

TANACETUM ZAHLBRUCKNERI (NÁB.) GRIERSON' NUN SEKONDER METABOLİTLERİ ve ANTİOKSİDAN ETKİLERİ*
SECONDARY METABOLITES AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF TANACETUM ZAHLBRUCKNERI (NÁB.) GRIERSON

Perihan GÜRBÜZ¹, Duygu EROĞLU¹, Şengül Dilem DOĞAN², Gökçe Şeker KARATOPRAK¹, Mehmet Yavuz PAKSOY³, Müberra KOŞAR⁴

1Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Farmakognozi Ab. D., Kayseri

2Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Temel Bilimler Ab. D., Kayseri

3Tunceli Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Ab. D., Tunceli

4Doğu Akdeniz Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Ab. D., Gazimağusa, Mersin

ÖZ

Bu çalışma kapsamında Asteraceae familyasına dahil endemik bir tür olan *Tanacetum zahlbruckneri* (Náb.) Grierson bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanol ekstresinin DPPH , ABTS + radikallerini süpürücü aktivitesi ve β -karoten-linoleik asitle oksidasyon yöntemi ile antioksidan aktiviteleri, Folin- Ciocalteu yöntemiyle toplam fenol, flavonit ve flavonol içeriği incelenmiştir. Metanol ekstresinden sıvı-sıvı partisyon yöntemiyle *n*-hekzan, dietil eter, diklorometan ve *n*-butanol ekstraları hazırlanmış, *n*-butanol ekstresinden çeşitli kromatografik yöntemler kullanılarak, klorojenik asit (1), rutin (2) ve konduritol F (3) izole edilmiştir. Elde edilen bileşiklerin yapıları spektroskopik yöntemler (IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 2D-NMR, IR, MS) kullanılarak aydınlatılmıştır. Bu çalışma ile Konduritol F *Tanacetum* türlerinden ilk defa izole edilmiştir. Klorojenik asit ve rutin bitkinin metanol ekstresindeki kantitatif tayini Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile gerçekleştirilmiştir. İzole edilen bileşiklerin antioksidan aktiviteleri ölçülmüş ve klorojenik asitin aktivitesi, rutin ve metanol ekstresinden daha yüksek bulunmuştur.

ABSTRACT

In the current study, antioxidant activity of methanol extract prepared from *Tanacetum zahlbruckneri* (Asteraceae) was studied with DPPH , ABTS+ radical scavenging and beta-carotene-linoleic acid cooxidation assays. Total phenol, flavonoid and flavonol contents of extracts were determined with Folin- Ciocalteu method. *n*-Hexane, diethyl ether, dichloromethane and *n*-butanol extracts were prepared from methanol extract with solvent partitioning and chlorogenic acid, rutin and conduritol F were isolated from *n*-BuOH extract with various chromatographic methods. Structures of the compounds were elucidated by extensive 1D- and 2D-NMR spectroscopic analysis in combination with IR, MS experiments. Conduritol F was isolated for the first time from *Tanacetum* species. Quantitative analyses of chlorogenic acid and rutin in MEOH extract were determined with High Pressure Liquid Chromatography (HPLC). Antioxidant activities of isolated compounds were studied and chlorogenic acid was found to be more active than rutin and methanol extract.

Anahtar kelimeler: *Tanacetum zahlbruckneri*, Klorojenik asit, Rutin, Konduritol F, HPLC

Keywords: *Tanacetum zahlbruckneri*, Chlorogenic acid, Rutin, Conduritol F, HPLC

*Bu araştırma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-2014-5558 numaralı proje ile yüksek lisans tezi olarak desteklenmiştir.

Makale Geliş Tarihi : 02.11.2016

Makale Kabul Tarihi: 28.02.2017

Corresponding Author: Yrd. Doç. Dr. Perihan Gürbüz, Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, Kayseri 38039

Tel: 0352 4380486

Fax: 0352 4379169

e-mail pgurbuz@erciyes.edu.tr

GİRİŞ

Tanacetum cinsi Dünya' da 161, Türkiye'de ise doğal olarak yetişen 27' si endemik 47 türle temsil edilmektedir (1, 2). *Tanacetum* türleri halk arasında, kuvvet verici, iştah açıcı ve kurt düşürücü, idrar arttırıcı, gaz söktürücü, midevi ve safra kesesi taşlarını düşürücü olarak kullanılmaktadır (3). Ayrıca, artrit, emanoğog (4) ve kolagog olarak kullanımı da bulunmaktadır (5). *Tanacetum* türleri üzerinde yapılan çok sayıda farmakolojik çalışmalarla bu türlerin başta migren tedavisinde olmak üzere, antitümör, antiinflamatuvar (6), antimikrobiyal, antifungal, insektisit (7), sitotoksik (8), antiprotozoal, antihelmintik (9, 10) antiülser (11) gibi birçok etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. *Tanacetum* türleri seskiterpen laktonlar (germakranolit, ödesmanolit, gyanolit), flavonoidler ve uçucu yağlar bakımından zengindir. Ayrıca nadiren de olsa, kumarin türevi maddeler ve fenolik asitleri de içermektedir (12-15).

