TÜRKİYE CUMHURİYETİ

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENDEMİK *ACHILLEA MULTIFIDA* (DC.) BOISS. BİTKİSİNİN SİTOTOKSİK ETKİLİ BİLEŞİKLERİNİN İZOLASYONU VE DİĞER BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ

TURGUT TAŞKIN

DOKTORA TEZİ

FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Leyla BİTİŞ

2016-İSTANBUL

TÜRKİYE CUMHURİYETİ

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENDEMİK *ACHILLEA MULTIFIDA* (DC.) BOISS. BİTKİSİNİN SİTOTOKSİK ETKİLİ BİLEŞİKLERİNİN İZOLASYONU VE DİĞER BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ

TURGUT TAŞKIN

DOKTORA TEZİ

FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Leyla BİTİŞ

2016-İSTANBUL

TEZ ONAYI

Kurum	: Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi	: Doktora
Anabilim Dalı	: Farmakognozi
Tez Sahibi	: Turgut TAŞKIN
Tez Başlığı	: Endemik *Achillea multifida* (DC.) Boiss.Bitkisinin Sitotoksik Etkili Bileşiklerinin İzolasyonu ve Diğer Biyolojik Aktiviteleri
Sınav Yeri	: Farmakognozi Anabilim Dalı
Sınav Tarihi	: 12.02.2016

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)	**Kurumu**	**İmza**
Doç.Dr. Leyla BİTİŞ	Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)		
Doç.Dr. Sevda S. SELÇUK	Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	
Prof.Dr. Ertan TUZLACI	Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	
Prof.Dr. Afife MAT	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	
Doç.Dr. Gülay MELİKOĞLU	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 25/02/2016 tarih ve 20 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Göksel ŞENER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Turgut Taşkın

İmza

Sevgili eşim Duygu Taşkın'a ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Tezimin konusunu veren, tez bitkimi temin eden, tez çalışmam süresince beni her konuda bilgisi ve tecrübesi ile yönlendiren, yardımcı olan danışman hocam Sayın ***Doç. Dr. Leyla BİTİŞ****'e,*

Tezimin izleme komitesinde yer alan, raporlarımı değerlendiren M.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın ***Doç. Dr. Sevda S. SELÇUK****'a ve İ.Ü.Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın* ***Doç. Dr.Gülay Melikoğlu****'na ,*

Anabilim Dalımızın doktora programının kapalı olduğu dönemde, Farmakognozi doktora programına beni kabul eden ve ders dönemimim büyük bir kısmının tamamlanmasına olanak sağlayan ***İstanbul Üniviversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine,***

Tezimin konusunu oluşturan A. multifida bitkisinin teşhisini yapan M.Ü. Eczacılık Fakülesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı öğretim üyeleri Sayın ***Prof. Dr. Ertan TUZLACI*** *ve* ***Yrd. Doç. Dr. Gizem BULUT****'a,*

Tezimin içerisinde bulunan sitotoksik çalışmaların yapılmasına olanak sağlayan M.Ü.Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın ***Prof. Dr. Fikriye URAS****'a ve sitotoksik çalışmaları yapan M.Ü.Eczacılık Fakülesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın* ***Yard. Doç. Dr. Özlem B. ÖZAKPINAR****'a,*

Tezimin içerisinde bulunan antimikrobiyal çalışmaların yapılmasına olanak sağlayan M.Ü.Eczacılık Fakülesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın ***Prof. Dr. Ümran Soyoğul Gürer****'e ve antimikrobiyal çalışmaları yapan M.Ü.Eczacılık Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın* ***Öğretim görevlisi Dr. Burçak Gürbüz****'e,*

Tezimin içerisinde bulunan ESI-Q-TOF LC/MS çalışmalarına yardımcı olan Yıldız Teknik Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda görevli olan ***Uzman Kimya Mühendisi Elif Öztürk****'e,*

Tezimin içerisinde bulunan ESI-Q-TOF LC/MS çalışmalarında çalışma metodunun oluşturulmasında ve elde edilen verilerin değerlendirmesinde bilgisi ve tecrübesi ile bana her konuda yardımcı olan İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya ABD'nda görevli olan Sayın ***Öğretim Görevlisi Dr. Duygu TAŞKIN****'a,*

Eğitim hayatım boyunca bana her zaman destek ve güç veren canım annem, babam ve ağabeyime,

Tez çalışmam süresince desteğini her zaman hissettiğim, varlığıyla bana güç veren canım eşim ***Duygu TAŞKIN'****a tüm kalbimle sonsuz teşekkür ederim.*

Bu tez, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 1002-Hızlı Destek programı kapsamında 114S080 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ ve AMAÇ……....3

2. GENEL BİLGİLER……....7

2.1. Botanik Bilgiler 7

2.1.1 Asteraceae (Compositae) familyası 7

2.1.2 *Achillea* L. Cinsi 8

2.1.3 *Achillea multifida* (DC.) Boiss. 10

2.2. *Achillea* L.Türlerinin Halk Arasında Tıbbi Amaçla Kullanımları..... 12

2.3. *Achillea* L. Türleri Üzerine Yapılan Kimyasal Araştırmalar ve Biyolojik Aktivite Çalışmaları 14

2.4. Fenolik Bileşikler ve Sınıflandırılması 23

2.4.1 Basit fenolikler 25

2.4.2 Fenolik asitler 25

2.4.3 Kumarinler 26

2.4.4 Flavonoidler..... 28

2.5. Kanser..... 32

2.5.1 Kanser ve Apoptoz..... 33

2.6. Sitotoksik Aktivite Yöntemleri 34

2.6.1 Mitokondriyal aktiviteye dayalı MTT testi 35

2.7. Oksidasyon ve Serbest Radikaller 36

2.8. Antioksidanlar ve Antioksidanların Sınıflandırılması..... 37

2.8.1 Antioksidanların yapılarına göre sınıflandırılması 38

2.8.2 Antioksidanların etki mekanizmalarına göre sınıflandırılması 39

2.9. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri 40

2.9.1 Hidrojen transferine dayanan reaksiyonlar (HAT) 40

2.9.2 Elektron transferine dayanan reaksiyonlar (ET) 41

2.10. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri 47

2.10.1 Agar dilüsyon yöntemi..... 47

2.10.2 Sıvı dilüsyon yöntemi..... 48

2.11. Kütle Spektrometrisi..... 48

2.11.1 Kütle spektrometrisinin genel prensipleri..... 48

2.11.2 Uçuş zamanlı kütle spektrometrisi..... 49

2.11.3 Elektrosprey iyonlaşmalı-kütle spektrometrisi (ESI-MS) 50

3. GEREÇ ve YÖNTEM……..51

3.1. Bitkisel Materyal 51

3.2. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler 51

3.3. Çözeltilerin Hazırlanması..... 51

3.3.1 Toplam fenolik madde miktarı tayinininde kullanılan çözeltiler..... 51

3.3.2 DPPH serbest radikali giderme kapasitesinde kullanılan çözelti..... 52

3.3.3 ABTS katyon radikali giderme kapasitesinde kullanılan çözeltiler.... 52

3.3.4 Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yönteminde kullanılan çözeltiler..... 52

3.3.5 Metal kelatı oluşturma kapasitesi yönteminde kullanılan çözeltiler... 52

3.3.6 Flavonoid kayma belirteçlerinin hazırlanması 53

3.3.7 İTK'da kullanılan belirteçlerin hazırlanması..... 53

3.4. Çalışmada Kullanılan Cihazlar..... 53

3.5. Fitokimyasal Ön Denemeler 54

3.6. Miktar Tayini Yöntemleri 55

3.7. Ekstrelerin Hazırlanması..... 55

3.8. Ekstrelerin Toplam Fenolik Madde Miktarlarının Belirlenmesi 56

3.8.1 Gallik asitin kalibrasyon eğrisinin hazırlanması 57

3.9. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri 57

3.9.1 DPPH radikali giderme aktivite tayini 57

3.9.2 ABTS katyon radikali giderme aktivite tayini 58

3.9.3 Demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü tayini (FRAP) 59

3.9.4 Metal kelatı oluşturma aktivitesi 60

3.10. Antimikrobiyal Duyarlılık Deneyi 61

3.10.1 Agar oluk diffüzyon yöntemi 62

3.10.2 Sıvı besiyerinde mikrodilüsyon yöntemi 62

3.11. Sitotoksik Aktivite Deneyleri 63

3.11.1 Anti-kanserojenik etkinin belirlenmesi 63

3.11.2 Kaspaz üzerine etkiler 64

3.12. İstatistik Hesaplamalar 65

3.13. Kromatografik Yöntemler 65

3.13.1 Kolon kromatografisi (KK) 65

3.13.2 İnce tabaka kromatografisi (İTK) 66

3.14. Spektroskopik Yöntemler 67

3.14.1 Ultraviyole spektroskopisi (UV/VIS) 67

3.14.2 Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR) 68

3.14.3 Kütle spektroskopisi (MS) 68

3.14.4 Kırmızı ötesi (Infrared) spektroskopisi (IR) 69

4. BULGULAR……..70

4.1. Fitokimyasal Ön Deneme Sonuçları 70

4.2. Miktar Tayini Sonuçları 70

4.3. *A.multifida* Bitkisinin Heptan, Kloroform ve Metanol Ekstrelerinin Fenolik Madde Miktar Tayin Sonuçları 71

4.4. *A.multifida* Bitkisinin Heptan, Kloroform ve Metanol Ekstrelerinin Antioksidan Aktivite Sonuçları 72

4.4.1 DPPH radikali giderme aktivite tayini 72

4.4.2 ABTS katyon radikali giderme aktivite tayini 73

4.4.3 Demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü tayini (FRAP) 74

4.4.4 Metal kelatı oluşturma aktivitesi 75

4.5. Antioksidan Kapasite Yöntemleri ile Toplam Fenolik Madde Miktarları Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi 77

4.6. *A.multifida* Bitkisinin Heptan, Kloroform ve Metanol Ekstrelerinin Antimikrobial Aktivite Sonuçları 77

4.7. *A.multifida* Bitkisinin Heptan, Kloroform ve Metanol Ekstrelerinin Sitotoksik Aktivite Sonuçları 80

4.8. *A.multifida* Bitkisinin Kloroform Ekstresinin (AMK) Fraksiyonlandırılması 81

4.9. AMK Ekstresinden Elde Edilen Fraksiyonların Sitotoksik Aktivite Sonuçları 83

4.10. AM-IV Fraksiyonunun Kaspazlar Üzerine Etkisinin Sonuçları 85

4.11. AM-III, AM-IV, AM-VI ve AM-VII Fraksiyonlarının Antioksidan Aktivite Sonuçları 88

4.11.1 DPPH radikali giderme aktivite tayini 88

4.11.2 ABTS katyon radikali giderme aktivite tayini 89

4.11.3 Demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü tayini (FRAP) 90

4.12. AM-VII Fraksiyonundan Madde İzolasyonu 91

4.13. AM-VI Fraksiyonundan Madde İzolasyonu 95

4.14. AM-III Fraksiyonundan Madde İzolasyonu 98

4.15. AM-IV Fraksiyonunun İçerdiği Fenolik Bileşiklerin Analizleri..... 104

4.16. AM-VII Fraksiyonundan Elde Edilen Saf Maddelerin Yapı Tayinleri 105

4.17. AM-VI Fraksiyonundan Elde Edilen Saf Maddelerin Yapı Tayinleri 148

4.18. AM-III Fraksiyonundan Elde Edilen Saf Maddelerin Yapı Tayinleri. 158

4.19. AM-IV Fraksiyonunun İçerdiği Fenolik Bileşiklerin HPLC-DAD Sistemi ile Analizleri 158

4.20. *A.multifida* Bitkisinin Kloroform Ekstresinden Elde Edilen Saf Maddelerin Rf Değerleri 160

4.21. *A.multifida* Bitkisinin Kloroform Ekstresinden Elde Edilen Saf Maddelerin Sitotoksik Aktivite Sonuçları 162

4.22. Saf Maddelerin Kaspazlar Üzerine Etkilerinin Sonuçları 163

4.23. *A.multifida* Bitkisinin Kloroform Ekstresinden Elde Edilen Saf Maddelerin Antioksidan Aktivite Sonuçları 167

4.23.1 DPPH radikali giderme aktivite tayini 167

4.23.2 ABTS katyon radikali giderme aktivite tayini 168

4.23.3 Demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü tayini (FRAP) 169

4.24. Elektrospray İyonlaşmalı Kuadrupol Uçuş Zamanlı Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometrisinin (ESI-Q-TOF LC/MS) Analiz Sonuçları 171

5. TARTIŞMA ve SONUÇ…….....178

6. KAYNAKLAR……186

7. EK: BİLİMSEL FAALİYET…….....208

8. ÖZGEÇMİŞ……....209

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

AAPH	: 2,2'azobis (2-metil propionamidin) dihidroklorür
ABTS	: 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit)
$AlCI_3$	: Alüminyum klorür
AM	: *Achillea multifida*
AMK	: *A. multifida* bitkisinin kloroform ekstresi
A549	:İnsan akciğer adenokarsinoma hücre hattı
BHA	: Bütillenmiş hidroksi anisol
BHT	: Butillenmiş hidroksi toluen
CUPRAC	: Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi
$DPPH^{\bullet}$	: DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali
EC_{50}	: Radikalin % 50'sinin inhibisyonunu sağlayan madde konsantrasyonu
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
ESI-Q-TOF LC/MS	:Elektrospray iyonlaşmalı kuadrupol uçuş zamanlı sıvı kromatografi kütle spektrometrisi
FCR	: Folin-Ciocalteu reaktifi
FRAP	: Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi
FT-IR	: Fourier transform IR spektrofotometrisi
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
HeLa	: İnsan serviks kanser hücre hattı
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HT-29	: İnsan kolon kanser hücre hattı
IR	: Kırmızı ötesi spektrometrisi

İTK	: İnce tabaka kromatografisi
K562	: İnsan lösemi kanser hücre hattı
m/z	: Kütle/yük
MCF-7	: İnsan meme kanser hücre hattı
MDA-MB-435	: İnsan göğüs kanser hücre hattı
MİK	: Minimal inhibitör konsantrasyonu
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NaOAc	: Sodyum asetat
$NaOCH_3$	: Sodyum metilat
NDGA	: Nordihidroguayaretik asit
NIH/3T3	: Fare embriyonik fibroblast hücre hattı
NMR	: Nükleer magnetik rezonans
ORAC	: Oksijen radikalini absorplama kapasitesi
PC-3	: İnsan akciğer adenokarsinoma hücre hattı
pİTK	: Preparatif ince tabaka kromatografisi
RERF-LC-KJ	: İnsan akciğer adenokarsinoma hücre hattı
RT	: Alıkonma zamanı
SK-BR-3	: İnsan göğüs kanser hücre hattı
TBHQ	: Tersiyer butil hidrokinon
TEAC	: Troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi
TPC	: Toplam fenolik bileşikler
TPTZ	: 2,4,6-tris(2-pridil)-s-triazin
TRAP	: Total radikal yakalama antioksidan kapasitesi
Troloks	: 6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit

UV	: Ultraviyole
U937	: İnsan lösemi kanser hücre hattı
QG-56	: İnsan akciğer adenokarsinoma hücre hattı
QG-90	: İnsan akciğer adenokarsinoma hücre hattı
WEHI	: Fare lösemi hücre hattı
λmax	: Maksimum dalga boyu

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Türkiye'de yetişen bazı *Achillea* türlerinin uçucu yağlarının majör bileşikleri 17

Tablo 2. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması 24

Tablo 3. En sık karşılaşılan serbest radikaller 37

Tablo 4. Doğal ve yapay antioksidanlar 38

Tablo 5. *Achillea multifida* bitkisinden elde edilen ekstrelerin isimleri, miktarları ve % verimleri 56

Tablo 6. Ekstrelerin başlangıç miktarları ve çözücü hacmi 61

Tablo 7. *A. multifida* bitkisinin fitokimyasal ön deneme sonuçları 70

Tablo 8. *A. multifida* bitkisinin miktar tayini sonuçları 70

Tablo 9. *A. multifida* bitkisinin heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin toplam fenolik bileşikleri (TFB) (gallik asit ekivalanı olarak) 71

Tablo 10. *A. multifida* bitkisinin heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin DPPH radikali giderme aktivitesi 72

Tablo 11. *A. multifida* bitkisinin heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin ABTS katyon radikali giderme aktivitesi 73

Tablo 12. *A. multifida* bitkisinin heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü 75

Tablo 13. *A.multifida* bitkisinin heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin metal kelatı oluşturma aktivite yüzdeleri 76

Tablo 14. Toplam fenolik madde miktarları ile antioksidan kapasite yöntemleri arasındaki ilişki 77

Tablo 15. *A.multifida* bitkisinin heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin antibakteriyal aktiviteleri 78

Tablo 16. *A.multifida* bitkisinin heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin antifungal aktiviteleri 79

Tablo 17. *A.multifida* bitkisinin heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin kanserli hücre hatları üzerindeki inhibisyon oranlar (%)..... 80

Tablo 18. *A. multifida* bitkisinin heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin normal hücre (NIH/3T3) çoğalması üzerine etkisi (%)..... 81

Tablo 19. AMK ekstresine yapılan kaba ayırmada kullanılan çözücü sistemleri ve elde edilen fraksiyonlar..... 82

Tablo 20. AMK ekstresine yapılan kaba ayırma sonucunda birleştirilen fraksiyonlar 82

Tablo 21. AMK ekstresinden elde edilen fraksiyonların kanserli hücre hatları üzerine sitotoksik aktiviteleri (%)..... 83

Tablo 22. AM-III, AM-IV, AM-VI ve AM-VII fraksiyonlarının miktarları 83

Tablo 23. AM-III, AM-IV, AM-VI ve AM-VII fraksiyonlarının NIH/3T3 hücresinin çoğalması üzerine etkisi (%)..... 84

Tablo 24. AM-III, AM-IV, AM-VI ve AM-VII fraksiyonlarının DPPH radikalini giderme aktivitesi..... 88

Tablo 25. AM-III, AM-IV, AM-VI ve AM-VII fraksiyonlarının ABTS katyon radikalini giderme aktivitesi..... 90

Tablo 26. AM-III, AM-IV, AM-VI ve AM-VII fraksiyonlarının demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü 91

Tablo 27. AM-VII ekstresinden elde edilen fraksiyonlar 92

Tablo 28. AM-VII ekstresine uygulanan kolon kromatografisi sonucunda birleştirilen fraksiyonlar 93

Tablo 29. AM-VI ekstresinden elde edilen fraksiyonlar..... 95

Tablo 30. AM-VI ekstresine uygulanan kolon kromatografisi sonucunda birleştirilen fraksiyonlar 95

Tablo 31. AM-III ekstresinden elde edilen fraksiyonlar..... 98

Tablo 32. AM-III ekstresine uygulanan kolon kromatografisi sonucunda birleştirilen fraksiyonlar 98

Tablo 33. AM-III (3) ekstresinden elde edilen fraksiyonlar 99

Tablo 34. AM-III (3) ekstresine uygulanan kolon kromatografisi sonucunda birleştirilen fraksiyonlar 99

Tablo 35. AM-III (4) ekstresinden elde edilen fraksiyonlar 100

Tablo 36. AM-III (4) ekstresine uygulanan kolon kromatografisi sonucunda birleştirilen fraksiyonlar 101

Tablo 37. AM-III (4)-2 ekstresinden elde edilen fraksiyonlar 102

Tablo 38. AM-III (4)-2 ekstresine uygulanan kolon kromatografisi sonucunda birleştirilen fraksiyonlar 102

Tablo 39. A (T7) bileşiğine ait ^{13}C-NMR, HMQC ve HMBC değerleri 109

Tablo 40. Skopoletin ve C (T6) bileşiğinin ^{1}H- NMR verileri 127

Tablo 41. Saf skopoletin ve C (T6) bileşiğinin λmax(nm) değerleri 127

Tablo 42. Skopoletin ve C (T6) bileşiğinin IR değerleri 127

Tablo 43. *A. multifida* bitkisinden elde edilen saf bileşiklerin Rf değerleri 160

Tablo 44. *A.multifida* bitkisinden elde edilen saf bileşiklerin kanserli hücre hatları üzerine sitotoksik aktiviteleri (IC_{50}: µg/mL) 162

Tablo 45. Kanserli hücre hatlarına karşı güçlü sitotoksik aktivite gösteren saf bileşiklerin NIH/3T3 hücresinin çoğalması üzerine etkisi (%) 163

Tablo 46. Saf bileşiklerin DPPH radikali giderme aktivitesi 167

Tablo 47. Saf bileşiklerin ABTS katyon radikali giderme aktivitesi 168

Tablo 48. Saf bileşiklerin demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü 170

Tablo 49. *A.multifida* bitkisinin metanol ekstresinde bulunan fenolik bileşikler 172

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. *A. multifida* bitkisinin Türkiye'de bulunduğu yer 11

Şekil 2. Klorojenik asitin yapısı 25

Şekil 3. Vanilik asitin yapısı 26

Şekil 4. Kumarinin kimyasal yapısı 26

Şekil 5. Kromon [benzo-γ-piron, (A)] ve 2-fenil benzopiron (B) 28

Şekil 6. Flavonoidlerde bant I ve bant II'yi veren gruplar 30

Şekil 7. $ABTS^{\cdot+}$ katyon radikalinin antioksidan maddelerle verdiği reaksiyon (Oliveira ve ark., 2014). 43

Şekil 8. Fe (III) kompleksinin Fe (II) formuna indirgenmesi 44

Şekil 9. Antioksidanların DPPH ile radikal süpürme reaksiyonları (Son ve Lewis, 2002). 45

Şekil 10. Cu (I)-Nc kelatının kimyasal yapısı (Özyürek ve ark., 2011) 46

Şekil 11. Gallik asitin kalibrasyon eğrisi 57

Şekil 12. $FeSO_4$'ın kalibrasyon eğrisi 60

Şekil 13. Heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin toplam fenolik madde içerikleri 71

Şekil 14. Heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin DPPH radikali giderme aktivitesi 73

Şekil 15. Heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin ABTS katyon radikalini giderme aktivitesi 74

Şekil 16. Heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin FRAP değerleri 75

Şekil 17. Heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin metal kelatlama aktiviteleri (%) 76

Şekil 18. AM-IV fraksiyonunun HeLa hücre hattı üzerine olası etki mekanizması .. 85

Şekil 19. AM-IV fraksiyonunun HT-29 hücre hattı üzerine olası etki mekanizması 86

Şekil 20. AM-IV fraksiyonunun MCF-7 hücre hattı üzerine olası etki mekanizması87

Şekil 21. AM-III, AM-IV, AM-VI ve AM-VII fraksiyonlarının DPPH radikalini giderme aktivitesi 89

Şekil 22. AM-III, AM-IV, AM-VI ve AM-VII fraksiyonlarının ABTS katyon radikalini giderme aktivitesi 90

Şekil 23. AM-III, AM-IV, AM-VI ve AM-VII fraksiyonlarının FRAP değerleri 91

Şekil 24. 5,7,8-trihidroksi–6,3',4'–trimetoksiflavon 105

Şekil 25. A (T7) bileşiğine ait UV spektrumları 109

Şekil 26. A (T7) bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu ($CDCl_3$, 500 MHz) 111

Şekil 27. A (T7) bileşiğinin kütle spektrumu (ESI-MS) 112

Şekil 28. A (T7) bileşiğinin IR spektrumu 113

Şekil 29. A (T7) bileşiğinin ^{13}C-NMR spektrumu ($CDCl_3$, 500 MHz) 114

Şekil 30. A (T7) bileşiğinin APT spektrumu ($CDCl_3$, 500 MHz) 115

Şekil 31. A (T7) bileşiğinin COSY spektrumu ($CDCl_3$) 116

Şekil 32. A (T7) bileşiğinin HMQC spektrumu ($CDCl_3$) 117

Şekil 33. A (T7) bileşiğinin HMBC spektrumu ($CDCl_3$) 118

Şekil 34. Eupatilin (5,7 dihidroksi- 6,3',4'- trimetoksiflavon) 119

Şekil 35. B (T7-1) bileşiğine ait UV spektrumları 122

Şekil 36. B (T7-1) bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu ($CDCl_3$, 500 MHz) 123

Şekil 37. B (T7-1) bileşiğinin IR spektrumu 124

Şekil 38. B (T7-1) bileşiğinin kütle spektrumu (ESI-MS) 125

Şekil 39. Skopoletin (7-hidroksi-6-metoksikumarin) 126

Şekil 40. Saf skopoletin ve C (T6) bileşiğinin metanol spektrumları 129

Şekil 41. Saf skopoletin ve C (T6) bileşiğinin $NaOCH_3$ spektrumları 129

Şekil 42. C (T6) bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu (MeOD, 500 MHz) 130

Şekil 43. C (T6) bileşiğinin kütle spektrumu (ESI-MS) 131

Şekil 44. C (T6) bileşiğinin IR spektrumu 132
Şekil 45. 8-hidroksi–salvigenin 133
Şekil 46. D (TA) bileşiğine ait UV spektrumları 136
Şekil 47. D (TA) bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu ($CDCl_3$, 500 MHz) 137
Şekil 48. D (TA) bileşiğinin kütle spektrumu (ESI-MS) 138
Şekil 49. D (TA) bileşiğinin IR spektrumu 139
Şekil 50. 4′-Hidroksiasetofenon 140
Şekil 51. E (TK) bileşiğinin UV Spektrumu 143
Şekil 52. E (TK) bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu ($CDCI_3$, 500 MHz) 144
Şekil 53. E (TK) bileşiğinin ^{13}C-NMR spektrumu ($CDCI_3$, 500 MHz) 145
Şekil 54. E (TK) bileşiğinin IR spektrumu 146
Şekil 55. E (TK) bileşiğinin kütle spektrumu (ESI-MS) 147
Şekil 56. 3 etil-2,6 dihidroksi-4 metoksi benzoik asit 148
Şekil 57. H (DT4) bileşiğinin UV Spektrumu 149
Şekil 58. H (DT4) bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu (MeOD, 500 MHz) 150
Şekil 59. H (DT4) bileşiğinin kütle spektrumu (ESI-MS) 151
Şekil 60. H (DT4) bileşiğinin IR spektrumu 152
Şekil 61. Elenolik asit 153
Şekil 62. K (DT5) bileşiğinin UV Spektrumu 154
Şekil 63. K (DT5) bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu (MeOD, 500 MHz) 155
Şekil 64. K (DT5) bileşiğinin kütle spektrumu (ESI-MS) 156
Şekil 65. K (DT5) bileşiğinin IR spektrumu 157
Şekil 66. AM-IV ekstesinin kromatogramı 158
Şekil 67. _____:t_R: 25,78 (AM-IV);_____:A (T7) bileşiğinin spektrumu 159
Şekil 68. _____:t_R: 14,79 (AM-IV);_____:C (T6) bileşiğinin spektrumu 159

Şekil 69. _____:t_R: 28,27 (AM-IV);_____:D (TA) bileşiğinin spektrumu 160
Şekil 70. A (T7) bileşiğinin HeLa hücre hattı üzerine olası etki mekanizması 164
Şekil 71. A (T7) bileşiğinin HT-29 hücre hattı üzerine olası etki mekanizması..... 165
Şekil 72. B (T7-1) bileşiğinin HeLa hücre hattı üzerine olası etki mekanizması 166
Şekil 73. Saf bileşiklerin DPPH radikali giderme aktivitesi 168
Şekil 74. Saf bileşiklerin ABTS katyon radikali giderme aktivitesi 169
Şekil 75. Saf bileşiklerin FRAP değerleri 170
Şekil 76. Klorojenik asit molekülünün parçalanma ürünleri 173
Şekil 77. Klorojenik asit molekülünün MS/MS fragmentleri 173
Şekil 78. Kersetin hekzosit molekülünün MS/MS fragmentleri 174
Şekil 79. Luteolin-7-*O*-gikozit molekülünün parçalanma ürünü 174
Şekil 80. Luteolin-7-O-gikozit molekülünün MS/MS fragmentleri 175
Şekil 81. Dikafeoil kinik asit molekülünün parçalanma ürünleri 176
Şekil 82. Dikafeoil kinik asit molekülünün MS/MS fragmentleri 176
Şekil 83. Luteolin molekülünün parçalanma ürünleri 177
Şekil 84. Luteolin molekülünün MS/MS fragmentleri 177

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. *Achillea multifida* (MARE: 11719) 10

Resim 2. AM-VII ekstresinin toluen:etilasetat:metanol (7:3:1) çözücü sisteminde yürütüldükten sonra 254 nm ve 366 nm UV ışık altındaki İTK kromatogramları..... 94

Resim 3. AM-VI ekstresinin toluen:etilasetat:metanol (7:3:1) çözücü sisteminde yürütüldükten sonra 366 nm UV ışık altındaki İTK kromatogramı..... 97

Resim 4. AM-III ekstresinin toluen:etilasetat:metanol (7:3:1) çözücü sisteminde yürütüldükten sonra 366 nm UV ışık altındaki İTK kromatogramı..... 103

Resim 5. AM-IV ekstresinin toluen:etilasetat:metanol (7:3:1) çözücü sisteminde yürütüldükten sonra 254 nm ve 366 nm UV ışık altındaki İTK kromatogramları... 104

Resim 6. A bileşiğinin farklı çözücü sistemlerinde yürütüldükten sonra 254 nm UV ışık altında ve NH_3/NA belirteci püskürtülüp bekletildikten sonra elde edilen İTK kromatogramları..... 107

Resim 7. B bileşiğinin farklı çözücü sistemlerinde yürütüldükten sonra 254 nm UV ışık altında ve NH_3/NA belirteci püskürtülüp bekletildikten sonra elde edilen İTK kromatogramları..... 121

Resim 8. C bileşiğinin farklı çözücü sistemlerinde yürütüldükten sonra 254 nm ve 366 nm UV ışık altındaki İTK kromatogramları 128

Resim 9. D bileşiğinin farklı çözücü sistemlerinde yürütüldükten sonra 254 nm UV ışık altında ve NH_3/NA belirteci püskürtülüp bekletildikten sonra elde edilen İTK kromatogramları..... 135

Resim 10. E bileşiğinin farklı çözücü sistemlerinde yürütüldükten sonra 254 nm UV ışık altında ve seryum sülfat belirteci püskürtülüp yakıldıktan sonra elde edilen İTK kromatogramları..... 142

Resim 11. K (DT5) bileşiğinin etilasetat:metanol (3:1) çözücü sisteminde yürütüldükten sonra 366 nm UV ışık altındaki İTK kromatogramı..... 154

Resim 12. Saf bileşiklerin toluen:etilasetat (2:1) çözücü sisteminde yürütüldükten sonra 254 nm UV ışık altındaki İTK kromatogramı 161

ÖZET

Endemik *Achillea multifida* (DC.) Boiss. Bitkisinin Sitotoksik Etkili Bileşiklerinin İzolasyonu ve Diğer Biyolojik Aktiviteleri

Turgut Taşkın

Doç. Dr. Leyla Bitiş

Amaç: Bu çalışmanın amacı, *A. multifida* bitkisinin topraküstü kısmından elde edilen heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin sitotoksik, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerini inceleyerek güçlü aktivite gösteren ekstre/ekstreleri belirlemek; daha sonra güçlü sitotoksik aktivite gösteren kloroform ekstresinden sitotoksik etkili bileşikleri saflaştırmak ve bu bileşiklerin yapılarını aydınlatmak; ayrıca güçlü antioksidan ve antimikrobiyal aktivite gösteren metanol ekstresinin içerdiği fenolik bileşikleri analiz etmektir.

Gereç ve Yöntem: Kloroform ekstresinden sitotoksik etkili bileşikleri saflaştırmak için kolon, ince tabaka ve preparatif ince tabaka kromatografi teknikleri kullanıldı. Saflaştırılan bileşiklerin yapıları UV, IR, NMR ve kütle spektroskopisi yöntemleriyle aydınlatıldı. Metanol ekstresinin içerdiği fenolik bileşikler ESI-Q-TOF LC/MS yöntemi ile analiz edildi. Heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin antioksidan kapasiteleri DPPH, ABTS, FRAP ve metal kelatı oluşturma aktiviteleri yöntemleriyle incelendi. Ekstrelerin sitotoksik aktiviteleri, HT-29, MCF-7, HeLa ve NIH/3T3 hücreleri üzerinde MTT yöntemiyle incelendi. Ayrıca ekstrelerin antimikrobiyal aktiviteleri, agar oluk difüzyon ve sıvı besiyerinde mikrodilüsyon yöntemleri kullanılarak araştırıldı.

Bulgular ve Sonuçlar: Kloroform ekstresinin HeLa, HT-29 ve MCF-7 hücre hatlarına karşı güçlü ve seçici sitotoksik aktivite gösterdiği saptandı ve bu ekstreden 8-hidroksi-salvigenin, 5,7,8-trihidroksi-6,3',4' trimetoksiflavon, eupatilin, skopoletin, 4′-hidroksiasetofenon, 3 etil-2,6 dihidroksi-4 metoksi benzoik asit ve elenolik asit izole edildi. Metanol ekstresinin diğer ekstrelerden daha güçlü antioksidan ve antibakteriyal aktivite gösterdiği bulundu ve bu ekstrenin klorojenik asit, kersetin heksozit, luteolin-7-*O* glukozit, dikaffeoil kinik asit ve luteolin içerdiği tespit edildi. 5,7,8-trihidroksi-6,3',4' trimetoksiflavon bileşiğinin HeLa ve HT-29 hücre hatlarına karşı;eupatilin bileşiğinin HeLa hücre hatlarına ve elenolik asit bileşiğinin ise MCF-7 hücre hatlarına karşı güçlü ve seçici sitotoksik aktivite gösterdiği tespit edildi.

Anahtar Sözcükler: *A.multifida*, sitotoksik, antioksidan, antimikrobiyal, izolasyon

SUMMARY

Isolation of Cytotoxic Compounds from the Endemic *Achillea multifida* (DC.) Boiss. and Its Other Biological Activities

Turgut Taşkın

Thesis Advisor: Assoc.Prof. Dr. Leyla Bitiş

Department of Pharmacognosy

Aim: The aim of this study was to evaluate antioxidant, antimicrobial and cytotoxic effects of heptane, chloroform and methanol extracts from *A. multifida* aerial parts, and then to isolate and identify cytotoxic compounds from chloroform extract, which showed the highest cytotoxic activity; also, to identify the phenolic compounds in methanol extract, which showed the highest antioxidant and antibacterial activity.

Materials and Methods: Column chromatography, thin layer chromatography and preparative thin layer chromatography were used for isolation of cytotoxic compounds from chloroform extract. Also, UV, IR, NMR and mass spectroscopy were used for identification of cytotoxic compounds from chloroform extract. The phenolic compounds in methanol extract were identified by ESI-Q-TOF LC/MS. The antioxidant activitiy of the extracts were assayed with various methods, DPPH, ABTS, FRAP and metal chelating capacity. The cytotoxic activity of the extracts were determined on cancer HT-29, HeLa, MC-7 and normal NIH/3T3 cells. The cytotoxic activity of the extracts were assayed using the MTT protocol. The antimicrobial activity of the extracts were assayed using the agar well diffusion and microbroth dilution methods.

Results and Conclusions: The chloroform extract showed strong activity and selectivity against HeLa, HT-29 and MCF-7 cell lines. 8-hydroxy-salvigenin, 5,7,8-trihydroxy-6,3',4'-trimethoxyflavone, eupatilin, scopoletin, 4′-hydroxyacetophenone, 3 ethyl-2,6 dihydroxy-4 methoxybenzoic acid and elenolic acid were isolated from chloroform extract. The methanol extract was showed the highest antioxidant and antibacterial activity. The phenolic compounds in methanol extract were identified as:chlorogenic acid, quercetin hexoside, luteolin-7-O glucoside, dicaffeoyl quinic acid, luteolin. 5,7,8-trihydroxy-6,3',4'-trimethoxyflavone, eupatilin and elenolic acid compounds showed strong activity and selectivity against HeLa, HT-29; HeLa and MC-7 cell lines, respectively.

Key Words: *A. multifida*, cytotoxic, antioxidant, antimicrobial, isolation

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Bitkilerin ürettiği doğal ürünler olan primer ve sekonder metabolitler doğrudan veya dolaylı olarak günümüzde tedavide kullanılabilecek ilaç adayları için en temel ürünlerdir. Bundan dolayı bitkiler ve taşıdığı bu bileşikler üzerinde yapılan bilimsel araştırmaların sayısının her geçen gün arttığı görülmektedir. Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan ilaçların yetersiz kalması; yıllar önce insanlığı tehdit eden bazı enfeksiyon hastalıklarının tekrar tedavi edilemez hale gelmesi insanların tekrar doğal kaynaklı ürünlere yönelmesine neden olmuştur. Ayrıca günümüzde insanların tedavi konusunda bilinçlendiği, hastalıklara yakalanmamak ve bağışıklık sistemlerini güçlendirmek için günlük yaşamlarında doğal kaynaklı antioksidanlara yer verdiği görülmektedir. Bu nedenlerden dolayı, tez çalışmamızda ülkemizde endemik olarak yetişen *A. multifida* bitkisinin gelecekte antikanser, antimikrobiyal veya antioksidan kaynağı olarak insanların kullanabileceği doğal bir kaynak veya doğal kaynaklı ilaçlar için bir hammadde olarak kullanılıp kullanılmayacağını araştırmak hedeflenmiştir.

Kontrolsüz hücre çoğalması olarak tanımlanan kanser, önemi giderek artan bir sağlık ve yaşam sorunu olarak bilinmektedir. Küresel kanser yükü geçtiğimiz 30 yıl içerisinde iki kattan daha fazla artmıştır. 2008'de 12 milyon yeni kanser vakasının teşhis edildiği, kanserden kaynaklanan 7 milyon ölümün gerçekleştiği ve kanserli 25 milyon kişinin halen hayatta olduğu tahmin edilmektedir. Dünya nüfusunun süregelen artışı ve yaşlanması kanser yükü üzerinde de büyük değişikliklere yol açacaktır. 2030'a gelindiğinde 27 milyon kanser vakası, kanserden kaynaklanan yıllık 17 milyon ölüm ve son beş yıl içinde kanser tanısı konmuş 75 milyon kişi rakamlarına ulaşılması beklenmektedir (Boyle ve Levin, 2008).

Günümüzde kanserin tedavisi için kullanılan yöntemler yetersiz kaldığı için son yıllarda yeni bileşikler (özellikle doğal kaynaklı bileşikler) elde etmek için çalışmalar sürmektedir. Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Kanser Enstitüsü 1960 yılından beri antitümöral ajanlar için geniş bir tarama yapmaktadır. Bu kurum tarafından 35,000 bitki örneği taranmış ve elde edilen sonuçlara göre antikanser ilaçların % 67'sinin doğal ürün veya doğal ürün türevleri olduğu bildirilmiştir. Bunun en güzel örneği olarak bitkiden elde edilen taksol bileşiği verilebilir. Son yıllarda bu kurum

tarafından doğal kaynaklı bileşikler üzerine bilimsel araştırmalar artmıştır (Ghantous ve ark., 2010).

Günümüzde 200'den fazla doğal ürün veya doğal ürün türevi bileşiklerin önklinik veya klinik denemeleri devam etmektedir. Bitkilerden izole edilen bazı bileşiklerin "faz denemeleri" aşağıda verilmiştir. Seskiterpen lakton bileşiklerini içeren *Artemisia annua* bitkisinden elde edilen artemisinin ve türevlerinin, klinik denemelerde gırtlak kanseri ve hipofiz tümörü için umut verici olduğu görülmüştür. Ayrıca bu bileşiğin lupus nefriti, meme, kolorektal ve küçük olmayan akciğer kanserine karşı faz I ve II; *Thapsia* (Apiaceae) cinsinden elde edilen tapsigargin ve türevi bileşiklerinin meme, böbrek ve prostat kanserleri için faz I; *Tanacetum parthenum* bitkisinden elde edilen partenolid ve analoğu olan dimetil-amino-partenolid bileşiğinin akut miyeloid lösemi, akut lenfoblastik lösemi, lenf ve diğer kan kanserlerine karşı faz I denemeleri halen devam etmektedir (Ghantous ve ark., 2010). Bu çalışmalar, bitkilerden izole edilen bileşiklerin veya türevlerinin gelecekte birçok kanser hastalığına karşı tedavi edici olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Antibiyotiklerin dikkatsiz ve yaygın kullanımı ilaç direncine yol açmıştır. Bundan dolayı son yıllarda bakteriler, virüsler, mantarlar ve parazitlerin neden olduğu enfeksiyonlara karşı kullanılan geniş spektrumlu antibiyotikler üzerine çalışmalar artmıştır. Günümüzde enfeksiyon rahatsızlıklarının tedavisinde sentetik antimikrobiyal ajanlar yerine doğal kaynaklı antimikrobiyal ajanlar üzerinde çalışmalar hız kazanmıştır. Yapılan bilimsel çalışmalarda, geleneksel tıpta kullanılan bitki veya bitki ekstrelerinin enfeksiyonlara karşı kullanılabilecek moleküllerin öncü potansiyel kaynağı olabileceği vurgulanmaktadır (Karaalp ve ark., 2009).

Antioksidan özellik gösteren bitki veya bitki ekstreleri insan sağlığı için oldukça önemlidir. Son yıllarda antioksidan aktivite gösteren bitki veya bitki ekstreleri, hem ilaç hem de gıda sanayiinde önem kazanmıştır. Bundan dolayı günümüzde doğal antioksidan kaynakları üzerine bilimsel çalışmaların sayısı artmıştır (Giorgi ve ark., 2009).

Achillea türleri Türkiye'de idrar arttırıcı, iştah açıcı, adet söktürücü, gaz giderici, yara iyileştirici (özellikle basurda), karın ağrısı için ve mensturasyon düzenleyici

olarak kullanılmaktadır. Ayrıca kozmetik sanayinde de kullanım alanlarına sahiptir (Tuzlacı, 2006; Baytop, 1999).

Achillea türleri İran'da tonik, anti-enflamatuar, antispazmodik, terletici, diüretik olarak; hemoraji, zatürre, romatizma ağrıları ve yara iyileştirici tedavilerde kullanılmaktadır. Ayrıca Çin tıbbında terletici, tonik, anti-hipertansif olarak kullanılmaktadır (Saeidnia ve ark., 2011; Xiao-Tang ve ark., 2006). Monograflara göre *Achillea* türleri taze veya kuru "drog" halinde; dahilen mono çay, çay karışımları, tablet, kapsül, draje, tentür, sulu ekstre vb. şeklinde; haricen oturma banyosu olarak ya da pomat şeklinde; iştah kaybı, dispepsi ve çeşitli jinekolojik rahatsızlıklarda kullanılmaktadır. Dünya'nın birçok yerinde kültürü yapılan *A. millefolium* bitkisel çay şeklinde, anti-enflamatuar, antispazmodik, hemostatik, kolagog olarak oldukça yaygın kullanılmakta ve monograflarda tıbbi tür olarak yer almaktadır (WHO monografları, 2009; ESCOP monografları, 2009).

Achillea türlerinin kimyasal içerik çalışmalarına bakıldığında, bu türlerin genellikle flavonoidler, terpenik bileşikler [monoterpenler, seskiterpenler (özellikle seskiterpen laktonlar), diterpenler, triterpenler], lignanlar ve amino asit türevleri içerdiği görülmektedir (Xiao-Tang ve ark., 2006). *Achillea* türleri üzerinde yapılan çalışmalarda genellikle seskiterpen lakton bileşiklerin kloroform ekstresinden izole edildiği görülmektedir (Todorova ve ark., 2007; Todorova ve ark., 1998).

Achillea multifida (ebülmülük veya civanperçemi) bitkisinin geleneksel tıpta üst solunum yolları ve akciğer enfeksiyonlarına karşı kullanıldığı kayıtlıdır (Başer ve ark., 2002).

Yapılan literatür taramalarında, ülkemizde endemik olarak yetişen *Achillea multifida* bitkisinin antimikrobiyal aktivitesi üzerine iki çalışmanın olduğu görülmüştür. Bunlardan Baser ve ark.'ın yaptığı bir çalışmada bitkiden elde edilen uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesi ve içeriğine bakılmış; Karaalp ve ark.'ın yaptığı başka bir çalışmada ise bitkinin kapitulumlarından hazırlanan n-hekzan, kloroform ve metanol ekstrelerinin antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir (Baser ve ark., 2002; Karaalp ve ark., 2009). Bu çalışmaların dışında *Achillea multifida* bitkisi üzerine başka herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bitkinin hem endemik olması hem de üzerine yukarıda anlatılan iki çalışmanın dışında başka bir bilimsel çalışmanın olmamasından dolayı *Achillea multifida* bitkisi tez konusu olarak seçilmiştir.

Bu tezin amacı:

- ✓ *Achillea multifida* bitkisinin topraküstü kısmından elde edilen heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin ilk defa sistematik ve kapsamlı bir çalışmayla, sitotoksik aktivitelerinin tespit edilmesi ve güçlü sitotoksik aktivite gösteren ekstreden bileşik veya bileşiklerin saflaştırılması,
- ✓ Saflaştırılan bileşik/bileşiklerin yapısı/yapılarının aydınlatılması,
- ✓ Yapıları aydınlatılan saf bileşiklerin veya kloroform ekstresinden elde edilen altekstrelerin sitotoksik aktivitelerinin incelenmesi ve güçlü aktivite gösteren ekstre(ler) veya bileşik/bileşiklerin olası etki mekanizmalarının incelenmesi,
- ✓ Saf bileşiklerin veya ekstre(ler)nin kanser olmayan hücreler üzerindeki toksik etkilerinin belirlenmesi ve gelecekte anti-tümör ajan olarak kullanılabilecek ekstre(ler) veya bileşik/bileşiklerin tespit edilmesi,
- ✓ Bitkiden elde edilen heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerini inceleyerek güçlü aktivite gösteren ekstrenin belirlenmesi ve bu ekstrenin içerdiği fenolik bileşikleri analiz etmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Botanik Bilgiler

2.1.1 Asteraceae (Compositae) familyası

Asteraceae familyası; tek yıllık, iki yıllık ya da çok yıllık otsu ya da bazen çalı, nadiren küçük ya da orta büyüklükte ağaç şeklinde, tüysüz ya da çoğu zaman çeşitli şekillerde salgılı ya da salgısız tüylü. Dokuları latisferli ya da latisfersiz. Yaprakları alternat ya da bazen karşılıklı, nadiren çevresel, stipulasız, (nadiren stipüllü), basit ve tam ya da dişliden çeşitli şekillerde parçalanmış, bileşik. Çiçek durumu 1 veya birden çok sık baş şeklinde birkaç ya da çok sayıda sapsız çiçeklerin çiçek tablası üzerinde dizilip, hemen hemen her zaman 1 veya birkaç sıralı fillariden (involukral brakte) oluşan koruyucu bir involukrum tarafından çevrilen kapitulum şeklinde kümelenmiştir; kapitulum bazen ikincil bir kapitulum benzeri baş şeklinde kümeleşmiştir (yalancı baş). Reseptakulum çıplak ya da palealı, uzun tüylü ya da kılçıklı. Çiçekler (çiçekçikler) epigin, sinpetal, tam ya da bazıları dişi ya da nötr ya da işlev bakımından erkek. Kaliks ovaryumun ucunda papus denilen tüyler, kıllar, pullar ya da kılçıklar ya da ± devamlı korona (taç) ile temsil edilmektedir; bazen papus tamamen yoktur. Korolla tüp şeklinde (huni şeklinde ya da tabanda silindirik, üste doğru çan şeklinde), filiform, dilsi ya da nadiren iki dudaklı, genellikle 3 ya da 5 dişli; nadiren bulunmaz. Stamenler (4-)5, filamentler korolla tüpüne bağlı, anterler kenarlarından birleşerek stilusu silindir şeklinde sarar (singenezis), nadiren serbest; iç yüzeylerinden açılır. Ovaryum alt durumlu, tek gözlü, tabanda bir adet anatrop ovullü; stilus genellikle yukarı doğru 2'ye çatallanmış, çoğu zaman disk çiçeklerin stilusları anterlerdeki poleni yakalayacak şekilde fırça tüylü. Meyve aken (sipsela), genellikle kalıcı ya da düşücü papuslu; papus sapsız ya da gaga benzeri bir uzantının (rostrum) ucundan çıkar. Kapitulumlar ya homogam (kapitulumdaki tüm çiçekler iki eşeyli) ya da heterogamdır (kenardaki çiçekler dişi ya da steril, içtekiler ise iki eşeyli). Bazen kapitulumlar tek eşeylidir. Bu durumda, bir kapitulumda yalnız dişi ya da erkek çiçek bulunur (Arabacı, 2006; Davis, 1975).

Asteraceae familyasında ayırt edici olarak kullanılan morfolojik karakterler şunlardır (Demir, 2008):

- Çiçeklerin tümünün dilsi olması/olmaması

- Bitkilerin süt içermesi/içermemesi
- Yaprakların ve/veya involukrum braktelerinin dikenli olması/olmaması
- Orta ve kenar çiçeklerinin şekli
- Çiçek rengi
- Reseptakulum örtüsü

Asteraceae familyası üyeleri yeryüzünün hemen hemen her yerinde yayılış göstermektedir. Özellikle Amerika'nın güneybatısı ve Meksika, Brezilya'nın güneyi, And Dağları boyunca, Akdeniz Bölgesi, Güneybatı Asya, Orta Asya, Güney Afrika ve Avustralya'da yoğun olarak bulunmaktadır. Compositae familyası yeryüzünde yaklaşık olarak 1100 cins ve 25000 tür ile temsil edilir. Türkiye Florası'nda Asteraceae familyası 136 cins ve 1195 tür ile temsil edilmektedir. Buna göre hem tür hem de cins bakımından floramızın en zengin familyasıdır. En çok endemik tür Asteraceae familyasında bulunmaktadır. Toplam 446 endemik tür içeren Asteraceae familyasının endemizm oranı % 37,3'tür. Bu familyadaki bitkiler antibakteriyel, antifungal, antihelmintik, antienflamatuar, insektisidal, antitümör gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip diterpenler, flavonoidler, seskiterpen laktonlar ve sekonder metabolitleri içermektedirler (Arabacı, 2006; Özak, 2011).

2.1.2 *Achillea* L. Cinsi

Çok yıllık otsu ya da yarı çalımsı bitkiler, kalın ya da ince odunsu rizomlu, rizomlar bazen sürünücü. Gövde dik ya da yükselici, silindirik ya da köşeli, düz, boyuna çizgili ya da derin oluklu. Yapraklar tamdan 3-4 pinnatipartite kadar değişen şekillerde, alternat. Kapitula heterogam, radiat, saplı ya da sapsızca, küçük ya da orta büyüklükte, genellikle uç kısımda korimbus şeklinde düzenlenmiş, çok nadiren tek, bazen basit şemsiye. İnvolukrum oblong-silindirik, ovoid, yarı küremsi ya da genişçe yarı küremsi. Fillariler 3-4 sıralı, dıştakiler içtekilere göre daha küçük, dar ya da genişçe şeffaf kenarlı. Çiçekler beyaz ya da sarı, bazen pembe; dilsi çiçekler dişi, tek bir sıra halinde, laminanın uç kısmı ± loblu; tüpsü çiçekler hermafrodit, düzenli 5-dişli, korolla tüpü ± basık, tabanı akenin tepesini saran bir torba şeklinde. Reseptakulum ± düz ya da konveks, palealı, palea lanseolat ya da oblong, zarımsı, paleanın ucuna kadar uzamayan orta damarlı. Aken oblong, oblanseolat ya da oblong-obovat, tüysüz, sırttan basık, kanatsız, tepesi nispeten daha geniş,

kahverengimsi-beyaz. Papus yok (Davis, 1975). *Achillea* türlerinde çiçek rengi önemli bir ayırt edici karakterdir. Fakat çiçeklerin rengi arazide geç evrede solmaktadır (Çakıcı, 2014).

Achillea L. ılıman kuşakta bulunan, Asteraceae (Compositae) familyasına ait çok yıllık bir cinstir (Davis, 1975). Çeşitliliğinin merkezi, tüm seksiyonlarının oluştuğu yer olan Güney Doğu Avrupa ve Güney Batı Asya'dır. *Achillea* L. cinsinin yeryüzünde tanımlanan tür sayısının yaklaşık 140'a ulaştığı tahmin edilmektedir. Türkiye'de yetişen *Achillea* türleri 6 seksiyon, 44 tür ve 50 takson olarak belirlenmiştir. Endemik tür sayısı ise 21 (28 takson)'dir. Türkiye Florası'nın yazımından sonra iki ek cilt hazırlanmıştır. Bu eklerden birincisinde (10. cilt) *Achillea* türleri ile ilgili herhangi bir bilgi yoktur. Fakat ikinci ek ciltte (11. cilt) *Achillea* cinsine ait iki yeni tür tanımlanmıştır. Bu türler *A.ketenoglui* H. Duman ve *A. milliana* H. Duman'dır.

Achillea türleri yaygın olarak civanperçemi ismi ile bilinmesine karşın değişik yörelerde akbaşlı, barsam otu, binbiryaprak otu, marsama otu, kandil çiçeği ve baytaran isimleriyle de bilinirler (Arabacı, 2006).

2.1.3 *Achillea multifida* (DC.) Boiss.



Bitki odunsu rizomlu. Gövde 10-35 cm, yükselici, tek ya da birkaç tane, kısa steril sürgünlü, dallanmamış, seyrek yapraklı, silindirik, yukarı doğru köşeli, hafifçe oluklu, pubessent. Yapraklar heteromorfik; taban yaprakları lanseolat-oblong, 2-10 x 1-3 cm'ye kadar (5 cm'e kadar petiol ile birlikte), 2-3 pinnatifitden pinnatisekte kadar değişen şekillerde, birincil segmentlerin sayısı 6-10 adet, uçtaki loplar lineer-lanseolat, 2,5-3 x 0,4-0,5 (-0,7) mm, ucu kıkırdağımsı, subakut, raşis 0,5-1 mm, uzun seyrek dağınık tüylü; gövde yaprakları lanseolat-oblong, 2,5-5 x 0,8-2 cm boyutlarında, 1-2 pinnatifitden pinnatisekte kadar değişen şekillerde, sapsız, uçtaki loplar lineer-lanseolat, 1-2 x 0,2-0,8 mm, mukronat, mukro kıkırdağımsı, seyrek dağınık tüylü.

Resim 1. *Achillea multifida* (MARE: 11719)

Çiçek kurulu sapı 2,5-15 mm. Kapitulum 4-60 adet, korimbus 2-9 cm genişliğinde. İnvolukrum yarı küremsiden genişçe yarı küremsiye kadar değişen şekillerde, 3-4,5 x 4-6 mm. Fillariler 2-3 sıralı; dıştakiler ovat, 2 x 1 mm, akut, 0,3 mm'ye kadar kahverengimsi kenarlı, pubessent; içtekiler genişçe ters ovat, 3-3,5 x 1,5 mm, obtus, 0,5 mm genişliğinde kahverengimsi kenarlı, pubessent. Palea oblongdan lanseolat'a kadar değişen şekillerde, 3-3,5 x 1 mm, subakut, uç kısmı 0,5 mm genişliğinde kahverengimsi, piloz ya da tüysüz.

Dilsi çiçekler 6-9 adet, beyaz, 4-6 x 2-3 mm, lamina yarı eliptik, 3-4(-5) x 2-3 mm, uç kısmı 3 loplu; tüpsü çiçekler 20-30 adet, sarı, 2 x 0,5 mm, ovaryum 1,25 mm. Aken oblanseolat, 1,5-2 x 0,4-0,6 mm, lineat, kahverengimsi (Davis, 1975; Arabacı, 2006).

Kromozom sayısı: 2n = 18

Çiçeklenme: Haziran-Eylül.

Habitat: *Abies* orman alanı, ıslak alanlar, alpinik yamaçlar.

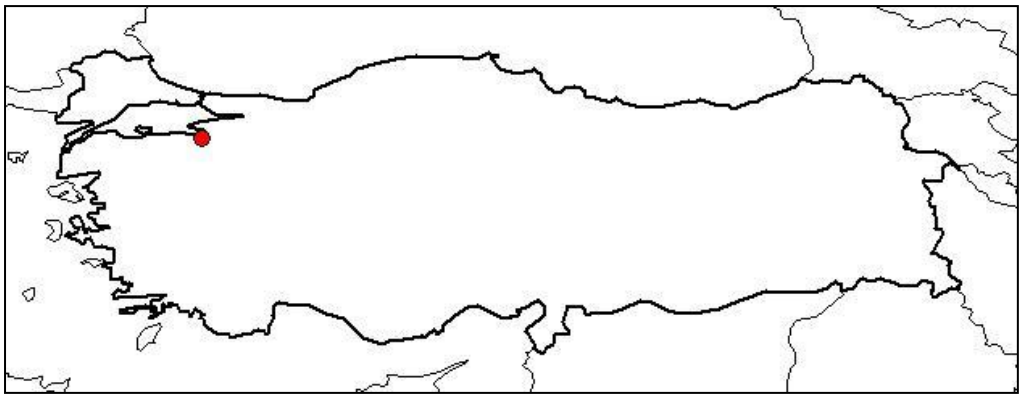
Yetiştiği yükseklikler: 1700-2550 m

Endemik: Endemik (Bursa-Uludağ)

Türkiye'deki yayılışı: Kuzeybatı Anadolu.

Tip: (Türkiye A2(A) Bursa) Olympus Bithynus (Ulu Da.), Aucher 1837: 3296 (holo.G!) .

Türkiye florası kayıtları: A2(A) Bursa: Olympus Bithynus (Ulu Da.), 1842, *Boiss.* Uludağ, 1873, Pichler. Bursa-Uludağ, Oteller, Kirazlı yayla arası, 1840 m., 4.07.1985, E.Tuzlacı, M. Öksüz ve Eczacılık Fakültesi öğrencileri, MARE 27. Bursa-Uludağ, Oteller Bölgesi, Teleferik (zirveye doğru çıkan) altında, 22.07.2009, Mehmet Z. Uyanık, MARE 11719.



Şekil 1. *A. multifida* bitkisinin Türkiye'de bulunduğu yer

2.2. *Achillea* L.Türlerinin Halk Arasında Tıbbi Amaçla Kullanımları

Achillea türleri yaygın olarak "civanperçemi" ismi ile bilinmesine karşın, değişik yörelerde akbaşlı, barsam otu, binbiryaprak otu, marsama otu, kandil çiçeği (*A. millefolium*); yılan çiçeği (*A. aleppica*); baytaran (*A. armenorum*); ebülmülük (*A. multifida*); ayvadana, ayıdanası, kurt otu (*A. nobilis*); tilkikuyruğu, yılandili (*A. setacea*) gibi değişik isimlerle bilinirler. Ülkemizde yetişen bazı *Achillea* türlerinin yöresel adları ve geleneksel kullanımları aşağıda verilmiştir (Tuzlacı, 2006; Baytop, 1999; Başer ve ark., 2002; Yalçın, 2015; Kültür, 2006).

Achillea biebersteinii (Ayvadana, Kılıç otu) bitkisi;

- Çiçekli kısımlarından (kapitulumlarından) hazırlanan dekoksiyon, dahilen, mide ağrısı ve karın sancısının giderilmesinde kullanılır.
- Bitkinin dövüldükten sonra çıkan suyu, haricen, yara ve kesiklerin tedavisinde kullanılır.
- Bitkinin topraküstü kısımları ağızda çiğnenerek ülser tedavisinde kullanılır.
- Bitkinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan infüzyon karın ağrılarının giderilmesinde kullanılır.
- Çiçek durumları iştah acıcı ve Elazığ bölgesinde pirelere karşı kullanılmaktadır.
- Topraküstü kısımlarından hazırlanan infüzyon dahilen kanser tedavisinde kullanılır.

Achillea crithmifolia (Güzelnamus otu, Mayasıl otu) bitkisi;

- Kurutulmuş çiçek kurullarından hazırlanan dekoksiyon hemoroitlere karşı kullanılır.
- Kurutulmuş kapitulumlarından hazırlanan dekoksiyon egzama tedavisinde kullanılır.
- Çiçek kurullarından hazırlanan dekoksiyon, haricen, saç dökülmesine karşı kullanılır.

Achillea kotschyi (Ayvadana) bitkisi;

- Toprak üstü kısımlarından hazırlanan dekoksiyon dahilen mide rahatsızlıkların giderilmesinde kullanılır.

Achillea magnifica (Arı çiçeği) bitkisi;

- Kurutulmuş kapitulumları dahilen mide rahatsızlıklarında kullanılır.

Achillea setacea (Tilkikuyruğu,Yılandili);

- Yapraklarının ezilmesiyle elde edilen lapa, haricen yara iyi edici olarak kullanılır.

Achillea millefolium **subsp.** ***millefolium*** (Civanperçemi, Ağrı otu, Sancı otu);

- Çiçekli ve yapraklı dallarından hazırlanan infüzyon dahilen idrar arttırıcı ve gaz söktürücü olarak kullanılır.
- Bitkinin topraküstü kısımlarından hazırlanan infüzyon dahilen mide ağrılarının giderilmesinde kullanılır.
- Bitkinin topraküstü kısımlarından hazırlanan dekoksiyon dahilen prostat hastalıkların tedavisinde ve baş ağrısının giderilmesinde kullanılır.

Achillea millefolium **subsp.** ***pannonica*** (Civanperçemi)

- Yapraklarından hazırlanan infüzyon dahilen kanser tedavisinde kullanılır.
- Topraküstü kısımlarından hazırlanan dekoksiyon akciğer kanseri tedavisinde kullanılır.

Achillea teretifolia (Kılıç otu);

- Kapitulumları dövülüp yaralı veya kesik yere bir bezle sarılarak, yara tedavisinde kullanılır.

Achillea wilhelmsii (Kardeşkınası, Kardeşkanı, Pisikkuyruğu);

- Bitkiden hazırlanan dekoksiyon, banyo halinde, çiçek hastalığı (çocuklarda) tedavisinde kullanılır.
- Erzurum (Ilıca) bölgesinde çiçekli dalları böcek kaçırtıcı ve öldürücü olarak kullanılır.

Achillea multifida (Ebülmülük);

- Geleneksel tıpta üst solunum yolları ve akciğer enfeksiyonlarına karşı kullanıldığı kayıtlıdır.

2.3. *Achillea* L. Türleri Üzerine Yapılan Kimyasal Araştırmalar ve Biyolojik Aktivite Çalışmaları

1995-2016 yılları arasında *Achillea* L. türleri üzerinde yapılan uçucu yağ çalışmaları

Ülkemizde *Achillea* türleri ile ilgili yapılan kimyasal çalışmalar son zamanlarda giderek artmıştır. *Achillea* türlerinin uçucu yağları ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Ülkemizde yetişen *Achillea* türlerinin uçucu yağlarının majör bileşenleri arasında başta ökaliptol (1,8-sineol) ve kafur olmak üzere, borneol, piperiton, L-kafur, cis-piperitol, trans-sabinen-hidrat, terpinen-4-ol ve α-tuyon bulunmaktadır. Ayrıca bu bileşenlerin yanında α-krisantenon, α-pinen, artemisia keton, viridiflorol, α-terpineol, linalol, β-tuyon, ve sabinen bileşenleri de tespit edilmiştir. Türkiye'de yetişen *Achillea* türlerinin uçucu yağlarının majör bileşikleri aşağıdaki Tablo 1'de gösterilmiştir (Arabacı, 2006).

Yapılan çalışmalarda *Achillea sieheana* bitkisinin topraküstü kısmından elde edilen uçucu yağından majör bileşik olarak kafur (% 39,9); *A. pseudoaleppica* bitkisinin topraküstü kısmından elde edilen uçucu yağından majör bileşikler olarak kafur (% 29,1), 1-8 sineol (%17,7), artemisia keton (% 10,3); *A. goniocephala* bitkisinin çiçekli topraküstü kısmından elde edilen uçucu yağından majör bileşikler olarak kafur (% 32,6), 1-8 sineol (% 23,2); *A. falcata* uçucu yağından majör bileşikler olarak 1-8 sineol (% 14-24), kafur (% 4-24), α-pinen (% 2-12); *A. coarctata* uçucu yağından majör bileşikler olarak 1,8-sineol (% 20,1), kafur (% 15,6), viridiflorol (% 11,8); *A. oligocephala* uçucu yağından 1,8-sineol (% 18,6), α-terpineol (% 6,8), linalool (% 6,0); *A. setacea* ve *A. teretifolia* uçucu yağlarından sırasıyla majör bileşik olarak 1-8 sineol (% 18,5; % 19,9); *A.lycaonica* uçucu yağından majör bileşik olarak trans-sabinen hidrat (% 9,3); *A.ketenoglui* uçucu yağından majör bileşikler olarak borneol (% 14,1), terpinen-4-ol (% 14,5); *A. biebersteinii* uçucu yağından 1,8-sineol (% 46,1), kafur (% 17,6), α-terpineol (% 8,2), borneol (% 3,4), sabinen (% 3,2), terpinen-4-ol (% 3,1); *A. schischkinii* ve *A. aleppica* DC. subsp. *aleppica* uçucu yağından majör bileşik olarak sırasıyla 1,8-sineol (% 32,5; % 26,1) bileşikleri saptanmıştır (Tabanca ve ark., 2004; Özen ve ark., 2003; Başer ve ark., 2001; Kurkcuoglu ve ark., 2003; Toker ve ark., 2003; Unlu ve ark., 2002; Kuesmenoglu ve ark., 1995; Işcan ve ark., 2006).

Achillea millefolium subsp. *millefolium* bitkisinin uçucu yağında ökaliptol, kafur, α-terpineol, β-pinen, borneol; *A. holosericea*, *A. taygetea, A. fraasii* uçucu yağında kafur, borneol, 1,8-sineol; *A. clavennae* bitkisinin uçucu yağında kafur (% 29,5), mirsen (% 5,5), 1,8-sineol (% 5,3), *β*-karyofillen (% 5.1), linalol (% 4.9); *A. talagonicave* ve *A.vermicularis* uçucu yağında 1,8-sineol ve kafur; *A.santolina* ucuçu yağında 1,8-sineol, kafur, 4-terpineol, trans-karveol; *A.ligustica* bitkisinin uçucu yağında santolina alkol (% 6,7-21,8), borneol (% 3,4-20,8), sabinol (% 2,1-15,5), trans-sabinil asetat (% 0,9-17,6), *α*-tuyon (% 0,4-25,8), viridiflorol (% 0,7-3,6); *A.lingulata*, *A.umbellata* uçucu yağında borneol, bornil asetat, kafur, *α*- ve *β*-tuyon, 1,8-sineol; *A.ptarmica, A.erba-rotta*, *A.moschata*, *A.nana* ve *A.nobilis* uçucu yağında kafur, 1,8 sineol, germakren D, terpinen-4-ol; *A distans* uçucu yağında bisabolen oksid, linalil oksid; *A.ageratum* uçucu yağında artemisia asetat, artemisia alkol, 1,8-sineol; *A. collina, A. aspleniifolia* uçucu yağında kamazulen, germakren D; *A. wilhelmsii* uçucu yağında karvakrol (% 25,1), linalol (% 11,0), 1,8-sineol (% 10,3), *E*-nerolidol (% 9,0), borneol (% 6,4); *A.conferta* uçucu yağında kafur (% 22,1), 1,8-sineol (% 10,0); *A.biserrata, A.clypeolata, A.crithmifolia, A.filipendulina, A.macrophylla, A.pannonica, A.pyrenaica, A.sibirica, A.taygetea* ve *A.tenuifolia* uçucu yağında pinen, 1,8-sineol, kafur, germakren-D, bisabolen oksid; *A.asplenifolia* uçucu yağında *β*-karyofillen (% 17,6), germakren D (% 15,6), kamazulen (% 13,3); *A. chrysocoma* uçucu yağında borneol (% 10,1), terpinen-4-ol (% 9,2), *cis-p*-menti-2-en-1-ol (% 8,2), *trans-p*-menti-2-en-1-ol (% 7,9); *A.pachycephala* uçucu yağında 1,8-sineol (% 27,7), kafur (% 27,4); *A. oxyodonta* uçucu yağında 1,8-sineol (% 38,5), artemisia keton (% 23,0); *A.abrotanoides* uçucu yağında 1,8-sineol, kafur (% 32,7); *A. fragrantissima* uçucu yağında *α*-tuyon (% 25,5–36,5), artemisia keton (% 13,2–23,8), santolina alkil (%12,5–21,2) majör bileşikler tespit edilmiştir (Candan ve ark., 2003; Magiatis ve ark., 2002; Beziç ve ark., 2003; Rustaiyan ve ark., 1998; Bader ve ark., 2003; Tuberoso ve ark., 2005; Kundakovic ve ark., 2007; Maffei ve ark., 1989; Maffei ve ark., 1993; Javidnia ve ark., 2004; Saeidnia ve ark., 2005; Maffei ve ark., 1994; Simic ve ark., 2002; Simic ve ark., 2000; Kundakovic ve ark., 2006; Bicchi ve ark., 1988; Fleisher, 1993).

A.multifida bitkisinin topraküstü kısımlarından elde edilen uçucu yağında α-pinen (% 0,8), kamfen (% 0,6), sabinen (% 4,1), mirsen (% 0,1), *α*-terpinen (% 0,2), limonen (% 0,2), 1,8-sineol (% 1,3), (*Z*)-*β*-osimen (% 0,1), *ϒ*-terpinen (% 0,6), *p*-simen (% 1), *α*-tuyon (% 60,9), *β*-tuyon (% 9,1), trans-sabinen hidrat (% 0,9), furanoid (% 0,1), kafur (% 3,7), benzaldehit (% 0,1), linalol (% 0,1), cis- sabinen hidrat (% 0,4), trans-*p*-menti-2-en-1-ol (% 0,1), pinokarvon (% 0,1), bornil asetat (% 0,4), *β*-elemen (% 0,1), terpinen-4-ol (% 0,8), *β*-karyofillen (% 0,1), hotrienol (% 0,1), mirtenal (% 0,2), sabinketon (% 0,1), sabinil asetat (% 0,3), trans-pinokarveol (% 1), trans-verbenol (% 0,1), 4,11-ödesmadien (% 0,1), *α*-terpineol (% 0,4), trans-sabinol (% 0,8), germakren D (% 0,5), bisiklogermakren (% 0,1), *p*-menta-1,5 dien-7-ol (% 0,1), karyofillen oksid (% 0,3), (*E*)-nerolidol (% 1,8), *p*-menta-1,4 dien-7-ol (% 0,1), hekzahidrofarnesil aseton (% 0,1), spatulenol (% 0,1), öjenol (% 0,1), T-kadinol (% 0,2), karvakrol (% 0,1), *α*-kadinol (% 0,2) bileşikleri analiz edilmiştir (Başer ve ark., 2002).

Tablo 1. Türkiye'de yetişen bazı *Achillea* türlerinin uçucu yağlarının majör bileşikleri

Bitki Türleri	**Majör Bileşikler**							
	Kafur	Ökaliptol	Borneol	Piperiton	L-Kafur	trans-sabinen hidrat	cis-Piperitol	α-Tuyon
A. multifida	✓							✓
A. oligocephala		✓						
A. sieheana	✓							
A. falcata		✓						
A. schischkinii		✓						
A. lycaonica						✓		
A. aleppica subsp.*aleppica*		✓						
A.pseudoaleppica	✓							
A.teretifolia		✓						
A. sintenisii	✓							
A. ketenoglui			✓					
A.goniocephala	✓							
A.setacea		✓						
A. coarctata		✓						
A. biebersteinii		✓		✓				

1997-2016 yılları arasında *Achillea* L. türleri üzerinde yapılan ve literatür bilgisine ulaşılabilen uçucu yağ dışındaki kimyasal çalışmalar

- *Achillea ageratum* bitkisinin topraküstü kısmından seskiterpen lakton bileşikler olan ageratriol 9-*O*-asetilageratriol, 1-dehidro-ageratril, 1-*O*-asetilageratriol, oplopan; seskiterpen bir bileşik olan 7β-hidroksioplop-11-enon; fenoksikromon türevi olan 6-demetoksikapillarisin ve flavonoid bileşikler olan 5,4'dihidroksi3,7dimetoksiflavon, krisosplenetin, penduletin, hispidulin, sirsileol bileşikleri izole edilmiştir (Vieira ve ark., 1997; Kijjoa ve ark., 1998).
- *A.asiatica* bitkisinin çiçeklerinden seskiterpen lakton bileşikler olan 8α-angeloksi-2α,4α,10β-trihidroksi-6βH,7αH,11βH-1(5)-guaien-12,6α-olid, 8α-angeloksi-4α,10β-dihidroksi-2-okso6βH,7αH11βH1(5)-guaien-12,6α-olid bileşikleri izole edilmiştir (Glasl ve ark., 2001).
- *A.ceretanica* bitkisinin çiçeklerinden proazulen bileşikler olan 2α,8α-dihidroksi-1α,5α,6β,7α,11βH-guaia-3,10(14)-dien-12,6-olid ve bu bileşin 8α-asetat bileşiği izole edilmiştir (Glasl ve ark., 1999).
- *A.collina* çiçeklerinden ödesmanolid halka taşıyan 11α,13-dihidroksi-santamarin, 11-epi-artesin, 11α,13-dihidroreynosin, 1β-hidroksi-11-epi-kolartrin; germakranolid halka taşıyan artabin, 1β-11-epi-gallisin, 11α,13-dihidropartenolid; guayanolid halka taşıyan matrikarin, desasetilmatrikarin, 11,13-dehidro desasetilmatrikarin, ahillin ve 8α-hidroksiahillin seskiterpen lakton bileşikleri izole edilmiştir. Ayrıca bu bitkiden 8α-angeloksi-2β,10β-dihidroksi-4β-metoksimetil-2,4-epoksi-6βH,7αH,11β-1(5)-guaien-12,6α-olid ve 8α-angeloksi-2α,4α,10β-trihidroksi 6βH, 7αH,11βH-1(5)-guaien-12,6α-olid isminde iki yeni seskiterpen lakton bileşik izole edilmiştir (Todorova ve ark., 2007).
- *A.clavennae* bitkisinin topraküstü kısımlarından guayanolid halka yapısında artekanin; 9α-asetoksiartekanin; epoksiklorohidrin; 3α-kloro-4β,10α-dihidroksi-1β, 2β-epoksi-5α,7αH-guai-11(13)-en-12,6α-olid; anadalusin; andalusin, apressin ve 9α-asetoksi bileşikleri izole edilmiştir. Seskiterpen lakton bileşik olan 9α-asetoksiartekanin ve apressin bileşiklerinin insan

kanser hücrelerinin çoğunda (özellikle Fem-X) önemli sitotoksik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Apressin bileşiğinin K562 hücresinde (IC_{50}=4.44 μM) çok güçlü bir sitotoksik aktivite gösterdiği bulunmuştur. Bitkiden saflaştırılan bileşiklerin normal insan hücresinde (PBMC) düşük sitotoksik aktivite gösterdiği saptanmıştır (Trifunovic ve ark., 2006).

