

***CENTAUREA MUCRONIFERA* DC**
BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL VE BİYOLOJİK
AKTİVİTE ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Yüksek Lisans Tezi

Emine Hatun SOYLU

Eskişehir 2022

***CENTAUREA MUCRONIFERA* DC BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL VE
BİYOLOJİK AKTİVİTE ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Emine Hatun SOYLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Farmakognozi Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Gülmira ÖZEK**

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Haziran 2022**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Emine Hatun SOYLU'nun “*Centaurea mucronifera* DC Bitkisinin Fitokimyasal ve Biyolojik Aktivite Özelliklerinin Araştırılması” başlıklı tezi .../.../2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmakognozi Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı):	Prof. Dr. Gülmira ÖZEK	
Üye :	Prof. Dr. Nilgün ÖZTÜRK	
Üye :	Doç. Dr. Nuraniye ERUYGUR	

Prof. Dr. GÜLŞEN AKALIN ÇİFTÇİ
Enstitü Müdürü

ÖZET

CENTAUREA MUCRONIFERA DC BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL VE BİYOLOJİK AKTİVİTE ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Emine Hatun SOYLU

Farmakognozi Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Haziran 2022

Danışman: Prof. Dr. Gülmira ÖZEK

Çalışmada, Sivas civarında yetişen *Centaurea mucronifera* DC bitkisinin üzerinde kapsamlı fitokimyasal ve biyolojik aktivite araştırmaları gerçekleştirilmiştir. Bitkinin toprak üstü kısmından hidrodistilasyonla uçucu yağ (CMUY), mikroekstraksiyonla sabit yağ asitleri (CMSY), ve maserasyonla *n*-hegzanlı, metanollü ve sulu ekstreleri (CMHE, CMME, CMSE) elde edilmiştir. CMUY ve CMSY kimyasal kompozisyonları gaz kromatografisi teknikleri (GC-FID ve GC/MS) ile incelenmiştir. Major uçucu bileşikler olarak 1-izobutil 4-izopropil 3-izopropil-2,2-dimetil suksinat, hegzadekanoik asit, 2-metil-2,2-dimetil-1-(2-hidroksi-1-metiletil)propil propanoat, karyofillen oksit, ve 1,5-epoksi-salvial-4(14)-en tespit edilmiştir. Çiçeklerin sabit yağ profilinde majör bileşikler olarak doymuş asitlerden hegzadekanoik, nonadekanoik ve stearik, doymamışlardan ise linolenik ve linoleik asitleri tespit edilmiştir. Polar çözücüler ile elde edilen ekstreler LC-MS/MS tekniği ile incelenmiştir. Majör bileşikler olarak kafeoyilquinik asit, ferulik, 5-kafeoyilquinik ve feruloyilquinik asitleri tespit edilmiştir. Flavonoidler grubundan ekstrelerde metil kersetin glukozit ve metil apigenin glukozit tespit edilmiştir. Uçucu yağ ve ekstrelerin antioksidan aktiviteleri DPPH, TEAC, CUPRAC testleri ile değerlendirilmiştir. Biyotografik HPTLC tekniği uygulanarak polar ekstrelerin antioksidan aktivitesinden fenolik bileşiklerin sorumlu olduğu tespit edilmiştir. Mikrotitre plaka tekniği kullanarak numunelerin zayıf α -amilaz enzimi inhibisyonu etkisi (<%50) saptanmıştır. Bununla birlikte, CMUY için en yüksek inhibisyon değeri (%34) tespit edilmiştir. Numuneler 2,0-0,001 mg/mL konsantrasyon aralıklarında asetilkolinesteraz enzimine karşı inhibisyon göstermemiştir. Tez kapsamında *C. mucronifera* apolar ve polar ekstrelerinin ve sabit yağının kimyasal kompozisyonları ilk kez aydınlatılmıştır. Uçucu yağ ve ekstrelerinin antioksidan, anti- α -amilaz ve antiasetilkolinesteraz etkileri ilk kez araştırılmıştır.

Anahtar Sözcükler: *Centaurea mucronifera*, Asteraceae, Alifatik ester, Antioksidan, Kafeoyilquinik asit.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF *CENTAUREA MUCONIFERA* DC CHEMICAL COMPOSITION and BIOLOGICAL ACTIVITY

In this study, comprehensive phytochemical studies and screening of biological activities of *Centaurea mucronifera* DC have been carried out. The essential oil (CMUY) and fatty acids (CMSY) were obtained from the aerial parts by hydrodistillation and microextraction, resp. The extracts were obtained by maceration with *n*-hexane (CMHE), methanol (CMME) and water (CMSE). The chemical compositions of CMUY and CMSY were investigated by gas chromatographic techniques (GC-FID and GC/MS). The major volatiles compounds have been found to be as 1-isobutyl 4-isopropyl 3-isopropyl-2,2-dimethyl succinate, hexadecanoic acid, 2-methyl-2,2-dimethyl-1-(2-hidroxy-1-methylethyl)propyl propanoate, caryophyllene oxide and 1,5-epoxi-salvial-4(14)-ene. Hexadecanoic, nonadecanoic, stearic, linolenic and linoleic acids were found in the fatty acids profile. The polar extracts chemical composition has been investigated with LC-MS/MS technique. Caffeoylquinic, ferullic, 5-caffeoylquinic, and ferulloylquinic acids have been found as main phenolic acids. The flavonoids in the extracts were presented by methyl quercetine glucoside and methyl apigenine glucoside. Antioxidant activities of the essential oils and the extracts were evaluated with DPPH, TEAC, and CUPRAC tests. Bioautographic HPTLC investigation of the polar extracts revealed the phenolic compound to be responsible for their antioxidant potential. Using the microtide plate technique, the weak α -amylase enzyme inhibition effect (<50%) of the samples was determined. Although, CMUY demonstrated the highest inhibition value (34%) among other extracts. Samples did not show inhibition against acetylcholinesterase enzyme at 2.0-0,001 mg/ml concentration intervals. Within the scope of the thesis, the chemical profiles of *C. mucronifera* apolar and polar extracts and fatty acids were investigated for the first time. Antioxidant, anti- α -amylase and antiacetylcholinesterase effects of essential oil and extracts were evaluated for the first time.

Keywords: *Centaurea mucronifera*, Asteraceae, Aliphatic ester, Antioxidant, Caffeoylquinic acid.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimi boyunca bana danışmanlık yapan, bilgi ve tecrübelerini en güzel şekilde aktararak öğrendiklerimden keyif almamı sağlayan, tez dönemi boyunca her konuda desteğini esirgemeyen kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Gülmira ÖZEK'e,

Araştırma konusu olan bitkinin toplanması ve teşhisini gerçekleştiren Doç. Dr. Mehmet TEKİN'e,

Yüksek lisans eğitimini aldığım Prof. Dr. Temel ÖZEK'e ve tüm Farmakognozi Anabilim Dalı üyelerine,

Labaratuvar araştırmaları ve analizlerinde yardım eden Doç. Dr. Fatih Göger'e

Bu süreci beraber tecrübe ettiğim yol arkadaşım Koray ALPAY'a

Tez dönemi boyunca benimle tecrübe ve bilgilerini cömertçe paylaşan ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Kevser AYÇİÇEK ve Tuğbanur TÜYSÜZ'e,

Tez çalışmalarım süresince deneysel çalışmalarda imkanlarını kullandığım Farmakognozi Anabilim Dalı'na ve BİBAM'a ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca her zaman bana güvenip benim bu günlere gelmemi sağlayan ve daima sevgilerini hissettiren canım aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

21/07/2022

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

.....

Emine Hatun Soylu

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. KAYNAK BİLGİSİ.....	3
2.1. Asteraceae Cinsi Morfolojik Özellikleri.....	3
2.1.1. <i>Centaurea L.</i> cinsi morfolojik özellikleri.....	3
2.1.2. <i>Centaurea mucronifera</i> bitkisinin morfolojik özellikleri.....	4
2.2. <i>Centaurea</i> Türlerinin Biyolojik Aktiviteleri.....	5
2.3. <i>Centaurea</i> Türleri Üzerinde Yapılan Fitokimyasal Araştırmalar.....	12
2.3.1. <i>Centaurea</i> türlerinin uçucu bileşikleri.....	16
2.3.2. <i>Centaurea</i> türlerinin sabit yağ asitleri.....	18
2.3.3. <i>Centaurea mucronifera</i> üzerinde daha önce rapor edilen fitokimyasal ve biyolojik çalışmalar.....	19
3. MATERYAL VE METOT.....	21
3.1. Kimyasal Maddeler.....	21
3.2. Cihazlar ve Apeyler.....	22
3.3. Bitkisel Materyal.....	24
3.4. Uçucu Yağ Eldesi.....	24
3.5. Sabit Yağ Asitlerinin Eldesi.....	25
3.6. Ekstrelerin Eldesi.....	26
3.7. Gaz Kromatografisi Analizi.....	27

3.8. Uçucu Bileşiklerin Teşhisi.....	28
3.9. Sıvı Kromatografisi Analizi.....	28
3.10. Toplam Fenol Miktar Tayini (TPC)	29
3.11. Toplam Flavonoit Miktar Tayini (TFC).....	30
3.12. Biyolojik Aktivite Çalışmaları.....	31
3.12.1. Serbest radikal (DPPH)'süpürücü etkisi.....	31
3.12.2. Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasite (TEAC) değerlendirmesi.....	33
3.12.3. Cu(II) iyon redükleyici antioksidan kapasitesi (CUPRAC) değerlendirmesi.....	34
3.12.4. α -Amilaz aktivite değerlendirilmesi.....	35
3.12.5. Antikolinesteraz aktivite değerlendirmesi.....	36
3.12.6. HPTLC- biyootografik analiz.....	38
4. BULGULAR.....	41
4.1. Uçucu Yağ ve Ekstrelerin Verim ve Özellikleri.....	41
4.2. Fitokimyasal Araştırmaların Sonuçları.....	42
4.2.1. Uçucu yağ kimyasal kompozisyonu.....	42
4.2.2. Sabit yağ asitlerinin kimyasal kompozisyonu.....	44
4.2.3. Ekstrelerin kimyasal kompozisyonu.....	45
4.2.4. Ekstrelerin toplam fenol miktarı.....	47
4.2.5. Ekstrelerin toplam flavonoit miktarı.....	47
4.3. Biyolojik Aktivite Sonuçları.....	48
4.3.1. Serbest radikal (DPPH) süpürücü etki verileri.....	48
4.3.2. HPTLC-Biyootografik analiz sonucu.....	50
4.3.3. Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasitesi (TEAK) verileri.....	51
4.3.4. Cu(II) iyon indirgeme antioksidan kapasitesi (CUPRAC) verileri....	52
4.3.5. α -Amilaz aktivite verileri.....	53
4.3.6. Ekstrelerin antikolinesteraz aktivite verileri.....	54
5. TARTIŞMA.....	55
5.1. Uçucu Yağ Profili.....	55
5.2. Sabit Yağ Asitleri Profili.....	57
5.3. Ekstrelerin Profili.....	58
5.4. Biyolojik Aktivite Araştırmaları.....	61

5.4.1. Antioksidan aktivite potansiyeli.....	61
5.4.2. Anti- α -amilaz potansiyel.....	63
5.4.3. Anti-asetilkolinesteraz potansiyel.....	64
6. SONUÇ.....	66
KAYNAKÇA.....	67
ÖZGEÇMİŞ.....	84

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. <i>Centaurea</i> türlerinin yöresel ismi ve halk arasında kullanımı.....	5
Tablo 2.2. <i>Centaurea</i> türleri üzerinde yapılan aktivite çalışmaları.....	7
Tablo 2.3. <i>Centaurea</i> türleri üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar sonucu tespit edilen sekonder metabolitler.....	12
Tablo 2.4. <i>Centaurea</i> türlerinde tespit edilen uçucu bileşikler.....	16
Tablo 2.5. <i>Centaurea</i> türlerinde tespit edilen sabit yağ asitleri.....	18
Tablo 3.1. Kullanılan kimyasal madde ve çözücülerin bilgileri.....	21
Tablo 3.2. Kullanılan cihaz ve apareylerin bilgileri.....	23
Tablo 3.3. <i>C. mucronifera</i> uçucu yağ ve ekstraktları için uygulanan HPTLC analiz şartları.....	39
Tablo 4.1. <i>C. mucronifera</i> topraküstü kısmından elde edilen uçucu yağ ve farklı çözücülerle hazırlanan ekstraktların verimleri.....	41
Tablo 4.2. <i>C. mucronifera</i> topraküstü kısmından elde edilen uçucu yağ kimyasal kompozisyonu.....	42
Tablo 4.3. <i>C. mucronifera</i> topraküstü kısmından elde edilen sabit yağ kimyasal kompozisyonu.....	44
Tablo 4.4. <i>C. mucronifera</i> bitkisinin toprak üstü kısımlarına ait ekstraktlarının toplam fenol miktarı	47
Tablo 4.5. <i>C. mucronifera</i> ekstraktlarında toplam flavonoid miktarı.....	48
Tablo 4.6. <i>C. mucronifera</i> ekstrakt ve uçucu yağının serbest radikal süpürücü etkisi.....	49
Tablo 4.7. Ekstraktların Trolox'a eşdeğer antioksidan kapasite değerleri.....	52
Tablo 4.8. Ekstraktların Cu(II) iyon indirgeme antioksidan kapasite değerleri..	53
Tablo 4.9. Uçucu yağ ve ekstraktlarının α -amilaz enzimi üzerinde gösterdikleri % inhibisyon değerleri.....	54
Tablo 4.10. Ekstraktların asetilkolinesteraz enzim inhibisyon aktivite değerleri.	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.1.	<i>Centaurea mucronifera</i> (DC.) Türkiye’de yayılışı.....	5
Şekil 3.1.	Kurutulmuş bitkisel materyal.....	24
Şekil 3.2.	<i>C. mucronifera</i> bitkisel materyalinin Clevenger apareyinde hidrodistilasyonu.....	25
Şekil 3.3.	<i>C. mucronifera</i> toplam lipit ekstraksiyonu.....	26
Şekil 3.4.	Bitkisel materyallerin çalkalayıcıda maserasyonu.....	27
Şekil 3.5.	<i>C. mucronifera</i> sıvı ekstrelerinin döner buharlaştırıcıda yoğunlaştırılması.....	27
Şekil 3.6.	GC-MS/FID sistemi.....	27
Şekil 3.7.	Shimadzu 20A HPLC - ABSciex 3200 Q trap MS/MS sistemi....	29
Şekil 3.8.	Ekstrelerin Folin-Ciocalteu reaktifi ile tepkime sonucunda meydana gelen renk değişimi.....	30
Şekil 3.9.	Ekstrelerin AlCl ₃ reaktifi ile tepkime sonucunda meydana gelen renk değişimi.....	31
Şekil 3.10.	Ekstrelerin DPPH reaktifi ile tepkime sonucunda meydana gelen renk değişimi.....	32
Şekil 3.11.	Ekstrelerin ABTS reaktifi ile tepkime sonucunda meydana gelen renk değişimi.....	33
Şekil 3.12.	Ekstrelerin Cu(II)-neokuproin kompleksi ile tepkime sonucunda meydana gelen renk değişimi.....	34
Şekil 3.13.	Numunelerin α -amilaz enzim ile tepkime sonucunda meydana gelen renk değişimi.....	36
Şekil 3.14.	Numunelerin asetilkolinesteraz enzim üzerindeki etkileri.....	37
Şekil 4.1.	Kuru ekstreler.....	41
Şekil 4.2.	<i>C. mucronifera</i> metanollü (A) ve sulu (B) ekstrelerinin LC-MS kromatogramı.....	45
Şekil 4.3.	<i>C. mucronifera</i> metanollü ekstrelerinde tespit edilen bileşiklerin kütle spektrumları:	46
Şekil 4.4.	Gallik asit kalibrasyon eğrisi.....	47

Şekil 4.5.	Kersetin kalibrasyon eğrisi.....	48
Şekil 4.6.	<i>C. mucronifera</i> uçucu yağ ve ekstralarının ve standart antioksidan maddelerin IC50 değerleri.....	49
Şekil 4.7.	<i>C. mucronifera</i> 'nın hekzanlı ekstre ve uçucu yağın anisaldehit reaktifi ile gösterdiği renk değişimleri.....	50
Şekil 4.8.	<i>C. mucronifera</i> 'nın metanollü ve sulu ekstraların NPR-PEG ve DPPH reaktifleri ile tepkime sonucu.....	51
Şekil 4.9.	Trolox kalibrasyon eğrisi.....	52
Şekil 4.10.	Trolox kalibrasyon eğrisi.....	53
Şekil 5.1.	<i>C. mucronifera</i> uçucu yağındaki majör bileşen grupları.....	55
Şekil 5.2.	<i>C. mucronifera</i> uçucu yağ bileşeni gaz kromatogramı.....	56
Şekil 5.3.	<i>C. mucronifera</i> sabit yağ asitleri gaz kromatogramı.....	57
Şekil 5.4.	<i>C. mucronifera</i> sabit yağının majör yağ asitleri.....	58
Şekil 5.5.	<i>C. mucronifera</i> ekstralarının ihtiva ettiği toplam fenoliklerin miktarları.....	60
Şekil 5.6.	<i>C. mucronifera</i> ekstralarının ihtiva ettiği toplam flavonoidlerin miktarları.....	60
Şekil 5.7.	<i>C. mucronifera</i> ekstralarının DPPH serbest radikali süpürme etkileri.....	61
Şekil 5.8.	<i>C. mucronifera</i> ekstralarının Trolox'a eşdeğer antioksidan kapasite değerleri.....	62
Şekil 5.9.	<i>C. mucronifera</i> ekstralarının Cu(II) iyon indirgeme antioksidan kapasitesi.....	62
Şekil 5.10.	<i>C. mucronifera</i> uçucu yağ ve ekstralarının α -amilaz enzimi inhibe etme etkileri.....	63
Şekil 5.11.	<i>C. mucronifera</i> uçucu yağ ve ekstralarının antikolinesteraz enzimi inhibe etme etkileri.....	64

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

Abs	: Absorbans
ABTS	: 2,2'-Azino-bis(3-etilbenztiyazoline-6-sulfonik asit)
ACh	: Asetilkolin
ATCI	: Asetiltiyokolin İyodür
BF3	: Boron Triflorür
BHT	: Bütillenmiş Hidroksi Toluen
BSA	: Bovin Serum Albümin
CMHE	: <i>Centaurea mucronifera</i> hekzanlı ekstre
CMME	: <i>Centaurea mucronifera</i> metanollü ekstre
CMSE	: <i>Centaurea mucronifera</i> sulu ekstre
CMSY	: <i>Centaurea mucronifera</i> sabit yağ asitleri
CMUY	: <i>Centaurea mucronifera</i> uçucu yağ
CUPRAC	: Bakır (II) İyon İndirgeme Antioksidan Kapasitesi
dk	: Dakika
DPPH	: 1,1-Difenil-2-pikril hidrazil radikali
DTNB	: 5,5'-[ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit)]
EtAc	: Etil Asetat
FCR	: Folin-Ciocalteu Reaktifi
FID	: Alev İyonlaşma Dedektörü
GA	: Gallik Asit
GAE	: Gallik Asit'e Eşdeğer Miktar
GC/MS	: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
GC-FID	: Gaz Kromatografisi-Alev İyonlaşma Detektörü
h/a	: Hacim/Ağırlık
HPTLC	: High-Performance Thin Layer Chromatography
IC₅₀	: %50 İnhibisyon gösteren değer
İnh %	: Yüzde İnhibisyon
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi
LC-ESI-MS/MS	: Sıvı Kromatografisi- Elektrosprey İyonizasyon- Kütle Spektrometri/ Kütle Spektrometri

MeOH	: Metanol
Nc	: Neokuproin
NPR	: Natural Product Reagent
PEG	: Polietilen Glikol
TEAC, TEAK	: Trolox’a Eşdeğer Antioksidan Kapasite
UV	: Ultraviyole
v/v	: Hacim/hacim

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Bitkiler besin kaynağı olmalarının yanı sıra içerdikleri kimyasal bileşenlerin tıbbi özelliklerinden dolayı büyük öneme sahiptir. Eski çağlardan beri bazı hastalıkları tedavi etmek amacıyla kullanılan tıbbi bitkilerin sayısı, yapılan bilimsel araştırmalar ışığında zamanla artış göstermektedir ve 20. yüzyılda bu sayı yaklaşık 20000 civarına ulaşmıştır (Baytop, 1999). Dünya Sağlık Örgütüne göre, gelişmekte olan ülkelerde toplumun %80'i tedavide bitkisel ilaçları tercih ettiği tespit edilmiştir ve gelişmiş ülkelerde reçeteli ilaçların yaklaşık %25'ini bitkisel kökenli etken maddeler oluşturmaktadır (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011). Sentetik ilaçların yan etkilerinin fazla olması, bitkisel ilaçların daha kolay ulaşılabilir olması araştırmacıları tıbbi bitkilerin içeriğindeki biyolojik olarak aktif bileşiklere yönlendirmiştir (Baytop, 1999).

Türkiye coğrafi konumundan dolayı önemli iklim kuşağının ortasında yer almaktadır. Ülkemizin coğrafi konumu, zengin bir bitki örtüsüne sahip olmasına ve endemik bitkiler açısından zengin bir ülke haline gelmesine neden olmuştur. 140 kadar tıbbi bitki 1948 ve 1974 Türk kodekslerinde kayıtlı olmasına rağmen günümüzde yaklaşık 500 bitki tıbbi amaçlar için kullanılmaktadır (Canlı, 2018). Tıbbi bitkilerin ürettikleri flavonoidler, tanenler, alkaloidler gibi sekonder bileşiklerin insan sağlığı açısından önemli biyolojik aktiviteye sahip olması yapılan çalışmalarla bilimsel olarak ortaya konulmuştur (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011). Dünya üzerinde mevcut olan bitkilerin çok az bir kısmı ile ilgili araştırma yapılmıştır. Tedavide kullanılabilecek yeni bitkisel kaynaklı ilaç hammaddelerinin keşfedilmesi açısından tıbbi bitkiler üzerinde yapılan kimyasal profil inceleme ve biyolojik aktivite çalışmaları büyük önem arz etmektedir.

Asteraceae familyası yaklaşık 24.000-30.000 tür ve 1600-1700 cins ile, özellikle Batı Asya ve Akdeniz bölgesi olmak üzere dünyaya yayılmış en büyük çiçekli bitki ailesidir. *Centaurea* cinsi, Türkiye'de 118'i endemik olmak üzere 194 türden oluşmaktadır (Şen vd., 2021). *Centaurea* cinsi peygamber çiçeği, zerdali diken, çoban kaldıran, timur diken, boğa diken gibi isimlerle anılmaktadır (Wagenitz, 1975).

Centaurea türleriyle ilgili gerçekleştirilen fitokimyasal çalışmalar sonucu bu bitki türlerinin kompozisyonlarını çoğunlukla seskiterpene ve flavonoidler oluşturmaktadır. *Centaurea* türlerinin tıbbi özellikleri büyük olasılıkla seskiterpen laktonların varlığından kaynaklanmaktadır (Sokovic vd., 2017). *Centaurea* türlerinin toprak üstü kısımları halk arasında yıllardır tek başına veya diğer bitkilerle kombinasyon halinde antidiyabetik, antiromatizmal, antiinflamatuvar, antibakteriyel, kolagog, stomaşik, diüretik, adet

söktürücü, hipotansif ve antipiretik amaçlarla kullanılmaktadır (Arif, Küpeli ve Ergun, 2004). Pek çok *Centaurea*, tükürük ve mide asitlerinin akışını uyararak, hastalara iştahı geri kazandırdığı inancıyla toniklere eklenmiştir (Khammar ve Djeddi, 2012).

Centaurea mucronifera DC. ülkemizde doğal olarak yetişen endemik bir türdür. Halk arasında “bolkar” geleneksel adıyla bilinmektedir ([http-1](http://1)). Kaynak taraması sonucu görülmüştür ki *C. mucronifera* türüyle ilgili şu ana kadar yapılan çalışmalar çok kapsamlı olmayıp sadece uçucu yağ kompozisyonu ve metanollü ekstresinin antioksidan ve sitotoksikite aktivitesi araştırılmıştır (Shoeb vd., 2007^b; Tepe vd., 2006; Dural vd., 2003).

Bu tez kapsamında *C. mucronifera* türünün toprak üstü kısımlarının uçucu yağ, sabit yağ asitleri ve farklı polariteli ekstralarının kimyasal kompozisyonlarının aydınlatılması amaçlanmıştır. Ayrıca, uçucu yağ ve ekstralarının biyolojik aktivite potansiyellerinin kapsamlı incelenmesi de amaçlanmıştır. Bu amaçlar doğrultusunda *C. mucronifera* ile ilgili aşağıdaki araştırmaların gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir:

- *C. mucronifera* bitkisi uçucu yağın elde edilmesi,
- *C. mucronifera* bitkisi sabit yağ asitlerin elde edilmesi,
- *C. mucronifera* farklı polaritelerde çözücülerle ekstraların elde edilmesi,
- Uçucu yağ ve sabit yağ asitlerin kompozisyonlarının GC-FID ve GC/MS teknikleri ile belirlenmesi,
- Ekstrelerin kompozisyonlarının HPLC tekniği ile belirlenmesi.
- Ekstrelerin toplam flavonoit ve toplam fenol miktarlarının tespit edilmesi,
- Ekstrelerin ve uçucu yağın Troloks’a eşdeğer antioksidan kapasitelerinin (TEAC), serbest radikal süpürücü etkilerinin (DPPH testi), bakır (II) iyon indirgeme antioksidan kapasitesinin (CUPRAC) belirlenmesi,
- Ekstre ve uçucu yağın antidiyabetik etkilerinin (α -amilaz enzimi inhibisyonu) belirlenmesi,
- Ekstre ve uçucu yağın antiasetilkolinesteraz enzim inhibisyonu belirlenmesi.

C. mucronifera bitkisi üzerinde daha önce Troloks’a eşdeğer antioksidan kapasitesi (TEAC), Cu(II) iyon indirgeme antioksidan kapasitesi (CUPRAC) deneyleri, antikolinesteraz ve α -amilaz enzim deneyleri uygulanmamış olup bu tezle birlikte ilk defa gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. *Centaurea* türleri üzerinde daha nice yapılan bilimsel çalışmalar referans alındığında *C. mucronifera*’nın biyolojik aktiflik potansiyelinin ortaya çıkarılması gerektiğini ve daha önce araştırılmamış enzim aktivitesinin araştırılması ihtiyacını ortaya çıkarmıştır.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Asteraceae Cinsi Morfolojik Özellikleri

Asteraceae familyası tek yıllık, iki yıllık veya çok yıllık otsu, bazen de çalı formunda olan bitkilerden oluşur. Bu familyada yapraklar alternat veya bazen karşılıklı, stipulasız (nadiren stipulalı), tam, dişli, loplu veya çeşitli şekilde parçadır. Çiçekler, genellikle çok sayıdadır, nadiren tek bir çiçekte bulunur. Çiçekler, involukrum yapraklarının (fillariler) oluşturduğu bir veya çok sayıda seriden oluşan bir kapitulum halinde kümelenmiştir. Kapitulum sapsız nadiren birleşmiş, bazen de baş şeklinde ikinci bir kapitulum halinde (pseudosefalium) kümelenmiştir. Çiçek tablası (reseptakulum) çıplak veya pullu uzun tüylü veya kıllı olabilir. Çiçekler epigindir, erkek organları hermafrodit veya en azından fonksiyonel olarak verimsiz olabilir. Kaliks ovaryum tepesinde kıllı, tüylü, meyve ile büyüyen aristalı papusla veya korolla (taç) ile temsil edilir. Meyve aken (cipsela) tipindedir. Sapsız olan veya dökülen bir papus taşır (Wagenitz, 1986; Kargün, 2011).

2.1.1. *Centaurea* L. cinsi morfolojik özellikleri

Bir yıllık, iki yıllık veya çok yıllık otlar, nadiren dikenli dallı küçük çalılar veya her zaman yeşil yapraklara sahip daha büyük yarı çalılardır. Gövdesi tomentoz veya skabroz, çok hücreli tüylü, nadiren tüsüzdür. Yaprak yüzeyleri genellikle sık veya kısa tüylü ya da pürtüklü olmakla beraber nadiren tüsüzdür. Almaçlı (alternat) olarak dizilmiş olan yapraklar bazen tamamen tabanda rozet formunda yer alır. Genellikle loplari laminanın yarısının üçte ikisi kadar derin parçalıdır. Bazen lamina tabanı gövde ile mesafe boyunca beraber gelişmiştir. Türkiye’de *Centaurea odyssei* Wagenitz hariç diğer türlerin yaprakları dikenli değildir. Kapitulum iki tip çiçekten ibaret ve disk şeklindedir. Involukrum oval, küremsi, yarım küre, hemen hemen silindirik, diktörtgenimsi (oblong) veya iğ biçimindedir (fusiform). Fillariler çok sıralı ve kiremitler gibi birbirlerinin üzerine binmiş durumda veya dik konumlu olup, neredeyse her zaman zarsı, saman renginde veya derimsidir. Çok çeşitli apendeçler tam veya saçaklıdan kirpikliye doğru, dairemsi, lanseolat veya üç köşeli, küt veya bir mukro, dikencik veya sert bir dikenle sonlanmış olabilir. Apendeçler bazen sadece bir mikron veya küçük dikenden ibarettir, nadiren apendeç bulunmayabilir. Reseptakulum düzgün kısa ve sert tüylerle örtülüdür. Çiçekler pembe, mor-kırmızı, mavi, sarı veya beyazımsı renkli ve tüpsüdür. Kenarda yer alan çiçekler steril (verimsizdir), merkezdekiler ise erdişidir (hermafrodit). Akenler genellikle

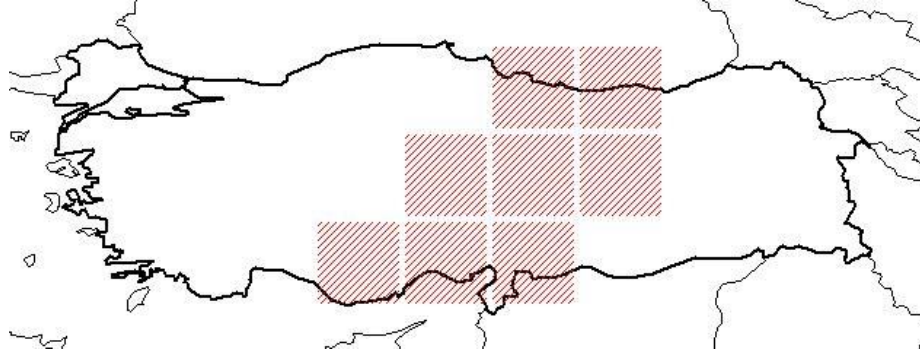
çıplak ve olgunlaştığı zaman yassılaştı, tepesi kalın veya kesiktir. Eşit olmayan ve yumuşak kıllardan oluşan papus merkeze doğru dereceli olarak uzamıştır, fakat en içteki sıra sık sık kısa ve daha çok balık pulu gibidir. Papus kalıcı veya nadiren düşüçüdür, bazen de olmayabilir (Wagenitz, 1975; Wagenitz, 1986; Kargün, 2011).

