

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Cuscuta campestris* Y. BİTKİSİNİN BİYOAKTİF**
BİLEŞENLERİNİN KROMATOĞRAFİK OLARAK İZOLASYONU
VE KARAKTERİZASYONU

EMİNE KILIÇKAYA SELVİ

TEZ DANIŞMANI

YRD. DOÇ. DR. EMİNE AKTÜZ TURUMTAY

TEZ JÜRİLERİ

PROF. DR. MURAT KÜÇÜK

PROF. DR. ZİHNİ AÇAR YAZICI

DOÇ. DR. FATİH İSLAMOĞLU

YRD. DOÇ. DR. FATMA YAYLACI KARAHALİL

DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

RİZE-2017

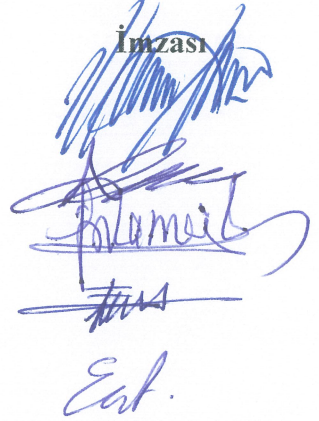
Her Hakkı Saklıdır

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Cuscuta campestris Y. BİTKİSİNİN BİYOAKTİF BİLEŞENLERİNİN
KROMATOĞRAFİK OLARAK İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Yrd. Doç. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY danışmanlığında, Emine KILIÇKAYA SELVİ tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 29/11/2017 tarihinde Kimya Anabilim Dalı'nda **DOKTORA** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı Adı Soyadı
Başkan	:Prof. Dr. Murat KÜÇÜK
Üye	:Prof. Dr. Zihni Açar YAZICI
Üye	:Doç. Dr. Fatih İSLAMOĞLU
Üye	:Yrd. Doç. Dr. Fatma YAYLACI KARAHALİL
Üye	:Yrd. Doç. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY

İmzası



Doç. Dr. Ferhat KALAYCI
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

Cuscuta campestris Y. Bitkisinin Biyoaktif Bileşenlerinin Kromatografik Olarak İzolasyonu ve Karakterizasyonu” başlıklı bu tez çalışması Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı’nda “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Tez danışmanlığımı üstlenen ve çalışmalarım boyunca bana yardımlarını esirgemeyen, tez çalışmasının planlanmasında, yürütülmesinde ve yayımlama süresince beni yönlendiren, bilgi ve tecrübeleriyle bana ışık tutan, değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Emine Akyüz Turumtay’a,

Cuscuta campestris Y. bitkisinin ekstrakt ve fraksiyonlarının, HepG2, SK-OV-3 ve hDFs hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri ile ilgili deneyler, Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezinde (Genkök) ortak çalışma kapsamında yapılmıştır. Ekstraktların SNU-398 hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri ile ilgili deneyler ise Karadeniz Teknik Üniversitesi, Antimikrobiyal Maddeleri Araştırma Geliştirme ve Test Laboratuvarından (Antimikrop) hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerin gerçekleştirilmesinde yardımcı olan Erciyes Üniversitesi Genkök araştırma merkezi Genom bölümü çalışanlarına ve Karadeniz Teknik Üniversitesi Antimikrop laboratuvarı çalışanlarına, çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Halbay Turumtay, Havva Er, Ümran Kalkan ve Uzman Adem DEMİR’e, oda arkadaşlarım Günay Kaya Kantar’a ve Gülay Akyüz’e,

Hayatımın her alanında beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, maddi ve manevi her türlü destekleriyle yanımda olan canım anneme, babama ve kardeşlerime,

Her an yakın ilgi ve desteğini yanımda hissettiğim, canım kızım Zeynep ve eşim Mustafa Selvi’ye teşekkürlerimi sunarım.

Emine KILIÇKAYA SELVİ

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “*Cuscuta campestris* Y. Bitkisinin Biyoaktif Bileşenlerinin Kromatografik Olarak İzolasyonu ve Karakterizasyonu” başlıklı bu tezi, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. 21/11/2017



Emine KILIÇKAYA SELVİ

Uyarı: Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir

ÖZET

Cuscuta campestris Y. BİTKİSİNİN BİYOAKTİF BİLEŞENLERİNİN KROMATOĞRAFİK OLARAK İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Emine KILIÇKAYA SELVİ

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Doktora Tezi

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY

Bitki kökenli antioksidanlar, serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarını önleme potansiyeline sahiptir. Bir holoparazitik bitki olan *Cuscuta campestris* geleneksel tıpta karaciğer yaralanma tedavisi ve kanseri önlemek için değerlendirilir. Bu çalışmanın amacı, *C. campestris*'in dietil eter, etil asetat, metanol, bütanol ve sulu ekstraktlarının içeriğini spektroskopik ve kromatografik yöntemlerle aydınlatarak antioksidan ve antikanser aktivite ile ilişkilendirmektir. HPLC-DAD analizleri ile rutin ve klorojenik asitin en yüksek bulunduğu sulu ekstrakt hariç, ekstraktlarda en fazla kuersetin, kamferol ve izoramnetin tespit edildi. En yüksek antioksidan potansiyel etil asetat ekstraktında (SC₅₀, 0,023 mg/mL) bulundu. Ekstraktların antikanser aktiviteleri SNU-398, HepG2 ve SK-OV-3 hücrelerinde değerlendirildi ve normal yetişkin insan dermal fibroblast (hDFs) hücrelerinde kontrol edildi. Metanol ve etil asetat ekstraktları sırasıyla 18,7 ve 19,6 µg/mL CC₅₀ değerleri ile SNU-398 üzerinde sitotoksikite gösterdi. HepG2 ve SK-OV-3 üzerinde etil asetat, metanol ve bütanol ekstraktları sitotoksikite gösterirken, dietil eter ve su ekstraktı sitotoksik bulunmadı. Etil asetat, metanol ve bütanol ekstraktlarından yalnızca bütanol ekstraktı hDFs hücrelerinde sitotoksik bulundu. Etil asetat ekstraktının, preparatif HPLC ile biriktirilen ana fraksiyonları saflaştırıldı ve UV, MS-MS ve FT-IR spektrumları ile kuersetin, kamferol ve izoramnetin olarak tanımlandı. Bu flavonollerin üçü de SK-OV-3 hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterirken, hiç biri hDFs hücrelerinde sitotoksik etki göstermedi. Kuersetin ve kamferol, HepG2 hücrelerinde de sitotoksik etki gösterdi. Sonuç olarak, *C. campestris*'in etil asetat ve metanol ekstraktları ile izole edilen kuersetin, kamferol ve izoramnetin antikanser ilaç geliştirme için ileriki çalışmalara umut vaad etmektedir.

2017, 112 sayfa

Anahtar Kelimeler: *C. campestris*, antioksidan, antikanser, HPLC-DAD, MS/MS

ABSTRACT

CHROMATOGRAPHIC ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BIOACTIVE COMPONENTS FROM THE PLANT OF *Cuscuta campestris* Y.

Emine KILIÇKAYA SELVİ

Recep Tayyip Erdoğan University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Ph.D. Thesis

Supervisor: Asiss. Prof. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY

Plant derived antioxidants have a potential to prevent cell damage caused by free radicals. As a holoparasitic plant, *C. campestris* is being valorized for treatment of liver injury and cancer prevention in traditional medicine. The purpose of this study is to identify the antioxidant and anticancer associated content of diethyl ether, ethyl acetate, methanol, *n*-butanol and water extracts of *C. campestris* by spectroscopic and chromatographic methods. Quercetin, kaempferol and isorhamnetin were found highest in all extracts except the water extract in which highest amount of rutin and chlorogenic acid was found by HPLC-DAD analyses. The highest antioxidant potential was found (SC₅₀, 0.023 mg/mL) in the ethyl acetate extract. Anticancer activities of the extracts were evaluated on SNU-398, HepG2 and SK-OV-3 cells and controlled on the normal adult human dermal fibroblast (hDFs) cells. Methanol and ethyl acetate extracts showed cytotoxicity on the SNU-398 with the CC₅₀ values of 18.7 and 19.6 µg/mL, respectively. While ethyl acetate, methanol and butanol extracts showed cytotoxicity on HepG2 and SK-OV-3, diethyl ether and water extract were not found cytotoxic. Only butanol extract was found cytotoxic on the hDFs cells among the ethyl acetate, methanol and butanol extracts. Main fractions of ethyl acetate extract collected with preparative HPLC were purified and identified as quercetin, kaempferol and isorhamnetin by using UV, MS-MS and FT-IR spectra. While these three flavonols showed cytotoxic effect on SK-OV-3 cells, none of them was found cytotoxic on the hDFs cells. Quercetin and kaempferol were showed cytotoxic effect on the HepG2 cells as well. In conclusion, the ethyl acetate, methanol extracts with the isolated quercetin, kaempferol and isorhamnetin from *C. campestris* are promising candidates for further studies on anticancer drug development.

2017, 112 page

Key Words: *C. campestris*, anticancer, antioxidant, HPLC-DAD, MS/MS

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XII
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	XIII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.2. Antioksidan Bileşikler	2
1.3. Bitki Fenolik Bileşikleri.....	2
1.3.1. Fenolik Asitler	3
1.3.2. Flavonoidler	4
1.3.2.1. Flavon ve Flavonoller	5
1.3.2.2. Flavanonlar	6
1.3.2.3. Kateşinler	6
1.3.2.4. Antosiyanidinler.....	7
1.3.2.5. Proantosiyanidinler (Kondense Tanenler)	7
1.4. Bitkilerden Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu ve Analizleri.....	8
1.4.1. Bitki Ekstraktının Fraksiyonlanması ve Fenolik Bileşenlerinin Saflaştırılması	9
1.5. Bitkilerdeki Fenolik Bileşiklerin Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması ve Analizi.....	10
1.5.1. Kromatografi.....	10
1.5.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Fenolik Bileşiklerin Analizi	11
1.5.2.1. Ultraviyole ve Görünür Bölge (UV-Vis) Dedektörleri.....	13
1.5.2.2. Kütle Spektrometrik (MS) Dedektörleri	14
1.6. Bitki Ekstraktlarının Antioksidan Aktivitelerinin Tayin Yöntemleri	16
1.6.1. Spektrofotometrik Toplam Fenolik Madde Tayini	16
1.6.2. Spektrofotometrik Toplam Flavonoid Tayini	17
1.6.3. DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi.....	18
1.7. Karaciğer Kanseri (Hepatoselüler Karsinoma).....	18

1.8.	Yumurtalık Kanseri (Adeno Karsinoma).....	19
1.9.	Kanser Çalışmalarında Kullanılan Hücre Hatları	20
1.9.1.	HepG2 Hücrelerinin Özellikleri.....	20
1.9.2.	SNU-398 Hücrelerinin Özellikleri.....	20
1.9.3.	SK-OV-3 Hücrelerinin Özellikleri.....	21
1.9.4.	Sağlıklı İnsan Fibroblast Deri Hücresi (hDFs)	22
1.10.	Hücre Canlılığı ve Sitotoksisite	22
1.10.1.	Tripan Mavis Testi.....	22
1.10.2.	MTT Testi	23
1.10.3.	MTS Testi	24
1.11.	<i>Cuscuta campestris</i> Yuncker	24
1.11.1.	Taksonomik Sınıflandırma	24
1.11.2.	<i>Cuscuta campestris</i> Bitkisinin Morfolojisi	25
1.11.3.	<i>Cuscuta</i> Türlerinin Geleneksel Kullanımı	26
1.11.4.	<i>Cuscuta</i> Türleri ile Yapılan Farmakolojik Çalışmalar	27
1.11.4.1.	Deri Koruma Etkisi	27
1.11.4.2.	Karaciğer Koruyucu Etkisi	28
1.11.4.3.	Kemik Erimesine Karşı Koruyucu Etkisi	28
1.11.4.4.	Diğer Etkiler	29
1.11.5.	Fitokimyasal Karakterizasyon	30
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	32
2.1.	<i>C. campestris</i> Bitki Örneğinin Toplanması	32
2.2.	Kimyasal Malzeme ve Materyaller	32
2.2.1.	Kullanılan Cihazlar	32
2.2.2.	Kullanılan Kimyasallar	33
2.3.	<i>C. campestris</i> Bitkisinden Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu	34
2.4.	Ekstraksiyon Geri Kazanımlarının Belirlenmesi	35
2.5.	Standartlar ve Stok Çözeltileri	36
2.6.	Fenolik Bileşiklerin HPLC-DAD Analiz Yöntemi.....	36
2.6.1.	HPLC-DAD Analiz Koşulları.....	36
2.6.2.	HPLC-DAD Analiz Yönteminin Validasyonu ve Kalibrasyonu	37
2.7.	Bitkinin Etilasetat Ekstraktının Preparatif HPLC-DAD ile Fraksiyonlarına Ayrılması	38
2.7.1.	Preparatif HPLC-DAD İçin Örnek Hazırlanması	38

2.7.2.	Preparatif HPLC-DAD Koşulları.....	38
2.7.3.	Fraksiyonların Saflaştırılması	39
2.7.4.	Saflaştırılan Fraksiyonların Yapısının Spektroskopik Yöntemlerle Aydınlatılması	41
2.8.	<i>C. campestris</i> Bitkisinin Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi	41
2.8.1.	Bitki Ekstraktlarında Spektrofotometrik Toplam Fenolik Madde Tayini	41
2.8.2.	Bitki Ekstraktlarında Toplam Flavonoid Tayini	42
2.8.3.	Bitki Ekstraktlarında DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini.....	43
2.9.	<i>C. campestris</i> Bitkisi Ekstrakt ve fraksiyonlarının Antikanser Özelliğinin Belirlenmesi.....	43
2.9.1.	Hücre Kültürü Analizleri	44
2.9.2.	Tripan Mavisi.....	45
2.9.3.	MTS Testi (promega).....	45
2.9.4.	MTT Testi	45
3.	BULGULAR.....	47
3.1.	Fenolik Bileşiklerin Analizi için HPLC-DAD Yönteminin Değerlendirilmesi	47
3.2.	Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonunun % Geri Kazanımı.....	50
3.3.	<i>C. campestris</i> Bitkisinin HPLC-DAD Analizleri	50
3.4.	<i>C. campestris</i> Bitkisinin Etil Asetat Ekstraktının Fraksiyonlarına Ayrılması	54
3.5.	Fraksiyonların Saflaştırma İşlemine Tabi Tutulması.....	57
3.5.1.	Saflaştırılan Fraksiyonların Yapılarının Aydınlatılması.....	60
3.5.1.1.	Saflaştırılan F31SA Fraksiyonu; Kuersetin	60
3.5.1.2.	Saflaştırılan F32-1SA Fraksiyonu; Kamferol	65
3.5.1.3.	Saflaştırılan F32-2SF Fraksiyonu; İzoramnetin.....	70
3.6.	Bitki Ekstraktlarında Spektrofotometrik Toplam Fenolik Madde Tayini	75
3.7.	Bitki Ekstraktlarında Spektrofotometrik Toplam Flavonoid Tayini.....	76
3.8.	Ekstrakt, Standart ve Saflaştırılan Fraksiyonların DPPH• Radikal Temizleme Aktivitelerinin Hesaplanması	76
3.9.	Bitki Ekstrakt ve Fraksiyonlarının Antikanser Aktivite Sonuçları.....	78
4.	TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....	82
4.1.	<i>C. campestris</i> Bitkisinden Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu	82
4.2.	Fenolik Bileşiklerin Analizinde Kullanılacak HPLC-DAD Sistemi için Metot Optimizasyonu	83

4.3.	<i>C. campestris</i> Bitkisinden Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonunun Geri Kazanımının Belirlenmesi	84
4.4.	<i>C. campestris</i> Bitkisinin Ekstraktlarındaki Fenolik Bileşiklerin HPLC-DAD ile Analizleri	85
4.5.	<i>C. campestris</i> Bitkisinin Biyoaktif Bileşenlerinin İzolasyonu ve Karakterizasyonu	87
4.6.	<i>C. campestris</i> Bitkisinde Biyoaktivite Çalışmaları.....	90
4.6.1.	Bitki Ekstraktlarında Spektrofotometrik Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoid Madde Tayini	90
4.6.2.	DPPH• Serbest Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini	91
4.6.3.	Ekstrakt ve İzole Edilen Flavonollerin SNU-398, HepG2, SK-OV-3 ve hDFs Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkileri.....	93
5.	ÖNERİLER.....	98
	KAYNAKLAR	100
	ÖZGEÇMİŞ	112

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Bitkilerde yaygın olarak rastlanan hidroksibenzoik asit, hidroksisinamik asit yapıları.....	4
Şekil 2.	Flavonoidlerin C ₆ -C ₃ -C ₆ yapısı.....	5
Şekil 3.	Rutin'in yapısı (Kuersetin-3-O-rutinozit).....	5
Şekil 4.	Flavon ve flavonollerin genel yapısı ve bu gruplara ait örnek bileşikler.....	6
Şekil 5.	Flavanonların genel yapısı ve bu gruplara ait örnek bileşikler.....	6
Şekil 6.	Kateşinlerin yapısı ve bu gruba ait örnek bileşikler.....	7
Şekil 7.	Antosiyanidinlerin yapısı ve bu gruba ait örnek bileşikler.....	7
Şekil 8.	Prosiyanidinlerin kimyasal yapısı (R=OH: Prodelfinidin, R=H: Prosiyanidin).....	8
Şekil 9.	Diyot dizisi dedektörünün şematik gösterimi (URL-1, 2017).....	14
Şekil 10.	Elektrosprey iyon kaynağı (ESI) şematik gösterimi (Şahin, 2014).....	15
Şekil 11.	Kuadrupol tipi kütle analizörü şematik gösterimi (URL-2, 2017).....	15
Şekil 12.	Gallik asit ile Folin-Ciocalteu reaktifi arasında gerçekleşen reaksiyon.....	17
Şekil 13.	Alüminyum(III)'un kuersetin ile oluşturduğu kompleks.....	17
Şekil 14.	DPPH• serbest radikal temizleme yönteminin çalışma mekanizması.....	18
Şekil 15.	HepG2 hücre hattı (URL-3).....	20
Şekil 16.	SNU-398 hücre hattı.....	21
Şekil 17.	SK-OV-3 hücre hattı (URL-4).....	21
Şekil 18.	MTT'nin indirgenme reaksiyonu.....	23
Şekil 19.	MTS'nin indirgenme reaksiyonu.....	24
Şekil 20.	<i>C. campestris</i> bitkisi.....	25
Şekil 21.	<i>C. campestris</i> bitkisinin ülkemizdeki yayılışı (URL-5).....	25
Şekil 22.	Optimize edilen HPLC-DAD metodu kullanılarak 5 mg/L derişimde 20 standart fenolik bileşiğin 254, 280, 315 ve 370 nm'deki kromatogramları	50
Şekil 23.	<i>C. campestris</i> bitkisinin beş ekstraktında HPLC-DAD ile belirlenen fenolik içeriğinin dağılım grafiği.....	51
Şekil 24.	<i>C. campestris</i> bitkisinin dietil eter ekstraktına ait 254, 315 ve 370 nm'deki HPLC-DAD kromatogramı (seyreltme oranı: 1/12).....	52
Şekil 25.	<i>C. campestris</i> bitkisinin etil asetat ekstraktına ait 254, 315 ve 370 nm'deki HPLC-DAD kromatogramı (seyreltme oranı: 1/6).....	52
Şekil 26.	<i>C. campestris</i> bitkisinin metanol ekstraktına ait 254, 315 ve 370 nm'deki HPLC-DAD kromatogram (seyreltme oranı: 1/45).....	53

Şekil 27. <i>C. campestris</i> bitkisinin bütanol ekstraktına ait 254, 315 ve 370 nm'deki HPLC-DAD kromatogramı (seyreltme oranı: 1/6).....	53
Şekil 28. <i>C. campestris</i> bitkisinin sulu ekstraktına ait 254, 315 ve 370 nm'deki HPLC-DAD kromatogramı (seyreltme oranı: 1/10).....	54
Şekil 29. Preparatif HPLC-DAD sistemi ile elde edilen A: standart karışıma B: Etil asetat ekstraktının fraksiyonlarına ait kromatogram	54
Şekil 30. F31 numaralı fraksiyonun analitik sistemde saflık kontrolü	56
Şekil 31. F32 numaralı fraksiyonun analitik sistemde saflık kontrolü	56
Şekil 32. F31 numaralı fraksiyonun Fortis kolon kullanılarak ayrılmasıyla elde edilen kromatogram	57
Şekil 33. F31SF fraksiyonunun UV spektrumu	57
Şekil 34. ACE kolon kullanılarak saflaştırılan F31SA numaralı fraksiyon.....	58
Şekil 35. F31SA numaralı fraksiyonun UV spektrumu	58
Şekil 36. F32 numaralı fraksiyonun Fortis kolon kullanılarak ayrılmasıyla elde edilen kromatogram	58
Şekil 37. F32-2SF fraksiyonunun UV spektrumu.....	59
Şekil 38. F32-1SF fraksiyonunun UV spektrumu.....	59
Şekil 39. ACE kolon kullanılarak saflaştırılan F32-1SA fraksiyonu.....	59
Şekil 40. F32-1SA fraksiyonunun UV spektrumu	60
Şekil 41. Kuersetinin molekül yapısı	60
Şekil 42. Kuersetin standardı ile saflaştırılmış F31SA fraksiyonunun karşılaştırılmasıyla elde edilen HPLC-DAD kromatogramı.....	61
Şekil 43. A: Kuersetin standardına ait; B: F31SA fraksiyonun UV spektrumu	61
Şekil 44. A: Kuersetin standardına, B: F31SA fraksiyonuna ait kütle spektrumu.....	62
Şekil 45. A: Kuersetin standardına, B: F31SA fraksiyonuna ait MS/MS spektrumu....	63
Şekil 46. A: Kuersetin standardına B: F31SA fraksiyonuna ait FT-IR spektrumu.....	64
Şekil 47. Kamferolün molekül yapısı.....	65
Şekil 48. Kamferol standardı ile F32-1SA fraksiyonunun karşılaştırılmasıyla elde edilen HPLC-DAD kromatogramı.....	65
Şekil 49. A: kamferol standardı, B: F32-1SA fraksiyonuna ait UV spektrumu	66
Şekil 50. A: Kamferol standardına, B: F32-1SA fraksiyonuna ait kütle spektrumu	67
Şekil 51. A: Kamferol standardına, B: F32-1SA fraksiyonuna ait MS/MS spektrumu.....	68
Şekil 52. A kamferol standardı ile B F32-1SA fraksiyonunun FT-IR spektrumu	69
Şekil 53. İzoramnetinin molekül yapısı	70

Şekil 54. İzoramnetin standardı ile F32-2SF fraksiyonunun karşılaştırılmasıyla elde edilen HPLC-DAD kromatogramı.....	70
Şekil 55. A: İzoramnetin standardına, B: F32-2SF fraksiyonuna ait UV spektrumu	71
Şekil 56. F32-2SF fraksiyonuna ait kütle spektrumu.....	72
Şekil 57. F32-2SF fraksiyonuna ait MS/MS spektrumu	72
Şekil 58. F32-2SF fraksiyonuna ait FT-IR spektrumu.....	73
Şekil 59. Flavonoidlerin C halkasının bağlarının bölünmesiyle oluşan fragmentasyon parçaları.....	74
Şekil 60. <i>C. campestris</i> bitkisinin ekstraktlarında spektrofotometrik toplam fenolik madde tayininin galik asit ve kuersetin eşdeğeri cinsinden sonuçları	75
Şekil 61. <i>C. campestris</i> bitkisinin ekstraktlarında toplam flavonoid miktarlarının kuersetin eşdeğeri cinsinden sonuçları	76
Şekil 62. <i>C. campestris</i> bitkisinin ekstraktlarının DPPH• temizleme aktiviteleri.....	77
Şekil 63. Bitki ekstraktlarının MTS yöntemi kullanılarak HepG2 kanser hücre hattı üzerine etkisi (CE için 18 mg/mL, CEA ve CB için 43 mg/mL, CM ve CS için 86 mg/mL başlangıç derişimlerinde çalışıldı).....	79
Şekil 64. Bitki ekstraktlarının MTS yöntemi kullanılarak SK-OV-3 kanser hücre hattı üzerine etkisi (CE 18 mg/mL, CEA, CM, CB, CS için 86 mg/mL başlangıç derişimlerinde çalışıldı)	79
Şekil 65. Bitki Ekstraktlarının MTS yöntemiyle hDFs hücre hattı üzerindeki etkisi (HepG2 hücre hattı için CEA ve CB için 43 mg/mL, CM için 86 mg/mL başlangıç derişimlerinde çalışıldı)	80
Şekil 66. Fraksiyonların MTS yöntemiyle HepG2 hücre hattı üzerindeki etkisi (Tüm fraksiyonların başlangıç derişimleri 0,02 mg/mL'dir).....	80
Şekil 67. Fraksiyonların MTS yöntemiyle SK-OV-3 hücre hattı üzerindeki etkisi (Tüm fraksiyonların başlangıç derişimleri 0,02 mg/mL'dir).....	81
Şekil 68. Fraksiyonların MTS yöntemiyle hDFs hücre hattı üzerindeki etkisi (Tüm fraksiyonların başlangıç derişimleri 0,02 mg/mL'dir).....	81
Şekil 69. <i>C. campestris</i> bitkisinin ekstraktlarında ana bileşen olan kuersetin, kamferol ve izoramnetinin miktarlarına ait grafik.....	86

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Çalışmalarda kullanılan cihazlar ve modelleri.....	32
Tablo 2. Çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler, temin edildikleri firmalar ve saflık dereceleri.....	33
Tablo 3. <i>C. campestris</i> bitkisinin farklı ekstraktlarına ait % verim hesabı	35
Tablo 4. Toplam fenolik madde tayininin uygulama aşamaları.....	42
Tablo 5. Toplam flavonoid tayini yöntemi için deney şartları.....	42
Tablo 6. DPPH radikal temizleme aktivitesi yöntemi için deney şartları	43
Tablo 7. Geliştirilen HPLC-DAD metodunun parametreleri	48
Tablo 8. Yöntemin tekrarlanabilirliğinin 20 fenolik standart bileşiğin gün içi tekrarlanabilirliği cinsinden hesaplanması.....	49
Tablo 9. <i>C. campestris</i> bitkisine ait ekstraktların % geri kazanımları	50
Tablo 10. <i>C. campestris</i> bitkisinin dietil eter, etil asetat, metanol, bütanol ve sulu ekstraktlarına ait fenolik bileşik miktarları (mg std/g kuru ekstrakt)	51
Tablo 11. <i>C. campestris</i> bitkisinin etil asetat ekstraktına ait bileşenlerinin preparatif HPLC-DAD ile belirlenmesi	55
Tablo 12. Kuersetin, kamferol ve izoramnetin standartlarının negatif iyon modundaki fragmentleri.....	74
Tablo 13. <i>C. campestris</i> bitkisinin dietil eter, etil asetat, metanol, bütanol ve su ekstraktlarında spektrofotometrik toplam fenolik madde tayini (n=3).....	75
Tablo 14. <i>C. campestris</i> bitkisinin ekstraktlarında spektrofotometrik toplam flavonoid miktarının kuersetin eşdeğeri cinsinden sonuçları (n=3).....	76
Tablo 15. Ekstraktlar, standartlar ve saflaştırılan fraksiyonlara ait DPPH temizleme aktiviteleri	77
Tablo 16. <i>C. campestris</i> ekstraktlarının SNU-398 karaciğer kanseri hücre hattı üzerindeki etkisi.....	78
Tablo 17. Fenolik bileşiklerin karakteristik absorpsiyon yaptıkları dalga boyu	89
Tablo 18. Farklı derişimlerdeki ekstraktların HepG2, SK-OV-3 ve hDFs hücre hatları üzerindeki % hücre canlılıkları.....	94
Tablo 19. İzole edilen fraksiyonların HepG2, SK-OV-3 ve hDFs hücre hatları üzerindeki % hücre canlılıkları	96

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Al(NO ₃) ₃	Alüminyum nitrat
C18	Oktadesil
CH ₃ COOK	Potasyum asetat
CV	Varyasyon katsayısı
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco's modified eagles medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
FBS	Fetal sığır serumu
FT-IR	Fourier dönüşümlü infrared spektrometrisi
g	Gram
GAE	Gallik asit eşdeğeri
GK	Geri kazanım
HCl	Hidroklorik asit
hDFs	Sağlıklı insal deri hücre hattı
HepG2	İnsan karaciğer kanseri hücre hattı
HPLC-DAD	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi-diyot dizi dedektörü
KE	Kuersetin eşdeğeri
L	Litre
LOD	Tespit limiti
LOQ	Tayin limiti
M	Molar
m	Kütle
mAU	Miliabsorbans Birimi
m/z	Kütle/yük
mg	Miligram
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre

μM	Mikromolar
MS	Kütle spektrometrisi
MTS	5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4,5-dimetiltiazol)-3-(4-sülfofenil) tetrazolyum
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-yl-2]-2,5-difeniltetrazolyum bromür
N	Normalite
nm	Nanometre
NaOH	Sodyum hidroksit
Na_2CO_3	Sodyum karbonat
<i>o</i> -	Orto pozisyon
<i>p</i> -	Para pozisyon
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
ppm	Milyonda bir kısım
R^2	Korelasyon katsayısı
rpm	Dakikadaki devir sayısı
RSD	Bağıl standart sapma
RT	Alıkonma zamanı
SC_{50}	% 50 temizleme derişimi
SD	Standart sapma
SK-OV-3	İnsan yumurtalık kanseri hücre hattı
SNU-398	İnsan karaciğer kanseri hücre hattı
UV	Ultraviyole Bölge
•	Radikalin tek elektronu
vd	Ve diğerleri
Vis	Görünür Bölge
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
%	Yüzde

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Bitkilerdeki sekonder metabolitler olarak bilinen fenolik bileşikler en popüler antioksidan bileşiklerdir. Fenolik bileşiklerin sağlık üzerindeki yararları genellikle bitki ekstraktlarını araştırarak ve geleneksel bilgilerden yararlanarak keşfedilir. Antioksidan potansiyeline sahip bitki sekonder metabolitlerinin çoğu, kalp yetmezliğinden birçok kanser hastalığına kadar geniş bir hastalık yelpazesinde iyileştirici etkiler sağlamaktadır. İlaç geliştirme çalışmaları çoğunlukla bitki temelli bileşiklerin ilaç olarak kullanılması veya ilaçların yan etkilerine karşı koruyucu olması üzerine odaklanmaktadır.

Cuscuta türleri tam parazit bitkilerdir ve tarım alanına verdiği zarardan dolayı istenmeyen ve zararlı olarak görülen türlerdir. Tarımsal ürünler için zararlı olmasına rağmen *Cuscuta* türleri, Çin, Pakistan, Bangladeş ve Nepal'de yaşayan insanların, karaciğer ve böbrek hasarında, kronik ülser, siyatik bozukluk tedavisinde, yara ve iltihaplanmanın iyileştirilmesinde, cinsel fonksiyonların düzenlenmesinde, yaşlanma ve gebelikte düşüğü engellenmek için kullandıkları popüler halk ilaçlarıdır (Donnapée vd., 2014; Ghimire ve Bastakoti, 2009; Qureshi ve Bhatti, 2008).

Bu tez çalışması kapsamında tarımsal üretimde büyük verim kaybına yol açan ve baş etmesi zor bir asalak tür olan *C. campestris* bitkisinin fitokimyasal içeriğinin belirlenmesi hedeflendi. Antioksidan ve antikanser aktivite yönünden iyi sonuçlar veren bitki ekstraktının aktif bileşen/bileşenlerinin belirlenmesi için preparatif HPLC-DAD kullanılarak fraksiyonlama ve ardından analitik HPLC-DAD yöntemiyle saflık kontrolü yapılan bileşenlerin yapıları UV, MS/MS, FT-IR yöntemleri ile aydınlatıldı. Böylelikle bu bitkinin aslında çok değerli fenolik bileşikler içerdiği ve gelecekte karaciğer ve yumurtalık kanseri tedavisinde takviye ürün olarak kullanılabilceği ortaya konuldu.

1.2. Antioksidan Bileşikler

Oksijen, hem aerobik yaşamın kaynağı hem de enerji metabolizması için gerekli bir elementtir. Ancak bu faydalı elementin yaşam boyunca birçok olumsuz etkiye de sebep olduğu bilinmektedir (Diplock, 1998). Çünkü biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijen içeren serbest radikaller olup bunlara serbest oksijen radikalleri adı verilmektedir. Serbest oksijen radikalleri oksijenin suya eksik indirgenmesi sırasında ve farklı oksidatif stres mekanizmalarıyla oluşmaktadır. Oksijenin eksik indirgenmesi sonucu oluşan süperoksit, hidrojen peroksit, nitrik oksit, hidroksil radikalleri, peroksi nitrit ve hipokloröz asit gibi reaktif türler vücutta oksijenli solunum sonucu üretilen serbest radikallerdir. Ortaklaşmamış elektron çiftine sahip olan bu radikaller, protein, yağ ve DNA gibi birçok biyolojik yapıtaşlarında hasara neden olan ve kimyasal reaktiviteleri oldukça yüksek olan bileşenlerdir.

Radikallerin etkisiyle meydana gelen oksidasyonu yavaşlatan, durduran ya da oluşmasını engelleyen her türlü moleküle antioksidan denilmektedir (Young ve Woodside, 2001). Antioksidanlar organizma tarafından sentezlendiği gibi (endojen) dışarıdan besin olarak da alınabilirler (eksojen) (Halliwell ve Gutteridge, 1985). Endojen antioksidanlar çoğunlukla enzimatik yapıdadırlar ancak enzimatik yapıda olmayan türleri de vardır (Jerry vd., 2000). Enzimatik antioksidanlara, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon redüktaz (GR); enzimatik olmayan antioksidanlara, albumin, bilirubin, ferritin, melatonin, sistein örnek verilebilir (Young ve Woodside, 2001; Fang vd., 2002). Eksojen antioksidanlar ise daha çok bitkiler tarafından sentezlenen çeşitli vitamin ve fenolik bileşikler olup dışarıdan organizmaya alındığında antioksidan aktivite göstermektedir (Kolaylı ve Keha, 1999).

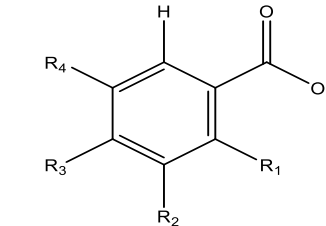
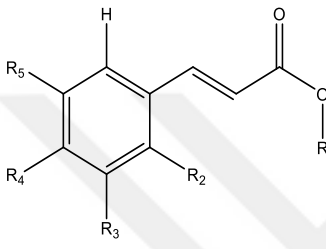
1.3. Bitki Fenolik Bileşikleri

Sekonder metabolitler olarak da ifade edilen fenolik bileşikler, bitkilerin ve onlardan türetilen ürünlerinin besinsel ve renk, koku, tat gibi duyuşal özelliklerinde önemli rol oynarlar (Fabre vd., 2001; Borbalán vd., 2003; Fang vd., 2007). Fenolik bileşikler, yapısal olarak aromatik halkaya bağlı bir ya da daha fazla hidroksil grup içeren basit moleküllerden yüksek polimerleşmiş bileşiklere kadar değişen yapılara

sahip olan bileşiklerdir. En basit fenolik bileşik bir tane hidroksil grubu içeren benzendir ve fenol olarak adlandırılmaktadır. Çoğu doğal olarak bulunan fenolik bileşikler, fenolik gruplardan birine ya da daha fazlasına bağlı mono ve polisakkaritlerle konjuge olarak buldukları gibi esterler ve metil esterler gibi fonksiyonel türevleri olarak da bulunabilirler (Shahidi ve Naczki, 2002). Bu tür yapısal çeşitlilik doğada fenolik bileşiklerin geniş bir yelpazede bulunmasını sağlamaktadır. Fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki grup altında incelenebilir.

1.3.1. Fenolik Asitler

Fenolik asitler bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan bileşiklerdir. Özellikle bitkilerin taç kısmında bulunurlar. Fenolik asitlerin bitkilerdeki rolü tam olarak açıklanamamasına rağmen besin alımı, protein sentezi ve enzim aktivitesi ile ilgili olduğu düşünülmektedir (Stalikas, 2007). Serbest asit formunda sadece istisnai durumlarda bulunabilirler. Daha çok sinamik ve benzoik asitten hidroksillenerek türevlenirler ve hidroksisinamik asitler ve (C₆-C₃), hidroksibenzoik asitler (C₆-C₁) olarak iki başlıkta incelenebilirler (Şekil 2). Fenolik asitlerin fonksiyonel gruplarından karboksil grupları, glikozidler, aminoasitler veya proteinlerle reaksiyona girebilirler ve alkollerle fenol esterleri, amino bileşikleriyle de amidleri oluşturabilirler. Esterleşmiş sinamik asitlere kafeik asitin esteri olan klorojenik asit örnek verilebilir (Şekil 1). Fenolik asitlerin, fenol halkasına bağlı hidroksil grupları da çok aktif olup, şekerlerle birleşerek glikozitleri oluştururlar (Harborne, 1998), (Şekil 1).

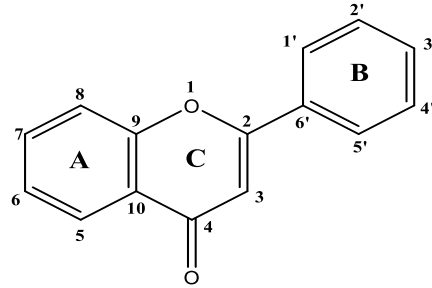
 <p>Hidroksibenzoik asitler (C₆-C₁)</p>		-R₁	-R₂	-R₃	-R₄	
	<i>p</i> -OH benzoik asit	-H	-H	-OH	-H	
	Vanilik asit	-H	-OCH ₃	-OH	-H	
	Gallik asit	-H	-OH	-OH	-OH	
	Sirincik asit	-H	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	
	Protokatekuik asit	-H	-OH	-OH	-H	
 <p>Hidroksisinamik asitler (C₆-C₃)</p>		-R₁	-R₂	-R₃	-R₄	-R₅
	Sinamik asit	-H	-H	-H	-H	-H
	<i>o</i> -Kumarik asit	-H	-OH	-H	-H	-H
	<i>m</i> -Kumarik asit	-H	-H	-OH	-H	-H
	<i>p</i> -Kumarik asit	-H	-H	-H	-OH	-H
	Ferulik asit	-H	-H	-OCH ₃	-OH	-H
	Sinapik asit	-H	-H	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃
	Kafeik asit	-H	-H	-OH	-OH	-H
Klorojenik asit	Kuinik asit	-H	-OH	-OH	-H	

Şekil 1. Bitkilerde yaygın olarak rastlanan hidroksibenzoik asit ve hidroksisinamik asit yapıları

1.3.2. Flavonoidler

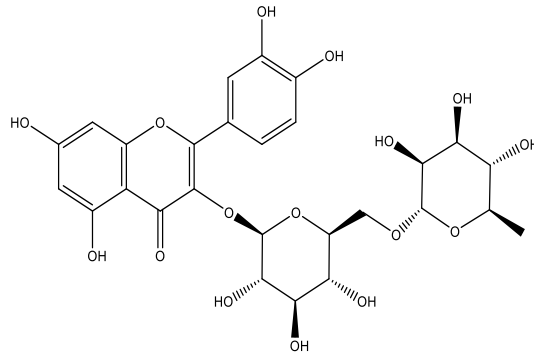
Flavonoidler, bitkilerin doğal yapılarında bulunan polifenolik antioksidanlardır. Biyolojik ve fizyolojik açıdan önemli olan flavonoidler bitkilerde üreme, savunma gibi faaliyetler için sinyal bileşikleri oluşturma ya da bitkilerin doku hasarlarında onarıcı olarak rol oynarlar. Flavonoidler çiçek, meyve ve yaprak pigmentlerinin kaynaklarıdır. UV ışığı absorbe eden flavonoidler böcekleri cezbederek polen taşınmasına yardımcı olurken aynı zamanda dokuların UV radyasyonuna karşı korunmasında da büyük rol üstlenirler (Bruneton, 1999; de Rijke vd., 2006). Son yapılan çalışmalarda özellikle flavonoidlerin antioksidan, antikanser, antimikrobiyal, antialerjik, antiinflamatuvar, fitoöstrojenik etkileri rapor edilmiştir (Heim vd., 2002; Williams vd., 2005; Androustopoulos vd., 2010; Park vd., 2006; Sithisarn vd., 2013; Park vd., 2006; Feng vd., 2012; Zierau vd., 2005).

Flavonoidler, 15 karbon atomu içeren ve iki fenil halkasının propan zinciri ile bağlanmasından oluşan difenilpropan ($C_6-C_3-C_6$) yapısındadır. Fenil grupları arasındaki üçlü karbon köprüsü (C_3) oksijenle halka oluşturarak flavonoidleri oluşturur. (Şekil 2).



Şekil 2. Flavonoidlerin $C_6-C_3-C_6$ yapısı

Bitkilerde flavonoidler aglikonları olarak nadir bulunurken, -OH gruplarının reaktif özelliklerinden dolayı şekerlerle kolaylıkla glikozillenirler veya alkillenirler. Bu nedenle, flavonoidlerin metoksi ve glikozil türevlerine bitkilerde sık rastlanır (Şekil 3). Flavonoid yapılarında C_3 sisteminin oluşturduğu heterosiklik halka, değişik yükseltgenme derecelerinde bulunabilir ve bu yükseltgenme derecesine bağlı olarak, flavonoidler alt gruplara ayrılır (Guliyev ve Harmandar, 2003).

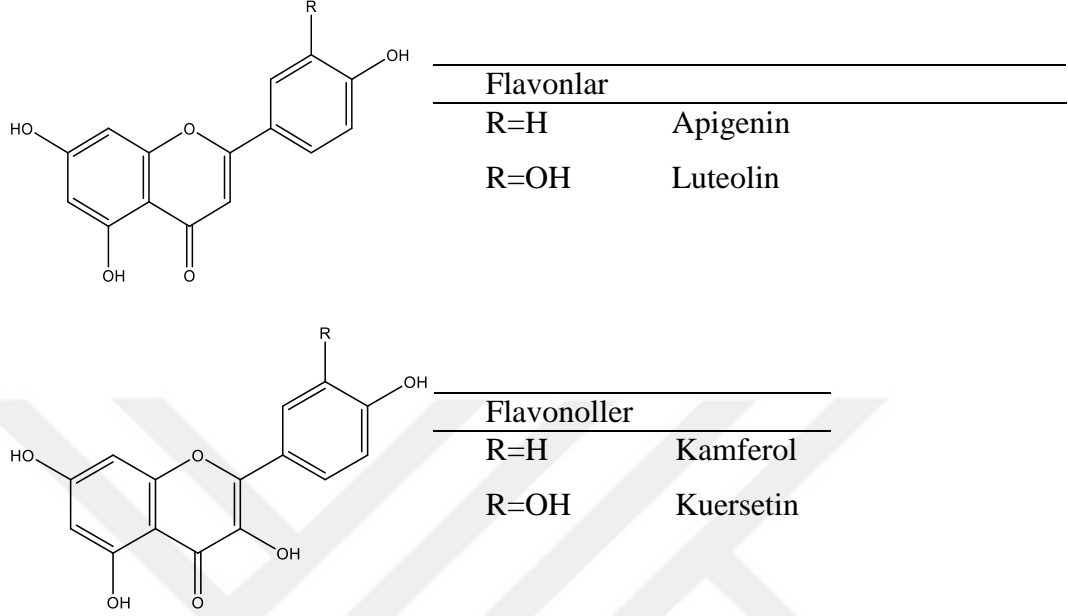


Şekil 3. Rutin'in yapısı (Kuersetin-3-O-rutinozit)

1.3.2.1. Flavon ve Flavonoller

Flavon ve flavonollerin yapısındaki farklılıklar C halkasının C_3 pozisyonuna -H ya da -OH grubunun bağlanmasına göre farklılık oluşturmaktadır. Flavonlar ve flavonoller, flavonoidlerin bitkilerde en çok rastlanan ve yapı çeşidi en fazla olan sınıfıdır (Shahidi ve Nacz, 2002). Bu bileşik grupları açık sarı ya da sarı renklidir.

