



***Origanum majorana* ve *Origanum syriacum* BİTKİLERİNDEN
SEKONDER METABOLİTLERİN İZOLASYONLARI,
YAPI ANALİZLERİ VE BAZI BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Özkan ŞEN

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Prof. Dr. Ramazan ERENLER

2015

Her hakkı saklıdır

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

DOKTORA TEZİ

Origanum majorana ve *Origanum syriacum* BİTKİLERİNDEN
SEKONDER METABOLİTLERİN İZOLASYONLARI, YAPI
ANALİZLERİ VE BAZI BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN
ARAŞTIRILMASI

ÖZKAN ŞEN

TOKAT
2015

Her hakkı saklıdır

Bu tez çalışması;

**TÜBİTAK tarafından (Proje No: 113 Z 195) ve Gaziosmanpaşa Üniversitesi BAP
(Proje No: 2014/30) tarafından desteklenmiştir.**

Prof. Dr. Ramazan ERENLER danışmanlığında, ÖZKAN ŞEN tarafından hazırlanan bu çalışma 14/05/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Kimya Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Nurettin YAYLI

Üye : Prof. Dr. Mustafa CEYLAN

Üye : Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

Üye : Prof. Dr. Ramazan ERENLER

Üye : Prof. Dr. Mahfuz ELMATAŞ

İmza :

İmza :

İmza :

İmza :

İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. Mehmet Ali SAKİN

Enstitü Müdürü

27.05.2015

TEZ BEYANI

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

Özkan ŞEN

14.05.2015

ÖZET

DOKTORA TEZİ

***Origanum majorana* ve *Origanum syriacum* BİTKİLERİNDEN SEKONDER METABOLİTLERİN İZOLASYONLARI, YAPI ANALİZLERİ VE BAZI BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Özkan ŞEN

Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ramazan ERENLER

Bitkilerin ilaç amaçlı kullanımı eksi çağlara kadar dayanmaktadır. Ülkemizde “Kekik” olarak bilinen *Origanum* gıda sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bu türler, antibakteriyal, antifungal, antiviral antioksidan, antikanserojen ve antidiyabetik özellik taşımaktadır. *Origanum majorana* L. (OM) ve *Origanum syriacum* L. (OS) türleri Gaziosmanpaşa üniversitesi "Aromatik ve Tıbbi Bitkiler Bahçesi"nden toplandı. OM bitkisi gölgede kurutulduktan sonra toprak üstü kısmı, metanol-kloroform çözücü sistemiyle (3:1) ekstrakte edildi. Organik çözücü uzaklaştırıldıktan sonra suda çözülen ekstrakt, sırasıyla hekzan ve etil asetat ile sıvı-sıvı ekstraksiyon yapıldı. Antioksidan aktivitesi yüksek olan etilasetat ekstraktı için, kromatografik yöntemler (kolon kromatografisi, preparatif HPLC) ile 5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon (1), hesperetin (2), hidrokinon (3), arbutin (4) ve rozmarinik asit (5,12) izole edildi ve yapıları spektroskopik yöntemler (1D-NMR, 2D-NMR, IR, UV, LC-TOF/MS) ile belirlendi. OS bitkisi ise sırasıyla hekzan, etil asetat, metanol ve su ile ekstrakte edildi. Su ekstraktı, süzöldükten sonra ayrıca etil asetat ile sıvı-sıvı ekstraksiyona tabi tutuldu. Antioksidan aktivitesi yüksek olan metanol ekstraktından kromatografik yöntemlerle daukosterin (6), 2-O- β -D-glikopiranozil-4,6-dihidroksi asetofenon (7), viteksin (8), visenin-2 (9), asasetin-7-O-[3-O-asetil- β -L-kisilopiranozil-(1-2)- β -D-glikopiranozit] (10), izoviteksin (11), rozmarinik asit (5) izole edildi ve yapıları spektroskopik yöntemlerle belirlendi. Saflaştırılan bileşiklerin antioksidan aktiviteleri ve C6 (Sıçan Beyin Tümör Hücresi), HeLa (İnsan Rahim Kanseri Hücresi) hücrelerine karşı farklı dozlarda antikanser aktiviteleri araştırıldı. 5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon (1), hesperetin (2), hidrokinon (3), bileşikler yüksek antioksidan ve antiproliferatif aktivite gösterirken, rozmarinik asit (5) orta derecede antiproliferatif etki gösterdi.

2015, 209 sayfa

Anahtar kelimeler: Antioksidan, Antiproliferatif, sekonder metabolitler.

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

Some biological activities of secondary metabolites isolated and elucidated from *Origanum majorana* and *Origanum syriacum*

Özkan ŞEN

Gaziosmanpaşa University

Institution of Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Ramazan ERENLER

The usage of plants as medicinal purpose has begun from the ancient times. The *Origanum* called as “Kekik” in Turkey has been used commonly in food industries. In addition, these species have been exhibited the antibacterial, antifungal, antiviral, antioxidant, anticancer and antidiabetic properties. *Origanum majorana* L. (OM) and *Origanum syriacum* L. (OS) have been collected from "Aromatic and Medicinal Plant Field" of Gaziosmanpaşa University. Aerial part of OM was dried at shadow then extracted with methanol-chloroform (3:1). After the removal of the solvent, the extract dissolved in water was applied liquid-liquid extraction with hexane and ethyl acetate respectively. The chromatographic techniques (column chromatography, preparative HPLC) were applied for the ethyl acetate extract exhibiting the high antioxidant activity to isolate the 5,6,3'-Trihydroxy-7,8,4'-trimethoxyflavone (1), hesperetin (2), hydroquinone (3), arbutin (4) ve rosmarinic acid (5,12). The aerial part of the OS was extracted sequentially with hexane, ethyl acetate, methanol and water. Water extract was also extracted with ethyl acetate as liquid-liquid extraction. Daucosterine (6), 2-O- β -D-glucoside 4-6 Dihydroxy acetophenone (7), vitexin (8), vicianin-2 (9), Acacetin-7-O-[3-O-acetyl- α -L-xosipiranosyl-(1-2)- β -glucopyranoside] (10), isovitexin (11), rosmarinic acid (5) were isolated by chromatographic methods from methanol extract which exhibited high antioxidant activity. The structure of isolated compounds were elucidated by spectroscopic techniques (1D-NMR, 2D-NMR, IR, UV, LC-TOF/MS). Antioxidant and antiproliferative activities of extracts and isolated compounds were carried out. C6 (Rat brain tumor cell), HeLa (Human uterine cancer cell) cells were used for the antiproliferative activities. 5,6,3'-Trihydroxy-7,8,4'-trimethoxyflavone (1), hesperetin (2), hydroquinone (3) have exhibited high antioxidant and antiproliferative activities. Rosmarinic acid has revealed the moderate antiproliferative activity.

2015, 209 pages

Keywords: Antioxidant, Antiproliferative, secondary metabolites.

ÖNSÖZ

Doktora süresi boyunca gerek ders aşamasında gerekse tez aşamasında ilgi ve desteğini esirgemeyen, her zaman tecrübeleri ve bilgileriyle bir yol gösterici olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Ramazan ERENLER'e;

Gerek doktora tez projesi değerlendirme, gerekse Tez izleme raporlarında sunmuş oldukları olumlu katkılarından dolayı Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ ve Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ'a

Bitkiyi temin etme ve ayrıca onlarla ilgili çalışmalarım konusunda yardımlarını esirgemeyen, her zaman bilgi birikimlerini benimle paylaşan Prof. Dr. İsa TELCİ'ye;

Doktora tez çalışması süresince her zaman yanımda olan, düşüncelerini ve deneyimlerini paylaşan ve yol gösterici olan, Uzman Hüseyin AKŞİT'e, Uzman Nusret GENÇ'e, Doktora öğrencisi Ömer KAYIR'a Yüksek lisans öğrencileri Beşir İSNAÇ, Süleyman M. ÇELİK, Bilal MERAL, İlyas YILDIZ ve Bitki Araştırma Laboratuvarı ekibine;

Bu çalışmamızı 113Z195 proje no ile destekleyen TÜBİTAK'a ve 2014/30 proje no ile destekleyen Gaziosmanpaşa Üniversitesi BAP birimine;

Bugünlere gelmemde çok büyük emeklere sahip olan, maddi-manevi hiçbir konuda desteğini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan değerli Aileme;

Çok teşekkür ederim.

Özkan ŞEN

Mayıs 2015

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
ÖNSÖZ	vii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGE DİZİNİ ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xix
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER VE KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1. Labitae (Lamiacea) Familyasının Özellikleri	5
2.1.1. Genel Özellikleri.....	5
2.2. <i>Origanum</i> Cinsi.....	6
2.2.1 <i>Origanum majorana</i> Bitkisinin Yayılımı ve Özellikleri	7
2.2.2 <i>Origanum syriacum</i> Bitkisinin Yayılımı ve Özellikleri	8
2.3. Hastalıklar ve Sekonder Metabolitler	11
2.3.1. Kanserin Tanımı	11
2.3.2. Kanser Neden Olan Etkenler.....	12
2.3.3. Kanserin Tedavisi	12
2.3.4. Kanser ve Kemoterapi	13
2.3.5. Kanser Kemoterapisinde Doğal Ürünlerin Yeri.....	14
2.3.6. Oksidasyon ve Antioksidan Aktivite	16
2.3.7. Antioksidan Aktivite Açısından Yapı-Aktivite İlişkisi	17
2.4. Çalışılan Taksonlara ait Literatür Araştırması.....	19
2.4.1. <i>Origanum majorana</i> L.....	19
2.4.1. <i>Origanum syriacum</i> L.....	21
2.5. Bitkiler ve Sekonder Metabolitler.....	22
2.5.1. Sekonder Metabolitler.....	22
2.7.1.1. Flavonoidlerin Tanımı ve Sınıflandırılması.....	23
2.7.1.2. Flavonoidlerin Doğada Bulunuşu ve Kullanım Alanları	24
2.7.1.3. Flavonoidlerin Tıbbi ve Biyolojik Özellikleri	25
3. MATERYAL VE METOD	28
3.1. Bitkisel Materyal.....	28
3.2. Biyolojik Materyaller.....	28
3.2.1. Kanser Hücreleri	28
3.3. Kullanılan Kimyasallar ve Reaktifler	29
3.3.1. İzolasyon İşleminde Kullanılan Kimyasallar ve Reaktifler	29
3.3.2. Antiproliferatif Aktivite Testleri İçin Kullanılan Kimyasallar	29
3.3.3. Antioksidan Özelliklerin Araştırılmasında Kullanılan Kimyasallar.....	29
3.4. Kullanılan Alet ve Cihazlar	30
3.5. Kullanılan Kimyasal Çözeltiler ve Hazırlanması	31
3.5.1. İzolasyon İşleminde Kullanılan Çözeltiler	31
3.5.1.1. Serik Sülfat Belirteci.....	31
3.5.2. Antioksidan Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler	31
3.5.2.1. DPPH Giderme Aktivitesi Tayini İle İlgili Çözeltiler	31
3.5.2.2. Metal Şelatlama Kapasitesi Tayini İle İlgili Çözeltiler	32
3.5.2.3. Toplam İndirgeme Kuvveti Tayini İle İlgili Çözeltiler	32
3.5.2.4. Toplam Fenol İçeriği Tayini İle İlgili Çözeltiler	32

	Sayfa
3.5.2.5. ABTS Radikalı Giderme Aktivitesi Tayini ile İlgili Çözeltiler.....	32
3.5.4. Antiproliferatif Aktivite Testlerinde Kullanılan Materyallerin Hazırlanması.....	33
3.5.4.1. HeLa ve C6 Hücrelerinin Hücre Kültürü.....	33
3.5.4.2. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması	33
3.5.4.3. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High Glucose) Çözeltisinin Hazırlanması.....	33
3.5.4.4. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High Glucose) Katkılı Çözeltisinin Hazırlanması	34
3.5.4.5. Tripsin EDTA Çözeltisi	34
3.5.4.6. Penicilin Streptomycin Çözeltisi	34
3.5.4.7. DPBS (Dulbecco's Phosphate Saline) Tampon Çözeltisinin Hazırlanması	34
3.5.4.8. Örneklerin Hazırlanması.....	35
3.6. Biyolojik Aktivite Testleri	35
3.6.1. Antioksidan Aktivite Testleri	35
3.6.1.1. Toplam Fenolik Madde Tayini	35
3.6.1.2. Serbest Radikal Giderme Aktivitesi (DPPH Testi).....	35
3.6.1.3. İndirgeme Gücü Aktivitesi.....	36
3.6.1.4. ABTS Radikalı Giderme Aktivitesi.....	36
3.6.3. Antiproliferatif Aktivite Testleri.....	37
3.6.3.1. xCELLigence RTCA (Gerçek Zamanlı Hücre Analizörü) SP (Tek Plak) Cihazı	37
3.6.3.2. Cedex HiRes Analyzer (Hücre Sayım Cihazı)	37
3.7. Kullanılan Saflaştırma Metotları	40
3.7.1. Ekstraksiyon İşlemleri	40
3.7.1.1. Biyolojik Aktivite Testleri İçin Ekstraksiyon Yöntemi.....	40
3.7.1.2. İzolasyon İşlemleri İçin Ekstraksiyon Yöntemi.....	40
3.7.2. Fraksiyonlandırma işlemi	40
3.7.3. Vakum Kromatografisi	41
3.7.4. Kolon Kromatografisi	41
3.7.5. İnce Tabaka Kromatografisi	42
4. BULGULAR.....	43
4.1. Ekstraksiyon İşlemleri	43
4.2. Total Fenolik Bileşik Tayini Sonuçları.....	46
4.3. Serbest Radikal Giderme Aktivitesi Sonuçları	48
4.4. Bitkisi Total İndirgeme Kapasitesi Tayini Sonuçları	50
4.5. ABTS ^{•+} Giderme Aktivitesi Tayini Sonuçları.....	53
4.6. Kolon Kromatografisi Sonuçları.....	56
4.6.1. <i>O. majorana</i> bitkisi için kolon kromatografisi	56
4.6.2. <i>O. syriacum</i> bitkisi için kolon kromatografisi	57
4.7. Fitokimyasal Çalışmalar	59
4.7.1. <i>O. majorana</i> bitkisinden İzole Edilen Bileşikler	59
4.7.2. <i>O. syriacum</i> bitkisinden İzole Edilen Bileşikler	61
4.8. İzole Edilen Bileşiklerin Fiziksel ve Spektral Özellikleri	63
4.8.1. 1 Nolu Bileşiğin [5,6-dihidroksi-2-(3-hidroksi-4-metoksifenil)-7,8-dimetoksi-4H-kromen-4-on] Fiziksel ve Spektral Özellikleri.....	63
4.8.2. 2 Nolu Bileşiğin [(S)-2,3-Dihidro-5,7-dihidroksi-2-(3-hidroksi-4-methoksifenil) -4H-1-benzopiran-4-on] Fiziksel ve Spektral Özellikleri.....	73
4.8.3. 3 Nolu Bileşiğin (Benzen-1,4-diol) Fiziksel ve Spektral Özellikleri.....	84

4.8.4. 4 Nolu Bileşğin (2R,3S,4S,5R,6S)-2-Hidroksimetil-6-(4-hidroksifenoksi) oksan-3,4,5-triol) Fiziksel ve Spektral Özellikleri	90
4.8.5. 5 Nolu Bileşğin [(2"R")-2-[(2"E")-3-(3,4-Dihidroksifenil)-1-okso-2-propenil]]oksi]-3-(3,4-dihidroksifenil) propanoik asit)] Fiziksel ve Spektral Özellikleri.....	99
4.8.6. 6 Nolu Bileşğin (3-O-β-D-glikopiranozil-sitosterol) Bileşğinin Fiziksel ve Spektral Özellikleri	108
4.8.7. 7 Nolu Bileşğin (2-O-β-D-glikopiranozil-4,6-dihidroksi) Fiziksel ve Spektral Özellikleri	117
4.8.8. 8 Nolu Bileşğin (5,7-Dihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-8-[(2S,3R,4R,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2H-piran-2-il]-4H-kromen-4-on) Fiziksel ve Spektral Özellikleri.....	126
4.8.9. 9 Nolu Bileşğin (5,7-dihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-6,8-bis[(2S,3R,4R,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)oksan-2-il]kromen-4-on) Fiziksel ve Spektral Özellikleri	135
4.8.10. 10 Nolu Bileşğin (Asasetin-7-O-[3-O-asetil-α-l-ksilopiranozil-(1-2)-β-glikopiranozit]) Fiziksel ve Spektral Özellikleri	144
4.8.11. 11 Nolu Bileşğin (5,7-dihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-6-[(2S,3R,4R,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)oksan-2-il]kromen-4-on) Fiziksel ve Spektral Özellikleri	154
4.8.12. 12 Nolu Bileşğin (Rozmarinik asit) Fiziksel ve Spektral Özellikleri	164
4.9. İzole Edilen Bileşiklerin Antioksidan Aktivite Test Sonuçları	165
4.9.1. <i>O. majorana</i> bitkisinden İzole Edilen Bileşiklerin Serbest Radikal Giderme Aktivitesi Sonuçları.....	165
4.9.2. <i>O. majorana</i> bitkisinden İzole Edilen Bileşiklerin Total İndirgeme Kapasitesi Tayini Sonuçları	166
4.8.3. <i>O. majorana</i> bitkisinden İzole Edilen Bileşiklerin ABTS ^{·+} Giderme Aktivitesi Tayini Sonuçları	167
4.8.4. <i>O. syriacum</i> bitkisinden İzole Edilen Bileşiklerin Serbest Radikal Giderme Aktivitesi Sonuçları.....	168
4.8.5. <i>O. syriacum</i> bitkisinden İzole Edilen Bileşiklerin Total İndirgeme Kapasitesi Tayini Sonuçları	169
4.8.6. <i>O. syriacum</i> bitkisinden İzole Edilen Bileşiklerin ABTS ^{·+} Giderme Aktivitesi Tayini Sonuçları	170
4.9. Antiproliferatif Aktivite Test Sonuçları.....	171
4.9.1. Ekstrelerin HeLa Hücrelerine Karşı Antiproliferatif Aktivite Sonuçları.....	171
4.9. 2. Ekstrelerin C6 Hücrelerine Karşı Antiproliferatif Aktivite Sonuçları.....	173
4.9.3. <i>O. majorana</i> Bitkisinden İzole Edilen Saf Bileşiklerin HeLa Hücrelerine Karşı Antiproliferatif Aktivite Sonuçları	174
4.9.4. <i>O. majorana</i> Bitkisinden İzole Edilen Saf Bileşiklerin C6 Hücrelerine Karşı Antiproliferatif Aktivite Sonuçları	177
4.9.3. <i>O. syriacum</i> Bitkisinden İzole Edilen Saf Bileşiklerin HeLa Hücrelerine Karşı Antiproliferatif Aktivite Sonuçları	178
4.9.3. <i>O. syriacum</i> Bitkisinden İzole Edilen Saf Bileşiklerin C6 Hücrelerine Karşı Antiproliferatif Aktivite Sonuçları	182
5. SONUÇ	183
KAYNAKLAR	210

SİMGE DİZİNİ ve KISALTMALAR DİZİNİ

ppm	:Milyonda bir kısım
mmol	:Milimol
µg	:Mikro gram
µL	:Mikro litre
mg	:Miligram
kg	:Kilogram
ml	:Mililitre
mM	:Milimolar
µM	:Mikromolar
g	:Gram
L	:Litre
β	:Beta
α	:Alfa
s	:Singlet
t	:Triplet
J	:Etkileşme Sabiti
d	:Dublet
dd	:Dubletin dubleti
m	:Multiplet
δ	:Kimyasal Kayma
DMSO	:Dimetil sülfoksit
DPBS	:Dulbekko'nun fosfat tampon tuzu
EDTA	:Etilendiamin tetra asetik asit
FBS	:Fetal Bovine Serum
NMR	:Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
ROT	:Reaktif Oksijen Türleri
SS	:Standart sapma
TCA	:Trikloroasetik asit
UV-VIS	:Ultraviyole-Görünür Bölge Spektrofotometresi
HMBC	:Heteronuclear Multiple Bond Corralation
HETCOR	:Heteronuclear Corralation
İTK	:İnce Tabaka Kromatografi
APT	:Attached Proton Test
BHA	:Bütillenmiş Hidroksi Anisol
BHT	:Bütillenmiş Hidroksi Toluen
DEPT	:Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
OM	: <i>Origanum majorana</i>
OS	: <i>Origanum syriacum</i>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. <i>Origanum majorana</i> bitkisi	7
Şekil 2.2. <i>Origanum syriacum</i> bitkisi	8
Şekil 2.3. Güllüce ve arkadaşlarının <i>Origanum vulgare</i> bitkisinden izole ettikleri moleküller	10
Şekil 2.4. Kanserle karşı kullanılan doğal ürünler	16
Şekil 2.5. Sentetik ve doğal antioksidanlar a) 3-terciyer bütül-4-hidroksi anisol b) 3,5-terciyer bütül-4-hidroksitoluen) α -tokoferol (vitaminE) d) troloks	17
Şekil 2.6. Flavonoidlerin benzoil (A) ve sinnamoil (B) halkası	23
Şekil 2.7. Flavonoidler (2-fenilbenzopiren) izoflavonoidler (3-benzopiren) ve neoflavonoidler (4-benzopiren)	24
Şekil 3.1. HeLa ve C6 kanser hücreleri	28
Şekil 3.2. xCELLigence RTCA SP cihazı ve temel bileşenleri	38
Şekil 3.3. Cedex HiRes analizörü	39
Şekil 4.1. <i>O. majorana</i> bitkisi için seçici ekstraksiyon şeması	44
Şekil 4.2. <i>O. syriacum</i> bitkisi için seçici ekstraksiyon şeması	45
Şekil 4.3. Gallik asit için kalibrasyon grafiği	46
Şekil 4.4. <i>O. majorana</i> bitkisinin farklı çözgen sistemleri ile elde edilen ekstraktlere ait total fenol içerikleri	46
Şekil 4.5. <i>O. syriacum</i> bitkisinin farklı çözgen sistemleri ile elde edilen ekstraktlere ait total fenol içerikleri	47
Şekil 4.6. <i>O. majorana</i> bitki ekstraktleri ve standartlara ait Serbest radikal giderme aktiviteleri IC ₅₀ değerleri	49
Şekil 4.7. <i>O. syriacum</i> bitki ekstraktleri ve standartlara ait Serbest radikal giderme aktiviteleri IC ₅₀ değerleri	50
Şekil 4.8. <i>O. majorana</i> bitki ekstraktleri ve standartlara ait Total İndirgeme değerleri	51
Şekil 4.9. <i>O. syriacum</i> bitki ekstraktleri ve standartlara ait Total indirgeme değerleri	52
Şekil 4.10. ABTS ^{•+} 'nin açık kimyasal yapısı	53
Şekil 4.11. <i>O. majorana</i> bitki ekstraktleri ve standartlara ait ABTS ^{•+} giderme aktiviteleri	54
Şekil 4.12. <i>O. syriacum</i> bitki ekstraktleri ve standartlara ait ABTS ^{•+} giderme aktiviteleri	55
Şekil 4.13. <i>O. majorana</i> bitkisi kolon kromatografisi	57
Şekil 4.14. <i>O. syriacum</i> bitkisi kolon kromatografisi	59
Şekil 4.15.1 Nolu Bileşik (5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon)	63
Şekil 4.16. 1 Nolu (5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon) bileşiğin HMBC korelasyonları	64
Şekil 4.17. 1 Nolu (5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon) bileşiğin ¹ H-NMR spektrumu (¹ H-NMR 400 MHz, DMSO-d ₆)	65
Şekil 4.18. 1 Nolu (5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon) bileşiğin ¹³ C-NMR spektrumu (¹³ C-NMR 100 MHz DMSO-d ₆)	66
Şekil 4.19. 1 Nolu (5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon) bileşiğin APT spektrumu	

(¹³ C-NMR 100 MHz DMSO-d ₆)	67
Şekil 4.20. 1 Nolu (5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon) bileşiğın DEPT-90 spektrumu (¹³ C-NMR100 MHz DMSO-d ₆).....	68
Şekil 4.21. 1 Nolu (5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon) bileşiğın HETCOR spektrumu (¹ H-NMR 400 MHz, ¹³ C-NMR 100 MHz DMSO-d ₆).....	69
Şekil 4.22. 1 Nolu (5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon) bileşiğın HMBC spektrumu (¹ H-NMR 400 MHz, ¹³ C-NMR 100 MHz DMSO-d ₆).....	70
Şekil 4.23. 1 Nolu (5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon) bileşiğın COSY spektrumu (¹ H-NMR 400 MHz DMSO-d ₆).....	71
Şekil 4.24. 1 Nolu (5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon) bileşiğın FT-IR spektrumu (KBr)	72
Şekil 4.25. 1 Nolu (5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon) bileşiğın LC-TOF-MS kromatogramı.....	72
Şekil 4.26. 2 Nolu bileşik (Hesperetin).....	73
Şekil 4.27. 2 Nolu (Hesperetin) bileşiğın HMBC korelasyonları.....	74
Şekil 4.28. 2 Nolu (Hesperetin) bileşiğın ¹ H-NMR spektrumu (¹ H-NMR400 MHz DMSO-d ₆).....	75
Şekil 4.29. 2 Nolu (Hesperetin) bileşiğın ¹³ C-NMR spektrumu (¹³ C-NMR 100 MHz DMSO-d ₆).....	76
Şekil 4.30. 2 Nolu (Hesperetin) bileşiğın APT spektrumu (¹³ C-NMR 100 MHz DMSO-d ₆).....	77
Şekil 4.31. 2 Nolu (Hesperetin) bileşiğın DEPT135 spektrumu (¹³ C-NMR 100 MHz DMSO-d ₆).....	78
Şekil 4.32. 2 Nolu (Hesperetin) bileşiğın DEPT-90 spektrumu (¹³ C-NMR 100 MHz DMSO-d ₆).....	79
Şekil 4.33. 2 Nolu (Hesperetin) bileşiğın HETCOR spektrumu (¹ H-NMR 400 MHz, ¹³ C-NMR 100 MHz DMSO-d ₆)	80
Şekil 4.34. 2 Nolu (Hesperetin) bileşiğın HMBC spektrumu (¹ H-NMR400 MHz, ¹³ C-NMR 100 MHz DMSO-d ₆).....	81
Şekil 4.35. 2 Nolu (Hesperetin) bileşiğın COSY spektrumu (¹ H-NMR 400 MHz, DMSO-d ₆).....	82
Şekil 4.36. 2 Nolu (Hesperetin) bileşiğın FT-IR spektrumu (KBr)	83
Şekil 4.37. OM'nın etil asetat ekstresi ve 2 nolu (Hesperetin) bileşiğın LC-TOF-MS kromatogramı.....	83
Şekil 4.38. 3 Nolu Bileşik (Hidrokinon)	84
Şekil 4.39. 3 Nolu (Hidrokinon) bileşiğın HMBC korelasyonları.....	84
Şekil 4.40. 3 Nolu (Hidrokinon) bileşiğın ¹ H-NMR spektrumu (¹ H-NMR 400 MHz DMSO-d ₆).....	85
Şekil 4.41. 3 Nolu (Hidrokinon) bileşiğın ¹³ C-NMR spektrumu(¹³ C-NMR 100 MHz DMSO-d ₆).....	86
Şekil 4.42. 3 Nolu (Hidrokinon) bileşiğın APT spektrumu (¹³ C-NMR100 MHz DMSO-d ₆).....	87
Şekil 4.43. 3 Nolu (Hidrokinon) bileşiğın HETCOR spektrumu (¹ H-NMR 400 MHz, ¹³ C-NMR 100 MHz DMSO-d ₆).....	88
Şekil 4.44. 3 Nolu (Hidrokinon) bileşiğın FT-IR spektrumu (KBr).....	89
Şekil 4.45. 3 Nolu (Hidrokinon) bileşiğın LC-TOF-MS kromatogramı.....	89
Şekil 4.46. 4 Nolu Bileşik (Arbutin).....	90

Şekil 4.47. 4 Nolu (Arbutin) bileşiğın HMBC korelasyonları.....	91
Şekil 4.48. 4 Nolu (Arbutin) bileşiğın ^1H -NMR spektrumu (^1H -NMR400 MHz DMSO- d_6).....	92
Şekil 4.49. 4 Nolu (Arbutin) bileşiğın ^{13}C -NMR spektrumu (^{13}C -NMR, 100 MHz, DMSO- d_6).....	93
Şekil 4.50. 4 Nolu (Arbutin) bileşiğın DEPT-90, DEPT-135, APT NMR spektrumları (^{13}C -NMR 100 MHz, DMSO- d_6)	94
Şekil 4.51. 4 Nolu (Arbutin) bileşiğın HETCOR spektrumu (^1H -NMR 400 MHz, ^{13}C -NMR 100 MHz, DMSO- d_6).....	95
Şekil 4.52. 4 Nolu (Arbutin) bileşiğın HMBC spektrumu (^1H -NMR 400 MHz, ^{13}C -NMR 100 MHz, DMSO- d_6).....	96
Şekil 4.53. 4 Nolu (Arbutin) bileşiğın COSY spektrumu (^1H -NMR 400 MHz, DMSO- d_6).....	97
Şekil 4.54. 4 Nolu (Arbutin) bileşiğın FT-IR spektrumu (KBr).....	98
Şekil 4.55. 4 Nolu (Arbutin) bileşiğın LC-TOF-MS kromatogramı.....	98
Şekil 4.56. 5 Nolu bileşik (Rozmarinik asit)	99
Şekil 4.57. 5 Nolu bileşiğın (Rozmarinik asit) ^1H -NMR spektrumu (400 MHz, DMSO- d_6).....	101
Şekil 4.58. 5 Nolu (Rozmarinik asit) bileşiğının ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) spektrumu.....	102
Şekil 4.59. 5 Nolu (Rozmarinik asit) bileşiğın DEPT-90, DEPT-135, APT NMR spektrumu (^{13}C -NMR 100 MHz, DMSO- d_6).....	103
Şekil 4.60. 5 Nolu (Rozmarinik asit) bileşiğın HETCOR spektrumu (^1H -NMR 400 MHz, ^{13}C -NMR 100 MHz, DMSO- d_6).....	104
Şekil 4.61. 5 Nolu (Rozmarinik asit) bileşiğın HMBC spektrumu (^1H -NMR 400 MHz, ^{13}C -NMR 100 MHz, DMSO- d_6).....	105
Şekil 4.62. 5 Nolu (Rozmarinik asit) bileşiğın COSY spektrumu (^1H -NMR 400 MHz, DMSO- d_6).....	106
Şekil 4.63. 5 Nolu (Rozmarinik asit) bileşiğın FT-IR Spektrumu (KBr)	107
Şekil 4.64. 5 Nolu (Rozmarinik asit) bileşiğın LC-TOF-MS kromatogramı	107
Şekil 4.65. Daukosterin (3-O- β -D-glikopiranozil-sitosterol) bileşiğının yapısı	108
Şekil 4.66. Daukosterin bileşiğının belirlenen HMBC korelasyonları	108
Şekil 4.67. Daukosterin bileşiğının ^1H -NMR spektrumu (400 MHz, DMSO- d_6)	110
Şekil 4.68. Daukosterin bileşiğının ^{13}C -NMR spektrumu (100 MHz, DMSO- d_6)	111
Şekil 4.69. Daukosterin bileşiğının HMBC spektrumu (400 MHz, DMSO- d_6)	112
Şekil 4.70. Daukosterin bileşiğının COSY spektrumu (400 MHz, DMSO- d_6)	113
Şekil 4.71. Daukosterin bileşiğının HETCOR spektrumu (400 MHz, DMSO- d_6).....	114
Şekil 4.72. Daukosterin bileşiğının DEPT-90 spektrumu (100 MHz, DMSO- d_6)	115
Şekil 4.73. Daukosterin bileşiğının DEPT-135 spektrumu (100 MHz, DMSO- d_6)	116
Şekil 4.74. 7 Nolu bileşik (2-O- β -D-glikopiranozil-4,6-dihidroksi asetofenon)	117
Şekil 4.75. 7 Nolu (2-O- β -D-glikopiranozil-4,6-dihidroksi asetofenon) bileşiğın HMBC korelasyonları.....	118
Şekil 4.76. 7 Nolu (2-O- β -D-glikopiranozil-4,6-dihidroksi asetofenon) bileşiğının ^1H -NMR spektrumu (400 MHz, DMSO- d_6).....	119
Şekil 4. 77. 7 Nolu (2-O- β -D-glikopiranozil-4,6-dihidroksi asetofenon) bileşiğın ^{13}C -NMR spektrumu (^{13}C -NMR100 MHz, DMSO- d_6).....	120
Şekil 4. 77. 7 Nolu (2-O- β -D-glikopiranozil-4,6-dihidroksi asetofenon) bileşiğın ^{13}C -NMR spektrumu (^{13}C -NMR100 MHz, DMSO- d_6).....	120

Şekil 4.78. 7 Nolu (2-O-β-D-glikopiranozil-4,6-dihidroksi asetofenon) bileşiğın, APT, DEPT-135, DEPT-90 NMR spektrumu (¹³ C-NMR100 MHz, DMSO-d ₆).....	121
Şekil 4.79. 7 Nolu (2-O-β-D-glikopiranozil-4,6-dihidroksi asetofenon) bileşiğın HETCOR spektrumu (¹ H-NMR 400 MHz, ¹³ C-NMR 100 MHz, DMSO-d ₆).....	122
Şekil 4.80. 7 Nolu (2-O-β-D-glikopiranozil-4,6-dihidroksi asetofenon) bileşiğın HMBC spektrumu (¹ H-NMR 400 MHz, ¹³ C-NMR100 MHz, DMSO-d ₆) .	123
Şekil 4.81. 7 Nolu (2-O-β-D-glikopiranozil-4,6-dihidroksi asetofenon) bileşiğın COSY spektrumu (¹ H-NMR 400 MHz, DMSO-d ₆)	124
Şekil 4.82. 7 Nolu (2-O-β-D-glikopiranozil-4,6-dihidroksi asetofenon) bileşiğın FT-IR spektrumu (KBr)	125
Şekil 4.83. 7 Nolu (2-O-β-D-glikopiranozil-4,6-dihidroksi asetofenon) bileşiğın LC-TOF-MS kromatogramı	125
Şekil 4.84. 8 Nolu bileşik (Viteksin)	126
Şekil 4.85. 8 Nolu (Viteksin) bileşiğın HMBC korelasyonları.....	127
Şekil 4.86. 8 Nolu (Viteksin) bileşiğın ¹ H-NMR spektrumu (400 MHz, DMSO-d ₆)...	128
Şekil 4.87. 8 Nolu (Viteksin) bileşiğın ¹³ C-NMR spektrumu (100 MHz, DMSO-d ₆) .	129
Şekil 4.88. 8 Nolu (Viteksin) bileşiğın APT, DEPT-135, DEPT-90 NMR spektrumu (¹³ C-NMR 100 MHz, DMSO-d ₆)	130
Şekil 4.89. 8 Nolu (Viteksin) bileşiğın HETCOR spektrumu (¹ H-NMR 400 MHz, ¹³ C-NMR 100 MHz, DMSO-d ₆).....	131
Şekil 4.90. 8 Nolu (Viteksin) bileşiğın HMBC spektrumu (¹ H-NMR 400 MHz, ¹³ C-NMR100 MHz, DMSO-d ₆)	132
Şekil 4.91. 8 Nolu (Viteksin) bileşiğın COSY spektrumu (¹ H-NMR 400 MHz, DMSO-d ₆).....	133
Şekil 4.92. 8 Nolu (Viteksin) bileşiğın FT-IR Spektrumu (KBr)	134
Şekil 4.93. 8 Nolu (Viteksin) bileşiğın LC-TOF-MS kromatogramı	134
Şekil 4.94. 9 Nolu (Visenin-2) Bileşik	135
Şekil 4.95. 9 Nolu (Visenin-2) bileşiğın HMBC korelasyonları	136
Şekil 4.96. 9 Nolu (Visenin-2) bileşiğın ¹ H-NMR spektrumu (400 MHz, DMSO-d ₆).....	137
Şekil 4.97. 9 Nolu (Visenin-2) bileşiğın ¹³ C-NMR spektrumu (100 MHz, DMSO-d ₆).....	138
Şekil 4.98. 9 Nolu (Visenin-2) bileşiğın APT, DEPT-90 NMR spektrumu (¹³ C- NMR100 MHz, DMSO-d ₆)	139
Şekil 4.99. 9 Nolu (Visenin-2) bileşiğın HETCOR spektrumu(¹ H-NMR 400 MHz, ¹³ C-NMR 100 MHz, DMSO-d ₆)	140
Şekil 4.100. 9 Nolu (Visenin-2) bileşiğın HMBC spektrumu (¹ H-NMR 400 MHz, ¹³ C-NMR 100 MHz, DMSO-d ₆).....	141
Şekil 4.101. 9 Nolu (Visenin-2) bileşiğın COSY spektrumu (¹ H-NMR 400 MHz, DMSO-d ₆).....	142
Şekil 4. 102. 9 Nolu (Visenin-2) bileşiğın FT-IR Spektrumu (KBr).....	143
Şekil 4.103. 9 Nolu (Visenin-2) bileşiğın LC-TOF-MS kromatogramı	143
Şekil 4.104. 10 Nolu bileşik (Asasetin-7-O-[3-O-asetil-β-L-kisilopiranozil-(1-2)-β-D-glikopiranozit]).....	144
Şekil 4.105. 10 Nolu (Asasetin-7-O-[3-O-asetil-β-L-kisilopiranozil-(1-2)-β-D-glikopiranozit])	145

Şekil 4.106. <i>O. syriacum</i> metanol ekstraktı 636-696 fraksiyonlarının HPLC kromatogramı	146
Şekil 4.107. 10 Nolu (Asasetin-7-O-[3-O-asetil-β-L-ksilopiranozil-(1-2)-β-D-glikopiranozit]) bileşiğin ¹ H-NMR spektrumu (400 MHz, DMSO-d ₆)	147
Şekil 4.108. 10 Nolu (Asasetin-7-O-[3-O-asetil-β-L-ksilopiranozil-(1-2)-β-D-glikopiranozit]) bileşiğin ¹³ C-NMR spektrumu (100 MHz, DMSO-d ₆) ...	148
Şekil 4.109. 10 Nolu (Asasetin-7-O-[3-O-asetil-β-L-ksilopiranozil-(1-2)-β-D-glikopiranozit]) bileşiğin APT, DEPT-135, DEPT-90 NMR spektrumu (¹³ C-NMR100 MHz, DMSO-d ₆) (¹³ C-NMR100 MHz, DMSO-d ₆)	149
Şekil 4.110. 10 Nolu (Asasetin-7-O-[3-O-asetil-β-L-ksilopiranozil-(1-2)-β-D-glikopiranozit]) HETCOR spektrumu (¹ H-NMR 400 MHz, ¹³ C-NMR 100 MHz, DMSO-d ₆)	150
Şekil 4.111. 10 Nolu (Asasetin-7-O-[3-O-asetil-β-L-ksilopiranozil-(1-2)-β-D-glikopiranozit]) bileşiğin HMBC spektrumu (¹ H-NMR 400 MHz, ¹³ C-NMR100 MHz, DMSO-d ₆)	151
Şekil 4.112. 10 Nolu (Asasetin-7-O-[3-O-asetil-β-L-ksilopiranozil-(1-2)-β-D-glikopiranozit]) bileşiğin COSY spektrumu (¹ H-NMR 400 MHz, DMSO-d ₆)	152
Şekil 4.113. 10 Nolu (Asasetin-7-O-[3-O-asetil-β-L-ksilopiranozil-(1-2)-β-D-glikopiranozit]) (Asasetin-7-O-[3-O-asetil-β-L-ksilopiranozil-(1-2)-β-D-glikopiranozit]) bileşiğin FT-IR spektrumu (KBr)	153
Şekil 4.114. 10 Nolu (Asasetin-7-O-[3-O-asetil-β-L-ksilopiranozil-(1-2)-β-D-glikopiranozit]) bileşiğin LC-TOF-MS kromatogramı	153
Şekil 4.115. 11 Nolu bileşik (İzoviteksin)	154
Şekil 4.116. OS Metanol ekstraktının 696-724 fraksiyonlarının HPLC kromatogramı	155
Şekil 4.117. 11 Nolu (İzoviteksin) bileşiğin HMBC korelasyonları	156
Şekil 4.118. 11 Nolu (İzoviteksin) bileşiğin ¹ H-NMR spektrumu (400 MHz, DMSO-d ₆)	157
Şekil 4.119. 11 Nolu (İzoviteksin) bileşiğin ¹³ C-NMR spektrumu (100 MHz, DMSO-d ₆)	158
Şekil 4.120. 11 Nolu (İzoviteksin) bileşiğin APT, DEPT-135, DEPT-90 NMR spektrumu (¹³ C-NMR 100 MHz, DMSO-d ₆)	159
Şekil 4.121. 11 Nolu (İzoviteksin) bileşiğin HETCOR spektrumu (¹ H-NMR 400 MHz, ¹³ C-NMR 100 MHz, DMSO-d ₆)	160
Şekil 4.122. 11 Nolu (İzoviteksin) bileşiğin HMBC spektrumu (¹ H-NMR 400 MHz, ¹³ C-NMR 100 MHz, DMSO-d ₆)	161
Şekil 4.123. 11 Nolu (İzoviteksin) bileşiğin COSY spektrumu (¹ H-NMR 400 MHz, DMSO-d ₆)	162
Şekil 4.124. 11 Nolu (İzoviteksin) bileşiğin FT-IR Spektrumu (KBr).....	163
Şekil 4.125. 11 Nolu (İzoviteksin) bileşiğin LC-TOF-MS kromatogramı	163
Şekil 4.126. 12 Nolu Bileşik (Rozmarinik asit).....	164
Şekil 4.127. <i>O. majorana</i> bitkisinden bileşiklerin serbest radikal giderme aktiviteleri	165
Şekil 4.128. <i>O. majorana</i> bitkisinden izole edilen bileşiklerin total indirgeme gücü aktiviteleri.....	166
Şekil 4.129. <i>O. majorana</i> bitkisinden izole edilen bileşiklerin ABTS ⁺ giderme aktiviteleri	167

Şekil 4.130. <i>O. syriacum</i> bitkisinden bileşiklerin serbest radikal giderme aktiviteleri	168
Şekil 4.131. <i>O. syriacum</i> bitkisinden izole edilen bileşiklerin total indirgeme gücü aktiviteleri.....	169
Şekil 4.132. <i>O. syriacum</i> bitkisinden izole edilen bileşiklerin ABTS ^{•+} giderme aktiviteleri.....	170
Şekil 4.133. HeLa hücrelerine antikanser ajanı olan 5-FU ilk 48 saat proliferasyon ...	172
Şekil 4.134. HeLa hücrelerine <i>O. majorana</i> bitkisi hekzan ekstresi ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık realtime hücre analiz grafiği.....	172
Şekil 4.135. HeLa hücrelerine <i>O. majorana</i> bitkisi etilasetat ekstresi ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık realtime hücre analiz grafiği.....	172
Şekil 4.136. HeLa hücrelerine <i>O. syriacum</i> bitkisi metanol ekstresi ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık realtime hücre analiz grafiği.....	173
Şekil 4.137. <i>O. majorana</i> ekstrelerinin C6 hücrelerine karşı antiproliferatif aktivitesi ...	173
Şekil 4.138. <i>O. syriacum</i> ekstrelerinin C6 hücrelerine karşı antiproliferatif aktivitesi....	174
Şekil 4.139. HeLa hücrelerine <i>O. majorana</i> bitkisinden izole edilen 5,6,3'-trihidroksi -7,8,4'-trimetoksiflavon bileşiği ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık realtime hücre analiz grafiği.....	175
Şekil 4.140. HeLa hücrelerine <i>O. majorana</i> bitkisinden izole edilen Hesperetin bileşiği ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık realtime hücre analiz grafiği	175
Şekil 4.141. HeLa hücrelerine <i>O. majorana</i> bitkisinden izole edilen Arbutin bileşiği ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık realtime hücre analiz grafiği	176
Şekil 4.142. HeLa hücrelerine <i>O. majorana</i> bitkisinden izole edilen Rozmarinik asit bileşiği ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık realtime hücre analiz grafiği	176
Şekil 4.143. HeLa hücrelerine <i>O. majorana</i> bitkisinden izole edilen Hidrokinon bileşiği ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık realtime hücre analiz grafiği	176
Şekil 4.144. HeLa hücrelerine 5-Fu bileşiği ilk 48 saat proliferasyon	177
Şekil 4.145. <i>O. majorana</i> etil asetat fazı ve saf bileşenlerin C6 hücrelerine karşı antiproliferatif aktivitesi	178
Şekil 4.146. HeLa hücrelerine <i>O. syriacum</i> bitkisinden izole edilen Daukosterin bileşiği ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık realtime hücre analiz grafiği	179
Şekil 4.147. HeLa hücrelerine <i>O. syriacum</i> bitkisinden izole edilen 4,6-dihidroksi asetofenon 2-O-D-glikozit bileşiği ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık realtime hücre analiz grafiği.....	179
Şekil 4.148. HeLa hücrelerine <i>O. syriacum</i> bitkisinden izole edilen Viteksin bileşiği ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık realtime hücre analiz grafiği	179
Şekil 4.149. HeLa hücrelerine <i>O. syriacum</i> bitkisinden izole edilen Visenin-2 bileşiği ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık realtime hücre analiz grafiği.....	180
Şekil 4.150. HeLa hücrelerine <i>O. syriacum</i> bitkisinden izole edilen Asasetin-7-O-[3-O-asetil- α -l-ksilopiranozil-(1-2)- β -glikopiranozit] bileşiği ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık realtime hücre analiz grafiği.....	180
Şekil 4.151. HeLa hücrelerine <i>O. syriacum</i> bitkisinden izole edilen izoviteksin bileşiği ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık realtime hücre analiz grafiği	180
Şekil 4.152. HeLa hücrelerine <i>O. syriacum</i> bitkisinden izole edilen Rozmarinik asit bileşiği ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık realtime hücre analiz grafiği	181
Şekil 4.153. HeLa hücrelerine 5-Fu bileşiği ilk 48 saat proliferasyon ve	181
Şekil 4.154. <i>O. syriacum</i> etil asetat ekstresi ve saf bileşenlerin C6 hücrelerine karşı antiproliferatif aktivitesi	182

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. <i>O. majorana</i> bitkisinin gallik asit eşdeğeri fenolik bileşik miktarları.....	46
Çizelge 4.2. <i>O. syriacum</i> bitkisinin gallik asit eşdeğeri fenolik bileşik miktarları.....	47
Çizelge 4.3. <i>O. majorana</i> bitkisi DPPH testi sonuçları	48
Çizelge 4.4. <i>O. syriacum</i> bitkisi DPPH testi sonuçları	49
Çizelge 4.5. <i>O. majorana</i> bitkisi İndirgeme kapasitesi testi sonuçları	51
Çizelge 4.6. <i>O. syriacum</i> bitki ekstreleri ve standartlara ait Total İndirgeme değerleri .	52
Çizelge 4.7. ABTS ^{•+} giderme aktivitesi sonuçları.....	53
Çizelge 4.8. ABTS ^{•+} giderme aktivitesi sonuçları.....	54
Çizelge 4.9. Antioksidan aktivite sonuçları	56
Çizelge 4.10. <i>O. majorana</i> kolon kromatografisi için çözücü sistemi	56
Çizelge 4.11. <i>O. syriacum</i> bitkisi kolon kromatografisi için çözücü sistemleri	58
Çizelge 4.14. 1 Nolu (5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon) bileşiğin ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR (400/100 MHz DMSO-d ₆) kimyasal kayma değerleri	64
Çizelge 4.15. 2 Nolu (Hesperetin) bileşiğin ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR (400/100 MHz DMSO-d ₆) kimyasal kayma değerleri.....	74
Çizelge 4.16. 3 Nolu (Hidrokinon) bileşiğin ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR (400/100 MHz DMSO-d ₆) kimyasal kayma değerleri.....	84
Çizelge 4.17. 4 Nolu (Arbutin) bileşiğin ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR (400/100 MHz DMSO-d ₆) kimyasal kayma değerleri	91
Çizelge 4.18. 5 Nolu (Rozmarinik asit) bileşiğin ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR kimyasal kayma değerleri	100
Çizelge 4.19. Daukosterin bileşiğinin ¹ H-NMR 400 MHz ve ¹³ C-NMR 100 MHz kimyasal kayma	109
Çizelge 4.20. 7 Nolu (2-O-β-D-glikopiranozil-4,6-dihidroksi asetofenon) bileşiğin ...	118
Çizelge 4.21. 8 Nolu (Viteksin) bileşiğin ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR kimyasal kayma değerleri	127
Çizelge 4.22. 9 Nolu (Visenin-2) bileşiğin ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR kimyasal kayma değerleri	136
Çizelge 4.23. 10 Nolu (Asasetin-7-O-[3-O-asetil-β-L-ksilopiranozil-(1-2)-β-D-glikopiranozit]) bileşiğin.....	145
Çizelge 4.24. 11 Nolu (İzoviteksin) bileşiğin ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR kimyasal kayma değerleri	156
Çizelge 4.25. <i>O. majorana</i> bitkisinden izole edilen bileşiklerin DPPH testi sonuçları	165
Çizelge 4.26. <i>O. majorana</i> bitkisinden izole edilen bileşiklerin total indirgeme testi sonuçları.....	166
Çizelge 4.27. <i>O. majorana</i> bitkisinden bileşiklerin ABTS ^{•+} giderme aktivitesi sonuçları	167
Çizelge 4.28. <i>O. syriacum</i> bitkisinden izole edilen bileşiklerin DPPH testi sonuçları.	168
Çizelge 4.29. <i>O. syriacum</i> bitkisinden izole edilen bileşiklerin total indirgeme testi sonuçları.....	169
Çizelge 4.30. <i>O. syriacum</i> bitkisinden izole edilen bileşiklerin ABTS ^{•+} giderme aktivitesi sonuçları	170
Çizelge 5.1. <i>Origanum.majorana</i> ve <i>Origanum syriacum</i> bitkilerinden izole edilen bileşikler.....	184

1.GİRİŞ

Besin zincirinde birincil üreticiler olarak görev yapan bitkiler, yeryüzünde mevcut olan birçok doğal bileşiğin en temel kaynaklarındandır. Bitkilerin birçok çevresel etmene ve genetik varyasyonlara bağlı olarak ürettikleri organik bileşikler; gıda, tıp, eczacılık, biyolojik mücadele, kozmetik, boya endüstrisi gibi pek çok alanda geniş kullanım alanına sahiptirler (Hoareau ve DaSilva 1999; Barış 2004; Abbasi ve ark. 2009; Davis ve Perez 2009).

Kökene insanlık tarihinin ortaya çıkışına kadar uzanan Tıbbi bitkiler; komplementer (tamamlayıcı) tıp, alternatif tıp ya da geleneksel tedavi uygulamalarında olduğu gibi modern tıp ve eczacılık bilimlerinde de kullanılmaktadır (Mainardi ve ark. 2009). Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nın 91 ülkenin farmakopelerine ve tıbbi bitkiler üzerinde yapılan bazı çalışmalara dayanarak yaptıkları araştırmaya göre, tedavi amaçlı kullanılan 20000 kadar bitkinin olduğu bildirilmiştir (Harvey, 2008). Ülkemizde tıbbi olarak kullanılan bitkilerin sayısı 500 civarında olup bu bitkilerin neredeyse tamamı doğal olarak yetişmektedir. Günümüzde kullanılan ilaçların çoğunun menşesine bakıldığında ise bitki kaynaklı olduğu görülmektedir. Bitkisel kaynaklı besinler, içerdiği fonksiyonel bileşik ve kimyasal maddelerden dolayı insanların sağlık durumlarının korunmasında etkilidir. Bu bağlamda geniş ölçüde meyve, sebze ve baharatları kapsayan doğal besinler; kanser dahil olmak üzere birçok hastalığa karşı olan koruyucu etkilerinden dolayı hem halk hem de bilimsel çevre tarafından büyük ilgi görmektedir (Shukla ve Singh 2007).

Modern bilimlerin gelişmesiyle birlikte günümüzde; biyoloji, kimya, farmakoloji gibi disiplinlerin ortak çalışmaları ile, halk ilacı olarak kullanılan birçok bitkinin, yapısında bulunan fonksiyonel bileşikler aydınlatılmakta ve biyolojik aktiviteleri saptanabilmektedir (Baykal, 1997; Dülger, 1999; Tadeğ, 2005).

Uluslararası Kanser Enstitüsü, anti-HIV aktivitesi için 50000 ve anti-tümör aktivitesi için 33000'den fazla bitki örneklerini test etmiştir. Merck, Glaxo, Boehringer ve Syntex gibi

büyük ilaç şirketleri doğal ürünlerden yeni ilaç elde etmek için çalışmalarını sürdürmektedir (Rates, 2001).

Bitkilerden elde edilen ilk etken madde 1805'te Alman Kimyacı Serturme tarafından afyon bitkisinden izole edilen morfindir. Bunu 1820'de kınakınanın kabuklarından kinin, 1868'de yüksük otu yapraklarından kalp yetmezliği tedavisinde kullanılan digitalin ve 1890'da söğüt dalı kabuğundan salisilik asidin izolasyonu takip etmiştir. Bugüne kadar yaklaşık 100000 sekonder metabolit bitkilerden izole edilerek tanımlanmıştır. Her yıl bu sayıya 4000 kadar yeni bileşik eklenmektedir (Heinrich ve ark., 2004). Bitkilerden izole edilen ve biyolojik aktivitesi belirlenmiş en önemli molekül grupları; polisakkaritler, flavonoidler, terpenoidler, alkaloidler, fenoller ve aminoasitlerdir (Zahran ve ark., 2005).

Origanum cinsi, genellikle çeşitli biyoaktif özelliklere sahip hoş kokulu bitkilerin oluşturduğu Lamiaceae (Labiatae) familyasının önemli üyelerinden biridir. Başta Akdeniz kıyıları olmak üzere dünya üzerindeki birçok bölgede yaygın şekilde baharat olarak kullanılan bu cins; ülkemizde 14'ü endemik, toplam 23 tür ve 6 hibrit ile temsil edilmektedir (Ietswaart 1982; Duman 2000; Viuda-Martos ve ark. 2009). *Origanum* cinsine ait bitki örnekleri ile yapılan çalışmalar sonucunda; bu bitkilerden elde edilen özütlerin, içerdikleri çeşitli fitokimyasallara bağlı olarak sindirim sistemi rahatsızlıklarını düzenleyici, menstural problemleri giderici, nefes açıcı, antispazmodik ve antimikrobiyal gibi birçok özelliğinin bulunduğu belirlenmiştir (Şahin ve ark. 2004; Barros ve ark. 2010).

Günümüzde, kanserin de dahil olduğu birçok önemli hastalığın mutasyonlar ile ilişkilendirilmesi; mutasyonların ortaya çıkışı ve önlenmesi üzerine yapılan çalışmaların önemli ölçüde artmasına neden olmuştur. Bu bağlamda sayısız kimyasal bileşiği sentezleme potansiyeline sahip olan bitkiler, mutajenite ve antimutajenite çalışmalarının odağını oluşturmaktadır (Loh ve ark. 2009).

Bu bağlamda antitümör ve antioksidan aktiviteye sahip olduklarına dair pek çok literatür (Gürkan ve ark., 1998; Gürkan ve ark., 2000; Sathiyamoorthy ve ark., 1999; Barrero ve ark., 1995; Barrero ve ark., 1997; Akbar ve ark., 1995; Lonergan ve ark., 1992) bulunan

ve Tokatta kültürü yapılan *Origanum majorana* L. ve *Origanum syriacum* L. bitki türlerinin antioksidan ve antikanser aktivitesini araştırmak ve aktiviteye sahip bitki ekstraktlarından sorumlu biyoaktif bileşiklerin izolasyonunu yapmak ve moleküllerin yapılarını spektroskopik yöntemlerle (1D-NMR, 2D-NMR, IR, UV, LC-TOF/MS) aydınlatmaktır. Ayrıca, saflaştırılan bileşiklerin antikanser ve antioksidan aktivitelerinin analizi ile biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Labitae (Lamiaceae) Familyasının Özellikleri

2.1.1. Genel Özellikleri

Lamiaceae familyası ilk kez De Jussieu tarafından 1789 yılında Labiatae adıyla isimlendirilmiştir. Daha sonra Lindley tarafından 1836 yılında Lamiaceae olarak adlandırılmıştır (Greuter, 1988; Hedge, 1992). Dünyanın belli başlı büyük ve eski familyalarındandır. Familya ile ilgili fosil kayıtları olmamasına rağmen yine de kökeninin Oligosen'e veya 70-90 milyon yıl öncesine dayandığı söylenebilir (Hedge, 1986; Chadeaud ve Emberger, 1960). Labiatae (Lamiaceae) familyasının 3300 türü bulunmaktadır (Ewans, 2002).

Lamiaceae familyasına ait bazı türlerde yapraklar genellikle basittir ve daima karşılıklı çapraz (opposite-decussate) dizilişlidir; stipul bulunmaz (Baytop, 1991; Watson and Dallwitz, 1978). Çiçekler genellikle hermafrodittir. Fakat bazı türlerin çiçeklerindeki erkek organların indirgenmiş ve steril olmasından dolayı çiçekler dişi özelliktedir. *Mentha*, *Nepeta*, *Ziziphora* gibi cinslerin birçok türünde böyle çiçeklerin oranı %50'ye varmaktadır. Böyle çiçeklerde korolla genellikle daha küçük ve daha açık renklidir (Watson and Dallwitz, 1978).

Lamiaceae familyasına ait bitkiler genellikle bütün yüzeylerinde tüylere sahiptir. Bu tüyler hem örtü hem de salgı tüyleri şeklindedir. Bu bitkilerin başlıca salgı organı olan salgı tüyleri, generatif organlarda da bulunabilmektedir (Mihalik, 1992). Familya üyelerinde çok hücreli başlı kapitat salgı tüylerinin yanında değişik tipte tüylere de rastlanmaktadır (Özörgücü ve ark., 1991; Özdemir ve Şenel, 1999).

Genellikle böceklerle, bazen de kelebeklerle veya kuşlarla ilgili çeşitli tozlaşma mekanizmaları mevcuttur. Bunlardan en gelişmiş olanı *Salvia* 'da görülmektedir. Böcek nektarın girişini engelleyen uzun, kıvrık staminal konnektif dokunun bir ucuna kafasıyla vurur. Diğer uç, eklem yerinin oynaklığı vasıtasıyla düşer ve böceğin sırtına polen

bulaştırır. Lamiaceae'de tozlaşma genellikle böceklerle olmaktadır. Fakat uzun korolla tüpüne sahip bazı türler kuşlar vasıtasıyla da tozlaşabilmektedir (Watson and Dallwitz, 1978).

Eski çağlardan günümüze kadar Lamiaceae familyası türleri halk arasında tıbbi olarak ve baharat amacıyla kullanılmıştır. Dioscoridis'in Materia Medica adlı eserinde yer alan bitkilerden 40 kadarı Lamiaceae familyasına aittir (Baytop, 2000). Günümüzde de bitki kimyası ile ilgili çalışmalar, halk arasında geniş bir kullanıma sahip olan Lamiaceae familyası üzerinde yoğunlaşmıştır (Nunez ve De Castro, 1992).

Familya ile ilgili 1978-1991 yılları arasında 2889 kimyasal içerikli çalışma tespit edilmiştir (Richardson, 1992). Türleri üzerinde yapılan kimyasal çalışmalarda, Lamiaceae familyası üyelerinde 147 farklı flavonoid aglikon tespit edilmiştir. Flavonoidlerin büyük çoğunluğu flavon (%60), bir kısmı flavonol (%16) ve flavonon (%20)'dur. Ayrıca az miktarda dehidroflavonol (%2) ve kalkan (%2) bulunmaktadır (Tomas Barberon ve Gil, 1992).

Labiatae bitkileri genel olarak uçucu yağ, fenolik bileşikler (flavonoit, fenolik asit, asetofenon bileşikleri), diterpen ve triterpenlerin yanı sıra saponin, polifenoltaneniridoit, kinon, furanoit, siklitol, kumarin, birkaç piridin ve pirolidin alkaloidi gibi bileşikleri taşır (Evans, 1989).

Labiatae familyasına ait *Origanum*, *Thymus*, *Coridothymus*, *Thymbra*, *Satureja* ve *Lippia* cinsleri ülkemizde kekik olarak bilinmektedir ve uçucu yağları monoterpenik fenol olan karvakrol ve timol bakımından zengindir (Baser, 2008).

2.2. *Origanum* Cinsi

Yarıçalımsı veya otsu, tüylü veya tüysüz (genellikle donuk mavimsi yeşil renkte) çok yıllık bitkilerdir. Gövdeler yükselici veya dik, genellikle dallanmış ve birkaç tanedir. Yapraklar hemen hemen sapsız veya az çok saplıdır; eliptik, ovat, kordat veya suborbikular şekildedir; kenarları düz veya az çok dişlidir; uç kısmı obtus veya akuminattır. Vertisillastrumlar 2 veya birkaç çiçeklidir; genellikle yalancı korimbus veya bir panikula şeklinde bulunan az çok yoğun, spika benzeri, çiçek durumları halinde kümeleşmiştir. Brakteler şekil ve büyüklük bakımından yapraklardan daima farklıdır; genellikle imbrikattır, kaliksin 1/2 veya 1/3'ü uzunluğundadır; ya zarımsı ve kısmen morumsu kırmızı ya da sarımsı yeşildir veya yapı ve renk bakımından yapraklara benzer. Kaliks çeşitlilik gösterir, hemen hemen aktinomorf ve 5 dişli veya zigomorf 1-2 dudaklıdır, 13 veya 10 damarlıdır; boğaz kısmı genellikle tüy halkası taşır. Korolla morumsu kırmızı pembe veya beyaz, az çok eşit 2 dudaklıdır; korolla tüpü bazen kese şeklinde veya düzdür; üst dudak emarginat veya kısa biçimde bilabiattır; alt dudak 3 lobludur. Stamenler 4 adet, alt çifti daha uzun; korollanın içinde veya dışarı uzamıştır, üst dudağın altından yükselir, dik veya birbirinden uzaklaşan şekildedir. Filamentler hemen hemen eş değildir; tekalar birbirinden uzaktır (Tanker ve ark., 1998).

Origanum (mercanköşk, merzengüş) cinsinde çiçekler, sık ve imbrikat dizilişli braktelerin koltuğundadır; kaliks 2 dudaklı ya da 5 dişli; korolla 2 dudaklıdır. Stamen 4 tane olup, birbirinden uzaklaşmıştır. Timol ve karvakrol taşıyan türler baharat olarak çok kullanılır (Davis, 1982).

Günümüzde *Origanum* türleri doğal olarak doğadan toplanıldığı gibi bazılarının çelikle ve tohumla üretimi de yapılmaktadır (Kokkini, 1996). Nötr veya bazik toprakları tercih ederler (Huxley, 1992). Nemli toprakları çok sevmedikleri gibi ayrıca, topraktaki azot, fosfor ve potasyum miktarının *Origanum* türlerinin gelişimini olumlu etkilemektedir (Guner ve ark., 2000). Toprağı gübrelemenin *Origanum* türleri açısından olumlu sonuçlar vermektedir (Ceylan, 1983). Yine *Origanum* türlerinin azot, fosfor ve potasyum içeren gübrelerle gübrelenmesinin verimi arttıracak da ileri sürülmektedir (Baricevic, 1996).

2.2.1 *Origanum majorana* Bitkisinin Yayılımı ve Özellikleri



Şekil 2.1. *Origanum majorana* bitkisi

Sistematik

Latince Adı	: <i>Origanum majorana</i>
Alem	: <i>Plantae</i>
Sınıf	: <i>Magnoliopsida</i>
Takım	: <i>Lamiales</i>
Familya	: <i>Lamiaceae</i>
Cins	: <i>Origanum</i>
Tür	: <i>Origanum majorana</i> L.
Endemik	: Endemik değil
Ömür	: Çok yıllık
Yapı	: Yarıçalı
Çiçeklenme	: 5-9
Habitat	: Kuru yamaçlar ve kayalık yerler, bazen kısmen gölgelik yerler
Yükseklik	: 400-1500
Endemik	: Endemik değil
Element	: D. Akdeniz
Türkiye Dağılımı	: G. Anadolu
Genel Dağılımı	: Kıbrıs

2.2.2. *Origanum syriacum* Bitkisinin Yayılımı ve Özellikleri



Şekil 2.2. *Origanum syriacum* bitkisi

Sistematik

Latince Adı	: <i>Origanum syriacum</i>
Alem	: <i>Plantae</i>
Bölüm	: <i>Magnoliophyta</i>
Sınıf	: <i>Magnoliopsida</i>
Takım	: <i>Lamiales</i>
Familiya	: <i>Lamiaceae</i>
Cins	: <i>Origanum</i>
Tür	: <i>Origanum syriacum</i> L.
Endemik	: Endemik değil
Ömür	: Çok yıllık
Yapı	: Çalı
Çiçeklenme	: 5-10
Habitat	: Kalkerli kayalar ve yamaçlar, sık sık partial shade
Yükseklik	: 200-2700
Endemik	: Endemik değil
Element	: D. Akdeniz
Türkiye Dağılımı	: B. ve G. Anadolu
Genel Dağılımı	: Kıbrıs, Lübnan, Latakya

Origanum cinsi Labiatae familyasına ait bir cins olup, Türkiye’de 22 *Origanum* türüne ait 32 takson yetişmektedir. Bunlardan 21 taksonu Türkiye için endemiktir. Dünyada bilinen 52 *Origanum* taksonunun % 60’ı Türkiye’de yayılış göstermektedir (Baser, 1978). *Origanum* cinsine ait türlerin büyük çoğunluğunun kökeni Akdeniz Bölgesidir ve kıyı bölgelerden yüksek dağlara, genellikle 400-4000 m arasında, çoğunlukla 1200-1500 m yükseklikte yetişmektedir (Oflaz ve ark., 2002). *Origanum vulgare* Amerika’ya eskiden koloniler tarafından Akdeniz Bölgesinden götürüldüğü belirtilmektedir (Olivier, 1996). *Origanum* türleri dünya ticaretinde mutfakta kullanılan şifalı otlar arasında birincil sıradadır. Ticari *Origanum*’un çoğu Türkiye ve Yunanistan yabani popülasyonlarından gelmektedir (Skoula ve Kamenopoulos, 1996).

Çoğu *Origanum* türlerinin uçucu yağ bileşenleri yoğun bir şekilde çalışılmıştır (Sendra ve ark., 1980; Ravid ve ark., 1983; Akgul ve ark., 1987; Harvala ve ark., 1987; Halim ve ark., 1991; Afsharypuor ve ark., 1997). *Origanum* türlerinin uçucu yağ ana bileşenleri timol ve karvakrol olarak belirlenmiştir (Sarer et al., 1982). *Origanum* türleri halk arasında tatlandırıcı ve güçlü dezenfektanlar ile parfümeride ve sabunlara koku verici olarak kullanılmaktadır (Gunther,1949; Chiej, 1984; Kotb, 1985).

Origanum türlerinin spazmolitik (Van den Broucke ve Lemli, 1980) antibakteriyel (Vokou ve ark., 1993), antifungal (Stiles ve ark., 1995), antioksidan (Lagouri ve ark., 1993; Nakatani, 1992; Deighton ve ark., 2000), gibi bazı biyolojik etkileri deneysel olarak kanıtlanmıştır. Lagouri ve arkadaşları 4 farklı türdeki *O. onites*, *O. dictamnus*, *T. Vulgaris*, *R. officinalis* bitkilerinin hekzan, diklormetan ve metanol ekstraktlarının antioksidan içeriği ve fenolik bileşenlerinin polaritenin artışıyla paralellik gösterdiğini belirtmişlerdir (Lagouri ve ark.,1993).

Güllüce ve arkadaşları *Origanum vulgare* bitkisinin petrol eteri, kloroform, etil asetat, n-bütanol ve su ekstraktlarını izolasyana hazırlamak için öncelikle bu ekstraktalara antimutajenik testler yaparak en etkili sonuçları gösteren n-bütanol ekstresine kolon kromatografisi uygulanarak Luteolin-7-O-glikuronit ve Luteolin-7-O-ksilozit gibi antimutajenik olarak aktif molekülleri izole etmişlerdir (Güllüce ve ark., 2012).

Şekil 2.3. Güllüce ve arkadaşlarının *Origanum vulgare* bitkisinden izole ettikleri moleküller
(Güllüce ve ark., 2012)

Lukas ve arkadaşları bazı *Origanum* türlerinde arbutin içeriğini HPLC ile belirlemişler ve en fazla arbutin içeriğinin *Origanum majorana* türünde olduğunu ayrıca *O. syriacum*, *O. vulgare* türlerindeki arbutin içeriğinin çok düşük olduğunu belirtmişlerdir (Lukas ve ark.,2010). *Origanum vulgare* L. ve *Origanum majorana* L. bitkilerinin uçucu yağları üzerinde yaptıkları araştırmada, uçucu yağların antifungal etkiye sahip olduklarını ve patojen fungus gelişimini inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır (Souza ve ark., 2010).

Origanum türlerinin deri pigmentasyonu kontrolünde olumlu etkileri mevcuttur. Bu nedenle, kozmetik sanayide deri beyazlaştırıcı olarak kullanılabileceği önerilmiştir. Yüksek antioksidan ve antimikrobiyal etkisinin bulunması gıda ve ilaç sanayide *Origanum* türlerinin kullanım potansiyeli söz konusudur. Alternatif tıpta bunlar yaygın olarak kullanılmakta olup, içinde *Origanum* türlerinin yalnız veya başka bitkilerle karışım şekilde bulunduğu patentli preperatlar kayıtlıdır.

2.3. HASTALIKLAR VE SEKONDER METABOLİTLER

2.3.1. Kanserin Tanımı

Kanser, genetik bir hastalıktır. Hücresel gelişimi kontrol eden genlerdeki bozukluklar kontrolsüz hücre büyümelerine yol açmaktadır. Bu genetik bozukluk birçok olguda kalıtsal değildir (Karp, 2005). Ancak, kanser olgularının %1'inde, eşey-kök hücrelerinin çeşitli genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonraki nesillere aktarılır ve bu değişim, yeni neslin kansere yatkınlığını oluşturur (Klug ve Cummings, 2002).

Kanser, tüm yüksek canlıların yakalanabildiği bir hastalık grubudur. Doğal ve laboratuvar hayvanlarında her yönden insan kanserlerine benzeyen hastalıklar vardır. İnsan kanserleri ise biyolojik ve klinik bakımlardan birbirlerinden çok farklı özellikleri olan ortalama 100 değişik hastalıktan oluşmaktadır. Bunlardan bazıları çok yavaş ilerleyen, tedavi edilmediklerinde bile uzun yıllar boyu yaşama olanak veren durumlardır. Diğer yandan tedavi edilmediklerinde genelde aylar içinde yayılarak ölüme yol açabilen saldırgan kanserler de bilinmektedir. Bu niteliklerinden dolayı bir hastalık olarak kanseri tüm özellikleri ile tanımlayacak bir ifade bulunamamıştır. İngiliz onkolog Willis'in tanımı, yeni görüşler ışığında bazı eksiklikler içermekle birlikte, en yaygın kabul gören tanımdır: "Kanser anormal bir doku kitlesidir. Büyümesi normal hücrelerden hızlıdır ve onlarla eşgüdüm içinde değildir. Bu büyüme hızı onu başlatan uyarının ortadan kalkmasından sonra da aynı aşırı biçimde devam eder" (Ruacan, 2003).

Tümörlü dokuları üç grup altında inceleyebiliriz; beniyin (iyi huylu), premaliyn ve maliyn (kötü huylu). Beniyin tümörler: herhangi bir dokudan oluşabilir, bölgesel olarak büyür, kenarları düzenlidir, genelde bir bağ dokusu kapsülü ile etrafındaki dokudan ayrılır, tek zararı büyüdüğü bölgede basınç oluşturmastır. İyi huylu tümörler etraflarındaki dokuları istila etmezler ve vücudun diğer bölümlerine metastaz yapmazlar. Bazı iyi huylu tümörler değişime uğrayıp maliyn tümörlere dönüşme kapasitesine sahiptir. Bunlara da intermediyer (premaliyn) tümörler denir. Üçüncü grup tümör türü ise maliyn (kötü huylu) tümörlerdir. "Maliyn" in kelime anlamı hızlı şekilde çoğalan ve ölüme sebep olan demektir. Kötü huylu kanserin özellikleri; hücrelerin hızlı çoğalması, kan damarına veya lenfatik dolaşıma geçerek (invazyon) bulunduğu dokuda

ikincil bir tümör oluşturması veya vücudun başka bir bölgesinde tümör oluşturması, yani metastaz yapmasıdır (Franks ve Teich, 1996; Klug ve Cummings, 2002; Karp, 2005).

2.3.2. Kansere Neden Olan Etkenler

Çevremizdeki kimyasal ajanlar, radyasyon ve virüsler kanser etkenleridir. Karsinojen olarak bilinen tüm bu ajanlar hücredeki proteinler, lipitler ve en önemlisi hücrenin genetik materyali olan nükleik asitlerle etkileşmelidir. Tek bir ajan tümör oluşumunda etkili değildir. Başlatıcı (initiator) karsinojenler genetik değişikliklere sebep olur, daha sonra artırıcı (promoter) karsinojenler bu mutasyona uğramış hücrelerin çoğalmasını uyarır, başlatıcılar kendileri karsinojen değildir. Hücrelerin karsinojen maddeye başlatıcılardan önce maruz kalmış olması gerekir, ne kadar zaman önce olduğu önemli değildir. Kimyasal karsinojenler, alkilasyon ajanları, polisiklik ve heterosiklik hidrokarbonlar, aromatik aminlerdir. Çok sayıda DNA ve RNA virüslerinin canlılarda amiplerden primatlara kadar hayvan türlerinde ve viral orijinli insan kanserlerine yol açtığı bulunmuştur. Kansere yol açan virüsler değişik mekanizmalarla hücrelerde dönüşüme yol açarlar (Livolsi ve ark., 1992; Weisburger, 1994; Cotran ve ark., 1999; Clayson, 2001; Ruacan, 2003).

2.3.3. Kanserin Tedavisi

Kanser tedavisinde üç ana yaklaşım vardır: cerrahi, radyasyon ve kimyasal tedavi. Kimyasal tedavi sitotoksik ilaçlarla az sayıdaki türü için tercih edilen bir yöntemdir. Bu ilaçların etkinliği; kanserin tipine, hastanın biyolojik ve fizyolojik durumuna, büyümesi veya yayılıp yayılmadığına bağlıdır. Birçok tümörde cerrahi ve radyasyona yardımcı olarak kullanılır. Cerrahi öncesi tümörü küçültmek için (neoadjuvan tedavi), cerrahi ve radyasyon tedavisi sonrası kalan hücreleri yok etmek için (adjuvan tedavi) kullanılır (Bozkurt, 2000; Calabresi ve Chabner, 2001; Larner ve Grosh, 2005).

Kanserin kimyasal tedavisinde üç hedef vardır. Birincisi kesin tedavi; kullanılan ilaçlarla tümörün büyümesini engelleyecek ölümcül sitotoksik etki sağlamak

istenmektedir. İdeal olarak bu ilaçların sadece maliyn hücreleri etkilemesi amaçlanır. İkincisi, kontrol; eğer kanserin tamamen ortadan kaldırılması mümkün değilse, büyümesini durdurmak ve yayılmasını önlemek, hastanın normal hayatını sürdürmesi ve hayat kalitesini sağlamaktır. Üçüncüsü anlık tedavi; kanser son evrede ise kesin tedavisi ve yayılmasını engellemek mümkün olmayabilir. Böyle durumda, hastalığın belirtilerine yönelik tedavi ve hayat kalitesini artırmak hedeflenir (Bozkurt, 2000; Calabresi ve Chabner, 2001; Mycek, 2001).

2.3.4. Kanser ve Kemoterapi

Bu hastalığın tanımlanmasında en bilinen isim olan “kanser” ismi, eski Romalılar döneminde şu 3 özelliği ile tanımlanan bir grup hastalık için kullanılmıştır. Kanseri daha farklı ve özel olarak tanımlayan terimler de vardır; örneğin “tümör”, “neoplazm” ya da “onko” köküne sahip terimler gibi. Bu terimler dokudaki bir şişliği tanımlamak için kullanılırken, “karsinoma” terimi organ dokularını saran ya da çevrelerinde bulunan dokularda gelişen kanser türlerinin tanımlanması için kullanılır; örneğin: cilt, ağız mukozası ya da intestinal mukoza kanserleri gibi. Diğer kullanılan bir terim ise “sarkoma”dır, bu terim ise vücudun kemik, kas, yağ gibi bağ ve destek dokularında gelişen kanser türleri için kullanılır. Kanser vücudun her kısmında gelişebilir.

Kanser hastalığı, toplumda kardiyovasküler sistem hastalıklarının ardından gelen en önemli ölüm sebeplerindendir. 1850’lerde dünyada görülen kanser oranı % 0,5 iken, 1946’da % 11, 1970’te % 16 ve 1994 yılında yaklaşık % 20 olduğu kayıtlıdır. (Baloğlu, 2001). WHO’nun verilerine göre dünyada 2001 yılında 10 milyon yeni kanser olgusu, 6 milyon kanserden ölüm ve 22 milyon kanserli hasta rapor edilmiştir. 2002 yılında 10.9 milyon yeni kanser vakasının görüldüğü, 6.7 milyon hastanın kanser nedeniyle öldüğü ve 24.6 milyon kişinin kanserli olarak yaşamına devam etmekte olduğu bildirilmiştir. Kanser nedeniyle ölüm oranlarının her geçen yıl hızla artması nedeniyle, Günümüzde bu hastalığın kardiyovasküler hastalıkların önüne geçebileceği tahmin edilmektedir. İstatistiksel sonuçlar, şaşırtıcı olarak toplumun üçte birinin hayatlarında bir defa kanser hastalığı ile karşılaşacağını göstermektedir (Yıldırım, 2009).

Kanserin tedavisinde kullanılan kemoterapinin ana ilkesi; hastanın veya konakçının normal hücrelerine zarar vermeden mikrop veya tümör hücrelerinin büyümesini, çoğalmasını durdurmak veya yok etmektir. Kemoterapide asıl amaç; hastayı tedavi etmek, yaşam süresini ve hastalıksız dönemi uzatmak, semptomları engellemek veya kontrol altına almak ve böylece yaşam kalitesini yükseltmektir (Arslan ve ark., 2006).

2.3.5. Kanser Kemoterapisinde Doğal Ürünlerin Yeri

Kanser tedavisinde birçok yöntem kullanılmaktadır. Cerrahi, radyoterapi (ışın tedavisi), kemoterapi ve immünoterapi tedavide en çok kullanılan yöntemlerdir. Bu yöntemler içerisinde kemoterapi en yeni olanıdır. Tümör tedavisinde cerrahi yöntem 100 yılı aşkın bir süredir uygulanmaktadır, radyoterapi de yine yaklaşık 80 yıldır kullanılır. Sistematik kemoterapinin uygulanması ise 2. Dünya Savaşı sırasında 1940 yılında Faber'in çocuklarda görülen lösemiye karşı metotraksatı kullanması ile başlamıştır. Bundan sonra bu alanda, özellikle son 10 yıl içerisinde ilaçlar ve tedavi sırasında görülen yan etkilerin hafifletilmesi üzerine büyük gelişmeler kaydedilmiştir. Gerçekten de kemoterapi, kanserin yayılmasını önlemek açısından umut vericidir. Çünkü kemoterapötik ilaçlar, yeni hücre oluşturmak üzere bölünen hücrelere müdahale ederek etkisini gösterir. Bu ilaçlar kan dolaşımına girerek vücuda dağılır böylece kanserli hücreleri oluştukları bölgelerin yanı sıra yayıldıkları diğer dokularda da (metastaz) öldürür. Bu da vücudun sadece lokal bir bölgesinde uygulanabilen avantajlı bir tedavi yöntemi olmasını sağlar. Bu arada önemli olan diğer bir nokta da, kemoterapötik ajanların kanserli hücrelere zarar verirken aynı zamanda normal hücrelere de zarar vermesidir. Çünkü kanserli hücreler, büyüme ve çoğalma mekanizmalarının kontrolünü kaybetmiş olması gibi ancak çok ince bir farkla normal hücrelerden ayrılır. Diğer yandan biyolojik davranışları ve kimyasal yapıları hemen hemen aynıdır. Kemoterapötik ilaçlarla tedavi esnasında genellikle belirli periyotlarda tedaviye ara verilir. Bu bekleme döneminde normal hücreler kanserli hücrelerden daha çabuk kendini yeniler ve bu küçük farklılık, pratikte kemoterapinin güvenilirliğini sağlar. Günümüzde antikanser ilaçların yaklaşık %50'si doğal ürünler veya yapısal olarak doğal ürünlerden elde edilen kimyasallardan oluşmaktadır. Sadece Taxol, Bristol-Mayers Squibb Şirketi'ne yıllık yaklaşık 2 milyar dolar ciro sağlamaktadır. Günümüzde Taxol'dan 50 defa daha fazla aktivitesi olan yeni

doğal ürünler keşfedilmiştir (Mann, 2002; Özbek, 2006).

Diğer kanser terapisi metotları gibi, kanser kemoterapisi de kendi sınırlarını kendisi belirler. Bunun içerisinde, büyük tümörlerde tüm hücrelere yeterli harabiyet verememesi, ilaç rezistansının gelişmesi ve mide bulantısı, kusma, diyare, saç dökülmesi ve enfeksiyona duyarlılığın artması gibi yan etkileri yer alır. Bu yan etkilerin en önemli sebebi tedavi esnasında normal hücrelerin de zarar görmesidir (Yener, 2006).

Yeni ve daha etki antikanser ajanların bulunmasına yönelik çalışmalarda, doğal ürünler oldukça önemli, üretken bir yer edinmiştir. Gerçekten, dünya üzerinde yetişen bitkiler binlerce yıldır hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılmaktadır, buna rağmen birçok bitkinin etkileri tam olarak açıklanamamış ya da bilinmiyor durumdadır. Son bilgilere göre Amerika'da 87 kanser ilacı vardır ve bunların % 62'si ya tamamen doğal ya da doğal maddeler model alınarak yapılmıştır. 1989-1995 yılları arasında 300'den fazla yeni antikanser etkili olabilecek ilaç başvurusundan % 61'inin doğal kaynaklı olduğu saptanmıştır (Dobrossy, 2002).

Kanser çağımızın en ölümcül hastalığıdır. Antikanser ilaçlar olarak doğal ürünler önemli yer tutmaktadır. 1960-1982 tarihleri arasında Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü, 35000 bitki örneklerinden elde edilen 114000 ektrakte üzerinde kanser taraması gerçekleştirdi. Ayrıca aynı enstitü, 1987'de insan kanser hücrelerine karşı yeni bir doğal ürünler programı başlattı. 20 Ülkeden topladıkları 28800 bitki örneklerinin antikanser taramalarını gerçekleştirdiler. Bu çalışmaların sonucunda klinik olarak yararlı ve satışa uygun ilaçlar ortaya çıktı (Cragg ve ark., 1993). Cragg (1997) yaptığı araştırmada, Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü geçen 10 yıl içerisinde 87 antikanser ilaçlarını onaylandı ve bunun %62'si doğal kaynaklıdır veya doğal ürünler model alınmıştır. Bu ilaçlardan bazıları şekil.2.1'te verilmektedir.

