



***MENTHA DUMETORUM* BİTKİSİNDEKİ POLİMETOKSİ
FLAVONLARIN İZOLASYONU, YAPI TAYİNİ VE
ANTİPROLİFERATİF AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

ERDEM OZAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KİMYA ANA BİLİM DALI
Prof. Dr. Ramazan ERENLER
Nisan - 2019
Her hakkı saklıdır**

T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANA BİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MENTHA DUMETORUM BİTKİSİNDEKİ POLİMETOKSİ
FLAVONLARIN İZOLASYONU, YAPI TAYİNİ VE
ANTİPROLİFERATİF AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

ERDEM OZAN

TOKAT
Nisan - 2019

Her hakkı saklıdır



Bu tez çalışması;

**Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK, No: 214Z209)
tarafından desteklenmiştir.**

Erdem Ozan tarafından hazırlanan “*Mentha Dumetorum* Bitkisindeki Polimetoksi Flavonların İzolasyonu, Yapı Tayini Ve Antiproliferatif Aktivitelerinin Belirlenmesi” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 19 NİSAN 2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü KİMYA ANA BİLİM DALI nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Ramazan ERENLER

Üye
Prof. Dr. Ömer Işıldak

Üye
Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin Akşit

Erdem Ozan
Ömer Işıldak
Hüseyin Akşit



Prof. Dr. Çetin ÇEKİÇ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

22-04/2019

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

ERDEM OZAN

19 Nisan 2019

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***MENTHA DUMETORUM* BİTKİSİNDEKİ POLİMETOKSİ FLAVONLARIN İZOLASYONU, YAPI TAYİNİ VE ANTİPROLİFERATİF AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

ERDEM OZAN

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANA BİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. RAMAZAN ERENLER)

Bu çalışmada, *Mentha dumetorum* bitkisinin toprak üstü kısmı suda kaynatıldı, soğutulup süzöldükten sonra sıvı kısım hekzan ile partitasyon yapıldı. Hekzan fazı ayırma hunisi ile ayrıştırıldı ve çözücü uzaklaştırılarak ham ekstrakt elde edildi. Hekzan ekstraktından, sefadeks LH-20, silika jel, preparatif TLC ve HPLC gibi kromatografik yöntemlerle yedi polimetoksi flavon türevi izole edildi. İzole edilen bileşiklerin yapıları spektroskopik yöntemlerle (¹H and ¹³C-NMR, LC-TOF-MS ve UV) belirlendi. İzole edilen bileşikler, ksantomikrol (MD-1), 5-hidroksi-6,7,8,4'-tetrametoksi flavanon (MD-2), 5-desmetil sinensetin (MD-3), 5-demetil nobiletin (MD-4), gardenin B (MD-5), 5-hidroksi-6,7,8,3',4'-penta metoksi flavanone (MD-6) ve 5-hidroksi-6,7,4'-trimetoksi flavone (MD-7) olarak tanımlandı. İzole edilen moleküllerin kantitatif analizleri LC-TOF-MS cihazı ile yapıldı. Moleküllerin toplam miktarı; hekzan ekstraktının % 6.2'si, kuru biyokütlenin % 0,12'si olarak hesaplandı. İzole edilen moleküllerin anti kanser aktiviteleri real-time hücre analizörü kullanılarak HeLA (insan servikal kanser hücre hattı) ve HT29 (insan kolon kanser hücre hattı) hücre hatları üzerinde değerlendirildi. Diğer moleküller ile karşılaştırıldığında MD-2 ve MD-5 moleküllerinin her iki hücre hattında da en yüksek aktivite gösterdiği tespit edildi.

2019, 38 Sayfa

ANAHTAR KELİMELEER: *Mentha dumetorum*, Polimetoksi flavonlar, Antikanser aktivite

ABSTRACT

MASTER THESIS

ISOLATION, IDENTIFICATION OF POLYMETHOXY FLAVONOIDS FROM
MENTHA DUMETORUM AND INVESTIGATION OF THEIR
ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITIES

ERDEM OZAN

TOKAT GAZIOSMANPASA UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

(SUPERVISOR: PROF. DR. RAMAZAN ERENLER)

In this study; Aerial part of *Mentha dumetorum* was boiled in water. After cooling and filtered, the liquid part was partitioned with hexane. Hexane phase was separated by separatory funnel then; the solvent was removed under reduced pressure to yield the crude extract which was subjected to chromatographic techniques (sephadex LH-20, silica gel, preparative TLC and HPLC) to isolate seven polymethoxy flavonoids. The isolated compounds, xanthomicrol (MD-1), 5-hydroxy-6,7,8,4'-tetramethoxy flavonone (MD-2), 5-desmethyl sinensetin (MD-3), 5-demethyl nobiletin (MD-4), gardenin B (MD-5), 5-hidroxy-6,7,8,3',4'-penta methoxy flavanone (MD-6) and 5-hidroxy-6,7,4'-trimethoxy flavone (MD-7) were elucidated by spectroscopic techniques (^1H and ^{13}C -NMR, LC-TOF-MS ve UV). Isolated compounds were quantified using a LC-TOF-MS instrument. The total amount of isolated polymethoxylated flavones was calculated as % 6.2 of hexane extract and % 0.12 of dry biomass. The anti-cancer effects of isolated compounds were evaluated using a real-time cell analyzer–single plate (RTCA-SP) instrument against HeLA (Human Cervix Carcinoma) and HT29 (Human Colorectal Adenocarcinoma) cell lines. MD-2 and MD-5 were found to reveal the most activity against both cell lines compared the all other isolated polymethoxylated flavones.

2019, 38 PAGE

KEYWORDS: *Mentha dumetorum*, Polimethoxylated flavones, Anti-cancer activity

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim boyunca gerek ders aşamasında gerekse tez aşamasında bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, benim için her zaman yol gösterici olan değerli hocam Prof. Dr. Ramazan ERENLER'e

Tez yazma aşamasında tecrübe ve bilgi birikimini bana aktaran Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ'a

Çalıştığım bitki hakkında bilgi birikimini benimle paylaşan ve bitkiyi temin etme konusunda yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. İsa TELCİ' ye;

Gerek laboratuvar çalışmalarında gerekse tezimi yazma aşamasında bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen Dr. Öğretim Üyesi Hüseyin AKŞİT'e, lisans ve yüksek lisans arkadaşım İlyas Yıldız'a

Bölümümüzün her türlü imkânından faydalanmamı sağlayan Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü yöneticilerine ve manevi desteğini esirgemeyen bütün öğretim elemanlarına;

Bütün hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan canım aileme;

Çok teşekkür ederim.

Erdem OZAN
19 Nisan 2019

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	5
3.1. Bitki Örnekleri	5
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	5
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	7
4.1 Polimetoksi Flavonların Bitki Örneğinden Özütleme	7
4.2 Ayırma ve Saflaştırma	7
4.3 Yapı Tayini	11
4.4 Kantitatif Analiz.....	15
4.5 Antikanser Aktivite.....	17
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	20
6. KAYNAKLAR	22
7. EKLER	24
7.1 EK-1. MD-1 Molekülüne Ait Spektral veriler	24
7.2 EK-2. MD-2 Molekülüne ait Spektral veriler.....	26
7.3 EK-3. MD-3 Molekülüne ait Spektral veriler.....	29
7.4 EK-4. MD-4 Molekülüne ait Spektral veriler.....	31
7.5 EK-5. MD-5 Molekülüne ait Spektral veriler.....	33
7.6 EK-6. MD-6 Molekülüne ait Spektral veriler.....	35
7.7 EK-7. MD-7 Molekülüne ait Spektral veriler.....	36
8. ÖZGEÇMİŞ	38

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Açıklama

g	Gram
kg	Kilogram
L	Litre
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimol
ppm	Milyonda bir kısım
%	Yüzde

Kısaltmalar

Açıklama

DMSO	Dimetilsülfoksit
DMSO-d ₆	Dötero Dimetilsülfoksit
EtOAc	Etilasetat
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
MeOH	Metanol
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
P-HPLC	Preparatif Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
LC-TOF-MS	Uçuş zamanlı Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
IC ₅₀	Yüzde Aktivitenin Yarıısı Kadar Aktivite Gösteren Derişim

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4. 1. Preperatif HPLC uygulaması: ayrılan ve saflaştırılan maddelerin HPLC kromatogramları.....	8
Şekil 4. 2. Polimetoksi flavonların izolasyon şeması	9
Şekil 4. 3. Ham özüt ve izole edilen moleküllerin LC-TOF-MS kromatogramları.....	10
Şekil 4. 4. Ham özütten izole edilen moleküller.....	10
Şekil 4. 5. <i>Mentha dumetorum</i> bitkisinden izole edilen polimetoksi flavonların kimyasal yapıları.....	15
Şekil 4. 6. Kantitatif analizde elde edilen farklı derişimlerin LC-TOF kromatogramları.....	16
Şekil 4. 7. İzole edilen moleküllerin HeLA hücrelerine karşı aktiviteleri.....	19
Şekil 4. 8. İzole edilen moleküllerin HT29 hücrelerine karşı aktiviteleri	19

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 4. 1. İzole edilen moleküllerin ^{13}C -NMR değerleri	13
Çizelge 4. 2. İzole edilen moleküllerin ^1H -NMR verileri	14
Çizelge 4. 3. İzole edilen moleküllerin özüt ve kuru bitkideki miktarları	16
Çizelge 4. 4. İzole edilen moleküllerin anti kanser aktivitelerinin aktivitesi	17

1. GİRİŞ

Mentha cinsinin türleri hızlı gelişen, çok yıllık bitki türleridir. Önemli miktarda rosmarinik asit, polifenoller (örneğin flavon türevleri ve organik asitler) içerir. Lamiaceae familyasına ait olan *Mentha* cinsi 18 tür ve 11 hibrit içerir. *Mentha dumetorum* bitkisi *Mentha longifolia* ve *Mentha aquatica* türlerinin bir hibridi olan çok yıllık bir türdür ve acımsı bir tada sahiptir. Türkiye’de nane olarak bilinen *Mentha* türleri, gıda sektöründe önemli bir kullanıma sahiptir.

Nane, Türk kültüründe; şerbetlere aroma, yemeklerde ve çorbalarda baharat; nezle ve soğuk algınlığı gibi bazı rahatsızlıklarda da ilaç olarak kullanılmıştır. Nane türleri, bu özelliklerinden dolayı dünyada ve ülkemize araştırmacıların ilgisini cezbeden tıbbi, aromatik ve şifalı bir bitki olma özelliğini halen korumaktadır. Ülkemizde nane türleri üzerinde yapılan çalışmaların büyük bir uçucu bileşenlerinin belirlenmesi ve bu bileşenlerin değişik stres, mevsimsel ve coğrafik koşullara göre değişimine odaklanmıştır. Literatürdeki çalışmaların küçük bir kısmı ise; nane türlerinin polifenolik (flavanoid ve organik asit) içeriğini tanımlamaya yöneliktir.

Doğal olarak yayılış gösteren veya kültüre edilebilen bitki örneklerinin içeriklerinin belirlenmesi onların ekonomik değerlerindeki artışa sebep olmaktadır. Gıda, kozmetik ve ilaç sanayisinde kullanılabilecek değerli moleküllerin varlığının tespiti, miktar analizi, kolay izolasyon tekniklerinin belirlenmesi, doğal kaynakların ekonomiye kazandırılmasının önemli basamaklardır. Bu bağlamda; bu çalışmada, henüz diğer nane türleri kadar tanınmamış, içeriği hakkında sınırlı bilgiye sahip olunan *Mentha dumetorum* bitkisinden potansiyel antikanser ajanlarının saflaştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmanın asıl odak noktası olan polimetoksi flavon türevleri, iki ya da daha çok metoksi grubu taşıyan flavon ya da flavanonlar olarak tanımlanır. Polimetoksi flavonların değişik doğal kaynaklardan elde edilmeleri ve bunların farklı kanser hücre kültürlerine karşı antikanser potansiyelleri birçok çalışmaya konu olmuştur.

Bu çalışmada flavon iskeletine farklı konumlardan bağlı metoksi grubu taşıyan moleküller değişik kromatografik yöntemler kullanılarak başarı ile izole edilerek yapıları aydınlatıldı. İzole edilen yedi polimetoksi flavonların tamamı bilinen moleküller olmasına rağmen bu bitki örneğinden ilk defa izole edildi.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Günümüzde; kanser en yaygın görülen hastalıkların başında gelmektedir. Hastalığın tedavisinde sentetik yarı sentetik veya doğal ilaçlar kemoterapi ajanı olarak kullanılmaktadır. Bir çok kanser türünün tedavisinde kullanılan sentetik kemoterapi ilaçlarının sağlıklı hücrelere de zarar vermesinden dolayı hastaların iyileşme süreleri uzatmakta ya da yaşamlarını yitirmektedir. Bundan dolayı; normal/sağlıklı hücreler üzerinde etki göstermeyen ya da en az kötü etkiyle anormal hücrelerin çoğalmasını seçici olarak engelleyecek yeni ilaçların geliştirilmesi gereklidir. İlaç geliştirme prosesinin ilk basamağı; hücresel ortamda aktivitenin ortaya konulmasıdır. Bunu hayvan deneyleri ve klinik testler takip etmektedir. Doğal kaynaklardan antikanser ilaç adayı moleküllerin keşfi, bitki ekstraktlarının ayırma ve saflaştırma işlemlerine tabi tutulması ve ayrılan her molekülün tekrar aynı testlerden geçirilmesi ile mümkündür.

Polimetoksi flavon kavramı 2 ya da daha fazla metoksi grubu taşıyan flavon türevleri olarak bilinir. Metoksi grubunun hidrofobik olmasından dolayı polimetoksi flavonlar hidroksi grubu taşıyanlara göre daha hidrofobik özelliğe sahiptir. Bundan dolayı polimetoksi flavonlar; insan vücudunda ince bağırsaklarda daha fazla absorbe edilebilir (Ho and Kuo 2014; Li et al. 2006). Sonuç olarak da vücut içinde hedef dokulara ulaşması daha kolay olacaktır (Walle 2007).

Bu güne kadar yapılmış çalışmalarda polimetoksi flavonların; antiinflamatuvar (Manthey et al. 2001), antioksidan (Anagnostopoulou et al. 2005), antialerjik (Kobayashi and Tanabe 2006) gibi birçok biyolojik aktiviteleri incelenmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda ise polimetoksi flavonların antikanser özelliği dikkat çekmektedir. Örneğin; nobiletin (3',4',5,6,7,8-hekzametoksi flavon) limon kabuğunda bol miktarda bulunan bir polimetoksi flavon türevidir. Nobiletin 'in prostat kanseri (Tang et al. 2007), mide kanseri (Yoshimizu et al. 2004), böbrek kanseri (Ohnishi et al. 2004), deri kanseri (Murakami et al. 2000) gibi kanser hücrelerine karşı etkisi araştırmacılar tarafından incelenmiş ve anti kanser aktivitesinin yüksek olduğu ortaya konulmuştur.

Tanacetum canensis bitkisinden izole edilen Salvigenin (3',6,7-trimetoksi flavon) molekülünün meme kanserine karşı önemli bir etkisinin olduğu rapor edilmiştir (Noori et al. 2013). Bir diğer polimetoksi flavon türevidir olan ksantomikrol'ün (4',5-dihidroksi-6,7,8-trimetoksi flavon) bazı kötü huylu tümörlere karşı standart olarak kullanılan kemoterapi ajanından daha seçici aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Jahaniani et al. 2005).

Narenciye kabuklarında majör olarak bulunan polimetoksi flavonların (Tangeretin, Nobiletin, 5-demetilnobiletin) SH-SY5Y (kötü huylu sinir sistemi tümörü) hücre hattına karşı tümör büyüme engelleyicisi olarak davrandığı rapor edilmiştir (Akao et al. 2008). Ayrıca tangeretin ve nobiletin moleküllerinin sinir sistemi iltihabını önleyici etkisi (Ho and Kuo 2014) ve kolon ve meme kanserine karşı antiproliferatif aktivitesi belirlenmiştir (Morley et al. 2007).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Bitki Örnekleri

Çalışmaya konu olan bitki materyalleri Prof. Dr. İsa TELCİ koordinatörlüğünde Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi uygulama arazisinde kültüre edildi. Bitki örnekleri Haziran 2015'te hasat edildi.

3.2 Kullanılan Cihazlar

NMR spektrumları Bruker Avence II marka cihazda (400 MHz) uygun çözücülerle (MeOD-d₄, CDCl₃) çözülerek kaydedildi. Spektrumlar Mestrenova v6.2.0 yazılımı ile işlendi.

İzole edilen moleküllerin HR-MS spektrumları Agilent 6210 model LC-TOF-MS cihazında, ZORBAX SB-C18 (4.6 x 100 mm, 3.5 µm) kolon üzerinden 0,6 mL/dakika akış hızı ile Su (%0.1 formik asit):ACN mobil fazlarının 0-1 dakika 90:10 1-20 dakika 50:50'ye lineer gradient, 20-23 dakika 20:80'e lineer gradient, 23-25 dakika 10:90 lineer gradient, 23-30 dakika 90:10 izokratik elüsyon uygulanarak kaydedildi. Pozitif iyon modunda, iyonlaşma enerjisi 175 eV olarak uygulandı.

