






Rumex crispus L.'dan Sekonder Metabolitlerin Kromatografik Yöntemlerle İzolasyonu ve Tayini

Isolation and Determination of Secondary Metabolites from *Rumex crispus* L. by Chromatographic Methods

Elif GÜNAY¹ , Dilek MUTLU² , Deniz KÜPÇÜK¹ , Gizem YILDIRIM BAŞTEMUR² ,
Sabriye PERÇİN ÖZKORUCUKLU^{2*} 

*Makale Bilgisi / Article Info

Alındı/Received: 14.05.2024

Kabul/Accepted: 27.08.2024

Yayımlandı/Published:02.12.2024

¹ İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

² İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul, Türkiye

© Afyon Kocatepe Üniversitesi

Öz

İnsanlar binlerce yıldır bitkilerin sağlık açısından faydalı özelliklerinden yararlanmaktadır. Günümüzde, tıp biliminin yanı sıra başta kozmetik endüstrisinde olmak üzere birçok sektörde bitkiler kullanılmaktadır ve bitkilerin fitokimyasal içeriklerinin belirlenmesine ilişkin çalışmalar da hızla artmaktadır. Halk arasında çeşitli amaçlarla kullanılan *Rumex crispus* L. bitkisi özellikle fenolik bileşikler ve antrakinonlar olmak üzere zengin sekonder metabolit içeriğinden dolayı dikkat çekmektedir. Bu çalışmada Türkiye’de yetişen *Rumex crispus* L. bitkisinden katma değere sahip fenolik bileşik ve antrakinonların izolasyonu pratik ve ekonomik bir metot olan gravity kolon kromatografisi ile gerçekleştirilmiştir. Ekstrakt apolar çözücü sistemden polar çözücü sistemine doğru fraksiyonlara ayrılmış ve bu fraksiyonlardaki fenolik bileşik ve antrakinon miktarları ters faz sıvı kromatografisi (RPLC) yöntemi ile belirlenmiştir. Protocateşik asit, gentisik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, polydatin, kumarin, resveratrol ve ellajik asit izolasyonu için etil asetat-metanol (6:4) çözücü sisteminin uygun olduğuna karar verilmiştir. Sonuç olarak, bitkilerdeki sekonder metabolitlerin araştırılmasında maliyeti düşük olan gravity kolon kromatografisi kullanılarak fenolik bileşiklerin ve antrakinonların saflaştırılabileceği ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Rumex crispus* L.; Gravity kolon kromatografisi; RPLC; Fenolik bileşik; Antrakinon.

Abstract

People have been benefiting from the health benefits of plants for thousands of years. Nowadays, plants are used in many sectors, especially in the cosmetic industry, as well as medical science, and studies on the determination of the phytochemical contents of plants are rapidly increasing. *Rumex crispus* L., a plant commonly used for various purposes by the public, attracts attention due to its rich secondary metabolite content, especially phenolic compounds and anthraquinones. In this study, the isolation of valuable phenolic compounds and anthraquinones from the *Rumex crispus* L. plant grown in Turkey was carried out by gravity column chromatography, which is a practical and economical method. The extract was divided into fractions from the nonpolar solvent system to the polar solvent system, and the amounts of phenolic compounds and anthraquinones in these fractions were determined by the reverse phase liquid chromatography (RPLC) method. It was decided that the ethyl acetate-methanol (6:4) solvent system was suitable for the isolation of protocatechuic acid, gentisic acid, caffeic acid, p-coumaric acid, polydatin, coumarin, resveratrol and ellagic acid. Consequently, it has been revealed that phenolic compounds and anthraquinones can be purified by using low-cost gravity column chromatography in the investigation of secondary metabolites in plants.

Keywords: *Rumex crispus* L.; Gravity column chromatography; RPLC; Phenolic compound; Anthraquinone.

1. Giriş

Bitkiler, insanlığın başlangıcından beri tedavi edici güçlerinden yararlanmak için ilaç olarak kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yayınlanan bir rapora göre dünya üzerindeki insanların yaklaşık %80'i, hastalıkları tedavi etmek için geleneksel bilgilere dayanarak bitki ve bitki özlerini kullanmaktadır (WHO, 1993). Bu amaçla kullanılan ve üzerinde çalışmalar yürütülen bir bitki olan *Rumex crispus* L., Türkiye’de yetişen çok yıllık yabani bir bitki olup genellikle nehir kıyıları, bataklıklar ve boş araziler gibi çeşitli ekosistemlerde yetişen, 30-150 cm arasında değişen boylara sahip bir bitkidir (Yıldırım vd. 2001). *Rumex*

crispus L., geleneksel tıpta gastrointestinal sistem, antiinflamatuar ve artrit gibi bozuklukların düzenlenmesinde, dermatolojik sorunlarda, ateşli hastalıkların tedavisinde kullanılan ve antioksidan, antitripanozomal (Orban-Gyapai vd. 2017) ve antimikrobiyal (Çoruh vd. 2008) özelliklerinden de yararlanan önemli bir bitki olarak kabul edilmektedir (Başkan vd. 2007, İdris vd. 2017).

