

ERZİNCAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

*Tanacetum alyssifolium* BİTKİSİNDEN *Axillarin* BİLEŞİĞİNİN  
İZOLASYONU, ANTİKANSEROJEN VE ANTİOKSİDAN  
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ



Samed ŞİMŞEK

KİMYA ANABİLİM DALI

ERZİNCAN  
2016

Her Hakkı Saklıdır

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

**Adı-Soyadı:** Samed şİMŞEK

**İmza** : 



*Tanacetum alyssifolium* Bitkisinden *Axillarin* Bileşiminin İzolasyonu, Antikanserojen ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi adlı Yüksek Lisans tezi, Erzincan Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi 'ne uygun olarak hazırlanmıştır.



Tezi Hazırlayan  
Samed ŞİMŞEK



Danışman  
Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL



Kimya ABD Başkanı  
Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL



Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL danışmanlığında, Samed ŞİMŞEK tarafından hazırlanan bu çalışma 30/05/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

İmza: 

Üye : Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL

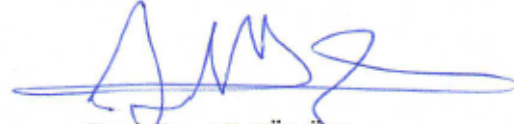
İmza: 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mustafa ÇATIR

İmza: 

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

30/05/2016



Prof. Dr. Ali SÜLÜN  
Enstitü Müdürü

**ÖZET**

Yüksek Lisans Tezi

***Tanacetum alyssifolium* BİTKİSİNDE *Axillarin* BİLEŞİĞİNİN  
İZOLASYONU, ANTİKANSEROJEN VE ANTIOKSİDAN  
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ****Samed ŞİMŞEK**Erzincan Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL

Bu çalışma *Tanacetum alyssifolium* bitkisinde mevcut olan sekonder metabolitleri kromatografik yöntemle (kolon kromatografisi) izole etmek, spektroskopik metotlarla yapılarını belirlemek, antikanserojen etkisi ve antioksidan aktivitesini incelemek amacı ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla *Tanacetum alyssifolium* bitkisi Erzincan ili Munzur dağı eteklerinden toplandı, oda şartlarında kurutuldu. Bitkinin toprak üstü kısmı, etil asetat/bütanol çözücü sisteminde ekstrakte edildi. Etil asetat ekstraktı kolon kromatografisi işlemlerine tabi tutuldu. Etil asetat ekstraktından kromatografik yöntemle (kolon kromatografisi) izole edilen bileşiğin yapısı spektroskopik metotlarla (1D-NMR, 2D-NMR, HPLC-TOF) aydınlatılarak yapısının 2-(3,4-Dihidroksifenil)-5,7-dihidroksi-3,6-dimetoksi-4H-kromen-4-on (*axillarin*) olduğu belirlendi. İzole edilen bileşiğin antioksidan aktivitesi kuprak metodu ile  $\text{Cu}^{2+}$  ve potasyum ferriksiyanat indirgeme metodu ile  $\text{Fe}^{3+}$  iyonları indirgeme kapasitesi, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) giderme aktivitesi tayini yöntemleriyle belirlendi. Standart antioksidan olarak troloks kullanıldı. *Axillarin* bileşiği  $\text{Fe}^{+3}$ 'ü indirgeme yeteneği yönünden standart olarak kullanılan troloksdan daha fazla indirgeme potansiyeline sahip olduğu, ( $\text{Cu}^{2+}$ ) indirgeme kapasitesinin troloks'dan daha az olduğu ve DPPH serbest radikalini troloksdan daha az fakat standarta yakın miktarda giderdiği belirlenmiştir. Antikanserojen aktivite testinde *axillarin* bileşiğinin 3 farklı konsantrasyonu hazırlanıp HeLa hücresi kullanılarak maksimum aktivite gösterdiği konsantrasyonu tespit edildi. Antikanserojen aktivite testinde en yüksek aktiviteyi 100 ve 50  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonunda göstermiştir ve maksimum aktiviteye 13. saatte ulaşmıştır.

**2016, 77 sayfa****Anahtar Kelimeler:** *Tanacetum alyssifolium*, izolasyon, antikanserojen aktivite, antioksidan aktivite, sekonder metabolit

**ABSTRACT**

Master Thesis

**ISOLATION OF *Axillarin* COMPOUND FROM *Tanacetum alyssifolium*,  
DETERMINATION OF ANTICANCEROGEN AND ANTIOXIDANT  
ACTIVITIES****Samed ŞİMŞEK**Erzincan University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemistry

Supervisor: Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL

The aim of this study was to isolate the available secondary metabolites in *Tanacetum alyssifolium* plants by column chromatography and determine their structures with spectroscopic methods. It was also aimed to examine the antioxidant and anticarcinogenic properties of *Tanacetum alyssifolium*. For this purpose, *Tanacetum alyssifolium* plants were 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/ butanol solvent system. The ethyl acetate extract was subjected to the procedure of column chromatography. The structure of the isolated compound with column chromatography method was elucidated by spectroscopic techniques (1D-NMR, 2D-NMR, HPLC-TOF). The isolated compound was determined as 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3,6-dimethoxy-4H-chromene-4-one (axillarin). The antioxidant capacity of the isolated compound was evaluated with CUPRAC method and DPPH radical scavenging activity tests, respectively. Trolox was used as standard antioxidant. In terms of the iron ( $\text{Fe}^{+3}$ ) reduce ability, axillarin compound was found to have more reduction potential than standard trolox and when compared the copper ( $\text{Cu}^{+2}$ ) reduce ability, axillarin compound displayed less reduction potential. However, axillarin and trolox showed close results in terms of DPPH radical scavenging capacities. For anticarcinogen tests, 3 different concentrations of axillarin compound were prepared and applied to HeLa cells in order to determine the concentration at which the maximal activity was shown. The highest anticarcinogenic activity was observed at 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and reached at 43 hours.

**2016, 77 pages****Keywords:** *Tanacetum alyssifolium*, isolation anticarcinogen activity, antioxidant activity, secondary metabolite

**TEŞEKKÜR**

Çalışmalarında her türlü desteği sağlayan, maddi manevi ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, değerli hocam Sayın Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL'a, teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarında bana göstermiş olduğu yardımlardan dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa ÇATIR'a şükranlarımı sunarım. İzole edilen bileşiğin yapısının aydınlatılmasında ve HPLC-TOF analizlerinin yapılmasındaki katkılarından dolayı Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ'a teşekkür ederim. Çalışmalarım sırasındaki yardımlarından dolayı Hüseyin KANBUR ve İbrahim TÜRKOĞLU'na ve Biyoloji Bölümü araştırma görevlisi Sayın Veli İLHAN'a minnettarım. Her aşamada yanımda olan ailemin her türlü desteğinden dolayı kendilerine sonsuz şükranlarımı sunarım.

Samed ŞİMŞEK  
Mayıs, 2016

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	vi
TABLolar LİSTESİ .....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	ix
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Botanik Bilgiler.....	4
2.1.1. Asteraceae (Compositae) familyası.....	4
2.1.2. Tanacetum cinsi.....	5
2.2. Sekonder Metabolitler.....	6
2.2.1. Flavonoidler.....	9
2.2.1.a Flavonoidlerin doğada bulunuşu ve kullanım alanları.....	12
2.2.1.b Flavonoidlerin tıbbi ve biyolojik özellikleri.....	13
2.2.1.c Flavonoidlerin biyosentezi.....	13
2.2.1. Flavonoidlerin belirlenmesi.....	15
2.3. Antikanserojen Aktivite.....	20
2.4. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar .....	22
3. MATERYAL ve YÖNTEM .....	30
3.1. Materyal .....	30
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler.....	30
3.1.2. Kullanılan malzeme, alet ve cihazlar.....	31
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması .....	31
3.1.3.a Ferrik iyonlarını ( $Fe^{3+}$ ) ferröz iyonlarına ( $Fe^{2+}$ ) indirgeme kuvveti yönteminde kullanılan çözeltiler .....	31
3.1.3.b Kuprak metoduna göre indirgeme kapasitesi tayininde kullanılan çözeltiler .....	32
3.1.3.c DPPH• serbest radikal giderme aktivitesi yönteminde kullanılan çözeltiler .....	32



3.1.3.d İnce tabaka kromatografisinde kullanılan belirteç çözeltisi .....	33
3.1.3.e Tripsin EDTA çözeltisinin hazırlanması .....	33
3.2. Yöntem.....	33
3.2.1. <i>Tanacetum alyssifolium</i> bitkisinin toplanması ve kurutulması .....	33
3.2.2. <i>Tanacetum alyssifolium</i> bitkisinin ekstraksiyonu ve etil asetat ekstresinin hazırlanması.....	33
3.2.3. Kromatografik yöntemler .....	35
3.2.3.a Kolon kromatografisi.....	35
3.2.3.b İnce tabaka kromatografisi .....	40
3.2.4. Antikanserojen aktivite testleri.....	41
3.2.4.a Hücre kültürü .....	41
3.2.4.b Hücrelerin sayılması işlemi .....	43
3.2.4.c Örneklerin hazırlanması.....	44
3.2.4.d Proliferasyon deneyi.....	44
3.2.5. Antioksidan aktivite testleri.....	45
3.2.5.a Ferrik iyonlarını ( $Fe^{3+}$ ) ferröz iyonlarına ( $Fe^{2+}$ ) indirgeme gücü tayini ..	45
3.2.5.b Kuprak metoduna göre idirgeme kuvveti tayini.....	45
3.2.5.c DPPH• serbest radikallerini giderme aktivitesi tayini .....	46
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	47
4.1. İzole Edilen Bileşiğin Yapı Analizi.....	47
4.2. Antikanserojen Aktivite Testi.....	55
4.3. Antioksidan Araştırma Sonuçları.....	56
4.3.1. Ferrik iyonlarını ( $Fe^{3+}$ ) ferröz iyonlarına ( $Fe^{2+}$ ) indirgeme kuvveti ile ilgili sonuçlar .....	56
4.3.2. Kuprak metoduna göre indirgeme kuvveti sonuçları .....	57
4.3.3. DPPH• serbest radikal giderme aktivitesi sonuçları.....	58
5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....	61
6. KAYNAKLAR.....	64
7. ÖZGEÇMİŞ.....	77

## SİMGELER ve KISALTMALAR

### Simgeler

%	Yüzde Değer
°C	Santigrat Derece
δ	Kimyasal Kayma

### Kısaltmalar

AlCl <sub>3</sub>	Alüminyum Klorür
BHA	Bütillenmiş Hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş Hidroksitoluen
C4H	Cinnamate 4-Hidroksilaz
CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	Amonyum Asetat
CHS	Kalkon Sentaz
CoA	Koenzim A
CuCl <sub>2</sub>	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
F3'H	Flavonoid 3'-Hidroksilaz
FeCl <sub>3</sub>	Demir (III) Klorür
FRAP	Demir (III) indirgeme antioksidan gücü
FS	Fruktan Sukraz
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sülfürik Asit
HCl	Hidroklorik Asit
HCN	Hidrosiyanik Asit
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Hz	Hertz
IPP	İzopentenil pirofosfat
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sodyum Sülfat
NaHCO <sub>3</sub>	Sodyum Bikarbonat
NaOAc	Sodyum Asetat
NaOMe	Sodyum Metoksit
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
NA	Naturstoffreagenz difenil borikasit β-aminoetilester
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Süperoksit Radikali
OH•	Hidroksil Radikali
PAL	Fenilalanin Amonyum Liyaz
PG	Propil Galat
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 <sub>2</sub> •	Tiyil Peroksit Radikali
SOD	Süperoksit Dismutaz
TBHQ	Tersiyerbutil Hidrokinon
TCA	Trikloroasetik Asit
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
4CL	4-Klumarat 4-Hidroksilaz

**TABLULAR LİSTESİ**

	<b>Sayfa</b>
Tablo 2. 1. Flavonoidlerin UV spektroskopisindeki absorpsiyon bantları.....	16
Tablo 2. 2. Flavonoid yapısı ve renk reaksiyonları.....	18
Tablo 2. 3. Bazı flavonoid C- ve O- glikozitlerin şeker karbonlarının <sup>13</sup> C NMR rezonansları .....	20
Tablo 2. 4. Radikal ve radikal olmayan türler.....	25
Tablo 3. 1. Etil asetat ekstresinin K-1 kolonundan elde edilen eluatlar ve kullanılan çözücü sistemleri.....	37
Tablo 3. 2. K-2 kolonundan elde edilen eluatlar ve kullanılan çözücü sistemleri .....	39
Tablo 3. 3. K-3 kolonundan elde edilen eluatlar ve kullanılan çözücü sistemleri .....	40

## ŞEKİLLER LİSTESİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 1. 1. Doğal ürünlerin ilaç sanayindeki yeri.....	2
Şekil 1. 2. <i>Tanacetum alyssifolium</i> .....	3
Şekil 2. 1. Sekonder metabolitlerin oluşumu .....	8
Şekil 2. 2. Flavonoid iskeletinin kimyasal yapısı.....	10
Şekil 2. 3. Flavonoid iskeletleri.....	11
Şekil 2. 4. Pelargonidin ve siyanidin bileşikleri.....	12
Şekil 2. 5. Flavonoidlerin biyosentezi.....	14
Şekil 2. 6. Bant I ve Bant II'yi veren gruplar.....	15
Şekil 2. 7. Serbest radikalın nötralizasyonu .....	27
Şekil 2. 8. Antioksidanların sınıflandırılması .....	28
Şekil 3. 1. Vakum altında süzülmesi ve klorofillerin ayrılması.....	34
Şekil 3. 2. Etilasetat ile ekstraksiyon .....	35
Şekil 3. 3. Belirteç püskürtülmeden önce ve sonra oluşan bantlar.....	41
Şekil 3. 4. Hücrelerin çökeltilmesi ve çözülmesi.....	42
Şekil 3. 5. Besi yerlerin hücre kültür kaplarına alınması .....	43
Şekil 3. 6. İnkübatör ve Inverted (ters) mikroskop .....	43
Şekil 4. 1. İzole edilen bileşiğin <sup>1</sup> H ve <sup>13</sup> C kimyasal kayma değerleri .....	47
Şekil 4. 2. İzole edilen bileşiğin <sup>1</sup> H-NMR spektrumu .....	48
Şekil 4. 3. İzole edilen bileşiğin <sup>13</sup> C-NMR spektrumu .....	49
Şekil 4. 4. İzole edilen bileşiğin COSY spektrumu .....	50
Şekil 4. 5. İzole edilen bileşiğin DEPT spektrumu .....	51
Şekil 4. 6. İzole edilen bileşiğin HMBC spektrumu .....	52
Şekil 4. 7. İzole edilen bileşiğin HMBC etkileşimleri .....	53
Şekil 4. 8. İzole edilen bileşiğin HSQC spektrumu .....	53
Şekil 4. 9. İzole edilen bileşiğin HSQC etkileşimleri .....	54
Şekil 4. 10. İzole edilen bileşiğin antiproliferatif aktivitesi.....	56
Şekil 4. 11. İzole edilen bileşiğin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) indirgeme gücünün standart antioksidan olan troloks ile mukayese edilmesi .....	57

Şekil 4. 12. İzole edilen bileşiğin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) kuprik iyonlarını ( $\text{Cu}^{2+}$ ) indirgeme kuvvetinin troloks ile mukayese edilmesi .....	58
Şekil 4. 13. Antioksidan tarafından DPPH radikalinin giderilmesi .....	59
Şekil 4. 14. İzole edilen bileşiğin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) DPPH serbest radikali giderme aktivitesinin troloks ile mukayese edilmesi .....	60



## 1. GİRİŞ

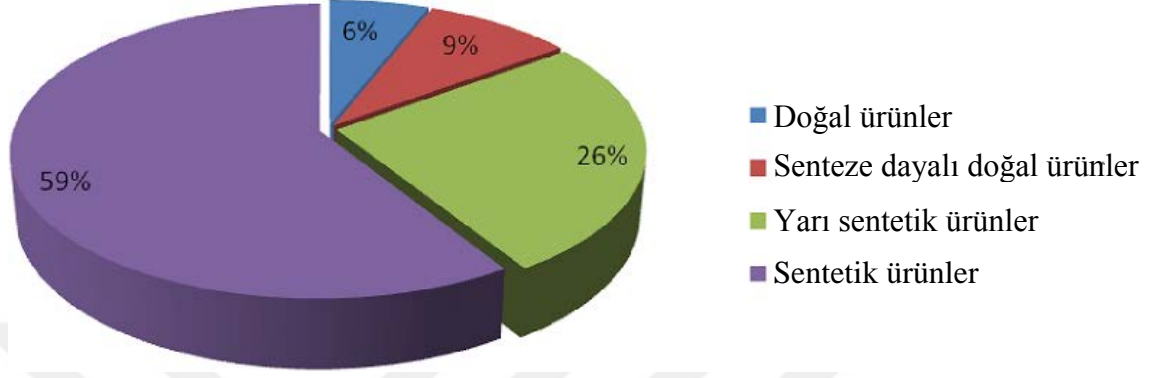
İnsanlığın var oluşundan bu yana tedavi ve gıda alanında tıbbi ve aromatik bitkiler kullanılmaktadır. Bitkiler, modern tıpta birçok ilacın hammaddesi olarak kullanılmaktadır. Ayrıca tıbbi ve aromatik bitkiler fitoterapi, aromaterapi gibi tamamlayıcı tedavilerin de ana unsurlarını oluştururlar. Aromatik bitkiler ayrıca tüm dünya mutfaklarında gıda katkı maddeleri olarak da kullanılmaktadır. İnsan beslenmesi ve sağlığı ile doğrudan ilişkili olan bu bitkilerin beklenen fizyolojik etkileri göstermesi, istenen tat, koku ve rengi vermesinin sahip oldukları sekonder metabolitlerle mümkün olduğu bildirilmektedir (Kürkçüoğlu, 2010).

Bitkisel ilaçlar birçok ülkenin birinci dereceden temel sağlık kaynağını oluştururlar. Dünya nüfusunun %80'i sağlık gereksinimleri için geleneksel ilaçları kullanmaktadır (Tiwari, 2008). Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO)'nın 91 ülkenin farmakopelerine dayanarak yaptığı bir araştırmaya göre 20.000 civarında bitki tedavi amacıyla kullanılmaktadır. 1926 yılından bu yana Türkiye'de olduğu gibi diğer ülkelerde de bitkilerin mikroorganizmaları öldürücü ve insan sağlığı için önemli olan özellikleri bilim adamlarının ilgisini çekmiş ve bitkiler üzerine yapılan çalışmalar artmıştır (Dülger, 1999).

1983-1994 yılları arasında üretilen 520 yeni ilacın, yaklaşık % 39'u mikrobiyal kaynaklıdır. 23.000'in üzerinde bilinen mikrobiyal sekonder metabolitin %42'si funguslar, % 42'si aktinomisetler ve % 16'sı da diğer bakteri türlerinden elde edilmektedir (Oskay ve Tamer 2009). 1981'den beri mikrobiyal doğal ürünlerden elde edilen kimyasal bileşiklerin % 40'ından fazlası öncü ilaç bileşiği için önemli kaynak olmuştur (Newman vd., 2003).

1980'lerden sonra sekonder metabolitlerin izolasyonu, yapı tayini ve biyolojik aktivite incelemeleri alanındaki çalışmalar artmıştır. Doğal ürünlerin ilaç keşfinde ve ilaç prosesi geliştirilmesinde büyük rolleri bulunmaktadır. Doğal ürünlerin doğrudan kullanımı, etkinliğini artırmak için molekülün modifiye edilmesi (yarı sentetik

ürünler) ve etkin olan doğal ürünlerin sentezlenebilmesi bakımından bitkiler ilaç sanayinde önemli bir yere sahiptir (Newman vd., 2007).



**Şekil 1. 1.** Doğal ürünlerin ilaç sanayindeki yeri (Cragg vd., 1997)

Halk ilacı olarak kullanılan birçok bitkinin modern bilimlerin gelişmesiyle birlikte biyoloji, kimya, farmakoloji, toksikoloji gibi disiplinlerin kombine çalışmasıyla, yapılarında bulunan sekonder metabolitlerin, fitokimyasal yapıları aydınlatılmakta ve biyolojik aktiviteleri incelenmektedir (Baykal, 1997; Dülger, 1999; Tadeğ, 2005).

Tıbbi bitkilerin yetiştirilmesi farmakognozi'nin gelişmesini sağlamıştır. 19. yüzyılın sonlarına doğru kimya alanında büyük ilerlemeler kaydedilmesinden dolayı tıbbi bitkilerin yetiştirilmesi üzerine ilgi azalmıştır. Ancak 1. Dünya Savaşı'ndan sonra tıbbi bitkilerin yetiştirilmesi tekrar gündeme gelmiştir. Fakat 1920'li yıllarda başlayan ve 1950'li yıllarda zirve noktasına ulaşan sentetik ilaçların geliştirilmesi ile tıbbi bitkilerin dünya ticaret hacmindeki payı büyük oranda gerilemiştir. Diğer taraftan sentetik gıda katkı maddelerinin toksik veya kanserojenik etkilerinin ortaya çıkmasından dolayı et, süt, meyve, sebze, deniz ürünleri ve meşrubat sektörlerinde doğal ürünler üzerine talep artmıştır (Fowler, 2006).

Dünyanın 750.000 ile 1.000.000 arasında bitki türüne ev sahipliği yaptığı tahmin edilmektedir. Bu bitki türlerinin sadece 500 bin kadarı belirlenmiştir ve her yıl 2000 kadar yeni bitki türleri tanımlanmaktadır. Günümüzde 20000 den fazla bitkinin tedavi amaçlı kullanımları bulunmaktadır. Bu durum tıbbi bitkilerden hastalıklara



karşı ilaç ve bitkilerde bulunan sekonder metabolitleri izole etme çalışmalarının önem kazanmasına ve artmasına neden olmuştur (Çalışkan, 2006).

Sekonder metabolitler çok büyük yapısal çeşitliliğe sahiptir ve bitkide sekonder metabolizma yollarının ara ürünlerinden meydana gelmektedir. Bitkiler tarafından sekonder metabolitler çok az miktarlarda üretilmesine rağmen doğal gıda ve ilaç ham maddeleri (farmasötikler, gıda katkı maddeleri, tatlandırıcılar, boyalar, koku vericiler, yapıştırıcılar, insektisitler, pestisitler vb.) elde etmek için sekonder metabolitler üzerinde yapılan araştırmalar artmıştır (Ahıskalıoğlu, 2007; Başer, 1990; Baytop, 1999).

Bu çalışmada daha önce doğal ürünler alanında üzerinde çalışma yapılmamış endemik bir tür olan *Tanacetum alyssifolium* bitkisinin etil asetat ve bütanol ekstraheleri hazırlanarak, etil asetat ekstraktından axillarin flavonoidi kromatografik yöntemle (kolon kromatografisi) izole edilmiştir. İzole edilen bileşiğin yapısı spektroskopik metotlarla (1D-NMR, 2D-NMR, HPLC-TOF) aydınlatılmıştır. Bitkiden elde edilen saf bileşiğin antikanserojen etkisi ve antioksidan aktivitesi incelenerek ilaç olma potansiyelinin araştırılması amaçlanmış ve çalışmalar bu yönde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 1. 2. *Tanacetum alyssifolium*

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Botanik Bilgiler

#### 2.1.1. Asteraceae (Compositae) familyası

Dünya’da ve Anadolu’nun birçok yerinde bulunan Asteraceae familyası üyeleri çok geniş habitat tiplerini kapsamaktadırlar. Diğer taraftan, Asteraceae’nin 23.000 türü Angiospermilerin % 10’u ile eşdeğerdedir. Genellikle tek, iki veya çok yıllık, yarı çalimsı veya otsu, küçük ve orta büyüklükte bitkilerdir (Mucciarelli ve Maffei, 2002; Wilson, 1986). Çiçekli bitkilerin en büyük familyalarından biri olan Asteraceae familyası endemik tür açısından Türkiye’nin en zengin familyasıdır (Erik ve Tarıkahya, 2004).

