

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Tanacetum kotschy (Boiss.) BİTKİSİ ÜZERİNDE
FİTOKİMYASAL ARAŞTIRMALAR ve BİYOAKTİVİTE
ÇALIŞMALARI

Biyolog Tuğçe ÖZTEKİN

**F.B.E. Biyoloji Anabilim Dalında
Hazırlanan**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nezhun GÖREN (Y.T.Ü.)

İSTANBUL, 2010

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	iv
KISALTMA LİSTESİ.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	ix
RESİM LİSTESİ.....	x
ÖNSÖZ.....	xi
ÖZET.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1 Compositae (Asteraceae) Familyası.....	7
2.1.1 Türkiye’ de Yetişen <i>Tanacetum</i> L. Türlerinin Botanik Özellikleri.....	9
2.1.1.1 Türkiye Türlerinin Tayin Anahtarı.....	10
2.1.1.2 <i>Tanacetum</i> L. Türlerinin Biyolojik Etkileri ve Halk Arasında Kullanımı.....	11
2.1.2 <i>Tanacetum kotschyi</i> Bitkisinin Genel Özellikleri.....	14
2.1.3 Türün Türkiye’ de ki Yayılışı.....	16
2.1.4 Botanik Özellikleri.....	17
3. FLAVONOİDLER.....	18
3.1 Flavonoidlerin Yapı Tayini.....	24
3.2 Flavonoidlerin Doğadaki Önemi.....	26
4. TERPENLER.....	29
4.1 Terpenlerin Sınıflandırılması.....	30
4.2 Seskiterpenler.....	33
4.3 Terpenlerin Doğadaki Önemi.....	36
5. STEROİDLER.....	38
6. DENEYSEL BÖLÜM.....	40

6.1	Materyal.....	40
6.2	İzolasyon Yöntemleri.....	40
6.2.1	Ekstraksiyon.....	40
6.2.2	Kromatografik Yöntemler.....	40
6.2.2.1	Kolon Kromatografisi.....	41
6.2.2.2	İnce Tabaka Kromatografisi (İTK/ TLC).....	45
6.2.2.3	Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi.....	45
6.2.2.4	Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HPTLC).....	46
6.2.2.5	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	46
6.2.2.6	Orta Basıncılı Sıvı Kromatografisi (MPLC).....	47
6.3	Spektroskopik Yöntemler.....	47
6.3.1	Ultraviyole Spektroskopisi (UV/VIS).....	47
6.3.2	Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (NMR).....	47
6.3.3	Infra-Red Spektroskopisi (IR).....	48
7.	BULGULAR.....	49
7.1	A Bileşiği (achillin).....	51
7.2	B Bileşiği (salvigenin).....	72
7.3	C Bileşiği (6,7,3',4'-tetrametoksi luteolin).....	79
7.4	D Bileşiği (7-hidroksi 6-metoksi kumarin).....	88
7.5	E Bileşiği (β -sitosterol).....	91
8.	ANTİOKSİDAN AKTİVİTE ÇALIŞMASI.....	94
9.	ANTİMİKROBİYAL ARAŞTIRMALAR.....	98
10.	SONUÇ VE TARTIŞMA.....	100
	KAYNAKLAR.....	103
	ÖZGEÇMİŞ.....	111

SİMGE LİSTESİ

μl	Mikrolitre
cm^{-1}	Frekans
g	Gram
J	Etkileşim sabiti
lt	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
nm	Nanometre
$^{\circ}\text{C}$	Derece
ppm	Milyonda bir parçacık

KISALTMA LİSTESİ

(O ₂) [·]	Süperoksit radikali
(OH) [·]	Hidroksil radikali
¹³ C NMR	Carbon Nuclear Magnetic Resonance
¹ H NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance
ADC2	Automatic Developing Chamber
AlCl ₃	Alüminyum klorür
APT	Attached Proton Test
Asetil CoA	Asetil koenzim A
ATR	Attenuated Total Reflectance
BHA	Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş hidroksitoluen
CC	Column Chromatography
CDCl ₃	Dötöro kloroform
Ce(SO ₄) ₂ ·4H ₂ O	Seryum sülfat
CHCl ₃	Kloroform
COSY	Correlation Spectroscopy
D ₂ O	Döteryum oksit
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DPPH	(1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)
EA	Etil asetat
FDA	Food and Drug Administration
G. Anadolu	Güney Anadolu
GD. Anadolu	Güney Doğu Anadolu
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
H ₂ SO ₄	Sülfirik asit
H ₃ BO ₃	Borik asit
HCl	Hidroklorik asit
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography

IPP	İzopentenil pirofosfat
IR	Infra Red Spectroscopy
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
K. Irak	Kuzey Irak
KB. İran	Kuzey Batı İran
KD. Anadolu	Kuzey Doğu Anadolu
LDL	Low Density Lipoprotein
MeOH	Metanol
MeOH-d ₄	Dötrö Metanol
MHA	Mueller Hinton Agar
MHB	Mueller Hinton Broth
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MPLC	Medium Pressure Liquid Chromatography
MRSA	Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
NaOAc	Sodyum asetat
NaOMe	Sodyum metoksit
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PG	Propil gallat
RS virüs	Respiratory syncytial virus
T.	<i>Tanacetum</i>
TBHQ	Terbütilhidrokinon
TLC	Thin Layer Chromatography
UV	Ultra-Violet
UV/VIS	Ultraviolet Visible Spectroscopy
WHO	World Health Organization

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1	Sekonder metabolitlerin oluşumu.....5
Şekil 2.1	<i>T. kotschy</i> bitkisinin Türkiye’ de ki dağılımı.....16
Şekil 3.1	2-fenilbenzopiran.....18
Şekil 3.2	Farklı iskelet yapısına sahip flavonoidler.....21
Şekil 3.3	Flavonoidlerin biyosentez yolu.....23
Şekil 4.1	İzopren (2-metil-1,3-butadien) molekülü.....29
Şekil 4.2	Myrcene molekülünün oluşumu.....30
Şekil 4.1.1	Terpenoid çeşitlerinin biyosentez yolu.....32
Şekil 4.2.1	Bazı seskiterpen bileşikleri.....33
Şekil 4.2.2	En çok görülen seskiterpen iskelet yapıları.....34
Şekil 4.2.3	En çok görülen seskiterpen lakton iskelet yapıları.....35
Şekil 5.1	Çiklopentanoperhidrofenantren.....38
Şekil 5.2	Bazı steroid yapıları.....39
Şekil 6.1	İzole edilen bileşiklerin elde edilmiş basamakları.....44
Şekil 7.1.1	A bileşiğinin IR spektrumu.....54
Şekil 7.1.2	A bileşiğinin ¹ H NMR (400 MHz, MeOH-d ₄) spektrumu.....55
Şekil 7.1.3	A bileşiğinin COSY (400 MHz, CDCl ₃) spektrumu.....56
Şekil 7.1.6	A bileşiğinin APT (400 MHz, CDCl ₃) spektrumu.....59
Şekil 7.1.7	A bileşiğinin ¹³ C NMR (400 MHz, CDCl ₃) spektrumu.....60
Şekil 7.1.8	A bileşiğinin HMBC (400 MHz, CDCl ₃) spektrumu.....61
Şekil 7.1.15	A bileşiğinin HMQC (400 MHz, CDCl ₃) spektrumu.....68
Şekil 7.2.1	B bileşiğinin UV spektrumları.....75
Şekil 7.2.2	B bileşiğinin ¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) spektrumu.....78
Şekil 7.3.1	C bileşiğinin UV spektrumları.....82
Şekil 7.3.2	C bileşiğinin ¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃ +D ₂ O) spektrumu.....85
Şekil 7.4.1	D bileşiğinin ¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) spektrumu.....90

Şekil 7.5.1	E bileşığının ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spektrumu.....	93
Şekil 8.1	<i>T. kotschy</i> bitkisinin gövde MeOH ve gövde EA ekstralarının DPPH radikali üzerinde ki süpürücü etkileri.....	96
Şekil 8.2	<i>T. kotschy</i> bitkisinin gövde EA ekstresinden izole edilen flavonoidlerin DPPH radikali üzerindeki süpürücü etkileri.....	97

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3.1	Bazı flavonoid grupları ve kaynakları.....	20
Çizelge 4.1.1	Terpenlerin sınıflandırılması.....	31
Çizelge 7.1	İzole edilen bileşiklerin genel özellikleri.....	49
Çizelge 7.1.1	A bileşiğinin ¹ H NMR (400 MHz, MeOH-d ₄) COSY, ¹³ C NMR, HMBC ve HMQC sonuçları.....	52
Çizelge 7.2.1	B bileşiğinin ¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) sonuçları ve UV kayma değerleri.....	73
Çizelge 7.3.1	C bileşiğinin ¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃ +D ₂ O) sonuçları ve UV kayma değerleri.....	80
Çizelge 7.4.1	D bileşiğinin ¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) sonuçları.....	88
Çizelge 7.5.1	E bileşiğinin ¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) sonuçları.....	91
Çizelge 8.1	<i>T. kotschy</i> bitkisinin gövde MeOH ve gövde EA ekstralarının DPPH radikali üzerindeki süpürücü etkileri ve standart sapma değerleri (% DPPH süpürücü etki ± St. Hata).....	96
Çizelge 8.2	İzole edilen flavonoidlerin DPPH radikali üzerindeki süpürücü etkileri ve standart sapma değerleri (% DPPH süpürücü etki ± St. Hata).....	97
Çizelge 9.1	<i>T. kotschy</i> bitkisinden elde edilen ekstralar ve sekonder metabolitlerin minimum inhibisyon konsantrasyonları.....	99

RESİM LİSTESİ

Sayfa

Resim 2.1	<i>Tanacetum kotschy</i> (Boiss.).....	11
Resim 7.1.1	A bileşiğinin [7 Tol: 3 EA] sisteminde yürütüldükten sonra 254 nm UV ışık altında ve seryum sülfat belirteci püskürtülüp yakıldıktan sonra elde edilen İTK kromatogramları.....	53
Resim 7.2.1	B bileşiğinin standart madde ile birlikte [7 Tol: 3 EA] sisteminde yürütüldükten sonra 254 nm UV ışık altında ve seryum sülfat belirteci ile yakıldıktan sonra elde edilen İTK kromatogramları.....	74
Resim 7.3.1	C bileşiğinin standart madde ile birlikte [7 Tol: 3 EA] sisteminde yürütüldükten sonra 254 nm UV ışık altında ve seryum sülfat belirteci ile yakıldıktan sonra elde edilen İTK kromatogramları.....	81
Resim 7.4.1	D bileşiğinin [7 Tol: 3 EA] sisteminde yürütüldükten sonra 254, 366 nm UV ışık altında ve seryum sülfat belirteci püskürtülüp yakıldıktan sonra elde edilen İTK kromatogramları.....	89
Resim 7.5.1	E bileşiğinin [Eter]' de yürütüldükten sonra seryum sülfat belirteci püskürtülüp yakıldıktan sonra elde edilen İTK kromatogramı.....	92

ÖNSÖZ

Yüksek lisansıma başladığım ilk günden itibaren alanındaki engin bilgi ve tecrübesiyle bana her zaman ışık olan, karşımıza çıkan her zorluğun üstesinden ustaca gelen ve bu anlamda hayata karşı duruşunu yaşamım boyunca kendime örnek alacağım, bana çok şey katan değerli hocam Prof. Dr. Nezhun Gören' e çok teşekkür ederim.

Yüksek lisansıma başlamama vesile olan ve bana inanan değerli hocalarım Prof. Dr. Ayşegül T. Sarıkaya ve Prof. Dr. Nazlı Arda' ya çok teşekkür ederim. Gerek laboratuvar çalışmalarım sırasında gerekse sonrasında bana her zaman yardımcı olan, her sorumu bıkmadan yanıtlayan ve yol gösteren Dr. Kaan Polatoğlu' na çok teşekkür ederim.

3 yıl süren serüvenimde beni başından sonuna kadar destekleyen, bana güvenen, bırakıp gitmek istediğim zamanlarda bana her zaman güç verip yola devam etmemi sağlayan canım aileme, “dost” kelimesinin aramızdaki arkadaşlığı ifade etmekte her zaman yetersiz kaldığı, Boğaziçi Üniversitesi' nin yollarını benimle birlikte bıkmadan aşındıran ve tez yazımında bana yardımcı olan kardeşim Gökçe S. Yalçın' e, en stresli zamanlarımda bir telefonuyla beni motive eden ve bana benden daha çok inanan Günhan Özseraçoğlu' na çok teşekkür ederim.

Antimikrobiyal aktivite testlerini Eskişehir Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalında görev yapan Doç. Dr. Fatih Demirci ve Biyolog Burcu Akçal gerçekleştirmiştir. Çalışmamızda izole ettiğimiz maddelerin NMR spektrumları Boğaziçi Üniversitesi' nde Dr. Ayla Türkekul Bıyık tarafından çekilmiştir. Çalışmamıza sağladıkları bu önemli katkılardan dolayı kendilerine çok teşekkür ederim.

ÖZET

Tanacetum türlerinden biri olan *Tanacetum kotschy* (Boiss.) ülkemizde Güney Doğu Anadolu Bölgesi başta olmak üzere birçok yerde doğal olarak yetişmektedir. Bu çalışmada Van ilinin Güzeldere Geçit' inden toplanan *Tanacetum kotschy* bitkisi üzerinde fitokimyasal ve biyolojik aktivite çalışmaları yapılmıştır. Bitkinin gövde etil asetat ekstresi ile çalışılmış ve sekonder metabolitler kolon kromatografisi (CC), ince tabaka kromatografisi (TLC), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), orta basınçlı sıvı kromatografisi (MPLC) ve yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC) gibi kromatografik yöntemler kullanılarak izole edilip saflaştırılmıştır. İzole edilen bileşiklerin kimyasal yapıları ise; ¹H NMR, COSY, ¹³C NMR, APT, HMBC, HMQC, UV/VIS ve IR gibi spektral yöntemlerle belirlenmiştir. İzolasyon sonucu bir seskiterpen lakton; achillin, iki flavonoid; salvigenin (6-metoksi apigenin 4'-7 dimetileter), 6,7,3',4'-tetrametoksi luteolin (6,7,3',4'-tetrametoksi apigenin), bir steroid, β -sitosterol ve bir de fenolik yapıya sahip bileşiklerden 7-hidroksi 6-metoksi kumarin elde edilmiştir. Ekstrelerin ve izole edilen bileşiklerin yapıları aydınlatıldıktan sonra antioksidan ve antimikrobiyal aktivite testleri yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Tanacetum kotschy*, seskiterpen lakton, flavonoid, antioksidan aktivite, antimikrobiyal aktivite

ABSTRACT

Tanacetum kotschy (Boiss.) (Compositae) grows mainly in the South Eastern part of Turkey. *Tanacetum kotschy* was collected from Güzeldere Pass (Van) in 1999. In this study phytochemical and biological activity analyses have been conducted on the ethyl acetate extract of the aerial parts of *T. kotschy*. The secondary metabolites have been isolated by means of chromatographic methods such as column chromatography (CC), thin layer chromatography (TLC), high pressure liquid chromatography (HPLC), medium pressure liquid chromatography (MPLC) and high performance thin layer chromatography (HPTLC). Chemical structures of the pure compounds have been identified by means of spectral methods such as ¹H NMR, COSY, ¹³C NMR, APT, HMBC, HMQC, UV/VIS and IR. A sesquiterpene lactone; achillin, two flavonoids; salvigenin (6-methoxy apigenin 7,4'-dimethylether), 6,7,3',4'-tetramethoxy luteolin, a phytosterol; β -sitosterol and a phenolic compound; 7-hydroxy 6-methoxy coumarin have been isolated from the EA extract of the aerial parts of *Tanacetum kotschy*. The MeOH and EA extracts of the plant and the pure secondary metabolites were evaluated for antimicrobial and antioxidant activities.

Key Words: *Tanacetum kotschy*, sesquiterpene lactone, flavonoid, antioxidant activity, antimicrobial activity

1. GİRİŞ

Yaşadığı doğayı ve sahip olduğu doğal zenginlikleri çok iyi tanıyan ve anlamaya çalışan toplumlarda çevre değer kazanır, korunur ve gelecek nesillere yaşanır bir miras olarak bırakılması için çaba sarfedilir. Doğadaki canlılığın temelini ise bitkiler oluşturur. Bir coğrafyada bitki topluluğu ne kadar çok ve zengin ise; bir o kadar canlıya rastlamak mümkündür. Bu nedenle yaşamın kaynağı sayılabilecek bitkileri tanımalı, onlara zarar vermeden en iyi şekilde faydalanma olanakları sağlanmalı ve doğal denge korunmalıdır (Özer vd., 2005).

Canlılar dünyasında yıllar boyunca değişen çevre şartları, modifikasyonlar ve hayatta kalma mücadelesi bilim insanlarını zaman geçtikçe bitkiler üzerinde daha fazla araştırma yapmaya yöneltmiştir. Bitkilerin kuraklık, soğuk, dış etkenler gibi stres koşullarında, virüs ve mikroorganizma saldırıları karşısında bir şekilde hayatta kalmaları, onların daha çok mercek altına alınmalarına neden olmuştur. Düünden bugüne pozitif bilimlerde daha fazla çalışma alanı ortaya çıkmış ve bu alanların ortaklaşa yürüttüğü çalışmalar sonucunda bitkiler dünyası aydınlatılmaya çalışılmıştır.

İnsanoğlu tarihin en eski çağlarından beri bitkileri ilaç, gıda, baharat, yakıt, katkı maddesi, boyar madde, mesken yapımı, gerektiğinde savaşta ve avlanmada zehir olarak kullanmıştır (Baytop, 1999; Abu-Dahab ve Afifi, 2007). Hastalık tedavilerinde bitkilerin kullanımının ne zaman başladığı kesin olarak bilinmiyorsa da; günümüzde sentetik ilaçların kullanımının yanı sıra alternatif olarak bazı durumlarda tercih edilmeleri, tıbbi bitkilerin yüzyıllardır değerlerini koruduklarının bir göstergesidir. Gelişmekte olan ülkelerde nüfusun % 80'i sağlık gereksinimlerini ilk etapta tıbbi bitkilerden sağlamaktadır. Dünya nüfusunun % 80'inin gelişmekte olan ülkelerde yaşamakta olduğu düşünülürse, toplam dünya nüfusunun % 64'ü bitkileri tedavi amaçlı kullanmaktadır (Tatlı ve Akdemir, 2006; Rozenkranz ve Wink, 2008). Günümüzde bitkilerin alternatif tıp başlığı altında tıbbi amaçla kullanılmaları, bitkilerin içerdikleri biyoaktif maddelerin izolasyonunda son yıllarda hız kazanan çalışmalar, bitkilerin kolay ve ucuz tedavi imkanı sağlamaları, meydana gelebilecek yan etkilerinin sentetik ilaçlara göre daha iyi bilinmesi ve birkaç etkiye birden sahip olmaları şeklinde sıralanabilir.

Bitkiler insanların tedavisinde kullanılabilen çok önemli terapötik özelliklere sahip kimyasalları içerirler (Jiang vd., 2005; Stévigny vd., 2005). Bitkilerden izole edilen ve biyolojik aktivitesi belirlenmiş en önemli moleköl grupları; polisakkaritler, flavonoidler, terpenoidler, alkaloidler, fenoller ve amino asitlerdir (Zahran vd., 2005).

İnsan ve hayvanlarda olduğu gibi bitkilerin de, kendilerini zararlıların saldırılarından korumak için çeşitli savunma sistemlerine sahip olduğu bilinmektedir. Bunlar bitkideki morfolojik ve bazı biyokimyasal olaylar arasında değışen bir dizi faktörden ileri gelmektedir. Bitkilerdeki biyokimyasal olaylar esnasında sentezlenen ve sekonder metabolit adı verilen doğal ürünler bitki-zararlı ilişkilerinde önemli rol oynarlar. Bitkilerin yaşamlarını sürdürmeleri için birinci derecede önemli olmayan; fakat değışen çevre koşullarına uyum sağlamada, savunma, hayatta kalma gibi önemli olaylarda avantaj sağlayan kimyasal maddelere sekonder metabolitler denir.

Bu maddelerin bitkideki önemli görevleri şunlardır:

- 1- Kuraklık, tuzluluk, UV ışınları vs. gibi değışik çevre faktörlerinin oluşturduğu stres ortamına karşı koyma.
- 2- Herbivorlara (böcek, sürüngen vb.) karşı savunma.
- 3- Mikroorganizmalara (bakteri, mantar vb.) karşı savunma.
- 4- Bazı metabolik ve gelişmiş diğerk ekolojik işlevler (örn: Tohum dağılımını sağlamak için hayvanları ve diğerk taşıyıcıları cezbetme gibi) (Özcan vd., 2001).

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

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

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

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

Sekonder metabolitler bitkilerde organizmanın yaşamını sürdürmesi için gerekli olan karbonhidrat, protein ve yağlardan oluşan primer metabolitlerin yan ürünleri olarak üretilirler. Çoğunlukla izoprenoid, fenilpropanoid, alkaloid ve yağ asitleri metabolik yollarından türevlenirler. Bu metabolik yollar farklı familya ve türler arasında kendilerine özgü olduğundan, sekonder metabolitler botanik sınıflandırma için belirteç olarak da kullanılmaktadırlar (Dewick, 1997; Bratt, 2000; Bourgaud ve vd., 2001). Ayrıca bu zengin çeşitliliğin sonucunda mikrobiyal ve hayvan saldırılarına karşı savunma yeteneği geliştirerek evrim süresince doğal seçilimi sağlarlar (Dixon, 2001). Sekonder metabolitlerin oluşum şeması şekil 1.1' de verilmektedir.

Dış yörüngelerinde ortaklanmamış elektron içeren kararsız ve reaktif haldeki atom ya da moleküllere serbest radikaller adı verilmektedir. Tüm aerobik organizmalarda metabolik işlemler sürecinde oksijenin suya indirgenmesi sırasında açığa çıkan hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi toksik özellikte bileşikler, yağlı besinlerin yüksek sıcaklıkta işlenmeleri, pişirilmeleri sonucu oluşan lipid peroksit, süperoksit (O_2)• ve hidroksil radikali (OH)• serbest radikallere örnektir. Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Ayrıca kanser, ateroskleroz, yaşlanmaya bağlı kardiyovasküler hastalıklar ve merkezi sinir sistemi hastalıkları gibi birçok hastalığa zemin oluştururlar. Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için gerekli olan en önemli savunma sistemi antioksidan savunma sistemleri kısaca antioksidanlardır.

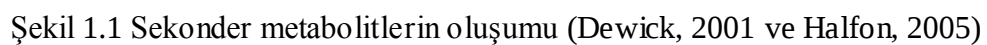
Antioksidanlar 4 ayrı şekilde etki ederler:

- 1- Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme, toplayıcı etki.
- 2- Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme, bastırıcı etki (Vitaminler, flavonoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler).
- 3- Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici, zincir kırıcı etki.
- 4- Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılmasında onarıcı etki (Dawn vd., 1996; Akkuş, 1995; Tietz, 1995; Burtis ve Ashwood, 1999).

Canlı organizmalar serbest radikallerin etkisinden korunmak için antioksidatif korunma sistemine sahiptirler. Fakat bazı durumlarda antioksidatif koruyucu sistemi iyi çalışmaz ve serbest radikaller vücutta birikir. Bu da önce yaşlanmayla başlayan, daha sonra hücre ölümü, doku ölümü ve sonrasında ise beyin damarlarının tahribatına varan hasarlara neden olur (Bilaloğlu vd., 1999).

Gıdalardaki bitkisel ve hayvansal yağların oksidatif yıkımı, ham maddelerin işlenmesi ve ürünün saklanması sırasında oluşan lipit oksidasyonu, besinlerin tatlarının ve kokularının bozulmasına böylelikle de gıdalarda kalitenin ve güvenirliliğin azalmasına neden olur. Bu nedenle endüstride besinlerin raf ömrünü uzatmak adına bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), propil gallat (PG) ve terbütillhidrokinon (TBHQ) gibi sentetik antioksidanlar kullanılmaktadır. Ancak yapılan araştırmalar sonucunda (BHA) ve (BHT)' nin canlı organizmalarda kanserojen etki göstermesi nedeniyle tokoferol gibi yüksek maliyetli, düşük aktiviteye sahip, doğal antioksidanların kullanılması gerektiği belirtilmiştir (Namiki, 1990; Sherwin, 1990; Wanasundara ve Shahidi, 1998). Özellikle Avrupa ülkelerinin birçoğunda ve bazı Uzakdoğu ülkeleri ile Amerika'da sentetik antioksidanların kullanımı ile ilgili yasal sınırlamalar getirilmeye başlanmıştır. Bu da bitkisel kaynaklı antioksidanlara olan ilgiyi arttırmak ve ticari olarak üretilmelerini sağlamaktadır (Eryiğit, 2006). Doğal antioksidanların en önemli grubunu fenolik bileşikler oluşturur. Bitkilerde antioksidan etkiye sahip en önemli polifenolik bileşenler flavonoidlerdir. Yapılarında bulunan hidroksil grupları radikaller üzerinde etkilidir ve lipit peroksidasyonunda önemli rol oynarlar (Hatano vd., 1989; Yen vd., 1993; Srivastava vd., 2006; Zhou ve Yu, 2006).

Tüm flavonoidler, 3'-4' dihidroksi konfigürasyonu ile antioksidan etkiye sahiptirler. Robinetin ve mirisetin gibi 5' pozisyonunda da hidroksil grubu taşıyan flavonoidlerin etkisi daha fazladır. B halkasının hidroksilasyonu antioksidan aktivite için önemlidir (Feredioon vd., 1992; Rice-Evans vd., 1996).



Tanacetum türleri birçok kimyasal bileşik türünü içermektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda başta seskiterpen laktonlar olmak üzere, seskiterpenler, triterpenler, kumarinler, monoterpenler ve flavonoidler gibi sekonder metabolitler izole edilmiştir (Gören vd., 2002). Ayrıca sahip oldukları biyolojik aktiviteler nedeniyle de birçok araştırmaya konu olmuşlardır.

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

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Compositae (Asteraceae) Familyası

Compositae (Asteraceae) familyası, çiçekli bitkilerin en büyük familyalarından biri olup; yeryüzünün hemen her yerinde yayılış gösteren familyalarından biridir. Royal Botanic Garden of Kew' e göre (Judd, 2002), 1600 cins ve 23.000' den fazla türle ifade edilen Compositae familyasının Türkiye'de doğal olarak yetişen 133 cins ve 430' u endemik olmak üzere 1156 türü bulunmaktadır. Yurdumuzda ise en zengin tür sayısı ile temsil edilmektedir (Davis, 1988).

Compositae familyası, yurdumuzda iki alt familya ile temsil edilir. Asteroideae (Tubuliflorae) ve Cichorioideae (Liguliflorae). *Tanacetum* L. cinsi Asteroideae alt familyasına girmektedir (Akman, 1998).

Bu bitkiler genellikle bahçelerde, çorak arazilerde yol ve dere kenarlarında, steplerde, kireçli kayalıklarda, gölgelik yerlerde, otlak arazilerde, dağ yamaçlarında, çatlaklarda ve yaklaşık 3600 metreye ulaşan yükseklikteki yerlerde yetişir.

Bu familyanın türleri küçük, orta boyda ya da uzun (gövde 6-150 cm) yıllık, iki yıllık, otsu, çok yıllık veya çalimsı yapıda beyaz ya da sarı çiçeklidir (Grierson, 1975; Davis vd., 1975). Bu cinsin ortalama 150-200 türü (Abad vd., 1995) bulunmakla beraber Türkiye'de başta Doğu Anadolu olmak üzere, İç ve Güney Anadolu' da oldukça yaygındır.

Yapraklar birbirini takip eden bir düzende, karşılıklı ya da halkasal biçimde konumlanmış olabilirler. Basit, farklı şekillerde ya da loblu yapılardır. Bu familyada çiçeklerin görünümü belki de en fazla ayırt edilebilir özelliklere sahiptir. Çiçekler sapsız, dal üzerinde bir demet oluşturacak şekilde kümelenerek kapitulumu (çiçek kümesi) oluşturmuştur. Çoğu brakte (çiçek sapı yaprakçığı) kapitulumun tabanında involukrum adı verilen bir yapı geliştirmiştir (involukral brakte). Aynı reseptakulum üzerinde bulunan çiçeklerin her biri bazen ayrı bir braktenin içinde olabilirler. Bu braktelerin varlığı ya da yokluğu, reseptakulum üzerindeki yeri, büyüklüğü ve şekli bu familyada cins ve tribüsler (familyanın alt grubu) arasında ki ayrımı yapmaya kolaylık sağlar. Korolla (taç yaprakların tümü) tüpsü, ipliksi, dilsli yapıda ya da iki dudaklı olup, genellikle 3 veya 5 dişlidir. Disk şeklindeki çiçekler genellikle şekilsiz, korollanın kenarında 5 tane petala sahiptir. Petaller (taç yaprak) ya çok uzun ya da çok kısa olup loblu petalleri meydana getirirler. Çiçekler epigindir (ovaryumun çiçek tablası içinde gömülü olması). Çiçeklerde kaliks (sepal topluluğu) olmayabilir, eğer varsa bunlar 2 ya da daha fazla dişli papus (korollanın tabanında bulunan disk ya da ip şeklinde kümelenen yapı) adı verilen

yapıya dönüşürler. Çiçeklerin çoğu protandır (erkek organların dişi organlardan daha önce olgunlaşması) ya da hermafrodittir. Brakteler gibi bu yapılarda ayırıcı bir özellik olup, tohumların dağılımını sağlarlar. Stamenler (çiçeğin erkek organı) genellikle 5 tanedir. Filamentleri serbest, korollada birleşmiş, anterler ise yatay olarak stilusun (boyuncuk) etrafında toplanmıştır. Pistil (dişi organ) 2 adet karpelden (tohum tomurcuklarını taşıyan değişime uğramış yaprak) meydana gelmiştir. Alt konumlu ovaryumda tek bir ovül bulunur. Stilus üst kısımda 2 dala ayrılır ve tüpsü çiçeklerin stilusları anterlerden polen toplayan tüplere sahiptirler. Meyveler aken (içinde tek tohum bulunan ve olgunlaştığında açılarak tohumun çıkmasına olanak verecek özel bağlantı yerleri olmayan kuru meyve) tipindedir. Tohumlar genellikle küçük bir endosperm (besi doku) içerirler (Davis vd., 1975).

Bazı Compositae türlerinin sistematik konumları ve sınıflandırılmalarındaki karışıklık nedeniyle genetik markerların kullanımıyla yeni çalışmalar yapılmaktadır (Francisco-Ortega ve Crawford, 1995; Keskitalo vd., 1998).

Dünya' da ve Anadolu' nun birçok yerinde dağılım gösteren Compositae familyasına ait birçok türün farmakolojik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu familyadaki bitkiler, diterpen ve flavonoidlerin yanı sıra ağırlıklı olarak, antibakteriyel, antifungal, antihelmintik, antienflamatuvar, insektisit, antitümör gibi pek çok biyolojik aktiviteye sahip seskiterpen lakton ve sekonder metabolitleri içermektedirler (Grierson, 1975).

2.1.1. Türkiye’ de Yetişen *Tanacetum* L. Türlerinin Botanik Özellikleri

Compositae familyası 13 tribüse ayrılır ve *Tanacetum* cinsi Anthemideae tribüsünde yer alıp ülkemizde 18’ i endemik olmak üzere 60 takson ve 44 tür ile temsil edilir (Davis vd., 1988; Güner vd., 2000).

Tanacetum cinsinin çoğu Batı Asya ve Avrupa’ da, kuzeyde ılıman bölgelerde ve özellikle de Anadolu’ da yayılış göstermektedir. Türler genellikle çok ufak farklarla birbirlerinden ayrıldıklarından, adlandırılmaları çoğu zaman oldukça güçleşmektedir. Bu nedenle Anadolu’ da henüz bilinmeyen bazı türlerin yetişme olasılığı büyüktür (Grierson, 1975).

Tanacetum türlerinin çoğu dış görünüşleri ile diğer cinslerin türlerine benzer ve kolaylıkla karıştırılabilir. Bu nedenle bu türün sistematigi eskiden beri oldukça karışıktır. *Tanacetum* adı Carlous von Linné (1753) tarafından “ Species Plantarum” adlı eserinde verilmiştir. Sonraki yıllarda Linné’ nin *Tanacetum* olarak adlandırdığı bitkilerin çoğu başka cinslere taşınmış, ayrıca başka cins adı altında topladığı bazı bitkiler de sonradan *Tanacetum’* a dahil edilmiştir. Ülkemizde ilk kapsamlı sistematik flora çalışması Boissier E. (1875) tarafından “Flora Orientalis” içerisinde verilmiş olup; *Tanacetum’* a ait türler *Pyrethrum* cinsi altında verilmiştir. Grierson (1975), Boissier’ den sonra Türkiye *Tanacetum* ları üzerinde en ayrıntılı çalışmayı yaparak daha önce yapılan birçok yanlış düzeltmiş ve Türkiye’ ye ait 44 türü “Flora of Turkey” adlı eserinde toplamıştır (Çelik, 1980).

Compositae familyasında bulunan *Tanacetum* taksonları çok yıllık otsu ya da yarı çalimsı, bazen dip kısmı odunlu, genellikle rizomlu bitkilerdir. Kısa, orta boylu veya uzun olabilirler. Gövde yatık ya da dik, genellikle yapraklı ve dallı, bazen çıplak ve basittir (dallanmamış). Bazı durumlarda bitki skapus (taban yapraklarından yükselen gövde) şeklinde olabilir. Bitki sık salgı cepli, genellikle tüylü, tüyler seyrek ya da sık, basit ya da çatallı; bazen de tüsüzdür. Yapraklar tamkenarlı, dişli pinnatifid (kanatsız bölmeli yaprak ayasının orta damara doğru üçte birinden az bir şekilde parçalanması) ya da 1-3 pinnatisektir (tüysü derin parçalı yaprak ayasının orta damara kadar derin parçalanması). Yaprakların ilk segmentleri bitkinin genç hali dışında genellikle aralıklıdır; bazı durumlarda aralıksız, birbirine çok yakındır. Bitkinin yetişkin halindeki yaprakları bütün görünümlüdür. Kapitüller heterogram (çiçekler farklı eşeylere sahip) ya da homogram (çiçekler aynı eşeyde), tek ya da korimboz (kapitulumların oluşturduğu şemsiye şeklinde ki yapı) olup; involukrum (brakte topluluğu) yarı-küresel ya da çan şeklinde; brakteler kiremit şeklinde dizilmiş, 3-4 sıralı, lanseolat (mızraksı), ya da oblong (uzun silindir), genellikle kenarlar ve uç kısımlar zarsı yapıdadır. Reseptakulum (çiçek tablası) düz ve çıplaktır.

Ligulat çiçekler (dişi çiçekler) var ya da yok; varsa renkleri beyaz, sarı ya da pembemsi-kırmızı, involukrumdan uzun ya da kısa, üst kısımları geniş, 3 dişli ya da loblu, tubulat çiçekler (erkek çiçekler) sarı, genellikle çok sayıda, uç kısımlar 3-5 lobludur. Akenler silindirik ya da uç kısımları geniş çomak şeklinde, 5-10 kaburgalı, çıplak, bazen salgı cepli; korona (taç) kısa ya da belirsiz, genellikle düzenli ya da düzensiz dişli veya loblu, bazen tek taraflıdır (Grierson 1975; Davis vd., 1975).

2.1.1.1 Türkiye Türlerinin Tayin Anahtarı

1. Kapitulum heterogram; kenarlarda bulunan dişi çiçekler, dilsî fakat bazen belirgin olmayıp; nadiren tüpsü çiçeklerden uzundur
2. Dişi çiçekler beyaz, soluk kükürt sarısı (fakat açık sarı değil) ya da pembemsi-kırmızı, daima belirgin dilsî şeklinde Grup A
2. Dişi çiçekler parlak ya da koyu sarı, bazen belirsiz, ligulalar bazen belirgin değil Grup B
1. Kapitulum homogram, tüm çiçekler tüpsü, dişi çiçekler tamamen eksik Grup C

Bu tez çalışmasında incelenen *Tanacetum kotschyi* bitkisi A grubunda yer almaktadır. Ayrıca;

* Gövdeler 20 cm' den kısa, yapraklar genellikle 3 cm' den kısa, ligulat çiçekler beyaz, 5-10 mm

*Yaprakların ilk segmentleri az sayıda, genellikle 5 parçadan az

*Yaprak bölümleri iyi, segmentler en fazla 2 mm kalınlıkta, 1-3 pinnatisekt

*Alt yapraklar oval orbikular, 2-pinnatisekt veya subpalmatisektir (Grierson, 1975).



Resim 2.1 *Tanacetum kotschyi* (Boiss.) Grierson (Demirkuş, 1999)

2.1.1.2 *Tanacetum* L. Türlerinin Biyolojik Etkileri ve Halk Arasında Kullanımı

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)' nün 91 ülkenin farmakopelerine ve tıbbi bitkileri üzerinde yapılan bazı çalışmalara dayanarak yaptığı bir araştırmaya göre tedavi amaçlı kullanılan tıbbi bitkilerin toplamının 20.000 kadar olduğu belirtilmiştir (Penso, 1983 ve Mahindru, 1992). Doğal olarak yetişen bitkilerin gövde, yaprak, tohum ve köklerinde birçok mikroorganizmanın büyümesini inhibe edebilecek maddeler izole edilmiş, bu maddeler mikroorganizmalar üzerinde denenmiş ve aktiviteleri rapor edilmiştir (Acharya ve Chatterjee, 1975). Bu nedenle tıbbi bitkiler dünyada olduğu kadar ülkemizde de oldukça geniş bir çalışma alanı yaratmıştır.

Doğal olarak yetişen bitkilere karşı ilginin bu denli fazla olmasının nedenlerinden en önemlisi sentetik kökenli ilaçların insan vücudunda beklenmedik yan etkiler oluşturmaları, buna karşılık bitkisel drogların çok eski çağlardan beri kullanılıyor olmasından dolayı yan etkilerinin daha iyi bilinmesidir. Ayrıca sentetik ilaçlar tek bir etkiye sahip olurken bitkisel droglar birden fazla etkiye sahiptirler (Baytop, 1984 ve Hakim, 1982).

T. vulgare, *T. parthenium*, *T. balsamita*, *T. annuum*, *T. cinerariifolium*, *T. coccineum* türleri içerdikleri biyoaktif kimyasal bileşikler nedeniyle uzun yıllar halk ilacı, parfüm, kozmetik hammaddesi ve tatlandırıcı olarak kullanılmıştır (Duke, 1987; British Herbal Pharmacopoeia 1996; Groom, 1997; Bruneton, 1999; Kırimer vd., 1999; Benjilali vd., 1999). Ayrıca *T. parthenium* bitkisinden elde edilen ekstreler ve bitki tozu antimigren ilacı olarak kullanılmakta ve bu özelliğinden dolayı bitkinin tarımı yapılmaktadır (Newall, 1996; British Herbal Pharmacopoeia 1996; Bruneton, 1999). *T. vulgare*, bitkisi ise eski çağlarda likör, peynir gibi gıda maddelerinde tatlandırıcı olarak kullanılmış olsa da; içerdği toksik etkiye sahip β -tuyon bileşiği sebebiyle artık kullanılmamaktadır (Reclu, 1925; Guenther, 1948; Hendriks vd., 1990; Newall, 1996; Groom, 1997; D' Amelio ve Roton, 1999). Amerika FDA (Food and Drug Administration) alkollü içeceklerde bu bitkinin kullanımına sınır koymuş ve son ürünün β -tuyon içermemesi gerektiğini belirtmiştir (Mitich, 1992).

Tanacetum türleri halk arasında, burkulma ve yaralanmalarda fomentasyon (ısı uygulaması-kompres) olarak, adet düzenleyici, (Newall, 1996; D' Amelio ve Roton, 1999), kulak çınlaması, baş dönmesi, eklem iltihabı, ateş düşürücü, karın ve diş ağrısına karşı (Newall vd., 2002), idrar söktürücü, karın gazı giderici, iştah açıcı, afrodizyak, antihelmintik (Baytop, 1999), sedef hastalığı (Bohlman vd., 1965; Kupchan vd., 1970; Jonson vd., 1984) böcek ısırıklarına karşı (Gören vd., 1996), yaraların iyileştirilmesinde, sakinleştirici, balgam söktürücü, antiseptik, yapraklardan yapılan merhem tendonlardaki tümörlerin tedavisinde, kökleri gut hastalığında, çiçekleri özellikle Rusya' da ülser tedavisinde (Duke, 1987), kanser tedavisinde ve romatizma ağrılarında (Berry, 1984) karşı ve insektisit olarak, sivilce ve kaşıntılı deri hastalıklarında, bit, pire, kene gibi vücut parazitlerine karşı, (Güven ve Yürekli, 1991; Asımgil, 1993) geleneksel tıpta kullanılmaktadır.