Ayrıca bu bitkinin kurutulmuş kökleri kabızlık şikayetlerinde, mesane enfeksiyonlarında, safra kesesi hastalıklarında ve dermatolojik sorunların tedavisinde kullanılmaktadır (Vasas vd. 2015, Larayetan vd. 2019). Sekonder metabolitler çevresel adaptasyonda, üreme

süreçlerinde, bitki savunmasında ve çevresel etkileşimlerde önemli işlevlere sahip organik bileşiklerdir. Fenolik bileşikler, bitkilerde bulunan en yaygın sekonder metabolitler arasında yer alır ve çeşitli kimyasal yapılar ve aktiviteler sergileyerek (Barba vd. 2014) anti-enflamatuar, antiviral, antibakteriyel, antioksidan, anti-aterojenik, antikolinesteraz, antimutajenik ve antikanser gibi çeşitli biyolojik etkilere katkıda bulunurlar (Sarıkahya vd. 2019, Fan vd. 2019). Antrakınonlar ise sekonder metabolitler içerisinde doğal pigmentlerin en büyük grubunu oluştururlar ve genellikle bitkilerde serbest formda veya glikozitler şeklinde bulunurlar (Fouillaud vd. 2016, Duval vd. 2016, Seigler, 2012). Antrakınonlar, antikanser, laksatif ve antimikrobiyal aktivitelere (Smolarz vd. 2013, Li-Weber vd. 2013, Huang vd. 2013) sahip oldukları bilinen bileşiklerdir ve özellikle physcion, chrysophanol, emodin, aloe-emodin ve rhein gibi bileşiklerin bu aktivitelere katkı sağladığı gösterilmiştir (Simoes vd. 2007).

Rumex crispus L. bitkisi, fenolik ve antrakınon bileşikleri bakımından zengin bir kaynak olarak literatürde tanımlanmıştır (Idris vd. 2017, Saoudi vd. 2021). Bu bitkinin biyoaktif bileşenlerini daha iyi anlamak ve farmakolojik etkilerini belirlemek, bitkilerden elde edilen bileşiklerin daha etkin bir şekilde kullanılmasını sağlayarak ilaç ve kozmetik endüstrisi gibi alanlarda yeni ürünlerin geliştirilmesine katkıda bulunabilmesi açısından önemli bir adımdır. Bitkilerdeki bu metabolitlerin türü ve miktarı, bitkinin genetik yapısına ve bitkinin yetiştiği çevresel şartlara bağlı olarak değişebilmektedir (Yıldırım Baştemur vd. 2024). Bu nedenle bu bitkinin bileşenlerinin tıbbi ve dermokozmetiğe yapabileceği katkıları tanımlayabilmek için basit ve etkin bir şekilde izolasyonun gerçekleştirilmesi ve güvenilir bir analiz yöntemi ile içeriklerinin belirlenmesi gereklidir.

Bitkilerin izolasyonu ve kantitatif analizlerinde kullanılan teknikler arasında kromatografik yöntemler öne çıkmaktadır. Kromatografik teknikler arasında ise gravity kolon kromatografisi ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) çalışmaları yaygın olarak yer almaktadır (Guo vd. 2011, Nazeam vd. 2020, Pham vd. 2020, Tsamo vd. 2021, Abdisa ve Zelalem, 2022). Kolon kromatografisi, bitkisel özütlerdeki bileşenleri izolasyonu için etkili bir yöntemdir. Bitki özütleri, çeşitli polariteye sahip bileşenleri içerdiğinden dolayı gravity kolon kromatografisi bu aşamada ideal bir ayırım sağlamaktadır (Skoog, 2009). HPLC ise yüksek tespit hassasiyeti, etkin ayırım ve hızlı analiz süresi nedeniyle sekonder metabolitlerin kantitatif tayinlerinde yaygın olarak kullanılan bir analiz yöntemi olarak öne çıkmaktadır

(Arora vd. 2022, Ntemafack vd. 2023, Yıldırım Baştemur vd. 2024).

Bu çalışmada, Türkiye'de yetişen *Rumex crispus* L. bitki kök örneğinden elde edilen ekstraktan fenolik bileşiklerin ve antrakınonların gravity kolon kromatografisi ile izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen fraksiyonlardaki bileşiklerin miktar tayinleri ters faz sıvı kromatografisi (RPLC) yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışma ile *Rumex crispus* L. bitki kök örneğinden uygun solvent sisteminin kullanılmasıyla fenolik bileşiklerin ve antrakınonların etkin bir şekilde tespit edilerek izolasyonunun yapılabileceği gösterilmektedir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Kullanılan Kimyasallar

Metanol, hekzan, etil asetat, orto-fosforik asit ve silika jel 60 (70-230 mesh ASTM) Merck Pvt. Ltd.; standart bileşikler (protokateşik asit, kateşin, gentisik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, polydatin, kumarin, resveratrol, ellajik asit, kuersetin, aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, physcion) ve tiyöre Sigma-Aldrich; ayırımı yapılacak bitki kök örneği miktarına göre 3 cm çapa sahip 60 cm uzunluğunda kullanılan musluklu cam kolon Isolab firmasından temin edilmiştir. Çalışma boyunca Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, ABD) su filtreleme sisteminde filtrelenen su (direnç $\geq 18,2$ M Ω cm) kullanılmıştır.

