

ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ENDEMİK *Astragalus dipsaceus* Bunge BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL
ANALİZİ ve BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

Elifay SERT

Danışman: Doç. Dr. Ayşe ŞAHİN YAĞLIOĞLU

Kimya Anabilim Dalı

**ÇANKIRI
2019**

Her Hakkı Saklıdır.

TEZ ONAYI

Elifay SERT tarafından hazırlanan “**ENDEMİK *Astragalus dipsaceus* Bunge BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL ANALİZİ ve BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Ayşe ŞAHİN YAĞLIOĞLU

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

Üye : Doç. Dr. Ayşe ŞAHİN YAĞLIOĞLU

Üye : Doç. Dr. Ferda ESER

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Tamer KEÇELİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum “**ENDEMİK *Astragalus dipsaceus* Bunge BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL ANALİZİ ve BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**” konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan “Bilimsel İntihal Tespit Programı”yla tarandığını, “intihal içermediğini” beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim. (/ / 20).

Elifay SERT

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ENDEMİK *Astragalus dipsaceus* Bunge BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL ANALİZİ ve BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

ELİFAY SERT

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Ayşe ŞAHİN YAĞLIOĞLU

Bu çalışmada endemik *Astragalus dipsaceus* Bunge bitkisinden sekonder metabolitlerinin biyolojik aktivite yönlendirmeli izolasyonu amaçlandı. Bu amaçla bitkinin tamamı kurutuldu ve maserasyon yöntemi ile MeOH:CHCl₃ (1:1) karışımında ekstrakte edildi. Elde edilen ham ekstre saf suda çözüldü ve sırasıyla hekzan, diklorometan, etilasetat, n-bütanol ve su ile ekstrakte edildi. Hazırlanan tüm ekstratlar (hekzan ekstresi, diklorometan ekstresi, etilasetat ekstresi, n-bütanol ekstresi ve su ekstresi) C6 ve HeLa hücrelerine karşı antikanser aktiviteleri incelendi. Yüksek aktivite gösteren etil asetat ekstresi çeşitli kromatografik yöntemlere (İTK, kolon kromatografisi vb.) tabi tutuldu ve izole edilen bileşiklerin yapıları spektroskopik-kromatografik yöntemlerle (GC-MS, 1D-2D NMR) belirlendi. Bu ekstrelerden sikloalpiosid-D, sikloalpiosid, ve genistein molekülleri tespit edildi. Daha sonra elde edilen bileşiklere C6 (sıçan beyin kanser hücresi) ve HeLa (insan rahim ağzı kanser hücresi) hücrelerine karşı antikanser aktivite testleri yapıldı. Pozitif kontrol olarak 5-FU kullanıldı. Bu testler sonucunda izole edilen moleküller ve 5-FU ile kıyaslandığında; C6 hücrelerine karşı genistein molekülünün, HeLa hücrelerine karşı ise sikloalpiosid molekülünün en yüksek aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi. Ayrıca sikloalpiosid ve genistein moleküllerinin 5-FU den daha düşük toksisiteye sahip olduğu belirlendi.

ANAHTAR KELİMELELER: Antikanser aktivite, sitotoksik aktivite, *Astragalus dipsaceus* Bunge, C6, HeLa, izolasyon, NMR, GC-MS

ABSTRACT

Master of Science Thesis

PHYTOCHEMICAL ANALYSIS and BIOLOGICAL ACTIVITIES of ENDEMIC *Astragalus dipsaceus* Bunge

ELİFAY SERT

Cankiri Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisors: Doç. Dr. Ayşe ŞAHİN YAĞLIOĞLU

In this study, bioassay guided isolation of secondary metabolites from endemic *Astragalus dipsaceus* Bunge plant was aimed. For this purpose, the whole plant was dried and extracted in a mixture of MeOH: CHCl₃ (1: 1) by maceration. The crude extract was dissolved in pure water and extracted with hexane, dichloromethane, ethyl acetate, n-butanol and water, respectively. All the prepared extracts (hexane extract, dichloromethane extract, ethylacetate extract, n-butanol extract and water extract) were investigated for the anticancer activities against C6 and HeLa cells. Ethyl acetate extract which had the highest activity was subjected to various chromatographic methods (TLC, column chromatography, etc.) and the structures of the isolated compounds were determined by spectroscopic-chromatographic methods (GC-MS, 1D-2D NMR). From this extract the cycloalpiosid-D, cycloalpiosid, and genistein molecules were detected. Then, anticancer activity tests were performed to the compounds against C6 (rat brain cancer cell) and HeLa (human cervical cancer cell) cells. 5-FU was used as a positive control. As a result of these tests, genistein exhibited the highest activity against C6 cells and Cycloalpioside showed the highest activity against HeLa cells among the other isolated compounds and 5-FU, respectively. In addition, cycloalpioside and genistein molecules were determined to have lower toxicity than 5-FU.

Key Words: Anticancer activity, cytotoxic activity, *Astragalus dipsaceus* Bunge, C6, HeLa, isolation, NMR, GC-MS

TEŐEKKÖR

Tez çalıŐmalarımın gerek ders gerekse tez çalışma kısmında bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gÖsterici ve destek olan danışman hocam sayın Doç. Dr. Ayşe ŞAHİN YAĞLIOĞLU'na minnettarım.

NMR yapı aydınlatma kısmında ve laboratuvar bilgisi konusunda olan yardımları ve değerli zamanlarını ayırmıŐ oldukları için sayın Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ ve ArŐ. Gör. Serkan KOLDAŐ hocalarıma teŐekkÖrÖ bir borç biliyor ve Őukranlarımı sunuyorum.

Son olarak benden hiçbir zaman desteĐini esirgemeyen bu hayattaki en bÖyÖk Őansım olan aileme; babam Ali Aykut SERT, annem Emine SERT, aĐabeyim ÖmÖr SERT ve ablam Bilgi SERT KARAKULAK'a sonsuz teŐekkÖrler...

Bu alıŐma, ankırı Karatekin Öniversitesi YÖksek Lisans Tez Projeleri (Proje no: FF200217L02) ve TÖrkiye Bilimsel ve Teknolojik AraŐtırma Kurumu (Proje no: TÖBİTAK 114Z198) tarafından desteklenmiŐtir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	xi
1.GİRİŞ.....	1
1.1 <i>Astragalus</i> ssp. Cinsinin Genel Özellikleri.....	1
1.2 Tıbbi Kullanımı.....	2
1.3 <i>Astragalus dipsaceus</i> Bunge Bitkisinin Genel Özellikleri.....	3
2.KAYNAK ÖZETLERİ.....	6
2.1 <i>Astragalus</i> ssp. Ekstrelerinin Biyolojik Aktivite Çalışmaları.....	6
2.2 <i>Astragalus</i> ssp. Ekstrelerinin İzolasyon Çalışmaları.....	22
3.MATERYAL VE YÖNTEM.....	27
3.1 Kullanılan Araç ve Malzemeler.....	27
3.2 Kullanılan Kimyasallar.....	27
3.2.1 İzolasyon İşleminde Kullanılan Kimyasallar.....	27
3.2.2 Biyolojik Aktivite Testlerinde Kullanılan Kimyasallar ve Hücreler.....	27
3.3 Kullanılan Cihazlar.....	28
3.4 Bitkinin Toplanması, Kurutulması ve Tür Teşhisi.....	28
3.5 Bitkinin Özütlenmesi (Ekstraksiyon) İşlemi.....	29
3.6 Antiproliferatif Aktivite Testlerinin Yapılması.....	34
3.6.1 Hücre Kültürü.....	34
3.6.2 In vitro antikanser aktivite (antiproliferatif aktivite) testi dizaynı.....	37
3.6.3 BrdU Cell ELİZA hücre proliferasyon deneyi.....	38
3.6.4 IC50 konsantrasyonunun belirlenmesi.....	38
3.7 Sitotoksik Aktivite Testlerinin Yapılışı.....	38
4. BULGULAR.....	39
4.1 Elde edilen ekstreler ve ekstre verimleri (%).....	39
4.2 Hekzan ve Diklorometan Ekstrelerinin GC-MS Analiz Sonuçları.....	40
4.3 Etilasetat Ekstresinin Kolon Kromatografisi.....	42
4.4 Diklorometan Ekstresinin Kolon Kromatografisi.....	44
4.5 İzole Edilen Bileşiklerin Fiziksel ve Spektral Özellikleri.....	46
4.5.1 Genistein.....	46
4.5.2 Sikloalpiosid.....	52
4.5.3 Sikloalpiosid D.....	62
4.5.4 EAS-6 fraksiyonun GC-MS Analiz sonuçları.....	70
4.5.5 EAS-7 fraksiyonun GC-MS Analiz sonuçları.....	72
4.5.6 EAS-8 fraksiyonun GC-MS Analiz sonuçları.....	74
4.5.7 EAS-9 fraksiyonun GC-MS Analiz sonuçları.....	76
4.6 Ekstrelerin Antikanser Aktivite Sonuçları.....	78
4.7 İzole Edilen Moleküllerin Kanser Aktiviteleri.....	80
4.8 Sitotoksik Aktivite Sonuçları	82
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	83
KAYNAKLAR.....	87
ÖZGEÇMİŞ.....	91

SİMGELER DİZİNİ

<u>Simge</u>	<u>Açıklama</u>
L	Litre
µg	Mikrogram
µM	Mikromolar
µL	Mikrolitre
mg	Miligram
g	Gram
GC-MS	Gaz Kromatografisi - Kütle Spektrometresi
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
HeLa	İnsan Rahim Kanseri Hücresi
C6	Sıçan Beyin Tümör Hücresi
EtOAc	Etil asetat
n-BuOH	n-Bütanol
CHCl ₃	Kloroform
CH ₂ Cl ₂	Diklorometan
IC ₅₀	Hücre Bölünmesini %50 İnhibe Eden İlaç Konsantrasyonu
IC ₇₅	Hücre Bölünmesini %75 İnhibe Eden İlaç Konsantrasyonu
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
5-FU	5-Floro urasil
DMSO	Dimetil sülfoksit
%	Yüzde

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	<i>Astragalus dipsaceus</i> Bunge.....	3
Şekil 1.2	<i>Astragalus dipsaceus</i> Bunge bitkisinin Türkiye’de yayılış gösterdiği iller.....	4
Şekil 1.3	<i>Astragalus dipsaceus</i> Bunge bitkisinin Türkiye’de yayılış gösterdiği bölgeler.....	5
Şekil 2.1	<i>A. membranaceus</i>	6
Şekil 2.2	<i>A. spinosus</i>	7
Şekil 2.3	<i>A. sinicus</i>	7
Şekil 2.4	<i>A. pinetorum</i>	8
Şekil 2.5	<i>A. argyroides</i>	9
Şekil 2.6	<i>A. bicolor</i>	9
Şekil 2.7	<i>A. galegiformis</i>	9
Şekil 2.8	<i>A. ponticus</i>	9
Şekil 2.9	<i>A. macrocephalus</i>	9
Şekil 2.10	(a) <i>A. polysaccharides</i> in (b) Standart numunenin HPLC kromatogramı.....	10
Şekil 2.11	<i>A. polysaccharides</i> ve siRNA’nın antitümör etkinliği.....	11
Şekil 2.12	<i>A. lagurus</i>	11
Şekil 2.13	<i>A. lagurus</i>	12
Şekil 2.14	<i>A. campylosema</i>	13
Şekil 2.15	<i>A. christianus</i>	13
Şekil 2.16	<i>A. campylosema</i>	14
Şekil 2.17	Selenyum.....	15
Şekil 2.18	Selenyum.....	15
Şekil 2.19	<i>A. membranaceus</i>	15
Şekil 2.20	<i>A. flavescens</i>	16
Şekil 2.21	<i>A. verus</i>	17
Şekil 2.22	<i>Trichophyton verrucosum</i>	17
Şekil 2.23	<i>T. Verrucosum lezyolu</i> dana.....	17
Şekil 2.24	Wistar sıçan.....	18
Şekil 2.25	Anti diyabetik.....	19
Şekil 2.26	<i>A. membranaceus</i>	19
Şekil 2.27	El ve parmaklarda romatoid artrit.....	19
Şekil 2.28	<i>Astragalus pelecinus</i>	21
Şekil 2.29	<i>A. armatus</i> Willd. subsp. <i>numidicus</i>	22
Şekil 2.30	<i>A. armatus</i> Willd. subsp. <i>numidicus</i> bitkisinden izole edilen bileşikler.....	23
Şekil 2.31	<i>A. tauricolus</i> Bitkisinden İzole Edilen Bileşikler.....	25
Şekil 2.32	<i>A. englerianus</i>	26
Şekil 3.1	Ekstraksiyon işlemi.....	29
Şekil 3.2	Evaporatörden çözücü uzaklaştırılması.....	30
Şekil 3.3	Elde edilen ekstreler.....	30
Şekil 3.4	CH ₂ Cl ₂ ekstresinin kolon kromatografisi.....	31
Şekil 3.5	Sikloalpiosid molekülü.....	32
Şekil 3.6	Genistein molekülünün İTK’sı.....	32
Şekil 3.7	Çalışma şeması.....	33
Şekil 3.8	Besiyeri.....	34

Şekil 3.9	Steril T75 flasklarda HeLa ve C6 hücresi	35
Şekil 3.10	Tripsin EDTA çözeltisi	35
Şekil 3.11	Tripan mavisi solüsyonu	36
Şekil 3.12	Thoma lamına hücre pipetleme işlemi	36
Şekil 3.13	96 kuyucuklu plakaya hücre pipetleme	37
Şekil 3.14	Plakaların inkübe edilmesi.....	37
Şekil 4.1	<i>A. dipsaceus</i> Bunge bitkisinden elde edilen ekstratlar ve ekstrat verimleri.....	39
Şekil 4.2	<i>A. dipsaceus</i> Bunge bitkisinin aktif ekstratları.....	41
Şekil 4.3	Genistein molekülü.....	46
Şekil 4.4	Genistein molekülünün ¹ H NMR spektrumu (600 MHz, DMSO-d ₆)...	47
Şekil 4.5	Genistein molekülünün ¹³ C NMR spektrumu (150 MHz, DMSO-d ₆)...	48
Şekil 4.6	Genistein molekülünün DEPT NMR spektrumu (150 MHz, DMSO-d ₆).....	49
Şekil 4.7	Genistein molekülünün HMBC NMR spektrumu (150 MHz, DMSO-d ₆)	50
Şekil 4.8	Genistein molekülünün HMBC NMR spektrumu.....	51
Şekil 4.9	Genistein molekülünün HSQC NMR spektrumu (150 MHz, DMSO-d ₆).....	52
Şekil 4.10	Sikloalpiosid molekülü.....	53
Şekil 4.11	Sikloalpiosid molekülünün ¹ H NMR spektrumu.....	54
Şekil 4.12	Sikloalpiosid molekülünün ¹³ C NMR spektrumu.....	55
Şekil 4.13	Sikloalpiosid molekülünün DEPT NMR spektrumu.....	56
Şekil 4.14	Sikloalpiosid molekülünün HMBC NMR spektrumu.....	57
Şekil 4.15	Sikloalpiosid molekülünün HMBC etkileşimi.....	58
Şekil 4.16	Sikloalpiosid molekülünün HMBC NMR spektrumu.....	58
Şekil 4.17	Sikloalpiosid molekülünün COSY NMR spektrumu.....	59
Şekil 4.18	Sikloalpiosid molekülünün HSQC NMR spektrumu.....	60
Şekil 4.19	Sikloalpiosid-D molekülü.....	62
Şekil 4.20	Sikloalpiosid-D molekülünün ¹ H NMR spektrumu.....	63
Şekil 4.21	Sikloalpiosid-D molekülünün ¹³ C NMR spektrumu.....	64
Şekil 4.22	Sikloalpiosid-D molekülünün DEPT NMR spektrumu.....	65
Şekil 4.23	Sikloalpiosid-D molekülünün HMBC NMR spektrumu.....	66
Şekil 4.24	Sikloalpiosid-D molekülünün COSY NMR spektrumu.....	67
Şekil 4.25	Sikloalpiosid-D molekülünün HSQC NMR spektrumu.....	68
Şekil 4.26	EAS-6 fraksiyonunun ana bileşenleri.....	70
Şekil 4.27	EAS-6 Proton NMR.....	71
Şekil 4.28	EAS-6 ¹³ C NMR.....	71
Şekil 4.29	EAS-7 fraksiyonunun ana bileşenleri.....	72
Şekil 4.30	EAS-7 ¹ H NMR.....	73
Şekil 4.31	EAS-7 ¹³ C NMR.....	73
Şekil 4.32	EAS-8 fraksiyonunun ana bileşeni.....	74
Şekil 4.33	EAS-8 ¹ H NMR.....	75
Şekil 4.34	EAS-8 ¹³ C NMR.....	75
Şekil 4.35	EAS-9 fraksiyonunun ana bileşeni.....	76
Şekil 4.36	EAS-9 ¹ H NMR.....	77
Şekil 4.37	EAS-9 ¹³ C NMR.....	77
Şekil 4.38	<i>A. dipsaceus</i> Bunge bitki ekstratlarının HeLa hücresine karşı	78

	antikanser aktivite sonuçları.....	
Şekil 4.39	<i>A. dipsaceus</i> Bunge bitki ekstralarının C6 hücresine karşı antiproliferatif aktivite sonuçları.....	79
Şekil 4.40	<i>A. dipsaceus</i> Bunge etilasetat ekstresi ve bu ekstreten izole edilen moleküllerin HeLa hücresine karşı antiproliferatif aktivite sonuçları...	80
Şekil 4.41	<i>A. dipsaceus</i> Bunge etilasetat ekstresi ve bu ekstreten izole edilen moleküllerin C6 hücresine karşı antiproliferatif aktivite sonuçları.....	81
Şekil 5.1	Çalışmanın özet şeması.....	86



TABLolar DİZİNİ

Tablo 4.1	<i>Astragalus dipsaceus</i> Bunge bitkisinden elde edilen ekstre miktarı ve verimi.....	40
Tablo 4.2	<i>Astragalus dipsaceus</i> Bunge elde edilen hekzan ve diklorometan ekstralarının GC-MS analiz sonuçları.....	41
Tablo 4.3	Etilasetat ekstresi kolonunun fraksiyon aralığına karşılık gelen çözücü sistemi.....	42
Tablo 4.4	Etilasetat ekstresi kolon kromatografisi sonuçları.....	43
Tablo 4.5	Diklorometan ekstresi kolonunun fraksiyon aralığına karşılık çözücü sistemi.....	44
Tablo 4.6	Diklorometan ekstresi kolon kromatografisinin birleştirilen tüplere uygulanan analizi.....	45
Tablo 4.7	Genistein molekülünün NMR değerleri.....	46
Tablo 4.8	Sikloalpiosid molekülünün NMR değerleri.....	61
Tablo 4.9	Sikloalpiosid-D molekülünün NMR değerleri.....	69
Tablo 4.10	EAS-6 fraksiyonunun GC-MS analiz sonucu.....	72
Tablo 4.11	EAS-7 fraksiyonunun GC-MS analiz sonucu.....	74
Tablo 4.12	EAS-8 fraksiyonunun GC-MS analiz sonucu.....	76
Tablo 4.13	EAS-9 fraksiyonunun GC-MS analiz sonucu.....	78
Tablo 4.14	Ekstre ve izole edilen moleküllerin IC ₅₀ ve IC ₇₅ Değerleri.....	82
Tablo 4.15	Moleküllerin sitotoksik aktivite sonuçları.....	82

1.GİRİŞ

Astragalus ssp. Leguminosae familyasının en büyük cinsidir. Dünyanın ılıman bölgesi boyunca yaygın olarak dağılan familya, esas itibariyle Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika, aynı zamanda Afrika ve Güney Amerika'daki dağlarda bulunur. Bunlar yıllık ve çok yıllık otlar veya küçük çalılıklardır. *Astragalus* türleri iki ana gruba ayrılmıştır: Şifalı bitkiler ve zehirli türler.

"*Astragali radix*" (*Astragalus membranaceous* bunge ve diğer *Astragalus* türlerinin kurutulmuş kökleri) geleneksel Çin tıbbında çok eski ve bilinen bir ilacı temsil eder. Resmi olarak Çin Farmakopesinde listelenmekte olup başlıca ter önleyici, diüretik ve tonik olarak, ayrıca hepatoprotektif, antioksidatif, immünoestimülan ve antiviral özellikleri için reçete edilmiştir.

Astragalus'un diğer en yaygın kullanımı yabani hayvanlar için yem olarak kullanımınıdır. Kimyasal açıdan bakıldığında, *Astragalus* türlerinin biyolojik aktif bileşenleri saponinler, polisakkaritler ve fenoliklerden oluşurken toksik bileşimler ise imidazolin alkaloidleri, nitro toksinler ve selenyum türevleri oluşur (Pistelli et al. 2002).

1.1 *Astragalus* ssp. Cinsinin Genel Özellikleri:

Astragalus ssp., kuzey yarımkürede yayılış gösterir ve 2500 türü bulunur. Ülkemizde 391 türü bulunur. Ancak daha sonra bulunan yeni tür ve kayıtlarla birlikte bu sayı 455'e ulaşmıştır. Bu türlerden yaklaşık 222 türü endemik olup yalnız ülkemizde doğal olarak yetişmektedir. Genellikle yüksek dağ katlarında ve steplerde yayılış gösterirler. Çalimsı formları küçük yastıkçıklar şeklindedir (Rios and Waterman 1997).

1.2 Tıbbi Kullanımı:

Astragalus (geven) bitkisi bağımsıklık sistemini güçlendirip gribe karşı antikor üretimini ve bunların hastalıklarla savaş kabiliyetini artırmakla etkilidir. Sadece soğuk algınlığı ve gribe karşı dayanıklılığı artırmakla kalmayıp aynı zamanda hastalığın süresini de kısaltır. Ayrıca enfeksiyon, çeşitli alerjiler, astım, kronik yorgunluk, kemoterapi ile ilişkili olarak iştah kaybı ve yorgunluk, anemi, kalp rahatsızlıkları, böbrek rahatsızlıkları, mide ülserleri, hepatit, genel hazım sorunları, yaralar da kullanılır. Bir çok geven türü halk arasında karaciğer koruyucu, antioksidan, immünostimulan ve antiviral özelliklerinden dolayı kullanılmaktadır. Bu farmakolojik aktivitenin üç grup kimyasal maddeden kaynaklandığı saptanmıştır. Bunlar: poliholozitler, saponinler ve fenoliklerdir (Rios and Waterman 1997).

Vücutta bir dizi bağımsıklık işlevini destekleyen *Aatragli Polysaccharoses* bileşeni içeren *Astragalus* (geven) bitkisi hakkında yapılan araştırmalarda;

- Soğuk algınlığı vakalarının şiddetini ve süresini azaltabildiği,
- Kalbin kan pompalama hacminde iyileştirmeler sağlayabildiği,
- Karaciğerde hücre hasarına karşı koruma sağlayabildiği,
- Kalp ve beyin dokularına oksijen taşınmasına yardımcı olduğu ve vücudun şevk ve direncini geliştirdiği,
- Fareler üzerindeki araştırmalarda geven özü kullanılan farelerde idrar torbası kanserinin daha az görüldüğü,
- Akciğer kanseri hastalarında tümör ilerleyişini durdurduğu belirlenmiştir (Kadıoğlu vd. 2008).

1.3 *Astragalus dipsaceus* Bunge Bitkisinin Genel Özellikleri

Astragalus dipsaceus Bunge bitkisi (Şekil 1.1) çok yıllık, otsu ve endemik bir bitkidir. 600-1320 m yükseklikte ve yaylalarda yetişir. Çiçeklenmesi 6. aydır. Genel dağılımı Türkiye olmakla birlikte Türkiye'deki dağılım gösterdiği bölgeler Kuzey ve Orta Anadolu bölgesidir (Şekil 1.3). Elementi İran-Turan'dır.

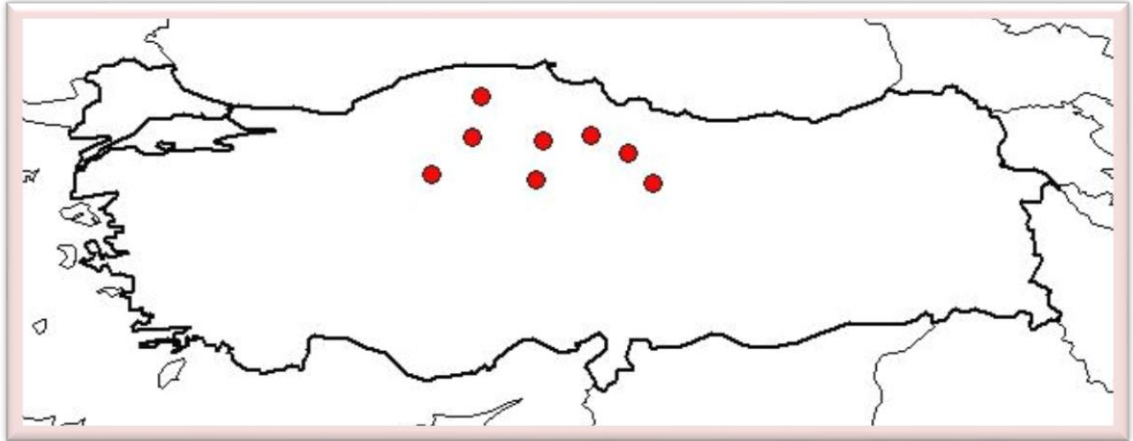


Şekil 1.1 *Astragalus dipsaceus* Bunge (URL 1)

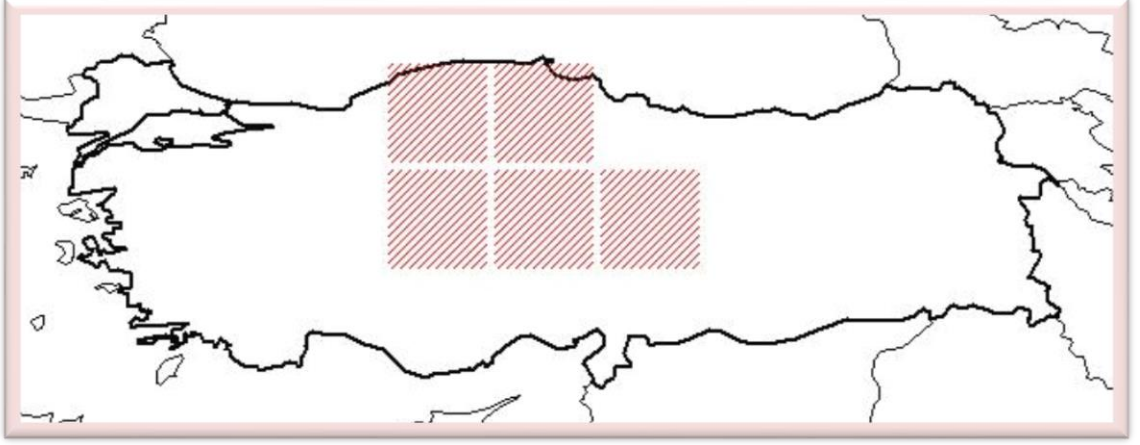
Taksonomik Sınıflandırma	
Alem	Plantae
Altalem	Tracheobionta
Bölüm	Magnoliophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Altsınıf	Rosidae
Takım	Fabales
Familya	Fabaceae
Cins	<i>Astragalus</i>
Tür	<i>Astragalus dipsaceus</i> Bunge

Genel Takson Bilgisi	
Ömür	Çok yıllık
Yapı	Ot
Çiçeklenme	6-6
Habitat	Yaylalar
Yükseklik	600-1300
Endemik	Endemik
Element	İran-Turan
Türkiye Dağılımı	K. ve O. Anadolu
Genel Dağılımı	Türkiye

Astragalus dipsaceus Bunge bitkisinin Türkiye’de yayılış gösterdiği iller; Çankırı, Kastamonu, Amasya, Ankara, Çorum, Sivas, Tokat, Yozgat’tır (Şekil 1.2).



Şekil 1.2 *Astragalus dipsaceus* Bunge bitkisinin Türkiye’de yayılış gösterdiği iller (URL 2)



Şekil 1.3 *Astragalus dipsaceus* Bunge bitkisinin Türkiye’de yayılış gösterdiği bölgeler (URL 2)

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 *Astragalus* ssp. Ekstrelerinin Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Huang et al., 2012 yılında bir çalışmada *A. membranaceus* (Şekil 2.1) lektinin (AML) K562 hücreleri (kronik miyeloid lösemi) üzerindeki antiproliferatif etkileri incelendi. AML ile K562 hücrelerinde apoptoz başlatma mekanizması morfoloji, akış sitometrisi ve western blot analizi ile araştırıldı. Sonuç olarak, kronik miyeloid lösemi hücre dizisinde AML, kaspaz bağımlı bir şekilde apoptozu indüklediği belirlendi ve AML'nin potansiyel bir anti-kanser ilacı gibi davranabileceği gösterildi (Huang et al. 2012).



Şekil 2.1 *A. membranaceus* (URL 3)

Radwan ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptığı bir çalışmada *A. spinosus* (Şekil 2.2) (Forssk)'un kök kısımlarının fitokimyasal analizi sonucunda bir adet yeni bir kumarin türevi olan Spinocoumarin I ile beraber 10 sekonder metabolit izole edilmiş ve izole edilen bileşiklerin yapıları spektroskopik yöntemlerle belirlenmiştir. Ayrıca tüm bileşiklerin A2780 (Yumurta Kanser Hücre Hattı) kanser hücrelerine karşı

antiproliferatif aktiviteleri incelenmiş olup, zayıf bir aktivite tespit etmişlerdir (Radwan et al. 2007).



Şekil 2.2 *A. spinosus* (URL 4)

2013 yılında yapılan bir çalışmada *A. sinicus* (Şekil 2.3) bitkisinin ekstraktlarından elde edilen fraksiyonların, iltihaplı deri hastalıklarının tedavisinde, önlenmesinde ve etkilerinin hafifletilmesinde kullanılabileceği tespit edilmiş, bu çalışma patent ile tescillendirilmiştir (Kim et al. 2013).



Şekil 2.3 *A. sinicus* (URL 5)

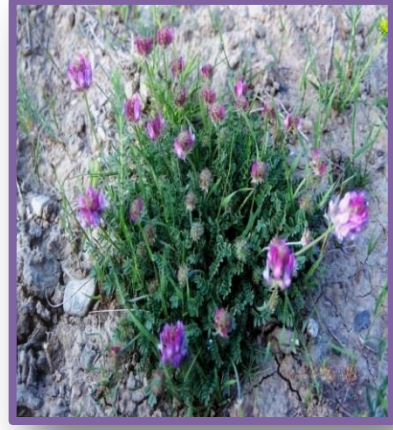
Ozbek ve diğerklerinin 2008 yılında yaptıkları çalışmada *A. pinetorum* (Şekil 2.4), *A. aduncus*, *A. argyroides* (Şekil 2.5) , *A. atrocorpus*, *A. bicolor* (Şekil 2.6) , *A. erinaceus*, *A. galegiformis* (Şekil 2.7) , *A. lagurus*, *A. macrocephalus*, *A. microcephalus*, *A. ponticus* (Şekil 2.8) , , *A. psoraloides* ve *A. trichostigma* bitkilerinin metanol ekstralarının antimitojenik aktivitesi incelendi. Ekstrelerin, sodyum azid (NaN_3), 9-aminoakridin (9AC), ve 4-nitro-1-kuinolin oksit (4NQO) antimitojenlerine karşı *Salmonella typhimurium* suşlarında TA1535-TA1537-TA1538 antimitojenik etkinlik gösterdiği belirlenmiştir (Ozbek vd. 2008).



