

**ÇANKIRI KARATEK N ÜN VERS TES  
FEN B L MLER ENST TÜSÜ**

**YÜKSEK L SANS TEZ**

***Bryonia multiflora* B TK S N N F TOK MYASAL ANAL Z VE ANT KANSER  
AKT V TES N N NCELENMES**

**Mesut GÖK**

**K MYA ANAB L M DALI**

**ÇANKIRI  
2014**

**Her hakkı saklıdır**

## TEZ ONAYI

Mesut GÖK tarafından hazırlanan “*Bryonia multiflora* Bitkisinin Fitokimyasal Analizi ve Antikanser Aktivitesinin İncelenmesi” adlı tez çalışması 13.01.2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

**Jüri Üyeleri :**

**Başkan:** Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

**Üye:** Yrd. Doç. Dr. Ayşe ŞAHİN YAĞLIOĞLU

**Üye:** Yrd. Doç. Dr. Salih ÖKTEN



**Yukarıdaki sonucu onaylarım**



**Prof. Dr. Sezgin ÖZDEN**  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

### Yüksek Lisans Tezi

***Bryonia multiflora* BTKSNNFTOK MYASAL ANALİZ VE ANTİKANSER AKTİVİTESİNİN İZOLASYONU VE SAĞLIK İZLENİMİ**

**Mesut GÖK**

**Çankırı Karatekin Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. brahim DEMİR**

Bu araştırma kapsamında, *Bryonia multiflora* (Cucurbitaceae) bitkisinin kökü sırasıyla hekzan, etil asetat ve metanol:kloroform (1:1) çözücülerinde maserasyon yöntemi ile ekstraksiyona bırakıldı. Evaporatörde çözücülerini uçurduktan sonra miktarı fazla olan metanol-kloroform (1:1) ekstresi hekzan, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc ve MeOH çözücülerini ile kolon kromatografisine tabi tutuldu. Kolon kromatografisi sonrası antikanser aktivitesi yüksek olan EtOAc ile gelen fraksiyonlar birleştirilerek flash kromatografisine tabi tutuldu. Daha sonra en aktif fraksiyon TLC ve GC-MS yardımıyla belirlenip birleştirildi. Preparatif TLC ile Cucurbitacin B molekülü izole edildi ve yapısı NMR ve HPLC-TOF/MS yardımıyla aydınlatıldı. Daha sonra anti kanser aktivitesi gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile (xCELLigence) belirlendi. Ayrıca *Bryonia multiflora* Bois. & Heldr. (Cucurbitaceae) bitkisinin kök, gövde, yaprak ve meyve kısımları hekzan ekstraktları esterle birleştirilerek 3 tekrarlı olarak GC-MS cihazında analiz edildi.

**2014, 50 sayfa**

**ANAHTAR KELİMELER:** *Bryonia multiflora* Bois. ve Heldr. (Cucurbitaceae), gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA), Cucurbitacin B, NMR, GC-MS ve FID.

## ABSTRACT

Master of Science Thesis

Phytochemical Analysis and Determination of Anticancer Activity of *Bryonia multiflora*

Mesut GÖK

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

Supervisors: Prof. Dr. brahim DEM RTA

In this study, *Bryonia multiflora* (Cucurbitacea) roots were extracted with n-heksane, EtOAc and methanol:chloroform (1:1). After the solvents evaporation, that we did column chromatography with methanol:chloroform (1:1) using n-Hexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc and MeOH solvents. After the column chromatography, the fractions obtained in ethyl acetate combined and evaporated for testing anti-cancer activity and separated again with flash chromatography. Therefore, the most active fractions were collected and combined using TLC and GC-MS. The goal compound of curbitacin B was isolated by the preparatif TLC, and defined by 1D and 2D NMR and HPLC-TOF/MS. Finally, the compound which is isolated and defined, were applied to anticarcinogenic activity tests by Real Time Cell Analysis System. Besides the extracts of the roots, stem, leaf and fruit of *B. multiflora* extracted with n-heksane and esterificated and analyzed with GC-MS for three times.

**2014, 50 pages**

**Key Words:** *Bryonia multiflora* Bois. and Heldr. (Cucurbitacea), RTCA real time cell analysis system, Cucurbitacin B, NMR, steroid, GC-MS and FID.data

## ÖNSÖZ VE TE EKKÜR

Tez çalı mam boyunca bana tüm deneyimlerini ve bilgilerini aktarmanın yanı sıra maddi ve manevi olarak çok destek olan de erli danı manım Prof. Dr. brahim DEM RTA 'a, Bitkinin tanımlanmasında bana yardımcı olan sayın Doç. Dr. Tamer KEÇEL 'ye, Anti-kanser aktivite çalı mam için bana yardımcı olan Ar . Gör. Serkan KOLDA 'a, GC-MS çalı malarında bana yardımcı olan Uzman Fatih Gül ve Yrd. Doç. Dr. Ay e AH N YA LIO LU'na, Bilmedi im birçok konuda tecrübelerinden yararlandı m Uzman Ali Rıza TÜFEKÇ 'ye, NMR çalı malarında ve aydınlatılmasına Tokat Gaziosmanpa a Üniversitesi'nde Uzman olan Hüseyin AK T ve Özkan EN'e, Bu çalı mamı maddi olarak destekleyen Çankırı Karatekin Üniversitesi BAP birimine(Proje No:2012/03) ve son olarak hiçbir zaman deste ini benden esirgemeyen ailemin her bir bireyine ve Abdurrahman ORHAN'a sonsuz saygı ve te ekkürleri bir borç bilirim.

Mesut GÖK

Çankırı, Ocak 2014

## Ç İNDEK İLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
ÖNSÖZ VE TE EKKÜR.....	iii
S İMGELER D Z N .....	vi
EK İLLER D Z N .....	vii
Ç İZELGELER D Z N .....	viii
1. G R .....	1
1.1. <i>Bryonia multiflora</i> .....	1
2. KAYNAK ÖZETLER .....	3
2.1. <i>Bryonia</i> Türleri ile Yapılan Çalı malar .....	3
2.2. Sekonder Metabolitler .....	3
2.3. Kukurbitasinler (Cucurbitacin).....	5
2.4. Ya Asitleri .....	6
2.5. Fitoterapi.....	8
2.6. Fitoterapinin Tarihçesi .....	8
2.7. Alternatif Tıp.....	9
2.8. Hücre Kültürü .....	10
2.9. Hücrelerin Safı tırılması ( zolasyonu) .....	11
2.10. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi.....	12
2.11. Anova Varyans Analizi .....	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	13
3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Aletler .....	13
3.1.1. Bitkisel materyal.....	13
3.1.2. Kullanılan kimyasal çözücüler .....	13
3.1.3. Dolgu maddeleri .....	13
3.1.4. Belirteçler .....	13
3.1.5. Ya asitlerinin esterle tırılması.....	14
3.1.6. Cihazlar .....	14
3.1.7.GC-MS parametreleri.....	14
3.2. Kromotografik Yöntemler.....	15
3.3. Aktivite Testleri.....	16
3.3.1. Anti kanser testi HeLa hücresi .....	16
3.4.1 Bitki kökünden ekstrelerin çıkarılması i lemi.....	17
3.4.2. Hekzan ile elde edilen ekstrelerin GC-MS analizi .....	17
3.4.2. BM-MeOH-CHCl <sub>3</sub> ekstresinin flash kromatografisi .....	19
3.4.3. <i>Bryonia multiflora</i> MeOH-CHCl <sub>3</sub> ekstresinin kolon kromatografisi.....	20
3.4.4. Mgt-17 flash kromaografisi.....	20
3.4.5. Anti kanser aktivite testi sonrası yapılan i lemler .....	22
4. BULGULAR .....	25
4.1. Anti-Kanser Testleri .....	25
4.1.1. Kolon kromatografisi ile elde edilen ekstrelerin anti-kanser aktiviteleri .....	25
4.1.2.MGT-17'nin flash kromatografisi ile elde edilen ekstrelerin anti kanser testleri .....	28
4.2. zole Edilen Molekülün Yapı Tayini .....	31
4.2.1. Cucurbitacin B molekülünün yapı tayini.....	31

4.2.2.NMR spektrumları.....	32
4.2.3. HPLC-TOF/MS analizi.....	41
4.2.4. infrared analizi.....	43
4.2.5. UV analizi.....	43
4.3. <i>Bryonia multiflora</i> Bitkisinden Elde Edilen Heksan Ekstrelerinin GC-MS Sonuçları ve statiksel De erlendirilmesi .....	44
5. TARTI MA VE SONUÇ.....	46
5.1. zole Edilen Cucurbitacin B Molekülünün Sonucu .....	47
5.2. GC-MS Sonuçlarının De erlendirilmesi .....	47
KAYNAKLAR. ....	49
ÖZGEÇM .....	51

## S İMGELER DİZİNİ

Simge	Açıklama
A	Atık
APT	Attached Proton Test
<i>B. multiflora</i>	<i>Bryonia multiflora</i>
d	Dublet
dd	Dubletin dubleti
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
F	Flash
GC-MS	Gaz Kromatografisi- Kütle Spektrometresi
TK	ince Tabaka Kromatografisi
J	Etkileme Sabiti
MS	Kütle Spektrometresi
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
RTCA	Real Time Cell Analyzer
s	Singlet
t	Triplet
TLC	Thin Layer Chromatografisi
UV-VIS	Ultraviyole-Görünür Bölge
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HETCOR	Heteronuclear Correlation
COSY	Correlated Spectroscopy
EtOAc	etilasetat
MeOH	metanol
CHCl <sub>3</sub>	kloroform
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	diklorometan



## EK LLER D Z N

ekil 2. 1. Cucurbitacin A ve Cucurbitacin E .....	6
ekil 2. 2. Cucurbitacin I ve Cucurbitacin S .....	6
ekil 2. 3. Hücre kültüründe kullanılan inkübatörler .....	11
ekil 2. 4. Gerçek zamanlı analiz sistemi .....	12
ekil 3. 1. Ekstraksiyon ve safla tırma eması .....	17
ekil 3. 2. B. multiflora bitki kökünün etil asetat ekstarksiyonu .....	18
ekil 3. 3. Flash kromatografisi .....	18
ekil 3. 4. MeOH-CHCl <sub>3</sub> ekstresi kolon kromatografisi .....	20
ekil 3. 5. Flash kromatografisinde fraksiyonların gösterilimi .....	21
ekil 3. 6. Birle tirilen maddelerin TLC'lerinin gösterilmesi .....	22
ekil 3. 7. Headspace GC-MS FID Cihazı .....	23
ekil 3. 8. Yukarıdaki tlc'de ham ekstrakt MeOH-CHCl <sub>3</sub> , Mgt-18 ve elde edilen Cucurbitacin B'nin tlc kar ıla tırılması .....	24
ekil 4. 1. MGT-18 20000 C6 hücresi anti-kanser sonuçları .....	25
ekil 4. 2. MGT-17 20000 C6 hücresi anti-kanser sonuçları .....	26
ekil 4. 3. MGT-18 20000 HeLa hücresi anti-kanser sonuçları .....	26
ekil 4. 4. MGT-17 20000 HeLa hücresi anti-kanser sonuçları .....	27
ekil 4. 5. 25000 HeLa hücresi B1 fraksiyonu anti-kanser sonucu .....	28
ekil 4. 6. 25000 HeLa B40 fraksiyonu anti-kanser aktivitesi .....	28
ekil 4. 7. Cucurbitacin B molekülünün anti-kanser aktivitesi .....	29
ekil 4. 8. Cucurbitacin B bile i inin 5FU ile kar ıla tırılması 50 µg/ml .....	29
ekil 4. 9. Cucurbitacin B bile i inin 5-FU ile kar ıla tırılması 100 µg/ml .....	30
ekil 4. 10. Cucurbitacin B bile i inin 5-FU ile kar ıla tırılması 250 µg/ml .....	30
ekil 4. 11. DEPT ve <sup>13</sup> C NMR spektrumları .....	33
ekil 4. 12. <sup>13</sup> C NMR spektrumu 214-110 ppm arası .....	34
ekil 4. 13. <sup>13</sup> C NMR spektrumu 83-15 ppm arası .....	34
ekil 4. 14. Hetcor spektrumu-1 .....	35
ekil 4. 15. Cucurbitacin B molekülü proton de erleri ile birlikte gösterilmesi .....	36
ekil 4. 16. Hetcor spektrumu-2 .....	36
ekil 4. 17. HMBC spektrumu .....	37
ekil 4. 18. COSY spektrumu ve molekül üzerinde protonların etkile imin gösterilmesi .....	38
ekil 4. 19. Aromatik bölge <sup>1</sup> H NMR spektrumu .....	39
ekil 4. 20. Trans hidrojenlerin <sup>1</sup> H NMR spektrumu .....	39
ekil 4. 21. Alifatik bölge <sup>1</sup> H NMR spektrumu .....	40
ekil 4. 22. Cucurbitacin B HPLC kromotogramı .....	41
ekil 4. 23. Cucurbitacin B HPLC-TOF/MS spektrumu .....	41
ekil 4. 24. nfrared spektrumu .....	43
ekil 4. 25. Cucurbitacin B UV absorbanası .....	44
ekil 4. 26. BM-Heksan kök ekstresi GC kromotogramı .....	44

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3. 1. GC parametreleri.....	14
Çizelge 3. 2. HPLC akı programı .....	15
Çizelge 3. 3. BM-MeOH-CHCl <sub>3</sub> flash kromatografisi .....	19
Çizelge 3. 4. Mgt-17 flash kromatografisi ile gelen fraksiyonlar .....	20
Çizelge 4. 1. Cucurbitacin B molekülünün NMR verileri .....	32
Çizelge 4. 2. GC-MS FID analiz tablosu .....	46
Çizelge 5. 1. B. multiflora heksan ekstraktlarının temel bileşenlerinin yüzde oranı.....	47

## 1. G R

### 1.1. *Bryonia multiflora*

Son yıllarda yapılan çalı malarda, biyolojik olarak aktif olan fitokimyasal do al bile ikler (fenolik bile ikler, steroidler, karotenoidler ve E vitamini) insan ve hayvanlarda kronik hastalıkların olu masını önledi ini veya ilerlemesini geciktirdikleri görülmü tür. Dünyada kronik hastalıkların mevcut teknoloji ile beraber ilerledi i ve insano lunun da bu çizgide kronik hastalıkların çarelerini pek çok yönden de erlendirip, çözüm yolları aranmaktadır. Günümüzde kronik hastalıkların en ba nda kanser, kalp ve damar hastalıkları görülmektedir (Sabandar *et al.* 2013, Wang *et al.* 2013)

Dünyada her yıl binlerce insan kanser hastalı ndan hayatını kaybetmektedir (Yang *et al.* 2013). Bu hastalı n tedavisi için sentetik ilaçlara birey olarak ve ülke olarak milyonlarca dolar harcanmaktadır. Kanser ve pek çok hastalı n tedavisi sentetik ilaçların kullanılmasıyla sa lanabilmektedir. Fakat bu sentetik ilaçların yan etkileri kısa vadede sorun olmazken uzun vadede ciddi sorunlar te kil etmektedir (Saeidnia *et al.* 2013). Günümüzde pek çok hastalı n tedavisi do ada yeti en bitkilerden elde edilen do al bile iklerden sa lanabilmektedir (Yang *et al.* 2014).

Ülkemiz bitki çe itlili i yönünden çok zengindir. Bu zenginli i önemli kılan en önemli etken yıllardan beridir halk arasında tedavi amaçla kullanılabilir ve hala kullanılıyor olmasıdır. Güneydo u Anadolu bölgesinde bulunan bitki çe itlili inin sundu u sonsuz nimetlerden yararlanma ve de erlendirme yıllarca hem terör olaylarından hem de bilimsel çalı ma yetersizli inden dolayı sürekli askıda kalmı tır.

Zengin bir floraya sahip olan bu bölgenin önemi gün geçtikçe artmaktadır. Tedavi amaçlı kullanılan ve bu bölgede ço u yerde yabancı olarak yeti en *Bryonia multiflora* bitkisi bu zenginli in en belirgin göstergesidir.

*Cucurbitaceae* (kabakgiller) familyasından olan, *Bryonia multiflora* Boiss. etheldr türü, Türkiye'nin, Batman, Hakkari, Mardin, Bitlis, Antalya, Burdur, Hatay, çel, Kayseri ve Van illerinde bulunur. Halk arasında it kaba ı veya eytan algamı olarak bilinir. Genelde ba ırsak a rıları, mide sancılarını gidermek için kullanılmı olup daha önce bu bitki tespit edilmi olmasına ra men bununla ilgili olarak herhangi bir literatür çalı masına rastlanmamı tır. Literatürde bu bitki ile ilgili bir çalı ma olmaması bu bitkiyi ara tırmaya de er kılmı tır. Bu bitkinin alt türleri ile ilgili birkaç makale mevcuttur. Bu makalelerden yola çıkarak bu bitkinin sekonder metabolitlerinin ayrılması, yapılarının belirlenmesi ve antikanser aktivitelerinin tespit edilmesi amaçlanmı tır.

## 2. KAYNAK ÖZETLER

### 2.1. *Bryonia* Türleri ile Yapılan Çalışmalar

*Bryonia dioica*'nın romatizma hastalıklarına, kireçlenmeye ve ufak çaptaki yaralara iyi geldiği bazı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (González *et al.* 2008, González *et al.* 2010).

*Black bryonia* olarak bilinen, *Bryonia dioica*, *Lonicera periclymenum* L.'nin ormanlık alanlarda, çalılarda, meyve ve evlerin önündeki bahçelerde bulunduğu, insanlar için oldukça toksik etkisinin olduğu rapor edilmiştir (Rafael *et al.* 2011).

Castroivejo'nun yaptığı çalışmada (2005) *Bryonia dioica*'nın meyvelerindeki ve kökündeki içeriği incelendiğinde zehir etkisinin triterpen glikozidlerden ve kalsiyum okzalit kristallerinden meydana geldiği tespit edilmiştir (Rafael *et al.* 2011).

*Bryonia dioica*'nın halk arasında ilaç olarak kullanılmasının yanı sıra, yeni keşfedilen bitkisi de yiyecek olarak kullanıldığı rapor edilmiştir (Martins *et al.* 2011).

*Black Bryonia* ve *Bryonia dioica*'nın meyvelerinde ham ve olgunlaşmış meyve fenolik bileşikler, flavonoidler, askorbik asit, tokoferol ve likopen gibi antioksidan maddelerin bulunduğu ve fitokimyasal ve biyoaktivitesinin çok yüksek olduğu rapor edilmiştir (Martins *et al.* 2011).

### 2.2. Sekonder Metabolitler

Sekonder metabolitler, bitkinin ekosistemle olan ilişkisinde, çevresel koşullara uyumunda, savunma, korunma, hayatta kalma, nesillerini sürdürme gibi önemli olaylarda bitkiye çeşitli avantajlar sağlayan kimyasal maddelerdir. Bu avantajlar ekilde sıralanabilir; bitkiyi patojenlere karşı koruyan antibakteriyel, antifungal, antiviral; diğer bitkilere karşı doğal ya da rekabet gücünü artıran anti-germinatif ve

toksik maddeler; UV 1 ınları, tuzluluk, kuraklık gibi zararlı çevresel etmenlerin neden oldu u stres ko ullarında direnç artırıcı metabolitler; zararlı hayvanlar ve otlara kar ı korunmayı sa layan insektisit, pestisit, molluskusit ve herbisitler; polinasyon ve tohum da ılımını sa lamak üzere hayvanları cezbedecek renkli ve güzel kokulu metabolitler bulunmaktadır (Bourgaud 2001, Sökmen, 2001).