2.2. Bitkilerin Toplanması ve Ekstraksiyonu

Bu çalışmada, 2023 yılının Nisan ayında Başakşehir/İstanbul konumundan toplanan *Rumex crispus* L. bitkisi kullanılmıştır. Bitkiler toplandıktan sonra İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Botanik Anabilim Dalında Doç. Dr. İbrahim Sırrı Yüzbaşıoğlu tarafından tür tayinleri yapılmış ve örnek numarası (ISTE 118534) verilmiştir. Bitki laboratuvar ortamında kurutulmuş ve kök kısmı ayrılarak öğütücü yardımıyla parçalanmıştır. Öğütücü yardımıyla küçük parçalar haline getirilen bitki kök örneği havanda sıvı azot yardımıyla toz haline getirilmiştir. Elde edilen bitki kökü tozundan 2,5 gram tartılarak üzerine 50 mL metanol eklenmiştir. Ekstraksiyon işlemi, %40 güç ile 10 dakika boyunca +4°C'de prob destekli ultrasonik homojenizatör cihazı (Bandelin, Sonopuls HD 4100) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen karışım 9500 rpm'de 15 dakika santrifüjlenerek süpernatant kısmı toplanmıştır. Vakumlu santrifüj yoğunlaştırıcı (Savant, Speedvac SC110) kullanılarak çözücü ekstraktan uzaklaştırılmış ve ham ekstrakt elde edilmiştir. Ekstrakt metanolde çözülmüş ve membran filtreden (Sartorius model 0,45 μ m politetrafloroetilen) geçirilerek kromatografik analizler için +4°C'de saklanmıştır.

2.3. Gravity Kolon Kromatografisi

Fenolik bileşiklerin ve antrakınonların en iyi şekilde elüsyon ve ayrılmanın sağlanması amacıyla polaritesi düşükten yükseğe doğru değişen ikili gradient solvent sistemleri kullanılmış ve Bajpai vd. (2016) tarafından uygulanan yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır. Hekzan-etil asetat ve etil asetat-metanol ikili gradient solvent sisteminin çalışmada kullanılan oranları ve elde edilen fraksiyon numaraları Çizelge 1'de verilmiştir. Kolonun hazırlanması için dolgu malzemesi olarak kullanılan silika jel kolona hekzan yardımıyla yüklenmiş ve üst yüzeyine kurutulmuş ince bir kum tabakası ilave edilmiştir. Bitki kök örneği için her bir solvent sisteminden 30 mL geçirilerek fraksiyonlar elde edilmiştir.

Çizelge 1. İkili gradient solvent sisteminden elde edilen fraksiyonlar.

Solvent Sistemi	Oran	Fraksiyon Numarası
Hekzan-Etil Asetat	10:0	1
Hekzan-Etil Asetat	8:2	2
Hekzan-Etil Asetat	6:4	3
Hekzan-Etil Asetat	4:6	4
Hekzan-Etil Asetat	2:8	5
Hekzan-Etil Asetat	0:10	6
Etil Asetat-Metanol	8:2	7
Etil Asetat-Metanol	6:4	8
Etil Asetat-Metanol	4:6	9
Etil Asetat-Metanol	2:8	10
Etil Asetat-Metanol	0:10	11

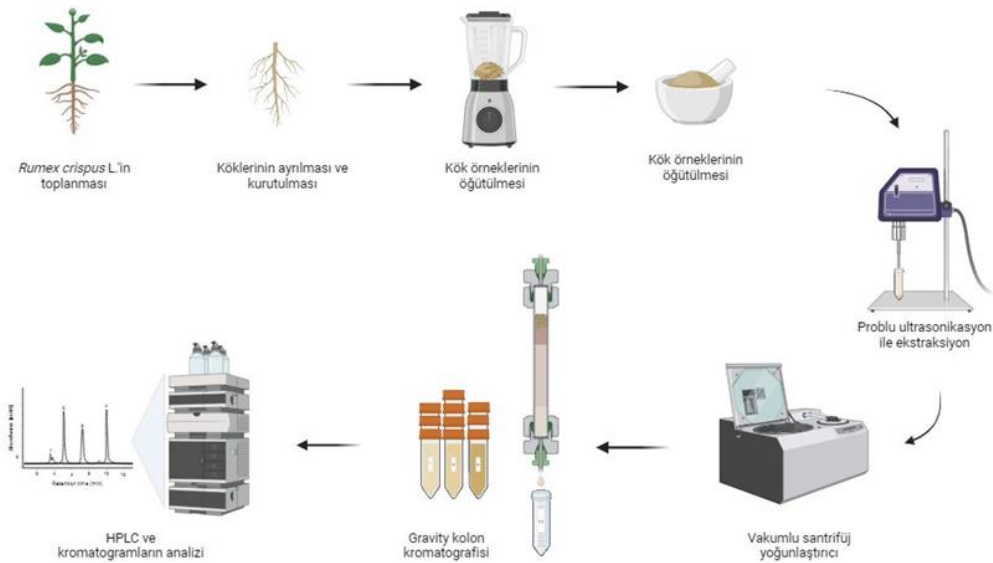
2.4. HPLC Analizi

Kromatografik çalışma için LC-10AD VP pompası, SIL-20A autosampler, bir CTO-10AS kolon fırını, DGU-20A gaz

giderme ünitesi ve bir SPD-M20A diyot dizi detektöründen (DAD) oluşan Shimadzu HPLC sistemi ve 25 cm x 4,6 mm, 5 µm boyutlarına sahip ZORBAX Eclipse Plus C18 kolonu kullanılmıştır. RPLC analizleri Akpınar vd. (2024) ve Yıldırım Baştemur vd. (2024) tarafından uygulanan yöntemler üzerinde düzenlemeler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Gradient program uygulanan çalışmada A mobil fazı olarak %0,5 (v/v) fosforik asit-deiyonize su karışımı, B mobil fazı olarak ise metanol kullanılmıştır. Gradient programındaki zaman-hacim değişiklikleri şöyledir: 0–2 dk, %20 B; 2–7 dk, %20–%30 B; 7–15 dk, %30–%45 B; 15–33 dk, %45–%90 B; 33–35 dk, %90 B; 35–45 dk, %90–%20 B. Hareketli faz akış hızı 1,0 mL/dakika, kolon sıcaklığı 25 °C, enjeksiyon hacmi 20 µL, çalışma dalga boyu 210 nm ve enjeksiyon süresi 45 dakikadır.

