

FARMAKOGNOZİ VE DOĐAL ÜRÜNLER KİMYASI
DOKTORA PROGRAMI
2022

1. R***** Y**** İki Endemik Sideritis Türü Üzerinde Fitokimyasal ve Biyoaktivite Çalışmaları

İKİ ENDEMİK SİDERİTİS TÜRÜ ÜZERİNDE FİTOKİMYASAL VE BİYOAKTİVİTE ÇALIŞMALARI

ÖZET

Bu çalışmada ülkemiz için yüksek endemizm gösteren *Sideritis* cinsine ait iki tür olan *Sideritis congesta* P.H. Davis et Hub.-Mor. ve *Sideritis stricta* Boiss. & Heldr. apud Bentham için fitokimyasal ve biyoaktivite çalışmaları yürütülmüştür.

İki bitkinin topraküstü kısımlarından maserasyon ile metanol (MeOH) ekstraktları ayrı ayrı hazırlanmış, ardından sıvı-sıvı geri-ekstraksiyon ile petrol eteri (PE), diklorometan (DCM), etilasetat (EtOAc) ve butanol (BuOH) ekstraktları elde edilmiştir.

Seçilen ekstraktlarda (MeOH, PE, DCM ve BuOH) sitotoksik aktivite WST-1 hücre proliferasyon testi ile MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları ile MCF-10A fibrokistik meme epitelyal hücre hattında test edilmiştir. Test edilen ekstraktlar içinde *S. congesta* için DCM ekstresi, *S. stricta* için DCM ve PE ekstraktları diğer ekstraktlardan daha aktif olarak gözlenmiştir.

S. stricta BuOH ekstresi, tüm ekstraktlar içinde en yüksek ekstraksiyon verimine sahip olduğu için ve *S. congesta* DCM ekstresi diğer ekstraktlardan daha aktif bulunduğu için çeşitli kromatografik yöntemlerle saflaştırma işlemine tabi tutulmuştur. *S. congesta* DCM ekstresinden linearol, 7-epikandikandiol ve foliol; *S. stricta* BuOH ekstresinden ise 4'-*O*-metilhipolaetin-7-*O*-[6'''-*O*-asetil- β -D- allopiranozil-(1 \rightarrow 2)-6''-*O*-asetil]- β -D- glikopiranozit (F1), izoskutellerain-7-*O*-[6'''-*O*-asetil- β -D-allopiranozil-(1 \rightarrow 2)-6''-*O*-asetil- β -D-glikopiranozit] (F2), 4'-*O*-metilizoskutellerain-7-*O*-[6'''-*O*-asetil- β -D-allopiranozil-(1 \rightarrow 2)-6''-*O*-asetil- β -D- glikopiranozit] (F3), 3'-*O*-metilhipolaetin-7-*O*-[6'''-*O*-asetil- β -D- allopiranozil-(1 \rightarrow 2)-6''-*O*-asetil- β -D- glikopiranozit] (F4), saflaştırılmıştır. Saflaştırılan maddelerin yapı tayini 1D ve 2D-NMR ile MS spektroskopik yöntemleri kullanılarak yapılmıştır.

Sıvı-sıvı ekstraksiyonla elde edilmiş PE, DCM, EtOAc ve BuOH ekstraktlarında fenolik maddelerin tespiti ve miktar tayini LC-HRMS ile gerçekleştirilmiştir. Her iki bitkinin alt ekstraktlarının analizi en zengin fenolik madde içeriğinin EtOAc ve müteakiben BuOH ekstraktlarında olduğunu göstermiştir. *S. congesta* ekstraktlarında p-kumarik asit ve verbaskozit, *S. stricta* ekstraktlarında ise verbaskozit ve klorojenik asit yüksek miktarda saptanmıştır.

S. congesta DCM ekstresinden izole edilen linearol ve 7-epikandikandiol maddeleri için WST-1 testi gerçekleştirilmiş ve ekstrakte linearolün yüksek miktarda bulunmasına rağmen aktivite göstermediği, dolayısıyla ekstraktın aktivitesinden sorumlu olmadığı, buna karşın 7-epikandikandiol 72 saat inkübasyon ile MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında orta-iyi derecede aktivite gösterdiği bulunmuştur (IC₅₀ değerleri sırasıyla 12.39, 31.96 ve 11.90 μ M bulunmuştur).

Saflaştırılmış diterpenler (linearol, foliol ve 7-epikandikandiol) ile F2, F3 ve F4 flavonoid glikozitlerinde sitotoksik aktivite tayini resazurin testi ile CCRF-CEM ve çoklu ilaca dirençli CEM/ADR5000 lösemi hücre hatları kullanılarak da yapılmıştır.

Flavonoid glikozitleri seçilen hücre hatları üzerinde aktif bulunmazken test edilen diterpenlerden en aktifi 7-epikandikandiol olarak saptanmıştır (IC₅₀ değeri her iki hücre hattı için sırasıyla 16.83 ± 1.00 µM ve 31.52 ± 3.00 µM).

