

ERZİNCAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İLİÇ PAPATYASI (*Tanacetum alyssifolium*) BİTKİSİNDEN İZOLE
EDİLEN SEKONDER METABOLİTLERİN ANTIOKSİDAN ve
ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Yakup ULUTAŞ

Danışman: Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL

KİMYA ANABİLİM DALI

ERZİNCAN
2017

Her Hakkı Saklıdır.

Kabul ve Onay Sayfası

Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL danışmanlığında, Yakup ULUTAŞ tarafından hazırlanan bu çalışma 30.06.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Kimya Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul oybirliği/~~oy çokluğu~~ (3./3.) ile kabul edilmiştir.


Başkan : Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL

İmza: 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ahmet ALTAY

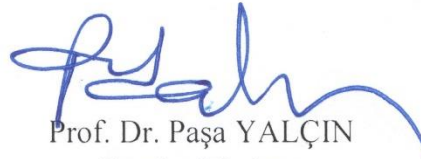
İmza: 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mesut IŞIK

İmza: 

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulunun 04 / 07 / 2017 tarih ve 21./2 nolu kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Paşa YALÇIN
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, şekil, ve tabloların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

Bilimsel Etiğe Uygunluk Sayfası

“İLİÇ PAPATYASI (*Tanacetum alyssifolium*) BİTKİSİNDEN İZOLE EDİLEN SEKONDER METABOLİTLERİN ANTIOKSİDAN ve ANTIKANSER AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ” isimli “Yüksek Lisans” tezim tarafımda intihal tespit programı ile incelenmiştir. Buna göre tezimde bilimsel etik ihlali ve intihal olarak nitelendirilebilecek herhangi bir durum olmadığını taahhüt ederim.

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir biçimde elde edildiğini; aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi beyan ederim. 04 /07 /2017

Yakup ULUTAŞ



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İLİÇ PAPATYASI (*Tanacetum alyssifolium*) BİTKİSİNDEN İZOLE EDİLEN SEKONDER METABOLİTLERİN ANTIOKSİDAN ve ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Yakup ULUTAŞ

Erzincan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL

Bu çalışma dünya üzerinde 161, Türkiye florasında 47 türle temsil edilen *Tanacetum* cinsine ait *Tanacetum alyssifolium* (Bornm.) Grierson (İliç papatyası) bitkisinde mevcut olan sekonder metabolitlerin kromatografik yöntemler ile izole edilmesi, spektroskopik metotlarla yapılarının belirlenmesi ve antiproliferatif ve antioksidan aktivitelerinin incelenmesi amacı ile gerçekleştirildi.

Bu amaçla, bitkinin toprak üstü kısmı etil asetat, n-bütanol ve su fazı olmak üzere üç çözücü sisteminde ekstrakte edildi. N-bütanol ekstraktı kolon kromatografisi işlemlerine tabi tutularak iki farklı bileşik izole edildi. İzole edilen bileşiklerin yapısı spektroskopik metotlarla (1D-NMR, 2D-NMR, HPLC-TOF) aydınlatılarak yapılarının Luteolin-7-O-β-D-glikozit ve İsofraxidin olduğu belirlendi. İzole edilen bileşiklerin antioksidan aktiviteleri, DPPH, ABTS serbest radikallerini giderme ve metal iyonlarını şelatlama kapasitelerine göre değerlendirildi. Antiproliferatif aktiviteleri ise HeLa (İnsan Rahim Kanseri) ve C6 (Sıçan Beyin Tümörü) hücre hatları üzerinde anti-kanser ilaç olarak kullanılan 5-Florourasil (5-FU) ile dört farklı dozda (5, 25, 50, 100 µg/mL) karşılaştırılarak incelendi.

2017, 85 sayfa

Anahtar Kelimeler: Antikanserojen aktivite, antioksidan aktivite, izolasyon, sekonder metabolit, *Tanacetum alyssifolium*.

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT and ANTICANCER ACTIVITIES OF SECONDERY METABOLITES ISOLATED FROM *Tanacetum alyssifolium*

Yakup ULUTAŞ

Erzincan University
Faculty of Sciences and Arts
Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL

This study was carried out with the aim of isolation of secondary metabolites present in *Tanacetum alyssifolium* (Bornm.) Grierson plant belonging to *Tanacetum* genus, which is represented by 161 species in the world and 47 species in Turkey, by means of chromatographic methods and determination of structures by spectroscopic methods as well as determination of their antioxidant and antiproliferative activities.

For this purpose, *Tanacetum alyssifolium* plants was collected from the foothills of Munzur Mountains in Erzincan province and dried at room temperature. The upper part of ground plant was extracted with ethyl acetate/ n-butanol and water solvent system. The n-butanol extract was subjected to the procedure of column chromatography. The structures of the isolated compounds were elucidated by spectroscopic methods (1 H-NMR, 2 D-NMR, HPLC-TOF) to reveal that Luteolin-7-O- β -D-glikozit and isofraxidine. The antioxidant activities of the isolated compounds were evaluated according to the DPPH and ABTS free radical scavenging and metal ion chelating capacities. Antiproliferative activities of the samples was investigated on HeLa (Human Rectum Cancer) and C6 (Rat Brain Tumor) cell lines at four different concentrations (5, 25, 50, 100 μ g/ml) and compared with 5-Fluorouracil (5-FU), which is used as an anticancer drug.

2017, 85 pages

Keywords: Anticancerogen activity, antioxidant activity, isolation, secondary metabolite, *Tanacetum alyssifolium*.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum bu çalışma, Erzinca Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Araştırma Merkezinde gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalarımın her aşamasında, bilgi, deneyim ve yakın ilgisini esirgemeyen, bana her zaman yardımcı olan değerli danışman hocam Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL'a,

Laboratuvar çalışmalarımnda bana göstermiş olduğu yardımlardan dolayı ve izole edilen bileşiklerin yapısının aydınlatılmasında katkılarından dolayı Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Başkanı Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ'a, antikanserojen aktivite testindeki katkılarından dolayı sayın Doç. Dr. Ayşe ŞAHİN YAĞLIOĞLU'na,

Özellikle laboratuvar çalışmaları sırasında her türlü bilgi birikimini benimle paylaşan kıymetli hocalarım Uzman Ali Rıza TÜFEKÇİ'ye, Araştırma Görevlisi Serkan KOLDAŞ'a, Uzman Fatih GÜL'e ve arkadaşım Ertuğrul CEYRAN'a

Bu süreçte maddi, manevi desteklerini esirgemeyen, sabır ve özveri ile hep yanımda olan çok değerli aileme;

Gönülden teşekkür ederim...

Yakup ULUTAŞ

Haziran, 2017

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	6
2. 1. Bitkinin Familyası ve Tanıtımı	6
2.1.1. Asteraceae (Compositae) familyası.....	6
2.1.2. İliç papatyası (<i>Tanacetum alyssifolium</i>) (Bornm.) Grierson.....	8
2.2. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler.....	11
2.3. Bitkisel Sekonder Metabolitler	14
2.4. Flavonoidler	19
2.4.1. Genel yapısı.....	19
2.4.2. Flavonoidlerin biyosentezi ve oluşumu	26
2.4.3. Flavonoidlerin doğadaki önemi	29
2.4.5. Flavonoidlerin yapı tayini	31
2.5. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar.....	33
2.6. Kanser	39
3. MATERYAL ve YÖNTEM	43
3.1. Kullanılan Araç ve Malzemeler	43

3.2. Kullanılan Kimyasallar ve Reaktifler.....	43
3.2.1. İzolasyon işleminde kullanılan kimyasallar ve reaktifler.....	43
3.2.2. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması.....	44
3.2.2.1. DPPH* serbest radikal giderme	44
3.2.2.2. ABTS ⁺ serbest radikal giderme.....	44
3.2.2.3. Metal şelatlama kapasitesi.....	44
3.2.3. Biyolojik aktivite testleri için kullanılan kimyasallar ve hücreler	45
3.3. Kullanılan Cihazlar	45
3.4. Bitkisel Materyal	46
3.4.1. Bitkinin toplanması ve kurutulması	46
3.4.2. Bitkinin ekstraksiyonu ve n-bütanol ekstresinin hazırlanması.....	46
3.5. Kromatografik Yöntemler.....	48
3.5.1. Kolon kromatografisi (KK).....	48
3.5.2. İnce tabaka kromatografisi (İTK).....	52
3.6. Anti Kanserojen Aktivite Testleri	53
3.6.1. Kanser hücre hatları ve hücre kültürü	53
3.6.2. <i>In vitro</i> anti kanser aktivite (antiproliferatif aktivite) testi dizaynı	54
3.6.3. BrdU Cell ELISA hücre proliferasyon deneyi	54
3.6.4. IC ₅₀ konsantrasyonunun belirlenmesi.....	54
3.7. Antioksidan Aktivite Testleri.....	55
3.7.1. DPPH* serbest radikallerini giderme aktivitesi tayini	55
3.7.2. ABTS ⁺ katyon radikal giderme aktivitesi tayini.....	55
3.7.3. Metal şelatlama kapasite tayini	55
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	57
4.1. İzole Edilen Bileşiklerin Yapı Analizi	57
4.2. Antikanserojen Aktivite Testleri	61

4.2.1. HeLa hücrelerine karşı antikanser aktivite sonuçları.....	62
4.2.2. C6 hücrelerine karşı antikanser aktivite sonuçları.....	63
4.3. Antioksidan Aktivite Testleri.....	64
4.3.1. DPPH* serbest radikallerini giderme aktivitesi tayini	64
4.3.2. ABTS* ⁺ katyon radikal giderme aktivitesi tayini.....	66
4.3.3. Metal şelatlama kapasite tayini	67
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	69
KAYNAKLAR	72
EKLER.....	82
EK-1 Luteolin-7-O-β-D-glikozit DEPT Spektrumu	82
EK-2 Luteolin-7-O-β-D-glikozit COSY Spektrumu.....	82
EK-3 Luteolin-7-O-β-D-glikozit HSQC Spektrumu.....	83
EK-4 Luteolin-7-O-β-D-glikozit HMBC Spektrumu	83
EK-5 İsofraxidin DEPT Spektrumu	84
EK-6 İsofraxidin COSY Spektrumu	84
EK-7 İsofraxidin HSQC Spektrumu	85
EK-8 İsofraxidin HMBC Spektrumu	85
ÖZGEÇMİŞ.....	86

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2. 1. <i>Tanacetum Alyssifolium</i> bitkisi.....	9
Şekil 2. 2. <i>Tanacetum alyssifolium</i> 'un Türkiye haritasındaki yeri	10
Şekil 2. 3. Sekonder metabolitlerin bazı uygulama alanları.....	11
Şekil 2. 4. Sekonder metabolitlerin bitkilerde bulunmasını temsil eden pasta grafiği (Croteau vd., 2000).	16
Şekil 2. 5. Sekonder metabolitlerin oluşumu (Hacıbekiroğlu, 2009).....	18
Şekil 2. 6. Genel flavonoid iskeleti	19
Şekil 2. 7. Flavonoidlerin benzoil (A) ve sinnerin (B) halkası	19
Şekil 2. 8. Farklı iskelet yapısına sahip flavonoidler	21
Şekil 2. 9. Flavonoller	22
Şekil 2. 10. Bazı flavonoid grupları ve kaynakları.....	25
Şekil 2. 11. Flavonoidlerin Biyosentezi (Geçibesler, 2009)	27
Şekil 2. 12. (a) Kromon (benzopiron) yapısı, (b) Fenil benzopiron yapısı	28
Şekil 2. 13. Kersetin ve rutin yapısı	29
Şekil 2. 14. Antioksidanların Sınıflandırılması (Çakar, 2010).....	35
Şekil 2. 15. Serbest radikalın nötralizasyonu	38
Şekil 2. 16. Kanser oluşum aşamaları (Oliveira vd., 2007)	40
Şekil 3. 1. Vakum altında süzülmesi ve klorofillerin ayrılması.....	47
Şekil 3. 2. Bütanol ile ekstraksiyon.....	48
Şekil 3. 3. TA-1 ana kolonu	51
Şekil 3. 4. Sephadex yüklü cam kolonlar	52
Şekil 3. 5. İnce Tabaka Kromatografisi	53
Şekil 3. 6. C6 ve HeLa kanser hücreleri.....	54
Şekil 4. 1. İzole edilen luteolin-7-O-β-D-glikozit bileşiğinin ¹ H ve ¹³ C kimyasal kayma değerleri.....	57
Şekil 4. 2. LC-TOF/MS spktrumları	58
Şekil 4. 3. Luteolin-7-O-β-D-glikozit ¹ H-NMR spktrumları	58
Şekil 4. 4. Luteolin-7-O-β-D-glikozit ¹³ C-NMR spktrumları	59

Şekil 4. 5. İzole edilen isofraxidin bileşiğinin ^1H ve ^{13}C kimyasal kayma değerleri .	59
Şekil 4. 6. LC-TOF/MS spktrumları	60
Şekil 4. 7. İsofraxidin ^1H -NMR spktrumları	61
Şekil 4. 8. İsofraxidin ^{13}C -NMR spktrumları	61
Şekil 4. 9. n-Bütanol, luteolin-7-O- β -D-glikozit, isofraxidin ve 5-FU nun HeLa hücrelerine karşı antikanser aktivite sonuçları (* testler üç tekrarlı ve iki kez tekrarlanmıştır).....	62
Şekil 4. 10. n-Bütanol, luteolin-7-O- β -D-glikozit, isofraxidin ve 5-FU nun C6 hücrelerine karşı antikanser aktivite sonuçları (* testler üç tekrarlı ve iki kez tekrarlanmıştır).....	63
Şekil 4. 11. Antioksidan tarafından DPPH $^{\bullet}$ radikalinin giderilmesi (Köksal, 2007) .	64
Şekil 4. 12. Bileşiklerin DPPH $^{\bullet}$ serbest radikali giderme aktivitesinin troloks ile mukayese edilmesi	65
Şekil 4. 13. Bileşiklerin ABTS $^{\bullet+}$ serbest radikali giderme aktivitesinin troloks ile mukayese edilmesi	66
Şekil 4. 14. Etilen Diamin Tetraasetik Asit' in açık yapısı ve metal şelatlama aktivitesi	67
Şekil 4. 15. Bileşiklerin metal şelatlama kapasitesinin EDTA ile mukayese edilmesi	68

TABLULAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2. 1. Bazı flavonoid grupları ve kaynakları	24
Tablo 2. 2. Flavonoidlerin UV spektroskopisindeki absorpsiyon bantları	31
Tablo 3. 1. N-bütanol ekstresinin TA-1 kolonundan elde edilen eluatlar ve kullanılan çözücü sistemleri.....	50
Tablo 4. 1. n-Bütanol, luteolin-7-O-β-D-glikozit, isofraxidin örneklerinin HeLa ve C6 hücrelerine karşı IC ₅₀ ve IC ₇₅ değerleri	63
Tablo 4.2. Bileşiklerin DPPH [•] serbest radikali giderme IC ₅₀ değerleri	66
Tablo 4.3. Bileşiklerin ABTS ^{•+} serbest radikali giderme IC ₅₀ değerleri.....	67
Tablo 4.4. Bileşiklerin Metal şelatlama kapasitesi IC ₅₀ değerleri.....	68

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

%	Yüzde Değer
°C	Santigrat Derece
δ	Kimyasal Kayma

Kısaltmalar

AlCl ₃	Alüminyum Klorür
ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
BHA	Bütillenmiş Hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş Hidroksitoluen
CH ₃ COONH ₄	Amonyum Asetat
CuCl ₂	Bakır (II) Klorür
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium- High glucose
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH•	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikali
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
FeCl ₃	Demir III Klorür
H ₂ SO ₄	Sülfürik Asit
HCl	Hidroklorik Asit
HCN	Hidrosiyanik Asit
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
Hz	Hertz
IPP	İzopentenil Pirofosfat
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
K ₂ S ₂ O ₈	Potasyum Persülfat
Na ₂ SO ₄	Sodyum Sülfat
NaHCO ₃	Sodyum Bikarbonat

Na ₂ HPO ₄	Disodyum Fosfat
NaOAc	Sodyum Asetat
NaOMe	Sodyum Metoksit
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
NA	Naturstoffreagenz Difenil Borikasit β-aminoetilester
O ₂ ⁻	Süperoksit Radikali
OH•	Hidroksil Radikali
POD	Peroksidaz
ppm	Milyonda Bir Birim
R•	Organik Radikali
RNS	Reaktif Azot Türleri
RO•	Alkoksi Radikali
ROO•	Peroksit Radikali
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RS•	Tiyil Radikali
RSO•	Sülfenil Radikali
RSO ₂ •	Tiyil Peroksit Radikali
SOD	Süperoksit Dismutaz
TCA	Trikloroasetik Asit
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Bitkilerin kullanımı insanlık tarihi kadar eskidir. Arkeolojik kalıntılara göre insanlar besin elde etmek ve sağlık problemlerini ortadan kaldırabilmek için öncelikli olarak bitkilerden faydalanmışlardır. Bitkiler dünyanın var oluşundan günümüze kadar insanlığın her türlü ihtiyacını karşılayan temel canlılar olmuştur. Günümüzde insanların doğala yönelmesi ile birlikte doğaya geri dönüş başlamış olup tıbbi ve aromatik bitkilere olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır (Gezgin, 2006; Koçyiğit, 2005).

Tıbbi ve aromatik bitkiler, sağlıklı bir yaşam sürmek, hastalıkların önüne geçmek ve tedavi etmek amacıyla insanlık tarihinin başlangıcından beri kullanılmaktadır. Bu bitkiler sadece ilaç, gıda, kozmetik sanayi ve meşrubat üretiminde kullanılmayıp, günümüzde hayvancılık ve organik tarımda da kullanımları son yıllarda artmıştır. Ayrıca, günümüzde tıbbi ve aromatik bitkiler çeşitli özelliklerinden dolayı birçok alanda kullanılmaktadırlar. Bu alanlardan biri de tekstil sektörüdür. Bitkiler barındırdıkları anti bakteriyel özellik sayesinde sentetik tekstil bitim maddelerine alternatif oluşturmaktadır (Güler vd. 2015).

Bugün dünya nüfusunun büyük bir çoğunluğunda bitkisel metabolik ürünler, ilaç hammaddesi olarak kullanılmaktadır. Birçok gelişmiş ülke tedavi amaçlı olarak bitkisel kaynaklara yönelmiştir. Kullanılan ilaçların büyük bir oranını bitkisel kaynaklar oluşturmaktadır. Sağlık gereksinimlerini ilk etapta geleneksel tıbbi bitkilerden sağlayan geliştirmekte olan ülkelerde bu oran nüfusun %80'i dir. Dünya nüfusunun %80' inin geliştirmekte olan ülkelerde yaşadığı düşünülürse toplam dünya nüfusunun % 64' ü bitkileri tedavi amaçlı kullanmaktadır. Gelişmiş ülkelerde reçete ile satılan ilaçların yaklaşık % 25' i bitkisel kökenli kimyasallardır (Richard, 2011).

Bitkilerin ürettiği oldukları primer ve sekonder metabolitler gibi doğal ürünler endüstrinin en temel ihtiyacı olan ürünlerdir. Bitkiler, doğadan almış oldukları hava, su, mineral ve bazı diğer öğeleri metabolizmalarında çeşitli reaksiyonlar sayesinde

insan vücudunun özümleyebileceği faydalı bileşimlere dönüştürmektedirler. Temel besin öğelerinden proteinler, karbohidratlar, yağlar ve vitaminler bunlara örnektir. Bunlar ağırlıklı olarak bitki metabolizmasında oluşan ve kullanılan etken maddelerdir. Örneğin; uçucu yağlar, esanslar, alkaloidler, tanenler vücudun savunma mekanizmasını destekler ve gücünü artırır, organların işlevlerini destekler ve/veya iyileşmeyi hızlı hale getirir. Böylece organizmadaki belirli organların işlevlerine ve dokulara olumlu etki yaparlar (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011).

Tıbbi ve aromatik bitkilerden, birçok hastalığa karşı kullanılan ilaçların etken maddeleri elde edilmektedir. Bitkilerin sentezlemiş olduğu flavonoid, alkaloid, terpenoid ve tanin gibi kimyasallar enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde yaygın şekilde kullanılmaktadır. (Korukluoğlu vd., 2006). Bu bitkiler bugüne kadar, gerek ülkemizde, gerekse dünyada birçok araştırmacı ve bilim insanının araştırma ve incelemelerine konu olmuştur (Bozkurt ve Göker, 1981; Turan, 2000). Türkiye'de tıbbi olarak kullanılan bitki sayısının 600 civarında olduğu bilinmektedir (Baytop, 1999; Alpınar ve Saclı, 1997).

Bugün dünya üzerinde yaklaşık bir milyon civarında bitki türünün bulunduğu bilinmektedir. Bunların sadece yarısına yakını tanımlanmış olup çok azının üzerinde araştırma ve inceleme yapılmıştır. Gıda ve ilaç amaçlı yetiştirilen türlerin sayısı üç bin civarında iken, ilaç amaçlı kullanılan bitkilerin sayısı her geçen gün artış göstermektedir. Mezopotamya uygarlığı zamanında ilaç ve gıda amaçlı kullanılan bitkilerin miktarı 250 kadarken, Orta çağlarda 4.000'e, 19.y.y. başlarında da bu miktarın 13.000'ne çıktığı bilinmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 1970'li yıllarda yapılan araştırmalara göre, 5'den fazla ülkenin farmakopelerinde de kayıtlı olan ve ticareti yapılan 1900 farklı bitkisel drog saptanmıştır. Yine aynı örgütün, tıbbi bitkiler üzerinde 1990'lı yıllarda 91 ülkede yapılan yayınlara ve farmakopelerine dayanarak hazırladığı rapora göre, tedavi amacıyla kullanılan tıbbi bitki sayısının 500 civarında olduğu ve bu sayının giderek arttığı belirtilmiştir (Erdemir, 1998).

Dünyada 80.000'den fazla bitki türü tıbbi ve aromatik kaynaklıdır (Joy vd. 2001). Türkiye coğrafi konumu ve zengin florasıyla pek çok bitkinin gen merkezi olup çok sayıda endemik bitki türlerine sahiptir. Türkiye'de yayılış gösteren takson sayısı 11.466'sı doğal olmak üzere toplam 11.707'dir ve bunun 3.649'u endemiktir (Güner vd. 2012; Avcı, 2005). Ülkemizdeki bitkisel zenginlik; 3 bitki coğrafyası bölgesinin kesiştiği yerde bulunması, Asya ve Avrupa arasında köprü vazifesi görmesi ve sahip olduğu iklim çeşitliliğinden ileri gelmektedir. Türkiye'nin bu önemi; bitkisel ilaç, bitki kimyasalları, gıda ve katkı maddeleri, kozmetik ve parfümeri sanayilerinin girdisini oluşturan pek çok bitkisel ürünü veren bitkilerin ülkemiz florasında bulunmasından kaynaklanmaktadır (Bayram vd., 2010). Ayrıca Anadolu tedavi gücü yüksek ve aromatik bitkilerin varlığı konusunda çok önemli bir potansiyele sahiptir ve binlerce yıldır ilaç yapımında kullanılan bitkileri bünyesinde barındırmaktadır (Arslan ve Peng, 2013). Bitkilerin tedavide kullanımları insanlık tarihiyle birlikte başlamıştır. Binlerce yıl önce insan, bitkilerin tedavi edici gücünü fark etmiş ve sağlıklı yaşayabilmek için ondan yararlanmış. Halk arasında halk hekimliği uygulamaları yaygınlaşmış ve Anadolu'daki halk ilaçları, uzun tecrübeler sonunda günümüze kadar ulaşmıştır. Bugün modern tıpta kullanılan pek çok ilaç bitkilerden elde edilmektedir.

20. yüzyılın başlarında ilaçların %40'ı bitkilerden üretilirken 1970'li yıllardan sonra bu oran %5'lere kadar düşmüştür. Uzun yıllar kullanılan sentetik ilaçların birçok insanda alerjik reaksiyonlar ve metabolizma bozukluklarına yol açtığı bilinmektedir. Sentetik ilaçların neden olduğu bu ciddi sağlık sorunlarının kesin sonuç alıcı tedavisinin olmayışı ve hasta için rahatsızlık verici olması, ekonomik yük olması gibi nedenlerden dolayı alternatif tıp uygulamalarına olan talep artmıştır (Özçelik ve Balabanlı 2005; Bayram vd. 2010).

Bütün ülkelerde yaşam düzeyinin yükselmesiyle doğru orantılı olarak tüketim de artmaktadır. Bu artıştan dolayı tıbbi ve aromatik bitkilerin tüketim alanları da genişlemektedir (Örneğin; ilaç, diş macunu, sabun, şeker sanayi gibi) (Baytop, 1999).

Artan kimyasal ilaç üretimi ve kullanımından kaynaklanan çeşitli sebeplerden ötürü insanlar yoğun bir şekilde doğal bitkilere yönelmişlerdir. Bitkisel kaynaklı ilaçların insan metabolizmasına olan uyumu sayesinde yukarıda bahsedilen bu yan etkiler hiç görülmemekte, ya da çok az görülmektedir (Yücel, 2014).

Doğadan toplanan tıbbi ve aromatik bitkilerin hiçbir işlem görmeden insanların kullanımına sunulması yeterli olmayacaktır. Bu yüzden uygun alanlarda uzmanlar tarafından kontrollü bir şekilde yetiştirilmelidirler. Özellikle endemik olanlar koruma altına alınmalı ve başta üniversiteler olmak üzere diğer ilgili kuruluşlar tarafından çoğaltılmalarına yönelik çalışmalar yapılmalıdır. Bitkilerin bilgilerinin bulunduğu veri bankaları oluşturulmalı ve hem iç hem de dış ticaret verileri dikkate alınarak doğadan toplanacak ve üretilecek miktarları belirlenmelidir (Bayram vd., 2010).

Geçmişten günümüze kadar, bitkilerden etken maddelerin izole edilmesi işlemi aralıksız devam etmektedir. 1805' de Sertürner tarafından izole edilen "morfin", 1868 de Nativelle tarafından izole edilen "digitalin" gibi bileşikler ilaç etken maddesi olarak kullanılmaktadırlar. Günümüze kadar devam eden bu işleme yeni örneklerden biri olarak *Taxus brevifolia* (Batı veya Pasifik porsuk ağacı) bitkisinden elde edilen taksol ve ondan hazırlanan kanser ilacı verilebilir (Şener, 2009).

Kanser hastalığının önemli kaynaklarından birisi, vücutta oluşan serbest radikallerdir. Serbest radikaller hücre içerisinde çeşitli tahribatlara sebep olmaktadır. İnsan vücudunda bu serbest radikallere karşı koruyucu sistemler vardır. Fakat yoğun stres altında bu sistemler işlevlerini yerine getiremezler ve böylece vücut kendini bu serbest radikallere karşı koruyamaz. Bu türler hücrelerin DNA'larına saldırarak kanser başta olmak üzere çeşitli hastalıklara sebep olurlar.

Serbest radikaller oldukça kararsızdırlar ve canlı sistemlerde bulunan maddeler ile kolay bir şekilde reaksiyona girme eğilimindedirler. Bu reaksiyon sonucu oluşan yeni ürünler erken yaşlanma, hücre yıkımı, hücre ölümü ve kanser gibi birçok hastalığa neden olmaktadır. Serbest radikaller kanser, kalp damar hastalıkları, DNA hasarı, bağışıklık sistemi yetmezliği, Parkinson hastalığı gibi hastalıklara öncülük eder (Akkuş, 1995; Ashwood ve Burtis, 1999; Dawn vd., 1996; Tietz, 1995).

Besinler sağlıklı yaşam için gerekli olan, farklı besin öğelerini içermektedir. Bazı besinler sağlığımız üzerinde olumlu etkileri olan farklı bileşikler de içerirler. Antioksidanlar bu bileşiklerin başında gelmektedir. Dengeli beslenmede, diyetle alınan antioksidanların ayrı bir önemi vardır. Diyetle alınacak olan doğal antioksidan kaynakları, içerdikleri anti kanser ajanlar sayesinde yukarıda bahsedilen hastalıkları engellemekte, oluşumunu geciktirmekte veya oluşan hasarları tedavi etmektedir. Bu yüzden anti kanserojen ajanlar içeren bitkilerin belirlenmesi, içerdikleri kimyasal bileşenlerin yapılarının aydınlatılması ve yan etkisi bulunmayan moleküllerin ilaç etken madde olarak kullanılmasının ilk basamağını oluşturur.

