



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



***LINUM ARBOREUM ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ÇALIŞMALAR***

**Zaher SULTAN**

**FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Belma KONUKLUGİL**

**ANKARA**

**2020**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***LINUM ARBOREUM* ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ÇALIŞMALAR**

**Zaher SULTAN**

**FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Belma KONUKLUGİL**

**ANKARA**

**2020**

## ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “*LINUM ARBOREUM ÜZERİNDE FARMAKOĞNOZİK ÇALIŞMALAR*” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezitimüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Zaher SULTAN

Tarih:

İmza:

## KABUL ve ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**Farmakognozi** Anabilim Dalında

**Zaher Sultan** tarafından hazırlanan

“**LINUM ARBOREUM ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ÇALIŞMALAR**” adlı  
tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ/  
OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

Prof. Dr. Belma Konuklugil  
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Prof. Dr. Levent Altun  
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Prof. Dr. Didem Deliorman Orhan  
Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

# İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	i
Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	vii
Çizelgeler	viii
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Linaceae Familyası ve Özellikleri	2
1.2. <i>Linum</i> Cinsi ve Özellikleri	2
1.3. Türkiye’de Yetişen <i>Linum</i> Türleri	3
1.4. <i>Linum arboreum</i> L.	4
1.5. Lignanlar	5
1.6. Ariltetralin Lakton Lignan	7
1.7. Podofilotoksin (Podophyllotoxin) (PTOX)	8
1.8. Podofilotoksin Biyosentezi	9
1.9. <i>Linum arboreum</i> cinsine Ait Sekonder Metabolit	12
1.10. Bitkilerin Antioksidan Aktiviteleri	12
1.11. Doğal Antikanser Bileşikler	13
1.12. Bitkilerin Antimikrobiyal Aktiviteleri	14
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>16</b>
2.1. Bitkinin Toplanması	16
2.2. Ekstre Hazırlanması	16
2.3. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon	16
2.4. Toplam Fenol İçeriğinin Belirlenmesi (Folin-Ciocalteu Total Fenol)	17
2.5. Toplam Flavonoit İçeriğinin Belirlenmesi	18
2.6. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite	18
2.7. Alkalın DMSO Yöntemiyle Süperoksit Radikal Süpürücü Aktivitesinin Tayini (SO)	19
2.8. Nitrik Oksit Radikal Süpürücü Aktivitesinin Tayini (NO)	19
2.9. Sitotoksitate Aktivitesi (MTT testi)	20

2.10. Antimikrobiyal Aktivite	20
2.11. HPLC Analizleri	21
2.12. Podofilotoksin ve Pikropodofilotoksin Miktar Tayini	21
2.13. HPLC Metodunun Validasyonu	22
2.14. Doğrusallık (Accuracy)	22
2.15. Gözlenebilme Sınırı (LOD)	23
2.16. Tayin Sınırı (LOQ)	23
2.17. Geri Kazanım (Recovery)	23
2.18. Kesinlik Tayini (Precision)	24
2.19. Seçicilik/Seçimlilik (Specifity/ Selectivity)	24
2.20. İstatistiksel Analiz	25
<b>3. BULGULAR</b>	26
3.1. Ekstraksiyon Sonuçları	26
3.2. Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit Sonuçları	26
3.3. Biyoaktivite Sonuçları	29
3.4. HPLC Analiz Sonuçları	32
<b>4. TARTIŞMA</b>	38
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	40
<b>ÖZET</b>	41
<b>SUMMARY</b>	42
<b>KAYNAKLAR</b>	43
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	48

## ÖNSÖZ

*Linum* cinsi dünyada 200'den fazla tür içermekte olup, ülkemizde 43 tür ile temsil edilmektedir. *Linum* türleri, ariltetralin lignan, flavonolignanlar ve arilnaftalen lignanlar gibi sekonder metabolit içerdikleri için önem taşımaktadır.

Bu çalışmanın konusu olan *Linum arboreum* L. dünya üzerinde yayılışı kısıtlıdır. Yunanistan'da Girit ve Karpathos adasında, ülkemizde de sadece Dağca civarında yetişmektedir.

*Linum arboreum*'un herba ve tohumlarında bulunan lignanların (podofilotoksin ve pikropodofilotoksin) HPLC-DAD yöntemi ile miktar tayini yapılmıştır. Ayrıca *Linum arboreum*'un herba ve tohum ekstraktları ve farklı çözücüler ile elde edilen fraksiyonlarının toplam fenol ve toplam fenolik bileşikleri tayin edilmiştir. Biyoaktivite çalışmalarında ise antioksidan (DPPH, alkalik DMSO süperoksit, nitrik oksit) antimikrobiyal ve sitotoksikite aktivitesi (HCT-116 kolon kanseri hücrelerine karşı) değerlendirilmiştir.

Öncelikle bu çalışmanın gerçekleşmesinde yardımları ile bana yol gösteren ve bilgilerini benden esirgemeyen danışman hocama Prof. Dr. Belma Konuklugil'e teşekkürlerimi sunarım.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

DPPH	2,2-difenil-1-pikril hidrazil (2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl)
IC <sub>50</sub>	%50 İnhibisyona neden olan konsantrasyon
HCT-116	Kolon kanseri hücreleri
HPLC/YBSK	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
MİK	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
MTT	[3-(4,5- dimetiltiazol-2- il)-2,5- difenil tetrazolyum bromür]
µg	Mikro gram
µL	Mikro litre
PTOX	Podofilotoksin
HPV	İnsan papilloma virüsleri
CAD	Sinnamil alkol-dehidrojenaz
ESI	Elektrosprey ionizasyon
MS	Kütle spektroskopisi
UV	Ultraviyole
DAD	Diode Array Dedektörü
LOD	Gözlenebilme sınırı
LOQ	Tayin sınırı
RSD	Bağıl standart sapması
DMSO	Dimetil sülfoksit
NBT	Nitroblue tetrazolium
RPM	Dakikadaki devir sayısı



## ŞEKİLLER

Şekil 1.1. <i>Linum arboreum</i> L. doğadaki resmi- Muğla	5
Şekil 1.2. Lignanların ana kimyasal yapıları	6
Şekil 1.3. Podofilotoksin ve bu bileşikten yarı sentez yoluyla elde edilen kemoterapik ajanlar	9
Şekil 1.4. Podofilotoksinin biyosentezi	11
Şekil 2.1. Ekstraksiyon ve fraksiyonlama şeması	17
Şekil 2.2. Pikropodofilotoksin ve podofilotoksin kimyasal yapısı	22
Şekil 3.1. Gallik asit'in kalibrasyon eğrisi	27
Şekil 3.2. Kersetin'in kalibrasyon eğrisi	27
Şekil 3.3. Toplam fenolik ve toplam flavonoit sonuçları	28
Şekil 3.4. Podofilotoksin'in Standart eğrisi	32
Şekil 3.5. Pikropodofilotoksin'in standart eğrisi	33
Şekil 3.6. Podofilotoksin'nin HPLC kromatogramı ve UV spektrumu	33
Şekil 3.7. Pikropodofilotoksin'nin HPLC kromatogramı ve UV spektrumu	33
Şekil 3.8. Herbadan elde edilen hekzan fraksiyonun HPLC kromatogramı	34
Şekil 3.9. Tohumdan elde edilen kloroform fraksiyonun HPLC kromatogramı	34
Şekil 3.10. Herbadan elde edilen etil asetat fraksiyonun HPLC kromatogramı	35
Şekil 3.11. Tohumdan elde edilen etil asetat fraksiyonun HPLC kromatogramı	35
Şekil 3.12. Herba ve tohum da podofilotoksin ve pikropodofilotoksin miktarı	37

## ÇİZELGELER

<b>Çizelge 1.1.</b> Bitkilerden elde edilen antikanser ilaçlar	14
<b>Çizelge 2.1.</b> HPLC’de kullanılan gradient sistemi	21
<b>Çizelge 3.1.</b> Elde edilen ekstreler ve fraksiyonların miktarı	26
<b>Çizelge 3.2.</b> Toplam fenolik ve toplam flavonoit sonuçları	28
<b>Çizelge 3.3.</b> Fraksiyonların antioksidan sonuçları	29
<b>Çizelge 3.4.</b> Fraksiyonların HCT-116 hücresine karşı sitotoksikite aktivite sonuçları	30
<b>Çizelge 3.5.</b> Fraksiyonların antimikrobiyal aktivite sonuçları	31
<b>Çizelge 3.6.</b> HPLC validasyon değerleri	36

# 1. GİRİŞ

Dünya üzerinde yaklaşık 1 milyon bitki türünün yetiştiği tahmin edilmektedir. Bitkilerden yaklaşık 20 bini halk arasında tedavi için kullanılmaktadır. Türkiye zengin bir floraya sahip olup 3.700'ü endemik olmak üzere, 12000 bitki türü barındırmaktadır. Dünyada ve Türkiye'de bitkiler gıda, ilaç, kozmetik olarak kullanılmaktadır (Dağlar ve Dağdeviren, 2018).

Tarih boyunca, geleneksel halk tıbbında birçok hastalığı tedavi etmek için yüksek miktarda lignan içeren bitkiler kullanılmıştır. Lignan içeren bitkiler, İngiltere, Kore, Amerikan, Çin, Japon, Güney Amerika ve Tibet gibi birçok farmakopede belgelenmiştir. Ayrıca, geleneksel tıp, modern ilaç tedavilerinin takibinde kritik bir ilham kaynağı olmuştur ve kullanılan bir dizi ilacın başlangıç maddesi olarak değerlendirilmiştir. Örneğin, lignanlar terapötik ajanların gelişimi için bir başlangıç noktası sağlayan önemli bir bileşik sınıfı oluşturur (Simpson ve ark., 2017).

Doğal ürünlerden ilaç keşfi 1940'lardan beri devam etmektedir. Bilim adamlarının bir kısmı, doğal ürün kimyasında yeni ve aktif bileşik/ler bulmak için çalışırken, organik kimyacılar bu bileşiklerin sentezi ve stereo-kimyasını araştırmaktadırlar. 2013 yılına kadar, 1453 kimyasal yapı FDA tarafından onaylanmış, bu bileşiklerin, yaklaşık %40'ı doğal ürün veya doğal ürün türevlerinden oluşmaktadır. Yeni stratejiler ve teknolojilerle, yılda 10000'den fazla yeni sekonder metabolitin yapısı aydınlatmakta olup bunların %25'ni biyolojik olarak aktif bileşikler oluşturmaktadır (Kinch ve ark., 2014).

Bu doğal kaynakların ve bunların izole edilmiş bileşenlerinin çok sayıda olması ve bunların antikanser, antioksidan, immünomodülatör, antimikrobiyal ve anti-enflamatuar gibi önemli biyoaktiviteler göstermeleri bu konuya olan ilgiyi arttırmış olup, günümüzde de bu ilgi devam etmektedir.

## 1.1. Linaceae Familyası ve Özellikleri

Linaceae familyası yıllık bir bitki türüdür ve dünyadaki en eski lifli bitkilerden biridir (5000 M.Ö). Bu familya 13 cins ve 250- 300 tür içermektedir. Bir yıllık veya çok yıllık otsu, nadiren odunsu ve lifli bitkileri içermektedir. Tropik ve ılıman bölgelerde dağılım göstermektedir. Yapraklar genellikle alternan veya nadiren opozit dizilişte, basit ve tam kenarlıdır. Çiçekleri, erdişi, aktinomorf, sepaller 4-5 adet, serbest; petaller 4-5 adettir. Çiçekler tek başınadır veya simoz çiçek durumu şeklindedir. Stamenleri, 4-5 tanedir ve değişmekle beraber genellikle, küçük staminotlarla beraber, altta birleşmiş olarak bulunurlar. Ovaryumu üst durumlu, 3-5 karpelden oluşmuştur. Plasentalanması eksenseldir. Stilus, 3-5. Meyva 8 veya 10 tohumlu bir kapsüldür. Türkiye Florasına göre iki cinsi bulunmaktadır; birincisi çiçekleri 5 parçalı, sepalleri tam, tohumları yassı ise *Linum*, ikinci ise çiçekleri 4 parçalı, sepalleri üç parçaya yarılmış, tohumları yumurta şeklinde ise *Radiola*, cinsidir (Davis 1966, Sambamurty 2005, Yıldırım 1995)

## 1.2. *Linum* Cinsi ve Özellikleri

*Linum* cinsi Linaceae familyasına ait olup, toplam 230 tür (toplam 5 seksiyon: *Syllinum*, *Cathartolinum*, *Dasylinum*, *Linum* and *Linastrum*) içermektedir (Pilkington, 2018; Yıldırım, 1995). *Linum* cinsi, otsu veya küçük çalı şeklindeki bitkilerden oluşmaktadır.

Yaprakları tam, basit, alternan veya nadiren opozit dizilişlidir. Çiçekler tek başınadır veya simoz çiçek durumu şeklindedir. Sepalleri 5, tam, kalıcı; petalleri 5 serbest veya tırnaklarıyla birleşik, çabuk düşücüdürler. Korolla 5 petalli, serbest veya tabanda az çok bileşik, beyaz, pembe, eflatun, mavi ve sarı renklerde, uzun veya kısa, erken dökülür ve dayanıksızdır. Ovaryumu üst durumludur, 5 karpelli ve 5 gözlüdür; her bir gözde iki tohum bulunur. Stamenler 5, filamentler tabanda birleşmiş ve değişken olarak 5 küçük staminot bulunmaktadır.

Meyva septisit kapsüldür. Kapsül 5 karpelden oluşmuş, genellikle açılan tarzda ve kısa bir gaga taşımaktadır, her bir hücre ikinci bir perde vasıtasıyla bölünmüştür. Tohumlar 10 adet, ovat, parlak ve yassıdır (Davis, 1966; Baytop, 1996).

*Linum* cinsi Balkanlar ve Anadolu'da bulunan bir cinstir. Kuzey ve Güneybatı Amerika'da da yaygın olarak bulunmaktadır. Çok yıllık türlerde, bitki tabanı genellikle bitkinin tanınmasına yardımcı taksanomik karakterlere sahiptir (odunsu olması veya olmaması, çiçeklenme zamanında verimsiz sürgünlerin varlığı ya da yokluğu, çiçek taşıyan gövdenin tabanında kalıcı rozetin bulunuşu veya bulunmayışı gibi (Seksiyon *Syllinum*'daki gibi)) (Davis, 1966).

### 1.3. Türkiye'de Yetişen *Linum* Türleri:

Türkiye'de yetişen *Linum* türleri 5 seksiyon altında incelenmektedir. Toplam 43 tür yetişmektedir ve bunun 16 tanesi endemiktir.