2.1.2. *Centaurea mucronifera* bitkisinin morfolojik özellikleri

Çok yıllık, kamefid, kuvvetli odunsu köklü, çok sayıdaki verimsiz sürgünle küme oluşturmaktadır. Bu kazık köklerin boyu 19- 45 cm, kalınlığı ise 1-4 cm kadardır. Çiçekli dallar 3-45 cm kadar boylanabilen, basit bir yapı göstermektedir. Yapraklar gri-beyaz tüylü tomentos, bazal yapraklar lanseolat, oblong, rhomboid ve hemen hemen daireseldir. Yaprak uçları sivri, yaprak kaide bağlantıları aşağıya doğru sarkarak uzamış durumdadır. Yapılan ölçümler sonunda bazal yapraklar 0,5-0,9 cm eninde, 5-9 cm boyunda, uçtaki yapraklar 5-7 cm eninde ve 5-8 cm boyunda olduğu bulunmuştur. Uzun saplı, gövdeye ait yapraklar birkaç tane ve benzer şekillidir. Kapituladaki involukrum 18-22-(25) eninde, 9-15-(21) mm boyundadır. Ek yapılar geniş, konveks, zarsı, yaklaşık dairemsi, hemen hemen geriye kıvrık, siller 21-36 adet, çok küçük dişli (0,1-0,8-1 mm), 0,3-1 mm uzunluğunda uçta küçük dikencikli, 24-36 sillidir. Akenler 2-4 mm eninde, 5-9 mm boyundadır. Akendeki tüy demeti iki sıralı, içteki sıra boyu ortalama 2-4 mm, dıştaki tüy demeti boyu 5-8 mmdir (Çelik, 2003).

C. mucronifera odunsu rizomları, 3–40 cm uzunluğunda basit çiçekli sapları, gri-beyaz tüyleri olan yaprakları ve pembe-mor renkli çiçekleri olan çok yıllık bir bitkidir. *C. mucronifera* Türkiye için endemik bir türdür. Güney ve Batı Anadolu'da genellikle kaya yarıklarında ve kalker kayalıklarında yetişir (Dural vd., 2003).

Halk arasında bolkar olarak bilinen *C. mucronifera* ülkemizde geniş yayılım göstermektedir (http-1). Özellikle Adana, Erzincan, Gümüşhane, Kayseri, Konya, Malatya, Kahramanmaraş, Niğde, Sivas ve Yozgat bölgelerinde rastlamak mümkündür (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. *Centaurea mucronifera* (DC.) Türkiye’de yayılışı (http-2)

2.2. *Centaurea* Türlerinin Biyolojik Aktiviteleri

Centaurea türleri üzerinde yapılan etnobotanik araştırmalar, bu türlerin halk arasında birçok hastalığı tedavi etmek amacıyla kullanıldığını ortaya çıkarmıştır. Aşağıdaki tabloda rapor edilen bazı *Centaurea* türlerinin halk arasında kullanımı özetlenmiştir (Tablo 2.1):

Tablo 2.1. *Centaurea* türlerinin yöresel ismi ve halk arasında kullanımı

<i>Centaurea</i> Türü	Yöresel İsim	Kullanılışı	Uygulama Şekli	Kaynak
<i>C. balsamita</i>	Kılıç otu	Çıban patlatıcı	Yaprak estresi	Sezik vd., 1997
<i>C. virgata</i>	Şaladır	Mide ağrısına karşı	Dahilen dekoksiyonu	Tabata vd., 1994
		Yara iyileştirici	Haricen, külleri tereyağı ile karıştırılarak merhem halinde	
<i>C. pulchella</i>	Boğa diken Gümüş süpürge	Çıban patlatıcı	Haricen, toz halde	Sezik vd., 2001
<i>C. lycopifolia</i>	Kumacı otu	Öksürük kesici	Dahilen, taze halde dövülerek çıkan özsuğu alınır ve şekerle karıştırılıp içilir	Yeşilada vd., 1995
		Kan dindirici	Haricen, toz halde	
<i>C. drabifolia</i>	Basur otu	Hemoroid tedavisinde	Dahilen infüzyon, çay veya sigara şeklinde	Honda vd., 1996
<i>C. benedicta</i> L.		İştah açıcı ve dispepsi, diüretik, galaktagog, karaciğer güçlendirici ve yara iyileştirici	İnfüzyon, dekoksiyon	Tiwana vd., 2021

Tablo 2.1. (devam) *Centaurea* türlerinin yöresel ismi ve halk arasında kullanımı

<i>Centaurea</i> Türü	Yöresel İsim	Kullanılışı	Uygulama Şekli	Kaynak
<i>C. pterocaula</i>	Çoruşbozan	Yara iyi edici	Haricen, toz halde	Sezik vd., 1997
<i>C. behen</i>	Ak behmen, zerdali diken	Midevi, adet söktürücü		Baytop, 1999
<i>C. solstitialis</i> ssp. <i>solstitialis</i>	Çakır diken, oğlak diken, sarıdiken	Çocuklarda uçuk tedavisi	Haricen, kavrulup toz edilerek	Fujita vd., 1995
		Sıtma tedavisi	Dahilen hap gibi yutularak veya sigara gibi içilerek	Tabata vd., 1994
		Peptik ülser semptomatik tedavi	Taze iken hap şeklinde	Sezik vd., 2001 Yeşilada vd., 1995 Honda vd., 1996
<i>C. iberica</i>	Çakırdiken, çobankaldıran	Ateş düşürücü	Dahilen, %2-6 lık infüzyon	Tuzlacı ve Erol, 1999 Sayar vd., 1990
		Yara iyi edici	Haricen toz halde	
		Mide ağrısına karşı	Dahilen, İnfüzyon	
<i>C. calcitarapa</i>	Çobankaldıran, Timur diken	Yılan ve akrep sokmasına karşı	Ezilerek sürme	
<i>C. urvillei</i> ssp. <i>armata</i>	Kötürüm	Ateş düşürücü	Dahilen %2-6'lık infüzyon	Akkurt, 2011; Baytop, 1994
<i>C. cyanus</i>	Peygamber çiçeği, gökbaş	İshal kesici, kuvvet verici, iştah açıcı, göğüs yumuşatıcı	Dahilen %5'lik infüzyon	Sayar vd., 1990
		Saç kepeklenmesine karşı	Haricen, infüzyonu ile baş yıkanır	
<i>C. sadleriana</i> Janka		Çiftlik hayvanlarının yaralarını iyileştirmek için		Csupor, 2010
<i>C. kurdica</i> Reichard		Yatıştırıcı, sedatif	Çiçek, meyve ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan infüzyon ve dekoksasyon	Gürağaç Dereli vd., 2020
<i>C. chilensis</i>		Antipiretik, antiromatizmal	Bitkinin sulu ekstresi	Arif vd., 2004; Sepulveda vd., 1994
<i>C. melitensis</i>		Dijestif, diüretik ve hipoglisemik	Tonik şeklinde	Arif vd., 2004; Kamanzi vd., 1983

Yapılan kapsamlı literatür çalışması sonucu *Centaurea* cinslerinin dünyada özellikle Türkiye’de asırlardır halk ilacı olarak kullanıldığı aynı zamanda birçok biyolojik aktivitelerinin bilimsel olarak kanıtlandığı görülmüştür. Çeşitli biyolojik çalışmalar, anti-enflamatuvar, anti-piretik, analjezik, anti-trombosit, yara iyileştirici, anti-ülserojenik,

hepatoprotektif, antiplasmodial, sitotoksik, antiproteazomal, antihemoroidal, antioksidan, antibakteriyel, antifungal ve alelokimyasal, idrar söktürücü, antineoplastik, tonik, antinosiseptif, antiaterosklerotik etki, gibi önemli aktiviteleri ortaya koymuştur (Albayrak, 2017; Sokovic, 2017)

Günümüze kadar birçok *Centaurea* türlerinin biyolojik ve fitokimyasal aktivitesi araştırılmış ve kanıtlanmış aktiviteler rapor edilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucu bu türlerin gıda sektörü ve ilaç endüstrisinde kullanılabileceği ortaya çıkarılmıştır. Aşağıdaki tabloda günümüze kadar rapor edilen bazı *Centaurea* türleri üzerinde yapılan ve bilimsel olarak kanıtlanmış biyolojik aktivite çalışmaları özetlenmiştir (Tablo 2.2.):

Tablo 2.2. *Centaurea* türleri üzerinde yapılan aktivite çalışmaları

Biyolojik Aktivite	<i>Centaurea</i> Türü	Çalışılan Kısım ve Kullanım Şekli	Kaynak
Antimikrobiyal	<i>C. nigra</i>	Tohumlardan elde edilen metanollü ekstre	Kumarasamy vd., 2003
	<i>C. iberica</i> <i>C. triumphettii</i> <i>C. cyanus</i>	Seskiterpen lakton ekstreleri	Ulusoylu, 2004
	<i>C. sessilis</i> <i>C. armena</i>	Uçucu yağlar	Yayli vd., 2005
	<i>C. aladagensis</i>	Uçucu yağı	Köse, 2007
	<i>C. virgata</i>	Kloroformlu ekstre	Ereçevit, 2007
	<i>C. pullata</i>	Toprak üstü kısımları Seskiterpen laktonlar	Djeddi vd., 2008
	<i>C. balsamita</i> <i>C. coronopifolia</i>	Kloroform, etil asetat, aseton ve etanol ekstreler	Yıldırım, 2008
	<i>C. amanicola</i> <i>C. consanguinea</i> <i>C. ptosimopappa</i>	Uçucu yağlar	Formisano, 2008
	<i>C. solstitialis</i> subsp. <i>solstitialis</i>	Çiçekli toprak üstü kısımlar Seskiterpen laktonlar	Özçelik vd., 2009
	<i>C. appendicigera</i> <i>C. helenioides</i>	Uçucu yağlar	Yayli, 2009
	<i>C. pseudosinaica</i>	Toprak üstü kısımları Metanollü ekstre	Mothana vd., 2010
	<i>C. cankiriense</i>	Çiçeklerinden hazırlanan etil asetat ekstresi	Cansaran vd., 2010
	<i>C. kilaea</i> <i>C. iberica</i>	Kapitulumlardan elde edilen metanollü ekstreler	Şen vd., 2010

Tablo 2.2. (devam) *Centaurea* türleri üzerinde yapılan aktivite çalışmaları

Biyolojik Aktivite	<i>Centaurea</i> Türü	Çalışılan Kısım ve Kullanım Şekli	Kaynak
Antimikrobiyal	<i>C. stenolepis</i> Kerner	Toprak üstü kısımlardan elde edilen etil asetat fraksiyonları flavonol glikoziti ve petrol eteri ekstresinden flavonol yapısındaki Jaceidin aglikonu	Şen, 2011
	<i>C. kurdica</i> <i>C. antiochia</i> var. <i>antiochia</i> <i>C. albonites</i> <i>C. persica</i>	Uçucu yağlar	Akkurt, 2011
	<i>C. persica</i>	Toprak üstü kısımlarının metanollü ekstresi	Sarker vd., 2012
	<i>C. cadmea</i> Boiss	Toprak üstü kısımlarının kloroform ekstresi	Astari vd., 2014
	<i>C. baseri</i>	Toprak üstü kısımların metanol ekstresi ve uçucu yağı	Köse vd., 2016
	<i>C. hausknechtii</i> <i>C. tomentella</i> Hand.-Mazz	Yağ asidi Uçucu yağ	Canlı C., 2018
	<i>C. hypoleuca</i> (DC.) <i>C. calcitrapa</i>	Çiçeklerin etil asetat ekstresi Yaprakların etilasetatlı ekstresi	Özcan vd., 2019 Dimkić vd., 2020
	<i>C. saligna</i> Wagenitz	Metanol ekstresi	Ereçevit ve Çakılcıoğlu, 2020
	<i>C. pumilio</i> (L.)	Toprak üstü kısımlarının uçucu yağı, metanollü ekstresi, kökün kloroformlu ekstresi	Naeim vd., 2020
	<i>C. cyanoides</i> Wahlenb	Toprak üstü kısımlarının metanollü fraksiyonu	Shadid vd., 2019
	<i>C. bingoelensis</i>	Diklorometan ve etil asetat ekstreleri	Uysal vd., 2021
	<i>C. diffusa</i>	Toprak üstü metanollü ekstresi	Skliar, Toribio ve Oriani, 2005
	<i>C. scabiosa</i> (L.)	Çiçeklerinden elde edilen metil tert-bütül eter ekstresi	Sharonova vd., 2021
	<i>C. gloriosa</i> var. Multiflora Radic	Kokulu kısımlarının sulu ekstresi	Cavar, Maksimovic ve Solic, 2011
	<i>C. napifolia</i> <i>C. schischkinii</i>	n-Butanol ekstresi Tohumların metanollü ekstresinden elde edilen indol alkaloidleri	Akkal vd., 2003 Shoeb vd., 2005
	<i>C. gigantea</i>	Toprak üstü kısımlarının metanollü ekstresinden elde edilen Salonitenolide türevleri	Shoeb vd., 2007 ^a
Antikanser/ sitotoksik			

Tablo 2.2. (devam) *Centaurea* türleri üzerinde yapılan aktivite çalışmaları

Biyolojik Aktivite	<i>Centaurea</i> Türü	Çalışılan Kısım ve Kullanım Şekli	Kaynak
Antikanser/ sitotoksik	<i>C. furfuracea</i>	Kloroformlu ekstre	Akkal vd., 2007
	<i>C. urvillei</i> subsp. <i>armata</i> <i>C. mucronifera</i>	Lignanlar	Shoeb vd., 2007 ^b
	<i>C. centaurium</i>	Metanol ekstrenin polifenolik fraksiyonu ve hekzan fraksiyonu	Conforti vd., 2008
	<i>C. africana</i>	Çiçekli toprak üstü kısımlarının etanollü ekstresi	Seghiri vd., 2009
	<i>C. arenaria</i>	Tüm bitkinin <i>n</i> -hekzan, metanol ve sulu ekstreleri	Csapi vd., 2010
	<i>C. tweediei</i> <i>C. diffusa</i>	Tohumlarının kloroform ekstresi	Bach vd., 2011
	<i>C. cadmea</i> Boiss	Toprak üstü kısımlarının kloroform ekstresi	Astari vd., 2014
	<i>C. baseri</i>	Toprak üstü kısımların metanol ekstresi	Köse vd., 2016
	<i>C. fenzlii</i> Reichardt	Toprak üstü kısımlarının diklorometan ekstresinin etilasetat fraksiyonu	Yırtıcı, 2019
	<i>C. solstitialis</i> (L.) subsp. <i>solstitialis</i>	Çiçekli kısımların etanol ekstresi	Alper ve Güneş, 2019
	<i>C. ragusina</i> (L.)	Yapraklarının metanollü ekstresi	Grienke vd., 2018
	<i>C. ragusina</i> (L.)	Yaprakların etanollü ekstresi	Vujčić vd., 2017
	<i>C. bingoelensis</i>	Metanol ekstresi	Uysal vd., 2021
	<i>C. hermannii</i>	Metanolik ekstresi	Artun ve Karagöz, 2021
	<i>C. africana</i>	<i>n</i> -butanol ve etilasetat ekstresi	Hadjira vd., 2021
	<i>C. derderiifolia</i>	Yaprağın kloroformlu ekstresi	Bulut vd., 2021
	<i>C. ainetensis</i>	Metanol ekstresinden elde edilen seskiterpen lakton olan Salograviolide A bileşeni	Al-Saghir, 2009
Antiinflamatuvar	<i>C. chilensis</i>	Elemanolit ester karışımları	Negrete vd., 1993
	<i>C. cyanus</i>	Kapitulumlardan elde edilen monosakkarit şekerler	Garbacki vd., 1999
	<i>C. thessala</i> <i>C. attica</i>		Skaltsa vd., 2000
	<i>C. iberica</i>	Metanol ekstresi	Koca vd., 2009a
	<i>C. tchihatcheffii</i>	Çiçeklerinden elde edilen etanol ekstresi	Koca vd., 2009b
	<i>C. solstitialis</i> L. subsp. <i>solstitialis</i>	Çiçekli kısımların etanol ekstresi	Alper ve Güneş, 2019

Tablo 2.2. (devam) *Centaurea* türleri üzerinde yapılan aktivite çalışmaları

Biyolojik Aktivite	<i>Centaurea</i> Türü	Çalışılan Kısım ve Kullanım Şekli	Kaynak
Antiinflamatuvar	<i>C. tougourensis</i> Boiss. & Reut	Toprak üstü kısımlarından elde edilen n-butanol ekstresi	Bensaad vd., 2021
	<i>C. aphrodisea</i> <i>C. athoa</i> <i>C. hyalolepis</i> <i>C. iberica</i> <i>C. polyclada</i>	Toprak üstü kısımlarının kloroformlu ekstreleri	Erel vd., 2014
	<i>C. africana</i>	n-Butanol ekstresi	Hadjira vd., 2021
	<i>C. nicolai</i>	Seskiterpen laktonlar	Vajs vd., 1999
	<i>C. deusta</i>		Karioti vd., 2002
Antifungal	<i>C. iberica</i>	Seskiterpen lakton ekstreleri	Ulusoylu, 2004
	<i>C. stenolepis</i> Kerner	Toprak üstü kısımlarından elde edilen etil asetat ve petrol eteri ekstresi	Şen, 2011
	<i>C. balsamita</i>	Aseton ekstresi	Boğa vd., 2016
	<i>C. musimomum</i>	Toprak üstü kısımlarının kloroformlu ekstresi	Medjroubi vd., 2005
	<i>C. bingoelensis</i>	Hidro-metanol ekstresi	Uysal vd., 2021
Antioksidan	<i>C. schischkinii</i>	Alkaloid ve lignanlar	Shoeb vd., 2005
	<i>C. americana</i>	Metanol ekstresi ve izole edilen bütün lignanlar	Shoeb vd., 2006
	<i>C. centaurium</i>	Metanol ekstrenin polifenolik fraksiyonu	Conforti vd., 2008
	<i>C. stenolepis</i>	Kapitulumlardan hariç toprak üstü kısımlarının metanol ekstresi	Şen, 2011
	<i>C. pulchella</i>	Metanol ekstresi	Zengin vd., 2010
	<i>C. balsamita</i>	Toprak üstü kısımlarının metanol ekstresi	Boğa vd., 2016
	<i>C. bornmuelleri</i> Hausskn.	Toprak üstü kısımlarının etil asetat ekstresi	Zengin vd., 2019 ^a
	<i>C. saligna</i> (K.Koch) Wagenitz	Metanol ekstresi	Keser vd., 2020
	<i>C. virgata</i> Lam.	Metanol ve sulu ekstresi	
	<i>C. cyanoides</i> Wahlenb	Toprak üstü kısımlarının metanollü fraksiyonu	Shadid vd., 2019
	<i>C. africana</i>	Etilasetat ekstresi	Hadjira vd., 2021
	<i>C. hypoleuca</i> (DC.)	Çiçeklerin etil asetat ekstresi	Özcan vd., 2019

Tablo 2.2. (devam) *Centaurea* türleri üzerinde yapılan aktivite çalışmaları

Biyolojik Aktivite	<i>Centaurea</i> Türü	Çalışılan Kısım ve Kullanım Şekli	Kaynak
Antidiyabetik	<i>C. bornmuelleri</i> Hausskn.	Toprak üstü kısımlarının etil asetat ekstresi	Zengin vd., 2019 ^a
	<i>C. solstitialis</i> subsp. <i>solstitialis</i>	Kloroform fraksiyonu	Yesilada vd., 2004
	<i>C. polypodiifolia</i> var. <i>Pseudobehen</i> <i>C. antalyense</i>	Metanol ekstreleri	Aktümsek vd., 2013
	<i>C. balsamita</i>	Toprak üstü kısımlarının petrol eteri ve aseton ekstresi	
Antialzhemir	<i>C. depressa</i>	Toprak üstü kısımlarının petrol eteri ekstresi	Boğa vd., 2016
	<i>C. lycopifolia</i>	Toprak üstü kısımlarının petrol eteri ve aseton ekstresi	
	<i>C. bornmuelleri</i> Hausskn.	Toprak üstü kısımlarının etil asetat ekstresi	Zengin vd., 2019 ^a
	<i>C. hypoleuca</i> (DC.)	Çiçeklerin etil asetat ekstresi	Özcan vd., 2019
Antiülser	<i>C. solstitialis</i> subsp. <i>solstitialis</i>	Seskitерpen lakton	Gürbüz ve Yesilada, 2007
	<i>C. iberica</i>		Khan vd., 2011
Antiplatalet	<i>C. iberica</i>	%1 lik metanol ekstresiyle hazırlanmış merhem formülasyonu	Koca vd., 2009 ^a
	<i>C. tchihatcheffii</i>	Etanol ekstresi	Koca vd., 2009 ^b
Yara iyileştirici	<i>C. sadleriana</i>	Metanol ekstresinin hekzan ve kloroform fraksiyonları	Csupor vd., 2010
	<i>C. virgata</i> Lam.	Etanol ekstresinin etilasetat fraksiyonu	Aksoy, 2020
Ağrı kesici	<i>C. solstitialis</i> (L.) subsp. <i>solstitialis</i>	Etanol ekstresi	Akkol vd., 2009
	<i>C. urvillei</i> subsp. <i>urvillei</i>	Flavonoit	Gülcemal vd., 2010
Antiprotozoal	<i>C. solstitialis</i> subsp. <i>solstitialis</i>	Seskitерpen lakon olan 13-acetyl solstitialin A	Özçelik vd., 2009
Uçuk tedavisinde antiviral	<i>C. rupestris</i>	Flavonoit bileşiği	Rusak vd., 1997
Fitoviral	<i>C. diffusa</i>	Etanol ekstresi ve bu ekstreden elde edilen hekzan fraksiyonu	Quintana vd., 2009
Fitotoksik	<i>C. musimomum</i>	Kloroform ekstresi	Medjroubi vd., 2005
	<i>C. maculosa</i>		Meepagala vd., 2006
	<i>C. furfuracea</i>	Kloroform ekstresi	Akkal vd., 2007
Antiparazit	<i>C. kilaea</i>	Toprak üstü kısımlarının kloroform ekstresi	Şen vd., 2017
Antiproliferatif	<i>C. deflexa</i>	nor-guaianolide lactone	Chicca vd., 2011

Tablo 2.2. (devam) *Centaurea* türleri üzerinde yapılan aktivite çalışmaları

Biyolojik Aktivite	<i>Centaurea</i> Türü	Çalışılan Kısım ve Kullanım Şekli	Kaynak
Antiproliferatif	<i>C. americana</i>	Çiçek ve yapraklardan elde edilen hidroalkolik ekstre	Gonzalez vd., 2011
	<i>C. carduiiformis</i>	Bitkinin etanollü kök ekstresinden elde edilen etilasetatlı fraksiyonları	Sahin Yaglioglu vd., 2014
Hepatoprotektif	<i>C. kurdica</i> Reichardt.	Çiçeklerin metanollü ekstresi, yapraklı dalların <i>n</i> -hekzan ekstresi	Gürağaç Dereli vd., 2020
Antidepresan	<i>C. patula</i> (DC.) <i>C. pulchella</i> Ledeb. <i>C. tchihatcheffii</i> Fisch. & Mey	Toprak üstü kısımların metanollü ekstresi	Russo vd., 2016
Kardiomiyosit koruyucu ajan	<i>C. borysthenica</i> Gruner	Toprak üstü kısımlarının metanol-sulu ekstraksiyonu	Korga vd., 2017

Yapılan kaynak taraması sonucu, *Centaurea* türlerinin çoğunlukla çiçek ve topraküstü kısımlarından faydalandığı görülmektedir. Bitkilerden uçucu yağ ve farklı polariteli ekstreleri elde edilerek çeşitli biyolojik aktivite testlerine tabi tutulmuştur. Yapılmış çalışmalarda *Centaurea* türleri daha çok antioksidan, sitotoksik ve antimikrobiyal aktivite potansiyeli olduğu tespit edilmiştir.

2.3. *Centaurea* Türleri Üzerinde Yapılan Fitokimyasal Araştırmalar

Centaurea türlerinin sahip olduğu sekonder metabolitleri aydınlatmak için pek çok fitokimyasal çalışma mevcuttur. Bu çalışmalar sonucunda tespit edilen bazı sekonder metabolitler aşağıdaki tabloda özetlenmiştir (Tablo 2.3.).