Asteraceae familyası üyelerinin çiçekleri genellikle çok sayıda, nadiren tek, sapsız kapitulum şeklinde olup her kapitulum involukrum braktellerle örtülmüştür (Davis vd., 1975; Grierson, 1975). Ayrıca çiçekleri hermafrodit veya tek eşeyli, aktinomorf ya da zigomorf simetridir ve yaprakları parçalanmamıştır. Kaliks ya tüy şeklini alarak pappusu meydana getirirler ya da tamamen körelirler (Heywood, 1978).

Türkiye’de tür sayısı bakımından ilk sırada yer alan Asteraceae (Compositae) familyasına ait toplam 1209 tür bulunmaktadır. Bu türlerin 447’si endemiktir ve Asteraceae familyasının 134 cinsi vardır (Davis vd., 1988; Doğan 2007; Özhatay and Kültür 2006).

Asteraceae familyasına ait birçok tür farmakolojik aktivite göstermektedir. Bu familyada bulunan bitkiler flavonoid ve diterpenlerin yanı sıra ağırlıklı olarak antibakteriyel, antifungal, antihelmintik, antienflamatuar, insektisit ve antitümör gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip sekonder metabolitleri bulundurmaktadır (Grierson, 1975; Koçak, 2008).

Kimyasal içerik bakımından Asteraceae familyası üyeleri birçok farklılık gösterirler ve bunların bir kısmı zehirlidirler. Asteraceae familyası zehirli olan içeriklere sahip olduğu gibi zengin uçucu yağ ve terpenoit içeriğine de sahiptir. Asteraceae familyası fenolik bileşiklere ve terpenlere sahip olmalarından dolayı tıp ve eczacılık alanında kullanılırlar (Mucciarelli ve Maffei, 2002).

Asteraceae familyası üyeleri süs bitkisi ve sebze olarak kullanılmasının yanı sıra etken madde ve uçucu yağlar içerdiklerinden tıbbi alanda, inulin ve sabit yağ taşıdıkları için gıda sektöründe, kauçuk taşıdıklarından dolayı da sanayi alanında kullanılmaktadırlar (Baytop, 1991).

### 2.1.2. *Tanacetum* cinsi

*Tanacetum* cinsi Compositae familyasında bulunmaktadır ve ülkemizde bu cinsin 18'i endemik olmak üzere 60 takson, 44 türü bulunmaktadır (Davis, 1988; Güner, 2000). Antihelmantik, karminatif, uyuz ilacı, migren tedavisinde, ateş düşürücü, kireçlenme tedavisinde, baş dönmesi tedavisinde, böcek ısırıklarında (D'Amelio, 1999; Newall, 1996) ve böcek öldürücü olarak (Asımgil, 1993; Güven, 1991) kullanılmalarının yanısıra yaraların iyileştirilmesinde (Sezik, 1999), ülser, yanık, epilepsi ve tüberküloz tedavilerinde, soğuk algınlığında, ödemlerde, sinir hastalıklarında (Duke, 1987) olmak üzere geleneksel tıpta halk ilacı olarak *Tanacetum* türlerinden yararlanılmaktadır. *Tanacetum* türlerinin aynı zamanda parfüm, kozmetik hammaddesi ve gıdalarda tatlandırıcı olarak kullanımları da bulunmaktadır (Duke, 1987; Guenther, 1948; Newall, 1996).

*Tanacetum* türleri küçük, orta büyükte veya uzundurlar. Genellikle rizomlu ve yarı çalı şeklinde olan çok yıllık bitkilerdir. Bazı *Tanacetum* türlerinin dip kısımları odunsu şeklindedir. Bitkinin yüzeyi tüylerle kaplıdır. Bu tüyler seyrek veya sık, basit veya çatallı biçimde olabilir. Gövdeleri yatık veya diktir ve genellikle yapraklı ve dallı biçimdedir. Yapraklar bütün, dişli, pinnatifit veya 1-3 pinnatisektir. Primer parçalar genellikle az çok mesafeli (genç hali hariç), bazen bitişik veya birbirine çok

yakındır. Olgunlaştıklarında tam yaprağa benzer durumda olurlar ve tam görünümlüdürler. Kapitulum heterogamous (çiçeklerin farklı eşeylere sahip olması) veya homogamous (tüm çiçeklerin aynı eşeyde olması), tek veya daha sıklıkla seyrek veya yoğun korimbus şeklindedir. Genellikle kenarları ve uç kısımları zarsıdır. Dişi çiçekler az çok belirgin şekilde beyaz, sarı veya pembe dilsî biçimdedir. Korona kısa veya hiç yoktur. Genellikle düzensiz dişli veya lobludur (Grierson, 1975 ).

*Tanacetum alyssifolium* (Asteraceae) Erzincan'a özgü bir türdür. İlk olarak 1890 yılında İliç ilçesi Kuruçay Köyü çevresinden toplanmıştır (Davis, 1975). Uzun yıllar boyunca toplanamayan tür Türkiye Bitkileri Kitabı'na göre DD kategorisinde değerlendirilmiştir (Ekim vd., 2000). Tür son dönemlerde yeniden toplanmıştır (Kandemir & Makbul, 2004). Türkiye'nin en nadir türlerinden birisi olan *T. alyssifolium* alanında özellikle şiddetli erozyona maruz kalmaktadır. Nadir türlerin korunmasına yönelik koruma çalışması yapılmadan önce ilgili türe ait çevresi, dağılımı, biyotik etkileşimi, morfolojisi, fizyolojisi, populasyon büyüklüğü, davranış, genetik çeşitliliği ve insanla etkileşimi konularında bilgiler elde edilmesi gerekmektedir (Primack, 2012).

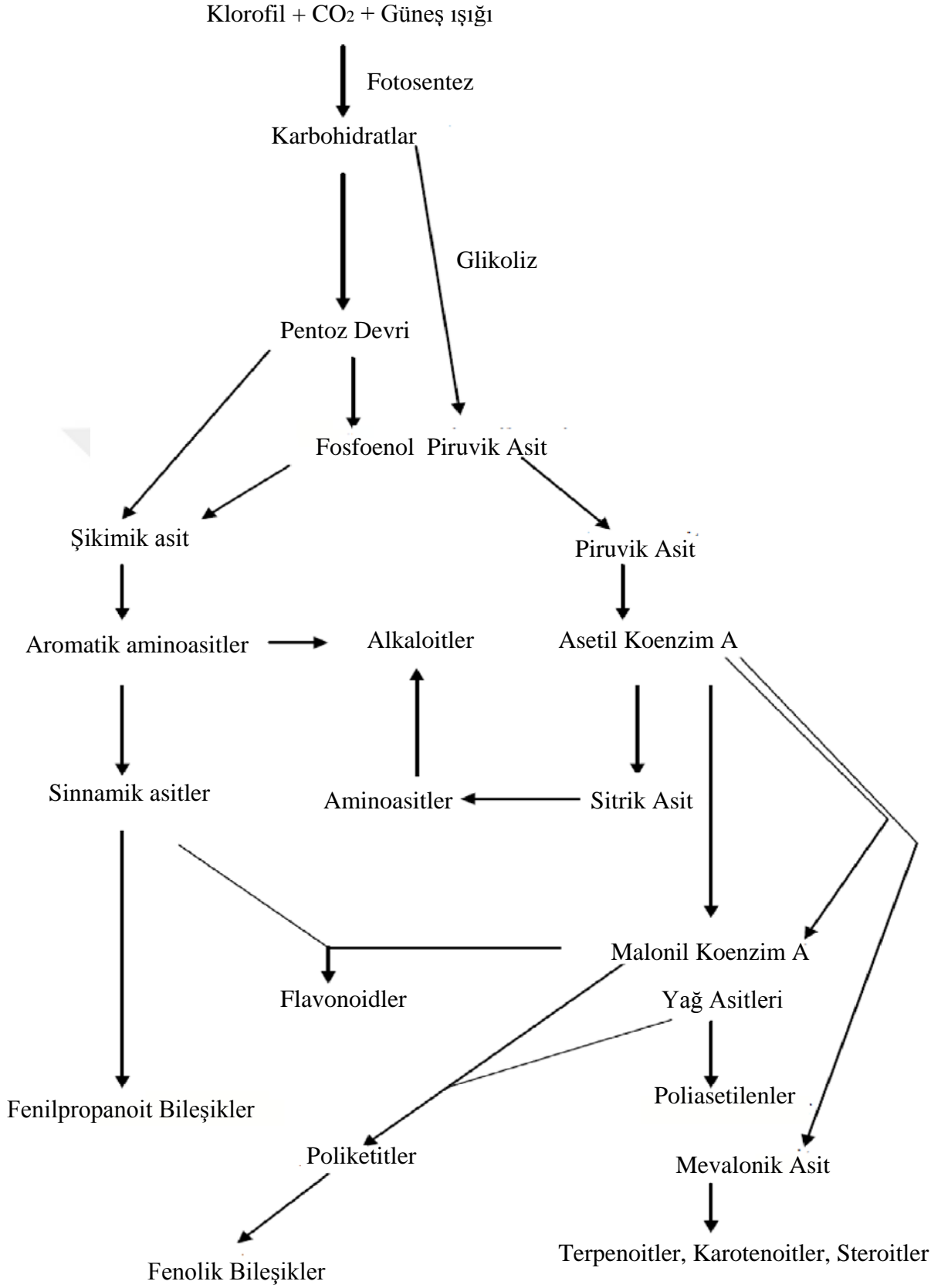
## 2.2. Sekonder Metabolitler

Sekonder metabolitler canlılık faaliyetleri için birinci dereceden büyüme ve üremede mutlak gerekli değildirler. Fakat organizmanın bulunduğu ortama daha iyi adapte olmasını sağlarlar. Doğal maddeler canlılarda hücreler arası haberleşme, depo ve taşıma maddesi, savunma, üreme/çoğalma gibi olayların gerçekleşmesinde rol oynamaktadırlar (Lemriss, 2003). Sekonder metabolitler koku, tat, renk vb. özellikleri ile dikkat çekmektedirler (Vining, 1990). Günümüzde kimyasal yapı zenginliğine ve çeşitliliğine sahip sekonder metabolit sayısı 215.000'i aşmış olup, her gün yeni doğal maddeler keşfedilmektedir (Kürkçüoğlu, 2010).

Sekonder metabolitler büyük yapısal çeşitliliğe sahiptir ve primer metabolizma sonucu oluşan metabolik ara ürünlerden veya onların son ürünlerinden meydana

gelmektedir. Moleköl ağırlıkları 3000 daltondan küçük olan sekonder metabolitler bitkiler tarafından çok az üretilirler (Ahıskalıoğlu, 2007; Başer, 1990; Baytop, 1999). Ancak çeşitli türlerde, farklı cinslerde veya familyalarda görülebirlirler (Herbert, 1989).

Sekonder metabolitlerin en önemli üreticileri bitkiler, bakteriler ve mantarlardır. Bilinen 23000 sekonder metabolitin % 42'si aktinomisetler, % 42'si mantarlar ve % 16'sı diğer bakteri türleri tarafından üretilmektedir. Bitkilerin çevreyle adaptasyonunda, bitkinin savunmasında, korunmasında ve hayatta kalmasında sekonder metabolitler önemli rol oynarlar. Doğada yaygın olarak bulunan sekonder metabolitler indoller, peptitler, piroller, glikopeptitler, terpenler, steroidler, alkaloitler ve flavonoidlerdir (Liang, 2003). 2500'den fazla sekonder metabolit şekil 2.1'de görüldüğü gibi beş karbonlu başlatıcı olan izopentenil pirofosfat (IPP) birimlerinden oluşurlar.



Şekil 2. 1. Sekonder metabolitlerin oluşumu (Hacıbekiroğlu, 2009)

Bitkilerin yapılarında bulunan sekonder metabolitlerin çoğu bir bitki türüne özgü olabilirler ve diğer bitkiler tarafından üretilmezler (Ramachandra, 2002). Sekonder metabolit üreticileri arasında en önemli olanı aktinomisetlerdir. Streptomyces, Saccharopolispora, Amycolatopsis, Micromonospora ve Actinoplantesler aktinomisetler içerisinde ticari öneme sahip bazı biyomoleküllerin üretiminden sorumlu olan önemli cinslerdir. Bunlar arasında en büyük paya sahip olan % 55 ile Streptomyces cinsidir (Lazzarini vd., 2000).

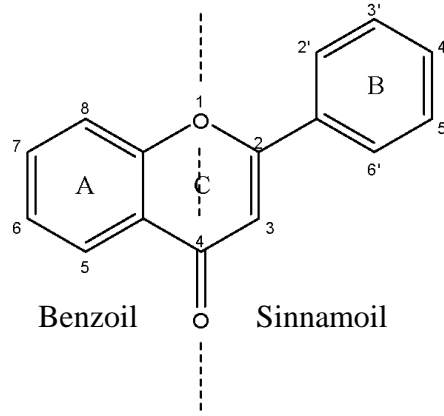
Bitkiler sahip oldukları sekonder metabolitler sayesinde kimya, ilaç, gıda, tekstil, kozmetik sanayi ve tarım alanlarında kullanılmaktadır (Çetin, 2006). Kompleks ve eşsiz yapılarından dolayı sentetik olarak sentezlenemeyen sekonder metabolitlerin etkinliğini artırmak için moleküllerin modifiye edilmesi üzerine çalışmalar son zamanlarda yoğunlaşmıştır (Rao ve Ravishangar, 2002).

### **2.2.1. Flavonoidler**

Sarı renkli olmalarından dolayı Latince 'sarı' anlamına gelen 'flavus' sözcüğünden türetilerek 'flavonoid' ismini almışlardır. Flavonoidler fenolik bileşiklerin en geniş ve en önemli grubunu oluştururlar (Acar, 1998). Flavonoidler üzerine ilk çalışma 1936 yılında Rusznyak ve Szent-Gyorgyi tarafından insanların kalp sağlığını koruma ve genel huzurunu artırma amacıyla yapılmıştır. Bitkilerde genellikle karışım halinde bulunmaktadır ve günümüzde bitkilerden 4000'den fazla izole edilen flavonoid bilinmektedir (Guliyev ve Harmandar, 1999).

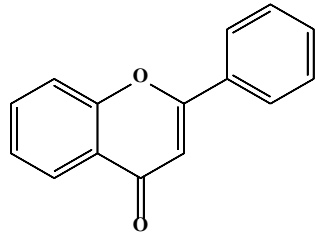
Flavonoidler 2-fenil benzopiron (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) yapısındadırlar ve ana iskeletinde 15 karbon bulunmaktadır. Bu yapılarından dolayı polifenolik bileşikler olarak kabul edilmektedir (Bors vd., 1990; Formica ve Regelson, 1995; Pütün, 1987). Flavonoid iskeleti bir heterosiklik halka (C) ve iki fenil (A,B) halkasından oluşmaktadır. Heterosiklik halka flavonoidlerin karakteristik özelliklerini belirlemektedir (Kocabaş, 2008). Glikoz metabolizması sonucu oluşan asetil koenzim A'dan meydana gelen malonil koenzim A'nın üç molekülünün kondenzasyonu ile A halkası oluşmaktadır.

Glikoz metabolizması sonucu oluşan şikimik asit üzerinden sinamik asit gibi fenil propanoit bileşiklerinden de B ve C halkaları meydana gelmektedir (Kahraman vd., 2002).

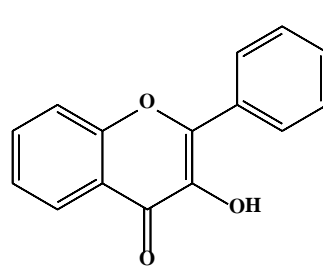


Şekil 2. 2. Flavonoid iskeletinin kimyasal yapısı

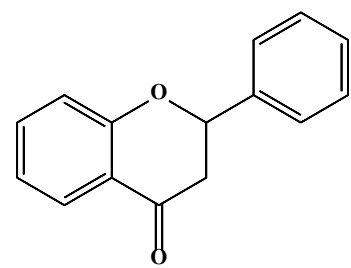
Üç karbonlu propan zincirinin üçüncü bir halka oluşturması, aromatik halkalara bağlı süstituentlerin sayısı, türü ve pozisyonları flavonoidlerin yapı çeşitliliğine neden olmaktadır. Flavonoidler yapısal olarak; antosiyaninler, proantosiyanidinler, flavonoller, flavonlar, biflavoniller, flavononlar, izoflavonlar, kalkon ve auronlar olarak sınıflandırılırlar.



Flavon

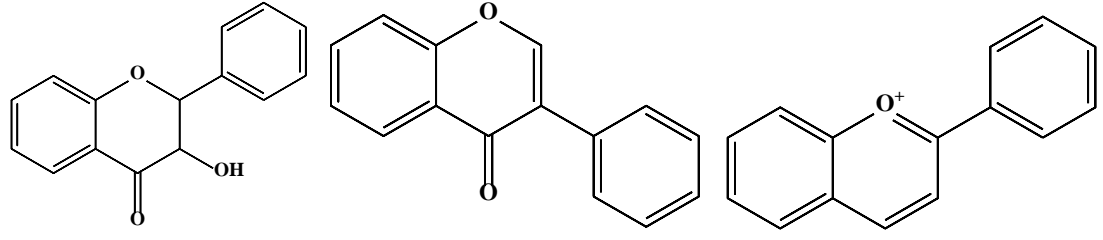


Flavonol



Flavonon

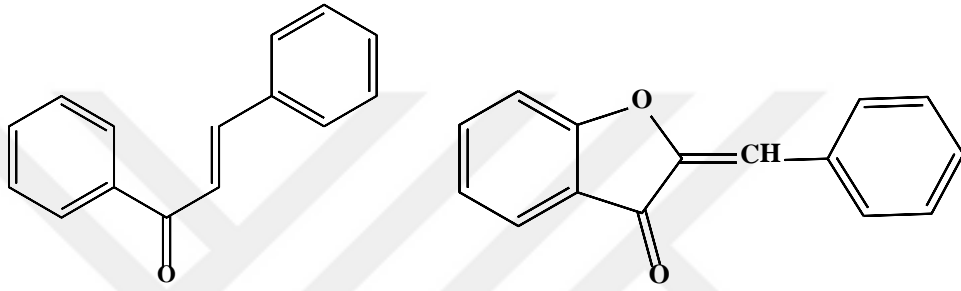




Dihidroflavonol

İzoflavon

Antosiyanidin

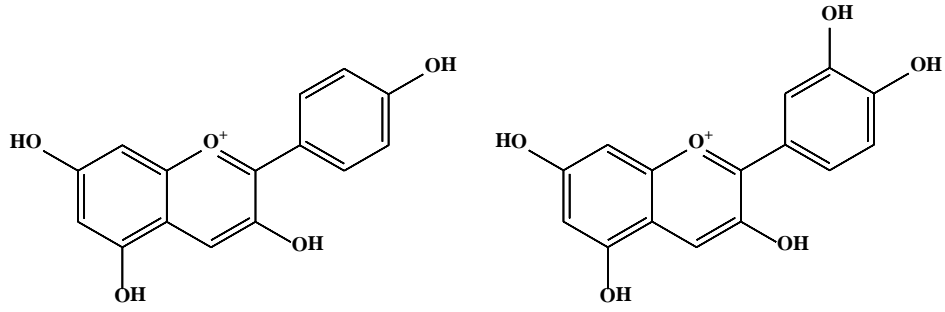


Kalkon

Auron

**Şekil 2. 3.** Flavonoid iskeletleri

Antosiyaninler, bitkilere renk veren yaygın ve önemli bir sınıftır. Sebzelere, meyvelere, meyve sularına ve taç yapraklara pembe, kırmızı, mavi ve mor renklerini veren fenolik bileşiklerdir (Castanedo-Ovando vd., 2009; Hong ve Wrolstad, 1986; Robards ve Antolovich, 1997; Rommel vd., 1992). Antosiyaninlerin bitkilere bu renkleri sağladığı ilk kez 1939 yılında Pauling tarafından tespit edilmiştir ve Pauling antosiyaninlerin renk şiddetine rezonans yapıdaki flavilyum iyonunun neden olduğunu ifade etmiştir (Wrolstad vd., 2005). Doğada bulunan farklı antosiyanidinlerle farklı şekerlerin bağlanması sonucunda çok farklı renkte antosiyaninler meydana gelmektedir. Bundan dolayı bitkiler, çiçekler, meyve ve sebzeler çok farklı ve zengin renklerde bulunmaktadır.



Pelargonidin

Siyanidin

**Şekil 2. 4.** Pelargonidin ve siyanidin bileşikleri**2.2.1.a Flavonoidlerin doğada bulunuşu ve kullanım alanları**

Flavonoidler hemen hemen her bitki türünde yaygın olarak bulunmaktadır. Bundan dolayı flavonoidler fenollerin en büyük sınıflarından biridir. Bakteri ve yosunların büyük bir kısmı flavonoid içermezler. Çiçeklerin sarı, kırmızı, turuncu, lacivert ve benzeri renklerinden sorumlu oldukları ifade edilmiştir. Flavonoidler genellikle bitkilerin çiçek, yaprak, gövde, kök, kabuk, dal, meyve gibi organlarında bulunmaktadır (Geçibesler, 2009).

Flavonoidler bitkilerde antioksidan, enzim inhibitörü ve aynı zamanda ışıktan koruma gibi önemli özellikleri bulunmaktadır (Harborne vd., 1975; Harborne ve Mabry, 1982). Aynı zamanda flavonoidler bitkilerde enerjinin dönüşümünü ve büyüme hormonlarını etkiledikleri gibi, solunumu ve fotosentezi düzenleme ve bulaşıcı hastalıklara karşı savunma fonksiyonları bakımından da zengin bileşiklerdir (Smith ve Banks, 1986).

Flavonoidler antioksidan özellik göstermeleri ve tanenlerin bileşenine katıldıkları için besin, tekstil, deri, metalurji, tıp, ziraat gibi alanlarda kullanılmaktadır. Ayrıca flavonoidler kremlerde katkı maddesi olarak, askorbik asitle beraber et ve et ürünlerinin proteolizini hızlandırdıklarından dolayı da et ve konserve endüstrisinde kullanılmaktadır (Harmandar ve Bilaloğlu, 1999).