#### A. *Syllinum* seksiyonu:

1. *Linum arboreum* L.
2. *Linum pamphylicum* (Boiss.) Podp. (endemik)
3. *Linum boissieri* Aschers. & Sint. ex Boiss. (endemik)
4. *Linum tauricum* Willd. subsp. *Bosphori* Davis (endemik)
5. *Linum cariense* Boiss (endemik)
6. *Linum mucronatum* Bertol.
7. *Linum flavum* L.
8. *Linum ciliatum* Hayek (endemik)
9. *Linum triflorum* Davis (endemik)
10. *Linum nodiflorum* L.
11. *Linum gyaricum* Vierh.
12. *Linum persicum* Boiss.
13. *Linum aretioides* Boiss. (endemik)
14. *Linum maritimum* L.
15. *Linum kaynakiae* Yılmaz (endemik)
16. *Linum vuralianum* Yılmaz & Kaynak (endemik)
17. *Linum vanense* Azn. (endemik)

#### B. *Linastrum* Seksiyonu:

18. *Linum corymbulosum* Reichb.
19. *Linum trigynum* L.

20. *Linum strictum* L.
21. *Linum annotinum* K. Koch (endemik)?

C. *Dasylinum* Seksiyonu:

22. *Linum olympicum* Boiss. (endemik)
23. *Linum hirsutum* L.
24. *Linum unguiculatum* Davis (endemik)
25. *Linum densiflorum* Davis
26. *Linum hypericifolium* Salisb.
27. *Linum pubescens* Banks & Sol.
28. *Linum anisocalyx* Davis (endemik)
29. *Linum seljukorum* Davis

D. *Linum* Seksiyonu:

30. *Linum nervosum* Waldst. & Kit.
31. *Linum aronium* Boiss. & Orph.
32. *Linum tmoleum* Boiss. (endemik)
33. *Linum tenuifolium* L.
34. *Linum virgultorum* Boiss. & Heldr.
35. *Linum meletonis* hand, -Mazz.
36. *Linum pycnophyllum* Boiss. & Heldr.
37. *Linum obtusatum* (Boiss.) Stapf (endemik).
38. *Linum empetrifolium* (Boiss.) Davis
39. *Linum austriacum* L.
40. *Linum peyronii* Post
41. *Linum bienne* Miller
42. *Linum usitatissimum* L.

E. *Cathartolinum* Seksiyonu:

43. *Linum catharticum* L. (Davis, 1966; Güner ve ark, 2000)
44. *Linum vanense* Azn. (endemik)

#### 1.4. *Linum arboreum* L.

Bir metreye ulaşabilen tüysüz çalıdır. Çiçek sapı 7-12 cm, terminal veya yanal; tabandaki rozet yapraklar obovat şeklinde, sapları kısa, 20-35\*13-15 mm. Gövde yapraklar, ters yumurtamsı- dikdörtgensi. 10 ve daha fazla çiçekli, sepal ters yumurtamsı- mızraksı, 7-8 mm. petaller sarı, 15-18 mm. kapsüller 5-6 mm. Kayalık alanlarda ve uçurumlarda bulunmaktadır. Yunanistan'da Girit ve Karpathos adasında, Türkiye'de sadece Datça (Muğla) civarında yetişmektedir (Davis 1966) (Şekil 1.1).

### Bitkinin Sistematikteki Yeri

Bölüm	: Spermatophyta
Alt Bölüm	: Angiospermae
Sınıf	: Dicotyledonae
Alt Sınıf	: Dialypetalae
Takım	: Geraniales
Familya	: Linaceae
Cins	: <i>Linum</i>
Tür	: <i>Linum arboreum</i> L., (Davis, 1966; Baytop, 1996).



Şekil 1.1. *Linum arboreum* L. doğadaki resmi- Muğla (Datça)(Zaher Sultan)

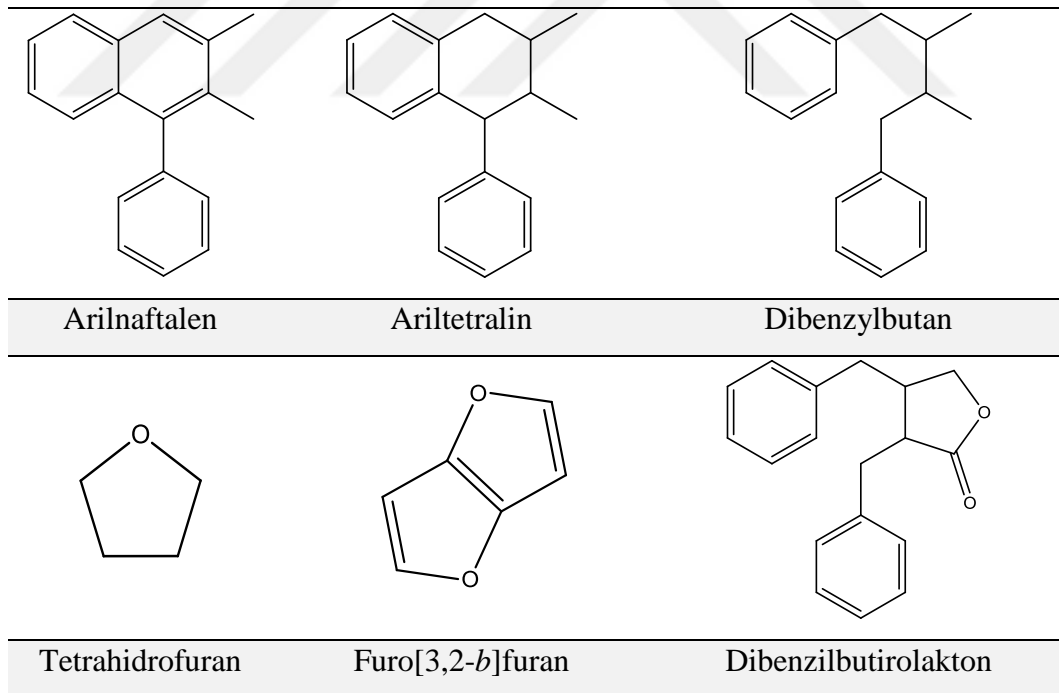
### 1.5. Lignanlar

Araştırmalara göre *Linum* cinsi lignan açısından zengin bir bitki cinsidir. Lignanlar reverz transkriptaz inhibisyonu (transcriptase reverse inhibition), HIV aktivitesi, kardiyovasküler sistem üzerine etkileri, antileishmaniasis özellikleri, hipoglisemik aktiviteler, 5-lipoksijenaz inhibisyonu, antifungal, antiromatizmal, antipsoriasis, antimalarial ve antiastmatik gibi önemli farmakolojik özelliklere

sahiptir (Alejandre-García ve ark., 2015). Ancak, sitotoksik ve antitümoral aktiviteleri büyük ilgi çekmektedir.

Lignanlar, bitkilerde iki fenilpropanoid ünitesinin  $\beta$ - $\beta'$  bağlantısıyla ve oksidatif dimerizasyonu ile peroksidazlar ve laktaz enzimleri yardımı ile sentezlenir ve 8 gruba ayrılır: Lignanlar moleküler yapılarına göre çeşitli kategorilere ayrılmaktadır: Furofuran, furan, dibenzilbutan, dibenzilbutirolakton, ariltetralin, arilnaftalen, dibenzosiklooktadien ve dibenzilbutirolaktol (Umezawa, 2003) (Hazar ve ark., 2016). Şekil 1.2'de lignanların ana yapıları verilmiştir.

Neolignanlar  $\beta$ - $\beta'$  bağı içermeyen lignan grubu olup, fenilpropan üniteleri arasındaki bağlantının konumuna göre 15 alt gruba ayrılmaktadır. En önemlileri benzofuran, 1,4-benzodiyoksolan, alkil aril eter, bifenil, siklobutan, 8-1'-bisiklo [3.2.1] oktan, 8-3'-bisiklo [3.2.1]oktan ve bifenil eterdir.



Şekil 1.2. Lignanların ana yapıları.

Günümüze kadar yapılan kimyasal çalışmalarla *Linum* türlerinden lipitler, proteinler, flavonoidler, antosiyanozitler, fenolik asitler, pektin, müsilaj, siyanogenetik



heterozitler, steroller ve enzimler gibi farklı bileşikler izole edilmiştir. *Linum* cinsine ait en yaygın tür *L. usitatissimum* (Keten) üzerinde birçok çalışma bulunmaktadır. Bu tür yağ, lif, lignan bakımından zengin bir türdür. Kayıtlara göre keten'in 8000 yıl önce Dicle ve Fırat vadileri içinde Verimli Hilal olarak adlandırılan bölgede ekimi yapılmıştır (Vassão ve ark., 2010). *L. usitatissimum* türünden antosiyanlar (delfinidin-3-glukozit, delfidin-3-rutinozit, delfinidin-3-diglukozit, delfinidin-3-triglukozit, delfinidin-3-glukozilrutinozit), flavonoidler (orientin, viteksin, izoorientin, izoviteksin), fenil propanoit (linusitamarin, linosinnamarin, kafeoilkinik asit), lignanlar (sekoizolarisirezanol diglukozit, pinorezinoldiglukozit), lipitler (linoleik asit, linolenik asit, oleik asit), müsilaj, protein (linin, konlinin), peptit (siklolinopeptit A/B/C/D/E/F/G/H/I), steroller (kolesterol, sitosterol, kampesterol, stigmasterol, A5-avenasterol, sikloartenol, 24- metilensikloartanol) ve enzim (linustatinaz, linamaraz) izole edilmiştir (Konuklugil ve Bahadır, 2004).

Lignanlar, 70'den fazla bitki familyasında ve bu familyaya ait bitkilerin köklerinde, yapraklarında, tohumlarında ve çiçeklerinde tespit edilmiştir. *Linum* cinsi *Syllinum*, *Cathartolinum*, *Dasylinum*, *Linum* and *Linastrum* toplam 5 seksiyonda sınıflandırılmaktadır (Pilkington, 2018).

## 1.6. Ariltetralin Lakton Lignan

70 farklı familyada 200'den fazla lignan tespit edilmiştir. Ancak ariltetralin grubu sadece birkaç familya da bulunmaktadır. Ariltetralin lakton lignanlar, doğal bileşikler arasında önemli bir konuma sahip olup, *Sinopodophyllum*, *Podophyllum*, *Dyosma*, *Diphylleia* (Berberidaceae), *Bursera* (Burseraceae), *Libocedrus* (Cupressaceae), *Linum* (Linaceae) bulunmaktadır. Ariltetralin grup lignanlar Linaceae familyasında Seksiyon *Syllinum*'da tespit edilmiştir (Sun ve ark., 2015; Konuklugil, 1995).

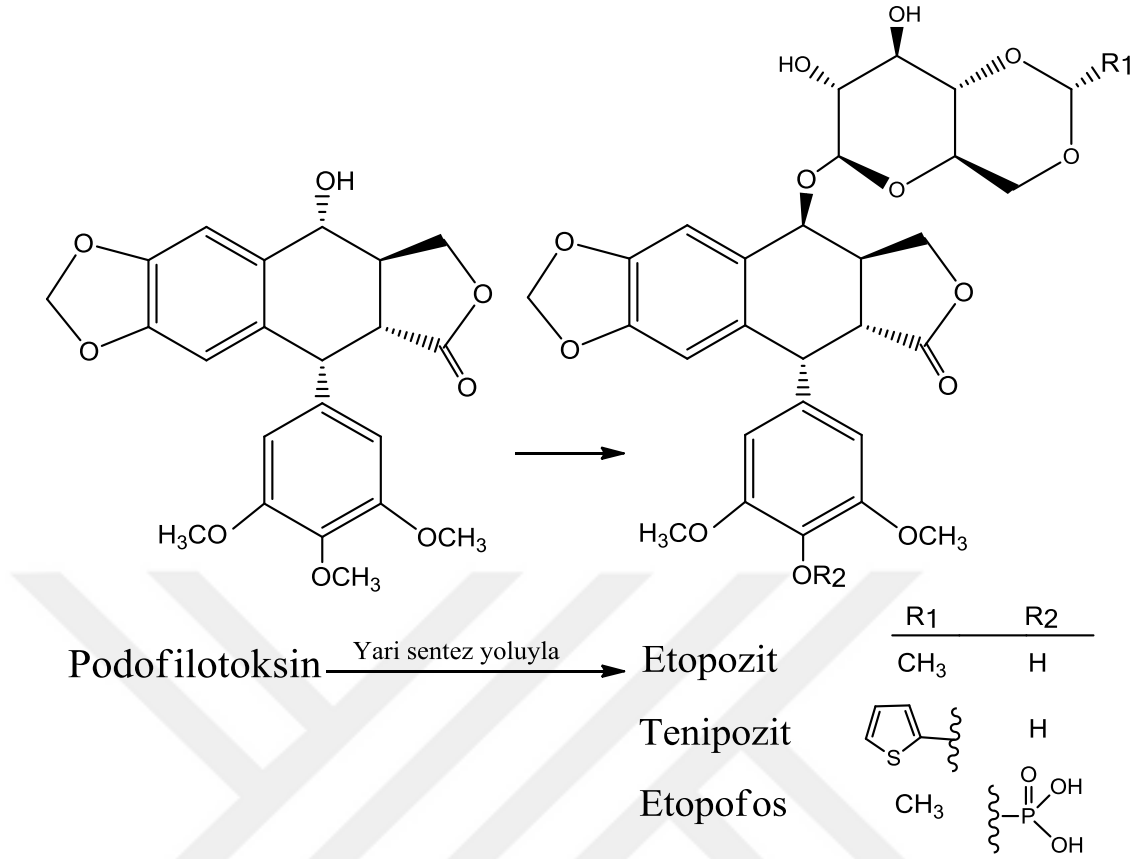
## 1.7. Podofilotoksin (Podophyllotoxin) (PTOX)

İlk defa Podwysstotzki tarafından 1880 yılında Amerika da yetişen *Podophyllum peltatum* türünden elde edilmiştir. PTOX insan sağlığı için en önemli ariltetralin lignandır. Sitotoksik ve antiviral aktiviteleri bulunmaktadır. İnsan papilloma virüsünün neden olduğu genital siğiller (*Condylomata acuminata*) tedavisinde kullanılır. PTOX, akciğer karsinomu ve malign lenfoma (non-Hodgkin's), lösemi ve testis kanserlerinin tedavisinde kullanılan etopofoz (etopophos), etoposit (etoposide) ve teniposit (teniposide) gibi kemoterapötik ajanların yarı-sentezi için başlangıç maddesidir (Botta ve ark., 2001; Federolf ve ark., 2007).

Podofilotoksin'den hareketle yarı sentez yoluyla elde edilmekte olan bu bileşiklerin total sentezleri ekonomik açıdan uygun değildir. Podofilotoksin, *Podophyllum* türlerinden; *P. hexandrum* ve *P. peltatum*'dan elde edilmektedir. (Petersen ve Alfermann, 2001). *P. hexandrum* rizomları podofilotoksin açısından en zengin kaynaklar olmasına karşın, bitki bu etken maddeyi 5-7 yıl arasında üretmektedir. Ayrıca doğadan ticari amaçla aşırı miktarda toplanmaları nedeniyle *Podophyllum* türleri tehlike altındadır (Molog ve ark., 2001; Arroo ve ark., 2002).