Tablo 2.3. *Centaurea* türleri üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar sonucu tespit edilen sekonder metabolitler

Tür	Bileşikler	Kaynak
	Seskitерpen Laktonlar	
<i>C. ptosimopappa</i>	Zaluzanin D Zaluzanin C	Çelik vd., 2006
<i>C. crithmifolia</i> Vis. <i>C. friderici</i> Vis. <i>C. paniculata</i> L. <i>C. calcitrapa</i> L.	Salonitenolid	Geppert vd., 2014

Tablo 2.3. (devam) *Centaurea* türleri üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar sonucu tespit edilen sekonder metabolitler

Tür	Bileşikler	Kaynak
Seskiterpen Laktonlar		
<i>C. pontica</i> Prodan <i>C. eriophora</i> L. <i>C. alba</i> L. subsp. <i>deusta</i> <i>C. alba</i> L. subsp. <i>caliacrae</i> <i>C. weldeniana</i> Reichenb.	Salonitenolid	
<i>C. vallesiaca</i> DC. <i>C. calcitrapa</i> L. <i>C. aspera</i> L. subsp. <i>aspera</i> <i>C. sphaerocephala</i> L. subsp. <i>lusitanica</i> <i>C. sulphurea</i> Willd. <i>C. eriophora</i> L. <i>C. rocheliana</i>	Snikin	Geppert vd., 2014
<i>C. debeauxii</i> Gren <i>C. bella</i> Trautv	Sinaropikrin Akroptillin Repin Janerin	
<i>C. behen</i>	Aguerin B	Amini vd., 2020
<i>C. behen</i>	Sinaropikrin β ,15-Dehidro-3 dehidrosolstitialin A Aguerin B Janerin Cebellin E	Shakeri vd., 2018
<i>C. ragusina</i> L.	Deasilsinaropikrin Ragusinin Hemistepsin A	Grinke vd., 2018
<i>C. affinis</i> Friv.	Snikin Salonitenolid	Janacković vd., 2004
<i>C. arenaria</i> Bieb. Aex Willd. subsp. <i>arenaria</i>	Snikin	Csapi vd., 2010
<i>C. cadmea</i> Boiss.	İvalin	Karamenderes vd., 2007
<i>C. calolepis</i> Boiss.	Snikin	Erel vd., 2011
<i>C. galicicae</i> Micevski	Snikin	Tešević vd., 2014
<i>C. kilaea</i> Boiss.	Snikin Dehydromelitensin	Şen vd., 2017
<i>C. virgata</i> Lam.	Snikin 8 α -O-(3,4-dihidroksi-2-metillenbutanoiloksi)-dihidromelitensin 8 α -hidroksi-sonchukarpolit	Tuzun vd., 2017
<i>C. papposa</i> (Coss.) Greuter <i>C. cyanus</i>	Snikin 13-O-asetilsolstitialin A	Grafakou vd., 2018 Keyvanloo Shahrestanaki vd., 2019
<i>C. pullata</i>	11 β ,13-dihidroksnikin 11 β ,13-dihidro-19 desoksisnikin 8 α -O-(4-asetoksi-5-hidroksiangeloil)-11 β ,13-dihidroksnikin	Djeddi vd., 2007
<i>C. zuccariniana</i>	Malasitenolid Snikin 4'-O-asetilsnikin	Ćirić vd., 2012
<i>C. diffusa</i> <i>C. tweediei</i>	Snikin Onopordopikrin	Bach vd., 2011

Tablo 2.3. (devam) *Centaurea* türleri üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar sonucu tespit edilen sekonder metabolitler

Tür	Bileşikler	Kaynak
Seskiterpen Laktonlar		
<i>C. sonchifolia</i>	Onopordopikrin	Lonerhan vd., 1992
<i>C. solstitialis</i> L. <i>ssp. solstitialis</i>	Klorojanerin 13-Asetil solstitialin A	Yeşilada vd., 2004
<i>C. ainetensis</i>	Salograviolid A	Al-Saghir vd., 2009
Fenolik Bileşikler (flavonoidler, fenolik bileşikler, antosiyanidinler)		
<i>C. albonitens</i>	Apigenin-4'-O-rhamnozid	Hamedeyazdan, 2017
<i>C. urvillei</i> DC. <i>subsp. urvillei</i>	Kamferol	Gülcemal vd., 2010
	Apigenin	
	Luteolin	
	Eriodiktol-7-O-b-D-glukuronopiranozid	
	Arbutin	
<i>C. kurdica</i>	Salidrozin	Keser vd., 2020
	Hispidulin-7-O-b-D-glukuronopiranozid	
	Apigenin-7-O-b-D-metilglukuronopiranozid	
	Kateşin	
	Vanillik Asit	
<i>C. virgata</i>	Gallik Asit	Keser vd., 2020
	Ferulik Asit	
	Rosmarinik Asit	
<i>C. saligna</i>	Gallik asit	Keser vd., 2020
<i>C. aksoyi</i>	Kafeik asit	Keser vd., 2020
<i>C. amaena</i>	Ferulik Asit	Albayrak vd., 2017
	Kersetin-3-b-D-glukozit klorojenik asit	
	protokateşik asit	
<i>C. ragusina</i> L.	Kersetin	Grienke vd., 2018
	Protokateşik asit	
	Kersetin -3-b-D-glukozit	
<i>C. behen</i>	Kamferol	Shakeri vd., 2018
	Ferulik asit	
	Krisin	
<i>C. papposa</i> (Coss.) Greuter	Oroksilin A	Grafakou vd., 2018
<i>C. zuccariniana</i>	Hispidulin	
	Öpatorin	
<i>C. kilaia</i>	Apigenin	Ćirić vd., 2012
	Genkvanin	
	Hispidulin	
<i>C. kilaia</i>	Kirsimaritin	Öksüz vd., 2013
	Salvigenin	
	Salvigenin	
<i>C. kilaia</i>	6-Hidroksiluteolin-6,7,3',4'-tetrametil eter	Öksüz vd., 2013
	Luteolin-7,3',4'-trimetil eter	
	Jaseosidin	
<i>C. kilaia</i>	Pektolinarigenin	

Tablo 2.3. (devam) *Centaurea* türleri üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar sonucu tespit edilen sekonder metabolitler

TÜR	Bileşikler	Kaynak
Fenolik Bileşikler (flavonoitler, fenolik bileşikler, antosiyanidinler)		
<i>C. salonilana</i>	Pektolinarigenin 6-Hidroksiluteolin-4'-metil eter Cirsiliol Hispidulin Apigenin 7-O-glukozit	Öksüz vd., 2013
<i>C. virgata</i> Lam.	Öpatorin	Sümer vd., 2018
<i>C. schmidii</i>	Jasein 3-Demetiljasein	Aghaei vd., 2021
<i>C. achtarovii</i> <i>C. dealbata</i> <i>C. montana</i> <i>C. nigra</i> <i>C. scabiosa</i> <i>C. simplicicaulis</i> <i>C. triumphetti</i> <i>C. hypoleuca</i>	Apigenin 7-O-glukuronit	Mishio vd., 2015
<i>C. maroccana</i> Vahl.	Sirsimaritin 6-Metoksiizokamferit Apigenin Hispidulin	Bicha vd., 2011
<i>C. sulphurea</i>	Sirsilineol Jaseosidin 3-O-metil-öpatorin	Kabouche vd., 2011
<i>C. schischkinii</i>	Apigenin	Shoeb vd., 2005
<i>C. achtarovii</i> <i>C. dealbata</i> <i>C. montana</i> <i>C. nigra</i> <i>C. scabiosa</i> <i>C. simplicicaulis</i> <i>C. triumphetti</i> <i>C. hypoleuca</i>	Siyanidin 3-O-(6'' malonilglukozit)-5-O glukozit	Mishio vd., 2015
Lignan		
<i>C. schischkinii</i>	Arktiin Matairesinozit Matairesinol Arktigenin	Shoeb vd., 2005
<i>C. zuccariniana</i>	Arktiin Arktigenin	Ćirić vd., 2012
<i>C. albonitens</i>	Arktiin	Hamedeyazdan vd., 2017
İndol Alkaloidleri		
<i>C. cyanus</i> L.	Moschamin sis-Moschamin Sentsiamin sis-Sentsiamin	Sarker vd., 2001
<i>C. schischkinii</i>	Schischkiniin	Shoeb vd., 2005

2.3.1. *Centaurea* türlerinin uçucu bileşikleri

Centaurea türleri üzerinde uçucu yağ kompozisyonunu aydınlatmak için yapılan pek çok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalar sonucunda tespit edilen uçucu bileşikler aşağıdaki tabloda özetlenmiştir (Tablo 2.4.).

Tablo 2.4. *Centaurea* türlerinde tespit edilen uçucu bileşikler

TÜR	Uçucu bileşik (%)	Kaynak
<i>C. iberica</i>	Germakren D (20,3) Karyofillen oksit (10,7) β -Karyofillen (10,5)	Kılıç, 2013
<i>C. solstitialis</i> <i>subsp. solstitialis</i>	β -eudesmol (15,5) Bisiklogermakren (14,2) Spathulenol (11,3)	
<i>C. virgata</i>	Germakren D (21,4) B-Karyofillen (16,5) Karyofillen oksit (9,5)	
<i>C. wagenitzii</i>	Hekzadekanoik asit (25,6) Nonakozan (12,0) Heptakozan (9,8) Karyofillen oksit (7,3) Karyofillenol II (3,8)	
<i>C. tossiensis</i>	Hekzadekanoik asit (50,6) Nonakozan (11,6) Heptakozan (10,7) Pentakozan (5,8) Dodekanoik asit (2,9)	Köse vd., 2008
<i>C. luschaniana</i>	Hekzadekanoik asit (40,0) Dodekanoik asit (12,6) Nonakozan (7,8) Spatulenol (4,6) Tetradekanoik asit (4,0)	
<i>C. appendicigera</i>	Karyofillen oksit (17,1) β -Karyofillen (17,5)	Yaylı vd., 2009
<i>C. helenioides</i>	Karyofillen oksit (18,2) Germakren-D (7,3) <i>cis</i> -Fitol (6,2)	
<i>C. kurdica</i>	Karyofillen (14,24) Germakren (11,95) β -Farnesen (9,78) Spatulenol (7,73)	
<i>C. antiochia</i> <i>var. antiochia</i>	Karyofillen (18,23) Germakren (27,37) Spatulenol (29,86) Hekzadekanoik asit (7,21)	Akkurt, 2011
<i>C. albonitens</i>	Karyofillen oksit (16,45) Germakren (9,23) Karyofillen (7,75) Spatulenol (7,97)	
<i>C. sibthorpii</i>	Hekzadekanoik asit (18,6) (Z,Z)-9,12-oktadekadienoik asit (12,2) (E)- β -Farnesen (10,4) Siklosatifin (9,9)	Formisano vd., 2008
<i>C. nicaeensis</i>	Hekzadekanoik asit (33,5) (Z,Z)-9,12-Oktadekadienoik asit (28,8)	
		Senatore vd., 2008

Tablo 2.4. (devam) *Centaurea* türlerinde tespit edilen uçucu bileşikler

Tür	Uçucu bileşik (%)	Kaynak
<i>C. parlatoris</i>	Hekzadekanoik asit (18,1) Heptakozan (9,6) Nonakozan (10,2)	Senatore vd., 2008
<i>C. soltistialis</i> <i>ssp. schouwii</i>	Hekzadekanoik asit (29,4) Heptakozan (7,7)	
<i>C. baseri</i>	Hekzadekanoik asit (42,3) Nonakozan (8,2) Heptakozan (8,0)	Köse vd., 2016
<i>C. calcitrapa</i>	Hekzadekanoik asit (10,2) 9,12-Oktadekadienoik asit (15,8) Trikozan (8,0)	Senatore vd., 2006
<i>C. sphaerocephala</i>	Hekzadekanoik asit (30,7) β -Ödesmol (5,4)	
<i>C. sessilis</i>	Karyofillen oksit (10,0) β -Ödesmol (12,4)	Yaylı vd., 2005
<i>C. armena</i>	β -Ödesmol (19,3) Calaren (10,3)	
<i>C. pterocaula</i>	Hekzadekanoik asit (13,9) Spatulenol (11,4) Karyofillen oksit (11,5)	Şen vd., 2021
<i>C. stenolepis</i> Kerner	Hekzadekanoik asit (38,4) Karyofillen oksit (12,6) Fitol (12,9)	Polatoglu vd., 2014
<i>C. rupestris</i>	Germakren D (24,3) Heptakozan (14,4)	Carev vd., 2018
<i>C. hierapolitana</i> Boiss.	Hekzadekanoik asit (33,4) Karvakrol (13,3)	Karamenderes vd., 2008
<i>C. cadmea</i> Boiss.	Hekzadekanoik asit (19,5) Karvakrol I (16,6)	
<i>C. calolepis</i> Boiss.	Hekzadekanoik asit (27,3) Karvakrol I (18,9)	
<i>C. cariensis</i> Boiss. subsp. <i>microlepis</i> (Boiss.) Wagenitz	Hekzadekanoik asit (10,0) Karvakrol (28,4)	
<i>C. ensiformis</i>	Hekzadekanoik asit (13,2) Karvakrol (17,4)	
<i>C. reuterana</i> Boiss var. <i>reuterana</i>	Hekzadekanoik asit (23,8) Karvakrol (14,9)	
<i>C. cyanus</i> L	Karvakrol (25,5)	
<i>C. depressa</i> Bieb	Hekzadekanoik asit (21,3) Karvakrol (14,2)	
<i>C. urvillei</i> DC. subsp. <i>urvillei</i>	Hekzadekanoik asit (26,4) Karvakrol (12,4)	

Tablo 2.4. (devam) *Centaurea* türlerinde tespit edilen uçucu bileşikler

Tür	Uçucu bileşik (%)	Kaynak
<i>C. babylonica</i>	Germakren D (43,0)	
<i>C. balsamita</i>	Germakren D (40,2)	
<i>C. aladaghensis</i>	β -Karyofillen (18,3) Germakren D (22,7) β -Ödesmol (11,8)	
<i>C. antiochia</i> var. <i>prealta</i>	Germakren D (45,1)	
<i>C. antitauri</i>	Germakren D (40,2)	
<i>C. cheirolepidoides</i>	β -Karyofillen (14,4) Germakren D (21,7)	Flamini vd., 2006
<i>C. deflexa</i>	β -Karyofillen (33,9) Germakren D (21,2)	
<i>C. iconiensis</i>	1-Undeken (84,3) Germakren D (43,1) β -Karyofillen (13,7)	
<i>C. ptosimopappoides</i>	β -Karyofillen (22,5) Germakren D (36,9)	

Tablo 2.4.'de görüldüğü üzere *Centaurea* türlerinin uçucu yağ ana bileşenlerini germakren D, hekzadekonoik asit ve β -karyofillen oluşturmaktadır.

2.3.2. *Centaurea* türlerinin sabit yağ asitleri

Centaurea türleri üzerinde sabit yağ asitleri kompozisyonunu aydınlatmak için yapılan pek çok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalar sonucunda tespit edilen yağ asitleri aşağıdaki tabloda özetlenmiştir (Tablo 2.5.).

Tablo 2.5. *Centaurea* türlerinde tespit edilen sabit yağ asitleri

Tür	Sabit yağ asit (%)	Kaynak
<i>C. sivasica</i> Wagenitz	Hekzadekanoik asit (17,93) Linoleik Asit (20,92) Linolenik asit (19,10)	
<i>C. tomentella</i> Hand.-Mazz	Hekzadekanoik asit (15,24) Linoleik Asit (21,76)	Canlı C, 2018
<i>C. haussknechtii</i> Boiss	Linoleik Asit (38,11)	
<i>C. virgata</i>	Oleik asit (20,27) Linoleik asit (28,08) Palmitik asit (22,29)	
<i>C. kurdica</i>	Oleik asit (26,34) Linoleik asit (28,77) Palmitik asit (21,98)	Keser S, 2020
<i>C. saligna</i>	Oleik asit (21,18) Linoleik asit (29,76) Palmitik asit (20,14)	
<i>C. patula</i>	Palmitik asit: 21,02 Linoleik: 18,92 Linolenik asit: 31,86	Zengin G, 2010

Tablo 2.5. (devam) *Centaurea* türlerinde tespit edilen sabit yağ asitleri

Tür	Sabit yağ asit (%)	Kaynak
<i>C. pulchella</i>	Palmitik asit (19.37) Linoleik (34.06) Linolenik asit (33.62)	Zengin G, 2010
<i>C. tchihatcheffii</i>	Palmitik asit (13.22) Linoleik (34.55) Linolenik asit (24.01)	

Tablo 2.5.'de görüldüğü üzere *Centaurea* türlerinin sabit yağ asitlerinin ana bileşenlerini doymuş yağ asitlerinden palmitik ve hekzadekanoik asit oluştururken doymamış yağ asitlerinden linoleik, linolenik ve oleik asitler oluşturmaktadır.

2.3.3. *Centaurea mucronifera* üzerinde daha önce rapor edilen fitokimyasal ve biyolojik çalışmalar

C. mucronifera'nın toprak üstü kısımlarının metanol ekstresinden iki adet lignan matairezinozit ve arktiin elde edilmiştir. Bitkinin metanollü ekstresi ve elde edilen lignan bileşikleri üzerinde antioksidan aktivite, sitotoksikite ve Brine shrimp toksisite testleri yapılmıştır. Yapılan testlere göre matairezinozit ve arktiin lignanları antioksidan aktivite (IC_{50} $2,2 \times 10^{-2}$ ve $16,0 \times 10^{-2}$ mg/mL) ve Brine shrimp toksisite (IC_{50} $1,6 \times 10^{-2}$ ve $9,8 \times 10^{-2}$ mg/mL) aktivitesi göstermiştir. Fakat, bu iki bileşik anlamlı bir sitotoksik aktivite göstermemiştir (Shoeb vd., 2007^b).

C. mucronifera bitkisinin toprak üstü kısımlarının metanollü ekstresi ile β -Karoten-linoleik asit inhibisyon testi ve serbest radikal süpürme kapasitesi (DPPH) olarak iki farklı antioksidan aktivite çalışmaları rapor edilmiştir. Yapılan çalışmada *C. mucronifera*'nın DPPH serbest radikal süpürme kapasitesi için ölçülen IC_{50} (μ g/mL) değeri $67,8 \pm 2,16$ ve β -karoten-linoleik asit inhibisyon yüzdesi $35,2 \pm 3,04$ olarak tespit edilmiştir. Çalışmada değerlendirilen diğer bitki ekstrelerine kıyasla en zayıf *C. mucronifera*'nın antioksidan aktivitesi tespit edilmiştir (Tepe vd., 2006).

C. mucronifera'nın taze kaputulumlarından hidrodistilasyon yöntemiyle % (a/a) 0.09 verimle uçucu yağlar elde edilmiştir. *C. mucronifera*'nın uçucu yağında monoterpenler hemen hemen hiç temsil edilmezken eser miktarda hidrokarbonlar ve oksijenli türevler tespit edilmiştir. Uçucu yağın kompozisyonu seskiterpenler ile karakterize edilmiştir. Uçucu yağın ana bileşikler sırasıyla germakren D (%29,3), β -ödesmol (%17,4), β -karyofillen (%7,3), karyofillen oksit (%5,2) ve bisiklogermakren (%4,8) olarak tespit edilmiştir (Dural vd., 2003).

C. mucronifera Türkiye endemik bitkisi olarak üzerinde yapılan bazı antioksidan aktivite ve sitotoksisite gibi biyolojik aktiviteleri incelenmiştir. Fakat, yapılan araştırmalar DPPH ve β -karoten/linoleik asit deneyi ile incelenmiş olup bu etkisinin aydınlatılması için daha fazla antioksidan deneyleri ile karşılaştırılması gerektiğini ortaya çıkarmıştır. *Centaurea* türleri üzerinde daha nice yapılan bilimsel çalışmalar referans alındığında *C. mucronifera*'nın biyolojik aktiflik potansiyelinin ortaya çıkarılması ve daha önce araştırılmamış enzim aktivitesinin araştırılması ihtiyacını ortaya çıkarmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddelere ve çözücülere ait bilgiler Tablo 3.1.'de yer almaktadır.

Tablo 3.1. Kullanılan kimyasal madde ve çözücülerin bilgileri

No	Kimyasal Madde	Kimyasal Formül	Menşei
1	α -Amilaz		Sigma-Ald., Fransa
2	ABTS 2,2'-Azino-bis (3 etil benzotiazolin-6-sülfonik asit		Sigma-Ald., Almanya
3	Akarboz	$C_{25}H_{43}NO_{18}$	Sigma-Ald., Fransa
4	Alüminyum klorür	$AlCl_3$	Merck, Almanya
5	Amonyum asetat	$NH_4CH_3CO_2$	
6	Anisaldehit		Sigma-Ald., Fransa
7	Asetik asit (buzlu)	CH_3COOH	Sigma-Ald., Almanya
8	Asetilkolinesteraz (AChE)		Sigma-Ald., Almanya
9	Asetiltiyokolin iyodür (ATCI)		Sigma-Ald., İngiltere
10	Askorbik asit		
11	Bakır (II)klorür	$CuCl_2$	
12	Borontriflorür	BF_3	Merck, Almanya
13	Bovin serum albumin	BSA	Sigma Ald., ABD
14	Bütillenmiş hidroksi tolüen (BHT)		Sigma-Ald., Almanya
15	Çözünür nişasta		Sigma-Ald., İngiltere
16	Diklorometan		
17	Dimetil sülfoksit (DMSO)		Sigma-Ald., ABD
18	1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH)		Sigma-Ald., Fransa
19	5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit)] (DTNB)	$C_{14}H_8N_2O_8S_2$	Sigma-Ald., ABD
20	Ellman reaktifi		
21	Etanol		Sigma-Ald.,Almanya
22	Etil asetat		Sigma-Ald.,Almanya
23	Folin-Ciocalteu reaktifi	FCR	Sigma-Ald., İsviçre
24	Formik asit	$HCOOH$	Sigma-Ald., Almanya
25	Galantamin		
26	Gallik asit	GA	Sigma-Ald., Çin
27	Hidroklorik asit	HCl	Sigma-Ald., Almanya
28	İyot	I	Sigma-Ald., Fransa

Tablo 3.1. (devam) Kullanılan kimyasal madde ve çözücülerin bilgileri

No	Kimyasal Madde	Kimyasal Formül	Menşei
29	Kersetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Sigma- Ald., Almanya
30	Kloroform	CHCl ₃	Sigma-Ald., Fransa
31	Magnezyum klorür heksahidrat	MgCl ₂ 6H ₂ O	Sigma-Ald., ABD
32	Metanol		Sigma-Ald., Polonya
33	Neokuproin		
34	n-Hekzan	C ₆ H ₁₄	Merck, Almanya
35	Sodyum dihidrojen fosfat	NaH ₂ PO ₄	Sigma-Ald., Fransa)
36	Nişasta		Sigma-Ald., Fransa
37	Natural Product reagent (NPR)		
38	Polietilen glikol (PEG)		
39	Potasyum iyodür	KI	Sigma-Ald., Almanya
40	Potasyum persülfat	K ₂ S ₂ O ₈	Sigma-Ald., Almanya)
41	Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Sigma-Ald., Fransa
42	Sodyum karbonat	Na ₂ CO ₃	Merck, Almanya
43	Sodyum klorür	NaCl	Riedel de Haen, Almanya
44	Sülfürik asit	H ₂ SO ₄	Sigma-Ald., Fransa
45	Tip 1 ultra saf su	-	Direct-Q® Water Purification System (Germany).
46	Toluen		Sigma-Ald., Fransa
47	Trolox [(±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit]	C ₁₄ H ₁₈ O ₄	Sigma-Ald., Almanya

3.2. Cihazlar ve Apareyler

Tez kapsamında yapılan deneysel çalışmalarda kullanılan cihaz ve aparey bilgileri Tablo 3.2.'de verilmiştir. Hekzanlı ve metanollü ekstrahelerin kurutulması düşük basınç altında rotavapor kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sulu ekstrenin kurutulması için liyofilizatör kullanılmıştır. Bitkinin toprak üstü yaprak dal ve çiçek kısımlarından uçucu yağ elde etmek için Clevenger apareyi kullanılmıştır. Mikrotiter ve dilüsyon çalışmalarında Eppendorf 8-12 uçlu otomatik pipetör kullanılmıştır. Spektrofotometrik ölçümler için mikropalak okuyucu cihazı kullanılmıştır. Ekstrelerin kimyasal kompozisyon analizi için UV-dedektör donanımlı sıvı kromatografisi sistemi kullanılmıştır. Enzim örneği buzdolabında -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.2. Kullanılan cihaz ve apareylerin bilgileri

Cihaz	Cihaz bilgileri
96-kuyucuklu eliza plakları	Iso Lab, Katalog no: 122.01.096
Buzdolabı (-20 +4)	Bosch
Clevenger apareyi	İLDAMCAM, EP'ye uygun
Çeker ocak	Siemens
Ekstre karıştırıcı	GFL
Hassas terazi	Mettler Toledo NewClassic MF, Switzerland
HPTLC daldırma aygıtı	CAMAG
HPTLC görüntüleyici	CAMAG Reprostar 3
HPTLC immersiyeon sistemi	CAMAG Automatic Developing Chamber 2 (ADC2)
HPTLC otomatik örnek uygulayıcısı	CAMAG Automatic TLC Sampler 4 (ATS4)
GC/FID	Agilent 6890N (SEM Ltd, İstanbul, Türkiye)
GC/MSD sistemi	Agilent 5975 (USA; SEM Ltd., İstanbul, Türkiye)
Liyofilizatör (Freeze Dryer)	Labconco Freezone 6 Plus
Manyetik karıştırıcı	Heidolph MR Hei- Standard, Germany
Mikro-plak okuyucu	Biotek Instruments Inc, Highland Park Winooski, USA
Otomatik pipetör	8-12 kanallı Eppendorf Research plus
pH Metre	WTW grup, InoLab, pH 7,2
Püskürtücü	Biostep SG e1 DESAGA technology
Rotavapor sistemi	Heidolph, Laborota 4010-Digital
Santrifüj	Eppendorf 5804
Spektrofotometre	UV-PharmaSpec1700, Shimadzu
Ultrasonik su banyosu	Elma, S100H, Almanya
UV spektrofotometre	SHIMADZU UV-1601, Japonya
Vortex	ISOLAB Laborgeräte GmbH MX-S

3.3. Bitkisel Materyal

Bitkisel materyal olarak *Centaurea mucronifera* bitkisinin toprak üstü kısımları kullanılmıştır (Şekil 3.1). Bitki örneği B6: Sivas: Sivas-Kangal-Gürün yol ayrımı, N 39 07 56,3 E 37 13 48,0 bölgesinde toplanmıştır. Bitkisel materyalin toplanması ve botanik teşhisi Doç. Dr. M. Tekin (Trakya Üniversitesi) tarafından gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Kurutulmuş bitkisel materyal

3.4. Uçucu Yağ Eldesi

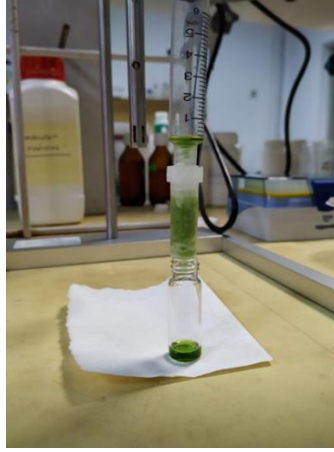
C. mucronifera bitkisinin toprak üstü kısmı çürümüş ve taze olmayan bitki parçaları ayrıldıktan sonra uçucu yağ (CMUY) elde etmek için uygun boyuta getirilmiştir. Avrupa Farmakopesine uygun Clevenger apareyinde hidrodistilasyon işlemine (3 saat) tabi tutulmuştur (Şekil 3.2.). Uçucu yağ miktarı az olduğu için hekzanda çözülerek alınmıştır. Daha sonra çözücü uçucu yağdan azot gazı altında uzaklaştırılmıştır. Yağ verimi kuru hava bitkisi üzerinden hesaplanmıştır (% h/a). Uçucu yağ numunesi amber renkli cam vial içerisinde +4°C’de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.2. *C. mucronifera* bitkisel materyalinin Clevenger apareyinde hidrodistilasyonu

3.5. Sabit Yağ Asitlerinin Eldesi

Sabit yağ asitleri (CMSY) ekstraksiyonu için kurutulmuş bitkinin yaprak ve çiçek kapitulumları tartılıp havanda toz haline getirilmiştir. Toz bitkisel materyalden lipitleri ekstre etmek için Fatty Acid Extraction Kit kullanılmıştır (Möller, 2019). Kit için önerilen prosedüre göre, 0,2 gr toz bitkisel materyal cam tüpe aktarılıp üzerine kloroform -metanol ekstraksiyon çözeltisi (3 mL) eklenmiştir. Karışım homojenizatörde homojenize edilip (15.000 rpm, 5 dk) üzerine 0,5 mL tampon çözeltisi eklenmiştir. Karışım vortex cihazında karıştırıldıktan sonra 1-2 dk bekletilmiştir. Süre sonunda faz ayrımı gerçekleşerek lipid bileşikleri içeren kloroformlu çözelti, tampon sulu fazından ayrılmıştır. Tüpün alt kısmında bulunan kloroformlu faz pipet ile alınarak başka bir vialle aktarılmıştır. Daha sonra ekstre Kit içinde bulunan özel enjektör yardımıyla kartuş filtresinden geçirilerek sadece lipid içeren berrak bir çözelti elde edilmiştir (Şekil 3.3.). Bu çözelti total lipid ekstresidir. Ekstrenin içinde bulunan sabit yağ asitlerinin analizi trans esterifikasyon işlemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, elde edilen ekstreten 200 µL alınarak azot gazı altında kurutulmuş ve üzerine 0,1 mL Boron Triflorür (BF₃) reaktifi ve 0,3 mL *n*-hekzan eklenerek geri çeviren soğutucu altında 95°C’de 1 saat ısıtılmıştır. Süre sonunda karışım üzerine 0,1 mL *n*-hekzan ve 0,1 mL distile su eklenip vortex yardımı ile karıştırılıp 1 dk bekletildikten sonra yeniden bir faz ayrımı oluşturulmuştur. Transesterifikasyon işlemi sonucunda elde edilen yağ asit metil esterlerini içeren organik faz pipetör ile amber vialle aktarılıp +4°C’de muhafaza edilmiştir. Karışım, gaz kromatografik analizi öncesinde azot gazı altında yoğunlaştırılmıştır.



Şekil 3.3. *C. mucronifera* toplam lipit ekstraksiyonu

3.6. Ekstrelerin Eldesi

Bitkisel materyalden farklı polaritedeki çözücüler ile üç ekstre elde edilmiştir. Bu amaçla bitkinin toprak üstü kısmından 20 gr tartılıp uygun boyuta getirildikten sonra sırayla *n*-hekzan, metanol ve distile su ile karıştırıcıda mesare edilmiştir (24×2 saat) (Şekil 3.4.). Elde edilen *n*-hekzanlı (CMHE) ve metanollü (CMME) ekstrater rotavaporda düşük basınç altında yoğunlaştırılmıştır (Şekil 3.5.). Distile su ile hazırlanan ekstre (CMSE) ise buzlukta dondurulduktan sonra vakum altında liyofilize edilerek kurutulmuştur. Ekstrelerin verimleri kuru bitki üzerinden hesaplanmıştır. Elde edilen tüm ekstrater amber vial içinde +4°C’de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.4. Bitkisel materyallerin çalkalayıcıda maserasyonu



Şekil 3.5. *C. mucronifera* sıvı ekstrelerinin döner buharlaştırıcıda yoğunlaştırılması

3.7. Gaz Kromatografisi Analizi

Elde edilen uçucu yağın ve sabit yağ metil esterlerin kimyasal kompozisyonları, gaz kromatografik tekniği ile araştırılmıştır. Bu amaçla uçucu yağ çözeltisi *n*-hekzan içinde (%10, v/v) hazırlanmıştır. Sabit yağ asitlerinin metil esterlerinin çözeltisi analiz öncesi *n*-hekzan ile seyreltilerek analiz için hazırlanmıştır. Uçucu yağın ve sabit yağ asitlerinin kimyasal kompozisyonları GC-FID ve GC/MS teknikleriyle aydınlatılmıştır (Şekil 3.6.). Her iki analiz için de HP-Innowax FSC kolonu (60 m × 0.25 µm, 0.25 µm film kalınlığı, Agilent, Walt & Jennings Scientific, Wilmington, DE, USA) ve taşıyıcı gaz olarak helyum gazı kullanılmıştır. Fırın 60 °C’de 10 dakika kaldıktan sonra 220 °C’ye dakikada 4 °C ile çıkıp, 220 °C’de 10 dakika kalıp, 240 °C’ye dakikada 1 °C ile çıkmak üzere programlanmıştır. Split oranı 40:1 olarak seçilmiştir. Alev iyonlaşma detektörü ve enjektör 250°C’de tutulmuştur. Kütle spektrumu 70 eV, kütle menzili 35-450 m/z seçilmiştir (Özek vd., 2022).



Şekil 3.6. GC-MS/FID sistemi

3.8. Uçucu Bileşiklerin Teşhisi

Maddelerin tanımlanmasında tutunma zamanları ve kütle spektrumları standartlara ve literatür bilgilerine paralel olarak değerlendirilmiştir. Wiley GC/MS Library (Wiley, New York, NY, USA) (<http-3>), MassFinder software 4.0 (Dr. Hochmuth Scientific Consulting, Hamburg) (Joulain, König ve Hochmuth, 2001). Adams Library (Adams, 2007), Başer Library of Essential Oil Constituents (Berger, 2007) kaynak olarak kullanılmıştır. Madde miktarların belirlenmesinde alev iyonlaşma dedektöründen (FID) elde edilen piklerin yüzde alanları kullanılmıştır.

