

**ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Centaurea derderiifolia* BİTKİSİNDEKİ BİYOAKTİF BİLEŞİKLERİN
İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

Fatma BULUT

KİMYA ANABİLİM DALI

**ÇANKIRI
2015**

Her hakkı saklıdır.

TEZ ONAYI

Fatma BULUT tarafından hazırlanan '*Centaurea derderiifolia* Bitkisindeki Biyoaktif Bileşiklerin İzolasyonu Ve Karakterizasyonu' adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman:

Jüri Üyeleri

Başkan:

Üye:

Üye:

Üye:

Üye:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Sezgin ÖZDEN

Enstitü Müdürü

Kontrol edilmiştir.

Yunus Tuğberk SANALP

Bilgisayar İşletmeni

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Centaurea derderiifolia BİTKİSİNDEKİ BİYOAKTİF BİLEŞİKLERİN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Fatma BULUT

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

İkinci Tez Danışmanı: Doç. Dr. Tefik Özen

Bu araştırma kapsamında *Centaurea derderiifolia* bitkisi n-hekzan, diklorometan, kloroform, metanol, metanol-kloroform, çözücülerinde ekstraksiyona bırakıldı. Evaporatörde çözücülerini uçurulduktan sonra miktarı fazla olan ve antikanser aktivitesi yüksek olan (kloroform) ekstrekolon kromatografisine tabi tutuldu. Kolon kromatografisi sonrası EtOAc ile gelen fraksiyonlar birleştirilerek sephadex(LH-20)kolon kromatografisine tabi tutuldu. Daucosterin molekülü izole edildi ve yapısı NMR ve HPLC-TOF/MS yardımıyla aydınlatıldı. Anti kanser aktivitesi x CELLigence ile belirlendi. 3 farklı yöntem ile antioksidan aktiviteleri belirlendi. Ayrıca hekzan ekstrelerinin sabit yağları GC-MS ile ve diğer ekstrelerdeki fenolik bileşikler ise HPLC-TOF/MS ile belirlendi.

2015, 63 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: *Centaurea derderiifolia*, NMR, GC-MS, xCELLigence

ABSTRACT

Master Thesis

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN PLANT *Centaurea derderiifolia*

Fatma BULUT

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

Co-Supervisor: Doç. Dr. Tefik Özen

In this study, *Centaurea derderiifolia* leaves and seeds were extracted with n-hexane, dichloromethane, chloroform, methanol and methanol-chloroform. After the solvents evaporation, the amount of excess and high anticancer activity (chloroform) extract that we did column chromatography. After the column chromatography, the fractions obtained in ethylacetate combined fractions from Sephadex (LH-20) was subjected to column chromatography. The compound of Daucosterin which is isolated and defined by NMR and HPLC-TOF/MS. The compound was applied to anticarcinogenic activity tests by xCELLigence. Antioxidant activity was determined with three different methods. Besides fatty acids of hexane extracts by GC-MS, other phenolic compounds in extracts by the HPLC-TOF/MS were performed.

2015, 63pages

KeyWords: *Centaurea derderiifolia*, NMR, GC-MS, xCELLigence

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca değerli bilgi ve tecrübeleriyle her zaman yol gösteren, bana öğrencisi olma onurunu, gururunu ve mutluluğunu yaşatan değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. İbrahimDEMİRTAŞ'a,

Kilometrelerce uzakta olmasına rağmen, bilgi ve tecrübesini esirgemeyen her durumda bana inancıyla ve güveniyle destek olan değerli ikinci tez danışman hocam sayın Doç. Dr. Tevfik ÖZEN'e,

Tez yazımı konusunda ve pek çok konuda bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen her zaman yol gösteren değerli hocam Doç.Dr. Ayşe ŞAHİN YAĞLIOĞLU'na, antioksidan çalışmamda bilgilerinden ve tecrübelerinden yararlandığım moral desteğiyle yanımda olan hocam Arş. Gör. Feyza ÖKE ALTUNTAŞ'a, anti-kanser aktivite çalışmam için yardımlarını esirgemeyenArş. Gör. Serkan KOLDAŞ'a, Laborant Merve Banu KOÇ'a, ve Yrd. Doç. Dr. Muhammed ALTUN'a, izolasyon ve saflaştırma çalışmalarında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Prof. Dr. Gilbert Kapche DECCAUX'a, GC-MS ve HPLC/TOF çalışmalarında yardımlarından dolayı Uzman Fatih GÜL'e

Bu çalışmamı maddi olarak destekleyen Çankırı Karatekin Üniversitesi BAP birimine (Proje No:2013/20)

Hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen sabırla ve inançla yanımda olan aileme sonsuz saygı ve teşekkürleri bir borç bilirim.

Fatma BULUT

Çankırı, Temmuz 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	2
2.1.Centaurea Türleri İle İlgili Yapılan Çalışmalar	2
2.2.1. Genel özellikleri	4
2.2.2.Centaurea L.cinsinin genel özellikleri	5
2.3. Centaurea derderifolia Bitkisinin Yayılımı ve Özellikleri.....	6
2.5.Tıbbi Bitkiler	10
2.5.1.Tıbbi bitkilerin tarihi	10
2.5.2.Tıbbi bitkilerin kullanım alanları	10
2.6.SekonderMetabolitler	11
2.6.1.Steroidler	11
2.6.2.Sekonder metabolitlerin ayrıştırılması ve saflaştırılması	12
3.MATERYAL METOD	13
3.1.Bitkisel Materyal	13
3.1.1.Bitkinin toplanması, kurutulması ve koordinatları	13
3.2.1. Dolgu maddeleri ve belirteçler	14
3.2.2. Kullanılan kimyasal çözücüler	14
3.2.3. Biyolojik aktivite testleri için kullanılan kimyasallar	14
3.2.4 Yağ asitlerinin esterleştirilmesi.....	15
3.2.5.GC-MS parametreleri	15
3.2.6.Ekstrelerin HPLC-TOF/MS analizi	16
3.2.7. HPLC-TOF/MS programı	16
3.3.AntioksidanAktivite Testleri.....	20
3.3.1.Toplam fenol bileşik miktarlarının tespiti	20

3.3.2.DPPH radikalini giderim testi.....	21
3.3.3.Metalşelatlama aktivite testi	22
3.4.AntikanserAktivite Testleri	22
3.4.1.Tümörhücre (HeLa)proliferasyon deneyi	22
3.5.1.Flash kromotografisi	23
3.5.2.Kolon kromotografisi	23
3.5.3.İnce tabaka kromotografisi	24
4.BULGULAR	25
4.1.1.Bitkinin yaprak kısmının ekstraksiyon işlemi.....	25
4.1.2.Bitkinin tohum kısmının ekstraksiyon işlemi	26
4.2.1. Bitki ekstralarının antikanser aktiviteleri	28
4.2.2.Flash kromatografisi ile elde edilen moleküllerin anti-kanser aktivitesi	29
4.3.Antioksidan Aktivite Sonuçları	32
4.3.1.Ekstrelerinantioksidan aktivitesi	32
4.3.1.1. Ekstrelerin DPPH• radikalini giderim aktivitesi.....	32
4.3.1.2. Ekstrelerinmetal iyonlarını şelatlama aktivitesi	33
4.3.1.3. Ekstrelerintoplam fenol bileşik miktarları	34
4.3.2. Yaprak kloroform ekstrelerinden izole edilen maddelerin antioksidan aktivitesi.....	36
4.4. <i>C.derderiifolia</i> BitkisininGC-MS Sonuçları	36
4.5. <i>C.derderiifolia</i> Bitkisinin HPLC-TOF/MS Sonuçları	40
4.5.1.Yaprak ekstralarının HPLC-TOF/MS analiz sonuçları	40
4.6.CD-YK'nın Flash Kromotografisi Sonuçları.....	42
4.7.Kolon Kromotografisinden İzole Edilen Bileşiklerin Fiziksel ve Spektral Özellikleri.....	44
4.7.1 Daucosterin(1) Bileşiğinin Fiziksel ve Spektral Özellikleri.....	44
4.8.Flash Kromotografisi İle İzole Edilen Bileşiklerin Fiziksel ve Spektral Özellikleri.....	50
4.8.1. Bileşik 2'nin Fiziksel ve Spektral Özellikleri	50
4.8.2. Bileşik 3'ün Fiziksel ve Spektral Özellikleri	52
4.8.3. Bileşik 4'ün Fiziksel ve Spektral Özellikleri	54
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	56
KAYNAKLAR	62

SİMGELER DİZİNİ

<i>C.derderiifolia</i>	<i>Centaureaderderiifolia</i>
D	Dublet
dd	Dubletindubleti
DEPT	Distortionless Enhancement byPolarization Transfer
F	Flash
GC-MS	Gaz Kromatografisi- Kütle Spektrometresi
İTK	İnce Tabaka Kromatografi
J	Etkileşme Sabiti
MS	Kütle Spektrometresi
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
RTCA	Real Time Cell Analyzer
S	Singlet
T	Triplet
TLC	ThinLayerChromotografi
UV-VIS	Ultraviyole-Görünür Bölge
HMBC	HeteronuclearMultiple Bond Corralation
HMQC	HeteronuclearMultiple Quantum Corralation
COSY	CorrelatedSpectroscopy
DMSO	Dimetilsülfoksit
BHT	BütillenmişHidroksiToluen
BHA	BütillenmişHidroksiAnisol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Germacrene D bileşiği.....	2
Şekil 2.2 <i>Centaurea derderiifolia</i> Wagenitzbitkisi	6
Şekil 3.1 <i>Centaurea derderiifolia</i> bitkisinin yaprak-gövde ve tohum resimleri.....	13
Şekil 3.2 <i>C.derderiifolia</i> bitkisinin hekzan ekstrelerine uygulanan esterleştirme işlemi.....	15
Şekil 4.1 <i>C.derderiifolia</i> bitkisinden elde edilen bazı bitki ekstreleri	27
Şekil 4.2 CD-YK'nın HeLa hücrelerine karşı gösterdiği anti-kanser aktivite	29
Şekil 4.3 CD-TM'un HeLa hücrelerine karşı gösterdiği anti-kanser aktivite.....	29
Şekil 4.4 Bileşik 1'in (Daucosterin) HeLa hücrelerine karşı gösterdiği antikanser aktivite	30
Şekil 4.5 Bileşik 2'nin HeLa hücrelerine karşı gösterdiği antikanser aktivite	30
Şekil 4.6 Bileşik 3'ün HeLa hücrelerine karşı gösterdiği antikanser aktivite	31
Şekil 4.7 Bileşik 4'ün HeLa hücrelerine karşı gösterdiği antikanser aktivite.....	31
Şekil 4.8 Ekstrelerin DPPH'radikalini giderim aktivitesi	33
Şekil 4.9 Ekstrelerin metal şelatlama aktivitesi (1mg/mL konsantrasyonda)	34
Şekil 4.10 <i>C.derderiifolia</i> bitkisinin yaprak kısmı hekzan ekstresine ait GC-MS kromatogramı..	38
Şekil 4.11 <i>C.derderiifolia</i> bitkisinin tohum kısmı hekzan ekstresine ait GC-MS kromatogramı..	40
Şekil 4.12 Daucosterin (1)Bileşiği.....	44
Şekil 4.13 Daucosterin (1) bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu (600 MHz,DMSO-d ₆)	46
Şekil 4.14 Daucosterin bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu (600 MHz, DMSO-d ₆).....	47
Şekil 4.15 Daucosterin bileşiğinin HMBC spektrumu (600 MHz, DMSO-d ₆).....	48
Şekil 4.19 Bileşik 2'nin ¹ H-NMR spektrumu (600 MHz, DMSO-d ₆)	50
Şekil 4.20 Bileşik 2'nin ¹³ C-NMR spektrumu (600 MHz, DMSO-d ₆)	51
Şekil 4.21 Bileşik 2'nin HMBC spektrumu (600 MHz, DMSO-d ₆)	51
Şekil 4.23 Bileşik 3'ün ¹³ C-NMR spektrumu (600 MHz, DMSO-d ₆)	53
Şekil 4.24 Bileşik 3'ün HMBC spektrumu (600 MHz, DMSO-d ₆)	53
Şekil 4.25 Bileşik 4'ün ¹ H-NMR spektrumu (600 MHz, DMSO-d ₆).....	54
Şekil 4.26 Bileşik 4'ün ¹³ C-NMR spektrumu (600 MHz, DMSO-d ₆).....	55
Şekil 4.27 Bileşik 4'ün HMBC spektrumu (600 MHz, DMSO-d ₆)	55

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 3.1 Analizi gerçekleştirilen fenolik bileşenler	17
Tablo 4.1 <i>Centaurea derderiifolia</i> yapraklarında ekstraksiyon verimi ve oranlarının çözücülere göre değişimi.....	26
Tablo 4.2 <i>Centaurea derderiifolia</i> tohumlarında ekstraksiyon verimi ve oranlarının çözücülere göre değişimi.....	27
Tablo 4.3 <i>C. derderiifolia</i> ekstrelerinin antioksidan aktiviteleri ve toplam fenol içerikleri	35
Tablo 4.4 <i>C. derderiifolia</i> yaprak kloroform ekstresinden izole edilen saf maddelerin antioksidan aktivitesi	36
Tablo 4.5 <i>C. derderiifolia</i> bitkisinin yaprak kısmı hekzan ekstresine ait sabit yağ asidi bileşenleri.....	37
Tablo 4.6 <i>C. derderiifolia</i> bitkisinin yaprak kısmı hekzan ekstresine ait ana bileşenler	38
Tablo 4.7 <i>C. derderiifolia</i> bitkisinin tohum kısmı hekzan ekstresine ait sabit yağ asidi bileşenleri	39
Tablo 4.8 <i>C. derderiifolia</i> bitkisinin tohum kısmı hekzan ekstresine ait ana bileşenler	39
Tablo 4.9 Yaprak ekstrelerinin fenolik bileşenleri ve miktarları (mg fenolik/1kg kuru bitki) ...	41
Tablo 4.10 Tohum ekstrelerinin fenolik bileşenleri ve miktarları (mg fenolik/1kg kuru bitki)..	42
Tablo 4.11 <i>C. derderiifolia</i> bitkisinin yaprak kısmının kloroform ekstresine ait flash kromatografisi tablosu	43
Tablo 4.12 Daucosterin (1) bileşiğinin kimyasal kayma değerleri	45

1. GİRİŞ

Geleneksel tedavi yöntemlerinde kullanılan doğal ilaçların en önemli kaynağını bitkiler oluşturmaktadır. Bitkilerden ekstreler hazırlanarak ilaç olarak kullanılması, M.Ö. 2700 yıllarına kadar uzanmaktadır. Ülkemizde tıbbi bitkiler üzerine yapılan ilk araştırmalar 1933'ten itibaren başlamıştır. Türk farmakopisine kayıtlı bitki sayısı 140 civarında olmasına rağmen halk arasında tıbbi amaç için kullanılan bitki sayısının çok daha fazla olduğu düşünülmektedir (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu 2013).

Dünyada tedavi amaçlı ve baharat olarak kullanılan bitkilerin sayısının 20.000 civarında olduğu Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından rapor edilmektedir. Ülkemiz tıbbi ve aromatik bitki çeşitliliği yönünden dünyanın en zengin ülkelerinden birisidir. Bu zenginliğin önemli bir göstergesi olarak gösterilecek tıbbi bitkilerden biri *Centaurea* cinsidir. Asteraceae familyasına ait bir cins olan *Centaurea* türleri halk arasında antidiyabetik, antidiyareik (ishal giderici), antiromatizmal, antienflamatuvar, kolagog (safra söktürücü), koleretik(safra akımını sağlayıcı), dijestif, stomasik (mideyi kuvvetlendirici), diüretik (idrar arttırıcı), adet söktürücü, astrenjan (dokuları sıkıştıran veya daraltan bir ilaç), hipotansif (tansiyon düşürücü), ateş düşürücü, sitotoksik, antibakteriyel amaçla kullanılmaktadır (Reyhan vd. 2004).

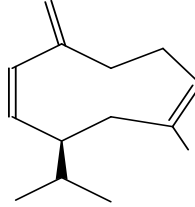
Ülkemizde önemli bir yeri olan *Centaurea* cinsinin değişik kısımlarının halk arasındaki kullanışı ve literatürde bu cins ile belirtilen birçok aktivite çalışmalarının yapılmış olması nedeniyle *Centaurea derderiifolia* türü araştırılmaya değer bulunmuştur. Bu bitki türü ile ilgili antimikrobial aktivite dışında yapılan bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu makalelerden yola çıkarak bitkinin sekonder metabolitlerinin kromatografik ve spektroskopik yöntemler kullanılarak belirlenmesi yapılarının aydınlatılması, antikanser ve antioksidan aktivitelerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. *Centaurea* Türleri İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Dalar ve ark (2012) yapmış oldukları bir çalışmada; ülkemize endemik olan *Centaurea karduchorum* ve birkaç bitkinin antioksidan aktivitelerini ve fenolik bileşenlerini incelemişlerdir. Tıbbi amaç için kullanılan yaprak ve çiçek ekstralarının hem çok yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu hem de fenolik bileşen açısından çok yüksek olduğu bulgusuna ulaşmışlardır. Ekstreler içerisinde temel bileşenlerin flavonoidler ve hidroksisinnamik asit olduğunu bulmuşlardır.

Zengin ve ark (2012) yapmış oldukları bir çalışmada, Türkiye'ye endemik *Centaurea drabifolia* subsp. *detonsa* bitkisinin uçucu yağ bileşenleri ve metanolekstrelerinin antioksidan kapasitesini (toplam fenolik madde içeriği, serbest radikal giderme aktivitesi (DPPH) ve demir iyonu indirgeme gücü incelenmiştir. GC-MS ile uçucu yağ analizinde temel bileşenin % 44.83 oranında Germacrene D bileşiğine ait olduğu belirlenmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Germacrene D bileşiği

Aktümsek ve ark (2013) yapmış oldukları bir çalışmaya göre; üç endemik *Centaurea* türünün (*C. polypodiifolia* var. *pseudobehen*, *C. pyrrhoblephara* ve *C. antalyense*) metanol ve sulu özlerinin antioksidan ve kolinesteraz inhibitör faaliyetleri incelenmiştir. Bu bitki özleri içindeki antioksidan aktivite fosfomolibden dâhil olmak üzere, *in vitro* bir model ile değerlendirilmiştir. Serbest radikal süpürücü testleri (DPPH ve ABTS⁺), β -carotene/linoleic asit test sistemi, metal şelat tayini, demir ve kolinesteraz inhibitör faaliyetleri Ellman kolorimetrik yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Toplam, fenol, flavonoid ve saponin içeriği ölçülmüştür. Değerlendirilen bu *Centaurea* özlerinde, en yüksek antioksidan etki *C. polypodiifolia*'da tespit edilmiştir. *C. pseudobehen* ve *C.*

antalyense'de ise AChE enzimin belirgin bir inhibisyonu gözlenmiştir. Bu çalışma *Centaurea* türlerinin, gıda, farmakolojive kozmetik gibi bazı sektörlerde bir antikolinesteraz ajan ve antioksidan kaynağı olabileceğini göstermiştir.

Forgo ve ark (2012) yapmış oldukları bir çalışmada; *Centaurea jacea* bitkisinin kloroform ekstresinden cirsiliol, isokaempferide, apigenin, hispidulin, cnicin, 4'-acetylcnicin, centaureidin ve ilk defa 1 β -isobutanoyl-2-angeloyl-glucose bileşiklerini izole etmişlerdir. İzole edilen bileşiklerin, HeLa, MCF-7 ve A431 hücreleri üzerine tümör hücre büyümesini engelleme aktivitesi incelenmiştir. Sonuç olarak Centaureidin bileşiğinin önemli derecede bir inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir.

Zengin ve ark (2010) toplamış oldukları *Centaurea* türlerinden (*C. pulchella*, *C. patula*, *C. tchihatcheffii*) elde ettikleri metanol ekstrelerininve bu üç türün yağ asidi bileşenlerinin antioksidan aktivitelerini standartlarla karşılaştırarak incelemişlerdir. Elde edilen bulgulara göre fenolik bileşenlerle paralel olarak *C. pulchella* metanol ekstresinin en fazla aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Yağ asitlerinin aktiviteleri incelendiğinde içerisindeki temel bileşen olan linoleik asit ve linolenik asit oranına göre IC₅₀ değerleri standartlara en yakın olan *C. pulchella* bitkisine ait olduğu bulgusuna ulaşılmıştır.

Seghiri ve ark(2009)yaptıkları bir çalışmada; Tunus'a endemik olan *Centaurea africana* Lamk var. *africana* (Bonnet) M bitkisinin çiçekleri ve toprak üstü kısımlarından 10 tane bilinen, 2 tane yeni bileşik izole etmişler. İzole edilen bileşiklerden algerianin insan kemik iliği kanser hücresine (HL-60) karşı sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir.