Podofilotoksin eldesi için bu nedenlerden dolayı alternatif kaynaklar düşünülmüş ve farklı cinslere ait bitkiler araştırılmıştır (Arroo ve ark., 2002). *Linum* türlerinde podofilotoksin grubu lignanların bulunması sonucu araştırmalar bu türlere özellikle de *Syllinum* seksiyonuna yönelmiştir (Molog ve ark., 2001; Petersen ve Alfermann, 2001).

PTOX bir tubulin polimerizasyon inhibitörü olmasına rağmen, etopozit ve tenipozit DNA topoizomeraz II inhibitörleri olarak sitotoksik etki göstermektedir (Newman ve ark., 2015). Ayrıca PTOX, bazı insan papilloma virüsleri (HPV) ve siğillere karşı topikal tedavide kullanılmaktadır. Bu bileşiğin müshil ve antiromatik gibi etkileri de bilinmektedir (Theobald Jr ve ark., 2016).



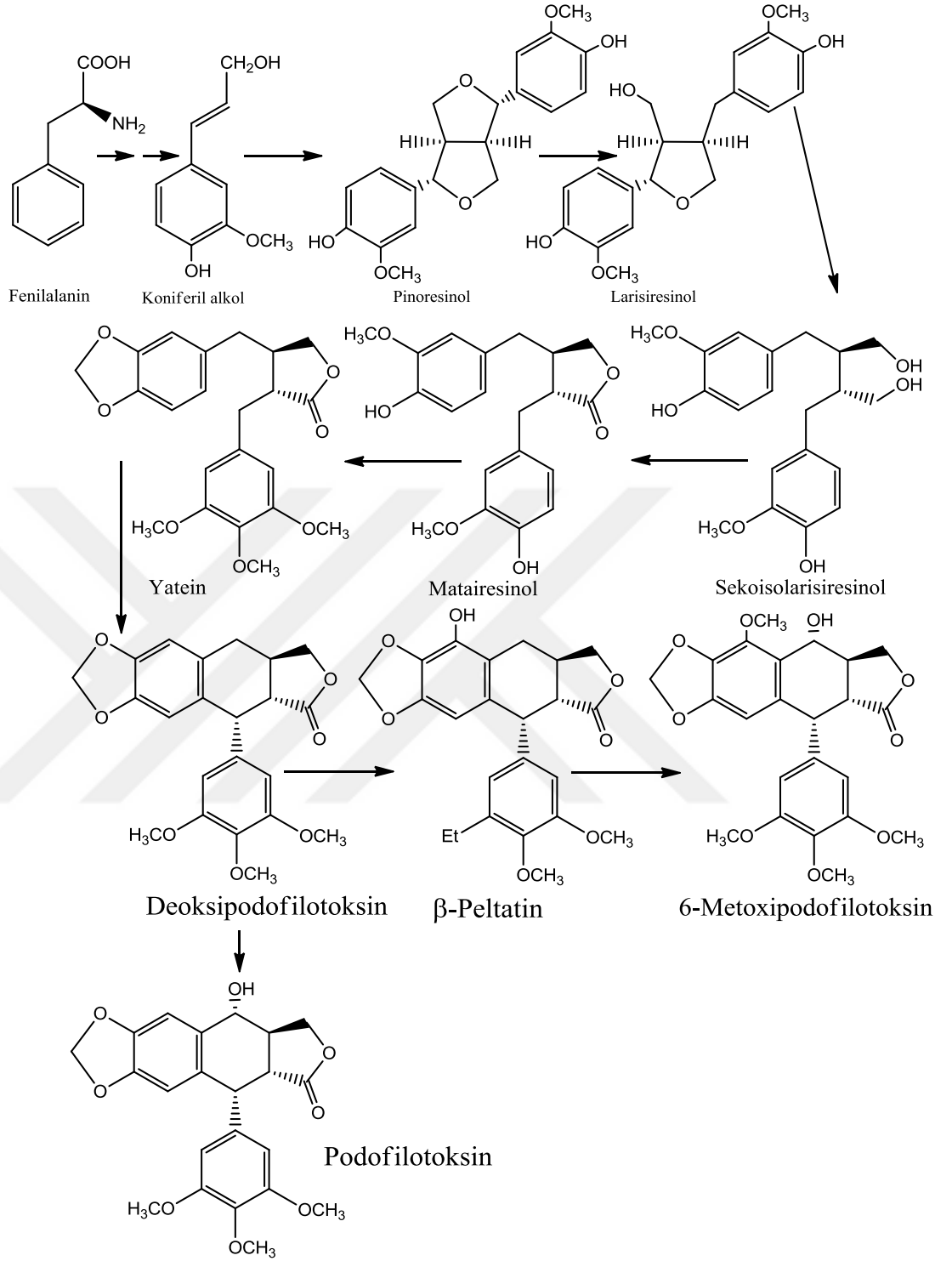
**Şekil 1.3.** Podofilotoksin ve ondan yarı sentez yoluyla elde edilen kemoterapötik ajanlar (Gordalıza ve ark. 2004; Lau ve ark. 2015).

### 1.8. Podofilotoksin Biyosentezi

Fenilalanin, sinamik asiti vermek üzere fenilalanin amonyak-liyaz (PAL) ile deamine edilir. Daha sonra sinamik asit 4-hidroksilaz (C<sub>4</sub>H) yardım ile hidroksilasyon gerçekleşip, *p*-kumarik asit elde edilir. Birkaç adım sonra, koniferil alkol, sinamil alkol-dehidrojenaz ile oluşturulur (CAD). İki koniferil alkol birleşerek pinoresinol meydana gelmektedir. Pinoresinol'ün iki enantiyomeri bulunmaktadır, (+)-pinoresinol, önce redüklenerek daha sonra oksitlenerek (-)-matairesinol ve bunu takiben (-)-matairesinol oksitlenerek, deokspodofilotoksin meydana gelmektedir. Deokspodofilotoksin, PTOX'nin öncü maddesidir (Renouard ve ark., 2018; Federolf vd., 2007; Gordalıza ve ark. 2004; Lau ve ark. 2015). (Şekil 1.4).

Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucu Cupressaceae, Lamiaceae, Linaceae, Podophyllaceae ve Polygalaceae gibi birçok alternatif kaynak PTOX için tanımlanmıştır. Bunlara rağmen hala *Linum* türleri PTOX için önemli bir kaynak olarak kabul edilmektedir (Bhattacharyya ve ark., 2012; Renouard ve ark., 2018).





**Şekil 1.4.** Podofilotoxin'in biyosentezi (Gordalıza ve ark. 2004; LAU ve ark. 2015).

## 1.9. *L. arboreum* cinsine Ait Sekonder Metabolit

Literatür taramasına göre tez konusu olan *L. arboreum* L., için sadece birkaç çalışma bulunmaktadır. Daha önce yapılan bir çalışmada, *L. arboreum* herbasında  $\beta$ -peltatin,  $\beta$ -glukoz ve heksoz bağlı 6-metoksipodofilotoksin HPLC-ESI/MS–MS-UV/DAD yardımıyla tespit edilmiştir (Schmidt ve ark., 2010). Bir başka çalışmada, bu bitkinin metanollü ekstresinin, sulu ekstreye göre daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. (Coban ve Konuklugil, 2005).

## 1.10. Bitkilerin Antioksidan Aktiviteleri

Oksidatif stres, çok sayıda kronik hastalığın önemli bir risk faktörüdür. Serbest radikaller ve diğer aktif oksijen türleri, astım, diyabet, kanser, parkinson ve alzheimer gibi hastalıkların patogeneğinde rol oynayan ajanlar olarak kabul edilir.

Antioksidan özelliği taşıyan bileşikler, oksidatif hasarı geciktiren veya engelleyen herhangi bir madde olarak tanımlanmaktadır. Biyolojik sistemde, reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türleri (süperoksit, hidroksil ve nitrik oksit radikalleri), DNA'ya zarar verebilir ve hücrelerde lipid ve proteinlerin oksidasyonuna neden olabilmektedir.

Normal hücrel aktivite için, üretilen reaktif oksijen türleri ve antioksidan savunma mekanizması arasındaki denge çok önemlidir. Bu denge bozulduğu zaman oksidatif stres ortaya çıkar.

Antioksidan bileşiğin temel özelliği serbest radikalleri yakalayabilmesidir. Fitokimyasallar (sekonder metabolitler: Tanen, fenol, alkaloid ve flavonoidler), bitki kökenli biyoaktif kimyasallardır. Antioksidan sekonder metabolitler bitkilerin tüm kısımlarında (kök, çiçek, herba, tohum, vd.) sentezlenmektedir. Fenolik asitler, polifenoller ve flavonoidler, peroksit, hidroperoksit veya lipid peroksit gibi serbest radikalleri etkisiz hale getirip böylece dejeneratif hastalıklara yol açan oksidatif mekanizmaları inhibe etmektedir. Bitkiler antik çağlardan beri iyi antioksidan olarak

kabul edilmektedir (Khan ve ark., 2019; Mahdi-Pour ve ark., 2012; Rahal ve Ark. 2014; Xu ve ark., 2017).

### **1.11. Doğal Antikanser Bileşikler**

Doğal ilaçlar, yüzyıllarca farklı kültürlerde geleneksel tıp sistemlerinin temelini oluşturmaktadır. Kanserin önlenmesi veya tedavisinde kullanılan çok sayıda bitki bulunmaktadır. Ayrıca, bu bitkilerden elde edilen ve kanser tedavisinde kullanılan ilaç listesi Çizelge 1.1’de gösterilmektedir (Zyad ve ark., 2018).

Kanser tedavisinde, antitümör-aktif bileşiklerin yaklaşık %60’ının bitkilerden ve diğer doğal kaynaklardan elde edildiği bilinmektedir. Sitotoksikite çalışmaları, bitki ekstraktları veya bitkilerden izole edilen sekonder metabolit bileşiklerin potansiyel toksisitesinin belirlenmesinde yararlı bir ilk adımdır.

Doğal bileşiklerin hücresel proliferasyonu düzenlenmesindeki rolü, 50 yıldan uzun süredir bilinmektedir, ancak bu bileşiklerin hücre ölümünün fizyolojik ve farmakolojik olarak etkilemesi son yıllarda önem kazanmıştır. Doğal bileşiklerin, kanserin gelişiminde ve ilerlemesinde rol oynayan kritik yollar üzerinde etkileri açıklanmıştır (Lombardi ve ark., 2017).

**Çizelge 1.1.** Bitkilerden elde edilen antikanser ilaçlar (Amin A ve ark. 2009)

<b>Vinkristin</b>	Akut lenfositik, akut miyeloid lösemi, küçük hücre akciğer kanseri Hodgkin lenfoma ve nöroblastoma
<b>Vinblastin</b>	Küçük olmaya hücre akciğer kanseri, mesane kanseri, beyin kanseri, testikül kanserleri, melanoma ve Hodgkin lenfoma,
<b>Paklitaksel</b>	Meme kanseri, yumurtalık kanseri, akciğer kanseri, boyun kanseri, rahim ağzı kanseri, kaposi sarkomu ve pankreas kanseri.
<b>Dosetaksel</b>	Meme kanseri, baş ve boyun kanseri, mide kanseri, prostat kanseri ve küçük olmayan hücre akciğer kanseri.
<b>Topotekan</b>	Yumurtalık ve akciğer kanseri
<b>İrinotekan</b>	Kolorektal kanseri, küçük hücre akciğer kanseri ve rahim ağzı kanseri.

Bu ilaçların kanser hücrelerine etki mekanizmaları çoğunlukla bilinmemektedir. Kanser önlenmesinde ve tedavisinde oksidatif stres rolü açıktır ve çoğu bitki iyi bir antioksidan kaynağıdır. Doğal bileşikler, mikrotübülere bağlanma, topoizomeraz inhibisyonu, DNA'ya bağlanma, hücre döngüsü durdurma ve apoptoza neden olarak antikanser etki göstermektedir (Lichota ve ark., 2018; Bahmani ve ark., 2017).

### **1.12. Bitkilerin Antimikrobiyal Aktiviteleri**

Çok ilaca dirençli suşların sayısı gittikçe artmaktadır böylece antibiyotiklere duyarlılığı azalmış suşların sayısı gittikçe artmaktadır. Ayrıca, sentetik ilaçlar sadece pahalı ve yetersiz değil, aynı zamanda yan etkilerinden dolayı da risklidir. Bu nedenle, mikrobiyal enfeksiyonları kontrol altına almak için yeni antimikrobiyal ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır.



Bitkilerin antimikrobiyal özellikleri üzerinde çalışmalar 1900'lü yıllardan itibaren araştırılmaya başlamıştır. Sonuç olarak antimikrobiyal etkili bitkiler, hem ilaçlara alternatif bir kaynak olarak hemde ilaç dirençliliğini indirgeyebilmek için antibiyotikler ile birlikte kullanılması önerilmiştir. Bazı bitki türlerinin antimikrobiyal aktiviteleri geniş çapta araştırılmıştır. Bitkiler, mikroorganizmaların iç pH'sı ve membran yapılarını değiştirerek antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Antimikrobiyal özelliklere sahip bitki ekstraktları ve fitokimyasalların kullanımı, tedavide büyük önem taşımaktadır. Son birkaç yılda, bu yönde birçok çalışma yapılmıştır (Gonelimali ve ark., 2018; Dabur ve ark., 2007).

*Linum* L., dünyada 100'den fazla tür içeren, Linaceae familyasının en geniş cinsidir. Anadolu ve Balkanlar'da yaygın olarak yetişmektedir. Ülkemizde 43 tür ile temsil edilmektedir. *Linum* türlerinden pek çok etken madde grubu izole edilmiştir. Bu etken madde grupları içinde ariltetralin grup lignanlar taşıdıkları ekonomik önem nedeni ile araştırmacıların ilgisi çekmiştir ve günümüzde de bu ilgi devam etmektedir. Ariltetralin grup lignanlar içinde, podofilotoksin bugün kanser tedavisinde kullanılan etopoz (etopophos), etoposit (etoposide) ve teniposit (teniposide)den başlangıç maddesidir. Podofilotoksinin doğadan toplanan *Podophyllum* türlerinden elde edilmesi ve bu türlerin tehlike altında olması nedeni ile araştırmacılar yeni kaynaklar aramıştır. Çalışmalar sırasında *Linum* türlerinde bu etken maddenin ve bunun 6 metoksi (6 MPTOX) türevinin bulunması *Linum* türlerine olan ilgiyi arttırmıştır. Bu etken madde Podofilotoksin ile aynı etkiye sahiptir ve *Linum* cinsinde *Syllinum* seksiyonunda tespit edilmiştir. Tez konusu olarak seçilen *L. arboreum*, yurdumuzda Datça (Muğla) bölgesinde yetişmekte olan bir türdür. Bu tür ile yapılan çalışmaların az olması nedeni *L. arboreum* L., bitkisinin ariltetralin grubu ve diğer grup lignan bileşiklerini taşıyıp taşımadığını tespit etmek için bu çalışma planlanmıştır.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Bitkinin Toplanması

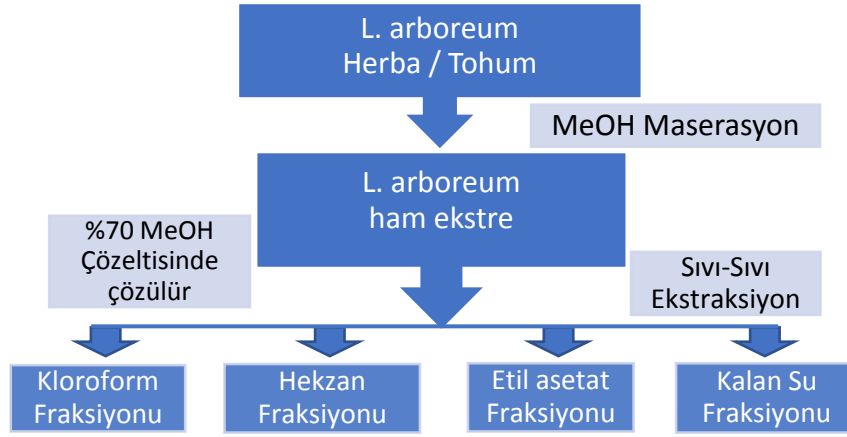
Bu çalışmada *Linum arboreum* L. Datça-Marmaris'ten (40 Km) 2010 yılında Nisan ayında çiçek açma zamanında toplanmıştır (Şekil 1.1). Bitki uygun bir şekilde laboratuvara nakledilip, herba ve tohum olarak iki kısma ayrılmıştır. Herbaryum için seçilen örnekler preslenip kurutulduktan sonra teşhis edilerek (Prof. Dr. Mehmet Koyuncu) Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi herbaryumunda AEF28887 nolu altında muhafaza edilmektedir.