- *A.clavennae, A.holosericea, A.lingulata ve A.millefolium* bitkilerinin topraküstü kısımlarından hazırlanan ekstrelerin (hekzan:eter:methanol=1:1:1) *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Klebsiella pneumonia, Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella enteritidis, Aspergillus niger* ve *Candida albicans* suşlarına karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu bitkilerden *A.clavennae* bitkisinin aktivite gösteren ekstresinden flavonoid bir bileşik olan apigenin ve guayan seskiterpen bileşiklerden olan 1-deoksi-1α-peroksi-rupikolin A ve 1-deoksi-1α-peroksi-rupikolin B bileşikleri izole edilmiştir (Stojanovic ve ark., 2005).
- *A.clypeolata* bitkisinin topraküstü kısımlarından yeni bir bileşik olan slipeotriol (seskiterpen alkol); ödesm-4(15)-en-3α,7α,11-triol, 3α,4α-epoksirupikolin-A, 3α,4α-epoksirupikolin-B ve ödesman türevi (7α-hidroksikarisson, 3α-dehidroksi-3α-hidroperoksislipeotriol) bileşikler izole edilmiştir (Todorova ve ark., 1998; Todorova ve Tsankova, 1999).
- *A.crithmifolia* bitkisinin topraküstü kısmından 1,2-seko-guayanolid hemiasetal yapısında yeni bir bileşik olan kritmifolia izole edilmiştir (Todorova ve ark., 1998).
- *A.depressa* bitkisinin topraküstü kısmından flavonoid bileşik olarak salvigenin, penduletin, sirsimaritin ve seskiterpen lakton bileşik olarak tanapartin-α-peroksit, reynosin, ridentin, akrifolit, 3β-kloro-4α,10α-dihidroksi-1α,2α-epoksi-5α,7αH-guayin-11(13)-en-12,6α-olid ve 3β-klor-4α,8α,10α-trihidroksi-1α,2α-epoksi-5α,7αH-guayin-11(13)-en-12,6α-olid bileşikleri izole edilmiştir (Trifunovic ve ark., 2005).
- *A.distans* bitkisinin çiçeklerinden seskiterpen bileşikler olan 13-hidroksi-3β-tigloiloksigermakra-1(10)*E*, 8α-izovaleroildesasetilizomontanin, distansolid A, distansolid B, izo-α-peroksiahifolid, 8α-tigloilloksidehidrolökodin,

4*E*,7(11)-trien-12,6α-olid, 8α-tigloiloksikanin ve 8α-izovaleroiloksikanin bileşikleri izole edilmiştir (Todorova ve ark., 2007).

- *A.falcata* bitkisinin topraküstü kısımlarından monoterpen yapıdaki 3,7-dihidroksi-3,7 dimetil-1,5-oktadien ve 3,6 dihidroksi-3,7 dimetil-1,7-oktadien; seskiterpen lakton yapıdaki sintenin ve flavonoid bileşik olan 5-hidroksi-6,7,3',4'-tetrametoksiflavon,5hidroksi-6,7,8,3',4'-pentametoksiflavon bileşikleri izole edilmiştir. Ayrıca *Achillea falcata* bitkisinin topraküstü kısmından izole edilen 3-β-metoksi-izo-seko-tanapartolid, tanafillin, izo-seko-tanapartolid ve 8-hidroksi-3-metoksi-izo-seko-tanapartolid bileşiklerin HaCaT hücresinde sitotoksik aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir (Bruno ve ark., 2003; Ghantous ve ark., 2009).
- *A.latiloba* bitkisinden flavonoid bileşikler olan sentaureidin, kersetin-3,3'-dimetileter, ermanin bileşikleri izole edilmiştir (Vetschera ve Wollenweber, 1999).
- *A.ligustica* bitkisinin topraküstü kısmından seskiterpen lakton bileşikler olan 3α-kloro-4β,10β-dihidroksi-1β,2β-epoksi-5α,7αH-guai-11(13)-en-12,6α-olid ve matrikarin bileşikleri izole edilmiştir. Ayrıca bitkinin çiçekli topraküstü kısmından seskiterpen bileşikler olan algerianolid, ligustolid-A, ligustolid-B, 3-deshidroksi-izo-seko-tanapartolid, desasetil-matrikarin, artekalin ve 5-hidroksi-5,6-sekokaryofillen-6-on bileşikleri izole edilmiştir (Mahmoud ve ark., 2012; Boudjerda ve ark., 2008; Ahmed ve ark., 2003).
- *A.lingulata* bitkisinden lignan yapısında olan epiaşantin, aşantin, epiödesmin, sesartemin, yangambin ve flavonoid glikoziti olan apigenin 7-*0*-glukozit bileşiği izole edilmiştir (Stojanovic ve ark., 2005).
- *A.magnifica* bitkisinin topraküstü kısımlarından triterpen bileşikler olan magnifikol, *β*-sitosterol, *α*-amyrin, lupeol ; flavonoid bileşikler olan artemetin, salvigenin ve luteolin 3',4',5,7-tetrametil eter bileşikleri izole edilmiştir (Ulubelen ve ark., 1989).
- *A.millefolium* bitkisinden seskiterpen lakton bileşikler olan ahillinin B, ahillinin C, 8α-(angeloiloksi) artabsin 1,4 endoperoksit, 8α-(tigloiloksi)

artabsin 1,4-endoperoksit, α-longipin-2-en-1-on; flavonoid bileşikler olan apigenin, luteolin, sinarosit, luteolin-7-malonilglukozit, kosmosiin, 5-hidroksi-3,6,7,4'-tetrametoksiflavon, luteolin-7-*O*-glukozit, apigenin-7-*O*-glukozit ve rutin bileşikleri izole edilmiştir. Ayrıca bitkiden elde edilen kastisin bileşiğinin insan tümör hücrelerinde antiproliferatif etkili olduğu saptanmıştır (Li ve ark., 2012; Kocevar ve ark., 2008; Haidara ve ark., 2006).

- *A.nobilis* bitkisinin topraküstü kısmından flavonoid bileşikler olan C-glikosilflavon, orientin, luteolin-6-C-apiofuranosil-(1'''→2'')-glukosit, izoorientin, viteksin, izoşaftosit, luteolin-7-*O*-β-glukuronid, luteolin-4'-*O*-β-glukozit ve kersetin-3-*O* metileter ve nadir bulunan kersetin-3-*O*-α-arabinosil-(1'''→6'')-glukozit ve kersetin-3-*O*-metileter-7-*O*-β-glukozit bileşikleri izole edilmiştir (Krenn ve ark., 2003).
- *A.pratensis* bitkisinden seskiterpen lakton bileşikler olan tauremisin, arglanin, 4-hidroperoksi-arglanin, 4-epi-arglanin ve santamarin bileşikleri izole edilmiştir (Glasl ve ark., 1999).
- *A.ptarmica* bitkisinden sesamin (lignan); *A.holosericea* bitkisinden lignan bileşikler olan sesartemin, episesartemin, yangambin, epiyangambin, aşantin, epiaşantin, magnolin, epimagnolin; *A.gypsicola* bitkisinden lignan bileşikler olan yangambin, aşantin, magnolin, epimagnolin, sesamin; *A.cretica* bitkisinden lignan bileşikler olan sesartemin ve yangambin bileşikleri izole edilmiştir (Stojanovic ve ark., 2005; Öksüz ve ve ark., 1990).
- *A.santolina* bitkisinin topraküstü kısmından seskiterpen lakton bileşikler olan lökodin, desasetilmatrikarin, 5-hidroksilökodin, 3,9-diasetoksi,13-hidroksi-1(10),4,7(11)-germakratrien-12,6-olid ve flavonoid bileşik olan eupatilin-7-metileter bileşikleri izole edilmiştir (Balboul ve ark., 1997).
- *A.setacea* bitkisinin topraküstü kısmından flavonoid bileşikler olan apigenin-7-*O*-glukoz, luteolin-7-*O*-glukoz, visenin-2, şaftosit, izoşaftosit, rutin, izoorientin, viteksin ve apigenin bileşikleri izole edilmiştir (Marchart ve Kopp, 2003).

- *A.schisschkinii* bitkisinden seskiterpen bileşikler olan *8β*-hidroksiahillin ve schischkinin bileşikleri izole edilmiştir (Ulubelen ve ark., 1988).
- *A.sibirica* subsp.*mongolica* bitkisinin yapraklarından flavonoid bileşikler olan C-glikosilflavon, kersetin-3-*O* glikozit, salvigenin, kastisin, artemetin; *A. sibirica* var. *discoidea* bitkisinin topraküstü kısmından seskiterpen bileşikler olan kamazulen ve desasetilmatrikarin bileşikleri izole edilmiştir (Vetschera ve Wollenweber, 1999).
- *A.sintenisii* bitkisinin topraküstü kısımlarından seskiterpen lakton bileşik olan sintenin; triterpen bileşik olan *α*-amyrin; flavonoid bileşik olan salvigenin bileşikleri izole edilmiştir (Gören ve ark., 1988).
- *A.spirokensis* bitkisinden triterpen bileşik olan *β*-Sitosterol; flavon bileşik olan salvigenin, diosmetin, artemetin; fenolik asit bileşik olan *p*-kumarik asit; seskiterpen lakton bileşik olan deasetoksimatrikarin; lignan bileşik olan sesamin bileşikleri izole edilmiştir (Ulubelen ve ark., 1989).
- *A.teretifolia* bitkisinden triterpen bileşik olan oleanolik asit; flavonoid bileşik olan artemetin; seskiterpen lakton bileşik olan sintenin bileşikleri izole edilmiştir (Öksüz ve ark., 1990).
- *A.vermicularis* bitkisinden seskiterpen hemiasetal yapısıda olan ahilleanon, vermikulon ve vermikularon bileşikleri izole edilmiştir. Saflaştırılan bileşiklerin bronşiyal astım, enflamasyon hastalıklarına ve bazı kanserlerin gelişiminde rol oynayan lipoksigenaz enziminin inhibisyonu üzerine aktiviteleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, vermikulon ve vermikularon bileşiklerin standart olarak kullanılan baikalein ile kıyaslandığında güçlü aktiviteleri çıkmasına rağmen ahilleanon bileşiğinin ise düşük aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Ahmad ve ark., 2005).

Yapılan literatür taramalarında *Achillea* türlerinden elde edilen ekstreler (metanol, etanol, etanol:su vb.) üzerine çok sayıda *in vivo* veya *in vitro* olarak yapılan aktivite çalışmasına rastlanılmıştır. Yapılan bu çalışmalarda, *Achillea* türlerinin yara iyileştirici, antioksidan, östrojenik, antidiyabetik, antispermatojenik, antiülser, immunosupressif, antimikrobiyal, antispazmodik, antienflamatuar ve

hipotansif aktiviteler gösterdiği tespit edilmiştir (Küpeli ve ark., 2007; Candan ve ark., 2003; Yaeesh ve ark., 2006; Cavalcanti ve ark., 2006; Trumbeckaite ve ark., 2011; Souza ve ark., 2011; Innocenti ve ark., 2007).

2.4. Fenolik Bileşikler ve Sınıflandırılması

Fenolik bileşikler aromatik bir halkaya (benzen) bir veya daha fazla hidroksil gruplarının direkt olarak bağlanmasıyla oluşan moleküllerdir. Polifenoller ise bir veya daha fazla benzen halkasına birden fazla fenolik hidroksil gruplarının bağlanmasıyla oluşmaktadır. Fenolik bileşikler bitkiler için karakteristiktir ve genellikle serbest halde olmayıp ester veya glikozit formda bulunurlar. Fenolik bileşikler, alkollere göre daha asidik olmalarına rağmen organik asitlerle karşılaştırıldıklarında zayıf asidik özellik gösterirler (Şahin, 2011; Oral, 2011). Bitkilerin temel bileşenlerinden olan fenolik bileşikler veya polifenoller bitkilerde en fazla bulunan yapılardan biri olup, bitki aleminde 8000'den fazla fenolik yapının varlığı bilinmektedir (Tsao, 2010).

Fenolik bileşikler karbon iskeletlerine göre flavonoidler ve flavonoid olmayan bileşikler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması Tablo 2' de gösterilmiştir (Lallemand ve ark., 2012). Flavonoidler C_6-C_3-C_6 iskeletiyle karakterize edilir ve heterosiklik yapı farklılıklarına göre sınıflandırılırlar. Flavonoid olmayanlar ise çok daha fazla çeşitlilik göstermektedir. Basit fenoller, hidroksibenzoik asitler, hidroksisinnamik asitler ve kumarinler flavonoid olmayan bileşiklere örnek olarak verilebilirler (Lallemand ve ark., 2012).

Tablo 2. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması

	Karbon iskeleti	Bileşik sınıfı
Flavonoid Olmayan Bileşikler	C_6	Basit fenoller
	C_6-C_1	Hidroksibenzoik asitler
	C_6-C_2	Asetofenonlar, fenilasetatlar
	C_6-C_3	Hidroksisinnamik asitler, fenilpropenler, kumarinler
	C_6-C_4	Kromonlar
	C_6-C_1-C_6	Naftakinonlar
	C_6-C_2-C_6	Ksantonlar
	$(C_6$-$C_3)_2$	Stilbenler, antrakinonlar
	$(C_6)_n$	Lignanlar
	$(C_6$-$C_1)_n$:Glikoz	Kateşol melaninler
	$(C_6$-$C_3)_n$	Hidrolize tanenler
Flavonoid Bileşikler	C_6-C_3-C_6	Flavonoller
	C_6-C_3-C_6	Flavonlar
	C_6-C_3-C_6	Flavanonlar
	C_6-C_3-C_6	Flavanoller
	C_6-C_3-C_6	Antosiyanidinler
	C_6-C_3-C_6	İsoflavonlar
	$(C_6$-C_3-$C_6)_2$	Biflavonoidler
	$(C_6$-C_3-$C_6)_n$	Kondanse tanenler (kateşin polimerler, proantosiyanidinler)

2.4.1 Basit fenolikler

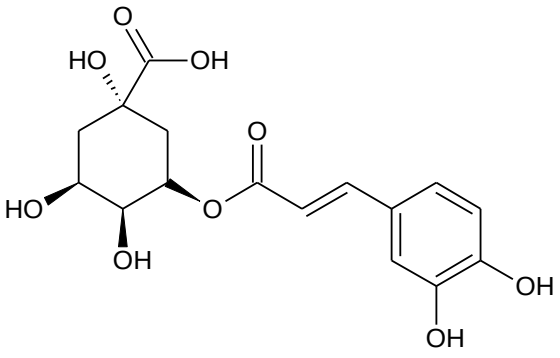
Benzen halkasında bir radikal grup bir hidroksil grubu taşıyan para, meta ve orto olarak isimlendirilen substitue fenollerdir. Basit fenolik maddelere resorsinol (1,3-dihidroksibenzen), ploroglusinol (1,3,5-trihidroksibenzen) örnek verilebilir (Şahin, 2011).

2.4.2 Fenolik asitler

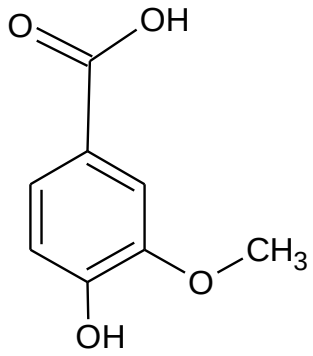
Fenol halkası üzerine karboksil grubunun bağlanmasıyla oluşan bileşiklerdir. Fenolik asitler çoğunlukla serbest halde bulunmayıp, bu asitlerin karboksil grupları aminoasitler, karbohidratlar, glikozitler veya proteinlerle reaksiyona girer. Ayrıca fenolik asitlerin fenolik hidroksil grupları da çok aktif olup, şekerlerle birleşerek glikozitleri oluşturmaktadırlar (Plazonic, 2009).

Fenolik asitler, sinnamik asitler (hidroksisinnamik asitler) ve benzoik asitler (hidroksibenzoik asitler) olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Hidroksisinnamik asitler hemen hemen her bitkide bulunan fenolik bileşiklerin büyük bir sınıfını oluştururlar (Plazonic ve ark., 2009). Kumarik asit, ferulik asit, kafeik asit, klorojenik asit, rosmarinik asit gibi asitler hidroksisinnamik asitler grubuna örnek olarak verilebilir (Perrone ve ark., 2008; Clifford ve ark., 2006).

Hidroksibenzoik asitler bitkisel gıdalarda çok az miktarlarda bulunurlar. Salisilik asit, hidroksibenzoik asit, gallik asit, prokateşik asit, vanilik asit gibi asitler hidroksibenzoik asitler grubuna örnek olarak verilebilirler (Robbins, 2003).



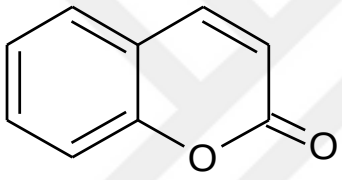
Şekil 2. Klorojenik asitin yapısı



Şekil 3. Vanilik asitin yapısı

2.4.3 Kumarinler

Kumarinler piron halkası ile benzen halkasının kondensasyonu sonucu oluşan heterosiklik yapıya sahip bileşiklerdir (Vardar, 2012).



Şekil 4. Kumarinin kimyasal yapısı

Kumarinin kapalı formülü $C_9H_6O_2$'dır. Molekül ağırlığı 146,15 g/mol'dür. Parlak, beyaz kristal yapılı bir maddedir ve erime noktası 68-700 ºC, kaynama noktası 297-299 ºC ve parlama noktası 150 ºC dir. Kumarinler kloroformda çözündüğünde UV'de 272 nm'de maksimum absorpsiyon göstermektedirler. Etanol, kloroform, dietil eter ve yağlarda kolay çözünürler, kaynar suda az ve 20 ºC' deki suda çok az çözünmektedirler (Vardar, 2012). Bu bileşikler bitkilerin hücrelerinde serbest ya da glikozitleri halinde bulunurlar (Erdoğan, 2009).

Kumarinler güzel kokusu nedeniyle 1882'den bu yana parfüm yapımında kullanılan kimyasallardır. Ayrıca alkollü içecekler ve tütünde de güzel aroması nedeniyle katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Ayrıca kumarinler ilaç endüstrinde birçok ilaçın yapımında başlangıç maddesi olarak kullanılmaktadır. Son zamanlardaki tıbbi araştırmalar kumarin türevlerinin anti-HIV ajanlar olarak kullanımı üzerine yoğunlaşmıştır (Kıytak, 2012; Erdoğan, 2009).

Kumarinler, anti-enflamatuar, antioksidan, antialerjik, antitrombotik, antiviral, antihepatotoksik ve antikanserojen aktivite gösterdiklerinden dolayı son yıllarda ilaç endüstrisinde oldukça önem kazanmışlardır. Hidrokumarinler tipik fenolik bileşiklerdir. Güçlü metal kelatlayıcı ve serbest radikal toplayıcılar gibi hareket ederler. Bunlar güçlü zincir kırıcı antioksidanlardır (Vardar, 2012).

Doğal kumarinler ve onların yapısal benzerleri antiinflamatuar, antibakteriyel ve analjezik eylemleri içeren biyolojik aktivitelere sahiptirler. Doğal şekilde oluşan iki kumarinin, memelilerin kanser hücresinin bir paneline karşı sitotoksisite gösterdiği bulunmuştur. Sülfonamit içeren kumarinler de antitümör aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca kumarinlerin immunomodülatör, immunosupressif ve antimalarial aktivite gösterdiği saptanmıştır (Rodriguez ve ark., 2012; Erdoğan, 2009).

Kumarinlerin Tanınmaları

Kumarinler UV ışıkta (366 nm) floresans özellik gösteren maddelerdir. Amonyak püskürtülüp UV ışık altında bakıldığında aldığı renk kumarinin yapısı hakkında bilgi verebilir. Genellikle kumarinler 220 ve 320 nm civarında iki kuvvetli, 250-260 nm arasında daha zayıf bir veya iki adsorbsiyon piki vermektedir (Işık, 2005). ^{1}H NMR spektrumunda C-5 de oksijen fonksiyonu bulunmuyorsa H-3 ve H-4 9,5 Hz'lik iki dublet olarak 6,10-6,40; 7,50-7,90 ppm aralığında gözlenirler. C-5 de oksijen bulunması halinde ise, H-3 ve H-4, 6,10-6,40; 7,90-8,20 ppm aralarında 9,5 Hz'lik iki dublet oluştururlar. C-8 de fonksiyonel grup varsa H-3 ve H-4, 6,60-6,90; 7,10-7,50 ppm aralarında 8,5 Hz'lik iki dublet halinde gözlenmektedir. Diğer aromatik protonlar, halkadaki sübstitüsyona bağlı olarak (hidroksil, metoksi, metilen vb.) kendi kimyasal kaymalarına uygun alanlarda rezonans yapmaktadırlar (Parelson ve ark., 1970).

MS spektrumunda, genellikle moleküler iyon pikinden sonra izlenen en belirgin pik lakton karboniline ait $[M-28]^{+}$ fragmentidir. Böylece bileşik benzofuran tipine dönüşmektedir. Kütle spektrumu, kumarinlerin molekül ağırlıklarının ve bölünme ürünlerinin saptanmasında kullanılmaktadır.

^{13}C NMR spektrumunda C-2, 160 ppm civarında; C-3, 115 ppm civarında; C-4, 140 ppm civarında; C-5, 128 ppm; C-6, 125 ppm; C-7, 131 ppm; C-8, 116 ppm

civarında çıkmaktadır. Bu değerler sübstitüsyonların cinsine ve konumuna bağlı olarak değişiklik gösterebilir (Kupriyanova, 1997).

2.4.4 Flavonoidler

Flavonoidler, insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri olan ve bitkilerde bulunan düşük molekül ağırlıklı doğal bileşiklerdir (Yalçın, 2013). Genellikle sarı renkli olmaları nedeniyle, latince sarı anlamına gelen flavus sözcüğünden türetilerek flavonoid adını almışlardır. Flavonoid bileşikleri, flavon (2-fenilkromon)'un bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan türevleridir. Bunlardan 3-OH içerenlere flavonoller, 2,3-çift bağı indirgenmiş olanlara flavanlar, fenil grubu 3-yerinde olanlara izoflavonlar denilmektedir. Flavonoid bileşikleri, fenil grubunun kromon halkasında bulunan hidroksil gruplarının sayısı ve konumu, ayrıca metil eterlerinin bulunması ile birbirlerinden ayrılmaktadırlar (Yılmaz, 2012).



A B

Şekil 5. Kromon [benzo-γ-piron, (A)] ve 2-fenil benzopiron (B)

Biyosentez araştırmalarından elde edilen bulgulara göre fenil alanin gibi amino asitlerin enzimatik deaminasyonlarından oluşan sinnamik asit türevleri malonil koenzim A ile kondanse olarak flavonoidleri oluştururlar. Karbon iskeleti C_6–C_3–C_6 şeklinde olan flavonoidlerin ana iskeletinde 15 karbon bulunur (Öztürk, 2008).

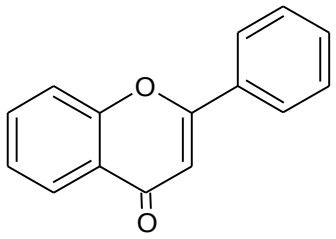
Flavonoidlerde yapı çeşitliliği

Flavonoidlerin yapısında en yaygın hidroksil substituenti bulunur. Flavonoid yapısında hidroksil gruplarının bulunması biyosentetik yolun sonucudur. Doğal flavonoidlerin en fazla yedi hidroksil grubu içerdiği bilinmektedir. A halkasının genellikle C-5 ve C-7 pozisyonlarında hidroksillenmeye yatkın olduğu gözlenmektedir. B halkasında ise genellikle C-4′ pozisyonu, çoğu kez C-3′ ve C-5′ pozisyonlarının hidroksillendiği gözlenmiştir. C-3′ ve C-5′ pozisyonundaki hidroksil grupları çoğu kez metillenmiş halde bulunmaktadırlar. Hidroksil grubu bulundurmayan aromatik halkalar ya da C-2′ pozisyonunda hidroksil grubu bulunduran flavonoidler doğada nadir olarak bulunmaktadırlar. Flavonoidlerin yapısındaki hidroksil grupları, reaktif özelliklerinden dolayı, kolaylıkla alkillenmekte ya da glikozillenmektedirler. Bu nedenle, flavonoidlerin metoksi ve glikozil türevlerine bitkilerde sık rastlanır. Doğada en çok mono, di veya trimetoksi flavonoidler gözlenmektedir (Işık, 2005; Rijke, 2006; Lakhanpal, 2007).

Bitkilerde flavonoid glikozitleri O veya C glikoziti şeklinde bulunurlar. *O* glikozitler doğada C glikozitlere göre daha yaygındır. Flavonoid *O* glikozitler, aglikonun bir veya daha fazla hidroksil grubuna şekerlerin bağlanmasıyla oluşurlar ve bu glikozit türleri genellikle C-3 ve C-7 pozisyonlarında bulunan hidroksil gruplarına bağlanırlar. C-glikozitler ise, aglikonun karbonuna bağlanan şekerleridir ve genellikle bu şeker molekülleri C-6 ve C-8 pozisyonlarına bağlanırlar (Rijke, 2006; Lakhanpal, 2007).

Flavonoidlerin tanınmaları

Flavonoidler, UV spektrumunda, biri uzun diğeri kısa dalga boyunda olmak üzere iki absorpsiyon bandı göstermektedir. Bant I uzun dalga boyundadır ve bu band B halkasıyla yani sinnamoil grubu ile ilgilidir. Bant II ise daha kısa dalga boyundaki banttır ve flavonoid yapısında bulunan A halkası yani benzoil grubu ile ilişkilidir. A ve B halkasına bağlanan substituentler absorpsiyon bantlarında batokromik ve hipsokromik kaymaya sebep olurlar ve bu faklılık flavonoidlerin yapılarının aydınlatılmasında kolaylık sağlamaktadır (Mabry ve ark., 1970; Işık, 2005).



Benzoil **Sinnamoil**

Şekil 6. Flavonoidlerde bant I ve bant II'yi veren gruplar

UV spektroskopisi, flavonoid bileşiklerin yapısı hakkında önemli bilgiler veren bir yöntemdir. Bileşiğin metanoldeki çözeltisine UV kayma belirteçleri (NaOMe, susuz $AlCl_3$, $AlCl_3$/HCl, susuz NaOAc ve NaOAc/H_3BO_3) ilave edilerek alınan spektrumlar flavonoidlerin yapı tayininde önemli bilgiler verir (Marbry ve ark., 1970; Işık, 2005).

Flavonoidlerin ^{1}H-NMR spektrumu, aromatik halka protonlarını ve sübstitüentlerin durumunu göstermektedir. Flavonoidlerde, aromatik halka protonları 5,00-8.00 ppm arasında izlenirken, metoksi grupları 3,8-3,9 ppm civarında singlet olarak görülmektedir. Eğer bir şeker grubu bağlı ise monoglikozitlerde şeker protonları 3,0-4,0 ppm arasında gözlenmekte, şekerin anomerik protonu H-1' daha aşağı alanda 4,8-6,0 ppm de dublet olarak görülmektedir.

Kütle spektrumu, flavonoid aglikon ve glikozitlerin yapıları hakkında önemli bilgiler sunmaktadır. Flavonoid aglikonların çoğu şiddetli moleküler iyon piki $[M]^+$ vermektedirler. Moleküler iyon pikine ek olarak, flavon aglikonları $[M-H]^+$ ve $[MCO]^+$ piklerini de göstermektedirler. Metoksi flavon olması halinde ise $[M-CH3]^+$ ve $[M-CO-CH3]^+$ pikleri gözlenmektedir (Markham, 1975; Işık, 2005).

Flavonoidlerin ve fenolik asitlerin farmakolojik etkileri

Flavonoidler çok güçlü antitümör ajanlardır, antioksidan ve antiproliferatif fonksiyonlarından ötürü apoptozisi indükleme, hücre farklılaşmasını ve hücre döngüsünü modüle edebilme özelliklerine sahiptirler. Flavonoidlerin lipit peroksidasyonunu önlemek suretiyle de aterosklerotik plakların büyümesini önlediği ispatlanmıştır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarla yüksek oranda flavonoid içeren

meyve ve sebze tüketimi ile daha düşük kanser riski arasındaki ilişki ortaya konmuştur.

Birçok epidemiyolojik çalışma, antioksidan olan flavonoidlerin kardiyovasküler hastalık ve kanser gelişim riskini düşürdüğünü savunmuştur. Flavonoidlerin sitotoksik aktivitesi, hidroksil sayısına ve hidroksil grubunun bulunduğu konuma bağlıdır. B halkasındaki orto hidroksilasyon ve 4-COO- grubunun olması, C2-C3 arasında çift bağ bulunması sitotoksisiteyi artırır (Beker, 2011; Yalçın, 2013).

Bazı flavonoid bileşikler UV ışınlardan koruma özelliklerine sahiptirler.Bu nedenlerden dolayı kozmetik ürünlerde (özellikle kremlerde) önemli katkı maddesi olarak kullanılmaktadırlar. Ayrıca flavonoidler metal iyonları ile reaksiyon verme kapasitesine sahip olduklarından analitik amaçla uranyum, zirkonyum, titan ve diğer metallerin tayininde kullanılabilmektedirler. Flavonoidler askorbik asitle beraber et ve et ürünlerinin proteolizini hızlandırdığı için et ve konserve endüstrisinde de kullanılmaktadırlar (Işık, 2005).

Flavonoidler aynı zamanda önemli antioksidan kaynaklarıdır. Flavonoidler antioksidan özelliklerini gosterebilmek için serbest radikallerle reaksiyona girerek onları etkisiz hale getirirler. Flavonoidlerin etki mekanizmalarını şu şekilde açıklayabiliriz:

a) Süperoksit radikali, hidroksil radikalini ve singlet oksijeni temizler.

b) Peroksil radikalini ve alkoksil radikalini yakalar, lipid peroksil zincirini kırar.

c) Siklooksigenaz ve lipooksigenaz enzimlerini inhibe eder.

d) Demir ve bakır gibi geçis metallerini kelatlar.

e) Protein kinaz enzimini inhibe eder.

f) Laktat transportunu engeller.

Flavonoidlere bu antioksidan özelliği B halkasındaki o-dihidroksi (kateşol) grubu, C halkasındaki 4-okzo grubu ile elektron delokalizasyonu için gerekli olan 2-3 çifte bağı ve son olarak da 3 ve 5 pozisyonlarında bulunan, radikal yakalama kapasitesi yüksek ve metalleri kelatlamaya yarayan hidroksil gruplarından ileri geldiği söylenmektedir. Hidroksil gruplarının düzenlenmesindeki değişiklik ve hidroksil

gruplarına glikozit yapılarının bağlanması flavonoidlerin antioksidan aktivitelerini düşürmektedir (Kahraman, 2002). Ayrıca flavonoid bileşikler antimikrobiyal, antispazmodik, diüretik, P-vitamin aktivitesine ve izoflavonoidler östrojenik aktiviteye sahiptirler (Kyle ve Duthie, 2006).

Fenolik asitler, kanser ve koroner kalp hastalıkları gibi ölümcül hastalıklara karşı koruyucu etki göstermektedirler. Ayrıca fenolik asitlerin anti-allerjik, antienflamatuvar, antimikrobiyal, antioksidan, antitrombotik ve vasodilatör olmak üzere pek çok etkisi olduğu kanıtlanmış ve bu yararlı etkilerinin temel sebebinin antioksidan özellik göstermeleri olduğu rapor edilmiştir (Tuncel ve Yılmaz, 2010).

2.5. Kanser

Kanser; büyüme özellikleri bozulmuş hücrelerin klonal şekilde yayılımıdır ve hastalıklar içerisinde en yaygın ve en ölümcül olanıdır (Yokuş ve Çakır, 2012). Yüzyıllar öncesinde olduğu gibi günümüzde de aramızdaki varlığını sürdürmekte ve insanlığı geçmişte olduğundan daha fazla tehdit etmektedir (Atıcı, 2007).

Türkiye'de yıllık kanser insidensi Sağlık Bakanlığınca yüz binde yaklaşık 150 olarak tahmin edilmiş ve her yıl yaklaşık 90.000-100.000 civarında yeni kanser olgusu görüleceği bildirilmiştir (Barutca, 2006). En sık görülen kanser türleri erkeklerde akciğer (% 22), kolorektal (% 12) ve prostat (% 11) iken kadınlarda ise meme (% 26), kolorektal (% 14) ve midedir (% 7). Kanser türlerinin dağılımı ülkelere göre farklılık göstermekle birlikte kolorektal kanserlerin (KRK) gelişmiş batılı ülkelerde önemli sağlık problemlerinden biri olduğu görülmektedir. Ülkemizde sağlıklı istatistikler bulunmamakla birlikte Sağlık Bakanlığı verilerine göre KRK tüm kanserler içinde 4.sırayı almaktadır. Meme kanseri tüm dünyada kadınlarda en çok görülen kanser türlerinin başında gelir. Yapılan bazı araştırmalarda meme kanserinin ABD'de kadın kanserlerinin % 29,7'sini (1998) ve Türkiye'deki kadın kanserlerinin de % 26'sını (1995) oluşturduğu tespit edilmiştir (Aktaş, 2010).

Çeşitliliklerine rağmen, kanserler temel ortak özellikler taşır. Bu özellikler; hücre bölünmesinin sürekli uyarılması, büyüme baskılayıcılardan kaçınma, genomik kararsızlık, hücre ölümüne karşı direnç, anjiyojenezin indüklenmesi ve invazyon ile metastaz yapma yeteneğidir (Yıldız, 2014; Barutca, 2006).

2.5.1 Kanser ve Apoptoz

Programlı hücre ölümü olarak da bilinen apoptoz, organizmanın normal gelişimi sırasında gerçekleşen ve enerji gerektiren fizyolojik bir süreçtir. Çok hücreli organizmalarda, hücrelerin bölünmesiyle artan hücre sayısı apoptoz ile dengelenir. Embriyonik gelişim sırasında olduğu gibi eğer bir hücreye artık gereksinim duyulmuyorsa, hücre ölüm yolakları aktive edilerek o hücrenin ölüme gidişi sağlanır (Kerr ve ark., 1972). Oldukça sıkı bir genetik kontrol altında gerçekleşen ve enerji gerektiren bir süreç olan apoptoz ile ilgili olarak birkaç mekanizma ortaya konulmuştur ve bunlardan birisi kaspaz aktivasyonu ile hücre ölümüdür.

- **Kaspaz aktivasyonu ile hücre ölümü**

Kaspazlar (Caspases), aktif merkezlerinde bir sistein aminoasidi taşıyan proteazlardır ve hedef proteinlerini karboksil uçlarında bulunan aspartik asit birimlerinden kestikleri için bu ismi almışlardır. Hücrede inaktif olarak bulunurlar ve prokaspaz olarak adlandırılırlar. Apoptotik sinyalin alınmasıyla birlikte proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler. Böylece bir kaskad şeklinde ilerler. Kaspazların N terminal uçlarında pro-domainleri bulunur. Bu prodomainler CARD (kaspaz toplayıcı domin) ve DED (ölüm reseptör domaini) dir. Apoptozda kaspazlarda ilk görev alanlar "başlatıcı" kaspazlar; sonraki aşamalarda görev alanlar ise "efektör" olarak adlandırılırlar. Kaspaz 2,8 ve 10 başlatıcı kaspaz olarak görev yaparken kaspaz 3,6,7 effektör kaspazlardır (Pınarbaşı, 2010). Memeli hücrelerinde iki büyük apoptotik yolak belirlenmiştir:

1. Mitokondrinin görev aldığı iç yolak
2. Ölüm reseptörleri ile gerçekleşen dış yolak

Mitokondrinin görev aldığı iç yolak: apoptotik iç yolak, apaf-1'in oligomerize olmak üzere indüklenmesi ile gerçekleşir. Apaf-1'in indüksiyonu ise sitokrom C'nin mitokondriden salıverilmesi ile gerçekleşir. Apaf-1'in oligomerizasyonu kaspaz-9 monomerlerinin biraraya getirilmesini sağlar. Böylece aktifleşen kaspaz-9, kaspaz-3'ü aktifleştirir ve hücre ölümü gerçekleşir (Ulukaya E. Apoptozis ders notları. Erişim: http://biyokimya.uludag.edu.tr/ apoptozisdersnotu, 04.05.2007).

Ölüm reseptörleri yolu ile hücre ölümü: makrofajlardan salınan tümör nekrozis faktör (TNF) ve sitotoksik T lenfositlerinde sentezlenen hücre yüzey proteini Fas ligandı, hedef hücre zarında bulunan ölüm reseptörleri aracılığıyla görev yapar. Bu ligandların hedef hücre yüzeyinde bulunan reseptörüne bağlanması ile aktifleşen TNF reseptörü TRADD (TNF receptor associated death domain) ve Fas reseptörü FADD (Fas associated death domain) olarak adlandırılan hücre içi proteinini kendisine çeker. FADD, kaspaz 8'i aktifleştiren bir aracı proteindir. Gerek ölüm reseptörleri adı da verilen TNF ve FAS reseptörleri gerekse FADD ve TRADD gibi bazı sitozolik proteinler ölüm sinyalini ileten yaklaşan 80 aminoasitlik ölüm bölgesi adı verilen bir kısmı taşırlar. Aktifleştirilen kaspaz-8, kendi proenzim şeklini parçalayarak daha da aktifleşir. Kaspaz-8 daha sonra proenzim halindeki etkili kaspazlara bağlanarak kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün aktifleşmesine neden olur. Aktifleşen kaspazlar da hücreyi ölüme götürür (Bell ve ark., 2008; Yu ve ark., 2004).

Apoptozun başta kanser olmak üzere çok sayıda hastalıkta önemli roller üstlendiği gösterilmiştir. Kanserin hücre proliferasyonunda artış ve apoptozda azalmaya bağlı olarak ortaya çıktığı bilinmektedir. Apoptozun inhibisyonu sonucu hasarlı hücreler prolifere olmakta ve dokuda hasara neden olmaktadır. Kanserde yaygın kullanılan bir tedavi şekli olan kemoterapi ile hücrelerde apoptozun uyarılarak etkin bir tedavinin gerçekleşmesi sağlanmaya çalışılmaktadır. Birçok antikanser ilaç, tümör hücre DNA sentezine ve hücre bölünmesine etki ederek apoptoz indüksiyonuna neden olmaktadır. İlaç tedavisinden sonra hücrenin apoptoza duyarlılığının değişmesinin, edinilmiş ilaç direncinde önemli bir mekanizma olduğu düşünülmektedir. Bu bilgiler ışığında, kanserde ilaç tedavisinin en önemli hedeflerinden birisinin, neoplastik hücrelerde apoptozu hızlandırmak olduğu düşünülmektedir (Kaufmann ve Gores, 2000).

2.6. Sitotoksik Aktivite Yöntemleri

Kimyasalların sitotoksisitesi hücre ölümünün, canlılığının, hücre yapısının, morfolojisinin, enerji metabolizmasının ve hücre çoğalmasının ölçülmesi gibi çeşitli parametrelerle belirlenebilir. Sitotoksisitenin *in vitro* testler ile ölçülmesinin birçok faydası söz konusudur. Bunlardan biri, toksisite testleri için kullanılan hayvan sayısını en aza indirmesidir. *In vitro* testlerin diğer bir üstünlüğü hücre ya da organın

toksik etkiye karşı mekanizmasının belirlenmesidir. *In vitro* sitotoksisite testleri hücre canlılığı, hücre çoğalması, membran bütünlüğü, DNA sentezi ya da hücresel metabolizma gibi çeşitli parametrelerin ölçülmesiyle temel hücre toksisitesini de belirler. Bu parametreleri ölçen çeşitli sitotoksisite deneyleri vardır. En çok kullanılan yöntemler "Neutral Red Uptake" ve "Tripan Blue Exclusion" yöntemi (hücre canlılığı için, boya canlı hücrelerin içine girer ve canlı hücrelerin lizozomlarında toplanırlar), "Lowry Coomassie Blue", "Sulforodamin B (SRB)" yöntemi ve "Kenacid Blue" yöntemi (toplam hücre proteini ve hücre çoğalmasını belirlemek için), MTT (mitokondriyal aktivite ve hücresel metabolizmayı belirlemek için) ve intraselüler laktat dehidrogenaz aktivite yöntemleridir (hücre lizizini belirlemek için). Laktat dehihrogenaz (LDH) yöntemi, hücre dışı ortamdaki laktat dehidrogenaz aktivitesinin ölçümüne dayanır ve membran bütünlüğünü tayin etmeye yarayan bir yöntemdir (Saetung ve ark., 2005; Demirgan, 2009).

2.6.1 Mitokondriyal aktiviteye dayalı MTT testi

Kültürdeki yaşayan hücre sayısını belirlemek için direkt ve indirekt olmak üzere iki yöntem vardır. Direkt yöntemde tüm hücreler sayılırken indirekt yöntem ise yaşayan hücrelerin kültür parametrelerindeki değişikliğine dayanır.

MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] deneyi, sık sık hücre poliferasyonunu ölçen indirekt indikatör olarak kullanılmasına rağmen aslında MTT mitakondriyal aktivasyonu ölçen bir indikatördür. MTT testi hücre kültürü esasına dayanan indirekt olarak hücre büyümesi ve/veya hücre ölümünü değerlendirmeyi amaçlayan bir ilaç duyarlılığı testidir. Bu yöntem, mitokondriyal enzim sistemleri tarafından kataliz edilen tetrazolium tuzlarının indirgenmesine dayanmaktadır ve hücre büyümesi ile ksenobiyotik sitotoksisiteyi yansıtır. Tetrazolium tuzları (MTT, XTT, WST-1), genelde substrat olarak renksiz, canlı hücrelerin mitokondriyal aktivitesi sonucu renkli ürünler veren maddelerdir. MTT bu amaçla kullanılan bir tetrazolium tuzudur ve substrat olarak sarı renkte olmasına rağmen canlı hücrelerin mitokondrilerinde süksinat-dehidrogenaz enzimine spesifik olarak bağlandığında suda çözünmeyen mavi-mor formazan tuzları oluşturur. Formazan tuzları, DMSO, izopropanol gibi organik solventlerde kolayca çözünürler. Solventte çözünen materyalin optik dansitesi, çözünmüş olan formazan kristallerinin

konsantrasyonunun verdiği absorbansa göre spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Ölçülen değer direkt olarak kültürdeki hücrelerin metabolik aktivitelerini verir ve bu değer de yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilir (Barutca, 2006; Demirgan, 2009; Sgouras ve ark., 1990).

2.7. Oksidasyon ve Serbest Radikaller

Elektronların bir atomdan başka bir atoma transferine oksidasyon denir ve oksijenli solunum da bizim metabolizmamızın önemli bir parçasıdır. Oksijen, elektron taşıma sisteminin esas elektron taşıyıcısıdır ve enerjinin ATP şeklinde üretilmesini sağlar. Fakat elektronlar çiftleşmediği zaman sorunlar ortaya çıkar ve serbest radikallerin oluşmasına sebep olabilirler (Beker, 2011). Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküllerdir (Bagchi ve Puri, 1998).

Serbest radikallerin birçoğu oksijen kaynaklıdır ve dolayısıyla radikal oksijen türleri olarak adlandırılırlar. Ancak radikal yapıda olmadığı halde reaktif olan oksijen türleri de vardır. Dolayısıyla radikal tanımı yetersiz kaldığı için tüm bu reaktif moleküllere "reaktif oksijen türleri" denilmektedir (Sen, 2010; Aydın, 2012). En sık karşılaşılan serbest radikaller Tablo 3'de verilmiştir (Yılmaz, 2012; Devasagayam, 2004).

Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri veya diğer serbest radikaller ile antioksidan sistem arasında oluşan dengesizliktir ve bu dengesizlik hücrenin önemli kısımlarında geri dönüşümsüz hasarlara neden olabilir. Oksijen türevi serbest radikaller proteinlere, yağlara, karbonhidratlara ve nükleik asitlere zarar verebilir (Yavaşer, 2011; Küçükçoban, 2009).

Tablo 3. En sık karşılaşılan serbest radikaller

Radikal Adı	**Simge**	**Etki**
Hidrojen radikali	$H^{\bullet}$	Bilinen en basit radikal
Süperoksit radikali	$O_2^{\bullet -}$	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü
Hidroksil radikali	$OH^{\bullet}$	En toksik (reaktif) oksijen metaboliti radikali
Hidrojen peroksit	H_2O_2	Reaktivitesi çok düşük, moleküler hasar yeteneği zayıf
Singlet oksijen	O_2	Yarılanma ömrü kısa, güçlü oksidatif form
Perhidroksi radikali	$HO_2^{\bullet}$	Lipidlerde hızlı çözünerek lipid peroksidasyonunu artırır
Peroksil radikali	$ROO^{\bullet -}$	Perhidroksile oranla daha zayıf etkili, lipidlere lokalize olur
Tiyil radikali	$RS^{\bullet}$	Sülfürlü ve çiftlenmemiş elektron içeren türlerin genel adı
Azot dioksit	NO_2	NO'nun oksijen ile reaksiyonundan üretilir

2.8. Antioksidanlar ve Antioksidanların Sınıflandırılması

Canlı organizmanın serbest radikallerin etkisinden korunması için antioksidatif korunma sistemine sahip olduğu bilinmektedir. Bazı durumlarda antioksidatif koruyucu sistemin iyi çalışmamasından dolayı, serbest radikallerin vücutta fazlalaştığı görülür. Antioksidanlar serbest radikalleri nötralize ederek oksidasyonunu engelleyen, yavaşlatan, durduran bileşiklerdir (Devasagayam, 2004). Antioksidan savunma çeşitli mekanizmalarla etkisini göstermektedir (Aydın, 2012). Bu mekanizmalar:

1. Radikal metabolit üretiminin önlenmesi

2. Üretilmiş radikallerin temizlenmesi (radikallerin detoksifikasyonu)

3. Hücre deformasyonunun onarılması

4. Sekonder radikal üreten zincir reaksiyonlarının durdurulması

5. Endojen antioksidan kapasitesinin artırılması

Antioksidanları öncelikle doğal antioksidanlar ve yapay antioksidanlar şeklinde sınıflandırmak daha doğru olacaktır. Doğal antioksidanlar ise enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Antioksidanlar, kimyasal bileşimine göre fenolik yapıda olan, aromatik amino ve organik sülfür bileşiminde olmak üzere üç gruba; etki mekanizmasına göre ise primer ve sekonder antioksidanlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Brewer, 2011; Yılmaz, 2012; Aydın, 2012).

Tablo 4. Doğal ve yapay antioksidanlar

Antioksidanlar	
Doğal Antioksidanlar	**Yapay Antioksidanlar**
1. Enzimatik (SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz, S transferaz, stokrom oksidaz)	Butillenmiş hidroksi anizol (BHA) Butillenmiş hidroksi toluen (BHT) Troloks
2. Enzimatik olmayan a) Endojen (bilirubin, ferritin, ürik asit, glutatyon, seruloplazmin) b) Eksojen (vitamin C, vitamin A, vitamin E, flavonoller, polifenoller	

2.8.1 Antioksidanların yapılarına göre sınıflandırılması

Fenolik antioksidanlar: Antioksidanların en önemlileri fenol grubu içerenler ve bunların dihidroksi türevleridir. Bu bileşikler hidrokinon olup tersinir olarak kinona yükseltgenirler. Sadece orto ve para polifenoller antioksidan özelliğe sahiptir. Fenolün kendisi antioksidan değilken yerdeğişimli benzenler, birden fazla benzen halkasını içeren aromatik bileşikler veya heterosiklik bileşikler, yapıları orto ve para hidroksi bileşiklerine benziyorsa antioksidan olabilirler. Bitkilerde bulunan doğal antioksidanlara örnek olarak flavonoid bileşikleri verilebilir.

Sentetik antioksidanlardan fenolik yapıda olanlar propil gallat, oktil gallat, dodesil gallat, nordihidroguayaretik asid (NDGA), butillenmiş hidroksi anisol (BHA), butillenmiş hidroksi toluen (BHT) ve tersiyer butil hidrokinon'dur (TBHQ) (Aydın, 2012; Özyurt, 2005).

Aromatik antioksidanlar: Aromatik amino antioksidanlar da genellikle fenollü antioksidanlara benzerler, yalnız hidroksi grupları kısmen veya tamamen amino grupları ile yer değiştirmişlerdir (Aydın, 2012).

Organik sülfür bileşikleri: Kuvvetli antioksidanlardan olan kükürtlü organik bileşikler fenolik yapıda olmayan antioksidanlardandır. β, β'-ditiyopropiyonik asit ve esterleri, özellikle dilauril ve distearil ditiyopropiyonatlar bu grupta yer almaktadırlar (Aydın, 2012; Özyurt, 2005).

2.8.2 Antioksidanların etki mekanizmalarına göre sınıflandırılması

Birincil antioksidanlar: Birincil antioksidanlar (tip–1 veya zincir kırıcı antioksidanlar) otooksidasyonun başlangıç aşamasını erteleyen veya engelleyen ya da otooksidasyonun ileri aşamasını yarıda kesen serbest radikal alıcılarıdır. Birincil antioksidanlar, çeşitli halka sübstitüsyonlarına sahip mono veya polihidroksi fenollerdir. Fenoldeki hidroksil grubuna göre orto ve para konumuna elektron veren grupların sübstitüsyonundan oluşan indüktif etki bileşiğin antioksidan aktivitesini arttırır. Sentetik birincil antioksidanlara örnek olarak bütillenmiş hidroksianisol, bütillenmiş hidroksitoluen, propil gallat ve *t*-bütil hidrokinon verilebilir. Tokoferoller ve karotenoitler doğal kaynaklı birincil antioksidanlardır (Öztürk, 2008; Çulhaoğlu, 2011).

İkincil antioksidanlar: Bu antioksidanlar oksidasyon hızını yavaşlatırlar fakat serbest radikalleri daha kararlı ürünlere dönüştürmezler. Etki mekanizmaları metal iyonlarını yakalamak, oksijen molekülünü tutmak, hidroperoksitleri radikal olmayan bileşiklere parçalamak, ultraviyole ışınlarını absorplamak veya oksijen atomunu etkisiz hale getirmek şeklinde olabilir. Bu antioksidanlar 'antioksidan sinerjistler'dir. Tek başlarına bulundukları ortamlarda antioksidan etkileri çok düşüktür veya hiç göstermezler. Ancak ortamda iki antioksidan madde bulunursa yalnız olarak gösterdikleri etkiden daha çok etkili olurlar. Sitrik asit, askorbik asit, askorbil

palmitat, lesitin, tartarik asit, EDTA ve β-karoten ikincil antioksidanlara örnek olarak verilebilir (Öztürk, 2008; Aydın, 2012; Çulhaoğlu, 2011).

2.9. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

Antioksidan aktivite tayin yöntemleri, kullanılan kimyasal reaksiyon açısından temel olarak iki sınıfta toplanabilir:

a) Hidrojen atomu transferi reaksiyonuna dayananlar (HAT)

b) Tek elektron transferi reaksiyonlarına dayananlar (ET)

HAT ve ET esaslı yöntemler bir örneğin koruyucu antioksidan kapasitesi yerine radikal (veya oksidan) süpürücü kapasitesini ölçmeye yöneliktir (Çulhaoğlu, 2011; Aydın, 2012).

2.9.1 Hidrojen transferine dayanan reaksiyonlar (HAT)

HAT temelli yöntemlerin birçoğu azo-bileşiklerin bozulması ile oluşan peroksil radikalleri için antioksidan ve substratın rekabetine dayanan yarışmalı kinetik reaksiyonları kullanmaktadır (Bener, 2013). HAT analiz yöntemleri şunlardır:

A) Oksijen radikal absorbans kapasitesi yöntemi (ORAC)

B) Total radikal yakalama antioksidan kapasitesi yöntemi (TRAP)

C) Krosin Beyazlatma Yöntemi (Crocin Bleaching Assay)

A) Oksijen radikal absorbans kapasitesi yöntemi (ORAC)

Peroksil radikalini oluşturmak için AAPH [2,2'azobis (2-metil propionamidin) dihidroklorür], hidroksil radikalini olusturmak için Cu(II)-H_2O_2 ve yükseltgenebilen protein substratı olarak fikoeritrin kullanılmaktadır. Oluşturulan radikaller ile fikoeritrin arasındaki yükseltgenme reaksiyonu sonucunda, fikoeritrinin floresansındaki zamana bağlı düşüş ölçülerek toplam antioksidan kapasitesi hesaplanmaktadır. Serbest radikal etkisini inceleyen ve miktar tayininde eğri altında kalan alan (area under curve-AUC) tekniğini kullanan bu yöntem, antioksidanların serbest radikalleri hem inhibe etme yüzdesini ve hem de inhibe etme süresini tek bir değer olarak ifade edebilen bir yöntemdir (Özyürek, 2005; Bener, 2013).

B) Total radikal yakalama antioksidan kapasitesi yöntemi (TRAP)

TRAP yönteminde 2,2'-azobis-(2-amidinopropan) diklorür ve plazma veya diğer biyolojik sıvılara ilave edilen peroksitlenebilir maddelerden oluşan peroksil radikalleri kullanılır. Plazmaya AAPH ilave edildikten sonra, reaksiyon süresince tüketilen oksijenin ölçülmesiyle oksitlenebilir maddelerin oksidasyonu tayin edilir. İndüksiyon periyodunun uzunluğu (lag phase) bir iç standart olan troloks (6-hidroksi-2,5,7,8- tetrametilkroman-2-karboksilik asit) ile karşılaştırılır ve kantitatif olarak plazmanın antioksidan kapasitesi troloks eşdeğeri cinsinden hesaplanır (Özyürek, 2005).

C) Krosin beyazlatma yöntemi (Crocin Bleaching Assay)

Bu yöntem; AAPH tarafından oluşturulan peroksil radikallerinin krosini yükseltgemesi (rengini gidermesi) esasına dayanmaktadır. Krosinin peroksil radikalleri ile yükseltgenme reaksiyonunda antioksidanların olmadığı durumdaki hızı (V_0) ve antioksidanların olduğu durumdaki hızı (V) 10 dakika içinde ölçülmektedir. Bu ölçülen hızların oranı (V_0/V) x eksenini, antioksidan konsantrasyonunun [A] krosin konsantrasyonuna [C] oranı y eksenini oluşturacak şekilde bir grafik oluşturulmaktadır. Oluşan bu lineer grafiğin eğimi ka / kc oranını yani peroksil radikalleri ile etkileşen bileşiğin göreceli kapasitesini belirtir. Ka; antioksidanlar ile peroksil radikalleri arasındaki reaksiyon hız sabiti, kc; krosin ile peroksil radikalleri arasındaki reaksiyon hız sabitidir. Bulunan ka / kc oranı, daha önceden troloks ile hesaplanan ka / kc oranına bölünerek sonuçlar troloks cinsinden hesaplanmaktadır. Bu yöntemde iki antioksidanın peroksil radikalleriyle etkileşimleri kıyaslanabilmektedir (Bener, 2013).

2.9.2 Elektron transferine dayanan reaksiyonlar (ET)

ET temelli yöntemler antioksidanın oksidanı indirgeme yeteneğini renk değişimi ile ölçer. Renk değişiminin derecesi örneklerin antioksidan konsantrasyonu ile ilişkilidir. Renk değişiminin derecesi, antioksidan derişimiyle orantılıdır (Aydın, 2012; Huang ve ark., 2005).

Oksidan + e^-(antioksidan) → indirgenmiş oksidan + yükseltgenmiş antioksidan

ET esaslı analiz yöntemleri şunlardır:

A) Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile toplam fenolik madde analizi

B) Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) yöntemi

C) Ferrik iyonu indirgeme antioksidan gücü (FRAP) yöntemi

D) DPPH kullanarak "toplam antioksidan potansiyel" ölçüm yöntemi

E) CUPRAC (Bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite) yöntemi

A) Folin Ciocalteu yöntemi

Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) molibdofosfotungstik heteropoliasittir. ($3H_2O.P_2O_5.13WO_3.5MoO_3.10\ H_2O$). Varsayılan aktif merkezi Mo(VI)'dır.

Mo(VI) (sarı) + e-(antioksidandan) → Mo(V) (mavi)

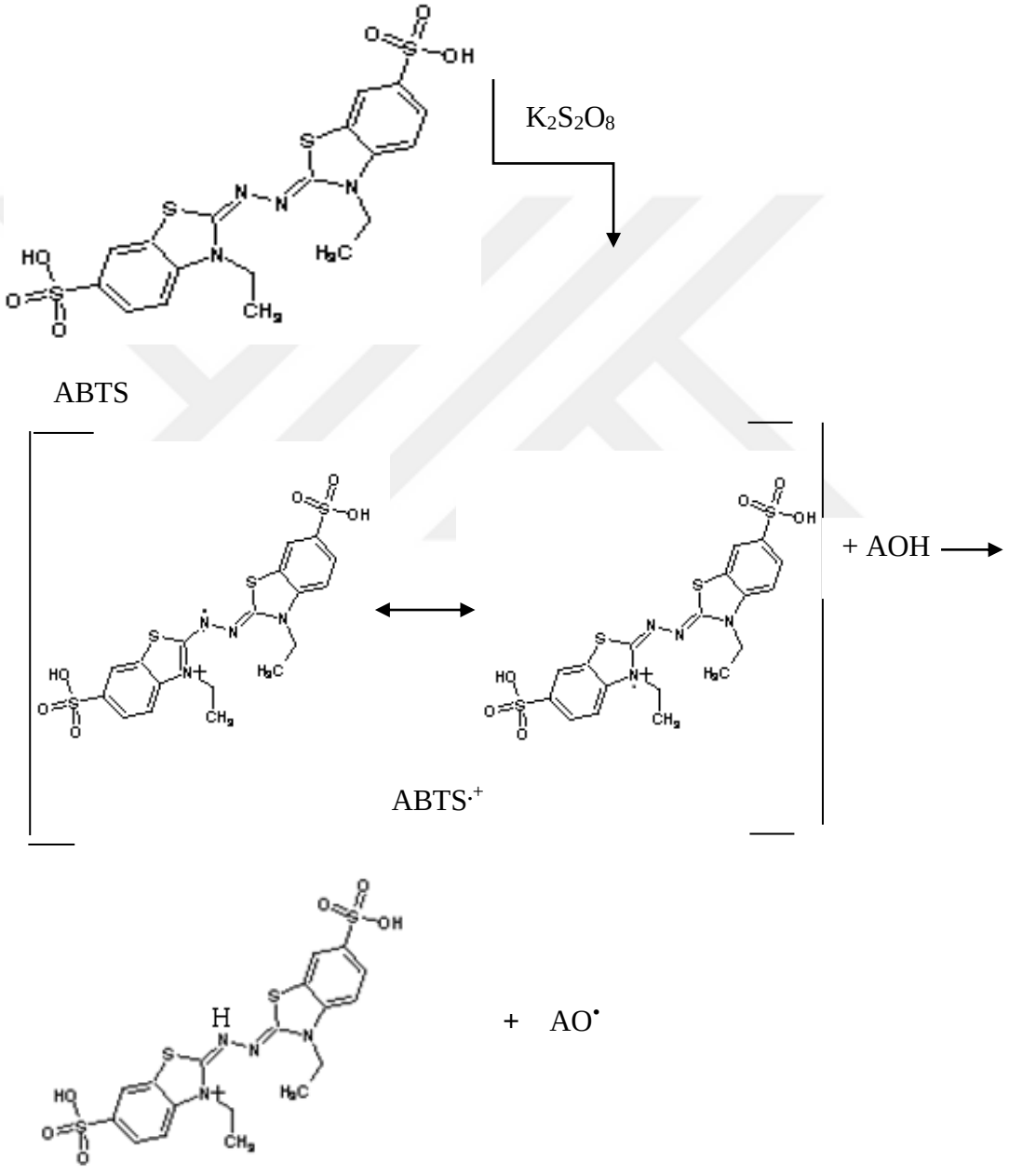
Fenolik bileşikler FCR ile yalnız bazik koşullar altında reaksiyona girerler (sodyum karbonat çözeltisiyle pH 10'a ayarlanır). Fenolik antioksidanların varlığında Mo (VI)'in indirgenmesiyle renk sarıdan maviye döner. Oda şartlarında 2 saat kadar bekletildikten sonra mavi renkli kompleks oluşumu 760 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür. Standart olarak genellikle gallik asit kullanılır ve sonuçlar gallik asit eşdeğeri olarak ifade edilir. Gallik asit standardı yerine kateşin eşdeğeri, klorojenik asit eşdeğeri, kafeik asit eşdeğeri, vanilik asit eşdeğeri de kullanılır. Metotların standardizasyon eksikliği tayin edilen fenollerde farklı değerler elde edilmesine neden olmaktadır.

Yöntemin zaman alması, rutin analizler için uygulanmasını zorlaştırmaktadır. Aynı zamanda sulu fazda gerçekleştirildiği için, lipofilik bileşikler için uygulanamamaktadır (Özyürek, 2005; Büyüktuncel, 2013; Öztürk, 2008).

B) TEAC (Troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi) / ABTS yöntemi

Bu yöntem; 2,2'- azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) (ABTS) kromojen radikal katyonunun absorbansının, antioksidanlar tarafından inhibisyonunu temel alır. Antioksidanlar varlığında $ABTS^{\cdot+}$ radikal katyonunun absorbansında belirli bir süre içindeki azalmadan yararlanarak toplam antioksidan kapasitesi troloks cinsinden bulunur. Bu nedenle bu yönteme "troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi" (ABTS/TEAC) adı da verilir. ABTS'nin potasyum persülfat ile oksidasyonu sonucu $ABTS^{\cdot+}$ radikal katyonu oluşmaktadır (Şekil 7). Yani sisteme antioksidan ilave

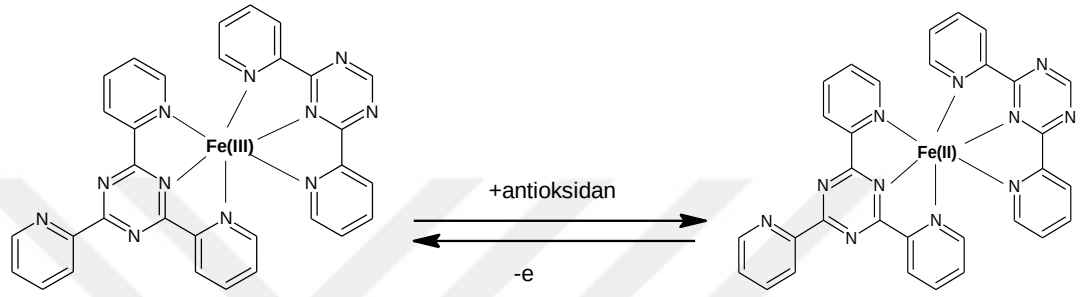
edilmeden önce radikal katyonu oluşturulmaktadır. Oluşan radikal katyonu oda sıcaklığında ve karanlık ortamda iki gün dayanıklıdır. Geliştirilen bu yöntem, hem lipofilik hem de hidrofilik sistemlerde kullanılabilmektedir (Bener, 2013; Oliveira ve ark., 2014). ABTS radikali fizyolojik bir radikal olmadığından *in vivo* deneylerde doğru bir etki göstermez (Wang ve ark., 2004).



Şekil 7. $ABTS^{\cdot+}$ katyon radikalinin antioksidan maddelerle verdiği reaksiyon (Oliveira ve ark., 2014).

C) FRAP (Demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü) yöntemi

Bu yöntemde Fe (III) tuzu ve Fe (III) $(TPTZ)_2Cl_3$ (TPTZ=2,4,6-tripiridil s-triazin), oksidan olarak kullanılır. Düşük pH da, Fe (III)-TPTZ kompleksi, Fe (II) formuna indirgenir (Şekil 8). Bu kompleks koyu mavi renklidir ve absorpsiyon maksimumu 593 nm'dir (Benzie ve Strain, 1996; Özyürek, 2005).



$[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$(λmax=593nm)

Şekil 8. Fe (III) kompleksinin Fe (II) formuna indirgenmesi

FRAP yöntemi demirin çözünürlüğünü sağlamak için asidik koşullarda (pH 3,6) gerçekleştirilir. FRAP yöntemi hidrofilik ve lipofilik antioksidanların tayininde kullanılan basit, ucuz ve dayanıklı bir yöntemdir. Bu yöntem orijinal olarak plazmanın antioksidan kapasitesini ölçmek için geliştirilse de bitki ekstrelerinin aktivitelerini ölçmek için de kullanılır (Szollosi ve Varga, 2002).

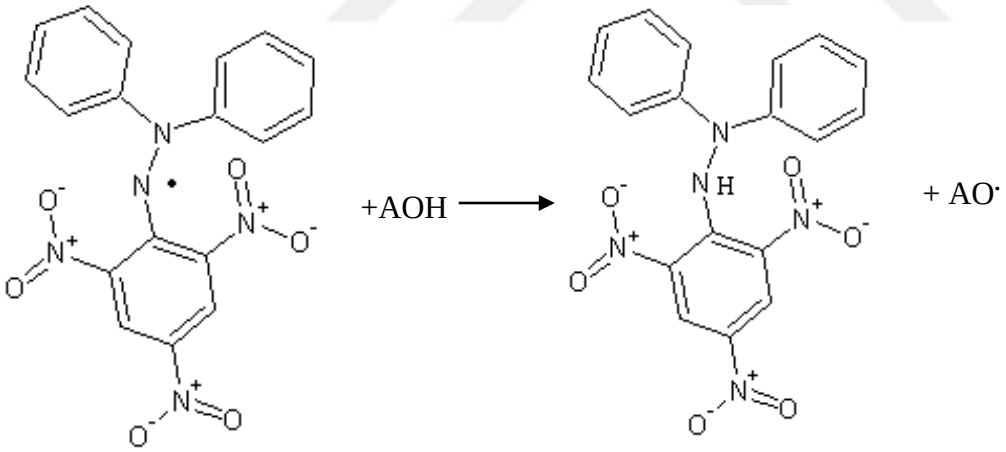
Yöntemin dezavantajlarından biri glutatyon gibi tiyol antioksidanların ölçülememesidir. Diğer bir dezavantajı ise reaksiyonunun spesifik olmamasıdır. Redoks potansiyeli 0,70 V'dan daha düşük potansiyele sahip *in vivo* olarak antioksidan özellik göstermeyen herhangi bir bileşik bile demiri indirgeyebilir (Büyüktuncel, 2013).

D) DPPH radikali giderme aktivitesi tayini

Bu metot 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikalinin antioksidanlar tarafından süpürülmesi esasına dayanmaktadır. Bu radikal hidrojen donörlerle etkileştiğinde hidrazine indirgenir. Mor renkli DPPH radikali 517 nm'de maksimum absorbsiyon verir. Etanol veya metanollü DPPH çözeltisine antioksidanın ilave

edilmesiyle absorbansta düşüş meydana gelir ve antioksidanların varlığıyla radikalin rengi mordan sarıya döner. Bu yöntem antioksidanların radikal süpürme kabiliyetlerini değerlendiren kolay ve geçerli bir yöntem olarak bilinmektedir. DPPH yöntemi flavonoidlerin, kumarinlerin, antosiyaninlerin ve diğer fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılır (Azeez ve Adaramoye, 2014; Giridhari ve Manasi, 2011; Özyürek, 2005).

Yöntemin hızlı ve basit olması gibi avantajlarına karşın bazı bileşenlerin (özellikle karotenoidler) 515 nm'de DPPH ile kesişen spektrum vermesi analizin yorumunu zorlaştırır. Ayrıca çoğu antioksidan sterik engellemeden dolayı DPPH ile yavaş reaksiyona girer. Bundan dolayı yöntem, DPPH ile reaksiyona giren antioksidanların antioksidan kapasitesi hakkında doğru bir değerlendirme ortaya koyamaz. Bunların yanında DPPH'ın rengi, ışık, hava oksijeni, nem ve pH'a fazlaca duyarlı olduğundan tekrarlanabilir sonuçlar elde edilebilmesi oldukça güçtür (Büyüktuncel, 2013; Özyürek, 2005). Aynı zamanda bu yöntem plazma antioksidan kapasitesinin ölçülmesinde uygun değildir. Çünkü plazma proteinleri metanol veya etanol varlığında çökelti oluştururlar (Kedare ve Singh, 2011).



DPPH 517 nm (mor) (DPPH) H sarı

Şekil 9. Antioksidanların DPPH ile radikal süpürme reaksiyonları (Son ve Lewis, 2002).

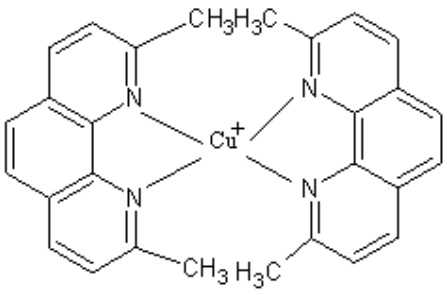
DPPH'in % 50'sinin inhibisyonunu sağlayan ekstre ve standart madde konsantrasyonu EC_{50} olarak tanımlanır. Bu değer çalışılan konsantrasyonlara karşı %

serbest radikal giderme aktivite değerlerinin y eksenine yerleştirilmesi ile elde edilen kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplanır.

E) CUPRAC (Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasite) yöntemi

Bu yöntemde, 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin-Nc)'in Cu (II) ile oluşturduğu bakır (II)-neokuproin (Cu (II)-Nc) kompleksinin antioksidan bileşikler varlığında 450 nm'de maksimum absorbans veren bakır (I)-neokuproin (Cu(I)-Nc) kelatına (Şekil 10) indirgenme yeteneğinden yararlanılarak örneklerin antioksidan kapasiteleri ölçülebilmektedir. Bu özellikten yola çıkarak geliştirilen antioksidan kapasite tayin yöntemi 'bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi' kısaca CUPRAC yöntemi olarak adlandırılmıştır (Apak ve ark., 2004).

Bu reaktif seçicidir, çünkü fenantrolin veya tripiridiltriazin türü ligandlarla bağlı demire göre daha düşük redoks potansiyeline sahiptir. FRAP yönteminde girişime neden olan basit şekerler ve sitrik asit, CUPRAC reaktifiyle okside olmaz. CUPRAC reaktifi, tiyol tipi antioksidanları okside etmek için yeterince hızlıdır. Renkli Cu (I)-Nc kelatı veren redoks reaksiyonu hava, güneş ışığı, nem ve pH gibi parametrelerden etkilenmez (Büyüktuncel, 2013).



Şekil 10. Cu (I)-Nc kelatının kimyasal yapısı (Özyürek ve ark., 2011).

- **Metal kelatı oluşturma kapasitesinin tayini**

Metal kelatı oluşturma kapasitesi yöntemi, Fe^{2+} iyonlarını bağlamak üzere güçlü bir demir kelatlayıcı olan ferrozin reaktifi ile ortamda bulunan metal bağlayıcı bileşiklerin yarışmasına dayanır. Kelatlama gücü yüksekse kırmızı renkli Fe^{2+}/ferrozin kompleksinin oluşumu engellenir. Bu yöntemde belli konsantrasyonlarda hazırlanan ekstre veya standart EDTA çözeltisine Fe^{2+} çözeltisi

eklenir. Daha sonra bu karışıma ferrozin eklenir ve referansa karşı çözeltilerin absorbansları 562 nm'de UV spektrofotometrede ölçülür (Dinis ve ark., 1984).

2.10. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Bir infeksiyonun sağaltımı ile ilgili uygun antimikrobik ilacın seçiminde; olası infeksiyon etkeni, infeksiyon etkeninin antibiyotik duyarlılığı, ilacın *in vivo* aktivitesini etkileyebilecek konak faktörleri, infeksiyonun yeri, ilacın farmakodinamik ve farmakokinetik özellikleri gibi bir dizi faktörün değerlendirilmesi gereklidir. Antimikrobik ilacın etken mikroorganizma üzerinde *in vitro* aktivitesi tedavide göz önüne alınması gereken faktörlerden biridir. Bir antibiyotiğin antimikrobik aktivitesinin saptanması için uygulanan *in vitro* işlemlere genel olarak duyarlılık testleri adı verilmektedir (Gülay, 2002). Mikroorganizmaların antimikrobiyal maddelere karşı duyarlılığının saptanmasında yaygın olarak kullanılan sıvı dilüsyon yöntemi (makrodilüsyon, mikrodilüsyon); agar dilüsyon yöntemi; difüzyon yöntemi (disk ya da oluk) olmak üzere farklı referans yöntemler vardır (NCCLS, 2002; NCCLS, 2003; CLSI, 2002; CLSI, 2008; CLSI, 2011).