Tanacetum türleri üzerinde yapılan araştırmalarda birçok yeni bileşiğe rastlanmış, bunlardan bazılarının çeşitli biyolojik aktiviteler gösterdiği gözlemlenmiştir. *Tanacetum* türleri yeni biyoaktif bileşiklerin bulunması açısından büyük bir potansiyele sahiptir. Özellikle içerdikleri biyoaktif seskiterpen laktonlar, flavonoidler ve uçucu yağlar araştırmacıların ilgisini

ekmektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda *Tanacetum* türlerinin ekstreleri, izole edilen bileşikleri ve uçucu yağları antihelmintik, antiinflamatuvar, alerjen, antikoag lant, antifibrinolitik, antimikrobiyal, karminatif, antiülser, antimigren, antitümör, antiplasmodik, sitotoksik, insektisit, fitotoksik gibi çeşitli özellikler göstermektedir (Gören, 2002). Bu nedenle *Tanacetum* türleri her geçen gün araştırmacıların daha da dikkatini çekmekte ve ekonomik olarak önemli bitkiler arasında yer almaktadırlar.

Tanacetum türleri başlıca seskiterpen lakton ve flavonoid içermekle birlikte; yapılarında nadir olarak diğer terpenik ve fenolik bileşiklere de rastlanmaktadır. Bu tez çalışmasında flavon, seskiterpen lakton ve steroid türevi bileşikler bulunup yapıları aydınlatılmıştır.

2.1.2 *Tanacetum kotschy* Bitkisinin Genel Özellikleri



Resim 2.2 *Tanacetum kotschy* (Boiss.) Grierson (Demirkuş, 1999)



Resim 2.3 *Tanacetum kotschyi* (Boiss.) (Gören, 1999)

Ömür: Çok yıllık

Yapı: Ot, genelde beyaz ya da sarı çiçekli

Çiçeklenme zamanı: Temmuz- Ağustos

Habitat: Kayalık, kireçtaşı, yamaç, kireçtaşı çatlakları, dere kenarları, gölgelik yerler, stepler

Minimum yükseklik: 1450 m

Maksimum yükseklik: 3580 m

Endemik: -

Türkiye dağılımı: G.D. Anadolu, K.D. Anadolu, G. Anadolu (Anti-Toroslar) 59 tür

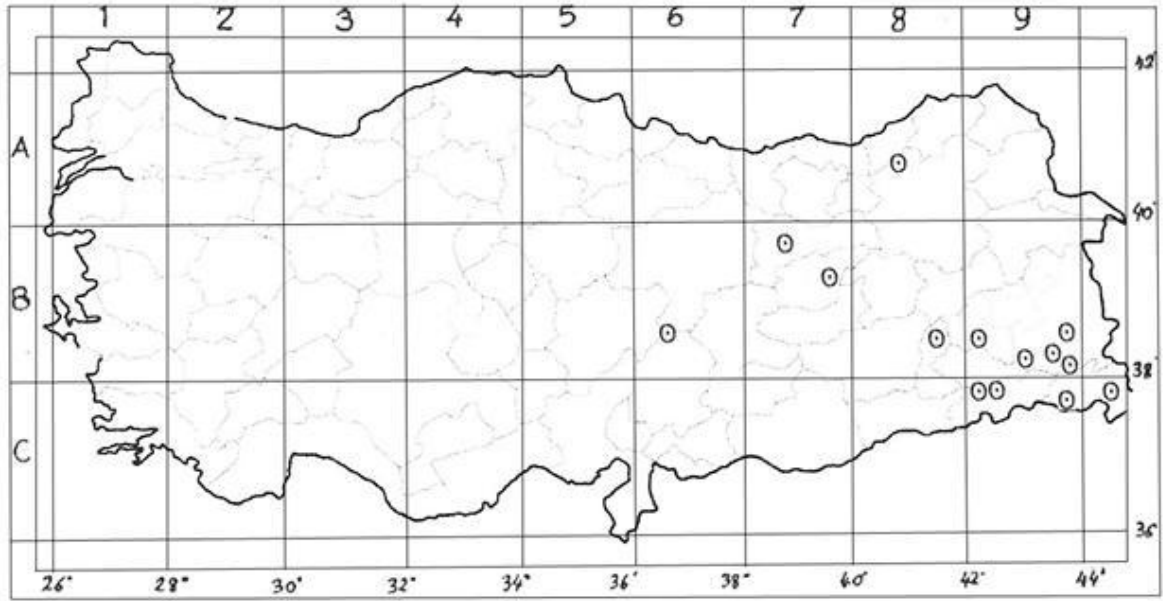
Genel dağılımı: K.B. İran, K. Irak, İran-Türkiye arası

Bulunduğu Kareler: B6, B7, B8, B9, C9

T. kotschyi bitkisi Compositae familyasının Anthemideae tribüsünde yer almaktadır (Davis, 1975).

2.1.3 Türün Türkiye’ deki Yayılışı

G.D. Anadolu, nadiren K.D. ve G. Anadolu. **A8** Rize: Cimil üstleri, 3200 m, (Davis) 21095. **B6** Maraş. Berit Da., 2700 m, (Davis) 20332. **B7** Erzincan: Sipikör Da., 2500 m, (Çelik) 182; Üzümlü, Keşiş Da., Buzhane civarı, 2530 m, (Çelik) 181. **B8** Muş: Muş üzeri Haçreş Da., (Kurtik Da.), 1450-2750 m, (Watson ve ark.) 2825. **B9** Bitlis: Pelli Da., 2560 m, (Davis) 22455. Van: Van-Erçek arası 8. km, 2100 m, (Davis) 44416; Gevaş, Artos Da., 2900-3050 m, (Çelik) 179; Güzelsu-Başkale arası, Güzeldere geçidi, 1700-1800 m, (Çelik) 183; Çuhgediği, 1200-1550 m, (Çelik) 180. **C9** Hakkari: Hakkari ve Kaval arası, 2500 m, (Davis) 45397. Siirt: Ramoran, Halakur Da., (Herakol Da.), Nabelek 3565. Hakkari: Kara Da., 3580 m, (Davis) 24507; **C10** Hakkari: Cilo tepe, 3200-3500 m, (Davis) 24068.



Şekil 2.1 *T. kotschyi* bitkisinin Türkiye’ deki dağılımı (Davis, 1974 ve Çelik, 1980)

Türün Türkiye Florası 'nda (*Flora of Turkey and the East Aegan Islands Vol 5:273*) Yer Alan Tanıtımının Özeti Aşağıda Verilmektedir:

Tanacetum kotschy (Boiss.) Grierson in Notes R.B.G. Edinb. 33: 435 (1975).

Syn : *Pyrethrum kotschy* (Boiss.) Diagn. Ser. 1 (6): 88 (1845).

Chrysanthemum kotschy (Boiss.) Nâb. in Publ. Fac. Sci. Univ. Masaryk Brno 52: 19 (1925)

C. kotschy var. *griseum* Nâb., loc. cit. Figure 12, p. 263.

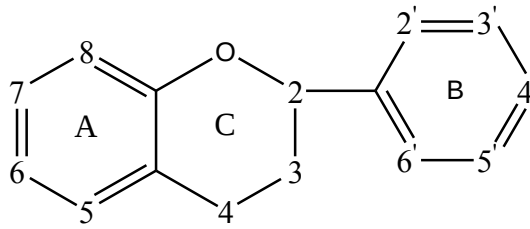
2.1.4 Botanik Özellikleri

Gövde 8-20 cm. Bazal yapraklar subpalmitisekt, 1-2.5 cm (0.5-1 cm petiyol-yaprak sapı içerir), dışta orbikular, primer segmentler 2-3 çift, parçalanmamış ya da 3-5 doğrusal şekilde bölünmüş, büyük segmentler 2-10x0.4 mm; kaulin yapraklar sesil (ana yapıya doğrudan bağlanmış, sapı olmayan ve geniş bir bağlantı tabanı olan), pinnatisekt, dıştan lanseolat (taban kısmında geniş uca doğru gittikçe incelen uzunluğu genişliğinden daha fazla olan mızraksı yaprak), lateral segmentler 3 çift, yükseklerdeki yapraklar basittir. Kapitula çıplak çiçek sapı üzerinde tektir. İnvolukrum 0.8-1.3 cm genişlikte; involukrumu meydana getiren pulsu yapraklar kahverengi ya da siyahımsı kenarlı, dışta düz lanseolat, 3.5x1.5 mm, iç kısımda oblanseolat (ters mızraksı), 7 mm' ye kadar genişleyebilir. Çiçek tablasının üzerinde ışın şeklinde olan çiçekler beyaz, dışı çiçekler 6-12 x 2.5-5 mm, disk şeklindeki çiçekler 2.5-3.5 mm dir. Akenler kahverengi, 2-2.5 mm, 4-5 damarlı, korona 1-1.5 mm, tek taraflı (akenin ön kısmında tek ya da daha fazla gelişen) pürüzlü bir yapıdadır. 1450-3580 m yükseklikte kayalık ve kireçtaşı yamaçlarında, yarıklarda ve dağların eteklerinde toplanmış taş yığınları arasında bulunur.

Bu tür *T. armenum* ' a benzer, fakat top çalı şeklinde olmayışı, yapraklarının subpalmatisekt oluşu, kapitulumlarının daha büyük, koronasının çok daha fazla gelişmiş olması ile kolayca ayırt edilebilir.

3. FLAVONOİDLER

Fenilalaninden türevlenen ve fenolik bileşiklerin en büyük sınıfını oluşturan flavonoidler latince sarı anlamına gelen '*flavus*' sözcüğünden türetilmiştir. Flavonoidler iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan difenil propan ($C_6-C_3-C_6$) yapısındaki fenolik bileşiklerdir (Eryiğit, 2006). Başlangıçta, çoğunlukla sarı renkli olan ve kimyasal olarak 2-fenilbenzopiran yapısı gösteren doğal bileşiklerin tümüne flavon adı verilmiştir.



Şekil 3.1 2-fenilbenzopiran

Günümüzde ise bu ya da buna benzer yapı gösteren tüm bileşiklere, doğal ya da sentez yoluyla elde edilmiş olsun, renk ayırımı yapılmadan flavonoid denmektedir. Zaman içinde farklı iskelet yapılarına sahip bileşiklerin elde edilmesi sonucunda flavonoidler kendi içinde gruplara ayrılmışlardır (Gören, 1978). Flavonoidlerin bazı çeşitleri diğerlerinden daha fazla yayılım gösterir. Flavonlar ve flavonoller başta olmak üzere, bazı bitki türlerinde flavonon, izoflavon ve antosiyanin gruplarına da rastlanmaktadır. En çok bilinen flavonoidler ve kaynakları çizelge 3.1' de verilmektedir (Nijveldt vd., 2001).

Polifenolik bileşiklerden olan flavonoidler, özellikle Polygonaceae, Rutaceae, Fabaceae, Umbelliferae, Compositae gibi familyalarda yaygın olarak bulunan, genellikle sarı, kırmızı/mavi renkli pigmentler olarak bilinirler (Bilaloğlu ve Harmandar, 1999; Şener ve Toker, 1986; Taylor ve Grotewold, 2005).

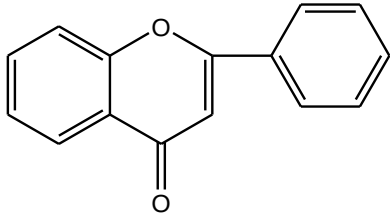
Bitkinin hemen hemen bütün organlarında; tohum, polen, kök, gövde, kabuk, resin, vaks, odun kalbi, yaprak ve çiçeklerin yanı sıra çay ve şarapta da flavonoid bulunmaktadır (Middleton, 1998). Flavonoidler hayvanlarda sentez edilmezler. Bazı alg türleri haricinde flavonoidler çoğunlukla vaskular (damarlı) bitkilerde bulunurlar (Halfon, 2005).

1930 yılında portakaldan yeni bir madde izole edilmiş ve bu maddenin yeni bir vitamin olduğu ileri sürülerek P vitamini olarak adlandırılmıştır. Daha sonra bu maddenin bir tür flavonoid (rutin) olduğu anlaşıldıktan sonra flavonoidler üzerinde yapılan çalışmalar hız kazanmıştır (Rice-Evans vd., 1996).

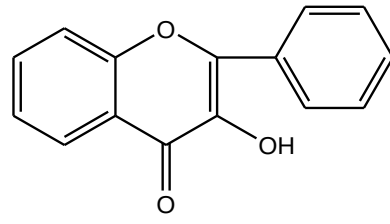
Flavonoidler ile ilgili çalışmalar 1992 yılında Bordeaux Üniversitesi'nden Dr. Serge Renaud adlı bilim adamının *French Paradox* adını verdiği araştırması sonucunda daha da ilgi çekici olmuştur. Bu çalışmada doymuş yağ oranı yüksek gıdaların yanında kırmızı şarap tüketiminin fazla olduğu Akdeniz toplumundaki kardiyasküler nedenli ölüm oranlarının düşük olduğu ileri sürülmüştür (Formica ve Regelson, 1995).

Çizelge 3.1 Bazı flavonoid grupları ve kaynakları

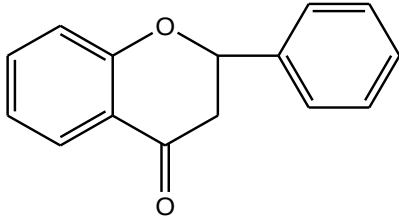
Grup	Bileşik	Kaynak
Flavon	Apigenin Krisin Kamferol Luteolin Miricetin Rutin Sibelin Kersetin	Elma Kabuğu Çilek, Kiraz Brokoli Kereviz Meyve Kabuğu Kızılcık Üzüm Marul, Zeytin, Soğan, Maydanoz
Flavonon	Fisetin Hesperetin Naringin Naringenin Taksifolin	Limon Limon Kabuğu
Kateşin	Kateşin Epikateşin	Kırmızı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



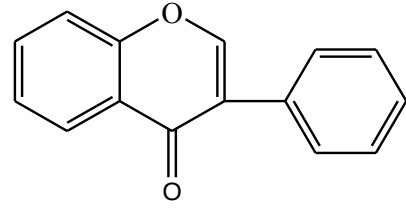
Flavon



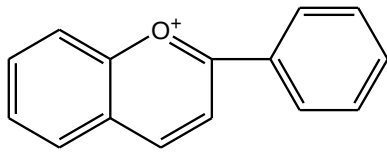
Flavonol



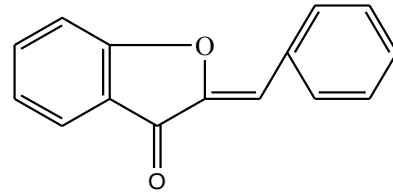
Flavonon



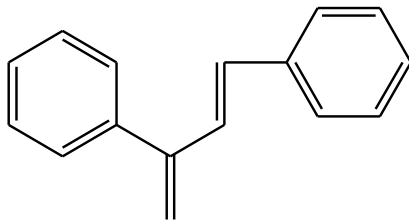
İzoflavon



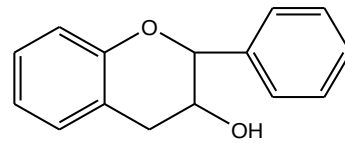
Antosiyanidin



Oron



Kalkon

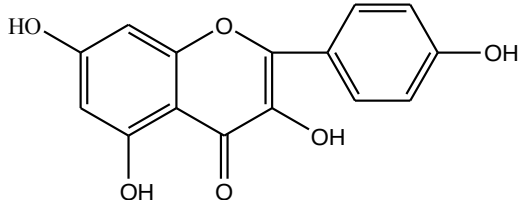


Kateşin

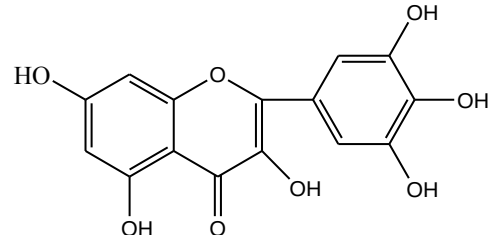
Şekil 3.2 Farklı iskelet yapısına sahip flavonoidler

Flavonoidler genellikle bir ya da daha fazla fenolik hidroksil grubunun şeker grubu ile bir araya gelmesiyle oluşan glikozit ve glikozit olmayan formda bulunurlar. Glikozitleşme ya eter bağı ile (O-glikozitleri) ya da karbon bağları arasında (C-glikozitleri) olur. Bu glikozitler özellikle vakuol ve apoplast gibi hidrofilik bölgelerde yer alırlar (McCullure, 1975; Wollenweber ve Dietz, 1981). C-glikozitleri asit hidrolizine karşı O-glikozitlerinden daha dayanıklıdır. Glikozit yapısında olmayan ve şekerin bağlandığı kısma aglikon veya genin adı verilir (Hanson, 2003). Glikozitlerin farmokodinamik etkisi aglikondan kaynaklanır. Glikozitler suda çözünürken, aglikonlar alkolde bile zor çözünürler. Doğal yolla oluşan flavonoidlerin çoğu aglikon formundan ziyade glikozit formda bulunurlar. Fakat aralarında kateşin gibi doğada glikozit formda bulunmayan flavonoidler de vardır (Okushio vd., 1996). Her bir aglikon çeşitli glikozit kombinasyonları şeklinde bitkilerde bulunabilir. Flavonoidlere bağlı 80 farklı şeker bulunmuştur. En çok görülen flavonoid glikozitleri; D-glukoz, D-galaktoz ve L-ramnoz'dur (Halfon, 2005). Glikozitler genellikle hücre içinde bulunurlar. *Tanacetum* türlerinde flavonoidler çoğunlukla metil esterleri şeklinde görülürler (Gören vd., 2002).

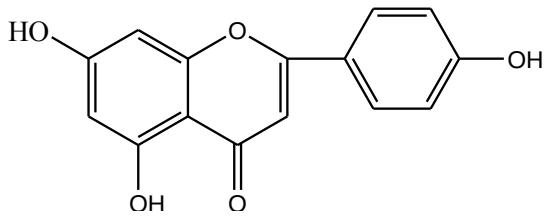
Genelde en fazla görülen flavonoid türleri flavonlar ve flavonollerdir. Neredeyse bütün bitkilerin yaprak ya da çiçeklerinde glikozit şeklinde bulunurlar ve sınıflandırmada önemli taksonomik belirteç görevi görürler. En çok görülen flavonol aglikonlar; kamferol, kersetin ve mirisetin; flavon aglikonlar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



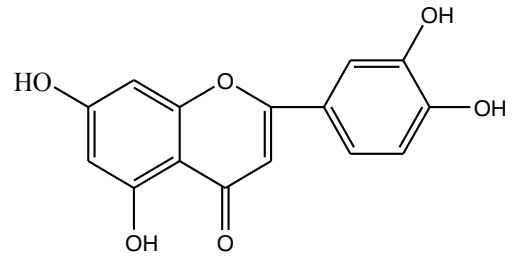
Kamferol



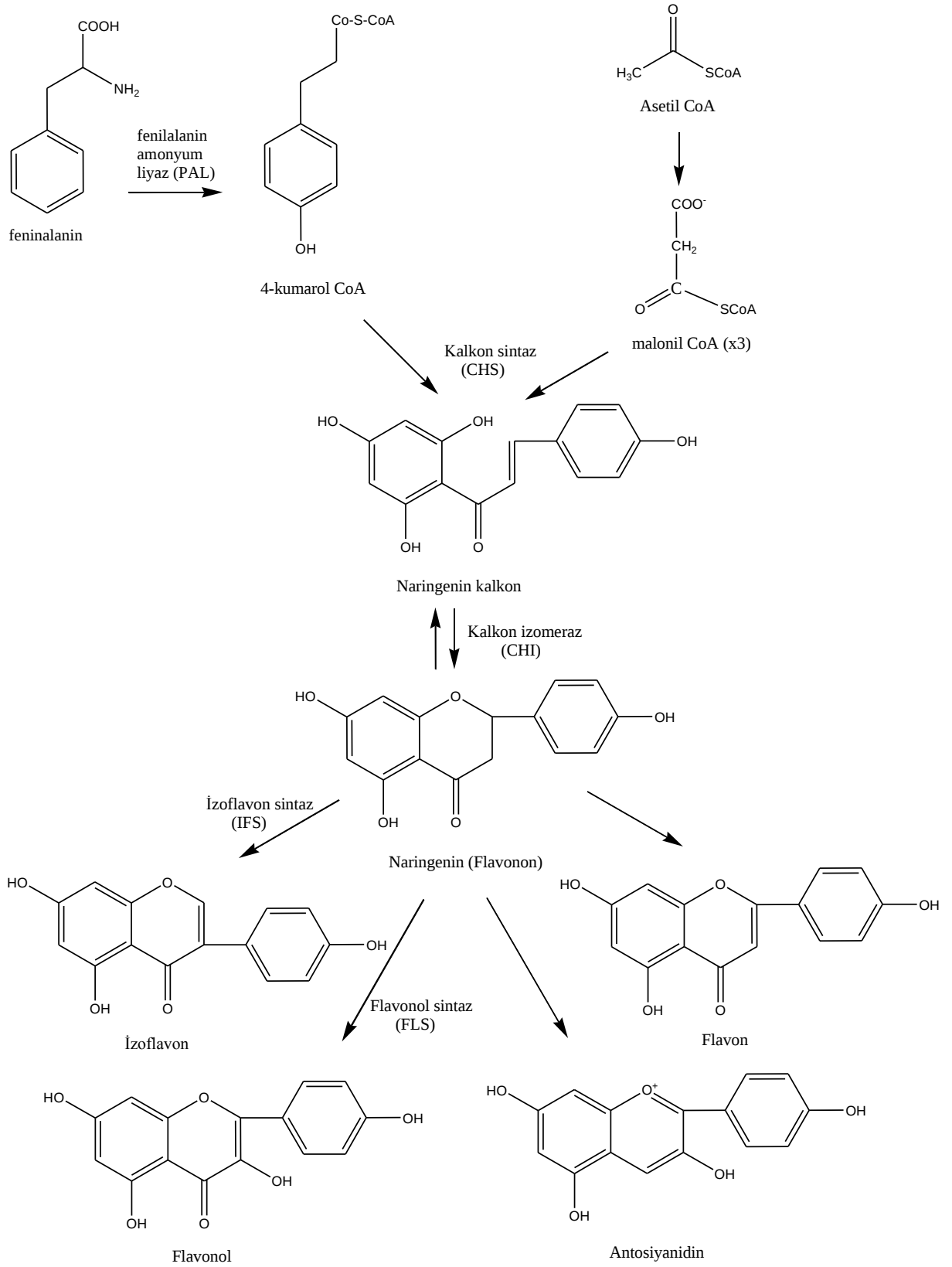
Mirisetin



Apigenin



Luteolin



Şekil 3.3 Flavonoidlerin biyosentez yolu (Burbulis ve Brenda, 1999; Halfon, 2005)

3.1 Flavonoidlerin Yapı Tayini

Flavonoidlerin yapısı çeşitli spektral yöntemler (UV spektroskopisi, 1,2 boyutlu NMR spektroskopisi) ve kimyasal reaksiyonlar ile belirlenir.

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

1.) Demir klorür/potasyum ferri siyanür çözeltisi ve Folin-ciocalteu ayırıcı püskürtülerek UV ışık altında donuk kırmızı bir renk görüldükten sonra amonyak buharına tutularak mavi renk görülmesi (İnce ve Filazi, 2009).

2.) Bileşikte eğer 5-OH serbest ise, İTK' da flavonoid spotu UV ışık altında herhangi bir belirteç püskürtmeden sarı, 3-OH serbest değilse mor renkte görünür. 5-OH grubu hiç yoksa ya da 5-OR şeklindeyse mavi ya da yeşilimsi mavi bir renk verir. Bütün fenolik asitler ve kumarinler UV ışıktaki mavi renkte görünürler.

3.) 5-OH grubunun serbest olması halinde, İTK' da spot üzerine herhangi bir belirteç püskürtülmeksizin NH₃ buharına tutulduğunda mor renk vermesi 4'-OH grubunun serbest olmadığını gösterir.

4.) 3'-OH grubunun olmadığı 4'-OH grubunun serbest ve 6-OH grubunun yapıda olması halinde UV ışık altında yine mor renk gözlemlenir ve NH₃ buharına tutulduğunda renkte herhangi bir değişiklik meydana getirmez. NA (Naturestoff Reagent) belirteci püskürtüldüğünde, eğer renkte bir değişiklik olmazsa yapıda 4'-OH, kırmızı-turuncu bir renk görülmesi halinde de 3' ve 4' konumlarında OH grubu olduğu anlaşılır.

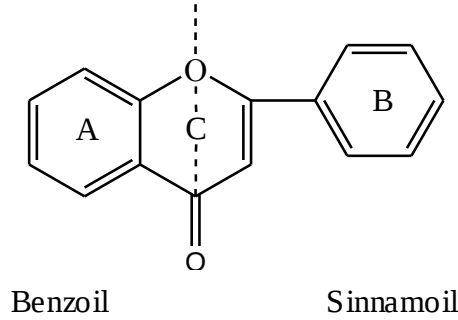
5.) 4'-OH grubu serbest ise, plakta mor renk gözlenir. Plaktaki spot NH₃ buharına tutulduğunda renk sarıya dönüşür, daha sonra NA belirteci ile de renkte herhangi bir değişiklik görülmez.

6.) Eğer yapıda 3' ve 4'-OH grupları serbest ise silika jel plakta görülen mor renk NH₃ buharı ile sarıya, NA belirteci ile turuncuya dönüşür. 3',4',5'-OH gruplarının varlığında görülen mor renk NH₃ buharı ile yine mor, NA belirteci ile turuncu-kırmızı bir renge dönüşür.

7.) 3 konumunda O varsa; UV ışık altında sarı, NH₃ buharı ile yine sarı, NA belirteci ile turuncu-kırmızı olur (Gören N. ders notları).

Flavonoidlerin elde edilmesi ve saflaştırılmasında kromatografik yöntemlerden kolon kromatografisi, kağıt kromatografisi, ince tabaka kromatografisi, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi gibi teknikler kullanılır.

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



Çeşitli reaktiflerin kullanılmasıyla spekturumda meydana gelen kayma değerleri yapıdaki hidroksil gruplarının ve süstitüentlerin konumları hakkında bilgi verir. Bu reaktifler NaOMe, NaOAc, NaOAc + H₃BO₃, AlCl₃, AlCl₃ + HCl' tir. Örneğin önce MeOH' de spekturumu alınır daha sonra bu solüsyona reaktif ilave edilerek bantların ayrı ayrı kayma değerleri ölçülüp, yorum yapılır.

Flavonoidlerin yapılarının belirlenmesinde UV spektroskopisi ve NMR sonuçları birlikte değerlendirilmelidir. Genellikle yapıda proton pikleri ¹H NMR spektrumunda kolaylıkla fark edilebilir. C halkasındaki protonlar flavonoidin iskelet yapısı hakkında bilgi verir.

A halkası protonları genelde 6.0-6.5 ppm arasında gözlemlenir. 5, 7 pozisyonları süstitüe ise C-6 ve C-8 protonları 6.0-6.5 ppm arasında 2.5 Hz' lik iki ayrı dublet verir.

B halkası protonlarına ait pikler sinnamoil konjugasyonu nedeni ile A halkası protonlarından daha aşağı alanda (6.7-7.9 ppm) sinyal verirler. 2', 6' protonları C halkasının oksidasyon derecesinden, 3', 5' protonları ise C- 4' konumunda olabilecek oksijen gruplarından etkilenirler.

Bu nedenle 3' ve 5' protonları 6.65-7.1 ppm' de, 2' ve 6' protonları ise daha aşağı alanda (7.10-8.10 ppm) sinyal verirler. Oksijen grupları –OH, -CH₃ ya da O-glikozit şeklinde olabilirler.

C halkasında C-3 protonu 6.3 ppm civarında bazı durumlarda A-halkası protonlarının verdiği sinyallerle üst üste gelen keskin bir singlet verir.

5-OH grubu karbonil grubu ile hidrojen bağı yaptığından 12-13 ppm civarında görülür.

Fenolik protonlar 10-12 ppm arasında sinyal verirler. Solüsyona birkaç damla D₂O damlatılarak tekrar NMR spektrumu alındığında bu sinyallerin kaybolması yapının hidroksil gruplarına sahip olduğunu gösterir. Aromatik metoksi protonları 3.50-4.10 ppm arasında, asetil protonları 2.25-2.50 ppm arasında sinyal verirler.

3.2 Flavonoidlerin Doğadaki Önemi

Yapılan araştırmalar flavonoidlerin en önemli özelliklerinin antioksidan etkiye sahip olduklarını ortaya koymuştur. Özellikle flavonlar ve kateşinler vücudu reaktif oksijen türlerine karşı koruyan en güçlü yapılardır (Groot ve Grace, 1994).

Serbest radikaller ve antioksidanlar insan sağlığı açısından büyük öneme sahiptirler. Besinlerle dışarıdan çeşitli antioksidanlar alınmakta olup, bunların başlıcaları antioksidan vitaminler ve flavonoidlerdir. Son yıllarda çok sayıda önemli antioksidan flavonoid keşfedilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır. Flavonoidlerin en önemli kaynağı ise başta çay olmak üzere baharatlar, çeşitli sebze ve meyvelerdir. Antioksidan içeriği yüksek olan gıdalar kanser, *Diabetes mellitus* (şeker hastalığı), yaşlanma, kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıkları da kapsayan bir grup hastalığa karşı koruma sağlar (Mehmetoğlu vd., 2005).

Flavonoidler serbest radikallerin neden oldukları zararı bir şekilde onarabilmektedir. Reaktif bir bileşikteki serbest radikalle reaksiyona girerek reaktif oksijen türlerini stabilize eder. Hidroksil gruplarının reaktif özelliklerinin yüksek olmasıyla radikaller inaktif hale gelir (Korkina, 1997).



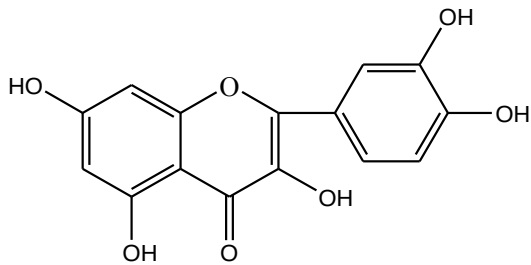
Bu reaksiyon ile LDL (low density lipoprotein) tanecikleri korunarak ateroskleroz (damar sertliği)' a karşı koruma sağlanmış olur (Shoskes, 1998).

Vasküler (damarlı) bitkilerde bulunan flavonoidlerin, 6400' den fazla farklı yapısı aydınlatılmış olup (Harborne ve Baxter 1999), bitkilerde taç yaprak ve meyvelerin renk oluşumunda etken maddelerden biri olması (Tanaka, 2006), UV ve çeşitli zararlılara karşı bitkiyi koruması, otçul hayvanlara karşı tiksindirici özelliğinin yanında, insanlarda antioksidan (Fahrnnan ve Volkova, 2002), antikanser, östrojenik, antifungal, antiviral (Cardenas vd., 2006), antibakteriyal (Trovato ve Monforte, 2000) ve son yıllarda yapılan araştırmalarda elde edilen sonuçlara göre kalp hastalıklarına karşı da olumlu etkilere sahip oldukları kanıtlanmıştır.

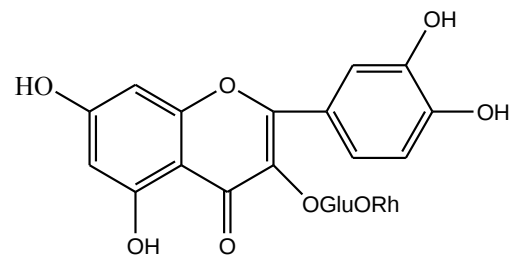
Yapılan araştırmalarda *Theobroma cacao*' dan elde edilen siyah çikolatada yüksek oranda flavonoid bulunduğu ve kolesterol düşürücü bir etki gösterdiği belirtilmiştir (Vinson vd., 1999; Adamson vd., 1999).

Knekt vd.' nin 24 yıl süren ve 9959 erkek ve kadın üzerine yaptıkları araştırma sonuçlarına göre, flavonoid içeren (ör:kersetin) gıdaların akciğer kanseri üzerinde olumlu bir etkisi olduğu belirtilmiştir (Knekt vd., 1997). Daha önceki yıllarda yapılan ve flavonoid içeren gıdaların kanserojen etki gösterdiği yönündeki iddialar da çürütülmüş, flavonoidlerin kanserli ya da ölü hücrelere etki ettiği, sağlıklı hücrelere zarar vermediği açıklanmıştır. Ayrıca kersetin ve apigenin' in farelerde melonoma hücrelerinin büyümesini, yayılmasını ve metastaz oluşturmasını engellediği belirtilmiştir (Caltagirone vd., 2000).

Rutin ve türevleri hemoroid, varis ve diğer kılcal damar hastalıklarına karşı ilaç olarak kullanılmakta ve bu nedenle İsviçre tonlarca *Sophora japonica* bitkisini Hindistan' dan ithal etmektedir (Halfon, 2005).



Kersetin



Rutin

İngilizlerin yaptığı bir araştırmada ise çaydaki flavonoidlerin osteoporoz (kemik erimesi)' u önlediği gözlemlenmiştir (Hegarty vd., 2000). Bazı çalışmalarda farklı flavonoid türlerinin Parkinson ve Alzheimer hastalığına karşı da olumlu etkileri olduğunu gösterilmiştir (Youdin ve Joseph, 2001).

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

Flavonoidlerin virüsler üzerinde de etkili olduğu belirtilmektedir. Bunlar *Herpes simplex* (uçuk virüsü), rs virüs, parainfluenza virüsü ve adenovirüstür. Flavonoidlerin bazıları virüslere replikasyon sırasında etki etmekte, bazıları da direk olarak infeksiyöz etkilerini inhibe etmektedir. Sayısı fazla olmamakla birlikte bazı kanıtlar virüsler üzerinde flavonoidlerin glikon formlarının aglikon formlarından daha çok etkili olduğunu göstermektedir (Bae vd., 2000).

Hollanda' da besinlerden alınan günlük flavonoid miktarının yaklaşık 23 mg olduğu tahmin edilmektedir. Bunların çoğu E vitamini ve β -karotenden alınır. Ülkeden ülkeye farklılık göstermekle birlikte en düşük tüketim Finlandiya' da (~ 2.6 mg), en fazla tüketim ise Japonya' dadır (68.2 mg) (Hertog vd., 1995; Friesenecker vd., 1994; Haenen ve Bast, 1999). Flavonoidler arasında genel olarak en fazla tüketilen çeşit ise elma ve soğanda bulunan kersetin' dir (Knekt vd., 1997).

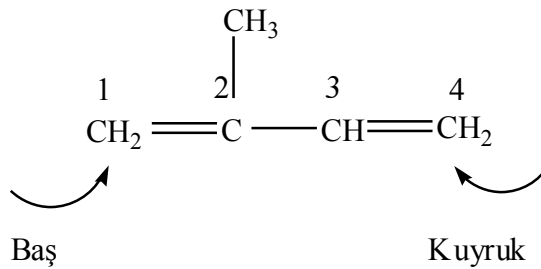
Birçok faydalı özelliğe sahip olan flavonoidler ile *in vivo* yapılan çalışmalar gelecek için çok umut verici olmakla birlikte, bu bileşikleri içeren gıdaların günlük ne kadar tüketilmesi gerektiği konusunda kesin bir ifade yoktur.

Flavonoidlerin bitkiler üzerinde de önemli görevleri vardır. Renk verici özellikleri sayesinde kuşlar ve böcekler tarafından çekici hale gelmekte ve bu sayede tozlaşmaya yardımcı olmaktadırlar. Kuşlar doğal renk maddesi antosiyanin içeren kırmızı-turuncu renkleri seçerken, tozlaşmayı sağlayan diğer canlılar flavon, flavonol, kalkon ve orondan ötürü sarı renkte olan çiçekleri tercih ederler. Lökoantosiyanidin, kateşin ve proantosiyanidinlerin öncül maddesi olup, bitkiye direnç sağlar (Martensa vd., 2002). Antosiyaninlerin tozlaşmaya etkilerinin dışında, tohumların yayılmasında, UV ışığa ve patojen saldırılarına karşı bitkiyi koruma gibi görevleri de vardır (Lee, 2002). Ayrıca oksinlere karşı gösterilen tepkilerde ve gibberellinlerin antagonisti olarak önemli rol oynadıkları saptanmıştır (Heidin ve Waage, 1986; Jacobs ve Rubery, 1988).

4. TERPENLER

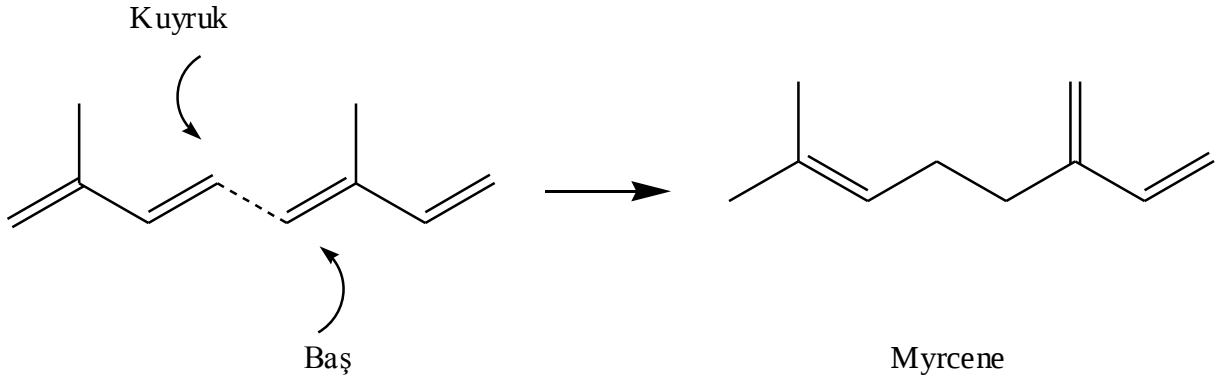
“Terpen” sözcüğü çam ağaçlarının reçinesi olarak adlandırılan yapışkan madde terebentin (*Balsamum terebinthinae*)’ den türemiştir (Breitmaier, 2006). Terpenler bitkilerden izole edilen doğal bileşikler arasında ilk sırada yer alan sayıları yaklaşık 30.000 civarında olan organik moleküllerdir. Doğal bileşikler arasında en fazla çeşitlilik gösteren bu moleküller, sardunya, okaliptus, gül, çam ağaçları, nane, biberiye, adaçayı gibi bitkilerin hoş kokularında; havuç ve domates gibi bitkilerin ise renk pigmentlerinde bulunurlar. İlk çağlarda buhar distilasyonu yolu ile izole edilen uçucu terpenlerin günümüzde parfüm, ilaç, gıda, kozmetik ve dezenfektan gibi farklı alanlarda endüstriyel üretimleri vardır. Yalnızca hidrokarbon içeren terpenlerin yanı sıra, oksijen, alkol, keton, aldehit, asit grubu taşıyan ya da proteinlerle birleşmiş halde olan terpenler de bulunmaktadır. Yapısında oksijen bulunan terpenler terpenoidler olarak adlandırılırlar (Yurkanis, 1998).

Bütün terpenler izopren adı verilen birimlerden oluşurlar. *İzopren kuralı* adı verilen bu görüş ilk defa 1887 yılında alman kimyacı Otto Wallach tarafından öne sürülmüş ve terpenler üzerindeki çalışmalarıyla 1910 yılında Nobel Kimya ödülünü kazanmıştır. Bu kurala göre terpenler beş karbon atomundan oluşan iskelet yapısına sahip izopren (2-metil-1,3-butadien) moleküllerinin 2,3,4 ya da fazla sayıda baş-kuyruk şeklinde bir araya gelmesiyle meydana gelir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 İzopren (2-metil-1,3-butadien) molekülü

Bu kurala göre izopren molekülündeki 1 nolu karbon (dallanmış taraftaki) baş olarak; 4 nolu karbon atomu (dallanmamış taraf) ise kuyruk olarak adlandırılır. Örneğin myrcene iki izopren biriminin baş-kuyruk kondenzasyonu ile oluşmuştur (Yeşilada ve Ezer, 1996) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Myrcene molekülünün oluşumu

Daha sonra Leopold Ruzicka “İzopren Kuralı” hipotezinden yola çıkarak “İzopren Biyolojik Kuralı” hipotezini oluşturmuştur. Bu çalışmaya göre terpenoidler izopren grupları tarafından oluşturulan öncül gruplar üzerinden sentezlenmektedir. Bu çalışmasıyla Ruzicka 1939 yılında Nobel ödülü kazanmıştır. Ancak yapılan çalışmalar aralarında Compositae familyasında olduğu bazı gruplarda terpenik bileşiklerin bu kuraldan farklı şekillerde de birleşebileceklerini göstermiştir (Dewick, 2001).