### 2.2. Ekstre Hazırlanması

*L. arboreum* herba ve tohumları ayrı ayrı metanol ile maserasyon yöntemi ile ekstre edilmiştir. Elde edilen metanollü ekstre alçak basınç altında rotavaporda yoğunlaştırılmıştır. Ekstreler 4°C de saklanmıştır (Javidnia ve ark., 2005).

### 2.3. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon

Sıvı-sıvı ekstraksiyon için kuru metanollü ekstre (herba ve tohum) %70 metanol:su da çözülüp ayırma hunisine aktarılmıştır, sıra ile hekzan, kloroform ve etil asetat ile fraksiyonlanmıştır. Böylece, 4 farklı fraksiyon elde edilmiştir. Fraksiyonlar alçak basınç altında yoğunlaştırılmıştır (Şekil 2.1).



**Şekil 2.1.** Ekstraksiyon ve fraksiyonlama şeması

#### 2.4. Toplam Fenol İçeriğinin Belirlenmesi (Folin-Ciocalteu Yöntemi)

Bitkilerde toplam fenolik madde miktarını tayin etmek için Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde önce gallik asit için kalibrasyon eğrisi elde edilmelidir. Gallik asitin stok çözeltisi için, 0,02 g gallik asit 10 mL etanolde çözülerek, distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Stok çözeltiden değişik konsantrasyonlarda hazırlanıp ve Folin-Ciocalteu yöntemi ile değerleri hesaplanmıştır. Her bir konsantrasyon için üç tekrar yapılmıştır ve 765 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Gallik asit kalibrasyon grafiği konsantrasyonuna karşı absorbans değerlerini kullanarak elde edilmiştir. Sonuçlar  $\mu\text{g}$  gallik asit eşdeğer/mg ekstre olarak ifade edilmiştir.

Örneklerin toplam fenol bileşiklerini elde etmek için 20  $\mu\text{L}$ , 20 mg/10mL konsantrasyonda örnek üzerine, 1.58 mL deiyonize su ve 100  $\mu\text{L}$  Folin Ciocalteu reaktifi ilave edilip karıştırılmıştır. Karışım üzerine 300  $\mu\text{L}$  %2 sodyum karbonat ilave edilip 30 dakika 40 °C bekletilmiştir. Karışımın absorbansı 765 nm'de köre karşı ölçülmüş ve her konsantrasyon için üç tekrar yapılmıştır (Singleton ve ark., 1965).

## 2.5. Toplam Flavonoit İçeriğinin Belirlenmesi

Bitkilerde toplam flavonoit miktar tayini için alüminyum klorür kolorimetrik metodu kullanılmaktadır. Bu yöntemde,  $AlCl_3$  'ün flavonlar ve flavonoitlerin C-4 keto grubu ve C-3 veya C-5 hidroksil grupları ile ve flavonoitlerin A- veya B- halkalarının orto-dihidroksil grupları ile kompleks oluşturup ve çözeltide renk değişimine sebep olmaktadır. Bu yöntemde bitkilerde bulunan toplam flavonoit miktarı kersetine eşdeğer olarak hesaplanmaktadır.

Kersetin kalibrasyon eğrisi için kersetin çözeltisini farklı konsantrasyonlarda hazırlanıp ve eğri elde edilmiştir. 250  $\mu$ L, 50 mg/10 mL konsantrasyondaki ekstre, 1250 mL distile su ve 75  $\mu$ L %5  $NaNO_2$  ilave edilip iyice karıştırılmıştır. Sonra 150  $\mu$ L %10  $AlCl_3$  ve 500  $\mu$ L NaOH (1M) ilave edilmiş 3 mL su ile tamamlanmıştır. 20 dakika bekletilmiş ve absorbansı 510 nm'de ölçülmüştür. Her konsantrasyon için 3 tekrar yapılmıştır. Kersetin kullanılarak hazırlanan standart ölçü eğrisine göre örneklerdeki flavonoit miktarı kersetine eşdeğer olarak hesaplanmıştır (Bağ ve ark., 2015). Sonuçlar  $\mu$ g kersetin eşdeğer/mg ekstre olarak ifade edilmiştir.

## 2.6. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite

Serbest radikal süpürücü aktivite 2,2-difenil-1-pikrihidrazil (2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl) (DPPH) kullanılarak yapılmıştır. 10 farklı konsantrasyon 20000 ile 39  $\mu$ g/mL arasında fraksiyonlar ve ekstralar (50  $\mu$ L) 96'lık-eliza plate kuyucuklarına eklenmiştir. Daha sonra her kuyucuğun üzerine 150  $\mu$ L taze hazırlanmış DPPH (0,1 mM) çözeltisinden ilave edilmiştir. Otuz dakika 37°C ve karanlıkta inkübe edildikten sonra Dimetil sülfoksit (DMSO) ile oluşan köre karşı 517 nm'de absorbansları kaydedilmiş ve kontrol olarak, DMSO ve DPPH çözeltisi kullanılmıştır. Azalan absorbans geriye kalan DPPH çözeltisi miktarını yani serbest radikal süpürücü aktivitesini vermiştir (Shirwaikar ve ark., 2006). Referans madde olarak kersetin kullanılmıştır. Deney üç tekrar yapılmıştır.

## **2.7. Alkalin DMSO Yöntemiyle Süperoksit Radikal Süpürücü Aktivitesinin Tayini (SO)**

Alkalin DMSO yöntemi deney ortamında, DMSO (Dimetil sülfoksit) tarafından oluşturulan süperoksit radikali, NBT (Nitroblue tetrazolium) ile renkli diformazan bileşiği oluşturmasına dayanmaktadır. Bu yöntemde 1 mL alkalin DMSO (0,9 mL DMSO + 0,1 mL 5 mM NaOH) üzerine 0.1 mL NBT (1mg/mL) ve 0,3 mL farklı konsantrasyonda (20000 ile 39 µg/mL) fraksiyonlar ve ekstreler ilave edilmiştir ve son hacmin 1,4 mL olmasına dikkat edilerek 560 nm'de absorbans ölçülmüştür (Senthil Kumar ve ark., 2012). Referans madde olarak kersitin kullanılmıştır. Deney üç tekrar yapılmıştır.

## **2.8. Nitrik Oksit Radikal Süpürücü Aktivitesinin Tayini (NO)**

Her fraksiyondan 10 farklı konsantrasyon 20000 ile 39 µg/mL arasında fraksiyonlar ve ekstreler 60 µL 96'lık plaklara konulmuştur. Ekstrelerin üzerine 60 µL sodium nitroprusside/ sodyum nitroprusit (10 mM) ilave edilmiştir ve 25°C de 150 dakika bekletilmiştir. Daha sonra üzerine 120 µL Griess reaktifi (%1 sülfanilamit, %0,1 naftiletlen diamin dihidroklorit, %2,5 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) eklenmiştir ve 577 nm'de absorbans ölçülmüştür (Harput ve ark., 2011). Referans madde olarak kersitin kullanılmıştır. Deney üç tekrar yapılmıştır.

Antioksidan sonuçları aşağıdaki denkleme göre hesaplanıp ve değerler IC<sub>50</sub> olarak verilmiştir.

$$\% \text{İnhibisyon} = \left[ \frac{(\text{Absorbans kontrol} - \text{Absorbans örnek})}{\text{Absorbans kontrol}} \right] \times 100$$

## 2.9. Sitotoksosite Aktivitesi (MTT testi)

HCT 116 kolon kanseri hücreleri (20.000 hücre/kuyu) 96'lık plaklarda kuyu başına 20.000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler ekildikten 24 saat sonra 1-40 µg/mL konsantrasyon aralığında ekstreler uygulanmış ve 72 saat sonra, final konsantrasyonu 5mg/mL MTT olacak şekilde solüsyonu RPMI 1640 besi yerinde çözülmüştür. Hücrelerin üzerindeki besi yeri atılmış ve 96'lık plakta her kuyuya 20 µL MTT çözeltisi ve 100 µL besiyeri eklenerek 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücrelerin üzerindeki besiyeri MTT karışımı atılmış ve canlı hücrelerde oluşan formazan kristallerinin 100 µL DMSO eklenerek çözünmesi sağlanmıştır. Birkaç dakika içinde 550 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçümü yapıp, kontrol grubundaki hücreler %100 canlı kabul edilmiştir (Mosmann, 1983). Referans olarak kamptotesin kullanılmıştır. IC<sub>50</sub> değerleri GraphPad Prism 7.0 yazılımı (GraphPad Software, ABD) kullanılarak hesaplanmıştır.

## 2.10. Antimikrobiyal Aktivite

Antimikrobiyal duyarlılık testi, modifiye mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak bakteriler için EUCAST Mueller-Hinton Broth (MHB) metodu ve mayalar için de Roswell Park Memorial Institute (RPMI) metodu kullanılmıştır. Kapalı mikropalakalar nemli ortamda 35 °C' de bakteriler için 24 saat, mayalar için 48 saat inkübe edilmiştir. Ekstrenin mikroorganizmanın makroskobik büyümesini tamamen inhibe ettiği en düşük konsantrasyon minimum inhibisyon konsantrasyonu olarak kabul edilmiştir (MIC). Bu test için *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ve *Candida albicans* (ATCC 14053), *Candida krusei* (ATCC 6258) kullanılmıştır (ISO 20776-1, 2006; EUCAST reading guides, 2019).

## 2.11. HPLC Analizleri

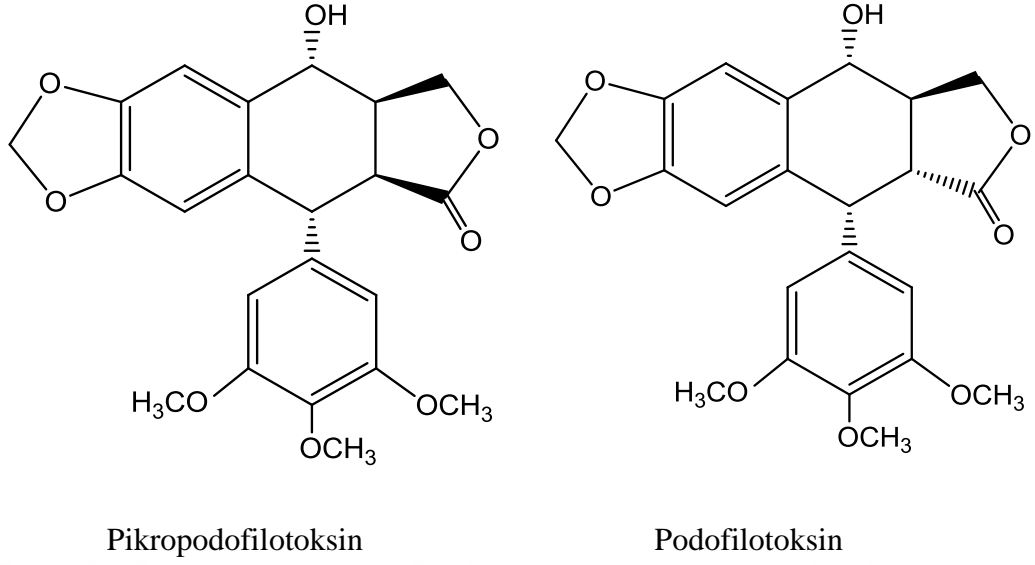
Tüm fraksiyonlar için HPLC örneği hazırlanmıştır. Bunun için, her bir fraksiyondan stok bir çözelti hazırlanıp ve 0,45 µm filtrelerden süzölmüştür. HPLC analizler “Agilent 1100” cihazında yapılmıştır. HPLC kolonu olarak “C18, 250×4,60 mm, 5 mikron, Phenomenex®” kolonu, Pompa: “P 580, Dionex”, Dedektör: “UVD 340 S – Photo Diode Array Dedector, Dione” kullanılmıştır (Kartal ve ark., 2004). Tüm fraksiyonlar gradient sistemi kullanarak HPLC’de analiz edilip sonuçlar 210 nm’de değerlendirilmiştir. Çözücü sistemi Çizelge 2.1’de verilmiştir.

**Çizelge 2.1.** HPLC’de kullanılan gradient sistemi

Zaman	Su+%0,01 fosforik asit	MeOH	Akış hızı
0	60	40	0,8
17	33	67	1
18	60	40	1
24	60	40	0,8

## 2.12. Podofilotoksin ve Pikropodofilotoksin Miktar Tayini

Podofilotoksin ve pikropodofilotoksin standartlarından 100 µg/mL konsantrasyonunda bir stok çözelti hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrileri 100, 50, 25, 10 ve 5 ppm standart stok çözeltisi kullanarak hazırlanmıştır. Fraksiyonlarda podofilotoksin ve pikropodofilotoksin tayini standartların alıkonma zamanı ve UV spektrumları karşılaştırarak yapılmıştır (Kartal ve ark., 2004).



Şekil 2.2. Pikropodofilotoksin ve podofilotoksin kimyasal yapısı

### 2.13. HPLC Metodunun Validasyonu

Metot validasyonu ICH kurallarına göre doğruluk, kesinlik, tayin limiti, geri kazanım ve seçicilik açısından değerlendirilmiştir.

### 2.14. Doğrusallık (Accuracy)

Podofilotoksin ve pikropodofilotoksin standartlarından (100, 50, 25, 10 and 5 ppm) HPLC analizi her bir konsantrasyon için 3 tekrar yapılarak bir kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Doğrusallık, analit derişime karşı dedektör cevabının doğru orantılı olarak artması ve çizilen grafikte noktaların doğru üzerinde veya yakın olarak yer almasıdır. Eğim, kesişim ve korrelasyon katsayısı ( $R^2$ ) doğrusallığı gösteren parametrelerdir.



