

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ENDEMİK *Polygonum sivasicum* Kit Tan & Yıldız TÜRÜNÜN BİYOAKTİVİTE
GÖSTEREN SEKONDER METABOLİTLERİNİN İZOLASYONU ve YAPI
TAYİNLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hümeyra KARAKAŞ

Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Anabilim Dalı

Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Tezli Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Ebru EROL

HAZİRAN 2023

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ENDEMİK *Polygonum sivasicum* Kit Tan & Yıldız TÜRÜNÜN BİYOAKTİVİTE
GÖSTEREN SEKONDER METABOLİTLERİNİN İZOLASYONU ve YAPI
TAYİNLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hümeyra KARAKAŞ
(215313003)**

Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Anabilim Dalı

Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Tezli Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Ebru EROL

HAZİRAN 2023

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 215313003 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Hümevra KARAKAŞ, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “Endemik *Polygonum sivasicum* Kit Tan & Yıldız Türünün Biyoaktivite Gösteren Sekonder Metabolitlerinin İzolasyonu ve Yapı Tayinleri” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Dr. Öğr. Üyesi Ebru EROL**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Gülaçtı Topçu**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Prof. Dr. Özlem Demirkıran
Trakya Üniversitesi

Teslim Tarihi : **14 Temmuz 2023**
Savunma Tarihi : **16 Haziran 2023**



Eşime ve çocuklarıma,

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca maddi manevi desteğiyle hep yanımda olan, bildiklerini benimle cömertçe paylaşan çok kıymetli ve saygıdeğer danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Ebru Erol'a,

Tez savunma sınavımda jüri üyesi olan ve desteğini tez çalışmam boyunca esirgemeyen çok değerli hocam Prof. Dr. Gülaçtı Topçu'ya,

Tezime sağladığı değerli katkılarından dolayı saygıdeğer hocam Prof. Dr. Özlem Demirkıran'a,

Tanıştığımız ilk günden itibaren bana inanan ve bildiklerini cömertçe aktaran hocam Doç. Dr. Işıl Gazioğlu'na,

Bitki materyalinin teşhisini sağlayan Dr. Öğr. Üyesi Çağla Kızılarıslan Hançer'e,

Her türlü yardım talebimi candan ve güleryüzlü bir şekilde kabul edip geri çevirmeyen hocam Dr. Öğr. Üyesi Halil Şenol'a,

Olmayacak dediğim anda bana son bir güç veren, birçok uzun akşamın sonunu birlikte gördüğüm sevgili lab arkadaşlarım Sena Ünüvar'a ve Hümevre Elif Karartı'ya,

Gösterdikleri özveri, sabır ve desteklerinden dolayı sevgili eşim İlker Karakaş'a ve canım çocuklarım Rana, Kerem ve Nurbanu'ya,

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projelerine BAP20221017 numaralı proje desteğinden dolayı,

teşekkürü bir borç bilirim.

Haziran 2023

Hümevra Karakaş

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Hümevra Karakaş
İmza

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	iv
BEYAN	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	viii
SEMBOLLER	ix
TABLO LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
ÖZET	xiii
SUMMARY	xiv
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1 Giriş.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	2
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1 <i>Polygonum</i> Cinsinin Sistematığı.....	3
2.2 Polygonaceae Familyası.....	3
2.3 <i>Polygonum</i> Cinsi.....	3
2.4 <i>Polygonum sivasicum</i> Kit Tan & Yıldız	4
2.5 <i>Polygonum</i> Türlerinin Halk arasında Kullanımı.....	4
2.6 <i>Polygonum</i> Türlerinden İzole Edilmiş Sekonder Metabolit Grupları.....	6
2.6.1 Stilbenler	6
2.6.2 Antrakınonlar	7
2.6.3 Steroidler	8
2.6.4 Sfingolipitler	10
2.6.5 Flavonoidler	10
2.7 Bazı <i>Polygonum</i> Türleri Üzerine Yapılmış Farmakolojik Çalışmalar.....	12
2.7.1 <i>Polygonum cuspidatum</i> türünün farmakolojik özellikleri.....	12
2.7.2 <i>Polygonum cognatum</i> türünün farmakolojik özellikleri	12
2.7.3 <i>Polygonum multiflorum</i> türünün farmakolojik özellikleri.....	13
2.7.4 <i>Polygonum aviculare</i> türünün farmakolojik özellikleri	13
2.8 Antioksidan Aktivite	14
3.GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1 Bitki Materyali	16
3.2 Kimyasal Maddeler ve Çözücüler.....	16
3.3 Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	16
3.4 Ekstrelerin Hazırlanması.....	17
3.5 Kromatografik Yöntemler.....	18
3.5.1 İnce tabaka kromatografisi (İTK).....	18
3.5.2 Kolon kromatografisi	19
3.5.3 Preparatif ince tabaka kromatografisi (PİTK).....	20
3.6 Spektroskopik Yöntemler	21
3.6.1 Nükleer magnetik rezonans spektroskopisi (NMR).....	21
3.6.2 Sıvı kromatografi- yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi (LC- HR/MS).....	22
3.7 Antioksidan Aktivite Belirleme Yöntemleri	23
3.7.1 ABTS katyon radikali giderim aktivitesi	23

3.7.2 DPPH serbest radikali giderim aktivitesi	24
3.7.3 Metal bağlama aktivitesi	24
3.7.4 CUPRAC indirgeme gücü	25
3.7.5 β -karoten-linoleik asit yöntemi	25
3.8 <i>Polygonum sivasicum</i> Yağ Asidi Profilinin GC-MS Kullanılarak Belirlenmesi	25
3.9 <i>Polygonum sivasicum</i> Fenolik Profilinin LC-HR/MS Kullanılarak Belirlenmesi	26
4.BULGULAR VE TARTIŞMA.....	28
4.1 Ekstraksiyon Sonuçları	28
4.2 Antioksidan Aktivite Sonuçları.....	28
4.2.1 ABTS katyon radikali giderim aktivitesi sonuçları.....	28
4.2.2 DPPH radikal giderim aktivitesi sonuçları.....	29
4.2.3 Metal bağlama antioksidan aktivite sonuçları.....	29
4.2.4 CUPRAC bakır (II) indirgeme aktivitesi sonuçları.....	30
4.2.5 β -karoten-linoleik asit yöntemi sonuçları.....	30
4.3 <i>Polygonum sivasicum</i> 'un Hegzan Ekstresi Fraksiyonlarından Saf Maddelerin İzolasyonu	31
4.3.1 Di(2-etilhekzil) fitalat (DEHP)	32
4.3.2 β -sitosterol.....	39
4.4 <i>Polygonum sivasicum</i> 'un Metanol Ekstresi Fraksiyonlarından Saf Maddelerin İzolasyonu	46
4.4.1 <i>Polygonum sivasicum</i> 'un Metanol Ekstresi B Fraksiyonundan Saf Maddelerin İzolasyonu	47
4.4.2 <i>Polygonum sivasicum</i> 'un Metanol Ekstresi E-Fraksiyonundan Saf Madde İzolasyonu	65
4.5 <i>P. sivasicum</i> 'un GC-MS Kullanılarak Belirlenen Yağ Asidi Profili Sonuçları.....	72
4.6 <i>P. sivasicum</i> 'un LC-MS Kullanılarak Belirlenen Fenolik Profil Sonuçları	73
5.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	75
KAYNAKLAR	79
EKLER	86
ÖZGEÇMİŞ.....	88

KISALTMALAR

A_{0,5}	: 0,5 Absorbansa karşılık gelen değer
ABTS	: 2,2'-Azinobis(3-etilbenzotrolin-6-sülfonik asit)
ATP	: Adenozin trifosfat
BHA	: Bütillenmiş hidroksi anisol
BHT	: Bütillenmiş hidroksi toluen
COSY	: ¹ H - ¹ H korelasyon spektroskopisi
CUPRAC	: Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi
DPPH	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
DXR	: Doksorubisin
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
FCR	: Folin Ciocalteu reaktifi
GC	: Gaz kromatografisi
GBM	: Glioblastoma multiforme
HEPG2	: Hepatosellüler karsinoma hücre hattı
HMBC	: Heteronükleer çoklu bağ korelasyon
HRMS	: Yüksek çözünürlüklü kütle spektroskopisi
HSQC	: Heteronükleer tekli kuantum korelasyon
IC₅₀	: % 50 inhibisyon gösteren konsantrasyon
İLMER	: İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi
İTK	: İnce tabaka kromatografisi
KK	: Kolon kromatografisi
LC-MS	: Sıvı kromatografisi kütle spektrometresi
MCF7	: Meme kanseri hücre hattı
MDA-MB-231	: Meme kanseri hücre hattı
NMR	: Nükleer magnetik rezonans
pH	: Hidrojenin gücü
PİTK	: Preparatif ince tabaka kromatografisi
ROS	: Reaktif oksijen türleri
UV	: Ultraviyole

SEMBOLLER

A	: Absorbans
α	: Alfa
β	: Beta
I	: Inhibisyon
μ	: Mikro
δ	: Delta



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: <i>Polygonum</i> türlerinden izole edilen bazı stilbenler.	7
Tablo 2.2: <i>Polygonum</i> türlerinden izole edilen bazı antrakinonlar.	8
Tablo 2.3: <i>Polygonum</i> türlerinden izole edilen bazı steroidler.	10
Tablo 2.4: <i>P. hydropiper</i> türünden izole edilen sfingoglukolipit.	10
Tablo 2.5: <i>Polygonum</i> türlerinden izole edilen bazı flavonoidler.	11
Tablo 3.1: Tez kapsamında kullanılan cihazlar ve markaları.	16
Tablo 3.2: Antioksidan aktivite için numune özellikleri.	23
Tablo 3.3: GC koşulları.	26
Tablo 3.4: MS koşulları.	26
Tablo 3.5: LC-MS koşulları.	27
Tablo 3.6: LC-MS analizinde kullanılan fenolik bileşik standartlarının listesi.	27
Tablo 4.1: <i>P. sivasicum</i> 'dan elde edilen ekstrelerin miktarları ve verimleri.	28
Tablo 4.2: ABTS katyon radikali giderim aktivitesi sonuçları.	29
Tablo 4.3: DPPH radikal giderim aktivitesi sonuçları.	29
Tablo 4.4: Metal bağlama aktivitesi sonuçları.	30
Tablo 4.5: CUPRAC bakır (II) indirgeme aktivitesi sonuçları.	30
Tablo 4.6: β -karoten-linoleik asit yöntemi sonuçları.	31
Tablo 4.7: Di(2-etilhekzil) fitalat'ın ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz), ^1H -NMR (CDCl_3 , 500 MHz) değerleri ve HMBC korelasyonu.	34
Tablo 4.8: <i>P. sivasicum</i> metanol ekstresi fraksiyonlarının karşılaştırılması.	47
Tablo 4.9: Annphenone'un ^{13}C -NMR (CD_3OD , 125 MHz), ^1H -NMR (CD_3OD , 500 MHz) değerleri ve HMBC korelasyonu.	51
Tablo 4.10: Hiperozit ^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz), ^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) değerleri ve HMBC korelasyonu.	60
Tablo 4.11: Daucosterol 'ün ^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz), ^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) değerleri ve HMBC korelasyonu.	67
Tablo 4.12: GC-MS yağ asidi profili sonuçları.	73
Tablo 4.13: <i>P. sivasicum</i> 'un metanol ekstresinde belirlenen fenolik bileşikler ve miktarları.	73

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: <i>Polygonum sivasicum</i> 'un toprak üstü kısımlarının görünümü.	5
Şekil 2.2: Endemik <i>Polygonum sivasicum</i> bitkisinin Türkiye'de yayılış haritası.	5
Şekil 2.3: Stilben kimyasal yapısı.	7
Şekil 2.4: Antrakinon kimyasal yapısı.	8
Şekil 2.5: siklopenta[α]fenantren (a) ve steroid (b) kimyasal yapıları.	9
Şekil 2.6: Kolesterol kimyasal yapısı.	9
Şekil 2.7: Flavonoidlerin temel iskeletini oluşturan fenilbenzopiran kimyasal yapısı.	11
Şekil 3.1: Hegzan ekstresi filtreleme aşamasında.	18
Şekil 3.2: Su ekstresinin kurutulması için kullanılan CHRIST marka liyofilizatör. .	19
Şekil 3.3: Kolon kromatografisi.	20
Şekil 3.4: Preparatif ince tabaka kromatografisi.	21
Şekil 3.5 : Bruker 500 MHz NMR, Bezmialem Vakıf Üniversitesinden alınmıştır.	22
Şekil 3.6: LC-HR/MS Thermo Q Exactive, Bezmialem Vakıf Üniversitesinden alınmıştır.	22
Şekil 3.7: ELISA mikropilaka okuyucu.	24
Şekil 4.1: <i>P. sivasicum</i> hegzan ekstresinin fraksiyonlandırılması sonucu elde edilen saf maddeler.	32
Şekil 4.2: Di(2-etilhekzil) fitalat'ın kimyasal yapısı.	32
Şekil 4.3: Di(2-etilhekzil) fitalatın vanilin-sülfürik asit reaktifi ile yakıldıktan hemen sonra (mor, solda) ve zamanla aldığı renkler (mavi, sağda).	33
Şekil 4.4: Di(2-etilhekzil) fitalat'ın ^1H - NMR (CDCl_3 , 500 MHz) spektrumu.	35
Şekil 4.5: Di(2-etilhekzil) fitalat'ın ^{13}C - NMR (CDCl_3 , 125 MHz) spektrumu.	36
Şekil 4.6: Di(2-etilhekzil) fitalat'ın HSQC spektrumu.	37
Şekil 4.7: Di(2-etilhekzil) fitalat'ın HMBC spektrumu.	38
Şekil 4.8: Di(2-etilhekzil) fitalat'ın COSY spektrumu.	39
Şekil 4.9: β -sitosterol'ün kimyasal yapısı.	40
Şekil 4.10: <i>C. cylindracea</i> 'dan (solda) ve <i>P. sivasicum</i> 'dan (sağda) izole edilen β -sitosterol'ün vanilin-sülfürik asit reaktifi ile yakıldıktan sonra elde edilen karşılaştırmalı ince tabaka kromatografisi.	40
Şekil 4.11: β -sitosterol'ün ^1H - NMR (CDCl_3 , 500 MHz) spektrumu.	42
Şekil 4.12: Karşılaştırmalı β -sitosterol'ün ^1H - NMR spektrumu tam boy.	43
Şekil 4.13: Karşılaştırmalı β -sitosterol'ün ^1H - NMR spektrumu (0-2,3 ppm).	44
Şekil 4.14: β -sitosterol'ün ^{13}C - NMR (CDCl_3 , 125 MHz) spektrumu.	45
Şekil 4.15: <i>P. sivasicum</i> metanol ekstresi kolonu sonrası toplanan fraksiyonlar.	46
Şekil 4.16: <i>P. sivasicum</i> metanol ekstresi kolonu sonrası birleştirilen fraksiyonlar..	46
Şekil 4.17: <i>P. sivasicum</i> 'un birleştirilmiş metanol fraksiyonlarının ince tabaka kromatografisi.	47
Şekil 4.18: <i>P. sivasicum</i> ' un metanol ekstresinin B fraksiyonundan elde edilen maddeler.	48
Şekil 4.19: Annphenone'nun kimyasal yapısı.	49

Şekil 4.20: Annphenone'un vanillin-sülfürik asit reaktifi ile yakıldıktan sonra elde edilen ince tabaka kromatografisi.	49
Şekil 4.21: Kütle spektrumunda iyonizasyon sonrası oluşan parçalanma ürünleri. ..	50
Şekil 4.22: Annphenone'nun ¹ H- NMR spektrumu (CD ₃ OD, 500 MHz).	52
Şekil 4.23: Annphenone'nun ¹³ C- NMR spektrumu (CD ₃ OD, 125 MHz).	53
Şekil 4.24: Annphenone'nun HSQC spektrumu.	54
Şekil 4.25: Annphenone'nun HMBC spektrumu.	55
Şekil 4.26: Annphenone'nun COSY spektrumu.	56
Şekil 4.27: Annphenone'nun kütle spektrumu.	57
Şekil 4.28: Hiperozit'in kimyasal yapısı.	58
Şekil 4.29: UV lamba altında ve Vanilin-sülfürik asit ile yaktıktan sonra elde edilen PSMFB-16-(17-21)-4 İTK'sı.	58
Şekil 4.30: Hiperozit'in ¹ H- NMR spektrumu (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz).	61
Şekil 4.31: Hiperozit'in ¹³ C- NMR spektrumu (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	62
Şekil 4.32: Hiperozit'in HMBC spektrumu.	63
Şekil 4.33: Hiperozit'in HSQC spektrumu.	64
Şekil 4.34: Daucosterol'ün kimyasal yapısı.	65
Şekil 4.35: Daucosterol'ün vanilin reaktifi püskürtüldükten sonraki ince tabaka kromatografisi.	65
Şekil 4.36: Daucosterol'ün ¹ H-NMR spektrumu (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz).	68
Şekil 4.37: Daucosterol'ün ¹³ C spektrumu (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	69
Şekil 4.38: Daucosterol'ün HMBC spektrumu.	70
Şekil 4.39: Daucosterol'ün HSQC spektrumu.	71
Şekil 4.40: Daucosterol'ün COSY spektrumu.	72
Şekil 4.41: <i>P. sivasicum</i> metanol ekstresinde LC-HR/MS sonuçlarına göre en çok belirlenen fenolik bileşiklerin kimyasal yapıları.	74

ENDEMİK *Polygonum sivasicum* Kit Tan & Yıldız TÜRÜNÜN BİYOAKTİVİTE GÖSTEREN SEKONDER METABOLİTLERİNİN İZOLASYONU ve YAPI TAYİNLERİ

ÖZET

Polygonaceae familyası dünyada yaklaşık 48 cins ve 1200 tür ile ülkemizde ise 10 cins ile temsil edilmektedir. *Polygonum* cinsi 7'si endemik olmak üzere 40 türle bu familyanın ülkemizdeki en büyük üyesidir. Endemik *Polygonum sivasicum* Kit tan & Yıldız bitkisi Sivas ili 1700 rakım üstünde doğal olarak yetişmektedir. Bu tez kapsamında *P. sivasicum* bitkisinden biyoaktif maddelerin izolasyonu yapılarak yapı tayinleri hedeflendi. Gölgede kurutulduktan sonra öğütücüde parçalanmış bitki materyalinin sırasıyla hegzan, etilasetat, kloroform ve metanol olmak üzere dört farklı çözücü ile maserasyon yöntemi kullanılarak ekstraktları elde edildi. Ayrıca, maserasyon sonucu bitki kalıntısı 80 °C sıcak demineralize su ile ekstre edilip, infüzyonu alındı. Su ile yapılan ekstre filtre edildikten sonra dondurulup, liyofilizatör yardımı ile çözücüsü uzaklaştırıldı. Böylelikle toplam 5 ekstre elde edildi. Ekstrelerin DPPH serbest radikali giderimi, ABTS katyon radikali giderimi, CUPRAC bakır (II) indirgeyici antioksidan aktivite, metal bağlama ve β -karoten-linoleik asit yöntemleri kullanılarak antioksidan aktiviteleri spektrofotometre ile analiz edildi.

Silika jel, C18 ve Sephadex LH-20 kolon dolgu maddeleri kullanılarak her bir ekstrenin kaba fraksiyonlandırılmasına gidildi. Fraksiyonlandırılma işleminden sonra miktar ve ince tabaka kromatografisi sonuçlarına dayanarak fraksiyonlar birleştirilerek saflaştırma işlemine devam edildi. İzole edilen saf maddelerin yapı tayinleri 1 boyutlu ve 2 boyutlu Nükleer Magnetik Rezonans (1D- ve 2D-NMR) ve yüksek çözünürlüklü Kütle Spektrometrisi (HRMS) spektroskopik yöntemleri ile tayin edildi. *P. sivasicum*'un hegzan ekstresinden β -sitosterol ve di(2-etilhekzil) fitalat; metanol ekstresinden anphenone, hiperozit ve daucosterol maddeleri izole edilerek yapıları aydınlatıldı. Metanol ekstresinin fenolik içeriği sıvı kromatografisi kütle spektroskopisi (LC-HR/MS) ile tayin edildi. Hegzan ekstresinin yağ asidi profili gaz kromatografisi kütle spektroskopisi (GC-MS) kullanılarak belirlendi.

Bu yüksek lisans tez çalışması, *Polygonum sivasicum* Kit Tan & Yıldız bitkisinden sekonder metabolitlerin izolasyonu üzerine yapılan ilk çalışma olup, hegzan ve metanol ekstraktlarından toplam beş madde izole edildi. Bu bileşiklerden biri olan anphenone, *Polygonum* cinsinden ilk defa izole edildi. Metanol ekstresinden izole edilen hiperozit molekülü, aynı zamanda LC-HR/MS kullanılarak tayin edilen 27 fenolik bileşik arasından üç major sekonder metabolitten biri olarak belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *Polygonum sivasicum* Kit Tan & Yıldız, madımak, izolasyon, sekonder metabolit

**ISOLATION and STRUCTURE ELUCIDATION of the BIOACTIVE
SECONDARY METABOLITES from ENDEMIC *Polygonum sivasicum* Kit
Tan & Yıldız**

SUMMARY

The Polygonace family is represented by 48 genera and 1200 species worldwide. Our country is home to 10 genera that belong to this family. The genus *Polygonum* includes 40 species, making it the biggest member of this family in Turkey. *Polygonum sivasicum* Kit tan & Yıldız, which is one of the 7 endemic *Polygonum* species, grows naturally in Sivas at 1700 m altitude. The purpose of this thesis is to isolate the bioactive secondary metabolites from *P. sivasicum* and elucidate their structures. Aerial parts of the plant were collected and dried under optimum conditions. The ground plant material was macerated with hexane, ethyl acetate, chloroform and methanol consecutively. The plant residue was infused with 80 °C demineralised water. After filtration, the water infusion was frozen at -80 °C to eliminate water by a lyophilizer. Total of five extracts were prepared. Antioxidant activity of the extracts was tested via DPPH free radical scavenging, ABTS cation radical scavenging, CUPRAC cupric reducing antioxidant activity, metal chelating and β -carotene-linoleic acid methods using a microplate reader.

Fractions from the extracts were obtained with Silica gel, C18 and Sephadex LH-20 column packing materials. Structure identification and elucidation of isolated pure compounds were performed by both one-dimensional and two-dimensional Nuclear magnetic resonance (1D- and 2D-NMR) and high-resolution mass spectrometry (HR-MS) spectroscopic methods. β -sitosterol and Di(2-ethylhexyl) phthalate were isolated from the hexane extract of *P. sivasicum*. The methanol extract afforded three compounds; annphenone, hyperoside and daucosterol. Fatty acid profile of hexane extract was obtained using GC-MS. Phenolic profile study was conducted using LC-HR/MS.

This master's thesis is the first study on the isolation of the secondary metabolites of *Polygonum sivasicum* Kit Tan & Yıldız that led to the identification of five compounds. Annphenone was isolated from a *Polygonum* genus for the first time. Hyperoside, which was detected as one of the major phenolics by LC-HR/MS, was also isolated during this study.

Keywords: *Polygonum sivasicum* Kit Tan & Yıldız, knotweed, isolation, secondary metabolites

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1 Giriş

Günümüzde olduğu gibi binlerce yıl öncesinde de insanların yaralarını iyileştirme, dental sorunlarını tedavi etme, patojenik hastalıklarla mücadele gibi ihtiyaçlarının varlığı bilinmektedir. Bu nedenle bitkisel ürünlerin tedavi amaçlı kullanımının insanlık tarihine eş değer olduğu düşünülmektedir [1].

Dünya Sağlık Örgütüne göre (DSÖ) gelişmekte olan ülkelerde nüfusun %80'i hala sağlık sorunlarını çözmek için tıbbi bitkilere muhtaçken [2]; gelişmiş ülkelerde sentetik ilaçların yan etkilerinden kaçınma, bitkisel ürünlerin daha güvenli olduğuna inanma, daha hesaplı ve ulaşılabilir olduklarını düşünme ve benzeri sebeplerden dolayı bitki kökenli preparatlara ilgi hızla artmaktadır. Gelişmiş ülkelerde toplumun %10-50'si bitkisel ilaçların bir çeşidini düzenli olarak kullanmaktadır [3].

ABD'de yetişen 5000 bitkiden 16'sının potansiyel medikal kullanım değeri taşıdığı ve 16 bitkiden her birinin değerinin 203 milyar dolar ve 16 bitki için toplam değerinin 3248 milyar dolar olduğu belirlenmiştir. ABD'de, 1985 yılında 40 bitkinin reçete değerinin 11,7 milyar dolar ve her bir bitki için değerinin ortalama 290 milyon dolar ve yaşam skalasına katkı değerinin ise 6 milyar dolar olduğu tahmin edilmektedir [4]. Ülkemizde bulunan toplam tür ve tür altı takson sayısı, yabancı kaynaklı ve kültür bitkileri dahil 11466 olup, 3649 endemik türle endemizm oranı %31,82 olarak belirlenmiştir [5]. Dünya çapında bitkisel ilaçlara duyulan ihtiyaç ve ülkemizdeki endemik bitki potansiyeli göz önünde bulundurulduğunda Türkiye'de yetişen endemik bitkilerin ilaç potansiyelleri ortaya konularak, kültüre alınma yoluyla ekonomik ve kültürel katkı sağlayacak nihai ürünlere dönüştürülmesi daha da önem kazanmıştır.

1.2 Tezin Amacı

Polygonum cinsine ait bitkiler üzerinde yapılan biyoaktivite ve sekonder metabolit izolasyonu çalışmalarının daha çok *P. cognatum*, *P. cuspidatum*, *P. multiflorum* ve *P. aviculare* türleri üzerinde yoğunlaşmış olduğu ve bu türlerden kardiyoprotektif, antikanser, antioksidan ve antienflamatuar özellikler taşıyan resveratrol'un; yüksek antidiyabetik potansiyeli taşıyan emodin'in; antioksidan aktiviteleriyle öne çıkmış kersetin, rutin gibi flavonoidlerin izole edilmiş olduğu belirlendi. Ülkemizde bu cinse ait 7 türün endemik olmasına rağmen yapılan araştırmaların kısıtlı olduğu görüldü [6-14].

Bu yüksek lisans tez çalışması ülkemizde doğal olarak yetişen endemik *Polygonum sivasicum* Kit Tan & Yıldız türü ile yapılan ilk sekonder metabolit izolasyonu çalışmasıdır. Endemizm oranı bu kadar yüksek bir coğrafyada yetişen ve yiyecek olarak sıklıkla tüketilen endemik bir bitkinin biyoaktivite gösteren sekonder metabolitlerinin çalışılmasının ilaç keşfine yönelik bitki temelli analitik ve farmakognozik araştırmalara önemli bir katkı sağlayacağı düşünülerek bu çalışma hedeflendi. Ayrıca diğer *Polygonum* türlerinin halk arasında diyabetik, guatr gibi hastalıkların yanı sıra romatizmal ve jinekolojik rahatsızlıkların tedavisinde kullanılıyor olması araştırmayı destekler niteliktedir. Bu amaçla, *P. sivasicum*'dan farklı polaritedeki çözücüler ile elde edilen ekstraktlardan antioksidan aktivite rehberli sekonder metabolitlerin izolasyonu ve yapı tayini çalışmaları hedeflendi. İzole edilen maddelerin yapılarının aydınlatılması için ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HSQC, HMBC, COSY ve HR-MS spektroskopik yöntemlerin kullanılması planlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 *Polygonum* Cinsinin Sistematığı

Alem: Bitkiler alemi

Bölüm: Spermatophyta

Altbölüm: Angiospermae

Sınıf: Dicotyledones

Altsınıf: Caryophyllidae

Takım: Polygonales

Familya: Polygonaceae

Cins: *Polygonum*

2.2 Polygonaceae Familyası

Otsu, çalimsı veya tırmanıcı bitkilerden oluşan Polygonaceae familyası dünyada yaklaşık 48 cins ve 1200 tür ile [15], ülkemizde ise 10 cins ile temsil edilmektedir [5]. Yapraklar genellikle alternat ve basittir. Stipulalar genellikle gövdenin etrafında zarımsı bir kın (okra) içinde birleşmiş şekilde bulunurlar. Çiçekler spikalarda demetler veya birleşik salkımlar, hermafrodit veya tek eşeyli, ışınsal haldedir. Çiçek örtüsü 3-6 parçalı ve aşağıda birleşmiştir. Taç yaprakları yoktur. Ovaryum üst durumlu, tek gözlüdür. Stamenler genelde 6-9 arası olup, nadiren 16'ya kadar çıktığı görülebilir. Stiluslar 2-4 tanedir. Ovul 1 tane ve tabanda bulunur. Çoğu zaman kalıcı çiçek örtüsü içinde kapalı olan meyveleri 3 köşeli veya mercimek şeklinde bir nuttur [16].

2.3 *Polygonum* Cinsi

Polygonum cinsi ülkemizde yetişen 40 tür ve 6 alttür ile Polygonaceae familyasının en büyük üyesidir. Bu türlerden 7 tanesi endemiktir. *Polygonum* ismi poly “çok” ve

gonum “boğum” kelimelerinin birleşmesiyle “çok boğumlu” anlamında kullanılmıştır. Bu ismin cinse ait bitkilerde görülen eklemli yapıya işaret ederek verildiği düşünülmektedir.

Tek yıllık, çok yıllık, odunsu bitkiler veya tırmanıcılarıdır. Çiçek örtüsü parçaları eşit, serbest veya birleşiktir. Stamenler genellikle 8 tanedir. Stigmalar ise 2 veya 3 adettir. Her zaman en azından kısmi şekilde kalıcı çiçek örtüsü içinde kapalı bulunan meyveleri 3 köşeli veya mercimek şeklinde bir nuttur [17].

2.4 *Polygonum sivasicum* Kit Tan & Yıldız

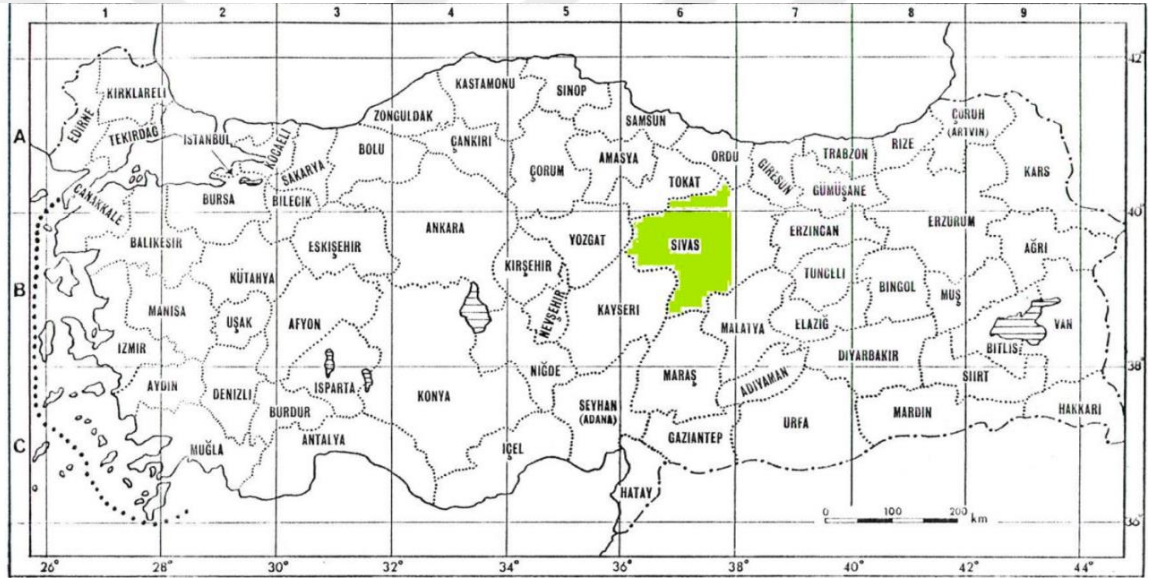
“Sivas madımağı” olarak bilinen endemik *Polygonum sivasicum* Kit Tan & Yıldız türü (Şekil 2.1), kayalar ve açık tablalarda, 1700-2400 m rakım aralığında bulunmaktadır. Şekil 2.2 bitkinin Türkiye’deki yayılım bölgesini göstermektedir. İran-Turan elementine ait bu türün çiçeklenme zamanı 6.-8. aylardır. Taban kısmı sert odunsu olan çok yıllık yarı çalimsı bitkilerdir. Gövdeler çok sayıda, tabanda dallanmış, toprak üzerine yatık, 5-10 cm boyundadır. Tüysüz veya kısa sert tüylerden dolayı hafif pürüzlü yapıda olup, bariz şekilde boyuna oluklu olan gövdede noduslar arası 5-12 mm’ dir. Okrea (kın) zarımsı, 12 mm’ye kadar, nodlar arası uzunluğa eşit veya ondan daha uzundur. 6-8 damarlı, kuvvetlice lasiniat (dar parçalara ayrılmış), üst şeffaf, alt kırmızımsı-kahverengidir. Yapraklar çok sayıda, sapsız, şeritsi, 10-20x1-15 mm, tam, açık grimsi-yeşil, hafifçe tepecikli, kenarları alta doğru kuvvetlice kıvrık, damarlar çok belirgindir. Brakteler benzer fakat gövde yapraklarından daha küçüktür. Dallanmamış, spika (başak) şeklinde, sık çiçeklidir. Çiçekler her nodusta 2-3 tane, nadiren tek, sapsız olabilirken nadiren 1-1,5 mm, ince, küçük saplı da olabilirler. Çiçek örtüsü çan şeklinde, 2,5-3 mm; loplar kremi beyaz renkte ve kırmızı-pembe tüplerden daha uzundur. Olgunlaşmamış meyva üç köşelidir ve siyah, kalıcı çiçek örtüsüne dâhildir [18].