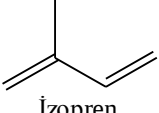
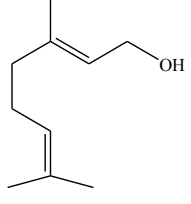
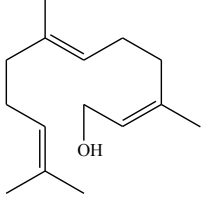
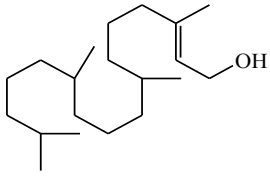
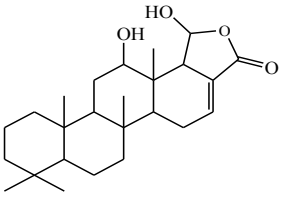
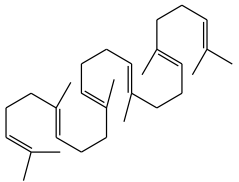
4.1 Terpenlerin Sınıflandırılması

Terpenler içerdikleri izopren birimleri dolayısıyla sahip oldukları karbon sayısına göre sınıflandırılırlar. Çizelge 4.1.1’ de verilen terpenlerin dışında 9 karbonlu kripton monoterpen, 13 karbonlu β -iyonon seskiterpen, 18 karbonlu trisporik asit karotenoid, ubikinon, α -tokoferol (E vitamini) ve K₁ vitamini ise meroterpenoid türü bileşiklere örnektir (Halfon, 2005).

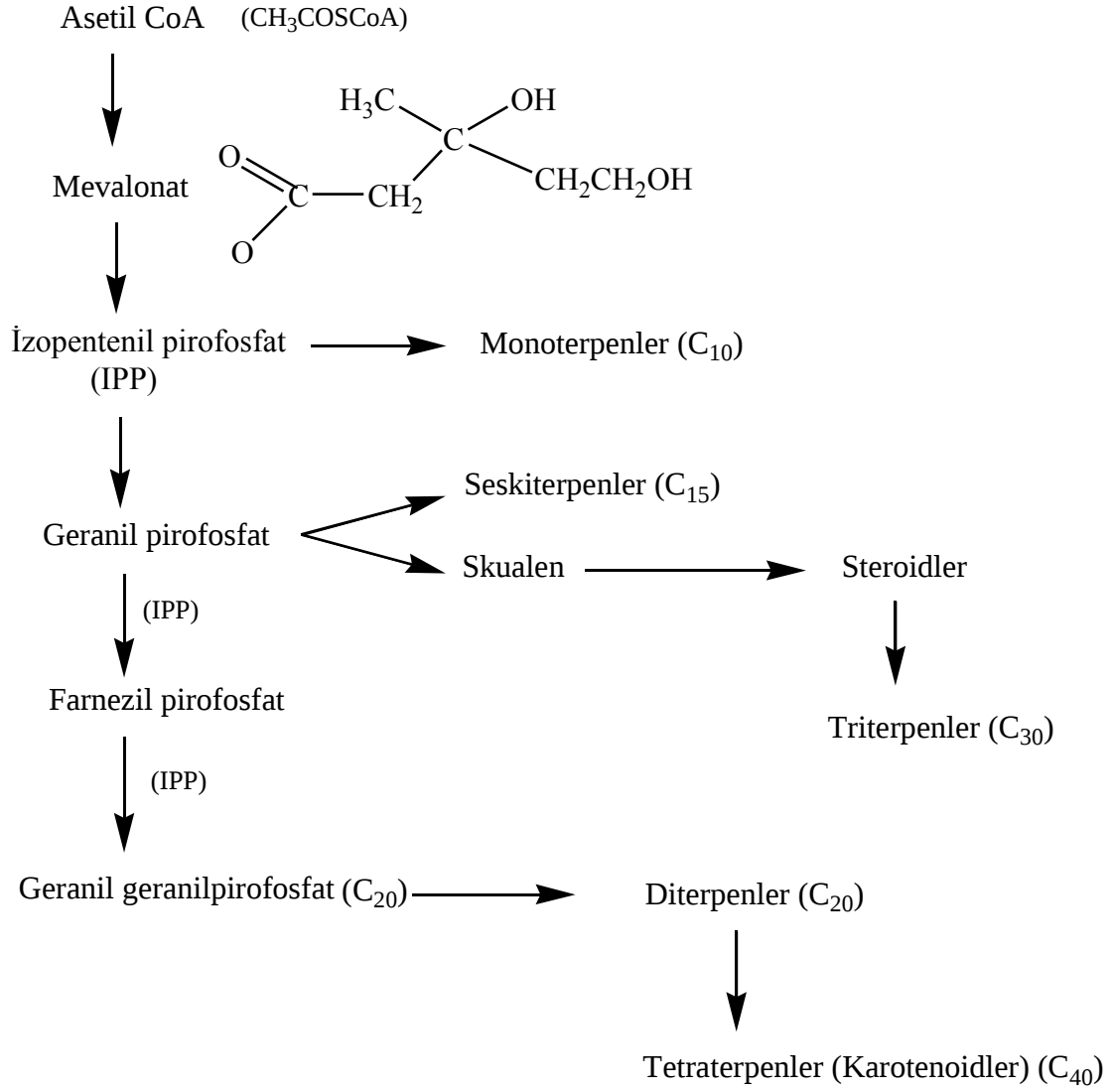
Mono ve seskiterpenler genellikle bitkilerde bulunurken, daha yüksek yapıli terpenler hem bitki hem de hayvanlarda bulunurlar. Örneğin köpekbalığı karaciğer yağının başlıca içeriği, steroid ve hormonların yapımında ana madde olan skualen açık zincirli bir triterpen, havuçta bulunan ve A vitamininin ön maddesi olan β -karoten ise tetraterpendir (Tabata vd., 1988).

Terpenler hemen hemen bütün bitkilerde bulunan doğal bileşiklerdir. Genellikle yüksek yapıli bitkilerin kök, yaprak, tohum, çiçek gibi kısımlarında ayrıca bazı liken ve yosun türlerinde de bulunmaktadır.

Çizelge 4.1.1 Terpenlerin sınıflandırılması

İzopren sayısı	Karbon sayısı	Sınıf	Örnek Yapı
1	C ₅	Hemiterpen (C ₅ H ₈)	 İzopren
2	C ₁₀	Monoterpen (C ₁₀ H ₁₆)	 geraniol
3	C ₁₅	Seskitерpen (C ₁₅ H ₂₄)	 farnesol
4	C ₂₀	Diterpen (C ₂₀ H ₃₂)	 fitol
5	C ₂₅	Sesterpen (C ₂₅ H ₄₀)	 skalerin
6	C ₃₀	Triterpen (C ₃₀ H ₄₈)	 skualen

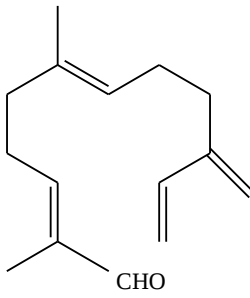
C₅, C₁₀, ve C₁₅ birimlerinin farklı şekillerde bir araya gelmeleriyle daha yüksek yapılı terpenoid bileşikler oluşur (Şekil 4.1.1).



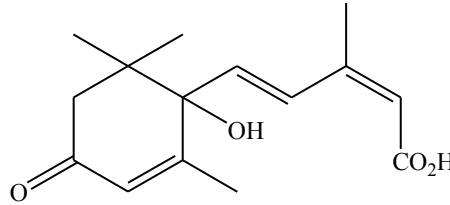
Şekil 4.1.1 Terpeneoid çeşitlerinin biyosentez yolu (Halfon, 2005)

4.2 Seskiterpenler

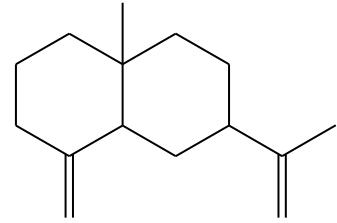
Seskiterpenler monoterpenlerin yapı taşı olan geranil piro fosfat molekülü ile izopentenil piro fosfat molekülünün kondenzasyonu sonucu meydana gelirler. Bitkideki uçucu yağ bileşenlerinden biri olan seskiterpenlerin kaynama noktaları 200 °C' den fazladır. Bugün uçucu yağlarda 1000 kadar seskiterpen türevi yapılar bulunmaktadır (Umay, 2007). Karbon iskeletlerine göre asiklik, monosiklik, bisiklik ya da trisiklik yapısında olabilirler.



Sinesal (asiklik)



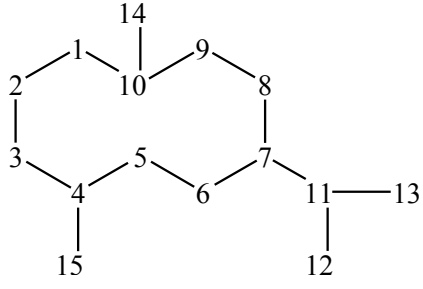
Absisik asit (monosiklik)



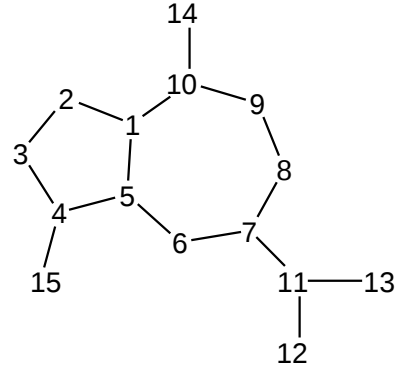
β -selinen (bisiklik)

Şekil 4.2.1 Bazı seskiterpen bileşikleri

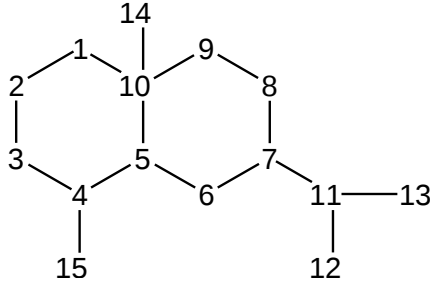
Seskiterpen laktonlar doğal bileşikler içinde en büyük sınıfı oluştururlar. Genellikle yaprak ve çiçeklerden izole edilen bu bileşikler, özellikle Compositae familyasında oldukça yaygın olarak bulunurlar. Ülkemizde bu familyaya ait *Tanacetum* ve *Inula* türlerinde birçok araştırma yapılmıştır (Topçu, 1995; Ulubelen, 1994). Genellikle Compositae familyasında görülen seskiterpen laktonlar yapısal olarak temel iskelet yapılarının haricinde hidroksil, ester, karboksilik asit ve benzeri grupların da yapıya bağlı olması nedeniyle çok çeşitli kimyasal yapılara sahiptirler. Sahip oldukları biyolojik aktiviteleri ile dikkati çeken seskiterpen laktonlar Compositae familyasında kemosentetik iz olarak kullanılmaktadırlar (Gören vd., 2002). Seskiterpen laktonlar farklı iskelet yapılarına sahiptirler. Sınıflandırma karbosiklik iskeletlerine ve lakton fonksiyonuna göre yapılır. En çok görülen seskiterpen yapıları şekil 4.2.2' de verilmektedir.



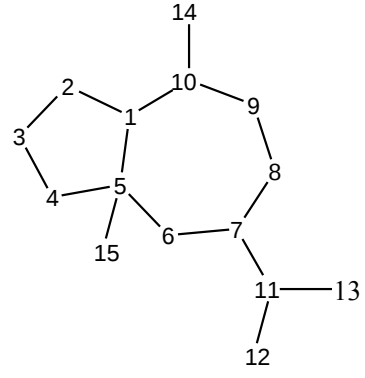
Germakran



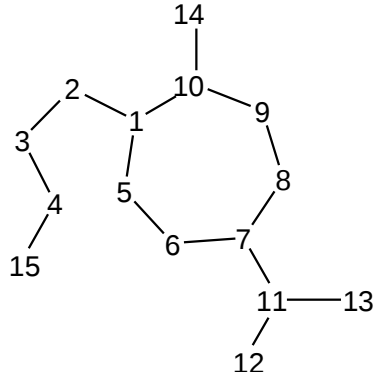
Gayanan



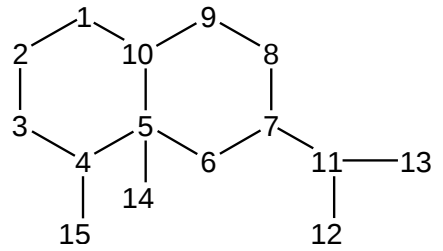
Ödesman



Pseudogayanan



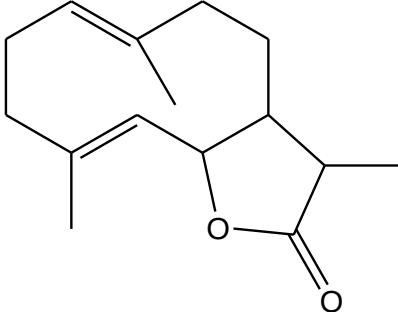
Ksantan



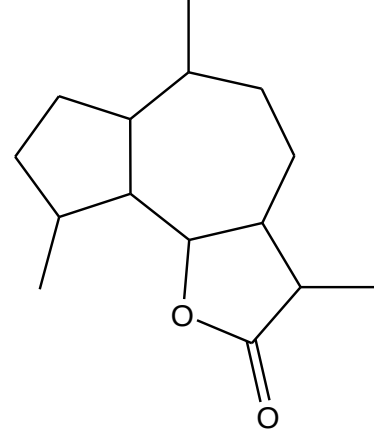
Eremofilan

Şekil 4.2.2 En çok görülen seskiterpen iskelet yapıları

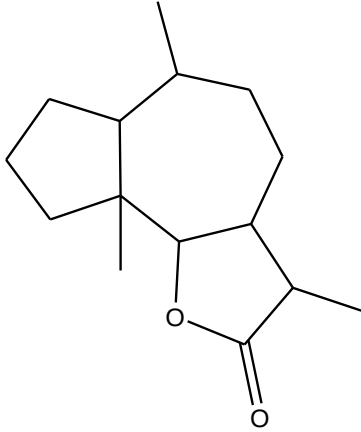
Temel iskelet yapısına lakton halkasının bağlanmasıyla farklı seskiterpen lakton türevleri meydana gelir. Çoğunlukla karşılaşılanlar ise; germakranolid, gayanolid, pseudogayanolid, ödesmanolid tipi yapılarıdır.



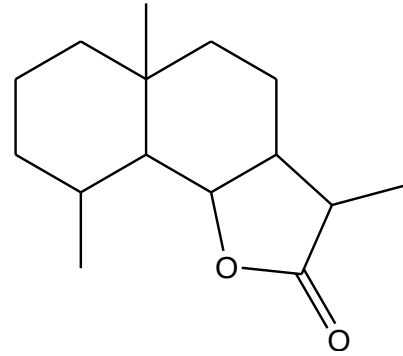
Germakranolid



Gayanolid



Pseudogayanolid



Ödesmanolid

Şekil 4.2.3 En çok görülen seskiterpen lakton iskelet yapıları

Seskiterten laktonlar; kolon kromatografisi, preparatif ince tabaka kromatografisi, HPLC ve ince tabaka kromatografisi gibi yöntemlerle elde edilebilirler. Yapılarını aydınlatmak için ^1H NMR, ^{13}C NMR, COSY, APT, HMBC, HMQC, IR gibi spektroskopik yöntemler kullanılır.

Seskiterten laktonlar ^1H NMR spektrumunda 0.00-2.00 ppm arasında karakteristik pikler verirler ve bu pikler H-13, H-14, H-15 protonlarına ait olan metil pikleridir. Moleküler çevresine bağlı olarak kimyasal kaymalar gözlenebilir. Metilen pikleri komşu grupların türüne göre 1.5-4.00 ppm arasında, doymamışlık pikleri ise 4.00-7.00 ppm arasında gözlemlenebilir (Gören, 1978). Lakton halkasına ait pikler 4.00 ppm civarında gözlenirken halkadaki kapanma C-6, C-7 ya da C-7, C-8 konumlarından gerçekleşebilir. Bu durum taksonomik bir fark yaratmaz, aynı bitkide iki ayrı yapı gözlemlenebilir (Halfon, 2005).

4.3 Terpenlerin Doğadaki Önemi

Doğal bileşiklerin en büyük sınıfını oluşturan terpenoid bileşikler gerek çeşitlilikleri gerekse farklı yapılarından dolayı biyolojik olarak oldukça önemli yapılardır. Her ne kadar biyolojik ve ekokimyasal fonksiyonları tam olarak belirlenmemiş olsa da; birçok bitki kendilerini böcek saldırılarına karşı korumak amacıyla uçucu terpenleri üretirler. Bazı bitkiler ise daha az uçucu fakat acı ve toksik etkiye sahip terpenleri yine hayvan saldırılarına karşı savunma olarak üretirler. Bu özelliklerin haricinde terpenler bitki büyüme hormonlarında (gibberellin, absisik asit), fitosentetik pigmentlerde (fitol, karotenoid), elektron taşıyıcılarında (ubikinon, plastokinon), polisakkarit döngüsünde ara molekül şeklinde (polifenil fosfat) bulunabilir ve hücre zarının yapısal bileşiklerinde (fitosterol) yer alan önemli moleküllerdir (Harborne, 1991). Terpen üreten bitkilerle beslenen bazı böcekler ise bu molekülleri metabolize ederek kendi büyüme hormonları ve feromonlarının yapılarına katarlar (Weinheim, 2006).

Bitkilerde doku yaralanmalarında terpenoid mekanizması oldukça etkilidir (Kuc' ve Lisker, 1978). Patates üzerinde yapılan bir çalışma dokuda bir yaralanma olduğu anda karbondioksit çıkışının başladığını ve solunumun arttığını ortaya koymuştur (Kahl, 1974). Bu özelliklerin de terpenoid sentezini başlattığı belirtilmektedir. Terpenoidlerin her ne kadar zarar görmüş dokuları enfeksiyona ve çürümeye karşı koruduğu bilinse de bu teori henüz tamamen kanıtlanmış değildir (Compton ve Preece, 1986; Ellialtıoğlu, 1994).

Bitkilerin kendilerine has olan uçucu kokuları uçucu yağlar olarak adlandırılır ve bu doğal bileşikler esas olarak terpenik yapıları içerirler. Bu yağlar endüstride parfüm, tatlandırıcı ve baharat yapımında kullanılmaktadır. Lilyumun kokusunda farnesol, portakalın tadında β -sinesal gibi seskiterpenler bulunur. Bir seskiterpen asiti olan absisik asit ise bitkide sonbahar aylarında dormansiye (tohumun çimlenmesine kadar geçen süre) başlatan ve kuraklık gibi durumlarda solunumu yavaşlatmakla görevli temel hormonlardan biridir.

Bir monoterpen olan ve *Mentha arvensis* bitkisinden elde edilen mentol, lokal anestezik ve rahatlatıcı etkiye sahiptir. Ayrıca tatlandırıcı olarak da gıda endüstrisinde ve diş macunlarında kullanılmaktadır. *Cinnamomum camphora* bitkisinden elde edilen kamfor ise eski çağlarda soğuk algınlığı gibi durumlarda kişiyi rahatlatmak için göğüs bölgesini ovalayarak kullanılmış, günümüzde ise anestezik olarak ve giysileri güvelere karşı korumak amacıyla kullanılmaktadır (Hanson, 2003).

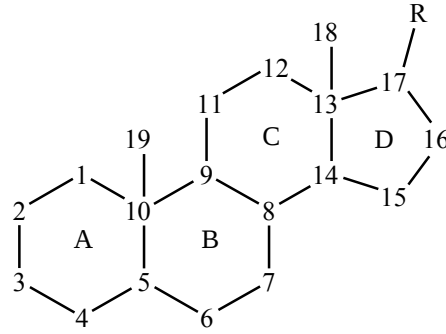
Seskiterpenler laktonlar antibakteriyel, antifungal, antitümör, antihelmintik, sitotoksik, diüretik (idrar söktürücü), ekspektoran (balgam söktürücü), kan basıncını düşürücü, fitotoksik ve analjezik etki gibi birçok biyolojik etkiye sahiptir (Burim vd., 1999). *Artemisia maritima*’ dan elde edilen santonin, Uzak Doğu’ da bağırsak solucanlarına karşı tedavi amaçla kullanılmıştır. Çin’ de üretilen ve *Artemisia annua*’ dan elde edilen artemisin ihtiva eden Qing Hao Su türevi ilaçlar ise Dünya Sağlık Örgütü tarafından sıtmaya karşı önerilmektedir. Bu bileşik içerdiği farklı bir peroksit nedeniyle biyolojik aktivite göstermektedir (Hanson, 2003).

Doğal ürünler içerisinde en fazla biyolojik aktivite siklik diterpenlerde görülür. Bitki büyüme hormonlarından biri olan diterpenik yapıdaki gibberellik asit bira endüstrisinde maltlama safhasında ve nişastayı hidrolize eden enzim olan α -amilazın üretimini düzenlemede kullanılır. Ayrıca çekirdeksiz üzüm üretiminde de kullanılmaktadır. *Stevia rebaudiana* bitkisinden elde edilen steviol, bazı ülkelerde düşük kalorili içecek yapımında kullanılır. Antitümör aktivite gösteren diterpenlerden taxol, porsuk ağacı *Taxus brevifolia*’ dan elde edilir, göğüs ve yumurtalık kanserine karşı güçlü bir etkisi vardır (Hanson, 2003). *Salvia* türlerinden elde edilen diterpenler, hematolojik anomaliler, düşük, menstrual düzensizlikler, kalp rahatsızlıkları, hepatit ve ödem gibi durumlarda kullanılmıştır. Bunların haricinde diterpenler sitotoksik (Ginda vd., 1988), antibakteriyel, antifilojistik (iltihap önleyici) ve antitüberküler özellikleri ile geleneksel olarak kullanılır (Lin vd., 1989).

Uzak Doğu’ da 5000 yıldan fazla bir süredir kullanılan ginseng, *Panax ginseng* bitkisinin köklerinden izole edilmektedir ve glikozidik triterpen yapısındadır. Ginseng’in fiziksel denge ve vücudun metabolik işlevlerine olumlu etkileri vardır (Hanson, 2003). Ayrıca elma, armut gibi meyvelerin kabuklarında bulunan α - ve β -amirin türevi ursolik ve oleanolik asit meyveyi böcek saldırılarından ve mikrobiyal etkilerden korur (Harborne, 1976).

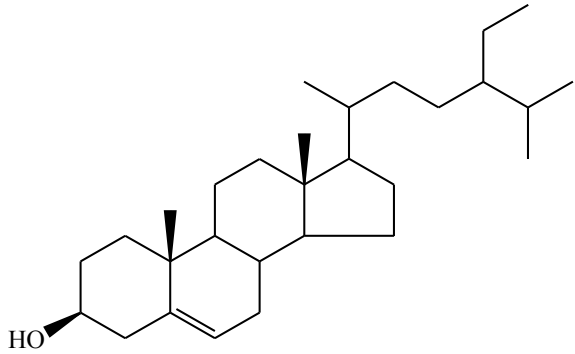
5. STEROİDLER

Tetrasiklik triterpenlerden türeyen steroidler çıklopentanoperhidrofenantren iskeletine sahip bileşiklerdir (Şekil 5.1). Bitki ve hayvanlarda yaygın olarak bulunan steroidler önemli biyolojik aktivitelere sahiptirler.

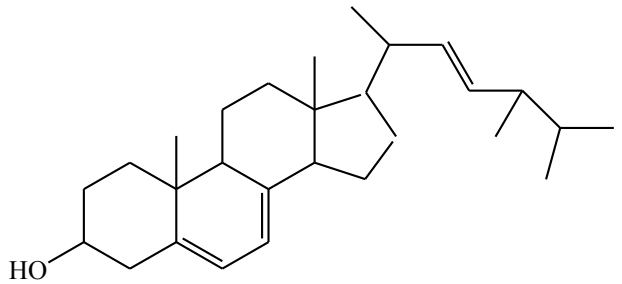


Şekil 5.1 Çıklopentanoperhidrofenantren

Yüksek yapılı bitkilerde fitosterol, sitosterol, stigmasterol, kampesterol; maya ve mantarlarda ergosterol; deniz canlıları ve alglerde fukosterol gibi steroidler bulunur.

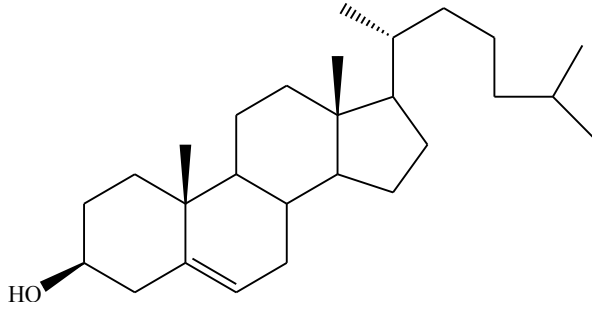


Sitosterol

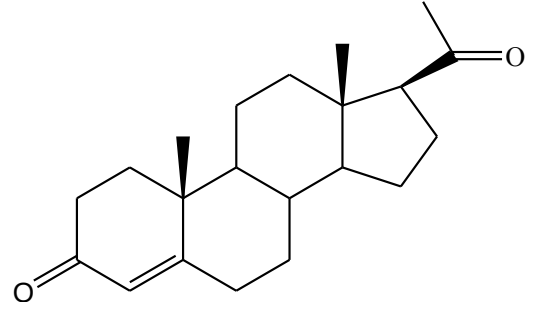


Ergosterol

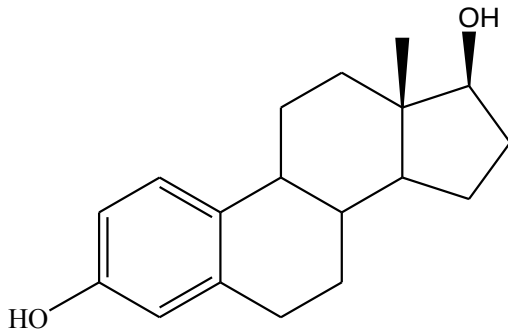
En çok bilinen ve sağlığımız açısından önemli bir yere sahip olan steroid ise kolesterol'dür. Ayrıca cinsiyet hormonları (progesteron, östrojen, androjen, testosteron), adrenal korteks hormonları (kortizon) ve D₂ (kalsiferol) vitamini de diğer önemli steroidal yapılarıdır (Hanson, 2003).



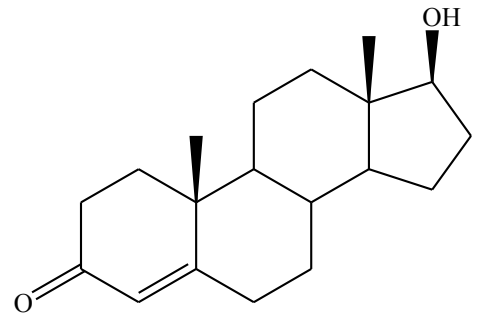
Kolesterol



Progesteron



Östrojen



Testosteron

Şekil 5.2 Bazı steroidal yapıları (Hanson, 2003)

6. DENEYSEL BÖLÜM

6.1 Materyal

Bu tez çalışmasında incelenen *Tanacetum kotschy* bitkisi 1999 yılında Prof. Dr. Nezhun Gören tarafından Van ilinin Güzeldere Geçit' inden toplanmıştır.

6.2 İzolasyon Yöntemleri

Saf maddelerin izolasyonunda kullanılan yöntemler alt başlıklar altında anlatılmıştır.

6.2.1 Ekstraksiyon

Toplanan *Tanacetum kotschy* bitkisi gölgede kurutulduktan sonra kök, gövde ve çiçeklerine ayrılmış, kök ve gövde kısımları ayrı ayrı, değirmende öğütülerek toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen kısımlar cam tanklara konularak sırasıyla hekzan, etil asetat (EA) ve metanol (MeOH) ile masere edilmişlerdir. Maserasyondan sonra sıvı kısım süzgeç kağıtından süzülerek alınmış ve organik çözücü evaporatörde uçurularak ham ekstratlar elde edilmiştir. Böylece 11.67 g Hekzan ekstresi, 19.29 g EA ekstresi, 16.53 g MeOH ekstresi elde edilmiş ve ekstratlar çalışmaya başlanılacağı güne kadar +4 °C' de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Bu tez çalışmasında bitkinin gövde etil asetat ekstresi ile çalışılmıştır.

6.2.2 Kromatografik Yöntemler

Çalışmamızda bitkiden elde edilen etil asetat (EA) ekstresindeki maddelerin izolasyonu ve saflaştırılması için kolon kromatografisi (CC), ince tabaka kromatografisi (TLC), yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC), orta basınçlı sıvı kromatografisi (MPLC) ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılmıştır.

6.2.2.1 Kolon Kromatografisi (CC)

Adsorbsiyon prensibine dayalı katı-sıvı kromatografi yöntemi olan bu teknik, saf madde izolasyonu için ekstreyi fraksiyonlara ayırmak için kullanılmıştır.

Kolon kromatografisinden önce ekstreden uzun zincirli hidrokarbonlar, yağlar ve vaksları uzaklaştırmak amacıyla 19.29 g olan gövde EA ekstresi 1 lt' lik balonda MeOH' de sıcak su banyosunda çalkalanarak çözülmüştür. Elde edilen çözelti buzdolabında (+4 °C) 1 gün bekletilmiştir. Ayrıca süzme işlemi için kullanmak üzere 1 lt MeOH de buzdolabında soğutulmuştur. MeOH' de bekletilen çözelti daha sonra amerikan bezinden süzölmüştür. Süzgeçteki çökelti soğutulan MeOH ile birkaç kez yıkanmıştır. Elde edilen çözeltiler birleştirilerek evaporatörde 40-50 °C' de 337 mbar basınçta uçurulmuştur. Bu şekilde doymuş hidrokarbonlarından kurtarılan ekstreye 1 gece vakum etüvünde bekletildikten sonra kolon kromatografisi uygulanmıştır.

Uygulama öncesi yeterli miktarda silika jel etüvde 100 °C' de 1 saat tutularak içindeki nemin uzaklaşması sağlanmıştır. Ekstre oda sıcaklığında MeOH' de çözölerek bir miktar silika jel HF₂₅₄ (Merck) ile karıştırılmış ve toz haline gelinceye kadar çözücü evaporatörde uçurulmuştur. Böylelikle ekstrenin silika jel tarafından emilmesi sağlanmıştır. Toz halindeki ekstre-silika jel karışımı vakumda 1 gece bekletilmiştir.

Boy 140 cm, çapı 5.5 cm olan cam kolona ilk olarak silika jel doldurulmuş ve vakum pompası yardımıyla kolon içine iyice sıkışması sağlanmıştır. Kolon içindeki silika jelin üst tabakası düzleştirildikten sonra silika jel ve ekstre karışımı kolona doldurulmuştur. Tekrar vakum pompası kullanılarak ikinci katmanında kolona düzgün bir şekilde yerleşmesi sağlanmıştır. Bu tabaka da düzleştirildikten sonra kolonun en üstüne cam pamuğu yerleştirilmiştir. Kolon kromatografisinde ayrımı yapılacak karışım önce ince tabaka kromatografisinde incelenmiş sonrasında, non-polar çözücünden polar çözücüye doğru gradient elüsyon yapılarak ayırım sağlanmıştır. Elüsyonda kullanılan çözücü karışımları ve fraksiyonlar sırasıyla verilmiştir.

Kolon Kromatografisi Fraksiyonları

- 1- % 100 Hekzan (1000 mL)
- 2- % 25 EA (250 mL) + % 75 Hekzan (750 mL)
- 3- % 50 EA (500 mL) + % 50 Hekzan (500 mL)
- 4- % 100 EA (1000 mL)
- 5- % 25 MeOH (250 mL) + % 75 EA (750 mL)
- 6- % 50 MeOH (500 mL) + % 50 EA (500 mL)
- 7- % 100 MeOH (1000 mL)

Kolon kromatografisi sonucunda elde edilen 26 fraksiyon cam balonlara alınmıştır. Yapılan ince tabaka kromatografisi çalışmaları sonucunda benzer olan fraksiyonlar birleştirilmiş ve 4 fraksiyon adı altında isimlendirilmiştir.

1. - 5. Fraksiyon $\Rightarrow$ Çalışılmadı

6. -8. Fraksiyon= TK 1 $\Rightarrow$ TK I

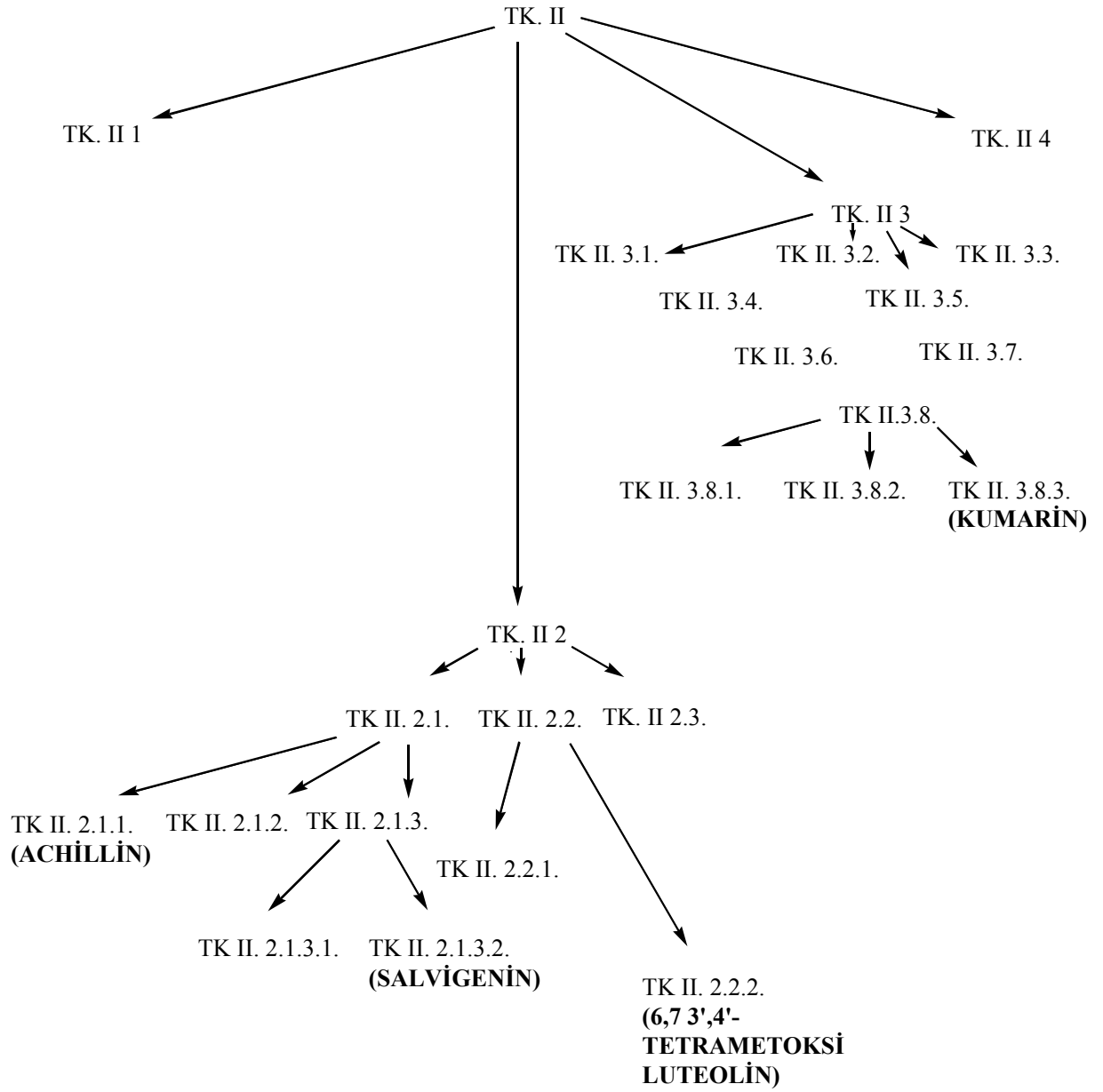
9.- 10. Fraksiyon= TK 2
11.- 18. Fraksiyon= TK 3
19.- 20. Fraksiyon= TK 4 } TK II

22. Fraksiyon = TK 5
23. Fraksiyon = TK 6 } TK III

24. Fraksiyon = TK 7
25. Fraksiyon = TK 8
26. Fraksiyon = TK 9 } TK IV

olarak adlandırılmıştır (TK= *Tanacetum kotschy*).

TK II [9 CHCl₃: 1 Eter] sisteminde preparatif ince tabaka kromatografisi yapılarak 4 gruba ayrılmıştır. TK II.1, TK II.2, TK II.3, TK II.4 şeklinde isimlendirilmiştir. Yapılan ince tabaka kromatografisi sonuçlarına göre öncelikle TK II.2 ile çalışılmaya başlanmıştır. [7 Tol: 3 EA] sisteminde 3 bant görülmüştür. Bunlardan ilkine HPLC uygulanmış ve aynı şekilde 3 ayrı fraksiyon elde edilmiştir. Birinci fraksiyondan bir seskiterpen lakton bileşiği olan achillin elde edilmiştir (22.7 mg). 3. banttan elde edilen karışım [8 CHCl₃ : 2 Eter] sisteminde HPTLC ile ayrılmış ve bir flavonoid olan salvigenin elde edilmiştir (4.8 mg). Diğer flavonoid, 6,7,3',4'-tetrametoksi luteolin ise yine [7 Tol: 3 EA] sistemi kullanılarak ilk ayırım sonunda elde edilen 2. banttan izole edilmiştir (6.43 mg). Hemen hemen bütün bitkilerde bulunan fénolik bir bileşik olan 7-hidroksi 6-metoksi kumarin de TK II.3' den [Eter] ile ayrılmıştır (16.1 mg). β -sitosterol ise TK I' den [CHCl₃] ile ayrılarak 3.8 mg elde edilmiştir (Şekil 6.4.1).



Şekil 6.1 İzole edilen bileşiklerin elde ediliş basamakları

6.2.2.2 İnce Tabaka Kromatografisi (İTK/TLC)

Çalışmamızın hemen her aşamasında, ekstre ve karışımların ön incelemelerinde, ayırma ve saflaştırma işlemlerinin çoğunda kullanılan bu ayırma tekniğinde hazır silika jel 60 F₂₅₄ (Merck) alüminyum plaklar kullanılmıştır. Gerek kolon kromatografisi sonucu elde edilen fraksiyonların gerekse preparatif İTK sonucu izole edilen bileşiklerin saflığını kontrol etmek için bu yöntemden yararlanılmıştır. Ayırımı yapılacak karışım, plaklara tatpik edilip uygun çözücü sistemi ile yürütme tanklarında yürütülmüştür. Daha sonra yapılan ayırımın görülmesi için plaklar karanlık odada Camag marka UV lamba altında 254 nm ve 366 nm’ de değerlendirilmiştir. Daha düşük dalga boylarında absorbands veren maddelerin gözlenebilmesi için plakların üzerine seryum belirteci püskürtölüp hotplate üzerine ısıtılmıştır. Böylelikle UV ışıktta görünmeyen bileşiklerin görünmesi sağlanmıştır.