2.5. Stok Çözeltilerin Hazırlanması

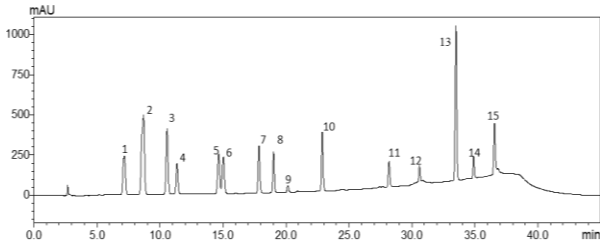
Standart bileşikler (protokateşik asit, kateşin, gentsik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, polydatin, kumarin, resveratrol, ellajik asit, kuersetin, aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, physcion) metanol ortamında çözülerek 25 µg/mL'lik stok çözeltileri hazırlanmıştır. Stok çözeltilerden her bir bileşik için belirlenen konsantrasyonda metanol ile seyreltme yapılarak kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır. Kalibrasyon çözeltileri; protokateşik asit, polydatin, resveratrol, rhein ve emodin bileşikleri için 0,25-2 µg/mL derişim aralığında; kateşin, gentsik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, kumarin, ellajik asit, kuersetin ve aloe-emodin bileşikleri için 0,5-2 µg/mL derişim aralığında; chrysophanol bileşiği için 0,25-5 µg/mL derişim aralığında; physcion bileşiği için 0,025-1 µg/mL derişim aralığında çalışılmıştır.



Şekil 1. Çalışmanın grafiksel özeti

3. Bulgular ve Tartışma

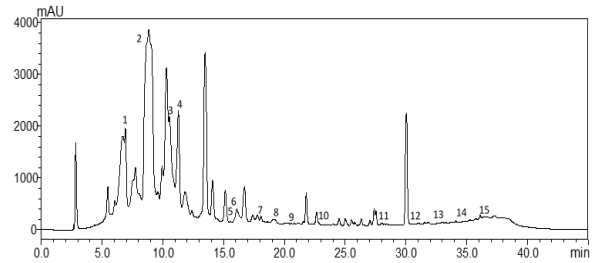
R. crispus L. bitki kök örneğinin ekstraksiyonu prob destekli ultrasonik homojenizatör ile gerçekleştirilmiştir. Ekstrakte edilmiş örneğe apolardan polara 3 farklı çözücünün çeşitli oranlarında 11 farklı çözücü sisteminde gravity kolon kromatografisi prosedürü uygulanmış ve 11 fraksiyon elde edilmiştir. Fraksiyonlardaki fenolik bileşik ve antrakinon miktarları RPLC ile tayin edilmiştir (Şekil 1). RPLC çalışmasında ilk olarak bileşiklerin HPLC profilleri ve alıkonma süreleri belirlenmiştir. Standart bileşiklerin alıkonma süreleri belirlendikten sonra 15 bileşiğin bir arada bulunduğu karışımın enjeksiyonu gerçekleştirilmiş ve bileşiklerin aynı anda kantitatif analize uygun olduğunu gösteren kromatogram Şekil 2'de verilmiştir. Her bir bileşiğin doğrusal aralığının belirlenmesi için 6 farklı derişimde üç tekrarlı RPLC analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen pik alanı değerlerine karşı derişimlerin grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Bileşiklerin korelasyon katsayıları 0,9990-0,9999 aralığında bulunmuştur ve kabul kriterini ($r \geq 0,999$) sağlamaktadır (Bulduk ve Gökçe, 2021). *R. crispus* L. bitki kök örneğindeki fenolik bileşiklerin ve antrakinonların kantitatif tayini bileşiklere ait pik alanlarına karşı derişim verileri ile oluşturulan kalibrasyon doğrusundan elde edilen regresyon denklemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2. Fenolik bileşikler ve antrakinonların standart karışımına ait kromatogram. (1) Protokateşik asit, (2) Kateşin, (3) Gentisik asit, (4) Kafeik asit, (5) p-Kumarik asit, (6) Polydatin, (7) Kumarin, (8) Resveratrol, (9) Ellajik asit, (10) Kuersetin, (11) Aloe-emodin, (12) Rhein, (13) Emodin, (14) Chrysophanol, (15) Physicon.

Gravity kolon kromatografisinden elde edilen her bir çözücü sistemindeki fraksiyonların üç tekrarlı olacak şekilde RPLC ile analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *R. crispus* L. bitki kök örneğinin fenolik bileşik ve antrakinon içeriği Çizelge 2'de gösterilmiştir. Buna göre protokateşik asit (9,802 µg/mg), gentisik asit (5,437 µg/mg), kafeik asit (84,124 µg/mg), p-kumarik asit (0,865 µg/mg), polydatin (0,561 µg/mg), kumarin (3,289 µg/mg), resveratrol (0,42 µg/mg), ve ellajik asit (2,194 µg/mg) için etil asetat-metanol (6:4) solvent sistemine sahip 8 numaralı fraksiyondan en yüksek bileşik miktarları elde edilmiştir. Kateşin (37, 238 µg/mg) ve kuersetin (0,513 µg/mg) için en yüksek miktarlar 7 numaralı fraksiyonda; aloe-emodin (11,308 µg/mg) ve rhein (4,379