3.9. Sıvı Kromatografisi Analizi

Elde edilen ekstreler %10 olacak şekilde metanollü ekstre metanolde, sulu ekstre suda çözülerek analiz için hazırlanmıştır. Sıvı kromatografik analizi aşağıda belirtilen şartlarda gerçekleştirilmiştir.

Sistem : Shimadzu 20A HPLC - ABSciex 3200 Q trap MS/MS (Şekil 3.7.)

Metod : Negatif İyonlaşma Metodu

Kolon : GL Science Intersil ODS 4.6 × 250, 5 µ

Kolon Sıcaklığı : 40°C

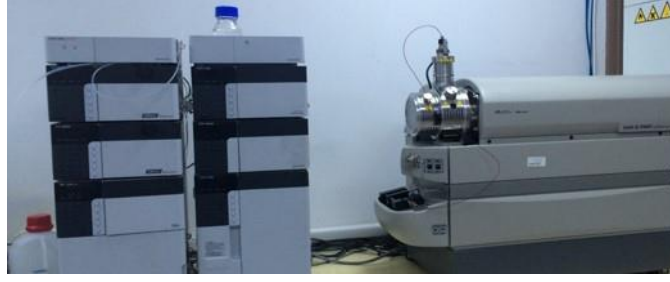
Hareketli Faz : (A) Su: Asetonitril: Formik asit (89:10:1)

(B) Asetonitril: Su: Formik asit (89:10:1)

Akış Hızı : 0.7 mL/dk

B çözücüsünün konsantrasyonu %10'dan başlanarak 40 dk.'da %100 olacak şekilde gradient olarak ayarlanmıştır

Sıvı Kromatografisi- Elektrosprey İyonizasyon- Kütle Spektrometri (LC-ESI-MS/MS) tandeminin sağladığı datalar Analyst 1.6 yazılımı tarafından toplanmış ve işlenmiştir. Geliştirilmiş kütle taraması (EMS) için kütle spektrometresi 100-1000 amu kütle aralığında çalıştırılmıştır. Geliştirilmiş numune iyonlarının spektrumları m/z 100 ve m/z 1000'e aralığında ölçülmüştür. Azot çarpışma gazı olarak kullanılmış ve çarpışma enerjisi 30 olarak ayarlanmıştır. Parametreler aşağıdaki gibidir: çarpışma enerji dağılımı (CES) -0, koşullandırma potansiyeli (DP) 20, giriş potansiyeli (EP) 10, perde gaz (CUR) 20, kaynak gaz 1 (GS1) 50, kaynak gaz 2 (GS2) 50, CAD-medium, ve sıcaklık (TEM) 600. Bilgiye bağlı kazanım (IDA) deneyi için kriterler, 100.000 m/z'den daha büyük ve 1000 m/z'den küçük iyonlar için düzenlenmiştir.



Şekil 3.7. Shimadzu 20A HPLC - ABSciex 3200 Q trap MS/MS sistemi

3.10. Toplam Fenol Miktar Tayini (TPC)

Bitkilerin toplam fenolik bileşik içeriğini tespit etmek için Folin-Ciocalteu (FC) reaktifi kullanılarak spektrofotometrik yöntem uygulanmıştır. Bu yöntemin ilkesi bir redoks reaksiyonuna dayanmaktadır. Fenolik bileşikler alkali ortamda (sodyum karbonattan dolayı) çözündüğünde fenolat tipi bileşikler oluşur. FC reaktifinde bulunan ağır metaller Mo ve Wo fenolatlarla elektron transferine dayalı bir tepkimeye girer. Tepkime sonucunda metal redüklenir, fenolik bileşikler ise oksitlenir. Sonuçta maviden mora dönük renk değişimi oluşmuştur (Şekil 3.8.).



Fenolik bileşikler bazik bir ortamda Folin-Ciocalteu ayıracını indirgeyerek oksitlenmiş forma dönüşür ve oluşan mavi renkli bileşiğin spektrofotometrede 760 nm dalga boyunda okuması yapılır. Standart madde ile kıyaslanarak fenolik madde miktarı belirlenmektedir (Özkan vd. 2007). Deneyde, 96-derin kuyucuklu plak kuyucuğuna 12 kanallı otomatik pipetörle (Eppendorf) sırayla 20 µL numune (ekstre/gallik asit), 1560 µL saf su, 100 µL Folin-Ciocalteu reaktifi ve 300 µL sodyum karbonat çözeltisi aktararak karıştırılmıştır. Karışım karanlıkta 2 saat süre ile inkübe edilmiştir. Süre sonunda karışımdan 300 µL alınarak 96-kuyucuklu mikropalak'a aktarılıp absorbans değerleri plak okuyucuda 760 nm'de ölçülmüştür. Standart fenolik bileşik olarak gallik asit kullanılmıştır. Gallik asit kalibrasyon eğrisi üzerinden ekstredeki toplam fenol miktarı hesaplanmıştır. Deney 3×3 kez tekrarlanmıştır. Gallik asidin farklı konsantrasyonlarda çözeltileri kullanılarak absorbans değerlerinin ortalaması alınıp kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Oluşturulan grafiğin r^2 'si bulunmuş ve $y=a \times x+b$ cinsinden denklemi oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrisi denklemi kullanarak ekstrelerdeki toplam fenol miktarı, g ekstrede mg gallik asite eşdeğer olarak (mgGAE/g_{ekstre}) hesaplanmıştır.



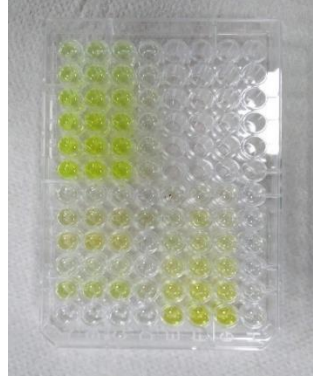
Şekil 3.8. Ekstrelerin Folin-Ciocalteu reaktifi ile tepkime sonucunda meydana gelen renk değişimi

Reaktiflerin hazırlanması:

- 1) Sodyum karbonat çözeltisi: 20 g Na_2CO_3 tartılıp 100 mL distile suyla tamamlanarak %20'lik sodyum bikarbonat hazırlanmıştır.
- 2) Gallik asit çözeltisi: Gallik asit 3 mg tartılıp üzerine 3 mL %10 DMSO içeren metanol eklenmiştir. Gallik asit 1 mg/mL'lik stok çözeltisi hazırlandıktan sonra 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; 0,1 mg/mL'lik konsantrasyonlara seyreltilmiştir.

3.11. Toplam Flavonoit Miktar Tayini (TFC)

Flavonoitler kimyasal yapıları gereği metaller ile şelat tipi renkli bileşikler oluştururlar. Ekstrelerdeki toplam flavonoid miktarları, AlCl_3 reaktifi kullanılarak rutin ve kersetine eşdeğer olarak tayin edilmiştir (Koşar, Göger ve Başer, 2011). Deneyde, 96-kuyucuklu plağa 12-kanallı otomatik pipetörle (Eppendorf) sırayla 80 μL numune (ekstre/ standart madde) çözeltisi (10 mg/mL), 80 μL AlCl_3 çözeltisi ve 1840 μL absolü etanol eklenmiştir. “Blank” olarak kullanılacak numunelerin üzerine AlCl_3 yerine 10 μL asetik asit (% 99,8) eklenmiştir. Karışım karıştırıldıktan sonra karanlıkta 40 dk süre ile inkübe edilmiştir. Süre sonunda karışımdan 300 μL alınarak 96-kuyucuklu mikropolağa aktarılmıştır (Şekil 3.9.). Absorbans değerleri plak okuyucuda 415 nm’de ölçülmüştür. Bulunan absorbans değerlerinin ortalaması alınarak rutin ve kersetin kalibrasyon eğrisi çizilmiş, denklem ve r^2 değerleri elde edilmiştir. Deney 3×3 tekrar yapılarak sonuçlar hem rutine hem kersetine eşdeğer olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.9. Ekstrelerin $AlCl_3$ reaktifi ile tepkime sonucunda meydana gelen renk değişimi

Reaktiflerin hazırlanması:

- 1) Alüminyum klorür çözeltisi: 2 g $AlCl_3$ tartılarak 100 ml saf suda çözülmüştür.
- 2) Asetik asit çözeltisi: 85 mL saf su üzerine 15 mL asetik asit eklenerek hazırlanmıştır.
- 3) Rutin çözeltisi (1-0,1 mg/mL): 4 mg rutin tartılıp ve 1; 0,8; 0,4; 0,2; 0,1 mg/mL'lik konsantrasyonlara seyreltilmiştir.
- 4) Kersetin çözeltisi (1-0,1 mg/mL): 4 mg kersetin tartılıp 4 mL'ye %10'luk DMSO içeren metanol ile tamamlanmış ve 1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 ve 0,1 mg/mL'lik konsantrasyonlara seyreltilmiştir.

3.12. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

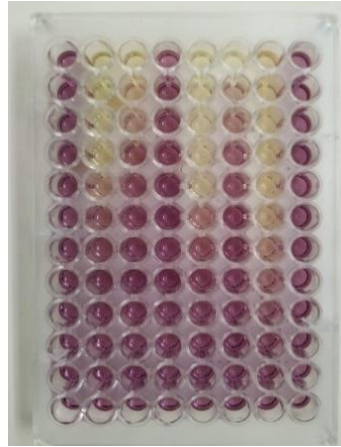
Biyolojik aktivite için test edilecek kuru ekstrelerin ve uçucu yağın çözeltileri (10 mg/mL) %10 DMSO içeren metanolde hazırlanmıştır. Çözeltiler santrifüj (5 dk 5.000 rpm) edilip amber vialde muhafaza edilmiştir.

3.12.1. Serbest radikal (DPPH)[•] süpürücü etkisi

DPPH[•] bir hidrojen atomu verebilen bileşiklerle reaksiyona giren kararlı bir serbest radikaldir. Bu yöntem antioksidan maddenin etkisi ile DPPH[•] serbest radikalının DPPH molekülüne indirgenmesine dayanır. Antioksidanın serbest radikal süpürücü aktivitesi 517 nm'de absorpsiyon değişimine göre değerlendirilir (Krishnaiah, Sarbatly ve Nithyanandam, 2011). Deneyde, taze hazırlanmış 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikali çözeltisi kullanılmıştır. Standart antioksidan olarak gallik asit, askorbik asit, BHT kullanılmıştır. Bir 96-kuyucuklu plağa 200 µL numune (ekstre/standart madde) 12-kanallı pipetör (Eppendorf Plus) kullanılarak aktarılmıştır. Daha sonra tüm

kuyucuklara 100 µL DPPH çözeltisi eklenmiş ve karanlıkta 30 dk inkübe edilmiştir (Şekil 3.10.). Süre sonunda absorbans değerleri mikropalak okuyucuda 517 nm’de ölçülerek numunelerin serbest radikal süpürücü etkileri tayin edilmiştir. İnhibisyon değerleri %50’nin üzerinde olan numuneler için IC₅₀ değerleri *SigmaPlot* programında hesaplanmıştır. Deney 3×3 kez tekrarlanmıştır. Spektrofotometrede okunan absorbans değerlerine göre kullanılan bileşiklerin (numuneler, gallik asit, askorbik asit, BHT) radikal süpürücü etkileri, kontrol olarak kullanılan %10 DMSO içeren metanol çözeltisine oranla aşağıdaki eşitlikten hesaplanmıştır:

$$\%Inh = \frac{Abs_{kontrol} - Abs_{numune}}{Abs_{kontrol}} \times 100$$



Şekil 3.10. Ekstrelerin DPPH reaktifi ile tepkime sonucunda meydana gelen renk değişimi

Reaktiflerin hazırlanması:

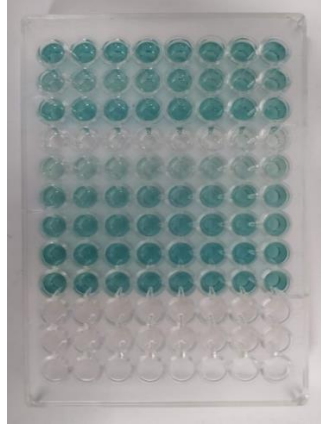
- 1) Numuneler: 2 mg/mL hazırlanmıştır.
- 2) DPPH çözeltisi: 2 mg DPPH %10’luk DMSO içeren metanol ile 25 mL’ye tamamlanıp, vortexde karıştırılır, ışıktan korunarak muhafaza edilmiştir.
- 3) Standart antioksidan çözeltiler: Gallik asit çözeltisi 1 mg/mL’lik stok çözeltiden 100 µL pipetörle çekilip, 900 µL %10’luk DMSO içeren metanol ile tamamlanarak 0,1 mg/mL hazırlanmıştır.
- 4) BHT çözeltisi: 1 mg BHT tartılıp 1 mL %10’luk DMSO içeren metanol eklenerek 01 mg/mL hazırlanmıştır.
- 5) Askorbik asit çözeltisi: 1 mg/mL hazırlanan stok çözeltiden 100 µL alınıp 900 µL %10’luk DMSO içeren metanol eklenerek 0,1 mg/mL hazırlanmıştır.

3.12.2. Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasite (TEAC) değerlendirmesi

TEAC testi, ABTS katyon radikalının 0,7-0,8 absorbans değerleri arasındaki kendine has mavi-yeşil renginin ortamda antioksidan varlığında indirgenerek ortama H⁺ verilmesine dayanır. ABTS, K₂S₂O₈ ile tepkimeye girerek ABTS^{•+} radikali oluşur (Re vd., 1999). Deneyde, derin kuyucuklu plağa 10 µL numuneler (ekstreler ve troloks) eklenmiştir. Karışım üzerine 990 µL ABTS eklenerek 30 dk karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Süre sonunda karışımdan 12-kanallı otomatik pipetör (Eppendorf) ile 300 µL numune mikropolağa aktarılmış ve 734 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür (Şekil 3.11.). Trolox için kalibrasyon eğrisi çizilerek linear doğru denklemi elde edilmiştir. Bu denklem kullanılarak numunelerin gösterdiği Troloksa eşdeğer antioksidan kapasiteleri hesaplanmıştır. İnhibisyon yüzde değerleri aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır:

$$\%Inh = \frac{Abs_{kontrol} - Abs_{numune}}{Abs_{kontrol}} \times 100$$

Abs_{kontrol} ve *Abs_{numune}*, kontrol ve numunelerin 734 nm'de ölçülen absorbans değerleridir.



Şekil 3.11. Ekstrelerin ABTS reaktifi ile tepkime sonucunda meydana gelen renk değişimi

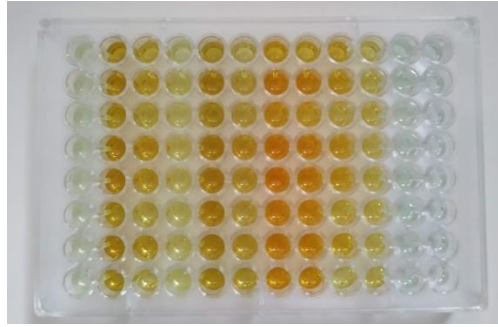
Reaktiflerin hazırlanması:

- 1) ABTS reaktifi çözeltisi (7 mM): 36 mg ABTS ve 6.6 mg potasyum persülfat tartılarak 10 mL suda çözülmüştür. Reaktifin aktif hale gelmesi için oda sıcaklığında 16 saat boyunca karanlıkta bekletilmiştir. Stok çözeltiden 1 mL alınarak UV spektrofotometrede absorbans 0,7-0,8 arasında ayarlanana kadar absolü etanol ile seyreltilmiştir.
- 2) Trolox çözeltisi: 3 mM/mL'lik stok çözeltisi absolü etanolde hazırlanmış ve 2 mM/mL, 1 mM/mL, 0,5 mM/mL, 0,1 mM/mL konsantrasyonlara seyreltilmiştir.

3) Numuneler 2 mg/mL hazırlanmıştır.

3.12.3. Cu(II) iyon redükleyici antioksidan kapasitesi (CUPRAC) değerlendirmesi

Elektron aktarımına dayalı toplam antioksidan belirleme yöntemidir. Deneyde neokuproin-Nc (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) ile $\text{Cu}(\text{Nc})_2$ kompleks oluşturarak açık mavi renkli Cu(II)-neokuproin kompleksi oluşur. Bu kompleks antioksidanlarla tepkimeye girdiği zaman indirgenme sonucu olarak sarı-turuncu renkli Cu(Nc) kompleksi oluşur. İndirgenme sonucu oluşan renk değişiminin absorbans değeri 450 nm’de ölçülerek antioksidan aktivite değerlendirme yapılır (Apak, 2004). Deneyde, 96-kuyucuklu mikroyağa 55 µL numune (ekstre/standart madde), 50 µL bakır(II)klorür, 50 µL amonyum asetat tampon ve 50 µL neokuproin çözeltileri eklenmiştir. Karanlıkta oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildikten sonra 450 nm’de absorbans değeri ölçülmüştür (Şekil 3.12.). Elde edilen absorbans değerleri ile Troloxun kalibrasyon eğrisi oluşturularak denklem elde edilmiştir. Numunelerin antioksidan etkileri troloxla eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Standart olarak 3, 2, 1, 0,5, 0,1 mM konsantrasyonda hazırlanan trolox çözeltileri kullanılmıştır.



Şekil 3.12. Ekstrelerin Cu(II)-neokuproin kompleksi ile tepkime sonucunda meydana gelen renk değişimi

Reaktiflerin hazırlanması:

- 1) Amonyum asetat (NH_4Ac) çözeltisi: Amonyum asetat 1927 g tartılıp 250 mL saf suda çözülmüş ve pH 7 olarak 1,0 M tampon çözeltisi hazırlanmıştır.
- 2) Neokuproin (Nc) çözeltisi: Neokuproin 7,8 mg tartılarak 5 mL %96’lık etanolde çözülmüştür ve derişimi $7,5 \times 10^{-3}$ M olarak hazırlanmıştır.
- 3) Bakır klorür (CuCl_2) çözeltisi: Bakır klorür 6,7 mg tartılarak 5 mL saf suda çözülmüş ve derişimi 1×10^{-2} M olarak hazırlanmıştır.

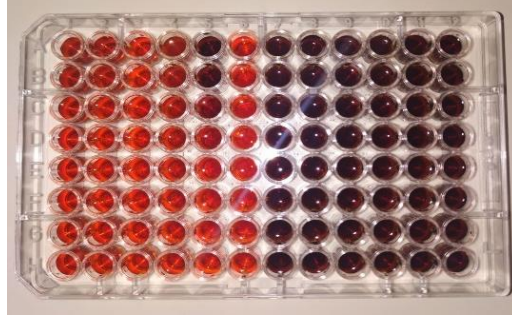
- 4) Trolox çözeltisi: trolox absö etanol ile 3, 2, 1, 0,5 ve 0,1 mM’lık derişimlerde hazırlanmıştır.
- 5) Numuneler 2 mg/mL hazırlanmıştır.

3.12.4. α -Amilaz aktivite değeriendirilmesi

α -Amilaz enzimi karbonhidratların hidroliz sürecini katalize eden bir enzimdir. Ekstre ve uçucu yağın α -amilaz enzim inhibisyonu I_2/KI reaktifi kullanılarak spektrofotometrik yöntem ile tayin edilmiştir (Zengin, 2014). Akarboz, bilinen bir α -amilaz enzim inhibitörüdür. Bu yöntemde α -amilaz inhibe edildiğı durumda nişasta parçalanmaz ve iyotla bağlanarak koyu kahverengi bir renk verir. Ancak ortamda enzimi inhibe eden bir madde bulunmadığında, enzim etkisini korur ve nişasta parçalanır, iyotla bağlanamaz. Sonuç olarak, iyotun rengi değışmez. Deneyde, 96-kuyucuklu plak kuyusuna 50 μ L numune (ekstre/uçucu yağ/akarboz) otomatik pipetör (Eppendorf) kullanılarak konulmuştur (Şekil 3.13.). Deneyde dilüsyon tekniğı uygulanmıştır. 96-kuyucuklu plak kuyusuna 50 μ L enzim çözeltisi eklenmiştir. Her numune için ayrıca blank olarak kullanılacak kuyusuna 50 μ L tampon çözeltisi eklenmiştir. Karışım, karanlıkta 37°C’de 10 dk süre ile inkübe edilmiştir. Süre sonunda tüm karışımların üzerine 50 μ L nişasta çözeltisi eklenmiştir. Karışım, karanlıkta 37°C’de 10 dk süre ile inkübe edilmiştir. Süre sonunda tüm karışımların üzerine sırasıyla 25 μ L HCl çözeltisi ve 100 μ L I_2/KI reaktifi eklenmiştir. Absorbans değeri plak okuyucuda 630 nm’de ölçülmüştür. Okuma sonucu “blank” absorbans değeriinden numunelerin absorbans değeri çıkarılmış ve kontrolün ortalaması alınarak % inhibisyon değeri hesaplanmıştır:

$$\%Inh = \left[\frac{(Abs_{kontrol} - Abs_{kontrol\ blank}) - (Abs_{numune} - Abs_{numune\ blank})}{(Abs_{kontrol} - Abs_{kontrol\ blank})} \right] \times 100$$

Burada, Abs_{numune} ve $Abs_{numune\ blank}$ numune ve numunenin “blanki” için ölçülen absorbans değeriidir. $Abs_{kontrol}$ ve $Abs_{kontrol\ blank}$ kontrol ve kontrol “blanki” için ölçülen absorbans değeriidir.



Şekil 3.13. Numunelerin α -amilaz enzim ile tepkime sonucunda meydana gelen renk değişimi

Reaktiflerin hazırlanması:

- 1) Tampon çözelti: 0,185 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 0,150 g $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılıp 80 mL distile suda çözülmüştür. Çözeltinin pH değeri 6,9 olacak şekilde ayarlanmıştır. 35 mg NaCl tartılarak 20 mL distile suda çözülmüş ve hazırlanan çözeltiye eklenerek tampon hazırlanmıştır.
- 2) Enzim çözeltisi: α -Amilaz enzim 1,23 mg tartılıp üzerine önceden hazırlanmış 20 mL tampon eklenmiştir. Çözelti $+4^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır.
- 3) Nişasta çözeltisi: Nişasta 20 mg tartılıp 40 mL suda çözülmüş ve 10 dk 100°C 'de manyetik karıştırıcı üzerinde ısıtılmıştır.
- 4) Standart madde çözeltisi: Akarboz 0,001 g tartılıp 1 mL saf suda çözülmüştür.
- 5) Hidroklorik asit çözeltisi: 10 mL distile su behere aktarılmış ve üzerine 4.1 mL derişik HCl damla damla eklenmiştir. Karışım balon jojeye aktarılıp distile su ile 50 mL'ye tamamlanmıştır.
- 6) İyot çözeltisi: 0,5 g iyot ve 1,5 g potasyum iyodür tartılarak koyu renkli bir kap içerisinde üzerine 50 mL distile suda eklenerek çözünmenin tam sağlanması için 30 dk otomatik karıştırıcıda karıştırılmıştır.

3.12.5. Antikolinesteraz aktivite değerlerlendirilmesi

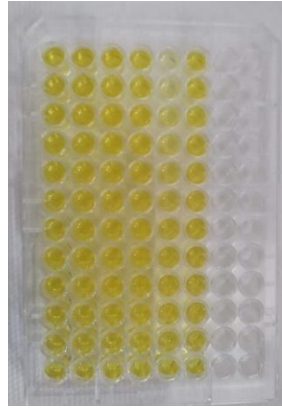
Deney için uçucu yağ ve ekstrelerin 10 mg/mL %10 DMSO'lu metanolün içinde çözeltileri hazırlanmıştır. Standart olarak galantamin çözeltisi kullanılmıştır. 96-kuyucuklu mikropiğa otomatik pipetör (8-kanallı, Eppendorf) yardımıyla sırayla 50 μL numuneler (ekstre/standart madde) eklenmiştir. Asetilkolinesteraz enzimi BSA ile daha iyi çalıştığı için numune seyreltme işlemi Tampon B ile yapılmıştır. Dilüsyon işleminden sonra tüm kuyucuklara 50 μL Tampon B ve 25 μL asetilkolinesteraz enzim çözeltisi eklenmiştir. Karışım 25°C 'de 15 dk inkübe edildikten sonra tüm kuyucuklara 125 μL

Ellman reaktifi (tampon C içinde DTNB) ve 25 µL ATCI çözeltisi eklenmiştir (Şekil 3.14). Numuneden gelen rengi elimine etmek için “blank” testi yapılmıştır. Bu amaçla, deneyin 0. dakikasında ve 15. dakikasında 412 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. 15. dakikada ölçülen absorbans değerlerinden 0. dakikada ölçülen absorbans değerleri çıkarılarak numuneden gelen renk elimine edilmiştir. Deney 3×3 kez tekrarlanmıştır. Kontrolün ortalama absorbans değeri hesaplanmış ve bu değerden numunelerin absorbans değerleri çıkarılmıştır. Numunelerin asetilkolinesteraz enzimini inhibe etme etkileri yüzde inhibisyon olarak aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır:

$$\%Inh = \left[\frac{(Abs_{kontrol} - Abs_{kontrol\ blank}) - (Abs_{numune} - Abs_{numune\ blank})}{(Abs_{kontrol} - Abs_{kontrol\ blank})} \right] \times 100$$

Burada, Abs_{numune} ve Abs_{numuneblank} numune ve numunenin “blanki” için ölçülen absorbans değerleridir. Abs_{kontrol} ve Abs_{kontrolblank} kontrol ve kontrol “blanki” için ölçülen absorbans değerleridir.

Ellman yönteminde asetilkolinin tiyoesteri olan asetiltiyokolin kullanılır. Asetilkolinesteraz enzimi, asetiltiyokolini tiyokolin ve asetat’a kadar hidroliz eder. Oluşan tiyokolin ise reaktif olarak kullanılan DTNB’yi 412 nm’de absorbans veren nitrobenzoata dönüştürür (Ellman vd., 1961).



Şekil 3.14. Numunelerin asetilkolinesteraz enzim üzerindeki etkileri

Reaktiflerin hazırlanması:

- 1) Tampon A (50 mM): tris-HCl 1,514 gr tartılır ve 250 mL ultra saf suda çözülür. Çözeltinin pH değeri 8’e ayarlamak için HCl damla damla eklenerek ayarlanmıştır (yaklaşık 600 µL HCl kullanılmıştır).

- 2) Tampon B (%0,1): 0,04 gr BSA (Bovin Serum Albumin) tartılıp 40 mL Tampon A içinde çözülmüştür.
- 3) Tampon C (0,1 M): 5,8 gr NaCl Buffer A içinde çözülmüş ve 0,406 gr $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (magnezyum klorür hekzahidrat) tartılıp çözeltiye eklenmiştir.
- 4) Substrat çözeltisi (15 mM): 0,086 gr ATCI (asetiltiyokolin iyodür) 20 mL ultra saf suda çözülmüştür.
- 5) Ellman reaktifi (3 mM): Çözelti taze olarak deney önce hazırlanmıştır. 1,188 gr DTNB 100 mL Tampon C içinde çözülerek hazırlanmıştır.
- 6) Enzim çözeltisi: Deneyden hemen önce buzluktan çıkartılarak çözünmesi beklenmiştir. 0,67 mg asetilkolinesteraz (500U) 44,5 mL Tampon A içinde çözülerek 10 U/mL'lik konsantrasyonda hazırlanmıştır.
- 7) Standart madde: Galantamin 2 mg tartılıp 1 mL %10'luk DMSO içeren metanolde çözülmüştür.

3.12.6. HPTLC- biyootografik analiz

C. mucronifera bitkisinden elde edilen uçucu yağ ve ekstrelerin (hekzan/metanol/su) antioksidan aktivitesi biyootografik yöntemle araştırılmıştır. Aktiviteden sorumlu bileşikler DPPH reaktifi ile HPTLC tekniği kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla, uçucu yağ ve ekstreler uygun çözücülerde çözülerek ince tabaka kromatografisi tekniği ile kromatografik ayırımı sağlanarak plak üzerine DPPH reaktifi uygulanmıştır. İnce tabaka kromatografisi için hareketsiz faz olarak silika jel kullanılmıştır. Uçucu yağ ve ekstrede bulunan bileşiklerin ayırımını sağlayacak uygun hareketli faz seçimi gerçekleştirilmiştir. Deneyde uygulanan hareketli fazlar aşağıda verilmiştir:

Sulu ve metanollü ekstreler için uygulanan hareketli fazlar:

- Toluen: EtAc: HCOOH: H₂O (5:100:10:10)
- *n*-Hekzan: EtAc: glasiyel asetik asit (10:6:2)
- Kloroform: EtAc: MeOH (30: 20: 10)
- Diklorometan: MeOH (9:1)

Hekzanlı ekstre ve uçucu yağ için uygulanan hareketli fazlar:

- Toluen: EtAc (95:5)
- Toluen: EtAc (97:3)

Polar ve apolar ekstrelerin ayrımını sağlayacak en uygun hareketli fazlar seçildikten sonra HPTLC tekniği uygulanmıştır. Kromatografik ayırım için uygulanan şartlar ve kullanılan reaktifler hakkındaki bilgiler Tablo 3.3.'de açıklanmıştır.