2.5 *Polygonum* Türlerinin Halk arasında Kullanımı

Polygonum türleri şeker hastalarında hipoglisemik etkili, idrar artırıcı ve damarları büzücü özelliğinden dolayı uzun süren kanamaların durdurulmasında, hemoroidlerde, kusma, ishal ve böbrek taşlarının düşürülmesinde ve özellikle bu cinsin tohumları bronşit hastalığı tedavisinde kullanılmaktadır [19]. Burdur’da egzema ve diyabet tedavisi için tüketilmektedir. Ayrıca bitkinin lapa haline getirilmiş formu guatr



Şekil 2.1: *Polygonum sivasicum*'un toprak üstü kısımlarının görünümü.



Şekil 2.2: Endemik *Polygonum sivasicum* bitkisinin Türkiye’de yayılış haritası.

hastalığında hastanın boğazına sarılarak kullanılmaktadır [20]. Erzurum’da, jinekolojik hastalıklar için süt içinde haşlanarak tüketilmektedir [21]. Tunceli’de ise romatizma hastalığı için kullanılmaktadır [22]. Yine Kuzeybatı Anadolu’da romatizmal ağrıları gidermek için *Polygonum salicifolium* Brous. ex Willd. bitkisinden elde edilen dekoksasyon içilmektedir [23].

Özellikle Kuzey Anadolu’nun sulak dağ çayırlarında yetişen *Polygonum bistorta* L. türü kabız, antiseptik ve idrar arttırıcı özellik taşımasıyla bilinir. *P. aviculare* Kuzey Anadolu yöresinde yetişir ve taşıdığı tanen türevleri sayesinde kabız ve kan dindirici

olarak kullanımı mevcuttur. Genç yaprakları ilkbaharda toplanılarak sebze olarak tüketilen ve ülkemizde en yaygın bulunan türlerden biri olan *P. cognatum*, idrar arttırıcı ve şeker hastalığına karşı %5'lik infüzyon şeklinde kullanılır [19]. Ülkemizin Güney Anadolu-Toros bölgesinde *P. cognatum*'un herba kısmından yapılan çayın içilmesiyle bitkinin kurt düşürücü etkisinden faydalandığı bilinmektedir [24].

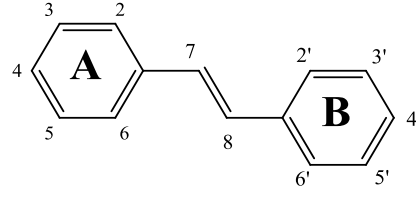
Geleneksel Çin Tıbbında bu cinse ait birçok türün yüzlerce yıllık kullanımı tek bir ekstre olarak veya karışımlar halinde mevcuttur. Geleneksel olarak saç rengini siyahlaştırıcı, böbrek ve karaciğer güçlendirici, yaşlanma karşıtı, uyuz gibi cilt rahatsızlıklarında hassaslaşan cildin rahatlatılması amaçlı kullanılan *P. multiflorum*'un geleneksel Çin tıbbına ait kitaplarda 242 tarifte geçtiği belirlenmiştir. Çin farmakopesinin 2010 basımında 46 patentli Çin ilacında bulunması güçlü ilaç etkisini ortaya koymaktadır [9].

Çin'de tıbbi kullanımı 1800 yıldan daha uzun bir süreye dayanan ve üzerinde en çok çalışılmış *Polygonum* türlerinden biri olan *P. cuspidatum* (Japon madımağı) diüretik özelliğinden dolayı karındaki kitlelerin tedavisinde kullanılmıştır. Bunun yanı sıra boğaz ve diş ağrısı, ülser, hemoroid, ve kronik bronşit yaygın uygulama alanlarındandır. Günümüzde Çin'de iltihaplanmaya bağlı rahatsızlıklar için kullanılan bitkisel terkiplerde ana etken maddelerden biri olarak yer almaktadır [25].

2.6 *Polygonum* Türlerinden İzole Edilmiş Sekonder Metabolit Grupları

2.6.1 Stilbenler

Stilbenler iki benzen halkasının etilen köprüsüyle birleşmesi sonucu oluşmuş polifenolik yapıdaki bileşiklerdir (Şekil 2.3). Stilben kelimesi latince 'parlayan' manasına gelen stilbos kelimesinden türemiştir [26]. İçinde Polygonaceae familyasının da bulunduğu 11 bitki familyasında ağırlıklı olarak görülürlerken, şimdiye kadar 55 familyadan 1038 stilben izole edilmiştir [27]. Üzerinde en çok çalışılmış stilben olan resveratrol kardiyoprotektif, antikanser, antioksidan ve antiinflamatuvar özellikler taşımasıyla bilinmektedir ve *P. cuspidatum* köklerinden bol miktarda izole edilmektedir. 70'den fazla bitkide tespit edilen resveratrol, en çok siyah üzüm çekirdeği, yer fıstığı ve çilekçillerde bulunmaktadır.



Şekil 2.3: Stilben kimyasal yapısı.

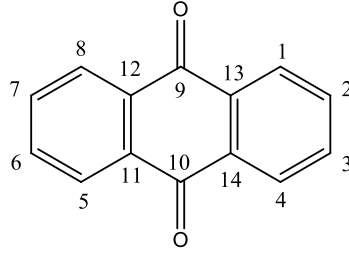
Monomer yapısındaki stilbenlerin yanı sıra dimerik ve tetramerik stilben glioizidleri de *Polygonum* türlerinden izole edilmiştir. *P. cuspidatum* %60 aseton ekstresinden dimerik stilben glikozidi saflaştırılırken [8], *P. multiflorum* kurutulmuş köklerinin %70 etanol ekstresinden tetramer stilben glikozidi olan Multiflorumizid J ve K izole edilmiştir [28]. Tablo 2.1 resveratrol ve bir glikozidi olan polydatinin kimyasal yapısını göstermektedir.

Tablo 2.1: *Polygonum* türlerinden izole edilen bazı stilbenler.

BİLEŞİĞİN ADI	BİLEŞİĞİN YAPISI	EKSTERESİ	BİTKİ ADI	KAYNAK
Resveratrol		%95 etanol	<i>P. cuspidatum</i>	[29]
Pikeid (polidatin)		Etil asetat	<i>P. multiflorum</i>	[30]

2.6.2 Antrakinonlar

Antrakinonlar iki aromatik halkanın iki karbonil grubu ile planar aromatik bir yapı oluşturmak üzere birleşmesiyle oluşan fenolik bileşiklerdir (Şekil 2.4). Günümüze kadar, en önemlileri emodin, rein ve parietin olmak üzere 80'den fazla antrakinon farklı likenlerden, mantarlardan ve bitkilerden izole edilmiştir (Tablo 2.2) [31].



Şekil 2.4: Antrakinon kimyasal yapısı.

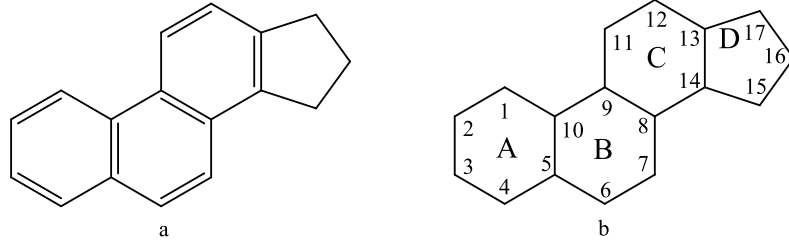
P. cuspidatum ve *P. multiflorum* türleri içerisinde aktif etken madde olarak bulunan emodin, hem antiinflamatuvar hem antioksidan özellikler taşımaktadır. Bu aktiviteleri sayesinde, diyabet semptomlarına karşı etkili olması ve sitokin yolaklarını kontrol etmesi sebebiyle emodin, diyabet tedavisinde en umut verici antrakinon olarak öne çıkmıştır [32].

Tablo 2.2: *Polygonum* türlerinden izole edilen bazı antrakinonlar.

BİLEŞİĞİN ADI	BİLEŞİĞİN YAPISI	EKSTERESİ	BİTKİ ADI	KAYNAK
Emodin		%80 metanol	<i>P. cuspidatum</i>	[32]
		Metanol	<i>P. cuspidatum</i>	[33]
		%70 etanol	<i>P. cuspidatum</i>	[34]
		Etil asetat	<i>P. multiflorum</i>	[35]
Parietin (Phycion)		Diklorometan	<i>P. multiflorum</i>	[36]
		Metanol	<i>P. cuspidatum</i>	[33]
Rein		Etil asetat	<i>P. multiflorum</i>	[30]
		Eter	<i>P. multiflorum</i>	[37]

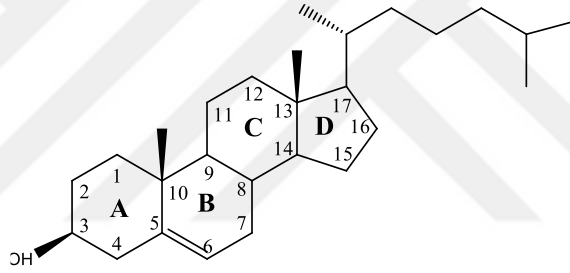
2.6.3 Steroidler

Steroidler 3 siklohegzan ve 1 siklopentan halkasının siklopenta[α]fenantren (Şekil 2.5) şeklinde dizilimiyle oluşmuş, 17 karbonlu ana iskelet yapısına sahip lipid çeşididirler. Günümüze kadar bitki, hayvan ve mantarlardan yüzlerce steroid çeşidi tanımlanmıştır. Steroidler steroller, cinsiyet hormonlarını, safra asitlerini ve adrenal korteks hormonlarını içine alan geniş bir bileşik grubudur [38].



Şekil 2.5: siklopenta[α]fenantren (a) ve steroid (b) kimyasal yapıları.

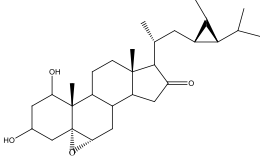
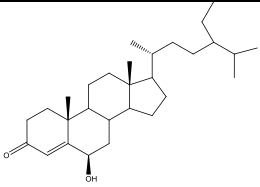
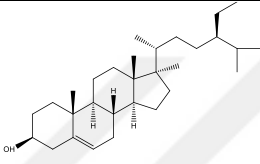
Steroller temel steroid iskeletine 17. karbondan uzun bir karbon zinciri ve en az bir hidroksil grubunun, genelde 3. karbondan, eklenmiş halidir. Hücre zarının bütünlüğünü ve akışkanlığını sağlamak, steroid hormonları ve safra asitleri gibi vücut için gerekli olan maddelerin sentezinde öncül molekül olarak rol almak, D vitamini üretiminde kullanılmak gibi önemli görevleri olan kolesterol Şekil 2.6'da gösterildiği gibi 27 karbonlu bir steroldür [39].



Şekil 2.6: Kolesterol kimyasal yapısı.

Özel bir sterol grubu olan fitosteroller ise bitkilerde bulunurlar ve östrojenik aktivite göstermeleri yönüyle önemlidirler. β -sitosterol ve stigmasterol gibi fitosterollerce zengin besinleri tüketmenin kandaki kolesterol seviyesini düşürmede aktif rolü olduğu düşünülmektedir. Rafine edilmemiş bitkisel yağlar, kuruyemişler, tam tahıllar ve bakliyat bol miktarda fitosterol içeren besin çeşitlerindedir. Tablo 2.3 *P. bistorta* ve *P. nodusum* türlerinin ekstraktlarından izole edilmiş olan bazı steroidleri göstermektedir. β -sitosterol glikozidi olan daucosterol ise, *P. multiflorum*, *P. viviparum* ve *P. capitatum* gibi birçok *Polygonum* türünden izole edilmiştir [40-42].

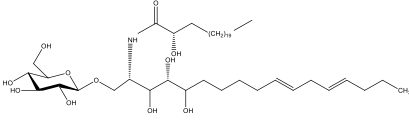
Tablo 2.3: *Polygonum* türlerinden izole edilen bazı steroidler.

BİLEŞİĞİN ADI	BİLEŞİĞİN YAPISI	EKSTERESİ	BİTKİ ADI	KAYNAK
Zhonghualiaoine I		%75 etanol	<i>P. nodosum</i> pers.	[43]
6-Hydroxystigmast-4-en-3-on		%90 metanol	<i>P. bistorta</i>	[44]
β -sitosterol		Hegzan	<i>P. bistorta</i>	[45]

2.6.4 Sfingolipitler

Sfingolipitler hem bitki hem de hayvan hücrelerinin zarında yapısal bileşen ve hücre sinyalleşme düzenleyicisi olarak görev alırlar. Amfifilik kimyasal yapıları hem hücre zarındaki görevlerini yerine getirebilmeleri hem de ilaç olma potansiyeli taşımaları adına önem taşımaktadır [46]. Seramidler bütün sfingolipitlerin temel yapı taşıdır ve uzun zincirli yağ asitlerinin sfingozin ile bağlanmasıyla oluşurlar. Glukoz veya galaktozun seramidin 1 numaralı karbonuna bağlanmasıyla serebrozidler meydana gelir. Tablo 2.4, *P. hydropiper* türünden metanol ile ekstre edilen Hidropiperzid molekülünün yapısını göstermektedir.

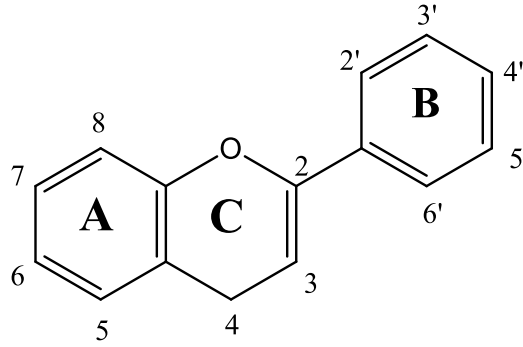
Tablo 2.4: *P. hydropiper* türünden izole edilen sfingoglukolipit.

BİLEŞİĞİN ADI	BİLEŞİĞİN YAPISI	EKSTERESİ	BİTKİ ADI	KAYNAK
Hidropiperzid		metanol	<i>P. hydropiper</i>	[47]

2.6.5 Flavonoidler

Flavonoidler 15 karbonlu, C6-C3-C6 iskeletine sahip, fenilbenzopiran yapısındaki, sekonder metabolitlerdir (Şekil 2.7) [[48]. Aynı zamanda *Polygonum* türlerinde en çok bulunan bileşik sınıfıdır. C halkasındaki kimyasal yapı farklılıkları sonucu flavon, flavonol, izoflavon, antosiyanin ve kalkon gibi değişik alt sınıflandırmalarıyla kimyasal çeşitlilik gösteren flavonoidler, ana yapılarına farklı sayıda ve değişik pozisyonlardan bağlanabilen hidroksil, metoksil veya glikozil gibi fonksiyonel grupları sayesinde biyolojik aktivite yönünden de geniş bir spektrumda potansiyel göstermektedirler [49].

Flavonoidlerin, başta polen taşıyıcı canlıları kendine çekme amaçlı çiçeklere ve meyvelere renk veya aroma verici; UV ve zararlı patojenlere karşı koruyucu; fitoaleksinler ve allelopatik bileşikler gibi sinyal molekülü üretici; ısıcağa ve soğuğa dayanıklılık sağlayıcı olmak üzere birçok biyolojik aktivitenin gerçekleştirilmesinde hayati önem taşıdıkları bilinmektedir [50]. Bitkilerden elde edilen ilk flavonoid olan rutin 1930 yılında izolasyonundan bugüne, 6000'den fazla flavonoid tanımlanmıştır [48]. Tablo 2.5 *Polygonum* türlerinden izole edilen bazı flavonol ve kalkon örneklerini listelemektedir.

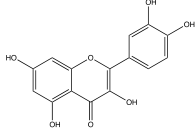
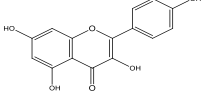
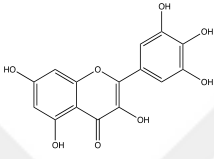
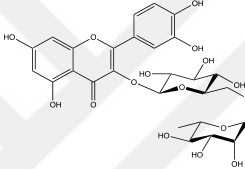
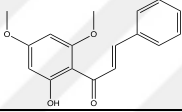


Şekil 2.7: Flavonoidlerin temel iskeletini oluşturan fenilbenzopiran kimyasal yapısı.

Tablo 2.5: *Polygonum* türlerinden izole edilen bazı flavonoidler.

2.7 Bazı *Polygonum* Türleri Üzerine Yapılmış Farmakolojik Çalışmalar

2.7.1 *Polygonum cuspidatum* türünün farmakolojik özellikleri

BİLEŞİĞİN ADI	BİLEŞİĞİN YAPISI	EKSTERESİ	BİTKİ ADI	KAYNAK
Kersetin		Dietil eter	<i>P. bistorta</i>	[51]
			<i>P. lapathifolium spp. nodosum</i>	[51]
			<i>P. aviculare</i>	[51]
Kamferol		Etil asetat	<i>P. aviculare</i>	[52]
		Dietil eter	<i>P. aviculare</i>	[51]
Mirsetin		Etil asetat	<i>P. aviculare</i>	[53]
		Dietileter	<i>P. convolvulus</i>	[51]
		Dietileter	<i>P. convolvulus</i>	[51]
Rutin		Etil asetat	<i>P. multiflorum</i>	[30]
Flavokawin B		Diklorometan	<i>P. persicaria</i>	[54]

P. cuspidatum bitkisinin Çin Farmakopesinde 100'den fazla ilaçta kullanımı mevcuttur. *P. cuspidatum*'un içerdiği etken maddelerden emodin ve polydatin miktarları bitki kalitesini belirlemede standart olarak kullanılmaktadır. Geleneksel olarak iltihaplanma, enfeksiyon, sarılık ve yanık tedavilerinde kullanımı olan *P. cuspidatum* türünün, lipid düzenleyici, anti-şok, antienflamatuvar, antikanser, hepatoprotektif, antiviral, antifungal ve antibakteriyel özellikleri yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur [25].

2.7.2 *Polygonum cognatum* türünün farmakolojik özellikleri

Antidiyabetik, antioksidan, antimikrobiyel, diüretik, antifungal özellikler taşıyan *P. cognatum*'un bu biyolojik aktivitelerini içerdiği tanenlere, flavonoid glikozitlere, sterollere, triterpenlere, poliuronidlere ve saponinlere bağlı olduğu düşünülmektedir [55].

2021 yılında *P. cognatum* bitkisinin, çok nadir görülen ve agresif ilerleyen bir beyin tümörü olan Glioblastoma multiforme (GBM) tumorüne karşı U87 hücre hattında doksorubisin (DXR) ilacı eşliğinde doza bağlı kullanımında, DXR'ın kanserli hücreler

üzerinde etkisinin arttığı görülmüştür [56]. Yapılan başka bir çalışmada aynı türün etanol ekstresinin meme kanserine karşı MDA-MB-231 hücre hattında etkili olduğu görülürken [7]; hegzan, aseton ve metanol ekstrelerinin MCF7 hücre hattında hücre viabilitesini doza bağlı olarak düşürdüğü ortaya konulmuştur [57]. *P. cognatum* türünün, gerek tek başına gerekse sentetik ilaçlar eşliğinde kullanıldığında özellikle meme kanserine karşı tesirli olduğu bu çalışmalar sonucunda belirlenmiştir.

2.7.3 *Polygonum multiflorum* türünün farmakolojik özellikleri

P. multiflorum kaynaklı 100'den fazla kimyasal bileşiğin tanımlanması yapılmıştır. Geleneksel Çin Tıbbı kitaplarında 242 ilaç terkininde yer aldığı bilinmektedir. Etken maddeler olan 2,3,5,4'- tetrahidroksistilben-2-*O* glikozitleri ve antrakinin miktarı bitki kalitesinin belirlenmesinde kullanılan standartlardır. Geleneksel olarak saç rengini siyahlaştırıcı, böbrek ve karaciğer güçlendirici, yaşlanma karşıtı, uyuz gibi cilt rahatsızlıklarında hassaslaşan cildin rahatlatılması kullanım alanları içindedir. Antioksidan, nöroprotektif, yaşlanma karşıtı ve bilişsel becerileri artırıcı özelliklerinden dolayı alzheimer ve parkinson hastalıklarında kullanım potansiyeli ortaya konulan *P. multiflorum*, aynı zamanda immunomodölatör, hepatoprotektif, antikanser, antiinflamatuar, antioksidan özelliklere sahiptir [10]. 2,3,5,4'- tetrahidroksistilben-2-*O* glikozitleri, resveratrol, polydatin, polygonumosid A, B, C ve D, emodin, aloe-emodin, fiksiyon, rein, rutin, kamferol, kersetin, polygonflavanol A, kateşin, epikateşin bu türden izole edilerek yapıları tayin edilen bileşiklerden bazılarıdır [58]. 2022 yılında yapılan bir araştırmaya göre, *P. multiflorum*'un %60 sulu etanol ekstresinin diyabetik farelerde 7 hafta boyunca kullanımı sonucu, deney grubu farelerinin kan şekerinin normal seviyeye geldiği gözlemlenmiştir. Bu çalışma, *P. multiflorum*'un kuvvetli antioksidan özelliği taşımasının yanında gösterdiği hipoglisemik etki ile *Polygonum* türlerinde potansiyel antidiyabetik aktivitenin varlığını desteklemesi yönünden önemlidir [59].

2.7.4 *Polygonum aviculare* türünün farmakolojik özellikleri

Geleneksel olarak farklı kültürlerde ağız yaralarında, diüretik olarak, idrar yolları iltihaplanmasında kullanımı olan *Polygonum aviculare*'nin etanol ekstrelerinin antidiyabetik, antiobezite, antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur [60, 61]. 2020 yılında yapılan bir çalışmayla %70 etanol

ekstresinin; su, etilasetat ve %100 etanol ekstrelerine göre daha yüksek oranda flavonoid içerdiği ve en fazla α -glukozidaz inhibe eden ekstre olduğu gösterilmiştir [62]. Kamferol, kersetin, juglanin, avikularin, mirsetin gibi flavonoidlerin yanı sıra, kafeik, klorojenik ve gallik asit gibi fenolik asitler, lignan yapısında olan avikulin ve emodin antrakinonu bulunmaktadır [12].

2.8 Antioksidan Aktivite

Reaktif oksijen türleri (ROS) moleküler oksijenin yükseltgenme-indirgenme reaksiyonları veya elektronla uyarma sonucu oluşan molekül grubuna verilen genel isimdir [63]. Yükseltgenmiş oksijen içeren ATP üretiminde aldığı aktif rolden dolayı mitokondri vücut içinde başlıca ROS oluşum kaynağıdır. Hidroksil radikali (\bullet OH), peroksil radikali ($\text{ROO}\bullet$), alkoksil radikali ($\text{RO}\bullet$), süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\bullet-}$) ve hidrogen peroksit (H_2O_2) başlıca ROS arasındadırlar.

Antioksidanlar, küçük miktarda bulduklarında oksidasyon işlemlerini kontrol ederek, geciktirerek veya önleyerek dejeneratif hastalıkların oluşmasını ve ilerlemesini engelleyen bileşiklerdir. Antioksidanlar bu fonksiyonlarını hidrogen donörü veya radikal bağlayıcı özellikleri sayesinde radikalleri kararlı hale getirerek gerçekleştirirler. Hücre içinde meydana gelen doğal hücresel aktivitelerin yan ürünü olan ROS, vücutta normal seviyelerde bulduklarında hücre sinyalizasyonunda rol aldıklarından gereklidirler. ROS miktarı, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz gibi vücut içinde üretilen enzimatik antioksidanlar (endojen antioksidanlar) sayesinde kontrol altında tutulmaktadır. Çevre kirliliği, toksinler, fiziksel stres, kızartılmış yiyecekler ve radyasyon homeostazı bozarak ROS miktarının kontrol dışı kalmasına sebep olurlar. ROS üretimi ve giderimi arasındaki bu dengesizliğe oksidatif stres denir. Oksidatif stresin kalp hastalıkları, diyabet ve karaciğer rahatsızlıkları gibi metabolik hastalıkların oluşumunda önemli rol oynadığı bilinmektedir. Dışarıdan antioksidan özellik taşıyan takviyeler (ekzojen antioksidanlar) almak oksidatif stresin önlenmesi ve dolayısıyla bu hastalıkların oluşumunun veya ilerlememesinin engellenmesi adına önemlidir. Alınan eksojen antioksidanlar arasında E ve C gibi vitaminler sayılabilir. Yağda çözünebilme özelliği sayesinde E vitamini hücre zarının yapısının korunmasında aldığı aktif rolden dolayı öne çıkmaktadır [64]. Vitaminlerin yanı sıra son yıllarda önemi daha da çok anlaşılan kersetin, kateşin gibi flavonoidler ve gallik asit, ferulik asit gibi fenolik asitler eksojen antioksidanların başında gelmektedirler.

Fenolik bileşikler yapılarında bulunan hidroksil grupları sayesinde eksojen antioksidan olarak görev almalarının yanı sıra endojen antioksidanların üretilmesini de desteklemektedirler. Bu nedenle antioksidan aktivite tayin metodları kullanılarak yüksek antioksidan potansiyeli taşıyan sekonder metabolitlerin belirlenmesi, doğal ürünlerin hastalıklardan koruyucu veya hastalıkların başlamalarını geciktirici etkilerini anlayıp nihai ürünlere dönüştürülebilmeleri adına önem taşımaktadır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Bitki Materyali

Tez kapsamında çalışılan bitki türü olan endemik *Polygonum sivasicum* Kit Tan & Yıldız bitkisi Sivas ili 1700 rakım üstünde bulunmaktadır. Bu çalışma için Sivas ili Gemerek ilçesi, İnkışla köyü Güre mevki'nden Haziran 2022'de toplanmıştır. Teşhisi Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasotik Botanik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Çağla Kızıllarslan Hançer tarafından yapılmıştır. Bitki örneği İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumunda İSTE-117503 herbaryum numarası ile saklanmaktadır.

3.2 Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Kimyasallar	Kullanılan antioksidan aktivite reaktifleri Sigma-Aldrich'den, diğer kimyasallar Isolab markadan temin edildi. α - tokoferol, amonyum asetat, asetik asit, (2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) (ABTS), bakır (II) klorür, β -karoten, butillenmiş hidroksi anisol (BHA), butillenmiş hidroksi toluen (BHT) demir (II) klorür, 1,1-diphenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), ferene, linoleik asit, neokuprin, potasyum persülfat, sülfürik asit, TWEEN 40, vanilin.
Çözücüler	Kullanılan çözücüler Isolab markadır. Aseton, Dietileter, Diklorometan, Dimetil sülfoksit, Etanol, Etilasetat, Hegzan, Kloroform, Metanol, Petroleteri (Sigma Aldrich).
Kolon dolgu maddeleri	Silika jel (60 Å, 70-230 mesh, Sigma-Aldrich), C18 (LiChroprep RP-18 (40-63 μ m)), Sephadex LH-20

3.3 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Tablo 3.1: Tez kapsamında kullanılan cihazlar ve markaları.

Cihaz	Cihazın Markası
-------	-----------------

Derin dondurucu	New Brunswick Scientific-Ultra Low Temperature Freezer
Döner Buharlaştırıcı	Buchi, Rotavapor R-100
ELISA	Biotek Synergy H1 Hybrid Reader
Etüv	Redline by BINDER
Gaz Kromatografisi	Thermo Scientific Trace 1310 GC
Hassas terazi	Shimadzu
HR-MS, Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi	Thermoscientific-Thermo Q Exactive
LC-MS, Sıvı kromatografisi kütle spektrometrisi	Thermoscientific-Thermo Q Exactive
Liyafilizatör	Christ Alpha 3-4 LSCbasic
Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR)	Bruker Avance Neo 500 MHz
Laboratuvar tipi öğütücü	Waring Commercial
pH metre	Mettler Toledo
Santrifüj	Nüve NF 1200
Ultrasonik banyo	VWR Ultrasonic Cleaner
UV Lambası	CAMAG
Vorteks	Bio Vortex V1 BIOSAN

Balon jöjeler, yuvarlak dipli cam balonlar, beherler, erlenler, magnetler, azot ve oksijen tüpleri, otomatik pipetler (20–200 μ L, 100–1000 μ L) (Isolab, Eppendorf), çoklu pipet (10-100 μ L), huniler, kolonlar.

3.4 Ekstrelerin Hazırlanması

Bitki örneği gölgede kurutulduktan sonra yüzey alanını arttırmak için laboratuvar tipi öğütücü kullanılarak küçük parçalara ayrıldı. Öğütülen bitki örneği sırasıyla hegzan, etilasetat, kloroform ve metanol çözücüleri eklenerek maserasyon işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem her bir çözücü için ekstrenin rengi önemli derecede açılana kadar devam edildi (48 saat x 6 tekrar). Ekstraksiyon işlemi sonucunda elde edilen ekstre Şekil 3.1’de gösterildiği gibi filtre kağıdından süzüldü ve süzüntünün çözücüsü döner buharlaştırıcı yardımıyla uzaklaştırılarak ham ekstre elde edildi. En son metanol ekstresinden geriye kalan bitki kalıntısı kurutulduktan sonra 80 °C su ile infüzyonu gerçekleştirildi. Ekstreden su liyafilizatör yardımıyla uzaklaştırıldı (Sekil 3.2).



Şekil 3.1: Hegzan ekstresi filtrelenme aşamasında.

3.5 Kromatografik Yöntemler

3.5.1 İnce tabaka kromatografisi (İTK)

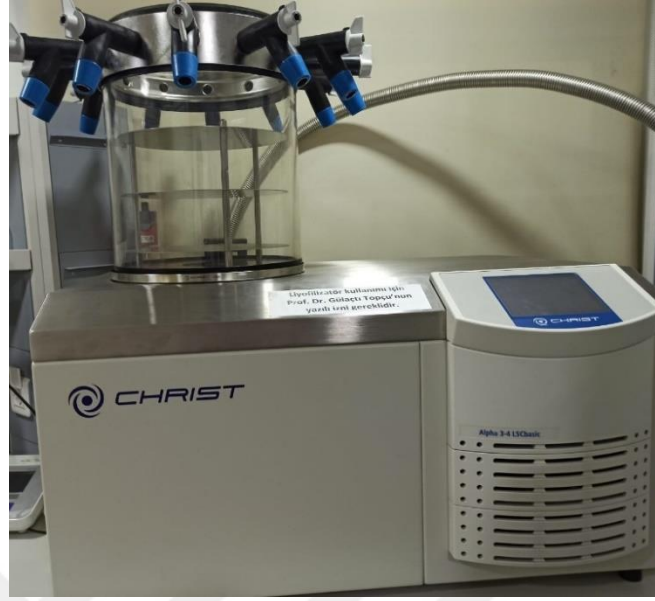
Bir karışımın bileşenlerini belirleme amaçlı kullanılan ince tabaka kromatografisi (İTK) nitel (kalitatif) bir analizdir. Bu tez çalışmalarında sabit faz olarak Merck marka Silika jel 60 F₂₅₄ kaplı alüminyum plakalar kullanıldı. 20×20 cm plakadan numune sayısına uygun istenen ölçüde sabit faz kesildi. İncelenecek karışımın çözeltisi ve karşılaştırılacak standartlar plağın alt kenarının 1 cm yukarisından kapiler ile 1'er cm aralıklarla tatbik edildi. Mobil faz apolar numuneler için hegzan ve etilasetat gibi polaritesi düşük çözücülerin farklı oranlarda karıştırılmalarıyla hazırlanırken, polar numuneler için kloroform ve metanol gibi polar çözücü karışımları tercih edildi. Uygun mobil fazda yürütülen plakadaki standart ve karışıma ait lekeler UV lambası ile UV₂₅₄/UV₃₆₆ dalga boylarında ve kullanılan vanilin-sülfürik asit reaktifi yardımıyla standartlarla karşılaştırılarak belirlendi.

Vanilin- Sülfürik asit reaktifi hazırlanışı:

A solüsyonu: 2 g vanilin 200 mL etanolde çözülür.

B solüsyonu: 20 mL sülfürik asit 180 mL etanol ile karıştırılır.

B solüsyonu, buz banyosuna yerleştirilmiş olan A solüsyonunun içine yavaş bir şekilde eklenir.



Şekil 3.2: Su ekstresinin kurutulması için kullanılan CHRIST marka liyafilizatör.

3.5.2 Kolon kromatografisi

Kolon kromatografisi ekstraları fraksiyonlandırmak ve fraksiyonlardan saf madde elde etmek amacıyla Silika jel, C₁₈ veya Sefadeks LH-20 gibi dolgu maddelerinden birine tutunmuş olan karışımın uygun bir mobil faz sistemi ile yürütülerek ayrıştırılması prensibine dayalı kromatografik bir yöntemdir (Şekil 3.3).