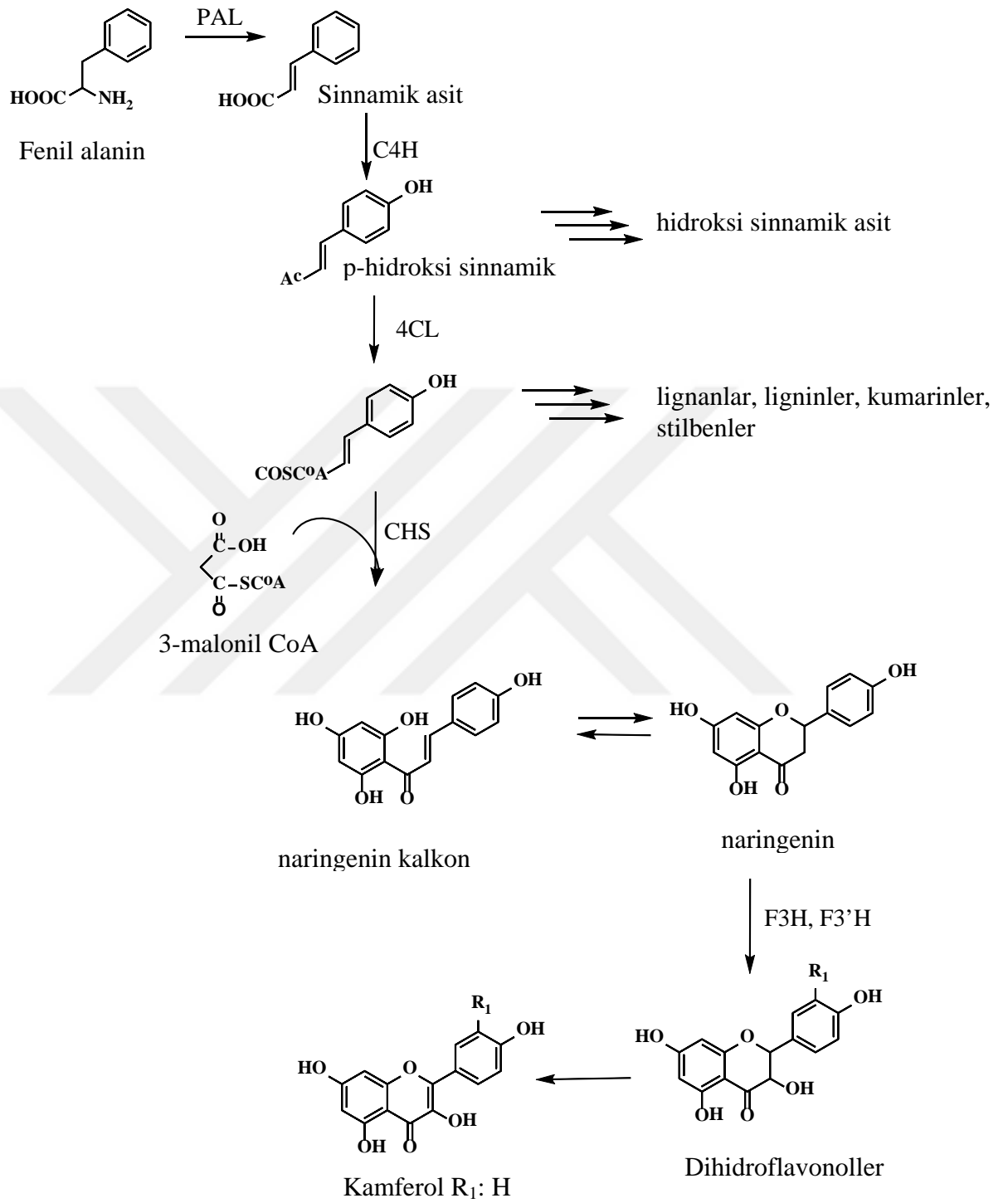
### **2.2.1.b Flavonoidlerin tıbbi ve biyolojik özellikleri**

Flavonoidlerin kılcal damar duvarlarına olumlu etkileri ilk belirlenen biyolojik özellikleridir (Ryzsnyak ve Szent-Greorgy, 1936). Bu bileşikler kılcal damarlarda kan sızdırmanın önlenmesini, kırılabilirlik ve geçirgenliğin ortadan kalkmasını sağlamaktadır (Jeney ve Uri, 1954). Flavon, flavonol, katekin ve flavanonların kılcal damarların tedavisinde etkileri bulunmaktadır (Vogel, 1971; Zaprometov, 1964). Borkowski flavonoidlerin spazmolitik özelliklerinden dolayı kan damarlarına olumlu etkisinin olduğunu ifade etmiştir (Borkowski ve Krug, 1960).

Flavonoidlerin kan damarlarına olumlu etkileri olduğu gibi, zayıf kalbi kuvvetlendirmede, kalp ritimlerinin kısılmasını sınırlamada, nabızı normalleştirmede etkilidirler (Jeney ve Uri, 1954). Flavonoidlerin en önemli özelliği karaciğer fonksiyonuna olumlu etkilerinin bulunmasıdır. Aynı zamanda flavonoidler safra salgılamasını hızlandırırlar ve karaciğerin barbiturat ve arsenik gibi bileşiklere karşı detoksikasyonuna etki etmektedirler (Davidovic ve Klostermann, 1954; Xadjay, 1972). Flavonoidlerin idrar sökücü özellikleri detoksikasyon etkisinin nedenlerinden biri olduğu ifade edilmiştir (Borkowski ve Krug, 1960).

### **2.2.1.c Flavonoidlerin biyosentezi**

Flavonoidler sekonder metabolitlerin önemli bir kısmını oluştururlar. Bitkilerde fotosentez ile oluşan ve canlıların yaşaması için gerekli olan primer metabolitlerden meydana gelmektedir (Burbulis vd., 1996). Fotosentez ile meydana gelen bütün karbonların % 2'si bitkiler tarafından flavonoidlere veya ilgili diğer bileşiklere dönüştürülmektedir (Smith ve Banks 1986). Flavonoidler fenil alanin gibi aminoasitlerin enzimatik deaminasyonundan meydana gelen sinamik asit türevlerinin, asetil CoA ile kondenzasyonundan veya malonil CoA kondenzasyonundan meydana gelmektedir (Dewick, 2001; Harborne, 1975).

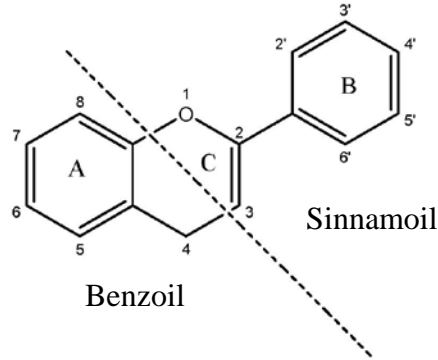


Şekil 2. 5. Flavonoidlerin biyosentezi

### 2.2.1.d Flavonoidlerin belirlenmesi

Flavonoid bileşiklerinin yapılarının aydınlatılmasında UV spektroskopisi önemli bilgiler vermektedir. Bu yöntemde bileşiğin metanoldeki çözeltisine ayrı ayrı NaOMe, susuz AlCl<sub>3</sub>, %50'lik HCl çözeltisi, susuz NaOAc ve katı halde NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> ilave edilerek spektrumlarda meydana gelen kaymalar, piklerin şiddeti, şekilleri arasındaki farklar ve bileşiğin ana iskeleti belirlenmektedir (Mabry vd., 1970).

UV spektrumunda flavonoid bileşiklerinin varlığında iki absorpsiyon bandı görülmektedir ve bu bantların biri uzun diğeri ise ona göre daha kısa dalga boyundadır. Uzun dalga boyunda olan banta Bant I adı verilmektedir ve Bant I flavonoid yapısının B halkasıyla (sinnamoil grubu) ilgilidir. Kısa dalga boyunda olan bant ise Bant II olarak isimlendirilmektedir ve flavonoid yapısının A halkası (benzoil grubu) ile ilgilidir (Mabry ve Markham, 1975).



Şekil 2. 6. Bant I ve Bant II'yi veren gruplar (Hacıbekiroğlu, 2009)

Flavonoid bileşiklerinin A ve B halkalarında bulunan hidroksil gruplarının sayıları arttıkça bantlar uzun dalga boylarına kaymaktadır. Halkalardaki hidroksil grupları (özellikle 3, 5 ve 4' konumlarında olanlar) glikozitlenirse ya da metillenirse bu bantlar (Bant I ve Bant II) hidroksil grubu serbest olan bileşiklere oranla daha kısa dalga boyuna kaymaktadır (Mabry vd., 1970).

Flavonoid bileşiklerinin metanoldeki UV absorpsiyonlarında farklılıklar bulunmaktadır. Flavonlarda Bant I 304–350 nm arasında görülürken flavonollerde 3-OH grubu mevcutsa 352–385 nm arasında, hidroksil grubu serbest olmadığına ise 328–357 nm arasında görülmektedir. B halkasında oksijenin işlevinin artması sonucunda Bant I uzun dalga boyuna kayarken, A halkasında 6 ile 8 konumunun oksidasyonu sonucunda ise Bant II uzun dalga boyuna kaymaktadır. Örneğin; 6-OCH<sub>3</sub> olması durumunda Bant II 270-275 nm aralığında olurken, 6-OH olması halinde ise Bant II daha uzun dalga boyuna kayarak 280-285 nm aralığında görülmektedir (Mabry vd., 1970 ).

**Tablo 2. 1.** Flavonoidlerin UV spektroskopisindeki absorpsiyon bantları

	<b>Bant I</b>	<b>Bant II</b>
Flavon	304-350 nm	250-270 nm
Flavonol	352-385 nm	250-270 nm
Flavonon	310-330 nm	275-290 nm
Kalkon	360-390 nm	240-260 nm
Auron	390-430 nm	240-260 nm
Antosiyanidin	475-560 nm	275-280 nm
Izoflavon	300-340 nm	245-270 nm

Sodyum metoksit, alüminyum klorür, seyreltik HCl, sodyum asetat ve borik asit UV kayma belirteçleridir ve bu belirteçlerle alınan spektrumlar flavonoidlerin yapı tayininde önemlidirler. Sodyum metoksit, flavon üzerindeki tüm hidroksil gruplarını iyonize etmektedir (Hacıbekiroğlu, 2009).

Flavon çekirdeğindeki tüm OH grupları NaOMe tarafından iyonize olurlar. Bundan dolayı Bant I uzun dalga boyuna kaymaktadır ve 4'-OH bulduran flavonoid bileşiklerinde bant şiddeti de artmaktadır. 4' konumunda hidroksil grubu bulunduğu zaman sodyum metoksit ile alınan spektrumdaki Bant I, metanolde alınan

spektrumdaki Bant I'den daha uzun dalga boyuna (~50-60 nm) kayarak bant şiddeti artmaktadır (Hacıbekiroğlu, 2009).

Alüminyum klorür, B halkasındaki *o*-dihidroksi grupları ve A halkasında 3 ve 5 konumundaki serbest hidroksil grupları ile ayrı ayrı kelat oluşturmaktadır. B halkasındaki *o*-dihidroksi grupları ile oluşan kelat seyreltik hidroklorik asit ilavesiyle bozunmaktadır. Yapılarında 5-OH ve 6-H olduğunda AlCl<sub>3</sub>/HCl spektrumunda Bant I metanol spektrumundaki Bant I'e göre 34-50 nm, 5-OH ve 6-OH olduğunda 25-30 nm, 5-OH ve 6-OCH<sub>3</sub> olduğunda ise 16-25 nm daha uzun dalga boyuna kaymaktadır (Mears ve Mabry, 1972).

Sodyum asetat, sodyum metoksitten daha zayıf baz olmasından dolayı asidik karakterdeki fenolik (3, 7' ve 4') hidroksillerini etkilemektedir. Flavon ve flavonollerde 7 konumunda hidroksil (-OH) grubu bulunduğu zaman Bant II 5-20 nm uzun dalga boyuna kaymaktadır. Ancak flavonlarda C-6 veya C-8'de oksijen işlevi olduğu zaman bu durum olmayabilir. 4' konumunda -OH ve 7' konumunda süstitüent (şeker veya metoksi) olduğunda Bant I, sodyum metoksit ile alınan spektrumdaki Bant I ile aynı dalga boyunda görülmektedir (Mabry vd., 1970).

Flavonoidlerin fenolik yapılarından dolayı NH<sub>3</sub> ve diğer bazlarla renk değişimi olmaktadır. Kâğıt ve ince tabaka kromatografisinde flavonoidlerin renk değişimi UV ışıktta (254 ve 366 nm) belirlenmektedir. Flavonoidlerin gösterdiği renkler yapılarındaki hidroksil gruplarının bağlı oldukları yerlere göre UV ışığa, NH<sub>3</sub> buharına ve NA belirtecine göre değişmektedir (Mabry ve Ulubelen, 1980).

**Tablo 2. 2.** Flavonoid yapısı ve renk reaksiyonları

Öğrenme Alanları	UV	UV/ NH <sub>3</sub>	UV\NA
Flavon, 5-OH ve 4'-OH	Koyu Mor	Sarı	Sarı
Flavonol, 5-OH ve 4'-OH, 3-OR	Koyu Mor	Sarı-yesil	Sarı
Flavon, 5-OH ve 3', 4'-OH	Koyu Mor	Sarı-yesil	Oranj
Flavonol, 5-OH ve 3',4'-OH, 3OR	Koyu Mor	Sarı-yesil	Oranj
Flavon, 5-OH ve 4'-OR	Koyu Mor	Renk değişmez	Kahve-mor
Flavonol, 5-OH ve 4'-OR, 3-OR	Koyu Mor	Kahve-mor	Kahve-mor
Flavonol, 5-OH ve 4'-OH, 6-OH	Koyu Mor	Kahve-mor	Mor
Flavonol, 3-OH ve 5-OH, ya da 5-OR	Soluk Sarı	Renk değişmez	Sarı
Flavonol, 3-OH ve 3', 4'-OH	Soluk Sarı	Renk değişmez	Oranj
Flavon, 5-OR	Açık Mavi	Sarı-yesil	Sarı-yesil
Flavonol, 5-OR, 3-OR	Açık Mavi	Mavi-Yeşil	Sarı
Flavonol, 5-OR ve 3', 4'-OH	Açık mavi	Fluoresans	Oranj

Flavonoidlerin <sup>1</sup>H-NMR spektrumu, yapıda bulunan aromatik halka protonlarını ve süstitüentlerin durumunu göstermektedir. 5,7-dihidroksi flavonlarda A halkasındaki C<sub>6</sub> ve C<sub>8</sub> protonları kimyasal değeri 5-7 ppm arasında olan iki duplet oluşturmaktadır. 5, 6, 7 ve 8'de süstitüent bulunduğu zaman ise C<sub>6</sub> ve C<sub>8</sub> protonları kimyasal değeri 6-6,5 ppm arasında olan bir singlet oluşturmaktadır. Eğer flavonda sadece 7-hidroksi grubu bulunursa o zaman C<sub>6</sub> protonu hem C<sub>8</sub> hem de C<sub>5</sub>'teki protonlarla orta ve meta etkileşerek bir dublet-dublet oluşturmaktadır. C<sub>8</sub> protonu 5,7-dihidroflavonlarda gözlenenden daha aşağı alanda bir duplet oluşturmaktadır. C<sub>5</sub> protonu ise C<sub>6</sub> protonuyla orto etkileşerek kimyasal kayma değeri yaklaşık 8 ppm olan bir duplet oluşturmaktadır (Topçu vd., 1996).

4'den substitüe flavonlarda B halkasındaki C<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>3</sub> ve C<sub>5</sub> protonları orto etkileşimli kimyasal kayma değeri 6,5-7,9 ppm arasında olan iki dublet oluşturmaktadır. Genellikle C<sub>3</sub> ve C<sub>5</sub> protonlarının dupletleri C<sub>2</sub> ve C<sub>6</sub> protonlarının



dubletlerinden daha yukarı alanda görülmektedir. Flavonlarda C halkasındaki C<sub>3</sub> protonu ise kimyasal kayma değeri yaklaşık 6,3 ppm'de keskin bir singlet oluşturmaktadır (Topçu vd., 1996).

<sup>13</sup>C NMR spektroskopisi flavonoid molekülünde bulunan şeker birimlerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Flavonoid hidroksilinin O-glikozillenmesi sonucunda hidroksilin bağlandığı karbon sinyali yaklaşık 2 ppm yukarı alana kaymaktadır. Ayrıca orto- ve para- pozisyonlarında bulunan sinyaller de yaklaşık 1-4 ppm aşağı alana kaymaktadır. C-glikozillenme sonucunda aglikonun şekerinin bağlandığı karbon atomu sinyali yaklaşık 10 ppm aşağı alana kaymaktadır. Şeker biriminin bağlı olduğu karbon atomunun sinyalinde değişiklik olurken diğer karbon atomlarının sinyalleri değişmemektedir. Bu şeker biriminin glikoz ile glikozillenmesi sonucunda ise karbon sinyali 8 ppm aşağı alana ve komşu karbon atomlarının sinyalleri de yaklaşık 1-3 ppm yukarı alana kaymaktadır (Bilaloğlu ve Harmandar 1997).

**Tablo 2. 3.** Bazı flavonoid C- ve O- glikozitlerin şeker karbonlarının <sup>13</sup>C NMR rezonansları

Glikozit tipi	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
7-O-glikozit	100.2	73.3	76.6	69.8	77.7	60.9
8-C-glikozit	73.9	71.4	78.8	70.8	81.4	61.5
3-O-galaktozit	102.3	71.3	73.4	68.0	75.8	60.8
8-O-galaktozit	73.9	68.5	75.4	69.1	80.5	61.3
3-O- $\alpha$ -ramnozit	101.9	70.4	70.6	71.5	70.1	1.3
3-C- $\alpha$ -ramnozit	77.3	75.0	75.5	72.2	72.2	18.1
2'-O-ksilozit	102.4	73.7	75.9	69.4	65.5	-
6-C-ksilozit	74.6	70.3	78.5	70.0	70.0	-
3-O- $\alpha$ -arabinozit	101.8	71.7	70.8	65.9	64.1	-
3-O- $\alpha$ -arabinofuranozit	108.1	82.1	77.2	86.2	61.0	-
8-C-arabinozit	74.4	68.2	74.5	68.9	71.0	-
3-O-glukuronit	101.1	73.7	75.9	71.3	75.9	169.7
3-O-allozit	99.9	71.6	71.6	67.2	75.1	61.3
2''-O-apiozit	109.0	76.5	79.1	74.0	64.4	-

### 2.3. Antikanserojen Aktivite

Kanser genellikle hücrelerin çoğalmasını ve büyümesini kontrol eden mekanizmalardaki hatalardan oluşan genetik bir hastalıktır (Lodish ve ark., 2003). Canlı vücudundaki hücre gruplarının farklılaşp aşırı ve kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıyla oluşmaktadır. Canlılarda hücrelerin büyümesi ve çoğalması bir düzen içerisinde gerçekleşmektedir. Fakat hücrelerin anormal şekilde büyümeye ve çoğalmaya başlaması sonucunda tümör meydana gelmektedir. Tümörler sağlıklı hücreleri sıkıştırarak veya içine sızarak zarar vermektedir. Kanser hücreleri türedikleri tümörden ayrılırlar ve kan veya lenf dolaşımı yoluyla vücudun diğer bölgelerine ilerlerler (Demirelli, 2003; Pecorino, 2005).

Kanser, insan sağlığını önemli derecede olumsuz etkilemektedir ve çoğu ölümlerin sebebi olmaktadır (Feng ve Chien, 2003). Normalde sağlıklı insanlarda vücut için gerekli olan yeni hücreleri oluşturmak için hücreler büyümektedir ve bölünmektedir. Ayrıca genlerde hücre büyümesini ve bölünmesini düzenlemektedir (Garza-Ortiz, 2008). Hücrelerin değişimi ile büyümeyi ve bölünmeyi düzenleyen genlerde mutasyonlar ve bundan dolayı da düzensiz çoğalmalar olmaktadır (Li vd., 2010). Sağlıklı insanlarda hücresel çoğalma, ölüm ve haberleşme, tek başına art arda uyaranlarla olmaktadır (Voorhoeve, 2010).

Tüm kanserlerin üçte biri sigaraya, üçte biri beslenme şekline, kalan üçte biri de çevreye bağlıdır (Aggarwal vd., 2009). Tütün ürünleri kullanımı hastalığın oluşmasında önemli bir kaynaktır. Diyet, genetik mutasyon, ultraviyole ışığa (UV) maruz kalma, alkol, kimyasal katkı maddeleri ve su kirleticileri de kanser oluşumuna neden olmaktadır. DNA'nın genetik istikrarsızlığı, DNA metilasyonu gibi epigenetik faktörler ve DNA tamir mekanizmalarındaki bozukluklar da kanser gelişimine neden olmaktadır (Sinici, 2004).

Kanser tedavisinde cerrahi, radyasyon ve kimyasal tedavi olmak üzere üç yöntem vardır. Kimyasal tedavi sitotoksik ilaçlarla çok az kanser türünde kullanılmaktadır. Sitotoksik ilaçların etkinliği kanserin tipine, hastanın biyolojik ve fizyolojik durumuna, tümörün büyümesi veya yayılıp yayılmadığına göre değişmektedir (Bozkurt, 2000; Calabresi ve Chabner, 2001; Larner ve Grosh, 2005). Sitotoksik ilaçlar kanserin tamamen ortadan kaldırılması mümkün olmadığı durumlarda kanserin büyümesini durdurur ve yayılmasını önler. Eğer kanser son evrede ise kesin tedavisi ve yayılması engellenemeyebilir. Bu durumda, hastalığın belirtilerine göre tedavi ve yaşam kalitesinin artırılması amaçlanmaktadır (Bozkurt, 2000; Calabresi ve Chabner, 2001; Mycek, 2001).

Gelişmiş ülkelerde destek ve alternatif olarak bitkisel ilaçların kullanımı hızla artmaktadır. Birçok ülkede özellikle Türkiye ve Asya tıbbında hastalıkların tedavisinde bitkilerden yararlanılmaktadır. Bitkisel tedavilerin “doğal” ve “güvenli”

olduğu belirtilmiştir. Bundan dolayı tüketiciler bitkisel ilaçları doktor reçetesi ile alınan ilaçlarla birlikte kendi istekleri doğrultusunda tüketmektedir (Gözüm, 2003; World Health Organization, 2002-2005).

Ross ve arkadaşları partenolit'in kanser hücrelerinin gelişimini engellediğini tespit etmişlerdir (Ross vd., 1999). Daha sonra yapılan çalışmalarda partenolitin hücre içi kükürtü tüketmesi, hücre içi reaktif oksijen türlerinin ve kalsiyum seviyesinin artmasından dolayı apoptosisin indüklendiği tespit edilmiştir (Zang vd., 2004; Wen vd., 2002).

Wu ve arkadaşları *T. parthenium* bitkisinin etanol ekstresinin iki farklı insan meme kanseri hücresi ve serviks kanseri hücresi üzerine etkisini araştırmışlardır. Etanol ekstresinden elde edilen partenolitin bütün kanser hücrelerinin gelişmesini engellediğini bulmuşlardır (Wu vd., 2006).

Wang ve arkadaşları partenolit'in indüklediği apoptosisin reaktif oksijen türlerinin artmasına ve hücre içi katalaz aktivitesine bağlı olduğunu ifade etmişlerdir (Wang vd., 2006).

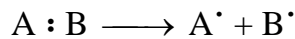
#### **2.4. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar**

Nötron ve protondan oluşan bir çekirdek ile bu çekirdeğin etrafında dönen elektronlardan atomlar meydana gelmektedir. Atom çekirdeğinin çevresindeki elektronların bulunduğu boşluklar orbital olarak adlandırılır. Orbitalerde spinleri birbirine zıt (  $\uparrow\downarrow$  ) şekilde olan iki elektron vardır. Bu elektronlar eşlenmiş veya ortaklanmış elektronlar olarak isimlendirilirler (Dikici, 1999). Elektronları bu şekilde olan atom ya da moleküller kararlı yapı göstermektedir. Bu kararlı yapı eşleşmemiş elektron bulunduğu zaman bozulmaktadır (Basaga, 1990; Di Mascio vd., 1991; Fırat, 1997; Halliwell, 1987).

Serbest radikaller dış yörüngelerinde bir ya da birden fazla eşleşmemiş elektron bulunduran yüksek oranda reaktif olan, kısa ömürlü, molekül ağırlığı düşük olan molekül, atom ya da iyonlardır (Abdollahi vd., 2003; Abdollahi vd., 2004). Genellikle ortaklanmamış elektron üst kısma bir nokta yazılarak gösterilmektedir (Akkuş, 1995). Bu tip moleküller elektron açığını kapatmak için diğer moleküllerle hızlı reaksiyona girerler ve stabil hale gelmek için elektron almaya gereksinim duyarlar. Başka moleküllerin elektronlarını alarak bu molekülleri serbest radikal haline dönüştürürler (Gökpınar vd., 2006). Serbest radikaller ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftir ve ortamdaki başka moleküllere saldırarak onları da radikal yaparak yapılarını bozmaktadır (Fantal, 1996; Temple, 2000). Bir dizi zincir reaksiyonu başlattıklarından ve birçok radikal oluşturduklarından dolayı serbest radikaller çok tehlikelidirler (Akkuş, 1995; Dikici, 1999).

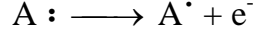
Serbest radikaller kimyasal olaylar, radyasyon, alkol, sigara, ağır metaller gibi çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenlerden oluşmaktadır. Serbest radikaller; kovalent bağların homolitik kırılması, normal bir molekülün elektron kaybetmesi ve normal bir moleküle elektron transferi ile oluşturulabilmektedirler (Akkuş, 1995; Onat vd., 2002).

