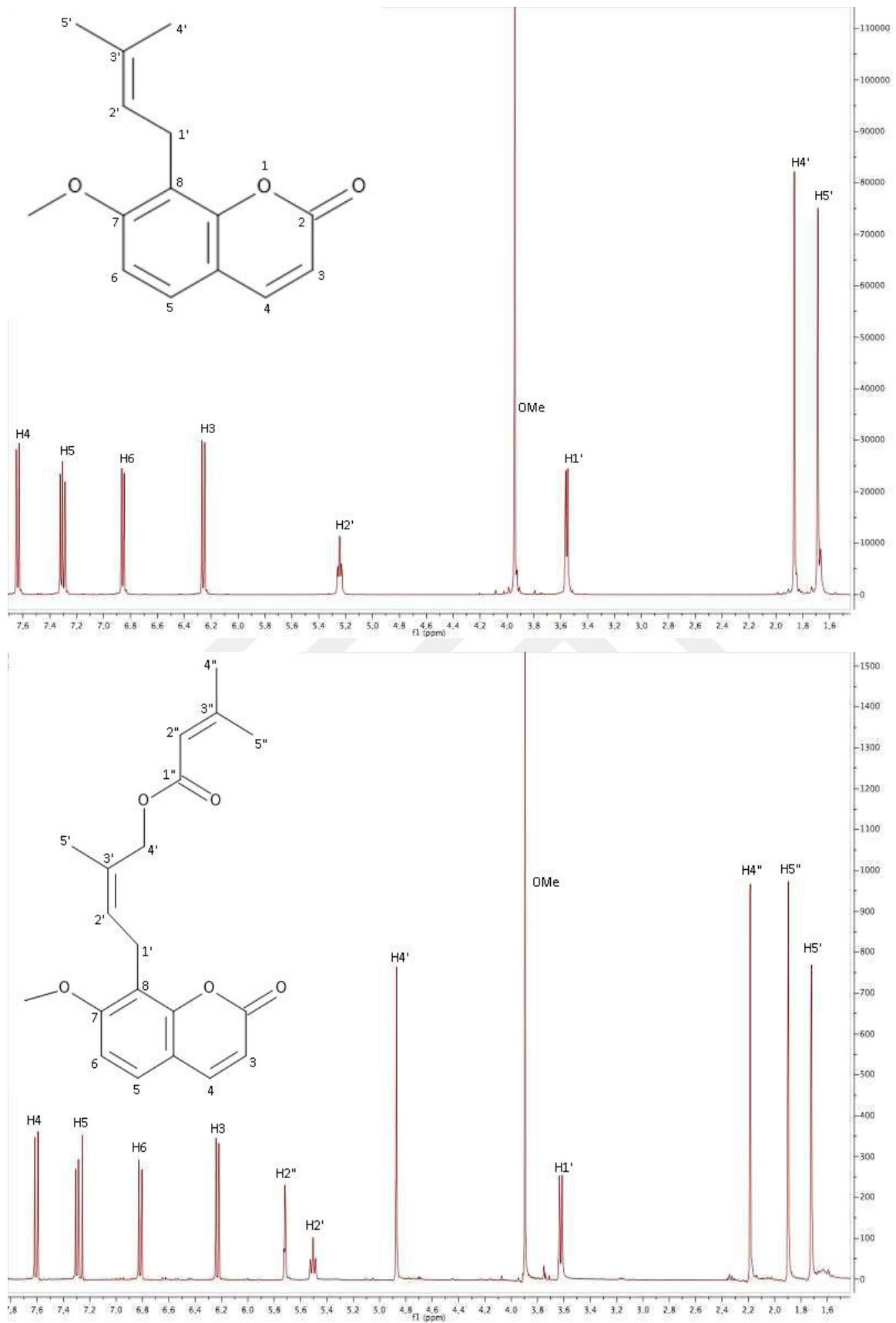
Resim 4.16. NP-4 kodlu bileşiğin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



Resim 4.17. NP-4 kodlu bileşimin genişletilmiş üst alan  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



Resim 4.18. NP-4 kodlu bileşimin genişletilmiş alt alan  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



Resim 4.19. NP-4 kodlu bileşik ile ostol <sup>1</sup>H NMR spektrumlarının karşılaştırılması

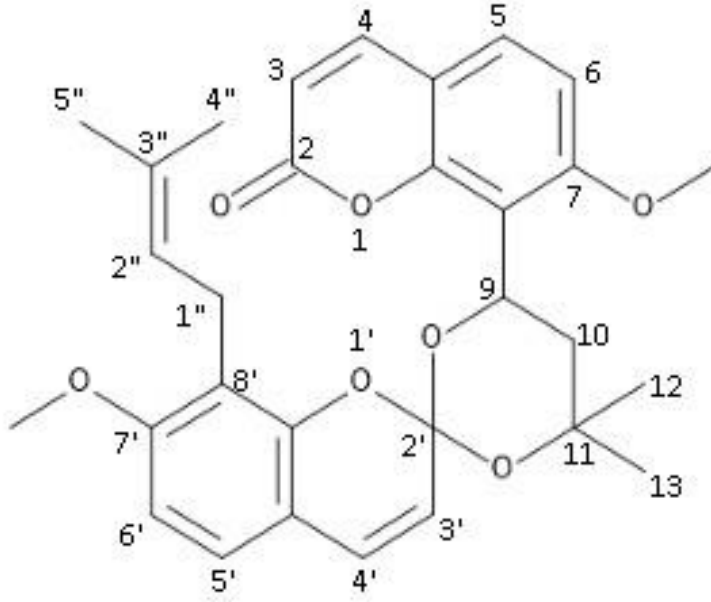


#### 4.2.5. NP-5 kodlu bileşiğe ait bulgular

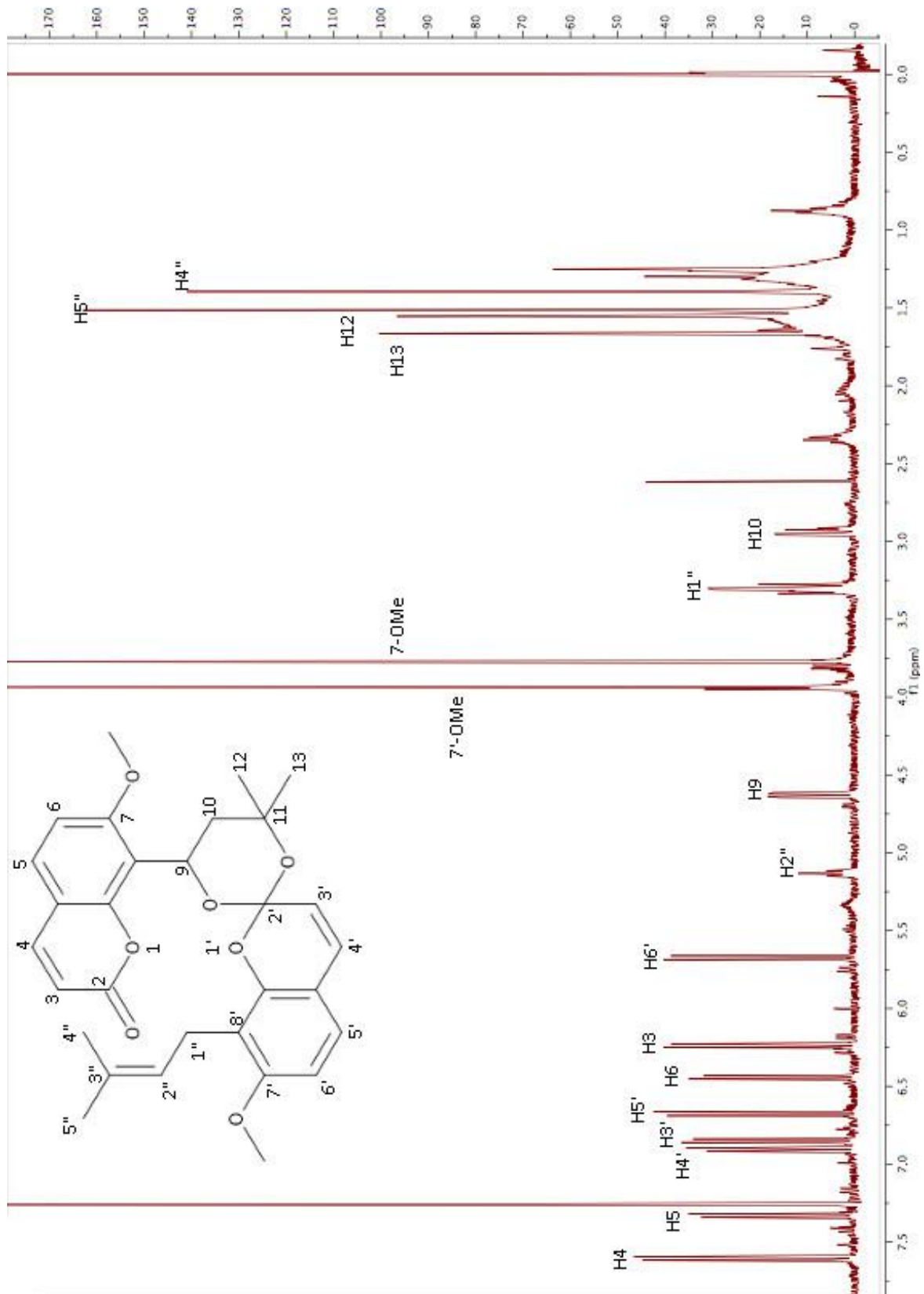
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).  $\delta$  ppm: 7,61 (1H, *d*,  $J = 9,4$  Hz, H-4); 7,33 (1H, *d*,  $J = 8,3$  Hz, H-5); 6,90 (1H, *d*,  $J = 8,6$  Hz, H-4'); 6,85 (1H, *d*,  $J = 8,6$  Hz, H-3'); 6,68 (1H, *d*,  $J = 9,8$  Hz, H-5'); 6,44 (1H, *d*,  $J = 8,3$  Hz, H-6); 6,25 (1H, *d*,  $J = 9,4$  Hz, H-3); 5,67 (1H, *d*,  $J = 9,8$  Hz, H-6'); 5,15 (1H, *t*,  $J = 7$  Hz, H-2"); 4,63 (1H, *dd*,  $J = 9,8$  ve 3,25 Hz, H-9); 3,90 (3H, *s*, 7'-OMe); 3,73 (3H, *s*, 7-OMe); 3,31 (2H, *dd*,  $J = 9,4$  ve 13,75 Hz, H-1"); 2,93 (2H, *dd*,  $J = 3,25$  ve 13,75 Hz, H-10); 1,66 (3H, *s*, H-13); 1,55 (3H, *s*, H-12); 1,51 (3H, *s*, H-5"); 1,30 (3H, *s*, H-4").

NP-5 kodlu bileşiğin  $^1\text{H}$  NMR spektrumunda aromatik bölgede 8 sinyal görülmektedir. Sinyaller dikkatle incelendiğinde dört tane AB sistemi gözlenmektedir.  $\delta$  7,61 ile 6,25 aynı  $J$  (9,40 Hz) değerine sahiptir.  $\delta$  7,33 ile  $\delta$  6,44'te bulunan sinyaller de aynı  $J$  (8,30 Hz) değeri taşımaktadır. Bu sinyallerin birbiriyle etkileştiği sonucu ortaya çıkmaktadır. Yine aromatik bölgede  $\delta$  6,68 ile  $\delta$  5,67 dublet sinyallerinin  $J$  değeri 9,80 Hz olup birbiri ile etkileşmektedir.  $\delta$  6,90 ve  $\delta$  6,85 sinyallerinin  $J$  değeri ise 8,60 Hz'dir. Bu sonuçlara göre bir kumarin halkası mevcuttur. Diğer aromatik yapı ise  $J$  ve kimyasal kayma değerlerine bakarak gamapiron halkasında karbonil grubunun olmadığı bu yüzden buna komşu karbonlara bağlı protonların aromatik bölgenin uçlarına kaymadığı sonucuna ulaşmaktayız.  $\delta$  3,73 ve 3,90'da bulunan 3H büyüklükte singlet sinyaller aromatik halkaya bağlı metoksil gruplarını göstermektedir. Alifatik bölgede  $\delta$  3,31 ile  $\delta$  5,15'te bulunan sinyaller karakteristik ABX yarılması göstermektedir.  $\delta$  3,31'de bulunan dubletin dubleti 2H büyüklüğündeki sinyal benzilik protona aittir.  $\delta$  5,15'te bulunan bir protonluk triplet sinyal ise vinilik protona aittir. Yine  $\delta$  1,30 ve 1,51'de bulunan 3 protonluk sinyaller aynı karbona komşu metil sinyallerini göstermektedir. Kumarin halkasına bağlı bu yan zincirin oluşturduğu bu yapı ostole çok benzemektedir. Bir ostol türevi diyebiliriz.  $\delta$  1,55 ve 1,66 sinyalleri de yine metil gruplarını göstermektedir.  $\delta$  2,93 ile  $\delta$  4,63 sinyalleri de aynı  $J$  (3,25 Hz) değerine sahiptir.  $\delta$  4,63'te bulunan proton hem oksijene hem de benzen halkasına komşu olduğu için daha alt alana kaydığı düşünülmektedir. Tüm bu veriler ışığında dimerik bir kumarin yapısının varlığı düşünülmektedir. Literatür taramasında bu bileşiğin daha önce izole edilmediği anlaşılmıştır. Bileşik miktarı çok az olduğundan kanıtlayıcı diğer spektroskopik yöntemler uygulanamamıştır. Bileşiğin yeniden ve daha fazla

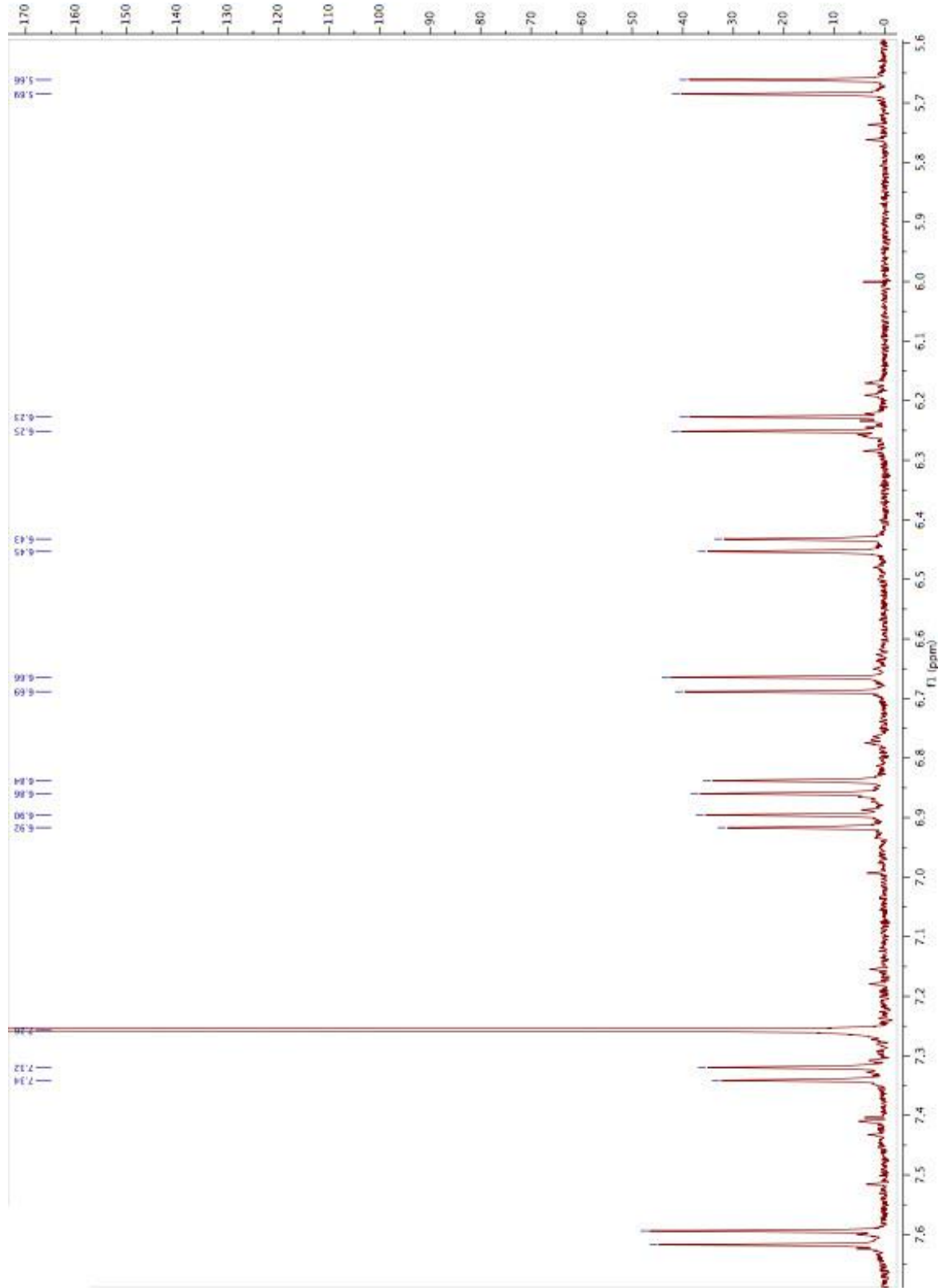
miktarda elde edilerek gerekli spektroskopik yöntemlerin uygulanabilmesi için çalışmaya devam edilmektedir.



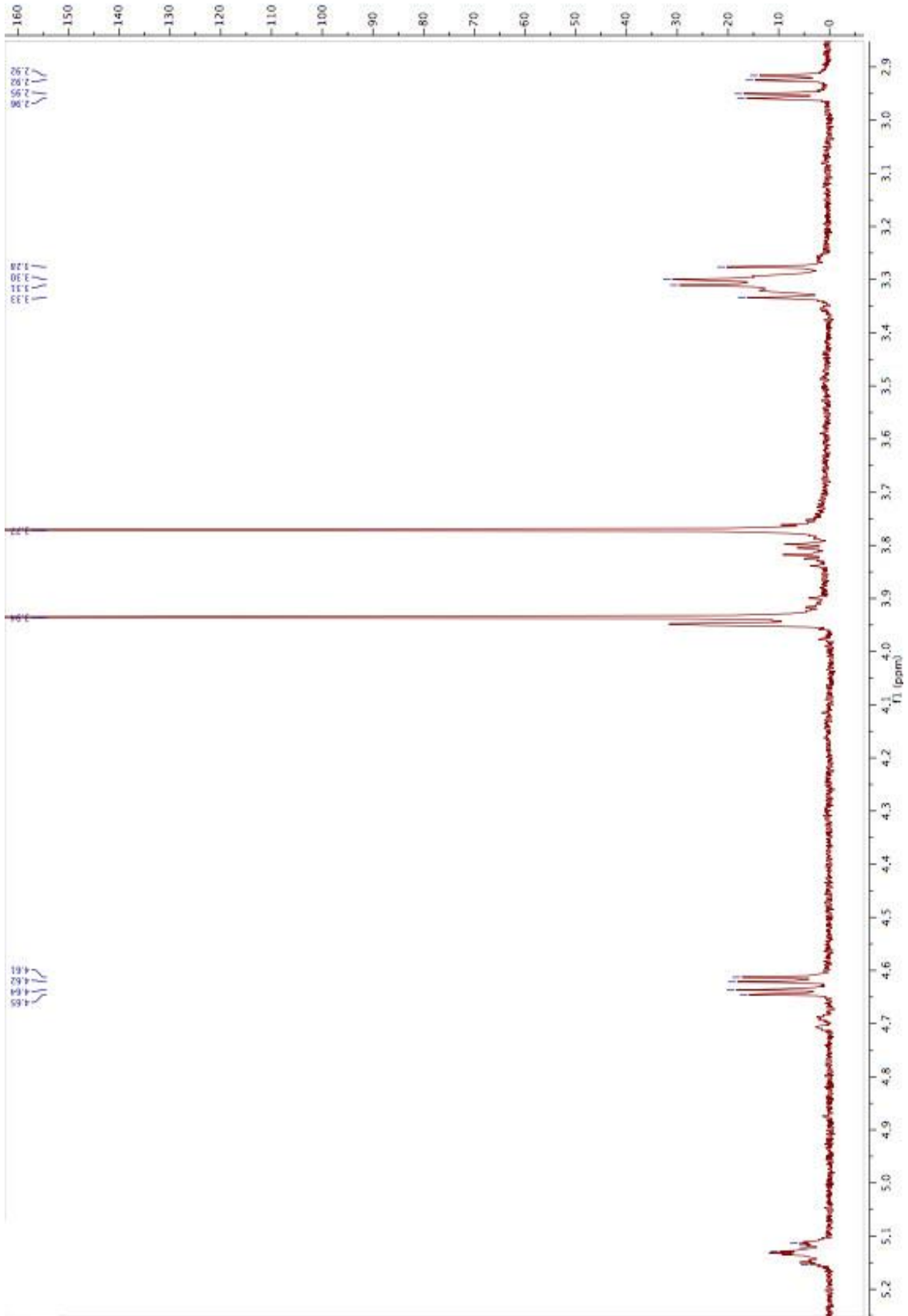
Şekil 4.9. NP-5



Resim 4.20. NP-5 kodlu bileşiğin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



Resim 4.21. NP-5 kodlu bileşimin aromatik alanının genişletilmiş <sup>1</sup>H NMR spektrumu

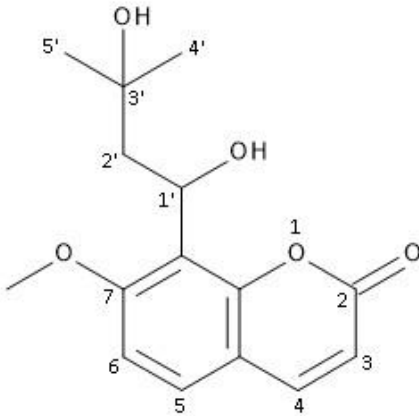


Resim 4.22. NP-5 kodlu bileşiğin alifatik alanının genişletilmiş  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

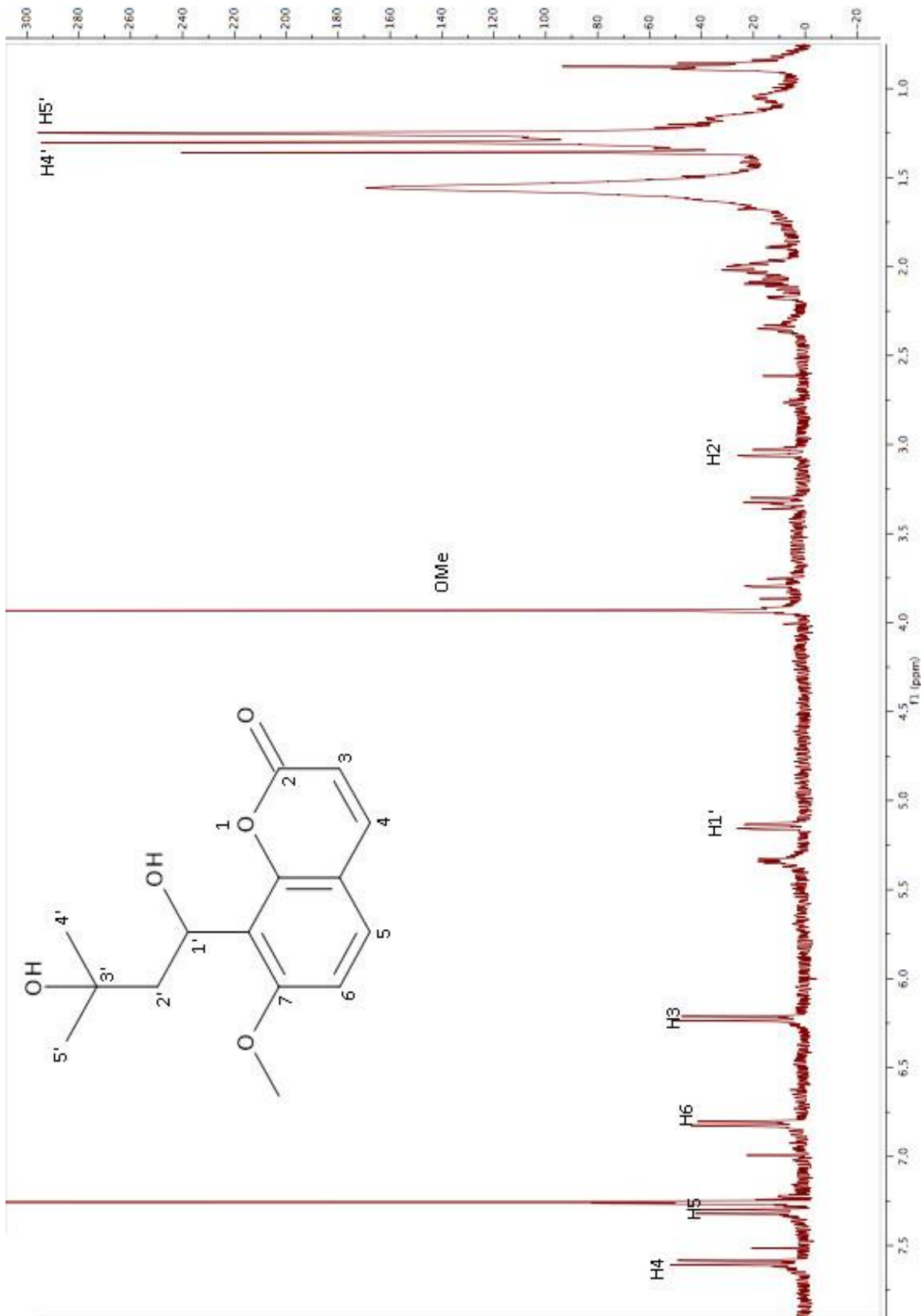
#### 4.2.6. NP-6 kodlu bileşiğe ait bulgular

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).  $\delta$  ppm: 7,60 (1H, *d*,  $J = 9,5$  Hz, H-4); 7,31 (1H, *d*,  $J = 8,7$  Hz, H-5); 6,62 (1H, *d*,  $J = 8,7$  Hz, H-6); 6,21 (1H, *d*,  $J = 9,5$  Hz, H-3); 5,15 (1H, *d*,  $J = 7,5$  Hz, H-1'); 3,90 (3H, *s*, OMe); 3,35 (1H, *dd*,  $J = 7,5$  Hz, H-2'b); 3,10 (1H, *dd*,  $J = 7,5$  Hz, H-2'a); 1,36 (3H, *s*, H-4'); 1,30 (3H, *s*, H-5').

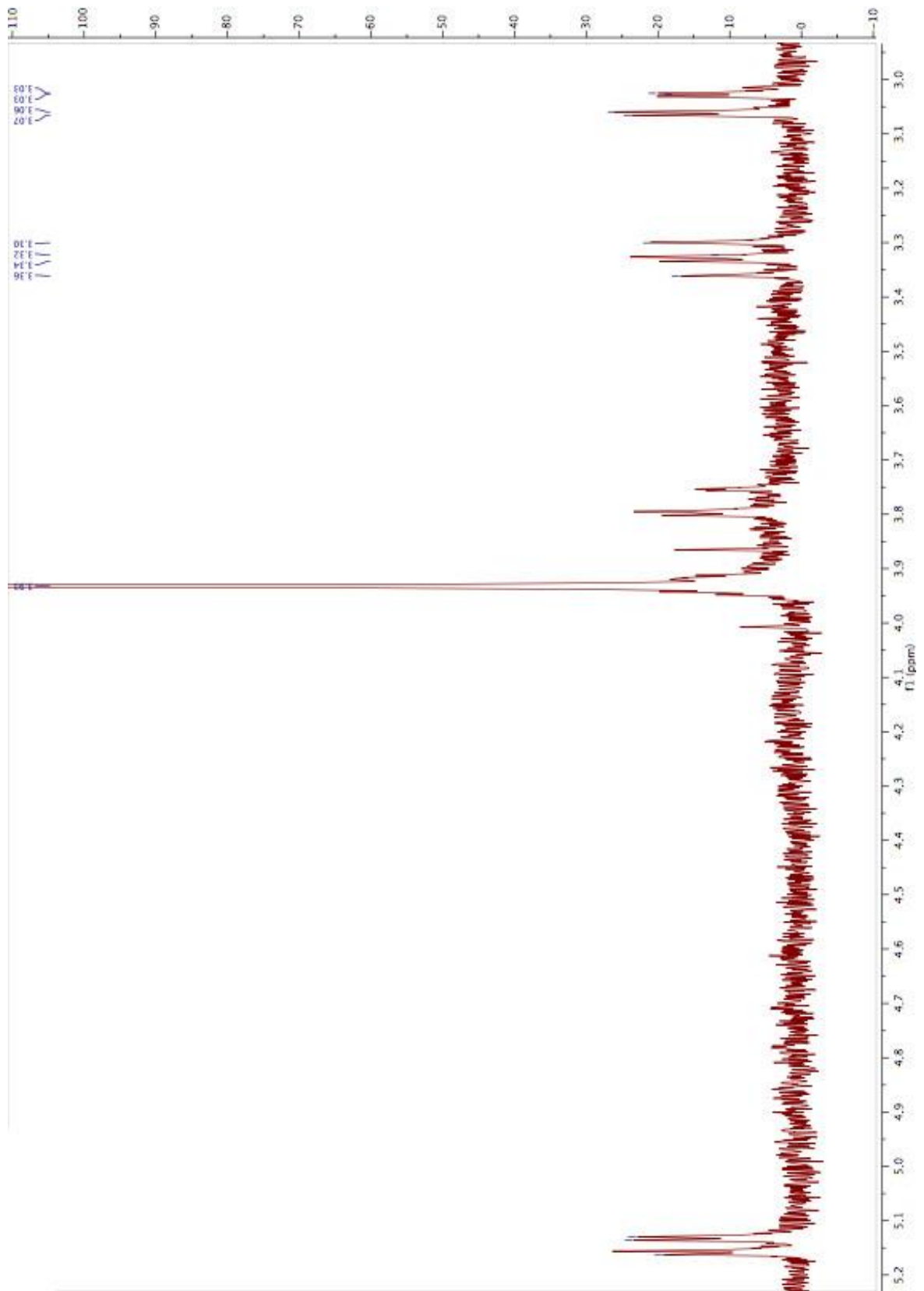
Bu bileşiğin  $^1\text{H}$  NMR spektrumunda yine AB sisteminin bulunduğu kumarin varlığını gösteren aromatik bölgedeki sinyaller bulunmaktadır.  $\delta$  7,60 ve 6,21 (sırasıyla H-4 ve H-3) sinyalleri ile  $\delta$  7,31 ve 6,62 (sırasıyla H-5 ve H-6) sinyalleri 7. konumda oksijene bağlı sübstitüent bulunan kumarin varlığını göstermektedir. Alifatik bölgede  $\delta$  1,30 ve 1,36'da 2 adet metil grubu protonları bulunmaktadır.  $\delta$  3,90'da kumarin halkasına bağlı metoksil grubunun protonları görülmektedir.  $\delta$  3,10 ve 3,35'te ve 5,15'te dubletin dubleti yarımaları olan sinyaller görülmektedir.  $\delta$  3,10 ve 3,35'teki sinyallerin  $\text{CH}_2$ 'ye ait oldukları düşünülmektedir. Bu bileşiğin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu meranzin hidrat ismiyle bilinen kumarine çok benzemektedir. Ancak  $\delta$  5,15'te bulunan sinyal meranzin hidrat'ta  $\delta$  3,60 civarında gözlenmektedir [140].  $\delta$  3,60'ta bulunan sinyalin  $\delta$  5,15'e kayması, hidroksile komşu protonun aynı zamanda benzilik proton olmasıyla açıklanabilir. Bu nedenle bileşiğin Şekil 4.10'da gösterildiği gibi olabileceği kanaatine varılmıştır. Bileşik çok az miktarda elde edilebildiği için diğer spektroskopik yöntemler uygulanamamıştır. Bileşiğin yarı sentez yolu ile elde edilerek kimyasal yapısının ispatlanması çalışmasına devam edilmektedir. Bu bileşik ve ostol NP-5 maddesinin biyogenetik öncüsüdür.



Şekil 4.10. NP-6



Resim 4.23. NP-6 kodlu bileşiğin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



Resim 4.24. NP-6 kodlu bileşimin alifatik bölgesinin genişletilmiş  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



#### 4.2.7. NP-7 kodlu bileşiğe ait bulgular

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).  $\delta$  ppm: 7,60 (1H, *d*, *J* = 9,5 Hz, H-4); 7,31 (1H, *d*, *J* = 8,7 Hz, H-5); 6,83 (1H, *d*, *J* = 8,7 Hz, H-6); 6,23 (1H, *d*, *J* = 9,5 Hz, H-3); 5,52 (1H, *t*, *J* = 7,5 Hz, H-2'); 4,83 (2H, *s*, H-4'); 3,91 (3H, *s*, OMe); 3,61 (2H, *d*, *J* = 7,5 Hz, H-1'); 2,05 (3H, *s*, H-2''); 1,73 (3H, *s*, H-5').