Hegzan, etilasetat ve kloroform ekstraları için ekstre az miktarda uygun çözücüde çözülerek adsorban ile karıştırıldı ve karışım oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kullanılacak kolonun boyu ve çapı ekstre miktarına uygun olarak seçildi. Mobil faz silikanın 1 cm kadar üstünde kalacak kadar, numune katı tatbik edildiğinde numunenin biraz üstünde kalacak kadar, akıtılarak numune uygulanmasına hazır hale getirildi. Kolonun üst kısmından kuru ekstre tatbik edildi. Elüsyona %100 hegzan ile başlanır ve sırasıyla diklorometan (DCM) ve metanol (MeOH) ile polarite arttırılarak elüsyona devam edildi, sonunda %100 metanol ile elüsyon tamamlandı. Fraksiyonların İTK sonuçlarına göre benzer fraksiyonlar birleştirildi.



Şekil 3.3: Kolon kromatografisi.

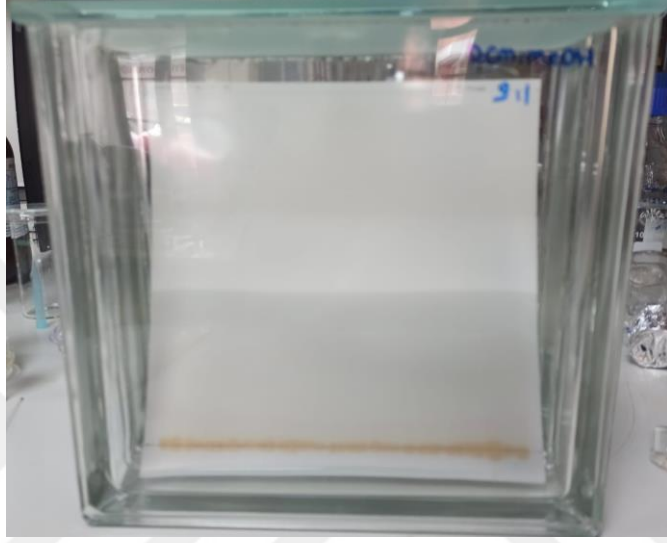
Saflaştırma için daha küçük boyuttaki kolonlarda silika jelin yanı sıra sefadeks LH-20 adsorban olarak kullanıldı. Sefadeks kolonu yapılırken fraksiyonun polaritesine göre diklorometan, metanol veya diklorometan-metanol karışımı mobil faz olarak kullanıldı. Seçilen mobil fazda çözünen fraksiyonun sefadeks kolonuna sıvı tatbiki gerçekleştirildi ve kolon metanol ile yıkanarak bitirildi.

Metanol ekstresinin fraksiyonlandırılmasında C18 dolgu maddesi kullanıldı. Ekstre silika jelde olduğu gibi adsorbana yedirilerek kuru halde hazırlanarak katı tatbik edildi. Elüsyona %100 saf su ile başlandıktan sonra metanol ile polarite düşürülerek devam edildi. Elüsyonun hızlanması için kolonun üst kısmından pompayla basınç uygulanır. En son %100 metanol ile elüsyon tamamlandı.

3.5.3 Preparatif ince tabaka kromatografisi (PİTK)

Hem nitel (kalitatif) hem de nicel (kantitatif) analizlerin yapılmasında kullanılan preparatif ince tabaka kromatografisi (PİTK) saflaştırılmak istenen maddenin ince bir hat şeklinde kapiler ile silika jel plağa (20×20 cm) alt kenarın 1.5 cm yukarisından yüklenmesiyle gerçekleştirildi. Plak, içine uygun mobil faz (40 mL) eklenmiş olan

23×24'lük İTK tankına yerleştirilerek yüklenen madde yürütüldü (Şekil 3.4). UV ışığı altında aktif olan maddenin yeri belirlenerek bir spatula yardımıyla kazınarak ayrıştırıldı. Beklenen ayrışmanın gerçekleşmediği durumlarda plak tekrar tanka yerleştirilerek ayrışma gerçekleşene kadar birden fazla kez yürütülebilir. Silikaya adsorbe olmuş madde uygun çözücü ile çözüldükten sonra silika jel SPE kartuşundan geçirilerek yıkandı. Safsızlık içerip içermediği tekrardan İTK yapılmak suretiyle kontrol edildi.



Şekil 3.4: Preparatif ince tabaka kromatografisi.

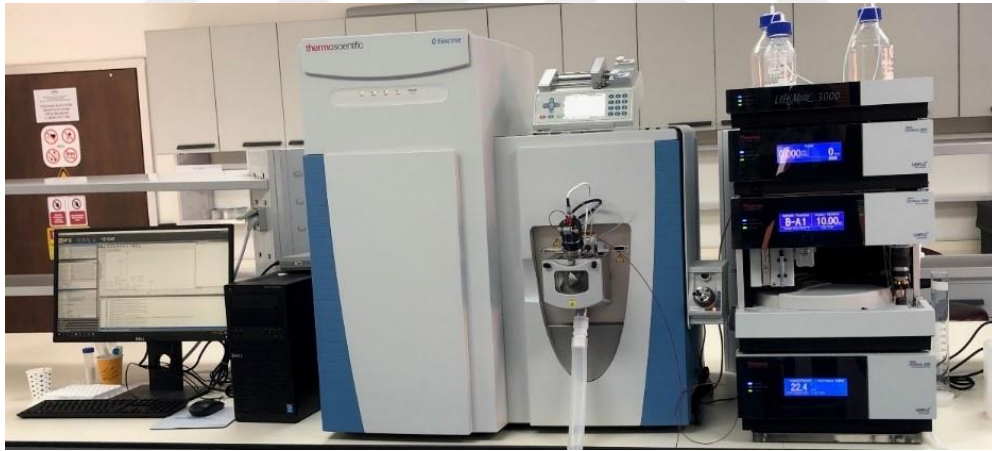
3.6 Spektroskopik Yöntemler

3.6.1 Nükleer magnetik rezonans spektroskopisi (NMR)

Kromatografik yöntemlerle saflaştırılan maddelerin ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, HSQC, COSY, HMBC spektrumları Bruker 500 MHz NMR cihazı kullanılarak alındı (Şekil 3.5). Referans olarak tetrametilsilan (TMS) ve çözücü olarak döterokloroform (CDCl_3), döterometanol (CD_3OD), döterosu (D_2O) ve döterodimetilsülfoksit ($\text{DMSO-}d_6$) kullanıldı.



Şekil 3.5 : Bruker 500 MHz NMR, Bezmialem Vakıf Üniversitesi websitesinden alınmıştır.



Şekil 3.6: LC-HR/MS Thermo Q Exactive, Bezmialem Vakıf Üniversitesi websitesinden alınmıştır.

3.6.2 Sıvı kromatografi- yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi (LC-HR/MS)

İzolasyon işlemi tamamlandıktan sonra, NMR spektrumlarının okunmasıyla yapısı tayin edilen maddenin moleküler ağırlığını belirlemek amaçlı LC-HR/MS cihazı kullanıldı (Şekil 3.6) ve molekülün yapısı onaylanmış oldu. LC saflıkta metanol kullanılarak çözünen numune filtre edildikten sonra cihaza enjekte edilmeye hazır hale getirildi.

3.7 Antioksidan Aktivite Belirleme Yöntemleri

Ekstrelerin DPPH serbest radikali giderimi, ABTS katyon radikali giderimi, CUPRAC bakır (II) indirgeyici antioksidan aktivite, metal bağlama ve β -karoten-linoleik asit yöntemleri kullanılarak antioksidan aktiviteleri yapılmadan önce testlerde kullanılmak üzere *P. sivasicum*'un beş farklı ekstresine ek olarak pişirilmiş bitki örneğinin de içinde bulunduğu altı numunenin her biri için 4000 ppm'lik stok çözeltileri hazırlandı. Ekstre kodları ve açıklamaları Tablo 3.2 'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2: Antioksidan aktivite için numune özellikleri.

Ekstrenin Adı	Ekstrenin Kodu
<i>P. sivasicum</i> hegzan ekstresi	PSH
<i>P. sivasicum</i> etilasetat ekstresi	PSE
<i>P. sivasicum</i> kloroform ekstresi	PSK
<i>P. sivasicum</i> metanol ekstresi	PSM
<i>P. sivasicum</i> su ekstresi	PSS
<i>P. sivasicum</i> pişirilmiş	PSC

3.7.1 ABTS katyon radikali giderim aktivitesi

Numunelerin ABTS katyon radikali giderim aktivitesi, ABTS'nin potasyum persülfat ile hazırlanan çözeltisinin 12-16 saat karanlıkta bekletilmesi sonucu oluşan ABTS^{•+} ile belirlendi. Kullanımdan önce ABTS^{•+} solüsyonu etanol ile seyreltilir. Bu işlem için 4000 ppm stok çözeltisinden farklı konsantrasyonlarda seyreltilerek hazırlanan örneklerden 96 kuyucuklu plakalara alınarak üzerlerine ABTS^{•+} çözeltisi eklendi. 10 dakika inkübasyon yapıldıktan sonra 734 nm'de spektrofotometre ile köre karşı absorbansı okundu [65]. Her bir numune için üç farklı okuma yapıldı. ABTS^{•+}'nin süpürme kapasitesi (inhibisyon yüzdesi-% I) denklem 3.1 kullanılarak hesaplandı. ABTS katyon radikal süpürme aktivitesi için antioksidan standartlar olarak BHA, BHT ve α - tokoferol kullanılmıştır.

$$\% I = \frac{A_{kontrol} - A_{örnek}}{A_{kontrol}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.7.2 DPPH serbest radikali giderim aktivitesi

Serbest radikal süpürme aktivitesi, Blois [66] tarafından hafif modifikasyonla açıklanan DPPH radikali giderim aktivitesi ile spektrofotometrik olarak belirlendi. Prosedürde, 0.4 mM DPPH metanol solüsyonu farklı konsantrasyonlarda numune ile muamele edildi. Otuz dakika sonra, 96 kuyucuklu bir mikropılaka okuyucu (Şekil 3.7) kullanılarak 517 nm’de köre karşı absorbensı ölçüldü. DPPH serbest radikali giderim aktivitesi (inhibisyon; I) denklem 3.1 kullanılarak hesaplandı. Bu aktivite için antioksidan standartlar olarak BHA ve α -tokoferol kullanıldı.

3.7.3 Metal bağlama aktivitesi

Metal bağlama aktivitesi Fe(II)-Ferozine metoduna göre belirlendi [67]. Bu işlem için 4 farklı konsantrasyonda hazırlanan numunelerin üzerilerine önce etanol daha sonra 0.2 mM FeCl₂ eklendi. Reaksiyon, 0.5 mM ferene ilavesiyle başlatıldı. Karışım kuvvetlice çalkalandı ve oda sıcaklığında 10 dakika beklemeye bırakıldı. Absorbans değeri 562 nm’de ölçüldü. Metal bağlama aktivitesi için standart olarak EDTA kullanıldı.



Şekil 3.7: ELISA mikropılaka okuyucu.

3.7.4 CUPRAC indirgeme gücü

Cu(II) indirgeme gücü antioksidan kapasitesi, hafif modifikasyonlarla Apak ve arkadaşlarının [68] yöntemine göre belirlendi. 96 kuyucuklu bir plakaya 4 farklı konsantrasyonda hazırlanan numunelerin üzerine NH₄Ac tampon (1 M, pH 7.0), 10 mM Cu (II) ve 7.5 mM neokuprin çözeltileri ilave edildi. 1 saat sonra, 450 nm’de absorbans değeri, 96 kuyucuklu mikropilaka okuyucu kullanılarak bir reaktif körüne karşı ölçüldü. CUPRAC yöntemi için antioksidan standartlar olarak BHA, BHT ve α - tokoferol kullanıldı.

3.7.5 β -karoten-linoleik asit yöntemi

β -karoten-linoleik asit tayini, linoleik asit oksidasyonundan ileri gelen konjuge dihidroperoksitlerin inhibisyonunun ölçülmesine dayanmaktadır [69]. Bu sistem, linoleik asidin inkübasyonu sırasında oluşan peroksit ürünlerinin, β -karotenin karakteristik sarı rengini tepkime vererek gidermesi ve bu renk gideriminin spektroskopik olarak takip edilmesi temeline bağlıdır. Reaksiyon sonunda çözeltide β -karotenin kaybolan karakteristik sarı renginin absorbansı 490 nm’de spektrofotometrede ölçüldü. Ortamda antioksidanların bulunması ya da antioksidan içerikli özütlerin ilave edilmesi, linoleik asitten oluşan peroksit ürünlerinin bu antioksidanlarla nötralize edilmesini sağlar ve bunun sonucu olarak da β -karotenin karakteristik sarı rengi korunmuş olur. Hızlı, basit ve duyarlı olması yönüyle öne çıkan bir yöntemdir [70].

Bu işlem için 4 farklı konsantrasyonda hazırlanan numunelerden 96 kuyucuklu plakaya β -karoten-linoleik asit emülsiyonu eklendi ve 470 nm’de absorbansı ölçüldü. Ardından 45 °C’de inkübasyon yapıldı. Her 30 dakikada bir, 470 nm dalga boyunda spektrofotometre ile köre karşı değerleri alındı. İnkübasyon, kontrolün minimum absorbansa (0.1) ulaşmasıyla sonlandırıldı.

3.8 *Polygonum sivasicum* Yağ Asidi Profilinin GC-MS Kullanılarak Belirlenmesi

P. sivasicum’un hegzan ekstresinin yağ asidi profili, yağların bazik ortamda metil ester türevine dönüştürülmesi sonrasında Gaz Kromatografisi (GC) kullanılarak kolonda moleküler ağırlıklarına göre ayrışması ve dedektör tarafından içeriğin hem kalitatif hem de kantitatif olarak tayin edilmesi prensibine dayanarak belirlendi.

Tablo 3.3: GC koşulları.

Cihaz: Thermo Scientific Trace 1310 GC	Fırın Sıcaklık Programı	
Mobil faz gazı: Helyum	Ayar: 6.00	
Mobil faz gazının akış hızı: 1 mL/dak.	Sıcaklık: 80°C	Süre: 1.00 dak.
Enjektör sıcaklığı: 220°C	Sıcaklık: 300°C	Süre: 5.00 dak.
Enjeksiyon hacmi: 0.5 µL		
Split oranı: 50:1		
Kolon: TG-5MS 0.25µm		

Tablo 3.4: MS koşulları.

Cihaz: Thermo Scientific Trace 9000 MS
Kütle tarama aralığı: 29-650 m/z
İyon kaynağı sıcaklığı: 280°C
İyonizasyon modu: EI
Tanımlama: BVÜ- İLMER Kütüphanesi

Bunun için *P. sivasicum* hegzan ekstresinden alınan numuneye 2 mL 0.5 N NaOH eklenerek 50 °C’de su banyosunda çözülene kadar karıştırıldı. Sonrasında, BF₃:CH₃OH ilave edilen karışım 80 °C’de çözününene kadar ısıtılarak soğumaya bırakıldı. Hacim doymuş NaCl çözeltisi ile 25 mL’ye tamamlandı. İşlem hegzan ile sıvı-sıvı ekstraksiyon yapılarak tamamlandı. Tablo 3.3 ve 3.4, GC ve MS cihaz koşullarını göstermektedir.

3.9 *Polygonum sivasicum* Fenolik Profilinin LC-HR/MS Kullanılarak Belirlenmesi

P. sivasicum’un metanol ekstresinin fenolik profili, 60 fenolik bileşik standardı (Tablo 3.6) kullanılarak sıvı kromatografisi kütle spektrometrisi ile kütle aralığı 100-900 m/z arasında taranması sonucu belirlendi. Sıvı kromatografisi için mobil faz olarak metanol ve su kullanıldı. Sıvı kromatografisi ve kütle spektrometrisinin koşulları Tablo 3.5’de verilmiştir.

Tablo 3.5: LC-MS koşulları.

HPLC Koşulları			Kütle Spektrometrisi Koşulları	
Mobil faz A: 1% HCOOH- H ₂ O			Sistem: Thermo Orbitrap Q-Exactive	
Mobil faz B: 1% HCOOH- MeOH			İyon kaynağı: ESI	
Kolon: Troyasil C18 HS – 150 x 3 mm 5 µm			Tarama aralığı: 100-900 m/z	
Metot (mL/min) % B			Gaz akış hızı: 45	
0.00	0.35	50	Yedek gaz akış hızı: 10	
1.00	0.35	50	Sprey potansiyeli (kV): 3.80	
3.00	0.35	100	Kapiler sıcaklığı. (°C): 320	
6.00	0.35	100	Yedek gaz ısıtıcı sıcaklığı (°C): 320	
7.00	0.35	50	S-lens RF seviyesi: 50.0	
15	0.35	50	Tanımlama: ILMER at BVU	

Tablo 3.6: LC-MS analizinde kullanılan fenolik bileşik standartlarının listesi.

Askorbik asit	Hesperidin	Kamferol	Vanilik asit
(-)-Epigallokateşin	Rutin	3'-O-metil kersetin	Naringin
(-)-Epigallokateşin gallat	Sirinjik asit	Apigenin	Sinapik asit
(+)-Kateşin	Rozmarinik asit	Hispidulin	Luteolin 7-glukozid
Klorojenik asit	Hiperozit	Izosakuranetin	p-Kumarik asit
Fumarik asit	Dihidrokamferol	Penduletin	Salisilik asit
(-)-Epikateşin	Oleuropin	Glisirizik asit	Naringenin
(-)-Epikateşin gallat	Apigenin 7-glukozid	Sinensetin	Luteolin
Verbaskozit	Ellajik asit	Kafeik asit fenetil ester	Nepetin
Çikoric asit	Kersitrin	Ramnositrin	Genistein
Orientin	Mirisetin	Krisin	Emodin
Kafeik asit	Nepetin-7-glukozid	Akasetin	Şatavarin
Kafein	Skutelarein	Kuillaik asit	Hederagenin
(+)- <i>trans</i> taksifolin	Kersetin	Sarsasapogenin	(-)- Karyofilen oksit
Luteolin-7-rutinozit	Herniarin	Gipsojenik asit	Kamferol

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Ekstraksiyon Sonuçları

Oda koşullarında gerçekleştirilen maserasyon işlemleri sonucunda elde edilen ekstrelerin miktarları ve ekstre verimleri Tablo 4.1’de gösterilmektedir. Buna göre en yüksek verim %10,17 ile metanol ekstresinden alınırken, en düşük verim % 0,32 ile kloroform ekstresinden alınmıştır. Elde edilen ekstrelerin antioksidan aktiviteleri belirlendi. İTK, antioksidan aktivite sonuçları ve ekstre miktarları değerlendirilerek öncelikle metanol ekstresinin fraksiyonlandırılmasına karar verildi.

Tablo 4.1: *P. sivasicum*’dan elde edilen ekstrelerin miktarları ve verimleri.

Kullanılan Bitki Materyali ve Miktarı (g)	Ekstrenin Kodu	Maserasyonda Kullanılan Çözücü	Ekstre Miktarı (g)	Ekstre Verimi (%)
<i>Polygonum sivasicum</i> (594 g)	PSH	Hegzan	8.28	1.39
	PSE	Etilasetat	9.74	1.64
	PSK	Kloroform	1.90	0.32
	PSM	Metanol	60.4	10.17
	PSS	Su infüzyonu	30.98	5.22

4.2 Antioksidan Aktivite Sonuçları

4.2.1 ABTS katyon radikali giderim aktivitesi sonuçları

ABTS katyon radikalinin gideriminde ekstrelerin aktiviteleri Tablo 4.2’de gösterildiği gibi sırasıyla PSM>PSE>PSC>PSK>PSH>PSS şeklindedir. Buna göre metanol ekstresinin IC₅₀ değeri 25,9 µg/mL bulunduğundan, standart olarak seçilen α -tokoferol’e ve BHT’nin IC₅₀ değerine yakın değerlerde çıkmıştır. Bu aktivitenin sonucunda metanol, etilasetat ve pişirilmiş *P. sivasicum* (PSC) IC₅₀ değerleri 100 µg/mL altında bulundu.

Tablo 4.2: ABTS katyon radikali giderim aktivitesi sonuçları.

	EKSTRE KODU	IC₅₀ (µg/mL)
EKSTRELER	PSH	290.00± 3.20
	PSE	34.80± 2.10
	PSK	116.30± 2.99
	PSM	25.90±1.45
	PSS	832.9±0.90
	PSC	42.60±0.88
STANDARTLAR	BHT	21.67±0.87
	BHA	7.23±0.01
	α-tokoferol	27.70±0.28

4.2.2 DPPH radikal giderim aktivitesi sonuçları

DPPH radikal giderim aktivitesi sonucunda metanol ve etilasetat ekstreleri sırasıyla 41,26 ve 67,10 µg/mL IC₅₀ değerleri ile 100 µg/mL'nin altında kalarak en aktif ekstreler olarak tespit edildi. Metanol ekstresinin IC₅₀ değeri standart olarak kullanılan α-tokoferol'ün IC₅₀ değerine (36,35 µg/mL) yakın olması sebebiyle bu yöntemde aktivitesi önemli bulundu. Bu yöntem sonucunda ekstrelerin aktivite sıralaması PSM>PSE>PSK>PSC>PSH>PSS şeklindedir. Tüm ekstrelerin ve standartların bu DPPH radikal giderim aktivite sonuçları Tablo 4.3'de verilmiştir.

Tablo 4.3: DPPH radikal giderim aktivitesi sonuçları.

	EKSTRE KODU	IC₅₀ (µg/mL)
EKSTRELER	PSH	276.20± 2.20
	PSE	67.10± 2.30
	PSK	106.30± 3.17
	PSM	41.26±1.01
	PSS	746.11±2.9
	PSC	113.78±2.61
STANDARTLAR	BHA	28.59±0.06
	α-tokoferol	36.35±0.24

4.2.3 Metal bağlama antioksidan aktivite sonuçları

Metal bağlama yönteminin sonuçlarına göre (Tablo 4.4) tüm ekstreler düşük aktivite gösterirken, pişirilmiş *P. sivasicum* 155,48 µg/mL IC₅₀ değeri ile en aktif numune olarak belirlendi. Bu sonuçlar doğrultusunda aktivite sıralaması en yüksekten düşüğe PSC>PSM>PSS>PSK>PSE>PSH şeklinde sıralandı.

Tablo 4.4: Metal bağlama aktivitesi sonuçları.

	EKSTRE KODU	IC₅₀ (µg/mL)
EKSTRELER	PSH	1418.62±1.12
	PSE	1331.62±5.34
	PSK	1314.93±4.12
	PSM	1018.62±6.64
	PSS	1031.62±2.34
	PSC	155.48±0.62
STANDART	EDTA	26.85±1.50

4.2.4 CUPRAC bakır (II) indirgeme aktivitesi sonuçları

CUPRAC bakır (II) indirgeme yönteminde ekstrelerin aktiviteleri Tablo 4.5’de gösterildiği gibi sırasıyla PSE>PSK>PSM>PSC>PSH>PSS şeklindedir. Buna göre tüm örneklerin A_{0,5} değerleri α - tokoferol standardından düşük çıkarken; PSE ve PSK ekstrelerinin diğer standartlar olan BHA (24,49 µg/mL) ve BHT (26,85 µg/mL) A_{0,5} değerlerine göre de düşük çıkarak yüksek CUPRAC bakır (II) indirgeme aktivitesi gösterdikleri belirlendi. En yüksek aktiviteyi 15,21 µg/mL A_{0,5} değeri ile etilasetat ekstresi gösterdi.

Tablo 4.5: CUPRAC bakır (II) indirgeme aktivitesi sonuçları.

	EKSTRE KODU	A_{0,5} (µg/mL)
EKSTRELER	PSH	108.49± 6.75
	PSE	15.21±2.43
	PSK	17.39±2.49
	PSM	54.09±3.81
	PSS	133.45±2.30
	PSC	94.33±3.40
STANDARTLAR	BHT	26.85±1.50
	BHA	24.49±0.19
	α -tokoferol	134.53±0.19

4.2.5 β -karoten-linoleik asit yöntemi sonuçları

β -karoten-linoleik asit yönteminin sonuçlarına göre (Tablo 4.6) tüm ekstreler orta derecede aktivite gösterirken; kloroform ekstresi 14.93 µg/mL IC₅₀ değeri ile en aktif ekstre olarak yüksek aktivite gösterdiği belirlendi. Bu değerın standartlar olan BHA (1.34 µg/mL) ve α -tokoferol (2.10 µg/mL) IC₅₀ değerlerinden yüksek olmakla beraber

kıyaslanabilir oranda olduğu görüldü. Buna göre aktivite sıralaması yüksekten düşüğe PSK>PSE>PSH>PSM>PSS>PSC şeklinde belirlendi.

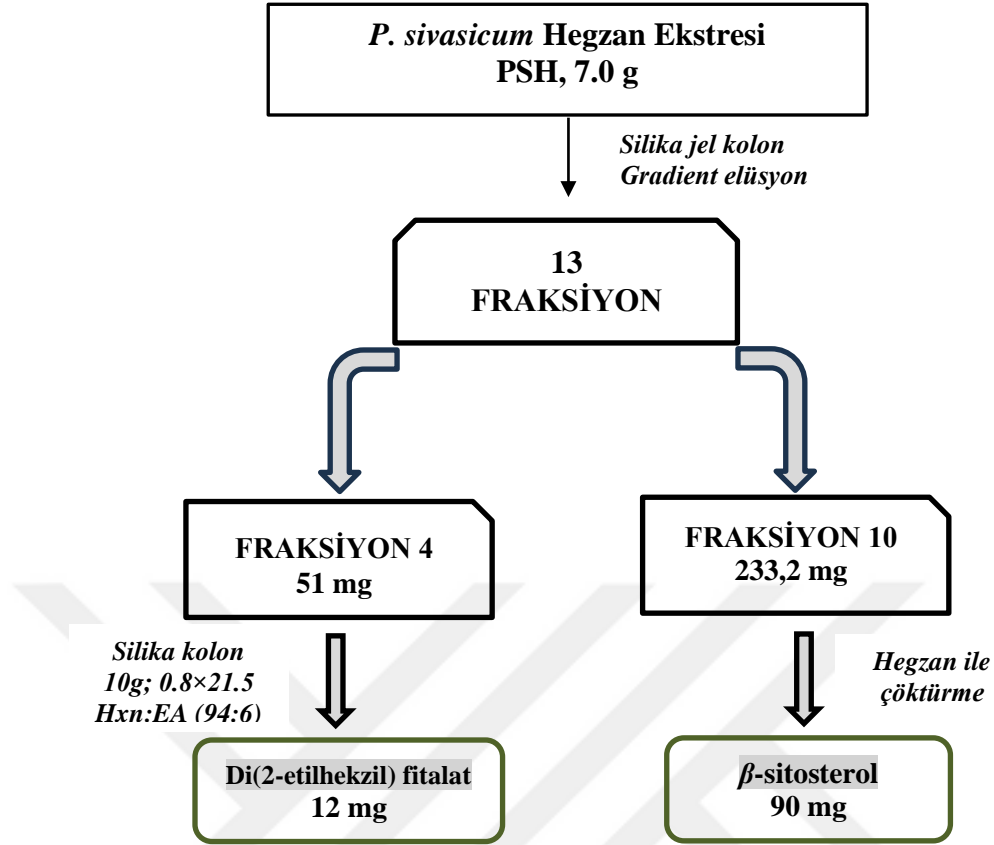
Tablo 4.6: β -karoten-linoleik asit yöntemi sonuçları.

	EKSTRE KODU	β-karoten IC₅₀ (μg/mL)
EKSTRELER	PSH	108.14 \pm 0.75
	PSE	108.00 \pm 3.63
	PSK	14.93 \pm 0.11
	PSM	153.77 \pm 2.37
	PSS	158.69 \pm 2.14
	PSC	772.25 \pm 3.70
STANDARTLAR	BHA	1.34 \pm 0.04
	α - tokoferol	2.10 \pm 0.08

4.3 *Polygonum sivasicum*'un Hegzan Ekstresi Fraksiyonlarından Saf Maddelerin İzolasyonu

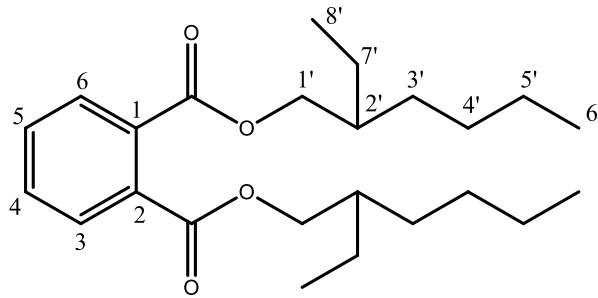
Hegzan ekstresini (PSH, 7.0 g) fraksiyonlandırmak için açık kolon kromatografisinde dolgu maddesi olarak silika jel kullanıldı. Ekstre çözülerek silika jel ile karıştırıldıktan sonra karışım oda şartlarında ışık görmeyecek şekilde kurumaya bırakıldı. Kuruyan karışım şartlanan silika jel kolonun üst kısmına katı olarak yüklendi. Elüsyona %100 hegzan ile başlandı ve sırasıyla %25 oranlarda diklorometan ile polarite artırılarak elüsyona devam edildi, sonunda %100 metanol ile elüsyon tamamlandı.

İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) yöntemi kullanılarak fraksiyonlar karşılaştırıldı. Bu amaçla mobil faz olarak hekzan:etilasetat çözücü sistemleri kullanıldı. Adsorban olarak normal faz Merck marka silika jel 60 F₂₅₄ kaplı alüminyum plakalar ve İTK reaktifi olarak vanilin-sülfürik asit kullanıldı. Benzer fraksiyonlar birleştirilerek 13 fraksiyon elde edildi.



Şekil 4.1: *P. sivasicum* hegzan ekstresinin fraksiyonlandırılması sonucu elde edilen saf maddeler.

4.3.1 Di(2-etilhekzil) fitalat (DEHP)



Şekil 4.2: Di(2-etilhekzil) fitalat'ın kimyasal yapısı.

P. sivasicum hegzan ekstresi 4. fraksiyonundan (PSHF4, 51 mg) madde izolasyonu için yapılan kolon kromatografisinde silika jel kullanıldı (10 g; 0,8×21,5 cm).

İzokrotik mobil faz olarak hegzan:etilasetat (94:6) sistemi kullanılarak yürütülen kolondan PSHF4-0 kodlu madde renksiz ve yağ kıvamında (12 mg) saf olarak elde edildi (Şekil 4.1). Vanilin belirteci püskürtülüp yakıldığında (105 °C) mor renk alan bileşik (Şekil 4.2), zamanla renk değişimi göstererek maviye döndü (Şekil 4.3).