Tez kapsamında *Sideritis congesta*, *Zingiber officinale* (zencefil), *Tilia* sp. (ıhlamur) ve *Cinnamomum* sp. (tarçın) bitkilerinin ekstreleri kullanılarak şurup formülasyonu hazırlanmış ve formülasyona giren bitkilerin geleneksel kullanımları doğrultusunda üst solunum yolları enfeksiyonu ile ilişkili semptomların azaltılmasında kullanılabileceği belirtilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Sideritis congesta*, *Sideritis stricta*, ekstraksiyon, izolasyon, yapı tayini, LC-HRMS, sitotoksik aktivite, şurup formülasyonu

PHYTOCHEMICAL AND BIOACTIVITY STUDIES ON TWO ENDEMIC SIDERITIS SPECIES

SUMMARY

In this thesis study, phytochemical and bioactivity studies were carried out on *Sideritis congesta* P.H. Davis et Hub-Mor and *Sideritis stricta* Boiss. & Held. apud Bentham, two species belonging to *Sideritis* genus, which has a high endemism ratio for our country.

The aerial parts of the two species were first macerated with methanol (MeOH) separately to get the main extracts. Then the main extracts were subjected to liquid-liquid re-extraction to get the sub-extracts of petroleum ether (PE), dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EtOAc) and butanol (BuOH).

Cytotoxic activity in selected extracts (MeOH, PE, DCM and BuOH) was tested using WST-1 cell proliferation assay on MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines and MCF-10A fibrocystic breast epithelial cell line. Comparison of IC₅₀ values showed that DCM extract for *S. congesta*, DCM and PE extracts for *S. stricta* had more antiproliferative activity than the rest extracts.

Since *S. stricta* BuOH extract had the highest extraction yield among all extracts and *S. congesta* DCM extract was found to be more active than other extracts, they were subjected to isolation by column and thin layer chromatography techniques. Linearol, 7-epicandicandiol, and foliol were isolated from *S. congesta* dichloromethane extract while four flavonoid glycosides 4'-*O*-methylhypolaetin 7-*O*-[6'''-*O*-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- 6''-*O*-acetyl- β -D-glucopyranoside] (F1), isoscutellarein 7-*O*-[6'''-*O*-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- 6''-*O*-acetyl- β -D-glucopyranoside] (F2), 4'-*O*-methylisoscutellarein 7-*O*-[6'''-*O*-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- 6''-*O*-acetyl- β -D-glucopyranoside] (F3), 3'-*O*-methylhypolaetin 7-*O*-[6'''-*O*-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- 6''-*O*-acetyl- β -D-glucopyranoside] (F4) were isolated from *S. stricta* butanol extract. Structure elucidation of the isolated compounds was made with 1D- and 2D NMR and MS techniques.

By using LC-HRMS, identification and quantification of phenolic compounds was performed in the PE, DCM, EtOAc and BuOH extracts obtained by liquid-liquid extraction. EtOAc extracts followed by BuOH extracts were found to have high concentrations of phenolic content in both species. While *p*-coumaric acid and verbacoside were found to be in large quantities in *S. congesta* extracts, *S. stricta* extracts were rich in verbacoside and chlorogenic acid, in general.

WST-1 test is also performed for linearol and 7-epicandicandiol isolated from *S. congesta* DCM extract. Although linearol was present to be high quantities in *S. congesta* DCM extract, it was not found to be active on the tested cell lines, showing that the activity of DCM extract can not be attributed to linearol. In contrast 7-epicandicandiol showed moderate activity on MCF-7, MDA-MB-231 and MCF-10A

cell lines after 72 hours of incubation (IC₅₀ values were found to be 12.39, 31.96 and 11.90 µM, respectively).

Cytotoxic activity assay in purified diterpenes (linearol, 7-epicandiciol and foliol) and F2, F3 and F4 flavonoid glycosides was performed by means of resazurin assay on CCRF-CEM and multi-drug resistant CEM/ADR5000 leukemia cell lines. The flavonoid glycosides were not found to be active on the selected cell lines, however 7-epicandiciol among the three kaurene diterpenes was found to be the most active diterpene (IC₅₀ 16.83 ± 1.00 µM and 31.52 ± 3.00 µM for two cell lines, respectively).

Within the scope of the thesis by using the extracts of *Sideritis congesta*, *Zingiber officinale* (ginger), *Tilia* sp. (linden) and *Cinnamomum* sp. (cinnamon) a syrup formulation was prepared. In accordance with the traditional usage of the plants in the formulation the syrup can be used to reduce the symptoms of upper respiratory tract infections.

Key words : *Sideritis congesta*, *Sideritis stricta*, extraction, isolation, structure elucidation, LC-HRMS, cytotoxic activity, syrup formulation