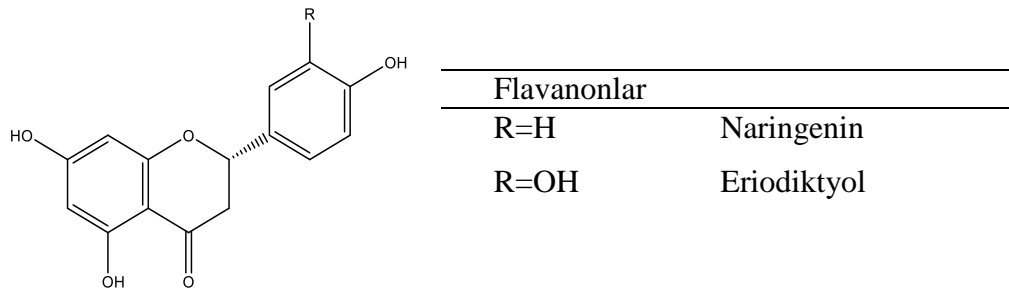
Bitkilerde hem serbest halde, hem de glikozitler halinde bulunurlar. Şekil 4'te flavon ve flavonollerin genel yapısı ve bu gruplara ait örnek bileşikler verilmiştir.



Şekil 4. Flavon ve flavonollerin genel yapısı ve bu gruplara ait örnek bileşikler

1.3.2.2. Flavanonlar

Flavanonlar, flavon ve flavonollerden farklı olarak C₂ halkasında çift bağ bulundurmazlar. Doğada çoğunlukla glikozillenmiş halde bulunurlar. Şekil 5'te flavanonların genel yapısı ve bu gruplara ait bileşikler verilmiştir.

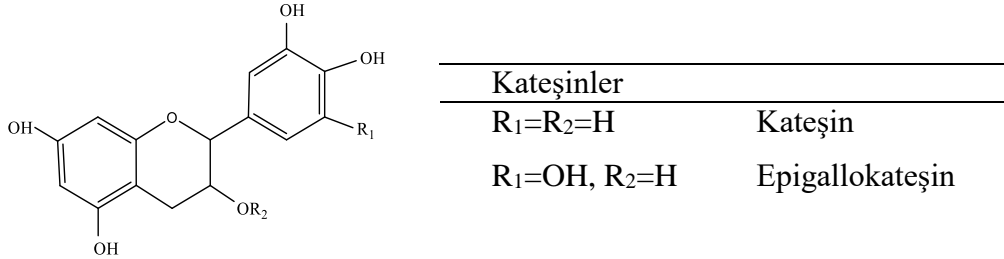


Şekil 5. Flavanonların genel yapısı ve bu gruplara ait örnek bileşikler

1.3.2.3. Kateşinler

Flavan-3-ol'ler diye de bilinen bu grup flavanonlardan farklı olarak C₃ pozisyonunda -OH grubu bulunduran, C₄ pozisyonunda ise keto grubu bulundurmayan

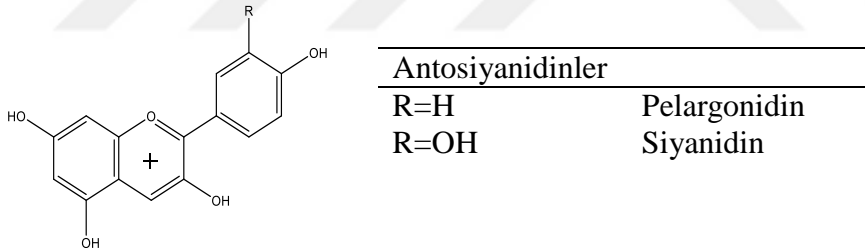
renksiz bileşiklerdir. Bitkilerde en sık bulunan flavonoid gruplarından. Şekil 6’da kateşinlerin yapısı ve grup üyelerine ait örnekler verilmiştir.



Şekil 6. Kateşinlerin yapısı ve bu gruba ait örnek bileşikler

1.3.2.4. Antosiyanidinler

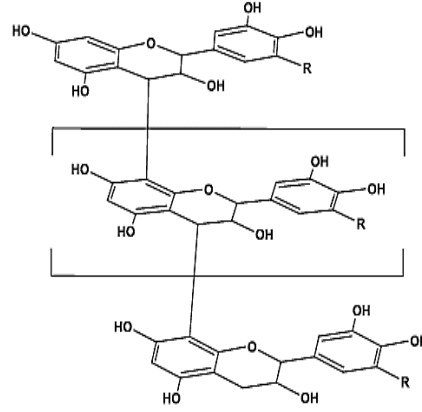
Antosiyanidinler, bitkiler aleminde çoğunlukla glikozitleri şeklinde (antosiyaninler) bulunurlar (Shahidi ve Naczki, 2002). Antosiyaninler bitkilerde kırmızı, pembe, mavi, mor ve turuncu renk tonlarını veren flavonoid gruplarıdır. Şekil 7’de antosiyanidinlere ait örnek yapılar verilmiştir.



Şekil 7. Antosiyanidinlerin yapısı ve bu gruba ait örnek bileşikler

1.3.2.5. Proantosiyanidinler (Kondense Tanenler)

Diğer flavonoid gruplarına göre nisbeten daha yüksek molekül ağırlığına sahip olan bu bileşik grubu polimerik yapıya sahiptir. Şekil 8’deki gibi yapı kateşin ve epikateşinin kondenzasyonundan oluşuyorsa prosiyanidin; kateşin ve gallokateşinin kondenzasyonundan oluşuyorsa prodelfinidin adını almaktadır (Şahin, 2014).



Şekil 8. Prosiyanidinlerin kimyasal yapısı (R=OH: Prodelfinidin, R=H: Prosiyanidin)

1.4. Bitkilerden Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu ve Analizleri

Fenolik asitler ve özellikle flavonoidler farmakolojik etkileri nedeniyle son yıllarda dikkatleri üzerine çeken fenolik bileşiklerdir. Belirlenen fenolik bileşenlerin sayısı her geçen gün artmaktadır. Fenolik asitlerin ve flavonoidlerin yapısal çeşitliliğinin fazla olması ve bitkilerde kompleks karışımlar halinde bulunmaları nedeniyle bu bileşiklerin kalitatif ve kantitatif analizleri için hassas ve güvenilir analitik yöntemler gereklidir.

Bitki dokusundan fenolik bileşiklerin izolasyonu, tanımlanması ve miktarlarının doğru bir şekilde belirlenebilmesi için en uygun ekstraksiyon yönteminin seçilmesi çok önemlidir. Standart bir ekstraksiyon yöntemi yerine çalışmanın amacına göre çeşitli ekstraksiyon yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin arasında bitki örneğinin geri soğutucu altında çözücüyle karıştırıcı eşliğinde ısıtılarak ekstraksiyonu (katı-sıvı ekstraksiyonu), sıvı-sıvı ekstraksiyonu, soxhlet ekstraksiyonu, macerasyon gibi klasik yöntemler kullanılabilirken; mikrodalga yardımıyla ekstraksiyon, ultrasonik ekstraksiyon, ultrasonik-mikrodalga yöntemiyle ekstraksiyon, süperkritik akışkan ekstraksiyonu gibi daha modern yöntemler de sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntemler ayrı ayrı kullanılabileceği gibi bir ya da bir kaç birliktede kullanılabilir.

Tez çalışması kapsamında katı-sıvı ekstraksiyonu kullanıldığı için ekstraksiyon yöntemlerinden sadece bu yöntem detaylandırılacaktır. Katı sıvı ekstraksiyonunun uygulama alanının çok geniş olması, uygulamasının kolay olması ve ekstraksiyon

veriminin yüksek olması nedeniyle bitkilerden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda sıklıkla kullanılmaktadır. Bu tür ekstraksiyonda örneğin mümkün olduğunca küçük parçacıklara ayrılarak çözücü ile temas ettiği yüzey alanının genişletilmesi, ekstraksiyon verimini artırmaktadır. Ayrıca ekstraksiyonda kullanılan çözücü tazelenerek ve ekstraksiyon basamağı arttırılarak çözücüye göç eden kütle miktarı artırılabilir (Pinelo vd., 2005).

Fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda metanol, etanol gibi alkollerle birlikte dietil eter, aseton, etil asetat ve asetonitril gibi çözücüler kullanılmaktadır (de Rijke vd., 2006; Naczk ve Shahidi, 2004; Prasain vd., 2004; Stalikas, 2007; Tura ve Robards, 2002). Bitki örneklerinden flavonoidlerin ekstraksiyonu için uygun çözücünün seçilmesi bitkide bulunan flavonoidlerin polaritesine bağlıdır. Flavonoid glikozitlerin ekstraksiyonu için yüksek polariteli çözücüler, aglikonların ekstraksiyonu için ise düşük polariteli çözücüler daha etkilidir. Aglikonlar daha çok benzen, etil asetat, dietil eter gibi çözücülerle ekstrakte edilirlerken, glikozit yapılı flavonoidler ise alkollerin (metanol, etanol) sulu çözeltileri veya asetonla ekstrakte edilebilirler (Naczk ve Shahidi, 2004). Hidroksibenzoik asit, hidroksisinamik asit türevleri ve flavonoid tri- veya tetra glikozitleri gibi daha polar bileşiklerin ekstraksiyonu için, sulu metanol veya sulu aseton kullanılması önerilir (de Rijke vd., 2006).

1.4.1. Bitki Ekstraktlarının Fraksiyonlanması ve Fenolik Bileşenlerinin Saflaştırılması

Bitki ekstraktlarında düşük derişimlerde bulunan, tanımlanan/tanımlanamayan fakat önem dereceleri derişim seviyelerinin çok üzerinde olan pek çok fenolik bileşik vardır. Bu bileşiklerin izolasyonu ve yapısının açıklığa kavuşturulması, bu bileşiklerin vücuttaki görevlerini anlamak bakımından oldukça önemlidir (Ryan vd., 1999). Ham bitki ekstraktlarından fenolik bileşiklerin izolasyonu ve saflaştırılmasında kolon kromatografisi, preparatif HPLC, katı faz ekstraksiyonu ve katı faz mikro ekstraksiyonu gibi yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır (de Rijke vd., 2006; Stalikas, 2007). Bu tez kapsamında fenolik bileşiklerin izolasyonu ve saflaştırılmasında preparatif HPLC sistemi kullanıldığı için sadece bu yöntem detaylandırılacaktır.

Preparatif HPLC, geniş iç çapı (10-50 mm) olan bir kolon ve yüksek akış hızı (4-100 mL/dakika) kullanılarak fenolik bileşenlerin hızlı bir şekilde ve tek bir yöntemle saf olarak ayrılmasına imkan veren bir yöntemdir. Çok düşük miktardaki örneklerin ayrılmasında ve saflaştırılmasında başarıyla uygulanarak mikro düzeyde saflaştırma yapmaktadır. Analitik HPLC cihazında bileşenlerin kalitatif ve kantitatif analizleri yapılırken, preparatif HPLC cihazında ise bileşenlerin ayrımı ve saflaştırılması gerçekleştirilmektedir (Liu vd., 2010).

1.5. Bitkilerdeki Fenolik Bileşiklerin Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması ve Analizi

1.5.1. Kromatografi

Kromatografi ilk kez Rus botanikçi Mikhail Tswett (1903) tarafından bulunmuştur. Tswett, bitki pigmentlerinin ayrımını kalsiyum karbonat içeren bir kolondan geçirerek yapmıştır. Kromatografi, bir karışımdaki bileşenlerin, birbirleriyle karışmayan biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere iki fazlı bir sistemde ayrılması ve saflaştırılması yöntemidir. Tüm kromatografik ayırmalar kullanılan hareketli fazın yapısına bağlı olarak gaz, sıvı ya da süper kritik akışkan olmak üzere üç sınıfa ayrılır. Hareketli fazda çözünen örnek, uygun sabit faz boyunca geçirilir. Numune içerisindeki farklı bileşenlerin sabit fazda değişik hızlarda hareket etmeleriyle ayırım sağlanmış olur. Hareketlilikteki bu farklılıkların bir sonucu olarak bileşenler ayrı bantlar halinde kaydedilirler. Alınan zamanına karşı dedektörden alınan sinyal şiddeti kullanılarak elde edilen kromatogramlar sayesinde bileşikler kalitatif ve/veya kantitatif olarak analiz edilebilirler (Skoog vd., 2007).

Hareketli fazın özelliğine göre çeşitli kromatografik yöntemler geliştirilmiştir. Sıvı ve gaz kromatografisi fazlar arasında madde aktarımını sağlayan dengelerin cinsine göre dört bölüme ayrılmıştır (Skoog vd., 2007). Bunlar: Adsorpsiyon kromatografisi, dağılma (paylaşım) kromatografisi, iyon değişim kromatografisi ve boyut eleme kromatografisidir.

Sıvı kromatografisinde bu dört yöntemde kullanılabilirken, gaz kromatografisinde ise bileşenlerin uçucu olması gerektiğinin bir sonucu olarak yalnızca adsorpsiyon ve dağılma kromatografisi kullanılır. Kısaca HPLC olarak adlandırılan yüksek performanslı sıvı kromatografisi analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılanıdır.

1.5.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Fenolik Bileşiklerin Analizi

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi fenolik bileşiklerin ayrılması ve karakterizasyonunda sıklıkla kullanılan bir analitik yöntemdir. Bu yöntemle bileşiklerin muhtemel türevleriyle ya da bozunma ürünleriyle birlikte eş zamanlı olarak analiz edilebilmesinin yanında birlikte elüe olan ya da girişim yapan matris ortamında bile düşük derişimdeki analitlerin analiz edilebilmesi mümkündür. Bir HPLC cihazı; hareketli faz rezervuarı, pompa, enjektör, ön kolon, kolon, kolon fırını, dedektör ve kaydedici bilgisayardan oluşmaktadır.

HPLC cihazında bileşiklerin ayrımı, analitin özelliklerine göre farklı kromatografik teknikler gerektirmektedir. Dağılma kromatografisi, tüm sıvı kromatografisi teknikleri arasında en yaygın kullanıma sahiptir. Hareketli ve sabit fazların bağıl polaritelerine göre iki tip dağılma kromatografisinden bahsedilir. Normal faz kromatografisinde sabit faz, hareketli fazdan daha polardır. Dolayısıyla benzer özelliklere sahip maddelerin birbiri içinde dağılma özelliği olduğu için apolar karakteri yüksek olan bileşik/bileşikler kolondan önce ayrılır. Ters faz kromatografisinde ise sabit faz apolar, hareketli faz ise nispeten polardır. Bu ayırım tekniğinde polarlığı en çok olan bileşik kolondan önce çıkar ve hareketli fazın polarlığı arttıkça elüsyon zamanı artar. Bu bağlamda en fazla kullanılan ters faz kolonları oktil (C8) ve oktadesil (C18) modifiye silika kolonlarıdır. HPLC ile yapılan bütün ayırma işlemlerinin dörtte üçü ters faz kromatografisi ile yapılmaktadır (Skoog vd., 2007).

Kolon seçimi fenolik bileşenlerin ayrılmasında en önemli basamaklardan biridir. Ters faz C18 kolonlarının kullanılmaya başlamasıyla birlikte farklı sınıftaki fenolik bileşiklerin birlikte ayrımı da önemli ölçüde gelişmiştir. Çoğunlukla 100-250 mm uzunluğunda, 2 ila 4,6 mm arasında değişen iç çapı, 2-10 µm parçacık boyutu olan

kolonlar kullanılmaktadır. Nicel ve nitel olarak hassas ayırım sağlayan analitik kolonun korunabilmesi ve kolonun etkin ömrünün artırılabilmesi için kolonla aynı dolgu maddesine sahip ön kolon kullanılabilir. Ön kolonun görevi sadece partikül haldeki maddeleri ve çözücü içindeki yabancı maddeleri tutmak değil, aynı zamanda numune içinde bulunan ve durgun faza tersinmez olarak bağlanan bileşikleri de tutmaktır.

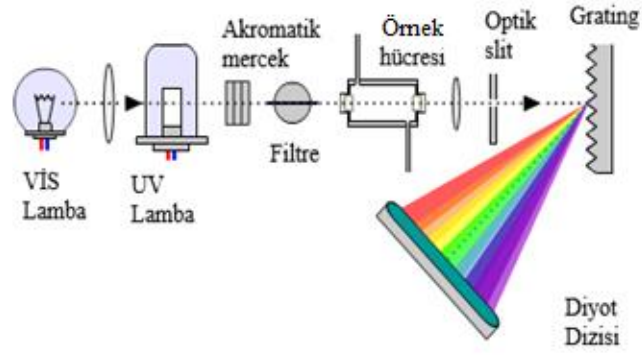
Fenolik bileşiklerin HPLC ile ayırımları için tek çözücü veya gradiyent denilen birden fazla çözücü sisteminin birlikte kullanımı ile oluşturulmuş sistemler kullanılabilir. Hangi çözücü sisteminin kullanılacağı, analitlerin sayısı, tipi ve matrisin yapısına bağlıdır. Çözücü olarak yüksek oranda suyun yanında asetonitril ve metanol en sık kullanılan organik çözücülerdir. Ayrıca tetrahidrofur, propanol gibi daha az polar olan çözücüler de kullanılabilir. Ters fazda dikkat edilmesi gereken, su ile karışabilir organik çözücüler kullanmaktır. Burada çözücü sisteminde herhangi bir hava kabarcığı kalmamasına da dikkat edilmelidir. İleri hassasiyet için hareketli faz içeriğindeki hava kabarcıklarının veya çözünmüş gazların giderilmesi adına pompa ünitesinden önce degaz üniteleri kullanılmaktadır (Skoog vd., 1998). Hareketli faz akış hızını sağlayan pompalar, ayırımın gerçekleştiği kolonların öncesinde yer alır. Düzenli akış hızı kolonun iç çapına bağlıdır; kolonda küçük iç çapı uygun akış hızını sağlayacak özel pompalar gerektirir. Günümüzde HPLC cihazları için 0,1-5 mL/dk akış hızı ve 600 bar'a kadar çıkabilen pompalar üretilmiştir (Akyüz, 2011).

Dedektörler, kolondan elüe olan örnek bileşiğinden alınan cevap doğrultusunda sinyallerin kromatogram üzerinde pik olarak ifade edilmesini sağlayan ünitedir ve kolon sonrasına monte edilir. HPLC sistemlerinin kuruluşundan bu yana çok farklı ölçüm ilkelerine dayanan dedektörler geliştirilmiştir. UV-Vis dedektör (sabit ve değişebilen dalga boyu), refraktif indeks dedektörü, floresans dedektör, elektrokimyasal dedektör ve kütle spektrometresi HPLC cihazında tercih edilen dedektörlerdir. Fenolik bileşiklerin analizinde çoğunlukla UV-Vis dedektörler ve kütle spektrometre kullanılmaktadır (Skoog vd., 2007). Bu tez kapsamında UV-Vis dedektörler (değişken dalga boylu) ve kütle spektrometresi kullanıldığı için bu iki dedektör detaylandırılacaktır.

1.5.2.1. Ultraviyole ve Görünür Bölge (UV-Vis) Dedektörleri

HPLC sistemleri için ideal bir dedektör yüksek duyarlılığa, düşük gürültü seviyesine, yüksek seçiciliğe ve geniş derişim aralığına sahip olmalıdır. Ayrıca analiz edilen bileşenlere duyarlı, basınç ve sıcaklık değişimlerine duyarsız olmalıdır (Hışıl, 1999). Ultraviyole-görünür bölge (UV-Vis) dedektörler bu sayılan özellikleri bir bütün halinde bünyelerinde bulunduran dedektörlerden biridir. Fenolik bileşiklerin yapısında bulunan konjuge çift bağlar ve aromatik bağlar sayesinde bu bileşikler UV ve Vis bölgede absorpsiyon yaparlar (Mabry vd., 1970). UV-Vis ışığa maruz kalan bileşiklerin moleküllerindeki bağ elektronlarının uyarılmasıyla absorpsiyon denilen her bileşiğe özgül etki meydana gelir. Böylece aranan bileşiğin dedeksiyonu gerçekleşir (Harvey, 2000). Sıvı kromatografi sistemlere uyarlanmış UV-Vis dedektörlerin, hem organik hem de inorganik sistemlere uygun, 10^{-4} - 10^{-5} M aralığında tipik duyarlılık değerine sahip ve bilimsel çalışmalarda oldukça tercih edilen dedektör tipi olduğu bilinmektedir (Skoog vd., 2007). Ancak geleneksel sıvı kromatografi sistemleri üzerinde yapılan geliştirme çalışmaları neticesinde, döteryum veya tungsten lambalı ışık kaynaklı diyot dizili spektrofotometreler (DAD) de kullanılmaya başlanmıştır.

Diyot dizisi dedektörleri, yüksek performanslı bir sıvı kromatografisi (HPLC) ile bileşenlerine ayrılan örneklerin UV-Vis absorpsiyon spektrumlarını kaydetmek için yaygın olarak kullanılır. Şekil 9' da gösterilen diyot dizi dedektöründe UV bölge için döteryum lamba, görünür bölge için tungsten lamba olmak üzere iki ışın kaynağı mevcuttur. UV lambası Vis lambasının ışın yolu üzerindedir. Geniş aralıklı bir emisyon kaynaktan (döteryum lamba gibi) gelen ışın bir akromatik mercek sistemiyle paralelleştirilir ve böylece ışığın tamamı, holografik bir bölücü üzerinde bulunan dedektör hücresinden geçer. Böyle bir düzenlemeyle kaynaktan çıkan tüm dalga boylarındaki ışık örnekten geçmiş olur. Bölücüden çıkan dağıtılmış ışık bir diyot dizisi üzerine düşer. 512 diyottan oluşan bir yüzeyde, her diyotun ayrı bir dalga boyundaki absorbansı eş zamanlı olarak ölçmesi mümkündür. Ölçüm verileri istenilen dalga boyu aralığında alınır ve zaman, absorpsiyon şiddeti ve spektrumları içeren üç boyutlu kromatogramlarla desteklenir. Eş zamanlı alınabilen spektrumlar sayesinde elüe edilen ve sinyal veren bileşenlerin doğru tanınması mümkün hale gelir (Akyüz, 2011).

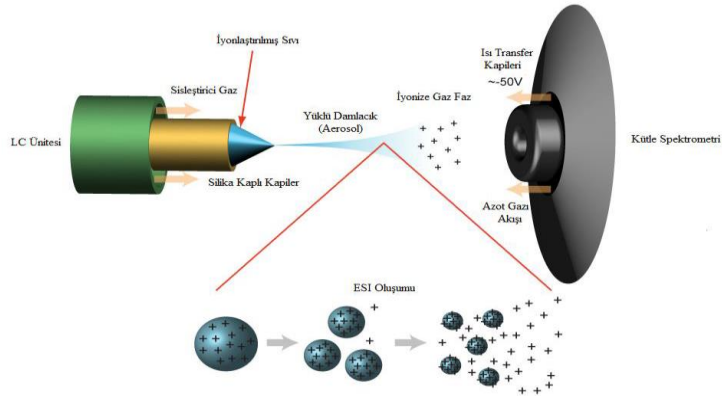


Şekil 9. Diyet dizisi dedektörünün şematik gösterimi (URL-1, 2017).

1.5.2.2. Kütle Spektrometrik (MS) Dedektörler

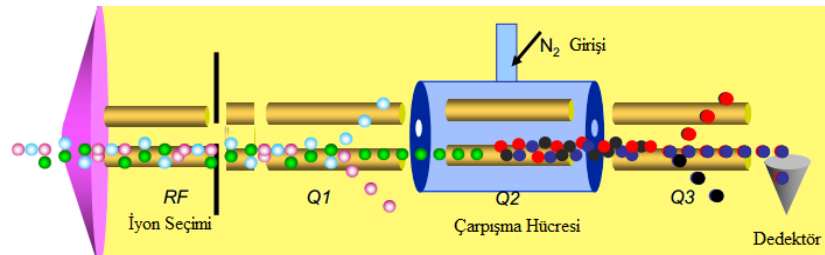
Kütle spektrometrik (MS) dedektörleri kalitatif ve kantitatif analizlerde sıklıkla kullanılan dedektörlerdir. Sıvı halde ve uçucu olmayan karışımların analizleri için sıvı kromatografisiyle birleştirilmiştir. Sıvı kromatografi ile örnek bileşenlerine ayrılır ve ayrılan bileşenler iyon haline getirilip kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayırım gerçekleşir. Böyle birleştirilmiş sistemlerde öncelikle ayırımın gerçekleştiği sıvı sistemden gelen hareketli faz çeşitli yöntemlerle ortamdan uzaklaştırılmalıdır. Burada hareketli faz, sürekli dairesel şekilde dönen ve ısıtılan yüzeye püskürtülerek vakumla uzaklaştırılabileceği gibi elektrosprey ve termosprey yöntemleri kullanılarak da uzaklaştırılabilir. Ancak püskürtme veya spreyleme işleminden sonra mevcut bileşenin iyonlarına ayrışması için bilindik bazı iyon kaynağına girmeleri gerekmektedir. Elektron bombardımanı (EB), kimyasal iyonlaştırma (CI) ve elektrosprey iyonlaştırma (ESI) üniteleri sıvı sistemlerde kullanılan iyonlaştırma kaynaklarıdır (Skoog vd., 2007). Çalışmada ESI tekniği kullanıldığı için sadece bu teknikten bahsedilecektir.

ESI, atmosfer basıncında ve oda sıcaklığında gerçekleşir. Numune, paslanmaz çelikten iğne şeklinde bir kapiler ile dakikada birkaç mikrolitre hız sağlanarak pompalanır. İğneye, etrafındaki silindirik elektroda göre birkaç kilovolt potansiyel uygulanır. Oluşan çok küçük ve elektrik yüklü parçacıklar, daha sonra bir elektron giderme kapilerinden geçer. Burada çözücü buharlaşır ve elektrik yükleri analit moleküllerine tutunur. Çözücü buharlaşırken yük yoğunluğu artar ve iyonlar, gaz fazına adsorbe olur (Şekil 10) (Skoog vd., 2007).



şekil 10. Elektrosprey iyon kaynağı (ESI) şematik gösterimi (şahin, 2014)

HPLC-MS sistemlerinde yaygın olarak kuadrupol kütle analizörleri, uçuş zamanlı kütle analizörleri (TOF) ve iyon tuzaklı analizörler kullanılmaktadır. Çalışmada kullanılan MS dedektörü kuadrupol kütle analizörü ile çalıştığı için sadece bu tip kütle analizöründen bahsedilecektir. Kuadrupol tipi analizörlerde, elektrot olarak dört paralel silindirik çubuk kullanılır. Karşılıklı çubuklar elektriksel olarak birbirine bağlıdır. Bir çift değişebilir doğru akım kaynağının pozitif tarafına, diğer çift ise negatif ucuna bağlanır. İlâveten her çubuk çiftine değişebilir radyo frekanslı alternatif akım potansiyeli uygulanır. Örnek, kapiler kolonundan çıktıktan sonra, kütle spektrometrenin girişinde bulunan transfer hattına, ardından iyonlaştırma ünitesine geçer ve iyonlaşarak parçalanır. Çubuklara hem doğru akım (DC) hem de radyofrekans (RF) gerilimi uygulanır. Kütle analizöründe uygulanan gerilim altında belirli m/z değerine sahip olan iyonların dışındaki bütün iyonlar çubuklara çarpar ve nötral moleküllere dönüşür. Sadece belli aralıkta m/z değerine sahip olan iyonlar dedektöre ulaşır (şekil 11). Kuadrupol tipi analizörlerde tarama süresinin çok kısa olması, özellikle kromatografik piklerin anında taranması için çok avantajlıdır (Skoog vd., 2007).



şekil 11. Kuadrupol tipi kütle analizörü şematik gösterimi (URL-2, 2017)

1.6. Bitki Ekstraktlarının Antioksidan Aktivitelerinin Tayin Yöntemleri

Fenolik bileşikler arasında büyük kimyasal çeşitlilik nedeniyle, numunelerin antioksidan kapasitesini değerlendirmek için pek çok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin dayandığı prensipler genel olarak oksidan maddelere bir hidrojen aktarımı ile onları indirgeyerek etkisiz hale getirmek ve oksidan oluşumunu önlemek, oluşan oksidan ajanların temizlenmesini sağlamak, oksidasyon ürünlerinin oluşturduğu hasarı onarmak ve oluşan radikal zincir reaksiyonlarını durdurmak şeklinde özetlenebilir. Bitkisel ürünlerde toplam antioksidan bileşenlerin veya aktivitenin ölçülmesinde temel olarak iki prensip kullanılmaktadır.

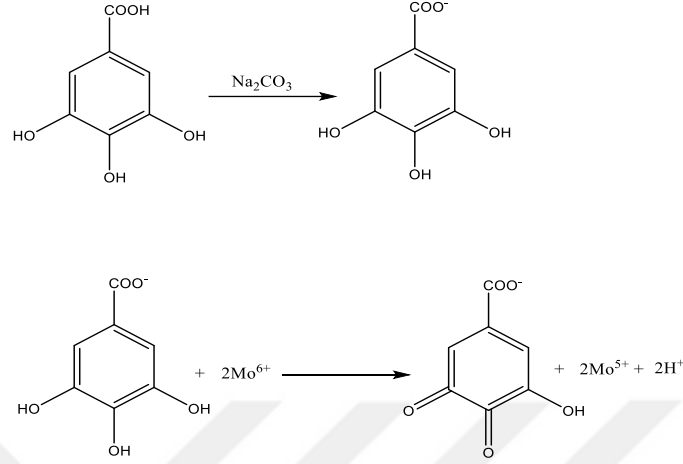
a) Antioksidan bileşikten hidrojen atomunun transferine dayanan yöntemlerdir ve oksijen radikal absorpsiyon kapasite yöntemi (ORAC), laktat dehidrogenaz yöntemi (LDL-oksidasyonu), toplam radikal tuzaklayıcı antioksidan parametre yöntemi (TRAP) örnek olarak verilebilir,

b) Antioksidan bileşikten elektron transferine dayanan yöntemlerdir ki bunlara toplam fenolik madde miktarının ölçüldüğü Folin yöntemi (FC), demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan güç yöntemi (FRAP), alüminyum ile toplam flavonoid tayin yöntemi, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal temizleme kapasitesi yöntemi (DPPH), Cu(II)'nin oksidan olarak kullanıldığı toplam antioksidan potansiyel yöntemi (CUPRAC) vb. örnek olarak verilebilir (Albayrak vd., 2010; Apak vd., 2005; Büyüktuncel, 2013).

1.6.1. Spektrofotometrik Toplam Fenolik Madde Tayini

Toplam fenolik madde tayininin temeli redoks reaksiyonuna dayanmaktadır. Fenolik bileşikler bazik ortamda Folin-Ciocalteu reaktifini indirgerken kendileri ise oksitlenmiş forma dönüşmektedir. Reaksiyon sonucunda indirgenmiş reaktifin oluşturduğu mavi rengin spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle, analizi yapılan örnekteki fenolik bileşiklerin toplam miktarlarının hesaplanması mümkün olmaktadır. Oluşan kompleksin renk şiddeti fenolik maddelerin derişimi ile doğru orantılı olup, 760 nm'de absorbans verir (Singleton vd., 1999). Şekil 12'de toplam fenolik madde

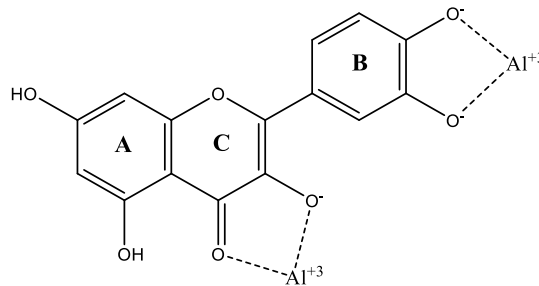
tayinin prensibi gallik asit ile Folin-Ciocalteu reaktifi arasında gerçekleşen reaksiyon üzerinden verilmiştir.



Şekil 12. Gallik asit ile Folin-Ciocalteu reaktifi arasında gerçekleşen reaksiyon

1.6.2. Spektrofotometrik Toplam Flavonoid Tayini

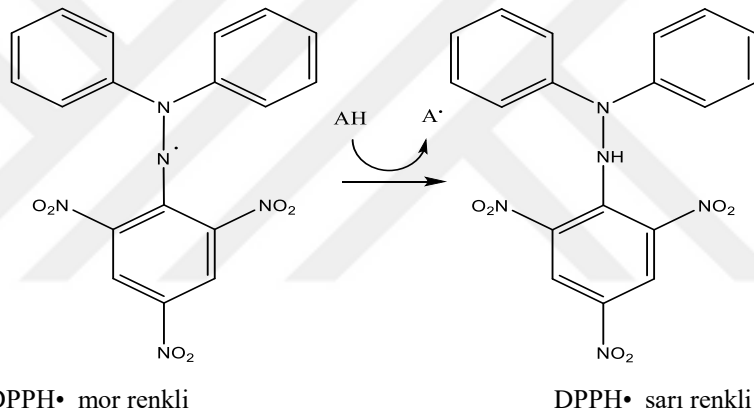
Spektrofotometrik olarak toplam flavonoid tayin yöntemi, alüminyum nitrat, flavon ve flavonol grubu bileşiklerin C_4 pozisyonunda bulunan keto grubu ile, C_3 veya C_5 pozisyonlarındaki hidroksil gruplarından biriyle kararlı kompleks oluşturması prensibine dayanır (Al-flavon veya Al-flavonol kompleksi) (Park vd., 1997). Bununla birlikte alüminyum, flavonoid grubu bileşiklerin A ve B halkalarındaki orto-dihidroksi gruplarıyla da kararsız kompleksler oluşturmaktadır. Şekil 13’de Al (III)’un kuersetin ile oluşturduğu kompleksin kimyasal yapısı verilmiştir. Toplam flavonoid tayininde kullanılan bu spektrofotometrik yöntem, alüminyum nitrat ve potasyum asetat içeren çözelti ile flavonoid içeren çözeltinin karıştırılması ve 30 dakika sonunda oluşan sarı rengin 415 nm ’de absorbans değerlerinin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır.



Şekil 13. Alüminyum(III)'un kuersetin ile oluşturduğu kompleks

1.6.3. DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi

DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) sentetik bir serbest radikal olup çözeltilerindeki mor rengi 517 nm’de maksimum absorbands vermektedir (Cuendet vd., 1997). Antioksidanlarla DPPH•’ın tepkimesi sonucunda DPPH•’ın indirgenerek radikal olmayan forma dönüşmesi rengin mordan sarıya dönüşmesiyle gözlenir (Şekil 14). Bu özellik tepkimenin görsel olarak izlenmesine izin verir (Teixeira vd., 2013). Bu durumda mor rengin şiddetindeki azalma antioksidan maddenin radikal temizleme aktivitesinin hesaplanmasında kullanılır. Standartlarla ve ekstraktlarla reaksiyona giren DPPH• reaktifinin oluşturduğu absorbands değişimi 517 nm’de ölçülüp, değişen derişimlere karşı absorbands şiddeti grafiğe geçirilir.



Şekil 14. DPPH• serbest radikal temizleme yönteminin çalışma mekanizması (AH: antioksidan bileşiği temsil etmektedir).

1.7. Karaciğer Kanseri (Hepatoselüler Karsinoma)

Primer karaciğer kanseri olarak da bilinen hepatoselüler karsinoma (HCC) dünyada en yaygın ve en ölümcül hastalıklardan biridir. Dünyada kanserden dolayı ölümlerin üçüncü nedenini oluşturmaktadır. Sağ kalım oranının yılda %9’un altında olduğu yapılan araştırmalar doğrultusunda rapor edilmiştir. Alkol, obezite, aşırı demir yüklenmesi, aflatoxinler karaciğer kanserinin sebepleri arasındadır (Bishayee vd., 2010). ABD’de kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %4’ü karaciğer kanseri nedeniyle olmaktadır (Bishayee vd., 2010; Cha ve de Matteo, 2005).

Karaciğer kanseri için kemoterapi uygun bir tedavi yöntemi değildir ve bu hastalık aynı zamanda radyoterapiye de dirençlidir. Birçok vakada, cerrahi müdahale veya organ nakli tek çözüm olarak görülmektedir (Aravalli vd., 2008). Fakat tümörün boyutu ve diğer tıbbi nedenlerden dolayı sadece %10–20 HCC hastasına cerrahi müdahale uygulanabilmektedir (Bishayee vd., 2010; Morris vd., 2009; Thomas ve Zhu, 2005). Bundan dolayı bu hastaların tedavisinde bitkisel preparatlara olan ilgi her geçen gün artmakta ve buna paralel olarak da bitkilerle ilgili çalışmalar hız kazanmaktadır.

1.8. Yumurtalık Kanseri (Adeno Karsinoma)

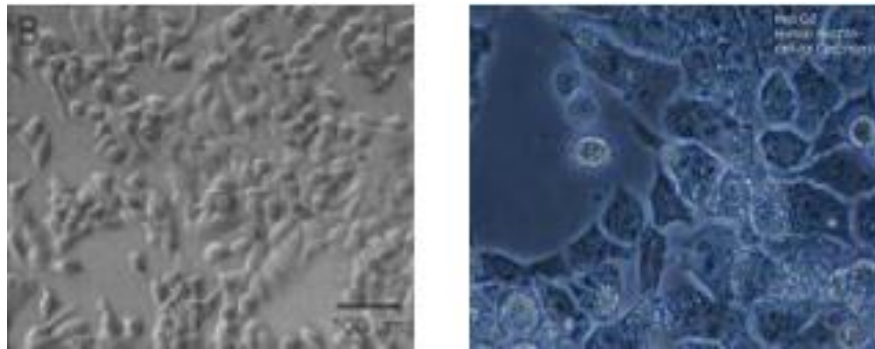
İnsan yumurtalık kanseri, kadınlarda en yaygın kötü huylu tümör olup, dünya çapında yıllık yaklaşık 225 bin vaka görülmektedir. Ayrıca her yıl 140000 ölümle diğer jinekolojik tümörle ölümler içinde en yüksek ölüm oranına sahiptir (Ming ve Hua, 2015). Sinsi başlangıcı ve erken teşhis yönteminin bulunmaması nedeniyle, hastaların % 70'i teşhis konulduğunda ileri aşamaya ulaşmış olur. Dahası, yumurtalık kanseri olan hastalarda, hastalığın tekrarlama oranı yaklaşık %70'tir. Bu oran jinekolojik kötü huylu tümörlerde ölüm oranı en yüksek kanserler olan, rahim ağzı kanseri ve endometriyal kanserden daha yüksektir. Cerrahiye dayanan multimodalite tedavisi yumurtalık kanseri için ana tedavi yöntemi olmakla birlikte kemoterapi yöntemi de sıklıkla kullanılmaktadır (Banerjee ve Kaye, 2013). Günümüzde kemoterapiler, özellikle de sisplatin ve paklitaksele dayalı kombine kemoterapinin, sağkalım oranını artırdığı bilinmektedir. Ancak tedavinin ilerleyen aşamalarında çoğu hastada sisplatine karşı birincil ve ya çoklu ilaç direnci gelişmektedir (Ying vd., 2016). Yapılan çalışmalarda birincil ve ya çoklu direncin klinik tedavide ana engel olduğu ve bu durumun ileri yumurtalık kanseri olan hastaların %20-30'unda 5 yıllık sağkalım oranı ile sonuçlandığını ortaya koymuştur (Gilbert vd., 2012). Bu nedenle yumurtalık kanseri olan hastaların hayatta kalması oranını iyileştirmek için etkili tedavi stratejilerinin keşfedilmesi büyük önem arz etmektedir.

1.9. Kanser Çalışmalarında Kullanılan Hücre Hatları

Bu tez çalışması kapsamında HepG2 ve SNU-398 karaciğer kanseri hücre hatları, SK-OV-3 yumurtalık kanseri hücre hattı ve hDFs sağlıklı insan dermal hücre hattı kullanıldı.

1.9.1. HepG2 Hücrelerinin Özellikleri

HepG2 (insan primer hepatoselüler karsinoma) hücre hattı, 15 yaşında iyi derecede farklılaşma gösteren hücelere sahip olan Amerikalı bir erkeğin hepatoselüler karsinoma dokusundan üretilmiştir. Bu hücreler 55 kromozoma sahip epitel hücrelerdir (Şekil 15). HepG2 hücreleri büyük ölçüde başarılı bir şekilde yetiştirilebilir ve transferrin, fibrinojen, plazminojen ve albümin gibi birçok plazma proteini salgırlar. Bunlar, insan büyüme hormonu ile uyarılabilirler. Bu yüzden HepG2 hücre hatlarıyla çalışmak diğer hücre hatlarına göre daha kolay olması bakımından tercih edilmekte ve *in vitro* modellemelerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Dehn vd., 2004). Ayrıca HepG2 hücreleri birçok bitki ekstraktının sitotoksitesinin araştırılmasında kullanılmaktadır (Park vd., 2002; Ruffa vd., 2002).

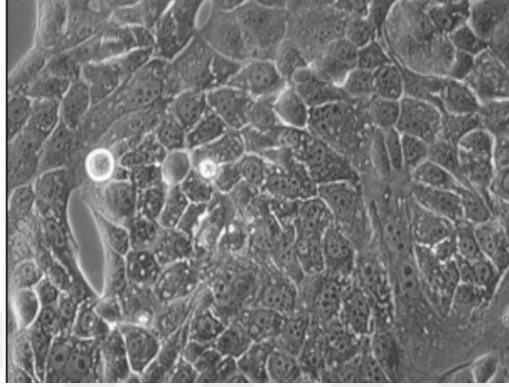


Şekil 15. HepG2 hücre hattı (URL-3)

1.9.2. SNU-398 Hücrelerinin Özellikleri

SNU-398 (insan primer hepatoselüler karsinoma) hücre hattı, 42 yaşında iyi derecede farklılaşma gösteren hücelere sahip olan Asyalı bir erkeğin hepatoselüler karsinoma dokusundan üretilmiştir. Bu hücreler epitel hücrelerdir (Şekil 16).

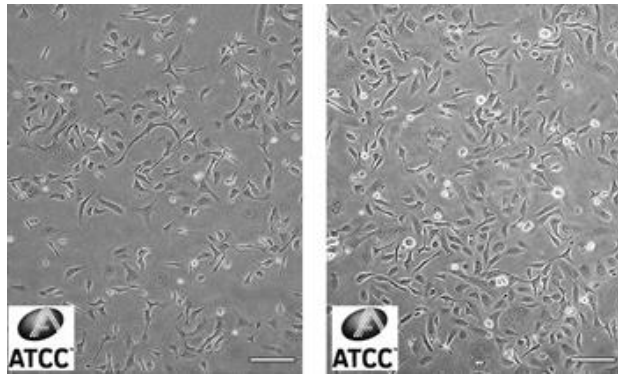
Günümüzde bu hücre dizileri, hepatoselüler karsinomadaki hepatit B virüsü ekspresyonunu, insülin benzeri büyüme faktörü ekspresyonunu (Kim vd., 1996), genlerin metilasyon durumunu (Cho vd., 2003; Suh vd., 2000) araştırmak için yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca bu hücre hattı bitki ekstraktlarının sitotoksitesinin araştırılması için de sıklıkla kullanılmaktadır (Abdelwahab vd., 2015; Shaheen vd., 2011). Şekil 16’da SNU-398 hücre hattının Őekli verilmiştir (Ku ve Park, 2005).



Şekil 16. SNU-398 hücre hattı

1.9.3.SK-OV-3 Hücrelerinin Özellikleri

SK-OV-3 yumurtalık kanseri hücre hattı 64 yaşındaki Kafkas asıllı bir kadının yumurtalık hücresinden üretilmiştir. SK-OV-3 hücreleri epitel hücrelerdir (Şekil 17). Bu hücre hattı bitki ekstraktlarındaki sitotoksitesinin araştırılmasında sıklıkla kullanılmaktadır (Ohyama vd., 2003; Reddy vd., 2013).



Şekil 17. SK-OV-3 hücre hattı (URL-4)

1.9.4. Sağlıklı İnsan Fibroblast Deri Hücresi (hDFs)

Yetişkin bir insana ait primer sağlıklı deri hücresidir. Hücreler ince uzun şekilli ve kırılğan yapıdadır. Bu hücre, birçok çalışmada bitki ekstraktlarının antikanser özelliklerini belirleyebilmek için kullanılmıştır (Kim vd., 2006; Moradi vd., 2016). Çalışmada elde edilen ekstrakt ve izole edilen fraksiyonların sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksitesini belirleyebilmek için sağlıklı hücre hattı olan hDFs kullanıldı.