Şekil 2.4 *A. pinetorum* (URL 6)



Şekil 2.5 *A. argyroides* (URL 7)



Şekil 2.6 *A. bicolor* (URL 8)



Şekil 2.7 *A. galegiformis* (URL 9)



Şekil 2.8 *A. ponticus* (URL 10)

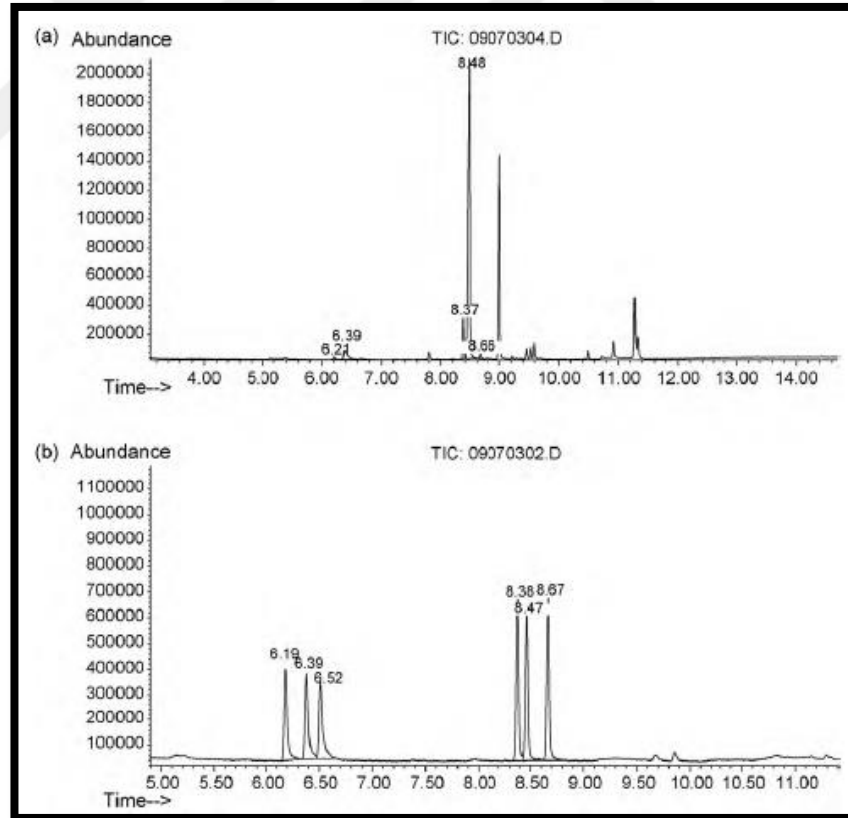


Şekil 2.9 *A. macrocephalus* (URL 11)

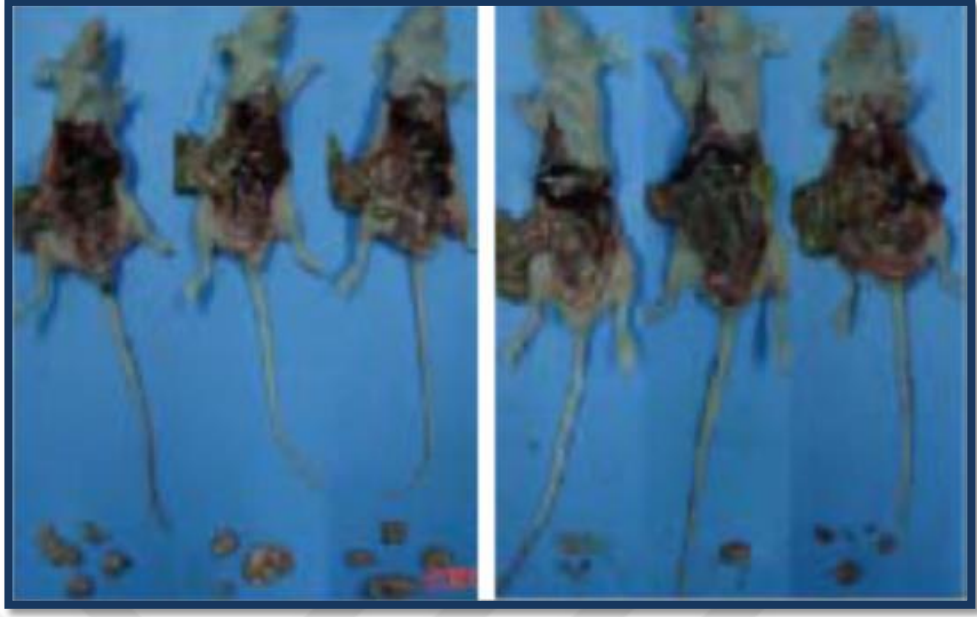
A. macrocephalus (Şekil 2.9) bitkisinde en iyi antimutajenik aktivite, bitkinin köklerinden (5 µg/plate doz; 85% inhibisyon) elde edilmiştir (Ozbek vd. 2008).

A. polysaccharides bitkisi üzerine yapılan bir çalışmada altı adet standart bileşik kullanılarak, bitkinin HPLC analizi yapılmıştır. Ayrıca bitkinin antioksidan ve antitümör aktiviteleri incelenmiştir. Yapılan HPLC analizi sonucunda; altı adet glikoz bağlı polisakkarit elde edilmiştir. Bununla birlikte bu bitkide güçlü antioksidan aktivite tespit edilmiştir (Li et al. 2010; Şekil 2.10).

A. polysaccharides bitkisinin, B16F10 hücrelerine (Fare melanoma hücresi) karşı yüksek antitümör etki gösterdiği gözlenmiştir (Li et al. 2010; Şekil 2.11).



Şekil 2.10 (a) *A. polysaccharides* in (b) Standart numunenin HPLC kromatogramı (Li et al. 2010; URL 12).



Şekil 2.11 *A. polysaccarides* ve siRNA'nın antitümör etkinliği (Li et al. 2010: URL 13).

2016 yılında yapılan bir çalışmada *A. lagurus* (Şekil 2.12 ve 2.13) bitkisinin etil asetat, metanol ve sulu ekstraktlarının enzim önleyici etkisi ve antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Antioksidan ve enzim önleyici etkileri (kolinesteraz, tirozinaz, amilaz ve glukosidaz enzimlerine karşı) spektrofotometrik yöntemlerle araştırılmıştır. Antioksidan kapasitesi; serbest radikal süpürme (DPPH ve ABTS) dahil olmak üzere güç azaltıcı (FRAP ve CUPRAC), fosfomolibdenum ve metal şelasyon yöntemleri gibi farklı deneyler kullanılarak değerlendirilmiştir (Zengin vd. 2016).



Şekil 2.12 *A. lagurus* (URL 14)

Toplam fenolik ve flavanoid içeriğinin çok yakın olduğu gözlenmiştir (20.34-20.72 mg GAEs/g ve 19.58-31.10 mg REs/g). Su ekstresinin etil asetat ve metanol ekstresi ile karşılaştırıldığında daha yüksek antioksidan ve enzim önleyici etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.



Şekil 2.13 *A. lagurus* (URL 15)

Sulu ekstrenin en güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir [DPPH (20.65 mg TEs/g); ABTS (67.43 mg TEs/g); CUPRAC (73.98 mg TEs/g) ve FRAP (53.49 mg TEs/g)]. Amilaz ve glükozidaz inhibisyonu, 0.12-0.56 ve 1.45-1.82 mmol ACAEs/g olarak bulunmuştur. Bu bulgular, *A. lagurus*' un gıda ve ilaç endüstrisinde kullanılabilir doğal biyolojik aktif maddeler içerdiğini göstermektedir (Zengin vd. 2016).

Gulluce vd. 2008 yılında yapmış oldukları çalışmada bazı endemik *Astragalus* türlerinin metanol ve hekzan ekstraktlarının antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri incelenmiştir (Gulluce vd. 2008).



Şekil 2.14 *A. campylosema* (URL 16)

Doğu Anadolu'da bulunan ve Erzurum civarında yetiştirilen dört endemik *Astragalus* türünün MeOH ekstresi yüksek serbest radikal süpürme aktivitesi göstermiştir (21.0-250.3 g/mL aralığında). *A. campylosema* (Şekil 2.14) ve *A. christianus* (Şekil 2.15) bitkilerinin metanol ekstreleri, β -karoten-linoleik asit sistemi söz konusu olduğunda incelenen *Astragalus* türleri arasında en yüksek aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir (Gulluce vd. 2008).



Şekil 2.15 *A. christianus* (URL 17)

A. campylosema (Şekil 2.16) kökü ekstrelerinin Linoleik asidin çalışma sistemi oksidantı tamamen inhibe ettiği bulunmuştur. Diğer yandan, test edilen *Astragalus* türlerinden elde edilen ekstre, disk difüzyon deneyine dayanan olası *in vitro* antibakteriyal, antikandidal ve antifungal aktiviteleri açısından değerlendirilmiş hiçbir ekstrenin test edilen mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 2.16 *A. campylosema* (URL 18)

A. membranaceus'un kökleri (Balık.) Bge. Var. Mongholicus (Bge.) Hsiao (*A. membranaceus*) kanser tedavisini destekleyen yardımcı bir reaktif olarak uzun süredir kullanılmaktadır. Li et al., 2014 yılında yapmış oldukları çalışmada *A. membranaceus* kökenli polisakkaritlerin selenyum (Şekil 2.17 ve 2.18) bağımlı antitümör immün modülasyon aktivitesini incelemişlerdir (Li et al. 2014).



Şekil 2.17 Selenyum (URL 19)



Şekil 2.18 Selenyum (URL 20)

Burada, Çin'in İç Moğolistan bölgesinde 5 büyük yaşam alanından alınan *A. membranaceus* (Şekil 2.19) kökenli polisakkaritlerin (PAM) kimyasal bileşimi ve immüno modüle edici aktivitesi karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda; bu verilerin selenyum içeriğinin *A.membranaceus* ve PAM'ların köklerinde farklı coğrafi kökenlerden farklı olduğu ve selenyumun PAM'ların antitümör immünomodülasyon aktivitelerine önemli bir katkı sağladığı öne sürülmüştür.



Şekil 2.19 *A. membranaceus* (URL 21)

Akyil vd. 2013 yılında yapmış oldukları çalışmada, *A. flavescens* (Şekil 2.20) bitkisinin potansiyel antimikrobiyal ve antimutajenik aktivitesini incelemişlerdir. Bitki materyali aseton ve metanol çözücülerini ile ekstre edilmiş ve ekstratların antimikrobiyal aktivitesi on bakteri karşısında disk difüzyon metodu kullanılarak değerlendirilmiştir (Akyil vd. 2013).



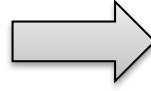
Şekil 2.20 *A. flavescens* (URL 22)

Antibakteriyel aktivite testleri için; *Escherichia coli* (ATCC 25992), *Terecoccus fecalis* (ATCC 29212), *Salmonella typhimuriu* (NRRLB-4420), *Bacillus subtilis* (NRS-744), *Proteus vulgaris*, *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* (ATCC 11778) ve *Yersinia* bakterileri kullanılmıştır.

Antimutajenik aktivite için; Ames / Salmonella mikrozom test sistemi uygulandı.

Sonuç olarak; *A. flavescens*, antibakteriyel ve antimutajenik aktivitesinin olmadığı belirlenmiştir (Akyil vd. 2013).

2012 yılında yapılan bir çalışmada, *A. verus* (Şekil 2.21) ekstresinin *Trichophyton verrucosum*'a (Şekil 2.22) karşı dermatofitozun *in vitro* ve *in vivo* kobay modeline karşı etkileri değerlendirilmiştir (Mikaeili et al. 2012).



Şekil 2.21 *A. verus* (URL 23)

Şekil 2.22 *Trichophyton verrucosum* (URL 24)

Albino kobaylarının derisi *T. Verrucosum* (Şekil 2.23) (1.0×10^7 konidya) ile enfekte edilmiş ve hayvanlar beş gruba ayrılmıştır (Her biri için $n = 5$). Negatif kontrol, pozitif kontrol (topikal terbinafin 1.0%) ve diğer üç grup: sırasıyla AE10%, AE20% ve AE40%. *A. verus* un sulu ekstresi alınmış, 7 günlük tedavi rejiminin tamamlanmasından 72 saat sonra klinik etkinliğin değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir. En önemli antifungal aktiviteler aseton ve metanol ekstraktları ile karşılaştırıldığında sulu ekstrede gözlenmiştir. Sonuç olarak, sulu ekstrenin umut verici antidermatofitik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Mikaeili et al. 2012).



Şekil 2.23 *T. Verrucosum* lezyolu dana (URL 25)

Shojaii vd. 2015 yılında *A. arbusculus* sakızının sulu ekstresinin hayvan modellerinde anti-inflamatuar ve analjezik aktivitelerinin değerlendirilmesi üzerinde inceleme yapmıştır.



Şekil 2.24 Wistar sıçan (URL 26)

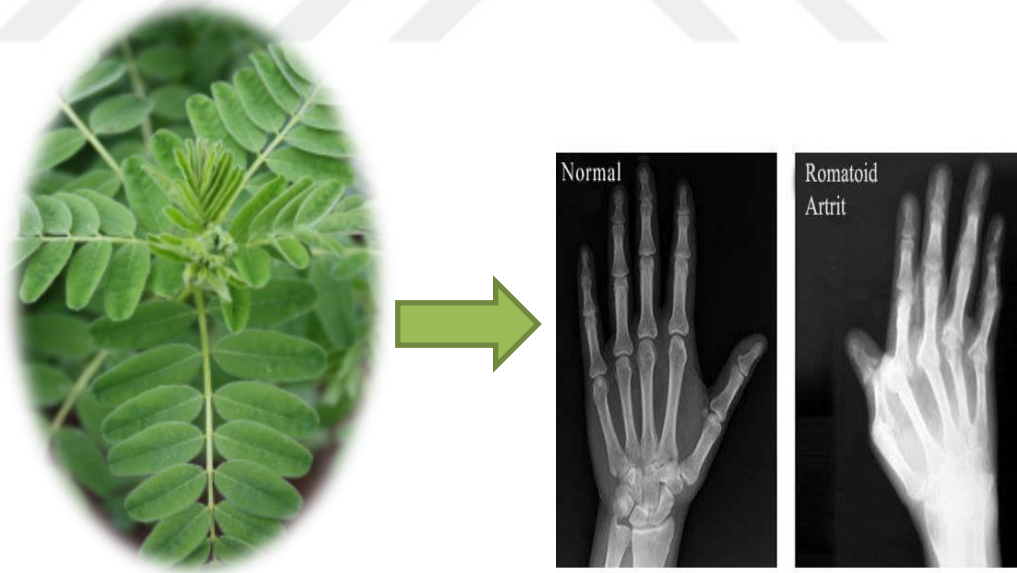
Çalışma şu şekilde yapılmıştır. Otuz beş erkek wistar sıçan (Şekil 2.24) beş gruba ayrılmış ve formalin enjeksiyonundan önce farklı dozlarda *A. arbusculus* sakızı ekstresiyle ön muamele edilmiştir. Pençe ödemi, 0 ve 8 gün sonra piezometre ile ölçülerek ve kontrollerle karşılaştırılmıştır. Ekstrenin analjezik etkisi, 42 erkek albino farede sıcak plaka testi kullanılarak değerlendirilmiştir. *A. arbusculus* sakızı ekstresinin sıçan pençe ödemini doza bağımlı bir şekilde azalttığı gözlenmiştir (Shojaii et al. 2015).

Diabetes mellitus (DM), günümüzde hastalığa yakalanılan ciddi bir kronik metabolik hastalıktır. Dünya nüfusunun %4'ünü teşkil eder. Günümüzde mevcut anti-diyabetik ve tedavi edilmiş ilaçları temin etmek için daha güçlü ve daha güvenli ilaçlara duyulan ihtiyaç bir zorunluluk haline gelmiştir (Kai et al., 2015). Kai et al., 2015 yılında yapmış oldukları çalışmada diyabetin tedavisinde geleneksel *A. membranaceus*'un biyolojik aktif bileşenlerini sistematik yönden incelemiştirlerdir. *A. membranaceus*, bitkisinin en yaygın Çin bitkisi olduğunu ve polisakkaritler (APS), saponinler (ASS), flavonoidler (ASF) vb. anti-diyabetik (Şekil 2.25) bileşikler açısından zengin olduğunu belirtmişlerdir (Kai et al. 2015).



Şekil 2.25 Anti diyabetik (URL 27)

2004 yılında *Gastrodia elata* ve *A. membranaceus* (Şekil 2.26) bitki ekstralarının sebze kurtları ve geyiklerin genç boynuzlarının Romatoid-nöroproteksiyon aktivitesi üzerine bir inceleme yapılmıştır. Doğal bitki ekstralarının, eklem sinirlerini korumayı sağladığı ve amiloid beta-peptid kaynaklı nöronal hücre ölümünü inhibe ettiği ve böylece artrit tedavisi ve önlenmesi için kullanılabilineceği belirtilmiştir (Kim et al. 2006; Şekil 2.27).



Şekil 2.26 *A. membranaceus* (URL 28) Şekil 2.27 El ve parmaklarda romatoid artrit (URL 29)

Jaradat ve arkadaşlarının 2016 yılında yapmış oldukları çalışmada Filistin geleneksel tıbbında kullanılan *Astragalus pelecinus* (Şekil 2.28) bitkisinin toprak üstü kısımları enfekte olmuş yaraların iyileştirilmesinde kullanılmıştır.

Bu çalışmada, aseton, etanol, metanol ve sulu ekstraktlardaki fitokimyasal bileşiklerin taranması, bitki toprak üstü kısımlarının antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ekstrenin antioksidan özelliği, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil serbest kök temizleme aktivitesi yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Antimikrobiyal aktivitenin tespiti ve *A. pelecinus*'un sulu ve metanolik ekstrakt konsantrasyonunun minimum inhibe edici konsantrasyonunun belirlenmesi, broth mikro-seyreltme metodu kullanılarak yapılmıştır. Antimikrobiyal aktivite, Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*, ayrıca *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve klinik bir *Candida albicans* izolatu ile karşılaştırılmıştır.

A. pelecinus türünün metanol, aseton, sulu ve etanolik ekstraktların protein, karbonhidrat, tanenler, glikozitler, flavonoidler, terpenoitler ve alkaloidler gibi fenolik bileşenler içerdiği görülmüştür. Bu bitkinin antioksidan aktiviteye sahip olduğu ($IC_{50} = 70.78 \pm 1.12 \mu\text{g/ml}$) ve sulu ekstraktının *Staphylococcus aureus*, MRSA, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Candida albicans*'a karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmada, *Astragalus pelecinus* bitkisinin, enfekte yaraların iyileşmesinde geleneksel kullanımını açıklayan biyolojik aktif moleküllere sahip olduğu gözlenmiştir. *A.pelecinus* bitkisinin, doğal antimikrobiyal ve antioksidan ilaç kaynağı sağlayabileceği, diabetes mellitus, kalp hastalıkları ve kanser dahil olmak üzere çeşitli tehlikeli hastalıkların önlenmesinde faydalı olabileceği ortaya konulmuştur (Jaradat et al. 2016).



Şekil 2.28 *Astragalus pelecinus* (URL 30)

Hu ve arkadaşlarının yapmış olduğu bu çalışma, *Astragalus chinensis*'in antioksidan, anti-proliferatif ve antiinflamatuvar aktiviteleri ile değerli bileşikleri elde etmek için tasarlanmıştır.

A. chinensis L.f.'den elde edilen etil asetat fraksiyonunun önemli antioksidan, anti-proliferatif ve anti-inflamatuvar aktivitelerine sahip olduğu belirlenmiştir. Daha sonra, formononetin (1), ramnositit (2), kalikozin (3), β -dakukosrol (4), ramnosititrin-3-O- β -D-glukozit (5) olarak tanımlanan beş tekli bileşik ayrılmış ve saflaştırılmıştır. Sonuçlar, formononetin ve rhamnosititrinin, tümör hücre hatlarına karşı önemli sitotoksikite eylemleri sergilediğini göstermiştir. Kalikozin, makrofajlarda NO üretimi üzerindeki inhibisyon etkilerinin en güçlü anti-enflamatuvar etkisini göstermiştir (Hu et al. 2017).

2.2 *Astragalus* ssp. Ekstrelerinin İzolasyon Çalışmaları

Labeled et al., 2016 yılında yapmış oldukları bir çalışmada *A. armatus* Willd. subsp. *numidicus* (Şekil 2.29) bitkisinin fitokimyasal analizlerini ve biyolojik aktivitelerini incelemişlerdir. Bu bitkinin kloroform, etil asetat ve n-bütanol ekstraktları ile sulu-etanolik ekstraktları hazırlanmıştır (Labeled et al. 2016).



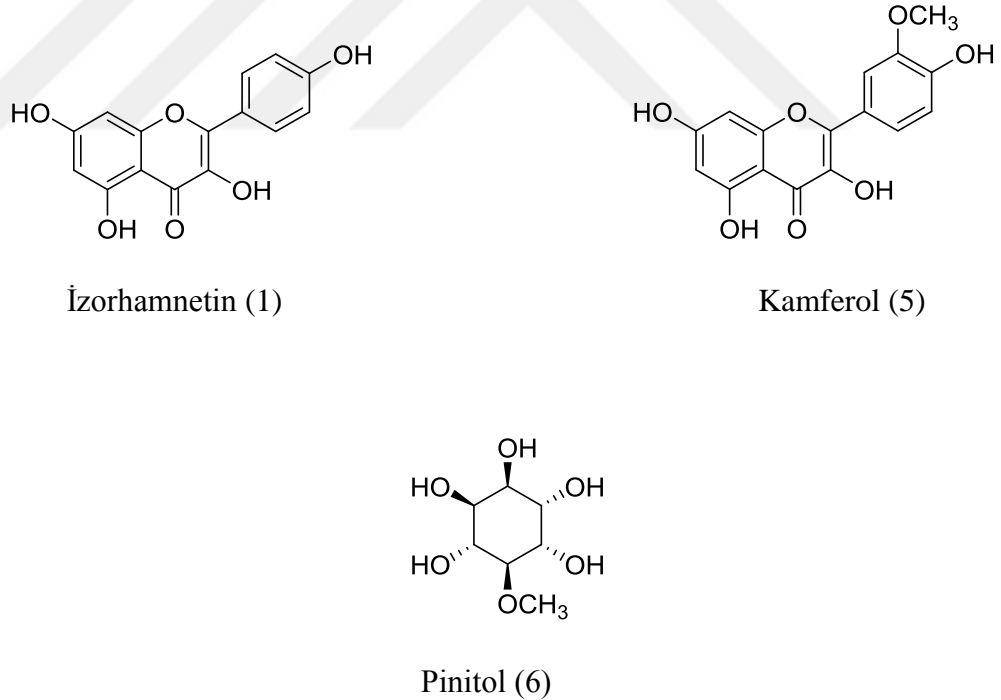
Şekil 2.29 *A. armatus* Willd. subsp. *numidicus* (URL 31)

Antioksidan aktivitesi için; serbest radikal süpürücü (DPPH, ABTS), CUPRAC ve demirli şelasyon metodları gerçekleştirilmiştir. Antikolinesteraz aktivitesini; asetilkolinesteraz ve bütirikolinesteraz enzimlerine karşı test etmişlerdir. Antibakteriyal aktivitesi ise; minimum inhibitör konsantrasyonu (Minimum Inhibitory Concentration) yöntemine göre gerçekleştirilmiştir Fagositik aktivite için; albino farelerinde karbon temizleme yöntemini kullanmışlardır (Labeled et al. 2016).

Sonuç olarak;

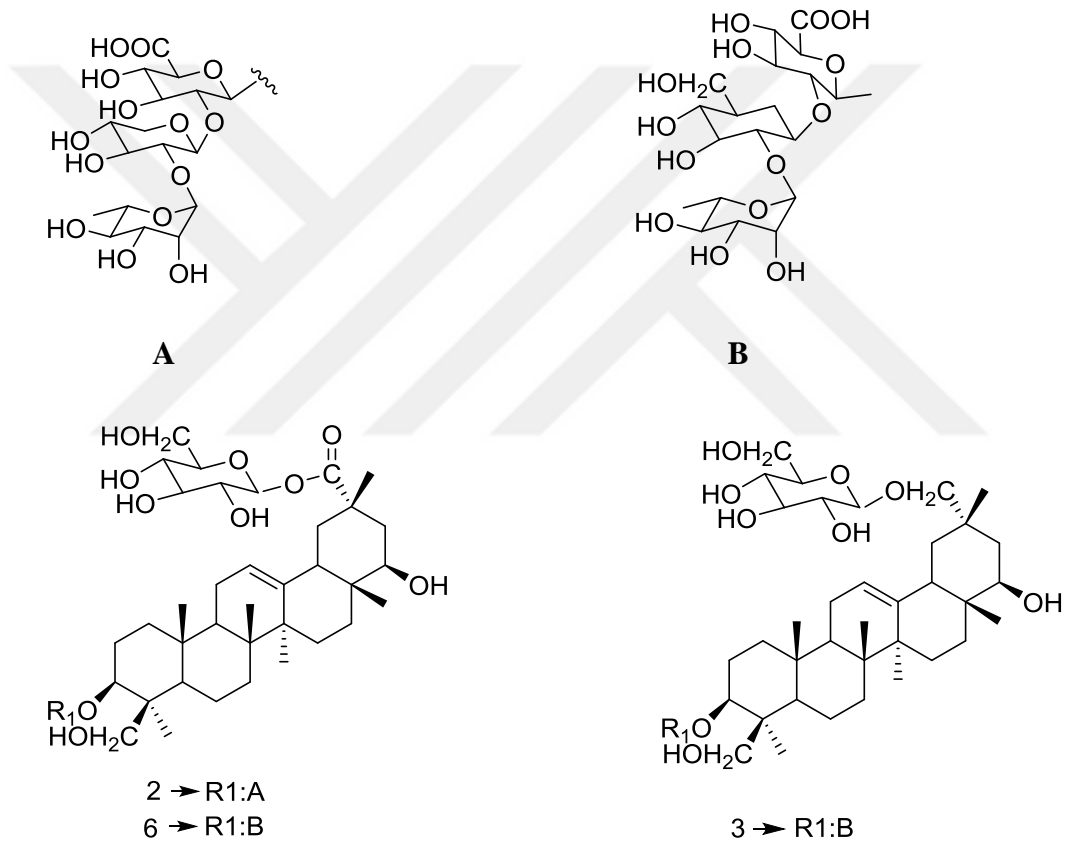
- Etil asetat ekstresinin en yüksek antioksidan aktivite sergilediği,
- Kloroform ekstresinin *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı her biri 80 µg/mL MIC değerleri ile en iyi antibakteriyal aktiviteyi sergilediği,
- n-bütanol ekstresinin en yüksek fagositik aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir.

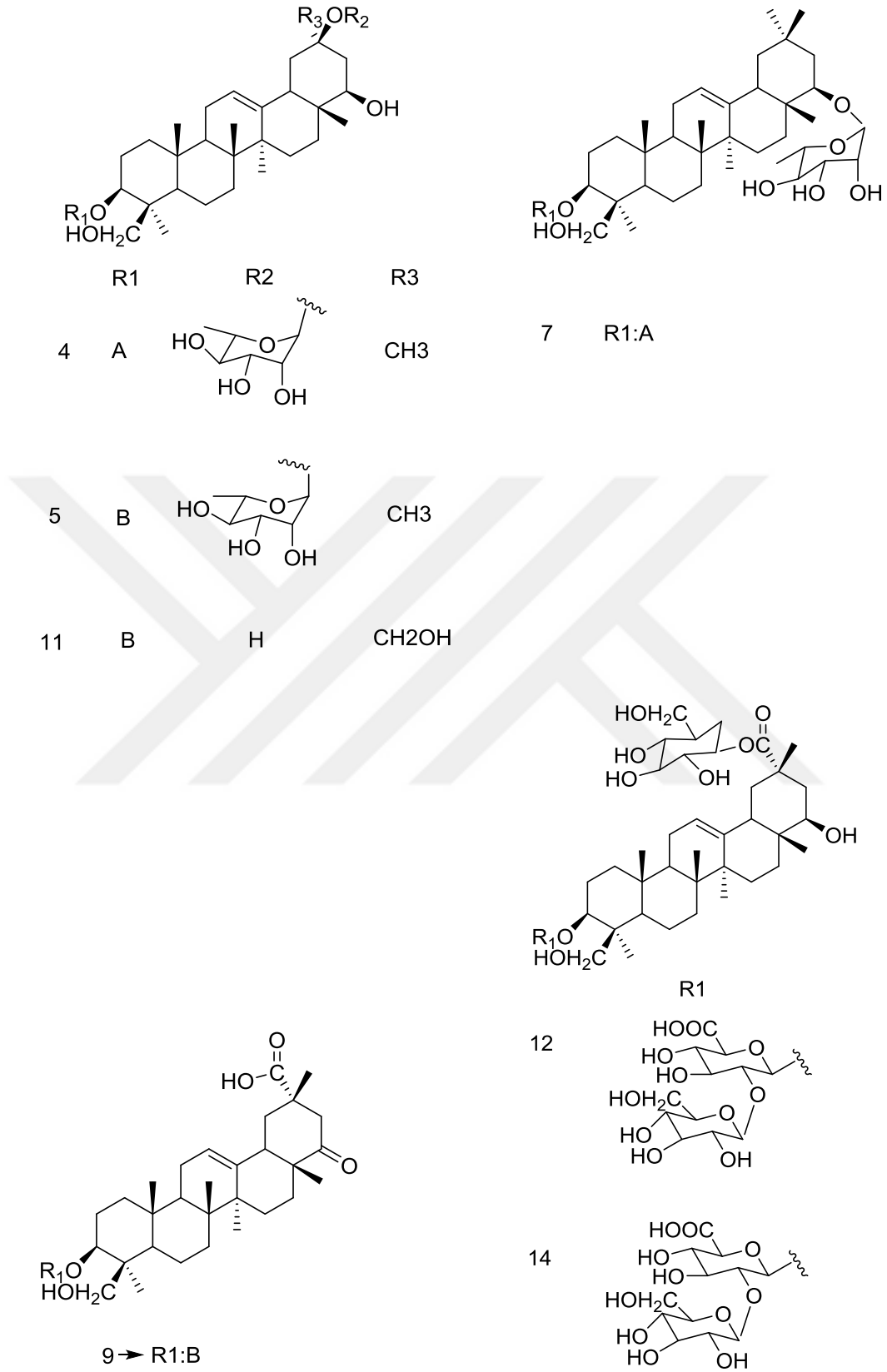
Bu çalışmada *A. armatus* Willd. subsp. *numidicus* bitkisinden Isorhamnetin (1), isorhamnetin-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D- galaktopiranozid (2), isorhamnetin-3-O- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 2)-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)]- β -D-galaktopiranozid (3), kamferol-3-O-(2,6-di-O- α -L-ramnopiranosil)- β -D-galaktopiranozid (4), kamferol-3-O-(2,6-di-O- α -L- ramnopiranosil)- β -D- glukopiranosid (5), pinitol (6) ve siklomakrosid D (7) 1, 2, 6 ve 7 ise *A. armatus*'tan ilk kez izole edilmiştir (Şekil 2.30).



Şekil 2.30 *A. armatus* Willd. subsp. *numidicus* bitkisinden izole edilen bileşikler (Labeled et al. 2016)

Gülcemal vd. (2013) *A. tauricolus* türü üzerine yapmış oldukları bir çalışmada, 22 adet oleanan tipi triterpen glikozit izole etmişler ve yapılarını ESIMS, HRMS analizleri ve 1D -2D NMR tekniklerini kullanarak belirlemişlerdir. Ayrıca izole etmiş oldukları 22 bileşiğin (Şekil 2.31) insan lösemi kanser hücresi (U937) üzerine antiproliferatif aktivitelerini incelemişler ve 1-12, 15, 17-19 nolu bileşiklerde zayıf aktivite, 11 nolu bileşikte ise dikkate değer (IC_{50} : 22 μ M) bir aktivite belirlemişlerdir (Gülcemal vd. 2013).





Şekil 2.31 *A. tauricolus* Bitkisinden İzole Edilen Bileşikler (Gülcemal vd. 2013)

2015 yılında, *A. englerianus* (Şekil 2.32) bitkisi üzerine yapılan bir çalışmada, bitkinin köklerinin kimyasal bileşenlerinin antioksidan aktiviteleri (DPPH yöntemi ile) incelenmiştir. Bileşenler silikajel, RP18, ve Sephadex LH-20 kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. İzole edilen bileşenlerin yapıları spektral veri ve fizikokimyasal özelliklerine bakılarak aydınlatılmıştır (Xiao et al. 2015).



Şekil 2.32 *A. englerianus* (URL 32)

Sonuç olarak *A. englerianus* köklerinin etil asetat fraksiyonu ile metanol ekstresinden 29 bileşik elde edilmiştir. Teşhis edilen bu bileşikler izolikiritigenin (1), 4'-hidroksi-2,4-dimetoksikalon (2), ksenognoz (3), formononetin (4), kaliksin (5), prunetin (6), (3R) – vestitol (7), likiritigenin (8), (6aR,11aR)-medikarpin-3-O-p-D-glikopiranosid (9), olean-12-en-3 β , 22 β , 24-triol (10), Friedelin (11), β -sitosterol (12), stigmasterol (13), 7 β -hidroksisitosterol (14), 7-oksositosterol (15), 3 β -sitosteril (9'Z) -9'-heptadekanoat (16), stigmast- 4-en-3-on (17), 5a, 8a-epidivoksi-ergosta-6,9,22E-trien-3p-ol (18), 5a, 8a-epidioksi-ergosta-6,22E-dien-3 β - (24), oleik asit (25), linoleik asit (26), sitrik asit (24), sitrik asit (26), sitrat (22), D-2-O-metilinositol (20), oktakoanol , A-linolenik asit (27), tripalmitin (28) ve trilinolein (29) dir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Araç ve Malzemeler

Çeşitli cam malzemeler (erlen, beher, cam tüpü, huni, baget vb.)

Hazır İTK plakaları (Silika gel 60 F₂₅₄)

İTK yürütücü kabin

3.2 Kullanılan Kimyasallar

3.2.1 İzolasyon İşleminde Kullanılan Kimyasallar

Hekzan (Merck), CH₂Cl₂ (Merck), EtOAc (Merck), n-bütanol (Merck), su (Destile) ekstraksiyon işleminde kullanıldı.

3.2.2 Biyolojik Aktivite Testlerinde Kullanılan Kimyasallar ve Hücreler

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)-High Glucose
- Penicillin Streptomisine
- Fetal Bovine Serum (Heat inactivated)
- Tripsin EDTA
- 5-Florourasil
- BrdU ELISA Kolorometrik Kit
- Trypan Blue

antikanser aktivite testleri için kullanılan kimyasallardır.

- HeLa (İnsan rahim hücresi kanseri)
- C6 (Sıçan beyin tümör hücresi)

antikanser aktivite testleri için kullanılan hücrelerdir.

3.3 Kullanılan Cihazlar

NMR (Agilent 600 MHz)

ELISA Mikroplate Okuyucu: (Awareness Chromate, USA)

GC-MS: Agilent 7890A gas chromatography and 5975C inert MSD, with Triple-Axis detector (Agilent Technology)

İnkübatör CO₂ Water-Jacketed (Nuair US Autoflow)

Mikroskop (Olympus CX21)

Steril Kabin (Esco class II type A2)

Otoklav (Panasonic)

Döner buharlaştırıcı

Santrifüj

Manyetik karıştırıcı

Etüv

Isıtıcı

pH metre

Ultrasonik Banyo

3.4 Bitkinin Toplanması, Kurutulması ve Tür Teşhisi

Astragalus dipsaceus Bunge bitkisi Çankırı ili Yapraklı ilçesinden çiçeklenme döneminde toplandı ve gölgede kurutuldu. Bitki örneklerinin tür teşhisi Dr. Öğrt. Üyesi Melda DÖLARSLAN tarafından yapıldı ve herbaryum numaraları alındı. Herbaryum

numarası ANK60524 olan *Astragalus dipsaceus* Bunge bitkisini Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryum depolarından alındı.