- a) **Kovalent Bağların Homolitik Kırılması ile:** Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık (500 - 600 °C) kimyasal bağların kopmasına yol açmaktadır. Kopma esnasında bağ yapısındaki iki elektron eşit şekilde farklı atomların üzerinde kalmaktadır. Üzerlerinde eşleşmemiş elektron kalmasından dolayı bu atomlar radikalik özellik göstermektedir (Kılınç ve Kılınç, 2002).



- b) **Normal Bir Molekülün Elektron Kaybetmesi ile:** Radikal olmayan bir molekülün elektron kaybetmesinin sonucunda dış orbitalinde eşleşmemiş

elektron kalmaktadır. Bunun sonucunda molekül radikal özellik göstermektedir (Kılınç ve Kılınç, 2002).



- c) **Normal Bir Moleküle Elektron Transferi ile:** Radikal olmayan bir molekülün elektron alması sonucunda dış orbitalinde eşleşmemiş elektron olmaktadır. Bunun sonucunda molekül radikal özellik göstermektedir (Kılınç ve Kılınç, 2002).



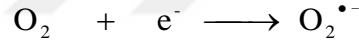
Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan serbest radikallerdir (Akkuş, 1995). Moleküler oksijenin ( $O_2$ ) orbitalinde paralel spin durumlu iki ortaklaşmamış elektron bulunmaktadır. Moleküler oksijen, yüksek derecede reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturmaktadır. Aynı zamanda moleküler oksijen radikal olmayan maddelerle yavaş ve diğer serbest radikallerle kolay bir şekilde reaksiyona girerler.  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  ve  $Mo^{5+}$  gibi geçiş metalleri eşleşmemiş elektronlara sahip olmalarına rağmen serbest radikal değildirler. Ancak serbest radikal oluşumunda önemli katkıları vardır (Altınışık, 2000).

Bitkilerde ve memelilerdeki en yoğun olarak oluşan serbest radikaller, reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS) olarak sınıflandırılmaktadır. Radikal oksijen türleri (ROS); süperoksit anyonu ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroksil ( $OH^{\bullet}$ ), peroksit ( $HOO^{\bullet}$ ) ve alkoksi ( $RO^{\bullet}$ ) radikalleridir. Radikalik olmayan oksijen türleri ise, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), ozon ( $O_3$ ) ve singlet oksijen ( $^1O_2$ )'dir (Reische, 2002). Ayrıca bu radikallerin yanı sıra tiyol radikalleri ( $RS^{\bullet}$ ) ve karbon merkezli radikaller de bulunmaktadır (Reische, 2002).

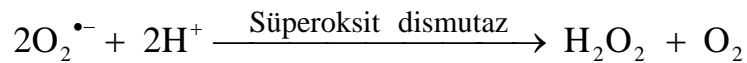
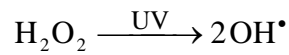
**Tablo 2. 4.** Radikal ve radikal olmayan türler

Radikal Türler	Radikal olmayan Türler
Moleküler oksijen, O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Süperoksit, O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Hipokloröz asit, HOCl
Hidroksil, OH <sup>•</sup>	Ozon, O <sub>3</sub>
Peroksil, RO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Singlet oksijen
Alkoksil, RO <sup>•</sup>	Peroksinitrit
Hidroksiperoksil, HO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	

Süperoksit (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) radikali moleküler oksijenin (O<sub>2</sub>) bir elektron almasından meydana gelmektedir (Halliwell, 1989).

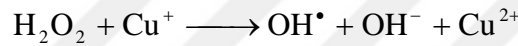
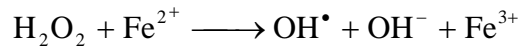


Hidrojen peroksitin (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) yapısında eşleşmemiş elektronu olmadığından radikal özellik taşımazlar (Çakmak vd., 1993). Süperoksit (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) radikaline bir elektron eklenmesiyle veya moleküler oksijenin (O<sub>2</sub>) indirgenmesiyle hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) elde edilmektedir (Halliwell, 2006; Halliwell ve Gutteridge, 1999; Hegedus vd., 2001; Mittler, 2002; Mittler, 2006). Hidrojen peroksit Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları ile hidroksil radikalini (OH<sup>•</sup>) oluşturmaktadır ve UV ışınlarının etkisiyle de OH<sup>•</sup>'e dönüşmektedir (Asad vd., 2004; Keha ve Küfrevioğlu, 2000).

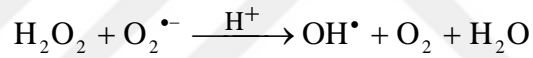


Hidroksi radikali ( $\text{OH}^\bullet$ ), Fenton reaksiyonu sonucunda hidrojen peroksidin indirgenmesiyle ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucunda hidrojen peroksidin süperoksit radikali ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) ile reaksiyonundan meydana gelmektedir (Choe ve Min, 2006).

Fenton reaksiyonları:

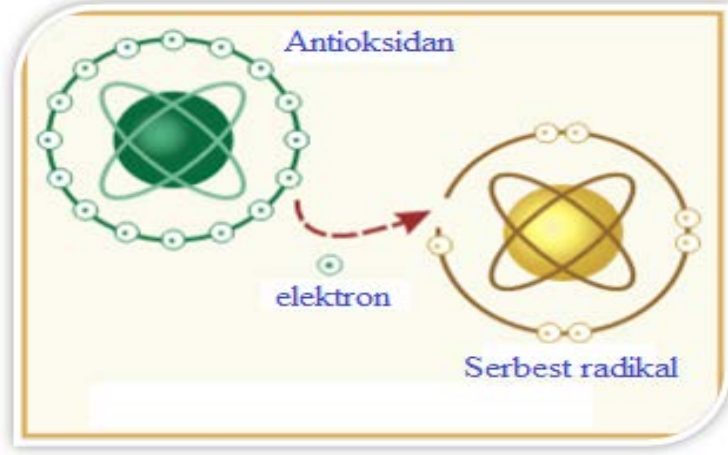


Haber-Weiss reaksiyonu:



Serbest radikaller yüksek derecede aktif bileşikler olduğundan çoğaldıklarında kontrol edilemeyen hasarların oluşmasına neden olmaktadır. Lipit peroksidasyonunda, kanser, sıtma, böbrek bozuklukları gibi hastalıklarda, DNA hasarı ve yaşlanmada serbest radikaller önemli rol oynamaktadır (Halliwell, 1997). Antioksidanlar serbest radikallerin oluşumunu engeller, çoğalan radikalleri temizler, oluşan hasarları onarır, yavaşlatır ve durdurur. Antioksidanlar lipit peroksidasyonu, proteinlerin çapraz bağlanması ve DNA mutasyonu ile etkileşerek doku hasarının oluşmasını engellemektedir (Rauha vd., 1999; Summanen vd., 2001). Vücutta serbest radikaller çoğaldıkça yaşlanma hızlanmakta, hücre ölümü ve doku ölümü gerçekleşmektedir (Gençaslan, 2007). Antioksidanlar; serbest radikalleri hücre zarına, hücre bileşenlerine ve nükleik asitlere saldırmadan kendine çekerek bağlamaktadır (Engin, 2007).

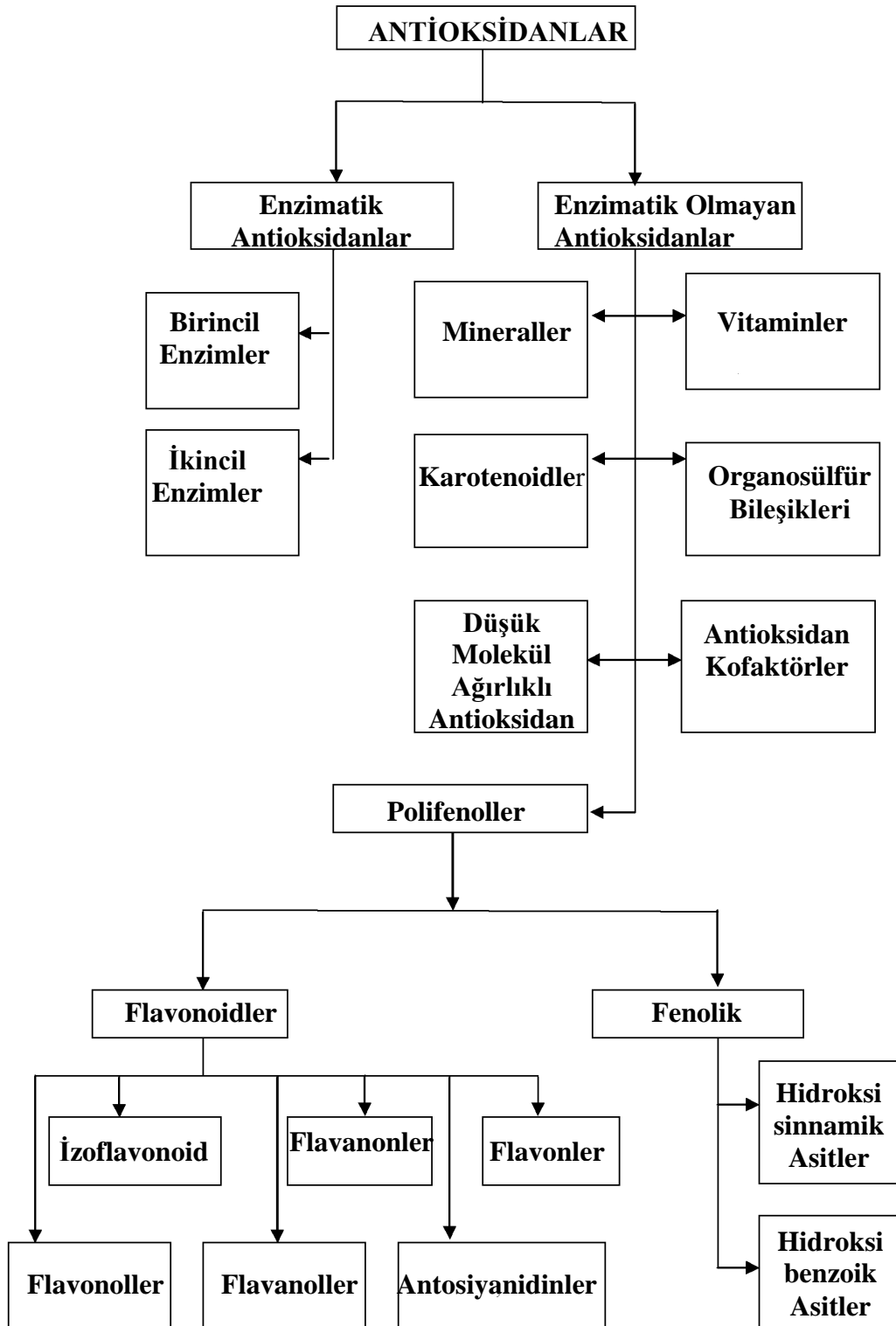




Şekil 2. 7. Serbest radikalın nötralizasyonu (Engin, 2007)

Antioksidanlar mekanizmalarına göre birincil antioksidanlar ve ikincil antioksidanlar olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadır. Birincil antioksidanlar radikallerle tepkimeye girerek zararlı hale dönüşmelerini ve başka radikal oluşumunu engellemektedir. İkincil antioksidanlar ise oksijen radikalini yakalarlar ve radikal zincir reaksiyonlarını kırarlar (Sertsever ve Gök, 2003).

Antioksidanlar doğal ve sentetik olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadır. Günümüzde butillendirilmiş hidroksianisol (BHA), butillendirilmiş hidroksitoluen (BHT), tersiyerbutil hidrokinon (TBHQ) ve propil gallat (PG) sentetik antioksidan olarak kullanılmaktadır. Sentetik antioksidanlar gıdaların bozulmalarını önlerler ve raf ömrünü uzatırlar. Bundan dolayı gıda sektöründe katkı maddesi olarak kullanılırlar. Doğal antioksidanlar, bitki ve hayvan hücrelerinde bulunmaktadır. Tokoferol, flavonoid, fenolik asit, vitamin C ve karotenoitler önemli doğal antioksidanlardır (Madhavi, 1996).



Şekil 2. 8. Antioksidanların sınıflandırılması (Çakar, 2010)

Antioksidan aktivite tayininde; elektron transferine dayanan yöntemler ve hidrojen atomu transferine dayanan yöntemler kullanılmaktadır.

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

**b) Hidrojen atomu transferine dayanan yöntemler:** Antioksidan ve substrat arasında rekabete dayalı reaksiyonlar olmaktadır. Genellikle azot grubu taşıyan maddeler bozularak peroksil radikalleri oluşturması ile olmaktadır. Oksijen radikali absorbans 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 dayanan yöntemlerdir (Özyürek, 2008).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler

- Diklorometan (Sigma)
- Bütanol (Sigma)
- Etil alkol (Sigma)
- Hekzan (Sigma)
- Etilasetat (Sigma)
- Aseton (Sigma)
- Sülfürik asit
- Kloroform (Sigma)
- Neokuprin
- DPPH radikali
- TCA
- İnce Tabaka Kromatografisi hazır alüminyum plakları (Slica gel 60 F<sub>254</sub>)
- Kolon Dolgu Maddesi (silikajel 70-230 mesh Merck)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- CuCl<sub>2</sub>
- K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>
- FeCl<sub>3</sub>
- CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>
- Tripsin EDTA (Sigma)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium- High glucose (DMEM, Sigma)
- HeLa (İnsan Rahim Kanseri Hücresi) Hücresi
- DMSO (Sigma)
- NaHCO<sub>3</sub>

### 3.1.2. Kullanılan malzeme, alet ve cihazlar

- Hassas terazi
- pH-metre
- Otomatik pipetler
- Vorteks
- Evaporatör
- Magnetik karıştırıcı
- Etüv
- Nükleer Manyetik Rezonans Cihazı
- UV lamba
- xCELLigence RTCA (Gerçek Zamanlı Hücre Analizörü) SP (Tek Plaka) Cihazı
- Hücre Sayım Cihazı (Cedex HiRes Analyzer)
- İnkübator CO<sub>2</sub> Water-jacketed (Nuaire US Autoflow)
- Steril kabin (Esco class II type A2)
- Vakum pompası
- Santrifüj (Hettich EBA20)
- HPLC

### 3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

#### 3.1.3.a Ferrik iyonlarını ( $Fe^{3+}$ ) ferröz iyonlarına ( $Fe^{2+}$ ) indirgeme kuvveti yönteminde kullanılan çözeltiler

1. 0,2 M pH: 6,6 fosfat tamponunun hazırlanması: 3,12 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tartılarak 90 mL saf suda çözüldü. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamamen çözüldükten sonra pH metre ile pH'sı 6,6'ya ayarlandı ve toplam hacim 100 mL olacak şekilde saf su ilave edildi.

2. %1'lik  $K_3Fe(CN)_6$  çözeltisinin hazırlanması: 0,75 g  $K_3Fe(CN)_6$  tartılarak bir miktar saf su ile çözüldü.  $K_3Fe(CN)_6$  tamamen çözüldükten sonra toplam hacim 150 mL olacak şekilde saf su ilave edildi.
3. %10'luk TCA çözeltisinin hazırlanması: 7,5 g TCA tartılarak bir miktar saf suda çözüldü. TCA tamamen çözüldükten sonra toplam hacim 75 mL olacak şekilde saf su ilave edildi.
4. %0,1'lik  $FeCl_3$  çözeltisinin hazırlanması: 82,5 mg  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  tartılarak bir miktar saf suda çözüldü.  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  tamamen çözüldükten sonra toplam hacim 50 mL olacak şekilde saf su ilave edildi.

#### **3.1.3.b Kuprak metoduna göre indirgeme kapasitesi tayininde kullanılan çözeltiler**

1. 0,01 M'lık  $CuCl_2$  çözeltisinin hazırlanması: 23,5 mg  $CuCl_2$  tartılarak 25 mL saf suda çözüldü.
2.  $7,5 \cdot 10^{-3}$  M'lık etanolik neokuprin çözeltisinin hazırlanması: 39 mg Neokuprin tartılarak 25 mL etil alkolde çözüldü.
3. 1 M'lık  $CH_3COONH_4$  tamponunun hazırlanması (pH: 6,5): 3,85 g  $CH_3COONH_4$  tartılarak 80 mL saf suda çözüldü. Amonyum asetat tamamen çözüldükten sonra pH-metre ile pH'sı 6,5'e ayarlandı ve toplam hacim 100 mL olacak şekilde saf su ilave edildi.

#### **3.1.3.c DPPH• serbest radikal giderme aktivitesi yönteminde kullanılan çözeltiler**

1.  $10^{-3}$  M'lık DPPH• çözeltisinin hazırlanması: 19,5 mg DPPH• tartılarak etil alkolde tamamen çözüncüye kadar bir gece boyunca manyetik karıştırıcı ile

karıştırıldı. Bir gece karıştırıldıktan sonra toplam hacim 100 mL olacak şekilde etil alkol ilave edildi.

### **3.1.3.d İnce tabaka kromatografisinde kullanılan belirteç çözeltisinin hazırlanması**

1. Sülfürik Asit (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) çözeltisinin hazırlanması: 10 ml derişik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile 90 ml etil alkol karıştırılarak hazırlandı.

### **3.1.3.e Tripsin EDTA çözeltisinin hazırlanması**

1. Oda sıcaklığında ya da 37 °C'de çözünen Tripsin EDTA çözeltisi steril kabinde 10 ml hacimli steril tüplere alınarak -20 °C'de muhafaza edildi.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. *Tanacetum alyssifolium* bitkisinin toplanması ve kurutulması**

*Tanacetum alyssifolium* bitkisi Erzincan'ın Kemah ilçesi sınırlarındaki Munzur dağı eteklerinden 2014 yılı haziran ayında kök kısımlarına zarar vermeyecek şekilde toplandı. Bitkisel materyal Erzincan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Dekanı, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ali Kandemir tarafından teşhis edildi. Toplanan numuneler oda sıcaklığında güneşe direk maruz kalmayacak bir ortamda kurutuldu.

### **3.2.2. *Tanacetum alyssifolium* bitkisinin ekstraksiyonu ve etil asetat ekstresinin hazırlanması**

Toplanıp kurutulmuş *Tanacetum alyssifolium* bitkisinin toprak üstü kısımları blenderde öğütüldü. Öğütülen bitki 4L lik iki cam balona konuldu ve yaklaşık 4 L hekzan

eklendi. Daha sonra cam balonların ağzı kapatılarak 24 saat boyunca oda şartlarında bekletildi. 24 saat tamamlandıktan sonra ekstre süzgeç kağıdı ile süzüldü ve üzerine tekrar hekzan eklendi. Bu işlem 5 kez aynı şekilde tekrarlandı ve organik fazlar birleştirildi ve hekzan evaporatörde uzaklaştırıldı. Daha sonra bitki tekrar oda şartlarında kurutuldu. Kurutulan bitki tekrar 4L lik iki cam balona konuldu ve yaklaşık 4 L metanol eklendi. Daha sonra cam balonların ağzı kapatılarak 24 saat boyunca oda şartlarında bekletildi. 24 saat tamamlandıktan sonra ekstre süzgeç kağıdı ile süzüldü ve üzerine tekrar metanol eklendi. Bu işlem 5 kez aynı şekilde tekrarlandı ve elde edilen ekstre süzüntüleri temiz bir şişede birleştirildi. Organik fazlar birleştirildi ve metanol evaporatörde uzaklaştırıldı. Metanolü uzaklaştırılan ekstreye 60 °C saf su eklendi ve vakum altında süzülerek bitkide bulunan klorofiller uzaklaştırıldı. Klorofiller uzaklaştırıldıktan sonra koyu kırmızı renkte sulu ekstrakt elde edildi.



**Şekil 3. 1.** Vakum altında süzülmesi ve klorofillerin ayrılması

Klorofillerinden arındırılan koyu kırmızı renkteki sulu ekstrakt ayırma hunisine konuldu. Daha sonra etil asetatın miktarı sulu ekstraktın miktarından fazla olacak şekilde ayırma hunisine etil asetat ilave edildi. Etil asetat eklenince üstte etil asetat fazı altta sulu faz olmak üzere iki faz oluştu. Etil asetat fazı temiz bir şişeye alındı ve sulu faz tekrar ayırma hunisine konularak etil asetat eklendi. Bu işlem 5 kez aynı şekilde tekrarlandı ve elde edilen etil asetat fazı temiz bir şişede birleştirildi.



Birleştirilen etil asetat fazında sulu faz kalmış olması ihtimaline karşılık sulu fazı alması için  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  eklenerek kurutuldu ve etil asetat evaporatöründe uzaklaştırıldı.



Şekil 3. 2. Etilasetat ile ekstraksiyon

### 3.2.3. Kromatografik yöntemler

*Tanacetum alyssifolium* bitkisinden elde edilen etil asetat fazında bulunan saf maddeleri izole etmek için kolon kromatografisi ve ince tabaka kromografisi kullanıldı.

#### 3.2.3.a Kolon kromatografisi

Etil asetat ekstresinde bulunan saf bileşiklerin izolasyonunda ve ekstrenin fraksiyonlandırılmasında kolon kromatografisi kullanıldı. Kolon dolgu maddesi olarak silikajel (70-230 mesh Merck) kullanıldı. Ekstre kolona yüklenmeden önce İTK ile kolonun hareketli fazı belirlendi. Kolonun hareketli fazı belirlendikten sonra kolonun alt kısmına silikajel geçmeyecek şekilde pamuk yerleştirildi. Kolon dolgu maddesi hareketli faz ile bulamaç haline getirilerek kolona yüklendi. Silikajelin kolona tamamen yerleşmesi ve boşluk kalmaması için alttan çözücü alınıp kolona tekrar eklendi. Homojenliği sağlamak için ekstrenin miktarına göre ekstreya silikajel

eklenip karıştırıldı ve karışımın çözücüsü evaporatörde uzaklaştırıldı. Kuru tatbikten sonra ekstre kolonun üst kısmından homojen olacak şekilde kolona yüklendi. Ekstrenin ince tabaka kromatografisindeki ayırımına göre apolar çözücüden polara doğru çeşitli çözücü ve çözücü karışımları hareketli faz olarak kolon kromatografisine uygulandı. Elde edilen fraksiyonların miktarına göre daha küçük boyuttaki kolonlardan yararlanılarak uygun yeni kolonlar yapıldı.

**a) Etil Asetat Ekstresinin Fraksiyonlandırılması:**

*Tanacetum alyssifolium* bitkisine bölüm 3.2.2'deki işlemlerin uygulanması sonucunda bitkiden 50 gram etil asetat ekstresi elde edildi. Bu ekstre kolona tatbik edilmeden önce metanolla çözüldü ve ince tabaka kromatografisi yöntemi ile değişik çözücü sistemlerinde incelendi. İnce tabaka kromatografisinde oluşan bantların ve renklerin yardımıyla için hareketli faz belirlendi. İTK sonuçlarına göre K-1 kolonunda başlangıç çözücüsü olarak diklorometan (DCM) kullanıldı. 1 kilogram silikajel (70-230 mesh Merck) diklorometan ile bulamaç haline getirildikten sonra kolona ilave edildi ve kolon dengelendi. 50 gram etil asetat ekstresine kuru tatbik yapıldıktan sonra kolona yüklendi ve diklorometan, etil asetat ve metanol çözücüleri ile hazırlanan farklı oranlardaki çözücü sistemlerinden yararlanıldı. Ekstrenin ince tabaka kromatografisindeki ayırımına göre polaritesi düşük çözücüden polaritesi yüksek çözücüye doğru çeşitli çözücü ve çözücü karışımları hareketli faz olarak kolon kromatografisine uygulandı.