6.2.2.3 Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi

Bu ayırma tekniği miktarı fazla olan fraksiyonlara kaba bir ön ayırım yapmak amacıyla kullanılmıştır. Bunun için laboratuvarıda kendi hazırladığımız plaklar kullanılmıştır. 150 g silika jel 60 HF₂₅₄₊₃₆₆ (Merck) 300 mL saf su ile cam balonda yaklaşık yarım saat boyunca çalkalanarak homojen bir karışım elde edilmiştir. Hepsi aynı kalınlıkta 20x20cm cam plaklar CAMAG TLC plak hazırlama aparatına yerleştirilerek, hazırlanmış olan süspansiyonla 0.5 µm kalınlığında olacak şekilde kaplanmıştır. Hazırlanan plaklar 1 gece oda sıcaklığında kurutulup, ertesi gün karışımındaki nemin iyice uçması için etüvde 105 °C’ de 1 saat bekletilmiştir. Daha ince ayırım gerektiren çalışmalarda ise hazır alüminyum ve Merck cam plaklar kullanılmıştır.

İTK’ da Kullanılan Belirteçler:

Seryum sülfat belirteci

Hazırlanışı: 10 g Ce(SO₄)₂ .4H₂O tartılarak üzerine 50 mL derişik H₂SO₄ ilave edilmiştir. Daha sonra karışım 500 mL’ ye tamamlanincaya kadar üzerine yavaş yavaş distile su eklenmiştir.

6.2.2.4 Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HPTLC)

İzole edilen maddelerin birbirleriyle karşılaştırılmasında, karışık maddelerin ekimlerinin daha iyi yapılarak ayrıştırılmasında, izolasyon çalışmalarında, miktarı az olan maddelerin plağa tatpik edilmesinde ve antioksidan aktivite çalışmasında yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi kullanılmıştır.

HPTLC cihazında genellikle hazır alüminyum İTK plakları kullanılmıştır. İzolasyondan önce maddenin hangi konsantrasyonda ekileceğini belirlemek için ön çalışmalar yapılmıştır. Bunun için çözücü içindeki madde, her biri aynı birim uzunluğunda (10 mm) fakat farklı konsantrasyonlarda birkaç bant şeklinde ekilmiştir. Ekim için CAMAG marka Linomat 5 cihazı kullanılmıştır. Bu cihaz bir enjektör ile azot gazı sayesinde plağa maddeyi püskürterek ekim yapmaktadır. Ekimden sonra uygun çözücü sisteminde yürütme işlemi gerçekleştirilmiş ve UV lamba altında bakılarak hangi konsantrasyondaki ekimin daha başarılı sonuç verdiği karar verilmiştir. Birim uzunluğa ekilecek madde miktarı seçilen konsantrasyon miktarı ile oranlanarak veriler bilgisayara girilmiştir. Plagın her iki tarafından 10 mm boşluk kalacak şekilde ekim yapılmıştır. Ekim tamamlandıktan sonra yürütme işlemi için ADC2 cihazı kullanılmıştır. Bunun için sisteme çözücünün türü, birden fazla çözücü kullanıldıysa herbirinin oranı, miktarı, satürasyon süresi, nem oranı, yürütme mesafesi ve kurutma süresi ile ilgili bilgiler girilmiştir. Genellikle satürasyon için 5 mL, yürütme için 10 mL olacak şekilde toplamda 15 mL çözücü sistemleri ile çalışılmıştır. Çözücüler cihaza eklendikten sonra diğer işlemler cihaz tarafından otomatik olarak yapılmıştır. Yürütme işlemi bittikten sonra plak cihazdan alınarak UV lamba altında incelenmiştir. Madde saf ise NMR için hazırlanmış, saf değilse aynı işlemler uygun şartlarda tekrarlanmıştır.

6.2.2.5 Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Bu teknik İTK ve MPLC ile ayrılamayan maddelerin ayrıştırılıp saf olarak elde edilmesinde ya da ince tabaka kromatografisi ile ayrıştırılabilecek duruma gelmeleri için kullanılmıştır. Çalışmamızda Shimadzu marka HPLC cihazı kullanılmıştır.

6.2.2.6 Orta Basıncılı Sıvı Kromatografisi (MPLC)

Kolon kromatografisinde elde edilen ve İTK sonuçlarına göre birçok maddenin bir arada bulunduğu görülen fraksiyonları daha ileri ayırımlar için tekrar fraksiyonlandırmak amacıyla kullanılmıştır. MPLC sonucunda karışımdaki maddeler saf olarak elde edilemese de; HPTLC tekniği ile ayrıştırılabilecek duruma gelmiştir. Çalışma için Buchi marka MPLC cihazı kullanılmıştır.

6.3 Spektroskopik Yöntemler

İzole edilen saf maddelerin yapılarının aydınlatılmasında kullanılan spektroskopik yöntemler ana başlıklar halinde kısaca anlatılmıştır.

6.3.1 Ultraviyole Spektroskopisi (UV/VIS)

UV/VIS spektroskopisi izole edilen bileşiklerden flavonoid yapısında olduğu tahmin edilenlerin yapılarının aydınlatılmasında kullanılmıştır. Çalışmalarda Perkin Lambda 25 UV/VIS spektrometre cihazı kullanılmıştır.

Flavonoidler konjuge aromatik yapılar olduklarından UV/VIS spektrumlarında çeşitli bantlar verirler. Yapılarının daha iyi belirlenebilmesi için çeşitli kelat yapıcı ve asit içeren reaktifler kullanılarak çekilen spektrumlar orjinal spektrumlarla karşılaştırılarak bantlarda meydana gelen kayma değerleri gözlemlenip, yapıda bulunan hidroksi, metoksi ya da şeker gruplarının konumları belirlenir. Bu çalışmada kullanılan reaktifler; sodyum metoksit (NaOMe), susuz alüminyum klorür ($AlCl_3$), hidroklorik asit (HCl), susuz sodyum asetat (NaOAc), ve borik asit (H_3BO_3)' tir.

6.3.2 Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (NMR)

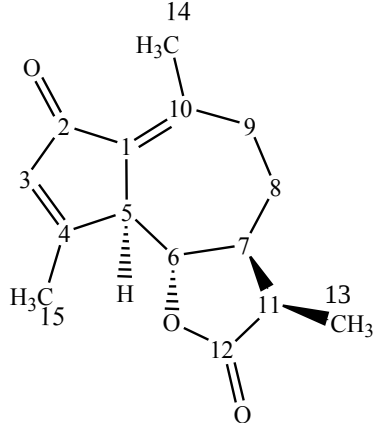
Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi izole edilen saf maddelerin yapı tayininde kullanılmıştır. Çalışmalarda Varian marka 400 MHz Mercury-VX 400 BB model NMR cihazı kullanılmıştır. Maddenin yapısına bağlı olarak bir boyutlu, iki boyutlu ve çok pulslu farklı spektral yöntemler de kullanılmıştır. Bunlardan tek boyutlu olanlar; 1H NMR, iki boyutlu olanlar; COSY (Correlation Spectroscopy), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) ve çok pulslu yöntemlerden ise APT (Attached Proton Test) yöntemleridir. NMR numunelerinde çözücü olarak $CDCl_3$, $MeOH-d_4$, ve D_2O kullanılmıştır.

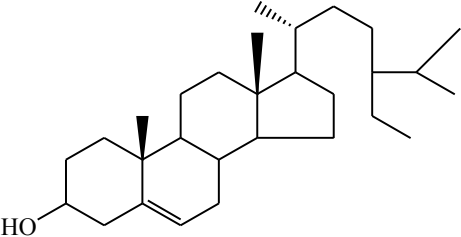
6.3.3 Infra-Red Spektroskopisi (IR)

İzole edilen saf maddelerden seskiterpen lakton bileşiğinin yapısını aydınlatmak için Perkin Elmer FT-IR spektrometresi kullanılmıştır. Çözücüsü tamamen uçurulduktan sonra kristal bir yapı alan maddeden temiz bir spatül yardımıyla bir miktar alındıktan sonra ATR kristalinin üzerine konularak spektrumu çekilmiş ve yapıdaki fonksiyonel gruplar gözlemlenmiştir.

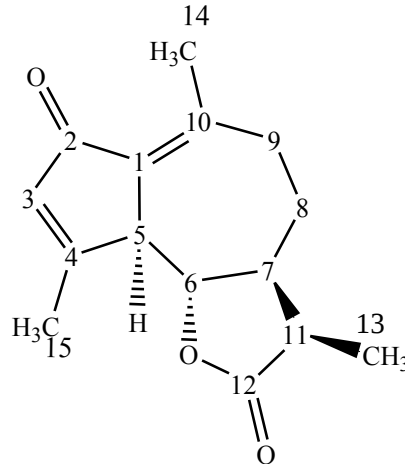
7. BULGULAR

Çizelge 7.1 İzole edilen bileşiklerin genel özellikleri

Bileşğin Adı	Türü	Kristal Yapısı	Renk Özellikleri	Yapısı
Achillin	Seskiterpen lakton	Açık sarı	UV (254 nm)-Kahverengi $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - Açık sarı	
Salvigenin	Flavon	Açık sarı	UV (254 nm)-Kahverengi $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - Koyu sarı	
6,7,3',4'-Tetrametoksi luteolin	Flavon	Sarı-Beyaz	UV (254 nm)-Kahverengi $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - Koyu sarı	

Bileşğin Adı	Türü	Kristal Yapısı	Renk Özellikleri	Yapısı
7-Hidroksi 6-metoksi kumarin	Fenolik Bileşik	Sarı	UV (254 nm)- Açık mavi UV (366 nm)- Parlak Mavi $Ce(SO_4)_2 \cdot 4H_2O$ - Sarı	
β -sitosterol	Steroid	Beyaz	UV (254 nm)- Renksiz UV (366 nm)- Renksiz $Ce(SO_4)_2 \cdot 4H_2O$ - Mavi-Fuşya; Kahverengi	

7.1 A Bileşiği: Achillin



Elde ettiğimiz bu bileşik açık sarı renkte ve kristalize bir yapıda olup silika jel plakta UV (254 nm) altında kahverengi görünmekte, 366 nm’ de ise görünmemektedir. Seryum sülfat belirteci pskrtlp 110 °C’ de yakıldığında da rengi açık sarıya dönüşmektedir (Resim 7.1.1).

IR spektrumunda 2942.30 cm⁻¹, de CH, CH₃ gerilim bantları, 1777.84 cm⁻¹, de lakton grubu, 1669.16 cm⁻¹, de keton grubu, 1608.88 cm⁻¹, de doymamışlık gözlemlenmiştir (Şekil 7.1.1).

Bileşiğin ¹H NMR’ ı dtro MeOH’ de alınmıştır. Buna göre; metil protonlarına ait sinyaller δ 1.01 (H-13, d, 7.8 Hz), δ 2.40 (H-14, s) ve δ 2.28 (H-15, s)’ de görüldü. Çifte bağa komşu metin protonu δ 6.14 (H-3, s), köprü başı protonu δ 3.59 (H-5, d, 10.2 Hz), lakton protonu δ 3.87 (H-6, t, 10.3 Hz) ve H-7 δ 2.48-2.60 (m)’ da gözlendi. 8-α Konumunda bulunan metin protonu δ 1.82-1.90 (m), 8-β konumdaki metin protonu δ 1.44 (m), H-9 protonu ise δ 2.30’ da (m) vermiştir. Lakton halkasında bulunan H-11 ise δ 2.69 (dq, J=7.4; 7.8 Hz) şeklinde izlenmiştir. δ 4.85’ de gözlenen singlet nedeniyle maddenin D₂O ilave edilerek tekrar spektrumu alınmış ve pikin kaybolduğu, dolayısıyla H₂O’ ya ait olduğu anlaşılmıştır (Şekil 7.1.2).

COSY spektrumunda bileşikteki visinal protonlar arasındaki etkileşimler, APT spektrumunda molekülde bulunan metil, metilen, metin ve katerner karbon atomları, HMQC spektrumunda tek bağ üzerinden C-H etkileşimleri, HMBC spektrumunda ise iki, üç ve dört bağ üzerinden proton -karbon korrelasyonları gözlemlenmiştir (izelge 7.1.1).

Çizelge 7.1.1 A bileşiğinin ^1H NMR (400 MHz, MeOH-d_4), ^{13}C NMR, COSY, HMBC ve HMQC sonuçları

H	^1H NMR	^1H - ^1H COSY	HMQC	C	^{13}C NMR	HMBC
1	-			1	170.35	H-9'
2	-			2	196.16	
3	δ 6.14, s	5	C-3	3	135.72	H-15, H-5
4	-			4	131.96	H-15, H-3
5	δ 3.59, d (J=10.2 Hz)	6, 15	C-5	5	53.14	H-15
6	δ 3.87, t (J=10.3 Hz)	5, 7	C-6	6	83.70	H-8, H-9, H-11
7	δ 2.48-2.60 (m)	5, 6, 8, 8', 11	C-7	7	52.15	H-13, H-8, H-9, H-11
8	δ 1.82-1.90 (m)	7, 8', 9, 9'	C-8	8	23.81	H-9
8'	δ 1.44, m	7, 8, 9, 9'	C-8	9	37.81	H-8, H-7, H-14
9	δ 2.40, m	7, 8, 8', 9	C-9	10	152.43	
9'	δ 2.30, m	7, 8, 8', 9	C-9	11	39.57	H-13, H-9
10	-			12	178.72	H-13, H-11
11	δ 2.69, dq (J=7.4; 7.8 Hz)	7, 13	C-11	13	10.16	H-8', H-11
12	-			14	21.77	H-9
13	δ 1.01, d (J=7.8 Hz)	7, 11	C-13	15	20.02	H-7
14	δ 2.40, s		C-14			
15	δ 2.28, s		C-15			
H ₂ O	δ 4.87 br d (J=20 Hz)					

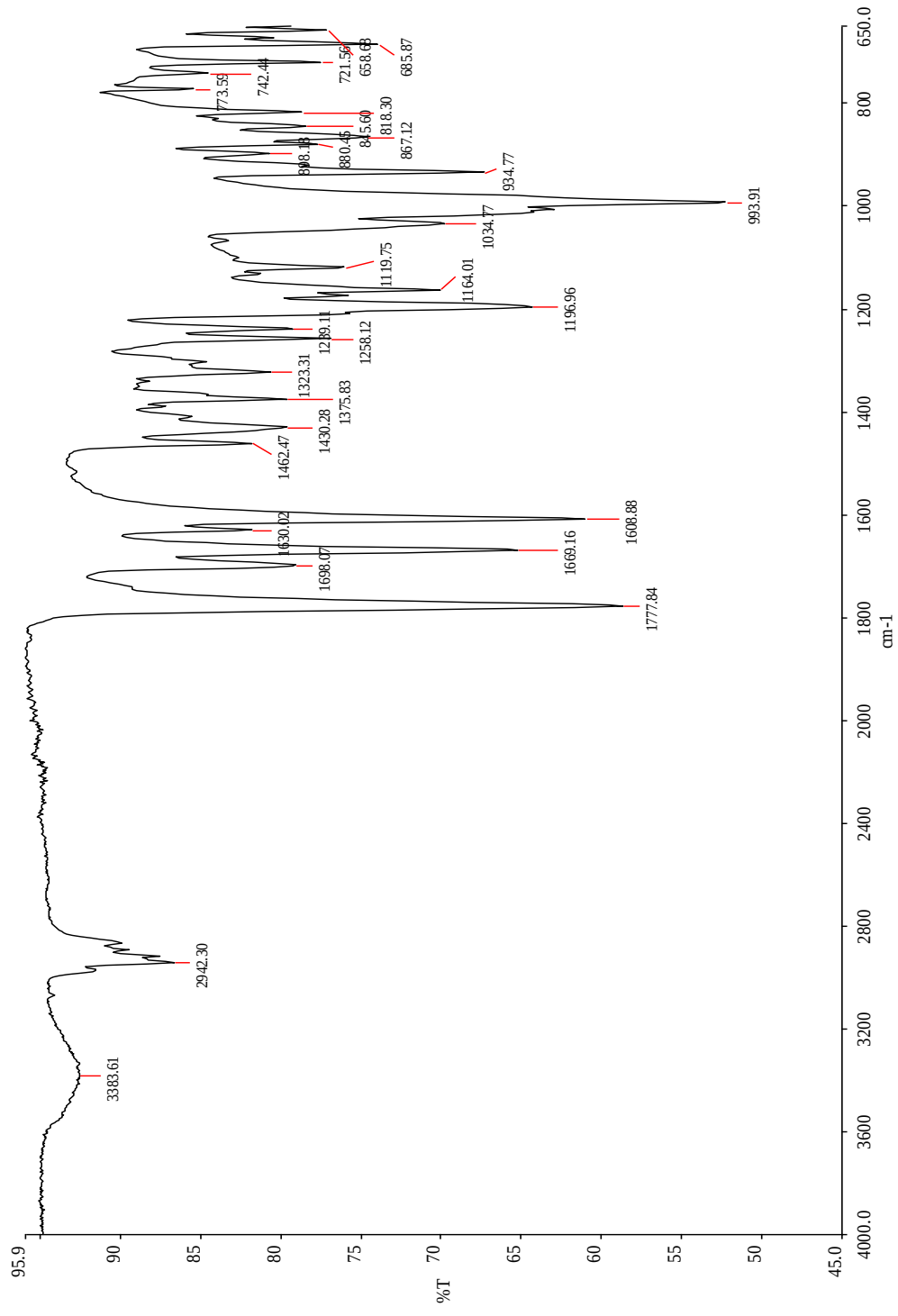


254 nm

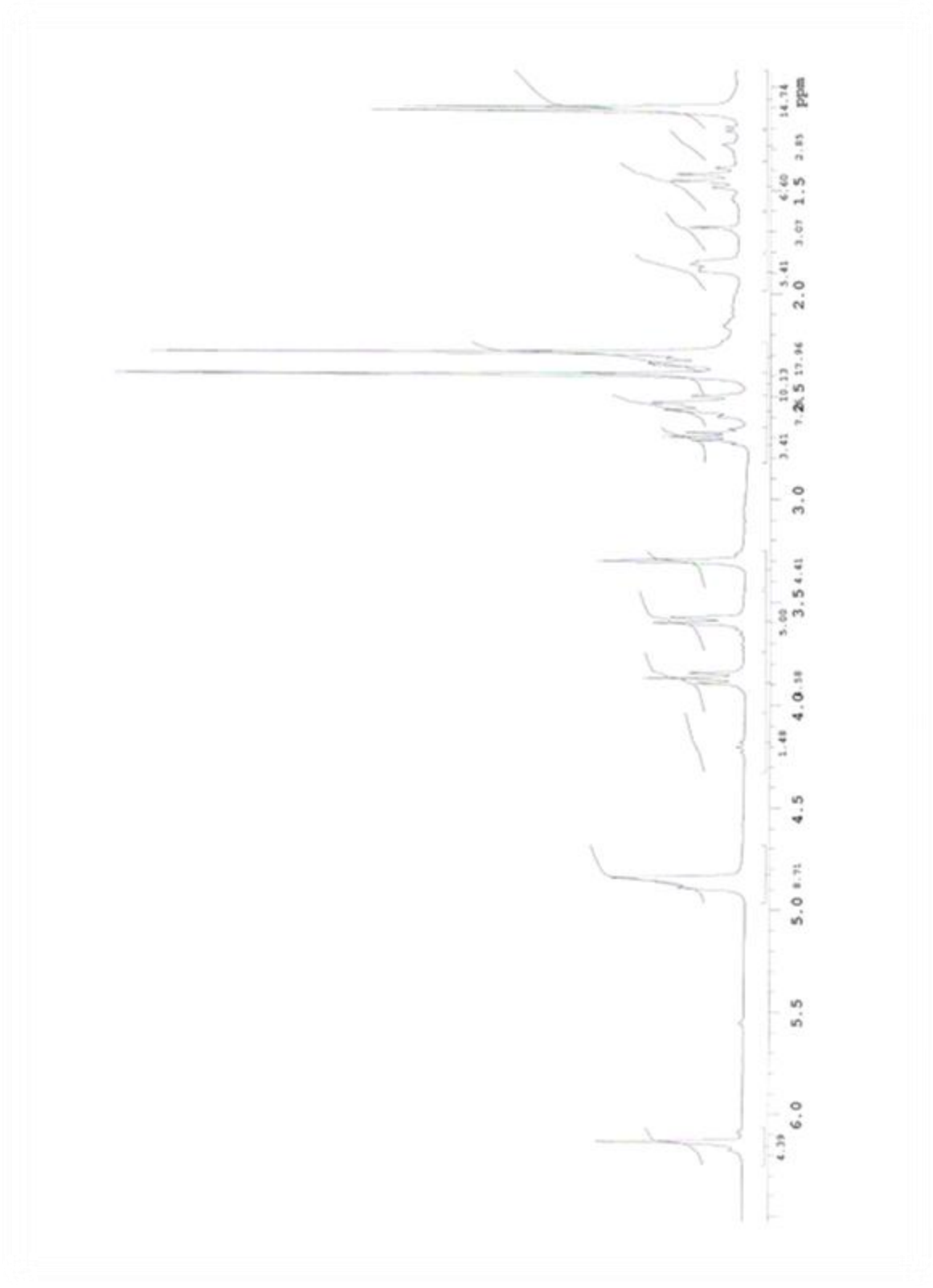


+ seryum sülfat

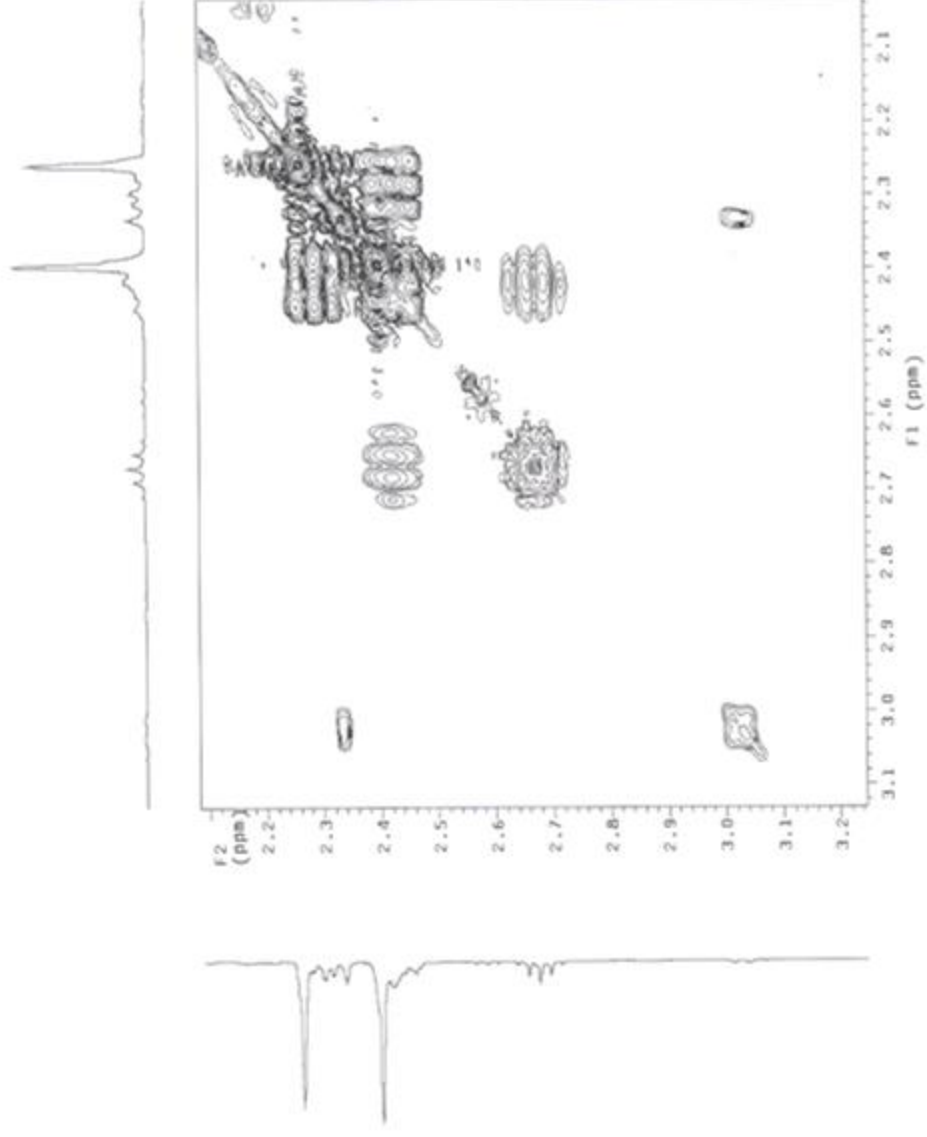
Resim 7.1.1 A bileşiminin [7 Tol: 3 EA] sisteminde yürütüldükten sonra 254 nm UV ışık altında ve seryum sülfat belirteci püskürtülüp yakıldıktan sonra elde edilen İTK kromatogramları



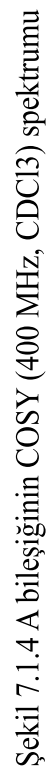
Şekil 7.1.1 A bileşiğinin IR spektrumu

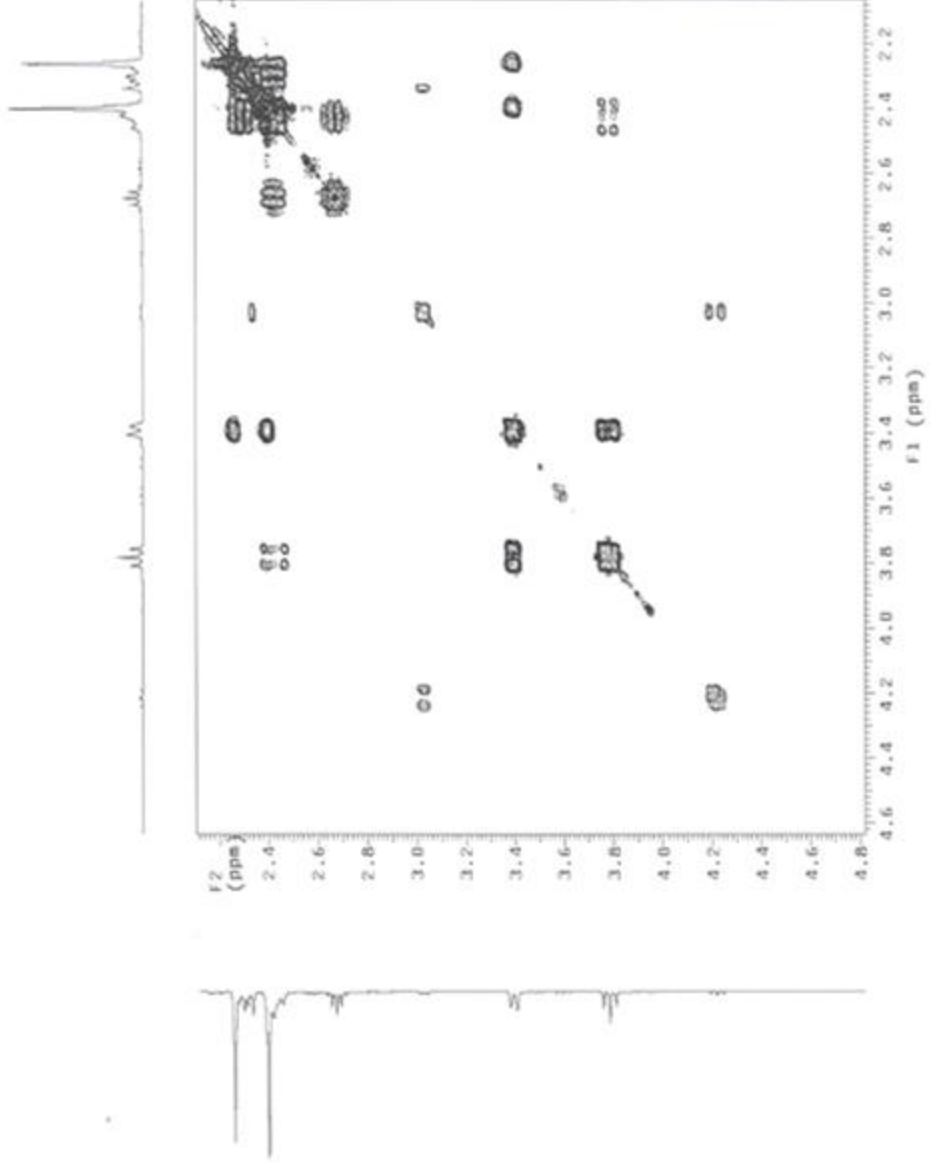


Şekil 7.1.2 A bileşiğinin ^1H NMR (400 MHz, MeOH-d_4) spektrumu

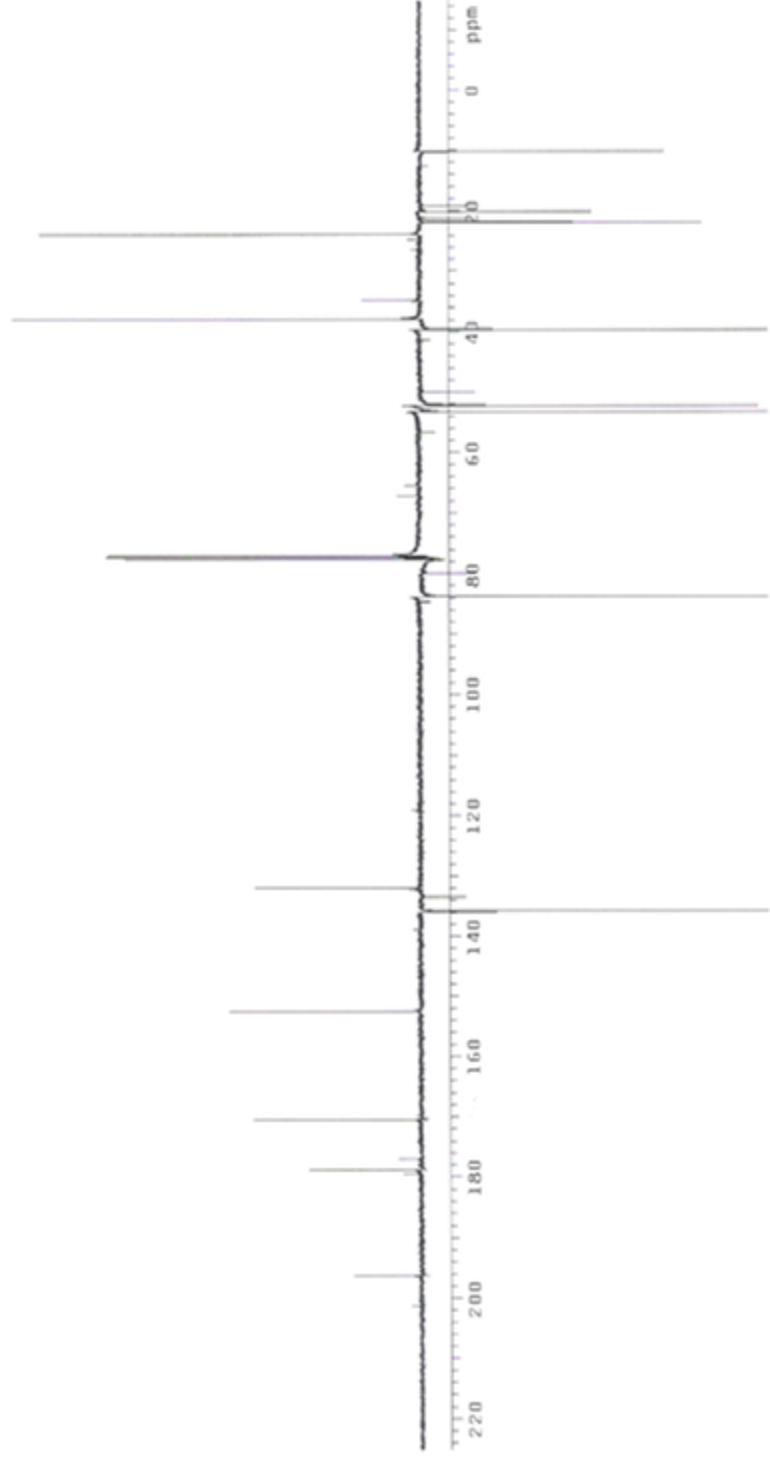


Şekil 7.1.3 A bileşiğinin COSY (400 MHz, CDCl₃) spektrumu

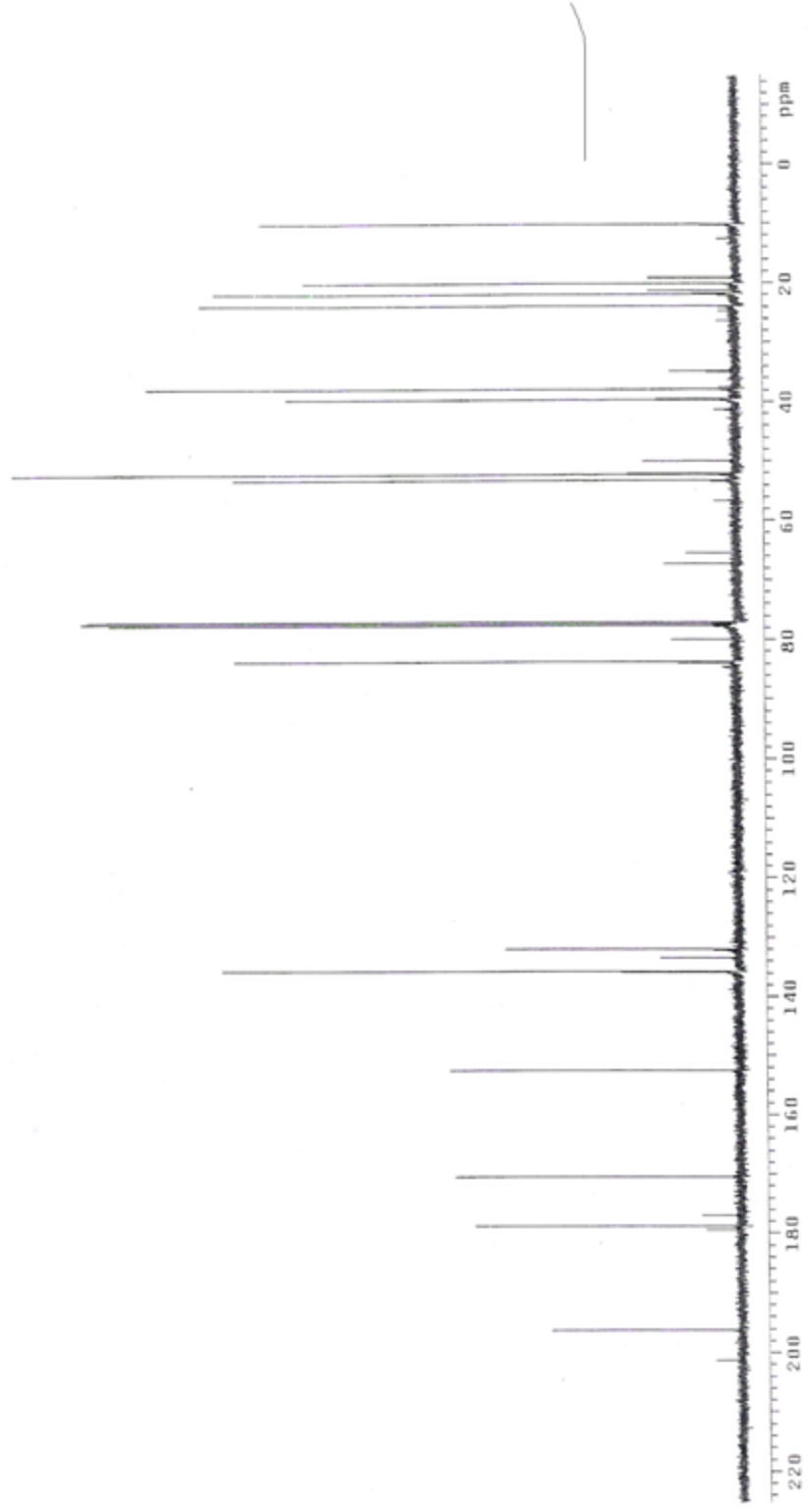




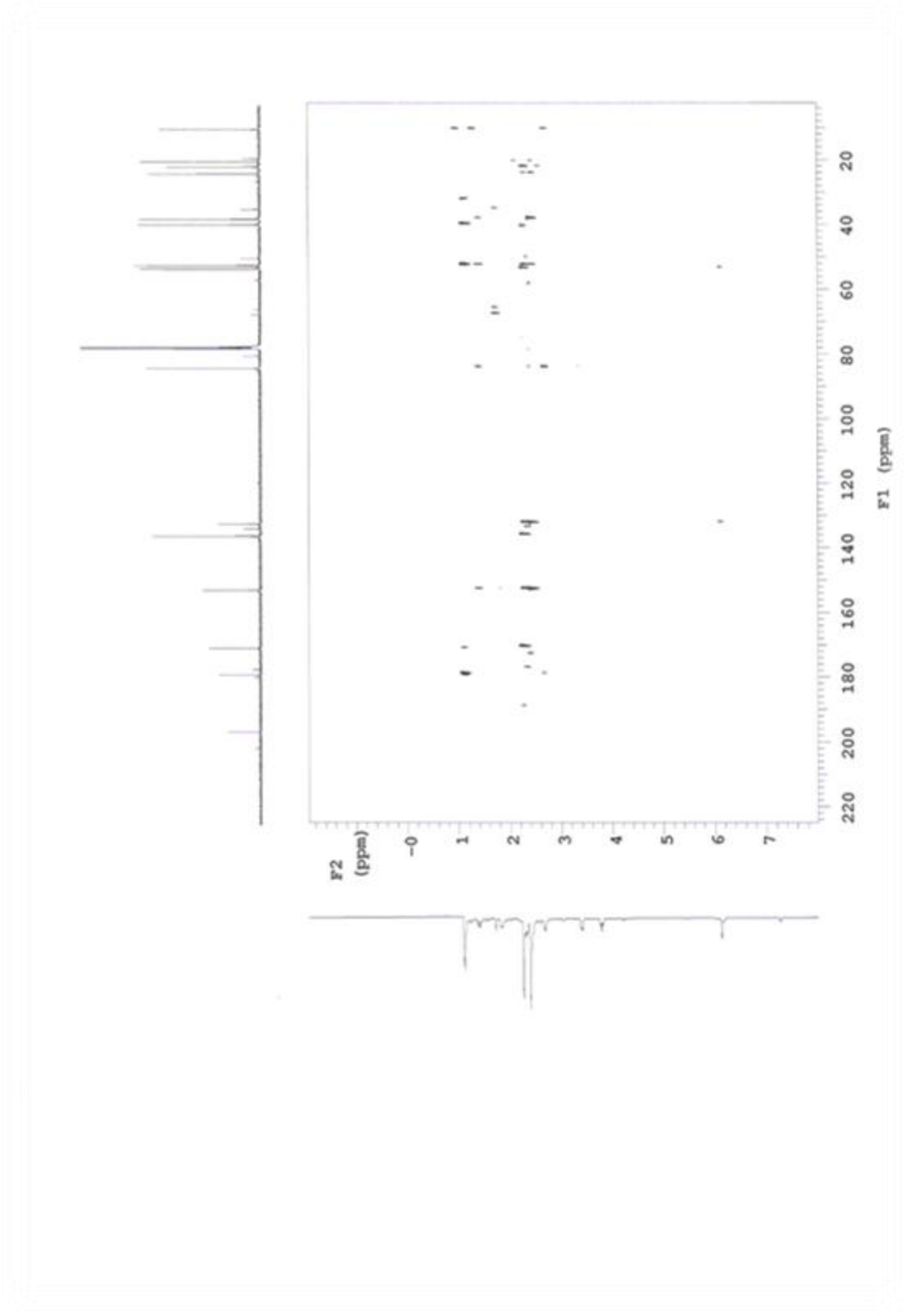
Şekil 7.1.5 A bileşiğinin COSY (400 MHz, CDCl₃) spektrumu