Shoeb ve ark (2005);*Centaurea schischkini*'nin çekirdeklerinden elde ettikleri metanol ekstresinin HPLC analizi sonucunda schischkiniin adı verilen yeni bir indol alkaloid ve dört tane lignan (arctiin, matairesinoside, matairesinol, arctigenin) bulmuşlardır. Schischkiniin'nin yapısı UV, HR FABMS ve 1D, 2D NMR teknikleri kullanılarak belirlenmiştir. Bileşiklerin serbest radikal giderme aktivitesi DPPH metodu kullanılarak belirlenmiştir. Toksikite testleri MTT yöntemiyle CaCo-2 kolon kanser hücreleri kullanılarak test edilmiştir. Arctigenin kayda değer bir antikanser aktivite gösterirken, schischkiniin'nin ılımlı bir antikanser aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Centaurea bracteata Scop. bitkisinin toprak üstü kısımlarını inceleyen Flamini ve ark (2001) bitkiden 19 tane bileşik izole etmişlerdir. Bir tane sterol glukozit, iki adet fenolik asit, üç adet quinic asit türevleri ve iki tanesi yeni olan on üç tane flavonoidin yapısını belirlemişlerdir. Bileşiklerin yapıları FABMS, 1D ve 2D NMR teknikleri kullanılarak aydınlatılmıştır. Yeni bileşikler: centabractein, bracteoside, bilinen bileşikler ise β -sitosterol-3-glucoside, protocatechuicacid, axillarin 7-glucoside, axillarin, nepetin, centaureidin, isokaempferide, hispidulin, caffeicacid, 6-hydroxyluteolin-6, 40-dimethylether, jacein, jaceidin, luteolin, 5-caffeoylquinic acid, apigenin 7-glucuronide, 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3-caffeoylquinic acid methyl esterdir.

Barbourve ark(2004), Lübnan halk tıbbında yaygın olarak kullanılan ve endemik olan *Centaurea ainetensis*'den elde ettikleri su ve metanol ekstralarının antimikrobiyal etkisini *in vitro* olarak test etmişlerdir. Antimikrobiyal etkinin belirlenmesinde disk difüzyon metodu kullanılmıştır. Sonuç olarak bitkinin metanol ekstresi su ekstresine göre daha iyi aktivite göstermiştir. *Centaurea ainetensis*'in çiçeklerinden elde edilen metanol ekstresinin %88.8 oranında antimikrobiyal aktivite gösterdiği bulgusuna ulaşılmıştır.

2.2. Asteraceae (Compositae) Familyasının Özellikleri

2.2.1. Genel özellikleri

Compositae (Asteraceae) familyası, çiçekli bitkilerin en büyük familyalarından biridir. Familyanın adı yıldız şeklinde çiçekleri bulunan bir cins olan Aster türünden gelmektedir. Compositae familyası hem vejetatif hemde generatif parçaları yönünden eşsiz morfolojik yapıları, kimyasal bileşenlere ve fitocoğrafyaya sahip taksonları içinde barındırmaktadır (Meo 2009).

Familya üyelerinin büyük bölümünü ılıman bölgelerde yayılış gösteren otsu formlar oluşturmaktadır. Compositae üyeleri Afrika'nın ağaç, çalı ve otsu formasyonlarında, Güney Amerika ve Avustralya'da yayılış gösterir. Ayrıca familya üyeleri Antartika kıtası dışında dünyada geniş yayılım gösterir. Yalnızca tropikal yağmur ormanlarındaki yayılışı zayıf kalmaktadır (Heywood 1978).

Bu familyaya ait çiçeklerde kaliks ve korolla çok değişik şekiller gösterir. Kaliks genel olarak farklılaşarak, papus adı verilen tüy veya pul şeklinde bir yapı meydana getirir. Korollanın petalleri birleşik, tüpsü, dilsî, ipliksi ya da nadir olarak iki dudaklıdır. Anterler stilusun etrafında bir tüp şeklinde birleşmiş, nadir olarak serbestir. Anterler büyük ölçüde korolla tüpü tarafından çevrilmiştir (Tutin vd. 1976).

2.2.2.Centaurea L.cinsinin genel özellikleri

Centaurea cinsi bir yıllık iki yıllık ya da daha uzun ömürlü olan bitkileri kapsamaktadır. Bu bitkilerin genellikle yaprakları almalı (alternat) üzerleri tüylü ya da pürtüklüdür. Morfolojileri değişkendir. Kapitula heterogam ve disk şeklindedir. İnvolumen yumurta şeklinde ya da küresidir. İnvolumen yapraklar çok sıralıdır. Çiçek tablasında sert tüyler bulunmaktadır. Çiçeklerin renkleri genellikle pembe, mavi, sarı, beyazımsı ve erguvanidir (Wagenitz 1975).

Centaurea L. cinsinin endemizm oranı yaklaşık % 60'dır. Endemizm oranının bu kadar yüksek olması bu cinsin gen merkezinin Türkiye olduğu kanaatini güçlendirmektedir.

2.3. *Centaurea derderiifolia* Bitkisinin Yayılımı ve Özellikleri



Şekil 2.2 *Centaurea derderiifolia* Wagenitz bitkisi

Bitkinin Sistematığı

Latince Adı: *Centaurea derderiifolia*

Âlem: Plantae

Bölüm: Kapalı Tohumlu

Sınıf: Çift Çenekli

Takım: Asterales

Familya: Asteraceae

Cins: *Centaurea*

Tür: *Centaurea derderiifolia* Wagenitz

Endemik: Endemik

Bitkinin Morfolojik Özellikleri

Yapı: ot

Çiçeklenme: Haziran-Temmuz

Rakım (En Düşük-En Yüksek): 1000-1900 m

Bitkinin Tanınma Özellikleri:

Bitki Yetiştirme Alanları: Step tepeler

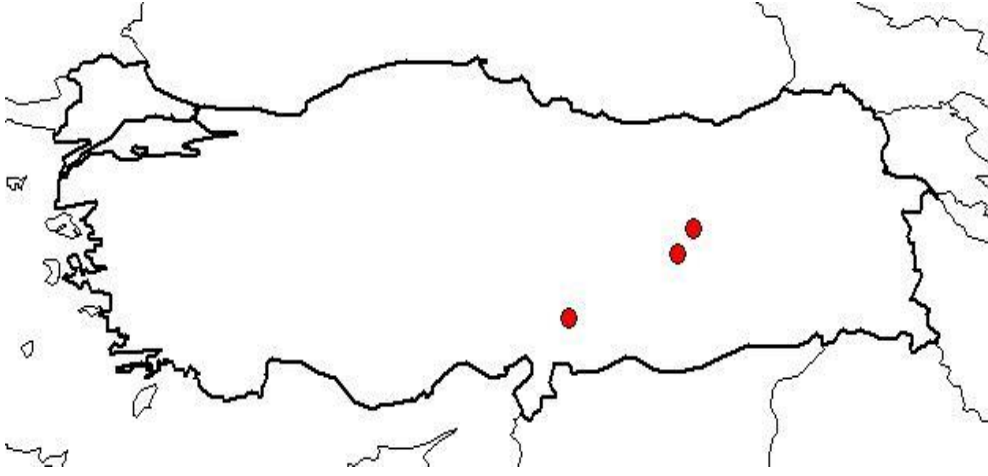
Yaşam Süresi: Çok yıllık

Yetiştirildiği Şehirler: Sivas, Tunceli, Elazığ, Kahramanmaraş

Element: İran-Turan

Türkiye Dağılımı: Doğu Anadolu Bölgesi

Genel Dağılım: Türkiye



Şekil 2.3 *Centaurea derderiifolia* bitkisinin illere göre dağılışı

2.4. *Centaurea* L. Türlerinin Biyolojik Aktivitesi

Tıbbi bitkilerden biri olan *Centaurea* L. Asteraceae familyasına ait bir cinstir ve Türkiye’de 168 türü vardır. Bitki Peygamber çiçeği, Zerdali diken, Çoban kaldıran, Timur diken gibi Türkçe isimlerle bilinmektedir. *Centaurea* türleri ile ilgili yapılmış pek çok çalışma bulunmaktadır (Reyhan vd. 2004).

Özellikle Batı ve Güneybatı Anadolu’da yaygın olarak bulunan *C. cyanus* türünün kurutulmuş çiçekleri halk arasında % 5’lik infüzyonları halinde ishal kesici, kuvvet verici, iştah açıcı ve göğüs yumuşatıcı olarak ve ayrıca kozmetik endüstrisinde kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak *C. chilensis* bitkisinin sulu ekstresi halk arasında antipiretik ve antiromatizmal olarak kullanılmaktadır (Reyhan vd. 2004).

İspanya’da yetişen *C. aspera*, *C. seridis* var. *maritima*, *C. melitensis* gibi pek çok *Centaurea* türü bitkinin infüzyon halinde halk arasında hipoglisemiyen olarak kullanıldığı bilinmektedir (Reyhan vd. 2004).

Çin geleneksel tedavisinde *Centaurea uniflorab* bitkisi ateş tedavisinde ve zehirlenmelere karşı kullanılmaktadır. Ayrıca bitkinin etil asetat ekstresinin membran lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği buna ek olarak damar sertliğine karşı etkilerinin olduğu da bilinmektedir. *Centaurea melitensis*’in acı lezzetinden dolayı halk arasında dijestif ve tonik olarak kullanıldığı ayrıca diüretik ve hipoglisemiyen etkilerinin de bulunduğu tespit edilmiştir (Reyhan vd. 2004).

Centaurea pallescens bitkisinin Mısır’da, acı lezzetinden dolayı stomasik, dijestif ve diüretik olarak kullanıldığı belirlenmiştir. Mısır halk tedavisinde yer alan diğer bir *Centaurea* türü olan *Centaurea sinaica*’nın sitostatik, diüretik, antipiretik (ateş düşürücü), antimalaryal, astrenjan, fitotoksik, antineoplastik, allerjenik, stomaşik, tonik ve emanagog (kadınlarda adet getirici) olarak kullanılmakta olduğu tespit edilmiştir (Reyhan vd. 2004).

İspanya'nın Barros bölgesinde *C. ornata* bitkisinin halk arasında depüratif, kolagog ve antiromatizmal amaçla kullanıldığı; ayrıca bitkinin toprak üstü kısımlarının Portekiz'de hipoglisemiyen, toprak altı kısımlarından hazırlanan ekstrelerin ise antispazmotik amaçla kullanıldığı bilinmektedir (Reyhan vd. 2004).

İsrail'de 1999 yılında yapılan bir çalışmada, *Centaurea eryngoides* ve *Centaurea pallescens* bitkilerinin de aralarında bulunduğu 66 Negev çöl bitkisinin sulu ekstrelerinin antimalaryal etkileri *Plasmodium falciparum*'a karşı incelenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, *Centaurea eryngoides*'in % 96'dan daha yüksek bir inhibitör aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (Reyhan vd. 2004).

Barrero ve ark (2000) yapmış oldukları bir çalışmada; 6 *Centaurea* türünden elde ettikleri seskiterpen ve seskiterpen laktonların ve salitenolit ile farklı kaynaklardan elde ettikleri kostunolid, dehidrokostuslakton, liknofolid ve eremantolid gibi farklı yapılara sahip seskiterpen laktonların antifungal etkilerini *Cunninghamella echinulata*'ya karşı incelemişlerdir. Farklı yapıya sahip olmalarına karşın benzer polariteye sahip kostunolid ve dehidrokostuslakton *Centaurea echinulata*'ya karşı dikkate değer bir antifungal etki göstermiştir. Sonuçlar analiz edildiğinde, seskiterpen laktonların antifungal etkileri ile polarite arasında ters orantı olduğu hipotezini doğruladığı anlaşılmıştır (Reyhan vd. 2004).

Eğirdir (Isparta) yöresinde geleneksel halk ilacı olarak kullanılan bitkilerin tespit edilmesine yönelik yapılan bir araştırmada, *Centaurea iberica*'nın mide ağrılarına ve böcek, yılan sokmalarına karşı kullanıldığı saptanmıştır (Reyhan vd. 2004).

Doğu Anadolu'da yetişen *C. behen* Ak behmen ve Zerdali dikenini olarak bilinen ve çiçekleri mideyi ve adet getirici olarak kullanılmaktadır. Kuzeybatı Anadolu'da yetişen ve Çoban kaldıran, Timur dikenini olarak bilinen *C. calcitrapa*'nın % 2-6'lık infüzyonları dahil ateş düşürücü olarak; çayır peygamberi ismiyle bilinen ve Kuzeydoğu Anadolu'da yaygın olarak yetişen *C. jacea* ateş düşürücü, adet getirici, kabız yapıcı ve iştah açıcı olarak kullanıldığı tespit edilmiştir (Reyhan vd. 2004).

2.5.Tıbbi Bitkiler

2.5.1.Tıbbi bitkilerin tarihi

Anadolu halkının yabani bitkileri ilaç olarak kullanması çok eski devirlere dayanmaktadır. Hitit dönemine ait tıbbi tabletlerde bulunan reçete formüllerinde kayıtlı bitki adları bunun bir kanıtı olarak gösterilebilir. Mısır'da M.Ö. 2500 yıllarında cesetlerin mumyalanmasında öncelikle nane olmak üzere pek çok bitkinin kullanıldığı bilinmektedir. Mumyalamada bitkilerden elde edilen ekstratlarla cesetler muamele edilmekte diğer yöntemler birlikte uygulanarak ve cesetlerin yüzyıllarca bozulmadan saklanabilmesine olanak sağlanmaktaydı. Birçok kutsal kitapta da hem şifa hem de bir güç kaynağı olarak bitkilerden bahsedilmektedir (Başoğlu 1982).

2.5.2.Tıbbi bitkilerin kullanım alanları

Tıbbi ve aromatik bitkiler gıda, ilaç, kozmetik, boya, parfüm, baharat gibi pek çok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde; gıdaların muhafaza süresini uzatabilmek için bitki ekstratlarının kullanımı her geçen gün artmaktadır. Tıbbi aromatik bitkiler ve uçucu yağlar; hazır yiyecek ürünlerine ilave edildiğinde gösterdikleri antimikrobiyal etki ile yiyeceklerin depolanma süresini arttırmaktadır (Farag vd. 1989).

Farmakolojik olarak üretilen ilaçların etken maddelerinin en az %25'i bitkilerden elde edilmektedir. Sentetik olarak üretilen birçok ilacın etken maddeleri de ilk defa bitkilerden izole edilen kimyasalların yapı benzerleridir (Kandavel ve Sekar 2010). Bitkilerin sentezlemiş oldukları flavonoid, alkaloid, terpenoid, tanin, berberin, kinin ve emetinler gibi kimyasallar enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılabilir (Hussain vd. 2011). Bitkilerin bazıları taze yaraların tedavisinde kullanılırken, diğerleri kronikleşmiş yaraların tedavisinde kullanılabilir (Khalil vd. 2007).

2.6.Sekonder Metabolitler

Bitkilerin temel yapı ve besin depo maddeleri olan primer metabolitler (nükleik asitler, proteinler, yağlar ve karbonhidratlar gibi) dışında bir de bitkilerin hayatiyetleri bakımından mutlak gerekli olmayan ve miktarları bazen ölçülemeyecek düzeylerde olan alkoloitler, uçucu yağlar, fenoller, glikozitler, steroidler, saponinler, flavonidler, tanenler, reçineler gibi küçük molekülü sekonder metabolitler bulunur. Bu sekonder metabolitler genel olarak alkoloitler, terpenoitler, fenoller olmak üzere üç temel grupta sınıflandırılır. Sekonder metabolitler genellikle antifungal, antibakteryal, antivirütik ve antioksidan etkilidir. Bu nedenden dolayı bitkilerde hastalık ve zararlılara karşı savunma, stres ve olumsuz çevre faktörlerine karşı korunma gibi önemli görevleri vardır. Sekonder metabolitler, bitkilerde gösterdikleri benzer etkileri insan metabolizmasında da gösterdiklerinden (örneğin alkoloitler daha çok ilaç olarak haşhaş bitkisi morfin kaynağı olarak, fenolik maddeler daha çok antioksidan olarak, biberiye bitkisi rosmarik asit kaynağı olarak) büyük önem taşırlar (Baydar 2009).

Sekonder metabolitler bitkilerde renk, tat ve koku gibi duyuşsal özelliklerin oluşumunda da büyük rol oynar. Sekonder metabolitlerce zengin olan tıbbi ve aromatik bitkiler aynı zamanda baharat, boya, parfüm bitkileridir. Örneğin Gül yaprağında bulunan geraniol, anason yağında bulunan anethol, kekik yağında bulunan karvakrol ve nane yaprağında bulunan mentol koku oluşumundan sorumludur (Baydar 2009).

2.6.1.Steroidler

Steroidler bitkisel kaynaklı kolesterol türevi olan sterollerdir. Siklik izoprenoidlerin yaygın bir grubunu oluştururlar. Genel olarak bitkisel sterol olarak adlandırılır ve 4-desmetil steroller 4.karbonunda metil bulundurmeyen normal fitosteroller, 4-monometil steroller ve 4,4'-dimetilsteroller olarak 4 grupta sınıflandırılırlar. Doğada bitkisel yağlar, yağlı tohumlar, bitki tohumları ve tahıllarda bulunmaktadır. Kaynaklara göre bitki türevli sterollerin 200'den fazla türevi bilinmektedir. En yaygın olarak bulunanları ise başta β -sitosterol olmak üzere stigmasterol, kampesterol ve ergosteroldür. Bu fitosteroller ve kolesterolün hepsi 4-desmetil sterol grubunda yer almaktadır.

Stanollar doğada eser miktarda bulunmaktadır. Sterol halkasında çift bağı yoktur. Stanoller, doğada sterollerden daha az bulunmakta ve sterollerin hidrojenlenmesi sonucu oluşmaktadır. Sitosterollerin doyurulması ile sitostanoller, kompesterollerin doyurulması ile kompestanoller oluşmaktadır. Fitosteroller, kolestrolden farklı olarak yan zincirlerinde ekstra bir metil ve etil grubu veya bir çift bağ bulundurmaktadır. Fitosteroller gıda katkısı olarak gıda sektöründe kullanılmaktadır. Ayrıca bağırsaklarda kolesterol emilmesini azalttıklarından kolesterol azaltıcı bir etkiye sahiptirler.

2.6.2.Sekonder metabolitlerin ayrıştırılması ve saflaştırılması

Homojen ve heterojen karışımlar fiziksel ve kimyasal özelliklerindeki farklılıklardan yararlanılarak fazlara ayrılır ve sonra bu fazlar mekanik olarak birbirinden ayrıştırılarak saf maddeler elde edilir.

Kromatografik ayırma yöntemlerinde; ayrılması istenen maddeler ile reaksiyon vermeyen sabit faz ve hareketli faz seçilir. Ayrılacak olan maddenin özelliğine göre, kullanılacak yöntem belirlenir. Bu yöntem uygun sabit ve hareketli faz seçilerek ayırım yapılabilir (Baydar 2009).

3.MATERYAL METOD

3.1.Bitkisel Materyal



Şekil 3.1 *Centaurea derderiifolia* bitkisinin yaprak-gövde ve tohum resimleri

3.1.1.Bitkinintoplanması, kurutulması ve koordinatları

Proje kapsamında yer alan Asteraceae familyasına ait *Centaurea derderiifolia* bitkisi Elazığ Keban-Bölükçalı (Hacısor) köyü, Ensedere 26.8 mevki, kayalık yamaç, 1200 m yüksekliğinden toplandı. Bitki kuru ve güneş ışığının girmediği depolarda kurutuldu.

3.2. Kullanılan Cihazlar ve Aletler

- GC-MS: Agilent 5975 C MSD-7890A-GC
- HPLC-TOF/MS: Agilent TOF 6210
- NMR:Agilent-600 MHz Premium Compact
- FTIR-ATR: PerkinElmer Spektrum-100 FT-IR Spectrometer
- Flash kromatografisi: Teledyne Isco-CombiflashRf
- Gerçek Zamanlı Hücre Analizörü: Roche marka singleplate modeli

- UV spektrofotometresi: Rayleigh marka- UV 2601 modeli
- Döner buharlaştırıcı: IKA
- Magnetik karıştırıcı: IKA
- Santrifüj:NF 800

3.2.1. Dolgu maddeleri ve belirteçler

- ❖ Silikajel (Merck 60-230 mesh), Silikajel İTK tabakaları F₂₅₄(20x20), Alimuna İTK Tabakaları Merck (20x20), Redisep flash column-40 g silica,
- ❖ Sefadeks LH -20(Ge Healthcare kolon dolgu materyali)
- ❖ Etanol- sülfirik asit belirteci:1 ml sülfirik asit çözeltisi ve 9 ml etanol karışımı bir süre buzda bekletilerek hazırlanır. Püskürtmeden sonra 125-130 derecede birkaç dakika ısıtılır.
- ❖ Serik sülfat belirteci:12 g amonyum seryum (IV) sülfat 50 mL derişik sülfirik asit ve 450 mL destile su ile hazırlanır.Püskürtmeden sonra 105-110 derecede birkaç dakika ısıtılır.

3.2.2. Kullanılan kimyasal çözücüler

Bu çalışmada hekzan, diklorometan, kloroform, etil asetat, metanol, dietil eter, etanol, bütanol gibi kimyasal çözücüler kullanıldı. Kullanılan bütün çözücüler literatürde yer alan destilleme sistemine göre saflaştırılarak kullanıldı.

3.2.3. Biyolojik aktivite testleri için kullanılan kimyasallar

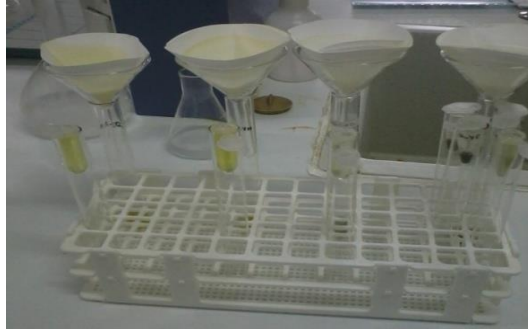
Bu çalışmada antioksidan aktivite çalışmalarında kullanılan kimyasallardan sodyum karbonat, folin-ciocalteu fenol ayracı, dimetilsülfoksit (DMSO), metanol, diklorometan, kloroform ve hekzan Merck'ten, EDTA, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), 3-(2-

pyridil)-5,6-bis(4-fenil-sulfonikasıit)-1,2,4-triazin (ferrozin), demir (II) klorit (FeCl₂), gallik asit, BHA ve BHT Sigma-AldrichGmbH'ten temin edilmiştir.