Son yıllarda tıbbi ve aromatik bitkilerin sağlık, gıda ve tekstil saneyinde kullanımı oldukça yaygındır (Tüfekçi, 2010). Bugüne kadar yaklaşık 100.000 sekonder metabolit doğal kaynaklı bitki türlerinden izole edilerek tanımlanmıştır. Bu sayıya her yıl 4.000 kadar yeni bileşik ilave edilmektedir (Verpoorte vd., 1999).

Bu bağlamda, bu çalışmada; *Tanacetum alyssifolium* bitkisinde bulunan sekonder metabolitlerin izolasyonu, yapılarının aydınlatılması ve antioksidan ve anti kanserojen aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2. 1. Bitkinin Familyası ve Tanıtımı

2.1.1. Asteraceae (Compositae) familyası

Türkiye; coğrafi konumu, jeomorfolojik yapısı ve farklı iklim tiplerinin etkisi altında bulunması nedeniyle son derece zengin bir floraya sahiptir. Sahip olduğu takson sayısı, endemik bitki sayısı ve birçok cinsin gen merkezi olması bakımından Avrupa ve Dünyada önemli yerlerden biridir (Heywood ve Tutin, 1964-1981). Türkiye'nin endemik türler bakımından en zengin familyası Asteraceae'dir. Toplam da 1.186 türe sahiptir ve bunların 446'sı endemiktir. Dünyada 1.110 cins ve yaklaşık 25.000 türe sahiptir (Heywood, 1978; Seçmen ve vd., 2000; Yıldız ve Aktoklu, 2010).

Endemik bitki bakımından en zengin ülkelerden biri olan Yunanistan'da bile bu değer 800-1.000 aralığında bulunmaktadır. Bu farklılıklar göz önüne alındığında Türkiye'nin bitki türleri açısından ne kadar zengin olduğu anlaşılmaktadır (Ekim, 2000).

Başka bir kaynağa göre, ülkemizde Asteraceae familyası 136 cins ve 1.345 tür ile temsil ediliyor ve en çok endemik tür de Asteraceae' de bulunuyor. Toplam 489 endemik türe sahiptir (Güner, 2013).

Asteraceae familyası; doğal kimyası, habitata adaptasyonu, çiçeklenme morfolojisi ile kozmopolit bir familyadır. Yaklaşık 1.509 cins ve 25.000 türle dünyada en fazla türü olan familyadır (Brummit, 1992; Heywood, 1985).

Asteraceae, dünya üzerinde yaklaşık 23.000 türü içerisinde barındıran bir familyaya sahiptir. Türkiye florasının büyük bir kısmını bu familya bitkileri oluşturmaktadır (Korkmaz ve ark., 2015; Grierson, 1965).

Yaklaşık 23.000 türle temsil edilen Asteraceae familyası dünyanın en büyük familyalarından biridir (Korkmaz, 2015). Compositae olarak da bilinen bu büyük familya damarlı bitkilerden oluşmaktadır. 1.620 genus ve 12 alt familyayı kapsamaktadır. Önemli bir kısmı otsu bitkilerden oluşmakta olup, sarmaşık veya ağaç formları da görülmektedir (Kumar ve Tyagi, 2013).

Türkiye Florasının başka bir önemli özelliği de çok sayıda endemik taksona sahip olmasıdır. Avrupa 3.500 endemik türe sahip iken, Türkiye de 3.649 endemik tür bulunmaktadır (Eminağaoğlu, 2015).

Asteraceae familyasının büyük bölümünü, ılıman bölgelerde yayılış gösteren otsu formlar meydana getirir. Asteraceae familyası üyeleri, çok geniş habitat tiplerini işgal ederler ve Antartika dışında neredeyse her bölgede bulunurlar. (Atar, 2006, Arabacı, 2006). Özellikle Amerika'nın güneybatısı ve Meksika, Brezilya'nın güneyi, And Dağları boyunca, Akdeniz Bölgesi, Güneybatı Asya, Orta Asya, Güney Afrika ve Avustralya da yoğun olarak bulunmaktadır (Bremer, 1994).

Morfoljik özelliklere göre, Asteraceae familyası; tek yıllık ve çok yıllık otsular, çalimsı, nadiren küçük ya da orta büyüklükte ağaç şeklinde bitkilerden oluşur. Yapraklar alternat veya bazen opozit, nadiren dairesel, stipülsüzdür (nadiren stipüllü). Çiçekler genellikle çok sayıda, nadiren tek ve sapsızdır. Çiçek durumu kapitulumdur. Kapitulum genellikle çok sayıda sapsız, küçük çiçekçiklerden oluşur. (Chamberlain, 1975; Doğan ve Sorkun, 1999).

Dünyada ve Anadolu’da geniş yayılım gösteren Asteraceae familyasına ait birçok türün farmakolojik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu familyadaki bitkiler, sadece diterpenler ve flavanoidler değil aynı zamanda ağırlıklı olarak antibakteriyel, antifungal, antihelmintik, antienflamatuar, insektisit, antitümör gibi pek çok biyolojik aktiviteye sahip seskiterpen alkaloidler de içermektedirler (Yıldız ve Aktoklu, 2010; Ertürk, 2003; Shing ve Sahu, 2002; Picman, 1986).

Asteraceae familyası ekonomik yönden de önem teşkil etmektedir. Bu familya, gıda bitkileri, hammadde kaynakları, medikal ve ilaç bitkileri, yabancı zararlı otları ve zehirli bitkileri içermektedir. Gıda olarak tüketilen bitkileri (*Lactuca L.*, *Cynara L.*), yağ hammadde kaynaklarını (*Helianthus annuus L.*), kauçuk hammadde kaynaklarını (*Taraxacum bicorne Dahlst.*), tıbbi ve ilaç bitkilerini (*Artemisia L.*, *Anthemis L.*), süs bitkilerini (*Dahlia Cav.*, *Aster L.*), sukulentleri (*Kleinia Mill*), yabancı otları (*Cirsium Mill*, *Sonchus L.*) ve zehirli bitkileri (*Senecio L.*) içerir.

Ayrıca bu familyadan bal gibi yiyecek maddeleri elde edilir, familya türleri ilaç sanayisinde kullanılır; ve birçok türü de süs bitkisi olarak yetiştirilir (Saday, 2005; Erdtman, 1996; Rowley vd., 1981).

2.1.2. İliç papatyası (*Tanacetum alyssifolium*) (Bornm.) Grierson

Türkiye’de bu cinsin 18’i endemik olmak üzere 60 takson ve 44 türü bulunmaktadır (Davis, 1988; Güner, 2000). Doğu Anadolu Bölgesinde sadece Erzincan’ın İliç ilçesinde yayılış göstermektedir. Çok yıllık bir bitkidir ve endemiktir. Çiçeklenme zamanı Haziran ve Temmuz aylarıdır. Genellikle kireçtaşı uçurumlar ve kayalarda yetişmektedir. Tür, jipsli alanlarda parçalanmış, küçük gruplar halinde yayılış göstermektedir. Habitatı bulunduğu toprakların yağmurda kolaylıkla çözünmesiyle oluşan doğal erozyonla gittikçe azalmaktadır ve yok olma tehlikesiyle karşı karşıyadır. Populasyonlar ciddi şekilde parçalanmış olup, alanda ki dağılım süreklilik göstermemektedir (Kandemir vd., 2015).



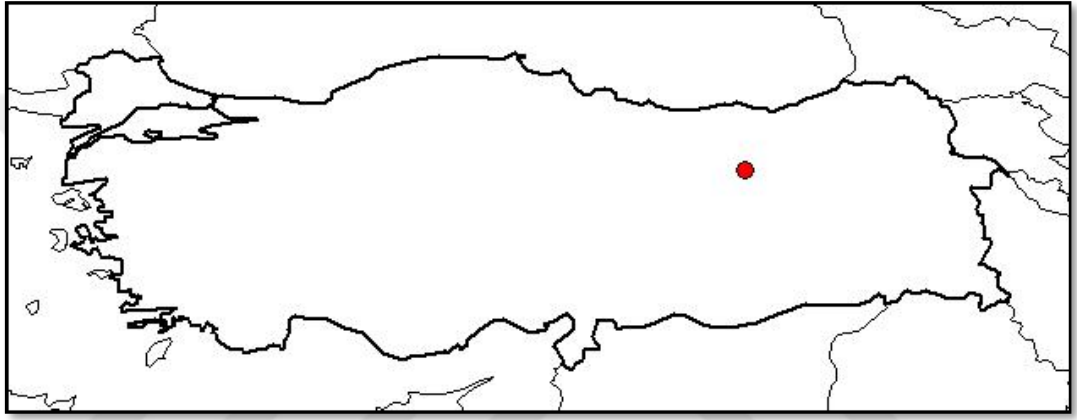
Şekil 2. 1. *Tanacetum Alyssifolium* bitkisi (Kandemir, 2017)

Tanacetum türleri Avrupa, Asya, Kuzey Afrika ve Kuzey Amerika'ya da yayılmıştır. (Korkmaz vd., 2015; Grierson, 1965).

Tanacetum türleri uzun zamandır Dünya üzerinde geleneksel yöntemlerle bazı hastalıkların tedavisinde veya ağrılarının giderilmesinde kullanılmaktadır. En yaygın olarak kullanılan *Tanacetum vulgare* L. bitkisinin antihelmintik ve *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. bitkisinin ateş düşürücü kullanımları öne çıksa da diğer türler, antiseptik, antibiyotik, antioksidan, antiinflamatuvar etkili kullanımlar da görülmüştür (Gören vd., 2002; Kumar ve Tyagi, 2013).

Tanacetum türleri Anadolu'da da yıllardır halk ilacı olarak kullanılmaktadır. (Altundag ve Ozturk, 2011).

Tanacetum türleri üzerinde yapılan fitokimyasal araştırma ve inceleme sonuçları neticesinde bitki kompozisyonlarının yoğunlukla seskiterpenoit ve flavonoitlerden oluştuğu tespit edilmiştir. Bu türün ana bileşenleri olarak görülen seskiterpenoitler bitkilerin gösterdiği biyolojik aktivitenin sorumlusu olduğu düşünülmektedir. Bazı türlerde flavonoitlerin ve bitkilerin uçucu yağlarının da biyolojik aktiviteye sahip oldukları görülmüştür (Gören vd., 2002).



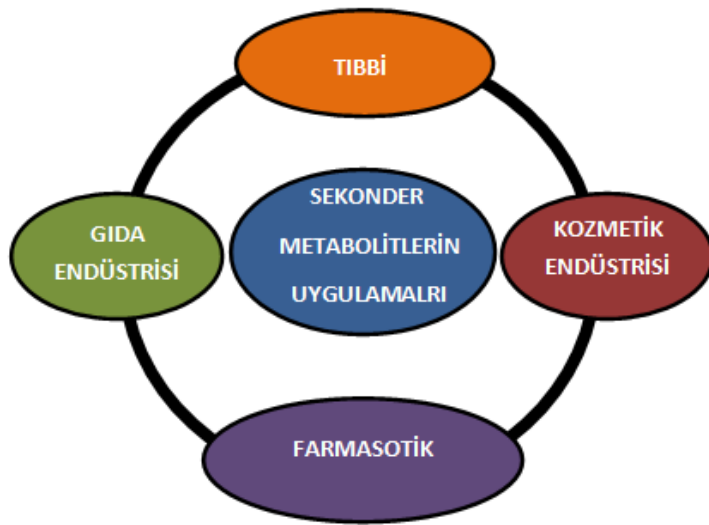
Şekil 2. 2. *Tanacetum alyssifolium*'un Türkiye haritasındaki yeri

Erzincan, bitki türleri açısından Türkiye'nin en önemli şehirlerinden birisidir. Sahip olduğu doğal bitkilerinin % 30.62 si endemiktir (Kandemir, 2006). Türkiye Bitkileri Veri Tabanına göre (TÜBİVES) Erzincan'da 77 familyaya ait 359 cins ve bu cinslere ait tür ve tür altı kategoride 1.031 takson tespit edilmiştir (URL 4). Bu ilimiz Doğu Anadolu ile Karadeniz bölgesi arasında geçiş özelliği göstermektedir. Erzincan aynı zamanda Türkiye'de bitkilerin dağılımında etkili olan ve Anadolu Çaprazı olarak adlandırılan hat üzerinde bulunmaktadır. Bütün bu özellikler Erzincan'daki bitki çeşitliliğinin yüksek olmasına neden olmuştur (Kandemir, 2006).

2.2. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler

Tıbbi bitkilerin tanımını tam olarak yapmak mümkün değildir. Günümüzde “tıbbi” ve “aromatik” bitkiler terimi genellikle birlikte kullanılmaktadır. Tıbbi ve aromatik bitkiler, hastalıkları önlemek, sağlığı sürdürmek veya hastalıkları iyileştirmek için ilaç olarak kullanılan bitkilerdir. Tıbbi bitkiler, beslenme, kozmetik, vücut bakımı, tütsü veya dini törenler gibi alanlarda yer alırken, aromatik bitkiler ise, güzel koku ve tat vermeleri için kullanılmaktadır (Anonim, 2005). Aromatik bitkilerin gıda, kozmetik ve parfümeri sektöründe de geniş kullanım alanı bulunmaktadır.

Tıbbi ve Aromatik bitkiler binlerce yıldır gıda, baharat, ilaç ve şifa bulmak amacıyla kullanılmaktadırlar. Bu nedenle anason, kimyon, haşhaş gibi bazı bitkilerin tanımı tarih öncesi devirlerden beri süregelmiştir. 20. yüzyılın başlarında ilaçların neredeyse yarısı bitkisel orijinli olmasına rağmen 1970' li yıllarda bu oran çok düşmüştür. Fakat 1990' lı yıllardan sonra, tıbbi ve aromatik bitkilerin yeni kullanım alanlarının bulunması, doğal ürünlere olan talebi artırmış ve kullanım miktarını her geçen gün arttırmaktadır. Tıbbi bitkiler piyasasının yıllık yaklaşık 60 milyar dolar civarında olduğu tahmin edilmektedir (Kumar, 2009).



Şekil 2. 3. Sekonder metabolitlerin bazı uygulama alanları

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre yaklaşık 20.000 bitki tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır.

WHO verilerine göre Japonya'da doktorların % 60-70'i hastalarına geleneksel ilaçları tavsiye etmektedir (WHO, 2002). Çiçekli bitkilerden sadece % 15'i üzerinde kimyasal ve farmakolojik araştırmalar yapılmıştır (Baser, 1995). Yeryüzündeki bütün bitki türleri düşünüldüğünde son derece düşük olan bu oran, bitkilerin, farklı ilaç şekillerinde kullanılmaları için oldukça büyük bir kaynak oluşturduklarını göstermektedir (Tarakçı, 2006). Bütün bu bilgiler ışığında, ülkemizin bu konuda büyük bir çalışma potansiyeline sahip olduğu sonucuna varılabilir (Kendir ve Güvenç, 2010).

Sanayileşmenin dünyamıza getirdiği kitle üretimi, ilaç sanayinde sentetik ve yarı sentetik ilaçlar lehinde bir gelişim gösterdiğinden bitkisel ürünlerin bu sektörde kullanımı gittikçe azalma eğilimindeydi. Son yıllarda sentetik ilaçların kullanımı sonucu meydana gelen ciddi yan etkiler ve bunların yol açtığı medikal ve ekonomik sorunlar bitkilerle tedaviyi tekrar popüler hale getirmiştir (Özbek, 2005).

Tıp alanındaki önemli gelişmelere rağmen, insanlar zaman zaman şifayı doğada aramış ve yüzyıllardır edindikleri deneyimler neticesinde tıbbi bitkilerin kullanımını günümüze değin sürdürmüşlerdir. Hastalıkların tedavisinde kullanılan özellikle sentetik ve kimyasal içerikli ilaçların yan etkilerinin ortaya çıkışı tıbbi bitki kullanımını artırmıştır (Bayramoğlu vd., 2009; Yıldız vd., 2010).

Yeni ilaçların neredeyse yarısının doğal kaynakları esas alması ilaç geliştirme çalışmalarını hızla doğaya yönlendirmiştir. Doğal kaynaklardan elde edilen ilaç hammaddeleri ve ilgili bileşikler arasında antibakteriyel, antikanser, antikoagülan, antiparazitik ve immunosupresan ajanlar tedavide kullanımda ilk sırada yer almaktadır. Bu ilaçlar ağırlıklı olarak antialerjik ve solunum yolları ilaçları,

analjezikler, kardiyovasküler ilaçlar ve antiinfektif ajanlardır (Zeybek ve Haksel, 2010).

Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar arasında da doğal kaynaklı ilaçların payı oldukça büyüktür. Başta taxan grubu paclitaxel, docetaxel ve kamptotesin türevi irinotekan ve topotekan olmak üzere dünyada satılan antikanser ilaçların yaklaşık üçte biri doğal kaynaklı bileşiklerden oluşur; bu ilaçların 2002 yılında pazar payı 3 milyar dolar olmuştur (Bulut, 2005).

Tıbbi ve aromatik bitkilerin ülke ekonomisi bakımından önemli ticaret hacmine sahip olduğu bilinir (Yücel, 2010). Türkiye geniş yüzölçümü, coğrafi konumu, iklimi, bitki çeşitliliği ve tarımsal potansiyeli sayesinde tıbbi ve aromatik bitkiler ticaretinde önde gelen ülkelerdendir. Gelişmiş ülkelerdeki bitkisel ilaç, gıda ve kozmetik sanayilerinin hammaddesini oluşturan bitkilerin çoğu Türkiye florasından temin edilmektedir. Bu durum Türkiye'nin tıbbi ve aromatik bitkiler ticareti yönünden ne kadar önemli bir konumda olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla Türkiye tıbbi ve aromatik bitkiler açısından büyük bir ekonomik potansiyele sahip olup birçok tıbbi ve aromatik bitkinin ihracatını ve ithalatını yapmaktadır (Yücer ve Altıntaş, 2012).

ABD'de reçete edilen 150 ilaçtan 84'ü doğal bileşik veya türevidir. Bu ilaçlar ağırlıklı antialerjik ve solunum yolları ilaçları, analjezikler, kardiyovasküler ilaçlar ve antiinfektif ajanlardır. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar arasında da doğal kaynaklı ilaçların payı oldukça büyüktür. Örneğin, doğal kaynaklı ilaç hammaddelerinden porsuk ağacından elde edilen ilaçlardan taxol, 2000 yılında 1,6 milyar dolar pazar payıyla önemli yer tutar. Başta taxan grubu paclitaxel, docataxel ve kamptotesin türevi irinotekan ve topotekan olmak üzere dünyada satılan anti kanser ilaçların yaklaşık üçte biri bu gibi doğal kaynaklı bileşiklerden oluşur; bu ilaçların 2002 yılında pazar payı 3 milyar dolar olmuştur (Harput, 2010).

Türkiye’de tıbbi ve aromatik bitkilerin büyük kısmı (347 tür) doğadan toplanmakta, doğrudan tüketilmekte, iç pazarda satılmakta veya ihraç edilmektedir. İhraç edilen bu bitkilerin başında, *Glycyrrhiza glabra* (meyan), *Rosmarinus officinalis* (biberiye), *Salvia* spp. (adaçayı türleri), *Sideritis* spp. (dağçayı türleri), *Origanum* spp. (kekik türleri), *Satureja* spp. (sater türleri), *Capparis* spp. (kebere türleri), *Gypsophilla* spp. (çöven türleri) ile *Galanthus* spp. (kardelen türleri) ve *Orchis* spp. (salep türleri) gibi bitkiler gelir (Öztürk vd., 2012).

Tıbbi ve aromatik bitkilerin mevcut varlıklarını devam ettirebilmeleri ancak onların korunmaları ve çoğaltılmalarına bağlıdır. Bu bağlamda ülkemizdeki tıbbi ve aromatik bitkilerden ekonomik ve daha etkin yararlanmak için çalışmalara önem verilmesi gerekmektedir.

2.3. Bitkisel Sekonder Metabolitler

Modern bilimlerin gelişmesiyle birlikte biyoloji, kimya, farmakoloji, toksikoloji gibi disiplinlerin kombine çalışmasıyla, halk ilacı olarak kullanılan birçok bitkinin, yapısında bulunan doğal bileşiklerin, fitokimyasal yapıları aydınlatılmakta ve biyolojik aktiviteleri belirlenebilmektedir (Baykal, 1997; Dülger, 1999; Tadeg, 2005). Bitkiler üzerinde yapılan araştırmalarda bitkilerin de insan ve hayvanlarda olduğu gibi, kendilerini dış saldırılara karşı korumak için çeşitli savunma sistemlerine sahip olduğu bildirilmiştir. Bitkilerin, ekosistemle olan ilişkisinde, çevresel koşullara uyumunda, savunma, hayatta kalma, korunma, nesillerini sürdürme gibi önemli olaylarda çeşitli avantajlar sağlayan, kimyasal maddeler sekonder metabolit olarak tanımlanmıştır (Bourgau, 2001). Bunlar bitkideki morfolojik ve bazı biyokimyasal olaylar arasında değişen bir dizi faktörler sonucu oluşmaktadır. Bitkilerdeki biyokimyasal olaylar esnasında sentezlenen sekonder metabolit adı verilen bu doğal ürünler bitki-zararlı ilişkilerinde önemli rol oynamaktadırlar. Kısaca bitkilerin yaşamlarını sürdürmeleri için birinci derecede önemli olmayan; fakat sürekli olarak değişmekte olan yaşam ve

çevre koşullarına karşı uyum sağlama, savunma, hayatta kalma gibi önemli olaylarda avantaj sağlayan kimyasal maddelere sekonder metabolitler denir.

Bu maddelerin bitkideki önemli görevlerinden bazıları şunlardır:

1- Kuraklık, tuzluluk, UV ışınları vs. gibi değişik çevre faktörlerinin oluşturduğu stres ortamına karşı koyma.

2- Bitkiyi herbivorlara (böcek, sürüngen vb.) karşı savunma, aynı ortamdaki diğer bitkilerle rekabet güçlerini artırma.

3- Mikroorganizmalara (bakteri, mantar vb.) karşı koruma.

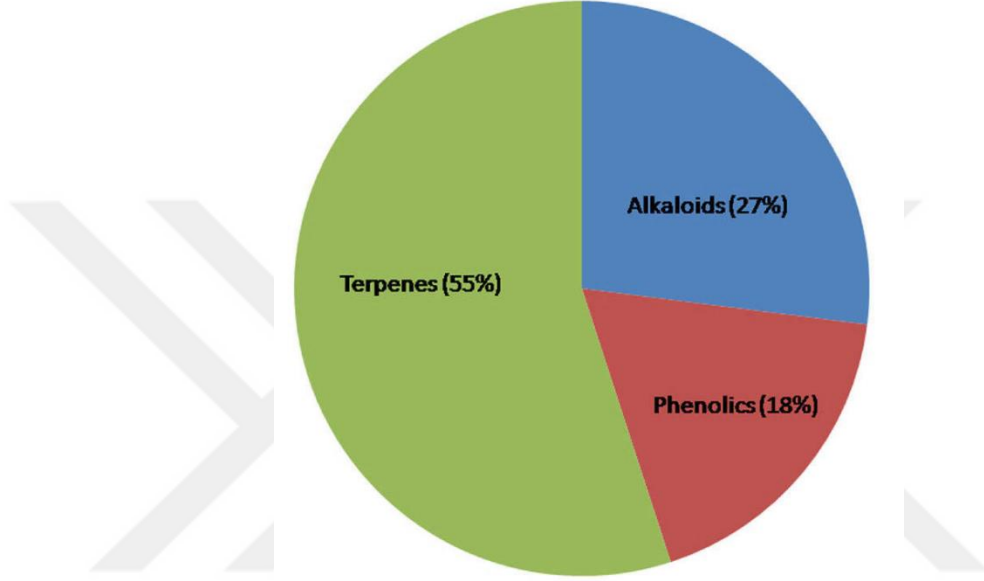
4- Tozlanmada faydalı organizmaları (özellikle böcekleri) cezbedici özelliğiyle çekme, simbiyotik ilişkilerde görev alma (Özcan vd., 2001).

Günümüzde en fazla çalışılan bitki sekonder metabolitleri alkaloidler, terpenoidler, fenolik bileşikler, antosiyaninler, taninler, saponinler ve uçucu yağlar olarak sıralayabiliriz. Bu bileşikler, tıbbi uygulamalarda, endüstride (sabun, parfüm, bitkisel yağ, boya, yapışkan, doğal plastik) ve pestisit üretiminde kullanılmaktadır.

Sekonder metabolitler insanlarda hastalık tedavisinde etkili olduğundan bazı ilaçların içeriğine katılmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde nüfusun %80'inin sağlık gereksinimlerini ilk etapta geleneksel tıbbi bitkilerden sağladığı bilinmektedir.

Bitkilerden elde edilen sekonder metabolitler hem o bitkinin savunma mekanizmasını aydınlatmada, hem de başta ilaç sanayi olmak üzere gıda, bitki zararlılarına karşı mücadele, kozmetik ve çeşitli endüstriyel alanlarda kullanımına olanak sağlamaktadır.

Bu kimyasal maddelerin önceden hiçbir işe yaramadığı bitkiler tarafından üretilen atık maddeler olduğu varsayılıyordu. Ancak daha sonra bu maddelerin savunma, korunma, ortama uyum, hayatta kalma ve nesillerini devam ettirmek için bitkilerin yapısına konulmuş oldukça karmaşık mekanizmaların ürünleri olduğu anlaşıldı.



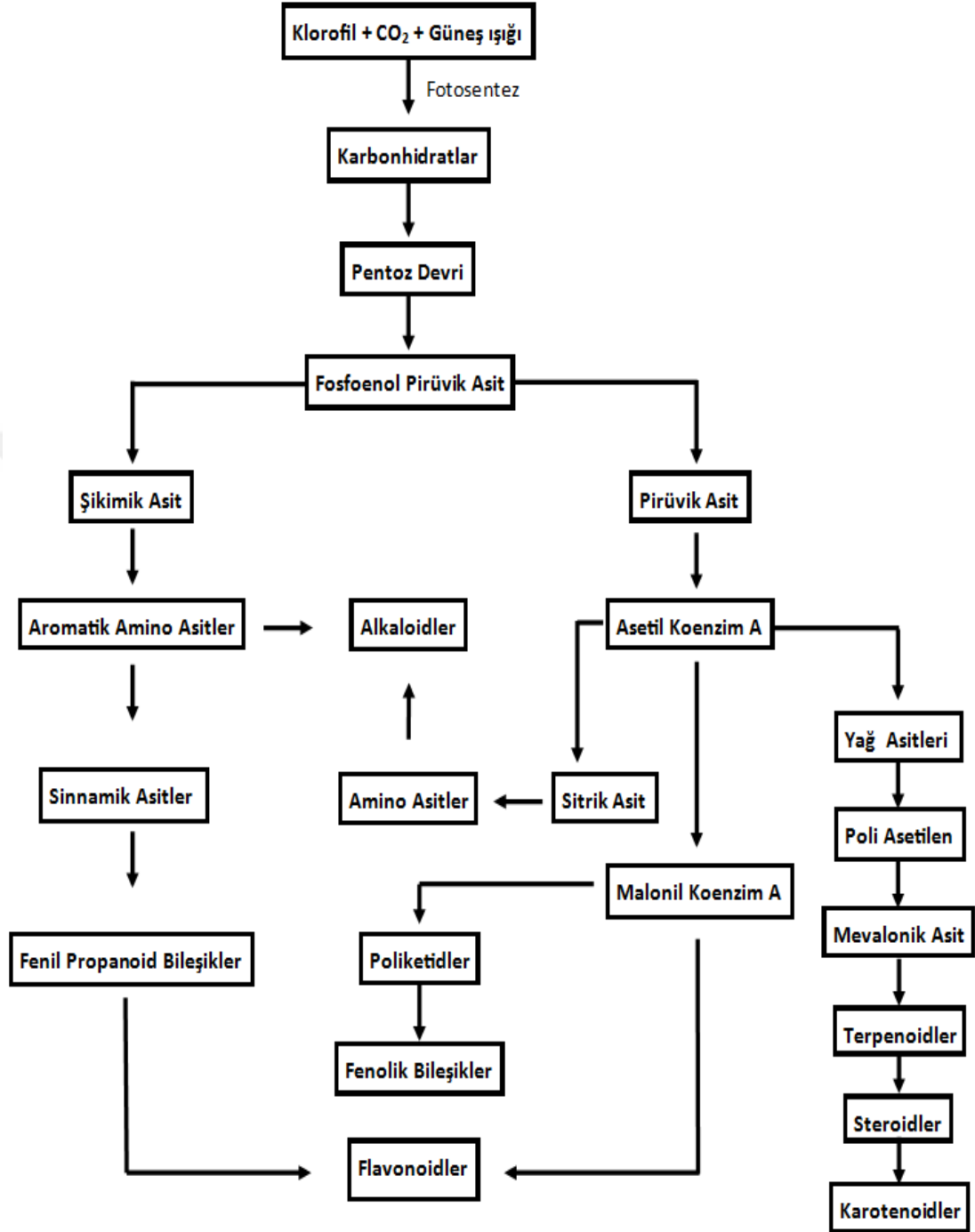
Şekil 2. 4. Sekonder metabolitlerin bitkilerde bulunmasını temsil eden pasta grafiği (Croteau vd., 2000).