Dilüsyon testlerinde, antimikrobiyal ilacın dilüsyonlarını içeren kuyucuklarda ya da agar yüzeyinde üremenin gözle görülebilir olması temel alınır. Bir mikroorganizmanın gözle görülebilir olarak üremesini engelleyen en düşük antimikrobiyal ilaç konsantrasyonu minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) olarak belirlenir. MİK, tanımlanan test koşullarında ilacın aktivitesini yansıtır ve klinisyene, infeksiyona neden olan mikroorganizmayı inhibe etmek için gerekli olan antimikrobiyal ilaç konsantrasyonunu gösterir (Seviçin, 2011).

2.10.1 Agar dilüsyon yöntemi

Test edilecek antimikrobiyal maddenin farklı konsantrasyonlarını içeren katı besiyerleri üzerine nokta ekim yöntemi ile mikroorganizmaların eklenmesi, belli süreler ve koşullar altında inkübasyon sonrasında mikroorganizma üremesinin görülmediği en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonunun MİK olarak değerlendirildiği bir testdir (Tekerlek, 2013; Şahin, 2006).

2.10.2 Sıvı dilüsyon yöntemi

Minimum inhibitör konsantrasyonu belirlemek için sıvı besiyerlerine antimikrobiyal etkiye sahip olan bileşiklerin seyreltik olarak belirli oranlarda eklenmesiyle hazırlanan besiyeri ortamları kullanılmaktadır. Tüpte ya da yuvarlak tabanlı kuyucukları olan steril plastik mikrodilüsyon plaklarında uygulanır. MİK, hem bir mikroorganizmanın herhangi bir antimikrobiyal maddeye karşı direncini hem de yeni bir antimikrobiyal maddenin aktivitesini gösterir. Bu amaçla Mueller-Hinton sıvı besiyerinde antimikrobiyal maddenin 2 kat dilüsyonları yapılarak gittikçe azalan yoğunlukta antimikrobiyal madde içeren dilüsyonlar elde edilir. Üzerlerine 24-48 saatlik aktif kültürden 0,1 mL aktarılır ve 37 ^{o}C'de 24-48 saat inkübe edilir. Tüp ya da yuvarlak tabanlı kuyucukları olan steril plastik mikrodilüsyon plaklarında üreme gözle değerlendirilir. Böylece üremenin olmadığı son dilüsyon MİK değeri olarak kabul edilir (Tekerlek, 2013; Şahin, 2006).

2.11. Kütle Spektrometrisi

Kütle spektrometrileri manyetik veya elektriksel bir alanda hareket eden yüklü partikülleri kütle/yük (m/z) oranlarına göre diğer yüklü partiküllerden ayırt ederek analizleme esasına göre çalışan cihazlardır (Biberoğlu, 2003).

Kütle spektrometrisi, günümüzde mevcut spektroskopik yöntemler arasında araştırmacılara molekülün tüm yapısı hakkında bilgi veren ve çoğu kez molekül kütlesinin ve molekül formülünün de bulunmasını sağlayan bir yöntemdir. Kütle spektrometrisinde çok az miktarda (pikogram miktarında) madde kullanılarak yapı analizi yapıldığı gibi, gaz ve sıvı kromatografına bağlanarak karışımların da analizi yapılabildiği için, kütle spektrometrisi, organik yapı analizi için tek başına bilgi verebilen çok yararlı bir yöntemdir (Erdik, 1993).

2.11.1 Kütle spektrometrisinin genel prensipleri

Kütle spektrometrisi dört ana bölümden oluşur:

- İyon Kaynağı
- Kütle Analizörü
- Dedektör
- Data Analizi



İyonlar oluşur	(m/z) oranlarına göre iyonların ayrılması	İyonların ölçülmesi
Elektron bombardımanı (EI)	Manyetik alan analizörü	Elektron çoğaltıcılar
Kimyasal iyonlaştırma (CI)	İyon tuzaklama	Çok kanallı plakalar
Hızlı atom bombardımanı (FAB)	Quadrupol (dört kutuplu)	Faraday kafesi
Elektrosprey iyonlaştırma (ESI)		
Matriks yardımlı lazer		
Desorpsiyon/iyonlaştırma (MALDI)		

Kütle spektometrisinde örnek moleküller, sisteme doğrudan (enjektör, plaka, prob, oto örnekleyici) ya da kromatografik cihazların çıkışı kütle spektrometrisinin iyon kaynağı girişi ile bir ara yüzey vasıtasıyla birleştirilerek verilir. Örnek moleküller normalde yüklü partiküller değillerdir ve kütle spektrometrileri iyonizasyon işlemi ile molekülleri yüklü iyonize moleküller haline dönüştürürler. Yüklü moleküller stabil değillerdir ve diğer moleküllerle veya bir yüzey ile temas ettikleri zaman fragmentlerine parçalanır ve yüklerini kaybederler. Yüklü moleküller daha sonra bir kütle analizöründe kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrılır, dedektöre ulaşan iyonların kütle/yük oranları belirlenir ve dedektörden alınan sinyaller bilgisayara aktarılarak spektrum kaydedilir. İyon kaynağından çıktığı andan detektöre ulaşana kadar tüm süreçlerde gaz fazında olduğu bilinen örnek iyonlarının birbirleri ve hava molekülleri arasındaki muhtemel çarpışmaları engellemek amacıyla sistemin tamamı yüksek vakum altında (en az $1x10^{-5}$ Pa) çalışmaktadır (Gündoğdu, 2014; Biberoğlu, 2003).

2.11.2 Uçuş zamanlı kütle spektrometrisi

Lazer ışını tarafından desorbe edilen ve elektriksel alan içerisinde belli bir kinetik enerjiyle hızlandırılan iyonlar, elektriksel alan uygulanmayan bir tüp içerisine girerler ve burada kütle/yük oranlarına göre farklı hızlarda hareket ederler. İyonların

ağırlıkları kütleleri ile orantılıdır. Dolayısıyla değişik kütledeki iyonlar değişik hızlarda yol alır ve detektöre değişik zamanlarda ulaşırlar. Tipik olarak yaklaşık iki metre uzunluğunda uçuş tüpleri içeren TOF (uçuş zamanlı kütle analizörüne) sistemleri diğer analizörlerle kıyaslandığında, duyarlılığı çok yüksektir. Bu yüksek duyarlılığın sebebi uçuş zamanlı analizör içerisinde ön ayırmadan geçen bütün iyonların dedektöre ulaşmasıdır. Bu tip kütle spektrometrileri kompleks biyopolimerlerin pmol düzeyindeki analizleri için kullanılır (Çal, 2014; Biberoğlu, 2003).

2.11.3 Elektrosprey iyonlaşmalı-kütle spektrometrisi (ESI-MS)

ESI-MS sistemi peptit, protein, aminoasit, polimer, oligosakkarit ve sentetik organik moleküllerin analizinde sıklıkla kullanılır. ESI'da örnek, kuvvetli bir elektriksel alan yardımıyla direkt olarak çözeltiden püskürtülür. Elektrosprey iyonlaşmada çözelti halinde bulunan örnek, akış hızı ayarlanabilen (nanolitre mertebesine kadar) bir şırınga ile cihaz içerisine pompalanır. Bu sırada çözeltide bulunan analit moleküllerinin yüklenmesini sağlamak amacıyla iğne şeklindeki bir kapilerin ucuna elektrik potansiyeli uygulananır ve örnek buradan püskürtülür. Püskürtme işlemi sonrasında yüklenmiş olan damlacıklar, kapilerin sonunda bulunan ancak daha düşük potansiyel uygulanan karşı elektroda doğru yönelirler.

Damlacıkların bu yolculuğu esnasında analit moleküllerinin etrafını saran veya oluşan bu damlacıkların içerisinde bulunan çözücü moleküllerini buharlaştırarak uzaklaştırmak için kurutucu gaz gönderilir veya ısıtma işlemi yapılır. Bu işlem sonucunda oluşan çözelti damlacıklarında bulunan analit molekülleri, yükleri dolayısıyla birbirlerine karşı itme kuvveti uygularlar. Bu itmeler ile kulombik patlamalar oluşur ve aynı türlerin farklı yüklü iyonları oluşur. Dolayısıyla, birden fazla fonksiyonel grup içeren büyük moleküller, çoklu yük taşıyan iyonlar haline dönüşebilirler. ESI'da iyonlaşan türler kütle/yük oranlarına göre ayrılmaları için kütle ayırıcısına gönderilirler. Kütle spektrometrisi sistemlerinde kütle ayırıcısı olarak en sık kullanılan sistemler TOF, dört kutuplu (Quadrapol, Q), iyon tuzaklamalı (IT) ve manyetik alanlı analizörleridir (Ho ve ark., 2003; Banerjee ve Mazumdar, 2011).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Bitkisel Materyal

Bursa-Uludağ yöresinde yetişen fakat lokasyonu tam belli olmayan *Achillea multifida* (DC.) Boiss. bitkisi 4.07.1985 tarihinde E. Tuzlacı, M. Öksüz ve Eczacılık Fakültesi öğrencileri tarafından oteller, kirazlı yayla arasından toplanmış ve MARE :27 kodu ile saklanmıştır. Daha sonra tez materyali olarak 22.07.2009 tarihinde oteller bölgesi, teleferik altından Mehmet Z. Uyanık tarafından toplandı ve Yard. Doç. Dr. Gizem Bulut tarafından teşhis edildi. Teşhis edilen örnek Prof. Dr. Ertan Tuzlacı tarafından kontrol edilerek MARE:11719 kodu ile Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'nda saklandı.

3.2. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

Folin Ciocalteu fenol reaktifi (FCR), 2,2–difenil–1–pikrilhidrazil (DPPH), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), troloks, 2,4,6-tris (2-pridil)-s-triazin (TPTZ), ABTS [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit)], ferrozin [3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazin-4′,4″-disulfonik asit sodyum tuzu], $FeCl_3.6H_2O$, $FeSO_4.7H_2O$, $FeCl_2$, Na_2EDTA, gallik asit ve sodyum karbonat Sigma'dan (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya); heptan, kloroform, etil asetat, etil alkol, toluen, metanol, silika jel 60 (0,2-0,5 mm; Merck KGaA 1.07733), silika jel 60 (0,063-0,200 mm; Merck KGaA 1.07734) ve ince tabaka plakları (Kieselgel $60F_{254}$, Merck KGaA 1.05554) Merck KGaA'dan (Darmstadt, Germany) satın alındı. Kullanılan tüm kimyasallar ve çözücüler analitik saflıktadır.

3.3. Çözeltilerin Hazırlanması

3.3.1 Toplam fenolik madde miktarı tayinininde kullanılan çözeltiler

% 2'lik sodyum karbonat (Na_2CO_3) çözeltisinin hazırlanması: 1 g Na_2CO_3 tartıldı ve bir miktar distile suda çözündükten sonra 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve distile su ile hacmine tamamlandı.

Folin-Ciocalteu reaktifi satın alındığı şekilde kullanıldı.

3.3.2 DPPH serbest radikali giderme kapasitesinde kullanılan çözelti

0,1 mM DPPH çözeltisinin hazırlanması: 0,0099 g DPPH tartıldı ve miktar metanol ile çözündükten sonra 250 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı.

3.3.3 ABTS katyon radikali giderme kapasitesinde kullanılan çözeltiler

7 mM $ABTS^{\bullet+}$ stok çözeltisinin hazırlanması: 0,3841 g 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) amonyum tuzu tartıldı bir miktar distile suda çözüldü ve yine distile suyla 100 mL'lik balon jojede hacmine tamamlandı.

2,45 mM potasyum peroksodisülfat ($K_2S_2O_8$) çözeltisinin hazırlanması: 0,0662 g potasyum peroksodisülfat tartıldı, distile suda çözüldü yine distile suyla 100 mL'lik balon jojede hacmine tamamlandı.

3.3.4 Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yönteminde kullanılan çözeltiler

40 mM HCl çözeltisinin hazırlanması: 820 µL der. HCl (% 37'lik) 250 mL' lik balon jojede distile su ile hacmine tamamlandı.

10 mM TPTZ çözeltisinin hazırlanması: 0,3120 g TPTZ, 100 mL 40 mM HCl'de 50 ^{o}C 'deki su banyosunda çözündü.

20 mM $FeCl_3.6H_2O$ çözeltisinin hazırlanması: 1,35 g $FeCl_3.6H_2O$ tartıldı, bir miktar suda çözüldü ve 250 mL'lik balon jojede hacmine tamamlandı.

300 mM asetat tamponu (pH 3,6) çözeltisinin hazırlanması: 3,1 g $NaCH_3COO.3H_2O$ tartıldı ve 600 mL distile suda çözündü, üzerine glasiyel asetik asit eklenip pH 3,6 olarak ayarlandı ve 1L'lik balon jojede yine distile suyla hacmine tamamlandı.

3.3.5 Metal kelatı oluşturma kapasitesi yönteminde kullanılan çözeltiler

5 mM ferrozin çözeltisinin hazırlanması: 0,0616 g ferrozin tartıldı, bir miktar distile suda çözüldü ve 25 mL'lik balon jojede distile su ile hacmine tamamlandı.

2 mM $FeCl_2$ çözeltisinin hazırlanması: 0,0140 g $FeCl_2$ tartıldı, distile suda çözüldü ve 50 mL'lik balon jojede distile su ile hacmine tamamlandı.

3.3.6 Flavonoid kayma belirteçlerinin hazırlanması

Alüminyum klorür çözeltisinin hazırlanması: 5,0 g nem içermeyen susuz $AlCl_3$ 100 mL spektroskopik saflıktaki metanole dikkatlice eklenerek oda şartlarında yaklaşık 24 saatte çözüldü. Çözelti plastik kapakla kapatılmış bir cam balonda saklandı.

Hidroklorik asit çözeltisinin hazırlanması: 50 mL derişik HCl 100 mL distile su ile karıştırılarak hazırlandı.

Susuz sodyum asetat ve susuz borik asit toz halde kullanıldı.

Sodyum metilat (metanol içindeki % 30'luk çözeltisi) satın alındığı şekilde kullanıldı.

3.3.7 İTK'da kullanılan belirteçlerin hazırlanması

Seryum sülfat belirtecinin hazırlanması: 10 g $Ce(SO_4)_2.4\ H_2O$ tartılarak üzerine der.H_2SO_4 ilave edildi. Daha sonra karışım 500 mL'ye tamamlanıncaya kadar üzerine yavaş yavaş distile su ilave edildi.

Amonyak (NH_3) buharı: Doğrudan amonyak buharı kullanıldı.

NA belirtecinin (Naturstoffreagenz A: Difenil borik asit-β-aminoetilester) hazırlanması: 100 mg toz NA bileşiği 100 mL metanolde çözülerek hazırlandı.

3.4. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Döner buharlaştırıcı (Rota Evaporatör- Heidolph)
Ultraviyole-görünür bölge spektrofometrisi (UV-Vis), (Shimadzu UV-1800)
Elektrospray iyonlaşmalı kuadrupol uçuş zamanlı sıvı kromatografi kütle spektrometrisi (ESI-Q-TOF LC/MS) (Agilent technologies 6530)
Çalkalamalı su banyosu (Memmert WB 14 termostatlı)
Otomatik pipetler (Transferpette, Biohit, Eppendorf)

Analitik terazi (Denver)

pH-metre (Mettler Toledo-Mp 220)

Ultra saf su cihazı (Millipore Milli-Q RG)

Nükleer Manyetik Rezonans Cihazı (NMR), (Bruker Avance III, 500 MHz)

Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC), (Shimadzu DSC- 60)

Rondo (Premier)

Infra-Red spektrometrisi (IR), (Shimadzu FT-IR Affinity-1)

3.5. Fitokimyasal Ön Denemeler

Oda sıcaklığında kurutulduktan sonra kaba toz haline getirilmiş 2,5 g numune üzerine 50 mL kaynar su konuldu, karışım 30 dk. kaynar su banyosunda tutuldu ve daha sonra pamuktan süzüldü. Elde edilen infüzyonda antrasen, flavon, saponin ve tananlere ait türevler arandı. Alkaloit varlığı, ayrıca kaba toz edilmiş numunenin uygun bir ön deneme yöntemine göre tüketilerek arandı.

Antrasen teşhisi: 10 mL infüzyon üzerine 5 damla derişik sülfürik asit konuldu. Karışım 15 dk. kaynar su banyosunda tutularak glikozitler hidrolize edildi. Karışım soğuduktan sonra 5 mL toluen ile çalkalandı. Toluenli kısım pipet yardımıyla diğer tüpe alındı ve üzerine 3 mL amonyak çözeltisi (% 10) ilave edildi. Alkali ilavesiyle kırmızı rengin oluşup oluşmadığına bakıldı (Borntraeger reaksiyonu).

Flavon teşhisi (cyanidin veya shibata reaksiyonu)**:** 5 mL infüzyon üzerine klorhidrik asitli etanol (shibata belirteci: derişik klorhidrik asit 1k+su 1k+ etanol 1k) ve biraz magnezyum tozu veya talaşı konuldu. Reaksiyon sonunda turuncu, pembe veya mor rengin oluşup oluşmadığına bakıldı.

Saponin teşhisi: 10 mL infüzyon bir deney tüpüne konuldu. Tüp baş parmak ile sıkıca kapatıldıktan sonra yatay olarak 30 saniye kuvvetle çalkandı ve 15 dk. dinlenmeye bırakıldı. 15 dk. sonunda en az 1 cm kalıcı köpük oluşup oluşmadığı gözlendi.

Tanen teşhisi: 3 mL infüzyon üzerine 2 mL tuzlu jelatin çözeltisi (sodyum klorür ile doyurulmuş % 1'lik jelatin çözeltisi) ilave edildi. Krem renkli bir çökelek oluşup oluşmadığına bakıldı.

Gallik ve kateşik tananlerin aranması: 2 mL infüzyon üzerine 3 damla seyreltik demir (III) klorür (% 5) ilave edildi. Gallik tanen için mavi-siyah bir renk veya çökelek, kateşik tanen için ise esmer zeytin yeşil renk veya çökelek oluşup oluşmadığına bakıldı.

Alkaloit teşhisi: 0,5 g toz edilmiş numune 10 mL N H_2SO_4 çözeltisi ile 20 dk. ağzı alüminyum folyo ile kapalı bir şekilde su banyosunda kaynatılarak tüketildi. Karışım soğuduktan sonra süzüldü ve süzüntü üzerine 5 mL 6N NH_3 çözeltisi ilave edildi. Kalevi hale gelen karışım ayırma hunisinde 2 defa 10 mL eter ile tüketildi ve eterli kısımlar birleştirildi. Daha sonra eterli kısımlar su banyosunda yoğunlaştırıldı. Elde edilen bakiye, üzerine 5 mL N H_2SO_4 çözeltisi ilave edilerek çözündürüldü. Asitli karışıma alkaloit reaktifleri ilave edilerek teşhis reaksiyonları gerçekleştirildi.

a) 1 mL asitli çözelti üzerine 1 damla Dragendorff belirteci (Bizmut karbonat+HCI+KI+Su) ilave edilerek turuncu-kırmızı bir renk oluşup oluşmadığına bakıldı.

b) 1 mL asitli çözelti üzerine 1 damla Mayer belirteci ($HgCI_2$+KI+Su) ilave edilerek beyazımsı bir çökelek meydana gelip gelmediğine bakıldı.

c) 1 mL asitli çözelti üzerine 1 damla Bouchardat belirteci (İyot +KI+Su) ilave edilerek esmer kırmızı bir renk oluşup oluşmadığına bakıldı.

3.6. Miktar Tayini Yöntemleri

Kül miktar tayini: Etüvde ısıtılarak sabit tartıma getirilmiş porselen bir krozeye, tam tartılmış 1 g toz edilmiş drog konuldu ve tartıldı. Drog kül fırınında düşük ısıdan başlamak üzere 300 ^oC ve 500 ^oC'de 30'ar dk. bekletilerek 1 saat yakıldı. İşlem sonunda kröze desikatöre alındı ve soğuduktan sonra tartıldı.

Su miktar tayini: Etüvde ısıtılarak sabit tartıma getirilmiş olan cam bir tartı kabı içine tam tartılmış 1 g kaba toz edilmiş drog konuldu ve tartıldı. Drog, 2 saat boyunca 100-105 ^oC'de etüvde bekletildi. İşlem sonunda cam tartım kabı desikatöre alınarak soğutuldu ve tartıldı.

3.7. Ekstrelerin Hazırlanması

Achillea multifida bitkisinin taşıdığı sekonder metabolitlerin enzimlerin etkisiyle değişikliğe uğramaması ve bu enzimlerin aktivasyonunu durdurmak amacıyla bitkinin topraküstü kısımları (562 g) oda şartlarında kurutuldu. Kurutulan bitkinin topraküstü kısımları toz edilerek sırasıyla heptan, kloroform ve metanol çözücüleri ile maserasyona bırakıldı. Maserasyon işlemine çözücülerin renksiz oluncaya kadar devam edildi. Maserasyondan sonra sıvı kısım süzgeç kağıdından süzülerek alındı ve

organik çözücüsü rotaevaparatörde 50 ^{o}C'yi aşmayan sıcaklıkta uçurulup ham ekstreler elde edildi ve ekstreler çalışmaya başlanılacağı güne kadar buzdolabında +4 ^{o}C' de muhafaza edildi. Elde edilen ekstrelerin isimleri, miktarları ve % verimleri aşağıdaki Tablo 5'de verildi.

Tablo 5. *Achillea multifida* bitkisinden elde edilen ekstrelerin isimleri, miktarları ve % verimleri

Bitki Materyali	Kullanılan Çözücüler	Ekstrelerin Adları	Miktarları (g)	Verimleri (%)
A.multifida	Heptan	Heptan ekstresi	9,6715	1.72
	Kloroform	Kloroform ekstresi	17,7579	3.16
	Metanol	Metanol ekstresi	63,7744	11.35

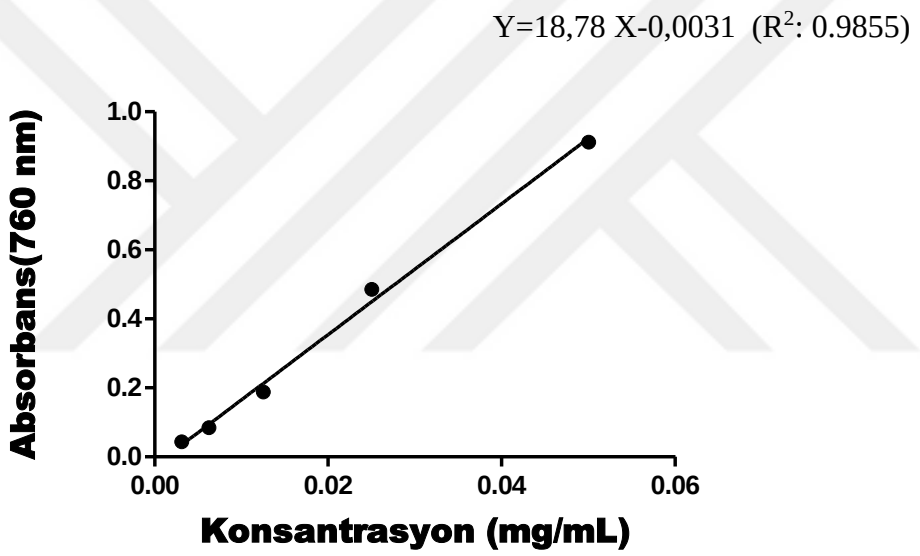
3.8. Ekstrelerin Toplam Fenolik Madde Miktarlarının Belirlenmesi

2-64 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan ekstrelerden 0,1'er mL tüplere alınarak hacimleri 4,6 mL olacak şekilde distile su ilave edildi. 0,1 mL Folin-Ciocalteu ayıracı (distile su ile 1/3 oranında seyreltilir) ve 0,3 mL % 2 lik sodyum karbonat çözeltisinden ilave edilerek, oda koşullarında 2 saat çalkantılı su banyosunda tutulduktan sonra meydana gelen mavi rengin absorbansı ekstrenin yerine 0,1 mL distile su içeren referansa karsı 760 nm'de ölçüldü. 0,5-0,03125 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan gallik asit çözeltilerine Folin-Ciocalteu ayıracı ile toplam fenolik madde tayini uygulandı. Ölçülen absorbanslara karşı konsantrasyonlar grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi hazırlandı ve doğru denklemi elde edildi. Elde edilen bu doğru denkleminden, örneklerin toplam fenolik madde miktarları mg gallik asit (mg GAE/g ekstre) eşdeğeri şeklinde hesaplandı. Deney üç kez tekrarlanarak ortalaması alındı (Taşkın, 2011).

3.8.1 Gallik asitin kalibrasyon eğrisinin hazırlanması

Gallik asitin standart doğru denkleminin elde edilmesi için gallik asidin 0,05-0,5 mg/mL konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlandı. Çözeltilere Folin-Ciocalteau metodu uygulandıktan sonra oluşan renklerin absorbansları 760 nm'de ölçüldü. Deney beş kez tekrarlandı ve bulunan değerlerden, en küçük kareler yönteminin uygulanmasıyla gallik asit kalibrasyon eğrisi elde edildi (Şekil 11). Ekstrelerin toplam fenolik madde miktarları standart gallik asit grafiğinden elde edilen doğru denklemi kullanılarak mg gallik asit eşdeğeri şeklinde belirlendi (Taşkın, 2011).

Absorbans = 18,78 gallik asit (mg) – 0,0031 (R^2: 0,9855)



Şekil 11. Gallik asitin kalibrasyon eğrisi

3.9. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

3.9.1 DPPH radikali giderme aktivite tayini

Ekstrelerin serbest radikal yakalama etkinliği 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikali kullanılarak tayin edildi (Taşkın, 2011). 2-32 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan ekstrelerden ve 5-30 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan standart çözeltilerden (askorbik asit ve BHT) 0,1'er mL alınarak, 3,9 mL 0,1 mM DPPH (metanolde) çözeltisi ilave edildi. DPPH çözeltisi ilave edilen ekstreler ve standart çözeltiler 1 dk. vortekslendikten sonra oda koşullarında ve karanlıkta 30 dk.

bekletildi. Absorbansları 517 nm'de UV-spektrofotometrede (Shimadzu 1800) metanole karşı ölçüldü. Örnek ve standart madde yerine 0,1 mL metanol kullanılarak aynı şartlarda kontrol hazırlandı. Kontrolün absorbansı günlük ölçüldü. Deney üç kez tekrarlanarak ortalaması alındı. EC_{50} değeri hesaplanmadan önce % DPPH radikali giderme kapasitesi aşağıda verilen formül ile hesaplandı:

$$\% \text{ DPPH radikali giderme kapasitesi} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100]$$

A_0 : Kontrol çözeltisinin absorbansı,

A_1 : Bitki ekstreleri ve standart çözeltilerin absorbansı

Başlangıç $DPPH^{\bullet}$ derişiminde % 50 azalmaya neden olan ekstre ve standart madde konsantrasyonu EC_{50} olarak tanımlanır. Bu değer çalışılan konsantrasyonlara karşı % serbest radikal giderme aktivite değerlerinin yerleştirilmesi ile elde edilen doğru denklemi kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar EC_{50} = mg/mL olarak verildi.

3.9.2 ABTS katyon radikali giderme aktivite tayini

ABTS katyon radikali, 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiozin-6-sulfonik asit) amonyum tuzu ($ABTS^{2-}$) nun peroksodisülfatla oksidasyonu sonucu meydana gelir. 7 mM ABTS amonyum tuzu suda çözüldü ve 2,45 mM potasyum peroksodisülfatla reaksiyona sokularak hazırlanan $ABTS^{\bullet+}$ stok çözeltisi oda sıcaklığında koyu mavi bir renk meydana gelmesini sağlamak için 12 - 16 saat bekletildi. Deney gününde, $ABTS^{\bullet+}$ stok çözeltisi, 734 nm'de absorbansı 0,70 (± 0,02) olacak şekilde metanol ile seyreltilerek $ABTS^{\bullet+}$ çalışma çözeltisi hazırlandı. 1-64 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan ekstrelerden ve 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL ve 30 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan standart çözeltiden (askorbik asit) 40 'ar µL alınarak, 3960 µL $ABTS^{\bullet+}$ çalışma çözeltisi ilave edildi ve renkte meydana gelen azalma spektrofotometrik olarak 734 nm'de metanole karşı 6. dk.'da ölçüldü. Örnek ve standart madde yerine 40 µL metanol kullanılarak aynı şartlarda kontrol hazırlandı. Kontrolün absorbansı günlük ölçüldü. Deney üç kez tekrarlanarak ortalaması alındı (Taşkın, 2011). % ABTS katyon radikalini giderici aktivite aşağıda verilen formül ile hesaplandı: % ABTS katyon radikalini giderici aktivite = $[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100]$

A_0 : Kontrol reaksiyonunun absorbansı

A_1 : Bitki ekstreleri ve standart çözeltilerin absorbansı

EC_{50} değeri, çalışılan konsantrasyonlara karşı % ABTS katyon radikalini giderici aktivite değerlerinin yerleştirilmesi ile elde edilen doğru denklemi kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar EC_{50} = mg/mL olarak verildi.

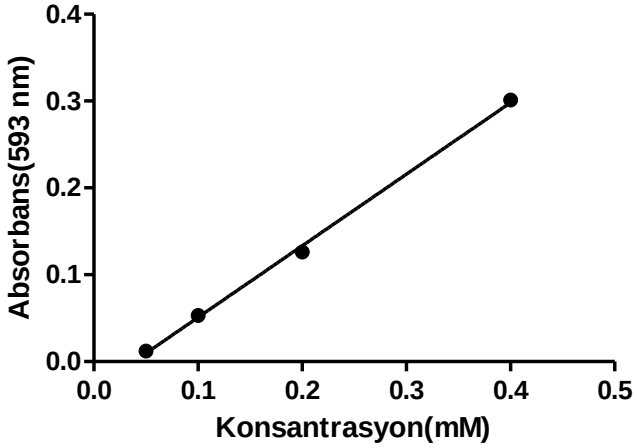
3.9.3 Demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü tayini (FRAP)

FRAP ayıracı, 25 mL 300 mM asetat tamponu (pH 3,6), 2,5 mL TPTZ çözeltisi (10 mM TPTZ'nin 40 mM HCI'deki çözeltisi) ve 2,5 mL 20 mM $FeCI_3.6H_2O$'nin karıştırılması ile hazırlandı ve 37 ^oC de 30 dk. bekletildi. FRAP ayıracının 3,8 mL'si 0,2 mL ekstre veya standart (askorbik asit) ile karıştırılarak, ekstre yerine distile su konularak hazırlanan referansa karşı absorbans artışı 4. dakikada 593 nm'de ölçüldü. Ekstrelerin 593 nm'deki absorbans değerleri, $FeSO_4.7H_2O$ ile hazırlanan kalibrasyon grafiğine ait değerlerle karşılaştırılmak suretiyle, FRAP değeri mM $FeSO_4$/mg ekstre olarak ifade edildi (Benzie ve Strain, 1996).

$FeSO_4$ kalibrasyon eğrisinin hazırlanması

$FeSO_4.7H_2O$'nun doğru denkleminin elde edilebilmesi için öncelikle $FeSO_4.7H_2O$'ın 1 mM'lık çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltinin distile su ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 0,4 mM, 0,2 mM, 0,1 mM ve 0,05 mM olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere FRAP deneyi uygulandıktan sonra oluşan renklerin absorbansları 4.dakikada 593 nm'de referansa karşı ölçüldü. Deney beş kez tekrarlandı ve bulunan değerlerden, en küçük kareler yönteminin uygulanmasıyla $FeSO_4.7H_2O$ kalibrasyon eğrisi çizildi ve standart doğru denklemi elde edildi (Benzie ve Strain, 1996).

Ekstrelerin ve standartın FRAP değerleri $FeSO_4.7H_2O$ grafiğinden elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlendi: Absorbans = 0,8226 $FeSO_4$ (mM) - 0,03374 (R^2: 0,9940)



Şekil 12. $FeSO_4$'ın kalibrasyon eğrisi

3.9.4 Metal kelatı oluşturma aktivitesi

1 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan ekstrelerden ve standart çözeltiden (EDTA) 200'er µL alınarak, 50 µL $FeCI_2$ (2 mM) çözeltisi ilave edildi. Daha sonra 200 µL ferrozin (5 mM) çözeltisi eklenerek reaksiyonun başlaması için 5 dk. bekletildi. Toplam hacim 4 mL oluncaya kadar metanol ilave edilerek oda sıcaklığında 10 dk. bekletildi. Referans çözeltisi olarak her bir bitki ekstresi için ayrı bir referans hazırlandı. Bu referanslar; 200 µL bitki ekstresi üzerine 50 µL $FeCl_2$ (2 mM) ve 3,75 mL metanol konularak hazırlandı. Kontrol çözeltisi olarak, bitki ekstresi eklenmeden 200 µL ferrozin (5 mM) üzerine 50 µL $FeCl_2$ (2 mM) ve 3,75 mL metanol ilave edildi. Daha sonra çözeltilerin absorbansları 562 nm'de UV spektrofotometrede ölçüldü. Deney üç kez tekrarlanarak ortalaması alındı (Dinis ve ark., 1994).

Ferrozin – Fe^{2+} kompleksi oluşumunu engelleme yüzdeleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

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

A_0 : Kontrol reaksiyonunun absorbansı,

A_1 : Bitki ekstreleri ve standart çözeltilerin absorbansı

3.10. Antimikrobiyal Duyarlılık Deneyi

Achillea multifida bitkisinin heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin antimikrobiyal aktiviteleri, agar oluk difüzyon ve sıvı besiyerinde mikrodilüsyon yöntemleri kullanılarak Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda incelendi.

Antimikrobiyal duyarlılık deneyi uygulanan mikroorganizmalar

Staphylococcus aureus ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida guilliermondii* KUEN 998, *Candida tropicalis* KUEN 1021, *Candida parapsilosis* ATCC 90018 ve *Candida krusei* ATCC 6258.

Antimikrobiyal duyarlılık deneylerinde kullanılan besiyerleri

Bakteriler için katyon ayarlı Mueller Hinton Broth (CAMHB)(Merck), Tryptic Soy Broth (TSB)(Merck), Tryptic Soy Agar (TSA)(Merck) besiyerleri, mantarlar için Sabouraud Dextrose Broth (SDB)(Merck) ve Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Merck) ve morfolino propan sülfonik asit (MOPS) (Sigma-Aldrich) ile tamponlanmış RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) besiyerleri, çözücü olarak; heptan, kloroform, metanol, dimetilsülfoksit (DMSO) kullanıldı.

Kullanılan ekstrelerin miktarları ve çözücülerin hacmi

Tablo 6. Ekstrelerin başlangıç miktarları ve çözücü hacmi

Ekstreler	Miktarları	Çözücü Hacmi
Heptan ekstresi	300 mg	1500 µL (DMSO)
Kloroform ekstresi	200 mg	1500 µL (metanol)
Metanol ekstresi	400 mg	1500 µL (metanol)

3.10.1 Agar oluk diffüzyon yöntemi

A. multifida ekstreleri, kapaklı tüpler içinde uygun konsantrasyonlarda ve uygun çözücülerde çözülerek kullanıldı. Mikroorganizma süspansiyonları 18 saatlik sıvı kültürlerden hazırlandı. İki kez fizyolojik tuzlu su (FTS) ile yıkanan bakteri süspansiyonları Mc Farland 0,5 standart bulanıklık tüpüne (1-2 x 10^8 kob/ml), maya süspansiyonu ise Mc Farland 1 standart bulanıklık tüpüne (3 x 10^8 kob/mL) hazırlandı. Bu süspansiyonlardan 100 µL alınıp 15 mL besiyeri (bakteriler için TSA, maya için PDA) içine ilave edildi ve steril boş petri kutularına konularak katılaşmaları beklendi. İçinde mikroorganizma bulunan 15 mL'lik katı agar besiyeri yüzeyine belirli aralıklarla 5 mm çapında oluklar açıldı ve açılan oluklara uygun çözücüleri içinde çözünmüş *A.multifida* ekstrelerinden 50 µL konuldu. Kontrol antibiyotik olarak meropenem'in 200 µg/mL (10 µg/oluk) ve antifungal olan flukonazol'ün 2000 µg/ml (100 µg/oluk) stok çözeltileri hazırlandı ve 50 µl oluklara konularak aynı şekilde test edildi. Ayrıca çözücüler de (meropenem için distile su, flukonazol için dimetilsülfoksit, ekstreler için heptan, kloroform ve metanol) aynı şekilde test edildi. Bütün petriler bakterilerin üremesi için 35 ºC 'de 18-24 saat, maya ise 35 ºC de 24-48 saat süre ile inkübe edildi, süre sonunda üreme inhibisyon zonları mm cinsinden ölçüldü (Perez, 1990; NCCLS, 1999; Rex ve ark., 1993).

3.10.2 Sıvı besiyerinde mikrodilüsyon yöntemi

Antibakteriyel duyarlılık deneyi

NCCLS önerileri doğrultusunda 24 saatlik bakteri kültüründeki kolonilerden Mc Farland 0,5 bulanıklığına göre bakteri süspansiyonu hazırlandı ve son inokulüm konsantrasyonu 5x10^5 kob/mL olacak şekilde sulandırıldı. Steril U tabanlı mikrodilüsyon plaklarına % 2 oranında NaCI içeren katyon ekli Mueller Hinton sıvı besiyerinden (CAMHB) 100 µL konuldu. *A. multifida* ekstreleri sırasıyla ilk kuyucuklara 100 µL konulup seri sulandırımları yapıldı. Daha sonra ekstre içeren kuyucuklara 100 µL içeren bakteri süspansiyonu eklendi ve 35 ºC 'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda gözle üreme görülmeyen en düşük ekstre konsantrasyonları minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) olarak saptandı. Negatif kontrol olarak CAMHB ve bakteri süspansiyonları, pozitif kontrol olarak meropenem (512-0,125 µg/ml) kullanıldı (NCCLS, 2003; NCCLS, 1993).

Antifungal duyarlılık deneyi

RPMI-1640 besiyerinin kullanıldığı mikrodilüsyon yöntemi NCCLS M27-A2 standartlarına uygun olarak uygulandı. L-glutamin ve fenol kırmızısı içeren RPMI 1640 besiyeri 0,165 M MOPS kullanılarak pH'ı 7,0'e ayarlandı. SDA'da 48 saatte üreyen maya kolonilerinden RPMI-1640 besiyeri ile 0,5-2,5x10^3 kob/mL'lik inokulüm hazırlandı. *A. multifida* bitkisinin heptan, kloroform ve metanol ekstrelerini içeren mikrodilüsyon plaklarının uygun kuyucuklarına maya süspansiyonundan 100 µL aktarıldı. Mikrodilüsyon plakları 35 ^oC de 48 saat inkübe edildi. MİK değerleri 24. ve 48. saatlerde makroskopik olarak üreme kontrollerine göre üremede belirgin azalmanın olduğu en düşük ekstre/ilaç konsantrasyonu olarak belirlendi. Negatif kontrol olarak RPMI-1640 besiyeri ve maya süspansiyonu, pozitif kontrol olarak flukonazol (5120-0,625 µg/mL) kullanıldı (Ergon ve Yücesoy, 2005; NCCLS, 2002).

3.11. Sitotoksik Aktivite Deneyleri

A. multifida bitkisinden hazırlanan heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin ve daha sonra güçlü sitotoksik akitivite gösteren kloroform ekstresinden, sütun kromatografisi sonucunda elde edilen alt ekstreler ve saf bileşiklerin sitotoksik aktiviteleri, insan kolon kanser hücre hattı HT-29 (ATCC, HTB-38), meme kanser hücre hattı MCF-7 (ATCC, HTB-38), insan serviks kanser hücre hattı HeLa (ATCC, CCL-2) ve fare embriyonik fibroblast hücre hattı olan NIH/3T3 (ATCC, CRL-1658) üzerinde MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] yöntemiyle incelendi.

3.11.1 Anti-kanserojenik etkinin belirlenmesi

Kanser hücrelerinin çoğaltılması için % 10 fetal sığır serumu, 100 mM L-Glutamin ve % 1 Penisilin-Streptomisin içeren Dulbecco's modifiye Eagle medium (DMEM) kullanıldı. MTT çalışmaları, Vybrant" MTT hücre proliferasyon kiti (invitrogen) kullanılarak 96 kuyucuklu doku kültür kaplarında gerçekleştirildi. Hücreler çözüldükten sonra kültür medyumunda kültüre edildi. 3. pasajdan sonra hücreler % 0,25'lik Tripsin-EDTA solüsyonuyla kaldırıldı. Daha sonra 15 mL'lik Falcon tübüne alınarak 2000 rpm'de 5 dak. santrifüjlendi. Santrifüj sonrası tüp içerisinde bulunan üst faz döküldü. Hücre pelleti 1 mL kültür medyumu ile süspanse edildildikten sonra hücre sayımı yapıldı. Bunun için % 1'lik tripan mavisi kullanıldı.

Hücre sayımından sonra her bir kuyucuğa $1x10^4$ hücre ekildi ve 37 °C'de % 95 nem ve % 5 CO_2'li ortamda 24 saat inkübasyona tabi tutuldu. Bu sürenin bitiminde, sentez bileşikler çeşitli konsantrasyonlarda eklenerek 37 °C'lik inkübatöre kaldırıldı.

Kültürün 48. saatinde kültür kabında bulunan medyum çıkarıldı ve her bir kuyucuğa 100 µL taze kültür medyumu konulduktan sonra 10 µL MTT boyası (5 mg/mL) eklenerek hücreler 37 °C'de 4 saat daha inkübe edildiler. İnkübasyon sonunda, canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözülmesi için her bir kuyuya 100 µL solubilizasyon çözeltisi eklendi ve 37 °C'de 12 saat bekletildi.

Kültür plağı mikroplaka okuyucusuna konularak absorbans değerleri 540 nm dalga boyunda okutuldu. Referans dalga boyu olarak 630 nm dalga boyu kullanıldı. Hiçbir madde eklenmeyen kontrol kültürlerinden elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alınarak bu değer % 100 kabul edildi. Sentez bileşikleri içeren kültürlerden elde edilen absorbans değerleri kontrol absorbans değerine oranlandı ve hücrelerin canlılık oranları % olarak ifade edildi (Sgouras ve ark., 1990).

3.11.2 Kaspaz üzerine etkiler

Apoptotik hücre ölümünde kaspazlar olarak bilinen sistein proteaz ailesi tarafından yürütülen iki süreç vardır: Kaspaz-8 tarafından başlatılan ekstrinsik (mitokondriyal) yolak ve kaspaz-9 tarafından tetiklenen intrinsik yolakların aktivasyonu ile hücre ölümü tetiklenmektedir. Ekstrinsik ya da intrinsik apoptotik süreçler sonunda en yaygın ölçülen kaspaz aktivitesi kaspaz-3'tür (Ozsavci ve ark., 2011). Yapılması planlanan bu çalışmada izole edilen bileşiklerin hücre ölümünü hangi yolak ile tetiklediği belirlenmeye çalışıldı.

Kaspaz-3 kolorimetrik analizi: Kaspaz-3 enzim aktivitesi ticari olarak satın alınmış olan kaspaz-3 deney kitinde belirtilen yöntem ile ölçüldü. Kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi, peptid substrat Asetil Asp-Glu-Val-Asp-*p*-nitroanilid'in (Ac-DEVD-*p*NA) kaspaz-3 tarafından parçalandıktan sonra serbest kalan *p*-nitroanilid (*p*NA) miktarının 405 nm'de ölçülmesi esasına dayanır (Ozsavci ve ark., 2011).

Kaspaz-9 kolorimetrik analizi: Kaspaz-9 enzim aktivitesi ticari olarak satın alınmış olan kaspaz-9 deney kitinde belirtilen yöntem ile ölçüldü. Peptid substrat Ac-

LEHD-*p*NA kaspaz-9 tarafından parçalandıktan sonra serbest kalan pNA nın ortaya çıkarttığı renk şiddeti 405 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek kaspaz-9 aktivitesi hesaplandı (Ozsavci ve ark., 2011).

Kaspaz-8 kolorimetrik analizi: Kaspaz-8 enzim aktivitesi ticari olarak satın alınmış olan kaspaz-8 deney kitinde belirtilen yöntem ile ölçüldü. Peptid substrat Ac-IETD-*p*NA kaspaz-8 tarafından parçalandıktan sonra serbest kalan pNA nın ortaya çıkarttığı renk şiddeti 405 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek kaspaz-8 aktivitesi hesaplandı (Ozsavci ve ark., 2011).

3.12. İstatistik Hesaplamalar

Tezde formülleri verilen bileşiklerin ve yapısı aydınlatılan saf moleküllerin çiziminde ACD/Chemsketch programının ACD 2012 Free versiyonu kullanıldı. Antioksidan aktivite sonuçları 3 paralel testin ortalaması ± standart sapması olarak verildi. Test edilen maddelerin arasındaki farkın değerlendirilmesinde ve en küçük kareler yöntemi kullanılarak doğru denklemlerinin elde edilmesinde Graphpad Prism 5 Demo programı kullanıldı. Anlamlılık sınırı olarak $P<0,05$ kabul edildi.

3.13. Kromatografik Yöntemler

Bitkinin topraküstü kısmından elde edilen ve güçlü sitotoksik aktivite gösteren kloroform ekstresindeki maddelerin izolasyonu ve saflaştırılması için kolon kromatografisi (KK), ince tabaka kromatografisi (İTK) ve preparatif ince tabaka kromatografisi (pİTK) kullanıldı.

3.13.1 Kolon kromatografisi (KK)

Kolon kromatografisi saf madde izolasyonu için ekstreyi fraksiyonlara ayırmak için kullanıldı. Kolon kromatografisinden önce ekstreden uzun zincirli hidrokarbonlar, yağlar ve vaksları uzaklaştırmak amacıyla 15 g kloroform ekstresi 500 mL' lik balonda MeOH ile ultrasonik banyoda çalkalanarak çözüldü.

Elde edilen çözelti buzdolabında (+4 ^{o}C) 1 gün bekletildi. Ayrıca süzme işlemi için kullanmak üzere 500 mL MeOH de buzdolabında soğutuldu.. Metanolda bekletilen çözelti daha sonra amerikan bezinden süzüldü. Süzgeçteki çökelti soğutulan MeOH ile birkaç kez yıkandı. Elde edilen çözelti rotary evaporatörde 40-50 ^{o}C'de 300 mbar basınçta uçuruldu. Bu şekilde doymuş hidrokarbonlarından

kurtarılan ekstreye kolon kromatografisi uygulandı (Öztekin, 2010). Uygulama öncesi ekstre miktarının yaklaşık 40 katı kadar silika jel (Kieselgel 40 (0,2-0,5 mm) etüvde 100 ^{o}C'de 1 saat tutularak içindeki nemin uzaklaşması sağlandı. Ekstre oda sıcaklığında MeOH'de çözülerek bir miktar silika jel ile karıştırıldı ve toz haline gelinceye kadar havanda silika jel ile dövüldü. Böylelikle ekstrenin silika jel tarafından emilmesi sağlandı.

Boyu 140 cm, çapı 5,5 cm olan cam kolona ilk olarak silika jel doldurulduu ve kolon içindeki silika jelin üst tabakası düzleştirildikten sonra silika jel ve ekstre karışımı kolona doldurulduu. Bu tabaka da düzleştirildikten sonra kolonun en üstüne cam pamuğu yerleştirildi. Kolon kromatografisinde ayrımı yapılacak karışımlar önce ince tabaka kromatografisi ile incelendi. Buradan elde edilen sonuçlara göre kolon kromatografisinde uygulanacak çözücü sistemleri belirlendi.

3.13.2 İnce tabaka kromatografisi (İTK)

Çalışmamızın hemen her aşamasında, ekstre ve karışımların ön incelemelerinde, ayırma ve saflaştırma işlemlerinin çoğunda kullanılan bu ayırma tekniğinde hazır silika jel 60 F_{254} (Merck) alüminyum plaklar kullanıldı. Kolon kromatografisi sonucu elde edilen fraksiyonların birleştirilmesi ve izole edilen bileşiklerin saflığını kontrol etmek için bu plaklardan yararlanıldı. Ayrımı yapılacak karışım, plaklara tatbik edilip uygun çözücü sistemi ile yürütme tanklarında yürütüldü. Daha sonra yapılan ayrımın görülmesi için plaklar karanlık odada Camag marka UV lamba altında 254 nm ve 366 nm'de değerlendirildi.

Daha düşük dalga boylarında absorbans veren maddeler ise seryum sülfat belirteci sayesinde görünür kılındı. Seryum sülfat belirteci değerlendirme yapılacak plakanın üzerine püskürtüldü ve ardından hotplate üzerinde ısıtılarak UV ışıkta görünmeyen maddelerin görünmesi sağlandı.

İnce tabaka kromatografisinde kullanılan çözücü sistemleri literatürdeki veriler ve ayrımı yapılacak karışımın bu çözücü sistemlerine verdiği tepkiler doğrultusunda deneme yanılma ile bulundu. Ayrıca maddeleri saflaştırmak için preperatif ince tabaka kromatografisinden yararlanıldı.

3.14. Spektroskopik Yöntemler

Saf maddelerin yapılarının aydınlatılmasında kullanılan spektroskopik yöntemler ana başlıklar halinde aşağıda kısaca anlatıldı.

3.14.1 Ultraviyole spektroskopisi (UV/VIS)

UV/görünür bölge spektrometre cihazı (Shimadzu UV-1800), izole edilen bileşiklerden flavonoid yapısında olduğu tahmin edilen bileşiklerin yapılarının aydınlatılmasında kullanıldı.

Flavonoidlerin 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 ve metoksi gibi grupların yerleri belirlendi. Saf maddeler metanolde çözülerek referansa karşı 200–500 nm dalga boyları arasında UV spektrumları alındı. Flavonoidlerin yapılarının belirlenmesinde kullanılan kayma belirteçleri aşağıda kısaca anlatıldı.

Kayma belirteçleri ile flavonoidlerin UV spektrumlarının alınması

UV spektrumu alınacak flavonoidin absorbsiyon bantlarının 0,600 ile 0,800 arasında absorbans değerlerini verebilmesi için metanol ile flavonoidlerin 35 ppm'lik stok çözeltileri hazırlandı (Öztürk, 2008).

Sodyum metilat ($NaOCH_3$) belirteci ile UV spektrumunun alınması

Flavonoidlerin stok çözeltisinden 3 mL alınarak referansa karşı UV spektrumu alındı. Bu çözeltinin üzerine hazır alınan sodyum metilat (metanoldeki % 30'luk çözeltisi) çözeltisinden 3–5 damla ilave edilir edilmez hemen UV spektrumu alındı. 5 dakika sonra flavonoidlerin bozulup bozulmadığını anlamak için tekrar ölçüm yapıldı (Mabry ve ark., 1970).

Alüminyum klorür/hidrojen klorür belirteci ile UV spektrumunun alınması

Flavonoidlerin stok çözeltisinden 3 mL alınarak referansa karşı metanol spektrumu alındı. Daha sonra 6 damla alüminyum klorür çözeltisi eklendikten hemen sonra yeniden spektrum alındı. Bazı izoflavonların ve dihidroflavonollerin $AlCl_3$ reaktifi ile en iyi etkiyi yapabilmesi için 1 dakika gibi zamana ihtiyaç olduğundan 1

dakika sonra tekrar spektrum alındı. Daha sonra flavonoid ve $AlCl_3$ içeren çözeltiye seyreltik HCl'den 3–5 damla eklenerek UV spektrumu alındı (Mabry ve ark., 1970).

Sodyum asetat/borik asit belirteci ile UV spektrumunun alınması

Flavonoidlerin stok çözeltisinden 3 mL alınarak referansa karşı metanol spektrumu alındı. Bu çözeltiye sodyum asetatın aşırısı (küvette karıştırılarak dibe çöktükçe, 2 mm'lik tabaka oluşuncaya kadar) toz halinde eklendi ve yaklaşık 2 dakika sonra spektrum alındı. Beş dakika sonra, bozunmanın olup olmadığını anlamak için yeniden spektrum alındı. Bu çözeltiye susuz borik asit (ilk önce ilave edilen NaOAc'nın yarısı kadar) ilave edildikten sonra UV spektrumu alındı (Mabry ve ark., 1970).

3.14.2 Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR)

Kromatografik yöntemlerle saflaştırılan bileşiklerin yapı tayininde Bruker Avance III 500 MHz modeli nükleer manyetik rezonans spektrometrisi kullanıldı. NMR spektrumları Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde bulanan NMR ölçüm laboratuvarında Uzm. Pınar Çağlar tarafından çekildi. Maddenin yapısına bağlı olarak bir boyutlu ve iki boyutlu spektral yöntemler kullanıldı. Bunlardan tek boyutlu yöntemlerden; ^{1}H NMR, ^{13}C NMR , iki boyutlu yöntemlerden ise COSY (Correlation spectroscopy), HMBC (Heteronuclear multiple bond correlation), HMQC (Heteronuclear multiple quantum correlation) yöntemleri kullanıldı. NMR numunelerinde çözücü olarak döterokloroform ($CDCl_3$) ve döterometanol (CD_3OD) kullanıldı.

3.14.3 Kütle spektroskopisi (MS)

Kütle spektroskopisi maddelerin molekül ağırlıklarını ve fragment iyonlarını bulmak için kullanıldı. Maddelerin kütle spektrumları, Yıldız Teknik Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan elektrospray iyonlaşmalı kuadrupol uçuş zamanlı sıvı kromatografi kütle spektrometrisi (ESI-Q-TOF LC/MS) (Agilent technologies 6530) cihazı kullanılarak Uzman Kimya Mühendisi Elif Öztürek tarafından çekildi.

ESI-Q-TOF LC/MS Çalışma Şartları

Sıvı kromatografi kuadropol uçuş zamanlı kütle spektrometresi (Q-TOF-LC/MS) sisteminde (Agilent6530, CA, Amerika) elektrospray iyonlaştırıcı (ESI) kaynağı (G6530B modeli, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) kullanıldı. Analiz için negatif ve pozitif iyon modları kullanıldı ve kütle aralığı 100-1000 m/z'ye kadar çalışıldı. ESI-Q-TOF-LC/MS cihazında çalışma parametreleri şu şekilde optimize edildi: kapiler voltajı 3500 V, kurutucu gaz sıcaklığı 350 ^{o}C, kurutucu gaz akış hızı 8 L/dk, sprey gaz basıncı 2 bar ve son plak dengeleme -500 V'dur.

Mobil faz (A) su ve % 0,1'lik trifloroasetik asitten; mobil faz (B) ise asetonitril ve % 0,1'lik trifloroasetik asitten oluşmaktadır. Gradient programı olarak aşağıdaki sistem takip edildi (Halpine, 1996): 0 dak. % 5 B; 1 dak. % 5 B; 20 dak. % 30 B; 25 dak. % 60 B; 28 dak. % 60 B; 33 dak. % 95 B; 35 dak. % 95 B; 40 dak. % 5 B. Sisteme numune 20 μL enjekte edildi.

3.14.4 Kırmızı ötesi (Infrared) spektroskopisi (IR)

Saf maddelerin IR spektrumları, İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Eczacılık Fakültesi laboratuvarında bulunan Shimadzu FT-IR Affinity-1 spektrometresinde Öğr. Gör. Dr. Duygu Taşkın tarafından çekildi.

Saf maddeler uygun çözücü ile çözüldükten sonra IR spektrumları alındı. Infrared spektrometrisi kullanılarak maddelerin yapısında bulunan fonksiyonel gruplar belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. Fitokimyasal Ön Deneme Sonuçları

Achillea multifida bitkisinin topraküstü kısımları üzerine yapılan ön deneme sonuçları Tablo 7'de verildi.

Tablo 7. *A. multifida* bitkisinin fitokimyasal ön deneme sonuçları

Fitokimyasal ön denemeler		**+/-**
Antrasen türevleri		-
Flavon türevleri		+
Saponin türevleri		-
Tanen	Gallik Tanen	-
	Kateşik Tanen	+
Alkaloit	Dragendorff	-
	Bouchardat	-
	Mayer	-

4.2. Miktar Tayini Sonuçları

Achillea multifida bitkisinin topraküstü kısımları üzerine yapılan kül ve su miktar tayini sonuçları Tablo 8'de verildi.

Tablo 8. *A. multifida* bitkisinin miktar tayini sonuçları

Miktar Tayini	***A. multifida***
Kül	% 10
Su	% 11

4.3. *A. multifida* Bitkisinin Heptan, Kloroform ve Metanol Ekstrelerinin Fenolik Madde Miktar Tayin Sonuçları

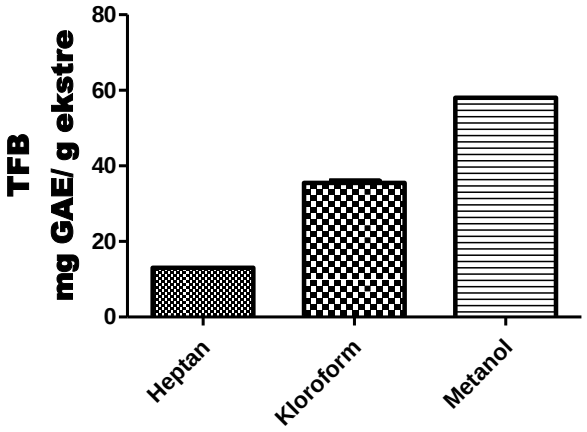
Heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin içerdikleri toplam fenolik madde miktarları, gallik asidin kalibrasyon eğrisinden elde edilen Y=18,78 X-0,0031 (R^2: 9855) doğru denklemi kullanılarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar mg gallik asit (mg GAE/g ekstre) eşdeğeri şeklinde Tablo 9 ve Şekil 13'de gösterildi. Ekstrelerin içerdikleri toplam fenolik madde miktarlarının sırası aşağıda verildi: metanol ekstresi > kloroform ekstresi > heptan ekstresi

Elde edilen sonuçlara göre *A. multifida* bitkisinin topraküstü kısmından hazırlanan metanol ekstresinin diğer ekstrelerden daha fazla toplam fenolik madde miktarı taşıdığı tespit edildi.

Tablo 9. *A. multifida* bitkisinin heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin toplam fenolik bileşikleri (TFB) (gallik asit ekivalanı olarak)

Ekstreler	**Toplam fenolik bileşikler (mg GAE/g ekstre)**
Heptan	13,00 ± 0,01
Kloroform	35,5 ± 0,7
Metanol	58,00 ± 0,01

Deneyler 3 kez tekrarlanarak değerlerin ortalamaları alındı ±SD (n=3)



Şekil 13. Heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin toplam fenolik madde içerikleri

4.4. *A.multifida* Bitkisinin Heptan, Kloroform ve Metanol Ekstrelerinin Antioksidan Aktivite Sonuçları

4.4.1 DPPH radikali giderme aktivite tayini

Heptan, kloroform ve metanol ekstrelerin serbest radikal yakalama etkinliği 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikali kullanılarak tayin edildi. Standart olarak askorbik asit ve BHT kullanıldı. Ekstrelerin ve standartların antioksidan aktiviteleri EC_{50} değerleri kıyaslanarak değerlendirildi. EC_{50} değeri çalışılan konsantrasyonlara karşı % serbest radikal giderme aktivite değerlerinin yerleştirilmesi ile elde edilen grafik kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar EC_{50} = mg/mL olarak Tablo 10 ve Şekil 14'de verildi. Ekstrelerin ve standartların DPPH radikalini giderme aktiviteleri aşağıda belirtilen sıra düzeninde tespit edildi.

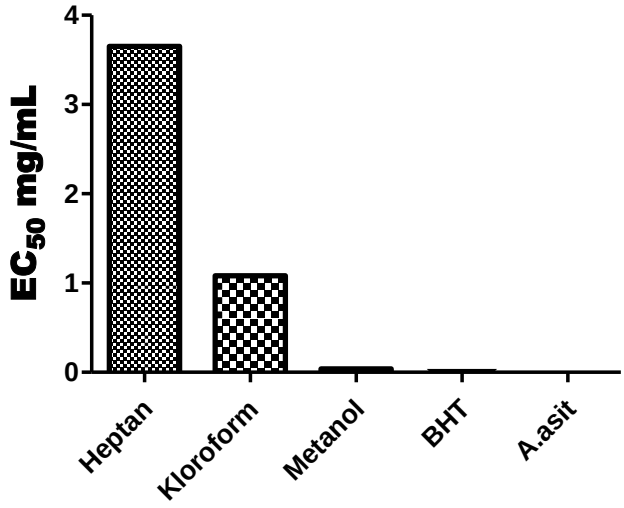
A.asit > BHT > metanol ekstresi > kloroform ekstresi > heptan ekstresi

EC_{50} değerleri ile antioksidan aktivite arasında ters bir orantının olduğu göz önüne alındığında, metanol ekstresinin heptan ve kloroform ekstresinden daha güçlü DPPH radikalini giderme aktivitesi gösterdiği tespit edildi.

Tablo 10. *A. multifida* bitkisinin heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin DPPH radikali giderme aktivitesi

Ekstreler/Standartlar	**EC_{50}= mg/mL**
Heptan	3,65±0,01
Kloroform	1,08 ± 0,04
Metanol	0,04±0,001
BHT	0,009± 0,001
Askorbik asit	0,003±0,002

Deneyler 3 kez tekrarlanarak değerlerin ortalamaları alındı ±SD (n=3)



Şekil 14. Heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin DPPH radikali giderme aktivitesi

4.4.2 ABTS katyon radikali giderme aktivite tayini

Heptan, kloroform, metanol ekstrelerin ve standart olarak kullanılan askorbik asitin ABTS katyon radikali giderme aktivitesi EC_{50} = mg/mL olarak Tablo 11 ve Şekil 15'de verildi. Ekstrelerin ve standartın ABTS katyon radikalini giderme aktiviteleri aşağıda belirtilen sıra düzeninde tespit edildi.

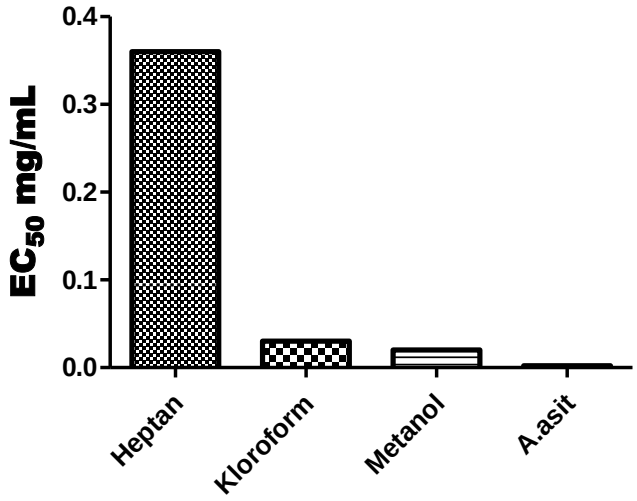
A.asit > metanol ekstresi > kloroform ekstresi > heptan ekstresi

Ekstrelerin ve standartın ABTS katyon radikali giderme aktivitesi kıyaslandığında, metanol ekstresinin heptan ve kloroform ekstresinden daha güçlü; askorbik asitten ise daha düşük aktivite gösterdiği saptandı.

Tablo 11. *A. multifida* bitkisinin heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin ABTS katyon radikali giderme aktivitesi

Ekstreler/Standart	**EC_{50}= mg/mL**
Heptan	0,36±0,01
Kloroform	0,03±0,001
Metanol	0,02±0,002
Askorbik asit	0,002±0,001

Deneyler 3 kez tekrarlanarak değerlerin ortalamaları alındı ±SD (n=3)



Şekil 15. Heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin ABTS katyon radikalini giderme aktivitesi

4.4.3 Demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü tayini (FRAP)

Heptan, kloroform, metanol ekstrelerinin ve standart olarak kullanılan askorbik asitin 0,2 mg miktarlarının demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü $FeSO_4$ grafiğinden elde edilen [absorbans = 0,8226 $FeSO_4$ (mM) - 0,03374 (R^2: 0,9940)] doğru denklemi kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar mM $FeSO_4$/0,2 mg ekstre olarak Tablo 12 ve Şekil 16'da verildi. Ekstrelerin ve askorbik asitin demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü aşağıda belirtilen sıra düzeninde saptandı.

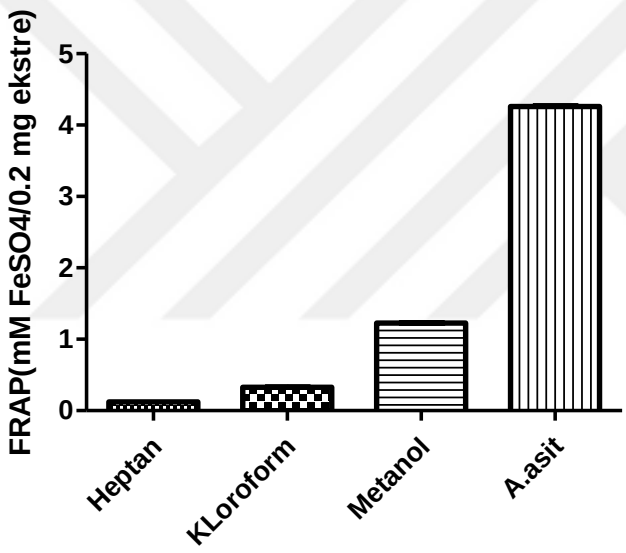
A.asit > metanol ekstresi > kloroform ekstresi > heptan ekstresi

Ekstrelerin ve standartın FRAP değerleri kıyaslandığında, metanol ekstresinin diğer ekstrelerden daha güçlü demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü gösterdiği fakat askorbik asitten daha düşük aktivite gösterdiği tespit edildi.

Tablo 12. *A. multifida* bitkisinin heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü

Ekstreler/Standart	**FRAP (**mM $FeSO_4$/0,2 mg ekstre)
Heptan	0,120±0,001
Kloroform	0,330±0,002
Metanol	1,230±0,005
Askorbik asit	4,260±0,002

Deneyler 3 kez tekrarlanarak değerlerin ortalamaları alındı ±SD (n=3)



Şekil 16. Heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin FRAP değerleri

4.4.4 Metal kelatı oluşturma aktivitesi

Heptan, kloroform, metanol ekstrelerinin ve standart olarak kullanılan EDTA'nın 200 µg miktardaki metal kelatı oluşturma yüzdeleri Tablo 13 ve Şekil 17'de verildi. Ekstrelerin ve standartın metal kelatı oluşturma aktiviteleri aşağıda belirtilen sıra düzeninde tespit edildi.

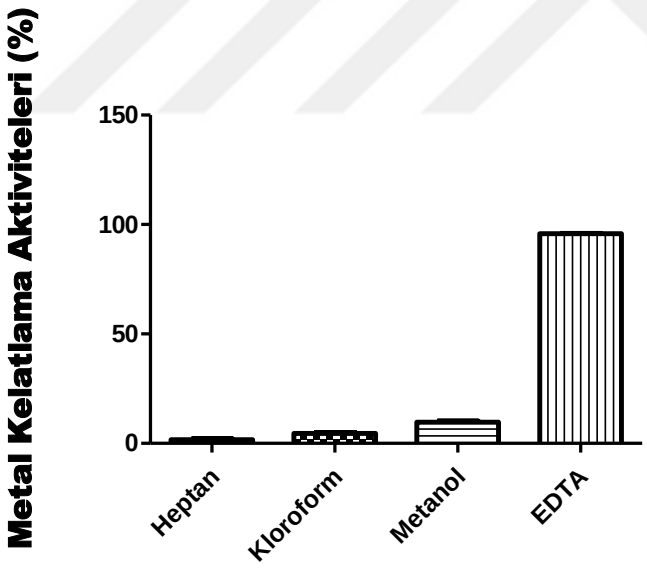
EDTA > metanol ekstresi > kloroform ekstresi > heptan ekstresi

Elde edilen sonuçlar kıyaslandığında, metanol ekstresinin diğer ekstrelerden daha güçlü fakat standart olarak kullanılan EDTA'dan ise daha düşük metal kelatı oluşturma aktivitesi gösterdiği saptandı.

Tablo 13. *A.multifida* bitkisinin heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin metal kelatı oluşturma aktivite yüzdeleri

Ekstreler/Standart	**Metal kelatı oluşturma aktivite yüzdeleri**
Heptan	1,68±0,60
Kloroform	4,58±0,50
Metanol	9,67±0,80
EDTA	95,78±0,20

Deneyler 3 kez tekrarlanarak değerlerin ortalamaları alındı ±SD (n=3)



Şekil 17. Heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin metal kelatlama aktiviteleri (%)

4.5. Antioksidan Kapasite Yöntemleri ile Toplam Fenolik Madde Miktarları Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi

Bitkinin topraküstü kısımlarından hazırlanan heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin içerdiği toplam fenolik madde miktarları (TFM) ile antioksidan kapasite yöntemleri arasındaki ilişkinin regresyon denklemi ve korelasyon katsayısının karesi Tablo 14'de verildi. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde metal kelatlama (R^2: 0,9743) ve ABTS katyon radikali giderici aktivite (R^2: 0,9520) yöntemleri ile toplam fenolik madde miktarları arasında iyi bir korelasyonun olduğu tespit edildi.

Tablo 14. Toplam fenolik madde miktarları ile antioksidan kapasite yöntemleri arasındaki ilişki

Kimyasal parametreler	R^2	Denklem
TFM ve DPPH	0,8172	Y= 0,6775 X-52,26
TFM ve ABTS	0,9520	Y= 0,3684 X+25,87
TFM ve metal kelatlama	0,9743	Y= 20,18 X-2,813
TFM ve FRAP	0,8833	Y= 0,0135 X-0,2167

4.6. *A.multifida* Bitkisinin Heptan, Kloroform ve Metanol Ekstrelerinin Antimikrobial Aktivite Sonuçları

A. multifida bitkisinin topraküstü kısmından elde edilen heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 suşlarına karşı antibakteriyal aktivite gösterdiği saptandı. Bu çalışmada ekstrelerin gram negatif bakterilere karşı bir etki göstermediği tespit edildi. Metanol ekstresinin *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (MİK:31,25 µg/ml), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (MİK:31,25 µg/ml), *Escherichia coli* ATCC 25922 (MİK:31,25 µg/ml) ve *Proteus vulgaris* ATCC 13315 (MİK:62,5 µg/ml) suşlarına karşı antibakteriyal aktivite gösterdiği saptandı.

Heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii* KUEN, *Candida tropicalis* KUEN, *Candida parapsilosis* ve *Candida krusei* suşlarına karşı bir etki göstermediği tespit edildi. Ekstrelerin ve standart olarak kullanılan antibiyotik ve antifungal ilaçların MİK değerleri Tablo 15 ve Tablo 16'da verildi.

Tablo 15. *A.multifida* bitkisinin heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin antibakteriyal aktiviteleri

Bakteriler	**Heptan**		**Kloroform**		**Metanol**		**Meropenem (10 µg/oluk)**	
	Zon çapı (mm)	MİK (µg/ml)	Zon çapı (mm)	MİK (µg/ml)	Zon çapı (mm)	MİK (µg/ml)	Zon çapı (mm)	MİK (µg/ml)
Staphylococcus aureus ATCC 25923	7	15, 625	6	7812,5	11	31,250	32	< 0, 125
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	4	250, 00	7	7812,5	11	31,250	38	< 0,125
Escherichia coli ATCC 25922	-		-		2	31,250	27	< 0, 125
Proteus vulgaris ATCC 13315	-		-		2	62,50	24	16
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	-		-		-		23	< 0,125
Klebsiella pneumoniae ATCC 4352	-		-		-		22	< 0, 125

MİK:Minimal inhibitör konsantrasyon; **(-):** İnhibisyon yok.

Tablo 16. *A.multifida* bitkisinin heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin antifungal aktiviteleri

Mayalar	**Heptan**		**Kloroform**		**Metanol**		**Flukonazol (10 µg/oluk)**	
	Zon çapı (mm)	MİK (µg/ml)	Zon çapı (mm)	MİK (µg/ml)	Zon çapı (mm)	MİK (µg/ml)	Zon çapı (mm)	MİK (µg/ml
Candida albicans ATCC 90028	-		-		-		22	640
Candida glabrata ATCC 90030	-		-		-		16	40
Candida guilliermondii KUEN 998	-		-		-		19	10
Candida tropicalis KUEN 1021	-		-		-		14	40
Candida parapsilosis ATCC 90018	-		-		-		36	10
Candida krusei ATCC 6258	-		-		-		9	160

MİK:Minimal inhibitör konsantrasyon; **(-):** İnhibisyon yok.

4.7. *A. multifida* Bitkisinin Heptan, Kloroform ve Metanol Ekstrelerinin Sitotoksik Aktivite Sonuçları

A. multifida bitkisinin topraküstü kısımlarından hazırlanan heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin sitotoksik aktiviteleri, insan kolon kanser hücre hattı HT-29 (ATCC, HTB-38), meme kanser hücre hattı MCF-7 (ATCC, HTB-38), insan serviks kanser hücre hattı HeLa (ATCC, CCL-2) ve fare embriyonik fibroblast hücre hattı olan NIH/3T3 (ATCC, CRL-1658) üzerinde MTT yöntemiyle incelendi.

Heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin 100 µg/mL konsantrasyonda, kanserli hücreler üzerindeki sitotoksik aktiviteleri Tablo 17' de verildi.

Tablo 17. *A.multifida* bitkisinin heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin kanserli hücre hatları üzerindeki inhibisyon oranlar (%)

Ekstreler (100 µg/mL)	**MCF-7**	**HeLa**	**HT-29**
Heptan	13,29±8,10	46,19±1,1	26,13±10,14
Kloroform	45,35±5,05	67,60±2,01	58,03±5,95
Metanol	5,85±2,87	13,08±8,60	-20,53±5,70

Kloroform ekstresinin HeLa (67,60±2,01) hücre hattına güçlü ve seçici; HT-29 (58,03±5,95) hücre hattına orta şiddette; MCF-7 (45,35±5,05) hücre hatlarına ise düşük sitotoksik aktivite gösterdiği saptandı. Heptan ekstresinin HeLa (46,19±1,1), HT-29 (26,13±10,14) ve MCF-7 (13,29±8,10) hücre hattlarına düşük sitotoksik aktivite gösterdiği tespit edildi. Metanol ekstresinin, HeLa (13,08±8,6) ve MCF-7 (5,85±2,87) hücre hatlarına düşük sitotoksik aktivite göstermesine rağmen HT-29 (-20,53±5,70) hücre hattına ise sitotoksik aktivite göstermediği saptandı.