### 2.15. Gözlenebilme Sınırı (LOD)

LOD analizi yapılan örneğin belirttiği fakat kantitatif sınırlar içerisine girmeyen en düşük derişimdir. HPLC’de Sinyal/Gürültü oranı 3 olarak değerlendirilmiştir.

$$LOD= 3,3 \times \frac{SD}{m}$$

SD: Boş çözeltilinin; çok az derişimdeki madde çözeltilisinin veya kesişim değerinin standart sapması,

m: Kullanılan kalibrasyon eşitliğinin eğim değeridir.

### 2.16. Tayin Sınırı (LOQ)

LOQ, analizi yapılan örneğin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının tayin edilebileceği doğrusallık sınırları içerisine girmeyen veya doğrusallığın en alt derişimini oluşturan düzeyidir. Doğrudan yapılan deneylerden veya hesaplama bulunabilir.

$$LOQ= 10 \times \frac{SD}{m}$$

SD: Boş çözeltilinin; çok az derişimdeki madde çözeltilisinin veya kesişim değerinin standart sapması,

m: Kullanılan kalibrasyon eşitliğinin eğim değeridir.

### 2.17. Geri Kazanım (Recovery)

Ölçüm sonucunun teorik değere oranının yüzdesi % geri kazanım değerini (%R) hesaplamaktır. Bu işlem için 5, 25 and 50 µg/mL standart fraksiyonlara eklenip

ve HPLC analizi 3 tekrar ile yapılmıştır. Geri kazanılan konsantrasyonun ortalaması doğruluk değeri olarak ve geri kazanım yüzdesi olarak gösterilmiştir.

$$\%R = \left[ \frac{(CF - CU)}{CA} \right] \times 100$$

CF: ölçüm sonucu (bilinen konsantrasyonda referans standarttan hazırlanmış numune);

CU: Kör konsantrasyonu;

CA: referans standarttan hazırlanmış numunenin teorik konsantrasyonu

### **2.18. Kesinlik Tayini (Precision)**

Spesifik analiz koşulları altında elde edilen bağımsız analitik sonuçlar arasındaki uyumun derecesidir. Gün içi ve günler arası analizlerin sonucu olarak değerlendirilmektedir. Gün içi analizler için tüm analizler 3 tekrar ile bir gün içinde yapılmıştır. Günler arası için 2 farklı günde 3 tekrarla analizler değerlendirilmiştir. Alıkonma zamanı ve pik alanların bağıl standart sapmaları kesinlik olarak kabul edilmiştir.

$$RSD\% = (SD / \text{Mean}) \times 100$$

### **2.19. Seçicilik/Seçimlilik (Specifity/ Selectivity)**

Yöntemin aranan analiti (miktarı tayin edilecek bileşik) örnek matriksindeki diğer maddelerden ayırabilme özelliğidir.

## 2.20. İstatistiksel Analiz

Tüm analizler, her numune için üç tekrar şeklinde yapılmıştır. Veriler İstatistiksel Analiz Sistemi yazılımı ile analiz edilip ve ortalama  $\pm$  SD olarak değerlendirilmiştir. Analizler arasındaki farklılıkların önemi  $p \leq 0,05$  düzeyinde değerlendirilmiştir.



### 3. BULGULAR

#### 3.1. Ekstraksiyon Sonuçları

*L. arboreum* herba (275,59 g) ve tohum kısmından (164,17 g) maserasyon yöntemi ile metanollü ekstre elde edilmiştir. Metanollü ekstre daha sonra sıvı-sıvı ekstraksiyon ile farklı polaritelerde solvanlar kullanılarak fraksiyonlara ayrılmıştır. Çizelge 3.1’de ekstrelerin ve fraksiyonların miktarları verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Elde edilen ekstreler ve fraksiyonların miktarı

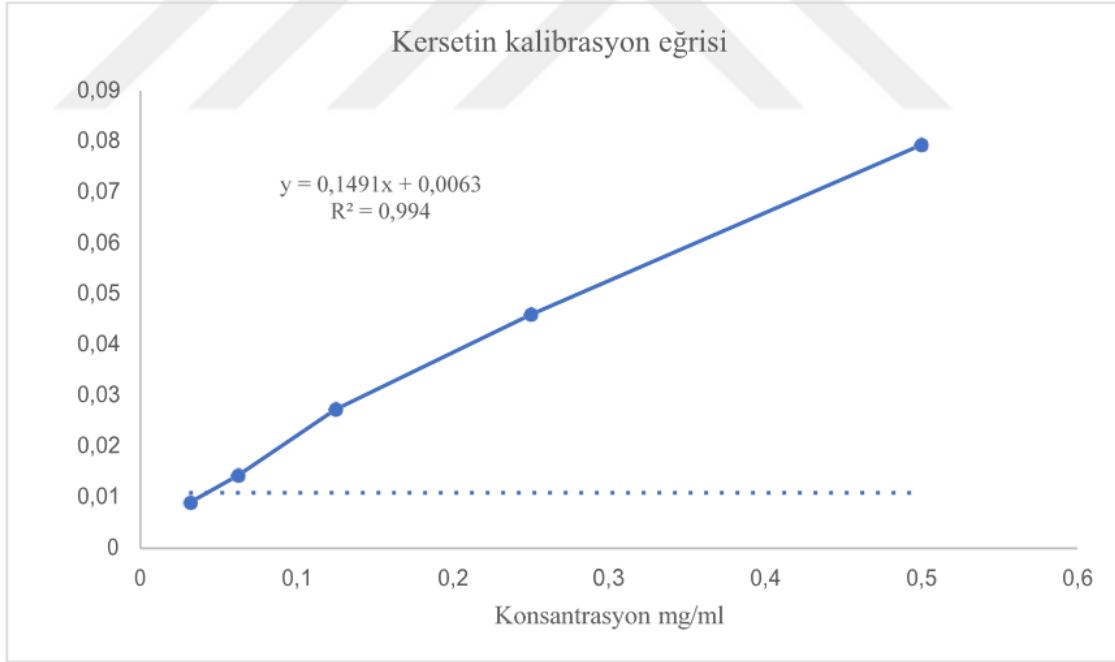
Ekstreler	Fraksiyonlar	Net dara (g)	Verim %(a/a)
Herba MeOH		24,71	8,96
	Herba Hekzan	4,53	1,64
	Herba Kloroform	2,65	0,96
	Herba Etil asetat	5,30	1,92
	Herba Kalan Su	11,08	4,02
Tohum MeOH		14,35	8,74
	Tohum Hekzan	4,15	2,52
	Tohum Kloroform	3,68	2,24
	Tohum Etil asetat	1,88	1,14
	Tohum Kalan Su	3,57	2,17

#### 3.2. Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit Sonuçları

Tüm fraksiyonların total fenol miktarları Folin-Ciocalteu metodu ile ve toplam flavonoit miktarı ise alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi ile belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.2 ve Şekil 3.3’te verilmiştir. Şekil 3.1. ve 3.2’de sırasıyla gallik asit ve kersetin kalibrasyon eğrisi gösterilmiştir. Herba ve tohumların etil asetat fraksiyonlarında en yüksek total fenol bileşik miktarı, herba ve tohumların sulu fraksiyonlarında ise en yüksek flavonoit miktarı tespit edilmiştir.



Şekil 3.1. Gallik asit'in kalibrasyon eğrisi



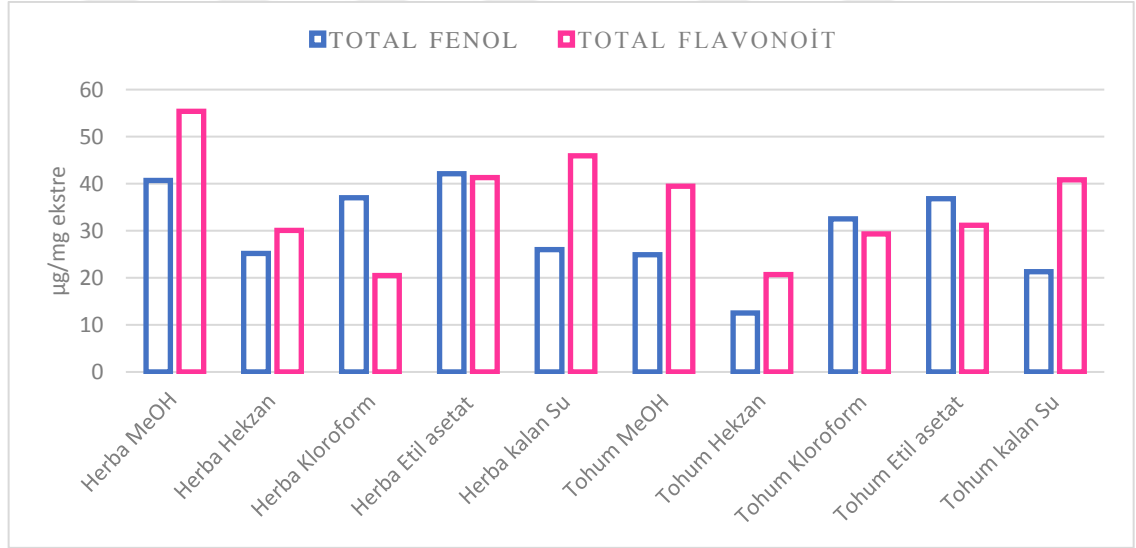
Şekil 3.2. Kersetin'in kalibrasyon eğrisi

**Çizelge 3.2.** Toplam fenol ve toplam flavonoit miktar tayini

Fraksiyonlar	Total Fenol	Total Flavonoit
	a	b
	$\mu\text{g}/\text{mg}$ ekstre $\pm\text{SD}$	$\mu\text{g}/\text{mg}$ ekstre $\pm\text{SD}$
Herba MeOH	40,7 $\pm$ 0,08	55,4 $\pm$ 0,01
Herba Hekzan	25,2 $\pm$ 0,09	30,1 $\pm$ 0,07
Herba Kloroform	37,0 $\pm$ 0,08	20,5 $\pm$ 0,01
Herba Etil asetat	42,1 $\pm$ 0,05	41,3 $\pm$ 0,08
Herba kalan Su	26,0 $\pm$ 0,02	45,9 $\pm$ 0,01
Tohum MeOH	24,9 $\pm$ 0,04	39,5 $\pm$ 0,07
Tohum Hekzan	12,5 $\pm$ 0,06	20,7 $\pm$ 0,01
Tohum Kloroform	32,5 $\pm$ 0,04	29,3 $\pm$ 0,01
Tohum Etil asetat	36,8 $\pm$ 0,02	31,2 $\pm$ 0,07
Tohum kalan Su	21,3 $\pm$ 0,08	40,8 $\pm$ 0,08

a :  $\mu\text{g}$  gallik asit eşdeğer / mg ekstre

b :  $\mu\text{g}$  kersetin eşdeğer / mg ekstre



**Şekil 3.3.** Toplam fenol ve toplam flavonoit sonuçları

### 3.3. Aktivite Sonuçları

Elde edilen tüm fraksiyonların antioksidan aktiviteleri 3 farklı yöntem ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar IC<sub>50</sub> olarak Çizelge 3.3'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, herba ve tohumun etil asetatlı ve sulu fraksiyonları diğer fraksiyonlara göre daha yüksek antioksidan aktivite göstermiştir.

**Çizelge 3.3.** Fraksiyonların antioksidan sonuçları

Fraksiyonlar	DPPH	SO	NO
	IC <sub>50</sub> µg/mL± SD	IC <sub>50</sub> µg/mL± SD	IC <sub>50</sub> µg/mL± SD
Herba MeOH	85,1±0,1	96,8±0,15	117,1±0,23
Herba Hekzan	112,3±0,12	128,6±0,22	132,5±0,33
Herba Kloroform	135,9±0,21	142,3±0,27	151,6±0,11
Herba Etil asetat	87,6±0,14	101,7±0,19	120,4±0,12
Herba kalan Su	78,4±0,26	85,5±0,12	98,1±0,19
Tohum MeOH	93,8±0,32	111,8±0,33	125,3±0,31
Tohum Hekzan	125,2±0,19	139,3±0,31	147,8±0,15
Tohum Kloroform	144,8±0,2	153,2±0,29	168,6±0,24
Tohum Etil asetat	98,5±0,34	109,5±0,24	116,1±0,19
Tohum kalan Su	81,3±0,28	99,8±0,31	109,5±0,16
Kersetin	8,23±0,1	11,2±0,21	13,1±0,11

*L. arboreum* fraksiyonları HCT-116 kolon kanseri hücre hattına karşı doza bağlı sitotoksosite göstermiştir. Tohumların etil asetatlı fraksiyonu diğer fraksiyonlara göre daha yüksek aktivite gösterirken herba ve tohumun hekzanlı ve kalan sulu fraksiyonlarında daha düşük aktivite gözlenmiştir. Diğer fraksiyonlar denenen dozlarda aktivite göstermemiştir. Sonuçlar Çizelge 3.4' te verilmiştir.