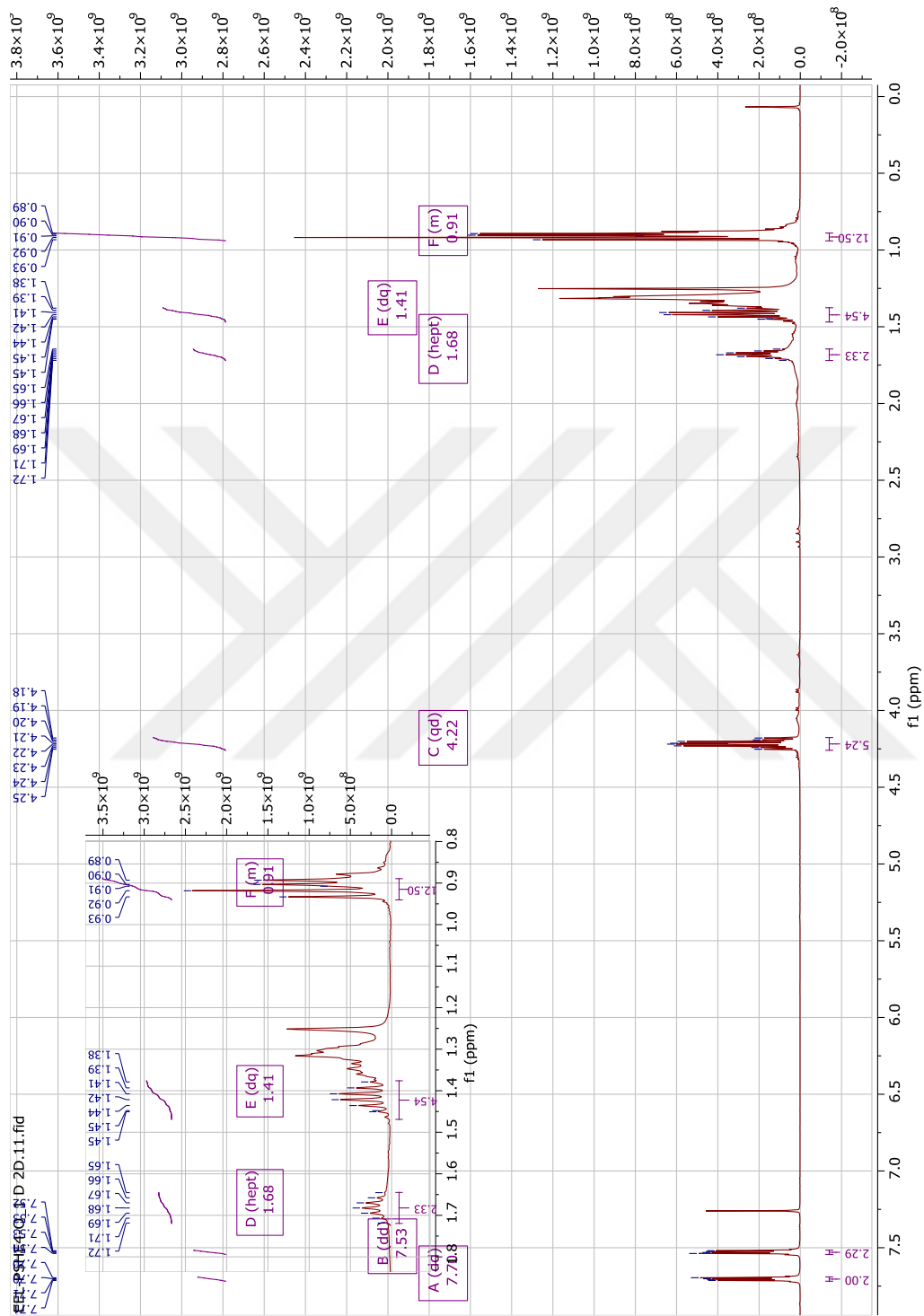
Şekil 4.3: Di(2-etilhekzil) fitalatın vanilin-sülfürik asit reaktifi ile yakıldıktan hemen sonra (mor, solda) ve zamanla aldığı renkler (mavi, sağda).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) spektrumunda aromatik bölgede iki protonun δ 7,70 (2H, *dd*, $J = 5.7, 3.3$ Hz) ve 7,53 (2H, *dd*, $J = 5.8, 3.3$ Hz) rezonans olduğu belirlendi. $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz) spektrumu incelendiğinde ise 128,82 ve 130,90, 132,46 ppm'de sadece 3 aromatik protonun rezonans olması simetrik bir molekülün varlığını düşündürdü. Ayrıca $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumunda toplamda 12 karbon olmasına rağmen, $^1\text{H-NMR}$ spektrumundaki proton sayısının bununla örtüşmemesi kimyasal yapıda simetrinin varlığını destekledi. Substituentlerin simetrik olmaları nedeniyle *para*-pozisyonundan bağlı olması durumunda $^1\text{H-NMR}$ spektrumundaki iki sinyal yerine bir sinyal görülmesi gerektiğinden bu fonksiyonel grupların birbirlerine *orto*-konumundan bağlı olduklarına karar verildi. 4,22 ppm'de görülen sinyal kimyasal yapıda bir metoksil grubunun varlığını düşündürdü. 1,68 ppm'deki sinyalin varlığı (*hept*, $J = 6.1$ Hz, 2H) bu iki hidrojenin iki metil veya üç metilen grubuna komşu olabileceğini dolayısıyla molekülün düz zincir yerine dallanmış olduğunu gösterdi. HMBC korelasyonu incelendiğinde H-7' ait sinyalin (1,41 ppm) bağlı olduğu önerilen 2 numaralı karbonla etkileşimde bulunması bunu desteklemektedir (Tablo 4.7). $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC ve COSY spektrumları (Şekil 4.4-4.8) değerlendirildiğinde molekülün bir fitalat türevi olduğuna karar verildi.

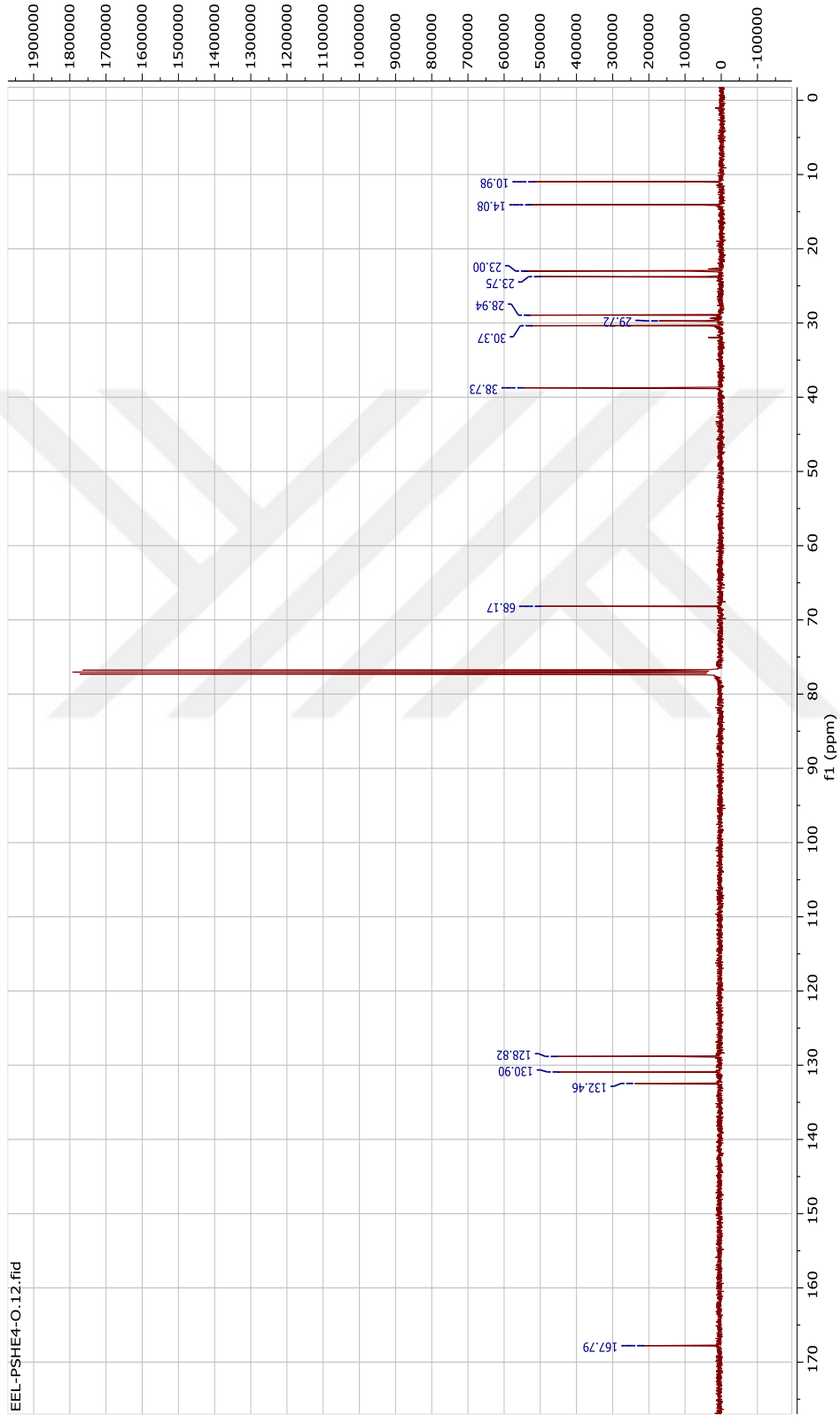
Yapılan literatür araştırması sonucu PSHF4-0 kodlu maddenin di(2-etilhekzil) fitalat olduğu belirlendi. Daha önce *Thevetia peruviana* türünden [71] elde edildiği gibi kahverengi bir alg olan *Undaria pinnatifida* [72] türünden de izole edildiği belirlendi. Daha önce Afrika kökenli bir bitki karışımının bileşenlerinin araştırıldığı bir yayında [73] rapor edilen ^1H ve ^{13}C -NMR spektrumları ile karşılaştırıldığında bileşiğin $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_4$ kapalı formülüne sahip 1,2-Benzenedikarboksilik asit, bis(2-etilhekzil) ester olduğu doğrulandı [74].

Tablo 4.7: Di(2-etilhekzil) fitalat'ın ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz), ^1H -NMR (CDCl_3 , 500 MHz) değerleri ve HMBC korelasyonu.

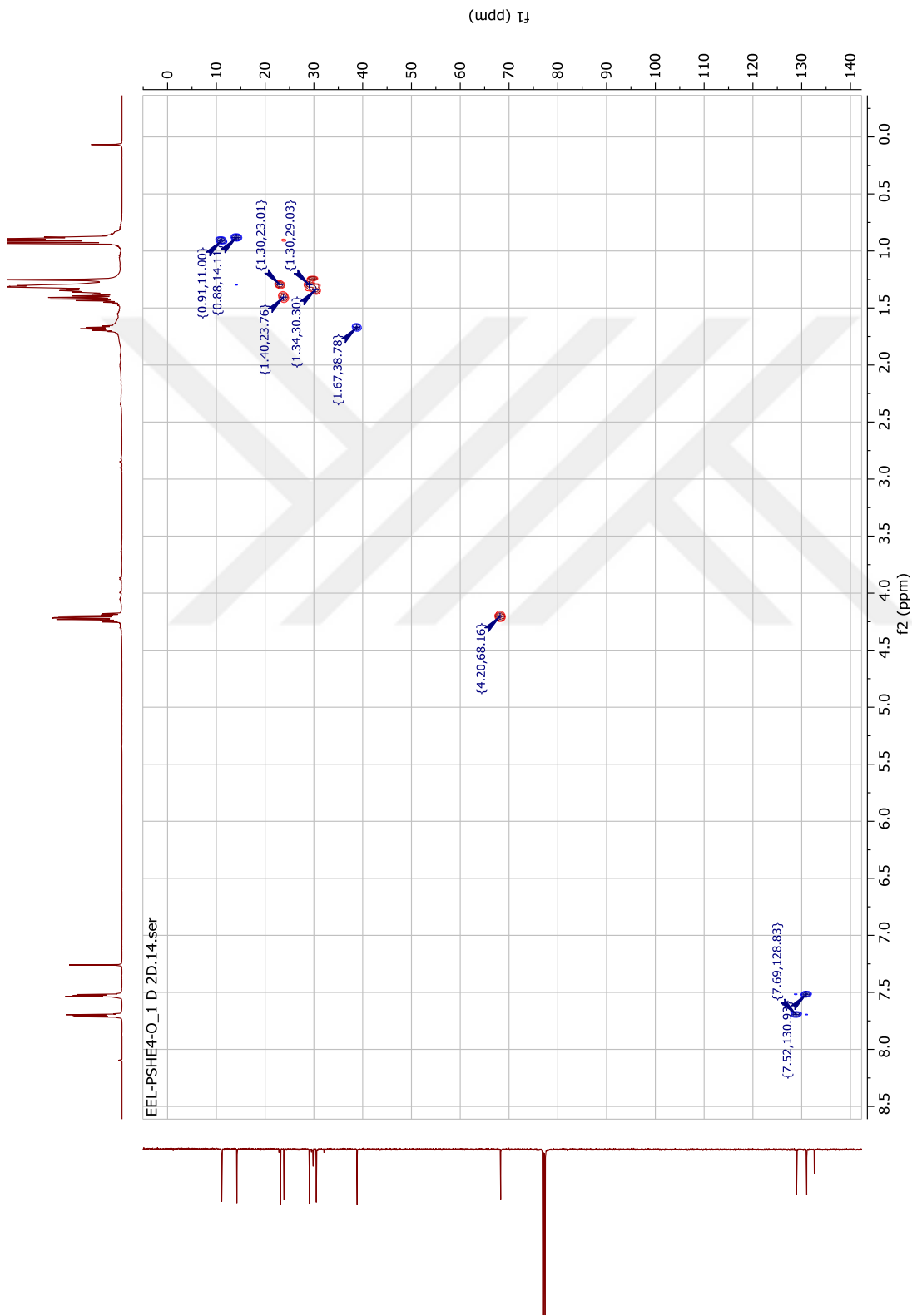
Pozisyon	δ_{C}	δ_{H}	HMBC (H→C)
1	132.46	-	-
2	132.46	-	-
3	128.82	7,70 (2H, <i>dd</i> , $J = 5.7, 3.3$ Hz)	C=O; C-1/2; C-4/5
4	130.90	7,53 (2H, <i>dd</i> , $J = 5.8, 3.3$ Hz)	C-3/6
5	130.90	7,53 (2H, <i>dd</i> , $J = 5.8, 3.3$ Hz)	C-3/6
6	128.82	7,70 (2H, <i>dd</i> , $J = 5.7, 3.3$ Hz)	C=O; C-1/2; C-4/5
1'	68.17	4.22 (4H, <i>dq</i> , $J = 10.9, 5.9$ Hz)	C=O; C-2'; C3'; C-5'
2'	38.73	1.68 (2H, <i>hept</i> , $J = 6.1$ Hz)	C-1'; C-2'; C-7'; C-8'
3'	30.37	1,32 (4H, <i>m</i>)	C-2'; C-4'; C-8'
4'	28.94	1,25 (4H, <i>m</i>)	C-2'; C-3'; C-5'; C-6'; C-7'
5'	23.00	1,35 (4H, <i>m</i>)	C-2'; C-3'; C-4'
6'	14.08	0.89 (6H, <i>m</i>)	C-4'; C-5'
7'	23.75	1.41 (4H, <i>dq</i> , $J = 14.3, 7.3$ Hz)	C-2'; C-8'
8'	10.98	0.92 (6H, <i>m</i>)	C-2'; C-7'
C=O	167.79	-	-



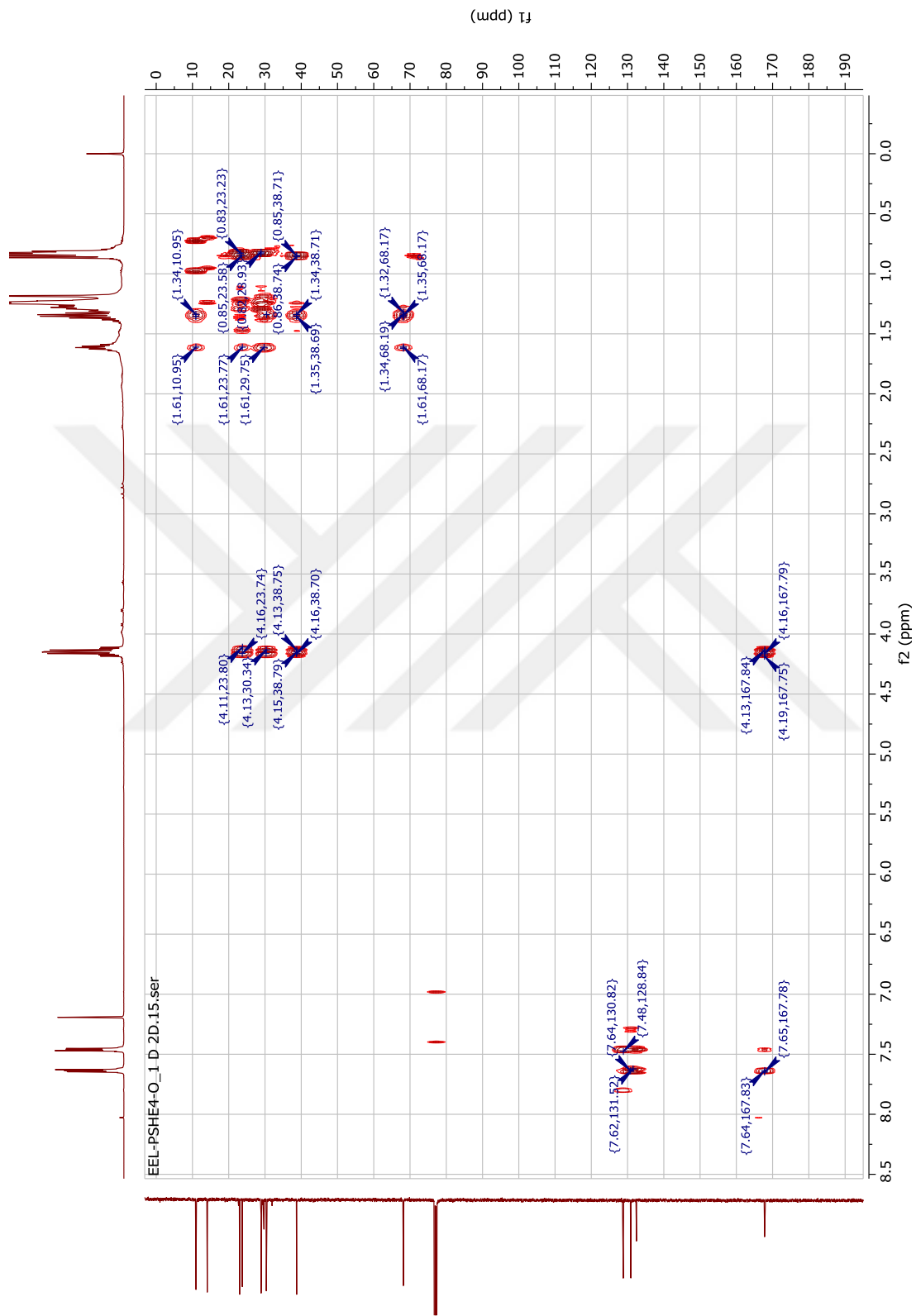
Şekil 4.4: Di(2-etilhekzil) fitalat'ın ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) spektrumu.



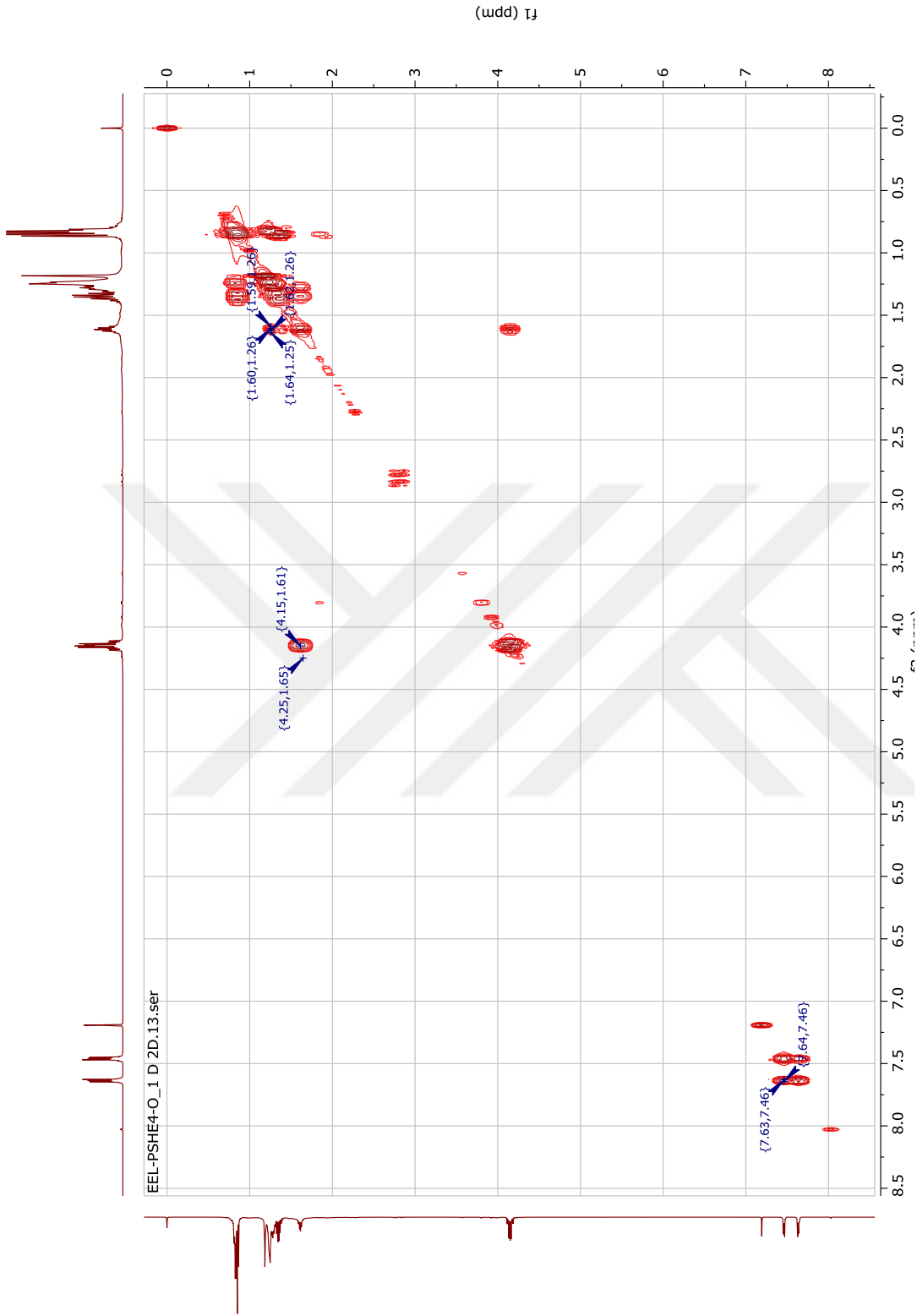
Şekil 4.5: Di(2-etilhekszil) fitalat'ın ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz) spektrumu.



Şekil 4.6: Di(2-etilhekzil) fitalat'ın HSQC spektrumu.

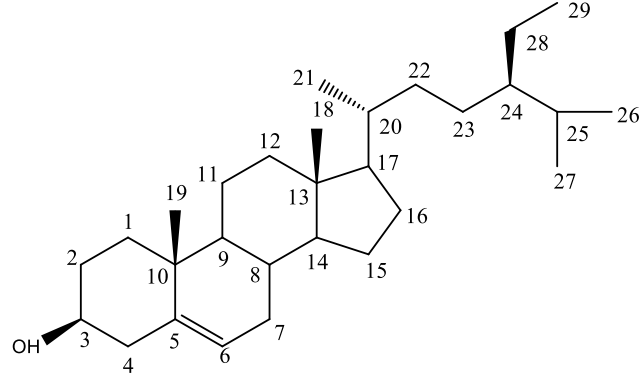


Şekil 4.7: Di(2-etilhekzil) fitalat'ın HMBC spektrumu.

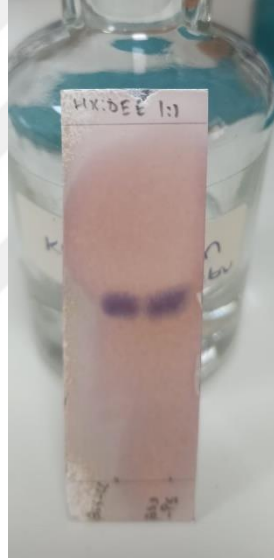


Şekil 4.8: Di(2-etilhekzil) fitalat'ın COSY spektrumu.

4.3.2 β -sitosterol



Şekil 4.9: β -sitosterol'ün kimyasal yapısı.

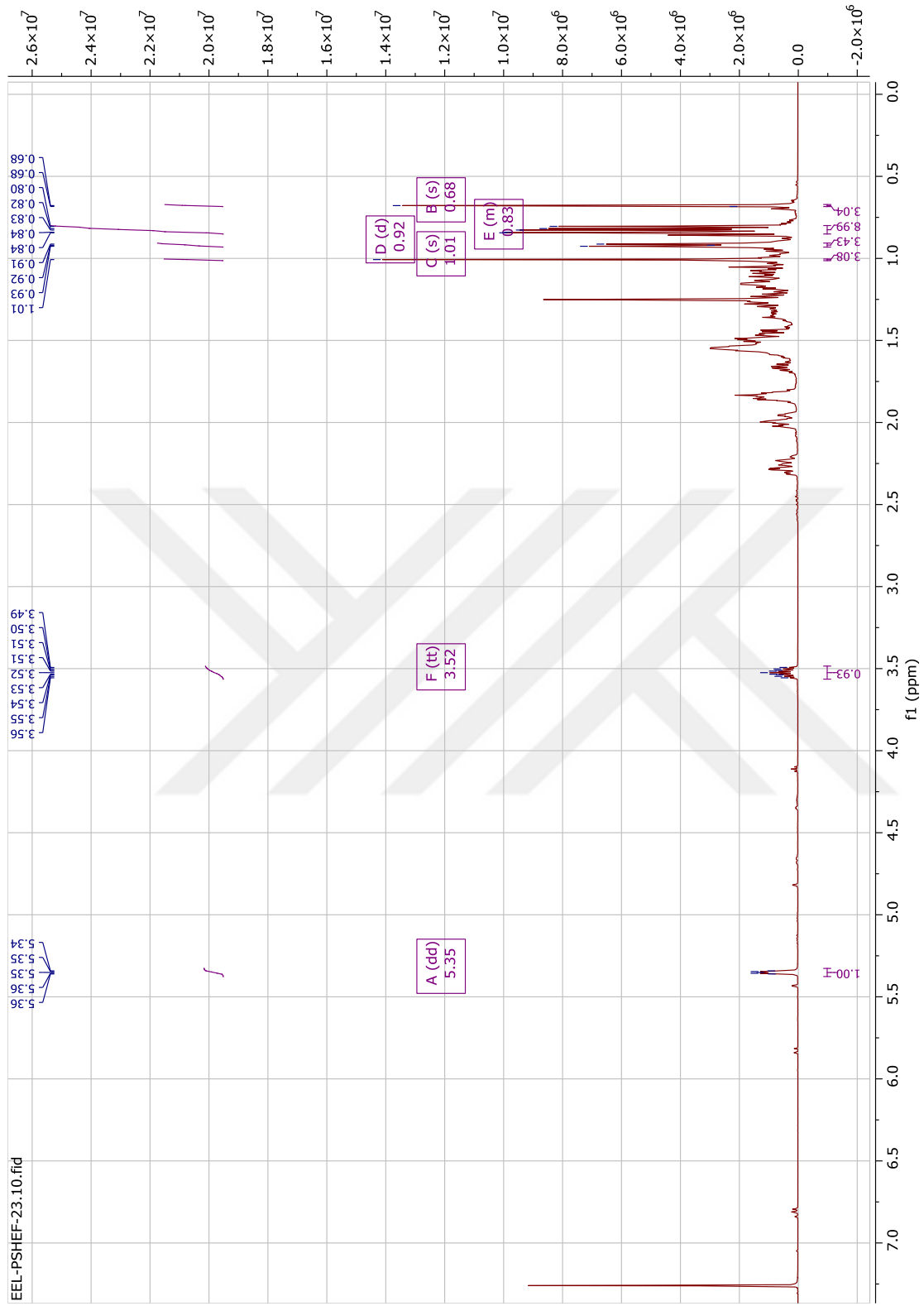


Şekil 4.10: *C. cylindracea*'dan (solda) ve *P. sivasicum*'dan (sağda) izole edilen β -sitosterol'ün vanilin-sülfürik asit reaktifi ile yakıldıktan sonra elde edilen karşılaştırmalı ince tabaka kromatografisi.

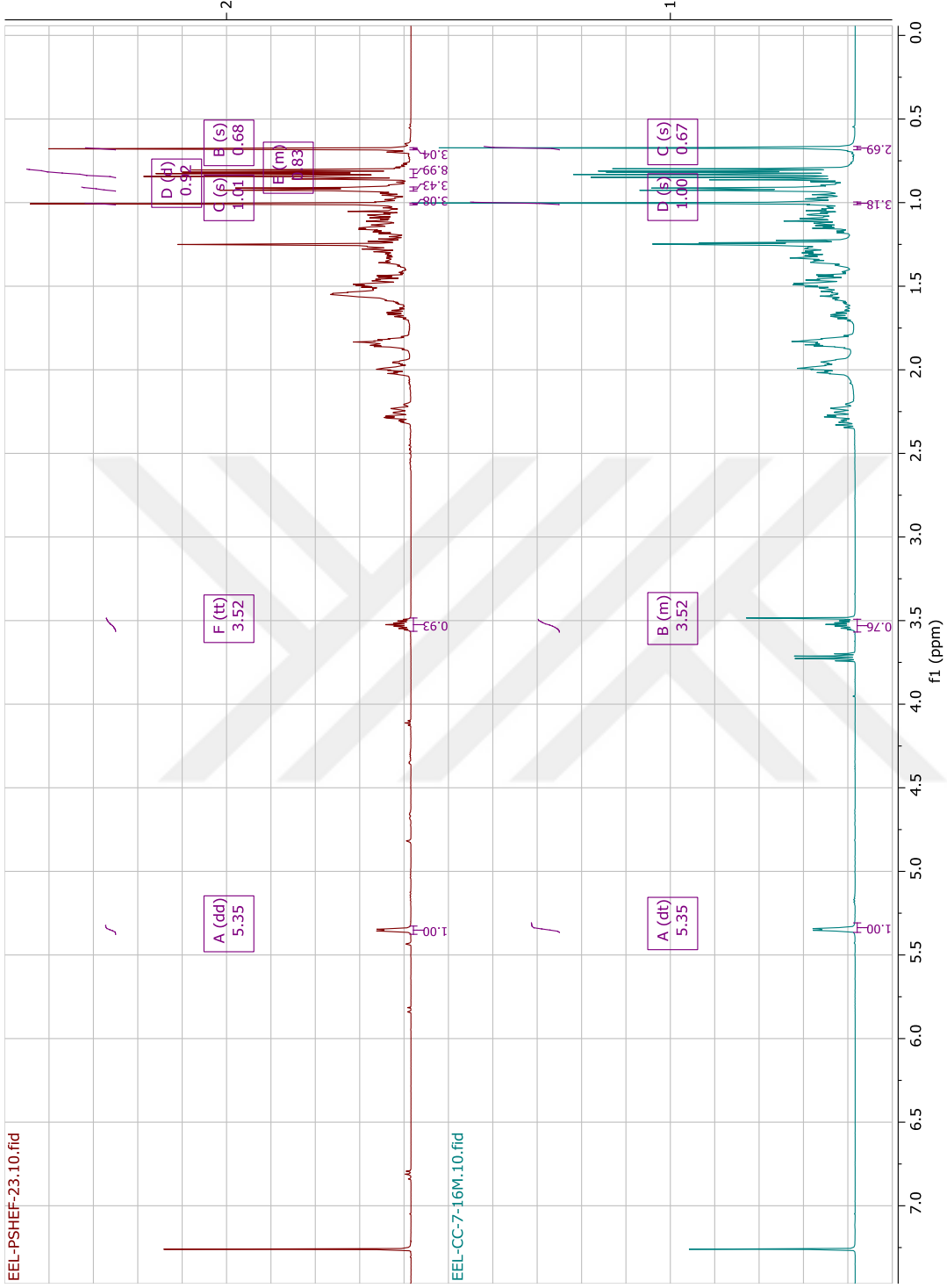
Hegzan ekstresi ana kolon faksiyonlandırılması sonrası elde edilen PSH-10 kodlu alt fraksiyona (232,2 mg) hegzan eklendiğinde beyaz iğne şeklinde kristallerin çöktüğü

gözlendi (Şekil 4.9). Silika jel plakada hegzan:dietileter (1:1) mobil fazında yürütüldükten sonra vanilin-sülfürik asit reaktifi ile yakıldığında ortaya çıkan mor renkli karakteristik leke maddenin β -sitosterol olabileceğini düşündürdü (Şekil 4.10). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) spektrumunda δ 5,35 (1H, *dd*, H-6) iki yerine bir olefinik protonun varlığı genelde steroidlerde görülen 22. ve 23. karbonlar arasındaki çifte bağın olmadığını ve olan sadece 1 çifte bağın ise 5 ile 6 numaralı karbonlara ait olabileceğini gösterdi. δ 0,68-1,01 bandında 6 metil grubu görülmesi yapının β -sitosterol olma ihtimalini kuvvetlendiren başka bir kanıt olarak değerlendirildi.