Antikanser aktivite çalışmaları için;Tripsin EDTA (%25) (Sigma)Penicilin streptomycin solüsyonu (Sigma) DPBS (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ve Fetal Bovine Serum (Heat inactivated) (Sigma),kimyasal maddeleri temin edilerek kullanılmıştır.

3.2.4 Yağ asitlerinin esterleştirilmesi

İlk olarak 10 µg/mLlik hazırlanan yağ asitleri ekstresinden 3 mL alınıp bir tüpe aktarıldı. Üzerine 5 mL 1 M KOH çözeltisi (metanol'de çözülmüş) eklendi ve çalkalandı. Bu tüpte 2 ayrı faz oluştu.Üst faz alınarak mikrofiltre ile vialle süzöldü ve GC-MS cihazına verildi.



Şekil 3.2C.*derderiifolia* bitkisinin hekzan ekstrilerine uygulanan esterleştirme işlemi

3.2.5.GC-MS parametreleri

Bitkinin hekzan ekstrelerindeki hidrokarbonların analizi için Agilent 5975 C MSD-7890-GC serisi kolon HP-5MS %5 Phenyl Methyl Silox 250 °C: 30 m x 250 µm x 0.25 µm, taşıyıcı gaz olarak helyum kullanıldı. Enjeksiyon hacmi ve sıcaklığı 1µl, 250 °C, splitsiz, dedektör ve voltajı FID şartlarında bir programla verildi.

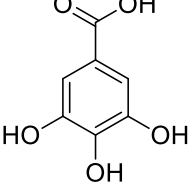
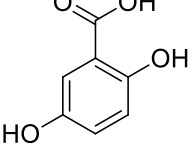
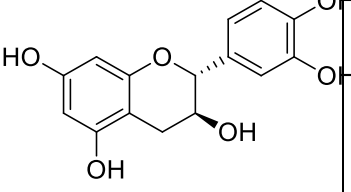
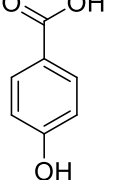
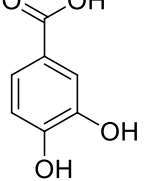
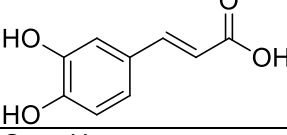
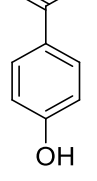
3.2.6. Ekstrelerin HPLC-TOF/MS analizi

Bitkinin diklorometan, kloroform, metanol, metanol-kloroform, etil asetat/su, bütanol/su ekstrelerinin fenolik madde içeriği HPLC-TOF/MS analizi ile gerçekleştirildi. Analiz işlemleri sırasında gallik asit, gentisikasit, kateşin, 4-hidroksibenzoik asit, protokateşoik asit, kafeik asit, 4-hidroksibenzaldehit, rutin, *p*-kumarik asit, ferulik asit, apigenin-7-glikozit, naringenin, kamferol, rosmarinik asit, salisilik asit, kersetin, resveratrol, klorojenik asit, vanilik asit, hesperidin, sinnamik asit, sisorik asit, ellajik asit, protokateşoik asit etil ester olmak üzere toplam 24 bileşenin kalitatif ve kantitatif analizi gerçekleştirildi. (Tablo 3.1)

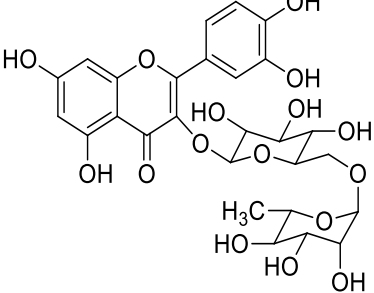
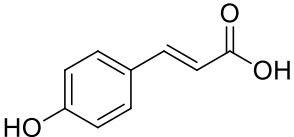
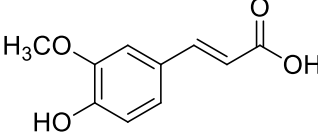
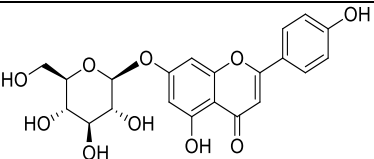
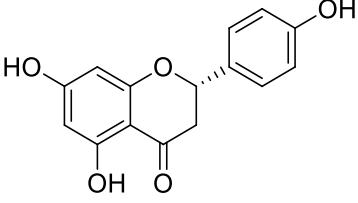
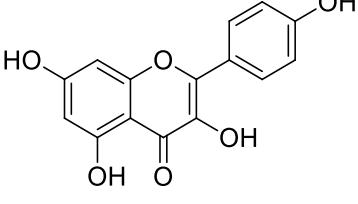
3.2.7. HPLC-TOF/MS programı

Analiz Agilent technologies HPLC-TOF/MS 1260 infinity 6210 cihazı kullanıldı. Enjeksiyon hacmi 1 mikrolitre, kolon sıcaklığı 35°C dir. Hareketli faz olarak %1'lik formik asit çözeltisi ve asetonitril (Merck, HPLC grade), kolon olarak ZORBAXSB-C18 4.6 mm × 100 mm (3.5 µm) ve dedektör olarak TOF/MS kullanıldı.

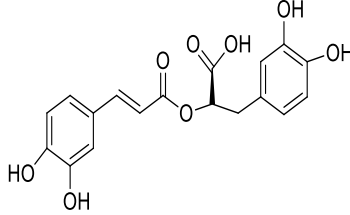
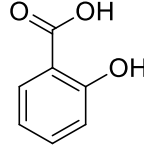
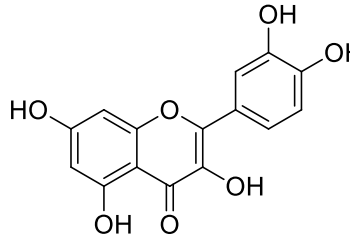
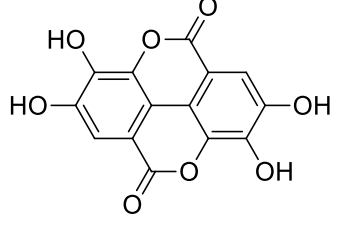
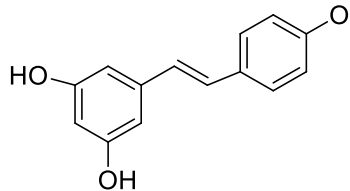
Tablo 3.1 Analizi gerçekleştirilen fenolik bileşenler

No	Molekül Adı	Molekül Formülü	Kapalı Formülü	Gerçek Molekül Ağırlığı (g/mol)	Hesaplanan Molekül Ağırlığı (g/mol)
1	Gallik asit		$C_7H_6O_5$	169,0142	169,0112
2	Gentisik Asit		$C_7H_6O_4$	153,0193	153,0163
3	Kateşin		$C_{15}H_{14}O_6$	289,0718	289,0675
4	4 – hidroksibenzoik Asit		$C_7H_6O_3$	137,0244	137,0217
5	Protokateşoik Asit		$C_7H_6O_4$	153,0193	153,0159
6	Kafeik Asit		$C_9H_8O_4$	179,0350	179,0316
7	4-hidroksi benzaldehit		$C_7H_6O_2$	121,0295	121,0271

Tablo3.1Analizi gerçekleştirilen fenolik bileşenler (devam)

No	Molekül Adı	Molekül Formülü	Kapalı Formülü	Gerçek Molekül Ağırlığı (g/mol)	Hesaplanan Molekül Ağırlığı (g/mol)
8	Rutin		$C_{27}H_{30}O_{16}$	609,1461	609,1395
9	p-kumarik Asit		$C_9H_8O_3$	163,0401	163,0367
10	Ferulik Asit		$C_{10}H_{10}O_4$	193,0506	193,0469
11	Apigenin-7-glikozit		$C_{21}H_{20}O_{10}$	431,0984	431,0939
12	Naringenin		$C_{15}H_{12}O_5$	271,0612	271,0698
13	Kamferol		$C_{15}H_{10}O_6$	285,0405	285,0369

Tablo 3.1 Analizi gerçekleştirilen fenolik bileşenler (devam)

No	Molekül Adı	Molekül Formülü	Kapalı Formülü	Gerçek Molekül Ağırlığı (g/mol)	Hesaplanan Molekül Ağırlığı (g/mol)
14	Rosmarinik Asit		$C_{18}H_{16}O_8$	359,0772	359,0732
15	Salisilik Asit		$C_7H_6O_3$	137,0244	137,0220
16	Kersetin		$C_{15}H_{10}O_7$	301,0354	301,0317
17	Ellajik Asit		$C_{14}H_6O_8$	300,9990	300,9946
18	Resveratrol		$C_{14}H_{12}O_3$	227,0714	227,0678

3.3.AntioksidanAktivite Testleri

Antioksidanlar, hem direkt hem de dolaylı olarak ilaçların, karsinojenlerin ve ksenobiyotiklerin toksik radikal reaksiyonlarının istenmeyen etkilerine karşı hücreleri koruyan maddeler olarak tanımlanmaktadır (Mercan 2004).

Doğal kaynaklı antioksidanlar meyvelerde, tahıllarda, baklagillerde, şifalı bitkilerde ve bitki kaynaklı içeceklerde bol miktarlarda bulunmaktadır. Bu nedenle besin maddelerinde özellikle taze meyve ve sebzelerde antioksidan aktivite tespiti öncelikli olduğundan bu aktiviteye sahip sekonder metabolitlerinin saflaştırılması, karakterizasyonu ve aktivitelerinin belirlenmesi önem kazanmaktadır.

Bu kaynaklarda bulunan antioksidanlar; tokoferoller, flavonoidler, fenolik asitler gibi fenolik bileşikler, alkaloid, klorofil, protein, amin gibi azotlu bileşikler, polifonksiyonlu organik asitler ve karotenlerdir. Sentetik antioksidanların toksik olabileceğini ve kansere yol açabileceğini ortaya koyan çalışmalar sonucunda bazı ülkelerde kullanılmalarına ilişkin sınırlamalar ve yasaklar getirilmiştir. Sentetik antioksidanlar hakkındaki şüpheler, doğal antioksidanlara olan eğilimi artırmış ve bitki kaynaklı antioksidanlar üzerinde yapılan çalışmalar artmıştır (Ak 2006).

3.3.1.Toplam fenol bileşik miktarlarının tespiti

Toplam fenolik bileşik miktarları, Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak, gallik asit eşdeğeri olarak belirlenmiştir(Singleton ve Rossi 1965). Bunun için; 0,1 ml ekstrakt 0,2 ml % 50'lik folin reaktifi ile karıştırılmış ve 3 dk. inkübe edilmiştir. Bu karışıma % 2'lik Na₂CO₃ eklenmiş ve 45dk.oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra çözeltilerin 760 nm dalga boyundaki absorbans değerleri köre karşı spektrofotometrede okunmuştur. Singleton ve ark (2005) şaraptaki toplam fenollerini ölçmek için bu yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntem; test edilen örneğin, reaktif oksidasyonunu inhibe etmesi için gerekli miktarını ölçmektedir. Bu yöntem gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde ve antioksidan çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Magalhães vd. 2006).

3.3.2.DPPH'radikalini giderim testi

Ekstrelerin serbest radikal giderim aktiviteleri 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH') kullanılarak belirlenmiştir (Brand-Williams vd. 1995). Farklı konsantrasyonlardaki ekstre çözeltileri % 0,004 DPPH'çözeltisi ile karıştırılmış ve oda sıcaklığında 30 dk. inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra örneklerin 517 nm dalga boyundaki absorbans değerleri spektrofotometrede köre karşı okunmuştur. Pozitif kontrol olarak BHT ve BHA kullanılmıştır.

Serbest radikal giderim aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

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

(Burada; A₀ kontrolün absorbansı ve A₁ örneğin absorbansıdır.)

DPPH' yöntemi, lipid oksidasyonunu önleyen antioksidanlar için genel olarak kabul edilmiş bir mekanizmadır. Bu yöntemin esası; DPPH' içeren çözelti ile hidrojen atomu verme eğilimi olan bir molekülün (antioksidan çözeltilisinin) karıştırılması sonucu DPPH' radikalinin indirgenmesine ve çözeltinin başlangıçta mor olan renginin kaybolmasına dayanmaktadır. DPPH' radikalinin miktarındaki azalma 517 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek aktivite tayini yapılabilmektedir. Antioksidan aktivite başlangıçtaki DPPH'derişiminin %50'sinin azalması için harcanan antioksidan miktarını ifade eden IC₅₀ değeri ile verilmektedir (Brand-Williams vd. 1995). Düşük IC₅₀ yüksek aktivitenin varlığını göstermektedir. DPPH'yöntemi çeşitli bitkiler ve gıdalardan elde edilen ekstrelerveya bileşiklerdeki serbest radikal söndürücü aktiviteyi tespit etmek amacıyla birçok araştırmacı tarafından kullanılmakta olan bir yöntemdir. Teknik olarak basit ve hızlı bir yöntem olmasına rağmen birtakım dezavantajları vardır. Peroksil radikali ile hızlı bir şekilde reaksiyona giren bazı antioksidanlar DPPH' ile yavaş bir şekilde reaksiyona girebilmektedir (Huang vd. 2005).

3.3.3.Metalşelatlama aktivite testi

Metal şelatlama aktivitesi, Decker ve Welch'in (1990) belirledikleri yönteme göre bazı modifikasyonlar kullanılarak yapılmıştır. Bu işlem için bitki  rneklarine 2 mM FeCl₂ ve 5 mMferrozin çözeltisi ilave edilmiştir(Decker ve Welch 1990).

 zeltiiler vortekside karıştırdıktan sonra oda sıcaklığında 10dk. bekletilmiştir. İnkübasyondan sonra  zeltiilerin 562 nm dalga boyundaki absorbands değerleri k re karşı spektrofotometrede okunmuştur.

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

(Burada; A₀ kontrolün absorbandsı ve A₁  rneğin absorbandsıdır).

3.4.AntikanserAktivite Testleri

3.4.1.T m rh cresi (HeLa)proliferasyon deneyi

Besi yeri olarak % 10 fetal bovine serum ve % 2 streptomisin-penisilin içeren DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) kullanıldı ve analizler ink bator içinde (% 5CO₂, % 100 nem) 37  C'da yapıldı.

İlk olarak herkuyucuğa 50'şer L besi yeri konulan EPlate9615 dk. steril kabinde ve 15 dk. inkübatörde bekletildi. Sonrasında ink batoriindeki istasyona yerleştirildi ve arka plan (background) okuması yapıldı. Daha sonrakuyucuklara her bir kuyucukta 2,5x10⁴ adet HeLa hücresi olacak şekilde 100  L hücre süspansiyonu koyuldu. Bundan sonra plaka yarım saat steril kabinde ve odakoşullarında bekletilerek hücrelerin kuyucuk tabanına yerleşmesi beklendi. Bu plakaistasyona yerleştirilerek 80 dk. boyunca 10'ar dakika aralıklarla ölçüm yapıldı. Bu sürede hücreler kuyucuk tabanına yerleşerek normal büyüme periyoduna girdi. Daha sonra istasyondan çıkarılan plakanın kuyucuklarına steril DMSO ve besi yeri kullanılarak hazırlanan ekstre  zeltiilerinden kuyucuklardaki son derişimler 250, 100 ve 50 g/mL olacak şekilde  zeltiiler eklendi. Sonrasında besiyeri ile kuyucuklardaki son hacim 200  L'ye tamamlandı. Eklemelerden sonra plaka hemenistasyona yerleştirildi ve 48 saat boyunca 10 dakika aralıklarla ölçüm

gerçekleştirildi. Testler üçer tekrarlı yapıldı ve grafikler standart sapma çubukları ile verildi.

3.5.Kromotografik Yöntemler

3.5.1.Flash kromatografisi

Ekstraksiyon işlemi ardından yapılan antikanser aktivite testi sonucunda en yüksek etkiyi gösteren bitkinin yaprak kısmının kloroform ekstresindeki bileşenlerin ayrılması için flash kromatografisi işlemi uygulandı. Bu çalışmada 40.00 g'lık flash kolonu (TeledyneIsco-CombiflashRfmarka) kullanılmıştır.

3.5.2.Kolon kromatografisi

Bu çalışmada elde edilen hedef ekstredeki bileşenlerin ayrılması için kolon kromatografisi işlemi uygulandı. Kolon kromatografisi cam kolonlarda dolgu maddesini kuru yükleme yaparak gerçekleştirildi. Ekstre uygun bir çözücüde çözüldüğüne bir miktar silikajel eklenir. Ekstrenin silikajel tarafından emilmesi sağlandı. Ekstrenin içindeki çözücü tamamen uzaklaştığında kolona ilk önce silikajel dolduruldu. Silikajelin kolon içindeki üst tabakası çepelere vurularak düzleştirildi ekstre karışımı kolona dolduruldu. Kolon kromatografisinde ayırımı yapılacak karışımlar önce İTK ile incelendi. Buradan elde edilen sonuçlar doğrultusunda uygun çözücüler sabit mobil faz veya gradyent elüsyon yöntemleri ile kolon kromatografisinde kullanıldı.

3.5.3.İnce tabaka kromatografisi

Ekstredeki bileşenlerin ayrılması için uygulanan flash kromatografisi işlemleri sonucunda elde edilen benzer fraksiyonların belirlenmesi amacıyla ince tabaka kromatografisi uygulandı. Flash kromatografisinden alınan fraksiyonlarasilikajel kaplı alüminyum plakalara tatbik edilerek uygun çözücü sistemlerinde yürütüldü. Maddelere ait spotlar UV (254 ve 366 nm) ışık altında incelendi. UV ışığı altında görünmeyen bileşenler iyot, Serik sülfat gibi reaktiflerle görünür hale getirildikten sonra değerlendirme yapıldı. Rf değerleri benzer olan maddeler aynı maddeler olarak değerlendirildi.

4.BULGULAR

Bu çalışmada gerçekleştirilen, bitki örneklerinin ekstre edilmesi, ayrılması, saflaştırması, yapı tayini işlemleri ve antioksidan aktivite testleri Çankırı Karatekin Üniversitesi Kimya Bölümü Bitki Araştırma Laboratuvarı'nda yapıldı. Antiproliferatif aktiviteye bağlı doz çalışmaları Çankırı Karatekin Üniversitesi Hücre Kültür Laboratuvarı'nda yapıldı.

4.1.Ekstraksiyon İşlemi

4.1.1.Bitkinin yaprak kısmının ekstraksiyon işlemi

Yaklaşık olarak 2kg olan *Centaurea derderiifolia* bitkisinin oda koşullarında kurutulmuş yaprak kısımları küçük parçalar haline getirildikten sonra sıvı azot ile dövülerek parçalandı. Tamamen toz haline getirilen yaprak kısmı 9Lhekzan 5 gün boyunca oda şartlarında maserasyon yöntemiyle 3 kez ekstraksiyona tabi tutuldu. Elde edilen ekstraktların çözücülerini düşük basınç altında (600 mmHg) kuruluğa kadar evapore edildi. Tüm ekstraksiyon işlemleri sonunda elde edilen ham ekstraktlar birleştirildi. Kalan posa sırası ile diklorometan, kloroform, metanol, metanol-kloroform çözücülerini kullanılarak aynı şekilde ekstrakte edildi. Bu işlem sonunda elde edilen ham ekstrakt miktarları hesaplandı (Tablo 4.1).Son olarak kalan bitki posası kurutuldu ve 4 saat su ile kaynatıldı. Elde edilen ekstrakt önce tülbent sonra adi süzgeç kağıdı ile süzüldü. Sulu ekstrakttaki su evaporatörde uzaklaştırıldı. Su ekstraktı önce etil asetat sonra da n-bütanol kullanılarak 4 gün ara ile ekstrakte edildi ve çözücülerini evaporatörde uzaklaştırıldı.

Tablo 4.1 *Centaurea derderiifolia* yapraklarında ekstraksiyon verimi ve oranlarının çözücülere göre değişimi

Kullanılan Çözücü	Bitkinin Kodu	Ekstre Miktarı (g)	% Verim
Hekzan	CD-YH	28,264	1,41
Diklorometan	CD-YD	59,996	2,99
Kloroform	CD-YK	11,366	0,57
Metanol	CD-YM	62,928	3,15
Metanol-Kloroform	CD-YMK	32,37	1,62
Su/Etilasetat	CD-Ye	1,274	2,77
Su/n-Bütanol	CD-YB	1,425	3,09

4.1.2.Bitkinin tohum kısmının ekstraksiyon işlemi

Yaklaşık olarak 397.16g olan *Centaurea derderiifolia* bitkisinin tohum kısmı 3L hekzan kullanılarak 5 gün ara ile oda şartlarında 3 kez ekstrakte edildi. Elde edilen ekstratların çözücüleri düşük basınç altında (600 mmHg) kuruluğa kadar evapore edildi. Tüm ekstraksiyon işlemleri sonunda elde edilen ham ekstratlar birleştirildi. Kalan posası sırası ile diklorometan, kloroform, metanol, metanol-kloroform çözücüleri kullanılarak aynı şekilde ekstrakte edildi. Bu işlem sonunda elde edilen ham ekstratların miktarları hesaplandı (Tablo4.2). Son olarak kalan bitki posası kurutuldu ve 5 saat su ile kaynatıldı. Elde edilen ekstre önce tülbent sonra adi süzgeç kağıdı ile süzüldü. Elde edilen su fazı oda sıcaklığına kadar soğutuldu ve bir ayırma hunisine alındı. Ayırma hunisine içindeki su fazı kadar etil asetat eklendi ve ekstraksiyon işlemi uygulandı. Etil asetat(EA) fazları ayrıldıktan sonra kalan su fazı bütanol kullanılarak 4 gün ara ile ekstrakte edildi. EA fazı ve bütanol fazı evaporatör kullanılarak çözücülerinden uzaklaştırıldı ve böylece ham ekstratlar elde edildi.