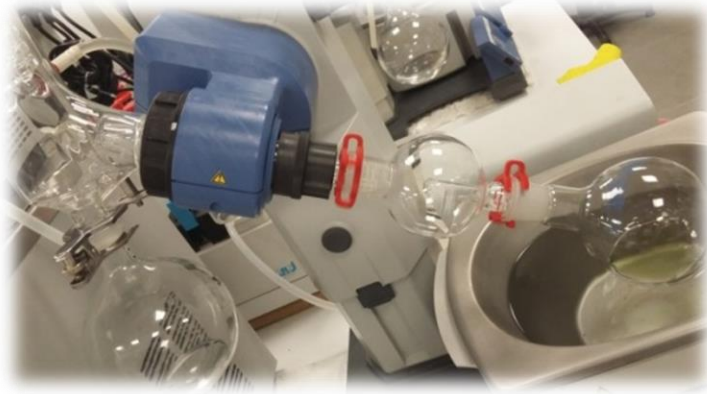
3.5 Bitkinin Özütlenmesi (Ekstraksiyon) İşlemi

1 kg tüm kuru bitki maserasyon yöntemi kullanarak Metanol - Kloroform (MeOH CHCl₃, 1:1) çözücü sisteminde oda sıcaklığında 2 gün aralıklarla 2 kez ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu. Daha sonra bitki posası süzülerek ortamdaki ayrıldı ve çözücü döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı. Elde edilen ham ekstre saf suda çözülerek sırasıyla hekzan, diklorometan (CH₂Cl₂), etilasetat (EtOAc) ve n-bütanol ile ekstrakte edildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Ekstraksiyon işlemi

Oluşan çözeltilerin çözücüleri uzaklaştırılarak hekzan, CH₂Cl₂, EtOAc, n-Bütanol ve su ekstresi elde edildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Evaporatörden çözücü uzaklaştırılması



Şekil 3.3 Elde edilen ekstratlar

Tüm ekstratların (Şekil 3.3) antiproliferatif aktivite testleri, HeLa ve C6 kanser hücrelerine karşı gerçekleştirildi. En yüksek aktive tespit edilen ekstrat kolon kromatografisine (Şekil 3.4) tabi tutularak saf maddelerin izolasyonu sağlandı.



Şekil 3.4 CH_2Cl_2 ekstresinin kolon kromatografisi

İzole edilen bileşiklerin (Şekil 3.5) yapıları 1D ve 2D NMR teknikleri, GC-MS, İTK (Şekil 3.6) gibi yöntemler kullanılarak aydınlatıldı.

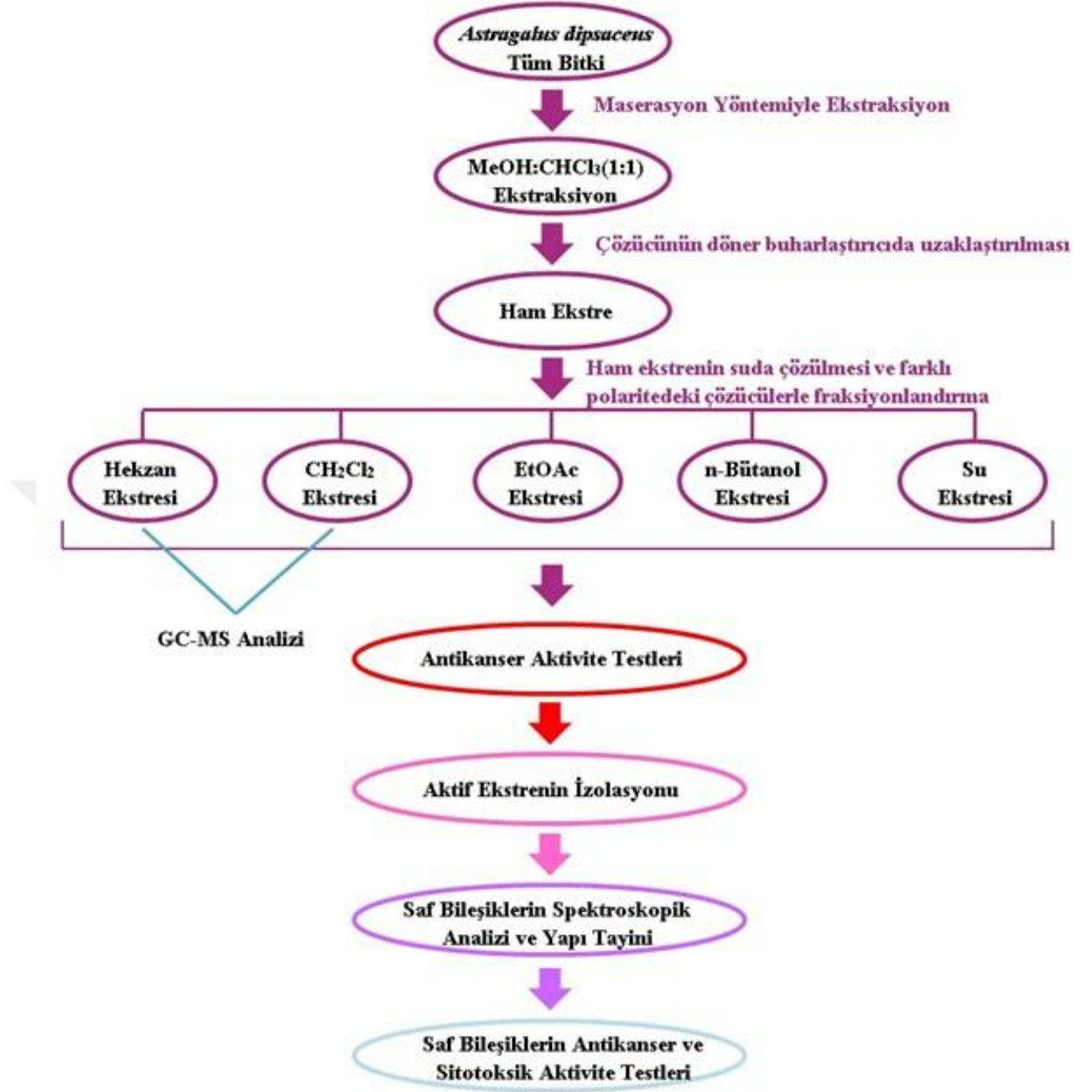


Şekil 3.5 Sikloalpiosid molekülü



Şekil 3.6 Genistein molekülünün İTK'sı

Son olarak izole edilen bileşiklerin antikanser ve sitotoksik aktivite testleri gerçekleştirildi. Tezin özet şeması Şekil 3.7'de verildi.

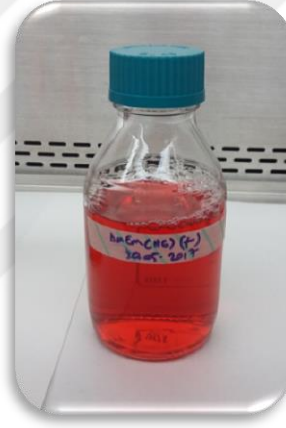


Şekil 3.7 Çalışma şeması

3.6 Antiproliferative Aktivite Testlerinin Yapılması

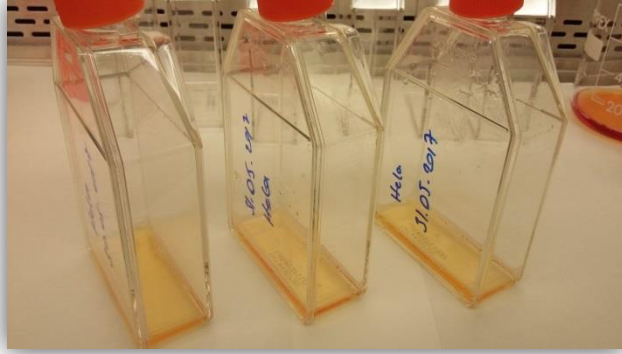
3.6.1 Hücre Kültürü

Bu çalışmada HeLa ve C6 kanser hücre hatları kullanıldı. Hücreler Fetal Bovine Serum (%10) ve Penisilin-Streptomisin(%2) solüsyonu içeren Dulbecco Modified Eagle's Medium besi yerinde (Şekil 3.8) kültüre edildi.



Şekil 3.8 Besiyeri

Hücreler, steril T75 hücre kültür flasklarında (Şekil 3.9) 37°C de %5 CO₂ ortamında 4-5 gün inkübe edilip konfluent hale geldiğinde, flasklardaki besi yeri 10 ml Tripsin-EDTA solüsyonu (Şekil 3.10) ile değiştirilerek, 5 dakika inkübe edildi.



Şekil 3.9 Steril T75 flasklarda HeLa ve C6 hücresi

Inkübasyon sonrasında flask hafifçe çalkalanarak hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlanarak, oluşan hücre süspansiyonu 50 ml steril falkon tüplere aktarılarak, hücreler üzerine 10 ml taze besi yeri eklenerek ve hücreler 600 RPM de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısım aspire edildikten sonra, hücre pelleti 2 ml taze besi yeri ile süspansiyon haline getirildi.



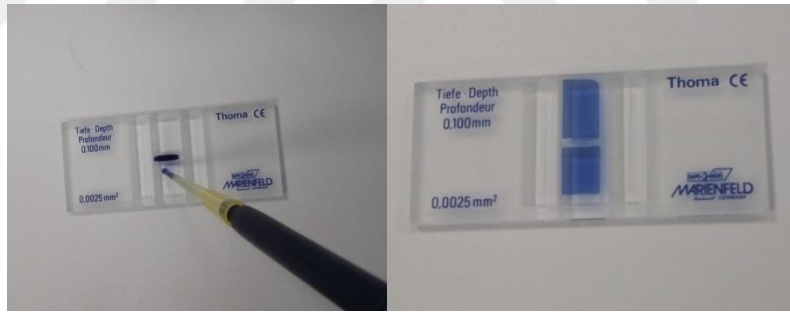
Şekil 3.10 Tripsin EDTA çözeltisi

Hücre sayımı için süspansiyonundan alınan 20 µl hücre 20 µl tripan mavisi solüsyonu (Şekil 3.11) ile karıştırılarak, bu karışımın 20 µl si Thoma lamına pipetlenerek (Şekil

3.12) hücreler mikroskop altında sayılarak hücre konsantrasyonu belirlendi (Hücre sayısı = 5 kuyucuktan sayılan toplam hücre sayısı x seyreltme faktörü x 50.000).



Şekil 3.11 Tripan mavisi solüsyonu

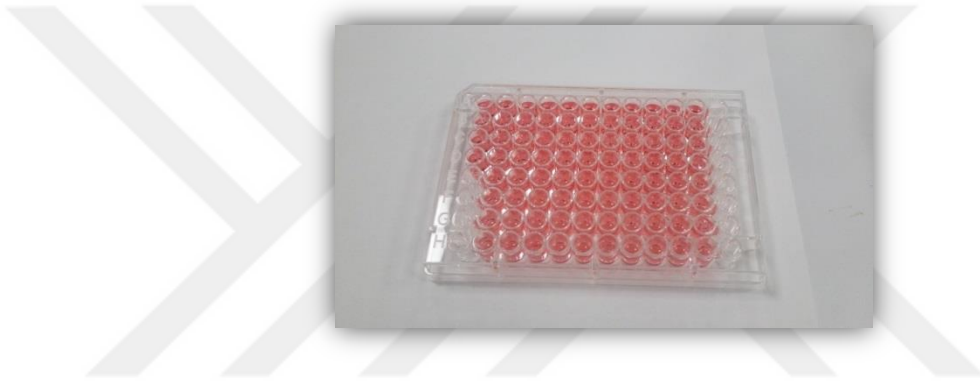


Şekil 3.12 Thoma lamına hücre pipetleme işlemi

Sayım işlemiden sonra yeni bir steril 15 ml lik Falcon tüp içinde çalışılacak hücre stok süspansiyonu hazırlandı. Eğer hücreler sadece split edilecekse ana hücre stoğundan 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde seyreltilerek, 1 ml hücre içinde 20 ml taze medyum bulunan kültür flasklarına pipetlenerek 37°C de %5 CO_2 ortamında 4-5 gün inkübe edildi.

3.6.2 *In vitro* antikanser aktivite (antiproliferatif aktivite) testi dizaynı

Hazırlanan hücre stoğundan 100 µl hücre süspansiyonu 96 kuyucuklu plakaların kuyucuklarına triplike olacak şekilde pipetlendi (Şekil 3.13). Negatif kontrol için besi yeri, pozitif kontrol için uygun bir antikanser bileşik olan 5-Florourasil ve test maddesi ile aynı konsantrasyonlarda (5-100 µg/mL) ilgili kuyucuklara eklendi. Kuyucuklardaki son hacim 200 µl olacak şekilde besi yeri ile tamamlandı.



Şekil 3.13 96 kuyucuklu plakaya hücre pipetleme

Pipetleme işlemi tamamlandıktan sonra plakalar 37°C de %5 CO₂ ortamında 24 saat inkübe edildi (Şekil 3.14).



Şekil 3.14 Plakaların inkübe edilmesi

3.6.3 BrdU Cell ELİZA hücre proliferasyon deneyi

Test maddelerinin antiproliferatif aktivitesi BrdU Cell Proliferation ELISA Kiti (Roche 11 647 229 001, Germany) kullanılarak üretici firmanın prosedürüne göre test edildi. Plakalar uygun bir mikrolaka okuyucu kullanılarak 450 ve 650 nm dalga boyunda okutuldu ve absorbans değerleri elde edildi.

3.6.4 IC₅₀ konsantrasyonunun belirlenmesi:

Test edilecek her maddenin IC₅₀ konsantrasyonunu (%50 sinin proliferasyonunun inhibe ettiği konsantrasyon) belirlenmesi için her bir test maddesinin belirli bir aralıkta logaritmik olarak artan konsantrasyonlarının (5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 µl) hücreler üzerinde test edilmesi sonrasında elde edilecek absorbansı değerlerinden hazırlanarak standart eğri üzerinden uygun bir program (Excel, SigmaPlot veya ED50V10.XLS) ve analiz metodu kullanılarak hesaplandı.

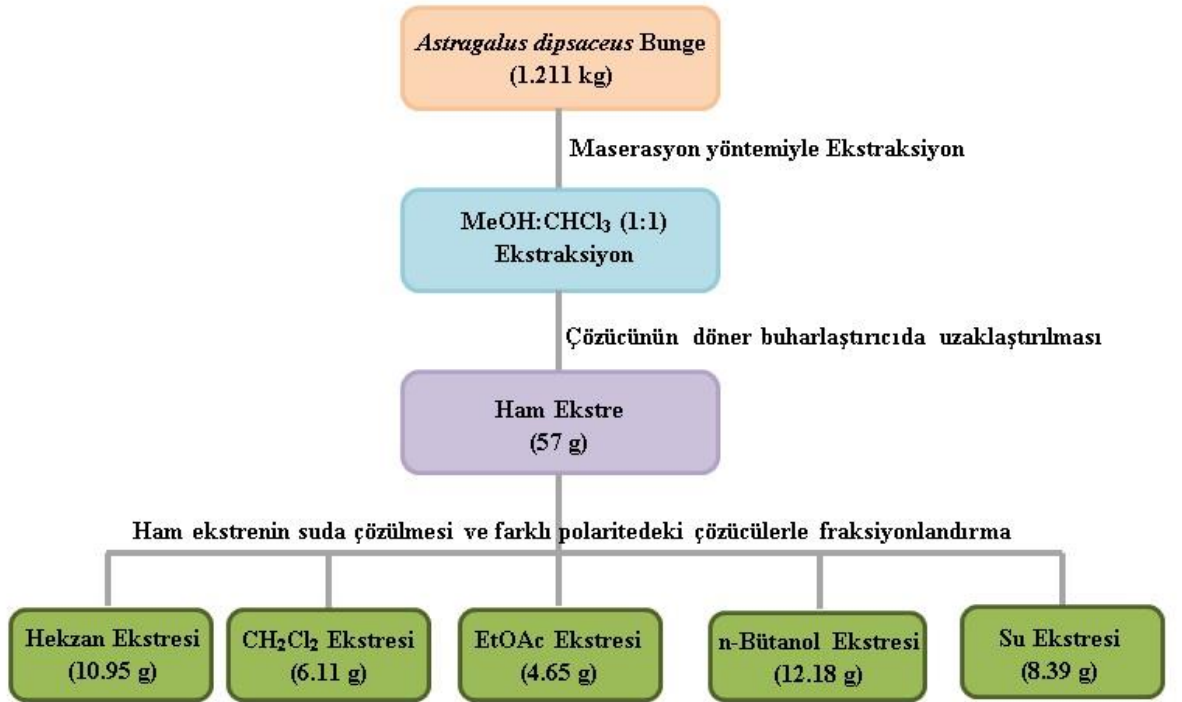
3.7 Sitotoksik Aktivite Testlerinin Yapılışı

Test maddelerinin sitotoksik aktivitesinin belirlenmesi için, hücreler test maddesinin IC₅₀ konsantrasyonunun altında ve üstünde seçilecek konsantrasyonlarda LDH Cell Cytotoxicity Assay (Roche 04 744 926 001, Germany) kullanarak üretici firmanın prosedürüne göre belirlenerek % sitotoksosite hesaplandı.

4. BULGULAR

4.1 Elde edilen ekstreler ve ekstre verimleri (%)

Astragalus dipsaceus Bunge (1.211 kg) bitkisinin tüm bitki kısmı ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu. Ham ekstre (57 g) ayırma hunisine alınarak apolardan polara doğru artan çözücü sistemi ile fraksiyonlandırıldı (Hekzan, Diklorometan, Etil Asetat, n-Bütanol, Su). Bu fraksiyonlar ayrı ayrı toplanıp, çözücülerini döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırıldı.



Şekil 4.1 *A. dipsaceus* Bunge bitkisinden elde edilen ekstreler ve ekstre miktarları

Astragalus dipsaceus Bunge bitkisinin tüm bitki kısımlarından elde edilen ekstre miktarı ve verimi Şekil 4.1’de gösterildiği gibidir.

Tablo 4.1 *Astragalus dipsaceus* Bunge bitkisinden elde edilen ekstre miktarları ve verimleri

	MeOH-CH ₂ Cl ₂ (1:1)	Hekzan	CH ₂ Cl ₂	EtOAc	n-BuOH	Su
Ekstre Miktarı	57	10.95	6.11	4.65	12.18	8.39
Verim (%)	4.71	0.90	0.50	0.38	1.00	0.69

A. dipsaceus Bunge bitkisinin tüm bitki kısımlarının hekzan ekstresi 10.95 g (% 0.90), diklorometan ekstresi 6.11 g (% 0.50), etil asetat ekstresi 4.65 g (% 0.38), n-Bütanol ekstresi 12.18 g (% 1.00) ve su ekstresi 8.39 g (% 0.69) elde edildi. Elde edilen en yüksek verimin (% 1.00) n-Bütanol ekstresinde olduğu tespit edildi (Tablo 4.1).

4.2 Hekzan ve Diklorometan Ekstrelerinin GC-MS Analiz Sonuçları

Astragalus dipsaceus Bunge (1.211 kg) bitkisinden fraksiyonlandırma işlemi yapılarak Hekzan ekstresi ve Diklorometan ekstresi elde edildi. Hekzan ekstresi gramajı 10.95 g ve Diklorometan ekstresi gramajı 6.11 g olarak tartıldı. Elde edilen her iki ekstrenin GC-MS cihazında analizi yapıldı (Tablo 4.2).

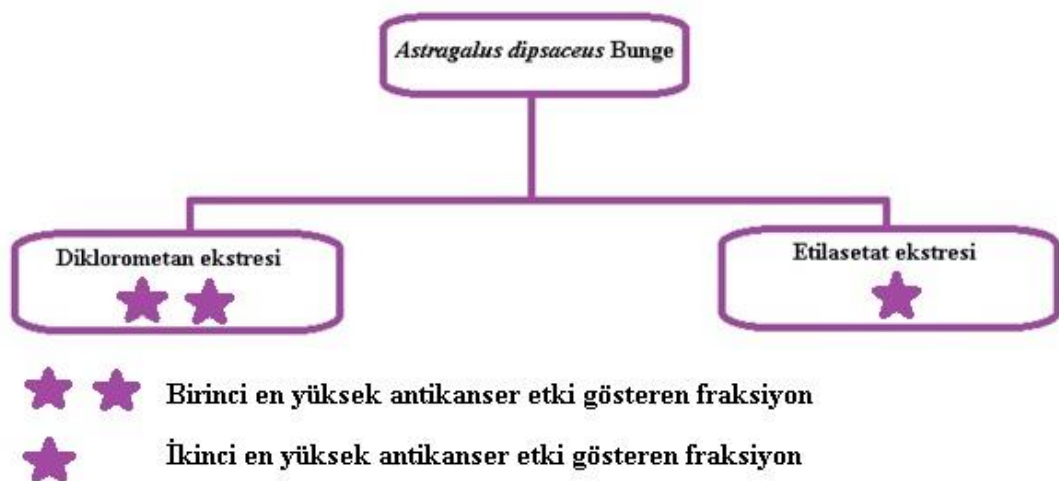
1-Hekzan Ekstresinin GC-MS sonuçlarına göre 13 bileşen tespit edildi. Bu bileşenlerden 2 tanesi doymuş yağ asiti, 1 tanesi çoklu doymamış yağ asiti ve 1 tanesi diğer yağ asitidir. Ana bileşenler ise palmitik asit (%38.75), stearik asittir (%41.60).

2-Diklorometan Ekstresinin GC-MS sonuçlarına göre 20 bileşen bulundu. Bu bileşenlerden 3 tanesi doymuş yağ asiti, 1 tanesi çoklu doymamış yağ asiti ve 16 tane de diğer yağ asitlerindedir. Ana bileşen ise palmitik asit (%39.26), stearik asit (21.84), linolenik asittir (%20.76).

Tablo 4.2 *Astragalus dipsaceus* Bunge elde edilen hekzan ve diklorometan ekstralarının GC-MS analiz sonuçları

No	RT	Izomer	Bileşik Adı	% Miktar	
				Hekzan	CH ₂ Cl ₂
Doymuş Yağ Asiti					
1	24.39/24.41	C ₁₆ :0	Palmitik Asit	38.75	39.26
2	30.39/30.40	C ₁₈ :0	Stearik Asit	41.60	21.84
3	20.99	C ₁₄ :0	Miristik Asit		4.38
Ara Toplam				80.35	65.48
Çoklu Doymamış Yağ Asiti					
4	29.47/29.69	C ₁₈ :3	Linolenik Asit	9.08	20.76
Ara Toplam				9.08	20.76
Diğer Bileşenler					
5	24.93	C ₁₃ :3	Metil 3-(3,5-di-tert-bütil-4-hidroksifenil) Propiyonat	3.07	
Ara Toplam				3.07	
Genel Toplam				92.5	86.24

Astragalus dipsaceus Bunge bitkisi üzerine yapılan antikanser aktivite testi sonucunda birinci en yüksek antikanser etki gösteren fraksiyon diklorometan ekstresi iken; ikinci en yüksek antikanser etki gösteren fraksiyonun etilasetat ekstresi olduğu görülmüştür.



Şekil 4.2 *A. dipsaceus* Bunge bitkisinin aktif ekstraları

4.3 Etilasetat Ekstresinin Kolon Kromatografisi

İlk olarak cam kolona dolgu maddesi olarak silika jel yüklendi. Silika jelin kolona tam olarak oturması için kolon çeperlerine plastik hortum vuruldu. Etil asetat ekstresi (4.65 g) 10 g silika jele emdirildi. Silika jele emdirilen ekstre kolona yüklendi. Sonra 500 ml hekzan kolondan geçirildi. Kolonda kullanılan çözücü sistemi ve fraksiyon aralığı Tablo 4.3'te gösterildiği gibidir.

Tablo 4.3 Etilasetat ekstresi kolonunun fraksiyon aralığına karşılık gelen çözücü sistemi

Fraksiyon Aralığı	Çözücü Sistemi
1-12	Hekzan-EtOAc (%5)
13-39	Hekzan-EtOAc (%10)
40-65	Hekzan-EtOAc (%20)
66-92	Hekzan-EtOAc (%25)
93-119	Hekzan-EtOAc (%30)
120-146	Hekzan-EtOAc (%40)
147-227	Hekzan-EtOAc (%50)
228-310	Hekzan-EtOAc (%60)
311-336	Hekzan-EtOAc (%70)
337-418	Hekzan-EtOAc (%80)
419-444	Hekzan-EtOAc (%90)
445-471	EtOAc (%100)
472-602	EtOAc-MeOH (%5)
603-680	EtOAc-MeOH (%10)
681-759	EtOAc-MeOH (%20)
760-837	EtOAc-MeOH (%40)
838-889	EtOAc-MeOH (%60)
890-914	EtOAc-MeOH (%80)
915-962	MeOH (%100)

Bu fraksiyonlardan toplanan tüplerdeki maddelere TLC uygulanarak birleştirilen tüplerin grafiği de Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.4 Etilasetat ekstresi kolon kromatografisi sonuçları

No	Birleştirilen Tüpler	Miktar (mg)	Yapılan Analiz	Analiz Kodu
1	1-40	90	İTK	
2	41-50	40	İTK	
3	51-54	40	İTK	
4	55-90	200	İTK	
5	91-115	30	İTK	
6	116-175	10	İTK	
7	176-179	20	İTK	
8	180-200	10	1D-2D NMR	EAS-5 Genistein
9	201-210	60	İTK	
10	211-223	50	İTK	
11	224-299	230	İTK	
12	300-315	50	İTK	
13	316-324	20	İTK	
14	325-330	20	İTK	
15	331-355	20	İTK	
16	356-359	10	İTK	
17	360-374	130	İTK	
18	375-400	190	İTK	
19	401-404	20	İTK	
20	405-445	90	İTK	
21	446-480	230	İTK	
22	481-484	20	İTK	
23	485-490	260	İTK	
24	491-499	10	İTK	
25	500-519	50	İTK	
26	520-530	80	İTK	
27	531-532	30	İTK	
28	533-570	980	1D-2D NMR	EAS-2 Sikloalpiosid
29	571-630	230	1D-2D NMR	EAS-1 Sikloalpiosid D
30	631-680	110	İTK	
31	681-700	120	İTK	
32	701-720	130	İTK	
33	721-795	440	İTK	
34	796-835	30	İTK	
35	836-900	320	İTK	
36	901-904	30	İTK	
37	905-925	260	İTK	
38	926-929	60	İTK	
39	930-945	350	İTK	
40	946-960	120	İTK	

4.4 Diklorometan Ekstresinin Kolon Kromatografisi

İlk olarak cam kolona dolgu maddesi olarak silika jel yüklendi. Silika jelin kolona tam olarak oturması için kolon çeperlerine plastik hortum vuruldu. Diklorometan ekstresi (5.6 g) 5 g silika jele emdirildi. Silikajele emdirilen ekstre kolona yüklendi. Sonra 1000 ml hekzan kolondan geçirildi. Kolonda kullanılan çözücü sistemi ve fraksiyon aralığı Tablo 4.5'te gösterildiği gibidir.

Tablo 4.5 Diklorometan ekstresi kolonunun fraksiyon aralığına karşılık çözücü sistemi

Fraksiyon Aralığı	Çözücü Sistemi
1-44	Hekzan-CH ₂ Cl ₂ (% 10)
45-142	Hekzan-CH ₂ Cl ₂ (% 20)
143-188	Hekzan-CH ₂ Cl ₂ (% 25)
189-234	Hekzan-CH ₂ Cl ₂ (% 30)
235-280	Hekzan-CH ₂ Cl ₂ (% 40)
281-371	Hekzan-CH ₂ Cl ₂ (% 50)
372-417	Hekzan-CH ₂ Cl ₂ (% 60)
418-464	Hekzan-CH ₂ Cl ₂ (% 70)
465-508	Hekzan-CH ₂ Cl ₂ (% 80)
509-554	Hekzan-CH ₂ Cl ₂ (% 90)
555-641	CH ₂ Cl ₂ (% 100)
642-749	CH ₂ Cl ₂ -EtOAc (% 10)
750-858	CH ₂ Cl ₂ -EtOAc (% 20)
859-880	CH ₂ Cl ₂ -EtOAc (% 30)
881-902	CH ₂ Cl ₂ -EtOAc (% 50)
903-949	EtOAc (% 100)
950-973	EtOAc-MeOH (% 5)
974-1040	EtOAc-MeOH (% 10)
1041-1088	EtOAc-MeOH (% 20)
1089-1136	EtOAc-MeOH (% 30)
1137-1184	EtOAc-MeOH (% 40)
1185-1209	EtOAc-MeOH (% 50)
1210-1233	EtOAc-MeOH (% 60)
1234-1258	EtOAc-MeOH (% 70)
1259-1282	EtOAc-MeOH (% 80)
1283-1307	EtOAc-MeOH (% 90)
1308-1332	MeOH (% 100)

Bu fraksiyonlardan toplanan tüplerdeki maddelere TLC uygulanarak birleştirilen tüplerin grafiği de Tablo 4.6'da verilmiştir.

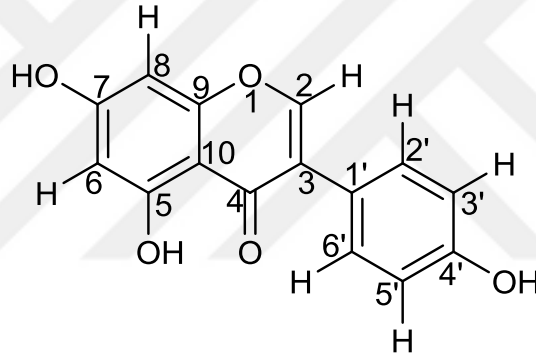
Tablo 4.6 Diklorometan ekstresi kolon kromatografisinin birleştirilen tüplere uygulanan analizi

No	Birleştirilen Tüpler	Miktar (mg)	Yapılan Analiz	NMR-GC/MS kod
1	1-19	50	İTK	
2	20-25	20	İTK	
3	26-40	90	İTK	
4	41-200	140	1D NMR/GC-MS	EAS-6
5	201-220	170	1D NMR/GC-MS	EAS-7
6	221-240	10	İTK	
7	241-280	1,980	İTK	
8	281-290	440	İTK	
9	291-350	1,610	1D NMR/GC-MS	EAS-8
10	351-414	150	1D NMR/GC-MS	EAS-9
11	415-430	120	İTK	
12	431-465	170	İTK	
13	466-480	80	İTK	
14	481-505	20	İTK	
15	506-570	80	1D-2D NMR	EAS-10
16	571-660	10	İTK	
17	661-690	20	İTK	
18	691-705	90	İTK	
19	706-719	20	İTK	
20	720-735	10	İTK	
21	736-880	60	İTK	
22	881-910	60	İTK	
23	911-920	60	İTK	
24	921-930	200	İTK	
25	931-940	80	İTK	
26	941-955	150	İTK	
27	956-970	160	İTK	
28	971-1050	83,950	İTK	
29	1051-1080	320	İTK	
30	1081-1160	410	İTK	
31	1161-1220	270	İTK	
32	1221-1245	70	İTK	
33	1246-1270	60	İTK	
34	1271-1300	50	İTK	

4.5 İzole Edilen Bileşiklerin Fiziksel ve Spektral Özellikleri

4.5.1 Genistein

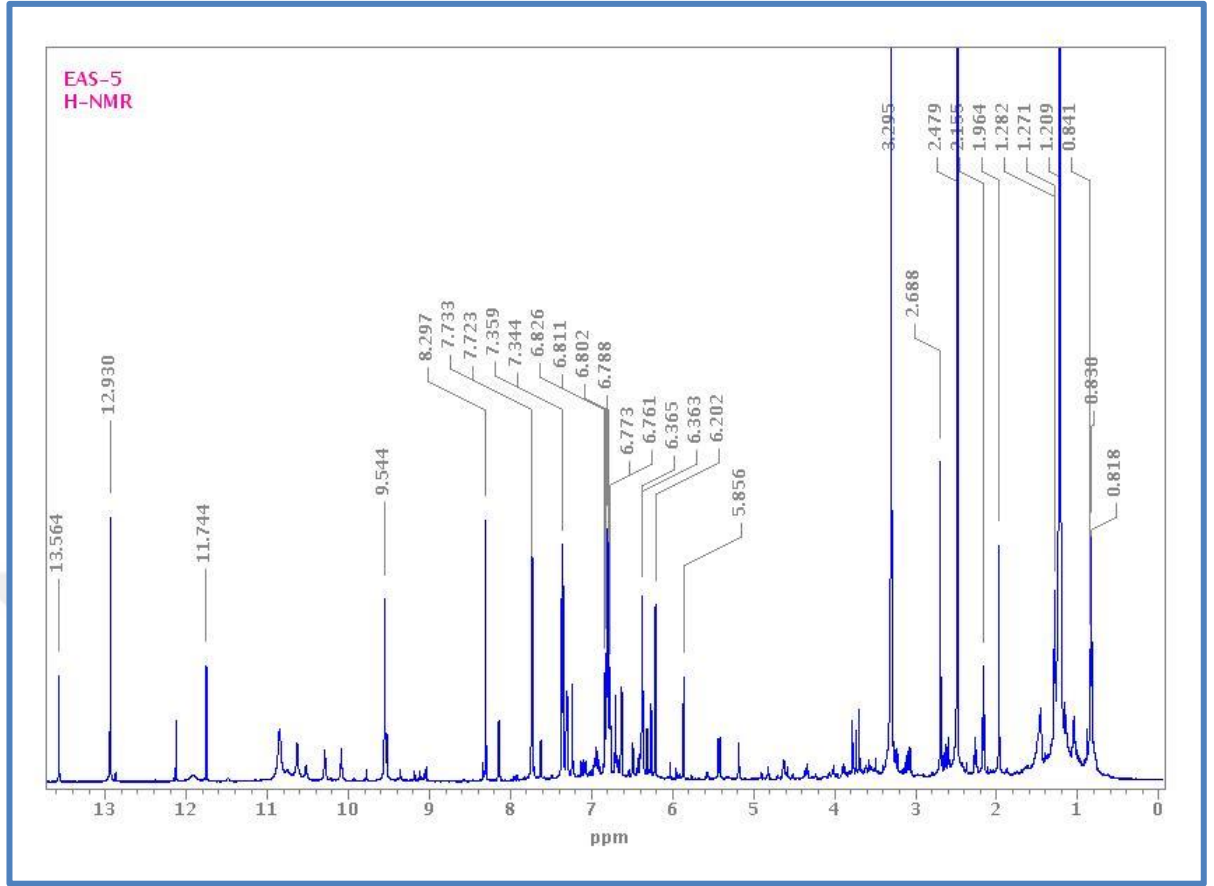
Genistein (4',5,7-Trihydroxyisoflavone) (Şekil 4.3), etilasetat ekstresinin kolon kromatografisinden (180-200 fraksiyon; 10.00 mg) izole edildi. Yapı tayinleri 1 ve 2 D NMR spektroskopisi kullanılarak aydınlatıldı. Elde edilen deneysel değerler literatür ile uyum içindedir (Yasuda et al. 1996).