Şekil 2.4. Kansere karşı kullanılan doğal ürünler

2.3.6. Oksidasyon ve Antioksidan Aktivite

Oksidasyon yani yükseltgenme, bir atom ya da molekülün bir alıcıya elektron vermesiyle gerçekleşir. Yükseltgenme potansiyeli karşısındakine göre yüksek olan madde yükseltgenirken diğeri indirgenir. Vücudumuzdaki ve besinlerdeki lipidler, proteinler, karbonhidratlar, nükleik asitler oksidasyona uğrayabilmekte ve canlı organizma için zararlı olabilecek oksidasyon ürünleri oluşturabilmektedir. Bilimde bu durum yaygın olarak “Oksidatif stres” şeklinde ifade edilmektedir (Papas, 1996). Oksidatif stres bazı kanser türleri ve koroner kalp hastalıkları (Gerber ve ark., 2002, Kris-Etherton ve ark., 2002; Serafini ve ark., 2002) gibi çeşitli kronik hastalıkların riskini arttırmanın yanı sıra, Parkinson gibi nörodejeneratif rahatsızlıklarla (Di Matteo ve Esposito, 2003) hücre ve deri yaşlanmasına da (Ames ve ark., 1993) neden olmaktadır.

Antioksidanlar, serbest radikallerin etkilerini yok edici sistemdir. Günümüzde antioksidanların gıda sanayinde kullanımı oldukça yaygın olup tükettiğimiz her ürüne antioksidan maddeler katılmaktadır. Bunlar gıdaları bozulmaya karşı korumakla birlikte daha uzun süreli saklanması sağlarlar. Bütillenmiş hidroksi tolueen (BHT) (Şekil 2.5.b)

ve bütillenmiş hidroksi anisol (BHA) (Şekil 2.5.a) bu amaçla kullanılan yaygın bileşiklerdir. Ancak yapılan çalışmalarda bunların toksik etkileri üzerine şüpheler bulunmaktadır (Sun ve Fukuhara, 1997). Bu nedenle son yıllarda yeni, daha güvenli ve ucuz antioksidan maddelerin bulunması için doğal ürünler üzerinde yaygın çalışmalar yapılmaktadır. Antioksidanlar vücutta çok kısa ömürlü fakat saldırgan olan serbest radikaller diye adlandırılan moleküllerle savaşırlar. Eğer serbest radikaller nötralize edilmezlerse vücutta ciddi hasarlara neden olabilirler.

Şekil 2.5. Sentetik ve doğal antioksidanlar a) 3-tertiyer bütıl-4-hidroksi anisol b) 3,5-tertiyer bütıl-4-hidroksitoluen) α -tokoferol (vitamin E) d) troloks

2.3.7. Antioksidan Aktivite Açısından Yapı-Aktivite İlişkisi

Fenolik bileşiklerin kimyasal yapıları antioksidan aktivitelerini etkiler. Bazı araştırmacılar tarafından bu maddelerin antioksidan aktivitelerini tahmin etmek için teorik bir metot olarak yapı-aktivite ilişkisi incelenmiş (Das ve ark., 1990; Ogata ve ark., 1997; Zhang, 1999). Polimerik polifenollerin basit monomerik fenoliklerden daha etkili antioksidanlar olduğu farklı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. Basit fenoller aracılığıyla peroksit radikallerinin giderilmesinde hidrolize edilebilen taninlerin daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu gösterilirken (Hagerman ve ark., 1998), bazı araştırmacılar da flavonollerin polimerizasyon derecesi yükseldikçe

süperoksit giderme aktivitesinin de arttığını belirlemişlerdir (Yamaguchi ve ark., 1999). Ayrıca antilipoperoksidan etkinin hem benzen halkasındaki metoksi ve hidroksil gruplarının sayısına ve pozisyonuna, hem de çift bağlardaki elektron delokalizasyonuna bağlı olduğu belirlenmiştir (McPhail ve ark., 1999). Farklı sebzelerden elde edilen flavonların şeker grupları ihtiva etmesinin flavonların antioksidan aktivitesini önemli derecede etkilediği gösterilmiştir (Plumb ve ark., 1999).

Antioksidan aktivite; yapılan ekstraksiyonlara göre değişim göstermektedir (Meyer ve ark., 1998). Ayrıca ekstraksiyon süresinin de antioksidan aktiviteyi etkilediği belirlenmiştir (Lapornik ve ark., 2005). Lipidler için antioksidan aktivite belirleme faktörleri moleküllerin lipofilik özelliklerine bağlıdır (Brand-Williams ve ark., 1995). Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesinin fenolik asitlere bağlı olduğu rapor edilmiştir. Antioksidan aktivite için antioksidanın diğer bileşiklerle etkileşimi önemli bir rol oynadığından, bir bileşiğin antioksidan potansiyeli antioksidan test sistemine, aynı test sistemi için çözücü polaritesine göre farklılıklar gösterebilmektedir (Pekkarinen ve ark., 1999). Bu sebepten bir bileşiğin antioksidan aktivitesi belirlenirken, bu bileşiğin bir yöntemde güçlü bir antioksidan, başka bir yöntemde ise prooksidant olduğu rapor edilmiştir (Von Gadov ve ark., 1997).

Antioksidan aktivite belirlenmesi lipid oksidasyonu boyunca antioksidanlar metal iyon bağlayıcı, radikal giderici ve peroksit bozucu olarak çeşitli şekillerde hareket ederler ve sinerjiye neden olmalarından dolayı sıklıkla birden fazla mekanizma içerirler. *In vitro* yöntemlerde etkili olan bir antioksidanın *in vivo* şartlarda da etkinliğinin belirlenmesinden önce biyogeçerlilik, absorpsiyon, metabolizma ve farmakokinetik gibi özelliklerinin dikkate alınması gereklidir. Bu nedenle antioksidan aktivite farklı mekanizmalar içeren farklı testlerle değerlendirilmelidir (Aruoma, 1997).

2.4. Çalışılan Taksonlara ait Literatür Araştırması

2.4.1. *Origanum majorana* L.

Literatürde *O. majorana* uçucu yağının ve çeşitli ekstraktlarının biyolojik aktiviteleri ile ilgili çalışmalar mevcuttur.

O. majorana uçucu yağının antioksidan aktivitesi olduğu gözlenmiştir (Schmidt ve ark., 2008). Ayrıca bu yağların potansiyel fumigant ve *Blattella germanica*'nın kontrolünde kullanılabileceği tanımlanmıştır (Jang ve ark., 2005).

O. majorana ve *O. vulgare* uçucu yağı *Spodoptera littoralis* larvalarına karşı fumigasyon ve topikal uygulama ile insektisidal etki göstermiştir (Pavela, 2005). *O. majorana* uçucu yağı *Ephestia kuehniella* zeller ve *Plondia interpunctella*'nın yumurtalarına karşı mortaliteye sahiptir (Yazici ve ark., 2009).

O. onites, *O. vulgare*, *O. minutiflorum* ve *O. majorana* uçucu yağlarının ve bileşenlerinin asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz inhibitör aktivitesi Elisa mikropate-okuyucu kullanılarak, spektrofotometrik Elman metoduyla belirlenmiştir. Hemen hemen tüm uçucu yağlar, her iki enzime de yüksek inhibitör etki göstermiştir. Ancak, bileşenler aynı oranda etki göstermemiştir (Orhan ve ark., 2008).

O. majorana uçucu yağının akut ve uzun dönem güvenlik çalışmaları fareler ve sıçanlar üzerinde gerçekleştirilmiştir. İlaç, tek doz olarak oral yoldan verilmiş, semptomlar ve mortalite 14 gün gözlemlenmiştir. Kronik toksisite, üretkenlik ve mutajenite çalışmaları değerlendirilmiştir. Farelerde LD50 1.203 g/kg ve sıçanlarda LD50 1.666 g/kg değerleri uçucu yağın iyi tolere edildiğini göstermiş, 40 mg/kg'a kadar tekrarlanan oral dozların fare ve sıçanlarda etkisiz olduğu gösterilmiştir. 2 ve 3 ay sonra glukoz, kolesterol, trigliserit ve total lipit değerlerinde azalma gözlenmiştir. Yüksek dozların hamile sıçanlarda teratojenik potansiyeli kanıtlanmamıştır. Test edilen hiçbir doz mutajenik etki göstermemiştir. Fertilitede azalma, teratojenik ve mutajenik veri bulunmaması *O. majorana* uçucu yağının geniş güvenlik sınırına sahip olduğunu doğrulamaktadır (El-Ashmawy ve ark., 2007).

O. majorana uçucu yağının değişik biyolojik metotlarla 5 Gram-pozitif bakteriye karşı etkili olduğu belirlenmiştir. Biyosidal aktivitesi, ölüm zamanı kaydedilerek çalışılmış, *Escherichia coli*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bacillus subtilis* ve *Saccharomyces*

cerevisiae 5 dakikadan az zamanda, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans* 2 saat ve daha az zamanda, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus lutea*, *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* 6 saatten daha uzun sürede cevap vermiştir (El-Nakeb ve ark., 2006).

O. majorana uçucu yağının, etanol toksisitesine uğramış erkek sıçanlar üzerindeki antioksidan etkisi incelenmiş, uçucu yağın oksidatif hasarın kontrolünde yararlı bir bitkisel tedavi olabileceği sonucuna varılmıştır (El-Ashmawy ve ark., 2007).

O. majorana bitkisinin çeşitli ekstraktlarıyla ilgili biyolojik aktivite çalışmalarına literatürde bulunmaktadır.

O. majorana metanol ekstraktının gastrointestinal hastalıklara neden olan *Helicobacter pylori*'ye karşı tedavi edici etkisi gösterilmiştir (Anonescu, ve ark., 1982).

O. majorana etanol ekstraktının antiülserojenik aktivitesi gastrik mukozalı sıçanlar üzerinde çalışılmış, 250 ve 500 mg/kg (vücut ağırlığı) dozlarda ülser, bazal gastrik sekresyonu ve asit çıkışı seviyesini azalttığı gözlenmiştir (Al-Howiriny ve ark., 2009).

O. majorana metanol ekstraktının antifungal aktivitesi çalışılmış, *Aspergillus niger*'in büyümesine karşı yüksek toksisite gösterdiği tayin edilmiştir (Leeja ve Thoppil, 2007).

O. majorana'nın metanol ekstraktının insektisidal aktivitesi çalışılmış, *Spodoptera littoralis* larvalarına karşı yüksek toksisite göstermiştir (Pavela, 2004).

Yapılan başka bir çalışmada ise *O. majorana* ekstraktı serbest radikal giderme aktivitesi göstermiştir (Abdel-Massih ve ark., 2010). Ayrıca *O. majorana* metanol ekstraktının yüksek radikal giderme aktivitesine sahip olduğu ve *O. vulgare* metanol ekstraktının yüksek antioksidan aktivitesi olduğu gözlenmiştir (Ndhlala ve ark., 2007).

Platelet hiperaktivitesi, damar duvarında platelet adhezyonuyla sonuçlanarak, trombozis ve kardiyovasküler hastalıklardaki artışın en önemli sorumlularından biridir. Yapılan bir çalışmada insan plateletleri hazırlanmış ve 50-200 µg/ml bitki yaprak tozuna eşdeğer test örnekleri 60 dakika inkübe edilmiştir. Plateletler daha sonra trombin (0.25 U/ml) ile aktive edilmiş ve laminin kaplı plaklara adhezyonu araştırılmıştır. *O. majorana*'nın metanol ekstraktının 200 µg/ml konsantrasyonda laminin kaplıkuyucuklara plateletlerin adhezyonunu %40 inhibe etmiştir. Ekstraktın, geleneksel tıpta, kardiyovasküler hastalıklar ve trombozisin tedavisinde kullanılabileceği kararlaştırılmıştır (Tognolini ve ark., 2006). *O. majorana* ekstraktının Jurkat lösemi hücre dizisi üzerinde apoptotik ve antiproliferatif aktivitesi çalışılmıştır. Hücre canlılığı, bitki ekstraktının konsantrasyonu

arttıkça azalmıştır. *O. majorana* ekstraktının anti-proliferatif etkisinin doza bağılı olarak arttığı gözlenmiştir (Abdel-Massih ve ark., 2010).

O. majorana bitkisinin çeşitli ekstraktının elde edilen bazı bileşiklerle ilgili biyolojik aktivite çalışmaları da literatürde bulunmaktadır.

Amiloid β protein ($A\beta$)'in neden olduğu nörotoksisite üzerinde *O. Majorana*'dan izole edilen ursolik asitin etkisi PC12 hücreleri kullanılarak araştırılmıştır. Ursolik asit ve vitamin E ile ön muamele, reaktif oksijen türlerinin toksisitesinden P12 hücrelerini korumaktadır. Bu antioksidan maddeler $A\beta$ 'in nörotoksik etkisini inhibe etmiştir (Heo ve ark., 2002).

O. majorana'dan elde edilen arbutinin sıçan hepatoloma hücreleri üzerinde güçlü sitotoksik etkisi olduğu gözlenmiştir (Assaf ve ark., 1987).

2.4.1. *Origanum syriacum* L.

O. syriacum var. *bevanii* uçucu yağı yüksek DPPH radikal giderme aktivite göstermiştir. Yapılan bu çalışma sonucunda, yiyecek endüstrisinde *O. syriacum* var. *bevanii*'nin doğal koruyucu madde olarak kullanılabileceği önerilmiştir (Sokmen ve ark., 2004).

Ayrıca, *O. syriacum* bitkisinin uçucu yağı bileşeni olan karvakrolün antikarsinojenik, antiproliferatif özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Karkabounas ve ark., 2006).

O. syriacum, *O. minutiflorum*, ve *O. onites*'in su ekstraktlarının antioksidan aktivitesi olduğu gözlenmiş ve bu etki polar fenolik bileşiklerin varlığına bağlanmıştır (Dorman ve ark., 2004).

O. syriacum metanol ekstraktının insan servikal adenokarsinoma Hela hücrelerine karşı sitotoksitesi tayin edilmiş ve 12 saat sonunda $20-400 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonları arasında IC_{50} değeri $474,92 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak bulmuşlar ve *O. syriacum* metanol ekstraktının aktiviteden sorumlu olan 11 adet flavon bileşiklerini izole etmişlerdir (El-Desouky ve ark., 2009).

O. syriacum etanol ekstraktının, insan meme adenokarsinoma (MCF) hücrelerine karşı antiproliferatif aktivitesine bakılmış ve 72 saat sonunda IC_{50} değeri $6,47 \mu\text{g mL}^{-1}$ tespit edilmiştir (Al-Kalaldeh ve ark., 2010).

Bazı bitkilerin Alzheimer, epilepsi gibi nörolojik hastalıklar ve depresyonda etkisi asetilkolinesteraz inhibisyonu, GABA(A)-benzodiazepin bölgesindeki afinitesi ve seratonin transporter testleriyle çalışılmış, *O. syriacum* etil asetat ekstraktının zayıf bir asetilkolinesteraz inhibisyonu göstermiştir (Salah ve Jager, 2005).

Origanum türlerinin antienflamatuvar aktivitesi iyi bilinmektedir, fakat sorumlu olan bileşenler tayin edilmemiştir. Yapılan bir çalışmada değişik *Origanum* türlerinden (*O. vulgare* subsp. *hirtum*, *O. vulgare* ve *O. syriacum*) elde edilen rosmarinik asit, oleanolik asit ve ursolik asidin antienflamatuvar aktiviteleri indometazin ile karşılaştırılmış ve her biri güçlü aktivite göstermiştir (Motamed ve ark., 2009).

O. syriacum üzerinde yapılan başka bir çalışmada, bileşenlerinden timokinonun antikanserojen etkisi olduğu gözlenmiştir (Lukas ve ark., 2009).

2.5. Bitkiler ve Sekonder Metabolitler

2.5.1. Sekonder Metabolitler

Bitkiler üzerinde yapılan araştırmalarda bitkilerin, ekosistemle olan ilişkisinde, çevresel koşullara uyumunda, savunma, korunma, hayatta kalma, nesillerini sürdürme gibi önemli olaylarda çeşitli avantajlar sağlayan, sekonder metabolit ürünleri adı verilen fenolik bileşikler tanımlanan içerdikleri saptanmıştır (Bourgau, 2001). Aromatik yapıya sahip bu fenolik bileşikler basit fenoller, fenolik asitler kumarinler, flavonoidler, stilbenler, taninler ve ligninlerdir. Bu bileşiklerin bazıları antimikrobiyal aktivite için, bazıları antioksidan ve bazıları koku, tat, renklilik oluşturmak gibi fonksiyonları üstlenirler (Bravo, 1998). Fenolik bileşiklerinin antioksidan etkileri, serbest radikalleri bağlamaları, metallerle şelat oluşturmaları ve bazı enzimleri inaktive etmeleriyle açıklanmaktadır (Tsao ve Yang, 2003).

Fenolik maddeler doğal antioksidanların en önemli gruplarını oluşturur. En yaygın bitkisel fenolik antioksidanlar flavonoidler ve fenolik asitlerdir. Bitki fenoliklerinin birçok araştırmacı tarafından hastalıklara direnç sağladığı belirtilmektedir. Fenolik asitlerin bir çeşit *Cephalosporium acremonium* mantar cinsinin in vitro ortamda gelişimine engel olduğu deneylerle gösterilmiştir. Literatürde fenolik asitlerin ve

flavonoidlerin bir grubunun antibiyotik, antifungal ve antiinflamatuvar olarak görev yaptığı ifade edilmektedir (Gordon, 2001).

Flavonoidler tüm bitki dokularında hücre içinde veya çeşitli bitkisel organların yüzeyinde bulunmaktadır (Moco ve ark., 2007). Flavonoidlerin en önemli biyolojik özelliği, antioksidatif etkiye sahip olmaları gösterilmektedir. Oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonunun, kalp damar hastalıkları, kanser ve kronik iltihaplanma gibi hastalıkların en önemli etkenleri olduğu, flavonoidlerin birçoğunun lipid peroksidasyonunu başlatan radikallerin ve lipid peroksi radikallerinin oluşumunu engellediği, flavonoidlerin bunların dışında metal iyonlarını bağlayarak lipidlerin oksidasyonunu önleyebildiği ve radikallerin oluşumunda görev yapan enzim sistemlerini inhibe edebildiği belirlenmiştir (Karakaya ve El, 1997). Flavonoidlerin doğrudan bağırsak mukozası üzerinde bir etkisi olabileceği ve oksidatif stres, kalp-damar hastalıkları ya da kansere karşı koruma sağladığı düşünülmektedir (Hollman ve Katan, 1999).

2.7.1.1. Flavonoidlerin Tanımı ve Sınıflandırılması

Flavonid kimyası ile ilgili çalışmalar çoğunluğunu doğal ürünlerin oluşturduğu kullanışlı fizyolojik özelliklere sahip yeni bileşiklerin araştırılmasıyla ortaya çıkmıştır. “Flavonoid” terimi genellikle 15 karbon atomu bulunan $C_6-C_3-C_6$ karbon iskeletini içeren geniş bir doğal ürün sınıfını veya özellikle fenilbenzopiran iskeletine sahip bileşikler tanımlama da kullanılır. Kimyasal bakımdan flavonoidler 2-fenilbenzopiran yapısı göstermektedirler (Şekil 2.12), (Mabry ve ark., 1970).

Şekil 2.6. Flavonoidlerin benzoil (A) ve sinnaoil (B) halkası

Flavon yapılarındaki aromatik halkalar **A** ve **B**, heterohalka ise **C** ile gösterilmektedir. **A** ve **C** halkalarındaki (benzopiran çekirdeğinde) karbon atomları oksijen atomundan başlayarak numaralandırılırken, **B** halkasındaki atomlar ise (') rakamlarla numaralandırılmaktadır.

Aromatik halkanın benzopiren (kroman) parçasına bağlanma pozisyonuna bağlı olarak flavonoidler 3 sınıfa ayrılırlar: Flavonoidler (2-fenilbenzopiren), izoflavonoidler (3-benzopiren) ve neoflavonoidler (4-benzopiren) (Marais et al., 2006).

Şekil 2.7. Flavonoidler (2-fenilbenzopiren) izoflavonoidler (3-benzopiren) ve neoflavonoidler (4-benzopiren)

2.7.1.2. Flavonoidlerin Doğada Bulunuşu ve Kullanım Alanları

Flavonoidler en yüksek yapıli bitkilerden basit yapıli mantarlara kadar hemen her bitki türünde yaygın olarak bulunan bileşiklerdir. Bakteri ve yosunların büyük bir kısmında bulunmazlar. Bu sebeple flavonoidler doğal olarak bulunan fenollerin en büyük gruplarından birini oluşturmaktadır. Ayrıca sahip oldukları biyolojik etkinliklerinden dolayı bitkilerin sekonder metabolitleri arasında en önemli bileşik sınıflarından birisini oluşturmaktadır (Guliyev ve Harmandar, 1999).

Flavonoidler, önceleri çiçeklerin sarı, kırmızı, turuncu, lacivert ve benzeri renklerinden sorumlu olan pigmentler olarak biliniyorlardı. Flavonoidlere genellikle bitkilerin çiçek, yaprak, gövde, kök, kabuk, dal, meyve gibi tüm organlarında rastlanmaktadır. Flavonoidler bitkilerde antioksidan, enzim inhibitörü ve aynı zamanda ışıktan koruma gibi bazı önemli özelliklere sahip (Harborne ve ark., 1975, Harborne ve Mabry, 1982)

oldukları gibi, bitkilerde enerjinin dönüşümüne ve büyüme hormonlarına da etki etmektedirler. Flavonoidler ayrıca solunumu ve fotosentezi düzenleme ve bulaşıcı hastalıklara karşı savunma fonksiyonlarına sahiptirler (Smith ve Banks, 1986). Flavonoidlerin bitkilerde azotun tutulmasını düzenleyen bakteriyel genlerin aktifleştirilmesinde yer aldıklarını gösteren araştırmalar, flavonoidlerle genler arasında belirgin bir ilişki olduğunu göstermektedir (Firmin ve ark., 1986). Son zamanlarda flavonoidlerin, endüstrinin çeşitli alanlarında kullanılmasıyla ilgili araştırmaların sayısı artmaktadır. Bu bileşiklerin antioksidan özellikleri, tabaklama maddelerinin (tanenlerin) bileşenine katılmalarından dolayı, besin, tekstil, deri, metalürji, tıp, ziraat gibi alanlarda kullanımı ve çeşitli ürün ve malzemeleri boyama yetenekleri, metaller ile tepkimede bulunma gibi özellikleriyle kullanılma olasılıkları artmaktadır. UV ışınlardan koruma özelliklerine sahip olmaları nedeni ile bazı flavonoidler kozmetik ürünlerde, özellikle kremlerde önemli katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Ayrıca flavonoidler metal iyonları ile reaksiyon verme kapasitesine sahip olduklarından analitik amaçla uranyum, zirkonyum, titan ve diğer metallerin tayininde kullanılabilmektedirler. Flavonoidlerin askorbik asitle beraber et ve et ürünlerinin proteolizini hızlandırdığı için et ve konserve endüstrisinde de kullanımı söz konusu olmaktadır.

2.7.1.3. Flavonoidlerin Tıbbi ve Biyolojik Özellikleri

Flavonoidler, bitkilerde özellikle çiçeklerdeki renklenmeyi sağlayan sekonder bileşiklerdir (Şener ve Toker, 1986). Çeşitli flavonoidlerin polar oksin taşınmasını negatif yönde etkilediği, ayrıca *Arabidopsis* polenlerinde yapılan çalışmalarda polen çimlenmesini artırıcı etkiye sahip oldukları kanıtlanmıştır. Bunlara ek olarak flavonoidlerin mikroorganizma ve böcek saldırılarına karşı koruyucu etkiye sahip olduğu da belirtilmiştir (Taylor ve Grotewold, 2005).

Flavonoidlerle ilgili ilk çalışma 1936 tarafından yapılmıştır (Çapanoğlu Güven ve ark 2010). Bu çalışmada flavonoidlerin biyolojik aktiviteleri sorgulanmıştır (Çapanoğlu Güven ve ark 2010). İlk zamanlarda bitkilerdeki renk, tat ve bitki fizyolojisindeki etkileriyle ortaya çıkan flavonoidler, son yıllarda özellikle sağlık üzerine olumlu etkilerinin ortaya çıkmasıyla önem kazanmıştır. Antioksidan ve serbest radikal

yakalama fonksiyonlarıyla, koroner kalp hastalıkları ve çeşitli kanser türlerinin engellenmesinde rol oynadığı birçok çalışmayla gösterilmiştir (Chen ve ark., 1996; Serafini ve ark., 2006). Flavonoidlerden flavon ve flavonoller (Vogel, 1971), ve flavanonların (Vogel, 1971) kılcal damarların tedavisinde etkili oldukları tespit edilmiştir. Flavonoidlerin kanın bileşenleri üzerine etkisi de açıklanmıştır. 3-metil flavonoidlerin kanın formülü elementlerine (bu elementler kan hücrelerinin agregasyon ve sedimentasyonunu önlerler) etki gösterdikleri de belirtilmiştir (Robbins, 1973). Flavonoidler kan damarlarına etkileri ile birlikte, zayıf kardiyotonik (kalp kuvvetlendirici) maddeler olarak da bilinirler. Bunlar kalp ritimlerinin kısılmasını sınırlama ve amplitüdünü artırma özelliği gösterirler. Başka bir araştırma sonuçlarına göre kersetin, rutin ve bazı flavonoller zayıf (hipodinamik) kalbi kuvvetlendirme, nabızı normalleştirme özelliğine sahiptirler (Jeney ve Uri, 1954). Bazı flavonoidlerin zayıf hipotansif etki gösterdikleri de açıklanmıştır.

Flavonoidler aglikon veya glikozitler şeklinde bulunmaktadır. Aglikonun farklı hidroksil gruplarına en az 8 ayrı monosakkarit veya bunların birleşmesi ile oluşan di-, tri-sakkaritlerin bağlanması sonucu glikozit formlar meydana gelmektedir (Erlund ve ark., 2006). Flavonoid glikozitleri bağırsağa girmeden önce şeker kısmından ayrılmakta, aglikonları ise hücre membranlarından serbestçe geçebilmektedir (De Pascual-Teresa ve ark., 2007; Viskupicva ve ark., 2008).

Flavonoidlerin pratik kullanım amacı ile incelenmeleri 1970'li yıllarda daha da hızlanmaya başlamıştır. Gerçekleştirilen geniş çaplı araştırmalar sonucu flavonoidlerin çok yönlü biyolojik ve farmakolojik aktivitelere sahip oldukları belirlenmiştir. Örneğin, bu tür bileşiklerin antioksidan özelliğe (Bors ve Saran, 1987), antimikrobiyal (Pratt ve Hudson, 1990), antiülserojenik, antiviral, hepatoprotektif, hipolidemik (Hikino ve Kiso, 1988; Wagner, 1989; Wagner ve ark., 1991) ve iltihaba karşı etkiye (Moroney ve ark., 1988) sahip oldukları açıklanmıştır. Bunlardan başka flavonoidlerin (Luteolin) antimutajenetik ve antikarsinojenik etkilere sahip oldukları *in vitro* ve *in vivo* şartlarda belirlenmiştir (Samy ve ark., 2006, Seelinger ve ark., 2008). Yapılan epidemiyolojik çalışmalarla yüksek oranda flavonoid içeren meyve ve sebze tüketimi ile daha düşük kanser riski arasındaki ilişki ortaya konmuştur. Flavonoidce zengin diyetle beslenen ve

sigara içen-içmeyen postmenopozal kadınlarda gıda sıklığı anketi yapılarak yürütölen bir çalışmada akciğer kanserine yakalanma riskinin flavonoid bazlı besinlerin tüketimi ile azaldığı ortaya konmuştur (Ben Sghaier ve ark., 2011). Proantosiyanidinler ve diğer flavonoidlerin pankreas kanseri ile ilişkisini anlatan bir çalışmada, her gün proantosiyanidince zengin meyve tüketimi yapan bireylerde, proantosiyanidinin pankreas kanserine yakalanma riskini %25 oranında düşürdüğü anlaşılmıştır (Rossi ve ark., 2012).

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada gerçekleştirilen, bitki örneklerinin ekstrakte edilmesi, test numunelerinin hazırlanması, fraksiyonlandırma, ayırma, saflaştırma, antioksidan aktivite testleri ve saflaştırılan bileşiklerin yapı karakterizasyonu Gaziosmanpaşa Üniversitesi Kimya Bölümü Bitki Araştırma Laboratuvarı'nda yapıldı. Antikanserojen aktivite testleri ise Çankırı Karatekin Üniversitesi Kimya Bölümü Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

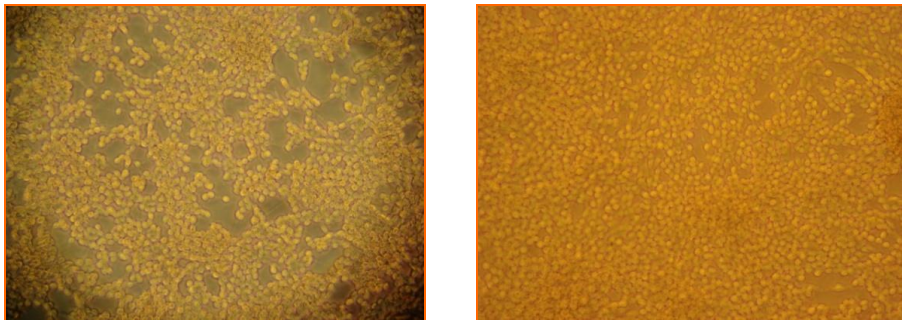
3.1. Bitkisel Materyal

Tez çalışması kapsamında belirlenmiş olan *Origanum majorana* ve *Origanum syriacum* türleri Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesinde Prof. Dr. İsa TELCİ tarafından yetiştirilerek 2013 yılı hasat döneminde toplandı. Bitki materyalleri baskısız kâğıtlar üzerinde rutubetsiz ve güneş almayan şartlarda kurutuldu.

3.2. Biyolojik Materyaller

3.2.1. Kanser Hücreleri

Antiproliferatif testlerde kullanılan HeLa (İnsan Rahim Kanseri Hücresi) ve C6 (Sıçan Beyin Tümör Hücresi) hücreleri, Çankırı Karatekin Üniversitesi Kimya Bölümü Hücre Kültürü Laboratuvarı'ndan temin edildi.



Şekil 3.1. HeLa ve C6 kanser hücreleri mikroskop görüntüleri

3.3. Kullanılan Kimyasallar ve Reaktifler

3.3.1. İzolasyon İşleminde Kullanılan Kimyasallar ve Reaktifler

Serik Sülfat Belirteci $(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich)

Kolon Dolgu Maddeleri:

Silika jel 60 (0,063-0,200 mm) (Merck).

Silika jel GF₂₅₄ (Merck).

Etanol (Merck), n-bütanol (Merck) ve kloroform, hekzan, etil asetat, metanol, metilen klorür gibi çözücüler teknik çözücüler literatürde belirtilen yöntemlere göre destile edildikten sonra NMR ve GC-MS yöntemleri ile saflıkları kontrol edilerek kullanıldı.

3.3.2. Antiproliferatif Aktivite Testleri İçin Kullanılan Kimyasallar

Tripsin EDTA (%25) (Sigma)

Penicilin streptomycin solüsyonu (Sigma)

DPBS (Dulbecco'nun fosfat tampon tuzu) (Sigma)

Fetal Bovine Serum (Heat inactivated) (Sigma)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium- High glucose (Sigma)

3.3.3. Antioksidan Özelliklerin Araştırılmasında Kullanılan Kimyasallar

2,2-Difenil 1-pikril hidrazil (DPPH),

Sodyum fosfat (NaH_2PO_4), (Sigma)

Sodyum hidroksit (NaOH), (Sigma)

Demir-II-klorür ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), (Sigma)

Potasyum ferrisiyanür [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$], (Sigma)

Demir-III-klorür (FeCl_3), (Sigma)

Sodyum karbonat (Na_2CO_3), (Sigma)

Folin-Ciocalteu Reaktifi (FCR), (Sigma)

Sodyum nitrit (NaNO_2), (Sigma)

Hidroklorik asit (HCl), (Sigma)

Sülfürik asit (H_2SO_4), (Sigma)
 α -Tokoferol (Sigma)
Troloks(Sigma)
Hidrojen peroksit (H_2O_2), (Merck)
Ferrozin, (Merck)
1,10-Fenantrolin, (Merck)
Triklorasetik asit (TCA), (Merck)
Alüminyum klorür (AlCl_3), (Merck)
Gallik asit, (Merck)
Kuersetin, (Merck)
Kafeik asit, (Merck)
Sodyum nitrat, (NaNO_3), (Merck)
Sodyum molibdat, (Na_2MoO_4), (Merck)
Amonyum molibdat, $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$, (Merck)
Bütillenmiş Hidroksi Anisol (BHA) (Merck)
Bütillenmiş Hidroksi Toluen (BHT) ise Merck'den temin edilmiştir.

3.4. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Dispenser	: (Isopenser)
Otomatik pipetler	: (Rainin)
Desikatör	
Değişik cam malzemeler	
Hazır İTK plakaları	:Silica gel 60 F ₂₅₄
^1H -NMR	:Bruker Avance III 400 MHz Spektrometre)
^{13}C -NMR	:Bruker 100 MHz Spektrometre)
UV-VIS Spektroskopisi	: HitachiU-2900
FT/IR	:Jasco 430 FT/IR Spektrometre
LC- TOF -MS	: (Agilent)
Döner buharlaştırıcı	:Heidolph
Vakum pompası	
İnkubator CO_2 Water-jacketed	:Nuaire US Autoflow

Steril kabin	:Esco class II type A2
Mikroskop	:Olympus CX21
UV lambası	:Camag
xCELLigance	:Roche
Saf su cihazı	:GFL 2004
Santrifüj	:Hettich Universal 320
Ultrasonik banyo	:Wise Clean WUC-D06H
Vorteks	:IKA MS3 Basic
Buzdolabı	:4 °C, Arçelik
Derin dondurucu	:-86 °C, Hettich/ Nuaire
Etüv	:Memmert 100-800
Hassas terazi	:Precisa/Denver
Isıtmalı su banyosu	:Wise Clean
Manyetik karıştırıcı	:IKA
Otoklav	:Hirayama
Erime Noktası	:(Elektrotermal 9100)

3.5. Kullanılan Kimyasal Çözeltiler ve Hazırlanması

3.5.1. İzolasyon İşleminde Kullanılan Çözeltiler

3.5.1.1. Serik Sülfat Belirteci

12 g amonyum seryum sülfat $(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich) 50 ml derişik sülfürik asit (H_2SO_4) ile çözüldü, hacmi saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.

3.5.2. Antioksidan Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

3.5.2.1. DPPH Giderme Aktivitesi Tayini İle İlgili Çözeltiler

- 0,1 mM'lık DPPH çözeltisinin hazırlanması: 4 mg DPPH 100 ml metanol içinde karıştırılarak tamamen çözüldü.

3.5.2.2. Metal Şelatlama Kapasitesi Tayini İle İlgili Çözeltiler

- 2 mM'lık FeCl_2 çözeltisinin hazırlanması: 0,0040 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ alınarak 10 ml metanolde tamamen çözülünceye kadar vortekslendi.
- 5 mM'lık ferrozin çözeltisinin hazırlanması: 0,0246 g ferrozin 10 ml metanolde tamamen çözülünceye kadar vortekslendi.

3.5.2.3. Toplam İndirgeme Kuvveti Tayini İle İlgili Çözeltiler

- %1'lik Potasyum ferrisiyanür $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ çözeltisinin hazırlanması: 1 g $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 100 ml destile suda çözünene kadar kuvvetli bir şekilde karıştırıldı
- 0,2 M'lık fosfat tamponunun hazırlanması (pH: 6,6): 2,4 g NaH_2PO_4 bir miktar destile suda çözülüp, pH metre kullanılarak pH'sı 6,6'ya ayarlandı ve toplam hacim destile suyla 100 ml'ye tamamlandı.
- %10'luk Triklorasetik asit (TCA) çözeltisinin hazırlanması: 10 g TCA destile suda çözülüp toplam hacmi 100 ml'ye destile suyla tamamlandı.
- %0,1'lik Demir klorür (FeCl_3) çözeltisinin hazırlanması: 165 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ destile suda çözüldü ve toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı.

3.5.2.4. Toplam Fenol İçeriği Tayini İle İlgili Çözeltiler

- %2'lik sodyum karbonat çözeltisi: 0,5 g Na_2CO_3 bir miktar destile suda çözülüp toplam hacim destile suyla 25 ml'ye tamamlandı.
- Folin-Ciocalteu Reaktifi (FCR), ticari olarak satın alındığı şekilde kullanıldı.

3.5.2.5. ABTS Radikali Giderme Aktivitesi Tayini ile İlgili Çözeltiler

- 0,1 M'lık fosfat tamponunun hazırlanması (pH: 7,4): 2,84 g Na_2HPO_4 180 ml destilesuda çözüldü. pH metre kullanılarak pH'sı 6,6'ya ayarlandı. Toplam hacim destilesu ile 200 ml'ye tamamlandı.
- 2 mM'lık ABTS çözeltisinin hazırlanması: 11 mg ABTS 0,1 M'lık ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponunda tamamen çözününceye kadar bir gece boyunca

karıştırıldı. Toplam hacim destile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

- 2,45 mM'lık potasyum persülfat çözeltisinin hazırlanması: 66,25 mg $K_2O_8S_2$ 0,1M'lık ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponunda tamamen çözününceye kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Toplam hacim destile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3 5.4. Antiproliferatif Aktivite Testlerinde Kullanılan Materyallerin Hazırlanması

3.5.4.1. HeLa ve C6 Hücrelerinin Hücre Kültürü

Tüm işlemler steril kabinde gerçekleştirildi. Steril kaplarda bulunan hücrelerin besiyeri uzaklaştırılarak, hücreler trypsin-EDTA (10 mL) ile 1-2 dakika inkübe edildi (veya CO_2 inkübatöründe, $37^\circ C$). Böylece yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden sökülmesi sağlandı. İnkübatörden çıkarılan kap içerisine besi yeri DMEM- (10 mL) eklenerek ortam nötralize edildi ve kap çalkalanarak hücre süspansiyonu falkon tüpüne aktarıldı, (600 RPM, 5 dk.) santrifüj edilerek hücrelerin çökeltilmesi sağlandı. Hücre çökeltisi DMEM + besi yeri (1-3 mL) ile bir pipet yardımı ile süspansiyon haline getirildi. Diğer taraftan steril 250 mL'lik kaplara 20 mL DMEM besi yerinden konuldu. Bu kaplara süspansiyon edilen hücrelerden 1 ml konuldu ve kaplar kapakları yarı açık halde inkübatöre yerleştirildi. Bu işlem (split) 4 günde bir tekrarlandı.

3.5.4.2. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Hücre pelletinden %10 DMSO-DMEM karışımı ile hazırlanan hücre süspansiyonu 1 ml (yaklaşık 1×10^6 hücre/ml) steril 2 ml cryoviallere alınarak, tüpler doğrudan sıvı azot içinde veya 1 gün $-80^\circ C$ de bırakıldıktan sonra sıvı azot içinde muhafaza edildi.

3.5.4.3. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High Glucose) Çözeltisinin Hazırlanması

1000 ml'lik bir behere deiyonize su (700-800 ml) konuldu, beher içine manyetik balık atılarak manyetik karıştırıcıya alındı, üzerine DMEM (1L için bir şişe) ilavesi yapıldı.

Oluşan karışım üzerine NaHCO_3 (2,2 g) ilave edildi ve pH metre ile HCl çözeltisi kullanılarak pH 7,2 ayarlandı. Toplam hacim 1L'ye tamamlandı. Bu çözelti steril kabine alınıp ve 0,22 mikronluk steril filtrelerden vakum altında steril şişelere süzülerek +4 °C'de muhafaza edildi.

3.5.4.4. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High Glucose) Katkılı Çözeltisinin Hazırlanması

500 ml'lik steril şişede bulunan DMEM çözeltisinden 60 ml alınıp ve bu şişeye 50 ml fetal Bovine Serum (FBS), 10 ml Penstrep ilave edildi. Tüm işlemler steril kabinde, steril malzemeler kullanılarak gerçekleştirildi ve + 4 °C'de saklandı.

3.5.4.5. Tripsin EDTA Çözeltisi

Oda sıcaklığında veya 37 °C'de çözünen Tripsin EDTA çözeltisi steril kabinde 10 ml hacimli steril tüplere alınarak -20 °C'de muhafaza edildi.

3.5.4.6. Penicilin Streptomycin Çözeltisi

Oda sıcaklığında veya 37 °C'de çözünen Penicilin Streptomycin çözeltisi steril kabinde 10 ml hacimli steril tüplere alınarak -20 °C'de tutuldu.

3.5.4.7. DPBS (Dulbecco's Phosphate Saline) Tampon Çözeltisinin Hazırlanması

1000 ml'lik bir behere deiyonize su (700-800 ml) konulup, beher içine manyetik balık atılarak manyetik karıştırıcıya alındı, üzerine DPBS (1L için bir şişe) ilavesi yapıldı. Herhangi bir ısıtma işlemi yapmaksızın çözünmesi sağlandı. 1 N HCl veya 1N NaOH kullanılarak pH 7,2'ye ayarlandıktan sonra, toplam hacim 1L'ye tamamlandı. Hazırlanan bu çözelti steril kabine alındı ve 0,22 mikronluk steril filtrelerden vakum altında steril şişelere süzülerek +4 °C'de muhafaza edildi.

3.5.4.8. Örneklerin Hazırlanması

Örneklerin DMSO'daki çözeltileri (20 mg/mL) hazırlanıp ve 1:3 oranında DPBS ile seyreltildi (5 mg/mL). Oluşan yeni çözeltiler 0.22 mikronluk steril filtreler kullanılarak steril falcon (15 ml) tüplerine süzüldü ve -20 °C'de muhafaza edildi.

3.6. Biyolojik Aktivite Testleri

3.6.1. Antioksidan Aktivite Testleri

3.6.1.1. Toplam Fenolik Madde Tayini

Total fenolik tayini Folin Ciocalteu reaktifi kullanılarak tayin edilmiştir. Yöntem, suda ve organik çözücülerde çözülmüş olan fenolik bileşiklerin folin reaktifleri ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan mor–menekşe renkli kompleks 760 nm'de maksimum absorbands oluşturur (Slinkart ve Singleton, 1977). Ekstraktlar içindeki toplam fenol miktarları, 250 µg/mL konsantrasyonda olacak şekilde destile suyla seyreltilmiş 200 µl (mg/mL) bitki ekstresi ve 200 µl Folin-Ciocalteu reaktifi 5 dakika süreyle karıştırıldı. %2'lik sodyum karbonat çözeltisinden 200 µl eklendikten sonra tüpler vortekste 1 dakika karıştırılarak bu karışımın üzerine 1,4 ml destile su ilave edildi. Daha sonra tüpler tekrar vortekslenerek 25 °C'de karanlıkta 90 dakika bekletildikten sonra UV spektrofotometrede 760 nm'de, destile sudan oluşan kör numuneye karşı absorbands ölçümü yapıldı.

3.6.1.2. Serbest Radikal Giderme Aktivitesi (DPPH Testi)

Bitki ekstratlarının ve izole edilen moleküllerin DPPH serbest radikalini süpürücü etkileri 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil stabil radikalinin menekşe/mor rengini giderme yetenekleri ile ölçülmektedir. Bu maddelerin DPPH ile oluşturdukları rengin 517 nm'de ölçümüne ve standart madde ile karşılaştırılmasına dayanmaktadır (Blois, 1958). Metot, ekstraktların bir proton veya elektron verebilme yeteneğinin, mor renkli DPPH çözeltisinin rengini açması esasına dayanır. Reaksiyon karışımının absorbandsının

düşmesi yüksek serbest radikal giderme aktivitesinin göstergesidir. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH·) radikalın etkinliğinin giderilmesi çalışmaları çeşitli araştırmacıların ortaya koydukları metodu takiben yapılmıştır (Hatano ve ark., 1988). Bu metoda göre, 0,1-0,5 mg/mL'lik konsantrasyona sahip olan 1 ml'lik örnekler ve standartların çözeltileri, 0,1 mM'lık DPPH çözeltisinin 1 ml'si ile vorteks yardımıyla 30 saniye karıştırıldıktan sonra karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 60 dakika bekletildi. Ardından 517 nm'de kör numuneye karşı spektrofotometrik ölçüm alındı. Kontrol olarak DPPH çözeltisi kullanılırken, kör olarak sadece metanol kullanıldı.

3.6.1.3. İndirgeme Gücü Aktivitesi

Bitki ekstraktların ve izole edilen moleküllerin indirgeme kapasitesi Oyaizu metoduna göre tayin edildi (Oyaizu, 1986). Ortamdaki indirgen madde Fe^{3+} iyonlarını Fe^{2+} iyonlarına indirger ve $FeCl_3$ ilavesiyle oluşan Prusya mavisi rengindeki kompleksin absorbansı ölçülür. Yüksek absorbans değeri yüksek indirgeme kapasitesinin göstergesidir. Bu metoda göre, her bir ekstrakt için 50, 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlara sahip örnek ve standartların 1 ml'si, 1 ml 0,2 M fosfat tamponu (pH= 6.6) ile karıştırıldı. Daha sonra 1 ml %1'lik potasyum ferrisiyanür [$K_3Fe(CN)_6$] eklenerek 50 °C'de 20 dk inkübasyona bırakıldı. Bu aşamadan sonra reaksiyon karışımı oda sıcaklığına getirilip üzerine 1 ml %10'luk trikloroasetik asit eklenerek 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Bu çözeltinin üst kısmından 1 ml alınarak 1 ml destile su ve 200 µl %0,1'lik $FeCl_3$ eklendikten sonra 700 nm'de absorbans değerleri ölçüldü.

3.6.1.4. ABTS $^{\cdot+}$ Radikali Giderme Aktivitesi

ABTS $^{\cdot+}$ (2,2'-azinobis(3-etilbenzothiazolin-6-sülfonat) radikali giderme aktivitesi Re ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre belirlendi. ABTS $^{\cdot+}$ radikali oluşturulması, ABTS $^{\cdot+}$ 'nin potasyum persülfat ($K_2S_2O_8$) oksidasyonu ile direkt üretilir. Bu işlem için 2 mM'lık ABTS $^{\cdot+}$ çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiye 2,45 mM'lık potasyum persülfat çözeltisi eklenerek ABTS $^{\cdot+}$ radikali elde edildi. Elde edilen çözelti kullanılmadan önce 734 nm'de absorbansı 0,1 M ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponu ile 0,700±0,025 nm'ye

ayarlandı. Farklı konsantrasyonlardaki (100-400 µg/ml) ekstralarının stok çözeltisine (100µl) ABTS^{•+} radikali çözeltisi (2,4 ml) ilave edildikten sonra 8 dakika inkübe edildi ve 734 nm’de absorbansları kaydedildi (Re ve ark.,1999).

3.6.3. Antiproliferatif Aktivite Testleri

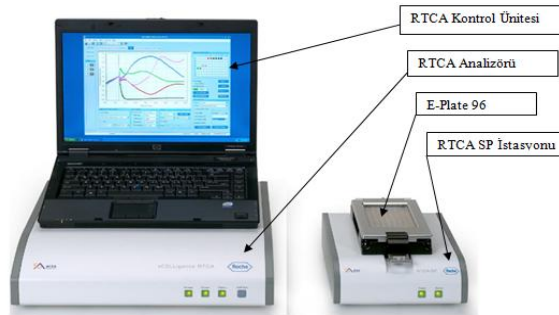
Ekstraktının, kolon fraksiyonlarının ve saf bileşiklerin antiproliferatif özellikleri xCELLigence cihazı ile E-Plate 96 plakalarında impedans ölçüm tekniği kullanılarak analiz edildi. Bunun için bir steril kabin içinde E-Plate 96 kuyucuklarına ilk olarak 50 µL besi yeri (Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium-high glucose + % 5 Fetal Bovine Serum + %1 Penicilin-Streptomisin) koyularak arka plan (background) okuması yapıldı. Daha sonra kuyucuklara 10000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 50 µL kanserli hücre (HeLa veya C6) süspansiyonu eklendi ve E-Plate 96 bir CO₂ inkübatöründe (%5 CO₂, 37 °C) bulunan xCELLigence SP Analiz İstasyonuna yerleştirilerek hücrelerin plaka yüzeyinde tutunarak büyüme eğilimi göstermeleri beklendi. Yaklaşık 24 saat sonra E-Plate 96 analiz istasyonundan çıkarılarak steril kabin içinde kuyucuklardaki son derişimleri ekstre ve fraksiyonlar için 250 mM ve 500 mM saf bileşikler için 10, 50 ve 100 mM olacak şekilde hazırlanan çözelti ve standart kuyucuğuna ise 5-florourasil eklendi. Bunlara ek olarak hücrelerin normal davranışlarını gözlemek için kontrol kuyucukları sadece besi yeri ortamında kanserli hücreler eklendi. Son durumda kuyucuklardaki toplam hacim 200 µL olacak şekilde eklemeler gerçekleştirilmiştir. Bundan sonra E-Plate 96 analiz istasyonuna yerleştirilerek hücrelerin davranışları yaklaşık 48 saat boyunca gerçek zamanlı olarak izlendi.

3.6.3.1. xCELLigence RTCA (Gerçek Zamanlı Hücre Analizörü) SP (Tek Plak) Cihazı

Biyolojik amaçlar için tasarlanmış, mikro-elektronik sensör teknolojisinin kullanıldığı çeşitli hücre bazlı testlerde hücre durumunu işaretleyici, gerçek zamanlı, otomatik izleme özelliği olan bir cihazdır. Günümüzde biyolojik testlerin çoğunluğu optik saymaya dayanmaktadır, RTCA SP cihazı ise biyolojik test süreçlerinin elektronik olarak saptanması, dolayısıyla molekül ve hücre biyolojisinin mikroelettronikle birleştirilmesi esasına dayanır. Hücrenin ya da molekülün bazı özelliklere sahip olup,

olmaması veya sahip olduğu özelliklerdeki değişiklikler elektron ve iyonların sensör yüzeylerindeki geçişlerini etkilemektedir. Sensör yüzeylerinin elektronik özelliklerin ölçülmesi sensörlerin üzerinde bulunan hücrelerin biyolojik durumu hakkında önemli bilgi vermektedir. Hücrelerde meydana gelen biyolojik değişmelere bağlı olarak, RTCA SP cihazı hücrelerle temas halinde olan sensörün elektronik özelliklerindeki değişimi otomatik olarak ölçer. Biyolojik deneylerde RTCA SP cihazı klasik cihazlara oranla başlıca avantajlara sahiptir: İşaretleyici olmadan sonuç saptama, gerçek zamanlı izleme, otomatik ölçüm, kontrolü kolay, daha doğru bilgi içeriği, yüksek doğruluk ve hassasiyet ve geniş çaplı uygulama seçeneğine sahip olmasıdır.

RTCA SP cihazının merkezi 96-kuyucuklu plakların (E-Plate 96) alt kısmına yerleştirilmiş mikroelettronik hücre sensörü dizisidir. Bu sensör elektrotlarının elektronik direnç ölçülmesi elektrotlar üzerindeki hücrelerde değişikliklerin saptanması ve izlenmesini sağlarlar. Eğer elektrotta hücre varsa, elektrot yüzeyine bağlı olan hücreler izolator olarak davranıp ortamın direncinin artışına neden olur. Bu yüzden elektrot üzerinde ne kadar hücre varsa elektrottaki direnç değişimi o kadar fazla olacaktır. Hücre durumunun göreceli durumunu belirtmesi açısından hücre indeksi (CI) parametresi türetilmiştir. Ortamda hücre olmadığı zaman sensörün elektronik özelliği etkilenmeyecektir. Elektrotlar üzerinde daha fazla hücre bulunduğunda direnç daha büyük olacaktır. Hücreler olmadığında veya elektrotlar üzerine iyi bağlanmadığı zaman CI değeri yaklaşık olarak sıfırdır. Aynı fizyolojik koşullarda elektrot üzerinde fazla hücre bağlı ise CI değeri daha yüksektir. Bu durumda CI, bir kuyucuk içinde hücre sayısı kantitatif olarak hesaplanabilir. RTCA SP cihazı şu bileşenlerden oluşur:

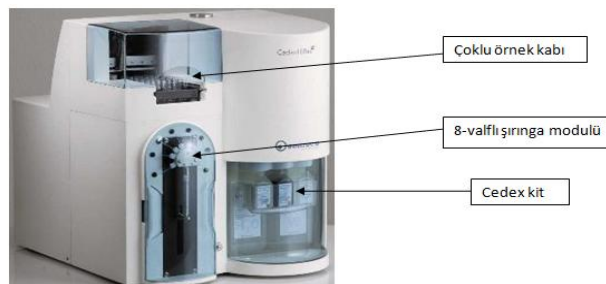


Şekil 3.2. xCELLigence RTCA SP cihazı ve temel bileşenleri (Katalogtan alınmıştır)

Hücreler, E-Plate 96'ın kuyucuklarına eklenir, sensör-elektrodun yüzeylerine temas eder ve bağlanır. Sensör yüzeylerinin elektronik özellikleri bir doku kültürü inkübatörünün içine yerleştirilen RTCA SP istasyonu ve RTCA analizörü aracılığıyla izlenir. Hücre canlılığı, morfolojisi ve sitotoksitesi gibi hücrenin biyolojik durumu hakkında eş zamanlı kantitatif bilgiler kontrol ünitesindeki RTCA yazılımının kontrolü ile belirlenmektedir.

3.6.3.2. Cedex HiRes Analyzer (Hücre Sayım Cihazı)

Cedex HiRes analizörü otomatik olarak hücre konsantrasyonunu ve süspansiyonunun elverişliliğini tanımlamaktadır. Analiz, hücre süspansiyonunun trypan blue göç metodu ile boyanması ve analiz edilmesi esasına dayanır. Elde edilen veriler, ekim işleminin değerlendirilmesinin yanında, hücre kültürünün spesifik büyüme oranı ve hücrenin çoğalması gibi hücre kültürünün durumunun ayrıntılı değerlendirilmesine izin verir. Hücrelerin ölü ya da canlı olarak teşhisi ve ayrımı çok tutarlı ve kesin sonuçlar sunan standardize durumlar altında yapılmaktadır. Total hücre, canlı hücre, ortalama alan ve total hücre yüzdesi aynı zamanda belirlenmektedir. Cell diameter histogramı canlı hücrelerin metrekaresindeki dağılımını göstermektedir. Belirli hacimde trypan blue hücre süspansiyonu içeren örnek kabına şırınga vasıtasıyla ilave edilmektedir. Kontrollü pompa hareketiyle hücre süspansiyonu ve boya sabit şekilde karıştırılmaktadır ve daha sonra her ölçüm zamanında yine inkübe edilmelidir. İnkübasyon periyodundan sonra şırıngadaki boyalı hücre süspansiyonu, kapiler tüp vasıtasıyla şekil tarayıcısı olan duyarlı akış bölmesine taşınmaktadır. Taralı flow chamber şekli değerlendirme işlemi için küçük şekillere parçalanmaktadır. Trypan blue metodu ile canlı olmayan boyanır ve ölü hücreler analizörde koyu şekilde boyalı görülecektir.



Şekil 3.3. Cedex HiRes analizörü (Cihazın katalogundan alınmıştır).

3.7. Kullanılan Saflaştırma Metotları

3.7.1. Ekstraksiyon İşlemleri

3.7.1.1. Biyolojik Aktivite Testleri İçin Ekstraksiyon Yöntemi

Çalışılan bitkilerle detaylı bir kantitatif, fitokimyasal ve biyolojik aktivite testleri yapmak amacı ile iki bitki farklı çözücü sistemleri ile ayrı ayrı ekstre elde edildi. Bu amaca yönelik bitkiler ekstraksiyon işleminden önce laboratuvar tipi değirmende öğütülerek 200µ'luk eleklerden geçirildi. Her bitki örneğinden (2 g) her bir çözücü sistemi için ayrı ayrı alındı 48 saatlik periyotlarda farklı çözücü sistemleri (3 × 200 ml) ile laboratuvar koşullarında ekstrakte edildi. Her bitki ekstraktı için kodlama yapıldı. Kodlamalar her bitkinin isminin baş harfleri ve ekstrakte edildiği çözücü sisteminin baş harfi ile yapıldı. Bitki isimleri ve kodlamaları alfabetik sıraya göre; OS, OM şeklinde kodlandı. Ekstraksiyon işlemi için kullanılan çözücü sistemleri kodlama şekli ise, apolardan polara doğru Hekzan (H), Etilasetat (E) şeklindedir.

3.7.1.2. İzolasyon İşlemleri İçin Ekstraksiyon Yöntemi

Kurutulmuş ve küçük parçalara ayrılmış OM bitkisinden alınarak metanol: kloroform (3:1) karışımında, 3 gün aralıklarla ekstraksiyona bırakıldı. Çözücüler döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı. Elde edilen bitki ekstraktı sıcak suda çözülerek apolardan polara doğru artan çözücü sistemi ile hekzan, etil asetat, kullanılarak ekstrakte edildi ve çözücüler döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı. OS bitkisi için ise apolardan polara doğru artan çözücü sistemi ile hekzan, etil asetat, metanol, su ve sudan etil asetat ile ekstraksiyon yapıldı ve çözücüler döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı.

3.7.2. Fraksiyonlandırma işlemi

Hedef fraksiyonun belirlenmesi için bitkinin etkili kısmı ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu. Ayırma hunusine alınan ham bitki ekstraktları veya vakum-sıvı kromatografisinden alınmış olan fraksiyonlar apolardan polara doğru artan çözücü

sistemi kullanılarak fraksiyonlandırıldı. (OM bitkisi için hekzan, etil asetat ve OS bitkisi için sırasıyla hekzan, etil asetat, metanol). Her bir fraksiyon ayrı ayrı toplandı ve çözücüleri döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı.

3.7.3. Vakum Kromatografisi

Vakum kromatografisi, genel anlamda kaba bir süzme işlemidir. Bitkiden elde edilen ham ekstraktlar silikajele emdirildi. Kolonda dolgu maddesi olarak düşük tanecik boyutlu silikajel kullanıldı. Düşük polariteli çözücü sistemlerinden başlanarak yüksek polariteli çözücü sistemleri ile süzme işlemi vakum altında yapıldı. Her bir fraksiyon ayrı ayrı toplanarak deriştirildi. Böylece ham bitki ekstraktından kaba bir ayırım sağlanmış oldu. Kullanılan mobil fazın hacmi ve polaritesi ayrılmak istenen madde karışımına göre ayarlandı. Vakum kromatografisi, ham bitki ekstraktının fraksiyonlandırılmasında kullanıldı.

3.7.4. Kolon Kromatografisi

Kolon kromatografi uygulamaları için farklı ebatlarda ve özellikte kolonlardan faydalınılmıştır. Kolon kromatografisi cam kolonlarda dolgu maddesini kuru yükleme/bulamaç yaparak gerçekleştirildi. Ekstrakt uygun bir çözücü de çözülmüştür ve ardından içine bir miktar silika jel eklendi. Ekstraktın içindeki çözücü döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılarak ekstrenin silika jel tarafından emilmesi sağlandı. Silikajel ve ekstrenin içinden çözücünün tamamen uzaklaştırılabilmesi için oda sıcaklığında 1 gece bekletildi. Kolona ilk olarak silika jel dolduruldu ve bir hortum yardımıyla kolon çeperlerine yavaş yavaş vurularak silika jelin kolon içine iyice oturması sağlandı. Silikajelin kolon içindeki üst tabakası düzleştirildikten sonra toz silika jel ve ekstre karışımı kolona dolduruldu. Ekstre-silika jel karışımından oluşan tabakanın üst yüzeyi düzleştirilmiş ve bu tabakanın üzerine pamuk dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Kolon kromatografisinde ayırımı yapılacak karışımlar önce ince tabaka kromatografisi ile incelendi. Buradan elde edilen sonuçlar doğrultusunda uygun çözücüler; sabit mobil faz veya gradient elüsyon yöntemleri ile kolon kromatografisinde kullanıldı.

3.7.5. İnce Tabaka Kromatografisi

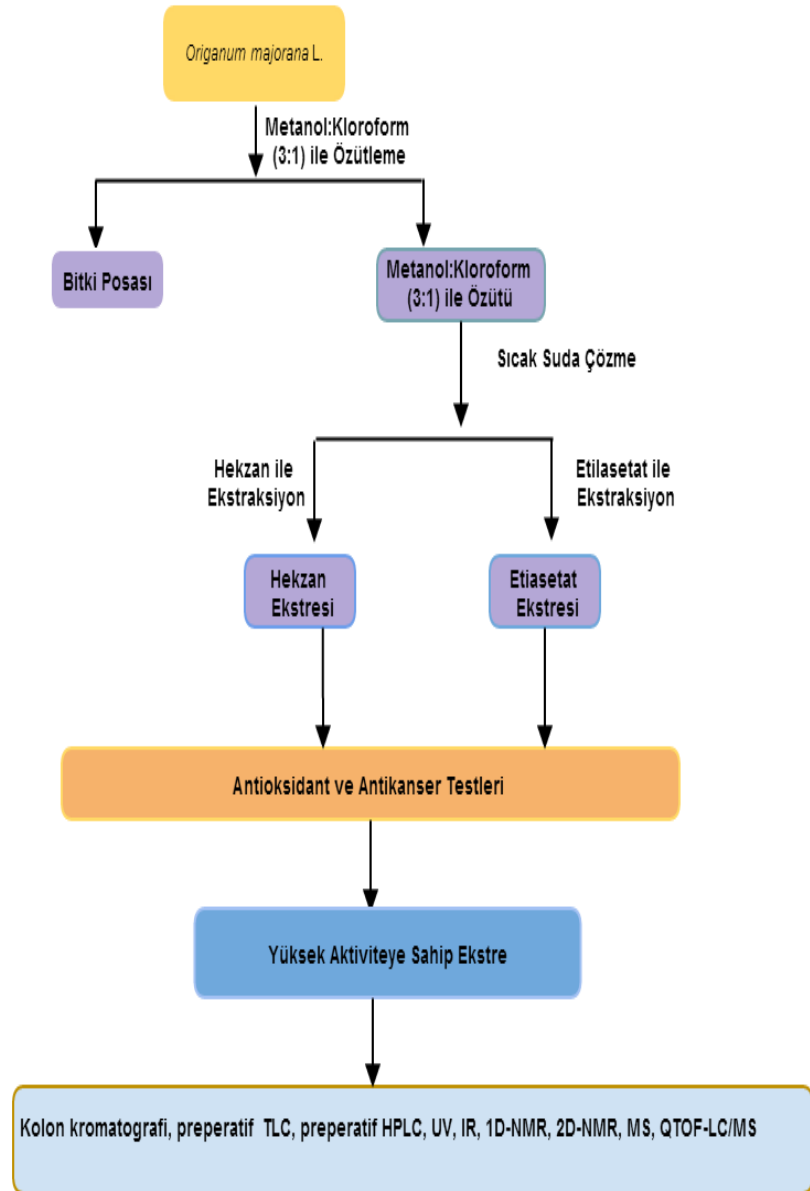
Herhangi bir karışım içindeki bileşenlerin kalitatif analizinin yapılmasını sağlayan kromatografi çeşididir. Alüminyum plakalar üzerine silikajel ya da alimüna partikülleri yerleştirilmiş tabaklar ticari olarak mevcuttur. Uygun aparatlarla destek fazı cam plakalar üzerine çekilerek preparatif olarak da kullanılabilir. Numune uygulaması kapiler bir tüp kullanılarak yapıldı. Uygulanan numune spotları kuruduktan sonra plaka az miktar mobil faz içeren cam bir tank içine alındı. Mobil faz plakanın üzerine yukarıya doğru tırmandı. Uygulama sonrası madde spotları UV (254 ve 366 nm) ışığı altında kontrol edildi. UV ışığı altında görünmeyen bileşenler iyot, seriksülfat gibi reaktiflerle görünür hale getirildikten sonra değerlendirme yapıldı. R_f değerleri aynı olan maddeler aynı maddeler olarak değerlendirildi. Bu çalışmada İTK uygulamaları kolon kromatografi ile toplanan fraksiyonlardan aynı olanlarını birleştirmek için kullanıldı. Spotların görünür hale getirilmesi işlemi seriksülfat çözeltisi ile yapıldı.

4. BULGULAR

Bu alısmada gerçekleştirilen, bitki örneklerinin ekstrekte edilmesi, test numunelerinin hazırlanması, fraksiyonlandırma, ayırma, saflaştırma yapı tayini işlemleri ve antioksidan aktivite testleri Gaziosmanpaşa Üniversitesi Kimya Bölümü Bitki Araştırma Laboratuvarı'nda yapıldı. Anti kanserojen aktivite testleri ise ankırı Karatekin Üniversitesi Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda yapıldı.

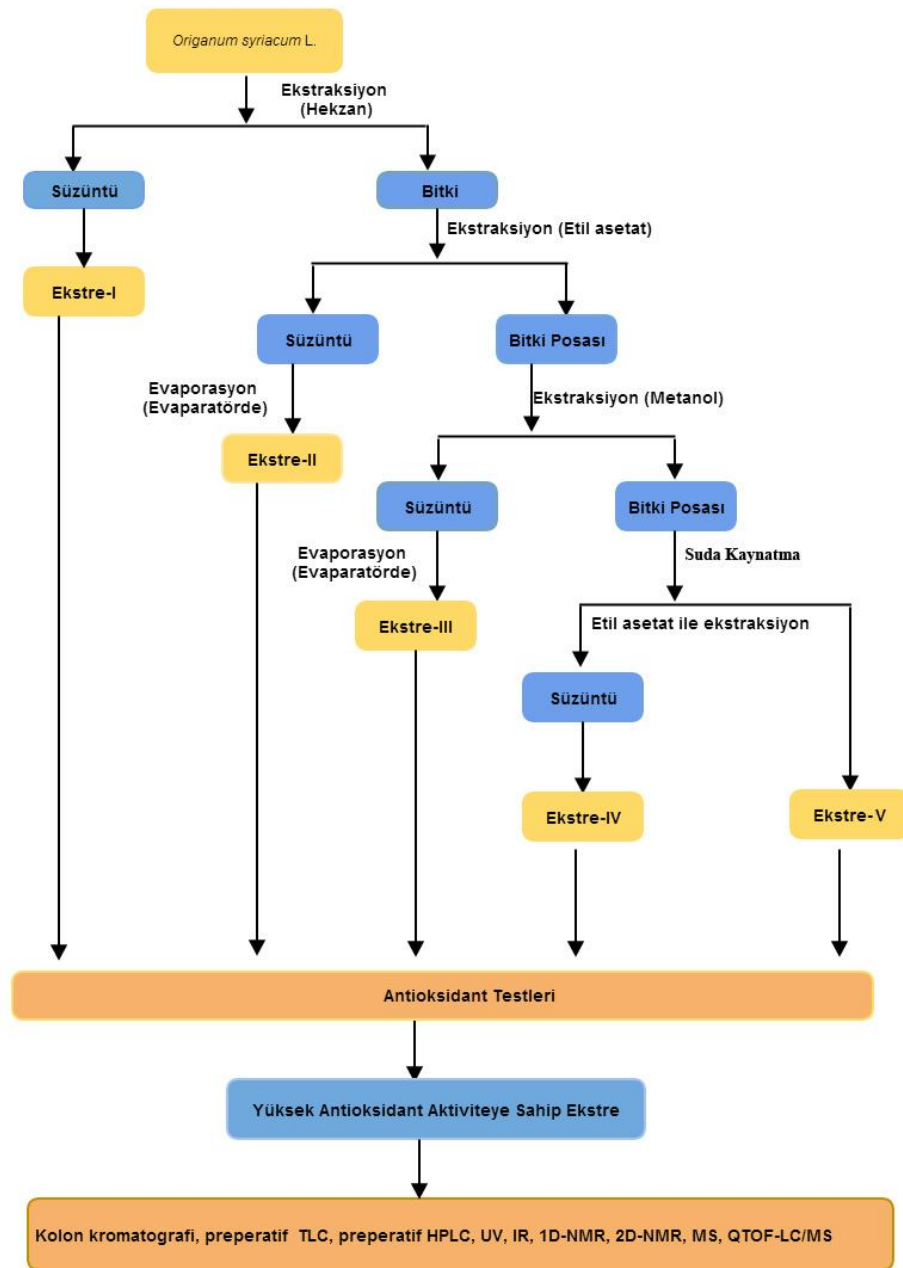
4.1. Ekstraksiyon İşlemleri

Bitki türlerinin farklı polariteye sahip çözücü sitemleri ile ekstrekte edildiğinde çözücü değişkenli biyolojik aktivite parametreleri değerlendirme açısından çözücü değişkenli ekstraksiyon işlemi yapıldı. 100 gram alınan *O. majorana* bitkisi gölgede kurutulduktan sonra toprak üstü kısımları 500 mL metanol-kloroform'da ekstrakt elde edilip suda zldkten sonra sırasıyla 500 mL hekzan, 500 mL etil asetat ile ekstrekte edildi. Biyolojik aktivite testleri için hekzan, etil asetat ekstraktlarından 20 mg alınarak DMSO'daki çözeltileri (20 mg/mL) hazırlandı. Bitkiden toplam 2 ekstrakt elde edilerek ve bu ekstrakteler için aktioksidan aktivite testleri gerçekleştirildi. Aktivitesi yüksek olan etilasetata aktiviteden sorumlu bileşiklerin izolasyonu için kolon kromatografisi uygulandı.



Şekil 4.1. *O. majorana* bitkisi için seçici ekstraksiyon şeması

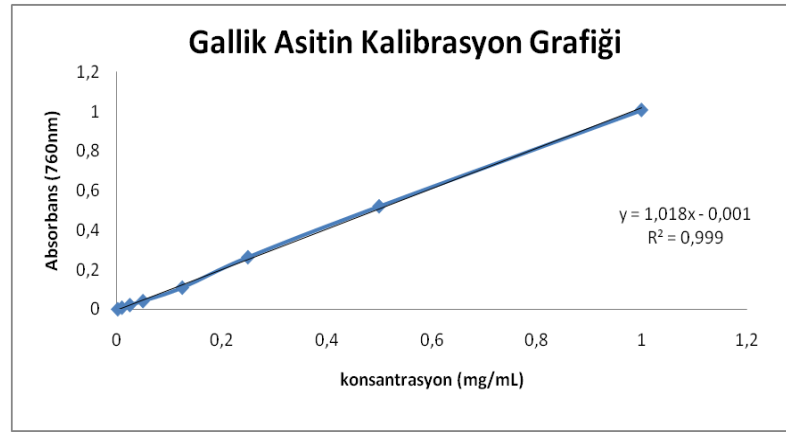
O. syriacum bitkisi gölgede kurutulduktan sonra toprak üstü kısmı (250 g) sırasıyla her bir çözücünden 1 L olmak üzere hekzan, etil asetat ve metanol de bekletildi. Süzülerek elde edilen katı kısım sıcak suyla çözülerek etil asetat ile ekstrakte edildi. Bitkiden toplam 5 ekstrakt elde edilerek ve bu ekstrakteler için antioksidan aktivite testleri gerçekleştirildi. Aktivitesi yüksek olan ekstraktların aktiviteden sorumlu bileşiklerin izolasyonu için kolon kromatografisi yapıldı.



Şekil 4.2. *O. syriacum* bitkisi için seçici ekstraksiyon şeması

4.2. Total Fenolik Bileşik

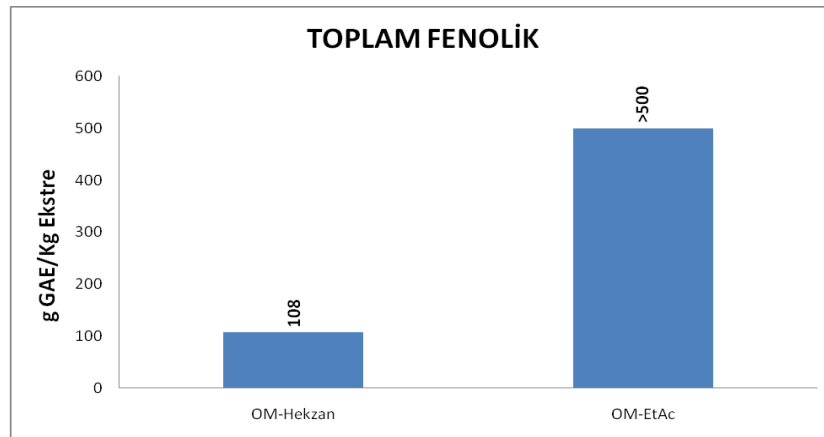
Tüm bitki ekstraktlarındaki çözünebilen fenolik madde miktarları Folin Ciocalteu Reaktifi (FCR) ile belirlendi. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan gallik asit çözeltisinin kalibrasyon grafiğinden elde edilen denklem kullanılarak, örneklerin toplam fenolik madde miktarları (g GAE/kg ekstre) hesaplandı.



Şekil 4.3. Gallik asit için kalibrasyon grafiği

Çizelge 4.1. *O. majorana* bitkisinin gallik asit eşdeğeri fenolik bileşik miktarları

Numune	Gallik asit eşdeğeri fenolik bileşik miktarı
<i>O.majorana</i> -Hekzan	108.2
<i>O.majorana</i> -Etil asetat	8485.9

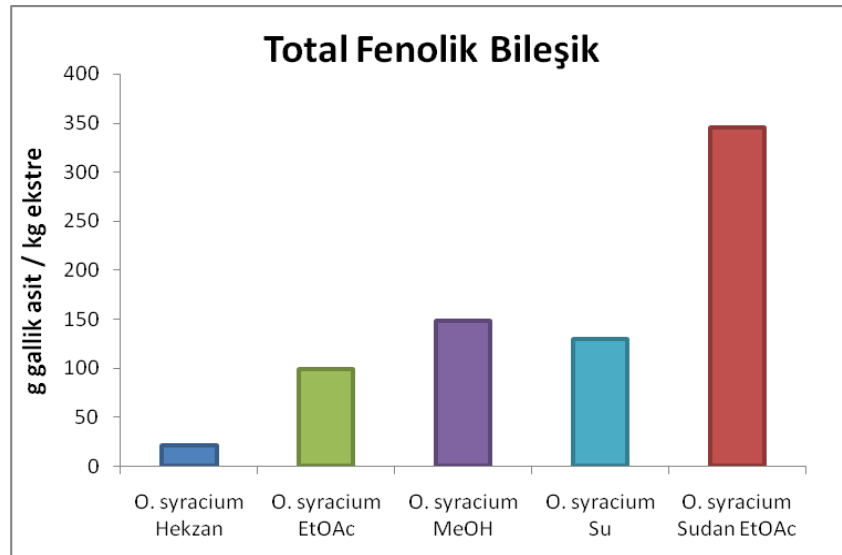


Şekil 4.4. *O. majorana* bitkisinin farklı çözücü sistemleri ile elde edilen ekstrele ait total fenol içerikleri

Fenolik bileşik miktarları *O. majorana*-Etil ekstresi için (g GAE/kg ekstre) 848.5 g iken *O. majorana*-Hekzan ekstresi 108.2 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.2. *O. syriacum* bitkisinin gallik asit eşdeğeri fenolik bileşik miktarları

Numune	Gallik asit eşdeğeri fenolik bileşik
<i>O. syriacum</i> Hekzan	20.9±1.1
<i>O. syriacum</i> EtOAc	99.5±6.3
<i>O. syriacum</i> MeOH	148.3±5.8
<i>O. syriacum</i> Su	130.3±3.1
<i>O. syriacum</i> Sudan EtOAc	345.1±9.4



Şekil 4.5. *O. syriacum* bitkisinin farklı çözgen sistemleri ile elde edilen ekstrele ait total fenol içerikleri

O. syriacum bitkisi için 20.9-345.1 (g GAE/kg ekstre) arasında değişen miktarlarıyla en fazla fenolik bileşik sudan EtOAc ekstraktı (345.1) içermektedir. Daha sonra sırasıyla MeOH ekstraktı (148.3), su ekstraktı (130.3), EtOAc ekstraktı (99.5), hekzan ekstraktı (20.9) (g /kg ekstre) gelmektedir. (Çizelge 4.2).

4.3. Serbest Radikal Giderme Aktivitesi Sonuçları

Farklı konsantrasyonlarda (0.1-0.5 mg/mL) hazırlanan standart (BHA, BHT, α - tokoferol) ve bitki ekstraktı (0.5 ml) alınarak heberisinin içerisine litrede 6×10^{-5} mol olacak şekilde hazırlanan DPPH radikal solusyonu (2.5 ml) eklendi. Bu karışım etkili bir şekilde karıştırılarak 60 dakika karanlıkta bekletildi ve 517 nm’de absorbans değerleri ölçüldü (Çizelge 4.3). Her bir bitki numunesi ve standartlar için ayrı ayrı metanol içeren bitki numune körleri ve DPPH içeren kontrol grupları oluşturuldu. Her bir bitki örneği ve standartlar ile tek tek çalışıldı ve kontrolün absorbansı günlük olarak her ölçümde tekrar tekrar okundu. Üç tekrar yapıldı.

Çalışmada kullanılan her bir numuneye ait ekstraktların serbest radikal giderici etkileri DPPH radikali üzerinden tayin edildi. Standart madde olarak BHA, BHT ve Troloks kullanıldı. Serbest radikal giderim aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Numune}}}{A_{\text{Kontrol}}} \times 100$$

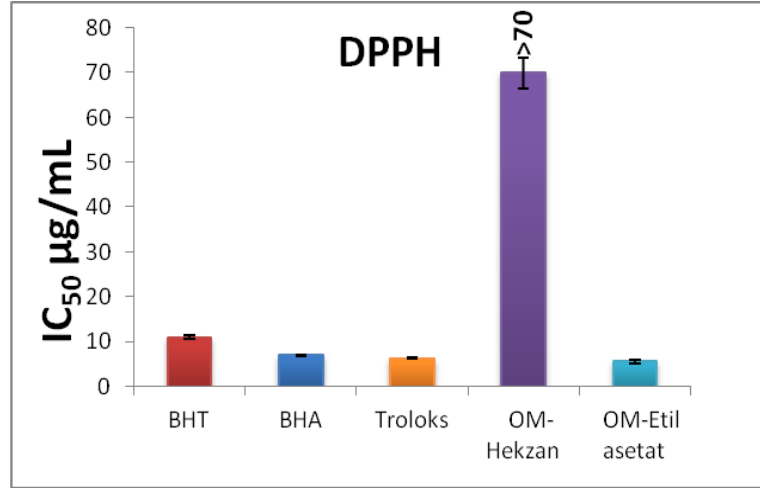
Bu formülde A_{Kontrol} , DPPH’ çözeltisinin absorbans değeridir. A_{Numune} ise bitki ekstraktı veya standartın absorbansıdır. DPPH’ giderme etkisi sonuçları IC_{50} şeklinde hesaplandı.

O. majorana bitkisinin değişik ekstraktlarının serbest radikal giderme aktiviteleri (DPPH) Çizelge 4.3’te verilmektedir.

Çizelge 4.3. *O. majorana* bitkisi DPPH testi sonuçları

Gruplar	IC_{50} $\mu\text{g/mL}$
<i>O. majorana</i> -Hekzan	120.4 $\pm$ 3.5
<i>O. majorana</i> -Etil asetat	5.5 $\pm$ 0.2
BHT	11.0 $\pm$ 0.4
BHA	6.9 $\pm$ 0.1
Troloks	6.3 $\pm$ 0.1

Test sonuçları bakımından ekstraktlar arası farklılık önemli bulunmuştur. Yapılan çoklu karşılaştırmada etil asetat ham ekstresinin sonucu (5.5, IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$), kontrol gruplarından yüksek iken, hekzan ham ekstresinin sonucu (120.4) düşük bulundu.

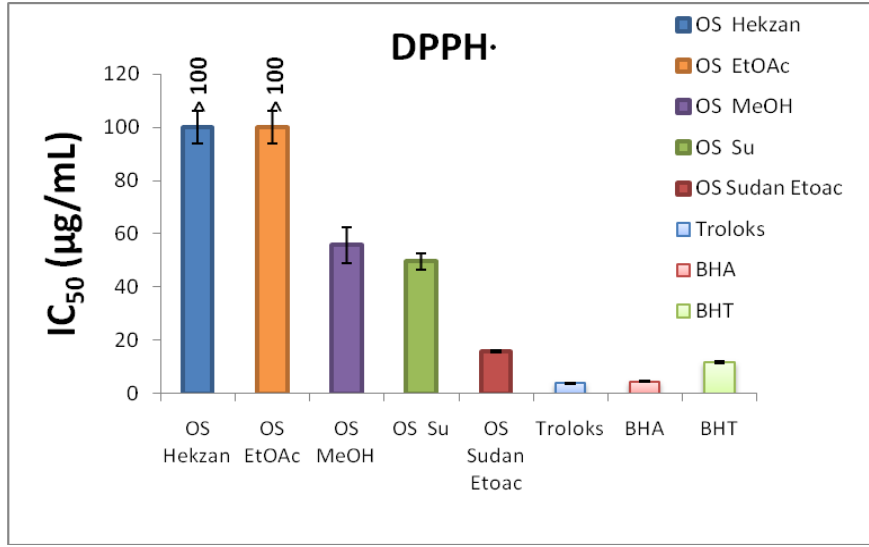


Şekil 4.6. *O. majorana* bitki ekstreleri ve standartlara ait serbest radikal giderme aktiviteleri IC_{50} değerleri

Standart maddeler ile kıyaslandığında *O. majorana*-Etil asetat numunesinin diğer numunelerden çok daha fazla radikal giderme kapasitesine sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4.6). Serbest radikal giderme aktivitesinde, *O. majorana*-Etil asetat kısmında gözlenen bu belirgin fark, fenolik bileşik içeriğinin diğer kısımdan fazla olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.4. *O. syriacum* bitkisi DPPH testi sonuçları

Gruplar	IC_{50} $\mu\text{g/mL}$
<i>O. syriacum</i> Hekzan	755.2±16.2
<i>O. syriacum</i> EtOAc	197.3±6.1
<i>O. syriacum</i> MeOH	55.7±6.8
<i>O. syriacum</i> Su	49.6±3.0
<i>O. syriacum</i> Sudan EtOAc	15.8±0.4
Trolox	3.8±0.2
BHA	4.4±0.1
BHT	11.5±0.4



Şekil 4.7. *O. syriacum* bitki ekstaktları ve standartlara ait serbest radikal giderme aktiviteleri IC₅₀ değerleri

O. syriacum bitkisinin serbest radikal giderme aktivitelerinde IC₅₀ (µg/mL) en yüksek aktivite sudan etilasetat ekstraktı sonucu (15.8) olup kontrol gruplarına en yakın değerdedir (Çizelge 4.4). Diğerleri sırasıyla MeOH ekstraktı (55.7), EtOAc ekstraktı (197.3) ve hekzan ekstraktı (755.2) gelmektedir (Şekil 4.7). Doğal antioksidanlar genellikle fenolik ve polifenolik bileşiklerdir (Velioglu ve ark., 1998; Kim ve ark., 1997). Serbest radikal giderme aktivitesi için elde edilen sonuçlar hesaplanan gallik asite eşdeğer fenolik bileşik miktarları (Çizelge 4.1 ve 4.2) ile de uyum göstermektedir.