µg/mg) için ise 11 numaralı fraksiyonda bulunmuştur. Emodin (0,279 µg/mg) 4 numaralı heksan-etil asetat (4:6) çözücü sistemindeki fraksiyonda, chrysophanol (11,522 µg/mg) 3 numaralı heksan-etil asetat (6:4) çözücü sistemindeki fraksiyonda ve physicon (1,97 µg/mg) 2 numaralı heksan-etil asetat (8:2) çözücü sistemindeki fraksiyonda en yüksek miktarlarda tespit edilmiştir. Elde edilen kromatogramlar ve her bileşik için tespit edilen miktarlar karşılaştırılmış, sonuç olarak 8 numaralı fraksiyonda protokateşik asit, gentisik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, polydatin, kumarin, resveratrol ve ellajik asit dahil olmak üzere sekiz fenolik bileşiğin en yüksek miktarda bulunduğu tespit edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda etil asetat-metanol (6:4) oranında kullanılan çözücünün sekiz metabolitin izolasyonu için en uygun çözücü sistemi olduğuna karar verilmiştir. Sekiz numaralı fraksiyonun RPLC kromatogramı Şekil 3'de verilmektedir.



Şekil 3. 8 numaralı fraksiyona ait kromatogram (1) Protokateşik asit, (2) Kateşin, (3) Gentisik asit, (4) Kafeik asit, (5) p-Kumarik asit, (6) Polydatin, (7) Kumarin, (8) Resveratrol, (9) Ellajik asit, (10) Kuersetin, (11) Aloe-emodin, (12) Rhein, (13) Emodin, (14) Chrysophanol, (15) Physicon.

Amarowicz vd. (2003), yeşil çaydan sekonder metabolit izolasyonu için kloroform-metanol-su (65:35:10) solvent sistemini kullanarak fraksiyonlama sonucunda kateşin tespit etmişlerdir. Nuzula vd. (2023) *Curcuma aeruginosa* bitkisinden sekonder metabolitlerin izolasyonu için gravity kolon kromatografisinde fraksiyonlama ve alt fraksiyonlama yaparak çeşitli solvent sistemleri üzerinde analizler gerçekleştirilmiştir. Curdione metabolitini elde etmek için ideal solvent sistemi n-heksan-diklorometan (9:1) olarak belirlenmiştir. Guo vd. (2011), *Rumex japonicus*'den emodini n-heksan-etanol-su (18:22:3), chrysophanolu n-heksan-etanol-su (18:12:3) ve physiconu aynı solvent sisteminde (18:10:3) oranlarında izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Minh vd. (2019)'nın *R. crispus* L. kök örneklerini kullanarak yaptıkları çalışmada antrakinon grubundan chrysophanol ve physicon bileşiklerini, çalışmamızda kullanılan çözücü sistemi ve oranı ile benzer olan heksan-etil asetat (9:1) çözücü sisteminde izole etmişlerdir. Karaduttan (*Morus nigra* L.) antioksidan özellik gösteren bileşiklerin izolasyonu için kromatografik yöntemler kullanılmış ve ideal çözücü sistemi su-metanol (20:80) olarak belirlenmiştir (Aybastier, 2021).

Çizelge 2. R. crispus L. bitki kök örneğinde bulunan fenolik bileşiklerin ve antrakinonların miktarları (µg/mg)

TE : Tespit Edilemedi.

Bileşik (µg/mg)	Fraksiyon No										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Protokateşik Asit	TE	TE	TE	TE	0,059 ± 0,007	TE	2,736 ± 0,212	9,802 ± 0,564	0,160 ± 0,078	0,223 ± 0,089	0,323 ± 0,103
Kateşin	TE	TE	TE	TE	1,023 ± 0,132	0,111 ± 0,034	37,238 ± 2,297	14,922 ± 1,658	0,885 ± 0,117	0,478 ± 0,043	0,059 ± 0,006
Gentisik Asit	TE	TE	TE	TE	TE	TE	2,304 ± 0,789	5,437 ± 1,432	0,005 ± 0,001	0,084 ± 0,011	0,225 ± 0,073
Kafeik Asit	TE	TE	TE	TE	3,275 ± 0,875	0,982 ± 0,231	47,645 ± 1,658	84,124 ± 2,348	18,485 ± 1,777	17,03 ± 0,431	25,29 ± 0,875
p-Kumarik Asit	TE	TE	TE	TE	TE	0,069 ± 0,007	0,012 ± 0,003	0,865 ± 0,065	0,001 ± 0,000	TE	TE
Polydatin	TE	TE	TE	TE	TE	TE	0,065 ± 0,008	0,561 ± 0,069	0,129 ± 0,005	0,190 ± 0,013	0,437 ± 0,003
Kumarin	TE	TE	TE	TE	TE	TE	1,131 ± 0,056	3,289 ± 0,009	0,160 ± 0,013	0,140 ± 0,008	0,033 ± 0,004
Resveratrol	TE	TE	TE	TE	TE	0,010 ± 0,003	0,100 ± 0,023	0,420 ± 0,032	0,083 ± 0,005	0,032 ± 0,006	TE
Ellajik Asit	TE	TE	TE	TE	0,016 ± 0,006	0,006 ± 0,001	1,433 ± 0,073	2,194 ± 0,874	0,142 ± 0,031	0,100 ± 0,004	0,641 ± 0,234
Kuersetin	TE	TE	TE	TE	TE	0,047 ± 0,007	0,513 ± 0,012	0,398 ± 0,007	0,005 ± 0,001	TE	0,071 ± 0,003
Aloe-Emodin	0,078 ± 0,008	0,194 ± 0,043	0,249 ± 0,065	0,057 ± 0,013	0,138 ± 0,007	0,331 ± 0,009	0,589 ± 0,039	1,139 ± 0,098	0,691 ± 0,065	3,384 ± 0,976	11,308 ± 2,985
Rhein	0,658 ± 0,023	0,056 ± 0,006	0,509 ± 0,009	TE	TE	TE	TE	0,191 ± 0,003	0,660 ± 0,045	1,182 ± 0,017	4,379 ± 0,029
Emodin	0,056 ± 0,007	0,100 ± 0,018	0,210 ± 0,076	0,279 ± 0,042	1,730 ± 0,671	0,170 ± 0,034	0,236 ± 0,023	0,263 ± 0,045	TE	TE	TE
Chrysophanol	0,014 ± 0,003	6,716 ± 1,745	11,522 ± 1,543	2,184 ± 0,698	2,144 ± 0,433	1,262 ± 0,112	0,977 ± 0,234	2,194 ± 0,194	0,396 ± 0,018	0,540 ± 0,200	1,198 ± 0,192
Physcion	0,857 ± 0,222	1,970 ± 0,083	0,726 ± 0,072	0,806 ± 0,042	0,317 ± 0,017	0,715 ± 0,031	0,584 ± 0,520	0,602 ± 0,059	0,324 ± 0,022	0,239 ± 0,093	0,145 ± 0,035