İnsanoğlu 19. yüzyılın sonuna kadar bu doğal ürünlerin kimyasal öneminin farkına varamamış olsa da; geçen yüzyıl boyunca sekonder metabolitlerle ilgili çalışmalar hız kazanmış, güçlü ve yeni spektroskopik ve kromatografik yöntemlerin gelişmesiyle organik kimyanın güçlü bir dalı haline gelmiştir (Sökmen ve Gürel, 2001).

1805 yılında Alman kimyacı Friedrich Sertürner'in haşhaştan morfini izole etmesiyle bitki sekonder bileşikleri üzerindeki çalışmalar hız kazanmıştır. Bu çalışma ile bitkiden biyoaktif bir maddenin izole edilebileceği ve bu aktif maddenin farklı kimyasal reaksiyonlarda görev alabileceği gösterilmiştir (Hartmann vd., 2005).

Sekonder metabolitler bitkilerde organizmanın yaşamını sürdürmesi için gerekli olan karbohidrat, protein ve yağlardan oluşan primer metabolitlerin yan ürünleri olarak üretilirler. Çoğunlukla izoprenoid, fenilpropanoid, alkaloid ve yağ asitleri metabolik yollarından türevlenirler. Bu metabolik yollar farklı familya ve türler arasında kendilerine özgü olduğundan, sekonder metabolitler botanik sınıflandırma için belirteç olarak da kullanılmaktadırlar (Dewick, 1997; Bratt, 2000; Bourgaud vd., 2001). Ayrıca bu zengin çeşitliliğin sonucunda mikrobiyal ve hayvan saldırılarına karşı savunma yeteneği geliştirerek evrim süresince doğal seçilimi sağlarlar (Dixon, 2001). Sekonder metabolitlerin oluşum şeması Şekil 2. 5' de verilmektedir.



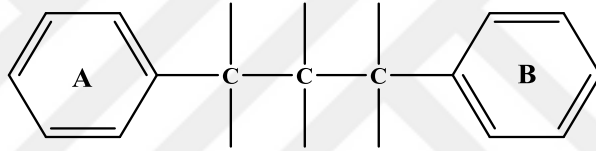


Şekil 2. 5. Sekonder metabolitlerin oluşumu (Hacıbekiroğlu, 2009)

2.4. Flavonoidler

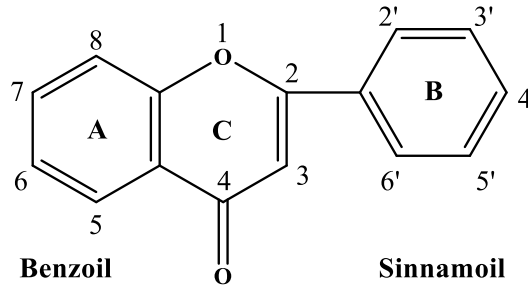
2.4.1. Genel yapısı

Fenilalaninden türevlenen ve fenolik bileşiklerin en büyük sınıfını oluşturan flavonoidler, latince sarı anlamına gelen 'flavus' sözcüğünden türetilerek 'flavonoid' ismini almışlardır. Flavonoidler iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan fenil benzopiran yapısındaki fenolik bileşiklerdir. Bu bileşikler genellikle 15 karbon atomuna sahip (C6-C3 C6) karbon iskeletini (Şekil 2. 6.) içeren doğal ürün sınıfındaki bileşiklerdir (Eryiğit, 2006).



Şekil 2. 6. Genel flavonoid iskeleti

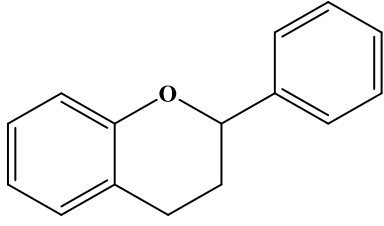
Kimyasal bakımdan flavonoidler 2–fenilbenzopiran yapısı göstermektedirler (Şekil 2.7), (Mabry vd., 1970).



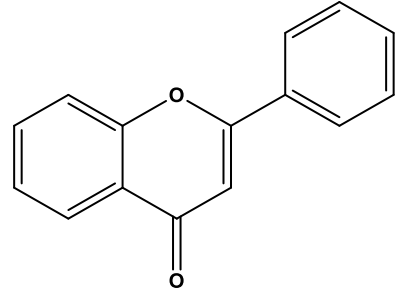
Şekil 2. 7. Flavonoidlerin benzoil (A) ve sinnamoil (B) halkası

Flavon yapılarındaki A ve B aromatik halkaları, C ise heterohalkayı göstermektedir. A ve C halkalarındaki (benzopiran çekirdeğinde) karbon atomları oksijen atomundan başlayarak numaralandırılırken, B halkasındaki atomlar ise “üssü” (') rakamlarla numaralandırılmaktadır. Aromatik halkanın benzopiren (kroman) parçasına bağlanma pozisyonuna bağlı olarak, bağlı süstitüentlerin sayısı, türü ve pozisyonları flavonoidlerin yapı çeşitliliğine neden olmaktadır. Flavonoidlerin sınıflandırılmalarında çok küçük farklılıklar vardır. Şekil 2.8.'de bazı flavon iskeletlerinin temel yapıları verilmiştir.

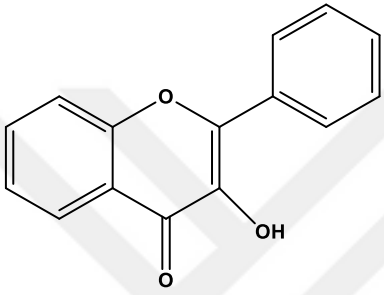




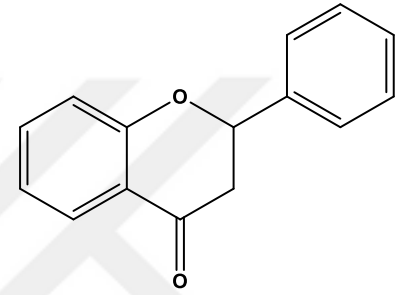
Flavan



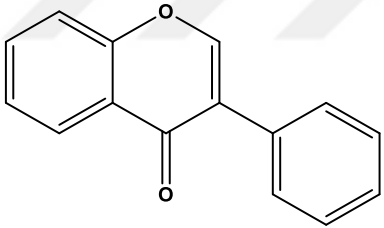
Flavon



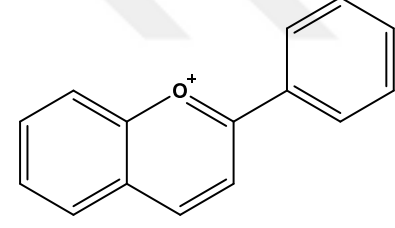
Flavonol



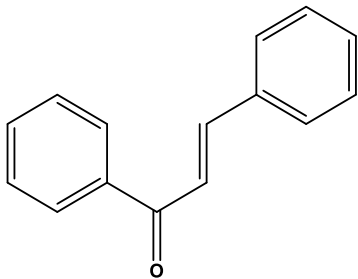
Flavonon



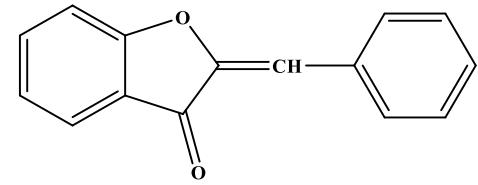
İzoflavon



Antosiyanidin



Kalkon

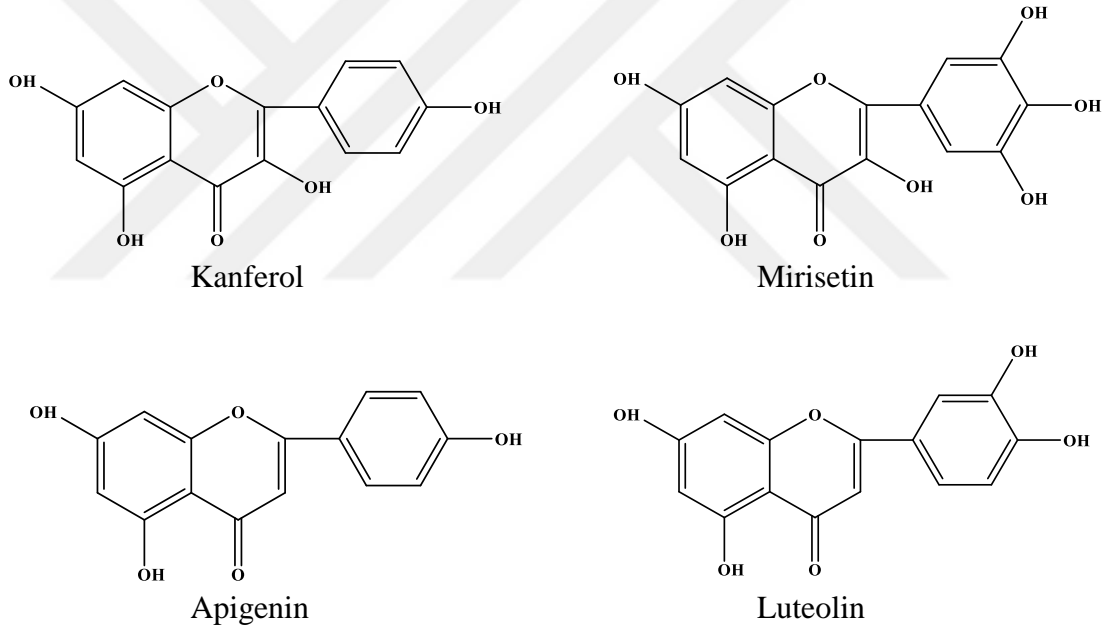


Auron

Şekil 2. 8. Farklı iskelet yapısına sahip flavonoidler

1930 yılında portakaldan yeni bir madde izole edilmiş ve bu maddenin yeni bir vitamin olduğu düşünülerek P vitamini olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra bu maddenin bir tür flavonoid (rutin) olduğu anlaşılmış ve flavonoidler üzerinde yapılan çalışmalar hızlanmıştır (Rice-Evans vd., 1996).

Genelde en fazla görülen flavonoid türleri flavonlar ve flavonollerdir. Neredeyse bütün bitkilerin yaprak ya da çiçeklerinde glikozit şeklinde bulunurlar ve sınıflandırmada önemli taksonomik belirteç görevi görürler. En çok görülen flavonoller; kamferol, kersetin ve mirisetin; flavonlar ise, apigenin ve luteolin'dir. (Şekil 2. 9.)

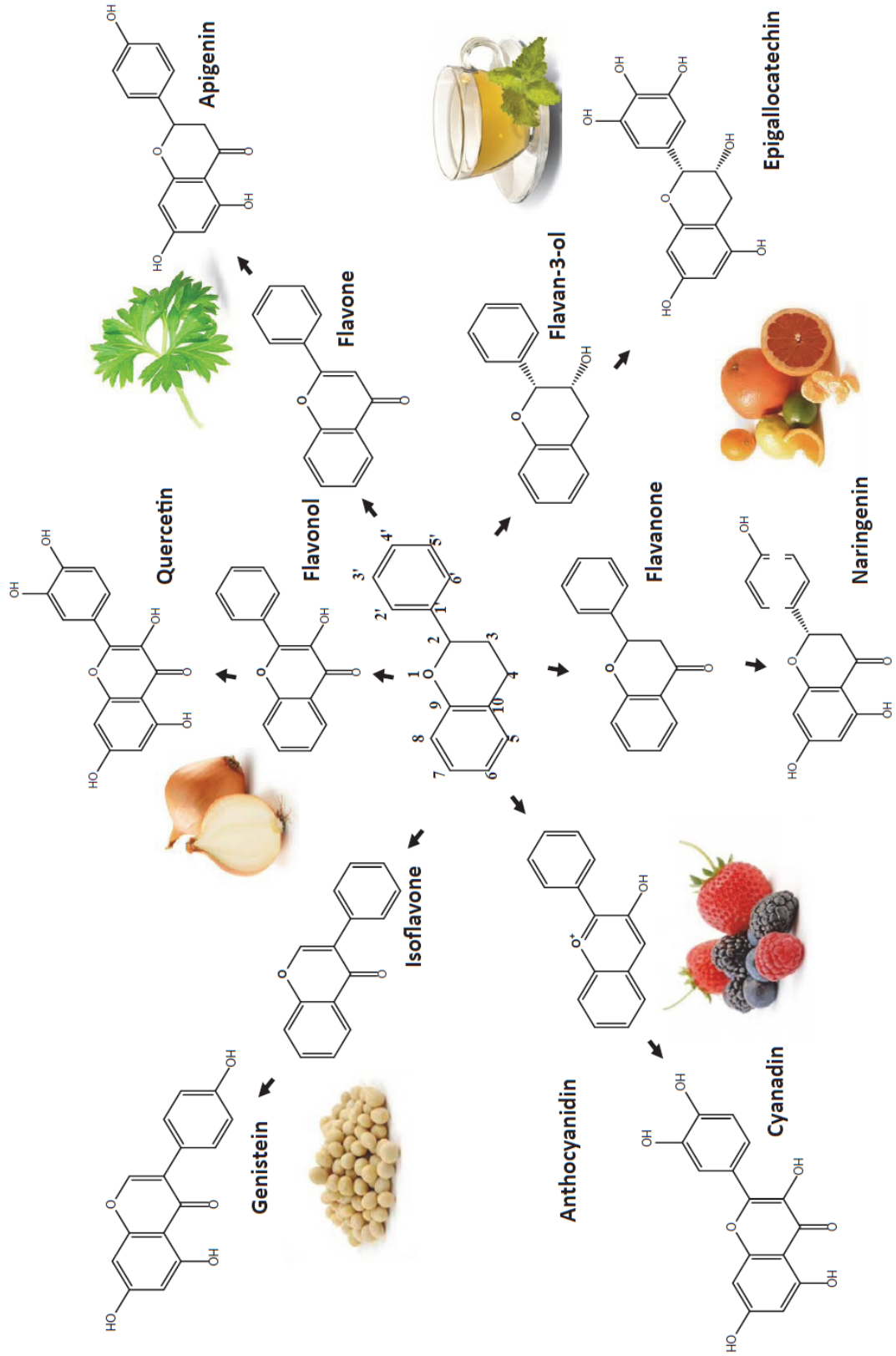


Şekil 2. 9. Flavonoller

Başlangıçta, çoğunlukla sarı renkli olan ve kimyasal olarak 2 fenilbenzopiran yapısı gösteren doğal bileşiklerin tümüne flavon adı verilmiştir. Günümüzde ise bu ya da buna benzer yapı gösteren tüm bileşiklere, doğal ya da sentez yoluyla elde edilmiş olsun, renk ayırımı yapılmadan flavonoid denilmektedir. Zamanla farklı iskelet yapılarına sahip bileşiklerin elde edilmesi neticesinde flavonoidler kendi içinde gruplandırılmıştır (Gören, 1978). Flavonoidlerin bazı türleri diğerlerinden daha fazla yayılım gösterir. Flavonlar ve flavonoller başta olmak üzere, bazı bitki türlerinde flavonon, izoflavon ve antosiyanin gruplarına da rastlanmaktadır. Flavonoidlerin ana diyet kaynakları geniş ve birbirinden farklı grupları içerirler. Flavonol; (kuersetin, mirisetin, kaempferol) bitkisel besinlerin büyük bir kısmında bulunur ve sebze yapraklarında, elma, soğan, brokoli, böğürtlen ve ahududularda bulunur. Flavonlar; (apigenin ve luteolin) ve antosiyanidinler tahıllarda, otlarda ve sebze yapraklarında da az miktarda mevcuttur. Kateşinler; (epikateşin, kateşin) çay, elma, üzüm, çikolata ve kırmızı şarapta çok yaygındır. Flavononlar; (naringenin ve hesperetin) turunçgillerde ve bu meyvelerin suyunda çok fazla bulunur. İzoflavonlar; (daidzein ve genistein) soya bazlı besinler ve soya fasulyesinde çokça bulunur (Tablo 2.1.) (Wang vd., 2009; Nijveldt vd., 2001).

Tablo 2. 1. Bazı flavonoid grupları ve kaynakları

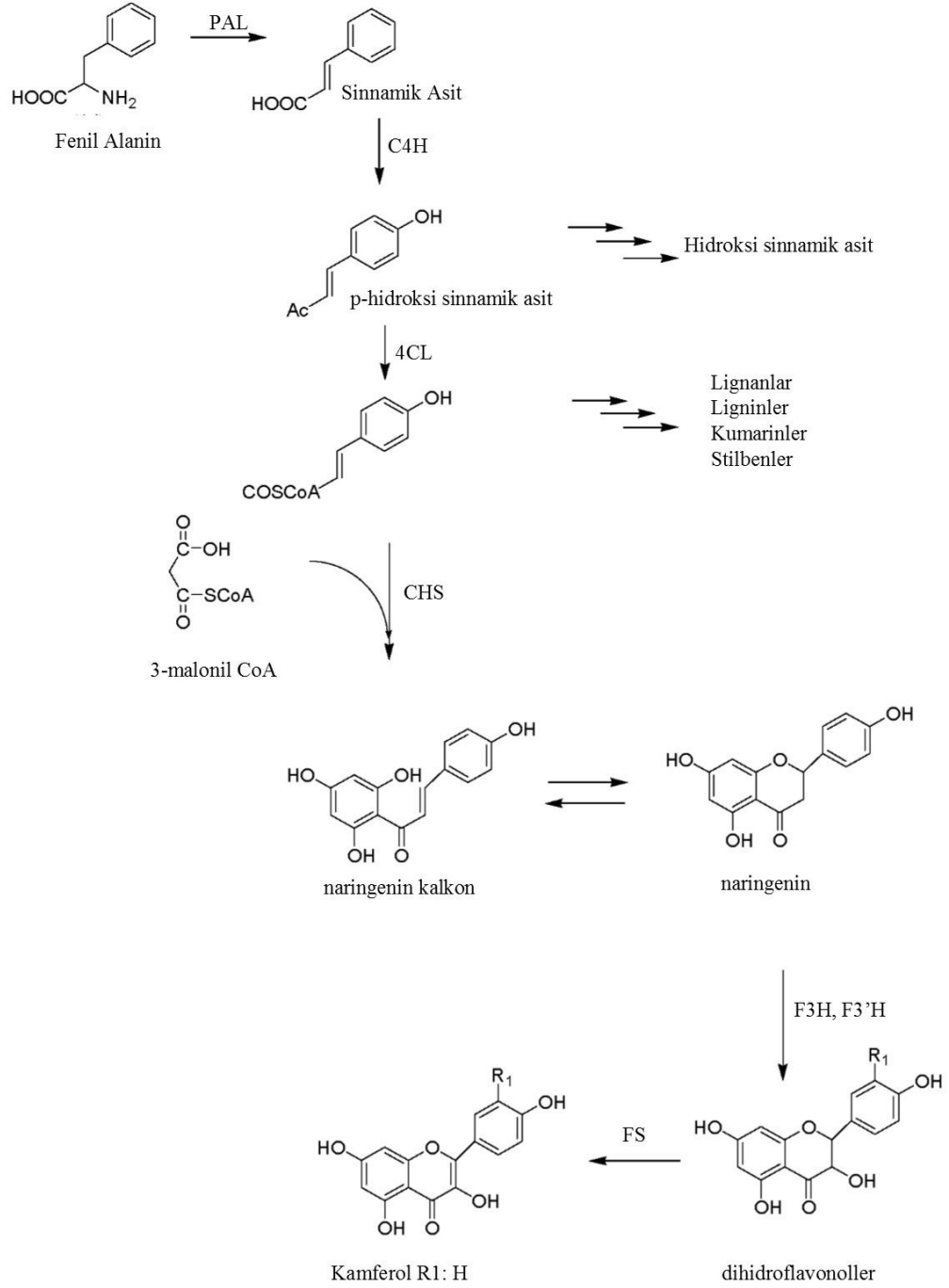
Grup	Bileşik	Kaynak
Flavon	Apigenin	Elma Kabuğu
	Krisin	Çilek, Kiraz
	Kamferol	Brokoli
	Luteolin	Kereviz
	Miricetin	Meyve Kabuğu
	Rutin	Kızılıcık
	Sibelin	Üzüm
	Kersetin	Marul, Zeytin, Soğan, Maydanoz
Flavonon	Fisetin	Limon
	Hesperetin	Limon Kabuğu
	Naringin	
	Naringenin	
Flavonol (Kateşin)	Taksifolin	
	Kateşin	Kırmızı şarap
	Epikateşin	Çay (siyah, yeşil)
Antosiyanin	Syanidin	Çilek
	Delfinidin	Kiraz
	Malvidin	Üzüm
	Pelargonidin	Ahududu, Frambuaz
	Peonidin	Kırmızı üzüm
	Petunidin	Kırmızı şarap
		Çay Koyu pigmentli meyve kabukları



Şekil 2. 10. Bazı flavonoid grupları ve kaynakları

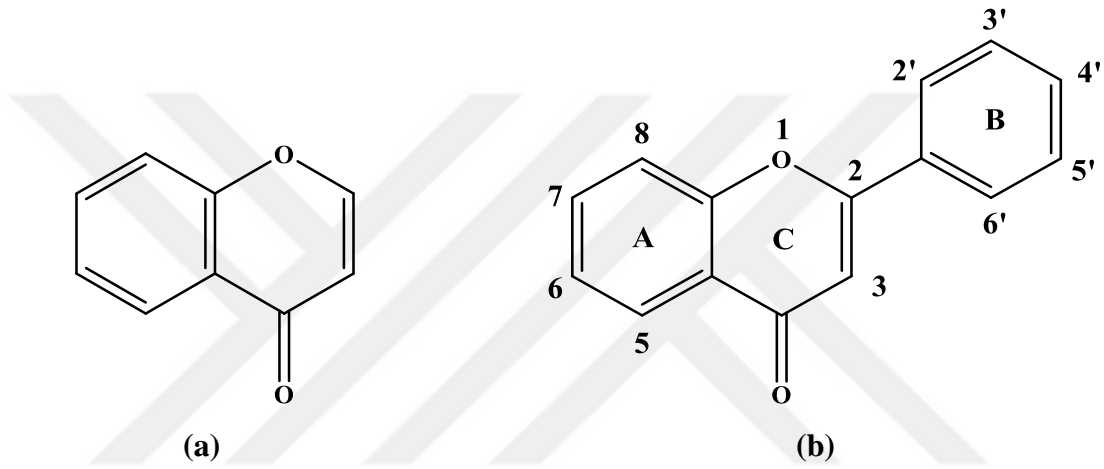
2.4.2. Flavonoidlerin biyosentezi ve oluşumu

Flavonoidler bitkisel gıdalarda bol ve yaygın olarak bulunmaktadır ve bitkilerin ikincil metabolitleridir. Bitkilerde fotosentez ile oluşan ve bitkilerin yaşamsal ihtiyaçları için kullandıkları birincil metabolitler olan karbohidratlar, aminoasitler gibi yapılardan türemektedirler. Bitkiler fotosentez sonucu oluşan bütün karbonların % 2'sini flavonoidlere veya ilgili diğer bileşiklere dönüştürmektedir (Smith ve Banks 1986). Flavonoidler fenil alanin gibi aminoasitlerin enzimatik deaminasyonundan meydana gelen sinamik asit türevlerinin, malonil CoA ile kondenzasyonundan veya asetil CoA kondenzasyonundan oluşmaktadır (Dewick, 2001; Harborne, 1975).



Şekil 2. 11. Flavonoidlerin Biyosentezi (Geçibesler, 2009)

Fenil benzopiran yapısı A, B ve C halkalarından meydana gelmektedir. A halkası glikoz metabolizması sonucu oluşan, asetil koenzim A'dan oluşan malonil koenzim A'nın 3 molekülünün kondenzasyonu ile oluşurken, B ve C halkaları ise yine glikoz metabolizması sonucu oluşan şikimik asit üzerinden sinamik asit gibi fenil propanoid bileşiklerinden oluşmuştur (Pütün, 1987; Formica ve Regelson, 1995).



Şekil 2. 12. (a) Kromon (benzopiron) yapısı, (b) Fenil benzopiron yapısı

Flavonoidlerin serbest radikal yakalama ve antioksidan özelliklerinin yapılarında bulunan üç gruptan ileri geldiği öne sürülmektedir (Bors vd., 1990).

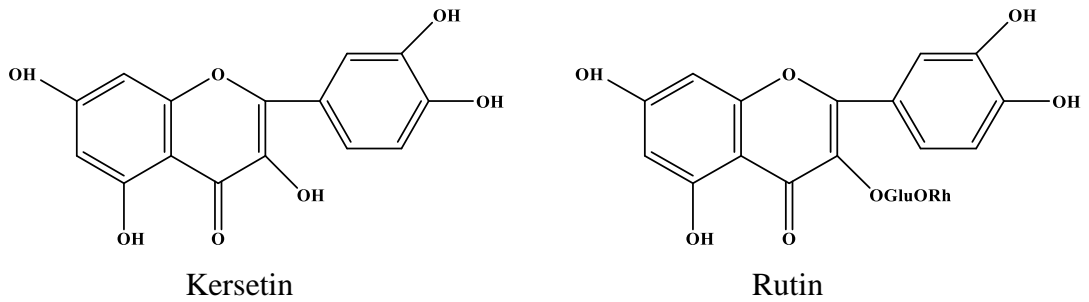
Bu yapısal gruplar şunlardır:

1. B halkasındaki o-dihidroksi (katesol) grubu (radikal hedef yeri).
2. C halkasındaki 4-okzo grubu ile 2-3 çift bağı (elektron delokalizasyonu için gereklidir).
3. 3 ve 5 hidroksil grupları (maksimal radikal yakalama ve metal şelatlarına için gereklidir).

2.4.3. Flavonoidlerin doğadaki önemi

Yapılan araştırmalar flavonoidlerin en önemli özelliklerinin antioksidan etkiye sahip olmaları olduğunu ortaya çıkarmıştır. Özellikle flavonlar ve kateşinler vücudu reaktif oksijen türlerine karşı koruyan en güçlü flavonoid yapılarıdır (Groot ve Grace, 1994). Serbest radikaller ve antioksidanlar insan sağlığı için önemlidirler. Besinlerle dışarıdan çeşitli antioksidanlar (antioksidan vitaminler ve flavonoidler) alınmaktadır. Son yıllarda çok sayıda önemli antioksidan flavonoid keşfedilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır. Flavonoidlerin en önemli kaynakları başta çay olmak üzere baharatlar, çeşitli sebze ve meyvelerdir. Antioksidan içeriği yüksek olan gıdalar kanser, Diabetes mellitus (şeker hastalığı), yaşlanma, kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıkları da kapsayan bir grup hastalığa karşı koruma sağlamaktadırlar (Mehmetoğlu vd., 2005). Flavonoidler serbest radikallerin neden oldukları zararı giderebilme özelliğine sahiplerdir. Reaktif bileşiklerdeki serbest radikaller ile reaksiyona girer ve reaktif oksijen türlerini stabilize ederler. Hidroksil gruplarının reaktif özelliklerinin yüksek olmasıyla radikaller inaktif hale geçer (Korkina, 1997).

Knekt ve arkadaşlarının 9.959 erkek ve kadın üzerine yaptıkları, 24 yıl süren çalışma sonuçlarına göre, flavonoid içeren (ör: kersetin) gıdaların akciğer kanseri üzerinde olumlu bir etkisi olduğunu gözlemlenmiştir (Knekt vd., 1997).



Şekil 2. 13. Kersetin ve rutin yapıları

Daha önceki yıllarda yapılan çalışmalarda flavonoid içeren gıdaların kanserojen etki gösterdiği yönündeki iddialar çürütülerek, flavonoidlerin sadece kanserli ya da ölü

hücrelere etki ettiği, sağlıklı hücrelere zarar vermediği belirtilmiştir. Ayrıca kersetin ve apigenin'in farelerde melonoma hücrelerinin büyümesini, yayılmasını ve metastaz oluşturmalarını engellediği açıklanmıştır (Caltagirone vd., 2000). Rutin ve türevleri hemoroid, varis ve diğer kılcal damar hastalıklarına karşı ilaç olarak kullanılmakta ve bu nedenle İsviçre tonlarca ‘‘*Sophora japonica*’’ bitkisini Hindistan'dan ithal etmektedir (Halfon, 2005).