Şekil 4.3 Genistein molekülü

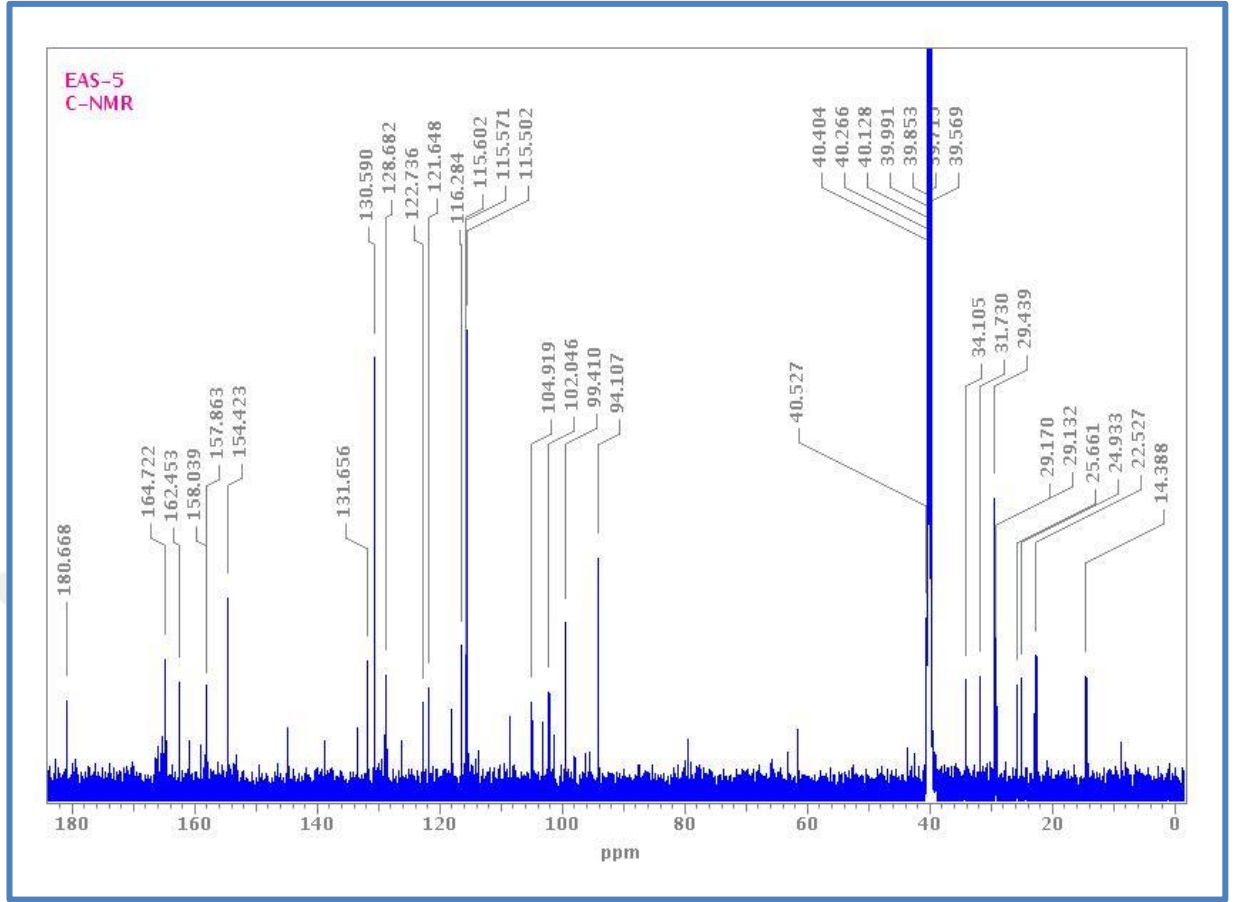
Tablo 4.7 Genistein molekülünün NMR değerleri

Karbon Atom	¹ H (Deneysel)	¹³ C (Deneysel; DMSO-d ₆)	¹³ C (Yasuda et al. 1996; DMSO-d ₆)
C-1	-	-	-
C-2	8.3 s	154.4	153.8
C-3	-	126.1	122.1
C-4	-	180.6	180.0
C-5	-	162.0	161.9
C-6	6.1 s	99.0	99.0
C-7	-	164.0	164.7
C-8	6.3 s	94.1	93.6
C-9	-	157.7	157.3
C-10	-	105.0	104.2
C-1'	-	122.0	121.1
C-2'	7.3 d	130.7	130.0
C-3'	6.7 d	115.7	114.9
C-4'	-	157.0	157.5
C-5'	6.7 d	115.7	114.9
C-6'	7.3 d	130.7	130.0



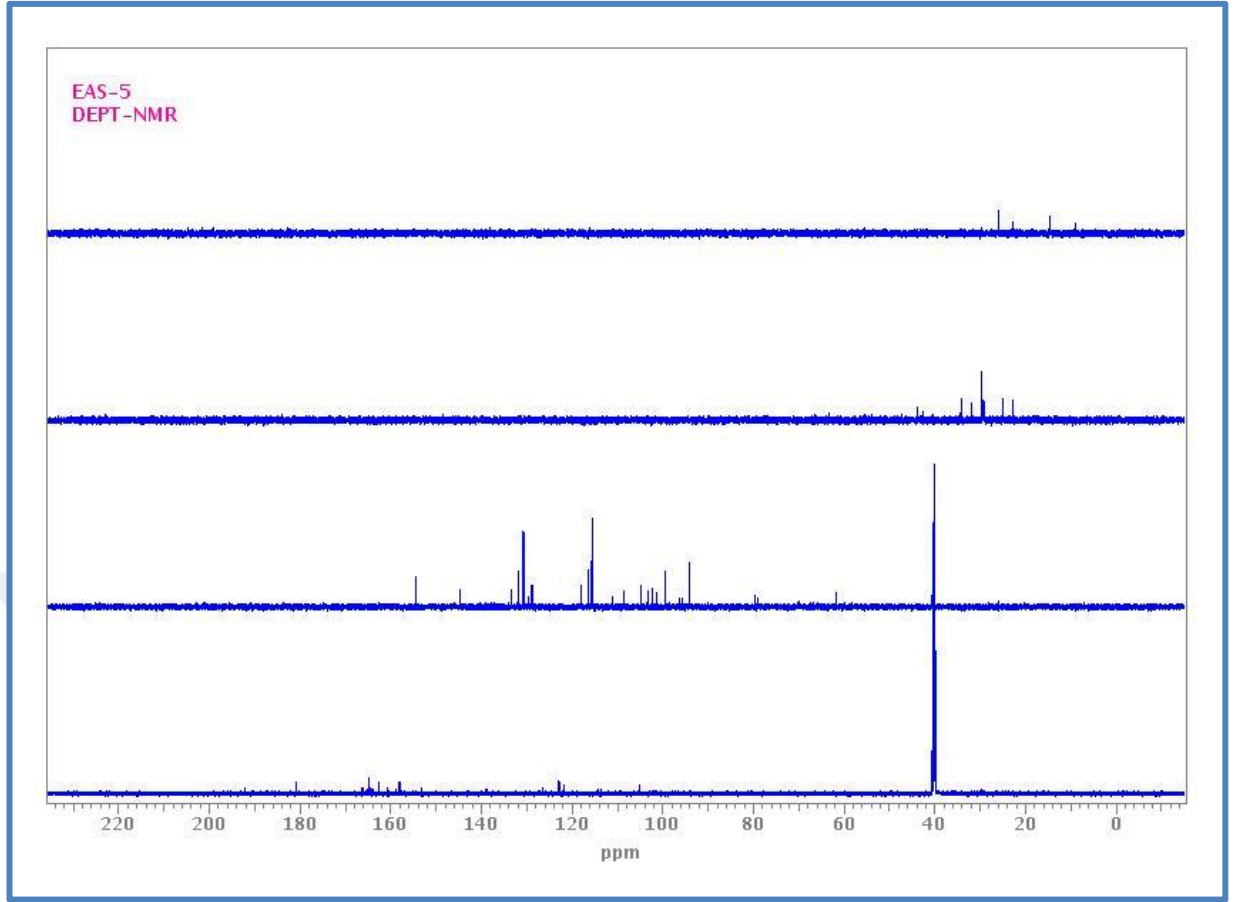
Şekil 4.4 Genistein molekülünün ^1H NMR spektrumu (600 MHz, DMSO-d_6)

Genistein molekülünün ^1H NMR spektrumu incelendiğinde; H-2 protonu 8.30 ppm de singlet olarak rezonans olmuştur. H-6 protonu 6.18 ppm de ve H-8 protonu 6.34 ppm de singlet olarak rezonans olmuştur. H-2' (7.35 ppm; d) ve H-3' (6,79 ppm; d) protonları birbirleriyle etkileşerek dublet olarak rezonans olmuşlardır. H-5' (6.79 ppm; d) ve H-6' (7.35 ppm; d) protonları birbirleriyle etkileşerek dublet olarak rezonans olmuşlardır (Şekil 4.4).



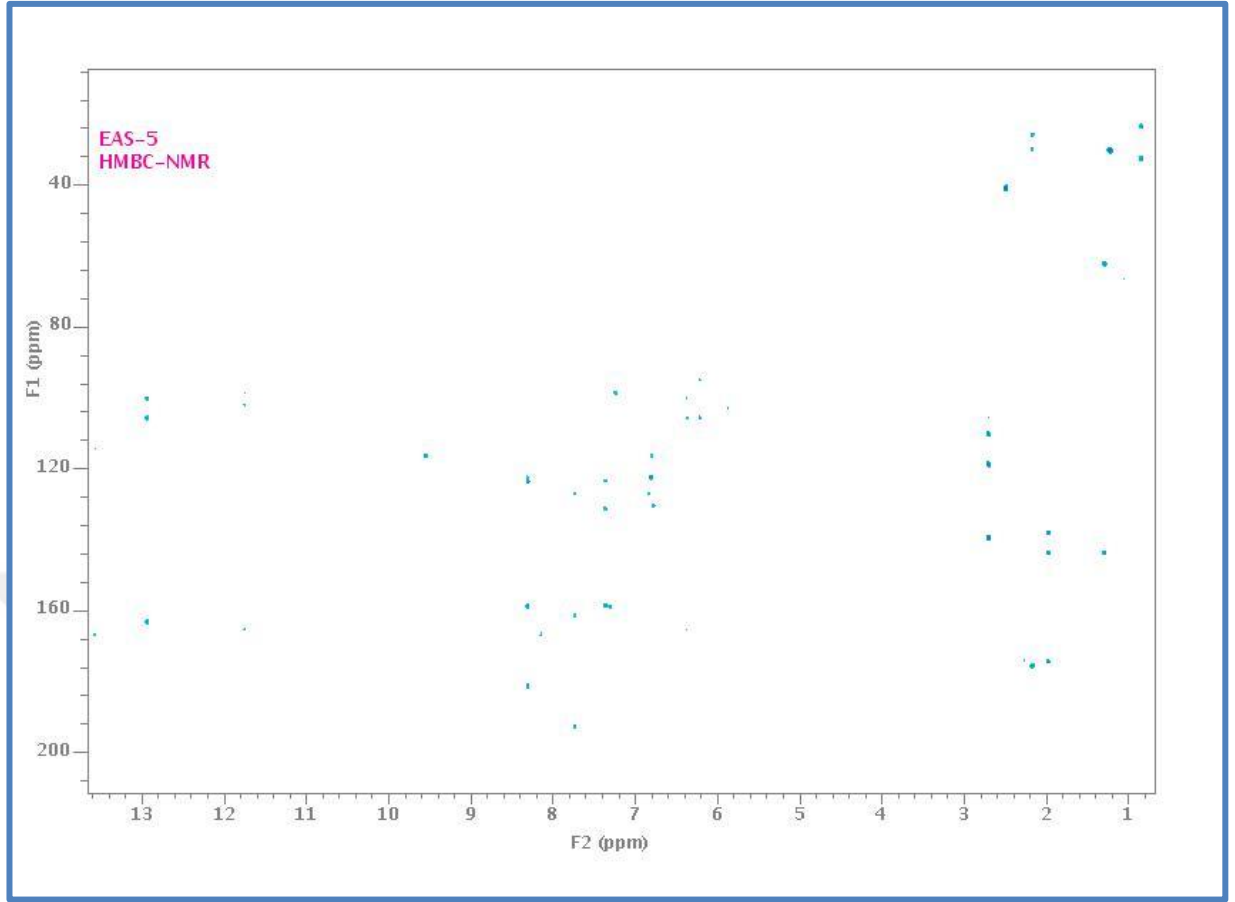
Şekil 4.5 Genistein molekülünün ^{13}C NMR spektrumu (150 MHz, DMSO- d_6)

Genistein molekülünün ^{13}C NMR spektrumu incelendiğinde 15 adet karbon sinyaline rastlanmıştır. 15 karbondan 8 tanesi kuarterner karbon atomuna (126.19 ppm, 180.66 ppm, 162 ppm, 164 ppm, 157.7 ppm, 105 ppm, 122 ppm ve 157 ppm), 7 tanesi metin karbon atomlarına (154.42 ppm, 99 ppm, 94.15 ppm, 130.73 ppm, 115.75 ppm, 115.75 ppm ve 130.73 ppm) aittir. Bu bileşiğin karbonil karbonuna ait sinyal 180.66 ppm de gözlenmektedir (Şekil 4.5).



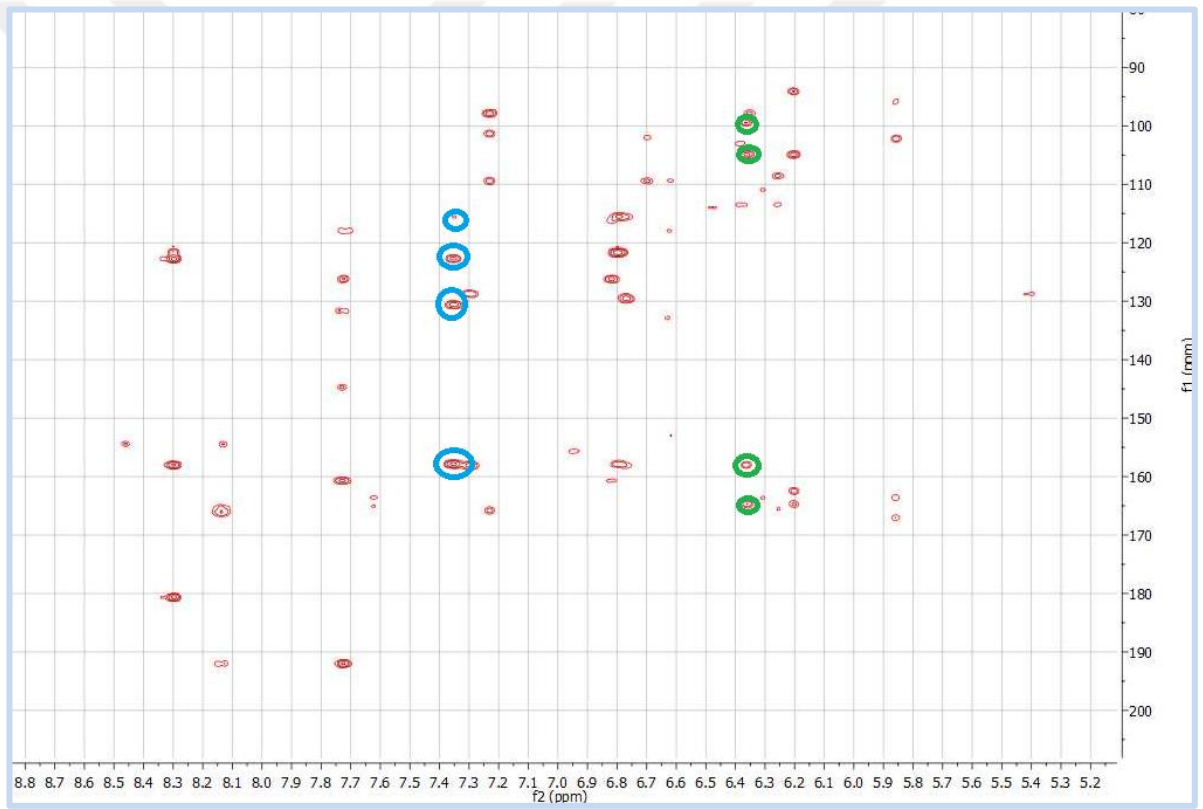
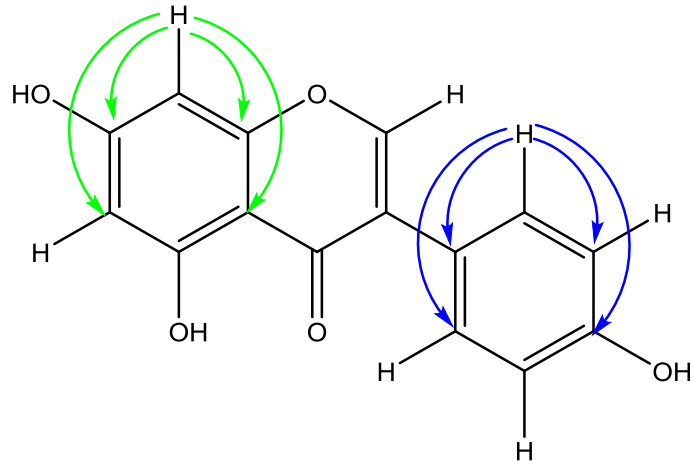
Şekil 4.6 Genistein molekülünün DEPT NMR spektrumu (150 MHz, DMSO-d₆)

Genistein molekülünün DEPT NMR spektrumu incelendiğinde 15 adet karbon sinyaline rastlanmıştır. 15 karbondan 8 tanesi C karbon atomuna (126.19 ppm, 180.66 ppm, 162 ppm, 164 ppm, 157.7 ppm, 105 ppm, 122 ppm ve 157 ppm), 7 tanesi CH karbon atomlarına (154.42 ppm, 99 ppm, 94.15 ppm, 130.73 ppm, 115.75 ppm, 115.75 ppm ve 130.73 ppm) aittir. Bu bileşiğin karbonil karbonuna ait sinyal 180.66 ppm de gözlenmektedir (Şekil 4.6).

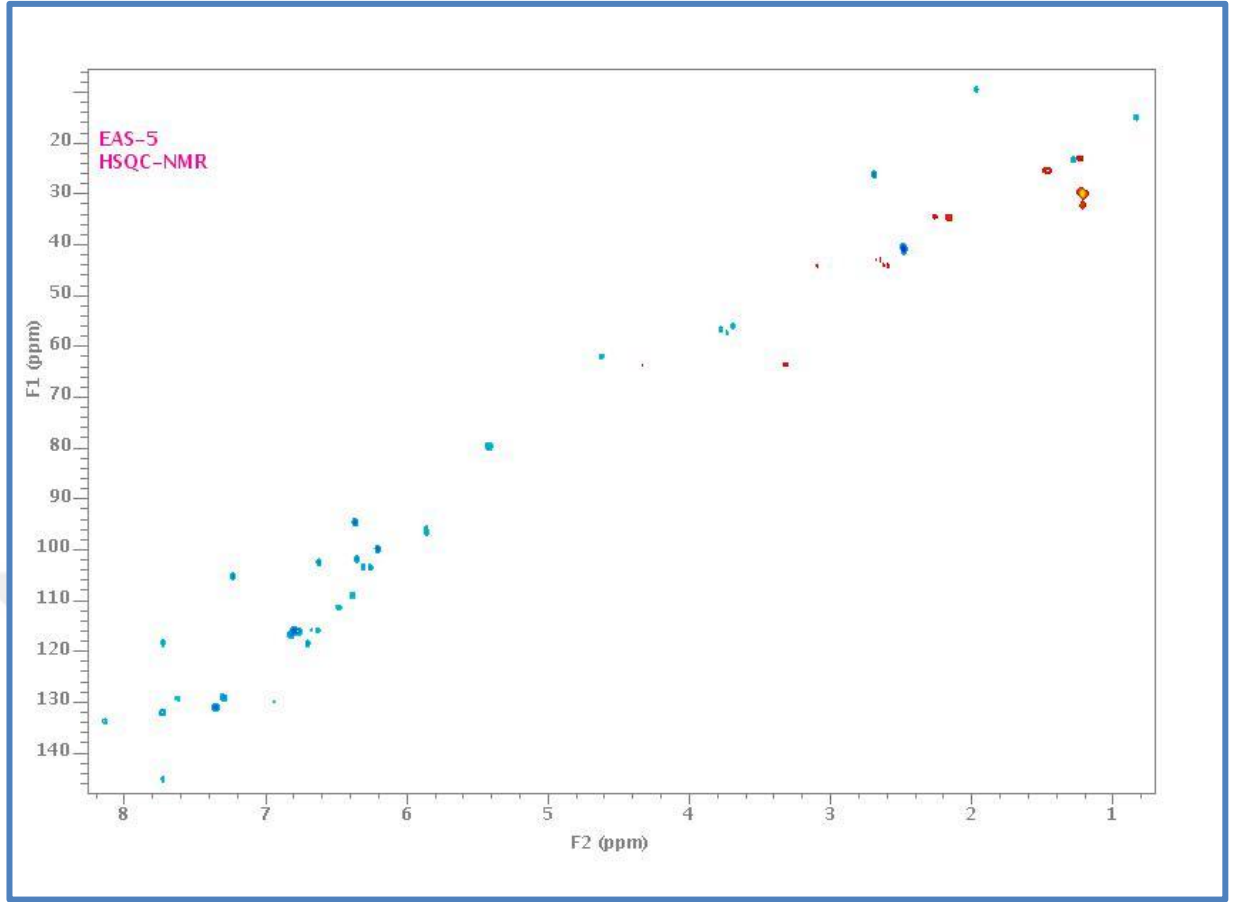


Şekil 4.7 Genistein molekülünün HMBC NMR spektrumu (150 MHz, DMSO-d₆)

Genistein molekülünün HMBC NMR spektrumu incelendiğinde 7,35 ppm deki H-2' protonunun, C-3' (115.75 ppm), C-1' (122 ppm) ve C-4' (157 ppm) karbonlarıyla korele olduğu görülmektedir. 6.34 ppm deki H-8 protonunun, C-7 (164 ppm), C-9 (157.7 ppm), C-6 (99 ppm) ve C-10 (105 ppm) karbonlarıyla korele olduğu görülmektedir (Şekil 4.7) (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 Genistein molekülünün HMBC NMR spektrumu



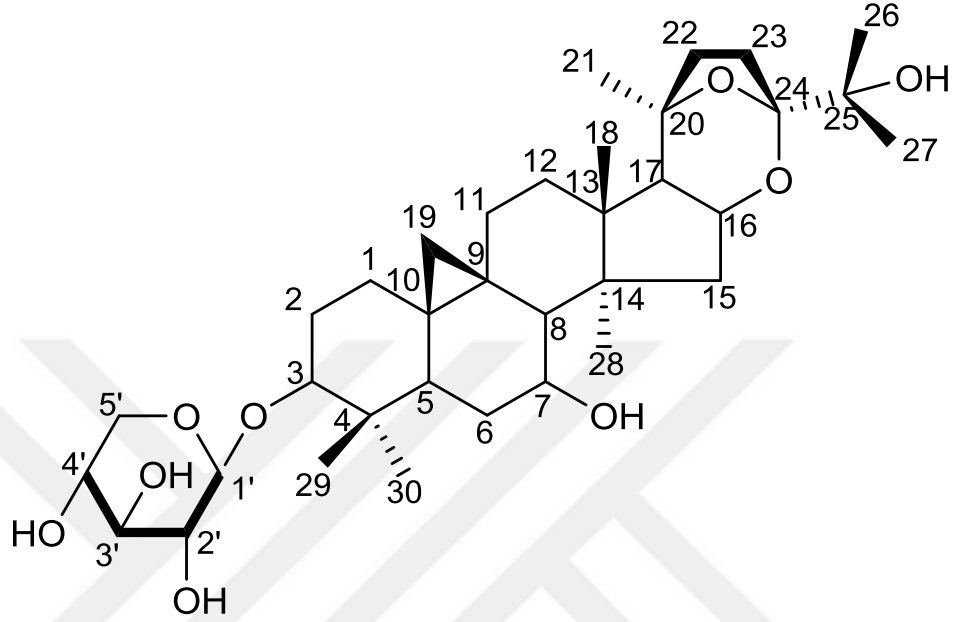
Şekil 4.9 Genistein molekülünün HSQC NMR spektrumu (150 MHz, DMSO-d₆)

Genistein molekülünün HSQC NMR spektrumu incelendiğinde; H-2 protonunun (8.30 ppm) C-2 karbonuna (154.42 ppm); H-6 protonunun (6.18 ppm) C-6 karbonuna (99.00 ppm); H-8 protonunun (6.34 ppm) C-8 karbonuna (94.15 ppm); H-2' ve H-6' protonlarının (7.35 ppm) C-2' ve C-6' karbonlarına (130.73 ppm); H-3' ve H-5' protonlarının (6.79 ppm) C-3' ve C-5' karbonuna (115.75 ppm) bağlı olduğu görülmektedir (Şekil 4.9).

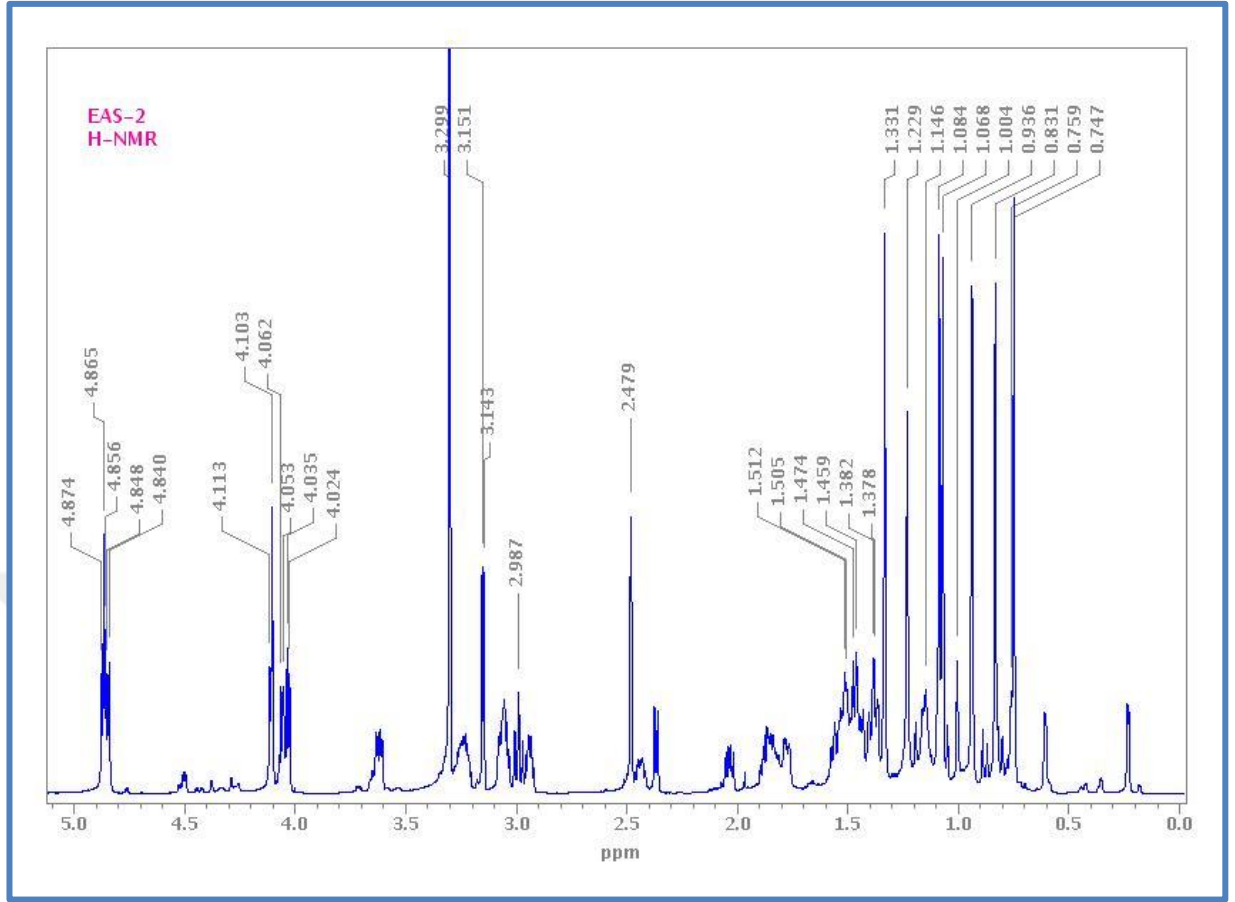
4.5.2 Sikloalpiosid

Sikloalpiosid (Şekil 4.10) etilasetat ekstresinin kolon kromatografisinden (533-570 fraksiyon; 980 mg; EAS-2) izole edildi. Yapı tayinleri 1 ve 2 D NMR spektroskopisi

kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen deneysel değerler literatür ile uyum içindedir. (Agzamova and Isaev 1995).