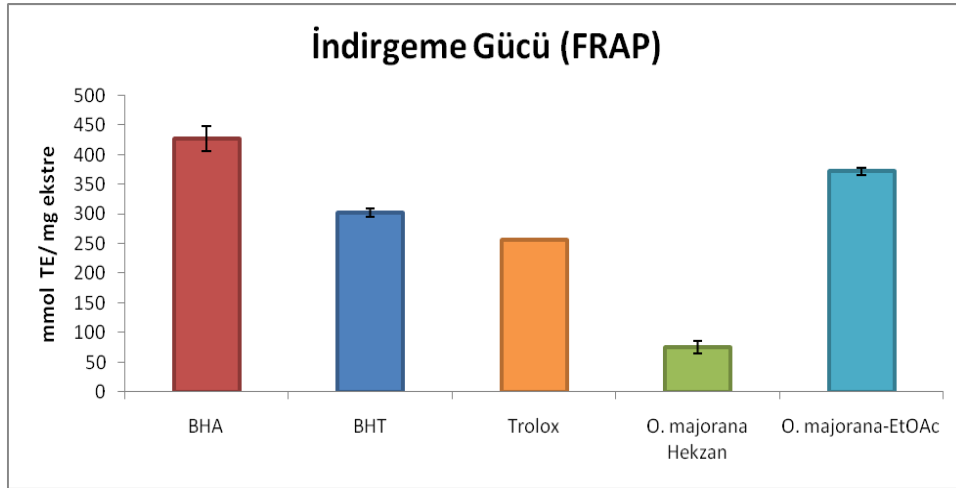
4.4. Total İndirgeme Kapasitesi Tayini Sonuçları

Antioksidan çalışmalarda yaygın olarak kullanılan bu metotta, test çözeltisinin sarı rengi ortamda bulunan antioksidan maddelerin indirgeme aktivitelerinden dolayı farklı tonlardaki yeşil renge dönüşmektedir (Gülçin, 2006a; Gülçin ve ark., 2006b). Numunelerin indirgeme potansiyeli, farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerinin (5-40 µg/mL) 700 nm'deki absorbansları ölçülerek belirlenmiştir (Şekil 4.8).

Çizelge 4.5. *O. majorana* bitkisi İndirgeme kapasitesi testi sonuçları

Gruplar	İndirgeme Gücü (mmol TE/mg ekstre)
BHA	427.04±20.5
BHT	302.7±6.6
Trolox	256.3±2.2
<i>O. majorana</i> -Hekzan	75.3±11.0
<i>O. majorana</i> -EtOAc	372.3±6.1

Örneklerin indirgeme gücü madde miktarları (mmol TE/mg ekstre) olarak hesaplandı.

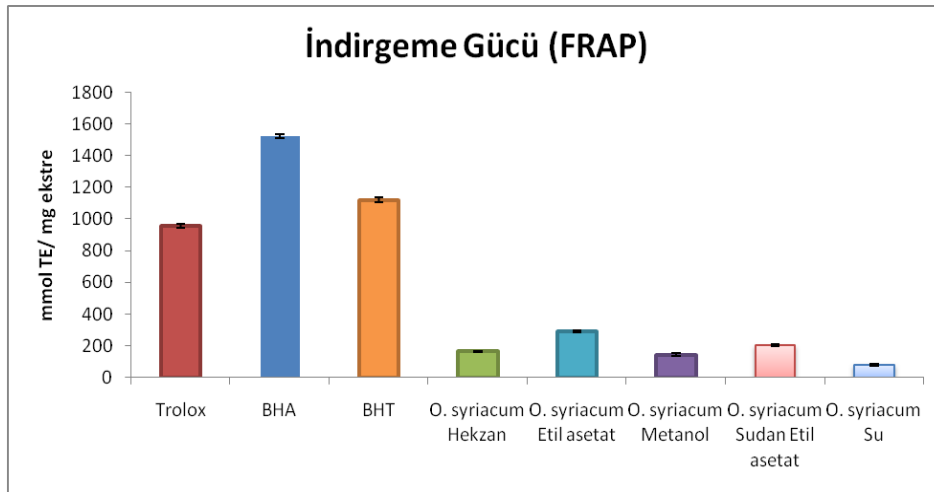


Şekil 4.8. *O. majorana* bitki ekstreleri ve standartlara ait İndirgeme değerleri

Total indirgeme testi için çizilen (mmol TE/mg ekstre) grafiğinden (Şekil 4.8) *O. majorana*-EtOAc için 372.3 (mmol TE/mg ekstre) olup standartlardan daha yüksek indirgeme kapasitesine sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca *O. majorana*-Hekzan için 75.3 olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.6. *O. syriacum* bitki ekstreleri ve standartlara ait Total İndirgeme değerleri

Gruplar	İndirgeme Gücü (mmol TE/mg ekstre)
Trolox	957.0±14.4
BHA	1523.1±12.2
BHT	1119.9±14.8
<i>O. syriacum</i> Hekzan	162.9±3.6
<i>O. syriacum</i> Etil asetat	292.7±5.8
<i>O. syriacum</i> Metanol	142.3±10.9
<i>O. syriacum</i> Sudan Etil asetat	201.6±7.9
<i>O. syriacum</i> Su	76.6±5.8

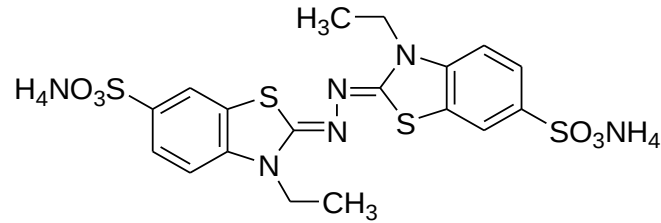


Şekil 4.9. *O. syriacum* bitki ekstreleri ve standartlara ait Total indirgeme değerleri

O. syriacum bitkisinin tüm konsantrasyonlardaki total indirgeme gücü sonuçlarında en yüksek aktivitenin etil asetat ekstresinde olduğu görüldü (Çizelge 4.6). Bazı çalışmalar (Tanaka ve ark., 1988; Yen ve Duh, 1993), indirgeyici maddelerin varlığında antioksidatif etkinin de attığını göstermektedir. Bu nedenle, bitkinin toprak üstü kısmının yüksek indirgeme kapasitesine sahip olmasının, bitkinin potansiyel antioksidan aktivite göstermesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

4.5. ABTS^{•+} Giderme Aktivitesi Tayini Sonuçları

ABTS^{•+} giderme aktivitesi, DPPH serbest radikal giderme aktivitesi gibi sulu karışımların, içeceklerin, ekstraktların veya saf maddelerin radikal giderme aktivitelerinde sıklıkla kullanılan bir metottur (Miller, 1996; Gülçin, 2007). 660, 734 ve 820 nm’de maksimum olan karakteristik uzun dalga boylu absorpsiyon spektrumu gösteren ABTS^{•+} radikal katyonun absorbansının antioksidan tarafından inhibisyonuna dayanmaktadır (Prior ve Cao, 1999). Orjinal yöntemde hidrojen peroksit ile metmiyoglobinin aktivasyonu sonucu ferrilmiyoglobin oluşur. Bu bileşik daha sonra 2,2-azinobis(3-etilbenzothiazollin-6-sülfonik asit) (ABTS) (Şekil 4.5) ’den ABTS^{•+} radikal katyonunun oluşmasına sebep olmaktadır. Bu yöntemde test edilecek numune, ABTS^{•+} radikalleri oluşumundan önce eklenir. Test bileşiği, ABTS^{•+} radikallerinin oluşumunu azaltır (Magalhães ve ark., 2008).

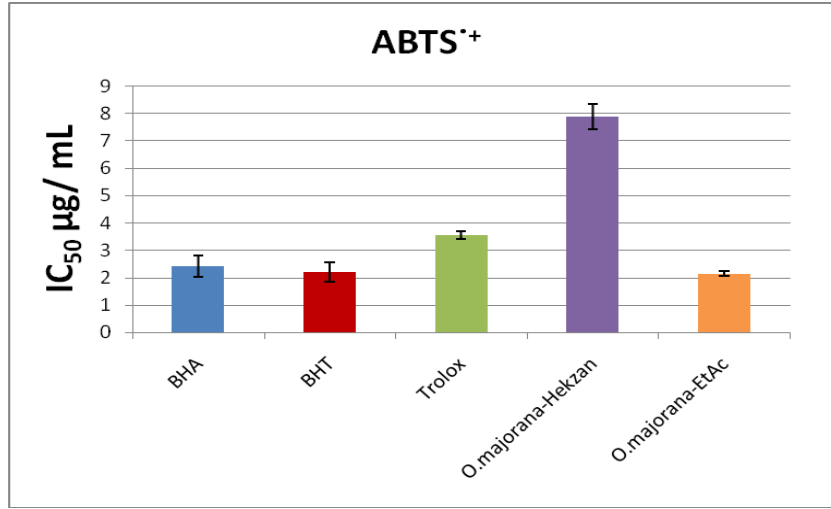


Şekil 4.10. ABTS’nin açık kimyasal yapısı

Çizelge 4.7. ABTS^{•+} giderme aktivitesi sonuçları

Gruplar	IC ₅₀ (µg/mL)
BHA	1.5±0.4
BHT	2.1±0.3
Torolox	3.4±0.1
<i>O.majorana</i> -Hekzan	8.1±0.4
<i>O.majorana</i> -EtOAc	2.1±0.1

O. majorana bitkisinin *O.majorana*-EtOAc ekstresinin 2.1 IC₅₀ (µg/mL) değeri ile en fazla ABTS^{•+} giderme aktivitesine sahip olduğu görüldü (Çizelge 4.7).

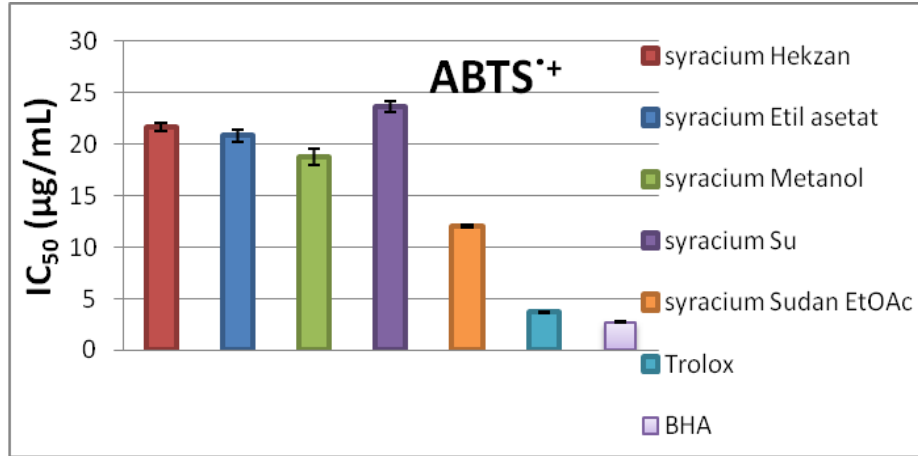


Şekil 4.11. *O. majorana* bitki ekstraktları ve standartlara ait ABTS^{•+} giderme aktiviteleri

ABTS^{•+} radikal giderme test sonuçlarına göre, bitkinin etil asetat kısmının BHT ve BHA ile kıyaslandığında ABTS^{•+} radikallerini gidermede oldukça etkili olduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 4.11).

Çizelge 4.8. ABTS^{•+} giderme aktivitesi sonuçları

Gruplar	IC ₅₀ (µg/mL)
<i>O. syracium</i> Hekzan	21.7±0.4
<i>O. syracium</i> Etil asetat	20.8±0.6
<i>O. syracium</i> Metanol	18.7±0.7
<i>O. syracium</i> Su	23.7±0.5
<i>O. syracium</i> Sudan Etil asetat	12.1±0.1
Trolox	3.7±0.04
BHA	2.7±0.07



Şekil 4.12. *O. syriacum* bitki ekstraktları ve standartlara ait ABTS^{•+} giderme aktiviteleri

O. syriacum bitki ekstraktları ABTS^{•+} giderme aktiviteleri IC₅₀ (µg/mL) arasında en yüksek Sudan Etil asetat ekstresi 12.05 olup sırasıyla MeOH ekstresi 18.77 Etil asetat ekstresi 18.77 Hekzan ekstresi 20.82 Su ekstresi 23.70 şeklinde azalmaktadır. Sudan etilasetat kısmında da aktivitenin yüksek çıkması, bitkinin bu kısımda yer alan düşük molekül ağırlığına sahip bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Brieva ve ark., 2001).

4.5. Etken Maddelerin Elde Edilmesi

Etken maddelerin elde edilmesinde, bu maddeleri içeren bitki ekstraktlarının belirlenmesi amacıyla ekstraktlarda yapılan antioksidan deneyleri yol gösterici testler olarak kullanılmıştır. Çalışmamızda *O. majorana* bitkisinin antioksidan testlerinde en iyi sonuçları veren sudan etilasetat ekstresi etken maddelerin saflaştırılması için seçilmiştir. *O. syriacum* bitkisinin antioksidan testlerinde iyi sonuçları veren sudan metanol ekstresi etken maddelerin saflaştırılması için seçilmiştir.

Çizelge 4.9. Antioksidan aktivite sonuçları

Numune	Toplam Fenolik (g GAE/Kg ekstrakt)	DPPH [•] Radikal Giderme [IC ₅₀ (µg/mL)]	FRAP (mmol TE/mg ekstre)	ABTS ^{•+} Radikal Giderme [IC ₅₀ (µg/mL)]
OM-Hekzan	108.2	120.4±3.5	75.3±11.0	8.1±0.4
OM-EtOAc	8485.9	5.5±0.2	372.3±6.1	2.1±0.1
OS-Hekzan	20.9±1.1	755.2±16.2	162.9±3.6	21.7±0.4
OS-EtOAc	99.5±6.3	197.3±6.1	292.7±5.8	20.8±0.6
OS-MeOH	148±5.8	55.7±6.8	142.3±10.9	18.7±0.7
OS-Su	130.3±3.1	49.6±3.0	76.6±5.8	23.7±0.5
OS-EtOAc	345.1±9.4	15.8±0.4	201.6±7.9	12.1±0.1
BHA	Test Edilmedi	6.9±0.1	427.04±20.5	1.5±0.4
BHT	Test Edilmedi	11.0±0.4	302.7±6.6	2.1±0.3
Trolox	Test Edilmedi	6.3±0.1	256.3±2.2	3.4±0.1

4.6. Kolon Kromatografisi Sonuçları

4.6.1. *O. majorana* bitkisi için kolon kromatografisi

10 g OM etil asetat ham ekstresi. 1.5 cm çapında 100 cm uzunluğundaki kolonda (Şekil 4.13) aşağıdaki çözücü sistemleri kullanılarak elue edildi (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. *O. majorana* kolon kromatografisi için çözücü sistemi

Çözücü Sistemi	Fraksiyon Aralığı	Bileşen
%100 Hekzan	1-5	
% 10 Etil asetat / Hekzan	5-25	Hidrokinon (3)
% 20 Etil asetat / Hekzan	25-45	
% 40 Etil asetat / Hekzan	45-72	Tri-metoksi Flavon (1)
% 60 Etil asetat / Hekzan	72-90	
% 75 Etil asetat / Hekzan	90-115	Hesperetin (2)
% 90 Etil asetat / Hekzan	115-135	Arbutin (4)
% 100 Etil asetat	135-170	Arbutin (4) + Rozmarinik asit (5)
% 100 Etil asetat	170-190	Rozmarinik asit (5)
% 5 Metanol / Etil asetat	190-210	Rozmarinik asit (5)

Fraksiyonlar 250 mL olarak toplanırken, toplanan fraksiyonlar yaklaşık 10 mL çözücü kalıncaya kadar döner buharlaştırıcıda çektirildi. Kristallenme gözlenen tüplerdeki kristaller, uygun çözücülerle yıkanarak kristal üstünden ayrıldı ve spektroskopik yöntemlerle yapı tayinleri gerçekleştirildi. 75-100 fraksiyonları birleştirilip diklormetan–etilasetat çözücü sisteminde tekrar kolon yapıldı ve %50 Diklormetan - %50 Etilasetat oranında hesperetin bileşiği olmak üzere *O. majorana* bitkisi kolon kromatografisinden 5 madde izole edildi.



Şekil 4.13. *O. majorana* bitkisi kolon kromatografisi

4.6.2. *O. syriacum* bitkisi için kolon kromatografisi

Elde edilen 100 g metanol ham ekstresi aşağıdaki çözücü sistemleri hareketli faz olarak kullanıldı (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. *O. syriacum* bitkisi kolon kromatografisi için çözücü sistemleri

Çözücü Sistemi	Fraksiyon Aralığı	Bileşen
%100 Hekzan	-	
% 50 Diklormetan/Hekzan	1-38	Klorofilli karışım
%100 Diklormetan	38-90	
% 50 Etil asetat / Hekzan	90-166	
% 60 Etil asetat / Hekzan	166-213	
% 75 Etil asetat / Hekzan	213-456	Steroid, 4,6-dihidroksiasetofenon 2-O-D- glikozit, viteksin
% 90 Etil asetat / Hekzan	456-514	
% 100 Etil asetat	514-567	Viteksin
% 100 Etil asetat	567-636	Rozmarinik asit + yeni bileşik
% 100 Etil asetat	636-696	Rozmarinik asit + yeni bileşik + isoviteksin
% 5 Metanol / Etil asetat	696-724	Rozmarinik asit + isoviteksin
% 5 Metanol / Etil asetat	724-830	Rozmarinik asit
% 10 Metanol / Etil asetat	830-908	Sükroz
% 20 Metanol / Etil asetat	908-930	Visenin-2

Fraksiyonlar 500 mL olarak toplanırken, toplanan fraksiyonlar yaklaşık 10 mL çözücü kalıncaya kadar döner buharlaştırıcıda çektirildi. Kristallenme gözlenen tüplerdeki kristaller, uygun çözücülerle yıkanarak kristal üstünden ayrıldı ve spektroskopik yöntemlerle yapı tayinleri gerçekleştirildi. *O. syriacum* bitkisinin kolon kromatografisinden 7 madde izole edildi.



Şekil 4. 14. *O. syriacum* bitkisi kolon kromatografisi

4.7. Fitokimyasal Çalışmalar

4.7.1. *O. majorana* bitkisinden İzole Edilen Bileşikler

O. majorana bitkisinden toplam 5 bileşik izole edilmiştir. İzole edilen bileşiklerin yapıları Çizelge 4.12’de verilmiştir.

Çizelge 4.12. *O. majorana* bitkisinden izole edilen bileşiklerin yapıları

Bileşik	Yapısı
(1)	
(2)	
(3)	
(4)	
(5)	

4.7.2. *O. syriacum* bitkisinden İzole Edilen Bileşikler

O. syriacum bitkisinden 1'i (10) yeni olmak üzere toplam 7 bileşik izole edilmiştir. İzole edilen bileşiklerin yapıları Çizelge 4.13'de verilmiştir.

Çizelge 4.13. *O. syriacum* bitkisinden izole edilen bileşiklerin yapıları

Bileşik	Yapısı
(6)	
(7)	
(8)	

(9)	
(10)	
(11)	
(12)	

4.8. İzole Edilen Bileşiklerin Fiziksel ve Spektral Özellikleri

4.8.1. 1 Nolu Bileşiğin [(5,6-dihidroksi-2-(3-hidroksi-4-metoksifenil)-7,8-dimetoksi-4H-kromen-4-on] Fiziksel ve Spektral Özellikleri

Şekil 4.15.1 Nolu Bileşik (5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon)

1 Nolu bileşik (5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon) OM bitkisinin etil asetat ekstraktından kolon kromatografisi ile silikajel kolonda hekzan:etil asetat (2:3) çözücü sisteminde 61-72 nolu fraksiyonlardan kristallendirilerek izole edildi (34 mg). İzole edilen molekülün fiziksel görünümümü ise kirli beyaz renkli amorf toz şeklindedir. Bileşiğin erime noktası 259 °C olarak ölçüldü. 5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon molekülü bilinen bir bileşik olup elde edilen veriler literatür (Nam ve ark., 2004) ile uyum içindedir.

Bileşik $C_{18}H_{16}O_8$ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon piki $[M-H]^-$ LC-MS-TOF kütle spektrumunda m/z: 359.0873 olarak bulunmuştur ve yapıyı doğrulamaktadır.

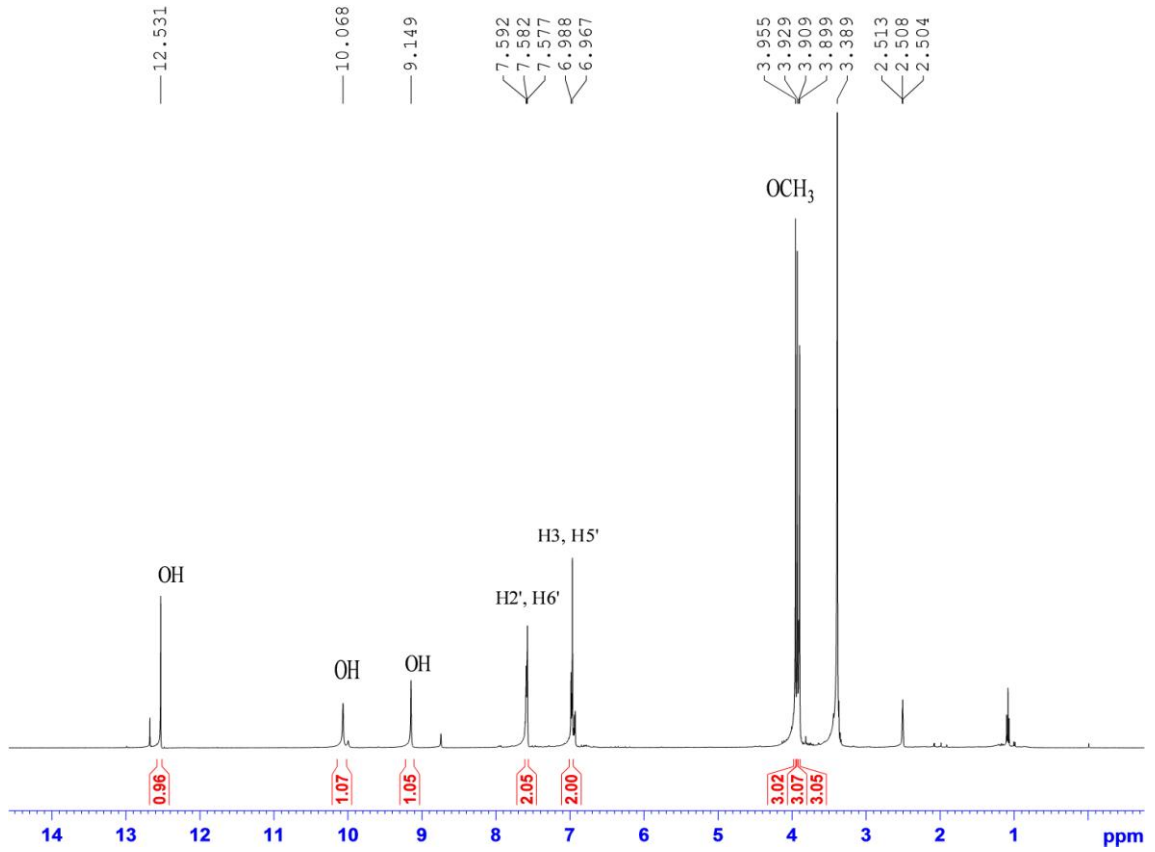
FT-IR $\nu(\text{cm}^{-1})$ 3412, 2941, 2830, 1648, 1049, 1011, 837, 758

1 Nolu bileşiğin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR kimyasal kayma değerleri çizelge 4.14’de verilmiştir.

Çizelge 4.12. 1 Nolu (5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon) bileşiğin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR (400/100 MHz DMSO- d_6) kimyasal kayma değerleri

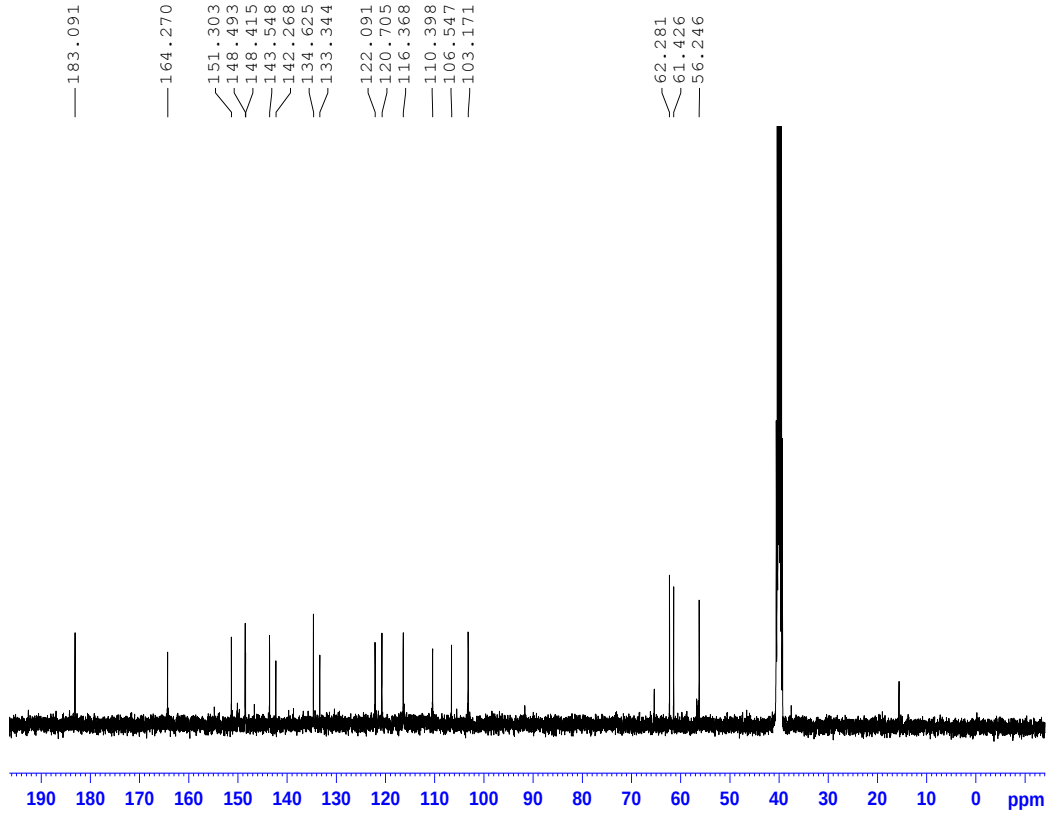
C/H	δ_{C} ppm	δ_{H} ppm (Hz)
C ₂ -H	164.7	-
C ₃ -H	103.1	6.96 s
C ₄ -H	183.1	-
C ₅ -H	143.6	-
C ₆ -H	134.6	-
C ₇ -H	148.4	-
C ₈ -H	133.3	-
C ₉ -H	142.3	-
C ₁₀ -H	106.6	-
C ₁ -H	122.1	-
C ₂ -H	110.4	7.58 m
C ₃ -H	151.3	-
C ₄ -H	148.5	-
C ₅ -H	116.4	6.98 m
C ₆ -H	120.7	7.58 m
C ₇ -OCH ₃	61.4	3.96 s
C ₈ -OCH ₃	62.2	3.93 s
C ₄ -OCH ₃	56.3	3.90 s

Şekil 4.16. 1 Nolu (5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon) bileşiğin HMBC korelasyonları



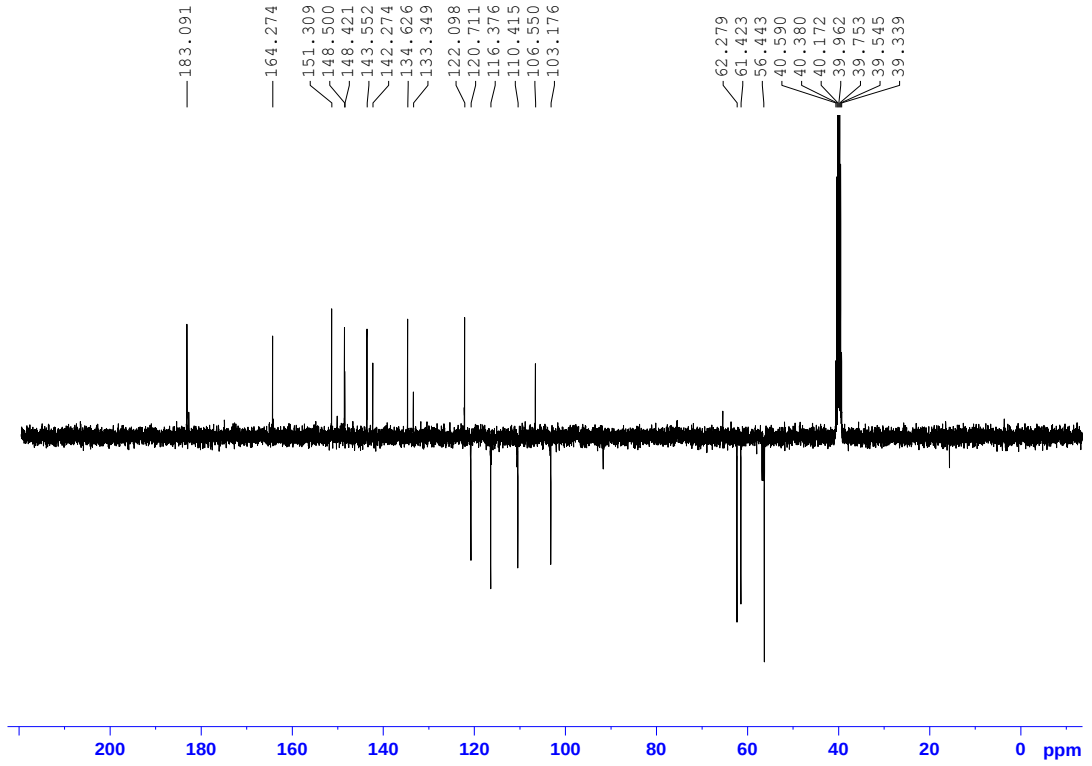
Şekil 4.17. 1 Nolu (5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon) bileşiğin ¹H-NMR spektrumu (¹H-NMR 400 MHz, DMSO-d₆)

1 Nolu bileşiğin ¹H-NMR spektrumunda flavon yapısının B (sinnamoil) halkasına ait H-2' ve H-6' protonları $\delta = 7.58$ ppm ve $\delta = 7.57$ ppm 'de çakışık olarak multiplet, H-5' protonu ve H-3 protonu da $\delta = 6.93$ ppm'de çakışık olarak multiplet rezonans olmuştur (Şekil 4.17).



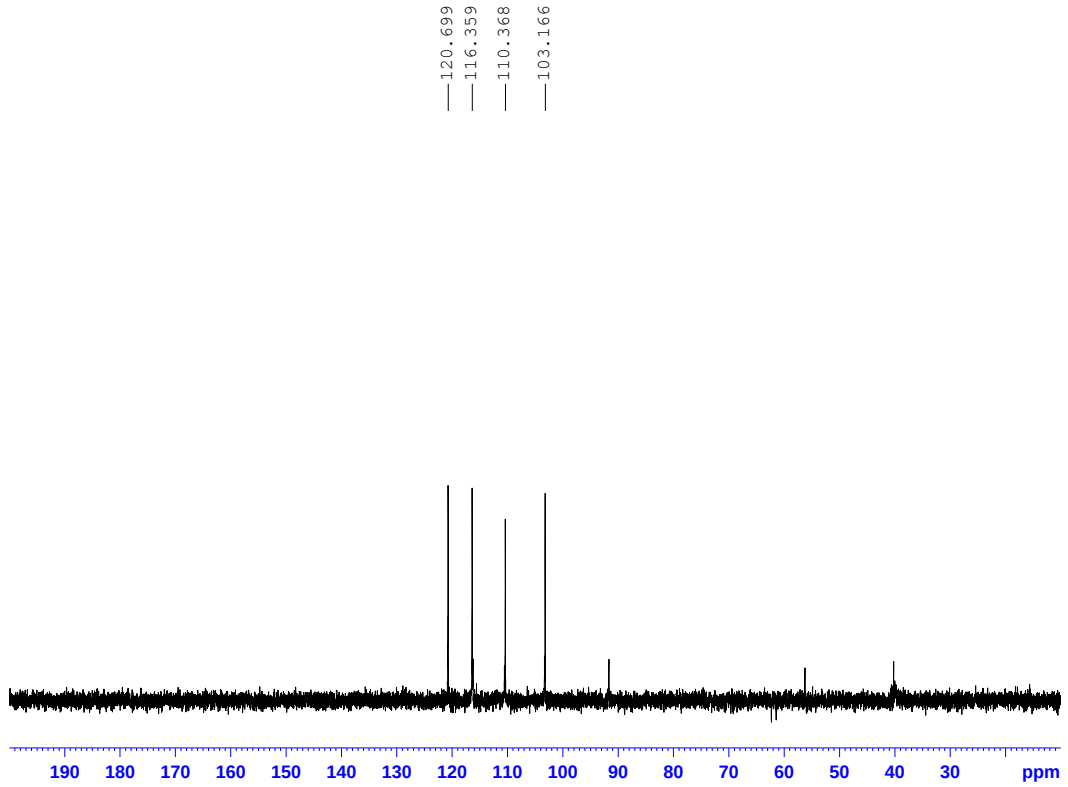
Şekil 4.18. 1 Nolu (5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon) bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumu (^{13}C -NMR100 MHz DMSO- d_6)

1 Nolu bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumu incelendiğinde, flavonoid iskeletinde 18 tane karbon olduğu görülmektedir. 18 karbondan 11 tanesi kuaterner karbonu, 4 tanesi metin karbonu ve 3 tanesi de metoksi gruplarında bulunan metil karbonlarıdır (Şekil 4.18).



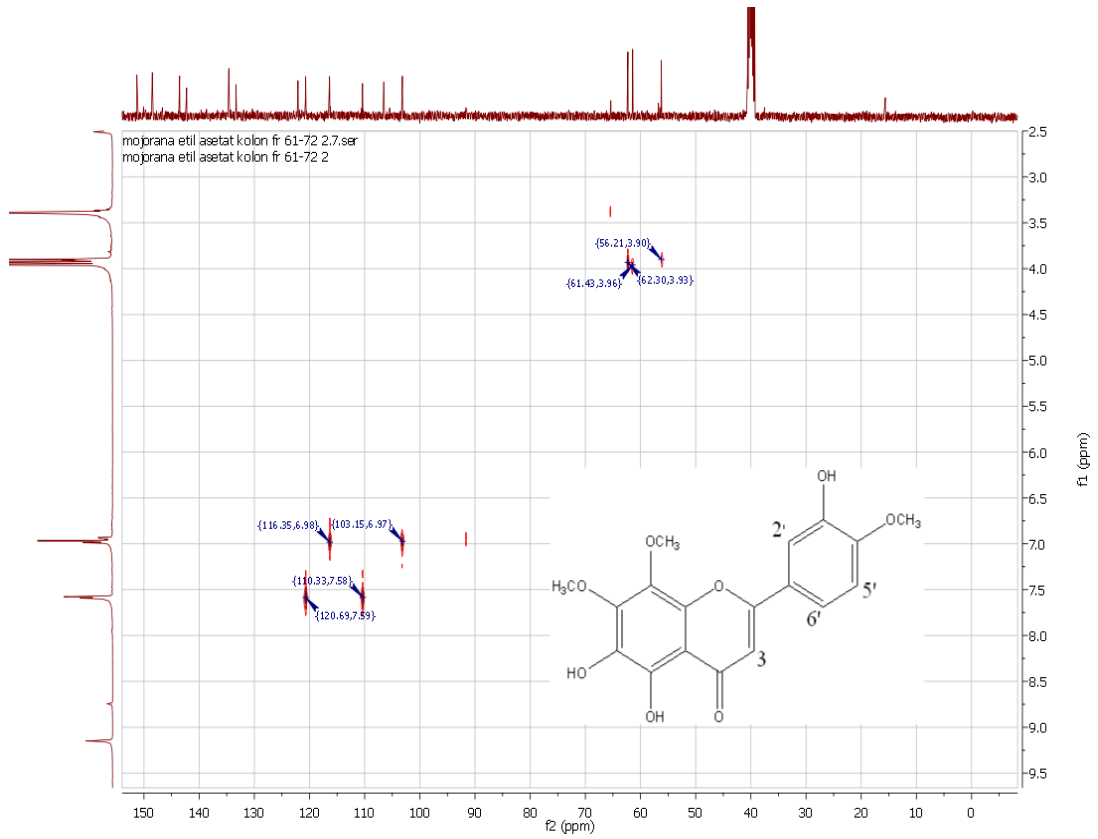
Şekil 4.19. 1 Nolu (5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon) bileşiğin APT spektrumu (^{13}C -NMR 100 MHz DMSO- d_6)

1 Nolu bileşiğin hangi tür karbon atomları içerdiğinin teyiti için bütün karbon atomlarının gözlenebildiği APT (Attached Proton Test) spektrumu alınmıştır. APT spektrumunda -C ve -CH₂ tipi karbonlar spektrumda pozitif olarak gözlenirken, -CH ve -CH₃ tipi karbonlar negatif olarak gözlenir. 1 Nolu bileşiğe ait APT spektrumunda 11 tane kuarternar karbonu (-C) pozitif olarak, 4 tane metin ve 3 metil karbonları (CH ve -CH₃) ise negatif olarak gözlendi. (Şekil 4.19).



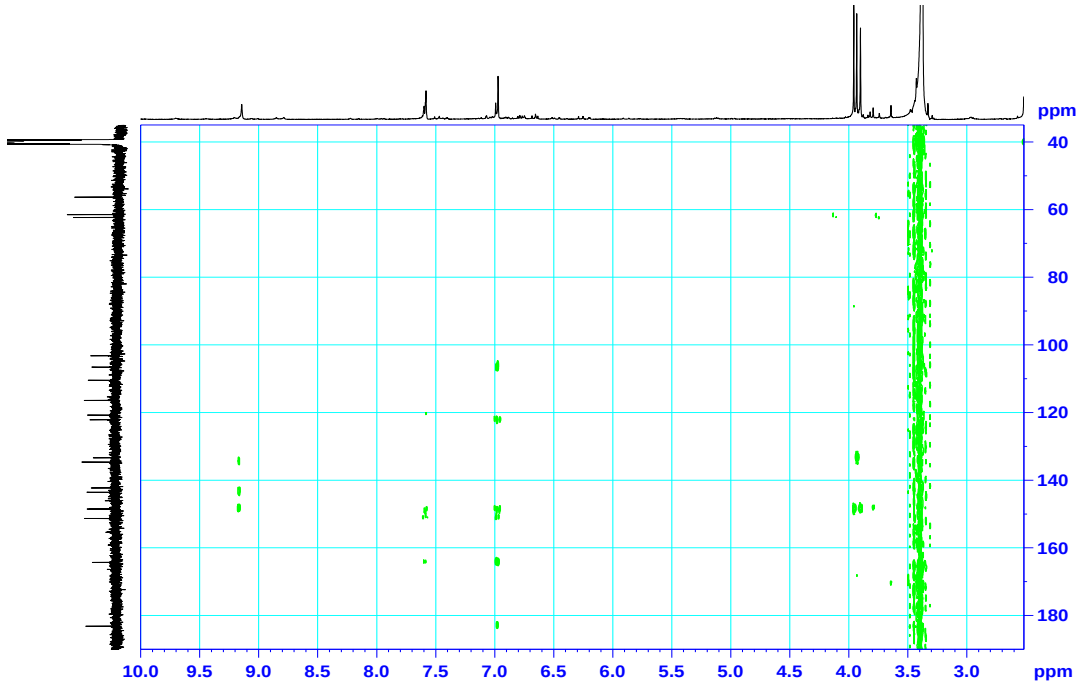
Şekil 4.20. 1 Nolu (5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon) bileşiğin DEPT-90 spektrumu (^{13}C -NMR100 MHz DMSO- d_6)

1 Nolu bileşiğe ait DEPT-90 spektrumlarında sadece $-\text{CH}$ tipi karbonlar spektrumda pozitif olarak gözlenirken $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$ ve $-\text{C}$ tipi karbonlar gözlenmez. Moleküle ait 4 adet metin karbonları ($-\text{CH}$) DEPT-90 spektrumunda pozitif olarak gözlendi (Şekil 4.20).



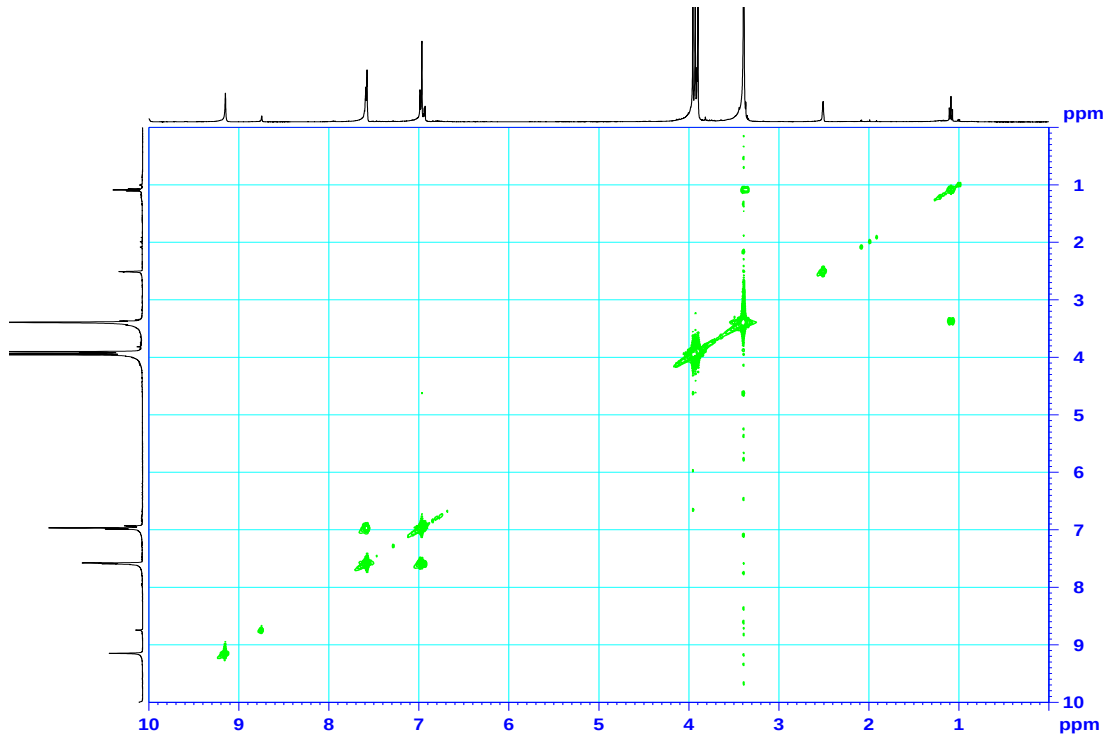
Şekil 4.21. 1 Nolu (5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon) bileşiğin HETCOR spektrumu (^1H -NMR 400 MHz, ^{13}C -NMR 100 MHz DMSO- d_6)

1 Nolu bileşiğin HETCOR spektrumunda, bileşikteki proton karbon eşleşmeleri tespit edilmektedir. Flavonoid halkasında 103.1 ppm'deki C-3 karbonunun 6.96 ppm'deki protonla etkileştiği, flavonoidin B halkasındaki 110.4 ve 120.7 ppm'deki C-2' ve C-6' karbonlarının 7.58 ppm'deki protonla, 116.4 ppm'deki C-5' karbonunun 6.98 ppm'deki protonla, 61.4, 62.2 ve 56.3 ppm'deki metoksi karbonlarının sırasıyla 3.96, 3.93, 3.90 ppm'deki protonlarla etkileştikleri tespit edilmiştir (Şekil 4.21).



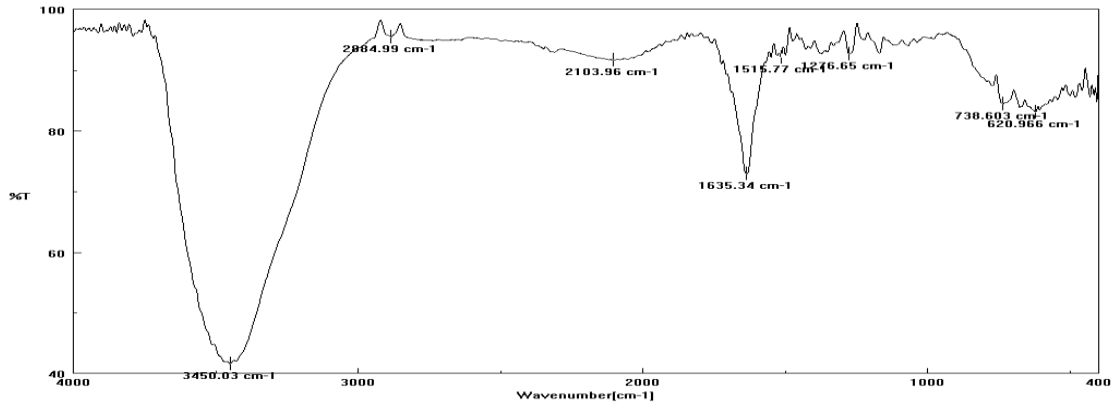
Şekil 4.22. 1 Nolu (5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon) bileşiğin HMBC spektrumu (^1H -NMR 400 MHz, ^{13}C -NMR 100 MHz DMSO- d_6)

HMBC spektrumu en fazla dört bağa kadar olan karbon-proton uzak mesafe etkileşimi hakkında bilgi vermektedir. 1 Nolu bileşiğin HMBC spektrumunda flavonoid iskeletinin B halkasının flavon iskeletine 2 nolu karbondan substitüe olması 164.7 ppm'deki 2 nolu karbonun H-2', H-6' ve H-3 protonları ile uzak mesafe etkileşimine girmesi ile belirlenmiştir. Spektrumdan 106.6 ppm'deki 10 nolu karbonun 6.96 ppm'deki H-3, protonu ile, 122.1 ppm'deki C-1' karbonunun 7.58 ppm'deki H-2', H-6' ile, 61.4, 62.2 ve 56.3 ppm'deki C-7, C-8 ve C-4' karbonlarının 3.96, 3.93 3.90 ppm'deki metoksi protonları ile uzak mesafe etkileşmesi yaptıkları gözlenmektedir (Şekil 4.22).



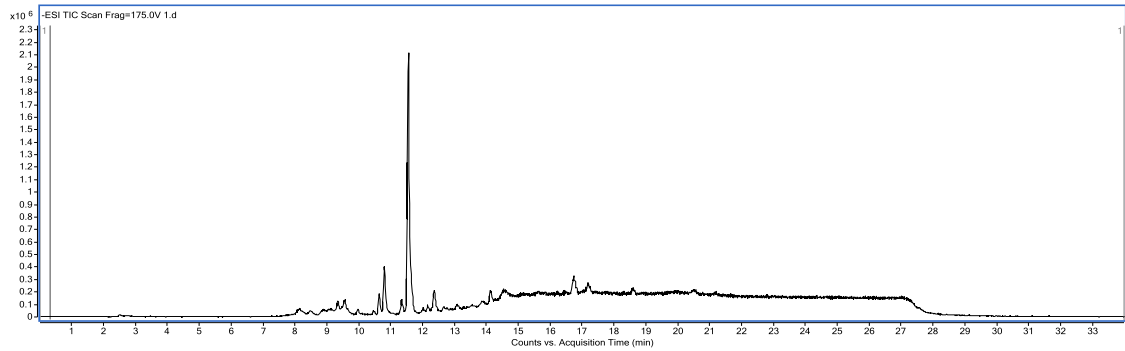
Şekil 4.23. 1 Nolu (5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon) bileşiğin COSY spektrumu (^1H -NMR 400 MHz DMSO-d_6)

1 Nolu bileşikteki proton-proton etkileşimlerini gösteren COSY spektrumu $\delta = 7.58$ ppm'de çakışık olarak görülen H-2' ve H-6' protonlarının $\delta = 6.98$ ppm'de rezonans H-5' protonu ile etkileşimi gözlenmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.24. 1 Nolu (5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon) bileşiğin FT-IR spektrumu (KBr)

FT-IR : 1 Nolu (5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon) bileşiğine ait fonksiyonel grupların gerilme ve eğilme titreşim bantları, $\nu = 3412$ (OH gerilimi), 2941 ve 2830 (alifatik C-H gerilimi), 1648 (C=O gerilimi), 1049 ve 1011 (C-O-C simetrik gerilmeleri), 837 ve 758 (substitue aromatik halka düzlem dışı C-H eğilimleri) cm^{-1} şeklinde gözlenmiştir.



Şekil 4.25. 1 Nolu (5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon) bileşiğin LC-TOF-MS kromatogramı

OM etil asetat ekstraktından izole edilen 1 nolu (5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon) bileşiğin LC-TOF-MS kromatogramlarından kapalı formülü $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_8$ olan bileşiğin 11.5 dakikada moleküler iyon pikinin (-)-ESI MS: m/z : 358.08 $[\text{M}-\text{H}]^-$ olduğu saptandı.

4.8.2. 2 Nolu Bileşğin (S)-2,3-Dihidro-5,7-dihidroksi-2-(3-hidroksi-4-methoksifenil)-4H-1-benzopiran-4-on) Fiziksel ve Spektral Özellikleri

Şekil 4.26. 2 Nolu bileşik (Hesperetin)

Yaygın ismi literatürde Hesperetin olan 2 nolu bileşik OM etil asetat ekstraktından kolon kromatografisi ile ilk önce silikajel dolgu maddesi kullanılıp 75-100 nolu fraksiyonları birleştirilerek tekrar silikajel dolgu maddesi ile diklormetan: etilasetat (1:1) çözücü sisteminde 18-20 nolu fraksiyonlardan kristallendirilerek izole edildi (30 mg). İzole edilen molekülün fiziksel görünümümü ise kirli beyaz renkli amorf toz şeklindedir. Bileşğin erime noktası 226-228 °C olarak ölçüldü. Hesperetin molekülü bilinen bir bileşik olup elde edilen veriler literatür (Waver ve ark., 2001) ile uyum içindedir.

Bileşik, $C_{16}H_{14}O_6$ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon piki $[M-H]^-$ LC-MS-TOF kütle spektrumunda m/z 301.27 olarak belirlendi.

FT-IR $\nu(\text{cm}^{-1})$ 3412, 2941, 2830, 1648, 1049, 1011, 837, 758

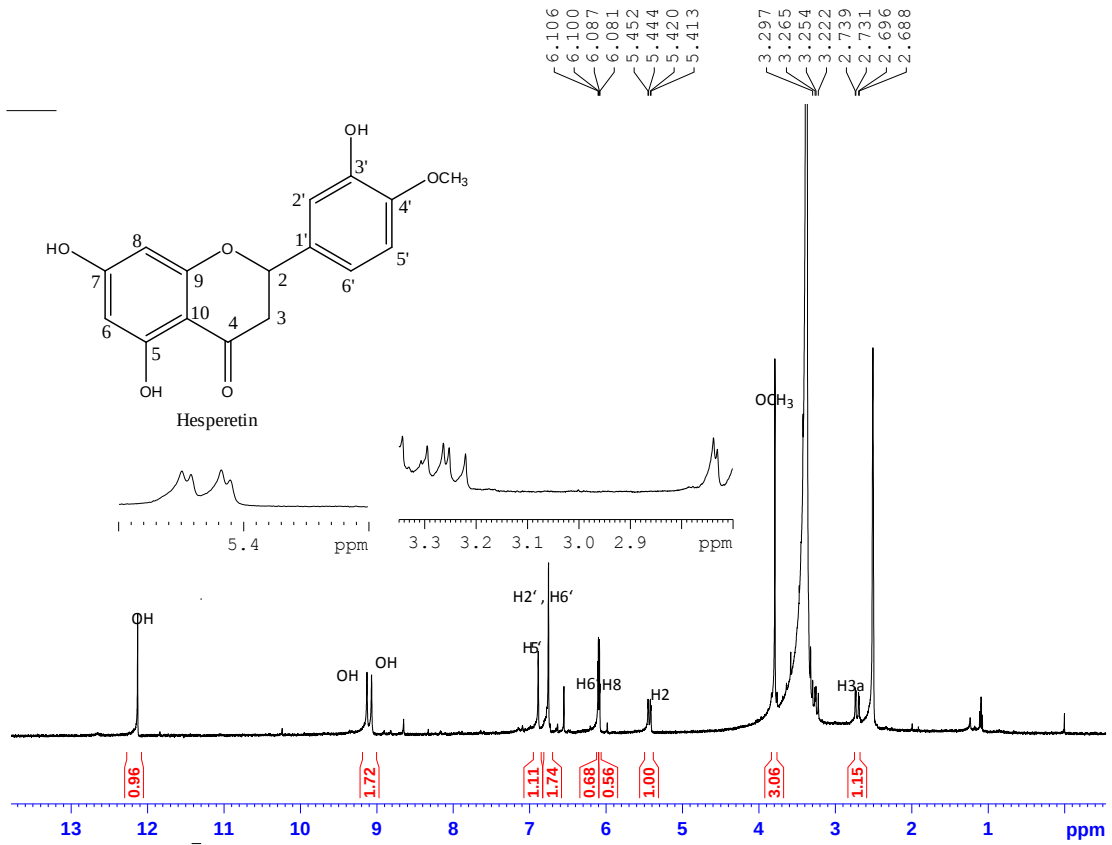
2 Nolu bileşiğin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR kimyasal kayma değerleri çizelge 4.15’de verilmiştir.

Çizelge 4.13. 2 Nolu (Hesperetin) bileşiğin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR (400/100 MHz DMSO- d_6) kimyasal kayma değerleri

C/H	δ_{H} ppm (Hz)	δ_{C} ppm
1	-	-
2	5.43 (dd $J = 12.6, 3.0$ Hz)	79.1
3a	2.71 (dd $J = 17.1, 3.0$ Hz)	42.6
3b	3.29 (dd $J = 17.1, 12.5$ Hz)	-
4	-	197.4
5	-	163.3
6	6.08 (d $J = 2.2$ Hz)	95.1
7	-	167.8
8	6.1 (d $J = 2.2$ Hz)	94.3
9	-	163.6
10	-	103.1
1'	-	129.7
2'	6.76 geniş s	115.8
3'	-	145.7
4'	-	146.2
5'	6.89 geniş s	114.8
6'	6.76 geniş s	118.5
4'-OMe	3.79 s	56.4

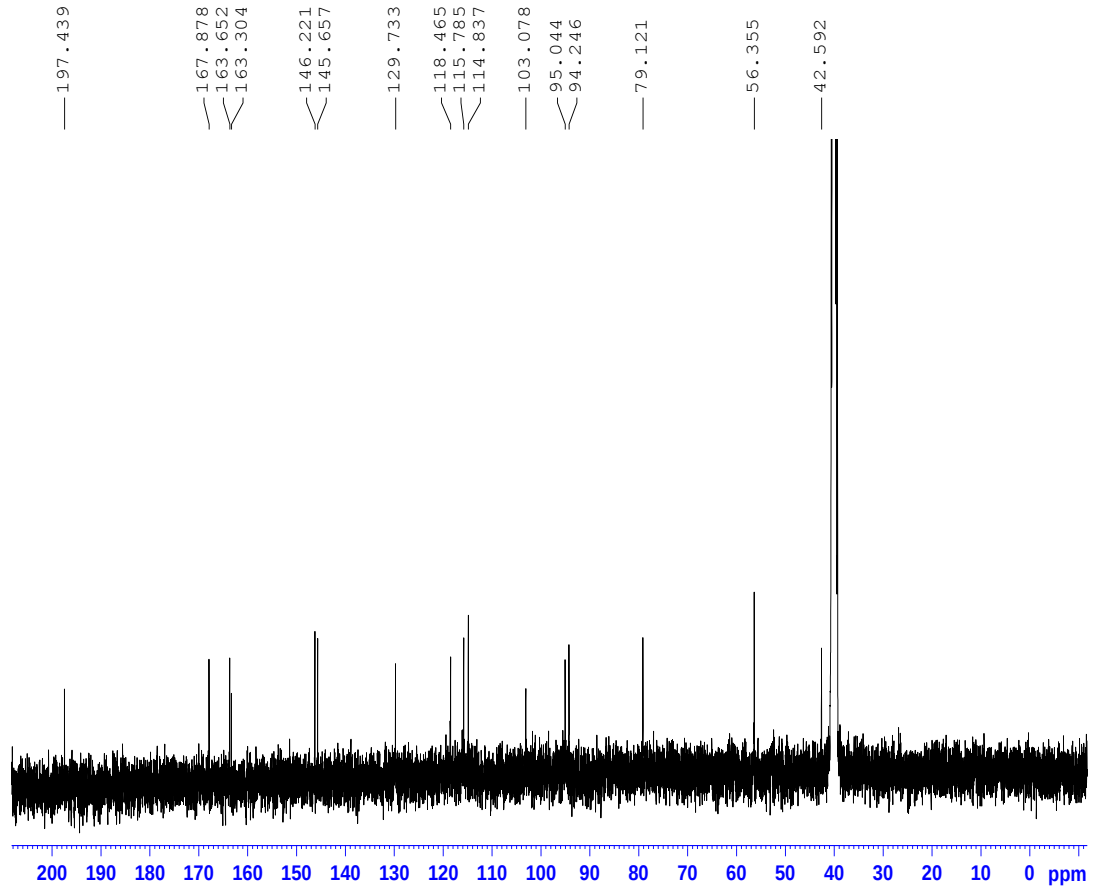
Hes

Şekil 4.27.2 Nolu (Hesperetin) bileşiğin HMBC korelasyonları



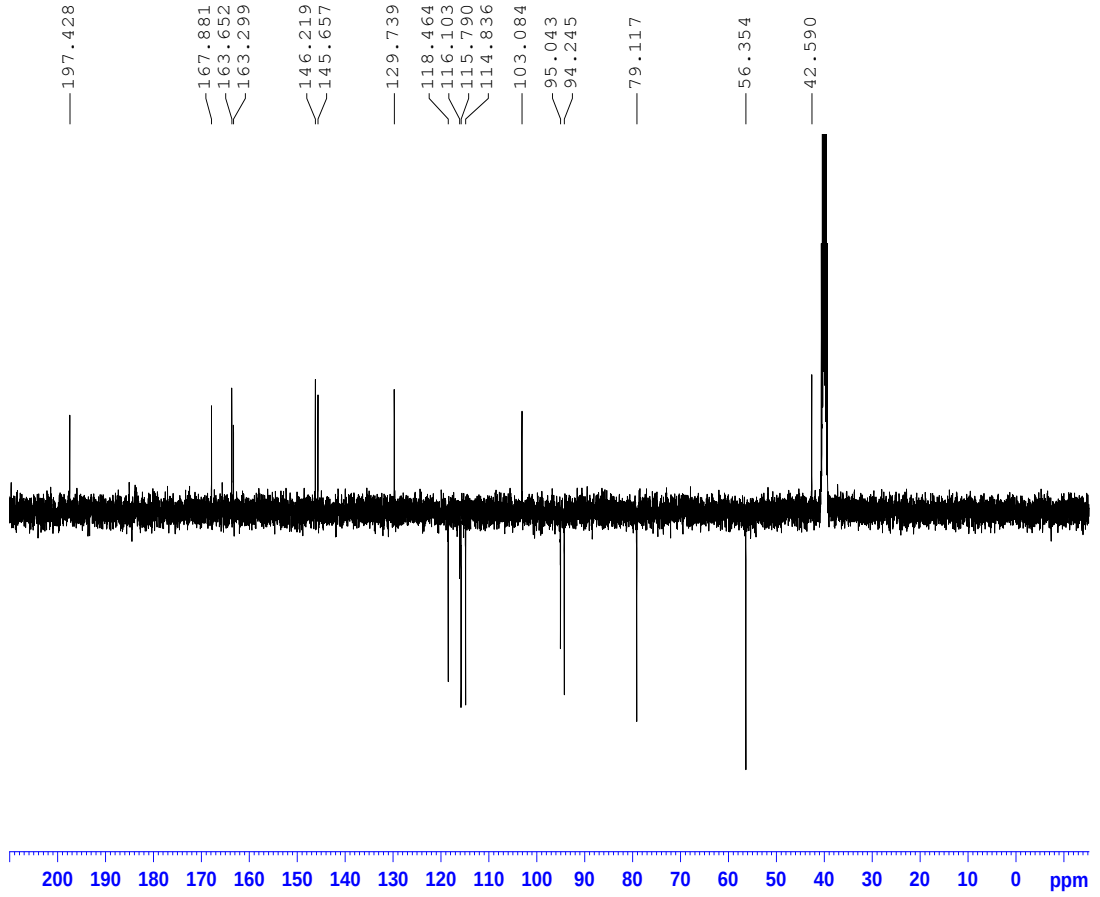
Şekil 4.28. 2 Nolu (Hesperetin) bileşiğin ^1H -NMR spektrumu (^1H -NMR400 MHz DMSO- d_6)

2 Nolu bileşiğin ^1H -NMR spektrumundan, bileşiğin flavonon iskeleti içerdiği tespit edilmiştir. ^1H -NMR spektrumunda flavon yapısının B (sinnaoil) halkasına ait H-2' ve H-6' protonları $\delta = 6.76$ ppm'de geniş singlet, H-5' protonu $\delta = 6.98$ ppm'de dublet ($J = 6.8$ Hz) gözlemlendi. Flavonoid iskeletindeki A (benzoil) halkasındaki H-6 ve H-8 protonları sırasıyla $\delta = 6.08$ ve $\delta = 6.10$ ppm'de dublet ($J = 2.2$ Hz), C halkasına ait H-3a ve H-3b protonları $\delta = 2.71$ ve $\delta = 3.29$ ppm'de ve H-2 protonu ise $\delta = 5.43$ ppm'de ($J = 12.6, 3.1$ Hz) dubletin dubleti olarak görülmüştür (Şekil 4.28).



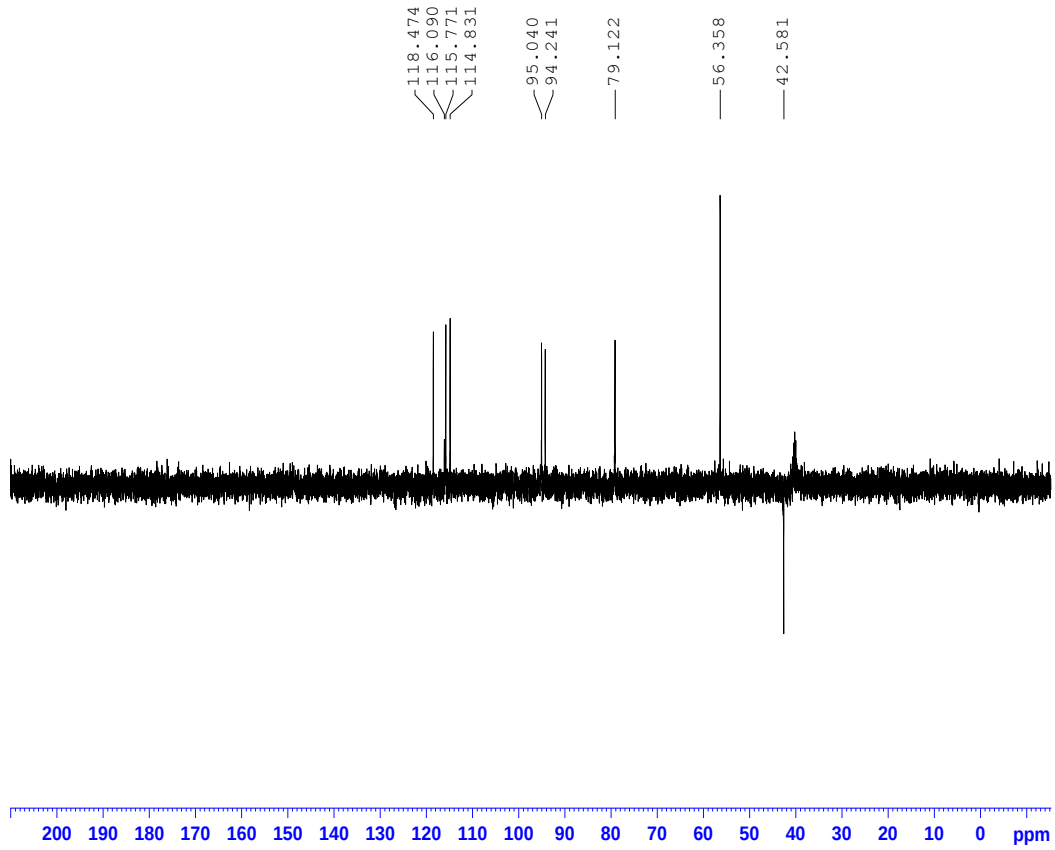
Şekil 4.29. 2 Nolu (Hesperetin) bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumu (^{13}C -NMR 100 MHz DMSO- d_6)

2 Nolu bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumu incelendiğinde, flavonoid iskeletinde 16 tane karbon olduğu görülmektedir. 16 karbondan 8 tanesi kuaterner karbonu, 6 tanesi metin karbonu, 1 tanesi metilen karbonu ve 1 tanesi de metoksi karbonudur. (Şekil 4.29).



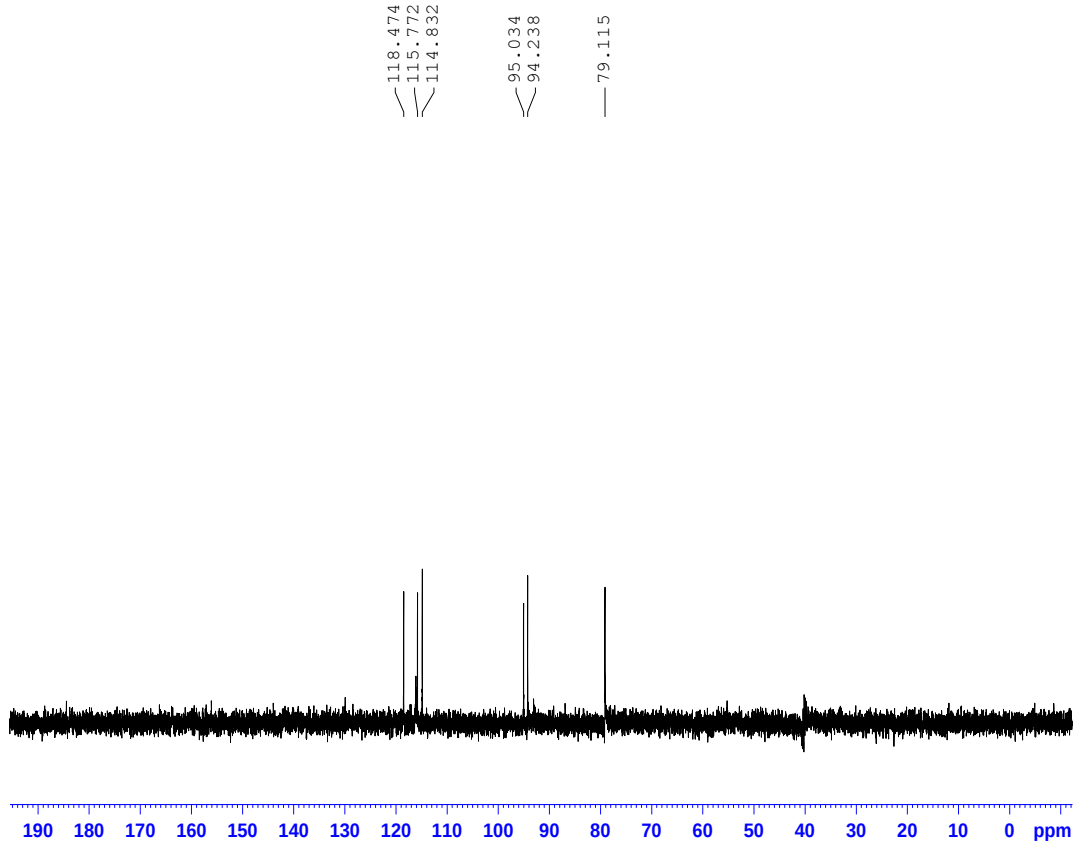
Şekil 4.30. 2 Nolu (Hesperetin) bileşiğın APT spektrumu (^{13}C -NMR 100 MHz DMSO- d_6)

2 Nolu (hesperetin) bileşiğın APT spektrumunda 8 adet kuarterner karbonu (-C) ve metilen ($-\text{CH}_2$) karbonlar spektrumda pozitif olarak gözlenirken, 6 adet metin (-CH) karbonu ve 1 adet metil ($-\text{CH}_3$) karbonu negatif olarak gözlenmiştir (Şekil 4.30).



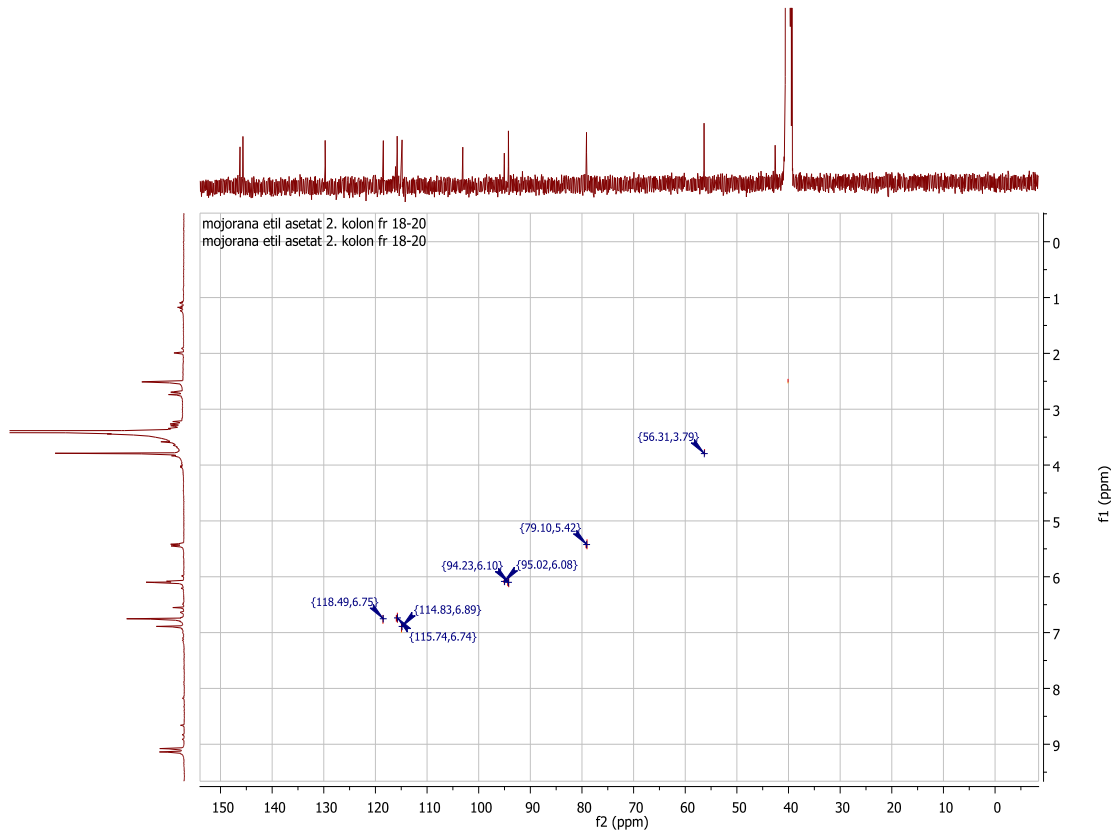
Şekil 4.31. 2 Nolu (Hesperetin) bileşiğin DEPT135 spektrumu (^{13}C -NMR 100 MHz DMSO- d_6)

2 Nolu bileşiğin DEPT-135 spektrumunda $-\text{CH}$ ve $-\text{CH}_3$ tipi karbon atomları pozitif pik verirken $-\text{CH}_2$ tipi karbonlar ise negatif olarak pik verir. Kuarterner karbonlar ise bu spektrumlarda gözlenmez. 2 nolu (hesperetin) bileşiğin DEPT-135 spektrumu incelendiğinde yapısında 6 tane $-\text{CH}$ grubu pozitif pik verirken 1 tane $-\text{CH}_2$ grubunun 42.5 ppm’de rezonans olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.31).



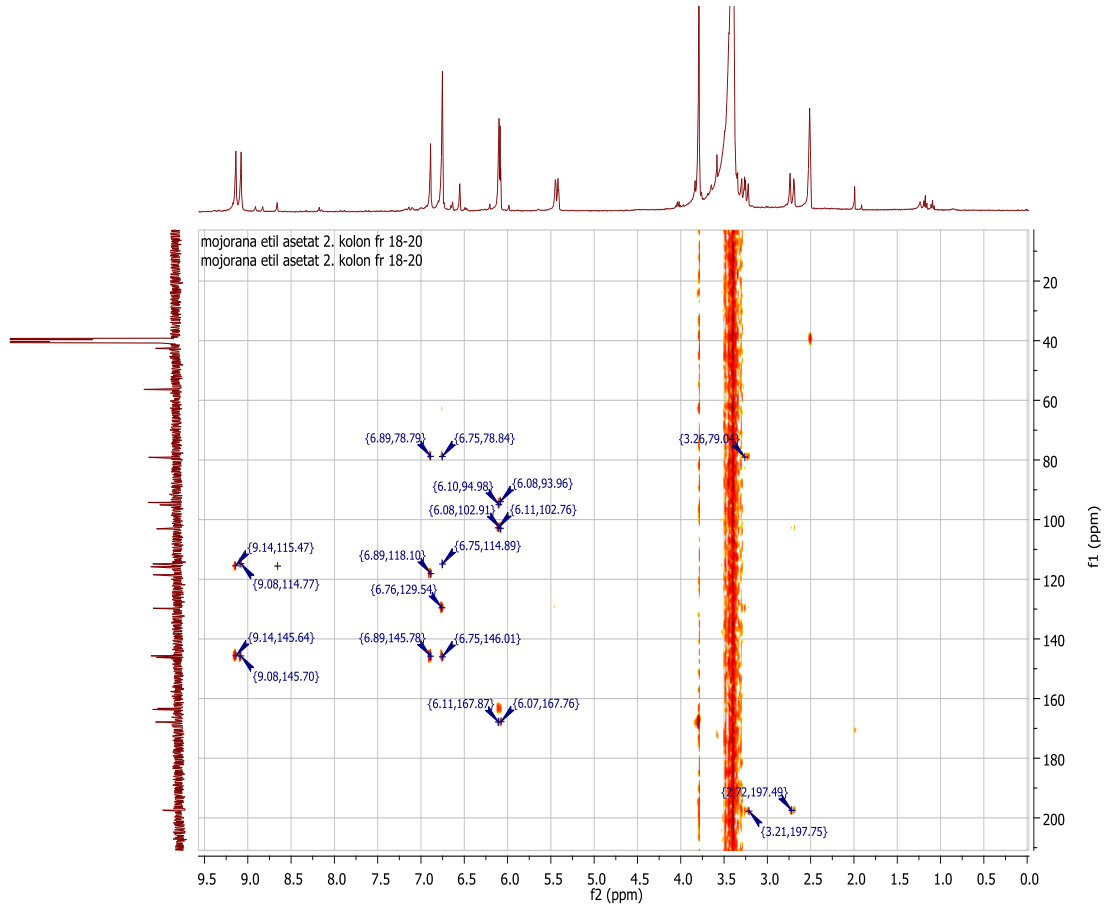
Şekil 4.32. 2 Nolu (Hesperetin) bileşiğin DEPT-90 spektrumu (^{13}C -NMR 100 MHz DMSO- d_6)

2 Nolu bileşiğin DEPT-90 spektrumlarında sadece $-\text{CH}$ tipi karbonlar spektrumda pozitif olarak gözlenirken $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$ ve $-\text{C}$ tipi karbonlar gözlenmez. Moleküle ait 6 adet metin karbonları ($-\text{CH}$) DEPT-90 spektrumunda pozitif olarak gözlenmiştir (Şekil 4.32).



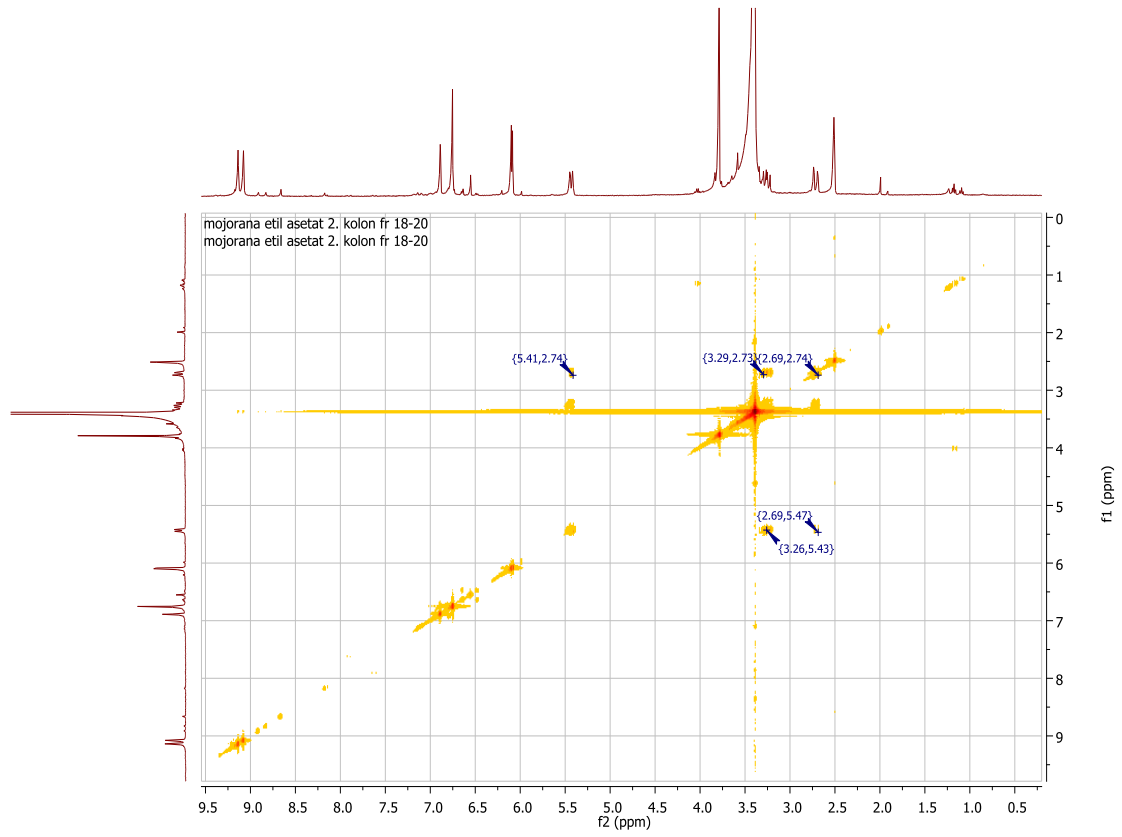
Şekil 4.33. 2 Nolu (Hesperetin) bileşiğin HETCOR spektrumu (¹H-NMR 400 MHz, ¹³C-NMR 100 MHz DMSO-d₆)

2 Nolu bileşiğin HETCOR spektrumunda, bileşikteki proton karbon eşleşmeleri tespit edilmektedir. Flavonoid halkasında C-3 (79.1 ppm) karbonunun 5.42 ppm'deki protonla (H-3), C-8 (94.9 ppm) karbonun 6.10 ppm'deki protonla (H-8) ve C-6 (95.1 ppm) karbonun 6.08 ppm'deki protonla (H-6) korele olduğu görülmektedir (Şekil 4.33). Flavonoidin B halkasındaki C-2' ve C-6' karbonlarının (115.8 ve 118.5 ppm) 6.76 ppm'deki protonlarla, metoksi karbonunun (56.4 ppm) 3.79 ppm'deki protonla etkileştiği tespit edilmiştir (Şekil 4.33).



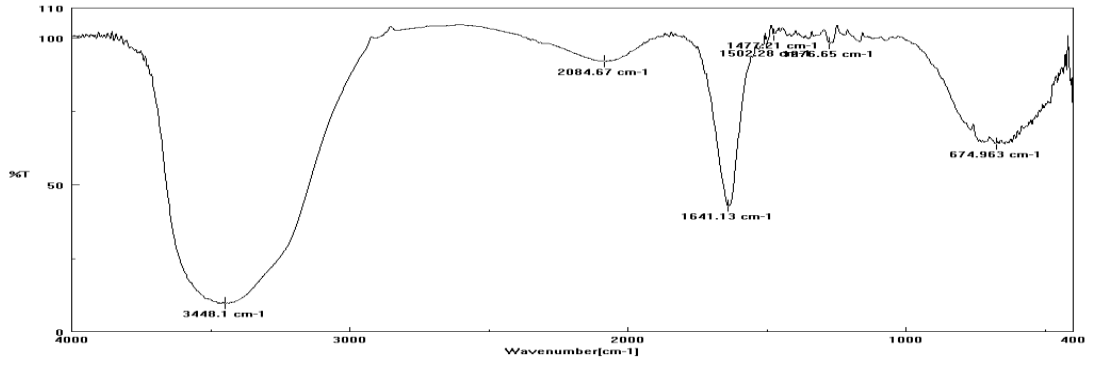
Şekil 4.34. 2 Nolu (Hesperetin) bileşiğin HMBC spektrumu (^1H -NMR400 MHz, ^{13}C -NMR 100 MHz DMSO- d_6)

2 Nolu bileşiğin HMBC spektrumunda flavonoid iskeletinin B halkasının flavon iskeletine 2 nolu karbondan substitüe olması 2 nolu karbonun H-2', H-6' ve H-3 protonları ile uzak mesafe etkileşim yapması ile belirlenmiştir. Spektrumdan C-5 karbonunun, 5-OH ve H-6 protonları ile uzak mesafe, 10 nolu karbonun H-3, 5-OH protonları ile, C-1' karbonunun H-2' ve H-6' protonları ile, 4' karbonunun metoksi protonları ile etkileşme yaptıkları gözlenmektedir (Şekil 4.34).