Sekonder metabolit kavramı ilk olarak Kossel (1891) tarafından ileri sürülmü ve bundan otuz yıl sonra Czapek (1921) birincil metabolitlerden modifiye olan bu metabolitleri “end product” (son ürün) terimi ile tanımlamı tır (Ramachandra 2002). Son yıllarda birçok endüstriyel alanda insan sa lı nı tehdit edici sentetik ürünlerin yerini, do al olan bitkisel sekonder metabolitler almı tır. Gıda sektöründe tatlandırıcı, kıvam artırıcı, renk ve koku verici birçok madde; kozmetik endüstrisinde parfüm ve kozmetik ürün (krem, tonik, maske), tarım alanında insektisit gibi kimyasallar; tekstilde kuma boyamada kullanılan do al boyalar çe itli bitkisel kaynaklı bile enlerden elde edilmektedir. Ayrıca, Dünya Sa lık Örgütü tarafından temel ilaçlar kapsamında ilan edilen 252 ilacın %11’i bitkisel sekonder metabolitlerden üretilmektedir. Bunlardan en yaygın olanları, *Salix* türlerinden izole edilen anti-piretik ve analjezik özelli i olan salisin (aspirin), *Taxus brevifolia*’dan elde edilen anti kanser etkisi olan taxol (paclitaxel) ve *Papaver somniferum*’dan elde edilen güçlü analjezik, narkotik etkisi olan morfindir (Ramachandra 2002, Verpoorte 1999).

Sekonder metabolitlerin do al ko ullar altında bitkilerden elde edilmesi; genellikle çevresel ko ullarda yeti en bitkilerin toplanmasının zor ve pahalı olması, bitkilerin do adan toplanması sonunda bitki türlerinin zamanla soylarının tükenmesi, sekonder metabolit miktar ve kalitesinin çevresel ve iklimsel ko ullardan etkilenmesi, belli geli im evrelerinde ve çok az miktarda üretilmeleri gibi sorunlar nedeniyle zordur ve bu nedenle gün geçtikçe artan talep kar ılanamamaktadır.

Sekonder metabolitler, birincil metabolizma yollarının ara ürünlerinden, özel metabolik yollarla üretilmektedirler ve genellikle biyosentez yollarına göre sınıflandırılırlar (Bourgaud 2001). Bu metabolitler, bitkiler tarafından çok az miktarlarda üretilirler ve

bazı bileşikler belirli türlere özeldirler. Çoğunlukla bitkilerin belirli organlarında, hatta belirli organların belirli hücrelerindeki belirli kompartımanlarda bulunurlar ve bitkinin belirli bir gelişim periyodu süresince üretilirler (Tolonen 2003).

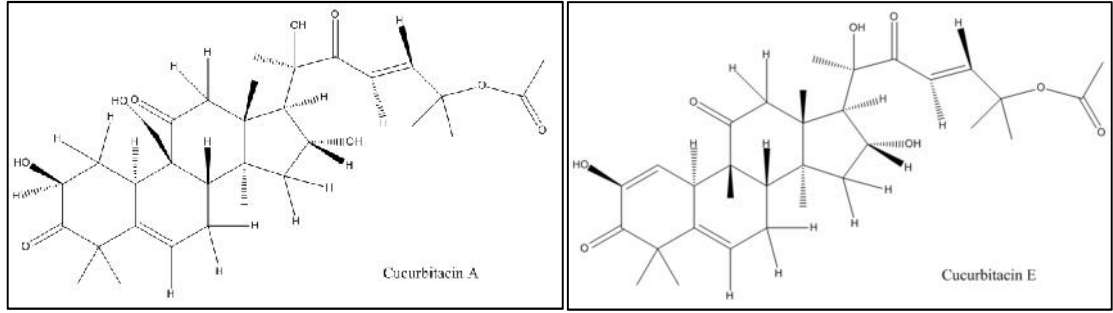
Sekonder metabolitler genel olarak 3 ana grupta incelenirler.

- ✓ Terpenler (Terpenoidler)
- ✓ Azot içeren alkaloidler ve Kükürt içeren bileşikler
- ✓ Fenolikler ve polifenolikler

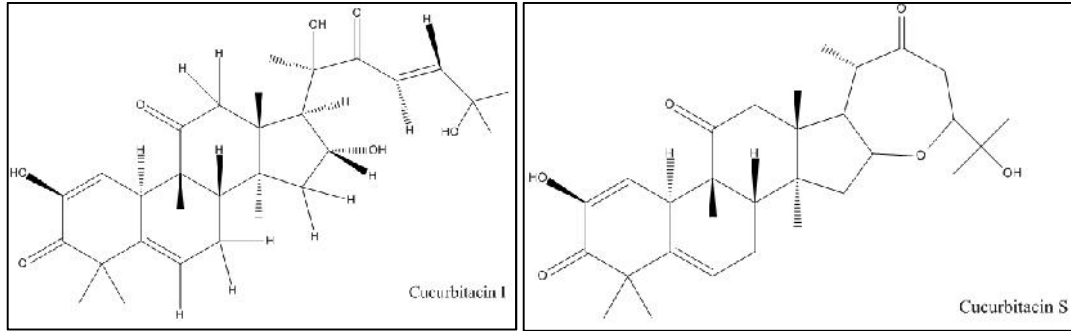
### **2.3. Kukurbitasinler (Cucurbitacin)**

Kukurbitasinler, kabakgiller familyasına ait birçok bitkinin biyokimyasal bileşimidir. Bal kabağı, su kabağı ve *Ecballium elaterium* (ekek hıyarı) gibi birçok bitkide bulunur (Baykut 1979, Gonzales 1968, Madhusudana 1974). Kukurbitasinlerin kimyasal sınıfı steroidler sınıfına girer. Genellikle kukurbitan olarak bilinen bir triterpenden türetilen kukurbitasinlerin spesifik özelliği beş ile altı numaralı karbonlar arasında bir çift bağın olmasıdır. Ayrıca kukurbitasinler genellikle bir glikozit gibi gözükür.

Kukurbitasinler genellikle bazı hayvanlar için toksik etkiye sahiptir, acımtırak bir tadı vardır. Kukurbitasinlerin A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, O, P, Q, R, S, T ve 28/29 nor-kukurbitasin gibi birçok çeşidi vardır. Anti-tümör aktiviteye sahip *Bryonia alba* bitkisi de kukurbitasinler içerdiği ve aktivitenin bu bileşiklerden kaynaklandığı belirlenmiştir. (Konopa 1966, Konopa et al. 1974). Halk arasında sinüzit tedavisinde kullanılan *Ecballium elaterium*'un sıvı kısmından kukurbitasin A, E ve I izole edilmiştir. (Gonzales 1966).



**ekil 2. 1. Cucurbitacin A ve Cucurbitacin E**



**ekil 2. 2. Cucurbitacin I ve Cucurbitacin S**

#### 2.4. Ya Asitleri

Kimya ve biyokimyada ya asidi, genelde uzun, alifatik kuyruklu bir karboksilik asittir. Uzun karboksilik ya asitlerinden 4 karbonlu ve daha uzun zincirli olanları ya asidi olarak sayılır; do al ya ları olu turan ya asitlerinden söz ederken ise bunların en az 8 karbonlu oldu u varsayılabılır. Ço u do al ya asitlerinin çift sayılı karbon atomu vardır, çünkü bunların biyolojik sentezlerinde iki karbon atomlu asetat kullanılır. Ya asitleri doymu ve doymama ya asitleri olarak iki gruba ayrılır.

**Doymu ya asitleri:** Doymu ya asitlerinin zincirlerinde çift ba lar veya ba ka fonksiyonel gruplar bulunmaz. Kısacası karboksilik asit [-COOH] grubundaki karbon dı ndaki di er karbonların olabildi ince çok hidrojenle ba kurmu oldu u anlamını ta ır.



### **Doymu ya asitleri**

Butirik asit:  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$

Laurik asit: (dodecanoic acid):  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$

Miristik asit: (tetradekanoik asit):  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$

Palmitik asit (heksadekanoik asit):  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COO}$

Stearik asit: (octadecanoic acid):  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$

Ara idik asit: (eicosanoic acid):  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$

**Doymamı ya asitleri:** Doymamı ya asitleri benzer ekillidir, ancak zincir üzerinde bir veya daha fazla alken grubu vardır. Bir alken grubunda, bir "-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-" ba yerine "-CH=CH-", yani birbirine çift ba la ba lanmı iki karbon vardır. Bir alken grubunun iki yanında ona ba lı olan karbon atomları ya cis ya da trans konumda olabilir.

**Cis:** Cis konumda bu iki kom u karbon, çift ba ın aynı tarafındadırlar. Çift ba la birbirine ba lı atomlar bu ba ın eksenini etrafında dönemediklerinden cis izomeri durumunda ya asidinin zinciri bu noktada bükük olur ve zincirin hareket serbestisi azalır. Bir zincirde ne kadar çok cis konumlu çift ba olursa zincirin esnekli i o derece azalır. Çok sayıda cis ba lı olan ya asitleri en serbestçe hareket edebildikleri bir ortamda oldukça e ri bir biçimleri olur. Örne in, bir tane çift ba lı oleik asitte bir "kö e" bulunur; Linoleik asit iki çift ba ıyla, belirgin bir e rili e sahiptir, Alfa linoleik asit ise üç cis ba ından dolayı çengel görünümünü olmayı tercih eder. Hareket serbestisi olmayan ortamlarda, örne in ya asitleri lipid zarında fosfolipitlerin parçası veya ya damlacıklarındaki trigliseritlerin parçası iken cis ba ları olan ya asitlerinin sıkı istiflenmelerine engel olur, bu da lipid zarının veya ya damlasının erime sıcaklı ını azaltır.

**Trans:** Trans konumda çift ba lı karbonlara kom u iki karbon çift ba ın kar lı taraflarında yer alırlar. Bu yüzden zincir fazla e ilmez ve bu tür ya asitlerinin ekilleri doymu ya asitlerine benzerler. Do ada bulunan ço u doymamı ya asidinde her bir çift ba ın ardından 3n sayıda karbon atomu vardır ve bu çift ba lar cis konumludur. *Trans* konumlu ya asitlerinin hemen hepsi yapıdadır.

Doymamı ya asitlerinin ekileri arasındaki farklar, ayrıca doymu ve doymamı lar arasındaki ekil farkları, biyolojik süreçler ve biyolojik yapıların (hücre zarları gibi) özelliklerini belirlemede önemli rol oynarlar.

### **Doymamı Ya asitleri:**

Alfa-Linoleik asit:  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$

Linoleik asit:  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$

Ara idonik asit:

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$

Oleik asit:  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$

Erusik asit:  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$

Alfa-linolenik asit omega 3 ya asitleri örneklerindedir. Linoleik asit ve ara idonik asit omega-6 ya asitleridir. Oleik ve erusik asit omega-9 ya asitleridir.

## **2.5. Fitoterapi**

Tıbbi bitkilerde tedavi anlamına gelen fitoterapi ilk kez Fransız hekim Henri Leclerc (1870-1955) tarafından kullanılmı tır (Faydao lu 2011). Geçmi teki fitoterapi uygulamaları ile günümüz arasında en büyük fark bitkilerin artık bütünüyle de il, faydalı ekstrelerin veya bitkilerden izole edilen maddelerle tedavi edilmesidir. Örne in eskiden bir bitkinin uçucu ya ından faydalanmak için onun çayı yapıp içilirken imdi o bitkideki uçucu ya ekstre edilerek tek ba ına kullanılmaktadır. Bu da bitkinin di er faydasız veya yan etkileri olabilen maddelerden hastayı uzak tutmayı sa lamaktadır (Faydao lu 2011, Sarı en 2005)

## **2.6. Fitoterapinin Tarihçesi**

Bitki ekstrelerinin kullanılı ma ili kin ilk yazılı belge M.Ö. 3000'lere kadar gitmektedir. Mezopotamya bölgesindeki Sümer, Asur ve Akat gibi uygarlıklarda bitkisel ilaçların kullanıldı ı bilinmektedir. Yine Çin ve Hint tıbbında da bitkilerin önemli bir yeri vardır.

Yunan tıbbının babası sayılan Hipokrat'ın kitabında bitkisel ürünlerden söz edilmektedir. İslam uygarlığında İbn Sina ve Al Gafini'nin bitkisel tıp konusunda önemli eserleri bulunmaktadır. İbn-i Sina "El Kanun fi'tıbb" kitabında yaklaşık altmış bitkilerin tanıtımı ve kullanımına geniş yer vermiştir.

20. yüzyılda kimya ve biyokimya alanındaki gelişmeler sonucunda bitkilere ilişkin toksikolojik, farmakolojik ve klinik çalışmalar yapılabilmeye imkân doğmuş ve ilaç yapımında bu bitkilerden faydalanabilmeye imkân artmıştır. Ayrıca bu bitkilerden elde edilen maddelerin izolasyonu ile tanımlanan maddelerin sentez yoluyla taklit edilerek ilaçların kimyasal yoldan elde edilmiştir (Faydaoğlu 2011, Sarımen 2005).

## **2.7. Alternatif Tıp**

Tamamlayıcı ve Alternatif tıp (TAT), birbirinden farklı birçok terapiyi içine alan bir terimdir. Çağdaş tıp biliminin hastalık sebepleri ve tedavisi konusunda somut verileri olmadığı, hasta için henüz mevcut objektif ve kanıtlanmış bir tedavi yöntemi olmadığı anda hasta istenilen sonuçları elde edilemeyen veya çağdaş tıp tedavilerini destekleyici olarak hastanın rahatlaması, bağışıklık sisteminin güçlenmesi, psikolojisinin düzelmesi amacıyla uygulanabilen tedavi yöntemidir. Ayrıca alternatif tıp sayesinde yeni ilaçların keşfedilmesinde önemli bir araçtır (Dey and De 2012, Faydaoğlu 2011, Sarımen 2005). Alternatif tıbbın yerine kullanılan anlamına da gelir, dolayısıyla bugünkü tıbbın yerine alternatifidir. Ayrıca bugünün tıbbı bütün eski tıbbı da bilir ve geçerliliğini sürdüren metotları hala uygular.

Tıp, asırlar önce, bugün "alternatif tıp" olarak tanınan şekilde yapılmıyordu. Doktorlar, kendilerince hastalıkları muayene ediyor ve ilacı bulabiliyorlardı veya örendikleri bitkiler, sular ve diğer maddelerle hastasını tedavi ediyordu. İnsanlığın bilgisi arttıkça ve yeni tıbbi araçları (mikroskop, radyografi, manyetik rezonans, tomografi, elektron mikroskopisi, biyopsi, kan dökümü idrar tahlilleri vb.) buldukça hastalıklar ve bu hastalıkların tedavisinde kullanılan yöntemler daha kapsamlı olarak geliştirildi. (Faydaoğlu 2011, Sarımen 2005).

## 2.8. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, Tek bir hücre veya hücrelerin doku ile bağlantısı olmadan laboratuvar ortamlarında (*in vitro*) çoğaltılmasıdır. Hücre kültürleriyle yapılan çalışmalar günümüzde popüler araştırma konularında önemli bir kısmı olmaktadır. Örneğin, kanser gibi çeşitli patolojik durumlarda belli bir maddenin etkilerini ya da bir hücre veya dokuda üretilen belli bir maddenin seviyelerini belirlemek amacıyla hücre kültürleri yapılabilmektedir. Canlı ortamda (*in vivo*) yapılamayan deneyler, belirli bir hücre hattından çoğaltılan hücrelerde (*in vitro*) laboratuvar ortamlarında yapılabilir. (Berg 2002, King 2013).

Hayvansal hücre kültürü teknikleri 1900'lerin ortalarında laboratuvar ortamında rutin olarak uygulanmaya başlandı fakat asıl doku kaynaklarından ayrılan sürdürülebilir ya da yavaş hücre hatları kavramı 19. yüzyılda ortaya konmuştur (Berg 2002, King 2013).

1885'de Wilhelm Roux bir tavuk embriyosu nöral plağının bir kısmını ayırarak ve ılık bir tuzlu su çözeltisinde dokuyu birkaç gün yatatarak doku kültürünün temellerini denetlemiştir (Berg 2002, Konopa 1966).

Ross Granville Harrison, 1907 ve 1910 yıllarında yaptığı deneyleri doku kültürünün metodolojisini de belirleyerek yayımlamıştır (Berg 2002, Konopa 1966). 1913'te Carrelaseptik (steril) koşullar altında düzenli olarak beslenmeleriyle hücrelerin kültür ortamında uzun süre hayatta kalıp çoğalabildiklerini göstermiştir. (Konopa 1966).

## 2.9. Hücrelerin Saflaştırılması (Purifikasyonu)

Hücreler dokulardan hücre dışı (*ex vivo*) olarak birkaç günde saflandırılabilir, ayrıştırılabilir. Tek çekirdekli hücreler, hücre dışı maddeyi bozan kollajenaz, tripsin ya da pronaz gibi enzimatik sindirim yapan enzimler tarafından yumuşak dokulardan ayrılabilirler. Farklı olarak, doku parçaları büyüme ortamına (besiyeri) konulabilir ve hücreler bu şekilde "kültüre edilmiş" olur. Hücreler, "birincil kültür" olarak adlandırılan

yöntemle do rudan kültüre edilebilmektedir. Tümörlerden kaynaklanan bazı istisnalar hariç, ço u birincil hücre kültürünün sınırlı ya am süresi vardır. Ço alan hücrelerin önemli bir miktarı (özellikle kanser kökenli olmayanlar), kültürün ilerleyen zamanlarında ya lanma ve bölünmenin durması gibi süreçlere girer; bu hücreyi canlılıktan alıkoyar. Belirlenmi ya da ölümsüzle tirilmi bir hücre hattı, rastgele bir mutasyonla veya talomeraz geninin yapay ifadesi gibi bilinçli de i imlerle süresiz ço alma yetene ine kavu abilir. Özel hücre tiplerinin iyi belirlenmi hücre hattı örnekleri oldukça çe itlidir. Hücreler uygun bir sıcaklık ve gaz karı mıyla (hayvan hücreleri için 37 derece ve %5 CO<sub>2</sub> içeren) inkübatörde geli tirilebilir ve sürdürülebilir (King 2013).



**ekil 2. 3.** Hücre kültüründe kullanılan inkübatörler

## 2.10. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi

Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi prensip olarak mikro elektronik hücrelerden geçen akımın de i iminin hücrelerle paralel olarak miktarını ölçen bir cihazdır. Yani buradaki her bir mikro hücreye sabit bir akım gönderilir, bu akım ise canlı hücrelerin bu mikro hücrelere yapı ması ile akımı de i tirir, hücre sayısı artıkça akım azalır, bu azalmaların miktarına göre bilgisayar programları aracılı ı ile yorumlanabilir duruma getiren bir cihazdır (Ebru and Scherthanc 2010).



ekil 2. 4. Gerçek zamanlı analiz sistemi

## 2.11. Anova Varyans Analizi

ANOVA ba ımsız de i kenlerin kendi aralarında nasıl etkile ime girdiklerini ve bu etkile imlerin ba ımlı de i ken üzerindeki etkilerini analiz etmek için kullanılır.