1.10. Hücre Canlılığı ve Sitotoksisite

Sitotoksisite moleküler olaylar sonucu protein, lipit gibi çeşitli makro molekülerin sentezlenmesinin engellenmesi ve buna bağlı olarak hücrenin fonksiyonlarında ve yapısında belirgin hasarlar meydana gelmesi olarak tanımlanır (Tuncer ve Demirci, 2011). *In vitro* hücre kültürü sistemlerine uygulanan bir maddenin sitotoksitesini, hücre tutunmaya engel olması, hücre morfolojisini belirgin derecede bozması, hücre büyüme hızını azaltması ya da hücre ölümüne neden olması ile değerlendirilir (Butler, 2004). Bu değerlendirmenin yapılabilmesi için çeşitli testler geliştirilmiştir. Bunlar canlılık, yaşam, hücre proliferasyonu ve metabolik sitotoksisite değerlendirme testleridir. Bu testlerin arasında canlılık değerlendirme testleri, toksik etki sonucu kültürde canlı kalan hücre oranının belirlenmesinde kullanılır. Nötral kırmızı, tripan mavisi gibi boyalar hücre canlılığının değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Metabolik sitotoksisite değerlendirme testleri ise kısa dönem toksiteden ziyade uzun dönemde oluşacak zararı anlamak için hücrelerin metabolik veya proliferatif kapasitelerini ölçmek için kullanılır. Bu amaçla MTT testi, MTS testi, Alamar mavisi testleri kullanılmaktadır (Tuncer ve Demirci, 2011). Tez kapsamında MTT, MTS ve Tripan mavisi testleri kullanıldığı için sadece bu testler detaylandırılacaktır.

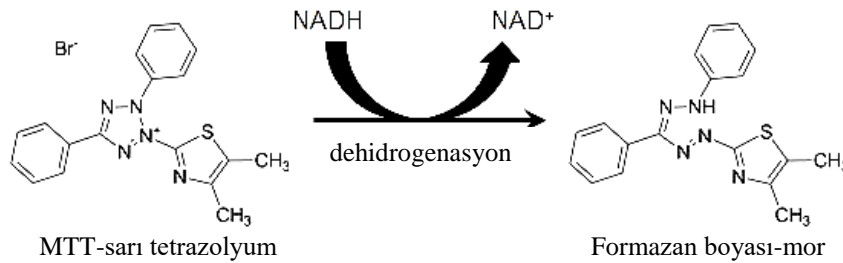
1.10.1. Tripan Mavisi Testi

Hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla uygulanan bu testle kullanılan tripan mavisi negatif yüklü bir boyadır. Eğer hücre canlı ve hücrenin membranı zarar görmemiş ise, boya hücre içine giremezken, membran bütünlüğü bozulmuş cansız

hücreler boyayı absorbe ederek mikroskop altında mavi renkli görünürler (Tuncer ve Demirci, 2011).

1.10.2. MTT Testi

Yöntemin temel prensibi, metabolik olarak aktif hücrelerin dehidrogenaz enzimleri ile MTT'yi (3-(4,5-dimetil-2-tiyazolil)-2,5-difenil-2*H*-tetrazolyum bromür), çözünmeyen mor formazan bileşiğine indirgemesine dayanır (Şekil 18). Eğer uygulanan ekstrakt sitotoksik etki oluşturarak o hücrede dehidrogenaz aktivitesini etkilerse mor renkli formazan oluşmamaktadır. Formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir (Tuncer ve Demirci, 2011). DMSO ve izopropanol gibi organik çözücülerde kolayca çözünen formazan kristalleri, derişime bağımlı olarak spektrofotometrik yöntemle 570 nm'de ölçülebilen bir absorbans verir. Absorbans değerlendirilerek, dolaylı yoldan hücrelerin metabolik aktivitesi ölçülür (de Souza Costa vd., 2007). Ölçülen değer yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilir (Butler, 2003).

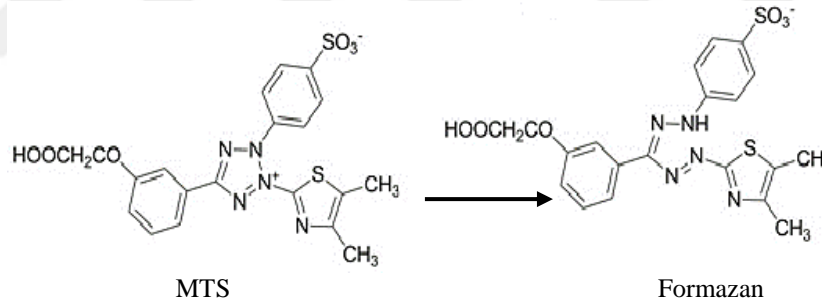


Şekil 18. MTT'nin indirgenme reaksiyonu

Kolorimetrik ve kantitatif olarak bitki ekstraktlarının sitotoksosite değerlendirmesinde MTT sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, uygulamasının hızlı ve kolay, doğruluğu ise yüksek olması ve çok sayıda örneği çalışmaya imkan vermesi nedeniyle tercih edilmektedir. Oluşan formazan kristallerini çözmek için bir çözücüye ihtiyaç duyulması ve yapılan pipetleme esnasında oluşan formazan kristallerinin zarar görmesi ya da deneyin ilerleyen aşamalarda örneklerin tekrardan okunabilmesine imkan vermemesi bu testin hassasiyetini düşürmektedir (Martin ve Clynes, 1993).

1.10.3. MTS Testi

MTT yöntemine benzeyen bu yöntemde, 3-(4,5-dimetil-2-tiyazolil)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS) kullanılmaktadır. Bu testte de dehidrogenaz enzimlerinin oluşturduğu formazan kristalleri, canlı hücre sayısıyla ilişkilendirilir ve derişime bağımlı olarak spektrofotometrik yöntemle 490-500 nm’de ölçülebilen bir absorbans verir. Absorbans değerlendirilerek, dolaylı yoldan hücrelerin metabolik aktiviteleri ölçülür. Fakat bu testte, kullanılan MTS ve indirgeme ile oluşan formazanın asetil ve sülfofenil gibi fonksiyonel gruplara sahip olmasından dolayı suda ve dolayısıyla hücre besisi ortamında çözünürlüğünün yüksek olması ek bir çözündürme işlemine gerek duyulmamasını ve deney esnasında gerekli zamanlarda absorbansın kaydedilmesinin mümkün olmasını sağlar. Bu sayede canlılığın değerlendirilmesi hakkında daha detaylı ve hücre sayısı hakkında MTT testine nazaran daha hassas bilgi sunar (Barltrop vd., 1991). Şekil 19’da MTS’nin indirgenme reaksiyonu verilmiştir.



Şekil 19. MTS'nin indirgenme reaksiyonu

1.11. *Cuscuta campestris* Yuncker

1.11.1. Taksonomik Sınıflandırma

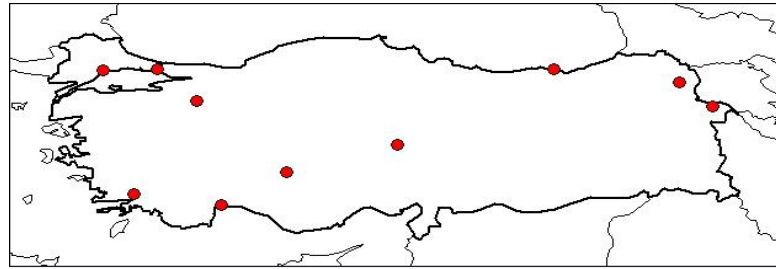
Cuscuta, Cuscutaceae familyasında yer alan tek yıllık veya çok yıllık otsu, tam parazit bir bitkidir (Yuncker, 1932). Yuncker’ a (1932) göre, Dünyada 200’ den fazla türü ve 70’in üstünde varyetesi, ülkemizde ise 16 türü tespit edilen bitki, en yaygın ve baş etmesi en zor olan asalak bir cinstir (Costea vd., 2010; Seçmen vd., 1995; Stefanovic vd., 2007). *Cuscuta campestris* Y. (*C. campestris*)’in anavatanı Amerika Birleşik Devletleri olup buradan diğer ülkelere yayılmıştır. Avrupa’ da ise ilk kez 1870

yılında saptanmıştır. Ülkemize ise yonca ithalatıyla birlikte tohumlarının geldiği düşünülmektedir (Costea vd., 2010). Şekil 20'de *C. campestris* bitkisinin fotoğrafı verilmiştir.



Şekil 20. *C. campestris* bitkisi

100-1500 m rakımda birçok kültür bitkisi ve yabani otlar üzerinde, ayrıca sulanan tarla ve bahçe bitkileri üzerinde yaşar (Davis vd., 1965). En fazla zararı yonca, domates, patates, havuç, soğan ve bibere verdiği belirtilmektedir (Costea vd., 2010; Kroschel, 2008). Bitkinin ülkemizdeki yayılışı Şekil 21’de verilmiştir.



Şekil 21. *C. campestris* bitkisinin ülkemizdeki yayılışı (URL-5)

(●:İstanbul, Kars, Antalya, , Kayseri, Konya, Muğla, Tekirdağ, Trabzon)

1.11.2. *Cuscuta campestris* Bitkisinin Morfolojisi

Türkçe’ de küsküt, ikşut, cinsaçı ya da bağboğan gibi isimlerle tanınır. *C. campestris* bitkisi pulsu yapraklı ve ipliksi sarı-turuncu renkli bir gövdeye sahiptir. Kökleri olmayan bitkinin emeçleri gelişmiştir ve kendisiyle konukçu bitki arasında bu emeçlerini kullanarak köprü kurar. Emeçlerini yeşil bitkilerin iletim demetlerine göndererek beslenen klorofilsiz tırmanıcı bitkidir. Çiçekler 2-3 mm boyunda, kısa bir

sap ile kompakt çiçek topluluklarında toplanmış olarak bulunur. Çiçekler beyaz, krem renge sahiptir.

C. campestris bitkisinin yaşam döngüsü üç evreden oluşmaktadır. Bu evreler tohum çimlenme evresi, konukçuya tutunmadan önceki evre ve konukçu üzerindeki parazitik evre'dir. Tohumların çimlenebilmesi için toprakta gerekli nemin olması gerekmektedir. Konukçu olmadan gerekli sıcaklık ve nemi alabilen tohumlar çimlenir. Çimlenme sırasında embriyo, endospermlerden beslenir. Endospermdeki besin maddeleri tükenince kök ölür ve belli bir uzunluğa ulaşan ipliksi gövde konukçu arayışına girer. Tohum çimlenmesinden konukçuya tutunma gereksinimi olan sürenin 3-5 hafta olduğu bilinmektedir. (Lanini ve Kogan, 2005). Tutunan gövdenin konukçuya bakan yüzeyinden parazit, konukçusuna su ve vitaminleri absorbe eden emeçlerini geçirerek konukçusunun floem ve ksilemi ile bağlantı kurar. Böylece konukçusundan yaşamı için gerekli su, mineral, organik ve inorganik maddeleri alır. Gövdesi konukçu bulup tutunamazsa toprağın üzerinde 1-5 hafta canlı fakat uykuda kalır, sonra ölür (Kadıoğlu, 1992).

Yüksek oranda besin ve su depo eden bu parazit bitkiler son dönemlerinde konukçularına fazla bağımlı olmadan da yaşamlarını sürdürebilirler. Bir yıldan diğer yıla oluşturdukları tohumlarla veya çok yıllık konukçu bitkilerin gövdelerinde gömülü kalan vejetatif parçaları ile geçerler (Bown ve America, 1995; Lanini ve Kogan, 2005). Tohumlar ise genellikle yaz sonu ve sonbaharda oluşur. Gelişme döneminde çok sayıda çiçek oluşturan bitki gelişme dönemi sonunda bol miktarda küçük yeşil renkli tohum üretir. Bitkinin tohumları toprakta çevre koşullarına bağlı olarak 10-30 yıl canlılıklarını sürdürebilirler (Lanini ve Kogan, 2005).

1.11.3. Cuscuta Türlerinin Geleneksel Kullanımı

Çin tarihinde ilk defa 2000 sene önce ilk kez Shen Nong Ben Cao Jing belgelerinde adı geçen *Cuscuta* bitkisi aynı raporda karaciğer ve böbrek fonksiyonlarını güçlendirmede en üst sınıf bitki olarak tanımlanmıştır. Batıda bütün kısımları, Çin'de ise tohumlarının halk ilacı olarak kullanıldığı çeşitli *Cuscuta* türleri farklı bölgelerde farklı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır.

Çin'in ünlü malzeme kitaplarından olan Ben Cao Gang Mu' da *C. chinensis*'in görme fonksiyonlarını geliştirdiği ve karaciğeri beslediği, kardiyovasküler hastalıkları, ishali ve düşüğü önlemede kullanıldığı belirtilmiştir. Yine aynı kitapta kasları düzenlediği, kemik ve tendon aktivitesini artırdığı da yer almaktadır (Donnapée vd., 2014; Şekeroğlu vd., 2012). Bunların yanı sıra özellikle kemoterapi ve radyoterapi tedavisinde destek amaçlı kullanılmakta ve ticari olarak preparatları da satılmaktadır. Pakistan'da bitkinin ezilerek elde edilen hamuru kronik ülser ve acı verici iltihaplı yaralar üzerine tampon olarak uygulanmaktadır (Qureshi vd., 2010). Aynı bitki Mısır'da göz enfeksiyonlarında, sarılık tedavisinde, saç dökülmesi ve kepeklenmesinin önlenmesinde, Vietnam'da ise bitkinin bütünü kabızlık tedavisinde kullanılmaktadır (Donnapée vd., 2014). Tayland'da kaynamış suyla hazırlanan bütün bitki örneği solucan düşürmede ve yine sarılık tedavisinde kullanılmaktadır (Cruz-Garcia ve Price, 2011). Türkiye'de ise sadece Mardin yöresinde kullanılan *C. arvensis* bitkisinin sulu ekstraktları karaciğer problemleri tedavisinde ve diz ağrılarında, hazırlanan bitkisel çayı özellikle sarılık ve yeni doğan sarılık tedavisinde kullanılmaktadır (Şekeroğlu vd., 2012).

1.11.4. Cuscuta Türleri ile Yapılan Farmakolojik Çalışmalar

Çeşitli *Cuscuta* türlerinin halk tarafından uzun yıllardır ilaç olarak kullanılması birçok farmakolojik çalışmaya ilham kaynağı olmuştur. Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar çeşitli *Cuscuta* türlerinin farklı farmakolojik özelliklerini ortaya koymuştur. Bu çalışmalardan çıkan sonuçlara göre *Cuscuta* türleri çeşitli hastalıkların tedavisinde geniş biyolojik aralıkta aktivite göstermiştir.

1.11.4.1. Deri Koruma Etkisi

Nisa ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *C. chinensis*' in sulu ekstraktının deri siğilleri ve deri kanseri üzerine etkisini araştırmışlardır. Ekstrakt, 1g/kg vücut ağırlığı olarak ağız yoluyla haftada üç kez 22 fareye uygulanmıştır. 190. günde farelerin başındaki siğillerde azalma ve hacminde küçülme ve siğillere bağlı olarak gelişen kanser oranında azaltma gözlemlenmiştir (Nisa vd., 1986).

1.11.4.2. Karaciğer Koruyucu Etkisi

Yen ve arkadaşları yaptıkları çalışmada *C. chinensis*' in sulu ve etanol ekstraktlarının ağrı kesici bir ilaç olan asetaminofenin neden olduğu hepatotoksisiteye karşı etkisini araştırmışlardır. Yüksek dozlarda alınan asetaminofen, karaciğer antioksidan enzimlerinin (glutasyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz) azalmasına yol açarak karaciğerde önemli derecede hepatotoksisiteye neden olmaktadır. Oral dozda 125 ve 250 mg/kg vücut ağırlığında denk gelen miktarda sulu ve etanol ekstraktları, karaciğerleri asetaminofen ile önemli ölçüde zarar görmüş olan farelere verilmiştir. *C. chinensis* 'in etanol ekstraktı bu karaciğer antioksidan enzimlerini yükselterek karaciğer üzerindeki hepatotoksisiteyi azaltmıştır. Sulu ekstrakt ise hiçbir etki göstermemiştir. Aynı grup tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise bitkinin flavonoidler ve lignanlar gibi esas bileşenlerinin suda çözünürlüğünün düşük olmasından dolayı, oral uygulamayla bu bileşenlerin sınırlı emilimlerini artırmak için aynı bitkinin tohumları parçalanarak etanol ekstraktının nanopartikülü hazırlanmıştır. Antioksidan ve asetaminofen ile zarar görmüş karaciğer hasarını önlemedeki etkisi etanol ekstraktıyla karşılaştırılmıştır. Hazırlanan nanopartikülün 25 ve 50 mg/kg 'da oral bir dozu aspartat aminotransferaz, alanin aminotransferaz ve alkalın fosfataz seviyelerini azaltarak aynı oranda önemli bir hepatoprotektif etki göstermiştir. Bu biyokimyasal değerlendirmeler fare karaciğer biyopsisi muayeneleri ile de desteklenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda hazırlanan nanopartikülün etanol ekstraktından beş kat daha düşük oral dozda bile daha etkili olduğunu göstermiştir (Yen vd., 2007; Yen vd., 2008a).

1.11.4.3. Kemik Erimesine Karşı Koruyucu Etkisi

Çeşitli *Cuscuta* türleri Çin'de ve bazı Asya ülkelerinde kemik erimesini tedavi etmek için kullanılmaktadır (Yao vd., 2005). Yang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *C. chinensis* bitkisinin tohumlarının sulu ekstraktı hazırlanarak bu ekstraktın kemik erimesi üzerindeki etkisi MG-63 hücre hattı kullanılarak araştırılmıştır. Elde edilen sonuca göre sulu ekstraktın 0,5-1 mg/L derişimde MG-63 hücre hattında alkalın fosfataz (ALP) aktivitesini, kollajen sentezini ve mineralizasyonu önemli ölçüde artırarak kemik yapımını artırdığı belirlenmiştir (Yang vd., 2009). Başka bir çalışmada

ise, *C. chinensis* bitkisinin tohumlarından elde edilen etanol ekstraktındaki kemik erimesine karşı etkili olan bileşenleri belirlemeye çalışmışlardır. Çalışmada kuersetin, kamferol, izoramnetin, astragalın ve hiperosit olmak üzere beş flavonoid izole etmişlerdir. İzole ettikleri bu flavonoidlerden kamferol ve hiperosit ALP aktivitesini ve kollajen sentezini önemli ölçüde artırarak kemik yapımını artırmış ve bu iki fenolik bileşik kemik erimesini önlemede aktif bileşen olarak bulunmuştur. *in vitro* ortamda bitkinin kemik erimesine karşı etki göstermesinde fitoöstrojen gibi davranarak kemik oluşumunu teşvik ettiği, kemik kütlesini geliştirdiği ve kemik metabolizmasını dengelediği sonucuna varılmıştır (Yang vd., 2011).

1.11.4.4. Diğer Etkiler

Farklı *Cuscuta* türleriyle yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda bu bitkilerin çeşitli farmakolojik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda *C. chinensis* ve *C. arvensis*'in antioksidan etkileri tespit edilmiştir (Bao vd., 2002; Gao vd., 2013). *C. chinensis* glikozitlerinin yaşlanma karşıtı etki gösterdiği (Cai vd., 2005), PC12 hücre farklılaşmasını uyararak hafızayı güçlendirdiği (Jian vd., 2003) gösterilmiştir. Ayrıca çeşitli *Cuscuta* türleriyle yapılan çalışmada *Cuscuta* polisakkaritlerinin Tip 2 şeker hastalarında kan şekerini düşürdüğü kanıtlanmıştır (Li vd., 2008). Yapılan diğer bir çalışmada *C. reflexa*'nın gövdesinin metanol ekstraktının antibakteriyel etki gösterdiği rapor edilmiştir (Pal vd., 2006). Başka bir çalışmada ise *C. japonica*'nın tohumlarının metanol ekstraktı ve bu ekstraktın hegzan, etil asetat ve bütanol fraksiyonlarının antihipertansif etkilerini araştırılmıştır (Oh vd., 2002). Çalışmada etil asetat fraksiyonu anjioteksin konverting enzim 1'i 400 µg/mL derişimde önemli ölçüde inhibe ederken (% 89), hegzan ve bütanol ekstraktları ise herhangi bir inhibisyon göstermemiştir (< % 30). Yılmaz vd. (2016)'ın yaptığı çalışmada ise *C. approximata*'nın dallarından hazırlanan metanol ekstraktı güçlü antifungal etki göstermiştir. *C. arvensis*'den elde edilen hegzan, kloroform, etilasetat metanol ve su ekstraktlarının fareler üzerinde denenmesiyle etanollü ve sulu ekstraktların ağrı kesici ve iltihap önleyici etkileri tespit edilmiştir (Koca vd., 2011; Şekeroğlu vd., 2012).

1.11.5. Fitokimyasal Karakterizasyon

Cuscuta türleri üzerinde Türkiye’de yapılmış fitokimyasal araştırmaya rastlanmamakla birlikte, Koca vd., (2011)’nin yaptıkları çalışmada *C. arvense*’den elde edilen hekzan, kloroform, etilasetat metanol ve su ekstraktlarının fareler üzerinde denenmesiyle etanollü ve sulu ekstraktların ağrı kesici ve iltihap önleyici etkileri tespit edilmiştir. Yılmaz vd. (2016)’ın yaptığı çalışmada ise *C. approximata*’nın dallarından hazırlanan metanol ekstraktı fungal bitki patojenlerinden olan *alternaria alternata*, *fusarium oksisporum* ve *rhizoktonia solani*’ye karşı kullanılmış ve güçlü antifungal etki gösterdiği ortaya konulmuştur. Literatürde ise *Cuscuta* türlerinden *campestris* üzerinde fitokimyasal çalışmaya rastlanmamakla birlikte özellikle *chinensis* türüyle ilgili yapılan çalışmalar öne çıkmaktadır.

Yapılan çeşitli çalışmalarda *Cuscuta* cinsi bitkilerin türleri farklı olsa da hepsinin flavonoidlerce zengin olduğu yapılan onlarca çalışmayla ortaya konulmuştur. *C. chinensis* ile ilgili yapılan bir çalışmada bitkinin toplam kimyasal yapısının % 3’ünün flavonoidlerden oluştuğu gösterilmiştir (Donnapee vd., 2014). Bitki özellikle flavonoidlerden kuersetin, kamferol, izoramnetin, astragalin, hiperosit ve lignanlar bakımından zengindir (Cornwell vd., 2004; Williamson vd., 2005). Farklı *cuscuta* türleriyle yapılan bir çalışmada bütün *cuscuta* türlerinde aynı çözünen fenolik bileşenlere rastlanmıştır. Bu fenolik bileşenler klorojenik asit, 3,5-dikafeoil kuinik asit, 4,5-dikafeoil kuinik asit, hiperosit, kuersetin astragalin, kamferol-3-*O*-galaktosit, kuersetin-3-*O*-galaktosit (Loffler vd., 1997). Yapılan diğer bir çalışmada ise *C. Chinensis*’in suda çözünen bileşenleri triptofan türevli alkaloidler (*cuscutamine*), iki yeni lignan (*Cuscutoside A* ve *B*) ve 3 bilinen lignan (*pinoresinol-4-O-glikozit*, *pinoresinol*, *epipinoresinol*), bunlarla birlikte dört flavonoid (*astragalin*, *hiperosid*, *kuersetin* ve *kuersetin-3-O-apiosil(1-2)-galaktozit*, *p-kumarik asit*, *kafeik asit*, *klorojenik asit* ve *arbutin* olarak bulunmuştur (Yahara vd., 1994). *C. chinensis* bitkisinden petrol eteri ve kloroform kullanılarak beş yeni fenolik bileşiğin izole edildiği çalışmada ise izole edilen bu bileşenlerin yapıları spektroskopik yöntemler kullanılarak β -sitosterol, *d*-sesamin, 9(R)-hidroksi-*d*-sesamin, *d*-pinoresinol ve daukosterol olarak karakterize edilmiştir (Ye vd., 2001). Ayrıca 2010 yılında He ve arkadaşları tarafından

yapılan çalışmada iki yeni lignan glikozit olan Cuscutoside C ve Cuscutoside D izole edilmiştir (He vd., 2010).

Yapılan çalışmalarda *Cuscuta* türlerinin en az 18 flavonoid, 13 fenolik asit, 2 steroid, 1 hidrokinon, 22 lignan, 2 reçine glikoziti içerdiği kanıtlanmıştır. Bitkinin içeriğinin bu kadar zengin olması geleneksel tıpta da kullanımını artırmıştır. Bitkinin ana bileşenleri hiperosit, kuersetin, rutin ve izoramnetin gibi flavonoidlerdir. Bitkinin içerdiği flavonoid miktarının ise bitkinin kalitesini belirlemek için kullanıldığı literatürde rapor edilmiştir (Shekarchi vd., 2014). Loffler vd., (1997)'in yaptıkları çalışmada farklı bölgelerden ve farklı konukçular üzerinden topladıkları *Cuscuta*'nın 9 farklı türünü çalışmışlardır. Bu türler *C. reflexa*, *C. platyloba*, *C. campestris*, *C. odorata*, *C. chinensis*, *C. pedicellata*, *C. europaea*, *C. gronovii* ve *C. lupuliformis*'tir. Yapılan çalışmada 9 *Cuscuta* türü üç gruba ayrılmıştır. *C. platyloba*, *C. campestris*, *C. chinensis* flavonoid miktarı hidroksisamik asit miktarından büyük olanlar, *C. pedicellata*, *C. lupuliformis*, *C. reflexa* hidroksisamik asit miktarı flavonoid miktarından büyük olanlar ve *C. odorata*, *C. europaea*, *C. gronovii* hidroksisamik asit miktarı flavonoid miktarına eşit olanlardır. Çalışma sonucunda *Cuscuta* türlerinde konukçu bitki ve toplandığı bölgeye bakmaksızın farklı miktarlarda benzer fenolik bileşiklerin bulunduğu saptanmıştır (Loffler vd.,1997).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. *C. campestris* Bitki Örneğinin Toplanması

Çalışmada Cuscutaea familyasında yer alan bir cins olan *C. campestris* türü Kayseri Talas'tan (1350 m) toplandı. Kuru olarak analiz edilecek olan bitki örneği bütün halinde açık havada direkt güneş almayacak bir ortamda kurutularak poşetlendi ve analiz edilene kadar buzdolabında +4 °C de saklandı. Bitkinin adlandırılması RTEÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Serdar MAKBUL tarafından yapıldı. Örnek, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi herbaryumunda saklandı (RUB).

2.2. Kimyasal Malzeme ve Materyaller

2.2.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan tüm cihazlar, üretici firmalar ve modelleriyle birlikte markaları Tablo 1'de verildi.

Tablo 1. Çalışmalarda kullanılan cihazlar ve modelleri

Cihaz Adı	Firma	Model
Çalkalayıcı	Heidolph	Unimax 1010
Dondurucu	Uğur	UDF7 SL
Evaporatör	Heidolph	Hei-VAP Value Digital G3
FT-IR	Perkin Elmer	Spectrum 100
HPLC-DAD	Thermo	Dionex Ultimate 3000
Preparatif HPLC-DAD	Thermo	Dionex Ultimate 3000
Konsantratör	Genevac	EZ-2 Elite
LC-MS/MS	Thermo	TSQ Quantum Access Max
Parçalayıcı	Waring	Commercial blender 7011S
Saf Su Cihazı	Sartorius Stedim Biotech	Arium 61316 ProUV
Santrifüj	Hettich	Universal 320 R
Spektrofotometre	Thermo	Multiskan Go
Terazi	Precisa	XB 220 A
Vorteks	Velp Scientifica	Vortex Mixer
Yarı otomatik pipetler	Ergoone	S7110, Germany

2.2.2. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar üretici firma ve saflık dereceleriyle beraber Tablo 2’de verildi.

Tablo 2. Çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler, temin edildikleri firmalar ve saflık dereceleri

Kimyasalın Adı	Üretici Firma	% Saflık
Al(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	Sigma-Aldrich	≥% 98
Asetonitril	Sigma-Aldrich	≥% 99,9
Asetik asit	Sigma-Aldrich	≥% 99,5
Bütanol	Sigma-Aldrich	≥% 99,5
CH ₃ COOK	Sigma-Aldrich	≥% 99,0
Dietil eter	Merck	≥% 99,7
DMSO	Sigma-Aldrich	≥% 99,9
DPPH	Alfa Aesar	≥% 95
Etanol	Merck	% 99,8
Etil asetat	Merck	≥ % 99,5
Filtre kağıdı	Macherey Nagel	110mm
Folin-ciocalteu	Merck	2N
HPLC filtre	Sartorius	RC 0,20 µm
Kloroform	Sigma-Aldrich	% 99,4
Metanol	J.T.Baker	≥% 99,8
Na ₂ CO ₃	Sigma-Aldrich	≥% 99,9
Tripsin/EDTA	Biochrom	≥% 99,9
Trypan mavisi	Sigma-Aldrich	-
SK-OV-3	ATCC	-
SNU-398	ATCC	-
hDFs	ATCC	-
HepG2	ATCC	-
Sisplatin	Koçak Farma, Turkey	≥% 99,9
DMEM	Biological Industries	-
FBS	Biochrom	≥% 99,9
L-glutamin	Life Technologies	≥% 99,5
MTT	Sigma-Aldrich	≥% 97,5
MTS	Sigma-Aldrich	≥% 97,5
PBS	Sigma-Aldrich	-
RPMI-1640	Sigma-Aldrich	-

2.3. *C. campestris* Bitkisinden Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu

Bütün olarak çalışılan bitki örneği rutubetsiz ortamda gölgede kurutulduktan sonra parçalayıcı ile toz haline getirildi ve ekstraksiyon işlemi sırasında aşağıdaki yol takip edildi.

1. Beş ayrı balona 10'ar gram örnek alındı, üzerlerine 100 mL kloroform eklendi ve çalkalayıcıda 30°C'de 30 dakika ekstrakte edildi. 30 dakika sonunda kloroform ortamdan süzülerek uzaklaştırıldı ve 100'er mL dietil eter, etil asetat, metanol, bütanol ve su olmak üzere beş farklı çözücü kullanılarak beş ayrı ekstraksiyon 40°C'de çalkalayıcıda 2 saat süreyle gerçekleştirildi.

2. 2 saat sonunda örnekler ayrı ayrı balonlara süzüldü, ekstraktların kalan kuru kalıntısı 2 kez 50 mL çözücü ile her defasında karıştırıcıda 40°C'de bir saat bekletmek koşuluyla yıkandı ve tüm ekstraktların çözeltileri kendi balonunda birleştirildi.

3. Elde edilen 5 ayrı ekstraktın çözücüsü evaporatörde kuruluğa kadar uçuruldu. Bütün ekstraksiyon işlemleri üç tekrarlı olarak yapıldı. Evapore edilerek kurutulmuş ekstraktların % verimi (kuru ağırlık bazında) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı ve ekstraktların verimleri Tablo 3'te verildi.

$$\% \text{ verim} = (W1 * 100) / W2$$

W1; çözücüsü uçurulmuş ekstraktın ağırlığını, W2; bitkinin ekstraksiyon öncesi kuru ağırlığını göstermektedir.

4. Kuru ekstraktlar 10 mL metanol: su (56:44) karışımı ile çözüldü ve 15000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Berrak çözeltiler alınarak 0,20 µm'lik filtreden süzüldü ve HPLC-DAD ile analiz edildi. Analizlerde ekstraktların derişimlerinin içeriklerindeki fenolik bileşiklerin analiz edilmesi için kullanılan doğrusal aralığın tespit edilen çoğu fenolik bileşik için çok üstünde olduğu gözlemlendi. Bu durumda ekstraktların fenolik içeriklerini doğrusal aralıkta analiz edebilmek için dietil eter ekstraktı 1/12; etil

asetat ekstraktı 1/6; metanol ekstraktı 1/45; bütanol ekstraktı 1/6 ve su ekstraktı 1/10 kat seyreltildi.

Bitkiden elde edilen ekstraktların kodlanmasında *C. campestris* bitkisini belirtmek amacıyla C harfi ile başlandı. Ekstraksiyonda kullanılan çözücüye göre dietil eter ile ekstrakte edilen E, etil asetat ile ekstrakte edilen EA, metanol ile ekstrakte edilen M, bütanol ile ekstrakte edilen B ve su ile ekstrakte edilen ise S harfleriyle kodlandı. Örneğin CB kodlu örnekte ilk harf bitkinin adını, ikinci harf ise ekstraksiyonda bütanol kullanıldığını gösterir.

Tablo 3. *C. campestris* bitkisinin farklı ekstraktlarına ait % verim hesabı

Ekstraktlar					
% Verim	CE	CEA	CM	CB	CS
	2,91±1,07	1,93±0,15	18,70±0,98	8,33±3,90	30,00±3,25

2.4. Ekstraksiyon Geri Kazanımlarının Belirlenmesi

Ekstraksiyon geri kazanımını belirleyebilmek amacıyla fenolik asitler için sirincik asit, sinamik asitler için *o*-kumarik asit ve flavonoidler için apigenin temsili standart fenolik bileşik olarak kullanıldı. Bu standart fenolik bileşikleri seçerken hiçbir ekstraktımızın bu standartları içermediğinden yapılan HPLC-DAD analizleri sonucu emin olundu. Geri kazanımı belirlerken bu üç standardın herbiri yönünde 1000 mg/L olan bir stok karışım hazırlandı. Üç standardın son hacimdeki derişimleri 40 mg/L olacak şekilde, toz halindeki bitki örneğine pipet ile eklendi ve Bölüm 2.3'te anlatılan aynı ekstraksiyon prosedürü uygulandı.

40 mg/L derişimdeki temsili fenolik bileşik karışımı kurutulmuş ve toz haline getirilmiş bitki örneğine eklenerek Bölüm 2.3' te anlatılan aynı ekstraksiyon prosedürü uygulandı. Temsili üç standardın bütün ekstraktlardaki % geri kazanımı (% GK) aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\% \text{ GK} = \frac{\text{Deneysel derişim (mg.L-1)}}{\text{Başlangıç derişimi (40 mg.L-1)}} * (\%)100$$

Deneysel derişim HPLC-DAD analizi sonucunda hesaplanan derişimdir.

2.5. Standartlar ve Stok Çözeltileri

Çalışmada 20 adet fenolik bileşik standardı kullanıldı. Bu standartlar: Gallik asit, protokatekuik asit, klorojenik asit, *p*-hidroksi benzoik asit (*p*-OH benzoik asit), vanilik asit, kafeik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, rutin, *o*-kumarik asit, sirincik asit, mirisetin, fisetin, kuersetin, apigenin, kamferol, izoramnetin, paenol ve timoldür. Stok çözeltilerden gallik asit, protokatekuik asit, *p*-OH benzoik asit, timol, rutin, ferulik asit, vanilik asit, kafeik asit, klorojenik asit, *p*-kumarik asit, ellacik asit, *o*-kumarik asit, sirincik asit, timol %50 metanolde 1 mg/mL derişimde, kuersetin, apigenin, kamferol % 100 metanolde 1 mg/mL derişimde, izoramnetin % 100 metanolde 0,25 mg/mL derişimde, mirisetin ve fisetin % 100 metanolde 2 mg/mL derişimde paenol ise 1 mg/mL derişimde % 50 metanolde hazırlandı. Ellacik asit ise % 50 metanolde 1 mg/mL derişimde hazırlandıktan sonra üzerine 200 µL 0,1 M NaOH eklenerek standart çözüldü ve son derişimi 0,83 mg/mL olarak hazırlandı.

2.6. Fenolik Bileşiklerin HPLC-DAD Analiz Yöntemi

2.6.1. HPLC-DAD Analiz Koşulları

HPLC analizleri bir DAD dedektör ile donanımlı Thermo Dionex Ultimate 3000 seri analitik HPLC sistemde yapıldı. Sistem Chromeleon program ile kontrol edildi. Tüm analizler için Agilent PLRP-S C18 (150 mm × 4,6 mm i.d., 100 Å pd) kolonu kullanıldı. Ayrıca ön kolon olarak kolonla uyumlu iç çapı 3 mm Macherey Nagel marka kolon kullanıldı. Hareketli faz (A) % 2 asetik asitin sudaki çözeltisi ve (B) % 70 asetonitril-su çözeltileri kullanıldı. Elüsyonda takip eden gradiyent kullanıldı. Başlangıç koşullarına dönmeden önce 0-3 dk % 5,5 B; 3-10 dk % 5,5-23 B; 10-20 dk % 23-31B; 20-30 dk % 31-56B; 30-40 dk % 56-85 B; 40-45 dk % 85-5,5 B; 45-60. dakikalar arasında başlangıç koşullarına dönüldü.

Akış hızı 1 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 10 µL idi. Kolon sıcaklığı 30°C ve örnek saklama sıcaklığı 18°C idi. Dedektör 254, 280, 315 ve 370 nm’de kromatogram almak üzere 200-400 nm aralığında çalıştırıldı.

2.6.2. HPLC-DAD Analiz Yönteminin Validasyonu ve Kalibrasyonu

Validasyon, yapılan deneylerde kullanılan yöntemin geçerliliğini göstermek için gerçekleştirildi. Metot validasyonu seçiciliğin değerlendirilmesi, gün içi hassasiyet, tekrarlanabilirlik, doğruluk, LOD ve LOQ parametreleri kullanılarak ölçüldü (Mukherjee and Bera, 2012; Chang et al., 2012).

HPLC-DAD analizlerinin tekrarlanabilirliğini belirleyebilmek için iki yöntem kullanıldı. (1) 0,5 mg/L derişimindeki standart karışımın 7 kez enjeksiyonu sonucu elde edilen pik alanlarının ve alıkonma zamanlarının varyasyon katsayısı (CV) hesaplanmasıyla, (2) 0,5 mg/L derişimindeki standart karışımın sabah 8-10 arası, öğlen 11-13 arası ve akşam 16-18 saatleri arasında üçer kez enjeksiyonu yapıldı. Gün içindeki bu üç zaman diliminin birleşik standart sapması hesaplanarak gün içi tekrarlanabilirlik varyasyon katsayısı olarak ifade edildi.

Yöntemin kantitatif performansı ve doğrusallığı, her bir standart fenolik bileşiğin kalibrasyon eğrileri kullanılarak % 56 metanol içerisinde hazırlanan 40, 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0.5 ve 0.25 mg/L derişim düzeylerinde, 10 µL enjeksiyon hacmi ile dedektör tepkisini görmek için izlendi.

20 adet fenolik standardın 0,5 mg/L’ lik karışımı HPLC-DAD ile 7 kez art arda analiz edildi. LOD; analitin istatistiksel olarak en düşük tayin düzeyi, LOQ; analitin kesin ve doğru olarak ölçülebilen en düşük derişimdir. Lineer ölçüm aralığında oluşturulan kalibrasyon eğrisinin eğiminden ve 7 tekrarlı ölçümlerin standart sapmasından yararlanarak LOD ve LOQ hesaplandı.

$$\text{Tayin Limiti (LOD)} = 3 \left(\frac{SD}{m} \right)$$

$$\text{Ölçüm limiti (LOQ)} = 9 \left(\frac{SD}{m} \right)$$

SD: Kalibrasyon eğrisinin en düşük seviyesindeki standart sapma, m: Kalibrasyon eğrisinin eğimi

2.7. Bitkinin Etilasetat Ekstraktının Preparatif HPLC-DAD ile Fraksiyonlarına Ayrılması

2.7.1. Preparatif HPLC-DAD İçin Örnek Hazırlanması

Toz haline getirilmiş kuru *C. campestris* bitkisinden 250 gram tartıldı. 2500 mL kloroformla yarım saat oda koşullarında ekstrakte edildi. Yarım saat sonunda kloroform fazı süzülerek ortamdan uzaklaştırıldı. Kalan kalıntının üzerine 2,5 litre etil asetat eklenerek çalkalayıcıda 2 saat ekstrakte edildi. Elde edilen ekstrakt süzülerek ayrıldı ve kalan katı kısmın üzerine 1,25 L etil asetat eklenerek aynı işlemler yapıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Süzülen tüm etil asetat ekstraktı birleştirilerek evaporatörde çözücüsü uçuruldu. Ekstraksiyon sonunda 12,5 g katı etil asetat ekstraktı elde edildi.

2.7.2. Preparatif HPLC-DAD Koşulları

Preparatif HPLC analizleri bir DAD dedektör ile donanımlı Thermo Dionex Ultimate 3000 seri preparatif HPLC sistemde yapıldı. Sistem Chromeleon program ile kontrol edildi. Analizler için Thermo hypersil gold prep (250x10mmx5µm p.d) kolon kullanıldı. Analitik sistemle aynı mobil fazlar ve aynı gradiyent elüsyon programı uygulandı. Akış hızı 4,7 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 700 µL'ye yükseltildi. Kolon sıcaklığı 30°C'ye ayarlandı. Dedektör, fenolik asitlerden benzoik asitlerin maksimum absorpsiyon verdiği 254, 280 nm, sinamik asitlerin maksimum absorpsiyon verdiği 315 nm ve flavonoidlerin maksimum absorpsiyon verdiği dalga boyu olan 370 nm'de kromatogram alırken aynı zamanda 200-400 nm aralığını taradı.

Analitik sistemden modifiye edilen preparatif sistemde standartların ayrımını kontrol edebilmek için 40 mg/L derişimindeki standart karışım kullanıldı. Standartlar analitik sisteme benzer elüsyon sırası ve alıkonma zamanları verdi. Standartların uygun ayrımının elde edilmesinin ardından 0,2 gram etil asetat ekstraktı tartılarak 15 mL (%56) metanolde çözüldü. Örnek 15000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Üstteki berrak kısım alınarak 0,25 µm filtreden süzülerek preparatif HPLC-DAD cihazına enjekte edildi. Hazırlanan tüm etil asetat ekstraktı bitene kadar bu işleme devam edildi. Toplamda piklerin elüsyon sırasına göre 42 tane fraksiyon elde edildi. Elde edilen fraksiyonlar ayrı ayrı numune kaplarında toplandı. Fraksiyonların çözücülerini konsantratörde kuruluğa kadar uçuruldu. Miktar olarak en fazla biriken 31 ve 32 numaralı fraksiyonların (F31 ve F32) saflık kontrolünü yapmak için Bölüm 2.6.1'de optimize edilen analitik sistemde yürütüldü. Fraksiyonların analitik sistemde elde edilen kromatogramlarında birden fazla bileşenden oluştuğu ve UV spektrumlarının temiz olmadığı görüldü. Bu iki fraksiyon saflaştırma işlemine tabi tutuldu. Diğer fraksiyonlar ise miktar olarak çok az biriktiği için -18°C de saklandı ve bu fraksiyonlara bu tez kapsamında herhangi bir analiz ya da saflaştırma işlemi uygulanmadı.

2.7.3. Fraksiyonların Saflaştırılması

Her iki fraksiyonun saflaştırma işleminde önce Fortis marka C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm), sonra ACE marka C18 (150x4,6 mm, 5 µm) kolon kullanıldı. Fortis kolonla saflaştırma işlemi preparatif HPLC-DAD sisteminde, ACE kolonla saflaştırma işlemi ise analitik HPLC-DAD sistemde yapıldı. İki sistemde de analitik sistemde kullanılan aynı gradiyent çözeltileri ile farklı gradient programları kullanıldı, akış 1,1 mL/dk enjeksiyon hacmi 100 µL, kolon sıcaklığı 30°C'ye ayarlandı. Saflaştırılacak F31 ve F32 fraksiyonların alıkonma zamanları, flavonoidlerin alıkonma zamanına yakın olması ve flavonoidlerle benzer UV spektrumları vermesi ayrıca bazı flavonoidler gibi 370 nm'de en yüksek absorban vermeleri sebebiyle bu bileşiklerin flavonoid türevli bileşikler olabileceği düşünülerek dedektör 370 nm'de çalıştırıldı.

Saflaştırma işlemi sırasında F31 ve F32 fraksiyonlarından Fortis kolon için 5 mg tartılarak 3 mL % 56 metanolde çözüldü ve 15000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda elde edilen berrak çözelti alınarak kolona enjekte edildi.

Fortis kolon kullanılarak F31 fraksiyonunu saflaştırabilmek için takip eden gradiyent kullanıldı. 0-7 dk % 2 B; 7-10 dk % 2-34 B; 10-20 dk % 34-22 B; 20-30 dk % 22-60 B; 30-35 dk % 60-2 B; 35-45. dakikalar arasında başlangıç koşullarına dönüldü. Saflaştırma sonunda elde edilen fraksiyon F31-SF (31 numaralı fraksiyonun fortis kolonunda saflaştırılması) olarak kodlandı. Toplanan fraksiyonun çözücüsü kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Elde edilen fraksiyonun hem analitik HPLC-DAD analizleriyle hem de UV spektrumuna bakılarak saflık kontrolü yapıldı. F31-SF fraksiyonunun tam olarak saflaşmadığına karar verildi. F31-SF numaralı fraksiyon ACE kolon kullanılarak saflaştırma işlemine devam edildi. Elüsyonda takip eden gradiyent kullanıldı. Başlangıç koşullarına dönmeden önce 0-5 dk % 5 B; 5-15 dk % 5-30 B; 15-20 dk % 30-25 B; 20-30 dk % 25-60 B; 30-35 dk % 60-5 B; 35-45. dakikalar arasında başlangıç koşullarına dönüldü. Analiz sonunda saf olarak 3,92 mg toz halde, sarı renkte F31-SA (31 numaralı fraksiyonun ACE kolon kullanılarak saflaştırılması) fraksiyonu elde edildi.