Tablo 3.3. *C. mucronifera* uçucu yağ ve ekstreleri için uygulanan HPTLC analiz şartları

İşlem	Detay	Sistem
Numune hazırlama	Uçucu yağ ve hekzanlı ekstre 10 mg/mL konsantrasyonda hekzanda Sulu ekstre distile suda metanollü ekstre metanolde 10mg/mL konsantrasyonda hazırlanmıştır.	
Hareketsiz Faz	HPTLC Silica gel 60 _{F254} , 10×10 cm	Merck
Hareketli faz	Uçucu yağ ve hekzanlı ekstre için: Toluen: EtAc; 95:5 Polar ekstreler için: Toluen: EtAc: HCOOH: H ₂ O; 5:100:10:10	CAMAG Automathic TLC Sampler 4
Yürütme	70 mm	CAMAG Automathic Developing Chamber 3
Kurutma	Havada	
Spotların Belirlenmesi	Hız: 5 Süre: 1 sn Tank: 20×10 cm	CAMAG Chromatogram Immersion Device III
Belirteç	Uçucu yağ ve hekzanlı ekstre için anisaldehit reaktifi Polar ekstreler için UV ışığı (254, 366 nm) ve NPR ve PEG reaktifi	CAMAG Reprostar 3

Numunelerde bulunan maddelerin ayrımını gözlemleyebilmek için uçucu yağ ve hekzanlı ekstreler için belirteç olarak anisaldehit reaktifi kullanılmıştır. Polar ekstrelerdeki ayrılan maddelerin belirlenmesi için UV ışık ve NPR-PEG reaktifleri kullanılmıştır (Agudelo vd., 2021).

Numunelerin plak üzerinde ayrımı sağlandıktan sonra antioksidan aktivitesi tespit etmek için %0,1 DPPH in metanol reaktifi plak üzerine uygulanmıştır. Uygulama ve karanlıkta inkübasyondan sonra plak yüzeyi mor renkli olurken, antioksidan aktif olan spotlar sarı renk olarak tespit edilmiştir.

Sonraki aşamada HPTLC CAMAG cihazı kullanılarak numuneler cam silika jel üzerine bantlar şeklinde uygulanmıştır. Aynı şartlarda kromatografik ayrımı gerçekleştirilmiştir. CMHE ve CMUY numuneleri için plaka üzerine anisaldehit reaktifi, CMME ve CMSE için NPR + PEG reaktifleri uygulanmıştır. Plak ısıtıldıktan sonra UV ışığı altında incelenmiştir. Elde edilen kromatogramlarda meydana gelen sarı, yeşil ve mavi flöresans veren spotlar ekstrelerin fenolik grubundan bileşikleri ağırlıkla ihtiva ettiklerini göstermiştir. Polar ekstrelerin detaylı kimyasal incelemesi LC-MS/MS tekniği ile araştırılmıştır.

Reaktiflerin Hazırlanması:

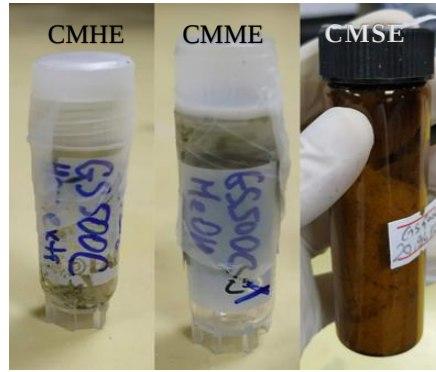
- 1) Anisaldehit reaktifi: anisaldehit (0,5 mL) glasiyel asetik asit ile (10 mL) karıştırılarak 85 mL metanol ve 5 mL derişik sülfürik asit ile hazırlanmıştır. Belirteç uygulandıktan sonra plak 5 dk 100-105°C de ısıtılmıştır. Oluşan renkler UV ve beyaz ışık altında incelenmiştir.
- 2) NPR reaktifi: 1 g difenilborik asit-etilaminoester 100 mL metanolde çözülmüştür. NPR belirteci uygulandıktan sonra plak 100-105°C de ısıtılmış ve PEG reaktifi uygulanmıştır. Oluşan renkler UV (254, 366 nm) ve beyaz ışık altında incelenmiştir.
- 3) PEG reaktifi: 5 g polietilen glikol-4000 100 mL etanolde çözülmüştür.
- 4) DPPH reaktifi: 0.05 g 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil 100 mL metanolde çözülmüş ve karanlıkta muhafaza edilmiştir. Reaktif plak üzerine uygulandıktan sonra plak 15-30 dk karanlıkta inkübe edilmiştir. Süre sonunda plak beyaz ışık altında incelenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Uçucu Yağ ve Ekstrelerin Verim ve Özellikleri

C. mucronifera bitkisinin toprak üstü kısmından Clevenger apareyinde hidrodistilasyon ile yeşilimtrak renkli ve keskin aromatik kokulu uçucu yağ elde edilmiştir (Şekil 4.1). Elde edilen uçucu yağ amber renkli vialle konularak +4°C’de muhafaza edilmiştir.

C. mucronifera toprak üstü kısmından farklı polaritelerdeki çözücülerle elde edilen ekstraller döner buharlaştırıcıda vakum altında ve liyofilizatörde kurutulup Eppendorf tüplerine konularak +4°C’de muhafaza edilmiştir (Şekil 4.1). Hekzanlı ekstre hafif kokulu sarı-yeşil rengindedir, metanollü ekstre ise yapışkan karakterli ve koyu yeşil renklidir. Sulu ekstre higroskopik sarı-bej renkli toz şeklinde elde edilmiştir.



Şekil 4.1. Kuru ekstraller

Uçucu yağ ve ekstrallerin kurutulmasıyla elde edilen verim bilgileri Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. *C. mucronifera* topraküstü kısmından elde edilen uçucu yağ ve farklı çözücülerle hazırlanan ekstrallerin verimleri

	Elde edilen yağ/ekstre, gr	Verim, %
Uçucu yağ (CMUY)	0,005	0,01
Hekzanlı ekstre (CMHE)	0,18	0,90
Metanollü ekstre (CMME)	1,38	6,90
Sulu ekstre (CMSE)	1,88	9,41

4.2. Fitokimyasal Araştırmaların Sonuçları

4.2.1. Uçucu yağ kimyasal kompozisyonu

C. mucronifera bitkisinin toprak üstü kısımlarından distile edilen uçucu yağın kimyasal kompozisyonu gaz kromatografi tekniği ile incelenmiştir. Bileşenlerin kalitatif analizinde GC/MS, kantitatif analizinde ise GC-FID tekniği kullanılmıştır. Uçucu yağda tespit edilen bileşikler HP-Innowax kapiler kolondan çıkış zamanına göre Tablo 4.2.'de listelenmiştir.

Tablo 4.2. *C. mucronifera* topraküstü kısmından elde edilen uçucu yağ kimyasal kompozisyonu

No	RRI	Bileşik	%
1	1032	α -Pinen	0,7
2	1076	Kamfen	e
3	1093	Hekzanal	0,1
4	1118	β -Pinen	0,2
5	1158	Thuja-2,4(10)-dien	0,1
6	1188	α -Terpinen	0,1
7	1192	2-Heptanon	e
8	1200	Dodekan	t
9	1194	Heptanal	e
10	1203	Limonen	0,2
11	1220	<i>p</i> -Menta-1,3,6-trien	e
12	1225	(<i>Z</i>)-3-Hekzenal	0,2
13	1226	Amil furan (=2-Pentil furan)	0,3
14	1255	γ -Terpinen	e
15	1280	<i>p</i> -Simen	0,1
16	1296	Oktanal	e
17	1304	1-Okten-3-on	0,1
18	1400	Tetradekan	e
19	1402	Nonanal	0,1
20	1441	Dihidro-mirsenol	0,1
21	1477	4,8-Epoksiterpinolen	0,3
22	1492	Siklosativen	e
23	1497	α -Kopaen	0,2
24	1498	2-Etil hekzanol	0,3
25	1499	α -Kamfolen aldehit (=Kamfolenal)	0,3
26	1536	Pinokamfon	0,3
27	1541	Benzaldehit	0,6
28	1562	Oktanol	0,1
29	1586	Pinokarvon	0,3
30	1611	Terpinen-4-ol	0,2

Tablo 4.2. (devam) *C. mucronifera* topraküstü kısmından elde edilen uçucu yağ kimyasal kompozisyonu

No	RRI	Bileşik	%
31	1648	Mirtenal	0,5
32	1655	(<i>E</i>)-2-Desenal	0,1
33	1663	Fenilasetaldehit (=Benzen asetaldehit)	1,3
34	1670	<i>trans</i> -Pinokarveol	1,0
35	1700	Heptadekan	0,1
36	1683	<i>trans</i> -Verbenol	1,1
37	1706	α -Terpineol	0,2
38	1722	Dodekanal (=Laurik aldehit)	0,1
39	1742	β -Selenin	0,2
40	1745	Verbenon	1,1
41	1751	Karvon	0,1
42	1764	(<i>E</i>)-2-Undesenal	0,1
43	1766	1-Dekanol	0,3
44	1797	<i>p</i> -Metilasetofenon	0,2
45	1804	Mirtenol	0,3
46	1830	Tridekanal	0,6
47	1838	(<i>E</i>)- β -Damassenon	0,2
48	1845	(<i>E</i>)-Anetol	0,5
49	1846	<i>trans</i> -Karveol	0,3
50	1864	<i>p</i> -Simen-8-ol	0,1
51	1868	(<i>E</i>)-Geranil aseton	0,3
52	1880	1-İzobutil 4-izopropil 3-izopropil-2,2-dimetil suksinat (= 2,2,4-trimetil-3-karboksiizopropil-izobutil pentanoat)	12,5
53	1887	2-Metil-2,2-dimetil-1-(2-hidroksi-1-metiletil)propil propanoat*	6,4
54	1945	1,5-Epoksi-salvial-4(14)-en	3,1
55	1958	(<i>E</i>)- β -İonon	0,4
56	1973	1-Dodekanol	0,5
57	2008	Karyofillen oksit	3,3
58	2021	2-Pentadekanon	0,1
59	2041	Pentadekanal	0,4
60	2042	Salvial-4(14)-en-1-on	0,5
61	2057	Ledol	0,1
62	2071	Humulen epoksit II	0,5
63	2131	Hekzahidro-farnezilaseton (= 6,10,14-trimetil-2-pentadekanon)	1,2
64	2138	Salviadienol	0,3
65	2144	Spatulenol	4,3
66	2179	Nor-kopaanon	0,7
67	2180	3,4-Dimetil-5-pentyliden-2(5H)-furanon (= Bovolit)	0,6
68	2186	Öjenol	0,3
69	2209	T-Muurolol	0,6
70	2239	Karvakrol	1,2

Tablo 4.2. (devam) *C. mucronifera* topraküstü kısmından elde edilen uçucu yağ kimyasal kompozisyonu

No	RRI	Bileşik	%
71	2243	Klovenol	0,2
72	2247	<i>trans</i> - α -Bergamotol	0,4
73	2257	β -Ödesmol+Torilenol (= 1-hidroksi-6,8-siklo-4(14)-ödesmen)	0,8
74	2289	4-Okso- α -ylangen (=Mustakon)	1,9
75	2316	Karyofilladienol-I	0,7
76	2320	14-Nor-kadin-5-en-4-on izomer A	0,5
77	2389	Karyofillenol-I (=karyofilla-2(12),6-dien-5- α -ol)	1,0
78	2368	Ödesma-4(15),7-dien-1- β -ol	0,8
79	2392	Karyofillenol-II (=karyofilla-2(12),6-dien-5- β -ol)	1,8
80	2500	Pentakosan	0,3
81	2503	Dodekanoik asit (=Laurik asit)	1,9
82	2670	Tetradekanoik asit (= Miristik asit)	2,2
83	2700	Heptakosan	2,9
84	2822	Pentadekanoik asit	1,4
85	2931	Hekzadekanoik asit	21,6
Toplam			89,0

RRI: relatif tutunma indisi; **e:** eser, $\leq 0,1$; % miktarları FID dedektör verilerine göre verilmiştir.

4.2.2. Sabit yağ asitlerinin kimyasal kompozisyonu

C. mucronifera çiçeklerinden elde edilen sabit yağ asitlerinin metillenmiş türevlerinin kalitatif analizinde GC/MS, kantitatif analizinde ise GC-FID tekniği kullanılmıştır. Sabit yağ asitleri HP-Innowax kapiler kolondan çıkış zamanına göre Tablo 4.3’de listelenmiştir.

Tablo 4.3. *C. mucronifera* topraküstü kısmından elde edilen sabit yağ kimyasal kompozisyonu

No	RRI	Bileşik	%
1	1810	Metil dodekanoat (=M. laurat)	2,7
2	2018	Metil tetradekanoat (=M. miristat)	1,1
3	2020	İzopropil miristat	0,6
4	2095	Metil pentadekanoat	0,5
5	2223	Metil hekzadekanoat (=M. palmitat)	24,8
6	2231	Metil (<i>E</i>)-3-Hekzadekanoat	1,2
7	2323	Metil heptadekanoat	0,4
8	2436	Metil oktadekanoat (=M. stearat)	7,2
9	2468	Metil oleat	4,9
10	2509	(<i>Z,Z</i>)-9,12-Metil oktadekadienoat (=M. linoleat)	11,6
11	2515	Metil nonadekanoat	22,6

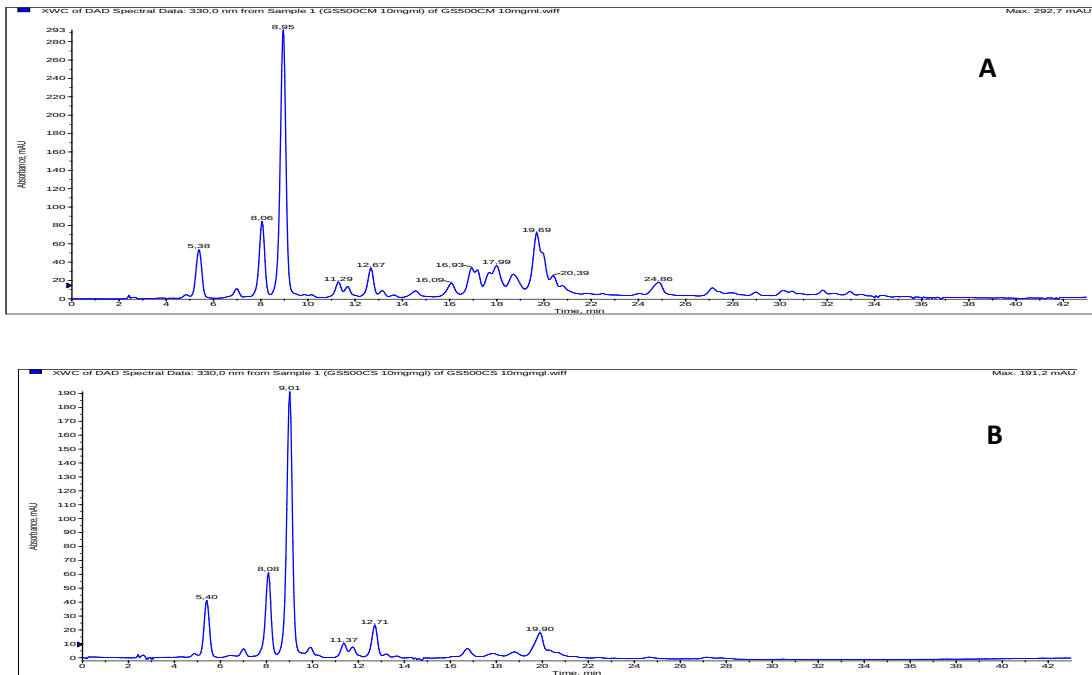
Tablo 4.3. (devam) *C. mucronifera* topraküstü kısmından elde edilen sabit yağ kimyasal kompozisyonu

No	RRI	Bileşik	%
12	2572	Metil linolenat	14,5
13	2634	Metil eikosanoat (=M. araşidat)	2,3
14	2841	Metil behenat (=M. dokosanoat)	2,4
Toplam			96,8

RRI: relatif tutunma indisi; % miktarları FID dedektör verilerine göre verilmiştir

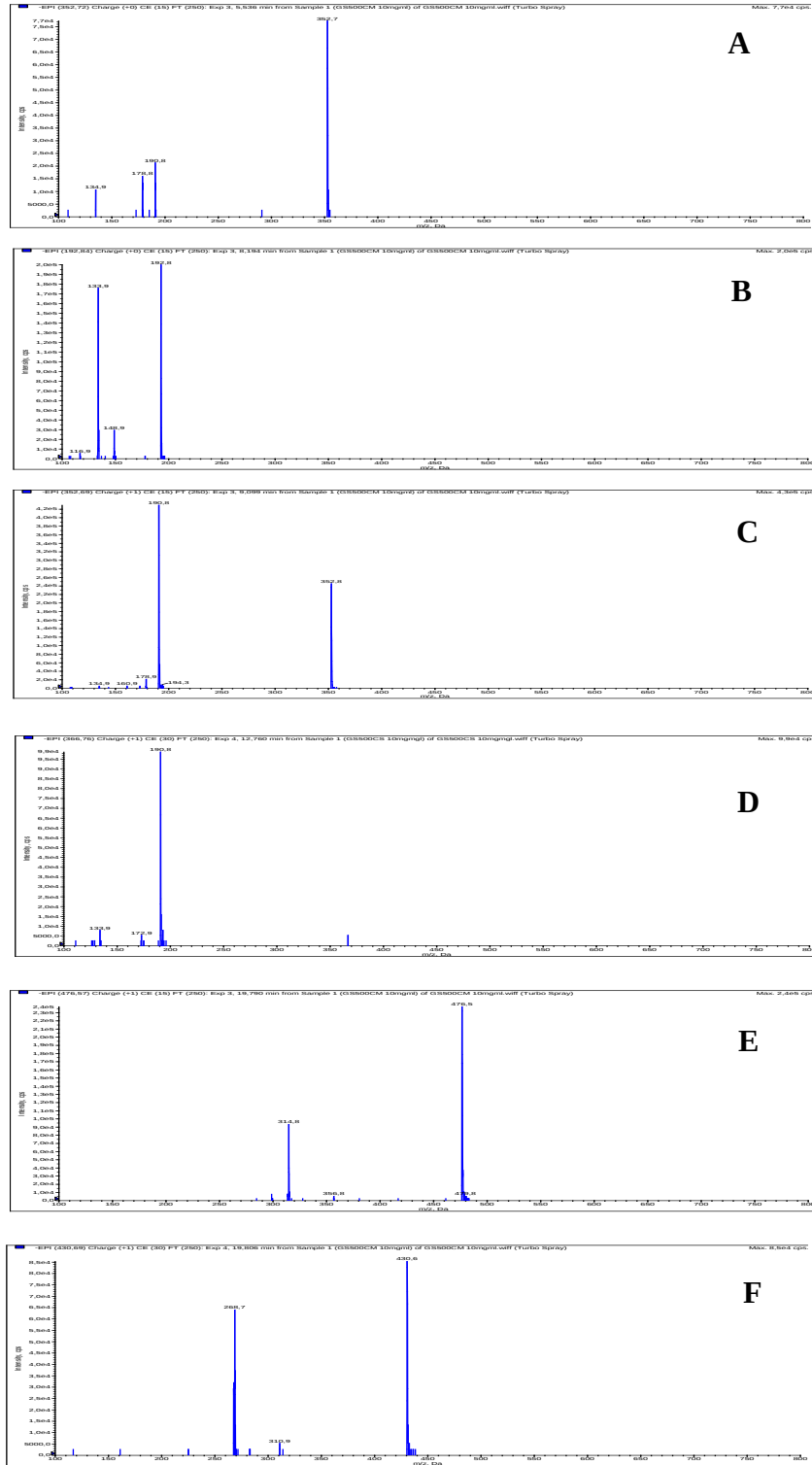
4.2.3. Ekstrelerin kimyasal kompozisyonu

C. mucronifera toprak üstü kısmından hekzan, metanol ve su ile elde edilen ekstrelerin kimyasal kompozisyonları LC-MS tekniği ile incelenmiştir. Ekstrelerin kromatografik profilleri birbirilerine benzer olup ana bileşikler olarak fenolik asit ve flavonoit türevleri tespit edilmiştir. Şekil 4.2’de *C. mucronifera* metanollü ve sulu ekstrelerinde bulunan bileşiklerin sıvı kromatografisi tekniği ile ayırım sonucu (kromatogramı) gösterilmiştir.



Şekil 4.2. *C. mucronifera* metanollü (A) ve sulu (B) ekstrelerinin LC-MS kromatogramı

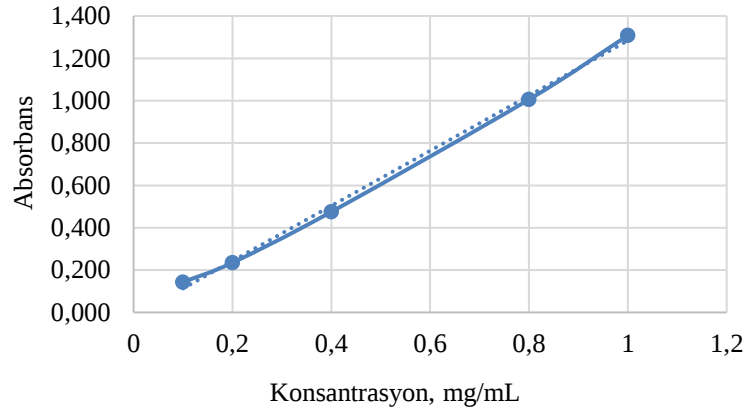
Kütle spektrum parçalanma özelliklerine göre ekstrelerde tespit edilen bileşiklerin spektrumları Şekil 4.3’de verilmiştir:



Şekil 4.3. *C. mucronifera* metanollü ekstrelerinde tespit edilen bileşiklerin kütle spektrumları: A: 1-kaffeoylquinik asit; B: ferulik asit; C: 5-kaffeoylquinik asit; D: feruloylquinik asit; E: metil kersetin glukoze; F: metil apigenin glukoze.

4.2.4. Ekstrelerin toplam fenol miktarı

C. mucronifera toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstrelerde toplam fenol miktarı Folin-Ciocalteu reaktifiyle spektrofotometrik olarak saptanmıştır. Standart madde olarak gallik asit kullanılmış ve numunelerde toplam fenol miktarı gallik asite eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.4’de yer alan kalibrasyon eğrisi gallik asit beş dilüsyon (0,1-1,0 mg/mL) çözeltileri kullanılarak elde edilmiştir.



Şekil 4.4. Gallik asit kalibrasyon eğrisi

C. mucronifera polar ekstrelerinin toplam fenol miktarları üç deney sonucunda elde edilen gallik asite eşdeğer ortalama verileri Tablo 4.4’de verilmiştir.

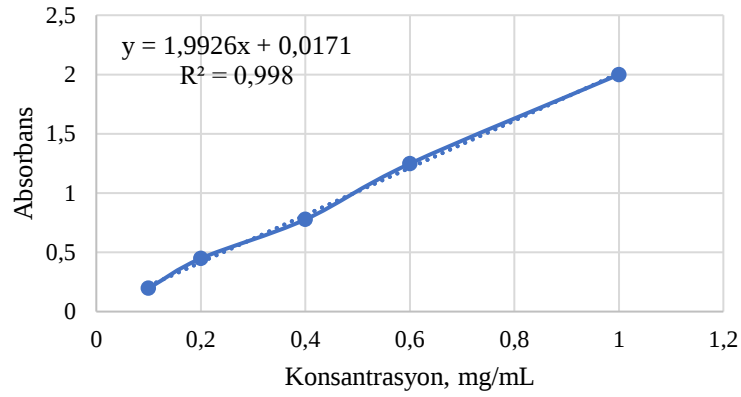
Tablo 4.4. *C. mucronifera* bitkisinin toprak üstü kısımlarına ait ekstrelerinin toplam fenol miktarı

Ekstre türü	Toplam Fenol Miktarı, (Ort±SS) GAEmg/g _{ekstre}
CMHE	6,78 ± 0,09
CMME	50,54 ± 2,23
CMSE	27,93 ± 1,39

CMHE: *C. mucronifera* hekzanlı ekstre, CMME: *C. mucronifera* metanollü ekstre, CMSE: *C. mucronifera* sulu ekstre, GAEmg/g_{ekstre}: 1 g ekstradaki gallik asite eşdeğer fenol miktarı.

4.2.5. Ekstrelerin toplam flavonoid miktarı

C. mucronifera bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen hekzanlı, metanollü ve sulu ekstrelerdeki toplam flavonoid miktarı, AlCl₃ ile oluşturduğu şelat renginin spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile tespit edilmiştir. Flavonoid miktarları hesaplamasında kersetin için elde edilen kalibrasyon eğrisi denklemi kullanılmıştır (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Kersetin kalibrasyon eğrisi

Üç tekrarlama sonucunda hesaplanan kersetine eşdeğer flavonoid miktarının ortalama değerleri Tablo 4.5’de verilmiştir.

Tablo 4.5. *C. mucronifera* ekstralarında toplam flavonoid miktarı

Ekstre türü	Toplam Flavonoid Miktarı (Ort±SS), KE mg/g _{ekstre}
CMHE	2,12 ± 0,28
CMME	18,93 ± 2,33
CMSE	5,44 ± 0,63

CMHE: *C. mucronifera* hekzanlı ekstre, CMME: metanollü ekstre, CMSE: sulu ekstre, KE mg/g ekstre: 1 g ekstradaki kersetine eşdeğer flavonoid miktarı, RE mg/g ekstre: 1 g ekstradaki rutine eşdeğer flavonoid miktarı.

4.3. Biyolojik Aktivite Sonuçları

4.3.1. Serbest radikal (DPPH) süpürücü etki verileri

C. mucronifera bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen hekzanlı, metanollü ve sulu ekstratlar ve uçucu yağın serbest radikal süpürücü etkileri DPPH radikalinin indirgenmesiyle oluşan renk değişiminin absorbans değerinin spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile tespit edilmiştir. Serbest radikal süpürücü aktivite % inhibisyon formülü ile hesaplanmıştır:

$$\%Inh = \frac{Abs\ kontrol - Abs\ numune}{Abs\ kontrol} \times 100$$

Test numunelerinin yüzde inhibisyon değerleri standart antioksidan maddeler olan gallik asit, BHT ve askorbik asit değerleriyle kıyaslanmıştır. İnhibisyon değerleri %50’den büyük olan numuneler için IC₅₀ (DPPH absorbansını yarıya indiren numunenin

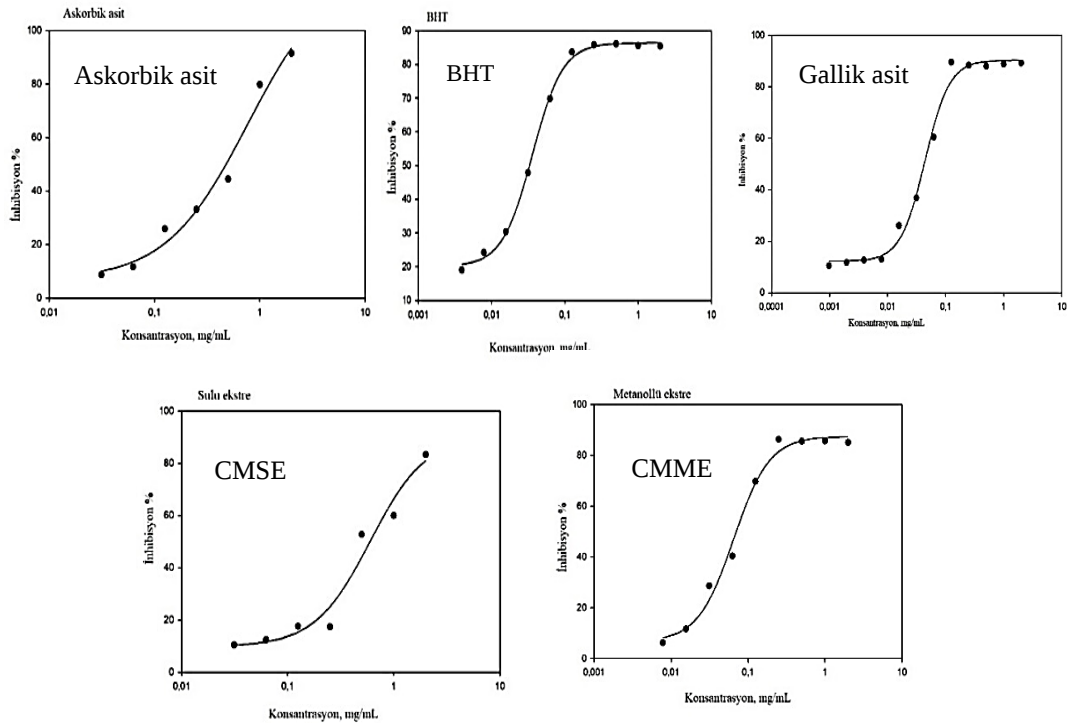
konsantrasyonu) değerleri *SigmaPlot* 12.0 programı kullanılarak hesaplanmıştır (Tablo 4.6.).

Tablo 4.6. *C. mucronifera* ekstre ve uçucu yağının serbest radikal süpürücü etkisi

Ekstre türü	Inh (Ort±SS), %	IC ₅₀ (Ort±SS), mg/mL
CMHE*	4,18 ± 4,69	-
CMME*	84,20 ± 0,88	0,13 ± 0,00
CMSE*	8352 ± 0,19	0,62 ± 0,02
CMUY*	9,04 ± 0,00	-
Gallik asit**	88,60 ± 0,58	0,05 ± 0,00
Askorbik asit**	91,21 ± 0,30	0,61 ± 0,00
BHT‡	83,72 ± 1,77	0,06 ± 0,02

CMHE: *C. mucronifera* hekzanlı ekstre; CMME: *C. mucronifera* metanollü ekstre; CMSE: *C. mucronifera* sulu ekstre; CMUY: *C. mucronifera* uçucu yağ; * ekstre ve yağ derişimi 2 mg/mL; ** 0,1 mg/mL derişimi; ‡ 1,0 mg/mL derişimi

C. mucronifera uçucu yağ ve ekstrelerinin IC₅₀ değerleri hesaplamasında kullanılan eğriler Şekil 4.6’de gösterilmiştir.



Şekil 4.6. *C. mucronifera* uçucu yağ ve ekstrelerinin ve standart antioksidan maddelerin IC₅₀ değerleri

4.3.2. HPTLC-Biyootografik Analiz Sonucu

C. mucronifera uçucu yağ ve ekstralarının serbest radikal süpürücü etkileri mikrotiter plak yöntemi uygulanarak spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Daha sonra numunelerin serbest radikal süpürücü etkileri HPTLC-biyootografik tekniği ile araştırılmıştır. Bu amaçla, numunelerin öncelikle İTK plak üzerinde ayırımı sağlanarak plak üzerine DPPH reaktifi çözeltisi uygulanmıştır. Sonuçlar 30 dk karanlıkta inkübasyondan sonra kaydedilmiştir.