T. zahlbruckneri' nin toprak üstü kısımları ve yapraklarının Van-Çatak bölgesinde, halk arasında kan dindirici, grip ve nezleye karşı kullanıldığı bildirilmiştir (16). Bitkinin çiçeklerinden elde edilen uçucu yağı ile yapılan bir gaz kromatografisi çalışmasında ana bileşenlerinin Germakran D ve spathulenol olduğu tespit edilmiştir (17). Bu çalışmanın amacı, Doğu Anadolu bölgesinde endemik olarak yayılış gösteren *T. zahlbruckneri*' nin toprak üstü kısımlarından hazırlanan MeOH ekstresinin spektroskopik yöntemlerle toplam fenol, flavonoid, flavonol içeriğini belirlemek, MeOH ekstresinden hazırlanan *n*-BuOH ekstresinden kromatografik çalışmalarla, sekonder metabolitlerin izolasyonunu yapmak, izole edilen bileşiklerin yapılarını spektroskopik (IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 2D-NMR, Kütle Spektrometresi) yöntemlerle aydınlatmak ve yapısı aydınlatılan bileşiklerin, MeOH ekstresindeki miktar tayinlerini gerçekleştirerek ekstre ve saf maddelerin DPPH , ABTS⁺ radikal süpürücü ve β-karoten / linooleik asit birlikte oksidasyonunu inhibe edici etki tayinini yapmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Genel Deneysel Prosedür

NMR ölçümleri Bruker AM 400 spektrometresi (¹H NMR, 400 MHz; ¹³C NMR, 100 MHz, internal standart: TMS); MS ölçümleri LC/MS High Resolution Time of Flight (TOF) Agilent 1200/6530 cihazı; IR spektrumları Perkin Elmer 400 FT-IR spektrometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kolon kromatografisi, silika jel 60 (Merck); GPC (General Permeation Chromatography), Sephadex LH-20 açık kolon kullanılarak, ters faz silika jel kolon kromatografisi ise orta basınçlı sıvı kromatografi (OBSK) ve yüksek basınçlı sıvı kromatografi (YBSK; Agilent 1100 sıvı kromatografi sistemi, degazör, pompa ve kontrolör ile birlikte) sistemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bitkisel Materyal

T. zahlbruckneri 1-5 Haziran 2013 tarihinde Van'ın Bahçesaray ilçesinden, Kavuşşahap dağlarından, Varikrapit geçidinden, 2400 m yükseklikten toplanmıştır. Bitki örnekleri Dr. Mehmet Yavuz Paksoy tarafından teşhis edilmiştir. Bitkiye ait herbaryum örneği Fırat Üniversitesi, Elazığ Herbaryumu (FUH)'nda saklanmaktadır (Paksoy 1503).

Ekstrelerin Hazırlanışı

Gölgede kurutulmuş, toz edilmiş bitkisel materyal (750 g) 37°C'de metanol (4 x 1.5 L) ile ekstre edilmiştir. Ekstreler süzülüş ve süzüntüler rotavaporunda, düşük ısıda ve düşük basınç altında kurutulmuştur (112 g, % 15). Ham metanol ekstresi 300 mL suda süspansiyon edildikten sonra bir ayırma hunisine alınmış, sırasıyla *n*-hekzan (4 x 600 mL), dietil eter (3x 400 mL), diklorometan (3 x 300 mL), etil asetat (3 x 300 mL) ve *n*-butanol (2 x 300 mL) ile sıvı sıvı ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Kurutulan ekstreler liyofilize edilerek çalışma zamanına kadar 4 °C' de muhafaza edilmiştir (Hekzan; 14 g, Et₂O; 2.2 g, CH₂Cl₂; 655 mg, *n*-BuOH; 18 g, Su; 65 g).

Toplam Fenol, Flavonoid ve Flavonol Miktar Tayini

MeOH ekstresinin içerdiği toplam fenol miktarı Folin-Ciocalteau (18) yöntemiyle hesaplanarak sonuçlar gallik asite eşdeğer (mg gallik asit/g ekstre) olarak verilmiştir. MeOH ekstresinin toplam flavonoid analizi ise Zhishen ve ark. (1999)' nın çalışmalarında kullandıkları metod modifiye edilerek yapılmıştır (19). Ekstrelerin içerdikleri toplam flavonoid miktarları kateşine eşdeğer (mg CE/g_{ekstre}) olarak hesaplanmıştır.

Yine aynı ekstrenin içerdiği toplam flavonol miktarı ise rutine eşdeğer olarak (RE) mg RE/g_{ekstre} olarak hesaplanmıştır (20). Bütün ölçümler üç paralel olarak yapılmış ve ortalama değerler kullanılmıştır.

Kromatografik Çalışmalar

18 g *n*-BuOH ekstresi yeterli miktar metanolde çözülerek Silika jel [70 x 5 cm] cam kolona tatbik edilmiştir. Elüsyonda çözücü sistemi olarak EtOAc-MeOH-H₂O (100:17:13) kullanılmıştır. Kolondan toplanan fraksiyonlar İTK ile kontrol edilerek 4 ana fraksiyonda toplanmış ve yoğunlaştırılmıştır. **FR.1:** 482 mg, **FR. 2:** 5 g, **FR. 3:** 3 g, **FR. 4:** 4.61 g.

FR. 4 (4.61 g), Silika jel kolon kullanılarak, CHCl₃-MeOH-H₂O (61:32:7) ve EtOAc- MeOH-H₂O (100:30:13) çözücü sistemleri ile fraksiyonlanmış ve buradan 4 alt fraksiyon (Fr. 4a→4d) elde edilmiştir.