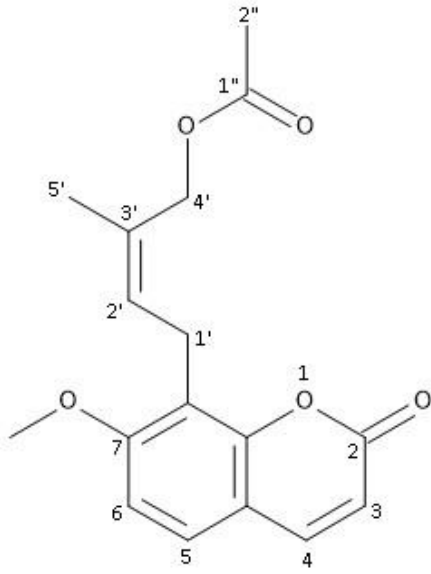
Yüksek Rezolüsyonlu Kütle Sprektrum (HRMS) Analizi:

(M)<sup>+</sup> için teorik hesaplanan: 302,1154

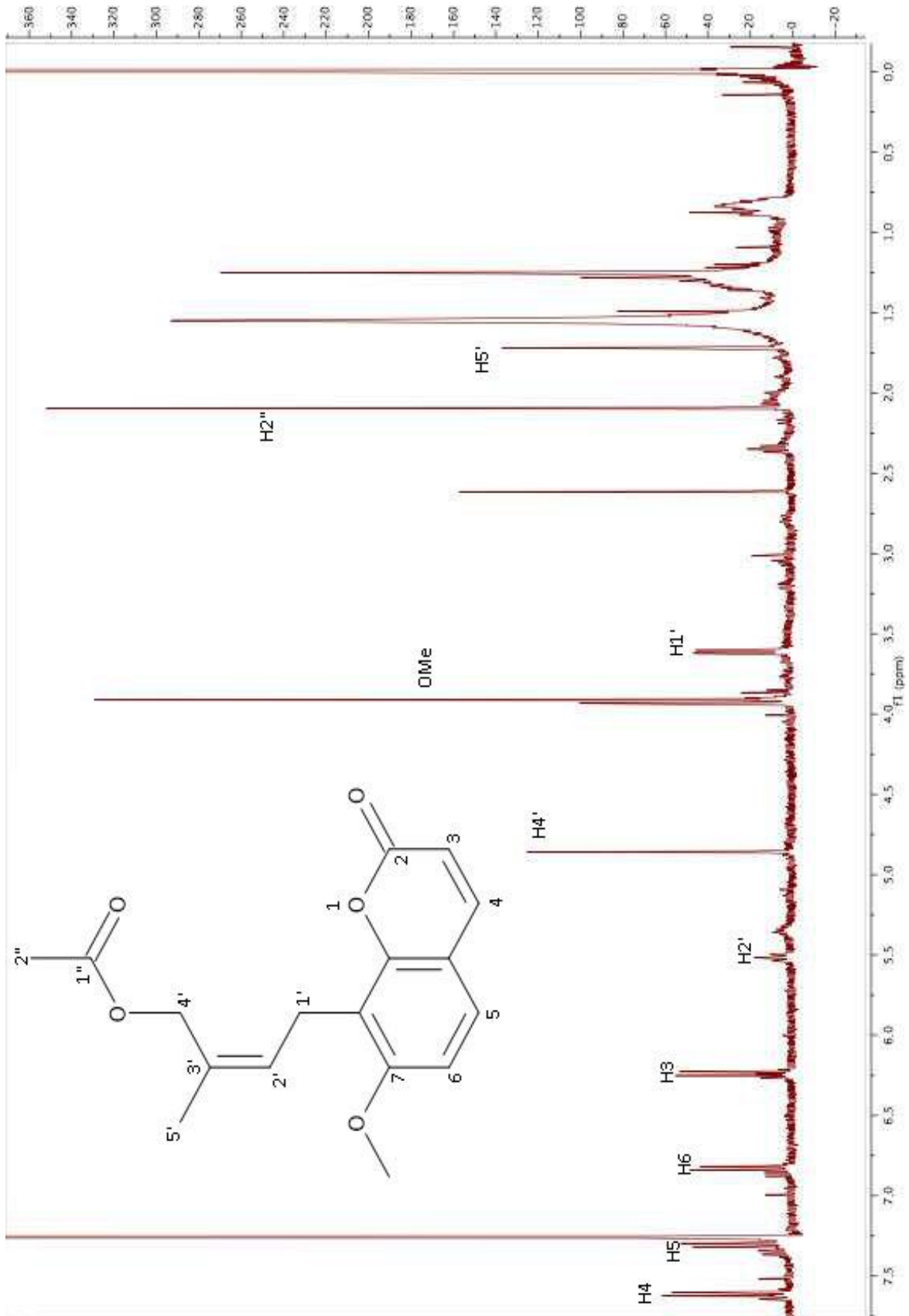
(M)<sup>+</sup> için bulunan 302,1344

(C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>)

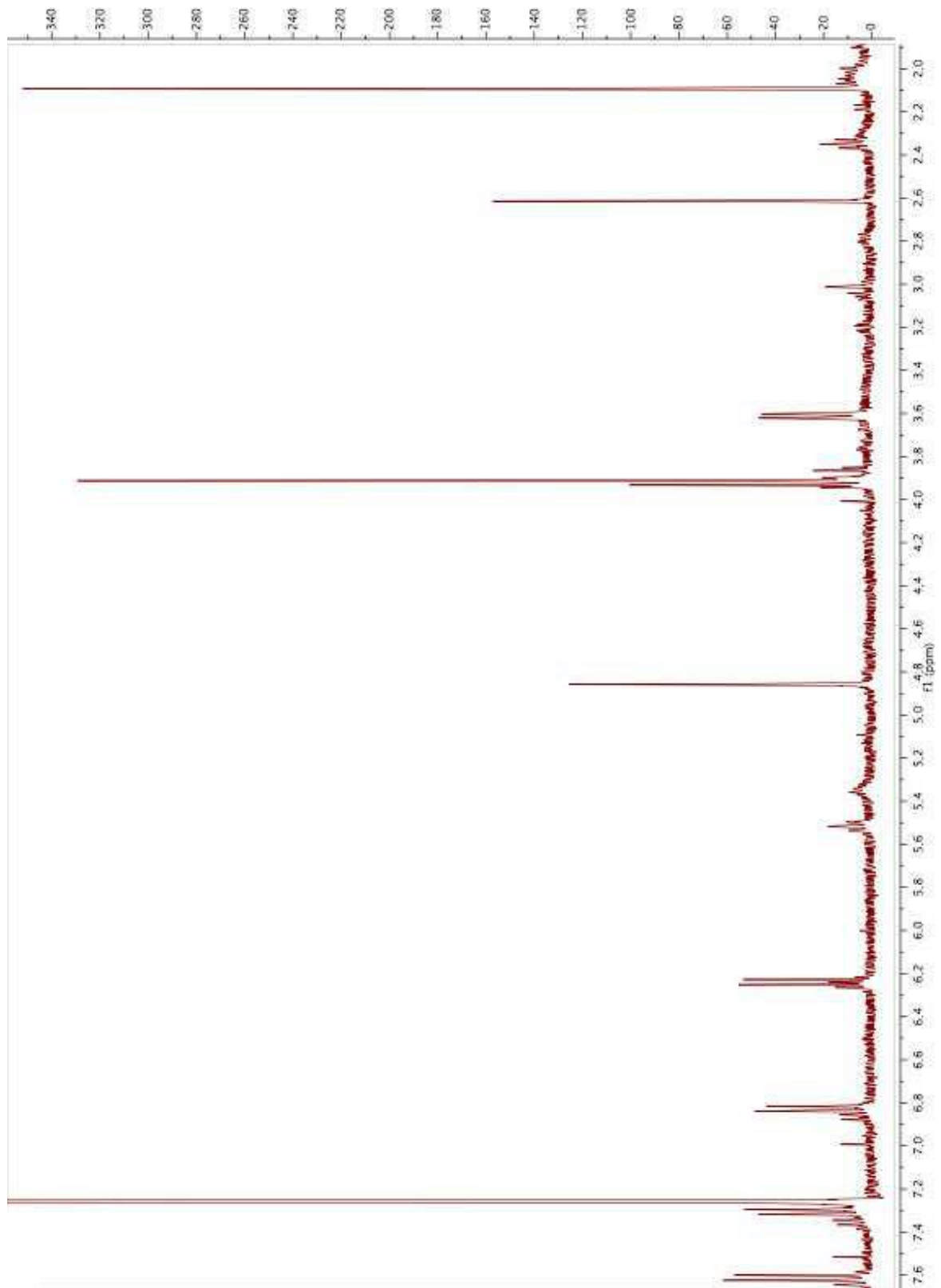
NP-7 kodlu bileşiğin <sup>1</sup>H NMR spektrumunda aromatik bölgede bulunan 4 proton sinyali bileşiğin bir ostol türevi olduğunu göstermektedir.  $\delta$  7,60 ve 6,23 (sırasıyla H-4 ve H-3) sinyalleri ile  $\delta$  7,31 ve 6,83 (sırasıyla H-5 ve H-6) sinyallerinin kumarin halkasına ait olduğu belirlenmiştir. 2H büyüklüğündeki  $\delta$  3,61 sinyali 8. konumdaki izoprenil grubunun benzilik protonlarını göstermektedir.  $\delta$  5,52 ise benzilik protona komşu vinilik protonu göstermektedir.  $\delta$  3,91 sinyali ise 7-metoksile ait protonları göstermektedir. Ostol ile çok benzer olan bu spektrumda metil grubuna ait üst alanda bulunan sinyaller ostol spektrumunda 2 tane iken bu maddenin spektrumunda 1 tanedir.  $\delta$  1,73'te yan zincire ait vinilik metil grubu protonları görülmektedir. 2H büyüklüğünde  $\delta$  4,83'te görülen sinyal ostol'un yan zincirindeki ikinci metilin oksitlenerek hidroksimetilen haline geldiğini ve  $\delta$  2,05'te görülen 3H büyüklüğündeki metil sinyali de bu hidroksimetilenin asetik asit ile esterleşmiş olduğunu göstermektedir. NP-7 bileşiğinin <sup>1</sup>H NMR spektrumu ile ostol'un <sup>1</sup>H NMR spektrumunun karşılaştırılması Resim 4.26'da görülmektedir. Sonuç olarak <sup>1</sup>H NMR spektrumundan bileşiğin 4'-asetoksi-ostol olduğu düşünülmektedir. Bileşik miktarı çok az olduğu için diğer spektroskopik yöntemler uygulanamamıştır. Bileşiği yarı sentez yolu ile elde ederek varlığını kanıtlama çalışmasına devam edilmektedir. Literatür taraması yapıldığında bileşiğin daha önce izole edilmemiş olduğu anlaşılmıştır.



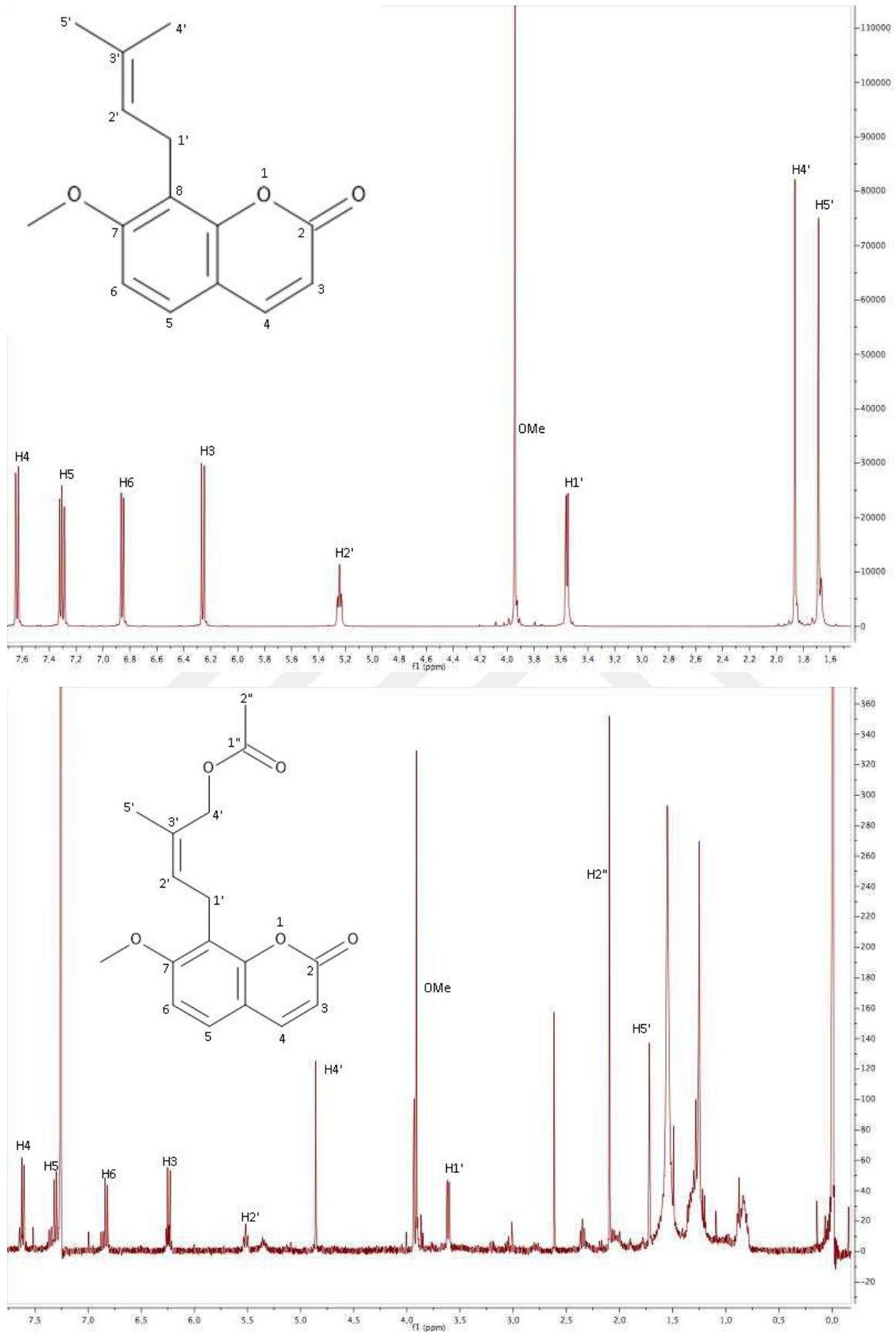
Şekil 4.11. 4'-asetoksi-ostol



Resim 4.25. NP-7 kodlu bileşiğin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



Resim 4.26. NP-7 kodlu bileşğin aromatik ve alifatik bölgesinin genişletilmiş  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

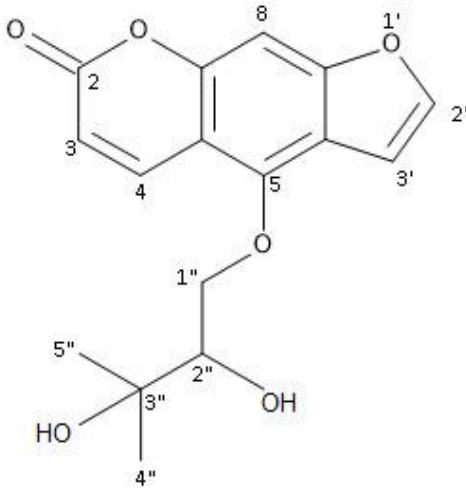


Resim 4.27. NP-7 ile ostol  $^1\text{H}$  NMR spektrumlarının karşılaştırılması

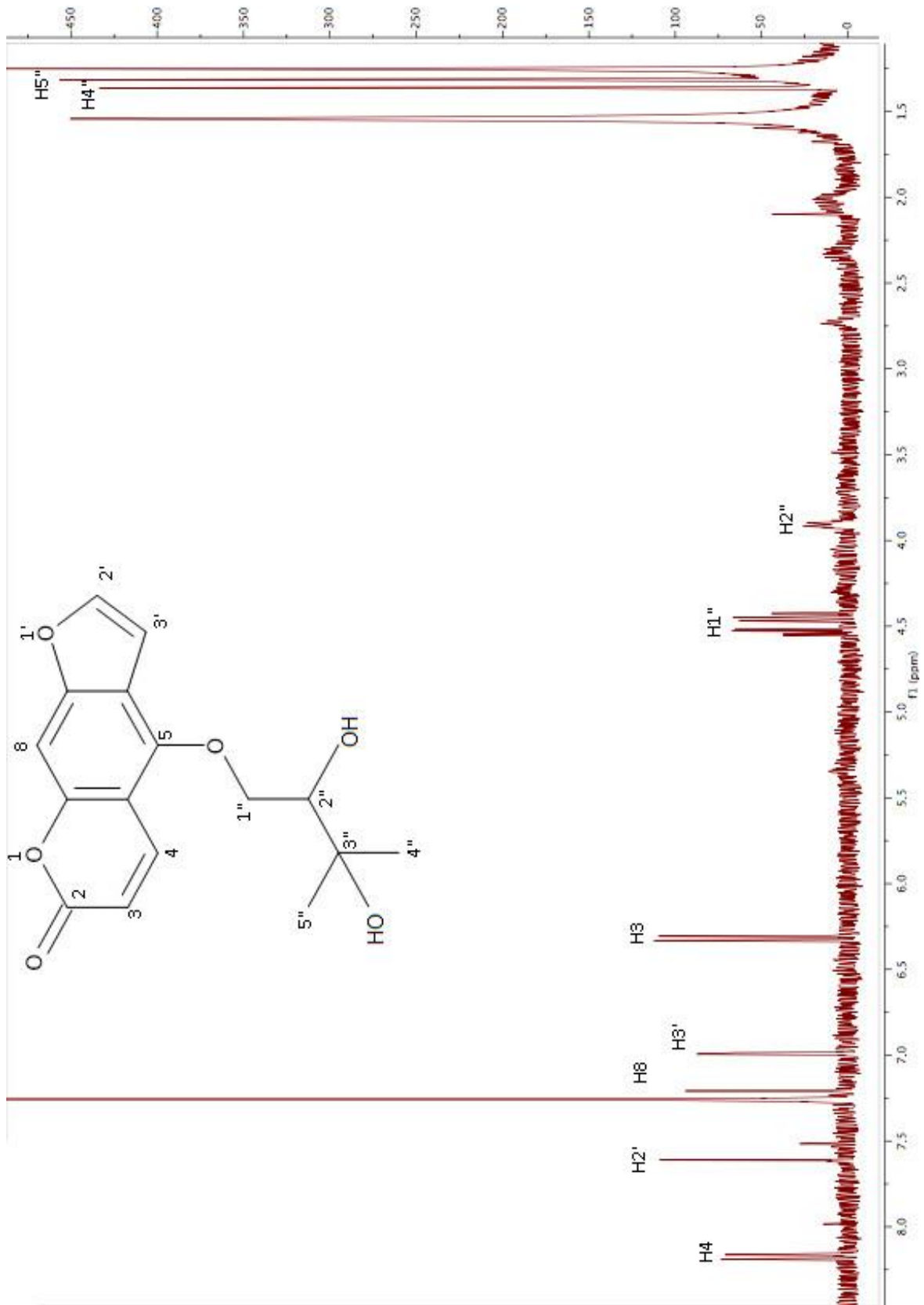
#### 4.2.8. NP-8 kodlu bileşiğe ait bulgular

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).  $\delta$  ppm: 8,20 (1H, *d*,  $J = 9,9$  Hz, H-4); 7,68 (1H, *d*,  $J = 2,4$  Hz, H-2'); 7,19 (1H, *br. s*, H-8); 7,00 (1H, *d*,  $J = 2,4$  Hz, H-3'); 6,30 (1H, *d*,  $J = 9,9$  Hz, H-3); 4,54 (1H, *dd*,  $J = 3,0$  ve  $9,6$  Hz, H-1''b); 4,45 (1H, *dd*,  $J = 7,8$  ve  $9,6$  Hz, H-1''a); 3,91 (1H, *dd*,  $J = 3,0$  ve  $7,8$  Hz, H-2''); 1,35 (3H, *s*, H-4''); 1,31 (3H, *s*, H-5'').

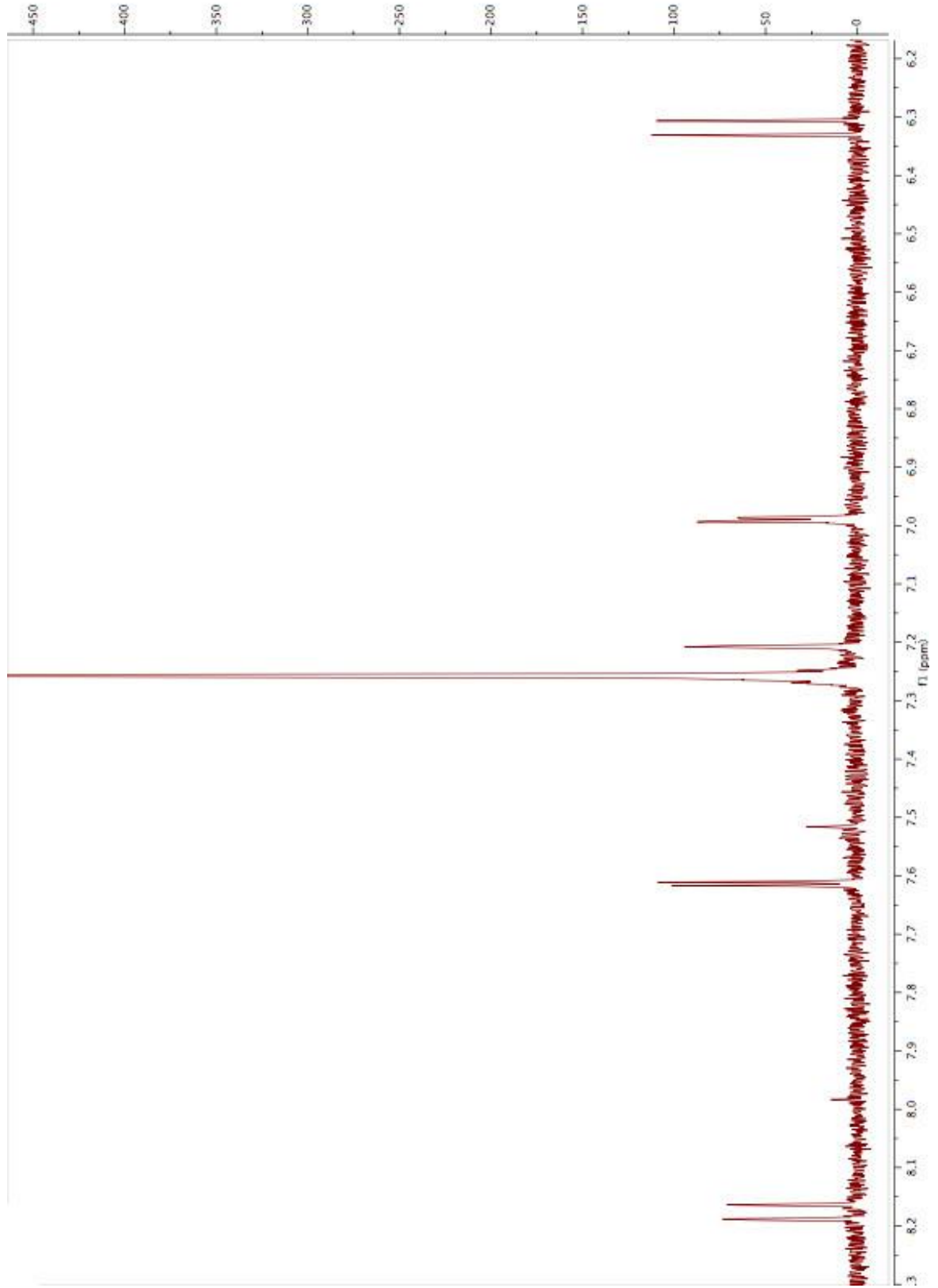
NP-8 kodlu bileşiğin  $^1\text{H}$  NMR spektrumunda aromatik bölgede furanokumarinler için karakteristik olan 2 tane AB sistem görülmektedir.  $\delta$  8,20 ve 6,30 (sırasıyla H-4 ve H-3) ile  $\delta$  7,68 ve 7,00 (sırasıyla H-2' ve H-3') sinyalleri furanokumarin ana iskeletini oluşturmaktadır.  $\delta$  7,19'da görülen bir proton büyüklüğünde ki dublet ise 8. konumdaki protonu göstermektedir. Buradan 5. konumda süstitüent olduğu anlaşılmaktadır. Alifatik bölgede  $\delta$  1,31 ve 1,35'te bulunan sinyaller 2 adet metil grubuna ait protonların varlığına işaret etmektedir.  $\delta$  4,45 ve 4,54'te bulunan dubletin dubleti sinyaller oksijene komşu protonları göstermektedir.  $\delta$  3,91'de bulunan dubletin dubleti ise hidroksile komşu olduğundan ileri gelmektedir. Bu veriler literatür verileri ile [143,144] uyumlu olup bileşiğin oksipösedanin hidrat olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.12. Oksipösedanin hidrat

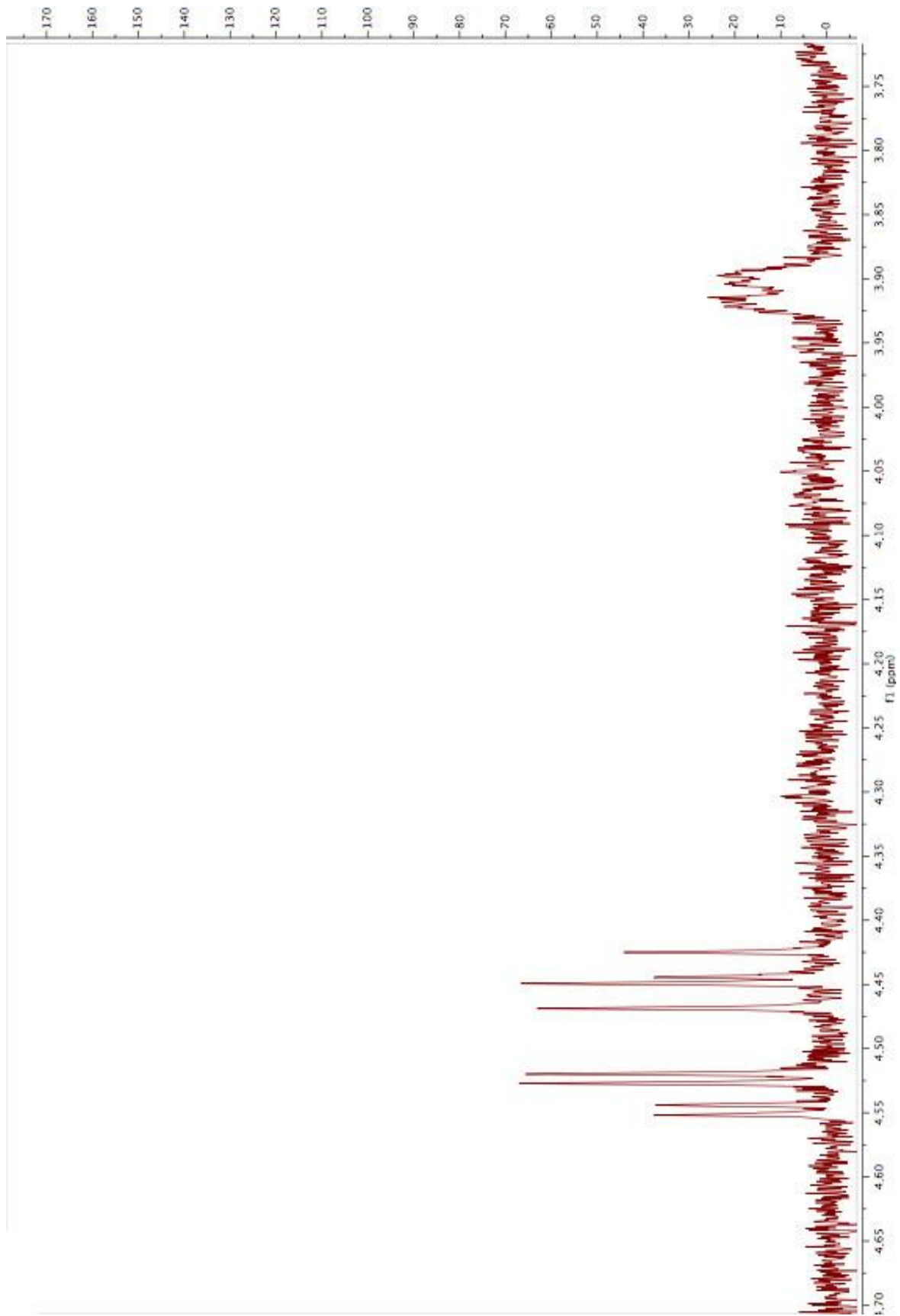


Resim 4.28. NP-8 kodlu bileşiğin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



Resim 4.29. NP-8 kodlu bileşiğin aromatik bölgesinin genişletilmiş <sup>1</sup>H NMR spektrumu





Resim 4.30. NP-8 kodlu bileşimin alifatik bölgesinin genişletilmiş  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

#### 4.2.9. NP-9 kodlu bileşiğe ait bulgular

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).  $\delta$  ppm: 9,24 (1H, s, H-3"); 8,78 (1H, *br d*,  $J = 4,6$  Hz, H-5"); 8,15 (1H, *dt*,  $J = 7,4, 1,6$  ve  $1,6$  Hz, H-7"); 7,61 (1H, *d*,  $J = 9,5$  Hz, H-4); 7,41 (1H, *dd*,  $J = 7,4$  ve  $4,6$  Hz, H-6"); 7,30 (1H, *d*,  $J = 8,7$  Hz, H-5); 6,83 (1H, *d*,  $J = 8,7$  Hz, H-6); 6,23 (1H, *d*,  $J = 9,5$  Hz, H-3); 5,60 (1H, *br t*,  $J = 7,7$  Hz, H-2'); 5,16 (2H, s, H-4'); 3,90 (3H, s, OMe); 3,68 (2H, *d*,  $J = 7,7$  Hz, H-1'); 1,81 (3H, *d*,  $J = 1,0$  Hz, H-5').

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).  $\delta$  ppm: 166,15 s (C-1"); 161,02 s (C-2); 160,00 s (C-7); 152,88 s (C-9); 152,82 *d* (C-7"); 150,52 *d* (C-3"); 143,63 *d* (C-4); 137,48 *d* (C-5"); 130,46 s (C-3'); 130,36 s (C-2"); 127,52 *d* (C-5); 126,64 *d* (C-2'); 123,45 *d* (C-6"); 116,38 s (C-8); 113,32 s (C-10); 112,98 *d* (C-3); 107,31 *d* (C-6); 56,07 *q* (OMe); 29,18 *q* (C-5'); 21,68 *t* (C-1'); 21,48 *t* (C-4').

Yüksek Rezolüsyonlu Kütle Spektrum (HRMS) Analizi:

(M+H)<sup>+</sup> için teorik hesaplanan: 366,1341

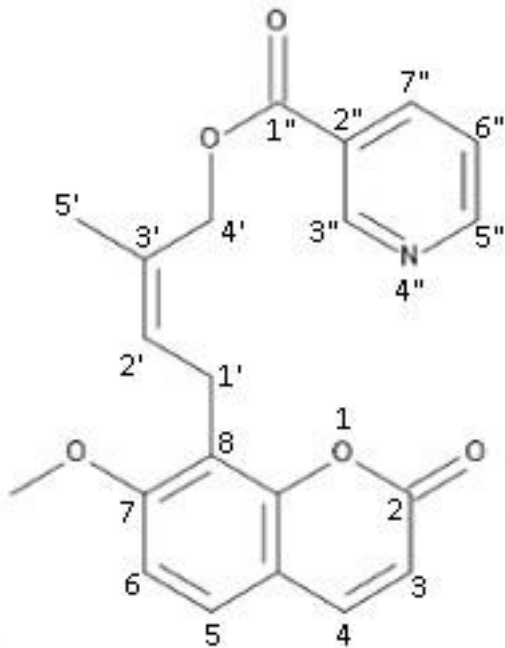
(M+H)<sup>+</sup> için bulunan: 366,1333

( $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{NO}_5$ )

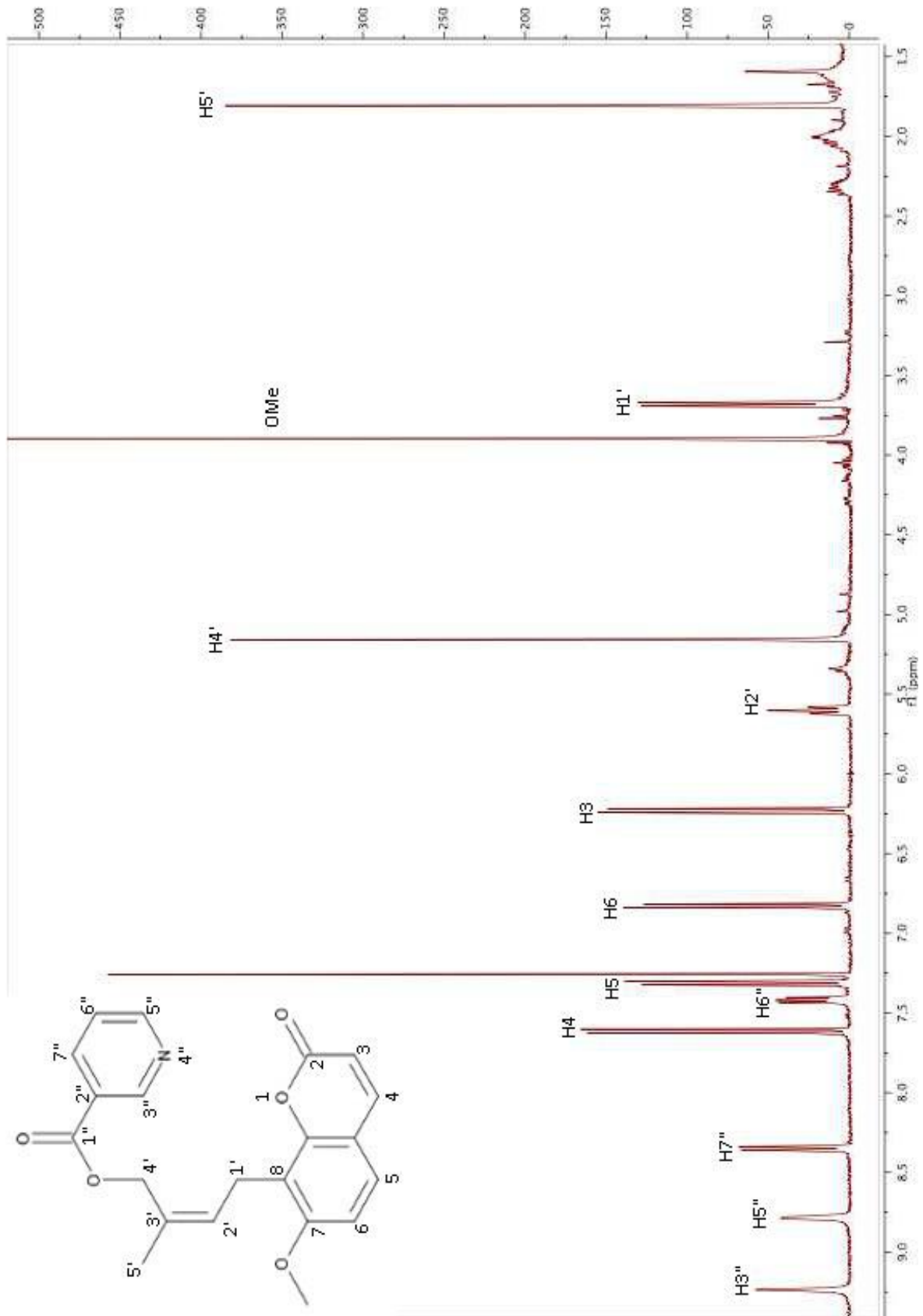
NP-9 kodlu bileşiğin yüksek rezolüsyonlu kütle spektrumu analizi ile yapılan tam kütle tayini sonucu proton katılmış molekül ağırlığı 366,1333 olarak saptanmıştır. Bu sonuç  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu ile birlikte değerlendirildiğinde molekülün kapalı formülü  $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{NO}_5$  olarak tespit edilmiştir.