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Aletler**

##### **3.1.1. Bitkisel materyal**

Proje kapsamında *B. multiflora* bitkisi 2011 Temmuz ayında. Batman'ın Gercü ilçesinin, Kozlu köyünde (37°38'21" Kuzey, 41°22'10" Doğu 862 m ) toplandı. Toplanan bitkinin tür te hisini Doç. Dr. Tamer KEÇEL tarafından yapıldı. Ankara üniversitesi herbaryumun'da 50534 herbaryum numarası ile kayıt edildi. Bu bitkiler kuru ve güneş ışığının girmedikleri depolarda kurutuldu.

##### **3.1.2. Kullanılan kimyasal çözücüler**

Bu çalışmada metanol, heksan, aseton, kloroform, diklorometan, etil asetat, dietiler, etanol kullanıldı. Bütün çözücüler literatürde yer alan destilleme sistemine göre saflaştırıldı.

##### **3.1.3. Dolgu maddeleri**

Silikajel (Merck 60-230 mesh), Silikajel TK tabakaları F<sub>254</sub>(20x20), Alimüna TK tabakaları Merck (20x20), Redisep flash column-12 g silica, RediSep flash column-24 g silica.

##### **3.1.4. Belirteçler**

Lekelerin Belirlenmesi: UV lambası ile 254 ve 366 nm'de. Serik sülfat belirteci (12 g amonyum seryum (IV) sülfat 50 mL deriik sülfürik asit ve 450 mL destile su hazırlandı. Püskürtmeden sonra 105-110 °C'de birkaç dakika ısıtılır.

### 3.1.5. Ya asitlerinin esterle tirilmesi

10 µg/mL lik hazirlanan ya asitleri ekstresinden 3 mL alinip bir tüpe aktarildi. Üzerine 5 mL 1 M KOH çözeltisi (metanol'de çözülmü ) eklendi ve çalkalandi. Bu tüpte faz olu tu. Üst faz dikkatli bir ekilde alındı, mikrofiltre ile vialle süzülerek GC-MS cihazına verildi. Tüm ya asitleri bu yöntemle hazirlandi.

### 3.1.6. Cihazlar

GC-MS: Agilent 5975 C MSD-7890A-GC

HPLC-TOF/MS: Agilent TOF 6210

Döner buharla tırıcı: IKA

FTIR-ATR: PerkinElmer spektrum-100

Flash kromatografisi: Teledyne Isco-CombiflashRf

Gerçek Zamanlı Hücre Analiz: Roche marka singleplate modeli

UV spektrofotometresi: Rayleigh marka- UV 2601 modeli

NMR : Bruker marka-Avance III 400 MHz <sup>1</sup>H ve 100 MHz <sup>13</sup>C

### 3.1.7.GC-MS parametreleri

Hidrokarbonları analiz için Agilent 5975 C MSD-7890-GC serisi kolon HP-5MS 5% Phenyl Methyl Silox 325 °C: 30 m x 250 µm x 0.25 µm, taşıyıcı gaz olarak Helyum kullanıldı. Enjeksiyon hacmi ve sıcaklığı 1 µl, 250 °C, split oranı 25:1, dedektör ve voltajı FID, 1.176471 kV artlarında toplamda 61 dakikalık bir programla verildi.

**Çizelge 3. 1.** GC parametreleri

Zaman (dakika)	Sıcaklık artı miktarı °C/dk	Kolon Sıcaklığı °C
4	0	120
26.66	3	200
10	0	200
5,33	15	280
15	0	280



### 3.1.8. HPLC TOF/MS parametreleri

Analiz için Agilent HPLC-TOF/MS 6210 serisi ile yapıldı. Enjeksiyon hacmi 5 mikrolitre ve pozitif mod'da verildi. Hareketli faz olarak %1'lik formik asit çözeltisi (Çözücü A) ve asetonitril (Çözücü b) (Merck, HPLC grade). Kolon olarak ZORBAX SB-C18 4.6 mm IDx250 mm (5 µm) ve dedektör olarak TOF/MS kullanıldı.

**Çizelge 3. 2.** HPLC akı programı

Akı hızı (mL/dk)	Zaman (dakika)	Çözücü A % 1'lik Formik asit çözeltisi	Çözücü B Asetonitril
0.6	0-1	90	10
0.6	1-20	50	50
0.6	20-23	20	80
0.6	23-25	90	10
0.6	25-30	90	10

### 3.2. Kromatografik Yöntemler

Kolon Kromatografisi Kuru tatbik: Numune 50-100 ml çok iyi çözündü ü bir çözücü içinde çözülmü tür. Çözelti, kolondaki dolgu maddesi ve tatbik edilecek numune miktarları da göz önünde tutularak, yeterli miktarda dolgu maddesi ile karı tırlımı tır. Dolgu maddesi çözeltiyi iyice tutunması ve tam kuruması sa lanmı tır. Daha önce hazırlanan ve üzerinde 1-3 cm çözücü bırakılan kolona kuru olarak aktarılmı tır. Kolon muslu u açılarak çözücü sisteminin fazlasının bo altılması ve kolon dolgu maddesinin tam oturması sa lanmı tır. Kolonun üzerine, dolgu maddesi yüzeyinin bozulmasını engellemek için pamuk yerle tirilmi ve kolona yeterli miktarda çözücü sistemi eklenerek elüsyona ba lanmı tır.

### **3.2.1. Flash kromatografisi kolonlarının hazırlanması**

Flash kolonu hazırlanırken silikajele emdirilmi olan numuneler katı numunelerin konulması için tasarlandı, kolondan ba ımsız kolon boyutlarında olan plastik bo kolona iyice istiflenerek konuldu. Sonra hazırlanan bu plastik kolon yerine yerle tirildi. 12 g'lık redisep silika kolonlar için flow Rate 30 mL/ dakika, 24 g'lık kolonlar için ise 35 mL/dakika olarak cihaz otomatik olarak ayarlandı. Ayrıca kolon ba latılmadan önce çözücü ile kolon artlandırıldı, daha sonra air purge 0.0 min olarak ayarlandı. Dalga boyları olarak 280 nm ve 360 nm ve ayrıca tüm dalga boyları seçilerek, flash kromatografisi uygulandı. Flash kromatografisi ile yapılan tüm kolonlar aynı artlarda yapıldı.

### **3.3. Aktivite Testleri**

#### **3.3.1. Anti kanser testi HeLa hücresi**

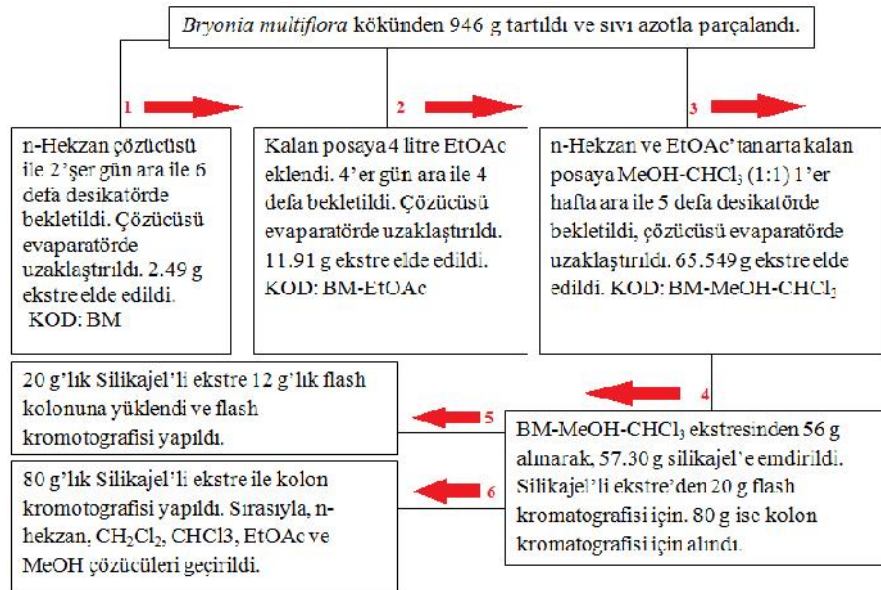
Besi yeri olarak % 10 fetal bovine serum ve % 2 streptomisin-penisilin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) kullanılmı ve analizler inkübatör içinde (% 5 CO<sub>2</sub>, % 100 nem) 37 °C'da yapıldı. İlk olarak kuyucuklara 50 µL besi yeri konulan E-Plate 96 15 dk. steril kabinde ve 15 dk. inkübatörde bekletildi ve sonrasında inkübatör içindeki istasyona yerle tirildi ve arka plan (background) okuması yapıldı. Sonrasında kuyucuklara her bir kuyucukta  $2,5 \times 10^4$  adet HeLa hücresi olacak ekilde 100 µL hücre süspansiyonu koyuldu. Bundan sonra plaka yarım saat steril kabinde ve oda ko ullarında bekletilerek hücrelerin kuyucuk tabanına yerle mesi beklendi. Bu plaka istasyona yerle tirilerek 80 dk. boyunca 10 dakika aralıklarla ölçüm yapıldı. Bu sürede hücreler kuyucuk tabanına yerle erek normal büyüme periyoduna girdi. Daha sonra istasyondan çıkarılan plakanın kuyucuklarına steril DMSO ve besi yeri kullanılarak hazırlanan ekstre çözeltilerinden kuyucuklardaki son deri imler 500, 250, 100 ve 50 µg/mL olacak ekilde çözeltiler eklenmi ve sonrasında besiyeri ile kuyucuklardaki son hacim 200 µL'ye tamamlandı. Eklemelerden sonra plaka derhal istasyona yerle tirildi ve 48 saat boyunca 10 dakika aralıklarla analiz gerçekte tirildi. Testler üçer tekrarlı yapıldı ve grafikler standart sapma çubukları ile verildi.

### 3.4.1 Bitki kökünden ekstrelerin çıkarılması i lemi

Bitkinin gövde ve yaprak kısımları gölgede, nemsiz ortamda kurutulduktan sonra 80 er gram alınarak 500 mL'lik balona konularak 450 mL destile hekzan ilave edildi. 2' er hafta, 3 defa bekletildi. Çözücüsü evaporatörde uzakla tırıldı. Ekstreler sırasıyla gövde 30 mg, yaprak 160 mg olarak tartıldı. Bitkinin meyve kısmı da gölgede ve nemsiz ortamda kurutuldu. 374 g 5 Litrelik balona konuldu. 3,8 litre hekzan ilave edildi. 2 er hafta, 3 defa bekletildi. Çözücüsü evaporatörde uzakla tırıldı. Meyve 260 mg elde edildi. Bitkinin kök kısmından elde edilen hekzan ekstresi ise ekil 3.1. deki yöntemle elde edilmi tir.

### 3.4.2. Hekzan ile elde edilen ekstrelerin GC-MS analizi için hazırlanması

Hekzan ile muamele edilen kök, gövde, yaprak ve meyve ekstrelerinden 10 mg/mL'lik stok çözeltilerden 3'er mL alındı. 5 mL 1M KOH çözeltisi (metanol)'de eklenerek esterle tirildi. Esterle tirme i leminden sonra üst faz enjektörle alınarak, 0,45 µm'lik filtre ile viallere süzüldü ve GC-MS cihazına verildi. Tüm bu i lemler, bitkinin kök, gövde, yaprak ve meyvelerin hekzan ekstreleri için ayrı ayrı 3 tekrarlı olarak yapıldı.



ekil 3. 1. Ekstraksiyon ve safla tırma eması



**ekil 3. 2.** *B. multiflora* bitki kökünün etil asetat ekstarksiyonu



**ekil 3. 3.** Flash kromatografisi

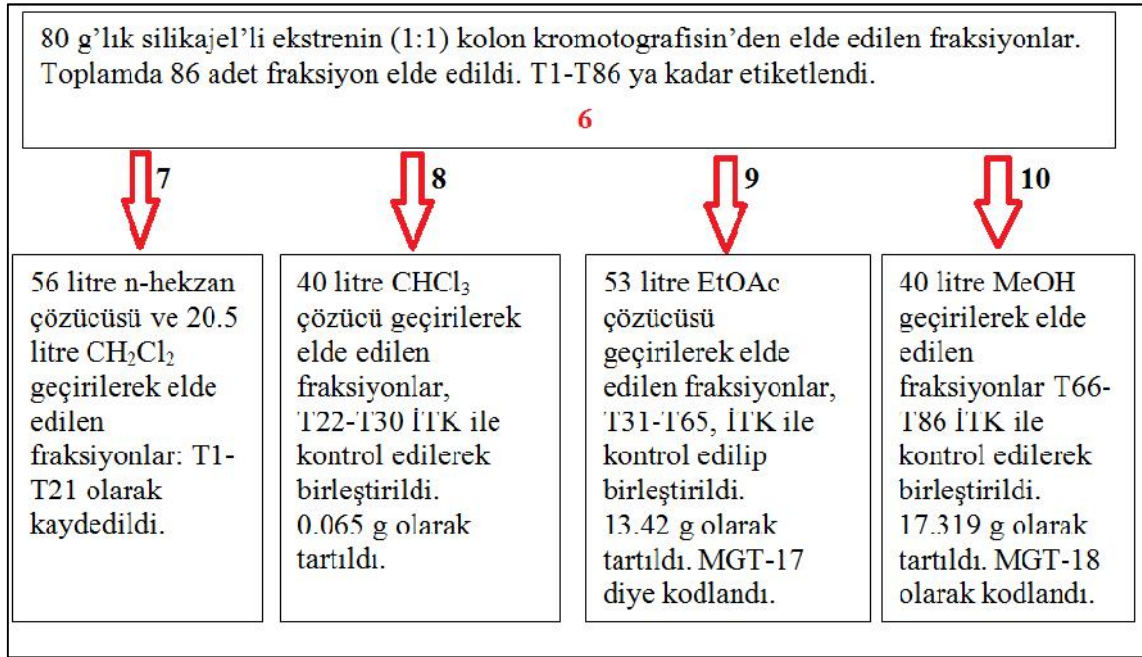
### 3.4.2. BM-metanol-kloroform ekstresinin flash kromatografisi

BM-MeOH-CHCl<sub>3</sub> ekstresinden silikajel-madde 20 g (1:1) alınarak 12 g Flash kolonuna yüklendi. flow rate 30 mL/dk ve treshold 0,02, 200-780 nm'de arasındaki tüm maddelerin toplanması için ayarlandı ve flash kromatografisi yapıldı. Kromatografi sonrası çizelge 3.1.'deki fraksiyonlar elde edildi.

**Çizelge 3. 3.BM-MeOH-CHCl<sub>3</sub> flash kromatografisi tablosu**

Çözücü Sistemi	Atık ile gelen fraksiyonlar	Racklarda toplanan fraksiyonlar
Heksan	A3-A68	[1-17]
CHCl <sub>3</sub> -heksan (5:95)	A68-A74	
CHCl <sub>3</sub> -heksan (10:90)	A75-A78	
CHCl <sub>3</sub> -Heksan (25:75)	A79-A102	
CHCl <sub>3</sub> -Heksan (50:50)	A103-A122	
CHCl <sub>3</sub> -Heksan (75:25)	A123-A137	[18-23]
CHCl <sub>3</sub>	A138-A145	
Heksan	A146-A149	
EtOAc-Heksan (25:75)	A150-A153	[23-24]
EtOAc-Heksan (50:50)	A154-A160	[25]
EtOAc -Heksan (75:25)	A161-A168	[26-37]
EtOAc	A169-A231	[38-104]
EtOAc-MeOH (95:5)	A232-A266	[105-126]
EtOAc-MeOH (91:9)	A267-A273	
EtOAc-MeOH (90:10)	A274	
EtOAc-MeOH (80:20)	A275	
EtOAc-MeOH (70:30)	A276	
EtOAc-MeOH (60:40)	A277	
EtOAc-MeOH (50:50)	A278	
EtOAc-MeOH (40:60)	A279	
EtOAc-MeOH (30:70)	A280	
EtOAc-MeOH (20:80)	A281	
EtOAc-MeOH (10:90)	A282-A283	
EtOAc-MeOH (95:5)	A284	
MeOH		

### 3.4.3. *Bryonia multiflora* MeOH-CHCl<sub>3</sub> ekstresinin kolon kromatografisi



ekil 3. 4. MeOH-CHCl<sub>3</sub> ekstresi kolon kromatografisi

### 3.4.4. MGT-17 Flash Kromatografisi

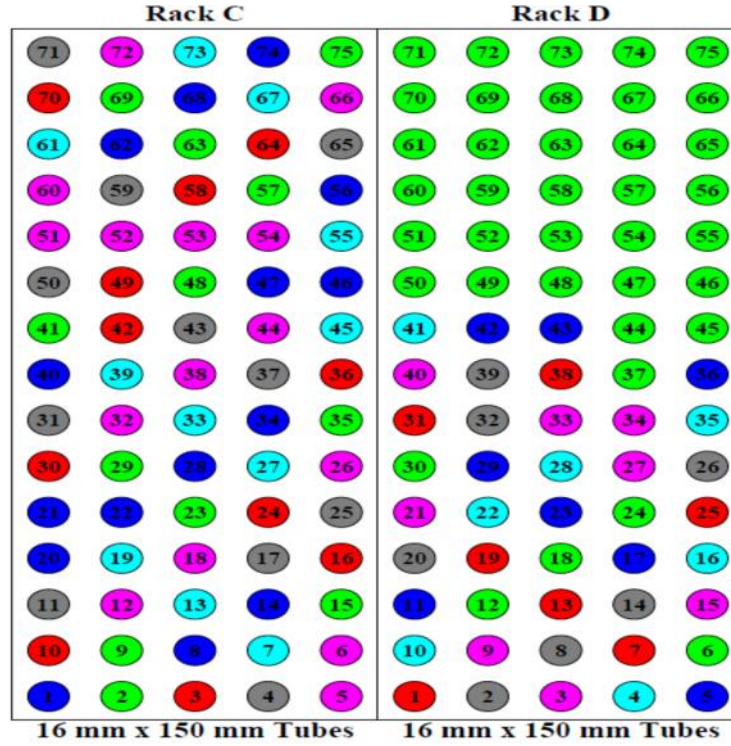
ekil-4.1,4.2,4.3,4.4'teki anti-kanser grafi ine göre MGT-17 ekstraktının anti-kanser aktivitelerinin daha iyi olmasından dolayı, flash kromatografisi ile izole etmek için MGT-17 ekstresi seçildi. 13.442 g MGT-17, 13.40 g silikajele emdirildi. Sonra çözücüsü çektilirip kurutuldu, 24 gramlık silikajelli flash kolonu, çözücü akı hızı 35 mL/dk'lık program ayarlandı ve kromatografik izole edilmeye ba landı.