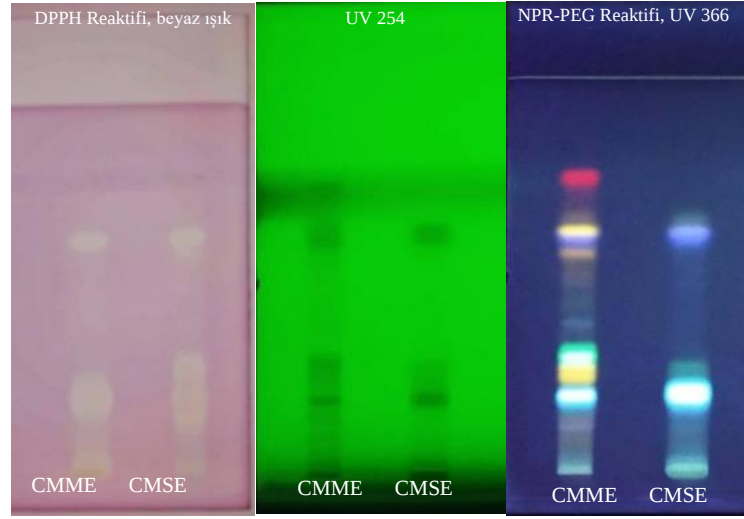
Çalışmanın birinci basamağında uçucu yağ ve ekstraların farklı hareketli fazlar ile ayırımları test edilmiştir. Bu kapsamda polar ekstradaki bileşiklerin ayırımı NPR reaktifi ve PEG reaktifi uygulanarak sonuçlar UV ışığı altında incelenmiştir. Sulu ve metanollü ekstre için en uygun hareketli faz olarak Toluen: EtAc: HCOOH: H₂O (5:100:10:10) karışımı seçilmiştir. Uçucu yağ ve hekzanlı ekstrede bulunan bileşiklerin ayırımı anisaldehit reaktifi ile kontrol edilmiştir. Reaktif uygulandıktan sonra plak 100°C'de 5 dk ısıtılarak sonuçlar beyaz gün ışığı altında incelenmiştir. Hekzanlı ekstre ve uçucu yağ için en uygun hareketli faz olarak Toluen: EtAc (95:5) karışımı seçilmiştir. (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. *C. mucronifera* 'nın hekzanlı ekstre ve uçucu yağın anisaldehit reaktifi ile gösterdiği renk değişimleri

Çalışmanın ikinci basamağında numunelerin serbest radikal süpürücü etkilerinin tespiti için plakta ayrılan bileşikler üzerine DPPH reaktifi uygulanmıştır. Biyootografik çalışma kapsamında uçucu yağ ve hekzanlı ekstre için belirgin bir serbest radikal süpürücü sonuç gözlemlenmemiştir.

Sulu ve metanollü ekstrelerdeki maddelerin ayrımını serbest radikal süpürücü etkilerini gözlemleyebilmek için numunelerin uygulandığı İTK plağı DPPH reaktifine daldırılmıştır. Üzerine reaktif tatbik edilen plak karanlıkta 30 dk inkübe edilmiştir. Biyootografik İTK tekniği ile ayrılan numunedeki bileşikler DPPH reaktifine karşı tepkime vererek sarı renkli spotlar meydana gelmiştir. Süre sonunda tepkime sonucu beyaz ışık altında incelenip kaydedilmiştir. Ayrılan bileşiklerin hangi madde grubuna ait olabileceğini tespit etmek amacıyla İTK çalışması bir kez daha uygulanıp plak üzerine NPR-PEG reaktifleri uygulanmıştır. Reaksiyon sonucu UV 254 ve 366 nm ışığı altında incelenip kaydedilmiştir (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. *C. mucronifera* 'nın metanollü ve sulu ekstrelerin NPR-PEG ve DPPH reaktifleri ile tepkime sonucu

Şekil 4.8.'de görüldüğü gibi, DPPH reaktifi ile tepkime veren bileşikler NPR-PEG reaktifi ile sarı, turuncu, mavi flöresans vermiştir. Bu şekilde sonuç bu bileşiklerin fenolik maddeler grubundan olduğu göstermektedir. Polar çözücüler olan metanol ve su ile bitkiden ağırlıklı olarak fenolik madde grubu ekstre edilmiştir.

4.3.3. Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasitesi (TEAK) verileri

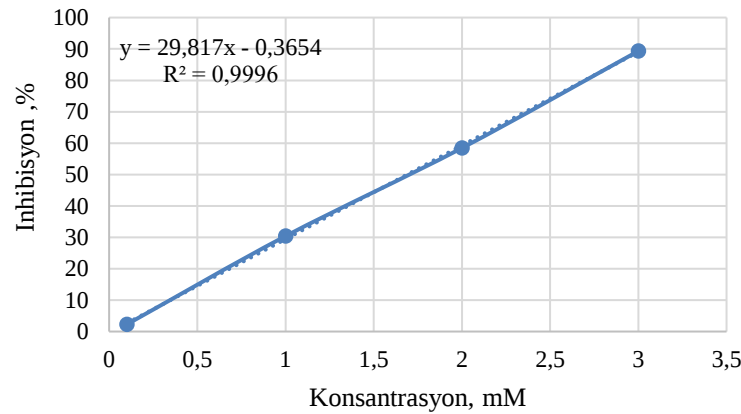
C. mucronifera bitkisinden elde edilen uçucu yağ ve ekstrelerin serbest radikal süpürücü etkileri $ABTS\bullet^+$ radikal katyonu kullanılarak spektrofotometrik yöntemle araştırılmıştır. Numunelerin antioksidan etkileri Trolox'un (standart inhibitör madde) $ABTS\bullet^+$ radikalini süpürme etkisi ile karşılaştırılarak belirlenmiştir (Tablo 4.7).

Ekstrelerin Trolox'a eşdeğer antioksidan kapasitesi Trolox için elde edilen kalibrasyon eğrisi denklemi kullanılarak hesaplanmıştır. Şekil 4.9'da Trolox için elde edilen kalibrasyon eğrisi ve denklemi gösterilmiştir.

Tablo 4.7. Ekstrelerin Trolox'a eşdeğer antioksidan kapasite değerleri

Ekstre türü	TEAK*(Ort±SS), mM
CMUY	inaktif
CMHE	0,08 ± 0,03
CMME	1,36 ± 0,14
CMSE	0,30 ± 0,02

CMHE: *C. mucronifera* hekzanlı ekstre, CMME: *C. mucronifera* metanollü ekstre, CMSE: *C. mucronifera* sulu ekstre; CMUY: *C. mucronifera* uçucu yağ; TEAK değerleri 2 mg/mL derişimdeki ekstreler için verilmiştir



Şekil 4.9. Trolox kalibrasyon eğrisi

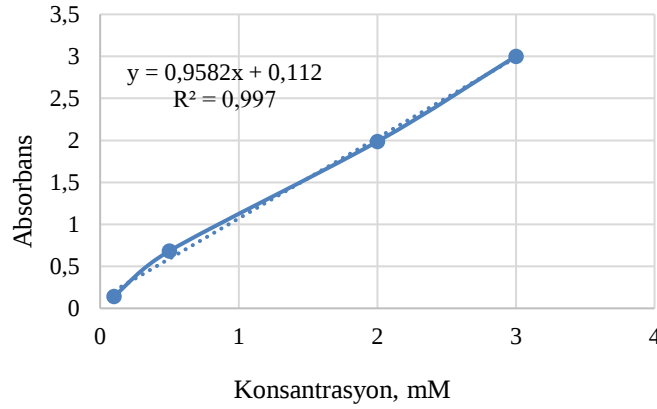
4.3.4. Cu(II) iyon indirgeme antioksidan kapasitesi (CUPRAC) verileri

CUPRAC metodunda *C. mucronifera* bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağ ve ekstrelerin bakır (II)-neokuproin kompleksini bakır(I)-neokuproin kompleksine indirgenmesine bağlı olarak antioksidan kapasite tayin edilmektedir. Kompleksin 450 nm'de gösterdiği absorbans değerleri spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Standart antioksidan madde olarak kullanılan Trolox'un absorbans değerleri ile kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir (Şekil 4.10). Kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem ile uçucu yağ ve ekstrelerin içerdikleri toplam antioksidan kapasiteleri Troloksa eşdeğer mM olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. Ekstrelerin Cu(II) iyon indirgeme antioksidan kapasite değerleri

Ekstre türü	CUPRAC*(Ort�SS), TEmM
CMUY	0,50 � 0,04
CMHE	0,55 � 0,03
CMME	2,02 � 0,29
CMSE	1,27 � 0,10

CMHE: *C. mucronifera* hekzanlı ekstre, CMME: *C. mucronifera* metanollü ekstre, CMSE: *C. mucronifera* sulu ekstre; CUPRAC değerleri 2 mg/mL derişimdeki ekstreler için verilmiştir



şekil 4.10. Trolox kalibrasyon eğrisi

4.3.5.  -Amilaz aktivite verileri

C. mucronifera bitkisinin toprak üstü kısmından elde edilen ekstrelerin karbondhidrat metabolizması üzerinde etkili olan  -amilaz enzimini inhibe etme potansiyeli mikrotitre tekniği ile % inhibisyon hesaplanarak değerlendirilmiştir. Standart antidiyabetik etkili madde olarak akarboz kullanılmıştır. Uçucu yağ ve ekstrelerin  -amilaz enzim inhibisyon değerleri Tablo 4.9'da verilmiştir. Test edilen numunelerin enzimi inhibe etme etkisi iyot rengindeki değişimin 630 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümü ile yapılmıştır.

Tablo 4.9. Uçucu yağ ve ekstralarının α -amilaz enzimi üzerinde gösterdikleri % inhibisyon değerleri

Ekstre türü	İnhibisyon (Ort $\pm$ SS), %
CMUY	34,14 $\pm$ 2,48
CMHE	13,10 $\pm$ 1,86
CMME	19,51 $\pm$ 2,20
CMSE	4,65 $\pm$ 0,00
Akarboz*	98,33 $\pm$ 0,97

CMHE: *C. mucronifera* hekzanlı ekstre, CMME: *C. mucronifera* metanollü ekstre, CMSE: *C. mucronifera* sulu ekstre; CMUY: *C. mucronifera* uçucu yağı, Inh % Yüzde değerleri 2 mg/mL derişimdeki ekstralar için verilmiştir.; *1 mg/mL standart enzim inhibitörü.

4.3.6. Ekstrelerin antikolinesteraz aktivite verileri

C. mucronifera bitkisinden elde edilen ekstre ve uçucu yağın asetilkolinesteraz enzimini inhibe etme potansiyeli tespit edilmesi için Ellman testi kullanılmıştır. Asetilkolinesteraz asetiltiyokolini tiyokolini ve asetata kadar hidroliz eder (Ellman vd., 1961). Oluşan tiyokolini ise kromojenik ajan olarak kullanılan DTNB'yi 405 nm'de absorbanı veren nitrobenzoata dönüştürür. Standart olarak kullanılan galantamin üzerinden ekstraların inhibisyonları karşılaştırılmıştır. Numunelerin AChE enzimini inhibe etme etkileri, yüzde inhibisyon olarak hesaplanmış ve elde edilen değerler Tablo 4.10'da verilmiştir. Test sonucunda tüm uçucu yağ ve ekstre numuneleri için çok düşük değerler elde edilmiştir.

Tablo 4.10. Ekstrelerin asetilkolinesteraz enzim inhibisyon aktivite değerleri

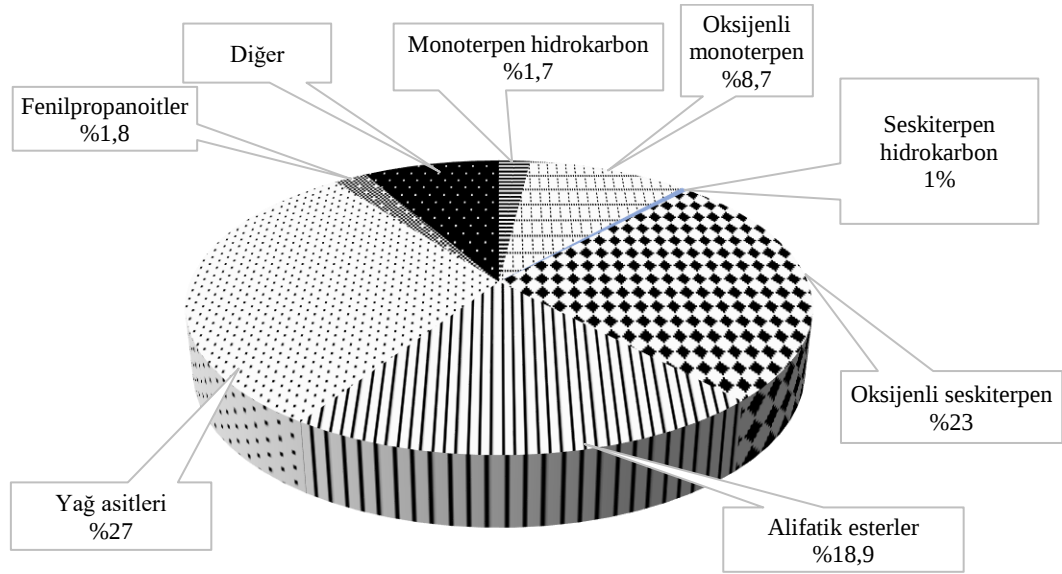
Ekstre türü	*İnhibisyon (Ort $\pm$ SS), %
CMUY	inaktif
CMHE	3,21 $\pm$ 0,00
CMME	10,70 $\pm$ 4,68
CMSE	12,25 $\pm$ 0,00
Galantamin	83,70 $\pm$ 1,56

CMHE: *C. mucronifera* hekzanlı ekstre, CMME: *C. mucronifera* metanollü ekstre, CMSE: *C. mucronifera* sulu ekstre Inh % Yüzde değerleri 2 mg/mL derişimdeki ekstralar için verilmiştir.

5. TARTIŞMA

5.1. Uçucu Yağ Profili

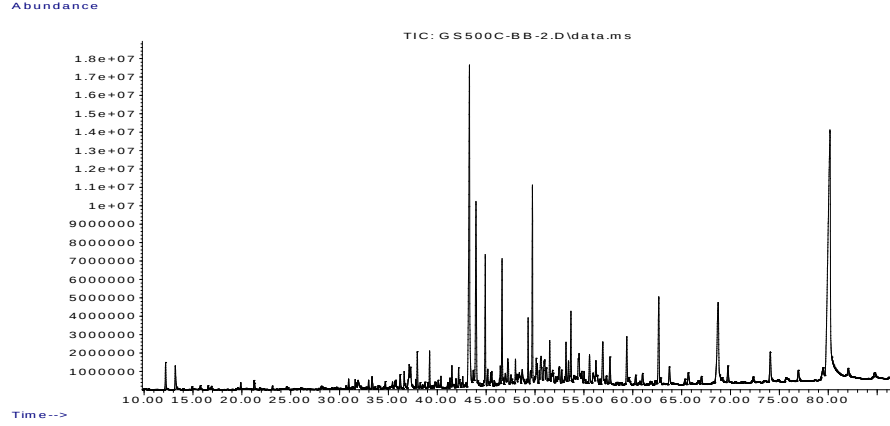
Araştırma kapsamında B6: Sivas lokalitesinde toplanmış *C. mucronifera* bitkisinin toprak üstü kısımları konvansiyonel hidrodistilasyona tabi tutularak elde edilen uçucu yağın verimi %0,01 olarak saptanmıştır. Kaynaklarda bulunan verilerde C5, Nigde, Camardi, Aladaglar, Narpuz Bogazi civarında toplanmış bir örneğin uçucu yağ verimi %0,09 olarak rapor edilmiştir (Dural vd., 2003). Yağ verimindeki farklılık edafik faktörlerden ve bitkinin gelişme durumundan kaynaklandığı düşünülmektedir. *C. mucronifera* gaz kromatografik analiz sonucunda uçucu yağında tespit edilen bileşikler dört ana grup altında toplanmıştır: monoterpen hidrokarbon, oksijenli monoterpen, seskiterpen hidrokarbon, oksijenli seskiterpen, esterler, fenilpropanoitler ve yağ asitleri. Uçucu yağdaki majör bileşenlerin dağılımı Şekil 5.1’de gösterilmiştir.



Şekil 5.1. *C. mucronifera* uçucu yağındaki majör bileşen grupları

C. mucronifera uçucu yağının %89’unu oluşturan toplam 85 bileşik tespit edilmiştir. Uçucu yağın önemli kısmını yağ asitleri (%27) oluşturmaktadır. Yağın %23’ünü oluşturan oksijenli seskiterpenler 20 bileşikten ibarettir. Yağın önemli bir kısmını oluşturan (%18,9) alifatik esterler sadece iki bileşikten meydana gelmiştir. Oksijenli monoterpenler ise 19 adet bileşikten meydana gelmiş olup uçucu yağın %8,7

kısmını oluşturmaktadırlar. Genel olarak uçucu yağın profilinde terpenik yapıdaki bileşikler %34,4 bollukta bulunmaktadır. Alifatik esterler ve yağ asitleri uçucu yağın yarısını oluşturmaktadır (toplam %50). Uçucu yağın gaz kromatogramı Şekil 5.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 5.2. *C. mucronifera* uçucu yağ bileşeni gaz kromatogramı

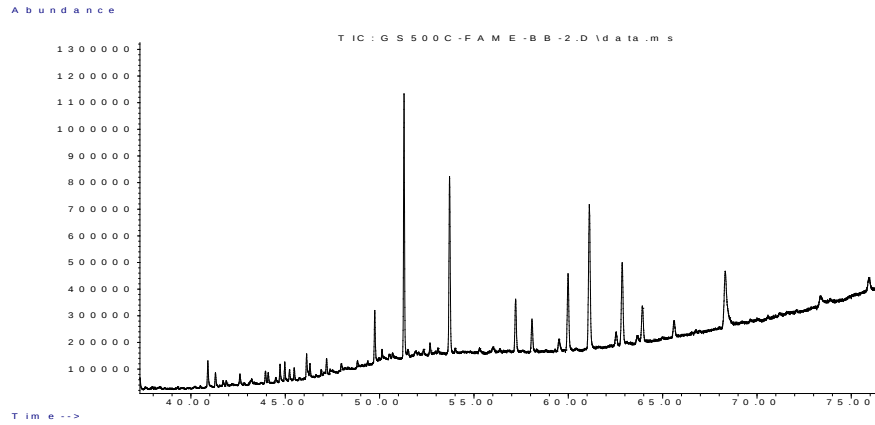
Dural vd. (2003) tarafından yayınlanmış çalışmada C5, Nigde, Camardi, Narpuz Bogazı lokalitesinde toplanan *C. mucronifera* örneğinin uçucu yağı çok farklı kimyasal kompozisyonunda sahiptir. Yağın majör bileşikler olarak seskiterpen hidrokarbonlar germakren D (%29,3) ve β -karyofillen (%7,3) ve oksijenli seskiterpen β -ödesmol (%17,4) tespit edilmiştir. Bununla birlikte, aromatik türevler benzaldehit ve fenilasetaldehid ile birlikte birçok terpenik olmayan düz zincirli (6-16 karbon atomu) alifatik aldehydleri içerdiği rapor edilmiştir. Genel olarak, alifatik aldehydler (12 bileşik) *C. mucronifera*'daki uçucu yağın %9,2'sini oluşturmuştur. Tez kapsamında incelenmiş *C. mucronifera* örneğinde tespit edilen iki alifatik esterler *Centaurea* uçucu yağı için ilk kez rapor edilmiştir. Genel olarak tez kapsamında araştırılan *C. mucronifera* örneğinin uçucu yağ kimyasal profili kaynaklarda rapor edilen diğer *Centaurea* uçucu yağlarının profilinden oldukça farklıdır.

C. mucronifera uçucu yağında tespit edilen 1-izobutil 4-izopropil 3-izopropil-2,2-dimetil suksinat (= 2,2,4-trimetil-3-karboksiizopropil-izobutil pentanoat) bileşiği daha önce farklı Asteraceae familyası türleri için rapor edilmiştir. Örneğin, Türkiye'de yetişen *Cousinia sivasica* Hub.-Mor. uçucu yağında %12.2 ve *Tripleurospermum decipiens* (Fisch & C. A. Mey) uçucu yağında %0.6 oranlarında bulunmuştur (Göger vd., 2021; Tekin vd., 2018).

Alifatik ester grubundan ikinci major uçucu bileşik olan 2-metil-2,2-dimetil-1-(2-hidroksi-1-metiletil)propil propanoat ise daha önce *Leonotis nepetifolia* (L.) R. Br. (Lamiaceae) yüksek oranda (%22,8) bulunmuştur (de Oliveira vd., 2015). Bunun yanı sıra *Carabus lefebvrei* Dejean böceği bu maddeyi savunma amacıyla salgılamaktadır (Giglio vd., 2009).

5.2. Sabit Yağ Asitleri Profili

Bu araştırma kapsamında *C. mucronifera* çiçeklerinin sabit yağı profili ilk kez araştırılmıştır. Genel olarak sabit yağın kompozisyonunda 14 yağ asidi tespit edilmiş olup yağ asitlerinin %96,8'i aydınlatılmıştır. Sabit yağ asitlerin gaz kromatogramı Şekil 5.3'de gösterilmiştir.



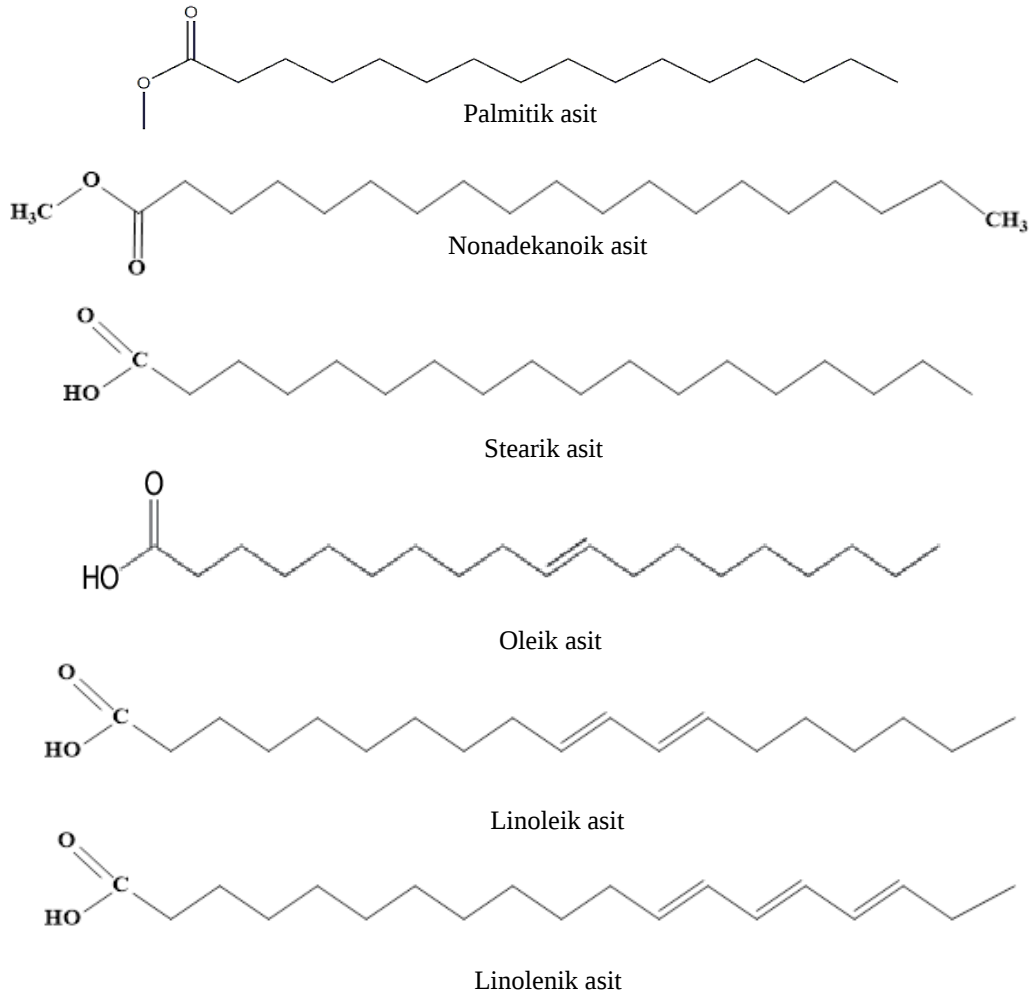
Şekil 5.3. *C. mucronifera* sabit yağ asitleri gaz kromatogramı

Sabit yağ kompozisyonunda doymuş yağ asitleri yüksek miktarda (%65,8) tespit edilmiştir. Başlıca palmitik (%24,8), nonadekanoik (%22,6) ve stearik (%7,2) asitleri ana bileşikler olarak tespit edilmiştir. Doymamış yağ asitlerinden ise linolenik (%14,5), linoleik (%11,6) ve oleik (%4,9) asitleri saptanmıştır.

Kaynak taramasında *C. mucronifera* sabit yağ asitleriyle ilgili bir bilgiye rastlanmamıştır fakat diğer *Centaurea* üzerinde yapılan sabit yağ asitleri çalışmaları incelendiğinde, Canlı (2018) tarafından yapılan araştırmada, *C. sivasica* Wagenitz, *C. tomentella* Hand.-Mazz türleri üzerinde doymuş yağ asitlerinin ana bileşeni hegzadekanoik asit tespit edilirken, *C. sivasica* Wagenitz, *C. tomentella* Hand.-Mazz ve *C. haussknechtii* Boiss türleri üzerinde doymamış yağ asitlerinin ana bileşenleri olarak, linoleik asit, linolenik asit asit tespit edilmiştir. Keser vd. (2020) tarafından yapılan

araştırmada, *C. virgata*, *C. kurdica* ve *C. saligna* türleri üzerinde sabit yağ asitlerinden doymuş yağ asitlerinin ana bileşenini palmitik asit oluştururken, doymamış yağ asitlerinin ana bileşenlerini oleik ve linoleik asit oluşturmaktadır. Zengin vd. (2010) tarafından yapılan araştırmada *C. patula*, *C. pulchella* ve *C. tchihatcheffii* türleri üzerinde sabit yağ asitleri profili incelendiğinde, doymuş yağ asitlerinin ana bileşiği palmitik asit ve doymamış yağ asitlerinin ana bileşikleri linoleik ve linolenik asit olarak tespit edilmiştir.

C. mucronifera'da tespit edilen majör yağ asitlerin formülleri Şekil 5.4'de gösterilmiştir.



Şekil 5.4. *C. mucronifera* sabit yağının majör yağ asitleri

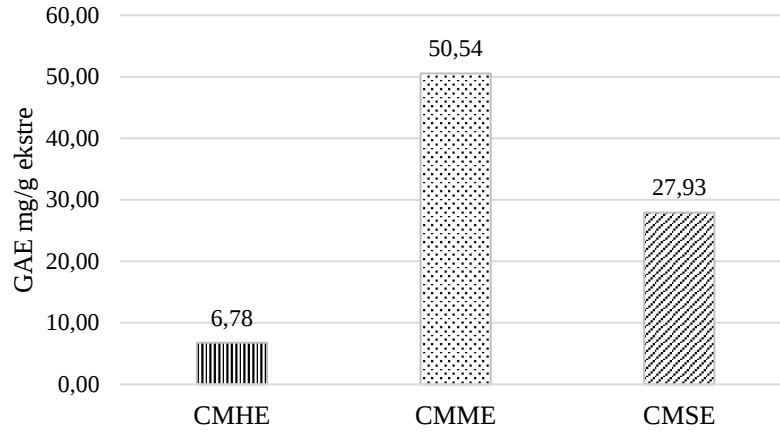
5.3. Ekstrelerin Profili

C. mucronifera bitkisinin toprak üstü kısmından polar ve apolar çözücüler kullanılarak ekstratlar elde edilmiştir. Elde edilen verilere göre en yüksek verim %9,41 ile

sulu ekstreden elde edilmiştir. Apolar çözücü olan hekzanla en düşük verimle ekstre edilmiştir.