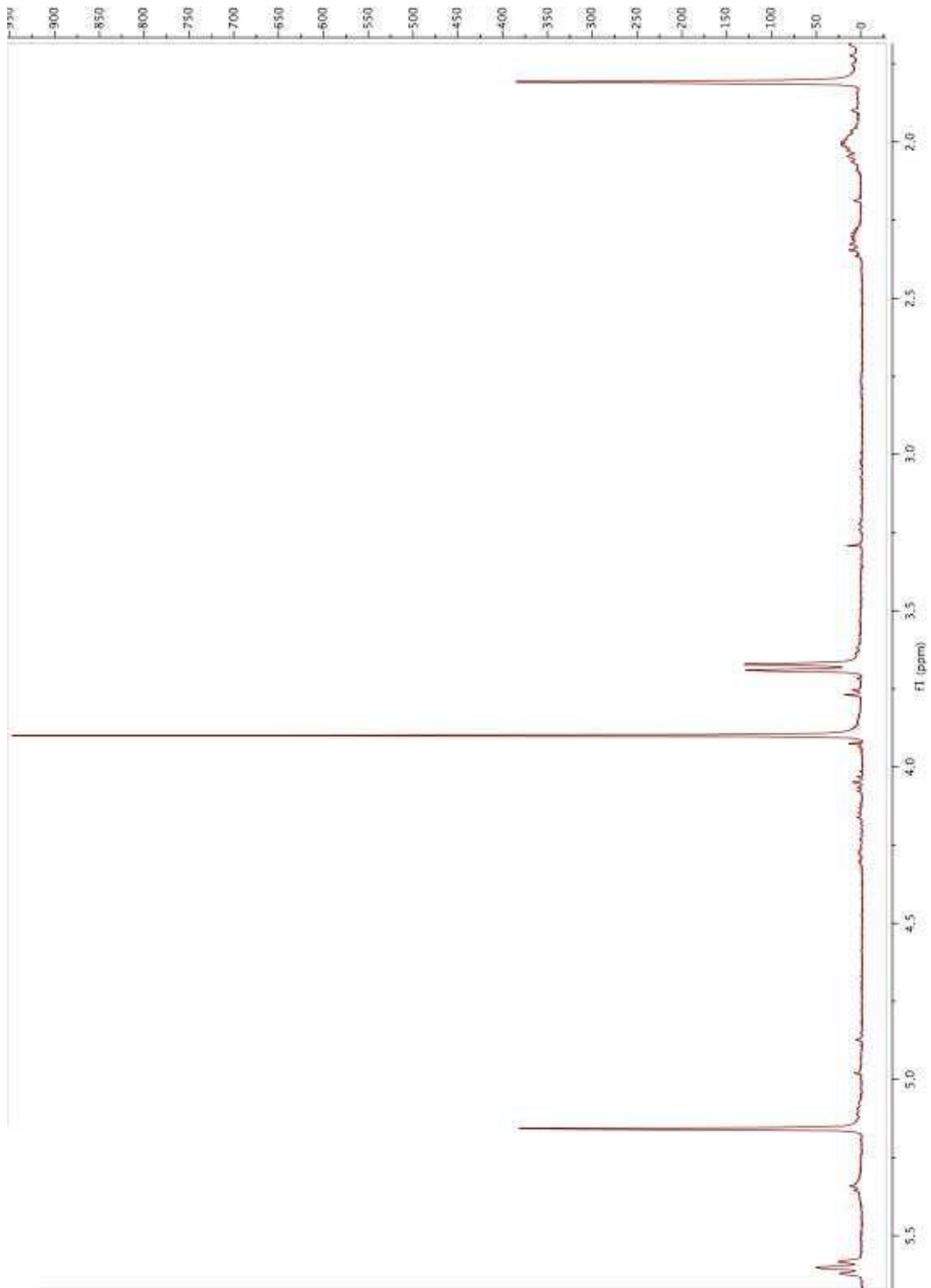
$^1\text{H}$  NMR spektrumunda aromatik bölgede  $\delta$  7,61 ve 6,23 (sırasıyla H-4 ve H-3) ile  $\delta$  7,30 ve 6,83 (sırasıyla H-5 ve H-6) sinyalleri bileşiğin ostol türevi bir bileşik olduğunu göstermektedir. Alifatik bölgede  $\delta$  3,90'da 3 protonluk singlet 7. konumdaki metoksile ait protonlar bulunmaktadır. 2H büyüklüğünde  $\delta$  3,68'de görülen dublet izopropil zincirindeki benzilik protonları, 1H büyüklüğünde  $\delta$  5,60'da görülen geniş triplet izopropil zincirindeki vinilik protonu ve 3H büyüklüğünde  $\delta$  1,81'de görülen dublet ise izopropil zincirinde bir tane vinilik metilin varlığını göstermektedir. Bu sinyaller ostol'e ait  $^1\text{H}$  NMR spektrumuna çok benzemektedir, ancak ostol'de üst

alanda görülen iki vinilik metil grubu yerine bu spektrumda bir tane vinilik metil grubu bulunmaktadır.  $\delta$  5,16'da 2 protonluk singlet, ostol'un yan zincirindeki metillerden birinin oksitlenerek hidroksimetilen grubu haline dönüşüp bir asitle esterleştiğini düşündürmektedir. ROESY spektrumu incelendiğinde  $\delta$  1,81'de bulunan vinilik metil dubleti (H-5') ile  $\delta$  5,60'ta bulunan geniş vinilik proton tripletinin (H-2') etkileştiği görülmektedir, bu etkileşme ostol'un yan zincirinin NP-4 ve NP-7 bileşiklerinde olduğu gibi 4' konumundan esterleştiğini göstermektedir. Aromatik bölgede kumarin protonlarına ilaveten dört proton sinyali daha görülmektedir. Bileşiğin kapalı molekül formülünden azot varlığı anlaşılmaktadır, azot içeren aromatik halkası olan bir asidin ester bağı ile ostol'e bağlı olabileceği ve bu asidin nikotinik asit olabileceği düşünülmektedir. Nikotinik asit esterlerine ait  $^1\text{H}$  NMR literatürleri incelendiği zaman bulunan kimyasal kayma değerleri elde ettiğimiz bileşiğin de nikotinik asit esteri olduğunu kanıtlamaktadır [145,146]. Bileşiğin pozitif modda alınan ES-TOF-MSMS kütle spektrumunda moleküler pikinden ilk fragment kopması molekülün ester grubunu oluşturan asidin kopmasına karşılık gelen  $m/z$  123 fragmentidir (Resim4.36).  $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$  elemental kompozisyonuna sahip olan bu fragment nikotinik asite eşdeğer olup molekülün nikotinik asit esteri olduğunu kanıtlamaktadır. Literatür taraması yapıldığında bileşiğin daha önce izole edilmediği anlaşılmıştır.

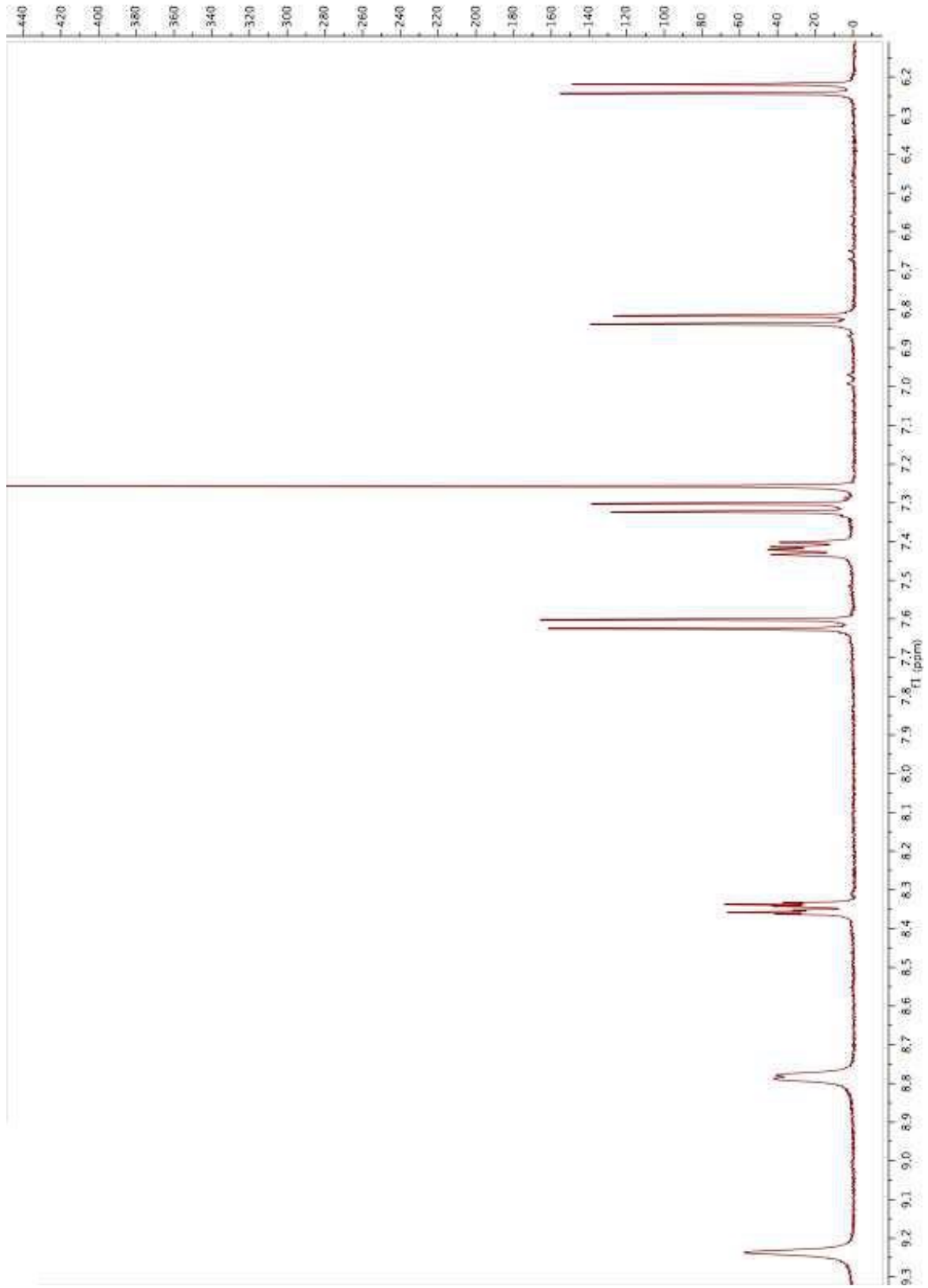


Şekil 4.13. Ostol-4'-nikotinat

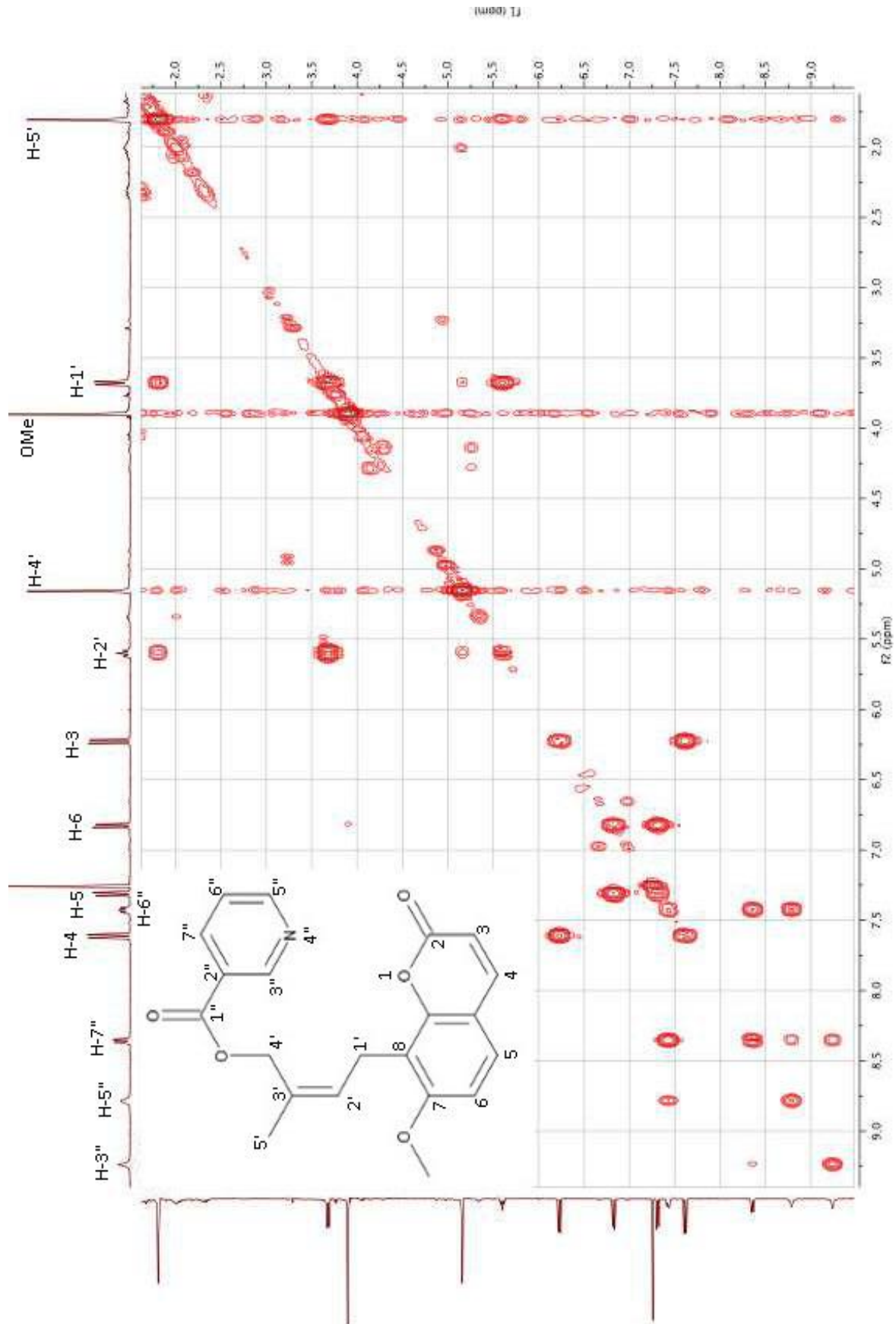
Resim 4.31. NP-9 kodlu bileşiğin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

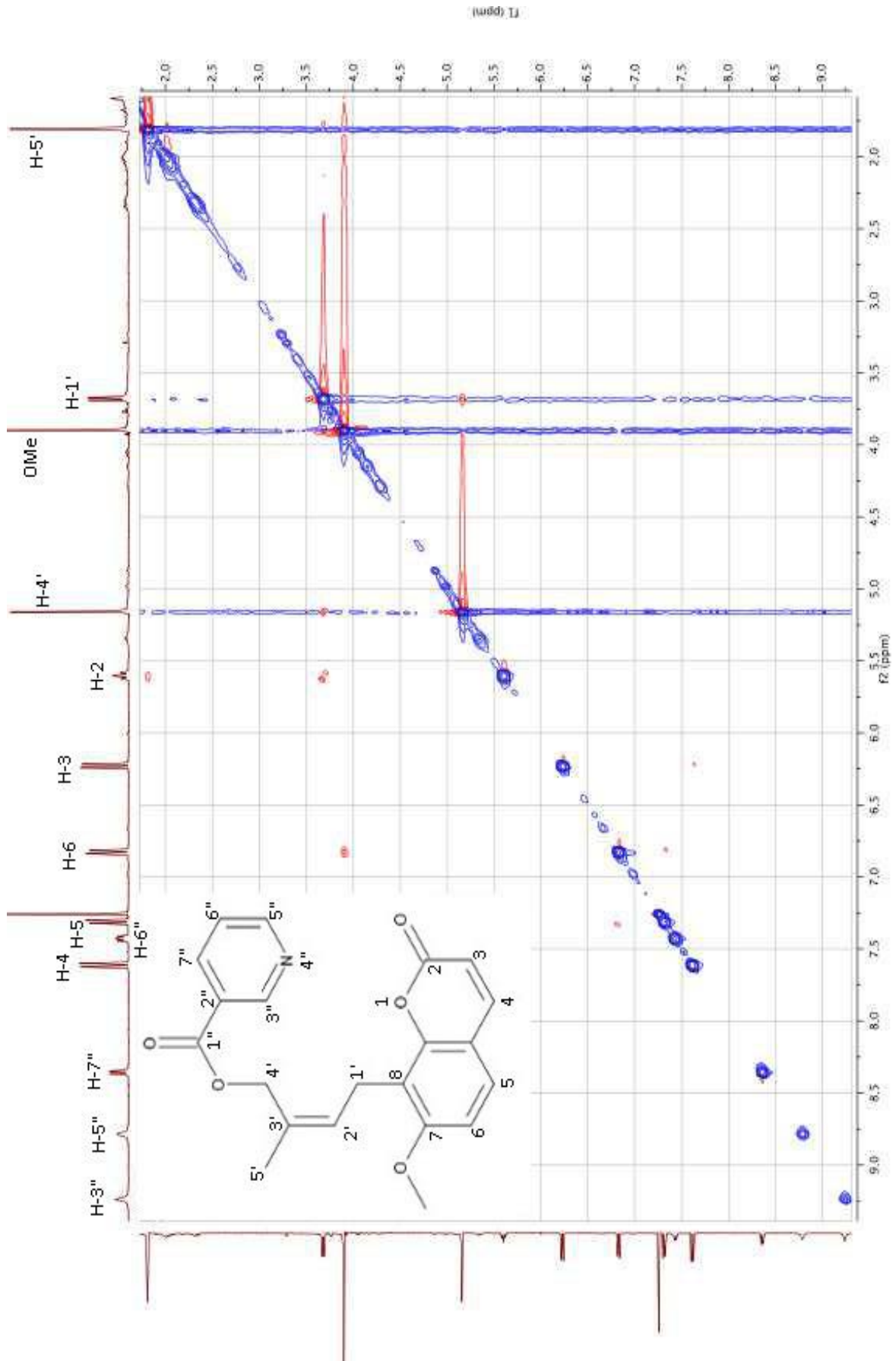


Resim 4.32. NP-9 kodlu bileşimin alifatik bölgesinin genişletilmiş <sup>1</sup>H NMR spektrumu



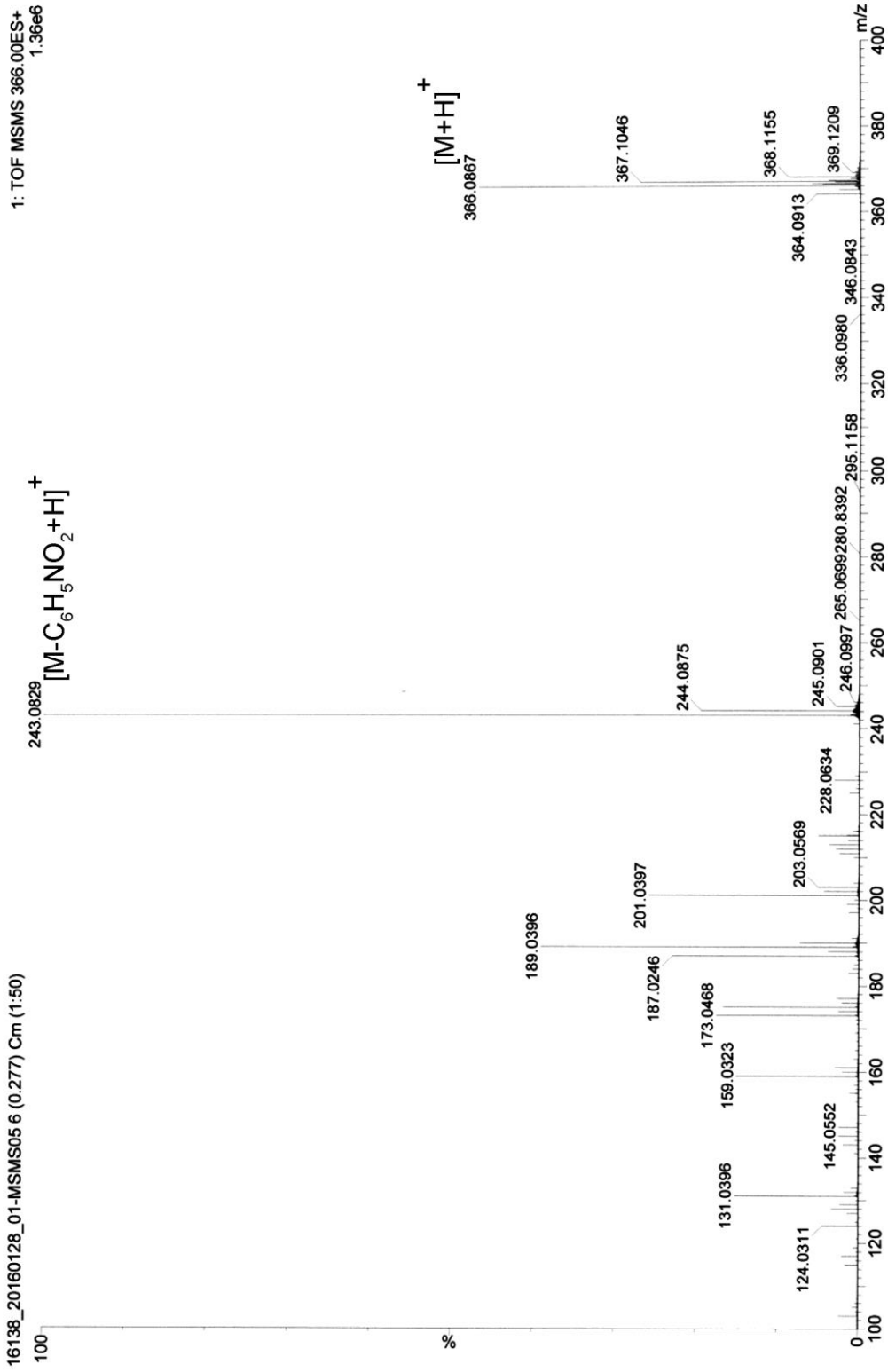
Resim 4.33. NP-9 kodlu bileşimin aromatik bölgesinin genişletilmiş <sup>1</sup>H NMR spektrumu



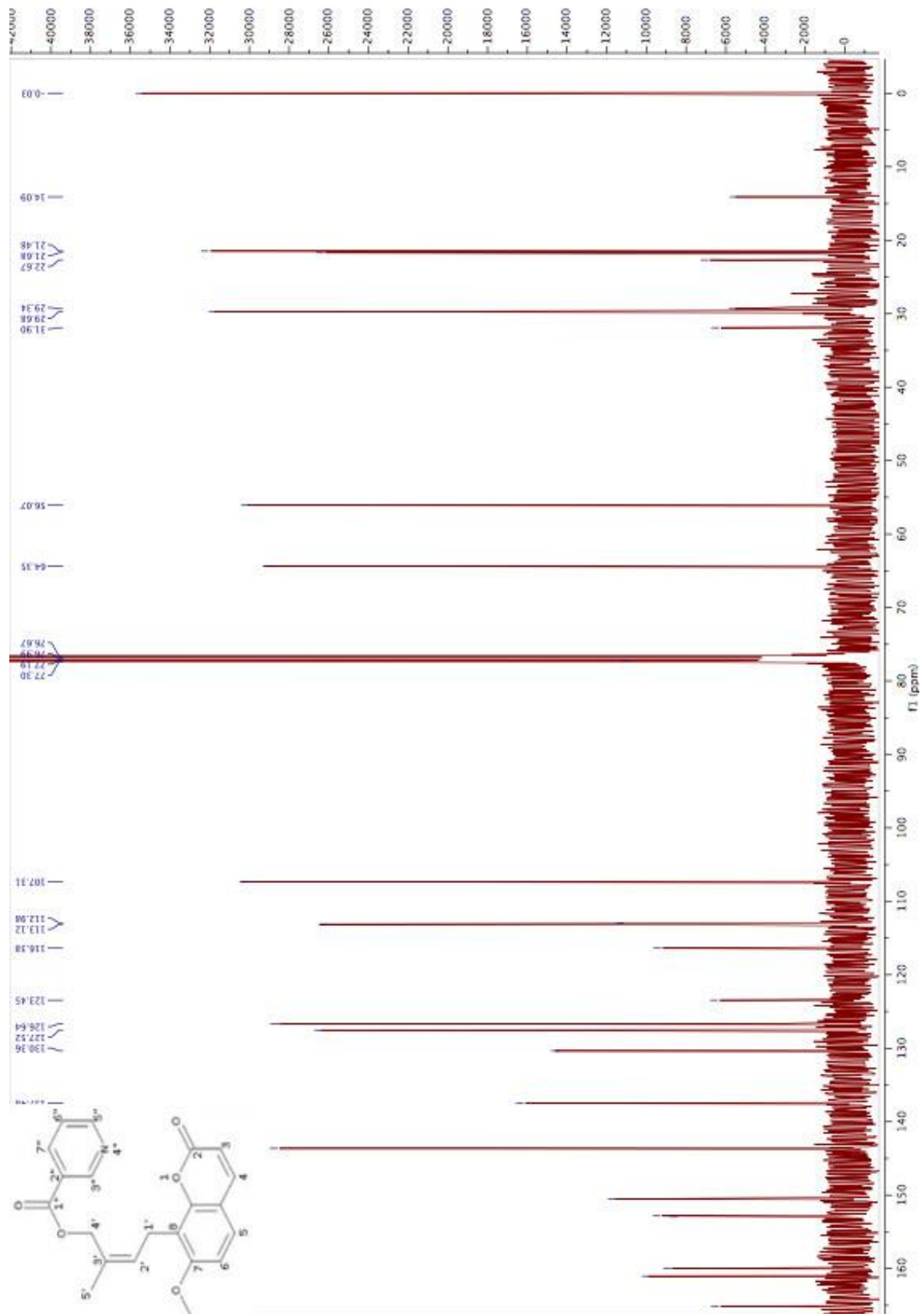


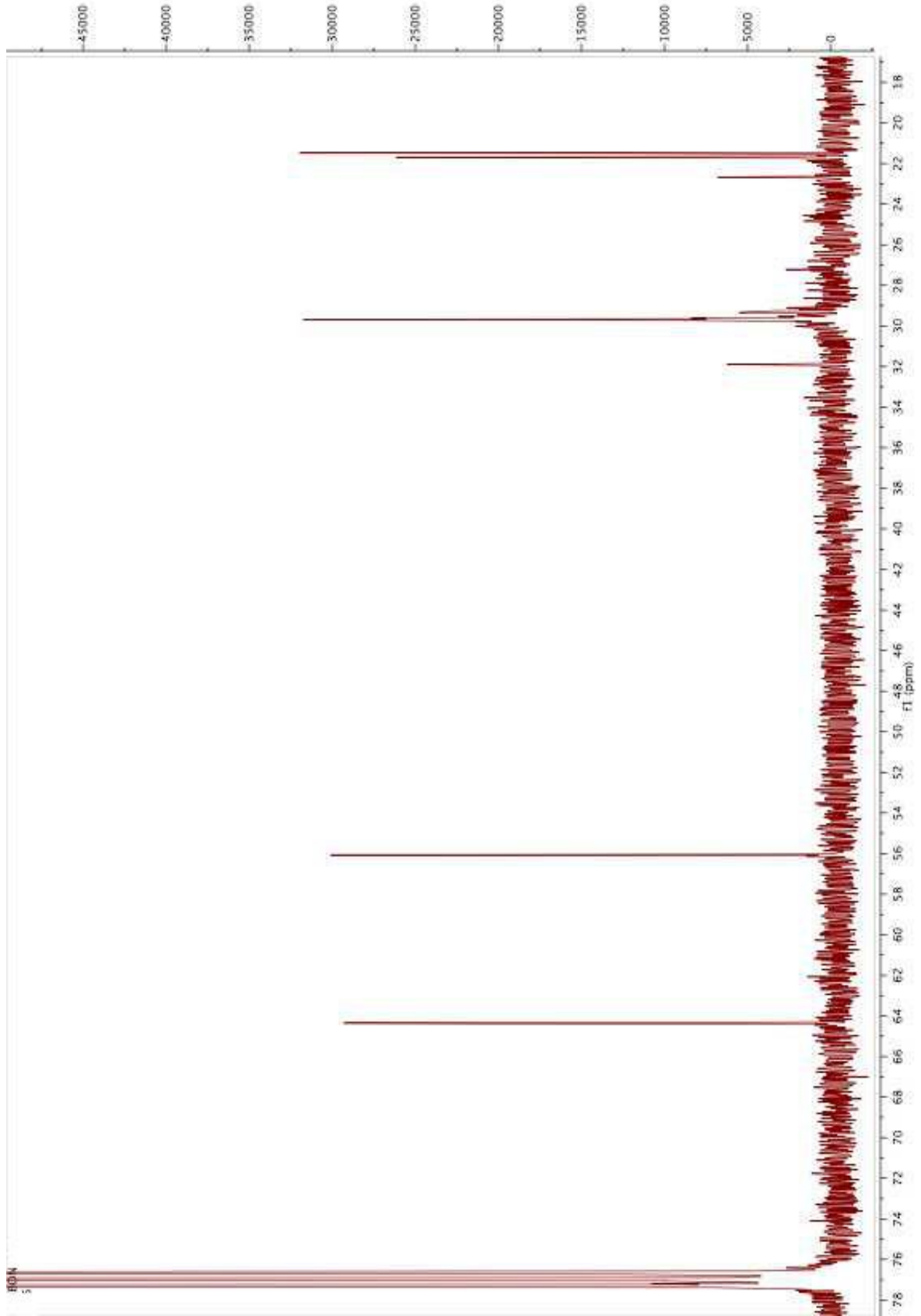
Resim 4.35. NP-9 kodlu bileşimin ROESY spektrumu



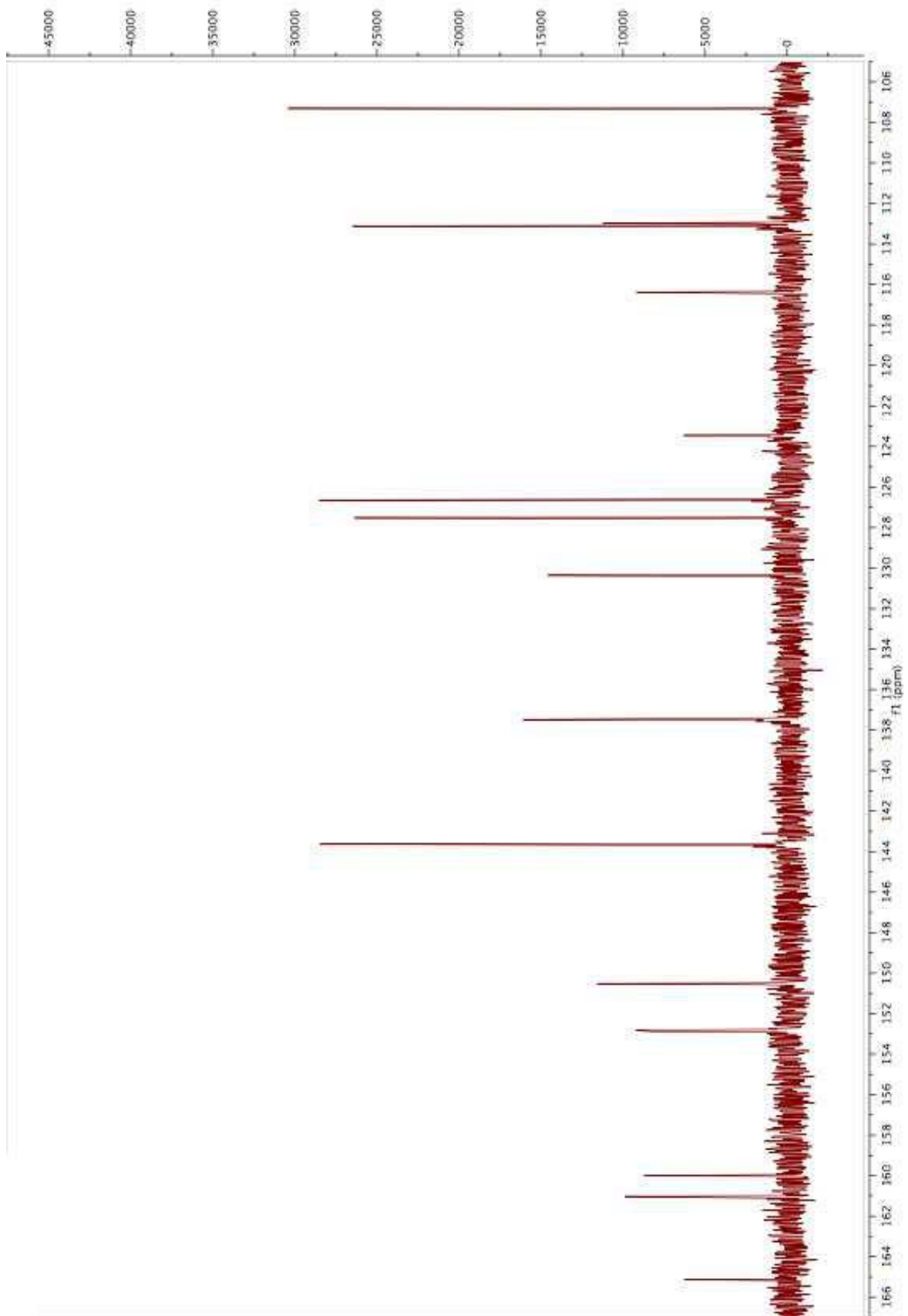


Resim 4.36. NP-9 kodlu bileşimin yüksek rezolüsyonlu kütle spektrumu

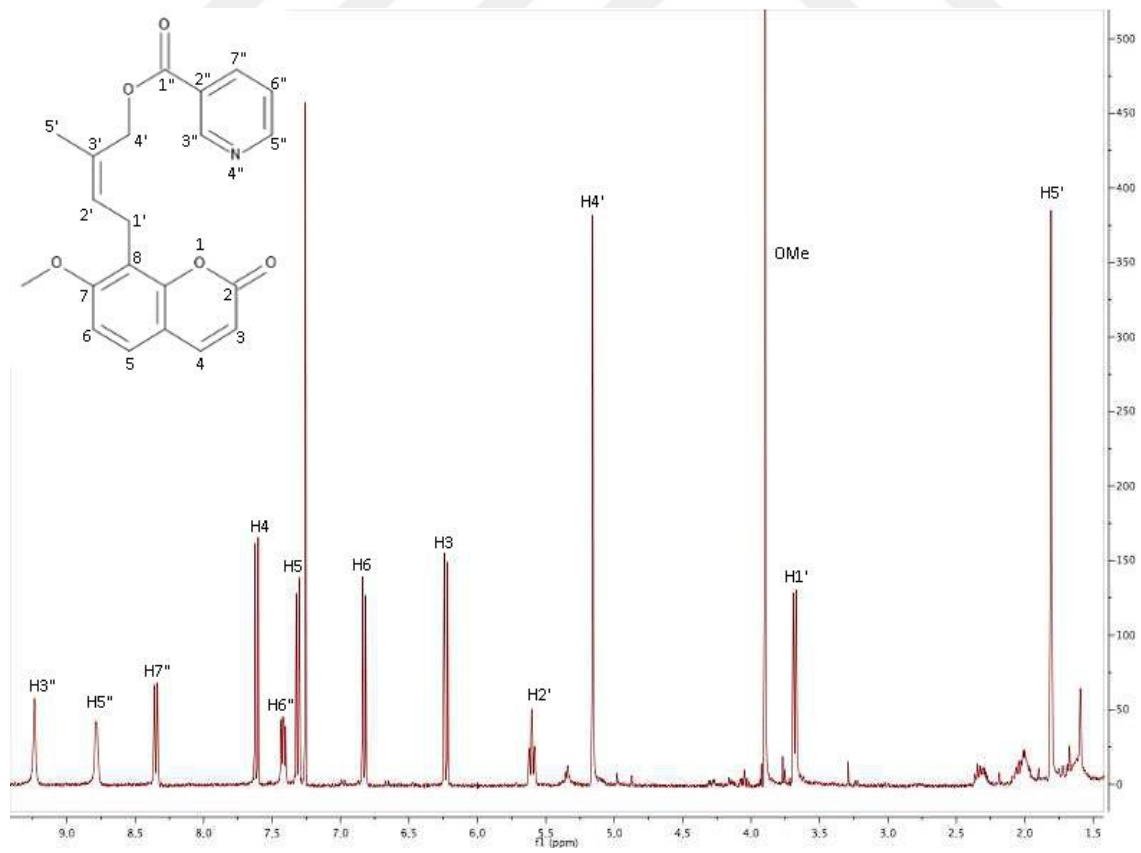
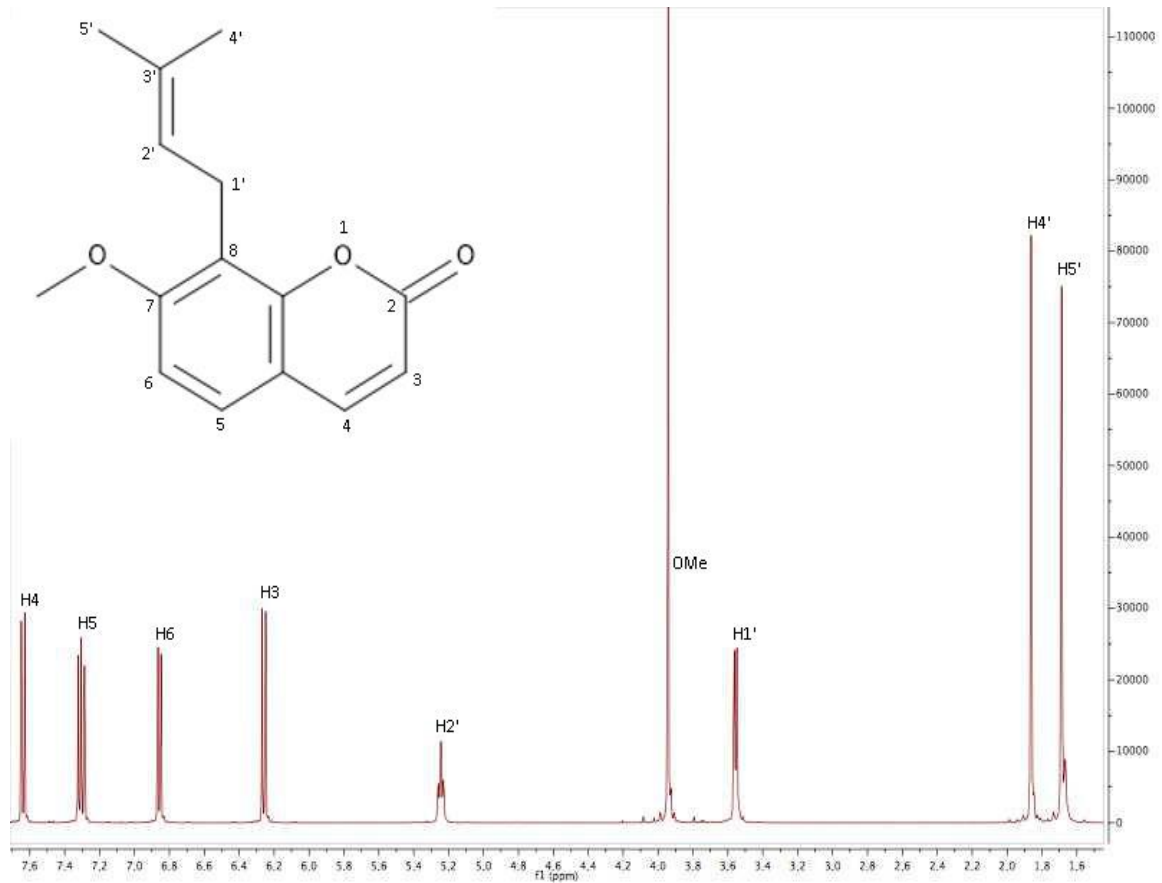
Resim 4.37. NP-9 kodlu bileşimin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