Rumex crispus L. bitkisinde fenolik bileşiklerin ve antrakininlerin izolasyonuna ilişkin çalışmalar mevcut olup bu bileşiklerin eş zamanlı izolasyonuna ilişkin bir çalışma literatürde mevcut değildir. Bu çalışmanın sonuçları, *Rumex crispus* L. bitki kökünün gravity kolon kromatografisi ile çeşitli çözücü sistemlerinden katma değere sahip olan fenolik bileşikler ve antrakininlerin izolasyonuna ilişkin bir bilimsel bulgu olarak sunulmaktadır. *R. crispus* L. köklerinin etil asetat ekstraktının nitrik oksit üretimini inhibe etmede ve sitokinlerin salgılanmasını azaltmada antiinflamatuvar etki gösterdiğinin ifade edilmesi ve *R. crispus* L.'nin diklorometan ve etil asetat ekstraktlarının, çeşitli metabolitlerin konsantrasyonu ile ilişkili olan daha güçlü antioksidan aktivite gösterdiği ile ilgili çalışmalar, yaptığımız çalışmada kullanılan etil asetat-metanol ekstraksiyonu ile fenolik bileşiklerin iyi bir şekilde izole edildiğini sergileyen verilerle uyumludur (Eom vd. 2020).

Farklı solvent sistemlerinin gravity kolon kromatografisine uygulanarak araştırılması sonucu, bileşenlerin ekstraksiyonu esnasında farklı solvent sistemlerinin farklı oranlarda etkin bir ayrımı, basit ve ucuz şekilde sağladığı sergilenmektedir. Bu çalışma ile uygun solvent sisteminin kullanılmasıyla fenolik bileşikler ve antrakininler gibi bileşenlerin etkin bir şekilde tespit edilerek izolasyonun yapılabileceği gösterilmektedir.

4. Sonuçlar

Bu çalışmada, *Rumex crispus* L. bitki köklerindeki fenolik bileşikler ve antrakininlerin izolasyonu için gravity kolon kromatografisinde ikili gradient çözücü sistemleri (hekzan-etil asetat, etil asetat- metanol) ile çalışılmış ve elde edilen fraksiyonlar RPLC yöntemi ile analiz edilmiştir. Elde edilen verilere göre; etil asetat-metanol (6:4) çözücü sisteminden elde edilen fraksiyonun protokateşik asit, gentisik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, polydatin, kumarin, resveratrol ve ellajik asit olmak üzere 8 adet sekonder metaboliti yüksek miktarlarda (0,42 µg/mg-84,124 µg/mg) içerdiği tespit edilmiştir. Fenolik bileşiklerin ve antrakininlerin aynı anda izolasyonu için en uygun çözücü sisteminin etil asetat-metanol (6:4) olduğu sonucuna varılmış ve biyolojik olarak aktif sekonder metabolitlerin izolasyonu için gravity kolon kromatografisinin başarılı bir şekilde uygulandığı gösterilmiştir. Ayrıca ülkemizde yetişen *Rumex crispus* L. bitkisinde fenolik bileşik ve antrakinin miktarının fazla olması, izolasyonunun kolay olması gibi avantajları ile ilaç, gıda, boya ve kozmetik sektörlerinde ham madde olarak kullanılabileceği öngörülmektedir. Elde edilen bulgulara göre, bitkilerden sekonder metabolitlerin izolasyonu için

hem pratik hem de ekonomik bir yöntem sağlayan bu çalışma, ileride yapılacak olan araştırmalara faydalı olacağı düşünülmektedir.

Etik Standartlar Bildirgesi

Yazarlar tüm etik standartlara uyduklarını beyan ederler.

Yazarlık Katkı Beyanı

Yazar 1: Araştırma, Deney tasarımı, Metodoloji, Analiz, Yazma –orijinal taslak

Yazar 2: Metodoloji, Görselleştirme, Yazma –orijinal taslak

Yazar 3: Araştırma, Deney tasarımı, Metodoloji, Yazma –orijinal taslak

Yazar 4: İnceleme ve düzenleme, Analiz ve yorumlama, Yazma –orijinal taslak

Yazar 5: İnceleme ve düzenleme, Denetleme/danışmanlık, Proje Yöneticisi,

Çıkar Çatışması Beyanı

Yazarların bu makalenin içeriğiyle ilgili olarak beyan edecekleri hiçbir çıkar çatışması yoktur.