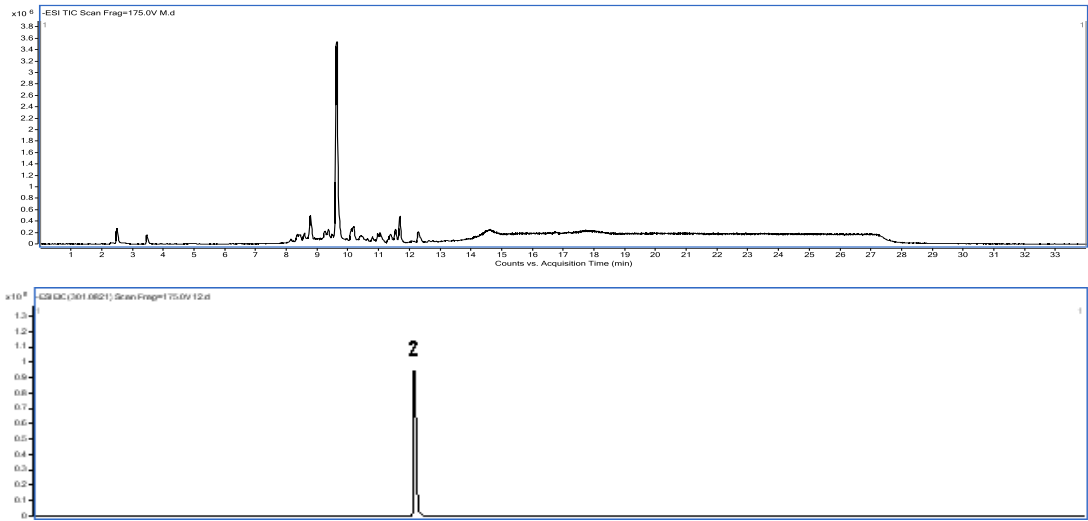
Şekil 4.35. 2 Nolu (Hesperetin) bileşiğın COSY spektrumu (^1H -NMR 400 MHz, DMSO-d_6)

Bileşikteki proton-proton etkileşimlerini göstren COSY spektrumu 2 nolu bileşiğın $\delta = 2.71$ ve $\delta = 3.29$ ppm’de rezonans olan H-3a ve H-3b protonlarının $\delta = 5.43$ ppm’de rezonans H-2 protonu ile etkileşimi gözlenmiştir (Şekil 4.35).



Şekil 4.36. 2 Nolu (Hesperetin) bileşiğin FT-IR spektrumu (KBr)

FT-IR: 2 Nolu (Hesperetin) bileşiğine ait fonksiyonel grupların gerilme ve eğilme titreşim bantları, $\nu = 3448$ (OH gerilimi), 2884 (alifatik C-H gerilimi), 1641 (C=O gerilimi), 1049 ve 1011 (C-O-C simetrik gerilimleri), 674 (substitue aromatik halka düzlem dışı C-H eğilimleri) cm^{-1} şeklinde gözlenmiştir (Şekil 4.36).



Şekil 4.37. OM'nin etil asetat ekstresi ve 2 nolu (Hesperetin) bileşiğin LC-TOF-MS kromatogramı

OM türünün etil asetat ekstresi ve izole edilen 1 nolu (Hesperetin) bileşiğin LC-TOF-MS kromatogramlarından kapalı formülü $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_6$ olan bileşiğin 15. dakikada moleküler iyon pikinin (-)-ESI MS: m/z : 301.1042 $[\text{M}-\text{H}]^-$ olduğu saptandı (Şekil 4.37).

4.8.3. 3 Nolu Bileşğin (Benzen-1,4-diol) Fiziksel ve Spektral Özellikleri

3 Nolu bileşik (Hidrokinon) OM etil asetat ekstraktından kolon kromatografisi ile silikajel dolgu maddesi kullanılarak, hekzan: etilasetat (1: 9) çözücü sisteminde 10-15 nolu fraksiyonlarından kristallendirilerek izole edildi (22 mg). 3 Nolu bileşik fiziksel görünümü beyaz renkli bir yapıdır. Bileşğin erime noktası 172 °C olarak ölçüldü. Hidrokinon molekülü bilinen bir bileşik olup elde edilen veriler literatür (Hajdok ve ark., 2012) ile uyum içindedir.

Bileşik $C_6H_6O_2$ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pikini $[M-H]^{-2}$ LC-TOF-MS kütle spektrumunda m/z 108.05 olarak vermiştir ve yapıyı doğrulamaktadır.

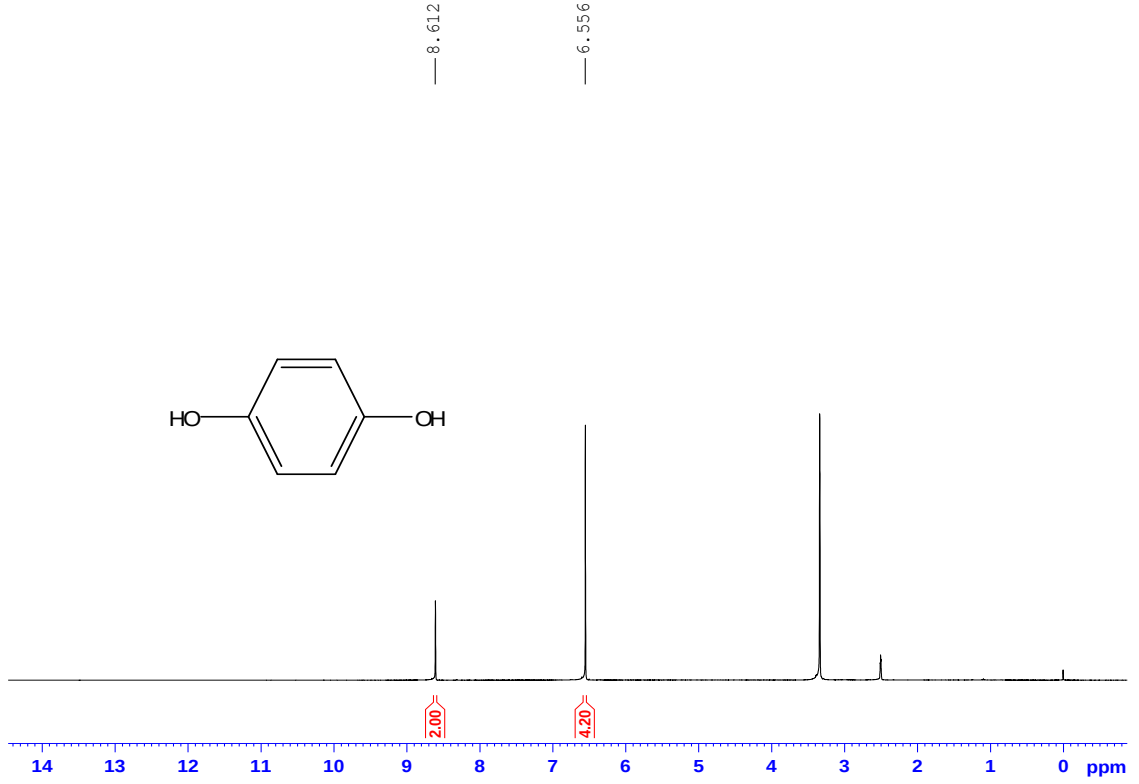
Şekil 4.38. 3 Nolu Bileşik (Hidrokinon)

3 Nolu bileşğin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR kimyasal kayma değerleri çizelge 4.16'de verilmiştir.

Çizelge 4.14. 3 Nolu (Hidrokinon) bileşğin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR (400/100 MHz DMSO- d_6) kimyasal kayma değerleri

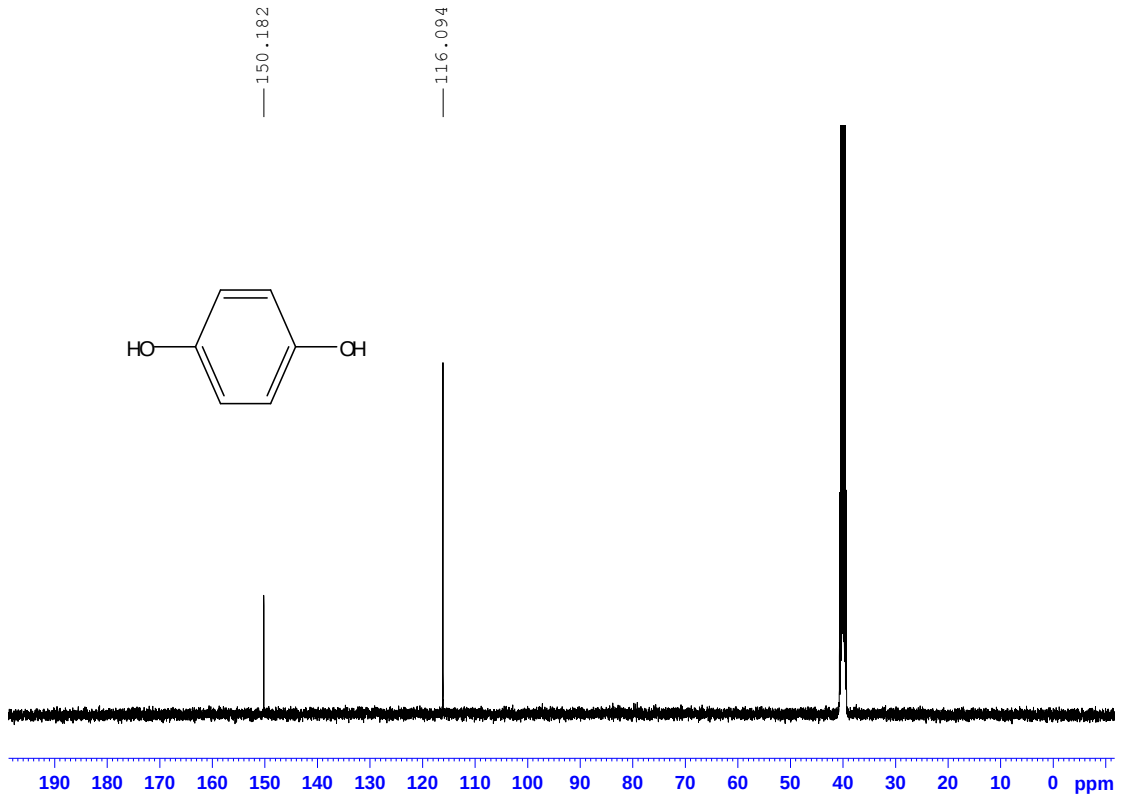
C/H	δ_H ppm (Hz)	δ_C ppm
C ₁ -H		150.2
C _{2,3,5,6} -H	6.55 s	116.0
C ₄ -H		150.2

Şekil 4.39. 3 Nolu (Hidrokinon) bileşğin HMBC korelasyonları



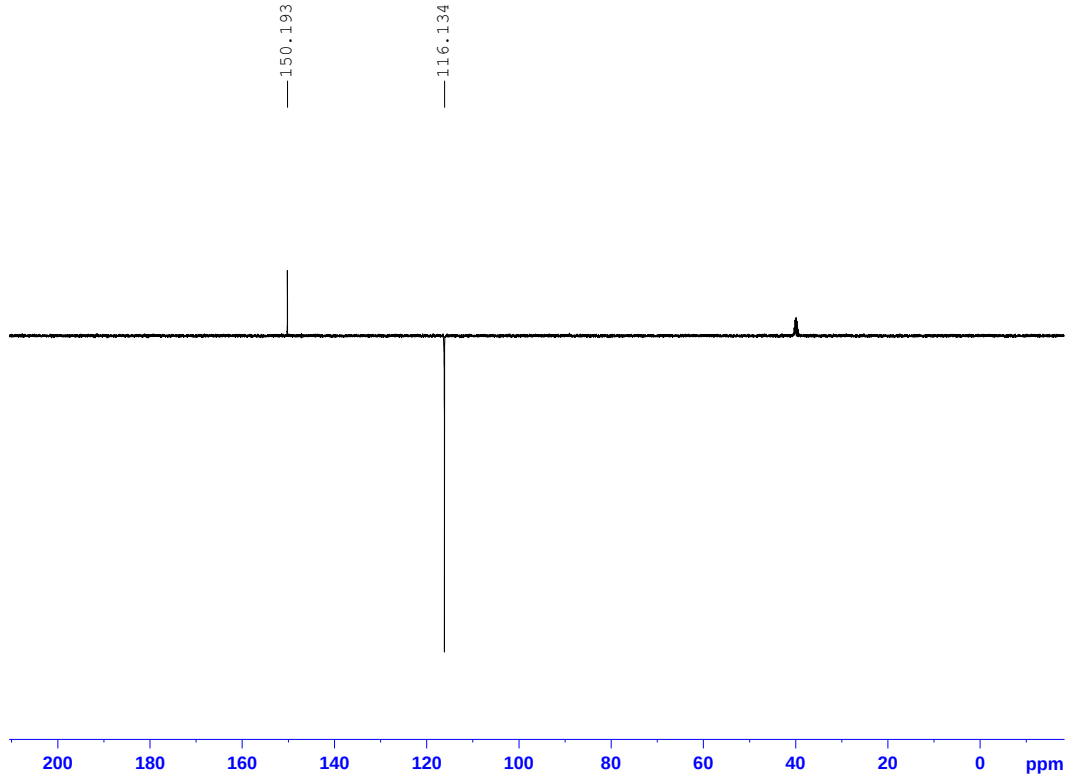
Şekil 4.40. 3 Nolu (Hidrokinon) bileşiğin ^1H -NMR spektrumu (^1H -NMR 400 MHz DMSO- d_6)

3 Nolu (Hidrokinon) bileşiğin ^1H -NMR spektrumundan bileşiğin yapısında bir fenol iskeleti bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.40). Bileşiğin ^1H -NMR spektrumunda, H-2, H-3, H-5, H-6 protonları tam simetrik olarak ile $\delta = 6.55$ ppm'de singlet şeklinde gözlenmiştir. Benzen halkasına bağlı OH grupları ise simetrik olarak $\delta = 8.61$ rezonans olmaktadır (Şekil 4.40).



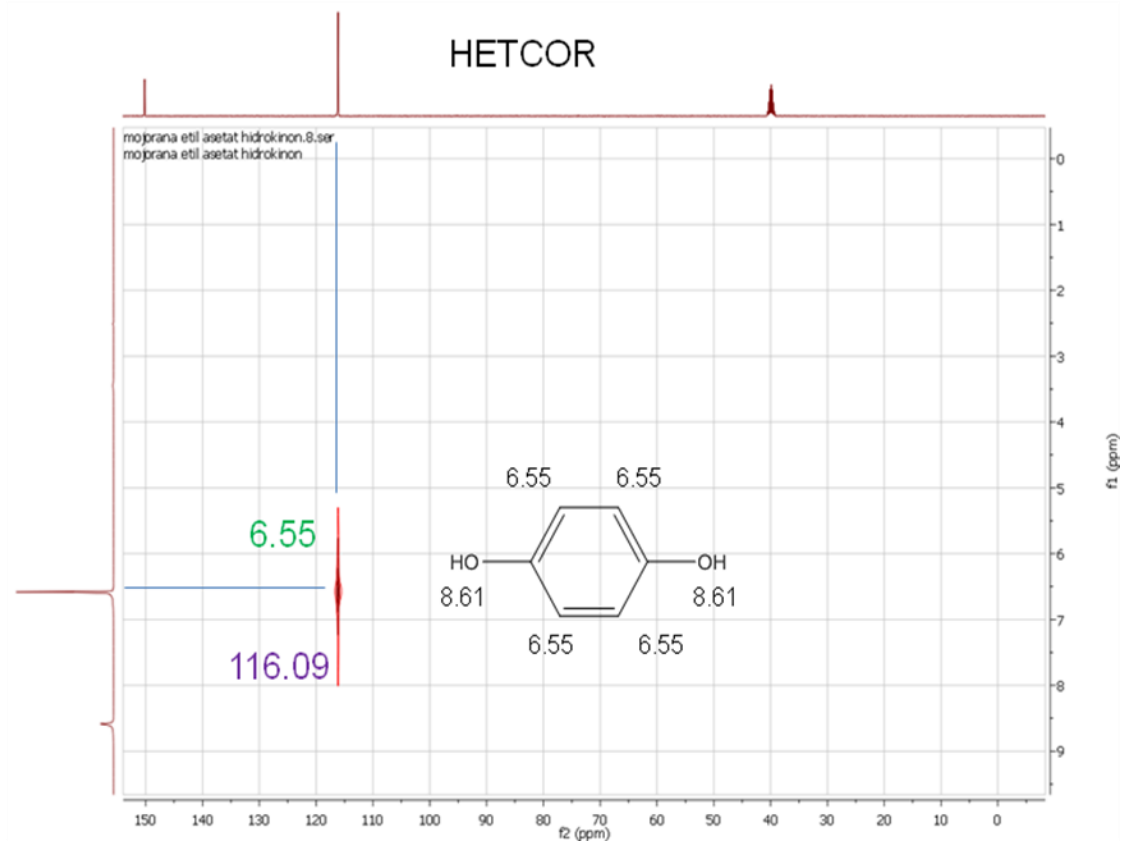
Şekil 4.41. 3 Nolu (Hidrokinon) bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu (^{13}C -NMR 100 MHz DMSO-d_6)

3 Nolu (Hidrokinon) bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu incelendiğinde yapıda 6 tane karbon olduğu görülmektedir. 6 Karbondan 2 tanesi kuaterner karbonu, 4 tanesi metin karbonu bulunması bileşiğin kaba formülünün ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$) olduğunu göstermektedir. Bileşiğin OH grubuna bağlı karbonu (C-1 ve C-4) $\delta = 150.2$ ppm’de metin karbonları ise (C-2, C-3, C-5, ve C-6) $\delta = 116.1$ ppm’de sinyal verdiği görülmüştür (Şekil 4.41).



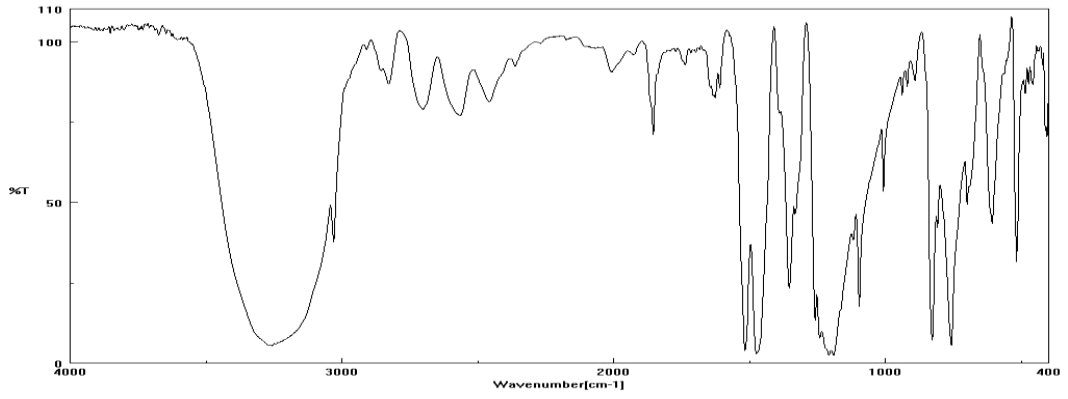
Şekil 4.42. 3 Nolu (Hidrokinon) bileşiğin APT spektrumu (^{13}C -NMR100 MHz DMSO- d_6)

3 Nolu (Hidrokinon) bileşiğin APT spektrumunda 1 adet kuarterner karbonu (-C) spektrumda simetrik pozitif olarak gözlenirken, 4 adet metin (-CH) karbonları negatif olarak gözlendi. Bileşiğe ait 2 adet kuarterner karbonlarının (-C) rezanans pikleri pozitif olarak 150.2 ppm'de ve 4 adet metin karbonları negatif olarak 116.1 ppm'de gözlenmektedir (Şekil 4.42).



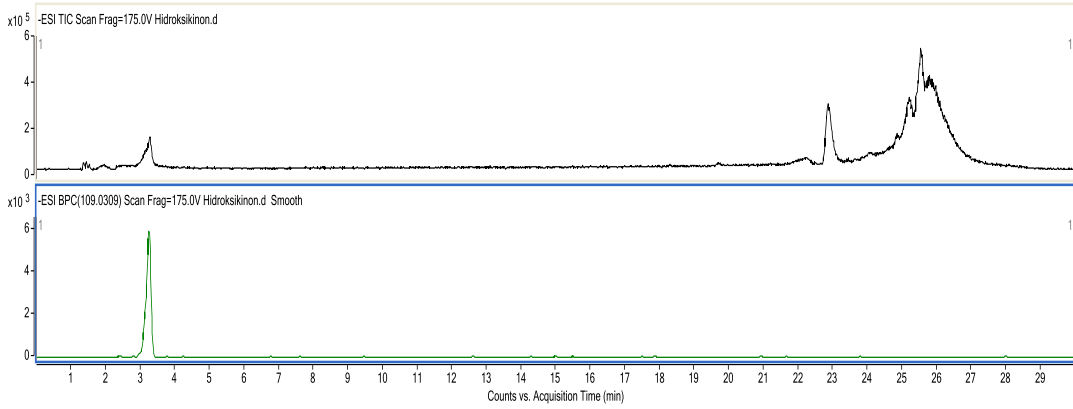
Şekil 4.43. 3 Nolu (Hidrokinon) bileşiğin HETCOR spektrumu (^1H -NMR 400 MHz, ^{13}C -NMR 100 MHz DMSO- d_6)

3 Nolu (Hidrokinon) bileşiğin Benzen halkasında 116.1 ppm'deki C-2, C-3, C-5, C-6 karbonlarının 6.55 ppm'deki protonlarla (H-2, H-3, H-5, H-6) korele olduğu görülmektedir (Şekil 4.43).



Şekil 4.44. 3 Nolu (Hidrokinon) bileşiğin FT-IR spektrumu (KBr)

FT-IR: 3 Nolu (Hidrokinon) bileşiğin FT-IR spektrumunda fonksiyonel gruplar, $\nu=3303$ (OH gerilimi), 3059 (aromatik, $=C-H$ gerilimleri), 2940 (alifatik, $C-H$ gerilimleri), 1595 ($C=C$ gerilimleri), 1067 ve 1033 ($C-O-C$ simetrik gerilimi), 767 ve 820 (substitue aromatik halka düzlem dışı para substitue $C-H$ eğilimleri) cm^{-1} (Şekil 4.44) olarak gerilme ve titreşim hareketleri sonucu pikler vermiştir.



Şekil 4.45. 3 Nolu (Hidrokinon) bileşiğin LC-TOF-MS kromatogramı

3 Nolu (Hidrokinon) bileşiğin LC-TOF-MS kromatogramlarından kapalı formülü $C_6H_6O_2$ olan bileşiğin 3. dakikada moleküler iyon pikinin (-)-ESI MS: m/z : $108,50 [M-H]^{-2}$ olduğu saptandı (Şekil 4.45).

4.8.4. 4 Nolu Bileşğin (2R,3S,4S,5R,6S)-2-Hidroksimetil-6-(4 hidroksifenoksi)oksan-3,4,5-triol) Fiziksel ve Spektral Özellikleri

Şekil 4.46. 4 Nolu Bileşik (Arbutin)

4 Nolu bileşik (Arbutin) OM etil asetat ekstraktından kolon kromatografisinde silikajel dolgu maddesi kullanılarak hekzan:etilasetat (1:9) çözücü sisteminde 10-15 nolu fraksiyonlardan kristallendirilerek izole edildi (120 mg). 4 Nolu bileşik fiziksel görünümü beyaz renklidir. Bileşğin erime noktası 199-200 °C olarak ölçüldü. Arbutin molekülü bilinen bir bileşik olup elde edilen veriler literatür (Wiedenfeld ve ark., 2007) ile uyum içindedir.

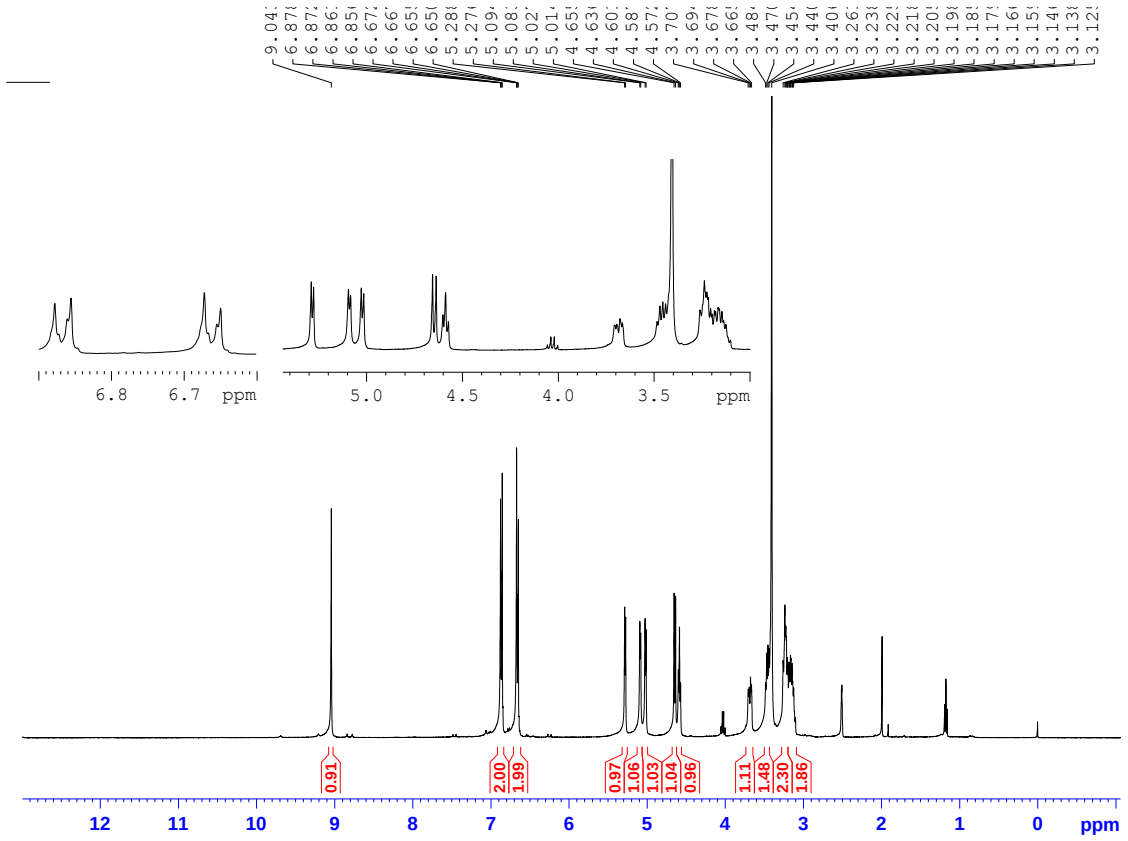
Bileşik $C_{12}H_{16}O_7$ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pikini $[M-H]^-$ LC-MS-TOF kütle spektrumunda m/z: 271.08 olarak bulunmuştur ve yapıyı doğrulamaktadır.

4 Nolu bileşiğin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR kimyasal kayma değerleri çizelge 4.17’de verilmiştir.

Çizelge 4.15. 4 Nolu (Arbutin) bileşiğin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR (400/100 MHz DMSO- d_6) kimyasal kayma değerleri

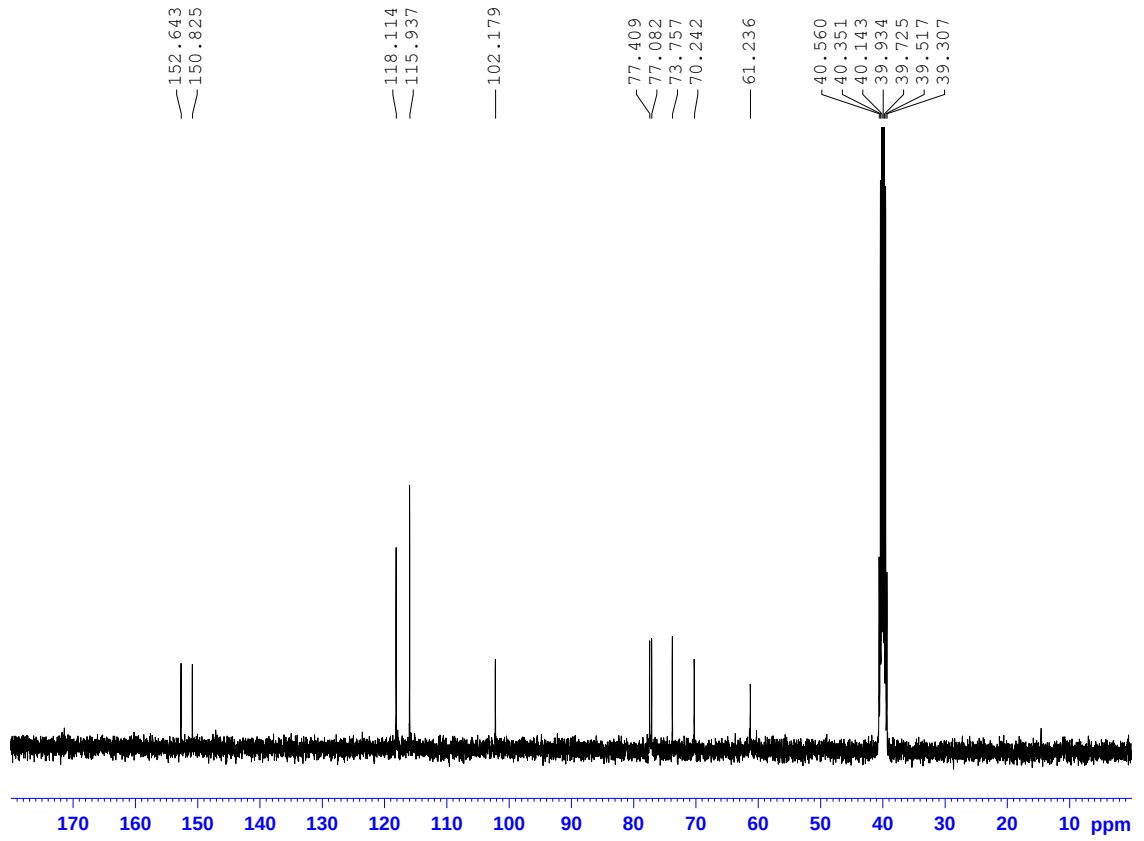
C/H	δ_{H} ppm (Hz)	δ_{C} ppm
1		150.6
2,6	6.66 (d, $J = 8.9$ Hz)	115.9
3,5	6.87 (d, $J = 8.9$ Hz)	118.1
4		152.6
1'	4.64 (d, $J = 7.5$ Hz)	102.2
2'	3.14 m	73.7
3'	3.23 m	77.1
4'	3.14 m	70.2
5'	3.23 m	77.4
6'a	3.47 m	61.2
6'b	3.69 m	

Şekil 4.47. 4 Nolu (Arbutin) bileşiğin HMBC korelasyonları



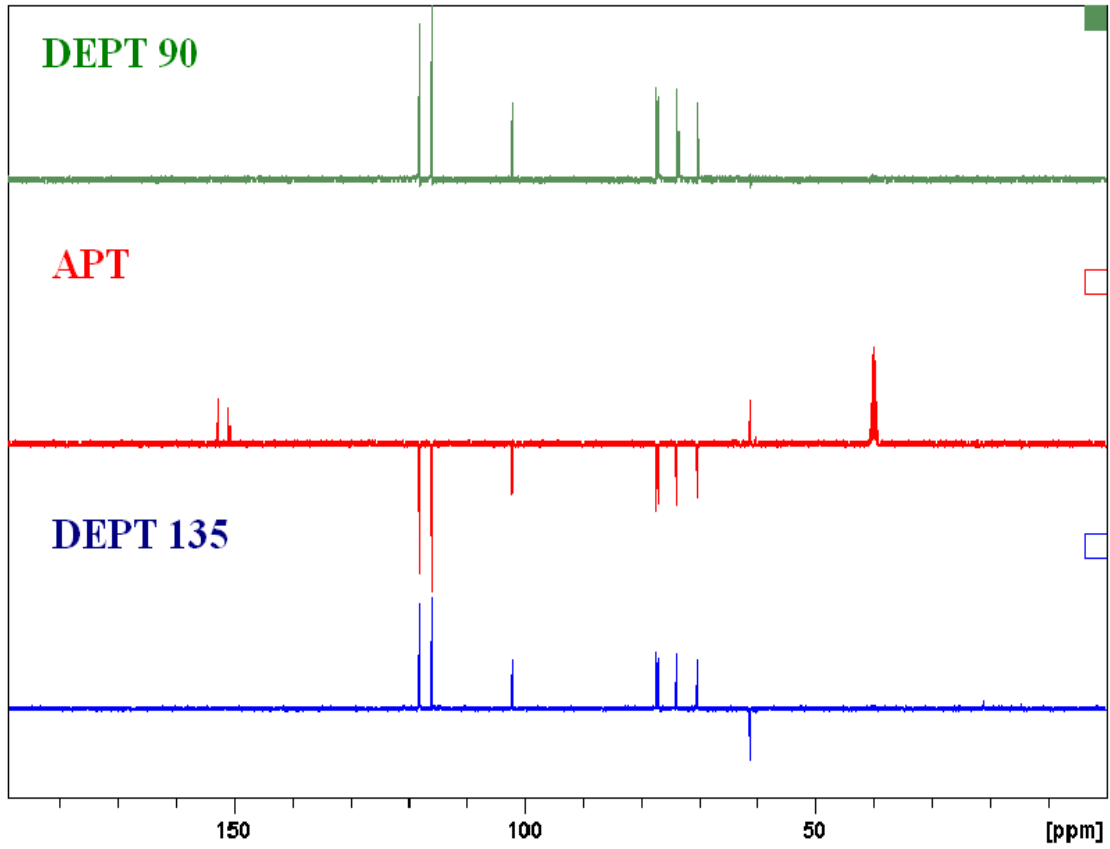
Şekil 4.48. 4 Nolu (Arbutin) bileşiğin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu ($^1\text{H-NMR}$ 400 MHz DMSO-d_6)

4 Nolu bileşiğin (Şekil 4.48). $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda aromatik halkasına ait H-2 ve H-6 protonları $\delta = 6.66$ ppm'de ($J = 8.9$ Hz) dublet, H-3, H-5 protonu $\delta = 6.87$ ppm'de ($J = 8.9$ Hz) dublet gözlendi. $^1\text{H-NMR}$ spektrumundan, bileşiğin bir aromatik halka içerdiği tespit edilmiştir. Glikozit grubuna bağlı anomerik 4.64 ppm'deki protonun dublet $J = 7.52$ Hz etkileşme sabitine sahip olması, glikozun halkaya β -glikozidik olarak bağlı olduğunu göstermiştir. Ayrıca şeker grubunun diğer protonları 3-5 ppm arasında rezonans olmuştur (Şekil 4.48).



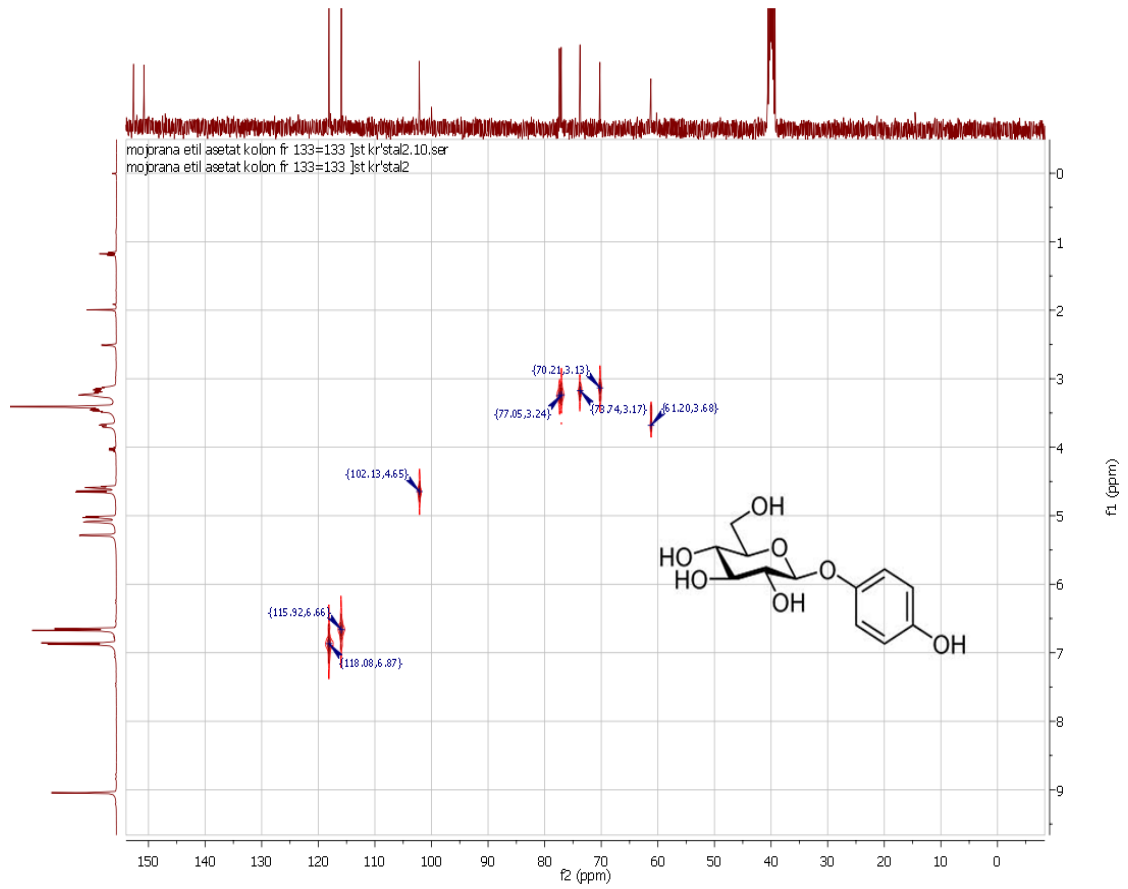
Şekil 4.49. 4 Nolu (Arbutin) bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumu (^{13}C -NMR, 100 MHz, DMSO- d_6)

4 Nolu bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumu incelendiğinde, toplamda 10 tane karbon olduğu görülmektedir. 10 karbondan $\delta = 150.8$ ve $\delta = 152.6$ ppm’de 2 tanesi kuaterner karbonu, 7 tanesi metin karbonu (C-2, C-6 ve C-3, C-5 karbonları simetrik olduklarından aynı yerde rezonans olmuştur), 1 tanesi metilen karbonudur. (Şekil 4.49).



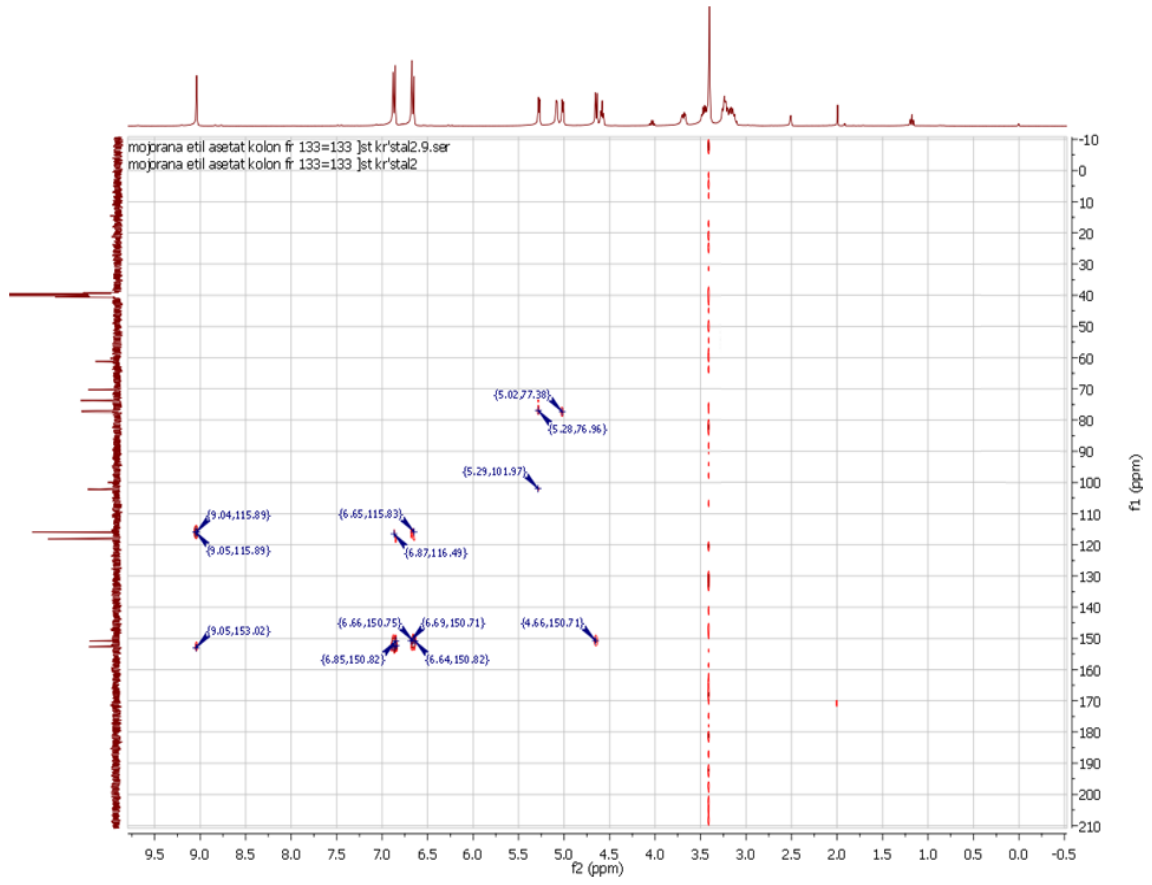
Şekil 4.50. 4 Nolu (Arbutin) bileşiğin DEPT-90, DEPT-135, APT NMR spektrumları (¹³C-NMR 100 MHz, DMSO-d₆)

4 Nolu bileşiğine ait APT, DEPT-90 ve DEPT-135 spektrumları incelendiğinde yapıda 12 karbon atomu olduğu görülmektedir. 12 karbondan 2 tanesi kuaterner karbonu (DEPT-90 ve DEPT-135 spektrumlarında sinyal vermeyen kısım), 9 tanesi metin karbonu (DEPT-90 ve DEPT-135 spektrumunda pozitif sinyal), 1 metilen karbonu (DEPT-135 spektrumunda negatif ve APT spektrumundaki pozitif sinyaller) içerdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.50).



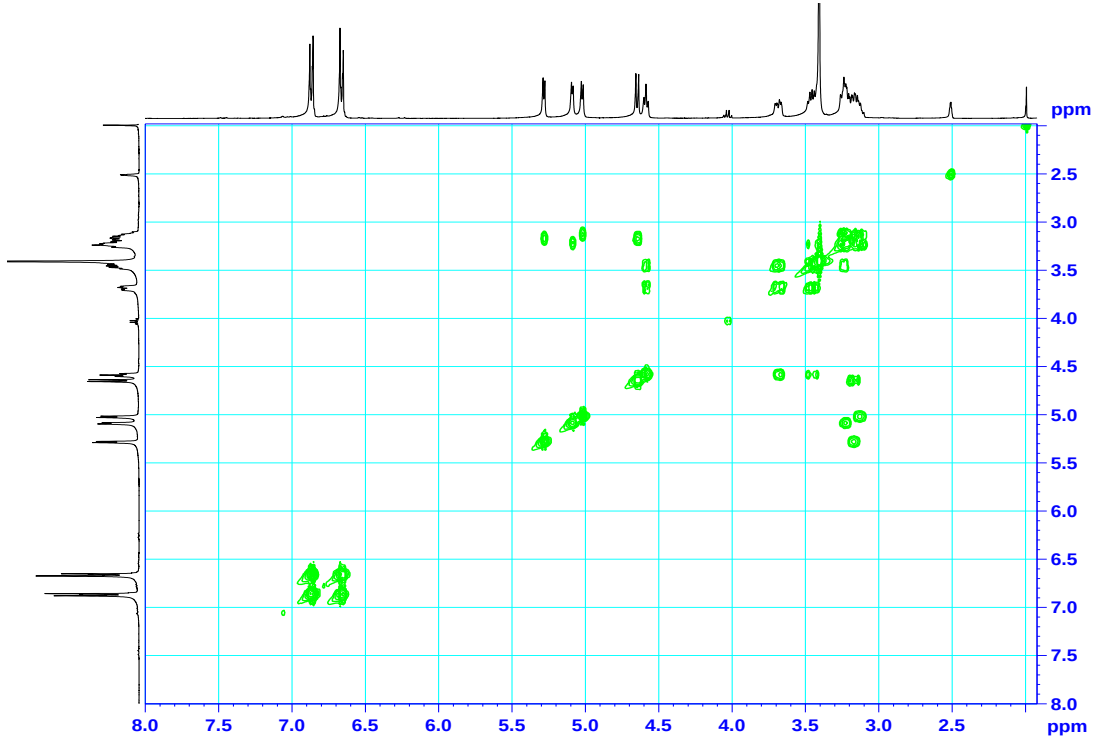
Şekil 4.51. 4 Nolu (Arbutin) bileşiğin HETCOR spektrumu (^1H -NMR 400 MHz, ^{13}C -NMR 100 MHz, DMSO- d_6)

4 Nolu bileşiğin HETCOR spektrumunda, bileşikteki proton karbon eşleşmeleri tespit edilmektedir. Benzen halkasındaki C-2 ve C-6 (115.9 ppm) karbonunun 6.66 ppm'deki protonla (H-2 ve H-6), C-3 ve C-5 (118.1) karbonun 6.87 ppm'deki protonla (H-3 ve H-5) ve glikozun anomerik C-1' (102.2) karbonun 4.64 ppm'deki protonla (H-1'), yine glikozdaki metilen C-6' (61.2) karbonun 3.47 ve 3.69 ppm'deki protonla (H-6a' ve H-6b') korele olduğu görülmektedir (Şekil 4.51).



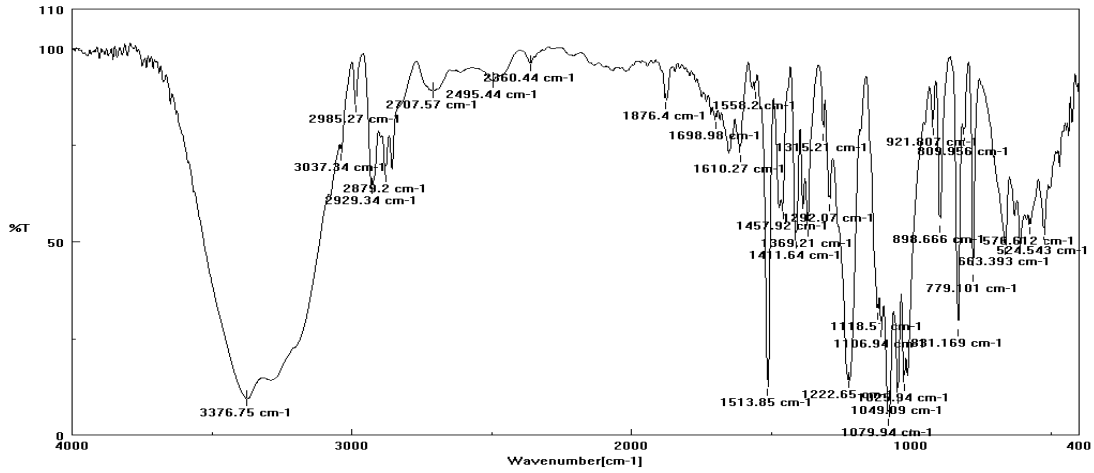
Şekil 4.52. 4 Nolu (Arbutin) bileşiğin HMBC spektrumu (^1H -NMR 400 MHz, ^{13}C -NMR 100 MHz, DMSO- d_6)

4 Nolu bileşiğin HMBC spektrumunda aromatik halkadaki 6.66 ppm'deki H-2 ve H-6 protonların 150.6 ppm'deki (C-1) karbonla, H-3 ve H-5 in 6.87 ppm'deki protonları 152.6 ppm'deki (C-4) karbonuyla ve 4.64 ppm'deki glikozun anomerik H-1' protonun 150.6 ppm'deki (C'-1) karbonla korele olduğu ve böylece glikozidik bağlanmanın H-1' / C-1''den olduğu görülmektedir (Şekil 4.52).



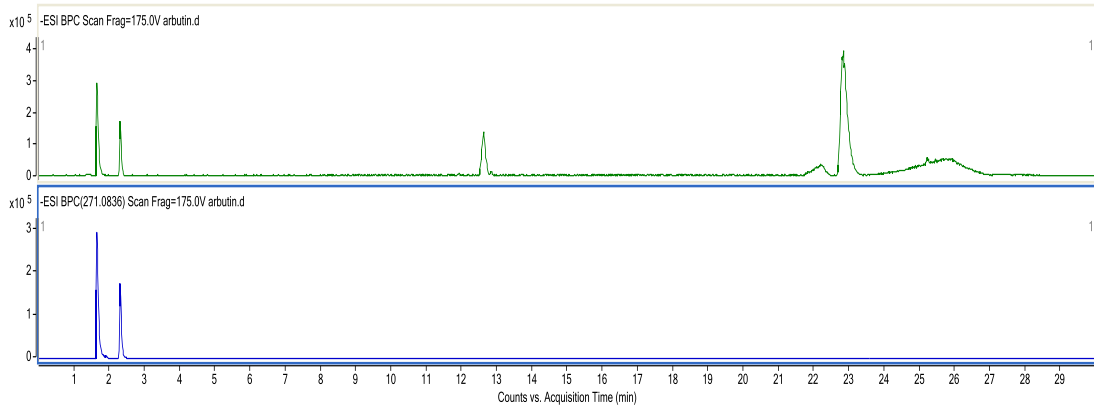
Şekil 4.53. 4 Nolu (Arbutin) bileşiğin COSY spektrumu (^1H -NMR 400 MHz, DMSO-d_6)

4 Nolu bileşikteki proton-proton etkileşimlerini göstren COSY spektrumunda $\delta = 6.66$ ppm'de H-2, H-6 protonlarının $\delta = 6.87$ ppm'deki H-3, H-5 protonları ile etkileşimi gözlenirken ayrıca şeker protonlarının birbirleriyle etkileşimleri görülmüştür (Şekil 53).



Şekil 4.54. 4 Nolu (Arbutin) bileşiğin FT-IR spektrumu (KBr)

FT-IR: 4 Nolu (Arbutin) bileşiğine ait fonksiyonel grupların gerilme ve eğilme titreşim bantları, $\nu = 3376$ (OH gerilimi), 2879 (alifatik C-H gerilimi), 898 ve 779 (substitue aromatik halka düzlem dışı C-H eğilimleri) cm^{-1} şeklinde gözlenmiştir (Şekil 4.54).



Şekil 4.55. 4 Nolu (Arbutin) bileşiğin LC-TOF-MS kromatogramı

4 nolu (Arbutin) bileşiğin LC-TOF-MS kromatogramlarından kapalı formülü $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_7$ olan bileşiğin moleküler iyon pikinin (-)-ESI MS: m/z : 271,08 $[\text{M}-\text{H}]^-$ olduğu saptandı (Şekil 4.55).

4.8.5. 5 Nolu Bileşiğın [(2''R'')-2-[(2''E'')-3-(3,4-Dihidroksifenil)-1-okso-2-propenil]]oksi]-3-(3,4-dihidroksifenil) propanoik asit)] Fiziksel ve Spektral Özellikleri

Şekil 4.56. 5 Nolu bileşik (Rozmarinik asit)

Yaygın ismi literatürde Rozmarinik asit olan 5 nolu bileşik OM etil asetat ekstraktından kolon kromatografisi ile silikajel dolgu maddesi kullanılarak etilasetat:metanol (9:1) çözücü sisteminde 170-210 nolu fraksiyonlardan izole edildi (300 mg). İzole edilen molekülün fiziksel görünümü ise sarı renkli amorf toz şeklindedir. Bileşiğın erime noktası 171-175 °C olarak tespit edildi. Rozmarinik asit molekülü bilinen bir bileşik olup elde edilen veriler literatür (Lu ve ark., 1999) ile uyum içindedir.

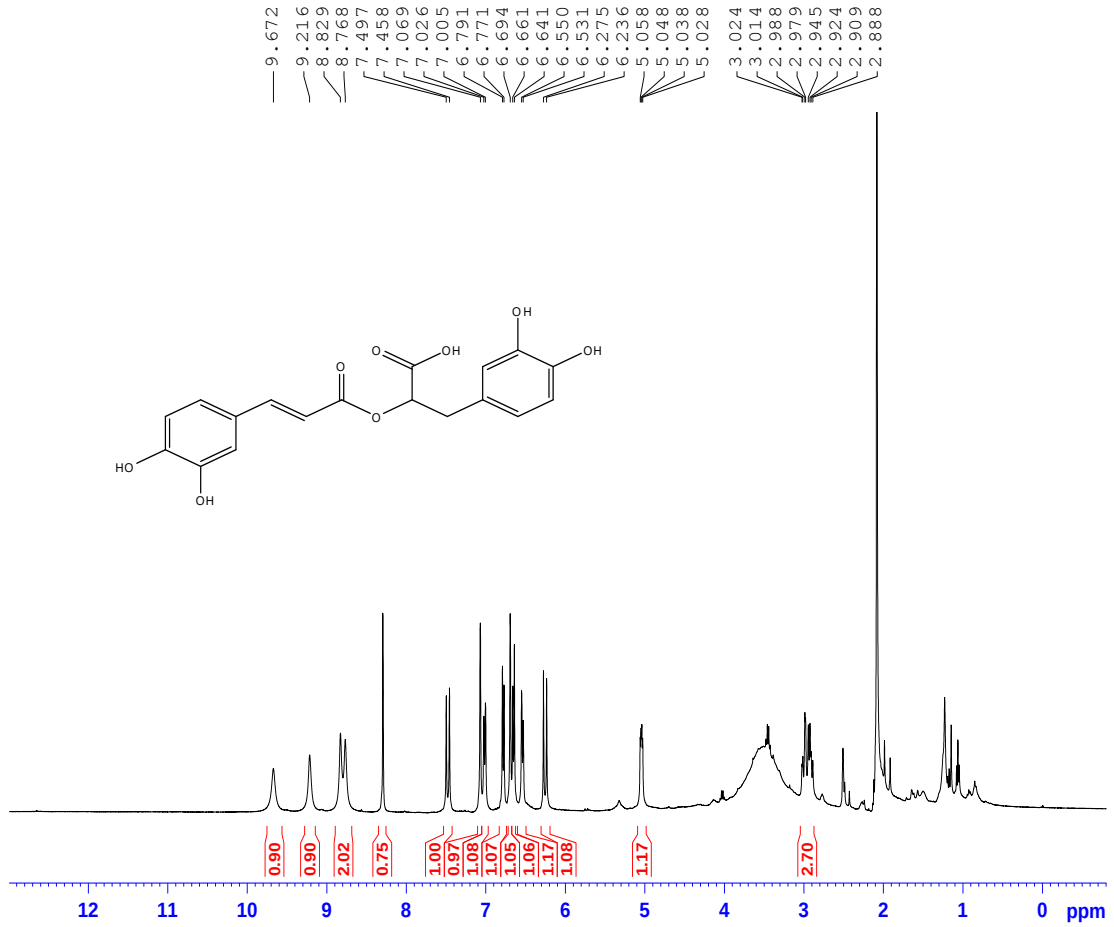
Bileşik C₁₈H₁₆O₈ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon piki [M-H]⁻ LC-TOF-MS kütle spektrumunda m/z: 359.1042 dir.

FT-IR ν(cm⁻¹) 3412, 2941, 2830, 1648, 1049, 1011, 837, 758

5 Nolu bileşiğın ¹H-NMR ve ¹³C-NMR kimyasal kayma değerleri çizelge 4.18'de verilmiştir.

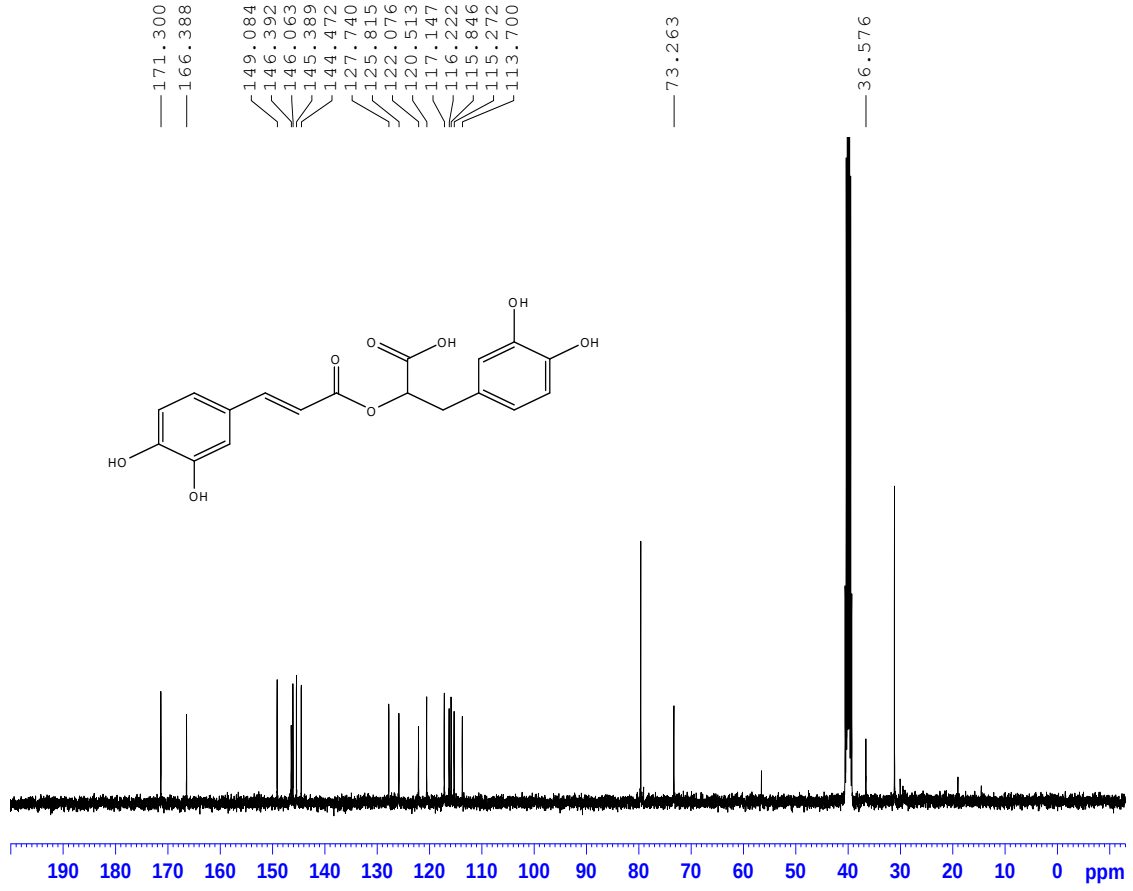
Çizelge 4.16. 5 Nolu (Rozmarinik asit) bileşiğin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR kimyasal kayma değerleri

C/H	δ_{H} ppm (Hz)	δ_{C} ppm
1	-	125.9
2	7.06 (d, $J= 2$ Hz)	115.3
3	-	149.1
4	-	146.1
5	6.79 (d, $J= 8.1$ Hz)	116.2
6	7.02 (dd, $J= 8.1, 2.0$ Hz)	122.0
7	7.46 (d, $J= 15.8$ Hz)	146.4
8	6.24 (d, $J= 15.8$ Hz)	113.7
9	-	166.4
1'	-	127.7
2'	6.69 (d, $J= 1.5$ Hz)	117.2
3'	-	144.5
4'	-	145.4
5'	6.54 (d, $J= 7.9$ Hz)	120.5
6'	6.65 (dd, $J= 7.9, 1.5$ Hz)	115.8
7a'	2.93 (dd, $J= 14.1, 10$ Hz)	36.6
7b'	2.94 (dd, $J= 14.1, 2.8$ Hz)	-
8'	5.08 (dd, $J= 10, 2.8$ Hz)	73.2
9'	-	176.5



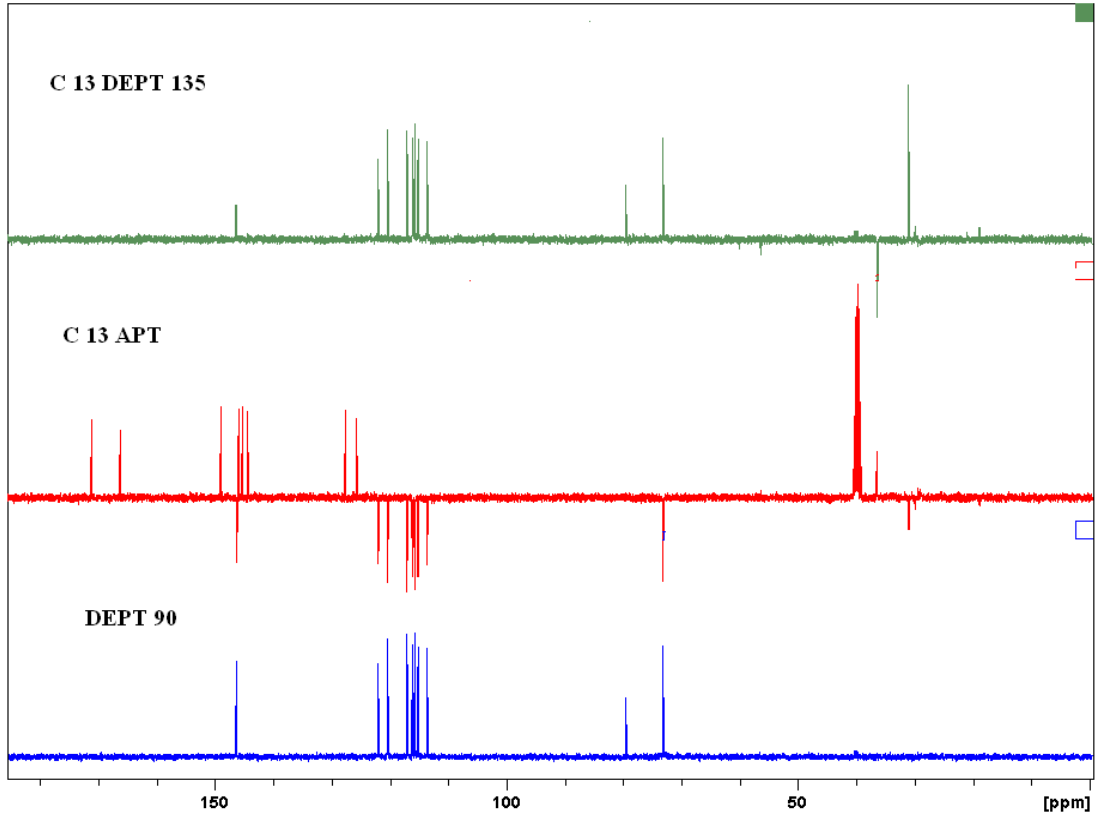
Şekil 4.57. 5 Nolu bileşiğin (Rozmarinik asit) ¹H-NMR spektrumu (400 MHz, DMSO-d₆)

5 nolu bileşiğin H-NMR spektrumu incelendiğinde, $\delta = 7.02$ (1H, d, $J = 2.2$ Hz), $\delta = 7.02$ (1H, dd, $J = 8.1$ Hz, $J = 2.2$ Hz), $\delta = 6.79$ (1H, d, $J = 8.1$ Hz) ve $\delta = 6.74$ (1H, d, $J = 2.2$ Hz), $\delta = 6.68$ (1H, d, $J = 8.1$ Hz), $\delta = 6.62$ (1H, dd, $J = 8.1$, $J = 2.2$ Hz) ppm'de iki grup aromatik ABX sistem protonları (sırasıyla H-2, 6, 5 ve H-2', 5', 6' numaralı protonlar) gözlenmiştir. $\delta = 7.46$ (1H, d, $J = 15.8$) ve $\delta = 6.24$ (1H, d, $J = 15.8$ Hz) ppm'deki kimyasal kayma değerleri molekülde birbirine göre trans konumda olan olefinik protonların varlığını göstermiştir. $\delta = 5.08$ (dd, $J = 10$, $J = 3.7$ Hz) ppm'de gözlenen sinyalin oksijen atomuna komşu olan H-8' protonu olduğu ve $\delta = 2.93$ ve (dd, $J = 14.1$, 3.7 Hz), $\delta = 2.94$ (dd, $J = 14.3$, 10.0 Hz) ppm'de gözlenen sinyallerin C-7' konumundaki metilene ait protonlar olduğu literatürlerle karşılaştırılarak tespit edilmiştir (Şekil 4.57).



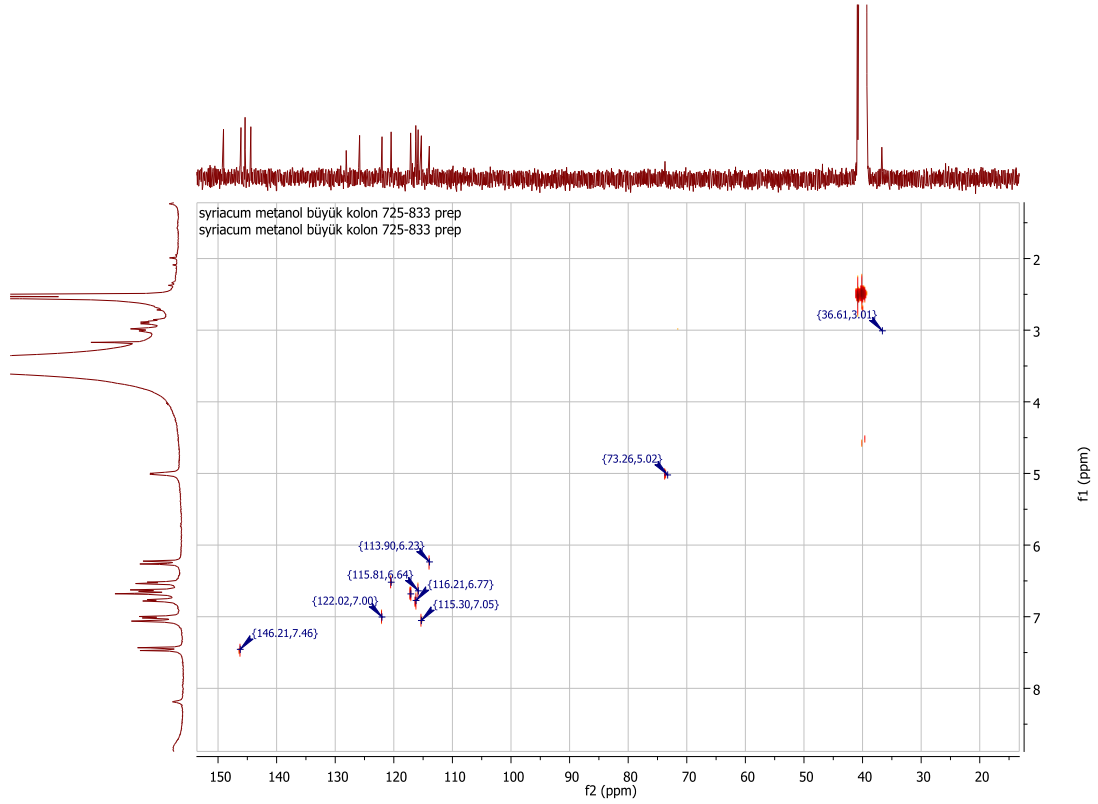
Şekil 4.58. 5 Nolu (Rozmarinik asit) bileşiğinin ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) spektrumu

5 Nolu bileşiğin ¹³C-NMR spektrumu incelendiğinde, iki fenil halkası üzerinde OH grupları ile süstitüe olmuş dört tane C atomu bulunmuştur. Bu karbonlar $\delta = 146.1$ (C-4), 149.1 (C-3), 144.5 (C-3') ve 145.4 (C-4') ppm'de sinyaller vermiştir. İki tane karbonil karbonu $\delta = 176.5$ (C-9'), 167.9 (C-9) ppm'de, olefinik karbonlar $\delta = 146.4$ (C-7), 113.7 (C-8) ppm'de, bir tane de estere komşu karbon atomu $\delta = 73.2$ (C-8') ppm'de 6 tane aromatik metin karbonlar $\delta = 117.2$ (C-2'), 120.5 (C-5'), 115.8 (C-6'), 115.3 (C-2), 116.2 (C-5), 122.0 (C-6) ppm'de gözlenmiştir. Bulgular, literatürler ile desteklenerek maddenin rozmarinik asit (5 nolu bileşik) olduğu bulunmuştur (Şekil 4.58).



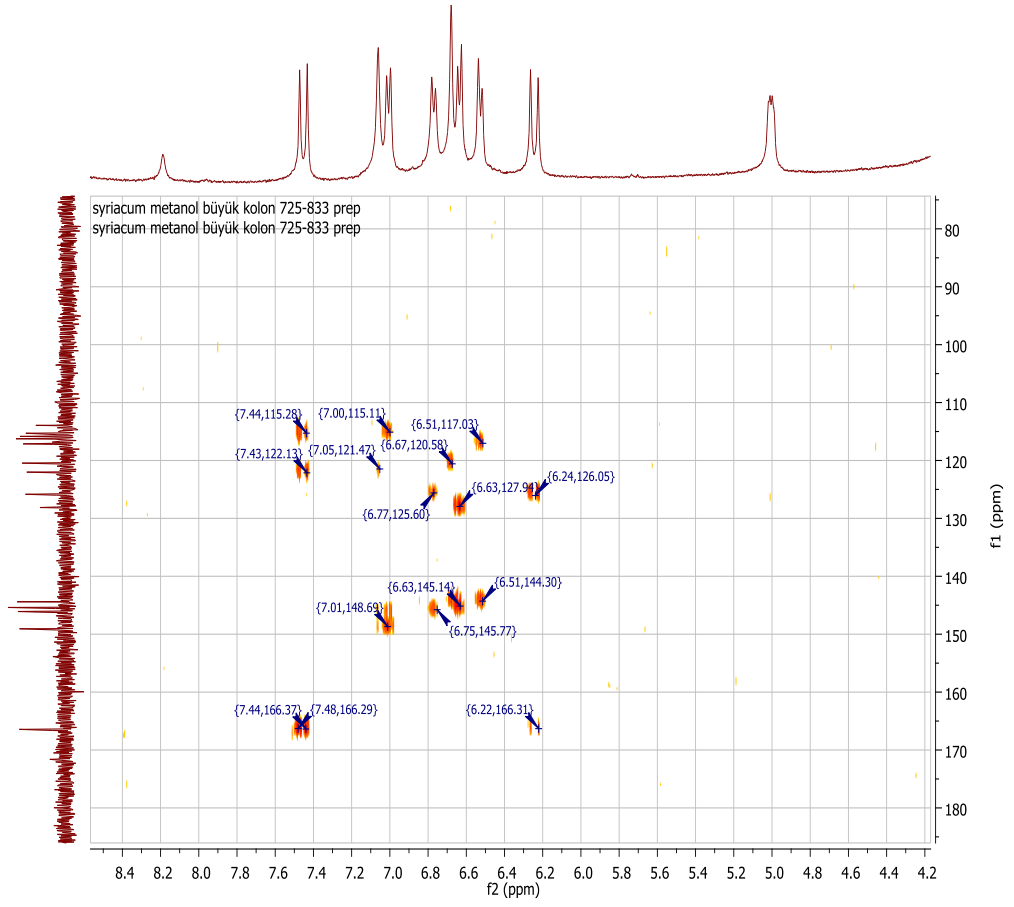
Şekil 4.59. 5 Nolu (Rozmarinik asit) bileşiğin DEPT-90, DEPT-135, APT NMR spektrumu (^{13}C -NMR 100 MHz, DMSO-d_6)

5 Nolu bileşiğine ait APT, DEPT-90 ve DEPT-135 spektrumları incelendiğinde yapıda 18 karbon atomu olduğu görülmektedir. 18 karbondan 8 tanesi kuaterner karbonu (DEPT-90 ve DEPT-135 spektrumlarında sinyal vermeyen kısım), 9 tane metin karbonunun 8 tanesi olefinik olup 1 tanesinde alifatik olduğu (DEPT-90 ve DEPT-135 spektrumunda pozitif sinyal), 1 metilen karbonu (DEPT-135 spektrumunda negatif ve APT spektrumundaki pozitif sinyaller) içerdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.59).



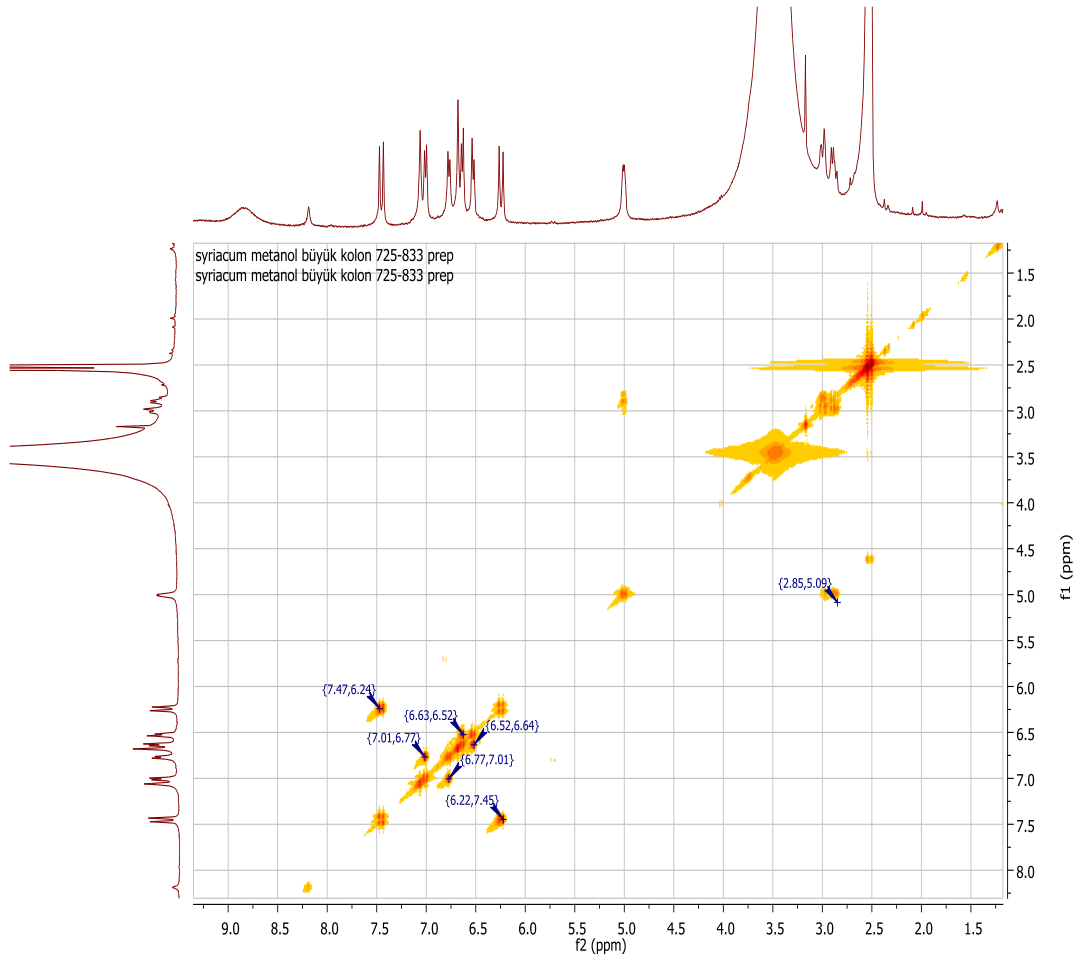
Şekil 4.60. 5 Nolu (Rozmarinik asit) bileşiğin HETCOR spektrumu (^1H -NMR 400 MHz, ^{13}C -NMR 100 MHz, DMSO-d_6)

5 Nolu bileşiğin HETCOR spektrumunda, bileşikteki proton karbon eşleşmeleri tespit edilmektedir. Aromatik halkada 115.3, 122.0, 116.2 ppm'deki ve 117.2, 115.8, 120.5 ppm'deki C-2, C-6, C-5 ve C-2', C-6', C-5' karbonlarının H-2, H-6, H-5 ve H-2', H-6', H-5', H-3 ve H-5 sırasıyla 7.1, 7.0, 6.8 ppm ve 6.7, 6.6, 6.54 ppm'deki protonlarla etkileştiği görülürken, 146.4, 113.7 ve 36.6, 73.2 ppm'deki C-7, C-8 ve C-7', C-8' karbonlarının 7.46, 6.24 ve 2.93, 2.94, 5.08 ppm'deki H-7, H-8 ve H-7a', H-7b', H-8' ppm'deki protonlarla korele olduğu görülmektedir (Şekil 4.60).



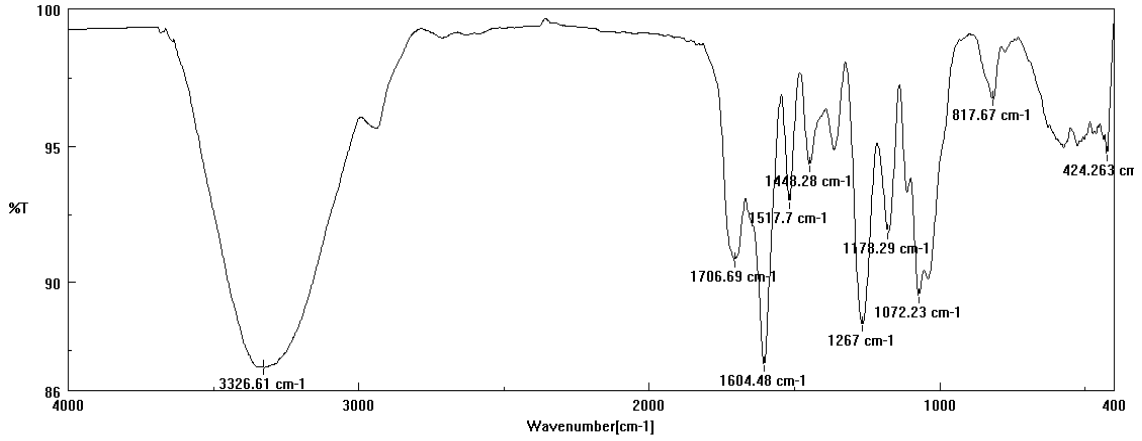
Şekil 4.61. 5 Nolu (Rozmarinik asit) bileşiğin HMBC spektrumu (^1H -NMR 400 MHz, ^{13}C -NMR 100 MHz, DMSO- d_6)

5 Nolu bileşiğin HMBC spektrumun da aromatik halkasında 7.06 ve 7.02. ppm'deki H-2 ve H-6 protonların 146.4 ppm'deki (C-7) karbonla, 6.69 ppm'deki H-2' protonlarının 144.5 ppm'deki (C-3') karbonla, 6.54. ppm'deki H-5' protonlarının 145.4 ppm'deki (C-4') karbonla, protonların korele olduğu görülmektedir (Şekil 4.61).



Şekil 4.62.5 Nolu (Rozmarinik asit) bileşiğin COSY spektrumu (^1H -NMR 400 MHz, DMSO-d_6)

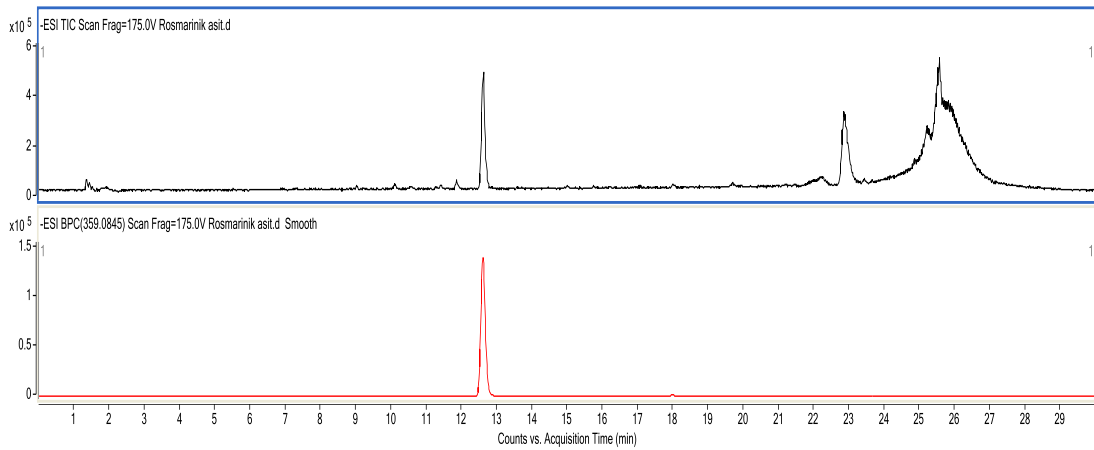
5 Nolu Bileşikteki proton-proton etkileşimlerini göstren COSY spektrumunda $\delta = 7.46$, ppm'de H-7 protonunun $\delta = 6.24$ ppm'de rezonans olan ve H-8 protonu ile etkileşimi, 5.08 ppm'deki H-8' protonunun, 2.93 ve 2.94 ppm'deki H-7a' ve H-7b' protonları etkileşimi gözlenirken, aromatik protonların birbirleriyle etkileşimleri görülmüştür (Şekil 4.62).



Şekil 4.63. 5 Nolu (Rozmarinik asit) bileşiğin FT-IR Spektrumu (KBr)

FT-IR: 5 Nolu (Rozmarinik asit) bileşiğine ait fonksiyonel grupların gerilme ve eğilme titreşim bantları, $\nu = 3376$ (OH gerilimi), 1706, 1604 (karbonil grupları), 817 (substitue aromatik halka düzlem dışı C-H eğilimi) cm^{-1} şeklinde gözlenmiştir (Şekil 4.63).

5 nolu (Rozmarinik asit) bileşiğin LC-TOF-MS kromatogramı Şekil 4.64’de verilmiştir.