Thermo hypersil gold prep kolondan elde edilen 32 numaralı fraksiyonun 5 mg'ı 3 mL %56 metanolde çözüldü ve santrifüj edilerek Fortis kolona enjekte edildi. Elüsyonda takip eden gradiyent kullanıldı. Başlangıç koşullarına dönmeden önce 0-3 dk % 10 B; 3-10 dk % 10-23 B; 10-20 dk % 23-40 B; 20-32 dk % 40-40 B; 32-35 dk % 40-10 B; 35-45. dakikalar arasında başlangıç koşullarına dönüldü. F32 numaralı fraksiyon bitene kadar bu işleme devam edildi. F32-1SF ve F32-2SF olmak üzere iki fraksiyon elde edildi. Bu fraksiyonlardan F32-1SF fraksiyonu (32 numaralı bileşenin, birinci fraksiyonun fortis kolon ile saflaştırılması) safsızlık içerirken, F32-2SF (32 numaralı bileşenin ikinci fraksiyonun fortis kolon ile saflaştırılması) fraksiyonu saf olarak elde edildi. Elde edilen fraksiyonların çözücüleri konsantratörde kuruluğa kadar uçuruldu. Saf olarak toz halde, sarı renkte 6,69 mg F32-2SF fraksiyonu elde edildi. HPLC-DAD analizinden ve UV spektrumundan saf olmadığına karar verilen F32-1SF fraksiyonu ACE kolon kullanılarak tekrar saflaştırma işlemine tabi tutuldu. F32-1SF fraksiyonundan 3 mg tartılarak çözme ve santrifüj işlemlerinin ardından ACE kolona enjekte edildi. Elüsyonda takip eden gradiyent kullanıldı. Başlangıç koşullarına dönmeden önce 0-5 dk % 15 B; 5-10 dk % 15-25 B; 10-20 dk % 25-40 B; 20-32 dk % 40-45 B; 32-35 dk % 45-10 B; 35-45. dakikalar arasında başlangıç koşullarına dönüldü. Saflaştırma işleminin ardından saf olarak toz halde sarı renkte 3,47 mg F32-1SA

fraksiyonu elde edildi. Sonuç olarak F31-SA, F32-1SA ve F32-2SF olmak üzere üç bileşen saf olarak elde edildi.

2.7.4. Saflaştırılan Fraksiyonların Yapısının Spektroskopik Yöntemlerle Aydınlatılması

Saflaştırılan fraksiyonların yapısının aydınlatılması amacıyla fraksiyonların alıkonma zamanları, UV spektrumları, MS/MS ve FT-IR spektrumları, ilgili standartların alıkonma zamanları, UV spektrumları, MS/MS ve FT-IR spektrumlarıyla karşılaştırıldı. Standartlarla aynı spektroskopik özelliklere sahip olan fraksiyonlar ilgili standart olarak adlandırıldı.

2.8. *C. campestris* Bitkisinin Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi

C. campestris bitkisinin antioksidan özelliklerinin belirlenmesi için Bölüm 2.3'te anlatıldığı gibi elde edilen her bir bitki ekstraktından 5 mL alındı ve evaporatörde çözücüsü uçuruldu. Kalan katı örnek 1 mL metanolde çözülerek santrifüj edildi ve berrak kısım alınarak antioksidan testlerde kullanıldı. Tüm analizler beş tekrarlı olarak yapıldı.

2.8.1. Bitki Ekstraktlarında Spektrofotometrik Toplam Fenolik Madde Tayini

Çalışmada Folin-Ciocalteu reaktifi ile toplam fenolik madde tayini, gallik asit ve kuersetin standartları kullanılarak elde edilen kalibrasyon grafiklerine göre değerlendirildi (Singleton vd., 1999). Metoda göre 20 µL 6 farklı derişimde (0,600; 0,300; 0,150; 0,075; 0,0375 ve 0,01875 mg/mL) gallik asit, kuersetin veya kör deneme için metanol, 400 µL 0,2 N Folin-Ciocalteu reaktifi ve 680 µL destile su karıştırılarak vortekslendi ve 3 dakika bekletildi. Karışıma 400 µL %10 Na₂CO₃ eklenerek vortekslenip 2 saat oda koşullarında bekletildi. Bekletmenin ardından 760 nm' de absorbansları ölçüldü ve standartlara ait kalibrasyon grafikleri çizildi. Bitki ekstraktlarının toplam fenolik madde içerikleri gallik asit eşdeğeri (GAE) ve kuersetin eşdeğeri (KE) cinsinden mg gallik asit eşdeğeri /g ekstrakt ve mg kuersetin eşdeğeri /g ekstrakt şeklinde hesaplandı. Tablo 4'te yöntemin uygulama süreçleri ayrıntılı olarak verildi.

Tablo 4. Toplam fenolik madde tayininin uygulama aşamaları

	Kör	Standart	Ekstrakt
Metanol	20 µL	-	-
Standart	-	20 µL	-
Ekstrakt	-	-	20 µL
Saf su	680 µL	680 µL	680 µL
0,2 N Folin reaktifi	400 µL	400 µL	400 µL
Tüpler vorteks ile karıştırıldı, 3 dakika sonra			
% 2 Na ₂ CO ₃	400 µL	400 µL	400 µL
2 saat oda koşullarında bekletildi ve 760 nm’de absorbands ölçüldü			

2.8.2. Bitki Ekstraktlarında Toplam Flavonoid Tayini

C. campestris bitkisinin 5 farklı ekstraktının toplam flavonoid miktarı Marcucci vd. (1998) tarafından geliştirilen metoduna göre belirlendi. Standart flavonoid bileşik olarak kuersetin kullanıldı. Bu amaçla kuersetinin 0,6 mg/mL derişimindeki stok çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltilerinden seyreltme koşuluyla 0,30; 0,15; 0,075; 0,0375; 0,0188 mg/mL derişim aralıklarında kalibrasyon çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 50 µL alınarak üzerine 10 µL % 10 Al(NO₃)₃, 10 µL 1 M CH₃COOK ve 430 µL % 80 metanol eklendi. Oda sıcaklığında 40 dakika boyunca bekletilip 415 nm’de absorbandsları ölçüldü. Sonuçta derişime karşı absorbands değerleri kullanılarak kuersetinin kalibrasyon grafiği elde edildi. Aynı işlemler ekstraktlar için de yapıldı (Tablo 5). Ekstraktların toplam flavonoid içerikleri kuersetinin kalibrasyon grafiğinin regrasyon denklemleri kullanılarak mg kuersetin eşdeğeri (KE)/g ekstrakt cinsinden hesaplandı.

Tablo 5. Toplam flavonoid tayini yöntemi için deney şartları

	Kör	Standart	Ekstrakt
Metanol	50 µL	-	-
Standart	-	50 µL	-
Ekstrakt	-	-	50 µL
Al (NO ₃) ₃ (%10)	10 µL	10 µL	10 µL
CH ₃ COOK (1 M)	10 µL	10 µL	10 µL
Metanol (% 80)	430 µL	430 µL	430 µL
40 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve 415 nm’de absorbands ölçüldü			

2.8.3. Bitki Ekstraktlarında DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini

Çalışmada DPPH• radikali metanol ile çözülerek 100 µM'lık çözeltisi kullanıldı. Metanol ile çözülerek farklı derişimlerde hazırlanan ekstraktlar ve fraksiyonlar eşit hacimde DPPH• çözeltisiyle karıştırılıp oda sıcaklığında 50 dakika bekletildi. Süre sonunda DPPH•'ın maksimum absorbans verdiği 517 nm'de absorbanslar okundu. Derişime karşı bulunan absorbanslar grafiğe geçirilerek SC₅₀ değerleri mg/mL cinsinden hesaplandı. Kör olarak DPPH• çözeltisinin ve ekstraktların çözüldüğü çözücü olan metanol kullanıldı. Çalışmada gallik asit, kuersetin, kamferol ve izoramnetin standart olarak kullanıldı. Pipetleme işlemleri Tablo 6' da verildi.

Tablo 6. DPPH radikal temizleme aktivitesi yöntemi için deney şartları

	Kör	Kontrol	Ekstrakt
Ekstrakt	150 µL	-	150 µL
Metanol	150µL	150 µL	-
DPPH• (100 µM)	-	150 µL	150 µL
50 dakika bekletildi ve 517 nm'de absorbanslar okundu			

2.9. *C. campestris* Bitkisi Ekstrakt ve fraksiyonlarının Antikanser Özelliğinin Belirlenmesi

Ekstrakt ve fraksiyonların antikanser özelliklerinin belirlenebilmesi için karaciğer kanseri hücre hattı (SNU-398, HepG2), yumurtalık kanseri hücre hattı (SK-OV-3) ve sağlıklı insan derisi fibroblast hücre hattı (hDFs) kullanıldı. Beş ekstrakt ve saflaştırılmış fraksiyonların MTS yöntemiyle HepG2, SK-OV-3 ve hDFs hücre hatları üzerindeki sitotoksitesisi belirlendi. Bu hücre hatları kullanılarak yapılan tüm deneylerde bir ekstraktın dört farklı seyreltmesi (1/500; 1/1000; 1/2000 ve 1/4000) kullanıldı. Ekstraktların çalışılan derişimlerde hücre hatları üzerindeki sitotoksitesileri karşılaştırıldı. HepG2 hücre hattı için ekstraktların başlangıç derişimleri; dietil eter 18 mg/mL, etil asetat ve butanol 43 mg/mL, metanol ve su 86 mg/mL'dir. SK-OV-3 için; dietil eter 18 mg/mL, etil asetat, metanol, bütanol ve su için 86 mg/mL başlangıç derişimlerinde çalışıldı. Ekstraktlardan HepG2 ve SK-OV-3 hücre hattı üzerinde yüksek oranda sitotoksitesite oluşturan etil asetat, metanol ve bütanol ekstraktlarının sağlıklı insan dermal hücre hattı (hDFs) üzerindeki sitotoksitesileri araştırıldı. Ekstraktların bu

hücre hattı üzerindeki derişimleri etil asetat ve bütanol için 43 mg/mL, metanol için 86 mg/mL'dir.

Safılaştırılan üç fraksiyonun (F31SA, F32-1SA ve F32-2SF) bir karışımı bu üç fraksiyonun birlikte etkisinin incelenmesi amacıyla hazırlandı. Bu karışımında her bir fraksiyonun oranı bitkinin etil asetat ekstraktındaki bulunma oranlarına göre belirlendi. Bunun için etil asetat ekstraktının 370 nm'deki kromatogramından F31SA, F32-1SA ve F32-2SF fraksiyonlarının alanlarının, kromatogramdaki toplam alana göre % değerleri hesaplandı. Ekstraktın kromatogramı %2,0 F31SA; %1,1 F32-1SA ve %1,0 F32-2SF bileşenlerini içermekteydi. Buna göre karışım; %48,78 F31SA; %26,83 F32-1SA ve %24,39 F32-2SF olacak şekilde hazırlandı.

Safılaştırılan üç fraksiyon ve karışımın HepG2, SK-OV-3 ve hDFs hücre hatları üzerindeki sitotoksitelerini belirleyebilmek için 0,02 mg/mL başlangıç derişiminden başlanarak dört seyreltme yapıldı (1/500; 1/1000; 1/2000;1/4000). Her bir derişimdeki % canlılık miktarları hesaplandı.

2.9.1. Hücre Kültürü Analizleri

İnsan karaciğer kanseri hücre hatlarından (HepG2), yumurtalık kanseri hücre hattı (SK-OV-3) ve insan derisi fibroblast hücre hattı (hDFs) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), % 10 fetal sığır serum (FBS), %1 penisilin streptomisin ve %1 L-glutamin içerikli besiyer ile flasklara ekilerek çoğalmaları sağlandı. Hücreler 37°C sıcaklıkta %5 CO₂' li ortamda inkübasyona bırakıldı. SNU-398 karaciğer kanser hücreleri ise %10 fetal dana serumu (FCS) ve gentamisin/fungizon içeren RPMI-1640 besiyeri kullanılarak 37°C, %5 CO₂ şartlarında T75 hücre kültür kaplarında çoğaltıldı. Hücreler %70-80 yoğunluğa ulaştığında pasajlanarak çoğaltıldı. Bitkiden elde edilen ekstrakt ve fraksiyonların antikanser etkileri canlılık değerlendirme testi tripan mavisi, metabolizma değerlendirme testi olan MTS ve MTT yöntemleri kullanılarak HepG2, SK-OV-3, hDFs ve SNU-398 hücre hatları üzerinde yapıldı.

2.9.2. Tripan Mavisi

Çalışmada kullanılan maddelerin HepG2, SK-OV-3 ve hDFs hücre hatları *in vitro* sitotoksik etkileri Tripan mavisi ve MTS kiti (promega) ile araştırıldı. Ekstraktlar DMSO (Dimetil sülfoksit) ile çözüldü ve filtreden geçirildi. HepG2, ve hDFs hücreleri 6' lı kuyucuklara her bir kuyucukta 5×10^5 hücre olacak şekilde ekim işlemi gerçekleştirildi. Hücreler ekilirken farklı derişimlerde ekstraktlar eklendi. 48 saat sonrasında kuyucuklardaki besiyeri alındı, 1 mL pH 7,4 olan fosfat tamponu (PBS) ile yıkama yapıldı. Hücreler tripsin/EDTA yardımıyla kaldırılıp ependorflara alındı. 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatantlar alındı ve pellet kısmına besiyeri eklendi. 15 sn vorteks yapıldı. Daha sonra tripan mavisi kullanarak farklı oranlarda hücrelerle muamele edilip Thoma lamında hücreler sayıldı. Sayılan hücrelerin ortalaması alınıp seyreltme faktörü ve 10^4 ile çarpılarak hücre miktarları aşağıdaki formül ile hesaplandı:

$$HS = OHS \times SF \times 10^4$$

(HS= Hücre Sayısı, OHS= Ortalama Hücre Sayısı, SF= Seyreltme Faktörü)

2.9.3. MTS Testi (promega)

MTS kiti ile yapılan deneyde ise HepG2, SK-OV-3, hDFs hücreleri 96 kuyucuklu pleytlere ekildi. Her bir kuyucuğa 5000 hücre olacak şekilde 100 µL besiyeri içinde dağıtıldı. 48 saat boyunca 37°C'de ,%5 CO₂' de bekletildi. Sonrasında her bir kuyucuğa 20 µL CellTiter 96 Aqueous reaktifi eklendi. Karanlık ortamda 37°C'de ,%5 CO₂' de 3 saat boyunca inkübe edildi. Sonuçlar 490 nm absorbansta ELISA okuyucuda okutuldu.

2.9.4. MTT Testi

Karaciğer kanseri SNU-398 hücre hattı ile yapılan deneylerin sonucunda hücre canlılıkları MTT yöntemiyle değerlendirildi. Hücre süspansiyonu (1×10^5 /mL) steril kapaklı tüplerde hazırlandı. 96 kuyucuklu pleytlere, 100 µL/kuyucuk şeklinde ekildi ve 37°C ve %5 CO₂ ortamında 24 saat bekletildi. Ekstraktların son derişimleri 100; 33,3; 11,1; 3,70; 1,23; 0,41; 0,14; 0,05 ve 0,02 µg/mL (her derişim üç kuyucuk) olacak

şekilde eklendi. Kontrol kuyucuklar (12 kuyucuk) RPMI, pozitif kontrol kuyucuklar antikanser ilaç Sisplatin ile hazırlandı. Pleytler 48 saat 37°C ve %5CO₂ ortamda bekletildi. Bekletme süresi sonunda hücre canlılığını belirlemek için 5 mg/mL yoğunlukta hazırlanan MTT solüsyonundan her bir kuyucuğa 10 µL eklendi ve 37°C, %5 CO₂ ve nemli ortamda 3 saat bekletildi. Süre sonunda kuyucuk içeriği boşaltıldı ve hücre içi formazan kristallerini çözündürmek üzere hücreler üzerine 100 µL/kuyucuk olacak şekilde DMSO ilave edildi. 30 dakika bekletme sonunda invert mikroskop altında kristallerin tamamen çözünüp çözünmediği gözlemlendi. Oluşan mavi-menekşe renk absorbansı 570 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Ekstraktların her bir derişimde hücreler üzerinde oluşturduğu toksik etki aşağıdaki formüle göre ayrı ayrı hesaplandı.

$$\% \text{ Toksisite} = [1 - (\text{Test Optik Dansite} / \text{Kontrol Optik Dansite})] \times \% 100$$

Her bir ekstrakt için canlı hücre sayısını yarıya düşüren ekstrakt derişimi (CC₅₀) hesaplandı. Negatif kontrol, ekstrakt içermeyen hücreler ve pozitif kontrol 5 µg/mL derişimde sisplatin maddesine maruz bırakılan hücrelerin üremesinin % 50 azalmasını ifade etmektedir.

3. BULGULAR

3.1. Fenolik Bileşiklerin Analizi için HPLC-DAD Yönteminin Değerlendirilmesi

Optimize edilen kromatografik şartlar altında yirmi standart fenolik bileşiğin ayrımı yapıldı. Tablo 7’de analit derişimine karşı elde edilen absorbens değerlerinin doğrusallığı R^2 olarak değerlendirildi. Çalışılan derişim aralığında doğrusal kalibrasyon verileri elde edildi ($R^2 \geq 0,999$). Alıkonma zamanı (RT) ve pik alanlarının tekrarlanabilirliği 0,5 mg/L derişimindeki standart karışımının 7 kez enjeksiyonu ile belirlendi. Alıkonma zamanlarının ve pik alanların tekrarlanabilirliği kabul edilebilir aralıkta, yüksek tekrarlanabilirlikte bulundu ($CV < 5$). Analitin mevcut olup olmadığını belirlemek için gerekli olan en küçük miktar LOD ve güvenilir kantitatif analiz yapabilmek için gerekli en küçük miktar LOQ değerleri mg/L cinsinden Tablo 7’de verildi. Yöntemin seçiciliği 20 fenolik standart karışımın iyi bir şekilde ayrılması için, en uygun kolon kullanılarak, kararlı kolon sıcaklığında ve ayırım için uygun çözücüler ve gradiyent elüsyonla birlikte uygun dedeksiyon aralığı kullanılarak belirlendi.

Tablo 7. Geliştirilen HPLC-DAD metodunun parametreleri

No	Standardın Adı	UV-Max	RT _{ort} ^a	R ²	*CV (RT)	*CV(Alan)	**LOD	**LOQ	Kesim noktası	Eğim
1	Gallik asit	280	2,98	0,999	0,581	0,184	0,002	0,006	-0,060	0,482
2	Protokatekuik asit	254	7,19	0,999	0,660	0,892	0,013	0,040	-0,001	0,253
3	Klorojenik asit	315	11,02	0,999	0,136	0,095	0,001	0,004	-0,005	0,473
4	<i>p</i> -OH Benzoik asit	254	11,31	1	0,182	0,807	0,011	0,030	0,020	1,081
5	Kafeik asit	315	12,37	0,999	0,165	0,186	0,003	0,008	0,030	0,895
6	Vanilik asit	254	13,32	0,999	0,088	0,304	0,004	0,013	0,010	0,524
7	Sirincik asit	280	13,70	0,999	0,059	0,213	0,003	0,009	-0,091	0,520
8	Rutin	254	15,05	0,999	0,022	0,235	0,003	0,010	-0,020	0,226
9	Ellacik asit	254	15,21	0,999	0,047	0,244	0,003	0,009	-0,142	1,295
10	<i>p</i> -Kumarik asit	315	16,27	1	0,083	0,349	0,005	0,015	-0,020	1,274
11	Ferulik asit	315	18,67	0,999	0,058	0,802	0,012	0,035	0,060	0,881
12	<i>o</i> -Kumarik asit	315	20,55	0,999	0,166	0,840	0,011	0,033	0,961	1,021
13	Mirisetin	370	22,86	0,999	0,015	0,254	0,001	0,001	-0,130	0,589
14	Fisetin	370	23,57	0,999	0,012	0,110	0,001	0,003	-0,112	0,760
15	Kuersetin	370	28,12	1	0,005	0,043	0,001	0,001	-0,050	0,661
16	Apigenin	315	31,55	1	0,013	0,690	0,010	0,029	-0,010	0,288
17	Kamferol	370	32,14	0,999	0,014	0,036	0,001	0,001	-0,051	0,646
18	İzoramnctin	370	33,05	0,999	0,020	0,525	0,006	0,018	0,030	0,268
19	Paenol	280	38,80	0,999	0,012	0,032	0,001	0,001	-0,242	0,765
20	Timol	280	40,68	0,999	0,010	0,680	0,009	0,028	-0,161	1,219

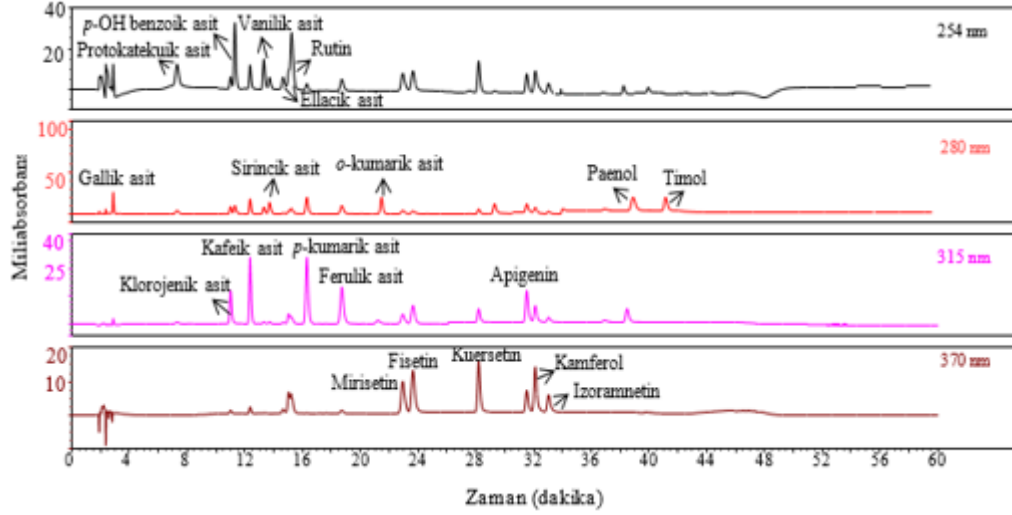
^a: Zaman birimi dakika cinsindedir. * : BSS: bağıl standart sapma ** : Değerler mg/L cinsinden verildi.

Ayrıca gün içi tekrarlanabilirlik birleşik standart sapma cinsinden hesaplanarak elde edilen veriler Tablo 8’de verildi.

Tablo 8. Yöntemin tekrarlanabilirliğinin 20 fenolik standart bileşiğin gün içi tekrarlanabilirliği cinsinden hesaplanması

Bileşenler	Gün içi Tekrarlanabilirlik (Ortalama pik alanı ± SD)			CV
	Sabah (8-11)	Öğle (11-13)	Akşam (16-18)	
Gallik asit	0,176 ± 0,001	0,175 ± 0,004	0,169 ± 0,001	1,261
Protokatekuik asit	0,117 ± 0,002	0,118 ± 0,004	0,114 ± 0,004	1,033
Klorojenik asit	0,213 ± 0,003	0,215 ± 0,005	0,216 ± 0,005	0,411
<i>p</i> -OH benzoik asit	0,503 ± 0,080	0,499 ± 0,004	0,502 ± 0,012	0,240
Kafeik asit	0,439 ± 0,012	0,445 ± 0,004	0,443 ± 0,004	0,399
Vanilik asit	0,246 ± 0,004	0,248 ± 0,004	0,244 ± 0,006	0,469
Sirincik asit	0,244 ± 0,001	0,245 ± 0,001	0,244 ± 0,001	0,136
Rutin	0,109 ± 0,003	0,106 ± 0,004	0,108 ± 0,004	1,089
Ellacik asit	0,528 ± 0,004	0,537 ± 0,011	0,533 ± 0,003	0,489
<i>p</i> -kumarik asit	0,609 ± 0,003	0,612 ± 0,004	0,611 ± 0,013	0,144
Ferulik asit	0,417 ± 0,009	0,424 ± 0,011	0,421 ± 0,006	0,482
<i>o</i> -kumarik asit	0,346 ± 0,006	0,350 ± 0,001	0,351 ± 0,003	0,325
Mirisetin	0,031 ± 0,001	0,033 ± 0,003	0,030 ± 0,001	1,064
Fisetin	0,250 ± 0,025	0,239 ± 0,022	0,245 ± 0,025	1,300
Kuersetin	0,130 ± 0,001	0,126 ± 0,002	0,123 ± 0,001	1,605
Apigenin	0,127 ± 0,010	0,128 ± 0,010	0,132 ± 0,002	1,184
Kamferol	0,284 ± 0,005	0,279 ± 0,004	0,281 ± 0,001	0,516
İzoramnetin	0,086 ± 0,003	0,092 ± 0,008	0,090 ± 0,008	1,674
Paenol	0,308 ± 0,001	0,306 ± 0,002	0,309 ± 0,005	0,287
Timol	0,498 ± 0,038	0,496 ± 0,051	0,486 ± 0,057	0,752

Optimize edilen HPLC-DAD metodu kullanılarak yürütülen 5 mg/L derişimindeki 20 standart fenolik bileşiğin 254, 280, 315 ve 370 nm’deki kromatogramları Şekil 22’de verildi. Verilen kromatogramda her bir standart fenolik bileşik, maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyunda gösterildi.



Şekil 22. Optimize edilen HPLC-DAD metodu kullanılarak 5 mg/L derişimde 20 standart fenolik bileşimin 254, 280, 315 ve 370 nm'deki kromatogramları

3.2. Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonunun % Geri Kazanımı

Ekstraksiyon geri kazanımını belirleyebilmek son hacimde 40 mg/L derişimdeki temsili üç fenolik bileşimin bitki örnekleri ile birlikte üç tekrarlı ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Temsili standart fenolik bileşikler için % geri kazanım değerleri hesaplandı ve sonuçlar Tablo 9'da verildi.

Tablo 9. *C. campestris* bitkisine ait ekstraktların % geri kazanımları

Standartlar	Dietil eter	Etil asetat	% Geri Kazanım		
			Metanol	Bütanol	Su
Siringik asit	65,35±0,22	76,38±1,80	106,24±0,26	87,42±0,14	25,63±0,84
<i>o</i> -Kumarik asit	63,46±0,21	77,93±0,67	86,73±0,10	73,97±0,82	50,16±1,92
Apigenin	64,82±0,03	86,95±1,11	73,00±0,87	64,82±0,60	0,72±0,07

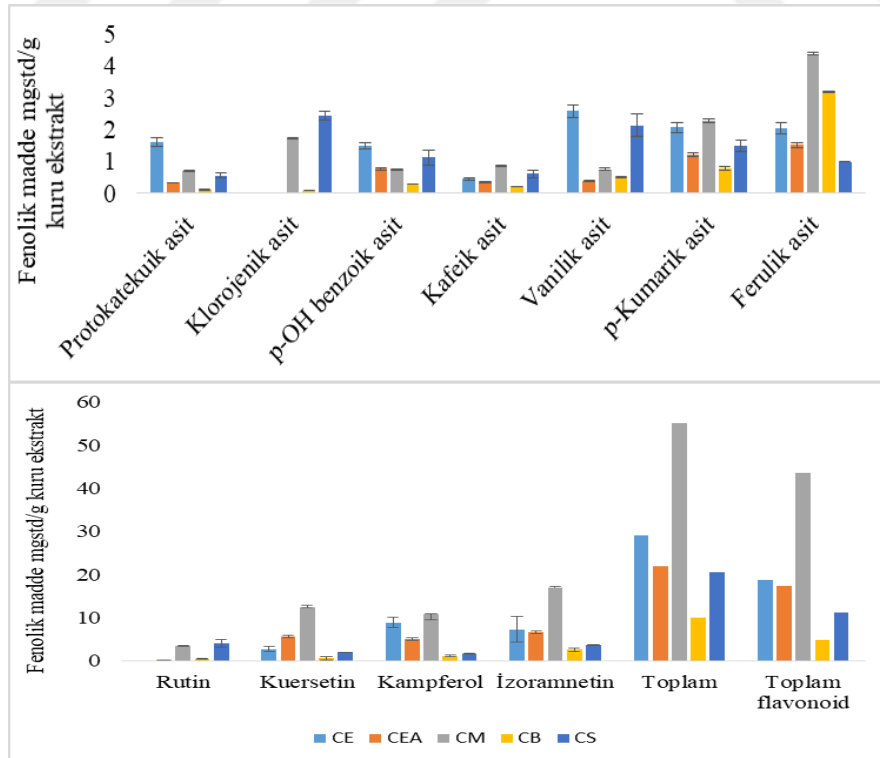
3.3. *C. campestris* Bitkisinin HPLC-DAD Analizleri

C. campestris bitkisinin dietil eter, etil asetat, metanol, bütanol ve sulu ekstraktlarının fenolik bileşik içeriklerine ait HPLC-DAD sonuçları Tablo 10'da ve HPLC-DAD ile belirlenen fenolik içeriklerinin dağılımını gösteren bar grafikleri Şekil 23'te verildi.

Tablo 10. *C. campestris* bitkisinin dietil eter, etil asetat, metanol, bütanol ve sulu ekstraktlarına ait fenolik bileşik miktarları (mg std/g kuru ekstrakt)

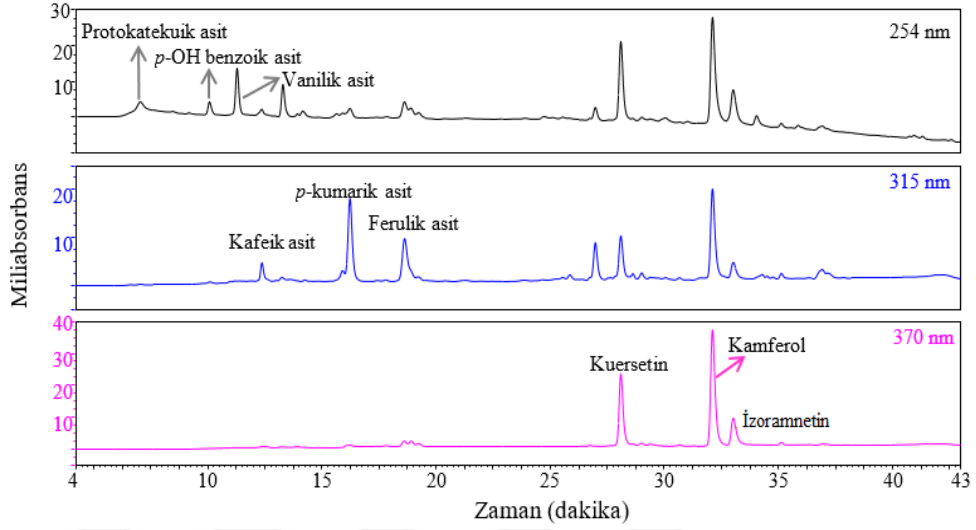
RT	Standartlar	Ekstraktlar				
		Dietil eter	Etil asetat	Metanol	Bütanol	Su
7,14	Protokatekuik asit	1,61±0,13	0,34±0,01	0,71±0,01	0,11±0,01	0,56±0,07
11,03	Klorojenik asit	G	0,02±0,00	1,72±0,01	0,09±0,01	2,45±0,13
11,33	<i>p</i> -OH benzoik asit	1,50±0,09	0,78±0,04	0,74±0,03	0,29±0,01	1,12±0,23
12,44	Kafeik asit	0,45±0,03	0,35±0,01	0,85±0,02	0,20±0,00	0,61±0,12
13,37	Vanilik asit	2,58±0,21	0,40±0,02	0,76±0,03	0,50±0,01	2,14±0,37
15,12	Rutin	<LOD	0,19±0,01	3,44±0,01	0,52±0,06	4,00±0,84
16,33	<i>p</i> -Kumarik asit	2,07±0,17	1,21±0,05	2,27±0,06	0,80±0,06	1,50±0,17
18,77	Ferulik asit	2,04±0,17	1,53±0,08	4,39±0,03	3,19±0,03	1,00±0,01
28,18	Kuersetin	2,73±0,56	5,60±0,28	12,47±0,06	0,57±0,35	2,00±0,01
32,16	Kampferol	8,84±1,19	5,00±0,35	10,72±0,12	1,15±0,27	1,64±0,06
33,06	İzoramnetin	7,25±2,99	6,61±0,37	16,97±1,27	2,57±0,36	3,57±0,09
	*Toplam	29,08	22,03	55,04	10,00	20,59
	**Toplam flavonoid	18,83	17,40	43,60	4,81	11,21

<LOD: Dedeksiyon limitinin altında, G: Gözlenmedi. *: HPLC-DAD ile belirlenen tüm fenolik bileşiklerin toplam miktarı (mg std/g kuru ekstrakt), **: HPLC-DAD ile belirlenen flavonoidlerin toplam miktarı (mg std/g kuru ekstrakt).

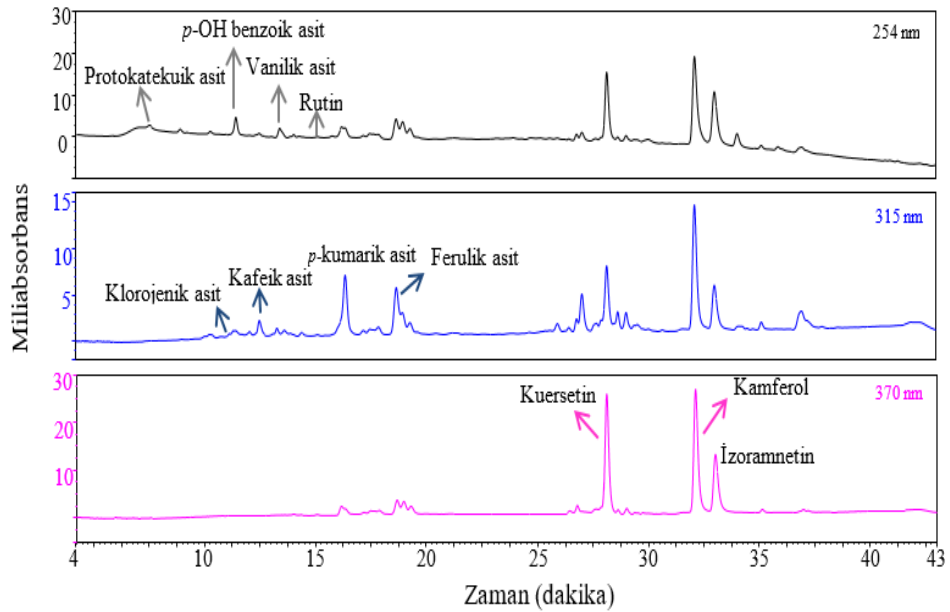


Şekil 23. *C. campestris* bitkisinin beş ekstraktında HPLC-DAD ile belirlenen fenolik içeriğinin dağılım grafiği

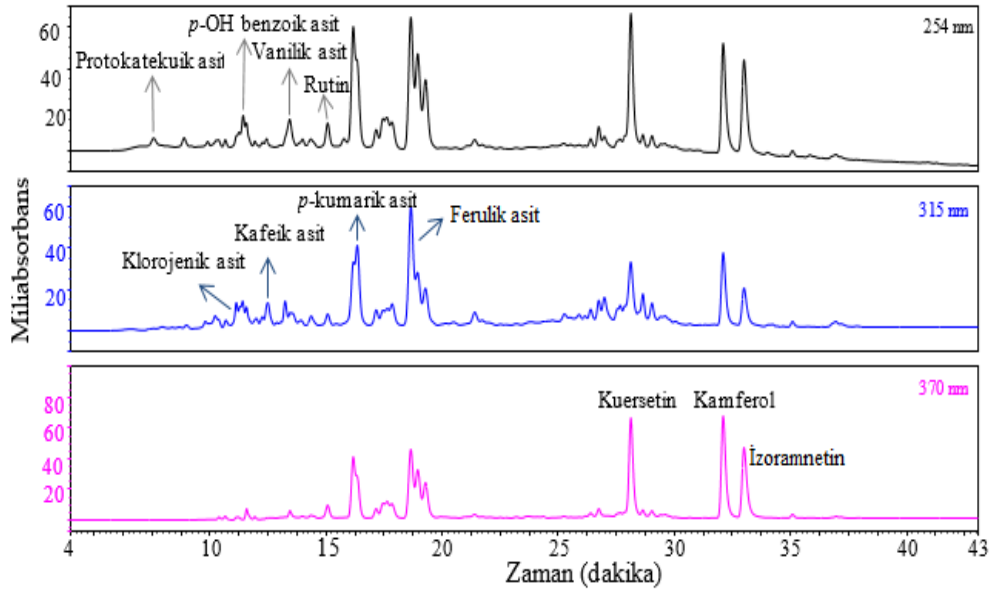
Ayrıca *C. campestris* bitkisinin dietil eter, etil asetat, metanol, bütanol ve sulu ekstraktlarına ait HPLC-DAD kromatogramları Şekil 24-28’de verildi.



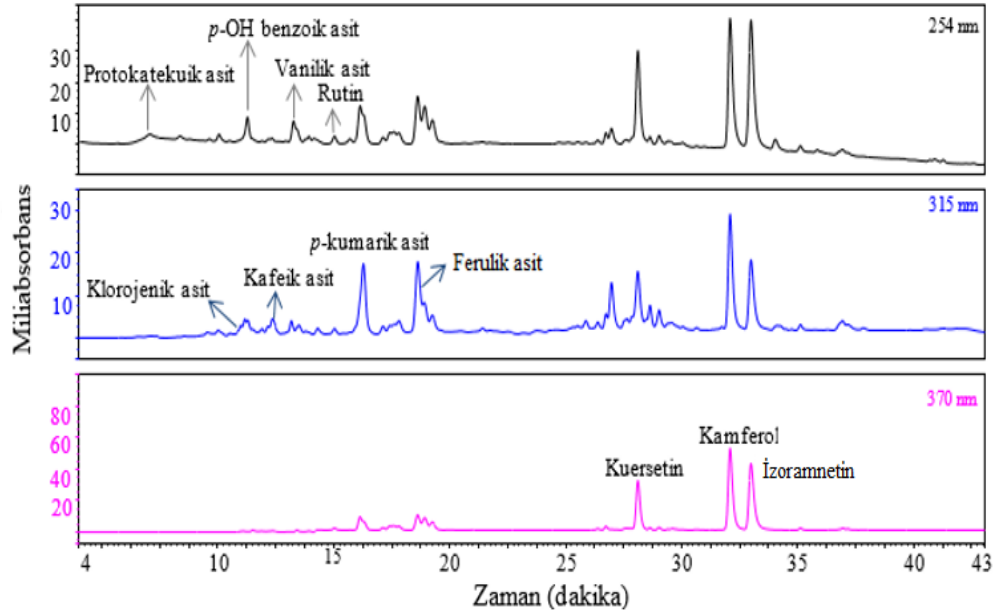
Şekil 24. *C. campestris* bitkisinin dietil eter ekstraktına ait 254, 315 ve 370 nm’deki HPLC-DAD kromatogramı (seyreltme oranı: 1/12)



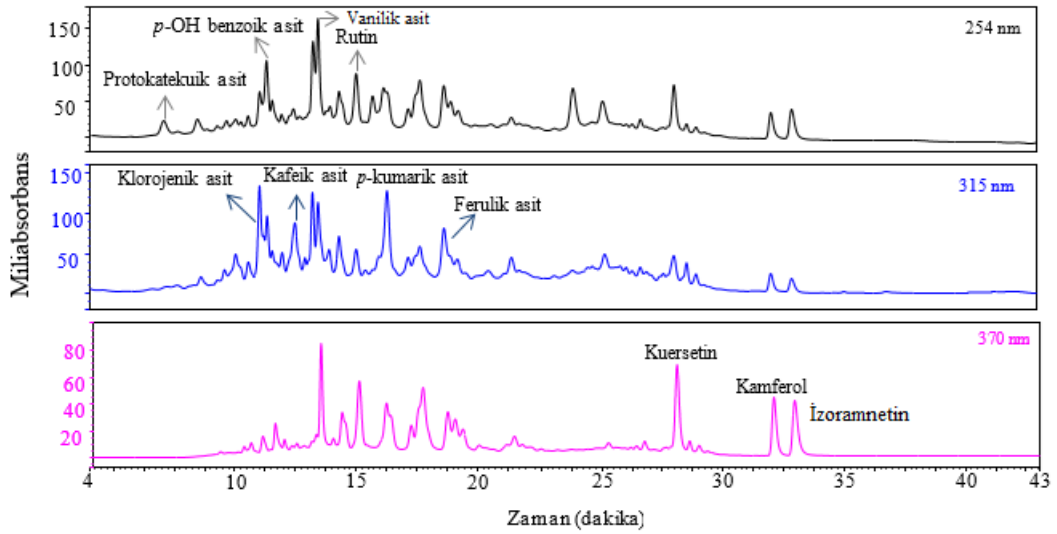
Şekil 25. *C. campestris* bitkisinin etil asetat ekstraktına ait 254, 315 ve 370 nm’deki HPLC-DAD kromatogramı (seyreltme oranı: 1/6)



Şekil 26. *C. campestris* bitkisinin metanol ekstraktına ait 254, 315 ve 370 nm'deki HPLC-DAD kromatogram (seyreltme oranı: 1/45)



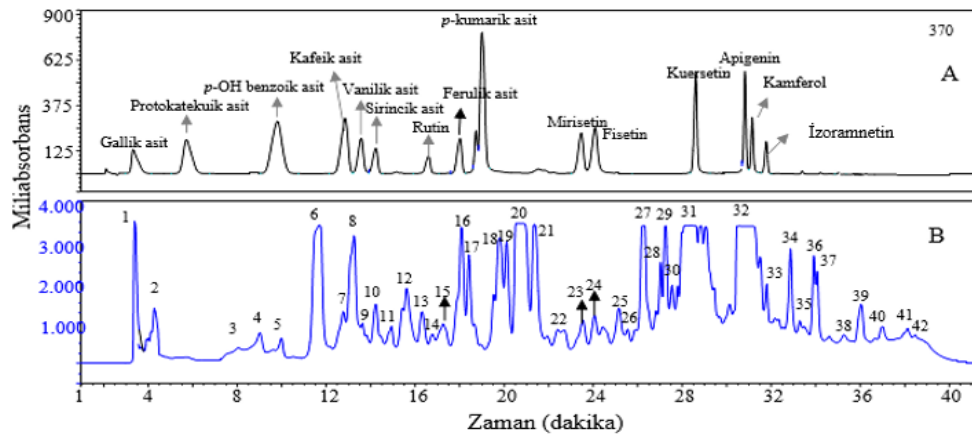
Şekil 27. *C. campestris* bitkisinin bütanol ekstraktına ait 254, 315 ve 370 nm'deki HPLC-DAD kromatogramı (seyreltme oranı: 1/6)



Şekil 28. *C. campestris* bitkisinin sulu ekstraktına ait 254, 315 ve 370 nm'deki HPLC-DAD kromatogramı (seyreltme oranı: 1/10)

3.4. *C. campestris* Bitkisinin Etil Asetat Ekstraktının Fraksiyonlarına Ayrılması

Preparatif HPLC-DAD sistemi kullanılarak elde edilen etil asetat ekstraktının fraksiyonlarını ve 40 ppm standart karışımı içeren kromatogramlar Şekil 29'da verildi. Örneğin ekstraksiyonu 2.7.1. başlık numarasıyla verilen 'Preparatif HPLC-DAD için Örnek Hazırlanması' bölümünde ifade edildiği gibi gerçekleştirildi. Ekstrakte edilen bitki örneği preparatif HPLC cihazına enjekte edilerek elüsyon sırasına göre numaralandırılan 42 tane fraksiyona ayrıldı. Elde edilen fraksiyonların, alıkonma zamanları ve UV spektrumları Tablo 11'de verildi.