**Çizelge 3.4.** Fraksiyonların HCT-116 hücresine karşı sitotoksosite aktivite sonuçları

<b>Fraksiyonlar</b>	<b>IC<sub>50</sub> µg/mL± SD</b>
Herba MeOH	>40
Herba Hekzan	29,230 ± 4,410
Herba Kloroform	>40
Herba Etil asetat	>40
Herba kalan Su	20,340 ± 2,090
Tohum MeOH	>40
Tohum Hekzan	22,200 ± 3,400
Tohum Kloroform	>40
Tohum Etil asetat	7,090 ± 0,730
Tohum kalan Su	12,840 ± 1,620
Kamptotesin	0,151 ± 0,014



Çizelge 3.5. Fraksiyonların antimikrobiyal aktivite sonuçları

Fraksiyonlar	MİK (µg/mL)					
	<i>Escherichia coli</i> (ATCC:25922)	<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	<i>Candida albicans</i> (ATCC 4053)	<i>Candida crusei</i> (ATCC 6258)
Herba MeOH	-	0,938	1,875	-	-	-
Herba Hekzan	-	-	-	-	-	-
Herba Kloroform	-	0,992	-	-	-	-
Herba Etil asetat	-	-	2,891	-	-	-
Herba kalan Su	-	0,859	1,719	-	-	-
Tohum MeOH	-	-	-	-	-	-
Tohum Hekzan	-	-	-	-	-	-
Tohum Kloroform	-	-	-	-	-	-
Tohum Etil asetat	-	-	0,600	-	-	-
Tohum kalan Su	-	-	-	-	-	-
Gentamisin	0,001	0,016	0,0005	0,002	*	*
Flukonazol	*	*	*	*	0,0002	0,032

“-“ aktif değil, “\*”denenmedi

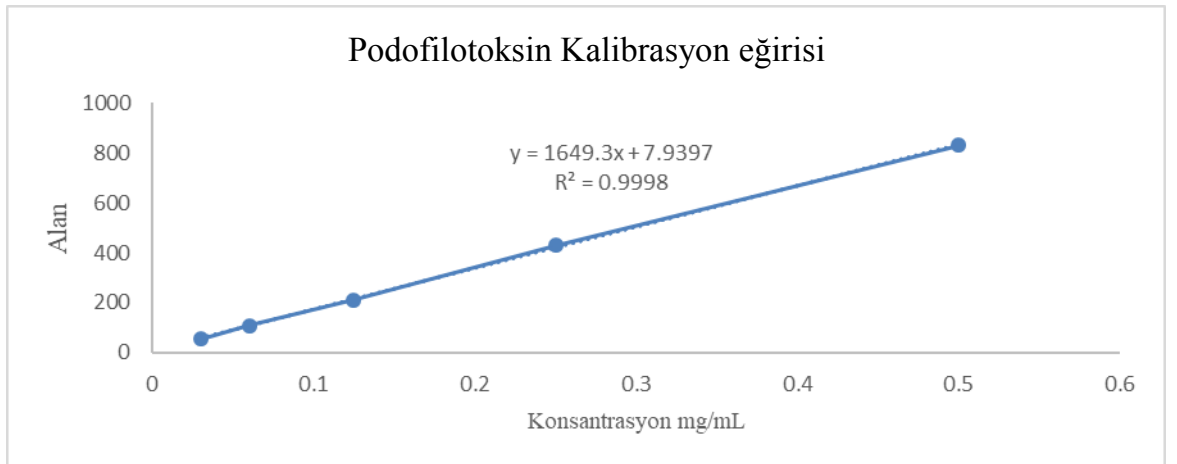
Elde edilen fraksiyonların antimikrobiyal aktiviteleri Gram pozitif, Gram negatif ve maya üzerine değerlendirilmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.5’te verilmiştir. *L. arboreum* tohum etil asetat fraksiyonu *Staphylococcus aureus*’a karşı güçlü aktivite gösterirken, herbanın ham ekstresi (metanollü) *Enterococcus faecalis* ve *Staphylococcus aureus* karşı zayıf aktivite gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca, herbanın kloroformlu ve kalan su fraksiyonları *Enterococcus faecalis* karşı zayıf aktivite göstermiştir. Ayrıca herbanın etil asetatlı fraksiyonu *Staphylococcus aureus*’a karşı zayıf

aktivite göstermiştir. Sonuç olarak, *L. arboreum*'un antifungal aktiviteye sahip olmadığı tespit edilmiştir.

### 3.4. HPLC Analiz Sonuçları

Podofilotoksin ve pikropodofilotoksin standartları için kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Bunun için, 100, 50, 25, 10 and 5 ppm standartları 3 kez analizi yapılmış ve konsantrasyon absorbansa karşı eğri elde edilmiştir.

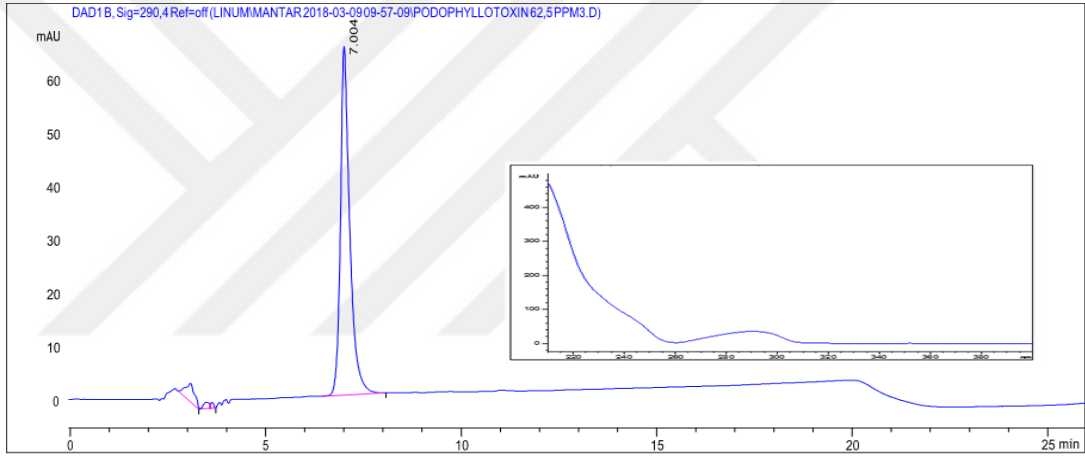
Podofilotoksin ve pikropodofilotoksin standartlarının alıkonma ve UV spektrum verilerini herbadan ve tohumdan elde edilen fraksiyonların alıkonma ve UV spektrum karşılaştırma yöntemi ile podofilotoksin, herbanın hekzan fraksiyonunda ve tohumlarda kloroform fraksiyonunda tespit edilmiştir. Pikropodofilotoksin ise herba ve tohumların etil asetat fraksiyonunda bulunmuş ve miktar tayini yapılmıştır. Tüm miktar tayin verileri Çizelge 3.6'da verilmiştir. Alınan sonuçlara göre, podofilotoksin ve pikropodofilotoksin herbada, tohumlara göre daha fazla bulunmaktadır.



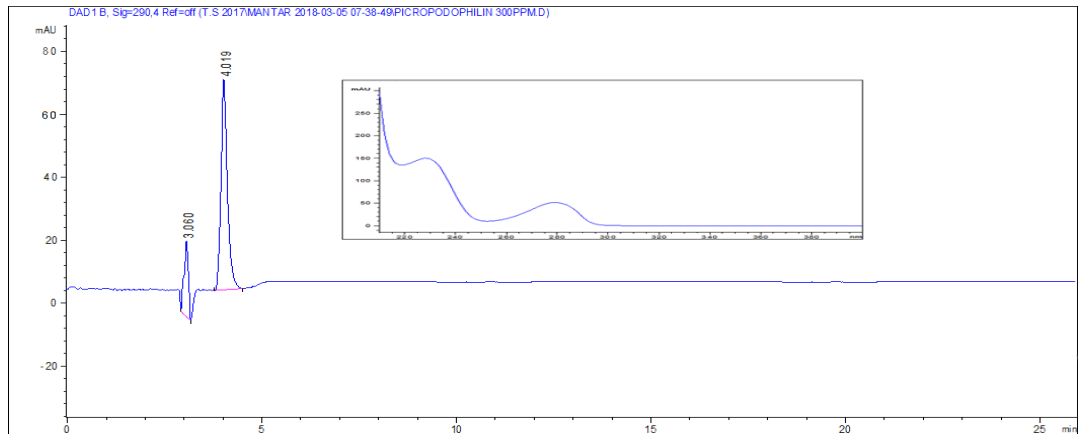
Şekil 3.4. Podofilotoksin'in kalibrasyon eğrisi



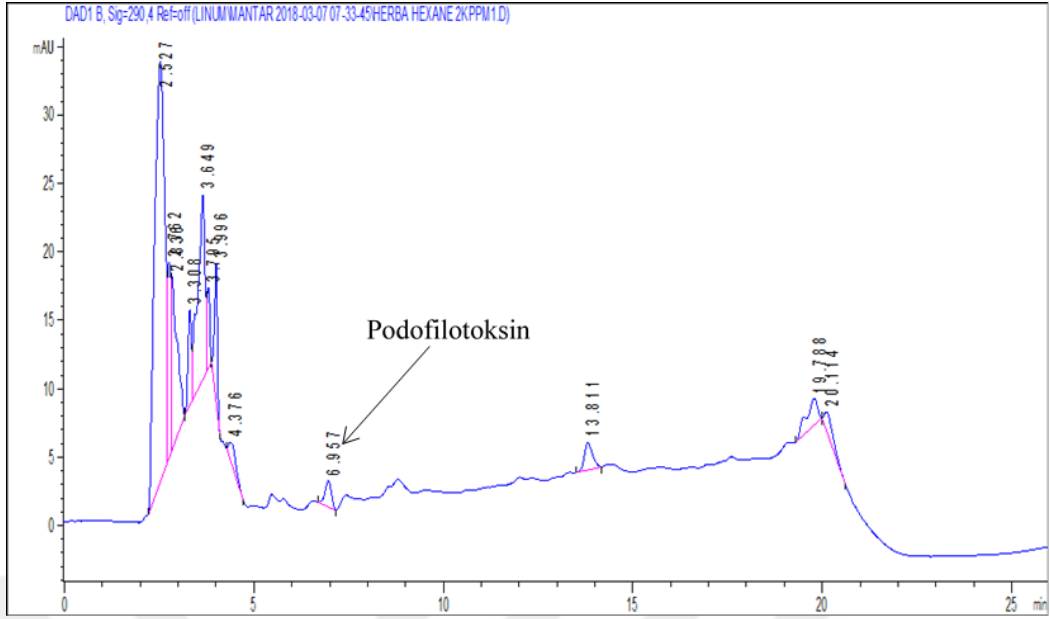
**Şekil 3.5.** Pikropodofilotoksin'in kalibrasyon eğrisi



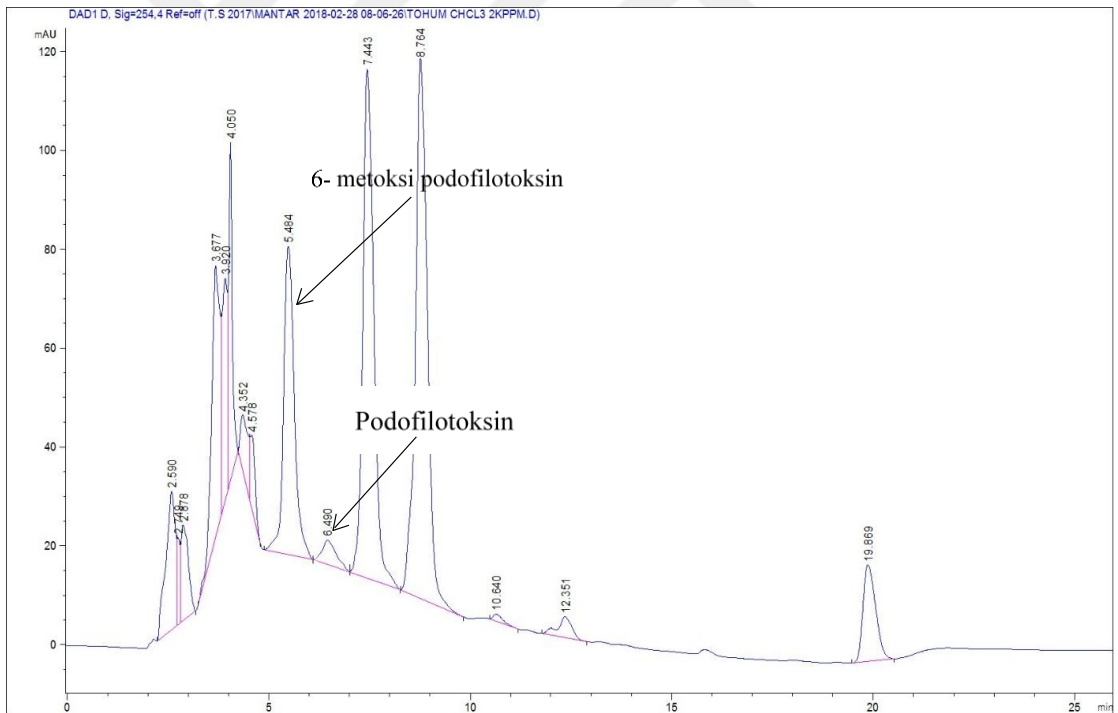
**Şekil 3.6.** Podofilotoksin'nin HPLC kromatogramı ve UV spektrumu



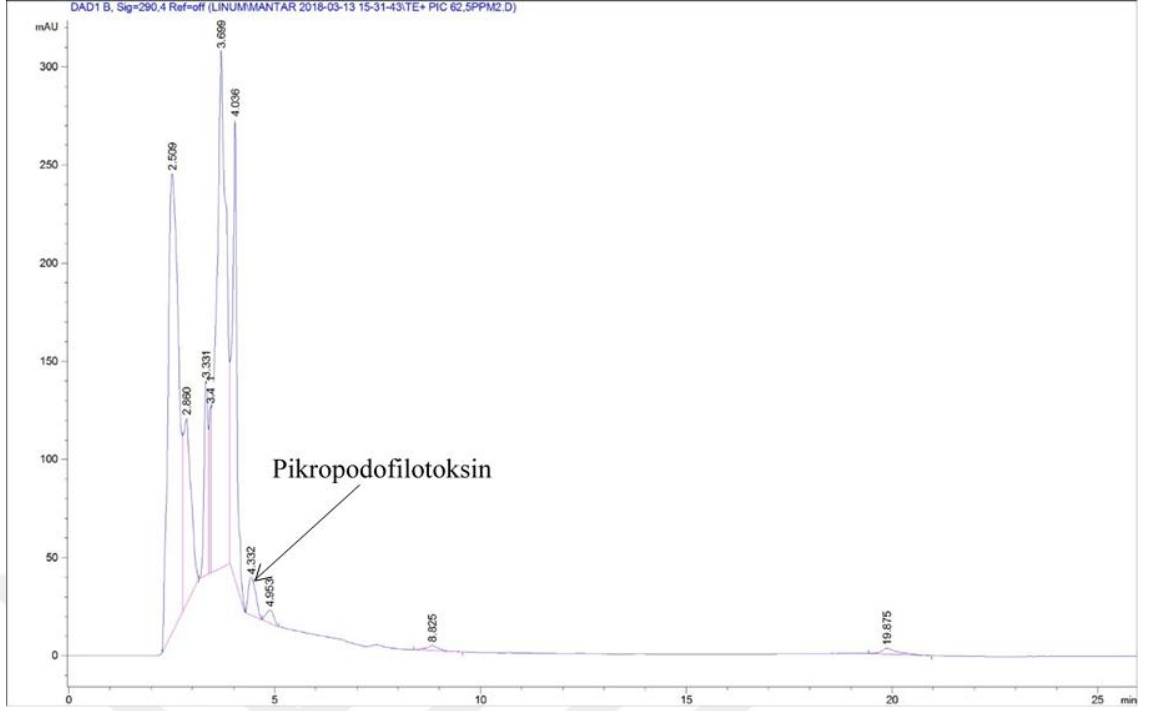
**Şekil 3.7.** Pikropodofilotoksin'nin HPLC kromatogramı ve UV spektrumu