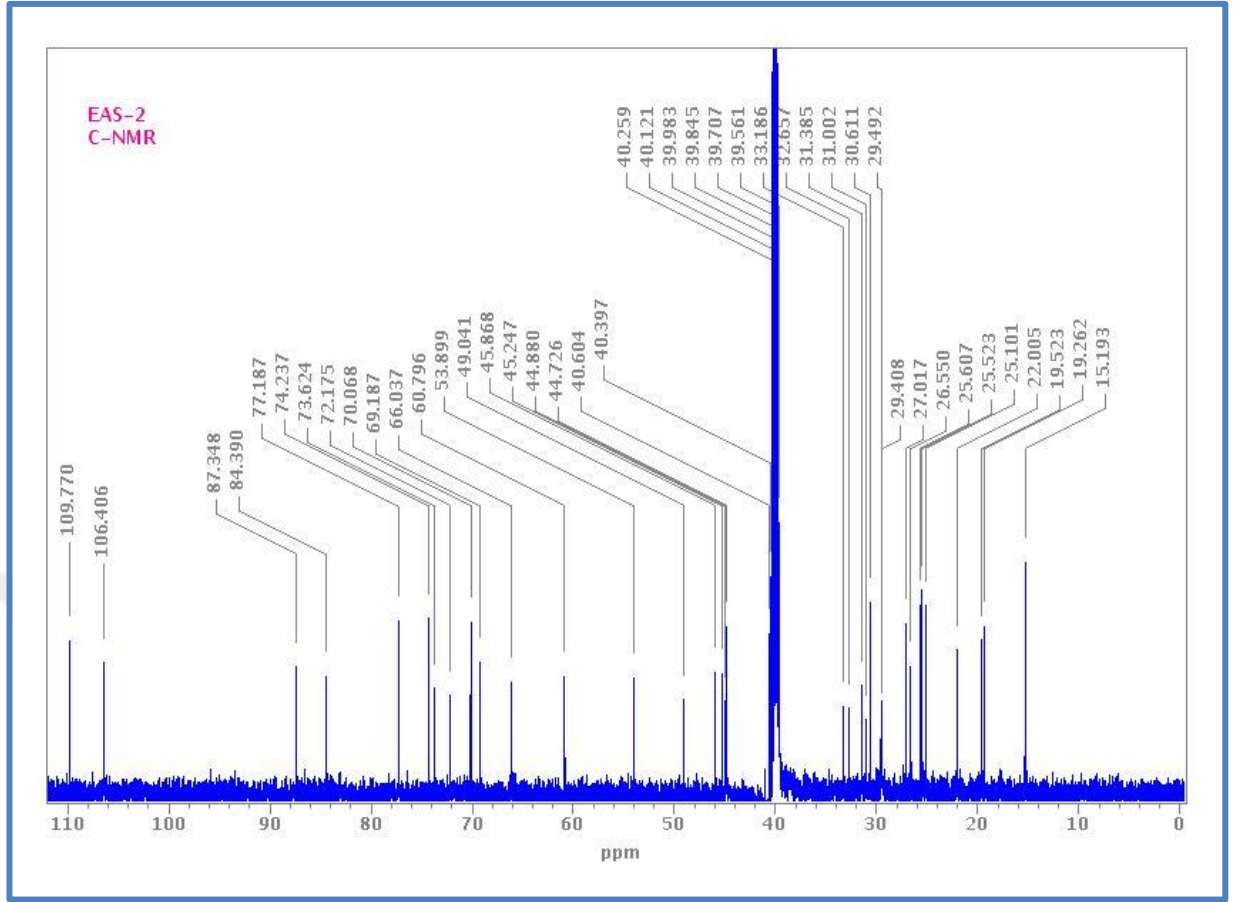


Şekil 4.10 Sikloalpiosid molekölü



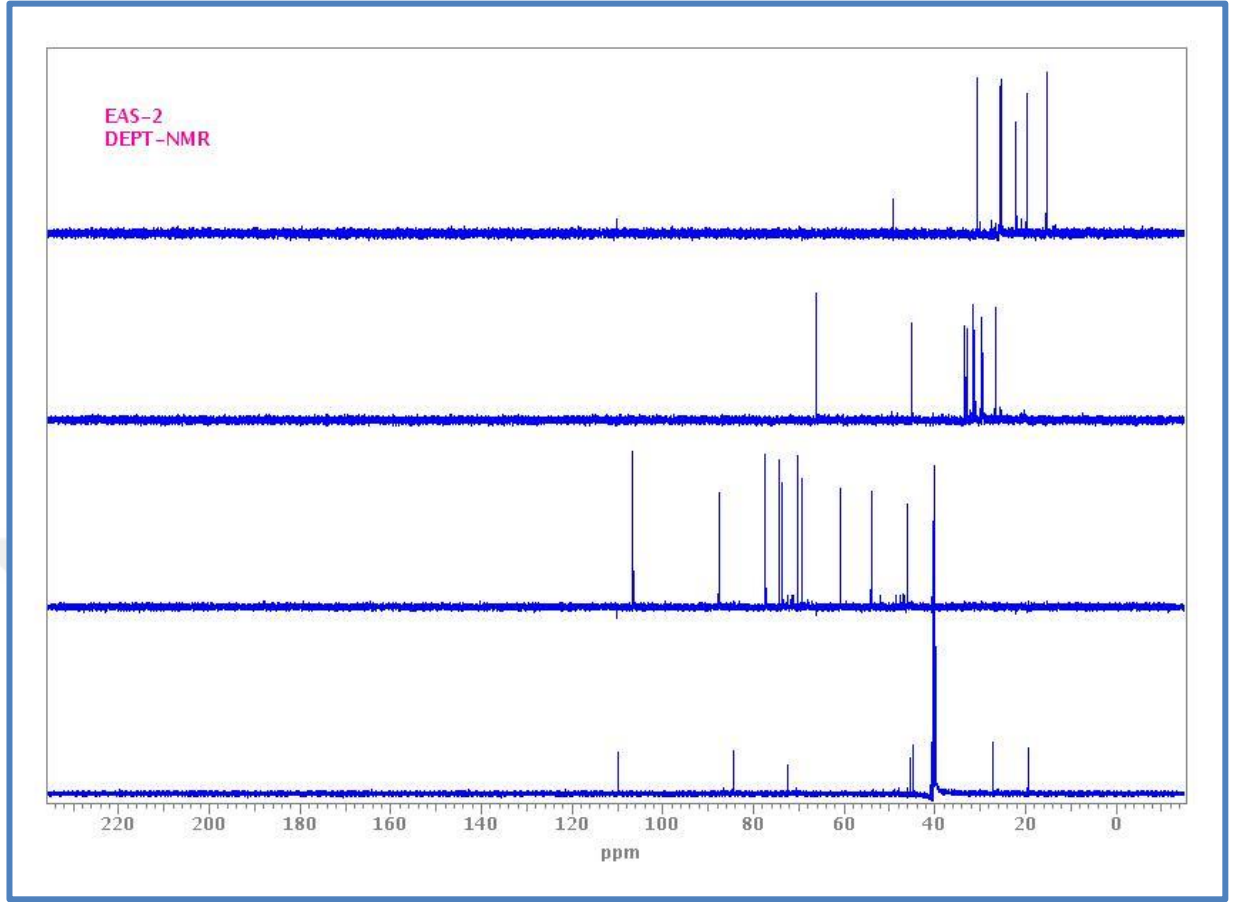
Şekil 4.11 Sikloalpiosid molekülünün ^1H NMR spektrumu (600 MHz, DMSO-d_6)

Sikloalpiosid molekülünün ^1H NMR spektrumu incelendiğinde; H-19 protonu 0.23 ppm ve 0.60 ppm de dublet olarak rezonans olmuştur. Yapıda bulunan 7 adet metil sinyali (1.23 ppm, 1.32 ppm, 1.08 ppm, 1.07ppm, 0.83 ppm, 0.94 ppm, 0.75 ppm) singlet olarak rezonans olmuştur. H-17 protunu 2.36 ppm de dublet olarak rezonans olmuştur. H-3 protonu 3.06 ppm de dd rezonans olmuştur. H-16 protonu 4.04 ppm de kuartet olarak rezonans olmuştur (Şekil 4.11).



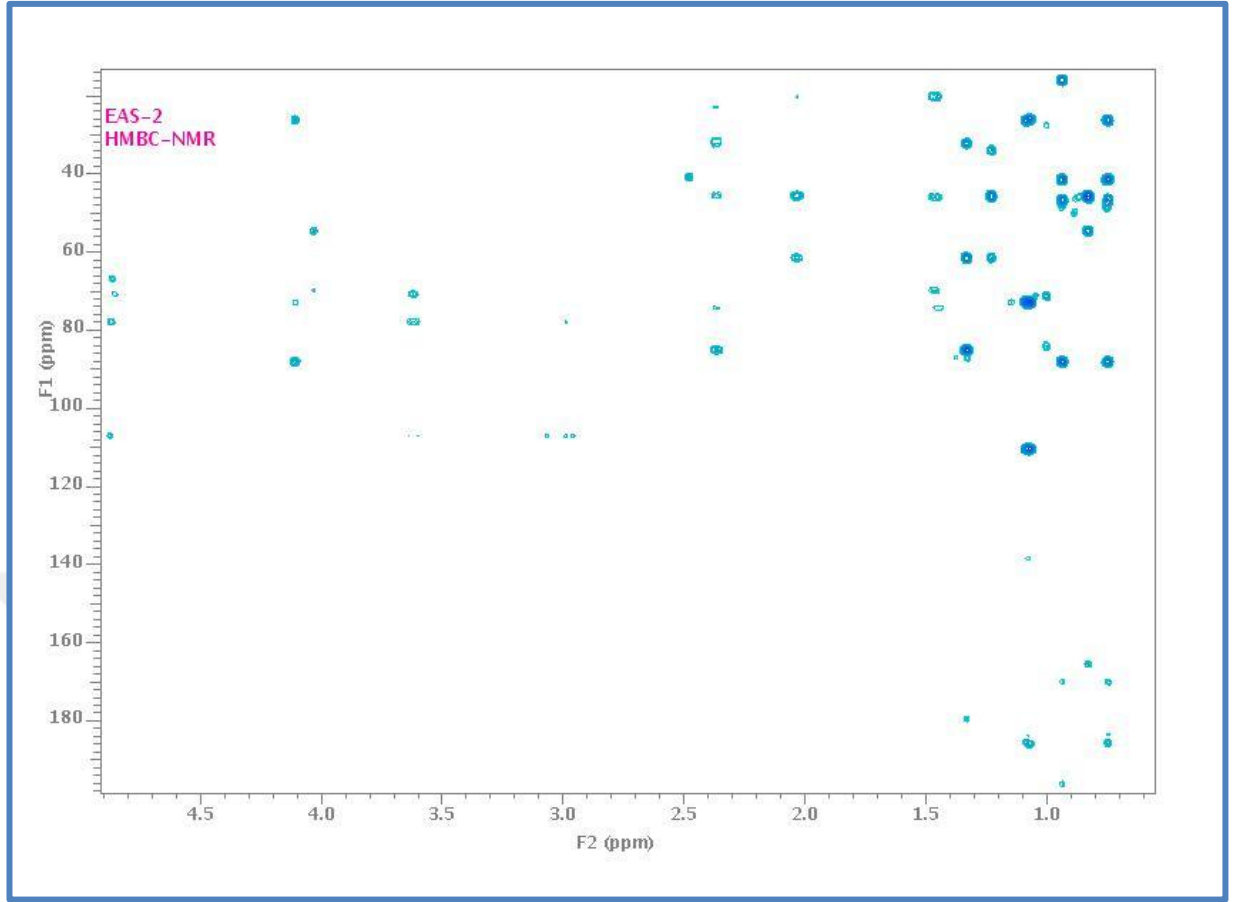
Şekil 4.12. Sikloalpiosid molekülünün ^{13}C NMR spektrumu (150 MHz, DMSO- d_6)

Sikloalpiosid molekülünün ^{13}C NMR spektrumu incelendiğinde 35 adet karbon sinyaline rastlanmıştır. Bu karbonlardan, 7 tanesi metil karbon atomuna aittir. Bunlar sırasıyla C-18, C-21, C-26, C-27, C-28, C-29, C-30 (22.06 ppm, 30.68 ppm, 25.22 ppm, 25.6 ppm, 19.54 ppm, 25.6 ppm, 15.2 ppm) karbonlarıdır. Yapıda 10 tane metilen karbon atomu bulunmaktadır. Bunlar sırasıyla C-1, C-2, C-6, C-11, C-12, C-15, C-19, C-22, C-23, C-5' (32.1 ppm, 30.2 ppm, 31.06 ppm, 26.4 ppm, 33.1 ppm, 44.88 ppm, 29.55 ppm, 32.65 ppm, 31.38 ppm, 66.03 ppm) karbonlarıdır. Ayrıca yapıda, 10 tane metin karbonu bulunmaktadır. Bunlar, C-3, C-5, C-7, C-8, C-16- C-17, C-1', C-2', C-3', ve C-4' (87.3 ppm, 45.25 ppm, 69.22 ppm, 53.81 ppm, 73.62 ppm, 60.79 ppm, 106.14 ppm, 74.23 ppm, 78.4 ppm, 70.06 ppm) karbonlarına aittir. Bununla birlikte, yapıda 8 tane kuarterner karbon atomuna bulunmaktadır. Bunlar ise C-4, C-9, C-10, C-13, C-14, C-20, C-24 ve C-25 karbonlarıdır (42.7 ppm, 19.25 ppm, 27.01 ppm, 44.88 ppm, 45.24 ppm, 30.68 ppm, 109 ppm, 72.18 ppm) (Şekil 4.12).



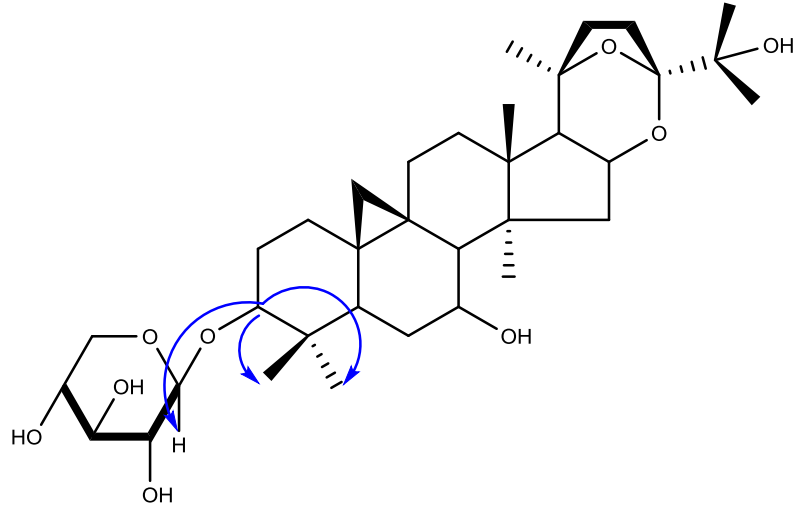
Şekil 4.13 Sikloalpiosid molekülünün DEPT NMR spektrumu (150 MHz, DMSO-d₆)

Sikloalpiosid molekülünün DEPT NMR spektrumu incelendiğinde 7 tane, metil karbonu (C-18, C-21, C-26, C-27, C-28, C-29, C-30); 10 tane metilen karbonu (C-1, C-2, C-6, C-11, C-12, C-15, C-19, C-22, C-23, C-5'); 10 tane metin karbonu (C-3, C-5, C-7, C-8, C-16- C-17, C-1', C-2', C-3', ve C-4') ve 8 tane kuarterner karbon atomu (C-4, C-9, C-10, C-13, C-14, C-20, C-24 ve C-25) belirlenmiştir (Şekil 4.13).

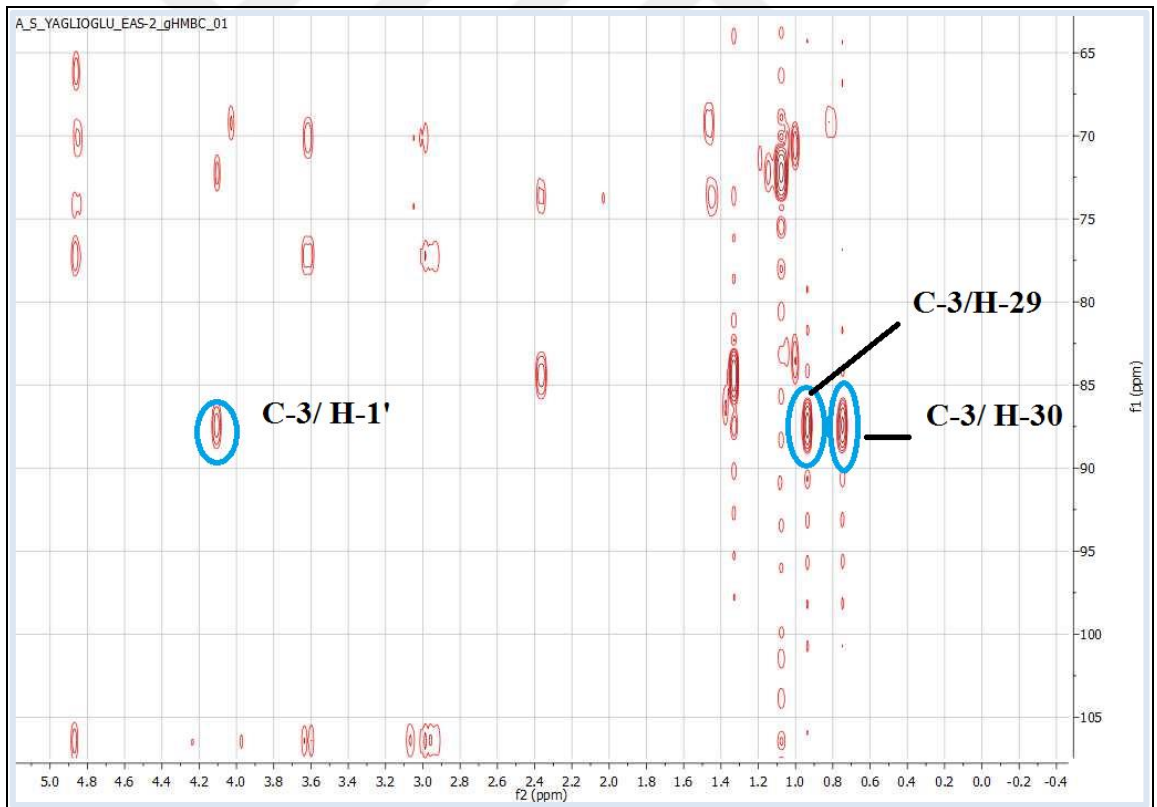


Şekil 4.14 Sikloalpiosid molekülünün HMBC NMR spektrumu (150 MHz, DMSO-d₆)

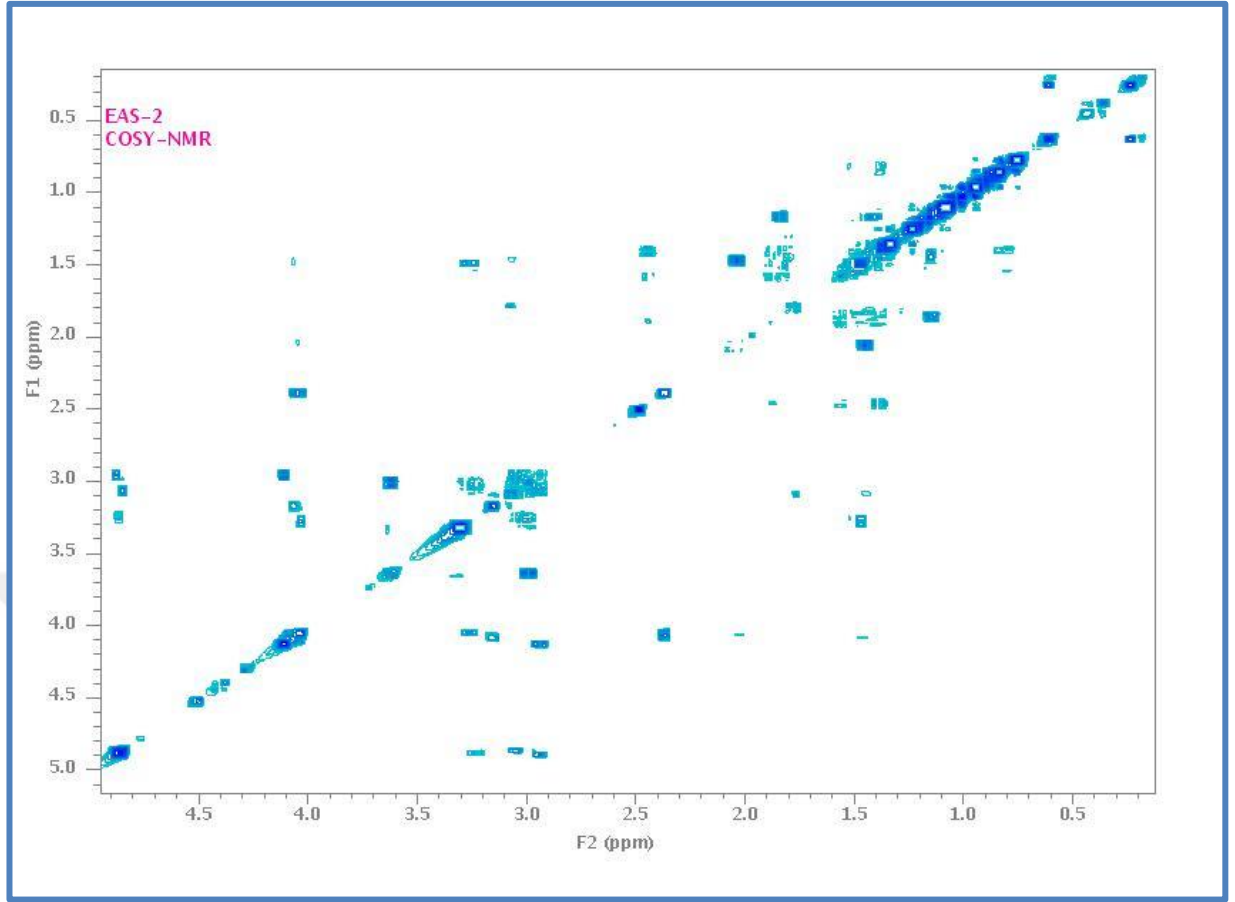
Sikloalpiosid molekülünün HMBC NMR spektrumu (Şekil 4.14) incelendiğinde 87.3 ppm deki C-3 karbonununun 4.10 ppm deki H-1' protonuyla, 0.94 ppm deki H-29 metil protonlarıyla ve 0.75 ppm deki H-30 metil protonlarıyla etkileştiği görülmektedir (Şekil 4.16) (Şekil 4.15).



Şekil 4.15 Sikloalpiosid molekülünün HMBC etkileşimi

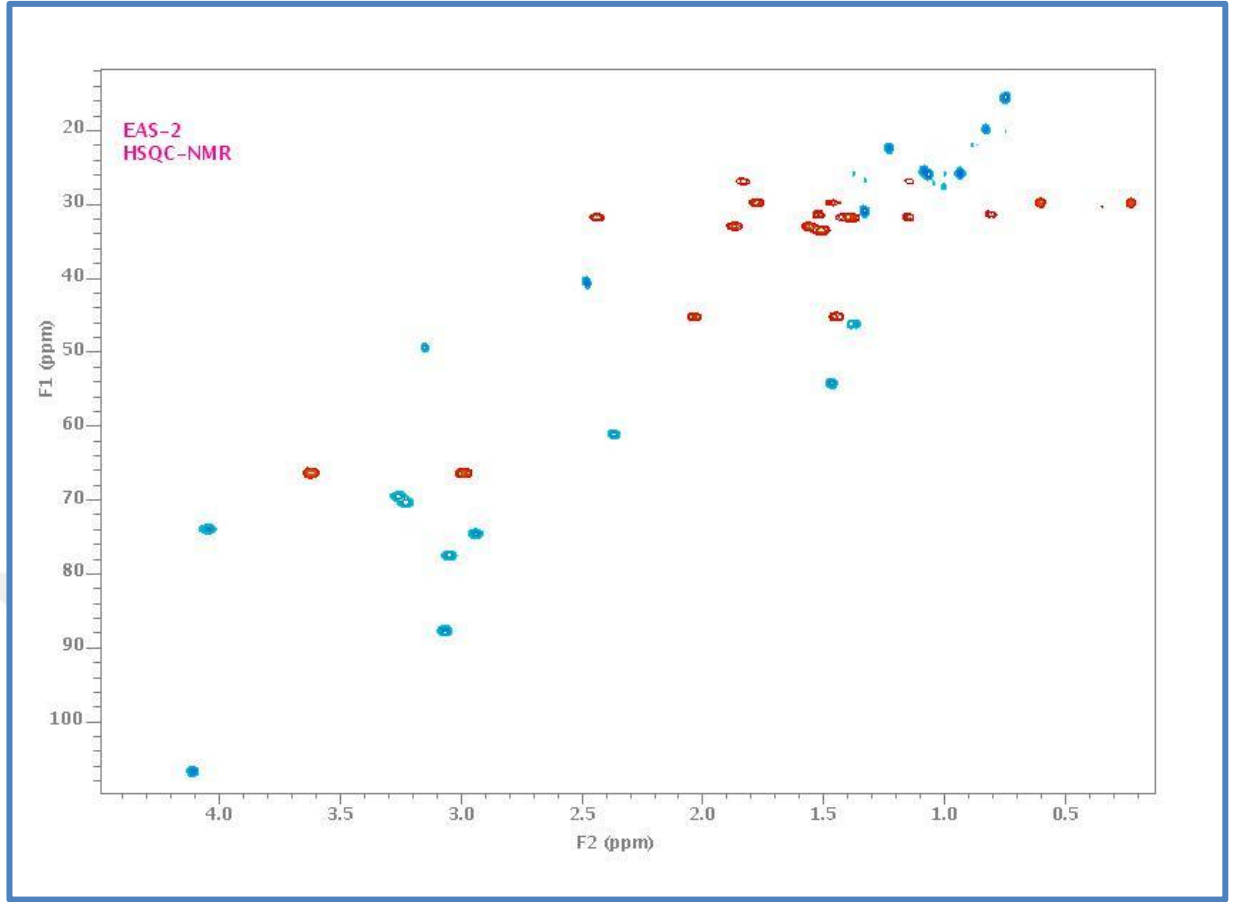


Şekil 4.16 Sikloalpiosid molekülünün HMBC NMR spektrumu



Şekil 4.17 Sikloalpiosid molekülünün COSY NMR spektrumu (150 MHz, DMSO-d6)

Sikloalpiosid molekülünün COSY NMR spektrumu incelendiğinde 1.44 ppm deki H-15a protonu 2.03 ppm deki H-15b protonu ve 0.83 ppm deki H-28 metil protonları ile etkileştiği görülmektedir. 0.23 ppm deki H-19a protonu 0.60 ppm deki H-19b protonu ile korole olmuştur (Şekil 4.17).



Şekil 4.18 Sikloalpiosid molekülünün HSQC NMR spektrumu (150 MHz, DMSO-d6)

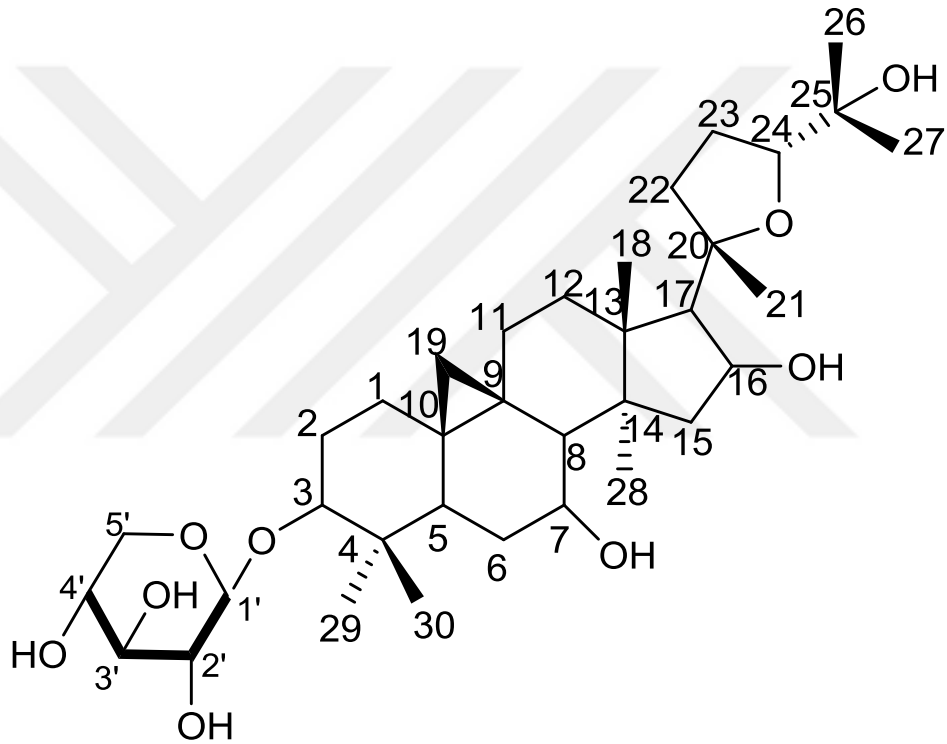
Sikloalpiosid molekülünün HSQC NMR spektrumu incelendiğinde; C-1 karbonu (32.1 ppm) CH₂ protonları ile (1.15-1.50 ppm); C-2 karbonu (30.2 ppm) CH₂ protonları ile (1.92-2.48 ppm); C-3 karbonu (87.3 ppm) CH protonu ile (3.06 ppm); C5 karbonu (45.26 ppm) CH protonu ile (1.38 ppm); C-6 karbonu (31.06 ppm); CH₂ protonları ile (0.8-1.53 ppm); C-7 karbonu (69.22 ppm) CH protonu ile (3.25 ppm); C-8 karbonu (53.81 ppm) CH protonu ile (1.46 ppm); C-11 karbonu (26.4 ppm) CH₂ protonları ile (1.23-1.90 ppm); C-12 karbonu (33.1 ppm) CH₂ protonları ile (1.68-2.31 ppm); C-15 karbonu (44.88 ppm) CH₂ protonları ile (1.44-2.03 ppm); C-16 karbonu (73.62 ppm) CH protonları ile (4.04 ppm); C-17 karbonu (60.79 ppm) CH protonu ile (2.36 ppm); C-19 karbonu (29.55 ppm) CH₂ protonları ile (0.23-0.60 ppm); C-22 karbonu (32.65 ppm) CH₂ protonları ile (1.86-1.55 ppm); C-23 karbonu (31.38 ppm) CH₂ protonları ile (1.38-2.42 ppm) korele olduğu görülmüştür (Şekil 4.18).

Tablo 4.8 Sikloalpiosid molekülünün NMR değerleri

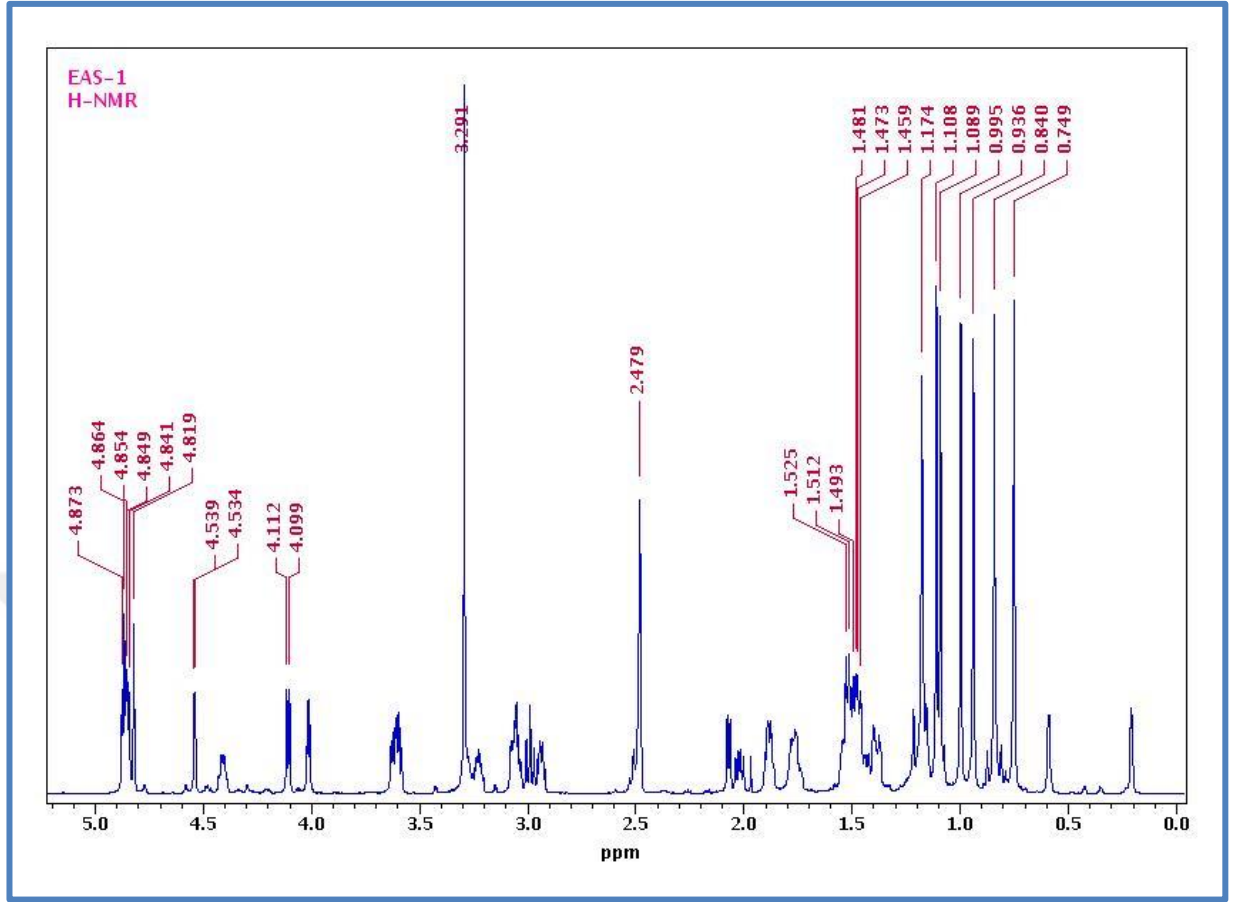
Karbon Atom		¹ H (Deneyisel)	¹³ C (Deneyisel; DMSO-d ₆)	¹³ C (Agzamova and Isaev, 1995; C ₅ D ₅ N)
C-1	CH ₂	1.15-1.50	32.10	31.83
C-2	CH ₂	1.92-2.48	30.20	29.92
C-3	CH	3.06 dd	87.30	88.13
C-4	C	-	42.70	41.03
C-5	CH	1.38	45.26	46.40
C-6	CH ₂	0.8-1.53	31.06	31.83
C-7	CH	3.25	69.22	69.95
C-8	CH	1.46	53.81	54.63
C-9	C	-	19.25	19.52
C-10	C	-	27.01	27.35
C-11	CH ₂	1.23-1.90	26.40	26.85
C-12	CH ₂	1.68-2.31	33.10	33.10
C-13	C	-	44.88	45.11
C-14	C	-	45.24	45.59
C-15	CH ₂	1.44-2.03	44.88	45.74
C-16	CH	4.04 q	73.62	74.33
C-17	CH	2.36 d	60.79	61.29
C-18	CH ₃	1.23 s	22.06	22.14
C-19	CH ₂	0.23-0.60 d	29.55	29.93
C-20	C	-	84.39	84.86
C-21	CH ₃	1.32 s	30.68	30.57
C-22	CH ₂	1.86-1.55	32.65	31.67
C-23	CH ₂	1.38-2.42	31.38	33.54
C-24	C	-	109.00	110.58
C-25	C	-	72.18	72.80
C-26	CH ₃	1.08 s	25.22	25.59
C-27	CH ₃	1.07 s	25.60	25.23
C-28	CH ₃	0.83 s	19.54	19.60
C-29	CH ₃	0.94 s	25.60	25.70
C-30	CH ₃	0.75 s	15.20	15.32
1'	CH	4.10 d	106.14	107.56
2'	CH	2.95 t	74.23	75.52
3'	CH	2.99 t	78.40	78.59
4'	CH	3.22 m	70.06	71.20
5'	CH ₂	2.98-3.62 5a t 5e dd	66.03	67.12
6'	-			

4.5.3 Sikloalpiosid D

Sikloalpiosid D (Şekil 4.19) etilasetat ekstresinin kolon kromatografisinden (571-630 fraksiyon; 230 mg; EAS-1) izole edildi. Yapı tayinleri 1 ve 2 D NMR spektroskopisi kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen deneysel değerler literatür ile uyum içindedir (Isaev et al. 2012).