Şekil 4.64. 5 Nolu (Rozmarinik asit) bileşiğin LC-TOF-MS kromatogramı

4.8.6. 6 Nolu Bileşğin (3-O-β-D-glikopiranozil-sitosterol) Bileşğinin Fiziksel ve Spektral Özellikleri

Şekil 4.65. Daukosterin (3-O-β-D-glikopiranozil-sitosterol) bileşğinin yapısı

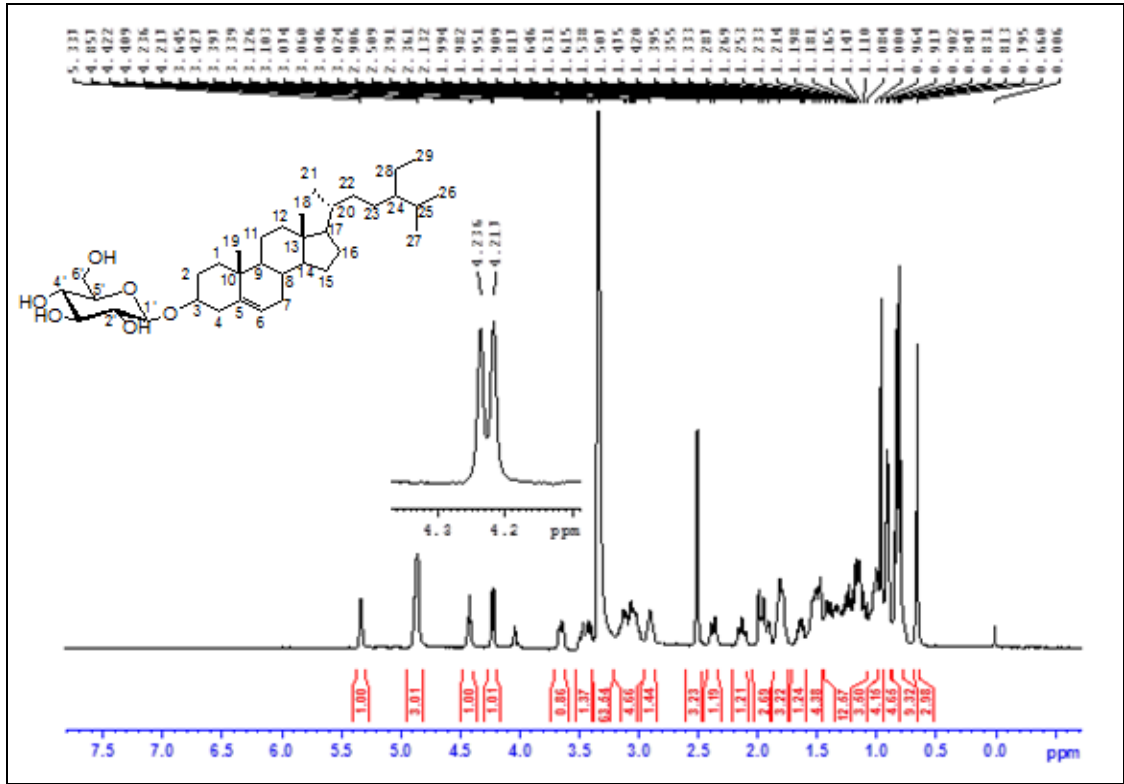
Daukosterin bileşğı, OS metanol ekstresi için yapılan kolon kromatografisinden EtOAc çözücü sisteminden 15 mg olarak izole edildi. Bileşğın erime noktası 273-275 °C olarak belirlendi. Daukosterin bileşğının erime noktası literatürde 280-283 °C (Matsuda ve ark., 2006), 288-289 °C (Wang ve ark., 2007) olarak bulunmuştur. Beyaz renkli daukosterin kristalinin kapalı formülü $C_{35}H_{60}O_6$ olup molekül ağırlığı 576 g/mol'dür. Daukosterin molekülü bilinen bir bileşik olup elde edilen veriler literatür (Wang ve ark., 2007) ile uyum içindedir.

Şekil 4.66. Daukosterin bileşğının belirlenen HMBC korelasyonları

6 Nolu bileşiğin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR kimyasal kayma değerleri çizelge 4.19’de verilmiştir.

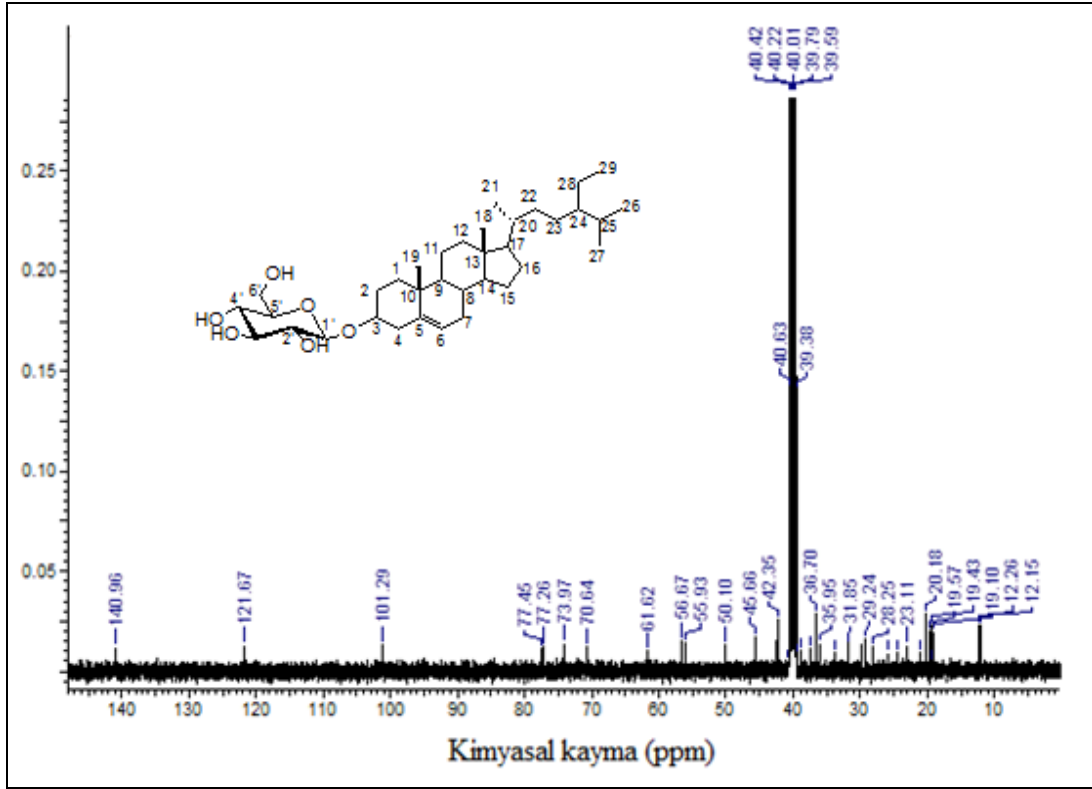
Çizelge 4.17. Daukosterin bileşiğinin ^1H -NMR 400 MHz ve ^{13}C -NMR 100 MHz kimyasal kayma değerleri (DMSO- d_6)

C/H	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm Hz)
1	37.3	1.76
2	31.8	1.90
3	77.2	3.12
4	39.5	-
5	140.1	-
6	121.7	5.35
7	24.3	1.87
8	33.9	1.55
9	50.1	0.81
10	36.7	-
11	20.2	0.70
12	40.7	-
13	42.3	-
14	56.7	0.98
15	23.1	1.22
16	28.2	1.22
17	55.9	1.08
18	12.3	0.65 s
19	19.4	0.81 s
20	35.9	1.27
21	19.3	0.73
22	38.8	2.33
23	26.0	1.14
24	45.7	0.92
25	29.2	1.60
26	19.6	0.95
27	19.1	0.92
28	21.1	1.52
29	12.1	0.80
1'	101.3	4.24 (d, $J = 7.77$ Hz)
2'	75.0	2.93
3'	77.4	3.46 (m)
4'	70.6	3.03
5'	77.3	3.12
6'	61.6	3.63



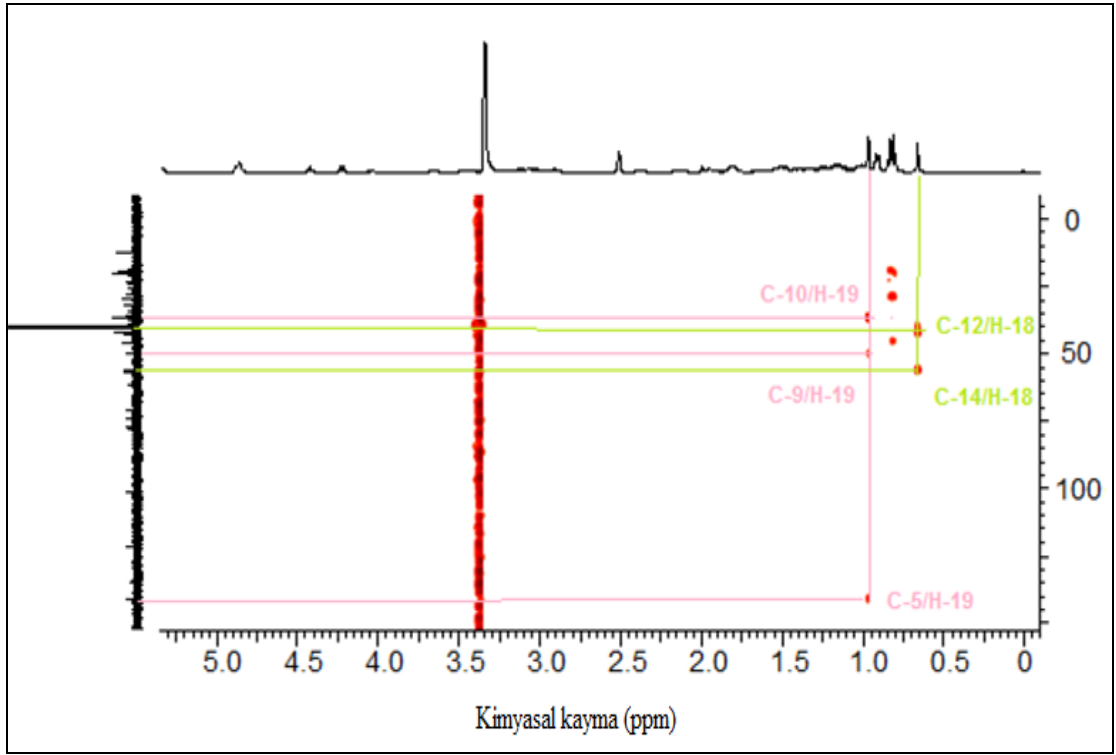
Şekil 4.67. Daukosterin bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu (400 MHz, DMSO-d₆)

6 Nolu bileşiğinin ¹H-NMR spektrumuna bakıldığında yapıda aromatik halkanın olmadığı tespit edildi. H-3' protonu 3.46 ppm'de multipler olduğu belirlendi. 0.5-1 ppm arasında rezonans olan pikler metil gruplarının varlığını belirtmektedir. Olefinik H-6 protonunun 5.35 ppm'de olduğu gözlemlendi. Spektrumun 1.0-2.5 ppm aralığında geniş metilen bantları görülmektedir. Spektrumun 1-2.5 ppm aralığı çok karmaşık olmasından dolayı Çizelge 4.17'de verilen kimyasal kaymalar HETCOR spektrumundan (Şekil 4.71) yararlanılarak elde edilmiştir. Glikoz grubunun protonları 3-5 ppm arasında olduğu görüldüğüne yine glikozun anomerik H-1' protonu 4.24 ppm'de dublete ayrıldığı ve etkileşme sabitinin $J = 7.8$ Hz olmasından dolayı glikozun β konfigürasyonda olduğuna karar verilmiştir (Şekil 4.67).



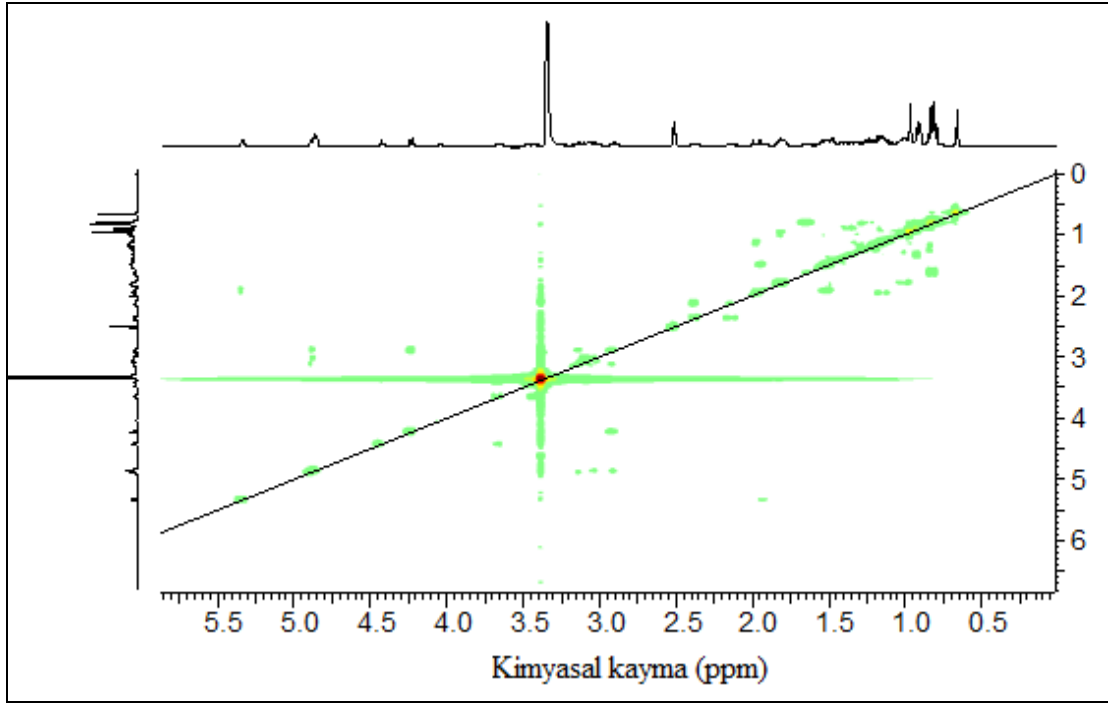
Şekil 4.68. Daukosterin bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu (100 MHz, DMSO-d_6)

Daukosterin bileşiğine ait ^{13}C NMR spektrumundan yapıda 35 karbon atomu olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.68). Bu karbonlardan 12 tanesi metilen, 14 tanesi metin, 6 tanesi metil ve 3 tanesi kuaterner karbon atomuna aittir. Steroit halkasında çift bağ karbonları $\delta = 141.0$ (C-5), 121.7 (C-6), ppm'de olduğu görülürken yine steroid halkasındaki metilen karbonlarının $\delta = 20-45$ ppm arasında olduğu belirlendi. Glikozun anomerik karbonun $\delta = 101.3$ ppm'de ve diğer karbonlarının $\delta = 60-77$ ppm arasında olduğu görülmüştür.



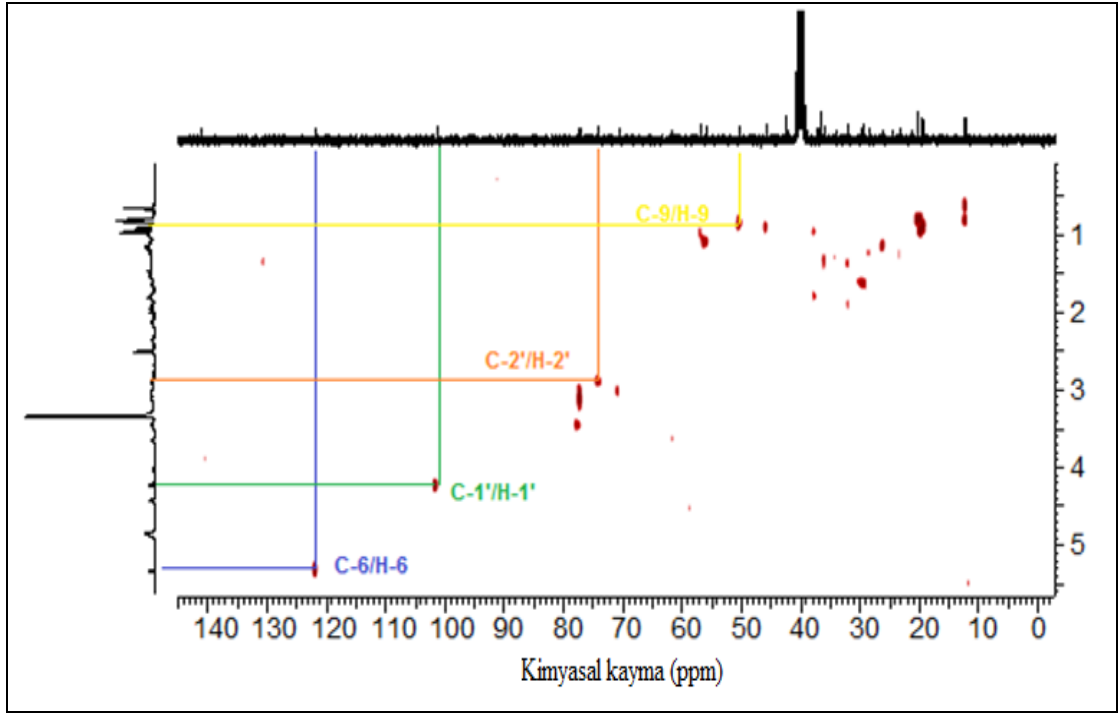
Şekil 4.69. Daukosterin bileşiğinin HMBC spektrumu (400 MHz, DMSO-d₆)

Daukosterin bileşiğinin HMBC spektrumu incelendiğinde 141.9 ppm'deki (C-5), 50.1 ppm'deki (C-9) ve 36.7 ppm'deki (C-10) karbonların 0.9 ppm'deki protonla (H-19) uzak mesafe etkileşimine girdiği görülmektedir. 56.7 (C-14) ve 40.7 (C-12) ppm'de rezonans olan karbonlar ise H-18 protonu (0.66 ppm) 3 bağ üzerinden uzak mesafe etkileşimine girmiştir (Şekil 4.69).



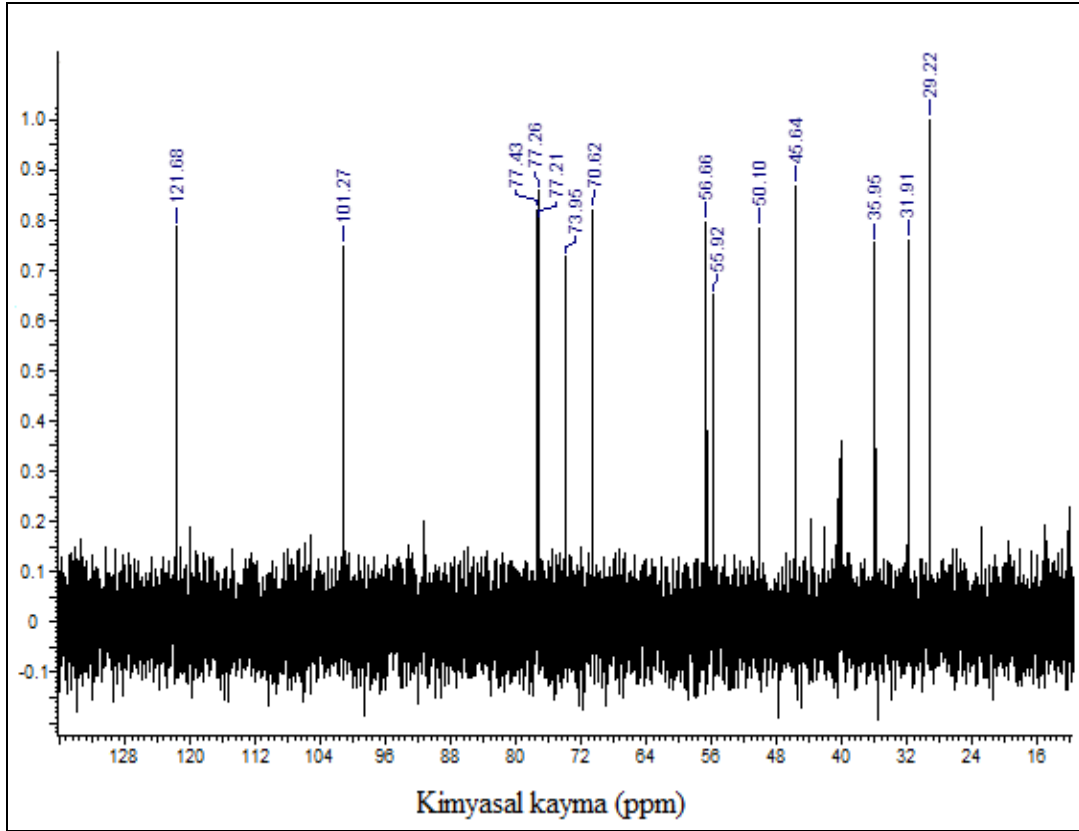
Şekil 4.70. Daukosterin bileşiğinin COSY spektrumu (400 MHz, DMSO-d₆)

6 Nolu bileşiğin COSY spektrumundan 4.24'deki protonun (H-1') 2.93 ppm'deki protonla (H-2'), 5.35'deki protonun (H-6) 1.87 ppm'deki protonla (H-7) etkileştiği görülmektedir (Şekil 4.70).



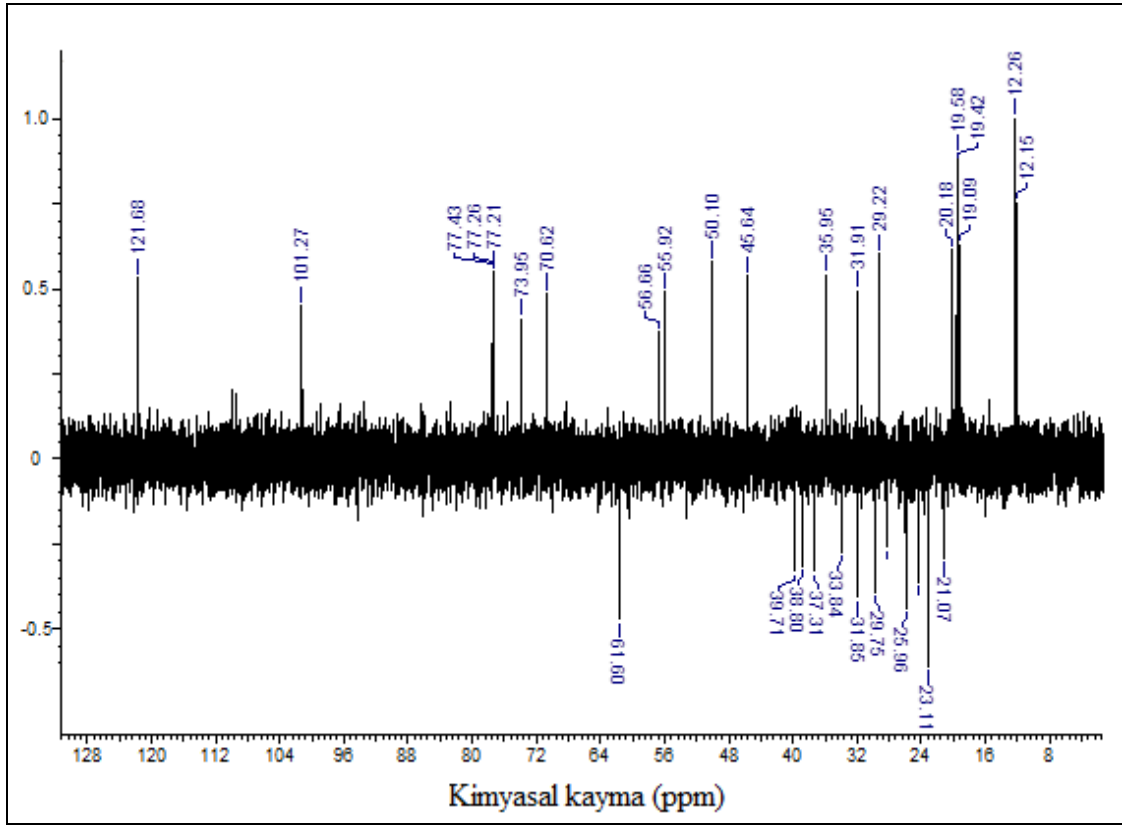
Şekil 4.71. Daukosterin bileşiğinin HETCOR spektrumu (400 MHz, DMSO-d₆)

6 Nolu bileşiğin HETCOR spektrumundan (Şekil 4.71) elde edilen karbon-proton etkileşimleri çizelge 4.17’de verilmiştir. Buna göre 121.7 ppm’deki çift bağ karbonu (C-6) 5.35 ppm (H-6) ile etkileşirken, anomerik karbon (C-1'; 101.29 ppm) 4.24 ppm’deki protonla (H-1'), 77.2 ppm’deki karbon (C-3) 3.12 ppm’deki protonla (H-3) doğrudan etkileşmektedir.



Şekil 4.72. Daukosterin bileşiğinin DEPT-90 spektrumu (100 MHz, DMSO-d₆)

Şekil 4.72’den 6 nolu bileşiğinin yapısında 14 tane metin karbonu olduğu belirlenmiştir. Bu da daukosterin molekülünün yapısı ile uyum içindedir.



Şekil 4.73. Daukosterin bileşiğinin DEPT-135 spektrumu (100 MHz, DMSO-d₆)

6 Nolu bileşiğin DEPT-135 spektrumunda (Şekil 4.73) pozitif sinyaller metin ve metil karbonlarını gösterirken negatif sinyaller metilen karbonlarını göstermektedir. Böylece yapıda 6 metil, 12 metilen karbonu olduğu belirlenmiştir. ¹³C-NMR spektrumundan da yararlanılarak bileşiğin 3 kuaterner karbon atomuna sahip olduğu tespit edilmiştir.

4.8.7. 7 Nolu Bileşğin (2-O-β-D-glikopiranozil-4,6-dihidroksi) Fiziksel ve Spektral Özellikleri

Şekil 4.74. 7 Nolu bileşik (2-O-β-D-glikopiranozil-4,6-dihidroksi asetofenon)

7 Nolu bileşik (2-O-β-D-glikopiranozil-4,6-dihidroksi asetofenon) OS metanol ekstraktından kolon kromatografisi ile silikajel dolgu maddesi kullanılarak hekzan: etilasetat (1:4) çözücü sisteminde 350-370 nolu fraksiyonlardan kristallendirilerek izole edildi (132 mg). 7 Nolu bileşik fiziksel görünümü sarı renkli bir kristal yapıdadır. Bileşğin erime noktası 205 °C olarak ölçüldü. 2-O-β-D-glikopiranozil-4,6-dihidroksi asetofenonmolekülü bilinen bir bileşik olup elde edilen veriler literatür (Gupte ve ark., 2008) ile uyum içindedir.

7 Nolu bileşğin $C_{14}H_{18}O_9$ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pikini $[M-H]^-$ LC-TOF-MS kütle spektrumunda m/z : 329.07 olarak bulunmuştur ve yapıyı doğrulamaktadır.

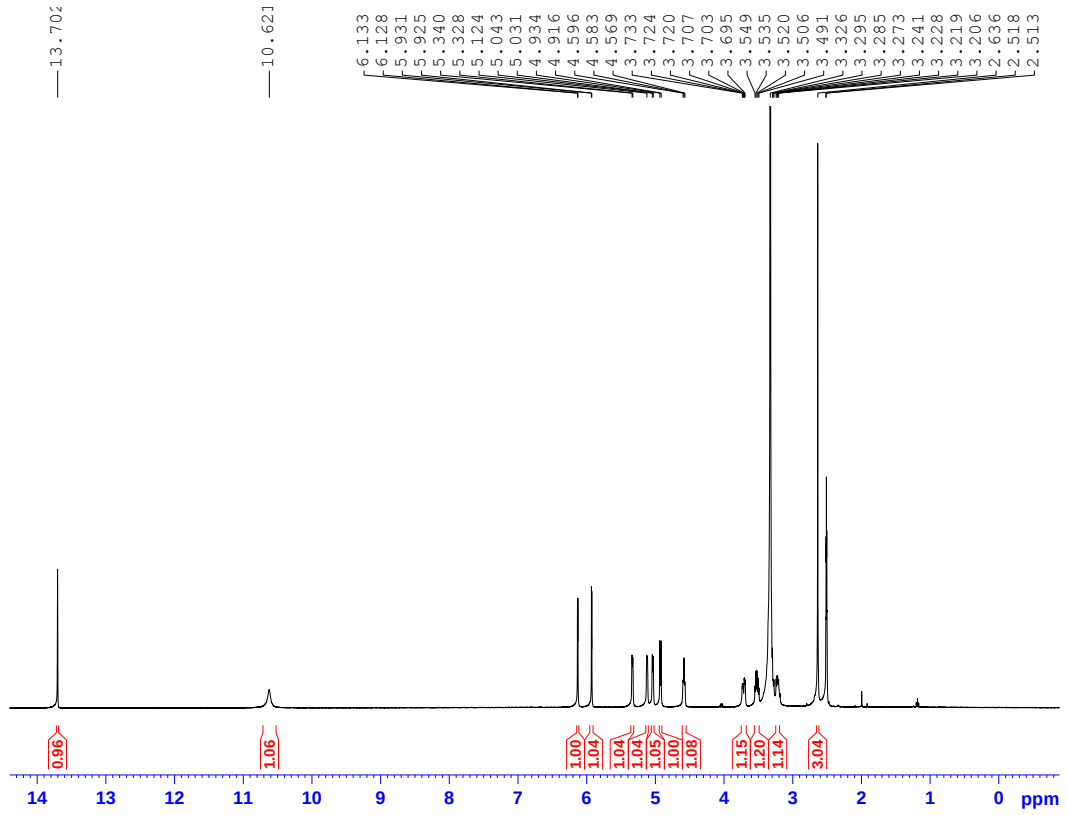
FT-IR $\nu(\text{cm}^{-1})$ 3255, 1855

7 Nolu bileşiğin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR kimyasal kayma değerleri çizelge 4.20'de verilmiştir.

Çizelge 4.18. 7 Nolu (2-O- β -D-glikopiranozil-4,6-dihidroksi asetofenon) bileşiğin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR kimyasal kayma değerleri

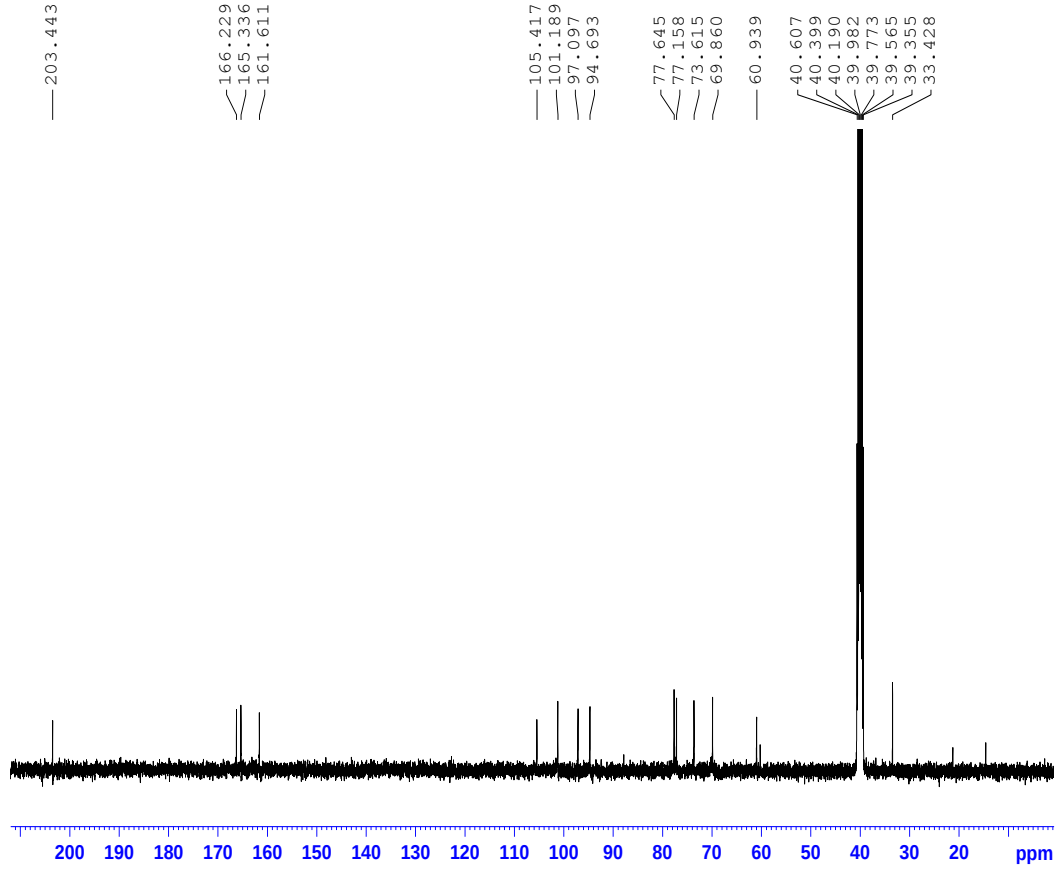
Posizyon	2-O- β -D-glikopiranozil-4,6-dihidroksi asetofenon	
	δ_{H} (Hz)	δ_{C}
1	-	105.4
2	-	161.6
3	5.92 (d, $J = 2.1$ Hz)	93.1
4	-	165.3
5	6.12 (d, $J = 2.1$ Hz)	94.7
6	-	166.2
7	-	203.4
8	2.63 (s)	33.4
1'	4.93 (d, $J = 7.3$ Hz)	101.2
2'	3.36 (m)	77.6
3'	3.38 (m)	73.6
4'	3.20 (m)	69.8
5'	3.30 (m)	77,1
6'a	3.51(m)	60.9
6'b	3.71 (m)	

Şekil 4.75. 7 Nolu (2-O- β -D-glikopiranozil-4,6-dihidroksi asetofenon) bileşiğin HMBC korelasyonları



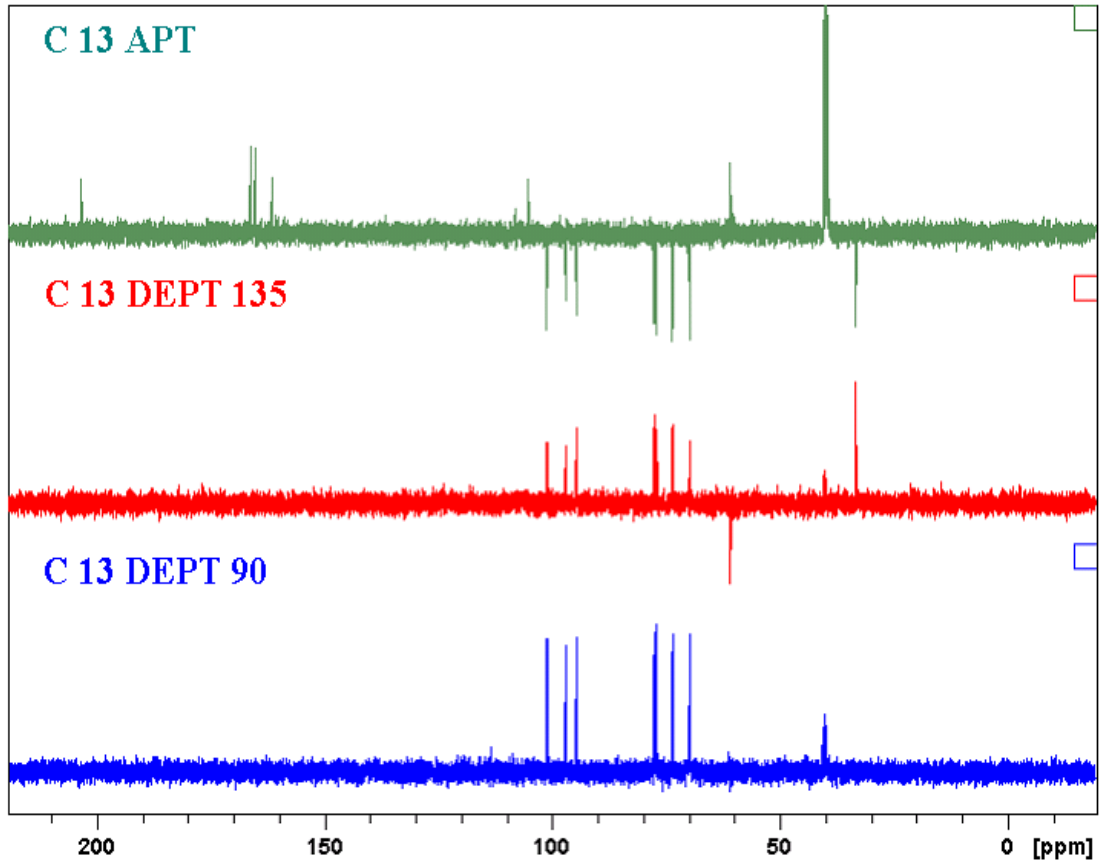
Şekil 4.76. 7 Nolu (2-O-β-D-glikopiranozil-4,6-dihidroksi asetofenon) bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu (400 MHz, DMSO-d₆)

7 Nolu bileşiğin ¹H-NMR spektrumundan, bileşiğin bir aromatik halka içerdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.76). ¹H-NMR spektrumunda aromatik halkasına ait proton rezonansları, H-3 ve H-5 protonları sırasıyla $\delta = 5.92$ ppm'de ($J = 2.1$ Hz), $\delta = 6.12$ ppm'de ($J = 2.1$ Hz) dublet şeklinde, H-8 protonu $\delta = 2.63$ ppm'de singlet şeklinde rezonans olmuştur. Glikozit grubuna bağlı anomerik protonu 4.93 ppm'e ($J = 7.3$ Hz) dublet şeklinde β-glikozidik olarak, şeker grubunun diğer protonları 3-5 ppm arasında rezonans olmuştur.



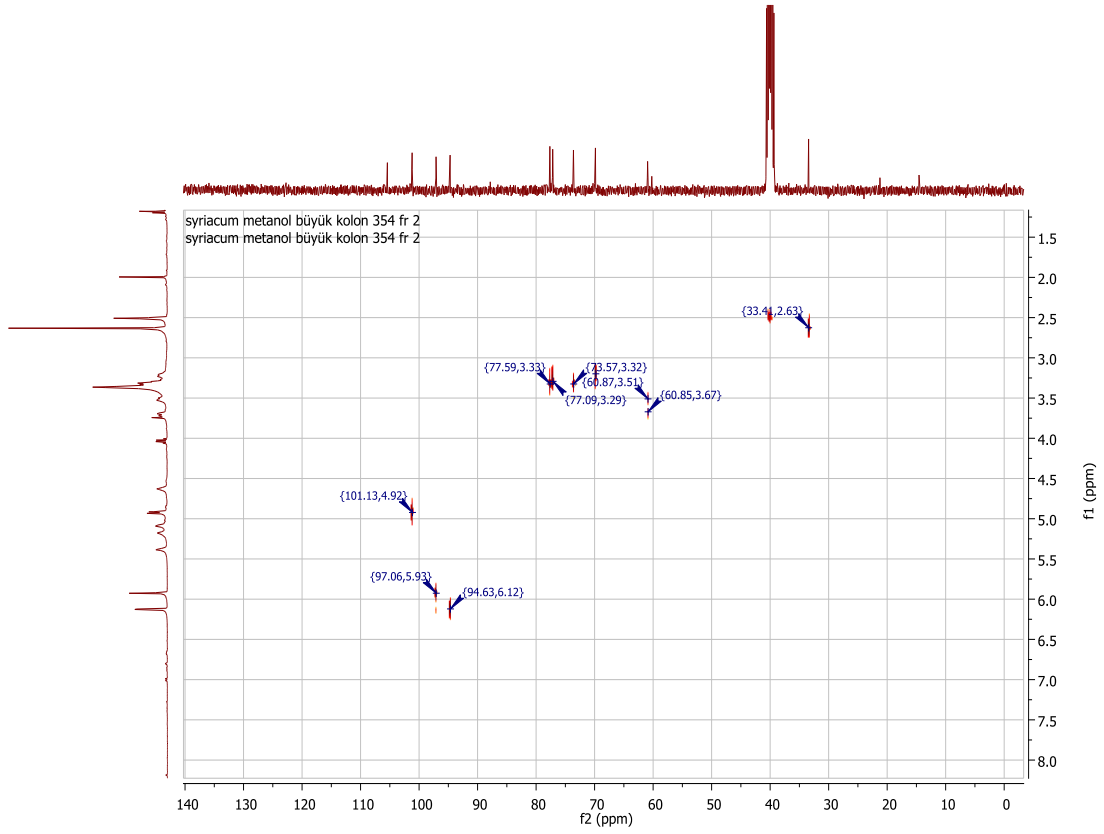
Şekil 4. 77. 7 Nolu (2-O-β-D-glikopiranozil-4,6-dihidroksi asetofenon) bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumu (^{13}C -NMR100 MHz, DMSO- d_6)

7 Nolu bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumu incelendiğinde, 14 tane karbon olduğu görülmektedir. 14 karbondan $\delta = 105.4$, $\delta = 161.6$, $\delta = 165.3$, $\delta = 166.22$, $\delta = 203.4$ ppm'de 5 tanesi kuaterner karbonları, 7 tanesi metin karbonu, 1 tanesi metilen karbonu $\delta = 61.2$ ppm'de karbonu ve 1 taneside metil $\delta = 33.4$ ppm'de karbonudur (Şekil 4.77).



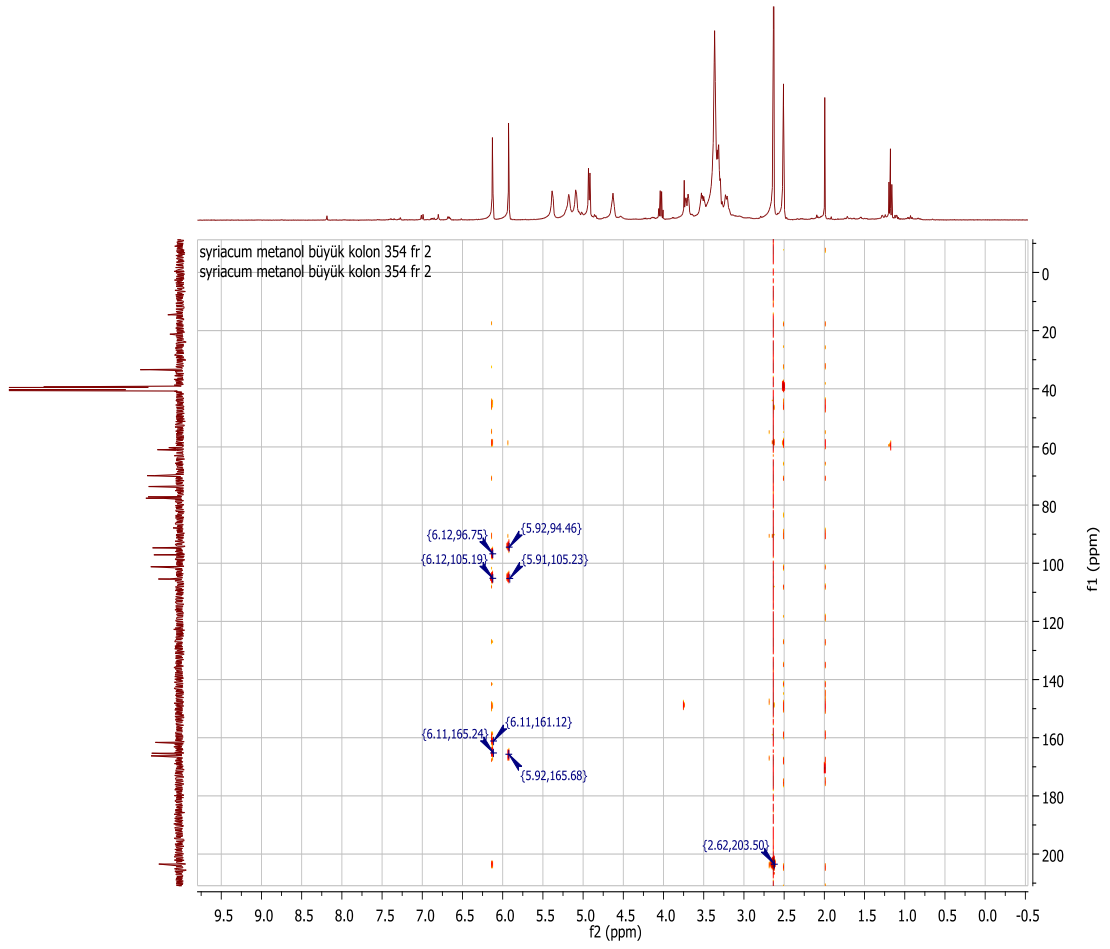
Şekil 4.78. 7 Nolu (2-O-β-D-glikopiranozil-4,6-dihidroksi asetofenon) bileşiğin, APT, DEPT-135, DEPT-90 NMR spektrumu (^{13}C -NMR100 MHz, DMSO- d_6)

7 Nolu bileşiğine ait APT, DEPT-90 ve DEPT-135 spektrumları incelendiğinde yapıda 14 karbon atomu olduğu görülmektedir. 14 karbondan 5 tanesi kuaterner karbonu (DEPT-90 ve DEPT-135 spektrumlarında sinyal vermeyen kısım), 7 tanesi metin karbonu (DEPT-90 ve DEPT-135 spektrumunda pozitif sinyal), 1 metilen karbonu (DEPT-135 spektrumunda negatif ve APT spektrumundaki pozitif sinyaller), 1 metil karbonu (DEPT-90, DEPT-135 spektrumlarında sinyal vermeyen, APT spektrumundaki pozitif sinyal veren kısım), içerdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.78).



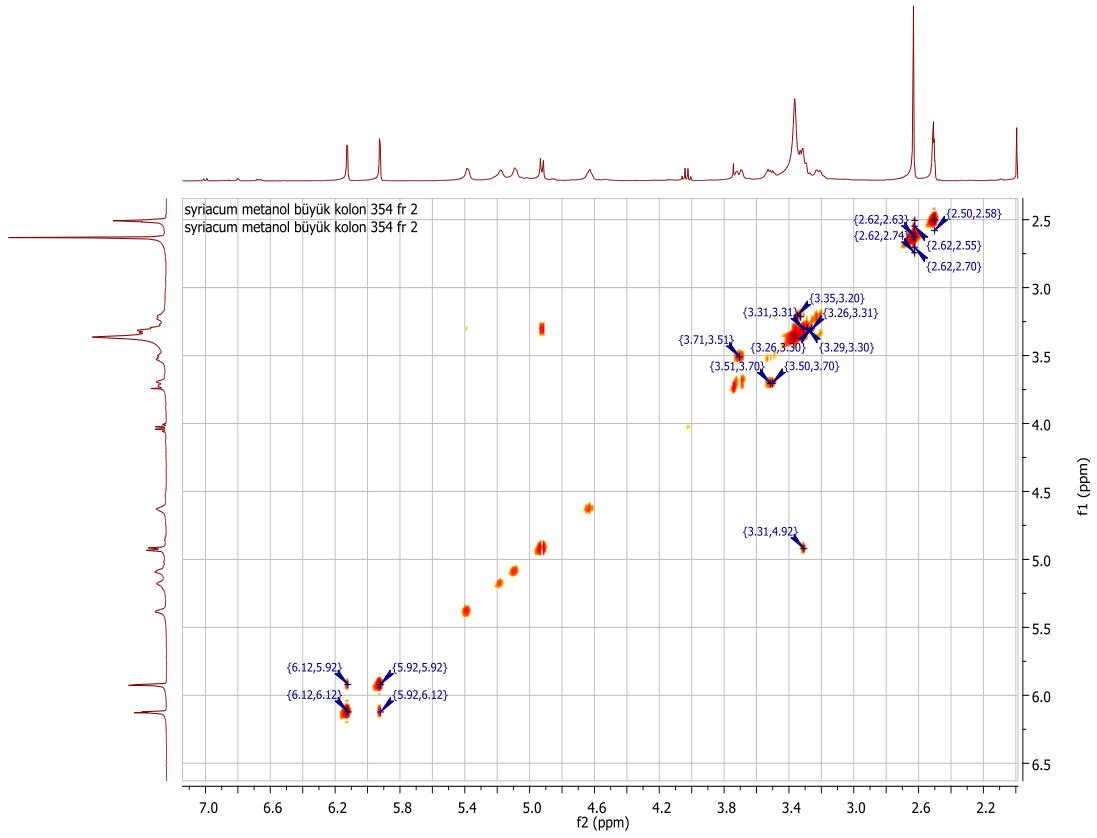
Şekil 4.79. 7 Nolu (2-O-β-D-glikopiranozil-4,6-dihidroksi asetofenon) bileşiğin HETCOR spektrumu (¹H-NMR 400 MHz, ¹³C-NMR 100 MHz, DMSO-d₆)

7 Nolu bileşiğin HETCOR spektrumunda, bileşikteki proton karbon eşleşmeleri tespit edilmektedir. Benzen halkasındaki 93.1, 94.7, 33,4 ppm'deki C-3, C-5 ve C-8 karbonlarının 5.92, 6.12 ve 2.63 ppm'deki H-3, H-5 ve H-8 protonlarıyla, glikozun 101.2 ppm'deki C-1' anomerik karbonun 4.64 ppm'deki H-1' protonla, yine glikozdaki metilen C-6' (60.92) karbonun 3.51 ve 3.71 ppm'deki protonla (H-6a' ve H-6b') korele olduğu görülmektedir (Şekil 4.79).



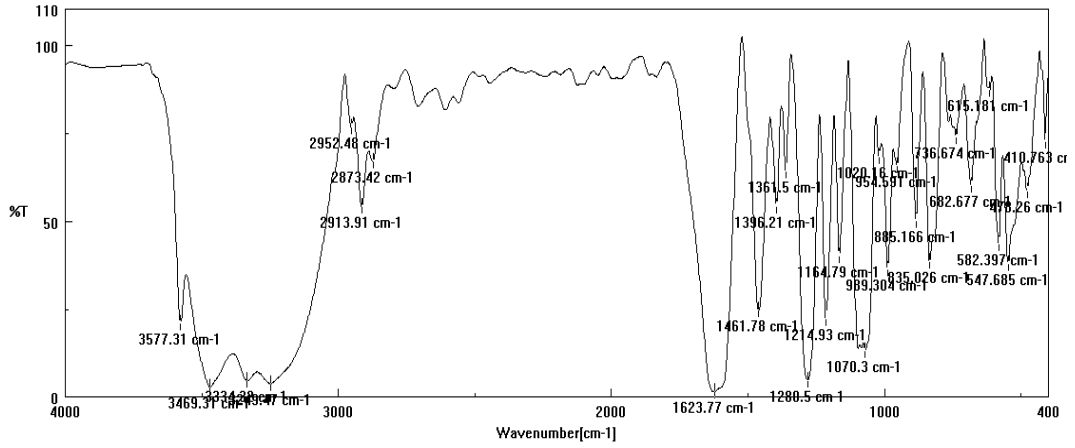
Şekil 4.80. 7 Nolu (2-O-β-D-glikopiranozil-4,6-dihidroksi asetofenon) bileşiğın HMBC spektrumu (^1H -NMR 400 MHz, ^{13}C -NMR100 MHz, DMSO- d_6)

7 Nolu bileşiğın HMBC spektrumunda aromatik halkadaki 5,92 ppm'deki H-3 protonunun 161.6 ppm'deki C-2 karbonuyla ve 105.4 ppm'deki C-1 karbonuyla etkileştiğı, 6.12 ppm'deki H-5 protonları 165.3 ppm'deki C-4 karbonuyla ve 105.4 ppm'deki C-1 karbonuyla etkileştiğı, 2.63 ppm'deki H-8 protonunun 203.4 ppm'deki C-7 karbonil karbonuyla etkileştiğı ve 4.93 ppm'deki glikozun anomerik H-1' protonun 161.6 ppm'deki C-2 karbonla etkileştiğı görölmektedir (Şekil 4.80).



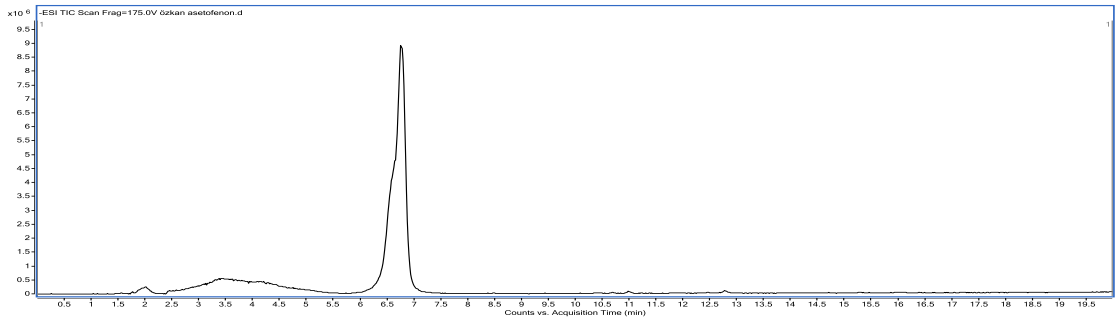
Şekil 4.81.7 Nolu (2-O- β -D-glikopiranozil-4,6-dihidroksi asetofenon) bileşiğin COSY spektrumu (^1H -NMR 400 MHz, DMSO-d_6)

7 Nolu bileşikteki proton-proton etkileşimlerini gösteren COSY spektrumunda $\delta = 5.92$ ppm'de H-3 protonlarının $\delta = 6.12$ ppm'de rezonans olan ve H-5 protonları ile etkileşimi gözlenirken ayrıca şeker protonlarının birbirleriyle etkileşimleri görülmüştür.



Şekil 4.82. 7 Nolu (2-O-β-D-glikopiranozil-4,6-dihidroksi asetofenon) bileşiğin FT-IR spektrumu (KBr)

FT-IR: 7 Nolu (2-O-β-D-glikopiranozil-4,6-dihidroksi asetofenon) bileşiğine ait fonksiyonel grupların gerilme ve eğime titreşim bantları, $\nu = 3226$ (OH gerilimi), 2879 (alifatik C-H gerilimi), 885 ve 835 (substitue aromatik halka düzlem dışı C-H eğilimleri) cm^{-1} şeklinde gözlenmiştir (Şekil 4.82).



Şekil 4.83. 7 Nolu (2-O-β-D-glikopiranozil-4,6-dihidroksi asetofenon) bileşiğin LC-TOF-MS kromatogramı

OS metanol ekstresi ve izole edilen 7 nolu (2-O-β-D-glikopiranozil-4,6-dihidroksi asetofenon) bileşiğin LC-TOF-MS kromatogramlarından kapalı formülü $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_9$ olan bileşiğin 6.5 dakikada moleküler iyon pikinin (-)-ESI MS m/z : 329.07 $[\text{M}-\text{H}]$ olduğu saptandı.

4.8.8. 8 Nolu Bileşğin (5,7-Dihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-8-[(2S,3R,4R,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2H-piran-2-il]-4H-kromen-4-on)
Fiziksel ve Spektral Özellikleri

Şekil 4.84. 8 Nolu bileşik (Viteksin)

8 Nolu bileşik (Viteksin) OS metanol ekstraktından kolon kromatografisi ile silikajel dolgu maddesi kullanılarak hekzan: etilasetat (1:4) çözücü sisteminde 441-482 nolu fraksiyonlardan izole edildi (60 mg). 8 Nolu bileşik fiziksel görünümü sarı renkli amorf toz yapıdadır. Bileşğin erime noktası 262-264 °C olarak ölçüldü. Viteksin molekülü bilinen bir bileşik olup elde edilen veriler literatür (Wen ve ark., 2007) ile uyum içindedir.

8 Nolu bileşik $C_{21}H_{20}O_{10}$ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon piki [M-H] LC-TOF-MS kütle spektrumunda m/z: 431.08 olarak bulunmuştur ve yapıyı doğrulamaktadır.

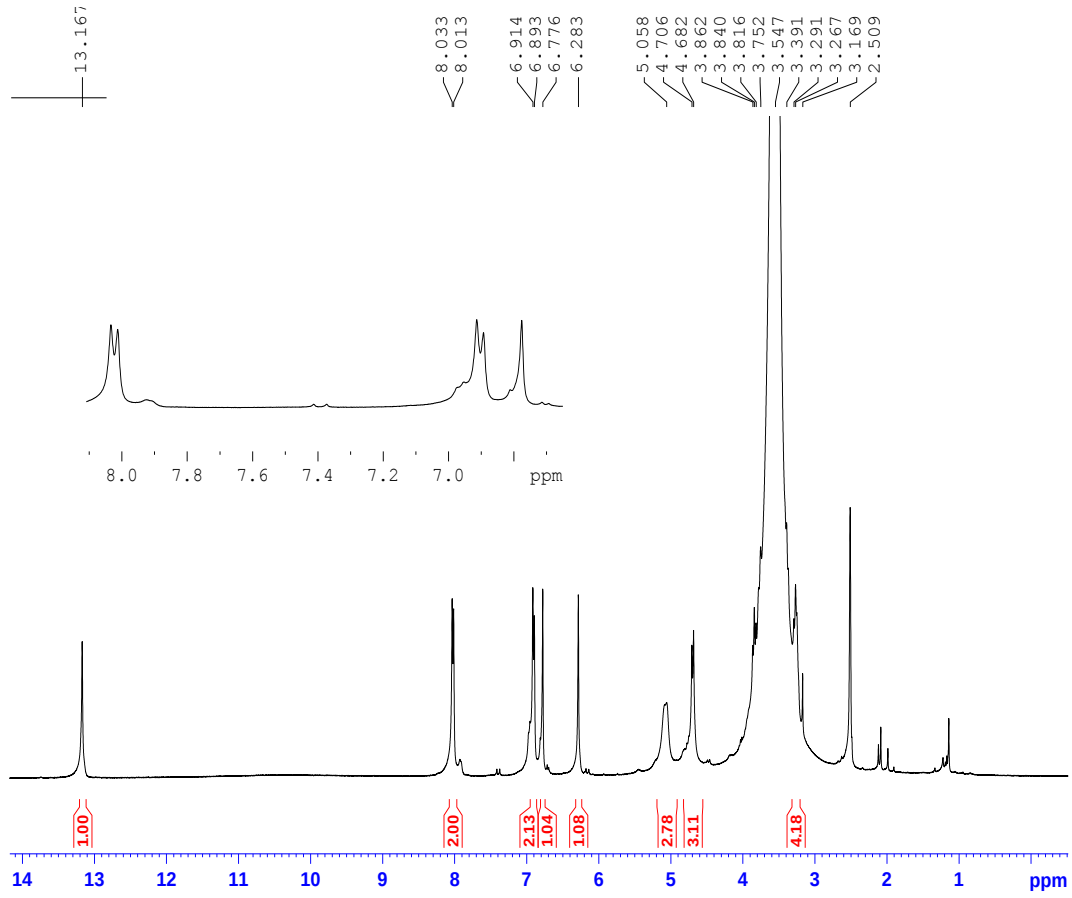
FT-IR ν (cm^{-1}) 3412, 2941, 2830, 1648, 1049, 1011, 837, 758

8 Nolu bileşiğin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR kimyasal kayma değerleri çizelge 4.21’da verilmiştir.

Çizelge 4.19. 8 Nolu (Viteksin) bileşiğin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR kimyasal kayma değerleri

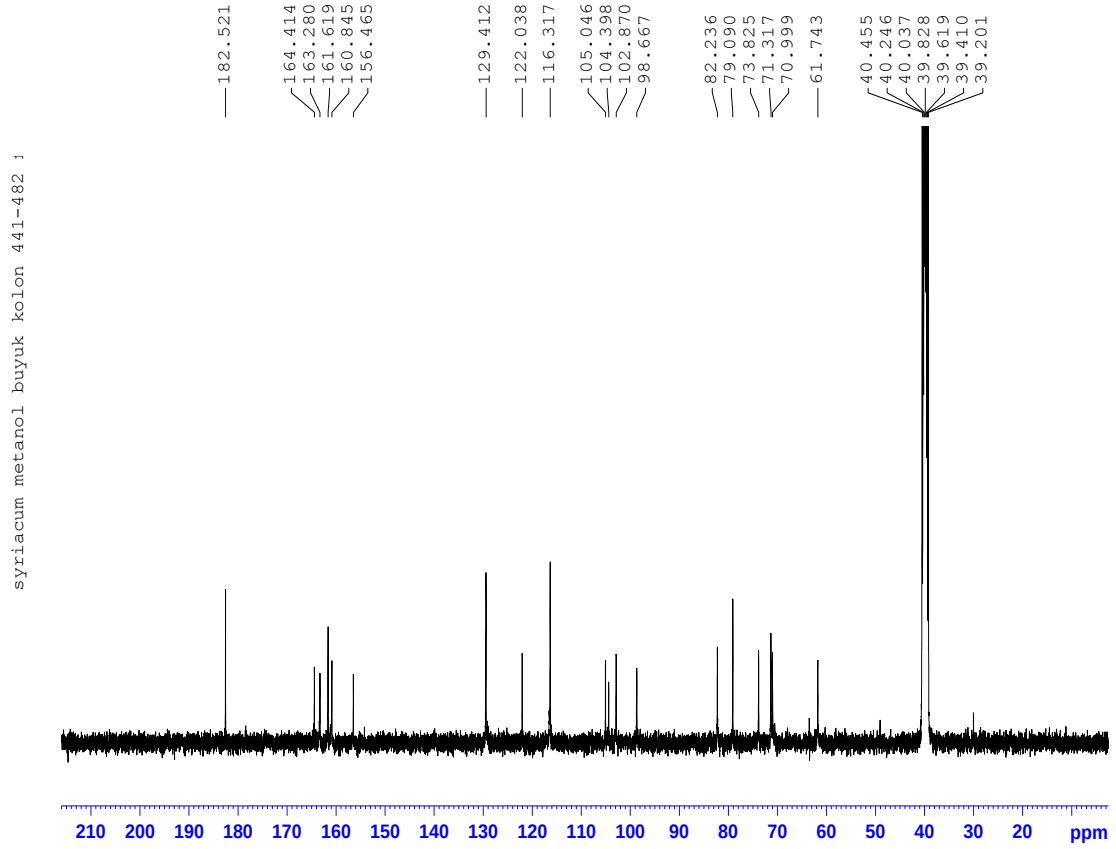
Pozisyon	Viteksin	
	δ_{H} (Hz)	δ_{C}
2	-	164.4
3	6.78 (s)	102.9
4	-	182.5
5	-	161.6
6	6.27 (s)	98.7
7	-	156.5
8	-	105.1
9	-	163.3
10	-	104.4
1'	-	122.0
2',6'	8.02 (d, $J = 8.0$ Hz)	129.4
3',5'	6.90 (d, $J = 8.3$ Hz)	116.3
4'	-	160.8
1''	4.70 (d, $J = 9.6$ Hz)	73.9
2''	3.79 (m)	71.4
3''	3.27 (m)	79.1
4''	3.41 (m)	71.0
5''	3.24 (m)	82.3
6''a	3.54 (m)	61.7
6''b	3.74 (m)	

Şekil 4.85. 8 Nolu (Viteksin) bileşiğin HMBC korelasyonları



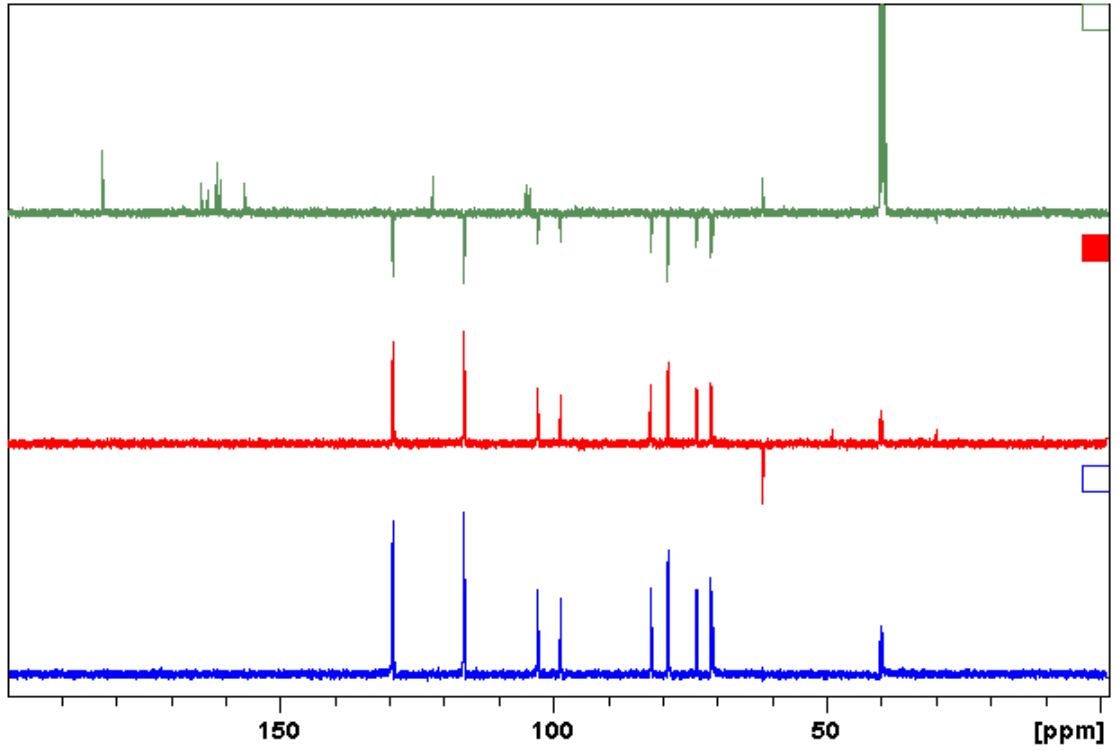
Şekil 4.86. 8 Nolu (Viteksin) bileşiğin ^1H -NMR spektrumu (400 MHz, DMSO-d_6)

8 Nolu bileşiğin ^1H -NMR spektrumuna bakıldığında $\delta = 8.03$ (2H, d, $J = 8.3$ Hz) ppm'de görülen sinyaller B halkasının H-2' ve H-6' protonlarına, 6.90 (2H, d, $J = 8.3$ Hz) ppm'de görülen sinyaller B halkasının H-3' ve H-5' protonlarına ve $\delta = 6.28$ (1H s,) ppm'de görülen sinyal ise A halkasının H-6 protonuna ait olduğu tespit edilmiştir. $\delta = 6.78$ ppm'de singlet olarak görülen bu sinyal molekülümüzün H-3 protonu olup flavon olduğuna işaret eder. $\delta = 4.70$ ppm'de görülen sinyal glikoz molekülünün H-1"protonuna aittir. H-1" protonunun dublete yarıldığı ve etkileşme sabitlerinin $J = 9.6$ Hz olduğu görülmüştür, buradan da glikozun β konfigürasyonda olduğuna karar verilmiştir.



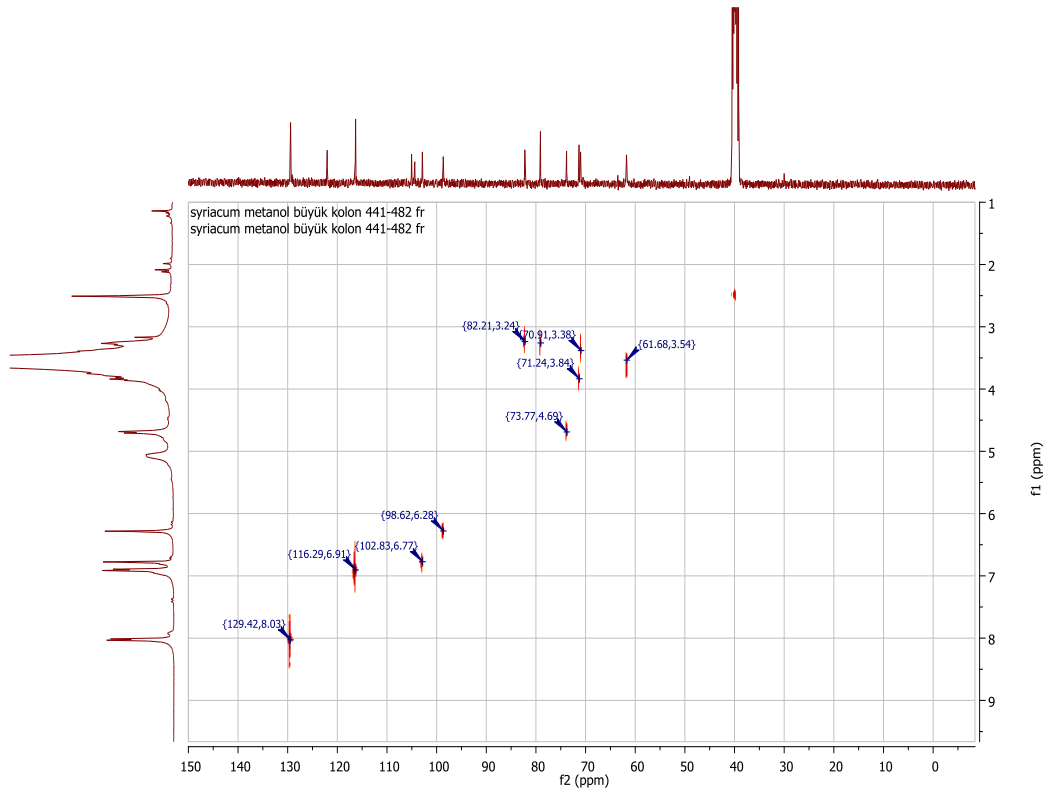
Şekil 4.87. 8 Nolu (Viteksin) bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumu (100 MHz, DMSO-d_6)

8 Nolu bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumunda 19 karbon sinyali görülmektedir. $\delta = 129.4$ ve $\delta = 116.3$ ppm'de görülen sinyallerin sırasıyla, C-2' ve C-6' ile C-3' ve C-5' konumlarına ait olduğunu literatürler değerleri de desteklemektedir. $\delta = 60.4$ -82.5 ppm'ler arasında görülen sinyaller glikoz molekülüne aittir. $\delta = 73.9$ ppm'de görülen sinyalin C-1' karbon atomuna ait olduğu literatür bilgileri ile karşılaştırılarak karar verilmiştir.



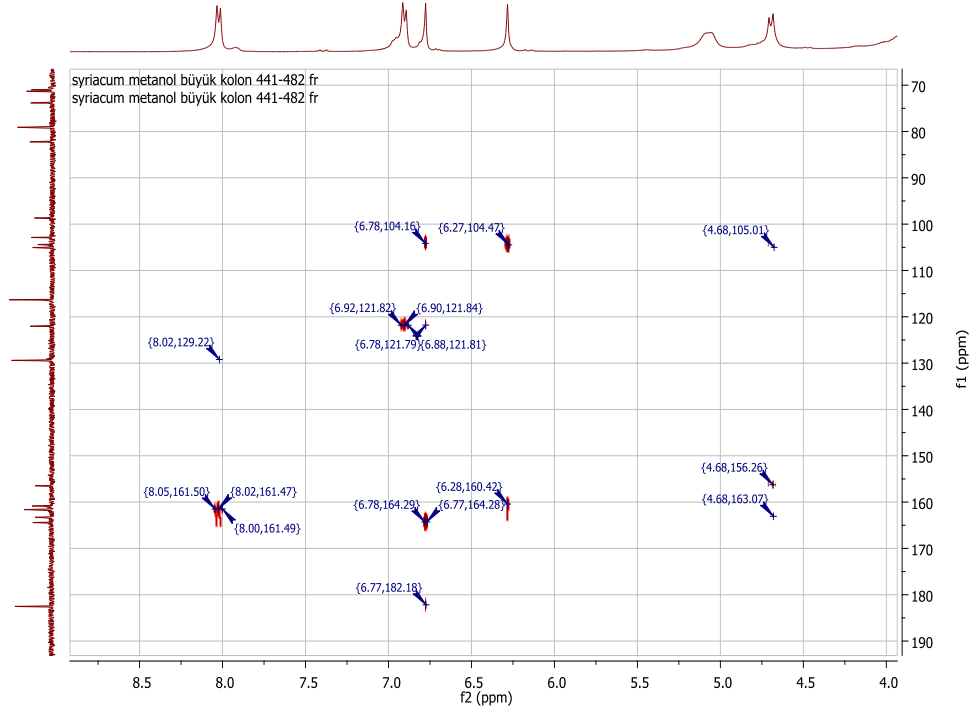
Şekil 4.88. 8 Nolu (Viteksin) bileşiğin APT, DEPT-135, DEPT-90 NMR spektrumu (^{13}C -NMR 100 MHz, DMSO-d_6)

8 Nolu bileşiğine ait APT, DEPT-90 ve DEPT-135 spektrumları incelendiğinde yapıda 19 karbon atomu olduğu görülmektedir. 19 karbondan 9 tanesi kuaterner karbonu (DEPT-90 ve DEPT-135 spektrumlarında sinyal vermeyen kısım), 9 tanesi metin karbonu (DEPT-90 ve DEPT-135 spektrumunda pozitif sinyal), 1 metilen karbonu (DEPT-135 spektrumunda negatif ve APT spektrumundaki pozitif sinyal), içerdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.88).



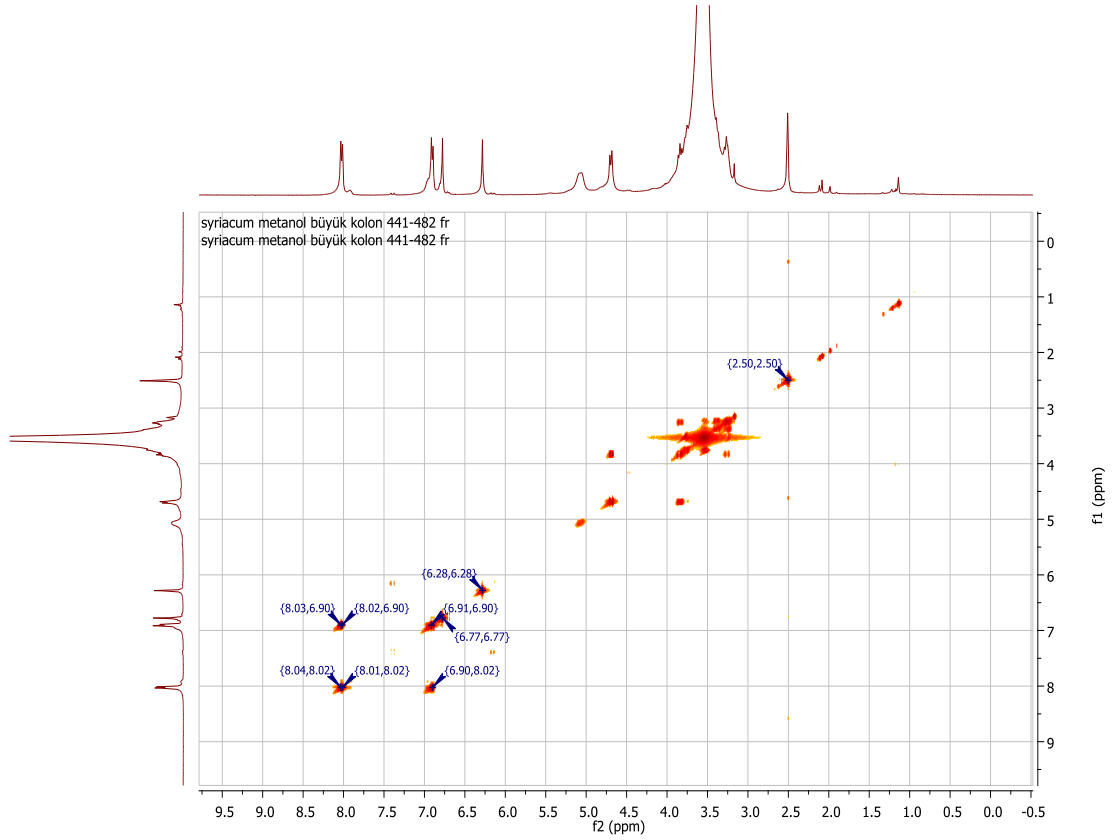
Şekil 4.89. 8 Nolu (Viteksin) bileşiğin HETCOR spektrumu (^1H -NMR 400 MHz, ^{13}C -NMR 100 MHz, DMSO-d_6)

8 Nolu bileşiğin HETCOR spektrumunda, flavonoid halkasında 102.9 ppm'deki C-3 karbonunun 6.78 ppm'deki protonla etkileştiği, flavonoidin B halkasındaki 129.4 ve 116.3 ppm'deki C-2', C-6' ve C-3', C-5' karbonlarının 8.02 ve 6.90 ppm'deki protonlarla, 73.9 ppm'deki glikozun C-1" karbonunun 4.70 ppm'deki H-1" protonuyla, etkileştiği tespit edilmiştir.



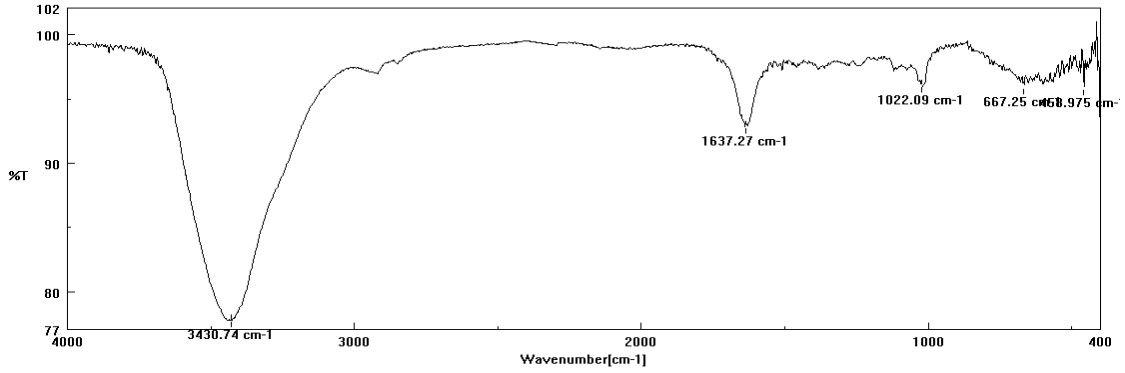
Şekil 4.90. 8 Nolu (Viteksin) bileşiğin HMBC spektrumu (^1H -NMR 400 MHz, ^{13}C -NMR100 MHz, DMSO- d_6)

8 Nolu bileşiğin HMBC spektrumunda flavanoidin B halkasındaki 8.02 ppm'deki H-2' ve H-6' protonlarının 164.4 ppm'deki C-2 karbonuyla, 6,90 ppm'deki H-3' ve H-5' protonlarının 160.8 ppm'deki C-4' karbonuyla, 122.0 ppm'deki C-1' karbonuyla etkileştiği, 4.70 ppm'deki glikozun H-1' protonunun 105.1 ppm'deki C-8 karbonla etkileştiği olduğu görülmektedir ve böylece glikozun flavona 8 konumundan bağlandığını belirlenmiştir (Şekil 4.90).



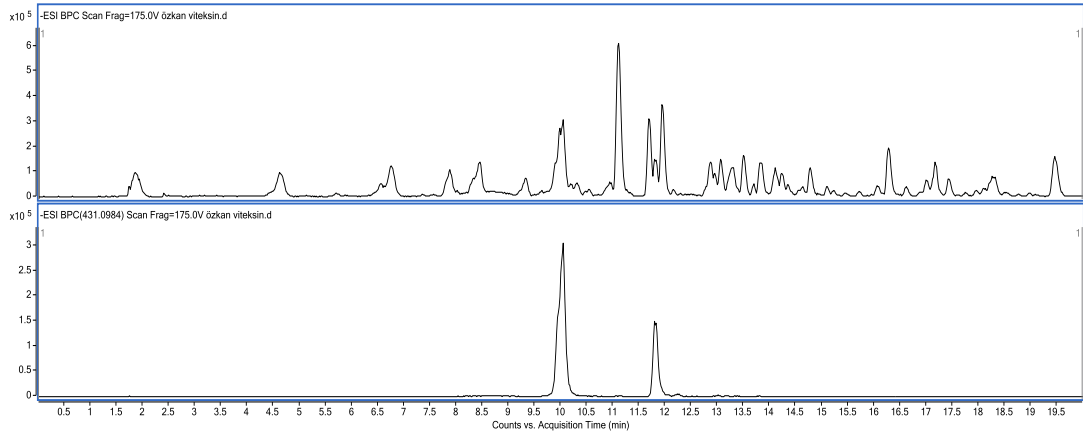
Şekil 4.91.8 Nolu (Viteksin) bileşiğin COSY spektrumu (^1H -NMR 400 MHz, DMSO-d_6)

8 Nolu bileşikteki proton-proton etkileşimlerini göstren COSY spektrumunda bileşiğin $\delta_{\text{H}} = 8.02$ ppm'de H-2' ve H-6' protonlarının $\delta_{\text{H}} = 6.90$ ppm'de rezonans olan H-3' ve H-5' protonları ile etkileşimi gözlenirken ayrıca şeker protonlarının birbirleriyle etkileşimleri görülmüştür (Şekil 4.91).



Şekil 4.92. 8 Nolu (Viteksin) bileşiğin FT-IR Spektrumu (KBr)

FT-IR : 8 Nolu (Viteksin) bileşiğine ait fonksiyonel grupların gerilme ve eğilme titreşim bantları, $\nu = 3430$ (OH gerilimi), 1637 (karbonil grubu), 2879 (alifatik. C-H gerilimi), 1022 (substitue aromatik halka düzlem dışı C-H eğilimleri) cm^{-1} şeklinde gözlenmiştir (Şekil 4.92).



Şekil 4.93. 8 Nolu (Viteksin) bileşiğin LC-TOF-MS kromatogramı (KBr)

OS metanol ekstresi ve izole edilen 8 nolu (Viteksin) bileşiğin LC-TOF-MS kromatogramlarından kapalı formülü $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{O}_{10}$ olan bileşiğin 10. dakikada moleküler iyon pikinin (-)-ESI MS: m/z 431.08 $[\text{M}-\text{H}]^-$ olduğu saptandı (Şekil 4.93).

4.8.9. 9 Nolu Bileşiğin (5,7-dihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-6,8-bis[(2S,3R,4R,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)oksan-2-il]kromen-4-on) Fiziksel ve Spektral Özellikleri

Şekil 4.94. 9 Nolu (Visenin-2) Bileşik

9 Nolu bileşik (Visenin-2) OS metanol ekstraktından kolon kromatografisi ile silikajel dolgu maddesi kullanılarak metanol: etilasetat (1:4) çözücü sisteminde 900-920 nolu fraksiyonlardan izole edildi (20 mg). 9 Nolu bileşik fiziksel görünümü sarı renkli amorf toz yapıdadır. Bileşiğin erime noktası 214-216 °C olarak ölçüldü. Visenin-2 molekülü bilinen bir bileşik olup elde edilen veriler literatür (Lu ve ark., 2000) ile uyum içindedir.

Bileşik $C_{27}H_{30}O_{15}$ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon piki $[M-H]^-$ LC-TOF-MS kütle spektrumunda m/z : 593,13 olarak bulunarak yapı doğrulanmıştır.

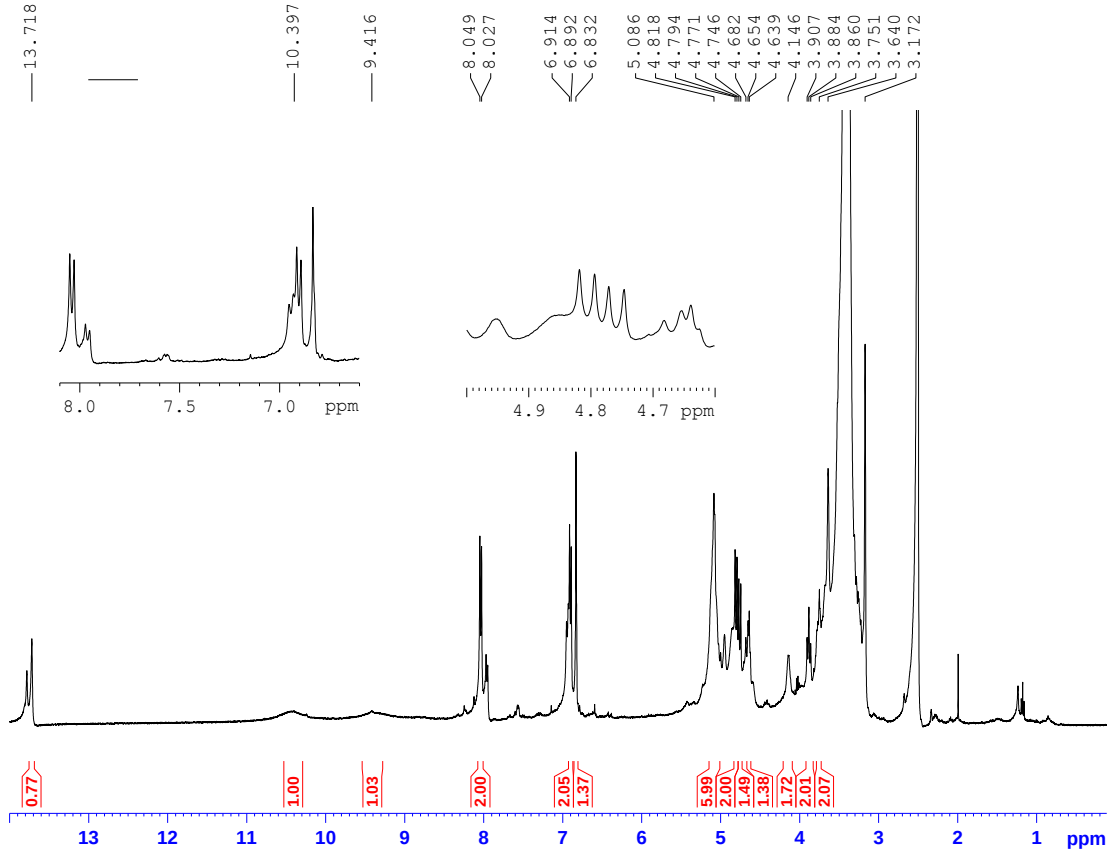
FT-IR ν (cm^{-1}) 3412, 2941, 2830, 1648, 1049, 1011, 837, 758

9 Nolu bileşiğin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR kimyasal kayma değerleri çizelge 4.22’de verilmiştir.