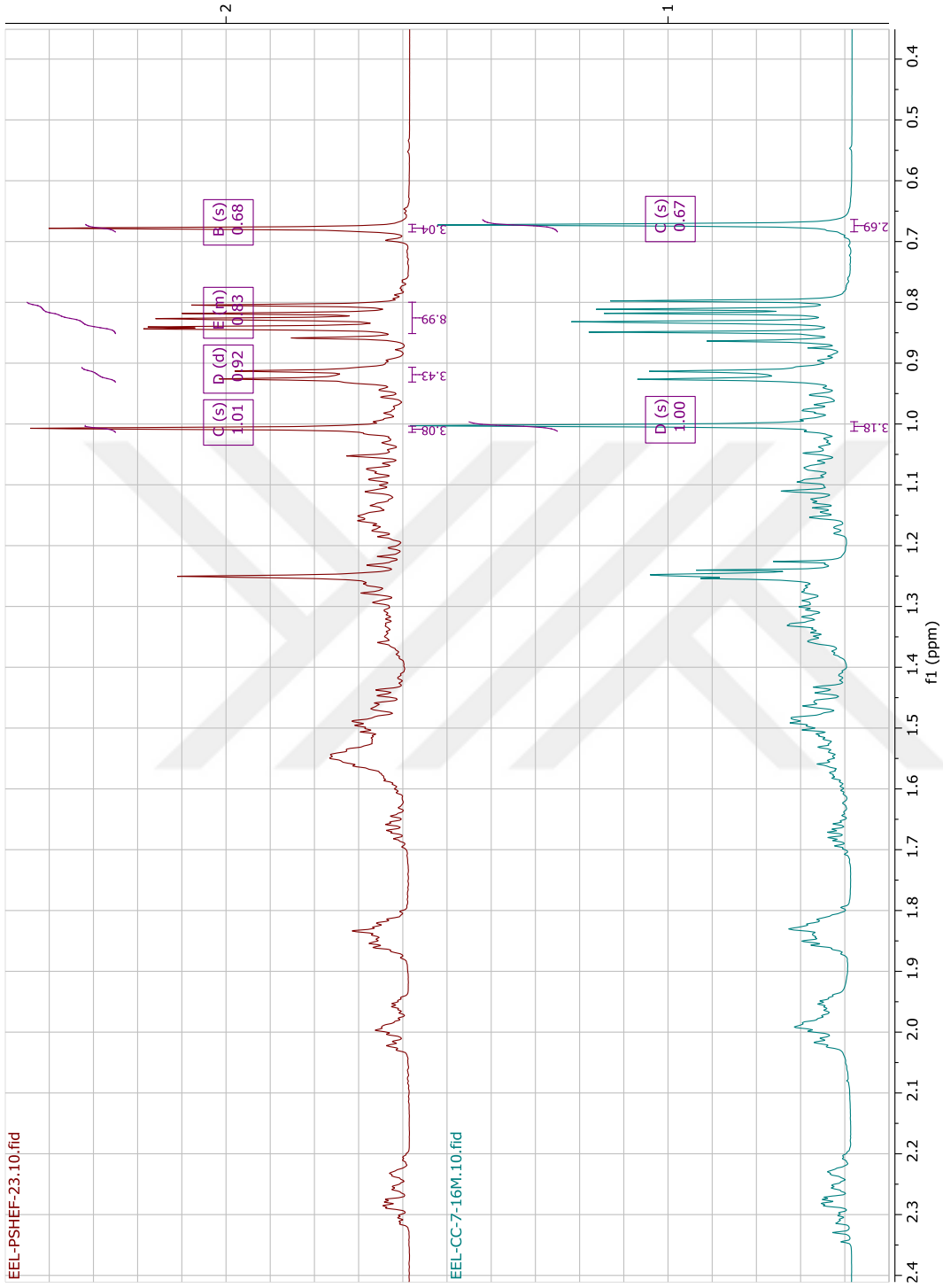
Fraksiyonun kolondan elde edilirken kullanılan mobil fazının (%75 diklorometan-%25 hegzan) polaritesi dikkate alınarak, laboratuvarımızda daha önce yeşil bir alg olan *Caulerpa cylindracea*'dan izole edilen β -sitosterol ile yapılan İTK sonucu Rf değerleri karşılaştırıldığında (hegzan:dietileter 1:1, Rf: 0,45) aynı olduğu hesaplandı (Şekil 4.10). Elde edilen madde ve *C. cylindracea*'dan izole edilen β -sitosterol'ün $^1\text{H-}$ ve $^{13}\text{C-}$ NMR'ları göz önünde bulundurulduğunda (Şekil 4.11-4.14) maddenin yapısı β -sitosterol olarak belirlendi [75]. Yapılan literatür araştırmaları ile β -sitosterol'ün bir diğer *Polygonum* türü olan *P. hydropiper*'den de izole edildiği belirlendi [76].



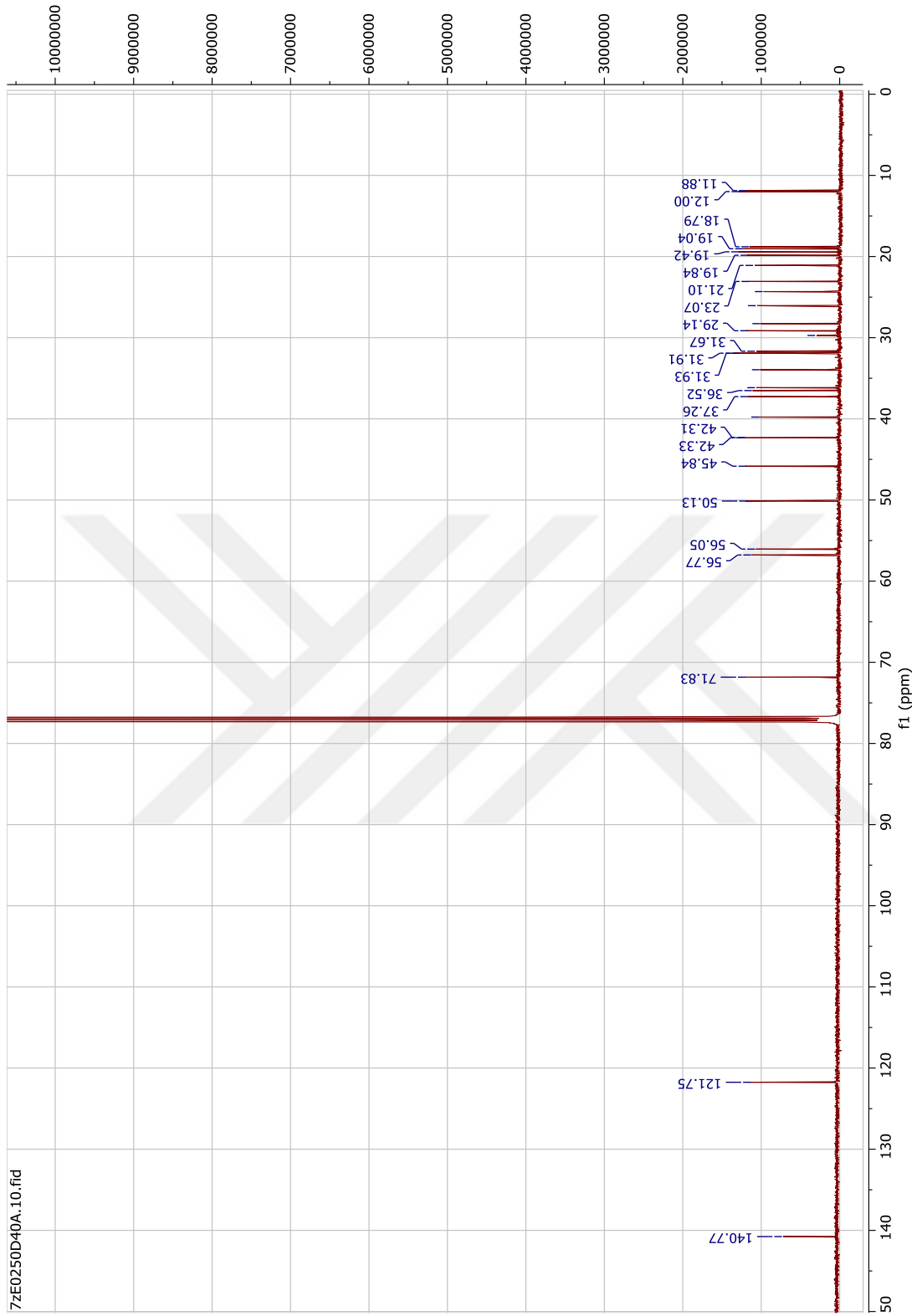
Şekil 4.11: β -sitosterol'ün $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) spektrumu.



Şekil 4.12: Karşılaştırmalı β-sitosterol'ün ¹H-NMR spektrumu tam boy.



Şekil 4.13: Karşılaştırmalı β-sitosterol'ün ¹H-NMR spektrumu (0-2,3 ppm).



Şekil 4.14: β -sitosterol'ün ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz) spektrumu.

4.4 *Polygonum sivasicum*'un Metanol Ekstresi Fraksiyonlarından Saf Maddelerin İzolasyonu

Metanol ekstresinden (PSM, 55,0 g) sekonder metabolit izolasyonu için ana kolon fraksiyonlandırma çalışmasında dolgu maddesi olarak C18 kullanıldı. Ekstre metanol ile çözülerek bir miktar C18 dolgu maddesi ile karıştırıldıktan sonra karışım oda şartlarında ışık görmeyecek şekilde kurumaya bırakıldı. Kuruyan karışım ultra saf su ile şartlanan C18 kolonun (6,5×60 cm) üst kısmına paketleme yöntemiyle katı olarak yüklendi. Elüsyona %100 su ile başlandı ve sırasıyla %25 oranlarda metanol ile polarite düşürülerek elüsyona devam edildi, sonunda %100 metanol ile elüsyon tamamlandı ve toplamda 20 fraksiyon elde edildi (Şekil 4.15).



Şekil 4.15: *P. sivasicum* metanol ekstresi kolonu sonrası toplanan fraksiyonlar.

Elde edilen fraksiyonlar, etilasetat:kloroform:metanol:su (15:8:4:1 ve 6:4:4:1 oranlarında) çözücü sistemleri ve adsorban olarak normal faz silika jel 60 F₂₅₄ kaplı alüminyum plakalar kullanılarak incelendi. İTK incelemeleri sonrasında benzer fraksiyonlar birleştirilerek 5 ana fraksiyon elde edildi (Şekil 4.16, Tablo 4.8). Fraksiyonların İTK'sı Şekil 4.17'de verilmiştir.

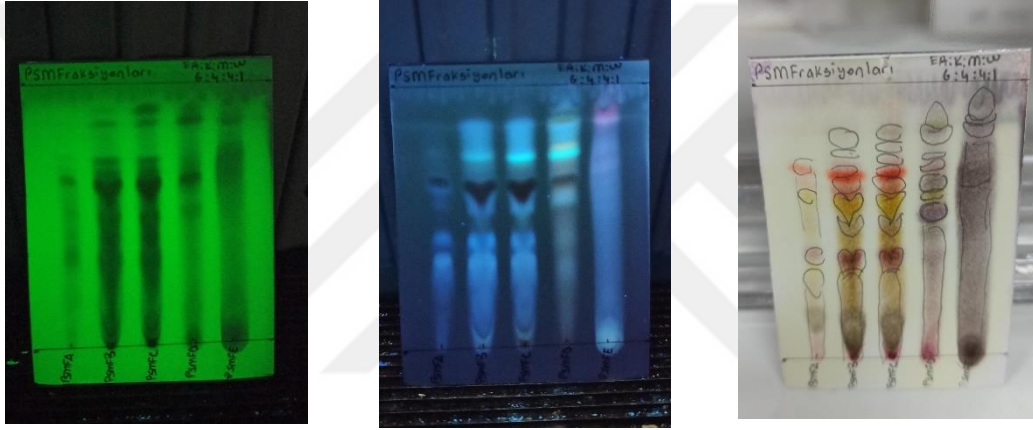


Şekil 4.16: *P. sivasicum* metanol ekstresi kolonu sonrası birleştirilen fraksiyonlar.

Tablo 4.8: *P. sivasicum* metanol ekstresi fraksiyonlarının karşılaştırılması.

Fraksiyonun Kodu	Fraksiyonun Elde Edildiği Mobil Faz	Fraksiyonun Miktarı (g)
PSMF A	% 100 Saf su	14,35
PSMF B	% 25 MeOH-% 75 Saf su	28,16
PSMF C	% 50 MeOH-% 50 Saf su	4,31
PSMF D	% 75 MeOH-% 25 Saf su	0,82
PSMF E	% 100 MeOH	3,50

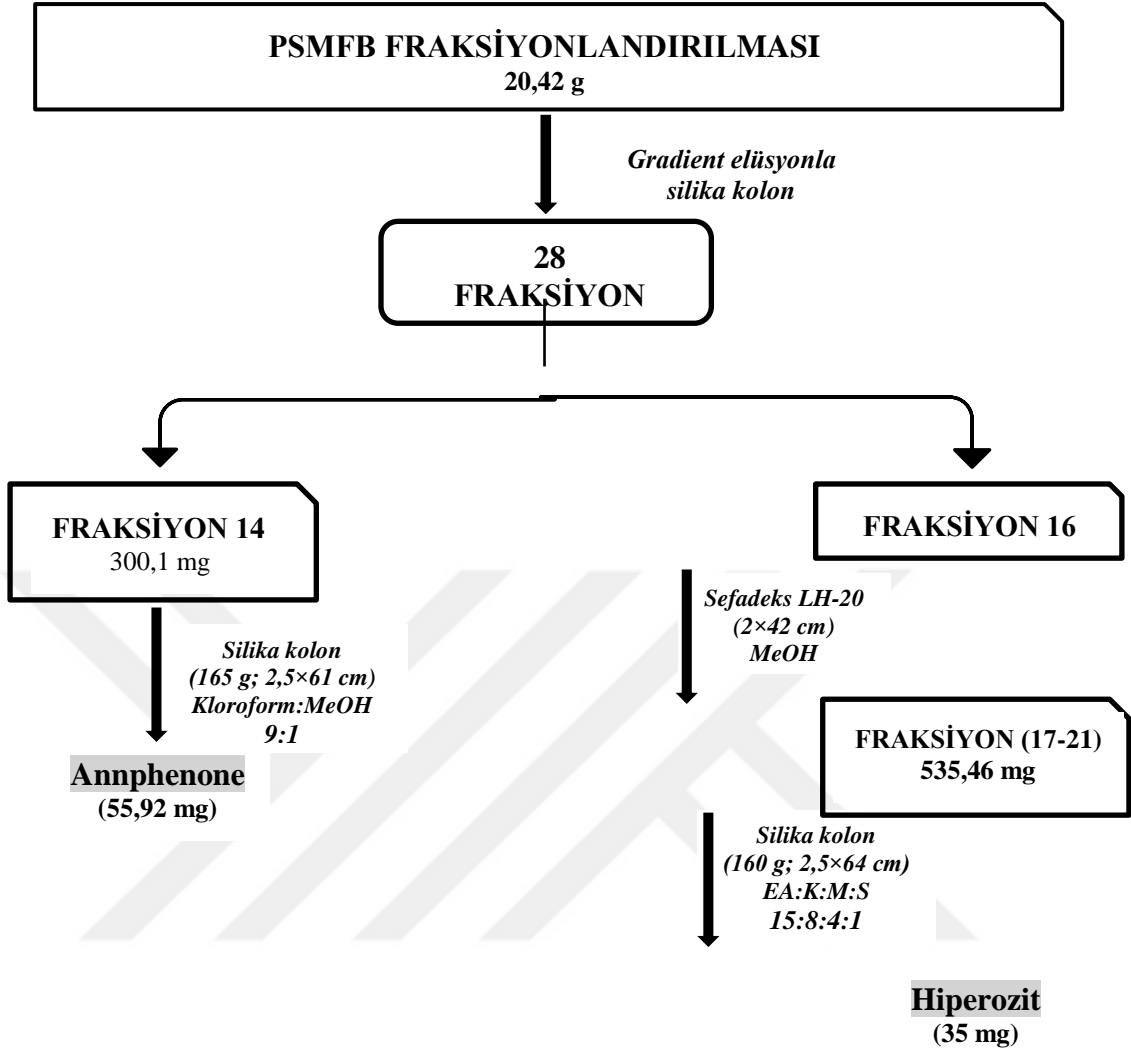
P. sivasicum fraksiyonlarının miktarları ve İTK sonuçları göz önünde bulundurularak öncelikle PSMFB ve PSMFE fraksiyonlarının çalışılmasına karar verildi.



Şekil 4.17: *P. sivasicum*'un birleştirilmiş metanol fraksiyonlarının ince tabaka kromatografisi.

4.4.1 *Polygonum sivasicum*'un Metanol Ekstresi B Fraksiyonundan Saf Maddelerin İzolasyonu

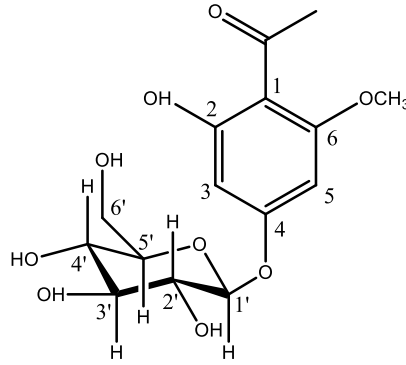
Metanol ekstresinin B fraksiyonundan (PSMFB, 20,42 g) fraksiyonlandırmak için açık kolon kromatografisinde dolgu maddesi olarak silika jel (400 g, 4×65 cm) kullanıldı. Ekstre çözülerek silika jel ile karıştırıldıktan sonra karışım oda şartlarında ışık görmeyecek şekilde kurumaya bırakıldı. Kuruyan karışım şartlanan silika jel kolonun üst kısmına katı olarak yüklendi. Elüsyona %100 hegzan ile başlandı ve sırasıyla %25 oranlarda diklorometan ile polarite artırılarak elüsyona devam edildi, sonunda %100 metanol ile elüsyon tamamlandı.



Şekil 4.18: *P. sivasicum*' un metanol ekstresinin B fraksiyonundan elde edilen maddeler.

İnce tabaka kromatografisi yöntemi kullanılarak fraksiyonlar karşılaştırıldı. Bu amaçla mobil faz olarak kloroform:metanol (9:1) çözücü sistemi kullanıldı. Adsorban olarak normal faz silika jel 60 F₂₅₄ kaplı alüminyum plakalar ve İTK reaktifi olarak vanilin-sülfürik asit kullanıldı. Benzer fraksiyonlar birleştirilerek toplamda 28 fraksiyon elde edildi. Alt fraksiyonların elde edilmiş sıralaması ve kullanılan çözücü sistemleri Şekil 4.18'de gösterilmiştir.

4.4.1.1 Annphenone



Şekil 4.19: Annphenone'nun kimyasal yapısı.

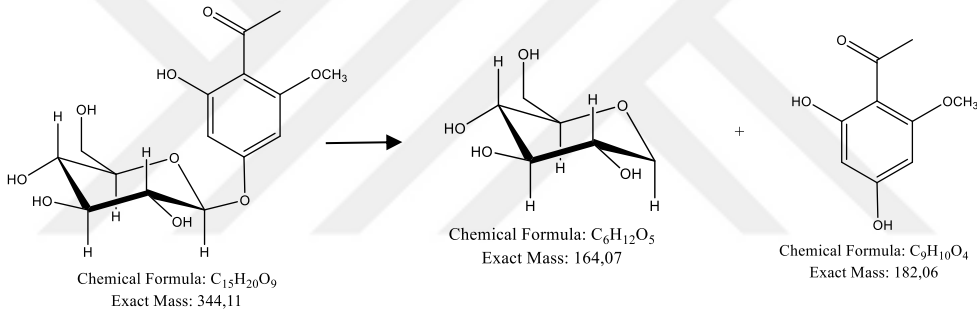
P. sivasicum metanol ekstresi B-alt fraksiyonundan (PSMFB-14, 300,1 mg) madde izolasyonu için yapılan kolon kromatografisinde silika jel kullanıldı (165 g; 2,5×61 cm). Açık kolon sisteminde izokrotik mobil faz olarak kloroform: metanol (9:1) kullanılarak yürütülen kolondan PSMFB-14-R2T43 kodlu madde beyaz renkli amorf katı şekilde 55,92 mg saf olarak elde edildi (Şekil 4.19). Silika jel plakta UV lamba (254 nm/366 nm) altında da görülen bileşik vanilin belirteci püskürtülüp yakıldığında (105 °C) turuncu renk aldı (Şekil 4.20).



Şekil 4.20: Annphenone'un vanilin-sülfürik asit reaktifi ile yakıldıktan sonra elde edilen ince tabaka kromatografisi.

¹H-NMR spektrumunda (CD₃OD, 500 MHz) aromatik bölgede iki protonun δ 6,33 (1H, *d*, *J*= 2.4 Hz, H-5) ve 6,13 (1H, *d*, *J*= 2.4 Hz, H-3) rezonans olduğu belirlendi. Bu iki dublet sinyalin yarılama sabitlerinin ~2 Hz civarında olması bu protonların birbirlerine meta pozisyonundan bağlı olduklarını gösterdi. Ayrıca, δ 3,81 (3H, *s*) ve 2,71 (3H, *s*) görülen iki metil singleti yapıda metoksil ve metil gruplarının olduğunu düşündürdü. ¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz) spektrumu incelendiğinde aromatik bölgede izlenen katerner karbona ait sinyal, δ 205,66 karbonil grubunun varlığını

desteklerken; aromatik bölgede görülen 3 sinyalin kimyasal kayma değerleri göz önünde bulundurulduğunda, bu sinyallerin δ 168,17, 168,08 ve 162,76 oksijen taşıyan karbonlara ait olduğu şeklinde yorumlandı. ^{13}C -NMR spektrumunda 15 karbon sinyali gözlemlenmiş olması, ESI kütle spektrumunda $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 345 ve m/z 367 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ pikleri kapalı formülün $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_9$ olduğunu destekledi (Şekil 4.27). ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, HSQC, HMBC ve COSY spektrumları (Şekil 4.22-27) değerlendirildiğinde PSMFB-(25-26)-R2T43 bileşiğinin glikoz içeren bir asetofenon olduğu tespit edildi. Ayrıca kütle spektrumunda m/z 183 piki molekülden 6 karbonlu şekerin ayrılmasıyla kalan parçalanma ürünü asetofenon varlığını doğrulamaktadır (Şekil 4.21). HMBC spektrumu incelendiğinde ise şekere ait 1 numaralı karbonun (anomerik karbon atomu) aromatik halkadaki 4 numaralı karbonla etkileşiminin olması şekerin asetofenona 4 numaralı karbondan bağlanmış olduğunu gösterdi (Tablo 4.9).

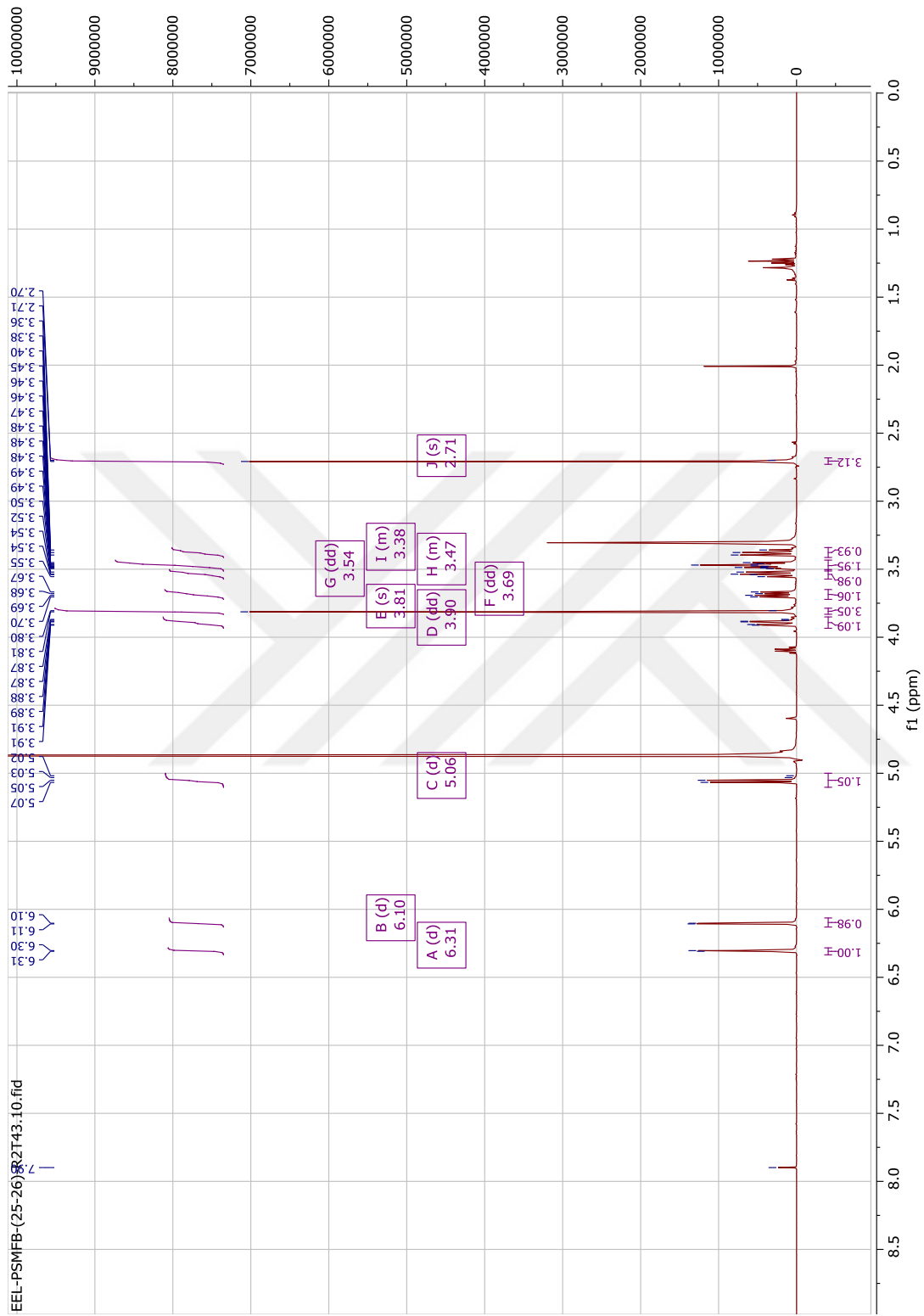


Şekil 4.21: Kütle spektrumunda iyonizasyon sonrası oluşan parçalanma ürünleri.

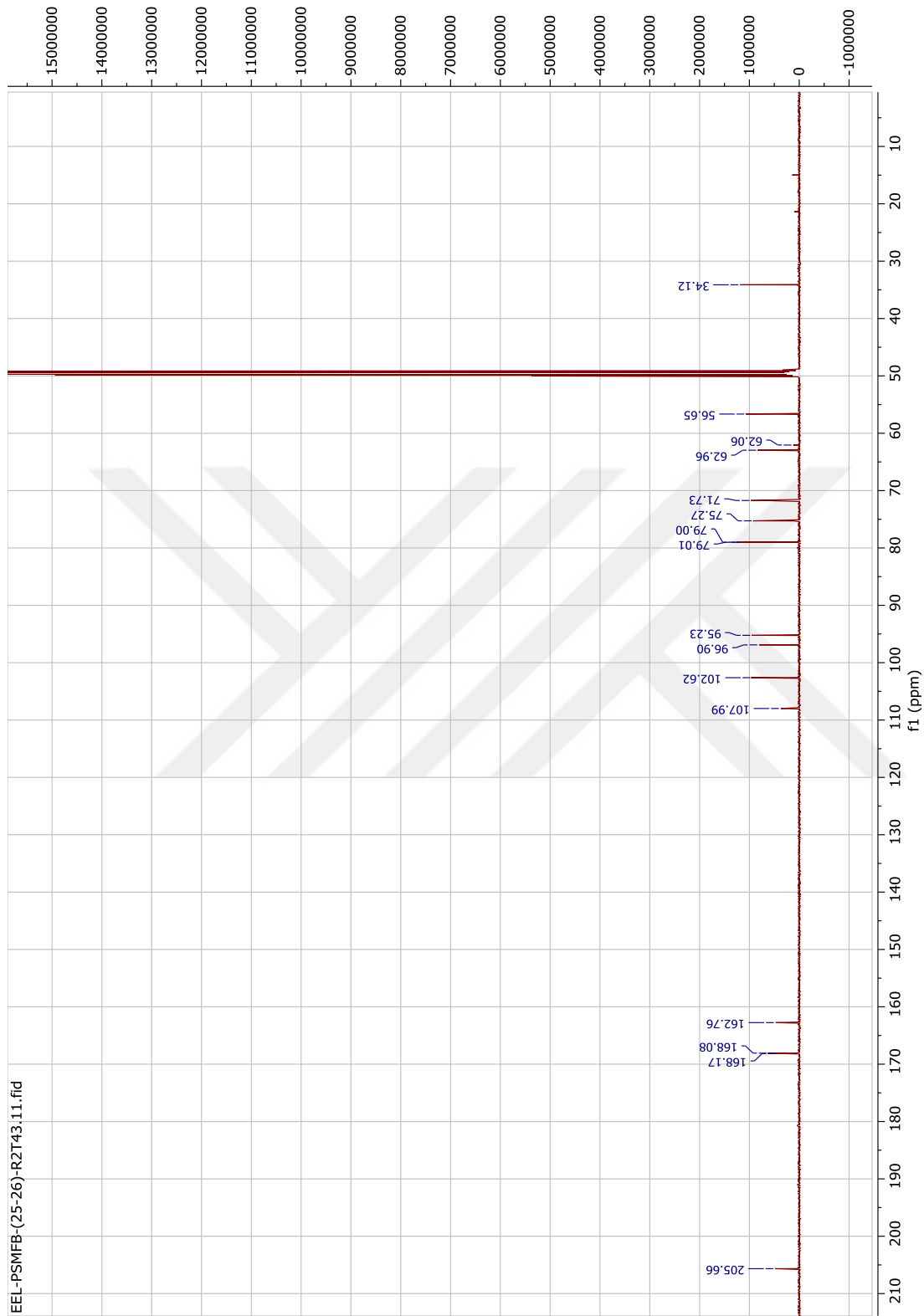
Yapılan literatür araştırması sonucu bu yapının *Artemisia annua* bitkisinden daha önce izole edildiği ve ismini bu bitkiden dolayı almış olan annphenone olduğu belirlendi [77]. Diğer bir çalışmada *Euphorbia balsamifera* türünden saf olarak elde edilen annphenone'a ait ^1H ve ^{13}C -NMR değerleri ile elde ettiğimiz spektral veriler kıyaslanarak, PSMFB-14-R2T43 kodlu maddenin 2,4-dihidroksi-6-metoksi-asetofenon 4-*O*- β -D-glukopiranozit olduğu doğrulandı [74].

Tablo 4.9: Annphenone'un ^{13}C -NMR (CD_3OD , 125 MHz), ^1H -NMR (CD_3OD , 500 MHz) değerleri ve HMBC korelasyonu.