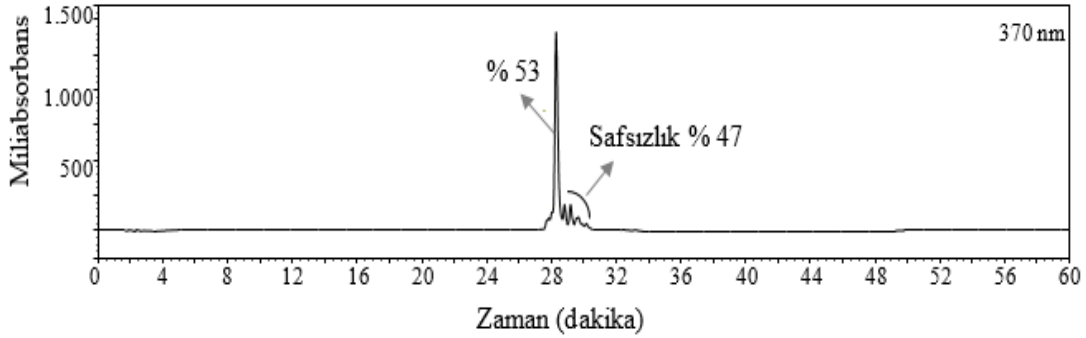


Şekil 29. Preparatif HPLC-DAD sistemi ile elde edilen A: standart karışıma ve B: Etil asetat ekstraktının fraksiyonlarına ait kromatogram

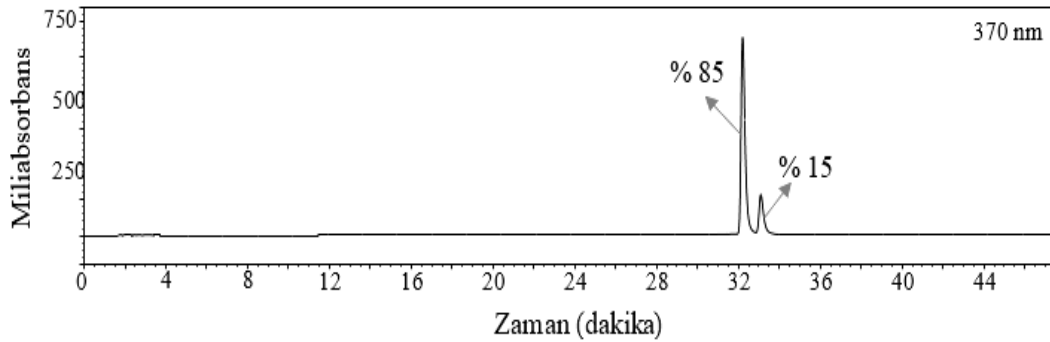
Tablo 11. *C. campestris* bitkisinin etil asetat ekstraktına ait bileşenlerinin preparatif HPLC-DAD ile belirlenmesi

Fraksiyonun Kodu	Alınma zamanı	UV Spektrumu	Fenolik bileşik ya da Türevi
1	3,42	262,3-234,8	Gallik asit türevi
2	4,38	260,2-230,0	Gallik asit türevi
3	8,25	273,5-232,0	Gallik asit türevi
4	9,40	259,9-295,1-231,2	Protokatekuik asit türevi
5	10,22	267,7	<i>p</i> -OH benzoik asit
6	12,08	260,5	<i>p</i> -OH benzoik asit türevi
7	12,86	240,4-316,4	Kafeik asit
8	13,44	260,9-293,9-219,0	Protokatekuik asit türevi
9	13,84	331,2-241,6	İzoramnetin türevi
10	14,36	242,4-219,0	Benzoik asit türevi
11	15,06	245,7-335,7	İzoramnetin türevi
12	15,76	248,3-301,7-219,8	Sinamik asit türevi
13	16,587	300,1-331,9-270,6	Kafeik asit türevi
14	16,97	264,2	<i>p</i> -OH benzoik asit türevi
15	17,46	254,8-232,7-308,9	Rutin
16	18,31	350,5-259,3-307,9	Rutin türevi
17	18,64	257,3-353,8-305,6	Rutin türevi
18	19,95	256,3-355,2-219,5	Rutin türevi
19	20,33	260,4-356,4-219,4	Rutin türevi
20	20,81	369,6-259,8-230	Kuersetin türevi
21	21,60	368,7-351,6-260,1	İzoramnetin türevi
22	22,93	312,7-267,3-233,0	Kafeik asit türevi
23	23,84	266,4	<i>p</i> -OH benzoik asit türevi
24	24,60	261,0-356,3-232,4	Kamferol türevi
25	25,47	299,7-275,5-235,3	Sinamik asit türevi
26	25,74	329,4-236,0-267,2	Apigenin türevi
27	26,49	345,3-259,9-300,4	Rutin türevi
28	27,16	358,0-260,7-304,0	Rutin türevi
29	27,369	358,6-260,0-300,2	Rutin türevi
30	27,72	267,6-244,7-289,2	Vanilik asit türevi
31	28,94	369,5-260,0-276,9	Kuersetin
32	30,65	400,1-347,7-301,5	İzoramnetin türevi
33	31,89	324,2-294,7-241,6	Ferulik asit türevi
34	32,97	365,8-299,3-267,5	Kamferol türevi
35	33,39	380,0-300,7-234,9-	Kamferol türevi
36	34,01	365,4-301,1-242,9	Kamferol türevi
37	34,16	302,6-239,7-269,8	Sinamik asit türevi
38	35,35	230,9-303,4-273,0	Sinamik asit türevi
39	36,13	243,2-288,2-321,4	Kafeik asit türevi
40	37,06	239,9-280,6	Sirincik asit türevi
41	38,21	279,2-221,9	Sirincik asit türevi
42	38,52	275,7-221,9	Sirincik asit türevi

Şekil 29'daki kromatogramdan da anlaşıldığı gibi F31 (33 mg) ve F32 (40 mg) numaralı fraksiyonlar *C. campestris* bitkisinde en fazla bulunan ve miktar olarak en fazla biriken fraksiyonlardır. Bu fraksiyonların saf olmadıkları pik şekilleri ve UV spektrumları kullanılarak gözlemlendi ancak safsızlığın ne boyutta olduğunun belirlenebilmesi için optimize edilen analitik HPLC-DAD sistemi kullanılarak saflık kontrolleri yapıldı. F31 numaralı fraksiyon % 47 safsızlık içerirken (Şekil 30), F32 numaralı fraksiyon ise iki bileşenden oluşmaktadır (Şekil 31). Bu bileşenlerden ilki F32 numaralı fraksiyonun % 85'ini oluştururken, ikinci bileşen ise % 15'ini oluşturmaktadır. Bu fraksiyonları saflaştırılmak için kromatografik ayırma işlemleri gerçekleştirildi.



Şekil 30. F31 numaralı fraksiyonun analitik sistemde saflık kontrolü için elde edilen HPLC-DAD kromatogramı

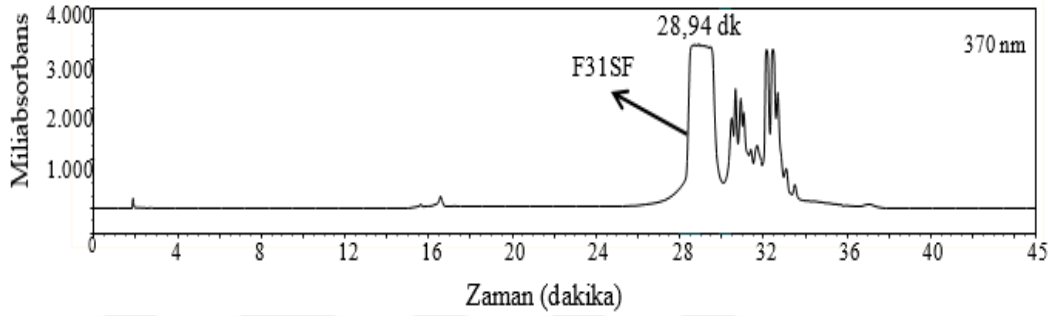


Şekil 31. F32 numaralı fraksiyonun analitik sistemde saflık kontrolü için elde edilen HPLC-DAD kromatogramı

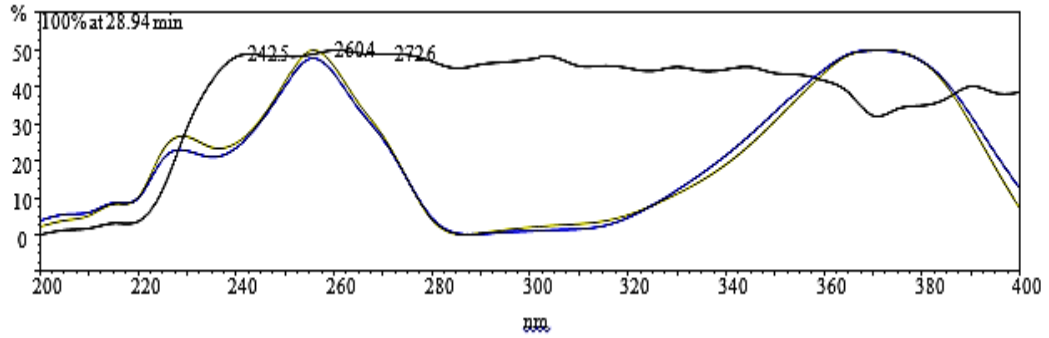
Şekil 30 ve Şekil 31'deki kromatogramların alıkonma zamanları ve UV-Vis spektrumları, kuersetin, kamferol ve izoramnetin standartlarının alıkonma zamanı ve UV-Vis spektrumları ile benzerlik göstermektedir. Bu fraksiyonların kuersetin, kamferol ve izoramnetin türü flavonoidler olduğu düşünüldü.

3.5. Fraksiyonların Saflaştırma İşlemine Tabi Tutulması

F31 numaralı fraksiyonu saflaştırabilmek amacıyla Bölüm '2.7.3 Fraksiyonların saflaştırılması' ana başlığında özetlenen yöntemler uygulanarak elde edilen çözelti Fortis kolona enjekte edildi. Şekil 32'deki kromatogramdan ve Şekil 33'deki UV spektrumundan da anlaşıldığı üzere F31 numaralı fraksiyonun saf olmadığı gözlemlendi.

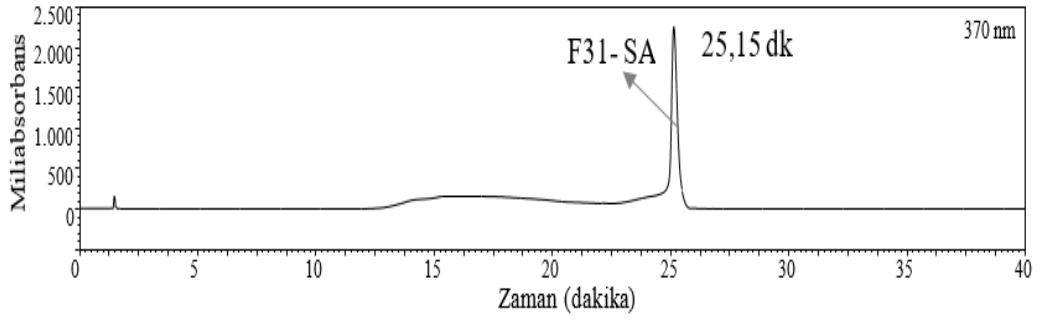


Şekil 32. F31 numaralı fraksiyonun Fortis kolon kullanılarak ayrılmasıyla elde edilen kromatogram

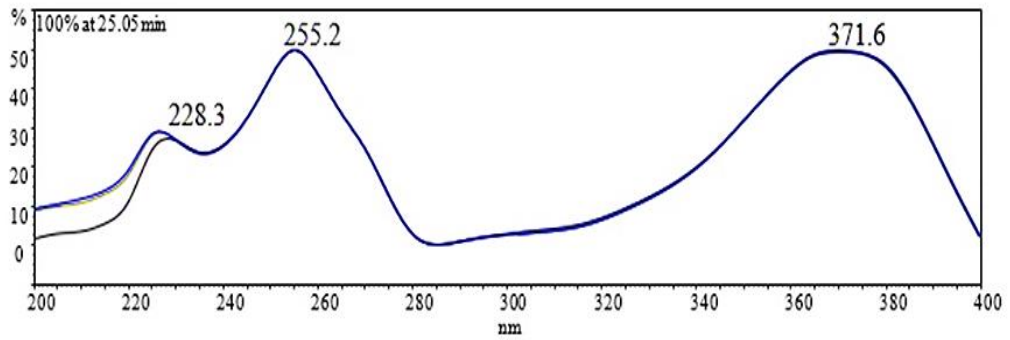


Şekil 33. F31SF fraksiyonunun UV spektrumu

Fortis kolonda ayrılan fraksiyonlardan miktar olarak en fazla biriken F31SF kodlu fraksiyon toplandı. Elde edilen fraksiyon ACE kolon kullanılarak tekrar saflaştırıldı. En son saf olarak 3,92 mg F31SA fraksiyonu elde edildi. F31SA fraksiyonun kromatogramı Şekil 34'te; UV spektrumu ise Şekil 35'te verildi.

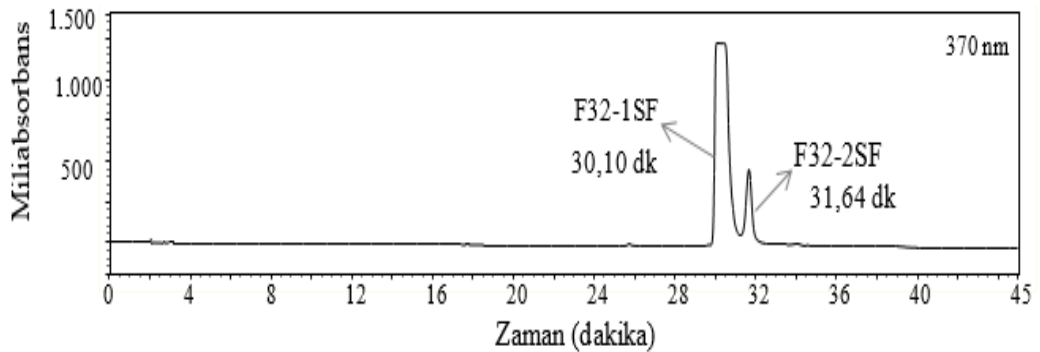


Şekil 34. ACE kolon kullanılarak saflaştırılan F31SA numaralı fraksiyonun HPLC-DAD kromatogramı

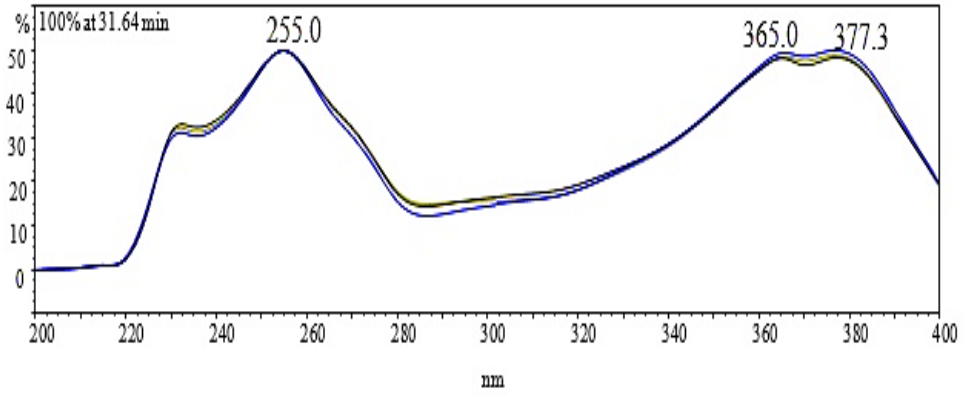


Şekil 35. F31SA numaralı fraksiyonun UV spektrumu

Preparatif kolondan toplanarak biriktirilen F32 numaralı fraksiyonundan 5 mg tartılarak 3 mL %56 metanol:su karışımında çözüldü ve Fortis kolona enjekte edildi. Fortis kolona enjeksiyon sonucu iki fraksiyon gözlemlendi. Bu fraksiyonlardan F32-2SF fraksiyonu saf olarak sarı renkte toz halde (6,69 mg) elde edildi (Şekil 36, Şekil 37).

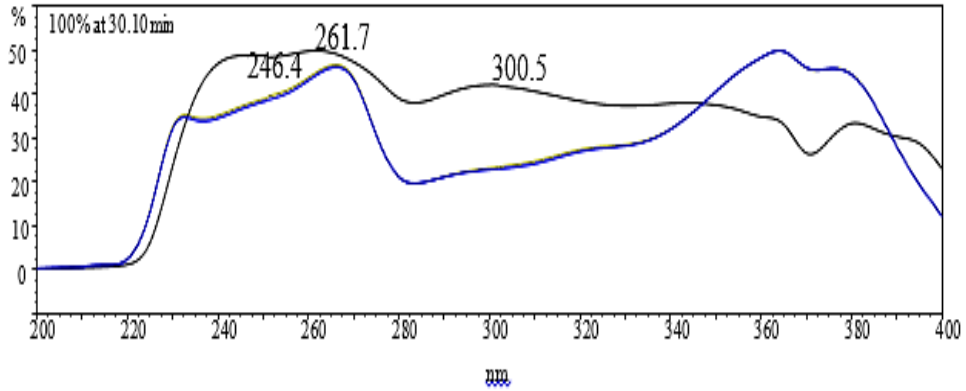


Şekil 36. F32 numaralı fraksiyonun Fortis kolon kullanılarak ayrılmasıyla elde edilen preparatif HPLC-DAD kromatogramı

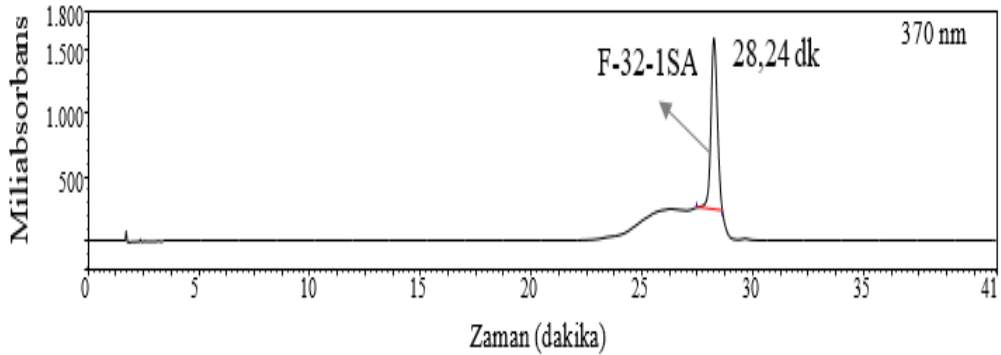


Şekil 37. F32-2SF fraksiyonunun UV spektrumu

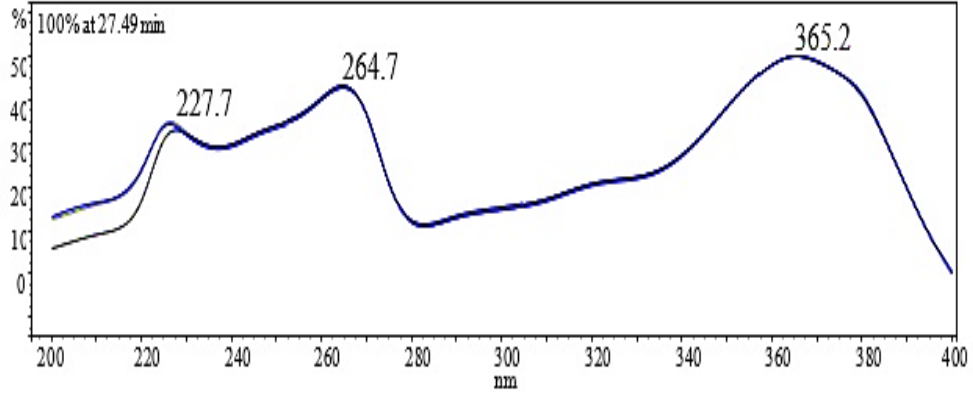
F32-1SF fraksiyonunun ise Şekil 38'deki UV spektrumundan da anlaşıldığı üzere saf olmadığı görüldü ve bu fraksiyon ACE kolon kullanılarak tekrar saflaştırıldı. Analiz sonucunda saf olarak F32-1SA (3,47 mg) fraksiyonu elde edildi (Şekil 39, Şekil 40).



Şekil 38. F32-1SF fraksiyonunun UV spektrumu



Şekil 39. ACE kolon ile saflaştırılan F32-1SA fraksiyonunun HPLC-DAD kromatogramı

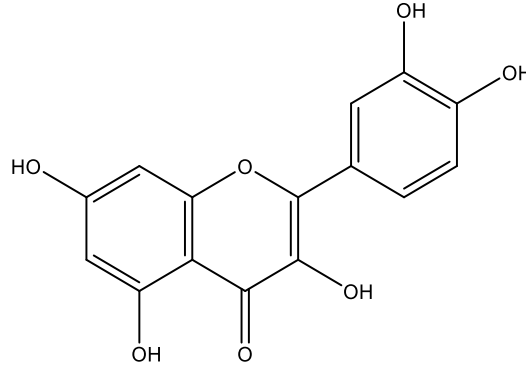


Şekil 40. F32-1SA fraksiyonunun UV spektrumu

3.5.1. Saflaştırılan Fraksiyonların Yapılarının Aydınlatılması

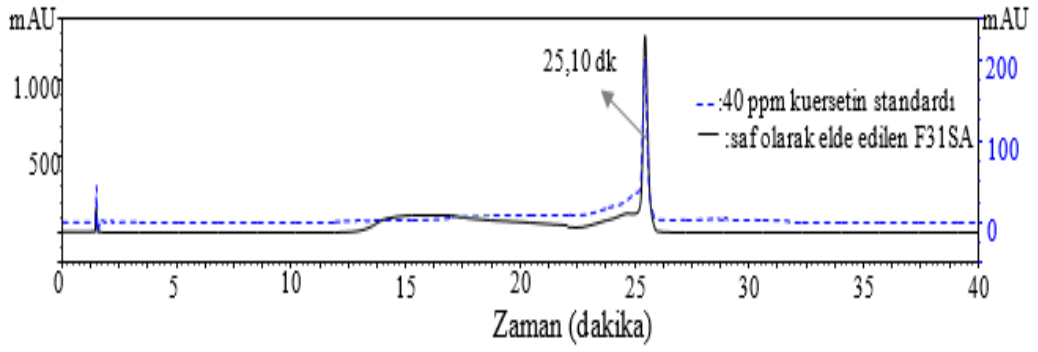
Elde edilen fraksiyonların alıkonma zamanları, UV, MS/MS ve FT-IR spektrumları, fraksiyonların saflaştırılması aşamasında benzerlikleri tespit edilen standartların alıkonma zamanı ve UV, MS/MS, FT-IR spektrumları karşılaştırıldı.

3.5.1.1. Saflaştırılan F31SA Fraksiyonu; Kuersetin

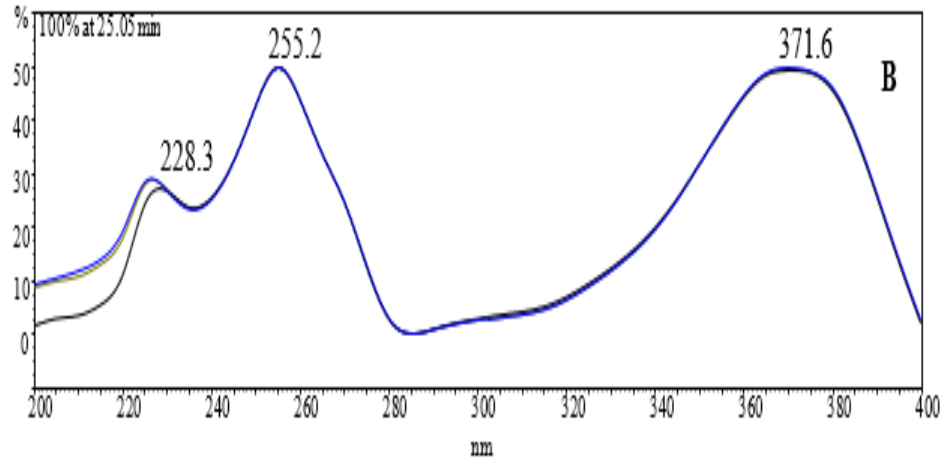
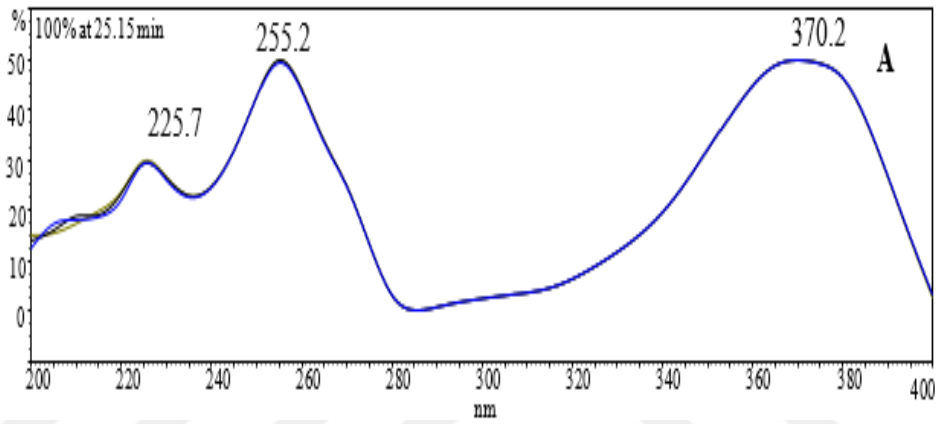


Şekil 41. Kueretin molekül yapısı

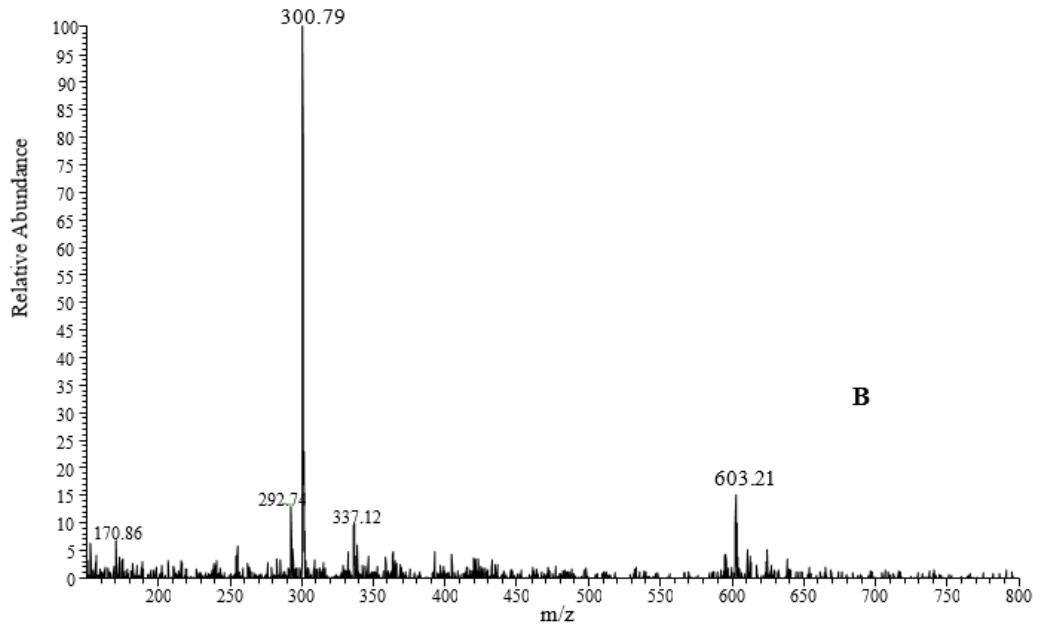
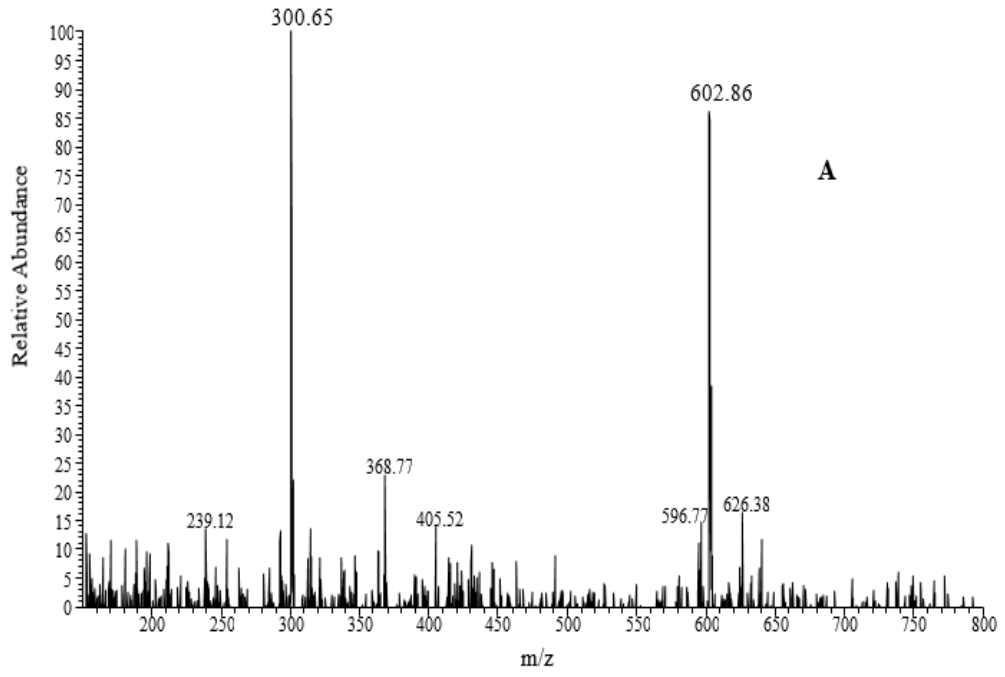
Kueretin standardıyla F31SA fraksiyonunun alıkonma zamanları, UV, MS/MS ve FT-IR spektrumları karşılaştırıldığında F31SA fraksiyonunun yapısı kueretin olarak aydınlatıldı (Şekil 42-46).



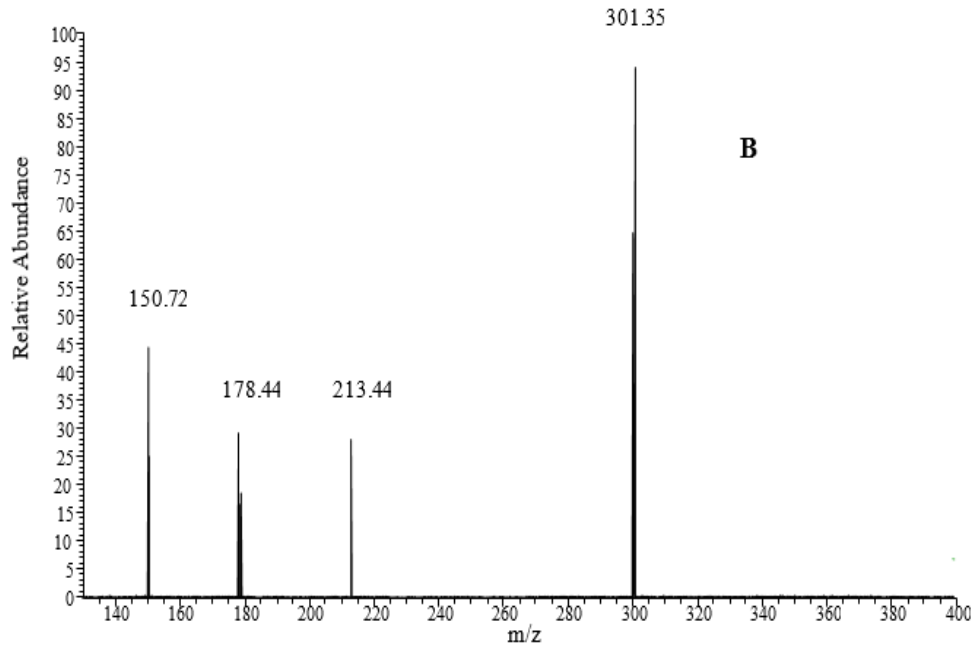
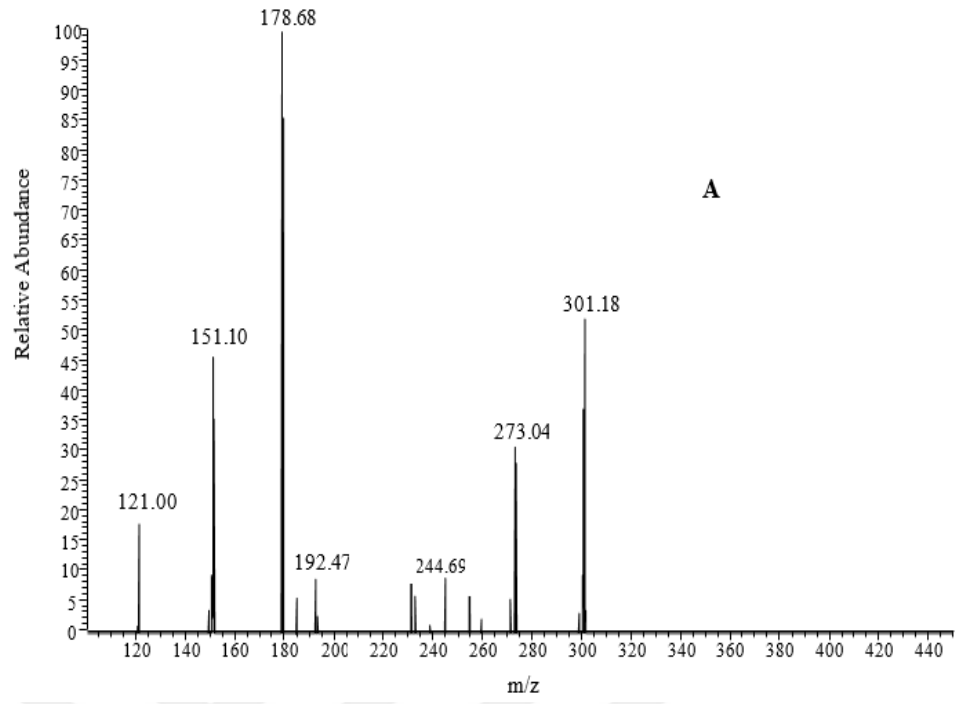
Şekil 42. Kuersetin standardı ile saflaştırılmış F31SA fraksiyonunun karşılaştırılmasıyla elde edilen HPLC-DAD kromatogramı



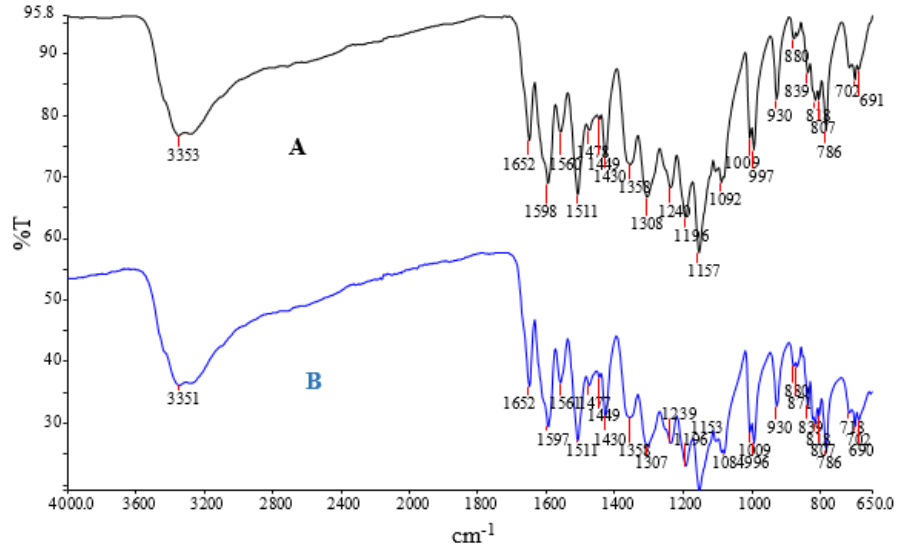
Şekil 43. A: Kuersetin standardına ait ve B: F31SA fraksiyonun UV spektrumu



Şekil 44. A: Kuersetin standardı ve B: F31SA fraksiyonuna ait kütle spektrumu



Şekil 45. A: Kuersetin standardı ve B: F31SA fraksiyonuna ait MS/MS spektrumu



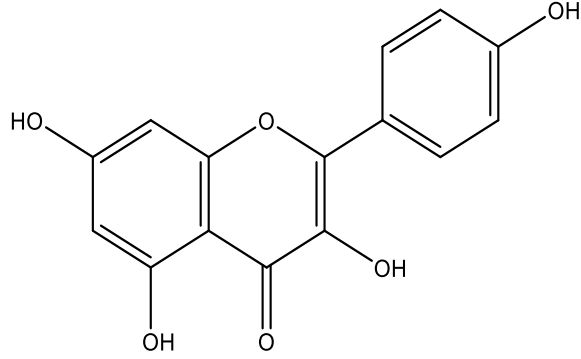
Şekil 46. A: Kuersetin standardı ve B: F31SA fraksiyonuna ait FT-IR spektrumu

Kuersetin standardı, sarı toz halde ve molekül ağırlığı 302,24 g/mol dür. IR (ν_{\max} / cm^{-1}) 3353-3200 (OH), 1652 (C=O), 1598-1511 Ar-halka, 1240-1092 (C-O) ve UV λ_{\max} 255; 370 nm dir. Negatif iyon modu ESI-MS-MS m/z : 300,65; 603,21 [M-H]⁻; fragmentleri m/z : 273,04 [M-H-CO]⁻; m/z : 229,01 [M-H-CO-CO₂]⁻, m/z 178,68 ^{1,2}[A]⁻; m/z 151,00 ^{1,2}[A-CO]⁻; m/z 121,00 ^{1,2}[B]⁻, MS/MS dir.

F31SA fraksiyonu, sarı toz halde IR (ν_{\max} / cm^{-1}) 3351-3200 (OH), 1652 (C=O), 1597-1511 Ar-halka, 1239-1084 (C-O), UV λ_{\max} 255,2; 371,6 nm. Negatif iyon modu ESI-MS-MS m/z : 300,79; 602,86 [M-H]⁻ fragmentleri m/z : 178,44 ^{1,2}[A]⁻; m/z 150,72 ^{1,2}[A-CO]⁻, MS/MS. Elde edilen veriler kuersetin standardıyla karşılaştırıldığında F31SA fraksiyonu kuersetine karşılık gelmektedir (Şekil 41-Şekil 46).

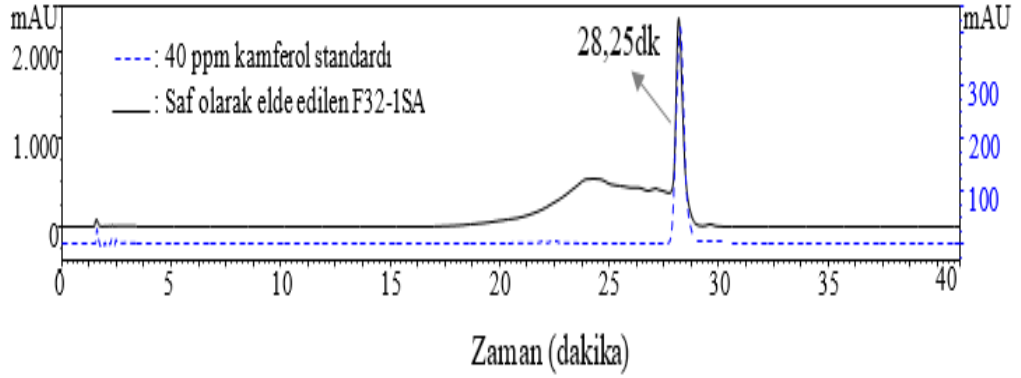
Literatürde yapılan bir çalışmada *C. chinensis* bitkisinin metanol ekstraktının fenolik bileşenlerini HPLC-DAD-ESI-MSⁿ yöntemi ve UV spektrumları da kullanılarak karakterize edilmiştir. Çalışmada kuersetin, kamferol ve izoramnetin bileşenleriyle birlikte yaklaşık 50 fenolik bileşeni ayırmışlardır. Elde edilen veriler ile benzer şekilde kuersetinin 250, 370 nm dalga boylarında maksimum absorpsiyon pikleri verdiğini ve [M-H]⁻ iyonu m/z : 301,04 iken MS/MS fragmentlerinin m/z : 273,042; 243,028; 229,00; 178,998; 151,004; 121,030 olduğu belirlenmiştir (Chen vd., 2015; Sathyadevi ve Subramanian, 2015; Sriseadka vd., 2012; Ye vd., 2005).

3.5.1.2. Safılaştırılan F32-1SA Fraksiyonu; Kamferol

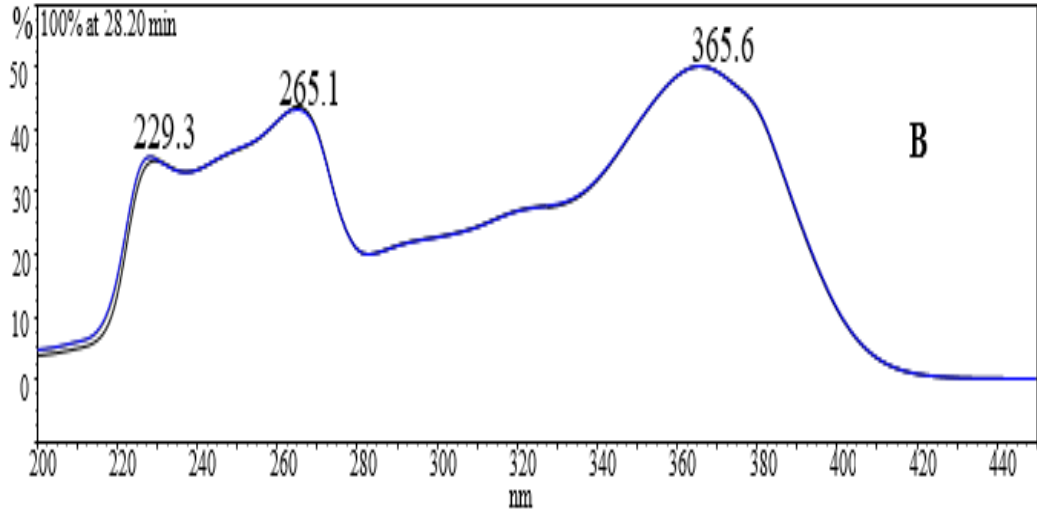
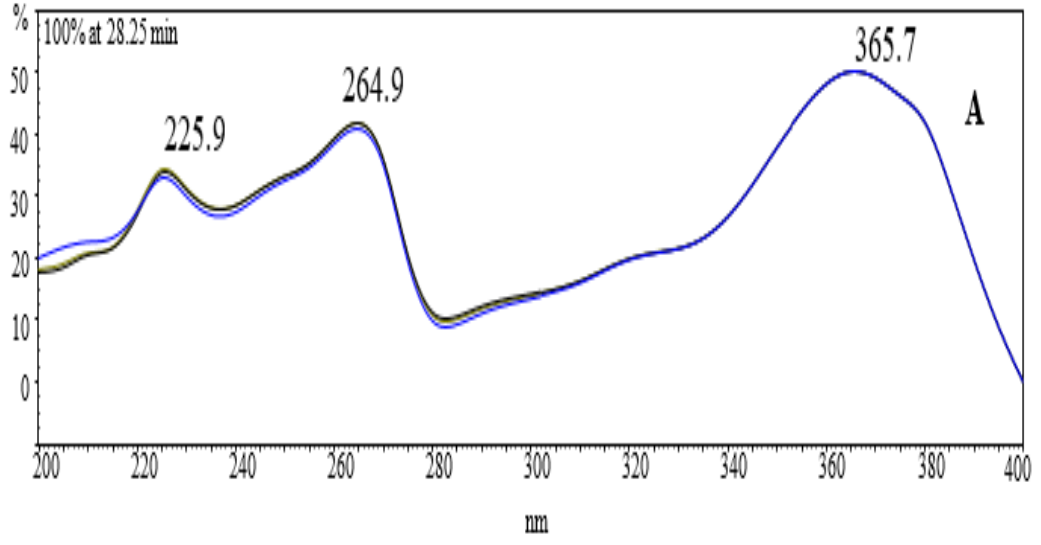


Şekil 47. Kamferol molekül yapısı

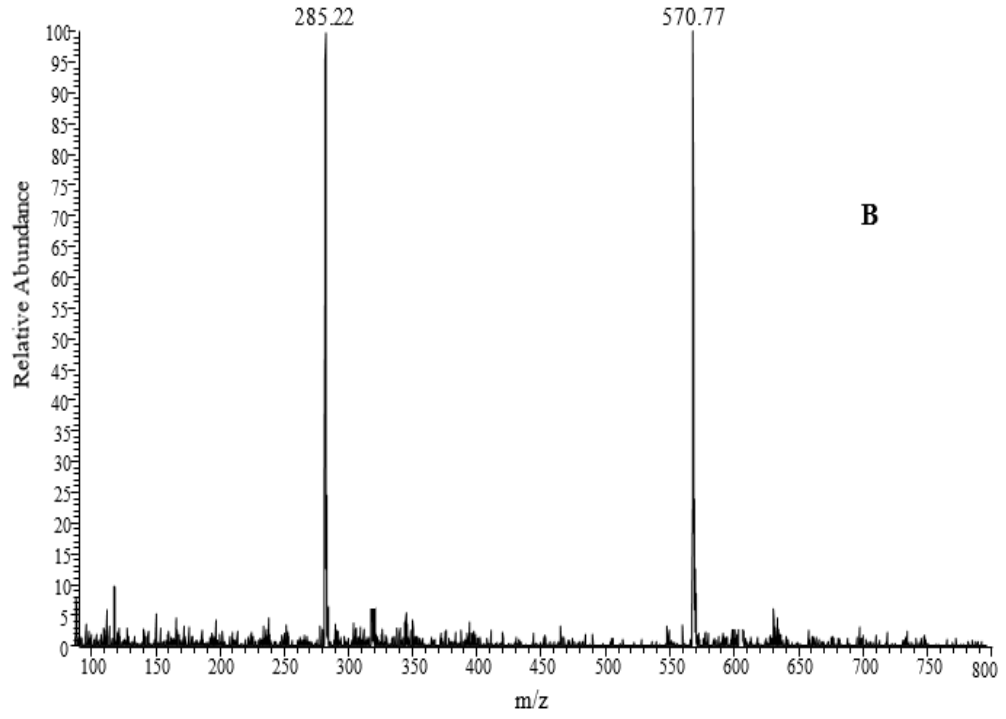
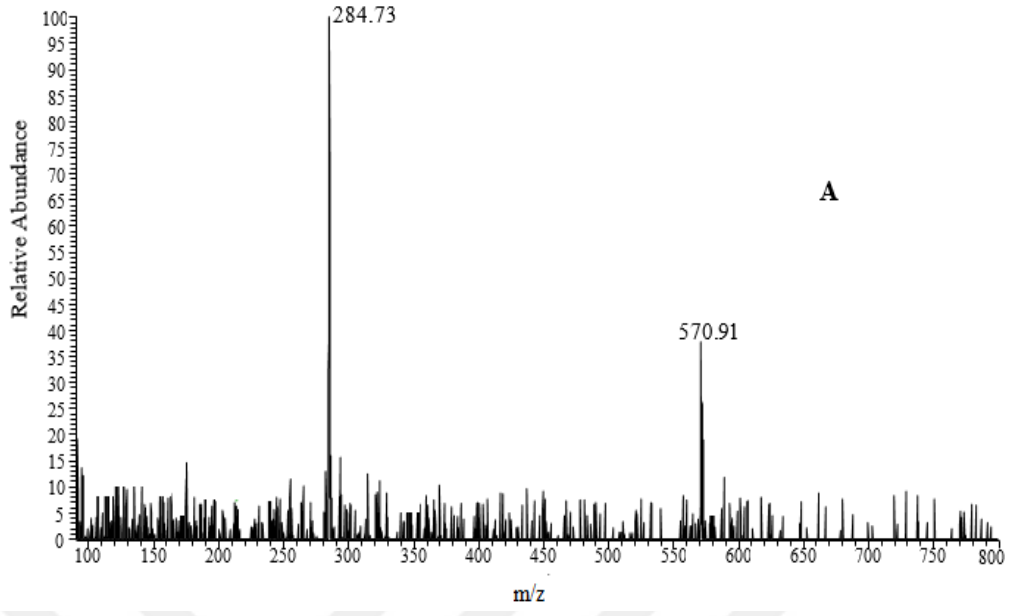
Kamferol standardıyla 32-1SA fraksiyonu karşılaştırıldığında, bu fraksiyonun kamferole karşılık geldiği gözlemlendi. Elde edilen veriler Şekil 48-52’de verildi.