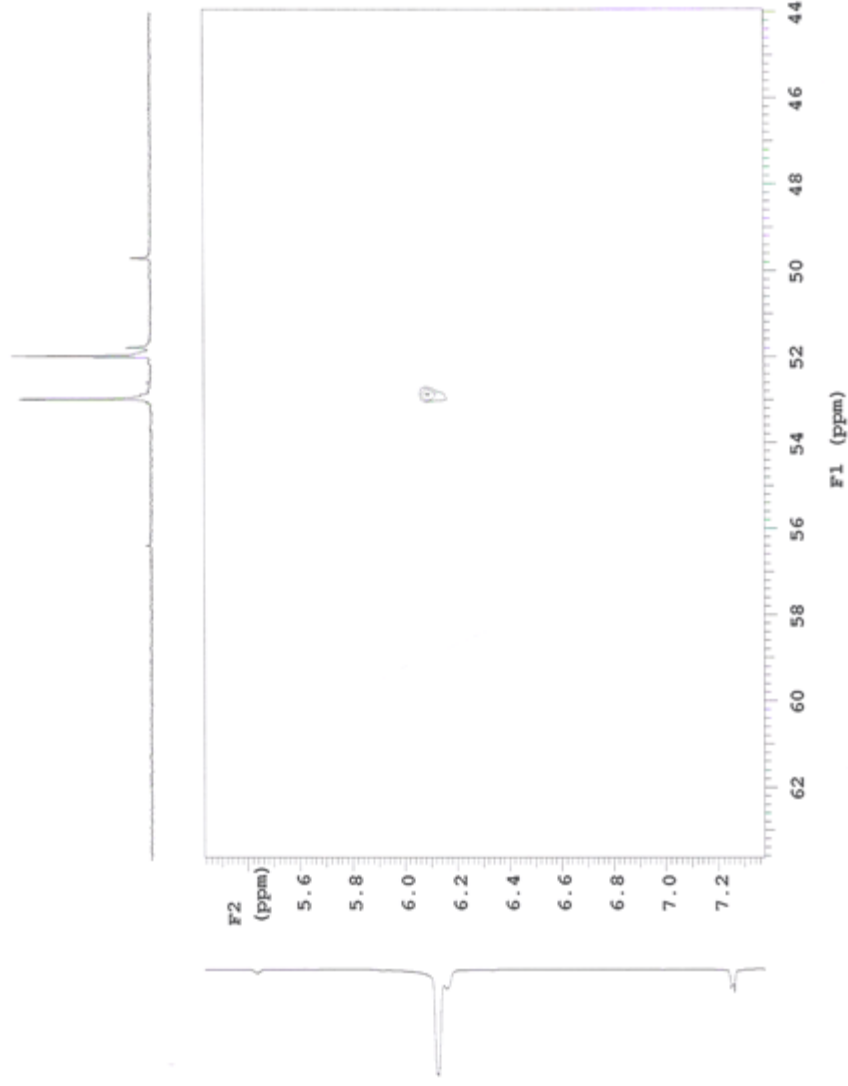
Şekil 7.1.6 A bileşiğinin APT (400 MHz, CDCl_3) spektrumu



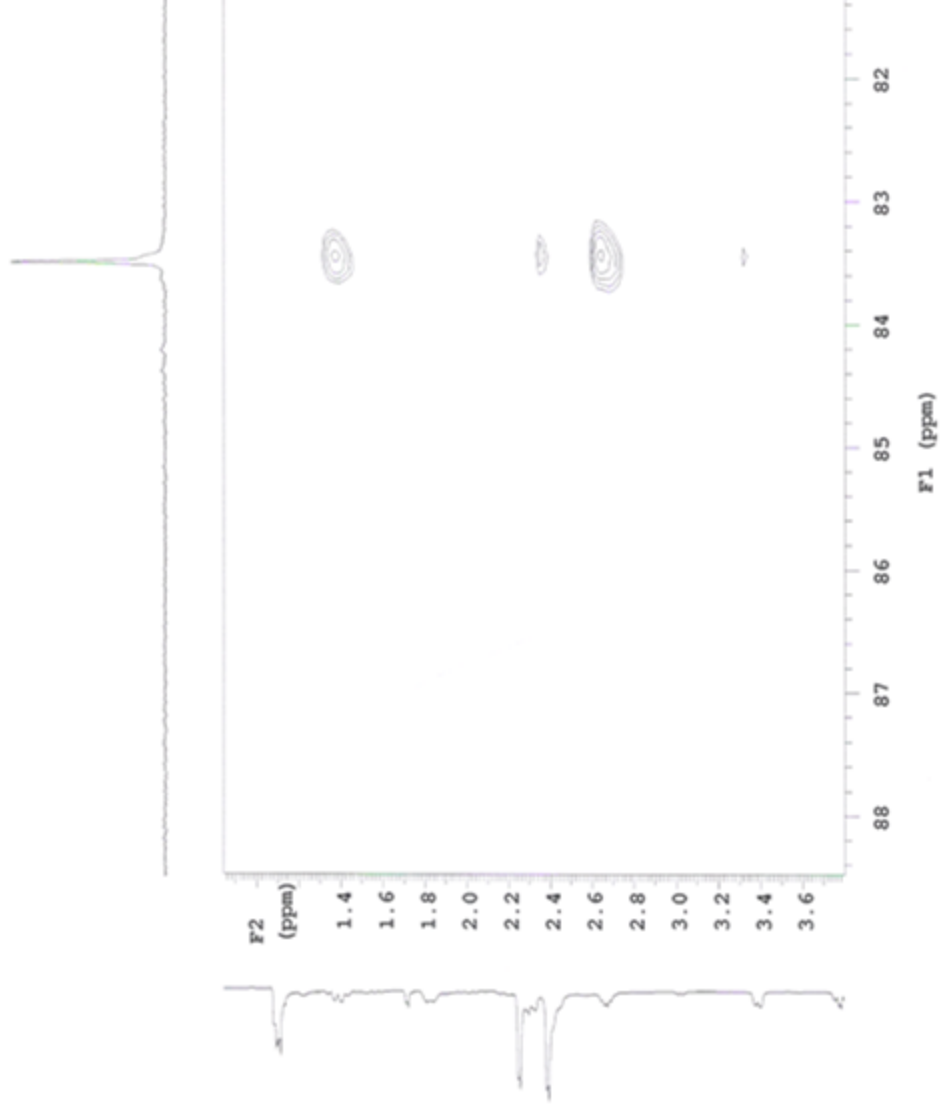
Şekil 7.1.1.7 A bileşiğinin ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3) spektrumu



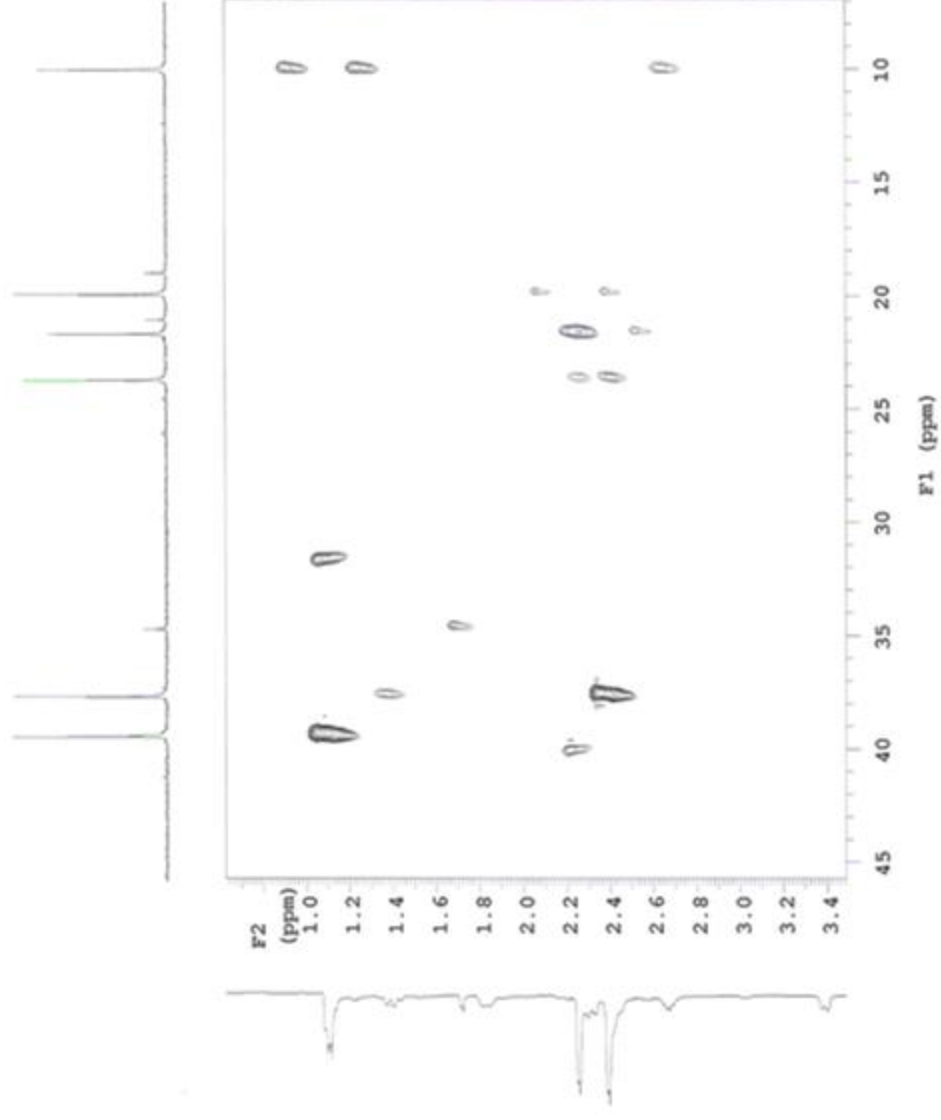
Şekil 7.1.8 A bileşiğinin HMBC (400 MHz, CDCl_3) spektrumu



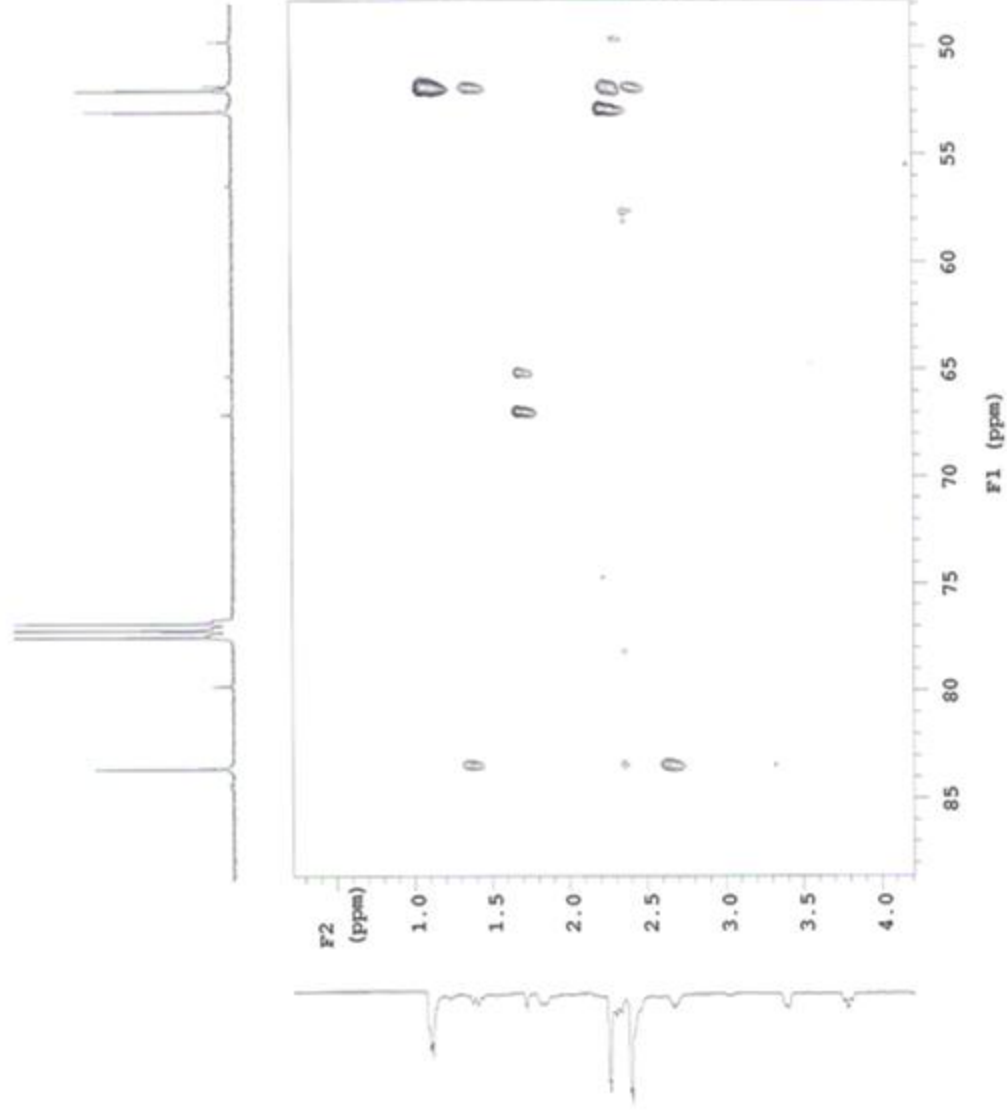
Şekil 7.1.9 A bileşiğinin HMBC (400 MHz, CDCl_3) spektrumu



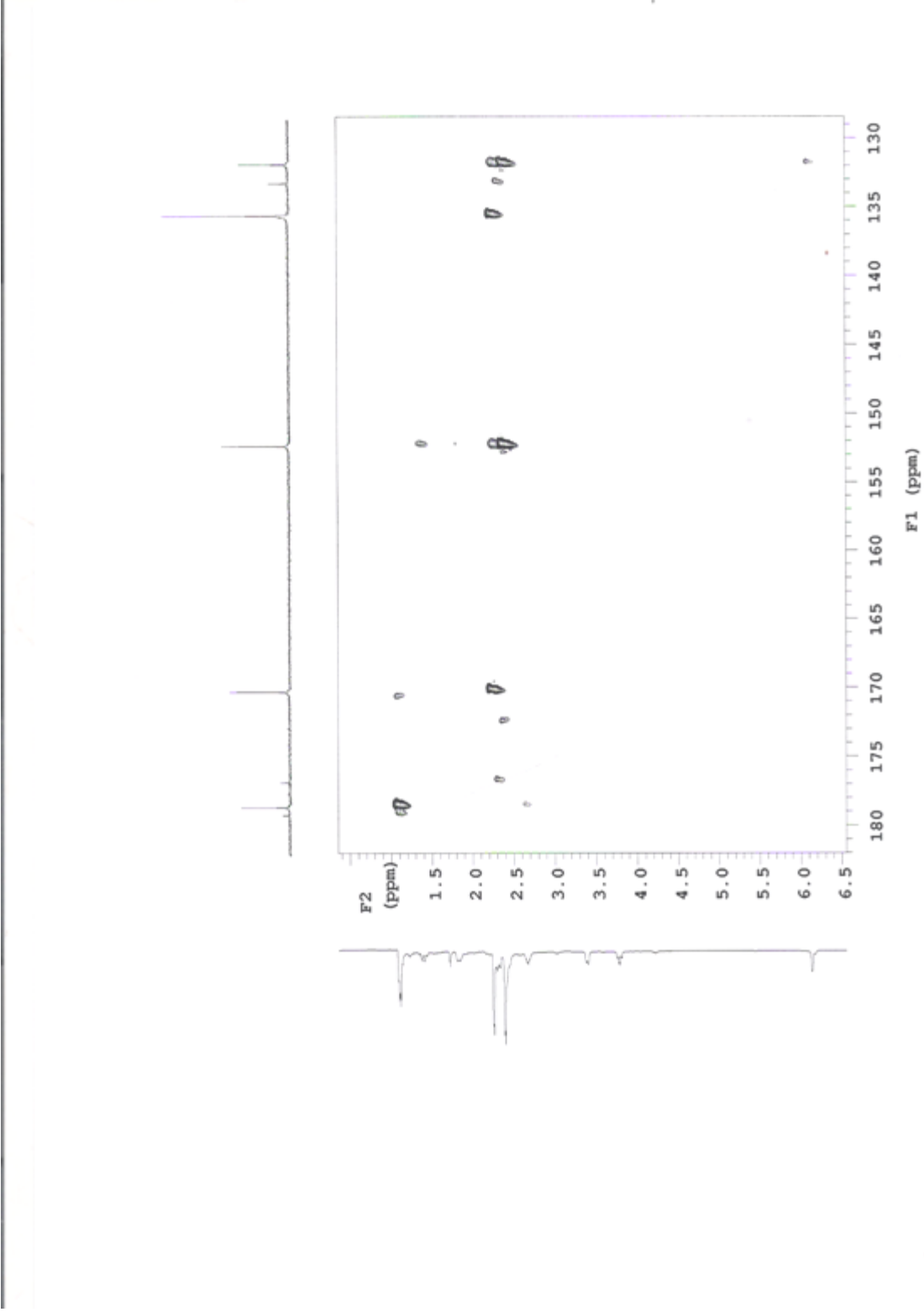
Şekil 7.1.10 A bileşiğinin HMBC (400 MHz, CDCl_3) spektrumu



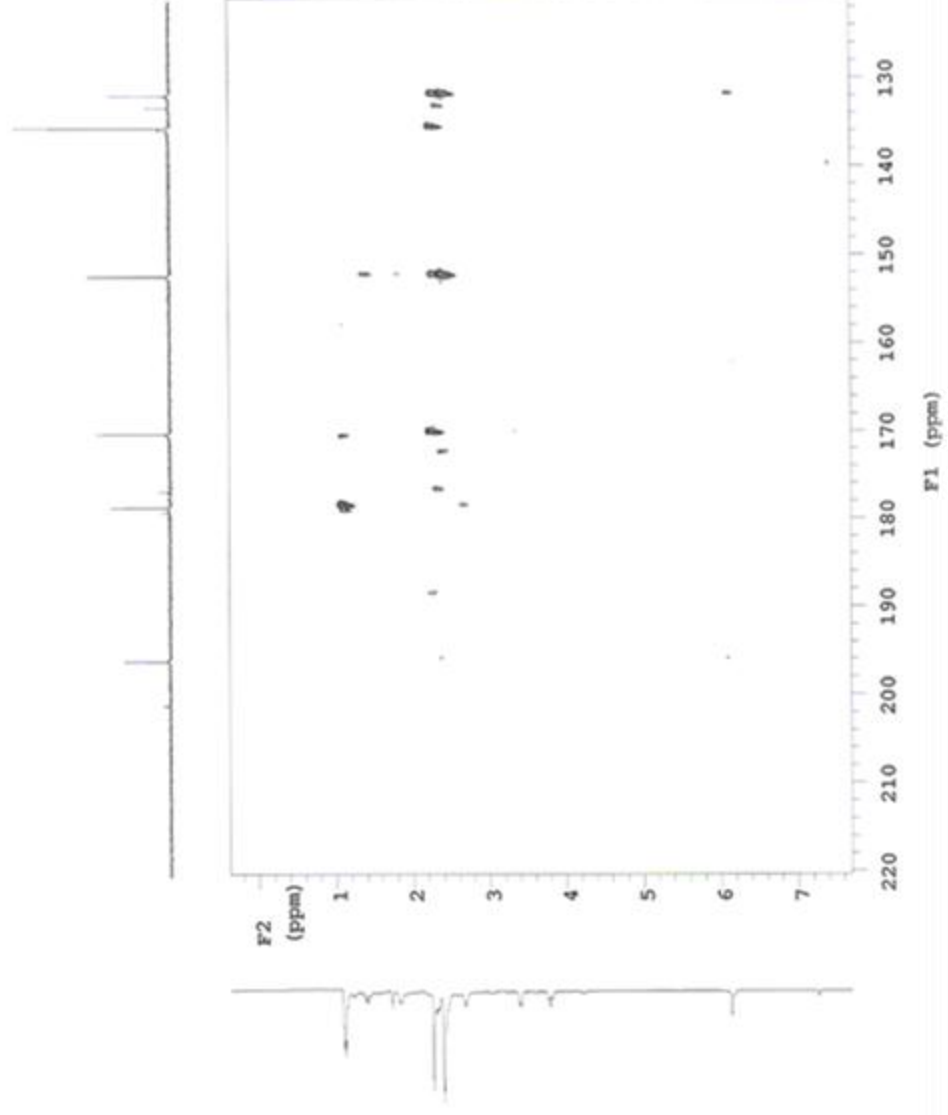
Şekil 7.1.11 A bileşiğinin HMBc (400 MHz, CDCl₃) spektrumu



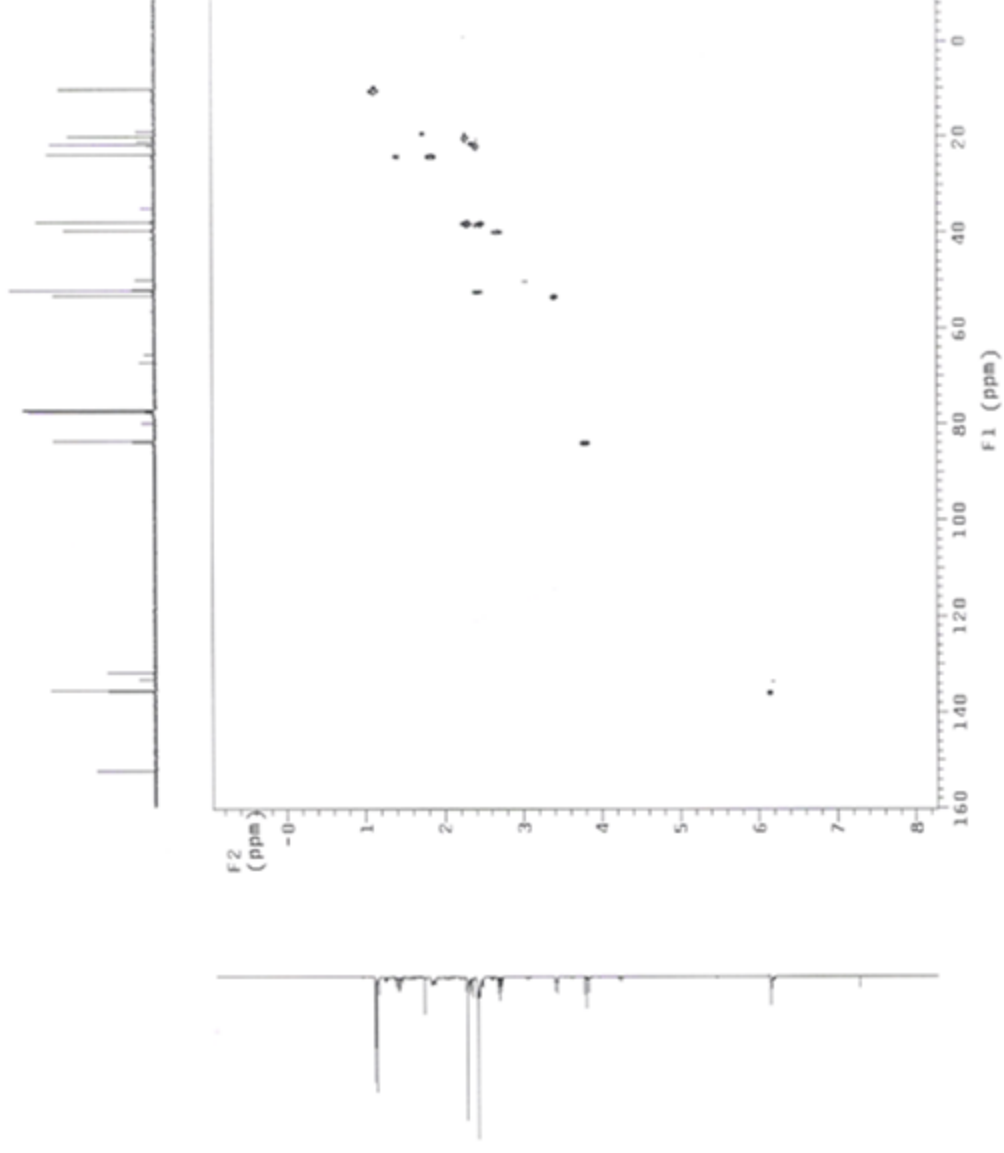
Şekil 7.1.12 A bileşiğinin HMBC (400 MHz, CDCl₃) spektrumu



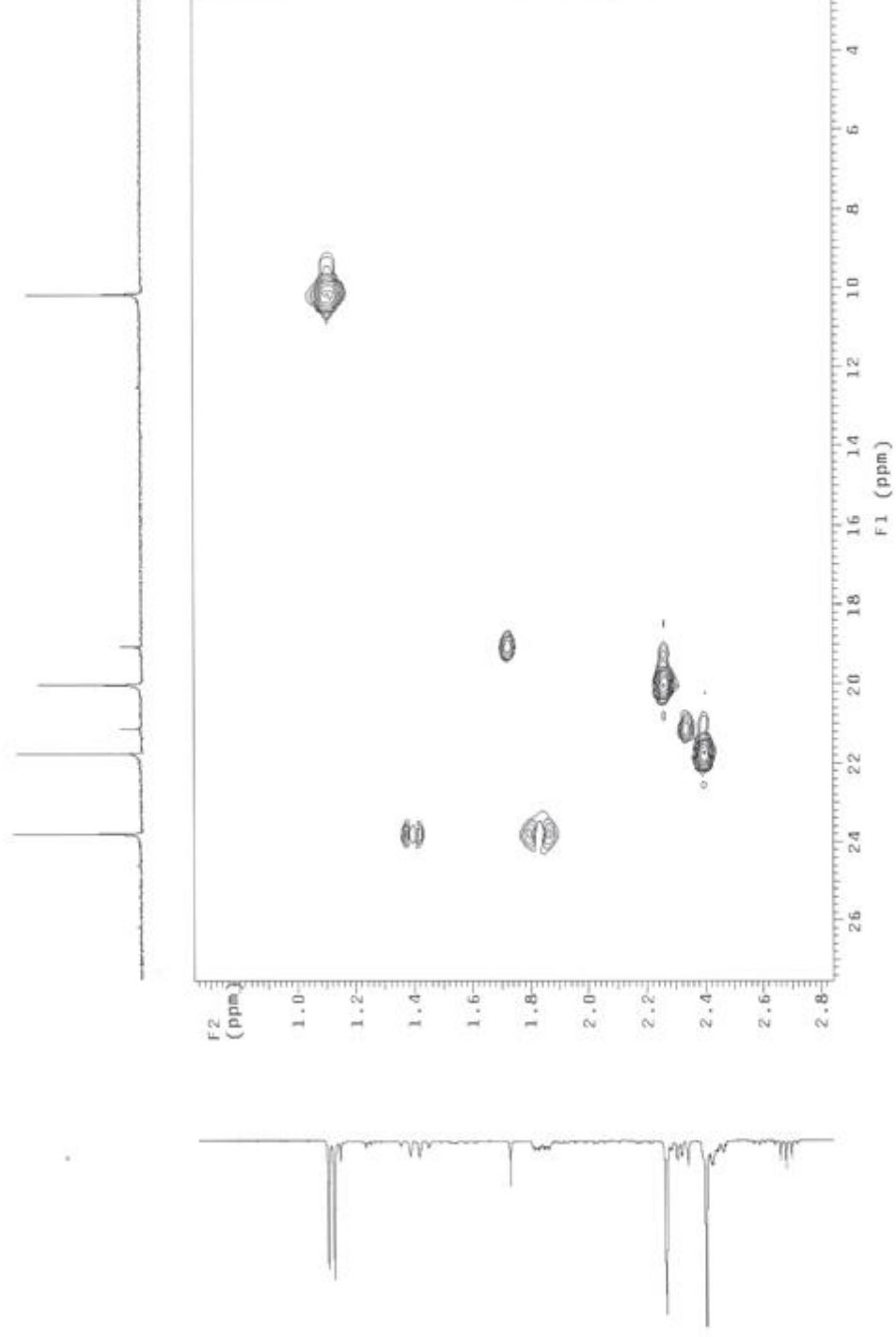
Şekil 7.1.13 A bileşiğinin HMBC (400 MHz, CDCl_3) spektrumu



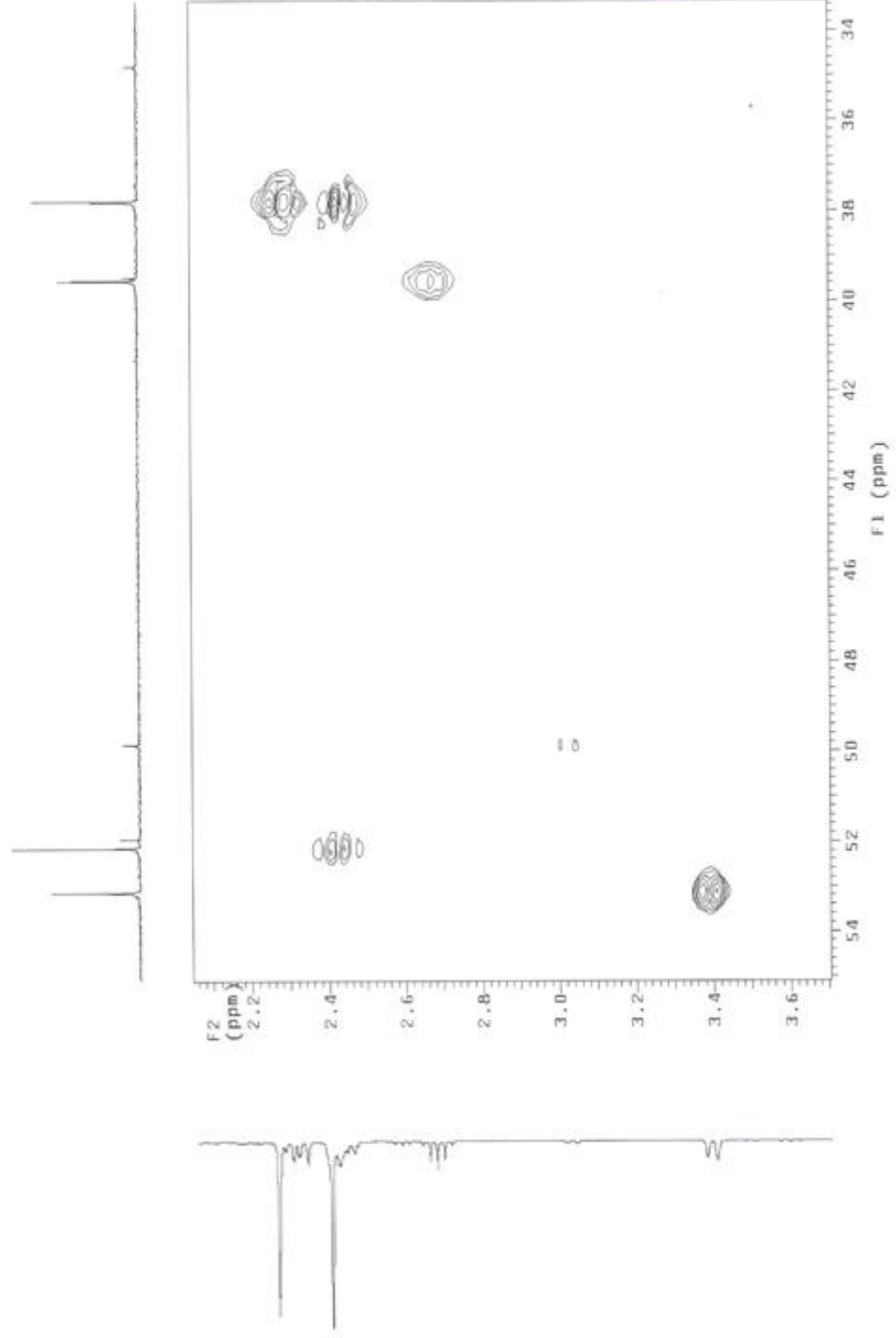
Şekil 7.1.14 A bileşiğinin HMBC (400 MHz, CDCl_3) spektrumu



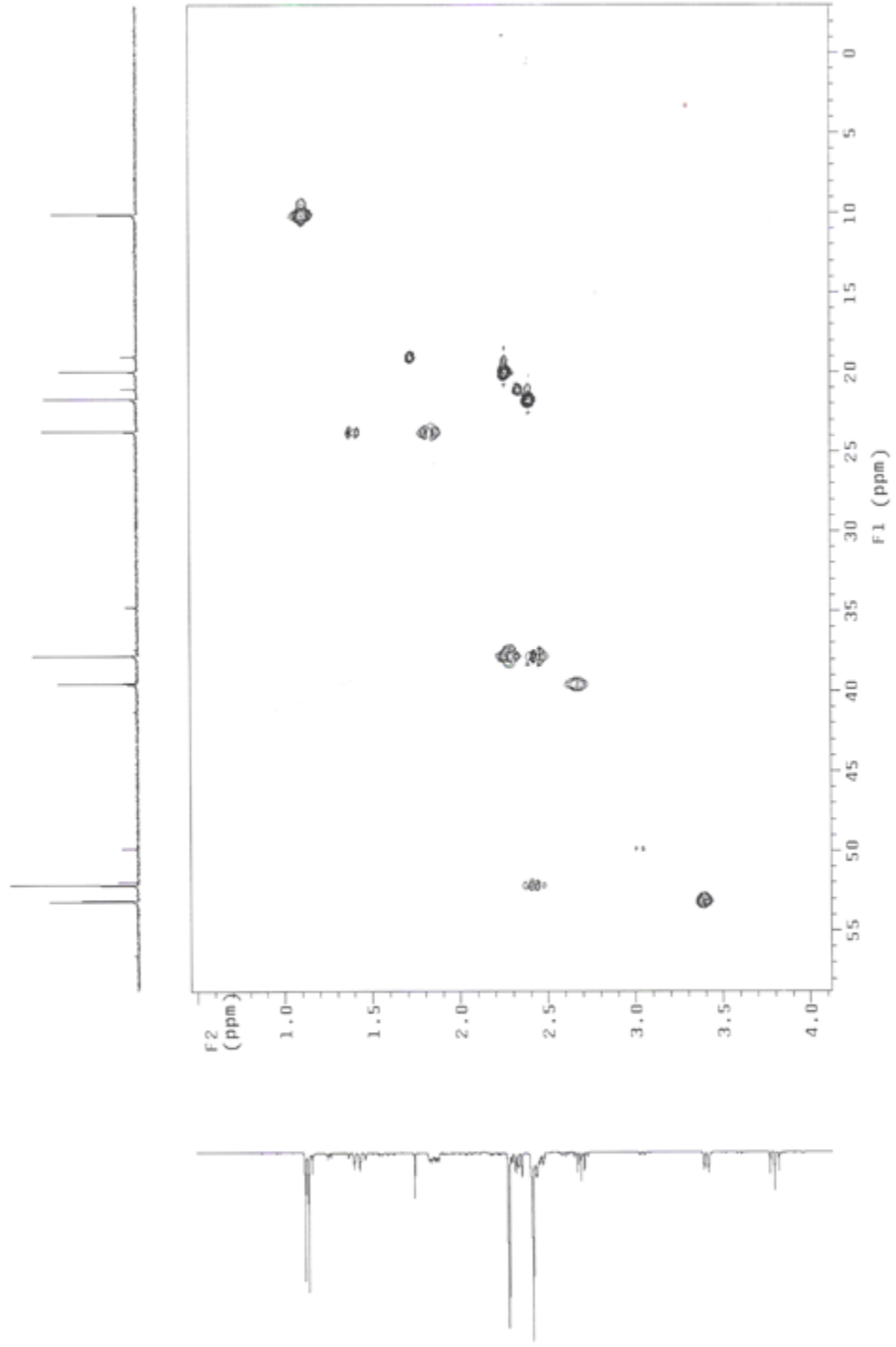
Şekil 7.1.15 A bileşiğinin HMQC (400 MHz, CDCl_3) spektrumu



Şekil 7.1.16 A bileşiğinin HMQC (400 MHz, CDCl_3) spektrumu

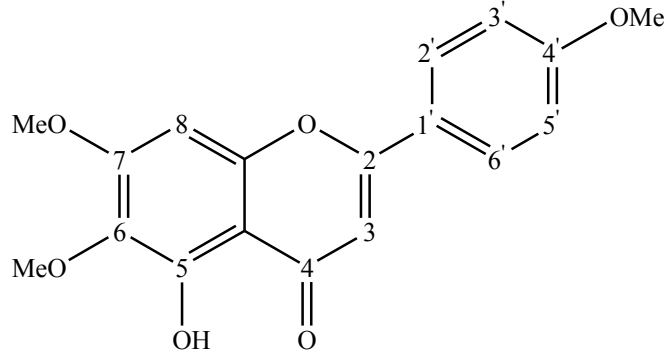


Şekil 7.1.17 A bileşiğinin HMQC (400 MHz, CDCl_3) spektrumu



Şekil 7.1.18 A bileşiğinin HMQC (400 MHz, CDCl_3) spektrumu

7.2 B Bileşigi: Salvigenin (6-metoksi apigenin 4'-7 dimetileter)



Bileşik açık sarı renkli ve kristalize bir yapıda olup; ince tabaka kromatografisinde silika jel plakta UV (254 nm)' de açık kahverengi, seryum sülfat belirteci püskürtülüp 110 °C' de yakıldığında ise sarı renk vermektedir (Resim 7.2.1). Bu maddenin yapı analizi ¹H NMR ve UV/VIS spektroskopisi ile belirlenmiştir.

¹H NMR spektrumunda (CDCl₃) δ 3.84, 3.88, 3.92 ppm' de 3 adet –OCH₃ protonlarına ait singletler gözlemlendi. δ 6.49 (H-3) ve 6.53 (H-8)' de gözlenen singletler nedeniyle yapının bir flavonoid olabileceği düşünüldü. H-8 protonu singlet olarak rezonans olduğundan C-6 pozisyonunda bir süstitüsyon olduğu anlaşılır. δ 7.78 (dd, J=1.95; 9 Hz) sinyali üst üste çakışan H-2'; H-6' protonlarına; δ 6.96 (dd, J=2.34; 9.37 Hz) ise yine üst üste çakışan H-3'; H-5' protonlarına ait sinyallerdir (Şekil 7.2.2).

UV spektrumunda farklı reaktiflerle yapılan uygulamalarla yapıdaki süstitüsyon netlik kazanmıştır. MeOH spektrumunda Bant I' e ait pik 342 nm' de; Bant II' ye ait olan pik 285 nm' de sinyal vermiştir. Bant II'nin 285 nm' de çıkması ise A halkasında ikiden fazla oksijen fonksiyonu bulunduğuna işaret etmektedir.

Kayma reaktifleriyle alınan UV spektrumları sonuçlarına göre;

1) MeOH: Bant I; 342 nm Bant II; 285 nm

2) MeOH+NaOMe: Bant I; 342 nm Bant II; 285 nm

* NaOMe ilave edildiğinde MeOH spektrumuna göre kayma olmaması; 4' pozisyonundaki OH grubunun serbest olmadığını ve metoksi gruplarından birinin C-4' pozisyonunda yer aldığını göstermektedir.

3) MeOH+NaOAc: Bant I; 342 nm Bant II; 285 nm

* Bant II' de kayma olmaması 7 pozisyonundaki OH grubunun serbest olmadığını ve metoksi gruplarından birinin bu pozisyonda yer aldığını göstermektedir.

4) MeOH+NaOAc+H₃BO₃: Bant I; 342 nm Bant II; 285 nm

* MeOH spektrumuna göre kayma olmadığından yapıda orto dihidroksi grupları yok demektir.

5) MeOH+AlCl₃: Bant I; 370 nm Bant II; 315 nm

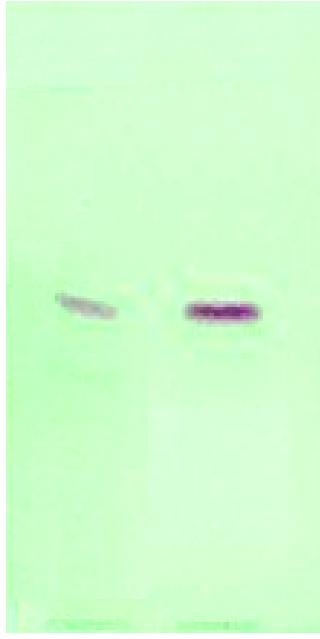
* MeOH spektrumuna göre her iki bantta da batokromik kayma görüldü. Bu 5 pozisyonunda OH grubunun olduğunu göstermektedir.

6) MeOH+AlCl₃+HCl: Bant I; 365 nm Bant II; 315 nm

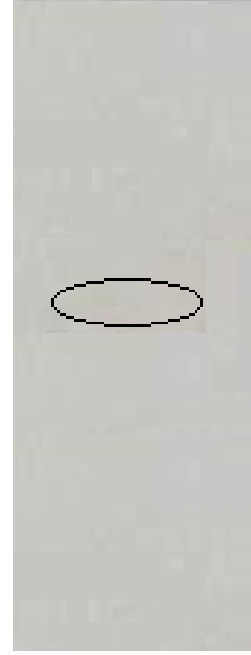
* MeOH+AlCl₃ spektrumuna göre kayma olmadığından 5 pozisyonunda OH grubunun olduğu netlik kazanmıştır (Şekil 7.2.1).