Resim 4.38. NP-9 kodlu bileşimin genişletilmiş üst alan  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



Resim 4.39. NP-9 kodlu bileşimin genişletilmiş alt alan  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



Resim 4.40. NP-9 ile ostol <sup>1</sup>H NMR spektrumlarının karşılaştırılması

#### 4.2.10. NP-10 kodlu bileşiğe ait bulgular

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).  $\delta$  ppm: 7,65 (1H, *d*, *J* = 9,5 Hz, H-4); 7,32 (1H, *d*, *J* = 8,7 Hz, H-5); 6,86 (1H, *d*, *J* = 8,7 Hz, H-6); 6,23 (1H, *d*, *J* = 9,5 Hz, H-3); 5,22 (1H, *t*, *J* = 7,5 Hz, H-2'); 3,81 (3H, *s*, OMe); 4,41 (2H, *s*, H-4'); 3,58 (2H, *d*, *J* = 7,5 Hz, H-1'); 1,80 (3H, *s*, H-5').

Yüksek Rezolüsyonlu Kütle Spektrum (HRMS) Analizi:

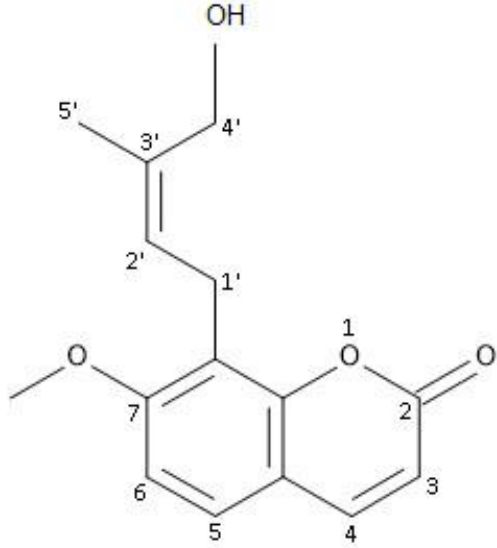
(M+Na)<sup>+</sup> için teorik hesaplanan: 283,0946

(M+Na)<sup>+</sup> için bulunan: 283,0835

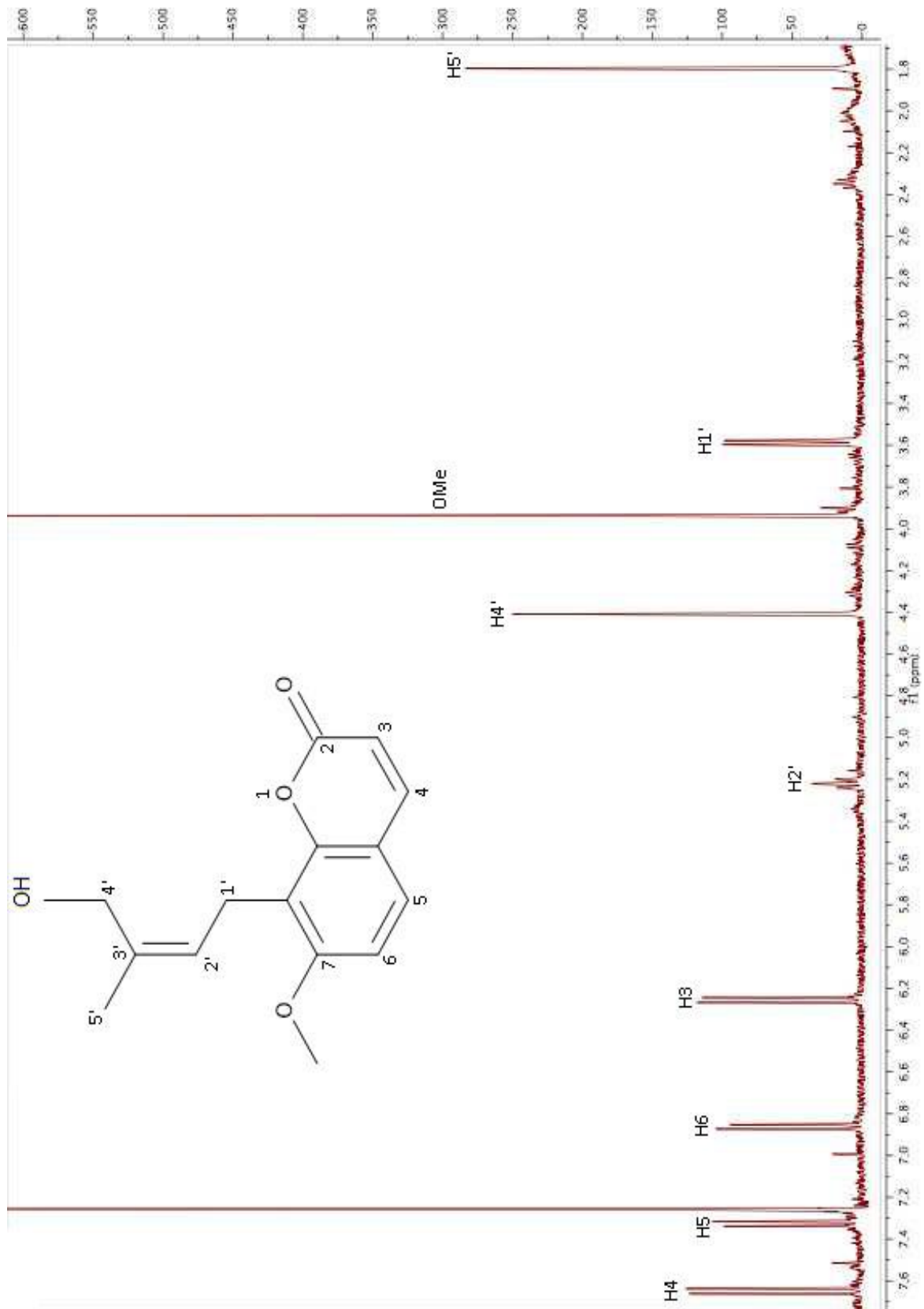
(C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>Na)

NP-10 Kodlu bileşiğin <sup>1</sup>H NMR spektrumu incelendiği zaman aromatik bölgede görülen 4 sinyal [ $\delta$  7,65 ve 6,23 (sırasıyla H-4 ve H-3) ile  $\delta$  7,32 ve 6,86 (sırasıyla H-5 ve H-6)] 7. konumda oksijene bağlı sübstitüent taşıyan kumarin varlığını göstermektedir. Alifatik bölgede  $\delta$  3,58'de bulunan 2H büyüklüğünde dublet yarıma ve  $\delta$  5,22'de 1H büyüklüğünde triplet yarıma sırasıyla izoprenil yan zincirindeki benzilik ve vinilik protonları göstermektedir.  $\delta$  3,81'de bulunan 3H büyüklüğündeki sinyal kumarinlerin 7. konumunda bulunan metoksile ait 3 protonu göstermektedir. Spektruma bakıldığında ostol'ün spektrumu ile çok benzer olduğu görülmektedir. Ostol'e ait <sup>1</sup>H NMR spektrumunda üst alanda görülen iki vinilik metil sinyali yerine  $\delta$  1,80'de tek bir vinilik metil sinyali bulunmaktadır. Ayrıca ostol spektrumunda olmayan 2H büyüklüğünde  $\delta$  4,41'de bir sinyal bulunmaktadır. Bu durum ostol'ün yan zincirinde bulunan iki metil grubundan birinin oksitlenerek hidrosimetilen grubuna dönüştüğünü göstermektedir. Bu bileşiğin büyük olasılıkla NP-4, NP-7 ve NP-9 kodlu bileşiklerin biyogenetik öncü maddesi olan 4'-hidroksi-ostol olduğu kanısına varılmıştır. Bileşiğin miktarı çok az olduğu için diğer spektroskopik yöntemler uygulanamamıştır. Bileşik yarı sentez yolu ile elde edilip gerekli spektrumlar alınacaktır. Literatür taraması yapıldığında bileşiğin daha önce bitkilerden izole edilmediği tespit edilmiştir. Ancak ostol ile sıçanlar üzerinde yapılan metabolizma çalışmalarında bu bileşiğin metabolit olarak oluştuğu saptanmıştır, ayrıca ostol'ün mikrobiyal transformasyonu ile de elde edilmiştir [147, 148]. Bu çalışmalarda 4'-hidroksi-ostol için verilen NMR spektrumları CDCl<sub>3</sub> içinde alınmadığı

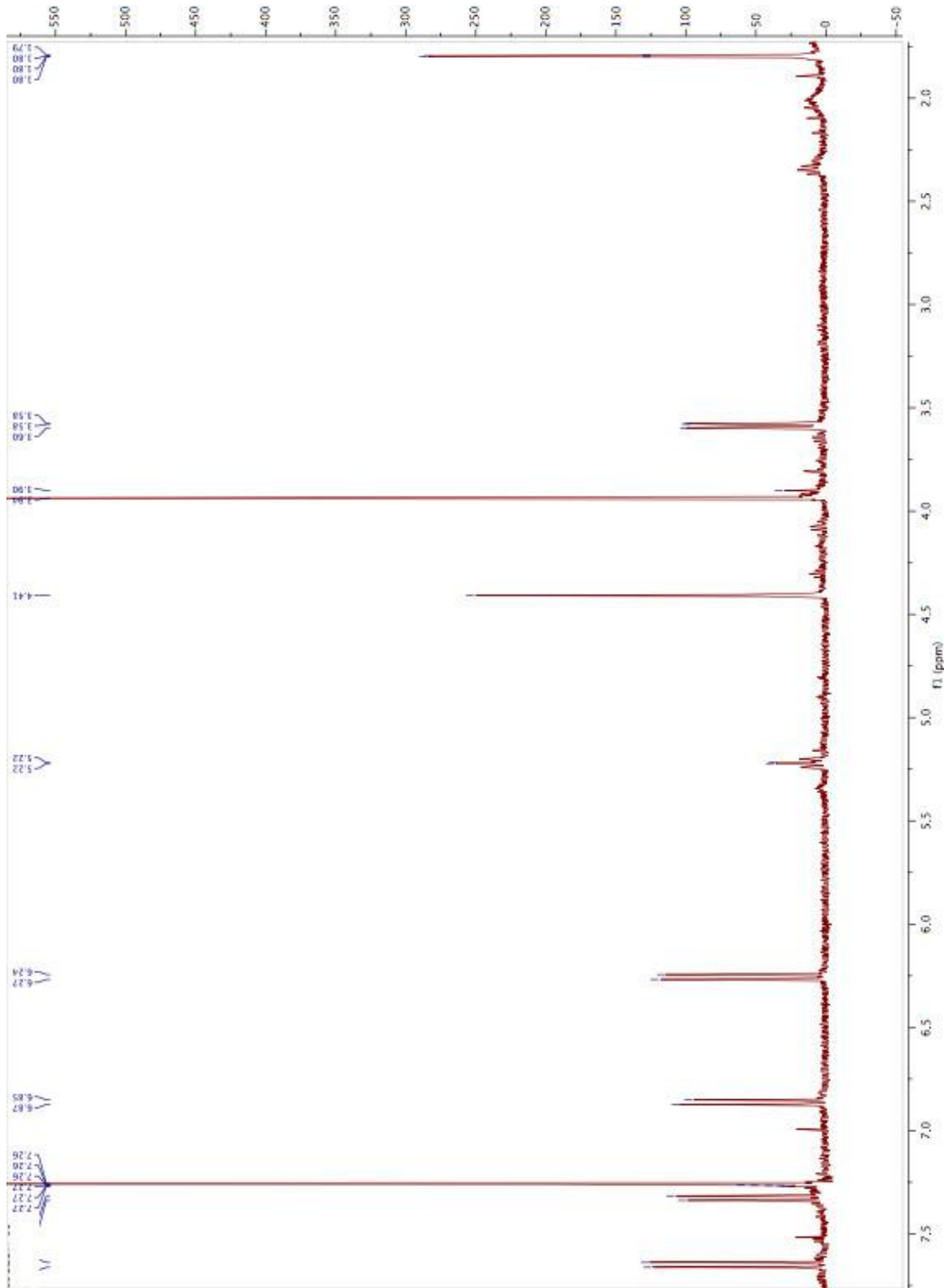
için literatürde verilen kimyasal kayma değerleri bizim NMR spektrumu ile tamamen uyuşmamaktadır. Resim 4.41'de NP-10 bileşiği ile ostol'un  $^1\text{H}$  NMR spektrumlarının karşılaştırması görülmektedir.



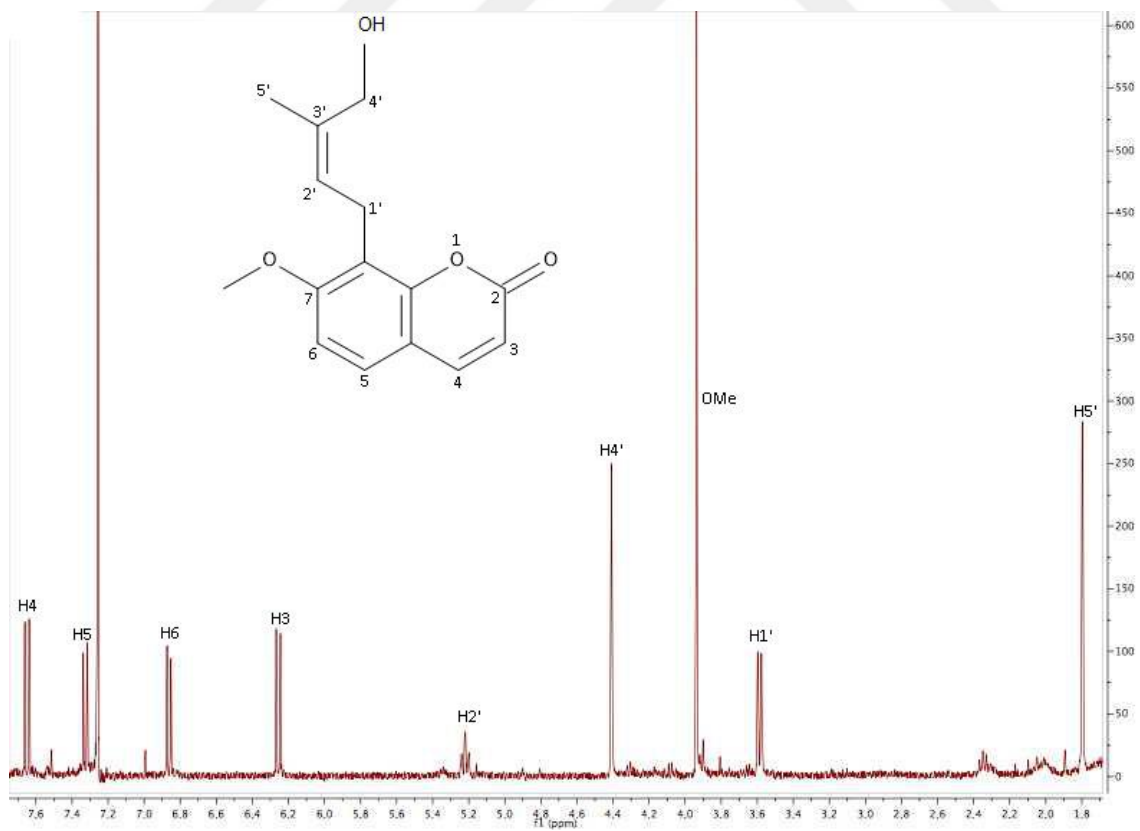
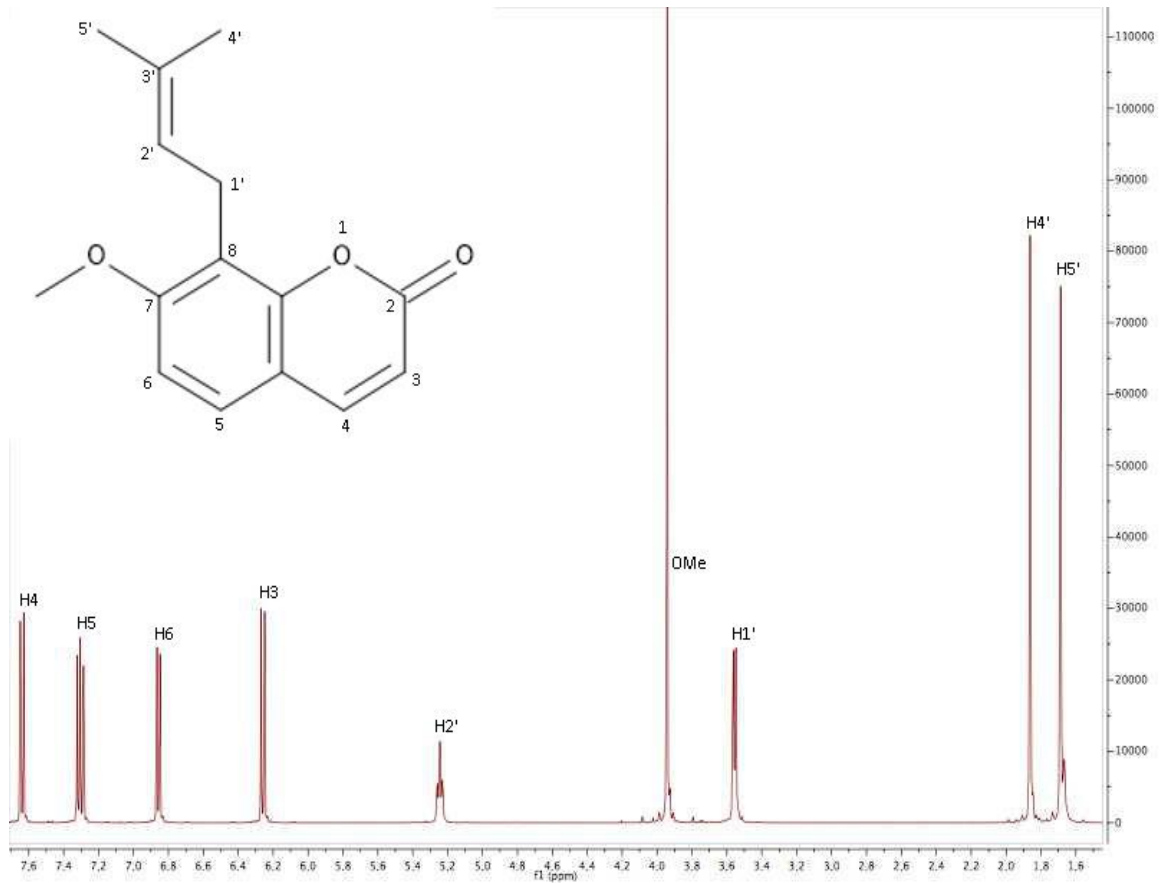
Şekil 4.14. 4'-hidroksi-ostol

Resim 4.41. NP-10 kodlu bileşiğin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu





Resim 4.42. NP-10 kodlu bileşğin aromatik ve alifatik bölgelerinin genişletilmiş  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

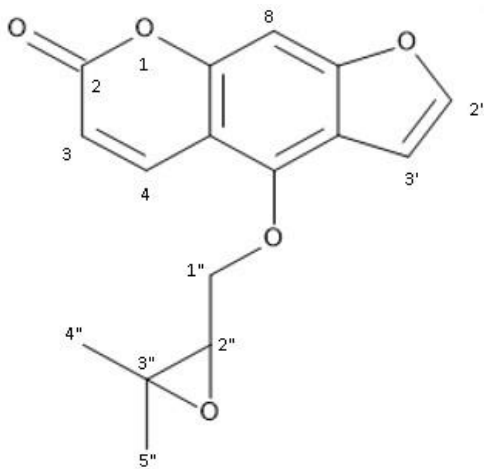


Spektrum 4.43. NP-10 ile ostol  $^1\text{H}$  NMR spektrumlarının karşılaştırılması

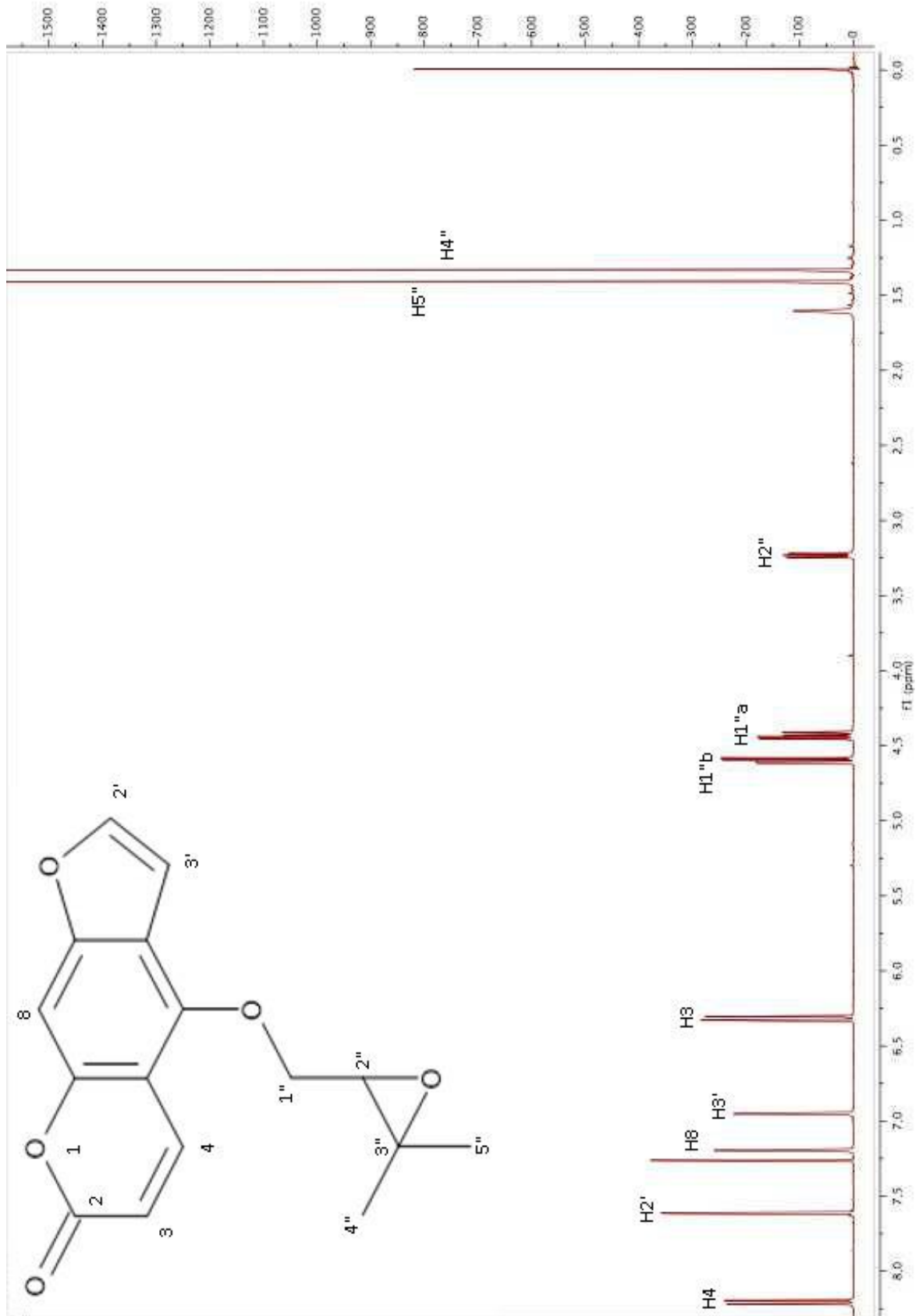
#### 4.2.11. NP-11 kodlu bileşiğe ait bulgular

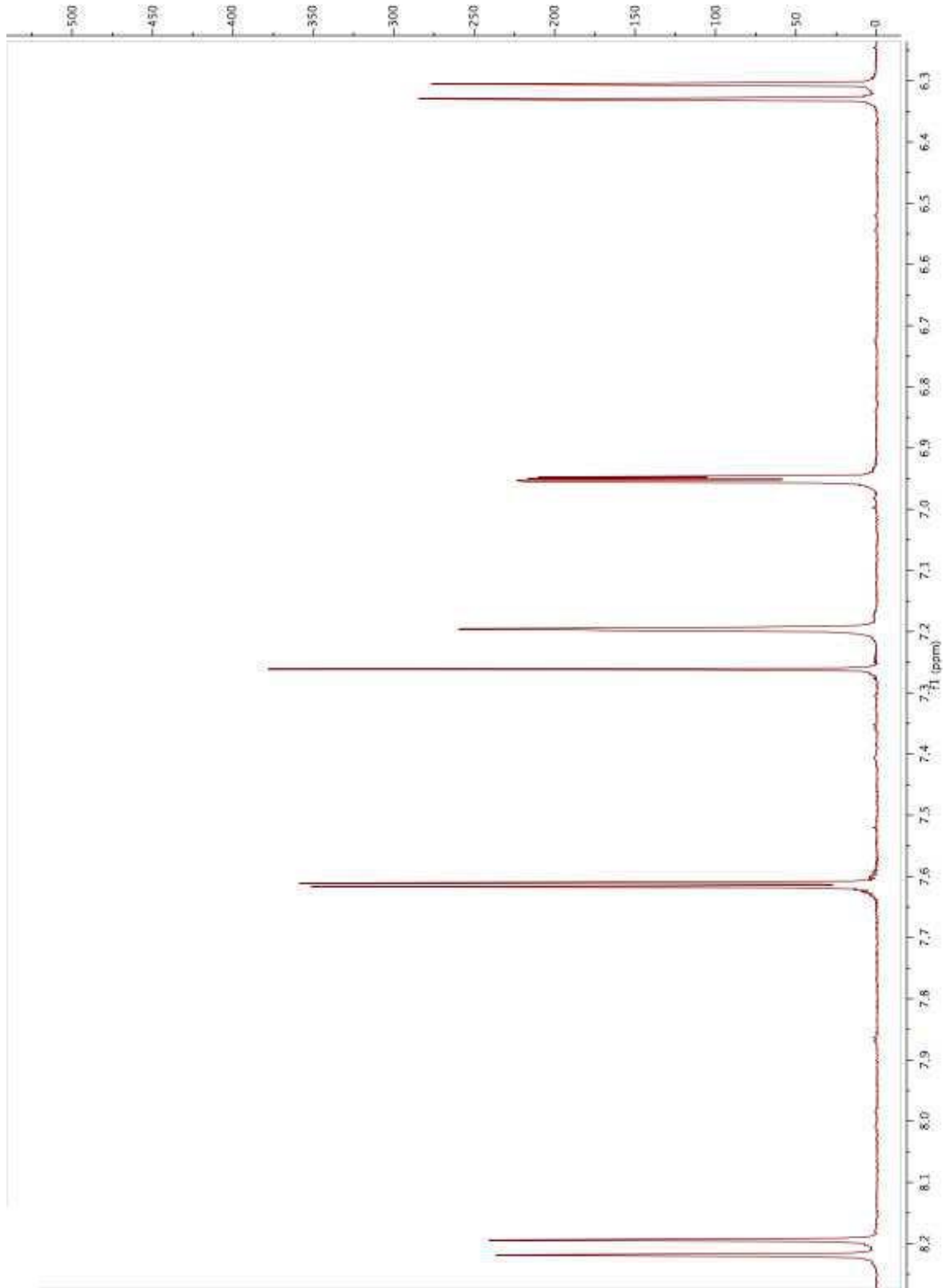
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).  $\delta$  ppm: 8,21 (1H, *d*,  $J = 9,6$  Hz, H-4); 7,61 (1H, *d*,  $J = 2,4$  Hz, H-2'); 7,19 (1H, br s, H-8); 6,95 (1H, *m*,  $J = 2,4$  Hz, H-3'); 6,32 (1H, *d*,  $J = 9,6$  Hz, H-3); 4,60 (1H, *dd*,  $J = 4,5$  ve  $10,8$  Hz, H-1''b); 4,42 (1H, *dd*,  $J = 6,6$  ve  $10,8$  Hz, H-1''a); 3,23 (1H, *dd*,  $J = 4,5$  ve  $6,6$  Hz, H-2''); 1,41 (3H, s, H-5''); 1,35 (3H, s, H-4'').

NP-11 kodlu bileşiğin  $^1\text{H}$  NMR spektrumunda  $\delta$  8,21 ve 6,32'deki sinyaller (sırasıyla H-4 ve H-3) ile  $\delta$  7,61 ve 6,95'deki sinyaller (sırasıyla H-2' ve H-3') aynı  $J$  değerine sahiptir ve AB sistemini göstermektedir. Bu durum furanokumarinler için karakteristiktir. Aromatik bölgede  $\delta$  7,19'daki singlet proton (H-8) ve H-4 proton sinyalinin alt alana kayması linear furanokumarin olduğunu düşündürmektedir. Alifatik bölgede en yüksek alanda bulunan  $\delta$  1,35 ve 1,41'de bulunan üçer protonluk singletler iki tane vinilik metil grubunu göstermektedir.  $\delta$  3,23, 4,42 ve 4,60 sinyalleri dubletin dubleti yarılma göstermektedir. Burada klasik bir ABX yarılması görülmektedir. 4,42 ve 4,60 ppm'de bulunan protonların alt alana kayması yan zincirin benzen halkasına direkt bağlı olmadığını oksijen atomuna bağlı olduğunu göstermektedir. Yan zincirde bir epoksit yapısının varlığı görülmektedir. Bu veriler literatür verileri ile [77, 123, 136, 143, 149] uyumlu olup bu bileşiğin oksipösedanın olduğunu göstermektedir.