Fr.4c (943 mg), CH₂Cl₂:MeOH (1:1) çözücü sistemiyle Sephadex LH-20 kolon kromatografisine tatbik edilmiş ve bu fraksiyondan **1** numaralı bileşik (18 mg) saf olarak elde edilmiştir.

Fr.4a (937 mg) EtOAc:MeOH:H₂O (100:17:13) çözücü sistemiyle hazırlanan silika jel kolona, tatbik edilmiştir. Elüsyon CHCl₃:MeOH:H₂O (65:45:12) çözücü sistemiyle yapılmıştır. İTK ile kontrolleri yapılan fraksiyonlardan ilk ikisi (4a₁→4a₂) (193 mg) önce orta basınçlı sıvı kromatografi (OBSK) sistemine uygulanarak, H₂O:ACN (80:20 ve 70:30) çözücü sistemi ile fraksiyonlanmış, sonrasında ilk fraksiyon (48 mg) CHCl₃:MeOH:H₂O (61:32:7) çözücü sistemiyle hazırlanan silika jel kolona, tatbik edilerek **3** numaralı bileşik (9 mg) saf olarak elde edilmiştir.

FR. 2 (906 mg), OBSK sisteminde hazır doldurulmuş silika kartuş kullanılarak CHCl₃:MeOH:H₂O (90:10:1→61:32:7) çözücü sistemi ile elüe edilmiş ve 16 alt fraksiyon (Fr. 1→ 16) toplanmıştır.

Fr. 2.12 (248 mg) Sefadeks LH-20 kolona tatbik edilerek, elüsyon CH₂Cl₂:MeOH (1:1) çözücü sistemi ile yapılmış ve iki alt fraksiyon elde edilmiştir. Bu alt fraksiyonlardan ilki (32 mg) CHCl₃:MeOH:H₂O (70:30:3) çözücü sistemiyle hazırlanan silika jel kolona, tatbik

edilerek elüsyona bu çözücü sistemi ile devam edilmiş ve 2 numaralı bileşik (8.6 mg) saf olarak elde edilmiştir.

Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK) Analizi

YBSK analizlerinde dedektör olarak Fotodiyot dizi dedektör (PDA) kullanılmış ve kromatografik olarak ayrılan maddeler 200-500 nm arasında analiz edilmiştir. Kolon olarak Teknokroma C₁₈ (250x4.6 mm, 5 µm) kolon kullanılmıştır. Akış hızı 1 mL/dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Elüsyon üçlü çözücü karışımlarıyla doğrusal olmayan gradient (Tablo I) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Maddelerin tanımlanmasında hem tutunma zamanları hem de UV spektrumları kullanılmıştır (21).

Tablo I. YBSK gradient akış tablosu

Zaman (dak)	Hareketli faz (%)		
	A	B	C
0	85	15	0
15	70	30	0
18	60	40	0
30	60	40	0
35	100	0	0
37	85	0	15
48	70	0	30
50	85	15	0

A: Metanol:su:asetik asit (10:88:2); B: Metanol:su:asetik asit (90:8:2); C: Metanol.

Antioksidan Etki Tayini

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) Radikalini Süpürücü Etki Tayini

Ekstrelerin DPPH radikalini süpürücü etkileri Gyamfi ve ark.'nın metoduna göre yapılmıştır (22). Metanol, n-butanol ekstreleri ile bu ekstrelerden elde edilen 1-3 kodlu maddeler aktiviteleri bakımından incelenmiştir. Pozitif kontrol olarak BHA kullanılmıştır. İnhibisyon yüzdesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

% inhibisyon = $[(Abs_{kontrol} - Abs_{örnek}) / Abs_{kontrol}] \times 100$
IC₅₀ değerleri nonlineer regresyon eğrileri kullanılarak (Sigma Plot 2001 versiyon 7.0, SPSS Inc., Chicago IL) hesaplanmıştır.

2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolin-6- sülfonik asit) (ABTS⁺) Radikalini Süpürücü Etki Tayini

MeOH ve n-BuOH ekstrelerinin ABTS⁺ radikalini süpürücü etkileri Re ve ark. (23) metoduna göre incelenmiştir. Bu metoda göre konsantrasyona karşı ölçülen inhibisyon yüzdeleri Troloks'a eşdeğer olarak (TEAC) hesaplanmıştır.

β-karoten / linoleik asit Birlikte Oksidasyonunu İnhibe Edici Etki Tayini

Ekstre ve saf maddelerin antioksidan aktivitesi β-karoten soldurma deneyine göre de yapılmıştır (24). Her 15 dakikada bir absorban ölçümü yapılarak β-karotenin solma derecesi izlenmiştir. İnhibisyon yüz-

desi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$AA\% = [1 - (Abs^0_{sample} - Abs^{105}_{sample}) / (Abs^0_{control} - Abs^{105}_{control})] \times 100$$

İstatistiksel Analiz

Bütün istatistiksel analizler SPSS 12 istatistik programı ile yapılmıştır. Varyansların analizi ANOVA prosedürüne göre uygulanmıştır. Ortalamalar arasındaki belirgin farklılıklar Games- Howell kıyaslama testine göre p<0.05 seviyesinde değerlendirilmiştir. Deney sonuçlarına ait verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro- Wilk normallik testine göre değerlendirilmiştir. Grupların varyans homojenliğini değerlendirmek için Levene testi kullanılmıştır.