Bitkiden hazırlanan bu ekstrelerin sitotoksik aktivite (özellikle kloroform ekstresinin) göstermesinden dolayı bu ekstrelerin gelecekte bitkisel kaynaklı ilaç üretimine yarar sağlayıp sağlamayacağını araştırmak amacıyla 200 µg/mL, 100 µg/mL ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda normal hücre (NIH/3T3) hattı üzerindeki toksik etkileri incelendi ve elde edilen sonuçlar Tablo 18'de verildi.

Tablo 18. *A. multifida* bitkisinin heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin normal hücre (NIH/3T3) çoğalması üzerine etkisi (%)

Konsantrasyon	Heptan ekstresi	Kloroform ekstresi	Metanol ekstresi
200 µg/mL	143,29	32,15	112,89
100 µg/mL	123,83	67,34	109,19
50 µg/mL	121,62	100,74	110,64

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde daha önce 100 µg/mL konsantrasyonda kanserli hücreler üzerine sitotoksik etki gösteren kloroform ekstresinin, 100 µg/mL ve 50 µg/mL konsantrasyonda normal hücre (NIH/3T3) hattı üzerine toksik etki göstermediği saptandı. 100 µg/mL ve 50 µg/mL konsantrasyonlardaki kloroform ekstresinin daha farklı normal hücreler üzerine toksiteleri incelendikten sonra bu ekstrenin özellikle gelecekte anti-kanser amaçla hazırlanabilecek bitkisel kaynaklı ilaç üretimine yararlı olabileceği düşünülmektedir.

Ayrıca heptan ve kloroform ekstrelerine göre güçlü antioksidan ve antibakteriyal etki gösteren metanol ekstresinin, 200 µg/mL, 100 µg/mL ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda NIH/3T3 hücre hattı üzerine toksik etki göstermemesi özellikle bu ekstrenin daha farklı normal hücre hatlarında sitotoksik aktiviteleri incelendikten sonra bu ekstrenin, gelecekte antioksidan ve antibakteriyal etkili hazırlanabilecek bitkisel kaynaklı ilaç üretimine yararlı olabileceği düşünülmektedir.

4.8. *A.multifida* Bitkisinin Kloroform Ekstresinin (AMK) Fraksiyonlandırılması

A.multifida bitkisinin topraküstü kısmından hazırlanan heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin insan meme kanser hücresi MCF-7, kolon kanser hücresi HT-29 ve insan serviks kanser hücre hattı olan HeLa hücrelerinde sitotoksik aktiviteleri incelendi ve kloroform ekstresinin diğer ekstrelerden daha güçlü sitotoksik aktivite gösterdiği tespit edildi. Bundan dolayı madde izolasyonuna kloroform ekstresi üzerinden devam edildi. Kloroform ekstresi silika jel içeren kolonda fraksiyonlandırıldı.

Kolon kromatografisi ile yapılan kaba ayırmada, hekzan–kloroform–metanol elüsyonu ile 28 fraksiyon elde edildi. Tablo 19'da kaba ayırmada kullanılan çözücü sistemleri ve elde edilen fraksiyonlar verildi.

Tablo 19. AMK ekstresine yapılan kaba ayırmada kullanılan çözücü sistemleri ve elde edilen fraksiyonlar

Fraksiyon Numarası	**Mobil Faz**	**Mobil Faz Miktarı**
1-4	Hekzan	1000 mL
5-8	1 Kloroform / 3 Hekzan	1000 mL
9-12	1 Kloroform / 1 Hekzan	1000 mL
13-16	Kloroform	1000 mL
17-20	1 Metanol / 3 Kloroform	1000 mL
21-24	1 Metanol / 1 Kloroform	1000 mL
25-28	Metanol	1000 mL

Kaba ayırım sonucunda elde edilen 28 fraksiyon ince tabaka kromatogafisi ile incelendi, benzer olan fraksiyonlar birleştirildi ve 9 fraksiyon adı altında isimlendirildi.

Tablo 20. AMK ekstresine yapılan kaba ayırma sonucunda birleştirilen fraksiyonlar

AM: *Achillea multifida*	
Fraksiyon Numarası	**Fraksiyon Adı**
1-2	AM-I
3-5	AM-II
6-8	AM-III
9-14	AM-IV
15	AM-V
16-18	AM-VI

19-20	AM-VII
21-24	AM-VIII
25-28	AM-IX

4.9. AMK Ekstresinden Elde Edilen Fraksiyonların Sitotoksik Aktivite Sonuçları

Kolon kromatografisi sonucunda benzer olan fraksiyonların birleştirilerek elde edilen 9 fraksiyonun, ayrı ayrı olarak 100 µg/mL konsantrasyonlarda insan meme kanser hücresi MCF-7, kolon kanser hücresi HT-29 ve insan serviks kanser hücre hattı olan HeLa hücrelerinde sitotoksik aktiviteleri incelendi. Elde edilen sonuçlar Tablo 21'de verildi.

Tablo 21. AMK ekstresinden elde edilen fraksiyonların kanserli hücre hatları üzerine sitotoksik aktiviteleri (%)

Hücre hatları	AM-I	AM-II	AM-III	AM-IV	AM-V	AM-VI	AM-VII	AM-VIII	AM-IX
HeLa	22,04	26,18	51,58	73,88	14,66	51,89	52,33	9,65	6,44
MCF-7	9,06	33,66	85,52	86,16	10,59	62,79	73,67	15,77	9,36
HT-29	10,7	43,24	82,19	92,75	-40,76	71,42	74,3	13,57	6,65

Elde edilen sonuçlara göre AM-III, AM-IV, AM-VI ve AM-VII fraksiyonlarının diğer fraksiyonlara göre kanserli hücre hatları üzerinde daha yüksek sitotoksik aktivite gösterdiği tespit edildi. Kanserli hücre hatları üzerine güçlü aktivite gösteren bu ekstrelerin miktarları Tablo 22'de verildi.

Tablo 22. AM-III, AM-IV, AM-VI ve AM-VII fraksiyonlarının miktarları

Fraksiyon adı	**Fraksiyon miktarı (g)**
AM-III	0,6856
AM-IV	0,2191
AM-VI	2,7239

AM-VII	11, 2183

AM-III, AM-IV, AM-VI ve AM-VII fraksiyonlarının kanserli hücre hatları üzerine gösterdiği sitotoksik aktivite sıra düzenleri aşağıda verildi.

HeLa hücre hattında; AM-IV > AM-VII > AM-VI > AM-III

MCF-7 hücre hattında; AM-IV > AM-III > AM-VII> AM-VI

HT-29 hücre hattında; AM-IV > AM-III > AM-VII> AM-VI

Kanserli hücre hatları üzerine diğer fraksiyonlardan daha yüksek sitotoksik aktivite gösteren bu 4 fraksiyonun, ekstre bazında gelecekte bitkisel kaynaklı ilaç üretimine yarar sağlayıp sağlamayacağını araştırmak amacıyla bu fraksiyonların farklı konsantrasyonlarda normal hücre hattı (NIH/3T3) üzerindeki sitotoksik etkisi incelendi ve sonuçlar canlı kalan hücre oranları (%) olarak Tablo 23'de verildi.

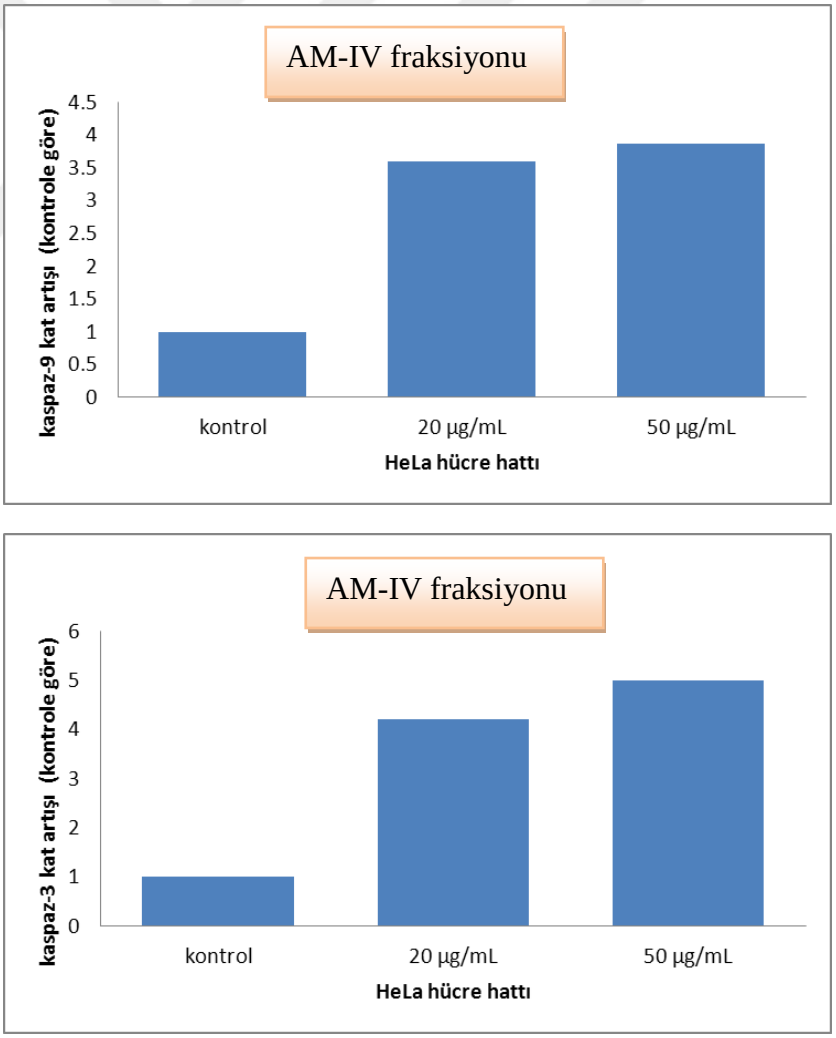
Tablo 23. AM-III, AM-IV, AM-VI ve AM-VII fraksiyonlarının NIH/3T3 hücresinin çoğalması üzerine etkisi (%)

Fraksiyonlar	**50 µg/mL**	**100 µg/mL**	**200 µg/mL**
AM-III	60,62	30,56	19,15
AM-IV	51,33	31,91	14,78
AM-VI	77,19	61,85	33,79
AM-VII	133,48	91,94	63,31

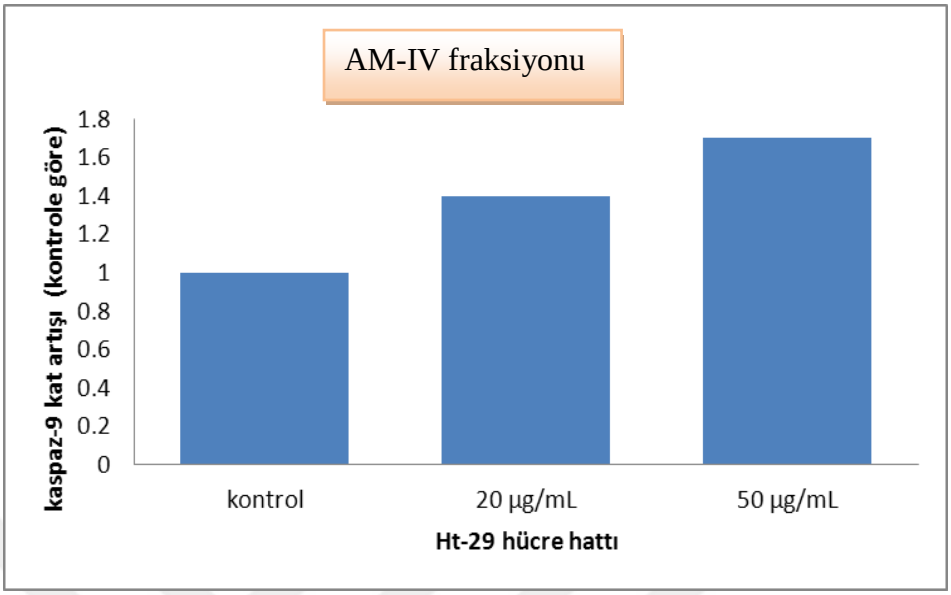
Elde edilen sonuçlar incelendiğinde AM-VII kodlu fraksiyonun 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarda, AM-VI kodlu fraksiyonun ise 100 µg/mL konsantrasyonda normal hücre hattı üzerinde toksik etki göstermediği tespit edildi. Ayrıca tabloda belirtilen bütün ekstrelerin 50 µg/mL konsantrasyonda normal hücre hattı üzerine herhangi bir toksik etki göstermemesi gelecekte bu ekstrelerin, bitkisel kaynaklı ilaç üretimine yarar sağlayabileceğini düşündürmektedir.

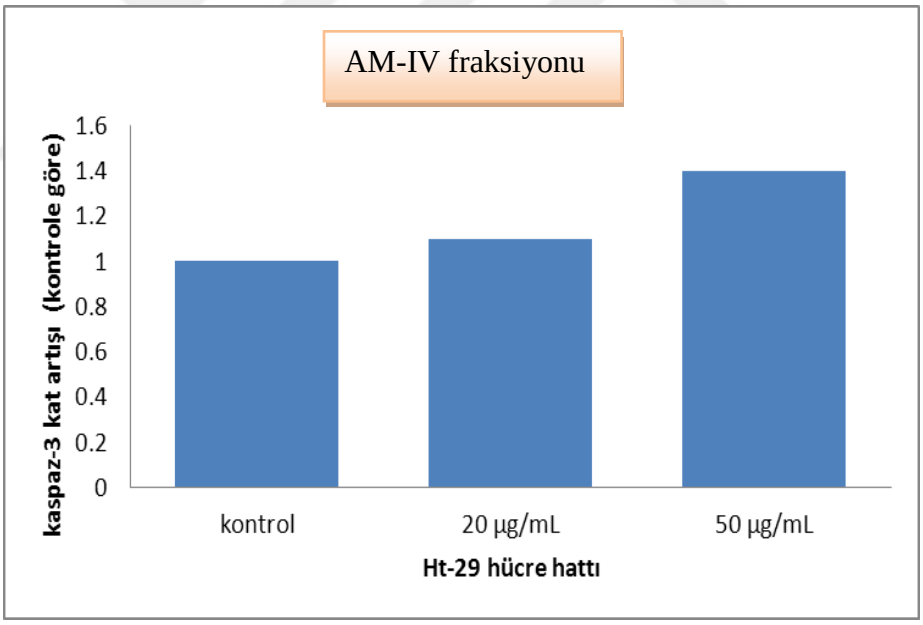
4.10. AM-IV Fraksiyonunun Kaspazlar Üzerine Etkisinin Sonuçları

AM-IV fraksiyonunun AM-III, AM-VI ve AM-VII fraksiyonlarından daha güçlü sitotoksik aktivite göstermesi ve 50 µg/mL konsantrasyonda normal hücre hattı üzerine herhangi bir toksik etki göstermemesinden dolayı bu fraksiyonun olası etki mekanizması aydınlatıldı. Bu çalışmanın sonucunda AM-IV fraksiyonunun kaspaz-9 ve kaspaz-3 seviyelerini arttırdığı saptandı. Bu ekstrenin HeLa ve HT-29 hücre hattı üzerindeki etkisini apoptotik iç yolağın (mitokondrinin görev aldığı iç yolak) aktivitasyonunu indükleyerek gerçekleştirdiği tespit edildi. Ayrıca bu ekstrenin kaspaz-8, kaspaz-9 ve kaspaz-3 seviyelerini arttırdığı belirlendi ve MCF-7 hücre hattı üzerindeki etkisini her iki apoptotik yolağın (mitokondrinin görev aldığı iç yolak; ölüm reseptörleri ile gerçekleşen dış yolak) aktivitasyonunu indükleyerek gerçekleştirdiği tespit edildi.

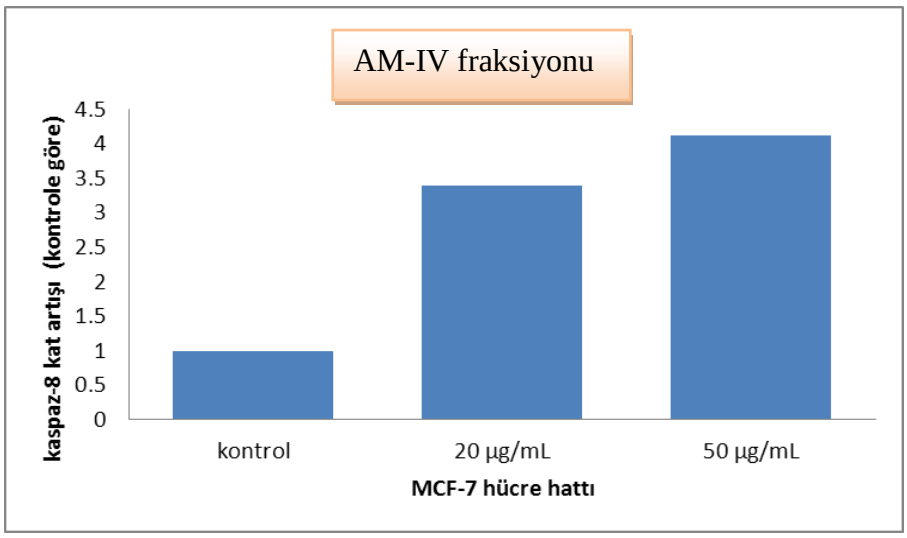


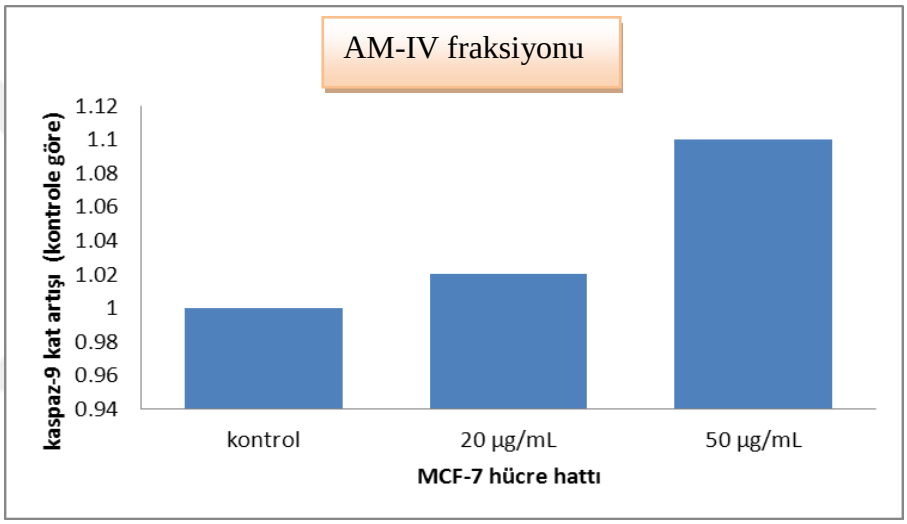
Şekil 18. AM-IV fraksiyonunun HeLa hücre hattı üzerine olası etki mekanizması

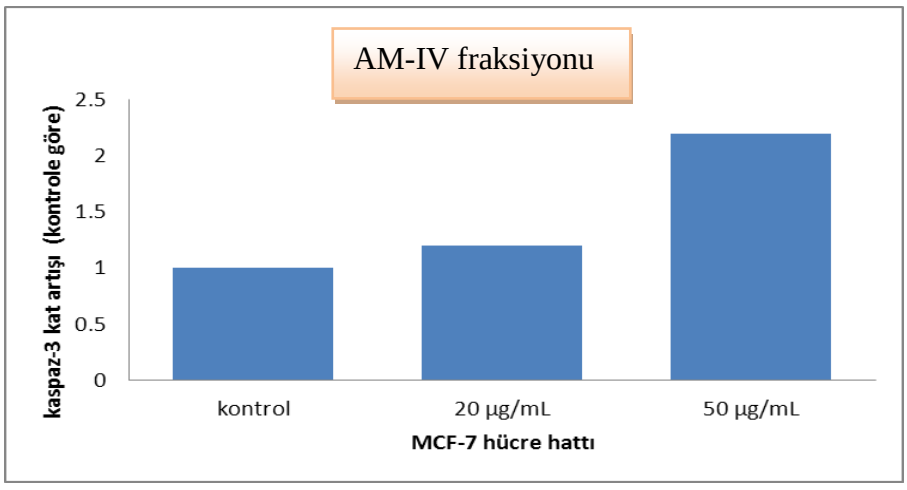




Şekil 19. AM-IV fraksiyonunun HT-29 hücre hattı üzerine olası etki mekanizması







Şekil 20. AM-IV fraksiyonunun MCF-7 hücre hattı üzerine olası etki mekanizması

4.11. AM-III, AM-IV, AM-VI ve AM-VII Fraksiyonlarının Antioksidan Aktivite Sonuçları

AM-III, AM-IV, AM-VI ve AM-VII fraksiyonlarının 50 µg/mL konsantrasyonda normal hücre hattı üzerine herhangi bir toksik etki göstermemesi gelecekte bu fraksiyonların doğal bir antioksidan kaynağı olarak bitkisel ilaç üretimine yararlı olup olmayacağını araştırmak ve kloroform ekstresi ile bu ekstreden elde edilen altekstrelerinin antioksidan aktivitelerini karşılaştırmak amacıyla bu fraksiyonların antioksidan aktiviteleri incelendi. Bu çalışmanın sonucunda AM-IV fraksiyonunun kloroform ekstresinden daha güçlü antioksidan aktivite gösterdiği tespit edildi.

4.11.1 DPPH radikali giderme aktivite tayini

Kloroform ekstresinden sütun kromatografisi sonucunda elde edilen ve sitotoksik aktivite gösteren AM-III, AM-IV, AM-VI ve AM-VII kodlu ekstrelerin serbest radikal yakalama etkinliği 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikali kullanılarak tayin edildi. Standart olarak askorbik asit kullanıldı.

Ekstrelerin ve standartın antioksidan aktiviteleri, EC_{50} değerleri kıyaslanarak değerlendirildi. EC_{50} değeri çalışılan konsantrasyonlara karşı % serbest radikal giderme aktivite değerlerinin yerleştirilmesi ile elde edilen grafik kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar EC_{50} = mg/mL olarak Tablo 24 ve Şekil 21'de verildi. Ekstrelerin ve standartın DPPH radikalini giderme aktivite sıra düzenleri aşağıda verildi.

A.asit > AM-IV > AM-III > AM-VI > AM-VII

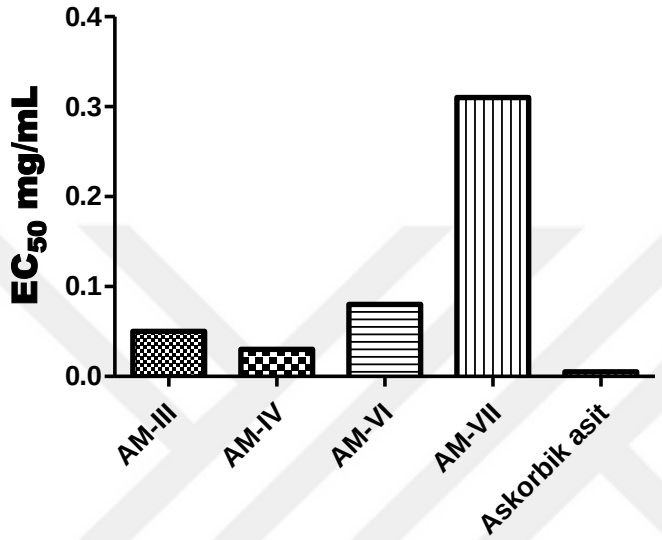
EC_{50} değerleri ile antioksidan aktivite arasında ters bir orantının olduğu göz önüne alındığında, AM-IV ekstresinin diğer ekstrelerden daha güçlü DPPH radikalini giderme aktivitesi gösterdiği tespit edildi.

Tablo 24. AM-III, AM-IV, AM-VI ve AM-VII fraksiyonlarının DPPH radikalini giderme aktivitesi

Fraksiyonlar	**EC_{50}= mg/mL**
AM-III	0,05±0,001
AM-IV	0,03±0,002

AM-VI	0,08±0,001
AM-VII	0,31±0,01
Askorbik asit	0,005±0,003

Deneyler 3 kez tekrarlanarak değerlerin ortalamaları alındı ±SD (n=3)



Şekil 21. AM-III, AM-IV, AM-VI ve AM-VII fraksiyonlarının DPPH radikalini giderme aktivitesi

4.11.2 ABTS katyon radikali giderme aktivite tayini

AM-III, AM-IV, AM-VI ve AM-VII kodlu fraksiyonların ve standart olarak kullanılan askorbik asitin ABTS katyon radikali giderme aktivitesi EC_{50} = mg/mL olarak Tablo 25 ve Şekil 22'de verildi. Fraksiyonların ve standartın ABTS katyon radikalini giderme aktivite sıra düzenleri aşağıda verildi.

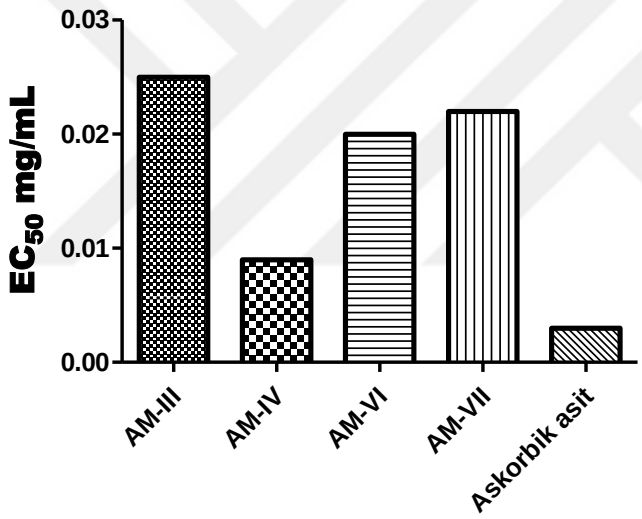
A.asit > AM-IV > AM-VI > AM-VII > AM-III

Fraksiyonların ve standartın ABTS katyon radikalini giderme aktivitesi kıyaslandığında, AM-IV fraksiyonunun diğer fraksiyonlardan daha güçlü fakat standart olarak kullanılan askorbik asitten ise daha düşük aktivite gösterdiği saptandı.

Tablo 25. AM-III, AM-IV, AM-VI ve AM-VII fraksiyonlarının ABTS katyon radikalini giderme aktivitesi

Fraksiyonlar	**EC_{50}= mg/mL**
AM-III	0,025±0,09
AM-IV	0,009±0,02
AM-VI	0,020±0,04
AM-VII	0,022±0,01
Askorbik asit	0,003±0,05

Deneyler 3 kez tekrarlanarak değerlerin ortalamaları alındı ±SD (n=3)



Şekil 22. AM-III, AM-IV, AM-VI ve AM-VII fraksiyonlarının ABTS katyon radikalini giderme aktivitesi

4.11.3 Demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü tayini (FRAP)

AM-III, AM-IV, AM-VI ve AM-VII kodlu fraksiyonların ve standart olarak kullanılan askorbik asitin 100 µg miktardaki demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü $FeSO_4$ grafiğinden elde edilen [absorbans = 0,8226 $FeSO_4$ (mM) - 0,03374 (R^2: 0,9940)] doğru denklemi kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar mM $FeSO_4$ /100 µg ekstre olarak Tablo 26 ve Şekil 23'de verildi. Fraksiyonların ve standartın demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü aşağıda verildiği gibidir.

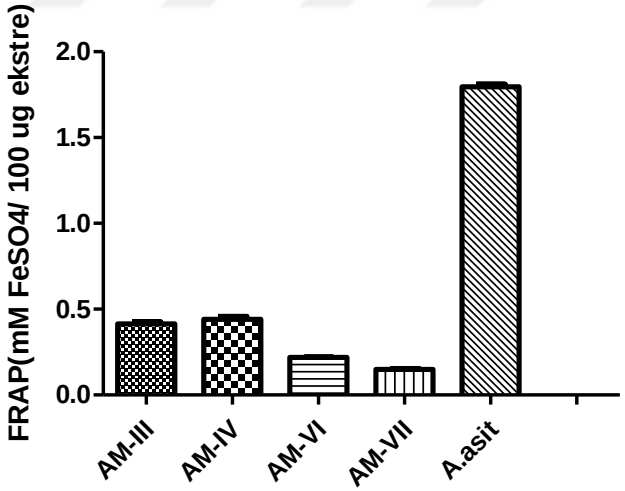
A.asit > AM-IV > AM-III > AM-VI > AM-VII

Fraksiyonların ve standartın FRAP değerleri kıyaslandığında AM-IV fraksiyonunun, diğer fraksiyonlardan daha güçlü aktivite gösterdiği fakat askorbik asitten ise daha düşük aktivite gösterdiği tespit edildi.

Tablo 26. AM-III, AM-IV, AM-VI ve AM-VII fraksiyonlarının demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü

Fraksiyonlar	**FRAP (**mM $FeSO_4$/100 µg ekstre)
AM-III	0,41±0,01
AM-IV	0,44±0,02
AM-VI	0,22±0,001
AM-VII	0,15±0,007
Askorbik asit	1,80±0,03

Deneyler 3 kez tekrarlanarak değerlerin ortalamaları alındı ±SD (n=3)



Şekil 23. AM-III, AM-IV, AM-VI ve AM-VII fraksiyonlarının FRAP değerleri

4.12. AM-VII Fraksiyonundan Madde İzolasyonu

100 µg/mL konsantrasyonda kanserli hücre hatlarında sitotoksik aktivite gösterip fakat aynı konsantrasyonda normal hücre hattı üzerine toksik etki göstermeyen ve diğer ekstrelerden daha fazla miktarda olan AM-VII ve AM-VI kodlu

fraksiyonlarından madde izolasyonuna başlandı. AM-VII ekstresi üzerinde yapılan ince tabaka kromatografisi (İTK) sonuçları doğrultusunda bu ekstreye preparatif ince tabaka kromatografisi (pİTK) uygulandı. Çözücü sistemi olarak 7 toluen-3 etilasetat-1 metanol kullanıldı. piTK'da P-1, P-2, P-3, P-4, P-5, P-6, P-7, P-8, P-9 ve P-10 kodlu 10 bant elde edildi. P-7 kodlu bant üzerine yapılan İTK sonuçları doğrultusunda bu banta 7 toluen-3 etilasetat-1 metanol çözücü sistemi kullanılarak tekrar preparatif ince tabaka kromatografisi uygulandı ve P-7.1 ve P-7.2 kodlu iki bant elde edildi. P-7.1 kodlu banttan elde edilen bileşik **A (T7)** bileşiği (5,8 mg) ve P-7.2 kodlu banttan elde edilen bileşik **B (T7-1)** bileşiği (13,4 mg) olarak adlandırıldı. Ayrıca P-6 kodlu banttan elde edilen bileşik **C (T6)** bileşiği (7,5 mg) olarak adlandırıldı. Daha sonra elimizde bulunan 6 g AM-VII ekstresine Kieselgel 60 (0,063-0,02 mm) silika kullanılarak kolon kromatografisi uygulandı. Elde edilen fraksiyonlar ve kullanılan çözücü sistemleri Tablo 27'de gösterildi.

Tablo 27. AM-VII ekstresinden elde edilen fraksiyonlar

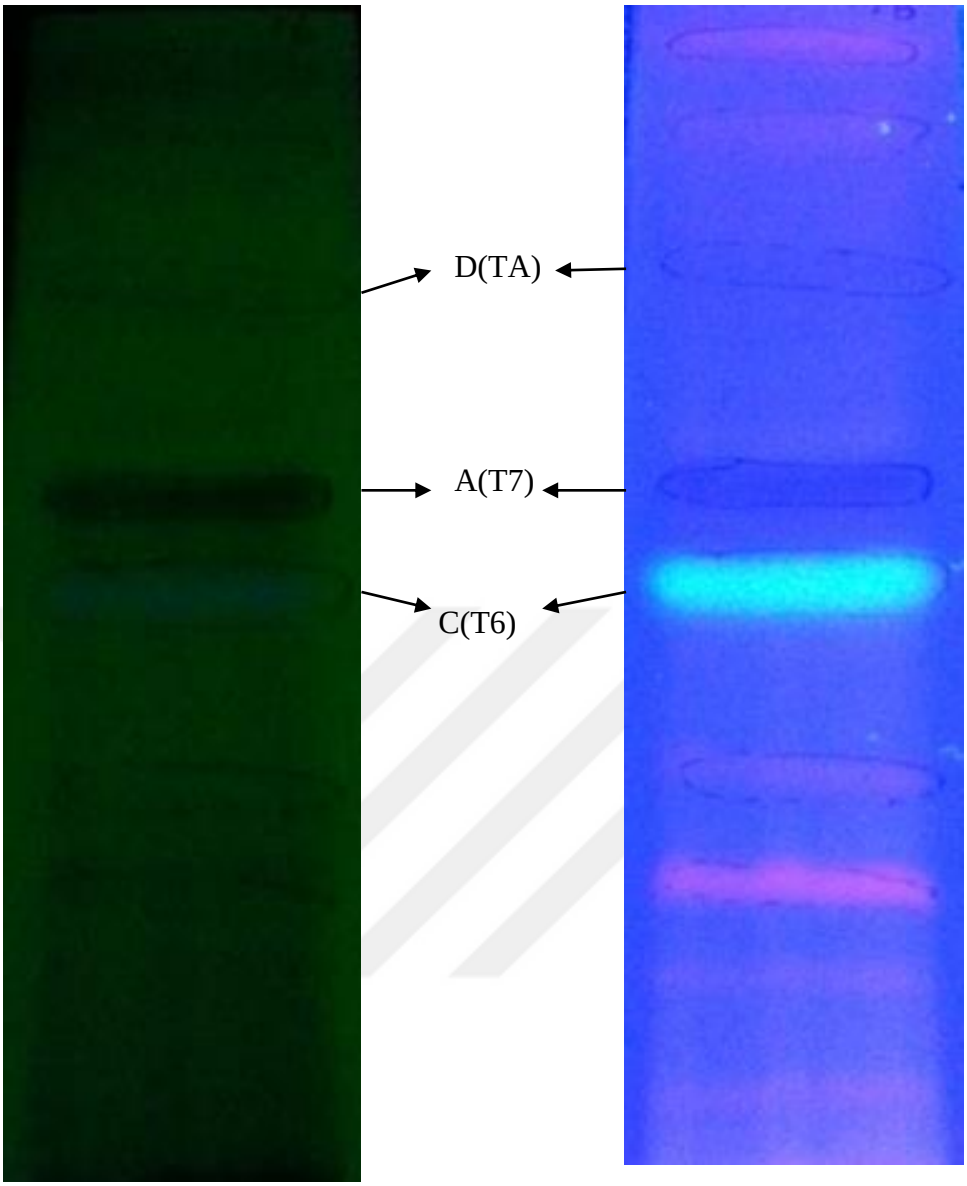
Fraksiyon Numarası	Mobil Faz	Mobil Faz Miktarı
1-4	Toluen	1000 mL
5-8	9 Toluen / 1 Etil asetat	1000 mL
9-12	3 Toluen / 1 Etil asetat	1000 mL
13-16	1 Toluen / 1 Etil asetat	1000 mL
17-20	Etil asetat	1000 mL
21-24	9 Etil asetat / 1 Metanol	1000 mL
25-28	1 Etil asetat / 1 Metanol	1000 mL
29-37	Metanol	2000 mL

Yapılan ince tabaka kromatogafisi çalışmaları sonucunda benzer olan fraksiyonlar birleştirildi ve 10 fraksiyon adı altında isimlendirildi. Birleştirilen fraksiyonlar ve isimleri Tablo 28'de verildi.

Tablo 28. AM-VII ekstresine uygulanan kolon kromatografisi sonucunda birleştirilen fraksiyonlar

Fraksiyon Numarası	**Fraksiyon Adı**
1-4	AM-VII-1
5-9	AM-VII-2
10-11	AM-VII-3
12-13	AM-VII-4
14-16	AM-VII-5
17-19	AM-VII-6
20-21	AM-VII-7
22-25	AM-VII-8
26-30	AM-VII-9
31-37	AM-VII-10

AM-VII-3 ve AM-VII-4 ekstrelerine toluen:etil asetat (5:2) sisteminde preparatif ince tabaka kromatografisi yapılarak P-3.1, P-3.2, P-3.3, P-3.4 ve P-4.1, P-4.2, P-4.3, P-4.4, P-4.5, P-4.6 kodlu ayrı ayrı bantlar elde edildi. P-3.3 ve P-4.4 kodlu bantlar benzer oldukları için birleştirildi ve elde edilen bu bileşik **D (TA)** bileşiği (4,9 mg) olarak adlandırıldı. Ayrıca P-4.3 kodlu banta toluen:etil asetat:metanol (7:3:1) sisteminde pİTK yapılarak P-4.3.1 ve P-4.3.2 kodlu iki bant elde edildi. P-4.3.1 kodlu bantan elde edilen bileşik **E (TK)** bileşiği (3,6 mg) olarak adlandırıldı.



7 Toluen: 3 EA: 1MeOH 7 Toluen: 3 EA: 1MeOH

254 nm 366 nm

Resim 2. AM-VII ekstresinin toluen:etilasetat:metanol (7:3:1) çözücü sisteminde yürütüldükten sonra 254 nm ve 366 nm UV ışık altındaki İTK kromatogramları

4.13. AM-VI Fraksiyonundan Madde İzolasyonu

AM-VI fraksiyonu üzerinde yapılan ince tabaka kromatografisi (İTK) sonuçları doğrultusunda en uygun çözücü sisteminin toluen:etilasetat:metanol (7:3:1) olduğuna karar verildi. Daha sonra elimizde bulunan 2 g ekstreye Kieselgel 60 (0,063-0,02 mm) silika kullanılarak kolon kromatografisi uygulandı. AM-VI ekstresi aşağıdaki çözücü sistemleri ile fraksiyonlandırıldı. Elde edilen fraksiyonlar ve kullanılan çözücü sistemleri Tablo 29'da gösterildi.

Tablo 29. AM-VI ekstresinden elde edilen fraksiyonlar

Fraksiyon Numarası	Mobil Faz	Mobil Faz Miktarı
1-4	Toluen	400 mL
5-6	9 Toluen / 10 Etil asetat	200 mL
7-11	4 Toluen / 1 Etil asetat	500 mL
12-15	1 Toluen / 1 Etil asetat	400 mL
16-18	Etil asetat	400 mL
19-22	3 Etil asetat / 1 Metanol	800 mL
23-24	1 Etil asetat / 1 Metanol	200 mL
25-27	Metanol	400 mL

Yapılan ince tabaka kromatografisi çalışmaları sonucunda benzer olan fraksiyonlar birleştirildi ve 9 fraksiyon adı altında isimlendirildi. Birleştirilen fraksiyonlar ve isimleri Tablo 30'da verildi.

Tablo 30. AM-VI ekstresine uygulanan kolon kromatografisi sonucunda birleştirilen fraksiyonlar

Fraksiyon Numarası	Fraksiyon Adı
1-7	AM-VI-1
8	AM-VI-2
9	AM-VI-3

10-12	AM-VI-4
13-17	AM-VI-5
18-19	AM-VI-6
20-23	AM-VI-7
24-26	AM-VI-8
27	AM-VI-9

AM-VI-6 fraksiyonuna toluen:etilasetat:metanol (7:3:1) sisteminde preparatif ince tabaka kromatografisi yapılarak P-6.1, P-6.2, P-6.3 ve P-6.4 kodlu bantlar elde edildi. P-6.3 kodlu banda tekrar aynı çözücü sistemi ile pİTK uygulandı ve P-6.3.1 ve P-6.3.2 kodlu iki ayrı bant elde edildi. AM-VI-7 fraksiyonuna toluen:etilasetat (5:2) sisteminde preparatif ince tabaka kromatografisi yapılarak P-7.1, P-7.2, P-7.3, P-7.4, P-7.5 ve P-7.6 kodlu ayrı ayrı bantlar elde edildi. Daha sonra P-7.3 kodlu bandına tekrar toluen:etilasetat:metanol (7:3:1) sisteminde preparatif ince tabaka kromatografisi yapılarak P-7.3.1 ve P-7.3.2 kodlu iki ayrı bantlar elde edildi. AM-VI-8 fraksiyonuna toluen:etil asetat (5:2) sisteminde preparatif ince tabaka kromatografisi yapılarak P-8.1, P-8.2, P-8.3, P-8.4 ve P-8.5 kodlu ayrı ayrı bantlar elde edildi. Daha önce elde edilen P-7.3.1, P-6.3.1 ve P-8.2 kodlu bantlar benzer oldukları için birleştirildi.

Birleştirilen bu bantlara tekrar toluen: etilasetat:metanol (7:3:1) sisteminde preparatif ince tabaka kromatografisi yapılarak P-7.6.8-1 ve P-7.6.8-2 kodlu iki bant elde edildi. P-7.6.8-1 kodlu bantan elde edilen bileşik **F (T7)** bileşiği (52 mg) olarak adlandırıldı.

AM-VI-9 fraksiyonuna toluen:etilasetat:metanol (7:3:1) sisteminde preparatif ince tabaka kromatografisi yapılarak P-9.1, P-9.2, P-9.3 ve P-9.4 kodlu bantlar elde edildi. P-9.2 kodlu banta tekrar aynı sistemle pİTK yapılarak P-9.2.1 ve P-9.2.2 kodlu iki ayrı bant elde edildi. Daha önce elde edilen P-8.1, P-7.3.2, P-6.1, P-9.2.1 kodlu bantlar birleştirildi. Birleştirilen bu bantlara tekrar toluen: etil asetat:metanol (7:3:1) sisteminde preparatif ince tabaka kromatografisi yapılarak P-8.7.6.9-1 ve P-8.7.6.9-2 kodlu iki ayrı bant elde edildi. Daha sonra P-8.7.6.9-1 kodlu banda tekrar

aynı sistemle pİTK uygulandığında P-8.7.6.9-1.0 ve P-8.7.6.9-1.1 kodlu iki bant elde edildi. P-8.7.6.9-1.0 kodlu bantan elde edilen bileşik **G (T6)** bileşiği (39,6 mg) olarak adlandırıldı.

P-7.1 ve P-6.2 kodlu bantlar birleştirildi daha sonra bu birleştirilen bu banda toluen:etil asetat:metanol (7:3:1) sisteminde pİTK uygulandığında P-7.6.0 ve P-7.6.1 kodlu iki ayrı bant elde edildi. P-7.4, P-7.5 ve P-7.6 kodlu bantlar birleştirildi daha sonra birleştirilen bu banda toluen:etilasetat:metanol (7:3:1) sisteminde pİTK uygulandığında P-7-m1 ve P-7-m2 kodlu iki bant elde edildi. P-7.6.0, P-7-m2 ve P-8.3 kodlu bantlar birleştirildi ve bunlara toluen: etil asetat:metanol (7:3:1) sisteminde pİTK uygulandığınd DT1 ve DT2 kodlu iki bant elde edildi. DT1 kodlu bantan elde edilen bileşik **H (DT4)** bileşiği (5 mg) olarak adlandırıldı.

P-6.3.2 ve P-8.4 kodlu bantlar birleştirilerek pİTK uygulandı ve P-6.8-m1 ve P-6.8-k1 kodlu iki bant elde edildi. P-6.8-k1 kodlu bantan elde edilen bileşik **K (DT5)** bileşiği (3,4 mg) olarak adlandırıldı.



Resim 3. AM-VI ekstresinin toluen:etilasetat:metanol (7:3:1) çözücü sisteminde yürütüldükten sonra 366 nm UV ışık altındaki İTK kromatogramı

4.14. AM-III Fraksiyonundan Madde İzolasyonu

Elimizde bulunan yaklaşık 700 mg AM-III ekstresine Kieselgel 60 (0,063-0,02 mm) silika kullanılarak kolon kromatografisi uygulandı. Elde edilen fraksiyonlar ve kullanılan çözücü sistemleri Tablo 31'de gösterildi.

Tablo 31. AM-III ekstresinden elde edilen fraksiyonlar

Fraksiyon Numarası	Mobil Faz	Mobil Faz Miktarı
1-3	Toluen	720 mL
4-7	7 Toluen / 3 Etil asetat	300 mL
8-19	7 Toluen / 5 Etil asetat	360 mL
20-32	1 Toluen / 1 Etil asetat	400 mL
33-35	Etil asetat	200 mL
36-42	3 Etil asetat / 1 Metanol	360 mL
43-50	1 Etil asetat / 1 Metanol	400 mL
51-57	Metanol	600 mL

Yapılan ince tabaka kromatografisi çalışmaları sonucunda benzer olan fraksiyonlar birleştirildi ve 4 fraksiyon adı altında isimlendirildi. Birleştirilen fraksiyonlar ve isimleri Tablo 32'de verildi.

Tablo 32. AM-III ekstresine uygulanan kolon kromatografisi sonucunda birleştirilen fraksiyonlar

Fraksiyon Numarası	Fraksiyon Adı
1-6	AM-III (1)
7-24	AM-III (2)
25-43	AM-III (3)
44-57	AM-III (4)

AM-III (3) fraksiyonu üzerinde yapılan ince tabaka kromatografisi (İTK) sonuçları doğrultusunda en uygun çözücü sisteminin etilasetat:metanol (3:1)

olduğuna karar verildi. Daha sonra elimizde bulunan yaklaşık 0,3 g ekstreye Kieselgel 60 (0,063-0,02 mm) silika kullanılarak kolon kromatografisi uygulandı. AM-III (3) ekstresi aşağıdaki çözücü sistemleri ile fraksiyonlandırıldı. Elde edilen fraksiyonlar ve kullanılan çözücü sistemleri Tablo 33'de gösterildi.

Tablo 33. AM-III (3) ekstresinden elde edilen fraksiyonlar

Fraksiyon Numarası	Mobil Faz	Mobil Faz Miktarı
1-12	Etil asetat	180 mL
13-32	9 Etil asetat / 1 Metanol	100 mL
33-38	7 Etil asetat / 1 Metanol	50 mL
39-53	5 Etil asetat / 1 Metanol	110 mL
54-70	4 Etil asetat / 1 Metanol	100 mL
71-84	3 Etil asetat / 1 Metanol	320 mL
85-100	Metanol	200 mL

Yapılan ince tabaka kromatografisi çalışmaları sonucunda benzer olan fraksiyonlar birleştirildi ve 4 fraksiyon adı altında isimlendirildi. Birleştirilen fraksiyonlar ve isimleri Tablo 34'de verildi.

Tablo 34. AM-III (3) ekstresine uygulanan kolon kromatografisi sonucunda birleştirilen fraksiyonlar

Fraksiyon Numarası	Fraksiyon Adı
1-21	AM-III (3)-1
22-28	AM-III (3)-2
29-73	AM-III (3)-3
74-100	AM-III (3)-4

AM-III (3)-1 fraksiyonuna etilasetat:metanol (3:1) sisteminde preparatif ince tabaka kromatografisi yapılarak P-(3)-1.1, P-(3)-1.2 ve P-(3)-1.3 kodlu üç ayrı bant elde edildi.

AM-III (3)-2 fraksiyonuna etil asetat:metanol (3:1) sisteminde preparatif ince tabaka kromatografisi yapılarak P-(3)-2.1, P-(3)-2.2 ve P-(3)-2.3 kodlu üç ayrı bant elde edildi. Daha sonra P-(3)-2.1 kodlu banda tekrar aynı sistemle pİTK uygulandığında P-(3)-2.1(k1), P-(3)-2.1(k2) ve P-(3)-2.1(k3) kodlu üç ayrı bant elde edildi.

AM-III (3)-3 fraksiyonuna etil asetat:metanol (3:1) sisteminde preparatif ince tabaka kromatografisi yapılarak P-(3)-3.1, P-(3)-3.2, P-(3)-3.3, P-(3)-3.4, P-(3)-3.5, P-(3)-3.6 kodlu altı ayrı bant elde edildi. Daha sonra P-(3)-3.1 kodlu banda tekrar aynı sistemle pİTK uygulandığında P-(3)-3.1(k1) ve P-(3)-3.1(k2) kodlu iki ayrı bant elde edildi.

AM-III (4) fraksiyonu üzerinde yapılan ince tabaka kromatografisi (İTK) sonuçları doğrultusunda en uygun çözücü sisteminin etilasetat:metanol (3:2) olduğuna karar verildi. Daha sonra elimizde bulunan yaklaşık 0,2 g ekstreye Kieselgel 60 (0,063-0,02 mm) silika kullanılarak kolon kromatografisi uygulandı. AM-III (4) ekstresi aşağıdaki çözücü sistemleri ile fraksiyonlandırıldı. Elde edilen fraksiyonlar ve kullanılan çözücü sistemleri Tablo 35'de gösterildi.

Tablo 35. AM-III (4) ekstresinden elde edilen fraksiyonlar

Fraksiyon Numarası	**Mobil Faz**	**Mobil Faz Miktarı**
1-6	Etil asetat	100 mL
7-13	9 Etil asetat / 1 Metanol	100 mL
14-15	7 Etil asetat / 1 Metanol	55 mL
16-36	5 Etil asetat / 1 Metanol	150 mL
37-49	4 Etil asetat / 1 Metanol	100 mL
50-71	3 Etil asetat / 1 Metanol	150 mL
72-107	3 Etil asetat / 2 Metanol	300 mL
108-125	3 Etil asetat / 3 Metanol	140 mL
126-130	Metanol	150 mL

Yapılan ince tabaka kromatografisi çalışmaları sonucunda benzer olan fraksiyonlar birleştirildi ve 5 fraksiyon adı altında isimlendirildi. Birleştirilen fraksiyonlar ve isimleri Tablo 36'da verildi.

Tablo 36. AM-III (4) ekstresine uygulanan kolon kromatografisi sonucunda birleştirilen fraksiyonlar

Fraksiyon Numarası	**Fraksiyon Adı**
1-8	AM-III (4)-1
9-51	AM-III (4)-2
52-80	AM-III (4)-3
81-100	AM-III (4)-4
101-130	AM-III (4)-5

AM-III (4)-1 fraksiyonuna etilasetat:metanol (3:2) sisteminde preparatif ince tabaka kromatografisi yapılarak P-(4)-1.1, P-(4)-1.2, P-(4)-1.3 ve P-(4)-1.4 kodlu dört ayrı bant elde edildi. Daha sonra P-(4)-1.2 kodlu banda tekrar aynı sistemle pİTK uygulandığında P-(4)-1.2(k1) ve P-(4)-1.2(k2) kodlu iki ayrı bant elde edildi.

P-(4)-1.3 kodlu banda tekrar aynı sistemle pİTK uygulandığında P-(4)-1.3(k1), P-(4)-1.3(k2) ve P-(4)-1.3(k3) kodlu üç ayrı bant elde edildi.

AM-III (3)-1 fraksiyonundan elde edilen P-(3)-1.2 kodlu bant, AM-III (3)-2 fraksiyonundan elde edilen P-(3)-2.2 kodlu bant ve AM-III (4)-1 fraksiyonundan elde edilen P-(4)-1.2(k1) kodlu bant ile birleştirildi ve elde edilen bileşik **L (O)** bileşiği (2,3 mg) olarak adlandırıldı.

AM-III (4)-2 fraksiyonu üzerinde yapılan ince tabaka kromatografisi (İTK) sonuçları doğrultusunda en uygun çözücü sisteminin toluen:etilasetat (1:3) olduğuna karar verildi. Daha sonra bu ekstreye Kieselgel 60 (0,063-0,02 mm) silika kullanılarak kolon kromatografisi uygulandı.

AM-III (4)-2 ekstresi aşağıdaki çözücü sistemleri ile fraksiyonlandırıldı. Elde edilen fraksiyonlar ve kullanılan çözücü sistemleri Tablo 37'de gösterildi.

Tablo 37. AM-III (4)-2 ekstresinden elde edilen fraksiyonlar

Fraksiyon Numarası	Mobil Faz	Mobil Faz Miktarı
1-20	Toluen	150 mL
20-38	1 Toluen / 1 Etil asetat	300 mL
39-57	1 Toluen / 2 Etil asetat	90 mL
58-70	1 Toluen / 3 Etil asetat	80 mL
71-80	1 Toluen / 5 Etil asetat	60 mL
81-92	1 Toluen / 7 Etil asetat	80 mL
93-103	Etil asetat	100 mL
104-126	1 Etil asetat / 1 Metanol	130 mL
127-130	Metanol	100 mL

Yapılan ince tabaka kromatogafisi çalışmaları sonucunda benzer olan fraksiyonlar birleştirildi ve 3 fraksiyon adı altında isimlendirildi. Birleştirilen fraksiyonlar ve isimleri Tablo 38'de verildi.

Tablo 38. AM-III (4)-2 ekstresine uygulanan kolon kromatografisi sonucunda birleştirilen fraksiyonlar

Fraksiyon Numarası	Fraksiyon Adı
1-5	AM-III (4)-2-(1)
6-100	AM-III (4)-2-(2)
101-130	AM-III (4)-2-(3)

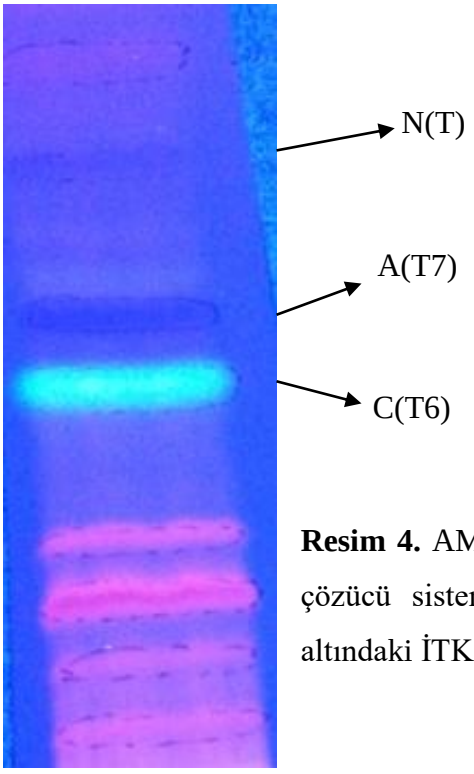
AM-III (4)-2-(1) fraksiyonuna toluen:etil asetat (1:3) sisteminde preparatif ince tabaka kromatografisi yapılarak P-(4)-2-(1).1 ve P-(4)-2-(1).2 kodlu iki ayrı bant elde edildi.

AM-III (4)-2-(1) fraksiyonundan elde edilen P-(4)-2-(1).2 kodlu bant ile AM-III (4)-1 fraksiyonundan elde edilen P-(4)-1.3(k3) kodlu bant birleştirildi ve elde edilen bileşik **M (P)** bileşiği (3,5 mg) olarak adlandırıldı.

AM-III (3)-3 fraksiyonundan elde edilen P-(3)-3.2(k1) kodlu banda tekrar toluen:etilasetat:metanol (7:3:1) sisteminde preparatif ince tabaka kromatografisi yapılarak P-(3)-3.2(k1).1 ve P-(3)-3.2(k1).2 kodlu iki ayrı bant elde edildi. AM-III (3)-3 fraksiyonundan elde edilen P-(3)-3.1(k2) kodlu banda tekrar toluen:etilasetat:metanol (7:3:1) sisteminde preparatif ince tabaka kromatografisi yapılarak P-(3)-3.1(k2).1 ve P-(3)-3.1(k2).2 kodlu iki ayrı bant elde edildi.

AM-III (4)-1 fraksiyonundan elde edilen P-(4)-1.3(k2) kodlu banda tekrar toluen:etilasetat:metanol (7:3:1) sisteminde preparatif ince tabaka kromatografisi yapılarak P-(4)-1.3(k2).1, P-(4)-1.3(k2).2 ve P-(4)-1.3(k2).3 kodlu üç ayrı bant elde edildi. AM-III (4)-1 fraksiyonundan elde edilen P-(4)-1.1 kodlu banda tekrar toluen:etil asetat:metanol (7:3:1) sisteminde preparatif ince tabaka kromatografisi yapılarak P-(4)-1.1(1), P-(4)-1.1(2) ve P-(4)-1.1(3) kodlu üç ayrı bant elde edildi.

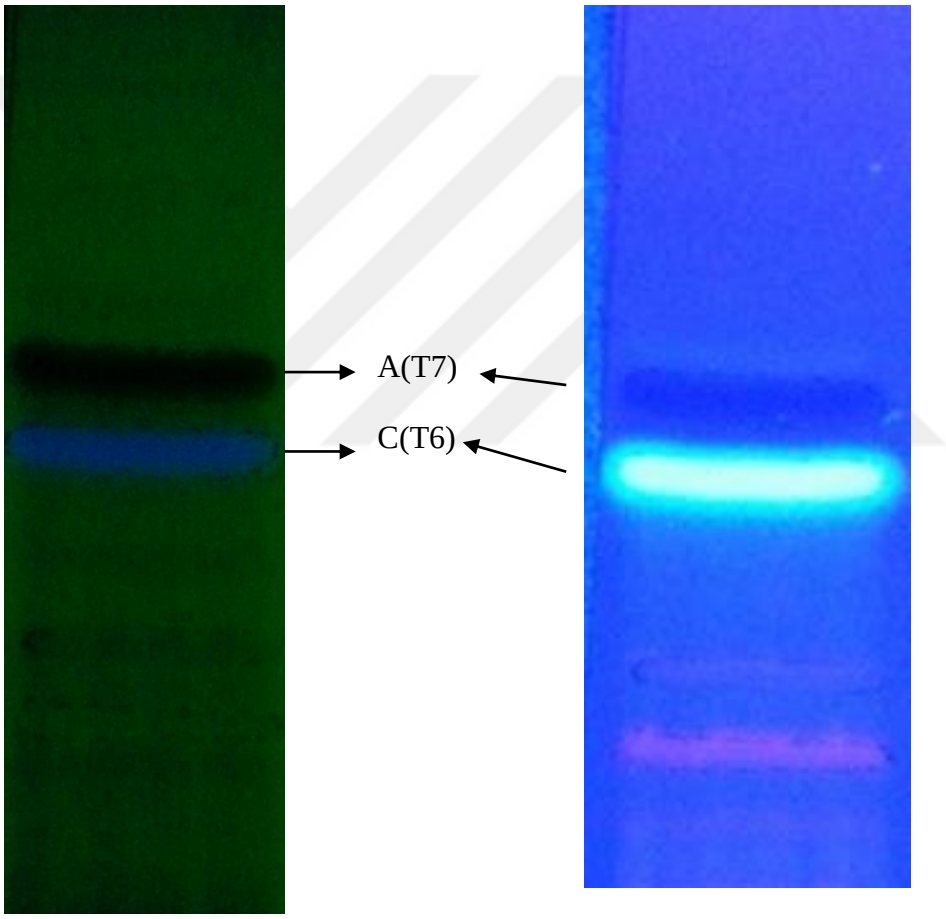
P-(3)-3.1(k2).2, P-(3)-2.1(k1).2, P-(4)-1.3(k2).2 ve P-(4)-1.1(2) kodlu bantlar birleştirildi ve elde edilen bileşik **N (T)** bileşiği (3,2 mg) olarak adlandırıldı.



Resim 4. AM-III ekstresinin toluen:etilasetat:metanol (7:3:1) çözücü sisteminde yürütüldükten sonra 366 nm UV ışık altındaki İTK kromatogramı

4.15. AM-IV Fraksiyonunun İçerdiği Fenolik Bileşiklerin Analizleri

AM-IV ekstresinin düşük miktarda (100 mg) olmasından dolayı bu ekstreden madde izolasyonu yapılamadı. Bu ekstrenin içerdiği fenolik bileşiklerin yapıları HPLC-DAD sistemi kullanılarak analiz edildi. Bu ekstrede bulunan fenolik bileşiklerin UV spektrumları daha önce AM-VII fraksiyonundan saflaştırılan ve yapıları aydınlatılan A (T7), C (T6) ve D (TA) bileşiklerinin UV spektrumları ile üst üste çakıştırıldığında bileşiklerin aynı olduğu tespit edildi.



7 Toluen: 3 EA: 1MeOH 254 nm

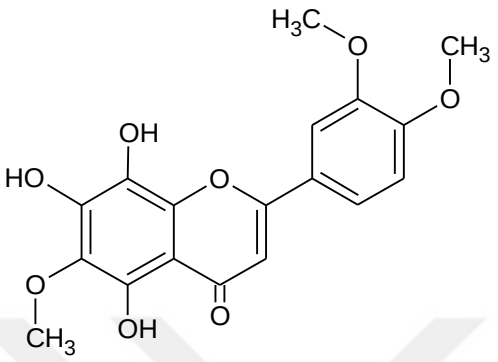
7 Toluen: 3 EA: 1MeOH 366 nm

Resim 5. AM-IV ekstresinin toluen:etilasetat:metanol (7:3:1) çözücü sisteminde yürütüldükten sonra 254 nm ve 366 nm UV ışık altındaki İTK kromatogramları

4.16. AM-VII Fraksiyonundan Elde Edilen Saf Maddelerin Yapı Tayinleri

AM-VII fraksiyonundan A (T7), B (T7-1), C (T6), D (TA) ve E (TK) kodlu 5 bileşik saflaştırılarak yapıları aydınlatıldı.

A (T7) Bileşiği: 5,7,8-trihidroksi–6,3',4'–trimetoksiflavon



Şekil 24. 5,7,8-trihidroksi–6,3',4'–trimetoksiflavon

Sarı renkli olan A (T7) bileşiği amorf halde elde edildi. A (T7) bileşiği İTK plağına tatbik edilip toluen:etilasetat:metanol (7:3:1) çözeltisinde yürütüldü. İTK plakta A (T7)'ya ait lekenin UV lamba (254 ve 366 nm) altında incelendiğinde mor, NH_3 buharına tutulup incelendiğinde sarı ve NA belirteci püskürtüldüğünde sarı renkte görülmesi C-5 konumunda –OH, C-3 konumunda–OH olmadığı/dolu, C-3' konumunda–OH olmadığı/dolu ve C-4' konumunda-OH gruplarının bulunabileceğini düşündürdü.

UV spektrumu; A (T7) bileşiğinin metanol içinde alınan UV spektrumunda Bant I 350 nm, Bant II 256 nm'de izlendi. Üç damla $NaOCH_3$ ilavesi ile alınan spektrumdaki Bant I (386 nm)'in metanol Bant I (350)'e göre 50-60 nm aralığının altında batokromik bir kaymanın (36 nm) olması ve pik şiddetinin azalması C- 4′ 'ünde -OCH_3 grubunun bulunduğunu gösterdi. Ayrıca $NaOCH_3$ ilavesiyle alınan spektrumdaki Bant I'in orijinal Bant I'e göre pik şiddetinin azalmasına rağmen 45-65 nm aralığının altında bir batokromik bir kaymanın (36 nm) olması C-3 de –OH grubunun olmadığını düşündürdü. $NaOCH_3$ ilavesiyle alınan spektrumun 310 nm'de yeni bir pikin olması ve NaOAc'ın aşırısı ilave edilerek alınan spektrumdaki Bant II'in metanol Bant II'sine göre 17 nm'lik bir kaymanın olması C-7 de –OH grubunun olduğunu gösterdi. Daha sonra NaOAc ilave edilmiş çözeltiye H_3BO_3 ilave edilerek alınan spektrumda Bant I'in, orijinal Bant I ile yaklaşık aynı kaymayı göstermesi C–

3′ konumunda –OCH_3 grubunun olduğunu gösterdi. A (T7)'nın metanoldeki çözeltisine $AlCl_3$ eklenerek spektrum alındıktan sonra HCl ilavesiyle alınan spektrumdaki Bant I'de, orijinal Bant I'e göre 13 nm'lik batokromik bir kayma gözlenmesi C-5 de -OH ve C-6 da –OCH_3 grubunun olabileceğini düşündürdü. Kayma belirteçleri ile alınan UV spektrumları Şekil 25'de verildi.

^{1}H-NMR spektrumunda (500 MHz, $CDCl_3$) (Şekil 26); δ 3,79 (3H, *s*), δ 3,92 (3H, *s*), ve δ 3,97 (3H, *s*) de izlenen sinyaller molekülde üç metoksi grubunun varlığını gösterdi. UV kayma belirteçleri ile alınan spektrumlara bakılarak bu metoksi gruplarından birisinin A halkasında C-6 da diğer ikisinin de B halkasında C-3′ ve C-4′ konumlarında bulunduğu belirlendi. 6,90 ppm'de (1H, *d*, *J* =8,5 Hz) H-5′, δ 7,65'de (1H, *d*, *J* = 2,1 Hz) H-2′ ve 7,63 ppm'de (1H, *dd*, *J* = 2,1; 8,5 Hz) H-6′ nın izlenmesi ile metoksi gruplarının yerleri kesin olarak belirlendi. 6,48 ppm'deki (1H, *s*) pik H-3 protonunu, 12,84 ppm'de (s, 1H) izlenen pik C-5 deki OH grubuyla C-4 deki karbonil grubunun molekül içi hidrojen bağ yaptığını gösterir.

^{13}C-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) ve APT spektrumları değerlendirildiğinde A (T7) bileşiğinin 3 metil, 4 metin (tersiyer) ve 11 katerner karbon olmak üzere toplam 19 karbon içerdiği belirlendi.

Kütle spektrumu: ^{1}H-NMR'da H-8'e ait sinyal görülmemesi ve ^{13}C-NMR'da 129,97 ppm'de izlenen katerner karbonun varlığı ayrıca kütle spektrumunda bileşiğin molekül ağırlığının 360 g/mol olarak çıkmasından dolayı C-8 de -OH grubunun olduğu belirlendi. A (T7) bileşiğinin molekül ağırlığı ($C_{18}H_{16}O_8$) 360 g/mol iken bir protonu kopmuş molekülü kütle spektrumunda 359,0772 g/mol olarak görüldü. A (T7) bileşiğinin fragment iyonlarının molekül ağırlıkları 344,0524; 329,0291; 314,0033; 286,0129; 258,0166; 230,0239; 202,0258; 186,0307 g/mol olarak saptandı. Molekülün negatif modtaki MS/MS spektrumu Şekil 27'de gösterildi.

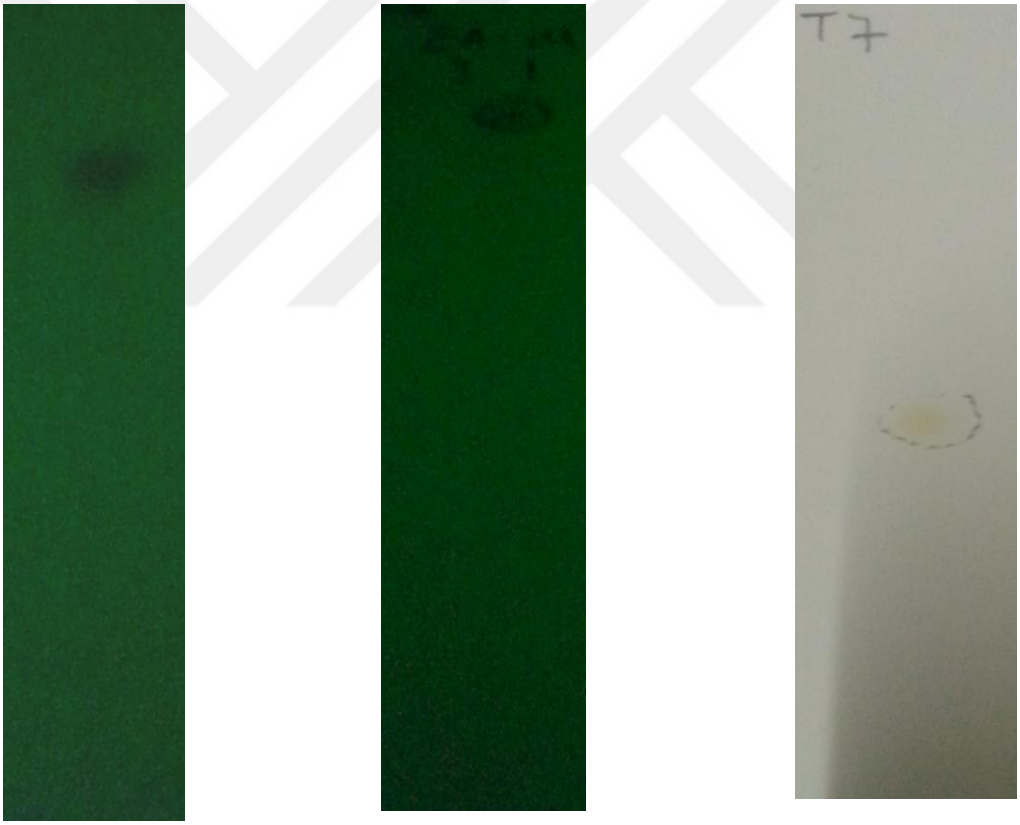
IR (MeOH)νmax :3324 (OH), 2942 (C-H), 2832, 1734, 1704, 1653 (C=O), 1559, 1456, 1418, 1306, 1270, 1215,1115, 1025, 678 cm^{-1}. A (T7) bileşiğine ait IR spektrumu Şekil 28'de verildi.

Erime sıcaklığı: A (T7) bileşiğinin erime sıcaklığı diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analiz yöntemi kullanarak 155,53 °C olarak ölçülmüştür.

A (T7) bileşiğinin yapısı UV, ^{1}H– NMR ve ^{13}C–NMR (Şekil 29), APT (Şekil 30), COSY (Şekil 31), HMQC (Şekil 32), HMBC (Şekil 33) ve kütle spektroskopi

yöntemleri kullanılarak belirlendi. A (T7) bileşiğine ait ^{13}C-NMR ile önemli HMQC ve HMBC değerleri Tablo 39'da verildi.

Yapılan literatür taramalarında bu bileşiğin isminin geçtiği sadece bir çalışmaya rastlanılmıştır. Kovacevic ve ark., yaptığı bu çalışmada iki bileşik izole edildiği belirtilmiş ve bunlardan birisinin yapısı aydınlatılmış fakat bir bileşiğin yapısı aydınlatılamamış ve tahminde bulunularak bu bileşiğin 5,7,8-trihidroksi–6,3',4'–trimetoksiflavon veya 5,7,3'-trihidroksi–6,8,4'–trimetoksiflavon olabileceği vurgulanmıştır. Fakat bu bileşiğe ait hiçbir spektral veriye ulaşılamamıştır (Kovacevic ve ark., 1997). Bu çalışmanın dışında bu bileşiğe ait herhangi bir literatür bilgisine rastlanılmaması ve bu bileşiğe ait hiçbir spektral verinin olmaması, bu bileşiğin tarafımızdan ilk defa izole edildiğini göstermiştir.