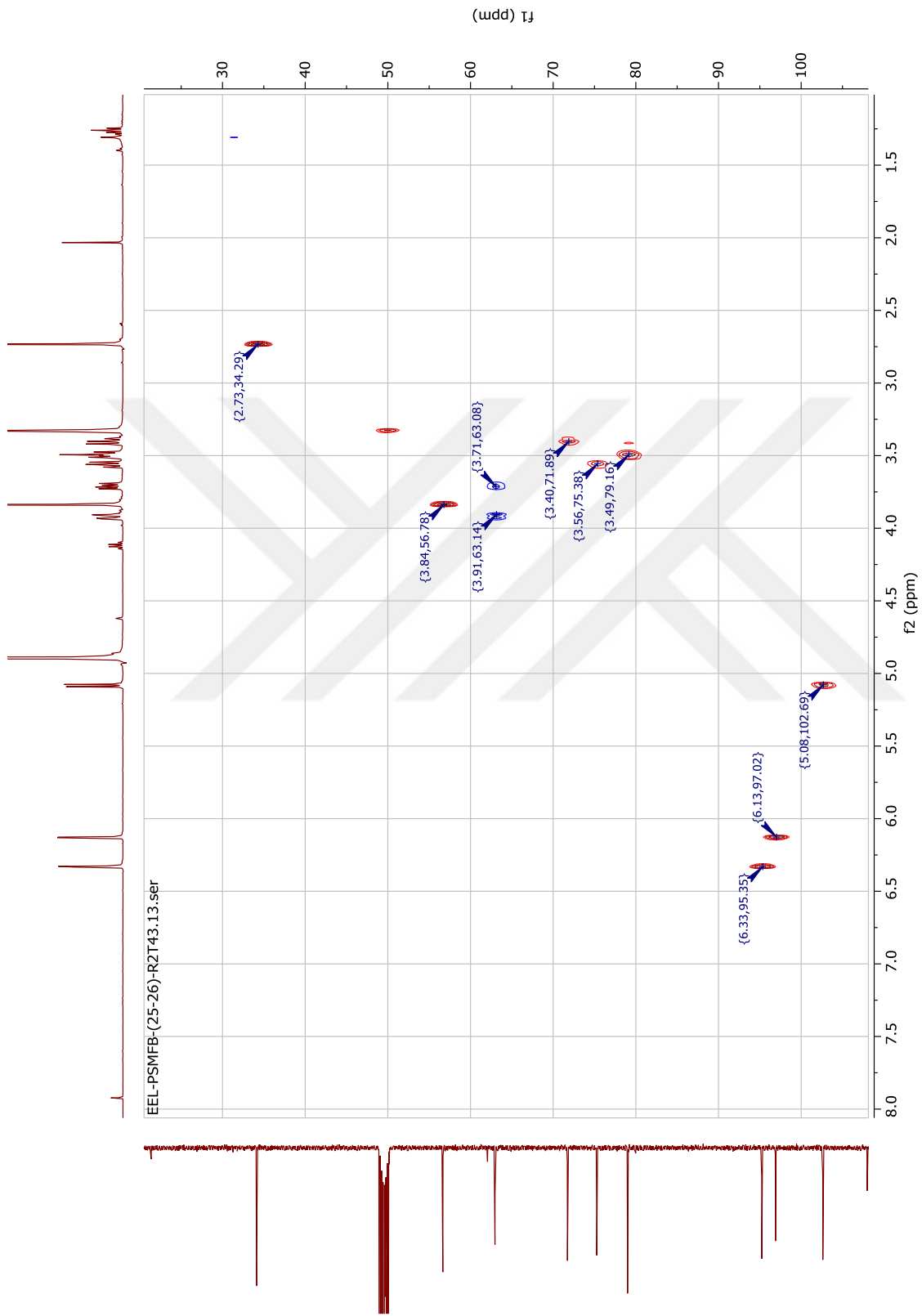
Pozisyon	δ_{C}	δ_{H}	HMBC (H \rightarrow C)
1	107.99	-	-
2	168.17	-	-
3	96.90	6.13 (1H, <i>d</i> , $J=2.4$ Hz)	C-1; C-2; C-5
4	162.76	-	-
5	95.23	6.33 (1H, <i>d</i> , $J=2.4$ Hz)	C-1; C-3; C-4
6	168.08	-	-
1'	102.62	5.08 (1H, <i>d</i> , $J=7.7$ Hz)	C-4; C-5'
2'	75.27	3.54 (1H, <i>dd</i> , $J=9.2; 7.7$ Hz)	C-3'/ C-5'; C-1'
3'	79.00	3.47 (1H, <i>m</i>)	C-2'; C-4'
4'	71.73	3.38 (1H, <i>m</i>)	C-6'; C-3'/ C-5'
5'	79.01	3.47 (1H, <i>m</i>)	C-4'; C-2'
6a'	62.96	3.71 (1H, <i>dd</i> , $J=12.2; 6.0$ Hz)	C-3'/ C-5'
6b'	62.96	3.91 (1H, <i>dd</i> , $J=12.1; 2.3$ Hz)	C-4'
C=O	205.66	-	-
-OCH ₃	56.65	3.81 (3H, <i>s</i>)	C-2; C-6
-CH ₃	34.12	2.71 (3H, <i>s</i>)	C-1; C=O



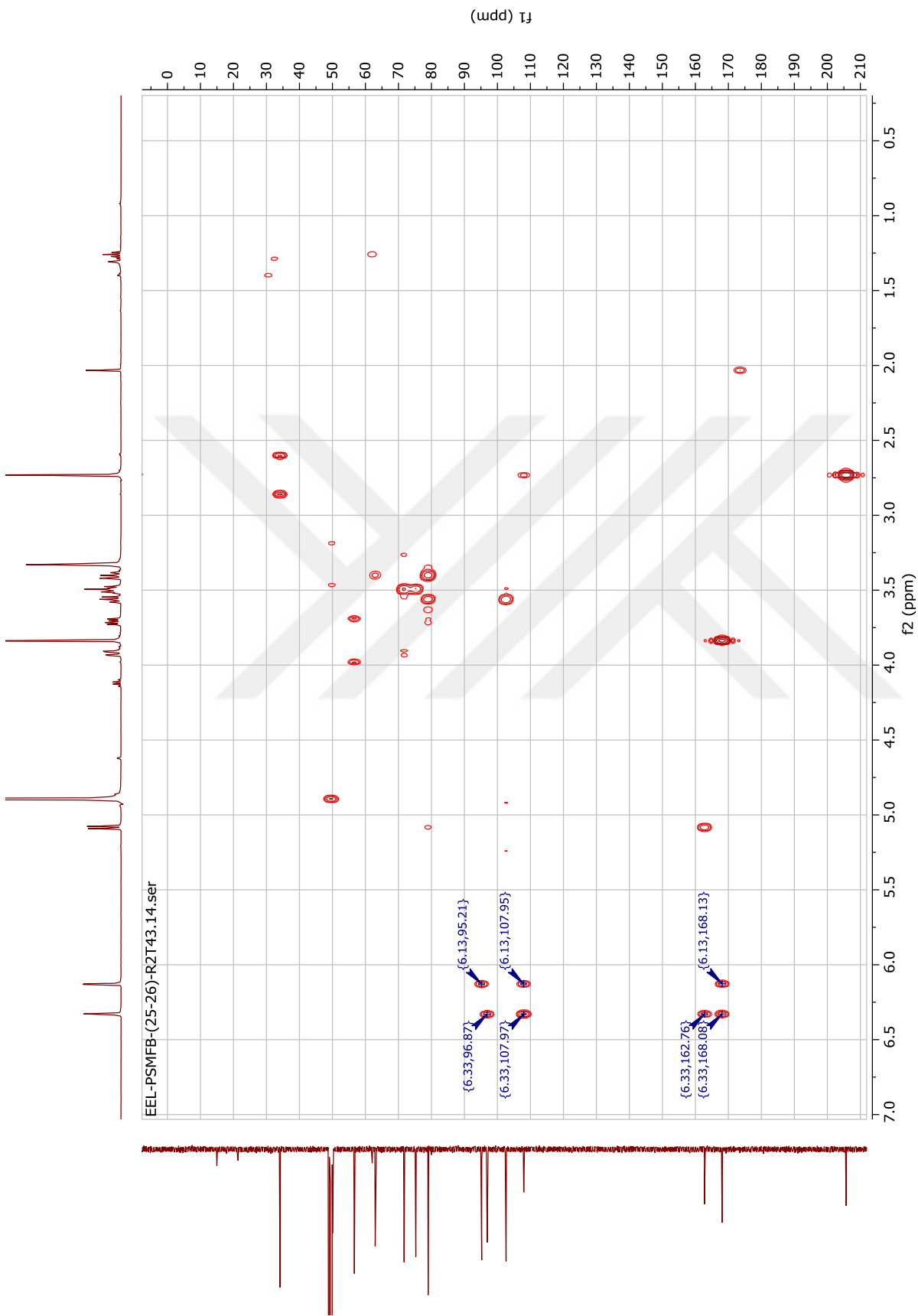
Şekil 4.22: Amphenone'nun $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (CD_3OD , 500 MHz).



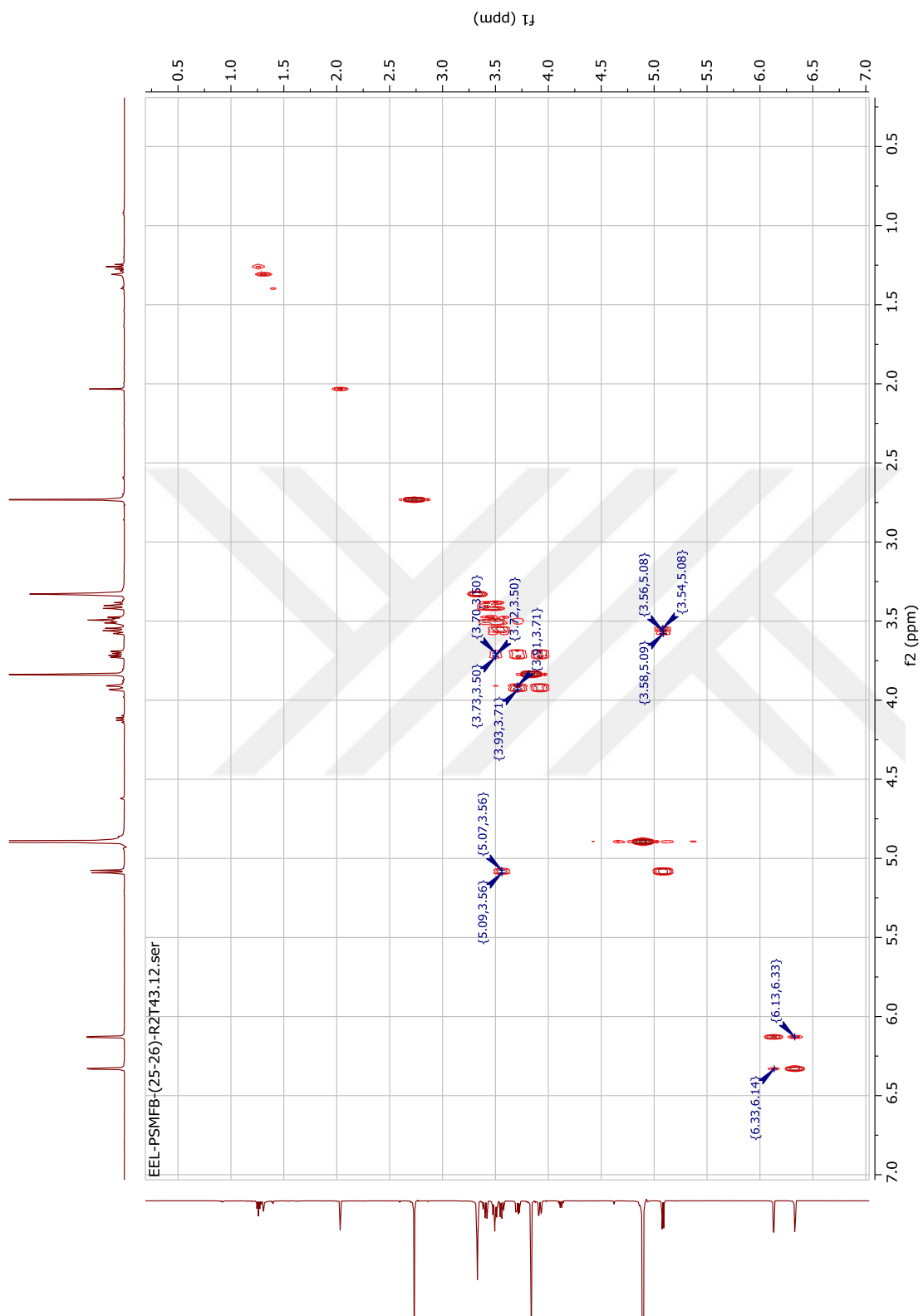
Şekil 4.23: Amphenone'nun ^{13}C - NMR spektrumu (CD_3OD , 125 MHz).



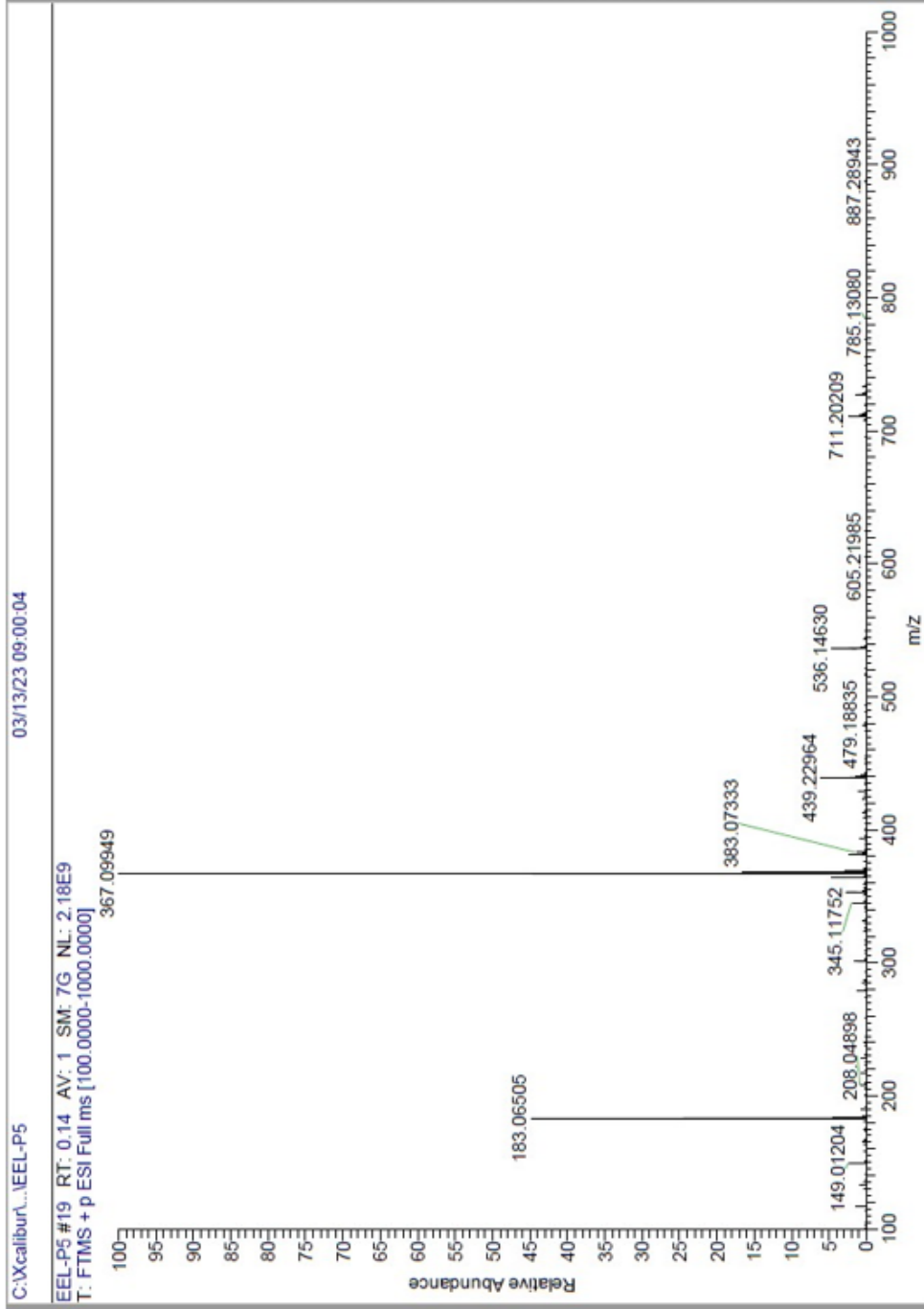
Şekil 4.24: Annphenone'nun HSQC spektrumu.



Şekil 4.25: Amphenone'nun HMBC spektrumu.

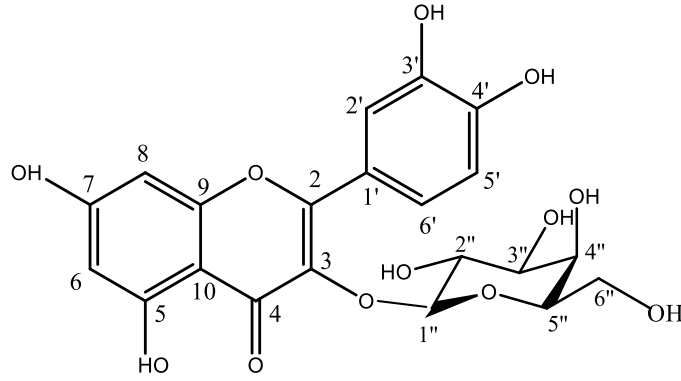


Şekil 4.26: Annphe none'nun COSY spektrumu.



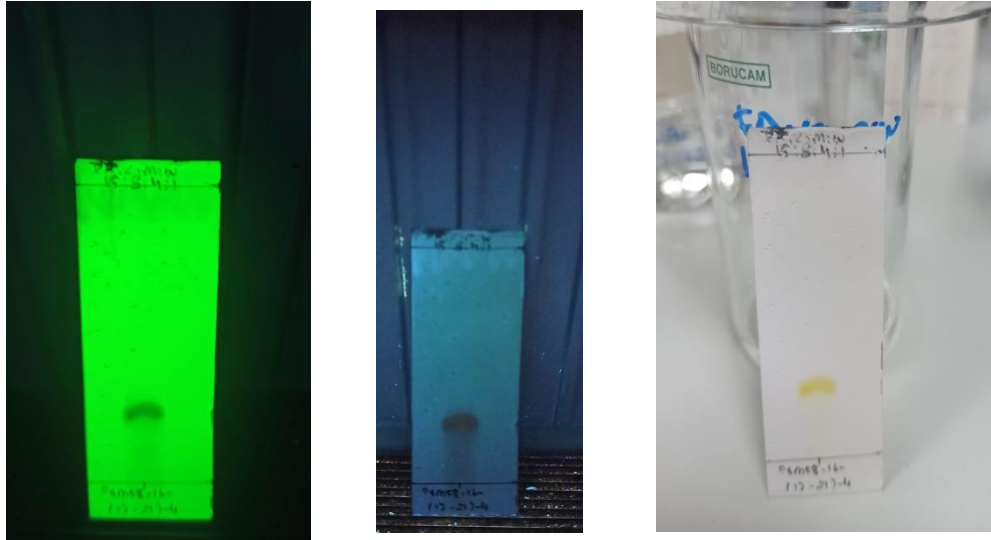
Şekil 4.27: Annphenone'nun kütle spektrumu.

4.4.1.2 Hiperozit



Şekil 4.28: Hiperozit'in kimyasal yapısı.

PSMFB-16 alt fraksiyonundan madde izolasyonu için öncelikle sefadeks LH-20 dolgu maddesi kullanılarak yapılan kolon kromatografisinde metanol mobil fazıyla fraksiyonlar toplandı. PSMFB-16-(17-21) kodlu fraksiyonun silika jel ile (160g; 2,5×64 cm) etilasetat: kloroform: metanol: su (15:8:4:1) izokrotik mobil faz sistemi kullanılarak yürütülen kolonundan PSMFB-16-(17-21)-4 kodlu madde parlak sarı renkli amorf katı şeklinde (35 mg), saf olarak elde edildi (Şekil 4.28). Silika jel plakta UV lambada 366 nm altında mor renkli görülen bileşik vanilin belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) sarı renk aldığı görüldü (Şekil 4.29).



Şekil 4.29: UV lamba altında ve Vanilin-sülfürik asit ile yaktıktan sonra elde edilen PSMFB-16-(17-21)-4 İTK'sı.

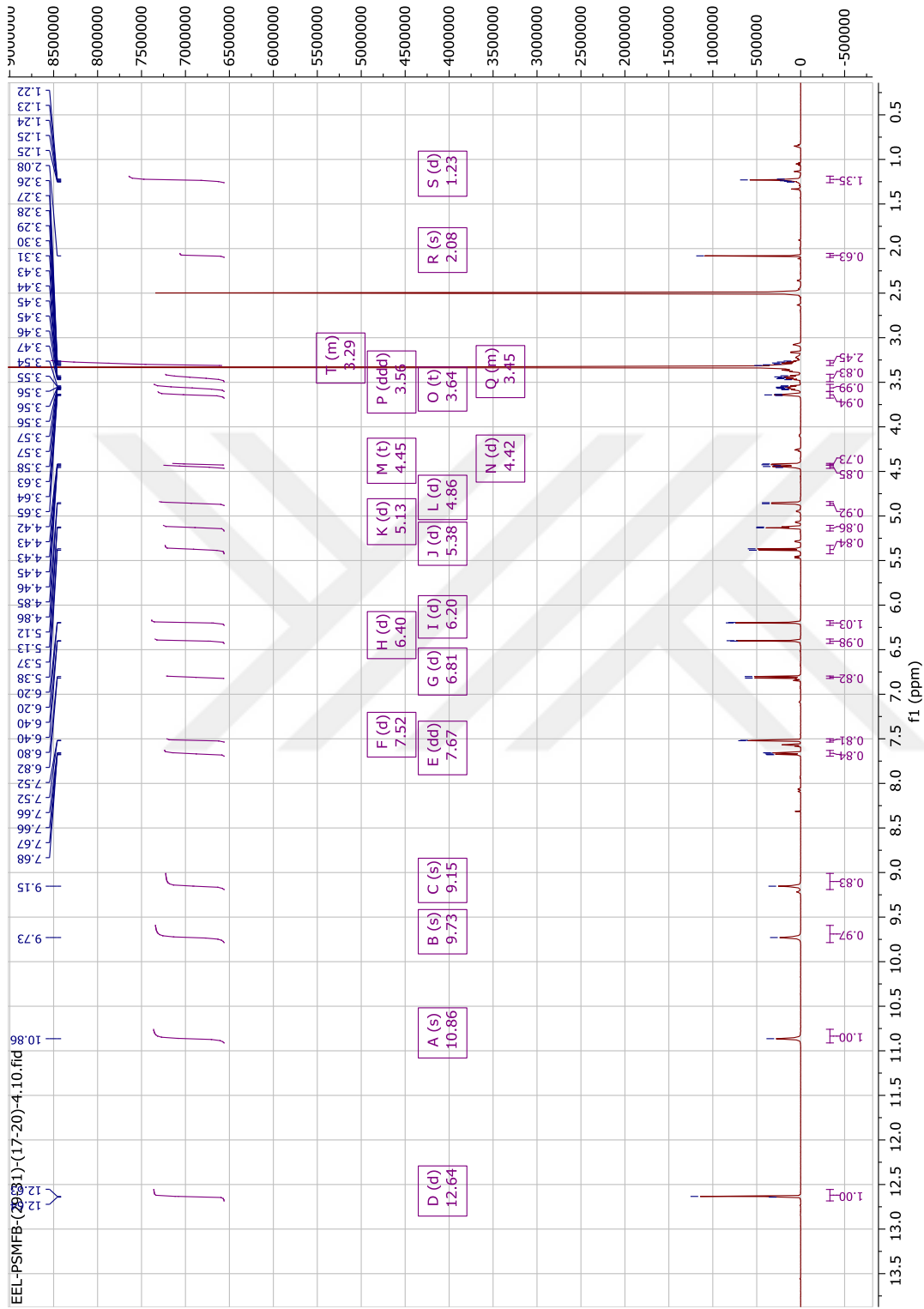
^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) spektrumunda 178,00 ppm'de görülen sinyal kimyasal yapıda karbonil grubu ihtimalini ortaya çıkarırken, δ 156,73, 156,80, 161,74

ve 164,62 sinyalleri oksijene bağlanmış 4 aromatik karbonun varlığını düşündürdü. Bunu destekler nitelikte $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz) spektrumunda 9,15, 9,73, 10,86 ve 12,64 ppm'de görülen dört sinyalin bu karbonlara bağlı olan dört hidroksil grubuna ait olabileceği öngörüldü. δ 6,21 (1H, *d*, $J=2.1$ Hz) ve δ 6,41 (1H, *d*, $J=2.1$ Hz) sinyalleri yarıma sabitleri ve kimyasal kayma değerleri değerlendirildiğinde birbirine meta pozisyonunda iki aromatik protona; δ 6,83 (1H, *d*, $J=8.5$ Hz) ve δ 7,67 (1H, *dd*, $J= 8.5, 2.2$ Hz) yaklaşık 9 Hz'lik yarıma sabiti olması sebebiyle orto pozisyonunda iki aromatik protona ve yine δ 7,52 (1H, *d*, $J= 2.3$ Hz) ile δ 7,67 (1H, *dd*, $J= 8,5, 2,2$ Hz) sinyallerinin birbirine meta olan iki protona ait olduğu görüldü. Dört hidroksil grubunun varlığı ve $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 125 MHz) spektrumunda 60-77 ppm bandında görülen şekere ait 5 karbon sinyali ve 102,26 ppm'de görülen anomerik karbona ait sinyal kimyasal yapının dört sübstituentli bir flavonoid glikozidi olma ihtimalini kuvvetlendirdi. $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HSQC ve HMBC spektrumları (Şekil 4.30-33) değerlendirildiğinde PSMFB-(16)-(17-21)-4 kodlu bileşiğin glikoz içeren bir flavonoid olduğu tespit edildi. Ayrıca HMBC spektrumu incelendiğinde şekere ait 1 numaralı karbonun aromatik halkadaki 3 numaralı karbonla etkileşiminin olması şekerin flavonoide 3 numaralı karbondan bağlanmış olduğunu gösterdi (Tablo 4.10). H-1" ve H-2" etkileşimleri incelendiğinde, yarıma sabitlerine ($J=7.7$ Hz) göre şekerin β -glikozit olduğu belirlendi.

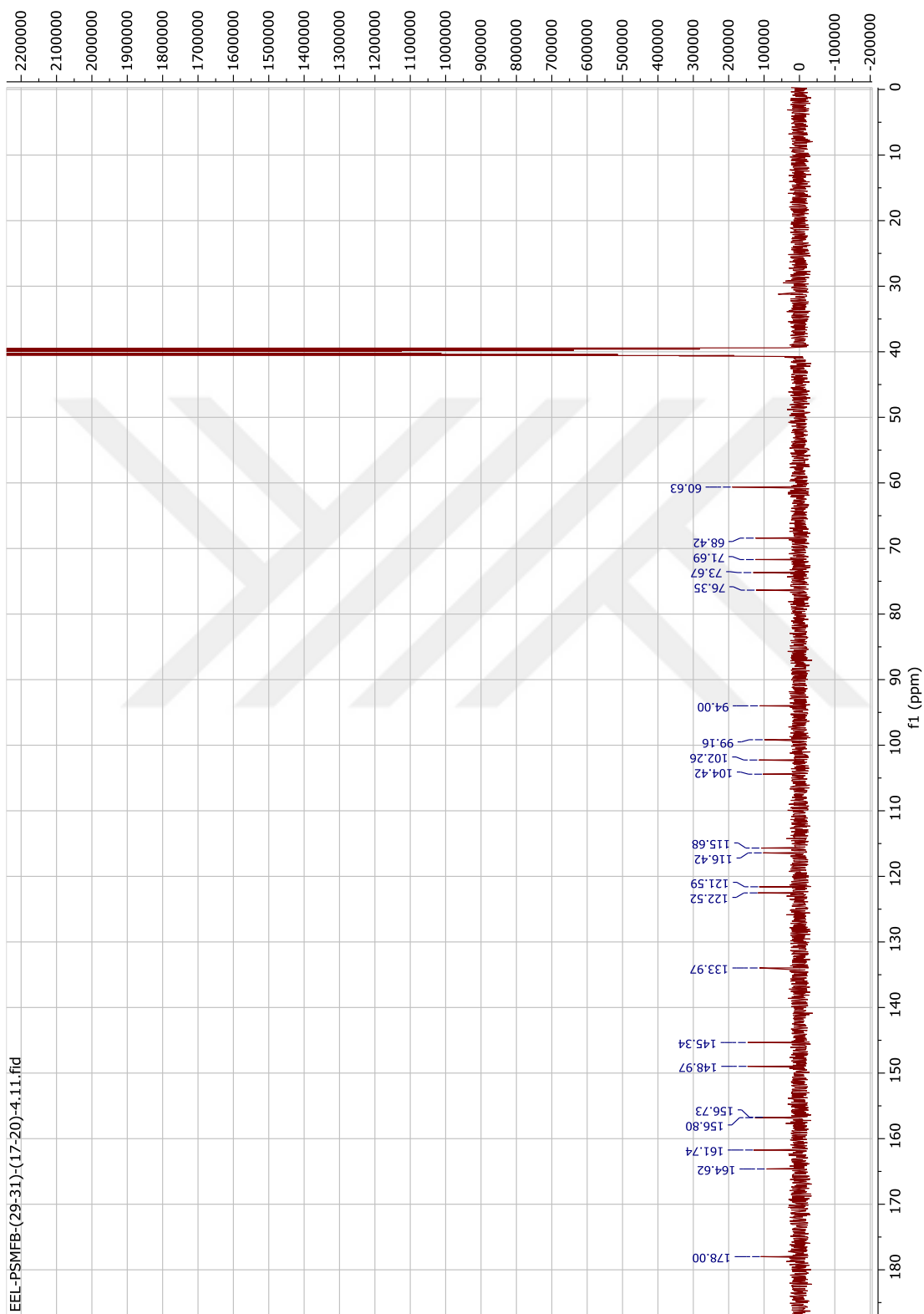
Yapılan literatür taramaları sonucu flavonidin kersetin, glikozit kısmının ise galaktopiranozid yapıda olduğuna karar verildi [78]. Bileşiğin *Hedyotis diffusa* bitkisinden daha önce saf olarak elde edilen hiperozit molekülüne ait 1D- ve 2D-NMR spektrumlarına ait kimyasal kayma değerleri ile örtüşmesi sebebiyle hiperozit (kersetin-3-*O*- β -galaktopiranozid) olduğu belirlendi [79].

Tablo 4.10: Hiperozit ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz), ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) değerleri ve HMBC korelasyonu.

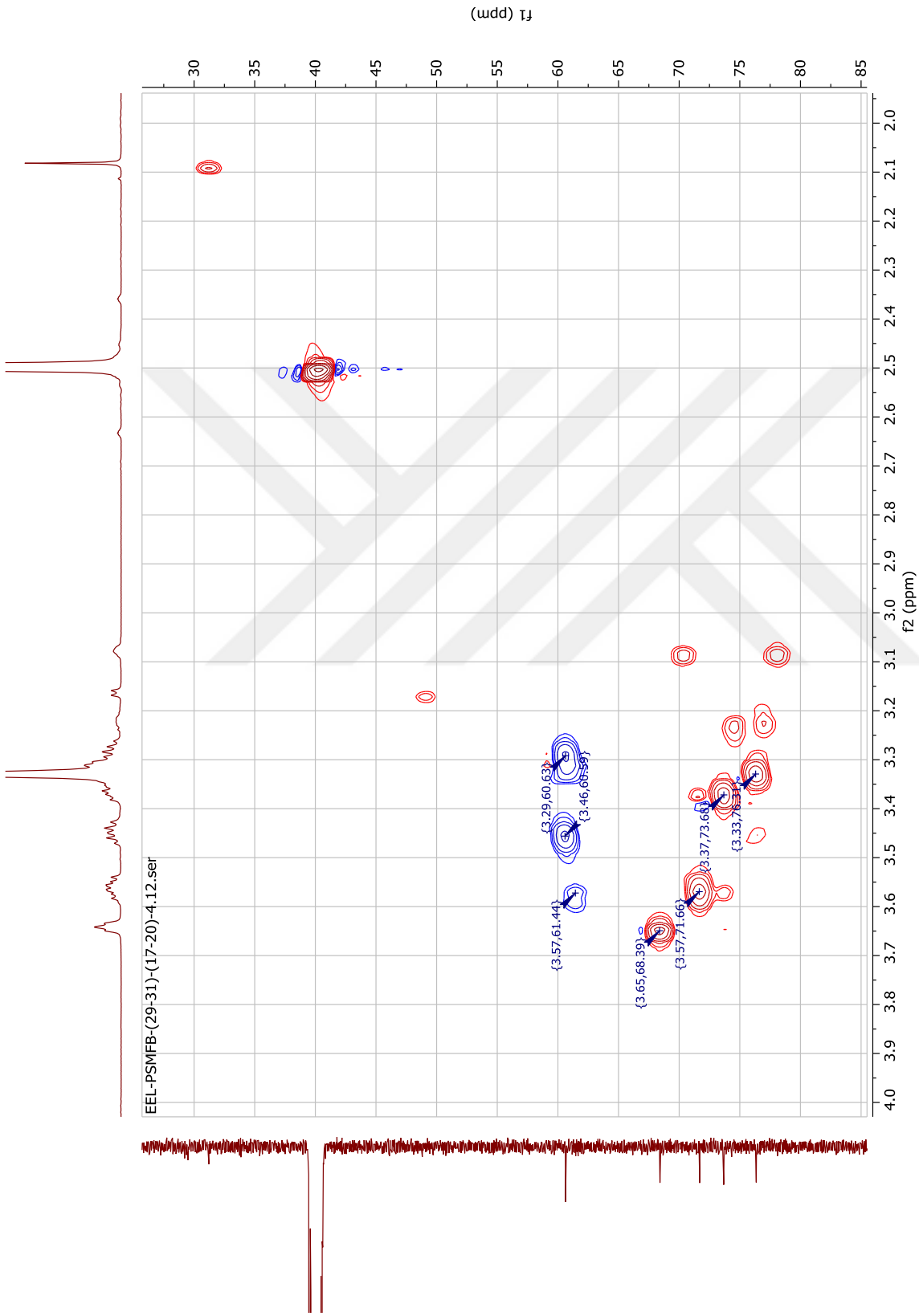
Pozisyon	δ_{C}	δ_{H}	HMBC
2	156.80	-	-
3	133.97	-	-
4	178.00	-	-
5	161.74	-	-
6	99.16	6.21 (1H, <i>d</i> , $J=2.1$ Hz)	C-5, C-7, C-8, C-10
7	164.62	-	-
8	94.00	6.41 (1H, <i>d</i> , $J=2.1$ Hz)	C-5, C-6, C-7, C-10
9	156.73	-	-
10	104.42	-	-
1'	121.59	-	-
2'	116.42	7.52 (1H, <i>d</i> , $J=2.3$ Hz)	C-1', C-4', C-9
3'	145.34	-	-
4'	148.97	-	-
5'	115.68	6.83 (1H, <i>d</i> , $J=8.5$ Hz)	C-1', C-3'
6'	122.52	7.67 (1H, <i>dd</i> , $J=8.5, 2.2$ Hz)	C-2', C-4', C-5', C-2
1''	102.26	5.36 (1H, <i>d</i> , $J=7.7$ Hz)	C-3
2''	71.69	3.57 (1H, <i>ddd</i> , $J=9.6, 7.7, 4.5$ Hz)	C-1''
3''	73.67	3.37	-
4''	68.42	3.64 (1H, <i>t</i> , $J=3.9$ Hz)	C-2'', C-3''
5''	76.35	3.32	C-1'', C-4'', C-6'',
6a''	60.63	3.46 (<i>m</i>)	-
6b''		3.29 (<i>m</i>)	-



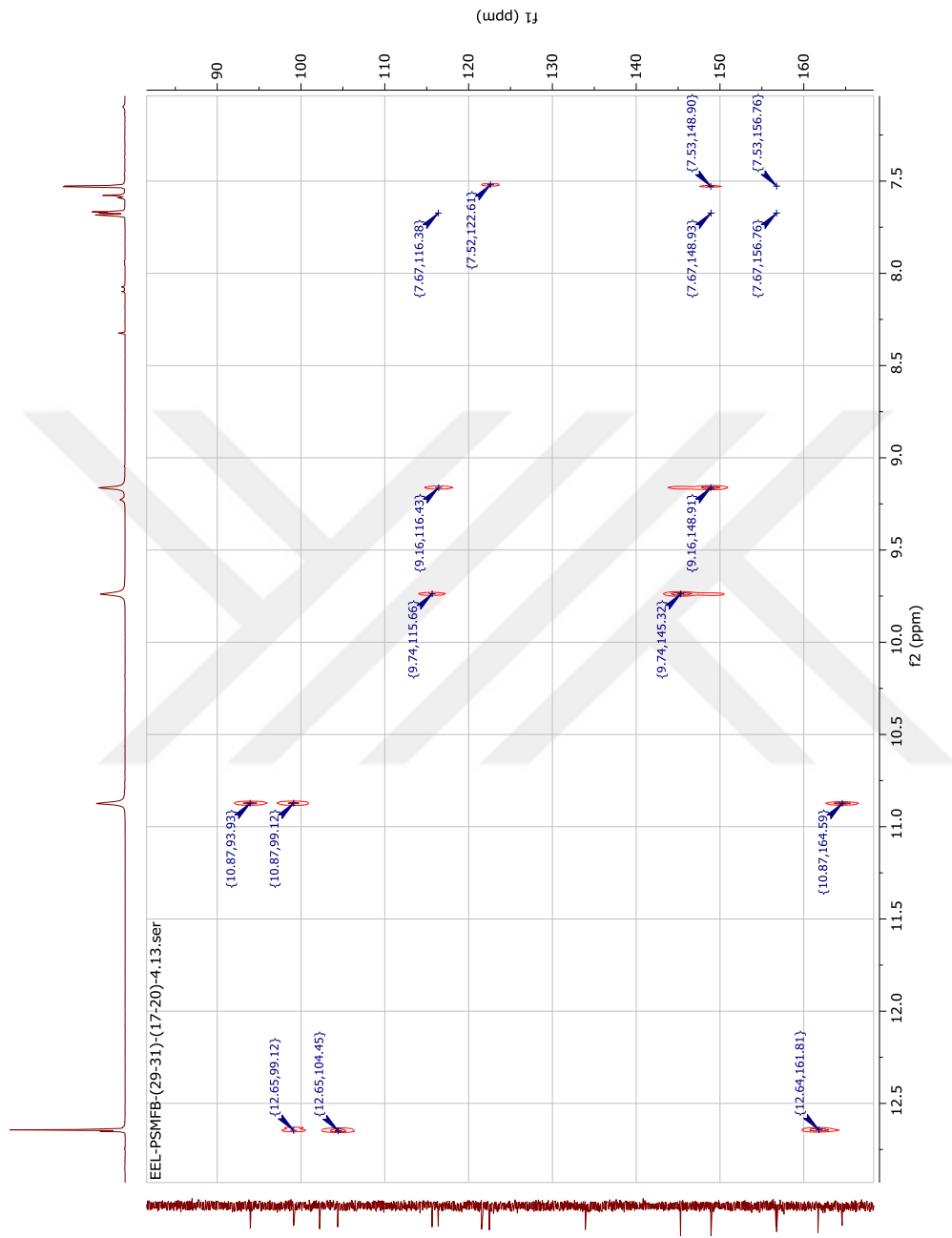
Şekil 4.30: Hiperozit'in $^1\text{H-NMR}$ spektrumu ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz).