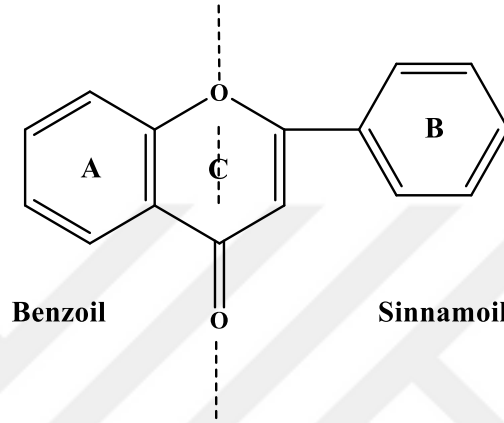
Başka bir çalışmada ise İngilizler çaydaki flavonoidlerin osteoporoz' u (kemik erimesi) önlediği sonucuna varmışlardır (Hegarty vd., 2000). Bazı çalışmalarda flavonoidlerin farklı türlerinin Parkinson ve Alzheimer hastalığına karşı da olumlu etkileri olduğu belirtilmiştir (Youdin ve Joseph, 2001).

Narenciye türlerinde baskın olarak bulunan naringenin' in kanserli prostat hücrelerinde meydana gelen DNA hasarlarını düzelttiği (Gao vd., 2006) ve farelere enjekte edilen tümörlü büyüme hücrelerini inhibe ettiği (Kanno vd., 2005) gözlemlenmiştir.

Yapılan bir araştırma da Hollanda'nın kişi başına besinlerden aldığı günlük flavonoid miktarının yaklaşık 23 mg olduğu tahmin edilmektedir. Ülkeden ülkeye farklılık göstermekle birlikte en düşük tüketimin Fındandıya'da (~ 2,6 mg), en fazla tüketim ise Japonya'dadır (~68,2 mg) (Hertog vd., 1995; Friesenecker vd., 1994; Haenen ve Bast, 1999).

Flavonoidlerin sadece insanlar üzerinde değil ayrıca bitkiler üzerinde de önemli görevleri vardır. Flavonoidler renk verici özellikleri sayesinde kuşlar ve böcekler tarafından daha çekici hale gelmekte ve bu sayede tozlaşmaya yardımcı olmaktadır. Kuşlar doğal renk maddesi antosiyanin içeren kırmızı-turuncu renkleri seçerken, tozlaşmayı sağlayan diğer canlılar flavon, flavonol, kalkon ve orondan ötürü sarı renkte olan çiçekleri tercih etmektedirler. Lökoantosiyanidin, kateşin ve proantosiyanidinlerin öncül maddesi olup, bitkiye direnç sağlamaktadır (Martensa vd., 2002). Antosiyaninlerin tozlaşmaya etkilerinin dışında, bitkiyi zararlılara karşı koruma ve tohumların yayılması gibi görevleri de vardır (Lee, 2002).

2.4.5. Flavonoidlerin yapı tayini



Flavonoidlerin yapısı bazı kimyasal reaksiyonlar ve çeşitli spektral yöntemler (UV spektroskopisi, 1, 2 boyutlu NMR spektroskopisi) kullanılarak belirlenebilir. UV spektroskopisi flavonoidlerin yapısı hakkında önemli temel bilgiler vermektedir. Flavonoidler konjuge aromatik gruplar içerdiklerinden UV spektrumunda yoğun absorpsiyon bantları verirler. Flavonoidlerin çoğu UV spektrumunda 2 ana pik verir. Bunlar 300-400 nm arasında görülen ve B halkasının (sinnamoil grubu) oksidasyonu hakkında bilgi veren Bant I ile 240-285 nm arasında görülen ve A halkasının (benzoil grubu) oksidasyonu hakkında bilgi veren Bant II'dir (Halfon, 2005).

Tablo 2. 2. Flavonoidlerin UV spektroskopisindeki absorpsiyon bantları

	Bant I (nm)	Bant II (nm)
Flavon	304-350	250-270
Flavonol	352-385	250-270
Flavonon	310-330	275-290
İzoflavon	300-340	245-270
Auron	390-430	240-260
Kalkon	360-390	240-260

Antosiyanidin	475-560	275-280
---------------	---------	---------

Çeşitli reaktiflerin kullanılmasıyla spekturumda meydana gelen kayma değerleri yapıdaki hidroksil gruplarının ve süstitüentlerin konumları hakkında bilgi vermektedir. Bu reaktifler NaOMe (Sodyum metoksit), NaOAc (sodyum asetat), NaOAc + H₃BO₃ (borik asit), AlCl₃ (alüminyum klorür), AlCl₃ + HCl (hidroklorik asit)' dir. Örneğin; ilk başta MeOH' de spekturumu alınır ve daha sonra bu solüsyona reaktif ilave edilerek bantların ayrı ayrı kayma değerleri ölçülüp, yorum yapılır.

Flavonoidlerin yapılarının belirlenmesinde UV spektroskopisi ve NMR sonuçları birlikte değerlendirilmelidir. Genellikle yapıda proton pikleri ¹H NMR spekturumunda kolaylıkla fark edilebilir. C halkasındaki protonlar flavonoidin iskelet yapısı hakkında bilgi verir. A halkası protonları genelde 6,0-6,5 ppm arasında gözlemlenir. 5, 7 pozisyonları süstitüe ise C-6 ve C-8 protonları 6,0-6,5 ppm arasında 2,5 Hz' lik iki ayrı dublet verir. B halkası protonlarına ait pikler sinamoil konjugasyonu nedeni ile A halkası protonlarından daha aşağı alanda (6,7-7,9 ppm) sinyal verirler. 2', 6' protonları C halkasının oksidasyon derecesinden, 3', 5' protonları ise C- 4' konumunda olabilecek oksijen gruplarından etkilenirler. Bu nedenle 3' ve 5' protonları 6,65-7,1 ppm' de, 2' ve 6' protonları ise daha aşağı alanda (7,10-8,10 ppm) sinyal verirler. Oksijen grupları -OH, -CH₃ ya da O-glikozit şeklinde olabilirler. C halkasında C-3 protonu 6,3 ppm civarında bazı durumlarda A-halkası protonlarının verdiği sinyallerle üst üste gelen keskin bir singlet verir. 5-OH grubu karbonil grubu ile hidrojen bağı yaptığından 12-13 ppm civarında görülür. Fenolik protonlar 10-12 ppm arasında sinyal verirler. Solüsyona birkaç damla D₂O damlatılarak tekrar NMR spekturumu alındığında bu sinyallerin kaybolması yapının hidroksil gruplarına sahip olduğunu gösterir. Aromatik metoksi protonları 3,50-4,10 ppm arasında, asetil protonları 2,25-2,50 ppm arasında sinyal verirler (Öztekin, 2010).

Flavonoid bileşiklerin belirlenmesinde farklı renk reaksiyonları da kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları maddeler halinde anlatılmıştır.

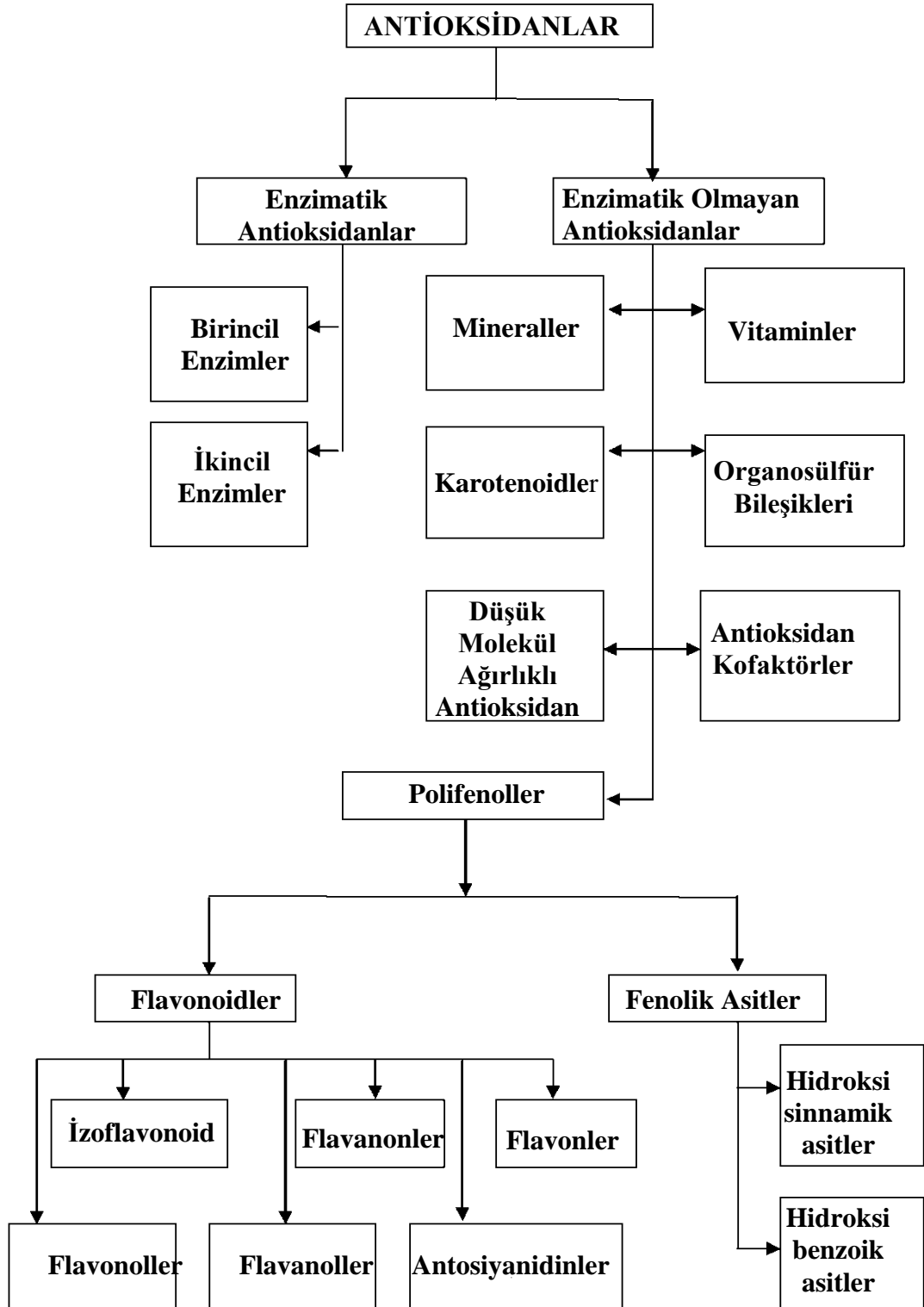
- 1) Demir klorür/potasyum ferri siyanür çözeltisi ve Folin-ciocalteu ayırıcı püskürtülerek UV ışık altında donuk kırmızı bir renk görüldükten sonra amonyak buharına tutularak mavi renk görülmesi (İnce ve Filazi, 2009).
- 2) Bileşikte eğer 5-OH serbest ise, İTK' da flavonoid spotu UV ışık altında herhangi bir belirteç püskürtmeden sarı, 3-OH serbest değilse mor renkte görünür. 5-OH grubu hiç yoksa ya da 5-OR şeklindeyse mavi ya da yeşilimsi mavi bir renk verir. Bütün fenolik asitler ve kumarinler UV ışıkta mavi renkte görünürler.
- 3) 5-OH grubunun serbest olması halinde, İTK' da spot üzerine herhangi bir belirteç püskürtülmeksizin NH₃ buharına tutulduğunda mor renk vermesi 4'-OH grubunun serbest olmadığını gösterir.
- 4) 3'-OH grubunun olmadığı 4'-OH grubun serbest ve 6-OH grubunun yapıda olması halinde UV ışık altında yine mor renk gözlemlenir ve NH₃ buharına tutulduğunda renkte herhangi bir değişiklik meydana getirmez. NA (Naturestoff Reagent) belirteci püskürtüldüğünde, eğer renkte bir değişiklik olmazsa yapıda 4'-OH, kırmızı-turuncu bir renk görülmesi halinde de 3' ve 4' konumlarında OH grubu olduğu anlaşılır.
- 5) 4'-OH grubu serbest ise mor renk gözlenir. Plaktaki spot NH₃ buharına tutulduğunda renk sarıya dönüşür, daha sonra NA belirteci ile de renkte herhangi bir değişiklik görülmez.
- 6) Eğer yapıda 3' ve 4'-OH grupları serbest ise silika jel plakta görülen mor renk NH₃ buharı ile sarıya, NA belirteci ile turuncuya dönüşür. 3', 4', 5'-OH gruplarının varlığında görülen mor renk NH₃ buharı ile yine mor, NA belirteci ile turuncu-kırmızı bir renge dönüşür.
- 7) 3 konumunda O varsa; UV ışık altında sarı, NH₃ buharı ile yine sarı, NA belirteci ile turuncu-kırmızı olur (Gören N. ders notları).

2.5. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

Gün boyu soluduğumuz kirli hava, bozulmuş besinlerdeki zararlı maddeler, katkı maddeleri, bilinçsiz beslenme ve hareketsizlik vücutta serbest radikal adı verilen maddeleri oluşturmaktadır. Serbest radikaller bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren kararsız ve reaktif haldeki atom veya moleküller olarak tanımlanırlar.

Tüm aerobik organizmalarda metabolik işlemler sürecinde oksijenin suya indirgenmesi sırasında açığa çıkan hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi toksik özellikte bileşikler, yağlı besinlerin yüksek sıcaklıkta işlenmeleri, pişirilmeleri sonucu oluşan lipid peroksit, süperoksit (O_2^*) ve hidroksil radikali (OH^*) serbest radikallere örnektir. Bugün serbest radikallerin hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerini etkilediği bilinmektedir. Serbest radikallerin pek çok hücrede moleküler değişimlere ve gen mutasyonuna yol açtığı iyi bilinmekte olup yaşlanma, hücre hasarı ve doku yıkımında rol oynadığı kabul edilmektedir. Ayrıca kanser, ateroskleroz, yaşlanmaya bağlı kardiyovasküler hastalıklar ve merkezi sinir sistemi hastalıkları gibi birçok hastalığa zemin oluştururlar.

Oksidatif hasarı azaltıcı veya geciktirici olarak bilinen antioksidanlar, endojen ve eksojen antioksidanlar olarak iki kısımda incelenmektedirler. Sentezlendiği organizmada etki gösteren antioksidanlara endojen antioksidanlar adı verilir ve bunlar enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak da iki kısımda incelenirler (Şekil 2. 14). Enzimatik antioksidanlar, hücrenin çeşitli organellerinde etki gösteren süperoksitdismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz gibi enzimlerden oluşurlar. Çeşitli metal iyonlarını bağlama, serbest radikalleri yakalama ve hapsedme ve süpürme gibi etkilere sahip glutatyon, bilirubin, ferritin, ürik asit gibi enzimatik olmayan antioksidanlarda mevcuttur. Eksojen antioksidan ise daha çok bitkiler tarafından sentezlenen çeşitli vitamin ve fenolik maddeler olup dışarıdan organizmaya alınıp etkinlik göstermektedirler (Kolaylı vd., 2003).



Şekil 2. 14. Antioksidanların Sınıflandırılması (Çakar, 2010)

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek ve gidermek için gerekli olan en önemli savunma sistemi antioksidan savunma sistemleridir. Antioksidanlar 4 ayrı şekilde etki ederler:

- 1- Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme, toplayıcı etki.
- 2- Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme, bastırıcı etki (Vitaminler, flavonoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler).
- 3- Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici, zincir kırıcı etki.
- 4- Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılmasında onarıcı etki (Keleştemur, 2011).

Normalde organizmada oluşan serbest radikallerle bunlara karşı savaş veren antioksidan savunma sistemleri arasında bir denge söz konusudur. Bu denge, serbest radikaller lehine bozulduğu zaman oksidatif stres oluşmaktadır (Karakoç, 2015).

Bugün besin sektöründe ilgilenilen en önemli konulardan birisi besinlerin yarı ömürlerinin uzatılması ve serbest radikallerin meydana getirdiği oksidasyon mekanizmalarının rol oynadığı besinsel bozulmaların önüne geçilmesidir (Switala ve Loewen, 2002). Gıdalardaki bitkisel ve hayvansal yağların oksidatif yıkımı, ham maddelerin işlenmesi ve ürünün saklanması sırasında oluşan lipid oksidasyonu, besinlerin tatlarının ve kokularının bozulmasına böylelikle de gıdalarda kalitenin ve güvenilirliğin azalmasına neden olur. Bu nedenle endüstride besinlerin raf ömrünü uzatmak adına bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), propil gallat (PG) ve terbütildidrokinon (TBHQ) gibi sentetik antioksidanlar kullanılmaktadır. Ancak yapılan araştırmalar neticesinde BHA ve BHT' nin canlı organizmalarda kanserojen etki göstermesi sebebiyle, tokoferol gibi yüksek maliyetli, düşük aktiviteye sahip, doğal antioksidanların kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır (Namiki, 1990; Sherwin, 1990; Wanasundara ve Shahidi, 1998). Amerika'

da, bazı Uzakdoğu ülkelerinde ve özellikle Avrupa ülkelerinin çoğunda sentetik antioksidanların kullanımı ile ilgili yasal sınırlamalar getirilmeye başlanmıştır. Bu da bitkisel kaynaklı antioksidanlara olan ilgiyi arttırmakta ve ticari olarak üretilmelerini sağlamaktadır (Eryiğit, 2006).

Serbest radikaller (kararsız bileşikler), vücutta normal metabolik reaksiyonlar sonucunda meydana gelmektedir. Bu bileşikler süperoksit dismutaz (SOD) v.b. enzimler aracılığı ile ortadan kaldırılabilmektedir (Nicholls vd., 2000). Canlı organizmalar serbest radikallerin etkisinden korunmak için antioksidatif koruma sistemine sahiptirler. Ancak bazı durumlarda söz konusu enzimde meydana gelen kalıtsal hasarlar ya da serbest radikallerin, yaşlanmaya bağlı olarak hücrelerde aşırı birikim göstermesi, yaşlanmanın hızlanmasına, hücrelerin ölümüne veya kontrolsüz çoğalmalarına neden olmaktadır (Bilaloğlu vd., 1999; Sun vd., 1988).

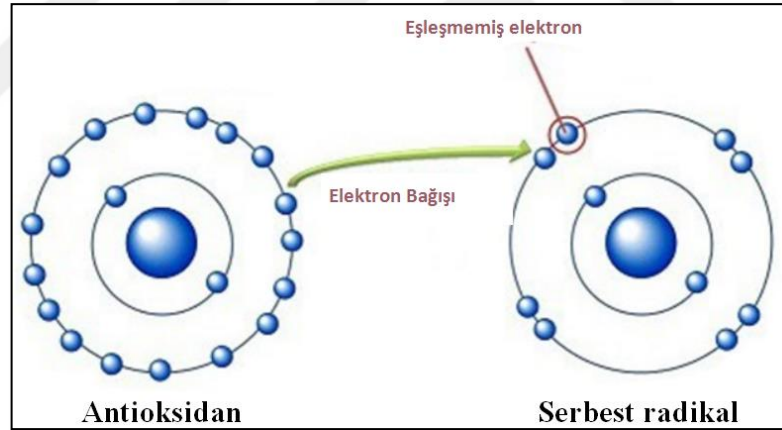
Günümüzde serbest radikallerin birçok organizma türünde genetik mutasyonlara yol açtığı bilinmektedir. Bu bileşiklerin yol açtığı oksidatif stres, birçok hastalığın temelidir (Switala ve Loewen, 2002).

Doğal antioksidanların en önemli grubunu fenolik bileşikler oluşturur. Bitkilerde antioksidan etkiye sahip en önemli polifenolik bileşenler flavonoidlerdir. Yapılarında bulunan hidroksil grupları radikaller üzerinde etkilidir ve lipid peroksidasyonunda önemli rol oynarlar (Hatano vd., 1989; Yen vd., 1993; Srivastava vd., 2006; Zhou ve Yu, 2006). Bitkilerdeki antioksidan bileşiklerin sayısının 4.000 ile 6.000 arasında olduğu tahmin edilmektedir (Havsteen, 2002; Wollgast vd., 2000).

Farklı disiplinlerden pek çok bilim insanı serbest radikallerin hücreler üzerindeki etkisini azaltabilmek için doğal kaynaklara başvurmaktadır (Ulubelen vd., 1995). Antioksidan maddeler, metabolik zincir reaksiyonları içerisinde okside olabileme potansiyeline sahip substratların oksidasyonunu önleyebilme veya geciktirebilme

yeteneğine sahiptirler. Bu nedenle birçok hastalığın tedavisinde önemli bileşikler olarak görünmektedirler (Halliwell vd., 2003).

Bitkilerde sekonder metabolizma sonucunda sentezlenen antioksidatif bileşikler (çoğunlukla fenolikler), bitkileri reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerine karşı korumaktadırlar. Fenolik bileşiklerin antioksidatif etki mekanizmaları arasında; serbest radikal yakalama, hidrojen verme, oksijenin etkisizleştirilmesi, metal iyon şelatlama, süperoksit ve hidroksil gibi radikaller için substrat görevi yapma sayılabilir. Fenolik bileşikler, antioksidan aktiviteye katkıda bulunurlar. Fenoller hidroksil grupları nedeniyle radikal giderme yeteneğine sahip oldukları için önemli bitki bileşenleridirler (Hatano vd., 1988).



Şekil 2. 15. Serbest radikalın nötralizasyonu

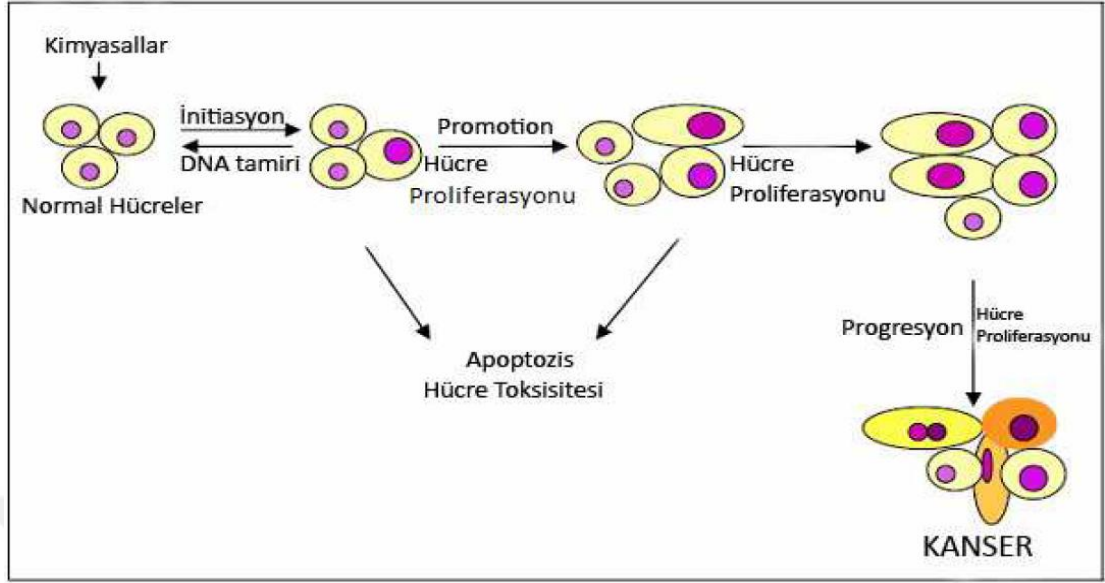
Antioksidan aktivite tayininde iki yöntem uygulanmaktadır.

1) Elektron transferine dayanan yöntemler: Oksidan maddenin indirgenmesi sonucunda rengin değişimi ölçülerek antioksidan madde ölçümü yapılmaktadır. Serbest radikal giderim DPPH yöntemi (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil), FRAP yöntemi, CUPRAC yöntemi ve TEAC/ABTS-Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi elektron transferine göre yapılan yöntemlerdir (Özyürek, 2008).

2) Hidrojen atomu transferine dayanan yöntemler: Antioksidan ve substrat arasında rekabete dayalı reaksiyonlar gerçekleşmektedir. Genellikle azot grubu taşıyan maddelerin bozularak peroksil radikalleri oluşturması ile gerçekleşir. Oksijen radikali absorban kapasitesi (ORAC), Toplam radikal yakalama parametresi (TRAP), Luminol yöntemi, DCFH-DA (Diklorofloresin-diasetat) yöntemi, Fikoeritrin esaslı yöntemler, Krosin yöntemi ve TOSC (Toplam oksiradikal) yöntemi hidrojen atomu transferine göre yapılan yöntemlerdir (Özyürek, 2008).

2.6. Kanser

Vücudu oluşturan hücreler biraraya gelerek dokuları, dokular bir araya gelerek organları oluşturmaktadır. Organ ve dokular oluşurken hücreler belirli bir düzen içinde, belirli iş bölümleri yaparak bir araya gelirler. Organizmanın temel birimi olan bu hücreler belirli bir hızda ve kontrol altında çoğalırlar. Öte yandan yaşlanan hücrelerde belirli bir hızda yıkılmaktadırlar. Kanseri en kısa tanımla hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalmaları demektir. Bu çoğalma sırasında kanser hücresinde, normal hücrelere göre yapısal farklılıklar çıktığı gibi, işlevleri açısından da farklılıklar çıkacaktır; bazen hücre normalde yaptığı işlevlerini yapmazken, bazen de normalde olmayan bazı yeni işlevleri de yapmaya başlayabilecektir. Anormal şekilde çoğalmaya başlayan bu hücreler buldukları yerdeki doku ve organları işgal edecek hatta daha uzaktaki organları işgal edecek ve işgal ettiği bu bölümlerin görevlerini engelleyecektir.



Şekil 2. 16. Kanser oluşum aşamaları (Oliveira vd., 2007)

Hücre kontrolünün bozulup bir hastalık olarak kanser tablosu çıkıncaya kadar geçen kanser oluşum süresi, kanser cinslerine göre değişiklik göstermekle birlikte ortalama 15-20 yıldır. İnsan vücudunda Kanser hastalığının oluşumunun nedenleri hala tam olarak bilinmemesine karşın, kanser oluşumuna sebep olabilecek iç ve dış etkenleri şöyle sıralayabiliriz;

- Kalıtım
- Sigara ve alkol kullanımı,
- Radyasyona maruz kalma,
- Bazı virüsler ve bakteriler,
- Kötü beslenme alışkanlığı,
- Gıdalardaki katkı maddeleri,
- Uzun süre güneş ışığına maruz kalma,
- Aşırı dozda röntgen ışınına maruz kalma,
- Bazı kimyasal maddeler (katran, benzin, boya maddeleri, asbest v.b.),
- Hava kirliliği.

Çağın vebası olarak gösterilen kanser geçen yüzyılın başlarında ölüm sebepleri arasında 7. ve 8.inci sıralarda iken günümüzde kalp hastalıklarından sonra ikinci sıradadır (Strensward ve Clark, 2004; akt: Hayrdaroğlu vd 2007). Dünya Sağlık Örgütü raporuna göre 2012 yılında bütün dünyada 12,1 milyon kanser vakası tespit edilmiştir. Aynı yıl içerisinde de 8,2 milyon insan kanserden hayatını kaybetmiştir. Sağlık Bakanlığının 2005 yılında yaptığı Türkiye Kanser İstatistikleri Araştırmasına göre ülkemizde 173.000 kanser hastası var olup bu sayı her geçen yıl artmaktadır.

Kanser uzun yıllar önce de var olan ancak yaşam süresinin uzamasıyla daha çok karşımıza çıkan bir hastalıktır. Bunun yanında, artan nüfusla beraber kansere yakalanan kişi sayısında da bir artış görülmektedir. Bu demografik değişimler göz önünde bulundurulduğunda 2030 yılında, yılda 26,4 milyon yeni kanser vakası ve 17,0 milyon kanser ölümü olabileceği tahmin edilmektedir (WHO, 2008).

Kanser, geç tanı konulduğunda ve tedavi edilmediğinde büyük oranda ölüme yol açan önemli bir kronik hastalıktır. Gelişmiş ülkelerde %25, Dünyada ise yaklaşık %10 civarında kanser ölümle sonuçlanmaktadır (Aydoğan vd., 2012).

Kanser, tüm dünyada önde gelen ölüm nedenlerinden birisidir. Kanser tedavisinde çeşitli kemoterapötikler, sitotoksik ve immünomodilatör ajanlar kullanılmaktadır. Bu ilaçlar hem oldukça pahalı hem de ciddi yan etkilere sahiptirler. Günümüzde Batı tıbbında kanser tedavisi için sadece sınırlı sayıda bitkisel ürün kullanılmaktadır. Bununla birlikte kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan taxol ve bazı alkaloidler gibi antikanser ilaçlar tıbbi bitkilerden elde edilmektedir.