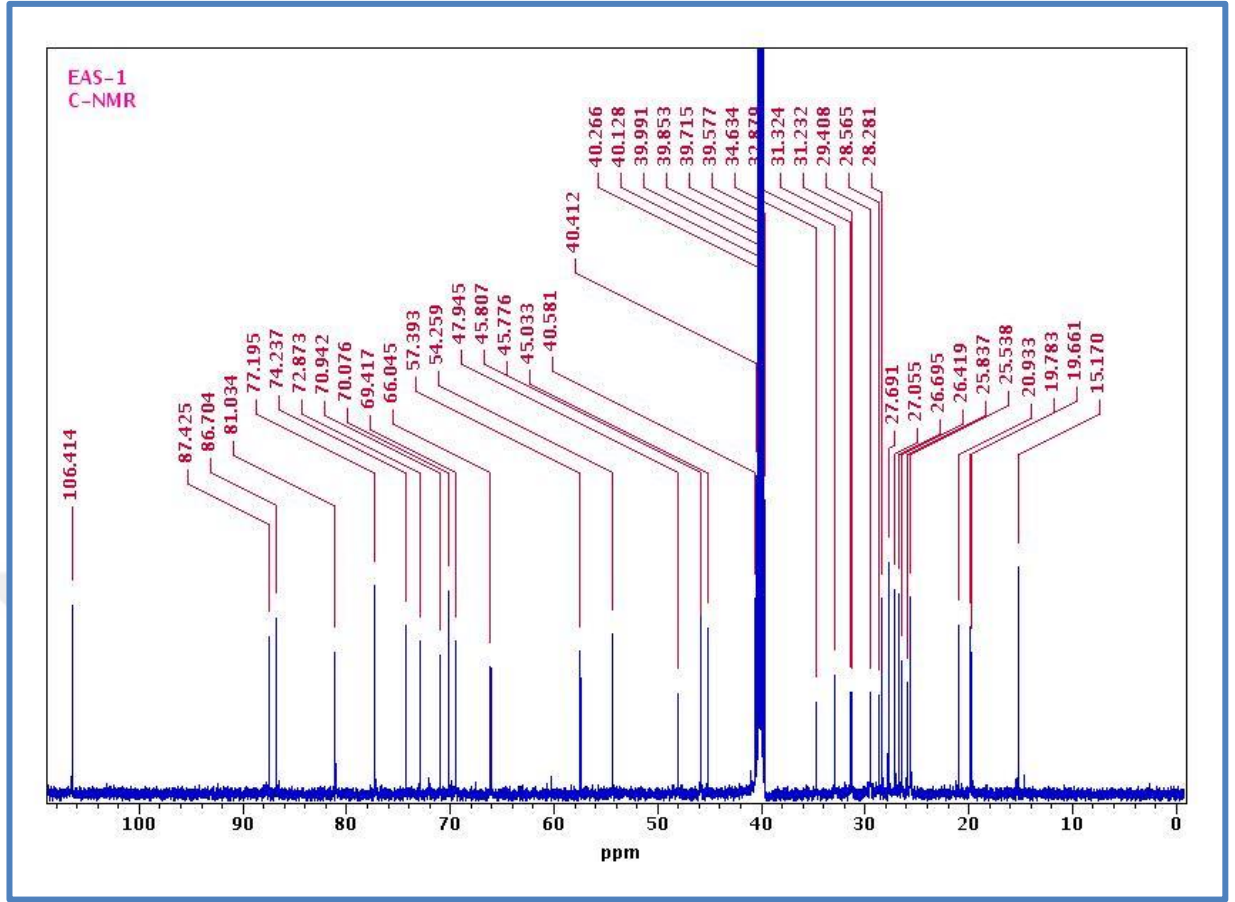


Şekil 4.19 Sikloalpiosid-D molekülü



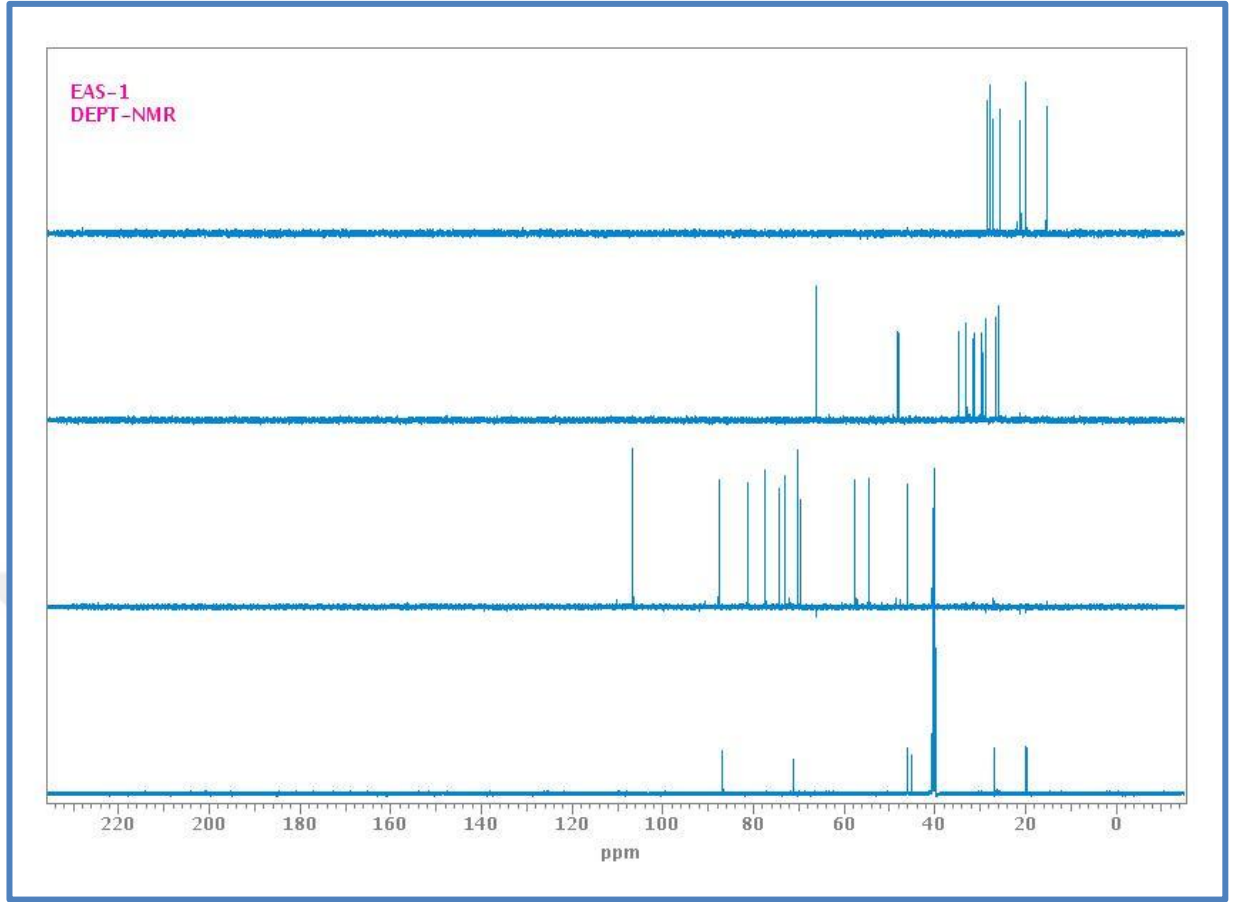
Şekil 4.20 Sikloalpiosid-D molekülünün ^1H NMR spektrumu (600 MHz, DMSO-d_6)

Sikloalpiosid-D molekülünün ^1H NMR spektrumu incelendiğinde; H-19 protonu 0.20 ppm ve 0.58 ppm de dublet olarak rezonans olmuştur. H-8 protonu 1.52 ppm ve H-17 protonu 2.06 ppm de dublet rezonans olmuştur. H-15 protonu 1.47 ppm ve 2.01 ppm, H-3 3.06 ppm ve H-24 3.59 ppm de dubletin dubleti olarak rezonans olmuştur. H-7 protonu 3.27 ppm de multiyet olarak rezonans olmuştur. H-16 protonu 4.40 ppm de kuartet olarak rezonans olduğu görülmüştür (Şekil 4.20).



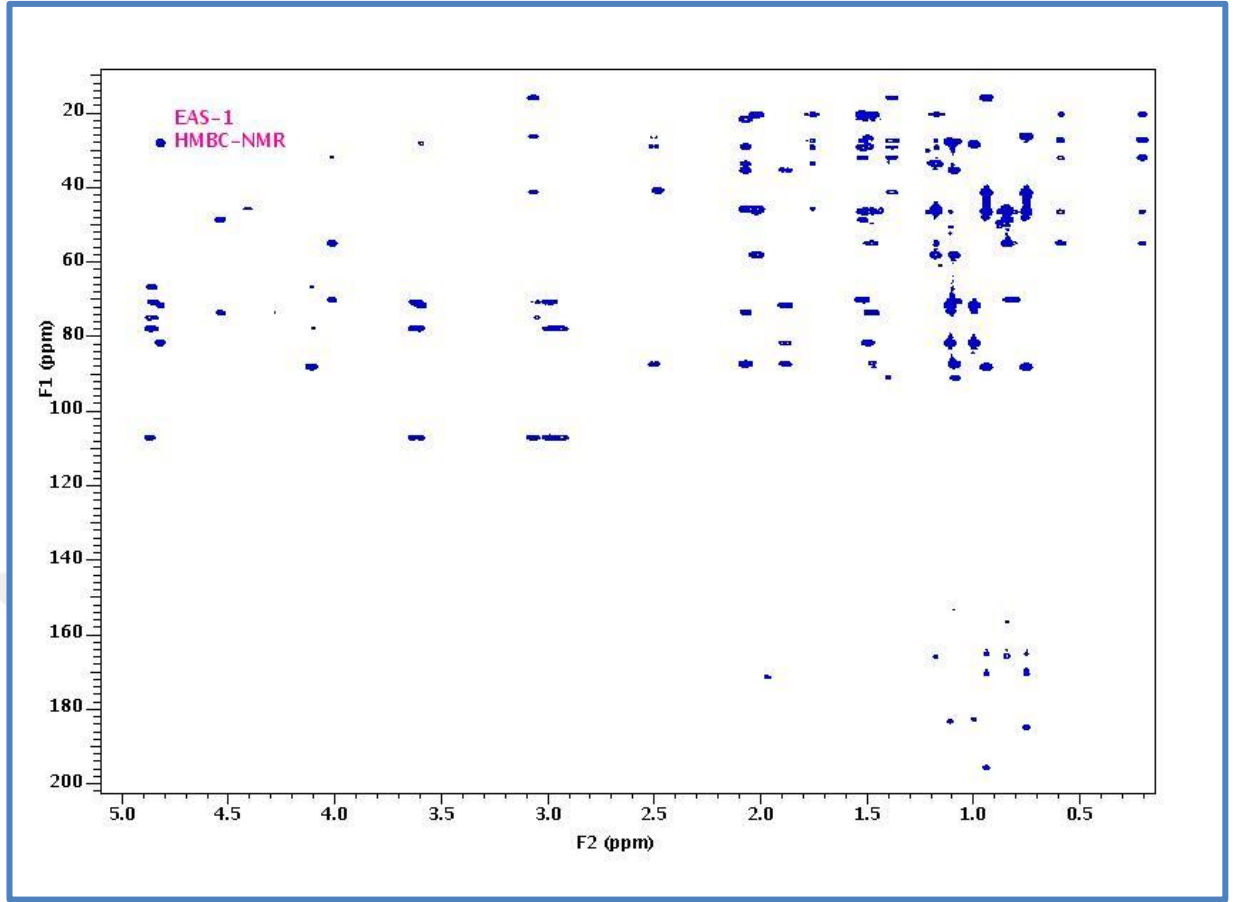
Şekil 4.21 Sikloalpiosid-D molekülünün ^{13}C NMR spektrumu (150 MHz, DMSO- d_6)

Sikloalpiosid-D molekülünün ^{13}C NMR spektrumu incelendiğinde 35 adet karbon sinyaline rastlanmıştır. Bu karbonlardan 7 tanesi kuarterner karbon atomuna aittir. Bunlar sırasıyla C-4, C-9, C-10, C-13, C-14, C-20, C-25 (40.58 ppm, 19.69 ppm, 26.69 ppm, 45.78 ppm, 45.04 ppm, 86.70 ppm, 70.95 ppm) karbonlarıdır. 10 tanesi metilen karbon atomu bulunmaktadır. Bunlar sırasıyla C-1, C-2, C-6, C-11, C-12, C-15, C-19, C-22, C-23, C-5' (32.88 ppm, 26.42 ppm, 31.23 ppm, 25.45 ppm, 32.40 ppm, 47.95 ppm, 28.57 ppm, 34.64 ppm, 25.83 ppm, 66.5 ppm) karbonlarıdır. Ayrıca yapıda 7 tane metil karbon atomu bulunmaktadır. Bunlar, C-18, C-21, C-26, C-27, C-28, C-29, C-30 (20.93 ppm, 28.28 ppm, 27.61 ppm, 27.06 ppm, 19.78 ppm, 15.17 ppm, 25.5 ppm) karbonlarıdır. Bununla birlikte yapıda 11 tane metin karbon atomu bulunmaktadır. Bunlar ise C-3, C-5, C-7, C-8, C-16, C-17, C-24, C-1', C-2', C-3', C-4' (87.4 ppm, 45.81 ppm, 69.41 ppm, 54.26 ppm, 72.87 ppm, 57.39 ppm, 81.03 ppm, 102.3 ppm, 74.0 ppm, 76.4 ppm, 69.9 ppm) karbonlarına aittir (Şekil 4.21).



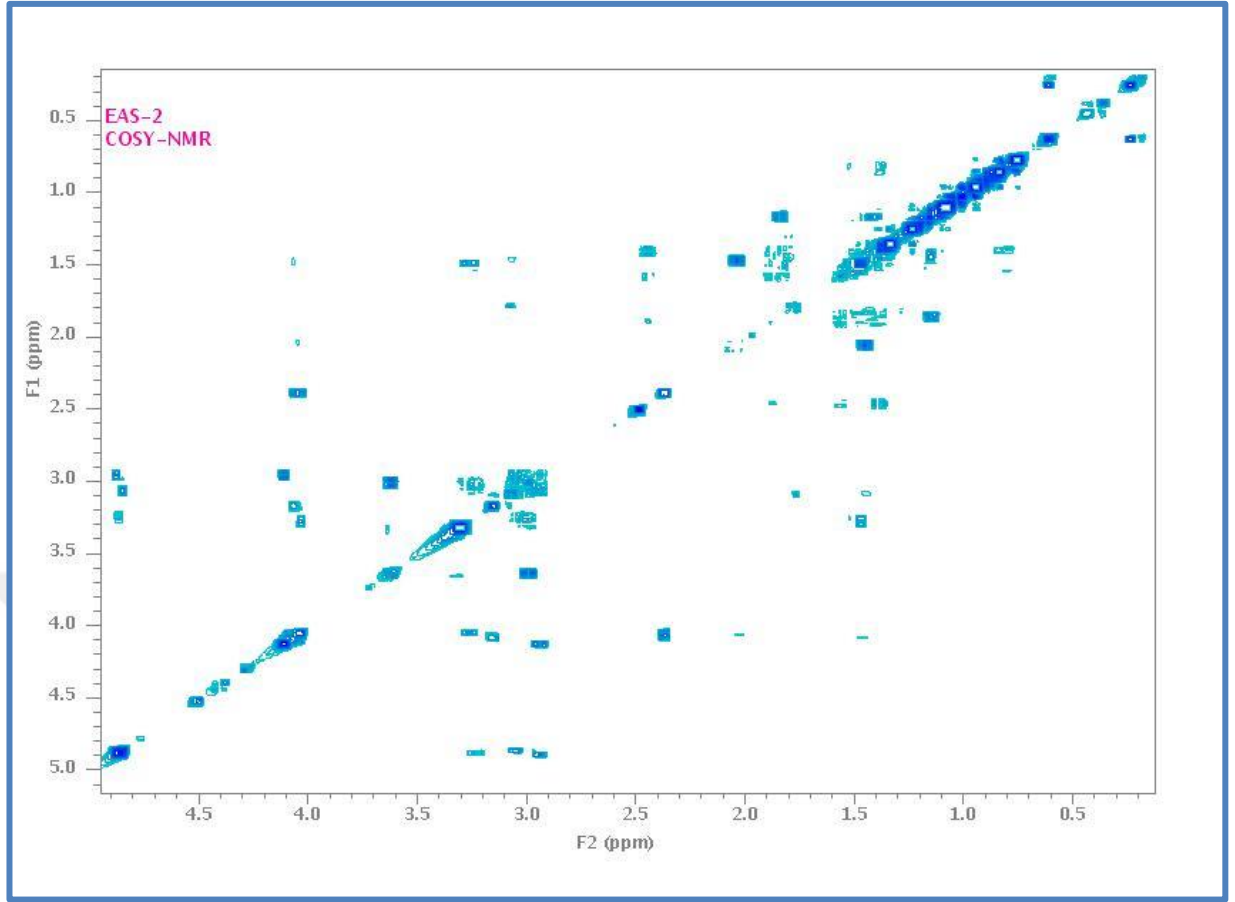
Şekil 4.22 Sikloalpiosid-D molekülünün DEPT NMR spektrumu (150 MHz, DMSO-d₆)

Sikloalpiosid-D molekülünün DEPT NMR spektrum incelendiğinde 7 tane kuarterner karbonu (C-4, C-9, C-10, C-13, C-14, C-20, C-25); 10 tane metilen karbonu (C-1, C-2, C-6, C-11, C-12, C-15, C-19, C-22, C-23, C-5'); 7 tane metil karbonu (C-18, C-21, C-26, C-27, C-28, C-29, C-30) ve 11 tane metin karbon atomu (C-3, C-5, C-7, C-8, C-16, C-17, C-24, C-1', C-2', C-3', C-4') belirlenmiştir (Şekil 4.22).



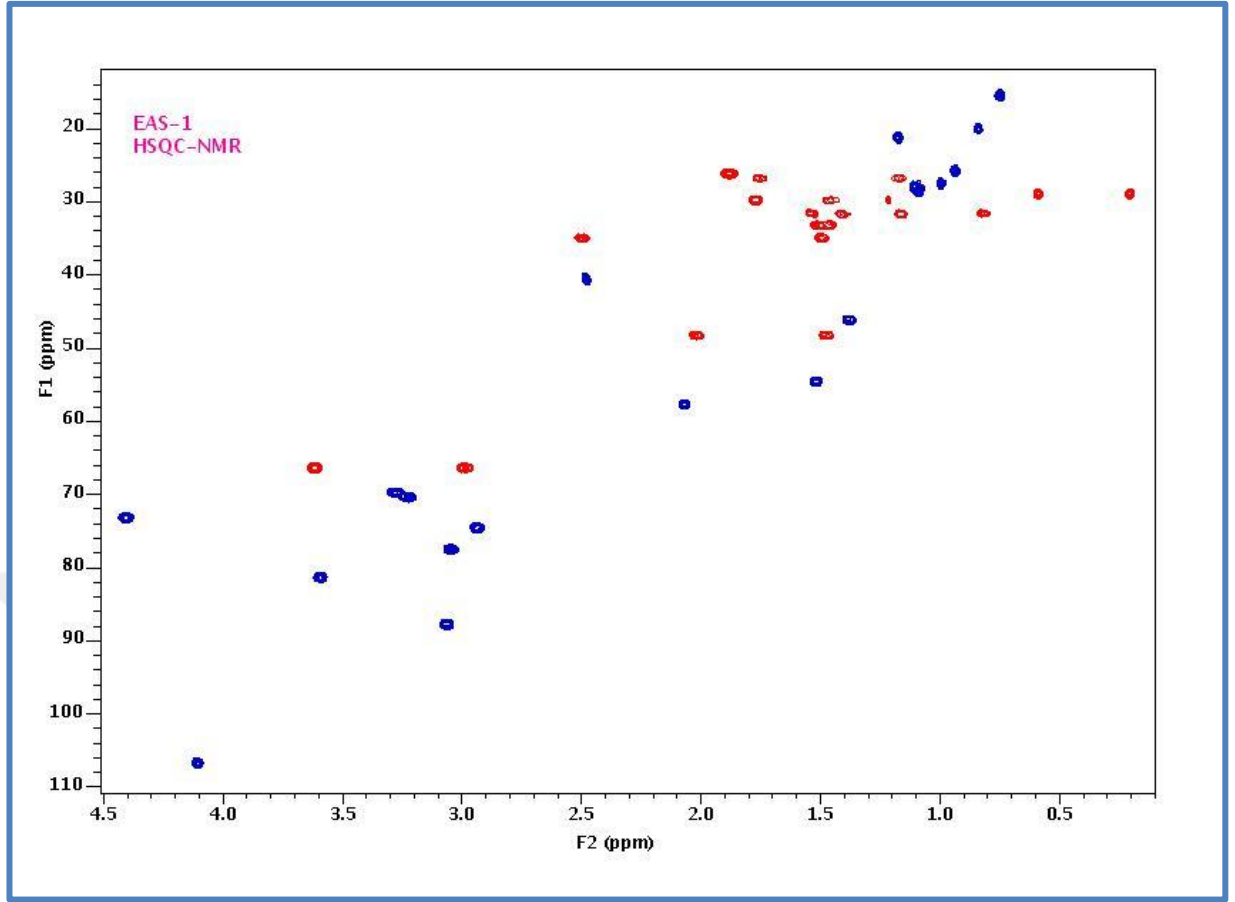
Şekil 4.23 Sikloalpiosid-D molekülünün HMBC NMR spektrumu (150 MHz, DMSO-d₆)

Sikloalpiosid-D molekülünün HMBC NMR spektrumu incelendiğinde 87.4 ppm deki C-3 karbonunun 5.34 ppm deki H-1' protonuyla, 0.74 ppm deki H-29 metil protonlarıyla ve 0.94 ppm deki H-30 metil protonlarıyla etkileştiği görülmektedir (Şekil 4.23).



Şekil 4.24 Sikloalpiosid-D molekülünün COSY NMR spektrumu (150 MHz, DMSO-d₆)

Sikloalpiosid-D molekülünün COSY NMR spektrumu incelendiğinde 1.47 ppm deki H-15a protonu 2.01 ppm deki H-15b protonu ve 0.84 ppm deki H-28 metil protonları ile etkileştiği görülmektedir. 0.20 ppm deki H-19a protonu 0.58 ppm deki H-19b protonu ile korole olmuştur (Şekil 4.24).



Şekil 4.25 Sikloalpiosid-D molekülünün HSQC NMR spektrumu (150 MHz, DMSO-d₆)

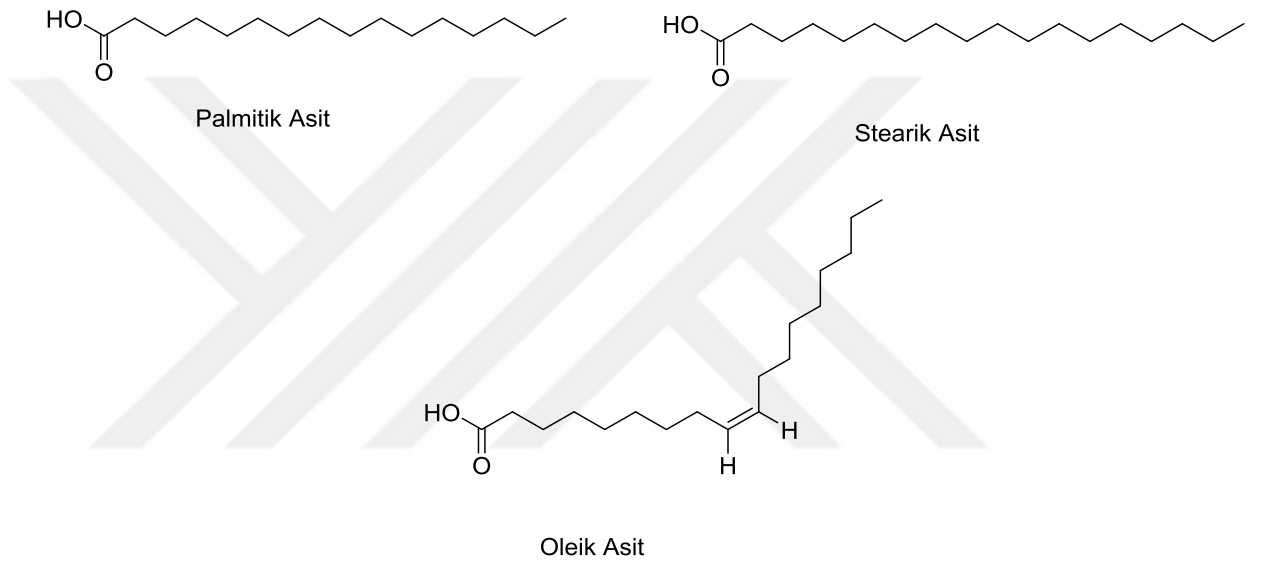
Sikloalpiosid-D molekülünün HSQC NMR spektrumu incelendiğinde C-1 karbonu (32.88 ppm) CH₂ protonları ile (1.50-1.45 ppm); C-2 karbonu (26.42 ppm) CH₂ protonları ile (1.17-1.75 ppm); C-3 karbonu (87.4 ppm) CH protonu ile (3.06 ppm); C-5 karbonu (45.81 ppm) CH protonu ile (1.38 ppm); C-6 karbonu (31.23 ppm) CH₂ protonları ile (0.82-1.53 ppm); C-7 karbonu (69.41 ppm) CH protonu ile (3.27 ppm); C-8 karbonu (54.26 ppm) CH protonu ile (1.52 ppm); C-11 karbonu (26.40 ppm) CH₂ protonları ile (1.77 ppm-1.17 ppm); C-12 karbonu (32.90 ppm) CH₂ protonları ile (1.46 ppm-1.51 ppm); C-15 karbonu (47.95 ppm) CH₂ protonları ile (1.47-2.01 ppm); C-16 karbonu (72.87 ppm) CH protonu ile (4.40 ppm); C-17 karbonu (57.39 ppm) CH protonu ile (2.06 ppm); C-19 karbonu (28.57 ppm) CH₂ protonları ile (0.20-0.58 ppm); C-22 karbonu (34.64 ppm) CH₂ protonları ile (1.49-2.49 ppm); C-23 karbonu (25.83 ppm) CH₂ protonları ile (1.87- 0.99 ppm); C-24 karbonu (81.03 ppm) CH protonu ile (3.59 ppm) korele olmuştur (Şekil 4.25).

Tablo 4.9 Sikloalpiosid-D molekülünün NMR değerleri

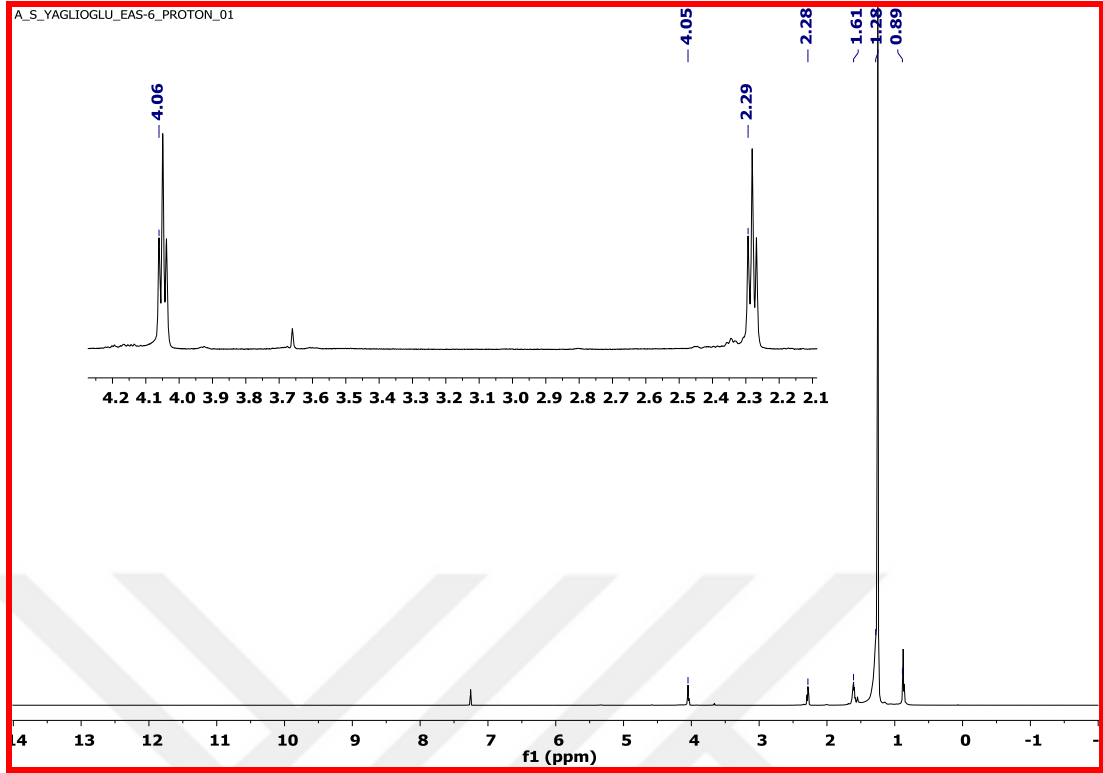
Karbon Atom		¹ H (Deneyisel)	¹³ C (Deneyisel; DMSO-d ₆)	¹³ C (Isaev et al. 2012; C ₅ D ₅ N)
C-1	CH ₂	1.50-1.45	32.88	31.84
C-2	CH ₂	1.17-1.75	26.42	29.93
C-3	CH	3.06 dd	87.4	88.23
C-4	C	-	40.58	41.03
C-5	CH	1.38	45.81	46.37
C-6	CH ₂	0.82-1.53	31.23	31.75
C-7	CH	3.27 m	69.41	70.23
C-8	CH	1.52 d	54.26	55.10
C-9	C	-	19.69	20.04
C-10	C	-	26.69	27.08
C-11	CH ₂	1.77-1.17	26.40	26.45
C-12	CH ₂	1.46-1.51	32.90	33.40
C-13	C	-	45.78	45.52
C-14	C	-	45.04	46.37
C-15	CH ₂	1.47-2.01 dd	47.95	48.78
C-16	CH	4.40 q	72.87	73.77
C-17	CH	2.06 d	57.39	57.98
C-18	CH ₃	1.17	20.93	21.25
C-19	CH ₂	0.20-0.58 d	28.57	28.86
C-20	C	-	86.70	87.31
C-21	CH ₃	1.08	28.28	28.64
C-22	CH ₂	1.49-2.49 td	34.64	35.02
C-23	CH ₂	1.87-0.99	25.83	26.75
C-24	CH	3.59 dd	81.03	81.70
C-25	C	-	70.95	71.21
C-26	CH ₃	1.11	27.61	27.12
C-27	CH ₃	0.99	27.06	28.22
C-28	CH ₃	0.84	19.78	19.87
C-29	CH ₃	0.74	15.17	25.73
C-30	CH ₃	0.94	25.5	15.30
1'	CH	4.10	106.38	107.51
2'	CH	3.34	74.0	78.51
3'	CH	3.18	76.4	78.55
4'	CH	3.32	69.9	71.21
5'	CH ₂	3.54-3.74	66.5	67.11
6'	-			

4.5.4 EAS-6 fraksiyonunun GC-MS Analiz sonuçları

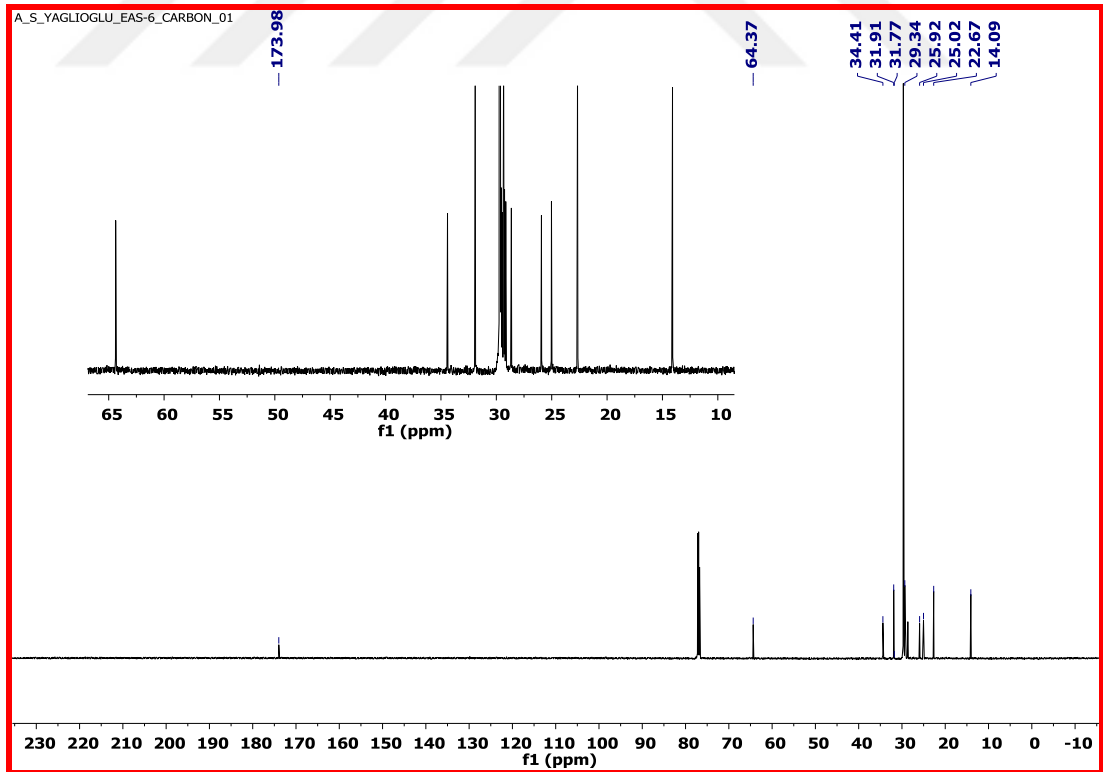
Diklorometan ekstresinin kolon kromatografisinin 80-200. fraksiyonlarının (140 mg; EAS-6) GC-MS analiz sonucunda yağ asitleri karışımı elde edildi (Tablo 4.10). ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ve GC-MS verileri sonucunda ana bileşen olarak palmitik asit, stearik asit ve oleik asit belirlendi (Şekil 4.26).