**Tablo 3. 1.** Etil asetat ektresinin K-1 kolonundan elde edilen eluatlar ve kullanılan çözücü sistemleri

Fraksiyon No	Çözücü Sistemi	Mobil Faz Miktarı (mL)
1-8	% 100 DCM	400
9-11	% 5 EtOAc-DCM	400
12-15	% 10 EtOAc-DCM	400
16-18	% 15 EtOAc-DCM	400
19-22	% 20 EtOAc-DCM	400
23-26	% 30 EtOAc-DCM	400
27-30	% 40 EtOAc-DCM	400
31-77	% 50 EtOAc-DCM	400
78-81	% 55 EtOAc-DCM	400
82-84	% 60 EtOAc-DCM	400
85-86	% 65 EtOAc-DCM	400
87-91	% 70 EtOAc-DCM	400
92-95	% 75 EtOAc-DCM	400
96-98	% 80 EtOAc-DCM	400
99-102	% 85 EtOAc-DCM	400
103-107	% 90 EtOAc-DCM	400
108-110	% 95 EtOAc-DCM	400
111-112	% 100 EtOAc	400
113-116	% 10 MeOH-EtOAc	400
117-120	% 20 MeOH-EtOAc	400
121-141	% 30 MeOH-EtOAc	400
142-143	% 40 MeOH-EtOAc	400
144-145	% 50 MeOH-EtOAc	400
146-147	% 60 MeOH-EtOAc	400
148-150	% 70 MeOH-EtOAc	400
151-170	% 80 MeOH-EtOAc	400
170-180	% 90 MeOH-EtOAc	400
180-196	% 100 MeOH	200

K-1 kolonundan elde edilen Tablo 3.1'deki eluatlar İTK ile incelendi ve benzer sonuçlar gösteren eluatlar birleştirildi. Bu işlemler sonucunda etil asetat ekstresinin K-1 kolonundan 1-14, 15-35, 36-43, 44-80, 81-95, 96-121, 122-134, 135-151 ve 152-196 olmak üzere 9 fraksiyon elde edildi.

K-1 kolonundan elde edilen 4. grup (44-80) fraksiyonuna K-2 kolonu yapıldı. Bu ekstre kolona tatbik edilmeden önce metanolla çözüldü ve ince tabaka kromatografisi yöntemi ile değişik çözücü sistemlerinde incelendi. İnce tabaka kromatografisinde oluşan bantların ve renklerin yardımıyla kolon kromatografisi için hareketli faz belirlendi. İTK sonuçlarına göre K-2 kolonunda hareketli faz olarak diklorometan (DCM) kullanıldı. 500 gram silikajel (70-230 mesh Merck) DCM ile bulamaç haline getirildikten sonra kolona ilave edildi ve kolon dengelendi. 10 gram 4. grup (44-80) fraksiyonuna kuru tatbik yapıldıktan sonra kolona yüklendi. K-2 kolonunda diklorometan ve metanol çözücüleri ile hazırlanan farklı oranlardaki çözücü sistemlerinden yararlanıldı. Ekstrenin ince tabaka kromatografisindeki ayırımına göre polaritesi düşük çözücünden polaritesi yüksek çözücüye doğru çeşitli çözücü ve çözücü karışımları hareketli faz olarak kolon kromatografisine uygulandı.

**Tablo 3. 2.** K-2 kolonundan elde edilen eluatlar ve kullanılan çözücü sistemleri

Fraksiyon No	Çözücü Sistemi	Mobil Faz Miktarı (mL)
1-10	% 100 DCM	200
11-20	% 1 MeOH DCM	200
21-50	% 1,5 MeOH-DCM	200
51-60	% 2 MeOH-DCM	200
61-71	% 2,5 MeOH-DCM	200
72-80	% 3 MeOH-DCM	200
81-91	% 4 MeOH-DCM	200
92-121	% 5 MeOH-DCM	200
122-141	% 10 MeOH-DCM	200
142-162	% 20 MeOH-DCM	200
163-170	% 30 MeOH-DCM	200
171-181	% 40 MeOH-DCM	200
182-190	% 50 MeOH-DCM	200
191-199	% 100 MeOH	200

K-2 kolonundan elde edilen Tablo 3.2'deki eluatlar İTK ile incelendi ve benzer sonuçlar gösteren eluatlar birleştirildi. Bu işlemler sonucunda etil asetat ekstresinin K-1 kolonundan 1-26, 27-42, 43-80, 81-126, 81-95, 127-162 ve 163-199 olmak üzere 7 fraksiyon elde edildi.

K-2 kolonundan elde edilen 5. grup (127-162) fraksiyonuna K-3 kolonu yapıldı. Bu ekstre kolona tatbik edilmeden önce metanolle çözüldü ve ince tabaka kromatografisi yöntemi ile değişik çözücü sistemlerinde incelendi. İnce tabaka kromatografisinde oluşan bantların ve renklerin yardımıyla kolon kromatografisi için hareketli faz belirlendi. İTK sonuçlarına göre K-3 kolonunda hareketli faz olarak diklorometan (DCM) kullanıldı. 100 gram silikajel (70-230 mesh Merck) DCM ile bulamaç haline getirildikten sonra kolana ilave edildi ve kolon dengelendi. 3 gram olan 5. grup (122-

167) fraksiyonuna kuru tatbik yapıldıktan sonra kolona yüklendi. K-3 kolonunda diklorometan, etil asetat ve metanol çözücüleri ile hazırlanan farklı oranlardaki çözücü sistemlerinden yararlanıldı. Ekstrenin ince tabaka kromatografisindeki ayırımına göre polaritesi düşük çözücünden polaritesi yüksek çözücüye doğru çeşitli çözücü ve çözücü karışımları hareketli faz olarak kolon kromatografisine uygulandı.

**Tablo 3. 3.** K-3 kolonundan elde edilen eluatlar ve kullanılan çözücü sistemleri

Fraksiyon No	Çözücü Sistemi	Mobil Faz Miktarı
1-9	% 100 DCM	250
10-20	% 10 EtOAc-DCM	250
21-30	% 20 EtOAc-DCM	250
31-41	% 25 EtOAc-DCM	250
42-55	% 40 EtOAc-DCM	250
56-67	% 50 EtOAc-DCM	250
68-79	% 70 EtOAc-DCM	250
80-84	% 100 MeOH	250

K-3 kolonundan elde edilen Tablo 3.3'deki eluatlar İTK ile incelendi ve benzer sonuçlar gösteren eluatlar birleştirildi. Bu işlemler sonucunda etil asetat ekstresinin K-3 kolonundan 2-14, 15-34, 35-63, 64-70 ve 71-84 olmak üzere 5 fraksiyon elde edildi. Bu kolondan elde edilen 1. grup (2-14) fraksiyonu izole edilen bileşiğe aittir.

### 3.2.3.b İnce tabaka kromatografisi

Kolon kromatografisinden elde edilen fraksiyonların saflık kontrolünde ve uygun çözücü sisteminin bulunmasında İTK yöntemi kullanıldı. Fraksiyonlar miktarlarına göre Silikajel 60 F<sub>254</sub> kaplı hazır alüminyum plakalara tatbik edildi ve uygun çözücü sistemlerinde yürütülerek incelendi. Numune tatbik edildikten sonra alüminyum

plaklar uygun çözücülerin bulunduğu cam tankların içerisine yerleştirilerek yürütüldü. Alüminyum plakada ilerleyen UV aktif maddeler, UV ışık altında (254 ve 366 nm) belirlendi. Daha düşük dalga boylarında absorbans veren, UV aktif olmayan maddelerin gözlemlenebilmesi için alüminyum plakların üzerine sülfürik asit ve etanol karışımı püskürtülüp lekeler ve bantlar görünür hale gelene kadar ısıtıldı (100-105 °C).



**Şekil 3. 3.** Belirteç püskürtülmeden önce ve sonra oluşan bantlar

#### **3.2.4. Antikanserojen aktivite testleri**

Antikanserojen aktivite tesitnde HeLa hücresi kullanılmıştır. HeLa hücreleri dünya çapında, kanser araştırması yapan birçok laboratuarda kültürlerde kullanılan özel hücrelerdir. 1951 yılında Henrietta Lacks isimli hastanın servikal bölgesinden alınan örneklerle kültürde üretilmeye devam edilmiştir ve kanser araştırmalarında kullanılmıştır. Hala günümüzde antikanserojen aktivite testlerinde kullanılmakta olan HeLa hücresi Henrietta Lacks'a ait servikal kanser hücreleridir.

##### **3.2.4.a Hücre kültürü**

HeLa hücresinin hücre kültürü için tüm işlemler steril kabinde yapılmıştır. Steril kültür kaplarında bulunan hücrelerin kullanmış olduğu besi yeri (DMEM) atık kabına alınarak uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin bulunduğu kültür kaplarına 10 ml tripsin-EDTA eklenmiştir ve CO<sub>2</sub> inkübatöründe, 37 °C'de 1-2 dakika inkübe edilerek

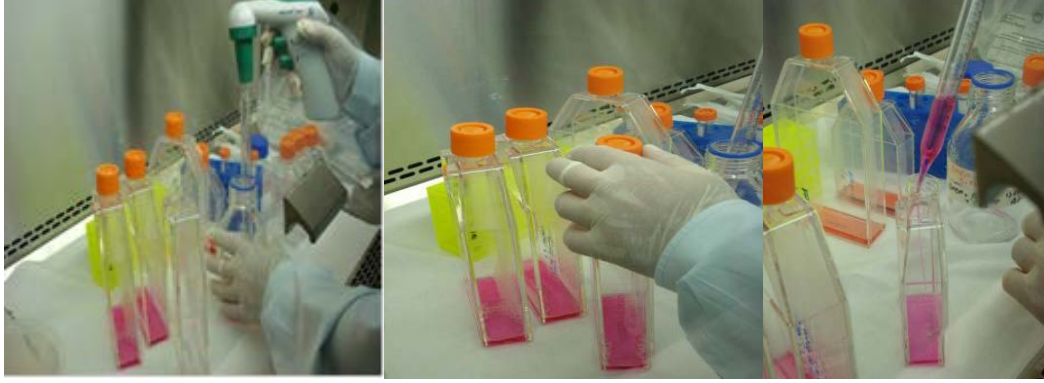
yüzeğe yapışan hücreler yüzeyden sökülmüştür. İnkübatörden çıkarılan kap içerisine 10 ml DMEM (besi yeri) eklenerek ortam nötralize edilmiştir. Hücre süspansiyonu iki ayrı 15 ml'lik falkon tüpüne eşit miktarlarda ilave edilmiştir ve bu tüpler 600 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilerek hücrelerin tüpün dibine çökmesi sağlanmıştır.



**Şekil 3. 4.** Hücrelerin çökeltilmesi ve çözülmesi (Şahin, 2010)

Santrifüj sonunda falkon tüplerindeki DMEM (besi yeri) atık kabına boşaltıldıktan sonra hücre çökeltisi üzerine 3'er ml besi yeri eklenmiştir ve bir pipet yardımı ile süspansiyon haline getirilmiştir. İlk tüpteki hücreler ile deney yapıp diğer tüpteki hücreler ise daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere kültür kaplarına alınmıştır ve inkübatöre yerleştirilerek büyümeleri sağlanmıştır. Bunun için steril 250 ml'lik kaplara 20 ml DMEM besi yerinden konulmuştur. Daha sonra bu kültür kaplarına süspansiyon halindeki hücrelerden 1 ml konulmuştur ve kaplar kapakları yarı açık halde inkübatöre yerleştirilmiştir. Bu işlem 3 günde bir tekrarlanmıştır. Her seferinde hücrelerin büyümesi ve kontamine olup olmadığı inverted mikroskop altında kontrol edilmiştir.





**Şekil 3. 5.** Besi yerlerin hücre kültür kaplarına alınması (Akdulum, 2011)  
(Pasajlama)



**Şekil 3. 6.** İnkübatör ve Inverted (ters) mikroskop (Akdulum, 2011)

### 3.2.4.b Hücrelerin sayılması işlemi

Besi yeri ile süspansiyon haline getirilmiş karışımdan 300  $\mu$ L alınmıştır ve Cedex HiRes Analyzer örnek kabına konulmuştur. Trypan blue ile hücre süspansiyonunu cihazın kendisi karıştırmaktadır. Trypan blue solüsyonu ile ölü hücreler etiketlenmiştir. Canlı hücrelerde membran intakt durumda olduğundan dolayı boyayı almaz iken ölü hücreler yani membranı hasar görmüş hücreler boyayı alarak maviye boyanmaktadır (Doyle vd., 1998). Trypan blue metodu ile canlı olmayan hücreler boyanır ve ölü hücreler analizörde koyu şekilde boyalı görülmektedir. Böylece cihaz

ölü hücreleri belirlemektedir. Kap içerisindeki canlı hücrelerin miktarı hücre sayım cihazı (Cedex HiRes Analyzer) ile otomatik olarak gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2.4.c Örneklerin hazırlanması**

Çalışılan numuneden ortalama 10 mg tartılarak steril DMSO'daki çözeltisi (20 mg/mL olacak şekilde) hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözelti numaralandırılmış steril ependorf tüpünde 1:20 oranında DMEM ile seyreltilerek kullanılmıştır.

#### **3.2.4.d Proliferasyon deneyi**

E-plate 96'nın her bir kuyucuğuna 50 µL kültür ortamı konulmuştur ve 15 dakika steril kabinde, 15 dakika inkübatörde bekletilmiştir. Daha sonra plaka, RTCA cihazına yerleştirilmiştir ve arka plan (background) okuması yapılmıştır. Bu işlemden sonra kuyucuklarda olması istenen hücre sayısı (25.000 hücre/kuyucuk) hesaplanarak oluşturulmuş hücre süspansiyonundan 100'er µL eklenmiştir. Plaka, hücrelerin dibe çökmesi ve ortama uyum sağlaması için yarım saat steril kabinde bekletildikten sonra RTCA cihazına yeniden yerleştirilmiştir ve 80 dakika süren ikinci aşama başlatılmıştır. Bu süre boyunca hücrelerin kuyucuk tabanına yapışarak büyüme sürecine girmeleri sağlanmıştır. Bu süre sonunda e-plate tekrar steril kabine alınmıştır ve kuyucuklara, son hacim 200 µL olacak şekilde farklı derişimlerde bitki ekstraktı içeren kültür ortamı çözeltisi eklenmiştir. Her bir numune için yüksek (50 µL), orta (20 µL) ve düşük doz (10 µL) olmak üzere üç farklı konsantrasyon ve her bir doz için üç tekrar yapılarak çalışılmıştır. Üç kuyucuk yüksek doz, üç kuyucuk orta doz ve üç kuyucuk düşük doz olmak üzere bir numuneye 9 kuyucuk kullanılmıştır. Numune eklendikten sonra plaka son kez RTCA cihazına yerleştirilmiştir ve 48 saat boyunca hücrelerin yaşam/ölüm durumları gerçek zamanlı olarak kaydedilmiştir.

### 3.2.5. Antioksidan aktivite testleri

#### 3.2.5.a Ferrik iyonlarını ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ferröz iyonlarına ( $\text{Fe}^{2+}$ ) indirgeme gücü tayini

İzole edilen molekülün indirgeme kuvveti tayini Oyaizu metoduna göre belirlendi (Oyaizu, 1986). Hazırlanan stok çözeltilerden 10, 20 ve 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  olacak şekilde deney tüplerine ilave edildi ve hacim destile suyla 1 mL'ye tamamlandı. Hacim tamamlandıktan sonra her bir deney tüpüne 2,5 mL 0,2 M fosfat tamponu (pH: 6,6) ve 2,5 mL %1'lik potasyum ferrisiyanür [ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ] ilave edildi ve bu karışım 50 °C'de 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra reaksiyon karışımına 2,5 mL %10'luk TCA ilave edildi. Karışımın üst fazından 2,5 mL alınarak üzerine 2,5 mL destile su ve %0,1'lik 0,5 mL  $\text{FeCl}_3$  ilave edildi. Elde edilen son karışımın absorbansları 700 nm'de köre karşı okundu. Kör olarak destile su ve kontrol için numune yerine su kullanıldı.

#### 3.2.5.b Kuprak metoduna göre indirgeme kuvveti tayini

Etil asetat ekstresinden elde edilen saf molekülün kuprik iyonu ( $\text{Cu}^{2+}$ ) indirgeme kapasiteleri Apak ve arkadaşlarının (2006) kullandığı Kuprak metoduna göre belirlendi. Bu yöntemde deney tüplerine 0,01 M'lık 0,25 mL  $\text{CuCl}_2$  çözeltisi ilave edilerek üzerine 0,25 mL  $7,5 \times 10^{-3}$  M'lık etanolik neokuprin çözeltisi ve 0,25 mL 1M'lık amonyum asetat ( $\text{NH}_4\text{OAc}$ ) tamponu ilave edildi. Çözelti karıştırıldıktan sonra sırasıyla 10, 20 ve 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  konsantrasyonlarında axillarin bileşiği ve standart karışıma ilave edildi ve yarım saat sonra 450 nm'de absorbansları ölçüldü. Reaksiyon karışımının absorbansının artması kuprik iyonu ( $\text{Cu}^{2+}$ ) indirgeme kapasitesinin arttığını göstermektedir.

### 3.2.5.c DPPH• serbest radikallerini giderme aktivitesi tayini

İzole edilen saf molekülün serbest radikal giderme aktivitesi Blois metoduna göre DPPH•'ın 1 mM'lık çözeltisi kullanılarak belirlendi (Blois, 1958). Bu yöntemde deney tüplerine sırasıyla 10, 20 ve 30 µg mL<sup>-1</sup> konsantrasyonlarında incelenecek numune ilave edildi ve etanol ile hacimleri 3 mL'ye tamamlandı. Daha sonra her bir deney tüpüne stok DPPH• çözeltisinden 1 mL ilave edilerek toplam hacim 4 mL oldu. Bu karışım 30 dakika oda sıcaklığı ve karanlıkta inkübe edildi ve etanolden oluşan köre karşı 517 nm'de absorbansları ölçüldü. Kontrol olarak, 3 mL etanol ve 1 mL DPPH• çözeltisi kullanıldı. Azalan absorbans geriye kalan DPPH• çözeltisi miktarını yani serbest radikal giderme aktivitesini verdi. Serbest radikal giderme aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak belirlendi.

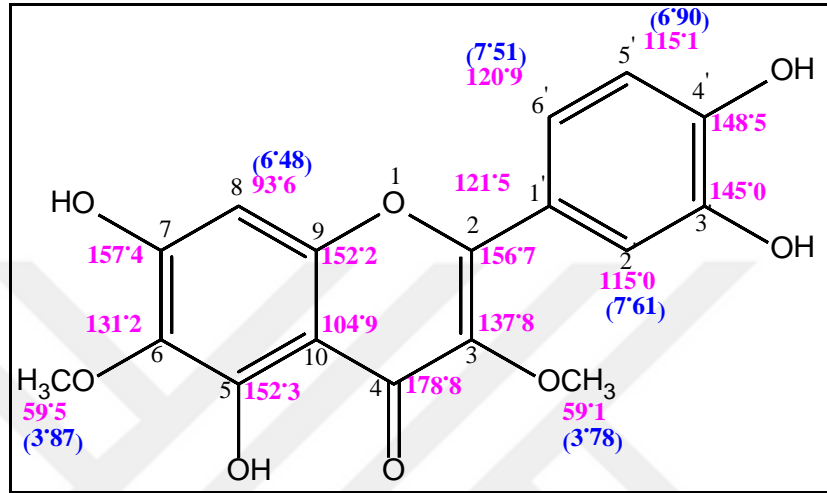
$$\% \text{ Serbest Radikal} = [ ( A_0 - A_1 ) / A_0 ] \times 100$$

A<sub>0</sub>: Kontrol Absorbansı

A<sub>1</sub>: Örnek Absorbansı

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

##### 4.1. İzole Edilen Bileşiğin Yapı Analizi

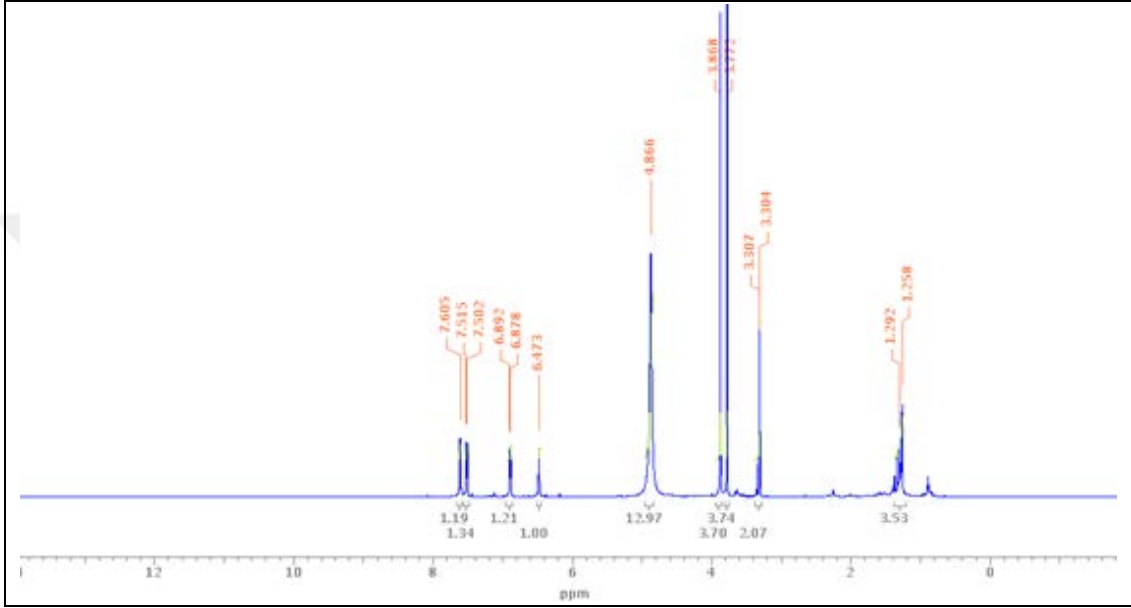


Şekil 4. 1. İzole edilen bileşiğin  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  kimyasal kayma değerleri

Kromatografik yöntemlerle sarı renkli, katı olarak izole edilen bileşiğin (200 mg) yapısı  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR, COSY, DEPT, HMBC ve HSQC analizleri ile yapı tayini yapılmıştır. Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.8'de sırasıyla izole edilen bileşiğe ait  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR, COSY, DEPT, HMBC ve HSQC spektrumları verilmiştir.