Şekil 4.31: Hiperozit'in ^{13}C -NMR spektrumu (DMSO- d_6 , 125 MHz).



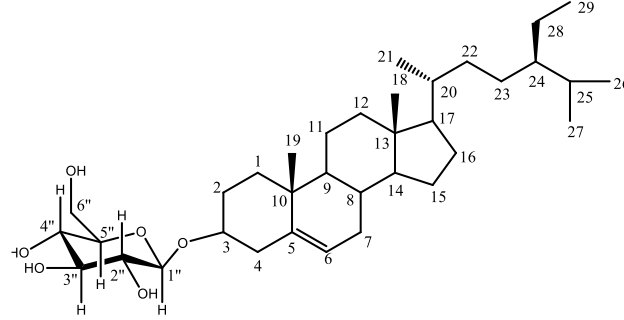
Şekil 4.32: Hiperozit'in HMBC spektrumu.



Şekil 4.33: Hiperozit'in HSQC spektrumu.

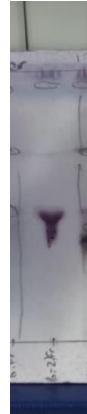
4.4.2 *Polygonum sivasicum*'un Metanol Ekstresi E-Fraksiyonundan Saf Madde İzolasyonu

Daucosterol



Şekil 4.34: Daucosterol'ün kimyasal yapısı.

Metanol ekstresinin E fraksiyonundan (PSMFE, 3,4 g) fraksiyonlandırma yapmak için açık kolon kromatografisinde dolgu maddesi olarak silika jel kullanıldı. Ekstre çözülerek silika jel ile karıştırıldıktan sonra karışım oda şartlarında ışık görmeyecek şekilde kurumaya bırakıldı. Kuruyan karışım şartlanan silika jel kolonun üst kısmına katı olarak yüklendi. Etilasetat:kloroform:metanol:su (15:8:4:1) izokrotik mobil fazı kullanılarak yürütülen silika jel kolonundan toplam 23 fraksiyon toplandı. PSMFE-6 kodlu alt fraksiyona metanol eklendiğinde beyaz amorf çökeltiler gözlemlendi. Dikkatli bir şekilde ayrılan PSMFE-6 kodlu bileşik beyaz renkli amorf katı şeklinde (9 mg), saf olarak elde edildi (Şekil 4.34). Silika jel plakta vanilin belirteci püskürtülüp yakılan madde (105°C) mor renk aldı (Şekil 4.35).



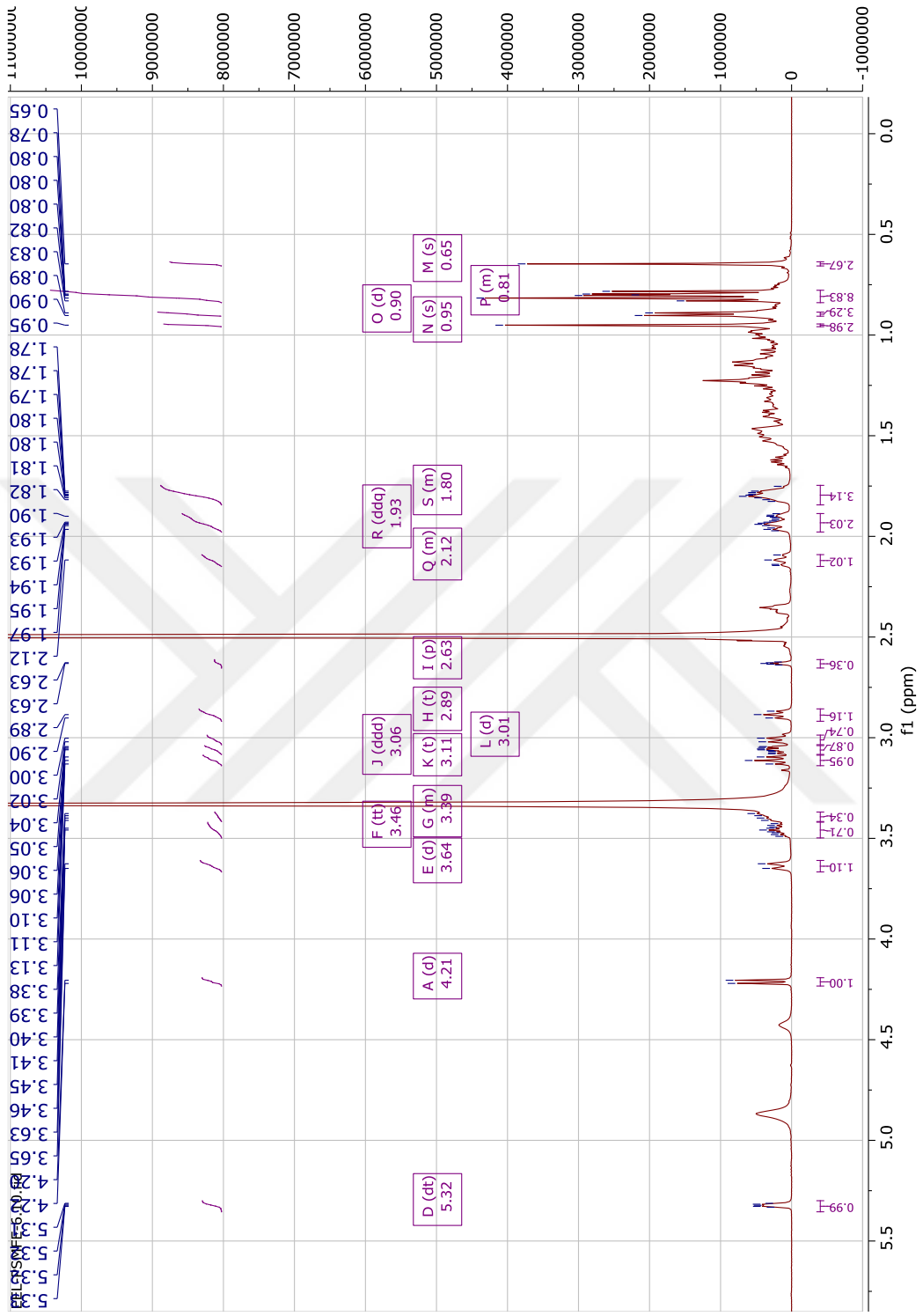
Şekil 4.35: Daucosterol'ün vanilin reaktifi püskürtüldükten sonraki ince tabaka kromatografisi.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz) spektrumunda δ 0,65 (3H, *s*), 0,90 (3H, *d*), 0,81 (9H, *m*), 0,95 (3H, *s*) olmak üzere 6 tane metil piki görülmesi ve 5,32 ppm'de (1H, *d*) görülen tek olefinik proton steroidler için karakteristik çifte bağ pozisyonunun 6 numaralı karbondan olabileceğini düşündürdü. $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda 2,90-4,22 ppm arasında görülen yedi proton ve $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumunda 61,10-100,77 ppm bandında görülen altı karbon (Şekil 4.36-40), göz önünde bulundurulduğunda PSMFE-6 kodlu bileşiğin bir steroid glikozidi olduğu tespit edildi. H-1' ve H-2' etkileşimleri incelendiğinde, yarımlama sabitlerine ($J=7.8$ Hz ve $J=8.4$ Hz) göre şekerin β -glikozit olduğu belirlendi.

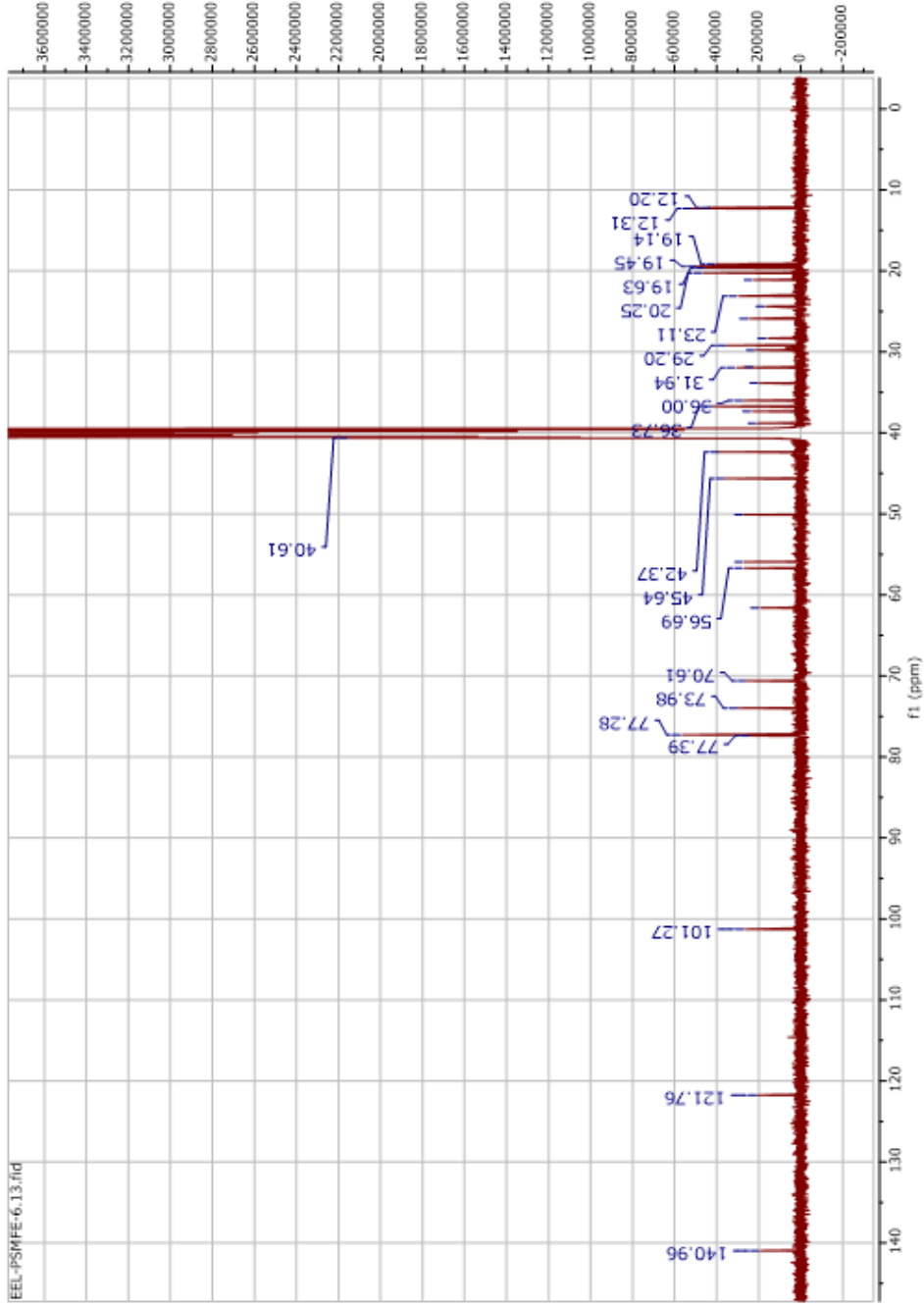
Bu tez kapsamında izole edilmiş olan β -sitosterol ve daha önce yeşil bir alg olan *Caulerpa cylindracea*'dan izole edilen β -sitosterol NMR kimyasal kayma değerlerinin örtüşmesi ve ^1H ve $^{13}\text{C-NMR}$ 'larında şeker proton ve karbonlarının görülmesi sebebiyle bir β -sitosterol glikozidi olduğuna karar verildi. Daha önce *Ipobomoa Batatas*, tatlı patates türünden elde edilen daucosterol maddesinin $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 125 MHz) kimyasal kayma değerleriyle karşılaştırıldığında örtüşmesi sebebiyle moleküle ait şekerin glukoz ve dolayısıyla birleşimin β -sitosterol-3-O- β -glukopiranozit olduğu belirlendi [80].

Tablo 4.11: Daucosterol 'ün ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz), ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) değerleri.

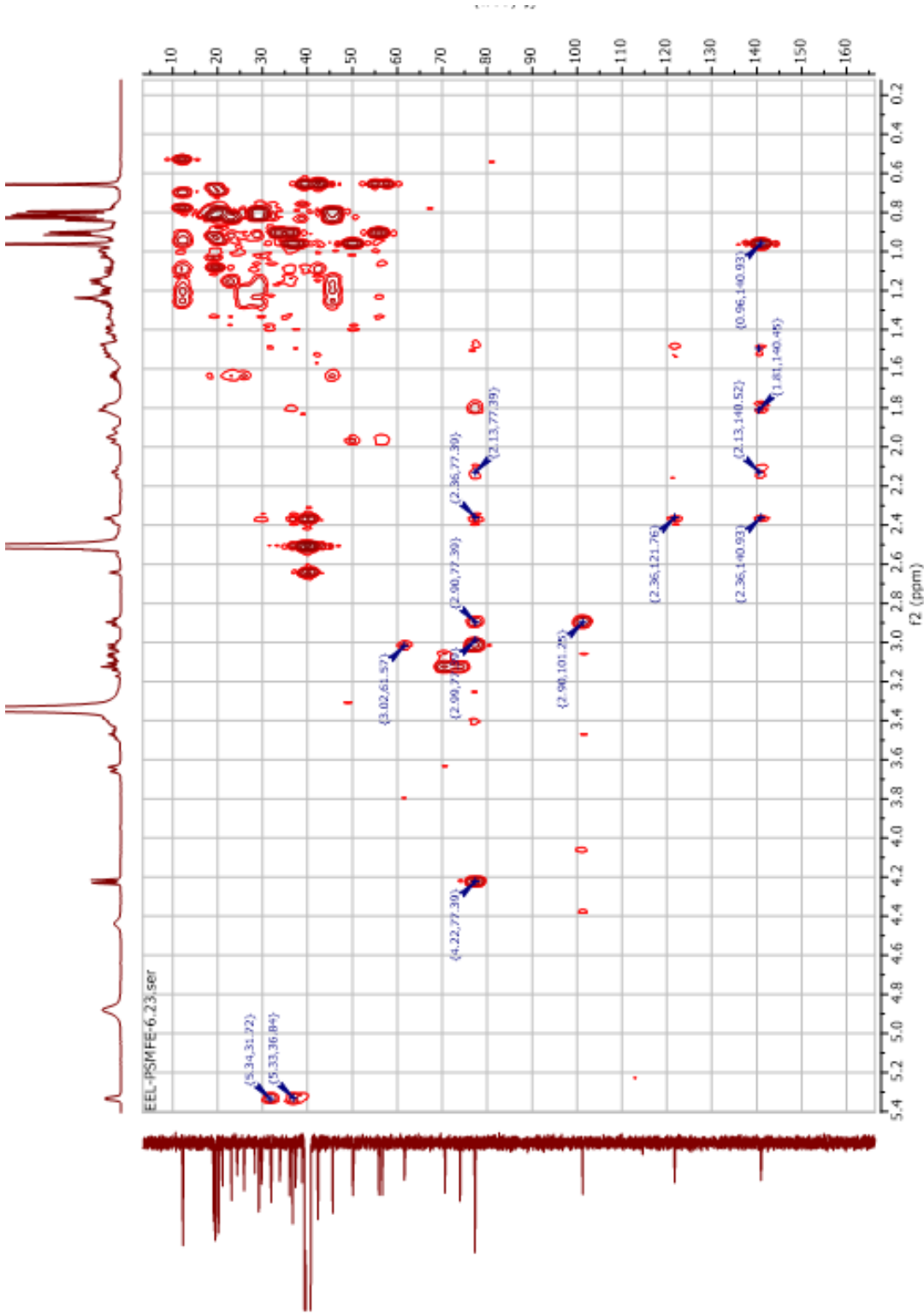
Pozisyon	δ_{C}	δ_{H}
1	38.31.	1.94
2	33.35	0.96
3	77.27	3.47
4	40.11	1.9
5	140.45	-
6	121.26	5.33 (1H, dt, $J=4.8, 2.1$ Hz)
7	31.44	1.39
8	31.39	1.50
9	49.61	0.89
10	39.01	-
11	20.61	0.96
12	40.57	1.14
13	41.87	-
14	56.19	1.09
15	23.89	
16	27.82	1.25
17	55.43	1.09
18	11.81	0.65 (3H, s)
19	19.75	0.95(3H, s)
20	36.84	1.81
21	20.61	0.90 (3H, d)
22	36.23	
23	27.82	1.16
24	45.14	0.92
25	28.70	1.23
26	20.61	0.81 (3H, m)
27	18.95	0.81 (3H, m)
28	22.61	0.82
29	19.13	0.81 (3H, m)
1'	100.77	4.22 (1H, d, $J=7.8$ Hz)
2'	73.48	2.90 (1H, t, $J=8.4$ Hz)
3'	76.89	3.47
4'	70.11	3.02
5'	76.78	3.07
6'	61.10	3.65 (1H, d, $J=11.5$ Hz) 3.41 (1H, tt, $J=11.5, 4.4$ Hz)



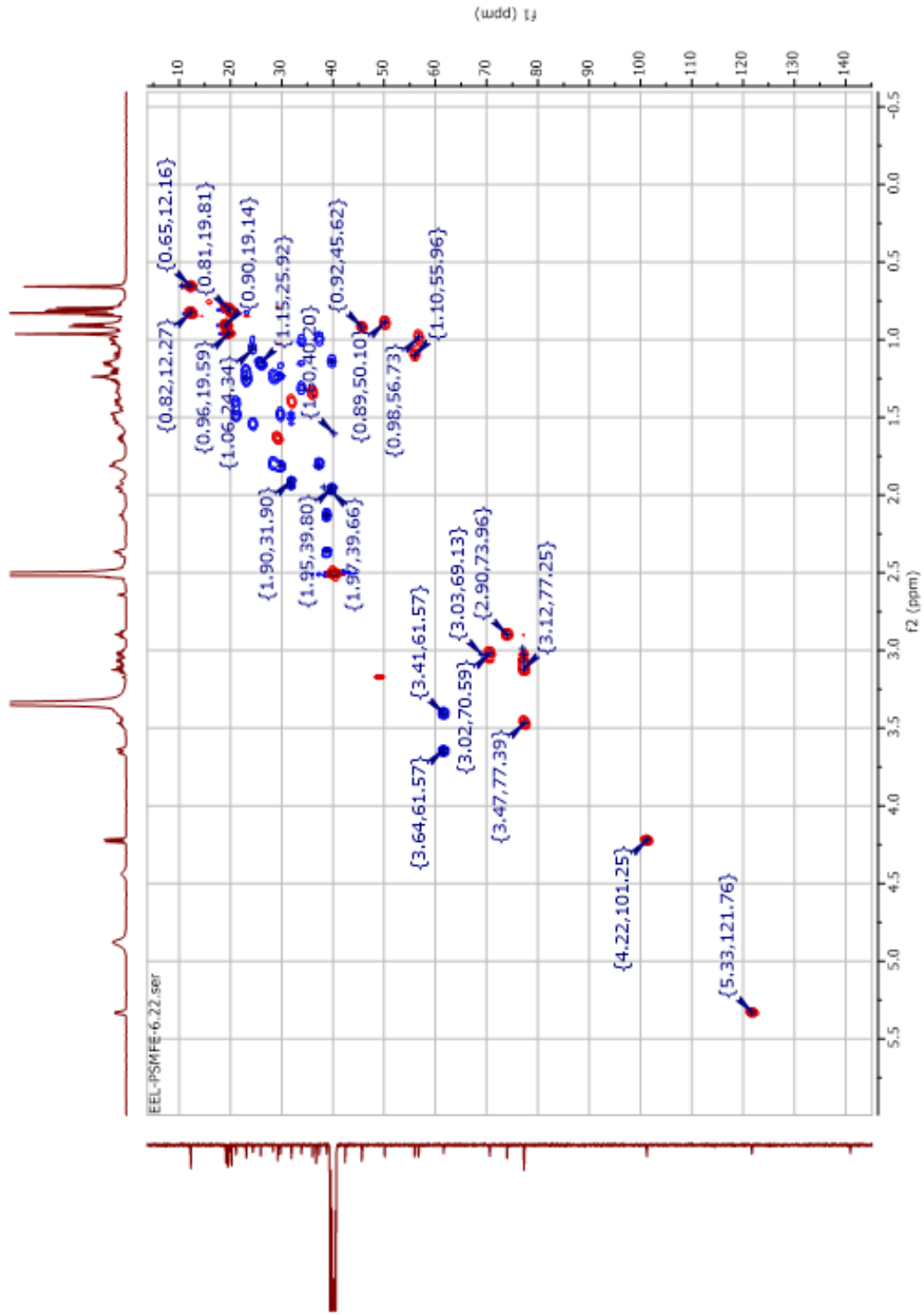
Şekil 4.36: Daucosterol'ün ¹H-NMR spektrumu (DMSO-d₆, 500 MHz).



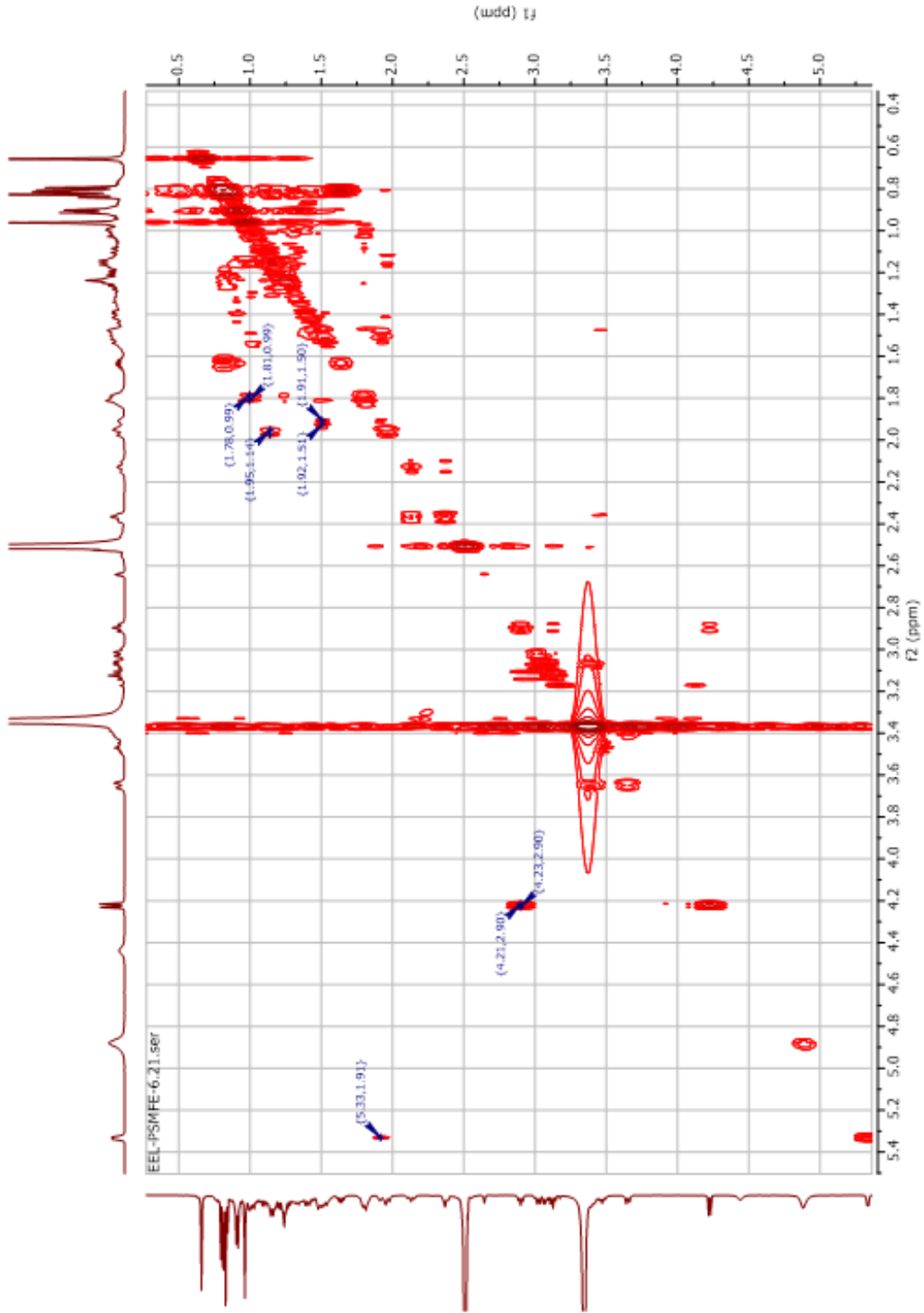
Şekil 4.37: Daucosterol'ün ^{13}C spektrumu ($\text{DMSO-}d_6$, 125 MHz).



Şekil 4.38: Daucosterol'ün HMBC spektrumu.



Şekil 4.39: Daucosterol'ün HSQC spektrumu.



Şekil 4.40: Daucosterol'ün COSY spektrumu.

4.5 *P. sivasicum*'un GC-MS Kullanılarak Belirlenen Yağ Asidi Profili Sonuçları

P. sivasicum'un hegzan ekstresinin GC-MS kullanılarak belirlenen yağ asidi profili sonuçları Tablo 4.12'de verilmiştir. Buna göre *P. sivasicum* hegzan ekstresinde en çok bulunan yağ asitleri α -linolenik asit, palmitik asit ve 8,11-oktadekadienoik asit olarak belirlendi.

Tablo 4.12: GC-MS yağ asidi profili sonuçları.

Retansiyon süresi	Yağ asidi	Molekül formülü	C:D	% Alan
5.92	Pelargonik asit	C ₉ H ₁₈ O ₂	9:0	0.05
6.51	Kaprik asit	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	10:0	0.11
7.61	Laurik asit	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	12:0	0.66
7.76	Azelaik asit	C ₉ H ₁₆ O ₄	9:0	0.12
8.25	Tridesiklik asit	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	13:0	0.03
8.99	Miristik asit	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	14:0	1.06
9.86	Pentadekanoik asit	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	15:0	0.40
10.67	Palmitoleik asit	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	16:1	0.80
10.87	Palmitik asit	C₁₆H₃₂O₂	16:0	25.28
12.00	Heptadekanoik asit	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	17:0	0.40
12.90	8,11-Oktadekadienoik asit	C₁₈H₃₂O₂	18:2	23.23
12.99	α-linolenik asit	C₁₈H₃₀O₂	18:3	28.49
13.25	Stearik asit	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	18:0	4.18
16.26	Araşidik asit	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	20:0	2.10
18.38	Heneikosanoik asit	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	21:0	0.22
21.16	Behenik asit	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	22:0	3.33
24.80	Trikosanoik asit	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	23:0	0.78
28.30	Nervonik asit	C ₂₄ H ₄₆ O ₂	24:1	0.11
29.64	Lignoserik asit	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	24:0	3.54
Total				95
Toplam doymuş yağ oranı				42.26
Toplam doymamış yağ oranı				52.63
Toplam doymuş yağ oranı/Toplam doymamış yağ oranı				0.8

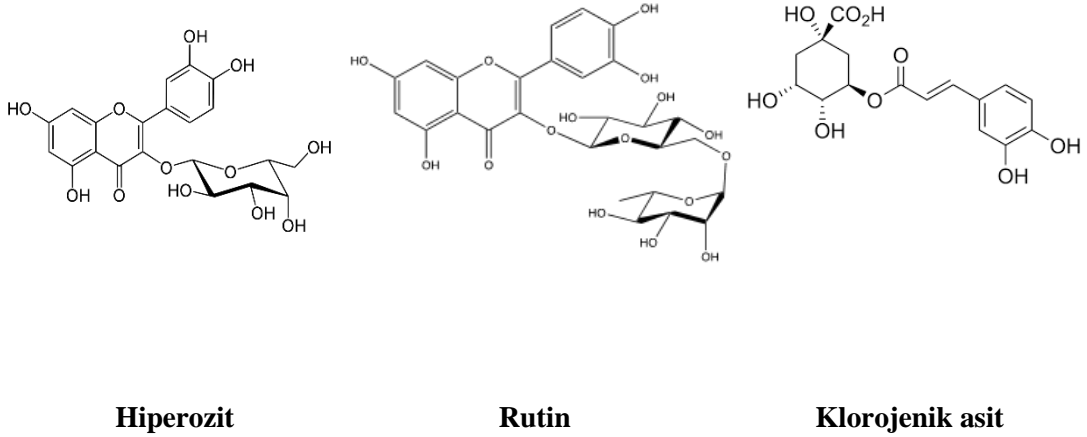
4.6 *P. sivasicum*'un LC-MS Kullanılarak Belirlenen Fenolik Profil Sonuçları

P. sivasicum'un metanol ekstresinin sıvı kromatografi-yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi (LC-HR/MS) kullanılarak belirlenen fenolik asit profili sonucu 27 fenolik asit tanımlandı (Tablo 4.13). Ekstrede hiperozit (226,75 mg/L), rutin (219,37 mg/L) ve klorojenik asit (165,33 mg/L) en yüksek konsantrasyonlarda belirlendi. Şekil 4.41 bu moleküllerin yapılarını göstermektedir.

Tablo 4.13: *P. sivasicum*'un metanol ekstresinde belirlenen fenolik bileşikler ve

miktarları

Fenolik asitler	Miktar (mg/L)
Askorbik asit	5.22
(-)-Epigallokateşin gallat	0.38
Klorojenik asit	165.33
(-)-Epikateşin gallat	3.52
Orientin	0.62
Kafeik asit	3.74
(+)- <i>trans</i> taksifolin	0.21
Vanilik asit	32.36
Luteolin 7-glukozid	0.46
Rutin	219.37
Hiperozit	226.75
Apigenin 7-glukozid	0.15
Ellajik asit	0.45
Kersitrin	7.58
Mirisetin	0.21
Kersetin	4.89
Salisilik asit	14.70
Naringenin	0.42
Luteolin	7.24
Nepetin	0.65
Apigenin	0.32
Hispidulin	2.50
Krisin	0.02
Akasetin	0.05
Pirogallol	0.23
3,4-Dihidroksibenzaldehid	0.07
Krisoeriol	0.83



Şekil 4.41: *P. sivasicum* metanol ekstresinde LC-HR/MS sonuçlarına göre en çok belirlenen fenolik bileşiklerin kimyasal yapıları.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

P. sivasicum'un hegzan, etilasetat, kloroform ve metanol olmak üzere dört farklı çözücüde ekstraları hazırlandı. Buna ek olarak su infüzyonu ve pişirilmiş madımak örnekleri hazırlanarak toplam altı numunenin DPPH serbest radikali giderimi, ABTS katyon radikali giderimi, CUPRAC bakır (II) indirgeyici antioksidan aktivite, metal bağlama ve β -karoten-linoleik asit yöntemleri kullanılarak antioksidan aktiviteleri spektrofotometre ile analiz edildi. ABTS katyon radikalının giderimi yönteminde 25,9 $\mu\text{g/mL}$ IC_{50} değeri ile metanol eksteresi en aktif ekstre olarak tespit edildi. Bu değer BHT (21,67 $\mu\text{g/mL}$) ve α -tokoferol (27,70 $\mu\text{g/mL}$) standartlarının IC_{50} değerlerine yakın bulundu.