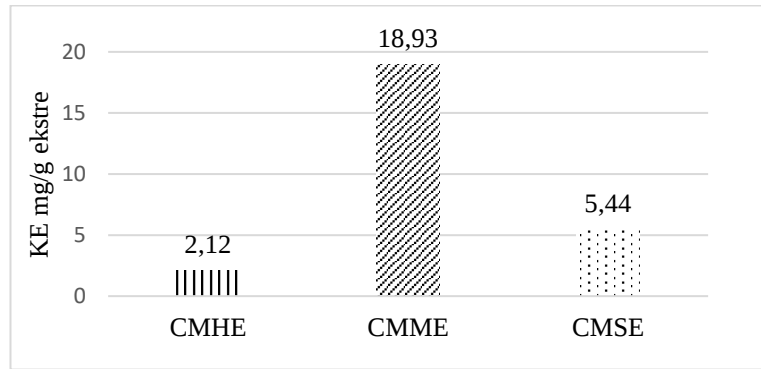
Polar çözücünün kimyasal profili sıvı kromatografisi tekniği ile aydınlatılmıştır. Metanollü ve sulu ekstrelerin bileşimleri birbirine çok benzer olarak bulunmuştur. Ekstrelerde yoğunlukla fenolik asitler; kaffeoyilquinik, ferulik, 5-kafeoyilquinik ve feruloyilquinik asitler tespit edilmiştir. Bununla beraber, ekstrelerde flavonoidler grubundan metil kersetin glukozit ve metil apigenin glukozit bulunmuştur. Literatürde *C. mucronifera* ekstreleri üzerinde daha önce yapılan kapsamlı fitokimyasal çalışma mevcut değildir. Fakat diğer *Centaurea* türleri üzerinde yapılan çalışmalar incelendiğinde fenolik asitlerden ferulik asit *C. kurdica*, *C. saligna* ve *C. amaena* türlerinin ana bileşeni olarak tespit edilmiştir (Keser vd. 2020; Albayrak vd.2017). Kaffeoyilquinik asit ve onun türevleri Türkiye’de yetişen *C. urviellei* subsp. *hayekiana* Wagenitz, *C. kotschi* var. *persica* (Boiss.) Wagenitz, *C. drabifolia* subsp. *detonsa* ve *C. patula* DC. türlerinde saptanmıştır (Zengin vd., 2019^b). Türkiye için endemik bir tür olan *C. baserii* içinde de kaffeoyilquinik asidin çeşitli esterlerine rastlanmıştır (Köse vd., 2016). Diğer endemik tür olan *C. pseudoscabiosa* subsp. *pseudoscabiosa* Boiss. et Buhse ekstresinde de bu bileşikler saptanmıştır(Flamini vd., 2002). Flavonoidlerden apigenin metil esteri daha önce *C. urviellei* DC. ve *C. austro-anatolica* türlerinde rastlanmıştır (Ulubelen ve Öksüz, 1982). Metil kersetin bileşiği ise daha önce *C. aegyptiaca* L. türünde rastlanmıştır (Senosy vd., 2018)

C. mucronifera ekstrelerinin toplam fenol miktarı tayini için Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak meydana gelen renk değişiminin absorbans değeri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Standart fenolik bileşik olarak gallik asit kullanılmış ve sonuçlar mg gallik asite eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Ekstreler için üç tekrarlı spektrofotometrik tayin sonucunda elde edilen değerlerinin kıyaslaması Şekil 5.5’de gösterilmiştir. Test edilen *C. mucronifera* ekstrelerinin arasında metanollü ekstresi en yüksek miktarda (50,54 GAE mg /g_{ekstre}) toplam fenol miktarına sahiptir.



Şekil 5.5. *C. mucronifera* ekstrelerinin ihtiva ettiği toplam fenoliklerin miktarları. CMHE: *C. mucronifera* hekzanlı ekstre, CMME: *C. mucronifera* metanollü ekstre, CMSE: *C. mucronifera* sulu ekstre

C. mucronifera ekstrelerinin toplam flavonoit miktarı tayini için $AlCl_3$ reaktifi kullanılarak meydana gelen renk değişiminin absorbans değeri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Standart fenolik bileşik olarak kersetin kullanılmış ve sonuçlar mg kersetine eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Ekstreler için üç tekrarlı spektrofotometrik ölçümler sonucunda elde edilen değerlerinin kıyaslaması Şekil 5.6’da gösterilmiştir. CMHE ekstre içinde $AlCl_3$ ile tepkimeye girecek bileşiklerin çok az miktarda olması dolayısıyla ölçülen absorbans değerleri negatif veya tutarsız olarak elde edilmiştir. Test edilen *C. mucronifera* ekstrelerinin arasında metanollü ekstresi en yüksek miktarda (18,94 KEmg/g_{ekstre}) toplam flavonoit miktarına sahiptir.

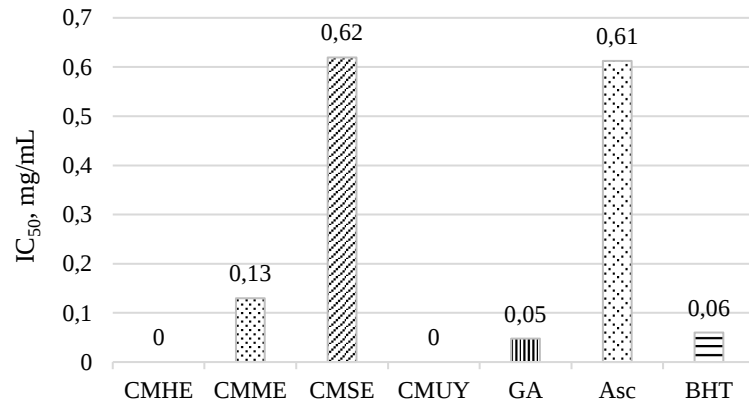


Şekil 5.6. *C. mucronifera* ekstrelerinin ihtiva ettiği toplam flavonoitlerin miktarları. CMHE: *C. mucronifera* hekzanlı ekstre, CMME: *C. mucronifera* metanollü ekstre, CMSE: *C. mucronifera* sulu ekstre

5.4. Biyolojik Aktivite Araştırmaları

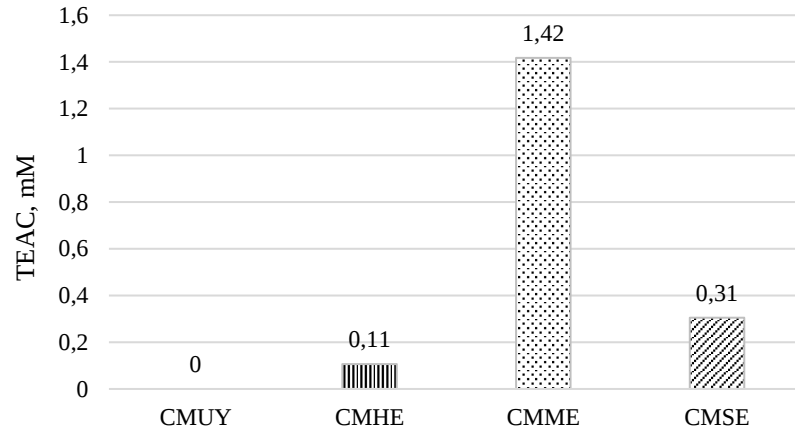
5.4.1. Antioksidan aktivite potansiyeli

C. mucronifera bitkisinin toprak üstü kısımlarına ait uçucu yağ ve ekstrelerin DPPH serbest radikalini süpürme etkileri spektrofotometrik metotla analiz edilmiştir. Numunelerin yüzde inhibisyon değerleri standart antioksidan madde olan gallik asitle karşılaştırılmıştır. İnhibisyon değerleri %50'den büyük olan numunelerin IC₅₀ değerleri *SigmaPlot* programında hesaplanmıştır. Analiz sonucunda uçucu yağ ve hekzanlı ekstrenin %50'den düşük bir aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Test edilen numunelerin arasında CMME en yüksek inhibisyon yüzdesi değerini (%84,20) göstermiştir. İkinci sırada CMSE (%83,52) ekstresi yer almıştır. Test ekstrelerin ve standart antioksidan maddelerin IC₅₀ değerleri kıyaslandığında sulu ekstre askorbik aside yakın etki göstermiştir (Şekil 5.7).



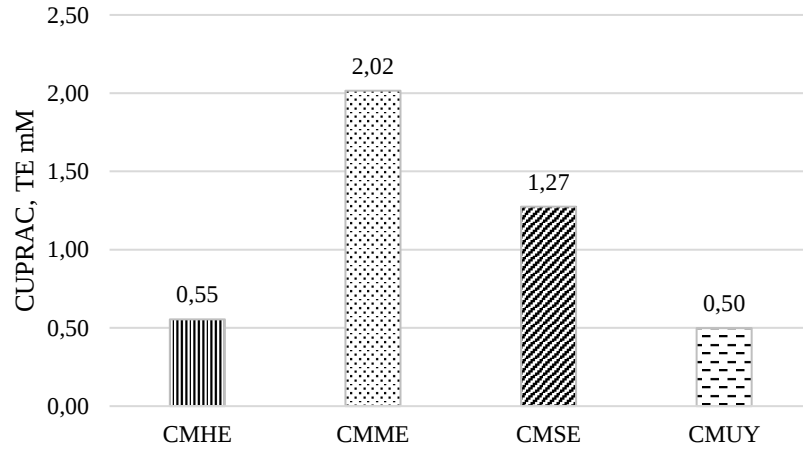
Şekil 5.7. *C. mucronifera* ekstrelerinin DPPH serbest radikali süpürme etkileri

C. mucronifera uçucu yağ ve ekstrelerinin ABTS serbest radikalini süpürme etkisi Trolox'a eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Uçucu yağ ve hekzanlı ekstre için bu test sonucunda anlamlı IC₅₀ değeri bulunamamıştır, polar ekstreler ise önemli derecede aktivite göstermiştir. Özellikle metanollü ekstre en yüksek aktiviteyi göstermiştir (Şekil 5.8.).



Şekil 5.8. *C. mucronifera* ekstrelerinin Trolox'a eşdeğer antioksidan kapasite değerleri

C. mucronifera uçucu yağ ve ekstrelerinin antioksidan kapasitesi farklı model reaksiyon şartlarında da değerlendirilmiştir. Bu doğrultuda numunelerin Cu(II) iyon indirgeme kapasitesi tayin edilmiştir. Substrat olarak Cu(II)-neokuproin kompleksi kullanılmıştır. Standart antioksidan madde olarak kullanılan Trolox'a göre kıyaslanan ekstreler arasında en yüksek iyon indirgeme kapasitesini metanollü ekstre göstermiştir (Şekil 5.9.).



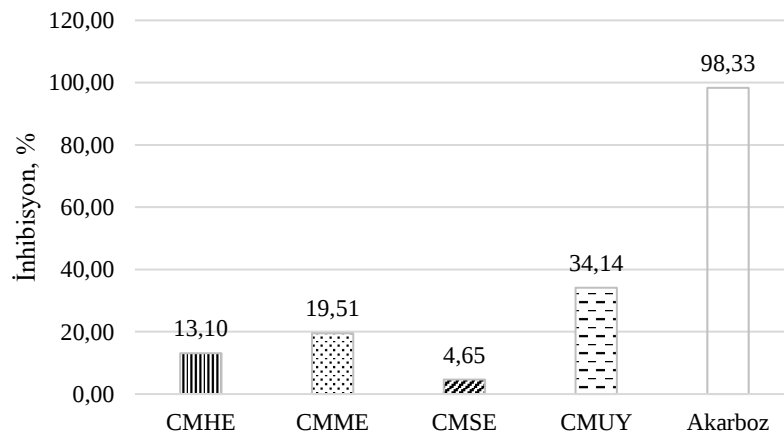
Şekil 5.9. *C. mucronifera* ekstrelerinin Cu(II) iyon indirgeme antioksidan kapasitesi

Kaynaklarda *C. mucronifera* türü üzerinde yapılan antioksidan çalışmaları mevcuttur. Shoeb vd. (2007b) tarafından yapılan çalışmada *C. mucronifera* toprak üstü kısımlarının metanol ekstresi ve lignan bileşiklerinin antioksidan aktivitesi DPPH testi ile araştırılmış ve IC₅₀ değerleri sırasıyla $2,2 \times 10^{-2}$ ve $16,0 \times 10^{-2}$ mg/mL tespit edilmiş olup orta düzeyde antioksidan aktivite gösterdiği değerlendirilmiştir.

Tepe vd. (2006) tarafından yapılan araştırmada *C. mucronifera* bitkisinin toprak üstü kısımlarının metanollü ekstresi ile β -Karoten-linoleik asit inhibisyon testi ve DPPH olarak iki farklı antioksidan aktivite çalışmaları rapor edilmiştir. Yapılan çalışmada *C. mucronifera*'nın DPPH serbest radikal süpürme kapasitesi için ölçülen IC₅₀ değeri 67,8 μ g/mL ve β -karoten-linoleik asit inhibisyon yüzdesi 35,2 olarak tespit edilmiştir. Çalışmada değerlendirilen diğer bitki ekstrelerine kıyasla en zayıf *C. mucronifera*'nın antioksidan aktivitesi tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde, *C. mucronifera*'nın metanollü ekstresinin antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir.

5.4.2. Anti- α -amilaz potansiyeli

C. mucronifera uçucu yağ ve ekstrelerinin antidiyabetik potansiyeli *in vitro* şartlarda pankreatik α -amilaz enzimi inhibe etme etkisine göre tespit edilmiştir. İnhibisyon etkisi standart inhibitör akarboz ile kıyaslama yapılarak değerlendirilmiştir. Numunelerin arasında CMUY en yüksek α -amilaz enzim inhibisyon etkisini göstermiştir (%34,14). Genel olarak, test edilen numuneler zayıf inhibisyon etkisini (<%50) sergilediği nedeniyle IC₅₀ değerler saptanamamıştır. Numunelerin anti-amilaz etkilerinin kıyaslaması Şekil 5.10'da gösterilmiştir.



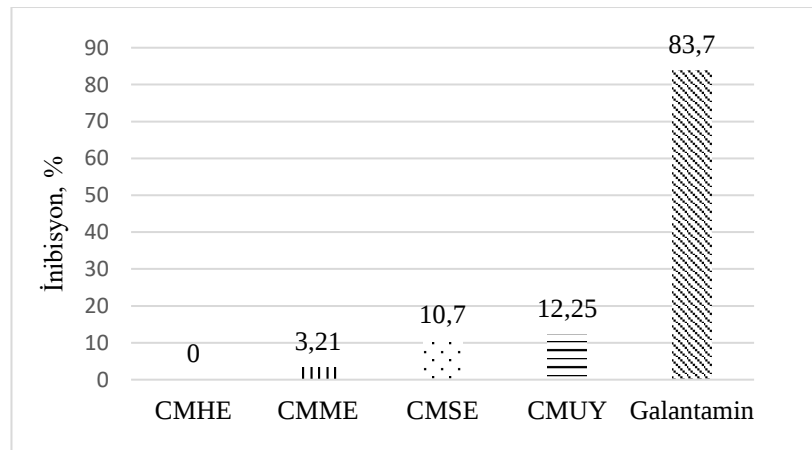
Şekil 5.10. *C. mucronifera* uçucu yağ ve ekstrelerinin α -amilaz enzimi inhibe etme etkileri

Kaynak taraması sonucu *C. mucronifera* üzerinde daha önce yapılan α -amilaz enzim inhibisyonu çalışmasına rastlanamamıştır. Diğer *Centaurea* türleri üzerinde yapılan α -amilaz çalışmaları incelendiğinde, Zengin vd. (2019^a) tarafından yapılan

çalışmada *C. bornmuelleri* Hausskn toprak üstü kısımlarının etil asetat ekstresinin α -amilaz enzim inhibe etme etkisi 19,90 mg/g akarboza eşdeğer olarak bildirilmiştir. Conforti vd. (2008) tarafından yapılan çalışmada, *C. centaurium* L. türünün toprak üstü kısımlarının *n*-hekzan fraksiyonu en yüksek α -amilaz inhibitör aktivitesi (IC₅₀ 158 mg mL) göstermiştir. Şen (2021) tarafından yapılan bir çalışmada, *C. pterocaula* Trautv. türünün toprak üstü kısımlarının uçucu yağının α -amilaz enzim inhibisyonu incelenmiştir. Sonuç olarak %50'nin üzerinde enzim inhibisyonu göstermiş ve IC₅₀ değeri 79.66 µg/mL olarak bildirilmiştir. Kaynak taraması sonucu, uçucu yağ α -amilaz enzim inhibisyon oldukça yüksek tespit edilirken, *n*-hekzan fraksiyonu ve etil asetat ekstresi orta düzeyde α -amilaz enzim inhibisyonu gösterdiği değerlendirilmiştir.

5.4.3. Antiasetikolinesteraz potansiyel

C. mucronifera bitkisinden elde edilen uçucu yağ ve ekstraların asetilkolinesteraz enzimi inhibe etme etkisi Ellman metodu ile spektrofotometrik olarak saptanmıştır. Ekstre ve uçucu yağ için oldukça düşük değerler elde edilmiştir. Genel olarak, uçucu yağ ve ekstraların test edilen 2,0-0,001 mg/mL konsantrasyon aralıklarındaki çözeltilerinin enzimi inhibe etme etkisine sahip olmadığı tespit edilmiştir. Numunelerin anti-asetilkolinesteraz etkilerinin kıyaslaması Şekil 5.11'da gösterilmiştir.



Şekil 5.11. *C. mucronifera* uçucu yağ ve ekstralarının antikolinesteraz enzimi inhibe etme etkileri

Özcan vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada *C. hypoleuca* DC çiçeklerin etil asetat ekstresinin asetilkolinesteraz enzimini inhibe etme etkisi g ekstrede 2,6 mmol galantamine eşdeğer olarak rapor edilmiştir. Aktümsek vd. (2013) tarafından yapılan

araştırmada ise *C. polypodiifolia* var. *pseudobehen* (Boiss.) Wagenitz metanollü ve sulu ekstresinin asetilkolinesteraz enzimini inhıbe etme etkisi zayıf (%24,54 ve 14,49) ve *C. antalyense* H.Duman & A.Duran metanollü ekstresinin asetilkolinesteraz enzimini inhıbe etme etkisi zayıf (%21,25) olarak değerlendirilmiştir. Genel olarak kaynak taraması sonucu *Centaurea* türlerinin asetilkolinestereaz enzimini inhıbe etme etkileri orta-zayıf olarak değerlendirilmiştir.

6. SONUÇ

- Araştırmada Sivas civarında yetişen *Centaurea mucronifera* bitkisi üzerinde biyolojik aktivite ve kimyasal kompozisyon araştırmaları gerçekleştirilmiştir.
- *C. mucronifera* toprak üstü kısmı uçucu yağ profili gaz kromatografik teknikleri ile incelenerek ana bileşikleri 1-izobutil 4-izopropil 3-izopropil-2,2-dimetil suksinat, hekzadekanoik asit, 2-metil-2,2-dimetil-1-(2-hidroksi-1-metiletil)propil propanoat, karyofillen oksit, 1,5-epoksi-salvial-4(14)-en ve spatulenol tespit edilmiştir.
- Çiçeklerin sabit yağ profilinde majör bileşikler olarak doymuş asitlerden hekzadekanoik, nonadekanoik, ve stearik, doymamışlardan ise linolenik ve linoleik asitleri tespit edilmiştir.
- Polar çözücüler ile elde edilen ekstrelerin majör bileşikler olarak kaffeoyilquinik asit, ferulik, 5-kafeoyilquinik ve feruloyilquinik asitleri tespit edilmiştir. Flavonoitler grubundan ekstrelerde metil kersetin glukozit ve metil apigenin glukozit tespit edilmiştir.
- *C. mucronifera* polar ekstrelerinin serbest radikal süpürücü aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. Bunun yanı sıra, polar ekstrelerin en yüksek oranda toplam fenol ve flavonoit miktarı ihtiva ettiği tespit edilmiştir.
- *C. mucronifera* uçucu yağ ve ekstrelerinin zayıf (%34,14 ve %4,65 arasında) α -amilaz enzimi inhibe etme potansiyeline sahip olduğu saptanmıştır.
- *C. mucronifera* uçucu yağ ve ekstrelerinin 2,0-0,001 mg/mL konsantrasyon aralıklarındaki çözeltileri asetilkolinesteraz enzimini inhibe etme etkisine sahip değildir.
- Tez kapsamında *C. mucronifera* bitkisi üzerinde kapsamlı fitokimyasal kompozisyonu araştırmaları gerçekleştirilmiştir. Bitkinin uçucu yağ ve ekstreleri üzerinde ilk anti- α -amilaz ve antiasetilkolinesteraz aktivite değerlendirilmeleri yapılmıştır.

KAYNAKÇA

- Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*: Allured publishing corporation Carol Stream, IL. 456, 544-545.
- Aghaei, M., Mirzaei, M., Ghanadian, M., Fallah, M., ve Mahboodi, R. (2021). 6-Methoxylated flavonoids: jacein, and 3-demethyljacein from *Centaurea schmidii* with their endoplasmic reticulum stress and apoptotic cell death in breast cancer cells along with in-silico analysis. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 20(2), 417–432.
- Agudelo, I. J., Bach, H., Ricco, R. A., & Wagner, M. L. (2021). Structural characteristics and content of polyphenolic compounds in healthy organs and galls induced by *allodiplosis crassa* kieff. and jörg (cecydomyiidae, diptera) on *geoffroea decorticans* (hook. and arn.) burkart (*Leguminosae*). *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 55(2), 259-274.
- Akkal, S., Benayache, F., Bentamene, A., Medjroubi, K., Seguin, E., Tillequin, F. (2003). Flavonoid aglycones from *Centaurea napifolia*. *Chemistry of Natural Compounds*, 39(2), 219-220.
- Akkal, S., Benayache, F., Medjroubi, K., Tillequin, F. (2007). Flavonol glycosides from *Centaurea furfuracea*, antiplasmodial and cytotoxic activities. *Chemistry of Natural Compounds*, 43(3), 319-320.
- Akkol., E. K, Arif, R., Ergun, F., Yesilada, E. (2009). Sesquiterpene lactones with antinociceptive and antipyretic activity from two *Centaurea* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 122(2), 210-215.
- Akkurt, A. (2011). *Bazı Centaurea L. Türlerinin Uçucu Yağlarının Kimyasal Bileşimleri Ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Aksoy, H. (2020). Evaluation of the Biological and wound healing activities of *Centaurea virgata* Lam. *Clinical and Experimental Health Sciences*, 10, 304-308.
- Aktümsek, A., Zengin, G., Güler, G. O., Cakmak, Y. S., Duran, A. (2013). Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea* L. species. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 290–296.

- Albayrak, S., Atasagun, B., & Aksoy, A. (2017). Comparison of phenolic components and biological activities of two *Centaurea* sp. obtained by three extraction techniques. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(6), 599–606.
- Alper, M. ve Güneş, H. (2019). The Anticancer and anti-inflammatory effects of *Centaurea solstitialis* extract on human cancer cell lines. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16(3), 273–281.
- Al-Saghir, J., Al-Ashi, R., Salloum, R., Saliba, N.A., Talhouk, R.S., Homaidan, F.R. (2009). Anti-inflammatory properties of salograviolide a purified from lebanese plant *Centaurea ainetensis*. *BioMed Central Complementary and Alternative Medicine*, 9(36).
- Amini, E., Nabiuni, M., Behzad, S.B., Seyfi, D., Eisvand, F., Sahebkar, A. ve Shakeri, A. (2020). Anticancer potential of aguerin b, a sesquiterpene lactone isolated from *Centaurea behen* in metastatic breast cancer cells. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 15(2), 165–173.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E., (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- Arif, R., Küpeli, E. ve Ergun, F. (2004). The biological activity of *Centaurea* L. species. *Gazi University Journal of Science*, 17(4), 149-164.
- Artun, F. T., Karagöz, A. (2021). Antiproliferative and apoptosis inducing effects of the methanolic extract of *Centaurea hermannii* in human cervical cancer cell line. *Biotechnic & Histochemistry*, 96(1), 1-10.
- Astari, K. A., Baykan Erel, Ş., Aydın Köse, F., Köksal Karayıldırım, Ç. ve Karaalp, C. (2014). Cytotoxic and antibacterial activities of *Centaurea cadmea* Boiss. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(1), 101–106.
- Bach, S. M., Fortuna, M. A., Attarian, R., de Trimarco, J. T., Catalán, C. A. N., Av-Gay, Y., ve Bach, H. (2011). Antibacterial and cytotoxic activities of the sesquiterpene lactones cnicin and onopordopicrin. *Natural Product Communications*, 6(2), 163–166.
- Baytop, T. (1994). *Türkçe Bitki Adları Sözlüğü*, Türk Dil Kurumu Yayınları. (578). Ankara: Türk Tarih Kurumu Basımevi.

- Baytop, T. (1999). *Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün)*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- Bensaad, M. S., Dassamiour, S., Hambaba, L., Bensouici, C. & Haba, H. (2021). In vitro assessment of antioxidant, anti-inflammatory, neuroprotective and antimicrobial activities of *Centaurea tougourensis* Boiss. & Reut. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 9(6), 790–802.
- Berger, R.G., (2007). *Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability*: Springer Science & Business Media.
- Bicha, S., Bentamene, A., Benaissa, O., Benayache, S., Garcia, V. P., Leon, F., Brouard, I., Bermejo, J., ve Benayache, F. (2011). Flavonoid aglycones from *Centaurea maroccana*. *Chemistry of Natural Compounds*, 47(1), 105–106.
- Boğa, M., Alkan, H., Ertaş, A., Oral, E. V., Yılmaz, M. A., Yeşil, Y., Gören, A. C., Temel, H. ve Kolak, U. (2016). Phytochemical profile and some biological activities of three *Centaurea* species from Turkey. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15(9), 1865–1875.
- Bulut, F., Demirtas, I., Koldas, S., Gul, F., Behcet, L., Ozen, T., & Oke-Altuntas, F. (2021). The cytotoxicity and antioxidant activity analysis of the isolated constituents and extracts from endemic *Centaurea derderiifolia*. *Natural Product Research*, 35(11), 1919-1922.
- Canlı, C. (2018). *Fen Bilimleri Enstitüsü Bazı Endemik Centaurea L. (Asteraeaceae) Türlerinin Fitokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi Ve İlaç Sanayinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul: Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Cansaran, A., Doğan, N. M., Öztekin, M., Acar, G. (2010). Antimicrobial activity of various extracts of *Centaurea cankiriense* A. Duran and H. Duman, *African Journal of Microbiology Research*, 4(8), 608-612.
- Carev, I., Maravić, A., Bektašević, M., Ruščić, M., Siljak-Yakovlev, S., Politeol, O. (2018). *Centaurea rupestris* L.: Cytogenetics, essential oil chemistry and biological activity. *Croatica Chemica Acta*, 91(1), 11–18.
- Cavar, S., Maksimovic, M. ve Solic, M. (2011). Biological activity and essential oil analysis of endemic *Centaurea gloriosa* var. Multiflora Radic. *Analytical Chemistry Letters*, 1(2), 173–180.

- Chicca, A., Tebano, M., Adinolfi, B., Ertugrul, K., Flamini, G., Nieri, P. (2011). Anti-proliferative activity of aguerin B and a new rare nor-guaianolide lactone isolated from the aerial parts of *Centaurea deflexa*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 3066–3070.
- Ćirić, A., Karioti, A., Koukoulitsa, C., Skaltsa H., ve Soković, M. (2012). Sesquiterpene lactones from *Centaurea zuccariniana* and their antimicrobial activity. *Chemistry and Biodiversity*, 9 (12), 2843–2853.
- Conforti, F., Menichini, F., Loizzo, M. R., Statti, A. G., Rapisarda, A., Menichini, F., Houghton, P. J. (2008). Antioxidant, α -amylase inhibitory and brine-shrimp toxicity studies on *Centaurea centaurium* L. methanolic root extract. *Natural Product Research*, 22(16), 1457–1466.
- Csapi, B., Hajdú, Z., Zupkó, I., Berényi, A., Forgo, P., Szabó, P., Hohmann, J., (2010). Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea arenaria*. *Journal of Phytotherapy Research*, 24, 1664–1669.
- Csupor, D., Blazsób, G., Balogh, Á., Hohmann, J. (2010). The traditional Hungarian medicinal plant *Centaurea sadleriana* Janka accelerates wound healing in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 127, 193–195.
- Çelik, S. (2003). *Centaurea* L. Cinsi *Psephelloidea* (Boiss.) Sosn. Seksiyonuna Ait Türlerin Ekolojik Özellikleri. Doktora Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Çelik, S., Rosselli, S., Maggio, A. M., Raccuglia, R.A., Uysal, I., Kisiel, W. ve Michalska, K. (2006). Guaianolides and lignans from the aerial parts of *Centaurea ptosimopappa*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 34(4), 349–352.
- de Oliveira, A. P., Guimaraes, L., Turatti, I. C. C., Lopes, N. P. and da Silva Almeida, J. R. G. (2015). GC-MS analysis of esterified fatty acids obtained from leaves of wild and cultivated specimens of *Leonotis nepetifolia*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 9(16), 525-530.
- Dimkić, I., Petrović, M., Gavrilović, M., Gašić, U., Ristivojević, P., Stanković, S. ve Janačković, P. (2020). New perspectives of purple starthistle (*Centaurea calcitrapa*) leaf extracts: phytochemical analysis, cytotoxicity and antimicrobial activity. *Applied Microbiology and Biotechnology Express*, 10(1), 1–21.