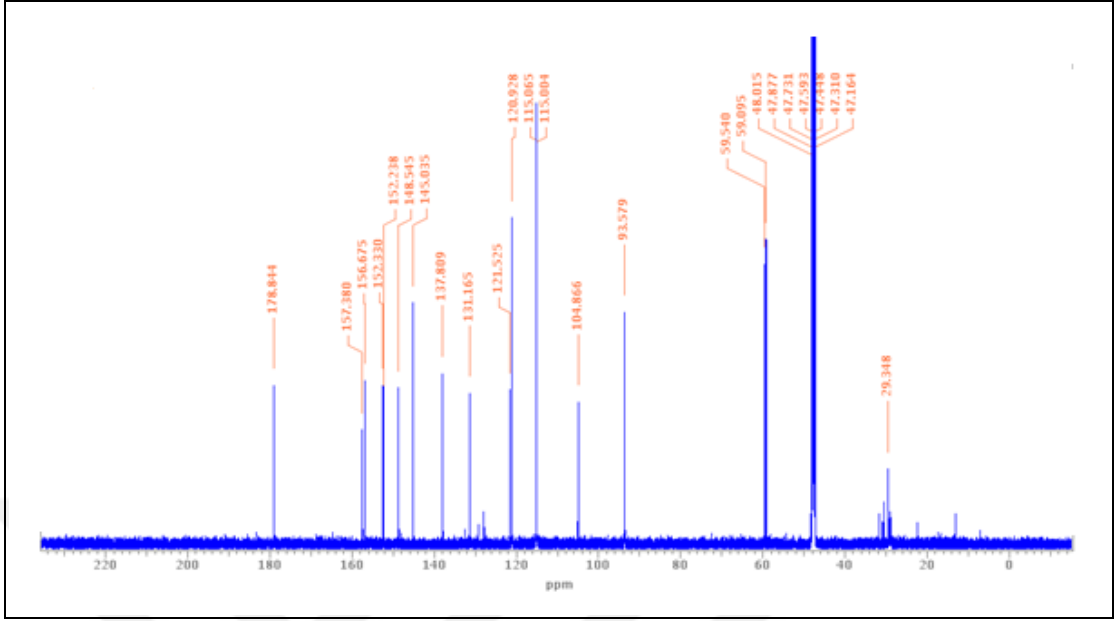
$^1\text{H}$ -NMR spektrumunda protonların etkileşme sabitleri ve kimyasal kayma değerleri incelendiğinde  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , ppm)  $\delta$ = 7,61 (s, 1H), 7,52 (d,  $J$  = 8,0 Hz, 1H), 6,89 (d,  $J$  = 8,0 Hz, 1H), 6,48 (s, 1H), 4,84 (bs, 4H, -OH), 3,87 (s, 3H, - $\text{OCH}_3$ ), 3,78 (s, 3H, - $\text{OCH}_3$ ) sinyalleri görülmektedir. Spektrumda aromatik bölgede 4 tane CH pikleri, 4,84 ppm'de fenolik OH piki ve metoksi gruplarına ait pikler görülmektedir. Aromatik protonlar (C-8 ve C-6')  $\delta$ = 7,61 ve 6,48 ppm'de singlet olarak sinyal verirken C-2' ve C-3' aromatik protonları  $\delta$ = 7,51 ve 6,90 ppm'de ( $J$  = 8,0 Hz) dublet olarak sinyal vermiştir.  $\delta$ = 3,87 ve 3,78 ppm'de singlet olarak görülen sinyaller ise bileşikte süstitüent olarak - $\text{OCH}_3$  gruplarının bulunduğu

göstermektedir.  $\delta = 6,48$  ppm'de singlet olarak gözlenen C-8 protonu yapının flavon türevi ve A halkasının trisüstitüe olduğunu göstermektedir.  $\delta = 7,51$  ppm'de dublet,  $\delta = 6,90$  ppm'de dublet ve  $\delta = 7,61$  ppm'deki singlet sinyalleri flavonoidin B halkasının 3',4'-disüstitüe olduğunu göstermektedir.



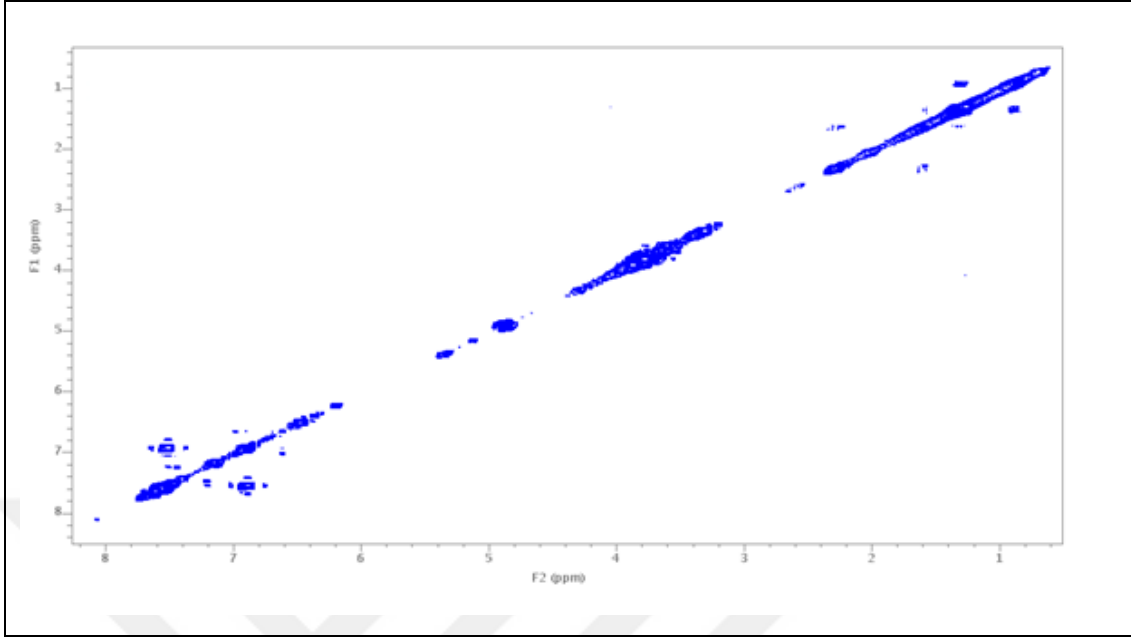
Şekil 4. 2. İzole edilen bileşiğin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu

$^{13}\text{C-NMR}$  spektrumunda karbonların kimyasal değerleri incelendiğinde  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , ppm)  $\delta = 178,8, 157,4, 156,7, 152,3, 152,2, 148,5, 145,0, 137,8, 131,2, 121,5, 120,9, 115,1, 115,0, 104,9, 93,6, 59,5, 59,1$  olmak üzere 17 sinyal görülmektedir. Spektrumda  $\delta = 157,4$  ve  $93,6$  ppm arasında 14 tane aromatik ve olefinik karbon atomu sinyalleri görülmektedir.  $\delta = 178,8$  ppm'deki sinyal bileşikte bir karbonil grubunun bulunduğunu ve  $\delta = 59,5$  ve  $\delta = 59,1$  ppm'deki sinyaller ise iki metoksi grubunun bulunduğunu göstermektedir.



Şekil 4. 3. İzole edilen bileşiğin  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu

Flavonoidlerin  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu, aromatik halka protonlarını ve sübstitüentlerin durumunu göstermektedir. 5,7-dihidroksi flavonlarda A halkasındaki C-6 ve C-8 protonları kimyasal değeri 5-7 ppm arasında olan iki duplet oluşturmaktadır. 5, 6, 7 ve 8'de sübstitüent bulunduğu zaman ise C-6 ve C-8 protonları kimyasal değeri 6-6,5 ppm arasında olan bir singlet oluşturmaktadır. 4'den substitüe flavonlarda B halkasındaki C-2, C-6, C-3 ve C-5 protonları orto etkileşimli kimyasal kayma değeri 6,5-7,9 ppm arasında olan iki duplet oluşturmaktadır. Genellikle C-3 ve C-5 protonlarının dupletleri C-2 ve C-6 protonlarının dupletlerinden daha yukarı alanda görülmektedir. Flavanoitlerin  $^{13}\text{C}$ -NMR spektroskopisi ise molekülde bulunan şeker birimlerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda ve hidrojenlerin sinyallerdeki yarılmalar ve kimyasal kayma değerlerinden yararlanarak saflaştırılan bileşiğinin yapısının 2-(3,4-Dihidroksifenil)-5,7-dihidroksi-3,6-dimetoksi-4H-kromen-4-on (axillarin) olduğu belirlenmiştir.



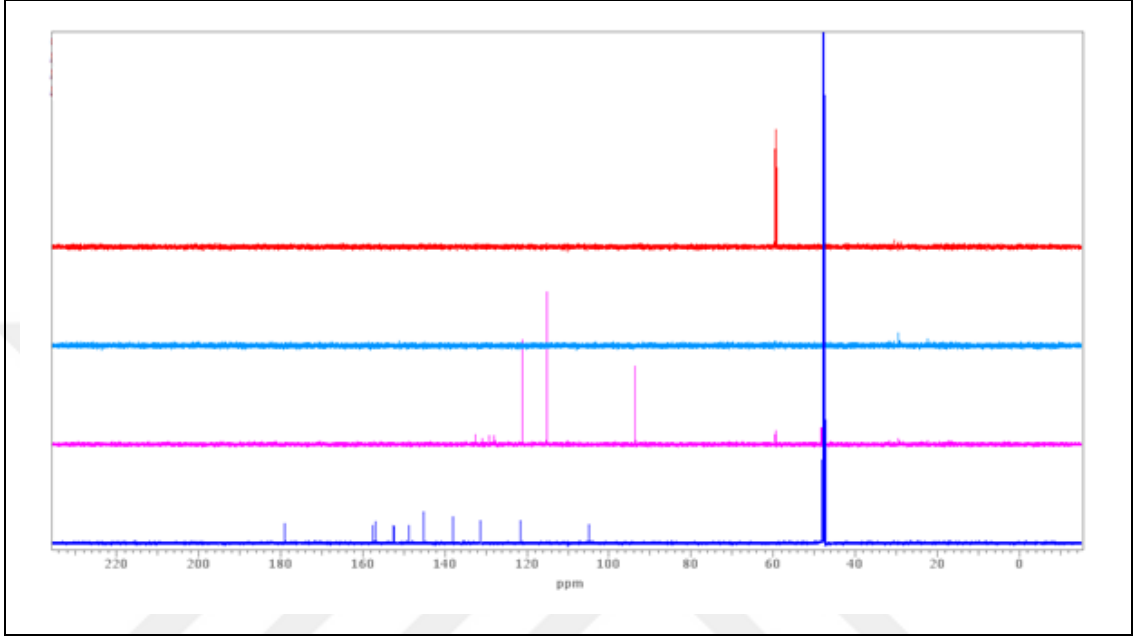
**Şekil 4. 4.** İzole edilen bileşiğin COSY spektrumu

Şekil 4.4. izole edilen bileşiğe ait COSY NMR spektrumunu göstermektedir. COSY, uzaysal etkileşimlerin belirlendiği ve iki boyutlu (2D) bir NMR tekniğidir. COSY spektrumu bize bir bileşiğe ait aynı tip çekirdekler (homonükleer) arasındaki iki boyutlu tepelik grafikleri şeklinde kayıt vermektedir. Köşegenin üst noktası yüksek alan (yukarı alan) bölgesini gösterirken, sol alt köşegeni düşük alan (aşağı alan) bölgesini göstermektedir. COSY spektrumundan hangi protonun hangi proton ile eşleştiğini bulabilmek için köşegenleri kesecek ve 90 °C lik iki üçgen oluşturacak şekilde bir çizgi ile ayrılır. Bu iki çizginin köşegeni kestiği noktalar eşleşen protonları vermektedir.

Spektruma göre, B halkasında C-2' karbonuna bağlı ve 7.51 ppm'de rezonans olan proton ile yine aynı halkaya bağlı C-3' karbonundaki 6.90 ppm'de rezonans olan birbirlerine orto pozisyonda bulunan protonların uzaysal olarak birbiriyle etkileştiği COSY NMR spektrumundan belirlenmiştir. Bu etkileşim komşu protonlar ve birbirlerine karşı orto pozisyonunda olmalarından dolayı sinyal boyutu daha fazladır. Yine aynı spektruma göre, C-2' karbonuna bağlı ve 7.51 ppm'de rezonans olan proton ile C-6' karbonundaki 7.61 ppm'de rezonans olan birbirlerine karşı meta



konumunda bulunan protonların uzaysal olarak birbiriyle etkileştiği COSY NMR spektrumundan belirlenmiştir.

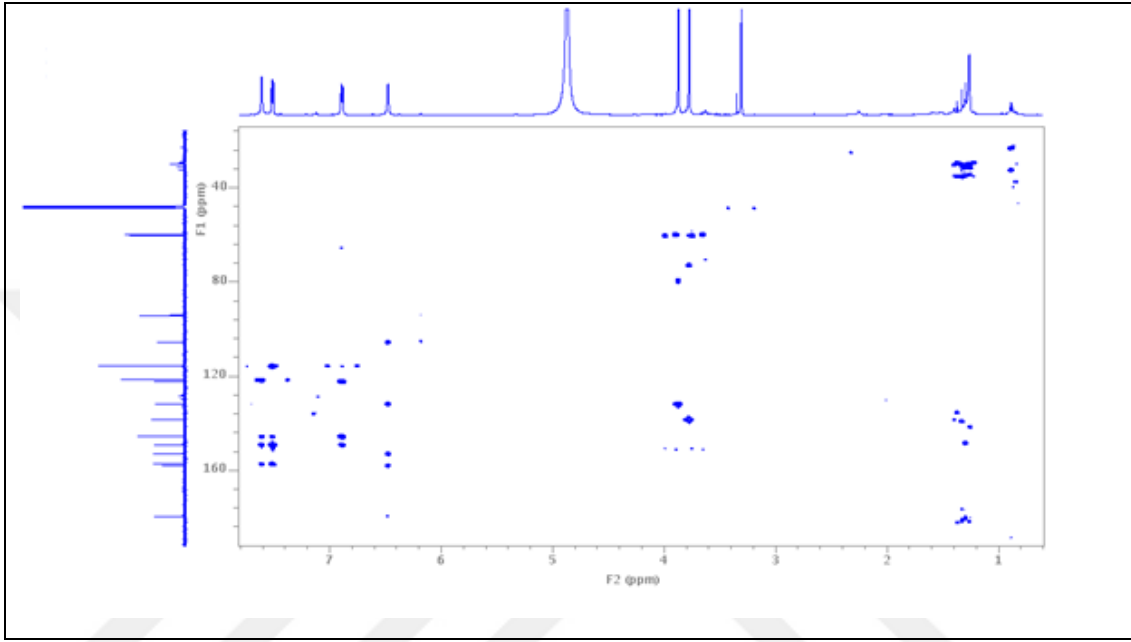


**Şekil 4. 5.** İzole edilen bileşiğin DEPT spektrumu

Şekil 4.5. izole edilen bileşiğe ait DEPT NMR spektrumunu göstermektedir. DEPT, iki boyutlu (2D) NMR tekniklerinden biridir. DEPT spektrumu bize bir bileşiğin hangi tür karbon atomlarından oluştuğunu göstermektedir. DEPT spektrumunda yukarıdan aşağıya doğru; en üstteki kırmızı renkli birinci spektrum  $\text{CH}_3$  karbonlarını, açikmavi renkli ikinci spektrum  $\text{CH}_2$  karbonlarını, pembe renkli üçüncü spektrum  $\text{CH}$  karbonlarını ve son olarak koyumavi renkli dördüncü spektrum quarterner karbon atomlarının varlığını göstermektedir.

Spektruma göre, 2 tane metil grubunun varlığı görülmektedir. Bu metil grupları A halkasındaki C-6 karbonuna bağlı metoksi ( $-\text{OCH}_3$ ) ve C halkasındaki C-3 karbonuna bağlı metoksi ( $-\text{OCH}_3$ ) gruplarının varlığını göstermektedir. Spektruma göre yapıda  $\text{CH}_2$  grupları bulunmamaktadır. Aynı zamanda yapıda dört adet  $\text{CH}$  bulunmakta fakat iki  $\text{CH}$  grubu birleşik geldiğinden ancak spektrum daha detaylı

incelendiğinde anlaşılabilir. Yapıda 11 adet quarterner karbon atomunun var olduğu DEPT spektrumundan anlaşılmaktadır.

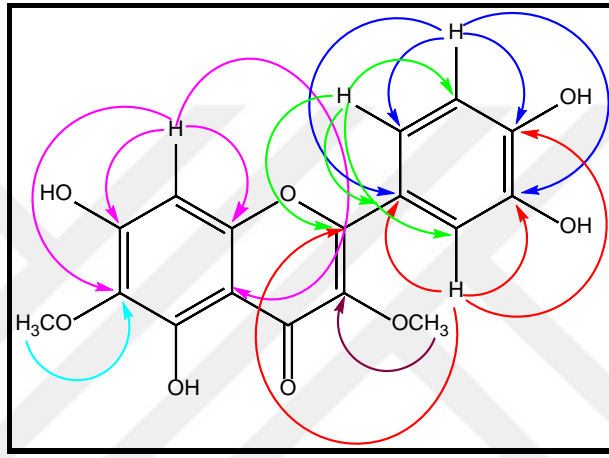


**Şekil 4. 6.** İzole edilen bileşiğin HMBC spektrumu

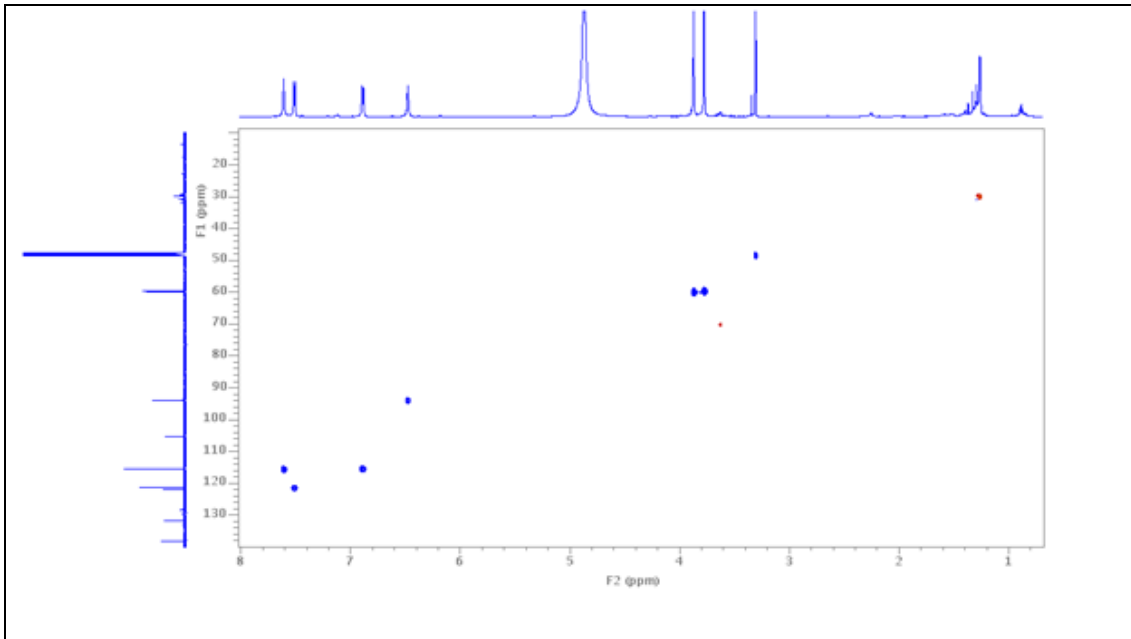
Şekil 4.6’de izole edilen bileşiğe ait HMBC NMR spektrumu görülmektedir. HMBC iki boyutlu (2D) heteronükleer korrelasyon tekniklerinden biridir. Bu teknik ile uzun mesafe karbonlar ve protonlar arasındaki etkileşimler belirlenir fakat bu etkileşimlerde doğrudan birbirine bağlı olan karbon proton etkileşimleri değil, en fazla dört bağa kadar olan komşu karbon proton etkileşimleri belirlenir.

HMBC spektrumuna göre, 3.78 ppm’de rezonans olan metoksi protonlarının C-3 karbon atomlarıyla etkileştiği, 3.87 ppm’de rezonans olan diğer metoksi protonlarının 131.16 ppm’de rezonans olan C-6 karbonu ile korale olduğu HMBC spektrumundan belirlenmiştir. 6.48 ppm’de rezonans olan H-8 protonu sırasıyla 104.9 (C-10), 131.2 (C-6), 152.2 (C-9) ve 157.4 (C-7) ppm’de rezonans olan karbonlar ile korale olduğu belirlenmiştir. Aromatik B halkasında 6.90 ppm’deki H-5’ protonunun; 120.9 (C-6’ kuvvetli), 121.5 (C-1’), 145.0 (C-3’) ve 148.5 (C-4’)

ppm'de rezonans olan karbon atomları ile, aynı halkada C-6' pozisyonunda 7.51 ppm'de rezonans olan protonunun; 115.0 (C-2'), 148.5 (C-4') ve 156.7 (C-2) ppm'de rezonans olan karbon atomları ile ve aynı halkada C-2' pozisyonunda 7.61 ppm'de rezonans olan protonunun; 121.5 (C-1'), 145.0 (C-3'), 148.5 (C-4') ve 156.7 (C-2) ppm'de rezonans olan karbon atomları ile korelasyonu HMBC tekniği ile belirlenmiştir.



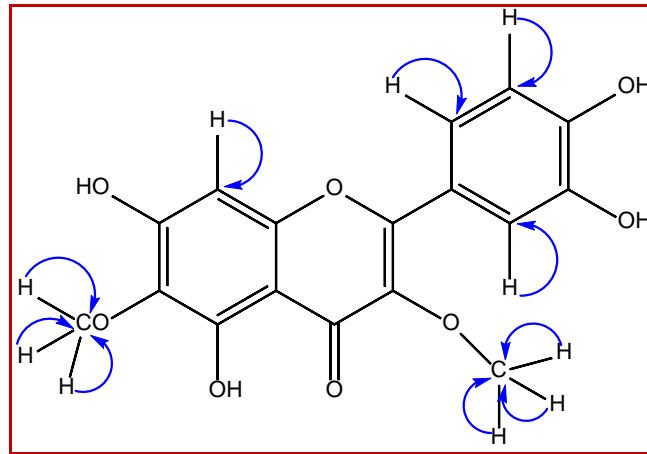
Şekil 4. 7. İzole edilen bileşiğin HMBC etkileşimleri



Şekil 4. 8. İzole edilen bileşiğin HSQC spektrumu

Şekil 4.7’de izole edilen bileşiğe ait HSQC NMR spektrumu görülmektedir. HSQC iki boyutlu (2D) heteronükleer korrelasyon tekniklerinden birisidir. Bu teknik ile uzun mesafe karbon-proton etkileşimleri değil, tek bağ ile doğrudan birbirine bağlı olan karbon proton etkileşimleri belirlenir. Bu teknikte Kırmızı renkli spotlar  $-CH_2$  (metilen) grubunun varlığını göstermektedir. Mavi rekli spotlar ise CH ve  $CH_3$  gruplarının varlığını gösterir. Bu teknikte quarterner karbonlarda proton olmadığı için quarterner karbonlar spot oluşturmaz ve dolayısı ile belirlenemez.

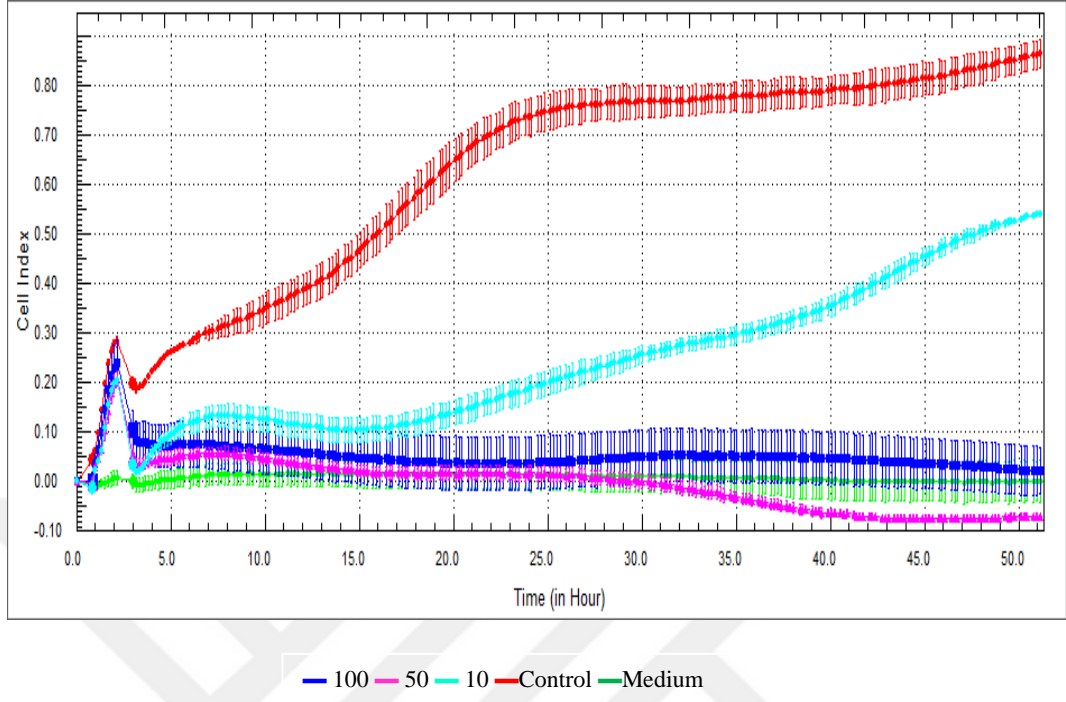
HSQC spektrumu ile 3.78 ppm’de rezonans olan metoksi protonlarının 59.1 ppm’deki karbon atomuna bağlı olduğu, 3.87 ppm’deki diğer metoksi protonlarının 59.5 ppm’deki karbon atomuna bağlı olduğu belirlenmiştir. Mevcut spektrumdan 6.48 ppm’de rezonans olan protonun 93.6 ppm deki C-8 karbonuna, 7.51 ppm deki protonun 120.9 ppm deki C-6’ karbon atomuna, 6.90 ppm’de rezonans olan protonun 115.1 ppm deki C-5’ karbon atomuna ve son olarak 7.61 ppm’deki protonun 115.0 ppm deki C-2’ karbon atomuna bağlı olduğu HSQC NMR tekniği ile belirlenmiştir.