Çizelge 3. 4. MGT-17 flash kromatografisi ile gelen fraksiyonlar

Çözücü Sistemi	Fraksiyonlar (atıklar)	Fraksiyonlar (UV dedektörü)	Program süresi Flow rate 35 mL/dk Dalga Boyu
Hekzan	B1-B19	C1-C359	299.8 dakika
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Hekzan (5:95)	B-20 ilk 50 dakika		50 dakika
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Hekzan (20:80)	B21-B23	C360-C874	325 dakika
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Hekzan (20:80)	B24-B26	C875-C1414	325 dakika
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	B27-B32	C1415-C1581	299.8 dakika
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -CHCl <sub>3</sub> (10:90)	B33-B37	C1582-C1638	299.5 dakika

<b>Tablo 3.2. nin devamı</b>			
% 100 CHCl <sub>3</sub>	B38	C1639-C2178	300 dakika
% 100 EtOAc	B39	C2179-C2754	314.8 dakika 254 nm-283 nm
MeOH- EtOAc (10:90)	B40	C2180-C2280	160 dakika 260 nm-268 nm
MeOH- EtOAc (20:80)	B40	C2281-C2283	299.8 dakika 270 nm- 280 nm
MeOH- EtOAc (25:75)	B40	C2284-C2302	165 dakika 250 nm-270 nm
MeOH- EtOAc (40:60)	B41	C2303-C2370	300.2 dakika 268 nm-270 nm

12 defa flash kromatografisi yapıldı. Flash kromatografisi ile racklarda UV absorbansına göre toplanan tüpler ekil 3.5.'te gözüken data'yı vermektedir. ekil 3.5.e göre aynı renkteki tüpler, aynı dalga boyunda gelen maddelerdir buna göre aynı renklerde olan tüpler birle tirildi. Aynı renklerde olmayan tekli tüplerde kendi aralarında birle tirildi. Daha sonra birbirine benzer tüpler TK ile kontrol edilip birle tirildi.



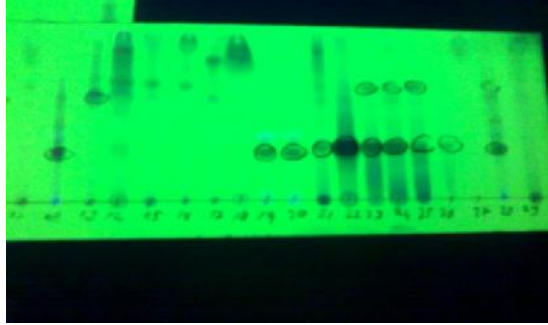
**ekil 3. 5.** Flash kromatografisinde tüplerin gösterilimi.

### 3.4.5. Anti kanser aktivite testi sonrası yapılan işlemler

Gerçek Zamanlı Analiz Sistemi (RTCA) ile anti kanser aktiviteleri yapıldı. B-40 antikanser aktivite testleri sonucunda aktiviteye rastlanmadı.

B1 fraksiyonun antikanser aktivite gözlemlendi ( ekil 4.5.) Aktivite gözlenmesinden ötürü öncelikle TK (12:76:5) çözücü sisteminde yürütüldü UV-254, 366 nm de ve serük sülfat kullanılarak kontrol edildi. Serük sülfat belirteci püskürtülüp ısıtıldıktan hemen sonra TK üzerinde 2 adet mor renk leke gözlemlendi, bu renklerin steroidlere özgü olduğu oldu u dü ünülerek benzer fraksiyonlar birleştirildi.

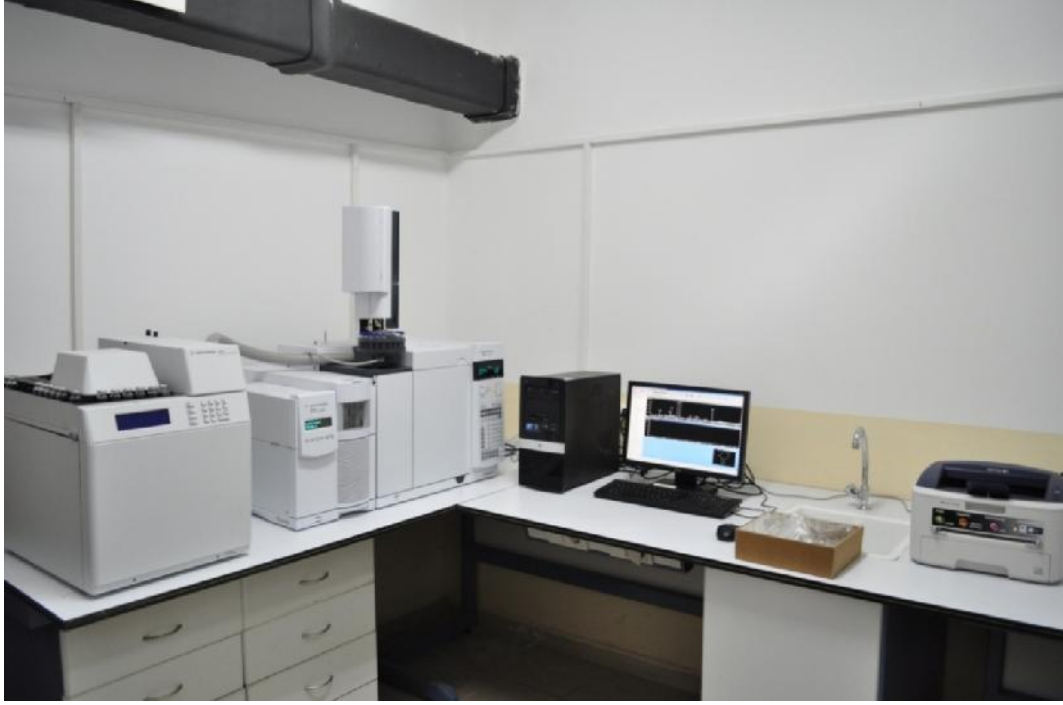
TK'ya yüklenen maddeler n-hekzan-EtOAc-MeOH (12:76:5) çözücü sisteminde yürütüldü. UV-254 ve 366 nm de gerektiğinde serük sülfat kullanılarak kontrol edildi. B1-B5, B6-B9 ve B10-B19'a ayrı olarak birleştirildi. Birleştirilen bu tüp'ler kendi aralarında tekrar TK ile takip edildi. UV lambası 254 ve 366 nm'de kontrol edildi sonra serük sülfat belirteci kullanılarak ısıtıldı aynı zamanda 2 adet mor leke tespit edildi. Bu mor lekelerin tüm fraksiyonlar da ve steroid'lere özgü lekeler gözlenmesi bu maddelerin preparatif TK ile alınabileceğini ini dü ündürmü tür.



**ekil 3. 6.** Birleştirilen maddelerin TK'larının gösterilmesi.



Ayrıca bu birleştirilen tüpler analiz amaçlı olarak, BK kodu ile GC-MS cihazına verildi. GC-MS analizi sonucunda; yağ asitleri, cucurbitacin B, lacholesta, ve stigmasterol gibi steroidler gözlemlendi fakat tanımlanan moleküllerin yüzdesinin düşük olmasından ötürü bu sonuçlar dikkate alınmayarak TK'da gözlemlenen mor renk veren lekelerin hedeflenerek safırlanmaya gidilmiştir.



**ekil 3. 7.** Headspace GC-MS cihazı.

Mor renk veren tüplerin safırlanması için yeterli olmamasından ötürü BM-EtOAc ekstresi ile karıştırıldı, benzer maddelerin bu ekstrede de bulunduğunu TK ile belirlendi. Bundan dolayı 11.91 g etil asetat ekstresi ile ağırlık oranları uygulandı. Ayrıca TK preparatif olarak daha iyi ayırmak için, yeni bir çözücü sistemi belirlenerek işleme başlandı.

BM- EtOAc ile alınan kısım öncelikle eterde çözüldü.

ETERDE  
ÇÖZÜNMEYEN

ETERDE  
ÇÖZÜNEN

Diklorometan ile çözülen kısım alındı, GC-MS analizi yapıldı. cucurbitacin B ve lacholesta steroidleri tespit edildi. m.steroid-1 olarak kaydedildi.



ekil 3. 8. Yukarıdaki TK'da ham MeOH-CHCl<sub>3</sub> ekstraktı, Mgt-18 ve elde edilen Cucurbitacin B'nin tlc'de karılaştırılması

Eterde çözünen kısım alındı. GC-MS analizi yapıldı. Bu fazda steroidler tespit edildi, fakat kütüphane taramasında sonuçların çelişki olması nedeniyle saflaştırılmaya gidildi. Eter ile alınan ekstre 5.5 g olarak tartıldı, m.steroid-2 diye kaydedildi. Son olarak TK yardımıyla cucurbitacin B olan (serik sülfat ile mor leke veren) ekstreler, m.steroid 1-2 BK, B20, fr C360-C874, fr C1433-C1489, A154-155-156, A-159, kısımları birleştirildi, çektirildi ve 11.2 g olarak tartıldı D diye kodlandı. TK yapılarak en uygun çözücü sistemi belirlendi. D karışımı %100 CHCl<sub>3</sub> ile çözüldü 20x20 lik Merck TK plakalara ekstre yüklendi ve CHCl<sub>3</sub>+MeOH (95:5) çözücü sistemi ile yürütüldü. Daha önce n-hekzan-EtOAc-MeOH (12:76:5) çözücü sistemini kullanılmamasının nedeni, kazıma oldu umuz bantı tekrar yürüttü ümüzde birden fazla maddenin gözlenmesi, bundan dolayı bu sistem preparatif TK'de kullanılmadı.

Hedef molekülü bulmak için serik sülfat belirteci püskürtüldü (105-110 °C) ısıtıldı, mor renk veren en üstten 4. sıradaki bantın mor renk verdi i tespit edildi. 4. sıradaki kazılarak çoğaltıldı. Sonra bu madde referans alınarak plakalar yürütüldü. Hedeflenen bant kazındı. Yaklaşık olarak 48 adet 20x20 TLC plakası kullanılarak 42.5 mg madde elde edildi. MGK diye kodlandı. Bu maddeden 22 mg NMR için, 10.5 mg antikanser için 3 mg ise IR ve erime noktası tayin cihazında harcandı. 7 mg arttı ve uygun koşullarda endoapta saklandı.

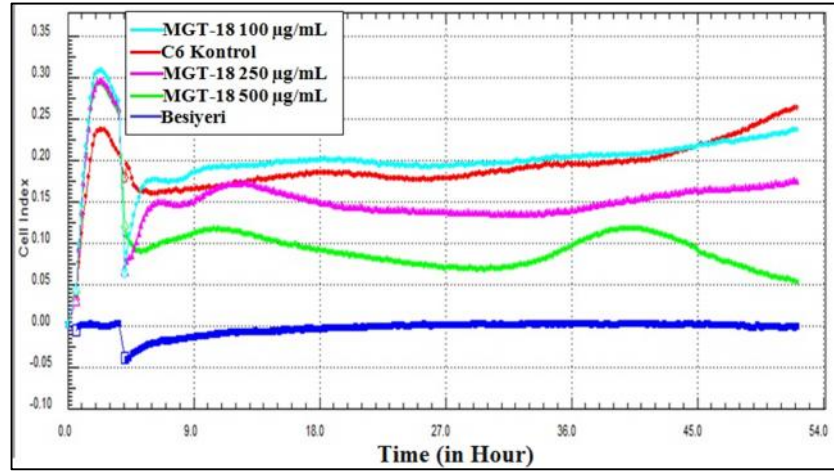
## 4. BULGULAR

### 4.1. Anti-Kanser Testleri

#### 4.1.1. Kolon kromatografisi ile elde edilen ekstrelerin anti-kanser aktiviteleri

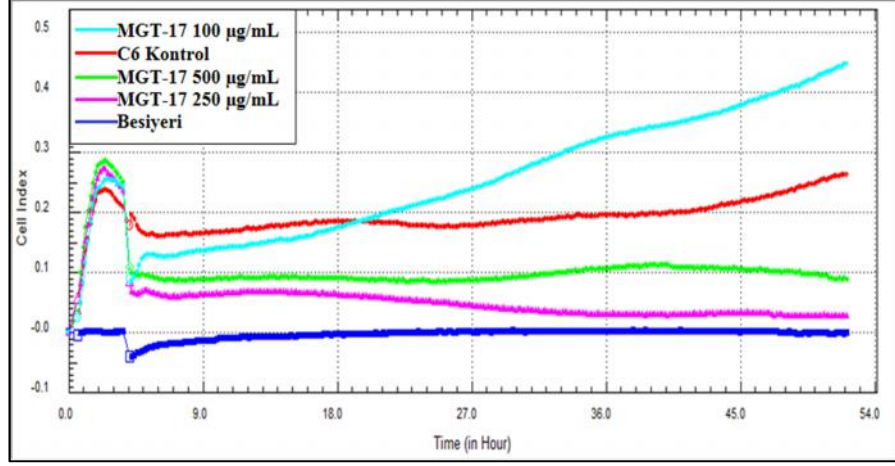
Kolon kromatografisi ile elde edilen MGT-17 ve MGT-18'e anti kanser testler yapıldı. sonuçlar aşağıdadır.

ekil 4. 1. incelendi inde, MGT-18 ekstresinin doza ba lı olarak aktivitesinde bir artış gözlenmekle birlikte, kontrolle kıyaslandı nda C6 hücrelerine kar ılımlı aktivite gösterdi i tespit edilmiştir.



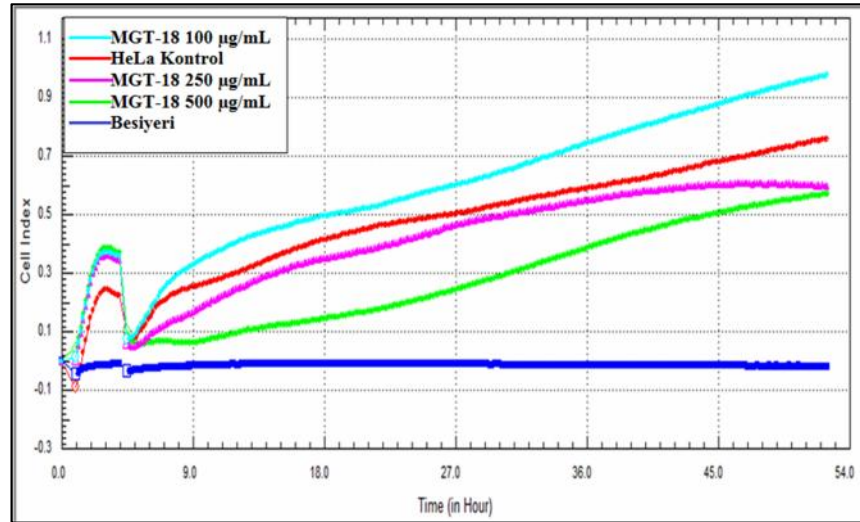
ekil 4. 1. MGT-18 C6 hücreleri anti-kanser sonuçları

ekil 4.2'e deki grafi e göre, MGT-17 ekstresinde 100 µg/mL konsantrasyonunda C6 hücrelerini artırdı ı gözlenmekte, 500 µg/mL konsantrasyonda ise orta bir aktivite gözlenmektedir.



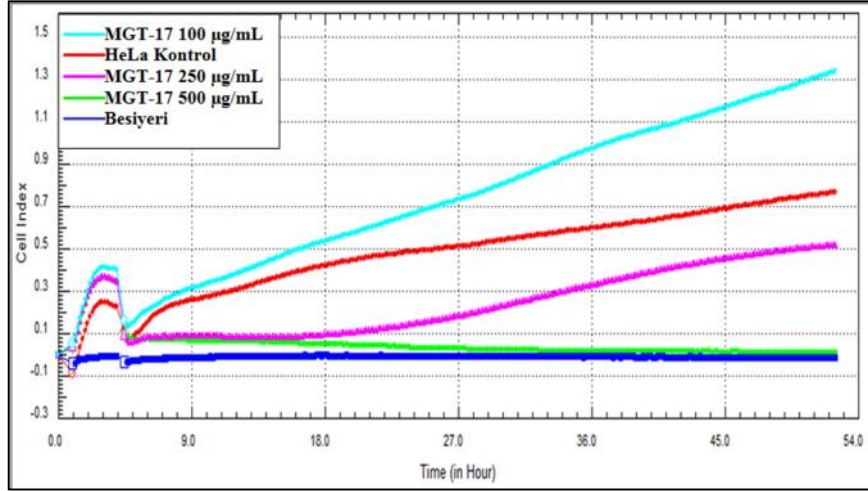
**ekil 4. 2.** MGT-17 C6 hücresi anti-kanser sonuçları

ekil 4. 3. incelendi inde, MGT-18 ekstresinin doza ba lı olarak aktivitesinde bir artı gözlenmekle birlikte, kontrolle kıyaslandı ında HeLa hücrelerine kar ı 500 µg/mL konsantrasyonda ılımlı aktivite gösterdi i tespit edilmi tir.



**ekil 4. 3.** MGT-18 HeLa hücresi anti-kanser sonuçları

ekil 4. 4. incelendi inde, MGT-17 ekstresinin doza ba lı olarak aktivitesinde bir artı gözlenmekle birlikte, kontrolle kıyaslandı ında HeLa hücrelerine kar ı 500 µg/mL konsantrasyonda çok yüksek aktivite gösterdi i tespit edilmi tir.

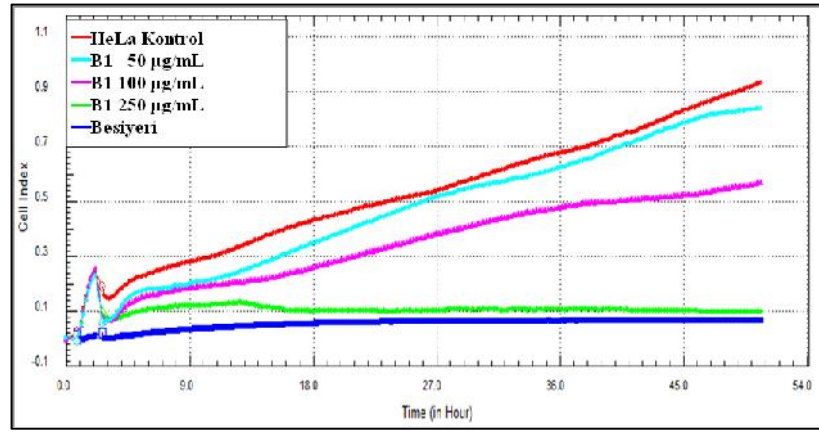


**ekil 4. 4. MGT-17 HeLa hücresi anti-kanser sonuçları.**

Anti-kanser test sonuçlarına göre MGT-17 ekstresinin, C6 ve HeLa kanser hücrelerine aktivitesinin MGT-18 ekstresine göre daha iyi oldu u gözlendi. Bir sonraki ayırma i lemne aktivite bakımından yüksek olan MGT-17 ekstresi ile devam edildi.

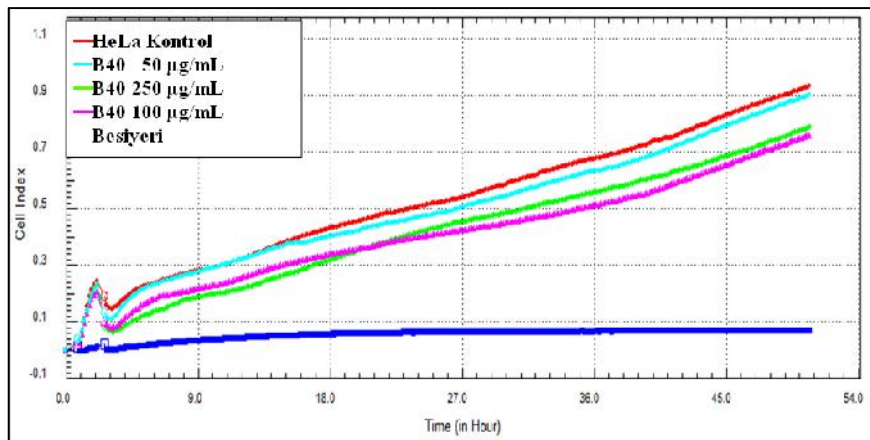
#### 4.1.2.MGT-17'nin flash kromatografisi ile elde edilen ekstrelerin anti kanser testleri

ekil 4. 5. incelendi inde, B1 fraksiyonunda doza ba lı olarak aktivitesinde bir artı gözlenmekle birlikte, kontrolle kıyaslandı ında HeLa hücrelerine kar ı 500 µg/mL konsantrasyonda çok yüksek aktivite gösterdi i tespit edilmi tir.