BULGULAR

Toplam Fenol, Flavonoit ve Flavonol Miktar Tayinleri

Metanol ekstresinde toplam fenol miktarı 63.45±2.32 mg GAE/g, toplam flavonoit miktarı 51.93±1.36 mgCA/g ve toplam flavonol miktarı 29.06±4.23 mgRE/g olarak hesaplanmıştır.

İzole edilen saf bileşiklere ait deneysel spektral değerler

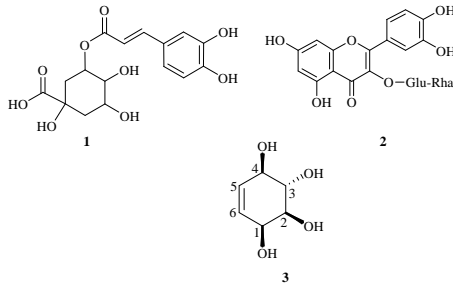
Bileşik 1: Rf: 0.76 (EtOAc:MeOH:H₂O, 100:17:13), 0.71 (CHCl₃:MeOH:H₂O, 61:32:7); IR (cm⁻¹): 3267, 1650, 1149; HR-ESIMS: m/z 353.09626 [M-H]⁻; ¹H NMR [(δ ppm) 400 MHz, DMSO-d₆]: 1.44-1.99 (4H, m, H-2, H-6), 3-3.6 (1H, * H-3), 3.88 (1H, d, J=2.3 Hz, H-4), 5.15 (1H, m H-5), 7.04 (H, d, J=1.9 Hz, H-2'), 6.74 (1H, d, J=8.2 Hz, H-5'), 6.97 (1H, dd, J=8.3/1.9 Hz, H-6'), 7.44 (1H, d, J=15.9 Hz, H-7'), 6.23 (1H, d, J=15.9 Hz, H-8'). ¹³C NMR [(δ ppm) 100 MHz DMSO-d₆]: 177.4 (C, C-1), 38.5 (CH₂, C-2), 72.2 (CH, C-3), 72.0 (CH, C-4), 73.8 (CH, C-5), 39.2 (CH₂, C-6), 126.0 (C, C-1'), 116.2 (CH, C-2'), 146.0 (C, C-3'), 148.8 (C, C-4'), 115.1 (CH, C-5'), 121.6 (CH, C-6'), 145.0 (CH, C-7'), 115.1 (CH, C-8'), 166.8 (C, C-9') (*DMSO-d₆ sinyalinin altında kaldığı için J değeri hesaplanamamıştır.)

Bileşik 2: Rf: 0.80 (EtOAc:MeOH:H₂O, 100:17:13), 0.77 (CHCl₃:MeOH:H₂O, 61:32:7); IR (cm⁻¹): 3332, 2462, 1601, LC-MS: m/z 609.14 [M-H]⁻; ¹H NMR [(δ ppm) 400 MHz, MeOH-d₄]: 6.20 (1H, d, J=2.1 Hz H-6), 6.38 (1H, d, J=2.1 Hz, H-8), 7.61 (1H, d, J=2.2 Hz, H-2'), 6.87 (1H, d, J=8.4 Hz, H-5'), 7.65 (1H, dd, J=8.4/2.1 Hz, H-6'), 5.09 (1H, d, J=7.6 Hz, Glc-1''), 3.49-3.23 (3H, m, Glc-2'', Glc-3'', Glc-5''), 3.79 (1H, d, J=10.7 Hz, Glc-6''), 4.52 (1H, bs, Rh-1'''), 3.62 (1H, dd, J=3.3/1.6 Hz Rh-2'''), 3.53 (1H, dd, J=9.4/3.5 Hz Rh-3'''), 3.30-3.24 (1H, * Rh-4'''), 3.49-3.23 (1H, m, Hz Rh-5'''), 1.11 (1H, d, J=6.2 Hz Rh-6'''); ¹³C NMR [(δ ppm) 100 MHz, MeOH-d₄]: 157.7 (C, C-2), 134.3 (C, C-3), 177.8 (C, C-4), 161.2 (C, C-5), 98.5 (CH, C-6), 164.8 (C, C-7), 93.5 (CH, C-8), 157.2 (C, C-9), 103.9 (C, C-10) 121.3 (C, C-1'), 114.5 (CH, C-2'), 144.5 (C, C-3'), 148.4 (C, C-4'), 115.8 (CH, C-5'), 121.8 (CH, C-6'), 103.2 (CH, Glc-1''), 74.3 (CH, Glc-2''), 76.7 (CH, Glc-3''), 69.9 (CH, Glc-4''), 75.8 (CH, Glc-5''), 67.1 (CH₂, Glc-6''), 100.8 (CH, Rh-1'''), 70.8 (CH, Rh-2'''), 70.68 (CH, Rh-3'''), 72.5 (CH, Rh-4'''), 68.2 (CH, Rh-5'''), 16.5 (CH₃, Rh-6''').

(*MeOH-d₄ sinyalinin altında kaldığı için J değeri hesaplanamamıştır.)