7 Toluen: 3 EA: 1MeOH 3 EA: 1MeOH + NH_3/NA

254 nm 254 nm

Resim 6. A bileşiğinin farklı çözücü sistemlerinde yürütüldükten sonra 254 nm UV ışık altında ve NH_3/NA belirteci püskürtülüp bekletildikten sonra elde edilen İTK kromatogramları

UV Kayma Değerleri (λmax, nm)

MeOH :256, 270, 350

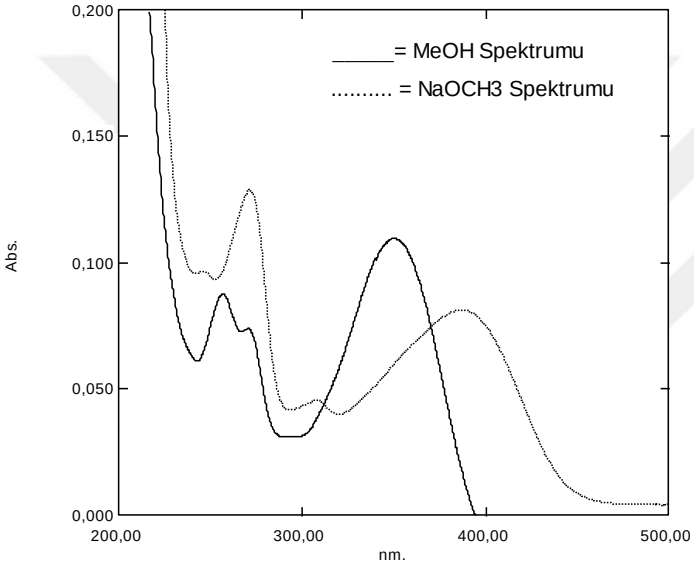
$NaOCH_3$:271, 310 omuz, 386

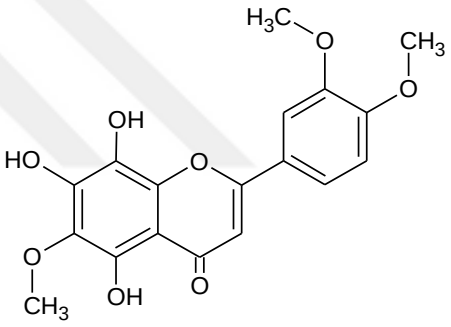
$AlCl_3$:217, 259, 367

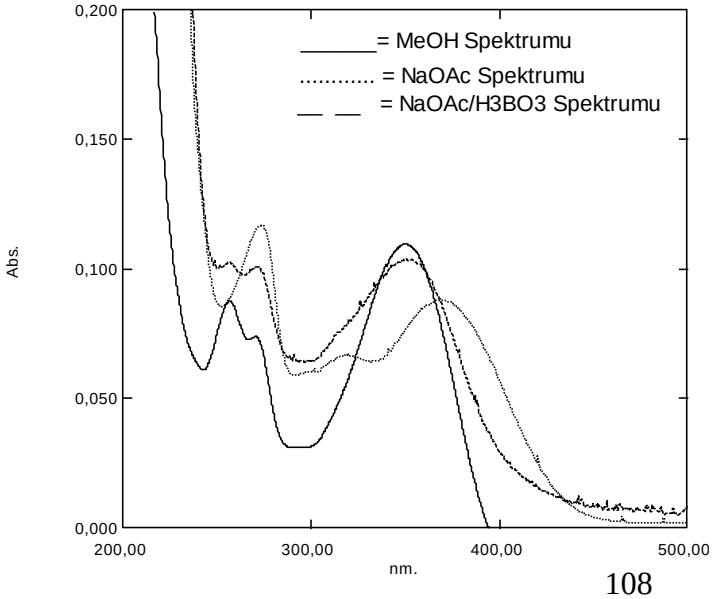
$AlCl_3$/HCl :221, 257, 363

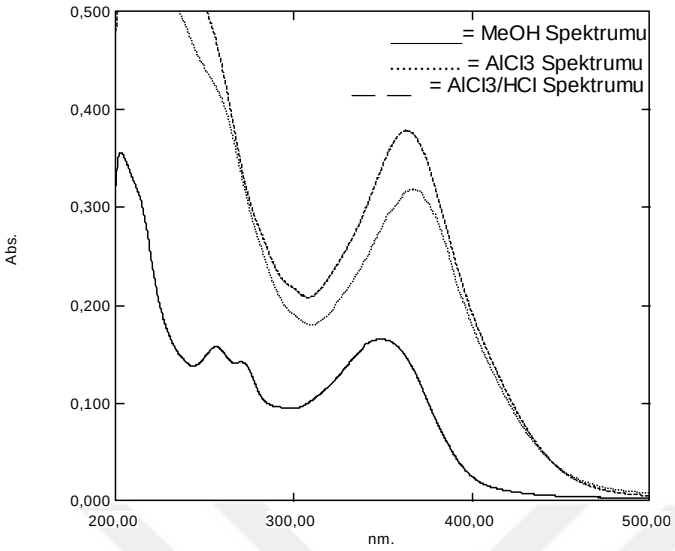
NaOAc :273, 318 omuz, 370

NaOAc/H_3BO_3 :256, 271, 353







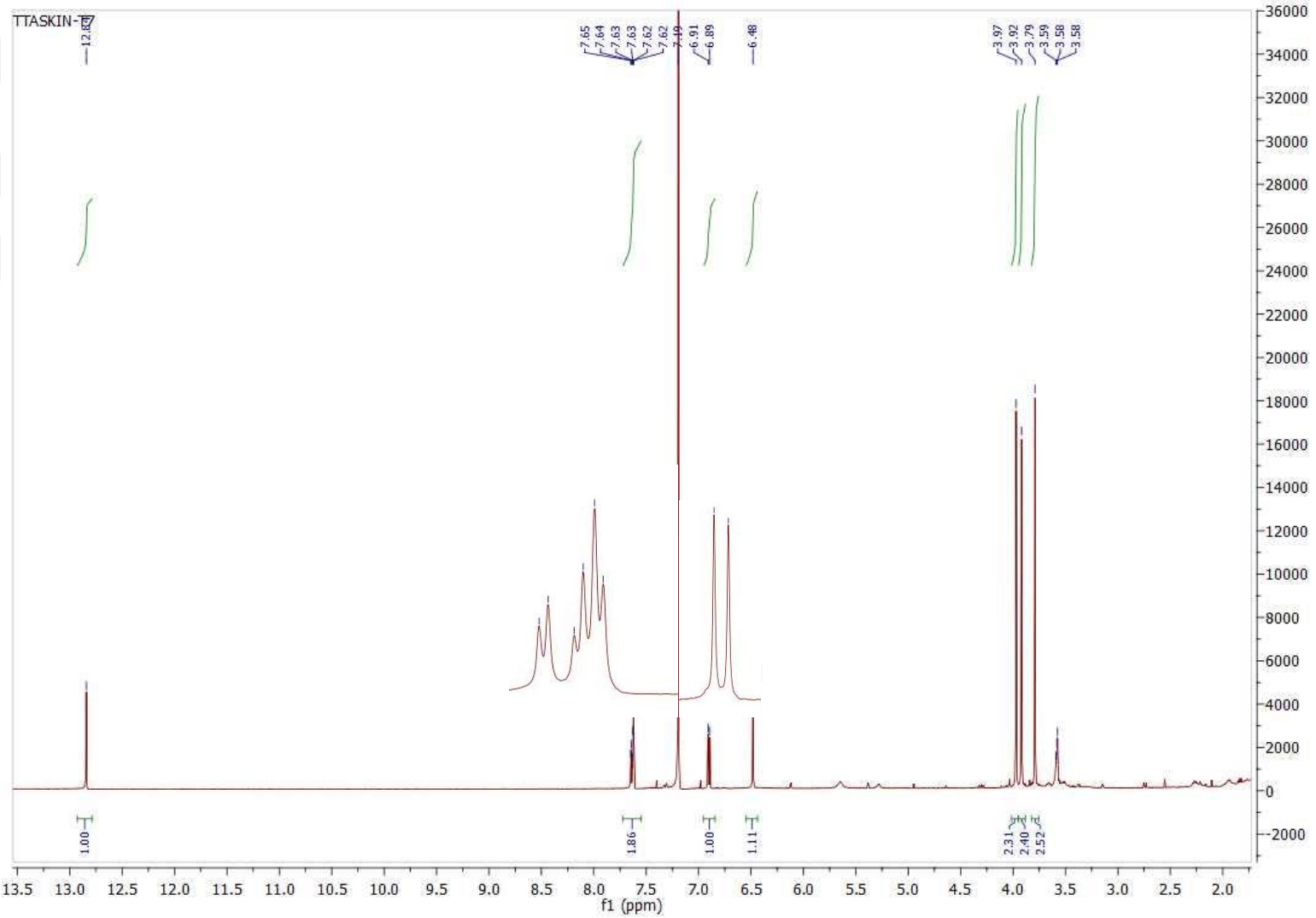


Şekil 25. A (T7) bileşiğine ait UV spektrumları

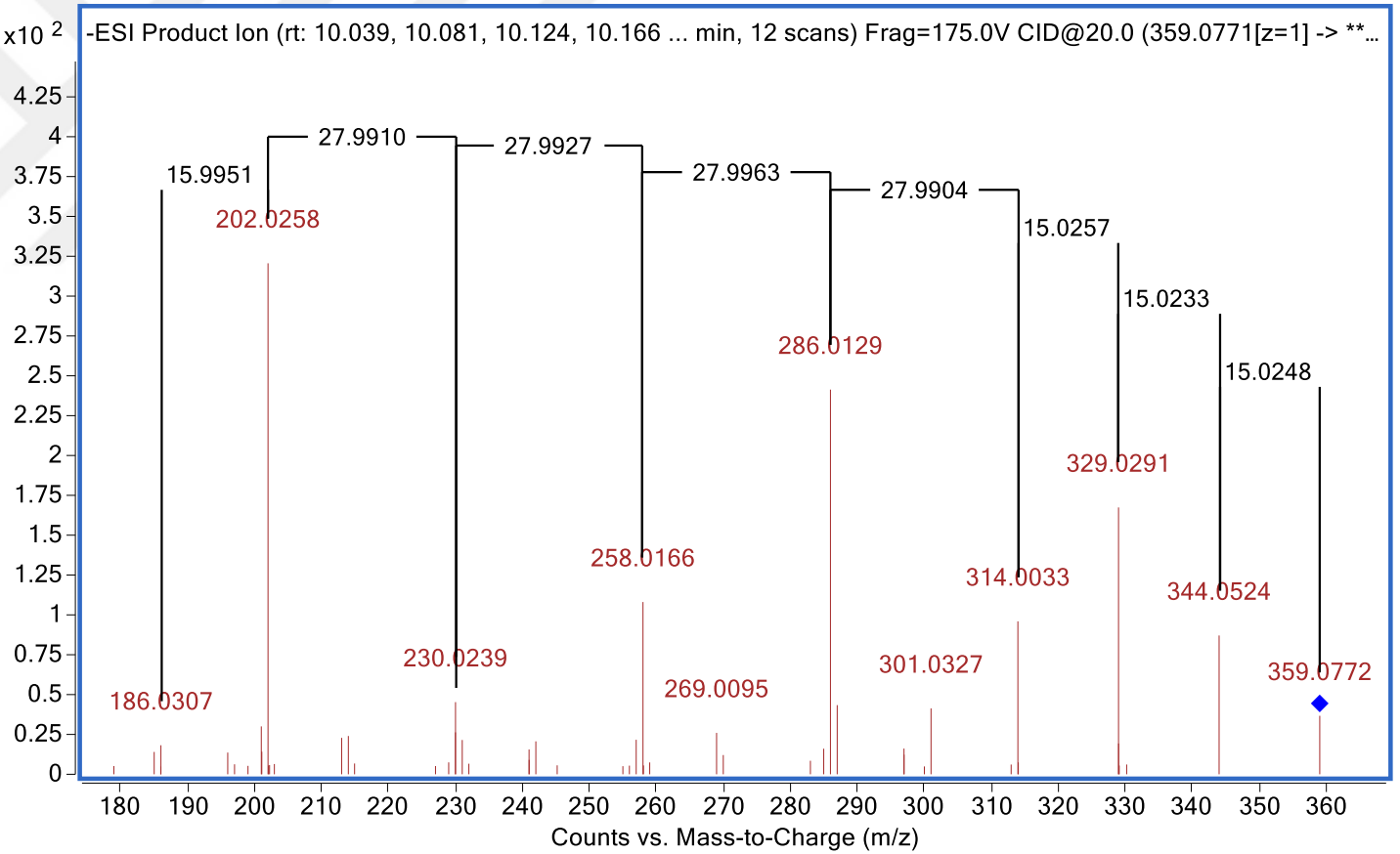
Tablo 39. A (T7) bileşiğine ait ^{13}C-NMR, HMQC ve HMBC değerleri

Pozisyon	^{13}C-NMR	HMQC	HMBC
2	155,80		H-2', H-6'
3	93,09	H-3	
4	179,26		
5	151,77		
6	138,70		6-OCH_3
7	148,70		
8	129,97		H-3, 6-OCH_3, Hidrojen bağı
9	145,51		
10	106,21		H-3, Hidrojen bağı
1'	123,61		H-5'
2'	114,46	H-2'	H-6'
3'	152,26		H-2', H-5', H-3, 3'-OCH_3, Hidrojen bağı
4'	154,90		H-2', H-3, 4'-OCH_3

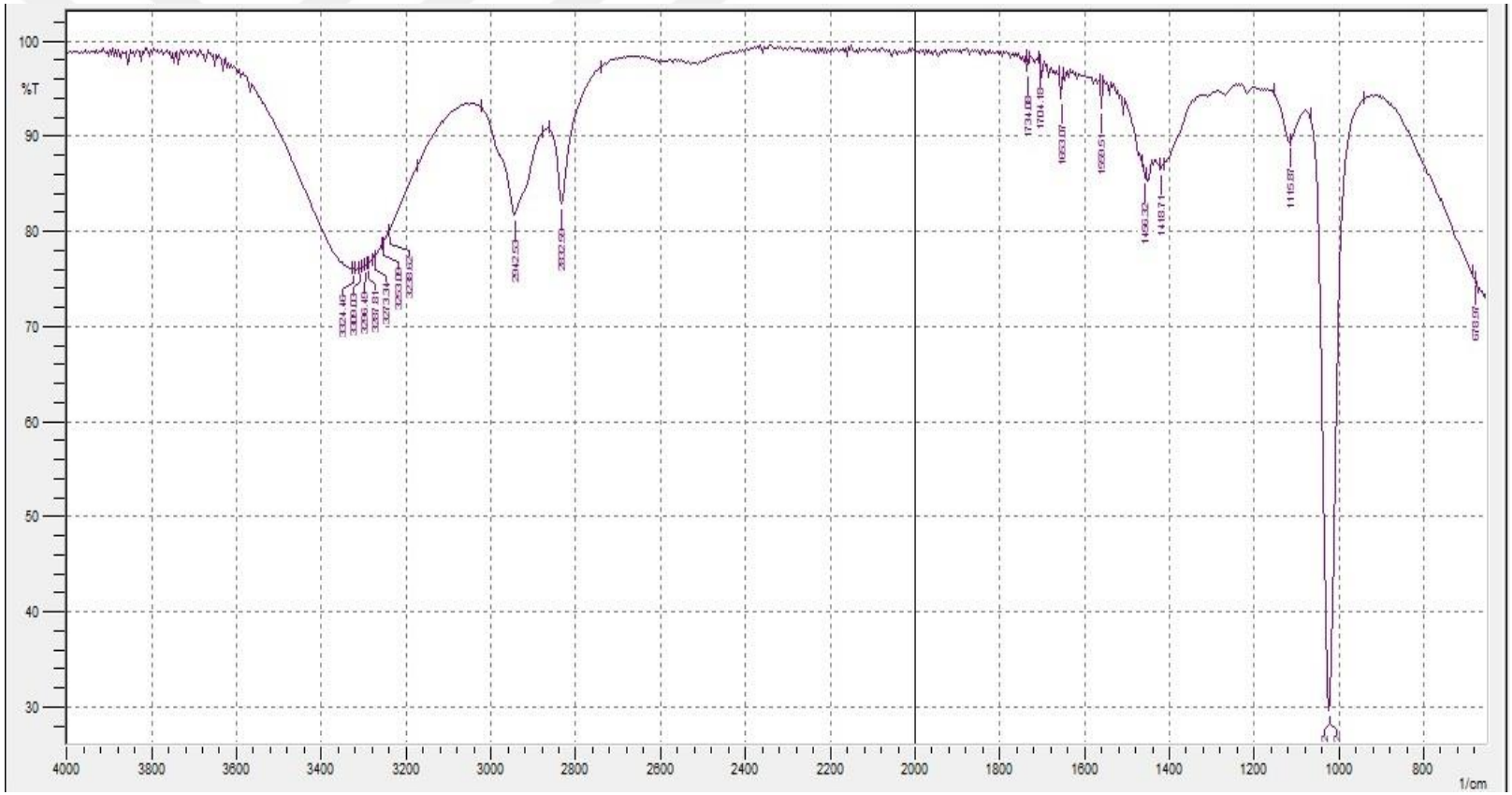
5'	110,38	H-5'	
6'	121,58	H-6'	H-2'
3'-OCH_3	60,18	3'-OCH_3	
4'-OCH_3	56,03	4'-OCH_3	
6-OCH_3	60,93	6-OCH_3	



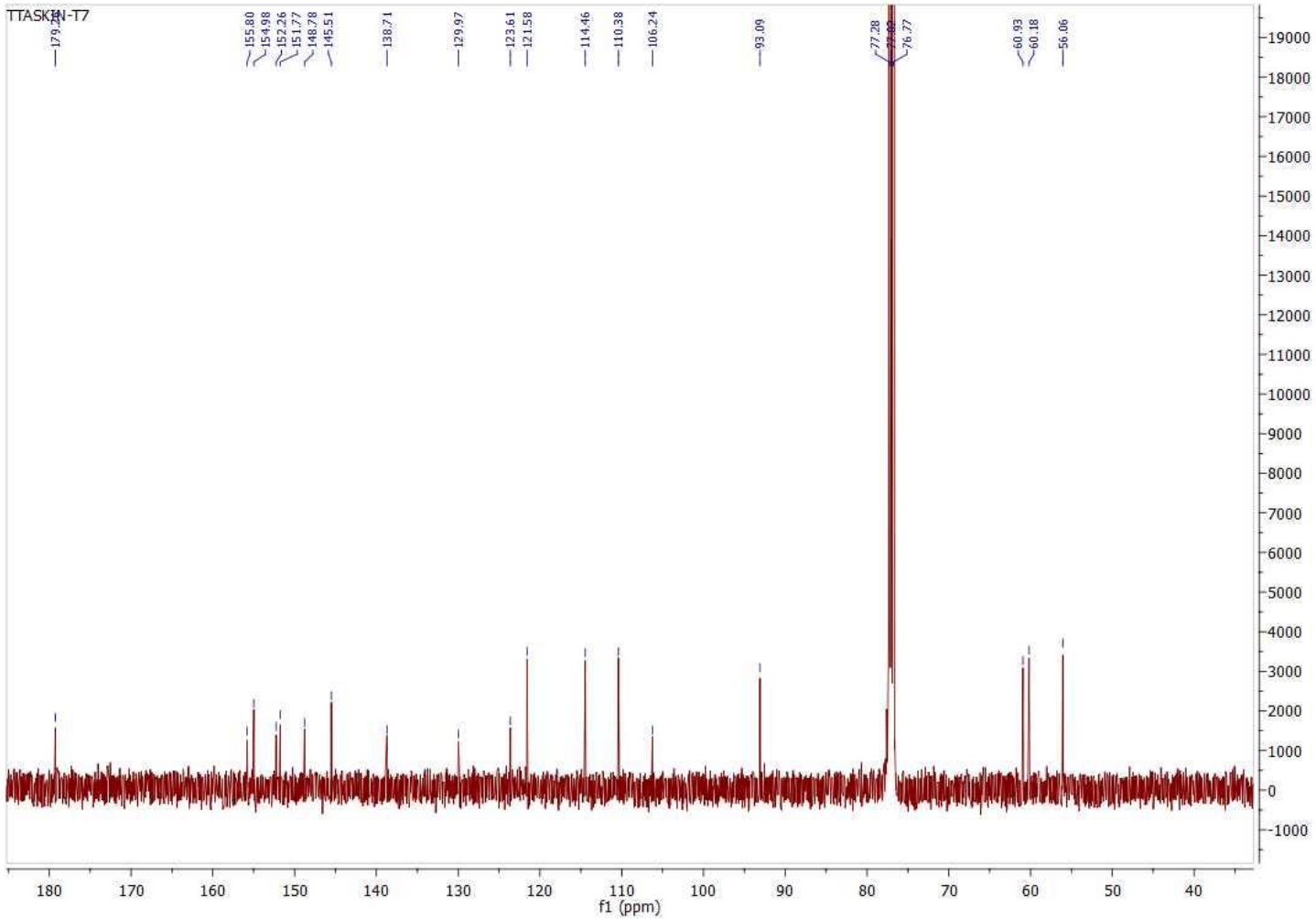
Şekil 26. A (T7) bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu ($CDCl_3$, 500 MHz)



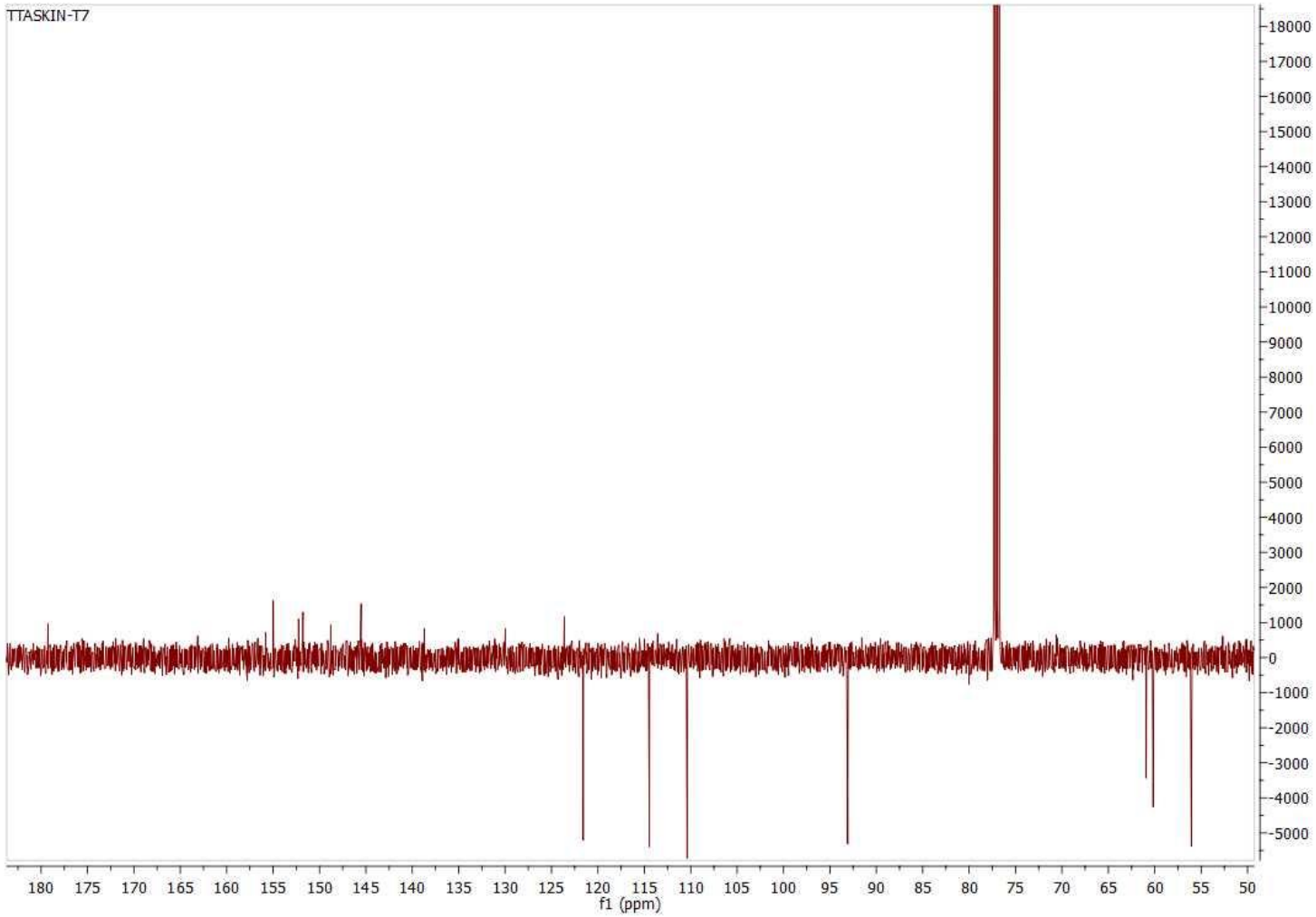
Şekil 27. A (T7) bileşiğinin kütle spektrumu (ESI-MS)



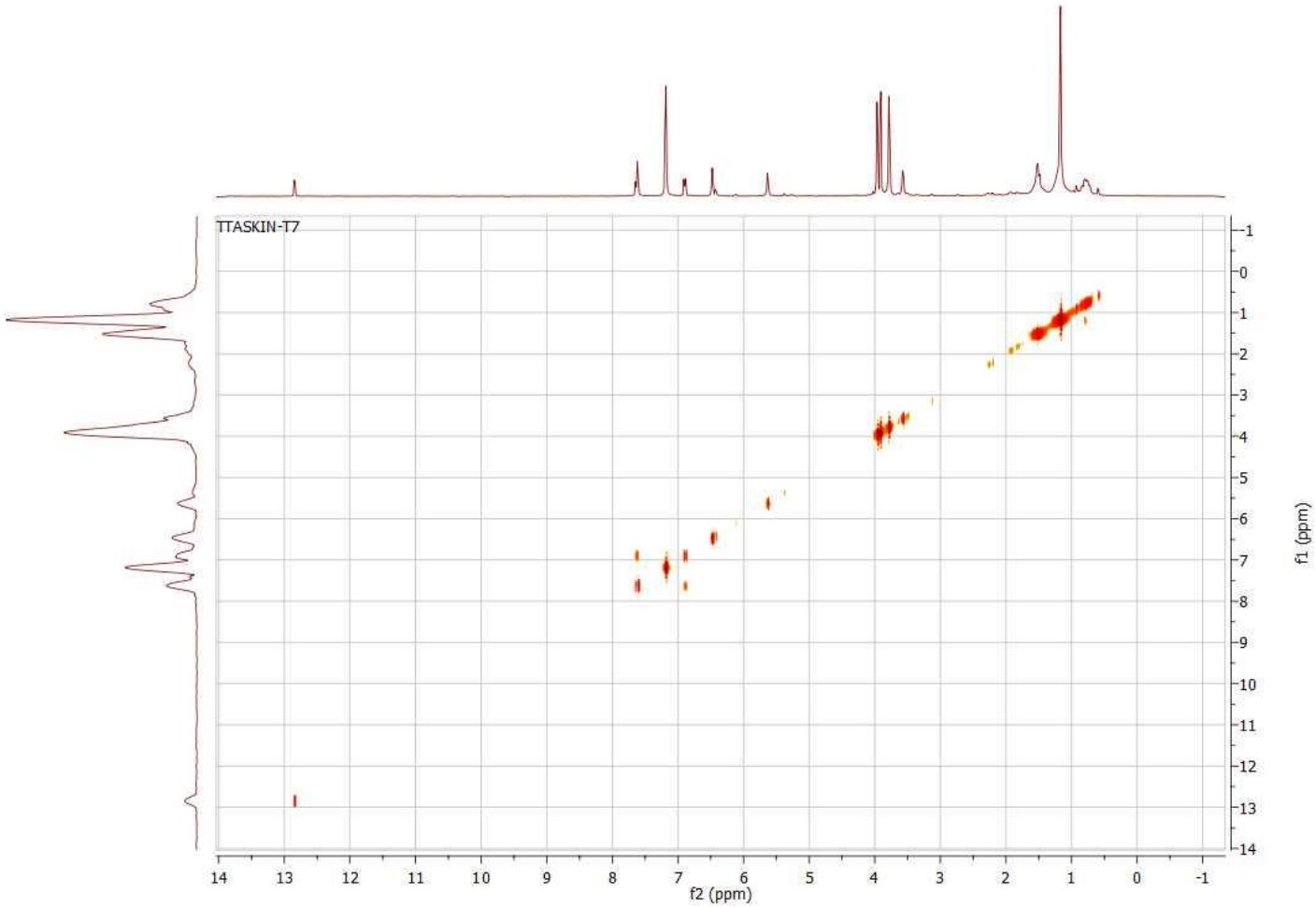
Şekil 28. A (T7) bileşiğinin IR spektrumu



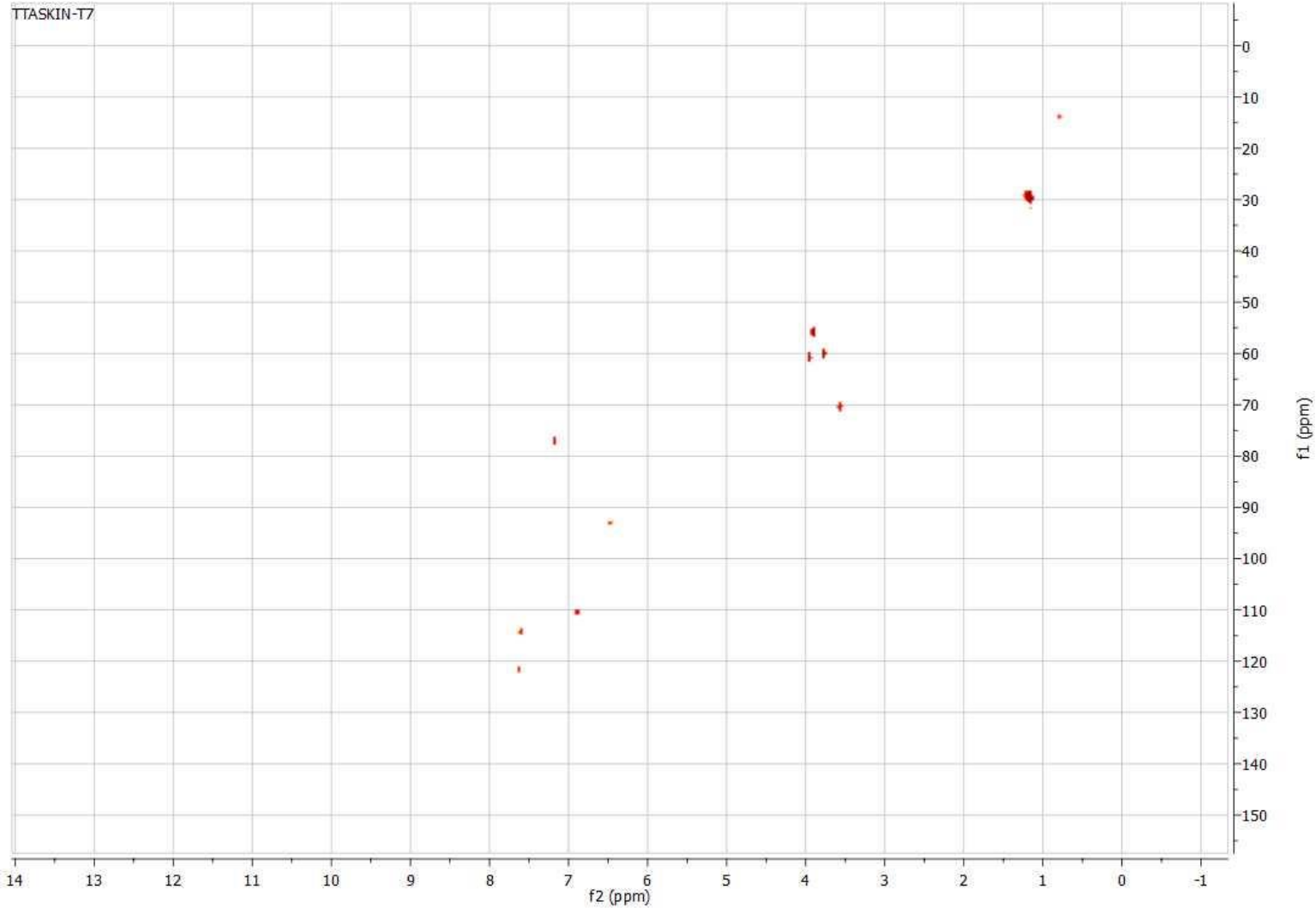
Şekil 29. A (T7) bileşiğinin ^{13}C-NMR spektrumu ($CDCl_3$, 500 MHz)



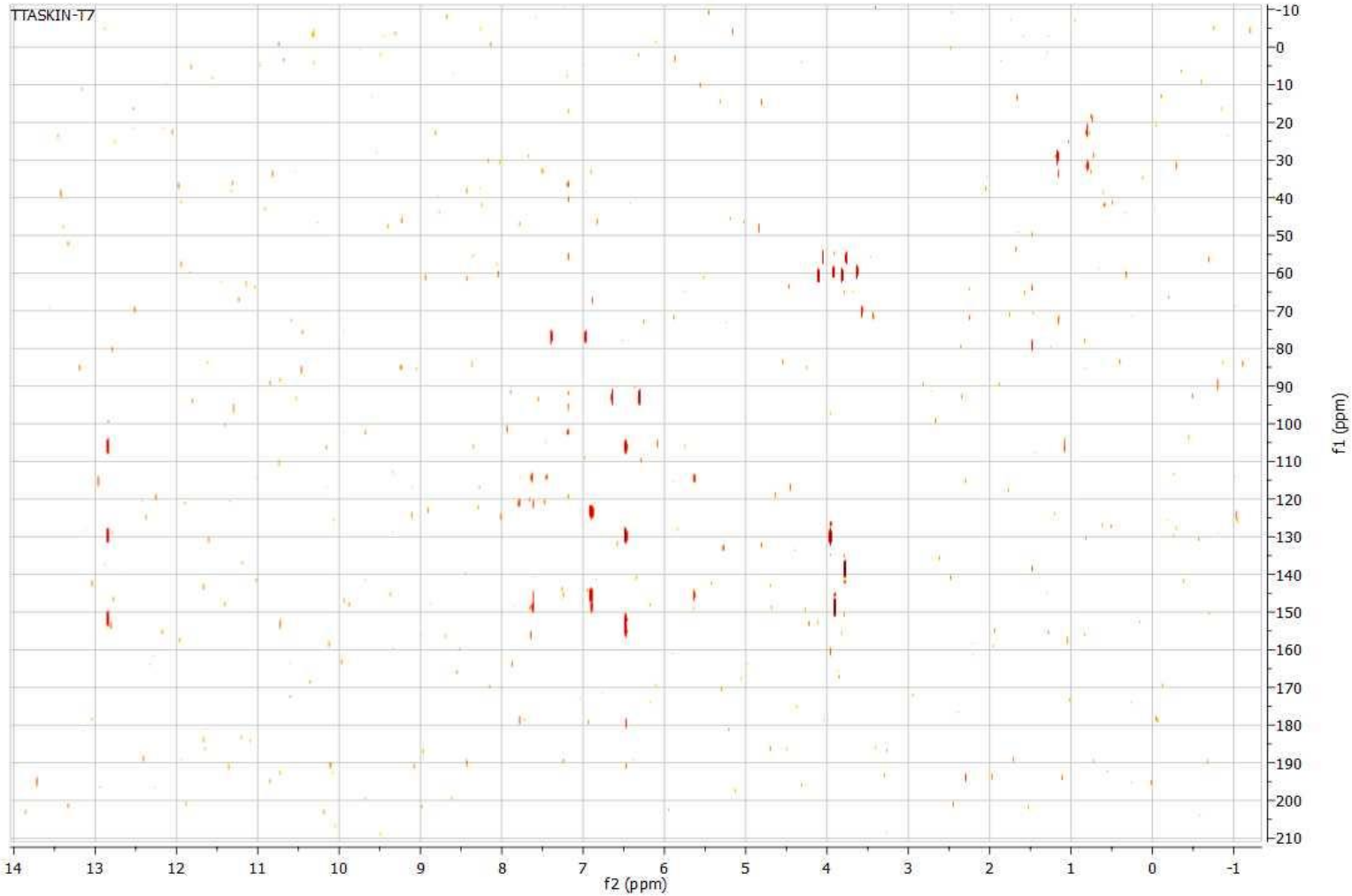
Şekil 30. A (T7) bileşiğinin APT spektrumu ($CDCl_3$, 500 MHz)



Şekil 31. A (T7) bileşiğinin COSY spektrumu ($CDCl_3$)

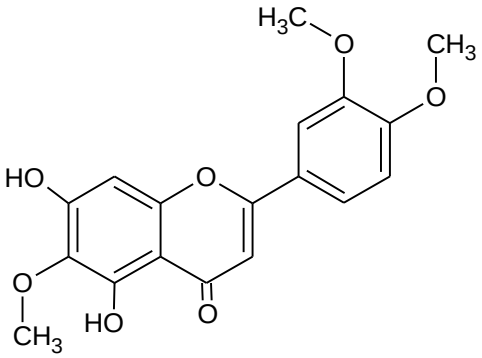


Şekil 32. A (T7) bileşiğinin HMQC spektrumu ($CDCl_3$)



Şekil 33. A (T7) bileşiğinin HMBC spektrumu ($CDCl_3$)

B (T7-1) Bileşiği: Eupatilin (5,7 dihidroksi-6,3',4'-trimetoksiflavon)



Şekil 34. Eupatilin (5,7 dihidroksi- 6,3',4'- trimetoksiflavon)

Sarı renkli olan B (T7-1) bileşiği amorf halde elde edildi. B (T7-1) bileşiği İTK plağına tatbik edilip toluen:etilasetat:metanol (7:3:1) çözeltisinde yürütüldü. İTK plakta B (T7-1)'ye ait lekenin UV lamba (254 ve 366 nm) altında incelendiğinde mor, NH_3 buharına tutulup incelendiğinde sarı ve NA belirteci püskürtüldüğünde sarı renkte görülmesi C-5 konumunda –OH, C-3 konumunda–OH olmadığı/dolu, C-3' konumunda–OH olmadığı/dolu ve C-4' konumunda-OH gruplarının bulunabileceğini düşündürdü.

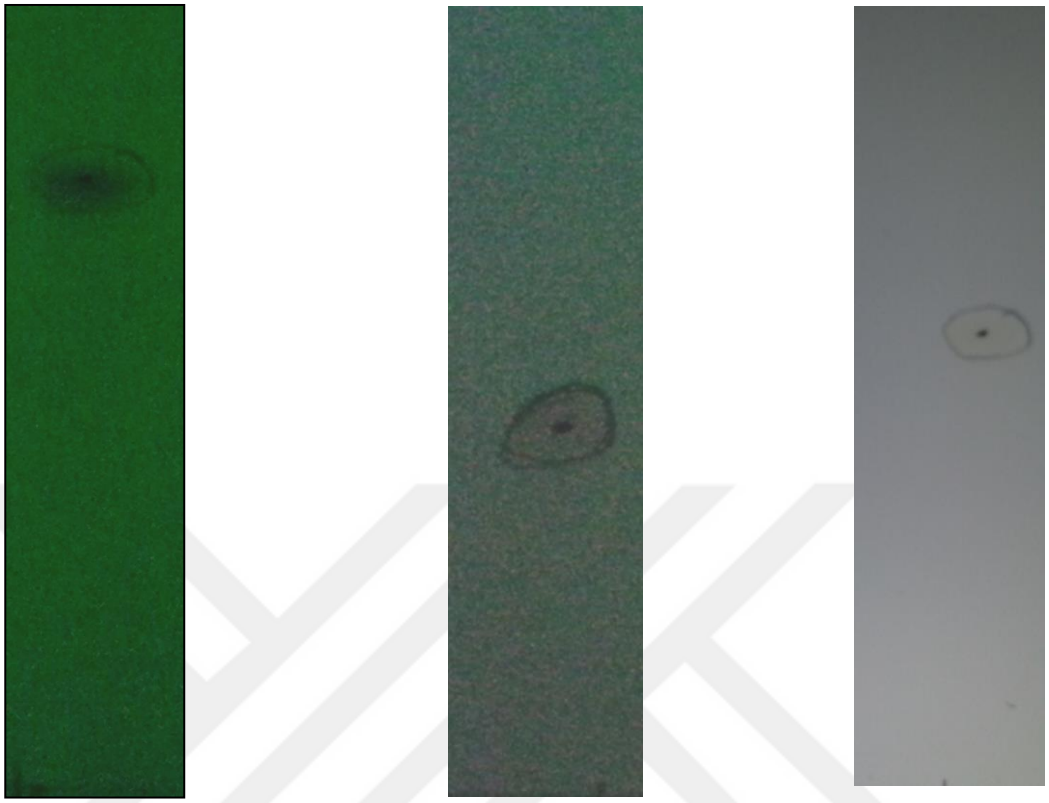
UV spektrumu; B (T7-1) bileşiğinin metanol içinde alınan UV spektrumunda Bant I 347 nm, Bant II 263 nm'de izlendi. Üç damla $NaOCH_3$ ilavesi ile alınan spektrumdaki Bant I (388 nm)'in metanol Bant I (347)'e göre 50-60 nm aralığının altında batokromik bir kaymanın (41 nm) olması ve pik şiddetinin azalması C- 4′ 'ünde -OCH_3 grubunun bulunduğunu gösterdi. $NaOCH_3$ ilavesiyle alınan spektrumdaki Bant I'in orijinal Bant I'e göre pik şiddetinin azalmasına rağmen 45-65 nm aralığının altında batokromik bir kaymanın (41 nm) olması C-3 de –OH grubunun olmadığını düşündürdü. $NaOCH_3$ ilavesiyle alınan spektrumda 305 nm'de yeni bir pikin olması ve NaOAc'ın aşırısı ilave edilerek alınan spektrumdaki Bant II'in metanol Bant II'sine göre 10 nm'lik bir kaymanın olması C-7 de –OH grubunun olduğunu gösterdi. Daha sonra NaOAc ilave edilmiş çözeltiye H_3BO_3 ilave edilerek alınan spektrumda Bant I'in, orijinal Bant I ile yaklaşık aynı kaymayı göstemesi C–3′ konumunda –OCH_3 grubunun olabileceğini gösterdi. B (T7-1)'nin metanoldeki çözeltisine $AlCl_3$ eklenerek spektrum alındıktan sonra HCl ilavesiyle alınan spektrumdaki Bant I'de, orijinal Bant I'e göre 19 nm'lik batokromik bir kayma

gözlenmesi C-5 de -OH ve C-6 da $–OCH_3$ grubunun bulunduğunu gösterdi. Kayma belirteçleri ile alınan UV spektrumları Şekil 35'de verildi.

^{1}H-NMR spektrumunda (500 MHz, $CDCl_3$) (Şekil 36); δ 3,88 (3H, *s*), δ 4,01 (3H, *s*) ve δ 4,06 (3H, *s*) izlenen sinyaller molekülde üç metoksi grubunun varlığını gösterdi. UV kayma belirteçleri ile alınan spektrumlara bakılarak bu metoksi gruplarından birisinin A halkasında C-6 ve diğer ikisinin de B halkasında C-3′ ve C-4′ konumlarında bulunduğu belirlendi. 6,99 ppm'de (1H, *d, J* =8,4 Hz) H-5′, δ 7,74'de (1H, *d, J* = 2,2 Hz) H-2′ ve 7,72 ppm'de (1H, *dd, J* = 2,1; 7,0 Hz) H-6′'nın izlenmesi ile metoksi gruplarının yerleri kesin olarak belirlendi. 5,75 ppm'deki (1H, *s*) pik H-3 protonunu, 6,57 ppm'deki (1H, *s*) pik H-8 protonunu, 12,94 ppm'de (1H, *s*) izlenen pik C-5 deki OH grubuyla C-4 deki karbonil grubunun molekül içi hidrojen bağı yaptığını gösterdi. ^{1}H-NMR'da elde edilen sinyaller literatürdeki eupatilin bileşiğine ait değerlerle uygunluk göstermektedir (Deng ve ark., 2004; Suleimenov ve ark., 2005; Nacer ve ark., 2006; Ulusoylu, 2004; Kolak ve ark., 2009).

IR (MeOH)νmax :3330 (OH), 2943, 2832, 1651 (C=O), 1449, 1306, 1270, 1215, 1113, 1025, 712, 678, 660 cm^{-1}. IR spektrumundan elde edilen pikler literatürdeki eupatilin bileşiğine ait değerlerle uygunluk göstermektedir (Suleimenov ve ark., 2005; Deng ve ark., 2004). B (T7-1) bileşiğine ait IR spektrumu Şekil 37'da verildi.

Kütle spektrumu: B (T7-1) bileşiğinin molekül ağırlığı ($C_{18}H_{16}O_7$) 344,315 g/mol iken bir protonu kopmuş molekülü kütle spektrumunda 343,0819 g/mol olarak görüldü. Molekülün negatif modtaki MS spektrumu Şekil 38'de gösterildi.



7 Toluen: 3 EA: 1MeOH 2 Toluen: 1EA + NH_3/NA

254 nm 254 nm

Resim 7. B bileşiğinin farklı çözücü sistemlerinde yürütüldükten sonra 254 nm UV ışık altında ve NH_3/NA belirteci püskürtülüp bekletildikten sonra elde edilen İTK kromatogramları

UV Kayma Değerleri (λmax, nm)

MeOH : 263, 270, 347

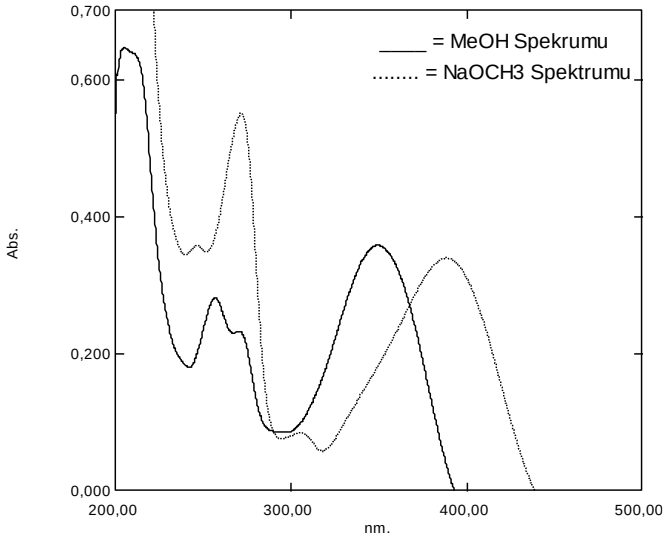
$NaOCH_3$: 271, 305 omuz, 388

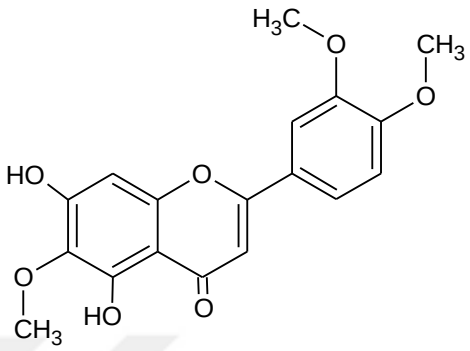
$AlCl_3$: 218, 260, 369

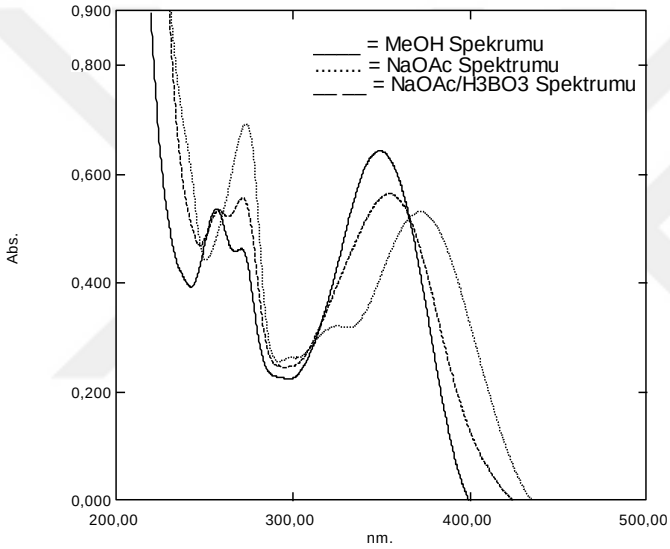
$AlCl_3$/HCl : 220, 267, 366

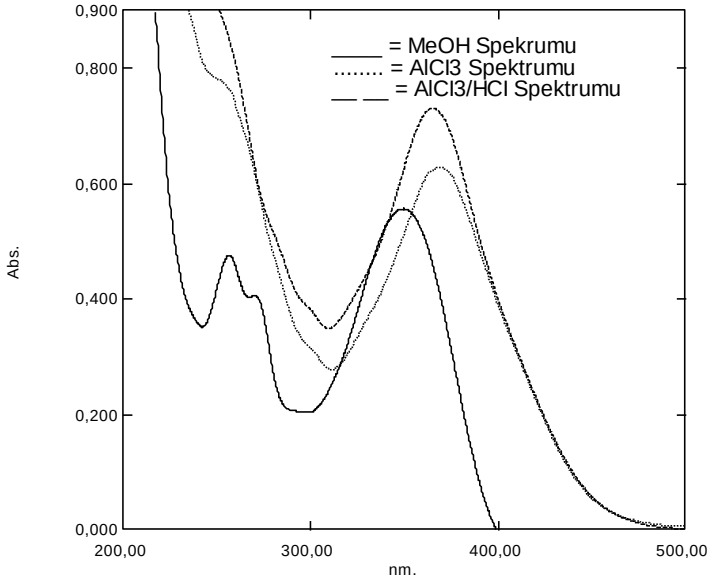
NaOAc : 273, 299, 323 omuz, 373

NaOAc/H_3BO_3 : 258, 271, 350

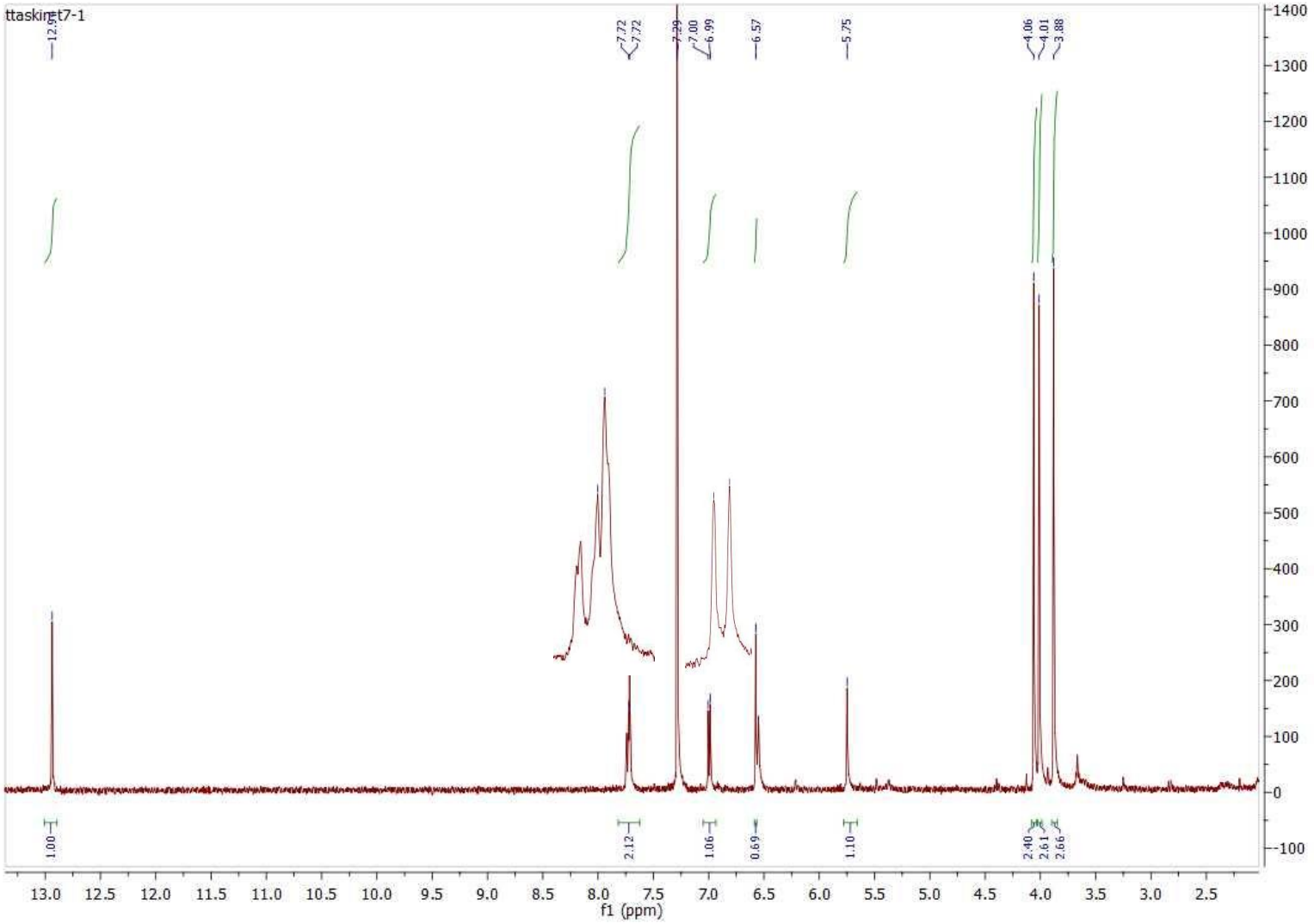




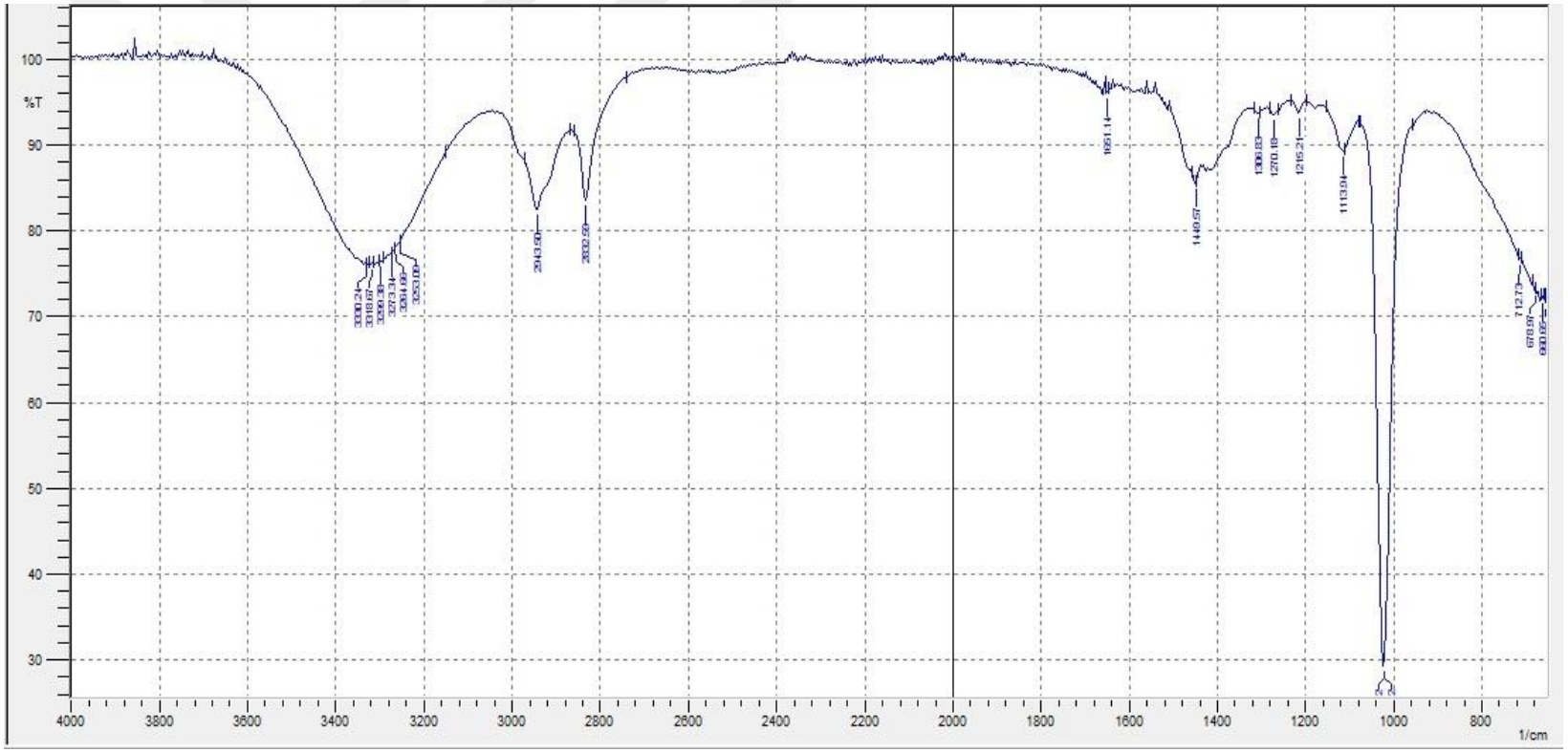




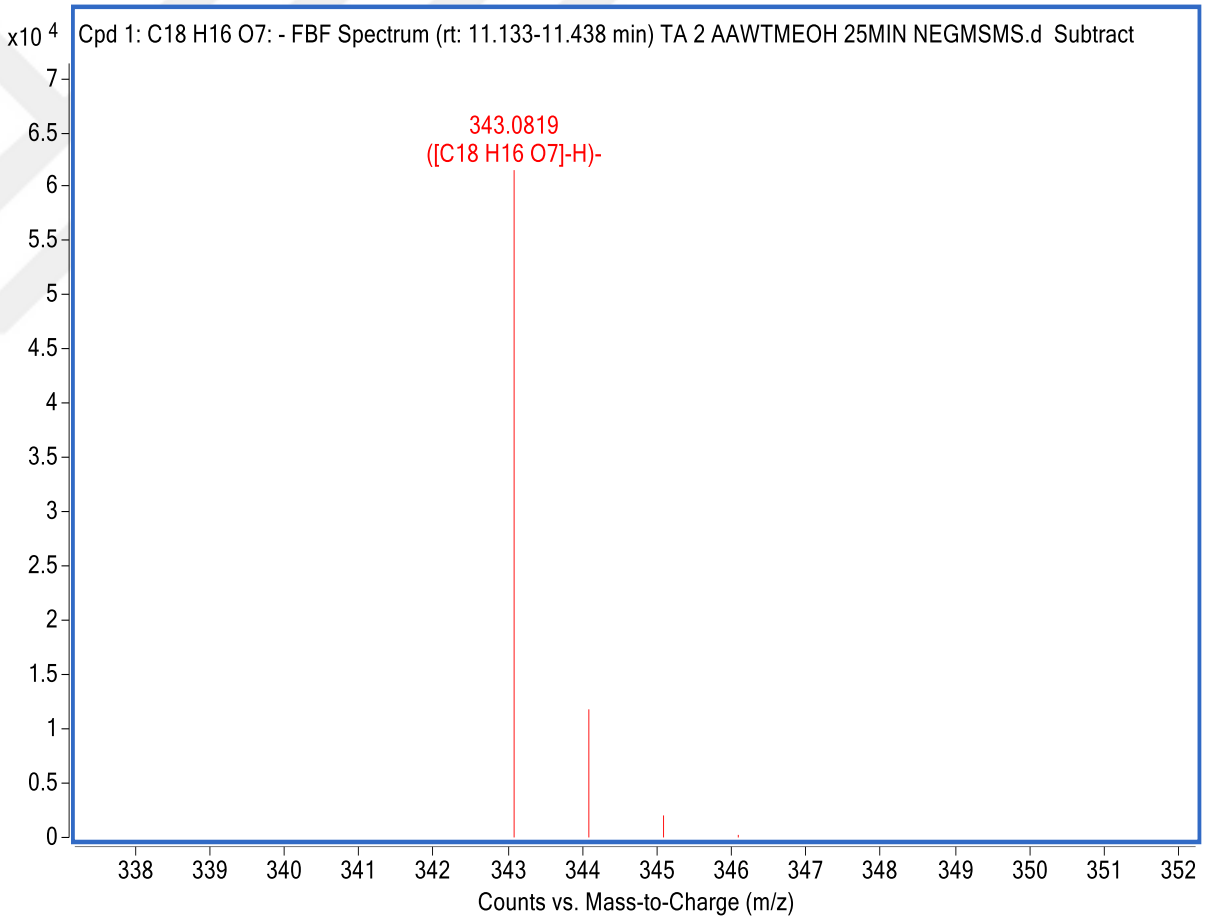
Şekil 35. B (T7-1) bileşiğine ait UV spektrumları



Şekil 36. B (T7-1) bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu ($CDCl_3$, 500 MHz)

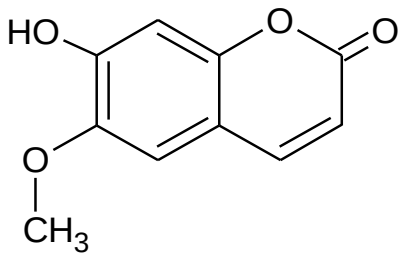


Şekil 37. B (T7-1) bileşiğinin IR spektrumu



Şekil 38. B (T7-1) bileşiğinin kütle spektrumu (ESI-MS)

C (T6) Bileşiği: Skopoletin (7-hidroksi-6-metoksikumarin)



Şekil 39. Skopoletin (7-hidroksi-6-metoksikumarin)

C (T6) bileşiği kristal olarak elde edildi. C (T6) bileşiği İTK plağına tatbik edilip toluen:etilasetat:metanol (7:3:1) çözeltisinde yürütüldü. İTK plakta C (T6)'ya ait lekenin UV lamba (254 ve 366 nm) altında incelendiğinde açık mavi renkte görülmesi bu bileşiğin kumarin olduğunu düşündürdü. Bu bileşik hem NH_3 buharına tutulup incelendiğinde hem de bu bileşiğe KOH (%5) belirteci püskürtüldüğünde C (T6) bileşiği mavi renkte görüldü.

^{1}H-NMR spektrumunda (500 MHz, MeOD); δ 3,93 (3H, *s*), de izlenen sinyal molekülde bir metoksi grubunun varlığını belirtti. 6,24 ppm (1H, *d*, *J* =9,4 Hz) H-3, δ 7,90'da (1H, d, *J* = 9,4 Hz) H-4, 7,15 ppm'de (1H, s) H-5 ve 6,80 ppm 'de (1H, s) H-8 protonunu gösterir. C (T6) bileşiğinin ^{1}H-NMR verileri ile skopoletin bileşiğinin literatürdeki ^{1}H-NMR verilerinin benzer olduğu görüldü ve her iki bileşiğin ^{1}H-NMR verileri karşılaştırılmalı olarak Tablo 40'de verildi (Bhatt ve ark., 2011).

UV spektrumları: Elimizde saf olarak bulunan skopoletin bileşiği ile izole ettiğimiz C (T6) bileşiğinin önce metanoldeki UV spektrumları, daha sonrada $NaOCH_3$ spektrumları üstüste çakıştırıldı ve spektrumların aynı olduğu tespit edildi. Saf skopoletin ve C (T6) bileşiğinin λmax(nm) değerleri Tablo 41'de, üstüste çakıştırılan spektrumları ise Şekil 40-41'de gösterildi.

IR spektrumu: Elimizde saf olarak bulunan skopoletin bileşiği ve C (T6) bileşiğinin IR değerlerinin aynı olduğu saptandı ve her iki bileşiğin IR değerleri Tablo 42'de gösterildi. C (T6) bileşiğinin IR değerlerinin literatür ile tam uygunluk gösterdiği saptandı (Habbu ve ark., 2012; Bhatt ve ark., 2011; Ferdinal ve ark., 2015).

Kütle spektrumu: C (T6) bileşiğinin molekül ağırlığı ($C_{10}H_8O_4$) kütle spektrumunda 192,0335 g/mol olarak tespit edildi. Ayrıca bu bileşiğin fragment iyonlarının molekül ağırlıkları 176,0112; 148,0158; 120,0220; 104,0267 g/mol olarak saptandı. C (T6) bileşiğinin fragment iyonlarının molekül ağırlıkları literatürdeki skopoletin bileşiğine ait değerler ile uygunluk göstermektedir (Zeng ve ark., 2015). Molekülün negatif modtaki MS/MS spektrumu Şekil 43'de gösterildi.

Tablo 40. Skopoletin ve C (T6) bileşiğinin ^{1}H- NMR verileri

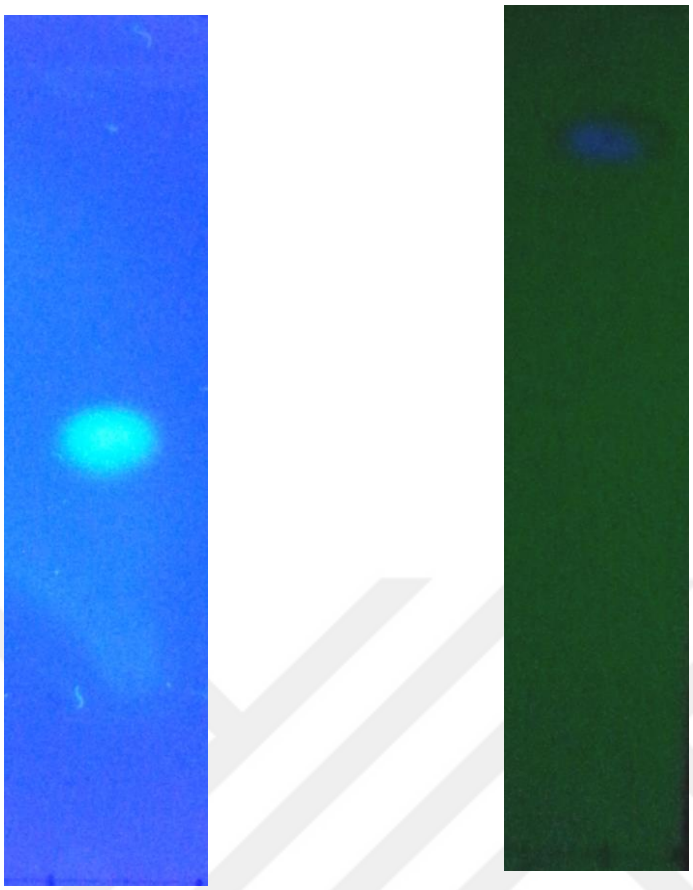
H numarası	**Skopoletin**		**C (T6) Bileşiği**	
	δ değerleri (ppm)	J değerleri (Hz)	δ değerleri (ppm)	J değerleri (Hz)
3	6,23	1H, d (9,2)	6,24	1H, d (9,4)
4	7,88	1H, d (9,6)	7,90	1H, d (9,4)
5	7,14	1H, s	7,15	1H, s
8	6,79	1H, s	6,80	1H, s
C-6-OMe	3,93	3H, s	3,93	3H, s

Tablo 41. Saf skopoletin ve C (T6) bileşiğinin λmax(nm) değerleri

Bileşikler	**λmax(nm)**	
	MeOH spektrumu	$NaOCH_3$ spektrumu
Saf skopoletin	227,60; 297,00; 344,60	205,80; 391,00
C (T6) Bileşiği	227,20; 297,80; 344,80	205,20; 391,60

Tablo 42. Skopoletin ve C (T6) bileşiğinin IR değerleri

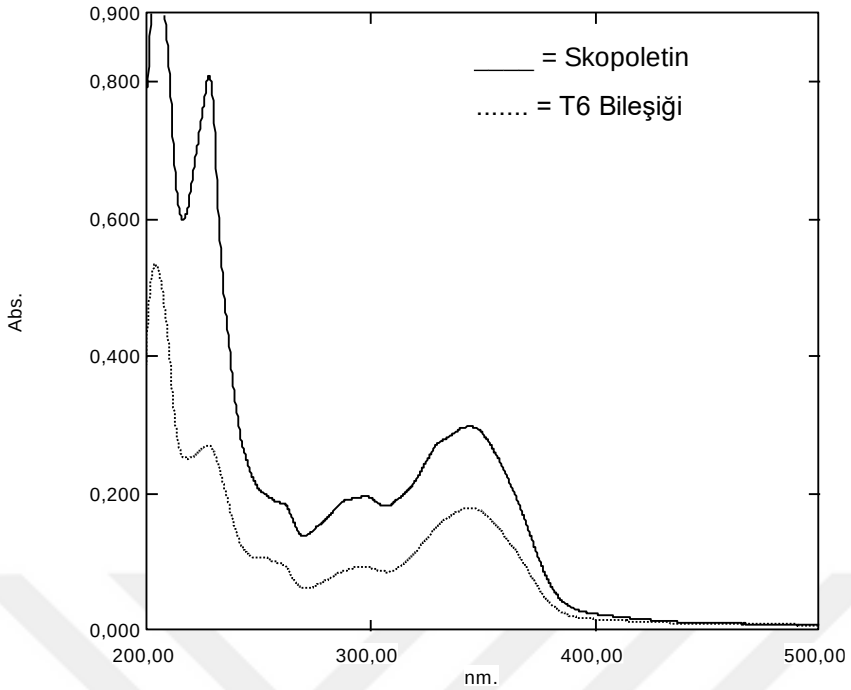
Bileşikler	**IR (MeOH)νmax**
Skopoletin	3338 (OH), 2944 (C-H), 2831, 1703 (C=O), 1569, 1506, 1450, 1415, 1112, 1025, 672, 661
C (T6) Bileşiği	3335 (OH), 2944 (C-H), 2833, 1669 (C=O), 1569, 1506, 1448, 1411, 1112, 1025, 677, 657



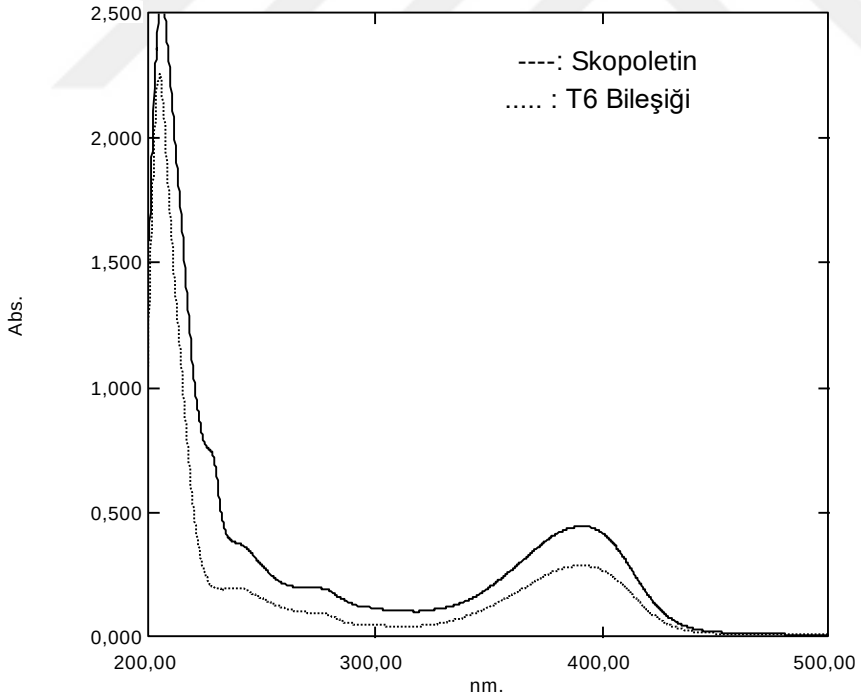
7 Toluen: 3 EA: 1MeOH EA

366 nm 254 nm

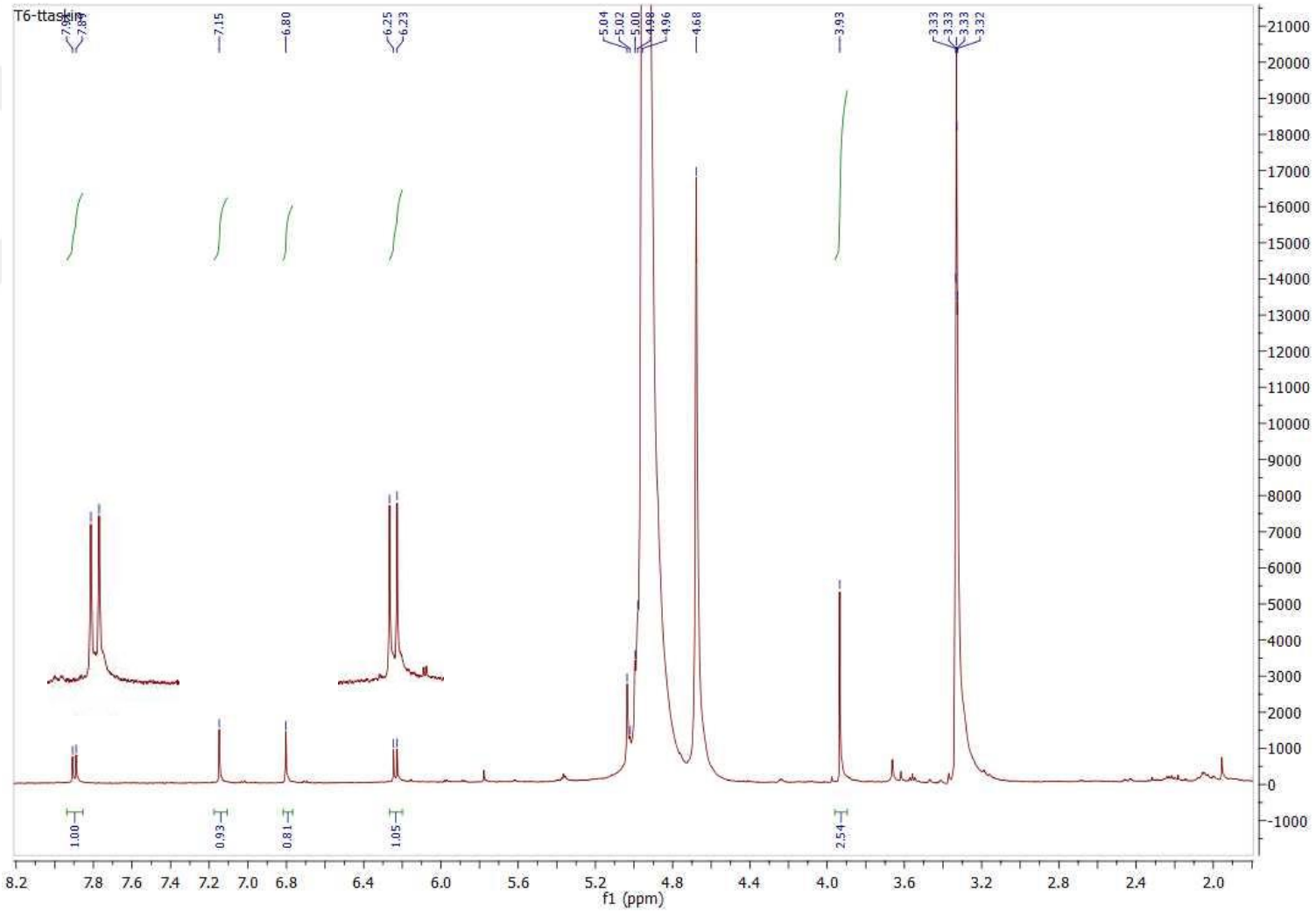
Resim 8. C bileşiğinin farklı çözücü sistemlerinde yürütüldükten sonra 254 nm ve 366 nm UV ışık altındaki İTK kromatogramları



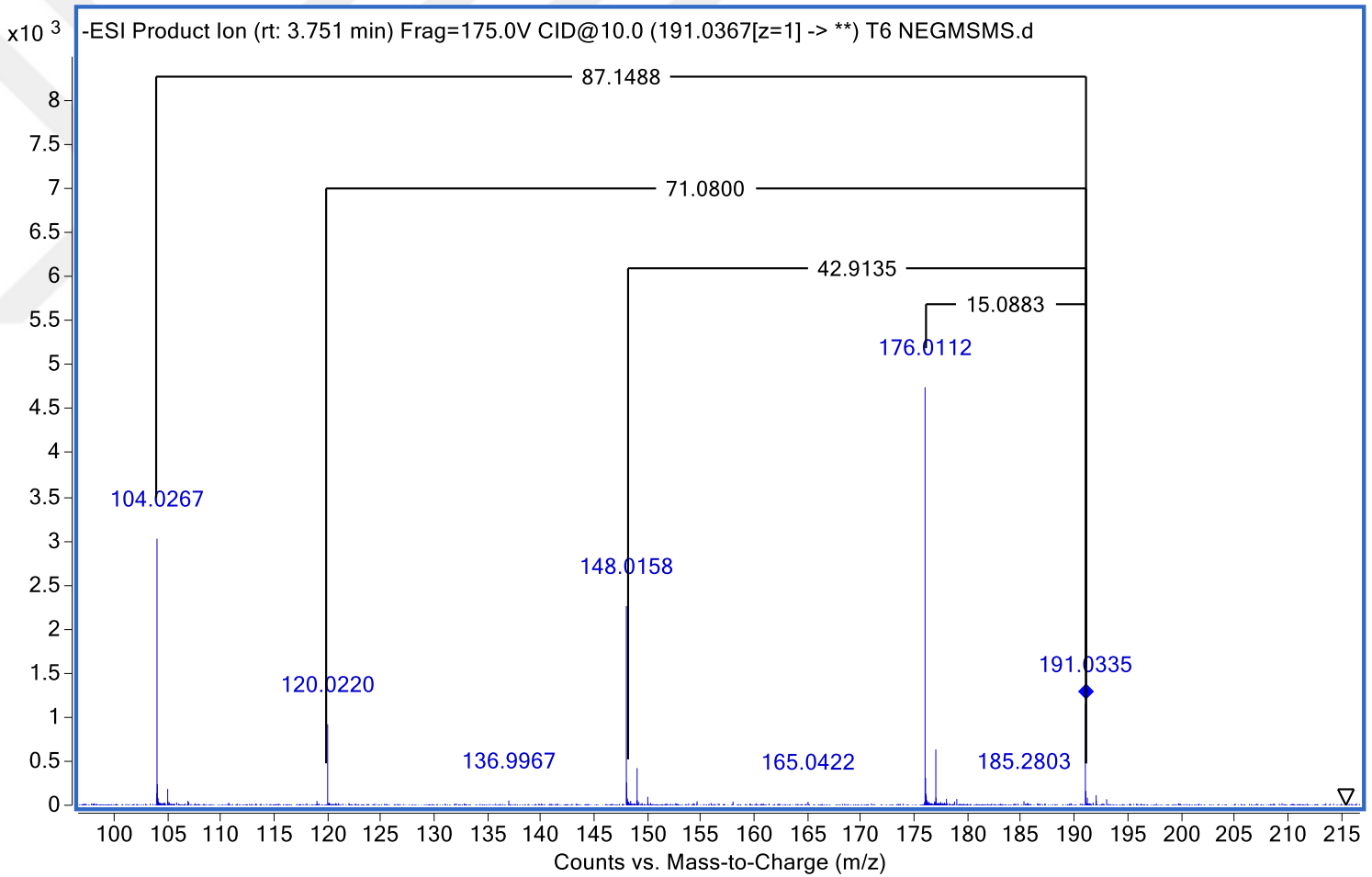
Şekil 40. Saf skopoletin ve C (T6) bileşiğinin metanol spektrumları



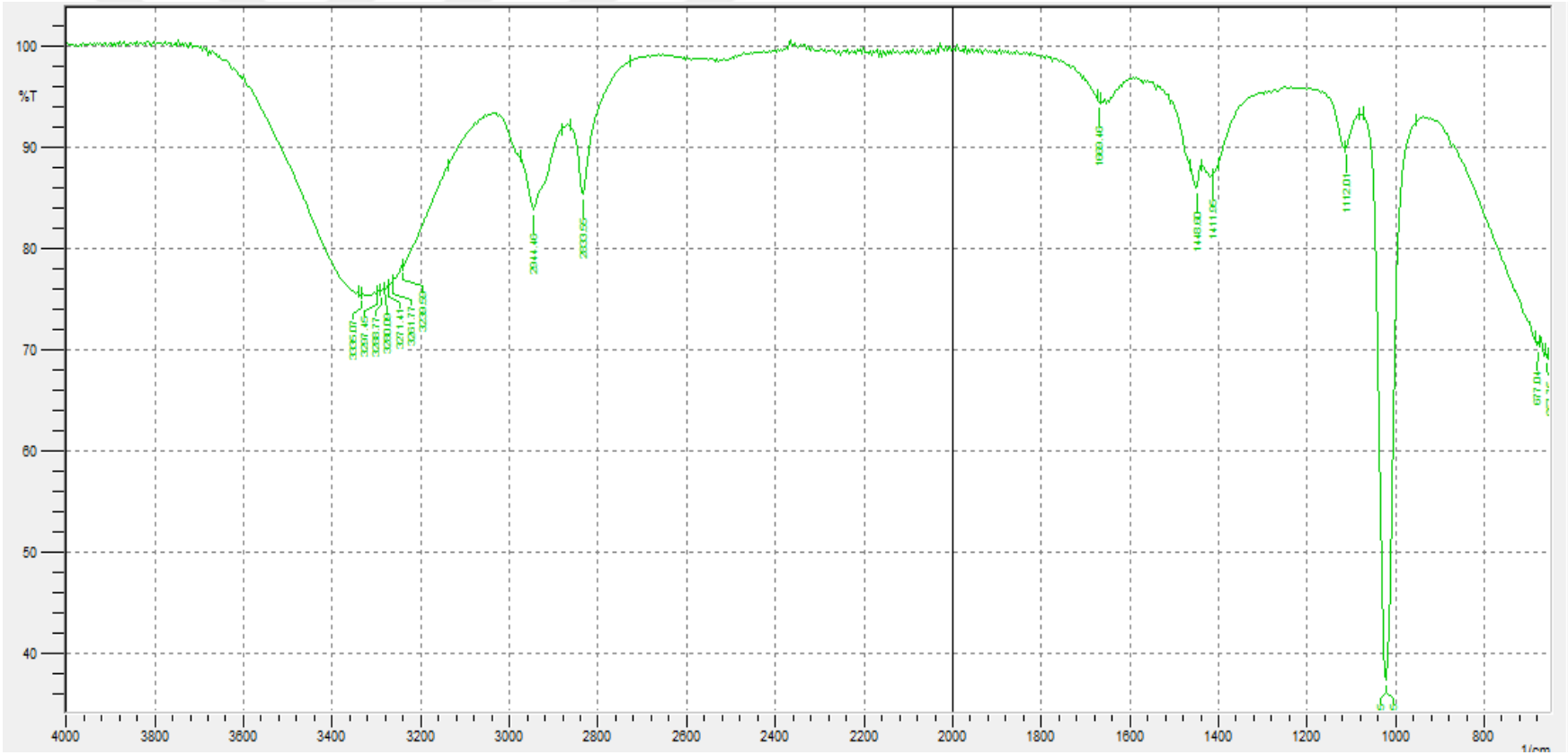
Şekil 41. Saf skopoletin ve C (T6) bileşiğinin $NaOCH_3$ spektrumları



Şekil 42. C (T6) bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu (MeOD, 500 MHz)

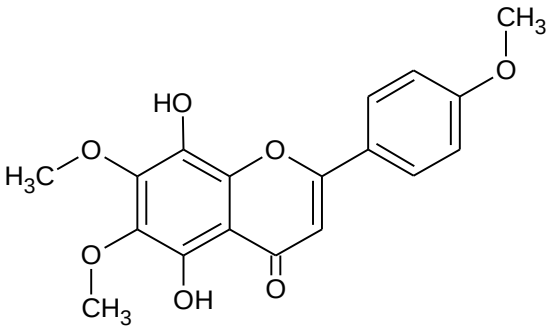


Şekil 43. C (T6) bileşiğinin kütle spektrumu (ESI-MS)



Şekil 44. C (T6) bileşiğinin IR spektrumu

D (TA) Bileşiği: 8-hidroksi-salvigenin (5,8-dihidroksi–6,7,4'–trimetoksiflavon)



Şekil 45. 8-hidroksi–salvigenin

Sarı renkli olan D (TA) bileşiği amorf halde elde edildi. D (TA) bileşiği İTK plağına tatbik edilip toluen:etilasetat:metanol (7:3:1) çözeltisinde yürütüldü. İTK plakta D (TA)'ye ait lekenin UV lamba (254 ve 366 nm) altında incelendiğinde mor, NH_3 buharına tutulup incelendiğinde sarı ve NA belirteci püskürtüldüğünde sarı renkte görülmesi C-5 konumunda –OH grubunun bulunabileceğini gösterdi.