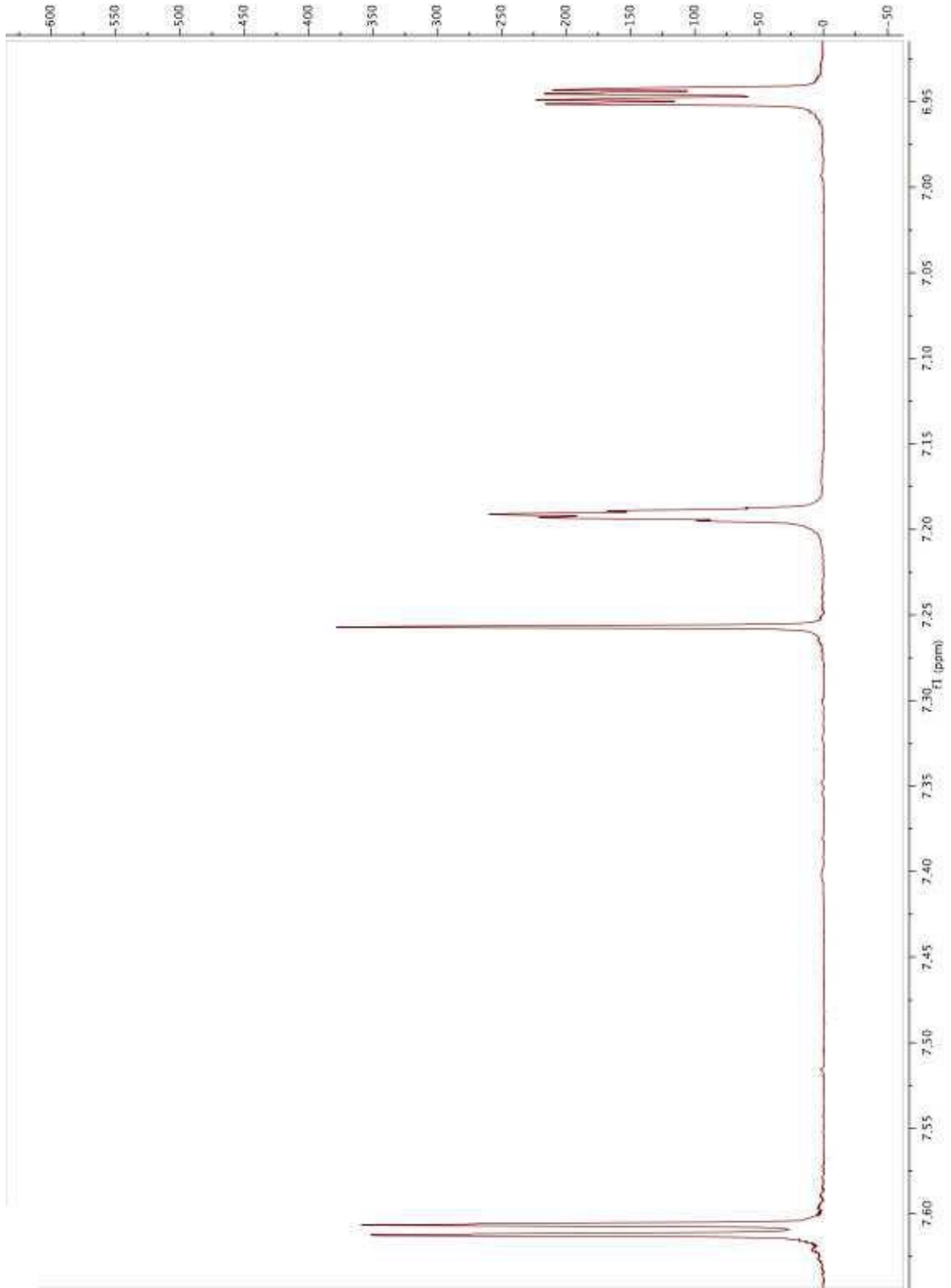


Şekil 4.15. Oksipösedanin

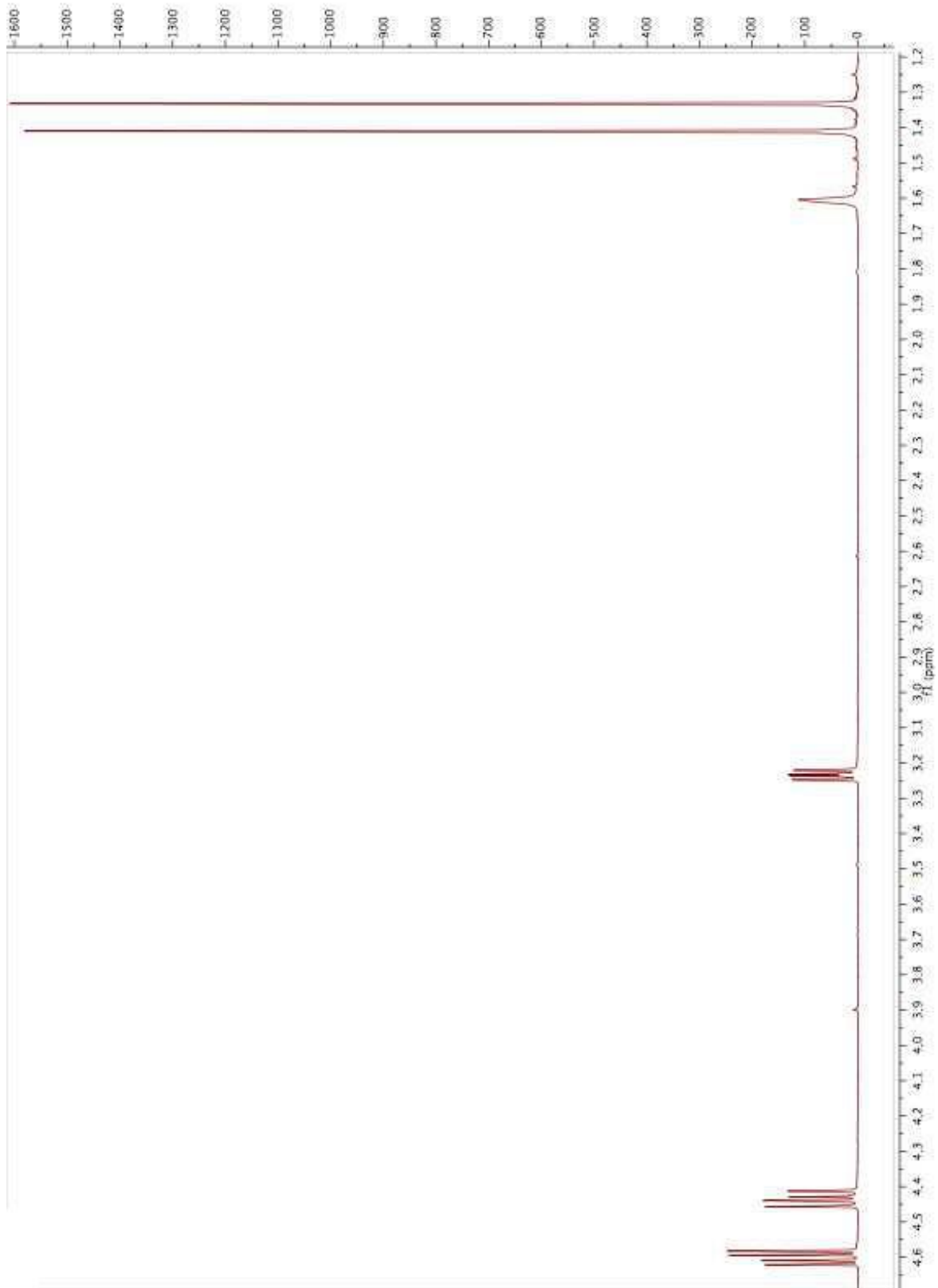
Resim 4.44. NP-11 kodlu bileşimin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



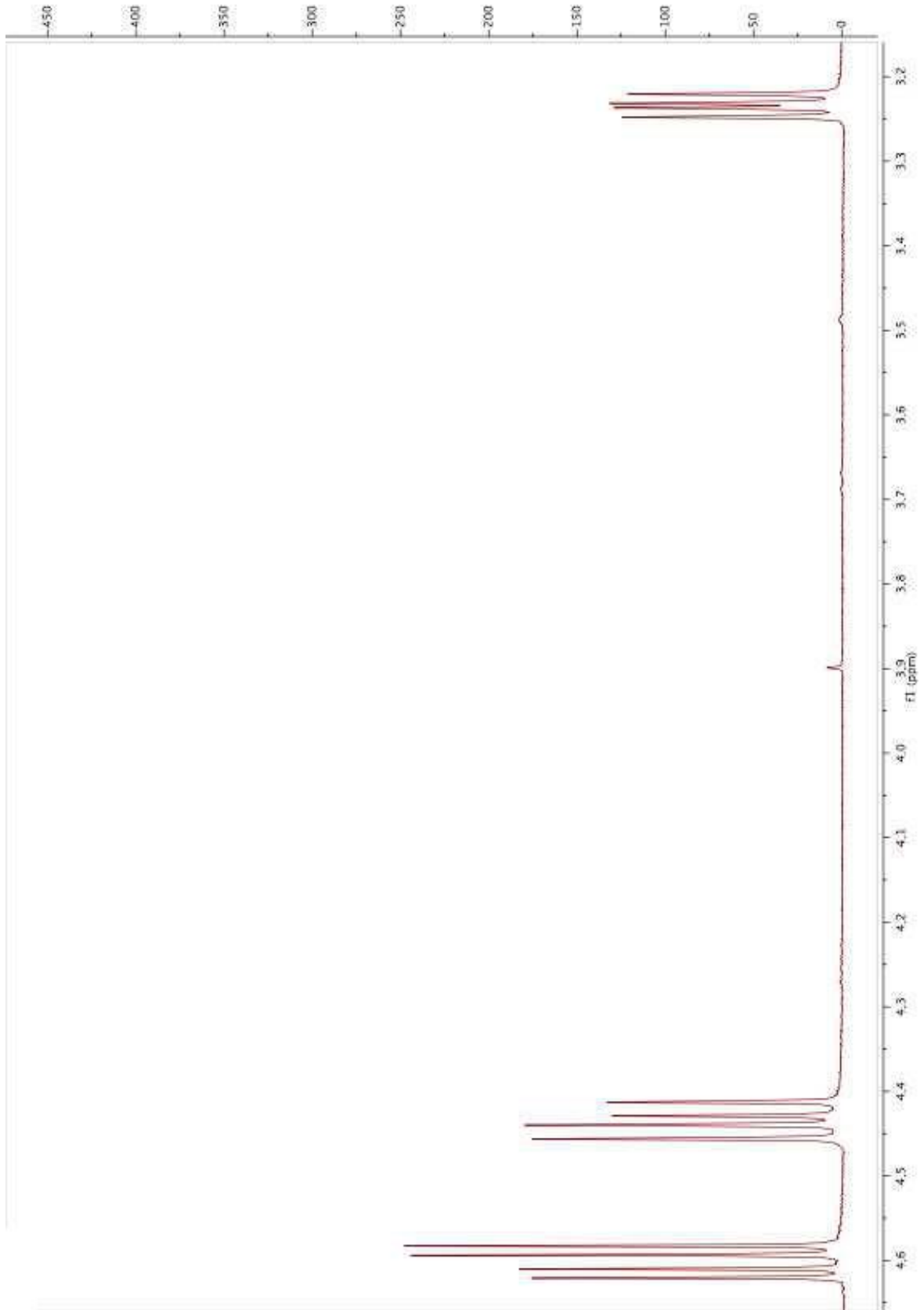
Resim 4.45. NP-11 kodlu bileşimin aromatik bölgesinin genişletilmiş <sup>1</sup>H NMR spektrumu



Resim 4.46. NP-11 kodlu bileşimin alifatik bölgesinin genişletilmiş  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



Resim 4.47. NP-11 kodlu bileşimin H1', H2', H4' ve H5' protonlarına ait sinyallerin genişletilmiş  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



Resim 4.48. NP-11 kodlu bileşimin H1' ve H2' protonlarına ait sinyallerin genişletilmiş  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

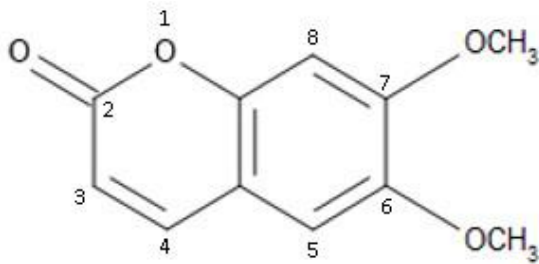


#### 4.2.12. NP-12 kodlu bileşiğe ait bulgular

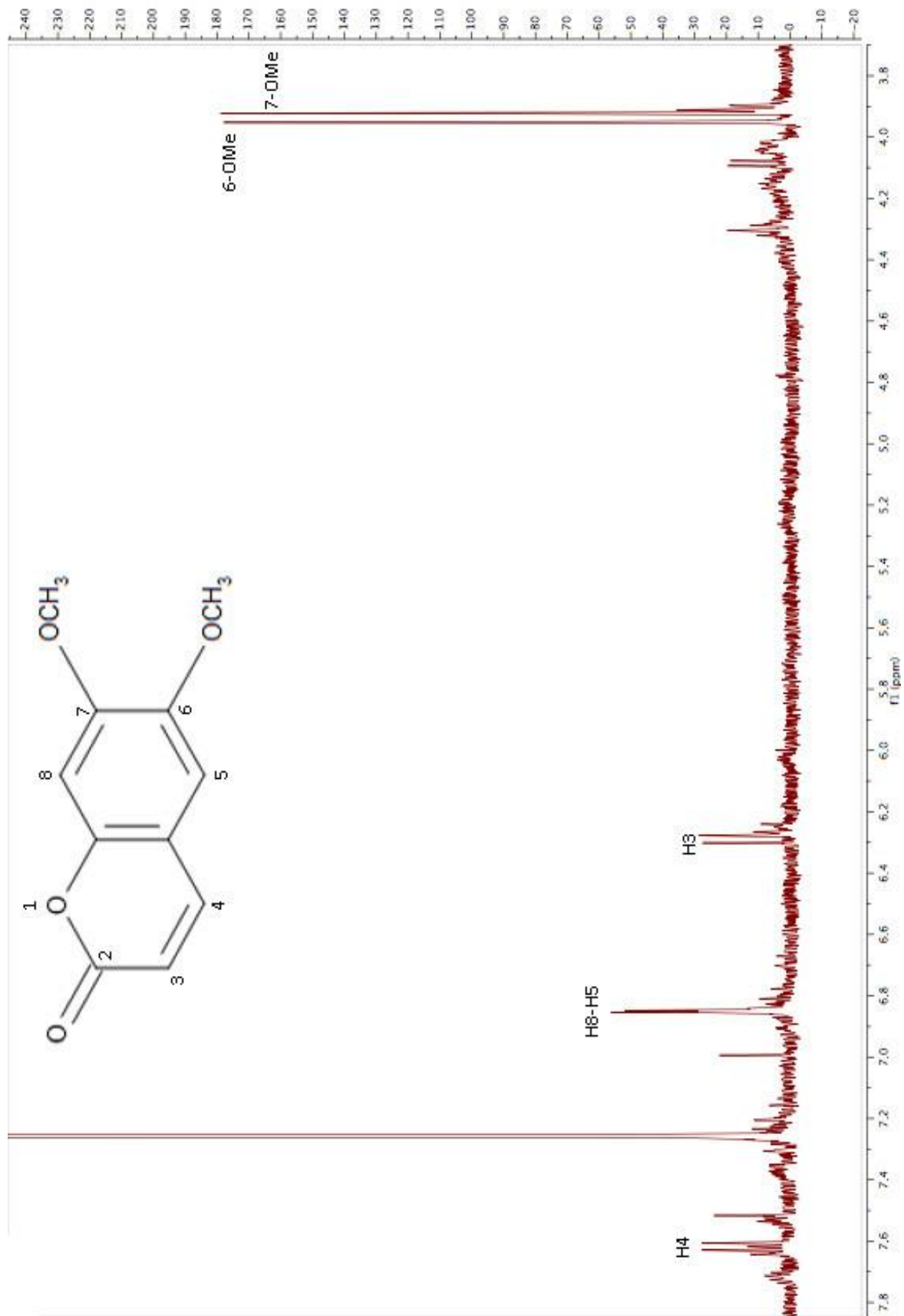
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).  $\delta$  ppm: 7,63 (1H, *d*,  $J = 9,6$  Hz, H-4); 6,81 (1H, *s*, H-8); 6,81 (1H, *s*, H-5); 6,24 (1H, *d*,  $J = 9,6$  Hz, H-3); 3,93 (3H, *s*, 7-OMe); 3,91 (3H, *s*, 6-OMe);

NP-12 kodlu bileşiğin  $^1\text{H}$  NMR spektrumunda aromatik bölgede  $\delta$  6,24, 6,81, 6,81 ve 7,63'te sinyaller bulunmaktadır. Sinyaller incelendiğinde iki tanesinin dublet iki tanesinin ise singlet olduğu görülmektedir ve hepsi 1H büyüklüğündedir.  $\delta$  6,24 ve 7,63 sinyallerinin aynı olan  $J$  değerleri ve iki sinyalinde dublet olması birbiriyle etkileştiğinin göstermektedir. Sinyallerin aromatik bölgenin iki ucuna doğru kayması kumarin varlığına işaret etmektedir.  $\delta$  3,91 ve 3,93'te 3H büyüklüğündeki sinyaller aromatik halkaya komşu metoksile ait protonları işaret etmektedir. Aromatik bölgedeki iki sinyalin aynı yerde olması ve aromatik yapıya bağlı iki metoksil grubunun varlığı bu metoksil sübstitüentlerinin birbiri ile komşu karbonlarda olduğunu göstermektedir.

Dolayısı ile aromatik halkada singlet veren  $\delta$  6,81 protonları birbiriyle eşdeğerdir. Tüm bu verilerin literatür verileri ile uyumlu olması bu bileşiğin skoparon olduğunu göstermektedir [150,151].



Şekil 4.16. Skoparon

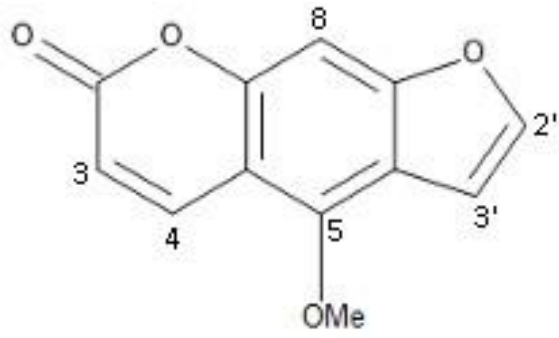
Resim 4.49. NP-12 kodlu bileşimin <sup>1</sup>H NMR spektrumu

#### 4.2.13. NP-13 kodlu bileşiğe ait bulgular

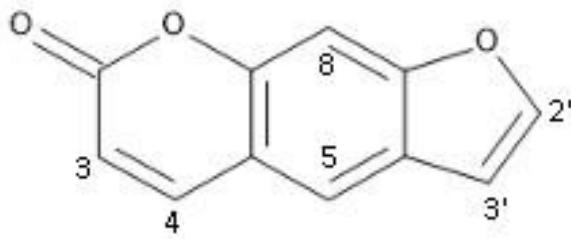
(A) Bergapten  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).  $\delta$  ppm: 8,15 (1H, *d*,  $J = 9,5$  Hz, H-4); 7,59 (1H, *d*,  $J = 2,2$  Hz, H-2'); 7,12 (1H, *s*, H-8); 7,02 (1H, *d*,  $J = 2,2$  Hz, H-3'); 6,27 (1H, *d*,  $J = 9,5$  Hz, H-3); 4,27 (3H, *s*, 5-OMe).

(B) Psoralen  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).  $\delta$  ppm: 7,80 (1H, *d*,  $J = 9,6$  Hz, H-4); 7,70 (1H, *d*,  $J = 2,2$  Hz, H-2'); 7,46 (1H, *s*, H-8); 7,68 (1H, *s*, H-5); 6,83 (1H, *d*,  $J = 2,2$  Hz, H-3'); 6,38 (1H, *d*,  $J = 9,6$  Hz, H-3);

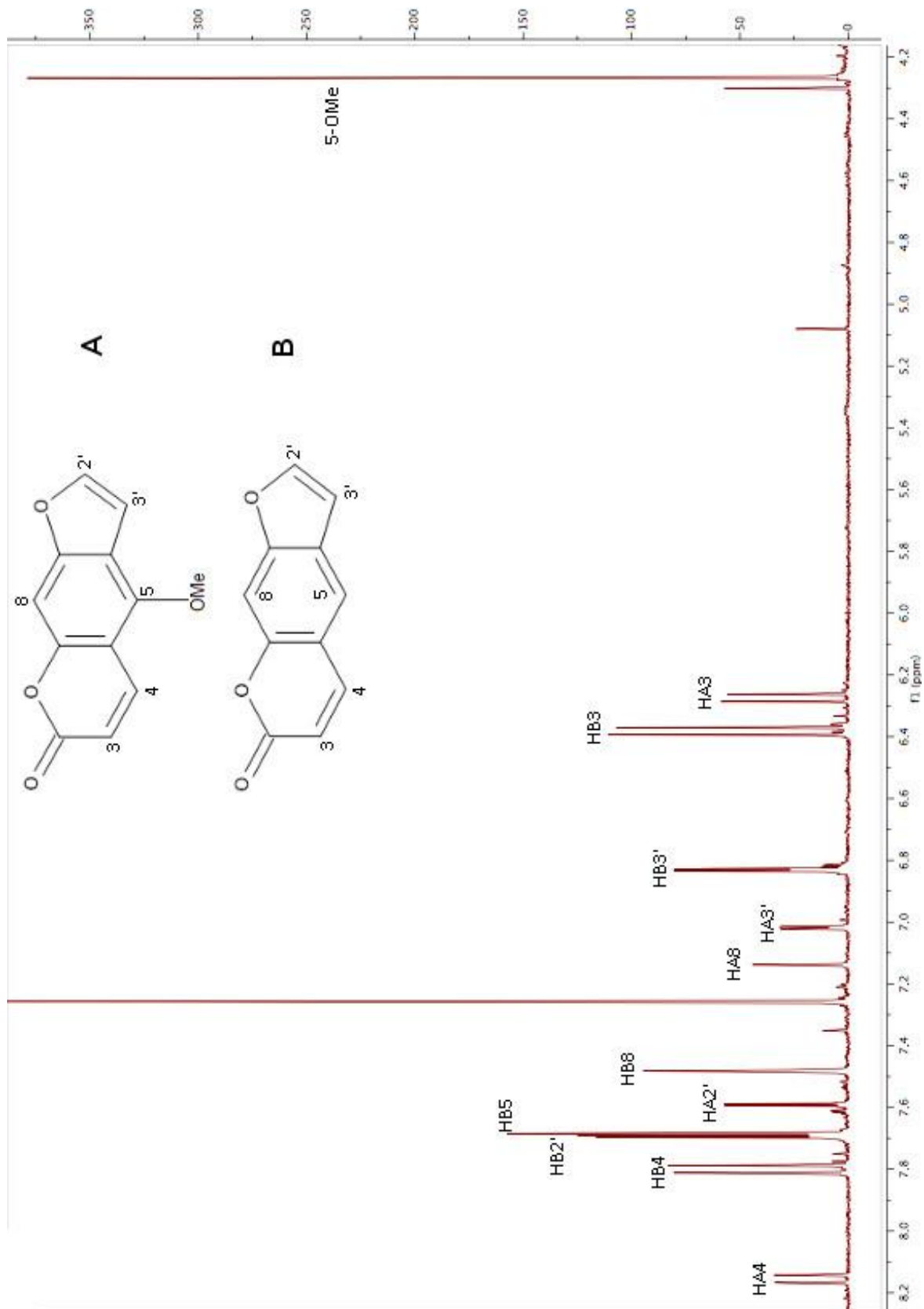
NP-13 kodlu bileşiğin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu incelendiğinde aromatik bölgede 11 sinyal görülmektedir. Dikkatle incelendiği zaman spektrumda 4 tane AB sisteminin bulunduğu fark edilmektedir. Bu durum iki farklı kumarin yapısı olduğu şüphesi uyandırmıştır.  $J$  değerleri ve sinyallerin konumu incelendiği zaman aromatik bölgenin iki ucuna kayan yarımalar görülmektedir.  $\delta$  8,15 ve 6,27'deki dublet sinyaller ile  $\delta$  7,59 ve 7,02'deki dublet sinyaller birbirleri ile etkileşmektedir.  $\delta$  7,80 ve 6,83'deki dublet sinyaller ile  $\delta$  7,70 ve 6,83'deki dublet sinyallerde birbirleri ile etkileşmektedir. Ayrıca  $\delta$  8,15'e kayma furanokumarinlerin 5. konumda süstitüent olması ile açıklanmaktadır [149].  $\delta$  4,27'de aromatik yapıya bağlı metoksil protonlarının varlığı 5. konumda metoksil olan furanokumarin varlığını göstermektedir. Aromatik bölgede bu sinyaller dışında  $\delta$  7,12 ile  $\delta$  7,46 ve 7,68 sinyalleri bulunmaktadır.  $\delta$  4,27'de bulunan metoksil protonlarının sinyalleri dışında alifatik bölgede sinyal bulunmaması sadece aromatik yapıdan oluşan furanokumarin yapısını işaret etmektedir. Eldeki veriler ile literatür verileri karşılaştırıldığında 5-metoksil içeren furanokumarin yapısının bergapten ile ikinci furanokumarin yapısının ise psoralen ile uyumlu olduğu gözlenmiştir [123, 134, 137, 144, 149, 152].

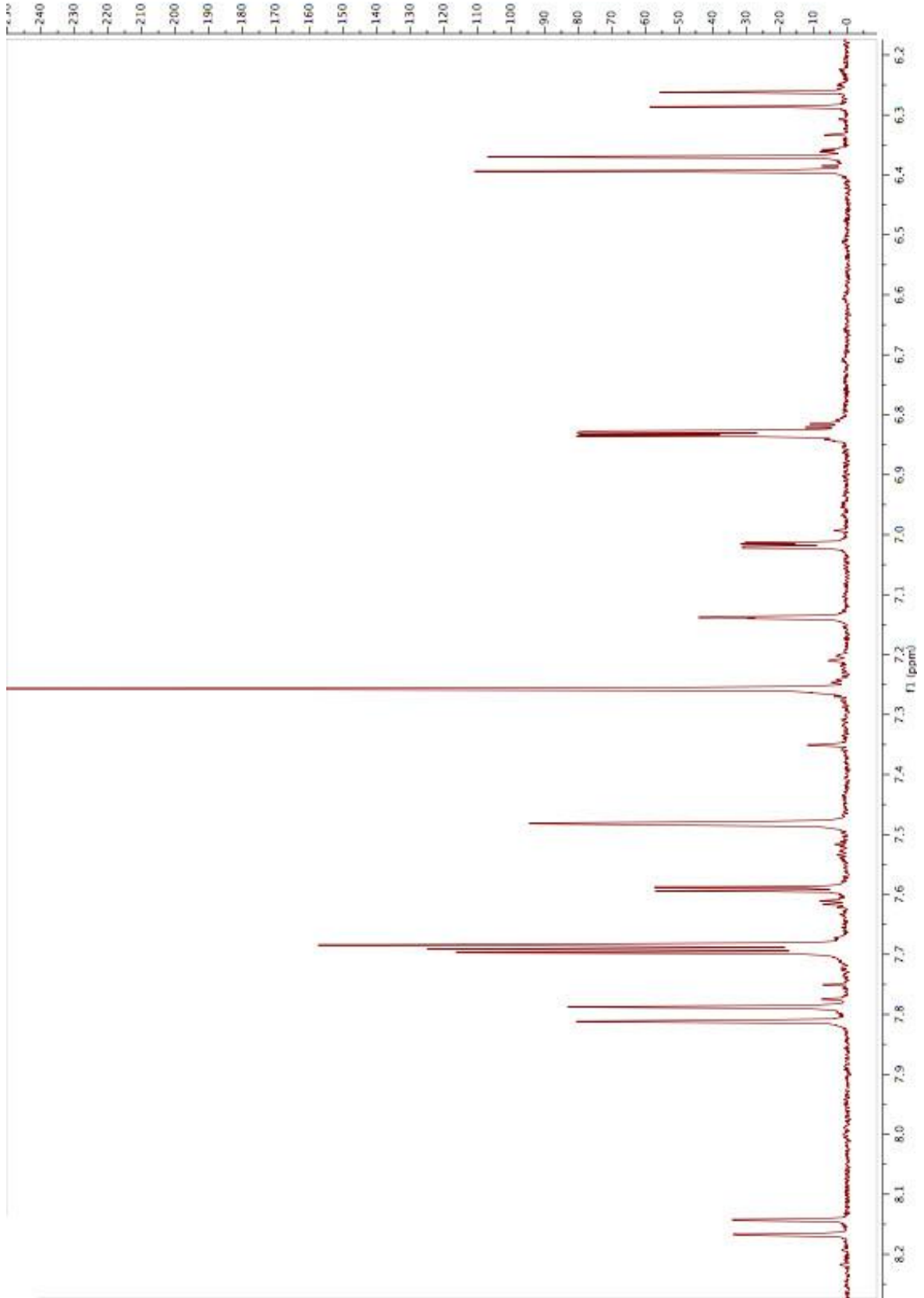


Şekil 4.17. (A) Bergapten



Şekil 4.18. (B) Psoralen

Resim 4.50. NP-13 kodlu bileşimin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

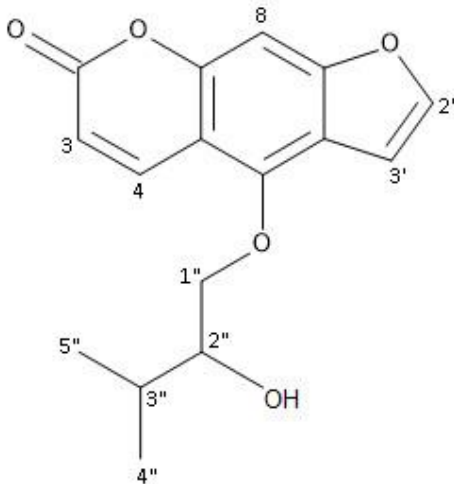


Resim 4.51. NP-13 kodlu bileşğin aromatik bölgesinin genişletilmiş <sup>1</sup>H NMR spektrumu

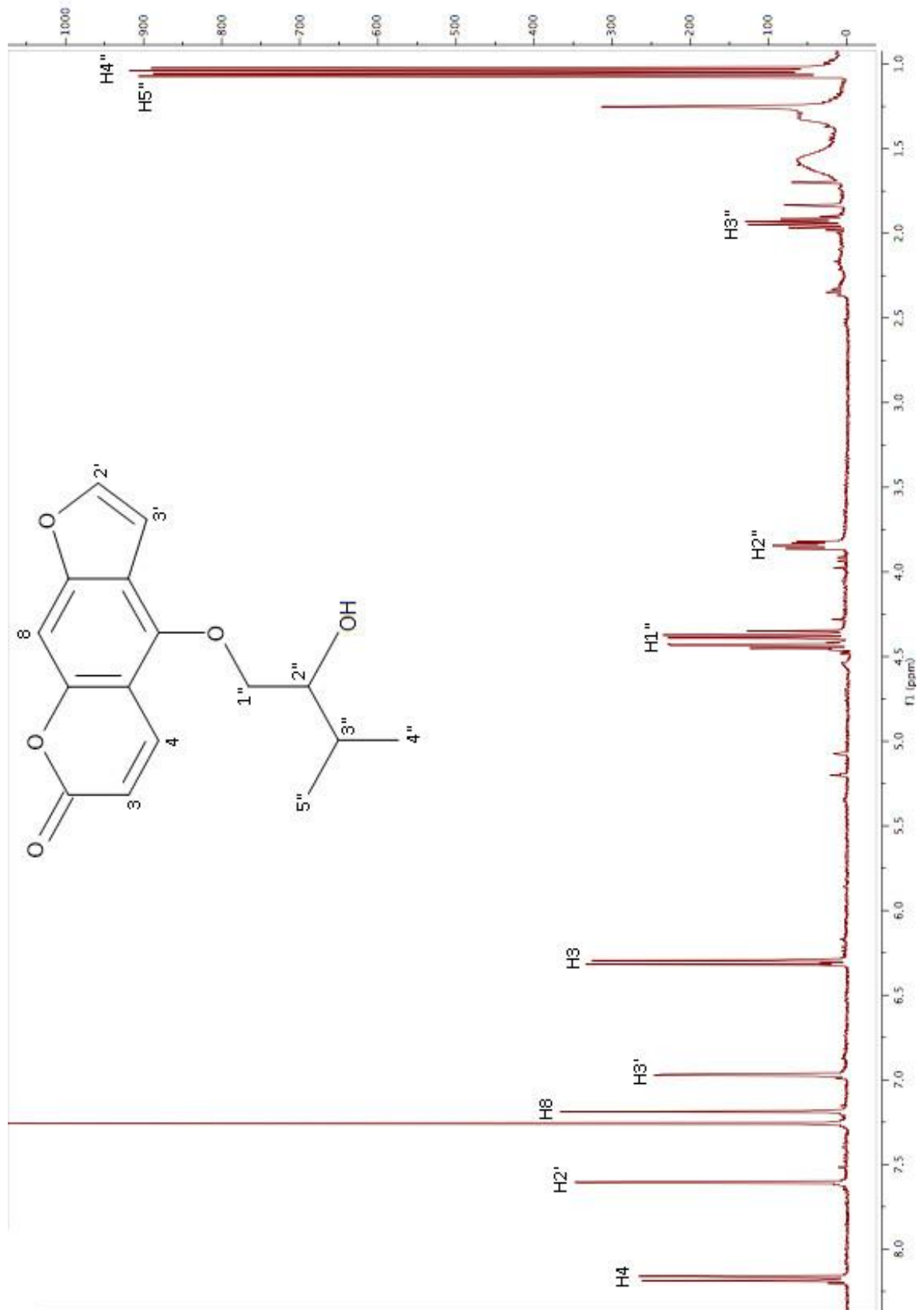
#### 4.2.14. NP-14 kodlu bileşiğe ait bulgular

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).  $\delta$  ppm: 8,17 (1H, *d*,  $J = 9,5$  Hz, H-4); 7,60 (1H, *d*,  $J = 2,5$  Hz, H-2'); 7,19 (1H, *s*, H-8); 6,97 (1H, *d*,  $J = 2,5$  Hz, H-3'); 6,31 (1H, *d*,  $J = 9,5$  Hz, H-3); 4,44 (1H, *dd*,  $J = 7,8$  ve  $9,8$  Hz, H-1''b); 4,36 (1H, *dd*,  $J = 7,8$  ve  $9,8$  Hz, H-1''a); 3,64 (1H, *ddd*,  $J = 7,8$  Hz, H-2''); 1,95 (1H, *m*,  $J = 7,8$  Hz, H-3''); 1,06 (3H, *d*,  $J = 7,0$  Hz, H-5''); 1,03 (3H, *d*,  $J = 7,0$  Hz, H-4'').