Tablo 4.2 *Centaurea derderiifolia* tohumlarında ekstraksiyon verimi ve oranlarının çözücülere göre değişimi

Kullanılan Çözücü	Bitkinin Kodu	Ekstre Miktarı (g)	% Verim
Hekzan	CD-TH	12,6	3.17
Diklorometan	CD-TD	4.581	1.15
Kloroform	CD-TK	1.737	0.44
Metanol	CD-TM	18.811	4.74
Metanol-Kloroform	CD-TMK	8.606	2.17
Su/Etilasetat	CD-Te	3,102	0.78
Su/Bütanol	CD-TB	1.529	0.38



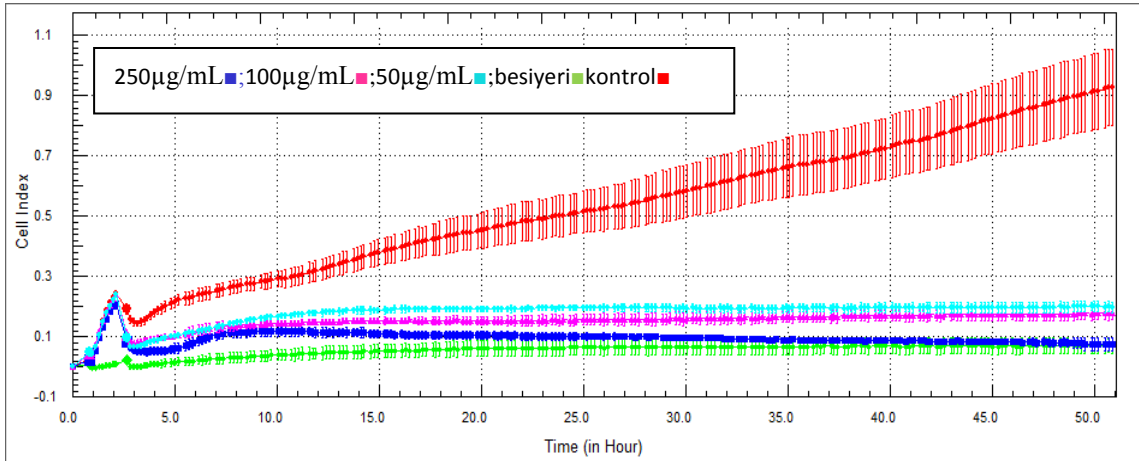
Şekil 4.1 *C. derderiifolia* bitkisinden elde edilen bazı bitki ekstraktları

4.2. Antikanser Aktivite Sonuçları

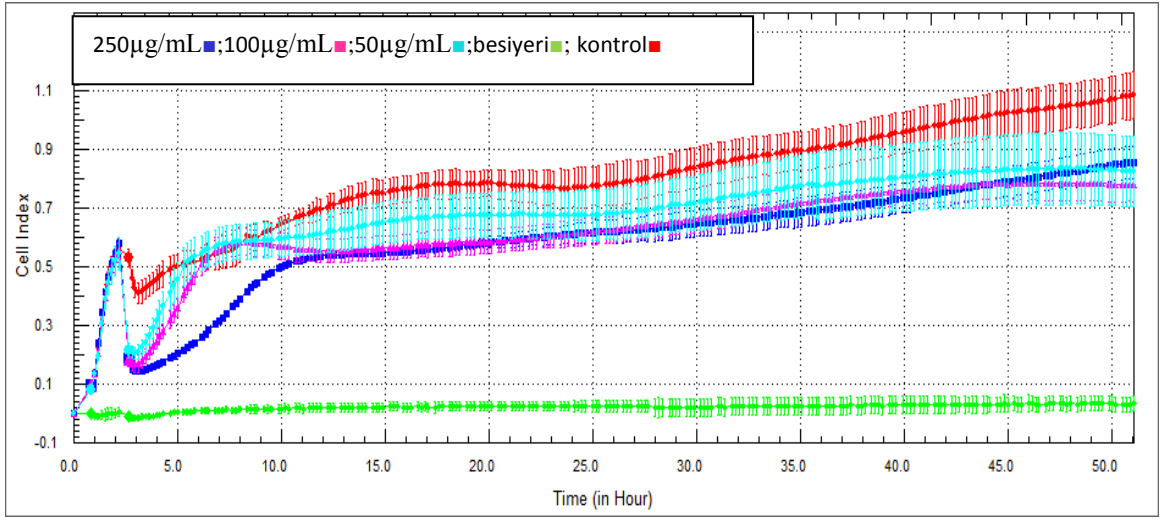
4.2.1. Bitki ekstralarının antikanser aktiviteleri

Elde edilen bütün ekstralere antikanser testi uygulandı. Bunların içerisinde en yüksek antioksidan aktiviteyi bitkinin tohum kısmının metanol ekstresi (CD-TM) ve çok yüksek antikanser aktiviteyi bitkinin yaprak kısmının kloroform ekstresi (CD-YK) gösterdi (Şekil 4.2'de ve Şekil 4.3).

Şekil 4.2 incelendiğinde, CD-YK ekstresinin artan doza karşılık aktivitesinde bir artış gözlenmekle birlikte, kontrole kıyaslandığında HeLa hücrelerine karşı çok yüksek bir aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.2 CD-YK'nın HeLa hüresine karşı gösterdiği anti-kanser aktivite



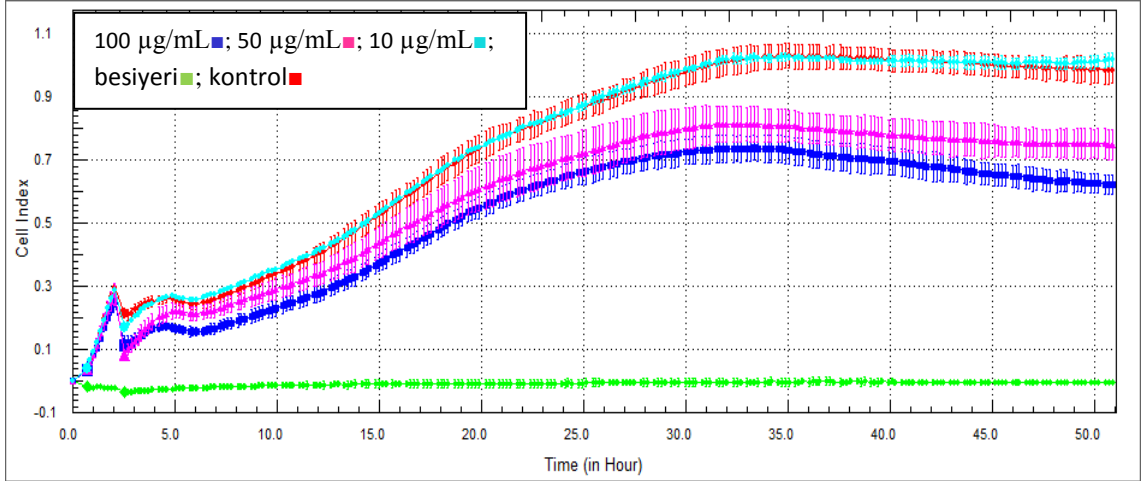
Şekil 4.3 CD-TM'un HeLa hüresine karşı gösterdiği anti-kanser aktivite

Şekil 4.3 incelendiğinde, CD-TM ekstresikontrolle kıyaslandığında HeLa hücrelerine karşı düşük bir aktivite göstermiştir. TM ekstresi bütün antioksidan aktivite testlerinde çok yüksek bir aktivite göstermesine karşın düşük bir antikanser aktivite gösterdiği için saflaştırma ve izolasyon işlemleri CD-YK ekstresi üzerinden devam etmiştir.

4.2.2. Kolon kromatografisi ile elde edilen molekülün anti-kanser aktivitesi

Kolon kromatografisi sonucunda izole edilen saf bileşiğe anti kanser testi uygulandı. Sonuçlar Şekil 4.4'de görüldüğü gibidir.

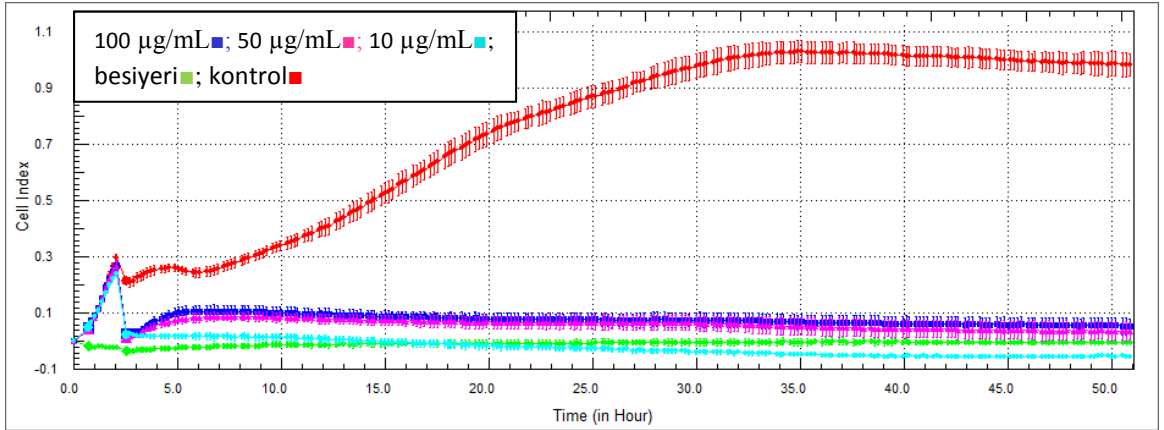
Şekil 4.4 incelendiğinde; Daucosterin (1) bileşiğinin doza bağlı olarak aktivitesinde net bir değişim gözlenmemiştir. Kontrolle kıyaslandığında HeLa hücrelerine karşı 50 ve 100µg/mL konsantrasyonlarda ılımlı bir aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.4 Bileşik 1'in (Daucosterin) HeLa hüresine karşı gösterdiği antikanser aktivite

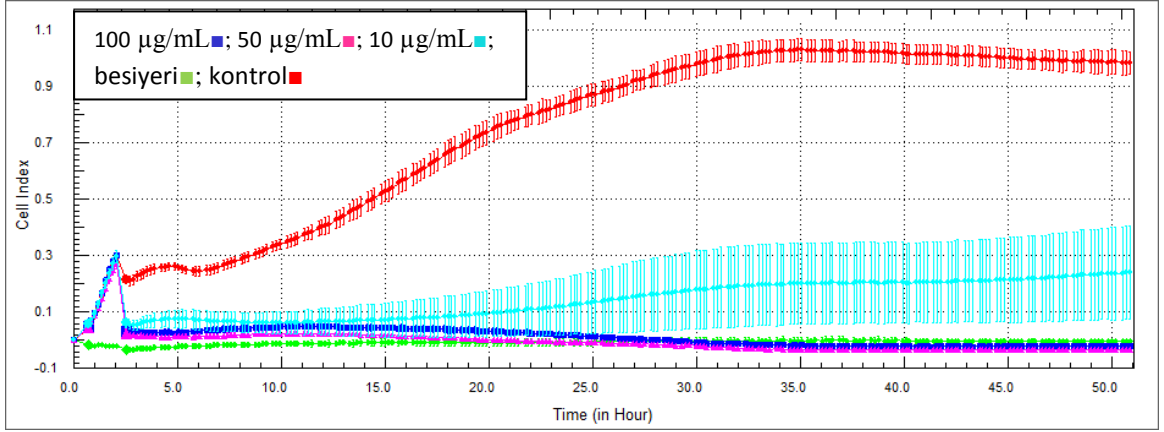
4.2.3 Flash kromatografisi ile elde edilen moleküllerin anti-kanser aktivitesi

Flash kromatografisi sonucunda izole edilen 2, 3, 4 bileşiklerine anti kanser testi uygulandı. Sonuçlar Şekil 4.5 'de Şekil 4.6'da ve Şekil 4.7'de görüldüğü gibidir.



Şekil 4.5 Bileşik 2'nin HeLa hüresine karşı gösterdiği antikanser aktivite

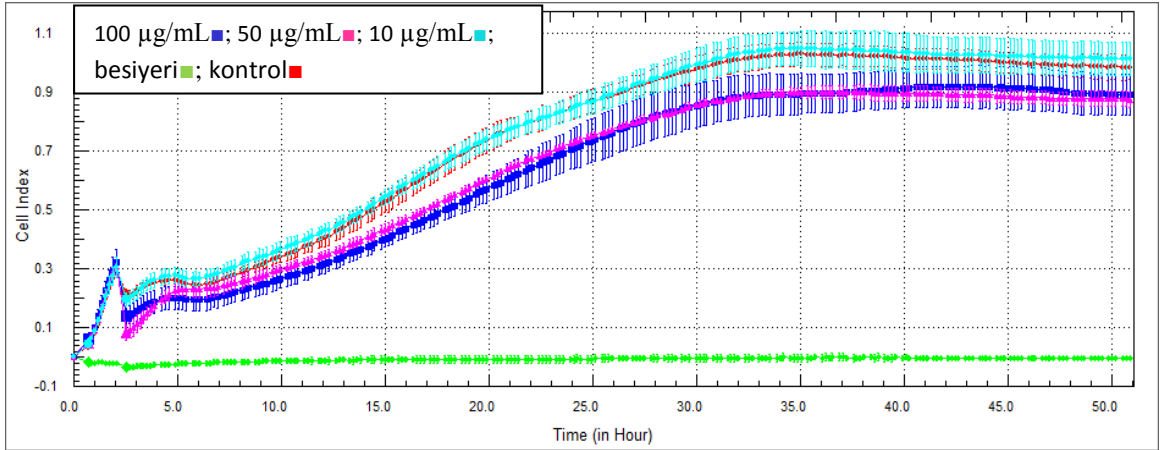
Şekil 4.5 incelendiğinde 2 bileşiğinin Kontrolle kıyaslandığında HeLa hücrelerine karşı bütün konsantrasyonlarda çok yüksek bir aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.6 Bileşik 3'ün HeLa hücresine karşı gösterdiği antikanser aktivite

Şekil 4.6 incelendiğinde 3 bileşiğinin Kontrolle kıyaslandığında HeLa hücrelerine karşı özellikle 100 ve 50µg/mL konsantrasyonlarda çok yüksek bir aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Şekil 4.7 incelendiğinde; 4 bileşiğinin doza bağlı olarak aktivitesinde bir azalış görülmüştür. Kontrolle kıyaslandığında HeLa hücrelerine karşı konsantrasyonlarda düşük bir aktivite gösterdiği tespit edilmiştir



Şekil 4.7 Bileşik 4'ün HeLa hücresine karşı gösterdiği antikanser aktivite

4.3. Antioksidan Aktivite Sonuçları

Bu tez çalışmasında, *Centaurea derderiifolia* türünün yaprak ve tohum kısımlarından elde edilen çeşitli ekstrelerin (diklorometan, hekzan, kloroform, metanol, kloroform-metanol) ve yaprak kloroform (YK) ekstresinden izole edilen saf maddelerin antioksidan aktiviteleri birbirini tamamlayan farklı *in vitro* testler ile belirlenmeye çalışılmıştır.

4.3.1. Ekstrelerin antioksidan aktivitesi

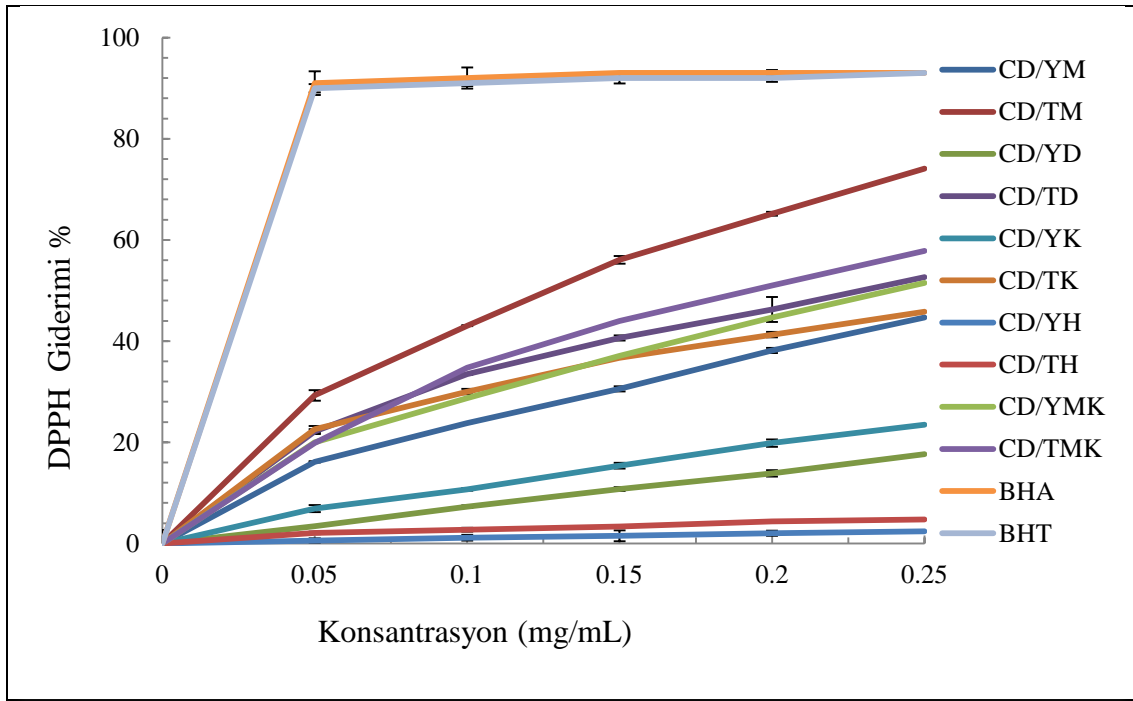
Elde edilen ekstrelerin antioksidan aktiviteleri DPPH· radikali giderimi, metal iyonlarını şelatlama testi ve toplam fenol miktarlarının ölçümü ile değerlendirilmiştir.

4.3.1.1. Ekstrelerin DPPH· radikali giderim aktivitesi

Bitki ekstrelerinin serbest radikal süpürücü etkisine DPPH· testi ile bakılmıştır. Bitki ekstrelerinin ve sentetik antioksidanların % DPPH· giderim aktiviteleri 0,050-0,250 mg/ml arasında değişen 5 farklı konsantrasyonda ölçülmüştür ve bu değerlere göre IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. IC₅₀ antiradikal verimliliğini ölçmek için geniş bir biçimde kullanılan bir parametredir. Düşük IC₅₀ değeri yüksek antioksidan aktiviteyi göstermektedir.

DPPH· radikali giderim aktivitesinin IC₅₀ değerlerine göre belirlenen etkinlikteki azalma sırası ; **BHA > BHT > TM > TMK > TD > YMK > YM > TK > YK > YD > TH > YH** şeklinde sıralanmıştır. Elde edilen veriler, her çözücü için tohum ekstrelerinin yaprak ekstrelerinden daha iyi bir DPPH· giderim kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir. Tüm ekstreler arasında en yüksek etki tohum metanol ekstresinde çıkarken (IC₅₀ = 0,127±0,001mg/mL), en düşük etki yaprak hekzan ekstresinde çıkmıştır (IC₅₀= 5mg/mL) (Tablo 4.3). Hekzan ekstreleri test edilen konsantrasyonlarda (0,050-0,250 mg/mL) herhangi bir etki göstermediğinden bu ekstreler 1-5 mg/mL konsantrasyonunda tekrar çalışılmıştır. Türlerine ait ekstreler sentetik antioksidanlar (BHT, BHA) ile kıyaslandığında, sentetik antioksidanların ekstrelerden daha düşük bir IC₅₀ değerine (daha yüksek bir antioksidan aktiviteye) sahip olduğu görülmektedir.

Şekil 4.8’de görüldüğü gibi, çalışılan tüm konsantrasyonlarda (0,050-0,250 mg/mL) tohum ekstreleri yaprak ekstrelerinden daha iyi DPPH’radikal giderim aktivitesi göstermiştir. Tohum kısımlardan en iyi aktiviteyi metanol ekstresi gösterirken, yaprak ekstrelerinden en iyi aktiviteyi metanol-kloroform ekstresi göstermiştir. Ekstreler sentetik antioksidanlar ile kıyaslandığında, özellikle 0,250 mg/mL ve bu konsantrasyonun üzerinde, TM’nin sentetik antioksidanlara yakın bir etki gösterdiği görülmektedir.