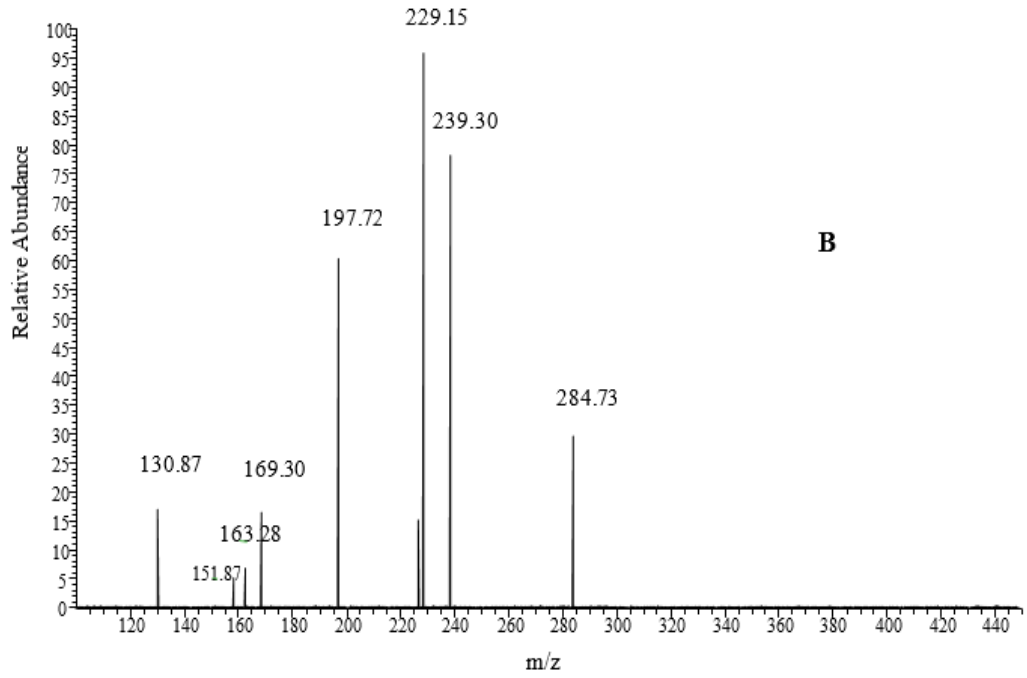
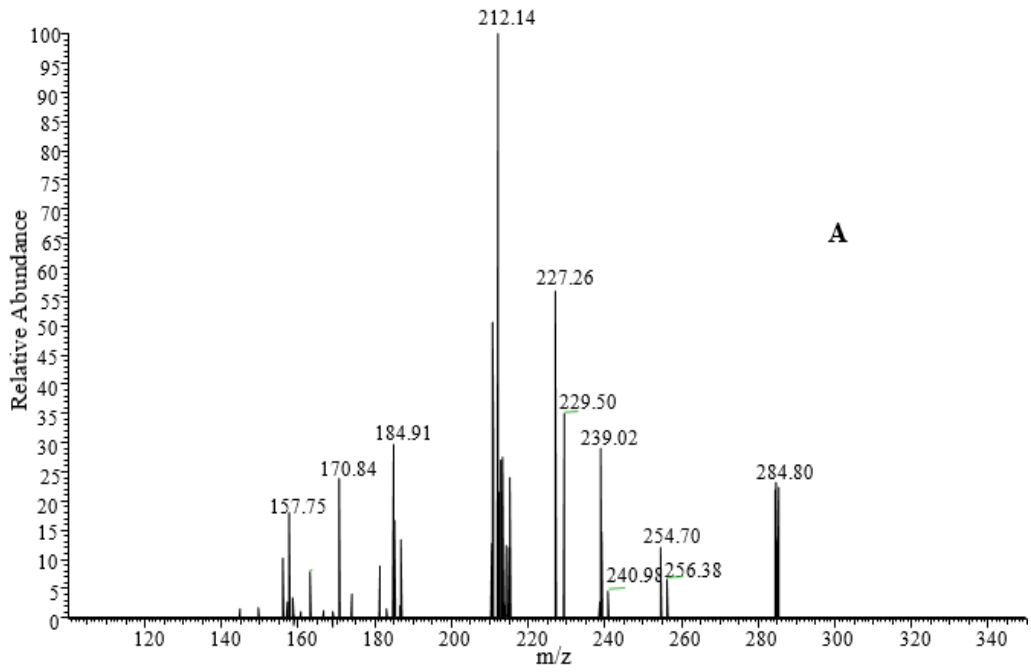
Şekil 48. Kamferol standardı ile F32-1SA fraksiyonunun karşılaştırılmasıyla elde edilen HPLC-DAD kromatogramı



Şekil 49. A: kamferol standardı ve B: F32-1SA fraksiyonuna ait UV spektrumu

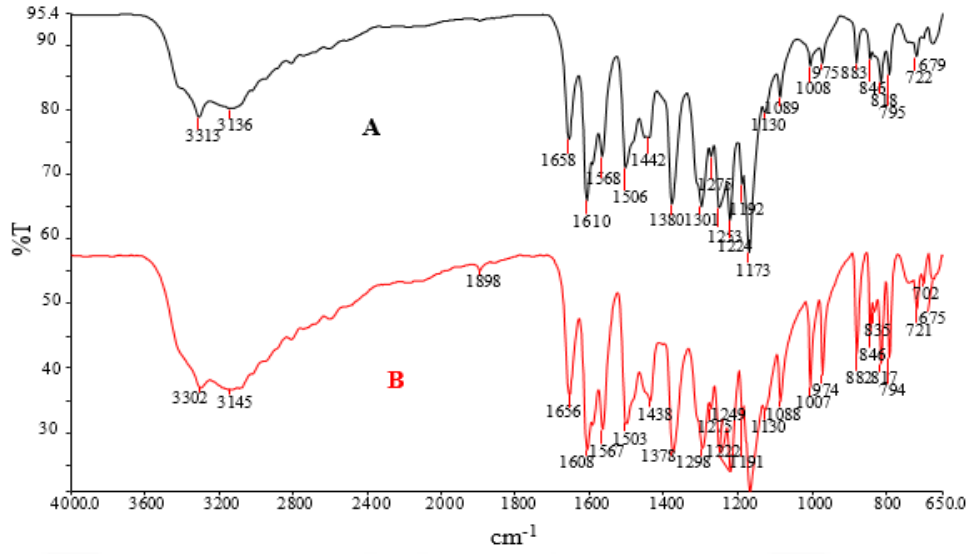


Şekil 50. A: Kamferol standardı ve B: F32-1SA fraksiyonuna ait kütle spektrumu



Şekil 51. A: Kamferol standardı ve B: F32-1SA fraksiyonuna ait MS/MS spektrumu

Ayrıca kamferol standardıyla saflaştırılmış F32-1SA fraksiyonunun FT-IR spektrumları karşılaştırıldı ve elde edilen veriler Şekil 51’de verildi.



Şekil 52. A: kamferol standardı ile B: F32-1SA fraksiyonunun FT-IR spektrumu

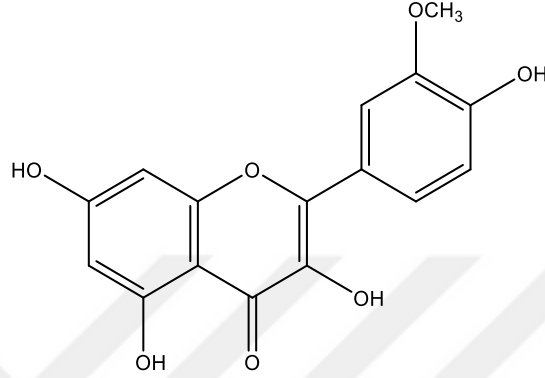
Kamferol standardı, sarı toz halde, molekül ağırlığı 286,24 g/mol'dür. IR (ν_{\max} / cm^{-1}) 3313-3000 (OH), 1658 (C=O), 1610-1506 Ar-halka, 1275-1173 (C-O); UV λ_{\max} 264,9; 365,7 nm'dir. Negatif iyon modu ESI-MS-MS m/z : 284,73; 570,91 [M-H]⁻; fragmentleri m/z : 256,18 [M-H-CO]⁻; 240,98 [M-H-CO₂]⁻; 239,02 [M-H-CO₂-H]⁻; 229,50 [M-H-2CO]⁻ MS/MS.

F32-1SA fraksiyonu, sarı toz halde, IR (ν_{\max} / cm^{-1}) 3302-3000 (OH), 1656 (C=O), 1608-1503 Ar-halka, 1298-1191 (C-O); UV λ_{\max} 265,1; 365,6 nm. Negatif iyon modu ESI-MS-MS m/z : 285,22; 570,77 [M-H]⁻; fragmentleri m/z : 239,30 [M-H-CO₂-H]⁻; 229,15 [M-H-2CO]⁻; 198,72 [M-H-C₂H₂O-CO₂]⁻; 151,87 ^{1,3}[A]⁻ MS/MS. Kamferol standardıyla F32-1SA fraksiyonunun UV, kütle, MS/MS ve FT-IR spektrumları karşılaştırıldığında F32-1SA fraksiyonunun yapısı kamferol olarak aydınlatıldı (Şekil 49-Şekil52).

C. chinensis bitkisinin, metanol ekstraktının fenolik bileşenlerinin HPLC-DAD-ESI-MSⁿ yöntemiyle karakterize edildiği bir çalışmada, benzer şekilde kamferolün 265 ve 366 nm dalga boylarında maksimum absorpsiyon pikleri verdiği belirlenmiştir. Yine benzer olarak [M-H]⁻ iyonu m/z : 285 ve MS/MS fragmentleri m/z : 239,035; 187,039; 143,050; 151,004 gözlenmiştir (Chen vd., 2015; Ye vd., 2005). Başka bir çalışmada ise *Padalum murex* bitkisindeki kamferol ve kuersetin fenolik bileşenleri izole edilerek karakterize edilmiştir. İzole edilen fenolik bileşenlerle standartların IR spektrumları

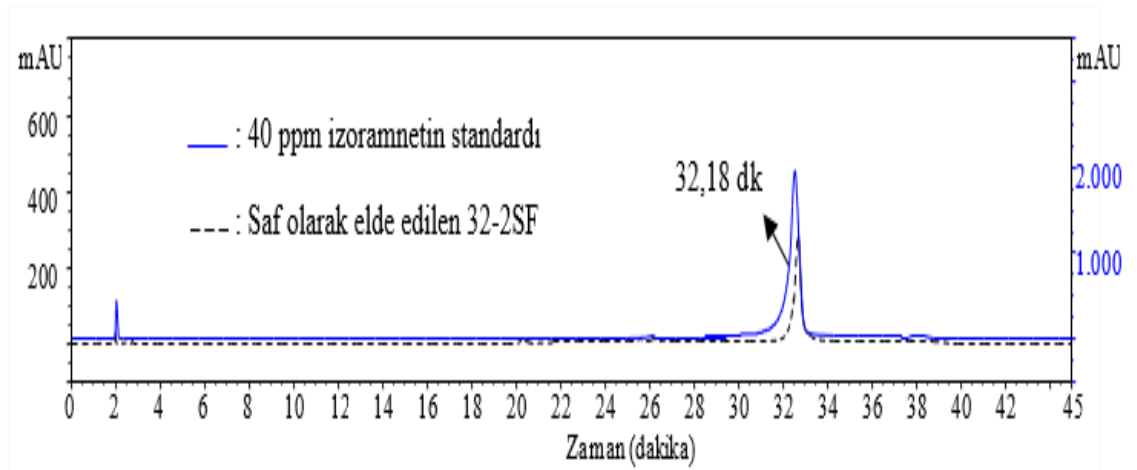
karşılaştırılmış ve kuersetin IR (v_{\max} / cm^{-1}): 3467 (O-H), 1679 (C=O), 1573-1412 (Ar-Halka), 2835 (C-H) şeklinde karakterize edilmiştir (Sathyadevi ve Subramanian, 2015; Sriseadka vd., 2012).

3.5.1.3. Saflaştırılan F32-2SF Fraksiyonu; İzoramnetin

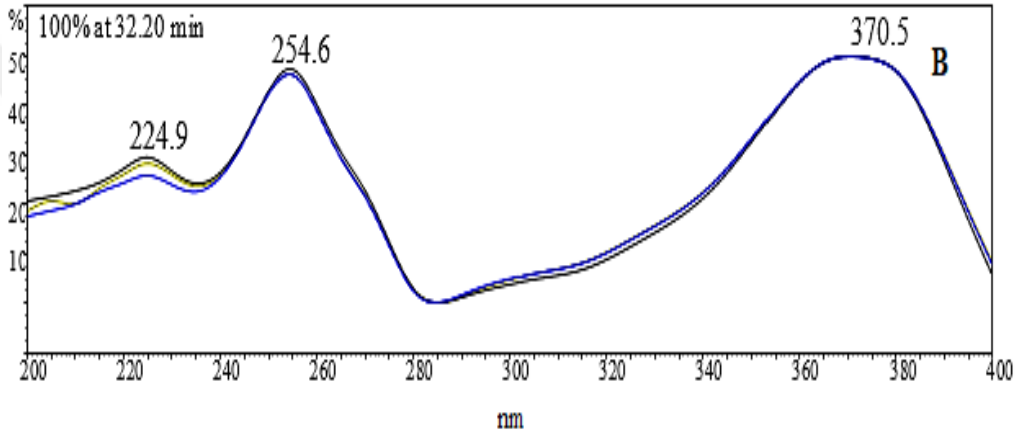
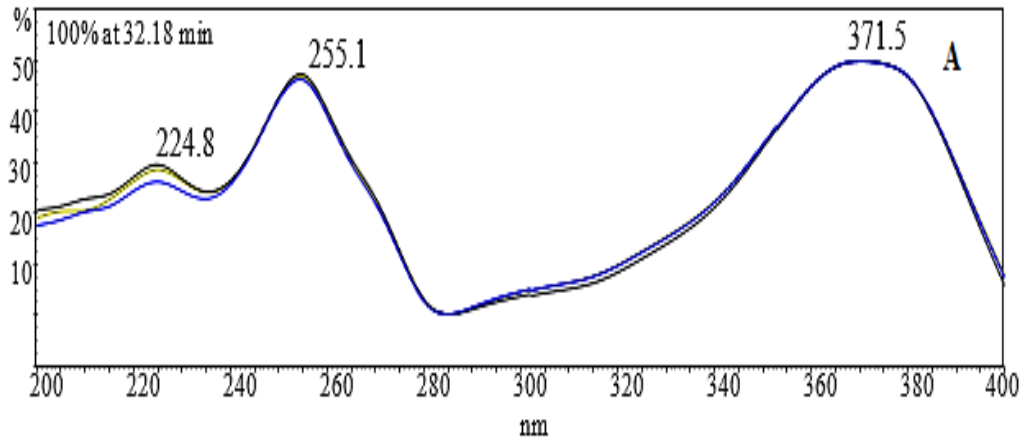


Şekil 53. İzoramnetinin molekül yapısı

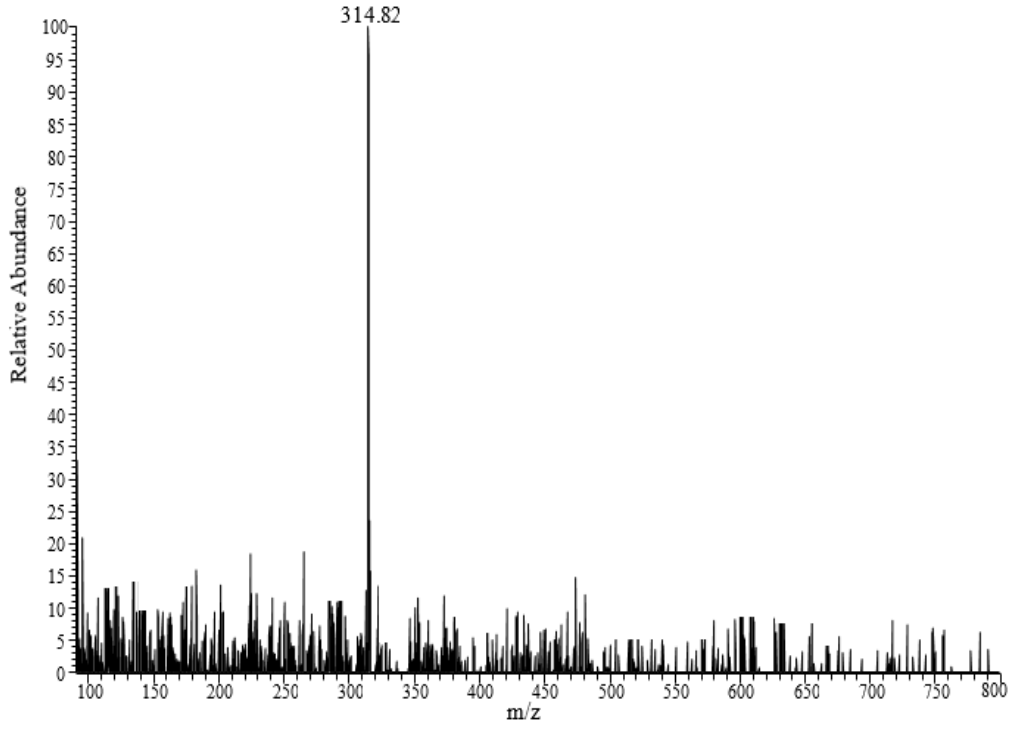
F32-2SF fraksiyonu için elde edilen veriler izoramnetin standardıyla karşılaştırıldığında izoramnetine karşılık gelmektedir. Saflaştırılan F32-2SF fraksiyonuyla izoramnetin standardının karşılaştırılmasıyla elde edilen kromatogram Şekil 53'te ve UV, MS, MS/MS ve FT-IR spektrumları Şekil 54- 58'de verildi.



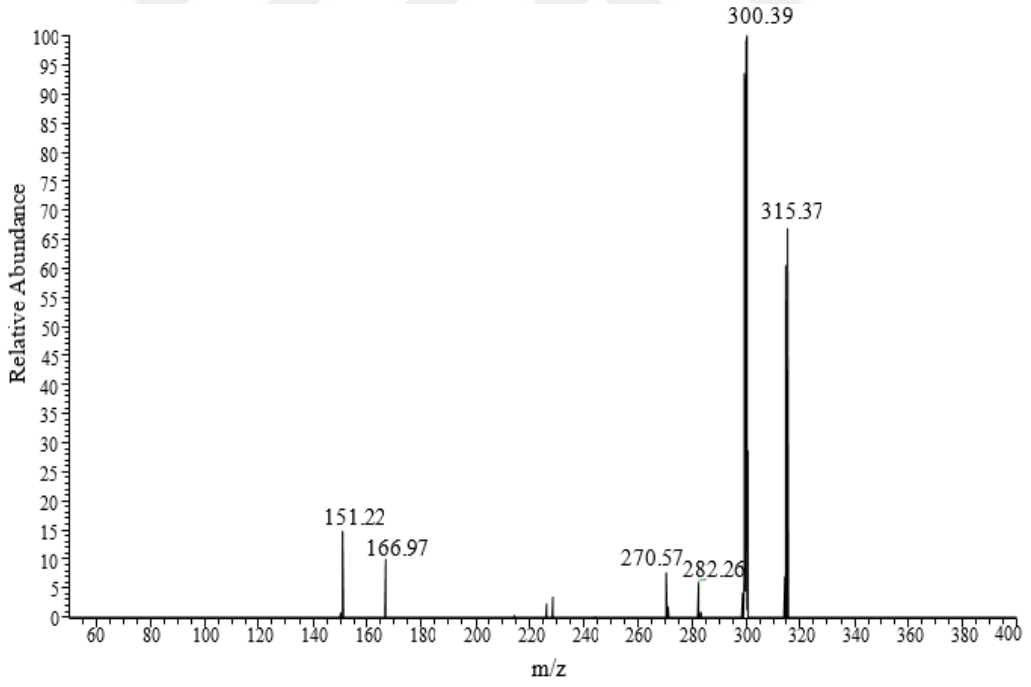
Şekil 54. İzoramnetin standardı ile F32-2SF fraksiyonunun karşılaştırılmasıyla elde edilen HPLC-DAD kromatogramı



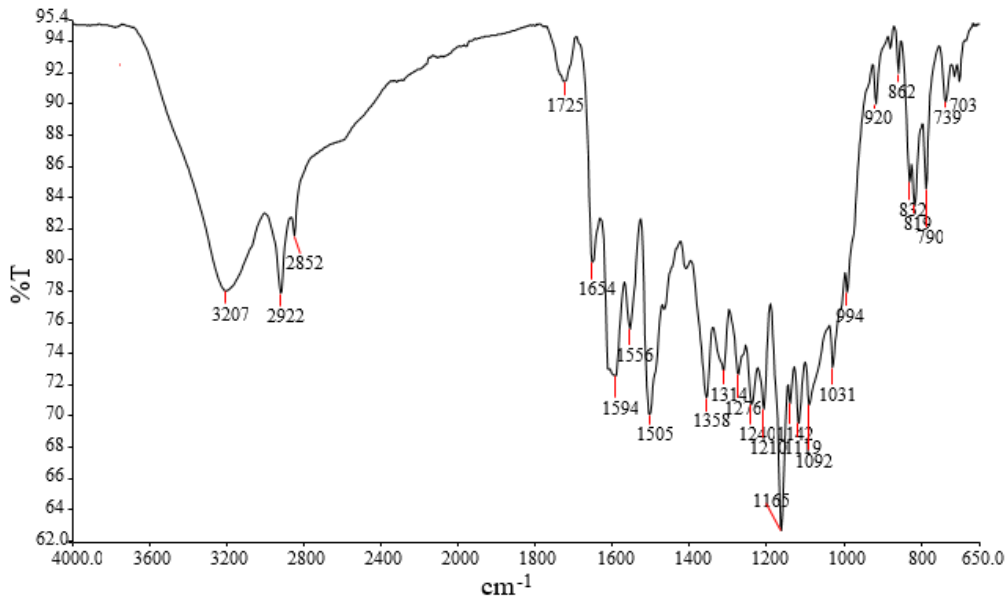
Şekil 55. A: İzoramnetin standardı ve B: F32-2SF fraksiyonuna ait UV spektrumu



Şekil 56. F32-2SF fraksiyonuna ait kütle spektrumu



Şekil 57. F32-2SF fraksiyonuna ait MS/MS spektrumu



Şekil 58. F32-2SF fraksiyonuna ait FT-IR spektrumu

İzorarnetin standardı, sarı toz halde, molekül ağırlığı 316,26 g/mol dür. UV λ_{\max} 255,1; 371,5 nm'dir. Saflaştırılmış 32-2SF fraksiyonu, sarı renkte toz halde, molekül ağırlığı 315,82 g/mol dür. IR (ν_{\max} / cm^{-1}): 3250-3000 (OH), 2922; 2852 (alifatik-CH), 1654 (C=O), 1594-1505 Ar-halka, 1276-1092 (C-O), UV λ_{\max} 254,6; 370,5 nm. Negatif iyon modu ESI-MS-MS $[\text{M}-\text{H}]^-$ iyonu m/z : 315 fragmentleri m/z : 300,39 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3]^-$; m/z : 282,26 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3-\text{OH}]^-$; m/z : 270,57 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3-\text{COH}]^-$; m/z : 151,22 $^{1,3}\text{A}^-$, MS/MS (Şekil 54-Şekil 58).

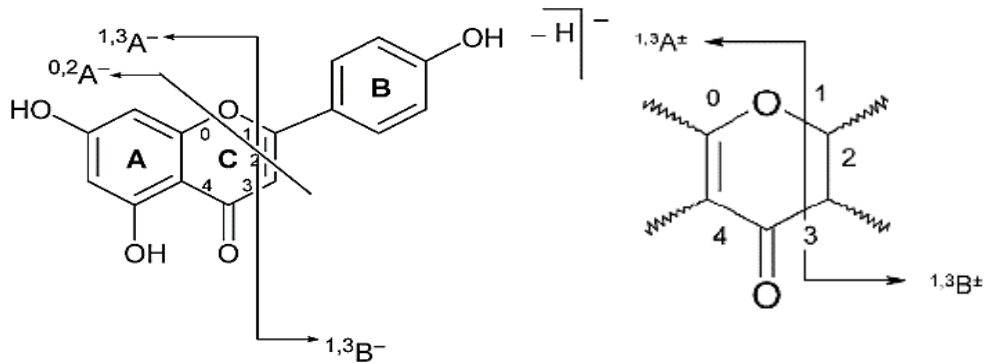
Chen vd., (2015) yaptıkları çalışmada *Pollen Typhae* bitkisinin % 60 sulu metanol ekstraktı kullanmışlardır. Elde edilen ekstrakt LC-MS/MS ile analiz edilmiş ve 15 tane bileşik karakterize etmişlerdir. Bu çalışmaya göre izoramnetin $[\text{M}+\text{H}]^+$ iyonu m/z : 316,06 ve MS/MS m/z : 301,032, 272,029, 256,034, 164,009, 151,004, fragmentleri vermiştir. Yine başka bir çalışmada *C. chinensis* bitkisinin metanol ekstraktının fenolik bileşenlerini UV spektrumlarını ve LC-MS/MS yöntemlerini kullanarak karakterize etmişlerdir. Elde edilen verilere göre izoramnetin UV λ_{\max} 254, 370 nm'de maksimum absorpsiyon pikleri verirken, $[\text{M}-\text{H}]^+$ iyonu m/z : 316,06 iken MS/MS fragmentleri ise m/z : 300,'dür (Cao vd., 2009; Chen vd., 2015; Ye vd., 2005). Başka bir çalışmada ise $[\text{M}-\text{H}]^-$ iyonu m/z : 315 iken fragmentleri 300; 271; 255 olarak bulunmuştur (Hossain vd., 2010; Peng vd., 2009). Elimizde izoramnetin standardı kalmadığından karakterizasyon için karşılaştırma literatür verileriyle yapıldı. İzorarnetin standardının

kütle ve IR verileri 32-2SF fraksiyonu ile karşılaştırıldığında fraksiyon izoramnetine karşılık gelmektedir.

Literatür verileriyle kendi çalışmamızı karşılaştırdığımızda *C. campestris* bitkisinin preparatif HPLC-DAD ile yapılan izolasyon çalışmaları sonucu saf olarak elde edilen F31SA, F32-1SA ve F32-2SF fraksiyonlarının kromatografik olarak alıkonma zamanları ve UV spektrumları, FT-IR ve MS/MS spektrumları ilgili standartların alıkonma zamanı, UV spektrumları, FT-IR ve MS/MS spektrumlarıyla ve literatür verileriyle karşılaştırılarak sırasıyla kuersetin, kamferol ve izoramnetin olarak aydınlatıldı. Tablo 12’de bu flavonollere ait negatif iyon modundaki MS/MS spektrumlarının fragmentleri, Şekil 59’da ise flavonoidlerin C halkasının parçalanmasıyla oluşan örnek fragmentler verildi (Troalen vd., 2014). Elde edilen verilerle literatür verileri karşılaştırılmış ve birbiriyle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Tablo 12. Kuersetin, kamferol ve izoramnetin standartlarının negatif iyon modundaki fragmentleri

Fragment (m/z)	Kuersetin	Kamferol	İzoramnetin
[M-H] ⁻	301	285	315
[M-H-CO] ⁻	273	257	-
[M-H-CO-CO ₂] ⁻	229	-	-
[M-H-CO ₂] ⁻	257	241	-
[M-H-CH ₃] ⁻	-	-	300
[M-H-CH ₃ -OH] ⁻	-	-	282
[M-H-CH ₃ -COH] ⁻	-	-	270
^{1,2} A ⁻	179	179	179
^{1,3} A ⁻	151	151	151



Şekil 59. Flavonoidlerin C halkasının bağlarının bölünmesiyle oluşan fragmentasyon parçaları

3.6. Bitki Ekstraktlarında Spektrofotometrik Toplam Fenolik Madde Tayini

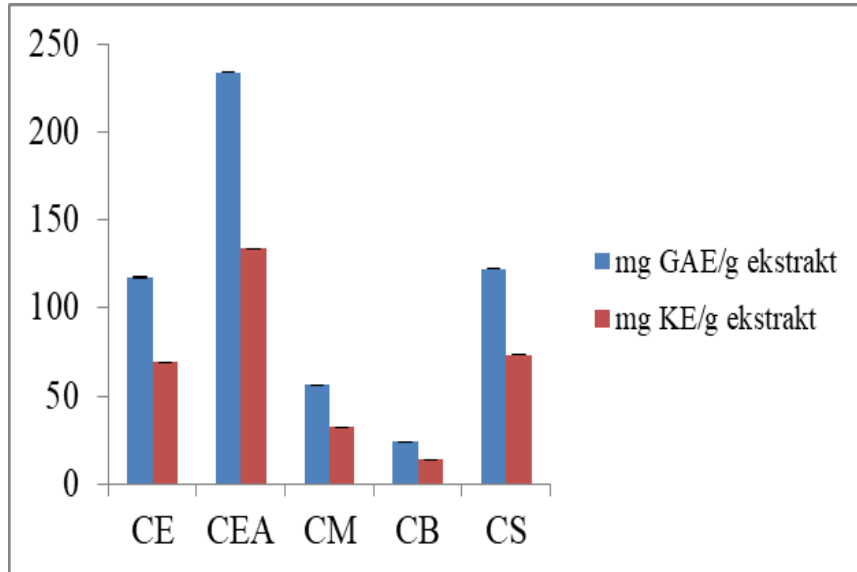
C. campestris bitkisinin dietil eter, etil asetat, metanol, bütanol ve sulu ekstraktlarının spektrofotometrik toplam fenolik madde tayini sonuçları gallik asit ve kuersetin eşdeğeri olarak Tablo 13'te verildi. Toplam fenolik madde tayininde standart olarak gallik asit ve kuersetin kullanıldı. Gallik asit ve kuersetin için doğrusal kalibrasyon değerleri elde edildi ($R^2_{\text{gallik asit}}=0,999$; $R^2_{\text{kuersetin}}=0,999$). Sonuçlar, mg GAE /g ekstrakt ve mg KE /g ekstrakt cinsinden verildi.

Tablo 13. *C. campestris* bitkisinin ekstraktlarında spektrofotometrik toplam fenolik madde tayini

No	Ekstraktlar	*mg GAE/g ekstrakt	**mg KE/g ekstrakt
1	CE	117,46±0,01	69,11±0,02
2	CEA	233,76±0,03	133,88±0,03
3	CM	56,34±0,05	32,34±0,03
4	CB	23,951±0,02	14,02±0,01
5	CS	122,32±0,03	73,33±0,02

*: mg gallik asit eşdeğeri/ g ekstrakt; **: mg kuersetin eşdeğeri/ g ekstrakt

Verilerin daha anlaşılır olması için her bir ekstraktın toplam fenolik madde miktarlarının dağılımları Şekil 60'da grafik halinde gösterildi.



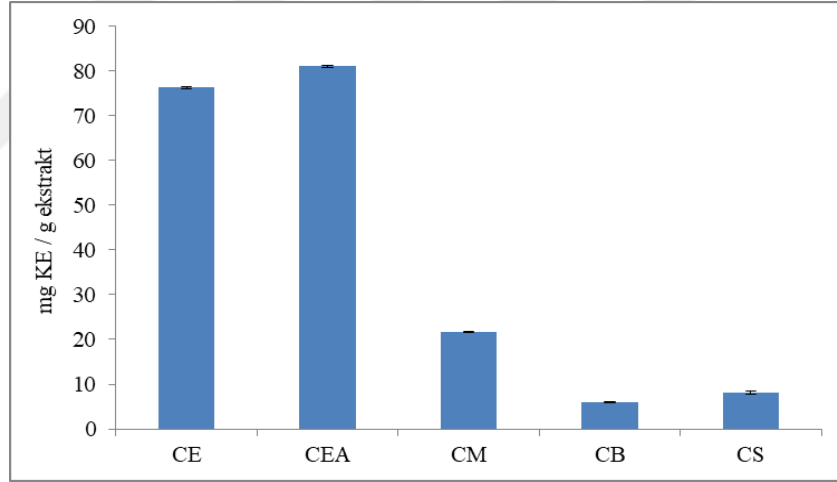
Şekil 60. *C. campestris* bitkisinin ekstraktlarında spektrofotometrik toplam fenolik madde tayininin gallik asit ve kuersetin eşdeğeri cinsinden sonuçları

3.7. Bitki Ekstraktlarında Spektrofotometrik Toplam Flavonoid Tayini

C. campestris bitkisinin dietil eter, etil asetat, metanol, bütanol ve sulu ekstraktlarının spektrofotometrik toplam flavonoid madde tayini sonuçları kuersetin eşdeğeri olarak Tablo 14' te, grafiksel olarak Şekil 61'de verildi. Kuersetin için doğrusal kalibrasyon değeri elde edildi ($R^2_{\text{kuersetin}}=0,998$). Burada birim olarak mg KE/g ekstrakt kullanıldı.

Tablo 14. *C. campestris* bitkisinin ekstraktlarında spektrofotometrik toplam flavonoid miktarının kuersetin eşdeğeri cinsinden sonuçları

No	Ekstraktlar	mgKE/g ekstrakt
1	CE	68,31±0,30
2	CEA	81,11±0,28
3	CM	21,67±0,20
4	CB	5,96±0,12
5	CS	8,14±0,30

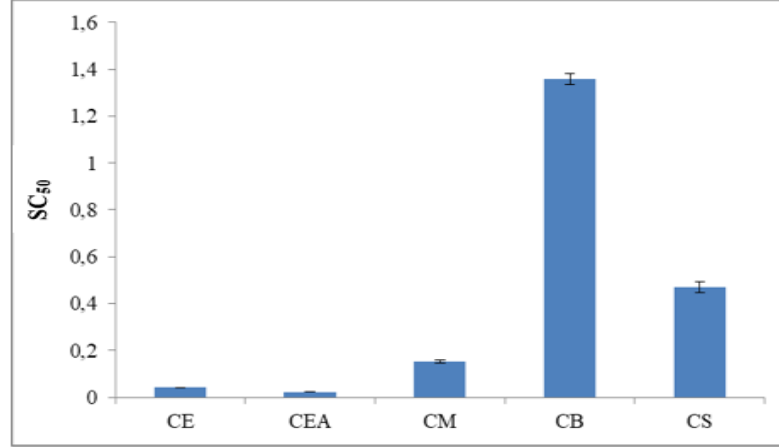


Şekil 61. *C. campestris* bitkisinin ekstraktlarında toplam flavonoid miktarlarının kuersetin eşdeğeri cinsinden sonuçları

3.8. Ekstrakt, Standart ve Saflaştırılan Fraksiyonların DPPH• radikal Temizleme Aktivitelerinin Hesaplanması

C. campestris bitkisinin ekstraktlarının ve saflaştırılan fraksiyonlarının DPPH• serbest radikal temizleme aktivitesi sonuçları SC_{50} değerleri cinsinden hesaplandı. DPPH• serbest radikal temizleme tayini için standart bileşik olarak gallik asit, kuersetin, kamferol ve izoramnetin kullanıldı. Dört standart için de üstel kalibrasyon grafikleri ile

uyumlu sonuçlar elde edildi ($R^2_{\text{gallik asit}}=0,996$; $R^2_{\text{kuersetin}}=0,993$; $R^2_{\text{kamferol}}=0,995$; $R^2_{\text{izoramnetin}}=0,994$). Ekstraktların DPPH• serbest radikal temizleme tayini sonucu elde edilen veriler Şekil 62’de grafik olarak gösterildi.



Şekil 62. *C. campestris* bitkisinin ekstraktlarının DPPH• radikali temizleme aktiviteleri

Fortis ve ACE kolon kullanılarak saflaştırılan fraksiyonların DPPH• serbest radikal temizleme aktiviteleri de ekstraktlarla aynı yöntem kullanılarak belirlendi. Elde edilen sonuçlar hem standartlarla hem de ekstraktlarla karşılaştırıldı. Saflaştırılan fraksiyonların ve standartların DPPH• radikal temizleme aktivite sonuçları Tablo 15’te verildi.

Tablo 15. Ekstraktlar, standartlar ve saflaştırılan fraksiyonlara ait DPPH temizleme aktiviteleri

Ekstrakt, standart ve fraksiyonlar	DPPH-SC ₅₀ (µg/mL)
CE	41,1±1,2
CEA	23,0±1,0
CM	153,4±5,1
CB	1359,2±22,5
CS	470,2±2,3
Gallik asit (standart)	3,0± 0,1
Kuersetin (standart)	2,1± 0,0
Kamferol (standart)	5,2± 0,3
İzoramnetin (standart)	6,1± 0,3
F31SA (Kuersetin)	4,1± 0,2
F32-1SA (Kamferol)	4,0± 0,4
F32-2SF (İzoramnetin)	6,9± 0,1

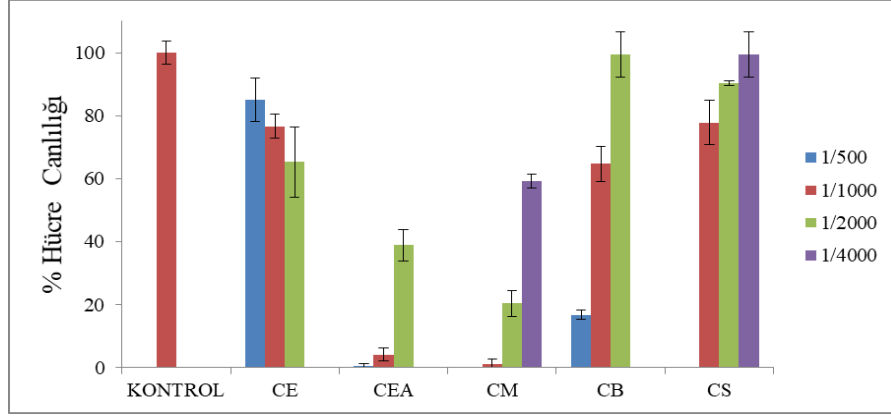
3.9. Bitki Ekstrak ve fraksiyonlarının Antikanser Aktivite Sonuçları

Beş farklı çözücü ortamında hazırlanan ekstraktların SNU-398 karaciğer kanseri hücre hattı üzerinde toksik etkileri MTT yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Sonuçlar CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) cinsinden hesaplandı. Mosmann vd. (1983)'ın yaptığı çalışmada $CC_{50}<30$ ise antikanser aktiviteden söz edilebileceğinden bahsedilmektedir. Burada etil asetat ve metanol ekstraktlarının CC_{50} değerlerine bakıldığında bu ekstraktların SNU-398 karaciğer kanser hücre hatları üzerinde sitotoksitelerinin yüksek olduğu; dietil eter, bütanol ve su ekstraktlarının ise bu kanser hücre hattı üzerinde sitotoksite oluşturmadığı görüldü (Tablo 16).

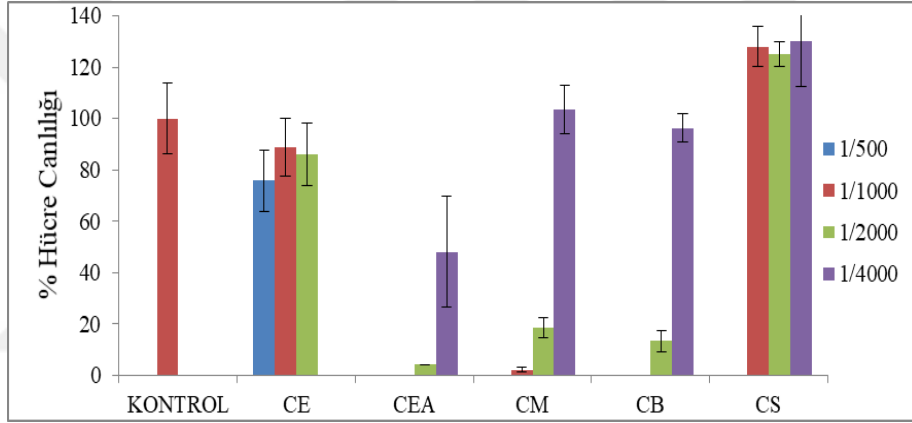
Tablo 16. *C. campestris* ekstraktlarının SNU-398 karaciğer kanseri hücre hattı üzerindeki etkisi (MTT yöntemi)

Ekstraktlar ve ilaç	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
CE	104,9 \pm 3,4
CEA	19,6 \pm 1,0
CM	18,7 \pm 1,9
CB	39,5 \pm 1,1
CS	145,2 \pm 13,3
Sisplatin	3,6 \pm 1,1

Ekstraktların MTS yöntemi kullanılarak HepG2 karaciğer kanseri ve SK-OV-3 yumurtalık kanseri hücre hatları üzerindeki etkisi, kullanılan ekstrakt derişimlerine karşılık elde edilen % hücre canlılığı cinsinden hesaplandı. Herbir ekstraktın, dört farklı derişimine karşılık ölçülen % hücre canlılıkları bar grafiği şeklinde Şekil 63-64'te verildi.