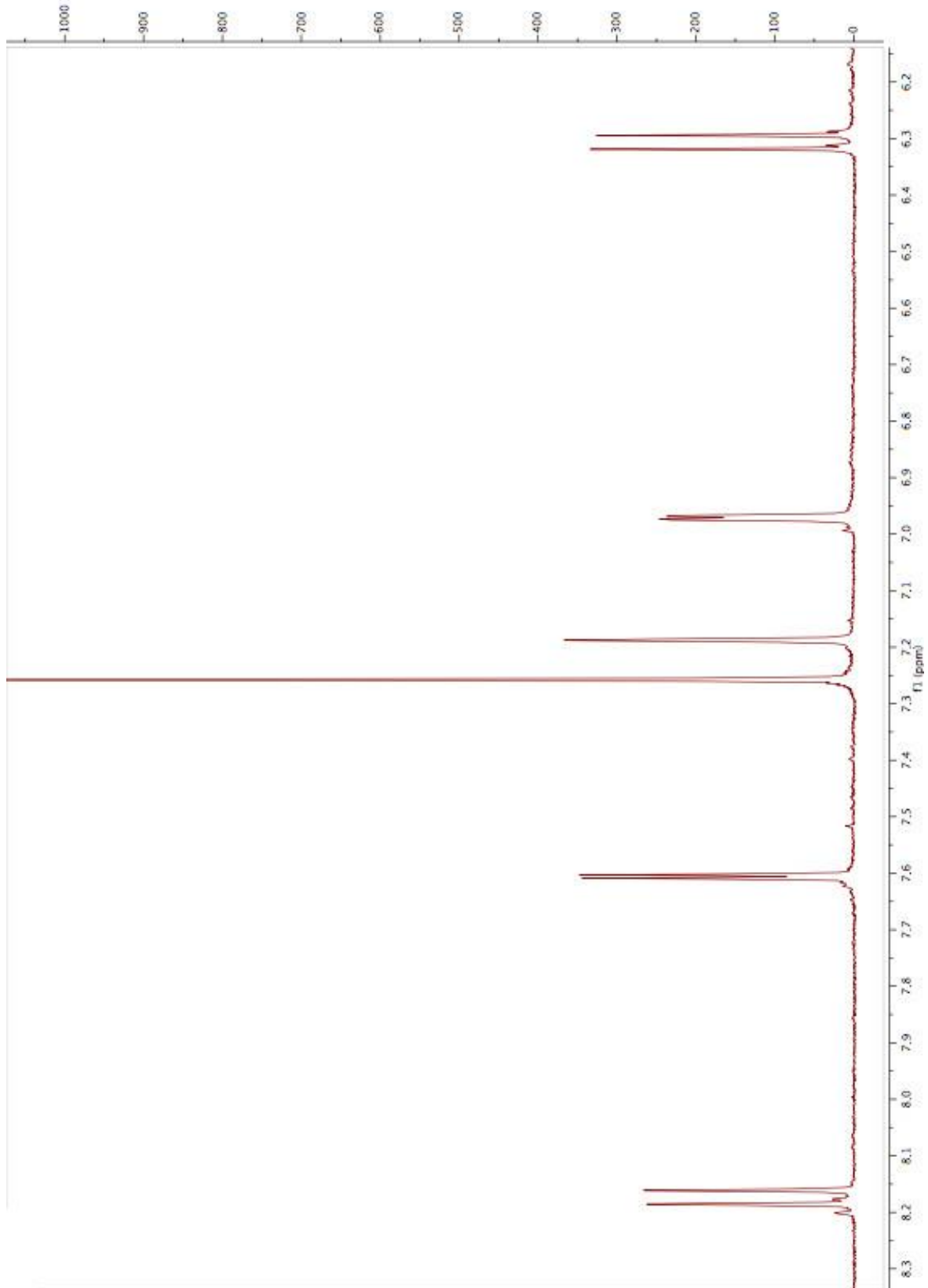
$\delta$  8,17 ve 6,31 ile  $\delta$  7,60 ve 6,97'de bulunan dublet sinyaller AB sistemini göstermektedir. Bu sistem furanokumarinler için karakteristiktir [135]. Bu sebeple  $\delta$  8,17 ve 6,31 sırasıyla 4. ve 3. konumdaki protonlara aittir. Ayrıca 4. konumdaki protonun alt alana kayması 5. konumdaki sübsitüent ile açıklanmaktadır [152].  $\delta$  7,60 ve 6,97 sinyalleri ise sırasıyla 2' ve 3' protonlarına aittir. Aromatik bölgede bulunan diğer sinyal ise ( $\delta$  7,19) 8. konumda bulunan protona aittir. Alifatik bölgede  $\delta$  3,64 ile  $\delta$  4,36 ve 4,44 sinyalleri ABX yarılmasına örnek teşkil etmektedir.  $\delta$  3,64'te dubletin dubletinin dubleti yarılması hidroksile komşu olduğunu göstermektedir.  $\delta$  4,36 ve 4,44 sinyalleri aynı karbonda bulunmaktadır. Ayrıca kimyasal kayması etere komşu olduğunu göstermektedir.  $\delta$  1,03 ve 1,06 da dublet olan iki sinyal aynı karbona bağlı metil gruplarına işaret etmektedir.  $\delta$  1,95 ise multipllet yarılma göstermektedir. Elde ettiğimiz verilerin pranferol isimli furanokumarin'in literatür verileri ile uyumlu olması bu bileşiğin pranferol olduğunu göstermektedir [153, 154].



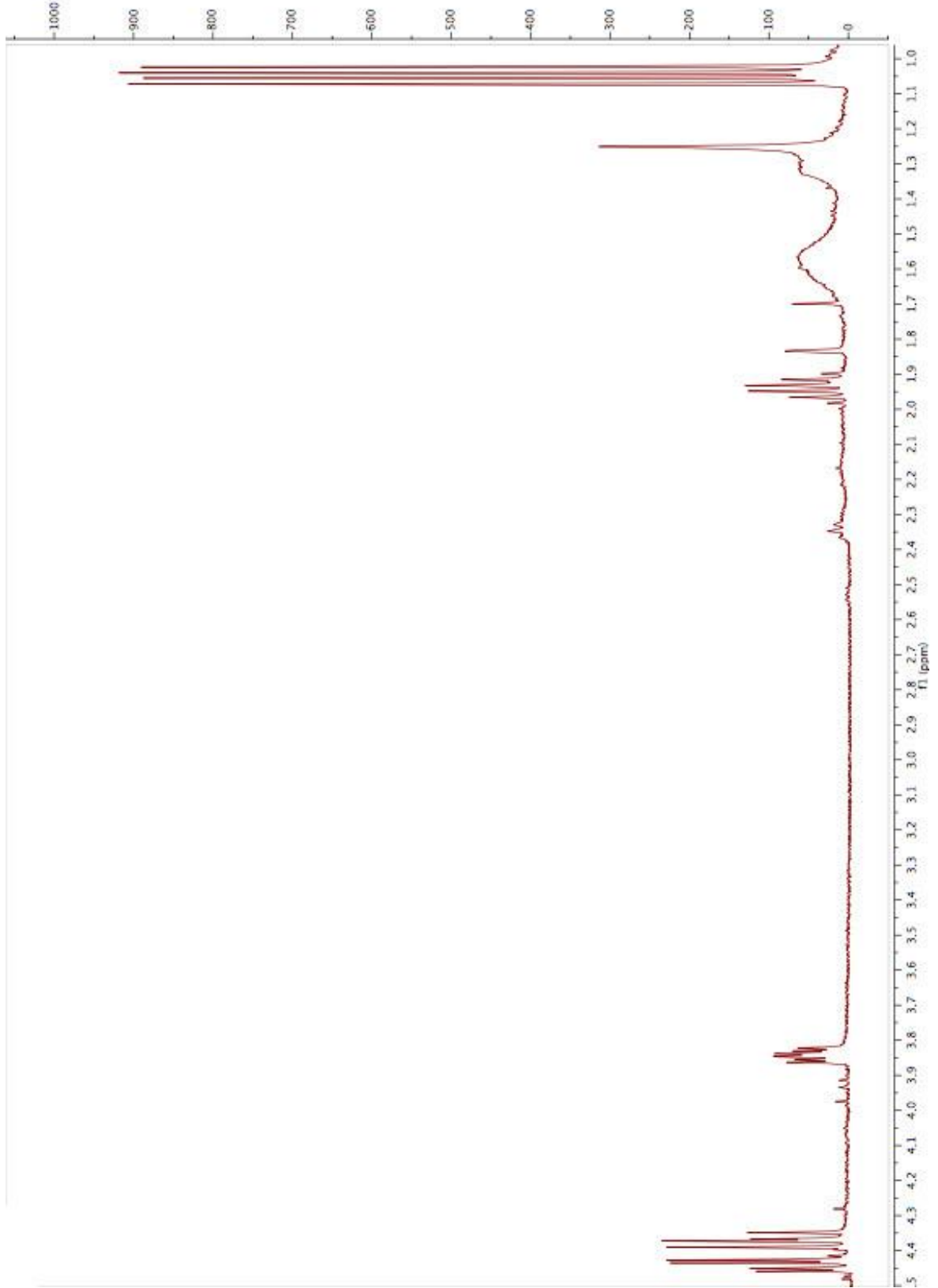
Şekil 4.19. Pranferol

Resim 4.52. NP-14 kodlu bileşğin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

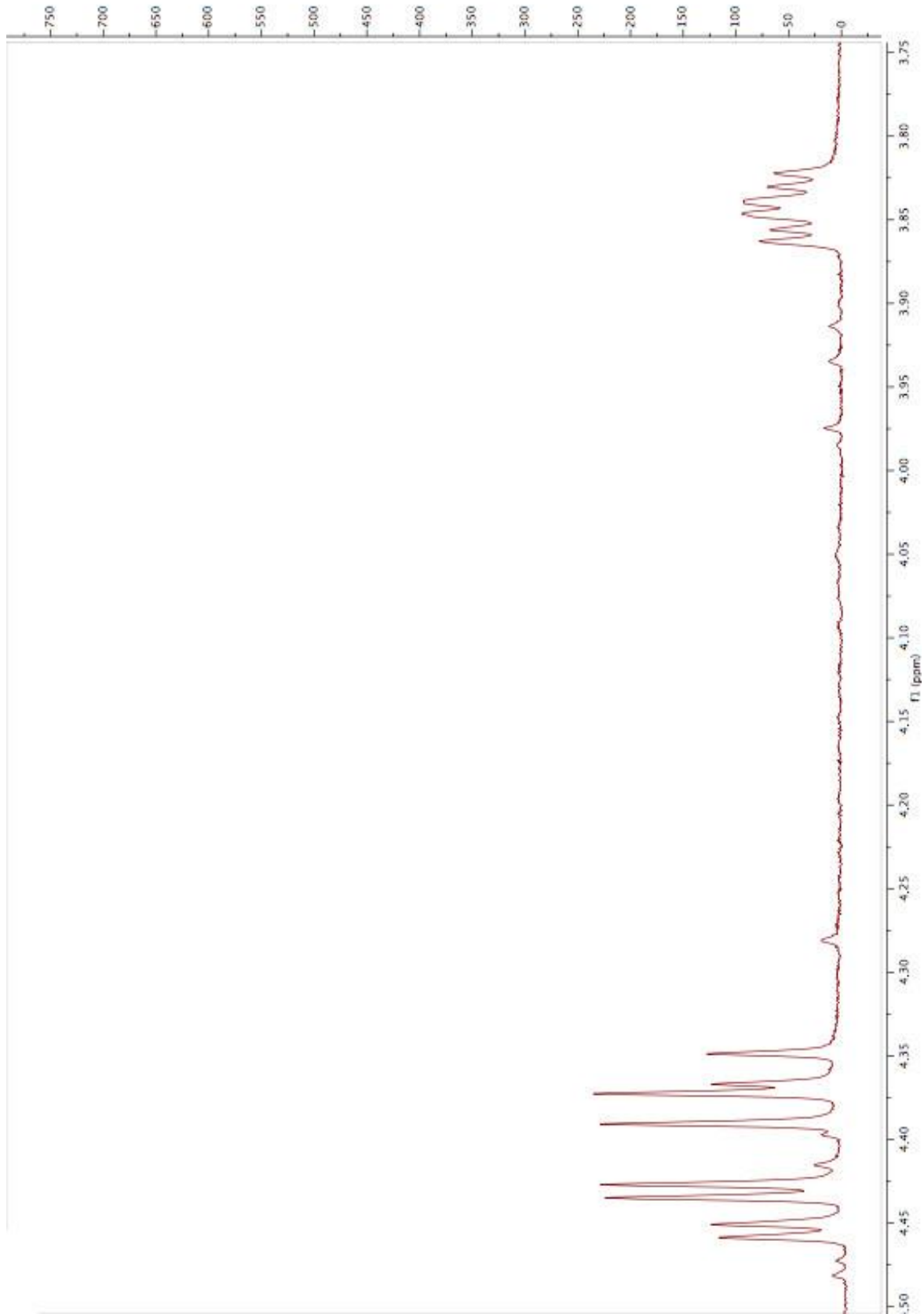




Resim 4.53. NP-14 kodlu bileşimin aromatik bölgesinin genişletilmiş <sup>1</sup>H NMR spektrumu



Resim 4.54. NP-14 kodlu bileşimin alifatik bölgesinin genişletilmiş  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

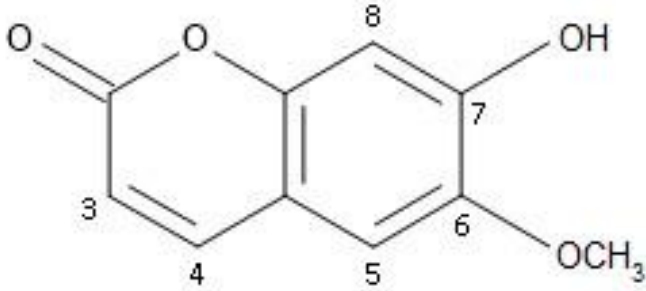


Resim 4.55. NP-14 kodlu bileşğin H1" ve H2" proton sinyallerinin genişletilmiş  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

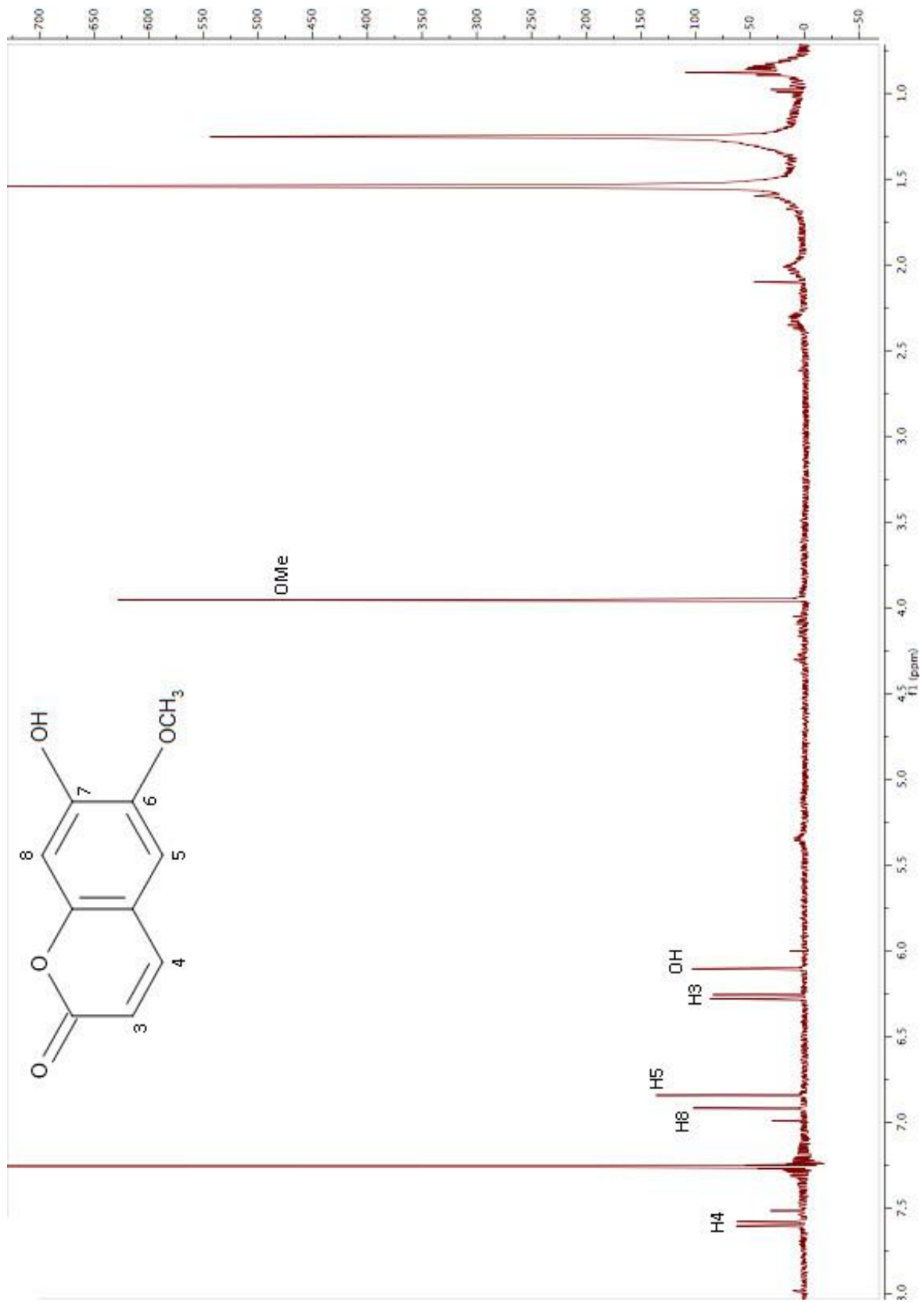
#### 4.2.15. NP-15 kodlu bileşiğe ait bulgular

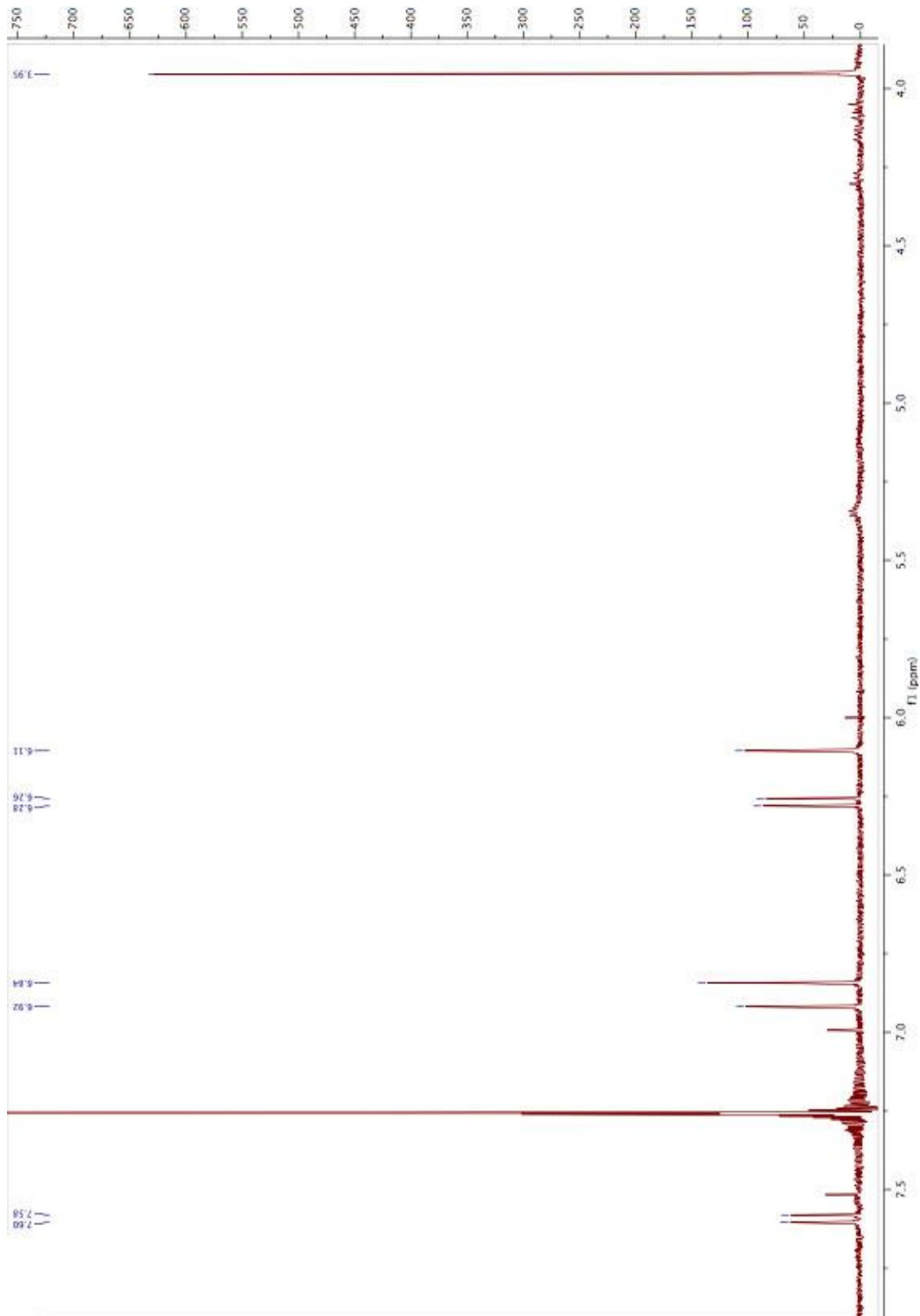
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).  $\delta$  ppm: 7,60 (1H, *d*,  $J = 9,5$  Hz, H-4); 6,92 (1H, *s*, H-8); 6,84 (1H, *s*, H-5); 6,26 (1H, *d*,  $J = 9,5$  Hz, H-3); 6,11 (1H, *s*, 7-OH); 3,96 (3H, *s*, 6-OMe).

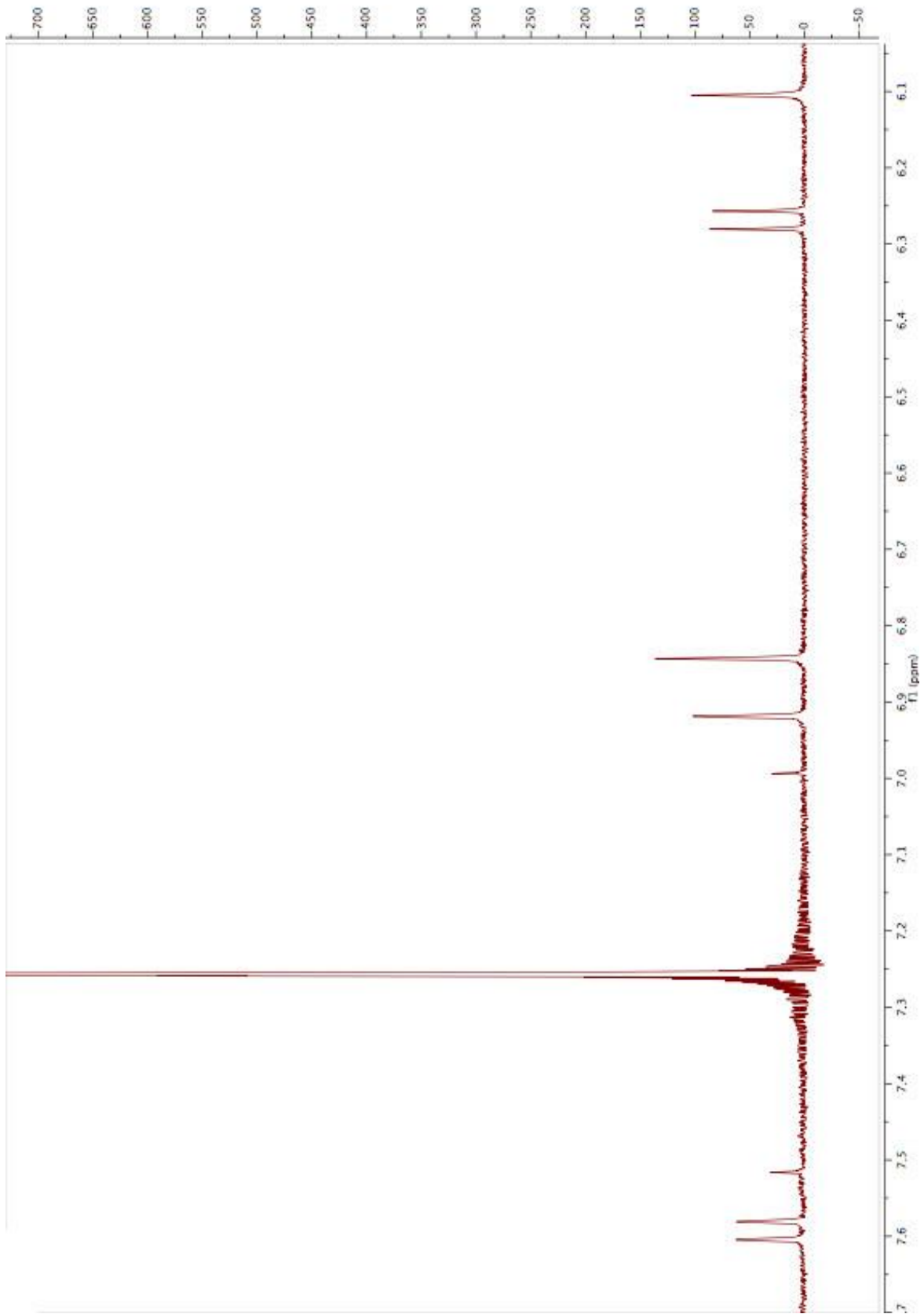
NP-15 kodlu bileşiğinin  $^1\text{H}$  NMR spektrumunda aromatik bölgede bulunan ve aromatik bölgenin uçlarına kayan  $\delta$  7,60 ve 6,26 (sırasıyla H-4 ve H-3) sinyalleri kumarin yapısını göstermektedir. Aromatik bölgede  $\delta$  6,84 ve 6,92'de singlet iki sinyal görülmektedir. Bu sinyallerin singlet olması ve aromatik bölgede bulunması birbiriyle komşu olmayan ve komşu karbonlarında sübstitüent bulunan protonlara aittir. Dolayısı ile bu sinyallerin 5. ve 8. konumda bulunan protonlara ait olduğu tespit edilmiştir.  $\delta$  6,11'deki singlet sinyal ise fenolik hidroksil protonu için karakteristiktir. Alifatik bölgede ise  $\delta$  3,96'da 3H büyüklüğünde tek bir sinyal görülmektedir. Bu sinyal ise aromatik halkaya bağlı metoksil grubu için karakteristiktir. Elde edilen veriler skopoletin yapısına işaret etmektedir. Literatür verileri ile uyumlu veriler bileşiğin skopoletin olduğunu doğrulamaktadır [151, 155].



Şekil 4.20. Skopoletin

Resim 4.56. NP-15 kodlu bileşimin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

Resim 4.57. NP-15 kodlu bileşimin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu-2

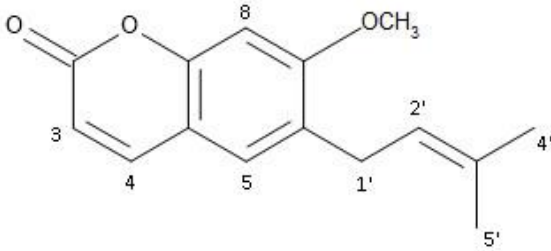


Resim 4.58. NP-15 kodlu bileşimin aromatik bölgesinin genişletilmiş  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

#### 4.2.16. NP-16 kodlu bileşiğe ait bulgular

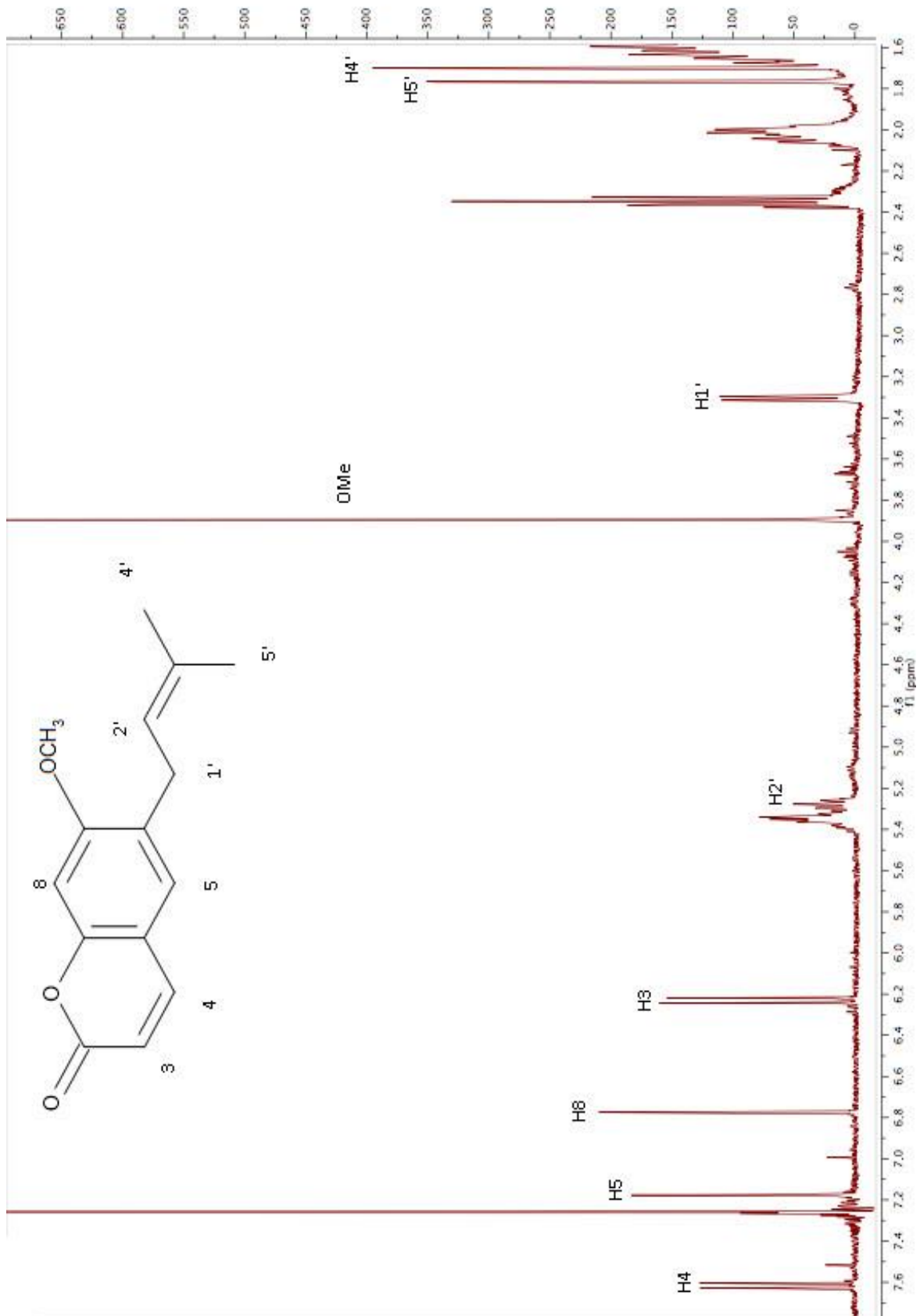
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).  $\delta$  ppm: 7,61 (1H, *d*,  $J = 9,5$  Hz, H-4); 7,18 (1H, *s*, H-5); 6,78 (1H, *s*, H-8); 6,21 (1H, *d*,  $J = 9,5$  Hz, H-3); 5,32 (1H, *t*,  $J = 7,2$  Hz, H-2'); 3,90 (3H, *s*, 7-OMe); 3,30 (2H, *d*,  $J = 7,2$  Hz, H-1'); 1,75 (3H, *s*, H-5'); 1,70 (3H, *s*, H-4').

NP-16 kodlu bileşiğin  $^1\text{H}$  NMR spektrumunda aromatik bölgede 1 tane AB sistemi görülmektedir.  $\delta$  7,61 ve 6,21'de bulunan dublet sinyaller (AB sistemi) kumarin varlığını göstermektedir. Aromatik bölgede  $\delta$  7,18 ve 6,78'de 1H büyüklüğünde singlet sinyallerin varlığı aromatik halkada birbiri ile komşu olmayan ve komşu karbondaki proton taşımayan protonları göstermektedir. Alifatik bölgede  $\delta$  3,96'da bulunan sinyal aromatik halkaya komşu metoksil grubunun varlığını göstermektedir.  $\delta$  3,30 ve 5,32'de karakteristik ABX yarılması gözlenmektedir.  $\delta$  3,30'da bulunan 2H büyüklüğünde dublet sinyalin spektrumdaki konumu gereği benzilik protonlar olduğu söylenebilir.  $\delta$  5,32'de 1H büyüklüğünde triplet olan sinyal ise vinilik protonu göstermektedir.  $\delta$  1,70 ve 1,75'de aynı karbondaki bağlı bulunan vinilik metil protonlarını göstermektedir. Alifatik bölgeden anlaşıldığı üzere biri metoksil grubu diğeri izoprenil grubu olmak üzere 2 yan zincir vardır. AB sistemini oluşturan sinyaller sırasıyla 4. ve 3. protona ait olduğunu düşünülmektedir. Singlet sinyaller ise 5. ve 8. konumda bulunan protonlardır. Buna göre maddenin suberozin olduğu ve verilerinin literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir [98,156].