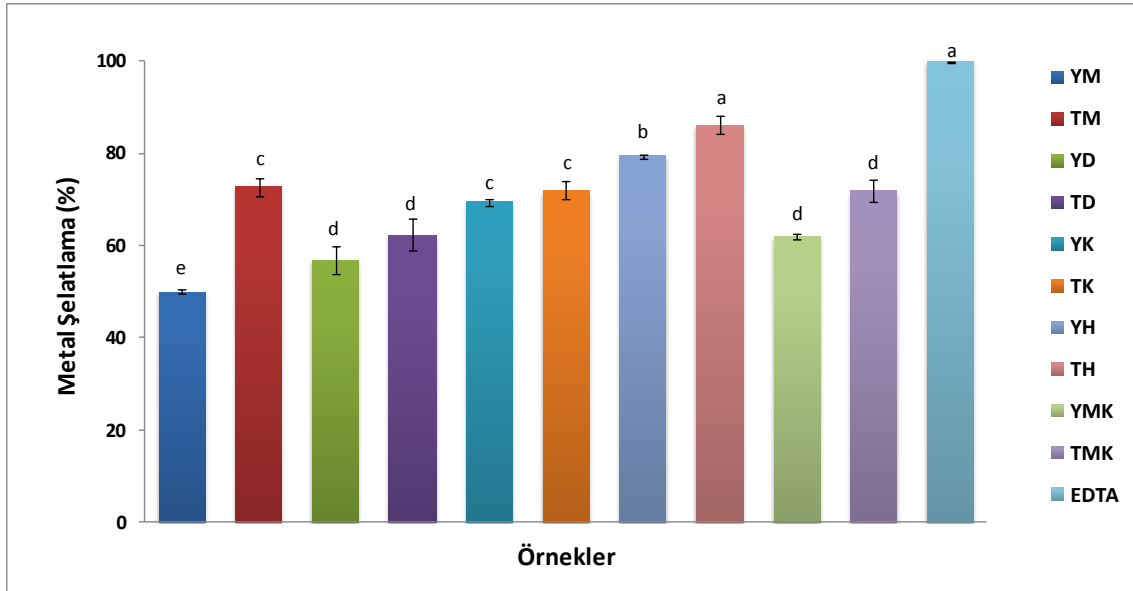


Şekil 4.8 Ekstrelerin DPPH’radikalini giderim aktivitesi

4.3.1.2. Ekstrelerin metal iyonlarını şelatlama aktivitesi

Bitki ekstrelerinin metal şelatlama aktiviteleri ferrozin testi ile belirlenmiştir. Bu testte şelatlama ajanlarının varlığında kompleks formasyon, mor rengin azalması sonucuyla bozulmaya uğramaktadır. Bu metoda göre; en düşük absorbans en yüksek şelat oluşturma kapasitesini göstermektedir. 1 mg/ml konsantrasyondaki Ferrozin – Fe^{2+} kompleksi oluşumunu engelleme yüzdeleri hesaplanmış ve Tablo4.3’de belirtilmiştir. Endemik *Centaurea* türünün tohumveyaprak ekstreleri arasında en yüksek metal şelatlama aktivitesi tohum hekzan ekstresinde bulunmuştur (%86,13 ± 1,99). Yaprak metanol ekstresi en zayıf şelatlama aktivitesine sahip ekstre olmuştur (%49,98 ± 0,36). Metal

şelatlama aktivite testinde, DPPH`radikal giderim antioksidan aktivite çalışmasında olduğu gibi tohum ekstreleri yaprak ekstrelerinden daha yüksek aktivite göstermiştir. TH pozitif kontrol EDTA`ya çok yakın etki göstermiştir.



Şekil 4.9 Ekstrelerin metal şelatlama aktivitesi (1mg/mL konsantrasyonda)

4.3.1.3. Ekstrelerintoplam fenol bileşik miktarları

Ekstrelerin toplam fenol miktarları, Folin-Ciocalteu (Magalhães vd.) reaktifi kullanılarak gallik asit standardına göre belirlenmiştir. FC yöntemi, fenolik bileşikler ve diğer indirgeyici bileşiklerden molibdenyuma elektron transfer edilmesine dayanmaktadır ($Mo(VI) + e^- \rightarrow Mo(V)$). Ekstrelerin toplam fenolik bileşik miktarları standart gallik asit grafiğinden elde edilen eşitlik kullanılarak belirlenmiştir. Standart eğri denklemi; y (absorbans) = $0,0061.x$ (μg gallik asit) - $0,0159$, $R^2=1$ şeklinde bulunmuştur. Elde edilen absorbans değerleri denkleme konulmuş ve toplam fenolik bileşiklerin miktarları hesaplanmıştır.

Ekstreler arasında en yüksek toplam fenolik bileşik miktarı TMekstresinde ($70,97 \pm 0,43 \mu g/mg$) belirlenmiştir (Tablo4.3). Bu ekstre, DPPH`radikalini giderme aktivitesi testinde en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Hekzan ekstrelerinin toplam fenol içerikleri düşük bulunmuştur ve bu ekstreler DPPH`testinde düşük aktivite göstermiştir. *C. derderifolia*

türüne ait ekstrelerin içerdikleri toplam fenol miktarları ile DPPH·radikalini giderme aktiviteleri arasında önemli oranda korelasyon bulunmuştur ($p<0,05$). Bunun aksine metal şelatlama aktivite testi ile toplam fenol içeriği arasında herhangi bir ilişki bulunmamıştır.

Tablo 4.3C. *derderiifolia* ekstrelerinin antioksidan aktiviteleri ve toplam fenol içerikleri

Numuneler ¹	DPPH· giderimi IC ₅₀ (mg/mL) ²	Metal şelatlama (% şelatlama) ²	Toplam fenol içeriği (µg GAE/mg extract) ²
YM	0,286 ± 0,003 ^c	49,98 ± 0,36 ^e	41,62 ± 0,28 ^e
TM	0,127 ± 0,001 ^a	72,65 ± 1,94 ^c	70,97 ± 0,43 ^a
YD	0,714 ± 0,026 ^e	56,82 ± 3,01 ^d	25,28 ± 0,19 ^g
TD	0,227 ± 0,004 ^b	62,27 ± 3,45 ^d	53,48 ± 0,58 ^b
YK	0,566 ± 0,024 ^d	69,35 ± 0,68 ^c	29,71 ± 0,25 ^f
TK	0,300 ± 0,007 ^c	71,93 ± 1,93 ^c	48,67 ± 0,16 ^d
YH	5,342 ± 0,014 ⁱ	79,34 ± 0,43 ^b	19,05 ± 0,62 ^l
TH	3,533 ± 0,013 ^f	86,13 ± 1,99 ^a	21,35 ± 0,09 ^h
YMK	0,229 ± 0,014 ^b	61,84 ± 0,61 ^d	53,19 ± 0,57 ^b
TMK	0,196 ± 0,004 ^b	71,81 ± 2,33 ^c	63,80 ± 0,41 ^c
BHT	0,023 ± 0,001 ^k	-	-
BHA	0,003 ± 0,000 ^k	-	-
EDTA	-	99,86 ± 0,14 ^f	-

¹YM: Yaprak metanol ekstresi TM: Tohum metanol ekstresi YD: Yaprak diklorometan ekstresi TD: Tohum diklorometan ekstresi YK: Yaprak kloroform ekstresi TC: Tohum kloroform ekstresi YH: Yaprak hekzan ekstresi TH: Tohum hekzan ekstresi

²Değerler üç deneyin ortalaması ± standart sapması şeklinde verilmiştir. Aynı sütun içinde farklı küçük harfle gösterilmiş değerler istatistiksel olarak birbirinden farklı çıkmıştır ($p<0,05$).

4.3.2. Yaprak kloroform ekstresinden izole edilen maddelerin antioksidan aktivitesi

Yaprak kloroform ekstresinden (kanser çalışmaları sonucunda en iyi aktiviteyi gösteren ekstre) izole edilen saf maddelerin antioksidan aktiviteleri birbirini tamamlayan farklı iki *in vitro* test ile belirlenmeye çalışılmıştır.

İzole maddelerden en iyi DPPH·radikalini giderim aktivitesini **4** bileşiği ($IC_{50}=0,76 \pm 0,03$) ve **3** bileşiği ($IC_{50}=1,01 \pm 0,06$) göstermiştir. Metal iyonlarını şelatlama aktivitesi testinde; en iyi şelatlayıcı madde olarak **3** bileşiği öne plana çıkmaktadır. **3** bileşiği ($\%88,3 \pm 0,61$) pozitif kontrol EDTA'ya oldukça yakın bir aktivite göstermiştir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4 *C. derderiifolia* yaprak kloroform ekstresinden izole edilen saf maddelerin antioksidan aktivitesi

Saf madde	DPPH·giderimi IC_{50} (mg/mL)	Metal şelatlama (%)
Daucosterin (1)	8,88 \pm 0.02	25,63 \pm 0,32
2	3,21 \pm 0,01	18,40 \pm 0,36
3	1,01 \pm 0,06	88,30 \pm 0,61
4	0,76 \pm 0,03	18,31 \pm 0,27

Değerler üç deneyin ortalaması \pm standart sapması şeklinde verilmiştir.

4.4.C.derderiifolia Bitkisinin GC-MS Sonuçları

C.derderiifolia bitkisi yaprak ve tohum olarak iki kısma ayrıldı. Her kısım, hekzan çözücüsü ile muamele edildi. Elde ettiğimiz hekzan ekstrelerindeki sabit yağa esterleştirme işlemi uygulanarak Agilent marka 5975 C, MSD-7890A model GC-MS cihazında içerdiği yağ asitleri araştırıldı.

Yapılan GC-MS analizi sonucunda; bitkinin yaprak kısmının hekzan ekstresinde % 36,10 Lupeol, % 17,71 Oleik asit, % 16,02 Linoleik asit,% 9,08 Palmitik asit dört ana bileşen olmak üzere toplam 20 bileşen belirlendi.

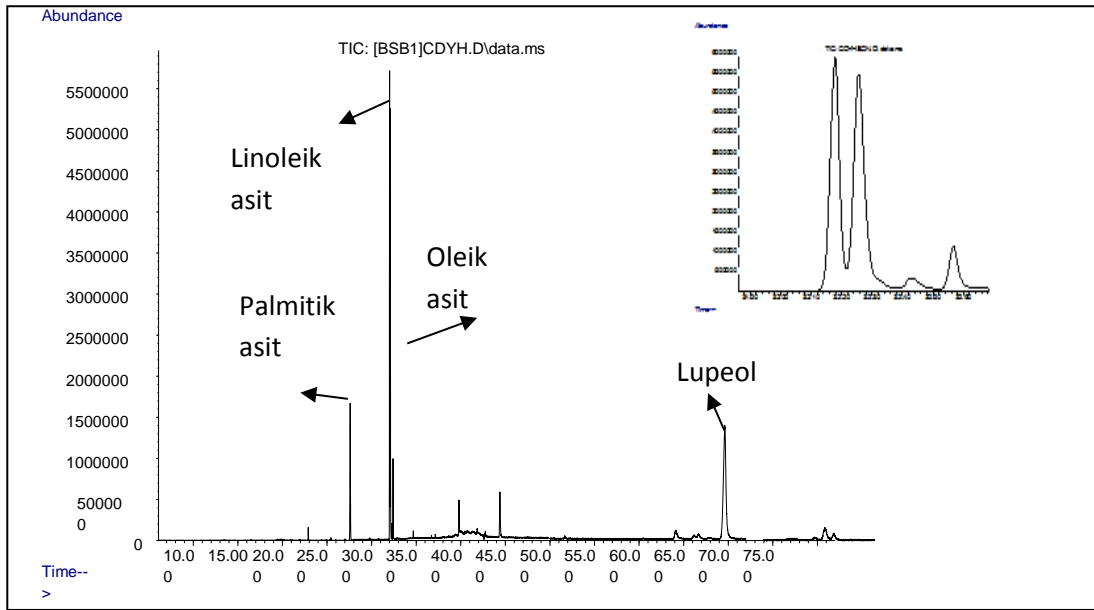
C.derderiifolia bitkisinin yaprak kısmının hekzan ekstresine ait yağ asitleri Tablo4.5'de verilmiştir.

Tablo4.5*C.derderiifolia* bitkisinin yaprak kısmı hekzan ekstresine ait sabit yağ asidi bileşenleri

RT	Bileşik Adı	%Miktar
22.892	C 14:0(Miristik Asit)	0.52
25.439	2-Dodecanone	0.13
27.596	C 16:0 (Palmitik Asit)	9.08
32.179	C 18:2 (Linoleik Asit)	16.02
32.259	C 18:1(Oleik Asit)	17.71
32.431	Phytol	0.57
32.538	C 18:0 (Stearik Asit)	2.61
34.840	C 20:0 (Araşidik Asit)	0.30
36.877	Pentacosane	0.11
37.306	C 22:0 (Behenik Asit)	0.22
39.937	Hexacosane	2.28
40.608	C 24:0 (Lignoserik Asit)	0.22
42.919	Farnesol	0.31
44.556	Octacosane	4.43
64.108	Beta-Sitosterol	2.23
66.196	Beta-Amyrin	0.63
66.683	Lanosterol	0.85
69.612	Lupeol	36.91
77.537	Taraxasterol	2.44
78.327	Lupeol acetate	1.07
		T=98.64

Tablo4.6 *C.derderiifolia* bitkisinin yaprak kısmı hekzan ekstresine ait ana bileşenler

Yaprak Kısmının Ana Bileşenleri	% Miktar
Lupeol	36.91
C18:1 (Oleik Asit)	17.71
C18:2 (Linoleik Asit)	16.02
C16:0 (Palmitik Asit)	9.08



Şekil 4.10 *C.derderiifolia* bitkisinin yaprak kısmı hekzan ekstresine ait GC-MS kromotogramı

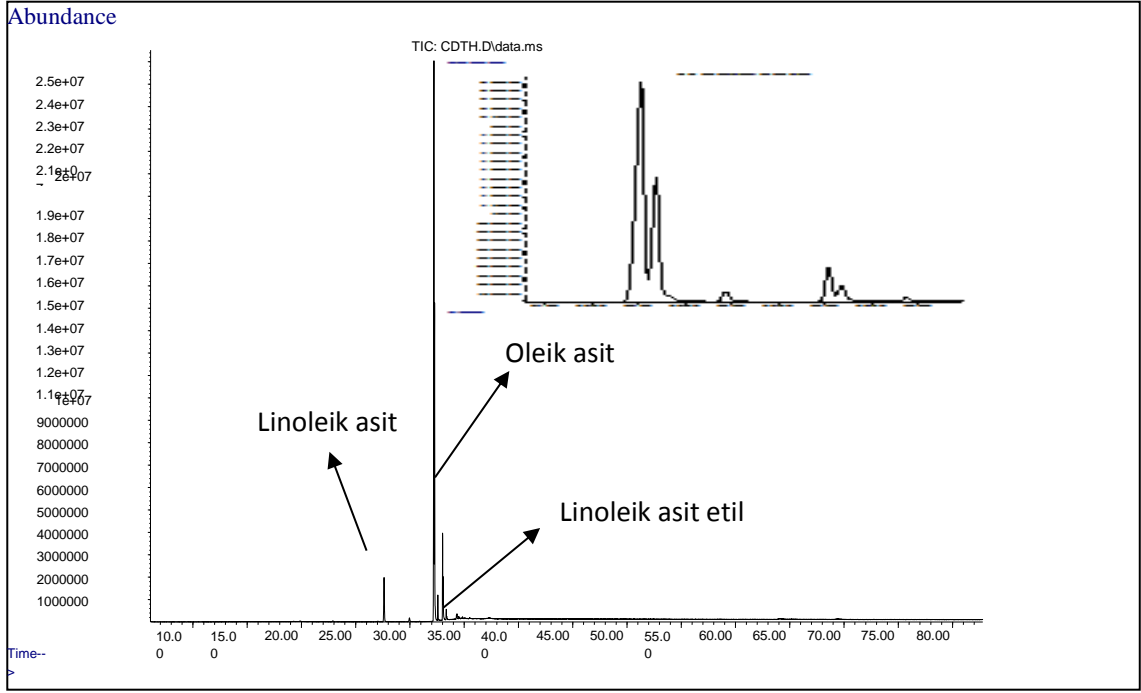
Bitkinin tohum kısmının hekzan ekstresinde; % 9,73Linoleik asit etil ester, % 25,95 Oleik asit,% 51,41Linoleik asit üç ana bileşen olmak üzere toplam 12 bileşen belirlendi.*C.derderiifolia* bitkisinin tohum kısmının hekzan ekstrelerine ait yağ asitleri tablosu aşağıda verilmiştir.

Tablo 4.7 *C.derderiifolia* bitkisinin tohum kısmı hekzan ekstresine ait sabit yağ asidi bileşenleri

RT	Bileşik Adı	% Miktar
27.624	C16:0 (Palmitik Asit)	6.76
29.959	C16: 0 ethyl(Palmitik Asit)	0.74
32.213	C18:2(Linoleik Asit)	51.41
32.276	C18:1 (Oleik Asit)	25.95
32.580	C18:0 (Stearik Asit)	2.18
33.020	C18:2 ethyl (Linoleik Asit Etil Ester)	9.73
33.352	Isopropyl linoleate	1.22
34.342	C18:2 isomer Linoleik asit	0.84
34.508	C18:1isomer (Oleik Asit)	0.27
34.582	C20:1(Gadoleik Asit)	0.17
34.851	C20:0(Araşidik Asit)	0.27
37.306	C 22:0(Behenik Asit)	0.46
		T=100

Tablo 4.8 *C.derderiifolia* bitkisinin tohum kısmı hekzan ekstresine ait ana bileşenler

Tohum Kısmının Ana Bileşenleri	% Miktar
C18:2 (Linoleik Asit)	51.41
C18:1 (Oleik Asit)	25.95
C18:2 (Linoleik Asit Etil Ester)	9.73



Şekil 4.11 *C.derderiifolia* bitkisinin tohum kısmı hekzan ekstresine ait GC-MS kromotogramı

4.5. *C.derderiifolia* Bitkisinin HPLC-TOF/MS Sonuçları

4.5.1. Yaprak ekstrelerinin HPLC-TOF/MS analiz sonuçları

Bitkinin diklorometan, kloroform, metanol, metanol-kloroform, etil asetat/su, bütanol/su ekstrelerinin fenolik madde içeriği HPLC-TOF/MS analizi ile gerçekleştirildi.

C.derderiifolia bitkisinin yaprak kısmının ekstrelerine ait fenolik bileşenleri ve miktarlarını gösteren tablo aşağıda verilmiştir.

Tablo 4.9 Yaprak ekstralarının fenolik bileşenleri ve miktarları (mg fenolik/1kg kuru bitki)

Bileşik	YD	YK	YM	YMK	Ye	Yb
Gentisik asit	-	-	52,35	24,15	286,57	91,86
Klorojenik asit	-	-	183,04	128,16	121,42	242,10
4-hidroksi benzoik asit	-	0,35	19,70	9,59	379,92	315,61
Protokateşuik asit	-	-	7,70	4,06	37,00	20,17
Vanilik asit	-	0,21	27,94	57,01	103,73	71,27
Kafeik asit	-	-	-	-	17,24	0,58
Rutin	-	-	-	-	-	3,05
P-kumarik asit	-	-	-	-	35,53	8,33
Sisorik asit	7,13	1,44	1,58	1,09	1,55	2,06
Ferulik asit	0,24	0,11	4,77	1,75	48,97	16,07
Salisilik asit	-	-	3,56	2,11	46,89	20,90
Kersetin	-	0,16	-	-	-	-
Kamferol	-	-	-	-	9,48	10,93
Sinnamik asit	28,48	5,39	30,28	15,54	28,82	29,84
4-hidroksi benzaldehit	-	-	-	-	1,21	-
Hesperidin	-	-	7,02	0,19	-	-

4.5.2 Tohum Ekstrelerinin HPLC-TOF/MS Analiz Sonuçları

Bitkinin diklorometan, kloroform, metanol, metanol-kloroform, etil asetat/su, bütanol/su ekstralarının HPLC-TOF/MS analizi sonucunda mevcut 24 bileşen arasından ekstralarda bulunan fenolik bileşen miktarları belirlendi.

C.derderiifolia bitkisinin tohum kısmının ekstralarına ait fenolik bileşenleri ve miktarlarını gösteren tablo aşağıda verilmiştir.

Tablo4.10 Tohum ekstralarının fenolik bileşenleri ve miktarları(mg fenolik/1kg kuru bitki)

Bileşik	TD	TK	TM	TMK	Te	Tb
Gentisik asit	-	-	16,75	4,59	39,30	284,39
Klorojenik asit	-	-	251,75	54,45	3,21	208,88
4-hidroksi benzoik asit	-	0,27	4,13	3,33	43,97	391,50
Protokateşuik asit	2,61	0,99	10,81	-	16,20	15,21
Vanilik asit	28,12	1,15	7,16	0,51	4,18	146,60
Kafeik asit	-	-	-	-	19,60	167,44
<i>p</i> -kumarik asit	-	-	-	-	5,03	78,28
Sisorik asit	7,17	0,47	-	-	-	-
Ferulik asit	-	0,07	1,70	0,40	10,63	60,30
Salisilik asit	-	-	-	-	-	6,080
Kersetin	-	-	24,65	-	-	-
Sinnamik asit	12,24	4,80	54,01	22,63	64,68	-
4-hidroksi benzaldehit	-	-	-	-	-	3,49
Apigenin -7 glukozit	-	-	1,36	-	-	-
Hesperidin	-	0,32	82,38	52,04	-	12,68

4.6.CD-YK'nın Flash Kromatografisi Sonuçları

Ekstraksiyon işlemi sonucunda elde edilen ekstralardan kanser aktivitesi yüksek olan ekstradaki bileşenlerin ayrılması için flash kromatografisi işlemi uygulandı. Bu çalışmada 40 g'lık flash kolonu (Teledyne Isco-Combiflash Rf marka) kullanıldı. 5,25 g CD-YK numunesi bir miktar metanolde çözüldü ve 10gr silikajel 60'a(0.063-0.200 mm.Merck) emdirildi. Karışımın çözücüsü uçurulduktan sonra homojenliğin sağlanması için ekstre ile silika jel karışımı sürekli karıştırıldı. CD-YK isimli ekstre boş flash kromatografi kolonuna dolduruldu cihaza yerleştirildi. Başlangıçta hekzan ile ön yıkama yapıldı. Daha sonra polarite artırıldı. Son çözücü olarak %100 metanol kullanıldı. Dalga boyları olarak 254 nm ve 667 nm seçildikten bir süre sonra tüm dalga boyları seçilerek, flash

kromatografisi uygulandı. Toplam 1044 fraksiyon toplandı. Kromatografi sonrası Tablo 4.11'deki fraksiyonlar elde edildi.