UV spektrumu; D (TA) bileşiğinin metanol içinde alınan UV spektrumunda Bant I 336 nm, Bant II 271 nm'de izlendi. Üç damla $NaOCH_3$ ilavesi ile alınan spektrumdaki Bant I (371 nm)'in metanol Bant I (336)'e göre 50-60 nm aralığının altında batokromik bir kaymanın (35 nm) olması ve pik şiddetinin azalması C- 4′ 'ünde -OCH_3 grubunun bulunduğunu gösterdi. $NaOCH_3$ ilavesiyle alınan spektrumdaki Bant I'in orijinal Bant I'e göre pik şiddetinin azalmasına rağmen 45-65 nm aralığının altında bir batokromik bir kaymanın (35 nm) olması C-3 de –OH grubunun olmadığını gösterdi. $NaOCH_3$ ilavesiyle alınan spektrumun 310-325 nm aralığında yeni bir pikin olmaması ve NaOAc'ın aşırısı ilave edilerek alınan spektrumdaki Bant II'in metanol Bant II'sine göre bir kaymanın olmaması C-7 de –OCH_3 grubunun olduğunu düşündürdü. D (TA)'nin metanoldeki çözeltisine $AlCl_3$ eklenerek spektrum alındıktan sonra HCl ilavesiyle alınan spektrumdaki Bant I'de, orijinal Bant I'e göre 22 nm'lik batokromik bir kayma gözlenmesi C-5 de –OH ve C-6 da –OCH_3 grubunun bulunduğunu gösterdi.

D (TA)'nin metanoldeki çözeltisine NaOAc'ın aşırısı ilave edilerek alınan spektrumdaki Bant I (370 nm), $NaOCH_3$ ile alınan spektrumdaki Bant I (371)'e yakın çıktığı için C–7 de –OCH_3 grubunun bulunduğu tespit edildi. Kayma belirteçleri ile alınan UV spektrumları Şekil 46'de gösterildi.

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) (Şekil 47); δ 3,78 (3H, *s*), δ 3,83 (3H, *s*), ve δ 3,97 (3H, *s*) de izlenen sinyaller molekülde üç metoksi grubunun varlığını belirtti. UV kayma belirteçleri ile alınan spektrumlara bakılarak bu metoksi gruplarından ikisinin A halkasında C-6 ve C-7 de diğer birinin de B halkasında C-4′ konumunda bulunduğu belirlendi. 8,00 ppm'de (dd, *J* = 3,5 Hz; *J* = 9,0 Hz, 2H) H-2′, H-6′, δ 6,96 (dd, *J* = 3,5 Hz; *J* = 9,1 Hz, 2H) H-5′, H-3′ izlenmesi ile metoksi gruplarının yerleri kesin olarak belirlendi. 6,48 ppm'deki (s, 1H) pik H-3 protonunu, 12,87 ppm'de (s, 1H) izlenen pik C-5 deki OH grubuyla C-4 deki karbonil grubunun molekül içi hidrojen bağ yaptığını gösterir.

Kütle spektrumu: ^{1}H-NMR'da H-8'e ait sinyal görülmemesi ve kütle spektrumunda bileşiğin molekül ağırlığının ($C_{18}H_{16}O_7$) 344,0872 g/mol olarak çıkmasından dolayı C-8 de -OH grubunun olduğu belirlendi. Ayrıca bu bileşiğin fragment iyonlarının molekül ağırlıkları 329,0555; 314,0340; 286,0370; 271,0223; 242,0228; 186,0310 g/mol olarak saptandı. Molekülen negatif modtaki MS/MS spektrumu Şekil 48'de gösterildi.

IR (MeOH)νmax : 3316 (OH), 2943 (C-H), 2831, 1680 (C=O), 1447, 1411, 1261, 1180, 1113, 1025, 663 cm^{-1}. D (TA) bileşiğine ait IR spektrumu Şekil 49'da verildi.

D (TA) bileşiğinin, ^{1}H-NMR, IR ve kütle spektrumlarından elde edilen değerler literatürdeki değerler ile uygunluk göstermektedir (Brahmachari ve ark., 2004; Intekhab ve Aslam, 2009). Literatür çalışmaları sonucu bu bileşiğin *Achillea* cinsinden ilk defa izole edildiği belirlendi.

UV Kayma Değerleri (λmax, nm)

MeOH : 214, 271, 336

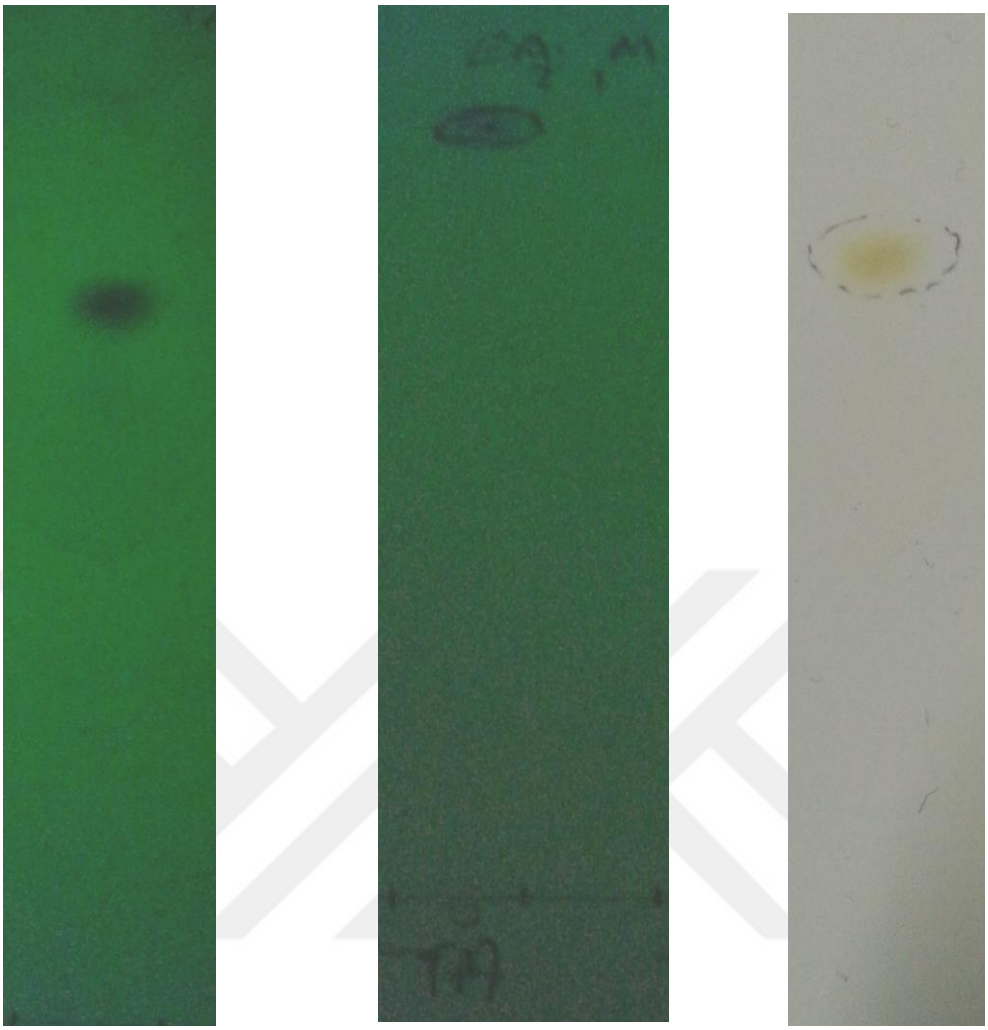
$NaOCH_3$: 274, 297 omuz, 371

$AlCl_3$: 213, 304 omuz, 363

$AlCl_3$/HCl : 215, 278 omuz, 358

NaOAc : 274, 297 omuz, 370

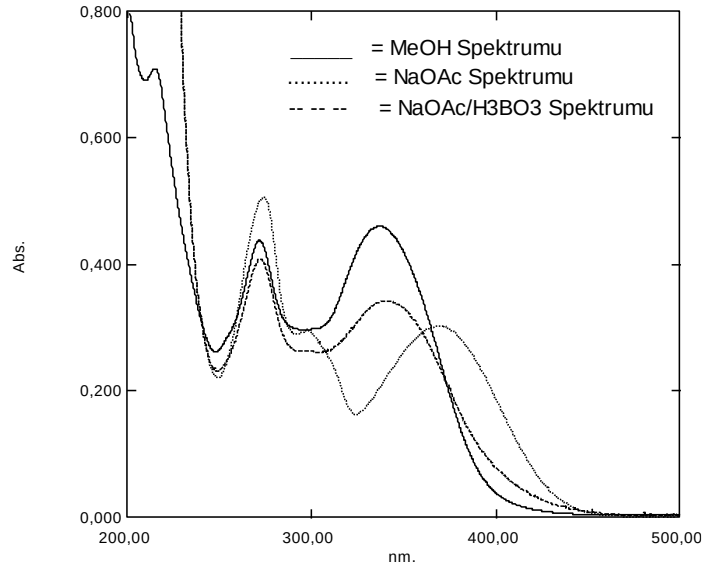
NaOAc/H_3BO_3 : 271, 298, 341

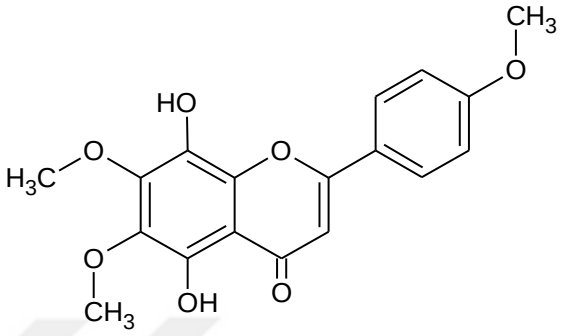


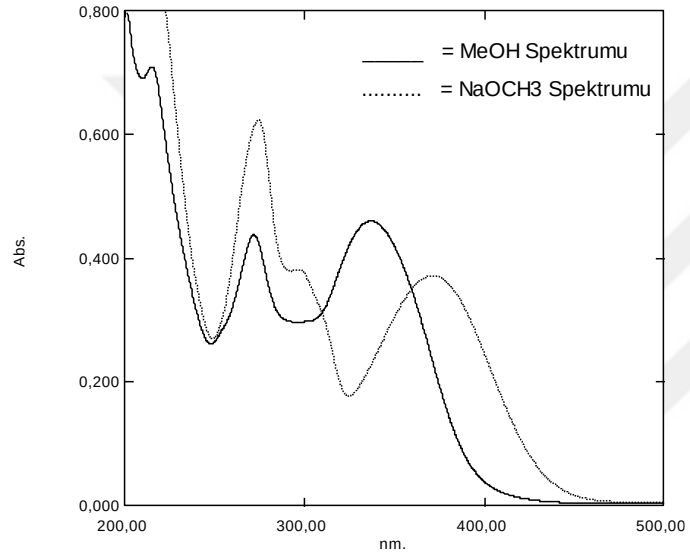
7 Toluen: 3 EA: 1MeOH 3EA : 1MeOH + NH_3/NA

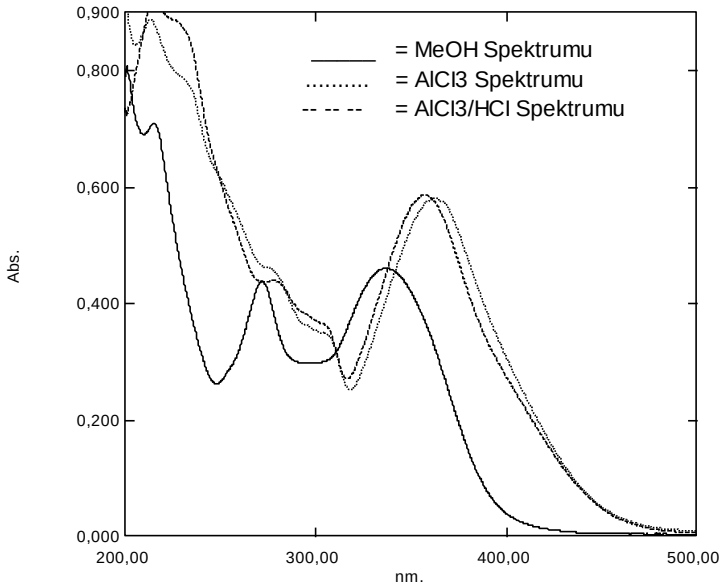
254 nm 254 nm

Resim 9. D bileşiğinin farklı çözücü sistemlerinde yürütüldükten sonra 254 nm UV ışık altında ve NH_3/NA belirteci püskürtülüp bekletildikten sonra elde edilen İTK kromatogramları

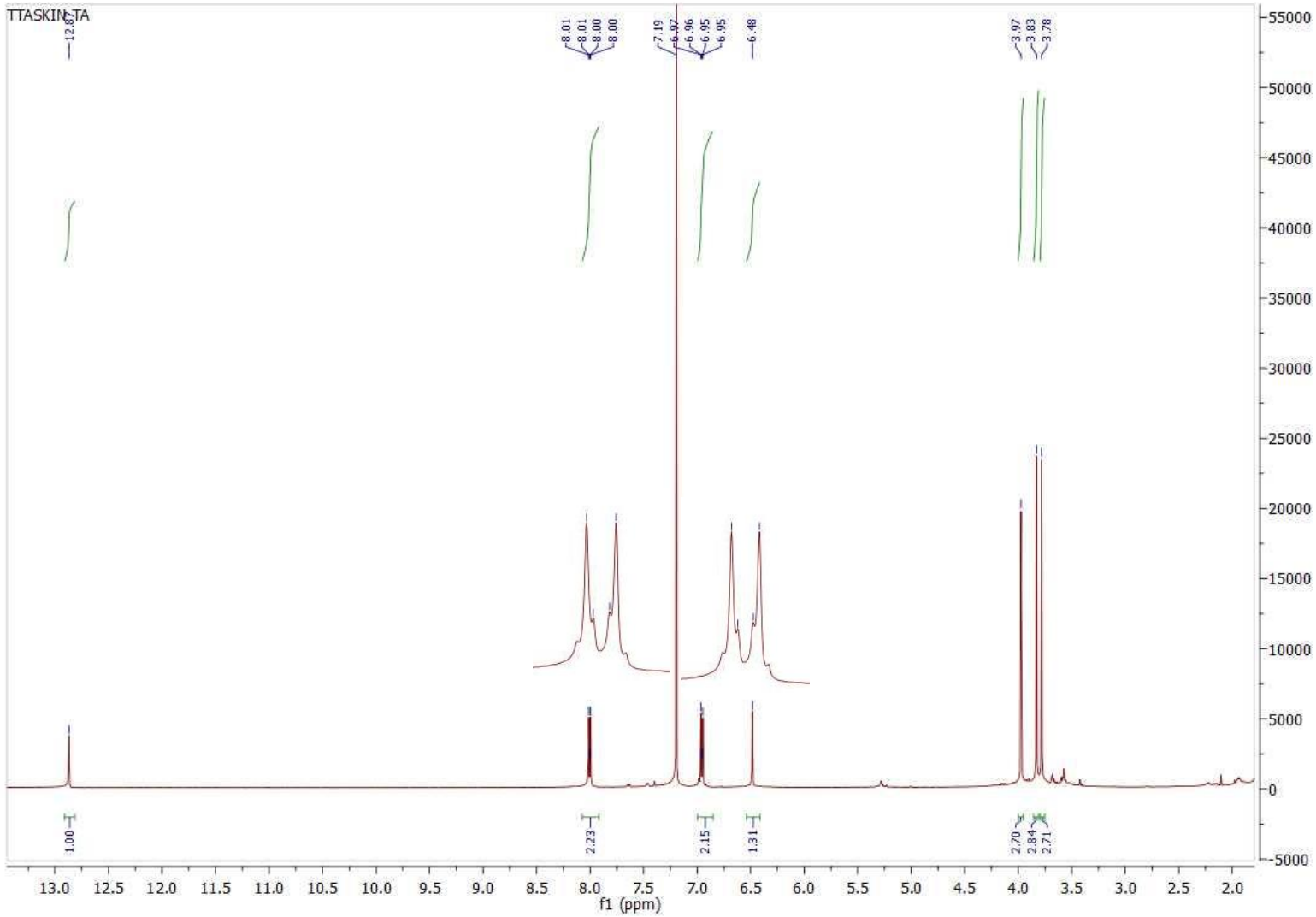




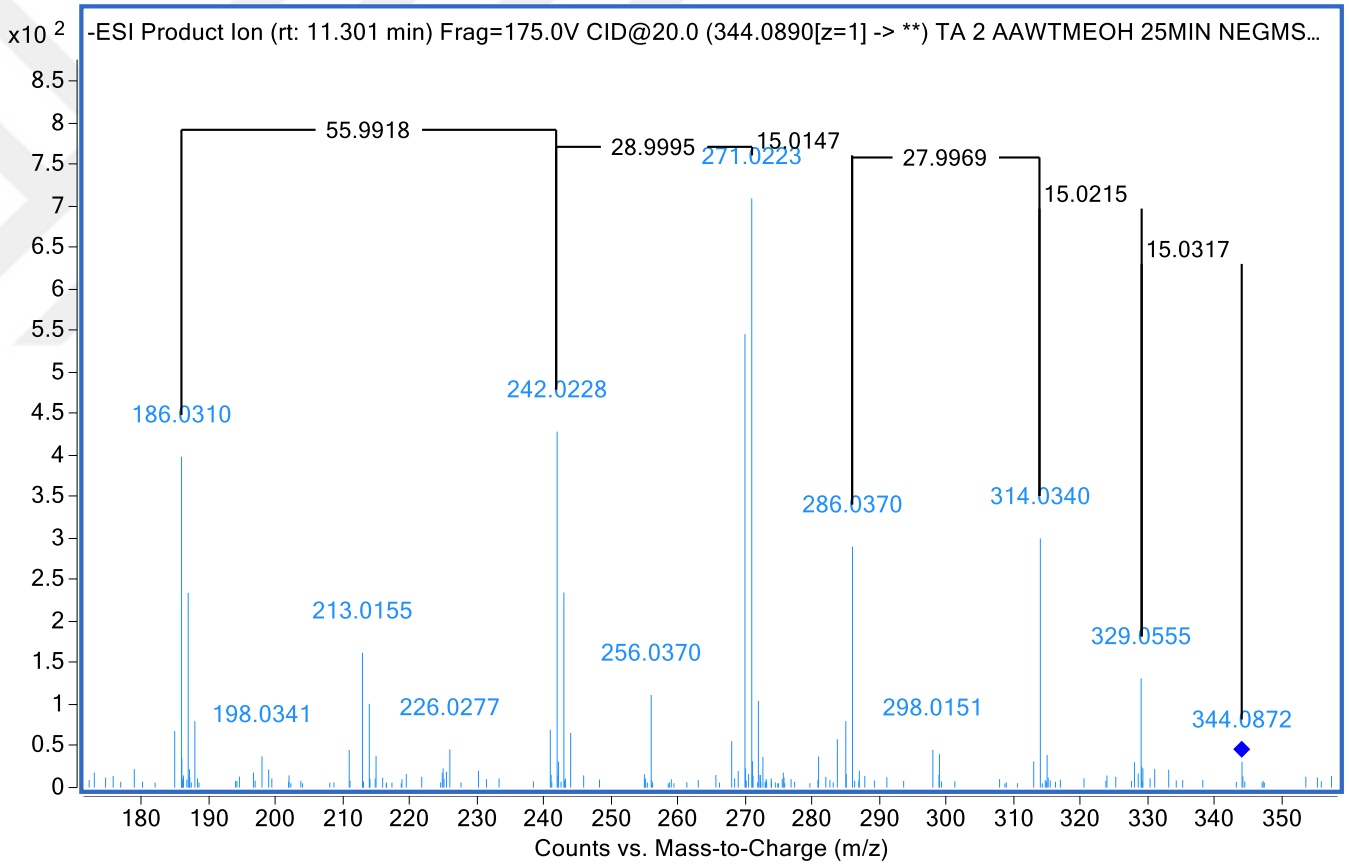




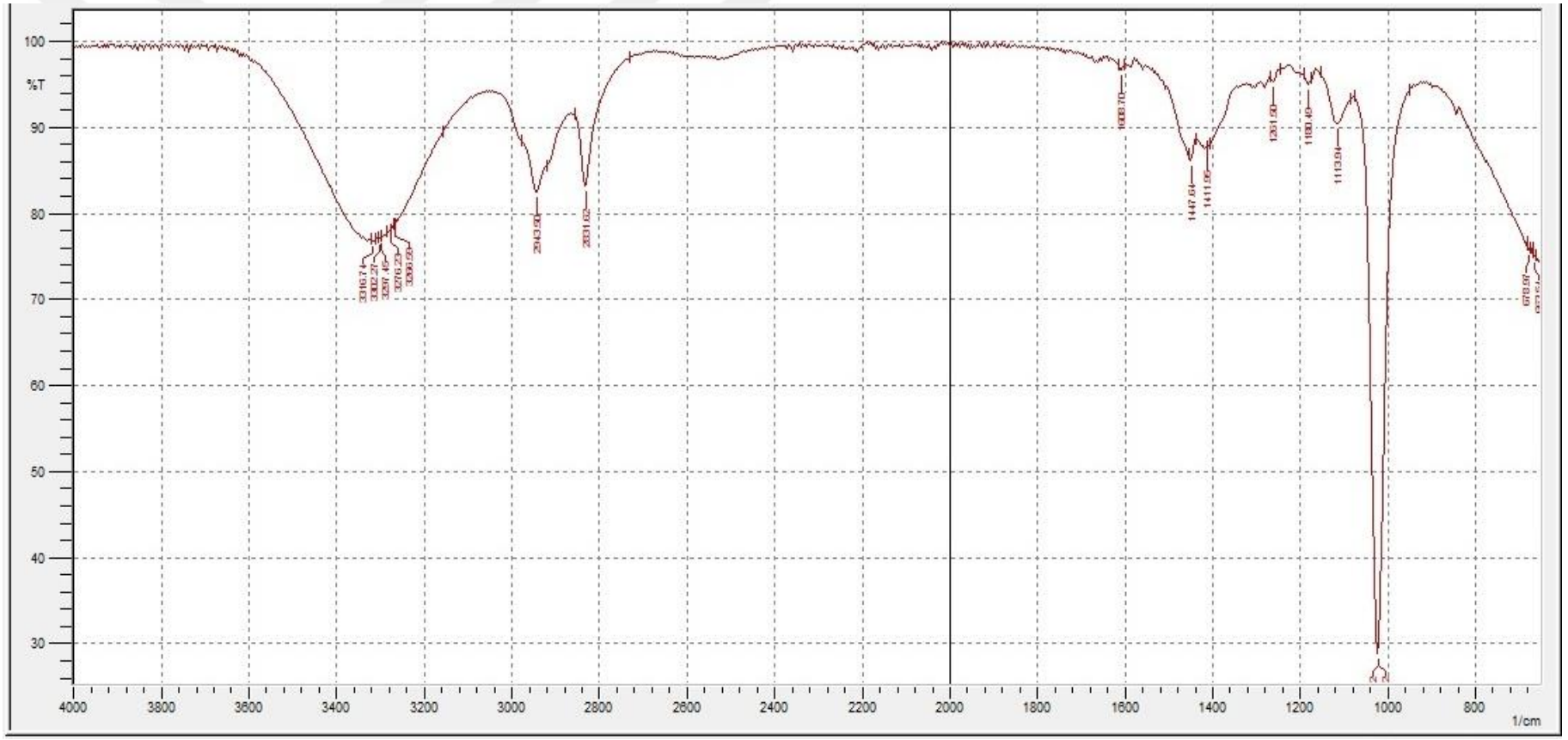
Şekil 46. D (TA) bileşiğine ait UV spektrumları



Şekil 47. D (TA) bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu ($CDCl_3$, 500 MHz)

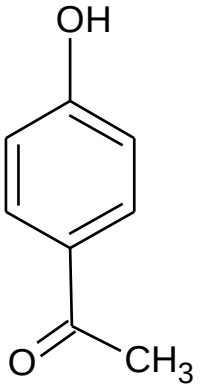


Şekil 48. D (TA) bileşiğinin kütle spektrumu (ESI-MS)



Şekil 49. D (TA) bileşiğinin IR spektrumu

E (TK) Bileşiği: 4′-Hidroksiasetofenon



Şekil 50. 4′-Hidroksiasetofenon

E (TK) bileşiği amorf olarak elde edildi. E (TK) bileşiği İTK plağına tatbik edilip toluen:etilasetat:metanol (7:3:1) çözeltisinde yürütüldü. İTK plakta E (TK)'ye ait lekenin UV lamba (254 ve 366 nm) altında incelendiğinde koyu mor renkte görülmesine rağmen NH_3 buharına tutulup incelendiğinde ve NA belirteci püskürtüldüğünde renginde bir değişmenin olmadığı görüldü. Daha sonra E (TK) bileşiğine seryum (IV) sülfat belirteci püskürtülüp 105 °C'de yakıldığında renginin kahverengine döndüğü görüldü.

UV spektrumu; E (TK) bileşiğinin metanolde alınan UV spektrumunda (Şekil 51) Bant I 218 nm, Bant II 274 nm'de gözlendi. E (TK) bileşiğinin UV spektrumlarından elde edilen değerler literatürdeki değerler ile uygunluk göstermektedir (Ding ve ark., 2000).

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) (Şekil 52); δ 2,49 (s, 3H) da izlenen sinyal molekülde bir metil grubunun varlığını belirtti. 7,84 ppm'de (2H, *dd*, J = 4,0 Hz; J = 9,0 Hz) H-2, H-6; 6,82 ppm'de (2H, *dd*, J= 3,5 Hz; J = 8,5 Hz) H-3, H-5 protonlarını gösterir. ^{1}H-NMR'da H-4'e ait sinyal görülmemesi ve kütle spektrumunda bileşiğin molekül ağırlığının 136,0451 g/mol olarak çıkmasından dolayı C-4 de -OH grubunun olduğu belirlendi. ^{1}H-NMR'da elde edilen sinyaller literatürdeki 4′-hidroksiasetofenon bileşiğine ait değerlerle uygunluk göstermektedir (Ding ve ark., 2000; Hirschmann ve ark., 2004; Kwon ve Lee, 2001; Lee ve ark., 2004; Jeon ve ark., 2008).

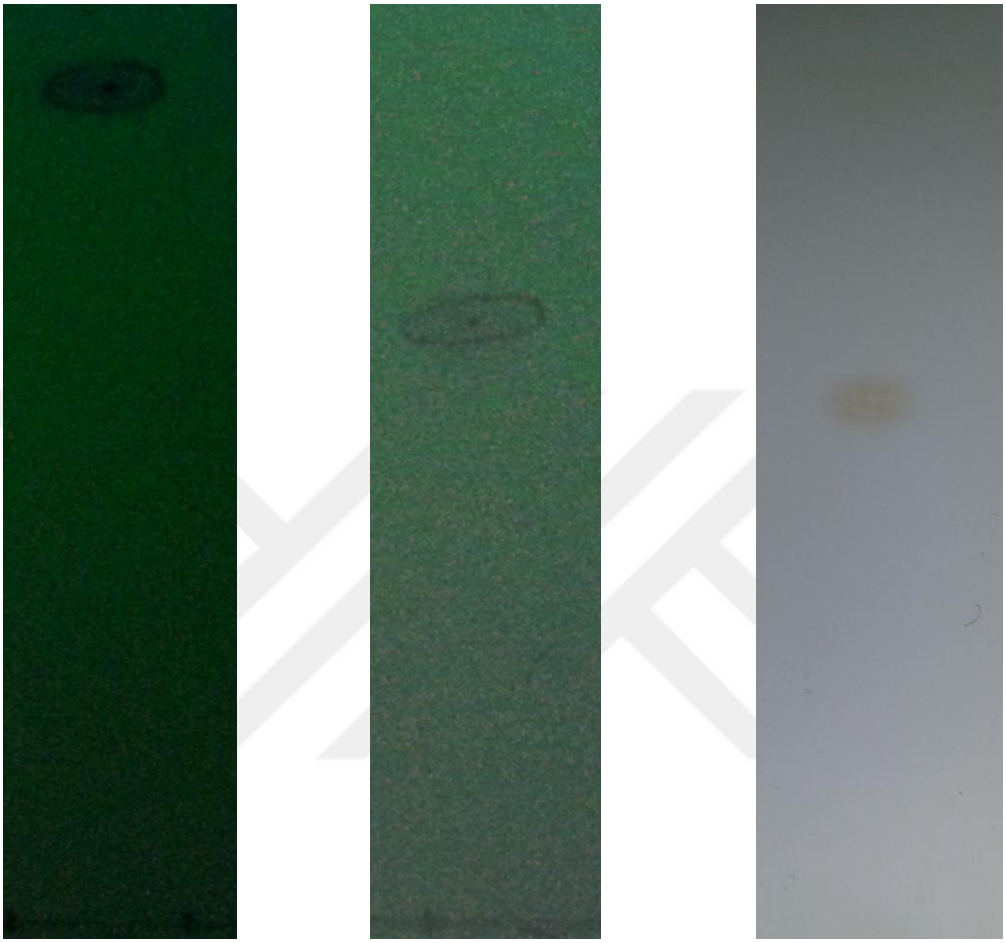
^{13}C-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) (Şekil 53) spektrumları incelendiğinde 26,34 ppm de metile ait (C-8); 114,64 ppm C-3, C-5; 130,38 ppm C-1; 132 ppm C-2, C-6; 160,07 ppm C-4 ve 197,43 ppm de karbonil grubuna ait (C-7) sinyalleri gözlendi. ^{13}C-NMR'da elde edilen sinyaller literatürdeki 4′-hidroksiasetofenon bileşiğine ait değerlerle uygunluk göstermektedir (Ding ve ark., 2000; Hirschmann ve ark., 2004; Kwon ve Lee, 2001; Lee ve ark., 2004; Jeon ve ark., 2008).

IR (MeOH)νmax: 3324 (OH), 2942 (C-H), 2831, 1863, 1665 (C=O), 1448, 1413, 1279, 1170 (C-O), 1114, 1030, 732, 687, 667 cm^{-1}. IR spektrumundan elde edilen pikler literatürdeki 4′-hidroksiasetofenon bileşiğine ait değerlerle uygunluk göstermektedir (Lee ve ark., 2004; Jeon ve ark., 2008). E (TK) bileşiğine ait IR spektrumu Şekil 54'de gösterildi.

Kütle spektrumu: E (TK) bileşiğinin molekül ağırlığı ($C_8H_8O_2$) kütle spektrumunda 136,0451 g/mol olarak tespit edildi. Ayrıca bu bileşiğin fragment iyonlarının molekül ağırlıkları 120,0164, 93,0327 g/mol olarak saptandı.
E (TK) bileşiğinin fragment iyonlarının molekül ağırlıkları literatürdeki 4′-hidroksiasetofenon bileşiğine ait değerlerle uygunluk göstermektedir (Ding ve ark., 2000; Lee ve ark., 2004). Molekülen negatif modtaki MS/MS spektrumu Şekil 55'de gösterildi.

Literatür çalışmaları sonucu bu bileşiğin *Achillea* cinsinden ilk defa izole edildiği belirlendi.

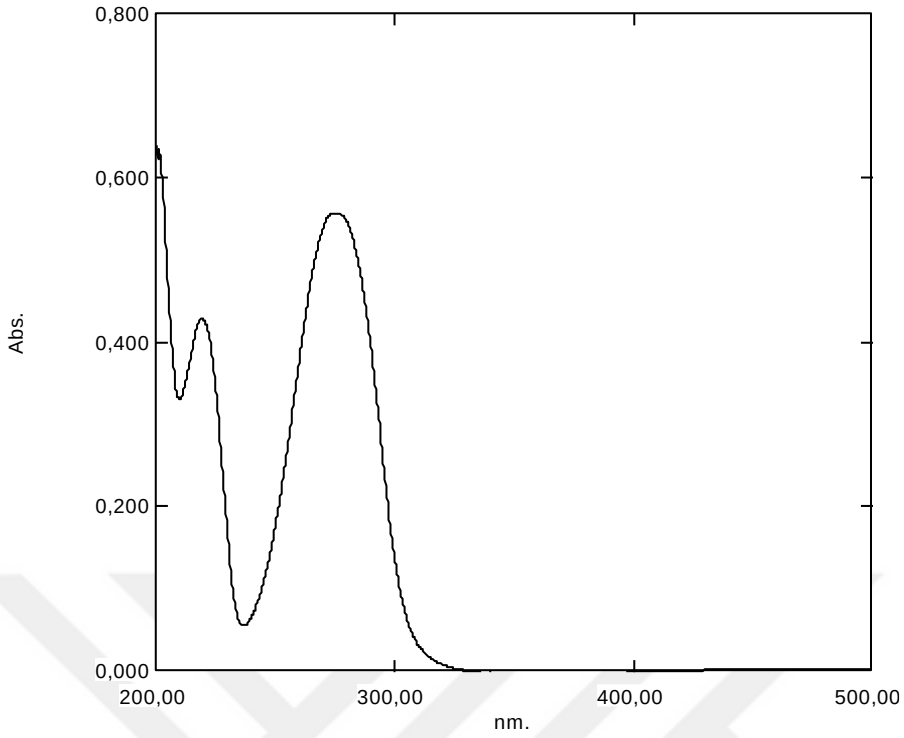
Bu bileşiğin NMR verilerinin değerlendirilmesinde yardımcı olan M.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Yard.Doç.Dr. Esra Tatar'a teşekkür ederim.



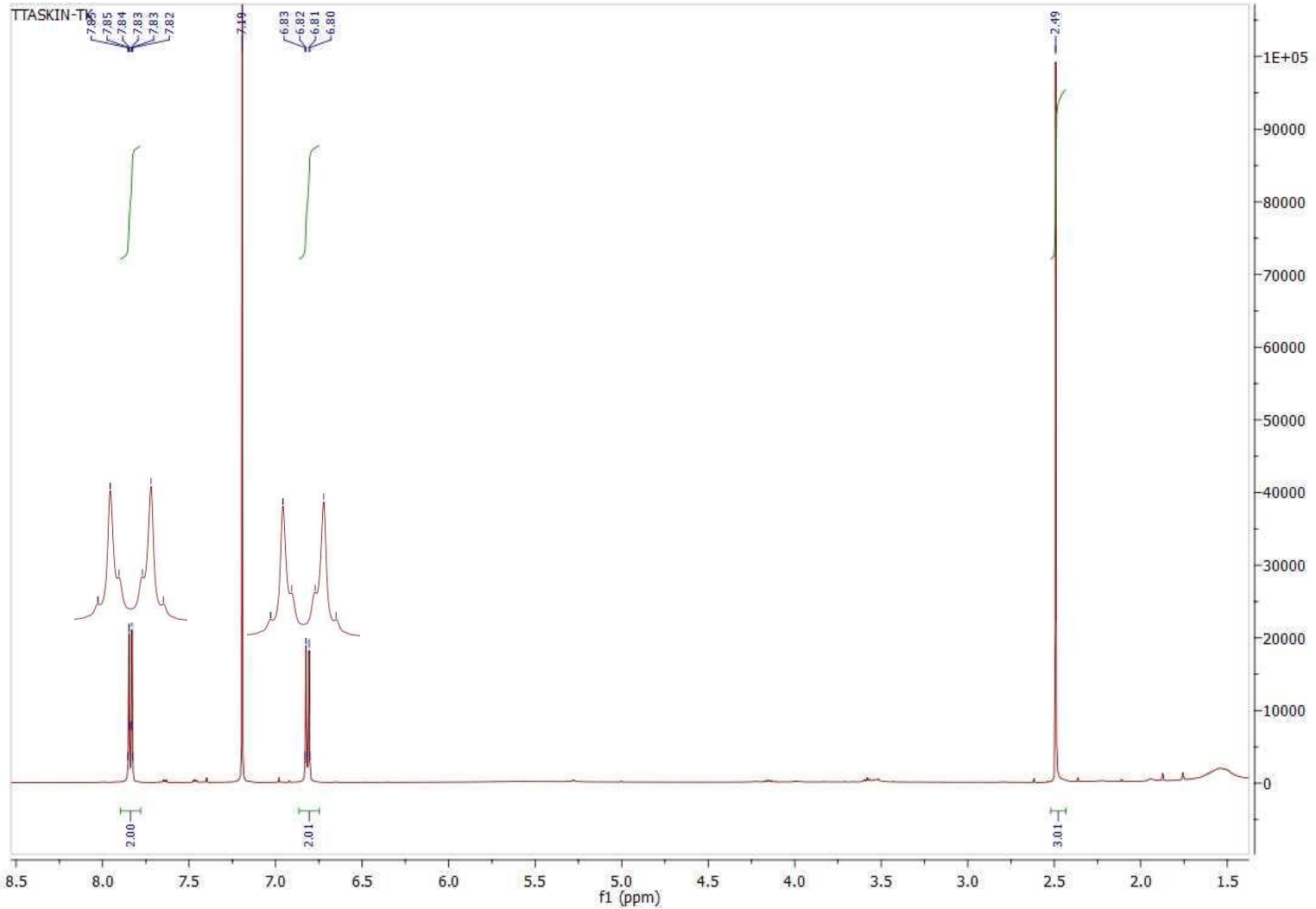
3 EA: 1MeOH 2 Toluen : 1EA + Seryum sülfat

254 nm 254 nm

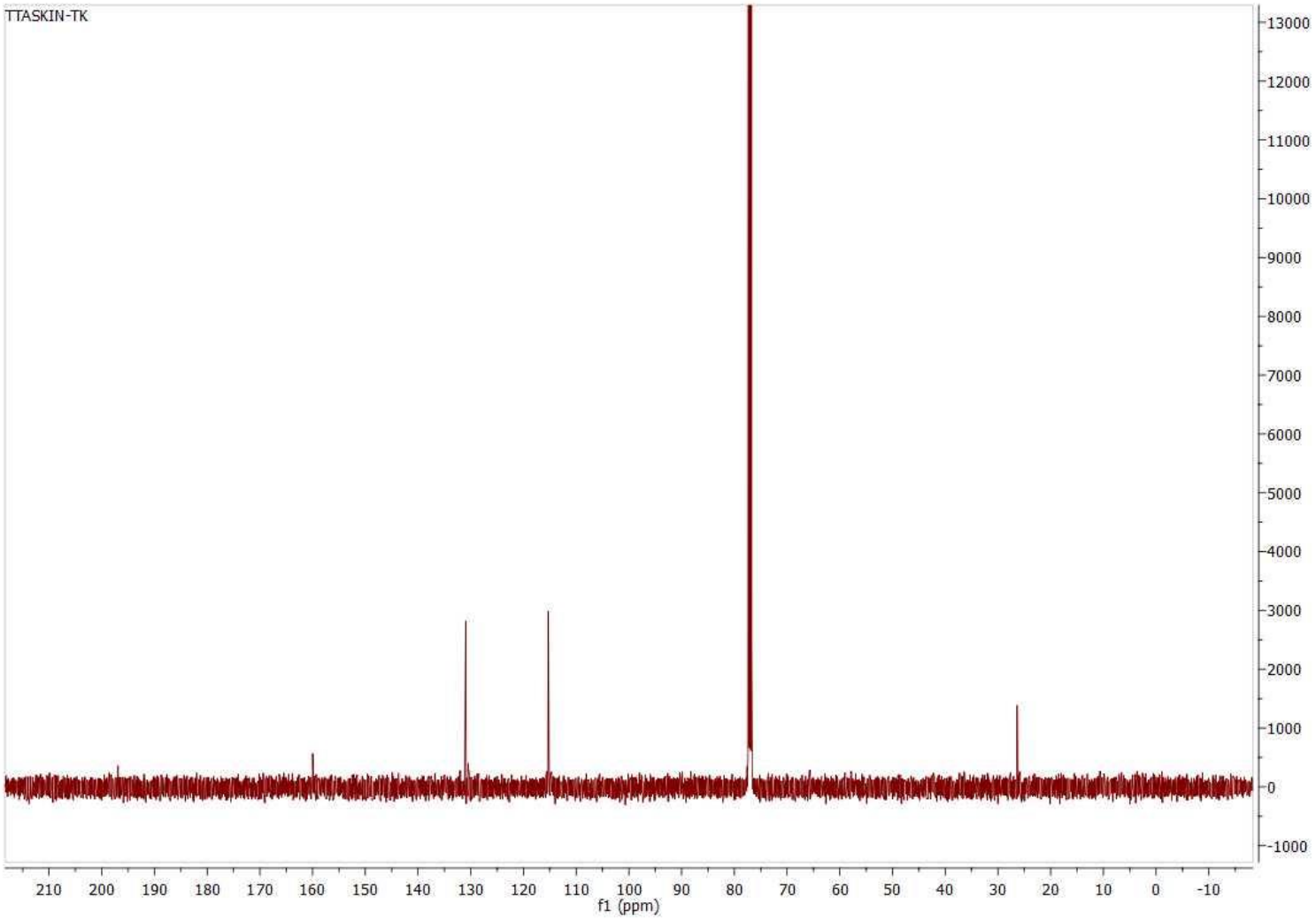
Resim 10. E bileşiğinin farklı çözücü sistemlerinde yürütüldükten sonra 254 nm UV ışık altında ve seryum sülfat belirteci püskürtülüp yakıldıktan sonra elde edilen İTK kromatogramları



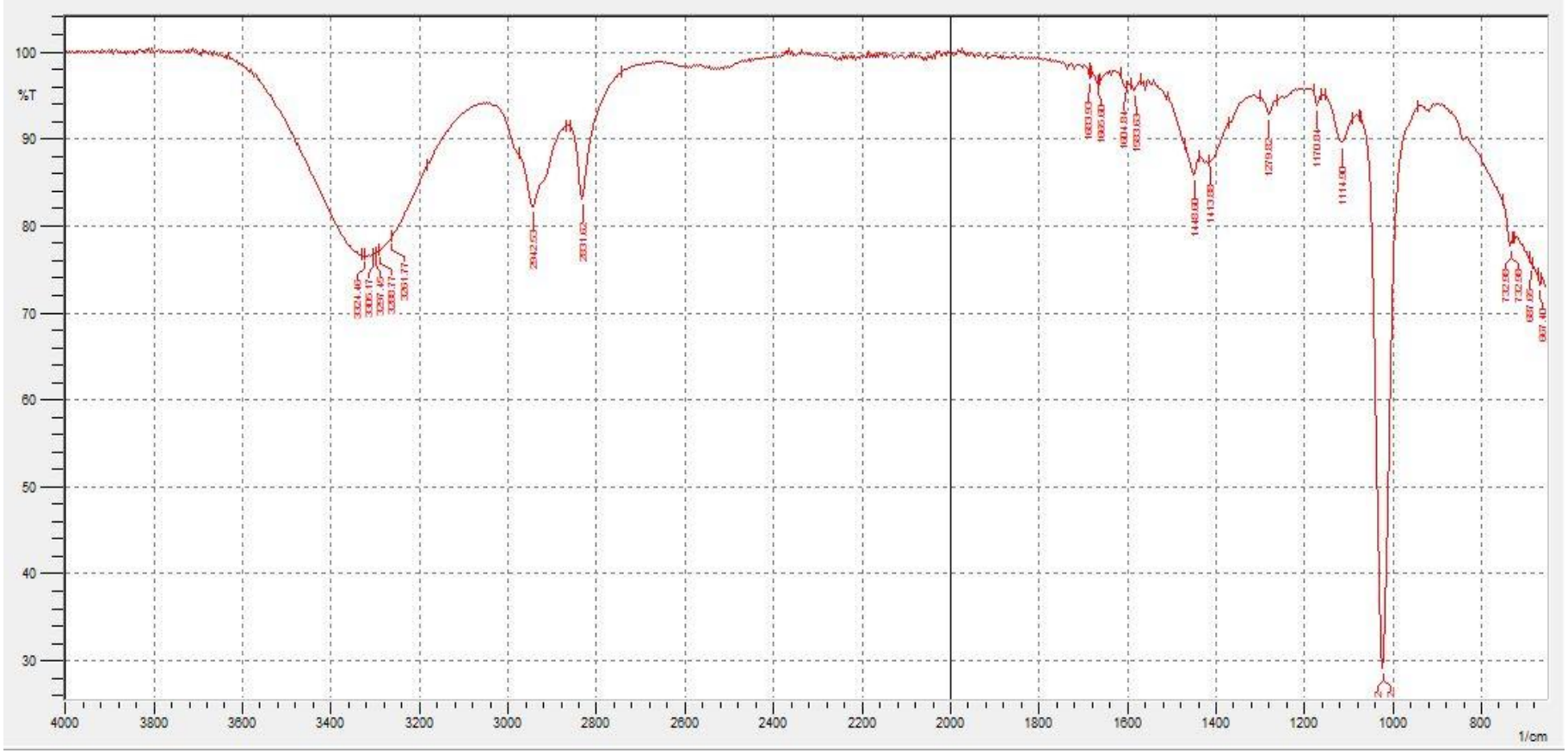
Şekil 51. E (TK) bileşiğinin UV Spektrumu



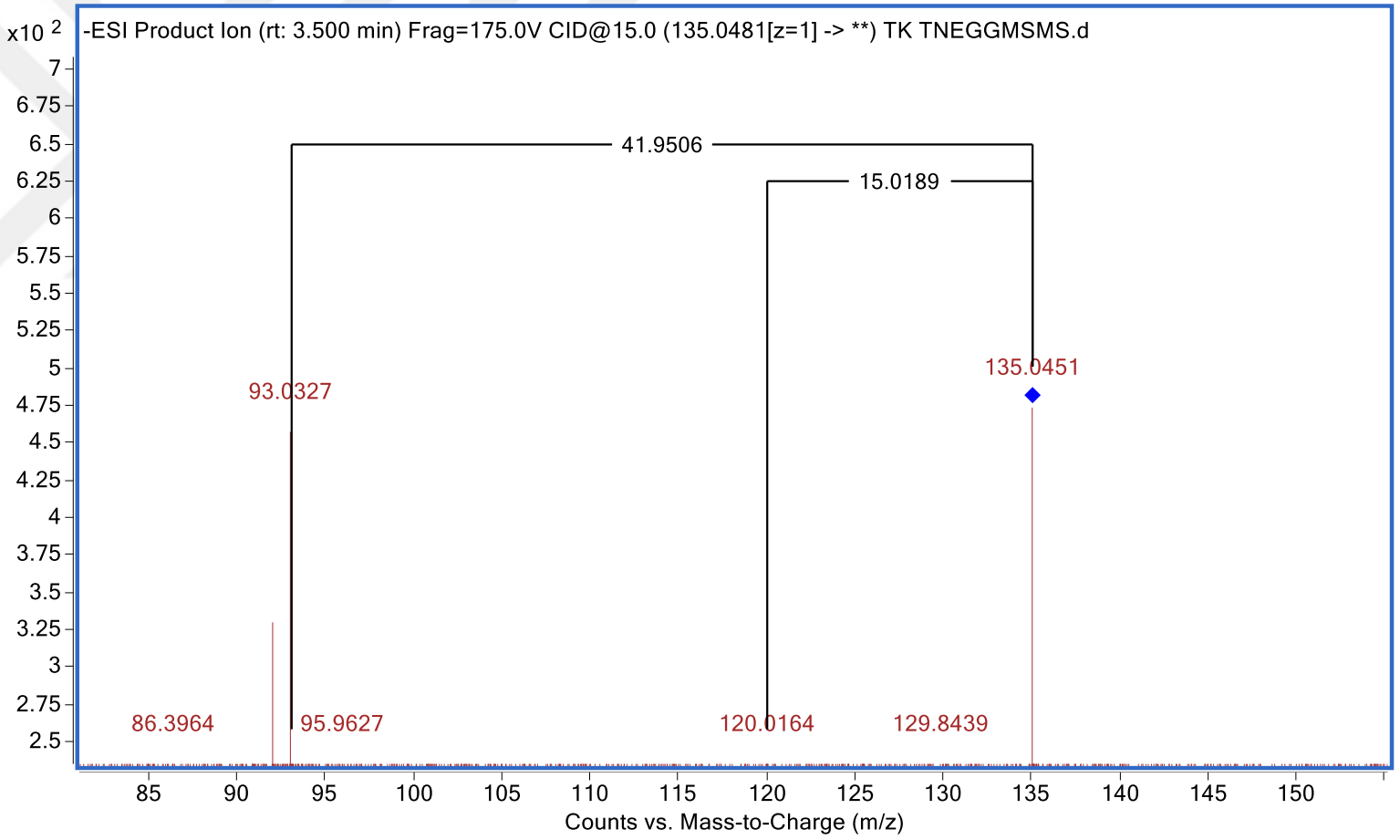
Şekil 52. E (TK) bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu ($CDCI_3$, 500 MHz)



Şekil 53. E (TK) bileşiğinin ^{13}C-NMR spektrumu ($CDCI_3$, 500 MHz)



Şekil 54. E (TK) bileşiğinin IR spektrumu

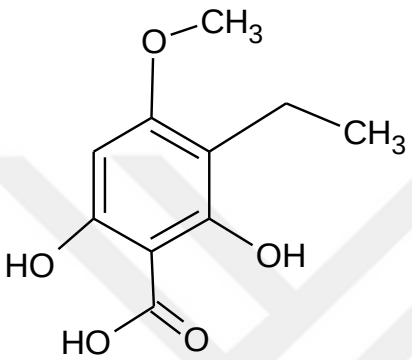


Şekil 55. E (TK) bileşiğinin kütle spektrumu (ESI-MS)

4.17. AM-VI Fraksiyonundan Elde Edilen Saf Maddelerin Yapı Tayinleri

AM-VI kodlu ekstreden F (T7), G (T6), H (DT4) ve K (DT5) kodlu 4 bileşik saflaştırıldı. Bu bileşiklerden F (T7) ve G (T6) kodlu bileşiklerin ^{1}H-NMR ve UV spektrumları incelendiğinde daha önce AM-VII kodlu ekstreden saflaştırılan ve yapıları aydınlatılan A (T7) ve C (T6) kodlu bileşikler ile yapılarının aynı oldukları görüldü.

H (DT4) Bileşiği: 3 etil-2,6 dihidroksi-4 metoksi benzoik asit



Şekil 56. 3 etil-2,6 dihidroksi-4 metoksi benzoik asit

H (DT4) bileşiği amorf olarak elde edildi. H (DT4) bileşiği İTK plağına tatbik edilip toluen:etilasetat:metanol (7:3:1) çözeltisinde yürütüldü. İTK plakta H (DT4)'a ait lekenin UV lamba (366 nm) altında incelendiğinde mavi renkte görülmesine rağmen NH_3 buharına tutulup incelendiğinde ve NA belirteci püskürtüldüğünde renginde bir değişmenin olmadığı görüldü.

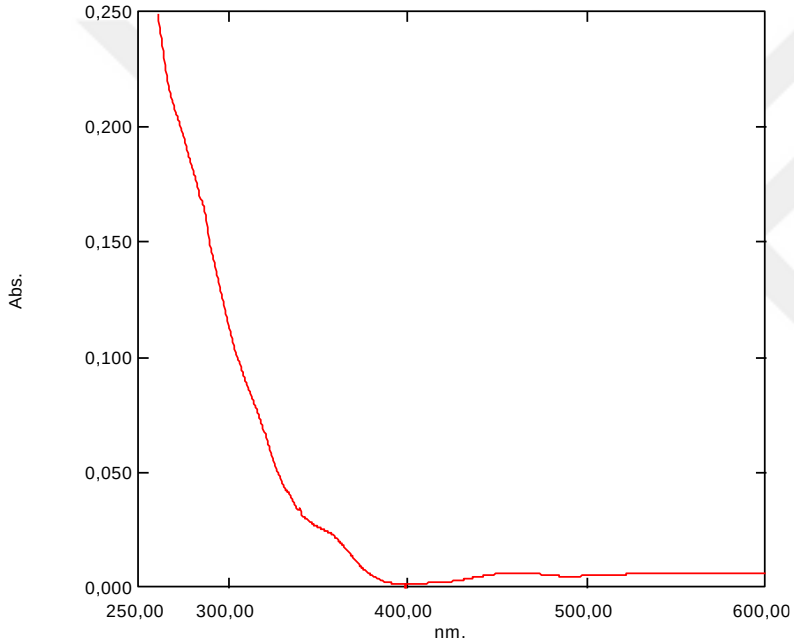
UV spektrumu; H (DT4) bileşiğinin metanolde alınan UV spektrumunda (Şekil 57) λmax değeri 359 nm olarak gözlendi.

^{1}H-NMR (500 MHz, MeOD) (Şekil 58); δ 1,91 (s, 3H) ppm' de izlenen sinyal molekülde metil grubunun varlığını; δ 3,67 (s, 3H) ppm'de izlenen sinyal de moleküldeki metoksi grubunun varlığını ispatlar. 8,57 ppm'de (1H, s) izlenen sinyal H-5 protonunu gösterir. ^{1}H-NMR'da H-2 ve H-6'ya ait sinyal görülmemesi C-2 ve C-6 da -OH grubunun bulunabileceğini düşündürdü. Daha sonra bileşiğin kütle spektrumu çekildiğinde bileşiğin ($C_{10}H_{12}O_5$) molekül ağırlığının 212,1462 g/mol çıkmasından dolayı C-2 ve C-6 da OH grubunun bulunduğu kesin olarak tespit edildi.

Kütle spektrumu: H (DT4) bileşiğinin molekül ağırlığı ($C_{10}H_{12}O_5$) kütle spektrumunda 212,1462 g/mol olarak tespit edildi. Ayrıca bu bileşiğin fragment iyonlarının molekül ağırlıkları 198,0767; 183,0690; 159,1245; 143,0924; 131,0838 g/mol olarak saptandı. Molekülen pozitif modtaki MS/MS spektrumu Şekil 59'da gösterildi.

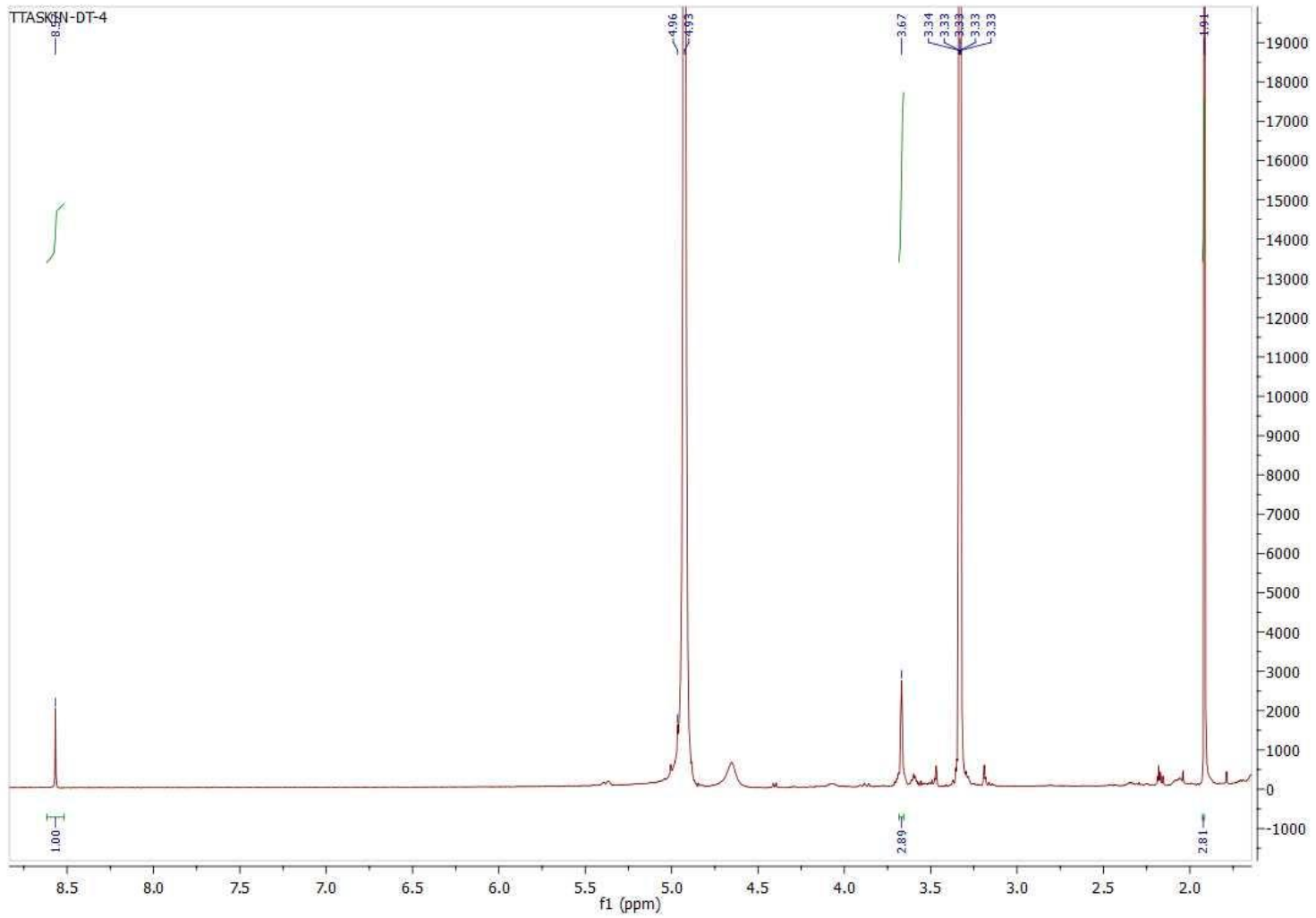
IR (MeOH)νmax: 3353 (OH), 2943 (C-H), 2832, 1680 (C=O), 1447, 1418, 1115 (C-O), 1030, 653 cm^{-1}. H (DT4) bileşiğine ait IR spektrumu Şekil 60'da gösterildi.

Literatür çalışmaları sonucu bu bileşiğin *Achillea* cinsinden ilk defa izole edildiği tespit edildi.

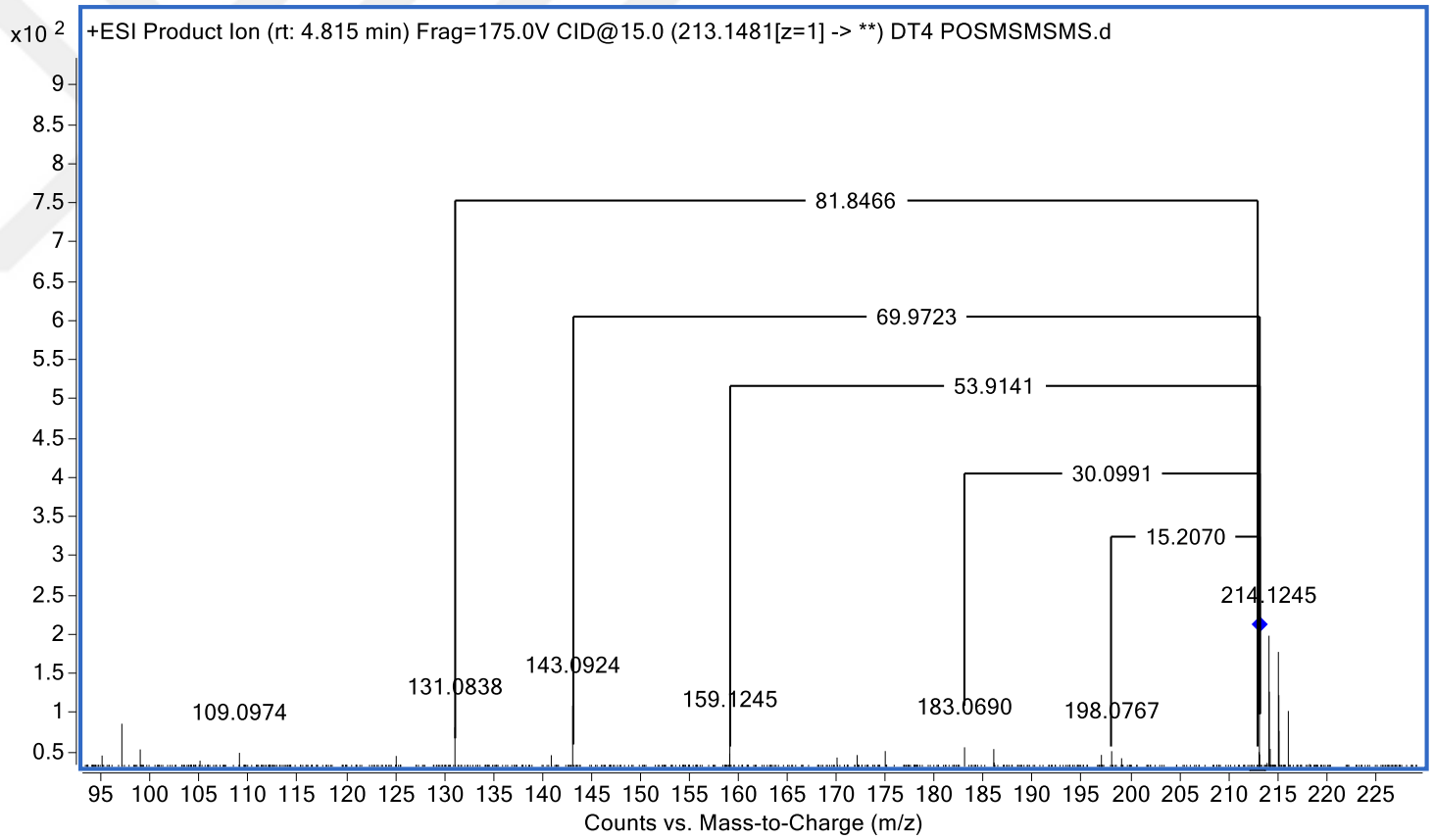


Şekil 57. H (DT4) bileşiğinin UV Spektrumu

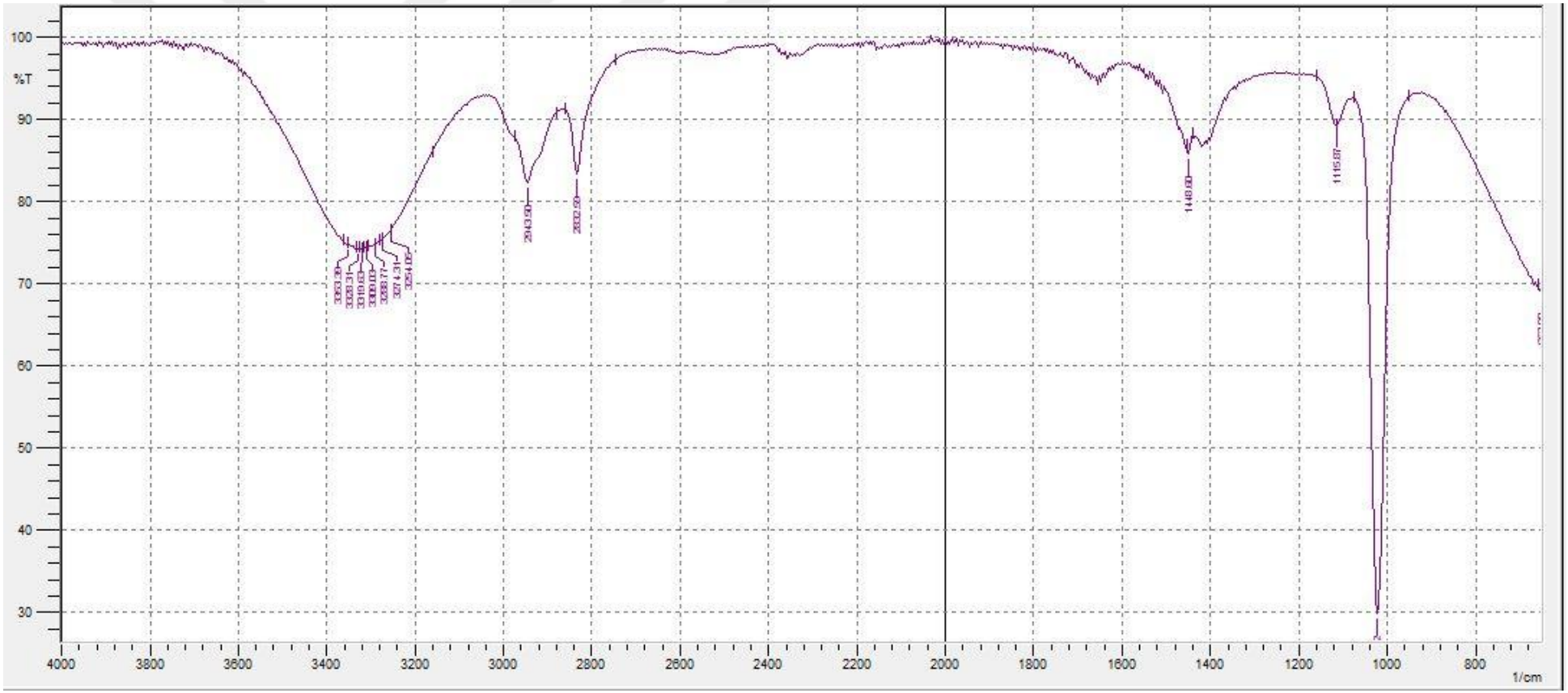
Bu bileşiğin NMR verilerinin değerlendirilmesinde yardımcı olan M.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Yard.Doç.Dr. Esra Tatar'a teşekkür ederim.