Bileşik 3: Rf: 0.43 (EtOAc:MeOH:H₂O, 100:17:13), 0.40 (CHCl₃:MeOH:H₂O, 61:32:7); IR (cm⁻¹): 1617, 3432; LC-MS: *m/z* 147.06 [M+H]⁺; ¹H NMR [(δ ppm) 400 MHz, DMSO-*d*₆]: 3.95 (H, dd, *J*=8.5/4.2 Hz, H-1), 3.19 (1H, dd, *J*=13.4/8.9 Hz, H-2), 3.40 (1H, dd, *J*=16.5/7.7 Hz, H-3), 3.73 (1H, d, *J*=6.5 Hz, H-4), 5.53 (1H, dd, *J*=10.0/2 Hz, H-5), 5.61 (1H, ddd, *J*=9.9/4.8/2.0 Hz, H-6); ¹³C NMR [(δ ppm) 100 MHz, DMSO-*d*₆]: 66.6 (CH, C-1), 71.6 (CH, C-2), 72.7 (CH, C-3), 72.5 (CH, C-4), 133.2 (CH, C-5), 127.5 (CH, C-6).

Bitkiden izole edilen bileşiklerin spektral analizleri ve bu analiz sonuçlarının literatür verileriyle karşılaştırılması sonucunda 1-3 bileşiklerinin sırasıyla 5-*O*-kafeoilkinik asit (klorojenik asit-1) (25, 26), kersetin 3-*O*-rutinozit (rutin-2) (27, 28) ve konduritol F (3) oldukları doğrulanmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. *T. zahlbruckneri*' den elde edilen bileşikler

Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Analizi

Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile yapılan klorojenik asit ve rutin için metanol ekstresindeki gerçek miktar tayini analizlerinde dalga boyları, klorojenik asit için 320 nm, rutin için 360 nm seçilmiştir. Buna göre metanol ekstresinde klorojenik asit miktarı 3.133 ± 0.014 mg/g, rutin 4.058 ± 0.016 mg/g ve klorojenik asit üzerinden hesaplanan hidroksisinnamik asit türevleri ise 2.136 ± 0.006 mg/g olarak bulunmuştur. Ekstrede tanımlanan bu bileşiklerin miktarları standart maddelerden hazırlanan kalibrasyon eğrileri kullanılarak belirlenmiştir. Maddelerin tanımlanmasında hem tutunma zamanları hem de UV spektrumları kullanılmıştır (Tablo II).

Antioksidan etki tayini

MeOH ve *n*-BuOH ekstraktları ile izole edilen klorojenik asit ve rutin için radikal süpürücü etkinliklerini belirlemek amacıyla farklı antioksidan aktivite tayin yöntemleri uygulanmıştır. DPPH radikalini süpürücü etki sonuçlarına göre *n*-Butanol ekstresi, metanol ekstresine

göre daha aktif bulunmuştur (Tablo III). *n*-BuOH ekstresinden izole edilen bileşiklerden klorojenik asit aktivitesi ile pozitif kontrol olarak kullanılan sentetik antioksidan BHA'nın aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ($p > 0.05$). Varyans homojenliğini test etmek için uygulanan Levene istatistiği sonuçlarına göre değişken için varsayımın sağlanmadığı gözlemlenmiştir ($p = 0.036$). Grupların çoklu karşılaştırıldığı Games-Howell testi sonuçlarına göre metanol ekstresi ile rutin arasında, klorojenik asit ile BHA arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır (sırasıyla, $p = 0.066$ ve $p = 0.292$). Çalışılan diğer ekstraktlar birbiri arasında ve BHA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

Tablo III. *T. zahlbruckneri* ekstraktlarının DPPH radikalini süpürücü etkisi

Örnekler	DPPH (IC ₅₀) (mg/mL)
MeOH	0.548 ± 0.028 ^a
<i>n</i> BuOH	0.204 ± 0.007 ^b
Klj asit	0.052 ± 0.007 ^c
Rutin	1.533 ± 0.260 ^a
BHA	0.065 ± 0.003 ^c
<i>F</i> değeri	84.513
<i>P</i> değeri	<0.001

T. zahlbruckneri ekstraktları ve pozitif kontrol BHA'nın DPPH radikalini süpürücü aktiviteleri. BHA, Butillenmiş hidroksianisol; MeOH, Metanol ekstresi; *n*-BuOH, *n*-butanol ekstresi; Klj asit, Klorojenik asit. Ortalama ± SS olarak verilen değerler ± % 95 güven aralığında belirtilmiştir. (a,b), (a,c), (b,c) arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.01$) aynı harflerle belirtilmiş değerler a grubu için $p = 0.066$, c için $p = 0.292$ olarak bulunmuştur.

Trolox'a eşdeğer olarak verilen ABTS⁺ radikal süpürücü etki testi sonuçlarına göre iki farklı dozda analiz edilen örneklerden klorojenik asit (Klj) 0.5 mg/mL konsantrasyonda ekstraktlardan ve rutinden daha aktif bulunmuştur. Ekstrelerin ABTS⁺ radikalini süpürücü etkilerine bakıldığında ise metanol ve *n*-butanol ekstraktlarının aynı konsantrasyondaki aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ($p > 0.05$) (Tablo

Tablo II. Standartlara ait kalibrasyon denklemleri ve korelasyon katsayıları

Madde	Tutunma Zamanı	Kalibrasyon Denklemi	Açıklayıcılık
	(dk)	($y = ax + b$)	Katsayısı
Klorojenik asit	9.2	$y = 33910x - 537.52$	0.9967
Rutin	24.1	$y = 17429x - 66.617$	0.9980

IV). Ekstreler ve ekstrelerin çalışılan konsantrasyonları, aktivite sonuçlarını istatistiksel olarak anlamlı etkilerken (sırasıyla $p<0.001$ ve $p<0.001$), hem ekstrelerin

Tablo IV. *T. zahlbruckneri* ekstrelerinin ABTS⁺ radikalini süpürücü etkisi.