Tablo 4.11 *C.derderiifolia* bitkisinin yaprak kısmının kloroform ekstresine ait flash kromatografisi tablosu

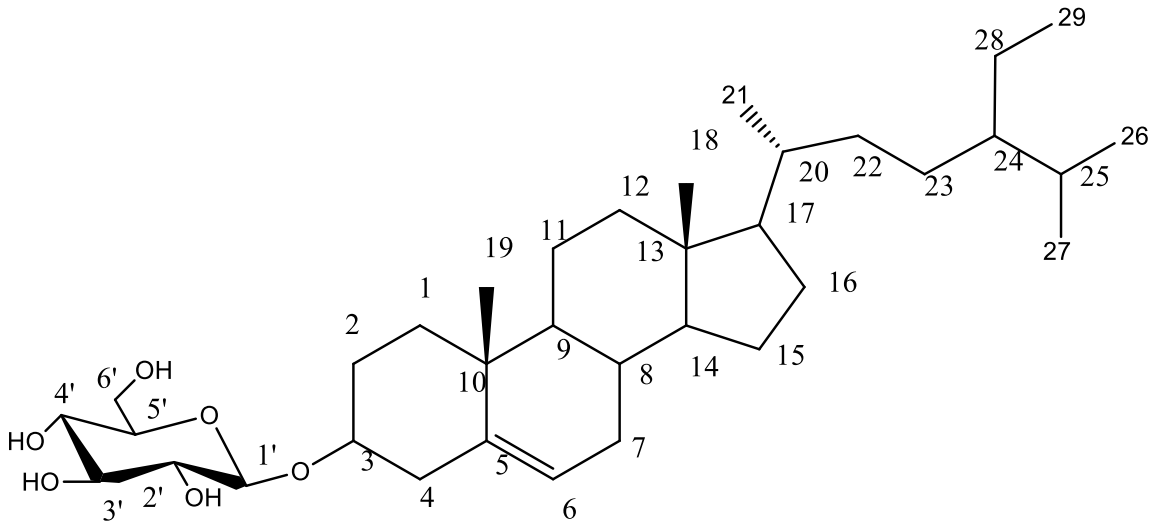
Çözücü Sistemi	Çözücü miktarı(L)	Fraksiyonlar (20 mL)
% 100 Hekzan	1 L	1-38
CHCl ₃ -Hekzan (1:9)	0.5 L	39-58
CHCl ₃ -Hekzan (3:7)	0,25 L	59-68
CHCl ₃ -Hekzan (4:6)	1 L	69-102
CHCl ₃ -Hekzan (6:4)	5 L	103-489
CHCl ₃ -Hekzan (8:2)	2.5 L	490-598
% 100 CHCl ₃	5 L	599-823
MeOH- CHCl ₃ (1:9)	1.5 L	824-898
MeOH- CHCl ₃ (1:3)	1.5 L	899-973
MeOH- CHCl ₃ (1:1)	0.5 L	974-1003
MeOH- CHCl ₃ (3:1)	0.5 L	1004-1023
% 100 MeOH	0.5 L	1024-1044

Flash kromatografisi sonucu benzer fenolikleri içerdiği gözlemlenen 17-19 nolu fraksiyonlar birleştirildi.0.293g olarak tartıldı ve sefadex kolon dolgu materyaliyle kolona tabi tutuldu. Fakat net bir ayrılmaya rastlanılamadı. Elde edilen 28-44. fraksiyonlar birleştirildi. Birleştirilen fraksiyonlar 0.25 g olarak tartıldı. İkinci kez sephadex (LH-20) kolon dolgu materyaliyle kolona tabi tutuldu.53 fraksiyon elde edildi. Yapılan İTK sonucunda **2**, **3** ve **4** bileşikleri elde edildi.

4.7.Kolon Kromatografisinden İzole Edilen Bileşiklerin Fiziksel ve Spektral Özellikleri

4.7.1 Daucosterin (1) Bileşiğinin Fiziksel ve Spektral Özellikleri

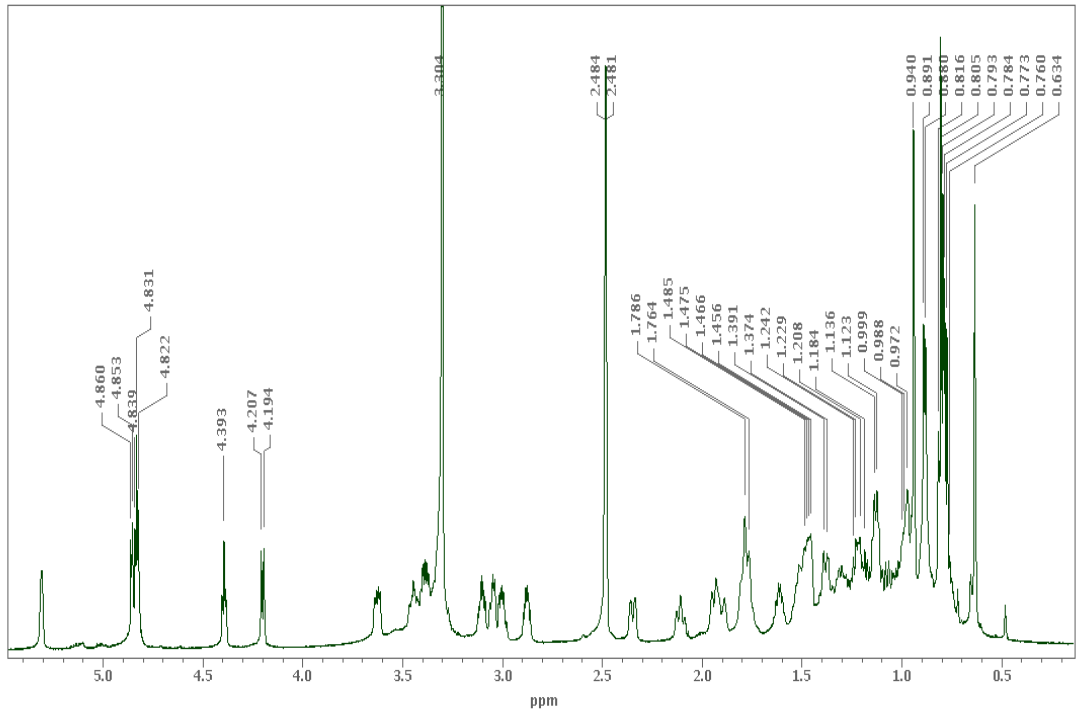
Daucosterin (1) bileşiği ekstraksiyon işlemi ile elde edilen CD-YK kodlu ham ekstre (5.25 g) flash kolonunun ardından sephadex (LH-20) kolon dolgu materyaliyle yapılan kolondan metanol: kloroform (3.5:6.5) çözücü sisteminde (28-30) nolu fraksiyonlardan kristallendirilerek izole edildi (9.20mg). Elde edilen kristallerden 6mg tartılarak yapı analizi için DMSO-d₆ çözücüsünde çözüldü.¹H, ¹³C, DEPT, HMBC spektrumları kaydedildi. Bileşiğin erime noktası 273-275°C olarak belirlendi. Bu molekül bilinen bir bileşik olup elde edilen veriler literatür ile uyum içindedir (Moghaddam vd. 2007).



Şekil 4.12 Daucosterin (1) Bileşiği

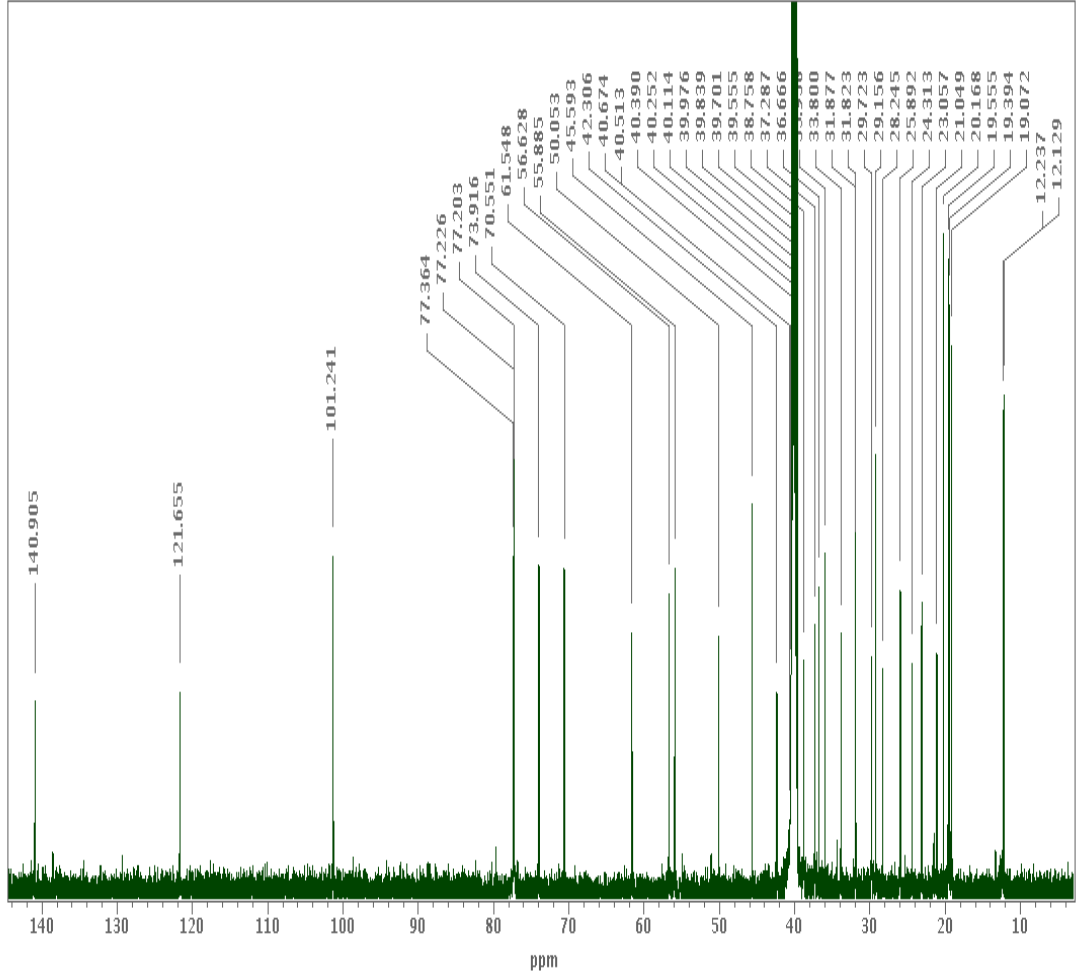
Tablo 4.12 Daucosterin (1) bileşiminin kimyasal kayma değerleri

Karbon	DEPT	$\delta C(\text{ppm})$	$\delta H(\text{ppm})$
1	CH2	37.28	1.28-0.98
2	CH2	31.85	1.91-1.88
3	CH	77.44	3.44
4	CH2	39.57	2.10/2.35
5	C	140.97	-
6	CH	121.69	5.30
7	CH2	24.31	1.13
8	CH	33.80	1.38
9	CH	50.13	0.86
10	C	36.71	-
11	CH2	20.17	1.17-1.22
12	CH2	39.68	1.94/1.11
13	C	42.39	-
14	CH	56.68	0.96
15	CH2	24.31	1.02-1,52
16	CH2	28.25	1.79-1.46
17	CH	55.90	1.07
18	CH3	12.24	0.80
19	CH3	19.56	0.93
20	CH	36.03	1.32
21	CH3	19.39	0.77
22	CH2	36.2	0.97-1.77
23	CH2	25.91	1.21-1.77
24	CH	45.62	0.89
25	CH	29.18	1.61
26	CH3	20.17	0.80
27	CH3	19.07	0.88
28	CH2	21.06	1.38-1.46
29	CH3	12.13	0.63
1'	CH	101.33	4.20
2'	CH	73.93	2.87
3'	CH	77.35	3.04
4'	CH	70.59	2.99
5'	CH	77.24	3.10
6'	CH2	61.58	3.39-3.63



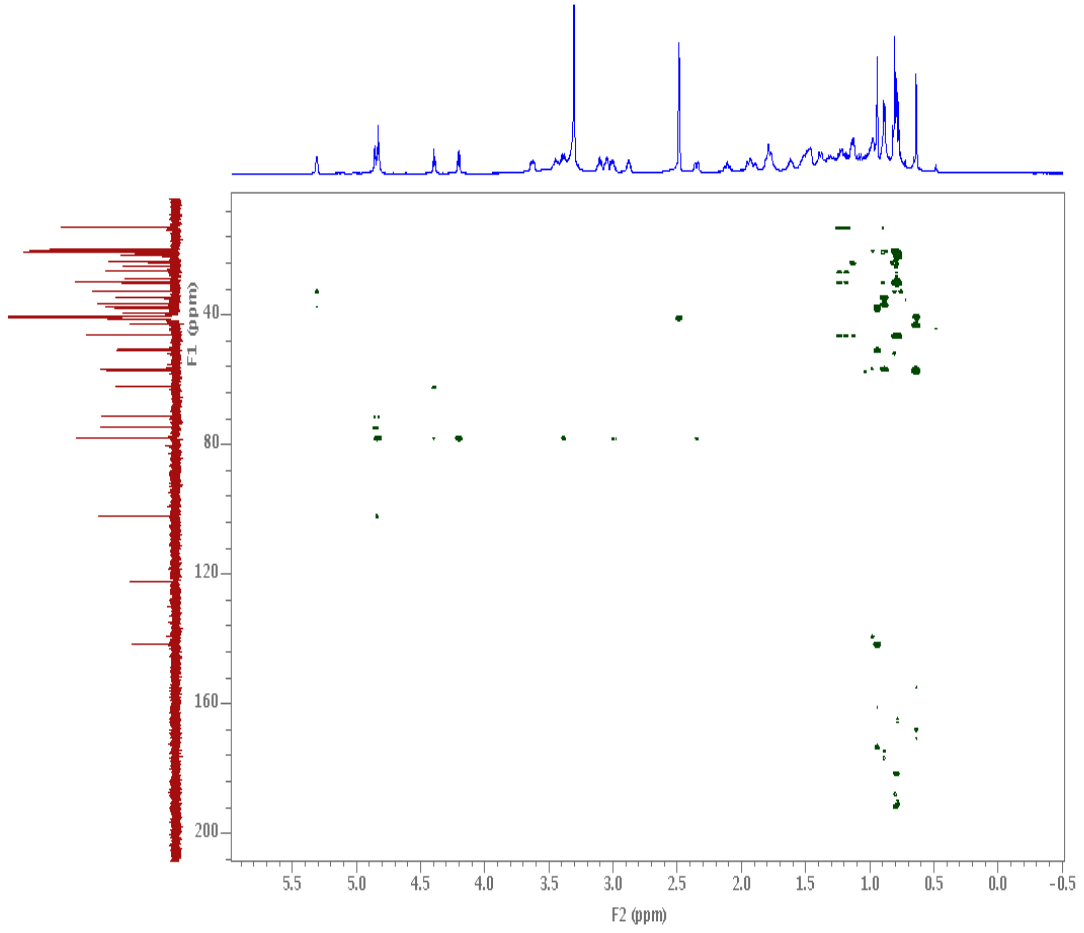
Şekil 4.13 Daucosterin (1) bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (600 MHz, DMSO- d_6)

Şekil 4.13’da verilen Daucosterin (1) molekülünün $^1\text{H-NMR}$ spektrumu incelendiğinde, H-3’ protonu 3.04 ppm’de multipl olarak rezonans olurken, anomerik karbona bağlı anomerik proton (H-1’) 4.20 ppm’de dublet olarak rezonans olmuştur. Yapıda aromatik halkanın olmadığı gözlemlendi. 0.5-1 ppm arasında rezonans olan singlet pikleri moleküldeki metil gruplarının varlığını göstermektedir.



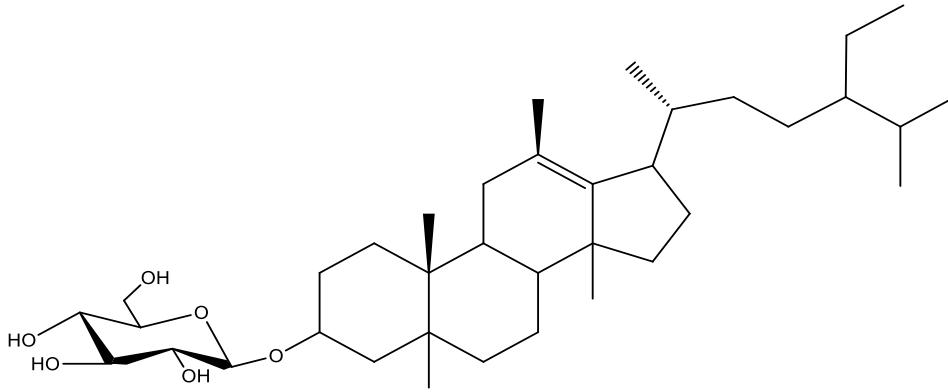
Şekil 4.14 Daucosterin bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu (600 MHz, DMSO-d₆)

Daucosterin bileşiğine ait ^{13}C -NMR spektrumundan, yapıda 35 karbon atomu olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.14). Bu karbonlardan 12 tanesi metilen, 14 tanesi metin, 6 tanesi metil ve 3 tanesi kuaterner karbon atomuna aittir.

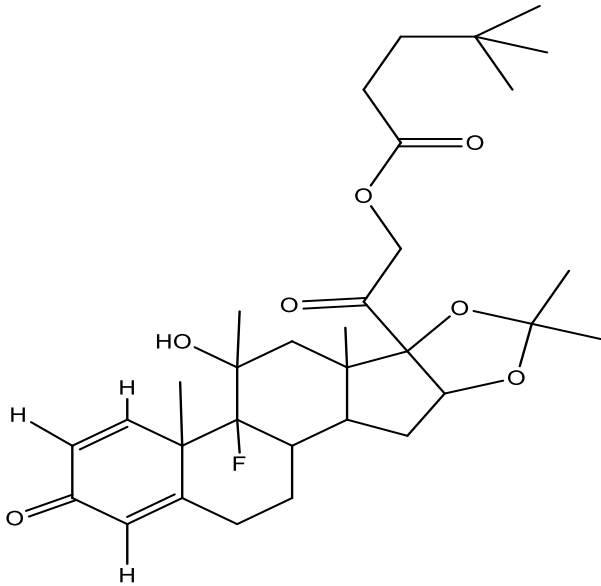


Şekil 4.15 Daucosterin bileşiğinin HMBC spektrumu (600 MHz, DMSO-d₆)

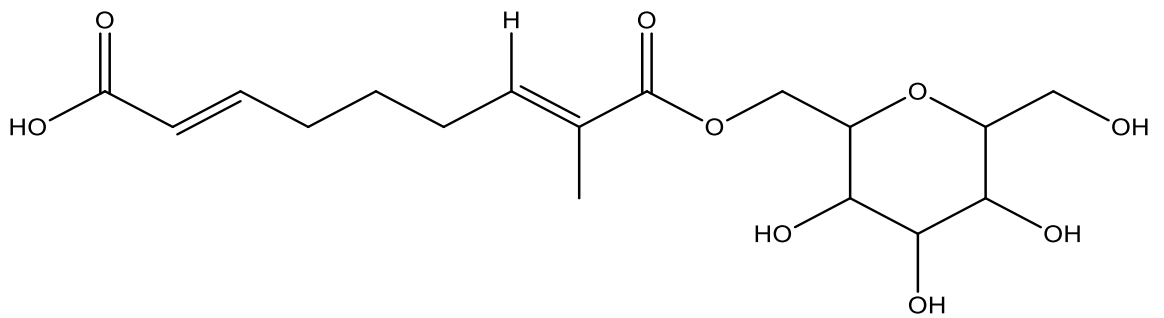
Daucosterin (1) bileşiğinin HMBC spektrumu (Şekil 4.15) incelendiğinde, 140,97 ppm'deki (C-5), 50,13 ppm'deki (C-9) ve (C-10) karbonların 0,93 ppm'deki protonla (H-19) uzak mesafe etkileşimine girdiği görülmektedir. 56,68 (C-14) ve 39,68 (C-12) ppm'de rezonans olan karbonlar ise H-18 protonu (0,80 ppm) 3 bağ üzerinden uzak mesafe etkileşimine girmiştir.