Çizelge 4.20. 9 Nolu (Visenin-2) bileşiğin ¹H-NMR ve ¹³C-NMR kimyasal kayma değerleri

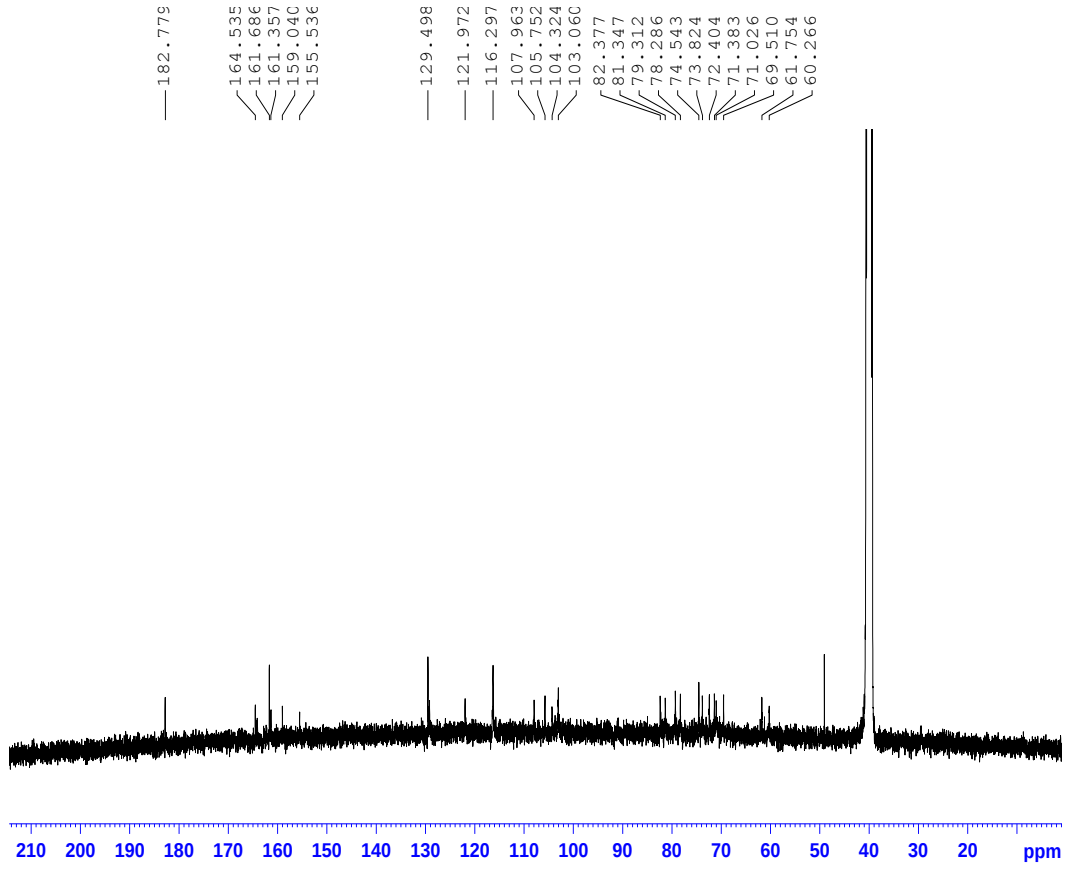
Posizyon	Visenin-2	
	δ_H (Hz)	δ_C
2	-	164.5
3	6.83 (s)	103.0
4	-	182.8
5	-	159.0
6	-	108.0
7	-	161.3
8	-	105.7
9	-	155.5
10	-	104.3
1'	-	122.0
2',6'	8.04 (d, $J= 8.5$)	129.5
3',5'	6.90 (d, $J= 8.5$)	116.3
4'	-	161.7
1''	4.75 (d, $J= 9.8$)	73.8
2''	3.39 (m)	69.5
3''	3.28 (m)	78.3
4''	3.88 (m)	71.4
5''	3.33 (m)	81.3
6''a	3.58 (m)	61.3
6''b	3.70 (m)	
1'''	4.80 (d, $J= 9.8$)	74.5
2'''	3.41 (m)	71.4
3'''	3.29 (m)	79.3
4'''	3.52 (m)	72.4
5'''	3.23 (m)	82.4
6a'''	3.58 (m)	61.7
6b'''	3.78 (m)	

Şekil 4.95. 9 Nolu (Visenin-2) bileşiğin HMBC korelasyonları



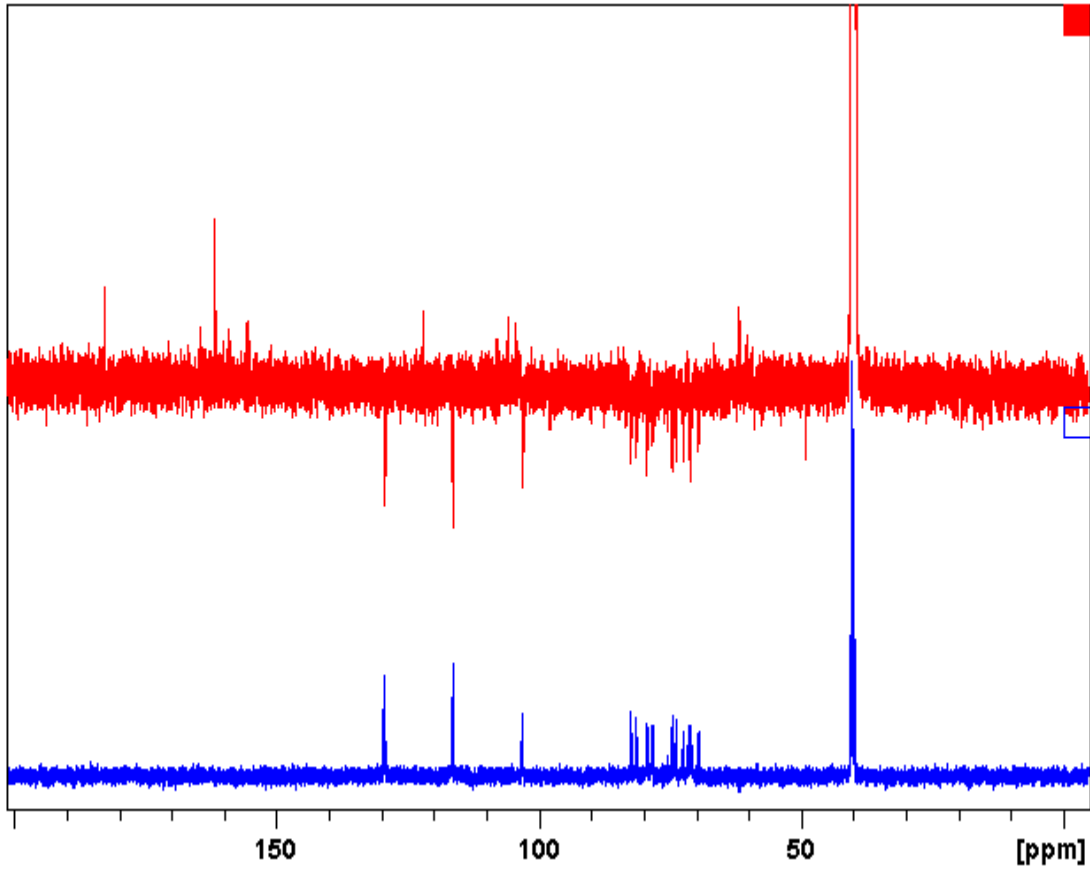
Şekil 4.96. 9 Nolu (Visenin-2) bileşiğin ^1H -NMR spektrumu (400 MHz, DMSO-d_6)

9 Nolu bileşiğin ^1H -NMR spektrumuna bakıldığında $\delta = 8.04$ (2H, d, $J = 8.5$ Hz) ppm'de görülen sinyaller B halkasının H-2' ve H-6' protonlarına, $\delta = 6.90$ (2H, d, $J = 8.5$ Hz) ppm'de görülen sinyaller B halkasının H-3' ve H-5' protonlarına, $\delta = 6.83$ (1H, s) ppm'de görülen sinyal ise A halkasının H-3 protonuna ait olduğu tespit edilmiştir. $\delta = 6.78$ ppm'de singlet olarak görülen bu sinyal molekülümüzün flavon olduğuna işaret eder. $\delta = 4.75$ ve 4.80 ppm'de görülen sinyaller glikoz moleküllerinin H-1'' ve H-1''' protonlarına aittir ve protonların dublete yarıldığı, etkileşme sabitlerinin $J = 9.8$ Hz olduğu görülmüştür, buradan da glikozların β konfigürasyonda olduğuna karar verilmiştir.



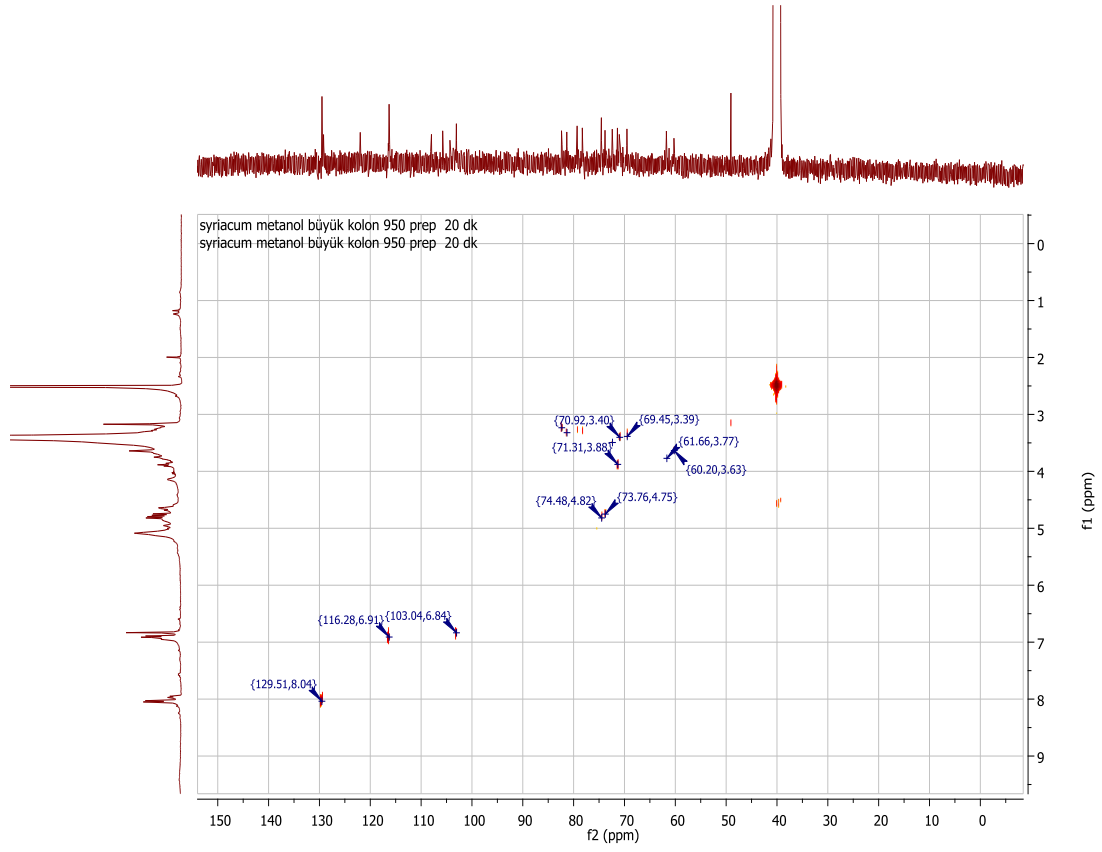
Şekil 4.97. 9 Nolu (Visenin-2) bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumu (100 MHz, DMSO- d_6)

9 Nolu bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumunda 25 karbon sinyali görülmektedir. $\delta = 129.5$ ve $\delta = 116.3$ ppm'de görülen sinyallerin sırasıyla, C-2' ve C-6' ile C-3' ve C-5' konumlarına ait olduğunu literatürler değerleri de desteklemektedir. $\delta = 60.4$ -82.5 ppm'ler arasında görülen sinyaller 2 adet glikoz molekülüne aittir. $\delta = 73.8$ ve 74.6 ppm'de görülen sinyallerin C-1'' ve C-1''' karbon atomlarına ait olduğu literatür bilgileri ile karşılaştırılarak karar verilmiştir.



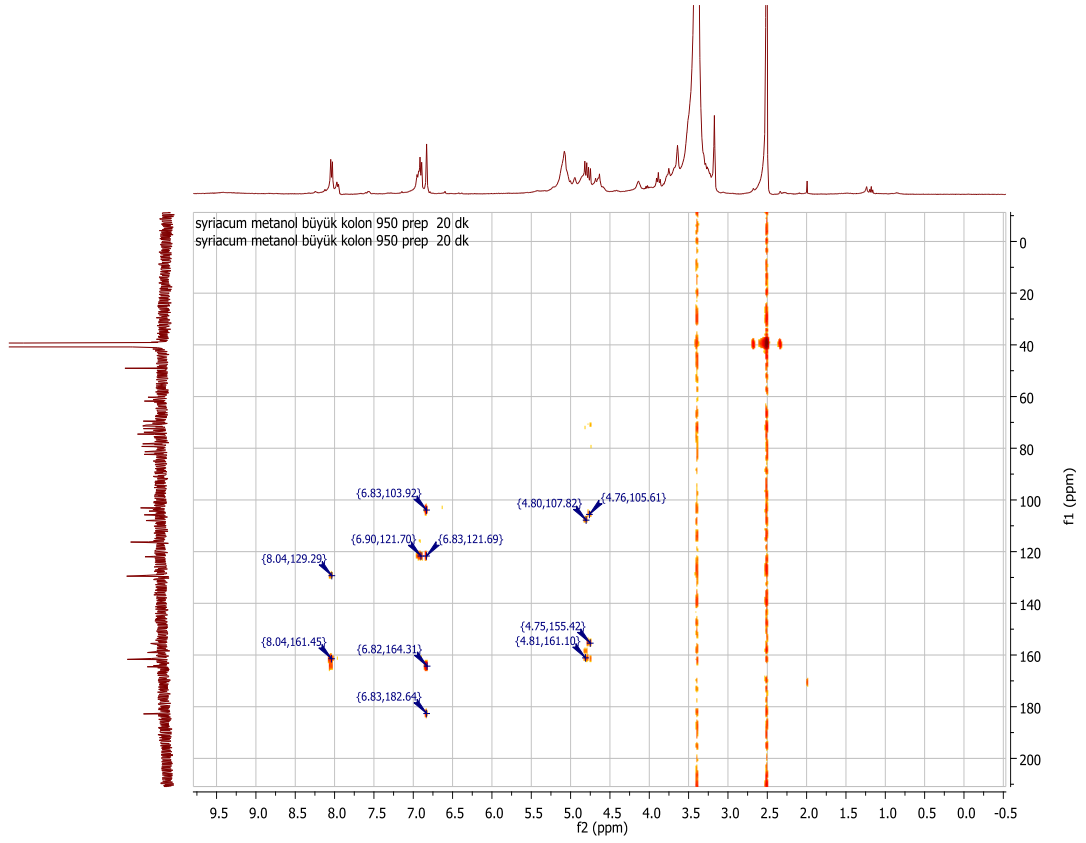
Şekil 4.98. 9 Nolu (Visenin-2) bileşiğin APT, DEPT-90 NMR spektrumu(^{13}C -NMR100 MHz, DMSO- d_6)

9 Nolu bileşiğine ait APT ve DEPT-90 spektrumları incelendiğinde yapıda 26 karbon atomu olduğu görülmektedir. 26 karbondan 9 tanesi kuaterner karbonu (DEPT-90 spektrumlarında sinyal vermeyen kısım), 15 tanesi metin karbonu (DEPT-90 spektrumunda pozitif sinyaller), 2 metilen karbonu (DEPT-135 spektrumunda negatif ve APT spektrumundaki pozitif sinyaller), içerdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.98).



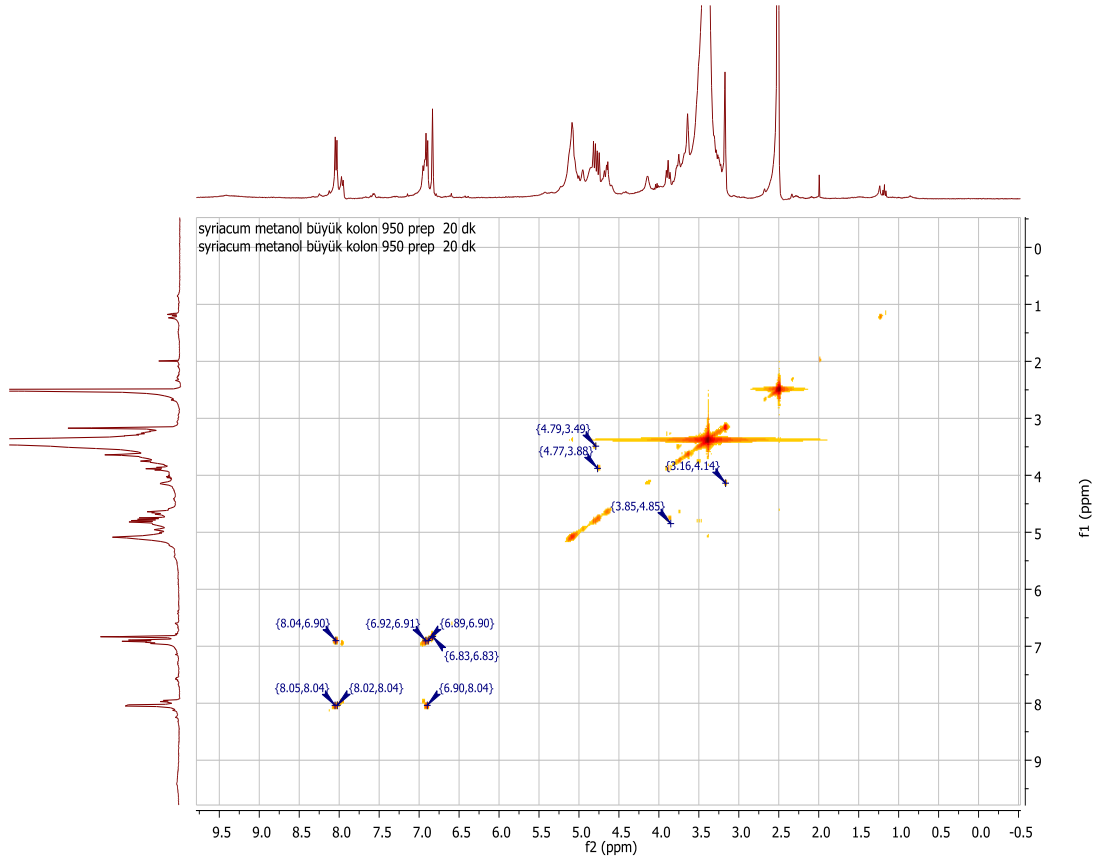
Şekil 4.99. 9 Nolu (Visenin-2) bileşiğin HETCOR spektrumu (^1H -NMR 400 MHz, ^{13}C -NMR 100 MHz, DMSO- d_6)

9 Nolu bileşiğin HETCOR spektrumunda, flavonoid halkasında 103.1 ppm'deki C-3 karbonunun 6.83 ppm'deki protonla etkileştiği, flavonoidin B halkasındaki 129.5 ve 116.3 ppm'deki C-2', C-6' ve C-3', C-5' karbonlarının 8.04 ve 6.90 ppm'deki protonlarla, 73.8 ve 74.5 ppm'de glikozların C-1'' ve C-1''' karbonları olan karbonunun 4.75 ve 4.80 ppm'deki protonlarla, etkileştiği belirlenmiştir (Şekil 4.99).



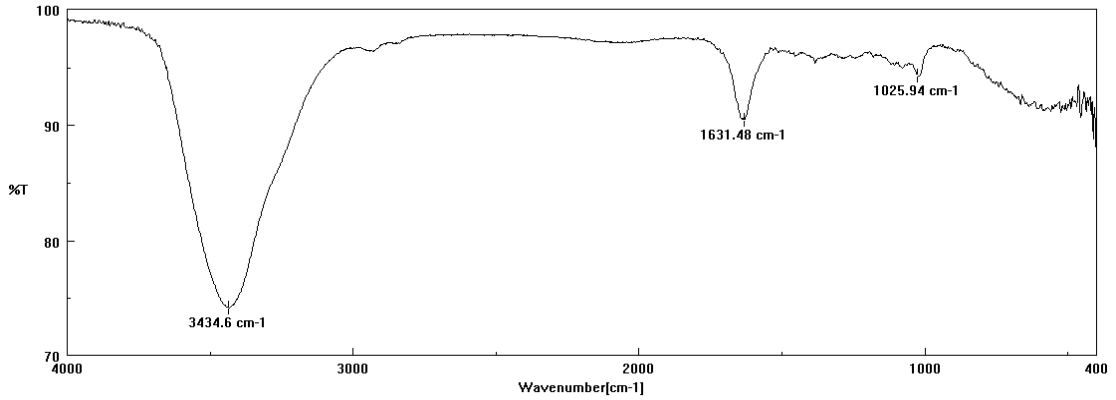
Şekil 4.100. 9 Nolu (Visenin-2) bileşiğin HMBC spektrumu (^1H -NMR 400 MHz, ^{13}C -NMR 100 MHz, DMSO- d_6)

9 Nolu bileşiğin HMBC spektrumunda flavanoidin B halkasındaki 8.04 ppm'deki H-2' ve H-6' protonlarının 164.5 ppm'deki C-2 karbonuyla, 6.90 ppm'deki H-3' ve H-5' protonlarının 161.7 ppm'deki C-4' karbonuyla, 122.0 ppm'deki C-1' karbonuyla etkileştiği, 4.75 ppm'deki glikozun H-1'' protonun 105.8 ppm'deki C-8 karbonuyla ve 4.80 ppm'deki glikozun H-1''' protonun 107.9 ppm'deki C-6 karbonuyla etkileşmesi, glikozların flavona C-6 ve C-8 konumundan bağlandığını belirtmektedir (Şekil 4.100).



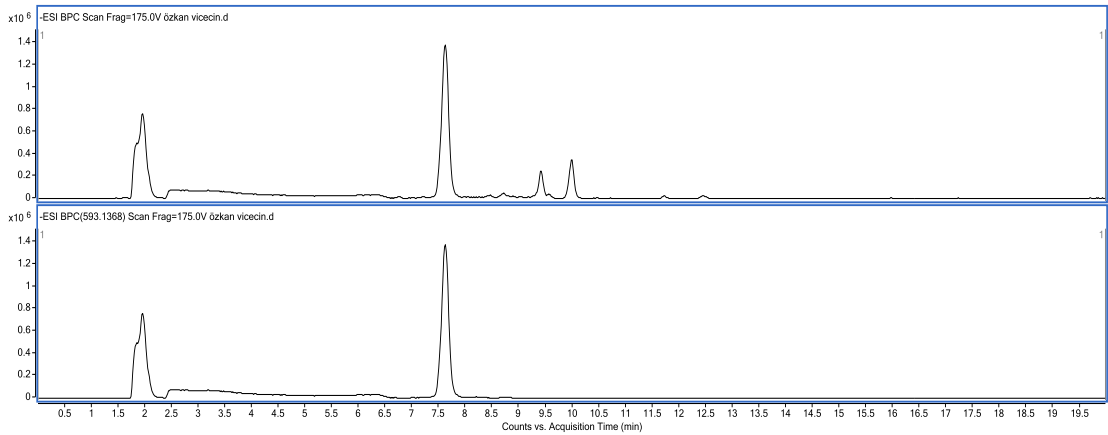
Şekil 4.101. 9 Nolu (Visenin-2) bileşiğin COSY spektrumu (^1H -NMR 400 MHz, DMSO-d_6)

9 Nolu bileşiğin proton-proton etkileşimlerini göstren COSY spektrumunda, $\delta = 8.04$ ppm'de H-2' ve H-6' protonlarının $\delta = 6.90$ ppm'de rezonans olan H-3' ve H-5' protonları ile etkileşimi gözlenirken, şeker protonlarının birbirleriyle etkileşimleri görülmüştür.



Şekil 4. 102. 9 Nolu (Visenin-2) bileşiğin FT-IR Spektrumu (KBr)

FT-IR : 9 Nolu (Visenin-2) bileşiğine ait fonksiyonel grupların gerilme ve eğilme titreşim bantları, $\nu = 3434$ (OH gerilimi), 1631 (karbonil grubu) 2879 (alifatik. C-H gerilimi), 1025 (substitue aromatik halka düzlem dışı C-H eğilimleri) cm^{-1} şeklinde gözlenmiştir.



Şekil 4.103. 9 Nolu (Visenin-2) bileşiğin LC-TOF-MS kromatogramı

9 Nolu (Visenin-2) bileşiğin LC-TOF-MS kromatogramlarından kapalı formülü $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{O}_{10}$ olan bileşiğin 7.5 dakikada moleküler iyon pikinin (-)-ESI MS m/z : 593.13 $[\text{M}-\text{H}]^-$ olduğu saptandı (Şekil 4.103).

4.8.10. 10 Nolu Bileşğin (Asasetin-7-O-[3-O-asetil- β -L-kisilopiranozil-(1-2)- β -D-glikopiranozit]) Fiziksel ve Spektral Özellikleri

Şekil 4.104. 10 Nolu bileşik (Asasetin-7-O-[3-O-asetil- β -L-kisilopiranozil-(1-2)- β -D-glikopiranozit])

10 Nolu bileşik (Asasetin-7-O-[3-O-asetil- β -L-kisilopiranozil-(1-2)- β -D-glikopiranozit]) OS metanol ekstraktından kolon kromatografisi ile silikajel dolgu maddesi kullanılarak etilasetat: metanol (1: 9) çözücü sisteminde 636-696 nolu fraksiyonlarından preperatif HPLC ile izole edildi (30 mg). 10 nolu bileşik fiziksel görünümü sarı renkli amorf toz yapıdadır. Bileşğin erime noktası 244-246 °C olarak ölçüldü. (Asasetin-7-O-[3-O-asetil- β -L-kisilopiranozil-(1-2)- β -D-glikopiranozit]) molekülü literatürde daha önce bilinmeyen bir bileşiktir (Şekil.4.104).

Bileşik $C_{28}H_{32}O_{15}$ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pikini $[M+CH_3COOH-H]^+$ LC-TOF-MS kütle spektrumunda m/z: 665.17 dır.

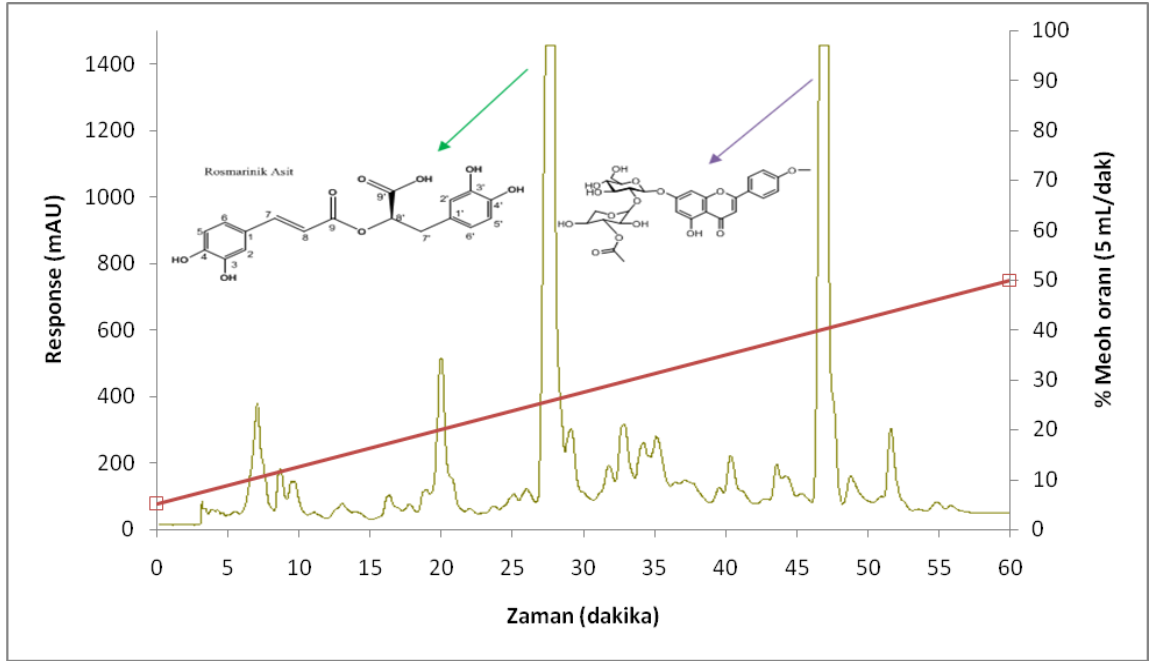
FT-IR $\nu(cm^{-1})$ 3412, 2941, 2830, 1648, 1049, 1011, 837, 758

10 Nolu bileşiğin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR kimyasal kayma değerleri çizelge 4.23’de verilmiştir.

Çizelge 4.21.10 Nolu (Asasetin-7-O-[3-O-asetil- β -L-ksilopiranozil-(1-2)- β -D-glikopiranozit]) bileşiğin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR kimyasal kayma değerleri

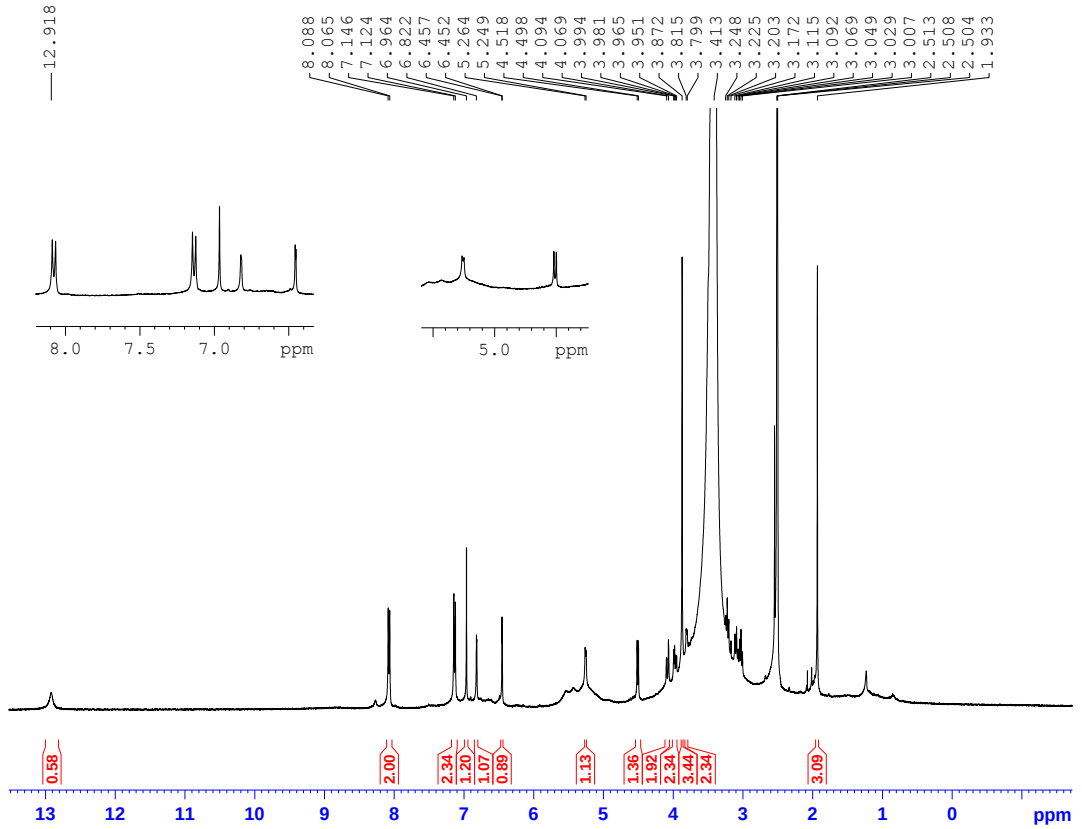
Posizyon	δ_{C}	δ_{H} (Hz)	Posizyon	δ_{C}	δ_{H} (Hz)
1	-	-	-	β -D-Glk (C-7)	-
2	164.3	-	1''	105.1	4.51 (d, $J = 7.5$)
3	104.2	6.97 s	2''	83.2	3.51 (dd, $J = 7.5, 9.2$)
4	182.5	-	3''	75.8	3.50 m
5	161.6	-	4''	69.2	3.47 m
6	100.1	6.47 (d, $J = 2.3$)	5''	74.2	3.41 (ddd, $J = 9.8, 6.4, 1.8$)
7	163.1	-	6''	63.9	4.12 (dd, $J = 11.3, 1.8$) 3.93 (dd, $J = 11.3, 6.4$)
8	95.2	6.82 (d, $J = 2.3$)	-	β -D-ksi (C-2 _{ksi})	-
9	157.4	-	1'''	99.1	5.29 (d, $J = 6.3$)
10	105.9	-	2'''	74.9	3.03 (t, $J = 8.3$)
1'	123.1	-	3'''	76.3	3.23 m
2',6'	128.9	8.09 (d, $J = 8.6$)	4'''	70.1	3.10 m
3',5'	115.1	7.14 (d, $J = 8.6$)	5'''	74.2	3.41 m
4'	162.9	-	1'''	170.7	-
-OCH ₃	56.0	3.87 s	-	-	-

Şekil 4.105. 10 Nolu (Asasetin-7-O-[3-O-asetil- β -L-ksilopiranozil-(1-2)- β -D-glikopiranozit]) bileşiğin HMBC korelasyonları



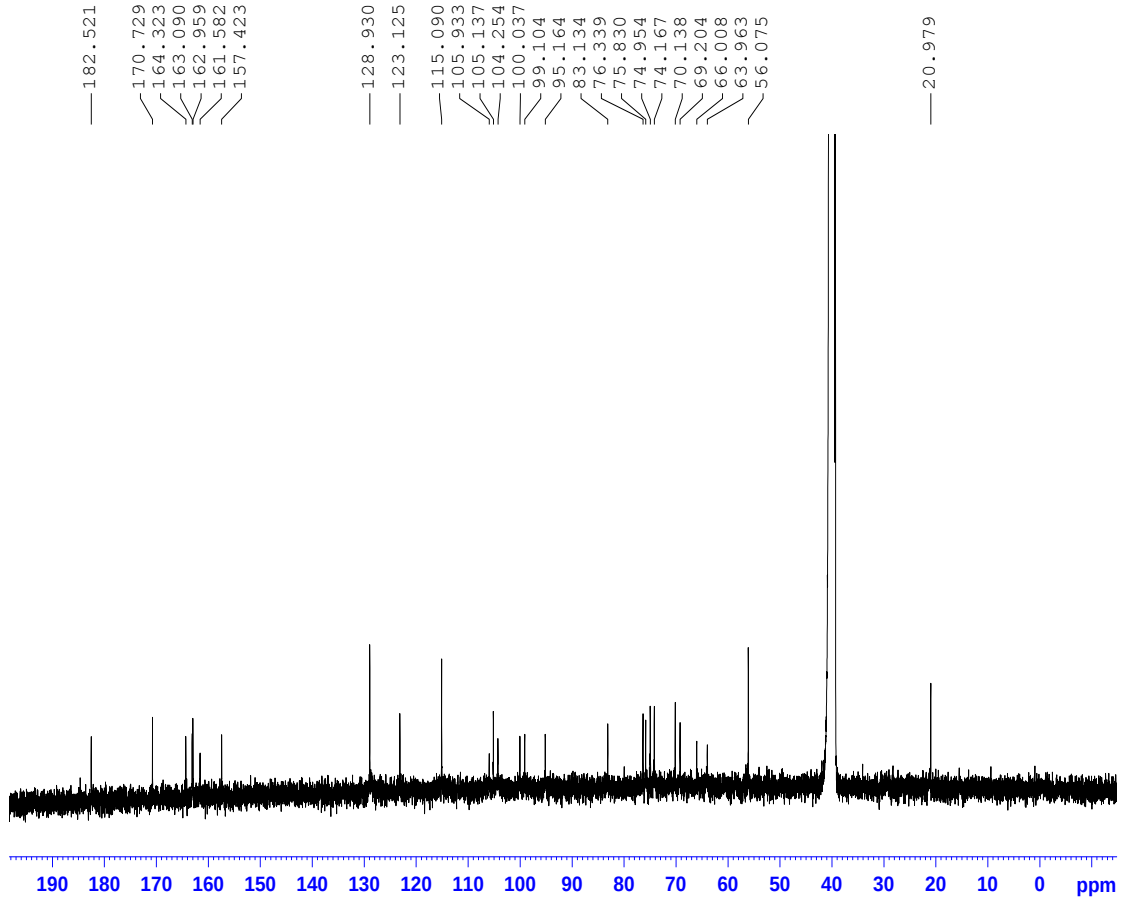
Şekil 4.106. *O. syriacum* metanol ekstraktı 636-696 fraksiyonlarının HPLC kromatogramı

OS metanol ekstraktından kolon kromatografisi ile silikajel dolgu maddesi kullanılarak etilasetat: metanol (1: 9) çözücü sistemindeki 636-696 nolu fraksiyonları için preparatif HPLC kullanıldı. Kromatogramdaki 16-18, 20-24 ve 40-41 dakikalarında üç pik görüldü. Her üç pik geldiği dakikalarda tüplere konularak evaporatörle çözücüler uzaklaştırıldı ve NMR'ları alınarak maddelerin izoviteksin, rosmarinik asit ve (Asasetin-7-O-[3-O-acetyl-β-L-xilopiranozil-(1-2)-β-D-glikopiranozit]) olduğu belirlendi (Şekil.4.106).



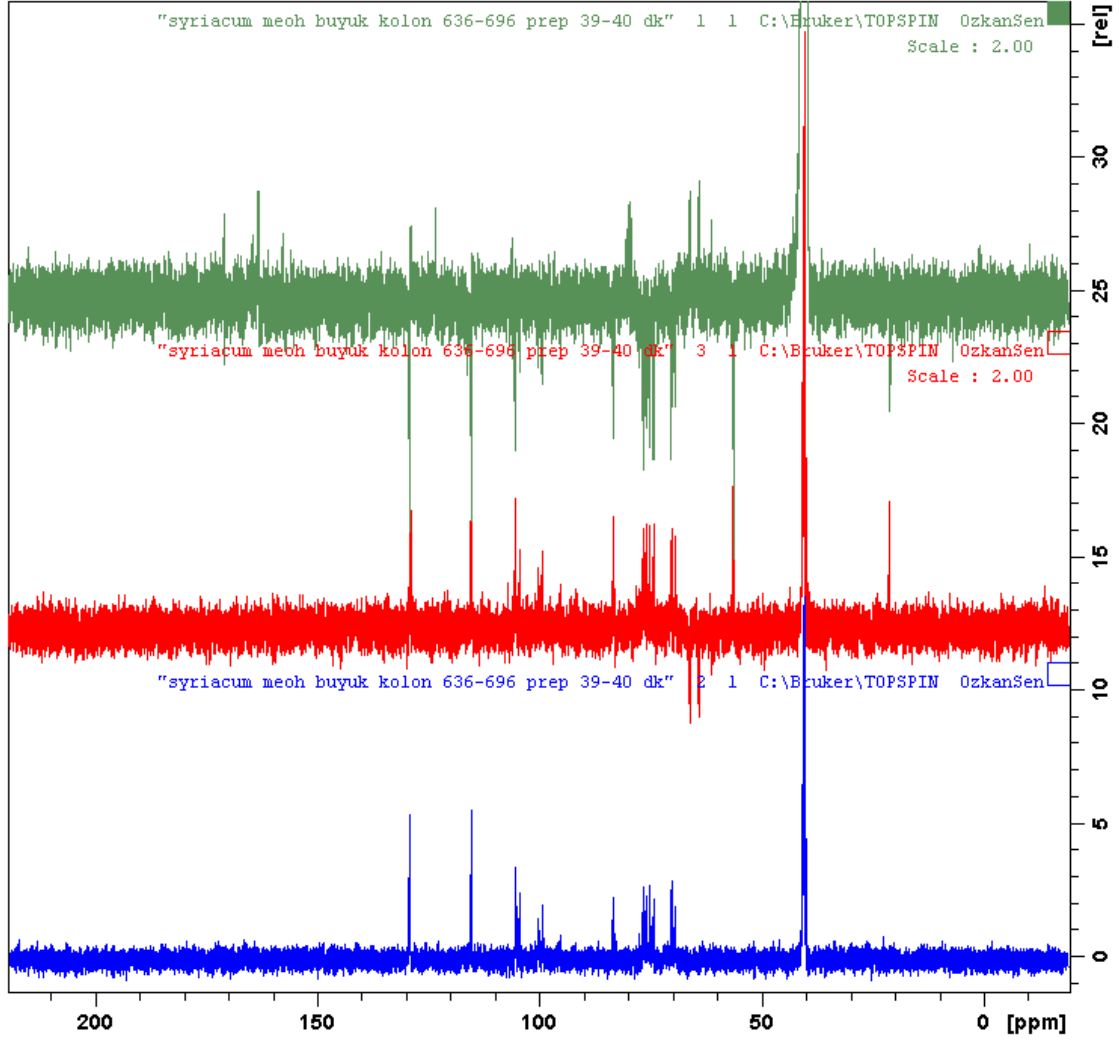
Şekil 4.107. 10 Nolu (Asasetin-7-O-[3-O-asetil-β-L-ksilopiranozil-(1-2)-β-D-glikopiranozit]) bileşiğin ¹H-NMR spektrumu (400 MHz, DMSO-d₆)

10 Nolu bileşiğin ¹H-NMR spektrumuna bakıldığında $\delta = 8.09$ (2H, d, $J = 8.6$ Hz) ppm'de görülen sinyaller B halkasının H-2' ve H-6' protonlarına, 7.14 (2H, d, $J = 8.6$ Hz) ppm'de görülen sinyaller B halkasının H-3' ve H-5' protonlarına ve $\delta_H = 6.47$ (d, $J = 2.3$ Hz) ppm ile $\delta = 6.82$ (d, $J = 2.3$ Hz) görülen sinyaller ise A halkasının H-6 ve H-8 protonuna ait olduğu tespit edilmiştir. $\delta_H = 6.97$ ppm'de singlet olarak görülen H-3 protonu molekülümüzün flavon olduğuna işaret eder. $\delta = 4.51$ ppm'de görülen sinyal glikoz moleküllerinin anomerik protonuna aittir. $\delta = 5.29$ ppm'de görülen sinyal ksiloz molekülünün anomerik protonuna aittir. Anomerik protonların dublete yarıldığı ve etkileşme sabitlerinin sırasıyla $J = 7.5$ Hz ve $J = 6.32$ Hz olduğu görülmüştür, buradan β konfigürasyonda olduklarına karar verilmiştir (Şekil 4.107).



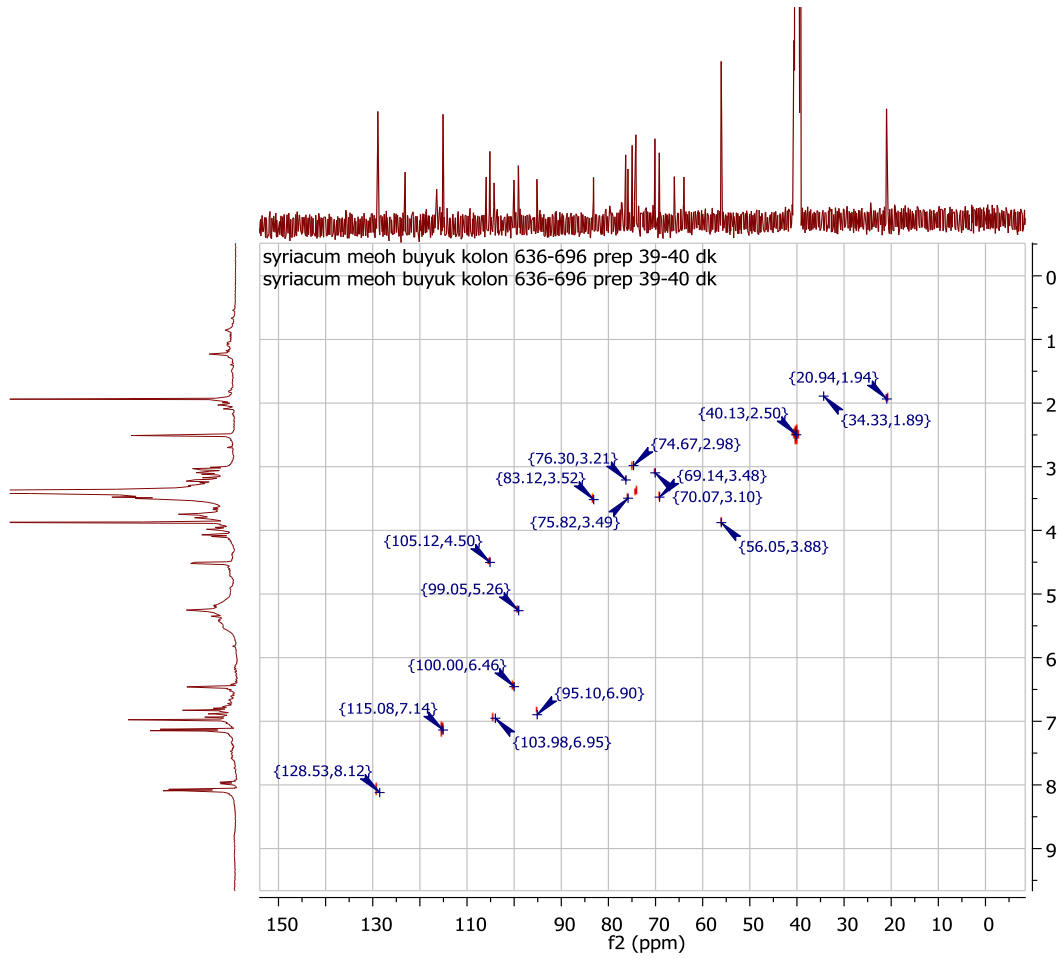
Şekil 4.108. 10 Nolu (Asasetin-7-O-[3-O-asetil-β-L-ksilopiranozil-(1-2)-β-D-glikopiranozit]) bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumu (100 MHz, DMSO-d_6)

10 Nolu bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumunda 26 karbon sinyali görülmektedir. $\delta = 128.9$ ve $\delta = 115.1$ ppm'de görülen sinyallerin sırasıyla, C-2',C-6' ile C-3',C-5' konumlarına, $\delta = 100.1$ ve $\delta = 95.2$ ppm'de görülen sinyallerin sırasıyla C-6,C-8 konumlarına, flavon halkasında metoksi karbonlarının $\delta = 56.3$ ppm'ait olduğunu literatürler değerleri de desteklemektedir. $\delta = 60.4$ -83.5 ppm'ler arasında görülen sinyaller glikoz ve ksiloz molekülüne aittir. Flavon halkasının $\delta = 182.5$ ppm'de görülürken ksiloz grubuna bağlı asetil grubunun karbonil karbonu $\delta = 170.7$ ppm'de görülmüştür. 99.1 ve 105.1 ppm'de görülen sinyallerin anomerik karbon atomuna ait olduğu literatür bilgileri ile karşılaştırılarak karar verilmiştir (Şekil 4.108).



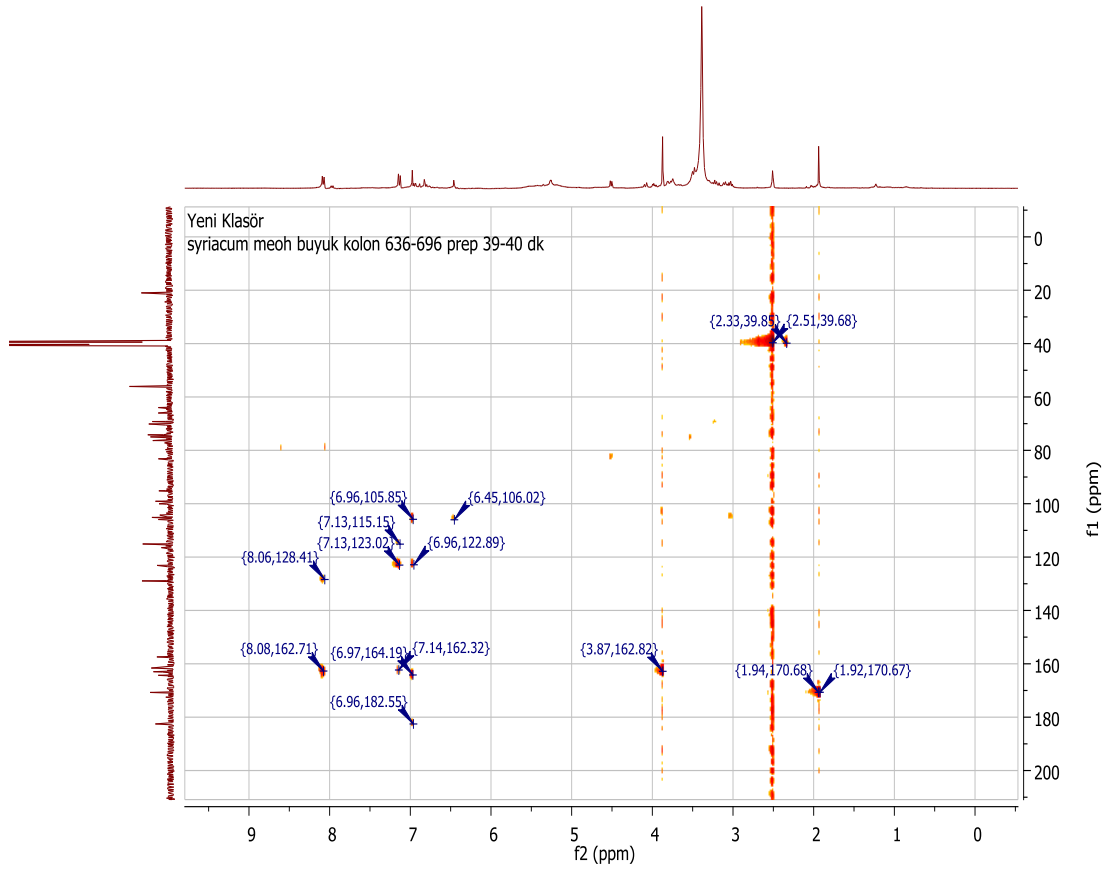
Şekil 4.109. 10 Nolu nolu (Asasetin Asasetin-7-O-[3-O-asetil- β -L-ksilopiranozil-(1-2)- β -D glikopiranozit]) bileşiğin APT, DEPT-135, DEPT-90 NMR spektrumu (^{13}C -NMR100 MHz, DMSO- d_6)

10 Nolu bileşiğine ait APT, DEPT-90 ve DEPT-135 spektrumları incelendiğinde 26 karbon atomu olduğu görülmektedir. 27 karbondan 9 tanesi kuaterner karbonu (DEPT-90 ve DEPT-135 spektrumlarında sinyal vermeyen kısım), 14 tanesi metin karbonu (DEPT-90 ve DEPT-135 spektrumunda pozitif sinyal), 2 metilen karbonu (DEPT-135 spektrumunda negatif ve APT spektrumundaki pozitif sinyal), 2 metil karbonu (APT ve DEPT-135 spektrumundaki pozitif sinyal içerdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.109).



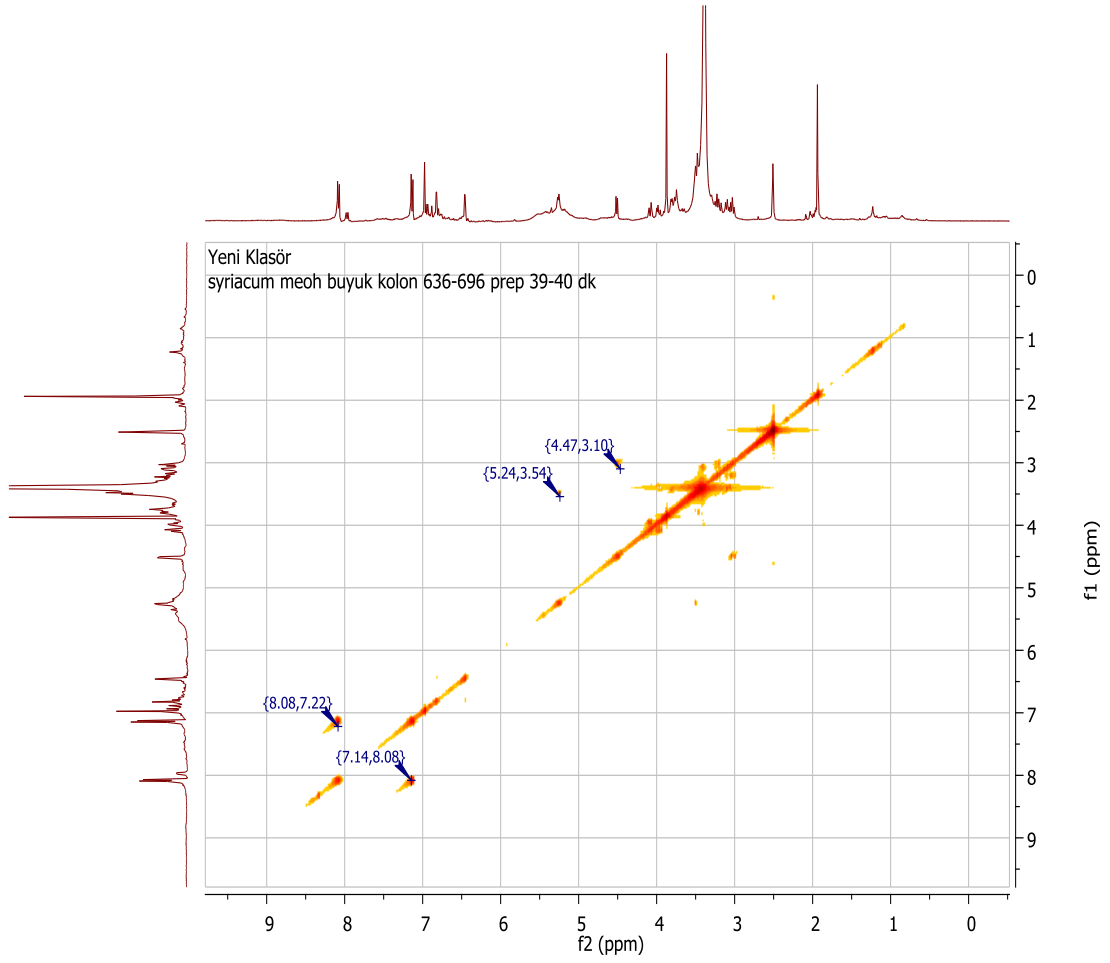
Şekil 4.110.10 Nolu (Asasetin-7-O-[3-O-asetil- β -L-ksilopiranozil-(1-2)- β -D-glikopiranozit]) bileşiğın HETCOR spektrumu (¹H-NMR 400 MHz, ¹³C-NMR 100 MHz, DMSO-d₆)

10 Nolu bileşiğın HETCOR spektrumunda, flavonoid halkasında 104.2 ppm'deki C-3 karbonunun 6.97 ppm'deki protonla etkileştiğı, flavonoidin B halkasındaki 128.9 ve 115.1 ppm'deki C-2', C-6' ve C-3', C-5' karbonlarının 8.09 ve 7.14 ppm'deki protonlarla, 105.1 ve 99.1 ppm'de glikoz ve ksilozun anomerik karbonları olan C-1" ve C-1"' karbonlarının sırasıyla 4.51 ve 5.29 ppm'deki protonlarla etkileştiğı tespit edilmiştir (Şekil 4.110).



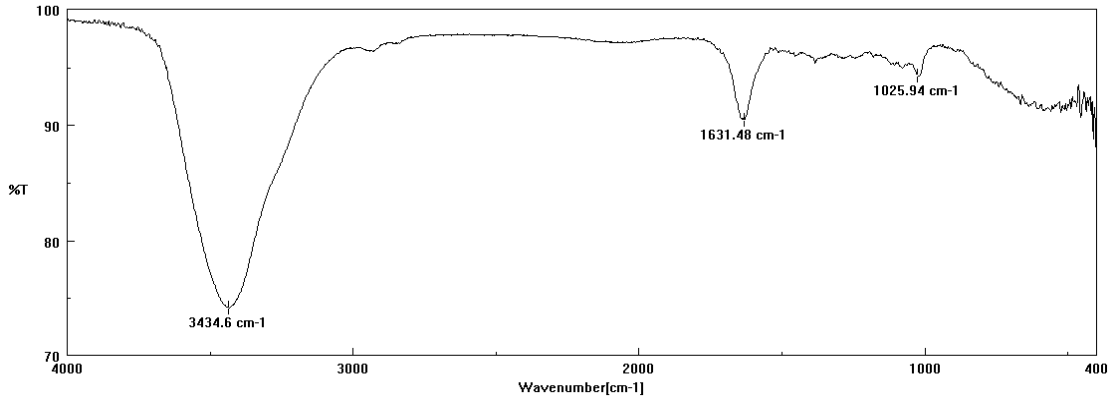
Şekil 4.111. 10 Nolu (Asasetin-7-O-[3-O-asetil- β -L-ksilopiranozil-(1-2)- β -D-glikopiranozit]) bileşiğin HMBC spektrumu (^1H -NMR 400 MHz, ^{13}C -NMR100 MHz, DMSO- d_6)

10 Nolu bileşiğin HMBC spektrumunda flavanoidin B halkasındaki 8.09 ppm'deki H-2' ve H-6' protonlarının 164.5 ppm'deki C-2 karbonuyla, 7.14 ppm'deki H-3' ve H-5' protonlarının 162.9 ppm'deki C-4' karbonuyla, 123.1 ppm'deki C-1' karbonuyla etkileştiği, 4.51 ppm'deki ksilozun anomerik H-1''' protonun 83.2 ppm'deki C-2'' karbonla etkileştiği olduğu görülmektedir ve böylece glikozun flavona 7 konumundan ve ksilozun glikoza C-2'' pozisyonundan bağlandığı belirlenmiştir (Şekil 4.111).



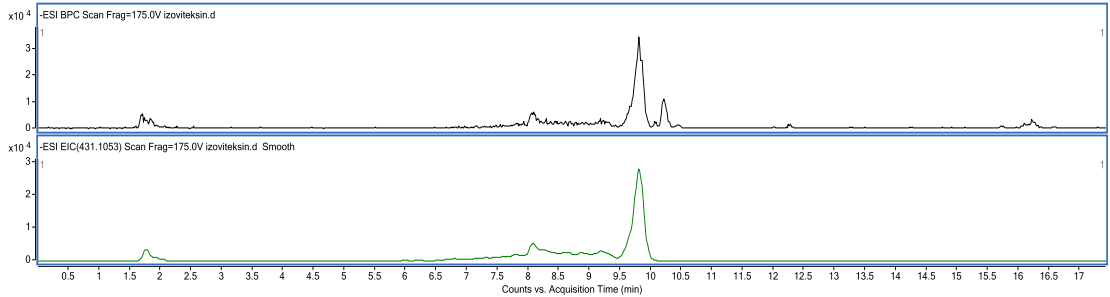
Şekil 4.112.10 Nolu (Asasetin-7-O-[3-O-asetil- β -L-ksilopiranozil-(1-2)- β -D-glikopiranozit]) bileşiğin COSY spektrumu ($^1\text{H-NMR}$ 400 MHz, DMSO-d_6)

10 Nolu bileşiğin proton-proton etkileşimlerini göstren COSY spektrumunda $\delta = 8.09$ ppm'de H-2' ve H-6' protonlarının $\delta = 7.14$ ppm'de rezonans olan H-3' ve H-5' protonları ile etkileşimi gözlenirken ayrıca şeker protonlarının birbirleriyle etkileşimleri görülmüştür (Şekil 4.112).



Şekil 4. 113. 10 Nolu (Asasetin-7-O-[3-O-asetil-β-L-ksilopiranozil-(1-2)-β-D-glikopiranozit]) bileşiğin FT-IR spektrumu (KBr)

FT-IR: 10 Nolu (Asasetin-7-O-[3-O-asetil-α-L-ksilopiranozil-(1-2)-β-glikopiranozit]) bileşiğine ait fonksiyonel grupların gerilme ve eğime titreşim bantları, $\nu = 3434$ (OH gerilimi), 1631 (karbonil grubu) 2879 (alifatik. C-H gerilimi), 1025 (substitue aromatik halka düzlem dışı C-H eğilimleri) cm^{-1} şeklinde gözlenmiştir (Şekil 4.113).



Şekil 4.114. 10 Nolu (Asasetin-7-O-[3-O-asetil-β-L-ksilopiranozil-(1-2)-β-D-glikopiranozit]) bileşiğin LC-TOF-MS kromatogramı

10 Nolu (Asasetin-7-O-[3-O-asetil-β-L-ksilopiranozil-(1-2)-β-D-glikopiranozit]) bileşiğin LC-TOF-MS kromatogramlarından kapalı formülü $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{15}$ olan bileşiğin 9,5 dakikada moleküler iyon piki (-)ESI MS: m/z 665.17 $[\text{M}+\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2-\text{H}]^-$ dir (Şekil 4.114).

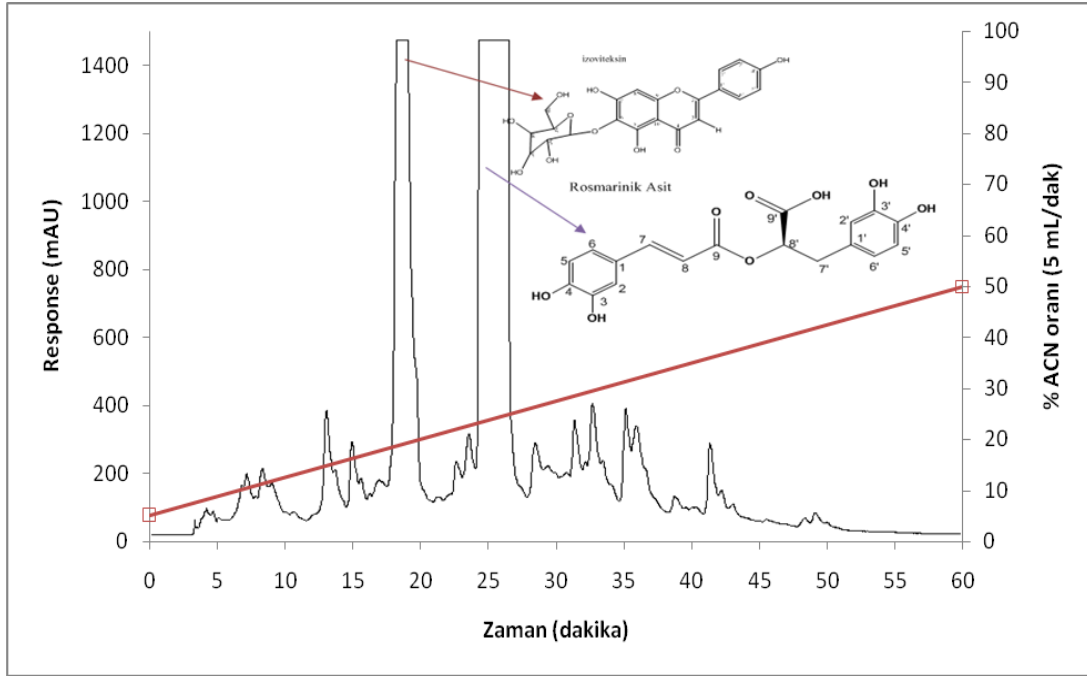
4.8.11. 11 Nolu Bileşğin (5,7-dihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-6-[(2S,3R,4R,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)oksan-2-il]kromen-4-on) Fiziksel ve Spektral Özellikleri

Şekil 4.115. 11 Nolu bileşik (İzoviteksin)

11 Nolu bileşik (İzoviteksin) OS metanol ekstraktından kolon kromatografisi ile silikajel dolgu maddesi kullanılarak etilasetat: metanol (1: 9) çözücü sisteminde 696-724 nolu fraksiyonlarından preperatif HPLC kullanılarak izole edildi (60 mg). 11 nolu bileşik fiziksel görünümü sarı renkli amorf toz yapıdadır. Bileşğin erime noktası 244-246 °C olarak ölçüldü. İzoviteksin molekülü bilinen bir bileşik olup elde edilen veriler literatür (Wen ve ark., 2007) ile uyum içindedir.

Bileşik $C_{21}H_{20}O_{10}$ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pikini $[M-H]^-$ LC-MS-TOF kütle spektrumunda m/z : 431.08 olarak vermiştir.

FT-IR $\nu(\text{cm}^{-1})$ 3412, 2941, 2830, 1648, 1049, 1011, 837, 758



Şekil 4.116. OS Metanol ekstraktının 696-724 fraksiyonlarının HPLC kromatogramı

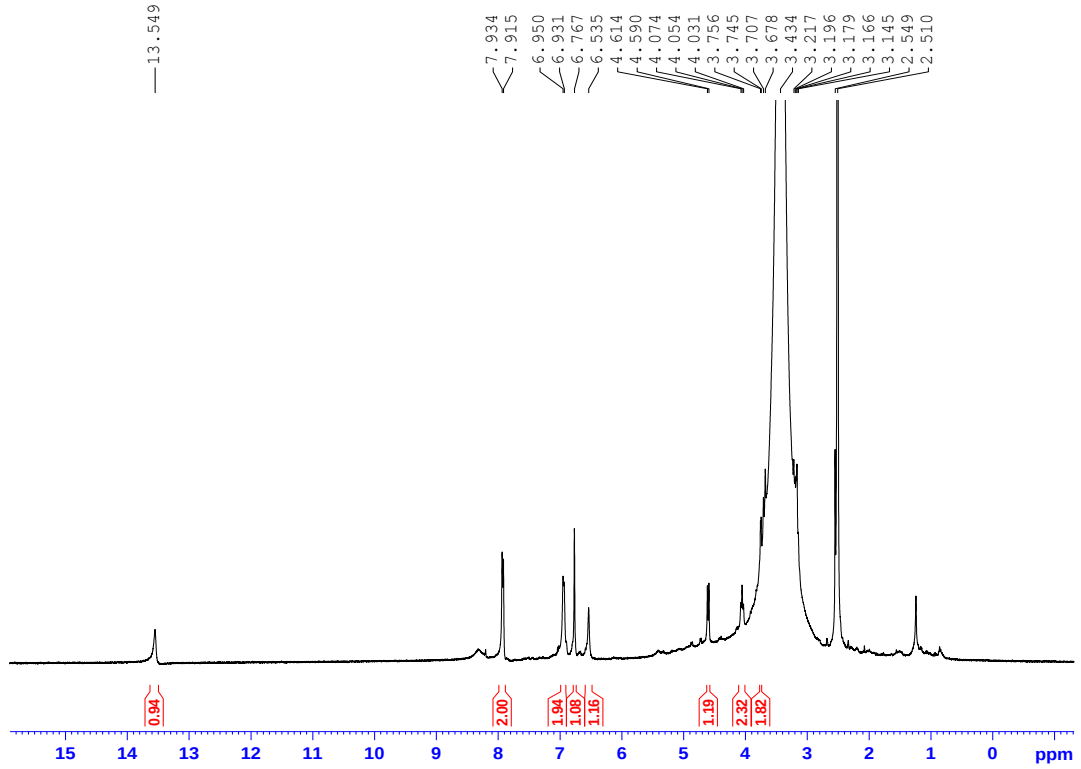
OS metanol ekstraktından kolon kromatografisi ile silikajel dolgu maddesi kullanılarak etilasetat: metanol (1: 9) çözücü sistemindeki 696-724 nolu fraksiyonları için preparatif HPLC kullanıldı. Kromatogramdaki 14-16 ve 20-22 dakikalarda iki pik görüldü. Her iki pik geldiği dakikalarda tüplere konularak evaporatörle çözücülerini uzaklaştırıldı ve NMR'ları alınarak maddelerin izoviteksin ve rozmarinik asit olduğu belirlendi (Şekil 4.116)

11 Nolu bileşiğin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR kimyasal kayma değerleri çizelge 4.24'de verilmiştir.

Çizelge 4.22. 11 Nolu (İzoviteksin) bileşiğin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR kimyasal kayma değerleri

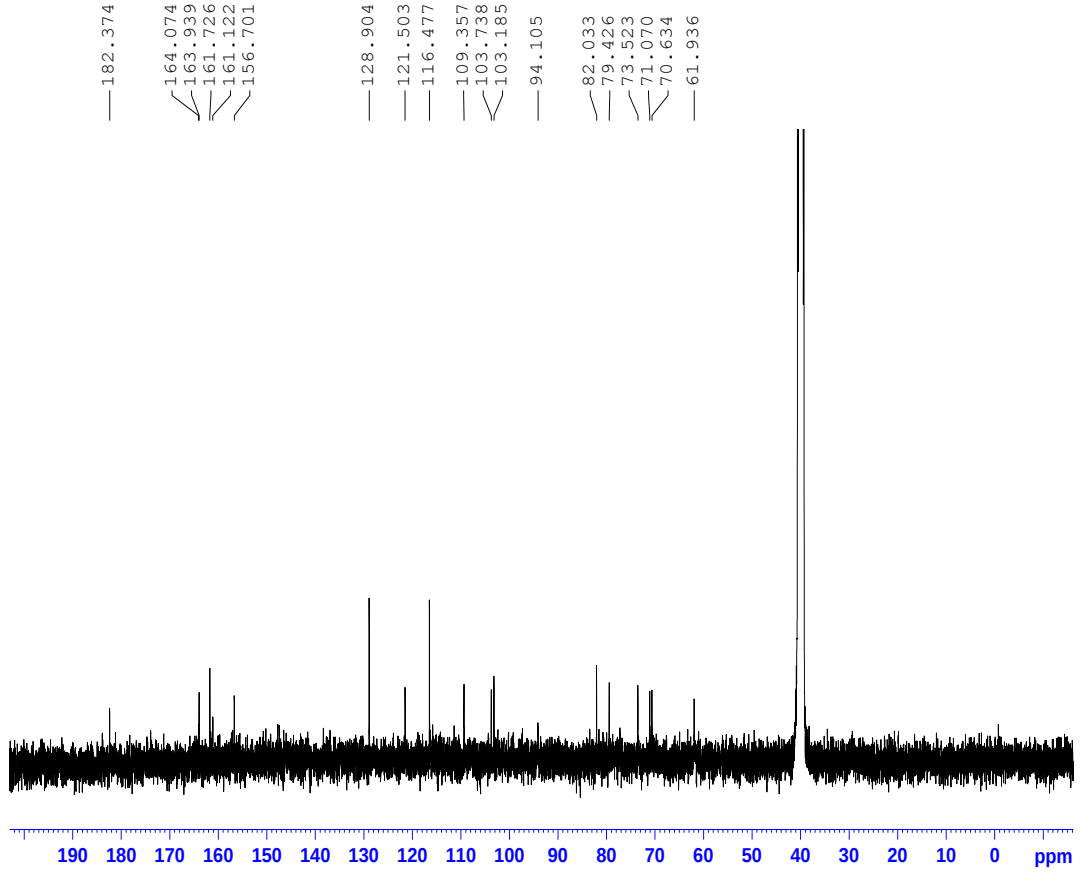
Pozisyon	İzoviteksin	
	δ_{H} (Hz)	δ_{C}
2	-	163.9
3	6.76 (s)	103.2
4	-	182.4
5	-	161.7
6	-	109.3
7	-	156.5
8	6.27 (s)	94.1
9	-	156.7
10	-	103.7
1'	-	121.5
2'	7.93 (d, $J = 7.7$ Hz)	128.9
3'	6.94 (d, $J = 7.7$ Hz)	116.5
4'	-	161.7
5'	6.94 (d, $J = 7.7$ Hz)	116.5
6'	7.93 (d, $J = 7.7$ Hz)	128.9
1''	4.60 (d, $J = 9.6$ Hz)	73.5
2''	3.10 (m)	71.1
3''	3.19 (m)	79.4
4''	3.41 (m)	70.1
5''	3.14 (m)	82.0
6''a	3.54 (m)	61.9
6''b	3.74 (m)	

Şekil 4.117. 11 Nolu (İzoviteksin) bileşiğin HMBC korelasyonları



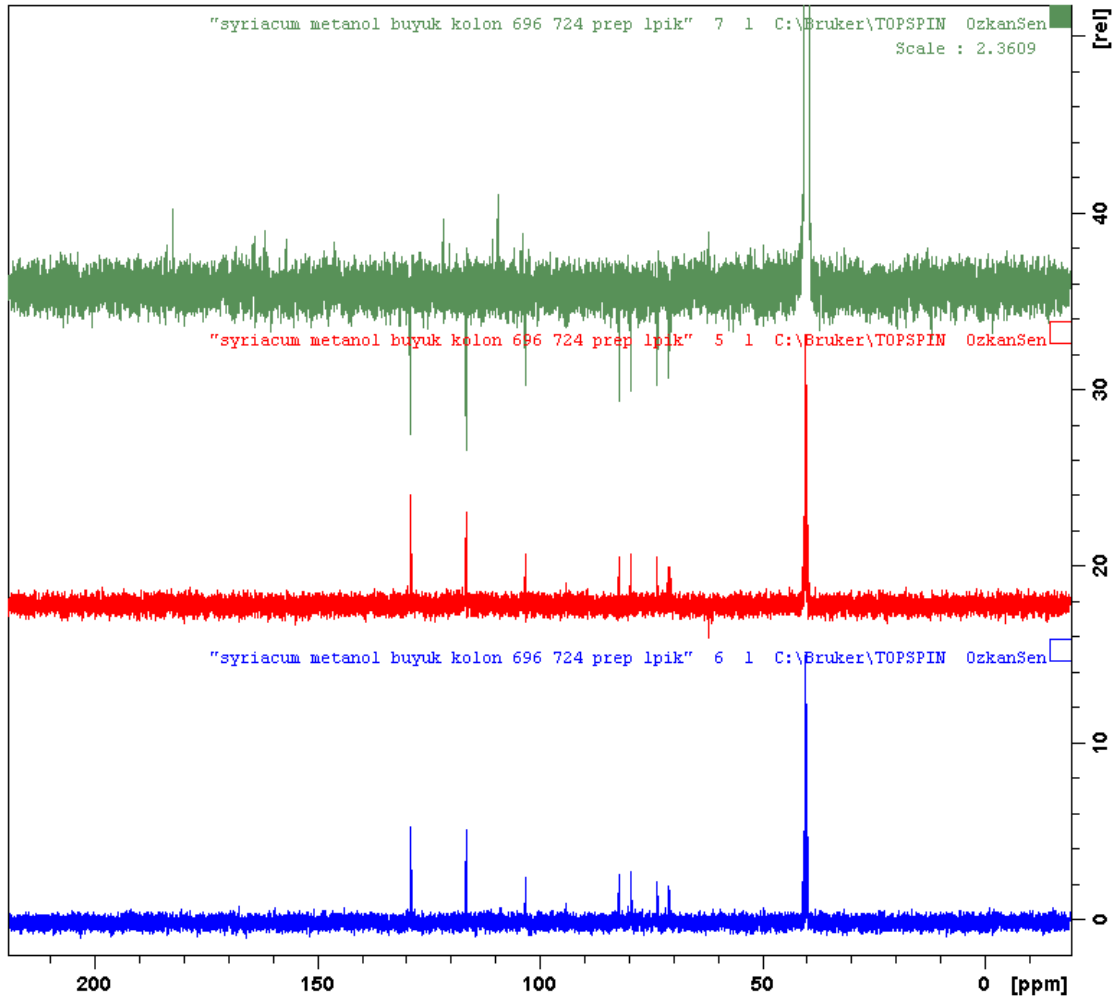
Şekil 4.118. 11 Nolu (İzoviteksin) bileşiğin ^1H -NMR spektrumu (400 MHz, DMSO-d_6)

11 Nolu bileşiğin ^1H -NMR spektrumunda, $\delta = 7.93$ (2H, d, $J = 7.7$ Hz) ppm’de görülen sinyaller B halkasının H-2' ve H-6' protonlarına, 6.94 (2H, d, $J = 7.7$ Hz) ppm’de görülen sinyaller B halkasının H-3' ve H-5' protonlarına ve $\delta = 6.76$ (s, 1H) ppm’de görülen sinyal ise C halkasının H-3 protonuna aittir. $\delta = 6.76$ ppm’de singlet olarak görülen bu sinyal molekülümüzün flavon olduğuna işaret eder. $\delta = 4.60$ ppm’de görülen sinyal glikoz moleküllerinin H-1" protonuna aittir. H-1" protonunun dublete yarıldığı ve etkileşme sabitinin $J = 9.64$ Hz olduğu görülmüştür, buradan da glikozların β konfigürasyonda olduğuna karar verilmiştir.



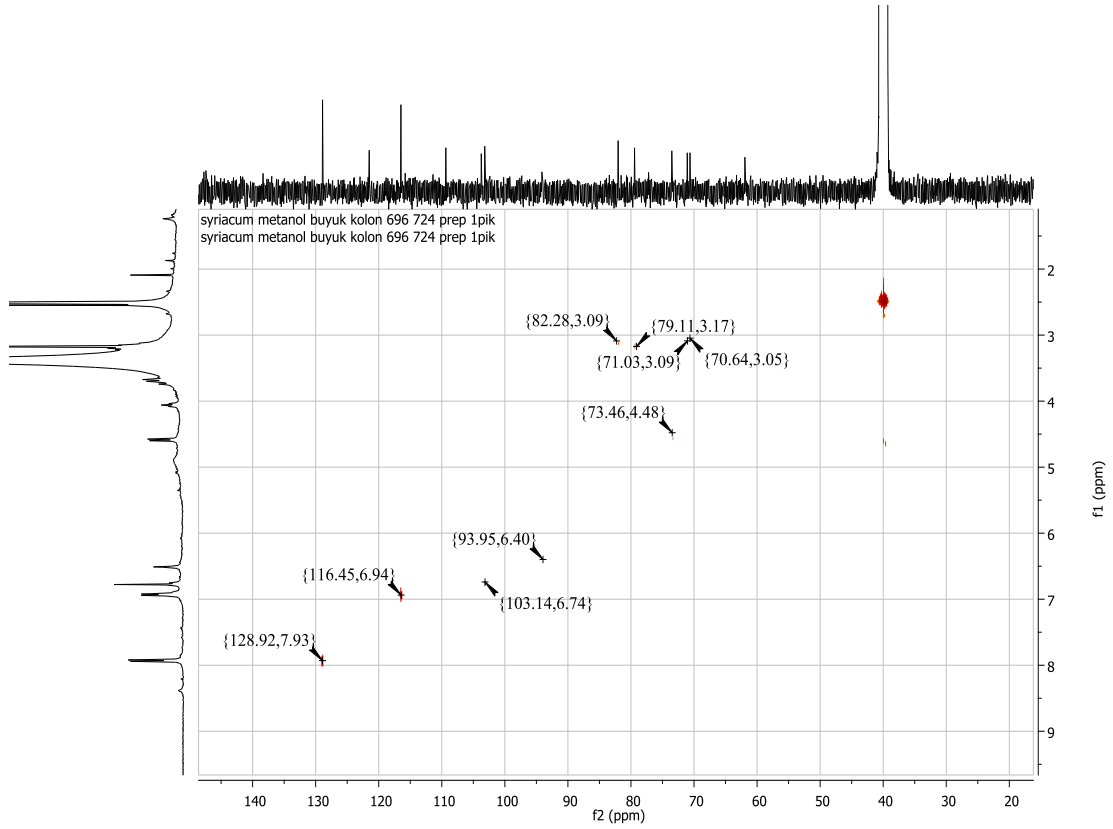
Şekil 4.119. 11 Nolu (İzoviteksin) bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumu (100 MHz, DMSO- d_6)

11 Nolu bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumunda 19 karbon sinyali görülmektedir. $\delta = 128.9$ ve $\delta = 116.5$ ppm'de görülen sinyallerin sırasıyla, C-2' ve C-6' ile C-3' ve C-5' konumlarına ait olduğunu literatürler değerleri de desteklemektedir. $\delta = 60.4-82.5$ ppm'ler arasında görülen sinyaller glikoz molekülüne aittir. $\delta = 73.9$ ppm'de görülen sinyalin C-1" karbon atomuna ait olduğu literatür bilgileri ile karşılaştırılarak karar verilmiştir.