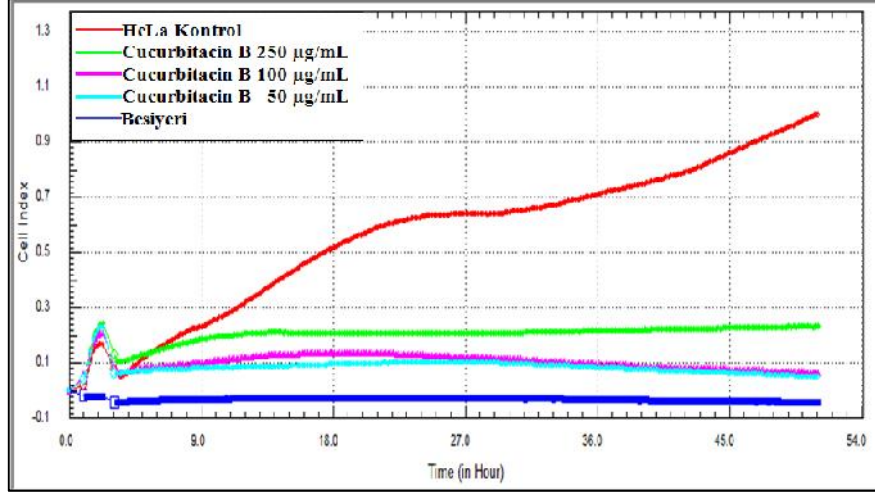
ekil 4. 5. HeLa hücresi B1 fraksiyonu anti-kanser sonucu

ekil 4.6'e göre MGT-17 ekstresinin flash ile yapılan ayırım sonucu elde edilen ekstrelerin, anti-kanser aktivitelerine göre en etkili fraksiyon B1 aktivitesi dü ük olan fraksiyon ise B40 fraksiyonu çıktı. Dolayısıyla aktivite bakımından yüksek olan B1 fraksiyonundan safla tırma i lemüne gidildi.



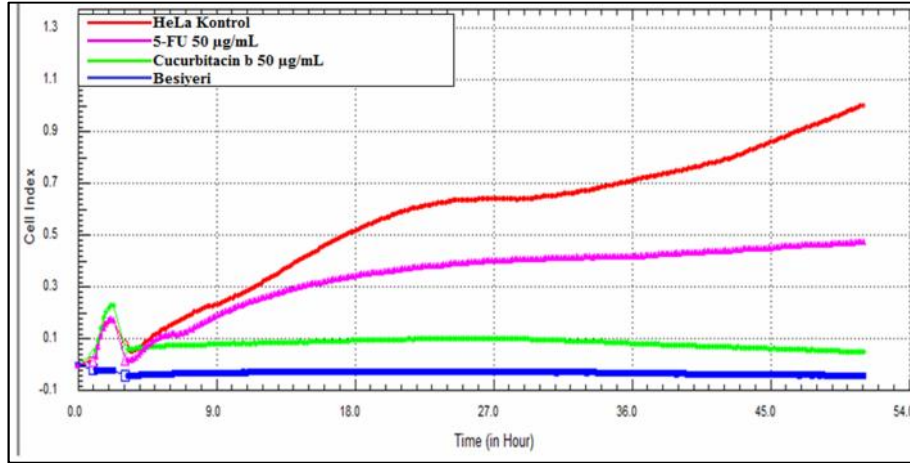
ekil 4. 6. HeLa B40 fraksiyonu anti-kanser aktivitesi

ekil 4. 7. incelendi inde, B1 fraksiyonundan elde edilen Cucurbitacin B molekülünün doza ba lı olarak aktivitesinde bir azalma gözlenmekle birlikte, kontrolle kıyaslandı nda HeLa hücrelerine kar ı çok yüksek aktivite gösterdi i tespit edilmi tir.



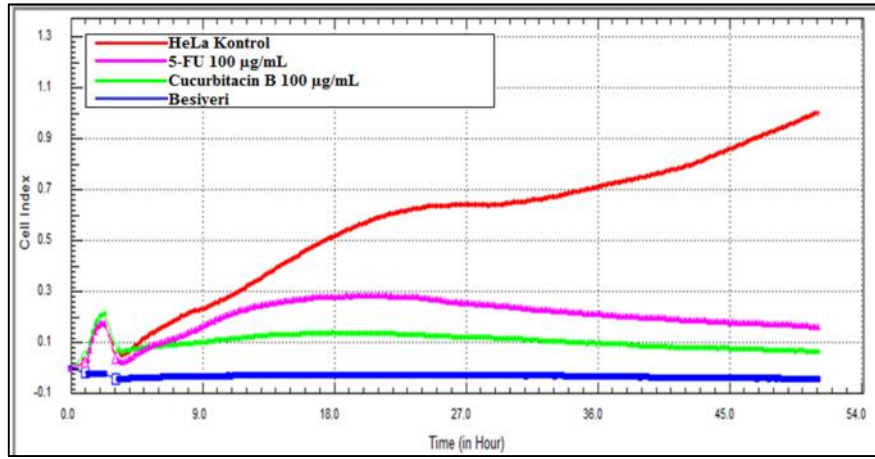
**ekil 4. 7.** Cucurbitacin B molekülünün anti-kanser aktivitesi

ekil 4. 8. incelendi inde, B1 fraksiyonundan elde edilen Cucurbitacin B molekülü ile standart olarak kullanılan 5-FU kıyaslandı nda HeLa hücrelerine kar ı çok daha dikkate de er aktivite gösterdi i tespit edilmi tir.



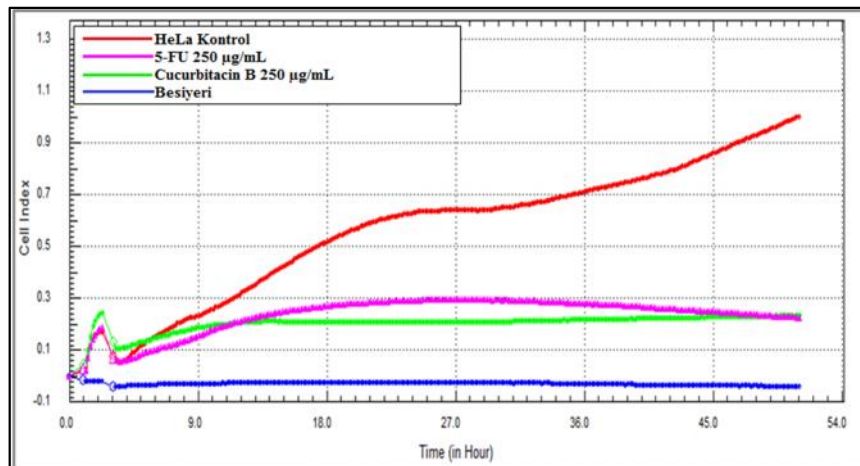
**ekil 4. 8.** Cucurbitacin B bile i nin 5-FU ile kar ıla tırılması 50 µg/ml

ekil 4.9'daki grafi e göre 5-FU ile Cucurbitacin B molekölü kar ıla tırıldı nda, Cucurbitacin B molekölünün aktivite bakımından daha iyi oldu u, fakat konsantrasyonun artmasıyla 5-FU'in aktivitesinin arttı ı, Cucurbitacin B molekölünün aktivitesinin ise dü tü ü gözlendi.



**ekil 4.9.** Cucurbitacin B bile i inin 5-FU ile kar ıla tırılması 100 µg/ml

ekil 4.10'deki 5-FU ile Cucurbitacin B molekölü kar ıla tırıldı nda, 5-FU'in aktivitesinin doz artı ma ba lı olarak arttı ı gözlenmektedir. Bununla birlikte, Cucurbitacin B molekölün de tam tersi bir etki gösterdi i tespit edilmi tir.



**ekil 4. 10.** Cucurbitacin B bile i inin 5-FU ile kar ıla tırılması 250 µg/ml



## 4.2. İzole Edilen Molekülün Yapı Tayini

### 4.2.1. Cucurbitacin B molekülünün yapı tayini

Beyaz renkli kristal olarak elde edilen cucurbitacin B bileşiği, TK'da 95:5 kloroform-metanol çözücü sisteminde yürütülüp, serik sülfat belirteci püskürtüldükten sonra kırmızı, ısıtıldıktan (100-120 °C) sonra maddeye ait lekelerde mor renk gözlenmesi yapının steroidal bir iskelete sahip olabileceği belirlendi. Elde edilen kristalden 22 mg alınarak CDCl<sub>3</sub> çözücüsünde çözüldü. 1D ve 2D NMR spektrumları kaydedildi. Erime noktası 192-195 °C olarak belirlendi. Kristal, 1D ve 2D (HETCOR, COSY ve HMBC) spektrumlarının yorumu ile yapının Cucurbitacin B olduğu belirlendi.

HETCOR spektrumunda hangi hidrojenlerin hangi karbona bağlı olduğu ekil 4.14. ve 4.16. da, HMBC spektrumu yardımıyla, proton-komulu karbon etkileşimi ile hangi karbonla komulu olduğu ekil 4.17'de, COSY spektrumu yardımıyla da proton-komulu proton etkileşimi ekil 4.18'de gösterildi. Bu spektrumlar yorumlanarak (Çizelge 4.1) yapı belirlendi.

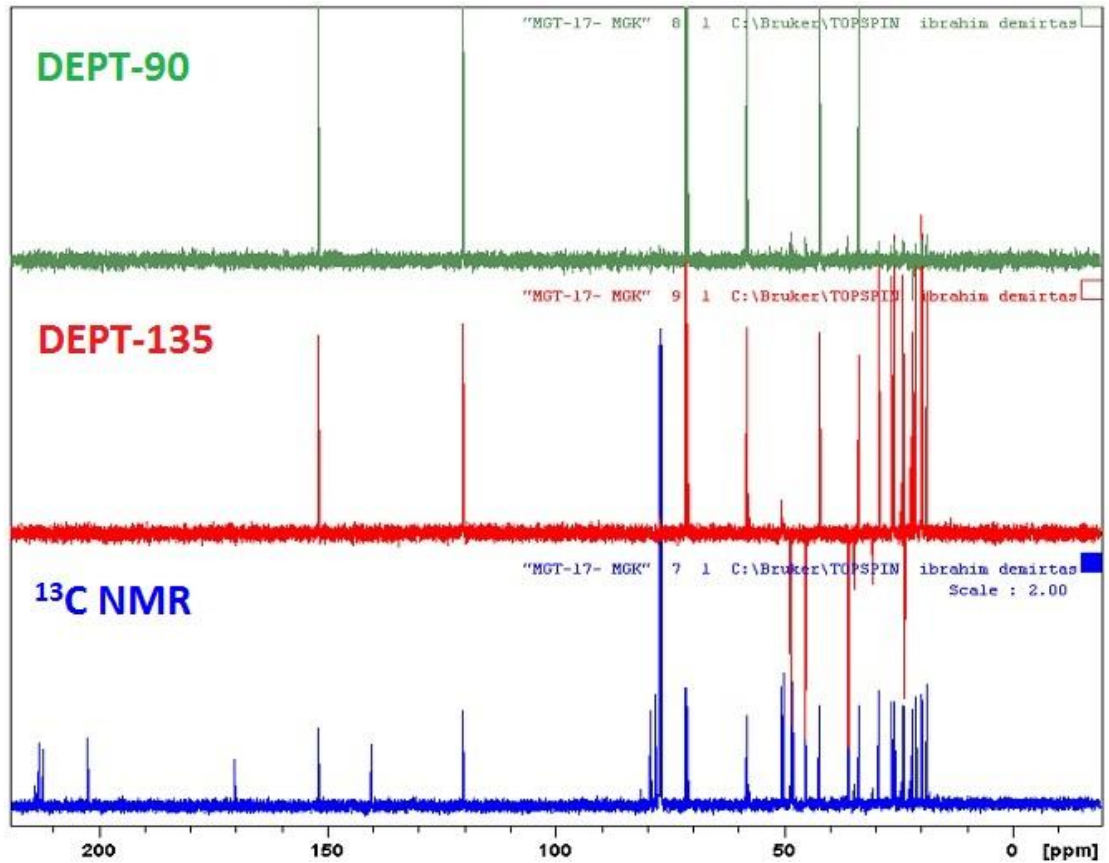
**Çizelge 4. 1.** Cucurbitacin B molekülünün NMR tablosu

C/H	$\delta_c$	DEPT	$\delta_H$	Cosy	HMBC (H C)
1	36.00	CH2	1.23/2.30		C-2,C-5,C-10
2	71.64	CH	4.42	2.30/1.230	C-1
3	213.07	C			
4	50.68	C			
5	140.38	C			
6	120.45	CH	5.80 d ( $J= 4.0$ Hz)	1.98	C-7,C-8,C-9,C-10,C-29
7	23.87	CH2	2.00/2.38		
8	42.39	CH	1.98	2.38/5.80	
9	50.25	C			
10	33.73	CH	2.74	1.23/2.30	C-1,C-4,C-5,C-11,C-19
11	212.21	C			
12	48.65	CH2	2.69/3.26		C-9,C-12,C-17,C-18,C-30
13	48.11	C			
14	48.45	C			
15	45.33	CH2	1.45/1.89 dd		
16	71.24	CH	4.35 ddd	1.890/2.49	C-13,C-14,C-15,C-20
17	58.20	CH	2.49	4.35	C-13,C-16,C-18,C-20,C-21,C-22
18	19.85	CH3	0.98 s		
19	20.04	CH3	1.08 s		
20	78.28	C			
21	29.37	CH3	1.29 s		
22	202.51	C			
23	120.31	CH	6.49 d ( $J= 15.6$ Hz)	7.06	C-22,C-24,C-25
24	151.94	CH	7.06 d ( $J= 15.6$ Hz)	6.49	C-22, C-23, -C25, -C26
25	79.34	C			
26	25.99	CH3	1.58 s		
27	26.42	CH3	1.55 s		C-24,C-25, C-26
28	21.26	CH3	1.35 s		
29	23.94	CH3	1.44 s		
30	18.89	CH3	1.36 s		
31	170.26	C			
32	21.94	CH3	2.02 s		

#### 4.2.2.NMR spektrumları

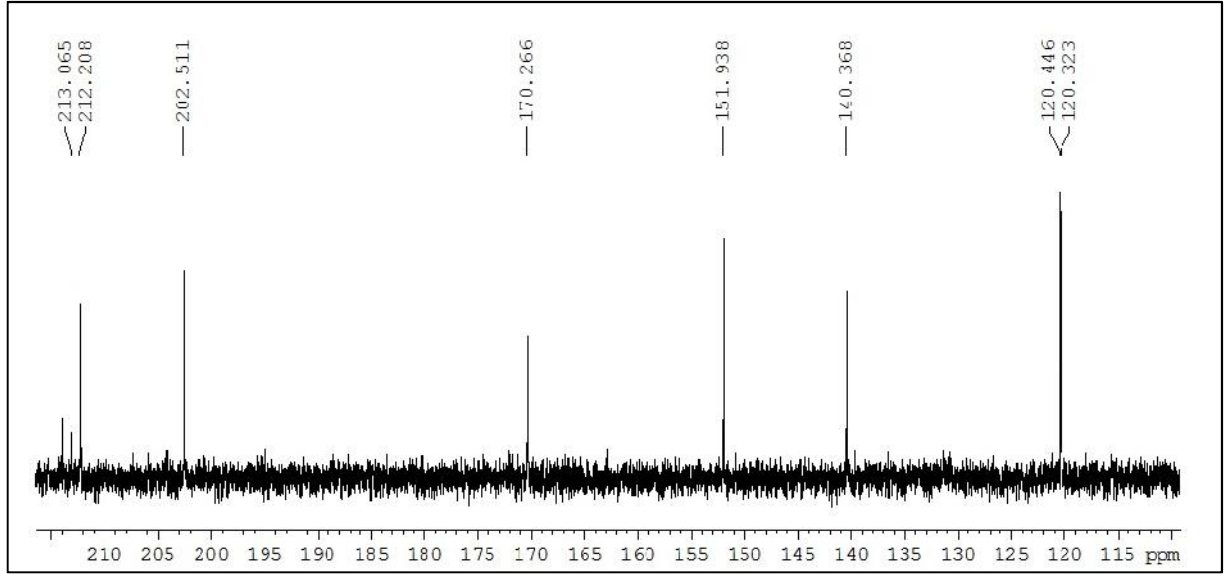
ekil 4.11.'de  $^{13}\text{C}$  ve dept 135 nmr yardımıyla  $\delta_c$  213.07 (C-3), 212.21 (C-11), 202.51 (C-22), 170.26 (C-31), 140.38 (C-5), 50.68 (C-4), 50.25 (C-9), 48.11 (C-13), 48.45 (C-14), 78.28 (C-20) ve 79.34 (C-25) 11 adet kuarterner karbonu, Dept-135 negatif  $\delta_c$  36.00 (C-1), 23.87 (C-7), 48.65 (C-12) ve 45.33 (C-15) 4 CH<sub>2</sub>, Dept-90 nmr'ıyla  $\delta_c$  151.94 (C-24), 120.45 (C-6), 120.31 (C-23), 71.67 (C-2), 71.24 (C-16), 58.20 (C-17), 42.39 (C-

8), ve 33.73 (C-10) 8 CH,  $^{13}\text{C}$ , Dept-90 ve Dept-135 yardımıyla  $^{13}\text{C}$  19.85 (C-18), 20.04 (C-19), 29.37 (C-21), 25.99 (C-26), 26.42 (C-27), 21.26 (C-28) 23.94 (C-29), 18.89 (C-30) ve 21.94 (C-32) 9CH<sub>3</sub> ve toplamda 32 adet karbon rezonans olup çizelge 4.1'de verildi.



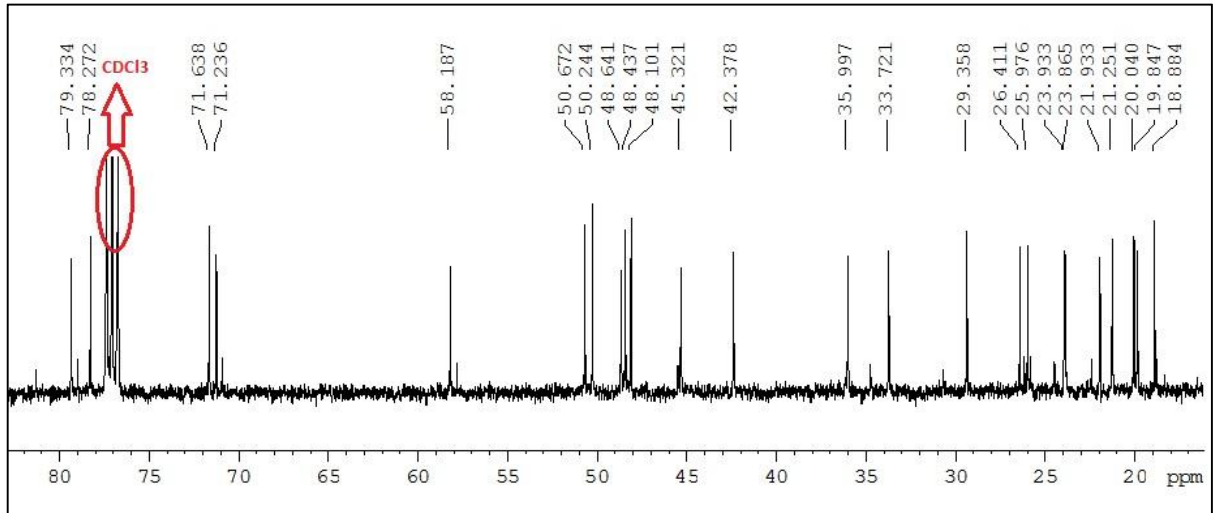
ekil 4. 11. DEPT ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumları

$^{13}\text{C}$  NMR spektrumunda ( ekil 4.12)  $^{13}\text{C}$  213.07 (C-3), 212.21 (C-11) ve 202.51 (C-22) rezonans olurken, ester grubuna ait karbonil 170.36 (C-31)'de rezonans oldu u görüldü. Ayrıca ester grubu FT-IR'da 1720  $\text{cm}^{-1}$ 'de ve 1251  $\text{cm}^{-1}$  pikin ( ekil 4.25) verilerinin literatürde kar ıla tırılması ile yapıda bir asetat oldu u ve bu asetat karbonilinin  $^{13}\text{C}$  170.36 (C-31) belirlendi.



ekil 4. 12. <sup>13</sup>C NMR spektrumu 214-110 ppm arası

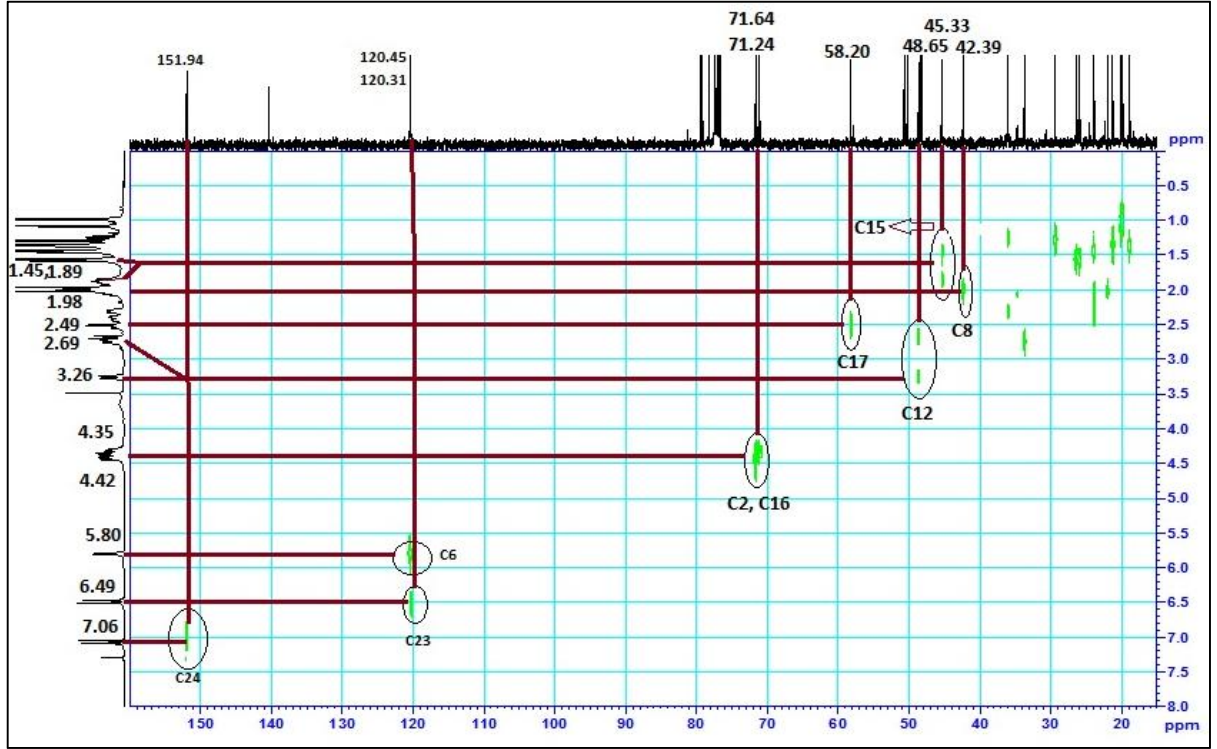
Bununla birlikte, hidroksil gruplarının ba lı oldu u karbonlardaki protonlar beklenildi i gibi di er alifatik protonlara göre daha a a ı alanda (4.42, 4.35) rezonans oldu u görüldü. Aynı ekilde karbon atomlarında, alifatik karbon atomlarına göre daha a a ı alanda geldi. (71.64 C-2, 71.24 C-16).



ekil 4. 13. <sup>13</sup>C NMR spektrumu 83-15 ppm arası

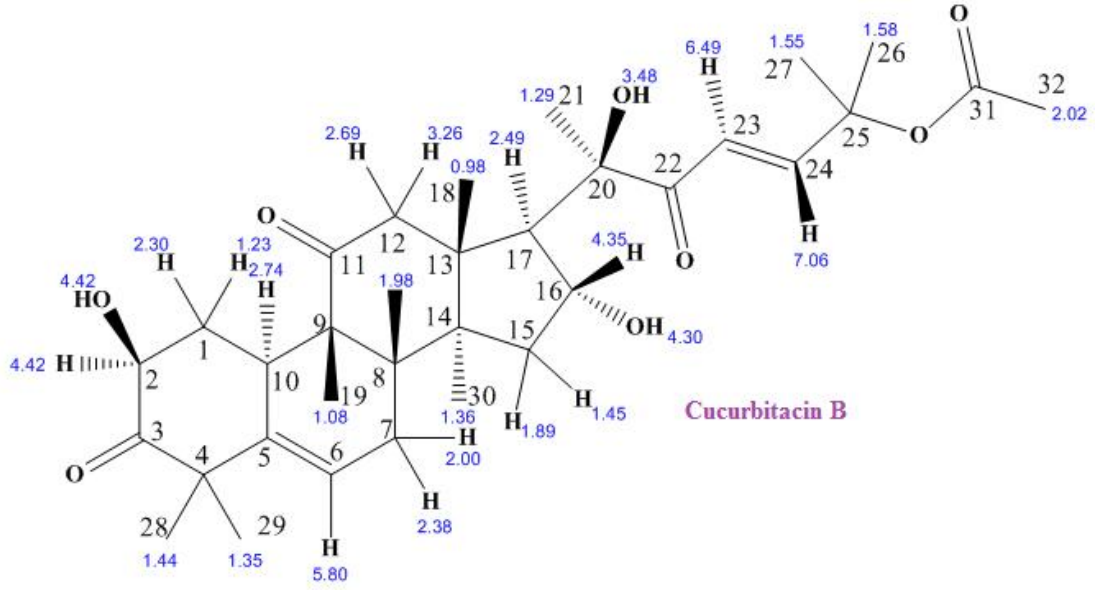
c 140.38 (C-5), 120.45 (C6), 120.31 (C-23) ve 151.94 (C-24)'de gözlenen karbon sinyalleri ve HETCOR spektrumunda c 120.45 (C6) protonunun H 5.80 (1 H, d, J= 4.0

Hz, H-6) ve  $^1\text{C}$  120.31 (C-23) ve 151.94 (C-24) protonlarının sırasıyla  $^1\text{H}$  7.06, 6.49 ( ekil 4.2.10) (1H, d,  $J=15.6$  Hz H-23, H-24)'de ortaya çıkmasıyla molekülde 2 çifte ba mın varlığına, 4 Hz'lik yarılmının gözlemlendi i çifte ba mın steroid iskeletinin içinde, 15.6 Hz lik yarılmının ise karbonile kom u alfa ve beta protonların trans konumda rezonans oldukları belirlendi.



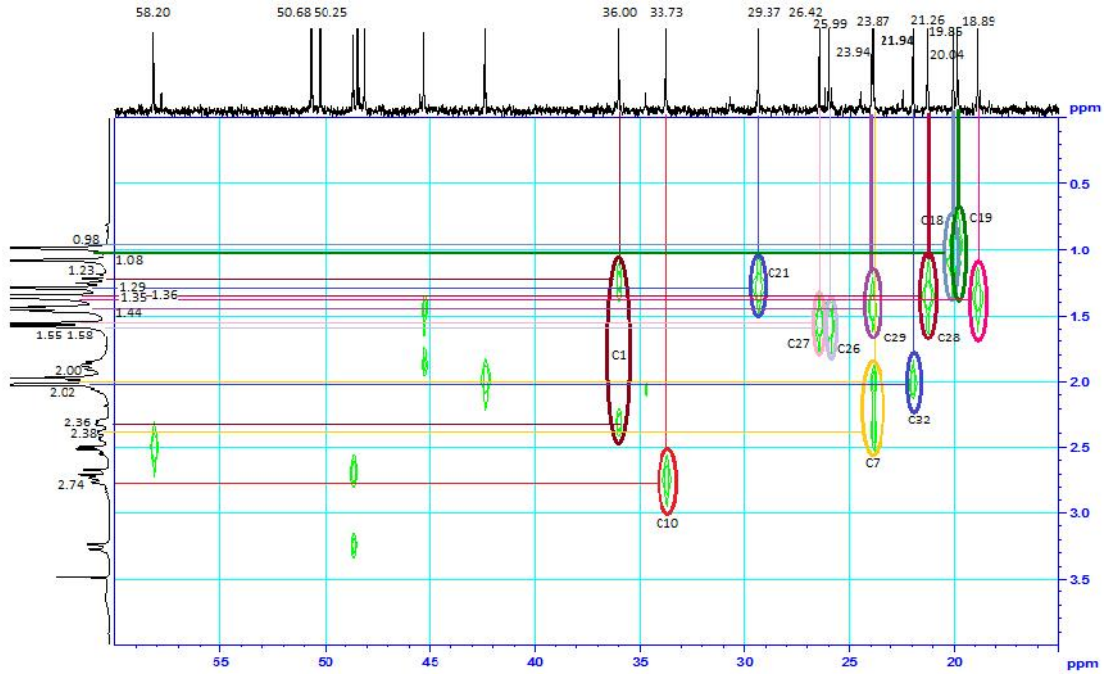
**ekil 4. 14.** Hetcor spektrumu-1

HETCOR spektrumunda, proton-karbon etkile imlerinin bir kısmı ekil 4.14'de gösterildi i gibi  $^1\text{H}$  7.06 (H-24) protonu  $^1\text{C}$  151.94 (C-24),  $^1\text{H}$  6.49 (H-23) protonları  $^1\text{C}$  120.31 (C-23),  $^1\text{H}$  5.80 (H-6) protonu  $^1\text{C}$  120.45 (C-6),  $^1\text{H}$  4.42 (H-2) protonu  $^1\text{C}$  71.64 (C-2) ve  $^1\text{H}$  4.35 (H-16) protonu  $^1\text{C}$  71.24 (C-16) ile etkile imleri gözlemlendi. Elde edilen veriler çizelge 4.1'dedir.



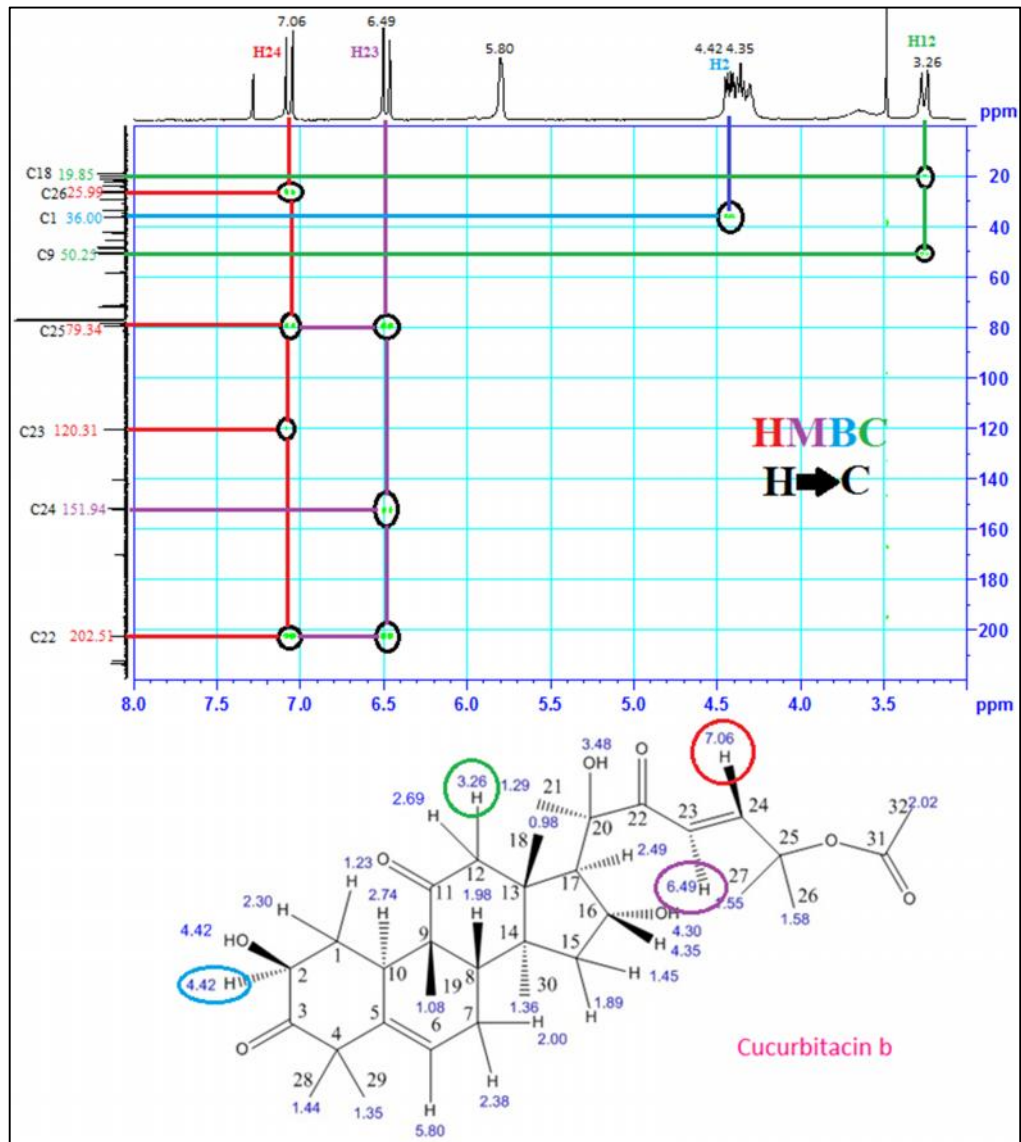
**ekil 4. 15.**Cucurbitacin B molekülü proton de erleri ile birlikte gösterilmesi

HETCOR yardımıyla  $^1\text{H}$  2.02 (3H, s, H-32),  $^1\text{H}$  1.58 (3H, s, H-26) 1.55 (3H, s, H-27) hidrojenleri elektronegatif bir gruba kom u olduklarını, bu ise karbonil karbonuna ve ester grubunu olu turan oksijenin etkisinden dolayı a a 1 alana kaydıklarını gözlemlendi.



**ekil 4. 16.** HETCOR spektrumu-2

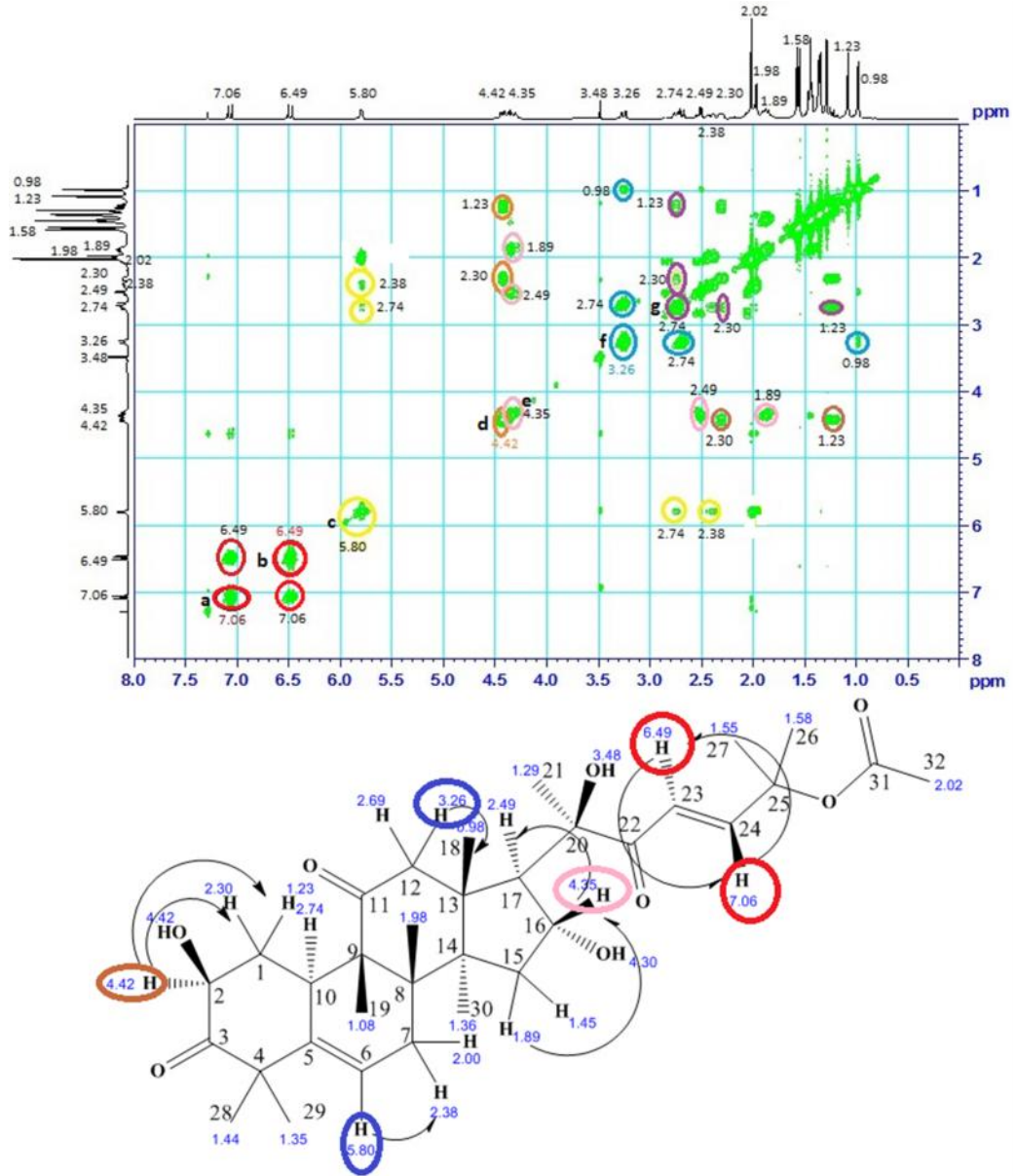
HETCOR spektrumunda, proton-karbon etkilemlerinin bir kısmı ekil 4.2.6'da gösterildi i gibi  $^1\text{H}$  1.23/2.36 (H-1) protonları  $^{13}\text{C}$  36.00 (C-1),  $^1\text{H}$  2.74 (H-10) protonları  $^{13}\text{C}$  33.73 (C-10),  $^1\text{H}$  1.29 (H-21) protonu  $^{13}\text{C}$  29.37 (C-21) ve  $^1\text{H}$  1.55 (H27) protonu  $^{13}\text{C}$  26.42 (C-27) ile etkilemleri gözlemlendi. Elde edilen de veriler çizelge 4.1'de görülmektedir.



ekil 4. 17. HMBC spektrumu

HMBC spektrumunda, proton-karbon etkilemlerinin bir kısmı ekil 4.17'de gösterildi i gibi  $^1\text{H}$  7.06 (H-24) protonu,  $^{13}\text{C}$  25.99 (C-26), 79.34 (C-25), 120.31 (23),

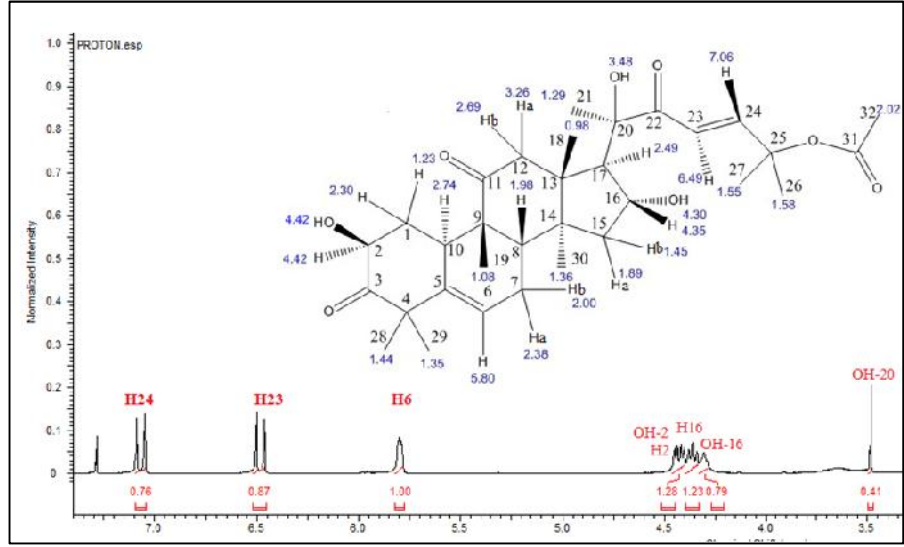
202.51 (C-22),  $^1\text{H}$  6.49 (H-23) protonu  $^{13}\text{C}$  79.34 (C-25), 151.94 (C-24), 202.51 (C-22),  $^1\text{H}$  4.42 (H-2) protonu  $^{13}\text{C}$  36.00 (C-1),  $^1\text{H}$  3.26 (H-12)  $^{13}\text{C}$  19.85 (C-18) ve 50.25 (C-9) ile etkileimleri gözlemlendi.



ekil 4. 18. COSY spektrumu ve molekül üzerinde protonların etkile imi

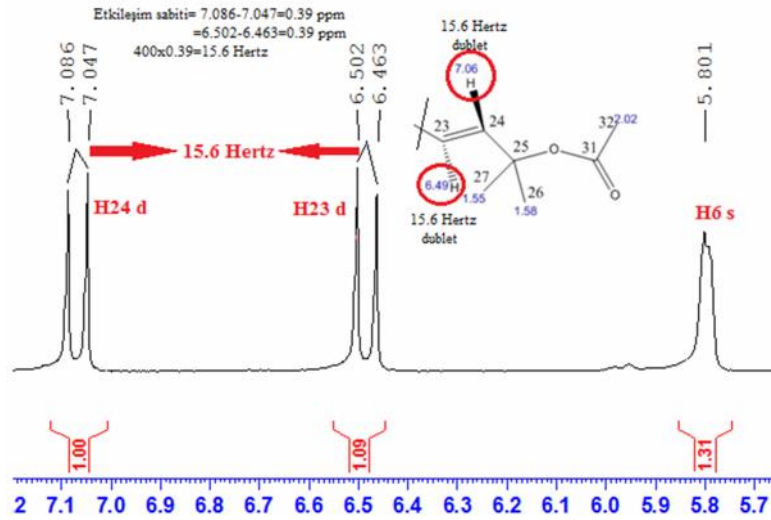
ekil 4.18'de HETCOR spektrumu ile belirlemi oldu umuz hidrojenlere kom u olan protonlar belirlendi, ekil üzerinde etkile imler gösterilerek veriler çizelge 4.1'e eklendi.





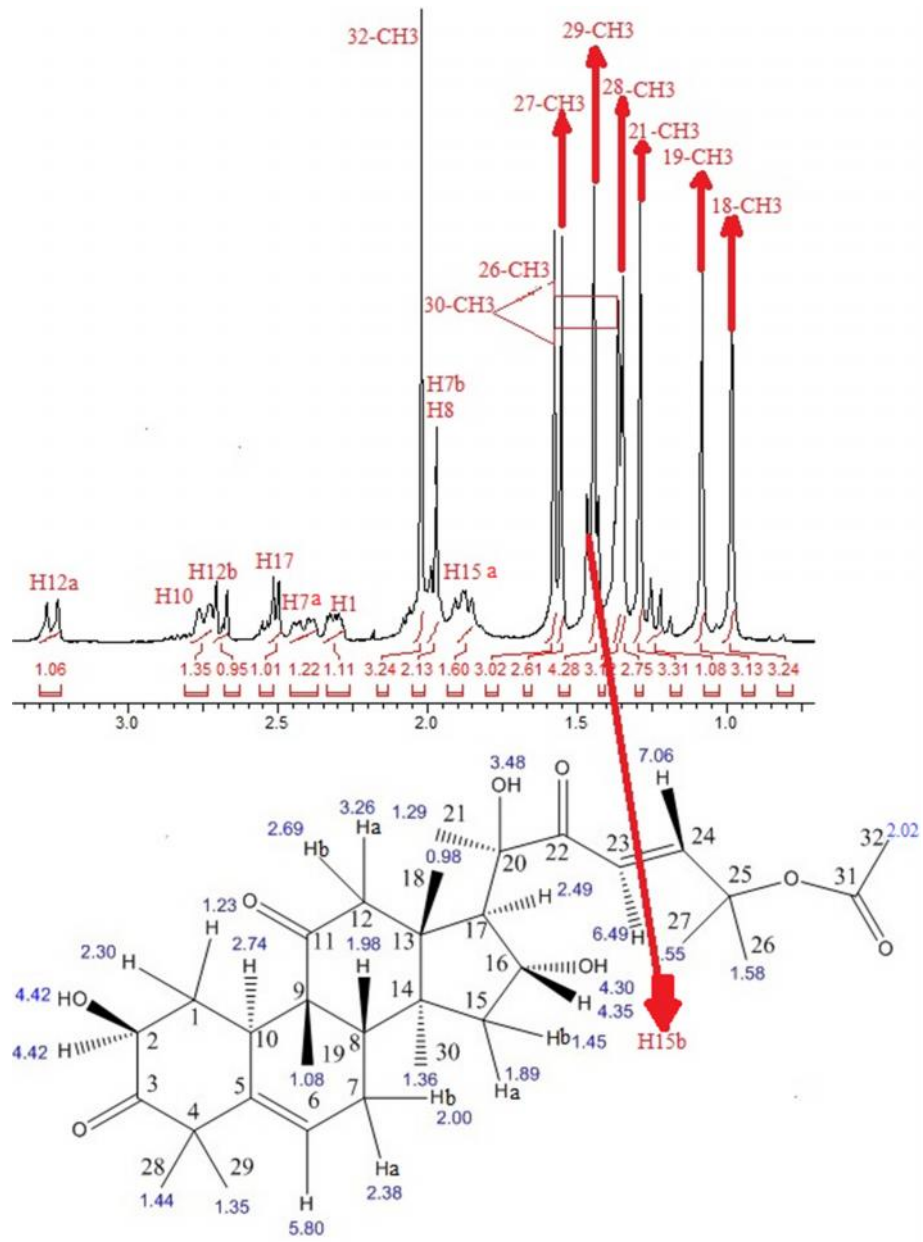
ekil 4.19. Aromatik bölge  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

ekil 4.19'da C6 üzerindeki hidrojen ve C-23 ve C-24 karbonları üzerindeki trans-hidrojenler, proton NMR'ında gösterildi.



ekil 4.20. Trans hidrojenlerin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

ekil 4.20 deki proton NMR'ında 7.06 ve 6.49 ppm'de dublet vermesi ile H-23 ve H-24 birbirine komu, çift bağ üzerindeki trans hidrojenler oldukları, eşit olarak 15.6 Hz. yarılmadan tespit edildi.

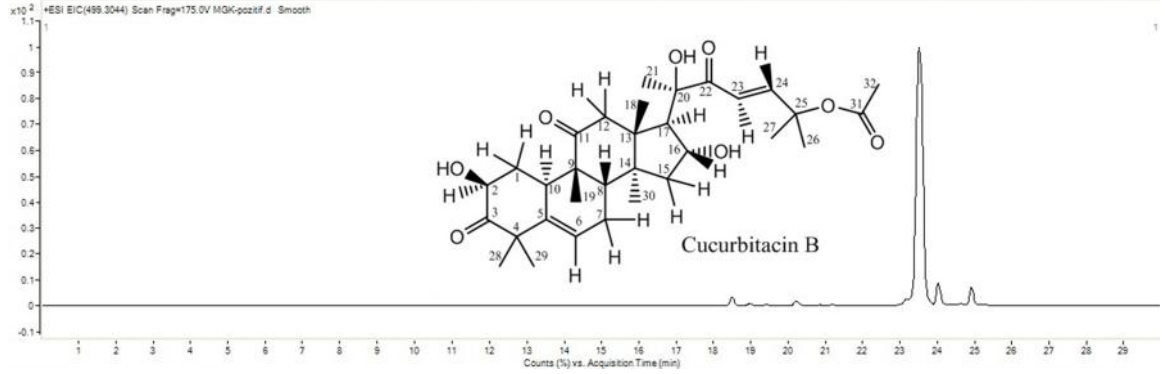


ekil 4. 21. Alifatik bölge <sup>1</sup>H NMR spektrumu

ekil 4.21.'de proton NMR'ında integrasyon de erleri ile birlikte özellikle metil grupları gösterildi. H15a ve H15b protonları, diastereotopik protonlar oldu u hetcor spektrumundan belirlendi ve enantiotopik proton H16 ile etkile erek dd ekinde gözlendi. H16 ise OH'dan dolayı 4.35 ppm'de ( ekil 4.21) gözlendi ve kom usundaki 3 protondan dolayı ddd olarak görüldü.

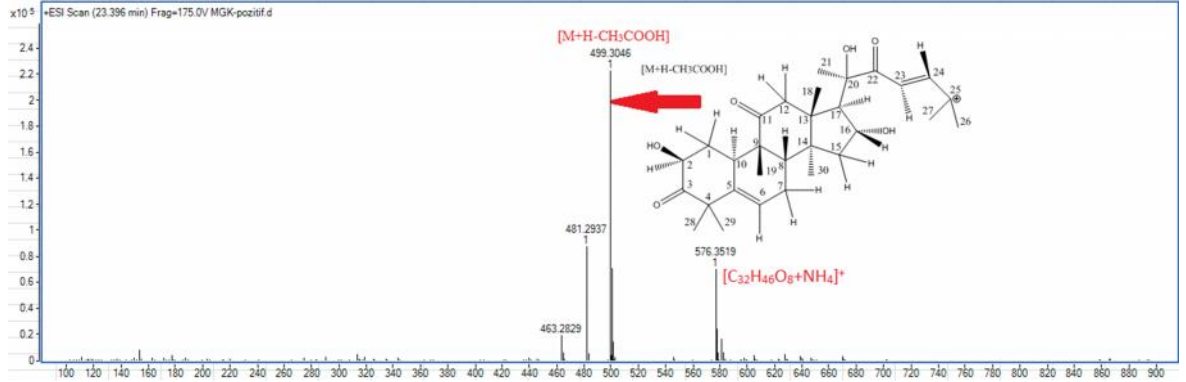
### 4.2.3. HPLC-TOF/MS analizi

HPLC-TOF/MS spektrumu ile NMR’da tahmin etti imiz molekülün kütlesi do rulandı.



ekil 4. 22.Cucurbitacin B HPLC kromotogramı

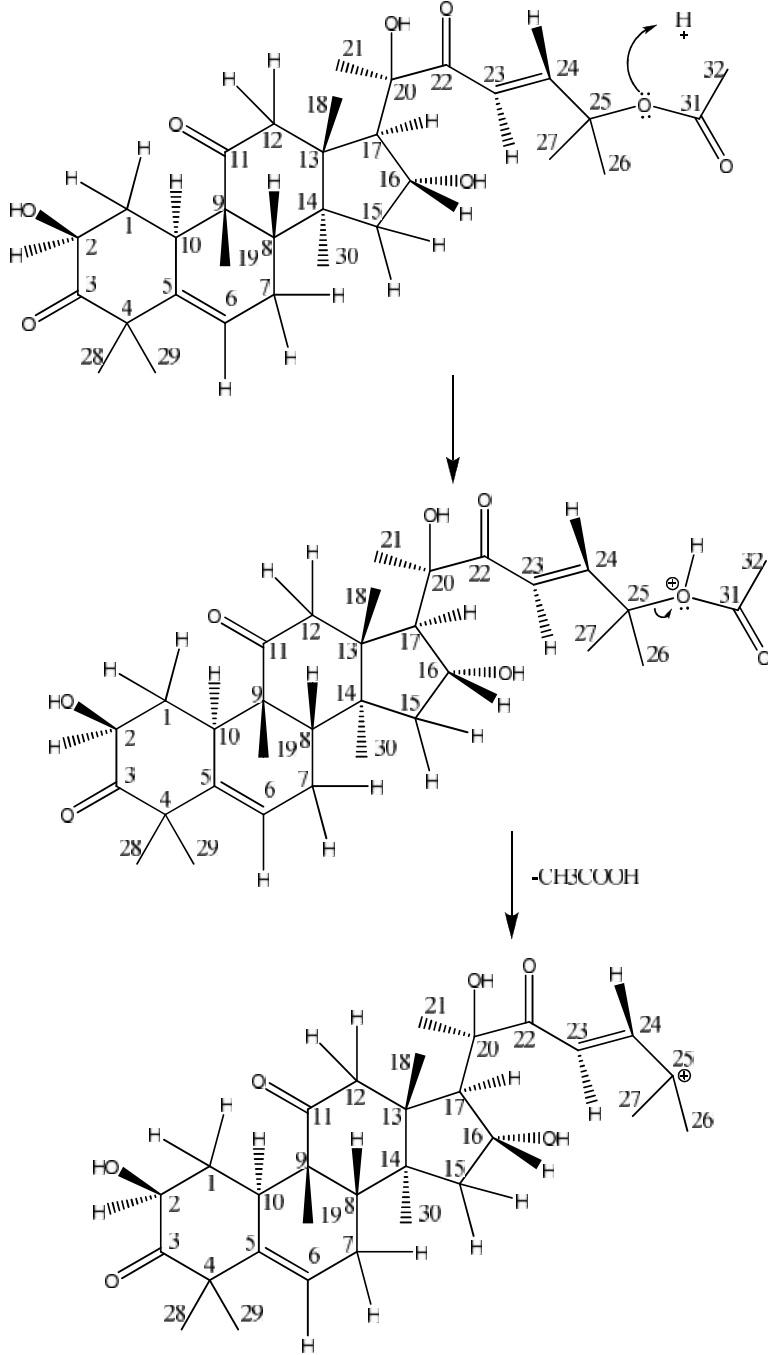
HPLC kromatogramında Cucurbitacin B maddesine ait olan kromotogram ekil 4.22’de gösterildi i üzere, maddemiz 23. dakikadan 25.30. dakikaya kadar geldi. Fakat hem saflık olarak hemde kromotogramın iyi olmasından ötürü 23.396 dakikada gelen kromotogramın kütle spektrumu alındı ve ekil 4.23’de gösterildi.



ekil 4. 23.Cucurbitacin B HPLC-TOF/MS spektrumu

Temel pik olan 499.3046 molekülü kütüphane’de var olan Cucurbitacin S molekülü ile aynı kütleyle sahip oldu undan kütüphane taramasında ana bile ik gözükmekte idi. Fakat NMR verileri bu molekülü do rulamıyordu. Dolayısıyla Cucurbitacin B molekülünün MS spektrumları ara tırıldı. ekil 4.24’te ki gibi Cucurbitacin B

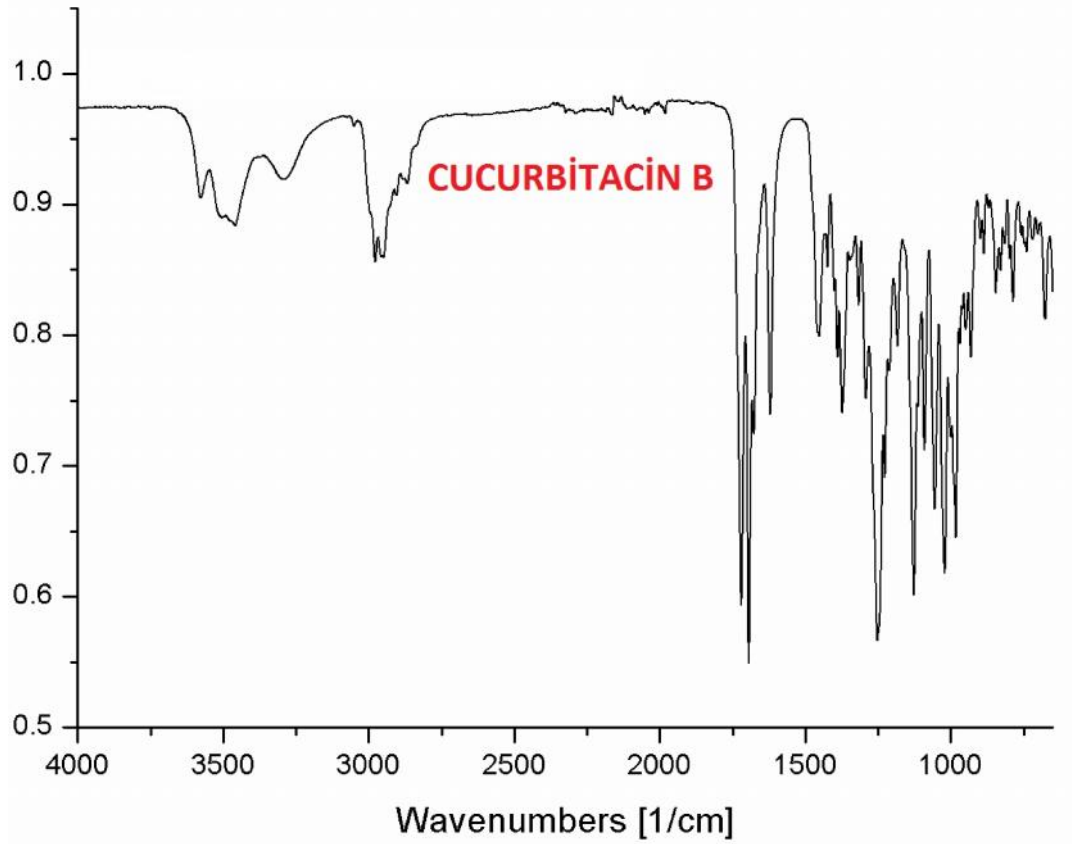
molekülünün iyonlaşmasından dolayı kütle temel iyon pikinin Cucurbitacin B molekülüne ait olduğunu belirledi.



ekil 4. 24. Cucurbitacin B molekülünün iyonlaşması

#### 4.2.4. infrared analizi

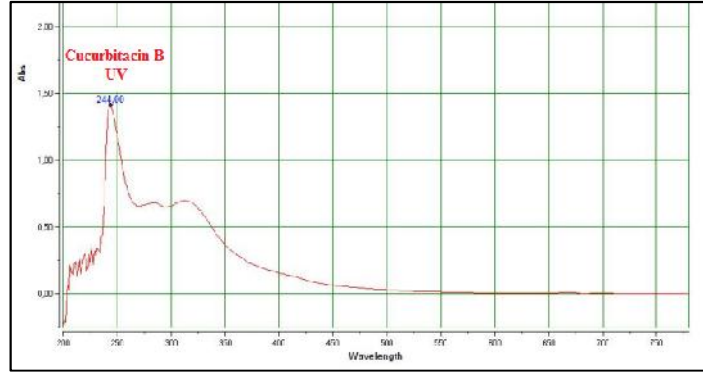
Cucurbitacin B molekülünün infrared analizi PerkinElmer spektrum-100 marka FTIR-ATR cihazında pelet olu turmadan do rudan katı halde analizi yapıldı. Spektrumdan  $3.458\text{ cm}^{-1}$  de O-H piki,  $3000\text{ cm}^{-1}$ 'in hemen altında alifatik grup,  $1720\text{ cm}^{-1}$ 'de ve  $1251\text{ cm}^{-1}$  pikin asetat karboniline,  $1700$  ve  $1677\text{ cm}^{-1}$ 'deki piklerde keton karbonilleri ve  $1620\text{ cm}^{-1}$ 'deki pik ise C=C çiftli ba fonksiyonel gruplara ait gerilimler oldu u belirlendi.



ekil 4. 2. infrared spektrumu

#### 4.2.5. UV analizi

Cucurbitacin B molekülüne ait UV spektrumu ekil 4.26 de gösterildi. UV analizi sonucunda 243-244 nm dalga boyunda Cucurbitacin B molekülüne ait spesifik dalga boyu ile uyumlu oldu u belirlendi.

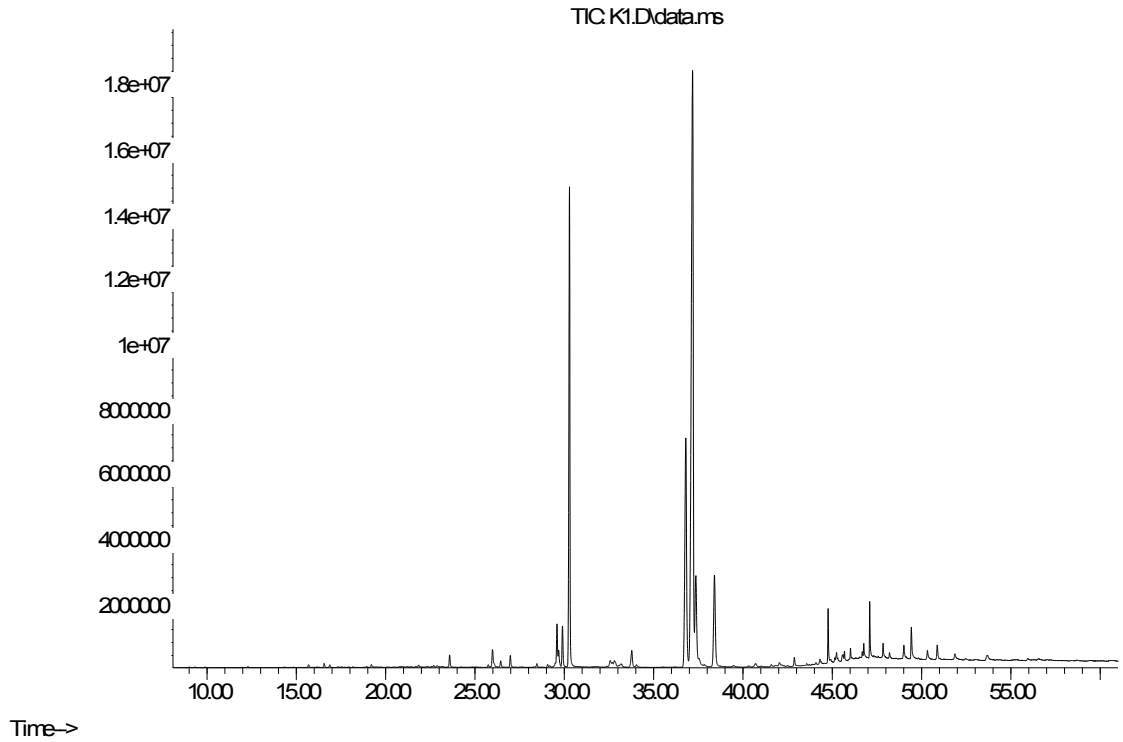


ekil 4. 3.Cucurbitacin B UV absorbansı

#### 4.3. *B. multiflora* bitkisinin GC-MS sonuçları ve istatistiksel de erlendirilmesi

*B. multiflora* bitkisinin hekzan ekstrelere ait GC-MS kromotogramı ekil 4.27’de ve istatistiksel analiz sonuçları çizelge 4.2’ de verildi.

Abundance



ekil 4. 4. BM-Hekzan kök ekstresi GC kromotogramı

*B. multiflora* bitkisinin kök, gövde, yaprak ve meyve olarak dört kısma ayrıldı. Her branş, hekzan çözücüsü ile muamele edildi. Elde edilen hekzan ekstraktları Agilent marka 5975 C, MSD-7890A model GC-MS cihazı ile üç tekerrürlü olarak analiz edildi. FID sonuçlarına göre, varyans analizi (ANOVA) ( $P < 0,05$ ) yapılarak ortalama ve standart hata değerleri hesaplandı. Sonuçlar tablo 4.2. de verildi. Bu veriler kök kısmının temel bileşeninin kütüphane sonuçlarına göre % 32,8 oranında, **omega-3** (9,12,15-octadecatrienoic acid, methyl ester) yağ asidinin olduğu, gövde ve yaprak kısmının temel bileşeninin % 29 ve % 14,4 oranında hegzadekanoyik asit metil ester olduğu, meyve kısmının temel bileşeni ise; %32 oranında, uzun zincirli bir bileşik olan “dotricontane” bileşiği olduğu belirlendi.

**Çizelge 4. 2. GC-MS FID analiz tablosu**

RT	RI	Ya asitleri	Kök	Gövde	Yaprak	Meyve
16.532	1312	12:0 lauric acid, methyl ester			0.127±0.110	0.053±0.053
23.576	1490	14:1 myristoleic acid, methyl ester	0.460±0.187	0.250±0.217	0.737±0.068	0.207±0.181
26.981	1486	15:1 pentadecanoic acid, methyl ester	0.343±0.101	0.853±0.051	0.237±0.205	0.080±0.080
29.580	1506	16:1 9-hexadecenoic acid, methyl ester	0.945±0.767			0.800±0.800
29.681	1507	16:1 7-hexadecenoic acid, methyl ester	0.277±0.479	0.787±0.059		
30.280	1582	16:0 hexadecanoic acid, methyl ester	9.930±1.077	26.943±1.384	14.097 0.772	6.107±0.825
32.548	1599	16:0 hexadecanoic acid, ethyl ester		0.703±0.040		0.153±0.153
33.773	1607	17:0 heptadecanoic acid, methyl ester	0.600±0.187	0.673±0.032	0.467±0.031	0.107±0.107
36.788	1627	18:2 linoleic acid, methyl ester	8.807±1.147	1.230±1.230	2.253±0.193	11.093±0.953
37.206	1705	18:3 -linoleic, methyl ester	30.913±3022	18.610±1.083	12.603±1.590	7.047±0.740
38.403	1637	18:0 stearic acid, methyl ester	3.210±0.308	5.050±0.251	3.230±0.095	1.863±0.306
42.877	1738	19:0 nonadecanoic acid, methyl ester	0.487±0.424		0.283±0.245	0.113±0.113
44.776	1726	20:0 arachidic acid, methyl ester	2.923±0.455	4.123±0.159	2.577±0.366	6.270±4.488
47.105	2002	22:0 behenic acid, methyl ester	1.353±1.353	4.497±0.708	3.373±0.061	5.523±3.011
48.209	2007	23:0 tricosanoic acid, methyl ester	7.333±6.373	5.443±1.240	4.977±0.441	5.250±0.617
49.434	1694	24:0 tetracosanoic acid, methyl ester	4.957±1.978	3.703±0.727	2.777±0.433	3.433±0.302
50.824	2019	25:0 pentacosanoic acid, methyl ester		0.377±0.377	0.583±0.340	0.577±0.517
52.472	1558	26:0 hexacosanoic acid, methyl ester	0.277±0.343	1.210±0.316	0.870±0.075	1.217±0.310
56.895	1648	28:0 octacosanoic acid, methyl ester		1.723±0.185	1.313±0.085	0.227±0.227
		<b>Alkanlar</b>				
19.193	1441	C16 hexadecane		0.443±0.006		
26.100	1478	C18 octadecane		0.703±0.110		
44.313	1746	C23 tricosane			0.777±0.012	
45.680	1993	C24 tetracosane		0.897±1.553	2.713±2.713	
46.662	1681	C25 pentacosane	1.243±1.158		3.877±0.107	1.093±1.093
49.016	2008	C27 heptacosane	4.353±2.236	2.297±0.382	5.990±0.738	5.957±2.127
50.332	2019	C28 octacosane	0.577±0.577	0.557±0.482	0.510±0.510	0.227±0.227
51.894	1489	C29 nonacosane	0.870±0.870	6.4171.013	12.803±0.424	5.253±0.859
55.980	1644	C32 dotriacontane		3.097±0.522	9.677±0.494	30.733±3.795
		<b>Di er Bile ikler</b>				
27.639	1491	hexahydrofarnesyl acetone		0.357±0.021	0.377±0.012	
30.957	1587	Isophytol			0.423±0.035	
37.658	1707	phytol		1.683±0.179	5.587±0.338	
45.245	1830	9,12,15-Octadecatrien-1-ol	1.367±0.735		0.243±0.243	1.603±1.603
45.629	1912	stigmasterol	4.433±1.802			0.980±0.980
45.686	1993	Desmosterol			2.713±2.713	
45.999	1994	Ethyl iso-allocholate			0.267±0.267	
		<b>TOPLAM</b>	<b>94.204</b>	<b>93.193</b>	<b>97.998</b>	<b>96.549</b>



## 5. TARTI MA VE SONUÇ

### 5.1. zole Edilen Cucurbitacin B Molekülünün Sonucu

Yapılan bu çalı mada; *Bryonia multiflora* Bois. & Heldr. (Cucurbitacea) bitkisinden bir steroid türü olan Cucurbitacin b molekülü izole edilmi olup, yapısı 1D-2D NMR, HPLC-TOF/MS, TLC ve ATR-FTIR ile aydınlatıldı.

Bu molekül, 50, 100 ve 250 µg/mL konsantrasyonlarda Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Cihazı (RTCA) yöntemi ile HeLa kanser hücresine verilmi olup 50 µg/mL'lik konsantrasyonda yüksek aktivite, daha sonra 100 ve 250 µg/mL'lik konsantrasyona do ru dü tü ü gözlemlendi. Günümüzde kullanılan bir tür kanser ilacı olan 5-FU ile Cucurbitacin B molekülü kar ıla tırıldı nda, 5-FU'in aktivitesinin doz artı na ba lı olarak arttı ı gözlemlendi. Bununla birlikte, Cucurbitacin B molekülün de tam tersi bir etki gösterdi i tespit edildi.

### 5.2. GC-MS Sonuçlarının De erlendirilmesi

*B. multiflora* bitkisinin kök, gövde, yaprak ve meyvelerinden elde edilen heksan ekstralarının yüzde oranları çizelge 5.1.'de verildi.

**Çizelge 5. 1.** *B. multiflora* heksan ekstralarının temel bile iklerinin yüzde oranı.

	Kök % miktar	Gövde % miktar	Yaprak % miktar	Meyve % miktar
1. Anabile ik	18:3 -linoleic, methyl ester <b>%32.8</b>	16:0 hexadecanoic acid, methyl ester <b>%29</b>	16:0 hexadecanoic acid, methyl ester <b>%14.4</b>	C32 Dotriacontane <b>%32</b>
2. Anabile ik	16:0 hexadecanoic acid, methyl ester <b>%10.54</b>	18:3 -linoleic, methyl ester <b>%20</b>	C29 Nonacosane <b>%13.6</b>	18:2 linoleic acid, methyl ester <b>%11.50</b>
3. Anabile ik	18:2 linoleic acid, methyl ester <b>%9.35</b>	C29 Nonacosane <b>%20</b>	18:3 -linoleic, methyl ester <b>%12.86</b>	18:3 -linoleic, methyl ester <b>%7.3</b>

## KAYNAKLAR:

- Baykut, M., Biran, M. ve Okçuo lu, N. 1979. Some investigations in the properties of ecballium elaterium and its constituents. *Chimica Acta Turcia*, 85, 57-85.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. and Gontier, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 839-851.(5), 161.
- Dey, A. and De, J. N. 2012. Ethnobotanical survey of Purulia district, West Bengal, India for medicinal plants used against gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 143(1), 68-80.
- Ebru Urcana, U. H., Marianthi, S., Reinhard, H. and Harry Scherthanc, F. X. R. 2010. Real-time xcelligence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. *Dental Meterials*, 7(2 6), 51–58. doi: 10.1016/j.dental.2009.08.007
- Faydao lu, S. 2011. Geçmisten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. *Kastamonu Üni., Orman Fakültesi Dergisi*, 2011, 11 (1): 52 - 67, 11, 52-67.
- Gonzales, B. R. and Panizo, F.M. 1966. Composition of ecballium elaterium I. introduction. *An. Real. Soc. Espan, Fis., Quim, Ser, B.*, 553-62(62), 4-5.
- Gonzales, B. R. and Panizo, F.M. 1968. Composition of ecballium elaterium II. separation of free cucurbitacins. *An. Real Soc. 63*, 895(Espan, Fis., Quim, Ser, B.), 9-10.
- González-Tejero, M. R., Casares-Porcel, M., Sánchez-Rojas, C. P., Ramiro-Gutiérrez, J. M., Molero-Mesa, J. and Pieroni, A., ElJohrig, S. 2008. Medicinal plants in the Mediterranean area: synthesis of the results of the project Rubia. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(2), 341-357.
- González, J. A., García-Barriuso, M. and Amich, F. 2010. Ethnobotanical study of medicinal plants traditionally used in the Arribes del Duero, western Spain. *Journal of Ethnopharmacology*, 131(2), 343-355.
- Jeremy M Berg, J. L. T. and Lubert S. 2002. *Biochemistry*. Newyork: W.H. Freeman.
- King, M. W. 2013. Web sitesi.<http://themedicalbiochemistrypage.org/steroid-hormones.php> Eri im Tarihi: 10.02.2013
- Konopa, J., Jereczek Morawska E., Matuszkiewicz A. and Nazarewicz T. 1966. Antitumor substances from Bryonia alba L. *Arzneimittelforschung*, 335, PubMed - indexed for MEDLINE, 13-13.
- Konopa, J., Matuszkiewicz A., Hrabowska M. and Onoszka K. 1974. Cucurbitacins, cytotoxic and antitumor substances from Bryonia alba L. Part II: Biological studies. *Arzneimittelforschung*, 1741-3, PubMed - indexed for MEDLINE.
- Konopa, J., Zieli ski, J. and Matuszkiewicz A. 1974. Cucurbitacins, cytotoxic and antitumor substances from Bryonia alba L. I: isolation and identification. *Arzneimittelforschung*, 1554-7, PubMed - indexed for MEDLINE, 10.
- Madhusudana Rao, M.1974. The constituents of Ecballium elaterium L. Part XXIII. Cucurbitacins and hexanorcucurbitacins. *Perkin Trans*, 2795J. *Chem. Soc.*, 2552-2556. doi: 10.1039/P19740002552
- Martins, D., Barros, L., Carvalho, A. M. and Ferreira, I. C. F. R. 2011. Nutritional and in vitro antioxidant properties of edible wild greens in Iberian Peninsula traditional diet. *Food Chemistry*, 125(2), 488-494.

- Rafael, M., Barros, L., Carvalho, A. M. and Ferreira, I. C. F. R. 2011. Topical anti-inflammatory plant species: Bioactivity of *Bryonia dioica*, *Tamus communis* and *Lonicera periclymenum* fruits. *Industrial Crops and Products*, 34(3), 1447-1454.
- Ramachandra Rao, R.S. and Ravishankar, G. A. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20(2), 101–153.
- Sabandar, C. W., Ahmat, N., Jaafar, F. M. and Sahidin, I. 2013. Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): A review. *Phytochemistry*, 85(0), 7-29.
- Saeidnia, S. and Abdollahi, M. 2013. Toxicological and pharmacological concerns on oxidative stress and related diseases. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 273(3), 442-455.
- Sarı en, Ö. ve Çalı kan, D. 2005. Fitotherapy: Herbal Medicine, Attention of in primary health care. *Sted*, 14(8),182-187.
- Sökmen, A. ve Gürel, E. 2001. Sekonder metabolit üretimi. *Bitki Biyoteknolojisi*. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya.
- Verpoorte, R., Van Der Heijden, R., Ten Hoopen, H. J. G. and Memelink J. 1999. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the Production of Fine *Biotechnology Letters*, 21(6), 467-479.
- Wang, H., Zhao, W., Choomuenwai, V., Andrews, K. T., Quinn, R. J. and Feng, Y. 2013. Chemical investigation of an antimalarial chinese medicinal herb *Picrorhiza scrophulariiflora*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(21), 5915-5918.
- Yang, G., Nowsheen, S., Aziz, K. and Georgakilas, A. G. 2013. Toxicity and adverse effects of tamoxifen and other anti-estrogen drugs. *Pharmacology & Therapeutics*, 139(3), 392-404.
- Yang, Y., Zhang, Z., Li, S., Ye, X., Li, X. and He, K. 2014. Synergy effects of herb extracts: Pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. *Fitoterapia*, 92(0), 133-147.

## ÖZGEÇM

Adı Soyadı : Mesut GÖK  
Do um Yeri : Gercü  
Do um Tarihi : 15.09.1984  
Medeni Hali : Evli  
Yabancı Dili : İngilizce  
Adres : Bey Mah. 16037. Sok. No:5 Kat:3 P.K. 01030  
Seyhan/ADANA TÜRK YE  
Tel: : 0544-363-63-58  
E-posta : [mesutgok84@gmail.com](mailto:mesutgok84@gmail.com)

Lise : SEYHAN ADASOKA İL SES

Lisans : Gaziosmanpa a Üniversitesi Fen-Edebiyat Kimya Bölümü 2010

Yüksek Lisans :

Çalı tı ı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Yayımları (SCI ve di er)

1- Kolda S., Tüfekçi A. R., Gül F., Gök M., Demirta ., 2011. *Origanum Vulgare* ssp. viride Bitkisinin Farklı Çözücü Ekstraktlarının Antioksidan Aktivitelerinin ncelenmesi, 25. Ulusal Kimya Kongresi, Erzurum

2- Gök M., Tüfekçi A.R., Gül F., Demirta , 2012. *Bryonia multiflora* bitkisinden elde edilen sabit yağların ve hidrokarbonların GC-MS ile analizi ve antioksidant aktivitelerinin incelenmesi, Kromatografi 2012 kongresi, Tokat