Şekil 58. H (DT4) bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu (MeOD, 500 MHz)

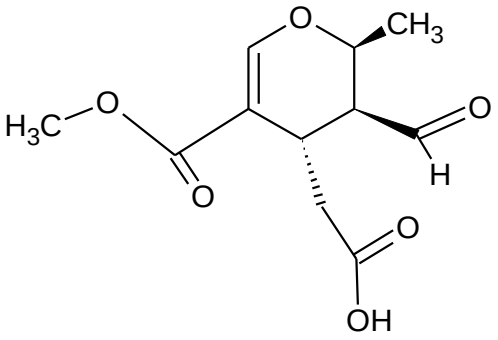


Şekil 59. H (DT4) bileşiğinin kütle spektrumu (ESI-MS)



Şekil 60. H (DT4) bileşiğinin IR spektrumu

K (DT5) Bileşiği: Elenolik asit



Şekil 61. Elenolik asit

K (DT5) bileşiği amorf olarak elde edildi. K (DT5) bileşiği İTK plağına tatbik edilip toluen:etilasetat:metanol (7:3:1) çözeltisinde yürütüldü. İTK plakta K (DT5) 'ya ait lekenin UV lamba (254 nm) altında incelendiğinde kahve-mor renkte görülmesine rağmen NH_3 buharına tutulup incelendiğinde renginin UV_{254} nm'de mavi olarak görüldüğü saptandı. Daha sonra NA belirteci püskürtüldüğünde mavi olarak görülen renginde bir değişmenin olmadığı tespit edildi.

UV spektrumu; K (DT5) bileşiğinin metanolde alınan UV spektrumunda (Şekil 62) λmax değeri 236 nm olarak gözlendi. K (DT5) bileşiğinin, UV spektrumlarından elde edilen λmax değeri literatürdeki değer ile uygunluk göstermektedir (Walter ve ark., 1973).

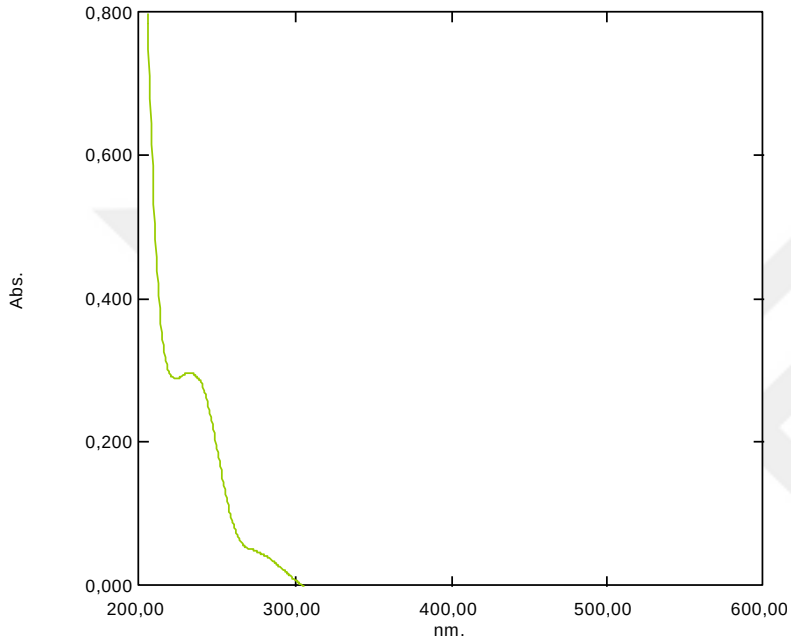
^{1}H-NMR (500 MHz, MeOD) (Şekil 63); δ 2,18 (s, 3H) ppm' de izlenen sinyal molekülde metil grubunun; δ 3,66 (s, 3H) ppm'de izlenen sinyal moleküldeki metoksi grubunun varlığını ispatlar. 4,65 ppm'de (1H, s) izlenen sinyal H-6 protonunu; 7,93 ppm'de (1H, s) izlenen sinyal aldehit grubunun protonunu gösterir. ^{1}H-NMR'da elde edilen sinyaller literatürdeki elenolik asit bileşiğine ait değerlerle uygunluk göstermektedir (Mackellar ve ark., 1973).

Kütle spektrumu; K (DT5) bileşiğin kütle spektrumu çekildiğinde bileşiğin ($C_{11}H_{14}O_6$) molekül ağırlığının 242,1765 g/mol ve bu bileşiğin fragment iyonlarının molekül ağırlıkları 225,1528; 215,7867; 181,1620; 130,9697 g/mol olarak saptandı. Bileşiğin fragment iyonlarının molekül ağırlıkları literatürdeki elenolik asit bileşiğine

ait değerlerle uygunluk göstermektedir (Walter ve ark., 1973; Dierkes ve ark., 2012). Molekülen negatif modtaki MS/MS spektrumu Şekil 64'de gösterildi.

IR (MeOH)νmax: 3329 (OH), 2944 (C-H), 2833, 1653 (C=O), 1447, 1418, 1112 (C-O), 1030, 666 cm^{-1}. K (DT5) bileşiğine ait IR spektrumu Şekil 65'de gösterildi.

Literatür çalışmaları sonucu bu bileşiğin *Achillea* cinsinden ilk defa izole edildiği belirlendi.

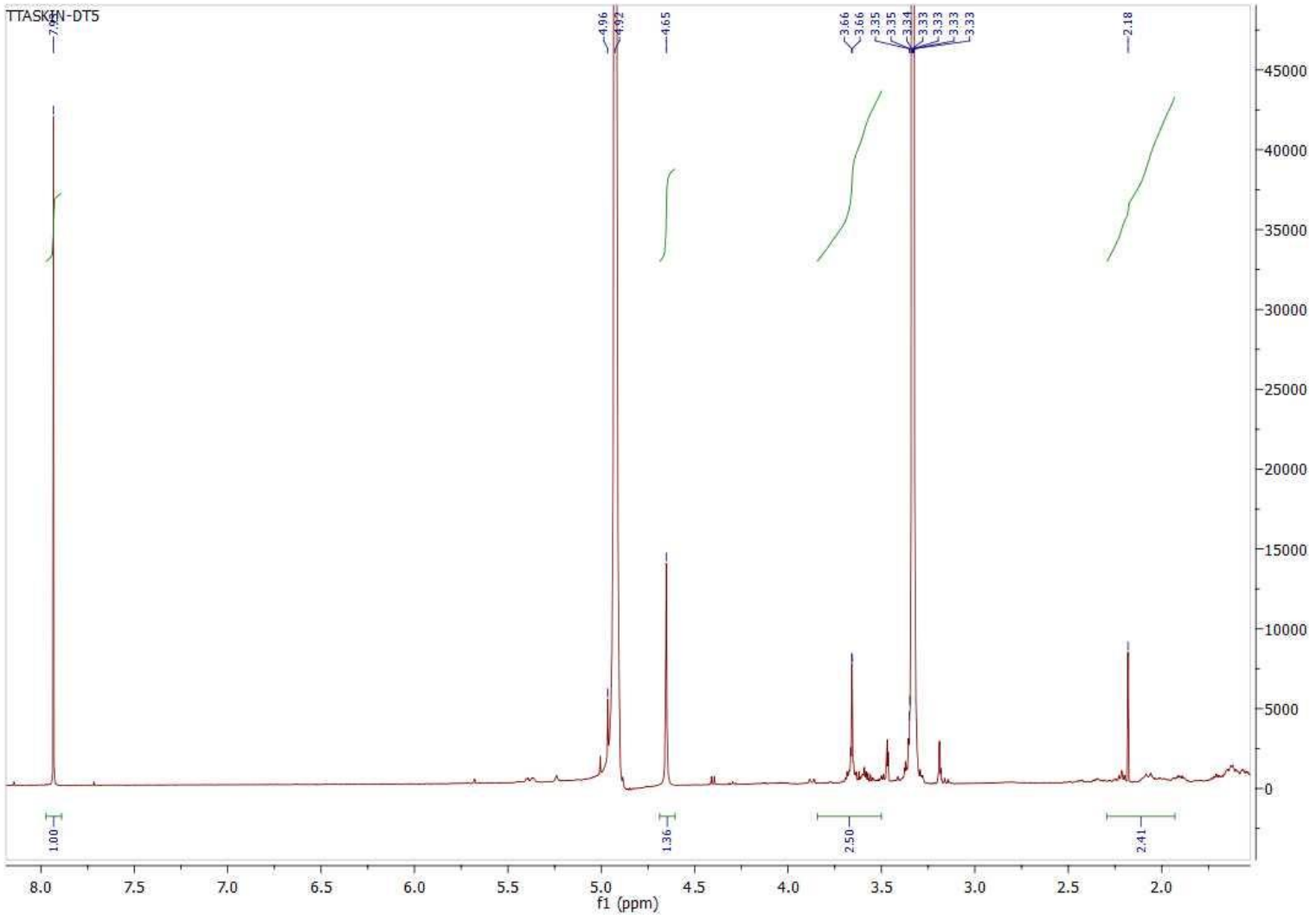


Şekil 62. K (DT5) bileşiğinin UV Spektrumu

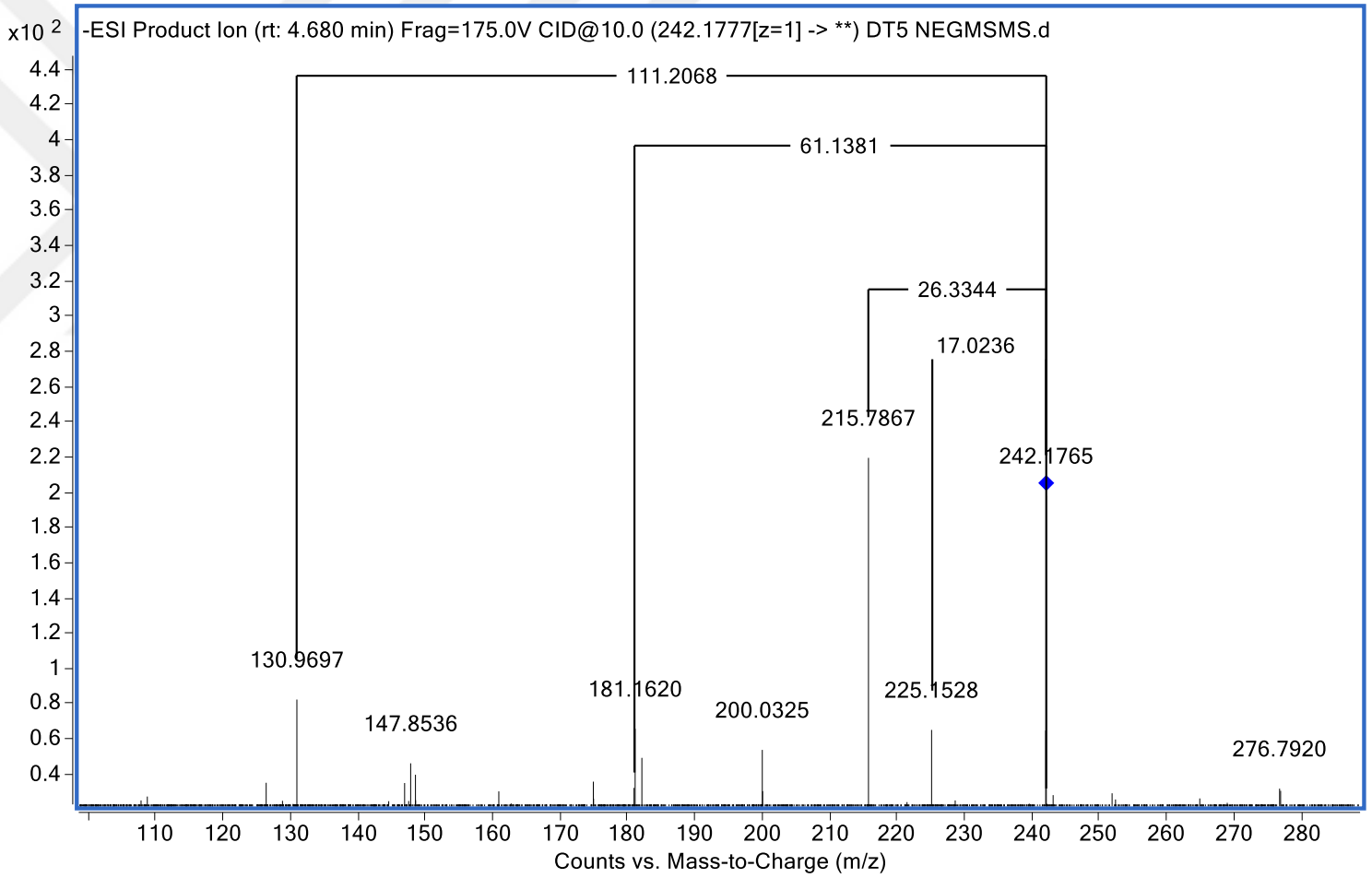


Resim 11. K (DT5) bileşiğinin etilasetat:metanol (3:1) çözücü sisteminde yürütüldükten sonra 366 nm UV ışık altındaki İTK kromatogramı

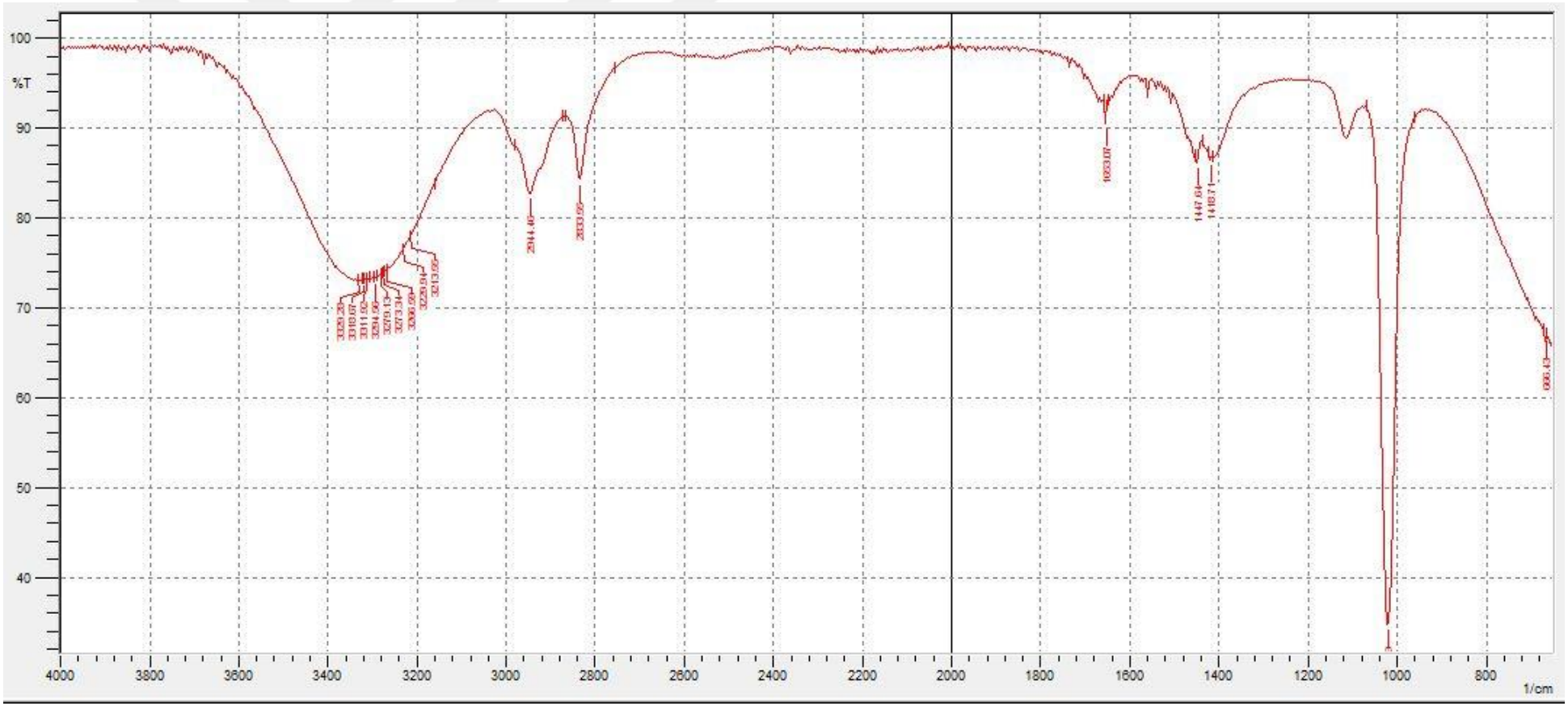
Bu bileşiğin NMR verilerinin değerlendirilmesinde yardımcı olan M.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Yard.Doç.Dr. Esra Tatar'a teşekkür ederim.



Şekil 63. K (DT5) bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu (MeOD, 500 MHz)



Şekil 64. K (DT5) bileşiğinin kütle spektrumu (ESI-MS)



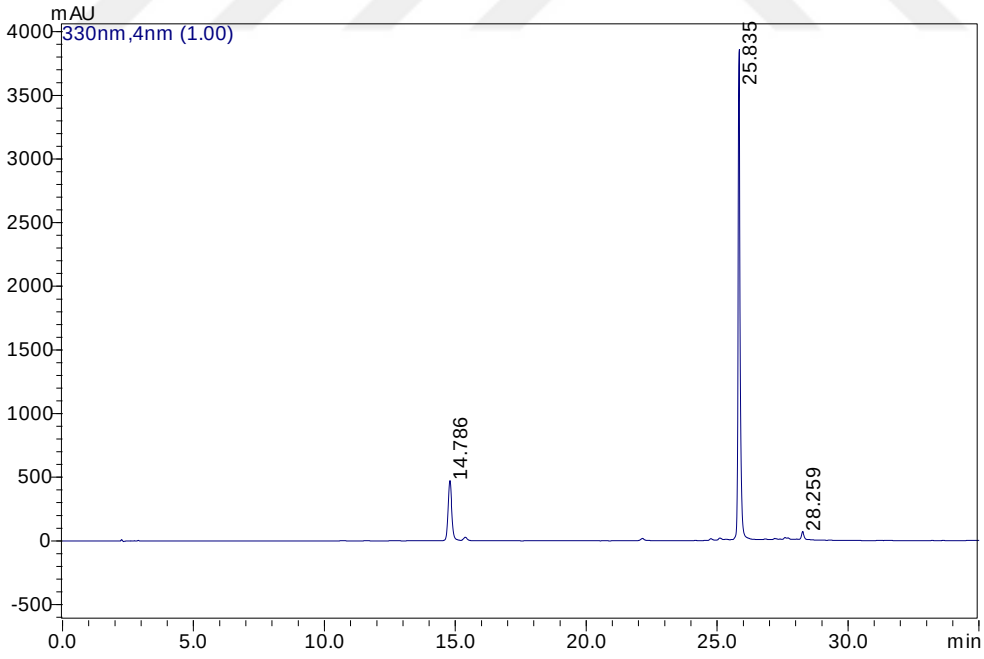
Şekil 65. K (DT5) bileşiğinin IR spektrumu

4.18. AM-III Fraksiyonundan Elde Edilen Saf Maddelerin Yapı Tayinleri

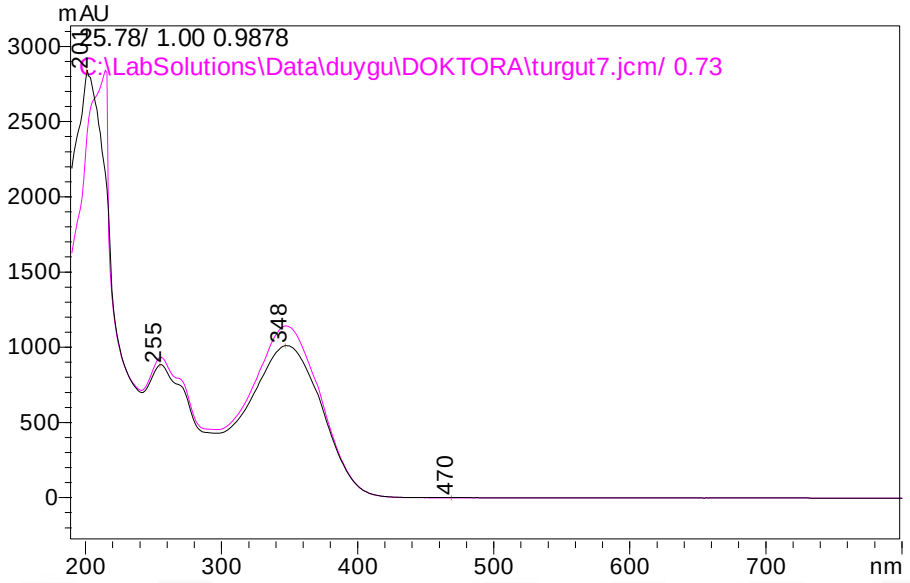
AM-III ekstresinden L (O), M (P) ve N (T) kodlu 3 bileşik saflaştırıldı. Bu bileşiklerden L (O) ve M (P) kodlu bileşiklerin ^{1}H-NMR ve UV spektrumları incelendiğinde daha önce AM-VI kodlu ekstreden saflaştırılan ve yapısı aydınlatılan H (DT4) kodlu bileşik ile yapılarının aynı olduğu görüldü. Ayrıca bu ekstreden saflaştırılan N (T) kodlu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumunun AM-VI kodlu ekstreden saflaştırılan K (DT5) kodlu bileşiğin spektrumu ile aynı olduğu tespit edildi.

4.19. AM-IV Fraksiyonunun İçerdiği Fenolik Bileşiklerin HPLC-DAD Sistemi ile Analizleri

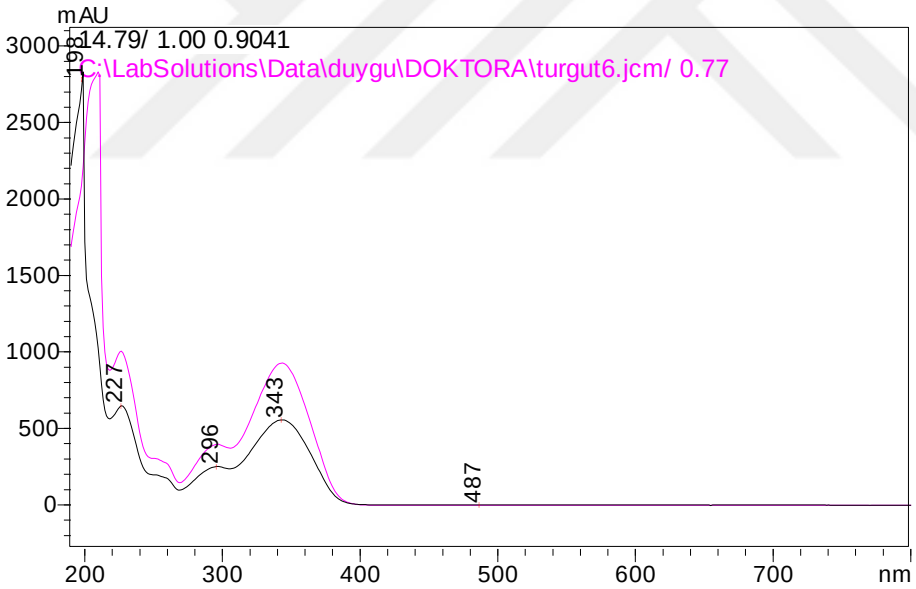
AM-IV fraksiyon miktarının (100 mg) çok düşük olmasından dolayı bu fraksiyondan madde izolasyonu yapılamadı. Fakat fraksiyonun çok güçlü sitotoksik aktivite göstermesinden dolayı fraksiyonun içeriği HPLC-DAD sistemi kullanılarak analiz edildi. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde AM-IV fraksiyonunun daha önce AM-VII ekstresinden izole edilen ve yapısı aydınlatılan A (T7), C (T6) ve D (TA) bileşiklerini içerdiği tespit edildi.



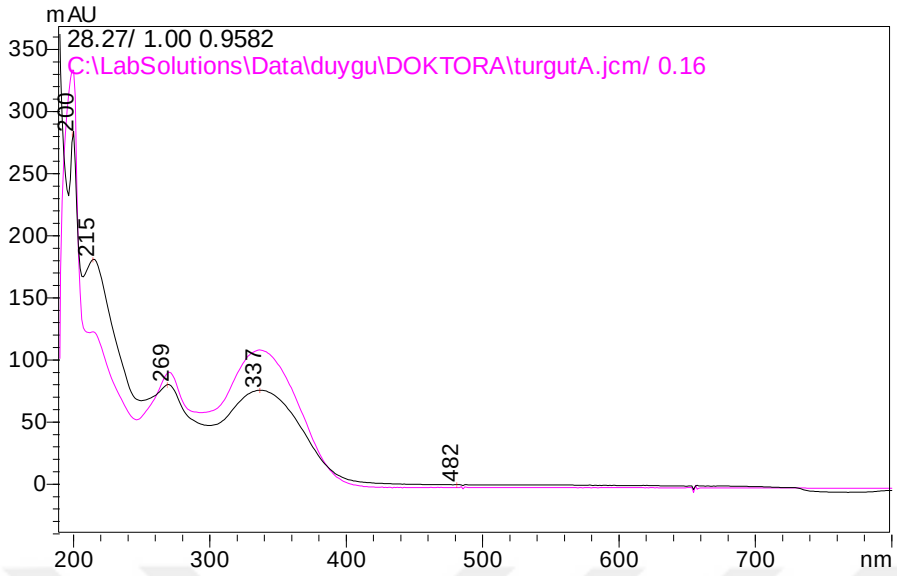
Şekil 66. AM-IV ekstesinin kromatogramı



Şekil 67. _____:t_R: 25,78 (AM-IV);_____:A (T7) bileşiğinin spektrumu



Şekil 68. _____:t_R: 14,79 (AM-IV);_____:C (T6) bileşiğinin spektrumu



Şekil 69. _____:t_R: 28,27 (AM-IV);_____:D (TA) bileşiğinin spektrumu

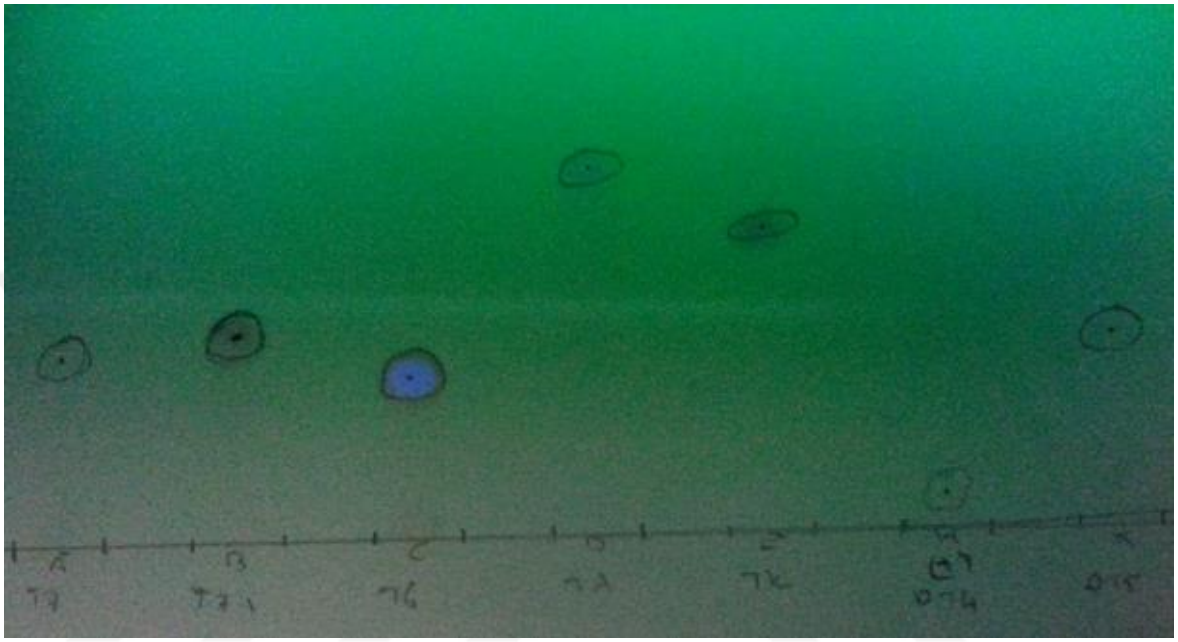
4.20. *A.multifida* Bitkisinin Kloroform Ekstresinden Elde Edilen Saf Maddelerin Rf Değerleri

AM-III, AM-IV, AM-VI ve AM-VII fraksiyonlarından elde edilen saf maddeler, toluen:etilasetat (2:1), toluen:etilasetat:metanol (7:3:1), etilasetat (% 100) ve etil asetat:metanol (3:1) çözücü sistemleri ile yürütülerek Rf değerleri (spotun yürüdüğü mesafe/çözücünün yürüdüğü mesafe) bulundu ve elde edilen değerler Tablo 43'de verildi.

Tablo 43. *A. multifida* bitkisinden elde edilen saf bileşiklerin Rf değerleri

Çözücü sistemleri / Saf bileşikler	Toluen:etilasetat (2:1)	Toluen:etilasetat :metanol (7:3:1)	Etil asetat	Etilasetat: metanol (3:1)
5,7,8-trihidroksi–6,3',4'–trimetoksiflavon	0,29	0,52	0,73	0,82
Eupatilin	0,32	0,55	0,74	0,84
Skopoletin	0,26	0,45	0,66	0,79
8-hidroksi –salvigenin	0,59	0,73	0,83	0,86
4′-Hidroksiasetofenon	0,49	0,58	0,81	0,83

3 etil-2,6 dihidroksi-4 metoksi benzoik asit	0,06	0,24	0,43	0,76
Elenolik asit	0,32	0,58	0,71	0,87



Resim 12. Saf bileşiklerin toluen:etilasetat (2:1) çözücü sisteminde yürütüldükten sonra 254 nm UV ışık altındaki İTK kromatogramı

4.21. *A.multifida* Bitkisinin Kloroform Ekstresinden Elde Edilen Saf Maddelerin Sitotoksik Aktivite Sonuçları

A.multifida bitkisinin kloroform ekstresinden saflaştırılan ve yapıları aydınlatılan bileşiklerin, insan meme kanser hücresi MCF-7, kolon kanser hücresi HT-29 ve insan serviks kanser hücre hattı olan HeLa hücrelerinde sitotoksik aktiviteleri incelendi ve elde edilen sonuçlar Tablo 44'de verildi.

Tablo 44. *A.multifida* bitkisinden elde edilen saf bileşiklerin kanserli hücre hatları üzerine sitotoksik aktiviteleri (IC_{50}: µg/mL)

	A	B	C	D	E	H	K
HeLa	**22,91**	**0,01**	38,90	>200	>200	>200	>200
MCF-7	-	-	-	>200	>200	>200	**15,89**
HT-29	**8,13**	-	40,73	>200	>200	>200	>200

A: 5,7,8-trihidroksi–6,3',4'–trimetoksiflavon; **B:** Eupatilin; **C:** Skopoletin; **D:** 8-hidroksi –salvigenin; **E:** 4′-Hidroksiasetofenon; **H:** 3 etil-2,6 dihidroksi-4 metoksi benzoik asit; **K:** Elenolik asit

Elde edilen sonuçlara göre, 5,7,8-trihidroksi-6,3',4' trimetoksiflavon bileşiğinin insan serviks kanser hücre hattı HeLa ve insan kolon kanser hücre hattı olan HT-29 hücrelerine karşı; eupatilin bileşiğinin HeLa hücre hatlarına karşı; elenolik asit bileşiğinin ise insan meme kanser hücre hattı olan MCF-7 hücrelerine karşı çok güçlü ve seçici sitotoksik aktivite gösterdiği saptandı. Ayrıca skopoletin bileşiğinin HeLa ve HT-29 hücre hatlarına karşı normal sitotoksik aktivite gösterdiği tespit edildi.

Kanserli hücre hatlarına karşı güçlü ve seçici sitotoksik aktivite gösteren 5,7,8-trihidroksi-6,3',4' trimetoksiflavon ve eupatilin bileşiklerinin normal hücre hattı (NIH/3T3) üzerindeki sitotoksik etkileri incelendi ve elde edilen sonuçlar Tablo 45'de verildi. Elenolik asit bileşiğinin normal hücre hattı üzerindeki toksik etkisini incelemek için gerekli olan miktarının yetersiz olmasından dolayı bu bileşiğin NIH/3T3 hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktivitesi tespit edilemedi.

Tablo 45. Kanserli hücre hatlarına karşı güçlü sitotoksik aktivite gösteren saf bileşiklerin NIH/3T3 hücresinin çoğalması üzerine etkisi (%)

Bileşikler	**10 µg/mL**	**50 µg/mL**	**100 µg/mL**	**200 µg/mL**
5,7,8-trihidroksi–6,3',4'–trimetoksiflavon	88,54	86,88	72,75	44,87
Eupatilin	85,05	41,86	30,06	14,15
Elenolik asit	93,53	87,05	86,24	57,32

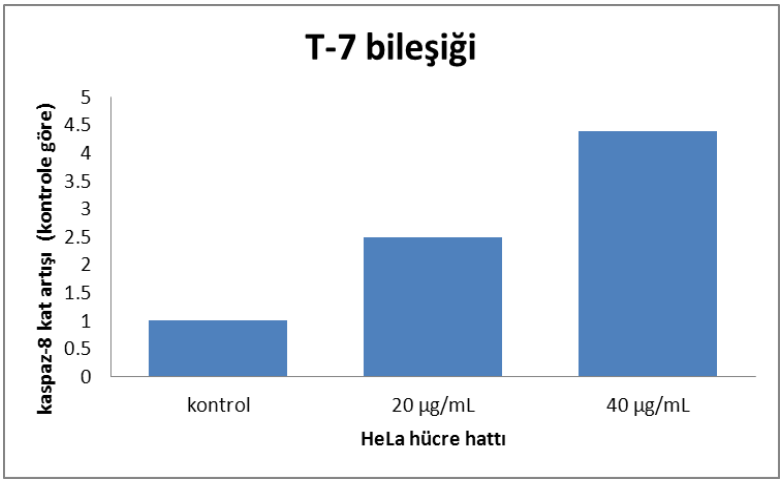
Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde eupatilin bileşiğinin 50 µg/mL-200 µg/mL konsantrasyonlarda normal hücre hattı üzerine toksik etki gösterdiği saptandı. Bundan dolayı eupatilin bileşiğinin gelecekte antikanser bir ajan olarak kullanılabilmesi için 50 µg/mL konsantrasyonun altında kullanılması gerekmektedir.

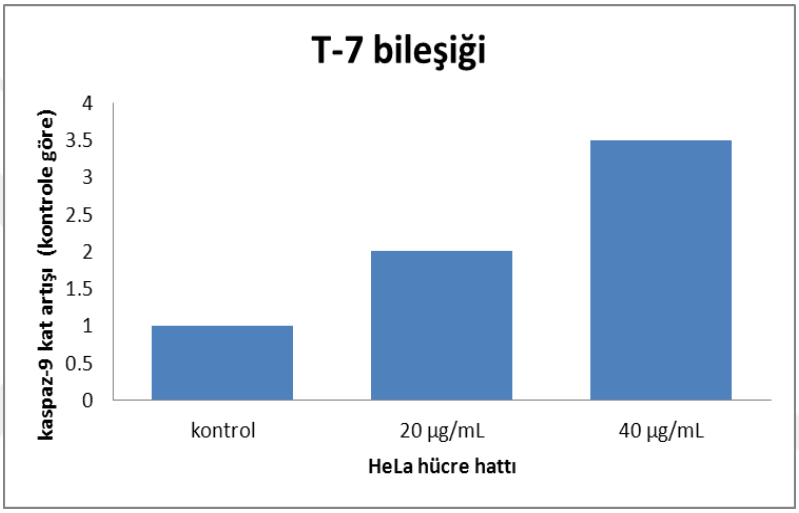
5,7,8-trihidroksi-6,3',4'-trimetoksiflavon bileşiğinin sadece 200 µg/mL konsantrasyonda normal hücre hattı üzerine toksik etki gösterdiği fakat diğer konsantrasyonlarda normal hücre hattı üzerine toksik etki göstermediği tespit edildi. Bundan dolayı bu bileşiğin gelecekte antikanser bir ajan olarak kullanılabilmesi için 200 µg/mL konsantrasyonun altında kullanılması gerekmektedir.

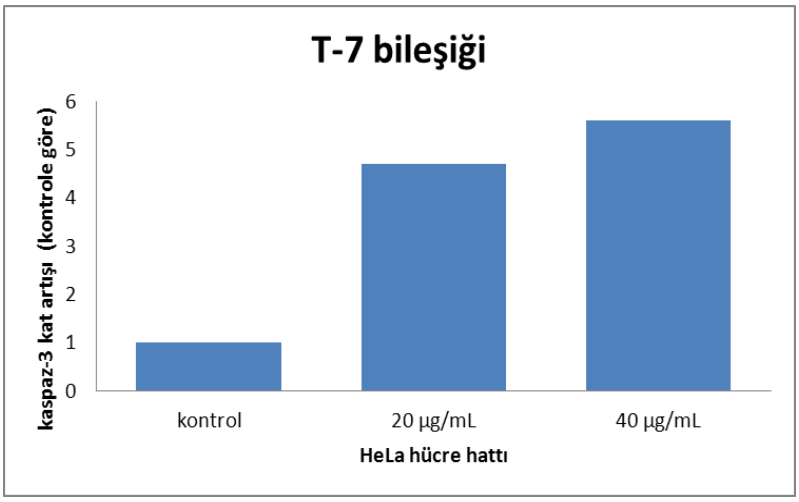
Elenolik asit bileşiği bütün konsantrasyonlarda normal hücre hattı üzerinde toksik bir etki göstermemiştir. Bundan dolayı bu konsantrasyonlarda bu bileşik gelecekte antikanser bir ajan olarak kullanılabilir.

4.22. Saf Maddelerin Kaspazlar Üzerine Etkilerinin Sonuçları

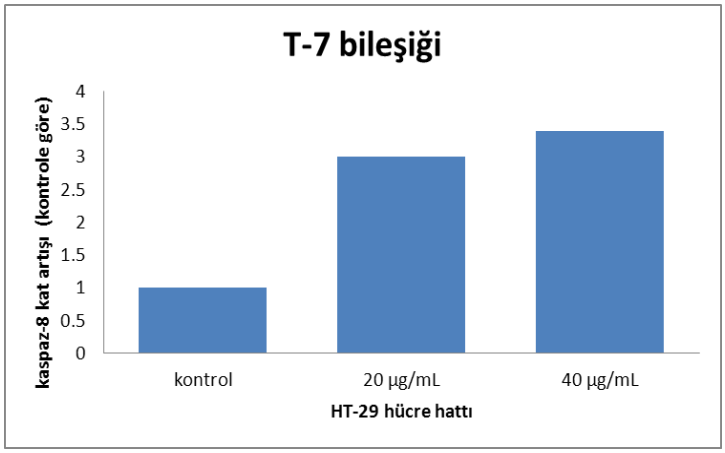
Bu çalışmanın sonucunda A (T7: 5,7,8-trihidroksi-6,3',4'-trimetoksiflavon) ve B (T7-1: eupatilin) bileşiklerinin kaspaz-8, kaspaz-9 ve kaspaz-3 seviyelerini arttırdığı saptandı. A (T7) bileşiğin HeLa ve HT-29 hücre hatları üzerindeki etkisini ve B (T7-1) bileşiğinin ise HeLa hücre hattı üzerindeki etkisini her iki apoptotik yolağın (mitokondrinin görev aldığı iç yolak; ölüm reseptörleri ile gerçekleşen dış yolak) aktivitasyonunu indükleyerek gerçekleştirdikleri tespit edildi.

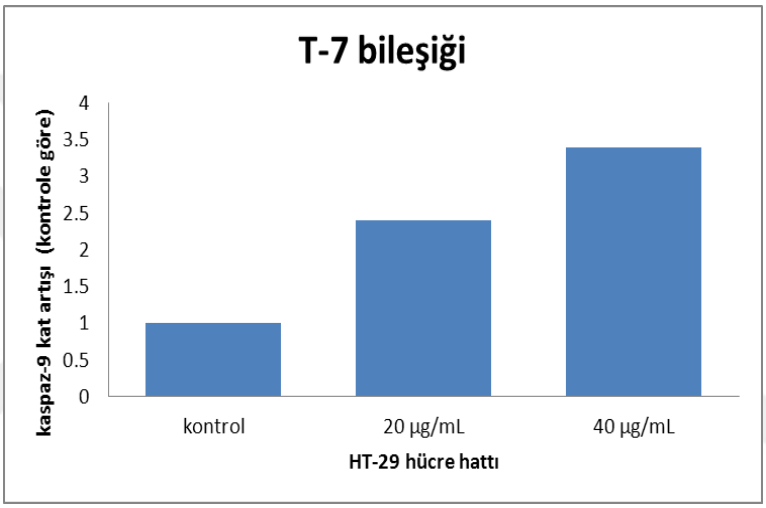


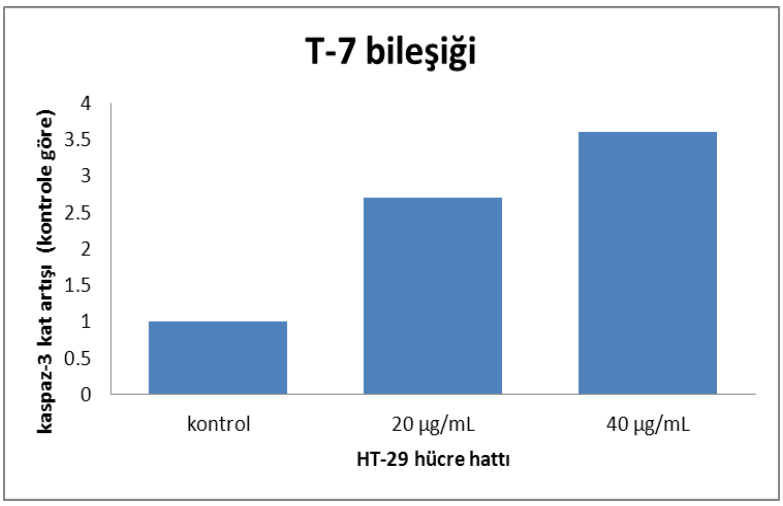




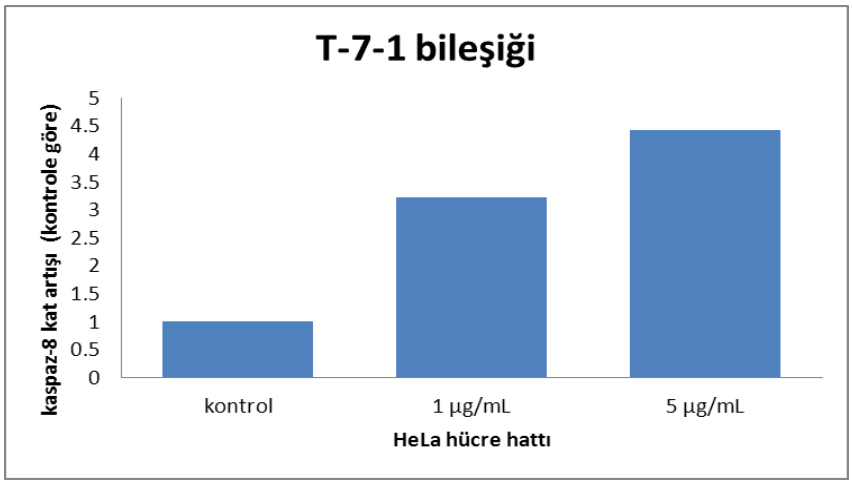
Şekil 70. A (T7) bileşiğinin HeLa hücre hattı üzerine olası etki mekanizması

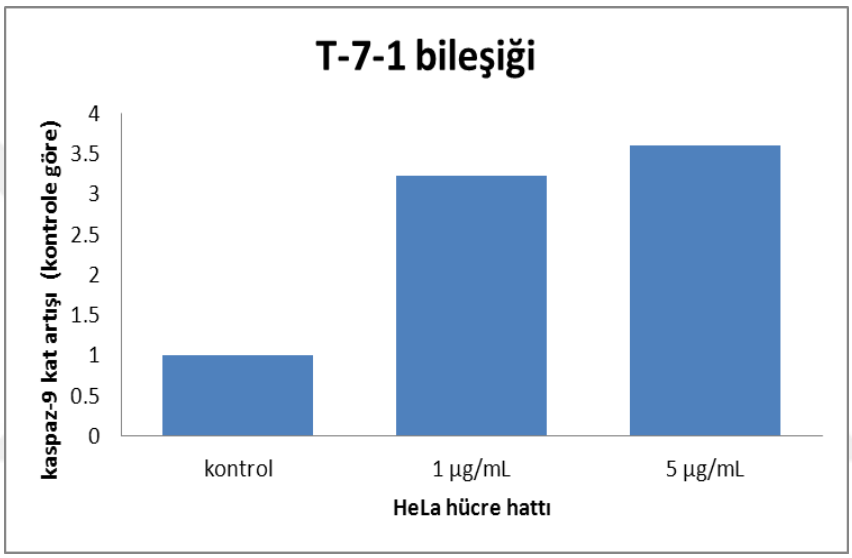


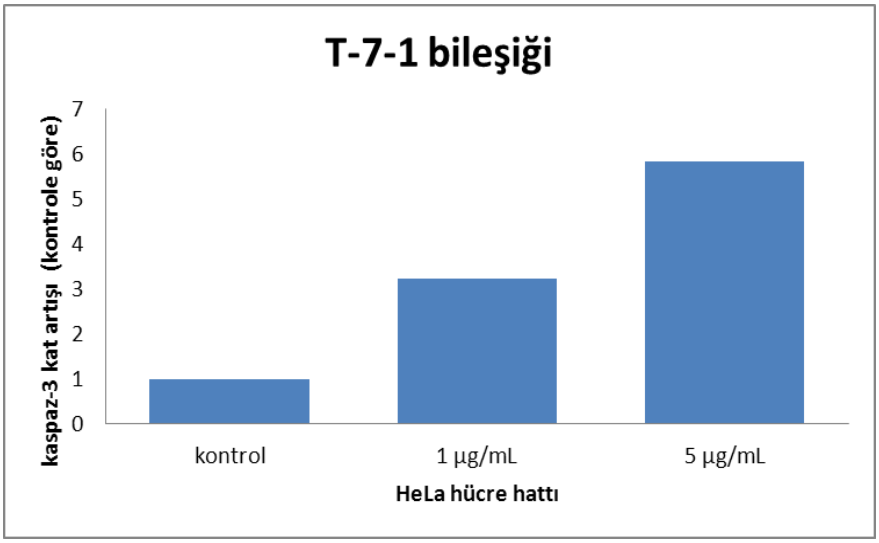




Şekil 71. A (T7) bileşiğinin HT-29 hücre hattı üzerine olası etki mekanizması







Şekil 72. B (T7-1) bileşiğinin HeLa hücre hattı üzerine olası etki mekanizması

4.23. *A.multifida* Bitkisinin Kloroform Ekstresinden Elde Edilen Saf Maddelerin Antioksidan Aktivite Sonuçları

4.23.1 DPPH radikali giderme aktivite tayini

A. multifida bitkisinin kloroform ekstresinden elde edilen saf maddelerin serbest radikal yakalama etkinliği 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikali kullanılarak tayin edildi. Standart olarak askorbik asit kullanıldı. Saf maddelerin ve standartın antioksidan aktiviteleri EC_{50} değerleri kıyaslanarak değerlendirildi. EC_{50} değeri çalışılan konsantrasyonlara karşı % serbest radikal giderme aktivite değerlerinin yerleştirilmesi ile elde edilen grafik kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar EC_{50}= mg/mL olarak Tablo 46 ve Şekil 73'de verildi. Saf bileşiklerin ve standartın DPPH radikalini giderme aktivite sıra düzenleri aşağıda verildi.

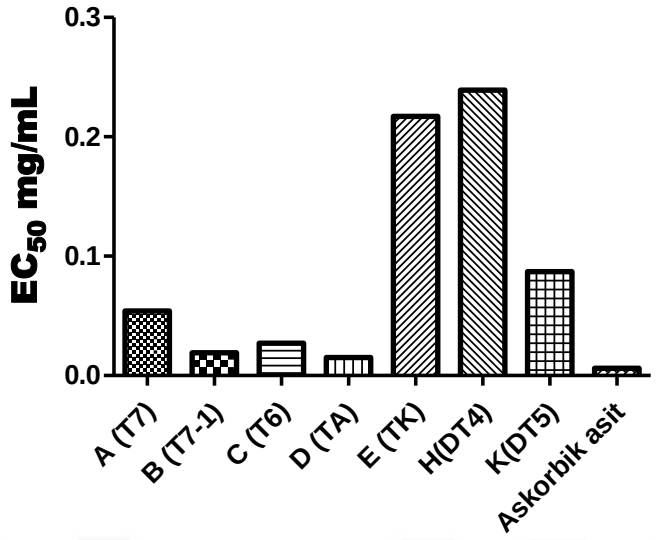
A.asit > D (TA) >B (T7-1) > C (T6) > A (T7) > K (DT5) > E (TK) >H (DT4)

EC_{50} değerleri ile antioksidan aktivite arasında ters bir orantının olduğu göz önüne alındığında D (TA) ve B (T7-1) bileşiklerinin diğer bileşiklerden daha güçlü DPPH radikalini giderme aktivitesi gösterdiği tespit edildi.

Tablo 46. Saf bileşiklerin DPPH radikali giderme aktivitesi

Bileşikler	**EC_{50}= mg/mL**
A (T7): 5,7,8-trihidroksi–6,3',4'–trimetoksiflavon	0,054±0,003
B (T7-1): Eupatilin	0,019±0,002
C (T6): Skopoletin	0,027±0,001
D (TA): 8-hidroksi –salvigenin	0,015±0,08
E (TK): 4′-Hidroksiasetofenon	0,217 ±0,002
H (DT4): 3 etil-2,6 dihidroksi-4 metoksi benzoik asit	0,239 ±0,022
K (DT5): Elenolik asit	0,087 ±0,009
Askorbik asit	0,006±0,005

Deneyler 3 kez tekrarlanarak değerlerin ortalamaları alındı ±SD (n=3)



Şekil 73. Saf bileşiklerin DPPH radikali giderme aktivitesi

4.23.2 ABTS katyon radikali giderme aktivite tayini

Saf bileşiklerin ve standart olarak kullanılan askorbik asitin ABTS katyon radikali giderme aktivitesi EC_{50} = mg/mL olarak Tablo 47 ve Şekil 74'de verildi. Saf bileşiklerin ve standartın ABTS katyon radikalini giderme aktivite sıra düzeni aşağıda verildi.

A.asit > B (T7-1) > D (TA) > C (T6) > H (DT4)> A (T7) > E (TK) > K (DT5)

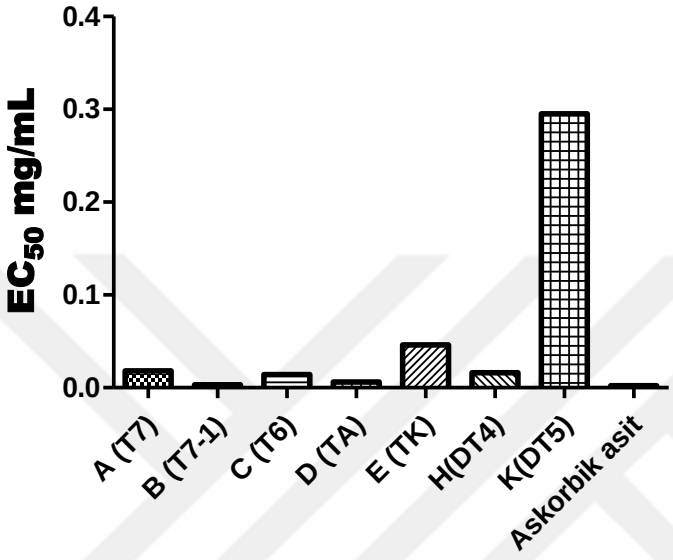
Saf bileşiklerin ve standartın ABTS katyon radikali giderme aktivitesi kıyaslandığında B (T7-1) ve D (TA) bileşiklerinin diğer bileşiklerden daha güçlü ABTS katyon radikali giderme aktivite gösterdiği saptandı.

Tablo 47. Saf bileşiklerin ABTS katyon radikali giderme aktivitesi

Bileşikler	**EC_{50}= mg/mL**
A (T7): 5,7,8-trihidroksi–6,3',4'–trimetoksiflavon	0,018±0,001
B (T7-1): Eupatilin	0,003±0,023
C (T6): Skopoletin	0,014±0,020
D (TA): 8-hidroksi–salvigenin	0,006±0,005
E (TK): 4′-Hidroksiasetofenon	0,046±0,001

H (DT4): 3 etil-2,6 dihidroksi-4 metoksi benzoik asit	0,016±0,003
K (DT5): Elenolik asit	0,295±0,001
Askorbik asit	0,002±0,005

Deneyler 3 kez tekrarlanarak değerlerin ortalamaları alındı ±SD (n=3)



Şekil 74. Saf bileşiklerin ABTS katyon radikali giderme aktivitesi

4.23.3 Demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü tayini (FRAP)

Saf bileşiklerin ve standart olarak kullanılan askorbik asitin 20 µg miktardaki demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü $FeSO_4$ grafiğinden elde edilen [absorbans = 0,8226 $FeSO_4$ (mM) - 0,03374 (R^2: 0,9940)] doğru denklemi kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar mM $FeSO_4$/20 µg ekstre olarak Tablo 48 ve Şekil 75'de verildi. Saf bileşiklerin ve standartın demir (III) iyonu indirgeme antioksidan güçlerinin sıra düzeni aşağıda verildi.

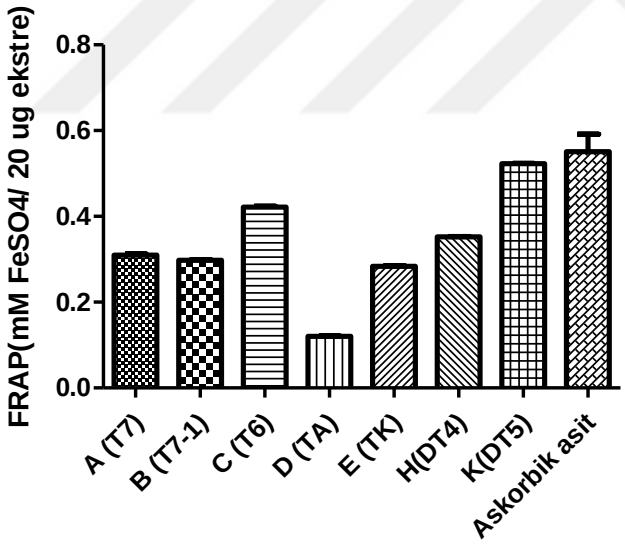
A.asit > K (DT5) > C (T6) > H (DT4) > A(T7) > B (T7-1) > E (TK) > D (TA)

Saf bileşiklerin ve standartın FRAP değerleri kıyaslandığında K (DT5) bileşiğinin diğer bileşiklerden daha güçlü ve standart olarak kullanılan askorbik asite ise yakın aktivite gösterdiği tespit edildi.

Tablo 48. Saf bileşiklerin demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü

Bileşikler	**FRAP (**mM $FeSO_4$/ 20 µg ekstre)
A (T7): 5,7,8-trihidroksi–6,3',4'–trimetoksiflavon	0,31±0,002
B (T7-1): Eupatilin	0,30±0,002
C (T6): Skopoletin	0,42± 0,002
D (TA): 8-hidroksi–salvigenin	0,12±0,002
E (TK): 4′-Hidroksiasetofenon	0,28±0,001
H (DT4): 3 etil-2,6 dihidroksi-4 metoksi benzoik asit	0,35±0,0007
K (DT5): Elenolik asit	0,52±0,001
Askorbik asit	0,55±0,06

Deneyler 2 kez tekrarlanarak değerlerin ortalamaları alındı ±SD (n=2)



Şekil 75. Saf bileşiklerin FRAP değerleri

4.24. Elektrospray İyonlaşmalı Kuadrupol Uçuş Zamanlı Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometrisinin (ESI-Q-TOF LC/MS) Analiz Sonuçları

A. multifida bitkisinin topraküstü kısmından hazırlanan heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin biyolojik aktiviteleri karşılaştırıldığında metanol ekstresinin heptan ve kloroform ekstrelerinden daha güçlü antioksidan ve antibakteriyal aktivite gösterdiği tespit edildi. Ayrıca metanol ekstresinin 200 µg/mL, 100 µg/mL ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda normal hücre (NIH/3T3) hattı üzerine toksik etki göstermediği saptandı.

Fenolik bileşiklerin antioksidan ve antimikrobiyal aktivite gösterdikleri bilinmektedir. Bitkiden hazırlanan metanol ekstresinin fenolik madde miktarının heptan ve kloroform ekstrelerinden daha yüksek olduğu tespit edilerek aktivite ile fenolik madde miktarı arasındaki ilişki bu çalışmada ortaya konuldu. Metanol ekstresinin antioksidan ve antibakteriyal aktivitesinin, heptan ve kloroform ekstresinden daha yüksek olmasına sebep olan fenolik bileşikler, elektrospray iyonlaşmalı kuadrupol uçuş zamanlı sıvı kromatografi kütle spektrometrisi (ESI-Q-TOF LC/MS) kullanılarak analiz edildi.

Bitkinin metanol ekstresinde bulunan majör fenolik bileşiklerin, molekül ağırlıklarını ve fragment iyonlarının kütlelerini tespit etmek amacıyla Yıldız Teknik Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (Merklab)'nde bulunan Q-TOF LC/MS cihazı kullanıldı. Metanol ekstresinde bulunan fenolik bileşikler MS/MS'e gönderilip fragment iyonlarının kütleleri tespit edildi. Böylelikle bitkide bulunan fenolik bileşiklerin ve o bileşiklere ait fragmentlerin molekül ağırlıkları ile elimizde bulunan standart bileşiklerin ve standart bileşiklere ait fragment iyonlarının molekül ağırlıkları karşılaştırılarak metanol ekstresindeki fenolik bileşiklerin analizi yapıldı. Ayrıca elimizde standartı olmayan bazı fenolik bileşiklerin analizinde literatür bilgilerinden de yararlanıldı.

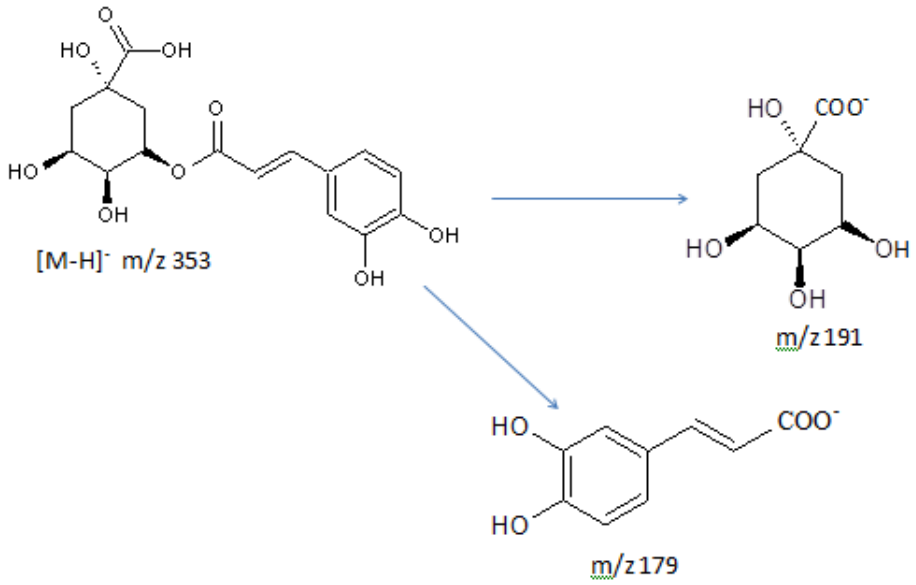
Analizi yapılan fenolik bileşiklerin alıkonma zamanları, molekül ve parçalanma ürünlerinin molekül ağırlıkları, kapalı formülleri Tablo 49'da gösterildi.

Tablo 49. *A.multifida* bitkisinin metanol ekstresinde bulunan fenolik bileşikler

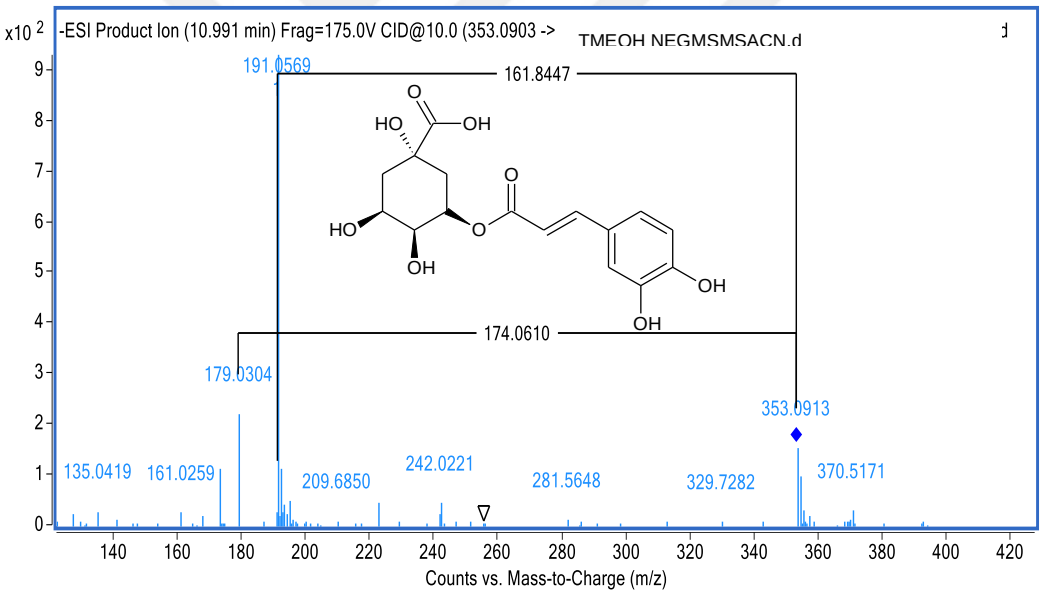
Bileşikler	**RT (min)**	**Ma**	**Mol. formülü**	**m/z deneysel**	**m/z hesaplanan**	**Ltr./ Std.**	**Fragment iyonları (m/z)**
Negatif mod							
Klorojenik asit	10,99	354,31	$C_{16}H_{18}O_9$	353,0913	353,0878	Std	191,179
Kersetin hekzosit	15,39	464,38	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463,0921	463,0955	Ref	301
Luteolin-7-O glukosit	17,02	448,37	$C_{21}H_{20}O_{11}$	447,0933	447,0876	Std	285
Dikafeoil kinik asit	18,20	516,45	$C_{25}H_{24}O_{12}$	515,1051	515,1042	Ref	353, 173
Luteolin	23,60	286,24	$C_{15}H_{10}O_6$	285,0368	285,0405	Std	175, 151,133

RT: Alıkonma zamanı; Ltr: Literatür; Std: Standart

Klorojenik asitin molekül ağırlığı 354,31 g/mol iken bir protonu kopmuş molekül ağırlığı 353,0913 g/mol dur. Klorojenik asitin kafeoil kısmının molekülden ayrılmasıyla 191 g/mol; kinik kısmının ayrılmasıyla da 179 g/mol molekül kütleli fragment iyonu oluşmuştur (Chen ve ark., 2012). Klorojenik asitin parçalanma ürünleri Şekil 76'da ve MS/MS fragmentleri Şekil 77'de gösterildi.



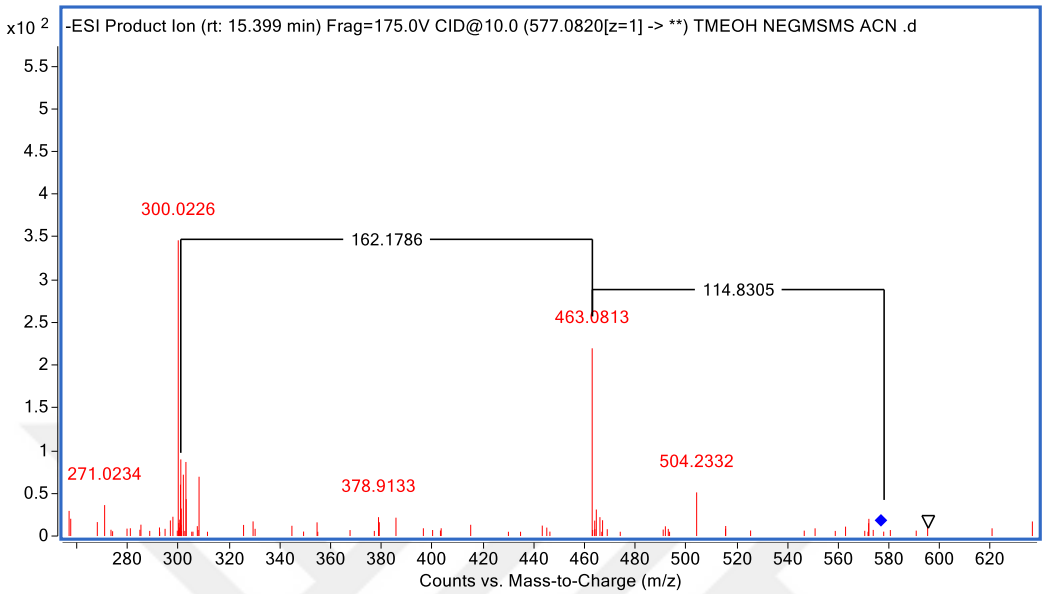
Şekil 76. Klorojenik asit molekülünün parçalanma ürünleri



Şekil 77. Klorojenik asit molekülünün MS/MS fragmentleri

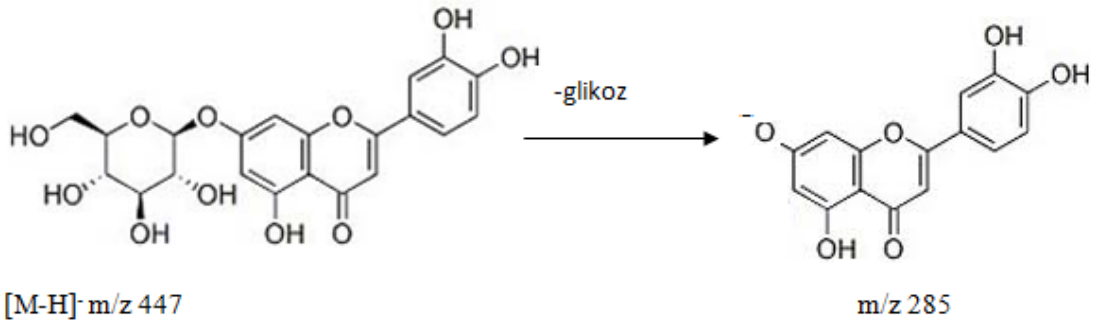
Kersetin hekzositin molekül ağırlığı 464,38 g/mol iken bir protonu kopmuş molekül ağırlığı 463,0921 g/mol'dur. Şekil 78'de 463 prekürsör iyonunun parçalandığı kersetin hekzosit molekülüne mobil fazda kullanılan TFA'nın molekül kütlesi olan 114 g/mol'un bağlanmasıyla kersetin hekzosit molekülü spektrumda 577 g/mol olarak görüldü. LC-MS'te mobil faz olarak kullanılan bir çözücünün analizi yapılan bir moleküle bağlanması mümkündür. Bundan dolayı parçalanan molekül kersetin hekzosit olup bu molekülden şeker grubunun ayrılmasıyla da 301 g/mol

molekül kütleli fragment iyonu olan kersetin molekülü oluşmuştur (Chen ve ark., 2012). Kersetin hekzositin MS/MS fragmentleri Şekil 78'de gösterildi.

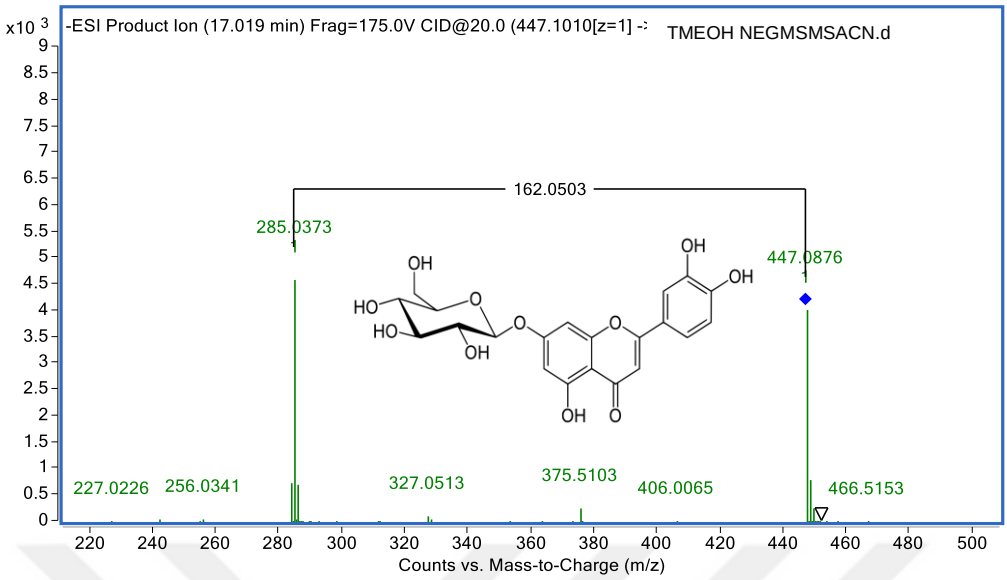


Şekil 78. Kersetin hekzosit molekülünün MS/MS fragmentleri

Luteolin-7-*O*- glukositin molekül ağırlığı 448,37 g/mol iken bir protonu kopmuş molekülü 447,0933 g/mol dur. Luteolin-7-*O*-glikozit molekülünden glikoz kısmının ayrılmasıyla 285 g/mol kütleli fragment iyonu oluşmuştur (Plazonic ve ark., 2009). Luteolin-7-*O*- glukositin parçalanma ürünü Şekil 79 ve MS/MS fragmentleri Şekil 80'de gösterildi.

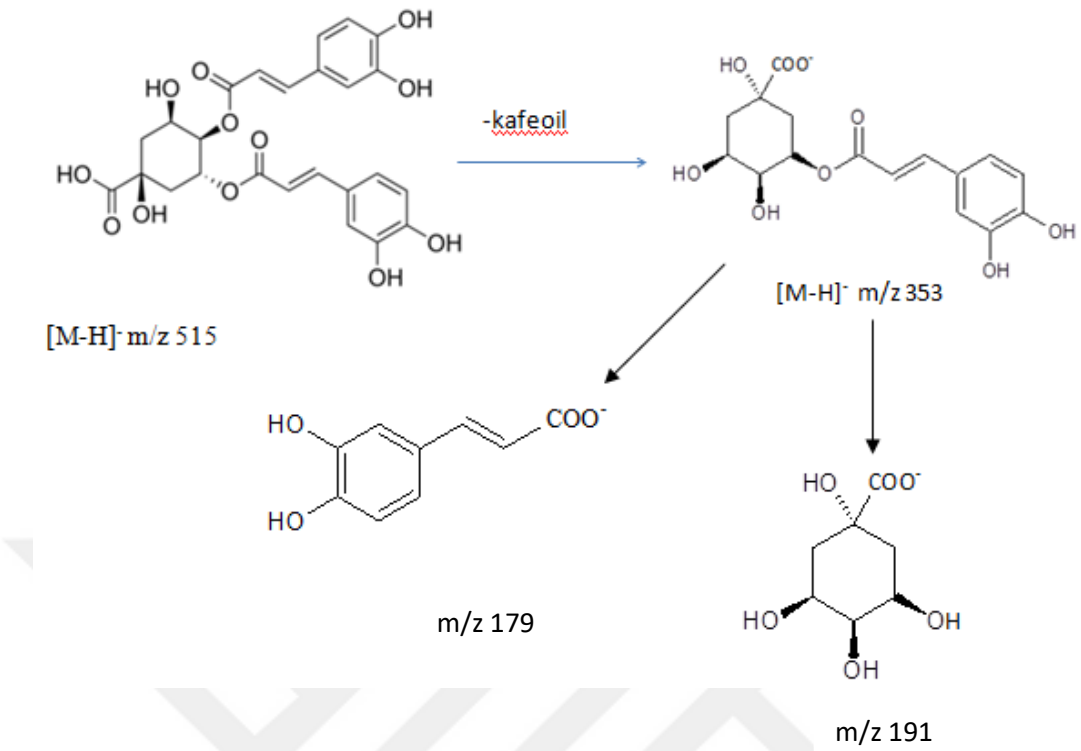


Şekil 79. Luteolin-7-*O*-gikozit molekülünün parçalanma ürünü

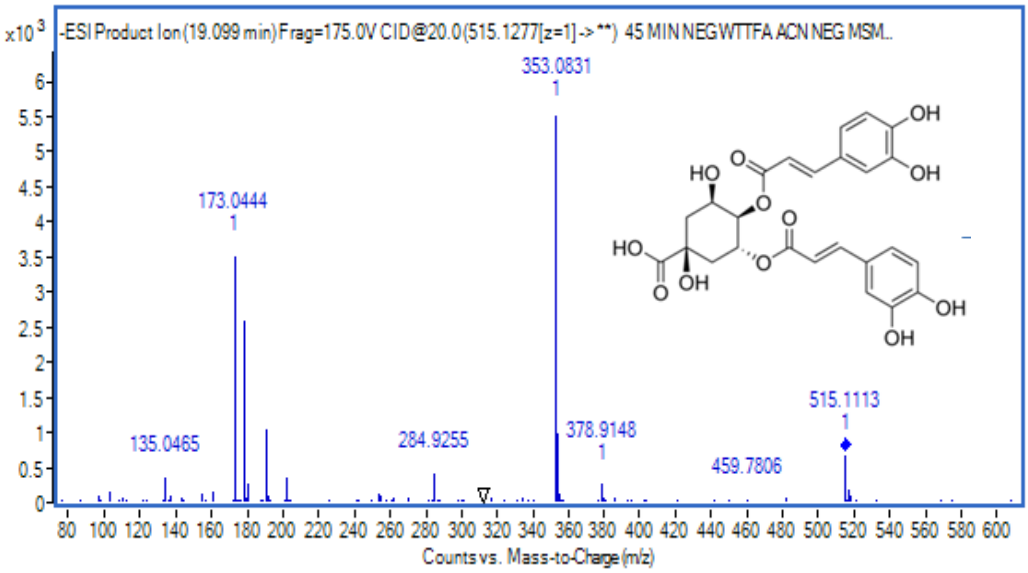


Şekil 80. Luteolin-7-O-gikozit molekülünün MS/MS fragmentleri

Dikafeoil kinik asit molekülünün ağırlığı 516,45 g/mol iken bir protonu kopmuş molekülün ağırlığı 515,1051 g/mol'dur. Dikafeoil kinik asit molekülünden M-H-kafeoil kısmının ayrılmasıyla 353 g/mol kütleli fragment iyonu ve M-H-kafeoil-kinik kısmının ayrılmasıyla da 173 g/mol kütleli fragment iyonu meydana gelmiştir (Chen ve ark., 2012). Dikafeoil kinik asit molekülünün parçalanma ürünleri Şekil 81'de ve MS/MS fragmentleri Şekil 82'de gösterildi (Schütz ve ark, 2005).