Bundan yaklaşık 200 yıl önce bir bitkiden ilk farmakolojik olarak aktif bir bileşik izole edilmiştir; haşhaş kabuğunda üretilen morfin. Bu durumla birlikte bitkilerden ilaçların üretilmesi, denenmesi ve uygulanabilir etkin dozları üzerinde çalışmaların yapıldığı bir dönem başladı. İkinci dünya savaşından sonra penisilinin keşfedilmesiyle mikroorganizmalardan yeni antibiyotikler üzerine geniş çaplı araştırmalar yapılmıştır. 1990'larda ilaçların yaklaşık %80'i ya doğal ürünlerdi ya da onlardan esinlenerek üretilen analoglarıydı. Antibiyotikler (ör; penicillin, tetracycline, erythromycin),

antiparasitikler (ör; avermectin), antimalaryaller (ör; quinine, artemisinin), lipid kontrol ajanları (ör; lovastatin ve analogları), organ transplantasyonu için immünosupresanlar (ör; cyclosporine, rapamycins) ve antikanser ilaçlar (ör; taxol, doxorubicin) tıpta bir devrim oluşturmuştur.

20. yüzyılın başlarında ortalama yaşam süresi 40 yıl iken bugün 77 yıla kadar çıkmıştır. (Harvey, 2008; Li ve Vederas, 2009). Tıbbi ve farmakolojik olarak aktif içeriklerinden dolayı bitkilere olan ilgi hızla artmaktadır.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Araç ve Malzemeler

Desikatör (bitki özütleme işleminde)

Mekanik karıştırıcılar

Değişik cam malzemeler

Hazır İTK plakaları (Silica gel 60 F₂₅₄)

3.2. Kullanılan Kimyasallar ve Reaktifler

3.2.1. İzolasyon işleminde kullanılan kimyasallar ve reaktifler

Serik Sülfat Belirteci: 12 g amonyum seryum sülfat (NH₄)₄Ce(SO₄)₄·2H₂O (Sigma-Aldrich) 50 ml derişik sülfürik asit (H₂SO₄) ile çözüldü, hacmi saf su ile 500 ml ye tamamlandı.

Sülfürik Asit Belirteci: %50 su %50 derişik sülfürik asit (H₂SO₄).

Kolon Dolgu Maddeleri:

- Silika jel 70-230 mesh (Merck)
- Sephadex LH-20 (Merck)

Çözücüler:

- Diklorometan (Sigma)
- Bütanol (Sigma)
- Etil alkol (Sigma)
- Hekzan (Sigma)
- Etilasetat (Sigma)

- Aseton (Sigma)
- Kloroform (Sigma)
- DMSO (Sigma)

3.2.2. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

3.2.2.1. DPPH[•] serbest radikal giderme

1. 5 mg DPPH[•] Radikal çözeltisi: 5 mg DPPH[•] Radikali alındı ve 100 ml etanol içerisinde çözüldü. Daha sonra karanlık bir ortamda oda sıcaklığında iki saat çalkalandı.

3.2.2.2. ABTS^{•+} serbest radikal giderme

1. 20 mL 7 mM ABTS çözeltisi: 76,8 mg ABTS saf suda çözüldü ve toplam hacim saf su ile 20 mL' ye tamamlandı.

2. 20 mL 2,45 mM K₂S₂O₈ çözeltisi: 13,25 mg K₂S₂O₈ saf suda çözüldü ve toplam hacim saf su ile 20 mL' ye tamamlandı.

3. ABTS[•] serbest radikal çözeltisi: 20 mL 7 mM ABTS ve 20 mL 2,45 mM K₂S₂O₈ 1:1 oranında karıştırıldı ve 734 nm'de yaklaşık 0,70 birim absorbans verinceye kadar (yaklaşık 1/120 oranında) metanol ile seyreltildi.

3.2.2.3. Metal şelatlama kapasitesi

1. 50 mL 2 mM FeCl₂*4H₂O çözeltisinin hazırlanması: 19,8 mg FeCl₂*4H₂O tartılıp saf suda çözüldü ve toplam hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

2. 50 mL 5 mM Ferrozin çözeltisinin hazırlanması: 123 mg Ferrozin saf suda çözüldü ve toplam hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Kimyasallar:

- Neokuprin
- DPPH radikali
- TCA
- Na₂HPO₄
- CuCl₂
- K₃Fe(CN)₆
- FeCl₃
- CH₃COONH₄
- Tripsin EDTA (Sigma)
- NaHCO₃

3.2.3. Biyolojik aktivite testleri için kullanılan kimyasallar ve hücreler

- Tripsin EDTA (%25) (Sigma)
- Penicilin streptomycin solüsyonu (Sigma)
- DPBS (Dulbecco'nun fosfat tampon tuzu) (Sigma)
- Fetal Bovine Serum (Heat inactivated) (Sigma)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium- High glucose (Sigma)
- Cell proliferation ELISA, BrdU kit (Roche)

3.3. Kullanılan Cihazlar

- ¹H NMR (Agilent 600 MHz Spektrometre)
- ¹³C NMR (Agilent 150 MHz Spektrometre)
- ELİSA (Rayto RT-2100C microplate reader)
- Döner buharlaştırıcı (Heidolph)
- Manyetik karıştırıcı
- Vakum pompası
- Etüv
- İnkubator CO₂ Water-jacketed (Nuair US Autoflow)

- Steril kabin (Esco class II type A2)
- Santrifüj (Hettich EBA20)
- Mikroskop (Olympus CX21)
- UV lambası (Camag)
- GC-MS (Agilent)
- Agilent HPLC-TOF/MS spectrometer

3.4. Bitkisel Materyal

3.4.1. Bitkinin toplanması ve kurutulması

Asteraceae familyasına ait *Tanacetum alyssifolium* bitkisi Erzincan'ın İliç ilçesi sınırlarındaki Munzur dağı eteklerinden 2014 yılı haziran ayında toplandı. Habitatı gittikçe azalmakta ve yok olma tehlikesiyle karşı karşıya olması sebebiyle, bitki toplanırken son derece hassas davranıldı ve kök kısımlarına zarar verilmemeye çalışıldı. Bitkisel materyal Erzincan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Dekanı, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ali Kandemir tarafından teşhis edildi. Toplanan bitki materyalleri oda sıcaklığında güneş ışığına maruz kalmayacak bir ortamda kurutuldu.

3.4.2. Bitkinin ekstraksiyonu ve n-bütanol ekstresinin hazırlanması

Kurutulan *Tanacetum alyssifolium* bitkisinin toprak üstü kısımları blender' da öğütüldü. Öğütülen bitki 4L'lik iki cam balona konuldu ve yaklaşık olarak 4L hekzan eklendi. Daha sonra cam balonların ağzı kapatılarak 24 saat boyunca oda şartlarında beklemeye bırakıldı. 24 saat tamamlandıktan sonra ekstre süzgeç kağıdı kullanılarak süzüldü ve üzerine tekrar hekzan eklendi. Bu işlem 5 kez aynı şekilde tekrarlandı ve organik fazlar birleştirilerek hekzan evaporatörde çektirildi. Daha sonra bitki tekrar oda şartlarında kurumaya bırakıldı. Kurutulan bitki tekrar 4L lik iki cam balona konuldu ve yaklaşık 4 L metanol ilave edildi. Daha sonra cam balonların ağzı kapatılarak 24 saat boyunca oda şartlarında beklemeye bırakıldı. 24 saat

tamamlandıktan sonra ekstre süzgeç kağıdı kullanılarak süzüldü ve üzerine tekrar metanol ilave edildi. Bu işlem 5 kez aynı şekilde tekrarlandı ve elde edilen ekstre süzüntüleri temiz bir şişede birleştirilerek, metanol evaporatörde uzaklaştırıldı. Metanol'ü uzaklaştırılan ekstreye 60 °C sıcaklığındaki saf su ilave edildi ve vakum altında süzülerek bitkide bulunan klorofillerin uzaklaştırılması sağlandı. Klorofiller uzaklaştırıldıktan sonra koyu kahverengi renkli sulu ekstrakt elde edilmiş olundu.



Şekil 3. 1. Vakum altında süzülmesi ve klorofillerin ayrılması

Klorofilleri uzaklaştırılan koyu kahverengi renkteki sulu ekstrakt ayırma hunisine konularak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Bütanol'ün miktarı sulu ekstraktın miktarından fazla olacak şekilde ayırma hunisine bütanol ilave edildi. Bütanol eklenince üstte bütanol fazı altta sulu faz olmak üzere iki faz meydana geldi. Bütanol fazı temiz bir şişeye alındı ve sulu faz tekrar ayırma hunisine konularak bütanol ilave edildi. Bu işlem 5 defa aynı şekilde yapıldı ve elde edilen bütanol fazı temiz bir kaptaki birleştirildi. Birleştirilen bütanol fazında sulu faz kalmış olması ihtimaline karşılık sulu fazı alması için Na_2SO_4 eklenerek kurutuldu ve bütanol evaporatöründe çektirildi.



Şekil 3. 2. Bütanol ile ekstraksiyon

3.5. Kromatografik Yöntemler

3.5.1. Kolon kromatografisi (KK)

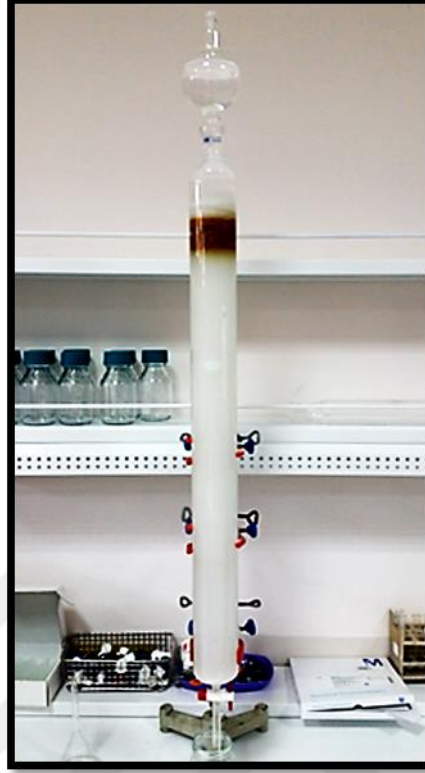
Bitkilerde bulunan bileşiklerin saf olarak elde edilmesi için kullanılan bir katı-sıvı ayırma yöntemidir. Kolon kromatografisi cam kolonlarda yapılmaktadır. Kolonda ayrımı gerçekleştirilecek materyalin özelliğine bağlı olarak çeşitli kolon dolgu maddeleri kullanılabilir. (Örneğin; silika, sephadex, alümina vb.) Sıvı olarak farklı polariteye sahip organik çözücüler kullanıldı. Öncelikle ekstre kolona yüklenilmeden İTK (ince tabaka kromatografisi) yapılarak kolonun başlangıç (hareketli) fazı belirlendi. Eğer ekstre başlangıç çözücüsünde çözünmüyor ise kuru tatbik denilen işlem gerçekleştirilir. Kuru tatbik işlemi şu şekilde yapılır; ekstre uygun bir çözücüde çözünür ve ardından içerisine bir miktar silika jel eklenir. Sonra ekstre içindeki çözücü döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılarak ekstrenin silika jel tarafından emilmesi sağlandı. Silika jel ve ekstrenin içindeki çözücünün tamamen uzaklaştırılabilmesi için oda sıcaklığında 1 gece bekletilir. Kolona ilk olarak çözücü ile bulamaç haline getirilmiş silika jel doldurulur ve kolonun şartlandırılması için belirli bir süre çözücü geçirilmeye devam edilir. Kolon şartlandırıldıktan sonra silika jelin kolon içindeki üst tabakası düzleştirilir ve sonra toz haldeki silika jel-ekstre karışımı kolona yüklenir. Farklı çözücü gradiyentleri kolondan geçirilerek ayırma işlemi gerçekleştirilir.

N-Bütanol Ekstresinin Fraksiyonlandırılması:

Tanacetum alyssifolium bitkisine bölüm 3.4.2'deki işlemlerin uygulanması sonucunda bitkiden 40 gram n-bütanol ekstresi elde edildi. N-bütanol ekstresini kolona yükleme yapmadan önce İTK yapılarak farklı çözücü sistemlerinde incelendi. İTK da oluşan bantların ve renklerin yardımıyla kolon başlangıç hareketli fazı belirlendi. İnce tabaka kromatografisi sonuçlarına göre TA-1 kolonunda başlangıç çözücüsü olarak hegzan (C₆H₁₄) kullanıldı. 1 kilogram silika jel (70-230 mesh Merck) hegzan ile bulamaç haline getirildikten sonra kolona yüklendi ve kolon şartlandırıldı. 40 gram n-bütanol ekstresine kuru tatbik yapıldıktan sonra kolona yüklendi ve hegzan, diklorometan, etil asetat ve metanol çözücüleri ile hazırlanan farklı oranlardaki çözücü sistemleri kullanıldı. Ekstrenin İTK' da ki ayırımına göre düşük polariteli çözücünden yüksek polariteli çözücüye doğru çeşitli çözücü ve çözücü karışımları hareketli faz olarak kolonda kullanıldı. İlk fraksiyon %50 DCM-Hegzan ile alındı.

Tablo 3. 1. N-butanol ekstresinin TA-1 kolonundan elde edilen eluatlar ve kullanılan çözücü sistemleri

Fraksiyon No	Çözücü Sistemi	Mobil Faz Miktarı (mL)
1-13	%50 Hegzan-DCM	400
14-19	%60 Hegzan-DCM	400
20-28	%70 Hegzan-DCM	400
29-37	%80 Hegzan-DCM	400
38-45	%90 Hegzan-DCM	400
46-56	%100 DCM	400
57-64	%10 EtOAc-DCM	400
65-71	%30 EtOAc-DCM	400
72-81	%50 EtOAc-DCM	400
82-89	%70 EtOAc-DCM	400
90-98	%90 EtOAc-DCM	400
99-108	%100 EtOAc	400
109-115	%10 MeOH-EtOAc	400
116-126	%20 MeOH-EtOAc	400
127-142	%30 MeOH-EtOAc	400
143-160	%40 MeOH-EtOAc	400
161-170	%50 MeOH-EtOAc	400
171-180	%100 MeOH	400



Şekil 3. 3. TA-1 ana kolonu

TA-1 kolonundan elde edilen Tablo 3. 1.'deki eluatlar İTK ile incelendi ve benzer sonuçlar gösteren eluatlar birleştirildi. Bu işlemler sonucunda etil asetat ekstresinin TA-1 kolonundan 1-13, 14-28, 29-41, 42-46, 47-75, 76-78, 79-90, 91-115, 116-126, 127-142, 143-160, 161-170 ve 171-180 olmak üzere 13 fraksiyon elde edildi.

TA-1 kolonundan elde edilen TA-1-(7,8,9) (8g) nolu üç fraksiyon LC/MS-TOF sonuçları neticesinde benzer yapılar içerdikleri için birleştirildiler. Bu üç fraksiyon yeniden kolon işlemine tabi tutuldu. Bu sefer kolon dolgu maddesi olarak silika jel yerine sephadex (LH-20) kullanıldı. Çözücü sistemi olarak % 35 metanol-% 65 kloroform kullanıldı.



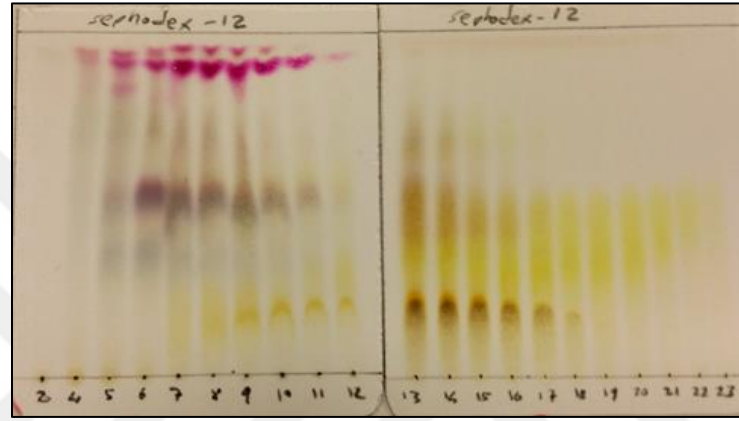
Şekil 3. 4. Sephadex yüklü cam kolonlar

Sephadex kolona yüklenilmeden önce metanol-kloroform karışımında, karanlık bir ortamda 24 saat boyunca bekletilerek sephadex'in şişmesi sağlandı. Daha sonra sephadex kolona yüklendi ve aynı çözücü sistemi kolondan geçirilmeye devam edilerek kolonun şartlandırılması sağlandı. Şartlandırılan kolona yaklaşık 0,5g madde yüklenerek çözücü sistemi değiştirilmeden ayırma işlemi uygulandı. Bu işlem 13 defa tekrar edilerek toplamda 13 tane sephadex kolon yapılmış olundu. Sephadex ile yapılan kolonlar sonucunda bileşik1 (84mg) ve bileşik2 (25mg) olmak üzere iki tane saf madde izolde edildi.

3.5.2. İnce tabaka kromatografisi (İTK)

Bir karışımın içinde bulunan bileşenlerin ayrılması, kalitatif olarak değerlendirilmesinde ve benzer olan fraksiyonların belirlenmesi amacı ile uygulanan basit bir kromatografi uygulamasıdır. Numune uygulaması kapiler bir tüp kullanılarak yapıldı. Uygulanan numune spotları kurutulduktan sonra tank içerisinde uygun mobil faz kullanılarak yürütüldü. Bileşenlere ait spotlar UV (254 ve 366 nm) ışık altında incelendi. UV ışığı altında görünmeyen bileşenlerin spot renklerini daha iyi

görebilmek için silika jel plakalarına serik sülfat ve sülfürik asit belirteçleri püskürtülüp ısıtıcıda 100 °C de oluşan spot renkleri incelendi. R_f değerleri benzer olan maddeler aynı maddeler olarak değerlendirilerek birleştirildi. Kolon kromatografisinden alınan fraksiyonların hepsine teker teker bu işlemler uygulanarak benzer fraksiyonlar birleştirildi.

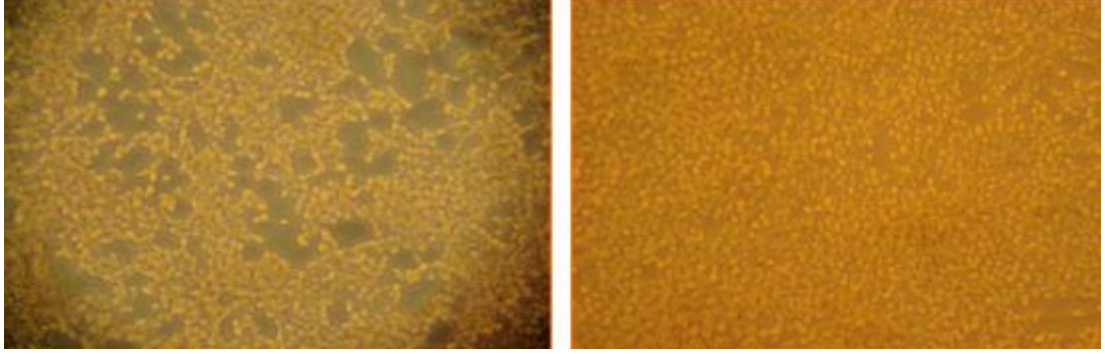


Şekil 3. 5. İnce Tabaka Kromatografisi

3.6. Anti Kanserojen Aktivite Testleri

3.6.1. Kanser hücre hatları ve hücre kültürü

Bu çalışmada HeLa (İnsan Rahim Kanseri) ve C6 (Sıçan Beyin Tümörü) kanser hücre hatları kullanıldı. Hücreler fetal bovine serum (%10) ve penisilin-streptomisin (%2) solusyonu içeren DMEM (Sigma, Germany) besi yerinde kültüre edildi. Hücreler, steril T75 hücre kültür flasklarında 37°C de %5 CO₂ ortamında 4-5 gün inkübe edildi. Konfluent hale geldikten sonra flasklardaki besi yeri 10 ml Tripsin-EDTA solusyonu ile değiştirildi ve 5 dakika inkübe edildi. Inkübasyon sonrasında hücrelerin yüzeyden ayrılmasını sağlamak için flask hafifçe çalkalandı. Oluşan hücre süspansiyonu 50 mL steril falkon tüplere aktarılarak, hücreler üzerine 10 mL taze besi yeri ilave edildi ve hücreler 1.500 RPM de 10 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant kısım aspire edildi ve sonra hücre pelleti 2 mL taze besi yeri ile süspansiyon haline getirildi. 1 mL hücre içinde 20 mL taze medyum bulunan kültür flasklarına pipetlenerek 37 °C de % 5 CO₂ ortamında 4-5 gün inkübasyona bırakıldı.



C6 (Sıçan Beyin Tümör Hücresi)

HeLa (İnsan Rahim Kanser Hücresi)

Şekil 3. 6. C6 ve HeLa kanser hücreleri

3.6.2. *In vitro* anti kanser aktivite (antiproliferatif aktivite) testi dizaynı

Hazırlanan hücre stoğundan 100 μ L hücre süspansiyonu 96 kuyucuklu plakaların kuyucuklarına triplike olacak şekilde pipetlendi. Pozitif kontrol için uygun bir antikanser bileşik (5-Florourasil) (Sigma F6627) numunelerle aynı konsantrasyonda, ilgili kuyucuklara konuldu. Kuyucuklardaki son hacim 200 μ L olacak şekilde besi yeri ile tamamlandı ve pipetleme işlemi yapılarak plakalar 37 °C de %5 CO₂ ortamında 24 saat inkübasyona bırakıldı.

3.6.3. BrdU Cell ELISA hücre proliferasyon deneyi

Test maddelerinin antikanser (antiproliferatif) aktivitesi BrdU Cell Proliferation ELISA Kiti (Roche 11 647 229 001, Germany) üretici firmanın prosedürüne göre kullanılarak test edildi. Plakalar uygun bir mikropilaka okuyucu kullanılarak 450 ve 650 nm dalga boyunda okutuldu ve absorbans değerleri elde edildi.

3.6.4. IC₅₀ konsantrasyonunun belirlenmesi

Test edilecek her maddenin IC₅₀ konsantrasyonunu (%50 sinin proliferasyonunun inhibe ettiği konsantrasyon) belirlenmesi için Excel, SigmaPlot veya ED50V10.XLS programı kullanılarak hesaplandı.

3.7. Antioksidan Aktivite Testleri

3.7.1. DPPH[•] serbest radikallerini giderme aktivitesi tayini

DPPH serbest radikal giderme Blois metoduna göre bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirildi (1958). Serbest radikal olarak DPPH[•]'in 0,1 mM'lık çözeltisi kullanıldı. 96 well microplate içerisine 210 µL DPPH[•] radikali ilave edildi. Daha sonra bunun üzerine incelenecek numune 15 µL (blank için 10 µL metanol) eklendi. 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı ve sonra 517 nm'de Microplate Reader' da absorbans okuması yapıldı. Azalan absorbans değeri geriye kalan DPPH[•] çözeltisi miktarını yani serbest radikal giderme (süpürme) aktivitesini verdi. Standart olarak Trolox kullanıldı. Sonuçlar standart (trolox) ve numunelerin IC₅₀ konsantrasyonu olarak verildi.

3.7.2. ABTS^{•+} katyon radikal giderme aktivitesi tayini

ABTS^{•+} serbest radikal giderme aktivitesi tayini bazı modifikasyonlarla Re ve arkadaşlarının (1999) geliştirdiği metoda göre yapıldı. İlk önce ABTS^{•+} katyon radikalini oluşturmak için 7 mM ABTS çözeltisi 2,45 mM potasyum persulfat (K₂S₂O₈) çözeltisi ile 1:1 oranında karıştırıldı. Karışım kullanılmadan önce 16 saat karanlıkta oda sıcaklığında bekletildi. Bu çalışmada standart olarak Trolox kullanıldı. 96 well microplate içerisine 2,5 µL numune, 2,5 µL standart konuldu ve üzerine seyreltilmiş ABTS^{•+} radikalinden 250 µL eklenerek karıştırıldı. 6 dakika oda sıcaklığında inkübasyondan sonra 734 nm'de Microplate Reader' da absorbans okuması yapıldı. Sonuçlar IC₅₀ konsantrasyonu olarak verildi.

3.7.3. Metal şelatlama kapasite tayini

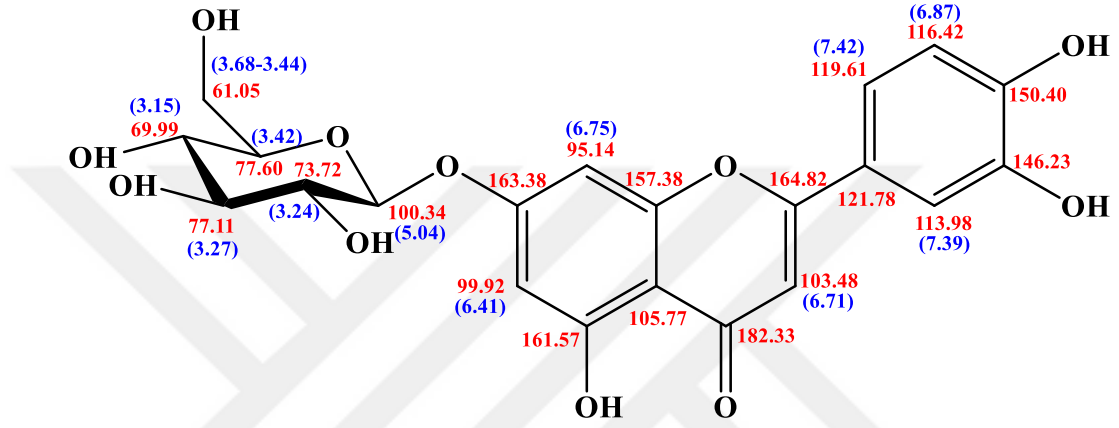
Metal şelatlama kapasite tayini Dinis ve arkadaşlarının (1994) metoduna göre gerçekleştirildi. Bu metot da standart olarak 0,35-25 µg aralığında EDTA kullanıldı. 96 well microplate içerisine 50 µL numune ve EDTA eklendi. Üzerine 185 µL saf su ve

5 µL 2 mM FeCl₂ ilave edildi ve 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 10 µL 5 mM Ferrozin eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı ve sonra 562 nm’de Microplate Reader’ da absorbans okuması yapıldı. Sonuçlar EDTA ve numunelerin IC₅₀ konsantrasyonu olarak verildi.