Şekil 4. 9. İzole edilen bileşiğin HSQC etkileşimleri

#### 4.2. Antikanserojen Aktivite Testi

Bu çalışmada *Tanacetum alyssifolium* bitkisinin etil asetat ekstresinden saflaştırılan axillarin bileşiminin HeLa hücre hattı üzerine antiproliferatif etkisi incelendi. Bileşimin farklı konsantrasyonlarında aktivitesi test edildi ve en iyi aktivite gösterdiği konsantrasyon belirlendi. Şekil 4.4'de görüldüğü gibi ekstre 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında en yüksek aktiviteyi gösterirken, 10 µg/mL konsantrasyonunda düşük aktivite gösterdi. İlk 2 saatte ekstre ile maruz bırakılmayan hücrelerde normal büyüme gözlemlendi. Fakat besleyici ortamda (DMEM) herhangi bir artış olmadı. Daha sonra saf bileşik E-plate 96'nın her bir kuyusundaki hücre kültürü ortamına eklendi. 3. saatten itibaren ekstrenin 50 µg/mL ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında aktivite artışı olurken, yani hücre çoğalması azalırken, 10 µg/mL konsantrasyonunda 8. saatten itibaren aktivite gösterdi ve 15. saatten sonra hücre çoğalması devam ederek ekstre aktivite göstermedi. 10 µg/mL konsantrasyonunda %50 aktivite göstermiştir. 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarındaki ekstre 13. saatte maksimum aktivitesine ulaşmıştır. Süre tamamlandıktan sonra da sonuç değişmedi. Sonuç olarak bileşimin farklı konsantrasyonlarındaki antikanserojen aktivite testinde en yüksek aktiviteyi 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonları göstermiştir ve 10 µg/mL konsantrasyonunda 8. saatten 15. saate kadar aktivite gösterip, 15. saatten sonra hücre çoğalması devam ederek ekstre aktivite göstermemiştir. Maksimum aktiviteye ise 13. saatte ulaşmıştır.



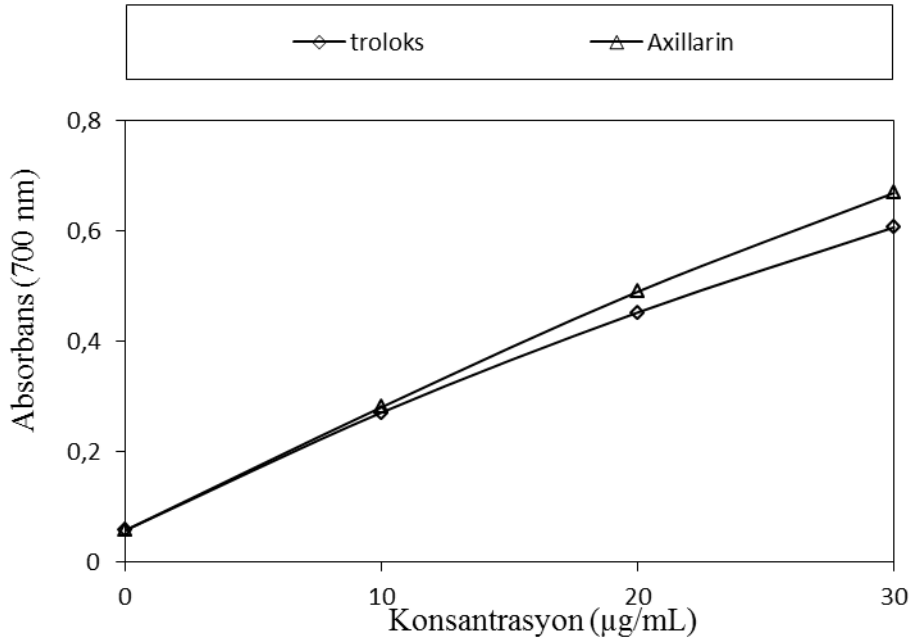
Şekil 4. 10. İzole edilen bileşiğin antiproliferatif aktivitesi

### 4.3. Antioksidan Araştırma Sonuçları

#### 4.3.1. Ferrik iyonlarını ( $Fe^{3+}$ ) ferröz iyonlarına ( $Fe^{2+}$ ) indirgeme kuvveti ile ilgili sonuçlar

Antioksidan aktivite çalışmalarının demir indirgeme metodunda, test çözeltisinin sarı rengi antioksidan maddelerin indirgeme aktivitelerinden dolayı ortamda antioksidan maddeler olduğu zaman yeşil renk olmaktadır (Gülçin vd., 2006). *Tanacetum alyssifolium* bitkisinin etil asetat ekstresinden izole edilen bileşiğin indirgeme gücü, farklı konsantrasyonlardaki (10–30  $\mu\text{g/mL}$ ) çözeltisinin 700 nm'deki absorbansı ölçülerek tespit edilmiştir. Bu bileşiğin indirgeme potansiyeli standart olarak kullanılan troloks ile karşılaştırılmıştır. İndirgeme kuvveti tayininde yüksek absorbans değeri yüksek indirgeme kapasitesini göstermektedir. Şekil 4.1. incelendiğinde elde edilen bileşiğin  $Fe^{3+}$ 'ü indirgeme yeteneği yönünden standart olarak kullanılan troloksdan daha fazla indirgeme potansiyeline sahip olduğu

görülmektedir. Bileşik fenolik ve hidroksilik grup içerdiğinden dolayı yüksek indirgeme kuvvetine sahiptir.



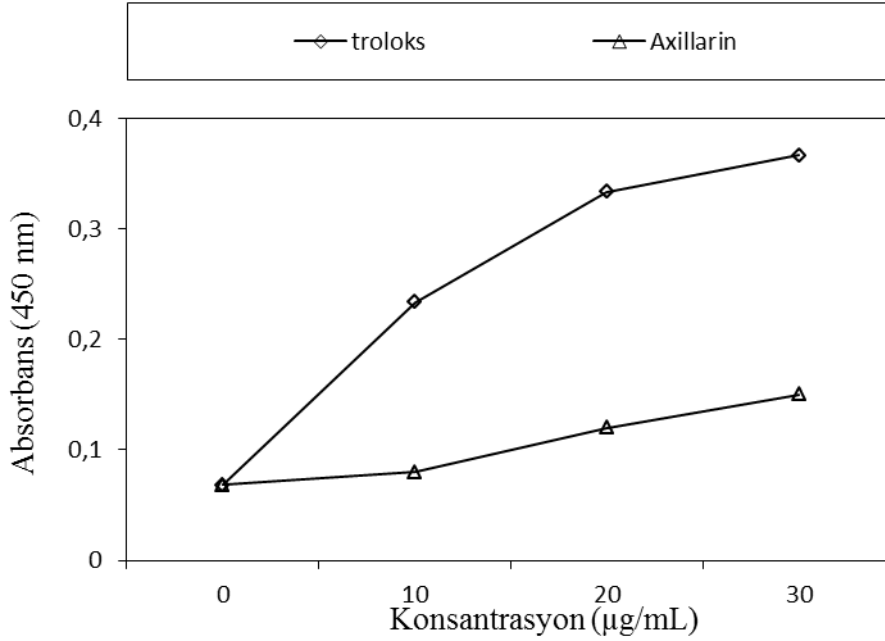
**Şekil 4. 11.** İzole edilen bileşiğin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) indirgeme gücünün standart antioksidan olan troloks ile mukayese edilmesi

#### 4.3.2. Kuprak metoduna göre indirgeme kuvveti sonuçları

Bitkiden izole edilen bileşiklerin kuprik iyonu ( $\text{Cu}^{2+}$ ) indirgeme kapasiteleri Apak ve arkadaşlarının (2006) kullandığı kuprak metoduna göre belirlendi. Kuprak metodunda 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin-Nc)  $\text{Cu(II)}$  ile  $\text{Cu(II)}$ -neokuproin kompleksini ( $\text{Cu(II)-Nc}$ ) oluşturur ve oluşan  $\text{Cu(II)}$ -neokuproin kompleksi ( $\text{Cu(II)-Nc}$ ) antioksidan bileşikler varlığında renkli  $\text{Cu(I)-Nc}$  kelatına indirgenmektedir. Daha sonra bu kelatın maksimum ışığı soğurduğu 450 nm'de absorbans değerleri ölçülmektedir (Markesbery, 1997; Somogyı ve ark., 2007).

Bu çalışmada bitkiden izole edilen bileşiğin kuprik iyonunu ( $\text{Cu}^{2+}$ ) indirgeme kapasitesi farklı konsantrasyonlardaki (10–30 µg/mL) çözeltilisinin 450 nm'deki absorbansı ölçülerek tespit edilmiştir. Bu bileşiğin kuprik iyonunu ( $\text{Cu}^{2+}$ ) indirgeme

kapasitesi artan konsantrasyon ile artmıştır ve indirgeme yeteneği standart antioksidan olarak kullanılan troloks'dan daha az olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.2.).



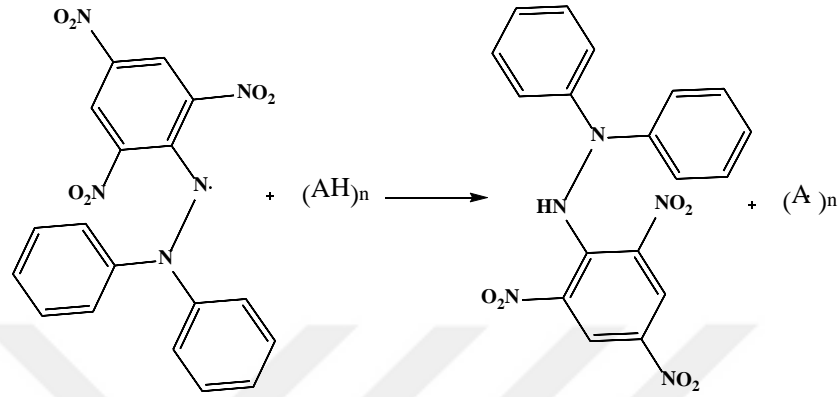
Şekil 4. 12. İzole edilen bileşiğin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) kuprik iyonlarını ( $\text{Cu}^{2+}$ ) indirgeme kuvvetinin troloks ile mukayese edilmesi

#### 4.3.3. DPPH• serbest radikal giderme aktivitesi sonuçları

İzole edilen bileşğin DPPH• serbest radikalini giderme aktivitesi Blois metoduna göre belirlendi. Antioksidanlar, DPPH ile etkileşime girip elektronlarını ya da hidrojen atomlarını vererek DPPH'nin serbest radikal özelliğini azaltırlar (Archana ve ark., 2005). DPPH• serbest radikal giderme aktivitesi yöntemi, DPPH çözeltisinin koyu menekşe renginin ortamdaki antioksidanlar tarafından elektron transferi ile rengin açılması ve meydana gelen bu renk değişikliğinin UV spektrofotometre ile ölçülmesi temeline dayanmaktadır. DPPH radikali antioksidanlar tarafından indirgendiği zaman absorbans azalmaktadır. DPPH çözeltisinin koyu menekşe rengi ne kadar açılırsa ve karışımın absorbansındaki azalma ne kadar yüksek olursa serbest radikali giderme gücü de o kadar yüksek olmaktadır (Mathew ve Abraham, 2006). Sonuçlar ortamda numune yok iken DPPH radikalinin gösterdiği absorbans belirlenip

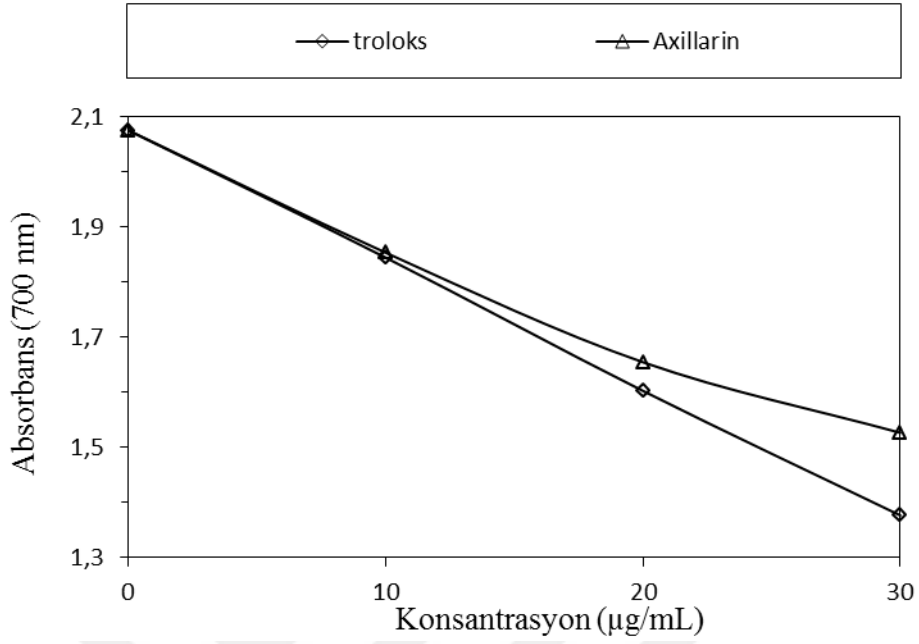


ve daha sonra ortama numune ilave edilerek meydana gelen renk indirgenmesine göre hesaplaması yapılır (Bandoniené ve Murkovic, 2002).



Şekil 4. 13. Antioksidan tarafından DPPH radikalının giderilmesi (Gülçin, 2002)

*Tanacetum alyssifolium* bitkisinin etil asetat ekstresinden saflaştırılan bileşiğin DPPH• serbest radikal giderme aktivitesi, farklı konsantrasyonlardaki (10–30 µg/mL) çözeltilisinin 517 nm'deki absorbansı ölçülerek tespit edilmiştir. Bu bileşiğin DPPH• serbest radikal giderme aktivitesi standart olarak kullanılan troloks ile karşılaştırılmıştır. Reaksiyon karışımının absorbansının düşmesi yüksek serbest radikal giderme aktivitesini göstermektedir. Şekil 4.4 incelendiğinde bileşiğin standart olarak kullanılan troloksdan daha az fakat standarta yakın miktarda DPPH serbest radikalini giderdiği görülmektedir. Bileşikte bulunan fenolik grupların sayısı standart antioksidana göre daha az olduğundan dolayı daha az DPPH serbest radikalini gidermiştir.



**Şekil 4. 14.** İzole edilen bileşiğin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) DPPH serbest radikali giderme aktivitesinin troloks ile mukayese edilmesi

Bileşiğin 30 µg/mL konsantrasyonunda DPPH radikali giderme aktivitesi % 26 ve troloksun aktivitesi % 33'dür. Serbest radikal giderme aktivitesi troloks > 2-(3,4-Dihidroksifenil)-5,7-dihidroksi-3,6-dimetoksi-4H-kromen-4-on şeklindedir.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, Asteraceae (Compositae) familyasının bir üyesi ve endemik bir tür olan *Tanacetum alyssifolium* bitkisinden çeşitli işlemler sonucunda hazırlanan ekstrelerde mevcut olan sekonder metabolitlerin izolasyonu, antioksidan ve antikanserojen aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

İnsanlığın var oluşundan buyana tedavi amacıyla kullanılan bitkilerin genellikle kök, yaprak, gövde, kabuk, çiçek ve meyvelerinde bol miktarda flavonoid, fenolik asit, lignan ve lignin gibi fenolik bileşikler bulunmaktadır. Bu fenolik bileşiklerin antikanserojen ve antioksidan aktivite gibi pek çok biyolojik etkileri bulunmaktadır. *Tanacetum* türlerinin Türkiye’de çok sayıda bulunması ve önemli derecede endemizm göstermesinden dolayı bu türlerden elde edilecek yeni biyoaktif bileşikler ülkemiz için önemli bir ekonomik kaynak sağlayacaktır (Kılıç, 2007).

*Tanacetum alyssifolium* bitkisinde bulunan sekonder metabolitlerin izolasyon çalışması etil asetat ekstresinin kolon kromatografisi ile fraksiyonlandırılmasıyla başlandı ve elde edilen fraksiyonların İTK sonuçlarına göre küçük kolonlarla saflaştırılması ile devam edildi. Bu işlemler sonucunda elde edilen bileşiğin saf olup olmadığı ilk önce İTK da kontrol edildi ve saf olduğu düşünülen bileşiğin spektral analizleri (NMR ve HPLC) yapıldı. Bu yüksek lisans tez çalışmasında *Tanacetum alyssifolium* bitkisinden izole edilen 2-(3,4-Dihidroksifenil)-5,7-dihidroksi-3,6-dimetoksi-4H-kromen-4-on (axillarin) bileşiği daha önce *Inula britannica* bitkisinden izole edilmiş (Park vd., 2000) ve antioksidan aktivitesini belirlemek için DPPH serbest radikal giderme aktivitesi çalışılmıştır. Ayrıca bu maddenin antikanserojen etkisini belirlemek için kortikal hücre kullanılarak maksimum aktivite gösterdiği konsantrasyon belirlenmiştir.

Axillarin bileşiğinin antioksidan aktivite çalışmasında, Ferrik iyonlarını ( $Fe^{3+}$ ) ferröz iyonlarına ( $Fe^{2+}$ ) indirgeme gücü tayini Oyaizu metoduna göre, kuprik iyonlarını ( $Cu^{2+}$ ) küpröz iyonlarına ( $Cu^{+}$ ) indirgeme kapasitesi Apak ve arkadaşlarının (2006)

kullandığı Cuprak metoduna göre ve DPPH serbest radikal giderme aktivitesi Blois metoduna göre DPPH'nin 1 mM'lık çözeltisi kullanılarak belirlendi (Blois, 1958). Çalışma sonucunda bulunan aktiviteler gıdaların antioksidan aktivitesinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan troloks ile karşılaştırıldı.

Son zamanlarda antioksidan aktivite gösteren bitkiler karotenoit, flavonoid ve fenolik bileşik içeriği bakımından zengin olduklarından ve yan etkilerinin olmamalarından dolayı gıda ve beslenme alanlarında kullanımları doğrultusunda çok sayıda çalışmalar yapılmıştır (Kulkarni vd.,2006). Antioksidan aktivite tayin metotları, gıda, farmasötik veya tıbbi amaçlı kullanılan bitkilerin ya da bu bitkilerden izole edilen bileşiklerin biyolojik aktivite kapasitelerinin aydınlatılmasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Yapılan bu çalışmada da bu metotlar kullanıldı ve bulgular birer doğal ve standart antioksidan olan troloks ile mukayese edildi. Axillarin bileşiğinin Ferrik iyonlarını ( $Fe^{3+}$ ) ferröz iyonlarına ( $Fe^{2+}$ ) indirgeme yeteneğinin standart olarak kullanılan troloksdan daha fazla olduğu, Kuprak metoduna göre indirgeme yeteneğinin artan konsantrasyon ile arttığı ve indirgeme yeteneğinin standart antioksidan olarak kullanılan troloks'dan daha az olduğu ve DPPH• serbest radikal giderme aktivitesinin standart olarak kullanılan troloksdan daha az fakat standarta yakın miktarda olduğu tespit edilmiştir.

*Tanacetum alyssifolium* bitkisinin etil asetat ekstresinden izole edilen axillarin bileşiğinin antikanserojen aktivite çalışmasında bileşiğin 3 farklı konsantrasyonu hazırlandı ve HeLa hücre kültürleri üzerine bu bileşiğin 48 saat uygulama sonunda antiproliferatif etkisi belirlendi. Erzincan'a endemik bir bitkiden elde edildiği için, bu çalışma bu ekstre ile yapılan ilk antikanserojen aktivite çalışmasıdır. Sonuç olarak 43. saatin sonunda 50 µg/mL gibi orta düzey bir konsantrasyonun sitotoksik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Antikanserojen aktivite çalışması ilerleyen zamanlarda başka kanserli hücre hatları ve normal hücre hatlarında devam edecektir. Kanserinin tedavisinde bitkisel kaynaklı tedavi yaklaşımlarının arttığı günümüzde elde ettiğimiz bulgular umut vericidir.

Sonuç olarak *Tanacetum alyssifolium* bitkisinin etil asetat ekstresinden 2-(3,4-Dihidroksifenil)-5,7-dihidroksi-3,6-dimetoksi-4H-kromen-4-on (axillarin) elde edildi ve bu bileşimin Ferrik iyonlarını ( $Fe^{3+}$ ) ferröz iyonlarına ( $Fe^{2+}$ ) indirgeme gücü, kuprik iyonlarını ( $Cu^{2+}$ ) küpröz iyonlarına ( $Cu^+$ ) indirgeme kapasitesi ve DPPH serbest radikal giderme aktivitesi gibi metotlar kullanılarak antioksidan aktivitesi, HeLa hücresi kullanılarak da antikanserojen aktivitesi belirlenerek maksimum aktivite gösterdiği konsantrasyonu belirlendi. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar ileride yapılacak çalışmalarla desteklenmesi halinde bu bitkinin yeni sentezlenecek kemoterapötikler için kaynak olabileceği ve bitki ekstrelerinden ilaç geliştirilmesine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

Abdollahi, M., Bahreini-Moghadam, A., Emmami, B., Fooladian, F., Zafariet, K., “Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced oxidative stress in rat submandibular saliva”, *Comp. Biochem. Physiol. C*, 135, 331-336, (2003).

Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nıkfar, S., Rezaie, A., “Pesticides and oxidative stress : a review”, *Med. Sci. Monit.*, 10, 141-147, (2004).

Acar, J., “Fenolik bileşikler ve doğal renk maddeleri”, Gıda Kimyası, pp. 435 452, *Hacettepe Üniversitesi yayınları*, Ankara, (1998).

Aggarwal, B. B., Danda, D., Gupta, S., Gehlot, P., “Models for prevention and treatment of cancer: problems vs promises,” *Biochemical Pharmacology*, 78, 1083-1094, (2009).

Ahıskalıoğlu, A., “Anemone Narcissiflora bitkisinin karakterizasyonu ve biyolojik aktivitesinin incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Trabzon, (2007).

Akdulum, B., “Echinacea Pallida'nın Köklerindeki Bileşiklerin İzolasyonu, Yapı Tayini ve Antiproliferatif Aktivitelerinin İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Tokat, (2011).

Akkuş, İ., “Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri”, *Mimoza Yayınları*, 38(5), 1-12, (1995).

Altınışik M., “Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar”, 21 Nisan 2008, <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01s.pdf>, (2000).

Archana, B., Dasgupta, N., De, B., “In vitro study of antioxidant activity of syzygium cumini fruit”, *Food Chem.* 90, 727-733, (2005).

Asad, N. R., Asad, L. M. B. O., Bonacossa de Almeida, C. E., Felzenszwalb, I. Cabral-Neto, J. B., Leitão, A. C., “Several pathways of hydrogen peroxide action that damage the e. coli genome”, *Genetics and Molecular Biology*, 27 (2), 291-303, (2004).