DPPH radikal giderim aktivitesi sonuçlarına göre metanol ekstresinin bu yöntemde de 41,26 $\mu\text{g/mL}$ IC_{50} değeri ile en aktif ekstre olduğu ortaya konuldu ve bu değer α -tokoferol (36,35 $\mu\text{g/mL}$) standardının IC_{50} değeriyle kıyaslandığında oldukça yakın olduğu belirlendi.

Metal bağlama yönteminin sonuçlarına göre tüm ekstralar düşük aktivite göstermelerine rağmen yiyecek olarak tüketilen bu türün pişirilmesiyle hazırlanmış bir numunenin antioksidan aktivite belirleme yönteminde orta dereceli aktivite göstermesi kayda değer bulundu. 2014 yılında siyah pirincin antioksidan kapasitesini ölçme amaçlı yapılan bir çalışmada benzer sonuçlar elde edilmiş ve metal bağlama kapasitesindeki artışın fenolik bileşiklerin parçalanması sonucu yenilerinin oluşmasına bağlı olduğu belirtilmiştir [81]. Isıyla glikozitlerin kopması sonucu aglikon yapıdaki hidroksil gruplarının serbest kalması sonucu karboksil grupları ile beraber metal bağlama kapasitesinde artış görülmesine bir diğer sebep olarak değerlendirilebilir.

CUPRAC bakır (II) indirgeme yönteminde etilasetat ve kloroform ekstralarının $A_{0,5}$ değerleri sırasıyla 15,21 $\mu\text{g/mL}$ ve 17,39 $\mu\text{g/mL}$ hesaplandı ve diğer standartlar olan BHA (24,49 $\mu\text{g/mL}$) ve BHT (26,85 $\mu\text{g/mL}$) $A_{0,5}$ değerlerine göre daha da düşük çıkarak bu yöntemde etilasetat ve kloroform ekstralarının yüksek antioksidan aktivite gösterdikleri belirlendi.

β -karoten-linoleik asit yönteminin sonuçlarına göre kloroform ekstresi dışında tüm ekstrelerin orta derecede aktivite gösterdiği görüldü. Kloroform ekstresi 14.93 $\mu\text{g}/\text{mL}$ IC_{50} değeri ile en aktif ekstre olarak bulundu ve bu yöntemde yüksek aktivite gösterdiği belirlendi.

P. sivasicum'un hegzan, etilasetat, kloroform ve metanol olmak üzere dört farklı çözücüde hazırlanan ekstrelerinin her biri için kaba fraksiyonlandırma gerçekleştirildi. Bu ekstrelerin verimleri ve ince tabaka kromatografisi sonuçları göz önünde bulundurulduğunda biyoaktif sekonder metabolitler açısından en zengin ekstrenin metanol ekstresi olduğuna karar verildi. Bu ekstreden bir steroidal glikozit (daucosterol), bir flavonoid glikozidi (hiperozit) ve bir asetofenon türevi (annphenone) olmak üzere üç farklı madde izole edildi. Ayrıca hegzan ekstresinin kaba fraksiyonlandırılması sırasında 1 steroid (β -sitosterol) çöktürülmek suretiyle saf olarak elde edilirken, 4. fraksiyonundan bir fitalat türevi (di-(2-etilhekzil)fitalat) izole edildi. Bunlar içinde annphenone'un ilk defa bir *Polygonum* türünden saf olarak elde edildiği yapılan literatür araştırmaları ile belirlendi. Annphenone, şimdiye kadar *Artemisia* ve *Euphorbia* cinsine ait birçok türden izole edilmiştir [77, 82, 83]. Son yıllarda *Prunus domestica* L. [84] ve *Prunus armeniaca* [85] gibi *Prunus* türlerinden de saf olarak elde edildiği belirlenen annphenone'nun sınırlı sayıda cinste görülmesine ek olarak *Polygonum* cinsinin endemik bir türünden ilk defa izole edilmiş olması kayda değer bulundu. Ayrıca annphenone molekülünün hepasellüler karsinoma, HEPG2 hücre hattında 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ IC_{50} değeri ile proliferatif etki göstermesi [77], ticari potansiyeli nedeniyle ekonomik açıdan da bölge halkı için önem taşıdığı bilinen bu türün sekonder metabolitlerinin izolasyonu ve biyoaktivite çalışmalarının önemini vurgular niteliktedir. Ayrıca, farklı hücre hatlarına karşı sitotoksikite çalışmalarının ileri araştırmalar ile değerlendirilmesi gerektiği öngörmekteyiz.

İlk olarak 1937 yılında *Hypericum perforatum*, sarı kantaron bitkisinden saf olarak elde edilen hiperozit [86], bu tez kapsamında LC-HR/MS kullanılarak fenolik içerik belirleme amaçlı yapılan çalışma sonucu, *P. sivasicum* türünde en çok bulunan üç fenolik bileşikten biri olduğu ortaya konuldu. Yapılan izolasyon ve yapı tayini çalışmaları sonucunda ise, tez içeriğinde belirtildiği gibi, metanol ekstresinden saf olarak elde edildi. *Hypericum perforatum* içeriğindeki hiperozit sebebiyle antidepresan özellik göstermektedir ve halk arasında bu sebeple sıklıkla kullanılan bir bitkidir [86]. Yaşa bağlı oluşan böbrek hasarını önlemede etkili olan hiperozitin,

akciğer, karaciğer, mide ve meme kanserlerine karşı etkisi sadece belli başlı sinyal yolları üzerinden çalışılmıştır. İleride yapılacak araştırmalarda farklı sinyal yollarının çalışılmasının hiperozitin farklı kanser hücrelerine etkisinin daha iyi anlaşılması adına önem taşıdığını düşünmekteyiz.

Bir β -sitosterol glikozidi olan daucosterol özellikle prostat kanseri [87] olmak üzere meme [80], kolon kanserlerine [88] karşı etkisi bir çok çalışmada ortaya konulmuştur. *Salvia syriaca* ekstresinin ve bu ekstreden elde edilen üç triterpenoid, β -sitosterol ve daucosterol saf maddelerine kıyasla antikolinesteraz aktivitesinin araştırıldığı başka bir çalışmada ise en aktif bileşiklerin 24 $\mu\text{g/mL}$ IC_{50} değeri ile β -sitosterol ve ardından 31 $\mu\text{g/mL}$ IC_{50} değeri ile daucosterol olduğu belirlenmiştir [89]. Bu nedenle β -sitosterol ve glikozidi olan daucosterol'un farklı hücre hatlarında sitotoksikite çalışmalarına ve antialzaymır ajan olarak ilaç keşfine yönelik çalışmalara açık olduğu öngörülmektedir.

Fitalatlar plastiklere esneklik sağlaması amacıyla eklenirler. Plastikte kovalent bağ yapmadıklarından suyla kolayca uzaklaştırılabilmeleri nedeniyle denizde, havada ve toprakta zaman içinde birikmektedirler. Ancak, fitalatların bitkilerde ve deniz canlılarında bulduklarına dair yapılan araştırmalar bu birleşik türünün canlılar tarafından da biyosentezinin mümkün olabileceğini gösterdi. Bu amaçla 2021 yılında yayınlanan bir makede alglerden izole edilen fitalatların içerdiği ^{14}C miktarı ölçülerek belirlenmiş ve bu miktarın solvent veya fosil türevi yakıt kaynaklı olması durumunda çok daha düşük seviyelerde seyretmesinin beklenildiği öne sürülmüştür [72]. Hormon bozucu ve toksik olma özellikleriyle bilinmelerine rağmen son yıllarda fitalatların antibakteriyel ve antikanser özelliklerinin araştırıldığı makalelerin sayısının çoğalması bu birleşik türünün diğer farmakolojik özelliklerinin de araştırılması gerektiğini düşündürmüştür [90]. Ayrıca birçok bitkide bulunduğu belirlenen fitalatların, günlük kullanım sonucu toksik seviyelere ulaşmaması amaçlı, tedavi için kullanılan bitki karışımlarındaki konsantrasyonunun standardize edilmesi gerektiği öngörülebilir.

P. sivasicum'un hegzan ekstresinin GC-MS kullanılarak belirlenen yağ asidi profili sonuçlarına göre içeriğinde en çok α -linolenik asit (%28,49), palmitik asit (%25,28) ve 8,11-oktadekadienoik asit (%23,23) bulunduğu ortaya konuldu. En önemli omega-3 yağ asitlerinden biri olan α -linolenik asit (ALA) keten tohumunda %50-60, balık yağında ise %30 civarında bulunmaktadır. Yiyecek olarak yöre halkı tarafından bolca

tüketilen bir bitki olması sebebiyle, *P. sivasicum*'un ALA miktarının balık yağındaki ALA miktarına yakın olması oldukça önemli bulundu.

P. sivasicum metanol ekstresinin fenolik profilinin 60- fenolik bileşik standardına karşı LC-HR/MS kullanılarak belirlenmesi sonucu flavonoid açısından zengin içeriğe sahip olduğu görüldü. Ekstrede hiperozit (226,75 mg/L), rutin (219,37 mg/L) ve klorojenik asit (165,33 mg/L) en yüksek konsantrasyonlarda bulunmuştur.



KAYNAKLAR

- [1] **Kelly, K.**, (2009). *History of Medicine*. 2009, New York: Facts on File.
- [2] **Efferth, T. & Koch, E.** (2011). Complex interactions between phytochemicals. The multi-target therapeutic concept of phytotherapy. *Curr Drug Targets*. 12(1): p. 122-32.
- [3] **Leisegang, K.**, *Herbal pharmacognosy: An introduction*, in *Herbal Medicine in Andrology*, R. Henkel and A. Agarwal, Editors. 2021, Academic Press. p. 17-26.
- [4] **Kumar, P.** (2004). Valuation of medicinal plants for pharmaceutical uses. *Current Science*. 86(7): p. 930-937.
- [5] **Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural M., Babaç, M.T.**, (2012). *Türkiye bitkileri listesi:(Damarlı Bitkiler)*. 2012, İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları.
- [6] **Gözcü, S.**, *Evaluation of antidiabetic and antioxidant effects of Paeonia mascula L. and Polygonum cognatum Meissn. extracts, isolation and structure elucidation of the compounds responsible from the effect*. 2021, Atatürk University.
- [7] **Eruygur, N. , Ucar, E. , Ataş, M. , Ergul, M. , Ergul, M. & Sozmen, F.** (2020). Determination of biological activity of Tragopogon porrifolius and Polygonum cognatum consumed intensively by people in Sivas. *Toxicol Rep*. 7: p. 59-66.
- [8] **Xiao, K. , Xuan, L. , Xu, Y. , Bai, D. , Zhong, D. , Wu, H. , Wang, Z. & Zhang, N.** (2002). Dimeric Stilbene Glycosides from *Polygonum cuspidatum*. *European Journal of Organic Chemistry*. 2002(3): p. 564-568.
- [9] **Lin, L. F. , Ni, B. R. , Lin, H. M. , Zhang, M. , Li, X. C. , Yin, X. B. , Qu, C. H. & Ni, J.** (2015). Traditional usages, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Polygonum multiflorum* Thunb.: A review. *Journal of Ethnopharmacology*. 159: p. 158-183.
- [10] **Teka, T., Wang, L. M. , Gao, J. , Mou, J. J. , Pan, G. X. , Yu, H. Y. , Gao, X. M. & Han, L. F.** (2021). *Polygonum multiflorum* : Recent updates on newly isolated compounds, potential hepatotoxic compounds and their mechanisms. *J Ethnopharmacol*. 271.
- [11] **Al-Hazimi, H. M. A. & Haque, S. N.** (2002). A new naphthoquinone from *Polygonum aviculare*. *Nat Prod Lett*. 16(2): p. 115-118.
- [12] (2016). Committee on Herbal Medicinal Products: Assessment report on *Polygonum aviculare* L., herba.

- [13] **Yıldız, İ.**, *Türkiye’de Yetişen Bazı Bitki Türlerinin Antimikrobiyal Ve Antioksidan Özelliklerinin İncelenmesi*. 2019, Anadolu Üniversitesi.
- [14] **Alev, A.**, *Endemik Polygonum samsunicum L. Bitkisinin Kimyasal İçeriği ve Biyokimyasal Aktivitelerinin Araştırılması*. 2019, Ondokuz Mayıs Üniversitesi.
- [15] **Heywood, V. H.**, (1978). *Flowering plants of the world*. 1978, Oxford: Oxford University Press.
- [16] **Davis, P. H.**, (1967). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol. 2. 1967, Edinburgh: Edinburgh University Press.
- [17] **Coode, M. J. E. & Cullen, J.**, (1967). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol. 2. 1967, Edinburgh: Edinburgh University Press.
- [18] **Tan, K. Y.**, (1988). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol. 11. 1988, Edinburgh: Edinburgh University Press.
- [19] **Baytop, T.**, (1984). *Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi*. 1. Baskı ed. 1984, İstanbul.
- [20] **Özçelik, H. & Balabanlı, C.** Burdur İlinin Tıbbi ve Aromatik Bitkileri. *I. Burdur Sempozyumu*: p. 1127-1136.
- [21] **Özgen, U., Kaya, Y. & Houghton, P.** (2012). Folk medicines in the villages of Ilica District (Erzurum, Turkey). *Turkish Journal of Biology*. 36(No. 1): p. Article 12.
- [22] **Tuzlacı, E. & Doğan, A.** (2010). Turkish folk medicinal plants, IX: Ovacık (Tunceli). *Marmara Pharmaceutical Journal*. 14: p. 136-143.
- [23] **Yesilada, E., Sezik, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y. & Tanaka, T.** (1999). Traditional medicine in Turkey IX: folk medicine in north-west Anatolia. *J Ethnopharmacol*. 64(3): p. 195-210.
- [24] **Yesilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Fujita, T., Tanaka, T., Takeda, Y. & Takaishi, Y.** (1995). Traditional medicine in Turkey. V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains. *J Ethnopharmacol*. 46(3): p. 133-52.
- [25] **Peng, W., Qin, R. X., Li, X. L. & Zhou, H.** (2013). Botany, phytochemistry, pharmacology, and potential application of *Polygonum cuspidatum* Sieb.et Zucc.: A review. *Journal of Ethnopharmacology*. 148(3): p. 729-745.
- [26] **Ziaullah & Rupasinghe, H. P. V.**, *Application of NMR Spectroscopy in Plant Polyphenols Associated with Human Health*, in *Applications of Nmr Spectroscopy, Vol 2*, AttaUrRahman and M.I. Choudhary, Editors. 2015. p. 3-92.
- [27] **Su, X., Zhou, D. & Li, N.**, *Chapter 8 - Bioactive stilbenes from plants*, in *Studies in Natural Products Chemistry*, R. Atta ur, Editor. 2022, Elsevier. p. 265-403.
- [28] **Yang, J. B., Ye, F., Tian, J. Y., Song, Y. F., Gao, H. Y., Liu, Y., Wang, Q., Wang, Y., Ma, S. C., Cheng, X. L. & Wei, F.** (2020). Multiflorumisides H-K, stilbene glucosides isolated from *Polygonum multiflorum* and their in vitro PTP1B inhibitory activities. *Fitoterapia*. 146.

- [29] **Wang, D. G. , Liu, W. Y. & Chen, G. T.** (2013). A simple method for the isolation and purification of resveratrol from *Polygonum cuspidatum*. *J Pharm Anal.* 3(4): p. 241-247.
- [30] **Liu, M. , Li, X. , Liu, Q. , Xie, S. , Zhu, F. & Chen, X.** (2020). Preparative isolation and purification of 12 main antioxidants from the roots of *Polygonum multiflorum* Thunb. using high-speed countercurrent chromatography and preparative HPLC guided by 1,1'-diphenyl-2-picrylhydrazyl-HPLC. *J Sep Sci.* 43(8): p. 1415-1422.
- [31] **Martorell, M. , Castro, N. , Victoriano, M. , Capo, X. , Tejada, S. , Vitalini, S. , Pezzani, R. & Sureda, A.** (2021). An Update of Anthraquinone Derivatives Emodin, Diacerein, and Catenarin in Diabetes. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2021.
- [32] **Shan, B. , Cai, Y. Z. , Brooks, J. D. & Corke, H.** (2008). Antibacterial properties of *Polygonum cuspidatum* roots and their major bioactive constituents. *Food Chemistry.* 109(3): p. 530-537.
- [33] **Matsuda, H. , Shimoda H Fau - Morikawa, T. , Morikawa T Fau - Yoshikawa, M. & Yoshikawa, M.** Phytoestrogens from the roots of *Polygonum cuspidatum* (Polygonaceae): structure-requirement of hydroxyanthraquinones for estrogenic activity. (0960-894X (Print)).
- [34] **Sheng, Z. W. , Ai, B. L. , Zheng, L. L. , Zheng, X. Y. , Yang, Y. & Shen, Y. X.** (2019). Capability of *Polygonum cuspidatum* extract in inhibiting AGEs and preventing diabetes. *Food Sci Nutr.* 7(6): p. 2006-2016.
- [35] **Ahn, S. M. , Kim, H. N. , Kim, Y. R. , Choi, Y. W. , Kim, C. M. , Shin, H. K. & Choi, B. T.** (2016). Emodin from *Polygonum multiflorum* ameliorates oxidative toxicity in HT22 cells and deficits in photothrombotic ischemia. *Journal of Ethnopharmacology.* 188: p. 13-20.
- [36] **Xu, M. L. , Zheng, M. S. , Lee, Y. K. , Moon, D. C. , Lee, C. S. , Woo, M. H. , Jeong, B. S. , Lee, E. S. , Jahng, Y. , Chang, H. W. , Lee, S. H. & Son, J. K.** (2006). A new stilbene glucoside from the roots of *Polygonum multiflorum* Thunb. *Arch Pharm Res.* 29(11): p. 946-951.
- [37] **Yao, S. , Li, Y. & Kong, L. Y.** (2006). Preparative isolation and purification of chemical constituents from the root of *Polygonum multiflorum* by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A.* 1115(1-2): p. 64-71.
- [38] **Ibrahim, S. , Elshafiey, E. , batreek, E. , Abdulrahim, E. , Azazy, E. , Abd-Elghany, E. , Mahmoud, E. , S.Hassan, E. , Amin, E. , Kamal, E. , Ali, E. & Sebaiy, M.** (2021). Steroids in Medicinal Chemistry: Literature Review. *Academic Journal of Chemistry:* p. 69-78.
- [39] **Luo, J. , Yang, H. & Song, B. L.** (2020). Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 21(4): p. 225-245.
- [40] **Rao, G., Xue, Y., Hui, T., Wang, W. & Zhang, Q.** (2009). Studies on the chemical constituents of the leaves of *Polygonum multiflorum*. 32(6): p. 891-893.
- [41] **Zhang, C., Li, Y. & Hu, F.** (2005). Chemical constituents in fruits of *Polygonum viviparum*. 25(2): p. 386-387.

- [42] **Zhao, H., Bai, H., Li, W., Wang, Y., Liu, Y. & Liu, A.** (2011). Chemical constituents from *Polygonum capitatum*. 23(2): p. 262-266.
- [43] **Shen, T. , Jia, Z. , Zheng, S. & Shen, X.** (2003). Steroids and Flavonoids from *Polygonum nodosum* pers. *Journal of the Chinese Chemical Society*. 50.
- [44] **Sun, X.-B. , Zhao, P.-H. , Xu, Y.-J. , Sun, L.-M. , Cao, M.-A. & Yuan, C.-S.** (2007). Chemical constituents from the roots of *Polygonum bistorta*. *Chemistry of Natural Compounds*. 43: p. 563-566.
- [45] **Manoharan, K. P. , Benny, T. K. H. & Yang, D. W.** (2005). Cycloartane type triterpenoids from the rhizomes of *Polygonum bistorta*. *Phytochemistry*. 66(19): p. 2304-2308.
- [46] **Bansal, R. & Suryan, A.** (2022). A Comprehensive Review on Steroidal Bioconjugates as Promising Leads in Drug Discovery. *ACS Bio & Med Chem Au*. 2(4): p. 340-369.
- [47] **Sultana, R. , Hossain, R. , Adhikari, A. , Ali, Z. , Choudhary, M. I. & Zaman, M. S.** (2015). Hydropiperside, a new Sphingoglycolipid from *Polygonum hydropiper*. *Natural Product Communications*. 10(4): p. 641-643.
- [48] **Magozwi, D. K. , Dinala, M. , Mokwana, N. , Siwe-Noundou, X. , Krause, R. W. M. , Sonopo, M. , McGaw, L. J. , Augustyn, W. A. & Tembu, V. J.** (2021). Flavonoids from the Genus *Euphorbia*: Isolation, Structure, Pharmacological Activities and Structure-Activity Relationships. *Pharmaceuticals*. 14(5).
- [49] **March, R. & Brodbelt, J.** (2008). Analysis of flavonoids: Tandem mass spectrometry, computational methods, and NMR. *Journal of Mass Spectrometry*. 43(12): p. 1581-1617.
- [50] **Panche, A. N. , Diwan, A. D. & Chandra, S. R.** (2016). Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci*. 5: p. e47.
- [51] **Smolarz, H. D.** Comparative study on the free flavonoid aglycones in herbs of different species of *Polygonum* L. (0001-6837 (Print)).
- [52] **Li, M.-m. L., Zeng-hui; Wang, Hai-yan; Huang, Hong-mei; Wang, Li-li & Xu, Yan.** (2014). Studies on antibacterial activities and chemical constituents of *Polygonum aviculare* L. 26(4): p. 526-530.
- [53] **Nugroho, A. , Kim, E. J. , Choi, J. S. & Park, H. J.** (2014). Simultaneous quantification and peroxynitrite-scavenging activities of flavonoids in *Polygonum aviculare* L. herb. *J Pharm Biomed Anal*. 89: p. 93-98.
- [54] **Derita, M. & Zacchino, S.** (2011). Chemotaxonomic Importance of Sesquiterpenes and Flavonoids in Five Argentinian Species of *Polygonum* Genus. *Journal of Essential Oil Research*. 23(5): p. 11-14.
- [55] **Gümüſçü, A., Dinç, S., Kara, M., Akkuş, M. & Gümüſçü, G.** (2022). Phenolic compounds of natural knotweed (*Polygonum cognatum* Meissn.) populations from Turkey. *International Journal of Plant Based Pharmaceuticals*. 2(1): p. 37-41.
- [56] **Demirtaş Pehlivan, M. , Coven, H. , Cerci, B. , Eldem, A. , Öz, T. , Savlak, N. , Soyöz, M. & Pirim, I.** (2021). The Cytotoxic Effect of

Polygonum cognatum and Chemotherapeutic Effect of Doxorubicin on Glioblastoma Cells. *European Journal of Therapeutics*. 27: p. 50-54.

- [57] **Pekdemir, S., Çiftçi M. & Karatepe, M.** (2020). Elazığ'da Yetişen *Polygonum cognatum* Meissn (Madımak) Bitki Ekstraktlarının In vitro Biyolojik Aktiviteleri ve Bazı Fitokimyasal Bileşenlerinin Belirlenmesi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*. 18: p. 368-378.
- [58] **Liu, Y. , Wang, Q. , Yang, J. , Guo, X. , Liu, W. , Ma, S. & Li, S.** (2018). *Polygonum multiflorum* Thunb.: a review on chemical analysis, processing mechanism, quality evaluation, and hepatotoxicity. *Frontiers in pharmacology*. 9: p. 364.
- [59] **Tang, W. , Zhan, J. , Li, S. , Liu, Y. & Ho, C.-T.** (2022). Hypoglycemic effects of naturally processed *Polygonum multiflorum* extract in KK CgAy/J mice and its mechanism of action. *Food Science and Human Wellness*. 11(5): p. 1177-1182.
- [60] **Granica, S. , Czerwińska, M. E. , Żyżyńska-Granica, B. & Kiss, A. K.** (2013). Antioxidant and anti-inflammatory flavonol glucuronides from *Polygonum aviculare* L. *Fitoterapia*. 91: p. 180-188.
- [61] **Sung, Y.-Y. , Yoon, T. , Yang, W.-K. , Kim, S. J. , Kim, D.-S. & Kim, H. K.** (2013). The antiobesity effect of *Polygonum aviculare* L. ethanol extract in high-fat diet-induced obese mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013.
- [62] **Cai, Y. , Wu, L. , Lin, X. , Hu, X. & Wang, L.** (2020). Phenolic profiles and screening of potential α -glucosidase inhibitors from *Polygonum aviculare* L. leaves using ultra-filtration combined with HPLC-ESI-qTOF-MS/MS and molecular docking analysis. *Industrial Crops and Products*. 154: p. 112673.
- [63] **Sies, H. & Jones, D. P.** (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature reviews Molecular cell biology*. 21(7): p. 363-383.
- [64] **Munteanu, I. G. & Apetrei, C.** (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(7): p. 3380.
- [65] **Re, R., Pellegrini, N., Pratergata, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C.** (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio Med*. 26: p. 1231-1237.
- [66] **Blois, M. S.** (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 181: p. 1199-1200.
- [67] **Decker, E. A. & Welch, B.** (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J. of Agri. and Food Chem*. 38: p. 674-677.
- [68] **Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. & Karademir, S. E. .** (2004). A novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols, vitamin C and E using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J Agr Food Chem*. 52: p. 7970-7981.
- [69] **Dapkevicius, A., Venskutonis, R., Van Beek, T. A. & Linszen, P. H. .** (1998). Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation

procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *J Sci Food Agric.* 77: p. 140-146.

- [70] **Koleva, I. I., van Beek, A. T., Linssen, J. P.H., de Groot, A. & Evstatieva, L. N.** . (2002). Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem Anal.* 13: p. 8-17.
- [71] **Save, S.** (2015). Determination of 1, 2-Benzenedicarboxylic acid, bis (2-ethylhexyl) ester from the twigs of Thevetia Peruviana as a Colwell Biomarker. *Journal of Innovations in Pharmaceuticals and Biological Sciences.* 2: p. 349-362.
- [72] **Namikoshi, M. , Fujiwara, T. , Nishikawa, T. & Ukai, K.** (2006). Natural Abundance ¹⁴C Content of Dibutyl Phthalate (DBP) from Three Marine Algae. *Marine Drugs.* 4(4): p. 290-297.
- [73] **Nair, J. J. , Ndhlala, A. R. , Chukwujekwu, J. C. & Van Staden, J.** (2012). Isolation of di(2-ethylhexyl) phthalate from a commercial South African cognate herbal mixture. *South African Journal of Botany.* 80: p. 21-24.
- [74] **Aljubiri, S. M. , Mahgoub, S. A. , Almansour, A. I. , Shaaban, M. & Shaker, K. H.** (2021). Isolation of diverse bioactive compounds from Euphorbia balsamifera: Cytotoxicity and antibacterial activity studies. *Saudi J Biol Sci.* 28(1): p. 417-426.
- [75] **Erol, E. , Orhan, M. D. , Avsar, T. , Akdemir, A. , Okudan, E. S. , Toraman, G. O. A. & Topcu, G.** (2022). Anti-SARS-CoV-2 and cytotoxic activity of two marine alkaloids from green alga Caulerpa cylindracea Sonder in the Dardanelles. *Rsc Advances.* 12(46): p. 29983-29990.
- [76] **Ayaz, M. , Junaid, M. , Ullah, F. , Subhan, F. , Sadiq, A. , Ali, G. , Ovais, M. , Shahid, M. , Ahmad, A. , Wadood, A. , El-Shazly, M. , Ahmad, N. & Ahmad, S.** (2017). Anti-Alzheimer's Studies on beta-Sitosterol Isolated from Polygonum hydropiper L. *Frontiers in pharmacology.* 8.
- [77] **Long, A. H. , Fu, J. , Hu, Y. & Luo, Y.** (2013). Annphenone from Artemisia vestita Inhibits HepG2 Cell Proliferation. *Asian Journal of Chemistry.* 25(17): p. 9497-9502.
- [78] **Andersen, O. M. & Markham, K. R.,** (2005). *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications* 1st ed. ed. 2005: CRC Press.
- [79] **Long, R. , Tang, C. , Yang, Z. , Fu, Q. , Xu, J. , Tong, C. , Shi, S. , Guo, Y. & Wang, D.** (2020). A natural hyperoside based novel light-up fluorescent probe with AIE and ESIPT characteristics for on-site and long-term imaging of β -galactosidase in living cells. *Journal of Materials Chemistry C.* 8(34): p. 11860-11865.
- [80] **Xu, H. , Li, Y. , Han, B. , Li, Z. , Wang, B. , Jiang, P. , Zhang, J. , Ma, W. , Zhou, D. , Li, X. & Ye, X.** (2018). Anti-breast-Cancer Activity Exerted by β -Sitosterol-d-glucoside from Sweet Potato via Upregulation of MicroRNA-10a and via the PI3K–Akt Signaling Pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 66(37): p. 9704-9718.
- [81] **Surh, J. & Koh, E.** (2014). Effects of four different cooking methods on anthocyanins, total phenolics and antioxidant activity of black rice. *J Sci Food Agric.* 94(15): p. 3296-3304.

- [82] **Singh, A. K. , Pathak, V. & Agrawal, P. K.** (1997). Annphenone, a phenolic acetophenone from *Artemisia annua*. *Phytochemistry*. 44(3): p. 555-557.
- [83] **Huang, S.-S. , Li, P. , Zhang, B.-J. , Deng, S. , Zhang, H.-L. , Sun, C.-P. , Huo, X.-K. , Tian, X.-G. , Ma, X.-C. & Wang, C.** (2017). Acetophenone glycosides from the roots of *Euphorbia fischeriana* and their inhibitory effects against *Mycobacterium smegmatis*. *Phytochemistry Letters*. 19: p. 151-155.
- [84] **Ortega-Vidal, J. , Cobo, A. , Ortega-Morente, E. , Galvez, A. , Martinez-Bailen, M. , Salido, S. & Altarejos, J.** (2022). Antimicrobial activity of phenolics isolated from the pruning wood residue of European plum (*Prunus domestica* L.). *Industrial Crops and Products*. 176.
- [85] **Prasad, D.** (1999). A new aromatic glycoside from the roots of *Prunus armeniaca*. *Fitoterapia*. 70(3): p. 266-268.
- [86] **Xu, S. , Chen, S. , Xia, W. , Sui, H. & Fu, X.** (2022). Hyperoside: A Review of Its Structure, Synthesis, Pharmacology, Pharmacokinetics and Toxicity. *Molecules*. 27(9): p. 3009.
- [87] **Gao, P. , Huang, X. , Liao, T. , Li, G. , Yu, X. , You, Y. & Huang, Y.** (2019). Daucosterol induces autophagic-dependent apoptosis in prostate cancer via JNK activation. *Biosci Trends*. 13(2): p. 160-167.
- [88] **Wang, G.-Q. , Gu, J.-F. , Gao, Y.-C. & Dai, Y.-J.** (2016). Daucosterol inhibits colon cancer growth by inducing apoptosis, inhibiting cell migration and invasion and targeting caspase signalling pathway. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 11: p. 395.
- [89] **Bahadori, M. B. , Dinparast, L. , Valizadeh, H. , Farimani, M. M. & Ebrahimi, S. N.** (2016). Bioactive constituents from roots of *Salvia syriaca* L.: Acetylcholinesterase inhibitory activity and molecular docking studies. *South African Journal of Botany*. 106: p. 1-4.
- [90] **Huang, L. , Zhu, X. , Zhou, S. , Cheng, Z. , Shi, K. , Zhang, C. & Shao, H.** (2021). Phthalic Acid Esters: Natural Sources and Biological Activities. *Toxins*. 13(7): p. 495.

EKLER

EK A: Şekil

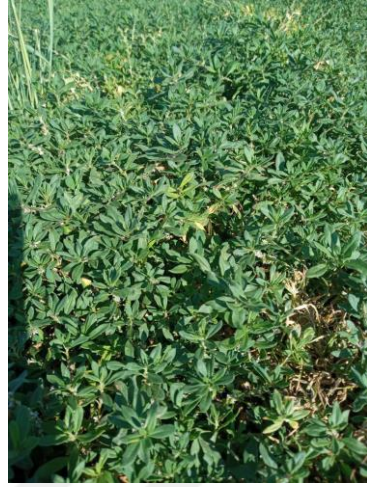


EK A

a)



b)



c)



d)



Şekil A.1 : *Polygonum sivasicum* toplanma aşamasına ait resimler a) gövde ve yaprak, b) doğal yetiştiği alan görünümü, c) çiçek kısmı ve d) yetiştiği habitat.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad :HÜMEYRA KARAKAŞ

Doğum Tarihi ve Yeri :

E-posta :

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans Bölümü** : 2002, Fatih Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya
- **Yüksek Lisans Bölümü** : 2006, University of Connecticut, Kimya

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

YÜKSEK LİSANS TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

Karakaş H., Hançer Ç. K., Erol E. (2022). Phytochemical study on endemic *Polygonum sivasicum* Kit Tan &Yıldız. *5th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem2022)*, November 23-25, Ankara, Turkey.