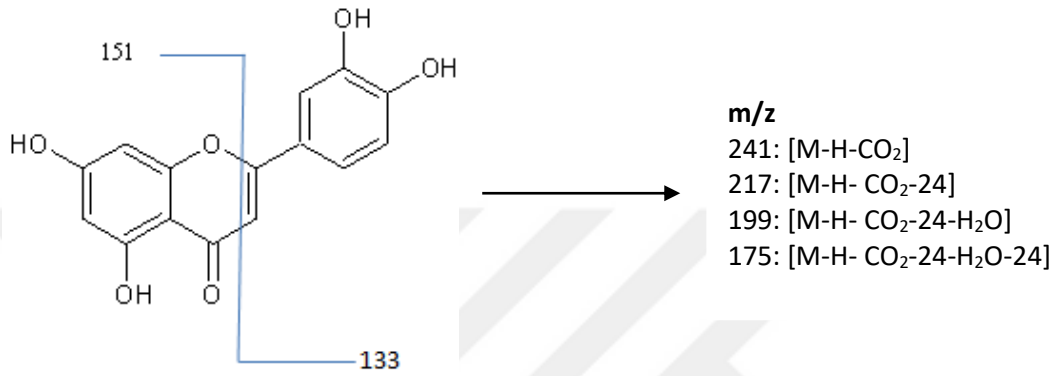


Şekil 81. Dikafeoil kinik asit molekülünün parçalanma ürünleri



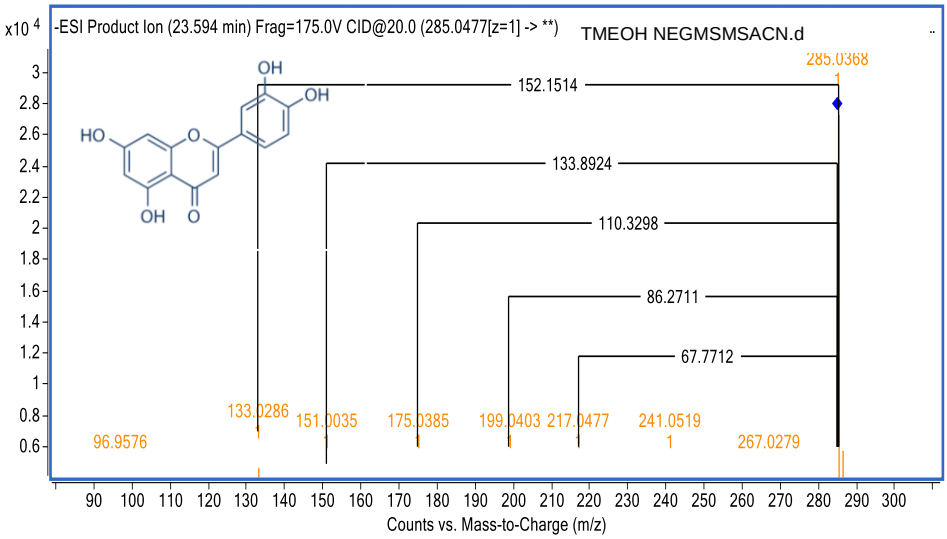
Şekil 82. Dikafeoil kinik asit molekülünün MS/MS fragmentleri

Luteolin bileşiğinin molekül ağırlığı 286,24 g/mol iken bir protonu kopmuş molekülünün ağırlığı 285,0368 g/mol dur. Luteolin bileşiği molekül ağırlıkları 175 g/mol, 151 g/mol ve 133 g/mol olan ürünlere parçalanmıştır. Luteolin bileşiğinin parçalanma ürünleri Şekil 83'de ve MS/MS fragmentleri Şekil 84'de gösterildi.



$[M-H]^-$ m/z 285

Şekil 83. Luteolin molekülünün parçalanma ürünleri



Şekil 84. Luteolin molekülünün MS/MS fragmentleri

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tez bitkimiz olan *Achillea multifida* bitkisi üzerinde yapılan literatür taramasında bitki ile ilgili sadece iki çalışmaya rastlanmış olup bunlar bitkinin uçucu yağ içeriği, ayrıca uçucu yağının ve kapitulumlarının antimikrobiyal aktivitesi üzerinde olduğu tespit edildi. Baser ve ark.'ın yaptığı bir çalışmada bitkiden elde edilen uçucu yağın *Enterobacter aerogenes* (MİK:62,5 µg/mL), *Pseudomonas aeruginosa* (MİK:125 µg/mL) ve *Candida albicans* (MİK: 62,5 µg/mL) suşlarına karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca bitkinin topraküstü kısımlarından elde edilen uçucu yağının majör bileşikler olarak α-tuyon (% 60,9), β-tuyon (% 9,1), sabinen (% 4,1), kafur (% 3,7) içerdiği tespit edilmiştir (Baser ve ark., 2002). Karaalp ve ark.'ın yaptığı başka bir çalışmada bitkinin kapitulumlarından hazırlanan n-hekzan, kloroform ve metanol ekstrelerinin hem antibakteriyal hem de antifungal etkileri incelenmiştir. Bitkiden hazırlanan kloroform ekstresinin *Staphylococcus aureus* (MİK=50 µg/mL), *Staphylococcus epidermidis* (MİK=50 µg/mL) ve *Escherichia coli* (MİK=100 µg/mL) suşlarına karşı etkili olduğu görülmüştür (Karaalp ve ark., 2009).

Tezimizde ise yukarıdaki iki çalışmadan farklı olarak *A.multifida* bitkisinin topraküstü kısımlarından hazırlanan heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Proteus vulgaris, Klebsiella pneumoniae Candida albicans, Candida glabrata, Candida guilliermondii, Candida tropicalis, Candida parapsilosis* ve *Candida krusei* suşlarına karşı antimikrobiyal aktiviteleri incelendi. Bitkiden hazırlanan metanol ekstresinin *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Escherichia coli* ve *Proteus vulgaris* suşlarına karşı antibakteriyal aktivite gösterdiği fakat hiçbir ekstrenin *Candida* türlerine karşı bir aktivite göstermediği tespit edildi.

Yapılan literatür taramalarında tez bitkimiz olan *A.multifida* bitkisi üzerine yukarıda anlatılan iki çalışmanın dışında başka hiçbir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ayrıca *Achillea* türleri üzerinde yapılan biyolojik aktivite ve biyolojik aktivite yönlendirmeli madde izolasyonu çalışmaları incelendiğinde, genellikle *Achillea* türlerinin topraküstü kısımlarından hazırlanan kloroform ve etilasetat ekstrelerinin güçlü sitotoksik aktivite; etanol ve metanol ekstrelerinin ise güçlü antioksidan ve

antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Saeidnia ve ark., 2009; Kundakovic ve ark., 2005; Eghdami ve Sadeghi, 2010; Candan ve ark., 2003).

Bu bilgiler ışığında tez bitkimiz olan *A.multifida* bitkisinin topraküstü kısımlarından hazırlanan heptan, kloroform ve metanol ekstrelerinin sitotoksik, antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri ilk kez tarafımızdan incelendi. Bitkiden elde edilen kloroform ekstresinin, heptan ve metanol ekstrelerinden daha güçlü sitotoksik aktivite göstermesinden dolayı bu ekstreden madde izolayonu yapıldı. Bu çalışmanın sonucunda *A.multifida* bitkisinin topraküstü kısımlarından ilk kez flavonoid bileşikler olarak 5,7,8-trihidroksi-6,3',4'trimetoksiflavon (majör bileşik), 8-hidroksi-salvigenin, eupatilin; kumarin bileşik olarak skopoletin; fenolik asit bileşikler olarak 4′-hidroksiasetofenon, 3 etil-2,6 dihidroksi-4 metoksibenzoik asit ve elenolik asit bileşikleri kolon kromatografisi, ince tabaka kromatografisi gibi kromatografik yöntemleri kullanılarak izole edildi ve izole edilen bu bileşiklerin yapıları ^{1}H-NMR, ^{13}C NMR, IR ve kütle spektroskopi yöntemleri ile aydınlatıldı.

Yapılan literatür taramalarında eupatilin bileşiğinin *Achillea setacea* ve *A. schischkinii* türlerinden (Ivancheva ve ark., 2002; Ulubelen ve ark., 1987); skopoletin bileşiği ise *A. clypeolata*, *A. millefolium*, *A. schischkinii*, *A. biebersteinia*, *A. krasheninnikovii*, *A. erba-rotta* ve *A. filipendulina* türlerinden izole edildiği tespit edildi (Werner ve ark., 2007; Ahmed ve ark., 2001; Ulubelen ve ark., 1987; Shmatova ve ark., 1985; Nano ve ark., 1981; Shamyanov ve ark., 1974). 8-hidroksi-salvigenin, 5,7,8-trihidroksi-6,3',4' trimetoksiflavon, 4′-hidroksiasetofenon, 3 etil-2,6 dihidroksi-4 metoksibenzoik asit ve elenolik asit bileşikleri ise bu çalışma ile ilk kez *Achillea* cinsinden izole edildiler.

Bu çalışma ile yapıları aydınlatılan bileşiklerin sitotoksik ve antioksidan aktiviteleri incelendi. 5,7,8-trihidroksi-6,3',4' trimetoksiflavon bileşiğinin insan serviks kanser hücre hattı HeLa ve insan kolon kanser hücre hattı olan HT-29 hücrelerine karşı; eupatilin bileşiğinin HeLa hücre hatlarına karşı; elenolik asit bileşiğinin ise insan meme kanser hücre hattı olan MCF-7 hücrelerine karşı çok güçlü ve seçici sitotoksik aktivite gösterdiği saptandı. Yapılan literatür çalışmalarında eupatilin bileşiğinin MCF-7 hücre hatlarına karşı sitotoksik aktivite göstermediği saptanmıştır (Csapi ve ark., 2010).

Bizim çalışmamızda da eupatilin bileşiği MCF-7 hücre hatlarına karşı sitotoksik aktivite göstermemiştir. 5,7,8-trihidroksi-6,3',4'trimetoksiflavon ve elenolik asit bileşiklerinin sitotoksik aktiviteleri üzerinde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

8-hidroksi-salvigenin ve eupatilin saf bileşiklerinin DPPH serbest radikalini süpürücü aktivitesi ve ABTS katyon radikalini süpürücü aktivitesinin diğer saf bileşiklerden daha güçlü olduğu saptandı. Skopoletin bileşiğinin ise demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücünün diğer saf bileşiklerden daha güçlü olduğu tespit edildi. Yapılan literatür taramalarında eupatilin bileşiğinin güçlü süperoksit anyon radikali giderme aktivitesi ve ABTS katyon radikalini süpürücü aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir (Kolak ve ark., 2009). Bizim çalışmamızda elde edilen eupatilin bileşiğinin antioksidan aktivitesi sonuçları literatür verileri ile paralellik göstermiştir. Yapılan başka bir çalışmada skopoletin bileşiğinin güçlü H_2O_2 süpürücü aktivitesi, süperoksit anyon radikali giderme aktivitesi ve DPPH radikali giderme aktivitesi gösterdiği bulunmuştur (Habbu ve ark., 2012). Bizim çalışmamızda ise yukarıdaki çalışmadan farklı olarak skopoletin bileşiğinin güçlü demir (III) iyonu indirgeme antioksidan aktivite gösterdiği tespit edildi. 8-hidroksi-salvigenin bileşiğinin antioksidan aktivitesi üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Ayrıca tezimizde ilk kez *A.multifida* bitkisinin topraküstü kısımlarından hazırlanan metanol ekstresinin heptan ve kloroform ekstresinden daha güçlü antibakteriyal ve antioksidan aktivite gösterdiği tespit edildi. Fenolik bileşikler ile antioksidan ve antibakteriyal aktivite arasında doğrusal bir ilişkinin olduğu bilgisi göz önüne alınarak metanol ekstresinin içerdiği fenolik bileşikler, elektrospray iyonlaşmalı kuadrupol uçuş zamanlı sıvı kromatografi kütle spektrometrisi kullanılarak tarafımızdan ilk kez tespit edildi. Bu yöntem ile *A. multifida* bitkisinin metanol ekstresinin fenolik asit bileşikler olarak dikaffeoil kinik asit (majör bileşik), klorojenik asit; flavonoid bileşikler olarak kersetin heksozit, luteolin-7-*O* glukozit ve luteolin bileşiklerini içerdiği belirlendi.

Yapılan literatür taramalarında *Achillea schischkinii* ve *A.collina* bitkilerinden luteolin bileşiğinin HPLC ile analiz edildiği saptandı (Khazneh ve ark., 2010; Karlova K, 2006). Ayrıca *A.millefolium, A.talagonica, A.ageratum, A.fragrantissima, A.cartilaginea, A.kotschyi* subsp. kotschyi, *A.lycaonica, A.coarctata ve A.ligustica*

bitkilerinden luteolin bileşiğinin izole edildiği tespit edildi (Lemmens ve ark., 2006; Saeiidmnia ve ark., 2009; Garcia ve ark., 1997; Bakr ve ark., 2014; Radusiene ve ark., 2011; Agar ve ark., 2015; Tuberoso ve ark., 2009).

A.collina bitkisinden luteolin-7-O glikozit bileşiği HPLC ile analiz edilmiş, *A. cartilaginea* bitkisinden ise bu bileşik izole edilmiştir (Karlova K, 2006; Radusiene ve ark., 2011). *A.kotschyi* subsp. *kotschyi*, *A.lycaonica*, *A.coarctata*, *A.collina* ve *A.cartilaginea* bitkilerinde klorojenik asit bileşiği izole edilmiştir (Agar ve ark., 2015; Radusiene ve ark., 2011; Giorgi ve ark., 2010). *A.millefolium* ve *A.collina* bitkilerinden dikafeoil kinik asit ve türevleri HPLC ile analiz edilmiştir (Benedek ve ark., 2006; Giorgi ve ark., 2010; Dias ve ark., 2013). *A.millefolium* bitkisinde kersetin heksozit bileşiği HPLC ile analiz edilmiştir (Dias ve ark., 2013). Yapılan literatür taramaları ile bizim çalışmamızın sonuçları kıyaslandığında bu çalışma ile analiz edilen bileşiklerin literatür ile paralellik gösterdiği saptandı.

Tıbbi olarak kullanılan ve farmakopelerde kayıtlı olan *A.millefolium* bitkisinin ve diğer *Achillea* türlerinin biyolojik aktivite yönlendirmeli madde izolasyonu; izole edilen bileşiklerin veya ekstrelerin sitotoksik, antioksidan, antimikrobiyal aktiviteleri ve fenolik bileşiklerinin analizleri üzerine yapılan ve literatür bilgilerine ulaşılabilen bilimsel çalışmalar aşağıda kısaca sunulmuştur. Ayrıca tez bitkimiz olan *A.multifida* bitkisinin sonuçları *A.millefolium* bitkisinin sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

A.millefolium bitkisinin metanol ekstresinden izole edilen ahillinin A bileşiğinin, akciğer kanser hücre hatları olan A549, RERF-LC-KJ, QG-56, PC-3 ve QG-90 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi incelenmiş ve bu bileşiğin A549 (IC_{50}:5,8 μM), RERF-LC-kj (IC_{50}:10 μM) ve QG-90 (IC_{50}:0,31 μM) hücre hatlarına karşı güçlü sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur (Yong ve ark., 2011).

A.millefolium bitkisinden izole edilen kastisin bileşiğinin sitotoksik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca bu bitkiden apigenin, apigenin-7-O-glukozit, luteolin, luteolin-7-O glukozit ve rutin HPLC yöntemi kullanılarak analiz edilmiş ve miktarları hesaplanmıştır (Haidara ve ark., 2005).

A.millefolium bitkisinin içerdiği fenolik bileşikler katı faz ekstraksiyonu yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemiyle incelenmiştir. Bitkide bulunan dikafeoilkinik asitlerin koleretik, flavonoidlerin ise antispazmodik etki gösterdiği

saptanmıştır (Benedek ve ark., 2006). Bu tür üzerine yapılan başka bir çalışmada, *A.millefolium* bitkisi üzerine tandem MS yöntemi kullanılarak bir çalışma yapılmış ve bitkinin 1-kafeoil kinik asit, 3 kafeoil kinik asit, 4 kafeoil kinik asit, 5 kafeoil kinik asit, 5- feruoil kinik asit, 1,5-/3,5-/3,4-/4,5-di kafeoil kinik asit ve 1-kafeoil 3-feruoil kinik asit içerdiği bulunmuştur (Jaiswal ve ark., 2011).

A.millefolium bitkisinden hazırlanan etanol ekstresinin, göğüs kanser hücre hatları olan SK-BR-3, MDA-MB-435 hücreleri ve lösemi kanser hücre hatlar olan U937 ve K562 hücreleri üzerinde sitotoksik aktivitesi incelenmiş ve etanol ekstrenin 10 µg/mL konsantrasyonda K562 ve SK-BR-3 hücrelerinin % 50'sini öldürdüğü saptanmıştır (Amirghofran, 2001).

Eghdami ve ark.'ın yaptığı bir çalışmada, *A. millefolium* bitkisinden hazırlanan metanol ve su ekstrelerinin toplam fenolik ve flavonoid içerikleri incelenmiş daha sonra bu ekstrelerin DPPH yöntemi ile antioksidan aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre metanol ekstresinin (% 75), su ekstresinden (% 50,8) daha güçlü antioksidan aktivite ve daha fazla fenolik (123,9±2,6 mg GAL/g ekstre) ve flavonoid madde (41,2±1,7 mg KE/g ekstre) taşıdığı tespit edilerek aktivite ile fenolik bileşikler arasında doğrusal bir ilişkinin olduğu gösterilmiştir (Eghdami ve Sadeghi, 2010).

Moldovan ve ark.'ın yaptığı bir çalışmada, *A.millefolium* bitkisinden hazırlanan sulu etanol (% 70) ekstresinin içerdiği toplam fenolik madde miktarı 131,59±2,96 mg kaffeik asit /g kuru ağırlık ve total flavonoid miktarları 46,59±2,31 mg kersetin /g kuru ağırlık olarak hesaplanmıştır (Moldovan ve ark., 2011).

A.millefolium bitkisinin çiçek, yaprak ve tohumlarından hazırlanan su ve etanol ekstrelerinin hidrojen peroksit giderme ve lipit peroksidasyon aktivite yöntemleri kullanılarak antioksidan aktiviteleri karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir (Keser ve ark., 2013). Ekstrelerin 100 µg konsantrasyondaki hidrojen peroksit giderme aktivitelerinin sırası aşağıda verilmiştir: tohum-etanol ekstresi (% 40,63)>çiçek-etanol ekstesi (% 40,57)> BHA (% 39,26)>yaprak-su ekstresi (% 23,63)>yaprak-etanol ekstresi (% 20,07)>çiçek-su ekstresi (% 18,19)>tohum-su ekstresi (% 17,75). Ayrıca 100 µg/mL konsantrasyondaki ekstrelerin lipit peroksidasyon yüzdeleri aşağıdaki sıraya göre tespit edilmiştir: tohum-su ekstresi (% 92,09)>tohum-etanol

ekstresi (% 91,89)>çiçek-su ekstresi (% 91,53)>yaprak-su ekstresi (% 91,43)> yaprak-etanol ekstresi (% 90,77)>çiçek-etanol ekstresi (% 90,31).

Candan ve ark.'ın yaptığı bir çalışmada *A.millefolium* subsp. m*illefolium* bitkisinin topraküstü kısımlarından hazırlanan metanol ekstresinin güçlü DPPH (IC_{50}: 45,60 µg/mL) radikalini süpürücü aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Candan ve ark., 2003). Aynı çalışmada bitkisinin topraküstü kısımlarından hazırlanan metanol ekstresinin *Clostridium perfringens, Candida albicans* ve *Candida krusei* suşlarına karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği saptanmıştır. Fakat tez bitkimiz olan *A.multifida* bitkisinin metanol ekstresi *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Escherichia coli* ve *Proteus vulgaris* suşlarına karşı antibakteriyal aktivite göstermiş fakat *Candida albicans, Candida glabrata, Candida guilliermondii, Candida tropicalis, Candida parapsilosis* ve *Candida krusei* suşlarına karşı antifungal aktivite göstermemiştir.

A.millefolium bitkisinin literatür verileri incelendiğinde bu bitkiden elde edilen metanol, etanol ekstrelerinin ve saf bileşiklerin özellikle göğüs kanser hücre hatları, lösemi kanser hücre hatları, serviks kanser hücre hatları ve akciğer kanser hücre hatları üzerine güçlü sitotoksik aktivite gösterdiği tespit edildi (Amirghofran, 2001; Yong ve ark., 2011; Dias ve ark., 2013). Tez bitkimiz olan *A.multifida* bitkisinin ise kloroform ekstresinin ve saflaştırılan bileşiklerinin meme kanser hücre hattı, serviks kanser hücre hattı ve kolon kanser hücre hatlarında güçlü sitotoksik aktivite gösterdiği tespit edildi. Ayrıca *A.millefolium* bitkisinin topraküstü kısımlarından hazırlanan metanol ekstresinin tez bitkimiz olan *A.multifida* bitkisinin metanol ekstresinden daha güçlü antioksidan aktivite gösterdiği saptandı.

Tifunovic ve ark.'ın yaptığı çalışmada *A.clavennae* bitkisinin topraküstü kısımlarından flavonol bileşikler olan sentauredin, penduletin, kastisin; kumarin bir bileşik olan izofraksidin; lignan yapıda sesamin ve seskiterpen lakton bileşikler olan artekanin, epoksiklorohidrin, anadalusin ve apressin bileşikleri izole edilmiştir (Trifunovic ve ark., 2006).

Niaz ve ark.'ın yaptığı bir çalışmada, *A.wilhelmsii* bitkisinden izole edilen saponin bileşiklerin sitotoksik aktivite gösterdiği saptanmıştır (Niaz ve ark., 2011).

A.talagonica bitkisinin topraküstü kısımlarından hazırlanan etil asetat ekstresinin sitotoksik aktivite göstermesinden dolayı bu ekstreden β-sitosterol, salvigenin ve santoflavon (5-hidroksi 4′,3′,6,7-tetrametoksi flavon) bileşikleri izole edilmiştir. İzole edilen bileşiklerden santoflavon (IC_{50}:15 µg/mL) bileşiğinin çok güçlü sitotoksik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Saeidnia ve ark., 2009).

A.alexandri-regis topraküstü kısımlarından hazırlanan kloroform ve etil asetat ekstreleri birleştirilerek insan serviks kanser hücre hattı (HeLa) ve lösemi kanser hücre hattı (K562) üzerine sitotoksik aktiviteleri incelenmiş ve kombine ekstrenin HeLa (IC_{50}: 25,92±4,96 µg/mL) hücre hattına güçlü sitotoksik aktivite göstermesine rağmen, K562 (IC_{50}:48,59 ±18,31 µg/mL) hücre hattına ise düşük aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Kundakovic ve ark., 2005).

A.odorata bitkisinin yapraklarından hazırlanan metanol ekstresinin, insan meme kanser hücre hattı MCF-7, insan epiglot hücre hattı Hep2 ve fare lösemi hücre hattı olan WEHI hücreleri üzerine sitotoksik etkileri incelendiğinde metanol ekstresinin WEHI (% 81,13) ve Hep2 (% 61,54) hücre hatlarına karşı güçlü sitotoksik aktivite gösterdiği bulunmuştur (Boutennoune ve ark., 2014).

A.holosericea bitkisinin köklerinden RP-C-18 MPLC yöntemi ile 3,5-di-O-[E]-kaffeoil kinik asit, 3-O-[E]-feruloil-5-O-[E]-kaffeoil kinik asit, 4-O-[E]-feruloil-5-O-[E]-kaffeoil kinik asit bileşikleri ve RP-HPLC yöntemi ile de 5-O-[E]-kaffeoil kinik asit bileşiği analiz edilmiştir (Radulovic ve ark., 2006).

Ardestani ve ark.'ın yaptığı bir çalışmada *A.santolina* bitkisinin topraküstü kısımlarından hazırlanan etanol:su (7:3) ekstresinin DPPH, süperoksit radikal giderme ve FRAP aktivite yöntemleri ile antioksidan aktivitesi incelenmiş ve sonuçlar aşağıda verilmiştir: DPPH (IC_{50}: 55 µg/mL) > süperoksit radikal (IC_{50}: 305 µg/mL) > FRAP (IC_{50}: 658 µg/mL) (Artestani ve Yazdanparast, 2007).

Yapılan literatür taramalarında *Achillea* türlerinden hazırlanan kloroform, metanol, etilasetat ekstrelerinin insan serviks kanser hücre hattı (HeLa), lösemi kanser hücre hattı (K562) ve fare lösemi hücre hattı olan WEHI hücrelerine sitotoksik aktivite gösterdiği tespit edildi (Kundakovic ve ark., 2005; Boutennoune ve ark., 2014). Elde edilen sonuçların tez bitkimiz olan *A. multifida* ile benzerlik gösterdiği saptandı.

A.multifida bitkisinin kloroform ekstresinin ve bu ekstreden sütun kromatografisi sonucunda elde edilen AM-III, AM-IV, AM-VI ve AM-VII kodlu altekstrelerin HeLa, HT-29 ve MCF-7 hücre hatlarına karşı güçlü ve seçici sitotoksik aktivite gösterdiği saptandı. Metanol ekstresinin heptan ve kloroform ekstresinden daha fazla toplam fenolik madde miktarı içerdiği ve daha güçlü antioksidan ve antibakteriyal aktivite gösterdiği tespit edildi. Ayrıca 100 µg/mL ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda kloroform ve metanol ekstrelerinin fare embriyonik fibroblast hücre hattı olan NIH/3T3 üzerinde toksik etki göstermediği bulundu.

Bundan dolayı metanol ve kloroform ekstrelerinin daha farklı normal hücre hatlarındaki ve *in vivo* deneyler ile toksik etkileri incelendikten sonra, gelecekte metanol ekstresinin hem gıda hem de ilaç endüstrisinde doğal bir antioksidan ve antibakteriyal kaynak olarak kullanılabileceği; ayrıca kloroform ekstresi, bu ekstreden elde edilen altekstreler (özellikle AM-III, AM-IV ve AM-VI ekstresi) ve bu ekstrelerden izole edilen 5,7,8-trihidroksi-6,3',4' trimetoksiflavon, eupatilin, elenolik asit bileşiklerinin ise gelecekte anti-kanser bir ajan olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

Agar OT, Dikmen M, Ozturk N, Yilmaz MA, Temel H, Turkmenoglu FP. Comparative Studies on Phenolic Composition, Antioxidant, Wound Healing and Cytotoxic Activities of Selected *Achillea* L. Species Growing in Turkey. Molecules 2015; 20: 17976-18000.

Ahmad VU, Farooq U, Hussain J, Abbasi MH, Jassbi AR, Nawaz SA, Choudhary MI. Three new sesquiterpene Hemiacetals from *Achillea vermicularis*. Nat Prod Res. 2005; 19(6): 551-559.

Ahmed KhM, El-Din SS, Abdel WS, El-Khrisy EAM. Study of the coumarin and volatile oil composition from aerial parts of *Achillea millefolium* L. Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research. 2001; 44(4): 218-222.

Ahmed AA, Gati T, Hussein TA, Ali AT, Tzakou OA, Couladis MA, Mabry TJ, Toth G. Ligustolide A and B, two novel sesquiterpenes with rare skeletons and three 1,10-seco-guaianolide derivatives from *Achillea ligustica*. Tetrahedron. 2003; 59(2003): 3729–3735.

Aktaş SH. Kemoterapinin Kolon Kanseri, Meme Kanseri ve Mide Kanserinde VEGF Düzeylerine Etkisinin İn Vivo ve İn Vitro İncelemesi. Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2010, Ankara (Danışman: Prof. Dr. Hakan Akbulut).

Amirghofran Z, Amirghofran MH. Cytotoxic activity of Thymus vulgaris, Achillea millefolıum and Thuja orientalıs on different growing cell lınes. Med J Islam Repub Iran. 2001; 15 (3) :149-154.

Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. J Agr and Food Chem. 2004; 52: 7970-7981.

Arabacı T. Türkiye'de Yetişen *Achillea* L. (Asteraceae) Cinsinin Revizyonu. İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2006, Malatya (Danışmanlar: Prof. Dr. Bayram Yıldız, Yard. Doç. Dr. Emel Yiğit).

Ardestani A, Yazdanparast R. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. Food Chem. 2007; 104 (1): 21-29.

Atıcı E. Cancer and leukemia in the history of medicine. Türk Onkoloji Dergisi. 2007; 22 (4): 197-204.

Aydın Ç. Denizli İlinde Yayılış Gösteren Bazı Endemik *Allıum* L. Taksonlarının Ekstraktlarının Aktif Bileşenlerinin Karakterizasyonu, Antioksidan ve Antibakteriyal Etkilerinin Belirlenmesi. Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2012, Denizli (Danışman: Prof. Dr. Ramazan Mammadov).

Azeez FA, Adaramoye OA. Evaluation of antioxidant and acteylcholinesterase-inhibitory properties of methanol extracts of nauclealatifolia, Cymbopogon citratus and Cocos nucifera: An in vitro study. Brit J of Med&Med Res. 2014;11:2156-2170.

Bader A, Flamini G, Cioni PL, Morelli I. Essential oil composition of *Achillea santolina* L. and *Achillea biebersteinii Afan.* collected in Jordan. Flavour Fragr. J. 2003; 18: 36–38.

Bagchi K, Puri S. Free radicals and antioxidants in health and disease. La Revue de Sanne de la Mediterranee orientale. 1998; 4(2): 350-360.

Bakr RO, Arafa RK, Al-Abd AM, Elshishtawy HM. Phenolics of *Achillea fragrantissima* growing in Egypt and its cytotoxic activity. Journal of Medicinal Plants Research. 2014; 8(21):763-771.

Balboul BA, Ahmed AA, Otsuka AH, Bando M, Kıdo M, Takeda Y. Guaianolide and A Germacranolide from *Achillea santolina*. Phytochemistry. 1997; 46*(6):* 1045-1049.

Banerjee S, Mazumdar S. Electrospray ionization mass spectrometry: A Technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. Int J Anal Chem. 2012; 1-41. doi:10.1155/2012/282574.

Barutca B. BAZI Bitki Ekstrelerinin Memeli Hücre Kültürlerinde Sitotoksik Aktivitelerinin İn Vitro Araştırılması. Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2006, Eskişehir (Danışman: Yard. Doç. Dr. Melih Zeytinoğlu).

Baser KHC, Demirci B, Duman H, Aytac Z, Adiguzel N. Composition of the essential oil of *Achillea goniocephala* Boiss. et bal. from Turkey. J Essent Oil Res. 2001; 13(4): 219-220.

Baser KHC, Demirci B, Demirci F, Kocak S, Akinci C, Malyer H, Guleryuz G. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Achillea multifida*. Planta Med. 2002; 68(10), 941-943.

Baytop T. Türkiye'de Bitkiler İle Tedavi. Nobel Kitabevleri, 2.Basım, İstanbul, 1999,176-177.

Beker BY. Flavonoidler Varlığında Askorbik Asidin Bakır (II) – Katalizli Oksidasyonu ve Bakır (II)/Askorbik Asit Nedenli Lipit Peroksidasyonunun İncelenmesi. Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2011, İstanbul (Danışman: Prof Dr. İnci Sönmezoğlu).

Bell BD, Leverrier S, Weist BM, Newton RH, Arechiga AF, Luhrs KA, Morrissette NS, Walsh CM. FADD and caspase-8 control the outcome of autophagic signalling in proliferating T cells. PNAS. 2008;105:16677-16682.

Benedek B, Geisz N, Jager W, Thalhammer T, Kopp B. Choleretic effects of yarrow (*Achillea millefolium* L.) in the isolated perfused rat liver. Phytomedicine. 2006; 13: 702-706.

Bener M. Besin Özütleri ve Serumda Antioksidan Kapasite Ölçümü İçin Moleküler Spektroskopik Sensörler Geliştirilmesi. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, 2013, İstanbul (Danışmanlar: Prof. Dr. Reşat Apak, Doç. Dr. Mustafa Özyürek).

Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of ''antioxidant power'': The FRAP assay. Anal Biochem. 1996; 239:70-76.

Beziç N, Skocibusiç M, Dunkiç V, Radoniç A. Composition and antimicrobial activity of *Achillea clavennae* L. essential oil. Phytother. Res. 2003;17:1037–1040 .

Biberoğlu G. Kütle Spektrometresi ve Tıp Alanında Kullanımı. T Klin Tıp Bilimleri. 2003; 23: 491-498.

Bicchi C, Frattini C, Cantamessa L, Poggio L. On the composition of *Achillea abrotanoides* (Vis.) Vis. essential oil. Flavour Fragr J. 1988; 3(3): 101-104.

Boudjerda A, Zater H, Benayache S, Chalchat JC, Platas JG, Leon F, Brouard I, Bermejo J, Benayache F. A new guaianolide and other constituents from *Achillea ligustica*. Biochem Sys Ecol. 2008; 36 (2008): 461-466.

Boutennoune H, Boussouf L, Rawashdeh A, AlQaoud K, Abdelhafez S, Kebieche M, Madani K. In vitro cytotoxic and antioxidant activities of phenolic components of Algerian Achillea odorata leaves. Arab J Chem. 2014; 1-7.

Boyle P, Levin B. Dünya kanser raporu. Dünya Sağlık Örgütü, Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu. 2008.

Brahmachari G, Goraj D, Chatterjee D, Mondal S, Mistri B. 5,8 dihydoxy-6,7,4'-trimethoxyflavone, a novel flavonoid constituent of *Limnophila indica.* Indian J. Chem. 2004; 43: 219-222.

Brewer MS. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. Compr Rev Food Sci F Safety. 2011;10: 221-247.

Bruno M, Rosselli S, Raccuglia RA, Maggio A, Senatore F, Arnold NA, Griffin CA, Herz W. Terpenoids and flavones from *Achillea falcate* (Asteracea). Revista de la Sociedad Quimica de Mexico. 2003; 47(2): 130-131.

Büyüktuncel E. Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektofotometrik yöntemler. Marmara Pharmacy Journal. 2013; 17: 93-103.

Candan F, Unlu M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sökmen A, Akpulat HA. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). Journal of Ethnopharmacology. 2003; 87 (2003): 215-220.

Cavalcanti AM, Baggio CH, Freitas CS, Rieck L, de Sousa RS, Da Silva-santos JE, Mesia-Vela S, Margues MC. Safety and antiulcer efficacy studies of *Achillea millefolium* L. after chronic treatment in Wistar rats. Journal of Ethnopharmacology. 2006;107: 277–284.

Chen HJ, Inbaraj BS, Chen BH. Determination of phenolic acids and flavonoids in *Taraxacum formosanum* Kitam by liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with a post-column derivatization technique. Int J Mol Sci. 2012; 2012(13): 260-285.

Clifford MN, Weiguo W, Kuhnert N. The chlorogenic acids of Hemerocallis. Food Chem. 2006; 95: 574–578.

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)., Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing in Yeasts, Approved Guideline, Vol, M-44-A. CLSI, Wayne, PA (2002).

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)., Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approved Standard-Third Edition. CLSI document M27-A3 (2008).

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI),. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing;Twenty-First Informational Supplement. M100-S21 31:1(2011).

Csapi B, Hajdú Z, Zupkó I, Berényi A, Forgo P, Szabó P, Hohmann J. Bioactivity-Guided Isolation of Antiproliferative Compounds from *Centaurea Arenaria.* Phytother. Res. 2010; 24: 1664–1669.

Çakıcı AV. Bingöl İlinde Yetişen Bazı *Achillea* L. (Asteraceae) Taksonlarının Uçucu Yağ Kompozisyonlarının Araştırılması. Bingöl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2014, Bingöl (Danışman: Yard. Doç. Dr. Alpaslan Koçak).

Çal A. Yeni Nesil Platin Komplekslerinin Kütle Spektrometrik Yöntemlerle İncelenmesi ve Antikanser Aktivitelerinin *in Vitro* Olarak Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2014, Ankara (Danışmanı: Prof. Dr. Bekir Salih).

Çulhaoğlu B. *Salvia chrysophylla* ve *Salvia trichoclada* Bitkilerindeki Sekonder Metabolitlerin izolasyonu, Yarı Sentetik Türevlerinin Eldesi, Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivitelerinin İncelenmesi. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2011, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. Gülaçtı Topçu).

Davis PH. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinb. Un. Press. 5. basım, Edinburgh, 1975.

Demir S. *Centaurea depressa* Bieb.'in Sekonder Metabolitlerin Araştırılması. Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2008, İzmir (Danışman: Yard. Doç. Dr. Canan Karaalp).

Demirgan R. Bazı *Papaver* Alkaloidlerinin Sitotoksik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2009 İstanbul (Danışman: Yard. Doç. Dr. Ali Karagöz).

Deng YR, Song AX, Wang HQ. Chemical components of Seriphidium santolium Poljak. J.Chin.Chem.Soc. 2004; 51(3): 629-636.

Devasagayam TPA, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. JAPI. 2004;52: 794-804.

Dias MI, Barros L, Dueñas M, Pereira E, Carvalho AM, Alves RC, Oliveira M, Beatriz PP, Santos-Buelga C, Ferreira ICFR. Chemical composition of wild and commercial *Achillea millefolium* L. and bioactivity of the methanolic extract, infusion and decoction. Food Chemistry. 2013; 141(4): 4152–4160.

Dierkes G, Krieger S, Dück R, Bongartz A, Schmitz OJ, Hayen H. High-performance liquid chromatography-mass spectrometry profiling of phenolic compounds for evaluation of olive oil bitterness and pungency. J. Agric. Food Chem. 2012; 60: 7597−7606.

Ding HY, Lin HC, Teng CM, Wu YC. Phytochemical and pharmacological studies on Chinese *Paeonia* species. J.Chin. Chem. Soc. 2000; 47(2): 381-388.

Ding SZ, Zheng PY. *Helicobacter pylori* infection induced gastric cancer; advance in gastric stem cell research and the remaining challenges. Ding and Zheng Gut Pathogens. 2012; 4(18): 1-11.

Dinis TCP, Madeira VMC, Almeida LM. Action of phenolic derivates (acetoaminophen, salycilate and 5-aminosalycilate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. Arch Biochem Biophys. 1994; 315:161−169.

Eghdami A, Sadeghi F. Determination of total phenolic and flavonoids contents in methanolic and aqueous extract of *Achillea millefolium.* Org. Chem. J. 2010; 2: 81-84.

Erdik E. Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler. 5. Baskı, Gazi Kitabevi, Ankara, 1993; 386-387.

Erdoğan A. Benzoksazol grubu içeren kumarinlerden ftalosiyaninlerin sentezi ve karakterizasyonu. Marmara Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2009, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. Mustafa Bulut).

Ergon CM, Yücesoy M. Evaluation of microdilution method using high resolution medium for antifungal susceptibility testing of yeasts. Turkish Journal of İnfection. 2005; 19 (4): 445-451.

E/S/C/O/P Monographs (Supplement): The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products. 2009; 2: 175-177.

Ferdinal N, Alfajri R, Arifin B. Isolation and characterization of scopoletin from the bark of *Fagraea ceilanica thumb* and antioxidants tests. International Journal Advanced Science Engineering Information Technology. 2015; 5(2): 70-74.

Fleisher Z, Fleisher A. Volatiles of *Achillea fragrantissima* (Forssk.) Sch. Bip. J Essen Oil Res**.** 1993; 5(2): 211-214.

Garcia MD, Puerta R, Martínez S, Sáenz MT. Analgesic, antipyretic and antiinflammatory effects of *Achillea ageratum.* Phytotherapy Research. 1997; 11(5): 376–379.

Ghantous A, Nasser N, Saab I, Darwiche N, Saliba NA. Structure-activity relationship of seco-tanapartholides isolated from *Achillea falcata* for inhibition of HaCaT cell growth. Eur J Med Chem. 2009; 44(2009*)*: 3794-3797.

Ghantous A, Muhtasib HG, Vuorela H, Saliba NA, Darwiche N. What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials?. Drug Discov Today. 2010;15(16): 668-678.

Giorgi A, Mingozzi M, Madeo M, Speranza G, Cocucci M. Effect of nitrogen starvation on the phenolic metabolism and antioxidant properties of yarrow (*Achillea collina* Becker ex Rchb.). Food Chem. 2009;114 (1): 204–211.

Giorgi A, Madeo M, Speranza G, Cocucci M. Influence of environmental factors on composition of phenolic antioxidants of *Achillea collina* Becker ex Rchb. Nat Prod Res. 2010; 24(16):1546-1559.

Giridhari L, Manasi M. In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of *Butea frondosa* Roxb. Flower. Pharmacog J. 2011; 21:65.

Glasl S, Kastner U, Jurenitsch J, Kubelka W. Qualitative and quantitative determination of sesquiterpenoids *Achillea* species by reversed-phase high-performance liquid chromatography, mass-spectrometry and thin-layer chromatography. J Chromatogr B. 1999; 729 (1999)*:* 361-368.

Glasl S, Presser A, Werner I, Wawrosch Ch, Kastner U, Jurenitsch J, Haslinger E, Kubelka W. Two proazulenes from *Achillea ceretanica* Sennen. Phytochem. 1999; 50:629-631.

Glasl S, Presser A, Gunbilig D, Werner I, Narantuya S, Haslinger E, Jurenitsch J, Kubelka W. Highly hydroxylated guaianolides of *Achillea asiatica* and Middle European *Achillea* species. Phytochem. 2001;58:1189–1194.

Gören N, Öksüz S, Ulubelen A. A sesquiterpene lactone, sintenin, from Achillea sintenisii. Phytochemistry. 1988; 27(7): 2346-2347.

Gülay Z**.** Antibiyotik duyarlılık testlerinin yorumu. Toraks Dergisi. 2002; 3(1):75-88.

Gündoğdu Y. Femtosaniye Laser Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (Fl-Tof) Kullanılarak Fulleren C60 Molekülünün İncelenmesi. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2014, Konya (Danışman: Prof. Dr. Hamdi Şükür Kılıç).

Habbu PV, Smita DM, Mahadevan KM, Shastry RA, Biradar SM. Protective effect of *Habenaria intermedia* tubers against acute and chronic physical and psychological stress paradigs in rats. Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn. 2012; 22(3): 568-579.

Haidara K, Zamir L, QW S, Batist G. The flavonoid casticin has multiple mechanisms of tumor cytotoxicity action. Cancer Lett. 2005; 242:180-190.

Haidara K, Zamir L, Shi QW, Batist G. The flavonoid casticin has multiple mechanisms of tumor cytotoxicity action. Cancer Lett. 2006; 242 (2006): 180-190.

Halpine SM. An improved dye and lake pigment analysis method for high-performance liquid chromatography and diode-array detector. Stud. Conserv. 1996; 41(2): 76-94.

Hirschmann GS, Tapia A, Theoduloz C, Rodriguez J, Lopez S, Feresin GE. Free radical scavengers and antioxidants from *Tagetes mendocina*. Z.naturforsch. 2004; 59: 345-353.

Ho CS, Lam CWK, Chan MHM, Cheung RCK, Law LK, Lit LCW, Ng KF, Suen MWM. Electrospray ionisation mass spectrometry: Principles and clinical applications. Clin Biochem Rev. 2003; 24: 3-12.

Huang D, Ou BX, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. J. Agr. Food Chem. 2005;53: 1841-1856.

Innocenti G, Vegeto E, Acgua SD, Ciana P, Giorgetti M, Agradi E, Sozzi A, Fico G, Tome F. In vitro estrogenic activity of *Achillea millefolium* L. Phytomedicine. 2007; 14(2-3):147–152.

Intekhab J, Aslam M. Isolation of a flavonoid from the roots of *Citrus sinensis*. Malaysian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2009; 7(1):1-8.

Işcan G, Kırımer N, Kürkçüoglu M, Arabacı T, Küpeli E, Başer KHC. Biological activity and composition of the essential oils of *Achillea schischkinii* Sosn. and *Achillea aleppica* DC. subsp. *aleppica*. J. of Agriculture and Food Chemistry. 2006; 54:170-173.

Işık FM. Edirne Bölgesinde Yetişen *Trifolium resupinatum* L. var. *microcephalum* Bitkisinin Fitokimyasal İncelenmesi. Trakya Ünivsersitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2005, Edirne Danışman (Yard. Doç. Dr. Temine Şabudak, Prof. Dr. Sevil Öksüz).

Ivancheva S, Tomas B.F, Tsvetkova R. Comparative analysis of flavonoids in *Achillea* sp. sect. *millefolium* and sect. ptarmica. Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences. 2002;55:5:43.

Jaiswal R, Kiprotich J, Kuhnert N. Determination of the hydroxycinnamate profile of 12 members of the Asteraceae family. Phytochemistry. 2011;72 (8): 781-90.

Javidnia K, Miri R, Sadeghpour H. Composition of the volatile oil of *Achillea wilhelmsii* C. koch from Iran. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences. 2004; 12(2): 63-66.

Jeon SH, Chun W, Choi YJ, Kwon YS. Cytotoxic constituents from the bark of *Salix hulteni*. Arc. Pharm. Res. 2008; 31(8): 978-982.

Kahraman A. Flavonoidler. Kocatepe Tıp Dergisi. 2002; 3: 01-08.

Karaalp C, Yurtman AN, Yavasoglu UK. Evaluation of antimicrobial properties of *Achillea* L. flower head extracts. Pharm Biol. 2009; 47(1): 86–91.

Karlova K. Accumulation of flavonoid compounds in flowering shoots of *Achillea collina* Becker ex. Rchb. Alba during flower development. Hort. Sci. (Prague). 2006; 2006 (4): 158–162.

Kaufmann SH, Gores GJ. Apoptosis In Cancer: Cause and Cure. Bioessays. 2000; 22: 1007-10017.

Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. J Food Sci Technol. 2011; 48: 412–422.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 1972; 26: 239-257.

Keser S, Celık S, Turkoglu S, Yılmaz O, Turkoglu I. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of water and ethanol extracts from *Achillea millefolıum* L. Turk J Pharm Sci. 2013;10 (3):385-392.

Khazneh E, Saltan G, Tekin M, Acıkara BÖ, Yeşiloğlu T, Özbilgin S. *Achillea* türlerinin önemi ve *Achillea schischkinii* türünün fenolik bileşikleri. Ankara Ecz. Fak. Derg. 2010; 39 (1): 43-50.

Kıytak M. Kumarinlerin karbonik anhidraz Ca-Xıı izo- enzimine karşı inhibitör aktivitelerinin Qsar modellemesi. Harran Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2012, Şanlıurfa (Danışman: Yard. Doç. Dr. Selami Palaz).

Kijjoa A, Vieira LM, Pereira JA, Silva AMS, Herz W. Further constituents of *Achillea ageratum*. Phytochemistry. 1998; 51: 555-558.

Kocevar N, Glavac I, Injac R, Kreft S. Comparison of capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography for determination of flavonoids in *Achillea millefolium*. J Pharm Biomed Anal. 2008; 46 (2008): 609–614.

Kolak U, Hacıbekiroglu I, Özturk M, Özgökce F, Topcu G, Ulubelen A. Antioxidant and anticholinesterase constituents of *Salvia poculata*. Turk J Chem. 2009; 33(2009); 813-824.

Kovacevic N, Dokovic D, Ristic M, Menkovic N, Tasic S, Grubisic D. Flavonoids from the herb resin of *Achillaea atrata* L., supspec *multifida* (DC) Heim. Farmatsiya (Sofia). 1997; 44(1): 14-16.

Krenn L, Miron A, Pemp E, Petr U, Kopp B. Flavonoids from *Achillea nobilis L.* Z. Naturforsch. 2003; 58:1-2.

Kuesmenoglu S, Baser KHC, Ozek T, Harmandar M, Goekalp Z. Constituents of the essential oil of *Achillea biebersteinii* Afan. J Essent Oil Res. 1995; 7(5): 527-528.

Kundakovic T, Stanojkovic T, Juranic Z, Kovacevic N. Cytotoxic and antioxidant activity of *Achillea alexandri-regis*. Pharmazie. 2005; 60(4); 319-320.

Kundakovic CA, Nematollahi F, Rustaiyan A, Moazami N, Masoud S, Bamasian S. Volatile constituents of *Achillea pachycephala*, *Achillea oxyodonta* and *A. biebersteinii* from Iran. Flavour Fragr. J. 2006; 21(2): 253-256.

Kundakovic T, Fokialakis N, Kovacevic N, Chinou I. Essential oil composition of *Achillea lingulata* and *A. umbellata.* Flavour Fragr. J. 2007; 22(3):184-187.

Kupriyanova GS. NMR studies fo the electronic structure of coumarins. J Struct Chem. 1997; 38(3): 408-408.

Kurkcuoglu M, Demirci B, Tabanca N, Ozek T, Baser KHC. The essential oil of *Achillea falcata* L. Flavour Fragr. J. 2003; 18(3):192-194.

Küçükçoban Ç. Türkiye'de Yetiştirilen Bazı Erik Çeşitlerinin Toplam Antioksidan Kapasitelerinin ve Başlıca Antioksidan Bileşenlerinin Karşılaştırılması. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2009, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. Esma Tütem).

Kültür Ş. Medicinal plants used in Kırklareli province (Turkey). J. Ethnopharmacol. 2006; 111 (2007): 341-364.

Küpeli E, Orhan İ, Küsmenoğlu Ş, Yeşilada E. Evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive activity of five Anatolian *Achillea* Species. Turkish J. Pharm. Sci. 2007; 4 (2): 89-99.

Kyle JAM, Duthie GG. Flavonoids in Foods.In: Andersan QM, Markham KR, ed.Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. CRC Press, Taylor and Francis Group, 2006, p: 219-22.

Kwon HC, Lee KR. Phytochemical constituents of *Artemisia japonica* ssp. *littoricola*. Arc. Pharm.Res. 2001; 24(3): 194-197.

Lakhanpal P, Kumar D. Quercetin: A Versatile flavonoid. IJMU. 2007; 2(2): 22-37.

Lallemand L, Mccarthy A, Mccarthy J. Production of chlorogenic and dactylifric acid species. International application published under the patent cooperation treaty (PCT), patent numarası: WO 2012/126789 A1. 2012;1-93.

Lee CK, Lu CK, Kuo YH, Chen JZ, Sun GZ. New prenylated flavones from the roots of Ficus beecheyana. J. Chin. Chem. Soc. 2004; 51(2): 437-441.

Lemmens-Gruber R, Marchart E, Rawnduzi P, Engel N, Benedek B, Kopp B. Investigation of the spasmolytic activity of the flavonoid fraction of *Achillea millefolium* on isolated guinea-pig ilea. Arzneimittelforschung. 2006; 56(8): 582-588.

Li Y, Zhu MC, Zhang ML, Wang YF, Dong M, Shi QW, Huo CH, Sauriol F, Kiyota H, Gu YC, Cong B. Achillinin B and C, new sesquiterpene dimers isolated from *Achillea millefolium*. Tetrahedron Lett. 2012; 53(2012)*:* 2601-2603.

Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag, New York, 1970; 46, 48,51, 258.

Mackaller FA, Kelly RC, Tamelen Van EE, Dorschel C. Structure and stereochemistry of elenolic acid. J. Am. Chem. Soc. 1973; 95(21): 7155-7156.

Maffei M, Chialva F, Codignola A. Essential Oils and Chromosome Numbers From Italian *Achillea* Species. J Essent Oil Res. 1989; 1(2): 57-64.

Maffei M, Germano F, Doglia G, Chialva F. Essential Oils, chromosome numbers and karyotypes from Italian *Achillea* Species. Part II. J Essent Oil Res. 1993; 5(1): 61-70.

Maffei M, Mucciarelli M, Scannerini S. Essential oils from *Achillea* species of different geographic origin. Biochem Sys Ecol. 1994; 22(7): 679-687.

Magiatis P, Skaltsounis AL, Chinou I, Haroutounian SA. Chemical Composition and *in-vitro* antimicrobial activity of the essential oils of Three Greek *Achillea* Species. Z Naturforsch C. 2002; 57(3-4):287-290.

Mahmoud AA, Al-Shihry SS, Hegazy MEF. A New Epimeric Sesquiterpene Lactone from *Achillea ligustica.* Rec Nat Prod. 2012; 6(1): 21-27.

Marchart E, Kopp B. Capillary electrophoretic separation and quantification of flavone-*O* and C-glycosides in *Achillea setacea* W. et K. J Chromatogr B. 2003; 792(2003)*:* 363-368.

Markham KR, Mabry TJ. Ultraviolet visible and proton magnetic resonance spectroscopy of flavonoids. In The Flavonoids Ed. Harborne JB, Mabry TJ, Manry H, Springer science-Business Media Dordrecht. 1975; 46-61.

Moldovan L, Gaspar A, Toma L , Cracıunescu O , Savıuc C. Comparison of polyphenolic content and antioxidant capacity of five Romanian traditional medicinal plants. Rev. Chim. 2011; 62(3):299-303.

Nacer A, Bernand A, Boustie J, Touzani R, Kabouche Z. Aglycone flavonoids of *Centaurea tougourensis* from Algeria. Chem. Nat. Com. 2006; 42(2): 230-231.

Nano GM, Appendino G, Bicchi C, Frattini C. Constituents of *Achillea erba-rotta*. All. Rivista Italiana EPPOS. 1981; 63(3), 139-40.

NCCLS. Performance Standarts For Antimicrobial Susceptibility Testing; Ninth İnformational Supplement. NCCLS Document M100-S9 [ISBN 1-56238-358-2]

NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne Pennsylvania, USA. 1999;19087-1898.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard-second edition NCCLS Document M27-A2, Wayne, PA. 2002; 22(15), NCCLS.

NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard-Sixth Edition, NCCLS Document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne Pennsylvania, USA. 2003;19087-1898.

Niaz A**,** Syed WAS**,** Ismail S, Ghayour A**,** Mehreen G, Imran K. Cytotoxic and anthelmintic potential of crude saponins isolated from *Achillea wilhelmsii* C. Koch and *Teucrium stocksianum* Boiss. BMC Complement Altern Med. 2011; 11**:**106.

Oliveira S, Souza GA, Eckert CR, Silva TA, Sobral ES, Fávero OA. Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. Quim Nova. 2014; 37: 497-503.

Oral RA. Bitkisel Kaynaklı Fenolik Bileşiklerin Üretilmesi, Bazı Fenolik Bileşiklerin ve Ekstraktların Maillard Reaksiyon Ürünleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü, Doktora Tezi, 2011 Kayseri (Danışman: Doç. Dr. Mahmut Doğan).

Ozsavci D, Ersahin M, Sener A, Bingol-Ozakpinar O, Toklu HZ, Sener G, Yegen B. The novel function of nesfatin-1 as an anti-inflammatory and antiapoptotic peptide in subarachnoid hemorrhage-induced oxidative brain damage in rats. Neurosurgery. 2011; 68 (6): 1699-1708.

Öksüz S, Ulubelen A, Tuzlacı E. Lignans from *Achillea gypsicola*. Scientia Pharmaceutica. 1990; 58(1): 29-31.

Öksüz S, Ulubelen A, Tuzlacı E. Constituents of *Achillea teretifolia*. Fitoterapia. 1990; 61(3): 283.

Özak M. *Tanacetum abrotanifolium* (L.) druce Bitkisi Üzerinde Fitokimyasal Araştırmalar ve Biyoaktivite Çalişmaları. Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2011, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. Nezhun Gören).

Özen HC, Toker Z, Clery RA, Owen NE. Composition of the essential oil of *Achillea pseudoaleppica* Hub.-Mor. J Essent Oil Res. 2003;15(2): 96- 97.

Öztekin T. *Tanacetum kotschyi* (Boiss.) Bitkisi Üzerinde Fitokimyasal Araştırmalar ve Biyoaktivite Çalışmaları. Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2010, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. Nezhun Gören).

Öztürk M. *Micromeria cilicica* ve *M. juliana* Türlerinde Antioksidan Bileşiklerin Hplc İle Analizi ve Yapılarının Aydınlatılması. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2008, İstanbul Danışman (Doç.Dr. Ufuk Kolak).

Özyurt D. Toplam Flavonoid Miktarının Geliştirilen Spektrofotometrik Yöntem İle Tayini. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2005, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. Birsen Demirata-Öztürk).

Özyürek M, Güçlü K, Tütem E, Başkan KS, Erçağ E, Çelik SE. A comprehensive review of CUPRAC methodology. Anal. Methods. 2011; **3:** 2439-2453.

Özyürek M. Bazı İçeceklerin Antioksidan Aktivitelerinin Tayininde Yeni Bir Yöntem Geliştirilmesi. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2005, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. Reşat Apak).

Perelson ME, Sheinker YN, Syrova GP, Turchin KF. NMR spectra of natural coumarin derivatives. Chem Nat Compd. 1970; 6(1): 5-11.

Perez C, Pauli M, Bazerque P. An Antibiotic assay by the agar-well diffusion method. Acta Biol Med Exp. 1990;15:113-115.

Perrone D, Farah A, Donangelo CM, Paulis T, Martin P. Comprehensive analysis of major and minor chlorogenic acids and lactones in economically relevant Brazilian coffee cultivars. Food Chem. 2008; 106: 859-867.

Pınarbaşı E. Apopitozis (Programlı Hücre Ölümü). Yıldırım A, Bardakçı F, Karataş M, Tanyolaç B (Editörler). Moleküler Biyoloji. 2. Baskı, Nobel Yayın Dağıtım. 2010:425-470.

Plazonic A, Bucar F, Maleš Z, Mornar A, Nigović B, Kujundžić N. Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array

detection and electrospray ıonization mass spectrometry. Molecules. 2009; 2009(14): 2466-2490.

Radulovic N, Stojanovic G, Asakawa Y. Hydroxycinnamoyl conjugates from the roots of *Achillea holosericea* Sibth. et Sm. Biochem Sys Ecol. 2005; 34 (2006); 83-87.

Radusiene J, Gudaityte O, Benetis R. Assesment of *Achillea cartlailaginea* introduced from wild to field collection. DOI: 10.17660/ActaHortic.2011.925.10

Rex JH, Pfaller MA, Rinaldi MG, Polak A, Galgiani JN. Antifungal susceptibility testing. Clin Microbiol Rev. 1993;6 (4):367-381.

Rijke E, Out P, Niessen WMA, Ariese F, Goojer C, Brinkman UA. Analytical separation and detection methods for flavonoids. J Chromatogr A. 2006; 1112(1-2): 31-63.

Robbins R. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. J Agr Food Chem. 2003; 51:2866-2887.

Rodriguez SV, Matos MJ, Guíñez RF, Maya JD, Lapier M, Azar CO, Cruz FP, Uriarte E, Santana L. Coumarin-chalcone derivatives as potential antitrypanosomal and antioxidant compounds. ECSOC-16. 2012;1(30): 1-14.

Rustaiyan A, Komeilizadeh H, Shariatpanahi MS, Jassbi A, Masoudi S. Comparative study of the essential oils of three *Achillea* Species from Iran. J. Essent. Oil Res. 1998;10:207-209.

Saeiidmnia S, Vassa N, Rezaeipoor R, Shafiee A, Gohari A.R, Kamalineiad M, Goodarzy S. Immunosuppressive principles from *Achillea talagonica*, an endemic species of Iran. Daru journal of pharmaceutical sciences. 2009; 1(17): 37-41.

Saeidnia S, Gohar AR, Yassa N, Shafiee A. Composition of the volatile oil of *Achillea conferta* DC. from Iran. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences. 2005; 13(1):34-36.

Saeidnia S, Moradi-Afrapoli F, Gohari AR, Malmir M. Cytotoxic flavonoid from *Achillea talagonica* Bioss. J Med Plants. 2009; 8(5): 52-56.

Saeidnia S, Gohari AR, Mokhber-Dezfuli N, Kiuchi F. A review on phytochemistry and medicinal properties of the genus *Achillea.* Daru. 2011; 19(3):173-186.

Saetung A, Itharat A, Dechsukum C, Wattanapıromsakul C, Keawpradub N, Ratanasuwan P. Cytotoxic activity of Thai medicinal plants for cancer treatment. Songklanakarin J. Sci. Technol. 2005; 27: 469-478.

Schütz K, Kammerer DR, Carle R, Schieber A. Characterization of phenolic acids and flavonoids in dandelion (*Taraxacum officinale* Web. ex Wigg) root and herb by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2005; 19:179-186.

Seviçin A. Kapsaisinin Bazı Bakteri ve Mayalara Karşı Antimikrobiyal Etkisinin Araştırılması. Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2011, Kayseri (Danışman: Doç. Dr. Hatice Özbilge).

Sgouras D, Duncan R. Methods for the evaluation of biocompatibility of soluble syntehic polymer which have potential for biomedical use: 1-use of the tetrazolium-based colorimetric assay (mtt) as a preliminary screen for evaluation of in vitro cytotoxicity. Journal of Materials Science: Materials in Medicine I. 1990; 61-68.

Shamyanov ID, Mallabaev A, Sidyakin GP. Components of *Achillea filipendulina*. Khimiya Prirodnykh Soedinenii. 1974; 6: 784.

Shmatova VV, Derkach AI, Karryev MO, Komissarenko NF. Coumarins from grass of Turkmenian species of the genus *Achillea.* Khimiya Prirodnykh Soedinenii. 1985; 4: 561.

Simic N, Palic R, Vajs V, Milosavljevic S, Djokovic D. Composition and antibacterial activity of *Achillea chrysocoma* essential oil. J Essent Oil Res. 2000;12(6): 784-878.

Simic N, Palic R, Vajs V, Milosavljevic S, Djokovic D. Composition and antibacterial activity of *Achillea asplenifolia* essential oil. J Essent Oil Res. 2002;14(1): 76-78.

Son S, Lewis BA. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: Structure- activity relationship. J. Agric. Food Chem. 2002; 50:468-472.

Souza P, Gasparotto A, Stefanello ME, Margues MC, da Silva-Santos JE, Kassuva CA. Hypotensive mechanism of the extracts and artemetin isolated from *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) in rats. Phytomedicine. 2011; 18: 819-825.

Stojanovic G, Hashimoto T, Asakawa Y, Palic R. Chemical composition of the *Achillea lingulata* extract. Biochem Sys Ecol. 2005; 33: 207-210.

Stojanovic G, Radulovic N, Hashimoto T. In vitro antimicrobial activity of extracts of four *Achillea* species: The composition of *Achillea clavennae* L. (Asteraceae) extract. J Ethnopharmacol. 2005;101:185-190.

Suleimenov EM, Smagulova FM, Morozova OV, Raldugin VA, Bagryanskaya IY, Gatilov YV, Yamavoi VI, Adekenov SM. Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Artemisia albida*. Chem. Nat. Com. 2005; 41(6): 689-691.

Szollosi SR, Varga IS. Total antioxidant power in some species of Labiatae (Adaptation of FRAP method). Acta Biologica. 2002; 46:125-127.

Şahin E. Bitkisel Kaynaklı Antimikrobiyallerin Gıda Kaynaklı Bazı Patojen Mikroorganizmalar Üzerinde Etkileri. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2006, İstanbul (Danışmanı: Prof. Dr. Necla Aran).

Şahin S. Türkiye'de Yetişen *Prunella* L. Türlerinin Fenolik Bileşikleri Ve Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesinde Analitik Metotlar. Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü, Doktora Tezi, 2011, Bursa (Danışman: Prof. Dr. Cevdet Demir).

Tabanca N, Ozek T, Başer KHC, Vural M. Composition of the essential oil of *Achillea sieheana* stapf and the enantiomeric distribution of camphor. J Essent Oil Res. 2004;16(3):180-181.

Taşkın T. Çakırlı (Bursa-Orhangazi) Yöresinde Yenebilen Bazı Yabani Bitkilerin Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi. Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2011, İstanbul (Danışman: Yard. Doç.Dr. Leyla Bitiş).

Tekerlek P. Bazı Bryofit Türlerinin Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi. Niğde Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2013, Niğde (Danışman:Yrd. Doç. Dr. Tuba Artan Onat).

Todorova MN, Krasteva ML, Markova MM, Tsankova ET, Taskova RM, Peev DR. Terpenoids from *Achillea clypeolata.* Phytochemistry. 1998; 49:8, 2371-2374.

Todorova MN, Markova MM, Tsankova ET. Crithmifolide: A sesquiterpene lactone from *Achillea crithmifolia*. Phytochemistry. 1998; 49(8): 2429-2432.

Todorova MN, Tsankova ET. New sesquiterpenoids from *Achillea clypeolata*. Phytochemistry. 1999; 52(1999):1515-1518.

Todorova M, Trendafilova A, Mikhova B, Vitkova A, Duddeck H. Chemotypes in *Achillea collina* based on Sesquiterpene lactone profile. Phytochemistry. 2007; 68:2007, 1722-1730.

Todorova M, Trendafilova A, Mikhova B, Vitkova A, Duddeck H. Terpenoids from *Achillea distans* Waldst. & Kit. Ex Willed. Biochem Sys Ecol. 2007; 35: 852-858.

Toker Z, Ozen HC, Clery RA, Owen NE. Essential oils of two *Achillea* species from Turkey. J Essent Oil Res. 2003; 15(2);100-101.

Trifunovic S, Aljancic I, Vajs V, Macura S, Milosavljevic S. Sesquiterpene lactones and flavonoids of *Achillea depressa*. Biochem Sys Ecol. 2005; 33: 317-322.

Trifunovic S, Vajs V, Juranic Z, Zizak Z, Tesevic V, Macura S, Milosavljevic S. Cytotoxic constituents of *Achillea clavennae* from Montenegro. Phytochemistry. 2006; 67: 887-893.

Trumbeckaite S, Benetis R, Burdulis D, Janulis V, Toleikis A, Viskelis P, Jakstas V, Raudone L. *Achillea millefolium* L. herb extract: Antioxidant activity and effect on the rat heart mitochondrial functions. Food Chem. 2011; 127: 1540–1548.

Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. Nutrients. 2010; 2:1231-1246.

Tuberoso CIG, Kowalczyk A, Coroneo V, Russo MT, Dessı S, Cabras P. Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and antifungal activities of the essential oil of *Achillea ligustica* All. J. Agric. Food Chem. 2005; 53:10148-10153.

Tuberoso CI, Montoro P, Piacente S, Corona G, Deiana M, Dessì MA, Pizza C, Cabras P. Flavonoid characterization and antioxidant activity of hydroalcoholic extracts from *Achillea ligustica*. All. J Pharm Biomed Anal. 2009; 50(3): 440-448.

Tuncel NB, Yılmaz N. Kaz Dağları'ndan toplanan bazı bitkilerin fenolik asit kompozisyonlarının yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile belirlenmesi. Akademik Gıda. 2010; 8 (3):18-23.

Tuzlacı E. Türkiye'nin Bitkisel Halk İlaçları, "Şifa Niyetine". Alfa yayınları, İstanbul, 2006.

Ulubelen A, Oksuz S, Tuzlaci E. Flavonoids and coumarins from *Achillea schischkinii*. Planta Medica. 1987; 53(5): 507.

Ulubelen A, Oksuz S, Tuzlaci E. New sesquiterpenoids from *Achillea schisschkinii.* Planta Medica. 1988; 54(5): 473-474.

Ulubelen A, Oksuz S, Tuzlaci E. A new triterpene and other compounds from *Achillea magnifica*. Planta medica. 1989; 55(4): 395.

Ulubelen A, Oksuz S, Tuzlaci E. Constituents of *Achillea spirokensis*. Fitoterapia. 1989; 60(1): 93-94.

Ulusoylu M. Centaurea iberica ve C. Triumfettii Türleri Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar. Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimler Enstitüsü, Doktora Tezi, 2004, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. Elçin Gürkan).

Unlu M, Daferera D, Donmez E, Polissiou M, Tepe B, Somken A. Compositions and the in vitro antimicrobial activities of the essential oils of *Achillea setacea* and *Achillea teretifolia* (Compositae). J Ethnopharmacol. 2002; 83(1-2);117-121.

Vardar B. Bazı Kumarinlerin Sentezi Ve Antioksidan Aktivitelerinin Karşılaştırılması. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2012, İstanbul (Danışman: Yard. Doç. Dr. Hülya Çelik Onar).

Vetschera KMV, Wollenweber E. Leaf exudate flavonoids of *Achillea sibirica* subsp.*mongolica* and *A.latiloba* (Compositae-Anthemideae). Biochem Sys Ecol. 1999; 27(1999): 523-525.

Vieira LM, Kijjoa A, Pereira JA, Gedris TE, Herz W. Germacranes and Flavonoids from *Achillea ageratum*. Phytochemistry. 1997; 45 (1): 111-115.

Yaeesh S, Jamal Q, Khan A, Gilani AH. Studies on hepatoprotective, antispasmodic and calcium antagonist activities of the aqueous-methanol extract of *Achillea millefolium.* Phytother. Res. 2006; 20:546-551.

Yalçın GT. Flavonoidlerin Kanser Hücrelerine Etkisi. Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2013, Konya (Danışmanlar:Yard. Doç. Dr. Bahadır Öztürk).

Yalçın S. Patnos (Ağrı) Yöresinde Farmasötik Botanik Araştırmaları. Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Bitirme Ödevi, 2015, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. Ertan Tuzlacı).

Yavaşer R. Doğal ve Sentetik Antioksidan Bileşiklerin Antioksidan Kapasitelerinin Karşılaştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2011, Aydın (Danışman: Prof. Dr. A. Alev Karagözler).

Yıldız M. *Cyclotrichium niveum* L.'den Elde Edilen Ekstrelerin Sitotoksik Aktivitelerinin İncelenmesi. Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2014, Ankara (Danışman: Prof. Dr. Mustafa Ark).

Yılmaz S. *Echinops orientalis* Trautv. Bitkisindeki Sekonder Metabolitlerin İzolasyonu, Yapı Tayini, Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2012, Tokat (Danışman: Doç. Dr. Ramazan Erenler).

Yokuş B, Çakır DÜ. Kanser Biyokimyası. Dicle Üniv. Vet. Fak. Derg. 2012; 1(2): 7-18.

Yong L, Man-Li Z, Bin C, Si-Ming W, Mei D, Françoise S, Chang-Hong H, Qing-Wen S, Yu-Cheng G, Hiromasa K. Achillinin A, a cytotoxic guaianolide from flower of Yarrow, *Achillea millefolium*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2011; 75(8): 1554-1556.

Yu L, Lenardo MJ, Baehrecke EH. Autophagy and caspases. Cell Cycle 2004; 3:11-46.

Zeng Y, Li S, Wang X, Gong T, Sun X, Zhang Z. Validated LC-MS/MS method for the determination of scopoletin in rat plasma and ıts application to pharmacokinetic studies. Molecules. 2015; 20: 18988-19001.

Xiao-Tang S, Man-Li Z, Qing-Wen S, Hiromasa K. Chemical constituents of the plants in the genus *Achillea.* Chem & Biodivers. 2006; 3:1163-1180.

Walter WM, Fleming HP, Etchells JL. Preparation of antimicrobial compounds by hydrolysis of oleuropein from green olives. Appl. Microbiol. 1973; 26: 773-776.

Wang CC, Chu CY, Chu KO, Choy KW, Khaw KS. Trolox-equivalent antioxidant capacity assay versus oxygen radical absorbance capacity assay in plasma. Clin Chem. 2004; 50:952-954.

Werner I, Mucaji P, Presser A, Glasl S. Sesquiterpenes and phenolic compounds from *Achillea clypeolata*. Zeitschrift fuer Naturforschung, B: Chemical Sciences. 2007; 62(2): 267-271.

WHO Monographs on Selected Medicinal Plants, Herba Millefolii. 2009; 4:179-191.

7. EK: BİLİMSEL FAALİYET

Taşkın T, Özakpınar ÖB, Uras F, Bitiş L. The Cytotoxic Effect of Fractions of Chloroform Extract from the Endemic *Achillea multifida* Aerial parts. Journal of Applicable Chemistry. 2015, 4(5): 1429-1433.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Turgut	**Soyadı**	Taşkın
Doğum Yeri	Tuzluca	**Doğum Tarihi**	26/03/1984
Uyruğu	T.C.	**Tel**	05063069982
E-mail	turguttaskin@marmara.edu.tr		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mezuniyet Yılı**
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi	2011
Lisans	Marmara Üniversitesi	2007
Lise	Mehmet Akif Ersoy Lisesi	2002

İş Deneyimi

Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
Araştırma Görevlisi	Marmara Üniversitesi	2009-

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***
İngilizce	İyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu #

YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	77,50							