Asimgil A., “Şifalı bitkiler”, 218-219, *Timaş Yayınları*, İstanbul, (1993).

Bandonienè, D., Murkovic, M., “The detection of radical scavenging compounds in crude extract of borage (*borago officinalis* L.) by using an on-line HPLC, DPPH method”, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 53, 45-49, (2002).

Basaga, H. S., “Biochemical aspects of free radicals”, *Biochemistry and Cell Biology*, 68, 989-998, (1990).

Başer, K. H. C., “Tıbbi bitki ve baharatların dünyada ve Türkiye’deki ticareti ve talep durumu”, *Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı Dergisi*, 53, 18-22, (1990).

Baykal, T., “Doğal kaynaklı bileşiklerin biyolojik aktivite yönünden değerlendirilmesi ve tedavideki yeri”, *GE*, 46, 21-22, (1997).

Baytop, T., “Türkiye’de bitkiler ile tedavi”, *Nobel Tıp Kitapevi*, Ankara, (1999).

Baytop, T., “Türkiye’de kullanılan tıbbi bitkiler”, *Nobel Tıp Kitapevleri*, 371, (1991).

Blois, M. S., “Antioxidant determinations by the use of a stable free radical”, *Nature*, 26, 1199-1200, (1958).

Borkowski, B., Krug, H., “Biol. inst. Rosl. Teczn’..”, 6, 18, (1960).

Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M., “Flavonoid as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies methods in enzimology”, 186, 343-355, (1990).

Bozkurt, A., “Antineoplastik ilaçlar”, *Farmakoloji Ders Kitabı (içinde)*, Bökesoy, T. A., Çakıcı, İ., Melli M. (Eds.), *Gazi Kitabevi*, Ankara, 625-640, (2000).

Burbulis, I. E., Iacobucci, M., Shirley, B. W., “a null mutation in the first enzyme of flavonoid biosynthesis does not affect male fertility in arabidopsis, *The Plant Cell*”, (8) 1013-1025, (1996).

Calabresi, P., Chabner, B. A., “Chemotherapy of neoplastic diseases”, Goodman & Gilman’s *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (içinde), Hardman, J. G., Limbird, L. E. (Eds.), 10. Edition, **McGraw-Hill**, New York, 1386, (2001).

Castaneda-Ovando, A., De Lourdes Pacheco- Hernandez, M. A., Elena Paez Hernandez, M. A., Rodriguez, J. A. and Galan-Vidal, C. A., “Chemical studies of anthocyanins: a review”, *Food Chemistry*, 113, 859-871, (2009).

Choe, E., Min, D. B., “Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods”, *Crit.Rev. Food Sci.Nutr.*, 46, 1-22, (2006).

Cragg, G. M., Newman, D. J., Snader, K. M., “Natural products in drug discovery and development”, *Journal of Natural Products*, 60(1), 52-60, (1997).

Çakar, B., “Ferulago Idaeae ve Ferulago Trojana bitkilerindeki sekonder metabolitlerin izolasyonu, antioksidan ve antikolinesteraz aktivitelerinin incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, (2010).

Çalışkan, E., “İğde çiçeği (Elaeagnus Angustifolia) ve Kedi nanesi (Nepeta Catoria) bitkilerinin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Tokat, (2006).

Çetin, B., “Rubia tinctorum bitkisinde agrobacterium rhizogenes aracılığıyla transforme saçaklı kök kültürlerinin oluşturulması ve sekonder metabolit üretimi”, Doktora Tezi, *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 54 s., (2006).

D’Amelio F. Sr., Roton B., “Botanicals a phytochemical desk reference”, 199, **CRC Press**, Florida, (1999).

Davidovich, P. M., Klosterman, G. F., *Arch. Dermatol. and Syphilis*, 199, 10, (1954).

Davis, P. H., Matthews V. A., Kupicha F. K. and Parris B. S., “Flora of Turkey and east aegan islands”, Vol. 5, *Edinburgh at the University Press*, Edinburgh, (1975).

Davis, P. H., Tan, K. and Mill, R. R. (eds.), “Flora of Turkey and the east aegan islands”, Vol. 10, *Edinburgh University Press*, Edinburgh, (1988).



Demirelli, F. H., “Kanserin moleküler genetik temelleri”, *İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri*, Sempozyum Dizisi, no: 37, 9-15, (2003).

Dewick, P. M., “Medicinal natural products: a biosynthetic approach”, John Wiley, Chichester, Bors, W., Saran, M., 1987. *Free Radical Res. Commun.*, (2), 131, (2001).

Di Mascio, P., Murphy, M. E., Sies, H., “Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols”, *American Journal of Clinical Nutrition*, 53, 194–200, (1991).

Dikici, İ., “Akut viral hepatitlerle interferon tedavisi görmüş kronik viral hepatitlerde oksidatif stresin araştırılması”, *Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı*, Uzmanlık Tezi, 73s, Konya, (1999).

Doğan, B., “Türkiye *Jurinea cass.* (Asteraceae) cinsinin revizyonu” Doktora Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya, (2007).

Doyle A, Griffiths J. B., “Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology”, *John Wiley&Sons*, 57(61), 62-64, (1998).

Duke J. A., “CRC Handbook of medicinal herbs”, *CRC Press*, Florida, 474-475, (1987).

Dülger B., Ceylan M., Alıtsaous M., Ugurlu E., “*Artemisia absinthium* l. (pelin)’un antimikrobiyal aktivitesi”, *Tr. J.of Biology*, 23(3), 377-384, (1999).

Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman H., Aytaç, Z., Adıgüzel, N., “Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı”, *Türkiye Tabiatını Koruma Derneği ve Yüzüncü Yıl Üniversitesi Yayınları*, Barışcan ofset, Ankara, (2000).

Engin, M. S., “Taflan (*laurocerasus officinalis roem.*) bitkisinin meyve, çekirdek ve yapraklarının mevsim değişikliğine göre antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi ve fenolik bileşik tayini”, Yüksek Lisans Tezi, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Tokat, (2007).

Erik, S. ve Tarıkahya, B., “Türkiye florası üzerine (about flora of turkey) kebiğeç”, 17, 139-163, (2004).

Fantal, A. G., “Reactive oxygen species in developmental toxicity; review and hypothesis”, *Teratology*, 53, 96-217, (1996).

Feng, S. S., Chien, S., “Chemotherapeutic engineering, application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases,” *Chemical Engineering Science*, 58, 4087–4114, (2003).

Fırat, S., “Kobaylarda radyasyonla oluşan akciğer hasarında doku glutatyon, glutatyon peroksidaz, glutatyon- S-transferaz düzeyleri ve N-asetil sistein’in bu sistem üzerindeki etkisi”, *Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Uzmanlık Tezi, 95s, Ankara, (1997).

Formica, J. V., Regelson, W., “Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids”, *Fd. Chem.Toxic*, 33 (12), 1061-1080, (1995).

Fowler, M. W., “Plants, medicines and man”, *J. Sci Food Agric*, 86, 1797-1804, (2006).

Garza-Ortiz, A., “Design, synthesis, characterization and biological studies of ruthenium and gold compounds with anticancer properties”, Doctoral Thesis, *Leiden Institute of Chemistry, Faculty of Science, Leiden University*, in Dutch, (2008).

Geçibesler, İ. H., “Stachys byzantina C. Koch. (dağ çayı) bitki ekstresinin antikanserojen ve insektisit aktivitelerinin incelenmesi ve aktif bileşenlerin izolasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Tokat, (2009).

Gençaslan, G., “Türkiyede tıbbi amaçla kullanılan bazı bitkilerin antioksidan özelliklerinin taranması”, Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Enstitüsü*, Ankara, 18 (2007).

Gökpınar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., ve Durmaz, Y., Algal “Antioksidanlar”, *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 23, 85-89, (2006).

Gözüm, S., Tezel A., Koç, M., “Complementary alternative treatments used by patients with cancer in eastern Turkey”, *Cancer Nurs*, (26) 230-6, (2003).

Grierson, A. J. C., Tanacetum L., In: P. H. Davis, Ed., “Flora of Turkey and east aegean islands”, Volume 5, *Edinburgh University Press*, Edinburgh, 295-311, (1975).

Guliyev, V. B., Harmandar, M., “Flavonoidler”, *Bakanlar Matbaacılık*, İstanbul, (1999).

Güenther E., “The essential oils”, *D. Van Nostard Company Inc.*, Vol. 5, Princeton, New Jersey, 481-485, (1948).

Gülçin, İ., “Isırgan otunun (*urtica dioica*) antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, oksidatif enzimlerinin karakterizasyonu ve bazı *in vivo* etkilerinin incelenmesi”, *Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, s114, (2002).

Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., Boyer, L., “Antioxidant activity of lignans from fringe tree (*Chionanthus virginicus L.*)”, *European Food Research and Technology*, 223, 759–767, (2006).

Güner A., Özhatay N., Ekim T., Başer K. H. C., “Flora of Turkey and east aegean islands”, Vol.11, *Edinburgh at the University Press*, Edinburgh, (2000).

Güven A., Yürekli A. K., “Fırat havzasında yayılış gösteren Tanacetum türlerinin ekonomik potansiyeli”, *6-8 Ekim 1986 Fırat Havzası Tıbbi Endüstriyel Bitkileri Sempozyumu*, Editörler: Baltepe, Ş., Babaç, M. T., Evren, H., 251-259, Elazığ, (1991).

Hacıbekiroğlu, I., “İris suaveolens’ten elde edilen bileşiklerin yapı tayini ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, (2009).

Halliwell, B., “Free radicals and metal ions in health and disease”, *Proceedings of the Nutrition Society*, 46, 13-26, (1987).

Halliwell, B., “reactive species and antioxidants, redox biology is a fundamental theme of aerobic life”, *Plant Physiol.*, 141, 312-322, (2006).

Halliwell, B., “Tell me about free radicals, doctor: a review”, *Journal of the Royal Society of Medicine*, 82, 747 -752, (1989).

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., “Free radicals in biology and medicine (3rd ed.)”, *Oxford University Press*, New York, (1999).

Halliwell, B., ‘‘Antioxidant and human disease: a general introduction’’, *Nutr. Rev.*, 55(1), 44-52, (1997).

Harborne, J. B. ve Marby, T. J., ‘‘The Flavonoids: Advances in Research’’, *Chapman and Hall*, London, (1982).

Harborne, J. B., Marby, T. J., Marby H., ‘‘The Flavonoids’’, *Chapman and Hall*, London, (1975).

Harmandar, M., Bilaloğlu, G. V., ‘‘Flavonoidler’’, 190, *Aktif Yayınevi*, Ankara, (1999).

Hegedus, A., Erdei S., Horvath, G., ‘‘Comparative studies of h<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress’’, *Plant Sci.*, 160, 1085–1093, (2001).

Herbert, R. B., ‘‘The biosynthesis of secondary metabolites’’, *2nd Ed. Chapman and Hall*, New York, USA, (1989).

Heywood, V. H., ‘‘Flowering plants of the world’’, *Oxford University Press*, Oxford, UK, 263-268, (1978).

Hong, V. and Wrolstad, R. E., ‘‘Cranberry juice composition’’, *Journal of The Association of Official Analytical Chemists*, 69(2), 199-207, (1986).

Jeney, E., Uri, J., ‘‘The Flavonoids’’, *Die Pharmazie*, 9, 553, (1954).

Kahraman, A., Serteser, M. Köken, T., ‘‘Flavonoidler’’, *The Medical Journal of Kocatepe*, (3), 1-8, (2002).

Kandemir, A., Makbul, S., ‘‘Erzincan’da yayılış gösteren bazı nadir bitki türleri üzerine gözlemler’’, *Erzincan Eğitim Fakültesi Dergisi*, 6(2), 37-49, (2004).

Keha, E., Küfrevioğlu, Ö. İ., ‘‘Biyokimya’’, *Aktif Yayınevi*, Erzurum, (2000).

Kılıç, E., ‘‘Tanacetum zahlbruckneri (Nāb.) Grierson Bitkisi Üzerinde Fitokimyasal Araştırmalar’’, Yüksek Lisans Tezi, *Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, (2007).

Kılınç, K. ve Kılınç, A., “Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri”, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 33(2): 110-118, (2002).

Kocabaş, N., “Homosisteinin indüklediği oksidatif stres üzerinde quercetin koruyucu etkisi”, Yüksek Lisans Tezi, *Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Biyokimya A.B.D., Afyonkarahisar, (2008).

Koçak, A., “Elazığ ve çevresinde yetişen Tanacetum L. (asteraceae) taksonlarının taksonomik yönden araştırılması”, Doktora Tezi, *Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Elazığ, (2008).

Kürkçüoğlu, M., “Sekonder metabolitler”, Bitki Kimyası ve Analiz Yöntemleri, *TC Anadolu Üniversitesi Yayını*, Eskişehir, (2010).

Larner, J. M., Grosh, W. W., “Mechanisms of action of antineoplastic drugs”, Broody’s Human Pharmacology (içinde), Minneman, K. P., Wecker, L. (Eds.), *Elsevier Mosby*, Pennsylvania, 523, (2005).

Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G. and Marinelli, F., “Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics”, *Antonie van Leeuwenhoek*, 78: 399-405, (2000).

Lemriss, S., Laurent, F., Couble, A., Casoli, E., Lancelin, J. M., Bonaccio, D., Rifai, S., Fassouane, A., Boiron, P., “Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes”, *Canadian Journal of Microbiology*, 49, 669-674, (2003).

Li, Y., Ma, C., Wang, Z., Chen, G., Ahn, K., Lazarus, P., Wu, R., “A disequilibrium model for detecting genetic mutations for cancer,” *Journal of Theoretical Biology*, 265, 218-224, (2010).

Liang, L., “Investigation of secondary metabolites of north sea bacteria: fermentation, isolation, structure elucidation and bioactivity”, *zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Georg-August-Universität zu Göttingen*, pp: 1-21, (2003).

Lodish, H., Berk, A., Matsudaire, P., Kaiser, A. C., Krieger, M., Scott, P. M., Zipursky, L. S. ve Darnell, J., “Molecular cell biology”, *W.H. Freeman and Company*, Fifth Edition, Newyork, ABD, 924-946, (2003).

Mabry, T. J. ve Markham, K. R., “Ultraviolet-visible and proton magnetic resonance spectroscopy of flavonoids”, İçinde Harborne, J. B., Mabry, T. J., ve Mabry H. (Eds.), *The Flavonoids*, London, **Chapman and Hall**, 46-47, (1975).

Mabry, T. J., Markham, K. R. ve Thomas, M. B., “The systematic identification of flavonoids”, Berlin, **Springer-Verlag**, 41-61, (1970).

Mabry, T. J., Ulubelen, A., **Agric and Food Chem.** 28, 188, (1980).

Madhavi, D. L., Deshpande, S. S. and Salunkhe, D. K., “Food antioxidants: technological, toxicological and health perspectives”, **Markel Dekker**, Newyork, 41-50 (1996).

Markesbery, W. R., “Oxidative stress hypothesis in alzheimeri disease”, **Free Radical Biology and Medicine**, 23(1), 134-147, (1997).

Madhavi, D. L., Deshpande, S. S. and Salunkhe, D. K., “Food antioxidants: technological, toxicological and health perspectives”, **Markel Dekker**, Newyork, pp 41-50, (1996).

Mathew, S. ve Abraham, T. E., “Studies on the antioxidant activities of cinnamon (cinnamomum verum) bark extracts, through various in vitro models”, **Food Chemistry**, 94, 520-528, (2006).

Mears, J. A., Mabry, T. J., “Phytochemistry”, 11, 411 (1972).

Mittler, R., “Abiotic stress, the field environment and stress combination”, **Trends Plant Sci.**, 11, 15-19, (2006).

Mittler, R., “Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance”, **Trends Plant Sci.**, 7, 405-410, (2002).

Mucciarelli, M. and Maffei, M., Wright, C.W., İn Editors, “Introduction to the genus”, **Taylor & Francis Publishing**, Newyork, 1-51, (2002).

Mycek, M. J., Harvey, R. A., “Farmakoloji”, **Güneş Kitabevi**, Ankara, 373, 374, (2001).

Newall C. A., Anderson L. A., Phillipson J. D., “Herbal medicines ‘a guide for health care professionals’”, *London Pharmaceutical Press*, London, (1996).

Newman, D. J., Cragg, G. M., Snader, K. M., “natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002”, *Journal of Natural Products*, 66, 1022-1037, (2003).

Newman, D. J., Cragg, G. M., “Natural products as sources of new drugs over the last 25 years”, *J. Nat. Prod.*, 70, 461-77, (2007).

Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E. Y. (Ed.), “İnsan biyokimyası”, *Palme Yayıncılık*, Ankara, (2002).

Oskay, M., Tamer, A., “Streptomyces kökenli antibiyotiklerin dünü, bugünü ve yarını”, *Journal of New World Science Academy*, 4, 48-60, (2009).

Oyaizu, M. “Antioksidative activities of products of browning reactions prepared from glucosamine”, *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315, (1986).

Özhatay, N. and Kültür, Ş., “Check-list of additional taxa to the supplement flora of Turkey III”, *Tr. J. Bot.*, 30, 281-316, (2006).

Özyürek, M., “Reaktif oksijen türleri süpürücü antioksidan aktivitenin ölçümünde modifiye cuprac yöntemlerinin geliştirilmesi”, *İstanbul Üniversitesi*, Doktora tezi, İstanbul, (2008).

Park, E. J., Kim, Y., Kim, J., “College of Pharmacy”, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea, *J. Nat. Prod.*, 63 (1), pp 34–36, (2000)

Pecorino, L., “Molecular biology of cancer”, *Oxford University Press*, (2005).

Pütün, E. A., “Centaurea thracica (Janka) hayek ve centaurea pichleri boiss, subsp. pichleri flavonoidleri”, Doktora tezi, *T.e. Anadolu D. Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Eskişehir., (1987).

Primack, R. B., Dönmez, A., Dönmez, E. O., “Koruma Biyolojisi”, s.274-275, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, (2012).

Ramachandra, R. S., Ravishankar, G. A., ‘‘Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites’’, *Biotechnology Advances*, (20), 101-153, (2002).

Rao, R. S., Ravishankar, G. A., ‘‘Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites’’, *Biotechnology Advances*, 20, 101-153, (2002).

Rauha, J. P., Tammela, P., Summanen, J., Vuorela, P., Kahkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., Kujala, T., Pihlaja, K., Törnquist, K. and Vuorela, H., ‘‘Action of some plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds on calcium fluxes in clonal rat pituitary GH4C1 cells’’, *Pharm. Pharmacol. Lett.*, 9, 66-69, (1999).

Reische, D., ‘‘Food lipids chemistry’’, *Nutrition and Biotechnology*, New York, Marcel Dekker Inc., pp., 489-516, (2002).

Robards, K. and Antolovich, M., ‘‘Analytical chemistry of fruit bioflavonoids review’’, *Analyst*, 122, (11R–34R.), (1997).

Rommel, A., Wrolstad, R. E. and Heatherbell, D. A., ‘‘blackberry juice and wine: processing and storage effects on anthocyanin composition, color and appearance’’, *Journal of Food Science*, 57, 385, (1992).

Ross, J. J., Arnason, J. T., Birnboim, H. C., ‘‘Low concentrations of the feverfew component parthenolide inhibit in vitro growth of tumor lines in a cytostatic fashion’’, *Planta Med* 1999, 65 (2), 126-129, (2003).

Ryzsnyak, S., and Szent-Greorgy, A., ‘‘Nature’’, (138) 27, (1936).

Sertsever, A., Gök, V., ‘‘Doğal antioksidanların biyoyararlılığı’’, 3. *Gıda Mühendisliği Kongresi*, 2-4 Ekim, Ankara, 83-98, (2003).

Sezik, E., Yeşilada E., ‘‘Essential oils ‘uçucu yağ taşıyan türk halk ilaçları’’’, 98 123, *Eskişehir Anadolu Üniversitesi Yayinevi*, Eskişehir, (1999).

Sinici, İ., ‘‘Genomiksin kanserdeki yeri’’, *II. Klinik Biyokimya ve Kanser Sempozyumu Özet Kitabı*, 16-18 Nisan 2004 Bursa, Bursa: Akmat Akinoğlu Matbaa San. Tic. Ltd. Şti., 110-112, (2004).

Smith, D. A., Banks, S. W., ‘‘Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological and structure activity relationship’’, 113-124, (1986).



Somogyi, A., Rosta, K., Pusztai, P., Tulassay, Z., Nagy, G., “Antioxidant measurements”, *Physiological Measurement*, 28, 41-55, (2007).

Summanen, J., Vuorela, P., Rauha, J. P., Tammela, P., Marjamaki, K., Pasternack, M., Törnquist, K. and Vuorela, H., “Effects of simple aromatic compounds and flavonoids on  $Ca^{+2}$  fluxes in rat pituitary GH4C1 cells”, *Eur. J. Pharmacol.*, 414, 125-133, (2001).

Şahin, A., “Bazı Centaurea Türlerinin Antiproliferatif Etkileri ve Aktif Bileşenlerin İzolasyonu”, Doktora Tezi, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Tokat, (2010).

Tadeg, H., Mohammed, E., Asres, K., Mariam, T. G., “Antimicrobial activities of some selected traditional ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders”, *J. of Ethnopharmacol.*, 100 (1), 168-175, (2005).

Temple, N. J., “Antioxidants and disease: more questions than answers”, *Nutritional Research*, 20, 449-459, (2000).

Tiwari, S., “Plants: A rich source of herbal medicine”, *Journal of Natural Products*, 1, 27-35, (2008).

Topçu, G., Eris, C., Kurucu, S., Ulubelen, A., *Tr. J of Chemistry*, 20, 265, (1996).

Vining, L.C., “Functions of secondary metabolites”, *Annual Review of Microbiology*, 44, 395-427, (1990).

Vogel, G., “Pharmacognosy and Phytochemistry”, 731, (Eds. Wagner, H., Hörhammer, L.), Berlin, (1971).

Voorhoeve, P. M. “MicroRNAs: oncogenes, tumor suppressors or master regulators of cancer heterogeneity?,” *Biochimica et Biophysica Acta 1805*, 72–86, (2010).

Wang, W., Adachi, M., Kawamura, R., Sakamoto, H., Hayashi, T., Ishida, T., et al. “Parthenolide-induced apoptosis in multiple myeloma cells involves reactive oxygen species generation and cell sensitivity depends on catalase activity”, *Apoptosis*, 11, 2225-2235, (2006).

Wen, J., You, K. R., Lee, S. Y., Song, C. H., Kim, D. G., “Oxidative stress mediated apoptosis, the anticancer effect of the sesquiterpene lactone parthenolide”, *J. Biol Chem*, 277 (41), 38954-38964, (2002).

Wilson, E. O., “Biodiversity”, *National Academic Press*, Washington, (1986).

World Health Organization Geneva, WHO 2002-2005, Traditional Medicine Strategy. 29-74.

Wrolstad, R. E., Durst, R. W. and Lee, J., “Tracking color and pigment changes in anthocyanin products”, *Trends in Food Science and Technology*, 16(9), 423-428, (2005).

Wu, C., Chen, F., Rushing, J. W., Wang, X., Kim, H. J., Huang, G., et al. “Antiproliferative activities of parthenolide and golden feverfew extract against three human cancer cell lines”, *J. Med Food*, 9(1), 55-61, (2006).

Xadjay, Y.A., *Farmakol, toksikol*, 7, 46, (1972).

Zang, S., Ong, C. N., Shen, H. M., “Critical roles of intracellular thiols and calcium in parthenolide-induced apoptosis in human colorectal cancer cells”, *Cancer Lett* 208 (2), 143-153, (2004).

Zaprometov, M. N., “Biochimiya katechinov”, *M. Nauka*, 295, (1964).

## ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Erzincan'da doğdu. İlköğrenim, orta ve lise öğrenimini Erzincan'da tamamladı. Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nden 2013 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.