Şekil 4.26 EAS-6 fraksiyonunun ana bileşenleri



Şekil 4.27 EAS-6 Proton NMR



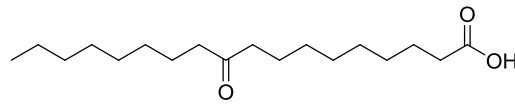
Şekil 4.28 EAS-6 ^{13}C NMR

Tablo 4.10 EAS-6 fraksiyonunun GC-MS analiz sonucu

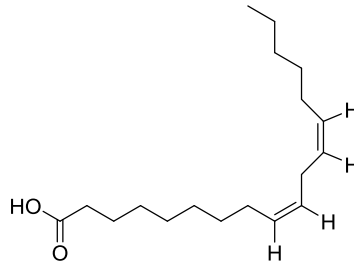
No	RT	İzomer	Bileşik Adı	% miktar
Doymuş Yağ Asitleri				
1	53.69	C ₁₆ :0	Palmitik asit	6.20
2	59.76	C ₁₉ :0	Stearik asit	11.56
Ara Toplam				17.76
Doymamış Yağ Asidi				
3	60.44	C ₁₉ :1	Oleik asit	47.95
Ara Toplam				47.95
Çoklu Doymamış Yağ Asitleri				
4	61.96	C ₁₉ :2	9,12 Oktadekadienoik asit	34.29
Ara Toplam				34.29
Genel Toplam				100

4.5.5 EAS-7 fraksiyonunun GC-MS Analiz sonuçları

Diklorometan ekstresinin kolon kromatografisinden 205-220 fraksiyonlarının (170 mg; EAS-7) GC-MS analiz sonucunda Tablo 4.11'deki veriler elde edildi. ¹H ve ¹³C NMR spektrumları ve GC-MS verileri sonucunda bu molekülün yağ asiti olduğu tespit edildi. Ana bileşenler 10-oktadekanoik asit ve linoleik asit olarak belirlendi.

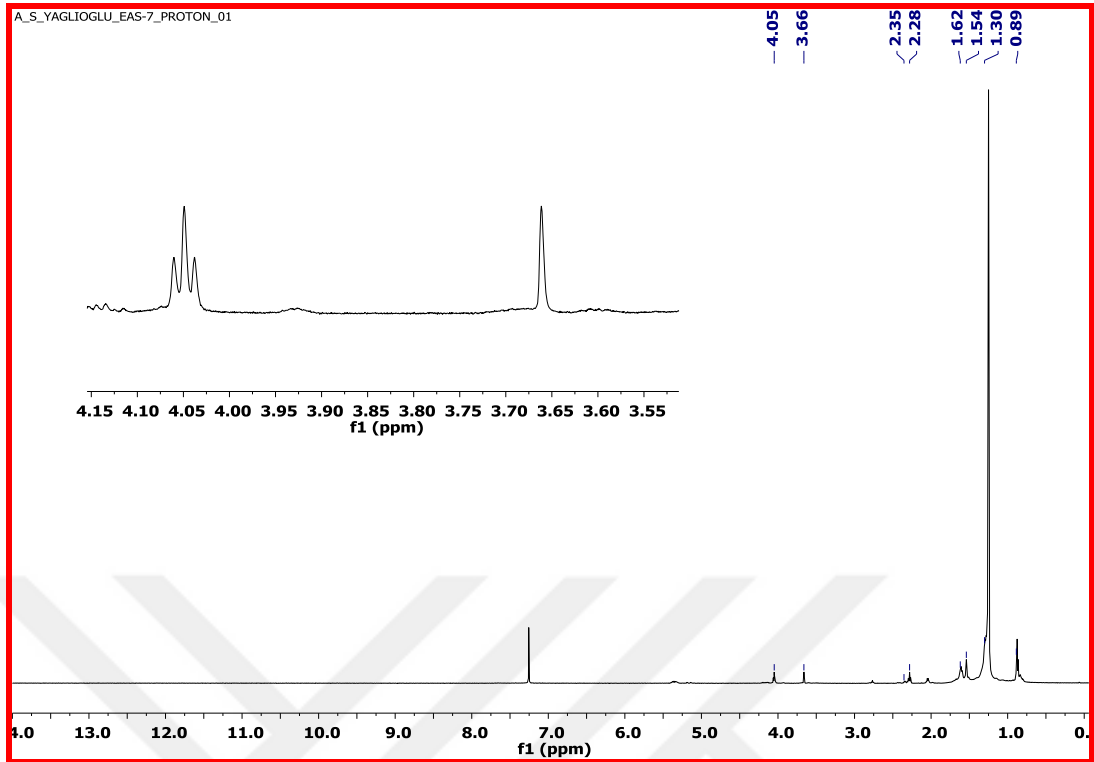


10-Oktadekanoik Asit

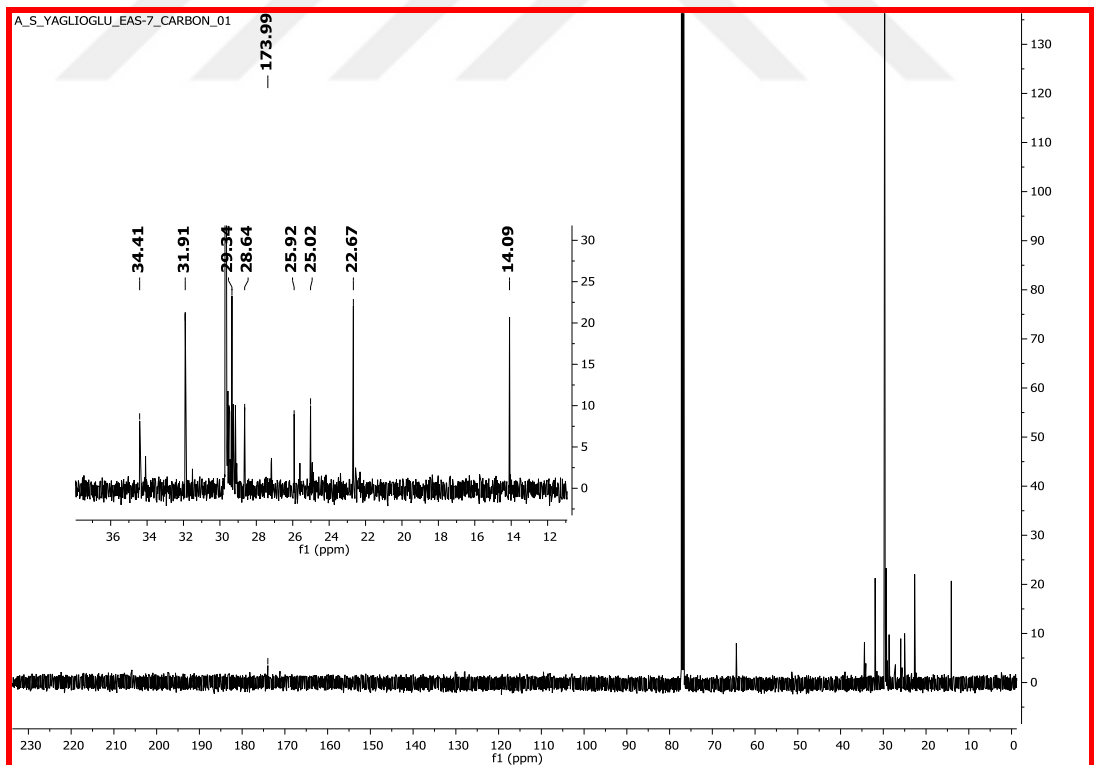


Linoleik Asit

Şekil 4.29 EAS-7 fraksiyonunun ana bileşenleri



Şekil 4.30 EAS-7 ^1H NMR



Şekil 4.31 EAS-7 ^{13}C NMR

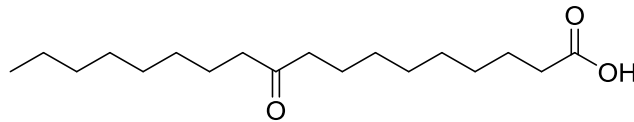
Tablo 4.11 EAS-7 fraksiyonunun GC-MS analiz sonucu

No	RT	İzomer	Bileşik Adı	% miktar *
Doymamış Yağ Asitleri				
1	60.44	C ₁₉ :1	10-oktadekanoik asit	49.12
Ara Toplam				49.12
Çoklu Doymamış Yağ Asidi				
2	61.96	C ₂₀ :2	Linoleik asit	36.88
Ara Toplam				36.88
Diğer Bileşenler				
3	32.43	C ₁₁ :0	Undekanol	13.99
Ara Toplam				13.99
Genel Toplam				100

*Nispi Değerlerdir.

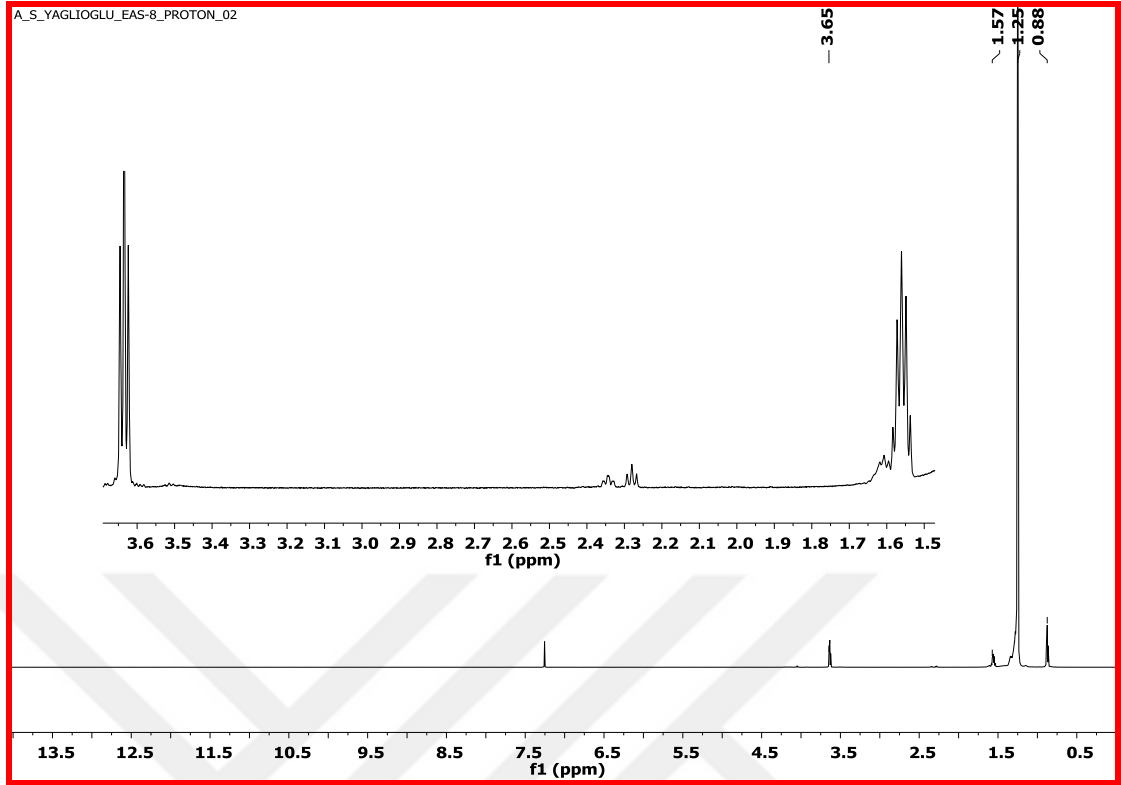
4.5.6 EAS-8 fraksiyonunun GC-MS Analiz sonuçları

Diklorometan ekstresinin kolon kromatografisinden 305-350 fraksiyonlarının (1.610 g; EAS-8) GC-MS analiz sonucunda Tablo 4.12'deki veriler elde edildi. ¹H ve ¹³C NMR spektrumları ve GC-MS verileri sonucunda bu molekülün yağ asiti olduğu tespit edildi. Ana bileşen 10-oktadekanoik asit olarak belirlendi.

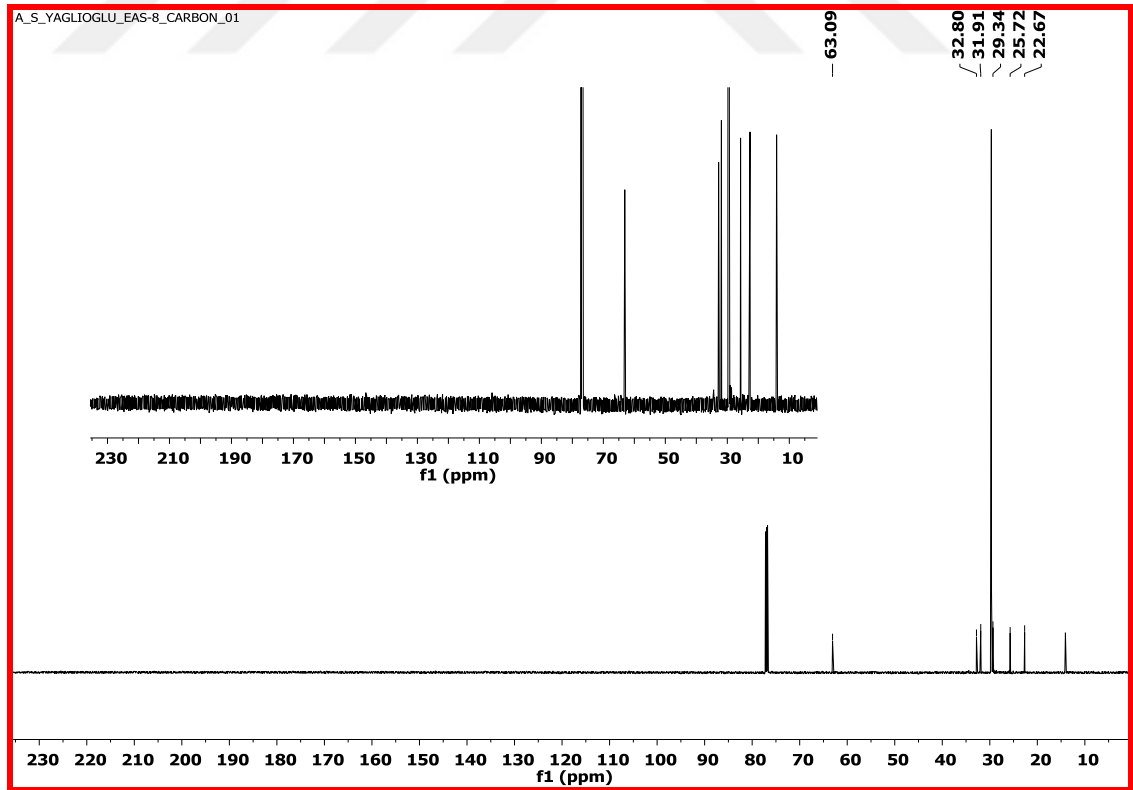


10-Oktadekanoik Asit

Şekil 4.32 EAS-8 fraksiyonunun ana bileşeni



Şekil 4.33 EAS-8 ¹H NMR



Şekil 4.34 EAS-8 ¹³C NMR

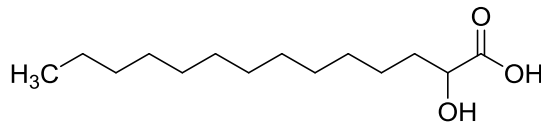
Tablo 4.12 EAS-8 fraksiyonunun GC-MS analiz sonucu

No	RT	İzomer	Bileşik Adı	% miktar *
Doymamış Yağ Asitleri				
1	60.48	C ₁₉ :1	10-oktadekenoik asit	38.05
Ara Toplam				38.05
Diğer Bileşenler				
2	50.95	C ₁₈ :1	Hekzahidrofarnesil aseton	34.36
3	62.00	C ₂₈ :0	3-(1,3-dihidroisopropil)- 1,5,8,11,14,17-hekzanol siklononadekan	27.57
Ara Toplam				61.94
Genel Toplam				100

*Nispi Değerlerdir.

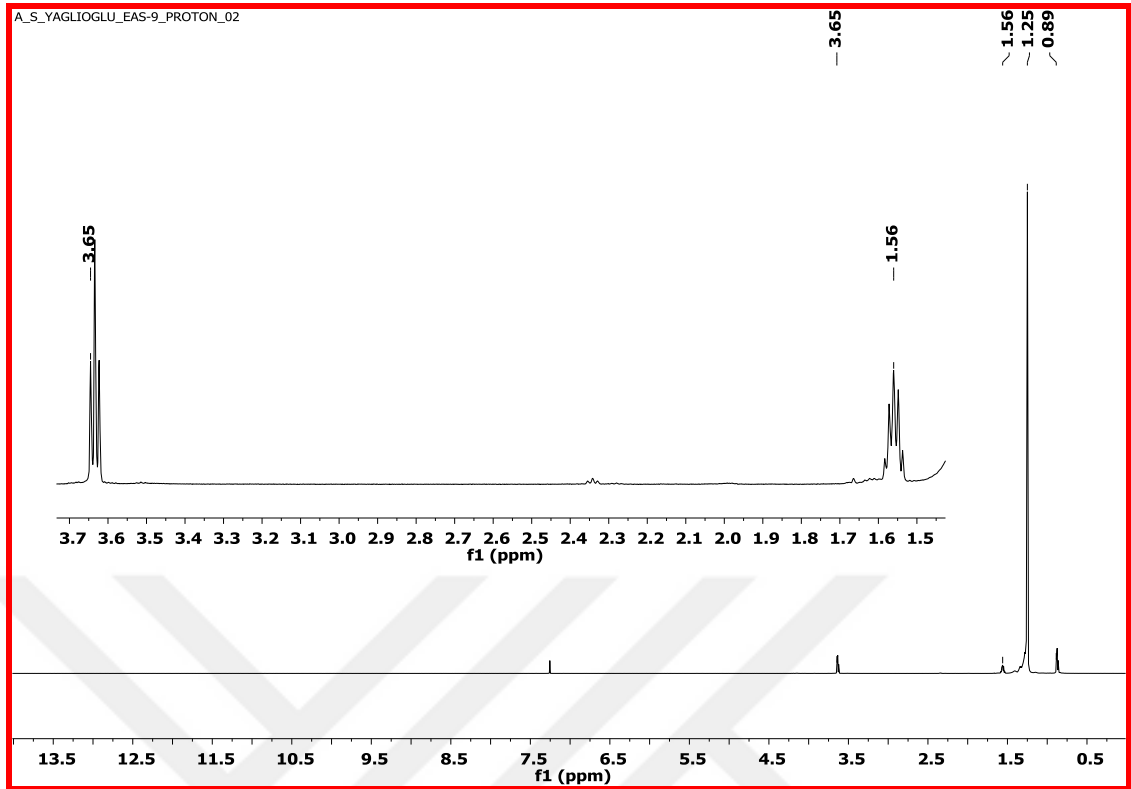
4.5.7 EAS-9 fraksiyonunun GC-MS Analiz sonuçları

Diklorometan ekstresinin kolon kromatografisinden 355-414 fraksiyonlarının (150 mg; EAS-9) GC-MS analiz sonucunda Tablo 4.13'teki veriler elde edildi. ¹H ve ¹³C NMR spektrumları ve GC-MS verileri sonucunda bu molekülün yağ asiti olduğu tespit edildi. Ana bileşen 2-hidroksi miristik asit olarak belirlendi (Şekil 4.35).

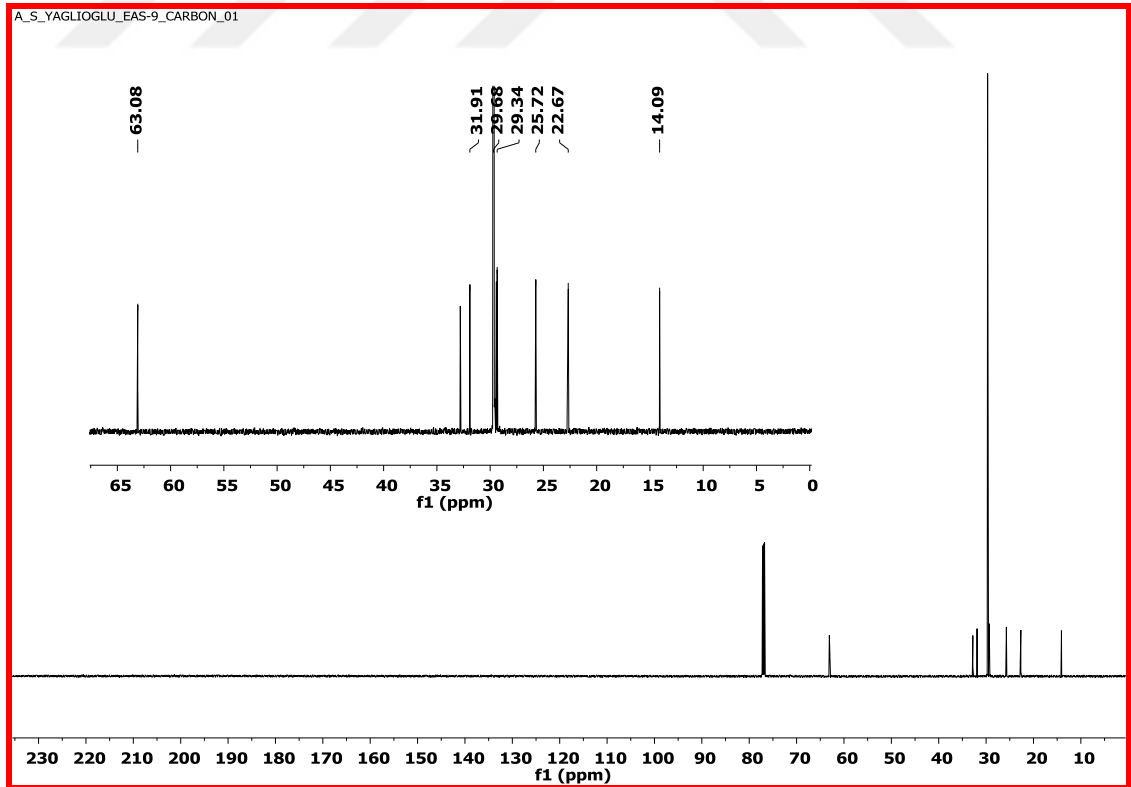


2-Hidroksi Miristik Asit

Şekil 4.35 EAS-9 fraksiyonunun ana bileşeni



Şekil 4.36 EAS-9 ^1H NMR



Şekil 4.37 EAS-9 ^{13}C NMR

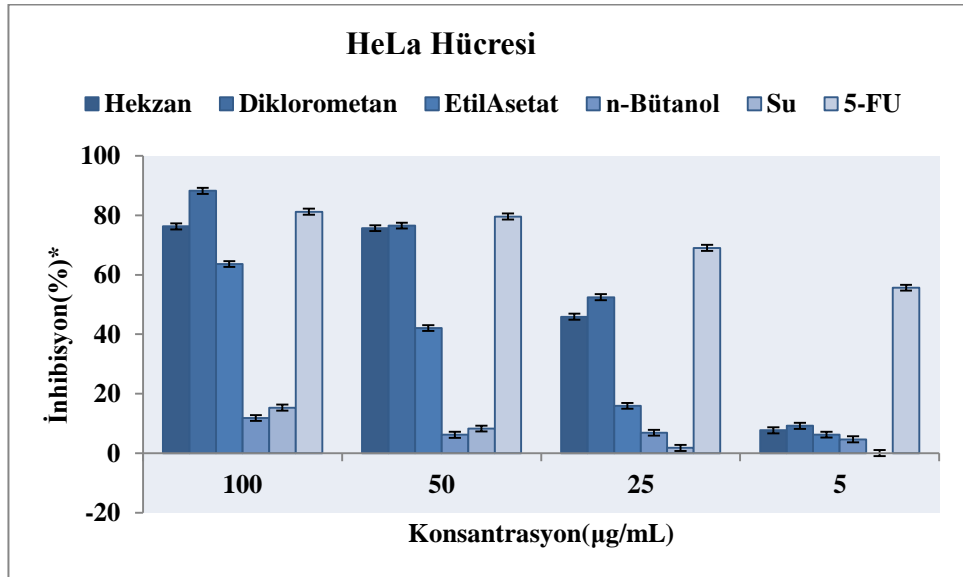
Tablo 4.13 EAS-9 fraksiyonunun GC-MS analiz sonucu

No	RT	İzomer	Bileşik Adı	% miktar *
Doymuş Yağ Asitleri				
1	65.91	C ₁₄ :0	2-hidroksi miristik asit	71,65
Ara Toplam				71.65
Diğer Bileşenler				
2	50.94	C ₁₈ :0	Hegzahidrofarnesil aseton	28,34
Ara Toplam				28.34
Genel Toplam				100

*Nispi Değerlerdir.

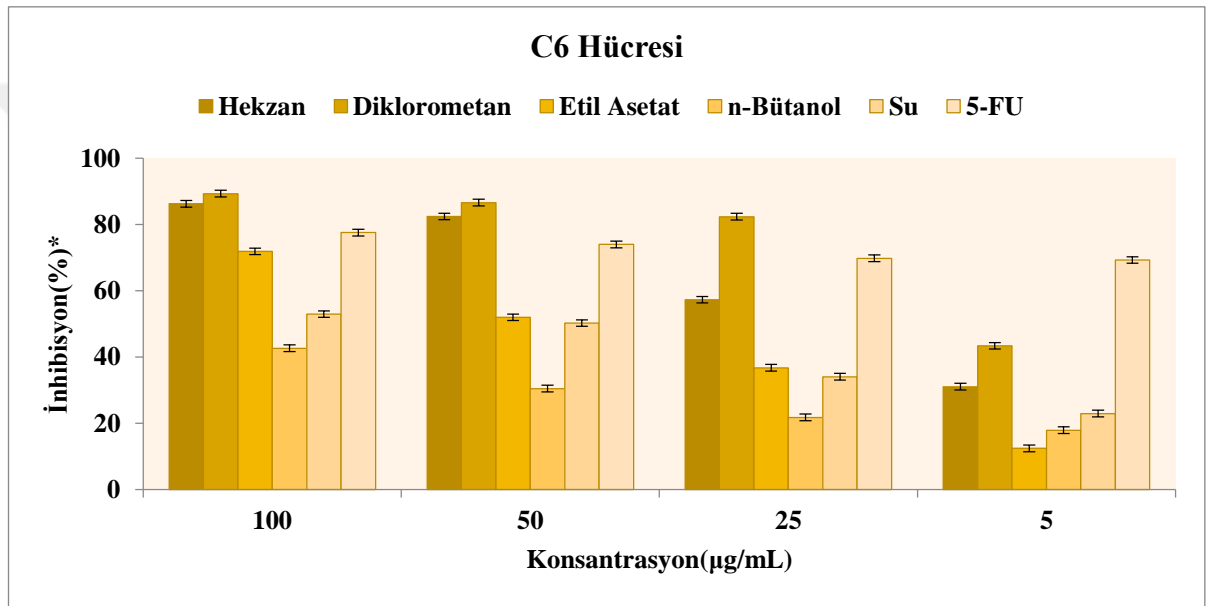
4.6 Ekstrelerin Antikanser Aktivite Sonuçları

Astragalus dipsaceus Bunge bitkisinden elde edilen Hekzan, Diklorometan, Etil Asetat, n-Bütanol, Su ekstralarının ve Etil asetat ekstresinden izole edilen sikloalpiosid, sikloalpiosid-D ve genistein moleküllerinin C6 ve HeLa hücrelerine karşı antikanser aktiviteleri incelendi ve IC₅₀ -IC₇₅ değerleri Tablo 4.14'te verildi.



Şekil 4.38 *A. dipsaceus* Bunge bitki ekstralarının HeLa hücrelerine karşı antikanser aktivite sonuçları (* testler üç tekrarlı ve iki kez tekrarlanmıştır.)

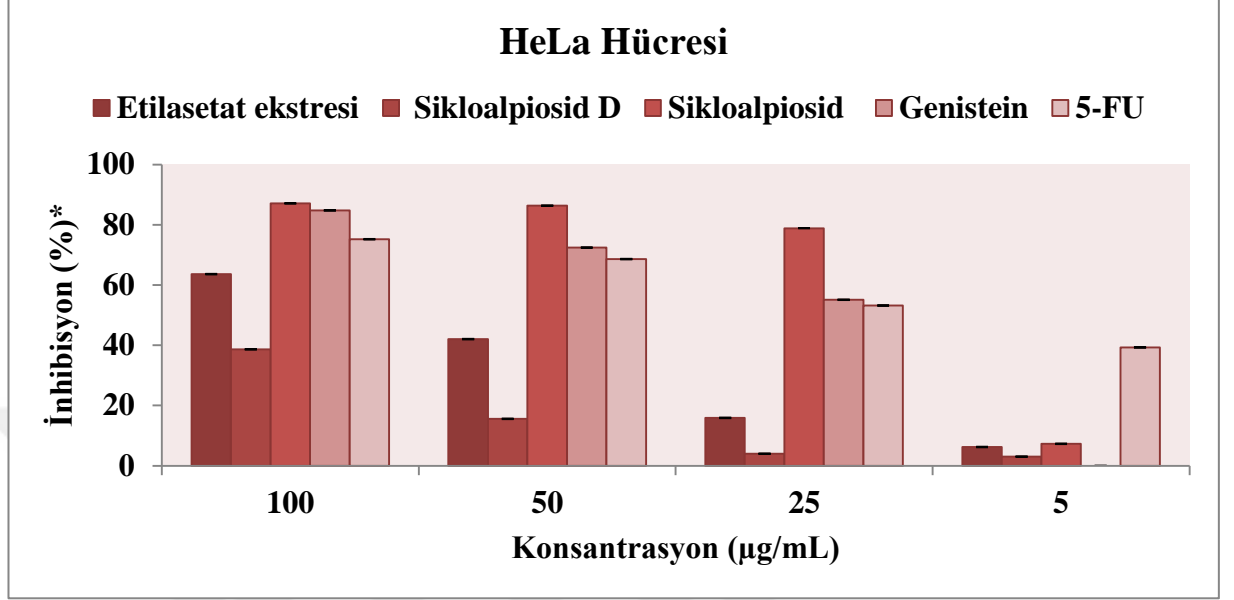
Endemik *A. dipsaceus* Bunge türünden elde edilen hekzan, diklorometan, EtOAc, n-Bütanol ve su ekstralarının ve standart olarak kullanılan 5-FU'nun HeLa hücresine karşı antikanser aktiviteleri incelendi. Yapılan testler neticesinde tüm ekstraların doz artışına bağlı olarak aktivitelerinde artış gözlemlendi (Şekil 4.38). Diklorometan ekstresinde HeLa hücresine karşı 5-FU den daha yüksek aktivite gözlemlendi. 100 µg/mL konsantrasyonda aktivite sırası ile: Diklorometan ekstresi> 5-FU> Hekzan ekstresi> EtOAc ekstresi> Su ekstresi> n-BuOH ekstresi şeklindedir.



Şekil 4.39 *A. dipsaceus* Bunge bitki ekstralarının C6 hücresine karşı antiproliferatif aktivite sonuçları (* testler üç tekrarlı ve iki kez tekrarlanmıştır.)

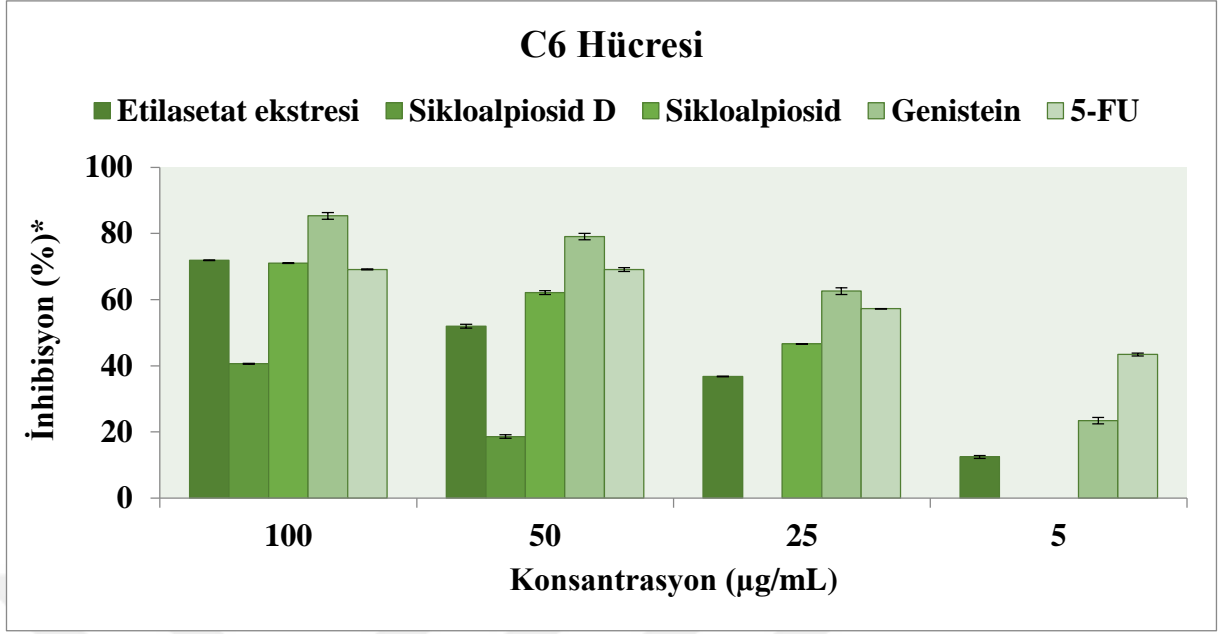
Endemik *A. dipsaceus* Bunge türünden elde edilen hekzan, diklorometan, EtOAc, n-Bütanol ve su ekstralarının ve standart olarak kullanılan 5-FU nun C6 hücresine karşı antiproliferatif aktiviteleri incelendi. Yapılan testler neticesinde tüm ekstraların doz artışına bağlı olarak aktivitelerinde artış gözlemlendi (Şekil 4.39). Diklorometan ve Hekzan ekstresinde C6 hücresine karşı 5-FU den daha yüksek aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi. 100 µg/mL konsantrasyonda aktivite sırası ile: Diklorometan ekstresi> Hekzan ekstresi> 5-FU> EtOAc ekstresi> Su ekstresi> n-BuOH ekstresi şeklindedir.