Örnekler	Konsantrasyon (mg/mL)	DPPH (IC ₅₀) (mg/mL)
MeOH	1	0.961 ± 0,090 ^a
	0.5	0.568 ± 0,059 ^{b,c}
nBuOH	1	0.985 ± 0,068 ^a
	0.5	0.459 ± 0,035 ^{b,d}
Klj asit	0.5	1.908 ± 0.112 ^e
	0.25	0.713 ± 0.036 ^c
Rutin	1	0.284 ± 0.064 ^{d,f}
	0.5	0.108 ± 0.030 ^f
BHA	0.25	2.610 ± 0.045 ^g
BHA	0.125	2.315 ± 0.103 ^{e,g}
F değeri		538.518
P değeri		<0.001

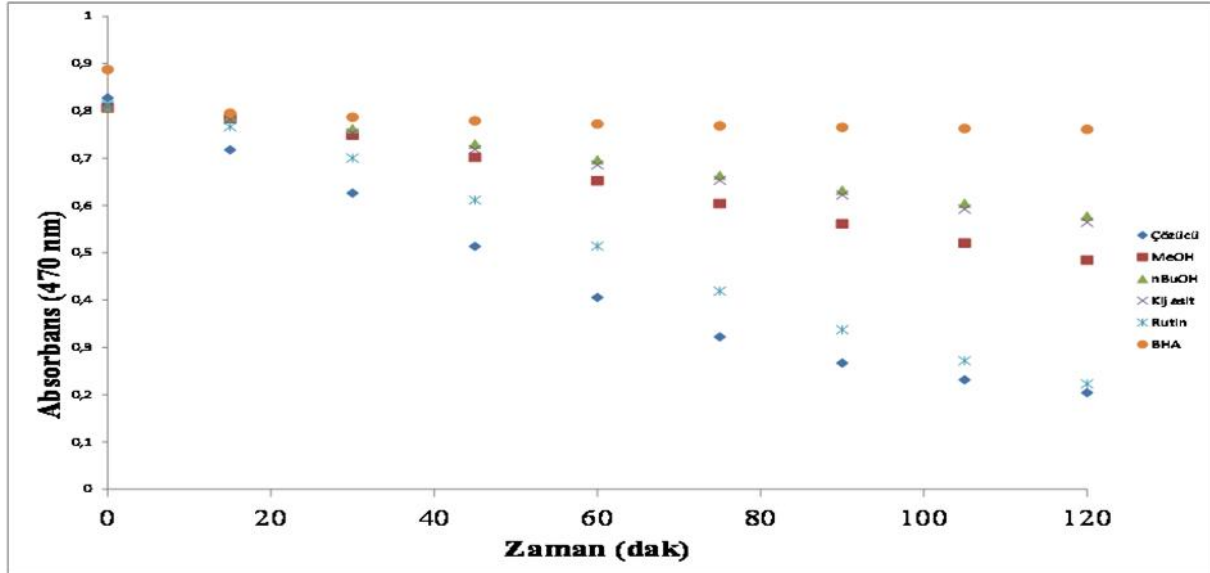
T. zahlbruckneri ekstreleri ve pozitif kontrol BHA'nın ABTS⁺ radikalini süpürücü aktiviteleri. BHA, Butillenmiş hidroksianisol; MeOH, Metanol ekstresi; *n*-BuOH, *n*-butanol ekstresi; Klj asit, Klorojenik asit. Ortalama ± SS olarak verilen değerler ± % 95 güven aralığında belirtilmiştir. (a-g) arasındaki farklı harflerle belirtilmiş değerler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$). Aynı harflerle belirtilmiş değerler a grubu için $p=0.982$ b için $p=0.276$, c grubu için $p=0.137$, d grubu için $p=0.189$, f grubu için $p=0.197$ g grubu için $p=0.408$ olarak bulunmuştur.

değişken için varsayımın sağlanmadığı gözlenmiştir ($p=0.02$). Grupların çoklu karşılaştırıldığı Games-Howell testi sonuçlarına göre standart olarak kullanılan BHA'nın yüksek konsantrasyonunun aktivitesi ile ekstrelerin, klorojenik asitin ve rutin her iki konsantrasyonda göstermiş olduğu aktiviteler arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur ($p<0.05$). Klorojenik asitin yüksek konsantrasyonunun göstermiş olduğu aktivite ile ekstrelerin ve rutin her iki konsantrasyonda göstermiş olduğu aktiviteler arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur ($p<0.01$).

Bu çalışmada *T. zahlbruckneri*'den elde edilen metanol ve *n*-butanol ekstreleri, β -karoten/linoleik asit soldurma deneyinde pozitif kontrol olan BHA ve ekstrelerden izole edilen klorojenik asit ve rutine karşı test edilmiş ve sonuçlar Şekil 2'de gösterilmiştir. Metanol ekstresi, *n*-butanol ekstresi ve klorojenik asit, oksidasyonu hemen hemen eşdeğer oranda engelleyici aktivite göstermişlerdir. Şekil 2' de görüldüğü gibi en yüksek aktiviteyi BHA gösterirken aktivitede zamana bağlı değişim gözlenmemiştir.

SONUÇ

T. zahlbruckneri halk arasında kan dindirici, grip ve nezle karşı kullanılan endemik bir bitkidir (16). Bitkinin uçucu yağlarının GC analizinde ana bileşenler olarak seskiterpen yapısında Germakren D ve spathulenol tespit edilmiştir (17). Bitkinin kimyasının ve antimikrobiyal etkilerinin incelendiği bir yüksek lisans çalışmasında da bitkiden bir triterpen ve seskiterpen bileşiği izole edilmiştir (29). Bu çalışmada Doğu Anadolu bölgesinde yayılış gösteren *T. zahlbruckneri*'nin toprak üstü kısımlarından hazırlanan MeOH ekstresinde öncelikle spektral yöntemlerle toplam fenol, flavonoid, flavonol miktar tayini gerçekleştirilmiştir. MeOH ekstresinden hazırlanan *n*-BuOH



Şekil 2. *T. zahlbruckneri* ekstreleri ve pozitif kontrol BHA'nın β -karoten / linoleik asit birlikte oksidasyonunu inhibe edici etkisi. BHA, Butillenmiş hidroksianisol; MeOH, Metanol ekstresi; *n*-BuOH, *n*-butanol ekstresi; Klj asit, Klorojenik asit.

hem de konsantrasyonların anlamlılığa olan etkisi $p=0.001$ bulunmuştur. Varyans homojenliğini test etmek için uygulanan Levene istatistiği sonuçlarına göre

ekstresinden kromatografik çalışmalarla, klorojenik asit, rutin ve konduritol F izole edilmiştir. İzole edilen bileşiklerin yapıları IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 2D-NMR, MS

yöntemleri kullanılarak aydınlatılmış ve elde edilen spektral değerler literatür verileriyle karşılaştırılarak doğrulanmıştır. Siklitol türevi maddeler olan konduritoller ve glikozitleri literatürde daha önce *Anthemis tinctoria* (Asteraceae) (30) ve *Marsdenia tomentosa*' dan (Asclepiadaceae) (31) elde edilmiştir. Doğal olarak çok fazla yayılış göstermeyen konduritollerin literatürde sentetik olarak elde edilmeleri ve alfa glukozidaz enzim inhibitör aktiviteleriyle ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır (32, 33). Bu sebeple, konduritollere F' nin ilk defa bir *Tanacetum* türünden elde edilmesi cinsin kemotaksonomisi açısından da önem arz etmektedir.

İzole edilen bileşiklerin MeOH ekstresindeki gerçek miktar tayinleri gerçekleştirilmiş ve bu sonuçlara göre klorojenik asit 3.133 ± 0.014 mg/g, rutin 4.058 ± 0.016 mg/g ve klorojenik asit üzerinden hesaplanan hidrokisisinnamik asit türevleri ise 2.136 ± 0.006 mg/g olarak bulunmuştur.

MeOH, *n*-BuOH ekstraktları ve saf maddelerin DPPH radikal süpürücü etki tayini sonuçlarına bakıldığında, *n*-BuOH ekstresinin MeOH ekstresinden daha aktif olduğu ABTS⁺ radikalini süpürücü etki tayininde ise MeOH ve *n*-BuOH ekstraktlarının benzer aktivite sergilediği görülmüştür. *n*-BuOH ekstresinden izole edilen klorojenik asitin radikal süpürücü etkisinin her iki ekstreten ve de rutinden yüksek olduğu saptanmıştır.