Verilerin Kullanılabilirliği

Bu çalışma sırasında oluşturulan veya analiz edilen tüm veriler, yayınlanan bu makaleye dahil edilmiştir.

Teşekkür

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje numarası: FLO-2023-40354). İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Botanik Anabilim Dalından Doç. Dr. İbrahim Sırrı Yüzbaşıoğlu'na bitki tür tayinindeki katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

5. Kaynaklar

- Abdisa Z. ve Zelalem G. (2022). Phytochemical Investigation of *Rumex Abyssinicus* Root Barks and In Vitro Evaluation of Its Antibacterial Activities. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A Chemistry*, 9(4), 1063-1072. <https://doi.org/10.18596/jotcsa.1035039>
- Arora, M., Mahajan, A., ve Sembi, J. K. (2022). Extraction and characterization of secondary metabolites from *Crepidium acuminatum* (D. Don) Szlach: A miraculous orchid. *South African Journal of Botany*, 149, 693-700. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.06.014>
- Akpınar, R., Yıldırım Baştemur, G., Bıçak, B., Sanli, N. O., Mertoğlu Kamalı, E., Pekmez, M., Kececi Gündüz, S., ve Perçin Özkorucuklu, S. (2024). Phytochemical profiling, in vitro biological activities, and in silico (molecular docking and absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity) studies of *Polygonum cognatum* Meissn. *Journal of Separation Science*, 47(1), 2300750. <https://doi.org/10.1002/jssc.202300750>
- Amarowicz, R., Shahii, F., ve Wiczowski, W. (2003). Separation of individual catechins from green tea using silica gel column chromatography and HPLC. *Journal of Food Lipids*, 10(2), 165–177.

- <https://doi.org/10.1111/j.1745-4522.2003.tb00013.x>
- Aybastır, Ö., (2021). Karaduttan (*Morus Nigra* L.) antioksidan bileşiklerin kromatografik yöntemlerle izolasyonu ve tayini. *Gıda*, 46 (1), 32-41. <https://doi.org/10.15237/gida.GD20114>
- Bajpai, V. K., Majumder, R., ve Park, J. G. (2016). Isolation and purification of plant secondary metabolites using column-chromatographic technique. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 11(4), 844-848. <https://doi.org/10.3329/bjp.v11i4.28185>
- Barba, F. J., Esteve, M. J., ve Frígola, A. (2014). Bioactive Components from Leaf Vegetable Products, Studies in Natural Products Chemistry, In: Atta ur, R. (ed.), Chapter 11, Elsevier, ISBN: 1572-5995, 321-346.
- Başkan, S., Daut-Ozdemir, A., Günaydin, K., ve Erim, F. B. (2007). Analysis of anthraquinones in *Rumex crispus* by micellar electrokinetic chromatography. *Talanta*, 71(2), 747-750. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.05.018>
- Bulduk İ. ve Gökçe S., (2021). Farmasötik Formülasyonlarda Levodopa ve Karbidopa Miktarının Belirlenmesi için Etkili ve Güvenilir bir HPLC Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 49 (4), 413-422. <https://doi.org/10.15671/hjbc.773988>
- Çoruh, I., Gormez, A., Ercisli, S., ve Sengul, M. (2008). Total phenolic content, antioxidant, and antibacterial activity of *Rumex crispus* grown wild in Turkey. *Pharmaceutical Biology*, 46(9), 634-638. <https://doi.org/10.1080/13880200802182240>
- Duval, J., Pecher, V., Poujol, M., ve Lesellier, E. (2016). Research advances for the extraction, analysis and uses of anthraquinones: A review. *Industrial Crops and Products*, 94, 812-833. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.056>
- Eom T, Kim E, ve Kim J.S. (2020), In vitro antioxidant, antiinflammation, and anticancer activities and anthraquinone content from *Rumex crispus* root extract and fractions. *Antioxidants (Basel)*, 9(726), 1-13. <https://doi.org/10.3390/antiox9080726>
- Fan, M., Ding, H., Zhang, G., Hu, X., ve Gong, D. (2019). Relationships of dietary flavonoid structure with its tyrosinase inhibitory activity and affinity. *LWT - Food Science and Technology*, 107, 25-34. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.076>
- Fouillaud, M., Venkatachalam, M., Girard-Valenciennes, E., Caro, Y., ve Dufossé, L. (2016). Anthraquinones and derivatives from marine-derived fungi: Structural diversity and selected biological activities. *Marine Drugs*, 14(4), 64. <https://doi.org/10.3390/md14040064>
- Guo, S., Feng, B., Zhu, R., Ma, J., ve Wang, W. (2011). Preparative isolation of three anthraquinones from *Rumex japonicus* by high-speed counter-current chromatography. *Molecules*, 16(2), 1201-1210. <https://doi.org/10.3390/molecules16021201>
- Huang, P-H., Huang, C-Y., Chen, M-C., Lee, Y-T., Yue, C-H., Wang, H-Y., ve Lin, H. (2013). Emodin and aloe-emodin suppress breast cancer cell proliferation through ER alpha Inhibition. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 376123. <https://doi.org/10.1155/2013/376123>
- Idris, O. A., Wintola, O. A., ve Afolayan, A. J. (2017). Phytochemical and antioxidant activities of *Rumex crispus* L. in treatment of gastrointestinal helminths in Eastern Cape Province, South Africa. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(12), 1071-1078. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.10.008>
- Larayetan, R., Ojemaye, M.O., Okoh, O.O., ve Okoh, A.I. (2019). Silver nanoparticles mediated by *Callistemon citrinus* extracts and their antimalaria, antitrypanosoma and antibacterial efficacy. *Journal of Molecular Liquids*, 273, 615-625. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.10.020>
- Li-Weber, M. (2013). Targeting apoptosis pathways in cancer by Chinese medicine. *Cancer Letters*, 332(2), 304-312. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.07.015>
- Minh, T. N., Van, T. M., Andriana, Y., Vinh, L. T., Hau, D. V., Duyen, D. H., ve Guzman-Gelani, C. D. (2019). Antioxidant, xanthine oxidase, α -amylase and α -glucosidase inhibitory activities of bioactive compounds from *Rumex crispus* L. root. *Molecules*, 24(21), 3899. <https://doi.org/10.3390/molecules24213899>
- Nazeam, J. A., Al-Shareef, W. A., Helmy, M. W., & El-Haddad, A. E. (2020). Bioassay-guided isolation of potential bioactive constituents from pomegranate agrifood by-product. *Food Chemistry*, 326, 126993. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126993>
- Nuzula, A. F., Kristanti, A. N., Aminah, N. S., Takaya, Y., Sahadatin, M. N., ve Wardana, A. P. (2023). Isolation and structure elucidation of secondary metabolite compounds from *Curcuma aeruginosa*. *Jurnal Kimia Riset*, 8(1), 81-91. <https://doi.org/10.20473/jkr.v8i1.44073>
- Ntemafack, A., Sabeena, A., Aristide, D., Ravi, S., Serge, A., Jules-Roger, K., Alain, W., Asha, Chaubey. (2023). Chemical profile, biological potential, bioprospection and biotechnological application of endophytes of *Rumex*: A systematic review. *Industrial Crops & Products*, 195, 116474. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116474>
- Orban-Gyapai, O., Liktör-Busa, E., Kusz, N., Stefko, D., Urban, E., Hohmann, J., ve Vasas, A. (2017). Antibacterial screening of *Rumex* species native to the Carpathian Basin and bioactivity-guided isolation of