Şekil 4.16 2 Bileşik 2'nin Yapısı



Şekil 4.17 Bileşik 3'ün Yapısı

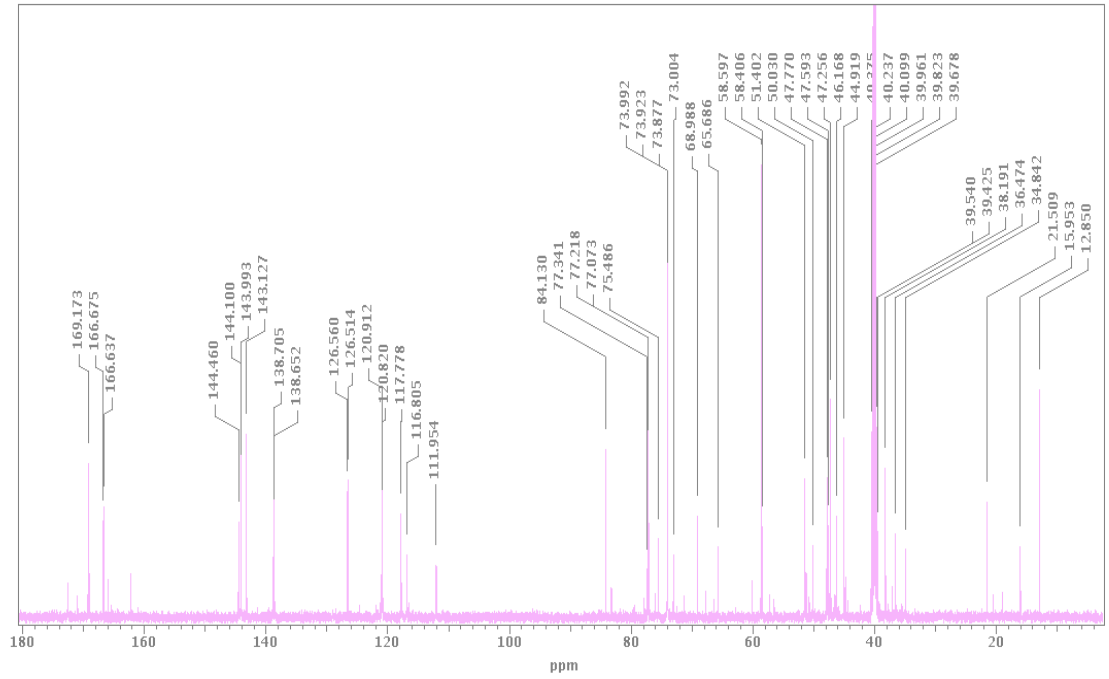


Şekil 4.18 Bileşik 4'ün Yapısı

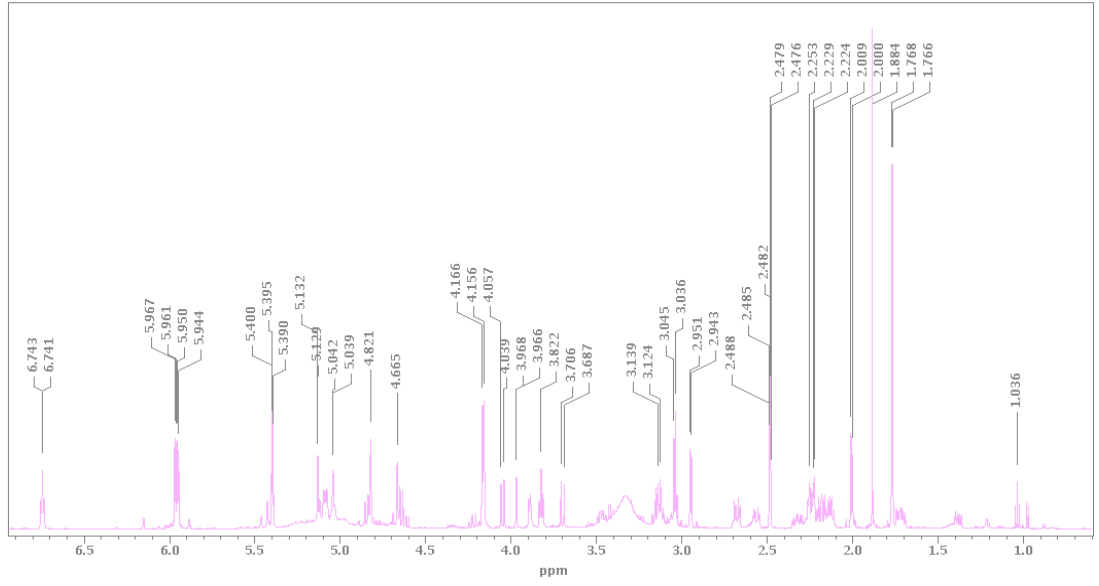
4.8. Flash Kromatografisi ile İzole Edilen Bileşiklerin Fiziksel ve Spektral Özellikleri

4.8.1. Bileşik 2'nin Fiziksel ve Spektral Özellikleri

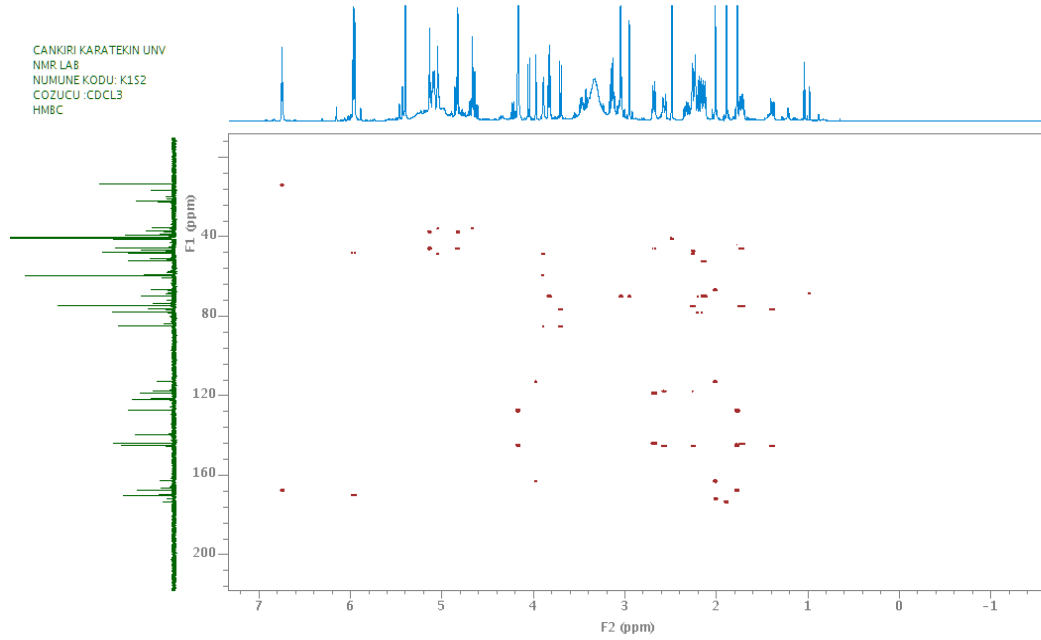
2 bileşiği ekstraksiyon işlemi ile elde edilen CD-YK kodlu ham ekstre (5.75 g) ham ekstrenin silikajel kolonundan ardından sephadex (LH-20) kolon dolgu materyaliyle yapılan (23-27) fr.lardan kristallendirilerek izole edildi (14.079 mg). Elde edilen kristallerden 8mg tartularak yapı analizi için DMSO-d₆ çözücüsünde çözüldü. ¹H, ¹³C, DEPT, HMBC spektrumları kaydedildi.



Şekil 4.19 Bileşik 2'nin ¹³C-NMR spektrumu (600 MHz, DMSO-d₆)



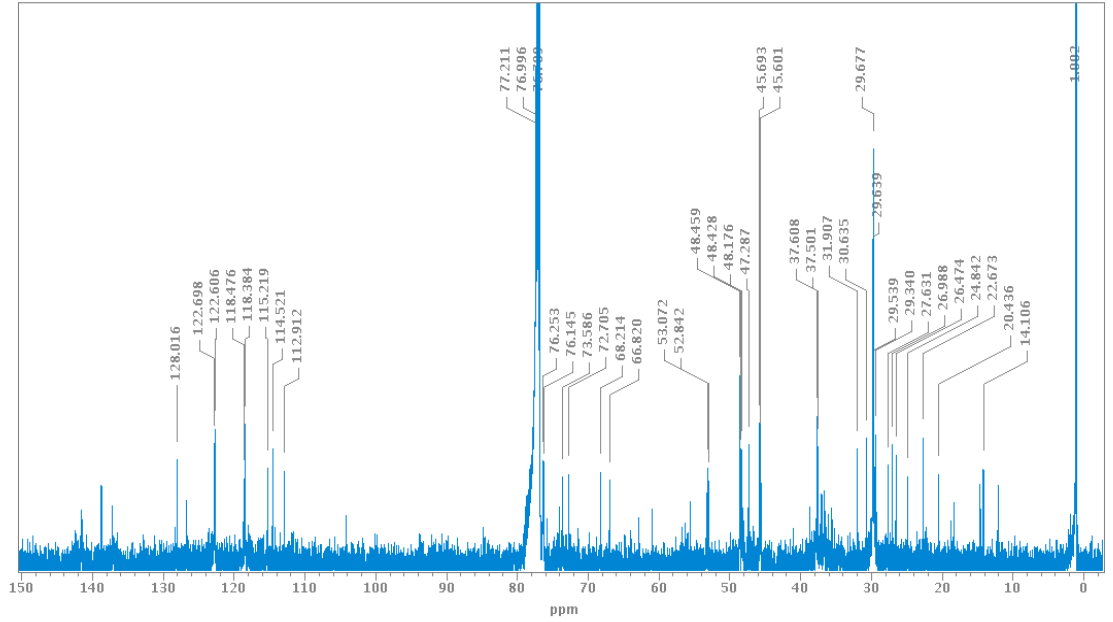
Şekil 4.20 Bileşik 2'nin ^{13}C -NMR spektrumu (600 MHz, DMSO-d₆)



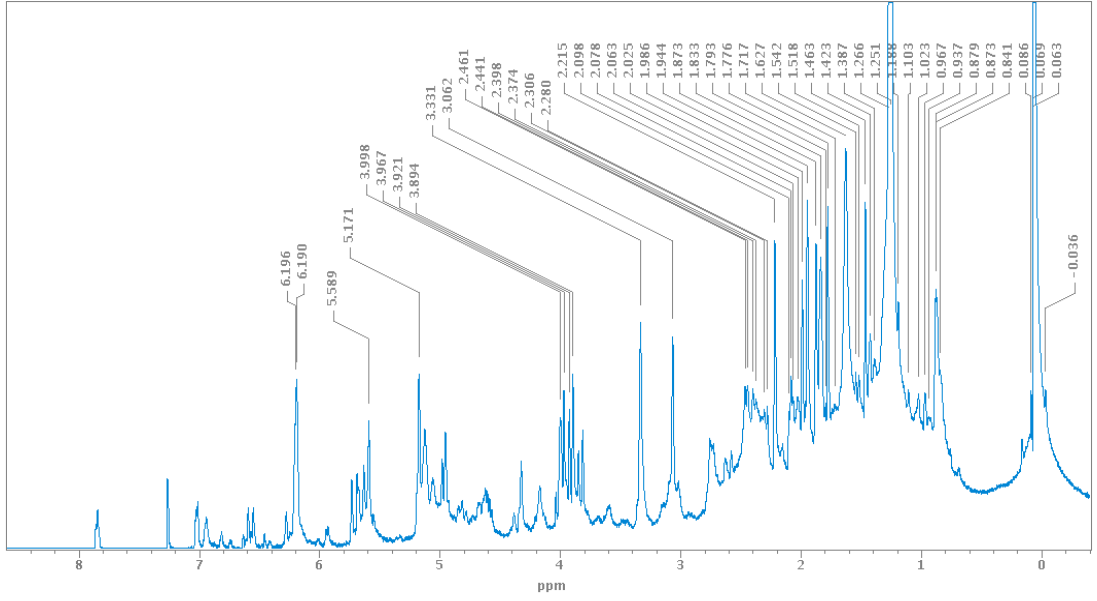
Şekil 4.21 Bileşik 2'nin HMBC spektrumu (600 MHz, DMSO-d₆)

4.8.2. Bileşik 3'ün Fiziksel ve Spektral Özellikleri

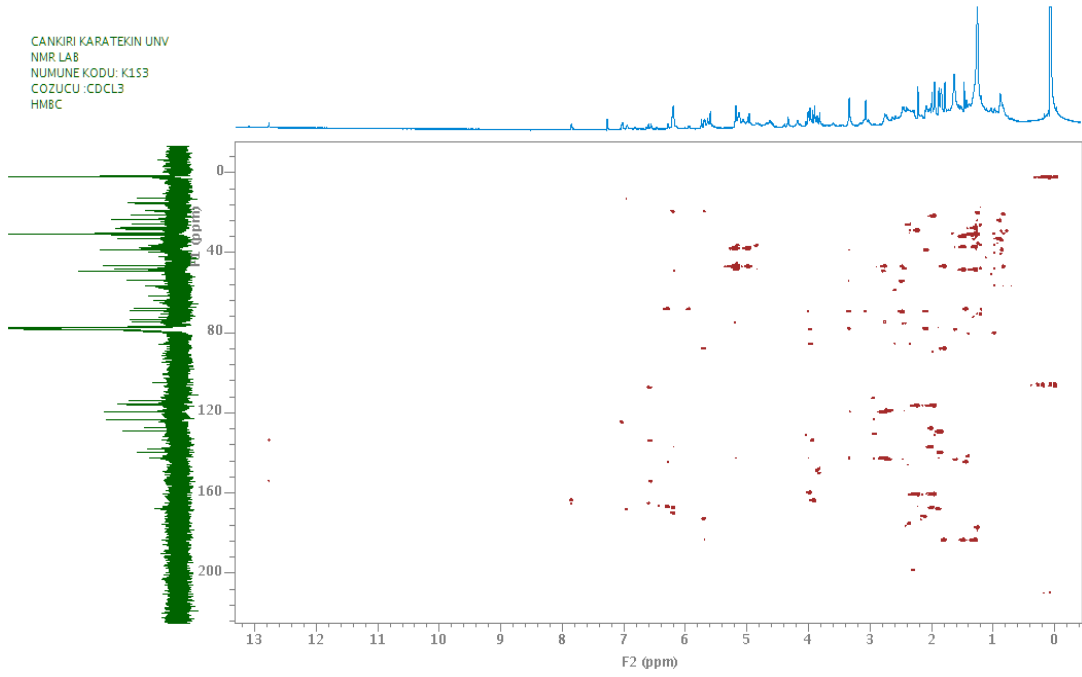
3 bileşiği ekstraksiyon işlemi ile elde edilen CD-YK kodlu ham ekstre (5.75 g) ham ekstrenin silikajel kolonundan ardından sephadex (LH-20) kolon dolgu materyaliyle yapılan (28-32) fraksiyonlardan kristallendirilerek izole edildi (8 mg). Elde edilen kristallerden 4 mg tartılarak yapı analizi için DMSO-d₆ çözücüsünde çözüldü. ¹H, ¹³C, DEPT, HMBC spektrumları kaydedildi.



Şekil 4.22 Bileşik 3'ün ¹H-NMR spektrumu (600 MHz, DMSO-d₆)



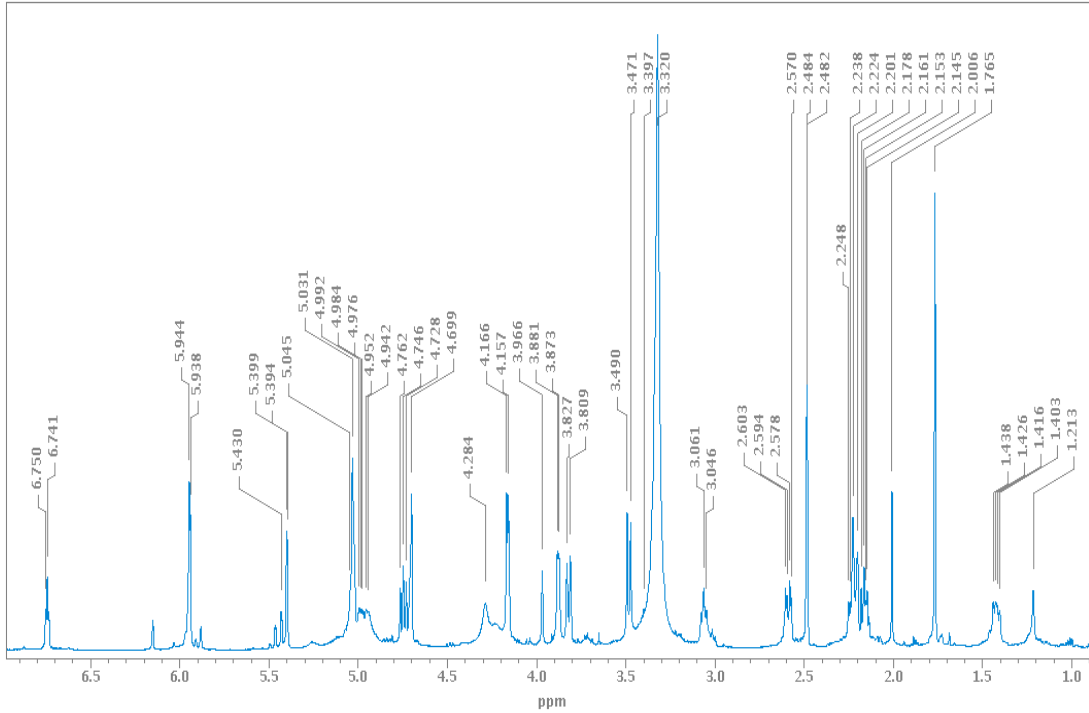
Şekil 4.23 Bileşik 3'ün ^{13}C -NMR spektrumu (600 MHz, DMSO-d₆)



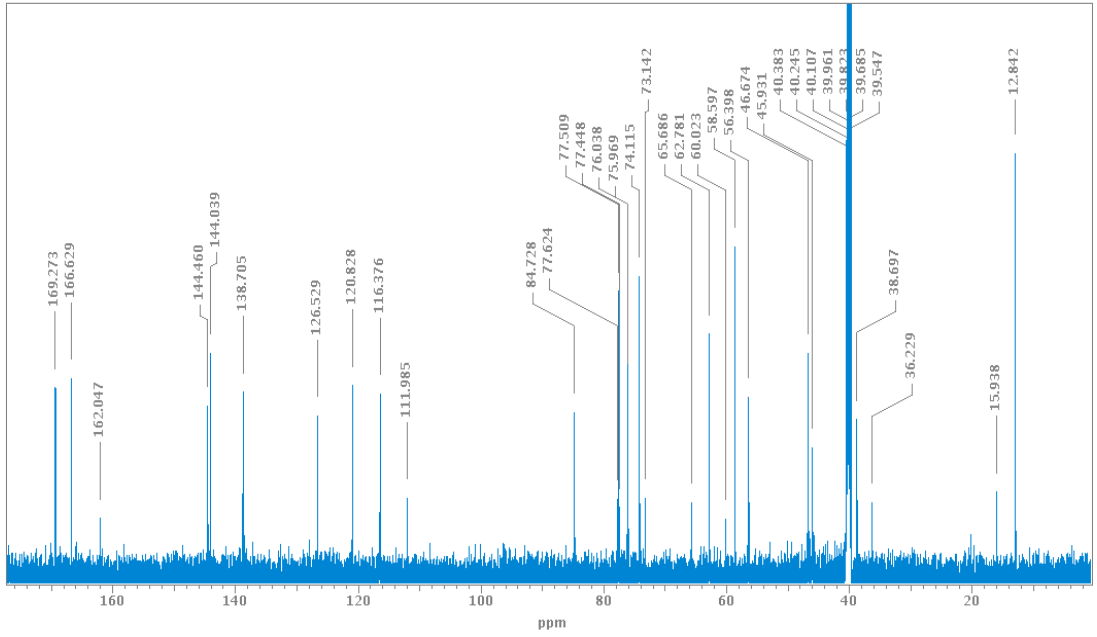
Şekil 4.24 Bileşik 3'ün HMBC spektrumu (600 MHz, DMSO-d₆)

4.8.3. Bileşik 4'ün Fiziksel ve Spektral Özellikleri

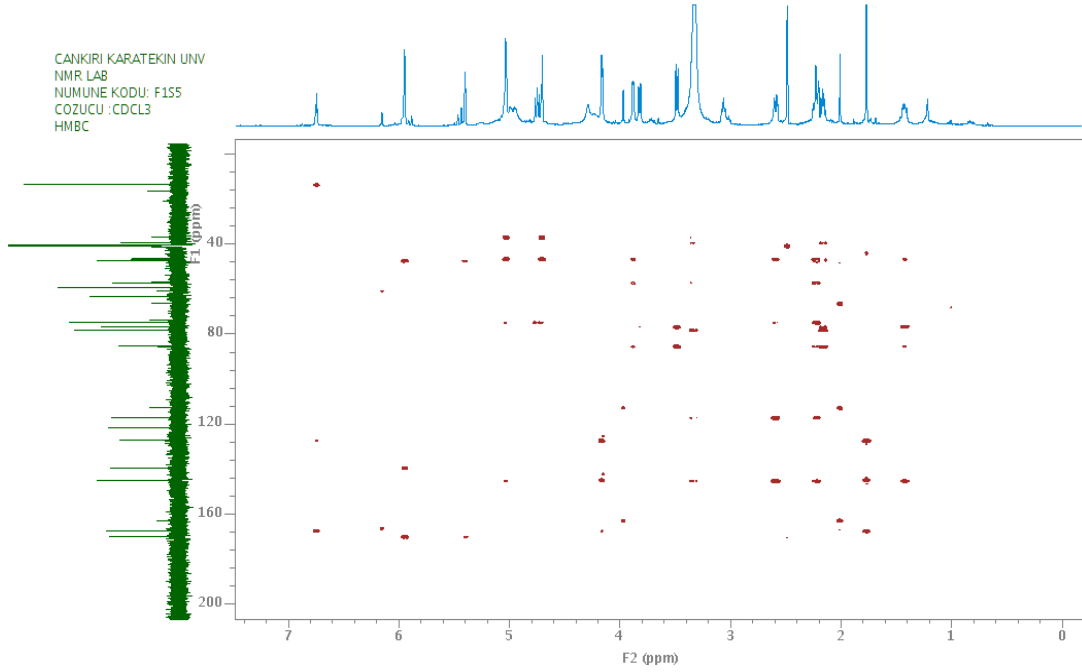
4 bileşiği ekstraksiyon işlemi ile elde edilen CD-YK kodlu ham ekstre (5.25 g) ham ekstrenin silikajel kolonundan ardından sephadex (LH-20) kolon dolgu materyaliyle yapılan (36-39) fraksiyonlardan kristallendirilerek izole edildi (9 mg). Elde edilen kristallerden 5mg tartılarak yapı analizi için DMSO-d₆ çözücüsünde çözüldü. ¹H, ¹³C, DEPT, HMBC spektrumları kaydedildi.