4.7 İzole Edilen Moleküllerin Kanser Aktiviteleri



Şekil 4.40 *A. dipsaceus* Bunge etilasetat ekstresi ve bu ekstreten izole edilen moleküllerin HeLa hücrelerine karşı antiproliferatif aktivite sonuçları (* testler üç tekrarlı ve iki kez tekrarlanmıştır.)

Endemik *A. dipsaceus* Bunge bitkisinin etil asetat ekstresinin ve bu ekstreten izole edilen Sikloalpiosid D, sikloalpiosid ve genistein molekülleri ve standart olarak kullanılan 5-FU'nun HeLa hücrelerine karşı antikanser aktiviteleri incelendi. Yapılan testler neticesinde tüm ekstrelerin doz artışına bağlı olarak aktivitelerinde artış gözlemlendi (Şekil 4.40). Sikloalpiosid D hariç, izole edilen diğer moleküllerinin HeLa hücrelerine karşı antikanser aktivitelerinin 5-FU den daha yüksek olduğu gözlemlendi. Sikloalpiosid molekülü çalışılan tüm dozlarda, genistein molekülünden daha güçlü aktivite gösterdi. Etil asetat ekstresindeki moleküllerin antagonistik etkiye sahip oldukları tespit edildi. 100 µg/mL konsantrasyonda aktivite sırası ile: Sikloalpiosid> Genistein> 5-FU> Etilasetat ekstresi> Sikloalpiosid D şeklindedir.



Şekil 4.41 *A. dipsaceus* Bunge etilasetat ekstresi ve bu ekstreten izole edilen moleküllerin C6 hücresine karşı antikanser aktivite sonuçları (* testler üç tekrarlı ve iki kez tekrarlanmıştır.)

Endemik *A. dipsaceus* Bunge bitkisinin etil asetat ekstresinin ve bu ekstreten izole edilen Sikloalpiosid D, sikloalpiosid ve genistein molekülleri ve standart olarak kullanılan 5-FU'nun C6 hücresine karşı antiproliferatif aktiviteleri incelendi. Yapılan testler neticesinde tüm ekstrelerin doz artışına bağlı olarak aktivitelerinde artış gözlemlendi (Şekil 4.41). 100 µg/mL konsantrasyonda, Sikloalpiosid D hariç, izole edilen diğer moleküllerinin C6 hücresine karşı antiproliferatif aktivitelerinin 5-FU'dan daha yüksek olduğu gözlemlendi. Genistein molekülünde yüksek dozlarda 5-FU'dan daha yüksek aktivite gözlemlendi. 100 µg/mL konsantrasyonda, etil asetat ekstresinin hem Sikloalpiosid D hemde 5-FU dan daha güçlü aktivite gösterdiği tespit edildi. 100 µg/mL konsantrasyonda aktivite sırası ile: Genistein> Etilasetat ekstresi> Sikloalpiosid> 5-FU> Sikloalpiosid-D şeklindedir.

Tablo 4.14 Ekstre ve izole edilen moleküllerin IC₅₀ ve IC₇₅ Değerleri

	HeLa Hücresi		C6 Hücresi	
	IC ₅₀	IC ₇₅	IC ₅₀	IC ₇₅
Hekzan ekstresi	25.03	53.79	6.42	45.77
Diklorometan ekstresi	28.47	57.65	*	23.26
Etilasetat ekstresi	44.76	70.32	32.58	63.03
n-Bütanol ekstresi	24.22	65.91	19.17	59.19
Su Ekstresi	52.83	75.63	*	43.92
Sikloalpiosid	12.86	45.64	30.49	57.78
Sikloalpiosid D	55.11	79.47	56.92	78.96
Genistein	31.20	58.48	10.28	47.43
5-FU	*	37.59	*	13.56

*<5µg/mL

4.8 Sitotoksik Aktivite Sonuçları

Sitotoksik aktivitenin belirlenmesi amacıyla C6 hücreleri kullanıldı. Deney sırasında antiproliferatif aktivite testlerinde kullanılan en yüksek doz olan 100 µg/mL konsantrasyonda çalışıldı. Pozitif kontrol olarak 5-FU kullanıldı. Test sonuçları Tablo 4.15'te verildi. Tablo 4.15 incelendiğinde etil asetat ekstresinden izole edilen sikloalpiosid ve genistein moleküllerinin 5-FU den daha düşük toksisiteye sahip olduğu görüldü.

Tablo 4.15 Moleküllerin sitotoksik aktivite sonuçları

Molekül	% Toksikite
Sikloalpiosid	30
Genistein	27
5-FU	51

5.) TARTIŞMA VE SONUÇ

Astragalus L. (Fabaceae) 269 taksonomik bölüme ayrılmış 5000'den fazla türü olan çiçekli bitkilerin en büyük cinslerinden biridir. Türkiye florasında 224'ü endemik 447 tür ile temsil edilmektedir. Türkiye'de yetişen *Astragalus* türleri üzerinde yapılan önceki fitokimyasal çalışmalar, bir dizi oleanan ve sikloartan tipi triterpen saponininin izolasyonu ile sonuçlanmıştır. Sikloartan ve oleanan tipi glikozitler, kardiyotonik, yara iyileşmesi, antiviral, anti-protozoal, immüno-uyarıcı, sitotoksik, adjuvan ve antioksidan aktiviteleri dahil olmak üzere ilginç biyolojik özellikler gösterir (Un vd. 2016). Ayrıca bir başka çalışmada *Astragalus* L.'den çeşitli fitokimyasalların biyolojik fonksiyonları birçok araştırmacı tarafından yoğun olarak çalışılmıştır. *Astragalus* bitkisinin ana aktif bileşenlerin saponin glikozitler, flavonoidler ve polisakaritler olduğu kanıtlanmıştır. Çinli bir bilim insanının bitkilerin kimyasal bileşenleri (cins *Astragalus* L.) hakkındaki sistematik derlemesine göre 140'tan fazla sikloartan tipi triterpen glikozit, 60 flavonoid ve 18 farklı polisakarit tespit edilmiştir. Farmakolojik çalışmalarda, *Astragalus* türlerinin ham özütleri gibi içerikler, anti-kanser, immünostimülan, antihipertansif, nöroprotektif, hepatoprotektif, antimikrobiyal, antiviral, kardiyoprotektif ve yaşlanma karşıtı aktiviteleri göstermiştir (Ghasemian-Yadegari et al. 2017).

Bu tez kapsamında endemik *Astragalus dipsaceus* Bunge bitkisinin biyolojik aktivite yönlendirmeli izolasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, tüm bitki ilk olarak ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu ve elde edilen ekstraktların biyolojik aktiviteleri C6 ve HeLa hücrelerine karşı test edildi. En yüksek aktiviteye sahip ekstraktlardan diklorometan ve etil asetat ekstraktlarının izolasyon çalışmaları gerçekleştirildi. *Astragalus dipsaceus* Bunge bitkisinin etil asetat ekstraktından Sikloalpiosid-D, Sikloalpiosid ve Genistein molekülleri izole edildi. İzole edilen moleküllerin yapıları spektral yöntemlerle aydınlatıldı ve C6 ve HeLa hücrelerine karşı antikanser aktiviteleri gerçekleştirildi.

Literatür taramaları sonucunda sikloalpiosid-D molekülünün daha önce *Astragalus alopecurus* Pall'da (Leguminosae) (Mamedova et al. 2004; Agzamova and Isaev, 1991) bitkisinden, sikloalpiosid molekülünün *Astragalus alopecurus* Pall'da (Leguminosae) (Mamedova et al, 2004; Agzamova and Isaev, 1995) bitkisinden, genistein molekülünün ise *Astragalus verrucosus* (Pistelli et al. 2002) , *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* ve *Astragalus peregrinus* (Bratkov et al, 2016) bitkilerinden de izole edildikleri görüldü. Ancak bu üç molekül ilk defa bu çalışmada *Astragalus dipsaceus* Bunge bitkisinden izole edilmiştir.

Sikloalpiosid-D, Sikloalpiosid ve Genistein moleküllerinin HeLa hücresine karşı yapılan testler sonucunda Sikloalpiosid ve Genistein moleküllerin HeLa hücresine karşı antikanser aktivitelerinin 5-FU'dan daha yüksek olduğu gözlemlendi. Sikloalpiosid molekülü çalışılan tüm dozlarda, genistein molekülünden daha güçlü aktivite gösterdi. Etil asetat ekstresindeki moleküllerin antagonist etkiye sahip oldukları tespit edildi. Sikloalpiosid-D, Sikloalpiosid ve Genistein moleküllerinin C6 hücresine karşı yapılan testler sonucunda ise 100 µg/mL konsantrasyonda, Sikloalpiosid ve Genistein moleküllerinin C6 hücresine karşı antikanser aktivitelerinin 5-FU'dan daha yüksek olduğu gözlemlendi. Genistein molekülünde yüksek dozlarda 5-FU'dan daha yüksek aktivite gözlemlendi. 100 µg/mL konsantrasyonda, etil asetat ekstresinin hem Sikloalpiosid-D hem de 5-FU'dan daha güçlü aktivite gösterdiği tespit edildi.

İzole edilen bu üç moleküle sitotoksik aktivitenin belirlenmesi amacıyla C6 hücreleri kullanılarak en yüksek doz olan 100 µg/mL konsantrasyonda çalışıldı ve pozitif kontrol olarak 5-FU kullanıldı. Test sonuçları incelendiğinde etil asetat ekstresinden izole edilen sikloalpiosid ve genistein moleküllerinin 5-FU'dan daha düşük toksisiteye sahip olduğu görüldü.

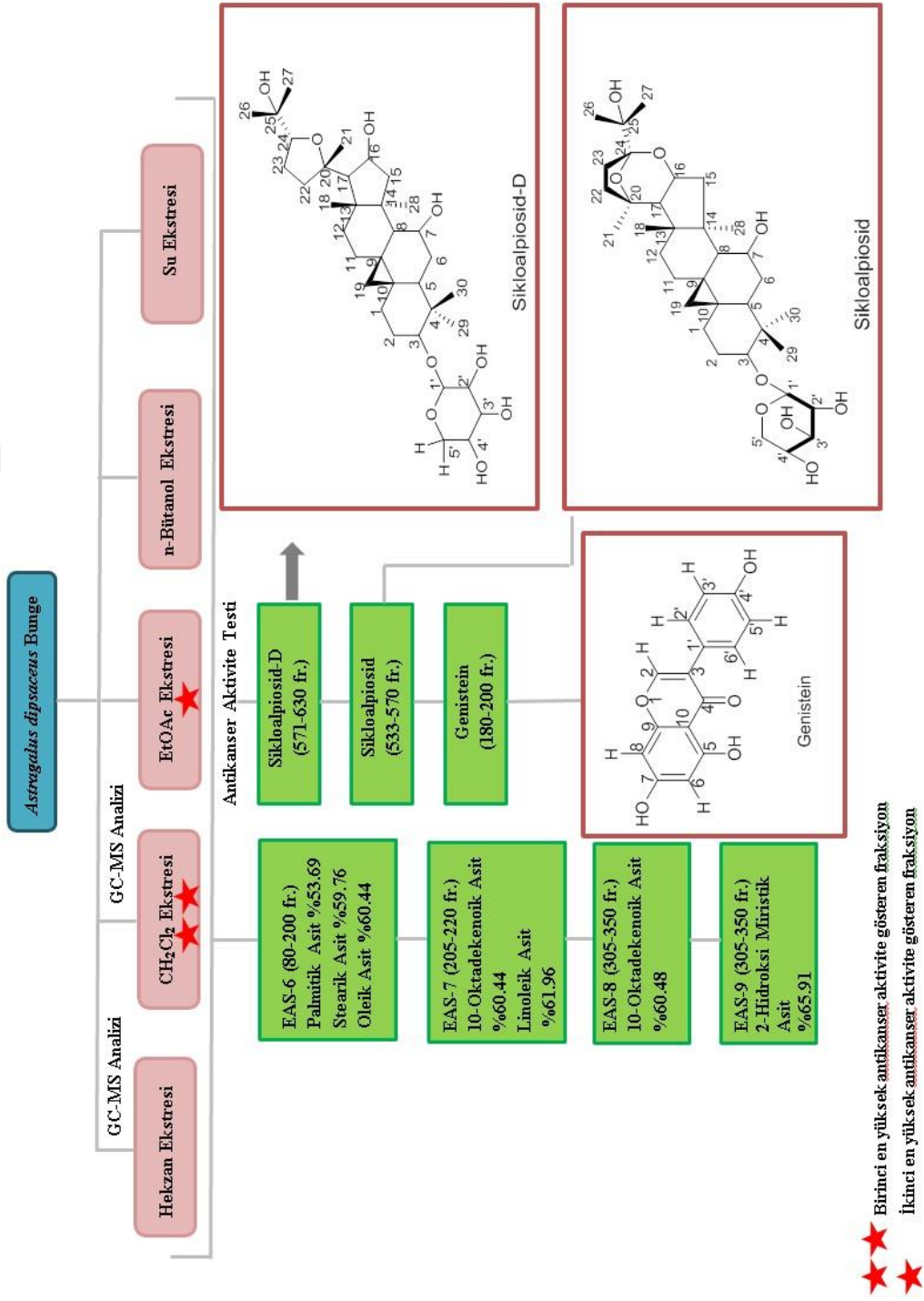
Cycloalpioside-D, Cycloalpioside ve Genistein molekülleri üzerine yapılan biyolojik aktivite çalışmaları araştırıldı. Hsiao et al., yaptıkları çalışmada genisteinin anti-lösemi

aktivitesini in vitro HL-60 hücrelerinde araştırmışlar ve soya türevi bir izoflavonoid bileşiği olan Genistein'in, çeşitli hücre fonksiyonları üzerinde iyileştirici yararları olduğunu tespit etmişlerdir (Hsiao et al. 2018). Khan ve arkadaşlarının 2006 yılında yapmış oldukları çalışmada *Astragalus alopecurus* türünden izole edilen sekiz sikloartan glikozitlerinden biri olan sikloalpiosid-D tirozinaz inhibisyonu çalışmışlardır. Bu çalışma sonucunda tirozinaz enzimine karşı aktiviteye sahip olmadığı görülmüştür (Khan et al. 2006).

Bu tez kapsamında *Astragalus dipsaceus* Bunge bitkisinin ilk kez izolasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş olup, sikloalpiosid-D, sikloalpiosid ve genistein molekülleri bu bitkiden ilk kez izole edilmiştir. Ayrıca izole edilen sikloalpiosid ve genistein molekülleri her iki hücre içinde 5-FU'dan daha yüksek aktiviteye sahip oldukları gözlemlendi. Bu moleküllerin kanser aktivite çalışmaları ilk kez bu çalışmada gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bu moleküllerin toksisite çalışmaları sonucunda düşük toksisiteye sahip oldukları belirlendi.

Bu bulgular ışığında; *Astragalus dipsaceus* Bunge bitkisininin hem izolasyon hem de aktivite çalışmaları gerçekleştirilerek bu bitkiye bilimsel bir kimlik kazandırılmıştır. Günümüzde ilaç sanayisinin Ar-Ge çalışmalarına verdiği önemi düşünürsek, bu tez sayesinde elde edilen verilerin ilaç sanayisine yararı olacağı düşünülmektedir.

Çalışmanın özet şeması Şekil 5.1 de verilmiştir.



Şekil 5.1. Çalışmanın özet şeması

KAYNAKLAR

- Agzamova, M. A., Isaev, M. I. 1991. Triterpene glycosides of Astragalus and their genins. XXXVIII. Cycloalpigenin D and cycloalpioside D from Astragalus alopecurus. *Chemistry of Natural Compounds*, 27(3); 326-332.
- Agzamova, M. A., Isaev, M. I. 1995. Astragalus Triterpene glycosides and their genins. I. Structures of Cycloalpigenin and cycloalpioside. *Chemistry of Natural Compounds*, 31(5); 589-595.
- Bratkov, V. M., Shkondrov, A. M., Zdraveva, P. K., Krasteva, I. N. 2016. Flavonoids from the Genus Astragalus: Phytochemistry and Biological Activity. *Pharmacognosy Review*, 10(19); 11-32.
- Akyil, D., Erdogmus, S F., Eren, Y., Ozkara, A., Korcan, E., 2013. Potential antimicrobial and antimutagenic activities of Astragalus flavescens, *Fresenius Environmental Bulletin*, 22(7), 1868-1873.
- Ghasemian-Yadegari, J., Nazemiyeh, H., Hamedeyazdan, S., Fathiazad, F. 2017. Secondary metabolites from the roots of Astragalus maximus. *Research Journal of Pharmacognosy*, 4(2); 31-38.
- Gulluce, M., Sokmen, M., Agar, G., Adiguzel, A., Baris, O., Sahin, F., 2008. Antimicrobial and antioxidant activities of methanol and hexane extract of some endemic Astragalus species. *Asian Journal of Chemistry*, 20(3), 2125-2132.
- Gülcemal, D., Masullo, M., Napolitano, A., Karayıldırım, T., Bedir, E., Alankuş-Çalışkan, Ö., Piacente, S. 2013. "Oleanane glycosides from Astragalus tauricolus: isolation and structural elucidation based on a preliminary liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry profiling", *Phytochemistry*, 86, 184-94.
- Hsiao, Y. C., Peng, S. F., Lai, K. C., Liao, C. L., Huang, Y. P., Lin, C. C., Lin, M. L., Liu, K. C., Tsai, C. C., Ma, Y. S., Chung, J. G. 2018. Genistein induces apoptosis in vitro and has antitumor activity against human leukemia HL-60 cancer cell xenograft growth in vivo. *Environmental Toxicology*, 34(4); 443-456.
- Hu, T., Liu, Q. M., He, X.W., Huang, F., Zhang, M.W., Jiang, J.G. 2017. Identification of bioactives from Astragalus chinensis L.f. and their antioxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative effects. *Journal Food Science Technology*, 54(13); 4315-4323.
- Huang L H., Yan Q J., Kopperapu N K., Jiang Z Q., Sun Y., 2012. Astragalus membranaceus lectin (AML) induces caspase-dependent apoptosis in human leukemia cells. *Cell proliferation*, 45(1), 15-21.
- Isaev, I.M., Agzamova, M. A., Isaev, M. I. 2012. Triterpene glycosides from Astragalus and their genins. XCI. Chemical transformation of cycloartanes. X. Syntheses based on cycloalpioside D and cycloalpigenin D. *Chemistry of Natural Compounds*, 47(6); 947-954.
- Isaev, M. I., Agzamova, M. A. 1995. Cycloartane glycosides from Astragalus amarus and Astragalus alopecurus. *Abstracts of papers of the American Chemical Society*, 210; 128.

- Jaradat, N. A., Al-Masri, M., Zaid, A. N., Eid, A. M., Saleh, A. M., Abu Zer, A. F., Romil, I. M., Hussien, A. M. A. 2017. Preliminary Phytochemical Screening and In-vitro Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities for *Astragalus pelecinus* from Palestine. *Journal of Materials and Environmental Sciences*, 8(4); 1492-1497.
- Kadioğlu, B., Kadioğlu, S., Turan, Y. 2008. “ Gevenlerin (*Astragalus* sp.) Farklı Kullanım Alanları ve Önemi”, *Atatürk Üniversitesi, Alınları Zirai Bilimler Dergisi*, 14(B), 17-26.
- Kai, Z., Michela, P., Antonio, P., Annamaria, P., 2015. Biological Active Ingredients of Traditional Chinese Herb *Astragalus membranaceus* on Treatment of Diabetes: A Systematic Review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 15(4), 315-329.
- Khan, M. T. H., Choudhary, M. I., Rahman, A., Mamedova, R. P., Agzamova, M. A., Sultankhodzhaev, M. N., Isaev, M. I. 2006. Tyrosinase inhibition studies of cycloartane and cucurbitane glycosides and their structure–activity relationships. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(17); 6085-6088.
- Kim, B H., Kim, T Y., Catholic University Industry Academic Cooperation Foundation, S. Korea, 2013. *Astragalus sinicus* extracts for preventing and treating inflammatory skin diseases, (Patent No: KR 2015017278) (Patent yıl: 16 Şubat 2015).
- Kim, J H., Insung Pharma Cential Co., Ltd., S. Korea, 2004. Natural herb extract having rheumatoid-neuroprotection activity consisting of *Gastrodia elata*, *Astragalus membranaceus*, vegetable worms, and young antlers of deer. (Patent No: KR 2006018536) (Patent Yıl: 2 Mart 2006).
- Labeled, A., Ferhat, M., Labeled-Zouad, I., Kaplaner, E., Zerizer, S., Voutquenne-Nazabadioko, L., Alabdul Magid, A., Semra, Z., Kabouche, A., Kabouche, Z., Ozturk, M., 2016 *Pharmaceutical Biology* (Abingdon, United Kingdom).
- Li, R., Chen, W., Wang, W., Tian, W., Zhang, X., 2010. Antioxidant activity of *Astragalus polysaccharides* and antitumor activity of the polysaccharides and siRNA. *Carbohydrate Polymers*, 82 (2), 240-244.
- Li, S., Bian, F., Yue, L., Jin, H., Hong, Z., Shu, G., 2014. Selenium-dependent antitumor immunomodulating activity of polysaccharides from roots of *A. Membranaceus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 69(64-72).
- Mamedova, R. P., Isaev, M. I. 2004. Triterpenoids from *Astragalus* Plants. *Chemistry of Natural Compounds*, 40(4); 303-357.
- Mikaeili A., Modaresi M., Karimi I., Ghavimi H., Fathi M., Jalilian N., 2012. Antifungal activities of *Astragalus* versus *Olivier*. against *Trichophyton verrucosum* on in vitro and in vivo guinea pig model of dermatophytosis. *Mycoses*, 55(4), 318-25.
- Ozbek, T., Gulluce, M., Agar, G., Adiguzel, A., Ozkan, H., Sahin, F., Baris, O., 2008. Investigation of the antimutagenic effects of methanol extract of *Astragalus* L. species growing in eastern Anatolia region of Turkey, *Fresenius Environmental Bulletin*, 17(12a), 2052-2058.
- Pistelli, L., 2002. Secondary metabolites of genus *Astragalus*: Structure and biological activity. *Studies in Natural Products Chemistry*, 27, Bioactive Natural Products (Part H).
- Radwan, M.M., El-Sebakhy, N.A, Asaad, A.M., Toaima, S.M, Kingston. D.G.I. (2007).”Spinocoumarin I, a new coumarin derivative from *Astragalus spinosus* Forssk”, *Natural Product Communications*, 2(9), 19-22.

- Rios, L.J., Waterman, P.G. 1997. "A review of the pharmacology and toxicology of Astragalus", *Phytotherapy Resources*, 11(6), 411-418.
- Shojaii, A., Motevalian, M., Rahnama, N., 2015. Evaluation of anti-inflammatory and analgesic activities and the phytochemical study of *Astragalus arbusculus* gum in animal models. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 26(4), 369-374.
- Un, R., Horo, I., Masullo, M., Falco, A., Senol, S. G., Piacente, S., Alankus-Caliskan, O. 2016. Cycloartane and oleanane-type glycosides from *Astragalus pennatulus*. *Fitoterapia*, 109; 254-260.
- Xiao, C., Qiu, L., Xu, W., Dong, X., Jiang, B., 2015. Chemical constituents from roots of *Astragalus englerianus* and their anti-oxidative activities. *Zhongcaoyao*, 46(1), 22-27.
- Yasuda, T., Mizunuma, S., Kano, Y., Saito, K., Ohsawa, K. 1996. Urinary and Biliary Metabolites of Genistein in Rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 19(3), 413-417.
- Zengin, G., Ceylan, R., Guler, G O., Carradori, S., Uysal, S., Aktumsek, A., 2016. Enzyme Inhibitory Effect and Antioxidant Properties of *Astragalus lagurus* Extracts, 12(2), 177-182.
- URL 1. <https://www.earth.com/earthpedia/plant/bg/astragalus-dipsaceus/> 05.02.2019
- URL 2. http://194.27.225.161/yasin/tubives/index.php?sayfa=1&tax_id=2756 06.03.2019
- URL 3. https://ast.wikipedia.org/wiki/Astragalus_membranaceus#/media/File:Astragalus_membranaceus.jpg , 22.12.2016.
- URL 4. http://www.colorfulnature.com/picture.jsp?lang=en_US&category=flowers&picGroupId=Astragalus_Spinosus-m , 22.12.2016.
- URL 5. https://species.wikimedia.org/wiki/Astragalus_sinicus#/media/File:Astragalus_sinicus_ja_Renge01.jpg , 11.11.2016.
- URL 6. <http://flora.org.il/en/plants/ASTPIN/> , 22.12.2016.
- URL 7. <http://www.plantarium.ru/page/image/id/439155.html> , 22.12.2016.
- URL 8. http://vanherbaryum.yyu.edu.tr/flora/famgenustur/fab/astragalus/bic/pages/Astragalus%20bicolor%20LAM_%20.jpg.htm , 22.12.2016.
- URL 9. <http://www.bee-paysage.fr/biblioplantes-fiche-plante.php?nomtaxon=Astragalus%20galegiformis> , 22.12.2016.
- URL 10. http://www.vanherbaryum.yyu.edu.tr/flora/famgenustur/fab/astragalus/pon/pages/Astragalus%20ponticus%20PALL_%20.jpg.htm , 22.12.2016.
- URL 11. <http://www.agaclar.net/forum/guney-dogu-anadolu-bolgesi/4608.htm> , 22.12.2016.
- URL 12-URL 13. Li, R., Chen, W., Wang, W., Tian, W., Zhang, X., 2010. Antioxidant activity of *Astragalus* polysaccharides and antitumour activity of the polysaccharides and siRNA. *Carbohydrate Polymers*, 82 (2), 240-244.
- URL 14. <http://www.plantarium.ru/page/image/id/139651.html> , 22.11.2016
- URL 15. <http://www.turkiyebitkileri.com/index.php?dil=tr&id=2&familya=36&cins=194&tur=3059#image-214033> , 22.12.2016.

- URL 16. <http://www.turkiyebitkileri.com/index.php?dil=tr&id=2&familya=36&cins=194&tur=866#image-23403> , 22.12.2016.
- URL 17. <http://www.turkiyebitkileri.com/index.php?dil=tr&id=2&familya=36&cins=194&tur=4150#image-219308> , 22.12.2016.
- URL 18. <http://econews.am/?p=6530&l=en> , 22.12.2016.
- URL 19. <http://www.bilgiustam.com/selenyum-nedir> , 22.12.2016.
- URL 20. <https://en.wikipedia.org/wiki/Selenium#/media/File:SeBlackRed.jpg> , 22.12.2016.
- URL 21. <https://gailfaithedwards.files.wordpress.com/2012/05/004.jpg> , 11.11.2016.
- URL 22. <http://www.turkiyebitkileri.com/index.php?dil=tr&id=2&familya=36&cins=194&tur=2825#image-219314> , 22.12.2016.
- URL 23. http://www.allposters.com/-sp/Milk-Vetch-Astragalus-Verus-Posters_i10655781_.htm , 22.12.2016.
- URL 24. https://en.wikipedia.org/wiki/Trichophyton_verrucosum , 22.12.2016.
- URL 25. https://en.wikipedia.org/wiki/Trichophyton_verrucosum#/media/File:Toplin_des_dieles_tiesse_vea.jpg , 22.12.2016.
- URL 26. <http://hilltoplabs.com/public/rats.html> , 22.12.2016.
- URL 27. <http://www.indiatimes.com/health/healthyliving/what-is-diabetes-mellitus-239597.html> , 22.12.2016.
- URL 28. <https://gailfaithedwards.com/2012/05/30/495/> , 24.12.2016.
- URL 29. <https://www.hemensaglik.com/makale/el-ve-parmaklarda-romatoid-artrit> , 22.12.2016.
- URL 30. <http://floraofgibraltar.myspecies.info/file/1278>) 04.03.2019
- URL 31. <http://www.teline.fr/en/photos/fabaceae/astragalus-armatus-subsp.-armatus> , 22.12.2016.
- URL 32. <http://catalog.digitalarchives.tw/item/00/6e/1e/7f.html> , 22.12.2016.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Elifay SERT
Doğum Yeri : Merkez / ÇANKIRI
Doğum Tarihi : 06 / 12 / 1992
Medeni Hali : Bekâr
Yabancı Dili : İngilizce
Adres : A.H.R. Mah. Pınar Sk. Çağlar Apt. A/Blok No:14
Çankırı/Merkez
Tel : 05465627044
E-posta : elifay.sert@gmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Çankırı Lisesi 2007-2011
Lisans : Gazi Üniversitesi 2011-2015
Yüksek Lisans : ÇKÜ Organik Kimya Anabilim Dalı 2016-2019

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl

Tekinak Gıda – Laborant - Çankırı/Merkez / 2015-2016
Çankırı Nevzat Ayaz Sosyal Bilimler Lisesi / Çankırı Gazi Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi - Kimya Öğretmeni - Çankırı/Merkez / 2017
Turaç Mühimmat Fabrikası - Kimyager – Çankırı/Şabanözü / 2018-2019

Sertifikalar

HPLC-TOFF (5.Ulusal Kimya Öğrenci Kongresi / İstanbul Üniversitesi - Mayıs 2014)

XRD (5.Ulusal Kimya Öğrenci Kongresi / İstanbul Üniversitesi - Mayıs 2014)

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler

- 1.) Ayşe Şahin Yağlıoğlu, Serhat Ursavaş, Muhammet Ören, **Elifay Sert**, Emiç Saray (2017). Anticancer Activities of *Anomodon viticulosus* (Hedw.)Hook. Taylor Extracts Against Rat Brain Tumour. IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, 26-29 Nisan 2017, İstanbul, TÜRKİYE.
- 2.) Ayşe Şahin Yağlıoğlu, Muhammet Şamil Yağlıoğlu, **Elifay Sert**, (2017). The antiproliferative activities against C6 cell of extracts of *Pinus sylvestris* L., IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, 26-29 Nisan 2017, İstanbul, TÜRKİYE.
- 3.) Ayşe Şahin Yağlıoğlu, Serhat Ursavaş, Muhammet Ören, **Elifay Sert** (2017). In vitro Anticancer Activities against C6 Cell Line of *Plagiomnium affine* (Blandow ex Funck) T.J. Kop. extracts. IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, 26-29 Nisan 2017, İstanbul, TÜRKİYE.
- 4.) Ayşe Şahin Yağlıoğlu, Serhat Ursavaş, Muhammet Ören, **Elifay Sert**, (2017). The Anticancer Activities of *Alleniella complanata* (Hedw.) S.Olsson, Enroth D. Quandt extracts. . IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, 26-29 Nisan 2017, İstanbul, TÜRKİYE.
- 5.) Ayşe Şahin Yağlıoğlu, Muhammet Şamil Yağlıoğlu, **Elifay Sert** (2017). The antiproliferative activities against C6 cell of extracts of *Pinus brutia* Ten., IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, 26-29 Nisan 2017, İstanbul, TÜRKİYE.
- 6.) Ayşe Şahin Yağlıoğlu, Muhammet Şamil Yağlıoğlu, **Elifay Sert** (2017). The biological activities of *Pinus nigra* J.F. Arnold extracts. IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, 26-29 Nisan 2017, İstanbul, TÜRKİYE.
- 7.) Ayşe Şahin Yağlıoğlu, Serhat Ursavaş, Muhammet Ören, **Elifay Sert** (2017). In vitro Anticancer Activities against C6 Cell Line of *Plagiomnium affine* (Blandow ex Funck) T.J. Kop. extracts. IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, 26-29 Nisan 2017, İstanbul, TÜRKİYE.

- 8.) Ayşe Şahin Yağlıoğlu, Serhat Ursavaş, Muhammet Ören, **Elifay Sert** (2017). Evaluation of In vitro Anticancer Activity of *Hylocomium splendens* (Hedw.) Schimp. extracts. . IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, 26-29 Nisan 2017, İstanbul, TÜRKİYE.
- 9.) Ayşe Şahin Yağlıoğlu, Serhat Ursavaş, Muhammet Ören, **Elifay Sert** (2017). Anticancer Activity Evaluation of *Thamnobryum alopecurum* (Hedw.) Nieuwl. ex Gangulee extracts. IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, 26-29 Nisan 2017, İstanbul, TÜRKİYE.
- 10.) Ayşe Şahin Yağlıoğlu, Serhat Ursavaş, Muhammet Ören, **Elifay Sert**, Emiç Saray (2017). The Biological Activities of *Abietinella abietina* (Hedw.) M.Fleisch extracts. IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, 26-29 Nisan 2017, İstanbul, TÜRKİYE.
- 11.) Ayşe Şahin Yağlıoğlu, Muhammet Şamil Yağlıoğlu, **Elifay Sert** (2017). The biological evulation of *Pinus pinea* L. extracts. IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, 26-29 Nisan 2017, İstanbul, TÜRKİYE.
- 12.) Ayşe Şahin Yağlıoğlu, **Elifay Sert**, Melda Dölarıslan, İbrahim Demirtaş (2019). Phytochemical Analysis and anticancer activities of apolar extracts endemic *Astragalus dipsaceus* Bunge. Uluslararası Ege Disiplinlerarası İnovatif Bilimsel Araştırmalar Sempozyumu, 26-27 Mart 2019, İzmir, TÜRKİYE.
- 13.) Ayşe Şahin Yağlıoğlu, **Elifay Sert**, Melda Dölarıslan, İbrahim Demirtaş (2019). Isolation Of Bioassays Guided Of Endemic *Astragalus dipsaceus* Bunge. Uluslararası Ege Disiplinlerarası İnovatif Bilimsel Araştırmalar Sempozyumu, 26-27 Mart 2019, İzmir, TÜRKİYE.