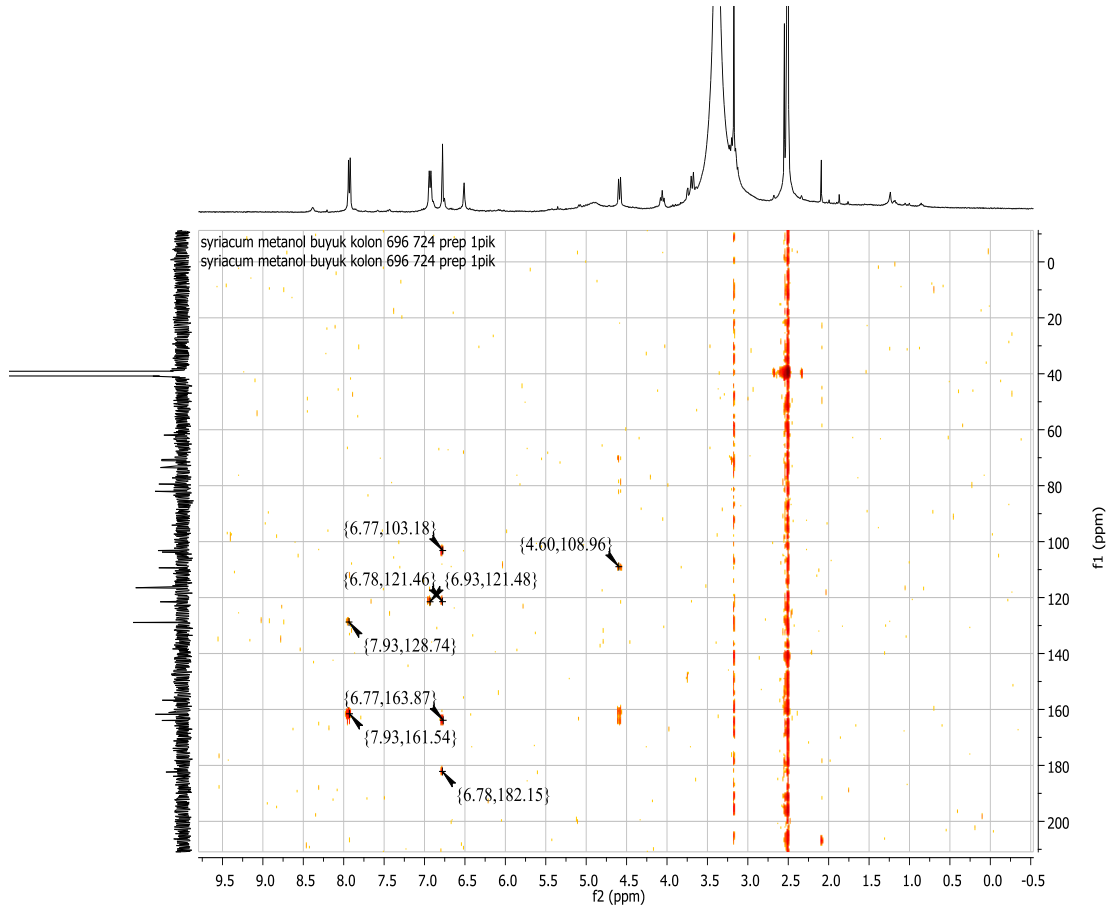
Şekil 4.120. 11 Nolu (İzoviteksin) bileşiğin APT, DEPT-135, DEPT-90 NMR spektrumu (^{13}C -NMR 100 MHz, DMSO-d_6)

11 Nolu bileşiğine ait APT, DEPT-90 ve DEPT-135 spektrumları incelendiğinde yapıda 19 karbon atomu olduğu görülmektedir. 19 karbondan 9 tanesi kuaterner karbonu (DEPT-90 ve DEPT-135 spektrumlarında sinyal vermeyen kısım), 9 tanesi metin karbonu (DEPT-90 ve DEPT-135 spektrumunda pozitif sinyal), 1 metilen karbonu (DEPT-135 spektrumunda negatif ve APT spektrumundaki pozitif sinyal), içerdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.120).



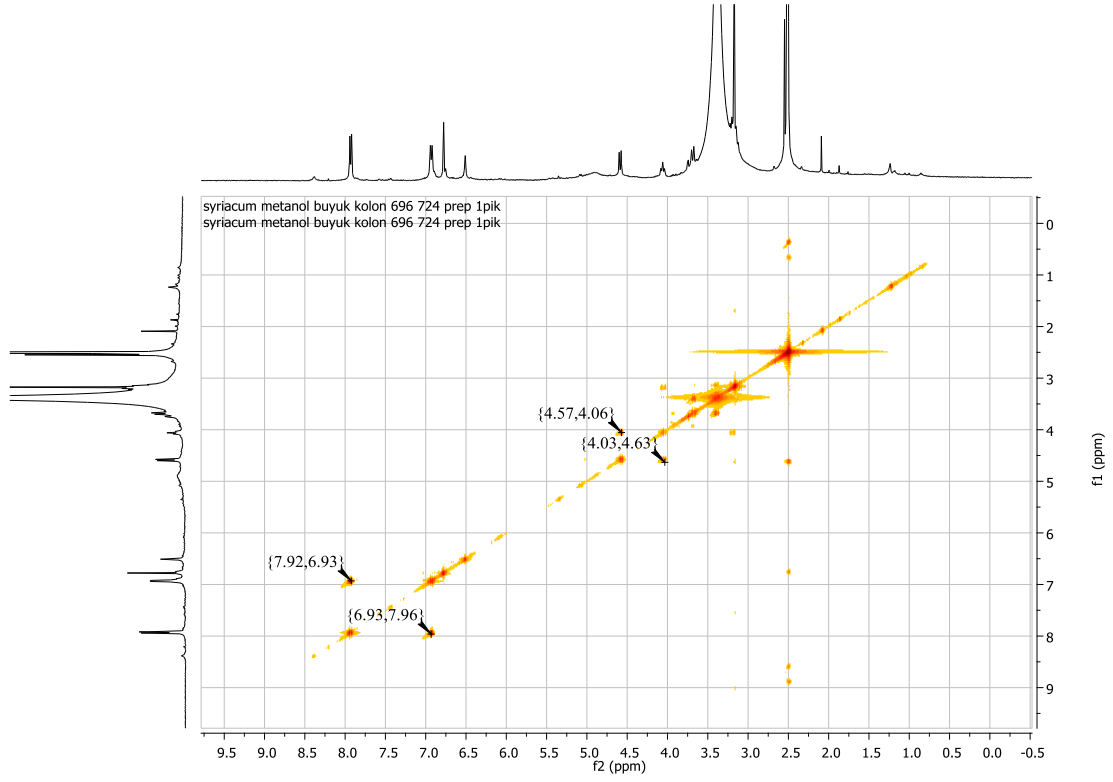
Şekil 4.121. 11 Nolu (İzoviteksin) bileşiğin HETCOR spektrumu (^1H -NMR 400 MHz, ^{13}C -NMR 100 MHz, DMSO- d_6)

11 Nolu bileşiğin HETCOR spektrumunda, flavonoid halkasında 103.2 ppm'deki C-3 karbonunun 6.76 ppm'deki protonla etkileştiği, flavonoidin B halkasındaki 128.4 ve 116.5 ppm'deki C-2', C-6' ve C-3', C-5' karbonlarının 7.93 ve 6.94 ppm'deki protonlarla, 73.5 ppm'deki glikozun C-1" karbonunun 4.60 ppm'deki protonla, etkileştiği tespit edilmiştir (Şekil 4.121).



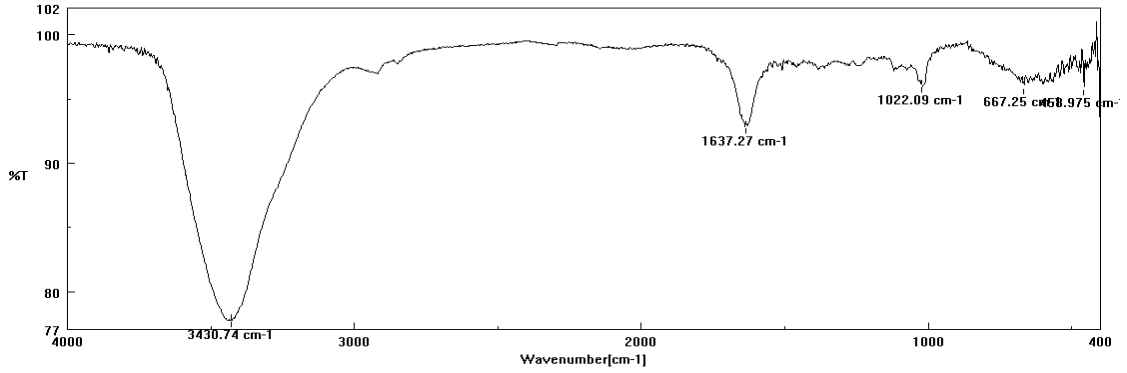
Şekil 4.122. 11 Nolu (İzoviteksin) bileşiğin HMBC spektrumu (^1H -NMR 400 MHz, ^{13}C -NMR 100 MHz, DMSO- d_6)

11 Nolu bileşiğin HMBC spektrumunda flavanoidin B halkasındaki 7,93 ppm'deki H-2' ve H-6' protonlarının 164.4 ppm'deki C-2 karbonuyla, 6,94 ppm'deki H-3' ve H-5' protonlarının 160.8 ppm'deki C-4' karbonuyla, 122.0 ppm'deki C-1' karbonuyla etkileştiği, 4.60 ppm'deki glikozun H-1'' protonunun 109.4 ppm'deki C-6 karbonuyla etkileştiği görülmektedir ve böylece glikozun flavona 6 konumundan bağlandığı belirlenmiştir (Şekil 4.122).



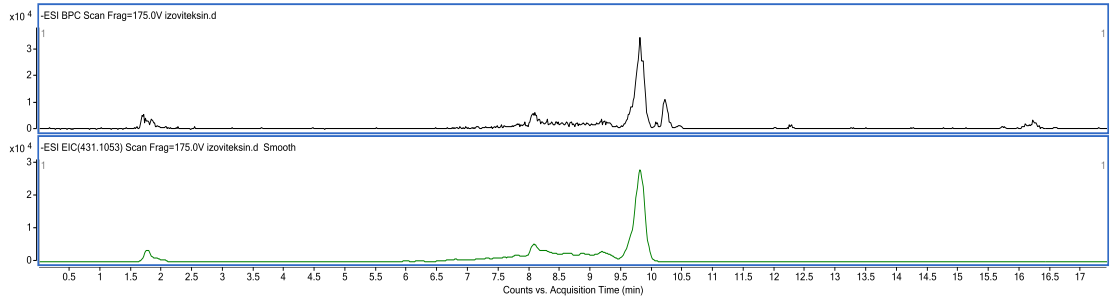
Şekil 4.123. 11 Nolu (İzoviteksin) bileşiğin COSY spektrumu (^1H -NMR 400 MHz, DMSO-d_6)

11 Nolu bileşiğin proton-proton etkileşimlerini gösteren COSY spektrumunda $\delta = 7.93$ ppm'de H-2' ve H-6' protonlarının $\delta = 6.94$ ppm'de rezonans olan H-3' ve H-5' protonları ile etkileşimi gözlenirken, şeker protonlarının birbirleriyle etkileşimleri görülmüştür (Şekil 4.123).



Şekil 4.124. 11 Nolu (İzoviteksin) bileşiğin FT-IR Spektrumu (KBr)

FT-IR: 11 Nolu (İzoviteksin) bileşiğine ait fonksiyonel grupların gerilme ve eğilme titreşim bantları, $\nu = 3430$ (OH gerilimi), 1637 (karbonil grubu), 2879 (alifatik. C-H gerilimi), 1022 (substitue aromatik halka düzlem dışı C-H eğilimleri) cm^{-1} şeklinde gözlenmiştir (Şekil 4.124).



Şekil 4.125. 11 Nolu (İzoviteksin) bileşiğin LC-TOF-MS kromatogramı

11 Nolu (İzoviteksin) bileşiğin LC-TOF-MS kromatogramlarından kapalı formülü $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$ olan bileşiğin 9.5 dakikasında moleküler iyon pikinin (-)-ESI MS m/z 431.08 $[\text{M}-\text{H}]^-$ olduğu saptandı.

4.8.12. 12 Nolu Bileşğin (Rozmarinik asit) Fiziksel ve Spektral Özellikleri

Şekil 4.126. 12 Nolu Bileşik (Rozmarinik asit)

Yaygın ismi literatürde Rozmarinik asit olan 12 nolu bileşik *O.syriacum* etil asetat ekstraktından kolon kromatografisi ile silikajel dolgu maddesi kullanılarak etilasetat: metanol (9: 1) çözücü sisteminde 700-800 nolu fraksiyonlardan izole edildi (200 mg). İzole edilen molekülün fiziksel görünümümü ise sarı renkli amorf toz şeklindedir. Bileşğin erime noktası 171-175 °C olarak ölçüldü. *O. majorana*'nın etil asetat fraksiyonundan rozmarinik asit (5 nolu bileşik) saf olarak elde edilmiştir. *O. majorana*'da rozmarinik asit'e yer verildiği için bu bölümde yer verilmemiştir.

Bileşik $C_{18}H_{16}O_8$ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pikini $[M-H]^-$ LC-TOF- MS kütle spektrumunda m/z 359.1042 olarak vermiştir.

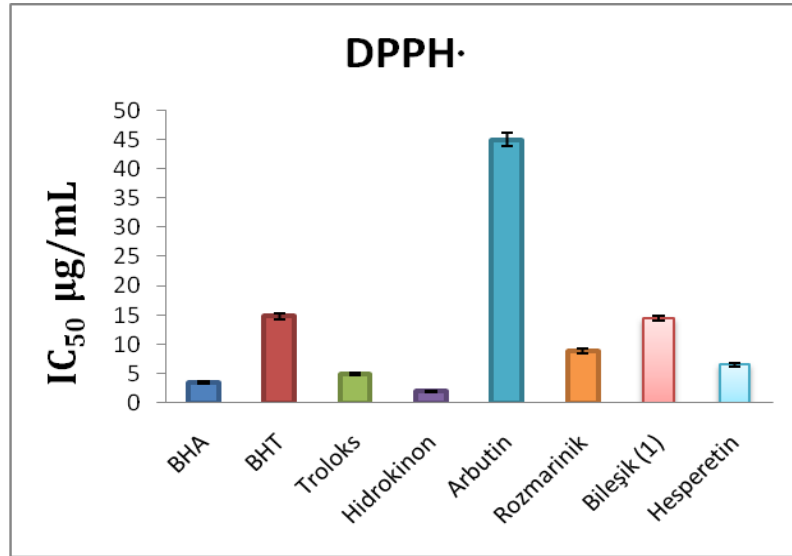
FT-IR $\nu(\text{cm}^{-1})$ 3412, 2941, 2830, 1648, 1049, 1011, 837, 758

4.9. İzole Edilen Bileşiklerin Antioksidan Aktivite Test Sonuçları

4.9.1. *O. majorana* bitkisinden İzole Edilen Bileşiklerin Serbest Radikal Giderme Aktivitesi Sonuçları

Çizelge 4.23. *O. majorana* bitkisinden izole edilen bileşiklerin DPPH testi sonuçları

Gruplar	IC ₅₀ (µg/mL)
BHA	3.4±0.1
BHT	14.7±0.4
Troloks	4.8±0.2
Hidrokinon	1.9±0.08
Arbutin	45.0±1.1
Rozmarinik	8.8±0.3
Bileşik (1)	14.5±0.4
Hesperetin	6.4±0.3



Şekil 4.127. *O. majorana* bitkisinden bileşiklerin serbest radikal giderme aktiviteleri

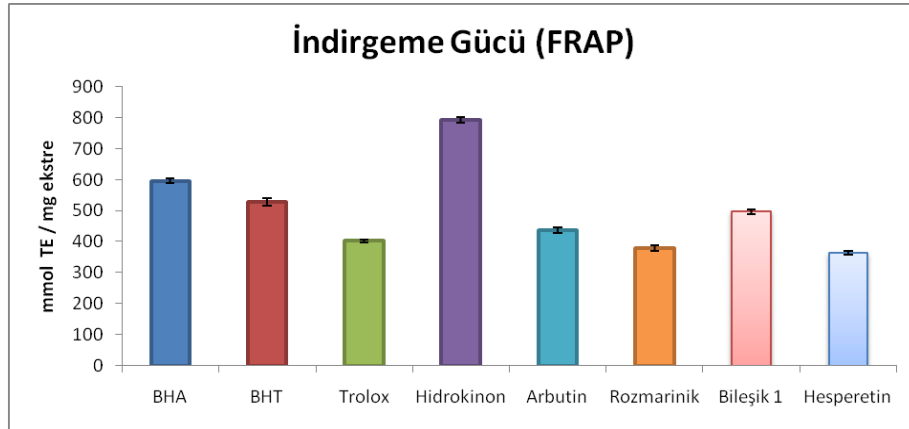
O. majorana bitkisinden izole edilen bileşiklerin serbest radikal giderme aktiviteleri (DPPH·) Çizelge 4.23 ve Şekil 4.128 verilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde serbest radikal giderme aktivitesi en yüksek olan hidrokinon bileşiği iken en düşük aktivite ise arbutin bileşiği olduğu görülmüştür. Saflaştırılan bileşiklerin aktiviteleri pozitif kontrol olarak kullanılan standartlar ile karşılaştırıldığında; en yüksek aktiviteye sahip olan hidrokinon standart bileşiklerden daha yüksek aktivite gösterdiği tespit

edilmiştir (Çizelge 4. 23, Şekil 4. 128). Hidrokinon bileşiğinden sonra yüksek aktiviteden düşük aktiviteye aktivite sıralaması Hesperetin, Rosmarinik asit, Bileşik-1 ve Arbutin şeklindedir. Bileşik-1, BHT ile aynı aktiviteye sahip iken BHA ve Trolox standardından daha düşük aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.128).

4.9.2. *O. majorana* bitkisinden İzole Edilen Bileşiklerin Total İndirgeme Kapasitesi

Çizelge 4.24. *O. majorana* bitkisinden izole edilen bileşiklerin total indirgeme testi sonuçları

Gruplar	İndirgeme Gücü (mmol TE /mg ekstre)
BHA	595.7±7.2
BHT	528.1±11.5
Trolox	402.2±3.6
Hidrokinon	792.1±8.7
Arbutin	436.8±8.6
Rozmarinik asit	378.7±8.6
Bileşik 1	496.8±8.6
Hesperetin	364.3±5.7



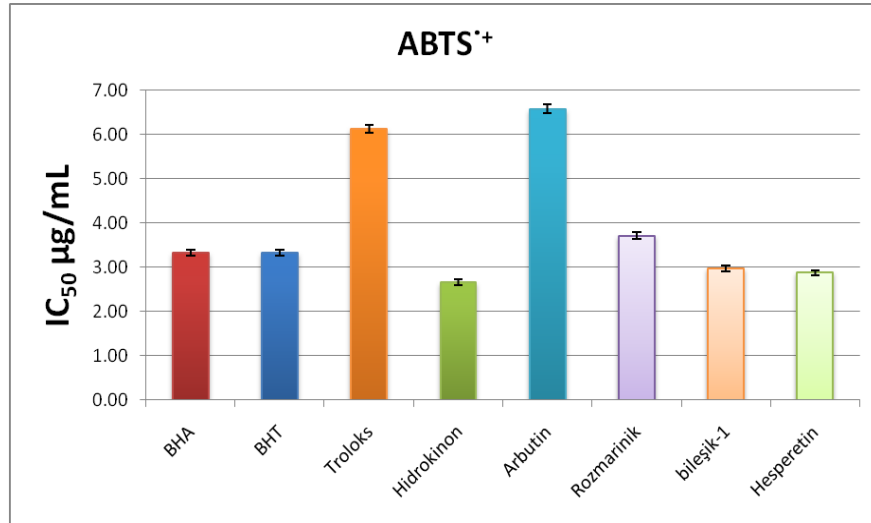
Şekil 4.128. *O. majorana* bitkisinden izole edilen bileşiklerin total indirgeme gücü aktiviteleri

Şekil 4.128 incelendiğinde tüm numunelerin standartlara yakın indirgeme kapasitesine sahip olduğu görülmekle birlikte, **Hidrokinon** bileşiğinin standartlardan daha yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Total indirgeme kapasitesi **Hidrokinon** > BHA > Bileşik-1 > BHT > Arbutin > Trolox > Rozmarinik asit > Hesperetin şeklinde sıralanmaktadır.

4.8.3. *O. majorana* bitkisinden İzole Edilen Bileşiklerin ABTS^{•+} Giderme Aktivitesi Tayini Sonuçları

Çizelge 4.25. *O. majorana* bitkisinden bileşiklerin ABTS^{•+} giderme aktivitesi sonuçları

Gruplar	IC ₅₀ (µg/mL)
BHA	3.32±0.070
BHT	3.33±0.071
Troloks	6.12±0.094
Hidrokinon	2.66±0.065
Arbutin	6.58±0.098
Rozmarinik	3.71±0.082
bileşik-1	2.97±0.064
Hesperetin	2.87±0.060



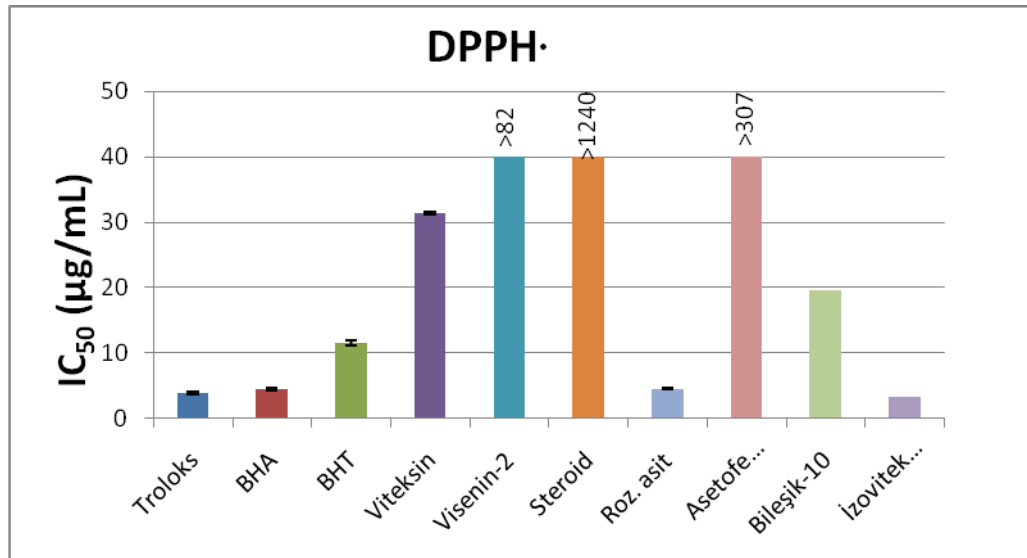
Şekil 4.129. *O. majorana* bitkisinden izole edilen bileşiklerin ABTS^{•+} giderme aktiviteleri

ABTS^{•+} katyon radikal giderme aktivitesi Hidrokinonun 2.66 IC₅₀ (µg/mL) değeri ile en yüksek aktiveye sahip olduğu ve sırasıyla Hesperetin 2.87, Bileşik-1 3.32 Rozmarinik asit 3.33, Arbutin 6.58 olarak azalmaktadır (Şekil 4.130). Elde edilen sonuçlar standartlarla kıyaslandığında hesperetin, Bileşik-1 ve Hidrokinonun standartlardan daha yüksek değerlere sahip olduğu görülmüştür.

4.8.4. *O. syriacum* bitkisinden İzole Edilen Bileşiklerin Serbest Radikal Giderme Aktivitesi Sonuçları

Çizelge 4.26. *O. syriacum* bitkisinden izole edilen bileşiklerin DPPH testi sonuçları

Gruplar	IC ₅₀ (µg/mL)
Troloks	3.854±0.1
BHA	4.4±0.1
BHT	11.5±0.4
Viteksin	31.3±0.1
Visenin-2	83.3±1.7
Steroid	1242.6±76.9
Roz. Asit	4.5±0.08
Asetofenon	307.8±7.2
Ham ekstre	7.5±0.08
Bileşik-10	19.5±0.001
İzoviteksin	3.3±0.001



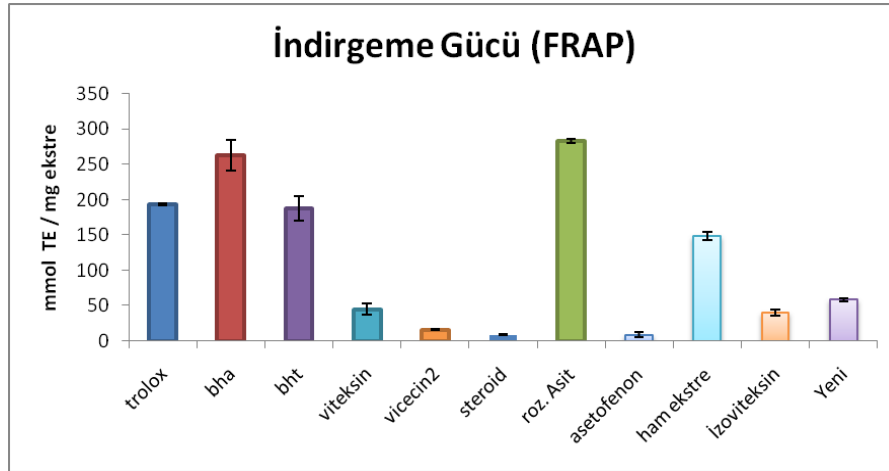
Şekil 4.130. *O. syriacum* bitkisinden bileşiklerin serbest radikal giderme aktiviteleri

O. syriacum bitkisinden izole edilen steroid 1242.6 IC₅₀ (µg/mL) ve asetofenon türevi olan bileşik 307.8 ile visenin-2 bileşiğinin 83.3 DPPH radikallerini giderme aktivitesi göstermediği, diğer bileşiklerin DPPH radikallerini giderme aktivitesi gösterdiği, izoviteksin bileşiğinin serbest radikal giderme aktivitesinin de 3.34 standartlardan daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.130).

4.8.5. *O. syriacum* bitkisinden İzole Edilen Bileşiklerin Total İndirgeme Kapasitesi Tayini Sonuçları

Çizelge 4.27. *O. syriacum* bitkisinden izole edilen bileşiklerin total indirgeme testi sonuçları

Gruplar	İndirgeme Gücü (mmol TE/mg ekstre)
Troloks	192.7±1.5
BHA	262.8±21.9
BHT	187.1±17.5
Viteksin	44.9±8.5
Visenin-2	15.9±1.2
Steroid	8.7±1.1
Roz. asit	283.2±2.7
Asetofenon	8.047±3.3
Ham ekstre	148.5±5.6
İzoviteksin	40.2±4.1
Yeni	58.3±2.5



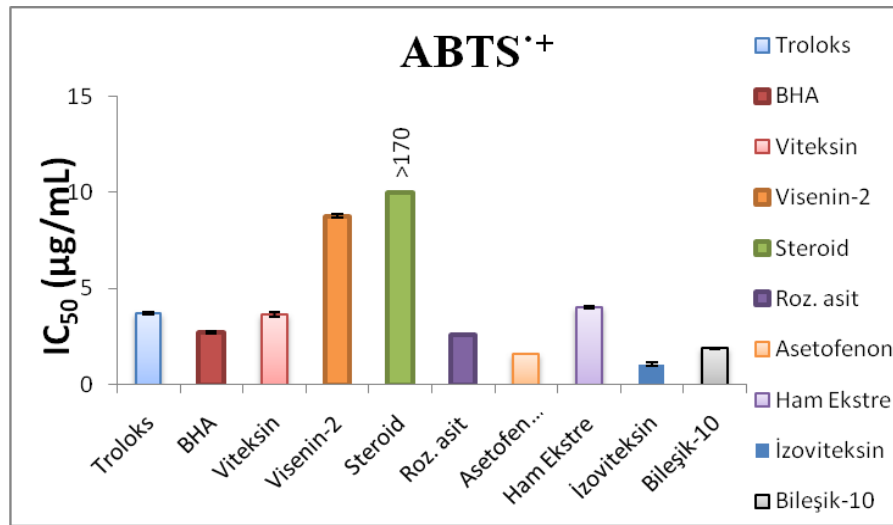
Şekil 4.131. *O. syriacum* bitkisinden izole edilen bileşiklerin total indirgeme gücü aktiviteleri

Şekil 4.131 incelendiğinde Ham ekstre, Rozmarinik asit ve İzoviteksin'in standartlara yakın total indirgeme kapasitesine sahip olduğu görülmekle birlikte, **Rozmarinik asit** bileşiğinin konsantrasyon artışıyla birlikte standartlardan yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Total indirgeme kapasitesi **Rozmarinikasit** > BHA > Trolox > BHT > Ham ekstre > Viteksin > Yeni > İzoviteksin > Visenin-2 > Steroid > Asetofenon sıralamasında azalmaktadır.

4.8.6. *O. syriacum* bitkisinden İzole Edilen Bileşiklerin ABTS^{•+} Giderme Aktivitesi Sonuçları

Çizelge 4.28. *O. syriacum* bitkisinden izole edilen bileşiklerin ABTS^{•+} giderme aktivitesi sonuçları

Gruplar	IC ₅₀ (µg/mL)
Trolox	3.7±0.04
BHA	2.7±0.07
Viteksin	3.6±0.13
Visenin-2	8.7±0.1
Steroid	174.5±13.2
Roz. asit	2.5±0.01
Asetofenon	1.6±0.006
Ham Ekstre	4.03±0.06
İzoviteksin	1.1±0.1
Bileşik-10	1.8±0.03



Şekil 4.132. *O. syriacum* bitkisinden izole edilen bileşiklerin ABTS^{•+} giderme aktiviteleri

Şekil 4.132 İncelendiğinde izoviteksin 1.0 IC₅₀ (µg/mL) bileşiğinin ABTS^{•+} radikal giderme aktivitesinin de standartlardan daha yüksek olduğu ve diğer bileşiklerin sırasıyla asetofenon türevi olan bileşik 1.6, bileşik-10 1.8, bileşik-10 1.8, rozmarinik asit 2.5, viteksin 3.0, visenin-2 8.7, steroid 174.5 olarak hesaplanmıştır.

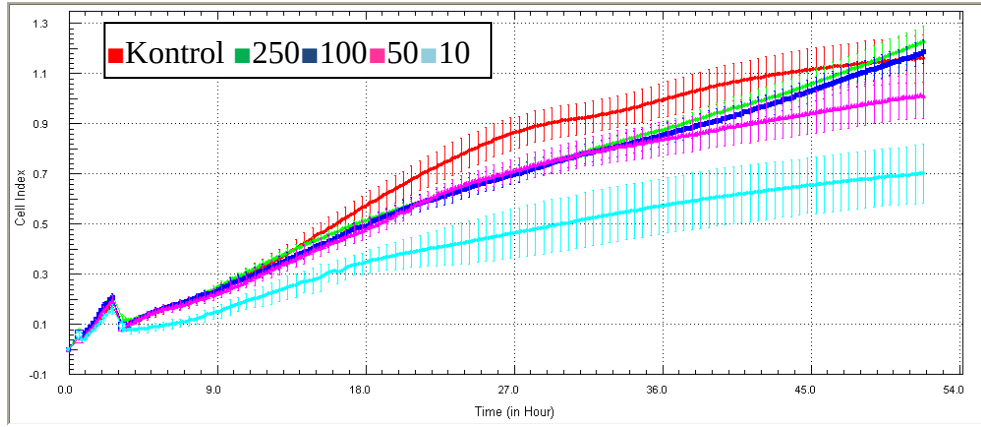
4.9. Antiproliferatif Aktivite Test Sonuçları

Antikanser/antiproliferatif aktivite testleri insan rahim kanseri (HeLa) hücre hattına karşı xCelligence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümler E-Plate 96 kuyucuklarının tabanlarına yerleşen hücrelerden kaynaklanan impedans farklılığına dayanmaktadır. Zaman karşı hücre sayısı ile orantılı olarak değişen CI (Cell Index) değerine ait grafik elde edilmektedir.

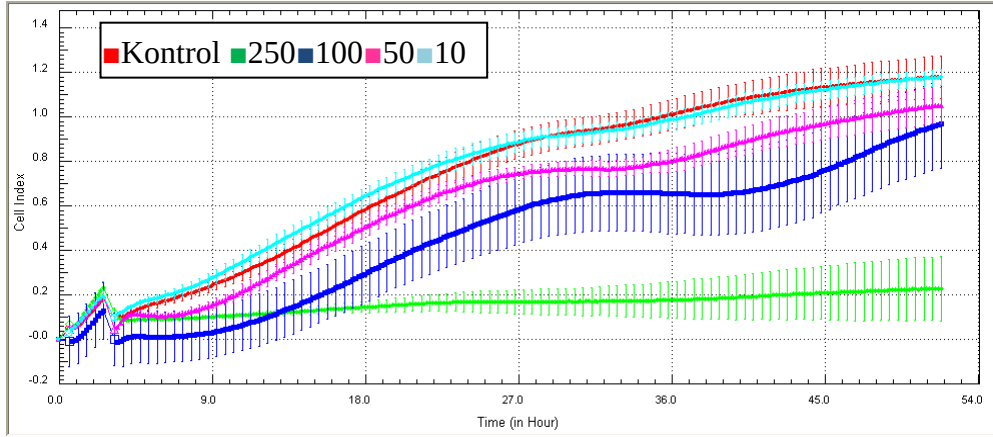
Besi yeri olarak % 10 fetal bovin serum ve % 2 streptomisin-penisilin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) kullanılmış ve analizler inkübatör içinde (% 5 CO₂, % 100 nem) 37 °C'de yapılmıştır. İlk olarak kuyucuklara 50 µL besi yeri konulan E-Plate 96 15 dk. steril kabinde ve 15 dk. inkübatörde bekletilmiş ve sonrasında inkübatör içindeki istasyona yerleştirilmiş ve arka plan (background) okuması yapılmıştır. Sonrasında kuyucuklara her bir kuyucukta 2,5x10⁴ adet HeLa hücresi olacak şekilde 100 µL hücre süspansiyonu koyulmuştur. Bundan sonra plaka yarım saat steril kabinde ve oda koşullarında bekletilerek hücrelerin kuyucuk tabanına yerleşmesi beklenmiştir. Bu plaka istasyona yerleştirilerek 80 dk. boyunca 10 dakika aralıklarla ölçüm yapılmıştır. Bu sürede hücreler kuyucuk tabanına yerleşerek normal büyüme periyoduna girmiştir. Bundan sonra istasyondan çıkarılan plakanın kuyucuklarına steril DMSO ve besi yeri kullanılarak hazırlanan ekstre çözeltilerinden kuyucuklardaki son derişimler saf maddeler için 100, 50 ve 10; ekstreler için 250, 100, 50 µg/mL olacak şekilde çözeltiler eklenmiş ve sonrasında besi yeri ile kuyucuklardaki son hacim 200 µL'ye tamamlanmıştır. Eklemelerden sonra plaka derhal istasyona yerleştirilmiş ve 48 saat boyunca 10 dakika aralıklarla analiz gerçekleştirilmiştir. Testler üçer tekrarlı yapılmış ve grafikler standart sapma çubukları ile verilmiştir.

4.9.1. Ekstrelerin HeLa Hücrelerine Karşı Antiproliferatif Aktivite Sonuçları

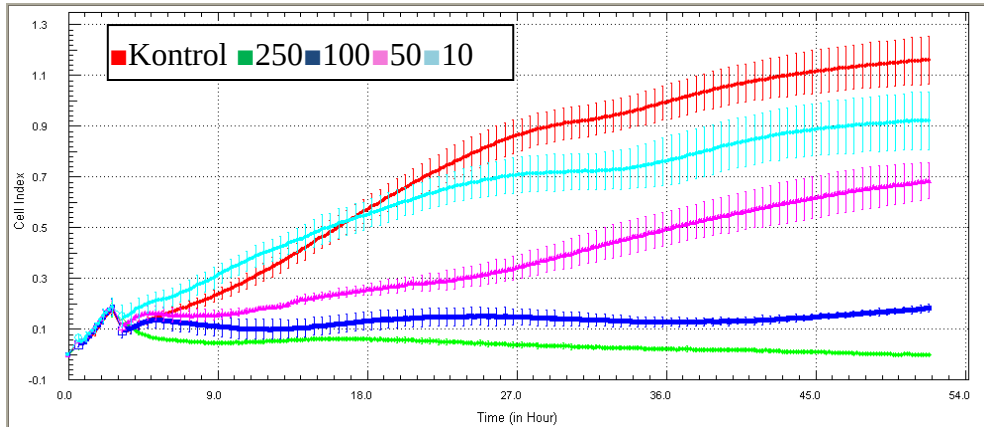
HeLa hücrelerine bitki ekstresi uygulamanın ardından ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık real time hücre analiz sonucuna göre 250 ppm ve 100 ppm'lik konsantrasyonda O.majorana etilasetat eksresi en yüksek antiproliferatif aktivite gösterirken antikanser ajanı olan 5-FU ise bütün bitki ekstrelerinden daha düşük bir aktivite gösterdi (Şekil 4.133).



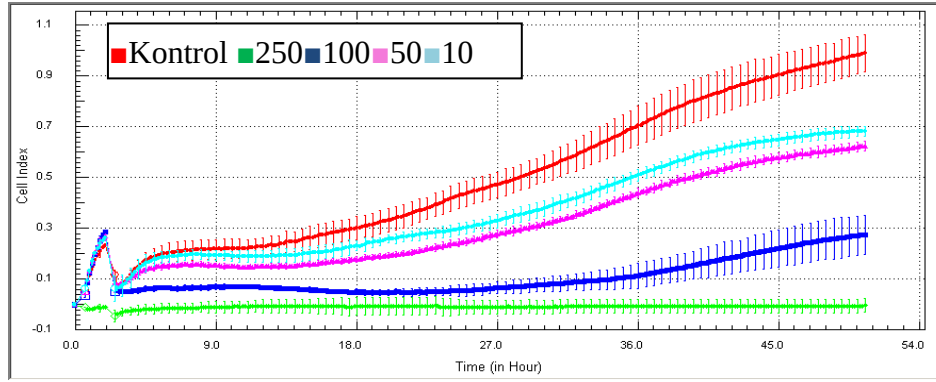
Şekil 4.133. HeLa hücrelerine antikanser ajanı olan 5-FU ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık realtime hücre analiz grafiği



Şekil 4.134. HeLa hücrelerine *O. majorana* bitkisi hekzan ekstresi ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık realtime hücre analiz grafiği



Şekil 4.135. HeLa hücrelerine *O. majorana* bitkisi etilasetat ekstresi ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık realtime hücre analiz grafiği

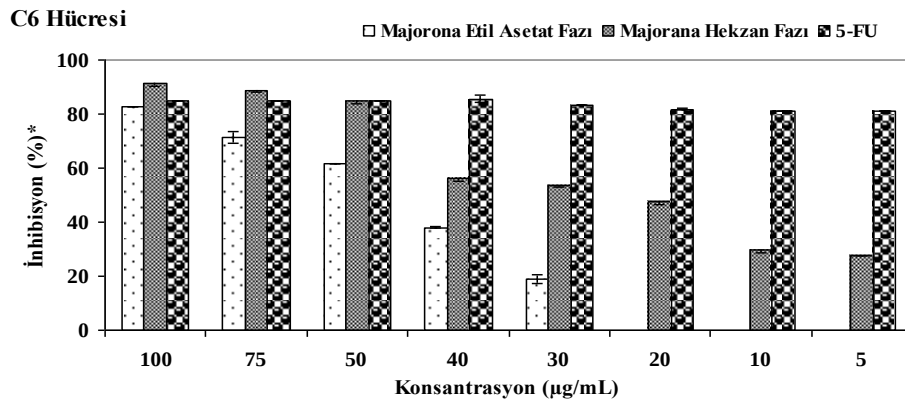


Şekil 4.136. HeLa hücrelerine *O. syriacum* bitkisi metanol ekstresi ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık realtime hücre analiz grafiği

4.9. 2. Ekstrelerin C6 Hücrelerine Karşı Antiproliferatif Aktivite Sonuçları

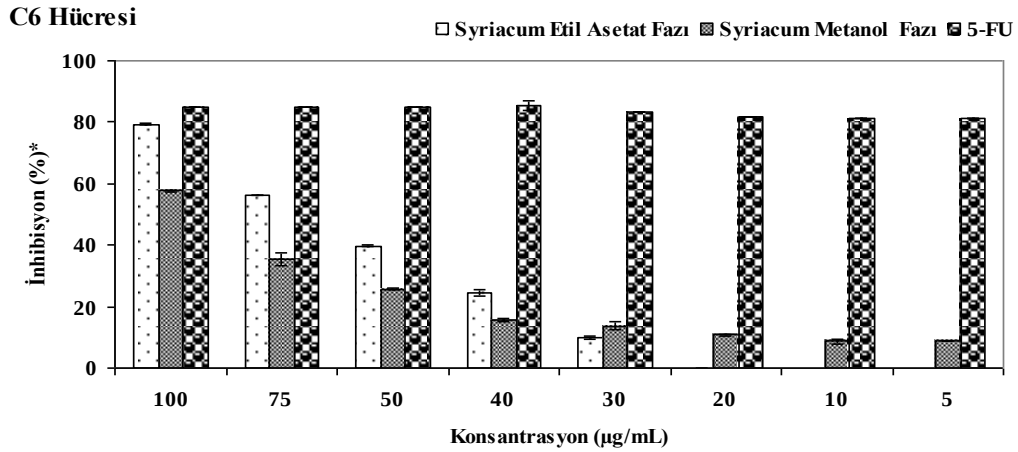
O. majorona hekzan ve etil asetat fazının C6 hücresine karşı antiproliferatif aktiviteleri belirlendi (Şekil 4.137). Tüm bu ekstrelerin antiproliferatif aktiviteleri standart olarak kullanılan 5-Floro urasil (5-FU) ile mukayese edildi. Ekstrelerin tüm konsantrasyonlarında doza bağlı olarak aktivitelerinde artış gözlemlendi. Yüksek dozlarda (100 ve 75 µg/mL) *O. majorona* hekzan fazının, hem 5-FU hem de *O. majorona* etil asetat fazından daha güçlü antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi.

100 µg/mL konsantrasyon da C6 hücresine karşı inhibisyon potansiyeli *O. majorona* hekzan fazı > 5-FU > *O. majorona* etil asetat fazı



Şekil 4.137. *O. majorona* ekstrlerinin C6 hücresine karşı antiproliferatif aktivitesi (*Tüm testler üç tekrarlolu ve üç kez tekrarlandı, p<0.01.)

O.syriacum etil asetat ve metanol fazlarının C6 hücresine karşı antiproliferatif aktiviteleri belirlendi (Şekil 4.138). Tüm bu fazların antiproliferatif aktiviteleri standart olarak kullanılan 5-fluorourasil (5-FU) ile mukayese edildi *O.syriacum* etil asetat ve metanol fazlarının tüm konsantrasyonlarında doza bağlı olarak aktivitelerinde artış gözlemlendi. Yüksek dozda (100 µg/mL) *O.syriacum* etil asetat fazı, metanol fazından daha yüksek antiproliferatif aktiviteye sahip olmakla beraber, 5-FU ile kıyaslandığında dikkate değer bir aktivite tespit edildi. 100 µg/mL konsantrasyonda C6 hücresine karşı inhibisyon potansiyeli; 5-FU > *Syriacum* etil asetat fazı > *Syriacum* metanol fazı



Şekil 4.138. *O.syriacum* ekstralarının C6 hücresine karşı antiproliferatif aktivitesi (*Tüm testler üç tekrarlolu ve üç kez tekrarlandı, p<0.01.)

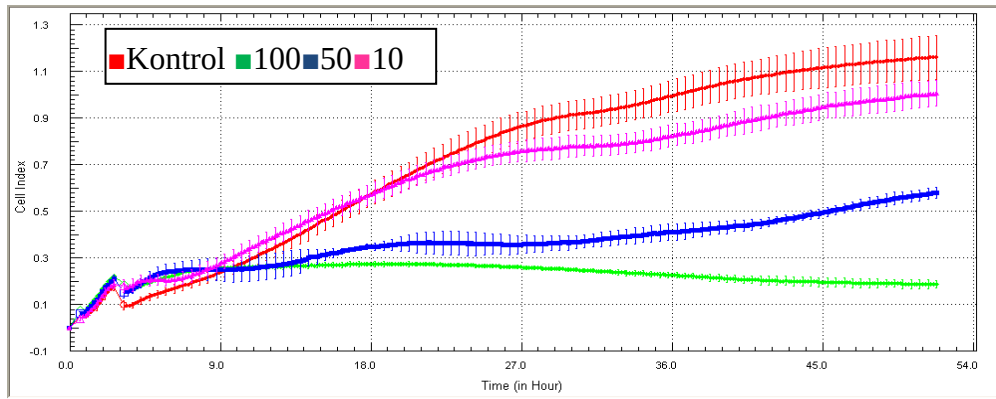
4.9.3. *O. majorana* Bitkisinden İzole Edilen Saf Bileşiklerin HeLa Hücrelerine Karşı Antiproliferatif Aktivite Sonuçları

O.majorana'dan ilk defa izole edilen 5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon (**1**) ile Hesperetin (**2**), Hidrokinon (**3**), Arbutin (**4**), rozmarinik asit (**5**), bileşiklerinin HeLa ve C6 kanser hücrelerine karşı antiproliferatif aktivitesi üç farklı dozda gerçek-zamanlı (Real-Time) olarak test edildi. İzole edilen bileşiklerin HeLa kanser hücrelerine karşı 100 mM'lık konsantrasyondaki antiproliferatif aktivite sonuçları 5-FU ile mukayese edildiğinde, bu aktiflik sırasının Hidrokinon > 5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon > Hesperetin > Rozmarinik asit > Arbutin > 5-FU şeklinde olduğu ve Hidrokinon'un antiproliferatif aktivitesinin yüksek olduğu ortaya çıktı.

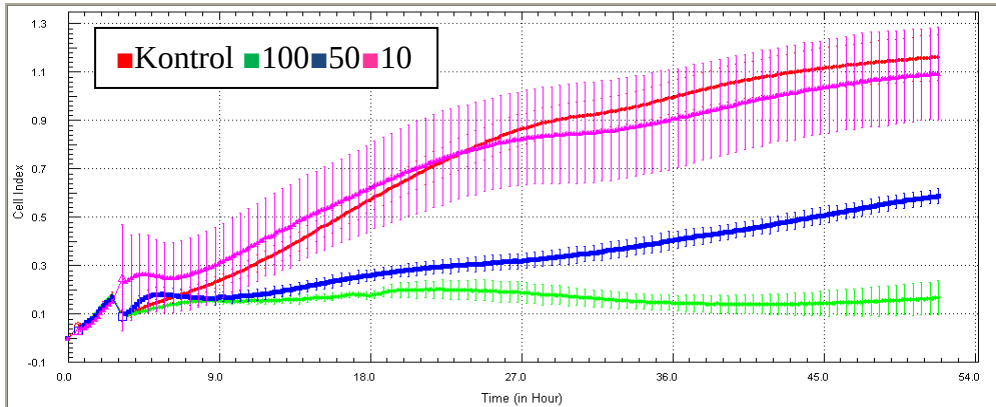
50 mM’lık konsantrasyondaki antiproliferatif aktivite sonuçları 5-FU ile mukayese edildiğinde, bu aktiflik sırasının Hidrokinon > 5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon > Hesperetin > Arbutin > Rozmarinik asit > 5-FU şeklinde olduğu sonucuna varıldı.

100 mM’lık konsantrasyondaki sıralamaya benzer 5-FU ile mukayese edildiğinde 5-FU kıyasen Hidrokinon’un antiproliferatif aktivitesinin yüksek olduğu ortaya çıktı.

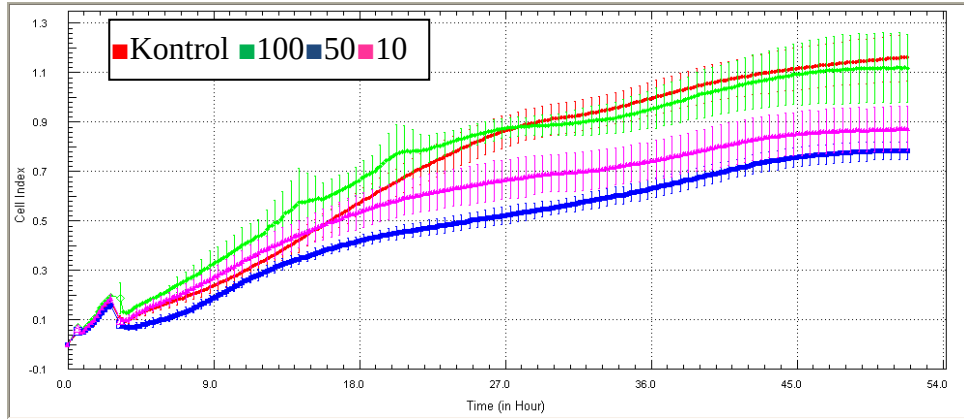
10 mM’lık konsantarsyonda ise antiproliferatif aktivite sıralması aynı fakat bu düşük dozda proliferativitenin azaldığı Hidrokinon’un yine aktivite gösterdiği görüldü.



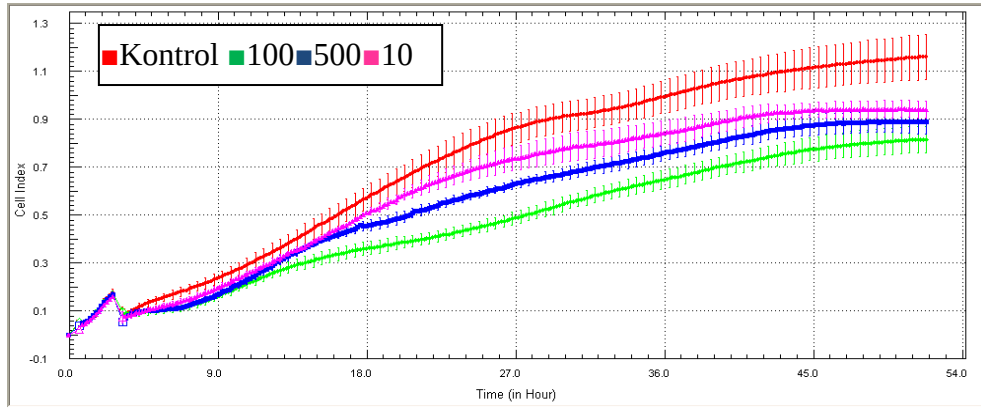
Şekil 4.139. HeLa hücrelerine *O.majorana* bitkisinden izole edilen 5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon bileşiği ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık realtime hücre analiz grafiği



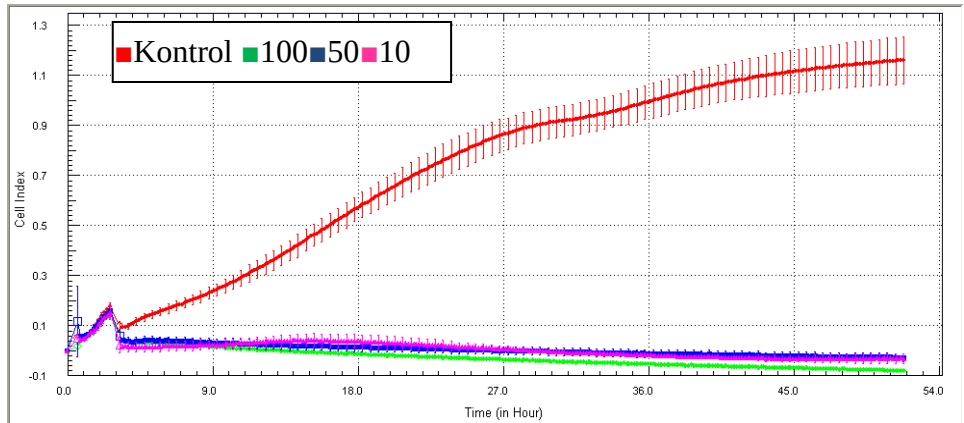
Şekil 4.140. HeLa hücrelerine *O.majorana* bitkisinden izole edilen Hesperetin bileşiği ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık realtime hücre analiz grafiği



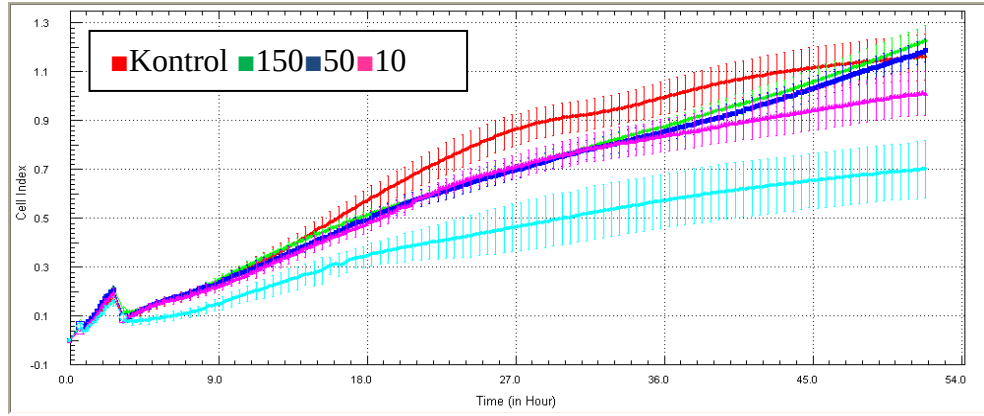
Şekil 4.141. HeLa hücrelerine *O.majorana* bitkisinden izole edilen Arbutin bileşiği ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık realtime hücre analiz grafiği



Şekil 4.142. HeLa hücrelerine *O.majorana* bitkisinden izole edilen Rozmarinik asit bileşiği ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık realtime hücre analiz grafiği



Şekil 4.143. HeLa hücrelerine *O.majorana* bitkisinden izole edilen Hidrokinon bileşiği ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık realtime hücre analiz grafiği



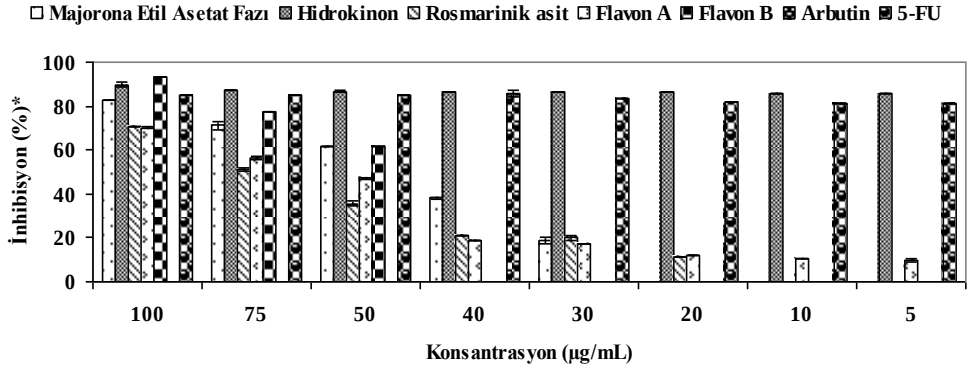
Şekil 4.144. HeLa hücrelerine 5-Fu bileşiği ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık realtime hücre analiz grafiği

4.9.4. *O. majorana* Bitkisinden İzole Edilen Saf Bileşiklerin C6 Hücrelerine Karşı Antiproliferatif Aktivite Sonuçları

O.majorana etil asetat fazı ve bu fazdan izole edilen saf bileşenlerin C6 hücrelerine karşı antiproliferatif aktiviteleri belirlendi (4.145). Etil asetat eksteresi ve bu fazdan izole edilen bileşiklerin antiproliferatif aktiviteleri standart olarak kullanılan 5-floro urasil (5-FU) ile mukayese edildi. *O.majorana* etil asetat fazı ve bu fazdan elde edilen saf bileşenler tüm konsantrasyonlarında doza bağlı olarak aktivitelerinde artış gözlemlendi. Yüksek dozlarda (100 ve 75 µg/mL) Hesperetin ve Hidrokinon'un hem 5-FU hem de *O.majorana* etil asetat fazından izole edilen diğer bileşiklerden daha güçlü antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi. Arbutin molekülünün ise tüm dozlarda C6 hücrelerine karşı antiproliferatif aktivitesinin olmadığı tespit edildi.

100 µg/mL konsantrasyonda C6 hücrelerine karşı inhibisyon potansiyeli; Hesperetin > Hidrokinon > 5-FU > *O.majorana* etil asetat fazı > Rozmarinik asit > 5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon>Arbutin.

C6 hücresi



Şekil 4.145. *O.majorona* etil asetat fazı ve saf bileşenlerin C6 hücresine karşı antiproliferatif aktivitesi (*Tüm testler üç tekerrürlü ve üç kez tekrarlandı, $p < 0.01$.)

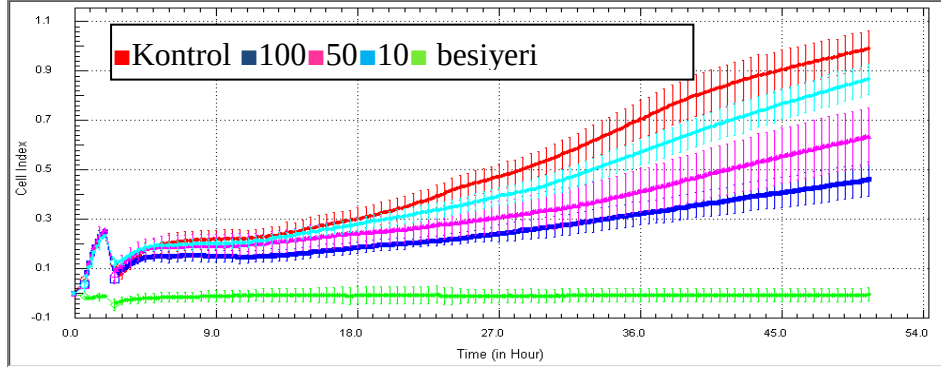
4.9.3. *O. syriacum* Bitkisinden İzole Edilen Saf Bileşiklerin HeLa Hücrelerine Karşı Antiproliferatif Aktivite Sonuçları

O.syriacum'dan izole edilen Daukosterin (6), 4,6-Dihidroksi asetofenon 2-O-D-glikozit (7), Viteksin (8), Vicensin-2 (9), Asasetin-7-O-[3-O-asetil- α -l-ksilopiranozil-(1-2)- β -glikopiranozit] (10), İzoviteksin (11), Rosmarinik asit (12) bileşiklerinin HeLa kanser hücrelerine karşı antiproliferatif aktivitesi üç farklı dozda gerçek-zamanlı (Real-Time) olarak test edildi.

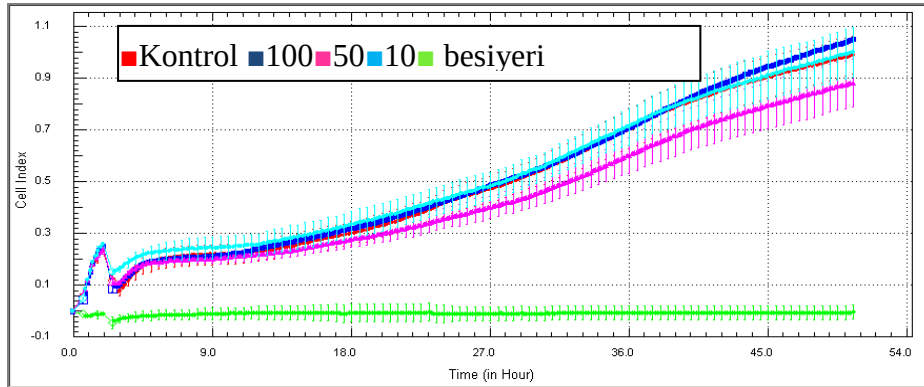
İzole edilen bileşiklerin HeLa kanser hücrelerine karşı 100 mM'lık konsantrasyondaki antiproliferatif aktivite sonuçları 5-FU ile mukayese edildiğinde, bu aktiflik sırasının 5-FU > Daukosterin > Rosmarinik asit > Viteksin > İzoviteksin > Vicensin-2 > 4,6-Dihidroksi-asetofenon-2-O-D-glikozit > Asasetin-7-O-[3-O-asetil- α -l-ksilopiranozil-(1-2)- β -glikopiranozit] şeklinde olduğu ve Daukosterin'in antiproliferatif aktivitesinin yüksek olduğu ortaya çıktı.

50 mM'lık konsantrasyondaki antiproliferatif aktivite sonuçları 5-FU ile mukayese edildiğinde, bu aktiflik sırasının Daukosterin > Rosmarinik asit > Viteksin > İzoviteksin > Vicensin-2 > 4,6-Dihidroksi-asetofenon-2-O-D-glikozit > Asasetin-7-O-[3-O-asetil- α -l-ksilopiranozil-(1-2)- β -glikopiranozit] > 5-FU şeklinde olduğu sonucuna varıldı. 50 mM'lık konsantrasyondaki sıralamada 5-FU ile mukayese edildiğinde 5-FU < Daukosterin'in antiproliferatif aktivitesinin yüksek olduğu ortaya çıktı.

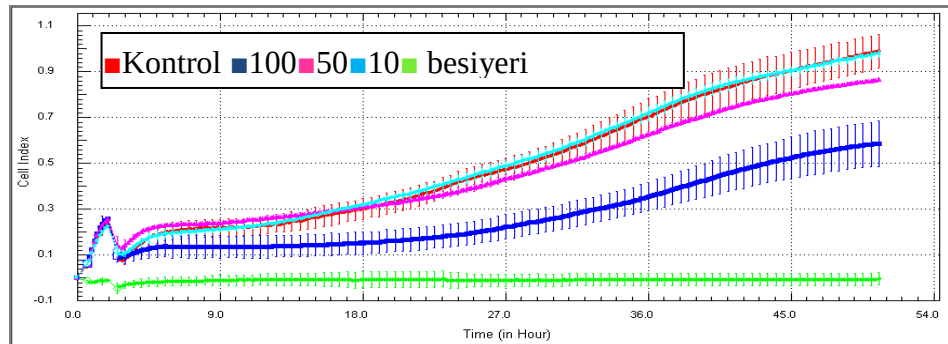
10 mM’lık konsantarsyonda ise antiproliferatif aktivite sıralması aynı fakat bu düşük dozda proliferativitenin azaldığı daukosterin’in yine aktivite gösterdiği görüldü.



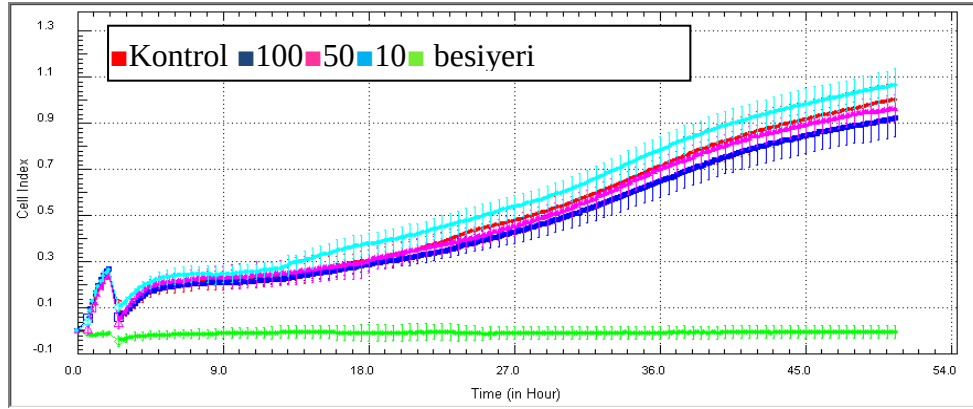
Şekil 4.146. HeLa hücrelerine *O.syriacum* bitkisinden izole edilen Daukosterin bileşiği ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık realtime hücre analiz grafiği



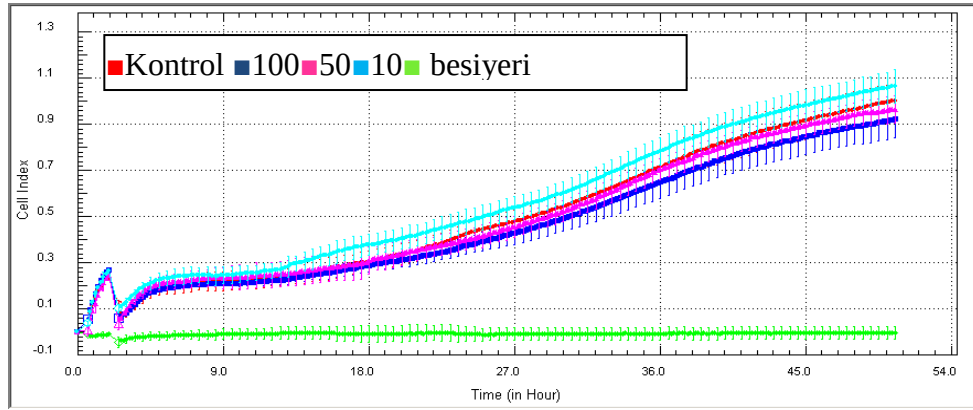
Şekil 4.147. HeLa hücrelerine *O. syriacum* bitkisinden izole edilen 4,6-dihidroksi asetofenon 2-O-D-glikozit bileşiği ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık realtime hücre analiz grafiği



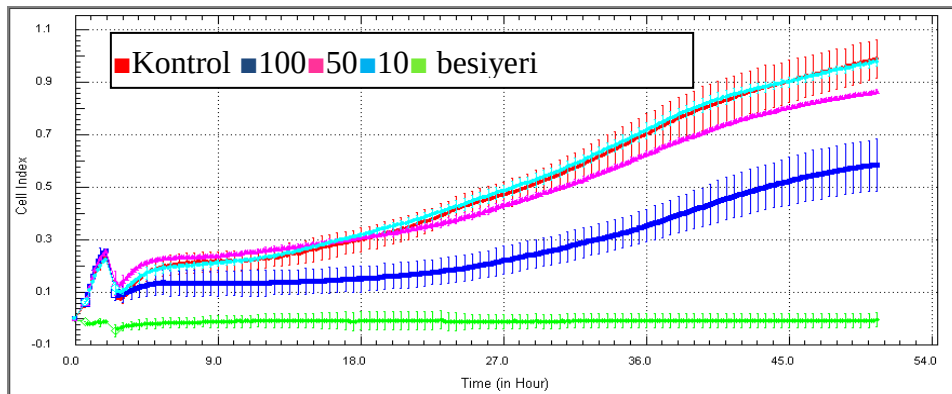
Şekil 4.148. HeLa hücrelerine *O. syriacum* bitkisinden izole edilen Viteksin bileşiği ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık realtime hücre analiz grafiği



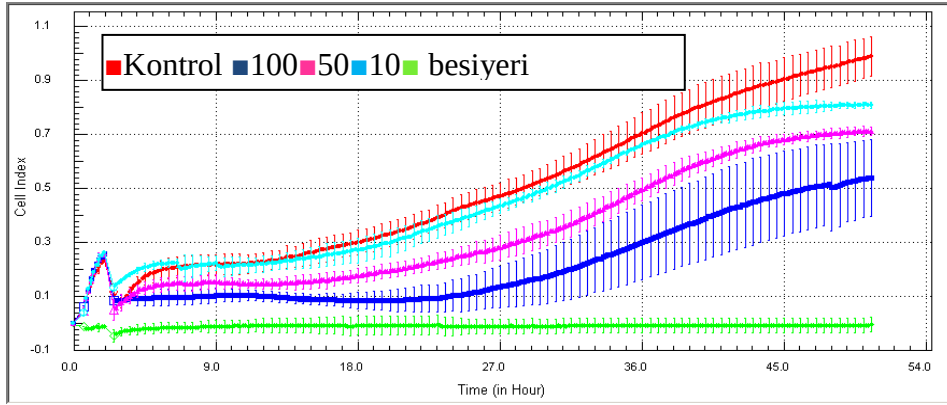
Şekil 4.149. HeLa hücrelerine *O. syriacum* bitkisinden izole edilen Vicenin-2 bileşiği ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık realtime hücre analiz grafiği



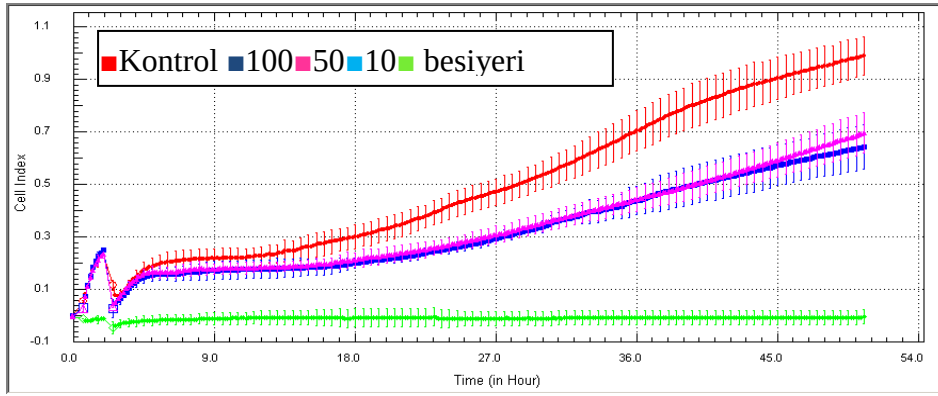
Şekil 4.150. HeLa hücrelerine *O.syriacum* bitkisinden izole edilen Asasetin-7-O-[3-O-asetil-α-l-ksilopiranozil-(1-2)-β-glikopiranozit] bileşiği ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık realtime hücre analiz grafiği



Şekil 4.151. HeLa hücrelerine *O.syriacum* bitkisinden izole edilen izoviteksin bileşiği ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık realtime hücre analiz grafiği



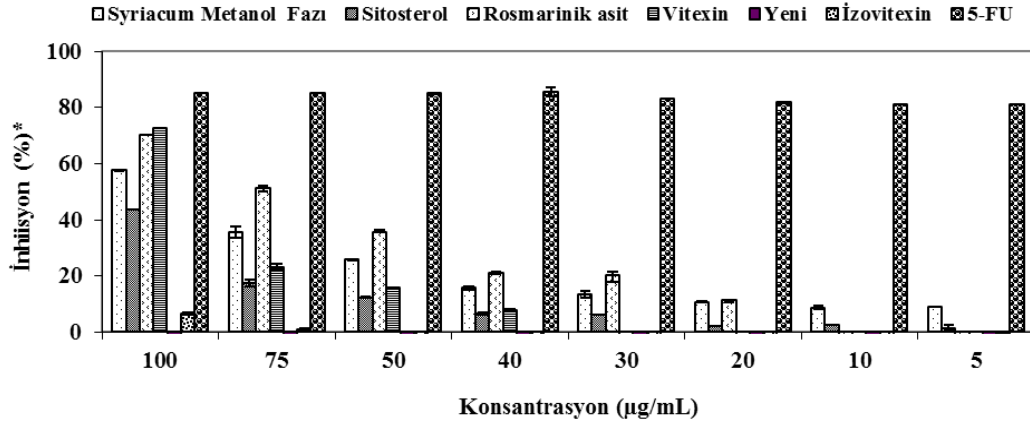
Şekil 4.152. HeLa hücrelerine *O.syriacum* bitkisinden izole edilen Rozmarinik asit bileşiği ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık realtime hücre analiz grafiği



Şekil 4.153. HeLa hücrelerine 5-Fu bileşiği ilk 48 saat proliferasyon ve canlılık realtime hücre analiz grafiği

4.9.3. *O. syriacum* Bitkisinden İzole Edilen Saf Bileşiklerin C6 Hücrelerine Karşı Antiproliferatif Aktivite Sonuçları

C6 Hücresi



Şekil 4.154. *O. syriacum* etil asetat ekstresi ve saf bileşenlerin C6 hücresine karşı antiproliferatif aktivitesi (*Tüm testler üç tekrerrülü ve üç kez tekrarlandı, p<0.01.)

O. syriacum metanol fazı ve bu fazdan izole edilen saf bileşenlerin C6 hücresine karşı antiproliferatif aktiviteleri belirlendi (Şekil 4.154). Tüm bu bileşenlerin antiproliferatif aktiviteleri standart olarak kullanılan 5-floro urasil (5-FU) ile mukayese edildi. *O. syriacum* etil asetat fazı ve bu fazdan elde edilen saf bileşenler tüm konsantrasyonlarında doza bağlı olarak aktivitelerinde artış gözlemlendi. Yüksek dozda (100 µg/mL) *O. syriacum* etil asetat fazı, rosmarinik asit ve vitexin, 5-FU ile kıyaslandığında dikkate değer antiproliferatif aktiviteye sahip oldukları gözlemlendi. Yeni (Asasetin-7-O-[3-O-asetil- α -l-ksilopiranozil-(1-2)- β -glikopiranozit]) molekülünün ise tüm dozlarda C6 hücresine karşı antiproliferatif aktivitesinin olmadığı tespit edildi. İzovitexin molekülünün ise yüksek dozlarda bile oldukça düşük aktiviteye sahip olduğu belirlendi.

100 µg/mL konsantrasyonda C6 hücresine karşı inhibisyon potansiyeli; 5-FU > Vitexin > Rosmarinik asit > *O. syriacum* metanol fazı > Sitosterol > İzovitexin > Yeni.

5. SONUÇ

Proje kapsamında Lamiceae familyasına ait *Origanum majorana* ve *Origanum syriacum* türleri üzerinde fitokimyasal ve biyolojik aktivite çalışmaları yapıldı. *Origanum majorana* bitkisinin toprak üstü kısmı metanol:kloroform (3:1) ekstresinin hekzan ve etilasetat ile ekstraksiyonu sonucunda hekzan ve etil asetat ekstraktları elde edildi. *Origanum syriacum* bitkisinden sırasıyla hekzan, etilasetat, metanol, su ekstraktları ve su ekstresine etilasetat ile yapılan ekstraksiyonu sonucu sudan etil ekstraktı elde edildi. Hazırlanan ekstraktlara DPPH serbest radikal giderme aktivitesi, indirgeme gücü, total fenolik bileşik tayini ve ABTS^{•+} radikal katyon giderme aktiviteleri ile C6 ve HeLa hücrelerine karşı antiproliferatif aktivitesi bakımından incelendi.

Tez çalışmasına başlamadan önce kapsamlı literatür çalışması yapılmış olup, çalışılan bitki türleri ile ilgili biyoaktif bileşik izolasyonu ve saflaştırılan biyoaktif bileşiklerin antioksidan ve antiproliferatif aktivite çalışmasına dair bir bulguya rastlanmadı.

Yapılan çalışma sonucunda bitki ekstraktlarının ve izole edilen biyoaktif moleküllerin biyolojik aktivite gösterdikleri ilk defa bu tez çalışması ile literatüre kazandırıldı. Tez çalışmasında üzerinde çalışma yapılmamış olan bitki türleri ile biyolojik aktivite yönlendirmeli araştırmalar (Bioassay Guided Research) ile çalışmalara devam edildi.

Origanum majorana su ekstresinden etil asetat ile ekstraksiyon kısmı için yapılan kolon kromatografisinden 5 bileşik (**1, 2, 3, 4 ve 5**); *Origanum syriacum* metanol ekstresi için yapılan kolon kromatografisinden 1'i, yeni (**10**) 7 bileşik (**6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12**) olmak üzere toplam 12 bileşik izole edildi. Bileşiklerin yapıları Çizelge 5.1'de verilmiştir.

Çizelge 5.1. *Origanum.majorana* ve *Origanum syriacum* bitkilerinden izole edilen bileşikler

Bileşik	Yapısı
(1)	
(2)	
(3)	
(4)	
(5)	

Bileşik	Yapısı
(6)	
(7)	
(8)	

(9)	
(10)	
(11)	
(12)	

Saflaştırılan Bileşiklerin Biyolojik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi :

5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon (1): (Nam ve ark., 2004). *Crinum latifolium* bitkisinden aralarında 5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon bileşiğinde bulunduğu 2 bileşiği ilk defa tanımlamışlar ve B16F10 (sıçan melanom) ve HCT116 (insan kolon) kanser hücrelerine karşı 5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon bileşiğinin ılımlı bir önleyici etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır.

5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon bileşiği bu tez çalışmasında *Origanum majorana* bitkisinden saflaştırılmış olup antioksidan aktiviteleri C6 (Sıçan Beyin Tümör Hücresi), HeLa (İnsan Rahim Kanseri Hücresi) hücrelerine karşı farklı dozlarda antikanser aktiviteleri araştırıldı ve yüksek antioksidan ve antiproliferatif aktivite antiproliferatif etki gösterdi. 5,6,3'-trihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon bileşiğinin ile litatürde (Sıçan Beyin Tümör Hücresi), HeLa (İnsan Rahim Kanseri Hücresi) hücrelerine karşı farklı dozlarda antikanser aktiviteleri bulunmamakta olup ilk defa bu tez çalışmasında yapılmıştır.

Hesperetin (2): Retinopati kaynaklı nörovasküler komplikasyonlar içeren diabetiğin önlenmesinde hesperetin faydalı olduğu bildirilmiştir (Kumar ve ark., 2013). Hesperetin glikoz alımını azalttığını belirlenmiş ve MDA-MB-231 göğüs kanserine karşı aktivite bakımından yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Yang ve ark., 2013). *Vepris glomerata* bitkisinden hesperetin de içinde bulunduğu 10 bileşik izole edilmiş ve antibakteriyel aktivite bakımından incelenmiş hesperetin aktivitesi standart olarak kullanılan kloramfenikol'e en yakın olduğu tespit edilmiştir (Kiplimo ve Koobanally, 2012).

Yapılan bir çalışmada hesperetin verilen farelerde, hesperetin farelerin embriyonik kök hücrelerindeki damar yapı formatını inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu etki bunun prooksidan etkisinden kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla hesperetin antikanser bir ajandır (Choi, 2007). Yapılan çalışmalar hesperetin, kolon (Nalini ve ark., 2012), meme (Choi ve ark., 2008), gastrointestinal (Zarebczan ve ark., 2011) gibi kanser türlerine karşı koruduğu gözlemlenmiştir.

Hesperetin bileşiği bu tez çalışmasında *Origanum majorana* bitkisinden saflaştırılmış olup antioksidan aktiviteleri ve C6 (Sıçan Beyin Tümör Hcreti), HeLa (İnsan Rahim Kanseri Hcreti) hücrelerine karşı farklı dozlarda antikanser aktiviteleri araştırıldı ve yüksek antioksidan ve antiproliferatif aktivite antiproliferatif etki gösterdi.

Hidrokinon (3): *Piper crassinervium* Kunth bitkisinden 4-hidroksi-benzoik asit ile hidrokinonun azot ve oksijen içeren türevi 3 yeni molekülün serbest radikal giderme aktivitesinin standartlardan daha yüksek olduğu *aktivitesi $EC_{50} = 1,20 \mu M$ olarak rapor edilmiştir (Yamaguchi ve ark., 2006).

Bu tez kapsamında *Origanum majorana* bitkisinden izole ettiğimiz hidrokinon bileşiği çok yüksek antioksidan ve antiproliferatif etki gösterdi.

İzole edilen moleküllere antioksidan aktivite testleri uygulandı. Hidrokinon (3) bileşiğinin en yüksek antioksidan ve antikanser aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bitkideki doğal antioksidanların çoğunlukla fenolik bileşikler fenolik asitler ve flavonoidler (Konczak ve ark., 2004; Kosar ve ark., 2004; Canadanovic-Brunet ve ark., 2005; Oboh ve ark., 2008) olması dolayısıyla izole edilen moleküllerin antioksidan aktivite göstermesi beklenen bir sonuçtur.

Arbutin (4): *Thymus serpyllum* (ExTs), *Thymus vulgaris* (ExTv), *Majorana hortensis* (ExMh), *Mentha piperita* (ExMp) bitkilerinin kurutulduktan sonra yapılan su ekstreleri ve fenolik bileşiklerden kafeik asit (CA), rozmarinik asit (RA), litospermik asit (LA), luteolin-7-O-glikruronit (Lgr), luteolin-7-O-rutinosit (Lr), eriodiktiol-7-O-rutinosit (Er), ve arbutin (Ab) bileşiklerinin hepsi göğüs kanser hücrelerine karşı aktiviteleri incelenmiş olup en fazla aktivitenin *Majorana hortensis* (ExMh) bitkisinde olup bu aktiviteden en az sorumlu bileşiğin arbutin olduğu tespit edilmiştir (Berdowska ve ark., 2013).

Bu tez kapsamında *Origanum majorana* bitkisinden izole ettiğimiz hidrokinon bileşiği çok yüksek antioksidan ve antiproliferatif etki gösterdi.

Rozmarinik asit (5), (12): Gohari ve ark. (2009) *Hymenocrater calycinus*' un çiçekli kısımlarından elde edilen etil asetat ve metanol özütlerinden, kromatografik yöntemlerle dört bileşik izole ederek ve ana bileşik olan rozmarinik asitin etkisi, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* ve *Aspergillus niger*'a uygulamışlar. İzole edilen bileşenler; β -sitosterol (1), ursolik asit (2), rozmarinik asit (3) ve kuersetin-3-O-rutinozit (4) şeklinde belirlenerek bakteri ve mantarlarla yapılan çalışmada rozmarinik asitin *Candida albicans* (MIC, 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$)'a karşı antifungal bir etkisi olduğunu ortaya koymuşlardır. Rozmarinik asit, antioksidan, anti-inflamatuar ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olup, antioksidan aktivitesi vitamin E'den ve sentetik bir antioksidan olan bütillenmiş hidroksi tolüenden (BHT) yüksek olduğu rozmarinik asidin DPPH aktivitesi $\text{IC}_{50} = 12,4 \mu\text{g/mL}$ rapor edilmiştir (Zheng ve Wang, 2001).

Rozmarinik asit bileşiği bu tez çalışmasında *Origanum majorana* ve *Origanum syriacum* bitkilerinden saflaştırılmış olup antioksidan aktiviteleri ve C6 (Sıçan Beyin Tümör Hücresi), HeLa (İnsan Rahim Kanseri Hücresi) hücrelerine karşı farklı dozlarda antikanser aktiviteleri araştırıldı ve orta düzeyde antioksidan ve antiproliferatif aktivite antiproliferatif etki gösterdi.

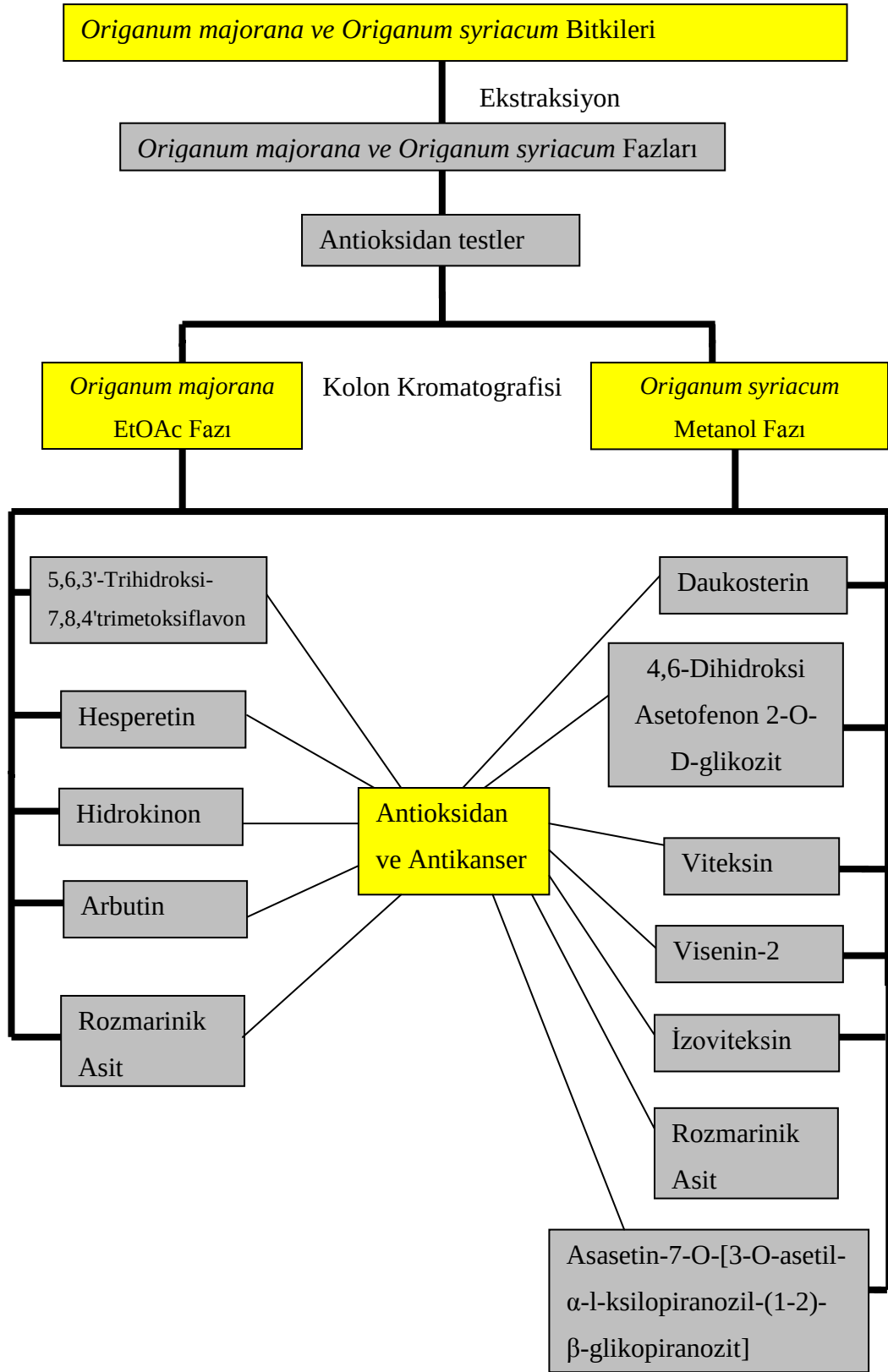
Daukosterin (6): *In vitro* denemelerde daukosterin (β -sitosterol-3-O- β -d-glikopiranozit) bileşiğinin de içinde bulunduğu 4 bileşik, Epstein-Barr virüsüne (EBV) karşı antitümör aktivite bakımından incelenmiş ve daukosterinin yüksek antitümör aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Guevara ve ark., 1999).