Şekil 4.25 Bileşik 4'ün ¹H-NMR spektrumu (600 MHz, DMSO-d₆)



Şekil 4.26 Bileşik 4'ün ¹³C-NMR spektrumu (600 MHz, DMSO-d₆)



Şekil 4.27 Bileşik 4'ün HMBC spektrumu (600 MHz, DMSO-d₆)

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışma HeLa (insan rahim kanseri) kanser hücresinde *Centaurea derderiifolia*'nın hekzan, diklorometan, kloroform, metanol-kloroform, su/EtOAC, su/bütanol ekstralarının antiproliferatif ve antioksidan etkilerini değerlendirerek yüksek etki gösteren ekstrelerden sekonder metabolit izolasyonu gerçekleştirmek ve yapısını aydınlatmak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Yapısı aydınlatılan maddenin antikanser ve antioksidan özelliklerinin olup olmadığının incelenmesi ve tüm ekstraların kimyasal bileşenlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Tez çalışması kapsamında *Centaurea derderiifolia*'nın antioksidan aktivite testleri 3 ayrı metoda göre *in vitro* testlerle belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen tüm ekstraların antioksidan aktiviteleri DPPH' radikali giderimi, metal iyonlarını şelatlama testi ve toplam fenol miktarlarının ölçümü ile değerlendirilmiştir. Bu çalışmalar neticesinde metal şelatlama aktivite testinde ve DPPH' radikal giderim antioksidan aktivite testinde tohum ekstraları yaprak ekstralarından daha yüksek aktivite göstermiştir. DPPH' testinde ekstralar arasında en yüksek etki tohum metanol ekstresinde çıkarken ($IC_{50}=0.127\pm 0,001$ mg/mL), en düşük etki ise yaprak hekzan ekstresinde çıkmıştır ($IC_{50}\Rightarrow 5$ mg/ml). Ekstreler sentetik antioksidanlar ile kıyaslandığında özellikle 0,250 mg/mL ve bu konsantrasyonun üzerinde TM'nin sentetik antioksidanlara yakın bir etki gösterdiği görülmektedir. Metal şelatlama testinde TH pozitif kontrol EDTA'ya yakın bir etki göstermiştir. Total fenol testinde ise TM'nin total fenol içeriği en yüksek olan ekstre olduğu tespit edilmiştir.

Tüm ekstraların HeLa hücrelerine karşı antiproliferatif etkileri 250, 100 ve 50µg/mL konsantrasyonlarda incelendi. İncelemeler neticesinde YK, TK, YD, TD ekstralarının çok yüksek antikanser aktivite gösterdiği tespit edildi. İncelemeler neticesinde endemik bir bitki olan ve daha önce hiç çalışılmamış olan *Centaurea derderiifolia* bitkisinin yaprak kısmının kloroform ekstresinin en yüksek antikanser aktiviteye sahip olduğu tespit edildi (CD-YK). Bu nedenle bitkinin bu kısmı üzerinden biyolojik aktivite yönlendirmeli araştırmalar yürütüldü.

Ekstraksiyon işlemi ardından yapılan antikanser aktivite testi sonucunda en yüksek etkiyi gösteren bitkinin yaprak kısmının kloroform ekstresindeki bileşenlerin ayrılması için flash kromatografisi işlemi uygulandı. 1, 2, 3 bileşiklerikristallendirilerek izole edildi. Moleküllerin yapısı ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HMBC spektumları yardımıyla belirlendi.

Flash ve kolon kromatografileri sonucunda izole edilen saf bileşiklere antioksidan testleri uygulandı. İzole edilen daucosterin bileşiğinin çalışılan konsantrasyonlarda ılımlı bir DPPH' ve metal şelatlama aktivitesi gösterdiği tespit edildi. İzole maddelerden en iyi DPPH'radikalini giderim aktivitesini **4** bileşiği ($\text{IC}_{50}=0,76 \pm 0,03$) ve **3** bileşiği ($\text{IC}_{50}=1,01 \pm 0,06$) göstermiştir. Metal iyonlarını şelatlama aktivitesi testinde; en iyi şelatlayıcı madde olarak **3** bileşiği öne plana çıkmaktadır. **3** bileşiği ($\%88,3 \pm 0,61$) pozitif kontrol EDTA'ya oldukça yakın bir aktivite göstermiştir.

Flash ve kolon kromatografileri sonucunda izole edilen saf bileşiklere anti kanser testi uygulandı. İzole edilen bileşiklerin HeLa hücrelerine karşı antiproliferatif etkileri 100, 50 ve 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonlarında incelendi. İncelemeler sonucunda daucosterin(**1**) bileşiğinin kontrolle kıyaslandığında HeLa hücrelerine karşı 50 ve 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonda ılımlı bir aktivite gösterdiği tespit edildi. **2** bileşiğinin Kontrolle kıyaslandığında HeLa hücrelerine karşı bütün konsantrasyonlardaçok yüksek bir aktivite gösterdiği tespit edildi. **3** bileşiğinin Kontrolle kıyaslandığında HeLa hücrelerine karşı özellikle 100 ve 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonlarda çok yüksek bir aktivite gösterdiği tespit edildi. **4** bileşiğinin doza bağlı olarak aktivitesinde bir azalış görülmüştür. Kontrolle kıyaslandığında HeLa hücrelerine karşı konsantrasyonlardadüşük bir aktivite gösterdiği tespit edildi.

C.derderiifoliay yaprak ve tohum ekstreleri ile yapılan çalışmalar neticesinde elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

GC-MS analizi sonucundabitkinin yaprak kısmının hekzan ekstresinde % 36,1 lupeol, % 17,71 oleik asit, % 16,02 linoleik asit, % 9,08 palmitik asit dört ana bileşen olmak üzere toplam 20 bileşen belirlendi. Bitkinin tohum kısmının hekzan ekstresinde ise, %

9,73linoleik asit etil ester, % 25,95 oleik asit, % 51,41 linoleik asit üç ana bileşen olmak üzere toplam 12 bileşen tespit edildi.

Yaprak kısmının hekzan ekstresinde %36,1 oranında bulunan antiprotozoal, antimikrobiyal, antienflamatuar, antitümör özellikler gösteren karmaşık bir farmakolojiye sahip biyoaktif bir triterpenoid olan Lupeol, ile ilgili yapılan bir çalışmada; Lupeol'ün MCF-7, A549, HeLa, RPMI 8226, G361ve bunların dışında pek çok farklı hücre hatlarında gösterdiği antikanser aktivite IC₅₀ değerleriyle belirlenmiştir (Gallo ve Sarachine 2009).

Linoleik asit; mısır, soya ve safran gibi bazı bitkilerin yağlarında yüksek miktarda bulunan omega-6 çoklu doymamış esansiyel bir yağ asitidir(Pérez-Matute vd. 2007).Bu yağ asidinin beyin gelişimi ve sinir hücrelerinin yenilenmesinde, hipertansiyon, koroner kalp hastalığı riskini azaltmada, enflamasyonu çoğaltan bazı faktörleri engelleme de rol oynadığı tespit edilmiştir (Yerlikaya 2014).

Oleik asit; doğada pek çok bitki yağında ve % 30 oranında hayvansal yağlarda gliserin esterleri olarak bulunan doymamış yağ asitidir. Doymamış yağ asitlerinin en önemlisidir.Bir çalışmada paklitaksel ve oleik asitin insan (MDA-MB-231) hücrelerindeki birleştirilmiş *in vitro* sitotoksik aktivitesi incelenmiştir.Oleik asitin paklitaksel kemosenesitivitesine etkisi IC₅₀ ve IC₇₀ değerleriyle karşılaştırılarak belirlenmiştir (Menendez vd. 2001).

Palmitik asit; hayvan ve bitkilerde bulunan 16 C'lu en yaygın doymuş yağ asitidir. Bir çalışmada kırmızı alg (ambrio zonata)'in insan lösemi hücreleri üzerinde seçici sitotoksik aktivite gösterdiği fakat; normal HDF hücreleri üzerinde sitotoksik aktivite göstermediği belirlenmiştir. Başka bir çalışmada ise palmitik asit bu bitki ekstraktından ayrılmış karakterize edilmiş ve biyolojik aktivitesine bakılmıştır. Çalışma sonucunda palmitik asitin insan lösemi hücrelerine seçici sitotoksik aktivite gösterdiği fakat normal HDF hücrelerine karşı sitotoksik aktivite göstermediği belirlenmiştir (Harada vd. 2001).

Son yıllarda bitkisel kökenli gıdalarda bulunan fenolik bileşiklerin yoğun bir şekilde incelenmesi; bunların insan sağlığı ile yakından ilişkisi olduğunun saptanmasından ve özellikle de kanser insidansını azalttığı yönündeki epidemiyolojik bilgilerden kaynaklanmaktadır. Ayrıca doğal antioksidan madde özelliği de göstermeleri, serbest radikallerin neden olduğu reaksiyonları durdurarak veya engelleyerek kanser, kalp hastalığı ve akciğer hastalıkları gibi pek çok hastalıkların oluşumuna engel olmaları sebebiyle de ilgi odağı olmuşlardır (Nizamlioğlu ve Nas 2010).

Tez çalışmasında *C.derderiifolia*'nın diklorometan, kloroform, meOH, su/EtOAc ve su/n-bütanol ekstralarının HPLC-TOF analizi sonucu ile fenolik bileşenleri tespit edildi.

C.derderiifolia'nın yaprak kısmının ana bileşenleri sinamik asit, klorojenik asit, ve 4-hidroksi benzoik asittir. Tohum kısmının ana bileşenleri ise vanilik asit, sinamik asit, klorojenik asit ve 4-hidroksi benzoik asittir.

Yaprak ve tohum kısımlarının ana bileşiklerinden biri olan sinamik asit ile ilgili yapılan bir çalışmada; Knoevengel kondenzasyon reaksiyonları yardımıyla sinamik asitler sentezlenmiş ve biyolojik aktivitelerine bakılmıştır. Bu bileşiklerin farklı antioksidan yöntemlerinde çok iyi aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu türevlerin antitümör etkileri HT-29, MRC-5, OAW-42, MDA-MB-231 ve HeLa normal hücre hatlarının poliferasyondaki IC₅₀ değerleri ile belirlenmiştir. Bir tanesi dışında bileşiklerin bütün hücre hatları için düşük bir antitümör etki gösterdiği belirlenmiştir (Pontiki vd. 2014).

Seidel ve ark (2014) yapmış oldukları bir çalışmada asetilasyon protein düzeylerini artıran pan-HDAC (histon deasetilaz) inhibitörleri olarak 3 yeni 4-hidroksi benzoik asit türevi belirlemişlerdir. Bu bileşiklerin hücre döngüsü ilerlemesini durdurduğunu ve normal hücrelerin yaşayabilirliğini etkilemeden, apoptotik hücre ölümüne neden olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışma verileri, 4-hidroksi benzoik asit türevlerinin antikanser potansiyele sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Seidel vd. 2014).

İzole edilen molekülün literatürdeki yeri ve önemi araştırılmıştır:

İn vitro denemelerde daucosterin bileşiğinin de aralarında bulunduğu 4 bileşik, Epstein-Barr virüsüne (EBV) karşı antitümör aktivite bakımından incelenmiş ve incelemeler

sonucunda bu molekülün yüksek antitümör aktivite gösterdiği tespit edilmiştir(Guevara vd. 1999).

Daucosterin molekülünün HeLa (insan rahim kanseri), Vero (Afrika yeşil maymun böbrek hücresi) ve C6 (sıçan beyin tümörü) hücrelerine karşı antiproliferatif aktiviteleri incelenen bir araştırmada, bu molekülünün yüksek konsantrasyonda (500 µg/mL) HeLa ve C6 hücrelerine karşı etkili olduğu tespit edilmiştir (Tufekci vd. 2010).

Wang ve ark. (2007) yılında yapmış oldukları bir çalışmada, Panax ginseng meyvelerinden izole edilen ve aralarında Daucosterin de olduğu 11 bileşiğin MTT testini kullanarak göğüs, akciğer ve prostat kanserlerine karşı *in vitro* antikanser aktivitesini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda Daucosterinin 10 ve 100 µM konsantrasyonda H838 (göğüs kanseri) hücrelerine; 1, 10 ve 100µM konsantrasyonlarda LNCaP (prostat kanseri) hücrelerine ve 1 ve 100µM'da ise PC3 (prostat kanseri) hücrelerine karşı % 20-90 arasında aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Daucosterin molekülünün antioksidan aktivitesini inceleyen bir araştırmada, bu molekülünün orta derecede indirgeme gücü aktivitesi (FRAP), yüksek derişimde kullanılan standartlara (Troloks, BHA, BHT) yakın serbest katyon radikali giderme aktivitesinin (ABTS) olduğu tespit edilmiştir(Aslan 2012).

Sonuç olarak, daha önce biyolojik aktivite bakımından çalışılmamış olan *Centaurea derderiifolia* bitki türünün antioksidan ve antikanser aktiviteleri araştırılmıştır. *Centaurea derderiifolia* ekstrelerinin büyük bir kısmının HeLa hücrelerinde doza bağlı olarak hücre proliferasyonu üzerinde inhibitör etki gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen tüm aktivite sonuçları ekstre ve saf bileşik bazında fitokimyasal analizlerle desteklenmiştir. Antioksidan aktivite testleri sonucunda en yüksek etkiyi gösteren TM ekstresi düşük antikanser etki gösterdiği için izolasyon çalışmaları yüksek antikanser aktivite gösteren YK ekstresi üzerinden yürütülmüştür. İzolasyon çalışmaları sonucunda bu ekstrede elde edilen Daucosterin molekülü daha önce farklı bitkilerden izole edilmiştir. Fakat bu bitki türünde ilk defa izole edilerek literatüre kazandırılmıştır. Yüksek antikanser aktivite gösteren bileşik 2, bileşik 3 ve düşük antikanser aktivite gösteren bileşik 4 ilk kez izole edilerek literatüre kazandırılmıştır.

Yapılan bu çalışmalara ek olarak yüksek antikanser ve yüksek antioksidan aktivite gösteren tohum ekstreleri incelenerek saf bileşenlerin izolasyon çalışmaları yapılabilir.

KAYNAKLAR

- Ak, T. 2006. Curcumin'in antioksidan ve antiradikal özelliklerinin incelenmesi.Yüksek Lisans Tezi,. Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Aslan, R. 2012. *Salvia aethiopsis* l. Bitkisindeki sekonder metabolitlerin izolasyonu, yapı tayini, uçucu yağ bileşenlerinin belirlenmesi ve antioksidan aktivitelerinin incelenmesi.Yüksek Lisans Tezi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, 22-24 s., Tokat.
- Başoğlu, F. (1982).Gıdalarda kullanılan bazı baharatların mikroorganizmalar üzerine etkileri ve kontaminasyondaki rolleri. Gıda Dergisi, 1(7);
- Baydar, H. (2009). Tıbbi ve aromatik bitkiler bilimi ve teknolojisi (genisletilmiş 3. Baskı). Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Isparta.51; 23-24.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. ve Berset, C. (1995).Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food Science and Technology, 1(28); 25-30.
- Decker, E. A. ve Welch, B. (1990).Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 3(38); 674-677.
- Farag, R., Daw, Z., Hewedi, F. ve El-Baroty, G. (1989).Antimicrobial activity of some egyptian spice essential oils. Journal of Food Protection, 9(52); 665-667.
- Faydaoğlu, E. v. ve Sürücüoğlu, M. S. (2013).Tıbbi ve aromatik bitkilerin antimikrobiyal, antioksidan aktiviteleri ve kullanım olanakları. Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 2(6); 233-265.
- Gallo, M. B. ve Sarachine, M. J. (2009).Biological activities of lupeol. Int J Biomed Pharm Sci, 1(3); 46-66.
- Guevara, A. P., Vargas, C., Sakurai, H., Fujiwara, Y., Hashimoto, K., Maoka, T., Kozuka, M., Ito, Y., Tokuda, H. ve Nishino, H. (1999).An antitumor promoter from moringa oleifera lam. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2(440); 181-188.
- Harada, H., Yamashita, U., Kurihara, H., Fukushi, E., Kawabata, J. ve Kamei, Y. (2001).Antitumor activity of palmitic acid found as a selective cytotoxic substance in a marine red alga. Anticancer research, 5(22); 2587-2590.
- Heywood, V. (1978).Flowering plants ofthe world. London: Oxford UniversityPress,
- Huang, D., Ou, B. ve Prior, R. L. (2005).The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of agricultural and food chemistry, 6(53); 1841-1856.
- Hussain, T., Arshad, M., Khan, S., Sattar, H. ve Qureshi, M. S. (2011).In vitro screening of methanol plant extracts for their antibacterial activity. Pak J Bot, 1(43); 531-538.
- Kandavel, D. ve Sekar, S. (2010).Interaction of plant growth promoting rhizobacteria (pgpr) and endophytes with medicinal plants–new avenues for phytochemicals. Journal of Phytology, 7(2);
- Khalil, E. A., Afifi, F. U. ve Al-Hussaini, M. (2007).Evaluation of the wound healing effect of some jordanian traditional medicinal plants formulated in pluronic f127 using mice (mus musculus). Journal of ethnopharmacology, 1(109); 104-112.
- Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., Lima, J. L. ve Rangel, A. O. (2006).Automatic method for the determination of folin-ciocalteu reducing capacity in food products. Journal of agricultural and food chemistry, 15(54); 5241-5246.
- Menendez, J., del Mar Barbacid, M., Montero, S., Sevilla, E., Escrich, E., Solanas, M., Cortes-Funes, H. ve Colomer, R. (2001).Effects of gamma-linolenic acid and oleic acid on paclitaxel cytotoxicity in human breast cancer cells. European journal of cancer, 3(37); 402-413.
- Meo, A. A. (2009).Pollen morphology of pyrethrum tatsiense (compositae) from pakistan. Biological Diversity and Conservation, 2); 61-64.
- Mercan, U. (2004).Toksikolojide serbest radikallerin önemi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 1(15); 91-96.

- Moghaddam, F. M., Farimani, M. M., Salahvarzi, S. ve Amin, G. (2007).Chemical constituents of dichloromethane extract of cultivated satureja khuzistanica. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 1(4); 95-98.
- Nizamlioğlu, N. ve Nas, S. (2010).The phenolic compounds in vegetables and fruit; structures and their importance. Electron J Food Technol, 1(5); 20-35.
- Pérez-Matute, P., Martínez, J., Marti, A. ve Moreno-Aliaga, M. (2007).Linoleic acid decreases leptin and adiponectin secretion from primary rat adipocytes in the presence of insulin. Lipids, 10(42); 913-920.
- Pontiki, E., Hadjipavlou-Litina, D., Litinas, K. ve Geromichalos, G. (2014).Novel cinnamic acid derivatives as antioxidant and anticancer agents: Design, synthesis and modeling studies. Molecules, 7(19); 9655-9674.
- Reyhan, A., Küpeli, E. ve Ergün, F. (2004).The biological activity of centaurea l. Species. Gazi University Journal of Science, 17(4); 149-164.
- Seidel, C., Schnekenburger, M., Dicato, M. ve Diederich, M. (2014).Antiproliferative and proapoptotic activities of 4-hydroxybenzoic acid-based inhibitors of histone deacetylases. Cancer letters, 1(343); 134-146.
- Singleton, V. L. ve Rossi, J. A. (1965).Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American journal of Enology and Viticulture, 3(16); 144-158.
- Tufekci, A. R., Sahin, A., Demirtas, I. ve Elmastas, M. 2010. Cirsium arvense (l.) scop. Subsp. Vestitum bitkisinin antikanser ve antioxidan aktivitelerinin İncelenmesi ve fitokimyasal araştırmalar. ^24 Ulusal Kimya Kongresi, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi
- Tutin, T., Heywood, W., Burges, N., Moore, D., Valentine, D., Walters, S. ve Webb, D. (1976). Flora europaea vol. 4 plantaginaceae to asteraceae (Cambridge Univ. Press, Cambridge, London).
- Wagenitz, G. (1975).Floristic connections between the balkan peninsula and the near east as exemplified by the genus centaurea. Problems of the Balkan flora and vegetation Sofia, 223-228.
- Yerlikaya, F. H., Mehmetoğlu İ. (2014).Obez kişilerde plazma yağ asit kompozisyonu desatür az ve elongaz enzim aktivitelerinin değerlendirilmesi 12(1); 43-47.