Çizelge 7.2.1 B bileşiğinin ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) sonuçları ve UV kayma değerleri

H	¹ H NMR	Reaktif	Bant I λ max	Bant II λ max
3	δ 6.49 s	MeOH	342 nm	285 nm
8	δ 6.53 s	NaOMe	342 nm	285 nm
2' - 6'	δ 7.78 dd (J=1.95; 9 Hz)	NaOAc	342 nm	285 nm
3' - 5'	δ 6.96 dd (J=2.34; 9.37 Hz)	NaOAc +H ₃ BO ₃	342 nm	285 nm
-OMe	δ 3.84 s	AlCl ₃	370 nm	315 nm
	δ 3.88 s δ 3.92 s	AlCl ₃ +HCl	365 nm	315 nm

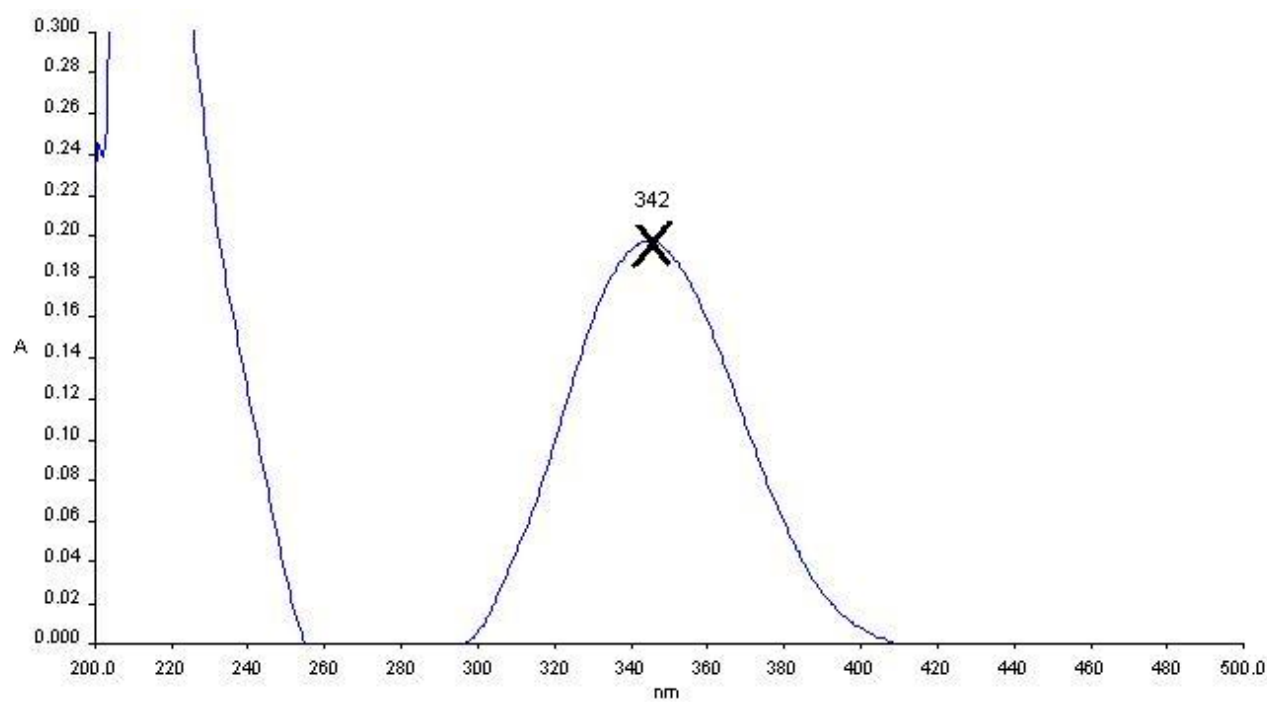


B bileşigi Standart
254 nm

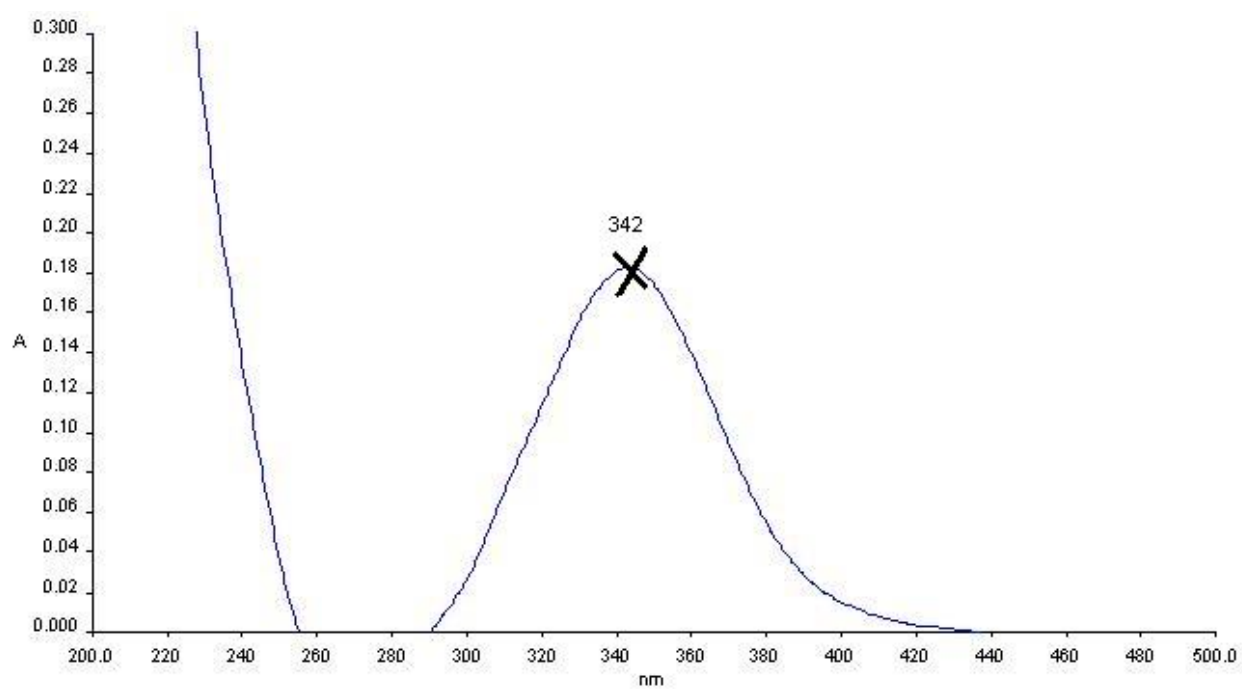


B bileşigi +
seryum sülfat

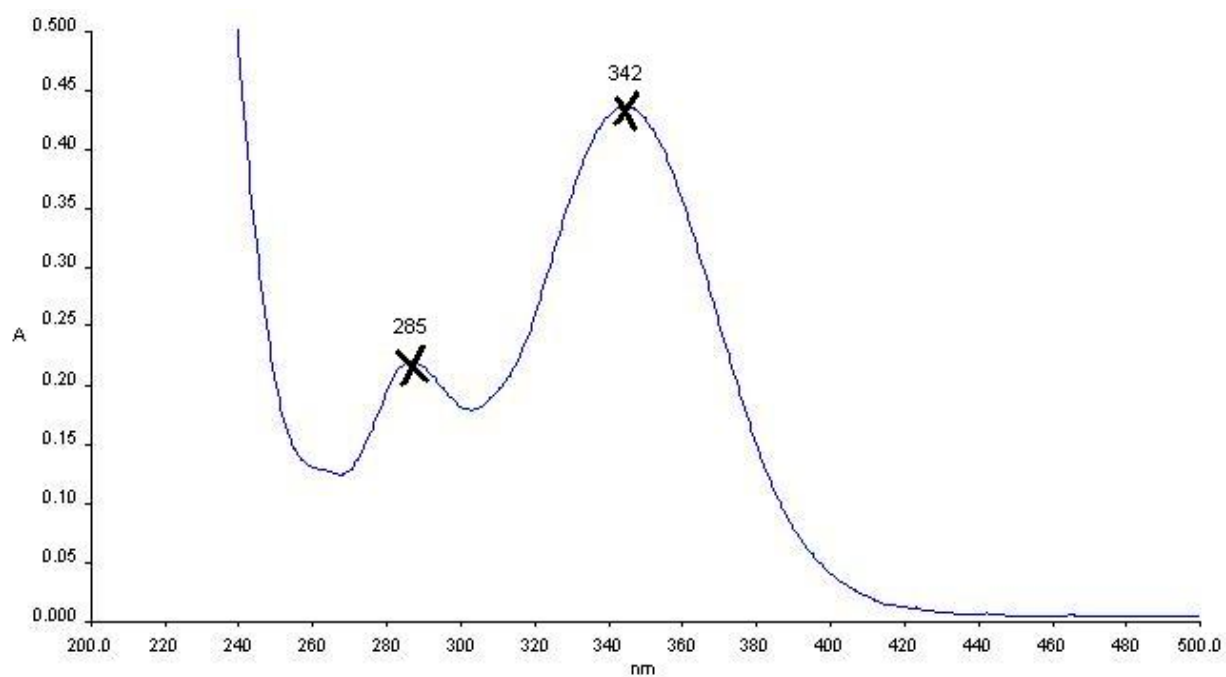
Resim 7.2.1 B bileşiginin standart madde ile birlikte [7 Tol: 3 EA] sisteminde yürütüldükten sonra 254 nm UV ışık altında ve seryum sülfat belirteci ile yakıldıktan elde edilen İTK kromatogramları



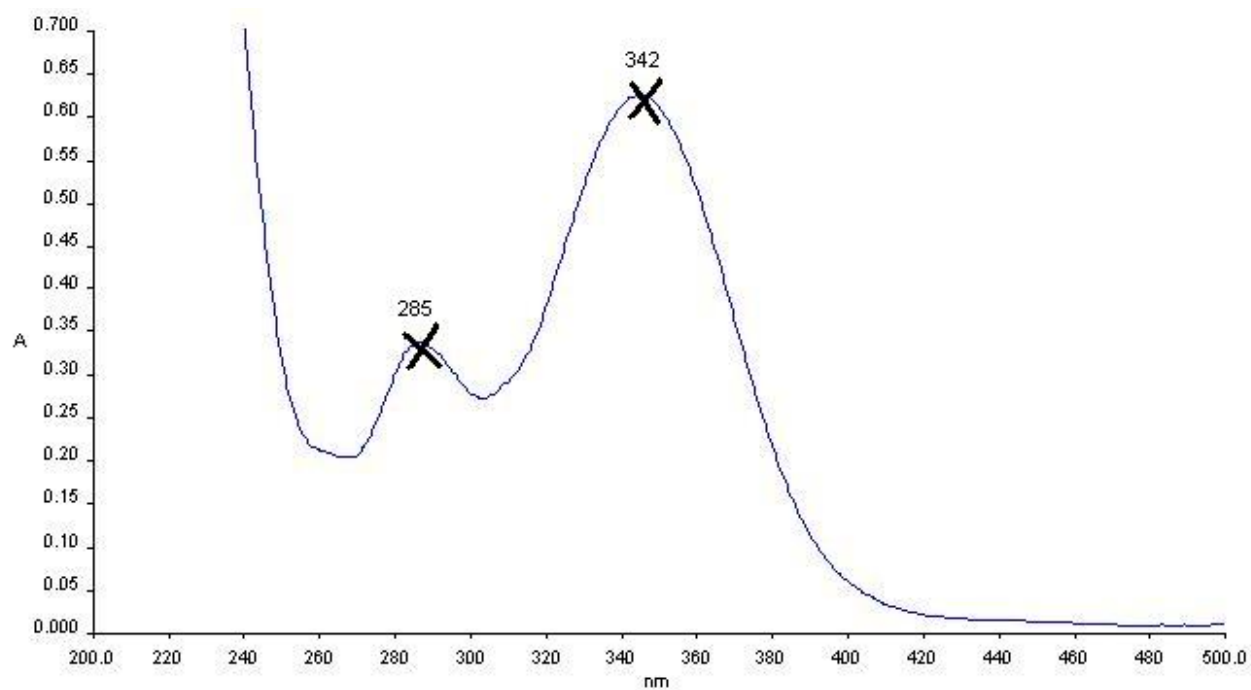
MeOH spektrumu



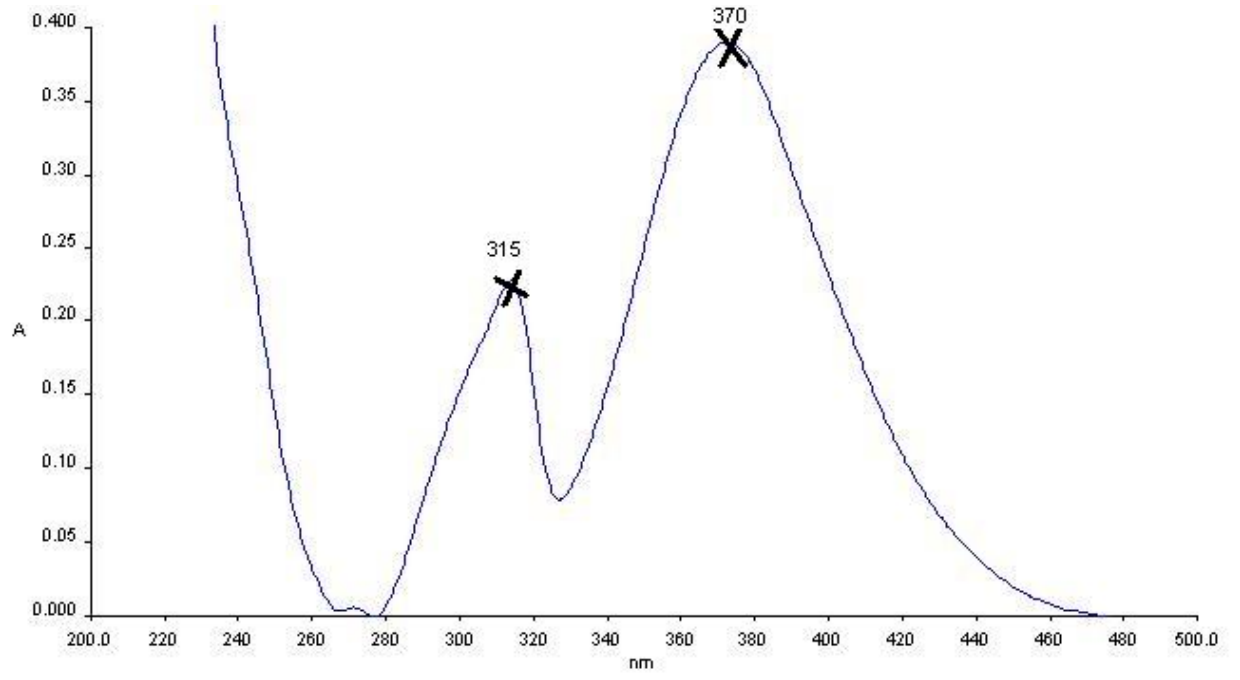
NaOMe spektrumu



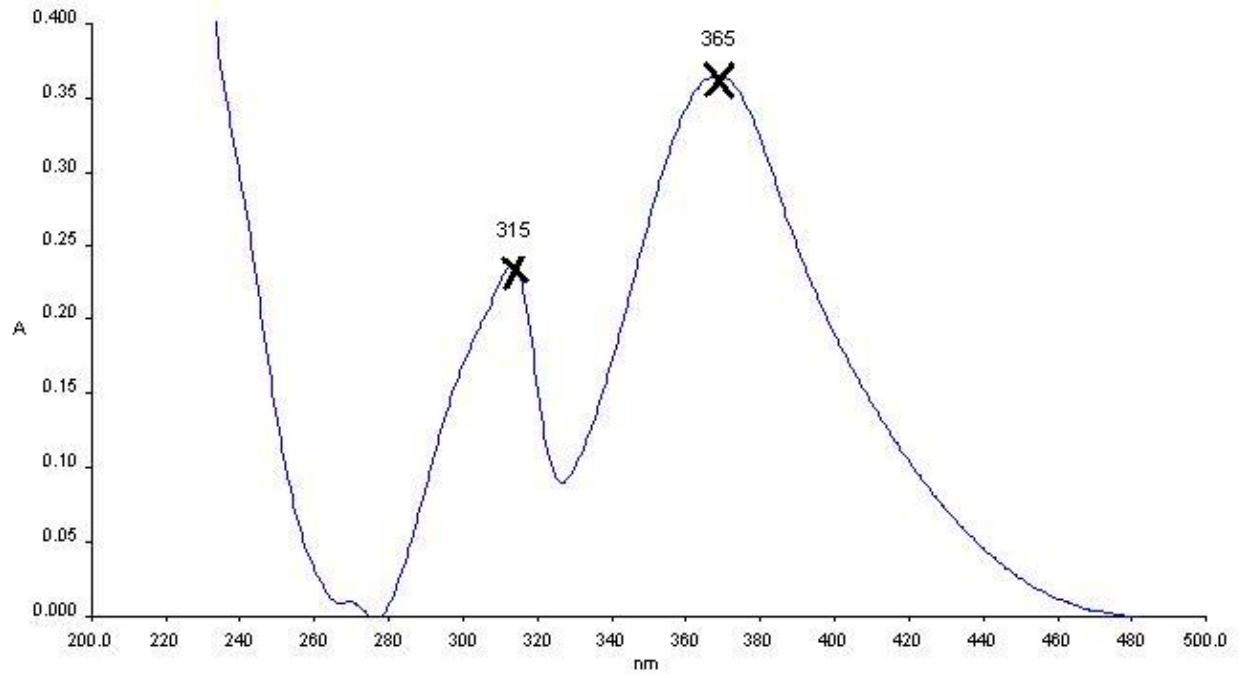
NaOAc spektrumu



NaOAc + H₃BO₃ spektrumu

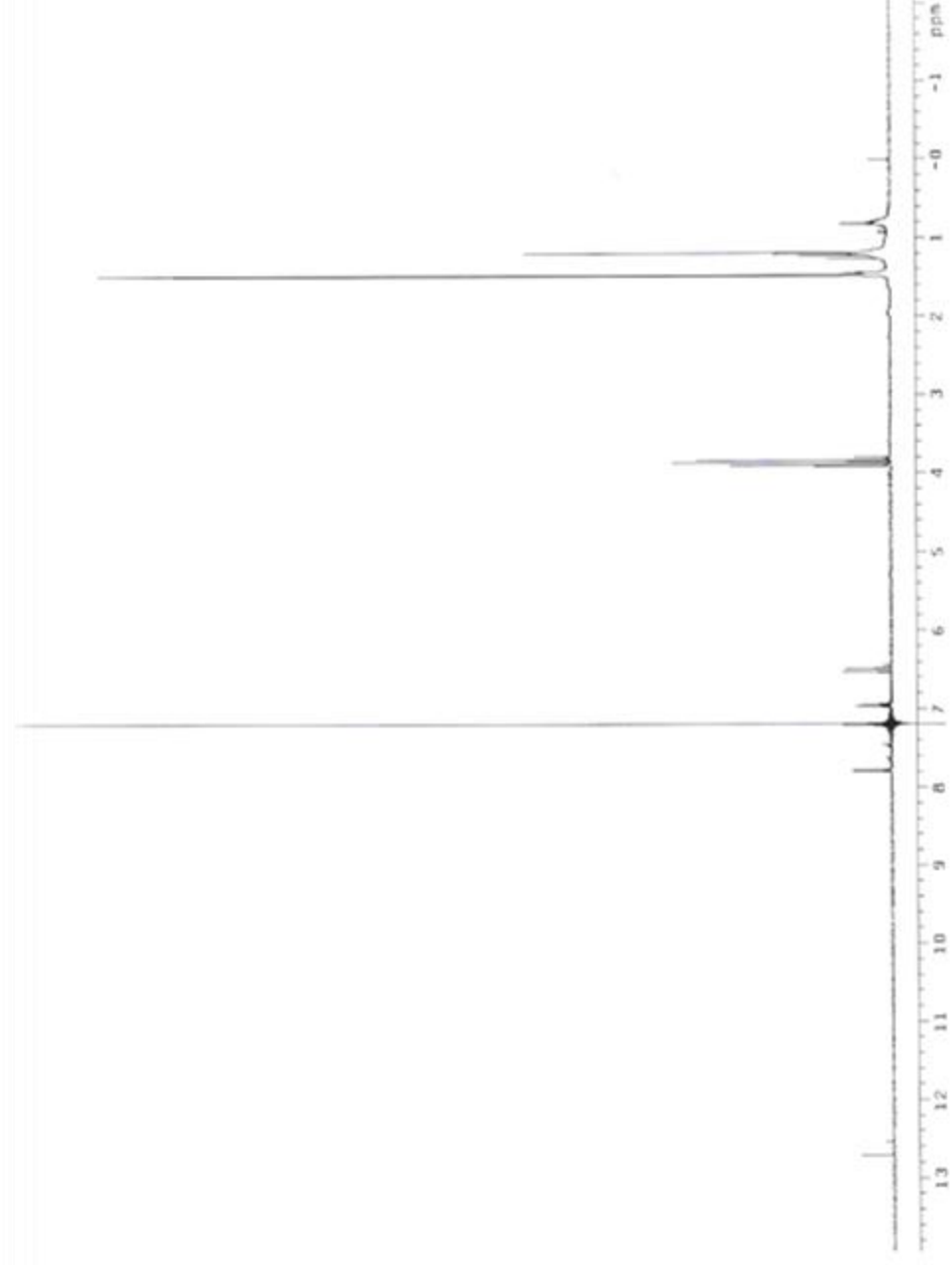


AlCl_3 spektrumu



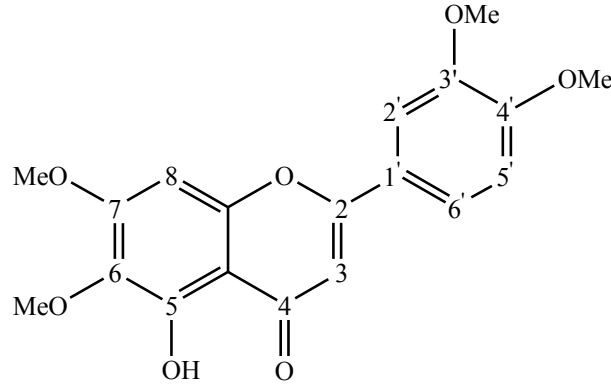
$\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ spektrumu

Şekil 7.2.1 B bileşiğinin UV kayma spektrumları



Şekil 7.2.2 B bileşiğinin ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spektrumu

7.3 C Bileşiği: 6,7,3',4'-tetrametoksi luteolin (6,7,3',4'-tetrametoksi apigenin)



İzole edilen diğeri bir bileşik olan C bileşiği silika jel plak üzerinde 254 nm UV ışık altında kahverengi görünmekte, seryum sülfat belirteci püskürtölüp yakıldığında ise sarı renk almaktadır (Resim 7.3.1). Kristalize bir yapı gösteren bu maddenin yapı analizi ^1H NMR ve UV/VIS spektroskopisi ile belirlenmiştir.

CDCl_3 da alınan ^1H NMR spektrumunda 3.80-4.00 ppm arasında görölün pikler yapıda metoksi gruplarının olduğunu ve bileşiğin bir flavon olabileceğini düşündürmüştür. Bu pikler δ 3.86, 3.90, 3.91 ve 3.92' de 4 tane olmak üzere birer singlet şeklinde görölümüştür. δ 7.28' de görölün geniş singlet nedeniyle D_2O ilave edilerek tekrar spektrum alınmış ve δ 7.28' de görölün singletin kaybolmadığı, aksine yarılarak bir dublet verdiği gözlenmiştir (H-2', d, $J=1.95$ Hz). δ 7.46' da orto ve meta etkileşim veren H-6' (dd, $J=8.59$; 1.95 Hz) protonu, δ 6.91' de orto etkileşim veren H-5' protonu (d, $J=8.2$ Hz) gözlenmiştir. H-8 protonu δ 6.53' de; H-3 protonu ise δ 6.49' da birer singlet vermiştir. H-8 protonun singlet vermesi C-6 pozisyonunun dolu olduğunu gösterir (Şekil 7.3.2). Moleküldeki süstitüe grupların konumları UV kayma reaksiyonları ile de kanıtlanmıştır.

Kayma reaktifleriyle alınan UV spektrumları sonuçlarına göre;

1) MeOH spektrumu: Bant I; 340 nm Bant II; 276 nm

2) MeOH+NaOMe: Bant I; 338 nm Bant II; 278 nm

* NaOMe ilave edildiğinde, MeOH spektrumuna göre kayma olmadığından; 4' pozisyonunda serbest OH grubu yok demektir. Buna göre metoksi gruplarından biri burada yer almaktadır.

3) MeOH+NaOAc: Bant I; 340 nm Bant II; 272 nm

* Bant II' de kayma olmadığından 7 pozisyonunda OH grubunun serbest olmadığı anlaşılmaktadır.

4) MeOH+NaOAc+H₃BO₃: Bant I; 340 nm Bant II; 272 nm

* MeOH spektrumuna göre kayma olmadığından yapıda orto dihidroksi grupları yok demektir.

5) MeOH+AlCl₃: Bant I; 370 nm Bant II; 282, 260 nm

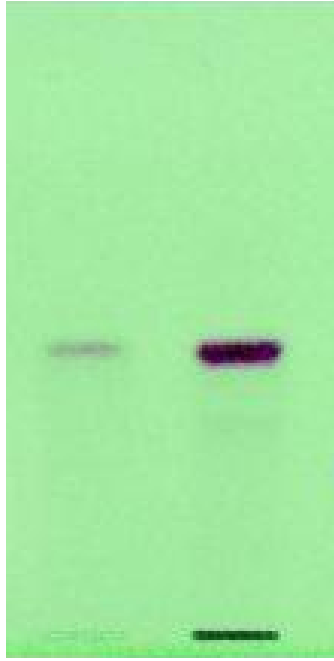
* MeOH spektrumuna göre her iki bantta da batokromik kayma görüldü. Bu; 5 pozisyonundaki OH grubundan ileri gelmektedir. Ayrıca Bant II' de ikiye bölünme olması 3' ve 4' pozisyonlarının dolu olduğunu göstermektedir.

6) MeOH+AlCl₃+HCl: Bant I; 362 nm Bant II; 280, 261 nm

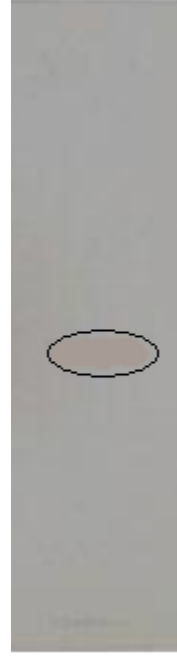
* MeOH+AlCl₃ spektrumuna göre fazla bir kayma olmadığından 3' veya 4' pozisyonunda OH grubunun olmadığı ve 5 pozisyonunda OH grubunun olduğu netlik kazanmıştır (Şekil 7.3.1).

Çizelge 7.3.1 C bileşiğinin ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃+D₂O) sonuçları ve UV kayma değerleri

H	¹ H NMR	Reaktif	Bant I λ max	Bant II λ max
3	δ 6.49 s	MeOH	340 nm	276 nm
8	δ 6.53 s	NaOMe	338 nm	278 nm
2'	δ 7.28 d (J=1.95 Hz)	NaOAc	340 nm	272 nm
5'	δ 6.91 d (J=8.2 Hz)	NaOAc+H ₃ BO ₃	340 nm	272 nm
6'	δ 7.46 dd (J=8.59; 1.95 Hz)	AlCl ₃	370 nm	282, 260 nm
-OMe	δ 3.86 s δ 3.90 s δ 3.91s δ 3.92 s	AlCl ₃ +HCl	362 nm	280, 261 nm

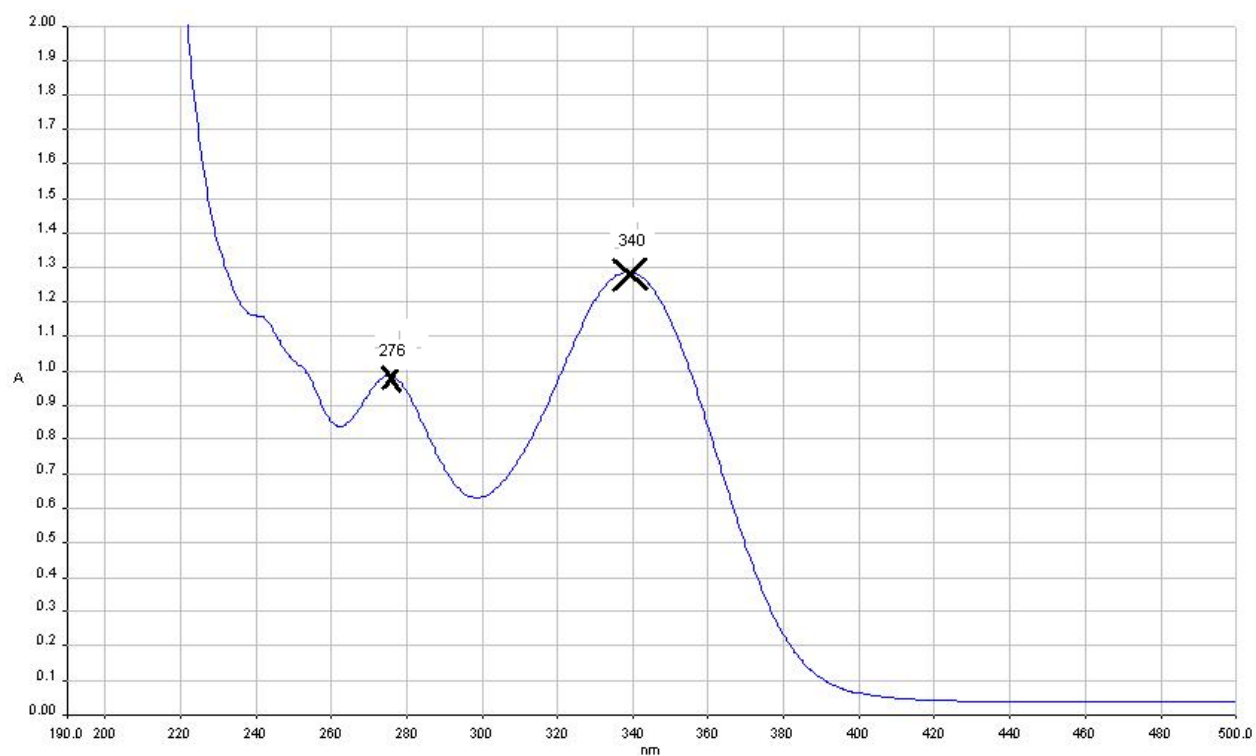


C bileşigi Standart
254 nm

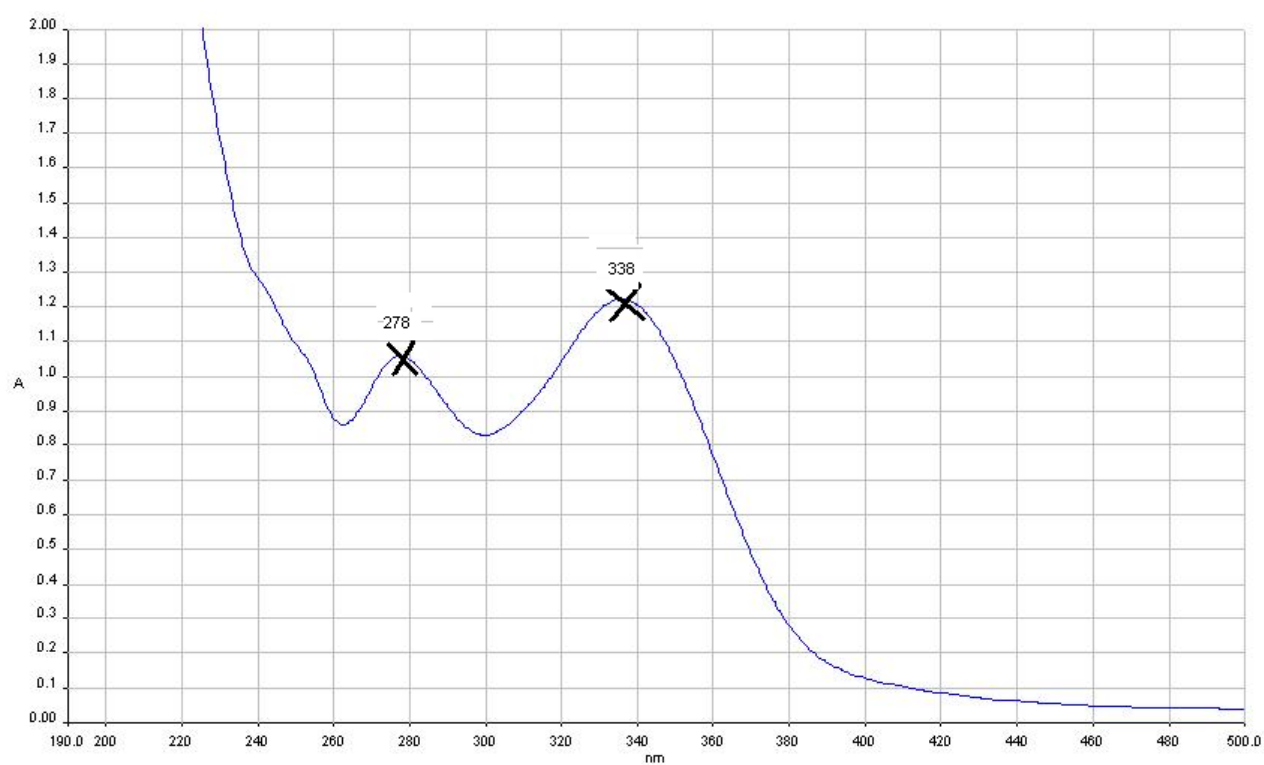


+ seryum sülfat

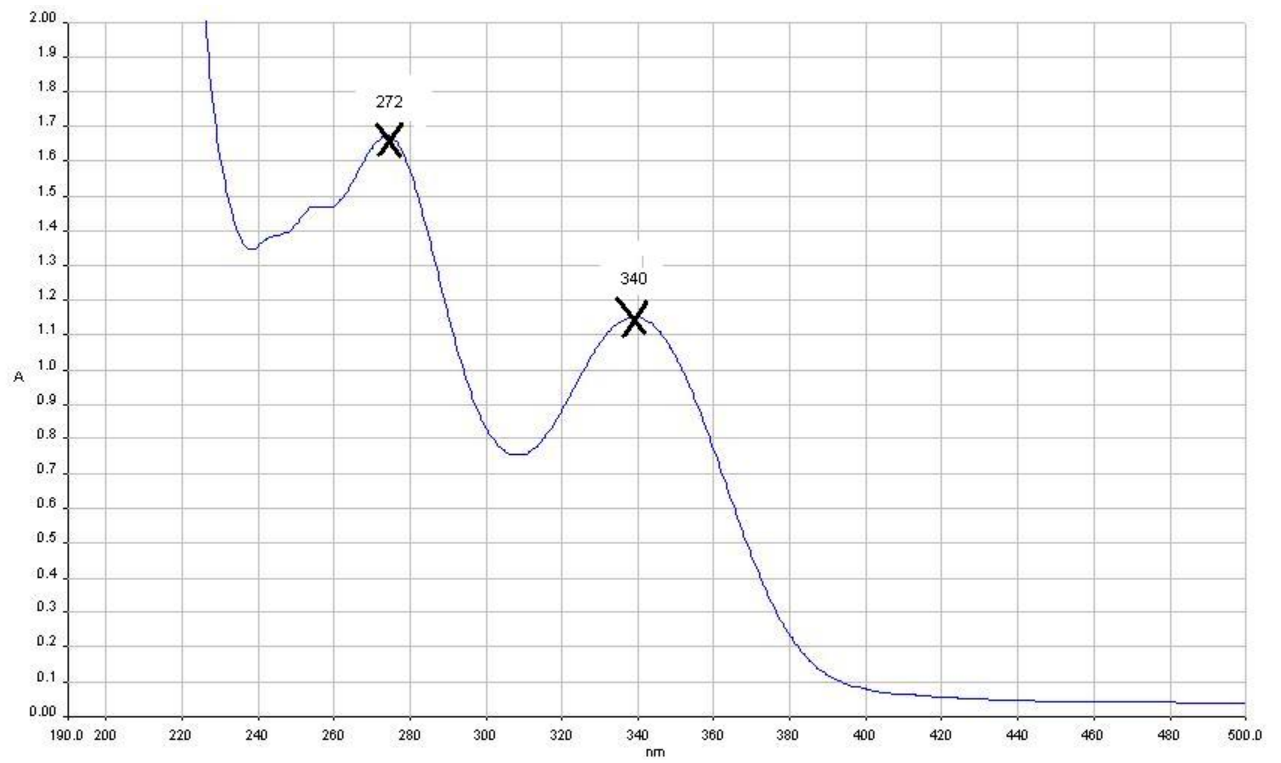
Resim 7.3.1 C bileşiginin standart madde ile birlikte [7 Tol: 3 EA] sisteminde yürütüldükten sonra 254 UV ışık altında ve seryum sülfat belirteci ile yakıldıktan sonra elde edilen İTK kromatogramları