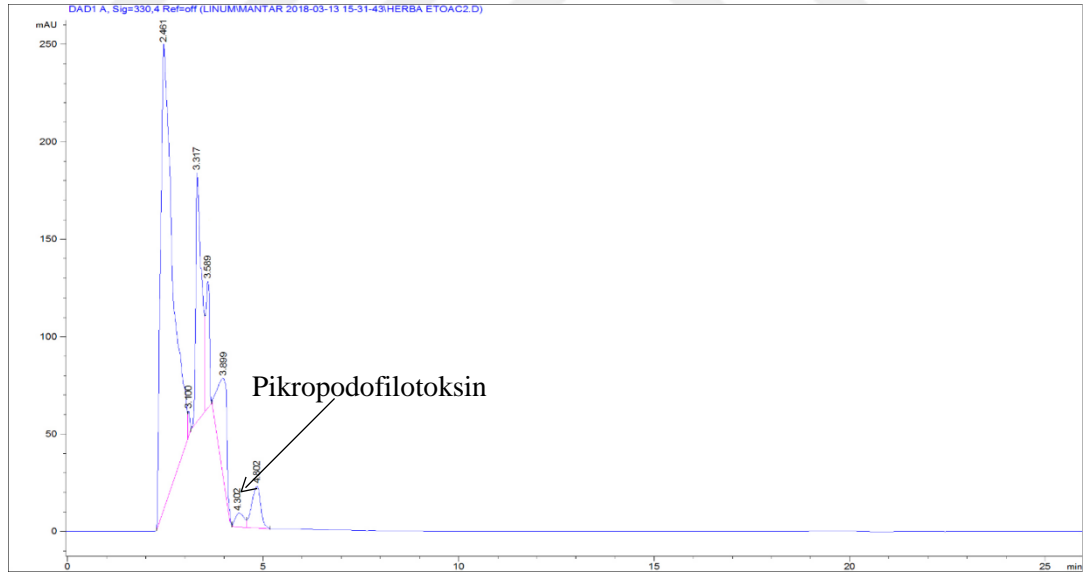
Şekil 3.8. Herbadan elde edilen hekzan fraksiyonun HPLC kromatogramı



Şekil 3.9. Tohumdan elde edilen kloroform fraksiyonun HPLC kromatogramı



**Şekil 3.10.** Herbadan elde edilen etil asetat fraksiyonunun HPLC kromatogramı



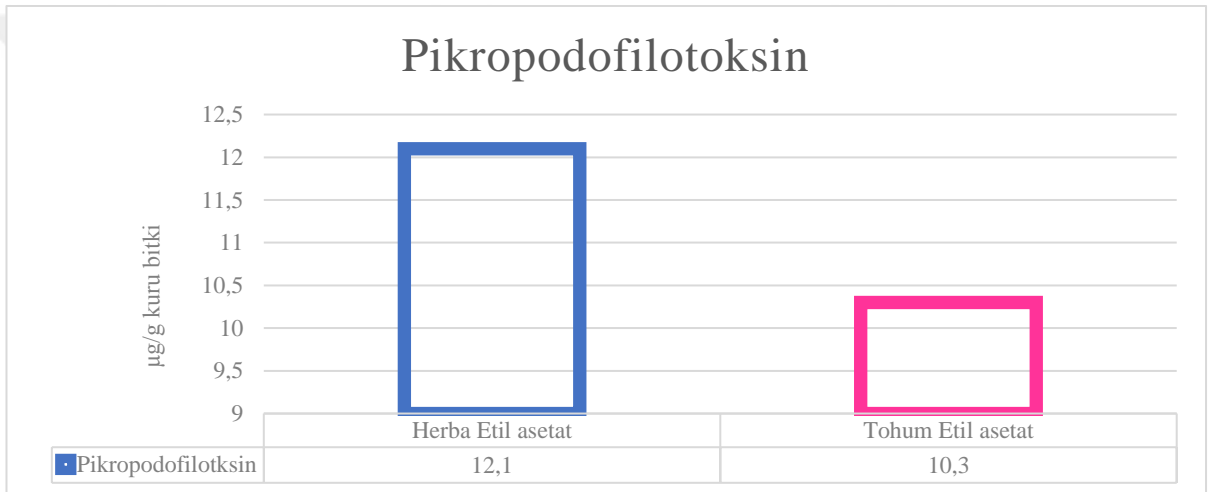
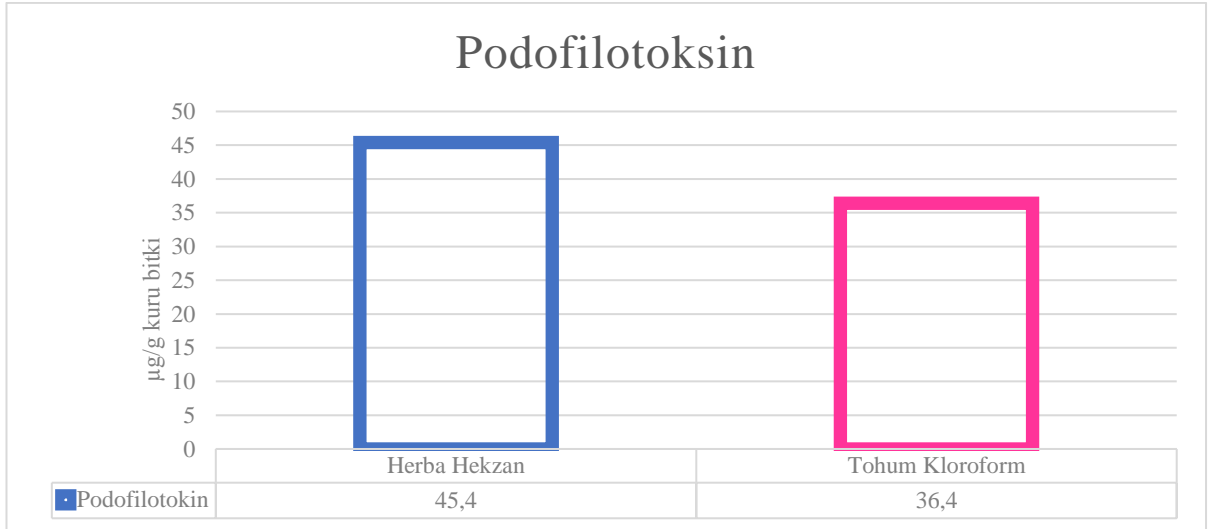
**Şekil 3.11.** Tohumdan elde edilen etil asetat fraksiyonunun HPLC kromatogramı

Çalışmalar sırasında, 6-metoksi podofilotoksin fraksiyonlarda tespit edilmiştir. Standart madde miktarı az olduğundan dolayı miktarı tayini yapılamamıştır. Sadece UV spektrum ve alıkonma zamanına göre tohumun ve

herbanın kloroformlu fraksiyonunda 6-metoksi podofilotoksin tespit edilmiştir (Şekil 3.9).

**Çizelge 3.6.** HPLC validasyon değerleri

<b>Podofilotoksin</b>	
LOD	0,17 µg/mL
LOQ	0,51 µg/mL
<b>Herba Hekzan</b>	45,4 µg/g kuru bitki
%RSD gün içi (Repeatability)	%0,03
% RSD günler arası (Intermediate Precision)	%0,23
Geri kazanım (Recovery)	%98,1- %103,5
<b>Tohum Kloroform</b>	36,4 µg/g kuru bitki
%RSD gün içi (Repeatability)	%0,05
% RSD günler arası (Intermediate Precision)	%0,15
Geri kazanım (Recovery)	%99,2 – %101,8
<b>Pikropodofilotoksin</b>	
LOD	0,15 µg/mL
LOQ	0,45 µg/mL
<b>Herba Etil asetat</b>	12,1 µg/g kuru bitki
%RSD gün içi (Repeatability)	%0,07
% RSD günler arası (Intermediate Precision)	%0,29
Geri kazanım (Recovery)	%95,6 – %102,7
<b>Tohum Etil asetat</b>	10,3 µg/g kuru bitki
%RSD gün içi (Repeatability)	%0,08
% RSD günler arası (Intermediate Precision)	%0,24
Geri kazanım (Recovery)	%99,3 – %101,1



**Şekil 3.12.** Herba ve tohumda podofilotoksin ve pikropodofilotoksin miktarı

## 4. TARTIŞMA

*Linum arboreum*, Linaceae familyasında *Linum* cinsinin, *Syllinum* seksiyonuna, ait bir bitkidir (Davis,1966). Ariltetralin grup lignanlar *Linum* cinsinde en sık rastlanan sekonder metabolitlerdir (Botta ve ark., 2001). Türkiye florasında, *Linum* cinsi 43 tür ile temsil edilmekte olup bu türlerin 16 tanesi endemiktir. *Linum arboreum* tek yıllık bir bitki olup, Türkiye’de Muğla da ve Yunanistan’da Girit ve Karpathos adasında yetişmektedir (Davis,1966). Yapılan Literatür taramasında Yunanistan’da yetişen tür ile ilgili olarak bir çalışmaya rastlanılmamış ve ayrıca *L. arboreum*’un hala orda mevcut olduğuna dair yeni bir kayıt da yoktur. Sadece Türkiye’de yetişen tür ile yapılan çalışmalar vardır. Hem daha önce alınan sonuçlar hem de bu tezde yapılan çalışmalar bilim dünyasına katkı sağlayacaktır.

Daha önce yapılan bir çalışmada, *L. arboreum* herbasında  $\beta$ -Peltatin,  $\beta$ -glukoz ve heksoz bağlı 6- metoksipodofilotoksin HPLC-ESI/MS–MS-UV/DAD yardımıyla tespit edilmiştir (Schmidt ve ark., 2010). Bu çalışmada ise, podofilotoksin ve pikropodofilotoksin hem herba hem de tohumlarda tespit edilmiş ve miktar tayinleri yapılmıştır. Podofilotoksin ve pikropodofilotoksin herbada daha yüksek miktarda bulunmuştur. Ayrıca, 6- metoksipodofilotoksin de tespit edilmiştir, fakat standart yeterli miktarda bulunmadığı için miktar tayini yapılmamıştır (bu madde piyasada bulunmamaktadır, bu yüzden bitkide bu maddenin miktarı tayini yapılmadı, sadece bizim yaptığımız çalışmalarda izole edilen madde kullanarak bu maddenin *L. arboreum* bitkisinde var olduğu tespit edilmiştir). Daha önce bu bitki üzerinde yapılan çalışmalara göre, metanollü ekstre, kalan sulu ekstreye göre daha yüksek antioksidan aktivite göstermiştir (Coban ve Konuklugil, 2005). Bu çalışmada, elde edilen metanollü ekstre farklı polaritelere sahip solvanlar ile fraksiyonlara ayrılarak, her bir fraksiyonun aktivitesi incelenmiştir. En yüksek total fenol bileşik miktarı herbada ve tohumlarda etil asetat fraksiyonlarında tespit edilmiştir. Kalan sulu fraksiyon ise herbada ve tohumlarda en yüksek flavonoit miktarı içermektedir. Herba ve tohumların etil asetatlı ve kalan sulu fraksiyonları diğer fraksiyonlara göre daha yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. Elde edilen fraksiyonlar arasında, tohumların etil asetatlı fraksiyonu



HCT-116 kolon kanserine karşı daha yüksek aktivite göstermiştir. Ancak incelenen fraksiyonlardan çok yüksek antimikrobiyal aktivite saptanmamıştır.

Bitki ekstralarının aktiviteleri, içerdikleri fenolik bileşik, flavonoid, alkaloid v.s. gibi sekonder metabolitlerden kaynaklanmaktadır. Flavonoidler, prostaglandinler yolağı üzerindeki etkisiyle, antioksidan, antiinflamatuvar, antinosiseptif ve sitostatik özellikler göstermektedir. Son çalışmalar, flavonoidlerin ve fenolik bileşiklerin yarı-polar veya polar fraksiyonlardan izole edildiğini göstermiştir (Deniz ve ark., 2015, Cowan, 1999). Yapılan bu çalışmada ise, etil asetatlı ve kalan sulu fraksiyonların en yüksek flavonoid ve fenolik bileşikleri içerdiği bulunmuştur. Bu nedenle, bu polar fraksiyonlar polar olmayan fraksiyonlara göre daha yüksek antioksidan aktivite sergilemiştir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Türkiye coğrafi özelliği, habitat ve tür çeşitliği nedeni ile zengin bir floraya sahiptir. Bu bitkilerden bazıları, geleneksel olarak veya farmasötik ve kozmetik endüstrisinde aktif bileşiklerinden dolayı kaynak olarak kullanılmaktadır. İlaç etken maddesi olabilecek bileşiklerin araştırılmasında bitkisel kaynaklar önem taşımaktadır.

Podofilotoksin, kemoterapide kullanılan etopoz (etopophos), etoposit (etoposide) ve teniposit (teniposide) gibi ilaçların yarı-sentezi için başlangıç maddesi olma özelliğinden dolayı ekonomik bir öneme sahiptir. Bu önemli etken madde, iki *Podophyllum* türünden elde edilmektedir. *P. hexandrum* ve *P. peltatum* un 5-7 yıllık rizomlarından elde edildiği ve bu türlerin yok olma tehlikesi nedeni ile araştırmacılar yeni kaynaklar aramak zorunda kalmıştır. Bu çalışmalar sırasında *Linum album*'da podofilotoksin ve 6-metoksipodofiloksin'in bulunması araştırmacıların *Linum* cinsine yönelmesine neden olmuştur.

Özellikle bitki doku kültürü yolu ile bu etken maddenin eldesi ile ilgili çalışmalar büyük önem kazanmış olup halen bu çalışmalar devam etmektedir. Ülkemizdeki *Linum* türlerinin hem sayısının hem de endemik türlerinin fazla olması nedeni ile ülkemizde bu türlerde ariltetralin grubu lignanlar araştırılmıştır. *Linum arboreum* da bu kapsamda çalışılmıştır. Amaç yüksek oranda podofilotoksin taşıyan türün bulunması ve bunun ekonomik olarak değerlendirilmesidir.

Bu kapsamda ileride yapılabilecek çalışmalar, bitki doku kültürü ile podofilotoksin miktarının artırılması için enzim çalışmalarının yapılması ve ayrıca *Linum* türlerinde miktarca fazla bulunan ve aynı etkiye sahip olduğu bilinen 6-metoksi podofilotoksinin hem enzim çalışmaları hem de klinik çalışmaların yapılması olabilir. Bu nedenle, tez kapsamında elde edilen sonuçlar ileride yapılacak çalışmalara katkı sağlayacaktır.

## ÖZET

### *Linum Arboreum* Üzerinde Farmakognozik Çalışmalar

Ülkemiz, bulunduğu coğrafi konum ve iklim özellikleri nedeniyle çok çeşitli bitki türlerine sahiptir. Ülkemizde bulunan toplam tür sayısı yaklaşık 11 800 bitki türü, endemik tür sayısı ise 3649 ve endemizm oranını %31,82 olarak belirlemişlerdir. Endemik türler bakımından en zengin bölgelerimiz Akdeniz, Doğu Anadolu ve İç Anadolu bölgeleridir. Tez konusu olan *Linum arboreum* L. 200'den fazla türü olan Linacea familyasına aittir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda *Linum* cinsinde majör bileşenler olarak ariltetralin lignanlar tespit edilmiştir. Bu çalışmada *Linum arboreum* L'de HPLC-DAD ile podofilotoksin ve pikropodofilotoksinin kalitatif ve kantitatif analizi hızlı, basit, doğru ve seçici bir HPLC metodu ile değerlendirilmiştir. Toplam fenolik bileşikler ve toplam flavonoid miktarı *Linum arboreum*'un fraksiyonlarında tayin edilmiştir. Ayrıca, bu fraksiyonların antioksidan (DPPH, süper oksit ve nitrik oksit), sitotoksikite (HCT-116) ve antimikrobiyal (Gram pozitif, Gram negatif ve maya) aktiviteleri tayin edilmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Ariltetralin lignan, Biyoaktivite, HPLC, HCT-116, Podofilotoksin, Pikropodofilotoksin.