Şekil 4.21. Suberozin

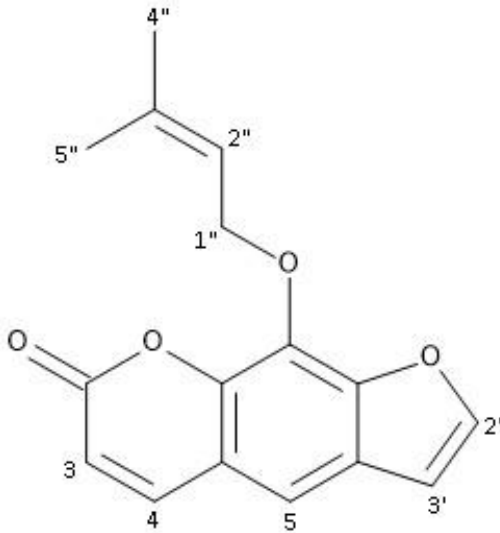


Resim 4.59. NP-16 kodlu bileşğin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

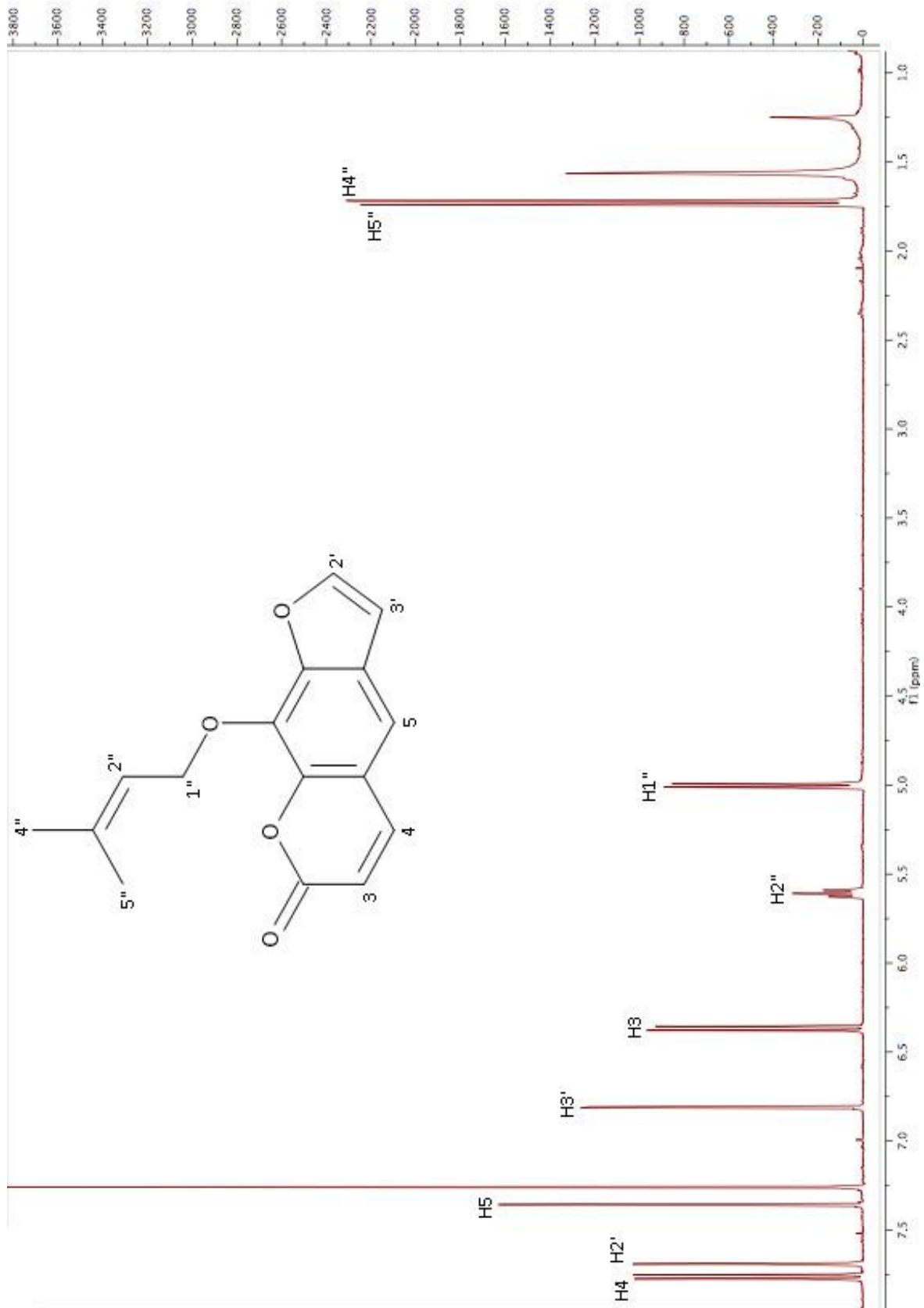
#### 4.2.17. NP-17 kodlu bileşiğe ait bulgular

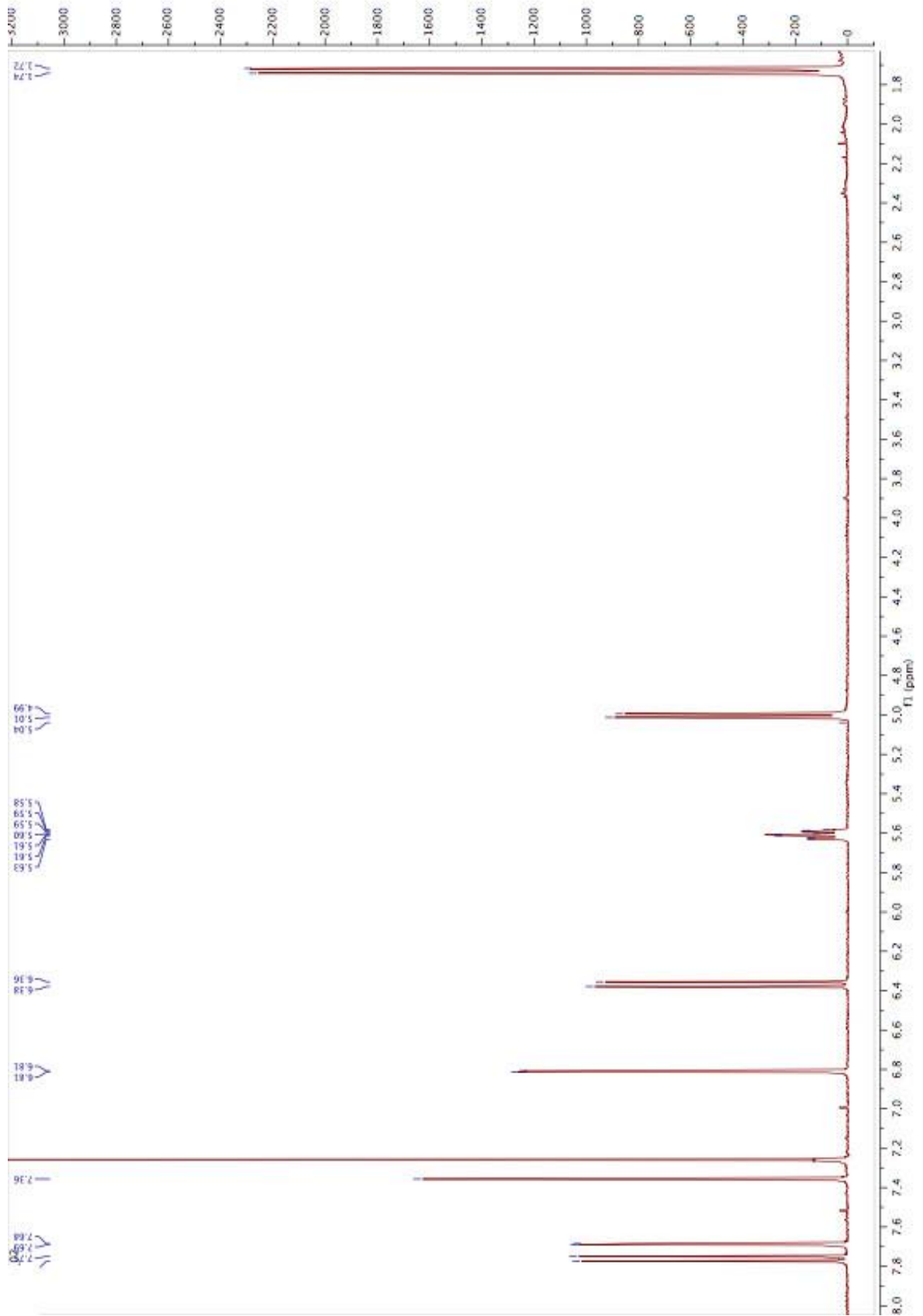
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).  $\delta$  ppm: 7,78 (1H, *d*,  $J = 9,6$  Hz, H-4); 7,67 (1H, *d*,  $J = 2,2$  Hz, H-2'); 7,36 (1H, *s*, H-5); 6,81 (1H, *d*,  $J = 2,2$  Hz, H-3'); 6,36 (1H, *d*,  $J = 9,6$  Hz, H-3); 5,60 (1H, *t*,  $J = 7,3$  Hz, H-2''); 5,00 (2H, *d*,  $J = 7,3$  Hz, H-1''); 1,74 (3H, *s*, H-5''); 1,72 (3H, *s*, H-4'').

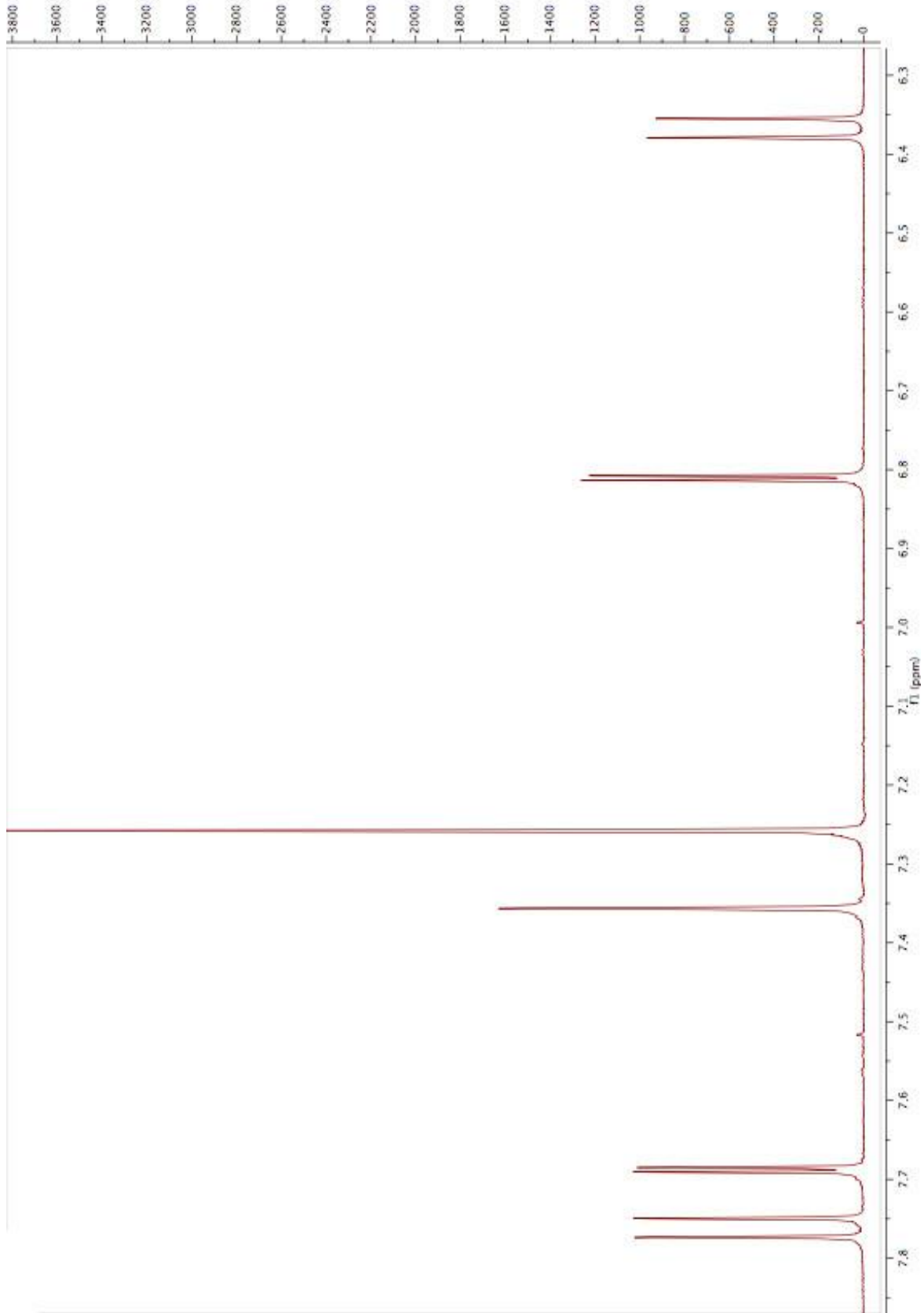
NP-17 kodlu bileşiğin  $^1\text{H}$  NMR spektrumunda aromatik bölgede  $\delta$  7,78 ve 6,36 ile  $\delta$  7,67 ve 6,81 sinyalleri AB sistemini göstermektedir. Buradan furanokumarin yapısı olduğu anlaşılmaktadır. Aromatik bölgede  $\delta$  7,36'da bulunan singlet sinyal ise 5. veya 8. konumda bulunan protonu göstermektedir. 5. konumda olsa  $\delta$  7,78'de bulunan 4. karbona bağlı protonun sinyalinin daha düşük alana kayması gerektiği için bu protonun 8. konumda olduğunu anlamaktayız. Alifatik bölgede üst alanda tetrametilsilan sinyaline en yakın konumda  $\delta$  1,72 ve 1,74 singlet sinyalleri aynı karbona komşu metil protonlarını göstermektedir.  $\delta$  5,00 ve 5,60'ta bulunan sinyaller karakteristik ABX yarılması göstermektedir.  $\delta$  5,00'da bulunan 2H büyüklüğündeki dublet sinyal benzilik proton olsa  $\delta$  3-3,5 arasında olması gerekmekte iken  $\delta$  5,00'a kayması oksijene komşu olduğunu ifade etmektedir.  $\delta$  5,60'ta bulunan triplet sinyal vinilik protonu göstermektedir. Tüm bu verilerden bileşiğin NP-2 kodlu isoimperatorin bileşiğinin izomeri olan imperatorin olduğu anlaşılmaktadır. Elde edilen veriler literatür verileri ile uyumludur [123, 136, 137].



Şekil 4.22. İmperatorin

Resim 4.60. NP-17 kodlu bileşğin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu-1

Resim 4.61. NP-17 kodlu bileşimin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu-2



Resim 4.62. NP-17 kodlu bileşimin aromatik bölgesinin genişletilmiş  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



## 5. TARTIŞMA

*Neocryptodiscus papillaris* bitkisinin hem kök hem de meyvelerinden majör bileşik olarak izole ettiğimiz ostol'ün antienflamatuar [64, 65], antitümör [15, 16, 69, 70], antibakteriyel [87], karaciğer yağlanmasını inhibe edici [111, 112], erektil disfonksiyon tedavi edici [117], osteoblastların farklılaşmasını stimüle edici [102-104], antikonvülzan [108, 109] aktivitelerinin olduğu bilinmektedir. Tez çalışmamız kapsamında MTT yöntemi ile ve MCF-7 hücre hattı üzerinde yapılan sitotoksik aktivite çalışmasında ostol 25 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığını % 71.85 oranında inhibe etmiştir. Kök petrol eteri ekstresinin miktarı en fazla olan ve 25 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığını % 75.58 oranında inhibe eden fraksiyonundan majör bileşik olarak izole ettiğimiz ostol sitotoksik aktiviteden sorumlu bileşik olarak belirlenmiştir. Literatür bilgileri [13, 14, 71] incelendiğinde ostol'ün MCF-7 hücre hattı üzerinde yapılan çalışmalarda sitotoksik aktivite gösterdiği, hazırlanan türevlerinde bu etkinin artmış olduğu ve bu nedenle üzerinde meme kanseri tedavisinde kullanılmak üzere ilaç geliştirme çalışmaları yapılabileceğinin belirtildiği [71] görülmektedir. Bu fraksiyondan yeni bileşik olarak izole ettiğimiz 4'-senesioiloksi-ostol, 4'-asetoksi-ostol ve ostol türevi olan NP-5 kodlu bileşiğin de fraksiyonda görülen aktiviteye katkıları olmuş olabilir, bu bileşiklerin miktarını arttırarak aktivitelerini tayin etmek için çalışmalarımıza devam etmekteyiz. Aynı fraksiyondan izole ettiğimiz izoimperatorin'in antienflamatuar [59,157] ve analjezik [157] aktivitesinin yanı sıra sitotoksik [70] aktivitesinin de olduğu bilinmektedir. Ancak MCF-7 hücre hattı üzerinde denendiğine dair bir bilgiye rastlamadık. Yaptığımız sitotoksik aktivite çalışmasında izoimperatorin ostol kadar yüksek aktivite göstermemiş, 250 µg/ml konsantrasyonda aktivite göstermiştir. Literatür bilgisine baktığımızda da ostol ve izoimperatorin üzerinde yapılan sitotoksik aktivite çalışmasında [70] bazı hücre hatları üzerine izoimperatorin'in ostol'den çok daha yüksek konsantrasyonda aktivite göstermiş olduğunu görüyoruz.

Izole ettiğimiz bileşiklerden oksipösedanin'in antibakteriyel [143], antioksidan [93], antikolinesteraz [101] aktivitelerin yanı sıra sitotoksik [77] aktivitesinin de olduğu bilinmekle birlikte MCF-7 hücre hattı üzerinde denendiğine dair bir bilgiye rastlamadık. Sitotoksik aktivite tayini çalışmamızda oksipösedanin hücre canlılığını

100 µg/ml konsantrasyonda % 49,53 oranında inhibe etmiştir. Bu bileşiği izole ettiğimiz fraksiyon ise hücre canlılığını 100 µg/ml konsantrasyonda % 85,48 oranında inhibe etmiştir. Bu fraksiyondan izole ettiğimiz ostol türevi yeni bileşik ostol-4'-nikotinat ve bitkilerden ilk kez tarafımızdan izole edilmiş olan 4'-hidroksi-ostol bileşiğinin de fraksiyonda görülen aktiviteye katkıları olmuş olabilir, bu bileşiklerin de miktarını arttırarak aktivitelerini tayin etmek için çalışmalarımıza devam etmekteyiz.

Meyve materyalinden izole ettiğimiz bileşiklerden imperatorin'in de antibakteriyel [84-88], antifungal [86, 88], antioksidan [97], antikolinesteraz [100, 101], anksiyolitik [105, 106], antikonvülsan [109, 110] ve hafıza güçlendirici [116], etkilerinin yanı sıra sitotoksik [72-76] aktivitesinin de olduğu ve MCF-7 hücre hattı üzerinde yüksek olmamakla birlikte sitotoksik aktivite gösterdiği açıklanmıştır [73].

İzole ettiğimiz bileşiklerden bergapten'in kolon ve serviks karsinom hücre hattı [78] üzerinde sitotoksik, suberozin'in [156] ise insan periferik kan mononükleer hücreleri üzerine antiproliferatif aktivite göstermiş olduğu bilinmektedir.

İzole ettiğimiz bileşiklerden oksipösedanin hidrat'ın antimikrobiyal [143], antioksidan [93], antikolinesteraz [101]; skoparon'un karaciğer koruyucu [158], antialerjik [159], antiinflamatuvar [160], antioksidan [161], skopoletin'in antibakteriyel [162], antifungal [163], antiviral [164], antiinflamatuvar [165] ve antiproliferatif [166] aktivitelerinin olduğu bilinmektedir.

4'-senesioiloksi-ostol, 4'-asetoksi-ostol, ostol-4'-nikotinat, NP-5 ve NP-6 bileşikleri ilk kez tarafımızdan izole edilmiş ve literatüre kazandırılmış olan yeni bileşiklerdir. 4'-hidroksi-ostol bileşiği daha önce ostol ile sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda metabolit olarak saptanmış, ayrıca ostol'ün mikrobiyal transformasyonu ile de elde edilmiş olmakla birlikte bitkilerden ilk defa tarafımızdan izole edilmiştir. İzole ettiğimiz bu bileşiklerin bulunduğu fraksiyonlarda sitotoksik aktivite görülmüştür. Ancak bileşikleri yeterli miktarda elde edemediğimiz için aktiviteleri incelenememiştir. Bu bileşiklerin yeniden elde edilerek ve yarı sentez yoluyla miktarının artırılması çalışmalarına devam etmekteyiz.



## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Haziran 2013'te Şanlıurfa İli Viranşehir İlçesinden toplanan *Neocryptodiscus papillaris* (Boiss.) Herrnsadt.& Heyn. bitkisi sitotoksik aktivite yönünden incelenmiş ve aktiviteden sorumlu bileşik/bileşikler araştırılmıştır.

Bitki kökünün petrol eteri ekstresinden kolon kromatografisi ve preparatif ince tabaka kromatografisi yöntemleri kullanılarak elde edilen ve saflaştırılan bileşikler spektral özelliklerinden yararlanılarak stigmasterol, izoimperatorin, ostol, 4'-senesioiloksi-ostol, NP-5, NP-6, 4'-asetoksi-ostol, oksipösedanin hidrat, ostol 4'-nikotinat, 4'-hidroksi-ostol, oksipösedanin, skoparon, bergapten, psoralen, pranferol ve skopoletin olarak teşhis edilmiştir. Literatürde 4'-senesioiloksi-ostol, NP-5, NP-6, 4'-asetoksi-ostol ve ostol-4'-nikotinat isimli bileşiklerin daha önce izole edilmiş olduğuna dair herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Dolayısıyla bu bileşikler ilk kez tarafımızdan izole edilmiş ve literatüre kazandırılmıştır. 4'-hidroksi-ostol bileşiğinin bitkilerden izolasyonu da ilk defa tarafımızdan yapılmıştır. Bitki meyvesinin petrol eteri ve diklorometan ekstresi karışımından yine kolon kromatografisi ve preparatif ince tabaka kromatografisi yöntemleri kullanılarak elde edilen ve saflaştırılan bileşikler spektral özelliklerinden yararlanılarak stigmasterol, izoimperatorin, ostol, 4'-senesioiloksi-ostol, oksipösedanin, skoparon, bergapten, psoralen, suberozin ve imperatorin olarak teşhis edilmiştir. Meyve ekstresinde kök ekstresinden farklı olarak suberozin ve imperatorin izole edilmiştir. Literatürde *Neocryptodiscus papillaris* bitkisinin üzerinde uçucu yağ analizi [17] dışında, bitkinin fitokimyasal içeriği ve sitotoksik aktivitesi yönünden incelendiğine dair başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. *Neocryptodiscus papillaris* bitkisi kimyasal içerik ve sitotoksik aktivite yönünden ilk kez tarafımızdan incelenmiştir.

Bitkiden elde edilen ekstralar, ekstre fraksiyonları ve fraksiyonlardan elde edilen yeterli miktardaki bileşikler sitotoksik aktivite yönünden incelenmiştir. Sitotoksik aktivite tayini MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difenil tetrazolium bromid] yöntemiyle MCF-7 (meme kanseri hücresi) hücre hattı üzerinde yapılmıştır. Kök petrol eteri ekstresinin fraksiyonlarından 5 tanesi farklı konsantrasyonlarda aktivite göstermiştir. En yüksek aktivitenin görüldüğü D fraksiyonundan 6 bileşik izole edilmiş ve teşhis

edilmiştir. Bu fraksiyonda miktarı en fazla olan bileşik D fraksiyonunun % 63,32 sini oluşturan ostol isimli bileşiktir. Ostol 25 µg/ml konsantrasyonda % 71,85 inhibisyon göstermiş ve sitotoksik aktiviteden sorumlu bileşik olarak belirlenmiştir. Bu fraksiyondan izole edilen izoimperatorin ostol kadar yüksek aktivite göstermemiş, 250 µg/ml konsantrasyonda aktivite göstermiştir. Yeni bileşik olarak izole ettiğimiz 4'-senesioiloksi-ostol, 4'-asetoksi-ostol ve ostol türevi olan NP-5 kodlu bileşiğin de bu fraksiyonun 25 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığını % 75.58 oranında inhibe ederek göstermiş olduğu aktivitesine katkısı olmuş olabilir, bu bileşiklerin miktarını arttırarak aktivitelerini tayin etmek için çalışmalarımıza devam etmekteyiz. Sitotoksik aktivite tayini çalışmamızda oksipösedanin hücre canlılığını 100 µg/ml konsantrasyonda % 49,53 oranında inhibe etmiştir. Bu bileşiği izole ettiğimiz E fraksiyonu ise hücre canlılığını 100 µg/ml konsantrasyonda % 85,48 oranında inhibe etmiştir. Bu fraksiyondan izole ettiğimiz ostol türevi yeni bileşik ostol-4'-nikotinat ve bitkilerden ilk kez tarafımızdan izole edilmiş olan 4'-hidroksi-ostol bileşiğinin de fraksiyonda görülen aktiviteye katkıları olmuş olabilir, bu bileşiklerin de miktarını arttırarak aktivitelerini tayin etmek için çalışmalarımıza devam etmekteyiz.

Literatür araştırmamız neticesinde, meyvelerinden elde edilen uçucu yağın analizi dışında, üzerinde herhangi bir çalışmaya rastlamadığımız *Neocryptodiscus papillaris* bitkisi tarafımızdan fitokimyasal olarak ve sitotoksik aktivitesi yönünden incelenmiştir. En yüksek aktivitenin görüldüğü fraksiyondan majör bileşik olarak izole ettiğimiz ostol, aktivitesini incelediğimiz bileşikler arasında en yüksek sitotoksik aktivite gösteren bileşiktir. Literatür bilgileri incelendiğinde ostol'un çok değişik biyolojik aktiviteler gösterilmiş olduğu, hazırlanacak türevleri üzerinde meme kanserinde etkili ilaç geliştirme çalışmaları yapılmasının önerildiği görülmektedir. *N. papillaris* bitkisinin köklerinden elde ettiğimiz petrol eteri ve diklorometan ekstralarının miktarı birlikte değerlendirildiğinde verim yüksektir ve ekstrenin neredeyse dörtte birini ostol oluşturmaktadır. O nedenle bu bitkinin ostol yönünden değerlendirilebileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca bitkiden elde edilen minör bileşiklerin miktarı arttırılarak aktivitelerine bakılması gerektiğini de düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. Hedge, I.C., ve Lamond, J. M. (1987). *Neocryptodiscus*. In K. H. Rechinger (Ed.), *Flora Iranica*. Graz: Akademische Druck-u. Verlagsanstalt, 162, 207-209.
2. İnternet: *Neocryptodiscus papillaris*. 2016-02-28.  
URL:<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=Neocryptodiscus>.  
<http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.theplantlist.org%2Ftpl1.1%2Fsearch%3Fq%3DNeocryptodiscus&date=2016-02-28> Son Erişim Tarihi: 28.02.2016.
3. Herrnstadt, I., ve Heyn, C. C. (1972). *Prangos* Lindl. In P. H. Davis (Ed.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh: Edinburgh University Press, 4, 387-388.
4. Özhatay, F. N., Kültür, Ş., ve Gürdal, M. B. (2011). Check-list of additional taxa to the supplement Flora of Turkey V. *Turkish Journal of Botany*, 35(5), 589-624.
5. Herrnstadt, I., ve Heyn, C. C. (1997). *Neocryptodiscus papillaris* (Boiss.) Herrnst. and Heyn: a new combination based on *Cachrys papillaris* Boiss. *Candollea*, 52(1), 181-184.
6. Murray, R. D. H., Mendez, J., ve Brown, S. A. (1982). *The natural coumarins. Occurance, Chemistry and Biochemistry*. Chicester: John Wiley & Sons. 1-100.
7. Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. (Second Edition). Hampshire: Intercept Ltd, 263-277.
8. Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., ve Williamson, E. M. (2004). *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 59-129.
9. Robbers, J. E., Speedie, M. K., ve Tyler, V. E. (1996). *Pharmacognosy and pharmacobiotechnology*. Baltimore: Williams & Wilkins a Waverly Company, 1-50.
10. Gliszczyńska, A., ve Brodelius, P. E. (2012). Sesquiterpene coumarins. *Phytochemistry Reviews*, 11(1), 77-96.
11. Roszkopf, F., Kraus, J., ve Franz, G. (1992). Immunological and antitumor effects of coumarin and some derivatives. *Die Pharmazie*, 47(2), 139-142.
12. Nazari, Z. E., ve Iranshahi, M. (2011). Biologically active sesquiterpene coumarins from *Ferula* species. *Phytotherapy Research*, 25(3), 315-323.
13. DaPeng, Y., TianWei, G., Ting, W., QingJiu, T., ve Chang Yan, M. (2010). Effects of osthole on migration and invasion in breast cancer cells. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 74(7), 1430-1434.
14. Hung, C. M., Kuo, D. H., Chou, C. H., Su, Y. C., Ho, C. T., ve Way, T. D. (2011). Osthole suppresses hepatocyte growth factor (HGF)-induced epithelial-

- mesenchymal transition via repression of the c-Met/Akt/mTOR pathway in human breast cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(17), 9683-9690.
15. Zhang, L., Jiang, G., Yao, F., He, Y., Liang, G., Zhang, Y., Hu B., Wu Y., Li Y., ve Liu, H. (2012). Growth inhibition and apoptosis induced by osthole, a natural coumarin, in hepatocellular carcinoma. *PloS One*, 7(5), 1-9.
  16. Shokoohinia, Y., Sajjadi, S. E., Gholamzadeh, S., Fattahi, A., ve Behbahani, M. (2014). Antiviral and cytotoxic evaluation of coumarins from *Prangos ferulacea*. *Pharmaceutical Biology*, 52(12), 1543-1549.
  17. Özek, G., Duran, A., Öztürk, M., ve Başer, K. H. C. (2010, 16-18 Ekim). *Neocryptodiscus papillaris* (Boiss.) *Hernst&Heyn* bitkisinin uçucu yağ kompozisyonu. 19. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısında sunuldu, Mersin.
  18. Nikonov, G. K., ve Saidkhodzhaev, A. I. (1971). The coumarins of *Cryptodiscus didymus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 7(1), 103.
  19. Ignat'eva, N. S., Vandyshev, V. V., ve Pimenov, M. G. (1974). Coumarins of the roots of *Cryptodiscus didymus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 10(4), 521-521.
  20. Baytop, A. (1983). *Farmasötik Botanik*, İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayınları, 50-55.
  21. Tanker, N., Koyuncu, M., ve Coşkun, M. (1998). *Farmasötik Botanik, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ders Kitapları No:78*. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi, 311-313.
  22. Trease, G. E., ve Evans, W. C. (2009). *Pharmacognosy* (Sixteenth Edition). London: Elsevier Limited, 133-148.
  23. Heywood, V. H. (1979). *Flowering Plants of the World*. London: Oxford University Press, 63-80.
  24. Polunin, O. (1997). *Flowers of Europa*. New York: Oxford University Press, 9-24.
  25. Talapatra, S. K., ve Talapatra, B. (2015). *Chemistry of Plant Natural Products*. Verlag: Springer, 642-678.
  26. Iranshahi, M., Askari, M., Sahebkar, A., ve Adjipavlou-Litina, D. (2015). Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory and lipoxygenase inhibitory activities of the prenylated coumarin umbelliprenin. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17(2), 99-103.
  27. Venugopala, K.N., Rashmi, V., ve Odhav, B. (2013). Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity. *Biomed Research International*. 1-14.

28. Lacy, A., ve O'kennedy, R. (2004). Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 10(30), 3797-3811.
29. Bogdał, D. (1998). Coumarins: fast synthesis by Knoevenagel condensation under microwave irradiation. *Journal of Chemical Research*, (8), 468-469.
30. Bourgaud, F., Hehn, A., Larbat, R., Doerper, S., Gontier, E., Kellner, S., ve Matern, U. (2006). Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry Reviews*, 5(2-3), 293-308.
31. Stanjek, V., ve Boland, W. (1998). Biosynthesis of angular furanocoumarins: mechanism and stereochemistry of the oxidative dealkylation of columbianetin to angelicin in *Heracleum mantegazzianum* (Apiaceae). *Helvetica Chimica Acta*, 81(9), 1596-1607.
32. Brown, S. A., ve Sampathkumar, S. (1977). The biosynthesis of isopimpinellin. *Canadian Journal of Biochemistry*, 55(7), 686-692.
33. Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J., ve Kowalska, T. (Editors). (2008). *Thin layer chromatography in phytochemistry*. Boca Raton: CRC Press, 365-397.
34. Martin, C. K., Baker, B. A., ve Byrde, R. J. W. (1966). Fungi toxicities of plant furanocoumarins. *Annals of Applied Biology*, 57(3), 501-508.
35. Wagner, H., ve Bladt, S. (1996). *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas* (Second edition). Dordrecht: Springer Science & Business Media, 125-146.
36. Ganzera, M., Sturm, S., ve Stuppner, H. (1997). HPLC-MS and MECC analysis of coumarins. *Chromatographia*, 46(3-4), 197-203.
37. Wu, C. M., Koehler, P. E., ve Ayres, J. C. (1972). Isolation and identification of xanthotoxin (8-methoxypsoralen) and bergapten (5-methoxypsoralen) from celery infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. *Applied Microbiology*, 23(5), 852-856.
38. Nyiredy, S., Dallenbach-Toelke, K., Zogg, G. C., ve Sticher, O. (1990). Strategies of mobile phase transfer from thin-layer to medium-pressure liquid chromatography with silica is the stationary phase. *Journal of Chromatography A*, 499, 453-462.
39. Glowniak, K., Matysik, G., Bieganowska, M., ve Soczewiński, E. (1986). Gradient thin-layer chromatography of coumarins and furocoumarins. *Chromatographia*, 22(7-12), 307-310.
40. Hoerhammer, L., Wagner, H., ve Lay, B. (1960). Investigation in pharmacognosy. I. Detecting adulteration of *Pimpinella saxifraga* root by *Heracleum sphondylium* root by means of thin layer chromatography. *Pharmazie* 15, 645-7.

41. Hoerhammer, L., Wagner, H., ve Kraemer-Heydweiller, D. (1966). New methods in pharmacognostic instruction. XII. Identification of umbelliferen roots and detection of important falsification by means of thin-layer chromatography. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 106(9), 267-272.
42. Zogg, G. C., Nyiredy, S., ve Sticher, O. (1989). Preparative medium pressure liquid chromatographic (MPLC) and semipreparative HPLC separation of furocoumarin isomers. *Chromatographia*, 27(11-12), 591-595.
43. Kozyra, M., Głowniak, K., Zabża, A., Zgórk, G., Mroczek, T., Cierpicki, T., Kulesza J., ve Mudło, I. (2005). Column chromatography and preparative TLC for isolation and purification of coumarins from *Peucedanum verticillare* L. Koch ex DC. *Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 18(103), 224-227.
44. Hadaček, F., Müller, C., Werner, A., Greger, H., ve Proksch, P. (1994). Analysis, isolation and insecticidal activity of linear furanocoumarins and other coumarin derivatives from *Peucedanum* (Apiaceae: Apioideae). *Journal of Chemical Ecology*, 20(8), 2035-2054.
45. Abraham, J. P., Joe, I. H., George, V., Nielsen, O. F., ve Jayakumar, V. S. (2003). Vibrational spectroscopic studies on the natural product, columbianadin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 59(1), 193-199.
46. Zogg, G. C., Nyiredy, S., ve Sticher, O. (1989). Apiaceenwurzeln. Qualitative und quantitative Furanocoumarinbestimmung in Apiaceenwurzeln. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 129, 717-722.
47. Liu, J. H., Zschocke, S., Reininger, E., ve Bauer, R. (1998). Comparison of Radix *Angelicae pubescentis* and substitutes-Constituents and inhibitory effect on 5-lipoxygenase and cyclooxygenase. *Pharmaceutical Biology*, 36(3), 207-216.
48. Okuyama, T., Takata, M., Takahashi, K., Ishikawa, T., Miyasaka, K., ve Kaneyama, N. (1989). High-performance liquid chromatographic analysis of naturally occurring glycosides and saponins. *Journal of Chromatography A*, 466, 390-398.
49. Qutinen, K., Haario, H., Vuorela, P., Nyman, M., Ukkonen, E., ve Vuorela, H. (1998). Optimization of selectivity in high-performance liquid chromatography using desirability functions and mixture designs according to PRISMA. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(3), 197-205.
50. Liu, L., Wang, Y., Xin, H. L., Fan, G. R., Zhang, Q. Y., Upton, R., ve Qin, L. P. (2012). Chemical diversity of *Cnidium monnieri* Cusson in China assessed by reversed phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC) analysis. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(13), 2559-2566.
51. Dewick, P. M. (1997). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. Chicester: John Wiley & Sons Ltd, 141-143.