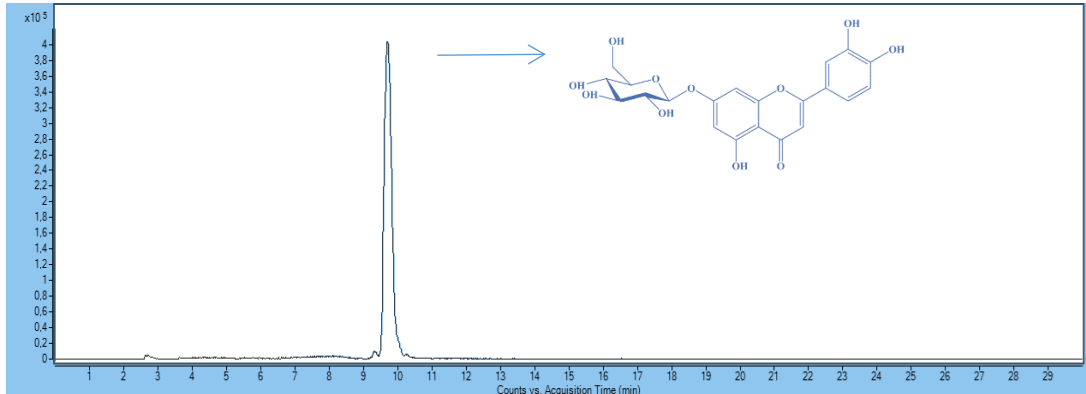
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

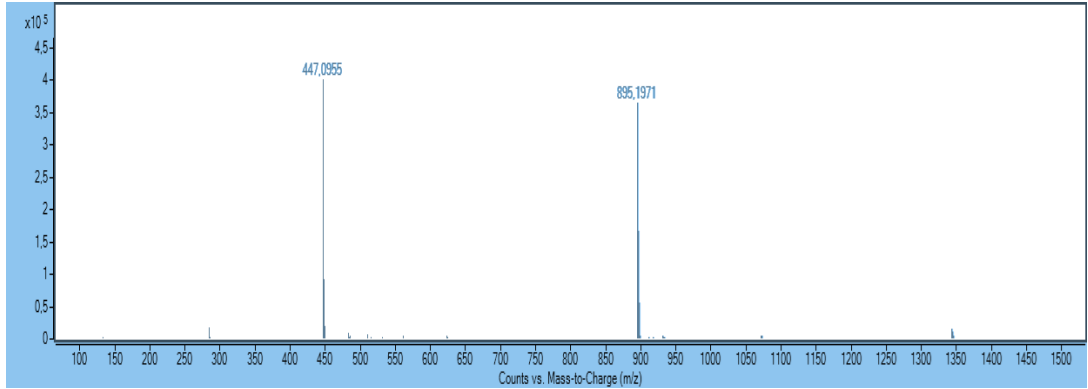
4.1. İzole Edilen Bileşiklerin Yapı Analizi



Şekil 4. 1. İzole edilen luteolin-7-O-β-D-glikozit bileşiğinin ¹H ve ¹³C kimyasal kayma değerleri

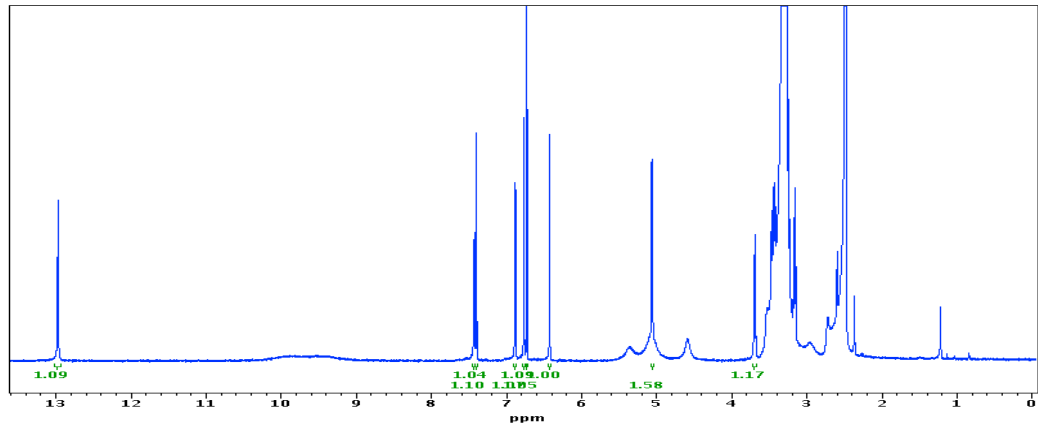
Bileşik sarı renkli kristaller şeklinde elde edildi. LC-TOF/MS spktrumunda gözlenen m/z [M-H]⁻ 447.0955 moleküler iyon pikinden yola çıkılarak bileşiğin kapalı formülü C₂₁H₂₀O₁₁ olarak belirlendi.





Şekil 4. 2. LC-TOF/MS spktrumları

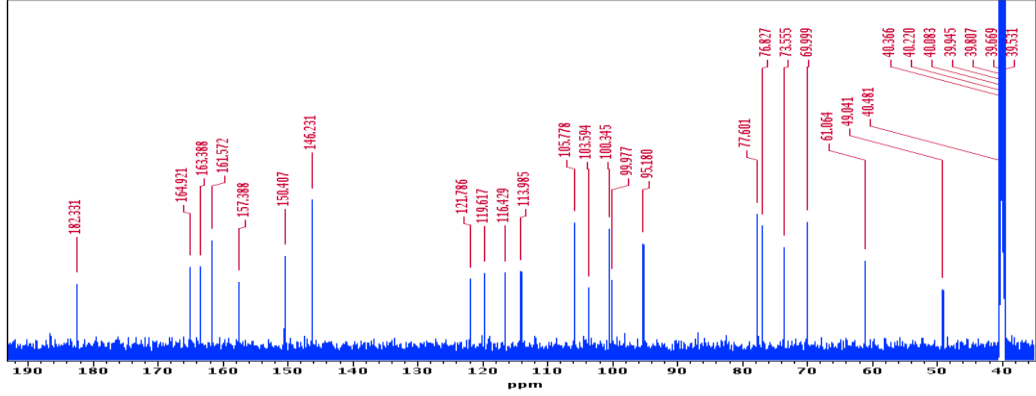
$C_{21}H_{20}O_{11}$ için hesaplanan 447.0955 molekülün ^{13}C -NMR spektrumunda gözlenen 21 karbon sinyali kapalı formül ile uyumludur. 1H -NMR spektrumunda aromatik bölgede görülen ABX sistemi, [δ_H 7,42 dd, $J=8,36/2,29$ Hz (H-6'), 7,39 d, $J=2,29$ Hz (H-2') ve 6,88 d, $J=8,34$ Hz (H-5')] B halkasının 3,4-disübstitüe olduğunu, AX sistemi [δ_H 6,6 d, $J=2,14$ Hz (H-6) ve 6,42, d, $J=2,14$ Hz (H-8)] A halkasının 6-ve 8 konumlarının serbest olduğunu, δ 6,72, s (H-3) sinyali ise 3 konumunun serbest olduğunu gösterdi.



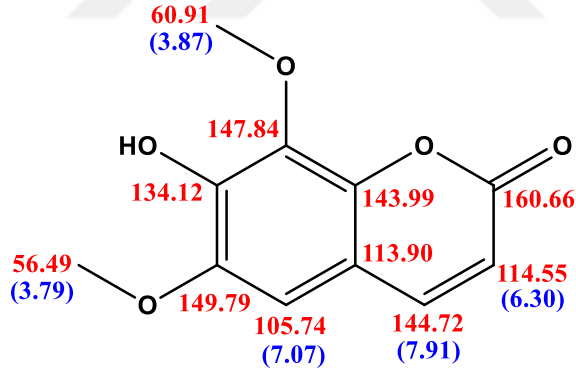
Şekil 4. 3. Luteolin-7-O-β-D-glikozit 1H -NMR spktrumları

Ayrıca δ_H 5,05, d, $J=7,56$ Hz sinyali ve ^{13}C -NMR spektrumunda görülen δ_C 100,38; 77,59; 76,82; 73,55; 69,99 ve 61,05 sinyalleri moleküle bağlı bir β -glikoz grubunu gösterdi. HMBC spektrumunda gözlenen 5,07 (H-1')/163,37(C-7) etkileşimi glikoz grubunun flavon iskeletine C-7 konumundan bağlı olduğunun delilidir. Birbiri ile etkileşen proton örüntüsü COSY spektrumundaki etkileşimler ile doğrulandı. C-H atamaları ise HSQC ve HMBC spektrumlarındaki etkileşimlerden yararlanılarak

yapıldı. Detaylı NMR verileri EK'de sunulmuştur. Bu bilgiler ışığında molekülün yapısı luteolin-7-O-β-D-glikozit olarak aydınlatıldı.

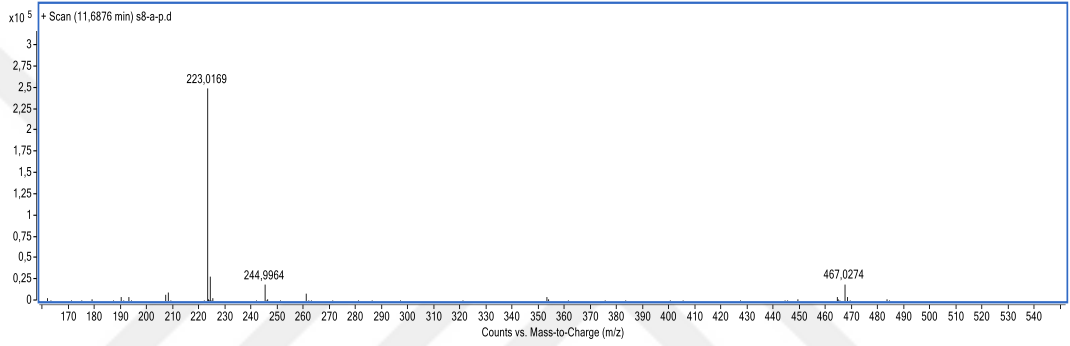
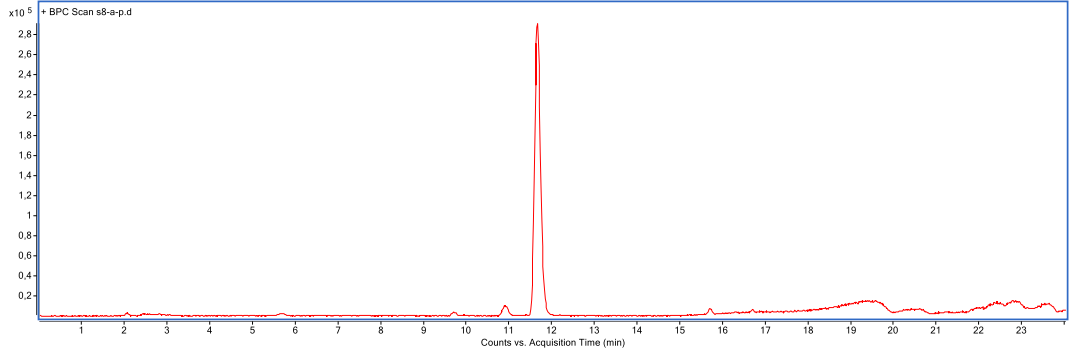


Şekil 4. 4. Luteolin-7-O-β-D-glikozit ¹³C-NMR spktrumları



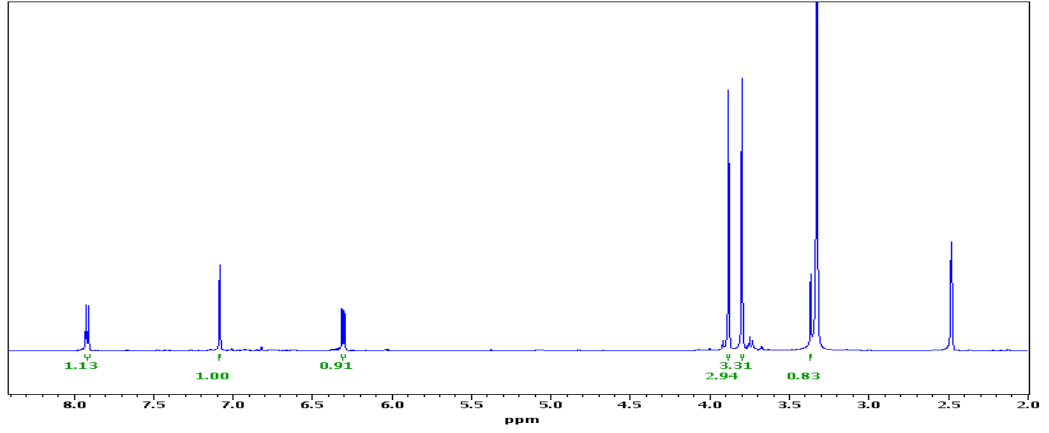
Şekil 4. 5. İzole edilen isofraxidin bileşiğinin ¹H ve ¹³C kimyasal kayma değerleri

LC-TOF/MS spektrumunda gözlenen ve C₁₁H₁₀O₅ kapalı formülüne uygun olarak m/z [M+H]⁺ 223.0169 moleküler iyon piki yapıyı doğrulamaktadır (C₁₁H₁₁O₅ için hesaplanan 223.0608).

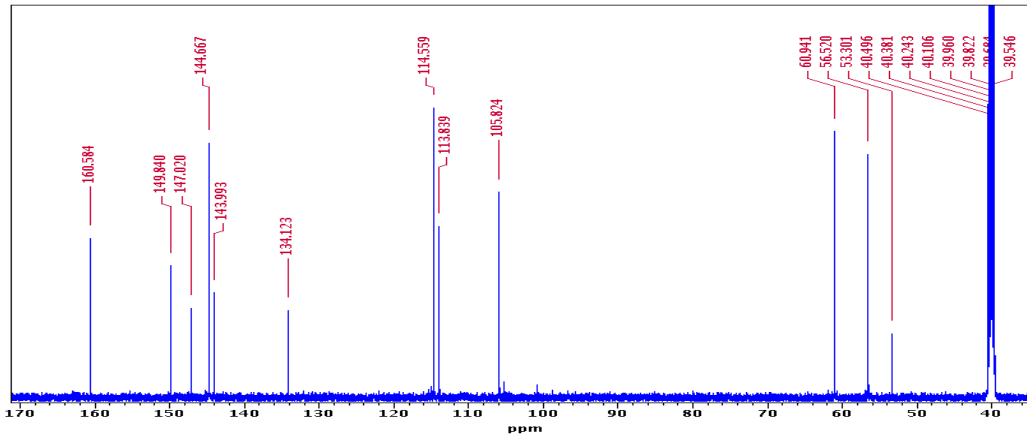


Şekil 4. 6. LC-TOF/MS spktrumları

Molekülün $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda gözlenen sinyaller kumarin türevlerinin karakteristik pikleridir. Lakton halkasının sinyalleri AB sistemi şeklinde (δ 6.30, d, $J = 9.43$ Hz, H-3) ve (δ 7.91, d, $J = 9.43$ Hz, H-4) gözlemlendi. δ 7.08 ppm'de gözlenen sinyal H-5 protonuna aittir. İntegrasyon değerleri 3 olan ve δ 3.80 ve δ 3.88 ppm'de gelen sinyaller metoksi gruplarının varlığını gösterdi. $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumunda 11 karbon sinyali gözlemlendi. DEPT spektrumunda gözlenen 2 CH_3 (C-6 ve C-8'e bağlı) 2 CH ve 6 kuarterner karbon moleküllere uyumludur. Elde edilen spektral veriler literatürle uyumludur. (Li vd., 2014)



Şekil 4. 7. İsofraxidin ¹H-NMR spktrumları



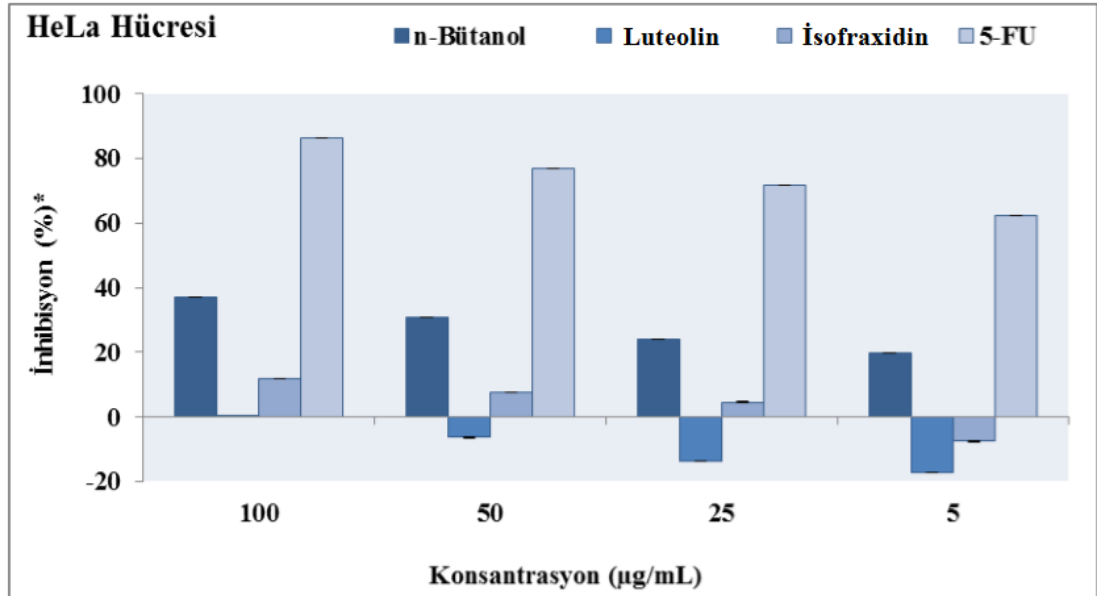
Şekil 4. 8. İsofraxidin ¹³C-NMR spktrumları

4.2. Antikanserojen Aktivite Testleri

n-Bütanol, luteolin-7-O-β-D-glikozit, isofraxidin ve standart olarak kullanılan 5-Fulourasil (5-FU) in HeLa (İnsan Rahim Kanseri) ve C6 (Sıçan Beyin Tümörü) hücrelerine karşı antikanser aktiviteleri dört dozda (100, 50, 25 ve 5 µg/mL) incelendi. Yapılan testler neticesinde tüm ekstraların HeLa ve C6 hücrelerine karşı IC₅₀ ve IC₇₅ değerleri Tablo 4.1. de verildi.

4.2.1. HeLa hücrelerine karşı antikanser aktivite sonuçları

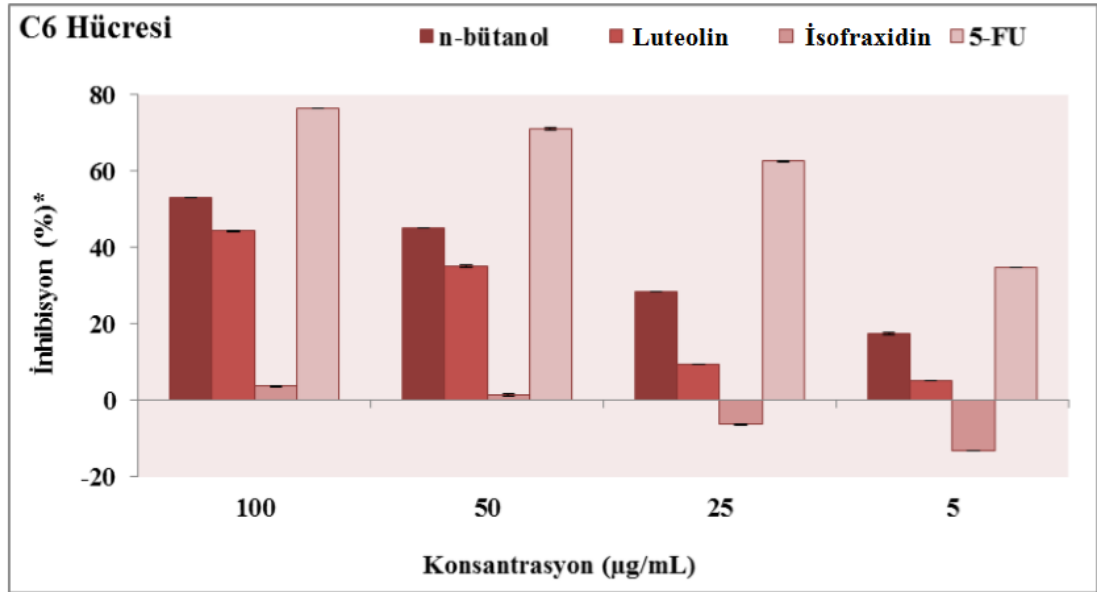
N-bütanol, luteolin-7-O- β -D-glikozit, isofoxidin örnekleri ve 5-FU nun HeLa hücrelerine karşı antikanser aktiviteleri incelendi. Yapılan testler neticesinde tüm örneklerde doz artışına bağlı olarak aktivitelerinde artış gözlemlendi (Şekil 4.9.). N-bütanol, luteolin-7-O- β -D-glikozit, isofoxidin örneklerinin çalışılmış olunan tüm dozlarda 5-FU den daha düşük aktiviteye sahip olduğu tespit edildi. Bununla birlikte n-bütanol ekstresinin 5-FU ile kıyaslandığında, 100 μ g/mL konsantrasyonda HeLa hücrelerine karşı ılımlı aktivite gösterdiği gözlemlendi. 100 μ g/mL konsantrasyonda aktivite sırası ile: 5-FU > n-bütanol ekstresi > isofoxidin > luteolin-7-O- β -D-glikozit şeklindedir.



Şekil 4. 9. n-Bütanol, luteolin-7-O- β -D-glikozit, isofoxidin ve 5-FU nun HeLa hücrelerine karşı antikanser aktivite sonuçları (* testler üç tekrarlı ve iki kez tekrarlanmıştır)

4.2.2. C6 hücresine karşı antikanser aktivite sonuçları

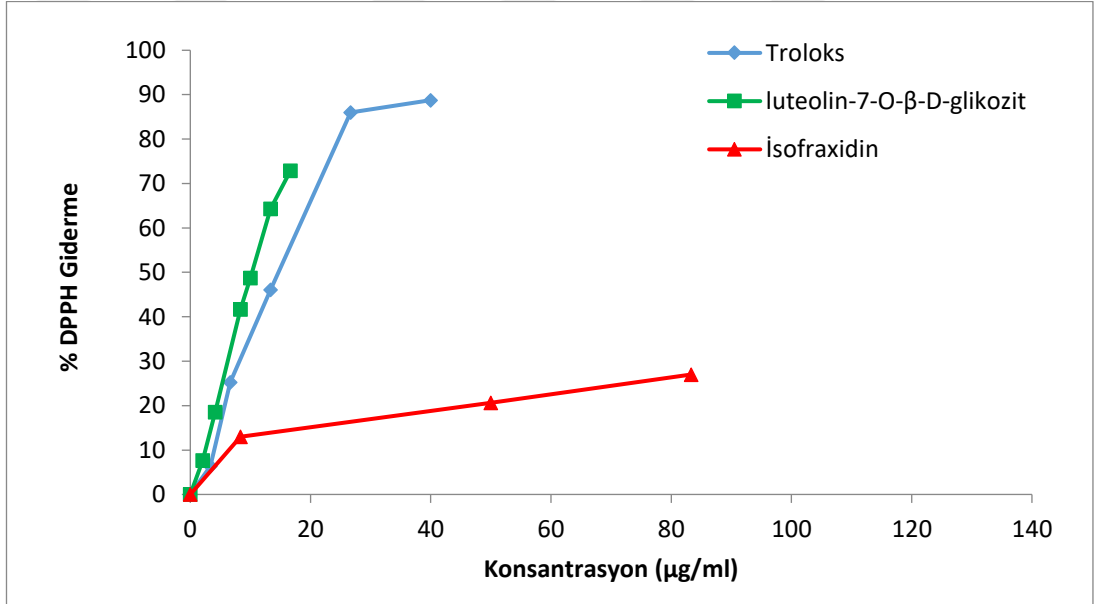
N-bütanol, luteolin-7-O- β -D-glikozit, isofraxidin örnekleri ve 5-FU nun C6 hücresine karşı antikanser aktiviteleri incelendi. Yapılan testler neticesinde tüm örneklerde doz artışına bağlı olarak aktivitelerinde artış gözlemlendi (Şekil 4.10.). N-bütanol, luteolin-7-O- β -D-glikozit, isofraxidin örneklerinin çalışılmış olunan tüm dozlarda 5-FU den daha düşük aktiviteye sahip olduğu tespit edildi. Bununla birlikte n-bütanol ve luteolin-7-O- β -D-glikozit örneklerinin 5-FU ile kıyaslandığında, 100 μ g/mL konsantrasyonda C6 hücresine karşı ılımlı aktivite gösterdiği gözlemlendi. Özellikle n-bütanol ekstresinde dikkate değer bir etki tespit edildi. 100 μ g/mL konsantrasyonda aktivite sırası ile: 5-FU > n-bütanol ekstresi > luteolin-7-O- β -D-glikozit > isofraxidin şeklindedir. n-Bütanol, luteolin-7-O- β -D-glikozit, isofraxidin örneklerinin C6 hücresine karşı hücre seçici etki gösterdiği belirlendi.



Şekil 4. 10. n-Bütanol, luteolin-7-O- β -D-glikozit, isofraxidin ve 5-FU nun C6 hücresine karşı antikanser aktivite sonuçları (* testler üç tekrarlı ve iki kez tekrarlanmıştır)

Tablo 4. 1. n-Bütanol, luteolin-7-O- β -D-glikozit, isofraxidin örneklerinin HeLa ve C6 hücrelerine karşı IC₅₀ ve IC₇₅ değerleri

Tanacetum alyssifolium bitkisinin n-bütanol ekstresinden saflaştırılan bileşiklerin DPPH^{*} serbest radikal giderme aktiviteleri, farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerinin 517 nm'deki absorbansları ölçülerek tespit edilmiştir. Bileşiklerin DPPH^{*} serbest radikal giderme aktiviteleri standart olarak kullanılan troloks ile karşılaştırılmıştır. Reaksiyon karışımlarının absorbanslarındaki düşme yüksek serbest radikal giderme aktivitelerini göstermektedir. Şekil 4.12. incelendiğinde luteolin-7-O-β-D-glikozit bileşiğinin standart olarak kullanılan troloksdan daha fazla miktarda DPPH^{*} serbest radikalini giderdiği görülmektedir. İsofraxidin bileşiğinin ise standarttan daha az miktarda DPPH^{*} serbest radikalini giderdiği görülmektedir.



Şekil 4. 12. Bileşiklerin DPPH^{*} serbest radikali giderme aktivitesinin troloks ile mukayese edilmesi

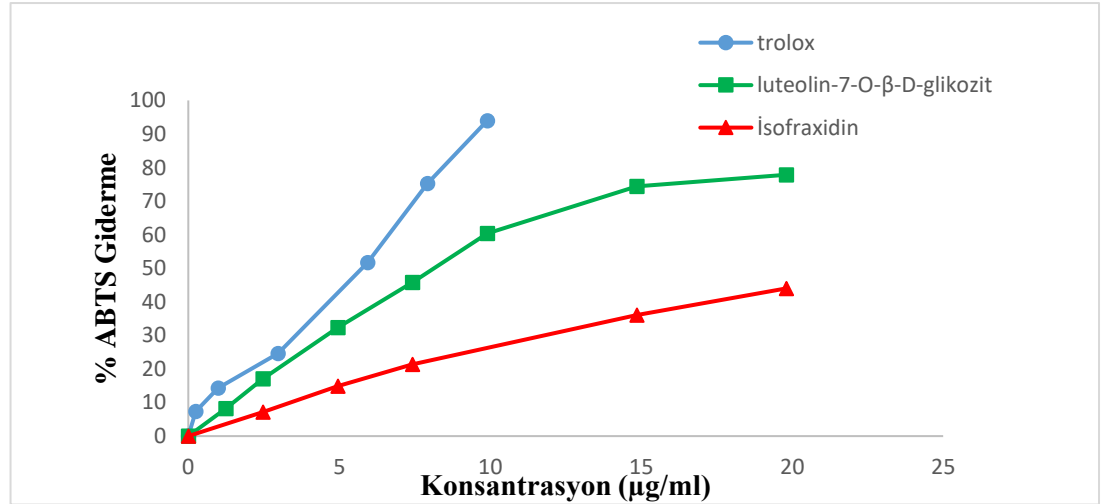
Bileşiklerin ~10 µg/mL konsantrasyonunda DPPH^{*} radikali giderme aktiviteleri luteolin-7-O-β-D-glikozitin % 48, isofraxidin % 13 ve troloksun ise % 46'dır. Serbest radikal giderme aktivitesi luteolin-7-O-β-glikozitin > troloks > isofraxidin şeklindedir.

Tablo 4.2. Bileşiklerin DPPH[•] serbest radikali giderme IC₅₀ değerleri

Örnek adı	IC ₅₀ (µg/ml)
Trolox	17,8
Luteolin-7-O-β-D-glikozit	10,73
İsofraxidin	335,97

4.3.2. ABTS^{•+} katyon radikal giderme aktivitesi tayini

ABTS^{•+} serbest radikal giderme aktivitesi tayini bazı modifikasyonlarla Re ve arkadaşlarının (1999) geliştirdiği metoda göre belirlendi. ABTS^{•+} serbest radikal giderme aktivitesi yöntemi, ABTS^{•+} çözeltisinin koyu yeşil renginin ortamdaki antioksidanlar tarafından elektron transferi ile rengin açılması ve meydana gelen bu renk değişikliğindeki absorbans şiddetinin ölçülmesi esasına göre yapılmaktadır. ABTS^{•+} radikali antioksidan yapılar tarafından indirgendiği zaman absorbans düşmektedir. ABTS çözeltisinin koyu yeşil rengi ne kadar açılırsa ve karışımın absorbans miktarındaki düşme ne kadar yüksek olursa serbest radikali giderme gücü de o kadar yüksek demektir.