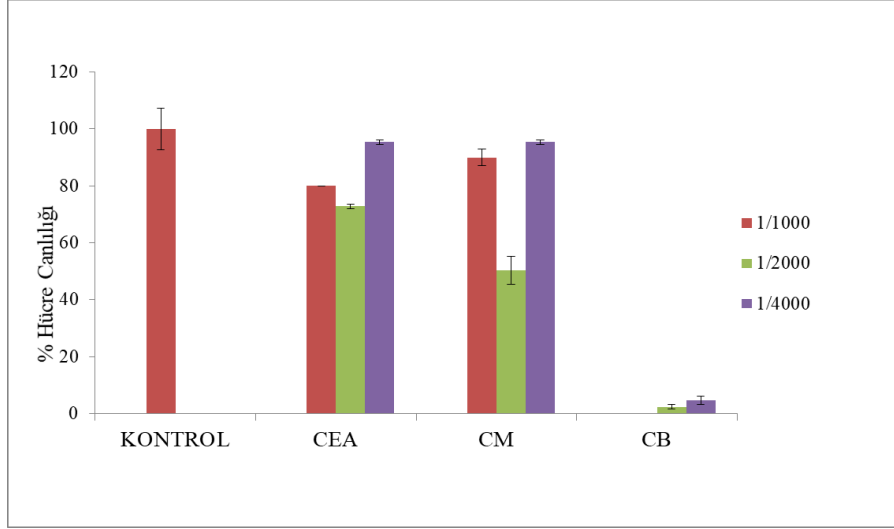


Şekil 63. Bitki ekstraktlarının MTS yöntemi kullanılarak HepG2 kanser hücre hattı üzerine etkisi (CE için 18 mg/mL, CEA ve CB için 43 mg/mL, CM ve CS için 86 mg/mL başlangıç derişimlerinde çalışıldı)



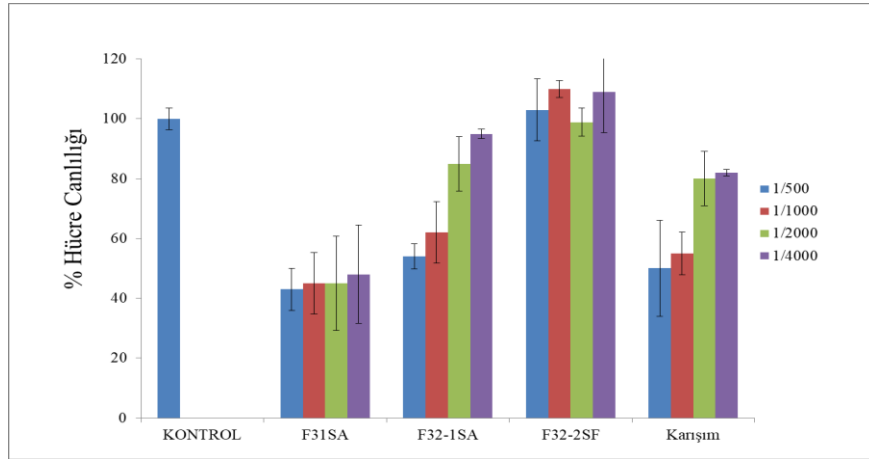
Şekil 64. Bitki ekstraktlarının MTS yöntemi kullanılarak SK-OV-3 kanser hücre hattı üzerine etkisi (CE 18 mg/mL, CEA, CM, CB, CS için 86 mg/mL başlangıç derişimlerinde çalışıldı)

SNU-398, HepG2 ve SK-OV-3 hücre hatlarında sitotoksik etki gösteren bitki ekstraktlarının (CEA, CM ve CB) sağlıklı insan hücreleri üzerinde sitotoksik olup olmadığını belirleyebilmek için sağlıklı insan fibroblast hücre hattı (hDFs) kullanıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 65'te verildi.

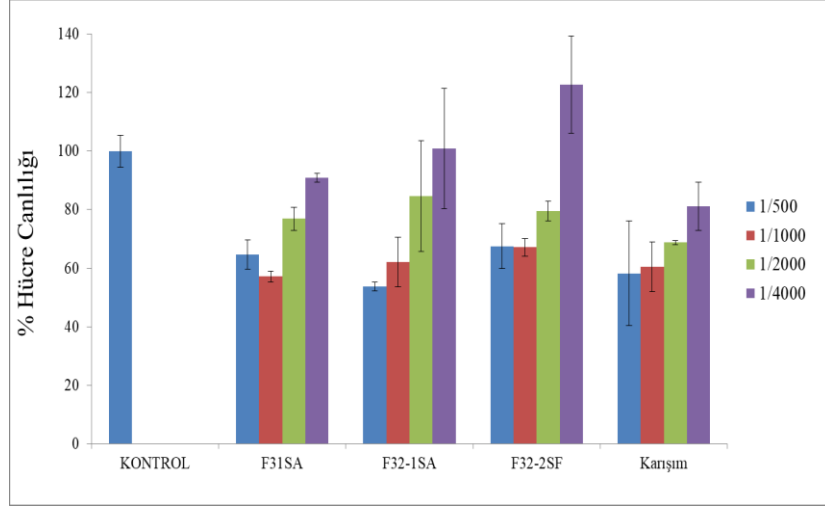


Şekil 65. Bitki Ekstraktlarının MTS yöntemiyle hDFs hücre hattı üzerindeki etkisi (HepG2 hücre hattı için CEA ve CB için 43 mg/mL, CM için 86 mg/mL başlangıç derişimlerinde çalışıldı)

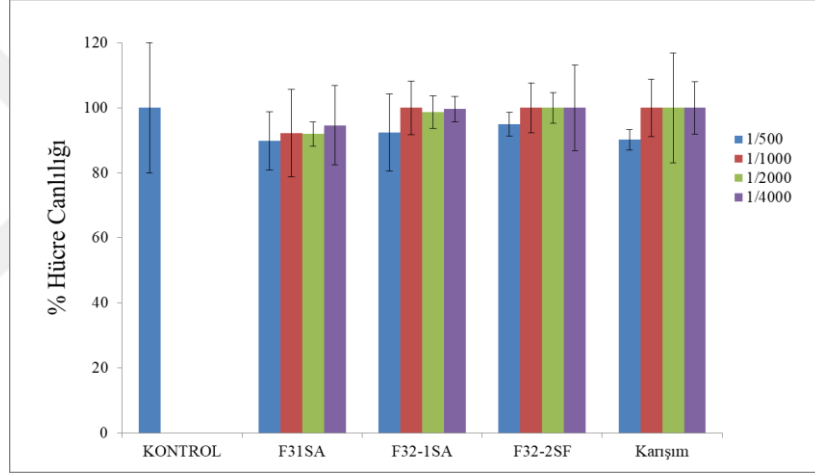
Ayrıca saflaştırılan fraksiyonların ve bu fraksiyonların bitkinin etil asetat ekstraktında bulunma oranlarına göre oluşturulduğu ‘karışım’ diye kodlanan fraksiyonun hDFs, HepG2 ve SK-OV-3 hücre hatları üzerinde sitotoksik etkilerinin olup olmadığı MTS yöntemiyle belirlendi. Elde edilen sonuçlar herbir ekstraktın dört farklı derişimine karşılık gelen % hücre canlılığı olarak bar grafiği şeklinde Şekil 66-Şekil 68’de verildi.



Şekil 66. Fraksiyonların MTS yöntemiyle HepG2 hücre hattı üzerindeki etkisi (Tüm fraksiyonların başlangıç derişimleri 0,02 mg/mL’dir)



Şekil 67. Fraksiyonların MTS yöntemiyle SK-OV-3 hücre hattı üzerindeki etkisi (Tüm fraksiyonların başlangıç derişimleri 0,02 mg/mL'dir)



Şekil 68. Fraksiyonların MTS yöntemiyle hDFs hücre hattı üzerindeki etkisi (Tüm fraksiyonların başlangıç derişimleri 0,02 mg/mL'dir)

4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

4.1. *C. campestris* Bitkisinden Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu

Nemsiz ortamda ve direkt güneş almadan bütün olarak kurutulan *C. campestris* bitki örneği parçalayıcı ile toz haline getirildi. Bitkilerden flavonoidlerin ekstraksiyonunda kurutulmuş bitki örnekleri kullanmak daha elverişlidir. Çünkü yaş bitki örneklerinden flavonoidleri ekstrakte ederken enzimlerin etkisini önlemek gerekir. Enzimler flavonoid glikozitleri ve benzer bileşikleri hidrolizlerler (Guliyev ve Harmandar, 2003). Kuru bitki örneği yağlı ve mumsu kısımları uzaklaştırmak için önce kloroformla ekstrakte edildi. Kloroform fazı süzülerek ortamdaki uzaklaştırıldı. Bitki örneklerindeki fenolik bileşiklerin sıcaklığa bağlı olarak bozunmasına engel olmak için ekstraksiyon düşük sıcaklıkta (40°C) gerçekleştirildi (Makroni ve Madani, 2016). Ekstraksiyon, her bir çözücü ile 3 kez ve her seferinde 2 saat süreyle uzun ekstraksiyon süresince gerçekleştirildi.

Ekstraksiyonda çözücü olarak geniş polarite aralığında dietil eter, etil asetat, metanol, bütanol ve su kullanıldı. Ekstraksiyonda kullanılan çözücü ve çözücünün polaritesi bitki örneklerinden fenolik bileşenlerin ekstraksiyonunda, ekstrakt verimini etkilemektedir (Papoutsis vd., 2016). Ekstraksiyonun verimli bir şekilde yapılabilmesi için fenolik bileşiklerin çözücü içindeki çözünürlüğü ve yapısı bozunmadan kararlı bir şekilde kalması çok önemlidir. Fenolik bileşikler için en çok tercih edilen çözücü metanoldür, çünkü bitki örneklerindeki fenolik bileşikler çoğunlukla metanolde çözünebilir ve bu çözücü ortamında yapıları bozunmadan kararlı olarak kalabilirler (Yao vd., 2004; Dmitrienko vd., 2012; Makroni ve Madani, 2016; Sukeksi ve Sarah, 2016). Flavonoidlerin ekstraksiyonu için çoğunlukla dietil eter ve etil asetat kullanılırken, fenolik asitler ve şeker bağlı fenolik bileşikler için ise su tercih edilir.

Bitkilerdeki fenolik bileşikler geniş polarite aralığında bulunduğundan bitkideki fenolik içeriği ortaya çıkarmak için tek çözücü ile ekstraksiyon yeterli olmayabilir. Bu nedenle, *C. campestris* bitkisinden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonuyla bitkinin fenolik içeriğini düzgün bir şekilde aydınlatmak için beş farklı ekstraksiyon çözücüsü kullanıldı. Elde edilen ekstraktların çözücüleri konsantratörde 40°C'de kuruluğa kadar

uçuruldu ve ekstraktlar deneylerin hiçbir aşamasında daha yüksek sıcaklığa maruz bırakılmadı. Elde edilen bu ekstraktlarda en yüksek verim sulu fazda %30 olarak elde edilirken en düşük verim ise etil asetat ekstraktında %1,93 olarak elde edildi (Tablo 3).

Çalışmada, ekstraksiyonda kullanılan ve dietil eter, etil asetat gibi diğer zclere göre apolar özellik gösteren zclerin ekstrakt verimleri daha düşükken, metanol, su gibi polar zclerin ekstrakt verimleri daha yüksek bulundu. Bu sonuca göre *C. campestris* bitkisinin polar özellik gösteren bileşenleri daha çok içerdiği söylenebilir. Ayrıca sulu fazın ekstrakt veriminin en yüksek olması, suda iyi znen şeker bağlı fenolik bileşiklerin de bitkide olabileceğini göstermektedir. Ayrıca suyun tek üzücü olarak kullanıldığı yöntemlerde yüksek oranda organik asitler, znr proteinler ve şekerler içeren ekstrakt elde edilir. Literatürde yapılan çalışmalarda *Cuscuta*'nın farklı türlerinin yapısında fazlaca miktarda şeker bağlı flavonoidler ve lignanların olduğu rapor edilmiştir. Lignanlarda fenolik bileşikler grubundadır ve özellikle şeker bağlı formlarının suda znrlkleri yüksektir. Çalışmamızda sulu fazda daha çok bulunan ve elimizde standartları olmadığı için yapısını aydınlatamadığımız ancak rutin standardı civarında elüe olan pek çok bileşik mevcuttur. Bu bileşiklerin şeker bağlı flavonoid, lignan veya UV-Vis bölgede tespit edilemeyen bileşenler olabileceği ve sulu fazın da ekstrakt veriminin bu yüzden en yüksek çıktığı söylenebilir (şekil 27, Tablo 11.)

4.2. Fenolik Bileşiklerin Analizinde Kullanılacak HPLC-DAD Sistemi için Metot Optimizasyonu

HPLC-DAD sistemi kullanılarak 20 standart fenolik bileşiğin analizini yapabilmek için uygun pik znrlkleri ile 60 dakikada analizler gerçekleştirilecek şekilde optimize edildi (Tablo 7 ve şekil 21). Kalibrasyon grafiklerinin regresyon denklem parametreleri eğim (m), kesme noktası (c), LOD ve LOQ değerleri Tablo 7'de verildi. 20 fenolik standardın kalibrasyonundan da doğrusal cevaplar ($R^2 \geq 0,999$) elde edildi. 0,5 mg/L derişimdeki standart karışımın alıkonma zamanlarının ve pik alanlarının varyasyon katsayısı (CV) ok düşük olması yöntemin tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğunu göstermektedir. Alıkonma zamanlarının varyasyon katsayısı 0,7'nin altında iken pik alanlarının varyasyon katsayısı ise 0,9'un altındadır.

Metodun duyarlılığı LOD (0,001-0,013 mg/L) ve LOQ (0,003-0,040 mg/L) bakımından oldukça yüksek bulundu. Bütün standartlar için oldukça düşük dedeksiyon limitleri elde edildi. Bu da az miktarda analit için dedektörün yüksek cevap verdiği anlamına gelmektedir. Tüm standartların içinde protokatekuik asit en yüksek LOD ve LOQ değerlerine sahip olduğu gözlemlendi. Değerler sırasıyla 0,013 mg/L ve 0,040 mg/L dir. Standartların gün içi tekrarlanabilirliği de oldukça düşük varyasyon katsayısı değerleriyle kabul edilebilir aralıkta, yüksek tekrarlanabilirlikte bulundu (Tablo 7). Yöntemin seçiciliği 20 fenolik standart karışımın iyi bir şekilde ayrılması için, kararlı kolon sıcaklığında en uygun kolon ve ayırım için uygun gradiyent elüsyon ve çözücüler ile birlikte uygun dedeksiyon aralığı kullanılarak belirlendi. Ayrıca seçici kromatografik ayırma ve dedeksiyonun yanı sıra örnek hazırlama aşamasında da *C. campestris*'teki fenolik bileşikler ekstre edebilmek için seçici koşullar kullanıldı. Bu veriler, yöntemin sağlam ve tekrarlanabilir olduğunu; ayrıca bitki ekstraktlarındaki fenolik bileşenleri analiz edebilmek için yeterli duyarlılıkta olduğunu göstermektedir.

4.3. *C. campestris* Bitkisinden Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonunun Geri Kazanımının Belirlenmesi

Sirincik asit, *o*-kumarik asit ve apigenin standartları ilave edilen *C. campestris* bitkisi beş farklı ekstraksiyon çözücüsü kullanarak '2.3. *C. campestris* bitkisinden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu' ana başlığında belirtilen aynı ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu. Elde edilen ekstraktlardaki üç standart fenolik bileşik için % geri kazanım hesaplandı. Metanol ekstraktında sirincik asit için %106,24±0,26 ve *o*-kumarik asit için %86,73±0,10 değerleriyle en yüksek % geri kazanım elde edildi (P<0,01). Apigenin için en yüksek geri kazanım etil asetat ile ekstraksiyon sonucu %86,95±1,11 olarak bulundu (p<0,01). Su ekstraktında ise sirincik asit için %25,63±0,84, *o*-kumarik asit için %50,16±1,92 ve apigenin için %0,72±0,07 geri kazanım değerleriyle hem fenolik asitler hem de flavonoidler için en düşük geri kazanım değerleri elde edildi (p<0,01).

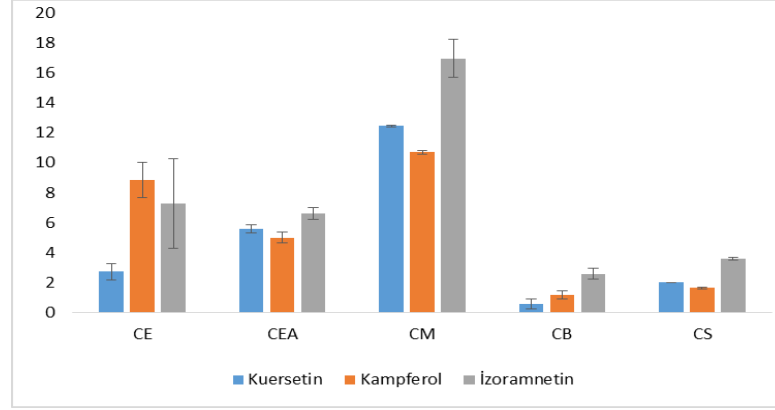
Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre fenolik asitlerin ekstraksiyonu için en uygun çözücü metanol iken flavonoidlerin en yüksek geri kazanımı etil asetat çözücüsünde elde edilmiştir. Literatürde yapılan bir çalışmada farklı polaritedeki çözücü ortamlarında ekstre edilmiş apigeninin % geri kazanımı belirlenmiştir.

Çözücü olarak aseton, metanol, etanol, bütanol ve su kullanılmıştır. Elde edilen sonuca göre apigeninin ekstraksiyonunda, metanolün diğer çözücülere göre daha etkili olduğu gözlenmiştir (Saeed vd., 2006). Etil asetatın bitki flavonoidleri için iyi bir çözücü olduğu ve bitki ekstraktlarındaki flavonoidleri sınıflandırmak için kullanılabileceği literatürde yapılan çalışmalarla desteklenmiştir (Guliyev ve Harmandar, 2003). Diğer taraftan su ve bütanolün aglikonların ekstraksiyonu için uygun olmadığı; glikozitlerin polariteyi artırmasından dolayı flavonoid glikozitlerin ekstraksiyonunun yüksek polariteli, aglikonlarının ise düşük polariteli çözücüler ile yapılabileceği literatürle desteklenmektedir (Geissman, 1962; Guliyev ve Harmandar, 2003).

Çalışmamızda elde edilen sonuca göre *C. campestris* bitkisinde belirlenen ve aynı zamanda bitkinin ana bileşeni de olan flavonoidler, bitkide aglikonları şeklinde bulunmaktadır. Bu bileşenleri ekstrakte edebilmek için ise en uygun çözücü etil asetat olarak bulundu.

4.4. *C. campestris* Bitkisinin Ekstraktlarındaki Fenolik Bileşiklerin HPLC-DAD ile Analizleri

C. campestris bitkisinin dietil eter, etil asetat, metanol, bütanol ve sulu ekstraktları optimize edilen HPLC-DAD sisteminde kalitatif ve kantitatif olarak analiz edildi. Gallik asit, sirincik asit, *o*-kumarik asit, ellacik asit, apigenin, mirisetin, fisetin, paenol ve timol fenolik bileşiklerine hiçbir ekstraktta rastlanmadı. Tüm ekstraktlarda ortak olarak protokatekuik asit, *p*-OH benzoik asit, kafeik asit, vanilik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, kuersetin, kamferol ve izoramnetin belirlendi. Çalışmamızda *C. campestris* bitkisinin sulu ekstrakt hariç diğer tüm ekstraktlarında en fazla flavonoidlerin flavonol grubuna ait üç bileşik; kuersetin, kamferol ve izoramnetin tespit edildi. Bu bileşiklerin ekstraktlardaki dağılımları Şekil 69'da bar grafiği olarak verildi.



Şekil 69. *C. campestris* bitkisinin ekstraktlarında ana bileşen olan kuersetin, kamferol ve izoramnetinin miktarlarına ait grafik

Dietil eter ekstraktında en fazla bulunan fenolik bileşen kamferol ($8,84 \pm 1,19$ mg/g) iken rutin dedeksiyon limitinin altında kaldı. Protokatekuik asit ($1,61 \pm 0,13$ mg/g), *p*-OH benzoik asit ($1,50 \pm 0,09$ mg/g) ve vanilik asit ($2,58 \pm 0,21$ mg/g) diğer ekstraktlarla karşılaştırıldığında en fazla bu ekstrakta belirlendi.

Etil asetat ekstraktında; en fazla bulunan fenolik bileşen izoramnetin ($6,61 \pm 0,37$) iken en az bulunan fenolik bileşen ise klorojenik asittir ($0,02 \pm 0,00$ mg/g). Kuersetin ise metanol ekstraktından sonra en yüksek etil asetat ekstraktında belirlendi ($5,60 \pm 0,28$ mg/g).

Metanol ekstraktında da etil asetat ekstraktında olduğu gibi en fazla miktarda izoramnetin ($16,97 \pm 1,27$ mg/g) belirlendi. Ayrıca sinamik asit türevlerinden kafeik asit ($0,85 \pm 0,02$ mg/g), ferulik asit ($4,39 \pm 0,03$ mg/g) ve *p*-kumarik asit ($2,27 \pm 0,06$ mg/g) en yüksek miktarda bu ekstrakta belirlendi. Kuersetin diğer ekstraktlarla karşılaştırıldığında en yüksek miktarda metanol ekstraktında tespit edildi ($12,47 \pm 0,06$ mg/g). Ekstrakta kromatografik olarak belirlenen flavonoidlerin toplam miktarına baktığımızda en yüksek flavonoid içerik yine bu ekstrakta belirlendi (Şekil 22, 69 ve Tablo 10).

Bütanol ekstraktında izoramnetin ($2,57 \pm 0,36$ mg/g) en fazla bulunan fenolik bileşiktir. HPLC-DAD ile belirlenebilen flavonoidlerin toplam miktarı açısından bakıldığında en düşük flavonoid içerik bu ekstrakta tespit edildi (Şekil 22 ve Tablo 10).

Yüksek polaritesinden dolayı su ekstraktında beklendiği gibi kuersetinin bir rutinozit şekerinin bağlı hali olan rutin en fazla bulunan fenolik bileşendir (4,00±0,84 mg/g). Oldukça polar fonksiyonel gruplar içeren kuinik asit ile kafeik asitin estesleşme ürünü olan klorojenik asit de en fazla sulu ekstraktta tespit edildi (2,45±0,13 mg/g).

Benzer şekilde *Cuscuta* türlerinin metanol ekstraktlarıyla yapılan çalışmalarda çoğunlukla klorojenik asit, 3,5-dikafeilkuinik asit, 4,5-dikafeilkuinik asit, hiperozit, kuersetin, kamferol, kamferol-3-*O*-galaktozit, kuersetin-3-*O*-glukozit ve izoramnetin tespit edilmiştir (Lee vd., 2011; Loffler vd., 1997; Ye vd., 2002; Ye vd., 2005; Ye vd., 2001). *C. chinensis* üzerine yapılan bir çalışmada flavonoidlerin bitkinin yapısında en fazla bulunan fenolik bileşenler olduğu rapor edilmiştir. Özellikle kuersetin, kamferol, izoramnetin, hiperozit, astragalin ve lignanların bitkinin farmakolojik aktivitesinde önemli rol oynadığı gözlenmiştir (Cornwell vd., 2004; Hajimehdipoor vd., 2012; Williamson vd., 2005). Ayrıca Ye vd. (2005)'nin yaptıkları çalışmada *C. chinensis* ve *C. australis* bitkilerinin tohum kısımlarının metanol ekstraktlarının fenolik içerikleri LC/MS yöntemiyle karakterize edilmiştir. Yapılan çalışmaya göre 50 tane fenolik bileşik alıkonma zamanları, UV spektrumları ve kütle spektrumları kullanılarak karakterize edilmiştir. Elde edilen sonuca göre iki bitkinin fenolik içeriklerinin birbirinden oldukça farklı olduğunu gözlenmiştir. Çalışmaya göre 23 flaonoid, 20 lignan, 7 kuinik asit türevi karakterize edilmiştir. *C. chinensis* bitkisinin tohumlarında en fazla bulunan fenolik bileşen hiperozit iken *C. australis* bitkisindeki ana bileşenler astragalin ve kamferol olarak bulunmuştur. Literatür çalışmalarıyla, çalışmamızı karşılaştırdığımızda benzer sonuçlar elde edildi.

4.5. *C. campestris* Bitkisinin Biyoaktif Bileşenlerinin İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Bitkilerden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda su, metanol, etanol, asetonitril aseton, etil asetat ve dietil eter gibi organik çözücüler sıklıkla kullanılmaktadır. ABD Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA, 2012)' ne göre çözücüler, insan sağlığı üzerine toksisitesine göre üç sınıfa ayrılmaktadır. 3. sınıf çözücüler etanol, aseton ve etil asetat gibi en az toksik olan ve insan sağlığı üzerine zararlı etkisi en az olan çözücülerdir. Asetonitril, hekzan, kloroform ve metanol gibi 2. sınıf çözücülerin kendi

toksisitelerinden dolayı farmakolojik ürünlerde kullanımı sınırlı olmalıdır. 1. sınıf çözücülerden ise kabul edilemez toksik özellikleri ve çevre için zararlı etkileri nedeniyle uzak durulması gerekmektedir. Benzen, diklorometan gibi çözücüler birinci sınıf çözücülere örnek verilebilir (Draft, 2010).

C. campestris bitkisinden biyoaktif bileşenleri izole edebilmek için bitkinin en güçlü DPPH• serbest radikal temizleme aktivitesine sahip olan, toplam fenolik ve toplam flavonoid içeriği en yüksek olan ve çalışılan kanser hücre hatları üzerinde en yüksek sitotoksik etkiye sahip olan etil asetat ekstraktı kullanıldı. Ayrıca çalışmada etil asetat ekstraktı ile bitkinin majör bileşenleri olan flavonoidlerin geri kazanımının en yüksek bulunması ve FDA (2012)'ya göre en az toksik olan ve insan sağlığı üzerinde en zararsız çözücülerden olması bu ekstraktın kullanılmasında önemli etkenlerdendir.

Çalışmamızda izole edilen bileşiklerin, alıkonma zamanları, UV, MS/MS ve FT-IR spektrumları ile standartlara ait veriler karşılaştırdı ve aynı alıkonma zamanı ve spektral verilere sahip olan bileşikler ilgili standart olarak adlandırıldı. Ayrıca rutinin alıkonma zamanı civarında gözlenen ve UV spektrumları literatürdeki bu şeker bağlı bileşiklere benzeyen fakat yapısını elimizde standartları olmadığı için aydınlatamadığımız pek çok fraksiyon mevcuttur. Bu fraksiyonların kromatogramları ve DAD ile elde edilen UV spektrumları incelendiğinde başlıca piklerin, rutin, kuersetin, kamferol ve izoramnetinin spektrumlarıyla benzer spektrumlara sahip oldukları gözlemlendi. Mevcut fenolik bileşik standartları ile bu bileşenlerin kesin tespiti mümkün olmasa da spektrumlarından faydalanarak başlıca pikler rutin, kuersetin, kamferol ve izoramnetinin türevleri olarak karakterize edildi. Ye vd. (2005) çalışmasında *C. chinensis* ve *C. australis* bitkisinin fenolik bileşikleri LC-UV/MS/MS yöntemlerini kullanarak karakterize edilmiş ve bitkide hiperosit, astragalin, kuersetin, kamferol ve izoramnetin fenolik bileşiklerinin yanı sıra bu bileşiklerin glikozit, galaktozit ve diğer şeker bağlı yapıları da yüksek miktarda tespit edilmiştir.

Ultraviyole spektroskopisi fenolik bileşiklerin yapı özellikleri hakkında önemli bilgiler verir. Tüm fenolik bileşikler UV bölgede 230-290 nm'de bir veya daha fazla karakteristik absorpsiyon gösterir. Farklı gruba ait fenolik bileşikler karakteristik olarak farklı UV absorpsiyon piki gösterir. Fenolik asitler 230-290 nm arasında bir veya iki

güçlü band gösterir. Hidroksi sinamik asitler 310-332 nm'de keskin bir absorpsiyon piki verir. Kafeik asitin kuinik asitle esterleşmesiyle oluşan klorojenik asit gibi türevleri genellikle 300-310 nm de bir omuz pikiyle birlikte 320-330 nm'de maksimum absorpsiyon piki verir (Mabry vd., 1970; Ye vd., 2005). UV spektroskopisi, flavonoidlerin yapısı hakkında da önemli bilgiler veren bir yöntemdir. Flavonoid bileşikleri biri uzun, diğeri kısa dalga boyunda olmak üzere iki absorpsiyon bantı vermektedir. Uzun dalga boyunda olan, flavonoidin B halkasının absorpsiyonu ile ilgilidir. Kısa dalga boyunda olan ise A halkasının absorpsiyonu ile ilişkilidir (Mabry vd., 1970).

Flavanonların spektrumları kısa dalga boyunda şiddetli absorpsiyon maksimumu 270-295 nm ve 300-360 nm aralığında ise küçük pik veya omuz karakterize edilir. Bu pikler sırasıyla A ve B halkasından kaynaklıdır. Flavanlardan farklı olarak flavon ve flavonollerin molekül yapısında C₄ pozisyonunda bulunan karbonil grubu ile B halkası konjuge olduğundan bu bileşiklerin UV bölge spektrumlarında birbirinden iyice seçilen iki şiddetli absorpsiyon şeridi açığa çıkar (Guliyev ve Harmandar, 2003). Flavonol ve onların glikozitleri 350-385 nm ve UV bölgede 250-280 nm aralığında iki maksimum absorpsiyon piki oluştururlar. Tablo 17'de fenolik bileşiklerin karakteristik absorpsiyon yaptıkları maksimum dalga boyları verildi.

Tablo 17. Fenolik bileşiklerin karakteristik absorpsiyon yaptıkları dalga boyu

	B bandı (nm)	A bandı (nm)
Flavon	304-350	250-270
Flavonon	300-360	270-295
Flavonol	350-385	250-280
Fenolik asitler (Hidroksi benzoik asit türevi)	-	230-290
Fenolik asitler (Hidroksi sinamik asit türevi)	310-332	230-290

Sıvı kromatografisine kombine edilmiş kütle spektrometresi, hem fenolik bileşiklerin hem de ilaç metabolizması ve farmakokinetik çalışmalarda kullanılan en önemli ve en avantajlı ölçüm cihazıdır. Ayrıca cihazın MS bölümündeki iyon tuzaklı kütle analizörleri bu çalışmalardaki seçiciliği ve duyarlılığı da artırdığı bildirilmiştir (Kang vd., 2012).

4.6. *C. campestris* Bitkisinde Biyoaktivite Çalışmaları

4.6.1. Bitki Ekstraktlarında Spektrofotometrik Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoid Madde Tayini

C. campestris bitkisine ait 5 farklı ekstrakt, toplam fenolik ve toplam flavonoid madde içerikleri açısından spektroskopik olarak karşılaştırıldı. Ekstraktların toplam fenolik içerikleri gallik asit cinsinden (GAE) 23,95 ile 233,76 mg GAE/g aralığında, kuersetin eşdeğeri cinsinden (KE) ise 14,02 ile 133,88 mg KE/g aralığında bulundu. En yüksek toplam fenolik içerik hem gallik asit hem de kuersetin eşdeğeri cinsinden etil asetat ekstraktında (233,76 mg GAE/g, 133,88 mg KE/g) hesaplanırken, en düşük toplam fenolik içerik ise 23,95 mg GAE/g, 14,02 mg KE/g değerleriyle bütanol ekstraktında elde edildi. Sonuçlar Tablo 13 ve Şekil 59'da verildi.

Toplam flavonoid içerik miktarını belirleyebilmek için kuersetin standart olarak kullanıldı. En yüksek miktarda toplam flavonoid içerik etil asetat ekstraktında hesaplanırken ($81,11 \pm 0,28$ mgKE/g), en düşük flavonoid içerik $5,96 \pm 0,12$ mg KE/g bütanol ekstraktında hesaplandı. Ekstraktlar toplam flavonoid içerik açısından karşılaştırıldığında, sırasıyla etil asetat > dietil eter > metanol > su > bütanol şeklindedir (Tablo 14 ve Şekil 60).

Ekstraktların kromatografik olarak içerdikleri fenolik asit ve flavonoidlerin toplam sonuçları, spektrofotometrik toplam fenolik ve flavonoid madde tayini sonuçlarıyla karşılaştırıldığında benzer sonuçlar gözlenmedi. Spektrofotometrik yöntemlerde toplam fenolik ve toplam flavonoid miktarları bakımından kromatografik yöntemlere göre daha yüksek değerler elde edildi. Ayrıca kromatografik analizle belirlenen fenolik bileşik sonuçlarına göre fenolik asitler için en zengin türün dietil eter ekstraktı olduğu görüldü. Yine kromatografik olarak en yüksek miktarda toplam flavonoid içerik metanol ekstraktında gözlemlendi. Spektrofotometrik olarak en yüksek toplam fenolik ve flavonoid içerik etil asetat ekstraktında elde edildi. Öyleyse kromatografik ve spektrofotometrik toplam fenolik ve toplam flavonoid madde miktarını birbirinden bu denli değiştiren türlerin bitkide kromatografik analizlerde standartlarla örtüştürerek tanımlayamadığımız ya da DAD dedektörü ile çalışılan dalga

boylarında gözlenemeyen fenolik bileşiklerden kaynaklanabilir. Ayrıca spektrofotometrik toplam fenolik ve toplam flavonoid madde miktarını belirlerken, bitkiden doğrudan yapılan ekstraksiyonda sadece fenolik bileşiklerin değil aynı zamanda bitkinin yapısından gelen diğer bileşenlerin etkisi olabileceği, matriks veya sinerjik etkilerinin de göz ardı edilmemesi gerekir.

4.6.2. DPPH• Serbest Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini

Ekstraktların ve izole edilen kuersetin (F31SA), izole edilen kamferol (F32-1SA), ve izole edilen izoramnetin (F32-2SF) fraksiyonlarının DPPH• serbest radikal temizleme aktiviteleri temsili olarak seçilen gallik asit, kuersetin, kamferol ve izoramnetin standartlarıyla karşılaştırıldı. Standart gallik asit için SC₅₀ değeri 3,0±0,0 µg/mL, standart kuersetin için SC₅₀ değeri ise 2,0±0,0 µg/mL, izole edilen kuersetinin SC₅₀ değeri 4,1±0,2 µg/mL, standart kamferol için 5,2±0,3 için µg/mL, izole edilen kamferol için SC₅₀ değeri 4,0±0,4 µg/mL, standart izoramnetin için 6,1±0,3 µg/mL, izole edilen izoramnetin için ise SC₅₀ değeri 6,9±0,1 µg/mL olarak bulundu (Tablo 15). İzole edilen bu flavonoller oldukça düşük SC₅₀ değerleriyle, standartlar gibi güçlü antioksidan etki gösterdi.

Etil asetat ekstraktı en yüksek DPPH• serbest radikal temizleme aktivitesine ve (23,0±1,0 µg/mL), benzer şekilde en yüksek toplam fenolik ve toplam flavonoid madde içeriğine sahiptir. Bütanol ekstraktı ise en düşük radikal temizleme aktivitesine sahiptir (1359,2±22,5 µg/mL). Yen vd., (2008b)'in *C. chinensis* üzerine yaptıkları çalışmada su ve etanol ekstraktları ve etanol ekstraktının *n*-hekzan, etil asetat, bütanol ve organik su fraksiyonlarının antioksidan özellikleri rapor edilmiştir. Etanol ekstraktı (0,124±0,003 mg/mL), sulu ekstraktan (0,269±0,003 mg/mL) daha yüksek DPPH• serbest radikal temizleme aktivitesi göstermiştir. Ayrıca bu fraksiyonlardan en fazla flavonoid içeriğine (kuersetin ve kamferol) sahip olan etil asetat fraksiyonu en güçlü radikal temizleme aktivitesine sahip fraksiyon olduğu bulunmuştur. Çalışmada ekstrakt ve fraksiyonların antioksidan aktivite sıralaması etil asetat>etanol>bütanol>su>su organik> *n*-hekzan şeklindedir. Yine diğer bir çalışmada ise *C. arvensis* bitkisinin *n*-hekzan, dikloro metan, etil asetat, metanol ve su ekstraktları hazırlanmıştır. Çalışmada benzer şekilde etil asetat

ve metanol ekstraktlarının diğer ekstraktlardan çok daha yüksek DPPH• radikal temizleme aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (Koca vd., 2011).

İzole edilen flavonollerle, ekstraktların serbest radikal temizleme aktivitesini karşılaştırdığımızda ise izole edilen flavonoller daha iyi radikal temizleme aktivitesi gösterdi. Tüm izole edilen flavonoller, ekstraktlardan en iyi DPPH• serbest radikal temizleme aktivitesine sahip olan etil asetat ekstraktından bile 10 kat daha iyi antioksidan aktivite gösterdi (Tablo 15). Burada ekstraksiyon ortamına fenolik olmayan ve antioksidan etkiyi düşüren bazı bileşiklerin de ekstrakte olduğu ya da DPPH• radikal temizleme aktivitesi düşük olan fenolik bileşiklerin ekstrakte edildiği söylenebilir.

C. chinensis bitkisinin tohumunun metanol ekstraktı ve bu ekstraktın *n*-hekzan, etil asetat, bütanol fraksiyonları ile yapılan bir çalışmada en yüksek DPPH• serbest radikal temizleme aktivitesi metanol ekstraktının, etil asetat fraksiyonunda olduğu rapor edilmiştir (SC₅₀, 50 µg/mL). Yine aynı çalışmada bitkiden metil 4-hidroksi-3,5-di metoksisinnamat, kafeik asit, kalikopteretin, kuersetin ve kamferol izole edilerek ve bu bileşiklerin antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Bileşiklerden kuersetin ve kamferol'un diğer üç bileşikten daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Kwon vd., 2000). Bu tez çalışması kapsamında izole edilen kuersetin ve izole edilen kamferol bileşikleri birbirine yakın antioksidan aktivite gösterirken izole edilen izoramnetinden ise daha düşük antioksidan aktivite gösterdi.

Elde ettiğimiz deneysel çalışmalarla literatürdeki çalışmalar karşılaştırıldığında birbirini destekler sonuçlar elde edilmiştir. *Cuscuta* türleri farklı olsa da en yüksek DPPH• serbest radikal temizleme aktivitesinin etil asetat ve metanol ekstraktları olduğu sonucu yaygındır. Bitki fenoliklerinin antioksidan etkisini anlamak için farklı polariteli çözücülerle hazırlanan ekstraktların radikal temizleme aktivitesinin taranması, dolayısıyla bu çözücülerin farklı fenolik gruplar için seçici olması gerekir. Çalışmamızda dietil eter ve etil asetat ekstraktlarının flavonoidler için seçimli olmasından dolayı bu ekstraktların DPPH• serbest radikal temizleme aktivitelerinin yüksek olduğu söylenebilir. Ayrıca polar özellik gösteren bütanol ve sulu ekstraktların flavonoidlerin ekstraksiyonu için uygun çözücüler olmadığı ve bu ekstraktların DPPH• radikal temizleme aktivitelerinin düşük olduğu söylenebilir. Öte yandan, bu

ekstraktların antioksidan aktivitesinin, farmakolojik etkinin göstergesiyle doğrudan orantılı olduğunu söylemek de her zaman doğru olmayabilir.

4.6.3. Ekstrakt ve İzole Edilen Flavonollerin SNU-398, HepG2, SK-OV-3 ve hDFs Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkileri

Yapılan *in vitro* çalışmada *C. campestris* bitkisinin ekstraktlarının, SNU-398, HepG2, SK-OV-3 ve hDFs hücre hatları üzerinde sitotoksiteleri araştırıldı. Hazırlanan beş ekstrakt içinde metanol ve etil asetat ekstraktları SNU-398 karaciğer kanseri hücre hattı üzerinde sitotoksite oluştururken (sırasıyla, SC_{50} 18,7±1,9, 19,6±1,0 µg/ mL), diğer ekstraktlar sitotoksite oluşturmadı (Tablo 16).

Ayrıca diğer karaciğer kanseri hücre hattı olan HepG2 hücre hattında da ekstraktların sitotoksik etki sırası CM> CEA > CB> CE> CS şeklinde olup SNU-398 hücre hattıyla aynı sitotoksik sırayı vermektedir. HepG2 hücre hattında 86 mg/mL derişimde stok çözeltinin kullanıldığı metanol ekstraktı, 1000 kat seyreltilmesiyle elde edilen %1,20 hücre canlılığıyla en yüksek sitotoksik etkiyi gösterirken, su ekstraktı ise aynı derişimde %77,8 hücre canlılığıyla en düşük antikanser aktiviteye sahip olan ekstrakt olarak bulundu (Şekil 63 ve Tablo 18). Su ekstraktı aynı zamanda SNU-398 karaciğer kanseri hücre hattı üzerinde 145,2±13,3 µg/mL CC_{50} değeriyle de tüm ekstraktlar içinde en düşük antikanser aktiviteye sahip olan ekstrakt olarak bulundu (Tablo 16).

SK-OV-3 yumurtalık kanseri hücre hattı için etil asetat, metanol ve bütanol ekstraktlarının başlangıç derişimi 86 mg/mL olarak ayarlandı. SK-OV-3 hücre hattı üzerinde dietil eter (hücre canlılığı, % > 75) ve su ekstraktları (hücre canlılığı, % > 125) sitotoksik etki oluşturmazken en yüksek sitotoksik etkiye sahip olan etil asetat ekstraktı 86 mg/mL derişimindeki stok çözeltinin 1000 ve 2000 kat seyreltilmesiyle elde edilen hücre canlılıkları sırasıyla %0 ve %4,1±0,1'dir (Tablo 18). Bütanol ve metanol ekstraktları ise 2000 kat seyreltmede çok düşük hücre canlılıkları göstererek sitotoksik etki oluşturdular (%<18,4) (Şekil 64 ve Tablo 18). SNU-398 ve HepG2 karaciğer kanseri hücre hatları üzerinde yüksek sitotoksik etkiye sahip olan etil asetat ve metanol ekstraktları, SK-OV-3 yumurtalık kanseri hücre hattı üzerinde de yüksek sitotoksik etki

gösterdi. Ayrıca bütanol ekstraktı düşük de olsa HepG2 ve SK-OV-3 hücre hatları üzerinde sitotoksikite oluşturken SNU-398 hücre hattı üzerinde sitotoksik etki oluşturmadı (CC_{50} $39,50 \pm 1,12$ $\mu\text{g/mL}$, Tablo 16).

HepG2 ve SK-OV-3 hücre hatları üzerinde sitotoksik etki gösteren bu ekstraktların sağlıklı hücreler üzerinde herhangi bir sitotoksik etki oluşturup oluşturmadığını anlayabilmek için hDFs hücre hattı kullanıldı. hDFs hücre hattıyla HepG2 ile SK-OV-3 hücre hattının karşılaştırılmasını yapmak için CEA ve CB için 43 mg/mL, CM için 86 mg/mL başlangıç derişimlerinde çalışıldı. Etil asetat ekstraktı çalışılan tüm seyreltme aralıklarında %80-95,3 hücre canlılığı ile hDFs hücre hattı üzerinde sitotoksikite oluşturmadı. Metanol ekstraktı ise 1000 ve 4000 kat seyreltmede sitotoksikite oluşturmazken, 2000 kat seyreltmede %50 hücre canlılığı ile sitotoksikite oluşturdu. Bütanol ekstraktı hem hDFs hücre hattı üzerinde hem de HepG2 ve SK-OV-3 hücre hatları üzerinde yüksek miktarda sitotoksikite oluşturarak antikanser aktivite göstermedi (Şekil 65, Tablo 18).