52. Kerimov, S. S., ve Dranitsyna, Y. A. (1965). Investigation of the coumarins and furocoumarins of *Hippomarathrum caspium* (DC.) Grossh. *Chemistry of Natural Compounds*, 1(5), 280-282.
53. Sajjadi, S. E., Zeinvand, H., ve Shokoohinia, Y. (2009). Isolation and identification of osthol from the fruits and essential oil composition of the leaves of *Prangos asperula* Boiss. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 4(1), 19-23.
54. Liu, R., Feng, L., Sun, A., ve Kong, L. (2004). Preparative isolation and purification of coumarins from *Cnidium monnieri* (L.) Cusson by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1055(1), 71-76.
55. Tjahjandarie, T. S. (2014). Coumarins from the stem bark of *Feronia limonia*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(12), 499-504.
56. Wang, K. Y., Yao, L., Du, Y. H., Xie, J. B., Huang, J. L., ve Yin, Z. Q. (2011). Anthelmintic activity of the crude extracts, fractions, and osthole from *Radix angelicae pubescentis* against *Dactylogyrus intermedius* in goldfish (*Carassius auratus*) in vivo. *Parasitology Research*, 108(1), 195-200.
57. Xing, J., Cao, H., Chen, Y., Shui, C., Shan, T., ve Hu, D. (2013). An LC-MS/MS Method for Determination of Imperatorin and Isoimperatorin in Rat Plasma and Application to a Pharmacokinetic Study. *Pharmacology & Pharmacy*, 4(5), 417.
58. Murquez, N., Sancho, R., Ballero, M., Bremner, P., Appendino, G., ve Fiebich, B. L. (2004). Imperatorin inhibits T-cell proliferation by targeting the transcription factor NFAT. *Planta Medica*, 70, 1-6.
59. Moon, L., Ha, Y. M., Jang, H. J., Kim, H. S., Jun, M. S., Kim, Y. M., Lee, Y. S., Lee, H. D., Son, K. H., Kim, H. J., Seo, H. G., Lee, J. H., Kim, Y. S., ve Chang, K. C. (2011). Isoimperatorin, cimicide E and 23-O-acetylshengmanol-3-xyloside from *Cimicifugae rhizome* inhibit TNF- $\alpha$ -induced VCAM-1 expression in human endothelial cells: involvement of PPAR- $\gamma$  upregulation and PI3K, ERK1/2, and PKC signal pathways. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 336-344.
60. Lino, C. S., Taveira, M. L., Viana, G. S. B., ve Matos, F. J. A. (1997). Analgesic and antiinflammatory activities of *Justicia pectoralis* Jacq and its main constituents: coumarin and umbelliferone. *Phytotherapy Research*, 11(3), 211-215.
61. Hoult, J. R. S., Forder, R. A., de las Heras, B., Lobo, I. B., ve Payá, M. (1994). Inhibitory activity of a series of coumarins on leukocyte eicosanoid generation. *Agents and Actions*, 42(1-2), 44-49.
62. Tandan, S. K., Chandra, S., Tripathi, H. C., ve Lal, J. (1990). Pharmacological actions of seselin, a coumarin from *Seseli indicum* seeds. *Fitoterapia*, 61(4), 360-363.
63. Liao, P. C., Chien, S. C., Ho, C. L., Wang, E. I. C., Lee, S. C., Kuo, Y. H., Jeyashoke, N., Chen, J., Dong, W. C., Chao, L. K., ve Hua, K. F. (2010). Osthole regulates inflammatory mediator expression through modulating NF- $\kappa$ B,

- mitogen-activated protein kinases, protein kinase C, and reactive oxygen species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10445-10451.
64. Chen, X., Pi, R., Zou, Y., Liu, M., Ma, X., Jiang, Y., Mao, X., ve Hu, X. (2010). Attenuation of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57 BL/6 mice by osthole, a natural coumarin. *European Journal of Pharmacology*, 629(1), 40-46.
65. Lopez-Gonzalez, J. S., Prado-Garcia, H., Aguilar-Cazares, D., Molina-Guarneros, J. A., Morales-Fuentes, J., ve Mandoki, J. J. (2004). Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines. *Lung Cancer*, 43(3), 275-283.
66. Lahouel, M., Zini, R., Zellagui, A., Rhouati, S., Carrupt, P. A., ve Morin, D. (2007). Ferulenol specifically inhibits succinate ubiquinone reductase at the level of the ubiquinone cycle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 355(1), 252-257.
67. Barthomeuf, C., Lim, S., Iranshahi, M., ve Chollet, P. (2008). Umbelliprenin from *Ferula szowitsiana* inhibits the growth of human M4Beu metastatic pigmented malignant melanoma cells through cell-cycle arrest in G1 and induction of caspase-dependent apoptosis. *Phytomedicine*, 15(1), 103-111.
68. Shahverdi, A. R., Saadat, F., Khorramizadeh, M. R., Iranshahi, M., ve Khoshayand, M. R. (2006). Two matrix metalloproteinases inhibitors from *Ferula persica* var. *persica*. *Phytomedicine*, 13(9), 712-717.
69. Jarzab, A., Grabarska, A., Kiełbus, M., Jeleniewicz, W., Dmoszyńska-Graniczka, M., Polberg, K., ve Stepulak, A. (2014). Osthole induces apoptosis, suppresses cell-cycle progression and proliferation of cancer cells. *Anticancer Research*, 34(11), 6473-6480.
70. Shokoohinia, Y., Hosseinzadeh, L., Alipour, M., Mostafaie, A., ve Mohammadi-Motlagh, H. R. (2014). Comparative evaluation of cytotoxic and apoptogenic effects of several coumarins on human cancer cell lines: osthole induces apoptosis in p53-deficient H1299 cells. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2014, 1-8.
71. You, L., An, R., Wang, X., ve Li, Y. (2010). Discovery of novel osthole derivatives as potential anti-breast cancer treatment. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20(24), 7426-7428.
72. Jakubowicz-Gil, J., Paduch, R., Ulz, Z., Badziul, D., Głowniak, K., ve Gawron, A. (2012). Cell death in HeLa cells upon imperatorin and cisplatin treatment. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 50, 381-91.
73. Luo, K. W., Sun, J. G., Chan, J. W., Yang, L., Wu, S. H., Fung, K. P., ve Liu, F. Y. (2011). Anticancer effects of imperatorin isolated from *Angelica dahurica*: induction of apoptosis in HepG2 cells through both death-receptor-and mitochondria-mediated pathways. *Chemotherapy*, 57(6), 449-459.



74. Bądziul, D., Jakubowicz-Gil, J., Langner, E., Rzeski, W., Głowniak, K., ve Gawron, A. (2014). The effect of quercetin and imperatorin on programmed cell death induction in T98G cells in vitro. *Pharmacological Reports*, 66(2), 292-300.
75. Pae, H. O., Oh, H., Yun, Y. G., Oh, G. S., Jang, S. I., Hwang, K. M., Kwon, T. O., Lee, H. S., ve Chung, H. T. (2002). Imperatorin, a furanocoumarin from *Angelica dahurica* (Umbelliferae), induces cytochrome c-dependent apoptosis in human promyelocytic leukaemia, HL-60 cells. *Pharmacology & Toxicology*, 91(1), 40-48.
76. Li, X., Zeng, X., Sun, J., Li, H., Wu, P., Fung, K. P., ve Liu, F. (2014). Imperatorin induces Mcl-1 degradation to cooperatively trigger Bax translocation and Bak activation to suppress drug-resistant human hepatoma. *Cancer Letters*, 348(1), 146-155.
77. Kang, T. J., Lee, S. Y., Singh, R. P., Agarwal, R., ve Yim, D. S. (2009). Anti-tumor activity of oxypeucedanin from *Ostericum koreanum* against human prostate carcinoma DU145 cells. *Acta Oncologica*, 48(6), 895-900.
78. Yang, L. L., Wang, M. C., Chen, L. G., ve Wang, C. C. (2003). Cytotoxic activity of coumarins from the fruits of *Cnidium monnieri* on leukemia cell lines. *Planta Medica*, 69(12), 1091-1095.
79. Sardari, S., Mori, Y., Horita, K., Micetich, R. G., Nishibe, S., and Daneshtalab, M. (1999). Synthesis ve antifungal activity of coumarins and angular furanocoumarins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 7(9), 1933-1940.
80. Shahverdi, A. R., Iranshahi, M., Mirjani, R., Jamalifar, H., Amin, G., and Shafiee, A. (2005). Bioassay-guided isolation ve identification of an antibacterial compound from *Ferula persica* var. *persica* roots. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(1), 17-19.
81. Shahverdi, A. R., Fakhimi, A., Zarrini, G., Dehghan, G., ve Iranshahi, M. (2007). Galbanic acid from *Ferula szowitsiana* enhanced the antibacterial activity of penicillin G and cephalexin against *Staphylococcus aureus*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(9), 1805-1807.
82. Bazzaz, F., Du, A. R., Iranshahi, M., Naderinasab, M., ve Khajeh Karamodin, M. (2010). Evaluating the potentiating effect of galbanic acid from *Ferula szowitsiana* on three common antibiotics against resistant hospital isolates of *Staphylococcus aureus*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 217-221.
83. Tegos, G., Stermitz, F. R., Lomovskaya, O., ve Lewis, K. (2002). Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(10), 3133-3141.
84. Raja, S. B., Murali, M. R., Roopa, K., ve Devaraj, S. N. (2011). Imperatorin a furocoumarin inhibits periplasmic Cu-Zn SOD of *Shigella dysenteriae* their by modulates its resistance towards phagocytosis during host pathogen interaction. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 65(8), 560-568.

85. Rosselli, S., Maggio, A., Bellone, G., Formisano, C., Basile, A., Cicala, C., Alfieri, A., Mascolo, N., ve Bruno, M. (2007). Antibacterial and anticoagulant activities of coumarins isolated from the flowers of *Magydaris tomentosa*. *Planta medica*, 73(2), 116.
86. Widelski, J., Popova, M., Graikou, K., Glowniak, K., ve Chinou, I. (2009). Coumarins from *Angelica lucida* L.-antibacterial activities. *Molecules*, 14(8), 2729-2734.
87. Wang, C. M., Zhou, W., Li, C. X., Chen, H., Shi, Z. Q., ve Fan, Y. J. (2009). Efficacy of osthol, a potent coumarin compound, in controlling powdery mildew caused by *Sphaerotheca fuliginea*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 11(9), 783-791.
88. Ulubelen, A., Topcu, G., Tan, N., Ölçal, S., Johansson, C., Üçer, M., Birman, H., ve Tamer, Ş. (1995). Biological activities of a Turkish medicinal plant, *Prangos platychnaena*. *Journal of Ethnopharmacology*, 45(3), 193-197.
89. Chiang, C. C., Cheng, M. J., Peng, C. F., Huang, H. Y., ve Chen, I. S. (2010). A novel dimeric coumarin analog and antimycobacterial constituents from *Fatoua pilosa*. *Chemistry & Biodiversity*, 7(7), 1728-1736.
90. Sancho, R., Márquez, N., Gómez-Gonzalo, M., Calzado, M. A., Bettoni, G., Coiras, M. T., Alcamí J., Cabrera M. L., Appedino G., ve Muñoz, E. (2004). Imperatorin inhibits HIV-1 replication through an Sp1-dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 279(36), 37349-37359.
91. Lee, C. L., Chiang, L. C., Cheng, L. H., Liaw, C. C., Abd El-Razek, M. H., Chang, F. R., ve Wu, Y. C. (2009). Influenza A (H1N1) antiviral and cytotoxic agents from *Ferula assa-foetida*. *Journal of Natural Products*, 72(9), 1568-1572.
92. Selim, Y. A., ve Ouf, N. H. (2012). Anti-inflammatory new coumarin from the *Ammi majus* L. *Organic and Medicinal Chemistry Letters*, 2(1), 1-4.
93. Naseri, M., Monsef-Esfehani, H. R., Saeidnia, S., Dastan, D., ve Gohari, A. R. (2013). Antioxidative coumarins from the roots of *Ferulago subvelutina*. *Asian Journal of Chemistry*, 25(4), 1875.
94. Whang, W. K., Park, H. S., Ham, I., Oh, M., Namkoong, H., Kim, H. K., Hwang, D. W., Hur, S. Y., Kim, T. E., Park, Y. G., Kim, J. R., ve Kim, J. W. (2005). Natural compounds, fraxin and chemicals structurally related to fraxin protect cells from oxidative stress. *Experimental and Molecular medicine*, 37(5), 436.
95. Nazemiyeh, H., Kazemi, E. M., Zare, K., Jodari, M., Nahar, L., ve Sarker, S. D. (2010). Free radical scavengers from the aerial parts of *Euphorbia petiolata*. *Journal of Natural Medicines*, 64(2), 187-190.
96. More, G., Lall, N., Hussein, A., ve Tshikalange, T. E. (2012). Antimicrobial constituents of *Artemisia afra* Jacq. ex Willd. against periodontal pathogens. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 1-7.

97. Bertin, R., Chen, Z., Martinez-Vazquez, M., Garcia-Argaez, A., ve Froidi, G. (2014). Vasodilation and radical-scavenging activity of imperatorin and selected coumarinic and flavonoid compounds from genus *Casimiroa*. *Phytomedicine*, 21(5), 586-594.
98. Golfakhrabadi, F., Abdollahi, M., Ardakani, M. R. S., Saeidnia, S., Akbarzadeh, T., Ahmadabadi, A. N., Ebrahimi, A., Yousefbeyk, F., Hassanadeh, A., ve Khanavi, M. (2014). Anticoagulant activity of isolated coumarins (suberosin and suberenol) and toxicity evaluation of *Ferulago carduchorum* in rats. *Pharmaceutical Biology*, 52(10), 1335-1340.
99. Chen, I. S., Chang, C. T., Sheen, W. S., Teng, C. M., Tsai, I. L., Duh, C. Y., ve Ko, F. N. (1996). Coumarins and antiplatelet aggregation constituents from Formosan *Peucedanum japonicum*. *Phytochemistry*, 41(2), 525-530.
100. Senol, F. S., Woźniak, K. S., Khan, M. T. H., Orhan, I. E., Sener, B., ve Głowniak, K. (2011). An *in vitro* and *in silico* approach to cholinesterase inhibitory and antioxidant effects of the methanol extract, furanocoumarin fraction, and major coumarins of *Angelica officinalis* L. fruits. *Phytochemistry Letters*, 4(4), 462-467.
101. Seo, W. D., Kim, J. Y., Ryu, H. W., Kim, J. H., Han, S. I., Ra, J. E., Seo, K. H., Jang, K. C., ve Lee, J. H. (2013). Identification and characterisation of coumarins from the roots of *Angelica dahurica* and their inhibitory effects against cholinesterase. *Journal of Functional Foods*, 5(3), 1421-1431.
102. Ming, L. G., Zhou, J., Cheng, G. Z., Ma, H. P., ve Chen, K. M. (2011). Osthol, a coumarin isolated from common *cnidium fruit*, enhances the differentiation and maturation of osteoblasts in vitro. *Pharmacology*, 88(1-2), 33-43.
103. Tang, D. Z., Hou, W., Zhou, Q., Zhang, M., Holz, J., Sheu, T. J., Li, T. F., Cheng, S. D., Qi, S., Harris, S. E., Chen, D., ve Wang, Y. J. (2010). Osthole stimulates osteoblast differentiation and bone formation by activation of  $\beta$ -catenin–BMP signaling. *Journal of Bone and Mineral Research*, 25(6), 1234-1245.
104. Zhang, Q., Qin, L., He, W., Van Puyvelde, L., Maes, D., Adams, A., Zheng, H., ve De Kimpe, N. (2007). Coumarins from *Cnidium monnieri* and their antiosteoporotic activity. *Planta Medica*, 73(1), 13-19.
105. Budzynska, B., Kruk-Slomka, M., Skalicka-Wozniak, K., Biala, G., ve Glowniak, K. (2012). The effects of imperatorin on anxiety and memory-related behavior in male Swiss mice. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 20(4), 325.
106. Kumar, D., Bhat, Z. A., Kumar, V., ve Shah, M. Y. (2013). Coumarins from *Angelica archangelica* Linn. and their effects on anxiety-like behavior. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 40, 180-186.

107. Matsuda, H., Tomohiro, N., Ido, Y., ve Kubo, M. (2002). Anti-allergic effects of *cnidii monnieri* fructus (dried fruits of *Cnidium monnieri*) and its major component, osthole. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(6), 809-812.
108. Luszczki, J. J., Andres-Mach, M., Cisowski, W., Mazol, I., Glowniak, K., ve Czuczwar, S. J. (2009). Osthole suppresses seizures in the mouse maximal electroshock seizure model. *European Journal of Pharmacology*, 607(1), 107-109.
109. Luszczki, J. J., Wojda, E., Andres-Mach, M., Cisowski, W., Glensk, M., Glowniak, K., ve Czuczwar, S. J. (2009). Anticonvulsant and acute neurotoxic effects of imperatorin, osthole and valproate in the maximal electroshock seizure and chimney tests in mice: a comparative study. *Epilepsy Research*, 85(2), 293-299.
110. Łuszczki, J. J., Andres-Mach, M., Gleńsk, M., ve Skalicka-Woźniak, K. (2010). Anticonvulsant effects of four linear furanocoumarins, bergapten, imperatorin, oxypeucedanin, and xanthotoxin, in the mouse maximal electroshock-induced seizure model: a comparative study. *Pharmacological Reports*, 62(6), 1231-1236.
111. Zhang, Y., Xie, M., Xue, J., ve Gu, Z. (2007). Osthole improves fat milk-induced fatty liver in rats: modulation of hepatic PPAR- $\alpha$ / $\gamma$ -mediated lipogenic gene expression. *Planta Medica*, 73(8), 718-724.
112. Sun, F., Xie, M. L., Zhu, L. J., Xue, J., ve Gu, Z. L. (2009). Inhibitory effect of osthole on alcohol-induced fatty liver in mice. *Digestive and Liver Disease*, 41(2), 127-133.
113. Liang, H. J., Suk, F. M., Wang, C. K., Hung, L. F., Liu, D. Z., Chen, N. Q., Chen Y. C., Chang C. C., ve Liang, Y. C. (2009). Osthole, a potential antidiabetic agent, alleviates hyperglycemia in db/db mice. *Chemico-biological Interactions*, 181(3), 309-315.
114. Fusi, F., Sgaragli, G., Cuong, N. M., ve Saponara, S. (2012). Mechanism of osthole inhibition of vascular Cav1.2 current. *European Journal of Pharmacology*, 680(1), 22-27.
115. Wang, Y. W., Yang, C. T., Chen, Y. H., Gong, C. L., Chen, Y. F., Kuo, Y. H., ve Leung, Y. M. (2015). Inhibitory effects of imperatorin on voltage-gated K<sup>+</sup> channels and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Pharmacological Reports*, 67(1), 134-139.
116. Sigurdsson, S., ve Gudbjarnason, S. (2013). Effect of oral imperatorin on memory in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 441(2), 318-320.
117. Wang, S. J., Lin, T. Y., Lu, C. W., ve Huang, W. J. (2008). Osthole and imperatorin, the active constituents of *Cnidium monnieri* (L.) Cusson, facilitate glutamate release from rat hippocampal nerve terminals. *Neurochemistry International*, 53(6), 416-423.

118. Mo, L. Q., Chen, Y., Song, L., Wu, G. M., Tang, N., Zhang, Y. Y., Wang, X. B., Liu, K. X., ve Zhou, J. (2014). Osthole prevents intestinal ischemia-reperfusion-induced lung injury in a rodent model. *Journal of Surgical Research*, 189(2), 285-294.
119. Wagner, A. M., Wu, J. J., Hansen, R. C., Nigg, H. N., ve Beiere, R. C. (2002). Bullous phytophotodermatitis associated with high natural concentrations of furanocoumarins in limes. *Dermatitis*, 13(1), 10-14.
120. Gupta, B. D., Banerjee, S. K., ve Handa, K. L. (1975). Coumarins from *Heracleum wallichii* and *Heracleum nepalense*. *Phytochemistry*, 14(11), 2533.
121. Bicchi, C., D'Amato, A., Frattini, C., Cappelletti, E. M., Caniato, R., ve Filippini, R. (1990). Chemical diversity of the contents from the secretory structures of *Heracleum sphondylium* subsp. *sphondylium*. *Phytochemistry*, 29(6), 1883-1887.
122. Ceska, O., Chaudhary, S. K., Warrington, P. J., ve Ashwood-Smith, M. J. (1986). Photoactive furocoumarins in fruits of some umbellifers. *Phytochemistry*, 26(1), 165-169.
123. Bergendorff, O., Dekermendjian, K., Nielsen, M., Shan, R., Witt, R., Ai, J., ve Sterner, O. (1997). Furanocoumarins with affinity to brain benzodiazepine receptors in vitro. *Phytochemistry*, 44(6), 1121-1124.
124. Cooke, D., Fitzpatrick, B., O'Kennedy, R., McCormack, T., ve Egan, D. I. (1997). *Coumarins-Multifaceted Molecules with Many Analytical and Other Applications. Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action*. Chichester: John Wiley & Sons, 303-332.
125. Egan, D., O'Kennedy, R., Moran, E., Cox, D., Prosser, E., ve Thornes, R. D. (1990). The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds. *Drug Metabolism Reviews*, 22(5), 503-529.
126. Kavli, G., Raa, J., Johnson, B. E., Volden, G., ve Haugsbø, S. (1983). Furocoumarins of *Heracleum laciniatum*: isolation, phototoxicity, absorption and action spectra studies. *Contact Dermatitis*, 9(4), 257-262.
127. Khadzai, Y. I., ve Kuznetsova, V. F. (1965). Photosensitizing activity of furocoumarins. *Khimiko-farmatsevticheskii Zhurnal*, 20(3), 66-70.
128. Schimmer, O., Beck, R., ve Dietz, U. (1980). Phototoxicity and photomutagenicity of furocoumarins and medicinal plants with furocoumarins in *Chlamydomonas reinhardtii*. Comparison of biological activities as a basis of risk evaluation. *Planta Medica*, 40, 68-76.
129. Bernas, T., ve Dobrucki, J. (2002). Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry*, 47(4), 236-242.

130. Hatok, J., Babusikova, E., Matakova, T., Mistuna, D., Dobrota, D., ve Racay, P. (2009). In vitro assays for the evaluation of drug resistance in tumor cells. *Clinical and experimental medicine*, 9(1), 1-7.
131. De-Eknamkul, W., ve Potduang, B. (2003). Biosynthesis of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. *Phytochemistry*, 62(3), 389-398.
132. Forgo, P., ve Kövér, K. E. (2004). Gradient enhanced selective experiments in the  $^1\text{H}$  NMR chemical shift assignment of the skeleton and side-chain resonances of stigmasterol, a phytosterol derivative. *Steroids*, 69(1), 43-50.
133. Heupel, R. C., Sauvaire, Y., Le, P. H., Parish, E. J., ve Nes, W. D. (1986). Sterol composition and biosynthesis in sorghum: Importance to developmental regulation. *Lipids*, 21(1), 69-75.
134. Intekhab, J., ve Aslam, M. (2009). Constituents from *Feronia limonia*. *Analele Universitii din București Chimie*, 18(2), 95-101.
135. Jiménez, B., Grande, M. C., Anaya, J., Torres, P., ve Grande, M. (2000). Coumarins from *Ferulago capillaris* and *F. brachyloba*. *Phytochemistry*, 53(8), 1025-1031.
136. Wei, Y., ve Ito, Y. (2006). Preparative isolation of imperatorin, oxypeucedanin and isoimperatorin from traditional Chinese herb "bai zhi" *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm) Benth. et Hook using multidimensional high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1115(1), 112-117.
137. Masuda, T., Takasugi, M., ve Anetai, M. (1998). Psoralen and other linear furanocoumarins as phytoalexins in *Glehnia littoralis*. *Phytochemistry*, 47(1), 13-16.
138. Ito, C., ve Furukawa, H. (1987). Constituents of *Murraya exotica* L. Structure elucidation of new coumarins. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 35(10), 4277-4285.
139. Wei, Y., Zhang, T., ve Ito, Y. (2004). Preparative isolation of osthol and xanthotoxol from Common *Cnidium Fruit* (Chinese traditional herb) using stepwise elution by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1033(2), 373-377.
140. Riviere, C., Goossens, L., Pommery, N., Fourneau, C., Delelis, A., ve Henichart, J. P. (2006). Antiproliferative effects of isopentenylated coumarins isolated from *Phellolophium madagascariense* Baker. *Natural Product Research*, 20(10), 909-916.
141. Farozzi, A., Shah, S. A., ve Banday, J. A. (2016). Structural and optical studies of 7-methoxy-8-(3-methylbut-2-enyl)-2-chromenone (osthol), a plant based coumarin. *Optik-International Journal for Light and Electron Optics*, 127(5), 2802-2805.

142. Chebrolu, K. K., Jayaprakasha, G. K., Jifon, J., ve Patil, B. S. (2013). Purification of coumarins, including meranzin and pranferin, from grapefruit by solvent partitioning and a hyphenated chromatography. *Separation and Purification Technology*, 116, 137-144.
143. Gökay, O., Kühner, D., Los, M., Götz, F., Bertsche, U., ve Albert, K. (2010). An efficient approach for the isolation, identification and evaluation of antimicrobial plant components on an analytical scale, demonstrated by the example of *Radix imperatoriae*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(5), 2039-2047.
144. Tesso, H., König, W. A., Kubeczka, K. H., Bartnik, M., ve Glowniak, K. (2005). Secondary metabolites of *Peucedanum tauricum* fruits. *Phytochemistry*, 66(6), 707-713.
145. De Cerqueira, M. D., de Souza-Neta, L. C., Guedes, M. L., Rivelino, R., ve Cruz, F. G. (2013). Myrciaine, a new nicotinic ester from *Myrcia blanchetiana* (Myrtaceae). *Tetrahedron Letters*, 54(11), 1421-1423.
146. Koczoń, P., Hrynaszkiwicz, T., Świśłocka, R., Samsonowicz, M., ve Lewandowski, W. (2003). Spectroscopic (Raman, FT-IR, and NMR) study of alkaline metal nicotines and isonicotines. *Vibrational Spectroscopy*, 33(1), 215-222.
147. Lv, X., Xin, X. L., Deng, S., Zhang, B. J., Hou, J., Ma, X. C., Wang, C. Y., Wang, Z. B., ve Kuang, H. X. (2012). Biotransformation of osthole by *Mucor spinosus*. *Process Biochemistry*, 47(12), 2542-2546.
148. Lv, X., Wang, C. Y., Hou, J., Zhang, B. J., Deng, S., Tian, Y., Huang, S. S., Zhang, H. L., Shu, X. H., Zhen, Y. H., Liu, K. X., Yao, J. H., ve Ma, Z. C. (2012). Isolation and identification of metabolites of osthole in rats. *Xenobiotica*, 42(11), 1120-1127.
149. Thanh, P. N., Jin, W., Song, G., Bae, K., ve Kang, S. S. (2004). Cytotoxic coumarins from the root of *Angelica dahurica*. *Archives of Pharmacal Research*, 27(12), 1211-1215.
150. Rumzhum, N. N., Sohrab, M. H., Al-Mansur, M. A., Rahman, M. S., Hasan, C. M., ve Rashid, M. A. (2012). Secondary metabolites from *Jatropha podagrica* Hook. *Journal of Physical Science*, 23(1), 29-37.
151. Bayoumi, S. A., Rowan, M. G., Beeching, J. R., ve Blagbrough, I. S. (2010). Constituents and secondary metabolite natural products in fresh and deteriorated cassava roots. *Phytochemistry*, 71(5), 598-604.
152. Heinke, R., Franke, K., Porzel, A., Wessjohann, L. A., Ali, N. A. A., ve Schmidt, J. (2011). Furanocoumarins from *Dorstenia foetida*. *Phytochemistry*, 72(9), 929-934.
153. Kuznetsova, G. A., Abyshev, A. Z., Perel'son, M. E., Sheinker, Y. N., ve Pek, G. Y. (1966). A new coumarin, pranferol, from the roots of *Prangos ferulacea*. *Chemistry of Natural Compounds*, 2(5), 252-255.

154. Li, X. S., Zhu, J. J., Zhao, H., Li, S. L., Hao, X. J., Yao, X. S., ve Tang, J. S. (2015). Three new compounds from the bark of *Antiaris toxicaria*. *Phytochemistry Letters*, 13, 182-186.
155. Vasconcelos, J. M., Silva, A. M., ve Cavaleiro, J. A. (1998). Chromones and flavanones from *Artemisia campestris* subsp. *maritima*. *Phytochemistry*, 49(5), 1421-1424.
156. Chen, Y. C., Tsai, W. J., Wu, M. H., Lin, L. C., ve Kuo, Y. C. (2007). Suberosin inhibits proliferation of human peripheral blood mononuclear cells through the modulation of the transcription factors NF-AT and NF- $\kappa$ B. *British Journal of Pharmacology*, 150(3), 298-312.
157. Cao, J., Zheng, L., Ji, L., Lu, D., Peng, Y., ve Zheng, J. (2015). Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 2B6 by isoimperatorin. *Chemico-biological Interactions*, 226, 23-29.
158. Kang, J. W., Kim, D. W., Choi, J. S., Kim, Y. S., ve Lee, S. M. (2013). Scoparone attenuates D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced fulminant hepatic failure through inhibition of toll-like receptor 4 signaling in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 57, 132-139.
159. Choi, Y. H., ve Yan, G. H. (2009). Anti-allergic effects of scoparone on mast cell-mediated allergy model. *Phytomedicine*, 16(12), 1089-1094.
160. Jang, S. I., Kim, Y. J., Lee, W. Y., Kwak, K. C., Baek, S. H., Kwak, G. B., Yun, Y. G., Kwoni T. O., Chung H. T., ve Chai, K. Y. (2005). Scoparone from *Artemisia capillaris* inhibits the release of inflammatory mediators in RAW 264.7 cells upon stimulation cells by interferon- $\gamma$  plus LPS. *Archives of Pharmacal Research*, 28(2), 203-208.
161. Atmaca, M., Bilgin, H. M., Obay, B. D., Diken, H., Kelle, M., ve Kale, E. (2011). The hepatoprotective effect of coumarin and coumarin derivatives on carbon tetrachloride-induced hepatic injury by antioxidative activities in rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 67(4), 569-576.
162. Garcia, D., Sanier, C., Macheix, J. J., ve d'Auzac, J. (1995). Accumulation of scopoletin in *Hevea brasiliensis* infected by *Microcyclus ulei* (P. Henn.) V. ARX and evaluation of its fungitoxicity for three leaf pathogens of rubber tree. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 47(4), 213-223.
163. Gnonlonfin, G. J. B., Adjovi, Y., Gbaguidi, F., Gbenou, J., Katerere, D., Brimer, L., ve Sanni, A. (2011). Scopoletin in cassava products as an inhibitor of aflatoxin production. *Journal of Food Safety*, 31(4), 553-558.
164. Chong, J., Baltz, R., Schmitt, C., Beffa, R., Fritig, B., ve Saindrenan, P. (2002). Downregulation of a pathogen-responsive tobacco UDP-Glc: phenylpropanoid glucosyltransferase reduces scopoletin glucoside accumulation, enhances oxidative stress, and weakens virus resistance. *The Plant Cell*, 14(5), 1093-1107.



165. Ding, Z., Dai, Y., Hao, H., Pan, R., Yao, X., ve Wang, Z. (2008). Anti-inflammatory effects of scopoletin and underlying mechanisms. *Pharmaceutical Biology*, 46(12), 854-860.
166. Xue-Li, L., Liang, Z. H., Xin-Lu, F., Kai, C., ve Bo-Chu, Q. (2001). Effect of scopoletin on PC3 cell proliferation and apoptosis. *Acta Pharmacol Sinica*, 22(10), 929-933.

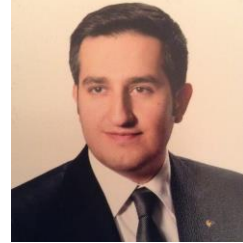




## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Mihoğlugil, Feyyaz  
 Uyuğu : T.C.  
 Doğum tarihi ve yeri : 24/10/1984 Konya  
 Medeni hali : Evli  
 Telefon : 0 (332) 323 83 66  
 Faks : 0 (332) 323 83 77  
 e-mail : feyyazmihoglugil@gmail.com



### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi/Farmakognozi ABD	2016
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/Farmakognozi ABD/ Fitoterapi Programı	2011
Lisans	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2006
Lise	Konya Karatay Anadolu Lisesi	2002

### İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2009-devam ediyor	Feyyaz Eczanesi - Konya	Sahip ve Mesul Müdür

### Yabancı Dil

İngilizce

### Yayınlar

- Orhan, I. E., Tosun, F., Gülpınar, A. R., Kartal, M., Duran, A., Mihoglugil, F., ve Akalgan, D. (2015). LC–MS quantification of parthenolide and cholinesterase inhibitory potential of selected *Tanacetum L.*(Emend. Briq.) taxa. *Phytochemistry Letters*, 11, 347-352.
- Tosun, F., Mihoglugil, F., Duran, A., ve Miski, M. (2015, Haziran). *Cytotoxic coumarins from the roots of Neocryptodiscus papillaris*. Paper presented at the 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara.

3. Miski, M., Tosun, F., Mihoglulil F., ve Duran, A. (2015, Ekim). *Sub-milligram scale secondary metabolite hunting by NMR spectroscopy; a new dimeric spirocoumarin from Neocryptodiscus papillaris*. Paper presented at the 11th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds, Antalya.
4. Tosun, F., Mihoglulil, F., Duran, A., ve Miski, M. (2015, Kasım). Cytotoxic coumarins from the fruits of *Neocryptodiscus papillaris* (BOISS.) Herrnst. & Heyn. Paper presented at the International Gazi Pharma Symposium, Antalya.

### **Hobiler**

Kitap okuma, Müzik, Masa Tenisi, Futbol





*GAZİ GELECEKTİR..*