Şekil 4. 13. Bileşiklerin ABTS^{•+} serbest radikali giderme aktivitesinin troloks ile mukayese edilmesi

Şekil 4.13. incelendiğinde luteolin-7-O-β-D-glikozit ve isofraxidin bileşiklerinin standart olarak kullanılan troloksdan daha az ABTS^{•+} serbest radikalini giderdiği görülmektedir. Bileşiklerin ~10 µg/mL konsantrasyonunda ABTS^{•+} radikali giderme

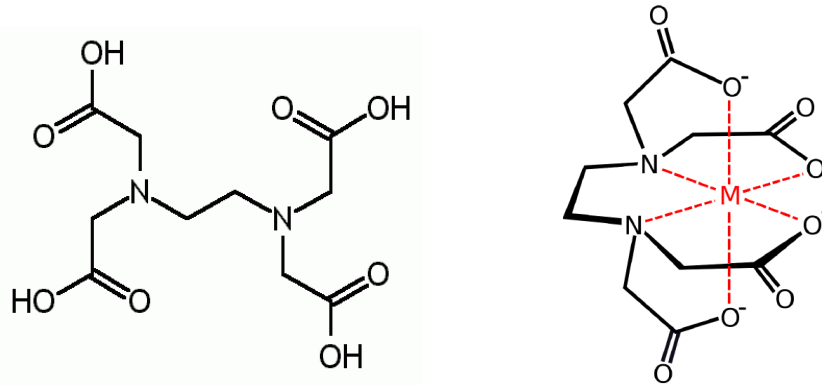
aktiviteleri troloksun % 93, luteolin-7-O- β -D-glikozitin % 60 ve isofraxidinin % 35'dir. Serbest radikal giderme aktivitesi troloks > luteolin-7-O- β -D-glikozit > isofraxidin şeklindedir.

Tablo 4.3. Bileşiklerin ABTS^{•+} serbest radikali giderme IC₅₀ değerleri

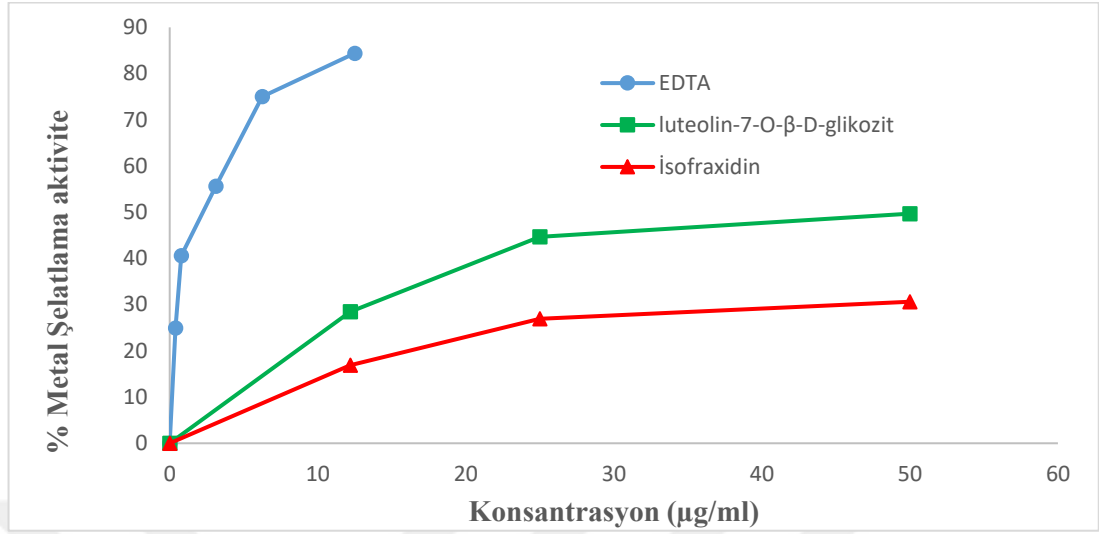
Örnek adı	IC ₅₀ (μ g/ml)
Trolox	5,26
Luteolin-7-O- β -D-glikozit	9,81
İsofraxidin	21,88

4.3.3. Metal şelatlama kapasite tayini

Metal şelatlama kapasite tayini Dinis ve arkadaşlarının (1994) metoduna göre belirlendi. Luteolin-7-O- β -D-glikozit ve isofraxidin bileşiklerinin metal şelatlama kapasiteleri Etilen Diamin Tetraasetik Asit (EDTA) ile kıyaslaması yapıldı. Sonuçları IC₅₀ değerleri ile ifade edildi.



Şekil 4. 14. Etilen Diamin Tetraasetik Asit' in açık yapısı ve metal şelatlama aktivitesi



Şekil 4. 15. Bileşiklerin metal şelatlama kapasitesinin EDTA ile mukayese edilmesi

Şekil 4.15. incelendiğinde luteolin-7-O-β-D-glikozit ve isofraxidin bileşiklerinin standart olarak kullanılan EDTA daha az şelatlama kapasitesi görülmektedir. Bileşiklerin ~10 µg/mL konsantrasyonunda şelatlama kapasiteleri EDTA % 84, luteolin-7-O-β-D-glikozitin % 44 ve isofraxidin % 16'dır. Metal şelatlama kapasitesi EDTA > luteolin-7-O-β-D-glikozitin > isofraxidin şeklindedir.

Tablo 4.4. Bileşiklerin Metal şelatlama kapasitesi IC₅₀ değerleri

Örnek adı	IC ₅₀ (µg/ml)
EDTA	3,47
Luteolin-7-O-β-D-glikozit	69,7
İsofraxidin	226,32

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tanacetum türleri birçok kimyasal bileşik türünü yapılarında bulundurmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda başta seskiterpen laktonlar olmak üzere, seskiterpenler, triterpenler, kumarinler, monoterenler ve flavonoidler gibi sekonder metabolitler izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır (Gören vd., 2002). Ayrıca sahip oldukları farklı biyolojik aktiviteler nedeniyle birçok araştırmaya konu olmuşlardır.

Bu nedenle ülkemizde yetişen *Tanacetum* türlerinin araştırılması ekonomik değeri olan türlerin ortaya çıkarılması açısından önem arz etmektedir (Spitzer ve Steelink, 1996). Çoğunlukla Compositae familyasındaki bitkilerde bulunan seskiterpen laktonların, familya içinde kemosistemik önemleri vardır. Çalışmalar sonucunda türlerin sistematik sınıflandırılmalarındaki hatalar düzeltilebilecek, izole edilen bileşiklerin ışığında faydalı olabilecek ve ekonomik değere sahip olan türler belirlenebilecektir.

Tanacetum Alyssifolium (İliç papyası) bitkisinin n-bütanol ekstresi ilk defa tarafımızdan çalışılmış olup, bir flavonoid glikozit olan luteolin-7-O- β -D-glikozit (7-(β -D-glucoopyranosyloxy)-5-hydroxy-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-4H-chromen-4-one) ve kumarin türevi olan isofraxidin (7-hidroksi-5,6-dimetoksi) *Tanacetum* türlerinden ilk defa izole edilmiştir. Bileşiklerin yapısı spektroskopik yöntemlerden ^1H NMR, ^{13}C NMR, COSY, HMBC, HMQC ve HPLC-TOF/MS kullanılarak aydınlatıldıktan sonra literatür araştırması ile kesinlik kazanmıştır.

Literatür taramaları sonucunda luteolin-7-O- β -D-glikozit'in daha önce *Centaurea urvillei* (Böke, 2005) *Zygophyllum simplex* L. (Hossam ve Ahmed 2017), *Brachychiton acerifolius* (Aisha vd., 2017), *Lagotis breviflora* (Xiang vd., 2016), bitkilerinden izole edildiği görülmüştür. İsoisofraxidin' in ise *Anemone tomentosa* (Hao vd., 2011), *Fraxinus rhynchophylla* (Lee vd., 2010), bitkilerinden izole edildiği belirlenmiştir.

Çalışmamızda fitokimyasal araştırmaların yanı sıra bitkinin ham ekstresi ve izole edilen bileşikler üzerinde antikanserojen ve antioksidan aktivite çalışmaları yapılmıştır.

İzole edilen bileşiklerin antioksidan aktivite çalışmalarında DPPH• serbest radikalini giderme aktivitesi Blois metoduna göre, ABTS⁺ serbest radikal giderme aktivitesi tayini bazı modifikasyonlarla Re ve arkadaşlarının (1999) geliştirdiği metoda göre ve Metal şelatlama kapasite tayini Dinis ve arkadaşlarının (1994) metoduna göre belirlendi. Çalışma sonucunda bulunan aktiviteler gıdaların antioksidan aktivitesinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan troloks ile karşılaştırıldı.

Sağlık açısından, sentetik antioksidanların toksik ve kanserojen etkileri nedeniyle doğal antioksidan özellik gösteren fenolik bileşiklere olan ilgi her geçen gün artmaktadır. Antioksidan olarak fenolik bileşikler kanser, kalp hastalıkları, katarakt, göz hastalıkları, yaşlılık hastalıkları vb. birçok hastalığı engelleyebildiği ifade edilmektedir. Bu nedenle fenolik madde içeriği yüksek olan meyve ve sebze tüketimi hastalıklara yakalanma riskini azaltmakta ve sağlık üzerine olumlu etkide bulunmaktadır (Nizamlıoğlu, 2010). Antioksidan aktivite tayin metotları, gıda, farmasötik veya tıbbi amaçlı kullanılan bitkilerin veya bu bitkilerden izole edilen bileşiklerin biyolojik aktivite kapasitelerinin aydınlatılmasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Yapılan bu çalışmada da bu metotlar kullanılmış olup bulgular birer doğal ve standart antioksidan olan troloks ile mukayese edilerek sonuçlar IC₅₀ değerleri olarak verilmiştir.

Luteolin-7-O-β-D-glikozit bileşiğinin standart olarak kullanılan Trolox• tan daha iyi DPPH radikalini süpürdüğu, ABTS katyon radikalini giderme tayininde artan konsantrasyon ile arttığı ve indirgeme yeteneğinin standart antioksidan olarak kullanılan troloks•dan daha az olduğu ve metal şelatlama kapasitesinin standart olarak kullanılan EDTA•den daha az olduğu tespit edilmiştir.

İsofraxidin bileşiğinin DPPH ve ABTS katyon radikalini giderme tayininde standart olarak kullanılan Trolox•tan ve metal şelatlama kapasitesinin de standart olarak kullanılan EDTA•den daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

İzole edilen her iki molekülün ve n-bütanol ekstresinin antikanserojen aktivite çalışmasında numunelerin 4 farklı konsantrasyonu hazırlanmış olup HeLa ve C6 hücre kültürleri üzerine bu numunelerin antiproliferatif etkisi belirlenmiştir. Sonuç olarak n-bütanol ekstresinin 5-FU ile kıyaslandığında, 100 µg/mL konsantrasyonda HeLa hücresine karşı ılımlı aktivite gösterdiği gözlenmiştir. N-bütanol ve luteolin-7-O-β-D-glikozit örneklerinin 5-FU ile kıyaslandığında C6 hücresine karşı, 100 µg/mL konsantrasyonda ılımlı aktivite gösterdiği gözlenmiş olup özellikle n-bütanol ekstresinde dikkate değer bir etki tespit edildi.

Sonuç olarak, Erzincan'ın İliç ilçesi Munzur dağı eteklerinden toplanan *Tanacetum alyssifolium* bitkisinin toprak üstü kısmı n-bütanol ekstresinden izolasyon çalışması ilk defa tarafımızdan yapılmıştır. Bu çalışmada bu bitkinin n-bütanol ekstresinden elde edilen 2 bileşiğin yapısı spektral analiz ve literatür karşılaştırılmasıyla aydınlatılmış, saf madde ve ekstrenin antioksidan ve antikanserojen aktivite analizleri yapılmıştır. N-bütanol ekstresi HeLa ve C6 hücresine karşı, luteolin-7-O-β-D-glikozit molekülü ise sadece C6 hücresine karşı inhibe edici ve selektif aktivite göstermiştir. Bu nedenle bitkinin n-bütanol ekstresinin ilaç geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülebilir.

KAYNAKLAR

- Aisha H. A. Z., Mohamed A. F., Manal A.A. H., Zeinab A. A. K., Radwa H. El-A., Hanaa M. El-R., (2017) "Flavonoid chemical composition and antidiabetic potential of *Brachychiton acerifolius* leaves extract" *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, Volume 7, Issue 5, 389–396.
- Akçiçek E., (2010) "Bitkilerle Tedavide Güncel Araştırmalar (Eski İlaçlar, Yeni Uygulama Alanları)", *Bitkilerle Tedavi Sempozyumu, Merkez efendi Geleneksel Tıp Derneği*, İstanbul, 50-51.
- Alpınar, K. ve Saçlı, S., (1997) "Türkiye'deki Etnobotanik Çalışmalar Hakkında Bir Bibliyografya", *XI. BİHAT Bildiriler Kitabı*, Ankara, 157-167,.
- Anonim, (2005) "Medicinal and Aromatic Plants" *Working Group-ECP/GR*.
- Archana, B., Dasgupta, N., De, B., (2005) "In vitro study of antioxidant activity of syzygium cumini fruit", *Food Chem.* 90, 727-733,.
- Arslan, M., ve Peng M., (2013) "Taiwan ve Türkiye'de Tıbbi ve Aromatik Bitki Türlerinin Kullanımı", *V. Süs Bitkileri Kongresi bildiriler kitabı içinde*, (ss. 163-169). Yalova: Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü.
- Avcı, M., (2005) "Çeşitlilik ve Endemizm Açısından Türkiye'nin Bitki Örtüsü", *Coğrafya Dergisi*, 13, 27-55.
- Aydoğan, Ü., Doğaner, Y.Ç., Borazan, E., Kömürcü, G., Koçak, N., Öztürk, B., Sağlam, K., (2012) "Kanser Hastalarında Depresyon ve Anksiyete Düzeyleri ve Hastalıkla Başa Çıkma Tutumlarının İlişkisi. *Türk Aile Halk Dergisi*, 16(2): 55-60.
- Baser, K.H.C., (1995) "Tıbbi Bitkiler", *Bilim ve Teknik*, Sayı 331, Haziran, ss76-79.
- Baykal, T., (1997) "Doğal Kaynaklı Bileşiklerin Biyolojik Aktivite Yönünden Değerlendirilmesi ve Tedavideki Yeri", *GE*, 46: 21-22.
- Bayram, E., Kırıcı E, Tansı S, Yılmaz G, Arabacı O, Kızıl S, Telci İ., (2010) "Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Üretimini Arttırılması Olanakları", *Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi, Bildiri Kitabı*: 104-107.
- Bayram, E., Kırıcı, S., Tansı, S., Yılmaz, G., Arabacı, O., Kızıl, S., Telci, İ., (2010) "Tıbbi Ve Aromatik Bitkiler Üretimini Arttırılması Olanakları". *Türkiye Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi Bildiriler Kitabı-I*, 437–456, 11–15 Ocak, Ankara.

- Bayramoğlu, M.M., Toksoy, D. ve Ően, G., (2009) “Türkiye’de Tıbbi Bitki Ticareti”, **II. Ormancılıkta Sosyo - Ekonomik Sorunlar Kongresi bildiriler kitabı içinde.** (ss. 88-98). Isparta: Orman Fakóltesi.
- Baytop, T., (1999) “Türkiye’de Bitkilerle Tedavi”, **Nobel Tıp Kitabevleri**, 2. Baskı, İstanbul.
- Blois M.S., (1958) “Antioxidant determinations by the use of a stable free radical” **Nature**, 181:1199–1200.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M., (1990) “Flavonoid as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies: *Methods in Enzimology*”. 186:343-355.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E., (2001) “Production of Plant Secondary Metabolites; a Historical Perspective”, **Plant Sci.**, 161: 839-851.
- Bozkurt, Y., ve Göker Y., (1981) “Orman Ürünlerinden Faydalanma”, **İstanbul Üniversitesi Orman Fakóltesi Yayınları**, İ.Ü. Yayın No 2840, O.F. Yayın No 297, İstanbul.
- Böke, N., (2005) “Glycoside isolation of *Centaurea urvillei* subsp. *stepposa* (Asteraceae) and its activities”, (Yüksek lisans) Ege Üniversitesi / **Fen Bilimleri Enstitüsü** / Kimya Bölümü.
- Bremer, K., (1994) “Asteraceae: Cladistics & Classification”, **Timber Press, Oregon**. Timber Press. U.S.A.
- Brummit, R.K., (1992) “Vascular Plant Families and Genera”, **Royal Botanic Gardens**, Kew, U.K..
- Bulut, G., (2005) “Narman (Erzurum) ve Köylerinde Halk İlacı Olarak Kullanılan Bitkiler”, Yüksek Lisans Tezi, **Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**.
- C.Doğan, K.. Sorkun, (1999) “Pollen analysis of honeys from Central, Eastern and Southeastern Anatolia in Turkey”, **Hacettepe Bulletin of Natural Sciences and Engineering Series A**,28.
- Caltagirone, S., Rossi, C. and Poggi A., (2000) “Flavonoids Apigenin and Quercetin Inhibit Melanoma Growth and Metastatic Potential”, **Int J Cancer**: 87: 595–600.
- Chamberlain, D. F., (1975) *Scorzonera* L. In: "Flora of Turkey and East Aegean Island",ed. P.H. Davis, Edinburg, 5, 632-657.
- Charwood, B.V., Rhodes, M.J.C., (1990) “Secondary Products from Plant Tissue Culture”, ISBN: 0 19-857717-6. **Clarendon Press.**, Dxford.

- Croteau, R., Kutchan, T. M., Lewis, N. G., (2000) "Natural Products (Secondary Metabolites). In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*"; Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. Eds.; American Society of Plant Physiologists: Rockville, MD, pp 1250-1318.
- Çakar, B., (2010) "Ferulago Idaeae ve Ferulago Trojana bitkilerindeki sekonder metabolitlerin izolasyonu, antioksidan ve antikolinesteraz aktivitelerinin incelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul.
- Davis, P. H., Tan, K. and Mill, R. R. (eds.), (1988) "Flora of Turkey and the east aegean islands", Vol. 10, *Edinburgh University Press*, Edinburgh.
- Dewick, P. M., (2001) "Medicinal natural products: a biosynthetic approach", John Wiley, Chichester, Bors, W., Saran, M., 1987. *Free Radical Res. Commun.*, (2) 131.
- Duke, J.A., (1987) "Handbook of Medicinal Plants", *CRC Press: Boca Raton*, Florida, 474-475.
- Dulger B., Ceylan M., Alıtsaous M., Ugurlu E., (1999) "Artemisia absinthium L. (Pelin)'un Antimikrobiyal Aktivitesi", *Tr. J.of Biology*, 23 (3) 377-384.
- Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman H., Aytaç, Z., Ve Adıgüzel, N., (2000) "Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı (Red Data Book of Turkish Plants)", Ankara: Türkiye Tabiatını Koruma Derneği.
- Eminağaoğlu, Ö., Aksu, G., (2015) "Barhal Vadisi (Yusufeli, Artvin-Türkiye) Florası, AÇÜ BAP Projesi, No: 2013.F10.01.04, Proje Sonuç Raporu.
- Erdemir, D. A., (1998) "At Kestanesi ve Prepagel. Doğanın Harika İlacı", Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, *Nobel Kitap Evi İstanbul*, 124.
- Erik S., ve Tarıkahya B., (2004) "Türkiye Florası Üzerine", *Kebikeç*, sayı 17, 151-153.
- Ertürk, Ö., (2003) "*Scorzonera mollis* Bieb. (Compositae) Bitkisinin Antimikrobiyal Aktivitesi", *Çevre Koruma Dergisi*, 47: 27-31.
- Eryiğit, F., (2006) "*Mentha pulegium* L. ve *Salvia tomentosa* Miller Bitkilerinin Metanol Özütlelerinin in vitro Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi", *Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi*, Isparta.
- Faydaoğlu, E., Sürücüoğlu, M. S., (2011) "Geçmisten Günümüze Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanılması ve Ekonomik Önemi", *Kastamonu Üni., Orman Fakültesi Dergisi*, 11 (1): 52 67.
- Formica J. V., Regelson, W., (1995) "Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids", *Fd. Chem. toxic.* 33 (12):1061-1080.

- Friesenecker, B., Tsai, A.G., Allegra, C. and Intaglietta, M., (1994) "Oral Administration of Purified Micronized Flavonoid Fraction Suppresses Leukocyte Adhesion in Ischemia-Reperfusion Injury": In Vivo Observations in the Hamster Skin Fold", *Int J Microcirc Clin Exp*; 14: 50–5.
- G. Erdtman, (1966) "Pollen morphology and plant taxonomy", *Angiosperms (An introduction of palynology revised edition)*, Hanerphthb. Co. New York.
- Gao, K., Henning, S.M., Niu, Y., Youssefian, A.A., Seeram, N.P., Xu, A. and Heber, D., (2006) "The Citrus Flavonoid Naringenin Stimulates DNA Repair in Prostate Cancer Cells", *J Nutr Biochem* 17: 89-95.
- Geçibesler, İ. H., (2009) "Stachys byzantina C. Koch. (dağ çayı) bitki ekstresinin antikanserojen ve insektisit aktivitelerinin incelenmesi ve aktif bileşenlerin izolasyonu", Yüksek Lisan Tezi, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Tokat.
- Gezgin, D., (2006) "Bitki Mitosları", *Sel Yayıncılık*, İstanbul.
- Gören, N., Arda, N., Çaliskan, Z., (2002) "Chemical characterization and biological activities of the genus *Tanacetum* (Compositae)", *Stud. Nat. Prod. Chem.*, 27, 547-658.
- Grace, P.A., (1994) "Ischaemia-Reperfusion Injury", *Br J Surg*;81: 637–47.
- Groot H., (1994) "Reactive Oxygen Species in Tissue Injury", *Hepatogastroenterology*; 41:328–32.
- Guler, H. K., Donmez, I. E., Aksoy, S. A., (2015) "Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Antibakteriyel Aktivitesi ve Tekstil Sektöründe Kullanımı", *SDU Journal of Science (E-Journal)*, 10 (2): 27-34.
- Güner, A., (2013) "Türkiye Bitkileri Listesi", *Nezhat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları Flora Dizisi 1*, İstanbul, 1290s.
- Güner, A., Aslan, S., Ekim T, Vural M, Babaç MT., (2012) "Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)", *Nezhat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını*, İstanbul: 1290s.
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., Ve Başer, K. H. C., (2000) "Flora of Turkey and the East Aegean Islands", *Edinburgh*, vol. 11.
- Hacıbekiroğlu, I., (2009) "Iris suaveolens'ten elde edilen bileşiklerin yapı tayini ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul.
- Haenen, G.R. and Bast, A., (1999) "Nitric Oxide Radical Scavenging of Flavonoids Methods Enzymol"; 301:490–503.

- Halfon, B., (2005) “Natural Products/Lecture Notes”, Boğaziçi Univesity Press, İstanbul.
- Halliwell, B., and Gutteridge J.M.C., (2003) “Free Radicals in Biology And Medicine”, *Oxford University Pres.* 3rd Ed.
- Harborne, J. B., Marby, T. J., Marby H., (1975) “The Flavonoids”, *Chapman and Hall*, London,.
- Harput ÜŞ (2010) “Bitkilerle Tedavide Güncel Arastırmalar”, “Yeni İlaç Gelistirme Çalışmalarında Tıbbi Bitkiler”, Bitkilerle Tedavi Sempozyumu, *Merkez efendi Geleneksel Tıp Derneği*, İstanbul, 45-46.
- Harvey, A.L., (2008) “Natural products in drug discovery”, *Drug Discov Today*, 13, 19,20, 894-901p.
- Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara. T., Okuda, T., (1988) “Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects”, *Chem. Pharm. Bull.* 36: 1090-1097.
- Havsteen, B., (2002) “The biocemistry and Medical significance of the flavonoids”, *Pharmacology and Therapeutics* 96 (2-3): 67-202.
- Haydaroğlu A., Bölükbaşı, B. ve Özşaran, Z., (2007) “Ege Üniversitesi'nde Kanser Kayıt Analizleri” 34134 Olgunun Değerlendirmesi. *Türk Onkoloji Dergisi*, 22(1), 22-28.
- Hegarty, V.M., May, H.M. and Khaw, K.T., (2000) “Tea Drinking and Bone Mineral Density in Older Women”, *Am J Clin Nutr*; 71:1003–7.
- Hertog, M.G., Kromhout, D., Aravanis, C., (1995) “Flavonoid Intake and Long-Term Risk of Coronary Heart Disease and Cancer in the Seven Countries Study”, *Arch Intern Med*; 155:381–6.
- Heywood, V. H., (1978) “Flowering Plants of the World. Oxford University Press”, Oxford, London.
- Heywood, V.H., (1985) “Flowering Plants of the World”, Equinox Ltd., Oxford, UK. 335.
- Hossam M. Abdallah and Ahmed Esmat., (2017) “Antioxidant and anti-inflammatory activities of the major phenolics from *Zygophyllum simplex L*”, *Journal of Ethnopharmacology* Volume 205 Pages 51–56.
- J.R. Rowley, A.O. Dahl, and J.S. Rowley., (1981) “Substructure in exines of *Artemisia vulgaris* (Asteraceae)”, *Review of Palaeobotany and Palynology* 35: 1-38.

- Joy PP., Thomas J., Mathew S., Skaria BP., (2001) “Medicinal Plants”, *Tropical Horticulture* Vol. 2. (Eds. Bose TK, Kabir J, Das P and Joy PP). Naya Prokash, Calcutta: 449-463.
- Juceni P. Chávez, Jorge M. David, Shu-Wei Yang, and Geoffrey A. Cordell, (1997) ‘‘24-Norhopene Derivatives from *Diatenopteryx sorbifolia*’’ *Journal Of Natural Products*, 60 (9), pp 909–911.
- Kandemir, A., (2017) “Resim arşivi”, Erzincan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü.
- Kandemir, A., (2006) “Türkiye ’nin BTC Boru Hatt Boyunca Önemli Bitki Alanları” (Ed. Dr. Neriman Özhatay), 126-179, İstanbul.
- Kandemir, A., Sevindi, C., Korkmaz, M., (2015) “Erzincan (Türkiye)’a Özgü Endemik Bitki Taksonlarının IUCN Tehdit Kategorileri”, *Bağbahçe Bilim Dergisi2* (1): 43-65.
- Kanno, S., Tomizawa, A., Hiura, T., Osanai, Y., Shouji, A., Ujibe, M., Ohtake, T., Kimura, K., and Ishikawa, M., (2005) “Inhibitors Effects of Naringenin on Tumor Growth in Human Cancer Cell Lines and Sarcoma s-180-Implanted Mice. *Biol. Pharm. Bull.* 28: 527-530.
- Karakoç, Akar. (2015) “Hipertiroidili Sıçanların Kalp Dokusundaki Oksidatif Stres Parametreleri Üzerine Egzersizin Etkisinin Araştırılması”, (Doktora tezi) *Sağlık Bilimleri Enstitüsü* Diss.
- Keleştemur, T. G., (2011) “Balıklarda Antioksidan Savunma ve Oksidatif Stres”, *Bibad ; Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 4(1), 69-73.
- Kendir, G., Güvenç., A., (2010) “Etnobotanik ve Türkiye’de Yapılmış Etnobotanik Çalışmalara Genel Bir Bakış”, *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, Cilt 30, Sayı 1, ss. 49-80.
- Knekt, P., Jarvinen, R. and Seppanen, R., (1997) “Dietary Flavonoids and the Risk of Lung Cancer and Other Malignant Neoplasms”, *Am J Epidemiol*; 146: 223–30.
- Koçyiğit, M., (2005) “Yalova İlinde Etnobotanik Bir Araştırma”, Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*.
- Kolaylı, S., Küçük, M., duran, C., Candan, F., ve Dinçer, B., (2003) “Chemical and Antioksidant properties of *Laurocerasus Officinalis* Roem”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 7489-7494, 51.
- Korkina, L.G., Afanasev I.B., (1997) “Antioxidant and Chelating Properties of Flavonoids” *Adv Pharmacol*; 38:151–63.