- Djeddi, S., Karioti, A., Skaltsa, H., Sokovic, M., Stojkovic, D., ve Seridi, R. (2007). Minor sesquiterpene lactones from *Centaurea pullata* and their antimicrobial activity. *Journal of Natural Products*, 70(11), 1796–1799.
- Djeddi, S., Karioti, A., Sokovic, M., Koukoulitsac, C., Skaltsa, H. (2008). A novel sesquiterpene lactone from *Centaurea pullata*: Structure elucidation, antimicrobial activity, and prediction of pharmacokinetic properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(7), 3725-3731.
- Dural, H., Bagci, Y., Ertugrul, K., Demirelma, H., Flamini, G., Cioni, P.L. ve Morelli, I. (2003). Essential oil composition of two endemic *Centaurea* species from Turkey, *Centaurea mucronifera* and *Centaurea chrysantha*, collected in the same habitat. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31(12), 1417–1425.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M., (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Ereçevit Sönmez, P. ve Çakılcıoğlu, U. (2020). Screening of antimicrobial effect against microorganisms threatening to human health of the endemic plant; *Centaurea saligna* (C. Koch) Wagenitz from Turkey. *Türk Doğa ve Fen Dergisi*, 9, 23-27.
- Ereçevit, P. (2007). *Tıbbi amaçlar için kullanılan bazı bitki türlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi. Elazığ: Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Erel, S.B., Karaalp, C., Bedir, E., Kaehlig, H., Glasl, S., Khan, S., Krenn L. (2011). Secondary metabolites of *Centaurea calolepis* and valuation of cnicin for anti-inflammatory, antioxidant, and cytotoxic activities. *Pharmaceutical Biology*, 49(8), 840–849.
- Erel, S. B., Demir, S., Karaalp, C., Nalbantsoy, A., Ballar, P., Khan, S. ve Yavasoglu, N. U. K. (2014). Bioactivity screening of five *Centaurea* species and in vivo anti-inflammatory activity of *C. athoa*. *Pharmaceutical Biology*, 52(6), 775–781.
- Faydaoğlu, E. ve Sürücüoğlu, M.S. (2011). Geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 11(1), 52-67.
- Flamini, G., Pardini, M., Morelli, I., Ertugrul, K., Dural, H., Bagci, Y. and Kargioglu, M. (2002). Flavonoid glycosides from *Centaurea pseudoscabiosa* subsp. *pseudoscabiosa* from Turkey. *Phytochemistry*, 61(4), 433-437.

- Flamini, G., Tebano, M., Cioni, P. L., Bagci, Y., Dural, H., Ertugrul, K., Uysal, T. ve Savran, A. (2006). A multivariate statistical approach to *Centaurea* classification using essential oil composition data of some species from Turkey. *Plant Systematics and Evolution*, 261(1/4), 217–228.
- Formisano, C., Mignola, E., Senatore, F., Bancheva, S., Bruno, M., & Rosselli, S. (2008). Volatile constituents of aerial parts of *Centaurea sibthorpii* (Sect. *Carduiformes*, Asteraceae) from Greece and their biological activity. *Natural Product Research*, 22(10), 840–845.
- Fujita, T., Sezik, E., Tabata, M., Yeşilada, E., Honda, G., Takeda, Y., Tanaka, T. ve Takaishi, Y. (1995). Traditional medicine in Turkey VII. folk medicine in middle and west black sea regions. *Economic Botany*, 49(4), 406–422.
- Garbacki, N., Gloaguen, V., Damas, J., Bodart, P., Tits, M., Angenot, L. (1999). Anti-inflammatory and immunological effects of *Centaurea cyanus* flower-heads. *Journal of Ethnopharmacology*, 68(1-3), 235-241.
- Geppert, B., Drożdż, B., Kielczewski, M. ve Holub, M. (1983). Sesquiterpene lactones. XXIII. Isolation of sesquiterpene lactones from *Centaurea* L. species. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 52(1), 23–34.
- Giglio, A., Brandmayr, P., Dalpozzo, R., Sindona, G., Tagarelli, A., Talarico, F. and Ferrero, E. A. (2009). The defensive secretion of *Carabus lefebvrei* Dejean 1826 pupa (Coleoptera, Carabidae): gland ultrastructure and chemical identification. *Microscopy Research And Technique*, 72(5), 351-361.
- Göger, G., Yavaş, İ., Yur, S., Köse, Y. B., ve Özek, G. (2021). Volatiles and fatty acid analyzes of *Tripleurospermum decipiens* (Fisch & CA Mey) Bornm and investigation of the extracts for antimicrobial and enzyme inhibitory activities. *Journal of Research in Pharmacy*, 25(4), 429-440.
- Gonzalez, L.T., Espinosa, L.E.M., Estilla, A.M.R., Murillo, K.T., Aranda, R.S., De Torres, N. W., Pérez, P. C. (2011). Protective effect of four Mexican plants against CCl₄-induced damage on the Huh7 human hepatoma cell line. *Annals of Hepatology*, 10, 73–79.
- Grafakou, M. E., Djeddi, S., Skaltsa, H. ve Tarek, H. (2018). Secondary metabolites from the aerial parts of *Centaurea papposa* (Coss.) Greuter. *Biochemical Systematics and Ecology*, 76, 15–22.

- Grienke, U., Rollinger, J. M., Brkanac, S. R., Vujčić, V., Urban, E., Ivanković, S., Stojković, R., Kralj, J., Brozovic, A. ve Stojković, M.R. (2018). Biological activity of flavonoids and rare sesquiterpene lactones isolated from *Centaurea ragusina* L. *Frontiers in Pharmacology* 9, 972.
- Gulcemal, D., Alankus-Caliskan, O., Karaalp, C., Ors, A. U., Ballar, P., ve Bedird, E. (2010). Phenolic glycosides with antiproteasomal activity from *Centaurea urvillei* DC. subsp *urvillei*. *Carbohydrate Research*, 345(17), 2529–2533.
- Gürağaç Dereli, F.T., Ilhan, M., Küpeli Akkol, E. (2020). Identification of the main active antidepressant constituents in a traditional Turkish medicinal plant, *Centaurea kurdica* Reichardt. *Journal of Ethnopharmacology*, 249, 112373.
- Gürbüz, I., Yesilada, E. (2007). Evaluation of the anti-ulcerogenic effect of sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis* by using various in vivo and biochemical techniques. *Journal of Ethnopharmacology*, 112(2), 284-291.
- Hadjira, S., Mansour, A., Berkel, C., Seghiri, R., Menad, A., Benayache, F., Benayache, S., Cacan, E., Ameddah, S. (2021). Antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties of *Centaurea africana* Lamk var. [Bonnet] M. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, 20 (1), 89-100.
- Hamedeyazdan, S., Niroumand, F. & F. Fathiazad. (2017). Phytochemical analysis and antioxidative properties of *Centaurea albonitens*. *Research Journal of Pharmacognosy*, 4(4), 57-64.
- Honda, G., Yeşilada, E., Tabata, M., Sezik, E., Fujita, T., Takeda, Y., Takaishi, Y. ve Tanaka, T. (1996). Traditional medicine in Turkey VI. folk medicine in west anatolia: Afyon, Kütahya, Denizli, Muğla, Aydın Provinces. *Journal of Ethnopharmacology*, 53, 75-87.
- Janacković, P., Tešević, V.B., Milosavljevic, S., Vajs, V., Marin, P.D. (2004). Sesquiterpene lactones, lignans and flavones of *Centaurea affinis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(3), 355–357.
- Joulain, D., König, W. ve Hochmuth, D. (2001). *Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils*: Library of Mass Finder 2.1, Hamburg, Germany
- Kabouche, A., Kabouche, Z., Touzani, R., ve Bruneau, C. (2011). Flavonoids from *Centaurea sulphurea*. *Chemistry of Natural Compounds*, 46(6), 966–967.
- Kamanzi, K., Raynaud, J. ve Voirin, B. (1983). The C-glycosyl flavonoids from flowers of *Centaurea melitensis*. *Plantes Medicinales et Phytotherapie*. 17(1), 47-51.

- Karamenderes, C., Bedir, E., Abou-Gazar, H., Khan, I.A. (2007). Chemical constituents of *Centaurea cadmea*. *Chemistry of Natural Compounds*, 43(6), 694–695.
- Karamenderes, C., Demirci, B. ve Başer, K. H. C. (2008). Composition of essential oils of ten *Centaurea* L. taxa from Turkey. *Journal of Essential Oil Research*, 20(4), 342-349.
- Kargün, K. (2011). *B7 Elazığ bölgesinde yetişen Centaurea, Psephellus ve Cyanus cinslerine ait türler üzerinde morfolojik ve palinolojik araştırmalar*. Yüksek Lisans Tezi. Bartın Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Karioti, A., Skaltsa, H., Lazari, D., Sokovic, M., Garcia, B. & Harvala, C. (2002). Secondary Metabolites from *Centaurea deusta* with Antimicrobial Activity. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(1-2), 75-80.
- Keser, S., Keser, F., Turkoglu, I., Kaygılı, Ö., Tekin, S., Demir, E., Karatepe, M., Yılmaz, Ö., Kırbağ, S., Sandal, S. ve Turkoglu, S. (2020). In vitro biological evaluation and phytochemical contents of three *Centaurea* L. species growing from eastern anatolia in Turkey. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 23(1), 148–156.
- Keyvanloo Shahrestanaki, M., Bagheri, M., Ghanadian, M., Aghaei, M., & Jafari, S. M. (2019). *Centaurea cyanus* extracted 13-O-acetylsolstitialin A decrease Bax/Bcl-2 ratio and expression of cyclin D1/Cdk-4 to induce apoptosis and cell cycle arrest in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(10), 18309–18319.
- Khammar, A. ve Djeddi, S. (2012). Pharmacological and biological properties of some *Centaurea* species. *European Journal of Scientific Research*, 84(3), 398-416.
- Khan, A. N., Fatima, I., Khaliq, U. A., Malik, A., Miana, G. A., Qureshi, Zia-ur-R, Rasheed, H. (2011). Potent anti-platelet constituents from *Centaurea iberica*. *Molecules*, 16, 2053-2064.
- Kılıç, Ö. (2013). Journal of medicinal plants research essential oil compounds of three *Centaurea* L. taxa from Turkey and their chemotaxonomy. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(19), 1344-1350.
- Koca, U., Suntar, I. P., Keles, H., Yesilada, E., Akkol, E. K. (2009a). In vivo anti-inflammatory and wound healing activities of *Centaurea iberica* Trev. Ex Spreng, *Journal of Ethnopharmacology*, 126(3), 551-556.

- Koca, U., Toker, G., Akkol, E. K. (2009b). Assessment of the extracts of *Centaurea tchihatcheffii* fischer for anti-inflammatory and analgesic activities in animal models. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8 (3), 193-200.
- Korga, A., Homa, M., Dudka, J., Józefczyk, A., Zgórk, G., Ostrowska, M. ve Burdan. F. (2017). Evaluation of the phytochemical composition and protective activities of methanolic extracts of *Centaurea borysthénica* and *Centaurea daghestanica* (Lipsky) Wagenitz on cardiomyocytes treated with doxorubicin. *Food and Nutrition Research* 61, 1344077.
- Koşar, M., Göger, F., Başer, K.H.C. (2008). In vitro antioxidant properties and phenolic composition of *Salvia virgata* Jacq. from Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(7), 2369-2374.
- Köse, Y.B., İşcan, G., Demirci, B., Başer, K.H.C., Çelik, S. (2007). Antimicrobial activity of the essential oil of *Centaurea aladagensis*. *Fitoterapia*, 78(3), 253-254.
- Köse, Y. B., Demirci, B., Başer, K. H. C. & Yücel, E. (2008). Composition of the essential oil of three endemic *Centaurea* Species from Turkey. *Journal of Essential Oil Research*, 20(4), 335–338.
- Köse, Y. B., İşcan, G., Göger, F., Akalın, G., Demirci, B., ve Başer, K. H. C. (2016). Chemical composition and biological activity of *Centaurea baseri*: new species from Turkey. *Chemistry and Biodiversity*, 13(10), 1369–1379.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R. ve Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, 8(9), 217–233.
- Kumarasamy, Y., Middleton, M, Reid, R. G., Nahar, L, Sarker, S. D. (2003). Biological activity of serotonin conjugates from the seeds of *Centaurea nigra*. *Fitoterapia*, 74(6), 609-612.
- Lonergan, G., Routsis, E., Georgiadis, T., Ageus, G., Hondrelis, J., Matsoukas, J., Larsen, L.K. ve Capean, F.R. (1992). Isolation, Nmr studies, and biological activities of onopordopicrin from *Centaurea sonchifolia*. *Journal of Natural Products*, 55 (2), 225–228.
- Medjroubi, K., Benayache, F. ve Bermejo, J. (2005). Sesquiterpene lactones from *Centaurea musimomum* antiplasmodial and cytotoxic activities. *Fitoterapia*, 76(7–8), 744–746.

- Meepagala, K. M., Osbrink, W., Sturtz, G., & Lax, A. (2006). Plant-derived natural products exhibiting activity against formosan subterranean termites (*Coptotermes formosanus*). *Pest Management Science*, 62(6), 565–570.
- Mishio, T., Iwashina T. ve Takeda, K. (2015). Anthocyanins and other flavonoids as flower pigments from eleven *Centaurea* species. *Natural Product Communications*, 10(3), 447–450.
- Mothana, R. A. A., Abdo, S. A. A., Hasson, S., Althawab, F. M. N., Alaghbari, S. A. Z., Lindequist, U. (2010). Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical screening of some yemeni medicinal plants. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 7(3), 323–330.
- Möller, R., Nürnberg, G., Albrecht, E., Ruth, W., Brockmann, G. A., & Dannenberger, D. (2019). A method for analyzing fatty acids in cattle hair, with special emphasis on lauric acid and myristic acid. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 121(11), 1900143.
- Naeim, H., El-Hawiet, A., Abdel Rahman, R. A., Hussein, A., El Demellawy, M. A., Embaby, A. M. (2020). Antibacterial activity of *Centaurea pumilio* L. root and aerial part extracts against some multidrug resistant bacteria. *BioMed Central Complementary Medicine And Therapies*, 20, 79.
- Negrete, R. E., Backhouse, N., Cajigal, I., Delporte, C., Cassels, B. K., Breitmaier, E., Eckhardt, G. (1993). Two new antiinflammatory elemanolides from *Centaurea chilensis*. *Journal of Ethnopharmacology*. 40(3), 149-153.
- Öksüz, S., Salan, Ü., Topçu, G. (2013). Flavonoids of *Centaurea kilaea* and *C. salonitana*. *Journal of Faculty of Pharmacy of Istanbul University*, 34, 55-61.
- Özcan, K., Acet, T., ve Çorbacı, C. (2019). *Centaurea hypoleuca* DC: Phenolic content, antimicrobial, antioxidant and enzyme inhibitory activities. *South African Journal of Botany*, 127, 313–318.
- Özçelik, B., Gürbüz, I., Karaoglu, T., Yeşilada, E. (2009). Antiviral and antimicrobial activities of three sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis*. *Microbiological Research*, 164(5), 545-552.
- Özek, G., Chidibayeva, A., Ametov, A., Nurmahanova, A., & Özek, T. (2022). Chemical composition of flower volatiles and seeds fatty acids of *Rosa iliensis* Chrshan, an endemic species from Kazakhstan. *Records of Natural Products*, 16(3), 225-235.

- Özkan, M., Kırca, A. ve Cemeroğlu, B. (2007). Gıdalara uygulanan bazı özel analiz yöntemleri. B. Cemeroğlu, (Ed.). *Gıda Analizleri içinde* (s.129-186). Ankara: Bizim Büro Basımevi.
- Polatoglu, K., Sen, A., Bitis, L., Bulut, G. ve Gören, N. (2014). Essential oil composition of *Centaurea stenolepis* Kerner. from Turkey. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* 17(6), 1268–1278.
- Quintana, N., El Kassis, E. G., Stermitz, F. R., Vivanco, J. M. (2009). Phytotoxic compounds from roots of *Centaurea diffusa* Lam. *Plant Signaling Behavior*, 4(1), 9–14.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Rusak, G., Krajacic, M., Plese, N. (1997). Inhibition of tomato bushy stunt virüs infection using a quercetagenin flavonoid isolated from *Centaurea rupestris* L. *Antiviral Research*, 36(2), 125-129.
- Russo, A., Cardile, V., Graziano, A. C. E., Rigano, D., Aktumsek, A., Zengin, G., ve Senatore, F. (2016). Effect of three *Centaurea* species collected from central anatolia region of Turkey on human melanoma cells. *Natural Product Communications*, 11(3), 275–278.
- Sahin Yaglioglu, A., Demirtas, I., & Goren, N. (2014). Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea carduiformis* DC. *Phytochemistry Letters*, 8, 213–219.
- Sarker, S. D., Laird, A., Nahar, L., Kumarasamy, Y., Jaspars, M. (2001). Indole alkaloids from the seeds of *Centaurea cyanus* (Asteraceae). *Phytochemistry*, 57(8), 1273-1276.
- Sarker, S. D., Nahar, L., Gujja, S., Begum, S. & Celik, S. (2012). Bioactivity of *Centaurea persica* Boiss. (Asteraceae). *Archives of Biological Sciences*, 64(2), 517–523.
- Sayar, A., Güvensen, A., Ozdemir, F. ve Öztürk, M. (1990). Muğla (Türkiye) ilindeki bazı türlerin etnobotanik özellikleri. *Ot Sistematik Botanik Dergisi*, 2(1), 151-160.
- Seghiri, R., Boumaza, O., Mekkiou, R., Benayache, S., Mosset, P., Quintana, J., Estévez, F., León, F., Bermejo, J., Benayache, F. (2009). A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea africana*. *Phytochemistry Letters*, 2(3), 114-118.

- Senatore, F., Landolfi, S., Celik, S., Bruno, M. (2006). Volatile components of *Centaurea calcitrapa* L. and *Centaurea sphaerocephala* L. ssp *sphaerocephala*, two Asteraceae growing wild in Sicily. *Flavour and Fragrance Journal*, 21(2), 282-285.
- Senatore, F., Formisano, C., Raio, A., Bellone, G., Bruno, M. (2008). Volatile components from flower-heads of *Centaurea nicaeensis* All., *C. parlatoris* Helder and *C. solstitialis* L. ssp *schoenwii* (DC.) Dostal growing wild in southern Italy and their biological activity. *Natural Product Research*, 22(10), 825-832.
- Senosy, W., Kamal, A., El-Toumy, S., Gendy, E. and Hussein, E. (2018). Phenolic compounds and Hepatoprotective activity of *Centaurea aegyptiaca* L. on Carbon Tetrachloride-induced Hepatotoxicity in Rats. *Journal of Advanced Pharmacy Research*, 2(2), 123-132.
- Sepulveda, S., Delhvi, S., Koch, B., Zilliken, F. (1994). Constituents of *Centaurea chilensis*. *Fitoterapia*, 65(1), 88-89.
- Sezik, E., Yeşilada, E., Tabata, M., Honda, G., Takaishi, Y., Fujita, T., Tanaka, T. ve Takeda, Y. (1997). Traditional medicine in Turkey VIII. folk medicine in east anatolia; Erzurum, Erzincan, Ağrı, Kars, Iğdır provinces. *Economic Botany*, 51(3), 195–211.
- Sezik, E., Yeşilada, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y., Tanaka, T. (2001). Traditional medicine in Turkey X. folk medicine in central anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, 75, 95-115.
- Shadid, K.A., Al-Lahham, S., Jaradat, N., Abu-Nameh, E. S. M. ve Qaisi, A. M. (2019). Preliminary phytochemical screening, antioxidant and antimicrobial activities of the aqueous, methanol, acetone, and hexane fractions of *Centaurea cyanoides* Wahlenb. *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(1), 21–32.
- Shakeri, A., Amini, E., Asili, J., Masullo, M., Piacente, S., ve Iranshahi, M. (2018). Screening of several biological activities induced by different sesquiterpene lactones isolated from *Centaurea behen* L. and *Rhaponticum repens* (L.) Hidalgo. *Natural Product Research*, 32(12), 1436–1440.
- Sharonova, N., Nikitin, E., Terenzhev, D., Lyubina, A., Amerhanova, S., Bushmeleva, K., Rakhmaeva, A., Fitsev, I., ve Sinyashin, K. (2021). Comparative assessment of the phytochemical composition and biological activity of extracts of flowering

- plants of *Centaurea cyanus* L., *Centaurea jacea* L. and *Centaurea scabiosa* L. *Plants-Basel*, 10(7), 1279.
- Shoeb, M., Celik, S., Jaspars, M., Kumarasamy, Y., MacManus, S. M., Nahar, L., Thoo-Lin, P. K., Sarker, S. D. (2005). Isolation, structure elucidation and bioactivity of schischkiniin, a unique indole alkaloid from the seeds of *Centaurea schischkini*. *Tetrahedron*, 61(38), 9001-9006.
- Shoeb, M., MacManus, S.M., Kumarasamy, Y., Jaspars, M., Nahar, L., Thoo-Lin, P.K., Nazemiyeh, H., Sarker, S.D. (2006). Americanin, a bioactive dibenzylbutyrolactone lignan, from the seeds of *Centaurea americana*. *Phytochemistry*, 67(21), 2370-2375.
- Shoeb, M., Celik, S., Nahar, L., MacManus, S. M., Kong-Thu-Lin, P., Jaspars, M., Sarker, S. D. (2007^a). Two salonitenolide derivatives from the aerial parts of *Centaurea gigantea* inhibit the growth of colorectal cancer cells in vitro. *Natural Product Communications*, 2(2), 121–125.
- Shoeb, M., MacManus, S. M., Jaspars, M., Kong-Thoo-Lin, P., Nahar, L., Celik, S., Sarker, S. D. (2007^b). Bioactivity of two Turkish endemic *Centaurea* species, and their major constituents. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 17(2), 155-159.
- Skaltsa, H., Lazaria, D., Panagouleasa, C., Georgiadou, E., Garciab, B., Sokovic, M. (2000). Sesquiterpene lactones from *Centaurea thessala* and *Centaruea attica*. antifungal activity. *Phytochemistry*, 55(8), 903-908.
- Skliar, M. I., Toribio, M. S., Oriani, D. S. (2005). Antimicrobial activity of *Centaurea diffusa*. *Fitoterapia*, 76 (7-8), 737-739.
- Sokovic, M., Ciric, A., Glamoclij, J. ve Skaltsa, H. (2017). Biological activities of sesquiterpene lactones isolated from the genus *Centaurea* L. (Asteraceae). *Current Pharmaceutical Design*, 23, 2767-2786.
- Sümer, T. B., Judit, H. ve Bijen, K. (2018). Green bio-inspired synthesis, characterization and activity of silver nanoparticle forms of *Centaurea virgata* Lam. and the isolated flavonoid eupatorin. *Green Processing and Synthesis*, 7(4), 372–379.
- Şen, A., Bitiş, L., Birteksöz, S., Bulut, G. (2010). Bazı *Centaurea* türlerinin kapitulumlarının antioksidan, antimikrobiyal aktivitelerinin ve toplam fenol içeriklerinin karşılaştırılması. 19. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı (19.BİHAT) Bildiri Özeti Kitabı, Mersin, s.86.

- Şen, A. (2011). *Centaurea stenolepis* Kerner Bitkisi Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul: Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Şen, A., Özbaş Turan, S., & Bitis, L. (2017). Bioactivity-guided isolation of anti-proliferative compounds from endemic *Centaurea kilaea*, *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 541-546.
- Şen, A., Kurkcuoglu, M., Yildirim, A., Senkardes, I., Bitis, L. ve Baser, K. H. C. (2021). Chemical composition, antiradical, and enzyme inhibitory potential of essential oil obtained from aerial part of *Centaurea pterocaula* Trautv. *Journal of Essential Oil Research*, 33(1), 44-52.
- Tabata, M., Sezik, E., Honda, G., Yeşilada, E., Fukui, H., Goto, K., Ikeshuri, Y. (1994). Traditional medicine in Turkey III. folk medicine in east anatolia, Van and Bitlis provinces. *International Journal of Pharmacognosy*, 32(1), 3-12.
- Tekin, M., Özek, G., Martin, E., Özek, T., Yılmaz, G. & Başer, K. H. C. (2018). Essential oil characterization of *Cousinia sivasica* Hub.-Mor. Asteraceae. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 11 (2), 16-21.
- Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H. A, Yumrutas, O, Sokmen, A. (2006). Screening of antioxidative properties of the methanolic extracts of *Pelargonium endlicherianum* Fenzl., *Verbascum wiedemannianum* Fisch & Mey., *Sideritis libanotica* Labill. subsp linearis (Bentham) Borm., *Centaurea mucronifera* DC. and *Hieracium cappadocicum* Freyn from Turkish flora. *Food And Chemistry*, 98 (1), 9-13.
- Tešević, V., Aljančić, I., Milosavljević, S., Vajs, V., Đorđević, I., Jadranin, M., Menković, N. ve Matevski, V. (2014). Secondary metabolites of three endemic *Centaurea* L. species. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 79(11), 1355–1362.
- Tiwana, G., Fua, J., Lu, L., Cheesman, M. J. ve Cock, I. E., (2021). A review of the traditional uses, medicinal properties and phytochemistry of *Centaurea benedicta* L. *Pharmacognosy Journal*, 13(3), 798–812.
- Tuzlacı, E., Erol, M. K., (1999). Turkish Folk Medicinal Plants. Part II. Eğirdir (Isparta). *Fitoterapia*, 70, 593-610.
- Tuzun, B.S., Hajdu, Z., Orban-Gyapai, O., Zomborszki, Z.P., Jedlinszki, N., Forgo, P., Kivcak, B., Hohmann, J., (2017). Isolation of chemical constituents of *Centaurea virgata* Lam. and xanthine oxidase-inhibitory activity of the plant extract and compounds. *Medicinal Chemistry*, 13(5), 498–502.

- Uddin, S., Alnsour, L., Segun, P., Servi, H., Celik, S., Göktürk, R. S. and Sarker, S. D. (2017). Flavonoids from two Turkish *Centaurea* species and their chemotaxonomic implications. *Trends in Phytochemical Research*, 1(4), 243-248.
- Ulubelen, A. and Öksüz, S. (1982). Cytotoxic flavones from *Centaurea urvillei*. *Journal of Natural Products*, 45(3), 373-373.
- Ulusoylu, M., (2004). *Centaurea iberica ve Centaurea triumfettii türleri üzerinde farmakognozik araştırmalar*. Doktora Tezi. İstanbul: Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Uysal, A., Zengin, G., Mahomoodally, M. F., Picot-Allain, C., Jekő, J., Cziáky, Z., Rodrigues, M. J., Ak, G., Polat, R., Urusan, Z., Sinan, K. I., & Custodio, L. (2021). A comparative study on biological properties and chemical profiles of different solvent extracts from *Centaurea bingöelensis*, an endemic plant of Turkey. *Process Biochemistry*, 102, 315–324.
- Vajs, V., Todorovic, N., Ristic, M., Tesevic, V., Todorovic, B., Janackovic, P., Marin, P., Milosavljevic, S. (1999). Guaianolides from *Centaurea nicolai*: antifungal activity. *Phytochemistry*, 52(3), 383-386.
- Vujčić, V., Radić Brkanac, S., Radojčić Redovniković, I., Ivanković, S., Stojković, R., Žilić, I. ve Radić Stojković, M. (2017). Phytochemical and bioactive potential of in vivo and in vitro grown plants of *Centaurea ragusina* L. – Detection of DNA/RNA active compounds in plant extracts via thermal denaturation and circular dichroism. *Phytochemical Analysis*, 28(6), 584–592.
- Wagenitz, G. (1975). *Centaurea* L. In: P.H. Davis (Ed.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol. 5, pp. 465–585. Edinburgh: Edinburgh University Press.
- Wagenitz, G. (1986). *Centaurea* in Southwest Asia. Patterns of distribution and diversity. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*, 89(B), 11-21.
- Yaylı, N., Yaşar, A., Güleç, C., Usta, A., Kolaylı, S., Coşkunçelebi, K., ve Karaoğlu, Ş. (2005). Composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea sessilis* and *Centaurea armena*. *Phytochemistry*, 66(14), 1741–1745.
- Yaylı, N., Yaşar, A., Yaylı, N., Albay, C., Asamaz, Y., Coskunçelebi, K., Karaoğlu, S. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea appendicigera* and *Centaurea helenioides*. *Pharmaceutical Biology*, 47(1), 7-12.

- Yeşilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Fujita, T., Tanaka, T., Takeda, Y. ve Takaishi, Y. (1995). Traditional medicine in Turkey V. folk medicine in the inner taurus mountain. *Journal of Ethnopharmacology*, 46, 133-152.
- Yesilada, E., Gurbuz, I., Bedir, E., Tatli, I., Khan, W. A. (2004). Isolation of anti-ulcerogenic sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. solstitialis through bioassay-guided fractionation procedures in rats. *Journal of Ethnopharmacol*, 95(2-3), 213-219.
- Yıldırım, N. (2008). *Centaurea balsamita* Lam. ve *Centaurea coronopifolia* Lam. türlerinin antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Konya: Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Yırtıcı, Ü. (2019). *Centaurea fenzlii* Reichardt özütünün antioksidan özellikleri ve enzim inhibisyon etkisinin belirlenmesi. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 8(1), 66–73.
- Zengin, G., Cakmak, Y. S., Guler, G. O., Aktumsek, A. (2010). In vitro antioxidant capacities and fatty acid compositions of three *Centaurea* species collected from central anatolia region of Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), 2638-2641.
- Zengin, G., Sarikurkcu, C., Aktumsek, A., Ceylan, R. (2014). Sideritis galatica Bornm: a source of multifunctional agents for the management of oxidative damage, Alzheimer's's and diabetes mellitus. *Journal of Functional Foods*, 11, 538-547.
- Zengin, G., Llorent-Martínez, E. J., Sinan, K. I., Yıldıztuğay, E., Picot-Allain, C., ve Mahomoodally, M. F. (2019^a). Chemical profiling of *Centaurea bornmuelleri* Hausskn. aerial parts by HPLC-MS/MS and their pharmaceutical effects: From nature to novel perspectives. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 174, 406–413.
- Zengin, G., Zheleva-Dimitrova, D., Gevrenova, R., Aktumsek, A., Sinan, K. I., and Mahomoodally, M. F. (2019^b). A comparative assessment of the LC-MS profiles and cluster analysis of four *Centaurea* species from Turkey. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20, 101-189.

http-1

<https://www.pavelkaalpines.cz/Photos/MakedonieNepalTurecko2013/centaureamucroniferabolkarturkey.html>, (Erişim tarihi: 26.05.2022)

http-2

http://194.27.225.161/yasin/tubives/index.php?sayfa=1&tax_id=5517, (Erişim tarihi:
01.12.2021)

http-3

<https://sciencesolutions.wiley.com/solutions/technique/gc-ms/>, (Erişim tarihi:
02.04.2021)