UV dalga boyu taramaları, metanol içinde 10 ppm'lik derişimlerde Shimadzu 20AT model DAD dedektörlü HPLC cihazında yapıldı. Thermo C18 (4.3X20 cm, 5 µm) ters faz kolon üzerinden elüsyon gerçekleştirildi. Mobil faz programı şu şekildedir; su (%1 formik asit):meOH, 1 mL/dakika akış hızı ile 75:25'den 50:50'ye 30 dakikalık lineer gradient uygulandı. Kolon fırını sıcaklığı 30 °C olarak ayarlandı. Saflaştırılan her molekülün UV dalga boyu taraması DAD dedektörü 600-200 nm aralığında tarama yapılarak kaydedildi

İzole edilen moleküllerin kantitatif analizleri; Agilent 6210 model LC-TOF-MS cihazında, ZORBAX SB-C18 (4.6 x 100 mm, 3.5 µm) kolon üzerinden 0,7 mL/dakika akış hızı ile Su (%0.1 formik asit içeren): ACN mobil fazlarının 0-1 dakika 75:25, 1-20 dakika 50:50'ye lineer gradient elüsyon uygulanarak kaydedildi. Pozitif iyon modunda, iyonlaşma enerjisi 175 eV olarak uygulandı. Moleküllerin kalibrasyon eğrileri 50, 100, 250, 500, 2500, 5000 ppb derişimlerde 6 noktalı ve 3 tekerrürlü analiz yapılarak çizildi. (Erenler et al. 2015).



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Polimetoksi Flavonların Bitki Örneğinden Özütleme

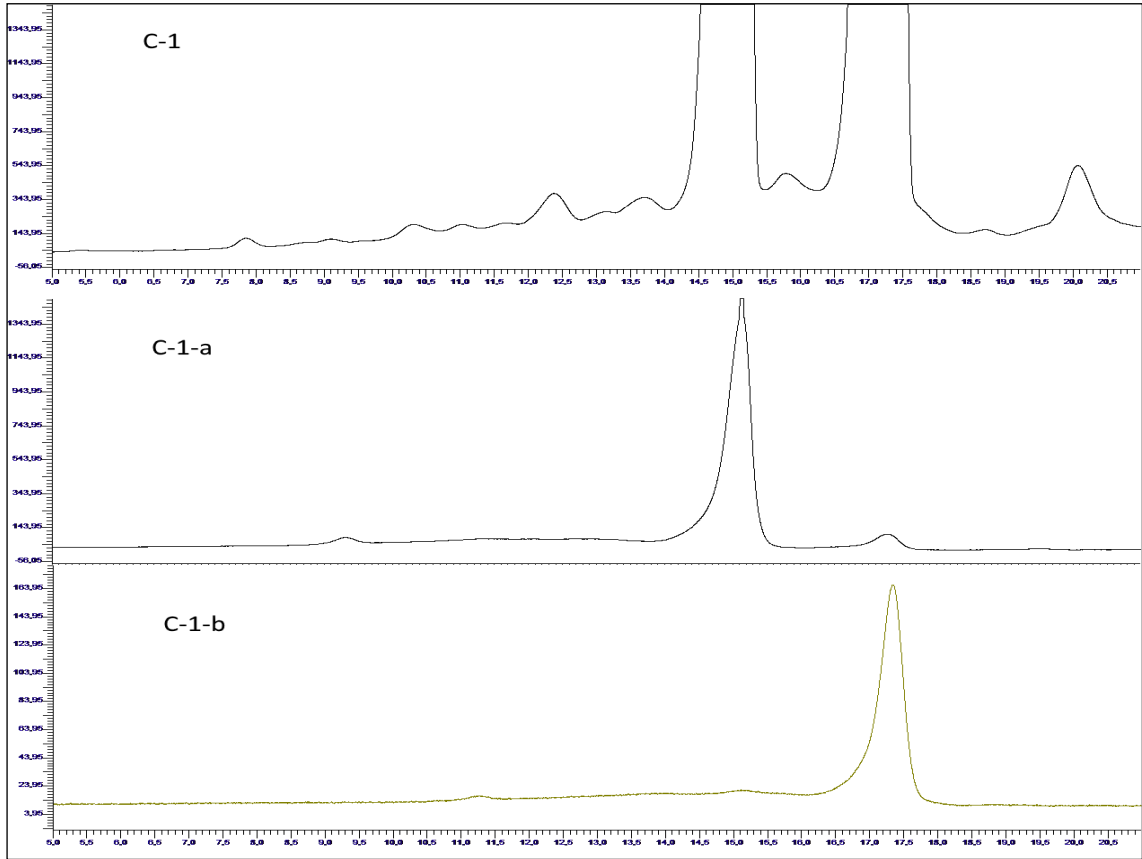
Kurutulmuş bitki örnekleri (1.0 kg) 5 L sıcak suda açık atmosferde 1 saat kaynatıldı ve oda sıcaklığına kadar soğutuldu. Bitki posası filtre kâğıdı ile süzülerek uzaklaştırıldı. Bitkinin su özütünden küçük parçalar alınarak eş hacimli hekzan ile ayırma hunisinde partisyona tabi tutuldu. Organik fazlar birleştirilerek dönel buharlaştırıcıda çözücü uzaklaştırıldı. Koyu sarı renkli yarı akışkan bir sıvı elde edildi (~2 g). Yapılan partitasyon işlemi ile yüksek polariteli metabolitlerin sulu fazda kalması sağlanarak hedef moleküller olan nispeten düşük polariteye sahip polimetoksi flavonlarca zenginleştirilmiş özüt elde edilmiş oldu.

4.2 Ayırma ve Saflaştırma

Elde edilen özüt metanol: kloroform karışımı ile çözülerek 100 g sefadeks LH-20 içeren kolon (3.5 × 70 cm cam kolon) üzerinden fraksiyonlandırıldı. Yürütücü olarak 0.5 ml/dakika akış hızı ile 65/35, MeOH/CHCl₃ karışımı kullanıldı. Kolona bağlanan ve 15 dakikada bir fraksiyon toplayacak şekilde ayarlanan kolektör yardımıyla 40 fraksiyon toplandı. Toplanan ilk 20 fraksiyonun yapılan İTK analizi sonunda polimetoksi flavonları içermediğinden; bu aralık çalışmaya dâhil edilmedi. İTK profiline göre benzer maddeleri içeren 21-25 (A), 26-28 (B), 29-36 (C) ve 37-40 (D) fraksiyonları birleştirildi. 37-40 (D) aralığından (MD-1) renksiz iğne kristaller halinde saf olarak elde edildi.

29-36 aralığı (C) 50 g sefadeks LH-20 içeren kolon (2 × 90 cm) üzerinden 0.25 mL/dakika akış hızı ile metanol kullanılarak fraksiyonlandırıldı. Her 10 dakikada bir fraksiyon olacak şekilde 35 fraksiyon toplandı. **8-14 (C-1)**, 15-28 (C-2) ve **29-35 (C-3)** aralıkları İTK analizine göre birleştirildi. 29-35 (C-3) aralığında; cam çeperine yapışık ve renksiz iğne kristaller (MD-1) ve kabin tabanında küre şeklinde kristallenen sarı renkli kristaller olmak üzere iki maddenin farklı şekilde kristallendiği gözlemlendi. Küre şeklindeki kristaller cam baget yardımı ile koparılarak ortamdan alındı ve metanol içinde oda şartlarında tekrar kristallendirildi (MD 2).

8-14 (C-1) aralığı 75/23/2 su/MeOH/formik asit karışımında (2.0 mL) çözülerek preparatif HPLC uygulaması ile ayrıldı. Her seferinde 200 µL hacimlerinde enjeksiyon yapılarak analiz 10 tekrarlı yapıldı. Bütün çalışmalarda toplanan maddelerin çözücülerini uzaklaştırıldı. C-1-a (MD-3) ve C-1-b (MD-4) bu uygulamadan yüksek saflıkta elde edildi. Elde edilen kromatogramlar aşağıda verilmiştir.



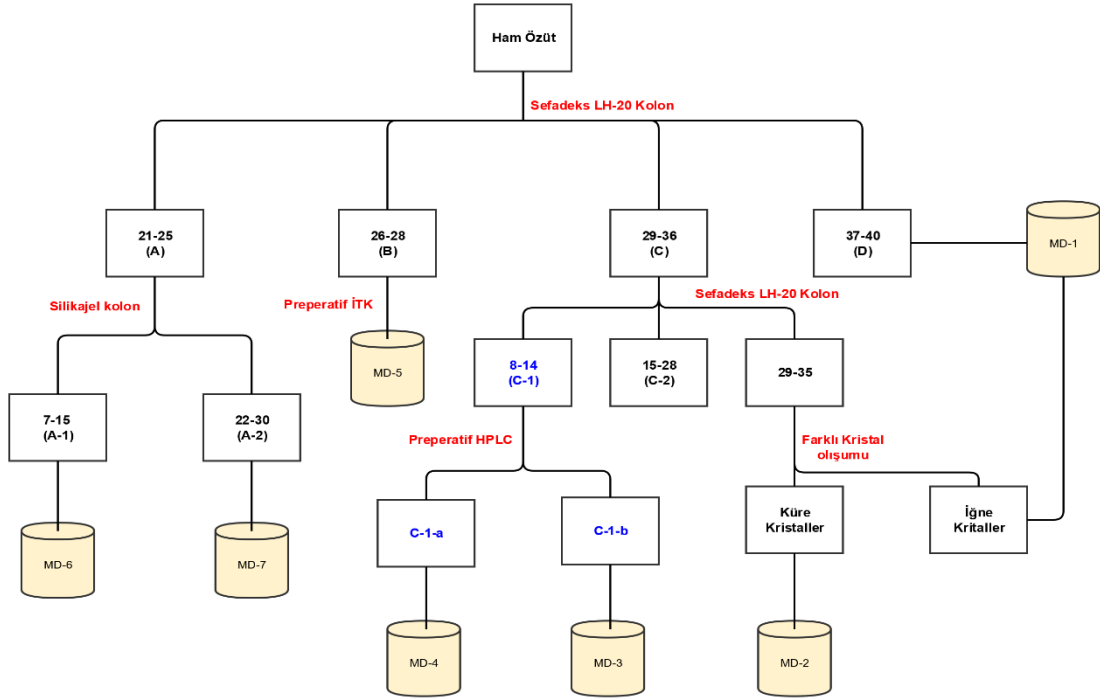
Şekil 4. 1. Preparatif HPLC uygulaması: ayrılan ve saflaştırılan maddelerin HPLC kromatogramları

B (26-28) aralığından preparatif İTK uygulaması ile MD-5 saf olarak elde edildi. Çalışmada B aralığı 10 ayrı İTK tabakasına uygulandı. Yürütücü olarak 60/40 hekzan/etil asetat kullanıldı. Her uygulamada $R_f = 0,6$ olan bantlar kazınarak alındı. Madde silika jel yüzeyinden yeterli miktarda 50/50 MeOH/CHCl₃ ile alınarak çözücülerini uzaklaştırıldı.

A(21-25) aralığı silikajel dolgululu kolonda (500 g silikajel, 3.5 × 60 cm) fraksiyonlandırıldı. Kolon 60/40 hekzan/etil asetat karışımı ile şartlandırıldı. Ayrılmak istenen karışım da aynı sistemde çözülerek kolona tatbik edildi. Yürütücü faz olarak da

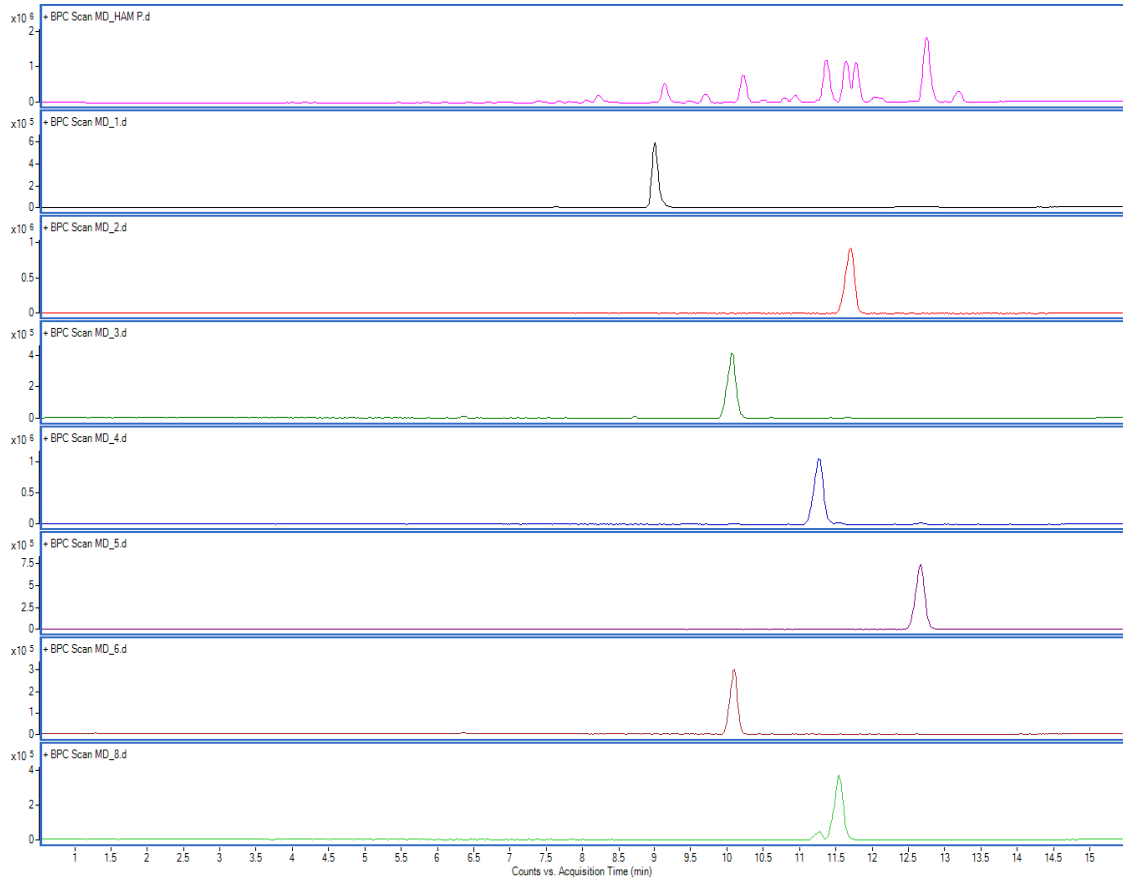
aynı sistem kullanıldı. Kolon musluğu kısılarak 20 dakikada bir fraksiyon (yaklaşık 15 mL) olacak şekilde akış hızı ayarlandı. Toplanan 30 fraksiyondan 7-15 aralığı (A-1) MD-6'yı 22-30 aralığı (A-2) MD-7'yi verdi.

Ham bitki özütünden polimetoksi flavonların izolasyonunu özetleyen şema aşağıda sunulmuştur.

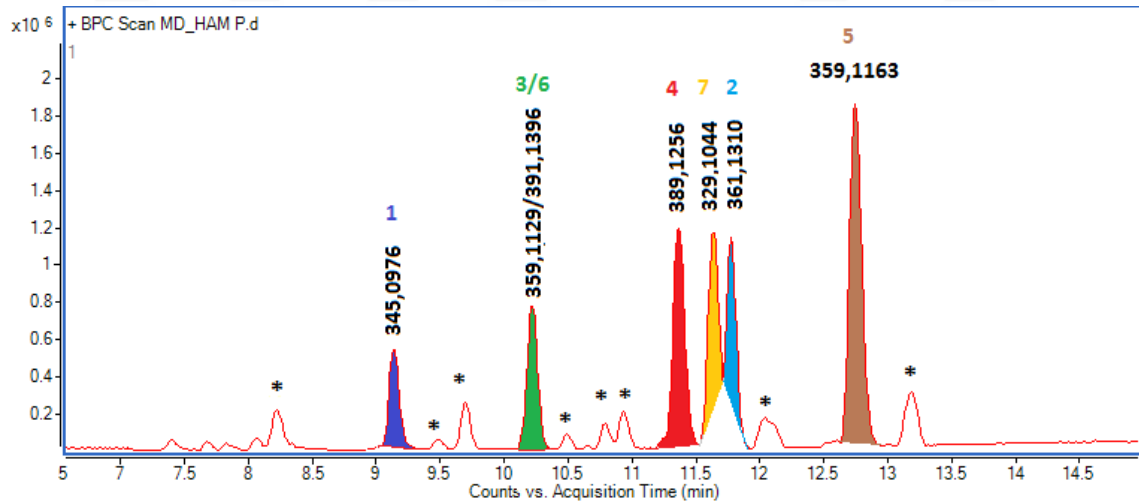


Şekil 4. 2. Polimetoksi flavonların izolasyon şeması

Ham özüt ve izole edilen moleküllerin LC-TOF kromatogramları aşağıda sunulmuştur. Şekil incelendiğinde bitki örneğinde bulunan polimetoksi flavonların 7 tanesi oldukça yüksek saflıkta elde edildiği görülmektedir.



Şekil 4. 3. Ham özüt ve izole edilen moleküllerin LC-TOF-MS kromatogramları



Şekil 4. 4. Ham özütten izole edilen moleküller

Yukarıdaki şekilde izole edilen moleküller ham özütün LC-TOF kromatogramında farklı renklerde vurgulanmıştır. Şekil 4.4 incelendiğinde; özütte major olarak bulunan polimetoksi flavonların izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ham özütün LC-TOF kromatogramında 3 ve 6 numaralı moleküller üst üste çakışık olarak gelmiştir. Ancak

ayırma ve saflaştırma basamaklarından sonra her birinin bireysel LC-TOF-MS spektrumları kaydedilmiştir.

4.3 Yapı Tayini

4.3.1 5,4'Dihidroksi-6,7,8-trimetoksi flavon (Ksantomikrol) (MD-1)

MD-1 molekülü renksiz iğne kristaller olarak elde edildi ve spektral veriler (^1H ve ^{13}C -NMR, MS) değerlendirilip, literatürle (Jahaniani et al. 2005) karşılaştırılarak 5,4'dihidroksi-6,7,8-trimetoksi flavon (Ksantomikrol) olarak tanımlandı. Spektral veriler (EK-1) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 345.0976, λ_{max} 334, 296 nm olarak ölçülmüştür.

Moleküle ait ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları Ek-1'de ^1H -NMR verileri Çizelge 4.2'de ^{13}C -NMR verileri ise Çizelge 4.1'de verilmiştir.

4.3.2 5-Hidroksi-6,7,8,4'-tetrametoksi flavanon (MD-2)

MD-2 molekülü sarı renkli top şeklinde kristaller halinde elde edildi ve spektral verileri (^1H -NMR, MS) literatürle (Jin ve ark., 2015) karşılaştırılarak 5-hidroksi-6,7,8,4'-tetrametoksi flavanon olarak tanımlandı. Spektral veriler (EK-2) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 361.1310, λ_{max} 362, 289, 224 nm olarak ölçülmüştür. Moleküle ait ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları Ek-2'de ^1H -NMR verileri Çizelge 4.2'de ^{13}C -NMR verileri ise Çizelge 4.1'de verilmiştir.

4.3.3 5-Hidroksi-6,7,3',4'-tetrametoksi flavon (MD-3)

MD-3 molekülü parlak sarı renkli katı olarak izole edildi ve spektral veriler literatürle (Tarawneh ve ark., 2015) karşılaştırılarak 5-hidroksi-6,7,3',4'-tetrametoksi flavon (5-desmetil sinensetin) olarak tanımlandı. Spektral veriler (EK-3) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 359.1168, λ_{max} 341, 275, 244 nm olarak ölçülmüştür. Moleküle ait ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları Ek-3'de ^1H -NMR verileri Çizelge 4.2'de ^{13}C -NMR verileri ise Çizelge 4.1'de verilmiştir.

4.3.4 5-Hidroksi-6,7,8,3',4'-pentametoksi flavon (MD-4)

MD-4 molekülü sarı renkli toz halinde elde edildi ve spektral veriler literatürle (Li ve ark., 2006) karşılaştırılarak; 5-hidroksi-6,7,8,3',4'-pentametoksi flavon (5-demetil nobiletin) olarak tanımlandı. Spektral veriler (EK-4) m/z $[M+H]^+$ 358.1188, λ_{max} 341, 265, 247 nm olarak ölçülmüştür. Moleküle ait 1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları Ek-4'de 1H -NMR verileri Çizelge 4.2'de ^{13}C -NMR verileri ise Çizelge 4.1'de verilmiştir.

4.3.5 5-Hidroksi-6,7,8,4'-tetrametoksi flavon (MD-5)

MD-5 molekülü sarı renkli amorf toz halinde elde edildi ve spektral veriler (NMR ve MS) literatürle (Li ve ark., 2006) karşılaştırılarak 5-hidroksi-6,7,8,4'-tetrametoksi flavon (Gardenin B) olarak tanımlandı. Spektral veriler (EK-5). m/z $[M+H]^+$ 359.1170, λ_{max} 331, 284 nm olarak ölçülmüştür. Moleküle ait 1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları Ek-5'de 1H -NMR verileri Çizelge 4.2'de ^{13}C -NMR verileri ise Çizelge 4.1'de verilmiştir.

4.3.6 5-Hidroksi-6,7,8,3',4'-pentametoksi flavanon (MD-6)

MD-6 sarı amorf toz halinde elde edildi. Spektral veriler (NMR, MS, UV) literatürle (Li ve ark., 2006) karşılaştırılarak 5-hidroksi-6,7,8,3',4'-penta metoksi flavanon olarak aydınlatıldı. Spektral veriler (EK-6) sunulmuştur. m/z $[M+H]^+$ 361.1396, λ_{max} 360, 292, 224 nm olarak ölçülmüştür. Moleküle ait 1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları Ek-6'da 1H -NMR verileri Çizelge 4.2'de ^{13}C -NMR verileri ise Çizelge 4.1'de verilmiştir.

4.3.7 5-Hidroksi-6,7,4'-trimetoksi flavon (MD-7)

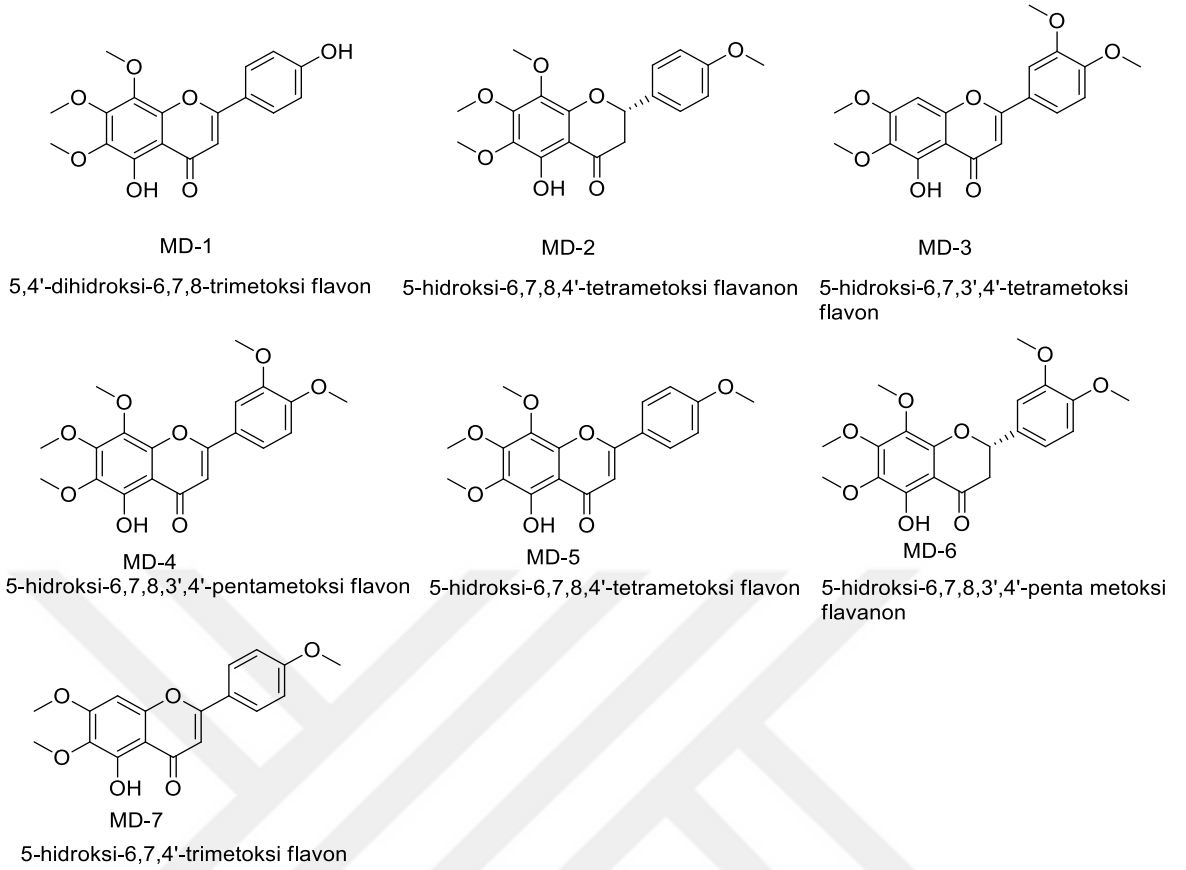
MD-7 kirli beyaz renkli toz halinde elde edildi ve spektral veriler 5-hidroksi-6,7,4'-trimetoksi flavon olarak tanımlandı. Spektral veriler (EK-7) m/z $[M+H]^+$ 329.1065, λ_{max} 332, 276, 217 nm olarak ölçülmüştür. Moleküle ait 1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları Ek-7'de 1H -NMR verileri Çizelge 4.2'de ^{13}C -NMR verileri ise Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4. 1. İzole edilen moleküllerin ¹³C-NMR değerleri

Pozisyon	MD-1	MD-2	MD-3	MD-4	MD-5	MD-6	MD-7
2	164.39	79.06	164.00	163.95	164.09	78.11	164.05
3	103.23	43.59	104.52	104.00	103.77	42.13	104.17
4	183.08	197.25	182.64	182.99	183.04	198.25	182.71
5	147.42	150.42	153.25	153.01	152.97	150.92	153.26
6	133.85	133.26	132.71	136.60	136.55	133.48	132.64
7	142.37	155.62	158.77	152.50	145.80	154.68	158.74
8	133.18	151.93	90.60	132.96	133.00	132.47	90.57
9	142.77	150.54	153.11	145.78	149.59	148.68	153.09
10	106.57	104.34	106.19	107.00	107.00	104.11	106.16
1'	123.42	130.39	123.84	123.71	123.50	130.85	123.59
2'	128.06	127.61	108.87	108.80	128.11	110.89	128.03
3'	114.53	114.20	151.34	149.55	114.63	149.03	114.54
4'	172.73	160.01	149.39	149.40	162.79	150.44	162.62
5'	114.53	114.20	111.22	111.30	114.63	111.65	114.54
6'	128.06	127.61	120.10	120.17	128.11	119.10	128.03
6-OMe	62.05	61.51	60.87	62.07	62.15	62.19	60.88
7-OMe	61.27	61.22	56.35	61.72	61.72	60.67	56.32
8-OMe	55.43	55.37	-	61.13	61.14	61.58	-
3'-OMe	-	-	56.17	56.14	-	56.25	-
4'-OMe	-	-	56.13	56.02	55.56	56.05	55.56

Çizelge 4. 2. İzole edilen moleküllerin ¹H-NMR verileri

Pozisyon	MD-1	MD-2	MD-3	MD-4	MD-5	MD-6	MD-7
2	-	5.42 (dd, J = 12.6, 3.1 Hz)	-	-	-	5.42 (dd, J = 12.5 Hz)	-
3	6.54 (s)	3.13 dd, J = 17.2, 12.6 Hz) 3.13 dd, J = 17.2, 12.6 Hz)	6.63 (s)	6.64(s)	6.63 (s)	3.08 (dd, J = 17.2 Hz) 2.85 (dd, J = 17.2 Hz)	6.59 (s)
8	-	-	6.58 (s)	-	-	-	6.55 (s)
2'	7.84 (d, J = 8.8 Hz)	7.42 (d, J = 8.8 Hz)	7.37 (d, J = 2.0 Hz)	7.44 (d, J = 2.0 Hz)	7.92 (d, J = 9.0 Hz)	7.03 (d, J = 2,4 Hz)	7.85 (d, J = 8.7 Hz)
3'	6.97 (d, J = 8.8 Hz)	6.98 (d, J = 8.8 Hz)	-	-	7.06 (d, J = 9.0 Hz)		7.02 (d, J = 8.7 Hz)
5'	6.97 (d, J = 8.8 Hz)	6.99 (d, J = 8.8 Hz)	7.01 (d, J = 8.5 Hz)	7.02 (d, J = 8.5 Hz,)	7.06 (d, J = 9.0 Hz)	6.97 (d, J= 8.9 Hz)	7.02 (d, J = 8.7 Hz)
6'	7.84 (d, J = 8.8 Hz)	7.42 (d, J = 8.8 Hz)	7.56 (dd, J = 8.5, 2.0 Hz)	7.61 (dd, J = 8.5, 2.0 Hz)	7.92 (d, J = 9.0 Hz)	6.88 (dd, J=8.9 Hz)	7.85 (d, J = 8.7 Hz)
6-OMe	3.83 (s)	3.86 (s)	4.02 (s)	4.01 (s)	4.00 (s)	4.03 (s)	3.93 (s)
7-OMe	4.04 (s)	4.11 (s)	4.01 (s)	4.13 (s)	4.13 (s)	4.12 (s)	3.97 (s)
8-OMe	3.93 (s)	3.88 (s)		3.97 (s)	3.92 (s)	3.80 (s)	-
3'-OMe	-	-	4.00 (s)	4.00 (s)	-	3.89 (s)	-
4'-OMe	-	-	3.96 (s)	3.99 (s)	3.97 (s)	3.86 (s)	3.90 (s)

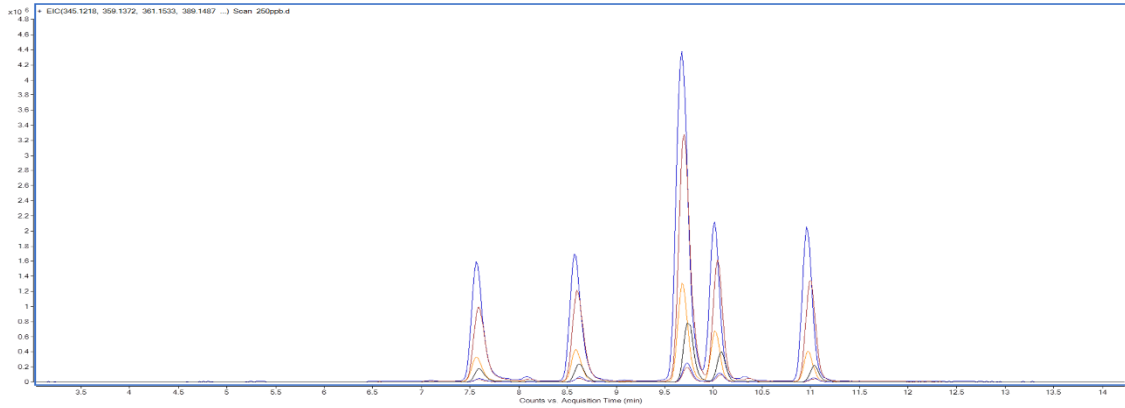


Şekil 4. 5. *Mentha dumetorum* bitkisinden izole edilen polimetoksi flavonların kimyasal yapıları

4.4 İzole Edilen Moleküllerin Kantitatif Analizi

İzole edilen moleküllerin kantitatif analizleri LC-TOF-MS cihazında gerçekleştirildi. Her madde için (50, 100, 250, 500, 2500, 5000 ppb derişimler hazırlanarak) 6 noktalı kalibrasyon eğrileri elde edildi.

İzole edilen moleküllerin hekzan özütü içindeki kantitatif analiz için 1.0 g kuru bitki tartılarak 10 mL sıcak su ile 2 saat boyunca ultrasonik banyoda özütlendi. Özütleme işlemi üç tekrarlı yapıldı. Su özütleri birleştirilerek liyofilizatör ile kurulağa kadar su uzaklaştırıldı. Özüt 5 mL suda çözülerek her seferinde 2 mL hekzan ile (5 defa) partisyona tabi tutuldu. Hekzan fazları birleştirilerek 1 mL hekzan:kloroform (1:1) karışımında çözüldükten sonra 1:20 oranına seyreltilerek analiz edildi (Barberán et al. 1985). Analiz üç tekerrürlü olarak yapılmış sonuçlar gerekli çevirme faktörleri kullanılarak mg/100 gr özüt ve mg/kg kuru bitki olarak sunulmuştur.



Şekil 4. 6. Kantitatif analizde elde edilen farklı derişimlerin LC-TOF kromatogramları

Kantitatif analiz sonuçları (Çizelge 4.3) verilmiştir. Çizelge incelendiğinde bitkinin suda kaynatılarak alınan su özütünün hekzan ile partitasyonundan elde edilen ham özütteki miktarları 383.49 – 3409.93 mg/100 gr özüt aralığında değişmektedir. İzole edilen moleküllerin toplam miktarı hekzan özütünün ~%6.2'sine tekabül ederken kuru bitkideki miktarı ise ~%0.12 olarak bulunmuştur. Çalışmada izolasyonu hedeflenen polimetoksi flavonların bitkinin su ile kaynatılarak hekzan ile partitasyonu ile polimetoksi flavonlar yaklaşık 50 kat deriştirilmiştir. Bu da izolasyon çalışmalarında hedef moleküllerin başarılı ile saflaştırılmasında önemli rol oynamıştır.

Çizelge 4. 3. İzole edilen moleküllerin özüt ve kuru bitkideki miktarları

	mg/100 g hekzan özütü	mg/kg kuru bitki
MD-1	609.47±1.44	12.19±0.12
MD-2	792.98±1.89	15.86±0.57
MD-3	648.25±2.03	12.97±0.05
MD-4	406.48±0.58	8.13±0.28
MD-5	3409.93±4.57	68.20±1.82
MD-6	383.49±3.12	7.67±0.89
MD-7	Analiz yapılamadı	Analiz yapılamadı
Toplam	6250.60	125,01

4.5 Antikanser Aktivite

Mentha dumetorum bitkisinden izole edilen moleküllerin hücresel ortamda anti kanser aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar; Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü, Hücre Kültür Laboratuvarında yürütüldü. Antikanser aktivite testleri xCELLigence RTCA cihazı kullanılarak HeLA ve HT29 hücre kültürleri üzerinde yapıldı. İzole edilen moleküllerin HeLA ve HT29 hücre hatlarına karşı anti kanser aktivitelerin değerlendirilmesi (Koldas et al. 2015)'da verilen teknikle değerlendirildi. Testler, üç derişim ve iki tekrarlı olarak yapılarak sonuçlar IC₅₀ (µg/mL) olarak ifade edildi. Pozitif kontrol olarak 5-florourasil negatif kontrol olarak da tampon/besi yeri ve DMSO kullanıldı. Her bir hücre hattı için izole edilen maddelerin anti kanser aktivite sonuçları Çizelge 4.4'de özetlenmiştir.

Çizelge 4. 4. İzole edilen moleküllerin anti kanser aktivitelerinin aktivitesi

	HeLA (IC ₅₀ µg/mL)	HT29 (IC ₅₀ µg/mL)
MD-1	38.30	111.44
MD-2	7.37	46.4
MD-3	14.48	132.14
MD-4	>150	94.54
MD-5	9.274	62.35
MD-6	64.44	82.88
MD-7	>150	>150

Çizelge 4.4. incelendiğinde MD-2 ve MD-5'in HeLA hücre hatlarına karşı oldukça yüksek aktivite gösterdiği, MD-2 ve MD-6 moleküllerinin ise HT-29 hücre hatlarına karşı aktif olduğu görülmektedir.

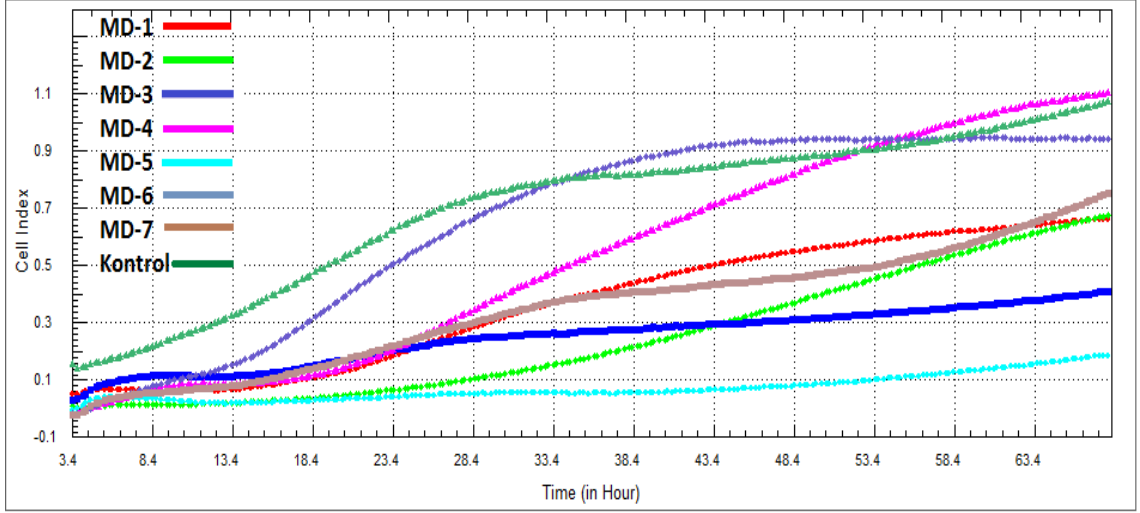
MD-2 (5-hidroksi-6,7,8,4'-tetrametoksi flavanon) molekülü HeLA hücre hattına karşı oldukça yüksek aktivite göstermiştir. Bu molekülün doğal ürünlerden izolasyonu ve antikanser aktivitesi hakkında literatürde her hangi bir veri bulunmamaktadır.

MD-5 (Gardenin B) molekülü de aynı hücre hattı için yüksek aktiviteye sahiptir. Yapısal olarak bu iki molekül incelendiğinde metoksi sayısı ve bağlı oldukları konumları bakımından benzerlik görülmektedir. Aralarındaki tek fark birisinin flavanon, diğersinin ise flavon iskeletine sahip olmasıdır. Sonuçlar göstermektedir ki; MD-2 ve MD-5 molekülleri HeLA hücrelerinin çoğalmasını önemli ölçüde engellemektedir. Bu moleküllerin aynı zamanda HT29 hücre hattı içinde önemli bir etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir.

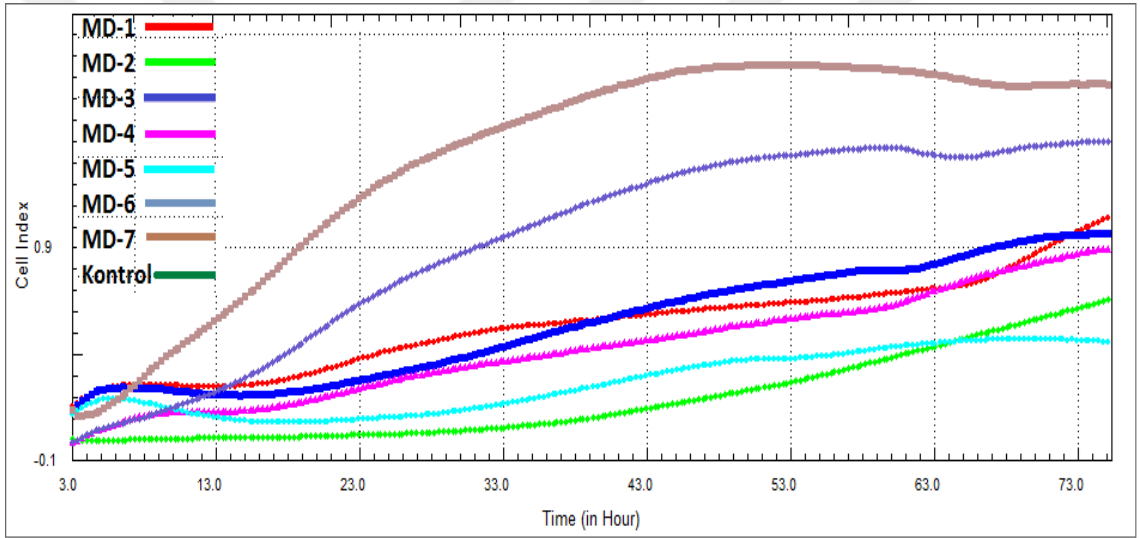
Gardenin B ve glukozit formu daha önce değişik doğal kaynaklardan izole edilmiştir (Grayer et al. 1996; Nieto et al. 1994; Parmar et al. 1994; Tewari and Mukharya 1988). Bu çalışmalarda gardenin B molekülünün anti kanser aktiviteleri değerlendirilmemiştir. Gardenin B molekülü *Mentha piperita* bitkisindeki varlığı daha önce rapor edilmiştir (Areias et al. 2001). Diğer nane türleri ve özellikle de *Mentha dumetorum* bitkisindeki Gardenin B molekülünün varlığı hakkında bir bilgi mevcut değildir.

MD-4 (5-demetil nobiletin) molekülünün; insan nöroblastoma kanser hücrelerine karşı antiproliferatif aktivitesi rapor edilmesine rağmen (Akao et al. 2008) bu çalışmada HeLA ve HT29 hücre hatlarına karşı önemli bir aktivite göstermemiştir.

İzole edilen moleküllerin 100 µg/mL derişimlerdeki antikanser aktivitelerinin inkübasyon zamanına karşı CI (cell index) değerlerinin şematize edilmiş hali HeLA hücre hattı için Şekil 4.7'de HT29, Şekil 4.8'de aşağıda verilmiştir. Düşük CI₅₀ değeri daha düşük yaşayan hücre anlamında gelmektedir. Kontrol grubunda hücre çoğalmasını engelleyecek bir etken olmadığından hücreler normal yaşamlarına devam etmiş inkübasyon süresince sürekli çoğalmış ve yüksek CI₅₀ değerlerine çıkmıştır. Şekil 4.8'de MD-2 ve MD-5 ilk 24 saat içinde hücrelerin çoğalmasını yüksek ölçüde engellediği görülmektedir.



Şekil 4. 7. İzole edilen moleküllerin HeLA hüresine karşı aktiviteleri



Şekil 4. 8. İzole edilen moleküllerin HT29 hüresine karşı aktiviteleri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada; *Mentha dumetorum* bitkisinden; lipofilik özelliğe sahip flavon aglikonları olan polimetoksi flavon türevlerinin izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyon aşamasında sefadeks LH-20, slikajel kolon, preparatif TLC ve HPLC teknikleri kullanıldı. Kromatografik işlemlerin sonucunda yedi farklı polimetoksi flavon türevi yüksek saflıkta izole edildi ve NMR, MS gibi teknikler kullanılarak yapıları aydınlatıldı.

İzole edilen moleküllerin bitki özütünde ve kuru bitkideki miktarları kantitatif olarak hesaplandı. İzole edilen moleküllerin; hekzan özütünün % 6,2'sini, kuru biyokütlenin ise % 0,12'sini oluşturduğu görüldü. İzole edilemeyen polimetoksi flavonların da özütte bulunduğu göz önüne alındığında bu değerlerin biraz daha artacağı aşikardır. Özüt içinde major olarak bulunan bileşen MD-5 (Gardenin B)'dir. Bu molekülün 1 kg kuru bitki içindeki miktarı 68.20 mg olarak hesaplandı.

Bitkide bulunan polimetoksi flavonların anti kanser aktiviteleri HeLA ve HT29 hücre hatlarına karşı xCELLigence RTCA cihazı kullanılarak değerlendirildi. MD-2 ve MD-5 moleküllerin her iki hücrenin çoğalmasını önemli ölçüde engellediği tespit edildi.

Çalışmadan elde edilen veriler ışığında;

i) Bitkinin polimetoksi flavonları daha fazla üretebilmesini sağlayacak değişik stres koşulları uygulanarak aktif moleküller olan MD-2 ve MD-5'in miktarları özüt içinde artırılarak bilirliliği araştırılmalıdır.

ii) MD-2 ve MD-5 moleküllerinin bitkiden izolasyonu için kolay izolasyon prosedürleri geliştirilmelidir.

iii) Moleküllerin miktarları yapılacak yeni çalışmalarla artırılarak mutlaka deney hayvanları üzerinde anti kanser aktiviteleri değerlendirilmelidir.

iv) Deney hayvanları üzerinde yapılacak testlerde ümit verici sonuçlar alınması halinde bu maddelerin sentez prosedürleri geliştirilip klinik testlere geçilmelidir.



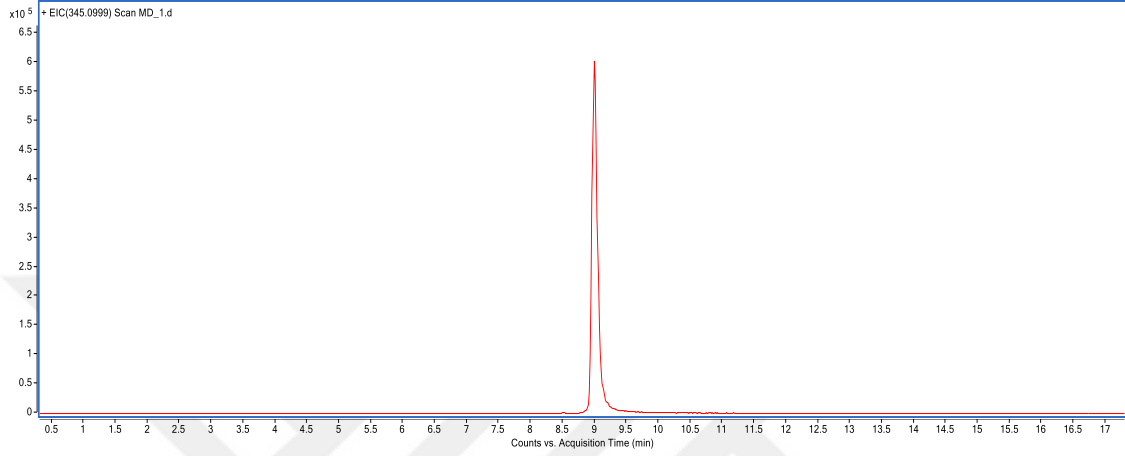
6. KAYNAKLAR

- Akao Y, Itoh T, Ohguchi K, Iinuma M, ve Nozawa Y (2008) Interactive effects of polymethoxy flavones from Citrus on cell growth inhibition in human neuroblastoma SH-SY5Y cells *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16:2803-2810 doi:<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.01.058>
- Anagnostopoulou MA, Kefalas P, Kokkalou E, Assimopoulou AN, ve Papageorgiou V.P.(2005) Analysis of antioxidant compounds in sweet orange peel by HPLC-diode array detection-electrospray ionization mass spectrometry *Biomed Chromatogr* 19:138-148
- Areias FM, Valentão P, Andrade PB, Ferreres F, ve Seabra RM (2001) Phenolic fingerprint of peppermint leaves *Food Chemistry* 73:307-311 doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00302-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00302-2)
- Barberán FAT, Tomás F, ve Núñez JM (1985) Seasonal Variation of Free Flavone Aglycones from *Sideritis leucantha* (Lamiaceae) *Zeitschrift für Naturforschung B A Journal of Chemical Sciences* 40 (c):914-916
- Erenler R, Telci I, Ulutas M, Demirtas I, Gul F, Elmastas M, ve Kayir O (2015) Chemical Constituents, Quantitative Analysis and Antioxidant Activities of *Echinacea purpurea* (L.) Moench and *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt. *J Food Biochem* 39:622-630
- Grayer RJ, Bryan SE, Veitch NC, Goldstone FJ, Paton A, ve Wollenweber E (1996) External flavones in sweet basil, *Ocimum basilicum*, and related taxa *Phytochemistry* 43:1041-1047
- Ho S-C, and Kuo C-T (2014) Hesperidin, nobiletin, ve tangeretin are collectively responsible for the anti-neuroinflammatory capacity of tangerine peel (*Citri reticulatae pericarpium*) *Food and Chemical Toxicology* 71:176-182 doi:<https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.06.014>
- Jahaniani F, Ebrahimi SA, Rahbar-Roshandel N, ve Mahmoudian M (2005) Xanthomicrol is the main cytotoxic component of *Dracocephalum kotschyii* and a potential anti-cancer agent *Phytochemistry* 66:1581-1592
- Kobayashi S, ve Tanabe S (2006) Evaluation of the anti-allergic activity of Citrus unshiu using rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells as well as basophils of patients with seasonal allergic rhinitis to pollen *Int J Mol Med* 17:511-515
- Koldas S, Demirtas I, Ozen T, Demirci MA, ve Behcet L (2015) Phytochemical screening, anticancer and antioxidant activities of *Origanum vulgare* L. ssp *viride* (Boiss.) Hayek, a plant of traditional usage *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95:786-798
- Li S, Lo CY, ve Ho CT (2006) Hydroxylated polymethoxyflavones and methylated flavonoids in sweet orange (*Citrus sinensis*) peel *Journal of agricultural and food chemistry* 54:4176-4185 doi:10.1021/jf060234n
- Manthey JA, Guthrie N, ve Grohmann K (2001) Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation *Curr Med Chem* 8:135-153

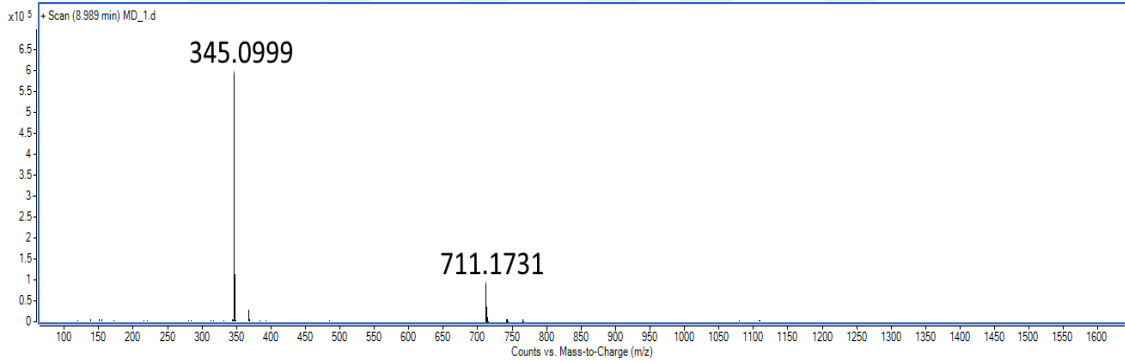
- Morley KL, Ferguson PJ, ve Koropatnick J (2007) Tangeretin and nobiletin induce G1 cell cycle arrest but not apoptosis in human breast and colon cancer cells *Cancer Letters* 251:168-178 doi:<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.11.016>
- Murakami A et al. (2000) Inhibitory effect of citrus nobiletin on phorbol ester-induced skin inflammation, oxidative stress, and tumor promotion in mice *Cancer Res* 60:5059-5066
- Nieto M, Gianello J, ve Tonn c Chemical-components of 3 species of parastrephia genus. in: *anales de la asociacion quimica argentina*, 1994. vol 2. asoc quimica argentina sanchez de bustamante 1749, 1425 buenos aires, argentina, pp 105-109
- Noori S, Hassan ZM, Yaghmaei B, ve Dolatkhah M (2013) Antitumor and immunomodulatory effects of salvigenin on tumor bearing mice *Cell Immunol* 286:16-21
- Ohnishi H et al. (2004) Inhibition of cell proliferation by nobiletin, a dietary phytochemical, associated with apoptosis and characteristic gene expression, but lack of effect on early rat hepatocarcinogenesis in vivo *Cancer Sci* 95:936-942
- Parmar VS et al. (1994) Highly oxygenated bioactive flavones from Tamarix *Phytochemistry* 36:507-511
- Tang MX et al. (2007) Protective effects of citrus nobiletin and auraptene in transgenic rats developing adenocarcinoma of the prostate (TRAP) and human prostate carcinoma cells *Cancer Sci* 98:471-477
- Tewari N, ve Mukharya D (1988) Isolation and study of a new gardenia glycoside gardenin-5- β -D-glucopyranoside from the stem of gardenia-florida (linn) *national academy science letters-india* 11:281-282
- Walle T (2007) Methoxylated flavones, a superior cancer chemopreventive flavonoid subclass? *Semin Cancer Biol* 17:354-362
- Yoshimizu N et al. (2004) Anti-tumour effects of nobiletin, a citrus flavonoid, on gastric cancer include: antiproliferative effects, induction of apoptosis and cell cycle deregulation *Aliment Pharm Therap* 20:95-101

7. EKLER

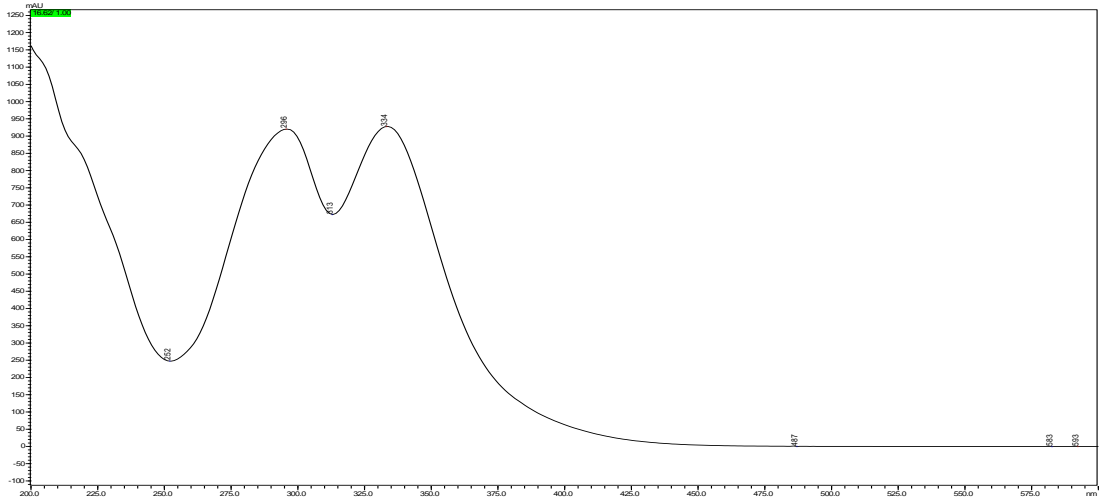
EK-1. MD-1 Molekülüne Ait Spektral veriler



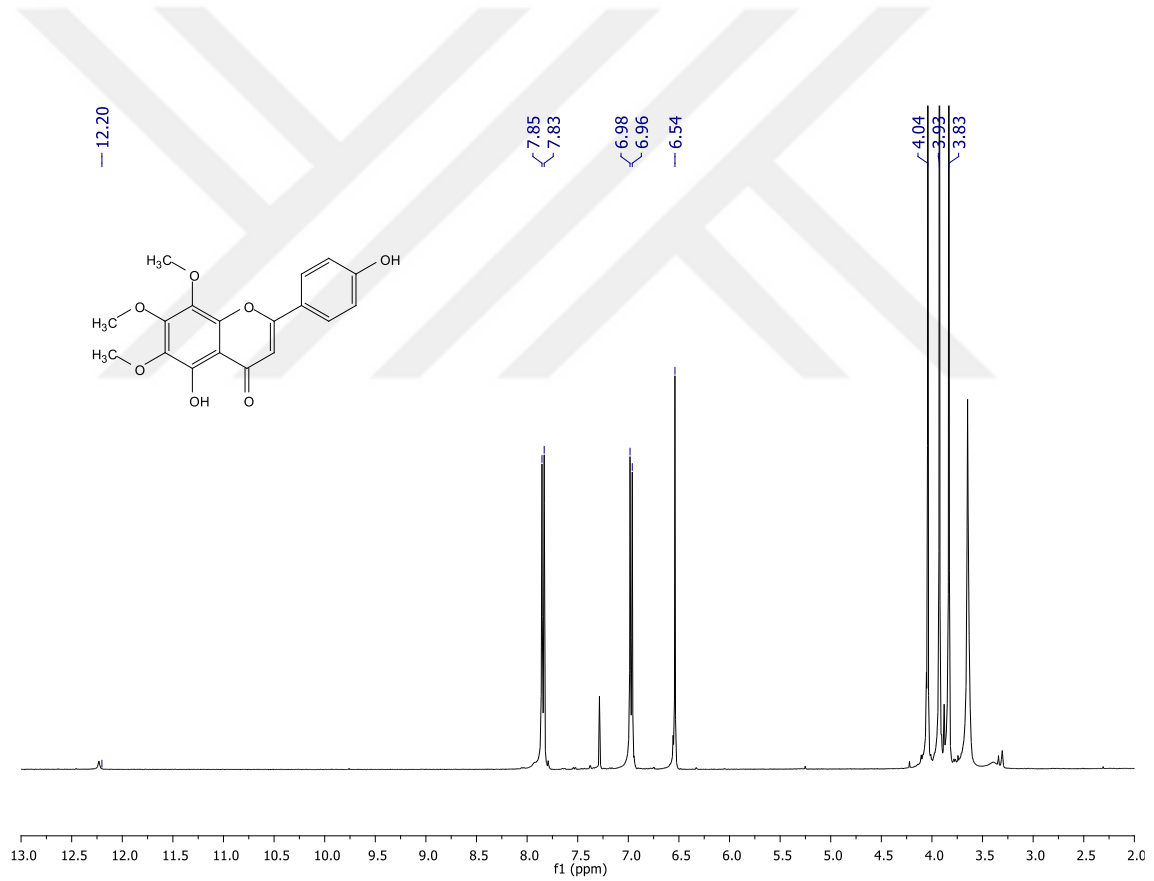
MD-1 Molekülünün LC-TOF-MS kromatogramı



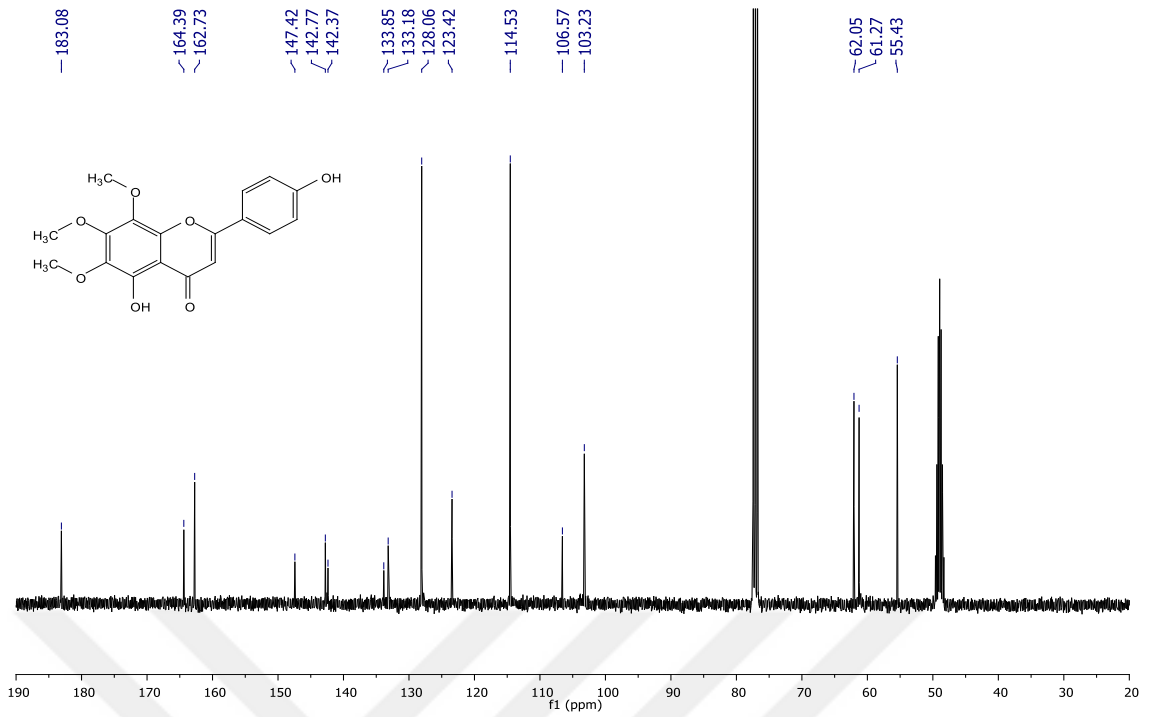
MD-1 molekülünün LC-TOF-MS spektrumu



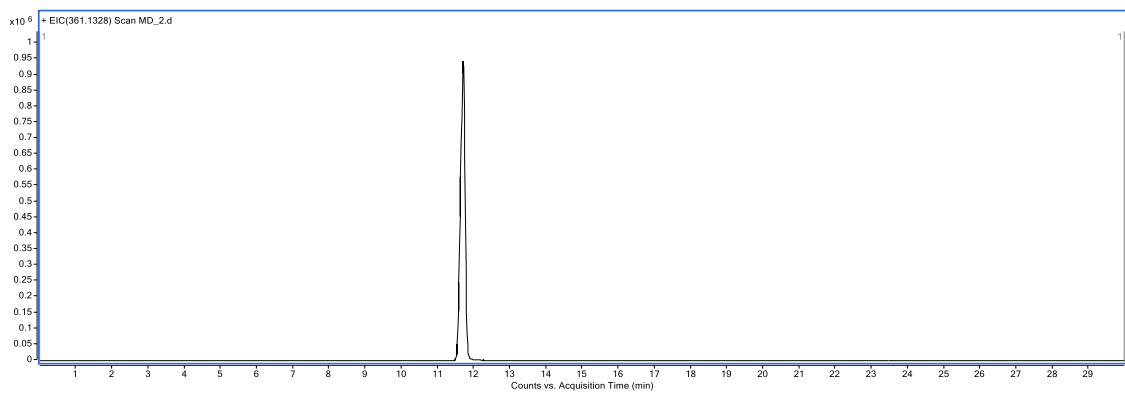
MD-1 Molekülünü UV dalga boyu taraması

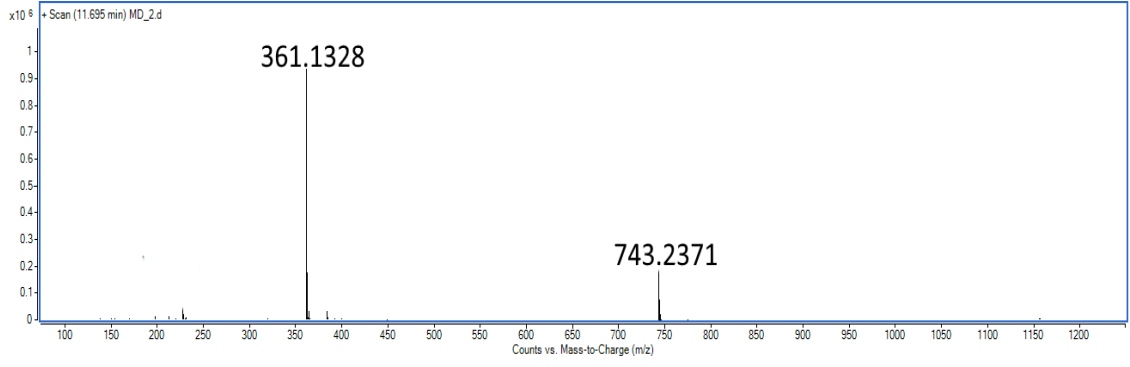


MD-1 Molekülünün 1H-NMR spektrumu

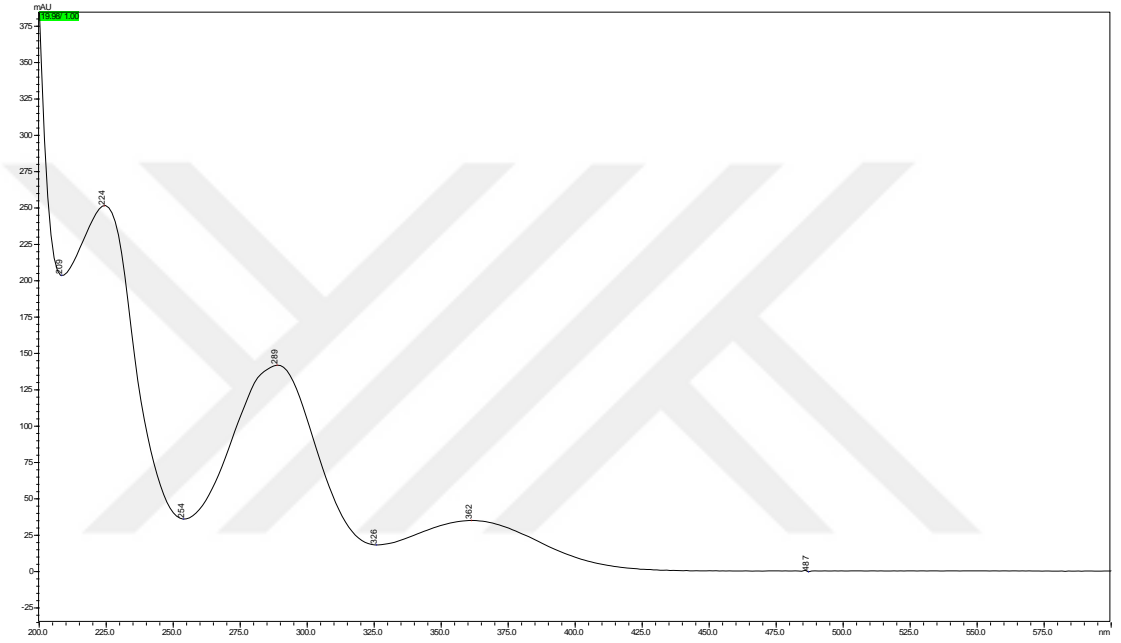


EK-2. MD-2 Molekülüne ait Spektral veriler

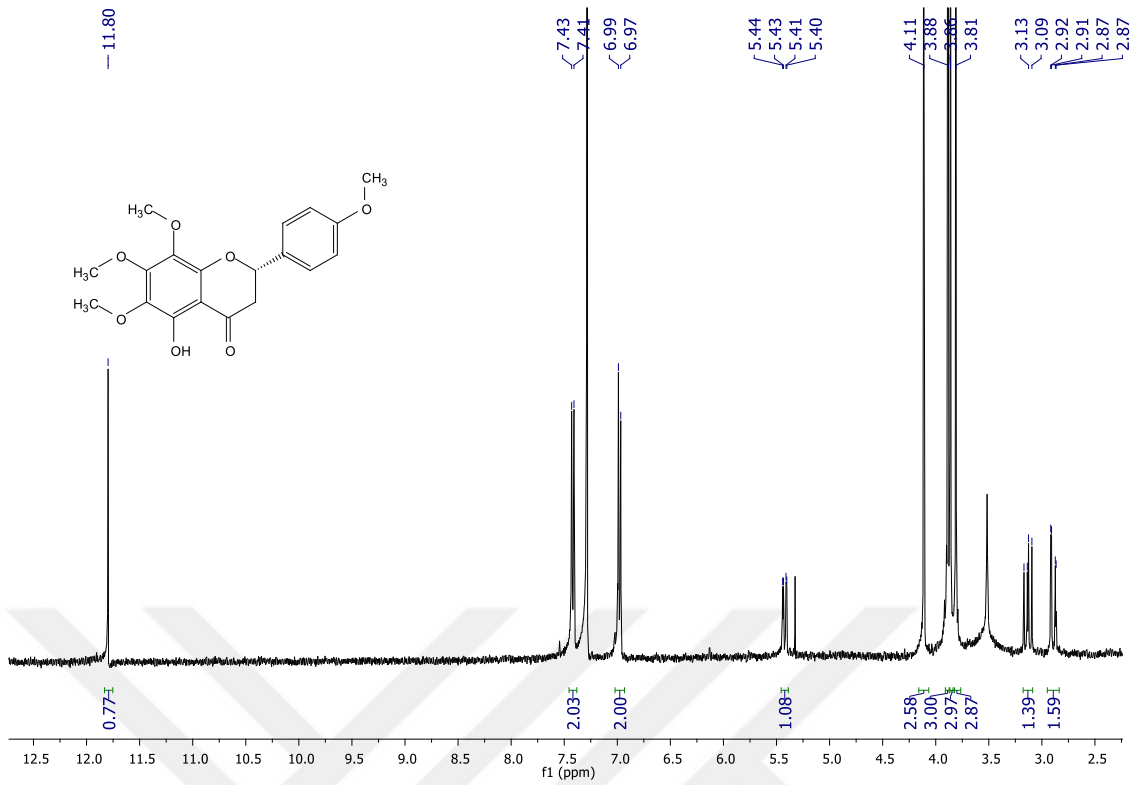




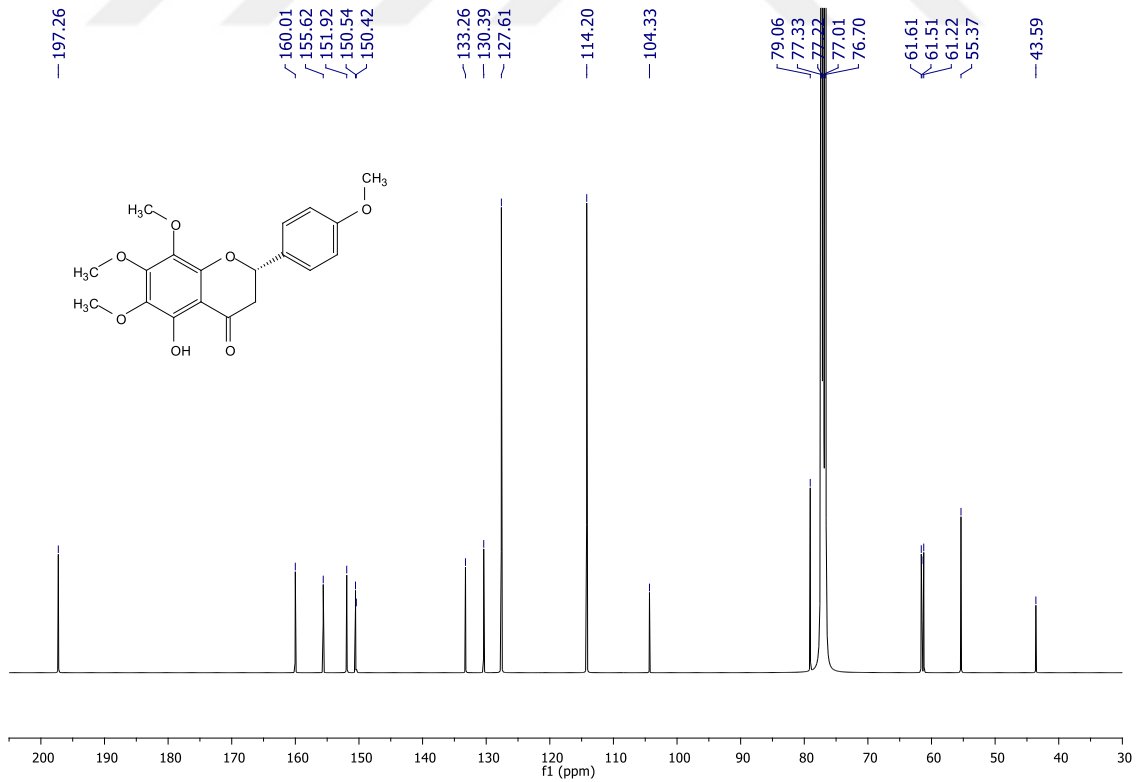
MD-1 molekülünün LC-TOF-MS spektrumu



MD-2 Molekülünün UV dalga boyu taraması

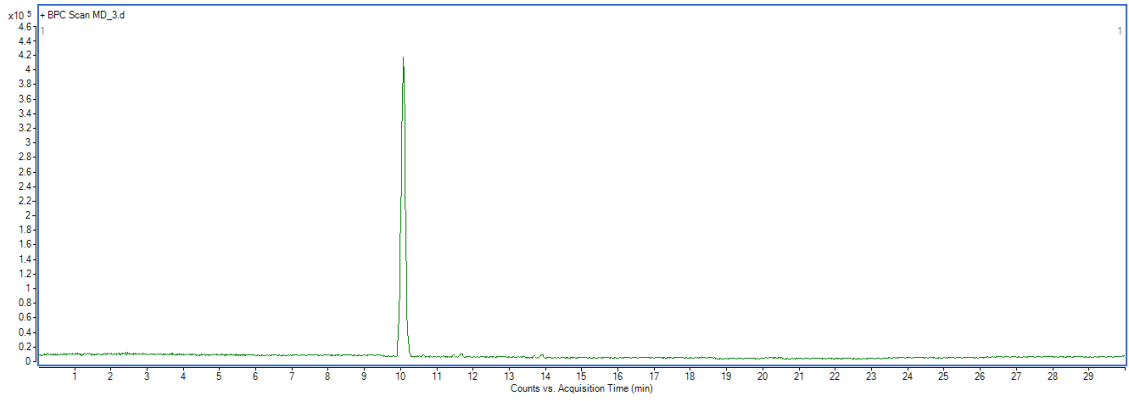


MD-2 Molekülünün 1H-NMR spektrumu

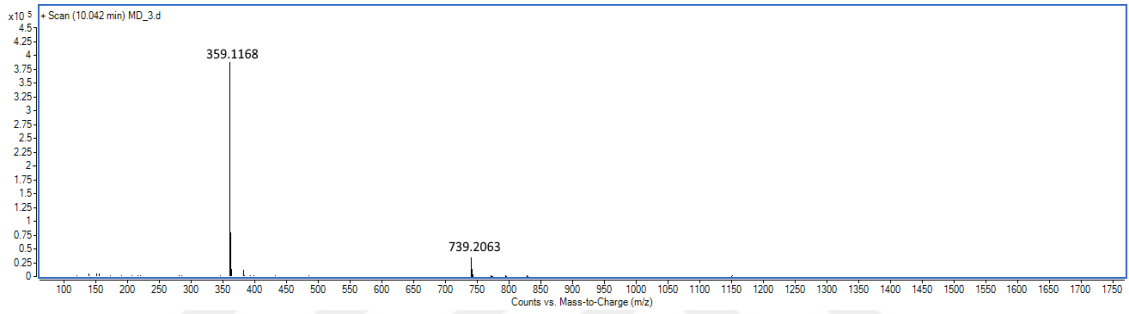


MD-2 Molekülünün 13C-NMR spektrumu

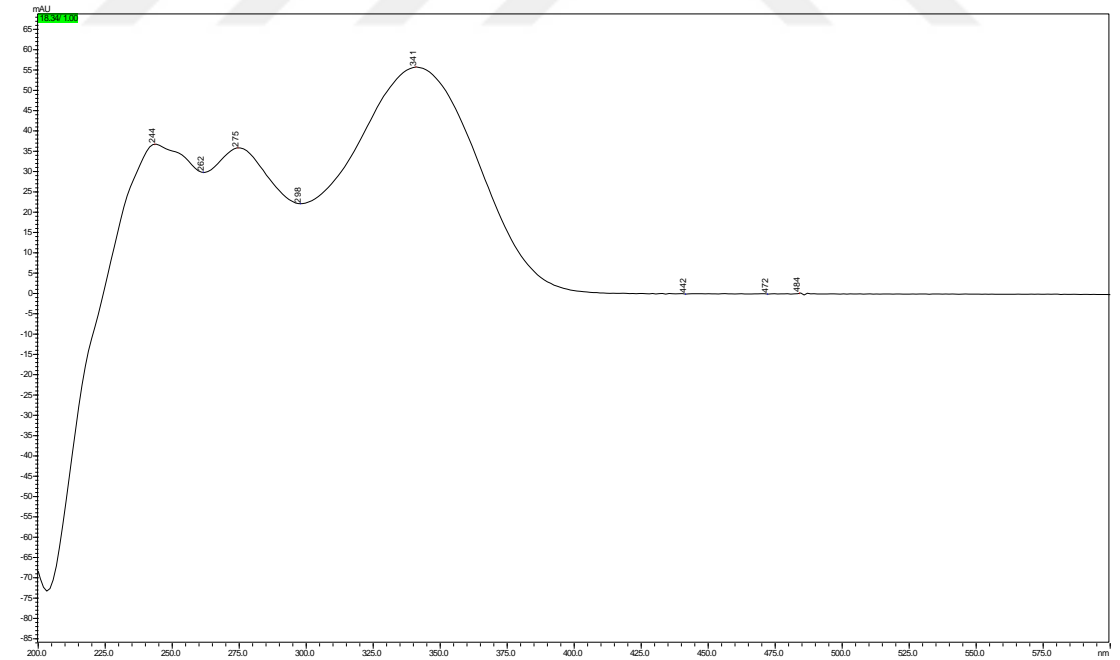
EK-3. MD-3 Molekülüne ait Spektral veriler



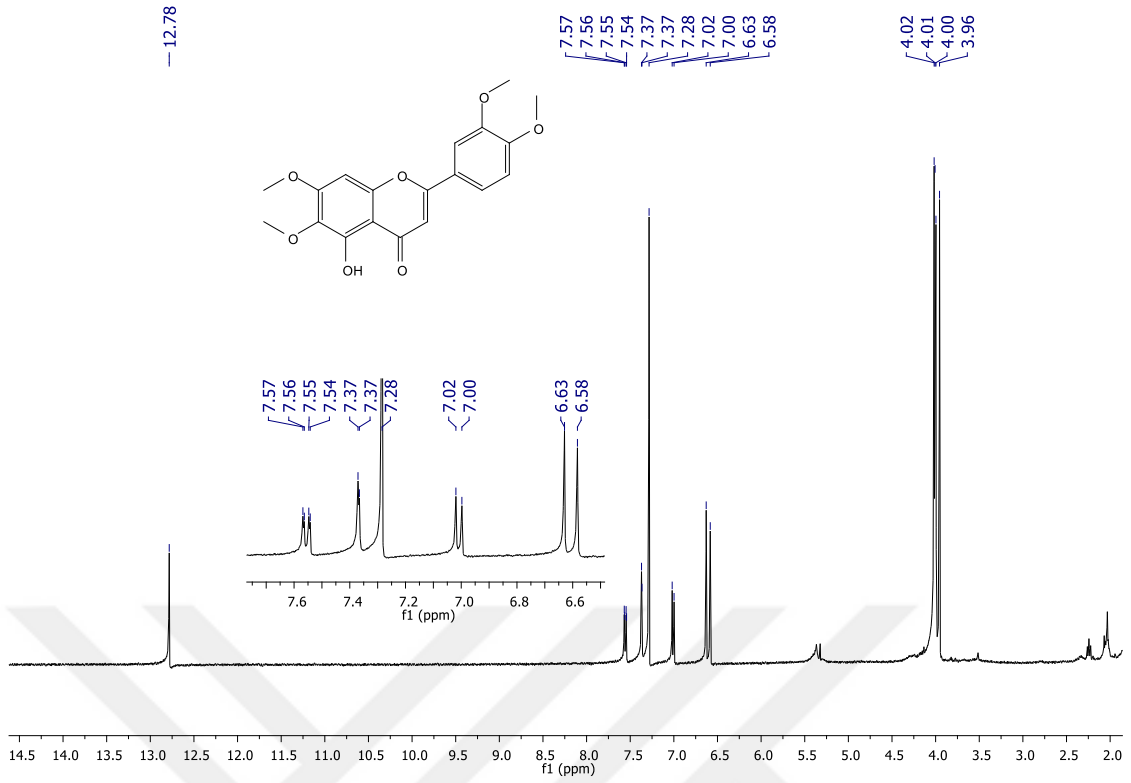
MD-3 molekülünün LC-TOF-MS kromatogramı



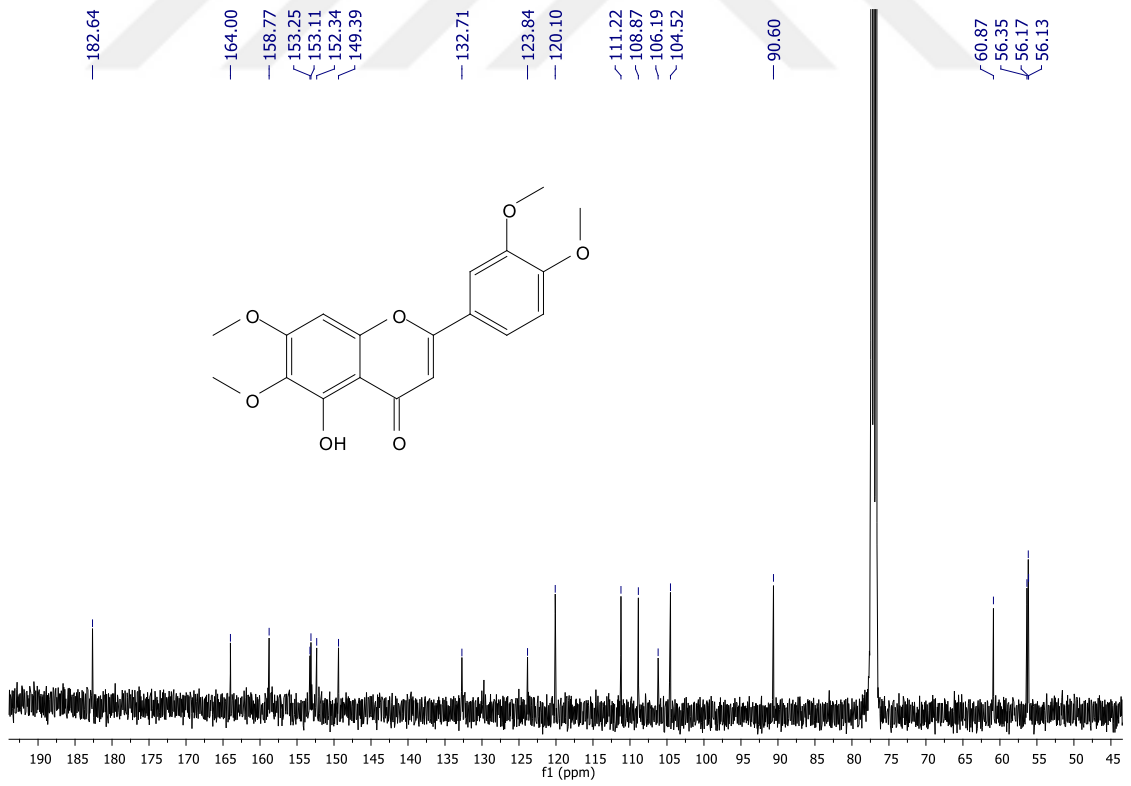
MD-3 molekülünün LC-TOF-MS spektrumu



MD-3 Molekülünün UV dalga boyu taraması

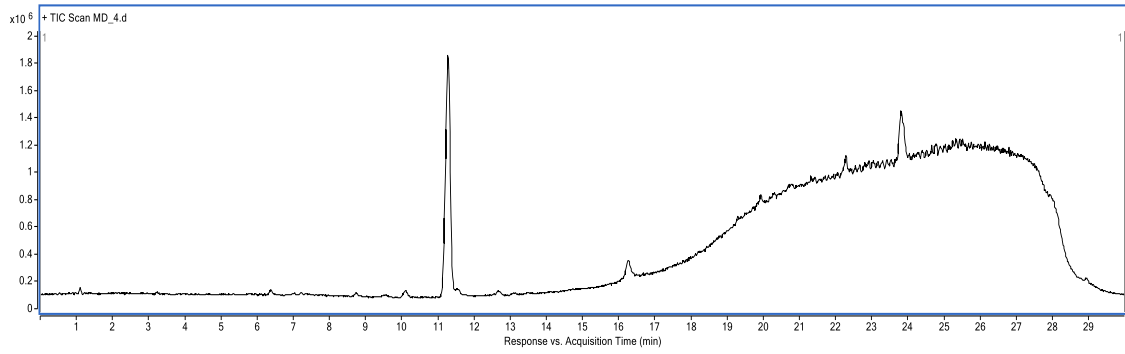


MD-3 Molekülünün 1H-NMR spektrumu

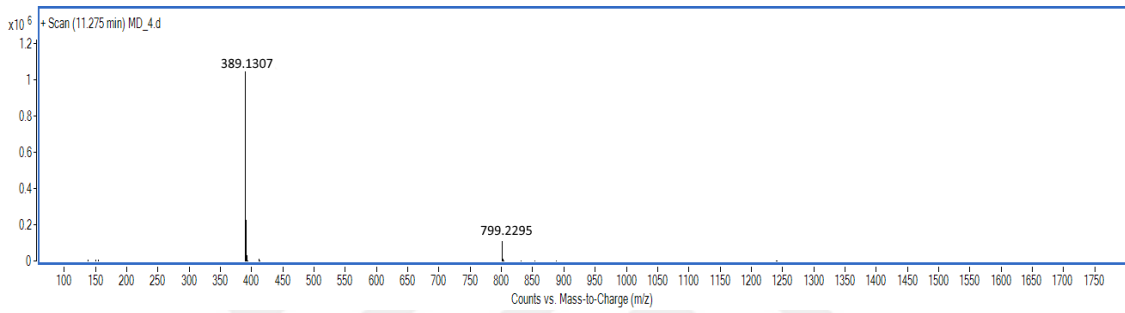


MD-3 Molekülünün 13C-NMR spektrumu

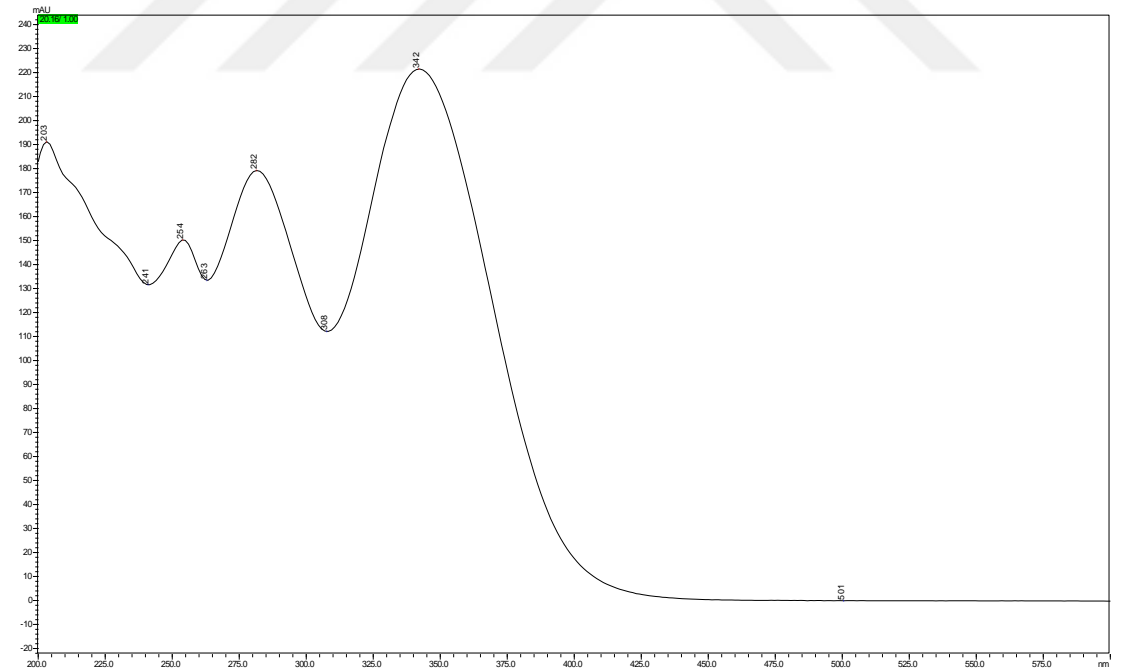
EK-4. MD-4 Molekülüne ait Spektral veriler



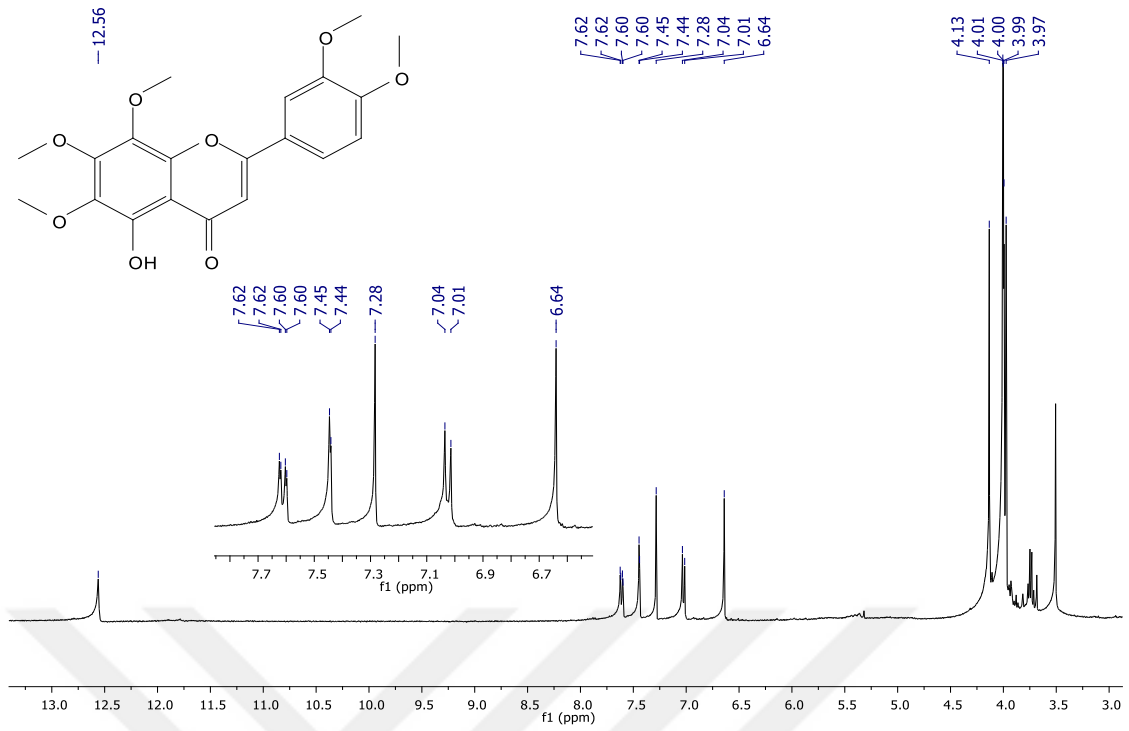
MD-4 molekülünün LC-TOF-MS kromatogramı



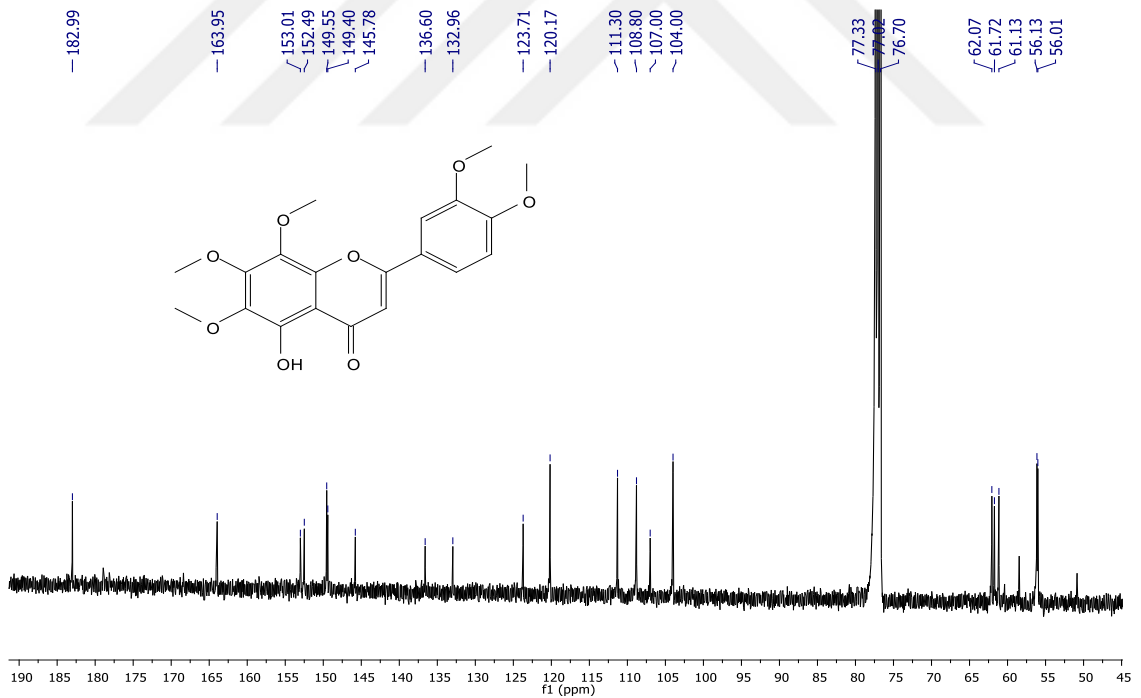
MD-4 molekülünün LC-TOF-MS spektrumu



MD-4 Molekülünün UV dalga boyu taraması

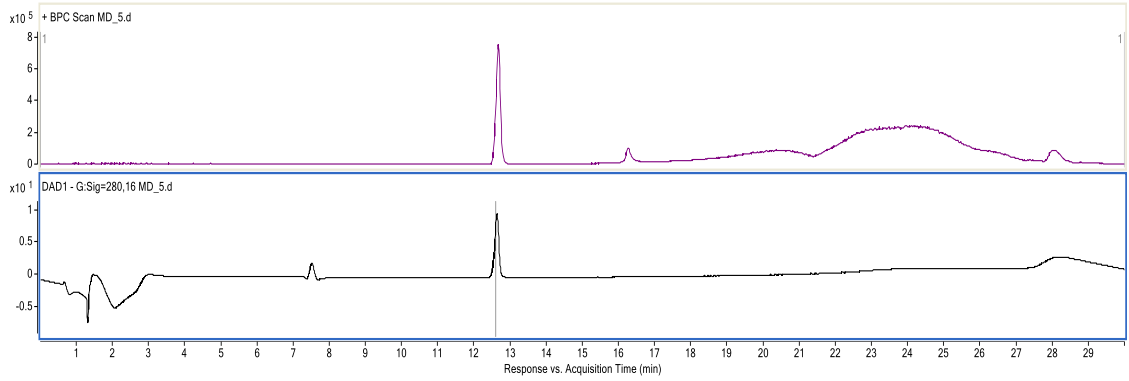


MD-4 Molekülünün ¹H-NMR spektrumu

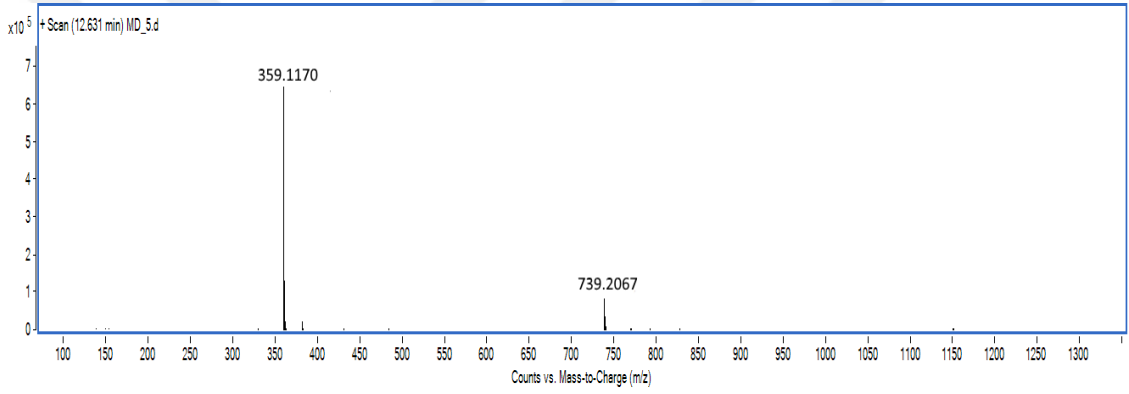


MD-4 Molekülünün ¹³C-NMR spektrumu

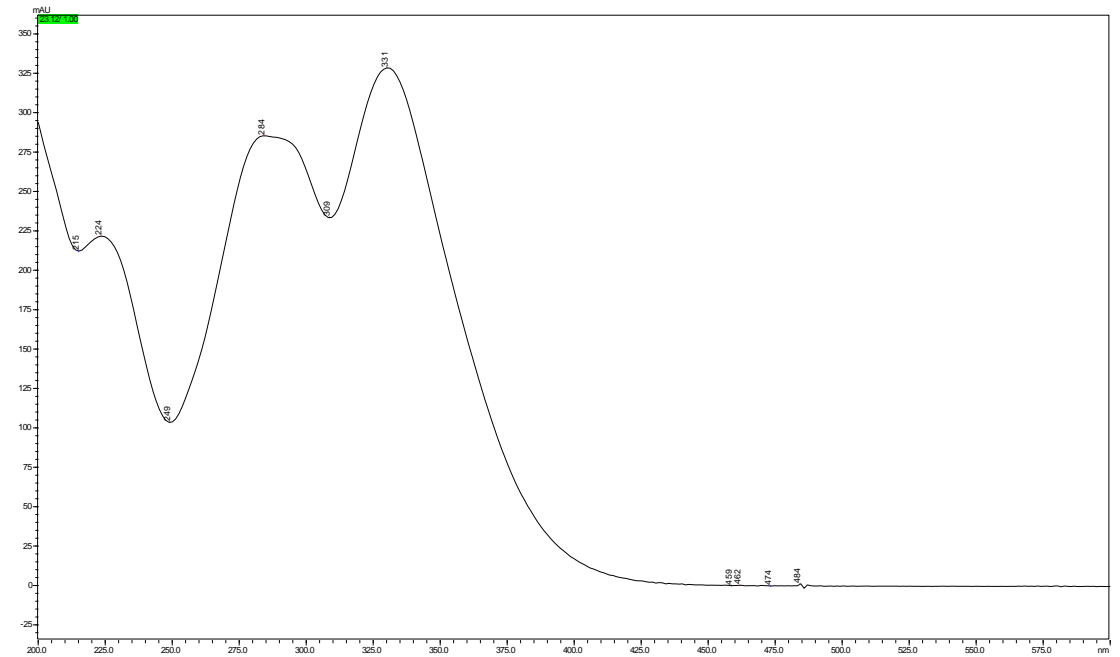
EK-5. MD-5 Molekülüne ait Spektral veriler



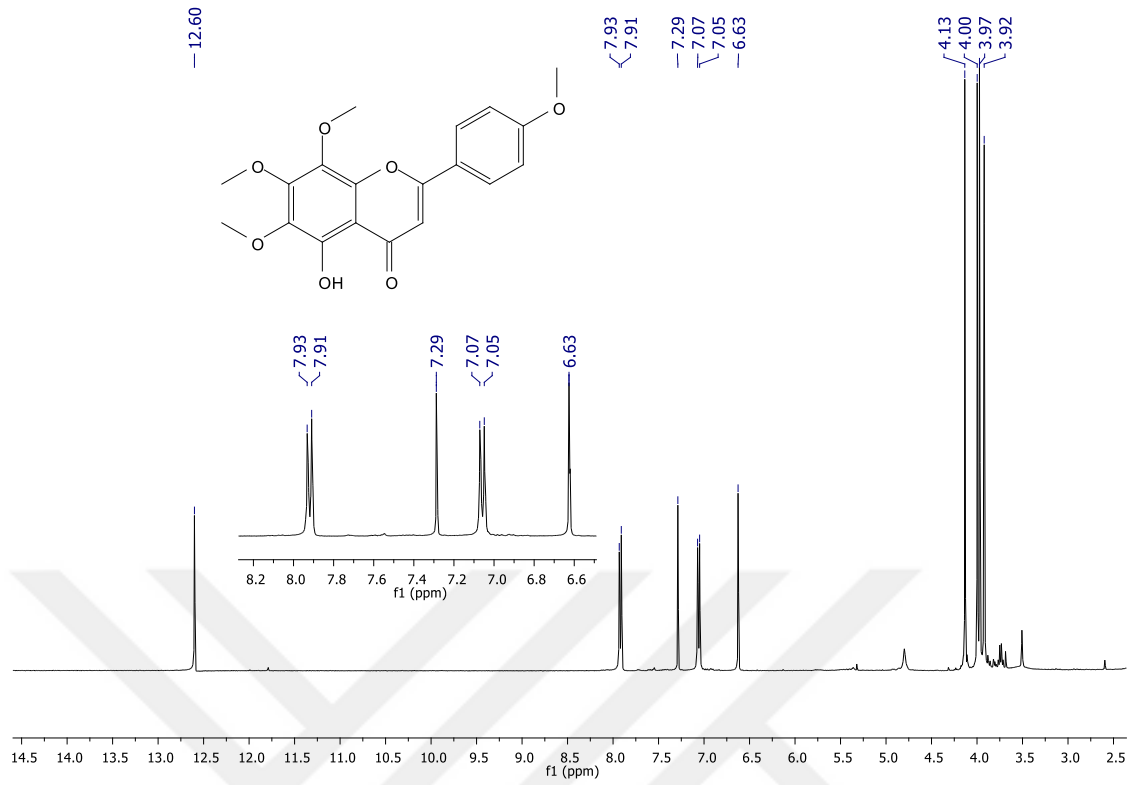
MD-5 molekülünün LC-TOF-MS ve UV (280 nm) kromatogramı



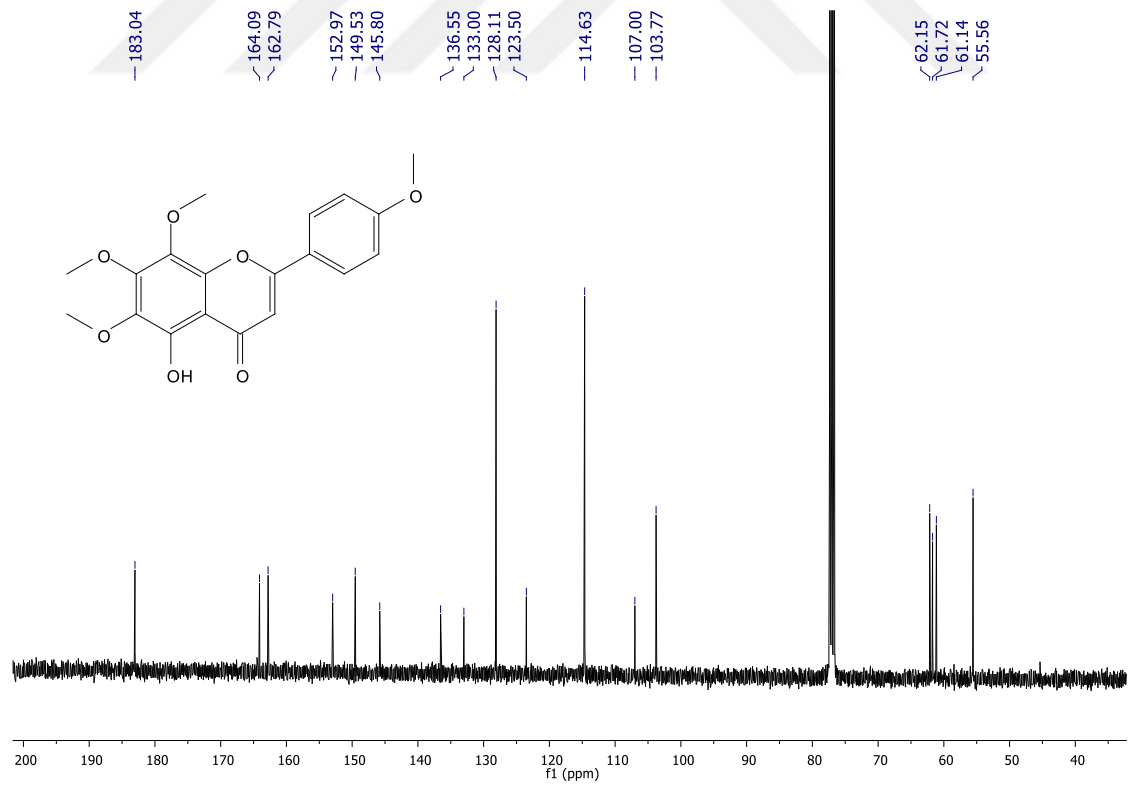
MD-5 molekülünün LC-TOF-MS spektrumu



MD-5 Molekülünün UV dalga boyu taraması

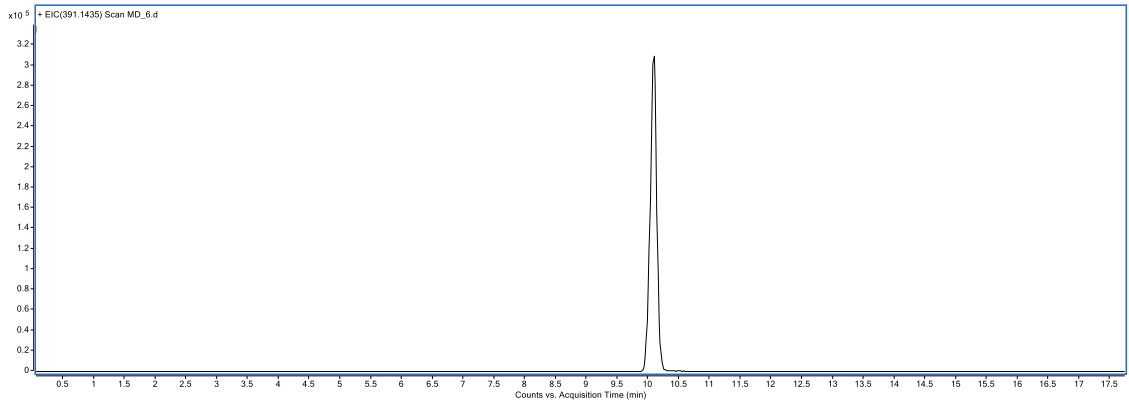


MD-5 Molekülünün ¹H-NMR spektrumu

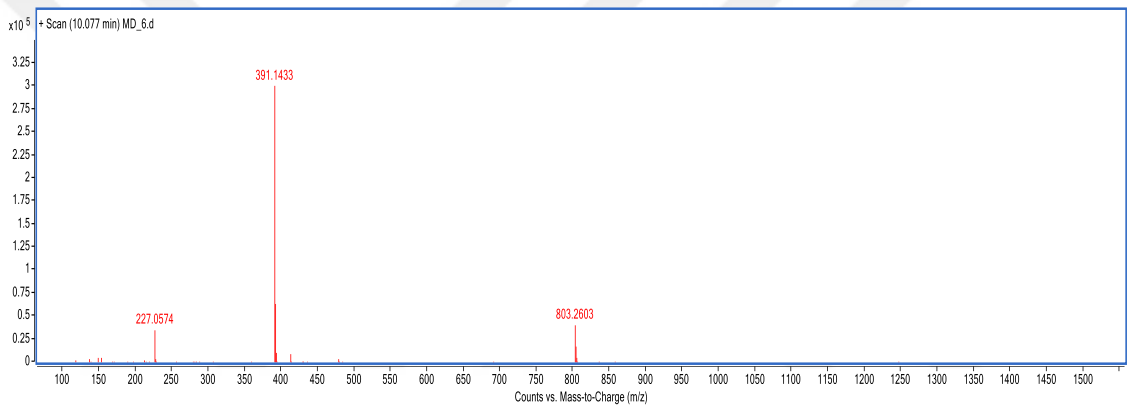


MD-5 Molekülünün ¹³C-NMR spektrumu

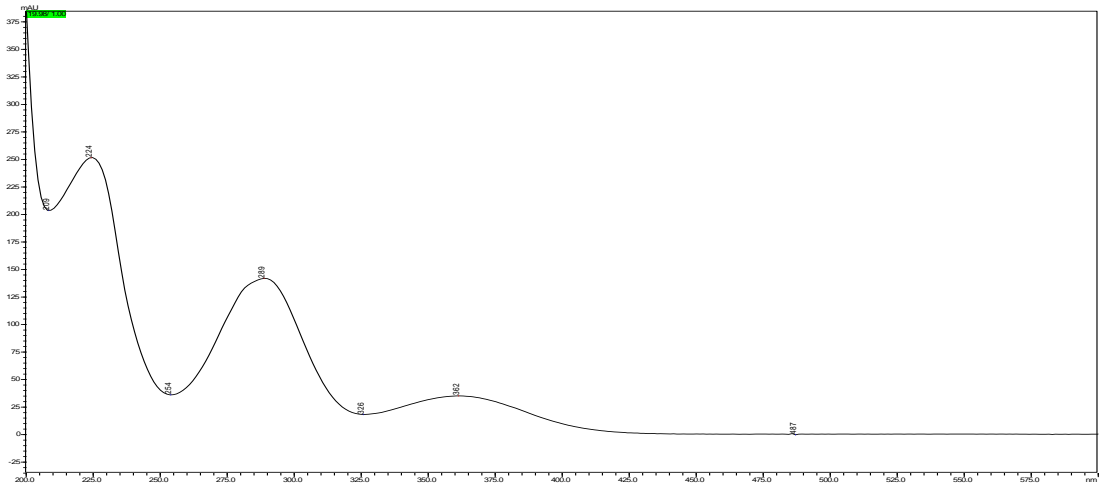
EK-6. MD-6 Molekülüne ait Spektral veriler



MD-6 Molekülünün LC-TOF-MS kromatogramı

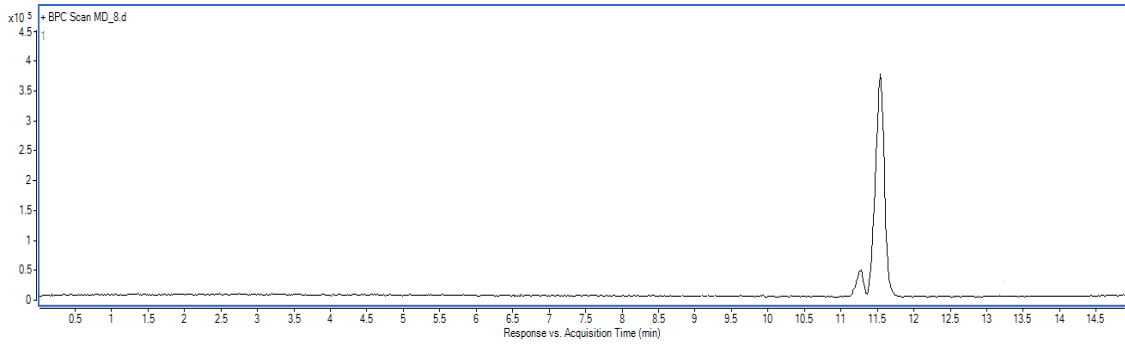


MD-6 Molekülünün LC-TOF-MS spektrumu

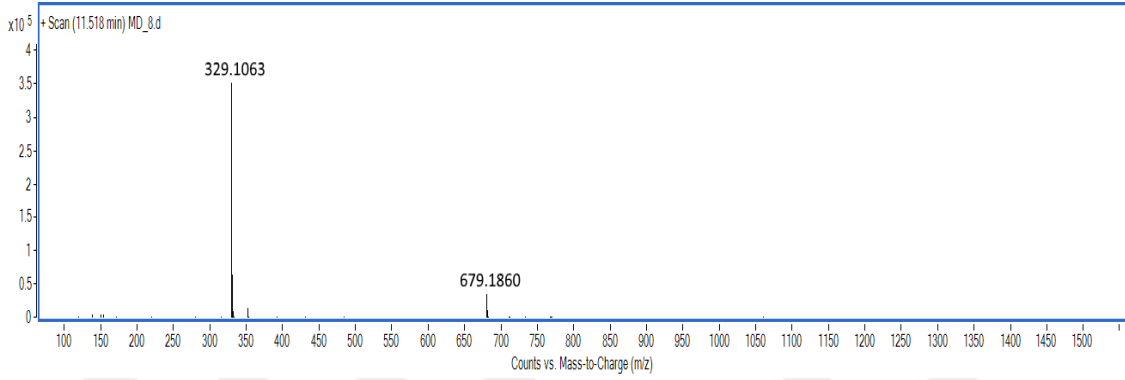


MD-6 Molekülünün UV dalga boyu taraması

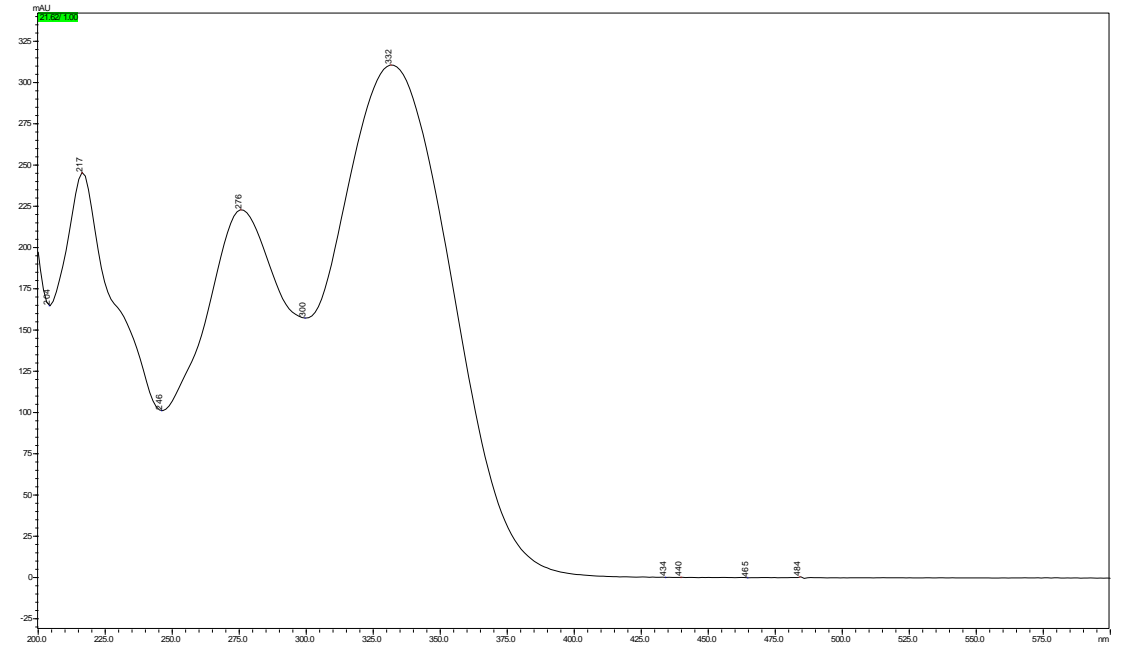
EK-7. MD-7 Molekülüne ait Spektral veriler



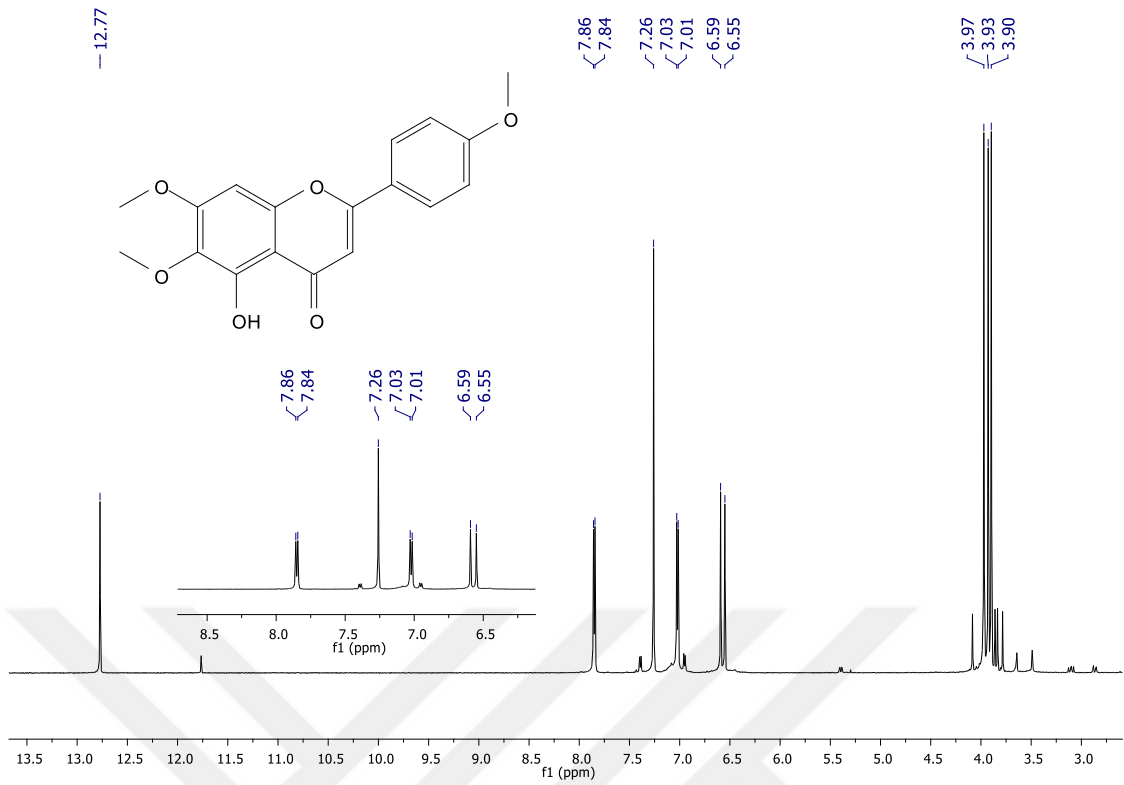
MD-7 Molekülünün LC-TOF-MS kromatogramı



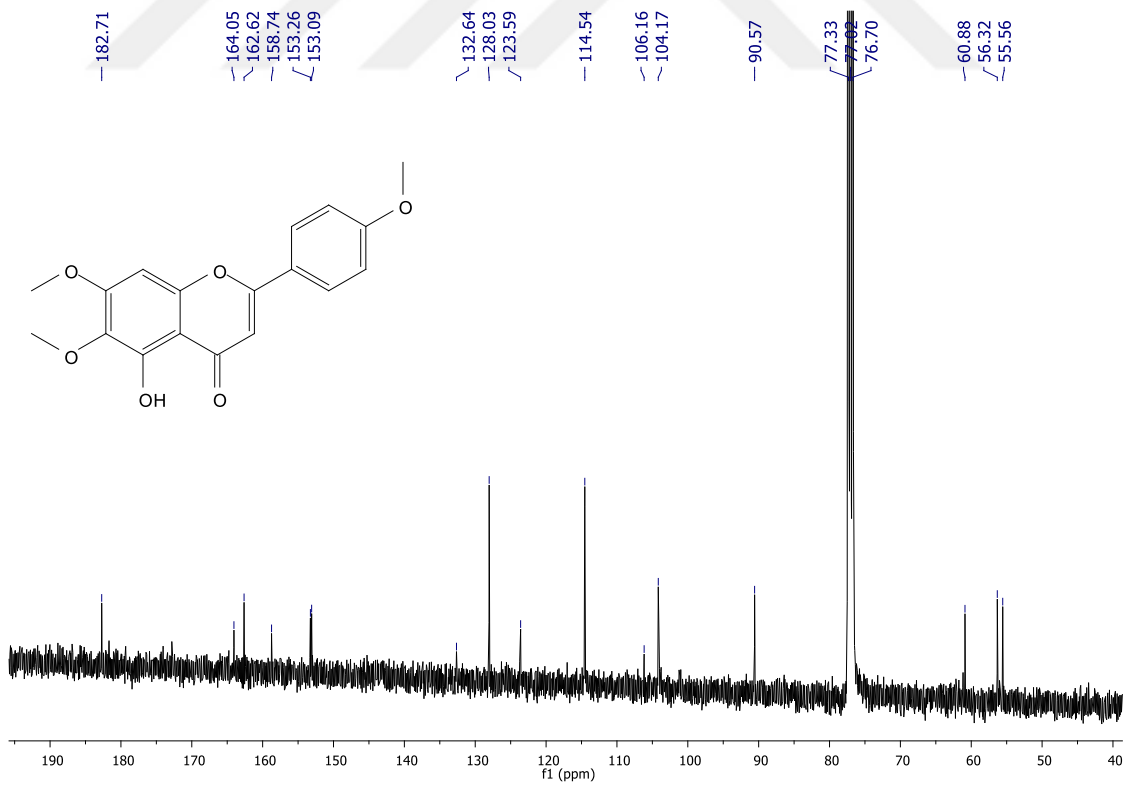
MD-7 Molekülünün LC-TOF-MS spektrumu



MD-7 Molekülünün UV dalga boyu taraması



MD-7 Molekülünün ¹H-NMR spektrumu



MD-7 Molekülünün ¹³C-NMR spektrumu

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Erdem Ozan
Doğum Tarihi ve Yer : 21.09.1990 / Antalya
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
Telefon : 0 507 187 65 67
e-mail : erdemozan.ddo@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi	--
Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi	2014
Lise	Muratpaşa Lisesi	2009

Kongreler

- V. Ulusal Polimer Bilim ve Teknolojisi Kongresi Tokat Teşekkür Belgesi
- 2015 Uşak Kromatografi Kongresi Katılım Belgesi

Deneyimli Olunan Çalışma Alanları

1. Kromatografik Teknikler

- Yağ Asitleri
- Uçucu Yağlar
- Pestisitler
- Fenolik Bileşikler
- Flavonoidler
- Bitkiler ve Doğal Ürünler
- HPLC/GC-MS/GC-FID/Flash Kromatografisi