β -karoten/linoleik asit birlikte oksidasyonunu inhibe edici etki sonuçlarına bakıldığında metanol ekstresi, *n*-Butanol ekstresi ve klorojenik asit birbirine yakın etki göstermiştir. Örneklerin β -karotenin renginin açılmasını inhibe etmesi ya da geciktirmesi serbest radikal süpürücü etkiyi yani antioksidan etkiyi kanıtlamıştır. Bu sonuçlara göre klorojenik asitin, rutin ile birlikte bitkinin antioksidan etkilerinden sorumlu bileşikler olduğu anlaşılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Korkmaz M, Kandemir A, İlhan V, et al. *Tanacetum erzincanense* (Asteraceae), a new species from Erzincan, Turkey. Turk J Bot 2015; 39: 96-104.
2. Bağcı E, Kursat M, Kocak A, et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Tanacetum balsamita* L. subsp *balsamita* and *T. chiliophyllum* (Fisch et Mey.) Schultz Bip. var. *chiliophyllum* (Asteraceae) from Turkey. J Essent Oil Bear Pl 2008; 11: 476-484.
3. Baytop T. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün). Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 1999.
4. Tournier H, Schinella G, De Balsa EM, et al. Effect of the chloroform extract of *Tanacetum vulgare* and one of its active principles, parthenolide, on experimental gastric ulcer in rats. J Pharm Pharmacol 1999; 51: 215-219.
5. Kurkina AV, Khusainova AI, Daeva ED, et al. Flavonoids from *Tanacetum vulgare* flowers. Chem Nat Compd 2011; 47: 284-285.
6. Wu CQ, Chen F, Rushing JW, et al. Antiproliferative activities of parthenolide and golden feverfew extract against three human cancer cell lines. J Med Food 2006; 9: 55-61.
7. Pajak B, Gajkowska B, Orzechowski A. Molecular basis of parthenolide-dependent proapoptotic activity in cancer cells. Folia Histochem Cytobiol 2008; 46: 129-135.
8. Ozek G, Ozek T, Iscan G, et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Tanacetum cadmeum* (Boiss.) Heywood subsp orientale grierson. J Essent Oil Res 2007; 19: 392-395.
9. Datta S, Saxena DB. Pesticidal properties of parthenin (from *Parthenium hysterophorus*) and related compounds. Pest Manag Sci 2001; 57: 95-101.
10. Sulsen VP, Cazorla SI, Frank FM, et al. Natural terpenoids from *Ambrosia* species are active in vitro and in vivo against human pathogenic Trypanosomatids. Plos Negl Trop Dis 2013; 7.
11. Maxia A, Sanna C, Piras A, et al. Chemical composition and biological activity of *Tanacetum audibertii* (Req.) DC. (Asteraceae), an endemic species of Sardinia Island, Italy. Ind Crops Prod 2015; 65: 472-476.
12. Móricz ÁM, Hábe TT, Böszörményi A, et al. Tracking and identification of antibacterial components in the essential oil of *Tanacetum vulgare* L. by the combination of high-performance thin-layer chromatography with direct bioautography and mass spectrometry. J Chromatogr A 2015; 1422: 310-317.
13. Mostafa EM, Rateb ANG, El-Hawary SS, El-Shamy AM. Phytochemical and biological investigation of *Tanacetum parthenium* (L.) cultivated in Egypt. J Med Plants Res 2007; 1 (1): 18-26.
14. Petrovic SD, Dobric S, Bokanjic DB, et al. Evaluation of *Tanacetum larvatum* for an anti-inflammatory activity and for the protection against indomethacin-induced ulcerogenesis in rats. J Ethnopharmacol 2003; 87: 109-113.
15. Rustaiyan A, Sedaghat S. Two new guaianolides from *Tanacetum fruticosum* Ledeb. Acta Hort 2005; 677:65-69.
16. Mükemre M, Behçet L, Çakılçioğlu U. Ethnobotanical study on medicinal plants in villages of Çatak (Van-Turkey). J Ethnopharmacol 2015; 166: 361-374.
17. Polatoğlu K, Demirci B, Gören N, et al. Essential oil composition of endemic *Tanacetum zahlbruckneri* (Náb.) and *Tanacetum tabrisianum* (Boiss.) Sosn. and Takht. from Turkey. Nat Prod Res 2011; 25: 576-584.
18. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods Enzymol 1999; 299: 152-178.
19. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem 1999; 64: 555-559.
20. Miliuskas G, Venskutonis PR, Van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food Chem 2004; 85: 231-237.
21. Koşar M, Dorman D, Başer K, et al. An improved HPLC post-column methodology for the identification of free radical scavenging

- phytochemicals in complex mixtures. *Chromatographia* 2004; 60: 635-638.
22. Gyamfi MA, Yonamine M, Aniya Y. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana: *Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries. *General Pharmacology: The Vascular System* 1999; 32: 661-667.
 23. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 1231-1237.
 24. Oomah BD, Mazza G. Flavonoids and antioxidative activities in buckwheat. *J Agricult Food Chem* 1996; 44: 1746-1750.
 25. Jin U-H, Lee J-Y, Kang S-K, et al. A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: Isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. *Life Sci* 2005; 77: 2760-2769.
 26. Sprogøe K, Stærk D, Jäger AK, et al. Targeted natural product isolation guided by HPLC-SPE-NMR: Constituents of *Hubertia* species. *J Nat Prod* 2007; 70: 1472-1477.
 27. De Bruyn A, Anteunis M, De Gussem R, et al. ¹H-NMR study of L-rhamnose, methyl α -L-rhamnopyranoside, and 4-O- β -D-galactopyranosyl-L-rhamnose in deuterium oxide. *Carbohydr Res* 1976; 47: 158-163.
 28. Xiao Z, Wu H, Wu T, et al. Kaempferol and quercetin flavonoids from *Rosa rugosa*. *Chem Nat Compd* 2006; 42: 736-737.
 29. Çağlar FP. *Tanacetum zahlbruckneri* (Náb.) Grierson Bitkisi Üzerinde Fitokimyasal Araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 2007.
 30. Papaioannou P, Lazari D, Karioti A, et al. Phenolic compounds with antioxidant activity from *Anthemis tinctoria* L.(Asteraceae). *Z Naturforsch C* 2007; 62: 326-330.
 31. Honda K, Ômura H, Hayashi N, et al. Conditols as oviposition stimulants for the danaid butterfly, *parantica sita*, identified from a host plant, *Marsdenia tomentosa*. *J Chem Ecol* 2004; 30: 2285-2296.
 32. Balci M, Sütbeyaz Y, Seçen H. Conditols and related compounds. *Tetrahedron* 1990; 46: 3715-3742.
 33. Kilbaş B, Balci M. Recent advances in inositol chemistry: Synthesis and applications. *Tetrahedron* 2011; 67: 2355-2389.