- compounds from *Rumex aquaticus*. *Fitoterapia*, 118, 101-106.
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.03.009>
- Pham, D. Q., Han, J. W., Dao, N. T., Kim, J.-C., Pham, H. T., Nguyen, T. H., Choib G.J., Vu H.D., Le Dang, Q. (2020). In vitro and in vivo antimicrobial potential against various phytopathogens and chemical constituents of the aerial part of *Rumex chinensis* Campd. *South African Journal of Botany*, 133, 73–82.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.07.006>
- Saoudi, M. M., Bouajila, J., Rahmani, R., ve Alouani, K. (2021). Phytochemical Composition, Antioxidant, Antiacetylcholinesterase, and Cytotoxic Activities of *Rumex crispus* L. *International Journal of Analytical Chemistry*, 6675436.
<https://doi.org/10.1155/2021/6675436>
- Sarikahya, N. B., Goren, A. C., ve Kirmizigül, S. (2019). Simultaneous determination of several flavonoids and phenolic compounds in nineteen different *Cephalaria* species by HPLC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 173, 120-125.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.05.019>
- Seigler, D. S. (2012). Plant secondary metabolism. *Springer Science & Business Media*.
- Simoes, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosman, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., ve Petrovick, P.R. (2007). Farmacognosia: da planta ao medicamento. Editora da UFSC, Florianópolis, 1102.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2013). Fundamentals of Analytical Chemistry. Cengage learning.
- Smolarz, H.D., Swatko-Ossor, M., Ginalska, G., ve Medynska, E. (2013). Antimycobacterial effect of extract and its components from *Rheum rhaponticum*. *Journal of AOAC International*, 96(1), 155-160.
<https://doi.org/10.5740/jaoacint.12-010>
- Tsamo, L. D. F., Yimgang, L. V., Wouamba, S. C. N., Mkounga, P., Nkengfack, A. E., Voutquenne-Nazabadioko, L., ve Sewald, N. (2021). A new ceramide (*Rumexamide*) and other chemical constituents from *Rumex abyssinicus* Jacq (Polygonaceae): isolation, characterization, antibacterial activities and chemophenetic significance. *Advances in Biological Chemistry*, 11(05), 266-282.
<https://doi.org/10.4236/abc.2021.115018>
- Vasas, A., Orbán-Gyapai, O., ve Hohmann, J. (2015). The genus *Rumex*: review of traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 175, 198-228.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.09.001>
- WHO. (1993) Summar WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. *Herbal Grom*. 28:13–4.
- Yıldırım Baştemur, G., Akpınar, R., Kır, E., ve Perçin Özkorucuklu, S., (2024). Development and Validation of the HPLC-DAD Method for the Simultaneous Determination of Anthraquinones in *Rumex crispus* L. and *Rumex acetosella* L. Plants and Evaluation of Their Antioxidant Capacities. *Journal of Analytical Chemistry*, 79(2), 179-189.
<https://doi.org/10.1134/S1061934824020035>
- Yıldırım, A., Mavi, A., ve Kara, A.A. (2001). Determination of Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Rumex crispus* L. Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4083–4089.
<https://doi.org/10.1021/jf0103572>