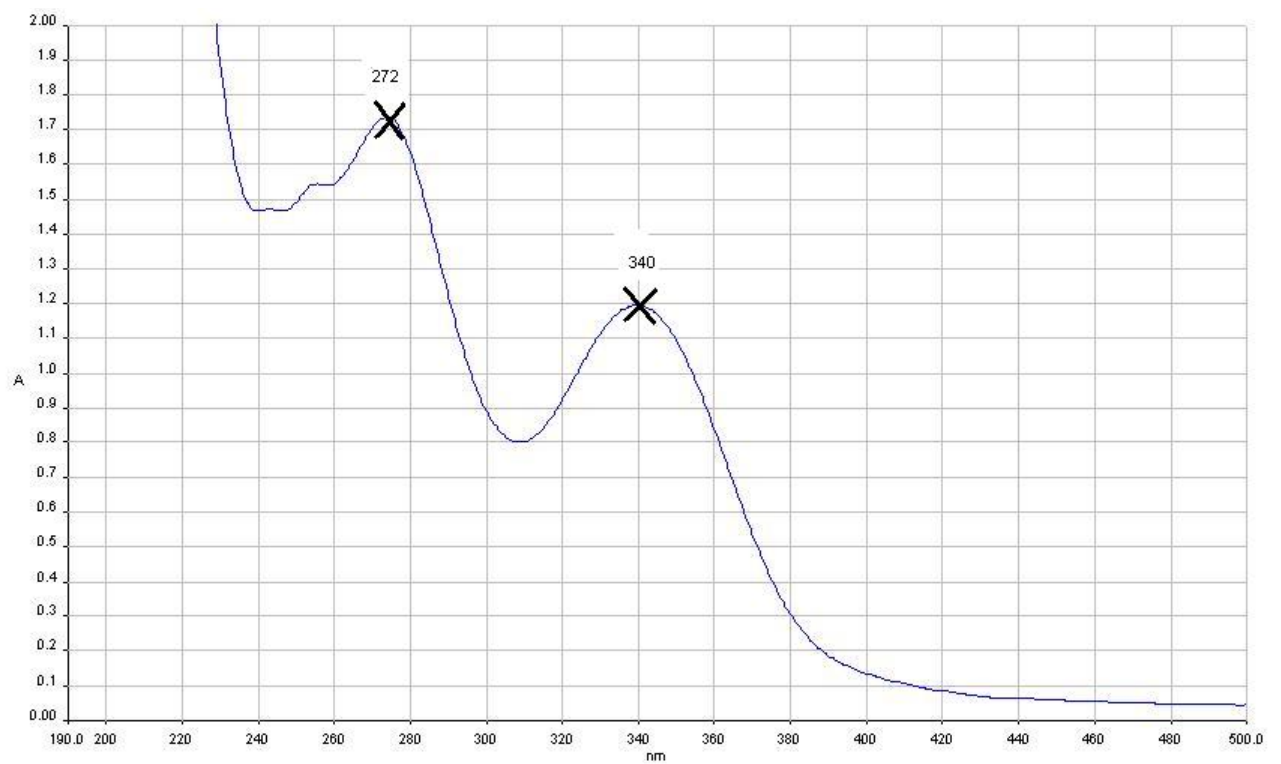
MeOH spektrumu



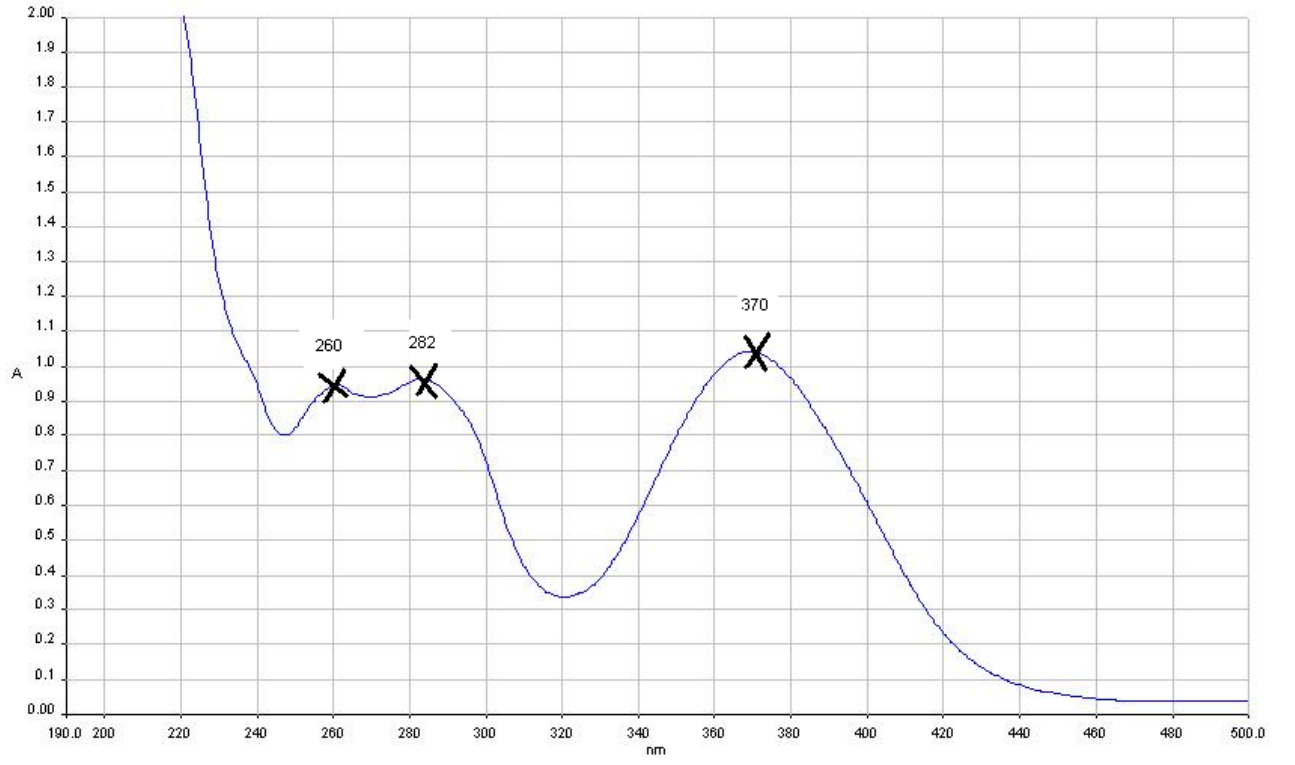
NaOMe spektrumu



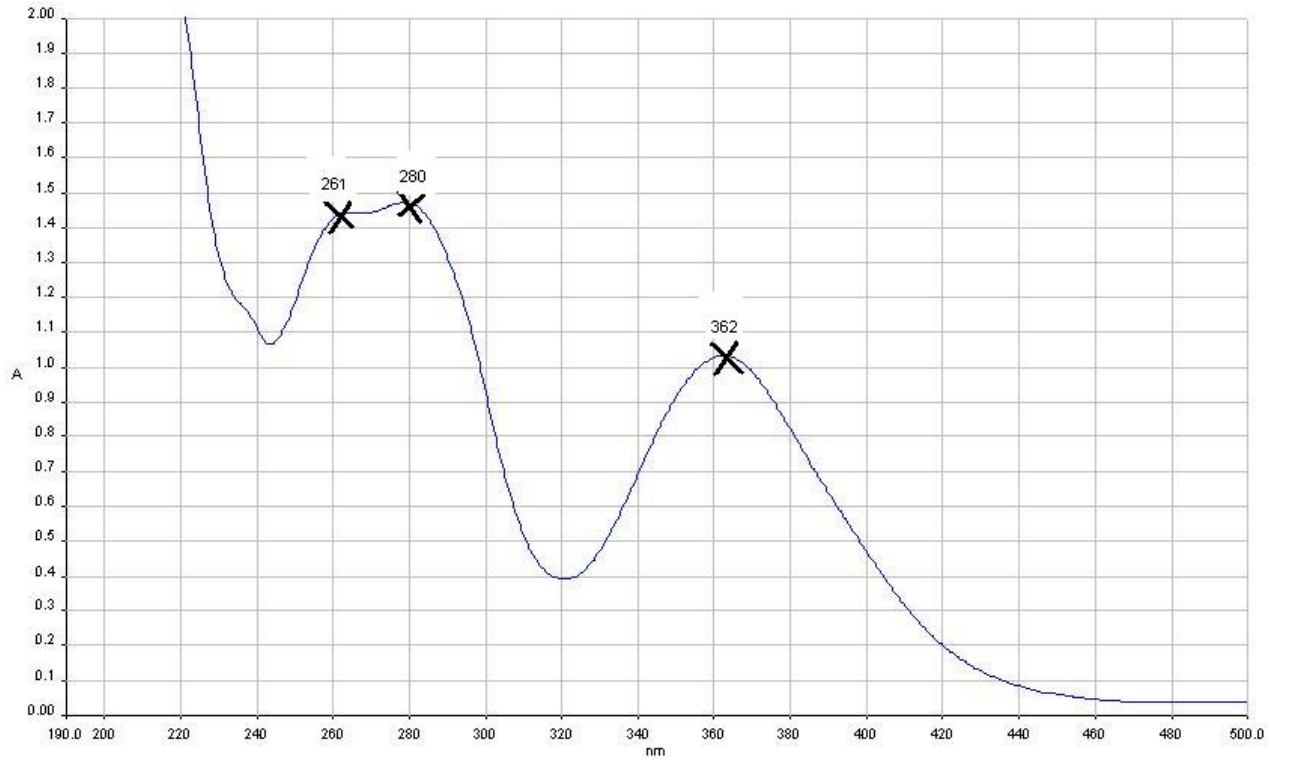
NaOAc spektrumu



NaOAc+ H₃BO₃ spektrumu

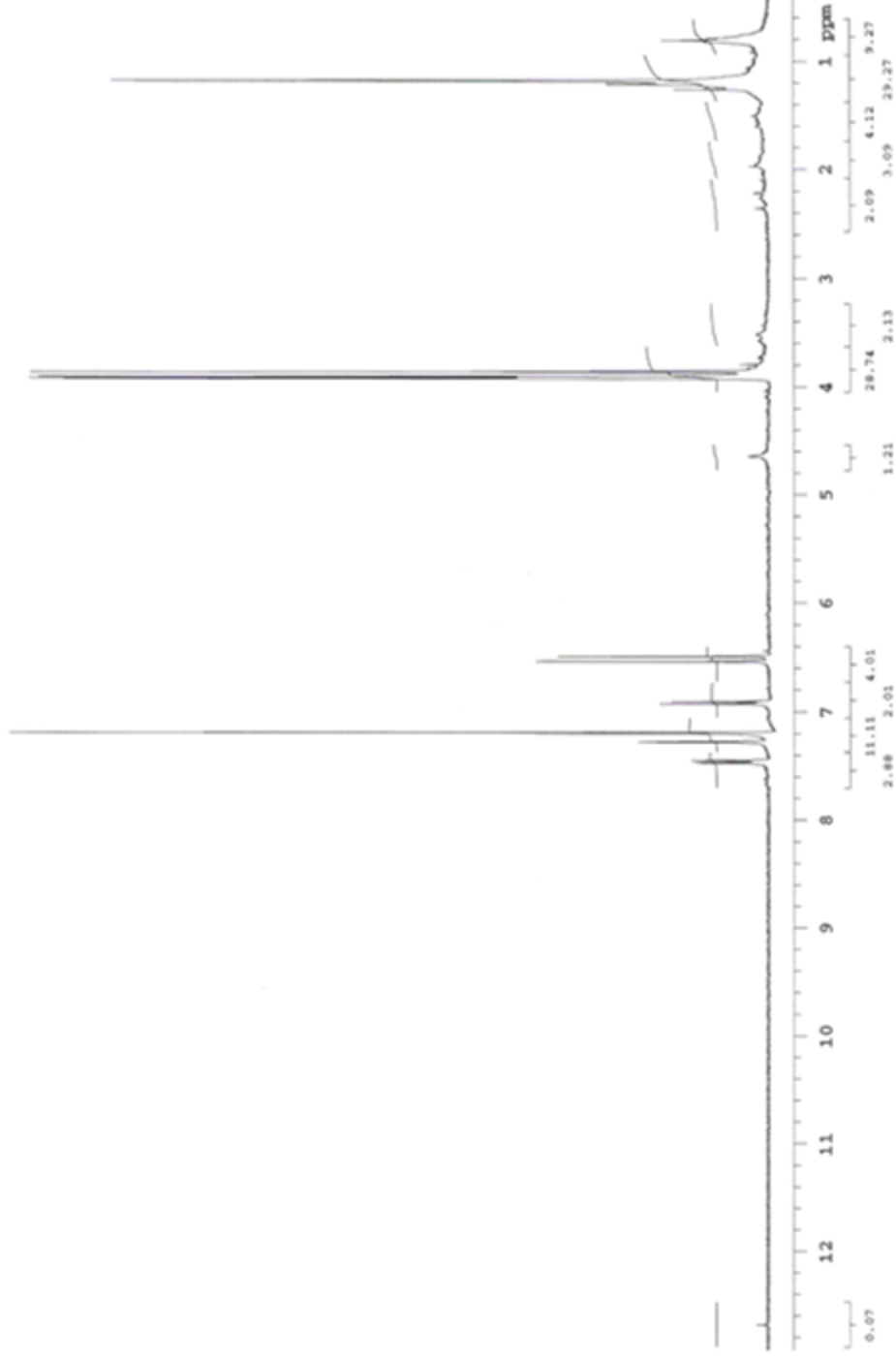


AlCl_3 spektrumu

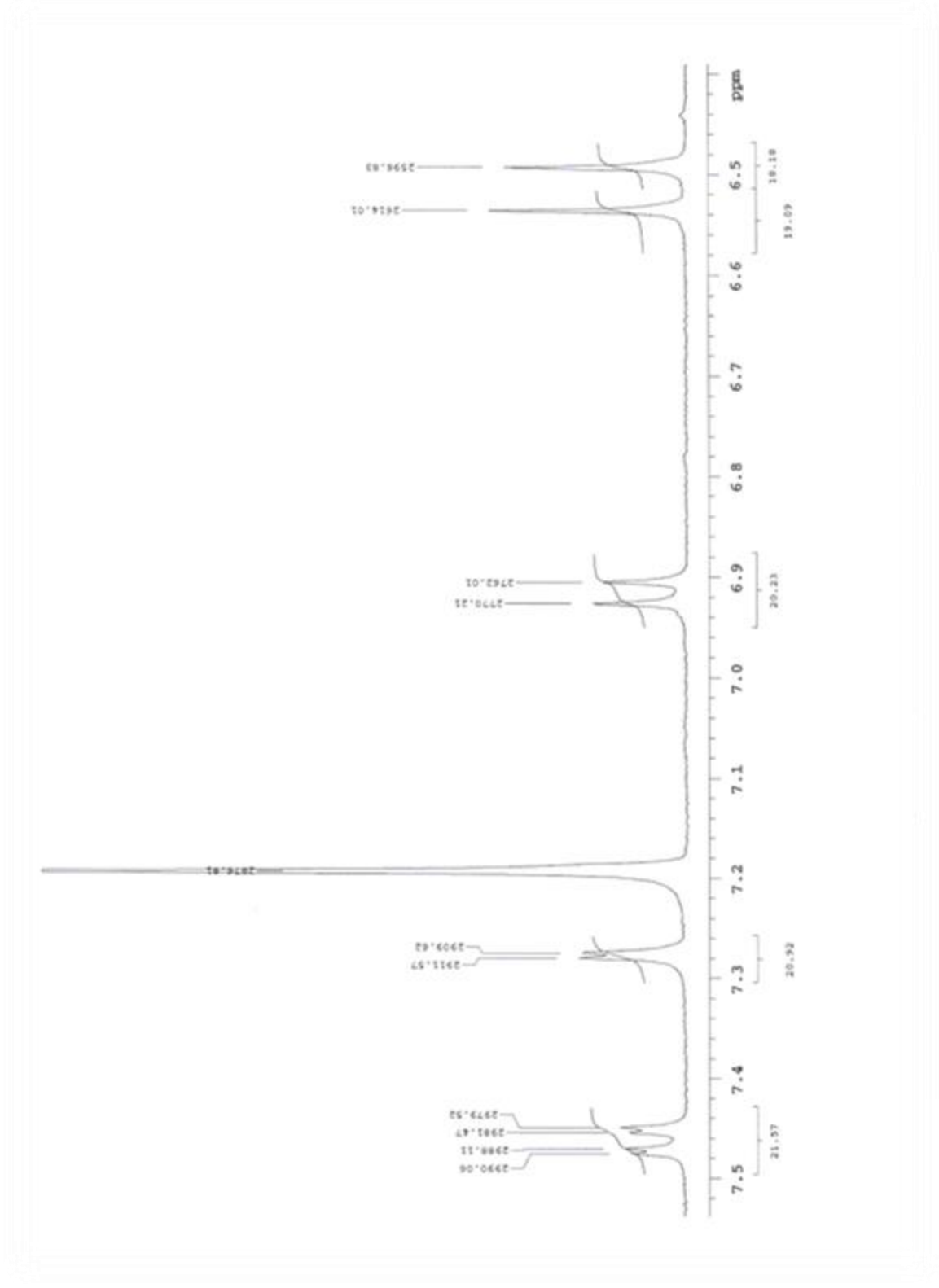


$\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ spektrumu

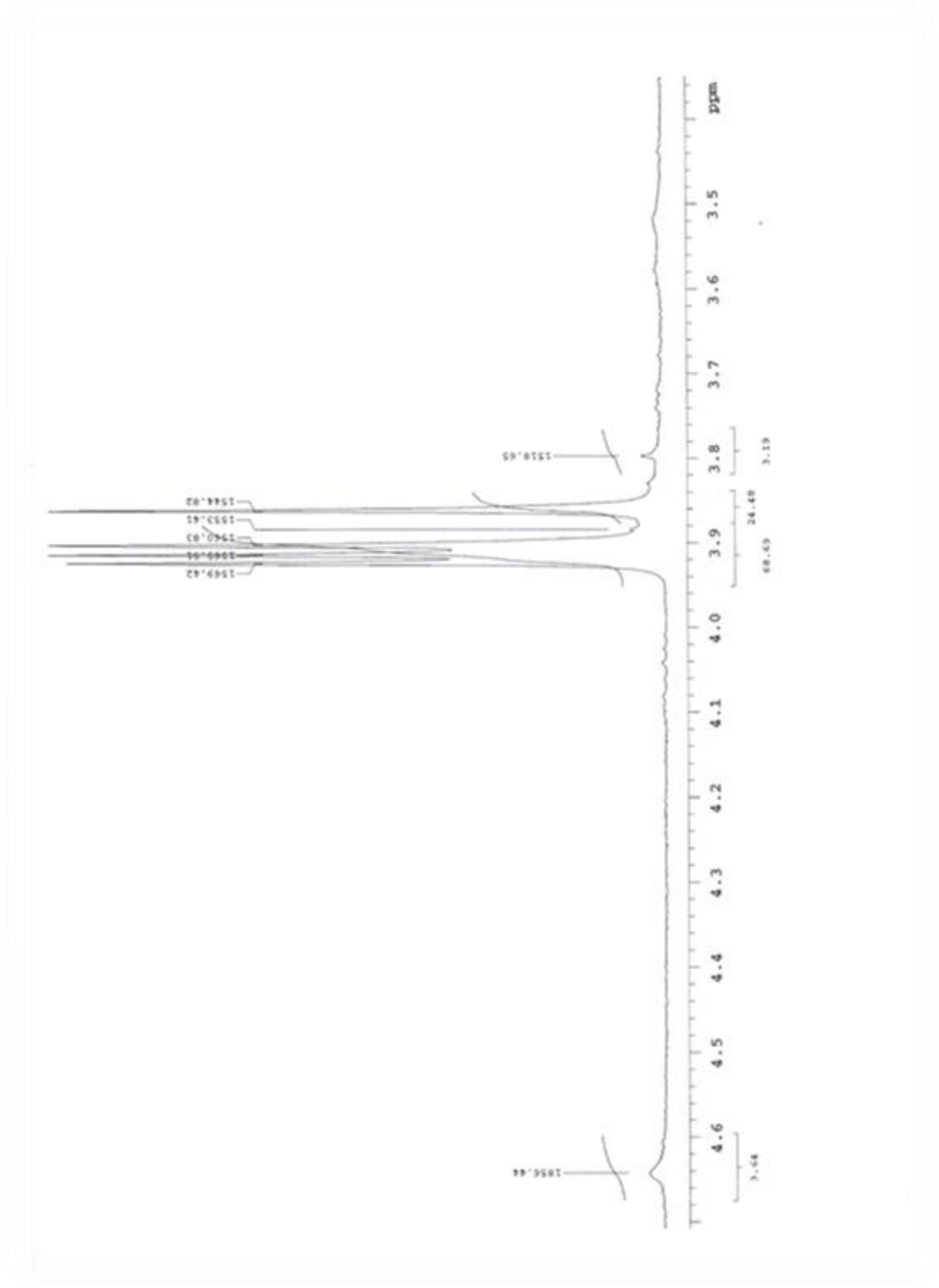
Şekil 7.3.1 C bileşiminin UV kayma değerleri



Şekil 7.3.2 C bileşiğinin 1H NMR (400 MHz, CDCl₃+D₂O) spektrumu

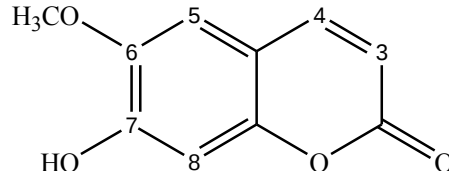


Şekil 7.3.3 C bileşiğinin ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃+ D₂O) spektrumu



Şekil 7.3.4 C bileşiğinin ^1H NMR (400 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{D}_2\text{O}$) spektrumu

7.4 D Bileşigi: 7-Hidroksi 6-metoksi kumarin



254 nm UV ışıktta açık mavi, 366 nm’ de ise parlak mavi renk veren bu bileşik seryum sülfat belirteci püskürtölüp 110 °C’ de yakıldıktan sonra açık sarı bir renk vermektedir (Resim 7.4.1).

CDCl_3 ’ da alınan ^1H NMR spektrumunda δ 3.88’ de görölün singlet (-OCH₃) grubuna aittir. H-3 protonu H-4 protonu ile etkileşerek δ 6.20’ de $J=9.37$ Hz’ lik bir dublet, H-4 protonu da aynı şekilde H-3 protonu ile etkileşerek δ 7.53’ de yine $J=9.37$ Hz’ lik dublet vermiştir. δ 6.79’ da H-8 protonu, δ 6.85’ de H-5 protonu singlet şeklinde rezonans olmuşlardır (Şekil 7.4.1).

Çizelge 7.4.1 D bileşiginin ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) sonuçları

H-3	δ 6.20 (1H, d, $J=9.37$ Hz)
H-4	δ 7.53 (1H, d, $J=9.37$ Hz)
H-5	δ 6.85 (1H, s)
H-8	δ 6.79 (1H, s)
6-OMe	δ 3.88 (3H, s)



254 nm

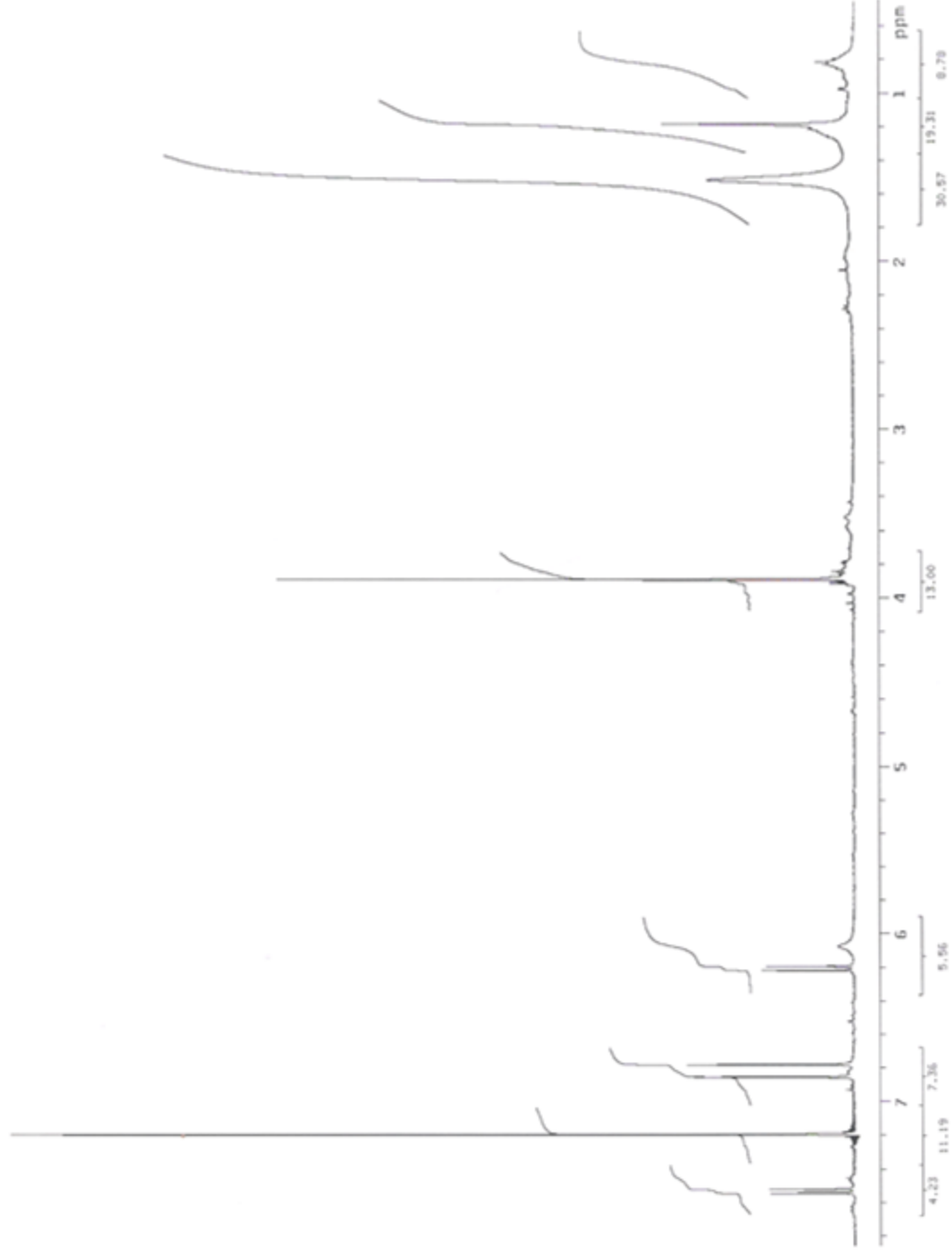


366 nm



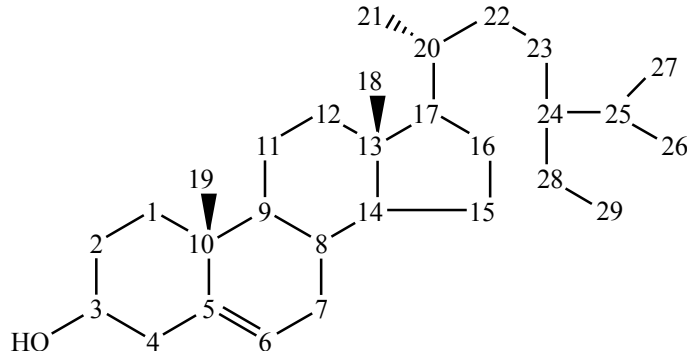
+seryum sülfat

Resim 7.4.1 D bileşiminin [7 Tol: 3 EA] sisteminde yürütüldükten sonra 254, 366 nm UV ışık altında ve seryum sülfat belirteci püskürtülüp yakıldıktan sonra elde edilen İTK kromatogramları



Şekil 7.4.1 D bileşiğinin ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spektrumu

7.5 E Bileşiği: β -sitosterol



İzole ettiğimiz diğer bir bileşik bir fitosterol olan ve kolesterole benzeyen bir yapı gösteren β -sitosterol' dır. Beyaz kristalize bir görüntüsü olan bu bileşik, 254 ve 366 nm UV ışıktı görünmemekte; seryum sülfat belirteci püskürtölüp 110 °C' de yakıldığında ise önce mavi-fuşya renk vermekte daha sonra kahverengine dönüşmektedir (Resim 7.5.1). Bileşiğin yapısı ^1H NMR spektroskopisi ve standartla İTK' da karşılaştıırma yapılarık belirlenmiştir (Şekil 7.5.1).

Karakteristik metil grupları δ 0.61-1.19 arasında gözlemlenmiştir. Buna göre; H-18 protonu δ 0.61, H-21 protonu δ 0.94, H-19 protonu δ 1.19' da singlet şeklinde rezonans olmuşlardır. H-19 protonu C-5 konumundaki çiftte bağ protonları ile allilik etkileşim gösterdiğinden daha aşağı alanda çıkmıştır. H-26 ve H-27 metil protonları birbirleriyle etkileşerek δ 0.85' de $J=6.6$ Hz' lik dublet vermişlerdir. H-6 konumudaki olefinik proton δ 5.28' de geniş bir dublet, C-3 konumundaki visinal hidroksil protonu ise δ 3.45' de bir multiplet vermiştir (Çizelge 7.5.1).

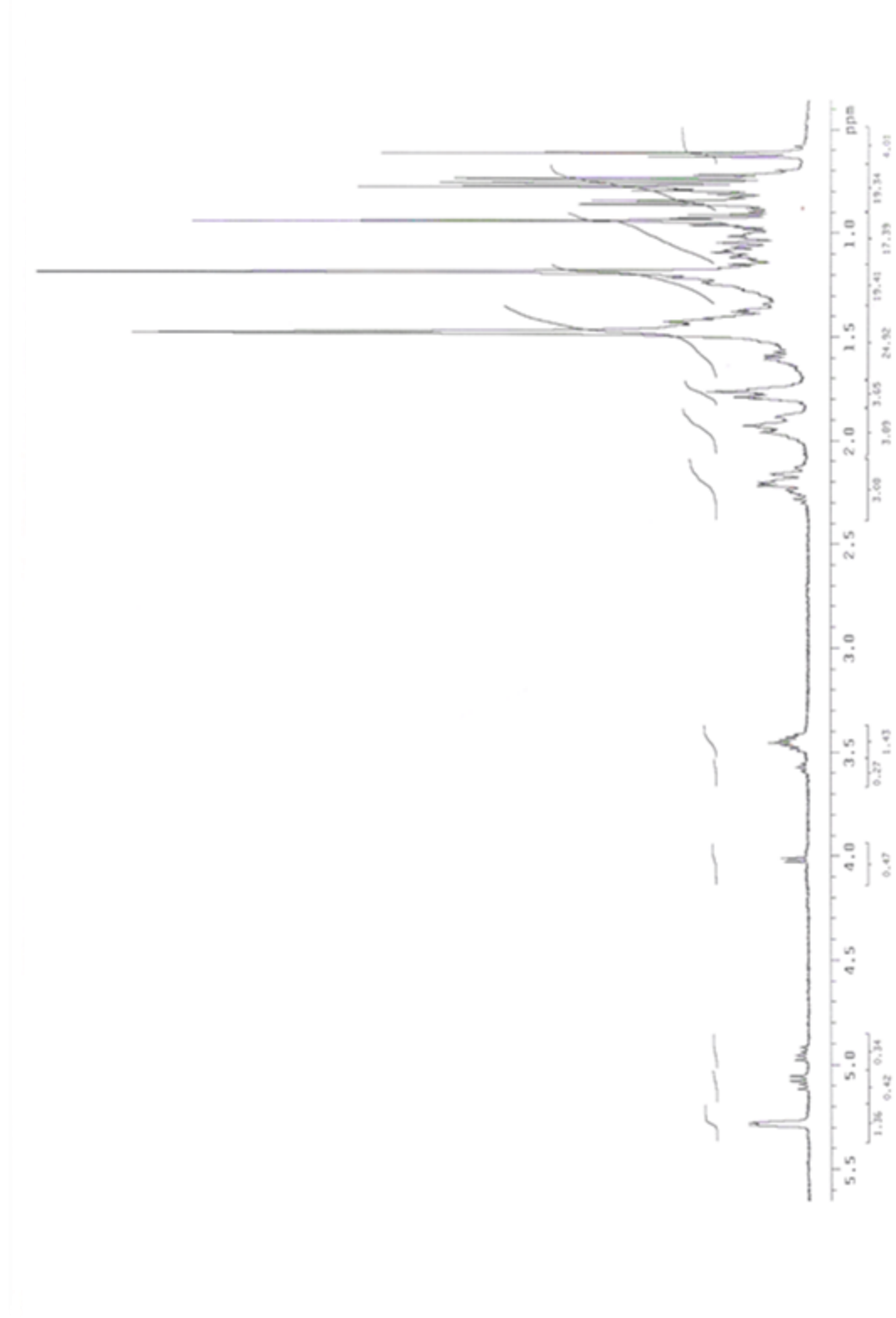
Çizelge 7.5.1 E bileşiğinin ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) sonuçları

H-18	δ 0.61, s
H-19	δ 1.19, s
H-21	δ 0.94, s
H-26; H-27	δ 0.85 (d, $J=6.6$ Hz)
H-3	δ 3.45, m
H-6	δ 5.28, br d



+ seryum sülfat

Resim 7.5.1 E bileşığının [Eter]' de yürütüldükten sonra seryum sülfat belirteci püskürtülüp yakıldıktan sonra elde edilen İTK kromatogramı



Şekil 7.5.1 E bileşiğinin ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spektrumu

8. ANTİOKSİDAN AKTİVİTE ÇALIŞMASI

Çalışmamızın bu bölümünde *Tanacetum kotschy* bitkisinin ham ekstreleri ve izole edilen flavonoidler üzerinde antioksidan aktivite incelemeleri yapılmıştır. Bu çalışma için CAMAG marka Linomat 5 ve TLC Scanner 3 cihazları kullanılmıştır. Uygulama HPTLC sisteminde silika jel plaklar kullanılarak yapılmıştır. Örneklerin antioksidan özellikleri DPPH serbest radikali ile yapılan absorbans ölçümleri ile belirlenmiştir. DPPH radikali 515-517 nm arasında maksimum absorbans göstermektedir. DPPH hidrojen/elektron aldığındaki indirgenerek hidrazin formunu alır ve verdiği maksimum absorbans değeri düşer. Ekstre ve saf maddelerin DPPH radikali süpürücü etkileri Yamaguchi ve arkadaşlarının (Yamaguchi vd., 1998) ve Shikov ve arkadaşlarının (Shikov vd., 2007) geliştirdikleri yönteme benzer bir yol izlenerek tespit edilmiştir (Polatoğlu, 2009).

Çalışmanın hazırlık aşamasında ham ekstrelerden gövde MeOH ve gövde EA ekstreleri 1mg/mL; izole edilen flavonoidler ise 10 mg/mL olacak şekilde spektroskopik MeOH’de çözülerek hazırlanmıştır. Serbest radikal olarak DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) 3.94 mg tartıldıktan sonra 100 mL MeOH’de dikkatlice çözülerek etrafı alüminyum folyo kaplı cam şişeye aktarılmıştır. DPPH kullanılmadığı zamanlarda buzdolabında saklanmıştır. Standart radikal süpürücü olarak BHT ve α -tokoferol kullanılmıştır. Her biri koyu renkli şişelerde 10 mg/mL ve 1mg/mL’lik miktarlarda MeOH’de çözülerek hazırlanmışlardır. Bunlar çalışmanın pozitif kontrol gruplarıdır. Her bir numuneden ve radikal gruplarından 5’er örnek olacak şekilde ependorflara önce 100’er μ L DPPH daha sonra 20’şer μ L hazırlanan ekstre ve flavonoidler ilave edilmiştir. En son gruba 20’şer μ L MeOH ilave edilmiştir. Bu grup çalışmanın negatif kontrol grubudur. Daha sonra her bir ependorf 1-2 dk. vorteks cihazında karıştırılıp, oda sıcaklığında 1 saat karanlıkta bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında 10x20 cm’lik İTK plaklar kullanılarak 2’şer μ L’lik ekimler yapılmıştır. Her plakta BHT ve α -tokoferol’ün olduğu pozitif kontrol grubu ve DPPH+MeOH’ün olduğu negatif kontrol grubu bulunmaktadır. Plaklara önce DPPH karıştırılmayan örnekler, diğer plaklara da DPPH’li örnekler ekilmiştir. Ekim işlemi tamamlandıktan sonra her plağın 517 nm’deki absorpsiyonu ölçülmüş ve sonrasında hesaplamalar yapılmıştır. Serbest radikal giderim aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır ve sonrasında her bir örneğin ortalaması alınıp, XLSTAT 2009 programı kullanılarak standart sapmaları belirlenmiştir. Ekstrelerin farklı konsantrasyonlardaki absorbans ölçümleri için 3, saf maddeler için 2 tekrar yapılmıştır.

Standart radikaller için;

$$A_{517} = A_{(-) \text{ kontrol}} - [A_{(+) \text{ kontrol}} - A_{\text{DPPH}^{\cdot-} \text{ sız } (+) \text{ kontrol}}] / A_{(-) \text{ kontrol}} \times 100$$

Örnekler için;

$$A_{517} = A_{(-) \text{ kontrol}} - [A_{\text{örnek}} - A_{\text{DPPH}^{\cdot-} \text{ sız örnek}}] / A_{(-) \text{ kontrol}} \times 100$$

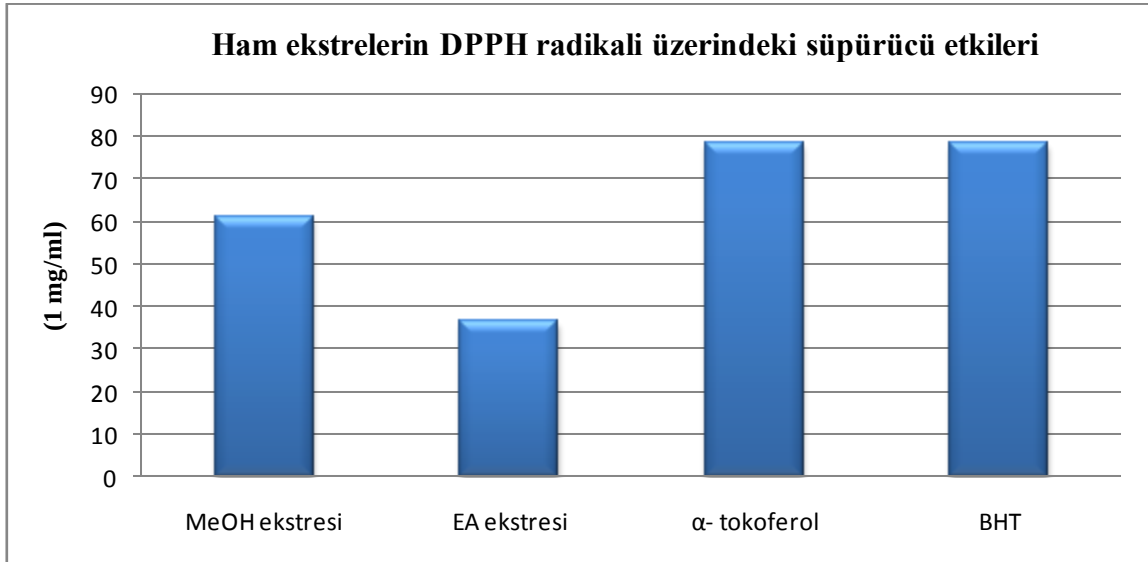
formülleri kullanılmıştır.

Ekstrelerin ve izole edilen flavonoidlerin radikal süpürücü etkileri, serbest bir radikal olan DPPH üzerinde standart radikal süpürücü BHT ve α -tokoferol ile karşılaştırılarak test edilmiştir. Serbest radikal süpürücü etki sonuçları 1 saat içinde süpürdüğü konsantrasyon olarak hesaplanmıştır. Saf maddelerin 10 mg/mL; ekstrelerin 1 mg/mL konsantrasyonlarındaki aktiviteleri belirlenmiştir. Buna göre MeOH ekstresi EA ekstresine göre; 6,7,3',4'-tetrametoksi luteolin bileşiği de salvigenin bileşiğine göre daha yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. Sonuçlar çizelge şeklinde verilmiştir.

Çizelge 8.1 *T. kotschy* bitkisinin gövde MeOH ve gövde EA ekstrlerinin DPPH radikali üzerindeki süpürücü etkileri ve standart sapma değerleri (% DPPH süpürücü etki $\pm$ St. Hata)

Örnek (1 mg/mL)	% DPPH süpürücü etki (Ort. $\pm$ SD.)
MeOH Ekstresi	61.06 $\pm$ 6.49
EA Ekstresi	36.6 $\pm$ 1.37
α -tokoferol	78.6 $\pm$ 1.87
BHT	78.4 $\pm$ 1.23

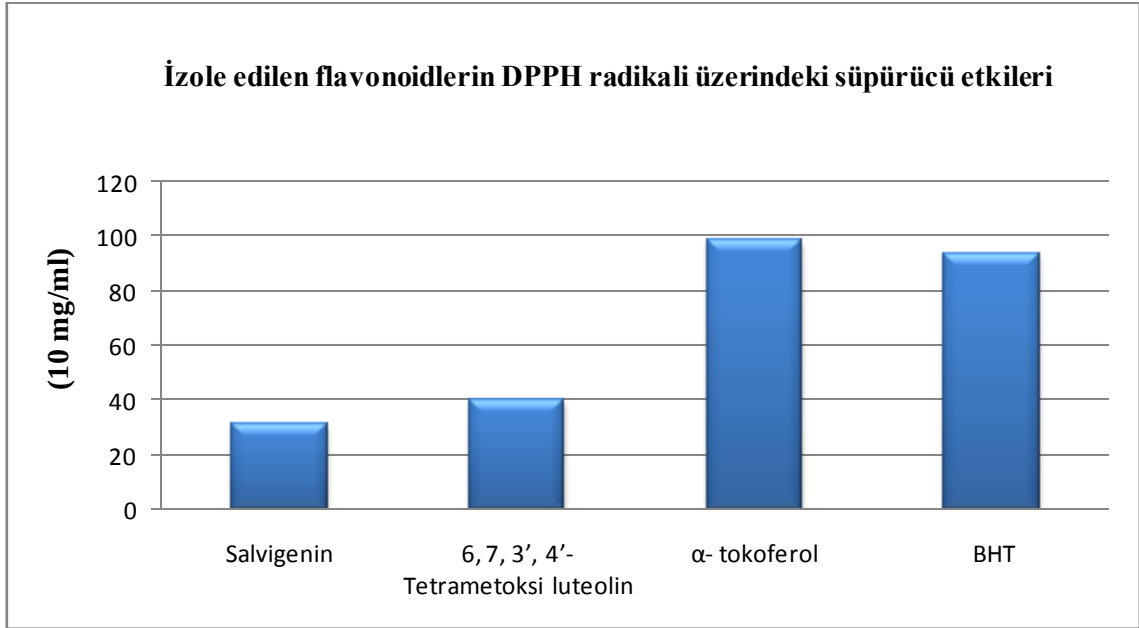
Şekil 8.1 *T. kotschy* bitkisinin gövde MeOH ve gövde EA ekstrlerinin DPPH radikali üzerindeki süpürücü etkileri



Çizelge 8.2 İzole edilen flavonoidlerin DPPH radikali üzerindeki süpürücü etkileri ve standart sapma değerleri (% DPPH süpürücü etki $\pm$ St. Hata)

EA Ekstresi (10 mg/mL)	% DPPH süpürücü etki (Ort. $\pm$ SD.)
Salvigenin	31.25 $\pm$ 3.51
6, 7, 3', 4'- Tetrametoksi luteolin	40.46 $\pm$ 4.64
α -tokoferol	98.88 $\pm$ 0.60
BHT	93.91 $\pm$ 0.32

Çizelge 8.2 *T. kotschy* bitkisinin gövde EA ekstresinden izole edilen flavonoidlerin DPPH radikali üzerindeki süpürücü etkileri



9. ANTİMİKROBİYAL ARAŞTIRMALAR

Antimikrobiyal aktivite testlerinde *Escherichia coli* (NRRL B-3008), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterobacter aerogenes* (NRRL 3567), *Proteus vulgaris* (NRRL B-123), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Meth. resist. S. aureus* (Klinik izolat) ve *Candida parapsilosis* (NRRL Y-12696) mikroorganizmaları kullanılmıştır. Tüm mikroorganizmalar stok halinde mikrotüpler içinde % 20' lik gliserol ile -85 °C' de korunmuştur. Analiz öncesi mikroorganizmalar Mueller Hinton Agar (MHA, Merck) katı besiyerinde 10 cm'lik petri kutularında 37 °C' de inkübatörde geliştirip, saflıkları kontrol edilmiştir. Daha sonra çalışılacak bakteriler Mueller Hinton Broth (MHB, Merck) sıvı besi yerlerine inoküle edilip 24 saat daha aynı sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Çalışmada kullanılacak tüm mikroorganizmalar deneylerden önce hazırlanmıştır. Ekstre ve saf maddeler 2mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanmıştır. Çözücü olarak % 25'lik DMSO veya MeOH ilave edilmiş sıvı besi ortamı kullanılmıştır. 96 kuyucuklu plakaların ilk sırasındaki (A1-12) her kuyucuğa 200 µL test maddeleri, geri kalan kuyucuklara (B1-12; H1-12) 100' er µL sıvı besi yeri (MHB) ilave edilmiştir. Daha sonra çok kanallı pipet yardımıyla A1-12 sırasındaki stok çözelti 100 er µL'lik hacimlerle B1-12 ve diğer sıralara (G1-12' ye kadar) seri halde transfer edilerek seyreltilmiştir. Kontrol grubunun olduğu sırada H sırasında seyreltme yapılmamıştır. Tüm kuyucuklara 100 µL bakteri ekmeden önce 24 saatlik MHB sıvı besiyerinde olan bakteriler McFarland No:0.5' e göre standartize edilmiş ve 24 saat 37 °C' de maddeler ile etkileştirmek üzere inkübe edilmiştir. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC, µL/mg) mikrobiyal üremenin olmadığı en yüksek konsantrasyon olarak belirlenmiştir. Ayrıca % 1'lik tetrazolium (TTC, Aldrich) tuzu renklendirme yardımıyla MIC değerlendirmelerinde kullanılmıştır. Çalışmada kloramfenikol standart antibakteriyal etken madde olarak kullanılmış ve 2 tekrarlı test sonuçları çizelge 9.1' de verilmiştir (Iscan vd., 2002; Winn vd., 2006).