- Korkmaz, M., Kandemir, A., İlhan, V., Dogan, N.Y., (2015) “*Tanacetum erzincanense* (Asteraceae)”, a new species from Erzincan, Turkey, *Turk. J. Bot.*, 39(1), 96-104.
- Korukluoğlu, M., İrkin R., Sertel S. (2006) “Salmonella ve Shigella Türlerinin gelişmesini engelleyen tıbbi bitkiler ve Esansiyel yağlar”, *Gıda Dergisi* 31(6): 319-324.
- Köksal, E., (2007) ”Karnabahar (*Brassica Oleracea*) peroksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, antioksidan ve antiradikal aktivitesinin belirlenmesi”, (Doktora tezi), *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- Kumar, S.A., (2009) “Plants-based Medicines” India.
- Kumar, V., Tyagi, D., (2013) “Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils of Genus *Tanacetum*” *J. Pharmacogn Phytochem.* 2(3), 155-159.
- Lee, H.S., (2002) “Characterization of Major Anthocyanins and the Color of Red-Fleshed Budd Blood Orange (*Citrus sinensis*)”, *J Agric Food Chem* 50:1243-1246.
- Li, J.W. at Vederas, J.C., (2009) “Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier”, *Science*, 325, 5937, 161-165 p.
- Li, X., Y. Zhao, R. Huang, W. Zhu, X. Zeng, J. Zhao, Y. Feng, R. He, (2014) “Simultaneous quantification of 17 bioactive constituents in *Sarcandra glabra* by liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry”, *Analytical Methods*, 6(19), 7989-7995.
- Mathew, S. ve Abraham, T. E., (2006) “Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*cinnamomum verum*) bark extracts, through various in vitro models”, *Food Chemistry*, 94, 520-528,.
- Martensa, S., Teerib, T. and Forkmann, G., (2002) “Heterologous Expression of Dihydroflavonol 4 reductases From Various Plants”, *FEBS Lett* 531:453-458.
- Mehmetoğlu, İ., Ünlü, C.M., Gökçe, R. and Kurban, S., (2005) “Flavonoid Contents and Antioxidant Features of Tea, Spices and other Comestibles of Plant Origin: Review”.
- Namiki, M., (1990) “Food Science and Nutrition”, 29, 273.
- Nicholls, P., Fita, L., Loewen, P.C., (2000) “Enzymology and Structure of Catalases”, *Advances in Inorganic Chemistry*, 51:51-106.
- Nizamlıoğlu, N. M., Nas, S., (2010) “Meyve ve Sebzelerde Bulunan Bileşikler; Yapıları ve Önemleri”, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 20-35.

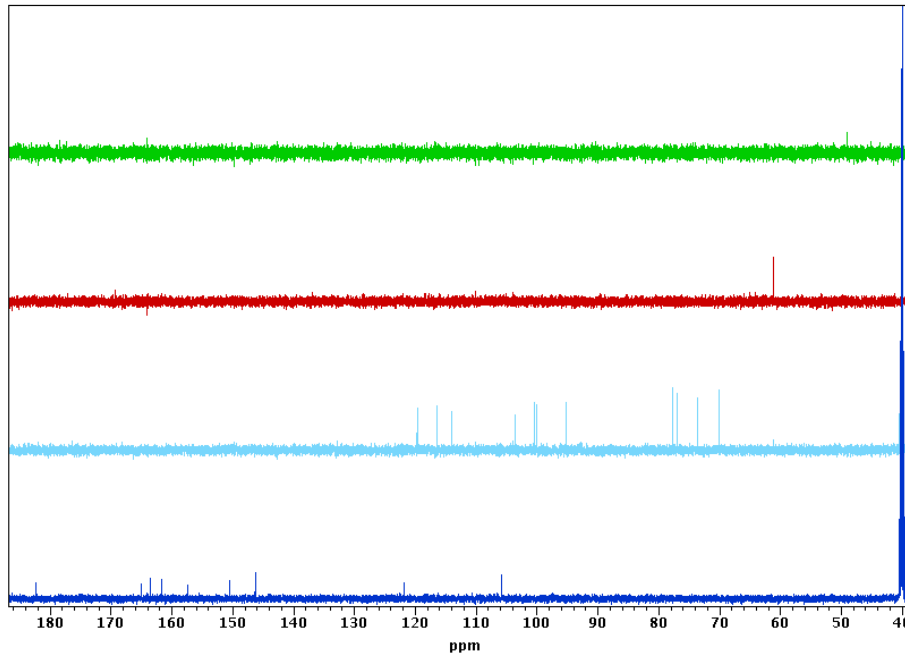
- Oskay, D., Oskay, M., (1995) "e-Journal of New World Sciences Academy", 4(2), 31-41.
- Oliveira, P.A., Colaço, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, H., De-La-Cruz P.L.F. at Lopes, C., (2007) "Chemical carcinogenesis", *An Acad Bras Cienc* 79, 4, 593-616 p.
- Ö.Seçmen, Y.Gemici, G.Görk, L. Bekat, E. Leblebici, (1998) "Tohumlu Bitkiler Sistematığı", *E.Ü.F.F.* kitaplar serisi no: 116, Bornova-İzmir.
- Özbek, H., (2005) "Cinsel ve Jinekolojik Sorunların Tedavisinde Bitkilerin Kullanımı", *Van Tıp Dergisi*, 12 (2):170-174.
- Özçelik, H., Balabanlı, C., (2005) "Burdur İlinin Tıbbi ve Aromatik Bitkileri", *1.Burdur Sempozyumu*, 16-19 Kasım 2005, Burdur.
- Özhatay, N., Kültür, Ş., (2006) "Check-List of Additional Taxa to the Supplement Flora of Turkey III", *Tr. J. Bot.*, 30:281-316.
- Öztekin, T., (2010) "*Tanacetum kotschyi* (Boiss.) bitkisi üzerinde fitokimyasal araştırmalar ve biyoaktivite çalışmaları", Yüksek Lisans Tezi, *Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- Öztürk M., Temel M., Tınmaz AB., Kil L., (2012) "Tıbbi ve aromatik bitkilerin dış Ticaretimiz deki yeri", *Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu*, 1, 36, Tokat.
- Özyürek, M., (2008) "Reaktif oksijen türleri süpürücü antioksidan aktivitenin ölçümünde modifiye cuprac yöntemlerinin geliştirilmesi", *İstanbul Üniversitesi*, Doktora tezi, İstanbul.
- Picman, A.A. (1986) "Biological Activities of Sesquiterpene Lactone", *Biochem. Systematic. And Ecology*, 11(4): 321-327.
- Pütün, EA., (1987) "Centaurea thracica (Janka) Hayek ve Centaurea Pichleri Boiss", Subsp. Pichleri Flavonoidleri, *Doktora tezi. T.C. Anadolu Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Eskişehir.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999) "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay", *Free Radical Biology and Medicine*. 1231-1237.
- Richard, A. D., (2011) "Plant biotechnology shapes up fort the 21.st century", *Plant Biology Division, Samuel Roberts Noble Foundation*, OK, USA (1), 3-6.
- Saday, S., (2005) "*Jurinea* Cass. (Compositae) Üzerinde Morfolojik, Palinolojik ve Anatomik Araştırmalar", Marmara Üniversitesi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

- Sannah P. N. M., Jacobus J.M. M., Ahmed A. Hussein & Namrita L., (2007) “Antitubercular Activity of Compounds Isolated from *Pelargonium sidoides*”, *Journal Pharmaceutical Biology* Volume 45, Issue 8.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L. ve Leblebici E., (2000) “Tohumlu Bitkiler Sistematigi”, *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi*, Bornova, İzmir.
- Sezik, E., Yeşilada, E., Tabata, M., Honda, G., Takaishi, Y., Fujita, T., Tanaka, T., and Takeda, Y., (1997) “Traditional Medicine in Turkey VIII”, “Folk Medicine in East Anatolia Erzurum, Erzincan, Ağrı, Kars, Iğdır Provinces”, *Economic Botany*, 51(3): 195-211.
- Shahidi, F. and Wanasundara, K.J., (1992) “Critical Reviews in Food Science, Nutrition” 32 (1), 67.
- Sherwin, E.R., (1990) “Antioxidants, In Branen, A.L., Davidson, P.M., Salminen, S., Food antioxidants”, *Marcel Dekker Inc.*, New York.
- Shing, B., Sahu, P.M., Sharma, M.K., (2002) “Anti-Inflammatory and Antimicrobial Activities of Triterpenoids from *Strobilanthes callosus* Ness”, *Phytomedicine*, 9: 355-359.
- Smith, D. A., Banks, S. W., (1986) “Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological and structure activity relationship”, 113-124.
- Strensward, J. ve Clark, D., (2004) “Palliative Medicine a Global Perspective”, *Oxford Textbook of Palliative Medicine*, 3rd ed. Oxford: Oxford University Press; p. 1119-224.
- Sun, Y., Oberley, L.W., Li, Y., (1988) “A simple method for clinical assay of superoxide dismutase” *Clin Chem.*, 34: 497-500.
- Switala, J., Loewen, P.C., (2002) “Diversity of Properties Among catalases”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 401(2): 145-154.
- Şener, B., (2009) “Türkiyede bitkisel ilaçlarla ilgili mevzuatın dünü, bugünü ve geleceği”, *Modern Fitofarmakoterapi ve Doğal Farmasötikler*; 1: 5-13.
- Tadeg, H., Mohammed E., Asres K., Mariam T. G., (2005) “Antimicrobial activities of Some Selected Traditional Ethiopian Medicinal Plants Used in The Treatment of Skin Disorders”, *J.of Ethnopharmacol.*, 100 (1),:168-175.
- Tanker, M., Tanker, N., (1991) “Farmakognozi” *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi*, Ankara.
- Tarakçı, S., (2006) “Beykoz Civarındaki Tıbbi Özellik Taşıyan Bitkiler Üzerine Araştırmalar”, Doktora Tezi, *Marmara Üniversitesi Fen Bil. Enstitüsü*.

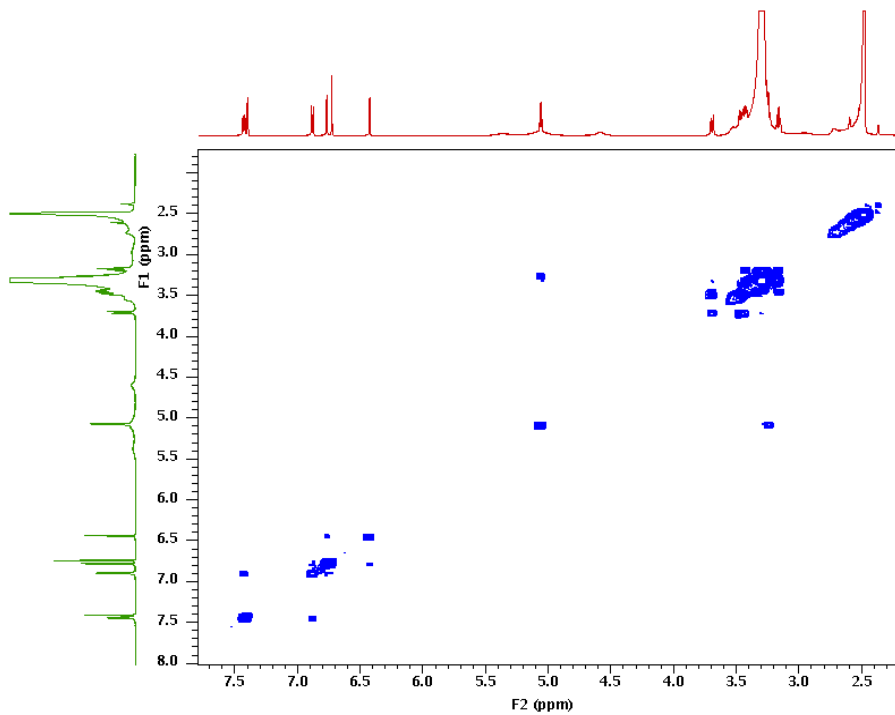
- Turan, F.A., (2000) “Türkiye’de Halk İlacı Araştırmaları”, **T.C. Kültür Bakanlığı**, Ankara.
- Tüfekçi, A. R., (2010) “Köy Göçüren (*Cirsium Arvense L. Scop. Subsp. Vestitum*) Bitkisinin Bazı Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi” **Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Tokat.
- Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK), (1997) “Türkiye’nin Bilim ve Teknoloji Politikası”, **TÜBİTAK Matbaası**, Ankara.
- Ulubelen, A., Fuente, de la G., Meriçli, A., Ruiz, L., (1995) “Norditerpenoid alkoloids of *Delphinium munzianum*”, **Phytochemistry** 39 (6): 1467-1473.
- V.H. Heywood, (1971) “Systematic survey of Old World Umbelliferae”, In: Heywood, V.H. (ed.) **The Biology and Chemistry of the Umbelliferae**, pp. 31-41. London: Academic Press.
- Verpoorte, R., Van Der Heijden, R., Ten Hoopen, H.J.G., Memelink, J., (1999) “Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolite Pathways for the Fine Chemical”, **Biotec. Lett.**, 21: 467-479.
- WHO: (2002) “Traditional Medicine Strategy 2002-2005”, Document HO/EDM/TRM/2002-1, **World, Health Organization**, Geneva.
- Xiang Y, Huaixiu W, Yulei C, Minxia F, Zenggen L, Lijuan M, (2017) ‘Phenolics from *Lagotis breviflora* Maxim’”, **Journal Natural Product Research**, Volume 31, Issue 3,.
- Yaldız, G., Yüksek, T. ve Şekeroğlu, N., (2010) “Rize İli Orman Ve Kıyı Köylülerinin Kalkındırılmasında Tıbbi Ve Aromatik Bitkilerin Önemi” III. **Ulusal Karadeniz Ormanlık Kongresi bildiriler kitabı içinde** (ss. 1176-1185) Rize.
- Yıldız, B., ve Aktoklu, E., (2010) “Bitki Sistematığı”, **Palme Yayıncılık**, Ankara, 396s..
- Youdin, K. and Joseph, J.A., (2001) “A Possible Emerging Role of Phytochemicals in Improving Age Related Neurological Dysfunctions: A Multiplicity of Effects”, **Free Radic. Biol. Med.** 30, 583–594.
- Yücel, E., (2014) “Türkiye’de Yetişen Tıbbi Bitkiler Tanıma Klavuzu”, **Tür Mat San**, Eskişehir: 234 s..
- Yücer, A., Altıntaş, G., (2012) “Türkiye’nin Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Dış Ticareti”, Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu, 1, 56-62, Tokat.
- Zeybek, U., Haksel M., (2010) “Türkiye’de ve dünyada önemli tıbbi bitkiler ve kullanımları”, **Argefar ve Sade Yayınları**, Meta Basım, İzmir.

EKLER

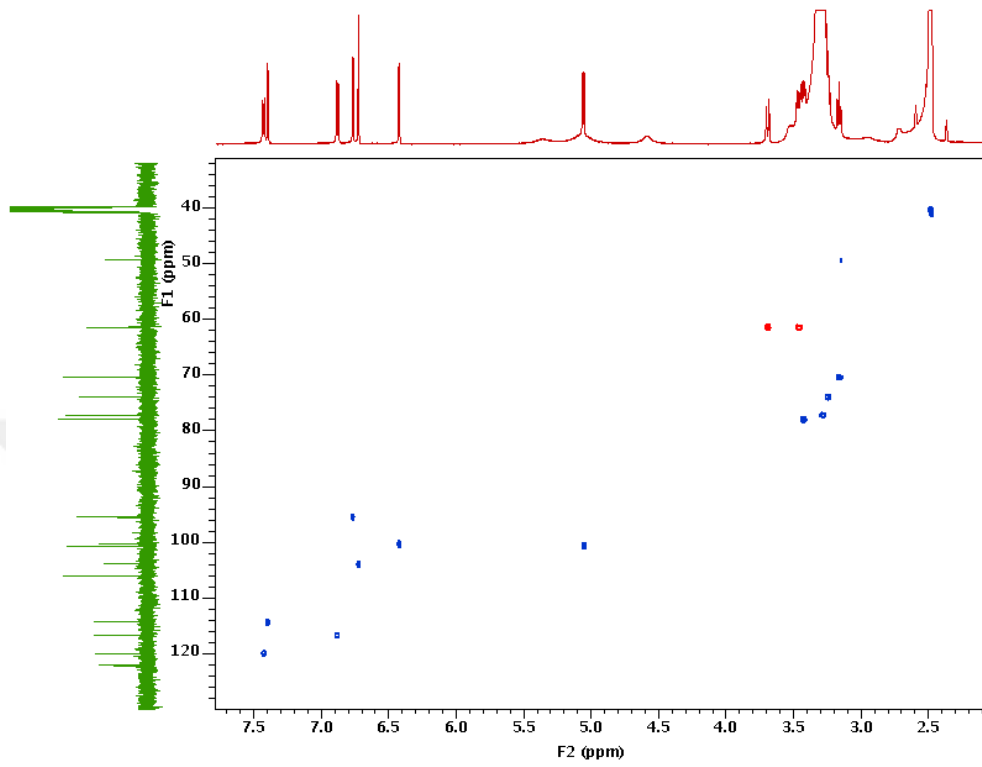
EK-1 Luteolin-7-O- β -D-glikozit DEPT Spektrumu



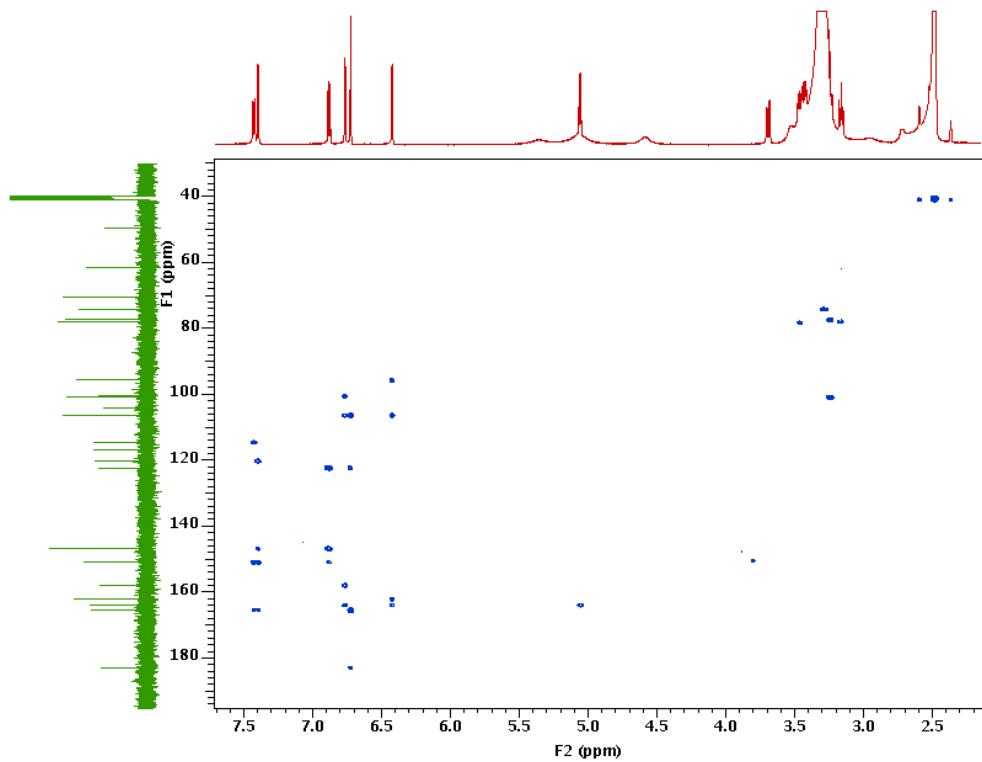
EK-2 Luteolin-7-O- β -D-glikozit COSY Spektrumu



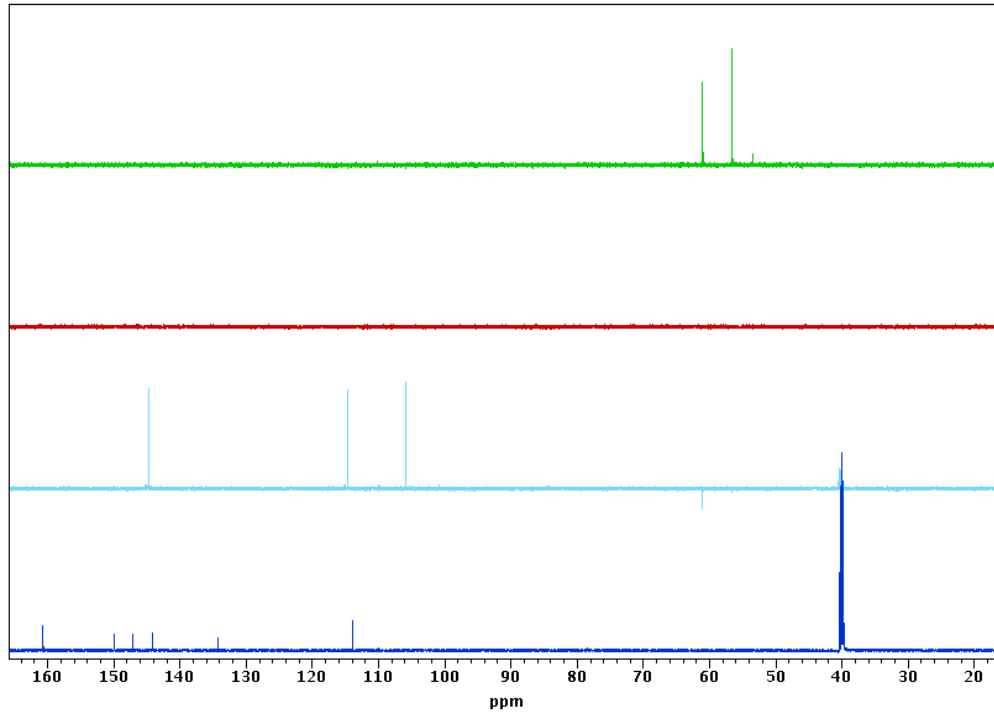
EK-3 Luteolin-7-O- β -D-glikozit HSQC Spektrumu



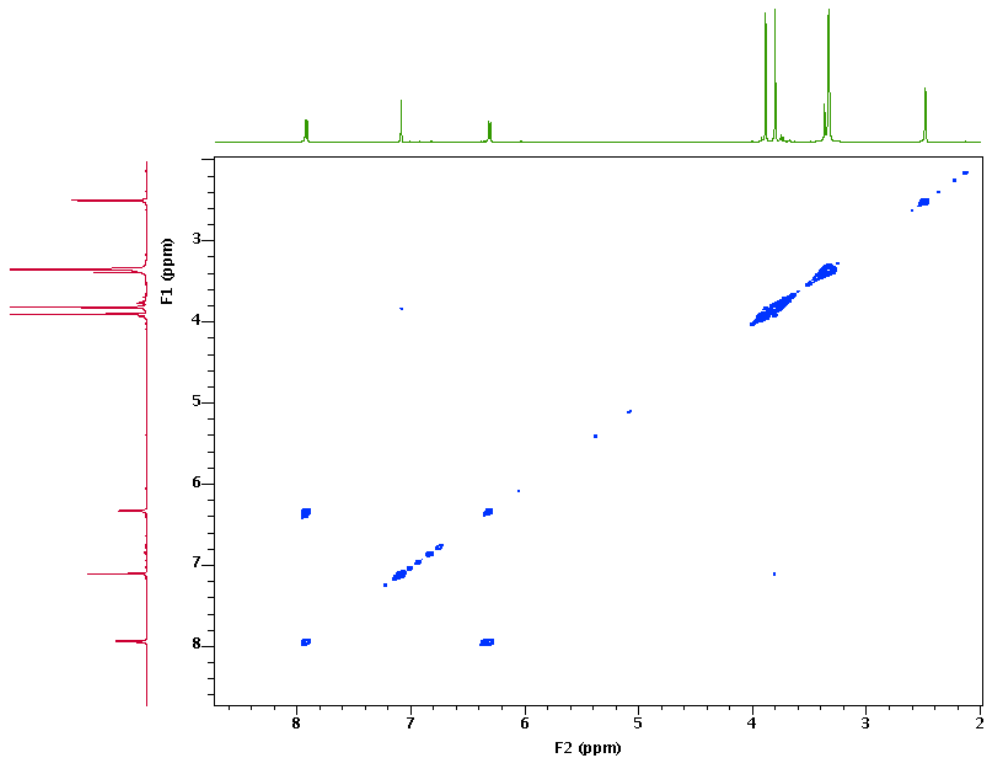
EK-4 Luteolin-7-O- β -D-glikozit HMBC Spektrumu



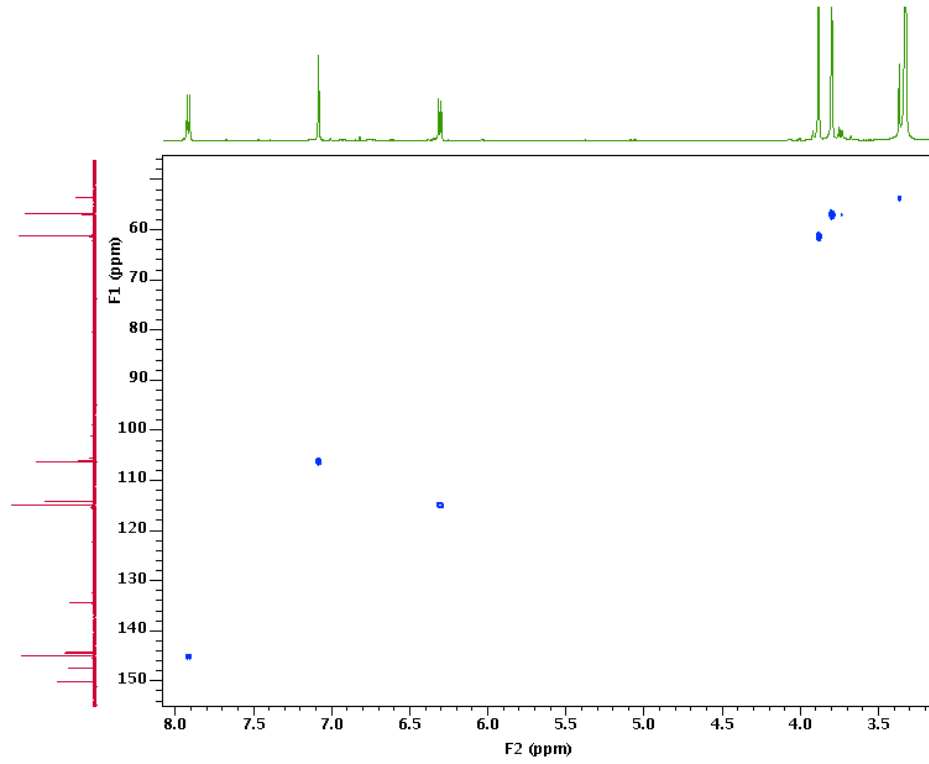
EK-5 İsofraxidin DEPT Spektrumu



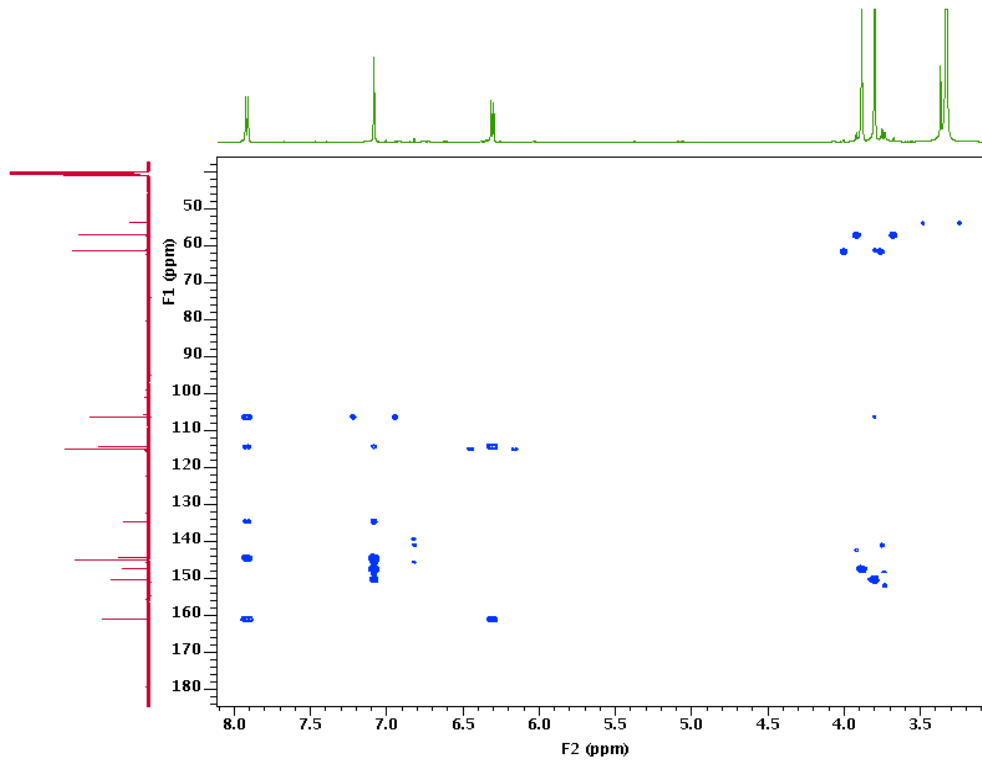
EK-6 İsofraxidin COSY Spektrumu



EK-7 İsofraxidin HSQC Spektrumu



EK-8 İsofraxidin HMBC Spektrumu



ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Erzincan'da doğdu. İlköğrenim, orta ve lise öğrenimini Erzincan'da tamamladı. Erzurum Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nden 2014 yılında mezun oldu. 2014 yılında, Erzincan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı'nda Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL danışmanlığında yüksek lisans öğrenimine başladı. Halen Kimya Anabilim Dalın da yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir.