Panax ginseng meyvelerinden izole edilen ve aralarında daukosterinin de olduğu 11 bileşiğin MTT testini kullanarak göğüs, akciğer ve prostat kanserlerine karşı *in vitro* antikanser aktivitesini inceleyen Wang ve ark. (2007), daukosterolün 10 ve 100 μM konsantrasyonda H838 (göğüs kanseri) hücrelerine, 1, 10 ve 100 μM konsantrasyonlarda LNCaP (prostat kanseri) hücrelerine ve 1 ve 100 μM 'da ise PC3 (prostat kanseri) hücrelerine karşı %20-90 arasında aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Viteksin, İzoviteksin Visenin-2 (8), (9), (11): Choi ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada, apigenin ve apigenin iki glikoziti olan viteksin ve izoviteksinin pinitolün anti-inflamatuar ve anti-alzheimer aktiviteleri incelenmiş olup anti-inflamatuar

aktivite sıralamasının izoviteksin > apigenin > viteksin iken anti-Alzheimer sıralamasının izoviteksin > viteksin > apigenin olduğunu tespit edilip İzoviteksinin anti-inflammatuar ve anti-alzheimer ilaç olarak geliştirilmesi önerilmiştir. Halk arasında ağrı kesici olarak kullanılan *Urtica circularis* bitkisinin su ekstraktı ve ekstraktan izole edilen visenin-2, viteksin, klorojenik asit ve kafeik asit antinosiseptif etkisi incelenmiş ve viteksin en yüksek aktivite gösterirken apigenin ise aktivite göstermediği ve isoviteksin ve viteksinin DPPH aktivitesi sırasıyla $IC_{50} = 0,37$ ve $0,41 \mu\text{g/mL}$ rapor edilmiştir (Gorzalczany ve ark., 2011).

Bu tez kapsamında *Origanum syriacum* bitkisinden izole ettiğimiz izoviteksin, viteksin, visenin-2 bileşiklerinin antioksidan ve antiproliferatif sıranklaması literatürle uyum içerisinde izoviteksin, viteksin, visenin-2 olarak tespit edildi.



Şekil. 5.1. Çalışmanın özet şeması

İzole edilen moleküllere antioksidan ve antikanser aktivite testleri uygulandı. Bütün izole edilen bileşikler arasında Hidrokinon'un en yüksek aktivitelere **(3)** sahip olduğu belirlenmiştir. Bitkideki doğal antioksidanların çoğunlukla fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler (Canadanovic-Brunet ve ark., 2005; Konczak ve ark., 2004; Koşar ve ark., 2004; Oboh ve ark., 2008) olması dolayısıyla izole edilen glukoz içermeyen fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler bileşiklerden antioksidan ve antikanser aktivite göstermesi beklenen bir sonuçtur.

Aynı zamanda önemli olcude antioksidan özelliğe sahip izole edilen bu bileşiklerin sentezlenmesi, antioksidan ve antikanserojenik etki mekanizmasının ortaya çıkartılarak ilaç sanayine kazandırılması önem arz etmektedir. *Origanum majorana* L. ile *Origanum syriacum* L. bitkisinde bulunan ve benzer molekül biyolojik aktiviteye sahip yeni formlarının sentezlenmesi, ülke ekonomisi açısından da önemli girdiler sağlayacaktır.

Bu çalışmada sonuçlar göz önüne alındığında, izole edilen bileşiklerin yüksek oranla aktiviteden sorumlu olan biyoaktif bileşenler olduğu düşünülmektedir. *Origanum majorana* L. ve *Origanum syriacum* L. bitkisi ile ilgili önceden yapılmış bir geniş biyoaktivite kontrollü izolasyon çalışması olmadığından, yaptığımız çalışma bitkinin genel kimyasal içeriğini ortaya koyması bakımından önemlidir.

İzole edilen yeni flavonoidler, steroidler, saponinler vb. molekülün antikanser ve antioksidan kapasiteleri belirlenmiştir. İzole edilen bu moleküllerin başka aktivitelerinde incelenmesi söz konusu olacaktır. İfade edildiği gibi ilaçların %80 doğal kaynaklıdır. Ya doğrudan doğruya bitkilerden izole edilmiştir veya ana iskelet doğal kaynaklı olup moleküle gruplar takılarak modifiye edilmiştir. Bu bağlamda izole edeceğimiz yeni doğal ürünler ya direk veya dolaylı olarak ilaç olabilme potansiyeline sahip olabilecektir.

KAYNAKLAR

- Abbasi, A.M., Khan, M.A., Ahmad, M., Zafar, M., Khan, H., Muhammad, N. and Sultana, S., 2009. Medicinal plants used for the treatment of jaundice and hepatitis based on socio-economic documentation. *African Journal of Biotechnology*, 8 (8), 1643-1650.
- Abdel-Massih, R.M., Fares, R., Bazzi, S., El-Chami, N., Baydoun, E., 2010. The apoptotic and anti-proliferative activity of *Origanum majorana* extracts on human leukemic cell line. *Leuk Res*, 34(8), 1052-1056.
- Afsharypuor, S., Ebrahim, S., Erfan, M., 1997. Volatile constituents of *Origanum vulgare* ssp. *Viride* (Syn. *O. heracleoticum*) from Iran. *Planta Medica*, 63, 179-180.
- Akgul, A., Bayrak, A., 1987. Constituents of essential oils from *Origanum* species growing wild in Turkey. *Planta Medica*, 53 (4), 114.
- Al-Howiriny, T., Alsheikh, A., Alqasoumi, S., Al-Yahya, M., ElTahir, K., Rafatullah, S., 2009. Protective Effect of *Origanum majorana* L. 'Marjoram' on various models of gastric mucosal injury in rats. *Am. J. Chin. Med.*, 37(3), 531-545.
- Ames, S.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., 1993. Oxidants, antioxidants and degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 17, 7915–7922.
- Antonescu, V., Sommer, L., Predescu, I., Barza, P., 1982. Physicochemical study of flavonoids from *Origanum vulgare*. *Farmacia*, 30, 201-208.
- Aruoma, O.I., Spencer, J.P.E., Warre, D., Jenner, P., Butler, J., Halliwell, B., 1997. Characterization of food antioxidants, illustrated using commercial garlic and ginger preparations. *Food Chemistry*, 60, 149-156.
- Arslan, Ö., Vural, H., Kömürcü, Ş., Özet, A., 2006. Kemoterapi Alan Kanser Hastalarına Verilen Eğitimin Kemoterapi Semptomlarına Etkisi. *C.Ü.HemGirelik Yüksekokulu Dergisi* 1, 15-28.
- Assaf, M.H., Ali, A.A., Makboul, M.A., Beck, J. P., Anton, R., 1987. Preliminary study of phenolic glycosides from *Origanum majorana*; quantitative estimation of arbutin; cytotoxic activity of hydroquinone. *Planta Med.*, 53(4), 343-345.
- Baloglu, E., 2001. Synthesis and biological evaluation of paclitaxel analogs. Blacksburg Virginia: Doctor of Philosophy in Chemistry (PhD Thesis).
- Barış, A., 2007. Farklı Tipteki Pestisitlerin Muhtemel Mutajenitelerinin Ames/Salmonella/Mikrozom Test Yöntemiyle Araştırılması. Y. Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon.
- Baricevic, D., 1996. Experiences with *Oregano* (*Origanum* spp.) in Slovenia, *Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano*, CIHEAM, 111-121, Valenzano (Bari).
- Barros, L., Ferreira, M.J., Queiro, B. Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., 2007. Total Phenols, Ascorbic Acid, β -carotene and Lycopene in Portuguese Wild Edible Mushrooms and Their Antioxidant Activities. *Food Chemistry*, 103, 413–419.
- Baser, K.H.C., 1978. The Turkish *Origanum* Species. In: Kintzios SE. *Oregano; The Genera Origanum And Lippia*. 109-126, London and New York.
- Baser, K.H.C., 2008. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol earring essential oils. *Curr. Pharm. Design.*, 14, 3106-3119.
- Baytop, A., 1991. *Farmasotik Botanik Ders Kitabı*. İstanbul Eczacılık Fakültesi

- Yayınları, No: 3687, İstanbul.
- Baytop, T., 1999. Türkiye'de Bitkilerle Tedavi, Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul.
- Baytop, T., 2000. Anadolu Dağlarında 50 Yıl "Bir Bitki Avcısının Gözlemleri". Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.
- Berdowska, I., Zielinski, B., Fecka, I., Kulbacka, J., Saczko, J., Gamian, A., 2013. Cytotoxic impact of phenolics from Lamiaceae species on human breast cancer cells. Food Chem., 141(2), 1313-1321.
- Bourgaud, F., Gravot A., Milesi S., Gontier E. 2001. Production of Plant Secondary Metabolites; a Historical Perspective. Plant Sci., 161, 839-851.
- Bozkurt, A., 2000. Antineoplastik ilaçlar, Farmakoloji Ders Kitabı (içinde), T. A.Bökesoy, Çakıcı, M. Melli (Eds.), Gazi Kitabevi, Ankara, 625–640.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutrition Reviews, 56(11), 317-333.
- Brieva, A., Guerrero, A., Pivel, J.P., 2001. Biochemical and pharmacological mechanism related to the activity of *Cryptomphalus aspersa* (SCA) (Endocare) in radiodermatitis. Dermatol Cosmet., 11(2), 71-75.
- Calabresi, P. and Chabner, B.A., 1996. Chemotherapy of neoplastic diseases. In: Goodman and Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9 Ed. th (Hardman, J.G., Limbird, L.E. Eds.). McGraw-Hill, New York, pp: 1225-1285
- Chadefaud, M., Emberger, L., 1960. Traite De Botanique (Systematique). Tome II, 832-833s.
- Canadanovic-Brunet, J.M., Djilas, S.M., Cetkovic, G.S., Tumbas, V.T., 2005. Free-radical scavenging activity of wormwood (*Artemisia absinthium* L) extracts. Journal of the Science of Food and Agriculture, 85(2), 265-272.
- Ceylan, A., 1983. Tıbbi Bitkiler-II (Uçucu Yag Bitkileri). Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayını No: 481, 306, İzmir.
- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., Chern, J.C., 2002. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis By Two Complementary Colorimetric Methods. Journal of Food and Drug Analysis, 10, 3, 178-182.
- Chung, Y.K., Heo, H.J., Kim, E.K., Kim, H.K., Huh, T.L., Lim, Y., Kim, S.K., Shin, D.H., 2001. Inhibitory effect of ursolic acid purified from *Origanum majorana* L. on the acetylcholinesterase. Mol. Cells, 11, 137-143.
- Chiej, R., 1984. The Macdonald Encyclopedia of Medicinal Plants. Macdonald Co. Ltd, London, pp. 212–297
- Choi, E.J., 2007. Hesperetin induced G1-phase cell cycle arrest in human breast cancer MCF-7 cells: involvement of CDK4 and p21. Nutr. Cancer, 59(1), 115-119.
- Choi, E.J., Bae, S. M., Ahn, W.S., 2008. Antiproliferative effects of quercetin through cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-453 cells. Arch Pharm Res, 31(10), 1281-1285
- Choi, J.S., Nurul Islam, M., Yousof Ali, M., Kim, E.J., Kim, Y.M., and Jung, H.A., 2013. Effects of C-glycosylation on anti-diabetic, anti-Alzheimer's disease and anti-inflammatory potential of apigenin. Food Chem. Toxicol. 64, 27–33.
- Clayson, D.B., 2001. Toxicological Carcinogenesis, Lewis Publishers, Florida, 113–114.
- Cotran, R.S., Kumar, V., Collins, T., 1999. Robbins Pathologic Basis of Disease, 6. Edition, W. B. Saunders Company, USA, 4, 330.
- Cragg, G. M., Boyd, M. R., Cardellina, J. H., II, Grever, M. R., Schepartz, S. A., Snader, K. M., Suffness, M., 1993. Role of Plants in the National Cancer Institute Drug Discovery and Development Program. Human Medicinal Agents

- From Plants; (A. D. Kinghorn, M. F. Balandrin, eds.), ACS Symposium Series; American Chemical Society, Washington, D.C., 534, 80-95.
- Cragg, G.M., Newman, D.J., Snader, K.M., 1997. Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.*, 60, 52-60.
- Das, N.P., & Pereira, T.A., 1990. Effect of flavonoids on thermal autoxidation of palm oil structure-activity relationships. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67, 255-258.
- Davis., P.H., 1982. *Flora of Turkey and East Aegean Island* Vo:7. 349-382 p, Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Davis., P.H., 1988. *Flora of Turkey and East Aegean Island* Vo:7. 948 p, Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Davis, S.C. and Perez, R., 2009. Cosmeceuticals and natural products: wound healing. *Clinics in Dermatology*, 27, 502-506.
- Deighton, N., Brennan, R., Finn, C., Davies, H.V., 2000. Antioxidant Properties of Domesticated and Wild Rubus Species. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 80, 1307-1313.
- De Pascual-Teresa, S., Sanchez-Moreno, C., Granado, E., Olmedilla, B., De Ancos, B., Cano, M. P., 2007. Short and mid-term bioavailability of flavanones from oranges in humans. *Current Topics in Nutraceutical Research*, 5(2-3), 129-134.
- Dinis, T.C.P., Maderia, V.M.C. and Almeida, L. M., 1994. Action of Phenolic Derivates (Acetaminophen, Salicylate, and 5-Aminosalicylate) As Inhibitors of Membrane Lipid Peroxidation and As Peroxyl Radical Scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315, 161-169.
- Di Matteo, V. and Esposito, E., 2003, Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 2: 95-107.
- Duman, H., 2000. *Origanum L.. Flora of Turkey and the East Aegean Islands* (supplement 2), Ed: Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T. and Başer, K.H.C., Univ. Press, Edinburgh, Vol.11, 207.
- Dülger, B., Ceylan M., Alitsaous M., Ugurlu E., 1999. "Artemisia absinthium L. (Pelin)'un Antimikrobiyal Aktivitesi" *Tr. J.of Biology*, 3, 377-384.
- El-Ashmawy, I. M., Saleh, A., Salama, O. M., 2007. Effects of *marjoram* volatile oil and grape seed extract on ethanol toxicity in male rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 101(5), 320-327.
- El-Desouky, S. K., Ibrahim, L. F., Kawashty, S. A., El-Ansari, M. A., Kim, Y. S., Chong, H. S., Kim, O. K., Kim, Y. K., 2009. Phytochemical Constituents and Biological Activities of *Origanum syriacum*. *Zeitschrift Fur Naturforschung Section B-a Journal of Chemical Sciences*, 64(4), 447-451.
- El-Nakeb, M.A., Fathy., S.M.F., Salama, O.M.A., 2006. GC/MS analysis, biostatic activities and biocidal dynamics of the essential oil of *Origanum majorana* cultivated in Egypt. *J. Pharm. Sci.*, 20, 150-156.
- Erkan, N., 2012. Antioxidant activity and phenolic compounds of fractions from *Portulaca oleracea* L. *Food Chemistry*, 133(3), 775-781
- Evans, W.C., 1989. *Trease And Evans' Pharmacognosy*, 13. ed. Oxford, The Alden Press, 217.
- Evans, W.C., 2002. *Trease and Evans' Pharmacognosy*, 15. ed. Edinburgh, W.B. Saunders, pp. 369-370, 401.
- Firmin, J.L., Wilson, K.E., Rossen, L., Johnston, A.W.B., 1986. Flavonoid activation of

- nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plants. *Nature*, 324, 90-92
- Franks, L. M., Teich, N. M., 1996. *Cellular and Molecular Biology of Cancer*, 3.Edition, Oxford University Press, New York, USA, 2–4, 21–25.
- Gerber, M., Boutron-Ruault, M. C., Hercberg, S., Riboli, E., Scalbert, A. and Siess, M. H. 2002. Food and cancer: State of the art about the protective effect of fruits and vegetables. *Bulletin du Cancer*, 89, 293–312.
- Gohari, R.A., Saeidnia, S., Shahverdi, R.G., Yassa, N., Malmir, M., Mollazade Kamyar, K., Naghinejad, R.A., 2009 Phytochemistry and antimicrobial compounds of *Hymenocrater calycinus*. *EurAsia. J. Bio. Sci.* 3, 64-68.
- Gorzalczany, S., Marrassini, C., Mino, J., Acevedo, C., Ferraro, G., 2011. Antinociceptive activity of ethanolic extract and isolated compounds of *Urtica circularis*. *J. Ethnopharmacol.*, 134(3), 733-738.
- Gordon, M.H., 2001. The Development of Oxidative Rancidity in Foods, In: *Antioxidants in Food, Practical Applications*, Pokonory, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (Eds), Woodhead Publishing Limited Cambridge, 17.
- Greuter, W. (ed), 1988. *International Code of Botanical Nomenclature*. Koetz Scientific Books, D. 2640, Königstein, Germany.
- Guarrera, P.M., 2005. Traditional phytotherapy in central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium). *Fitoterapia.*, 76, 1-25.
- Guevara, A.P., Vargas, C., Sakurai, H., Fujiwara, Y., Hashimoto, K., Maoka, T., Kozuka, M., Ito, Y., Tokuda, H., Nishino, H., 1999. An antitumor promoter from *Moringa oleifera*, *Lam. Mutat Res.*, 440(2), 181-188.
- Gulcin, I., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R., 2006b. Antioxidant activity of a triterpenoid glycoside isolated from the berries of *Hedera colchica*: 3-O-(β -D-glucopyranosyl)-hederagenin, *Phytherapy Research*, 20, 130-134.
- Gulcin, I., 2007. Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa, *Amino acids*, 32, 431-438.
- Gulluce, M., Karadayi, M., Guvenalp, Z., Ozbek, H., Arasoglu, T., Baris, O., 2012. Isolation of some active compounds from *Origanum vulgare* L. ssp *vulgare* and determination of their genotoxic potentials. *Food Chemistry*, 130(2), 248-253.
- Guliyev, V.B., Harmandar, M., 1999. *Flavonoidler*, Bakanlar Matbaacılık, İstanbul.
- Guner, A., Ozhatay, N., Ekim, T. and Baser, K.H.C., 2000. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands Vol. 11 (supplement-II)*, Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Gunther, E., 1949. *The Essential Oils*, Vol. 3, 535. Van Nostrand Co, New York.
- Gupte, A., Buolamwini, K. J. 2008. Synthesis and biological evaluation of phloridzin Gulcin, I., 2006a. Antioxidant and antiradical activities of L-Carnitine, *Life Sciences*, 78, 803-811. analogs as human concentrative nucleoside transporter 3 (hCNT3) inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19, 917–921.
- Hagerman, A. E., Riedl, K. M., Jones, G. A., Sovik, K. N., Ritchard, N. T., Hartzfeld, P.W. & Riechel, T.L. 1998. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1887-1892.
- Halim, A.F., Mashaly, M.M., Zaghloul, A.M., Abdel-Fattah, H., De Potter, H.L., 1991. Chemical constituents of the essential oils of *Origanum syriacum* and *Stachys aegyptiaca*. *International Journal of Pharmacognosy* 29 (1), 1–5.
- Harborne, J.B., Mabry, T.J., Mabry, H., 1975. *The Flavonoids*. Chapman and Hall,

London

- Harborne, J.B., Mabry, T.J. (Eds.), 1982. The Flavonoids: Advances in Research, Vols. 1–2, Chapman and Hall, London.
- Harvala, C., Menounos, P., Argyriadou, N., 1987. Essential oil from *Origanum dictamnus*. *Planta Medica* 53 (4), 107–109.
- Hasani-Ranjbar, S., Nayebi, N., Larijani, B. and Abdollahi, M., 2009. A systematic review of the efficacy and safety of herbal medicines used in the treatment of obesity. *World Journal of Gastroenterology*, 15 (25), 3073–3085.
- Hedge, I.C., 1986. Lamiaceae of South-West Asia: Diversity, Distribution and Endemism.
- Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., Williamson, E.M. 2004. Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy, Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Heo, H. J., Cho, H. Y., Hong, B., Kim, H. K., Heo, T. R., Kim, E. K., Kim, S. K., Kim, C. J., Shin, D. H., 2002. Ursolic acid of *Origanum majorana* L. reduces Abeta-induced oxidative injury. *Mol Cells*, 13(1), 5–11.
- Hikino, H. and Y. Kiso. 1988. Natural products for liver diseases in Economics and Medicinal Plants Research. Vo. 2nd ed. H. Wagner, H. Hikino and N.R. Farnsworth Wagner, Academic Press.
- Hoareau, L. and Da Silva, E.J., 1999. Medicinal plants: a re-emerging health aid. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, 2 (2), 56–70.
- Huxley, A., 1992, The New Dictionary of Gardening. Macmillan Press.
- Ietswaart, J.H., 1982. *Origanum* L.. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Ed: Davis, P.H., Univ. Press, Edinburgh, Vol.7, 297–313.
- Jang, Y.S., Yang, Y.C., Choi, D.S., Ahn, Y.J., 2005. Vapor phase toxicity of marjoram oil compounds and their related monoterpenoids to *Blattella germanica* (Orthoptera: Blattellidae). *J Agric Food Chem*, 53(20), 7892–7898.
- Jeney, E., Uri, J., 1954. Pharmacological effect of flavone dyes. *Pharmazie*, 9(7), 533–546.
- Karakaya, S., El, S.N., 1997. Flavonoidler ve sağlık. *Beslenme ve Diyet Dergisi* 26(2), 54–60.
- Karkabounas, S., Kostoula, O.K., Daskalou, T., Veltsistas, P., Karamouzis, M., Zelopitis, I., Metsios, A., Lekkas, P., Evangelou, A. M., Kotsis, N., Skoufos, I., 2006. Anticarcinogenic and antiplatelet effects of carvacrol. *Exp Oncol*, 28(2), 121–125.
- Karp, G., 2005. Cell and Molecular Biology Concepts and Experiments, 4. Edition, John Wiley & Sons, USA, 669.
- Kayaalp SO. 1998. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 8. ed. Ankara:Hacettepe Taş Kitapçılık; pp. 1051–1052.
- Kim, B.J., Kim, J.H., Kim, H.P., Heo, M.Y., 1997. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (II): antioxidative activity and free radical scavenging activity, *Int. J. Cosmetic Sci.*, 19, 299–307.
- Kiplimo, J.J., Koorbanally, N.A., 2012. Antibacterial activity of an epoxidised prenylated cinnamaldehyde derivative from *Vepris glomerata*. *Phytochemistry Letters*, 5(3), 438–442.
- Klug, W.S., Cummings, M.R., 2002. Genetik, 6. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, 24,28, 635–651.
- Kokkini, S., 1996. Taxonomy, diversity and distribution of *Origanum* species Proceedings of the IPGRI International Workshop on *Oregano*, CIHEAM, 12,

- Valenzano (Bari).
- Konczak, I., Okuno, S., Yoshimoto, M., Yamakawa, O., 2004. Caffeoylquinic Acids Generated In Vitro in a High-Anthocyanin-Accumulating Sweet potato Cell Line. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2004(5), 287-292.
- Kosar, M., Dorman, D., Baser, K., Hiltunen, R., 2004. An improved HPLC post-column methodology for the identification of free radical scavenging phytochemicals in complex mixtures. *Chromatographia*, 60(11-12), 635-638.
- Kris-Etherton, P.M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A. E., Hilpert, K.F., Griel, A.E., & Etherton, T.D. 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine*, 113(Suppl 9B), 71–88.
- Kumar, B., Gupta, S.K., Srinivasan, B. P., Nag, T.C., Srivastava, S., Saxena, R., Jha, K. A., 2013. Hesperetin rescues retinal oxidative stress, neuroinflammation and apoptosis in diabetic rats. *Microvasc. Res.*, 87 65-74.
- Lagouri, V., Bantouna, A., Stathopoulos, P., 2010. A Comparison of the Antioxidant Activity and Phenolic Content of Nonpolar and Polar Extracts Obtained from Four Endemic Lamiaceae Species Grown in Greece. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34 (5), 872-886.
- Lapornik, B., Prosek, M., & Wondra, A.G. 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time, *Journal of Food Engineering*, 71, 214–222.
- Leeja, L., Thoppil, J. E., 2007. Antimicrobial activity of methanol extract of *Origanum majorana* L. (*Sweet marjoram*). *J. Environ. Biol.*, 28(1), 145-146.
- Livolsi, V.A., Merino, M.J., Brooks, J.S.J., Saul, S.H., Tomaszewski, J.E., 1992. *Patoloji*, 2. Baskı, Saray Tıp Kitabevleri, İzmir, 33, 35, 36.
- Lu, Y., Foo, L.Y., 1999. Rosmarinic acid derivatives from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*, 51 91-94.
- Lu, Y., Foo, Y.L., 2000. Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*, 55, 263-267.
- Lukas, B., Schmiderer, C., Franz, C., Novak, J., 2009. Composition of essential oil compounds from different Syrian populations of *Origanum syriacum* L. (*Lamiaceae*). *J. Agric. Food Chem.*, 57(4), 1362-1365.
- Lukas, B., Schmiderer, C., Mitteregger, U., Novak, J., 2010. Arbutin in *marjoram* and *oregano*. *Food Chemistry* 121, 185–190.
- Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B., 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin.
- Magalhães, L.M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J.F.L.C., 2008. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties, *Anal. Chim. Acta*, 613, 1-19.
- Mahindru, S.N., 1992. *Indian Plant Perfumes*, Metropolitan Phototype Settera Printers Ltd. India.
- Mainardi, T., Kapoor, S. and Bielory, L., 2009. Complementary and alternative medicine: Herbs, phytochemicals and vitamins and their immunologic effects. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 123 (2), 283-294.
- Mann, J., 2002. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nat. Rev. Cancer*, 2(2), 143-8.
- Marais, J.P.J., Deavours, B., Dixon, R.A., Ferreira, D., 2006. Stereochemistry of flavonoids. *Sci. Flavonoids*. 1:1.

- Matsuda, H., Hirata, N., Kawaguchi, Y., Naruto, S., Takata, T., Oyama, M., Iinuma, M., Kubo, M., 2006. Melanogenesis stimulation in murine B16 melanoma cells by kava (*Piper methysticum*) rhizome extract and kavalactones, Biol. Pharm. Bull., 29(4), 834-837.
- Meyer, A.S., Heinonen, M., Frankel, E. N. 1998. Antioxidant interactions of Catechin, Cyanidain, Caffeic acid, Quercetin and ellagic acid on human LDL oxidation. Food Chemistry, 61, 71-75.
- Mihalik, E., 1992. Histological Detection of Sudanophilic Lipids in Some Lamiaceae. Acta Horticulturae, 306, 259-267.
- Miller, D.D., 1996. Mineral. Food Chemistry, Fennema, O.R. (Ed.), Dekker: New York, 618-649.
- Moroney, M. A., Alcaraz, M. J., Forder, R. A., Carey, F., Hoult, J. R., 1988. Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. J. Pharm. Pharmacol., 40(11), 787-792.
- Motamed, S.M, Naghibi, F., 2009 Antioxidant activity of some edible plants of the Turkmen Sahra region in northern Iran. Food Chem., 119, 1637-1642.
- Nakatani, 1992. N. Natural Antioxidants from Spices. ACS. Symp. Ser., 507, 72-86.
- Nam, N.H., Kim, Y., You, Y.J., Hong, D.H., Kim H.M., and Ahn, B.Z. 2004. New constituents from *Crinum latifolium* with inhibitory effects against tube-like formation of human umbilical venous endothelial cells. Natural product research, 18, 485-491.
- Nalini, N., Aranganathan, S., Kabalimurthy, J., 2012. Chemopreventive efficacy of hesperetin (citrus flavonone) against 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. Toxicol. Mech. Methods, 22(5), 397-408.
- Ndhlala, A.R., Kasiyamhuru, A., Mupure, C., Chitindingu, K., Benhura, M. A., Muchuweti, M., 2007. Phenolic composition of *Flacourtia indica*, *Opuntia megacantha* and *Sclerocarya birrea*. Food Chemistry, 103(1), 82-87
- Nunez, R.D., De Castro, C.O., 1992. Palaeoethnobotany and Archaeobotany of The Lamiaceae in Europa and The Near East. Advances in Labiate Science, 437-454.
- Oboh, G., Raddatz, H., Henle, T., 2008. Antioxidant properties of polar and non-polar extracts of some green leafy vegetables. Journal of the Science of Food and Agriculture, 88(14), 2486-2492.
- Oflaz, S., Kürkçüoğlu, M., Başer, K.H.C., 2002. *Origanum onites* ve *Origanum vulgare* subsp. *Hirtum* üzerinde farmakognozik araştırmalar. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı. Eskişehir.
- Ogata, M., Hoshi, M., Shimotohno, K., Urano, S., Endo, T., 1997. Antioxidant activity of magnolol, honokiol and related phenolic compounds. Journal of the American Oil Chemists' Society, 74, 557-568.
- Olivier G. W., 1996. The world market of *Oregano*, Proceedings of the IPGRI International Workshop on *Oregano* (ed: S. Padulosi), International Plant Genetic Resources Institute, Ciheam-Valenzano, 8-12 May 1996, Bari, Italy, 142-6.
- Orhan, I., Kartal, M., Kan, Y., Sener, B., 2008. Activity of essential oils and individual components against acetyl- and butyrylcholinesterase. Z. Naturforsch C, 63(7-8), 547-553.
- Özbek, T., 2006. Doğu Anadolu Tıbbi Bitkilerine Ait Bazı Türlerin Ames/*Salmonella* Mikrozom Testi Kullanılarak Antimutajenik Özelliklerinin Saptanması. Y.

- Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Özdemir, C., Şenel, G., 1999. *Salvia sclarea* L.'nin Morfolojik, Anatomik ve Karyolojik Özellikleri. Tr. J. of Botany, 23, 7-18.
- Morgaris, N., Koedam, A., Vokou, D., 1982. Aromatic Plants. Martinius Nijhoff Publisher, Vol:7, London, 265-269.
- Özörgücü, B., Gemici, Y., Türkan, İ., 1991. Karşılaştırmalı Bitki Anatomisi. Ege Üniversitesi Yayınları, İzmir.
- Papas, A. M., 1996. Determinants of antioxidant status in humans. Lipids, 31, 77-82.
- Pavela, R., 2004. Insecticidal activity of certain medicinal plants. Fitoterapia, 75(7-8), 745-749.
- Pavela, R., 2005. Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. Fitoterapia, 76(7-8), 691-696.
- Penso, G., 1983. Index Plantarum Medicinalium Totius Mundi Eorumque Synonymorum, Milano.
- Plumb, G.W., Price, K. R., & Williamson, G. 1999. Antioxidant properties of flavonol glycosides from green beans. Redox Report, 4, 123-127.
- Pezzuto, J.H., 1997. Plant-derived anticancer agents. Biochemical Pharmacology, 53, 121-133.
- Prieto, P., Pineda, M. Aguilar, M., 1999. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity Through The Formation of a Phosphomolybdenum Complex. Anal. Biochem., 269, 337-341.
- Prior, R.L. and Cao, G., 1999. In vivo total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods, Free Radical Bio. Med., 27, 1173-1181.
- Rates, S.M.K., 2001. Plants as source of drugs. Toxicon, 39, 603-613.
- Ravid, U., Putievsky, E., 1983. Essential oils of *Majorana syriaca*, *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* plants growing wild in Israel. Planta Medica 49, 248-249.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C.A., 1999. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. Free Radicals in Biology and Medicine, 26, 1231-1237.
- Richardson, P.M., 1992. The Chemistry of The Lamiaceae: An Introduction and Overview. Advances in Labiatae Science, 291-297.
- Robbins, R.C., 1973. Physiological effects of plant flavonoids. J. Chem. Pharm. 4, 271.
- Rossi, M., Lugo, A., Lagiou, P., Zucchetto, A., Polesel, J., Serraino, D., Negri, E., Trichopoulos, D., La Vecchia, C., 2012. Proanthocyanidins and other flavonoids in relation to pancreatic cancer: a case-control study in Italy. Ann Oncol, 23(6), 1488-1493.
- Salah, S.M., Jager, A.K., 2005. Screening of traditionally used Lebanese herbs for neurological activities. J. Ethnopharmacol., 97(1), 145-149.
- Samy, R.P., Gopalakrishnakone, P., Ignacimuthu, S., 2006. Anti-tumor promoting potential of luteolin against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in rats. Chem. Biol. Interact., 164(1-2), 1-14.
- Sarer, E., Scheffler, J., Baerheim, S., 1982. Monoterpenes of the essential oil of *Origanum majorana*. Planta Medica, 46, 236-239.
- Seelinger, G., Merfort, I., Schempp, C.M., 2008. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin. Planta Med, 74(14), 1667-1677.
- Sendra, J.M., Cunat, P., 1980. Volatile constituents of Spanish *Origanum* (*Coriandorhymus capitatis*) essential oil. Phytochemistry, 19, 89-92 and 1513-

1517.

- Serafini, M., Bellocco, R., Wolk, A., Ekstrom, A.M. 2002. Total antioxidant potential of fruit and vegetables and risk of gastric cancer. *Gastroenterology*, 123, 985–991.
- Slinkard, K., ve Singleton, V.L., 1977. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods, *Am. J. Enol. Viticult*, 28, 49-55.
- Schmidt, E., Bail, S., Buschbauer, G., Stoilova, I., Krastanov, A., Stoyanova, A., Jirovetz, L., 2008. Chemical composition, olfactory evaluation and antioxidant effects of the essential oil of *Origanum majorana* L. from Albania. *Nat. Prod. Commun.*, 3, 1051-1056.
- Shukla, Y. and Singh, M., 2007. Cancer preventive properties of ginger: A brief review. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 683-690.
- Smith, D.A., Banks, S.W., 1986. Plant flavonoids in Biology and medicine: Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships. Eds. V. Cody, E. Middleton and J. Harborne, New York, 113–124.
- Skoula, M. and Kamenopoulos, S. 1996, *Origanum dictamnus* L., *Origanum vulgare* spp. *hirtum*. Link Ietswaart: Traditional uses and production in Greece, Proceedings of the IPGRI International Workshop on *Oregano*, International Plant Genetic Resources Institute, Ciheam-Valenzano, 8–12 May 1996, Bari, Italy, 26–32 .
- Stiles, J.C., Sparks, W. and Ronzio, R. A. 1995. The inhibition of *Candida albicans* by *oregano*. *J. Applied Nutr.*, 47, 96–102.
- Souza, N.A.B., Lima, E.O., Guedes, D.N., Pereira, F.O., Souza, E.L., Sousa, F.B., 2010. Efficacy of *Origanum* essential oils for inhibition of potentially pathogenic fungi. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46, 499-508.
- Sun, B., Fukuhara, M., 1997. Effects of co-administration of butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole and flavonoids on the activation of mutagens and drug metabolizing enzymes in mice, *Toxicology*, 122, 61.
- Şahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., Agar, G. and Özer, H., 2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*, 15, 549-557.
- Şener, B. ve Toker, G. 1986. Flavonoitlerin Eczacılık Yönünden Önemi. *Mar. Üniv. Ecz. Der.*, 2(2), 169-183.
- Tadeg, H., Mohammed, E., Asres, K., Mariam, T. G., 2005, Antimicrobial activities of Some Selected Traditional Ethiopian Medicinal Plants Used on The Treatment of Skin Disorders, *J. of Ethnopharmacol.*, 1, 168-175.
- Tanaka, M., Kuei, C.W., Nagashima, Y., and Taguchi, T., 1988. Application of antioxidative maillard reaction products from histidine and glucose to sardine products, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54, 1409-1414.
- Tanker, N., Koyuncu, M., Coşkun, M., 1998. *Farmasötik Botanik*, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 343.
- Taylor, L.P, Grotewold, E., 2005. Flavonoids as developmental regulators. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 317–323.
- Tognolini, M., Barocelli, E., Ballabeni, V., Bruni, R., Bianchi, A., Chiavarini, M., Impicciatore, M., 2006. Comparative screening of plant essential oils: phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity. *Life Sci.*, 78(13), 1419-1432.

- Tomas-Barberan, F.A., Gil, M.I., 1992. Chemistry and Natural Distribution of Flavonoids in The Lamiaceae. *Advances in Labiatae Science*, 299-305.
- Tsao, R., and Yang, R., 2003. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: Towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.*, 1018, 29-40.
- Van Den Broucke CO, Lemli JA. 1980. Antispasmodic activity of *Origanum compactum*. *Planta Med.*, 38, 317-331.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., and Oomah, B.D., 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4113-4117.
- Viskupicva, J., Ondrejovic, M., Sturdik, E., 2008. Bioavailability and metabolism of flavonoids. *Journal of Food and Nutrition Research*, 47(4), 151-162.
- Viuda-Martos, M., Navajas, Y.R., Zapata, E.S., Fernández-López, J. and Pérez-Álvarez, J.A., 2009. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour and Fragrance Journal*, 25, 13-19.
- Vogel, J.R., Beer, B., Clody, D.E., 1971. A simple and reliable conflict procedure for testing antianxiety agents. *Psychopharmacology*, 21, 1-7.
- Vokou, D. Kokkini, S. and Bassiere, J. M., 1993. Geographic variation of Greek *oregano* (*Origanum vulgare* spp. *hirtum*). *Biochem. Syst. Ecol.*, 21 (2), 287-295.
- Von Gadow A., Joubert E., Hansmann C.F., 1997. Comparison of the antioxidant activity of Aspalathin with that of other plant phenols of Rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -Tocopherol, BHT, and BHA. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 632-638.
- Wagner, H., 1989. Search for new plant constituents with potential antiphlogistic and antiallergic activity. *Planta Med.*, 55-235.
- Wagner, H., Elbl, G., Lotter, H., Guinea, M., 1991. Evaluation of natural products as inhibitors of angiotensin I-converting enzyme (ACE) *Pharm. Pharmacol.*, 1-15.
- Wang, W., Zhao, Y., Rayburn, E.R., Hill, D.L., Wang, H., Zhang, R., 2007. In vitro anti-cancer activity and structure-activity relationships of natural products isolated from fruits of *Panax ginseng*, *Cancer Chemother Pharmacol*, 59, 589-601.
- Watson, L., Dallwitz, M.T., 1978. *The Families of Flowering Plants*. Oxford University Press, London.
- Wawer, I. and Zielinska, A., 2001. C-13 CP/MAS NMR studies of flavonoids. *Magn. Reson. Chem.*, 39, 374-380.
- Weisburger, E.K., 1994. General principles of chemical carcinogenesis, *Carcinogenesis* (içinde), Raven Press, New York, 2, 3.
- Wen, P., Han, H., Wang, R., Wang, N., Yao, X. 2007. C-glycosylflavones and aromatic glycosides from *Campylotropis hirtella*. *Asian Journal of Traditional Medicines*, 2, 4.
- Wiedenfeld, H., Zynch, M., Buchwald, W. and Furmanowa, M. 2007. New compounds from *Rhodiola kirilowii*. *Scientia Pharmaceutica*, 75, 29-34.
- Yamaguchi, F., Yoshimura, Y., Nakazawa, H., and ariga, T. 1999. Free radical scavenging activity of grape seed extract and antioxidants by electron spin resonance spectrometry in an H₂O₂/NaOH/DMSO system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2544-2548.
- Yamaguchi, L.F., Lago, J.H., Tanizaki, T.M., Mascio, P.D., Kato, M.J., 2006. Antioxidant activity of prenylated hydroquinone and benzoic acid derivatives

- from *Piper crassinervium*. Kunth. Phytochemistry, 67(16), 1838-1843.
- Yang, Y., Wolfram, J., Boom, K., Fang, X., Shen, H., Ferrari, M., 2013. Hesperetin impairs glucose uptake and inhibits proliferation of breast cancer cells. Cell Biochem. Funct., 31(5), 374-379.
- Yazici, B., Ayvaz, A. T., Aker, S., 2009. Pyogenic granuloma of the lacrimal sac. Int Ophthalmol, 29(1), 57-60.
- Yen, G.C., and Duh, P.D., 1993. Antioxidative properties of methanolic extracts from peanut hulls. Journal of the American Oil Chemists' Society, 70, 383-386.
- Yen, G.C., Duh, P.D., and Tsai, C.L., 1993. Relationship between antioxidant activity and maturity of peanut hulls. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 41, 67-70.
- Zahran, M.M., Aboul-Enein, A.M. and Abol-Ella, F.M., 2005 "Molecular Changes on Cancer Cells as Affected by Willow Extracts". Res. J. Agric. Biol. Sci., 1(3), 284-287.
- Zhang, Y.H., 1999. Theoretical methods used in elucidation activity differences of phenolic antioxidants. Journal of the American Oil Chemists' Society, 76, 745-748.
- Zheng, W., Wang, S.Y., 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 5165-5170.
- Zaprometov, M.N., 1962. On the mechanism of biosynthesis of catechols. Biokhimiia. 27, 366-377.
- Zarebczan, B., Pinchot, S.N., Kunnimalaiyaan, M., Chen, H., 2011. Hesperetin, a potential therapy for carcinoid cancer. Am. J. Surg., 201(3), 329-332; discussion 333.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Özkan ŞEN
Doğum Tarihi	12.06.1985 Eskişehir
Medeni Hali	Bekar
Yabancı Dili	İngilizce
Telefon	0 356 252 16 16/3070
Faks	0 356 252 15 85
e-mail	ozkansen26@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Gaziosmanpaşa Üniversitesi Kimya (Organik) Doktora	2010-2015
Yüksek Lisans	Afyon Kocatepe Üniversitesi Kimya (Organik) Yüksek Lisans	2007-2009
Lisans	Afyon Kocatepe Üniversitesi Kimya Bölümü	2003-2007
Lise	Süleyman Çakır Lisesi	1999-2003

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2009-	Gaziosmanpaşa Üniversitesi	Uzman (NMR, HPLC)

Projelerde Yaptığı Görevler :

Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP)

Mentha dumetorum Bitkisinden Bazı Biyolojik Aktif Sekonder Metabolitlerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu (2012/108), Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, **Araştırmacı**, 2012-2013.

Origanum Majorana, Bitkisinden Sekonder Metabolitlerin İzolasyonları, Yapı Analizleri ve Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi (2014/30), Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, **Araştırmacı**, 2014-2015

ESERLER

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :

A1. Erol I, **Sen O**, Dedelioglu A, Cifti C., 2009. Synthesis and Characterization of Novel Fluorine-Containing Methacrylate Copolymers: Reactivity Ratios, Thermal Properties, and Antimicrobial Activity, Journal Of Applied Polymer Science. 114(6), 3351-3359

A2. Erol,I., **Sen, O.**, Cıfci, C., and Gurler, Z., 2010. New Methacrylate Copolymers Based on the Benzofurane Ring: Synthesis, Characterization, Monomer Reactivity, Ratios and Biological Activity, Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry 47, 1032–1041.

A3. Erenler, R., Yilmaz, S., Aksit, H., **Sen, O.**, Genc, N., Elmastas, M., and Demirtas, I., 2014. Antioxidant Activities of Chemical Constituents Isolated from *Echinops orientalis* Trauv Rec. Nat. Prod. 8(1), 32-36

A4. Aksit, H., Çelik, S.M., **Sen, O.**, Erenler, R., Demirtas, I, Telci, I., and Elmastas, M., 2014. Complete Isolation and Characterization of Polar Portion of *Mentha dumetorum* Water Extract, Rec. Nat. Prod. 8(3), 277-280

A5. Erenler, R., **Sen, O.**, Yaglioglu, A.S., and Demirtas, I., Bioactivity-guided Isolation of Antiproliferative Sesquiterpene Lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *Solstitialis*, Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening. in press.

A6. Erenler, R., **Sen, O.**, Aksit, H., Demirtas, I., Yaglioglu, A.S., Elmastas, M., Telci, I., Isolation and identification of chemical constituents from *Origanum majorana* and investigation of antiproliferative and antioxidant activities, Journal of the Science of Food and Agriculture. In press

B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

B.1. Erenler, R., **Sen, O.**, Topcu G., Isolation and Identification of Chemical Constituents From *Origanum Cyriacum* L., 3rd Biotechnology World Congress February 10th- 12th, 2014, Dubai, UAE.

B.2. Erenler, R., Elmastas, M., **Sen, O.**, Isnac, B., Topcu G., Aksit, H., Yildiz, I., Telci, I. and Topcu, G., Antioxidant Activities of Chemical Constituents Isolated Some *Origanum* Species, BIT's 5th Annual International Congress of medicchem Biotechnology World Congress November 18th- 20th, 2014, Suzhou, China.

B.3. Erenler, R., Isnac, B., **Sen, O.**, Aksit, H., Kayir, O. and Elmastas, M., Secondary Metabolites Isolated from *Origanum Onites* Activities of Chemical Constituents Isolated Some *Origanum* Species, BIT's 5th Annual International Congress of medicchem Biotechnology World Congress November 18th- 20th, 2014, Suzhou, China

B.4. Erenler, R., Meral, B., **Sen, O.**, Elmastas, M., Genc, N., Koysu, P. and Eminagaoglu, O., Antioxidant Activities of *Origanum Rotundifolium* Boiss, BIT's 5th Annual International Congress of medicchem Biotechnology World Congress November 18th- 20th, 2014, Suzhou, China

B.5. Erenler, R., **Sen, O.**, Aksit, H., Yildiz, I., Elmastas, M. and Demirtas, I., Antioxidant Activities of Chemical Constituents Isolated *Origanum syriacum* L., BIT's 5th Annual International Congress of medicchem Biotechnology World Congress November 18th - 20th, 2014, Suzhou, China

C. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

C1. **Şen, Ö.**, Erol, İ., Çifci, C., Yan Dalda Flor İçeren Yeni Metakrilat Monomerlerinin Sentezi ile Termal ve Biyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi, 22. Ulusal kimya Kongresi, 6-10 Ekim 2008, Mogosa.

C2. **Şen, Ö.**, Erol, İ., Çifci, C., Yan Dalda Flor ve Keton İçeren Metakrilat Monomerlerinin Kopolimerizasyon Davranışlarının İncelenmesi, 22. Ulusal kimya Kongresi, 6-10 Ekim 2008, Mogosa.

C3. **Şen, Ö.**, Şahin, A., Gezer, E., Yurt, M., İsnaç, B., Tüfekçi, A.R., Demirtaş, İ., *Centaurea solstitialis* subsp. *solstitialis* bitkisinin antiproliferatif aktivitelerinin incelenmesi ve fitokimyasal analizi, 25. Ulusal Kimya Kongresi, 27 Haziran – 2 Temmuz 2011, Erzurum.

C4. **Şen, Ö.**, İsnaç, B., Gezer, E., Yurt, M., Genç, N., *Centeurea solstitialis* subsp. *solstitialis* Bitkisinin Yaprak ve Çiçek Kısmı Ekstraktlarının Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi, 25. Ulusal Kimya Kongresi, 27 Haziran – 2 Temmuz 2011, Erzurum.

C5. **Şen, Ö.**, Elmastaş, M., Meral, B., Genç, N., Erenler, R., *Centeurea solstitialis* subsp. *solstitialis* Bitkisinin Yaprak ve Çiçek Kısmı Ekstraktları Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi ve Etkili Bileşiklerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Kromatografi Kongresi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi 6-9 Haziran 2012, Tokat.

C6. Şen,Ö., Erenler, R., Akşit, H., Demirtaş, İ., Çadır (*Ferula communis*) Bitkisinin Sekonder Metabolitlerinin İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi ve Etkili Bileşiklerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Kromatografi Kongresi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi 6-9 Haziran 2012, Tokat.

C7. Aslan, R., Erenler, R., Akşit, H., **Şen, Ö.,** Genç, N., *Salvia Aethiopis* Bitkisindeki Uçucu Yağ Bileşenleri. Kromatografi Kongresi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi 6-9 Haziran 2012, Tokat.

C8. Erenler, R., Akşit, H., **Şen, Ö.,** Gönül, N., Seymen, M., *Falcaria Vulgaris* Bitkisindeki Uçucu Yağ Bileşenleri. Kromatografi Kongresi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi 6-9 Haziran 2012, Tokat.

C9. Yılmaz, S., Erenler, R., Akşit, H., **Şen, Ö.,** Demir, A., Demirtaş, İ., *Echinops orientalis Trautv.* Bitkisindeki Sekonder Metabolitlerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu., Kromatografi Kongresi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi 6-9 Haziran 2012, Tokat.

C10. Şen, Ö., Kahraman, Z., Ağıl, T.A., Özel, E., Akşit, H., Telci, İ., Erenler, R., Türkiye’de Kültürü Yapılan Bazı Origanum Türlerinin Uçucu Yağ Bileşenlerinin GC-MS ile Belirlenerek Karşılaştırılması. Kromatografi Kongresi, Uludağ Üniversitesi 19-22 Haziran 2013, Bursa.

C11. İsnaç, B., Elmastaş, M., Genç, N., Akşit, H., **Şen, Ö.,** Demirtaş, İ., Erenler, R., *Teucrium chamaedrys* L. Subsp. *chamaedrys* Bitkisinden Diterpenoid Bileşiklerinin İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Kromatografi Kongresi, Uludağ Üniversitesi 19-22 Haziran 2013, Bursa.

C12. Çelik, S.M., Erdoğan, T., Elmastaş, M., Akşit, H., Erenler, R., Telci, İ., **Şen, Ö.,** Albayrak, A.,İ., *Mentha dumetorum* Bitkisinden Bazı Sekonder Metabolitlerinin Saflaştırılması veYapılarının Aydınlatılması. Kromatografi Kongresi, Uludağ Üniversitesi 19-22 Haziran 2013, Bursa.

C13. *Origanum majorana* L. Bitkisinden Bazı Sekonder Metabolitlerinin İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Erenler, R., **Şen, Ö.**, Telci, İ., Kromatografi Kongresi, Uludağ Üniversitesi 19-22 Haziran 2013, Bursa.

C.14. Güzel, A., **Şen, Ö.**, Şanda, A.M., Elmastaş, M., *Sphaerophysa kotschana* Boiss. (*Fabacea*) Bitkisinin Vitamin A ve Vitamin E İçeriğinin Belirlenmesi I. Organik Kimya Kongresi, Sakarya Üniversitesi 25-29 Ekim 2013, Sakarya.

KAYNAKLAR

- Abbasi, A.M., Khan, M.A., Ahmad, M., Zafar, M., Khan, H., Muhammad, N. and Sultana, S., 2009. Medicinal plants used for the treatment of jaundice and hepatitis based on socio-economic documentation. *African Journal of Biotechnology*, 8 (8), 1643-1650.
- Abdel-Massih, R. M., Fares, R., Bazzi, S., El-Chami, N., Baydoun, E., 2010. The apoptotic and anti-proliferative activity of *Origanum majorana* extracts on human leukemic cell line. *Leuk Res*, 34(8), 1052-1056.
- Afsharypuor, S., Ebrahim, S., Erfan, M., 1997. Volatile constituents of *Origanum vulgare* ssp. *Viride* (Syn. *O. heracleoticum*) from Iran. *Planta Medica* 63, 179-180.
- Akgul, A., Bayrak, A., 1987. Constituents of essential oils from *Origanum* species growing wild in Turkey. *Planta Medica* 53 (4), 114.
- Al-Howiriny, T., Alsheikh, A., Alqasoumi, S., Al-Yahya, M., ElTahir, K., Rafatullah, S., 2009. Protective Effect of *Origanum majorana* L. 'Marjoram' on various models of gastric mucosal injury in rats. *Am J Chin Med*, 37(3), 531-545.
- Ames, S. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. 1993. Oxidants, antioxidants and degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 17, 7915–7922.
- Antonescu, V., Sommer, L., Predescu, I., Barza, P., 1982. Physicochemical study of flavonoids from *Origanum vulgare*. *Farmacia*, 30, 201-208.
- Aruoma, O. I., Spencer, J. P. E., Warre, D., Jenner, P., Butler, J., Halliwell, B., 1997. Characterization of food antioxidants, illustrated using commercial garlic and ginger preparations. *Food Chemistry*, 60: 149-156.
- Assaf, M. H., Ali, A. A., Makboul, M. A., Beck, J. P., Anton, R., 1987. Preliminary study of phenolic glycosides from *Origanum majorana*; quantitative estimation of arbutin; cytotoxic activity of hydroquinone. *Planta Med*, 53(4), 343-345.
- Baloglu, E., 2001. *Synthesis and biological evaluation of paclitaxel analogs*. Blacksburg Virginia: Doctor of Philosophy in Chemistry (PhD Thesis).
- Barış, A., 2007. Farklı Tipteki Pestisitlerin Muhtemel Mutajenitelerinin Ames/Salmonella/Mikrozom Test Yöntemiyle Araştırılması. Y. Lisans Tezi,

Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon.

- Baricevic, D., 1996. Experiences with *Oregano* (*Origanum* spp.) in Slovenia, Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, CIHEAM, 111-121, Valenzano (Bari).
- Barros, L., Ferreira, M.J., Queiro, B. Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., 2007. Total Phenols, Ascorbic Acid, β -carotene and Lycopene in Portuguese Wild Edible Mushrooms and Their Antioxidant Activities. Food Chemistry, 103, 413–419.
- Baser, K.H.C., 1978. The Turkish *Origanum* Species. In: Kintzios SE. *Oregano*; The Genera *Origanum* And *Lippia*. 109-126, London and New York.
- Baser, K.H.C., 2008. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol earring essential oils. Curr. Pharm. Design., 14, 3106-3119.
- Baytop, A., 1991. Farmasotik Botanik Ders Kitabı. İstanbul Eczacılık Fakültesi Yayınları, No: 3687, İstanbul.
- Baytop, T., 1999. Türkiyede Bitkilerle Tedavi, Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul.
- Baytop, T., 2000. Anadolu Dağlarında 50 Yıl “Bir Bitki Avcısının Gözlemleri”. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.
- Ben Sghaier, M., Skandrani, I., Nasr, N., Franca, M. G., Chekir-Ghedira, L., Ghedira, K., 2011. Flavonoids and sesquiterpenes from *Tecurium ramosissimum* promote antiproliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: a structure-activity relationship study. Environ Toxicol Pharmacol, 32(3), 336-348.
- Bozkurt, A., 2000. Antineoplastik ilaçlar, Farmakoloji Ders Kitabı (içinde), T. A.Bökesoy, Ç. Çakıcı, M. Melli (Eds.), Gazi Kitabevi, Ankara, 625–640.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutrition Reviews 56(11), 317-333.
- Brieva, A., Guerrero, A., Pivel, J.P., 2001. Biochemical and pharmacological mechanism related to the activity of *Cryptomphalus aspersa* (SCA) (Endocare) in radiodermatitis, Dermatol Cosmet., 11(2), 71-75.
- Calabresi, P. and B.A. Chabner, 1996. Chemotherapy of neoplastic diseases. In: Goodman and Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9 Ed. th(Hardman, J.G., Limbird, L.E. Eds.). McGraw-Hill, New York, pp: 1225-1285
- Chadefaud, M., Emberger, L., 1960. Traite De Botanique (Systematique). Tome II, 832-833s.
- Ceylan, A., 1983. Tıbbi Bitkiler-II (Uçucu Yag Bitkileri). Ege Üniversitesi, Ziraat

Fakültesi Yayını No: 481, 306, İzmir.

- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., Chern, J.C., 2002. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis By Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10, 3, 178-182.
- Chung, Y.K., Heo, H.J., Kim, E.K., Kim, H.K., Huh, T.L., Lim, Y., Kim, S.K., Shin, D.H., 2001. Inhibitory effect of ursolic acid purified from *Origanum majorana* L. on the acetylcholinesterase. *Mol. Cells*, 11, 137-143.
- Chiej, R., 1984. The Macdonald Encyclopedia of Medicinal Plants. Macdonald Co. Ltd, London, pp. 212–297
- Clayson, D. B., 2001. Toxicological Carcinogenesis, Lewis Publishers, Florida, 113–114.
- Cotran, R. S., Kumar, V., Collins, T., 1999. Robbins Pathologic Basis of Disease, 6. Edition, W. B. Saunders Company, USA, 4, 330.
- Çapanoğlu, G. E., Toydemir, O. G., Boyacıoğlu, D. Flavonoidlerin biyoyararlılığını etkileyen faktörler. *Derleme / Review GIDA* 2010; 35 (5): 387-394.
- Das, N. P., & Pereira, T.A., 1990. Effect of flavonoids on thermal autoxidation of palm oil structure-activity relationships. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67, 255-258.
- Davis., P.H., 1982. Flora of Turkey and East Aegean Island Vo:7. 349-382 p, Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Davis., P.H., 1988. Flora of Turkey and East Aegean Island Vo:7. 948 p, Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Davis, S.C. and Perez, R., 2009. Cosmeceuticals and natural products: wound healing. *Clinics in Dermatology*, 27, 502-506.
- Deighton, N., Brennan, R., Finn, C., Davies, H.V., 2000. Antioxidant Properties of Domesticated and Wild Rubus Species. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 80, 1307-1313.
- De Pascual-Teresa, S., Sanchez-Moreno, C., Granado, E., Olmedilla, B., De Ancos, B., Cano, M. P., 2007. Short and mid-term bioavailability of flavanones from oranges in humans. *Current Topics in Nutraceutical Research*, 5(2-3), 129-134.
- Dinis, T.C.P., Maderia, V.M.C. and Almeida, L. M., 1994. Action of Phenolic Derivates (Acetaminophen, Salicylate, and 5-Aminosalicylate) As Inhibitors of Membrane

- Lipid Peroxidation and As Peroxyl Radical Scavengers. Archives of Biochemistry and Biophysics, 315, 161-169.
- Di Matteo, V. and Esposito, E., 2003, Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord, 2, 95–107.
- DOBROSSY, L., 2002, Cancer mortality in central-eastern Europe: facts behind the figures. Lancet Oncol, 3(6), 374-381.
- Dülger, B., Ceylan M., Alitsaous M., Ugurlu E.,1999. “*Artemisia absinthium* L. (*Pelin*)’un Antimikrobiyal Aktivitesi” Tr. J.of Biology, 3, 377-384.
- El-Ashmawy, I. M., Saleh, A., Salama, O. M., 2007. Effects of *marjoram* volatile oil and grape seed extract on ethanol toxicity in male rats. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 101(5), 320-327.
- El-Desouky, S. K., Ibrahim, L. F., Kawashty, S. A., El-Ansari, M. A., Kim, Y. S., Chong, H. S., Kim, O. K., Kim, Y. K., 2009. Phytochemical Constituents and Biological Activities of *Origanum syriacum*. Zeitschrift Fur Naturforschung Section B-a Journal of Chemical Sciences, 64(4), 447-451.
- El-Nakeb, M.A., Fathy., S.M.F., Salama, O.M.A., 2006. GC/MS analysis, biostatic activities and biocidal dynamics of the essential oil of *Origanum majorana* cultivated in Egypt. J. Pharm. Sci., 20, 150-156.
- Erlund, I., Freese, R., Marniemi, J., Hakala, P., Alfthan, G., 2006. Bioavailability of quercetin from berries and the diet. Nutr Cancer, 54(1), 13-17.
- Evans, W. C., 1989. Trease And Evans’ Pharmacognosy, 13. ed. Oxford, The Alden Press, 217.
- Evans, W.C., 2002. Trease and Evans’ Pharmacognos., 15. ed. Edinburgh, W B Saunders, pp. 369-370, 401.
- Firmin, J.L., Wilson, K.E., Rossen, L., Johnston, A.W.B., 1986. Flavonoid activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plants. Nature 324, 90-92
- Franks, L. M., Teich, N. M., 1996. Cellular and Molecular Biology of Cancer, 3.Edition, Oxford University Press, New York, USA, 2–4, 21–25.
- Gerber, M., Boutron-Ruault, M. C., Hercberg, S., Riboli, E., Scalbert, A. and Siess, M. H. 2002. Food and cancer: State of the art about the protective effect of fruitsand vegetables. Bulletin du Cancer, 89, 293–312.

- Gordon, M.H., 2001. The Development of Oxidative Rancidity in Foods, In: Antioxidants in Food, Practical Applications, Pokonory, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (Eds), Woodhead Publishing Limited Cambridge, 17.
- Greuter, W. (ed), 1988. International Code of Botanical Nomenclature. Koetz Scientific Books, D. 2640, Königstein, Germany.
- Guarrera, P.M., 2005. Traditional phytotherapy in central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium). *Fitoterapia*, 76, 1-25.
- Guner, A., Ozhatay, N., Ekim, T. and Baser, K.H.C., 2000. Flora of Turkey and the East Aegean Islands Vol. 11 (supplement-II), Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Gunther, E., 1949. The Essential Oils, Vol. 3, 535. Van Nostrand Co, New York.
- Gupte, A., Buolamwini, K. J. 2008. Synthesis and biological evaluation of phloridzin analogs as human concentrative nucleoside transporter 3 (hCNT3) inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19, 917–921.
- Gülçin, İ., 2006a. Antioxidant and antiradical activities of L-Carnitine, *Life Sciences*, 78, 803-811.
- Gülçin, İ., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R., 2006b. Antioxidant activity of a triterpenoid glycoside isolated from the berries of *Hedera colchica*: 3-O-(β -D-glucopyranosyl)-hederagenin, *Phytotherapy Research*, 20, 130-134.
- Gülçin, İ., 2007. Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa, *Amino acids*, 32, 431-438.
- Gulluce, M., Karadayi, M., Guvenalp, Z., Ozbek, H., Arasoglu, T., Baris, O., 2012. Isolation of some active compounds from *Origanum vulgare* L. ssp *vulgare* and determination of their genotoxic potentials. *Food Chemistry*, 130(2), 248-253.
- Hagerman, A. E., Riedl, K. M., Jones, G. A., Sovik, K. N., Ritchard, N. T., Hartzfeld, P.W. & Riechel, T.L. 1998. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1887-1892.
- Hajdok, S., Conrad, J., Beifuss, U., 2012. Laccase-catalyzed domino reactions between hydroquinones and cyclic 1,3-dicarbonyls for the regioselective synthesis of substituted p-benzoquinones. *J Org Chem*, 77(1), 445-459.
- Halim, A.F., Mashaly, M.M., Zaghloul, A.M., Abdel-Fattah, H., De Potter, H.L., 1991. Chemical constituents of the essential oils of *Origanum syriacum* and *Stachys*

- aegyptiaca*. International Journal of Pharmacognosy 29 (1), 1–5.
- Harborne, J.B., Mabry, T.J., Mabry, H., 1975. The Flavonoids. Chapman and Hall, London
- Harborne, J.B., Mabry, T.J. (Eds.), 1982. The Flavonoids: Advances in Research, Vols. 1–2, Chapman and Hall, London.
- Harvala, C., Menounos, P., Argyriadou, N., 1987. Essential oil from *Origanum dictamnus*. Planta Medica 53 (4), 107–109.
- Harvey, A.L., 2008. Natural products in drug discovery, Drug Discov Today, 13(19-20), 894-901.
- Hasani-Ranjbar, S., Nayebi, N., Larijani, B. and Abdollahi, M., 2009. A systematic review of the efficacy and safety of herbal medicines used in the treatment of obesity. World Journal of Gastroenterology, 15 (25), 3073-3085.
- Hedge, I.C., 1986. Lamiaceae of South-West Asia: Diversity, Distribution and Endemism.
- Heo, H. J., Cho, H. Y., Hong, B., Kim, H. K., Heo, T. R., Kim, E. K., Kim, S. K., Kim, C. J., Shin, D. H., 2002. Ursolic acid of *Origanum majorana* L. reduces Abeta-induced oxidative injury. Mol Cells, 13(1), 5-11.
- Hikino, H. and Y. Kiso. 1988. Natural products for liver diseases in Economics and Medicinal Plants Research. Vo. 2nd ed. H. Wagner, H. Hikino and N.R. Farnsworth Wagner, Academic Press.
- Hoareau, L. and Da Silva, E.J., 1999. Medicinal plants: a re-emerging health aid. EJB Electronic Journal of Biotechnology, 2 (2), 56-70.
- Huxley, A., 1992, The New Dictionary of Gardening. Macmillan Press.
- Jang, Y. S., Yang, Y. C., Choi, D. S., Ahn, Y. J., 2005. Vapor phase toxicity of marjoram oil compounds and their related monoterpenoids to *Blattella germanica* (Orthoptera: Blattellidae). J Agric Food Chem, 53(20), 7892-7898.
- Jeney, E., Uri, J., 1954. Pharmacological effect of flavone dyes. Pharmazie, 9(7), 533-546.
- Karakaya, S., El, S.N., 1997. Flavonoidler ve sağlık. Beslenme ve Diyet Dergisi 26(2), 54-60.
- Karkabounas, S., Kostoula, O. K., Daskalou, T., Veltsistas, P., Karamouzis, M., Zelovitis, I., Metsios, A., Lekkas, P., Evangelou, A. M., Kotsis, N., Skoufos, I., 2006. Anticarcinogenic and antiplatelet effects of carvacrol. Exp Oncol, 28(2), 121-125.
- Karp, G., 2005. Cell and Molecular Biology Concepts and Experiments, 4. Edition, JohnWiley & Sons, USA, 669.
- Kayaalp SO. 1998. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 8. ed.

- Ankara:Hacettepe Taş Kitapçılık; pp. 1051-1052.
- Kim, B.J., Kim, J.H., Kim, H.P., Heo, M.Y., 1997. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (II): antioxidative activity and free radical scavenging activity, *Int. J. Cosmetic Sci.*, 19, 299-307.
- Klug, W. S., Cummings, M. R., 2002.Genetik, 6. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, 24,28, 635–651.
- Kokkini, S., 1996. Taxonomy, diversity and distribution of *Origanum* species
Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, CIHEAM, 12, Valenzano (Bari).
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, , S. M., Binkoski, A. E.,Hilpert, K. F., Griel, A. E., & Etherton, T. D. 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine*, 113(Suppl 9B), 71–88.
- Lagouri, V., Bantouna, A., Stathopoulos, P., 2010. A Comparison of the Antioxidant Activity and Phenolic Content of Nonpolar and Polar Extracts Obtained from Four Endemic Lamiaceae Species Grown in Greece. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34 (5), 872-886.
- Lapornik, B., Prosček, M., & Wondra, A.G. 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time, *Journal of Food Engineering*, 71, 214–222.
- Leeja, L., Thoppil, J. E., 2007. Antimicrobial activity of methanol extract of *Origanum majorana* L. (*Sweet marjoram*). *J Environ Biol*, 28(1), 145-146.
- Livolsi, V. A., Merino, M. J., Brooks, J. S. J., Saul, S. H., Tomaszewski, J. E., 1992. *Patoloji*, 2. Baskı, Saray Tıp Kitabevleri, İzmir, 33, 35, 36.
- Lu, Y., Foo, Y. L. 2000. Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*, 55, 263-267.
- Lukas, B., Schmiderer, C., Franz, C., Novak, J., 2009. Composition of essential oil compounds from different Syrian populations of *Origanum syriacum* L. (*Lamiaceae*). *J Agric Food Chem*, 57(4), 1362-1365.
- Lukas, B., Schmiderer, C., Mitteregger, U., Novak, J., 2010. Arbutin in *marjoram* and *oregano*. *Food Chemistry* 121, 185–190
- Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B., 1970. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin.
- Magalhães, L.M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J.F.L.C., 2008. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties, *Anal. Chim. Acta*,

613, 1-19.

- Mahindru, S. N., 1992. Indian Plant Perfumes, Metropolitan Phototype Settera Printers Ltd. India.
- Mainardi, T., Kapoor, S. and Bielory, L., 2009. Complementary and alternative medicine: Herbs, phytochemicals and vitamins and their immunologic effects. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 123 (2), 283-294.
- Marais, J.P.J., Deavours, B., Dixon, R.A., Ferreira, D., 2006. Stereochemistry of flavonoids. *Sci. Flavonoids*. 1:1.
- Matsuda, H., Hirata, N., Kawaguchi, Y., Naruto, S., Takata, T., Oyama, M., Iinuma, M., Kubo, M., 2006. Melanogenesis stimulation in murine B16 melanoma cells by kava (*Piper methysticum*) rhizome extract and kavalactones, *Biol. Pharm. Bull.*, 29(4), 834-837.
- Meyer, A.S., Heinonen, M., Frankel, E. N. 1998. Antioxidant interactions of Catechin, Cyanidain, Caffeic acid, Quarsetin and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chemistry*, 61, 71-75.
- Mihalik, E., 1992. Histological Detection of Sudanophilic Lipids in Some Lamiaceae. *Acta Horticulturae*, 306, 259-267.
- Miller, D.D., 1996. Mineral. *Food Chemistry*, Fennema, O.R. (Ed.), Dekker: New York, 618-649.
- Moroney, M. A., Alcaraz, M. J., Forder, R. A., Carey, F., Hoult, J. R., 1988. Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. *J Pharm Pharmacol*, 40(11), 787-792.
- Motamed, S.M, Naghibi, F., 2009 Antioxidant activity of some edible plants of the Turkmen Sahra region in northern Iran. *Food Chem*; 119, 1637-1642.
- Nakatani, 1992. N. Natural Antioxidants from Spices. *ACS Symp. Ser.*, 507, 72–86.
- Nam, N.H., Kim, Y., You, Y.J., Hong, D.H., Kim H.M., and Ahn, B.Z. 2004. New constituents from *Crinum latifolium* with inhibitory effects against tube-like formation of human umbilical venous endothelial cells. *Natural product research* 18, 485-491.
- Ndhlala, A. R., Kasiyamhuru, A., Mupure, C., Chitindingu, K., Benhura, M. A., Muchuweti, M., 2007. Phenolic composition of *Flacourtia indica*, *Opuntia megacantha* and *Sclerocarya birrea*. *Food Chemistry*, 103(1), 82-87

- Nunez, R.D., De Castro, C.O., 1992. Palaeoethnobotany and Archaeobotany of The Lamiaceae in Europa and The Near East. *Advances in Labiatae Science*, 437-454.
- Oflaz, S., Kürkçüoğlu, M., Başer, K.H.C., 2002. *Origanum onites* ve *Origanum vulgare* subsp. *Hirtum* üzerinde farmakognozik araştırmalar. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı. Eskişehir.
- Ogata, M., Hoshi, M., Shimotohno, K., Urano, S., Endo, T., 1997. Antioxidant activity of magnolol, honokiol and related phenolic compounds. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74, 557-568.
- Olivier G. W., 1996. The world market of Oregano, *Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano* (ed: S. Padulosi), International Plant Genetic Resources Institute, Ciheam-Valenzano, 8–12 May 1996, Bari, Italy, 142-6.
- Orhan, I., Kartal, M., Kan, Y., Sener, B., 2008. Activity of essential oils and individual components against acetyl- and butyrylcholinesterase. *Z Naturforsch C*, 63(7-8), 547-553.
- Özdemir, C., Şenel, G., 1999. *Salvia sclarea* L.'nin Morfolojik, Anatomik ve Karyolojik Özellikleri. *Tr. J. of Botany*, 23, 7-18.
- Morgaris, N., Koedam, A., Vokou, D., 1982. *Aromatic Plants*. Martinius Nijhoff Publisher, Vol:7, London, 265-269s.
- Özörgücü, B., Gemici, Y., Türkan, İ., 1991. *Karşılaştırmalı Bitki Anatomisi*. Ege Üniversitesi Yayınları, İzmir.
- Papas, A. M., 1996. Determinants of antioxidant status in humans. *Lipids*, 31, 77–82.
- Pavela, R., 2004. Insecticidal activity of certain medicinal plants. *Fitoterapia*, 75(7-8), 745-749.
- Pavela, R., 2005. Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. *Fitoterapia*, 76(7-8), 691-696.
- Penso, G., 1983. *Index Plantarum Medicinalium Totius Mundi Eorumque Synonymorum*, Milano.
- Plumb, G.W., Price, K. R., & Williamson, G. 1999. Antioxidant properties of flavonol glycosides from green beans. *Redox Report*, 4, 123-127.
- Prieto, P., Pineda, M. Aguilar, M., 1999. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity Through The Formation of a Phosphomolybdenum Complex. *Anal. Biochem.*, 269, 337-341.

- Prior, R.L. and Cao, G., 1999. In vivo total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods, *Free Radical Bio. Med.*, 27, 1173-1181.
- Rates, S.M.K., 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39, 603-613.
- Ravid, U., Putievsky, E., 1983. Essential oils of *Majorana syriaca*, *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* plants growing wild in Israel. *Planta Medica* 49, 248–249.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C.A., 1999. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- Richardson, P.M., 1992. The Chemistry of The Lamiaceae: An Introduction and Overview. *Advances in Labiatae Science*, 291-297.
- Robbins, R.C., 1973. Physiological effects of plant flavonoids. *J. Chem. Pharm.* 4, 271.
- Rossi, M., Lugo, A., Lagiou, P., Zucchetto, A., Polesel, J., Serraino, D., Negri, E., Trichopoulos, D., La Vecchia, C., 2012. Proanthocyanidins and other flavonoids in relation to pancreatic cancer: a case-control study in Italy. *Ann Oncol*, 23(6), 1488-1493.
- Salah, S. M., Jager, A. K., 2005. Screening of traditionally used Lebanese herbs for neurological activities. *J Ethnopharmacol*, 97(1), 145-149.
- Samy, R. P., Gopalakrishnakone, P., Ignacimuthu, S., 2006. Anti-tumor promoting potential of luteolin against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in rats. *Chem Biol Interact*, 164(1-2), 1-14.
- Sarer, E., Scheffler, J., Baerheim, S., 1982. Monoterpenes of the essential oil of *Origanum majorana*. *Planta Medica*, 46, 236–239.
- Seelinger, G., Merfort, I., Schempp, C. M., 2008. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin. *Planta Med*, 74(14), 1667-1677.
- Sendra, J.M., Cunat, P., 1980. Volatile constituents of Spanish *Origanum (Coriandorhymus capitatis)* essential oil. *Phytochemistry* 19, 89–92 and 1513–1517.
- Serafini, M., Bellocco, R., Wolk, A., Ekstrom, A. M. 2002. Total antioxidant potential of fruit and vegetables and risk of gastric cancer. *Gastroenterology*, 123, 985–991.
- Serafini, M., Villano, D., Spera, G., Pellegrini, N., 2006. Redox molecules and cancer prevention: the importance of understanding the role of the antioxidant network. *Nutr Cancer*, 56(2), 232-240.
- Slinkard, K., ve Singleton, V. L., 1977. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manuel Methods, *Am. J. Enol. Viticult*, 28, 49-55.

- Schmidt, E., Bail, S., Buschbauer, G., Stoilova, I., Krastanov, A., Stoyanova, A., Jirovetz, L., 2008. Chemical composition, olfactory evaluation and antioxidant effects of the essential oil of *Origanum majorana* L. from Albania. *Nat. Prod. Commun.*, 3, 1051-1056.
- Shukla, Y. and Singh, M., 2007. Cancer preventive properties of ginger: A brief review. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 683-690.
- Smith, D.A., Banks, S.W., 1986. Plant flavonoids in Biology and medicine: Biochemical, pharmacological and structureactivityrelationships. Eds. V. Cody, E. Middleton and J. Harborne, New York, 113–124.
- Skoula, M. and Kamenopoulos, S. 1996, *Origanum dictamnus* L., *Origanum vulgare* spp. *hirtum*. Link Ietswaart: Traditional uses and production in Greece, Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, International Plant Genetic Resources Institute, Ciheam-Valenzano, 8–12 May 1996, Bari, Italy, 26–32 .
- Stiles, J. C., Sparks, W. and Ronzio, R. A. 1995. The inhibition of *Candida albicans* by *oregano*. *J Applied Nutr* 47, 96–102.
- Souza, N. A. B., Lima, E. O., Guedes, D. N., Pereira, F. O., Souza, E. L., Sousa, F. B., 2010. Efficacy of *Origanum* essential oils for inhibition of potentially pathogenic fungi. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46 499-508.
- Şener, B. ve Toker, G. 1986. Flavonoitlerin Eczacılık Yönünden Önemi. *Mar. Üniv. Ecz. Der.*, 2(2), 169-183.
- Tadeg, H., Mohammed, E., Asres, K., Mariam, T. G., 2005, Antimicrobial activities of Some Selected Traditional Ethiopian Medicinal Plants Used on The Treatment of Skin Disorders, *J.of Ethnopharmacol.*, 1, 168-175.
- Tanaka, M., Kuei, C.W., Nagashima, Y., and Taguchi, T., 1988. Application of antioxidative maillard reaction products from histidine and glucose to sardine products, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54, 1409-1414.
- Tanker, N., Koyuncu, M., Coşkun, M., 1998. *Farmasötik Botanik*, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 343.
- Taylor, L.P, Grotewold, E., 2005. Flavonoids as developmental regulators. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 317–323.
- Tognolini, M., Barocelli, E., Ballabeni, V., Bruni, R., Bianchi, A., Chiavarini, M., Impicciatore, M., 2006. Comparative screening of plant essential oils:

- phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity. *Life Sci*, 78(13), 1419-1432
- Tomas-Barberan, F.A., Gil, M.I., 1992. Chemistry and Natural Distribution of Flavonoids in The Lamiaceae. *Advances in Labiatae Science*, 299-305.
- Tsao, R., and Yang, R., 2003. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: Towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography. J. Chromatogr. A*. 1018, 29-40.
- Van Den Broucke C.O., Lemli J.A., 1980. Antispasmodic activity of *Origanum compactum*. *Planta Med.* 38, 317-331.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., and Oomah, B.D., 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4113-4117.
- Verpoorte R., Van Der Heijden R., Ten Hoopen H. J. G., Memelink J.1999. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnology Letters* 21, 467–479.
- Viskupicva, J., Ondrejovic, M., Sturdik, E., 2008. Bioavailability and metabolism of flavonoids. *Journal of Food and Nutrition Research*, 47(4), 151-162.
- Vogel, J.R., Beer, B., Clody, D.E., 1971. A simple and reliable conflict procedure for testing antianxiety agents. *Psychopharmacology* 21, 1–7.
- Vokou, D. Kokkini, S. and Bassiere, J. M., 1993. Geographic variation of Greek *oregano* (*Origanum vulgare* spp. *hirtum*). *Biochem. Syst. Ecol.*, 21 (2), 287-295.
- Von Gadow A., Joubert E., Hansmann C.F., 1997. Comparison of the antioxidant activity of Aspalathin with that of other plant phenols of Rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -Tocopherol, BHT, and BHA. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 632–638.
- Wagner, H., 1989. Search for new plant constituents with potential antiphlogistic and antiallergic activity. *Pluntu. Med.*, 55-235.
- Wagner, H., Elbl, G., Lotter, H., Guinea, M., 1991. Evaluation of natural products as inhibitors of agiotensin I-converting enzyme (ACE) *Pharm. Pharmacol.*, 1-15
- Wang, W., Zhao, Y., Rayburn, E.R., Hill, D.L., Wang, H., Zhang, R., 2007. In vitro anti-cancer activity and structure-activity relationships of natural products isolated from fruits of *Panax ginseng*, *Cancer Chemother Pharmacol*, 59, 589-221

- Watson, L., Dallwitz, M.T., 1978. The Families of Flowering Plants. Oxford University Press, London
- Wawer, I. and Zielinska, A., 2001. C-13 CP/MAS NMR studies of flavonoids. *Magn. Reson. Chem.*, 39, 374-380
- Weisburger, E. K., 1994. General principles of chemical carcinogenesis, *Carcinogenesis*(içinde), Raven Press, New York, 2, 3.
- Wen, P., Han, H., Wang, R., Wang, N., Yao, X. 2007. C-glycosylfavones and aromatic glycosides from *Campylotropis hirtella*. *Asian Journal of Traditional Medicines*, 2, 4.
- Wiedenfeld, H., Zynch, M., Buchwald, W. and Furmanowa, M. 2007. New compounds from *Rhodiola kirilowii*. *Scientia Pharmaceutica*, 75, 29–34.
- Yamaguchi, F., Yoshimura, Y., Nakazawa, H., & ariga, T. 1999. Free radical scavenging activity of grape seed extract and antioxidants by electron spin resonance spectrometry in an H₂O₂/NaOH/DMSO system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2544-2548.
- Yazici, B., Ayvaz, A. T., Aker, S., 2009. Pyogenic granuloma of the lacrimal sac. *Int Ophthalmol*, 29(1), 57-60.
- Yen, G.C., and Duh, P.D., 1993. Antioxidative properties of methanolic extracts from peanut hulls, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70, 383-386.
- Yen, G.C., Duh, P.D., and Tsai, C.L., 1993. Relationship between antioxidant activity and maturity of peanut hulls, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 67-70.
- Yener, N., 2006. *Kemoterapi Uygulayan Hemşirelerin Bilgi Düzeylerinin Kemoterapi Alan Hastaların Hemşirelik Bakımından Memnuniyet Düzeylerine Etkisi* (Y. Lisans Tezi), Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir.
- Yıldırım, S., 2009. *Kemoterapi Alan Hastalarda Kemoterapiye Bağlı Yan Etkilerin Beslenme Eğitimi Öncesi ve Sonrası Değerlendirilmesi* (Y. Lisans Tezi), Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Zonguldak
- Zahran, M.M., Aboul-Enein, A.M. and Abol-Ella, F.M., 2005 “Molecular Changes on Cancer Cells as Affected by Willow Extracts” *Res. J. Agric. Biol. Sci.*, 1(3), 284-287.
- Zaprometov, M.N., 1962. On the mechanism of biosynthesis of catechols. *Biokhimiia*.

27, 366–377.

Zhang, Y. H. 1999. Theoretical methods used in elucidation activity differences of phenolic antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76, 745-748.