Tablo 18. Farklı derişimlerdeki ekstraktların MTS yöntemi kullanılarak HepG2, SK-OV-3 ve hDFs hücre hatları üzerindeki % hücre canlılıkları

Kanser Hücre Hattı	Seyreltme Oranları	% Hücre Canlılığı		
		CEA (Başlangıç derişimi 43 mg/mL)	CM (Başlangıç derişimi 86 mg/mL)	CB (Başlangıç derişimi 43 mg/mL)
HepG2	1/500	0,6±0,7	-	16,8±1,2
	1/1000	4,2±2,0	1,2±1,0	64,7±4,3
	1/2000	38,9±5,5	20,4±4,0	99,4±6,7
	1/4000	-	59,3±2,6	-
	1/500	0	0	0
hDFs	1/1000	80,0±0,4	90,0±2,8	-
	1/2000	72,8±0,7	50,3±4,9	2,3±0,7
	1/4000	95,3±0,7	95,3±0,7	4,7±1,4
Kanser Hücre Hattı	Seyreltme Oranları	CEA (Başlangıç derişimi 86 mg/mL)	CM (Başlangıç derişimi 86 mg/mL)	CB (Başlangıç derişimi 86 mg/mL)
	1/500	0	0	0
SK-OV-3	1/1000	0	2,1±0,8	0
	1/2000	4,1±0,1	18,4±3,9	13,3±4,6
	1/4000	47,9±21,8	103,6±7,9	96,2±5,9

Literatürde farklı *Cuscuta* türleriyle farklı çözücüler kullanılarak hazırlanan ekstraktlar çeşitli kanser hücre hatlarında test edilmiş ve bu analizlerin çoğunda da kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etki oluşturmuştur. Örneğin, *C. reflexa*'nın sulu ekstraktı, Hep3B hücrelerinin çoğalmasında doza bağımlı olarak toksisiteye sahip

olduğu ve sağlıklı hücresel üzerinde belirgin bir toksikliğe sahip olmadığı gözlenmiştir (Suresh vd., 2011). Bir diğer çalışmada *C. reflexa Roxb.* bitkisinin % 95 alkollü, % 50 alkollü ve sulu ekstraktları ve % 95 alkollü ekstraktın hekzan, kloroform, bütanol ve sulu fraksiyonları hazırlanmıştır. Bu ekstrakt ve fraksiyonların MCF-7 meme kanser hücre hattı üzerinde toksisitesi araştırılmıştır. % 95 alkollü ekstrakt ve onun kloroform fraksiyonu MCF-7 hücre hattı üzerinde en fazla sitotoksik etkiye sahip ekstrakt ve fraksiyon oldukları belirlenmiştir. Diğer bir çalışmada ise *C. chinensis* bitkisinin bütün olarak su ile ekstrakte edilen kısmının akut lenfoblastik lösemi (CCRF-CEM) hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi araştırılmış ve ekstraktın minimum ve maksimum etki derişimi 1-10 µg/mL aralığında bulunmuştur. Sulu ekstraktın SC₅₀ değeri 24 saatlik uygulama için 3 µg/mL olarak belirlenmiştir (Jafarian vd., 2014). Bir diğer çalışmada *C. chinensis* bitkisinin tohumları metanol ile ekstrakte edilmiştir. Elde edilen ekstrakt MCF-7 ve T47D meme kanseri hücre hattına uygulanmıştır. Ekstraktın 10 µM derişimde meme kanserinin yayılmasını önlediği gösterilmiştir (Umehara vd., 2004).

Literatürde *C. campestris* bitkisinin etil asetat ve metanol ekstraktlarının SNU-398, HepG2 ve SK-OV-3 karaciğer kanseri hücre hatları üzerine sitotoksik etkisiyle ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. *C. campestris* bitkisinin farklı çözücü ortamlarındaki ekstraktları hazırlanarak yapılan bu çalışma, literatür verileri incelendiğinde ilk kez rapor edilmiştir.

Bitkiden izole edilmiş üç flavonol ve bu flavonollerin belli oranlarda karıştırılmasıyla oluşturulan ve karışım olarak adlandırılan 0,02 mg/mL başlangıç derişimlerdeki fraksiyonların (1/500, 1/1000, 1/2000 ve 1/4000) dört farklı derişimdeki antikanser aktiviteleri HepG2, SK-OV-3 ve hDFs hücre hatları üzerinde incelendi. İzole edilen kuersetin hDFs hücreleri üzerinde yaklaşık %92 hücre canlılığı ile sitotoksikite oluşturmazken HepG2 hücre hattı üzerinde tüm derişimlerde <% 50 hücre canlılığı ile sitotoksikite gösterdi. Bu fraksiyon aynı zamanda SK-OV-3 hücre hattı üzerinde 0,02 mg/mL derişimdeki ekstraktın 1000 kat seyreltilmesiyle %57,1±1,8 hücre canlılığı ile sitotoksikite oluşturdu. İzole edilen kamferol normal hDFs hücrelerindeki % hücre canlılığı yaklaşık %92 iken, aynı derişimde HepG2 ve SK-OV-3 hücre hatlarında düşük hücre canlılığı (sırasıyla %53,5 ± 4,1 ve %53,7 ± 1,5) ile bu hücre hatlarında sitotoksikite oluşturdu. İzole edilen izoramnetin HepG2 hücre hattı

üzerinde hücre canlılığı % >99,4 iken, 0,02 µg/mL derişimde SK-OV-3 hücre hattı üzerinde % hücre canlılığı %67,1±3,0'dir. Ayrıca aynı derişimde hDFs üzerinde yaklaşık % 100' e yakın hücre canlılığı ile hDFs hücre hattı üzerinde de sitotoksisite oluşturmamıştır (Şekil 66-68). İzole edilen izoramnetin HepG2 hücre hattında sitotoksisite oluşturmazken, SK-OV-3 hücre hattı üzerinde sitotoksik etki oluşturmuştur. Ayrıca karışım diye kodlanan fraksiyonda 0,02 mg/mL derişimde HepG2 hücre hattı üzerinde hücre canlılığı %50 iken, SK-OV-3 hücre hattı üzerinde hücre canlılığı %58 civarındadır. Aynı derişimde hDFs hücre hattı üzerinde ise %90 civarında canlılık gösterdiği için HepG2 ve SK-OV-3 kanser hücre hatlarında sitotoksisite uyardığı sonucuna varıldı (Tablo 19).

Tablo 19. İzole edilen fraksiyonların MTS yöntemi kullanılarak HepG2, SK-OV-3 ve hDFs hücre hatları üzerindeki % hücre canlılıkları

Fraksiyonlar	Seyraltme Oranı	% Hücre Canlılığı		
		HepG2	SK-OV-3	hDFs
İzole kuersetin (Başlangıç derişimi 0,02 mg/mL)	1/500	42,1±7,1	64,8±5,3	89,6±8,9
	1/1000	44,9±10,3	57,1±1,8	92,2±13,5
	1/2000	43,5±15,8	76,7±3,9	92,4±3,8
	1/4000	47,8±16,4	90,6±1,5	94,6±12,1
32-1SA (kamferol) (Başlangıç derişimi 0,02 mg/mL)	1/500	53,5±4,1	53,7±1,5	91,6±11,9
	1/1000	61,8±10,2	62,2±8,5	100,1±8,3
	1/2000	85,3±9,1	84,7±15,5	98,7±4,9
	1/4000	95,4±1,5	100,4±12,8	99,6±4,0
32-2SF (izoramnetin) (Başlangıç derişimi 0,02 mg/mL)	1/500	103,2±10,3	67,5±7,7	95,4±3,7
	1/1000	110,2±2,9	67,1±3,0	100,0±7,7
	1/2000	99,4±4,7	79,5±3,4	99,7±4,8
	1/4000	108,9±13,6	99,9±15	100,2±13,1
Karışım (Başlangıç derişimi 0,02 mg/mL)	1/500	50,1±16,0	58±10,0	90±3,2
	1/1000	55,3±7,2	61±8,5	100±8,8
	1/2000	80,4±9,1	69±0,7	100±16,8
	1/4000	82,0±0,4	81±8,3	100±8,0

Dietil eter ekstraktı DPPH• serbest radikal temizleme aktivitesinde diğer ekstraktlarla karşılaştırıldığında ikinci sırada yer almaktadır. Ayrıca toplam flavonoid içerik olarak da metanole en yakın olan ekstrakt olmasına rağmen bu çalışmada kullanılan hücre hatları üzerinde antikanser özellik göstermedi. Dietil eter ekstraktı, etil asetat ekstraktından daha fazla kamferol ve izoramnetin içerirken etil asetat ekstraktı ise dietil eter ekstraktından yaklaşık iki kat fazla kuersetin içermektedir. Bu yüzden kuersetinin sitotoksisiteden sorumlu biyoaktif bileşen olduğunu varsayıldı.

Bu varsayımı metanol ekstraktının en fazla kuersetin içeriğine sahip olması ve yine bu ekstraktın en sitotoksik ekstrakt olması sonucu desteklemektedir. Ancak bu sonuçtan tam olarak emin olabilmek için kuersetin olarak karakterize edilen fraksiyonların da SNU-398 karaciğer kanseri hücre hattında da denenmesi gerekmektedir. Literatürde kuersetinin hepatoma (HepG2, Hep3G), melanoma (B16F10), prostat (PC-3), yumurtalık kanseri (SK-OV-3), lösemi, meme kanseri (MCF-7) gibi farklı yayılcı özellik gösteren hücre hatları üzerindeki antikanser aktivitesine sahip olduğunu gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır (Lee vd., 2011; Pavanato vd., 2003; Ren vd., 2015; Russo vd., 2010; Vijayababu vd., 2006; Yang vd., 2011). Ayrıca literatürde kamferol ve izoramnetinin yumurtalık kanseri (OVCAR-3), melanoma (B16), yayılcı özellik gösteren meme kanseri (MDA-MB-231) hücre hatlarında sitotoksik etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Luo vd., 2011; Phromnoi vd., 2009; Rho vd., 2011).

Çalışmada, ekstraktların sitotoksitesini izole edilen fraksiyonların sitotoksitesinden daha yüksek çıktı. Bu kullanılan ekstrakt ve izole edilen fraksiyonların çalışılan kanser hücre hatları üzerinde test edilen derişimlerinin farklı olması, yani ekstraktların derişimlerinin izole edilen fraksiyonların derişiminden yüksek olmasından kaynaklanabileceği gibi ekstraktlardaki diğer antikanser bileşenlerin oluşturabileceği sinerjik etkiden de kaynaklanabilir. Tablo 18 ve 19'daki verilere bakıldığında ekstraktların derişimlerini en yüksek 86 mg/mL derişimden başlarken izole edilen fraksiyonların derişimleri ise 0,02 mg/mL'dir. Ancak SNU-398 hücre hattı üzerinde etil asetat ekstraktının CC₅₀ değeri 0,0196 mg/mL ve metanol ekstraktının CC₅₀ değeri 0,0187 mg/mL bulundu. Eğer fraksiyonların HepG2 ve SK-OV-3 hücre hatlarında daha yüksek derişimlerde çalışılabilmiş olsaydı yine bu hücre hatlarında sitotoksite oluştururdu.

5. ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında *C. campestris* bitkisinin beş farklı çözücü ortamındaki fenolik içerikleri kalitatif ve kantitatif olarak HPLC-DAD yöntemiyle belirlendi. Çalışmada ayrıca ekstraktların DPPH• radikal temizleme aktiviteleri, toplam fenolik ve toplam flavonoid içerikleri karşılaştırmalı olarak incelendi. Ekstraksiyon geri kazanımları HPLC-DAD analizleri sayesinde ekstraktlarda bulunmadığı tespit edilen temsili fenolik standartlar ile hesaplandı. Ayrıca ekstraktların SNU-398, HepG2 ve SK-OV-3 kanser hücre hatları ve hDFs sağlıklı insan dermal hücre hattı üzerindeki sitotoksitesisi de bu tez kapsamında araştırıldı.

Bu verilerden yola çıkarak en iyi serbest radikal temizleme özelliğine sahip, kanserli hücre hatları üzerinde yüksek sitotoksitesite gösteren ve en yüksek toplam flavonoid içeriğe sahip olan ve geri kazanım çalışmasında flavonoidlerin en yüksek % geri kazanımlarının elde edildiği ekstrakt olan etil asetat ekstraktı preparatif HPLC-DAD cihazıyla fraksiyonlarına ayrıldı. Elde edilen 42 fraksiyondan majör bileşen olan üç fraksiyon farklı kolonlar kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırılan fraksiyonlar UV, MS-MS ve FT-IR yöntemleri ve ilgili standartlarla karşılaştırılarak yapısı aydınlatıldı. Bu fraksiyonların da antikanser aktivitesi HepG2, SK-OV-3 kanser hücre hatları ve hDFs hücre hattı üzerinde sitotoksitesisi araştırıldı. Ayrıca bu fraksiyonların DPPH• radikal temizleme aktiviteleri de standartlarla karşılaştırılmalı olarak çalışıldı. İzole edilen kuersetin, kamferol ve izoramnetin fraksiyonlarının SNU-398 karaciğer kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksitesileri araştırılabilir.

Preparatif HPLC-DAD sisteminde yürütülüp toplanan diğer fraksiyonlarını da çalışılan hücre hatlarında sitotoksitesisine bakılıp kanserli hücre hatları üzerinde sitotoksitesite gösteren her bir bileşen ya da bileşenlerin yapısı MS/MS, NMR, IR spektrumlarına başvurulularak aydınlatılabilir. Bu fraksiyonlardan sitotoksitesite gösteren bileşenlerin antioksidan özellikleri de incelenebilir.

Ayrıca antikanser aktivite gösteren ekstrakt ve fraksiyonların hayvan deneyleri ile *in-vivo* antikanser etkileri araştırılabilir. *In vivo* etkili olan bileşen ya da bileşenlerin ilaç üretimi için faz çalışmalarına başlanabilir.

Kanser çalışmalarında deneylerde kullanılan derişim aralıkları genişletilip deneyler tekrarlanabilir. Deneylerde izole edilen fraksiyonların derişimi 20 µg/mL iken, test edilen ekstrakt derişimleri bu değerin çok üzerindedir. Ekstraktlarla izole edilen fraksiyonların derişimleri birbirine yakın tutularak deneyler tekrarlanabilir. Böylece ekstrakt ve izole edilen bileşiklerin antikanser aktivitesi daha iyi karşılaştırılabilir.

Ayrıca bitki yaş/ kuru olarak ve tohum, iek ve gövde olarak ayrı kısımlarının fenolik içerikleri antioksidan ve antikanser aktiviteleri araştırılabilir. Aktif bileşenlerin bitkide en bol buldukları zaman ve yerlerinin tespit edilmesi açısından farklı bölgelerden ve farklı mevsimlerde de örnek toplanarak değerlendirme yapılabilir.



KAYNAKLAR

- Abdelwahab, M. F., Hussein, M. H. and Kadry, H. H., 2015.** Cytotoxicity and antioxidant activity of new biologically active constituents from *Micromeria nervosa* grown in Egypt. Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University, 53,185-194.
- Akyüz E., 2011.** *Digitalis ferruginea* ssp. *Schischkinii* ve Bazı Endemik *Digitalis* Türlerinin Ekstraktlarında Mevcut Kardiyak Glikozitleri ve Fenolik Bileşiklerin Kromatografik Yöntemlerle Belirlenmesi. Doktora Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimlerinin Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 119 s., 9-12.
- Albayrak, S., Sağdıç, O. ve Aksoy, A., 2010.** Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 26,401-409.
- Androustopoulos, V. P., Papakyriakou, A., Vourloumis, D., Tsatsakis, A. M. and Spandidos, D. A., 2010.** Dietary flavonoids in cancer therapy and prevention: substrates and inhibitors of cytochrome P450 CYP1 enzymes. Pharmacology and Therapeutics, 126, 9-20.
- Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., Karademir, S. E. and Altun, M., 2005.** Total antioxidant capacity assay of human serum using copper(II)-neocuproine as chromogenic oxidant: the cuprac method. Free Radical Research, 39, 949-961.
- Aravalli, R. N., Steer, C. J. and Cressman, E. N., 2008.** Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma. Hepatology, 48, 2047-2063.
- Banerjee, S. and Kaye, S. B., 2013.** New strategies in the treatment of ovarian cancer: current clinical perspectives and future potential. Clinical Cancer Research, 19, 961-968.
- Bao, X., Wang, Z., Fang, J. and Li, X., 2002.** Structural features of an immunostimulating and antioxidant acidic polysaccharide from the seeds of *Cuscuta chinensis*. Planta Medica, 68, 237-243.
- Barltrop, J. A., Owen, T. C., Cory, A. H. and Cory, J. G., 1991.** 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans As cell-viability indicators. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1, 611-614.
- Bishayee, A., Politis, T. and Darvesh, A. S., 2010.** Resveratrol in the chemoprevention and treatment of hepatocellular carcinoma. Cancer Treatment Reviews, 36, 43-53.
- Bown, D. and America, H. S. O., 1995.** The royal horticultural society encyclopedia of herbs and their uses. Dorling Kindersley, ISBN: 0751302031, 424 p.

- Bruneton, J., 1995.** Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. Lavoisier Publishing, Paris, 19950309485, ISBN: 2743000287, 915 p.
- Butler, M., 2003.** Animal Cell Culture and Technology. Bios Scientific Publishers, ISBN: 1859960499, 244 p.
- Büyüktuncel, E., 2013.** Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler. Marmara Pharmaceutical Journal, 17, 93-103.
- Cai, X. G., Xu, A. X., Ge, B., Gao, X. and Yang, S. H., 2005.** Effects of a polysaccharide from *Ccl* on inhibiting oxygen free radical threshold of senile mice model. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 27, 1326-1328.
- Cao, X., Wei, Y. and Ito, Y., 2009.** Preparative isolation of isorhamnetin from stigma maydis using high-speed counter current chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 32, 273-280.
- Cha, C. and DeMatteo, R. P., 2005.** Molecular mechanisms in hepatocellular carcinoma development. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 19, 25-37.
- Chang, Q., Tan, Y., Yong, N. and Ge L., 2012.** Determination of flavonoids in *costus speciosus* and *etlingera elatior* by liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Letters*, 45, 345-355.
- Chen, Y., Yu, H., Wu, H., Pan, Y., Wang, K., Jin, Y. and Zhang, C., 2015.** Characterization and quantification by LC-MS/MS of the chemical components of the heating products of the flavonoids extract in pollen *typhae* for transformation rule exploration. *Molecules*, 20, 18352-18366.
- Cho, J. W., Jeong, Y. W., Han, S. W., Park, J. B., Jang, B. C., Baek, W. K., Kwon, T. K., Park, J. W., Kim, S. P. and Suh, M. H., 2003.** Aberrant p16INK4A RNA transcripts expressed in hepatocellular carcinoma cell lines regulate pRb phosphorylation by binding with CDK4, resulting in delayed cell cycle progression. *Liver International*, 23, 194-200.
- Cornwell, T., Cohick, W. and Raskin, I., 2004.** Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry*, 65, 995-1016.
- Costea, M. and Stefanovi, S., 2010.** Evolutionary history and taxonomy of the *Cuscuta umbellata* complex (Convolvulaceae): Evidence of extensive hybridization from discordant nuclear and plastid phylogenies. *Taxon*, 59, 1783-1800.
- Cruz Garcia, G. S. and Price, L. L., 2011.** Ethnobotanical investigation of wild food plants used by rice farmers in Kalasin, Northeast Thailand. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 7, 1-33.

- Cuendet, M., Hostettmann, K., Potterat, O. and Dyatmiko, W., 1997.** Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta*, 80, 1144-1152.
- Davis, P. H., Cullen, J. and Coode, M. J. E., 1965.** Flora of Turkey and the East Aegean Islands. University Press, ISBN: 0852245599, 9780852245590, 590 p.
- de Rijke, E., Out, P., Niessen, W. M. A., Ariese, F., Gooijer, C. and Brinkman, U. A. T., 2006.** Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112, 31-63.
- de Souza Costa, C. A., Teixeira, H. M., Lopes do Nascimento, A. B. and Hebling, J., 2007.** Biocompatibility of resin-based dental materials applied as liners in deep cavities prepared in human teeth. *Journal of Biomedical Materials Research*, 81, 175-184.
- Dehn, P. F., White, C. M., Conners, D. E., Shipkey, G. and Cumbo, T. A., 2004.** Characterization of the human hepatocellular carcinoma (hepg2) cell line as an in vitro model for cadmium toxicity studies. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 40, 172-182.
- Dey, P. M. and Harborne, J. B., 1989.** Preface to the Series, in: J.B, H. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry*. Academic Press, ISBN: 0124610110, 9780124610118 537 p., 283-325.
- Diplock A., 1998.** Healthy lifestyles nutrition and physical activity, antioxidant nutrients. ILSI Europe concise monograph series, ISBN 1-57881-003-5, 56p.
- Dmitrienco, G. S., 2012.** Methods of extraction, preconcentration, and determination of quercetin. *Journal of Analytical Chemistry*, 67, 340-353.
- Donnapee, S., Li, J., Yang, X., Ge, A., Donkor, P. O., Gao, X. and Chang, Y., 2014.** *Cuscuta chinensis* Lam.: A systematic review on ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional herbal medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 157, 292-308.
- Draft, F., 2010.** Guidance for Industry: Adaptive design clinical trials for drugs and biologics. Food and Drug Administration, 50 p., 1-3.
- Fang, Y. Z., Yang, S. and Wu, G., 2002.** Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Regulation of Physiological Systems by Nutrients*, 18, 872-879.
- Feng, R., Guo, Z. K., Yan, C. M., Li, E. G., Tan, R. X. and Ge, H. M., 2012.** Anti-inflammatory flavonoids from *Cryptocarya chingii*. *Phytochemistry*, 76, 98-105.
- Gao, J. M., Li, R., Zhang, L., Jia, L. L., Ying, X. X., Dou, D. Q., Li, J. C. and Li, H. B., 2013.** *Cuscuta chinensis* seeds water extraction protecting murine osteoblastic MC3T3-E1 cells against tertiary butyl hydroperoxide induced injury. *Journal of Ethnopharmacology*, 148, 587-595.

- Geissman, T. A., 1962.** The Chemistry of Flavonoid Compounds. Macmillan Press., 666 p., 35-55.
- Ghimire, K. and Bastakoti, R. R., 2009.** Ethnomedicinal knowledge and healthcare practices among the tharus of nawalparasi district in central Nepal. Forest Ecology Management, 257, 2066-2072.
- Gilbert, L., Basso, O., Sampalis, J., Karp, I., Martins, C., Feng, J., Piedimonte, S., Quintal, L., Ramanakumar, A. V., Takefman, J., Grigorie, M. S., Artho, G. and Krishnamurthy, S., 2012.** Assessment of symptomatic women for early diagnosis of ovarian cancer: results from the prospective DOvE pilot project. The Lancet Oncology, 13, 285-291.
- Guliyev, V. B. and Harmandar, M., 2003.** Flavonoidler, İstanbul: Aktif Yayınevi. ISBN: 9759675803, 382 s., 1-15.
- Hajimehdipoor, H., kondori, B. M., Amin, G. R., Adib, N., Rastegar, H. and Shekarchi, M., 2012.** Development of a validated HPLC method for the simultaneous determination of flavonoids in *Cuscuta chinensis* Lam. by ultra-violet detection. Journal of Pharmaceutical Sciences, 20, 57-62.
- Halliwel, B. and Gutteridge, J. M., 1985.** Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, ISBN: 0198541376, 9780198541370, 346 p., 20-45.
- Harborne, A. J., 1998.** Phytochemical Methods A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. Springer Science & Business Media, ISBN: 0412572605, 9780412572609, 302 p., 4-74.
- Harvey D., 2000.** Modern analytical chemistry. Mc Graw Hill International Edition, ISBN: ISBN-13: 978-0072375473, 798 p.,
- He, X. H., Yang, W. Z., Meng, A. H., He, W. N., Guo, D. A. and Ye, M., 2010.** Two new lignan glycosides from the seeds of *Cuscuta chinensis*. Journal of Asian Natural Products Research, 12, 934-939.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R. and Bobilya, D. J., 2002.** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. Journal of Nutritional Biochemistry, 13: 572-584.
- Hışıl Y., 1999.** Enstrümental gıda analizleri (I), Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova-İzmir, 218 s.
- Hossain, M. B., Rai, D. K., Brunton, N. P., Martin-Diana, A. B. and Barry-Ryan, C., 2010.** Characterization of phenolic composition in Lamiaceae Spices by LC-ESI-MS/MS. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58, 10576-10581.
- Jafarian, A., Ghannadi, A. and Mohebi, B., 2014.** Cytotoxic effects of chloroform and hydroalcoholic extracts of aerial parts of *Cuscuta chinensis* and *Cuscuta epithymum* on Hela, HT29 and MDA-MB-468 tumor cells. Research in Pharmaceutical Sciences, 9, 115-122.

- Jian-Hui, L., Bo, J., Yong-Ming, B. and Li-Jia, A., 2003.** Effect of *Cuscuta chinensis* glycoside on the neuronal differentiation of rat pheochromocytoma PC12 cells. *International Journal of the Developmental Neuroscience*, 21, 277-281.
- Kadıoğlu, İ., 1992.** Küsküt (*Cuscuta* spp.) ve mücadelesi. *Herboloji Haberleri, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü*, 3, 1-11.
- Kang J.S., 2012.** Principles and applications of LC-MS/MS for the quantitative bioanalysis of analytes in various biological samples, tandem mass spectrometry-applications and principles, Dr Jeevan Prasain (Ed.), ISBN: 978-953-51-0141-3, InTech, China.
- Kim, M. M., Ta, Q. V., Mendis, E., Rajapakse, N., Jung, W. K., Byun, H. G., Jeon, Y. J. and Kim, S. K., 2006.** Phlorotannins in ecklonia cava extract inhibit matrix metalloproteinase activity. *Life sciences*, 79, 1436-1443.
- Kim, S. O., Park, J. G. and Lee, Y. I., 1996.** Increased expression of the insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor gene in hepatocellular carcinoma cell lines: implications of IGF-I receptor gene activation by hepatitis B virus X gene product. *Cancer Research*, 56, 3831-3836.
- Koca, U., Kupeli, E. and Sekeroglu, N., 2011.** Evaluation of in vivo and in vitro biological activities of different extracts of *Cuscuta arvensis*. *Natural Product Communication*, 6, 1433-1436.
- Kolayli, S. and Keha, E., 1999.** A comparative study of antioxidant enzyme activities in freshwater and seawater-adapted rainbow trout. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 13, 334-337.
- Kroschel, J., 2008.** Parasitic weeds of the world: Biology and Control. Oxfordshire CAB International, ISBN: 0-85198-873-3, 332 p., 185-190.
- Ku, J. L. and Park, J. G., 2005.** Biology of SNU cell lines. *Cancer Research and Treatment*, 37, 1-19.
- Kwon, Y. S., Chang, B. S. and Kim, C. M., 2000.** Antioxidative constituents from the seeds of *Cuscuta chinensis*. *Natural Product Sciences*, 6, 135-138.
- Lanini, W. and Kogan, M., 2005.** Biology and management of *Cuscuta* in crops. *Ciencia e Investigación Agraria*, 32, 127-141.
- Lee, M. S., Chen, C. J., Wan, L., Koizumi, A., Chang, W. T., Yang, M. J., Lin, W. H., Tsai, F. J. and Lin, M. K., 2011.** Quercetin is increased in heat-processed *Cuscuta campestris* seeds, which enhances the seed's anti-inflammatory and anti-proliferative activities. *Process Biochemistry*, 46, 2248-2254.
- Li, D. Z., Peng, D. Y., Zhang, R. and Xu, X. X., 2008.** Effects of *cuscuta chinensis* polysaccharide on diabetic mice by alloxan. *Anhui Medical and Pharmaceutical Journal*, 10, 7-15.

- Liu, X., Tang, Y., Wei, S., Yu, H., Lv, H. and Ge, H., 2010.** Isolation and purification of phenolic compounds from *Magnoliae officinalis* by preparative high performance liquid chromatography. *Journal of Liquid. Chromatography and Related Technology*, 33, 431-440.
- Loffler, C., Czygan, F. C. and Proksch, P., 1997.** Phenolic constituents as taxonomic markers in the genus *Cuscuta* (Cuscutaceae). *Biochemical Systematics Ecology*, 25, 297-303.
- Luo, H., Rankin, G. O., Li, Z., de Priest, L. and Chen, Y. C., 2011.** Kaempferol induces apoptosis in ovarian cancer cells through activating p53 in the intrinsic pathway. *Food Chemistry*, 128, 513-519.
- Mabry, T. J., Markham, K. R. and Thomas, M. B., 1970.** The systematic identification of flavonoids. Springer, ISBN: 978-3-642-88460-3, 355 p., 35-226.
- Marcucci, M., Woisky, R. and Salatino, A., 1998.** Use of aluminium chloride in the flavonoids quantification of propolis samples. *Mensagem Doce*, 46, 3-9.
- Martin, A. and Clynes, M., 1993.** Comparison of 5 microplate colorimetric assays for in vitro cytotoxicity testing and cell proliferation assays. *Cytotechnology*, 11, 49-58.
- Ming, L. I. and Hua, J., 2015.** MicroRNA and its Role in ovarian cancer. *Journal of International Obstetrics & Gynecology*, 42, 136-140.
- Macroni, A. and Madani, K., 2016.** Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. *Separation and Purification Technology* 162, 68-76.
- Moradi, M. T., Karimi, A. and Alidadi, S., 2016.** In vitro antiproliferative and apoptosis inducing activities of crude ethyle alcohole extract of *Quercus brantii* L. acorn and subsequent fractions. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 14, 196-202.
- Morris Stiff, G., Gomez, D., de Liguori Carino, N. and Prasad, K. R., 2009.** Surgical management of hepatocellular carcinoma: is the jury still out. *Surgical Oncology*, 18, 298-321.
- Mosmann, T., 1983.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- Mukherjee, A. and Bera, A., 2012.** A detailed study of validation parameters and system suitability test in HPLC. *Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences*, 3, 426-448.
- Nacz, M. and Shahidi, F., 2004.** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054, 95-111.

- Nisa, M., Akbar, S., Tariq, M. and Hussain, Z., 1986.** Effect of *Cuscuta chinensis* water extract on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced skin papillomas and carcinomas in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 18, 21-31.
- Oh, H., Kang, D. G., Lee, S. and Lee, H. S., 2002.** Angiotensin converting enzyme inhibitors from *Cuscuta japonica* Choisy. *Journal of Ethnopharmacology*, 83, 105-108.
- Ohyama, K., Akaike, T., Hirobe, C. and Yamakawa, T., 2003.** Cytotoxicity and apoptotic inducibility of *Vitex agnus castus* fruit extract in cultured human normal and cancer cells and effect on growth. *Biological & pharmaceutical Bulletin*, 26, 10-18.
- Pal, D. K., Mandal, M., Senthilkumar, G. P. and Padhiari, A., 2006.** Antibacterial activity of *Cuscuta reflexa* stem and *Corchorus olitorius* seed. *Fitoterapia*, 77, 589-591.
- Papoutsis, K., Pristijono, P., Golding, J. B., Stathopoulos, C. E., Scarlett, C. J., Bowyer, M. C. and Vuong, Q. V., 2016.** Impact of different solvents on the recovery of bioactive compounds and antioxidant properties from lemon (*Citrus limon* L.) pomace waste. *Food Science and Biotechnology*, 25, 971-977.
- Park, Y. K., Koo, M. H., Ikegaki, M. and Contado, J. L., 1997.** Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Arquivos deBiologia Tecnologia*, 40, 97-106.
- Park, K. J., Yang, S., Eun, Y. A., Kim, S. Y., Lee, H. H. and Kang, H., 2002.** Cytotoxic effects of Korean medicinal herbs determined with hepatocellular carcinoma cell lines. *Pharmaceutical Biology*, 40, 189-195.
- Park, J., Kim, S. H. and Kim, T. S., 2006.** Inhibition of interleukin-4 production in activated T cells via down-regulation of NF-AT DNA binding activity by apigenin, a flavonoid present in dietary plants. *Immunology Letters*, 103, 108-114.
- Pavanato, A., Tuñón, M. J., Sánchez-Campos, S., Marroni, C. A., Llesuy, S., González-Gallego, J. and Marroni, N., 2003.** Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Digestive Diseases and Sciences*, 48, 824-829.
- Peng, C., Liang, Y., Wang, X., Xie, H., Zhang, T. and Ito, Y., 2009.** Preparative isolation and purification of flavonoids from the Chinese medicinal herb *Belamcanda* by high-speed countercurrent chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 32, 2451-2461.
- Phromnoi, K., Yodkeeree, S., Anuchapreda, S. and Limtrakul, P., 2009.** Inhibition of MMP-3 activity and invasion of the MDA-MB-231 human invasive breast carcinoma cell line by bioflavonoids. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30, 1169-1176.

- Pinelo, M., Fabbro, P. D., Manzocco, L., Nuñez, M. J. and Nicoli, M. C., 2005.** Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chemistry*, 92, 109-117.
- Prasain, J. K., Wang, C. C. and Barnes, S., 2004.** Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free Radical Biology and Medicine*, 37, 1324-1350.
- Qureshi, R. and Bhatti, G. R., 2008.** Ethnobotany of plants used by the Thari people of Nara Desert, Pakistan. *Fitoterapia*, 79, 468-473.
- Qureshi, R., Bhatti, G. R. and Memon, R. A., 2010.** Ethnomedicinal uses of herbs from northern part of Nara desert, Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 42, 839-851.
- Reddy, A. S., Malek, S. N. A., Ibrahim, H. and Sim, K. S., 2013.** Cytotoxic effect of *Alpinia scabra* (Blume) naves extracts on human breast and ovarian cancer cells. *Complementary and Alternative Medicine*, 13, 314-328.
- Ren, M. X., Deng, X. H., Ai, F., Yuan, G. Y. and Song, H. Y., 2015.** Effect of quercetin on the proliferation of the human ovarian cancer cell line SKOV-3 in vitro. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 10, 579-583.
- Rho, H. S., Ghimeray, A. K., Yoo, D. S., Ahn, S. M., Kwon, S. S., Lee, K. H., Cho, D. H. and Cho, J. Y., 2011.** Kaempferol and Kaempferol Rhamnosides with Depigmenting and Anti-Inflammatory Properties. *Molecules*, 16, 3338-3344.
- Ruffa, M. J., Ferraro, G., Wagner, M. L., Calcagno, M. L., Campos, R. H. and Cavallaro, L., 2002.** Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 335-339.
- Russo, M., Spagnuolo, C., Volpe, S., Mupo, A., Tedesco, I. and Russo, G. L., 2010.** Quercetin induced apoptosis in association with death receptors and fludarabine in cells isolated from chronic lymphocytic leukaemia patients. *British Journal of Cancer*, 103, 642-648.
- Ryan, D., Robards, K., Prenzler, P. and Antolovich, M., 1999.** Applications of mass spectrometry to plant phenols. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 18, 362-372.
- Saeed, M. K., Deng, Y., Perveen, Z., Ahmad, W., Dai, R. and Yu, Y., 2006.** Optimal Recovery of apigenin from *torreya grandis* by extraction, fractionation and structure elucidation. *Proceedings of the 2006 WSEAS International Conference on Cellular and Molecular Biology, Biophysics and Bioengineering*, Athens, July 14-16, 32-38.
- Sathyadevi, M. and Subramanian, S., 2015.** Extraction, isolation and characterization of bioactive flavonoids from the fruits of *Physalis peruviana* Linn extract. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 8, 152-157.

- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L. and Leblebici, E., 1995.** Tohumlu bitkiler sistematigi. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, ISBN: 4236621447135, 394 s., 116-200.
- Shaheen, U. Y., Hussain, M. H. and Ammar, H. A., 2011.** Cytotoxicity and antioxidant activity of new biologically active constituents from *Salvia Lanigra* and *Salvia Splendens*. *Pharmacognosy Journal*, 3, 36-48.
- Shahidi, F. and Naczk, M., 2002.** Food phenolics : sources, chemistry, effects and applications. Technomic Publishing, ISBN: 1566762790, 331 p., 150-185.
- Shekarchi, M., Kondori, B. M., Hajimehdipoor, H., Abdi, L., Naseri, M., Pourfarzib, M. and Amin, G., 2014.** Finger printing and quantitative analysis of *Cuscuta chinensis* flavonoid contents from different hosts by RP-HPLC. *Food and Nutrition Sciences*, 5, 914-921.
- Singleton, V. L., Orthofer, R. and Lamuela Raventós, R. M., 1999.** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Sithisarn, P., Michaelis, M., Schubert-Zsilavec, M. and Cinatl, J. J., 2013.** Differential antiviral and anti inflammatory mechanisms of the flavonoids biochanin A and baicalein in H5N1 influenza A virus infected cells. *Antiviral Research*, 97, 41-48.
- Skoog, D. A., Holler, F. J. and Crouch, S. R., 2007.** Principles of Instrumental Analysis. Cengage Learning, 7. Baskı, ISBN: 1305577213, 9781305577213, 992 p., 673-697.
- Striseadka, T., Wongpornchai, S. and Rayanakorn, M., 2012.** Quantification of flavonoids in black rice by liquid chromatography-negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 60, 11723-11732.
- Stalikas, C. D., 2007.** Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30, 3268-3295.
- Stefanovic, S., Kuzmina, M. and Costea, M., 2007.** Delimitation of major lineages within *Cuscuta* subgenus *Grammica* (Convolvulaceae) using plastid and nuclear DNA sequences. *American journal of Botany*, 94, 568-589.
- Suh, S. I., Pyun, H. Y., Cho, J. W., Baek, W. K., Park, J. B., Kwon, T., Park, J. W., Suh, M. H. and Carson, D. A., 2000.** 5-Aza-2'-deoxycytidine leads to down-regulation of aberrant p16INK4A RNA transcripts and restores the functional retinoblastoma protein pathway in hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Letters*, 160, 81-88.
- Sukeksi, L. and Maya S., 2016.** Characterizations and extraction of polyphenols from residual pulp of pink guava as source of antioxidants. *Journal of Engineering and Applied Science*. 11, 5209-5216.

- Suresh, V., Sruthi, V., Padmaja, B. and Asha, V. V., 2011.** In vitro anti-inflammatory and anti-cancer activities of *Cuscuta reflexa* Roxb. *Journal of Ethnopharmacology*, 134, 872-877.
- Şahin H., 2014.** Orman gülü bali ve bitkisindeki Grayanotoksin-III (GTX-III) izoformunun LC-MS/MS ile analizi. Doktora Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimlerinin Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 153 s., 11-20.
- Şekeroğlu, N., Ufuk, K. and Meraler, S. A., 2012.** Geleneksel bir halk ilacı: İkşut. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 22, 235-243.
- Teixeira, M. D., Canelas, C. V., Canto, M. A., Teixeira, J. M. and Dias, B., 2009.** HPLC-DAD quantification of phenolic compounds contributing to the antioxidant activity of *Maclura pomifera*, *Ficus carica* and *Ficus elastica* extracts. *Analytical Letters*, 42, 2986–3003.
- Thomas, M. B. and Zhu, A. X., 2005.** Hepatocellular carcinoma: the need for progress. *Journal of clinical oncology. Journal of Clinical Oncology*, 23, 2892-2899.
- Troalen, L. G., Phillips, A. S., Peggie, D. A., Barran, P. E. and Hulme, A. N., 2014.** Historical textile dyeing with *Genista tinctoria* L. *Analytical Methods*, 6, 8915-8923.
- Tuncer, S. and Demirci, M., 2011.** Dental materyallerde biyoyumluluk değerlendirmeleri. *Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 21, 141-149.
- Tura, D. and Robards, K., 2002.** Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. *Journal of Chromatography A*, 975, 71-93.
- Umehara, K., Nemoto, K., Ohkubo, T., Miyase, T., Degawa, M. and Noguchi, H., 2004.** Isolation of a new 15 membered macrocyclic glycolipid lactone, Cuscutic Resinoside a from the seeds of *Cuscuta chinensis*: a stimulator of breast cancer cell proliferation. *Planta Medica*, 70, 299-304.
- URL-1, 2017.** <http://www.crawfordscientific.com/Chromatography-Technical-Tips-Diode-Array-Detector-Settings.html> (5 Mayıs 2017).
- URL-2, 2017.** <http://www.turkbiyokimyadernegi.org.tr/dosyalar/belgeler/kongre/huray-islekel.pdf> (12 Mayıs 2017).
- URL-3, 2017.** <http://www.celeromics.com/en/Support/cell-lines/hepg2.php> (28 Eylül 2017).
- URL-4, 2017.** <http://www.lgcstandardsatcc.org/products/all/HTB7.aspx#characteristics> (28 Eylül 2017).
- URL-5, 2017.** http://www.tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=6395 (5 Mayıs 2016).

- Vijayababu, M. R., Arunkumar, A., Kanagaraj, P., Venkataraman, P., Krishnamoorthy, G. and Arunakaran, J., 2006.** Quercetin downregulates matrix metalloproteinases 2 and 9 proteins expression in prostate cancer cells (PC-3). *Molecular and Cellular Biochemistry*, 287, 109-116.
- Williamson, G., Barron, D., Shimoi, K. and Terao, J., 2005.** In vitro biological properties of flavonoid conjugates found in vivo. *Free Radical Research*, 39, 457-469.
- Yahara, S., Domoto, H., Sugimura, C., Nohara, T., Niiho, Y., Nakajima, Y. and Ito, H., 1994.** An alkaloid and two lignans from *Cuscuta chinensis*. *Phytochemistry*, 37, 1755-1757.
- Yang, H. M., Shin, H. K., Kang, Y. H. and Kim, J. K., 2009.** *Cuscuta chinensis* extract promotes osteoblast differentiation and mineralization in human osteoblast like MG-63 cells. *Journal of Medicinal Food*, 12, 85-92.
- Yang, L., Chen, Q., Wang, F. and Zhang, G., 2011.** Antiosteoporotic compounds from seeds of *Cuscuta chinensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 135, 553-560.
- Yang, Y. M., Son, Y. O., Lee, S. A., Jeon, Y. M. and Lee, J. C., 2011.** Quercetin inhibits α -MSH-stimulated melanogenesis in B16F10 melanoma cells. *Phytotherapy Research*, 25, 1166-1173.
- Yao, L., Jiang, Y., Datta, N., Singanusong, R., Liu, X., Duan, J., Raymont, K., Lisle, A. and Xu Y., 2004.** HPLC analyses of flavanols and phenolic acids in the fresh young shoots of tea (*Camellia sinensis*) grown in Australia. *Food Chemistry*, 84, 253-263.
- Yao, C. H., Tsai, H. M., Chen, Y. S. and Liu, B. S., 2005.** Fabrication and evaluation of a new composite composed of tricalcium phosphate, gelatin, and Chinese medicine as a bone substitute. *Journal of Biomedical Materials Research B, Applied Biomaterials*, 75, 277-288.
- Ye, M., Li, Y., Yan, Y. N., Liu, H. W. and Ji, X. H., 2002.** Determination of flavonoids in Semen *Cuscutae* by RP-HPLC. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, 28, 621-628.
- Ye, M., Yan, Y. and Guo, D. A., 2005.** Characterization of phenolic compounds in the Chinese herbal drug Tu-Si-Zi by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communication Mass Spectrometry*, 19, 1469-1484.
- Ye, M., Yan, Y., Ni, X. and Qiao, L., 2001.** Studies on the chemical constituents of the herba of *Cuscuta chinensis*. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 24, 339-341.
- Yen, F. L., Wu, T. H., Lin, L. T. and Lin, C. C., 2007.** Hepatoprotective and antioxidant effects of *Cuscuta chinensis* against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 111, 123-128.

- Yen, F. L., Wu, T. H., Lin, L. T., Cham, T. M. and Lin, C. C., 2008a.** Nanoparticles formulation of *Cuscuta chinensis* prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 1771-1777.
- Yen, F. L., Wu, T. H., Lin, L. T., Cham, T. M., Lin, C. C., Cham, M. T., 2008b.** Concordance between antioxidant activities and flavonol contents in different extracts and fractions of *Cuscuta chinensis*. *Food Chemistry*, 108, 455-462.
- Yılmaz, Ö. and Özkan, R., 2016.** Küçük tohumlu yonca küskütü (*Cuscuta approximata* Bab.)'nün antifungal etkilerinin belirlenmesi. *Turkish Journal of Science*, 2, 1-6.
- Ying, J., Wang, J., Ji, H., Lin, C., Pan, R., Zhou, L., Song, Y., Zhang, E., Ren, P., Chen, J., Liu, Q., Xu, T., Yi, H., Li, J., Bao, Q., Hu, Y. and Li, P., 2016.** Transcriptome analysis of phycoerythrin inhibitory effects on SKOV-3 cell proliferation. *Gene*, 585, 58-64.
- Young, I. and Woodside, J., 2001.** Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54, 176-186.
- Yuncker, T. G., 1932.** The genus *Cuscuta*. *Memoirs of the Torrey Botanical Club*, 18, 109-331.
- Zierau, O., Hamann, J., Tischer, S., Schwab, P., Metz, P., Vollmer, G., Gutzeit, H. O. and Scholz, S., 2005.** Naringenin-type flavonoids show different estrogenic effects in mammalian and teleost test systems. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 326, 909-916.

ÖZGEÇMİŞ

Emine KILIÇKAYA SELVİ, 15/02/1986 tarihinde Kayseri’de doğdu. 2004 yılında Erciyes Üniversitesi, Kimya Bölümün'de başladığı lisans öğrenimini 2008 yılında bölüm birincisi olarak tamamladı. 2008 yılında Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda başladığı yüksek lisans eğitimini 2011 yılında tamamladı. 2011 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda doktora öğrenimine başladı. 2009 yılı itibariyle Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde araştırma görevlisi olarak görev yapmaktadır. Emine KILIÇKAYA SELVİ, evli ve 1 çocuk annesidir.