## SUMMARY

### **Pharmacognostic studies on *Linum arboreum***

Our country has a wide variety of plant species due to its geographical location and climatic characteristics. The total number of species in Turkey is approximately 11 800 plant species, the number of endemic species is 3649 and the rate of endemism is determined as 31.82%. The richest regions in terms of endemic species are the Mediterranean, Eastern Anatolia and Central Anatolia regions. *Linum arboreum* L., which is the subject of the thesis, belongs to Linaceae family which has more than 200 species. Aryltetralin lignans are major compounds of *Linum* genus. In this study, a fast, simple, accurate and selective HPLC method was validated for the qualitative and quantitative analysis of podophyllotoxin and picropodophyllotoxin by HPLC-DAD in *Linum arboreum* L. Furthermore, total phenolic and total flavonoid contents, antioxidant (DPPH, Superoxide, Nitric oxide), cytotoxicity (HCT-116 cell line) and antimicrobial activity (Gram- positive, Gram negative and yeast) of *Linum arboreum* were investigated.

**Keywords:** Aryltetralin lignan, Bioactivity, HPLC, HCT-116, Podophyllotoxin, Picropodophyllotoxin.

## KAYNAKLAR

- ALEJANDRE-GARCÍA I, ÁLVAREZ L, CARDOSO-TAKETA A, VILLARREAL ML (2015). Cytotoxic Activity and Chemical Composition of the Root Extract from the Mexican Species *Linum scabrellum*: Mechanism of Action of the Active Compound 6-Methoxypodophyllotoxin. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 298463-298469.
- AMIN A, GALI-MUHTASIB H, OCKER M, SCHNEIDER-STOCK R(2009), Overview of Major Classes of Plant-Derived Anticancer Drugs, *Int J Biomed Sci*; 5 (1): 1-11
- ARROO R R J, ALFERMANN A W, MEDARDE M, PETERSEN M, PRAS N, WOOLLEY J G (2002). "Plant Cell Factories as a Source for Anti-Cancer Lignans" *Phytochem.*,1, 27-35.
- BAG GC, GRIHANJALI P, BHAIGYABATI TH (2015). Assessment of total flavonoid content and antioxidant activity of methanolic rhizome extract of three *Hedychium* species of manipur valley. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 30:154-161.
- BAHMANI M, SHIRZAD H, SHAHINFARD N, SHEIVANDI L, RAFIEIAN-KOPAEI M (2017). Cancer Phytotherapy: Recent Views on the Role of Antioxidant and Angiogenesis Activities. *Evid Based Complement Alternat Med*, 22: 299-309
- BHATTACHARYYA D, SINHA R, GHANTA S, CHAKRABORTY A, HAZRA S, CHATTOPADHYAY S (2012). Proteins differentially expressed in elicited cell suspension culture of *Podophyllum hexandrum* with enhanced podophyllotoxin content, *Proteome Science*, 10: 1-12.
- BAYTOP, T (1999). *Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi*, Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri, s.262-263.
- BOTTA B, DELLE MONACHE G, MISITI D, VITALI A, ZAPPIA G (2001). Aryltetralin Lignans: Chemistry, Pharmacology and Biotransformations. *Curr. Med. Chem.* 8: 1363- 1381.
- CANEL C, DAYAN FE, GANZERA M, KHAN IA, RIMANDO A, BURANDT CL JR, MORAES RM. (2001). High yield of podophyllotoxin from leaves of *Podophyllum peltatum* by in situ conversion of podophyllotoxin 4-o- $\beta$ -glucopyranoside. *Planta Med.* 67:97-99. doi:10.1055/s-2001-10636
- COBAN T, KONUKLUGIL B (2005). Free Radical Scavenging Activity of *Linum arboreum*. *Pharm. Biol.*, 43: 370-375.
- COWAN MM (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12:564-601.

DABUR R, GUPTA A, MANDAL TK (2007). Antimicrobial activity of some Indian medicinal plants. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* **4**: 4313–318.

DAĞLAR N, DAĞDEVİREN HN (2018). Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulamalarında Fitoterapinin Yeri. *Euras J Fam Med*, **7**:73-77

DAVIS PH (1966). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Edinburgh, USA, 2, s: 428.

DINIZ TC, SILVA JC, DE LIMA-SARAIVA SR, RIBEIRO FP, PACHECO AG, DE FREITAS RM, QUINTANS- JUNIOR LJ, QUINTANS JDES, MENDES RL, ALMEIDA JR (2015). The role of flavonoids on oxidative stress in epilepsy. *Oxid. Med. Cell Longev.* 171756-171762.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing EUCAST reading guide for broth microdilution. v 1.0, 2019. Available at: <http://www.eucast.org> (last accessed February, 2019).

FEDEROLF K, ALFERMANN W, FUSS E (2007). Aryltetralin-lignan formation in two different cell suspension cultures of *Linum album*: Deoxypodophyllotoxin 6-hydroxylase, a key enzyme for the formation of 6-methoxypodophyllotoxin. *Phytochemistry*, **68**: 1397-1406

GONELIMALI FD, LIN J, MIAO W (2018). Antimicrobial Properties and Mechanism of Action of Some Plant Extracts Against Food Pathogens and Spoilage Microorganisms. *Front Microbiol.* 9:1639-1645.

GORDALIZA M, GARCIA J M, MIGUEL DE CORRAL M A, CASTRO M A, GOMEZ-ZURITA M A (2004). Podophyllotoxin: distribution, sources, applications, and new cytotoxic derivatives. *Elsevier Toxicon* 44: s: 441-459.

HARPUR US, GENÇ Y, KHAN N, SARACOĞLU I (2011). Radical Scavenging Effects of Different *Veronica* Species. *Rec. Nat. Prod.* 5:100-106.

HAZAR S, CHATTOPADHYAY S (2016). An overview of lignans with special refence to podophyllotoxin, a cytotoxic lignan: *Chem. Biol. Lett.*, 3(1), 1-8

International Conference on Harmonization (ICH). *Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B*, 1996. ICH, 2005. *Harmonized tripartite guideline: validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)*.

International Organization for Standardization (ISO). *Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems- Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices- Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. ISO 20776-1: 2006*.

- JAVIDNIA K, MIRI R, REZAI H, JAFARI A, AZARMEHR A, AMIRGHOFRAN Z (2005). Biological Activity and Aryltetraline Lignans of *Linum persicum*. *Pharm. Biol.* 43: 547-254.
- KARTAL M, KONUKLUGIL B, INDRAYANTO G, ALFERMANN AW (2004). Comparison of different extraction methods for the determination of podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin in *Linum* species. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35: 441-447.
- KAZUSAKI M, UEDA S, TAKEUCHI N, OHGAMI Y (2012). Validation of analytical procedures by high-performance liquid chromatography for pharmaceutical analysis. *Chromatogr.* 33: 65-73.
- KHAN W, SUBHAN S, SHAMS DF, AFRIDI SG, ULLAH R, SHAHAT AA, ALQAHTANI AS (2019). Antioxidant Potential, Phytochemicals Composition, and Metal Contents of *Datura alba*. *Biomed Res Int.* 17:2403718-2403726.
- KINCH MS, HAYNESWORTH A, KINCH SL, HOYER D (2014). An overview of FDA-approved new molecular entities: 1827±2013. *Drug Discov. Today*, 19: 1033-1039.
- KONUKLUGIL B (1995). The Importance of Aryltetralin (Podophyllum) Lignans and Their Distribution in The Plant Kingdom. *J. Fac. Pharm. Ankara*, 24:2-11.
- KONUKLUGIL B IONKOVA I, VASILEV N. SCHMIDT, T, J., WINDHÖVEL J., FUSS E. ALFERMANN A. W (2007) Lignans from *Linum* species of sections *Syllinum* and *Linum*, *Natural Product Research*, 21:1, 1-6
- KONUKLUGIL B, BAHADIR Ö (2004). *Linum usitatissimum* L. and its chemical constituents and Biological activities. *J. Fac. Pharm, Ankara*, 33: 63-84.
- KRAUSE J P, SCHULTZ M, DUDEK S (2002). "Effect of Extraction Conditions on Composition, Surface Activity and Rheological Properties of Protein Isolates from Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82,970-976.
- LAU W, S. SATTELY E, (2015) Six enzymes from mayapple that complete the biosynthetic pathway to etoposide aglycone. *Science Magazine: Plant Science* Vol 349 (6253), s:1224-1228.
- LICHOTA A, GWOZDZINSKI K (2018). Anticancer Activity of Natural Compounds from Plant and Marine Environment. *Int J Mol Sci.* 19:3533-3542.
- LOMBARDI VRM, CARRERA I, CACABELOS R (2017). In Vitro Screening for Cytotoxic Activity of Herbal Extracts. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017:2675631-2675639

- MAHDI-POUR B, JOTHY SL, LATHA LY, CHEN Y, SASIDHARAN S (2012). Antioxidant activity of methanol extracts of different parts of *Lantana camara*. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2:960–965.
- MOHAGHEGHZADEH A, GHOLAMI A, SOLTANI M, HEMMATI S, ALFERMANN AW.(2005) *Linum mucronatum*: Organ to organ lignan variations. *Z Naturforsch;* 60c: 508-10
- MOHAGHEGHZADEH A, HEMMATI S, MEHREGAN I, ALFERMANN AW (2003). *Linum persicum*: Lignans and placement in Linaceae. *Phytochemistry Rev;* 2: 363-9.
- MOSMANN T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65:55-62.
- NEWMAN DG, CRAGG GM, KINGSTON DGI (2015). Natural Products as Pharmaceuticals and Sources for Lead Structures. *The Practice of Medicinal Chemistry (Fourth Edition)*, s:101-139
- PETERSEN M, ALFERMANN A W (2001) "The Production of Cytotoxic Lignans by Plant Celi Cultures". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55: 135-142.
- PILKINGTON LI (2018). Lignans: A Chemometric Analysis. *Molecules*, 23: 1666-1670.
- RAHAL A, KUMAR A, SINGH V, YADAV B, TIWARI R, CHAKRABORTY S, DHAMA K (2014). Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay, *BioMed Res. Inter.* Vol 2014, Art. ID 761264, s:19.
- RENOUARD S, CORBIN C, DROUET S (2018). Investigation of *Linum flavum* (L.) Hairy Root Cultures for the Production of Anticancer Aryltetralin Lignans. *Int J Mol Sci.*19: 990- 997.
- SAMBAMURTY A V S S, (2005) *Taksonomy of Angiosperm*, IK International Pvt. Ltd. s:701
- SCHMIDT TJ, HEMMATI S, KLAES M, KONUKLUGIL B, MOHAGHEGHZADEH A, IONKOVA I. FUSS E, ALFERMANN W (2010). Lignans in flowering aerial parts of *Linum* species – Chemodiversity in the light of systematics and phylogeny, *Phytochemistry*, 71: 1714-1722.
- SENTHIL KUMAR R, RAJKAPOOR B, PERUMAL P (2012). Antioxidant activities of *Indigofera cassioides* Rottl. Ex.DC. using various in vitro assay models. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2: 256-259.
- SHABIR GA (2003). Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: understanding the differences and similarities between validation requirements of the us food and drug administration, the us pharmacopeia and the international conference on harmonization. *J. Chromatogr.* 987: 57-66.



- SHI P, DU W, WANG Y, TENG X, CHEN X, YE L (2018). Total phenolic, flavonoid content, and antioxidant activity of bulbs, leaves, and flowers made from *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. *Food Sci Nutr.* **7**:148–154.
- SHIRWAIKAR A, SHIRWAIKAR K, RAJENDRAN IS, PUNITH A (2006). In vitro antioxidant studies on the benzyl tetra isoquinoline alkaloid berberin *Biol. Pharm. Bull.* **29**:1906-1912.
- SIMPSON D, AMOS S (2017). *Pharmacognosy Fundamentals, Applications and Strategies*, Academic press, 267-280
- SINGLETON VL, ROSSI JA (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *Am. J. Enol. Vitic.* **16**:144-149.
- SUN YJ, ZHANG YL, WANG Y (2015). Purity Assessment of Aryltetralin Lactone Lignans by Quantitative <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance. *Molecules.* **20**: 9671–9685.
- THEOBALD RJ (2016). Podophyllotoxin. Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier. s: 34-67.
- UMEZAWA T (2003). Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochem. Rev.* **2**: 371-390
- United States Pharmacopoeial Convention, Validation of Compendial Procedures, in United States Pharmacopoeia, United States Pharmacopoeial Convention: Rockville. 2016. s. 1640-1645.
- VASSÃO DG, KIM KW, DAVIN LB, LEWIS NG (2010). Lignans (Neolignans) and Allyl/Propenyl Phenols: Biogenesis, Structural Biology, and Biological/Human Health Considerations Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology, s: 815-928
- VASSAO DG, KIM KW, LAURENCE B, NORMAN D, LEWIS G (2010). Natural Products Structural Diversity-I Secondary Metabolites: Organization and Biosynthesis. Ed, Liu HW, Mander L, Comprehensive Natural Products II. Elsevier Science.
- XU DP, LI Y, MENG X (2017). Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *Int J Mol Sci.* **18**:96-106
- YILDIRIM C (1995). *Linum hirsutum* L. Subsp. *Byzantinum* azn., da sitolojik ve embriyolojik çalışmaları. Yüksek lisans tezi, Marmara Üniversitesi, Fen bilimleri enstitüsü.
- ZYAD A., LEOUIFOUDI I, TILAOUI M, MOUSE HA, KHOUCHANI M AND JAAFARI A (2018). Natural Products as Cytotoxic Agents in Chemotherapy against Cancer. Cytotoxicity, Ed: Çelik TA s:68.

# ÖZGEÇMİŞ

## I. Bireysel Bilgiler

Adı : Zaher  
Soyadı : SULTAN  
Doğum yeri ve tarihi : Tripoli – 10 Ocak 1977  
Uyruğu : Türkiye - Lübnan  
Medeni durumu : Evli  
Askerlik durumu : Muaf  
İletişim adresi ve telefonu : Tall Sq., Tall Street Kadı Ahmet  
Sultan-i zade building first flr.  
Tripoli – Trablusşam – LEBANON- LÜBNAN  
+961 3 109 324 +90 555 233 19 35

## II. Eğitimi

Eczacılık Lisans, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi 2002  
Türkçe Dili, Ankara Üniversitesi TÖMER 1997

## III. Ünvanları

ECZACI

## IV. Mesleki Deneyimi

Sanofi Aventis Liban S.A.L: Nisan 2006- Bugün  
Pharma International Company Mart 2004- Mart 2006  
Pharmacy Sultan Tripoli Lebanon: Ocak 2002 – Şubat 2004