Çizelge 9.1 *T. kotschy* bitkisinden elde edilen ekstreler ve sekonder metabolitlerin minimum inhibisyon konsantrasyonları (MIC mg/mL cinsinden verilmiştir)

	M.O.	Kaynak	Tetra metoksi luteolin	Achillin	Salvigenin	Gövde Hekzan	Gövde EA	Gövde MeOH	Çiçek Hekzan	Çiçek MeOH	Kök EA	Kök MeOH	Kloram fenikol
B1	<i>Escherichia coli</i>	NRRL B-3008	0,25	0,125	0,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	2,5 <	0,00781
B2	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	0,25	0,125	0,25	1,25	0,156	1,25	0,625	1,25	1,25	2,5	0,0039
B3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	0,25	0,125	0,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	2,5	0,0625
B4	<i>Enterobacter aerogenes</i>	NRRL 3567	0,25	0,125	0,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	2,5	0,0625
B5	<i>Proteus vulgaris</i>	NRRL B-123	0,25	0,125 <	0,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	2,5	0,0156
B6	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311	0,25	0,125	0,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	2,5	0,03125
B10	MRSA	Klinik izolat	0,25	0,125 <	0,25 <	1,25	0,156	0,625	1,25	1,25	1,25	1,25	0,00781
F8	<i>Candida parapsilosis</i>	NRRL Y-12696	0,25	0,125	0,125	1,25	0,625	1,25	1,25	1,25	1,25	2,5	1.25*

Not: Ön sonuçlar (preliminary) *T. kotschy* çiçek hekzan ve kök EA'da madde çözünme problemleri olmuştur. Antifungal olarak ketokonazol kullanılmıştır.

Deneyler 2 kez yapıldı, bir kez daha tekrarlanacaktır.

10. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında Compositae familyasına ait *Tanacetum kotschy* bitkisinin gövde etil asetat ekstresi üzerinde fitokimyasal ve biyoaktivite çalışmaları yapılmış, sonuçta 1 seskiterpen lakton; achillin, 2 flavonoid; salvigenin (6-metoksiapigenin 7-4'dimetileter), 6,7,3',4'-tetrametoksi luteolin, 1 fenolik bileşik; 7-hidroksi 6-metoksi kumarin ve bir de steroid; β -sitosterol (24-etil- 5-kolesten-3-ol) izole edilmiştir.

Tanacetum kotschy bitkisi ilk defa tarafımızdan çalışılmış olup, bir seskiterpen lakton olan achillin, *Tanacetum* türlerinden ilk defa izole edilmiştir. Bileşiğin yapısı spektroskopik yöntemlerden ^1H NMR, ^{13}C NMR, COSY, APT, HMBC, HMQC ve IR kullanılarak aydınlatılmıştır.

Literatür taramaları sonucunda achillin'in daha önce *Achillea millefolium* bitkisinden izole edildiği görülmüştür (Glasla vd., 2002). *Tanacetum* türlerinden ise *T. microphyllum* bitkisinden achillin'in farklı bir türevi olan 8 β -hidroksiachillin adlı bileşik izole edilmiştir (Abad vd., 1994).

Elde ettiğimiz flavonoidlerden biri olan salvigenin (6-Metoksi apigenin 7-4'dimetileter) adlı bileşik daha önce yine bir *Tanacetum* türü olan *T. aucheranum*' dan izole edilmiş olup (Gören vd., 1997), bu çalışmada bileşiğin yapısı, ^1H NMR, UV spektroskopileri yardımıyla ve referans madde ile karşılaştırılarak aydınlatılmıştır. Yapılan literatür taraması sonucunda bu bileşiğin daha önce, *Centaurea ornata*, *Orthosiphon stamineus*, *Salvia aethiopis*, *Sideritis congesta* türlerinden de elde edildiği ve Salvigenol (pisatirotol) olarak adlandırıldığı da görülmüştür (Ulubelen ve Uygur, 1976; Sezik ve Ezer, 1984; Navarro vd., 1990; Tezuka vd., 2000). Bu bitkilerin haricinde *A. depressa*, *A. ochroleuca*, *A. santolina* ve *A. wilhelmsii* gibi bazı *Achillea* türlerinden de izole edildiği (Valant-Vetschera ve Wollenweber, 1999; Si vd., 2006) görülen salvigenin bileşiği 6. karbonda metoksi sübstitüenti taşıması nedeniyle kemotaksonomik olarak önemlidir (Ulubelen ve Uygur, 1976; Sezik ve Ezer, 1984; Ferreres vd., 1986; Navarro vd., 1990; Tezuka vd., 2000). salvigenin bileşiği (5-hidroksi-4',6,7-trimetoksiflavon) şeklinde de isimlendirilmektedir.

İzole ettiğimiz diğer bir flavonoid olan 6,7,3',4'-tetrametoksi luteolin bileşiği daha önceki çalışmalarda *Tanacetum* türlerinden *T. santolinoides*, *T. albipannosum* ve *T. aucheranum* bitkilerinden izole edilmiş (El-Din vd., 1985; Gören ve Jakupovic, 1990; Gören vd., 1997) olup; çalışmamızda bileşiğin yapısı ¹H NMR, UV spektroskopisi yöntemleriyle belirlenip referans madde ile karşılaştırılarak aydınlatılmıştır. Bu bileşik ayrıca 5-hidroksi luteolin 6,7,3',4' tetrametileter ve 3',4',6,7 tetrametoksi 5-hidroksiflavon şeklinde de isimlendirilmektedir (Gören vd., 2002).

Bir fenolik bileşik olan ve birçok bitkide bulunan 7-hidroksi 6- metoksi kumarin çalışmamızda izole ettiğimiz bir diğer bileşiktir. Fenolik maddeler doğal antioksidanların en önemli gruplarını oluştururlar (Gray, 1978; Javonovic vd., 1984; Shahidi ve Wanasundara ve Shahidi, 1992; Moure vd., 2001). Bunlar bitkilerin tüm kısımlarında görülen polifenolik komponentlerdir. Yeni kesilmiş çimen kokusunda bulunan kumarin 1882' den bu yana parfüm ve önemli bir antikoagulant olan warfarinin yapımında kullanılmaktadır (Schäfer vd., 1990). Kumarin bileşiğinin yapısı ¹H NMR spektroskopisi ile aydınlatıldıktan sonra literatür araştırması ile kesinlik kazanmıştır. Bileşik scopoletin olarak da adlandırılmaktadır (Mohamed ve Mahrous, 2009).

Yüksek bitkilerde bulunan fitosterollerden biri olan β -sitosterol (24-etil-5-kolesten-3-ol) bileşiği izole ettiğimiz diğer bir bileşiktir. β -Sitosterol steroidal ilaçların ve kolesterol düşürücü gıdaların yapımında kullanılan bir bileşiktir (Vanhanen ve Miettinen, 1992; Gylling ve Miettinen, 1996; Jones vd., 1997). Bileşiğin yapısı ¹H NMR spektroskopisi ile belirlenip (Moghaddam vd., 2006), İTK' da standart madde ile farklı çözücü sistemlerinde kontrol edilmiştir.

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

Sonuç olarak, Van Güzeldere Geçit' inden toplanan *Tanacetum kotschyi* bitkisinin gövde etil asetat ekstrelerinden izolasyon çalışması ilk defa tarafımızdan yapılmıştır. Bu çalışmada bu bitkiden elde edilen 5 maddenin yapısı spektral analiz ve literatür karşılaştırılmasıyla aydınlatılmış, saf madde ve ekstrelerin antioksidan ve antimikrobiyal aktivite analizleri yapılmıştır.

Saf maddeler ve ekstrelerin antioksidan etkileri HPTLC sistemiyle modifiye edilen bir yöntemle belirlenmiştir. En yüksek antioksidan etkiyi MeOH ekstresi vermiştir. Aktivitesi (% 61.06) kısmen α -tokoferol (% 78.6) ve BHT' ye (% 78.4) yakın çıkmıştır. İzole edilen saf maddelerden en yüksek antioksidan aktiviteyi 6,7,3',4'-tetrametoksi luteolin (% 40.46) göstermiştir. Bu etkinin maddenin izole edildiği Gövde (EA) ekstresinin göstermiş olduğu antioksidan etkiden (% 36.6) daha yüksek olduğu görülmektedir. İzole edilen maddelerin aktiviteleri α -tokoferol ve BHT' den oldukça düşük değerlerde çıkmıştır. Saf maddede daha yüksek antioksidan aktivite görülmesi izole edilen maddenin karışım halindeyken sinerjik etki göstermediği, aksine antagonist bir etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir.

Antimikrobiyal analizler ile ham ekstre ve izole edilen maddelerin hangi mikroorganizmaya karşı ne kadar direnç gösterdikleri belirlenmiştir. Saf maddelerden 6,7,3',4'-tetrametoksi luteolin, salvigenin ve achillin; ekstrelerden de gövde (hekzan), gövde (EA), gövde (MeOH), çiçek (hekzan), çiçek (MeOH), kök (EA) ve kök (MeOH) örnekleri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *MRSA* ve *Candida parapsilosis* mikroorganizmalarına karşı test edilmişlerdir. Saf madde ve ekstrelerin tamamı *Candida parapsilosis* dışındaki bütün mikroorganizmalara karşı zayıf inhibe edici ve selektif olmayan bir aktivite gösterdikleri halde; saf maddelerin tamamı ve gövde (EA) ekstresi *Candida parapsilosis*' e karşı yüksek inhibe edici ve selektif aktivite göstermiştir. Bu nedenle *Candida parapsilosis*' e karşı ilaç geliştirilmesi amacıyla bu maddeler ve gövde (EA) ekstresi ile *in vivo* çalışmalara yönelinebileceği düşünülebilir.

KAYNAKLAR

- Abad, M.J., Barmejo, P. and Villar A., (1995), "An Approach to the Genus *Tanacetum* L. (Compositae): Phytochemical and Pharmacological Review", Vol.9: 79-92.
- Abad, M.J., Bermejo, P., Valverde, S. and Villar, A., (1994), *Planta Medica*, 60(3): 228.
- Abu-Dahab, R. and Afifi, F., (2007), "Antiproliferative Activity of Selected Medicinal Plants of Jordan Against a Breast Adenocarcinoma Cell Line", (MCF7), *Sc. Pharm.* 75,121-136.
- Acharya, T.K. and Chatterjee, I.B., (1975), "Isolation of Chrysophanic acid-9-anthrone, the Major Antifungal Principle of *Cassia tora*", *Lloydia*, 38, 218-220.
- Adamson, G.E., Lazarus, S.A., Mitchell, A.E., Prior, R.L., Cao, G., Jacobs, P.H., Kremers, B.G., Hammerstone, J.F., Rucker, R.B., Ritter, K.A. and Schmitz, H.H. (1999), "HPLC Method for Quantification of Procyanidins in Cocoa and Chocolate Samples and Correlation to Total Antioxidant Capacity", *J Agric Food Chem* 47:4184-4188.
- Akkuş, İ., (1995), *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*, Mimoza Yayınları, Konya.
- Akman, Y., (1998), *Bitki Biyoteknolojisine Giriş*, 8. Baskı Palme Yayınları, 394-396, Ankara.
- Asımgil, A., (1993), *Şifalı Bitkiler*, Timaş Yayınları, 218-219, İstanbul.
- Bae, E.A., Han, M.J., Lee, M. and Kim, D.H., (2000), "In Vitro Inhibitory Effect of Some Flavonoids on Rotavirus Infectivity", *Biol Pharm Bull*; 23:1122-4.
- Baytop, T., (1984), *Türkiye' de Bitkiler ile Tedavi*, İstanbul Üniversitesi Yayınları, Eczacılık Fakültesi, No: 40, İstanbul.
- Baytop, T., (1999), *Türkiye' de Bitkiler ile Tedavi*, Nobel Tıp Kitapevleri, 978-9-754-8. İstanbul.
- Benjilali, B., Zrira, S., Ismaili-Alaoui, M., Greche, H., Belanger, A. and Hajjaji, N., (1999), "Composition of *Tanacetum annuum* L. Oil from Morocco", *Journal of Essential Oil Research*, 11: 343-348.
- Berry, M.I., *Pharm. J.*, (1984), 232, 611.
- Bilaloğlu, G.V. ve Harmandar, M., (1999), *Flavonoidler*, Bakanlar Matbaacılık Ltd.Ştd., 336-343, İstanbul.
- Bohlman, F., Fanglanel, L., Kleine, K.M., Kramer, H.D., Monch, H. and Schuber, J., (1965), *Chem. Ber.* 98, 2596.
- Boissier E., (1875), "Flora Orientalis", Vol. 5.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. and Gontier, E., (2001), "Production of Plant Secondary Metabolites: A Historical Perspective, *Plant Sci.*, 161: 839.
- Bratt, K., (2000), "Secondary Plant Metabolites as Defense Against Herbivores and Oxidative Stress", University of Uppsala, Sweden, 91-554-4807-0.
- Breitmaier, E., (2006), "Terpenes: Importance, General Structure, and Biosynthesis", WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- British Herbal Medicine Association, (1996), "British Herbal Pharmacopoeia", Published by the British Herbal Medicine Association and completely revised by its scientific committee 4th edition, 81-82.
- Bruneton, J., (1999), "Pharmacognosy Phytochemistry Medical Plants", 2nd edition, Hampshire Intercept Press, 631-635.

- Burbulis, I.E., and Brenda, W.S., (1999), "Interactions Among Enzymes of the *Arabidopsis* Flavonoid Biosynthetic Pathway", Department of Biology, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA 24061-0406, Edited by Ronald R. Sederoff, North Carolina State University, Raleigh, NC, vol. 96, no. 22, 12930.
- Burim, R.V., Canelle, R., Lopez, J.L.C. and Takahashi, C.S., (1999), *Genet. Mol. Biol.*, 22,2.
- Burtis, C.A. and Ashwood, E.R., (1999), *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania.
- Caltagirone, S., Rossi, C. and Poggi A., (2000), "Flavonoids Apigenin and Quercetin Inhibit Melanoma Growth and Metastatic Potential", *Int J Cancer*: 87: 595–600.
- Cardenas, M., Marder, M., Blank, V.C. and Roguin, L.P., (2006), *Bioog. Med. Chem.*, 14, 2966.
- Compton, M.E. and Preece, J.E., (1986), "Exudation and Explant Establishment" *Newsletter IAPTC*, 50: 9-18.
- Çelik, N., (1980), "Türkiye' nin *Tanacetum* L. Türleri Üzerinde Sistemik ve Kimyasal Bir Araştırma", *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları*, Sayı: 387, Ankara.
- D' Amelio, F.Sr., and Roton, B., (1999), "Botanical a Phytochemical Desk Reference", CRC Press, 199.
- Davis, P.H., (1974), "Materials for a Flora of Turkey, xxx: Compositae I in Notes R.B.G. Edinburgh, vol. 33/2 259-262.
- Davis, P.H., Matthews V.A., Kupicha F.K. and Parris B.S., (1975), "Flora of Turkey and East Aegan Islands", Vol. 5, Edinburgh at the University Press, Edinburgh.
- Davis, P.H., Mill R.R. and Tan K., (1988), *Flora of and East Aegan Islands*, Vol. 10, Edinburgh at the University Press, Edinburgh.
- Dawn, B.M., Allan, D.M. and Colleen, M.S., (1996), *Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach*, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland.
- Demirkuş, N., (1999), Van Yüzüncüyıl Üniversitesi Herbaryumu, [http://vanherbaryum.yyu.edu.tr/flora/famgenustur/ast/tan/kot/pages/Tanacetum%20kotschy%20\(BOISS_\)%20GRIERSON%20%20.jpg.htm](http://vanherbaryum.yyu.edu.tr/flora/famgenustur/ast/tan/kot/pages/Tanacetum%20kotschy%20(BOISS_)%20GRIERSON%20%20.jpg.htm).
- Dewick, P.M., (2001), "Medicinal Natural Products 'A Biosynthetic Approach'" Second Edition, John Wilwy & Sons Ltd. Baffins Lane, Chichester.
- Dixon, R.A., (2001), "Natural Products and Plant Disease Resistance" *Nature*, 411, 843-847.
- Duke, J.A., (1987) , "Handbook of Medicinal Herbs", 474-475, CRC Press, Florida.
- El-Din, A.S., El-Sebakhy, A.N. and El-Ghazouly, M., (1985), *Acta Pharma. Jugosl.*, 35, 283.
- Ellialtıoğlu, Ş., (1994), "Doku Kültürü Yoluyla Vegetatif Çoğaltmada Doku Kararması Korunumu, Nedenleri ve Çözüm Yolları" *Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü*, Ankara.
- Eryiğit, F., (2006), "*Mentha pulegium* L. ve *Salvia tomentosa* Miller Bitkilerinin Metanol Özütlelerinin in vitro Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi" *Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi*, Isparta.
- Fahrnman, B. and Volkova, N., (2002), *Nurition*, 18, 268.
- Feredioon, S., Janitha, P.K. and Wanasundara P.D., (1992), "Phenolic Antioxidants, Critical Reviews in Food Science and Nutrition", 32(1), 67–103.
- Ferreres, F., Tomas-Barberan, F.A., Tomas-Lorente, F., (1986), "Flavonoid Compounds from *Ballota hirsuta*", *Journal of Natural Products*, 49(3): 554-555.

- Formica, J.V. and Regelson, W., (1995), "Review of the Biology of Quercetin and Related Bioflavonoids", *Food Chem Toxicol*: 33:1061–80.
- Francisco-Ortega, J. and Crawford, D.J., (1995), *American Journal of Botany*, 82 (10), 1321.
- Friesenecker, B., Tsai, A.G., Allegra, C. and Intaglietta, M., (1994), "Oral Administration of Purified Micronized Flavonoid Fraction Suppresses Leukocyte Adhesion in Ischemia-Reperfusion Injury": In Vivo Observations in the Hamster Skin Fold", *Int J Microcirc Clin Exp*; 14: 50–5.
- Gao, K., Henning, S.M., Niu, Y., Youssefian, A.A., Seeram, N.P., Xu, A. and Heber, D., (2006), "The Citrus Flavonoid Naringenin Stimulates DNA Repair in Prostate Cancer Cells", *J Nutr Biochem* 17: 89-95.
- Ginda, H., Kusumi, T., Ishitsuha, M.O., Kakisawa, H., Weijie, Z., Jun, C., and Tian, G.Y., (1988), *Tetrahedron Letters*, (29), 4603.
- Glasla, S., Mucajia, P., Wernera, I. Presserc, A., Jurenitscha, J. and Naturforsch, Z., (2002), "Sesquiterpenes and Flavonoid Aglycones from a Hungarian Taxon of the *Achillea millefolium* Group, 57c, 976- 982.
- Gören, N. and Jakupovic, J., (1990), *Phytochemistry* , 29(9), 3031.
- Gören, N., Kırmızıgül, S. and Zdero, C., (1997), *Phytochemistry* , 44(2), 311.
- Gören, N., (1978), "Smyrniun connatum (Umbelliferae) Bitkisi Üzerinde Fitokimyasal Araştırmalar" İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Genel Kimya Kürsüsü, Doktora Tezi.
- Gören, N., Arda, N. and Çalışkan, Z., (2002), "Chemical Characterization and Biological Activities of the Genus *Tanacetum* (Compositae)", *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 27, Edited by Atta-ur Rahman, Elsevier Science Press.
- Gören, N., Tahtasakal, E., Kraviec, M. and Watson, W.H., (1996), *Phytochemistry*, 42, 757,
- Bandoniene, D., Pukalskas, A., Venskutonis, P.R. and Gruzdiene, D., (2000), *Food Res. Intl.*, 33, 785.
- Grace, P.A., (1994), "Ischaemia-Reperfusion Injury", *Br J Surg*;81: 637–47.
- Gray, J.I., (1978), *JAOCS* 55, 539.
- Grierson, A.J.C., (1975), In *Flora of Turkey and the East Aegan Islands*; P.H. Davis, Ed., Edinburgh University Press, Edinburgh, Vol. 5, pp. 256-292.
- Groom, N., (1997), *The New Perfume Handbook*, Blackie Academic Press, 325, London.
- Groot H., (1994), "Reactive Oxygen Species in Tissue Injury", *Hepatogastroenterology*; 41:328–32.
- Guenther, E., (1948), "The Essantial Oils", 481-485, D. Van Nostard Company Inc., vol.5, Princeton, New Jersey.
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T. and Başer., K.H.C., (2000), "Flora of Turkey and East Aegan Islands", vol.11, Edinburgh at the University Press, Edinburgh.
- Güven, A. ve Yürekli A.K., (1991), "Fırat Havzasında Yayılış Gösteren *Tanacetum* Türlerinin Ekonomik Potansiyeli", 6-8 Ekim 1986 Fırat Havzası Tıbbi Endüstriyel Bitkileri Sempozyumu, Ed: Baltepe, Ş., Babaç, M.T. ve Evren, H., 251-259, Elazığ.
- Gylling, H. and Miettinen, T.A., (1996), "J. Lipid Res.", (37), 1776.
- Haenen, G.R. and Bast, A., (1999), "Nitric Oxide Radical Scavenging of Flavonoids Methods Enzymol; 301:490–503.

- Hakim, M.S., (1982), Medicinal and Aromatic Plants in History-The History of Medicinal and Aromatic Plants 13, Karachi.
- Halfon, B., (2005), Natural Products/Lecture Notes, Boğaziçi University Press, İstanbul.
- Hanson, J.R., (2003), Natural Products the Secondary Metabolites, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, U.K.
- Harborne, J.B., (1976), Phytochemical Methods, Chapman and Hall, London.
- Harborne, J.B., (1991), Recent Advances in the Ecological Chemistry of Plant Terpenoids. In Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids, J.B. Harborne and F.A. Tomas-Barberan, eds (Oxford: Clarendon Press), pp. 399-426.
- Harborne, J.B. and Baxter, H., (1999), The Handbook of Natural Flavonoids, 2 volumes, Wiley, V.C.H., Weinheim.
- Hartmann, T., Kutchan, T.M. and Strack, D., (2005), "Evaluation of Metabolic Diversity", Phytochemistry, 66, 1193-1194.
- Hatano T., Edamatsu, R., Mori, A., Fujita, Y. and Yasuhara, E., (1989), "Effect of Interaction of Tannins with Co-Existing Substances. VI. Effects of Tannins and Related Polyphenols on Superoxide Anion Radical and on DPPH Radical. Chemical and Pharmaceutical Bulletin" 37, 2016-2021.
- Hegarty, V.M., May, H.M. and Khaw, K. T., (2000), "Tea Drinking and Bone Mineral Density in Older Women", Am J Clin Nutr; 71:1003-7.
- Heidin, P.A. and Waage, S.K., (1986), "Roles of Flavonoids in Biology and Medicine, Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships", Alan R. Liss, New York, 87.
- Hendriks, H., Elst, D.J.D.V.D., Putten F.M.S.V., Bos, R., (1990), "The Essential Oil of Dutch Tansy (*Tanacetum vulgare* L.)", J. Essential Oil Research, 2,155-162.
- Hertog, M.G., Kromhout, D., Aravanis, C., (1995), "Flavonoid Intake and Long-Term Risk of Coronary Heart Disease and Cancer in the Seven Countries Study", Arch Intern Med; 155:381-6.
- Iscan, G., Kırimer, N., Kürkçüoğlu, M., Başer, K.H.C. and Demirci, F., (2002), "Antimicrobial Screening: *Mentha piperita* Essential Oil", J.Agric.Food Chem.50, 3943-3946.
- İnce, S. ve Filazi, A., (2009), "Korunga Bitkisinin (*Onobrychis viciifolia*) Fitokimyasal İçeriği ve Farelerde Akut Oral ÖD50'sinin Belirlenmesi" Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., (56), 264.
- Jacobs, M. and Rubery, H.H., (1988), Naturally Occurring Auxin Transport Regulators Science, (241): 346.
- Javonovic, S.V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B. and Simic, M.G., (1984), J.Am.Chem.Soc., 116, 4846.
- Jiang, R.W., Lau, K.M., Hon, P.M., Mak, T.C.W., Woo, K.S. and Fung K.P., (2005), "Chemistry and Biological Activities of Caffeic Acid Derivates from *Salvia miltiorrhiza*, Curr. Med. Chem., 12, 237-246.
- Jones, P.J.H., MacDougall, D.E., Ntanios, F. and Vanstone, C.A., (1997), Can. J. Physiol. Pharmacol., (75), 217.
- Jonson, E.S., (1984), Feverfew; A Traditional Herbal Remedy for Migraine Arthritis, Sheldon press, London.
- Judd & al., (2002), Plant Systematics: A Phylogenetic Approach.
- Kahl, G., (1974), "Metabolism in Plant Storage Tissue Slices. Bot. Rev. 40: 253-314,

- Kanno, S., Tomizawa, A., Hiura, T., Osanai, Y., Shouji, A., Ujibe, M., Ohtake, T., Kimura, K., and Ishikawa, M., (2005), "Inhibitors Effects of Naringenin on Tumor Growth in Human Cancer Cell Lines and Sarcoma s-180-Implanted Mice. *Biol. Pharm. Bull.* 28: 527-530.
- Keskitalo, M., Linden, A. and Valkonen, J.P.T., (1998), *Theor. Appl. Genet.*, 96, 1141.
- Kırimer, N., (1999), "Essential Oils in Honour of Prof. Dr. K. Hüsnü Can Başer on his 50th Birthday" *Eskişehir Anadolu Üniversitesi Basımevi*, 99-100, 122-123, Eskişehir.
- Kırimer, N., Tabanca, N., Tümen, G., Duman, H. and Başer, K.H.C., (1999), "Composition of Essential Oils of Four Endemic *Sideritis* Species From Turkey", *Flavour and Fragrance J.*, 14/6, 421-425.
- Knekt, P., Jarvinen, R. and Seppanen, R., (1997), "Dietary Flavonoids and the Risk of Lung Cancer and Other Malignant Neoplasms", *Am J Epidemiol*; 146: 223-30.
- Knekt, P., Jarvinen, R., Reunanen, A. and Maatela, J., (1996), "Flavonoid Intake and Coronary Mortality in Finland": A Cohort Study. *BMJ*; 312:478-81.
- Korkina, L.G., Afanas'ev I.B., (1997), Antioxidant and Chelating Properties of Flavonoids. *Adv Pharmacol*; 38:151-63.
- Kuc', J. and N. Lisker., (1978), "Terpenoids and Their Role in Wounded and Infected Plant Storage Tissue", 203-242. In: GG. Kahl (ed.). *Biochemistry of Wounded Plant Tissues*. Walter de Gruyter and Co., Berlin.
- Kupchan, S.M., Fessler, D.C., Kakin, M.A., and Giacobbe. T.J., (1970), *Science*, (168), 3929.
- Lee, H.S., (2002), "Characterization of Major Anthocyanins and the Color of Red-Fleshed Budd Blood Orange (*Citrus sinensis*)", *J Agric Food Chem* 50:1243-1246.
- Lin, L.Z., Wang, X.M., Huang, X.L., Huang, Y. and Cordell, G.A., (1989), *Phytochemistry*, (28), 3542.
- Mahindru, S. N., (1992), *Indian Plant Perfumes*, Metropolitan Phototype Settera Printers Ltd. India.
- Martensa, S., Teerib, T. and Forkmann, G., (2002), "Heterologous Expression of Dihydroflavonol 4-reductases From Various Plants", *FEBS Lett* 531:453-458.
- Mcclure, J.W., (1975), Physiology and Functions of Flavonoids, In: Harborne, J.B., et al. (Eds.), *The Flavonoids*. Academic Press, New York, pp. 45-77.
- Mehmetoğlu, İ., Ünlü, C.M., Gökçe, R. and Kurban, S., (2005), "Flavonoid Contents and Antioxidant Features of Tea, Spices and other Comestibles of Plant Origin: Review".
- Middleton, E.J., (1998), "Effect of Plant Flavonoids on Immune and Inflammatory Cell Function", *Adv Exp Med Biol*; 439:175-82.
- Mitich, L.W., (1992), "Tansy" *Weed Technology*, (6) 242-244.
- Moghaddam, F.M., Farimani, M.M., Salahvarzi, S. and Gholamreza Amin, G., (2006), "Chemical Constituents of Dichloromethane Extract of Cultivated *Satureja khuzistanica*" (3).
- Mohamed, N.H. and Mahrous, A.E., (2009), "Chemical Constituents of *Descurainia sophia* L. and its Biological Activity", *Rec. Nat. Prod.* 3:1 (61).
- Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Dominguez, M., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M.J. and Parajo, J.C., (2001), "Food Chem.", (72), 145.
- Namiki, M., (1990), "Food Science and Nutrition", 29, 273.

- Navarro, J.J., Caballero, M.C., Morán, J.R., Grande, M., Anaya, J., (1990), "Guaianolides and Eudesmanolides From *Centaurea ornata*", Journal of Natural Products, 53(3): 573-578.
- Newall, C.A., (1996), "Herbal Medicines 'A Guide for Health Care Professionals'", London Pharmaceutical Press, London.
- Newall, C.A., Anderson, L. and Phillipson, J.D., (2002), "Matricaria, 191-193. In Plantas Mediciniais: Guia Para Profissional de saúde. Premier, São Paulo, Brazil.
- Nijveldt, R.J., Nood, E., Hoorn, D., Boelens, P.G., Norren, K. and Leeuwen, P., (2001), "Flavonoids: a Review of Probable Mechanisms of Action and Potential Applications 1-3. Am J Clin Nutr;74: 418-25.
- Okushio, K., Matsumoto, N., Kohri, T., Suzuki, M., Nanjo, F. and Hara, Y., (1996), "Absorption of Tea Catechins into Rat Portal Vein", Biol Pharm Bull; 19:326-9.
- Özcan, S., Gürel, E. ve Babaoğlu, M., (2001), Bitki Biyoteknolojisi, Selçuk Üniversitesi Yayınevi, Konya.
- Özer, Z., Elibüyük, Ö., Önen, H. ve Elibüyük, A., (2005), Yabancı Otlarla Sağlıklı Yaşam, Renk Yayın Tanıtım Matbaacılık, Ankara.
- Penso, G., (1983), Index Plantarum Medicinalium Totius Mundi Eorumque Synonymorum, Milano.
- Polatoğlu, K., (2009), "*Tanacetum chiliophyllum* (Fisch.&Mey.) Schultz Bip. Türü Varyeteleri Üzerinde Karşılaştırmalı Fitokimyasal ve Biyolojik Araştırmalar", Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 159, İstanbul.
- Reclu, M., (1925), Guide De L' Herboriste, Paris Libraire J.-B. Baillière et Fils 19, Rue Hautefeuille, 19, 174.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G., (1996), "Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids", Free Radic Biol Med, 20(7), 933-956.
- Rozenkranz, V. and Wink, M., (2008), "Alkaloids Induce Programmed Cell Death in Bloodstream Forms of *Trypanosomes* (*Trypanosoma b. brucei*), Molecules, 13, 2462-2473.
- Schäfer, F.P., (1990), Dye Lasers, 3rd Ed., Springer-Verlag, Berlin.
- Sezik, E. and Ezer, N., (1984), "Phytochemical Investigations on the Plants Used as Folk Medicine and Herbal Tea in Turkey. Acta Pharmaceutica Turcica, 26:4-9.
- Shahidi, F. and Wanasundara, K.J., (1992), "Critical Reviews in Food Science, Nutrition" 32 (1), 67.
- Sherwin, E.R., (1990), Antioxidants, In Branen, A.L., Davidson, P.M., Salminen, S., Food antioxidants, Marcel Dekker Inc., New York.
- Shikov, A.N., Pozharitskaya, O.N., Ivanova S.A. and Makarov, V.G., (2007), "Seperation and Evaluation of Free Radical-Scavenging Activity of Phenol Components of *Embllica officinalis* Extract by Using an HPTLC-DPPH Method.", J. Sep. Sci., 30, 1250-1254.
- Shoskes, D.A., (1998), "Effect of Bioflavonoids Quercetin and Curcumin on Ischemic Renal Injury: A New Class of Renoprotective Agents", Transplantation: 66:147-52.
- Si, Z.T., Zhang, M.L., Shi, Q.W. and Kiyota H., (2006), "Chemical Constituents of the Plants in the Genus *Achillea*. Chem. Biodiver, 3:1163-80.
- Sökmen, A. ve Gürel, E., (2001), Bitki Biyoteknolojisi, S.Ü. Vakfı Yayınları, 975-6652-04-7:211-261.
- Spitzer, C. and Steelink, C., (1996), "Sesquiterpene Lactones in Chemotaxonomy", Phytochemistry 5, 357-365.

- Srivastava A., Harish, S.R. and Shivanandappa, T., (2006), "Shivanandappa Antioxidant Activity of the Roots of *Decalepis hamiltonii*", Wight&Arn. Food Science and Technology 39 (10), 1059–1065.
- Stévigny, C., Bailly C. and Quentin-Leclercq, J., (2005), "Cytotoxic and Antitumor Potentialities of Aporphinoid Alkaloids, Curr. Med. Chem.- Anti-Cancer Agents, 5, 173-182.
- Şener, B. ve Toker, G., (1986), Flavonoidlerin Eczacılık Yönünden Önemi, Mar. Üniv. Ecz. Der., 2 (2):169-183.
- Tabata, M., Honda, G. and Sezik, E., (1988), "A Report on Traditional Medicine and Medicinal Plants in Turkey", Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto Univ., (60).
- Tanaka, Y., (2006), "Flower Colours and Cytochromes" (450), Phytochem rev. 5.283-291.
- Tatlı, I. İ., and Akdemir, Z. S., (2006), "Cytotoxic Activity on some *Verbasum* Species Growing in Turkey", H. U. Journal of the Faculty of Pharmacy, 26 (2), 77-85.
- Taylor, L.P. and Grotewold, E., (2005), Flavonoids as Developmental Regulators *Current Opinion in Plant Biology*, 8: 317-323.
- Tezuka, Y., Stampoulis, P., Banskota, A.H., Awale, S. and Tran, K.Q., (2000), "Constituents of the Vietnamese Medicinal Plant *Ortosiphon stamineus*", Chemical Pharmaceutical Bulletin, 48(11):1711-1719.
- Tietz, N.W., (1995), Clinical Guide to Laboratory Tests., W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania.
- Topçu, G., Öksüz, S., Herz, W. and Diaz, J.G., (1995), "Structurally Related Guainolides from *Inula thapsoides*", Phytochemistry, (40), 1717.
- Trovato, A. and Monforte, M.T., (2000), Boll.Chim.Farm, 39, 225.
- Ulubelen, A. and Uygur, I., (1976), "Flavonoidal and Other Compounds of *Salvia aethopsis*", Planta Medica, 29,4, 318-320.
- Ulubelen, A., Topçu, G., Eriş, C., Sönmez, U., Kartal, M., Kurucu, S. and Bozok-Johansson, C., (1994), "Terpenoids from *Salvia sclarea*" Phytochemistry (36), 971.
- Umay, A., (2007), "*Lavandula stoechas*, *Melissa officinalis* ve *Tribulus terrestris* Bitkilerinin Kimyasal İçeriklerinin Araştırılması", Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Adana.
- Valant-Vetschera, K.M. and Wollenweber, E., (1999), "Leaf Exudate Flavonoids of *Achillea sibirica* subsp. *mongolica* and *A. latiloba* (Compositae Anthemideae). Biochem Syst. Ecol.; 27: 523–5.
- Vanhanen, H.T. and Miettinen, T.A., (1992), "Clin. Chim. Acta." (205), 97.
- Vinson, J.A., Proch, J. and Zubik, L., (1999), "Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Cocoa, Dark Chocolate, and Milk Chocolate. J. Agric Food Chem. 47: 4821-4824.
- Wanasundara, U.N. and Shahidi, F., (1998), "Antioxidant and Pro-oxidant Activity of Green Tea Extracts in Marine Oils", Food Chemistry, 63, 335–342.
- Weinheim, E.B., (2006), Terpenes, Chapman and Hall Ltd., London.
- Winn, W.C., Allen, S.D., Janda, W.M., Koneman, E.W., Procop, G.W., Schreckenberger, P.C. and Woods, G.L., (2006), Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th Edition, Lippincott Williams&Wimkins, Philadelphia.
- Wollenweber, E. and Dietz, V.H., (1981), "Occurrence and Distribution of Free Flavonoid Aglycones in Plants", Phytochemistry 20: 869-932.

Yamaguchi, T., Takamura H., Matoba T. and Terao J., (1998), "HPLC Method for Evaluation of the Free Radical-Scavenging Activity of Foods by Using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl" *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, (6), 1201-1204.

Yen, G.C., Duh, P.D. and Tsai, C.L., (1993), "Relationship Between Antioxidant Activity and Maturity of Peanut Hulls", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 67–70.

Yeşilada, E. and Ezer, N., (1996), "Essential Oil Composition of Four Turkish Species of Steridis" *Phytochemistry*, 41/1 203-205.

Youdin, K. and Joseph, J.A., (2001), "A Possible Emerging Role of Phytochemicals in Improving Age-Related Neurological Dysfunctions: A Multiplicity of Effects", *Free Radic. Biol. Med.* 30, 583–594.

Yurkanis, P., (1998), "Organic Chemistry", Second Edition, Prentice Hall, Chapter 23.

Zahran, M.M., Aboul-Enein, A.M. and Abol-Ella, F.M., (2005), "Molecular Changes on Cancer Cells as Affected by Willow Extracts" *Res. J. Agric. Biol. Sci.*, 1(3), 284-287.

Zhou, K. and Yu, L., (2006), "Total Phenolic Contents and Antioxidant Properties of Commonly Consumed Vegetables Grown in Colorado", *Food Science and Technology*, 39(10), 1155–1162.

ÖZGEÇMİŞ

Doğum Tarihi	14.06.1984	
Doğum Yeri	Bolu	
Lise	1999-2002	Bilfen Koleji
Lisans	2002-2006	İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans	2007-2010	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü