ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bryonia multiflora BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL ANALİZİ VE ANTİKANSER AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ

Mesut GÖK

KİMYA ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2014

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Mesut GÖK tarafından hazırlanan "*Bryonia multiflora* BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL ANALİZİ VE ANTİKANSER AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ" adlı tez çalışması 13.01.2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

Jüri Üyeleri :

Başkan: Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ayşe ŞAHİN YAĞLIOĞLU

Üye : Yrd. Doç. Dr. Salih ÖKTEN

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Sezgin ÖZDEN

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Bryonia multiflora BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL ANALİZİ VE ANTİKANSER AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ

Mesut GÖK

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

Bu araştırma kapsamında, Bryonia multiflora (Cucurbitacea) bitkisinin kökü sırasıyla hekzan, etil asetat ve metanol:kloroform (1:1) çözücülerinde maserasyon yöntemi ile ekstraksiyona bırakıldı. Evaporatörde çözücüleri uçurulduktan sonra miktarı fazla olan metanol-kloroform (1:1) ekstresi hekzan, CH2Cl2, CHCl3, EtOAc ve MeOH çözücüleri ile kolon kromatografisine tabi tutuldu. Kolon kromatografisi sonrası antikanser aktivitesi yüksek olan EtOAc ile gelen fraksiyonlar birleştirilerek flash kromotografisine tabi tutuldu. Daha sonra en aktif fraksiyon TLC ve GC-MS yardımıyla belirlenip birleştirildi. Preparatif TLC ile Cucurbitacin B molekülü izole edildi ve yapısı NMR ve HPLC-TOF/MS yardımıyla aydınlatıldı. Daha sonra anti kanser aktivitesi gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile (xCELLigence) belirlendi. Ayrıca Bryonia multiflora Bois. & Heldr. (Cucurbitacea) bitkisinin kök, gövde, yaprak ve meyve kısımları hekzan ekstreleri esterleştirilerek 3 tekrarlı olarak GC-MS cihazında analiz edildi.

2014, 50 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: *Bryonia multiflora* Bois. ve Heldr. (Cucurbitacea), gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA), Cucurbitacin B, NMR, GC-MS ve FID.

ABSTRACT

Master of Science Thesis

Phytochemical Analysis and Determination of Anticancer Activity of *Bryonia multiflora*

Mesut GÖK

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

Supervisors: Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

In this study, *Bryonia multiflora* (Cucurbitacea) roots were extracted with n-heksane, EtOAc and methanol:chloroform (1:1). After the solvents evaporation, that we did column chromatography with methanol:chloroform (1:1) using n-Hexane, CH_2Cl_2, $CHCl_3$, EtOAc and MeOH solvents. After the column chromatography, the fractions obtained in ethyl acetate combined and evaporated for testing anti-cancer activity and separated again with flash chromatography. Therefore, the most active fractions were collected and combined using TLC and GC-MS. The goal compound of curbitacin B was isolated by the preparatif TLC, and defined by 1D and 2D NMR and HPLC-TOF/MS. Finally, the compound which is isolatied and defined, were applied to anticarcinogenic activity tests by Real Time Cell Analysis System. Besides the exctracts of the roots, stem, leaf and fruit of *B. multiflora* exctracted with n-heksane and esterificated and analyzed with GC-MS for three times.

2014, 50 pages

Key Words: *Bryonia multiflora* Bois. and Heldr. (Cucurbitacea), RTCA real time cell analysis system, Cucurbitacin B, NMR, steroid, GC-MS and FID.data

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bana tüm deneyimlerini ve bilgilerini aktarmanın yanı sıra maddi ve manevi olarak çok destek olan değerli danışmanım Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ'a, Bitkinin tanımlanmasında bana yardımcı olan sayın Doç. Dr. Tamer KEÇELİ'ye, Anti-kanser aktivite çalışmam için bana yardımcı olan Arş. Gör. Serkan KOLDAŞ'a, GC-MS çalışmalarında bana yardımcı olan Uzman Fatih Gül ve Yrd. Doç. Dr. Ayşe ŞAHİN YAĞLIOĞLU'na, Bilmediğim birçok konuda tecrübelerinden yararlandığım Uzman Ali Rıza TÜFEKÇİ'ye, NMR çalışmalarında ve aydınlatılmasına Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi'nde Uzman olan Hüseyin AKŞİT ve Özkan ŞEN'e, Bu çalışmamı maddi olarak destekleyen Çakırı Karatekin Üniversitesi BAP birimine(Proje No:2012/03) ve son olarak hiçbir zaman desteğini benden esirgemeyen ailemin her bir bireyine ve Abdurrahman ORHAN'a sonsuz saygı ve teşekkürleri bir borç bilirim.

Mesut GÖK
Çankırı, Ocak 2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **viii**
1. GİRİŞ **1**
1.1. *Bryonia multilflora* **1**
2. KAYNAK ÖZETLERİ **3**
2.1. *Bryonia* Türleri İle Yapılan Çalışmalar **3**
2.2. Sekonder Metabolitler **3**
2.3. Kukurbitasinler (Cucurbitacin) **5**
2.4. Yağ Asitleri **6**
2.5. Fitoterapi **8**
2.6. Fitoterapinin Tarihçesi **8**
2.7. Alternatif Tıp **9**
2.8. Hücre Kültürü **10**
2.9. Hücrelerin Saflaştırılması (İzolasyonu) **11**
2.10. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi **12**
2.11. Anova Varyans Analizi **12**
3. MATERYAL VE YÖNTEM **13**
3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Aletler **13**
3.1.1. Bitkisel materyal **13**
3.1.2. Kullanılan kimyasal çözücüler **13**
3.1.3. Dolgu maddeleri **13**
3.1.4. Belirteçler **13**
3.1.5. Yağ asitlerinin esterleştirilmesi **14**
3.1.6. Cihazlar **14**
3.1.7.GC-MS parametreleri **14**
3.2. Kromotografik Yöntemler **15**
3.3. Aktivite Testleri **16**
3.3.1. Anti kanser testi HeLa hücresi **16**
3.4.1 Bitki kökünden ekstrelerin çıkarılması işlemi **17**
3.4.2. Hekzan ile elde edilen ekstrelerin GC-MS analizi **17**
3.4.2. BM-MeOH-$CHCl_3$ ekstresinin flash kromotografisi **19**
3.4.3. *Bryonia multiflora* MeOH-$CHCl_3$ ekstresinin kolon kromatografisi **20**
3.4.4. Mgt-17 flash kromaografisi. **20**
3.4.5. Anti kanser aktivite testi sonrası yapılan işlemler **22**
4. BULGULAR **25**
4.1. Anti-Kanser Testleri **25**
4.1.1. Kolon kromatografisi ile elde edilen ekstrelerin anti-kanser aktiviteleri **25**
4.1.2.MGT-17'nin flash kromotografisi ile elde edilen ekstrelerin anti kanser testleri **28**
4.2. İzole Edilen Molekülün Yapı Tayini **31**
4.2.1. Cucurbitacin B molekülünün yapı tayini **31**

4.2.2.NMR spektrumları.....32
4.2.3. HPLC-TOF/MS analizi.....41
4.2.4. İnfrared analizi.....43
4.2.5. UV analizi.....43
4.3. *Bryonia multiflora* Bitkisinden Elde Edilen Heksan Ekstrelerinin GC-MS Sonuçları ve İstatiksel Değerlendirilmesi 44
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....46
5.1. İzole Edilen Cucurbitacin B Molekülünün Sonucu 47
5.2. GC-MS Sonuçlarının Değerlendirilmesi 47
KAYNAKLAR. 49
ÖZGEÇMİŞ.....51

SİMGELER DİZİNİ

Simge	Açıklama
A	Atık
APT	Attached Proton Test
B. multiflora	*Bryonia multiflora*
d	Dublet
dd	Dubletin dubleti
DEPT	Distortionless Enhancement byPolarization Transfer
F	Flash
GC-MS	Gaz Kromatografisi- Kütle Spektrometresi
İTK	İnce Tabaka Kromatografi
J	Etkileşme Sabiti
MS	Kütle Spektrometresi
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
RTCA	Real Time Cell Analyzer
s	Singlet
t	Triplet
TLC	Thin Layer Chromotografi
UV-VIS	Ultraviyole-Görünür Bölge
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Corralation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Corralation
HETCOR	Heteronuclear Corralation
COSY	Correlated Spectroscopy
EtOAc	etilasetat
MeOH	metanol
$CHCl_3$	kloroform
CH_2Cl_2	diklorometan

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Cucurbitacin A ve Cucurbitacin E 6
Şekil 2. 2. Cucurbitacin I ve Cucurbitacin S 6
Şekil 2. 3. Hücre kültüründe kullanılan inkübatörler 11
Şekil 2. 4. Gerçek zamanlı analiz sistemi 12
Şekil 3. 1. Ekstraksiyon ve saflaştırma şeması 17
Şekil 3. 2. B. multiflora bitki kökünün etil asetat ekstarksiyonu 18
Şekil 3. 3. Flash kromatografisi 18
Şekil 3. 4. MeOH-CHCl3 ekstresi kolon kromatografisi 20
Şekil 3. 5. Flash kromatografisinde fraksiyonların gösterilimi. 21
Şekil 3. 6. Birleştirilen maddelerin TLC'lerinin gösterilmesi 22
Şekil 3. 7. Headspace GC-MS FID Cihazı. 23
Şekil 3. 8. Yukarıdaki tlc'de ham ekstrakt MeOH-CHCl3, Mgt-18 ve elde edilen Cucurbitacin B'nin tlc karşılaştırılması 24
Şekil 4. 1. MGT-18 20000 C6 hücresi anti-kanser sonuçları 25
Şekil 4. 2. MGT-17 20000 C6 hücresi anti-kanser sonuçları 26
Şekil 4. 3. MGT-18 20000 HeLa hücresi anti-kanser sonuçları 26
Şekil 4. 4. MGT-17 20000 HeLa hücresi anti-kanser sonuçları. 27
Şekil 4. 5. 25000 HeLa hücresi B1 fraksiyonu anti-kanser sonucu 28
Şekil 4. 6. 25000 HeLa B40 fraksiyonu anti-kanser aktivitesi 28
Şekil 4. 7. Cucurbitacin B molekülünün anti-kanser aktivitesi 29
Şekil 4. 8. Cucurbitacin B bileşiğinin 5FU ile karşılaştırılması 50 µg/ml 29
Şekil 4. 9. Cucurbitacin B bileşiğinin 5-FU ile karşılaştırılması 100 µg/ml 30
Şekil 4. 10. Cucurbitacin B bileşiğinin 5-FU ile karşılaştırılması 250 µg/ml 30
Şekil 4. 11. DEPT ve 13C NMR spektrumları 33
Şekil 4. 12. 13C NMR spektrumu 214-110 ppm arası 34
Şekil 4. 13. 13C NMR spektrumu 83-15 ppm arası 34
Şekil 4. 14. Hetcor spekturumu-1 35
Şekil 4. 15.Cucurbitacin B molekülü proton değerleri ile birlikte gösterilmesi 36
Şekil 4. 16. Hetcor spektrumu-2 36
Şekil 4. 17. HMBC spekturumu 37
Şekil 4. 18. COSY spektrumu ve molekül üzerinde protonların etkileşimin gösterilmesi 38
Şekil 4. 19. Aromatik bölge 1H NMR spektrumu 39
Şekil 4. 20. Trans hidrojenlerin 1H NMR spektrumu 39
Şekil 4. 21. Alifatik bölge 1H NMR spektrumu 40
Şekil 4. 22.Cucurbitacin B HPLC kromotogramı 41
Şekil 4. 23.Cucurbitacin B HPLC-TOF/MS spektrumu 41
Şekil 4. 24. İnfrared spektrumu 43
Şekil 4. 25.Cucurbitacin B UV absorbansı 44
Şekil 4. 26. BM-Heksan kök ekstresi GC kromotogramı 44

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3. 1. GC parametreleri 14
Çizelge 3. 2. HPLC akış programı 15
Çizelge 3. 3.BM-MeOH-$CHCl_3$ flash kromotografisi 19
Çizelge 3. 4. Mgt-17 flash kromatografisi ile gelen fraksiyonlar 20
Çizelge 4. 1. Cucurbitacin B molekülünün NMR verileri 32
Çizelge 4. 2. GC-MS FID analiz tablosu 46
Çizelge 5. 1. B. multiflora heksan ekstrelerinin temel bileşiklerinin yüzde oranı. 47

1. GİRİŞ

1.1. Bryonia multilflora

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, biyolojik olarak aktif olan fitokimyasal doğal bileşikler (fenolik bileşikler, steroidler, karotenoidler ve E vitamini) insan ve hayvanlarda kronik hastalıkların oluşmasını önlediğini veya ilerlemesini geciktirdikleri görülmüştür. Dünyada kronik hastalıkların mevcut teknoloji ile beraber ilerlediği ve insanoğlunun da bu çizgide kronik hastalıkların çarelerini pek çok yönden değerlendirip, çözüm yolları aranmaktadır. Günümüzde kronik hastalıkların en başında kanser, kalp ve damar hastalıkları görülmektedir (Sabandar *et al.* 2013, Wang *et al.* 2013)

Dünyada her yıl binlerce insan kanser hastalığından hayatını kaybetmektedir (Yang *et al.* 2013). Bu hastalığın tedavisi için sentetik ilaçlara birey olarak ve ülke olarak milyonlarca dolar harcanmaktadır. Kanser ve pek çok hastalığın tedavisi sentetik ilaçların kullanılmasıyla sağlanabilmektedir. Fakat bu sentetik ilaçların yan etkileri kısa vadede sorun olmazken uzun vadede ciddi sorunlar teşkil etmektedir (Saeidnia *et al.* 2013). Günümüzde pek çok hastalığın tedavisi doğada yetişen bitkilerden elde edilen doğal bileşiklerden sağlanabilmektedir (Yang *et al.* 2014).

Ülkemiz bitki çeşitliliği yönünden çok zengindir. Bu zenginliği önemli kılan en önemli etken yıllardan beridir halk arasında tedavi amaçla kullanılabilir ve hala kullanılıyor olmasıdır. Güneydoğu Anadolu bölgesinde bulunan bitki çeşitliliğinin sunduğu sonsuz nimetlerden yararlanma ve değerlendirme yıllarca hem terör olaylarından hem de bilimsel çalışma yetersizliğinden dolayı sürekli askıda kalmıştır.

Zengin bir floraya sahip olan bu bölgenin önemi gün geçtikçe artmaktadır. Tedavi amaçlı kullanılan ve bu bölgede çoğu yerde yabani olarak yetişen *Bryonia multiflora* bitkisi bu zenginliğin en belirgin göstergesidir.

Cucurbitaceae (kabakgiller) familyasından olan, *Bryonia multiflora* Boıss. etheldr türü, Türkiye'nin, Batman, Hakkari, Mardin, Bitlis, Antalya, Burdur, Hatay, İçel, Kayseri ve Van illerinde bulunur. Halk arasında it kabağı veya şeytan şalgamı olarak bilinir. Genelde bağırsak ağrıları, mide sancılarını gidermek için kullanılmış olup daha önce bu bitki tespit edilmiş olmasına rağmen bununla ilgili olarak herhangi bir literatür çalışmasına rastlanmamıştır. Literatürde bu bitki ile ilgili bir çalışma olmaması bu bitkiyi araştırmaya değer kılmıştır. Bu bitkinin alt türleri ile ilgili birkaç makale mevcuttur. Bu makalelerden yola çıkarak bu bitkinin sekonder metabolitlerinin ayrılması, yapılarının belirlenmesi ve antikanser aktivitelerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. *Bryonia* Türleri ile Yapılan Çalışmalar

*Bryonia dioica'*nın romatizma hastalıklarına, kireçlenmeye ve ufak çaptaki yaralara iyi geldiği bazı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (González *et al.* 2008, González *et al.* 2010).

Black bryonia olarak bilinen, *Bryonia dioica, Lonicera periclymenum* L.*'nin* ormanlık alanlarda, çalılarda, meyve ve evlerin önündeki bahçelerde bulunduğu, insanlar için oldukça toksik etkisinin olduğu rapor edilmiştir (Rafael *et al.*2011*).*

Castroivejo'nun yaptığı çalışmada (2005) *Bryonia dioica'*nın meyvelerindeki ve kökündeki içeriğe bakıldığında zehir etkisinin triterpen glikozidlerden ve kalsiyum okzalat kristallerinden meydana geldiği tespit edilmiştir (Rafael *et al.* 2011).

*Bryonia dioica'*nın halk arasında ilaç olarak kullanılmasının yanı sıra, yeni filizlenmiş otsu bitkisi de yiyecek olarak kullanıldığı rapor edilmiştir (Martins *et al.*2011).

Black Bryonia ve *Bryonia dioica'*nın meyvelerinde ham ve olgunlaşmış meyve fenolik bileşikler, flavonoitler, askorbik asit, tokoferol ve likopen gibi antioksidan maddelerin bulunduğu ve fitokimyasal ve biyoaktivitesinin çok yüksek olduğu rapor edilmiştir (Martins *et al.* 2011).

2.2. Sekonder Metabolitler

Sekonder metabolitler, bitkinin ekosistemle olan ilişkisinde, çevresel koşullara uyumunda, savunma, korunma, hayatta kalma, nesillerini sürdürme gibi önemli olaylarda bitkiye çeşitli avantajlar sağlayan kimyasal maddelerdir. Bu avantajlar şu şekilde sıralanabilir; bitkiyi patojenlere karşı koruyan antibakteriyel, antifungal, antiviral; diğer bitkilere karşı doğal yaşamda rekabet gücünü artıran anti-germinatif ve

toksik maddeler; UV ışınları, tuzluluk, kuraklık gibi zararlı çevresel etmenlerin neden olduğu stres koşullarında direnç artırıcı metabolitler; zararlı hayvanlar ve otlara karşı korunmayı sağlayan insektisit, pestisit, molluskusit ve herbisitler; polinasyon ve tohum dağılımını sağlamak üzere hayvanları cezbedecek renkli ve güzel kokulu metabolitler bulunmaktadır (Bourgaud 2001, Sökmen, 2001).

Sekonder metabolit kavramı ilk olarak Kossel (1891) tarafından ileri sürülmüş ve bundan otuz yıl sonra Czapek (1921) birincil metabolitlerden modifiye olan bu metabolitleri "end produckt" (son ürün) terimi ile tanımlamıştır (Ramachandra 2002). Son yıllarda birçok endüstriyel alanda insan sağlığını tehdit edici sentetik ürünlerin yerini, doğal olan bitkisel sekonder metabolitler almıştır. Gıda sektöründe tatlandırıcı, kıvam artırıcı, renk ve koku verici birçok madde; kozmetik endüstrisinde parfüm ve kozmetik ürün (krem, tonik, maske), tarım alanında insektisit gibi kimyasallar; tekstilde kumaş boyamada kullanılan doğal boyalar çeşitli bitkisel kaynaklı bileşenlerden elde edilmektedir. Ayrıca, Dünya Sağlık Örgütü tarafından temel ilaçlar kapsamında ilan edilen 252 ilacın %11'i bitkisel sekonder metabolitlerden üretilmektedir. Bunlardan en yaygın olanları, *Salix* türlerinden izole edilen anti-piretik ve analjezik özelliği olan salisin (aspirin), *Taxus brevifolia*'dan elde edilen anti kanser etkisi olan taxol (paclitaxel) ve *Papaver sominiferum*'dan elde edilen güçlü analjezik, narkotik etkisi olan morfindir (Ramachandra 2002, Verpoorte 1999).

Sekonder metabolitlerin doğal koşullar altında bitkilerden elde edilmesi; genellikle çevresel koşullarda yetişen bitkilerin toplanmasının zor ve pahalı olması, bitkilerin doğadan toplanması sonunda bitki türlerinin zamanla soylarının tükenmesi, sekonder metabolit miktar ve kalitesinin çevresel ve iklimsel koşullardan etkilenmesi, belli gelişim evrelerinde ve çok az miktarda üretilmeleri gibi sorunlar nedeniyle zordur ve bu nedenle gün geçtikçe artan talep karşılanamamaktadır.

Sekonder metabolitler, birincil metabolizma yollarının ara ürünlerinden, özel metabolik yollarla üretilmektedirler ve genellikle biyosentez yollarına göre sınıflandırılırlar (Bourgaud 2001). Bu metabolitler, bitkiler tarafından çok az miktarlarda üretilirler ve

bazı bileşikler belirli türlere özeldirler. Çoğunlukla bitkilerin belirli organlarında, hatta belirli organların belirli hücrelerindeki belirli kompartımanlarda bulunurlar ve bitkinin belirli bir gelişim periyodu süresince üretilirler (Tolonen 2003).

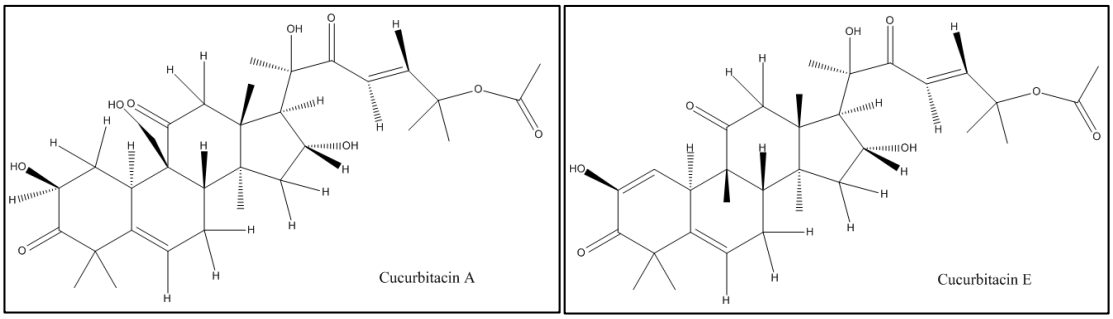
Sekonder metabolitler genel olarak 3 ana grupta incelenirler.

- ✓ Terpenler (Terpenoidler)
- ✓ Azot içeren alkaloidler ve Kükürt içeren bileşikler
- ✓ Fenolikler ve polifenolikler

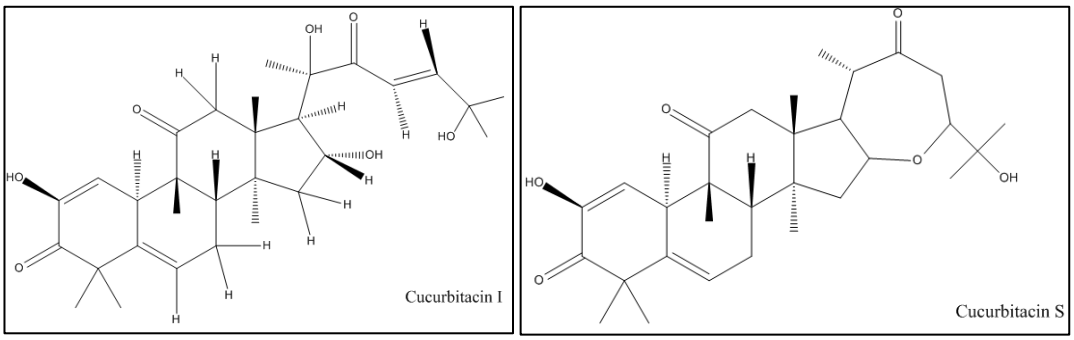
2.3. Kukurbitasinler (Cucurbitacin)

Kukurbitasinler, kabakgiller familyasına ait birçok bitkinin biyokimyasal bileşiğidir. Bal kabağı, su kabağı ve *Ecballium elaterium* (eşek hıyarı) gibi birçok bitkide bulunur (Baykut 1979, Gonzales 1968, Madhusudana 1974). Kukurbitasinlerin kimyasal sınıfı steroidler sınıfına girer. Genellikle kukurbitan olarak bilinen bir triterpenden türetilen kukurbitasinlerin spesifik özelliği beş ile altı numaralı karbonlar arasında bir çift bağının olmasıdır. Ayrıca kukurbitasinler genellikle bir glikozit gibi gözükür.

Kukurbitasinler genellikle bazı hayvanlar için toksik etkiye sahiptir, acımtırak bir tadı vardır. Kukurbitasinlerin A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, O, P, Q, R, S, T ve 28/29 nor-kukurbitasin gibi birçok çeşidi vardır. Anti-tümör aktiviteye sahip *Bryonia alba* bitkisi de kukurbitasinler içerdiği ve aktivitenin bu bileşiklerden kaynaklandığı belirlenmiştir. (Konopa 1966, Konopa et al. 1974). Halk arasında sinüzit tedavisinde kullanılan *Ecballium elaterium*'un sıvı kısmından kukurbitasin A, E ve I izole edilmiştir. (Gonzales 1966).



Şekil 2. 1. Cucurbitacin A ve Cucurbitacin E



Şekil 2. 2. Cucurbitacin I ve Cucurbitacin S

2.4. Yağ Asitleri

Kimya ve biyokimyada yağ asidi, genelde uzun, alifatik kuyruklu bir karboksilik asittir. Uzun karboksilik yağ asitlerinden 4 karbonlu ve daha uzun zincirlileri yağ asidi olarak sayılır; doğal yağları oluşturan yağ asitlerinden söz ederken ise bunların en az 8 karbonlu olduğu varsayılabilir. Çoğu doğal yağ asitlerinin çift sayılı karbon atomu vardır, çünkü bunların biyolojik sentezlerinde iki karbon atomlu asetat kullanılır. Yağ asitleri doymuş ve doymamış yağ asitleri olarak iki gruba ayrılır.

Doymuş yağ asitleri: Doymuş yağ asitlerinin zincirlerinde çift bağlar veya başka fonksiyonel gruplar bulunmaz. Kısacası karboksilik asit [-COOH] grubundaki karbon dışındaki diğer karbonların olabildiğince çok hidrojenle bağ kurmuş olduğu anlamını taşır.

Doymuş yağ asitleri

Butirik asit: $CH_3(CH_2)_2COOH$

Laurik asit: (dodecanoic acid): $CH_3(CH_2)_{10}COOH$

Miristik asit: (tetradekanoik asit): $CH_3(CH_2)_{12}COOH$

Palmitik asit (heksadekanoik asit): $CH_3(CH_2)_{14}COO$

Stearik asit: (octadecanoic acid): $CH_3(CH_2)_{16}COOH$

Araşidik asit: (eicosanoic acid): $CH_3(CH_2)_{18}COOH$

Doymamış yağ asitleri: Doymamış yağ asitleri benzer şekillidir, ancak zincir üzerinde bir veya daha fazla alken grubu vardır. Bir alken grubunda, bir "-CH_2-CH_2-" bağ yerine "-CH=CH-", yani birbirine çift bağla bağlanmış iki karbon vardır. Bir alken grubunun iki yanında ona bağlı olan karbon atomları ya cis ya da trans konumda olabilir.

Cis: Cis konumda bu iki komşu karbon, çift bağın aynı tarafındadırlar. Çift bağla birbirine bağlı atomlar bu bağın ekseni etrafında dönemediklerinden cis izomeri durumunda yağ asidinin zinciri bu noktada bükük olur ve zincirin hareket serbestisi azalır. Bir zincirde ne kadar çok cis konumlu çift bağ olursa zincirin esnekliği o derece azalır. Çok sayıda cis bağı olan yağ asitleri en serbestçe hareket edebildikleri bir ortamda oldukça eğri bir biçimleri olur. Örneğin, bir tane çift bağlı oleik asitte bir "köşe" bulunur; Linoleik asit iki çift bağıyla, belirgin bir eğriliğe sahiptir, Alfa linoleik asit ise üç cis bağından dolayı çengel görünümlü olmayı tercih eder. Hareket serbestisi olmayan ortamlarda, örneğin yağ asitleri lipit zarında fosfolipitlerin parçası veya yağ damlacıklarındaki trigliseritlerin parçası iken cis bağları olan yağ asitlerinin sıkı istiflenmelerine engel olur, bu da lipit zarının veya yağ damlasının erime sıcaklığını azaltır.

Trans: Trans konumda çift bağlı karbonlara komşu iki karbon çift bağın karşı taraflarında yer alırlar. Bu yüzden zincir fazla eğilmez ve bu tür yağ asitlerinin şekilleri doymuş yağ asitlerine benzerler. Doğada bulunan çoğu doymamış yağ asidinde her bir çift bağın ardından 3n sayıda karbon atomu vardır ve bu çift bağlar *cis* konumludur. *Trans* konumlu yağ asitlerinin hemen hepsi yapıdadır.

Doymamış yağ asitlerinin şekilleri arasındaki farklar, ayrıca doymuş ve doymamışlar arasındaki şekil farkları, biyolojik süreçler ve biyolojik yapıların (hücre zarları gibi) özelliklerini belirlemekte önemli rol oynarlar.

Doymamış Yağ asitleri:

Alfa-Linoleik asit:$CH_3CH_2\mathbf{CH=CH}CH_2\mathbf{CH=CH}CH_2\mathbf{CH=CH}(CH_2)_7COOH$
Linoleik asit: $CH_3(CH_2)_4\mathbf{CH=CH}CH_2\mathbf{CH=CH}(CH_2)_7COOH$
Araşidonik asit:
$CH_3(CH_2)_4\mathbf{CH=CH}CH_2\mathbf{CH=CH}CH_2\mathbf{CH=CH}CH_2\mathbf{CH=CH}(CH_2)_3COOH$
Oleik asit: $CH_3(CH_2)_7\mathbf{CH=CH}(CH_2)_7COOH$
Erusik asit: $CH_3(CH_2)_7\mathbf{CH=CH}(CH_2)_{11}COOH$
Alfa-linolenik asit omega 3 yağ asitleri örneklerindendir. Linoleik asit ve araşidonik asit omega-6 yağ asitleridir. Oleik ve erusik asit omega-9 yağ asitleridir.

2.5. Fitoterapi

Tıbbi bitkilerde tedavi anlamına gelen fitoterapi ilk kez Fransız hekim Henri Leclerc (1870-1955) tarafından kullanılmıştır (Faydaoğlu 2011). Geçmişteki fitoterapi uygulamaları ile günümüz arasında en büyük fark bitkilerin artık bütünüyle değil, faydalı ekstrelerin veya bitkilerden izole edilen maddelerle tedavi edilmesidir. Örneğin eskiden bir bitkinin uçucu yağından faydalanmak için onun çayı yapılıp içilirken şimdi o bitkideki uçucu yağ ekstre edilerek tek başına kullanılmaktadır. Bu da bitkinin diğer faydasız veya yan etkileri olabilen maddelerden hastayı uzak tutmayı sağlamaktadır (Faydaoğlu 2011, Sarışen 2005)

2.6. Fitoterapinin Tarihçesi

Bitki ekstrelerinin kullanılışına ilişkin ilk yazılı belge M.Ö. 3000'lere kadar gitmektedir. Mezopotamya bölgesindeki Sümer, Asur ve Akat gibi uygarlıklarda bitkisel ilaçların kullanıldığı bilinmektedir. Yine Çin ve Hint tıbbında da bitkilerin önemli bir yeri vardır.

Yunan tıbbının babası sayılan Hipokrat'ın kitabında bitkisel ürünlerden söz edilmektedir. İslam uygarlığında İbn Sina ve Al Gafini'nin bitkisel tıp konusunda önemli eserleri bulunmaktadır. İbn-i Sina "El Kanun fi'ttıbb" kitabında sağaltıcı bitkilerin tanıtımı ve kullanılışına geniş yer vermiştir.

20. yüzyılda kimya ve biyokimya alanındaki gelişmeler sonucunda bitkilere ilişkin toksikolojik, farmakolojik ve klinik çalışmalar yapılabilme imkânı doğmuş ve ilaç yapımında bu bitkilerden faydalanabilme imkânı artmıştır. Ayrıca bu bitkilerden elde edilen maddelerin izolasyonu ile tanımlanan maddeler sentez yoluyla taklit edilerek ilaçların kimyasal yoldan elde edilmiştir (Faydaoğlu 2011, Sarışen 2005).

2.7. Alternatif Tıp

Tamamlayıcı ve Alternatif tıp (TAT), birbirinden farklı bir çok terapiyi içine alan bir terimdir. Çağdaş tıp biliminin hastalık sebepleri ve tedavisi konusunda somut verileri olmadığı, hasta için henüz mevcut objektif ve kanıtlanmış bir tedavi yöntemi olmadığında hasta isteğiyle başlanılabilen veya çağdaş tıp tedavilerini destekleyici olarak hastanın rahatlaması, bağışıklık sisteminin güçlenmesi, psikolojisinin düzelmesi amacıyla uygulanabilen tedavi yöntemidir. Ayrıca alternatif tıp sayesinde yeni ilaçların keşfedilmesinde önemli bir araçtır (Dey and De 2012, Faydaoğlu 2011, Sarışen 2005). Alternatif eskinin yerine kullanılan anlamına da gelir, dolayısıyla bugünkü tıp eskinin yerine alternatiftir. Ayrıca bugünün tıbbı bütün eski tıbbı da bilir ve geçerliliğini sürdüren metotları hala uygular.

Tıp, asırlar önce, bugün "alternatif tıp" olarak tanınan şekilde yapılıyordu. Doktorlar, kendilerince hastalıkları muayene ediyor ve işe yarayabileceğini umduğu veya öğrendiği bitkiler, sular ve diğer maddelerle hastasını tedavi ediyordu. İnsanlığın bilgisi arttıkça ve yeni teşhis araçları (mikroskop, radyografi, manyetik rezonans, tomografi, elektron mikroskobisi, biyopsi, kan dışkı idrar tahlilleri vb.) bulundukça hastalıklar ve bu hastalıkların tedavisinde kullanılan yöntemler daha kapsamlı olarak geliştirildi. (Faydaoğlu 2011, Sarışen 2005).

2.8. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, Tek bir hücre veya hücrelerin doku ile bağıntısı olmadan laboratuvar şartlarında *(in vitro)* çoğalmasıdır. Hücre kültürleriyle yapılan çalışmalar günümüzde popüler araştırma konularında önemli bir kısmı oluşturmaktadır. Örneğin, kanser gibi çeşitli patolojik durumlarda belli bir maddenin etkilerini ya da bir hücre veya dokuda üretilen belli bir maddenin işlevlerini belirlemek amacıyla hücre kültürleri yapılabilmektedir. Canlı ortamda (*in vivo*) yapılamayan denemeler, belirli bir hücre hattından çoğaltılan hücrelerde *(in vitro)* laboratuvar şartlarında yapılabilir. (Berg 2002, King 2013).

Hayvansal hücre kültürü teknikleri 1900'lerin ortalarında laboratuvarda rutin olarak uygulanmaya başlanmış fakat asıl doku kaynaklarından ayrılan sürdürülebilir yaşayan hücre hatları kavramı 19. yüzyılda ortaya konmuştur (Berg 2002, King 2013).

1885'de Wilhelm Roux bir tavuk embriyosu nöral plağının bir kısmını ayırmış ve ılık bir tuzlu su çözeltisinde dokuyu birkaç gün yaşatarak doku kültürünün temellerini de atmıştır (Berg 2002, Konopa 1966).

Ross Granville Harrison, 1907 ve 1910 yıllarında yaptığı deneyleri doku kültürünün metodolojisini de belirleyerek yayımlamıştır (Berg 2002, Konopa 1966). 1913'te Carrelaseptik (steril) koşullar altında düzenli olarak beslenmeleriyle hücrelerin kültür ortamında uzun süre hayatta kalıp çoğalabildiklerini göstermiştir. (Konopa 1966).

2.9. Hücrelerin Saflaştırılması (İzolasyonu)

Hücreler dokulardan hücre dışı (*ex vivo)* olarak birkaç günde saflaştırılabilir, ayrıştırılabilir. Tek çekirdekli hücreler, hücre dışı maddeyi bozan kollajenaz, tripsin ya da pronaz gibi enzimatik sindirim yapan enzimler tarafından yumuşak dokulardan salınabilirler. Farklı olarak, doku parçaları büyüme ortamına (besiyeri) konulabilir ve hücreler bu şekilde "kültüre edilmiş" olur. Hücreler, "birincil kültür" olarak adlandırılan

yöntemle doğrudan kültüre edilebilmektedir. Tümörlerden kaynaklanan bazı istisnalar hariç, çoğu birincil hücre kültürünün sınırlı yaşam süresi vardır. Çoğalan hücrelerin önemli bir miktarı (özellikle kanser kökenli olmayanlar), kültürün ilerleyen zamanlarında yaşlanma ve bölünmenin durması gibi süreçlere girer; bu hücreyi canlılıktan alıkoyar. Belirlenmiş ya da ölümsüzleştirilmiş bir hücre hattı, rastgele bir mutasyonla veya talomeraz geninin yapay ifadesi gibi bilinçli değişimlerle süresiz çoğalma yeteneğine kavuşabilir. Özel hücre tiplerinin iyi belirlenmiş hücre hattı örnekleri oldukça çeşitlidir. Hücreler uygun bir sıcaklık ve gaz karışımıyla (hayvan hücreleri için 37 derece ve %5 CO_2 içeren) inkübatörde geliştirilebilir ve sürdürülebilir (King 2013).



Şekil 2. 3. Hücre kültüründe kullanılan inkübatörler

2.10. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi

Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi prensip olarak mikro elektronik hücrelerden geçen akımın değişiminin hücrelerle paralel olarak miktarını ölçen bir cihazdır. Yani buradaki her bir mikro hücreye sabit bir akım gönderilir, bu akım ise canlı hücrelerin bu mikro hücrelere yapışması ile akımı değiştirir, hücre sayısı artıkça akım azalır, bu azalmaların miktarına göre bilgisayar programları aracılığı ile yorumlanabilir duruma getiren bir cihazdır (Ebru and Scherthanc 2010).



Şekil 2. 4. Gerçek zamanlı analiz sistemi

2.11. Anova Varyans Analizi

ANOVA bağımsız değişkenlerin kendi aralarında nasıl etkileşime girdiklerini ve bu etkileşimlerin bağımlı değişken üzerindeki etkilerini analiz etmek için kullanılır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Aletler

3.1.1. Bitkisel materyal

Proje kapsamında *B. multiflora* bitkisi 2011 Temmuz ayında. Batman'ın Gercüş ilçesinin, Kozlu köyünde (37º38'21" Kuzey, 41º22'10" Doğu 862 m) toplandı. Toplanan bitkinin tür teşhisini Doç. Dr. Tamer KEÇELİ tarafından yapıldı. Ankara üniversitesi herbaryumun'da 50534 herbaryum numarası ile kayıt edildi. Bu bitkiler kuru ve güneş ışığının girmediği depolarda kurutuldu.

3.1.2. Kullanılan kimyasal çözücüler

Bu çalışmada metanol, hekzan, aseton, kloroform, diklorometan, etil asetat, dietileter, etanol kullanıldı. Bütün çözücüler literatürde yer alan destilleme sistemine göre saflaştırıldı.

3.1.3. Dolgu maddeleri

Silikajel (Merck 60-230 mesh), Silikajel İTK tabakaları F_{254}(20x20), Alimüna İTK tabakaları Merck (20x20), Redisep flash column-12 g silica, RediSep flash column-24 g silica.

3.1.4. Belirteçler

Lekelerin Belirlenmesi: UV lambası ile 254 ve 366 nm'de. Serik sülfat belirteci (12 g amonyum seryum (IV) sülfat 50 mL derişik sülfürik asit ve 450 mL destile su hazırlandı. Püskürtmeden sonra 105-110 °C'de birkaç dakika ısıtılır.

3.1.5. Yağ asitlerinin esterleştirilmesi

10 µg/mL lik hazırlanan yağ asitleri ekstresinden 3 mL alınıp bir tüpe aktarıldı. Üzerine 5 mL 1 M KOH çözeltisi (metanol'de çözülmüş) eklendi ve çalkalandı. Bu tüpte faz oluştu. Üst faz dikkatli bir şekilde alındı, mikrofiltre ile viale süzülerek GC-MS cihazına verildi. Tüm yağ asitleri bu yöntemle hazırlandı.

3.1.6. Cihazlar

GC-MS: Agilent 5975 C MSD-7890A-GC
HPLC-TOF/MS: Agilent TOF 6210
Döner buharlaştırıcı: IKA
FTIR-ATR: PerkinElmer spektrum-100
Flash kromatografisi: Teledyne Isco-CombiflashRf
Gerçek Zamanlı Hücre Analiz: Roche marka singleplate modeli
UV spektrofotometresi: Rayleigh marka- UV 2601 modeli
NMR : Bruker marka-Avance III 400 MHz ^{1}H ve 100 MHz ^{13}C

3.1.7.GC-MS parametreleri

Hidrokarbonları analiz için Agilent 5975 C MSD-7890-GC serisi kolon HP-5MS 5% Phenyl Methyl Silox 325 °C: 30 m x 250 µm x 0.25 µm, taşıyıcı gaz olarak Helyum kullanıldı. Enjeksiyon hacmi ve sıcaklığı 1µl, 250 ºC, split oranı 25:1, dedektör ve voltajı FID, 1.176471 kV şartlarında toplamda 61 dakikalık bir programla verildi.

Çizelge 3. 1. GC parametreleri

Zaman (dakika)	Sıcaklık artış miktarı ºC/dk	Kolon Sıcaklığı ºC
4	0	120
26.66	3	200
10	0	200
5,33	15	280
15	0	280

3.1.8. HPLC TOF/MS parametreleri

Analiz için Agilent HPLC-TOF/MS 6210 serisi ile yapıldı. Enjeksiyon hacmi 5 mikrolitre ve pozitif mod'da verildi. Hareketli faz olarak %1'lik formik asit çözeltisi (Çözücü A) ve asetonitril (Çözücü b) (Merck, HPLC grade). Kolon olarak ZORBAX SB-C18 4.6 mm IDx250 mm (5 μm) ve dedektör olarak TOF/MS kullanıldı.

Çizelge 3. 2. HPLC akış programı

Akış hızı (mL/dk)	Zaman (dakika)	Çözücü A %1'lik Formik asit çözeltisi	Çözücü B Asetonitril
0.6	0-1	90	10
0.6	1-20	50	50
0.6	20-23	20	80
0.6	23-25	90	10
0.6	25-30	90	10

3.2. Kromotografik Yöntemler

Kolon Kromatografisi Kuru tatbik: Numune 50-100 ml çok iyi çözündüğü bir çözücü içinde çözülmüştür. Çözelti, kolondaki dolgu maddesi ve tatbik edilecek numune miktarları da göz önünde tutularak, yeterli miktarda dolgu maddesi ile karıştırılmıştır. Dolgu maddesi çözeltiyi iyice tutunması ve tam kuruması sağlanmıştır. Daha önce hazırlanan ve üzerinde 1-3 cm çözücü bırakılan kolona kuru olarak aktarılmıştır. Kolon musluğu açılarak çözücü sisteminin fazlasının boşaltılması ve kolon dolgu maddesinin tam oturması sağlanmıştır. Kolonun üzerine, dolgu maddesi yüzeyinin bozulmasını engellemek için pamuk yerleştirilmiş ve kolona yeterli miktarda çözücü sistemi eklenerek elüsyona başlanmıştır.

3.2.1. Flash kromatografisi kolonlarının hazırlanması

Flash kolonu hazırlanırken silikajele emdirilmiş olan numuneler katı numunelerin konulması için tasarlandı, kolondan bağımsız kolon boyutlarında olan plastik boş kolona iyice istiflenerek konuldu. Sonra hazırlanan bu plastik kolon yerine yerleştirildi. 12 g'lık redisep silika kolonlar için flow Rate 30 mL/ dakika, 24 g'lık kolonlar için ise 35 mL/dakika olarak cihaz otomatik olarak ayarlandı. Ayrıca kolon başlatılmadan önce çözücü ile kolon şartlandırıldı, daha sonra air purge 0.0 min olarak ayarlandı. Dalga boyları olarak 280 nm ve 360 nm ve ayrıca tüm dalga boyları seçilerek, flash kromatografisi uygulandı. Flash kromatografisi ile yapılan tüm kolonlar aynı şartlarda yapıldı.

3.3. Aktivite Testleri

3.3.1. Anti kanser testi HeLa hücresi

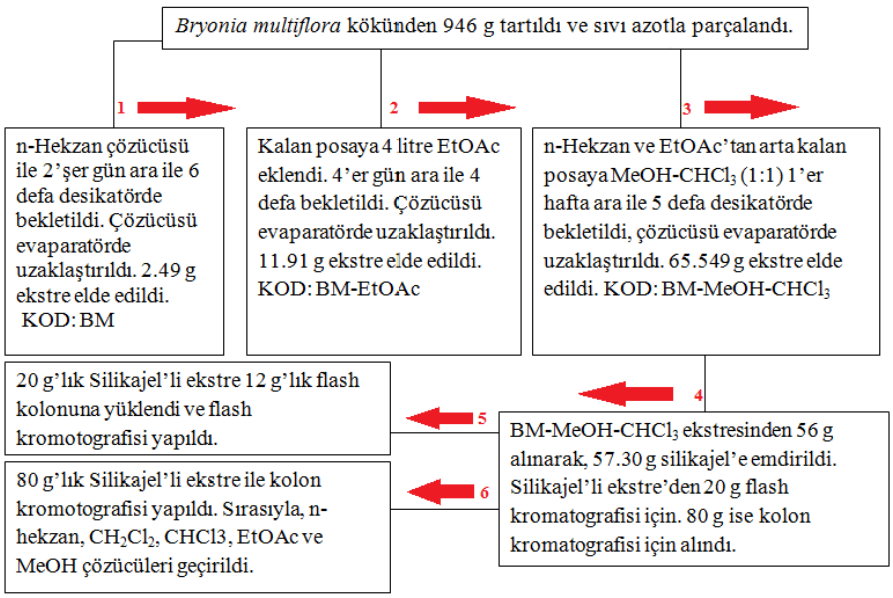
Besi yeri olarak % 10 fetal bovine serum ve % 2 streptomisin-penisilin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) kullanılmış ve analizler inkübatör içinde (% 5 CO_2, % 100 nem) 37 ºC'da yapıldı. İlk olarak kuyucuklara 50 µL besi yeri konulan E-Plate 96 15 dk. steril kabinde ve 15 dk. inkübatörde bekletildi ve sonrasında inkübatör içindeki istasyona yerleştirildi ve arka plan (background) okuması yapıldı. Sonrasında kuyucuklara her bir kuyucukta $2{,}5x10^4$ adet HeLa hücresi olacak şekilde 100 µL hücre süspansiyonu koyuldu. Bundan sonra plaka yarım saat steril kabinde ve oda koşullarında bekletilerek hücrelerin kuyucuk tabanına yerleşmesi beklendi. Bu plaka istasyona yerleştirilerek 80 dk. boyunca 10 dakika aralıklarla ölçüm yapıldı. Bu sürede hücreler kuyucuk tabanına yerleşerek normal büyüme periyoduna girdi. Daha sonra istasyondan çıkarılan plakanın kuyucuklarına steril DMSO ve besi yeri kullanılarak hazırlanan ekstre çözeltilerinden kuyucuklardaki son derişimler 500, 250, 100 ve 50 µg/mL olacak şekilde çözeltiler eklenmiş ve sonrasında besiyeri ile kuyucuklardaki son hacim 200 µL'ye tamamlandı. Eklemelerden sonra plaka derhal istasyona yerleştirildi ve 48 saat boyunca 10 dakika aralıklarla analiz gerçekleştirildi. Testler üçer tekrarlı yapıldı ve grafikler standart sapma çubukları ile verildi.

3.4.1 Bitki kökünden ekstrelerin çıkarılması işlemi

Bitkinin gövde ve yaprak kısımları gölgede, nemsiz ortamda kurutulduktan sonra 80 şer gram alınarak 500 mL'lik balona konularak 450 mL destile hekzan ilave edildi. 2'şer hafta, 3 defa bekletildi. Çözücüsü evaparatörde uzaklaştırıldı. Ekstreler sırasıyla gövde 30 mg, yaprak 160 mg olarak tartıldı. Bitkinin meyve kısmı da gölgede ve nemsiz ortamda kurutuldu. 374 g 5 Litrelik balona konuldu. 3,8 litre hekzan ilave edildi. 2 şer hafta, 3 defa bekletildi. Çözücüsü evaparatörde uzaklaştırıldı. Meyve 260 mg elde edildi. Bitkinin kök kısmından elde edilen hekzan ekstresi ise Şekil 3.1. deki yöntemle elde edilmiştir.

3.4.2. Hekzan ile elde edilen ekstrelerin GC-MS analizi için hazırlanması

Hekzan ile muamele edilen kök, gövde, yaprak ve meyve ekstrelerinden 10 mg/mL'lik stok çözeltilerden 3'er mL alındı. 5 mL 1M KOH çözeltisi (metanol)'de eklenerek esterleştirildi. Esterleştirme işleminden sonra üst faz enjektörle alınarak, 0,45 µm'lik filtre ile viallere süzüldü ve GC-MS cihazına verildi. Tüm bu işlemler, bitkinin kök, gövde, yaprak ve meyvelerin hekzan ekstreleri için ayrı ayrı 3 tekrarlı olarak yapıldı.



Şekil 3. 1. Ekstraksiyon ve saflaştırma şeması



Şekil 3. 2. *B. multiflora* bitki kökünün etil asetat ekstarksiyonu



Şekil 3. 3. Flash kromatografisi

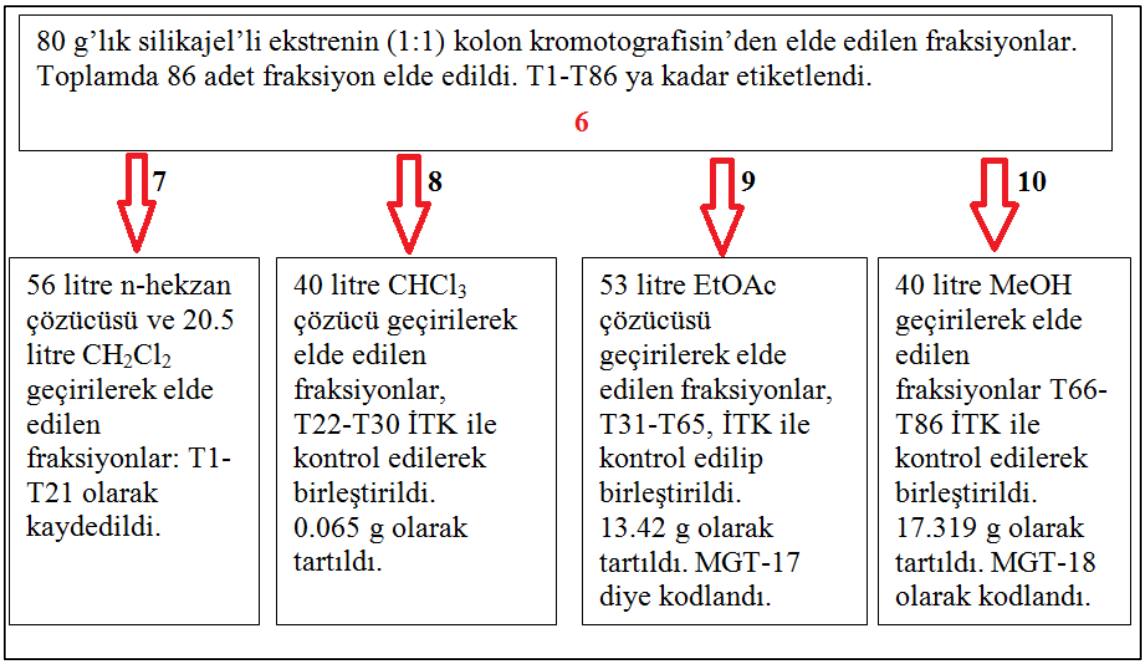
3.4.2. BM-metanol-kloroform ekstresinin flash kromotografisi

BM-MeOH-$CHCl_3$ ekstresinden silikajel-madde 20 g (1:1) alınarak 12 g Flash kolonuna yüklendi. flow rate 30 mL/dk ve treshold 0,02, 200-780 nm'de arasındaki tüm maddelerin toplanması için ayarlandı ve flash kromotografisi yapıldı. Kromotografi sonrası çizelge 3.1.'deki fraksiyonlar elde edildi.

Çizelge 3. 3.BM-MeOH-CHCl3 flash kromotografisi tablosu

Çözücü Sistemi	Atık ile gelen fraksiyonlar	Racklarda toplanan fraksiyonlar
Heksan	A3-A68	[1-17]
$CHCl_3$-heksan (5:95)	A68-A74	
$CHCl_3$-heksan (10:90)	A75-A78	
$CHCl_3$-Heksan (25:75)	A79-A102	
$CHCl_3$-Heksan (50:50)	A103-A122	
$CHCl_3$-Heksan (75:25)	A123-A137	[18-23]
$CHCl_3$	A138-A145	
Heksan	A146-A149	
EtOAc-Heksan (25:75)	A150-A153	[23-24]
EtOAc-Heksan (50:50)	A154-A160	[25]
EtOAc -Heksan (75:25)	A161-A168	[26-37]
EtOAc	A169-A231	[38-104]
EtOAc-MeOH (95:5)	A232-A266	[105-126]
EtOAc-MeOH (91:9)	A267-A273	
EtOAc-MeOH (90:10)	A274	
EtOAc-MeOH (80:20)	A275	
EtOAc-MeOH (70:30)	A276	
EtOAc-MeOH (60:40)	A277	
EtOAc-MeOH (50:50)	A278	
EtOAc-MeOH (40:60)	A279	
EtOAc-MeOH (30:70)	A280	
EtOAc-MeOH (20:80)	A281	
EtOAc-MeOH (10:90)	A282-A283	
EtOAc-MeOH (95:5)	A284	
MeOH		

3.4.3. *Bryonia multiflora* MeOH-$CHCl_3$ ekstresinin kolon kromatografisi



Şekil 3. 4. MeOH-$CHCl_3$ ekstresi kolon kromatografisi

3.4.4. MGT-17 Flash Kromotografisi

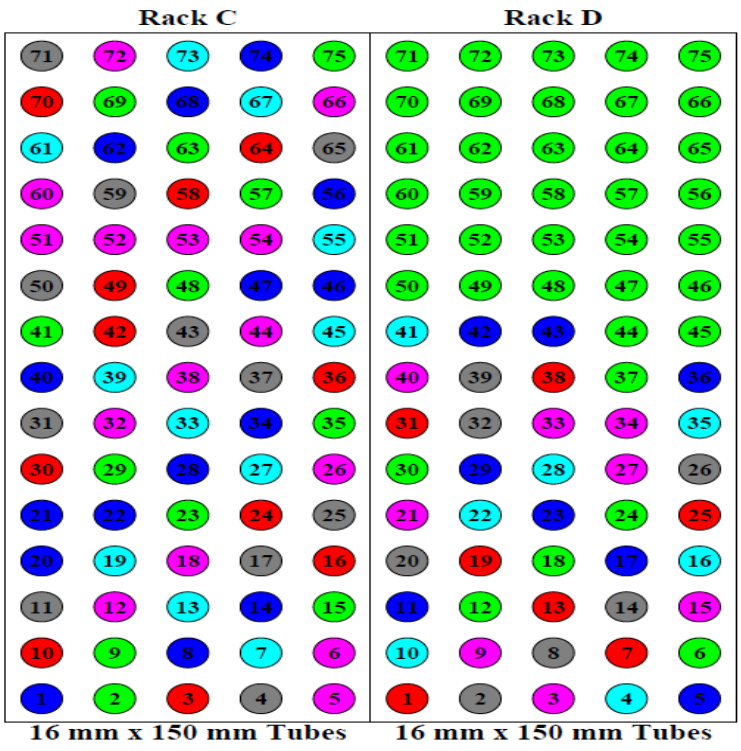
Şekil-4.1,4.2,4.3,4.4'teki anti-kanser grafiğine göre MGT-17 ekstraktının anti-kanser aktivitelerinin daha iyi olmasından dolayı, flash kromatografisi ile izole etmek için MGT-17 ekstresi seçildi. 13.442 g MGT-17, 13.40 g silikajele emdirildi. Sonra çözücüsü çektirilip kurutuldu, 24 gramlık silikajelli flash kolonu, çözücü akış hızı 35 mL/dk'lık program ayarlandı ve kromatografik izole edilmeye başlandı.

Çizelge 3. 4. MGT-17 flash kromatografisi ile gelen fraksiyonlar

Çözücü Sistemi	Fraksiyonlar (atıklar)	Fraksiyonlar (UV dedektörü)	Program süresi Flow rate 35 mL/dk Dalga Boyu
Hekzan	B1-B19	C1-C359	299.8 dakika
CH_2Cl_2-Hekzan (5:95)	B-20 ilk 50 dakika		50 dakika
CH_2Cl_2-Hekzan (20:80)	B21-B23	C360-C874	325 dakika
CH_2Cl_2-Hekzan (20:80)	B24-B26	C875-C1414	325 dakika
CH_2Cl_2	B27-B32	C1415-C1581	299.8 dakika
CH_2Cl_2-$CHCl_3$ (10:90)	B33-B37	C1582-C1638	299.5 dakika

Tablo 3.2. nin devamı			
%100 $CHCl_3$	B38	C1639-C2178	300 dakika
%100 EtOAc	B39	C2179-C2754	314.8 dakika 254 nm-283 nm
MeOH- EtOAc (10:90)	B40	C2180-C2280	160 dakika 260 nm-268 nm
MeOH- EtOAc (20:80)	B40	C2281-C2283	299.8 dakika 270 nm- 280 nm
MeOH- EtOAc (25:75)	B40	C2284-C2302	165 dakika 250 nm-270 nm
MeOH- EtOAc (40:60)	B41	C2303-C2370	300.2 dakika 268 nm-270 nm

12 defa flash kromatografisi yapıldı. Flash kromotografisi ile racklarda UV absorbansına göre toplanan tüpler Şekil 3.5.'te gözüken data'yı vermektedir. Şekil 3.5.e göre aynı renkteki tüpler, aynı dalga boyunda gelen maddelerdir buna göre aynı renklerde olan tüpler birleştirildi. Aynı renklerde olmayan tekli tüplerde kendi aralarında birleştirildi. Daha sonra birbirine benzer tüpler İTK ile kontrol edilip birleştirildi.



Şekil 3. 5. Flash kromatografisinde tüplerin gösterilimi.

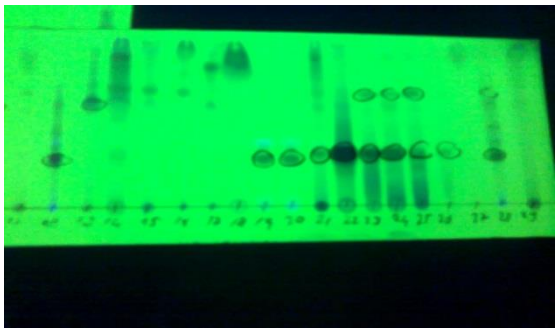
3.4.5. Anti kanser aktivite testi sonrası yapılan işlemler

Gerçek Zamanlı Analiz Sistemi (RTCA) ile anti kanser aktiviteleri yapıldı. B-40 antikanser aktivite testleri sonucunda aktiviteye rastlanmadı.

B1 fraksiyonun antikanser aktivite gözlendi (Şekil 4.5.) Aktivite gözlenmesinden ötürü öncelikle İTK (12:76:5) çözücü sisteminde yürütüldü UV-254, 366 nm de ve serük sülfat kullanılarak kontrol edildi. Serük sülfat belirteci püskürtülüp ısıtıldıktan hemen sonra İTK üzerinde 2 adet mor renk leke gözlendi, bu renklerin steroidlere özgü olduğu düşünülerek benzer fraksiyonlar birleştirildi.

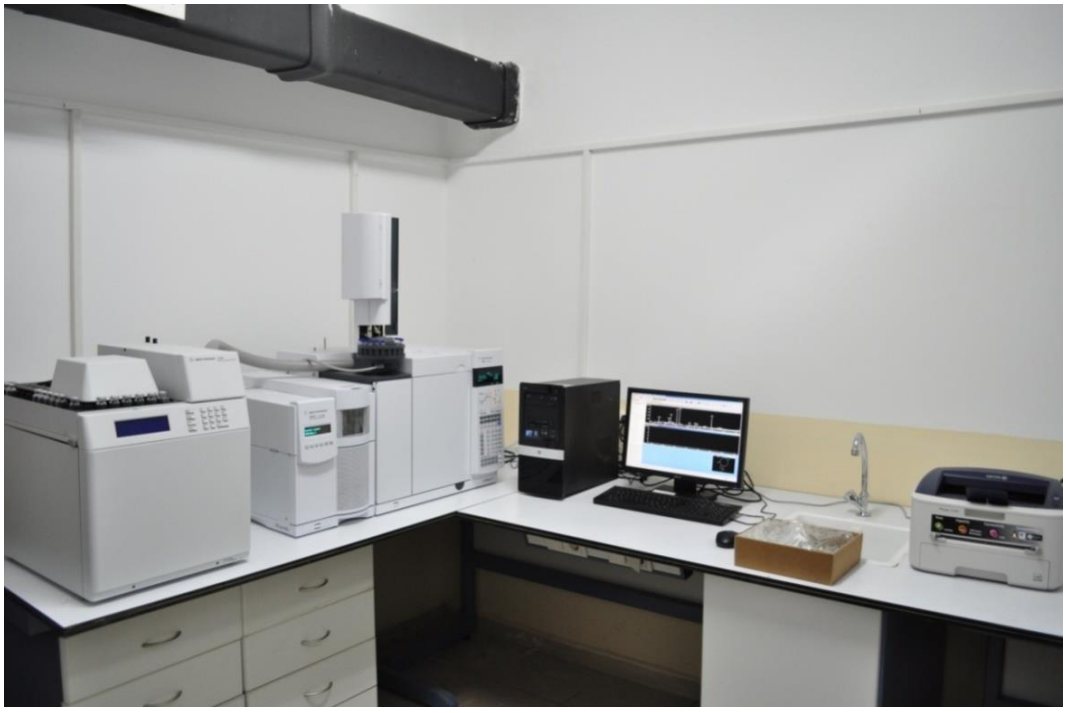
İTK'ya yüklenen maddeler n-hekzan-EtOAc-MeOH (12:76:5) çözücü sisteminde yürütüldü. UV-254 ve 366 nm de gerektiğinde serik sülfat kullanılarak kontrol edildi.

B1-B5, B6-B9 ve B10-B19'a ayrı olarak birleştirildi. Birleştirilen bu tüp'ler kendi aralarında tekrar İTK ile takip edildi. UV lambası 254 ve 366 nm'de kontrol edildi sonra serik sülfat belirteci kullanılarak ısıtıldı aynı hizada 2 adet mor leke tespit edildi. Bu mor lekelerin tüm fraksiyonlar da ve steroid'lere özgü lekeler gözlenmesi bu maddelerin preparatif İTK ile alınabileceğini düşündürmüştür.



Şekil 3. 6. Birleştirilen maddelerin İTK'larının gösterilmesi.

Ayrıca bu birleştirilen tüpler analiz amaçlı olarak, BK kodu ile GC-MS cihazına verildi GC-MS analizi sonucunda; yağ asitleri, cucurbitacin B, lacholesta, ve stigmasterol gibi steroidler gözlendi fakat tanımlanan moleküllerin yüzdesinin düşük olmasından ötürü bu sonuçlar dikkate alınmayarak İTK'da gözlenen mor renk veren lekelerin hedeflenerek saflaştırılmaya gidilmiştir.



Şekil 3. 7. Headspace GC-MS cihazı.

Mor renk veren tüplerin saflaştırmak için yeterli olmamasından ötürü BM-EtOAc ekstresi ile karşılaştırıldı, benzer maddelerin bu ekstrede de olduğu İTK ile belirlendi. Bundan dolayı 11.91 g etil asetat ekstresi ile aşağıdaki işlemler uygulandı. Ayrıca İTK preparatif olarak daha iyi ayırmak için, yeni bir çözücü sistemi belirlenerek işleme başlandı.

BM- EtOAc ile alınan kısım öncelikle eterde çözündü.

ETERDE ÇÖZÜNMEYEN

Diklorometan ile çözülen kısım alındı, GC-MS analizi yapıldı. cucurbitacin B ve lacholesta steroidleri tespit edildi. m.steroid-1 olarak kaydedildi.



Şekil 3. 8. Yukarıdaki İTK'da ham MeOH-$CHCl_3$ ekstraktı, Mgt-18 ve elde edilen Cucurbitacin B'nin tlc'de karşılaştırılması

ETERDE ÇÖZÜNEN

Eterde çözünen kısım alındı. GC-MS analizi yapıldı. Bu fazda steroidler tespit edildi, fakat kütüphane taramasında sonuçların çelişkili olmasından dolayı saflaştırmaya gidilmiştir. Eter ile alınan ekstre 5.5 g olarak tartıldı, m.steroid-2 diye kaydedildi. Son olarak İTK yardımıyla cucurbitacin B olan (serik sülfat ile mor leke veren) ekstreler, m.steroid 1-2 BK, B20, fr C360-C874, fr C1433-C1489, A154-155-156, A-159, kısımları birleştirildi, çektirildi ve 11.2 g olarak tartıldı D diye kodlandı. İTK yapılarak en uygun çözücü sistemi belirlendi. D karışımı %100 $CHCl_3$ ile çözüldü 20x20 lik Merck İTK plakalara ekstre yüklendi ve $CHCl_3$+MeOH (95:5) çözücü sistemi ile yürütüldü. Daha önce n-hekzan-EtOAc-MeOH (12:76:5) çözücü sistemini kullanılmamasının nedeni, kazımış olduğumuz bandı tekrar yürüttüğümüzde birden fazla maddenin gözlenmesi, bundan dolayı bu sistem preparatif İTK'de kullanılmadı.

Hedef molekülü bulmak için serik sülfat belirteci püskürtüldü (105-110 °C) ısıtıldı, mor renk veren en üstten 4. sırada olan banttın mor renk verdiği tespit edildi. 4. sıradaki kazılarak çoğaltıldı. Sonra bu madde referans alınarak plakalar yürütüldü. Hedeflenen bant kazındı. Yaklaşık olarak 48 adet 20x20 TLC plakası kullanılarak 42.5 mg madde elde edildi. MGK diye kodlandı. Bu maddeden 22 mg NMR için, 10.5 mg antikanser için 3 mg ise IR ve erime noktası tayin cihazında harcandı. 7 mg arttı ve uygun koşullarda ependofta saklandı.

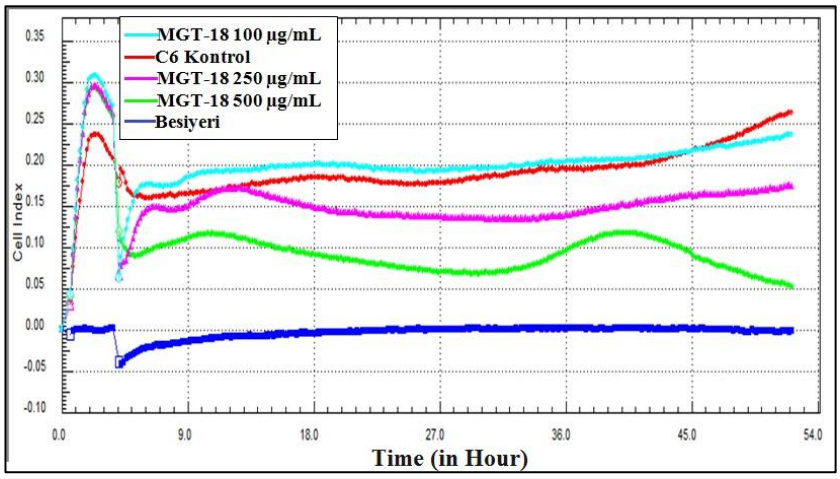
4. BULGULAR

4.1. Anti-Kanser Testleri

4.1.1. Kolon kromatografisi ile elde edilen ekstrelerin anti-kanser aktiviteleri

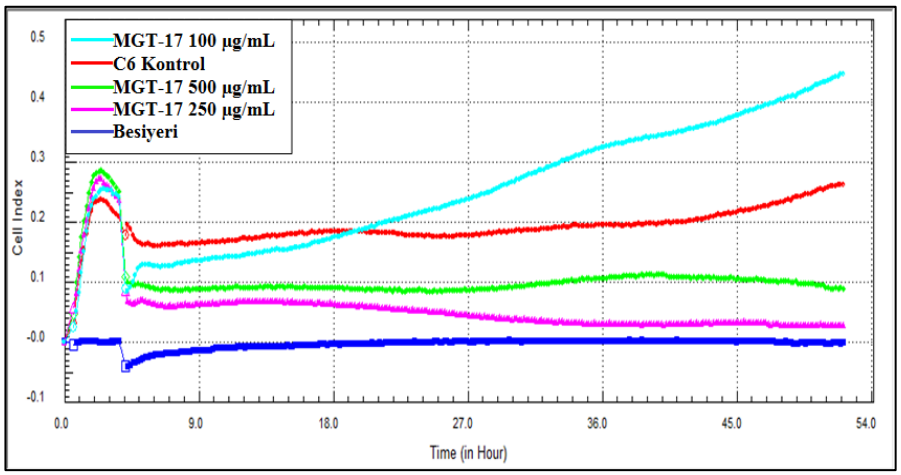
Kolon kromatografisi ile elde edilen MGT-17 ve MGT-18'e anti kanser testler yapıldı. sonuçlar aşağıdadır.

Şekil 4. 1. incelendiğinde, MGT-18 ekstresinin doza bağlı olarak aktivitesinde bir artış gözlenmekle birlikte, kontrolle kıyaslandığında C6 hücrelerine karşı ılımlı aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.



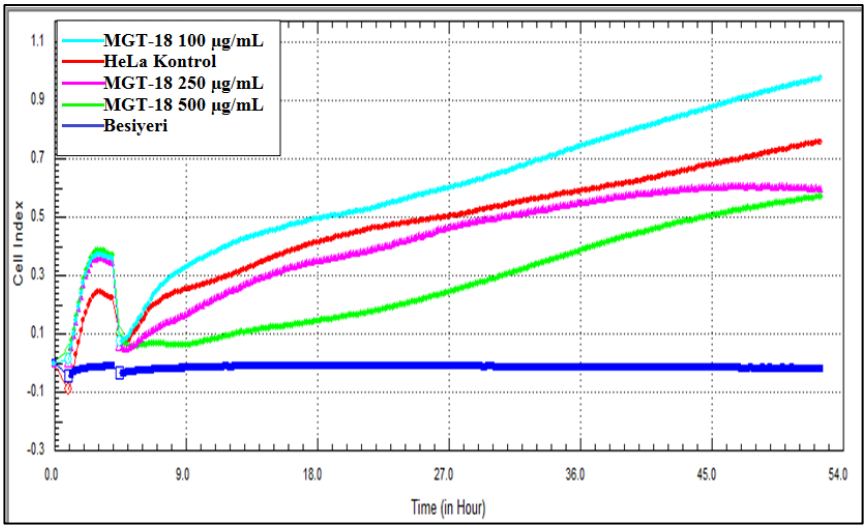
Şekil 4. 1. MGT-18 C6 hücresi anti-kanser sonuçları

Şekil 4.2'e deki grafiğe göre, MGT-17 ekstresinde 100 µg/mL konsantrasyonunda C6 hücresini artırdığı gözlenmekte, 500 µg/mL konsantrasyonda ise orta bir aktivite gözlenmektedir.



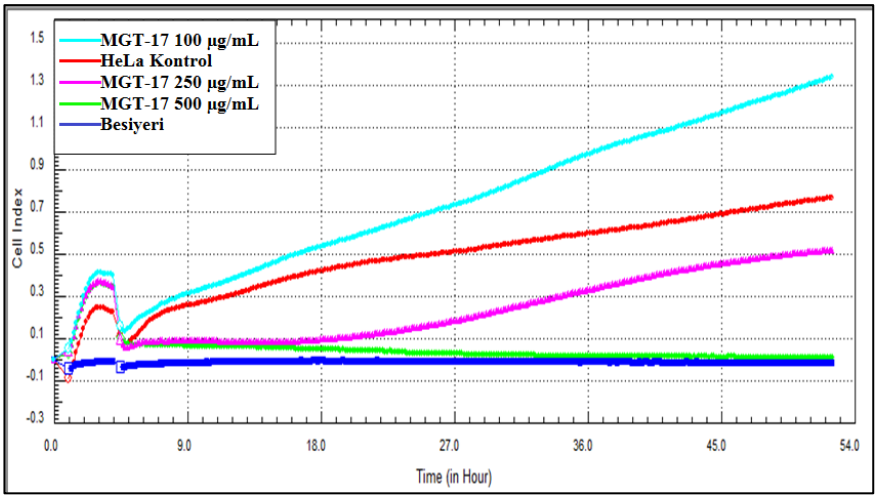
Şekil 4. 2. MGT-17 C6 hücresi anti-kanser sonuçları

Şekil 4. 3. incelendiğinde, MGT-18 ekstresinin doza bağlı olarak aktivitesinde bir artış gözlenmekle birlikte, kontrolle kıyaslandığında HeLa hücrelerine karşı 500 µg/mL konsantrasyonda ılımlı aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil 4. 3. MGT-18 HeLa hücresi anti-kanser sonuçları

Şekil 4. 4. incelendiğinde, MGT-17 ekstresinin doza bağlı olarak aktivitesinde bir artış gözlenmekle birlikte, kontrolle kıyaslandığında HeLa hücrelerine karşı 500 µg/mL konsantrasyonda çok yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

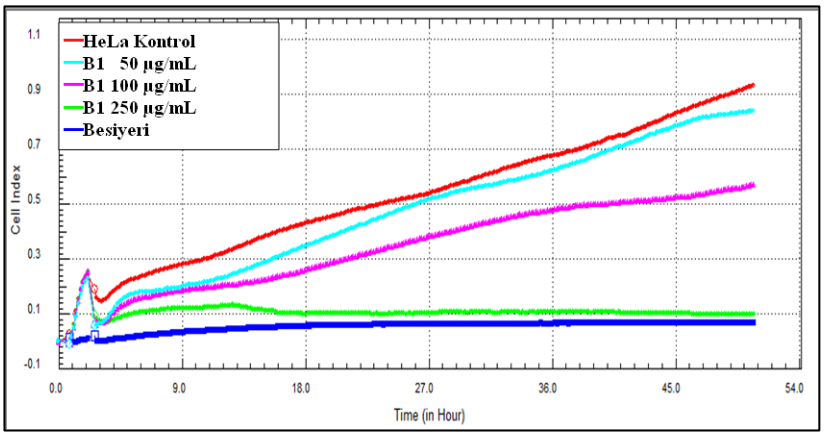


Şekil 4. 4. MGT-17 HeLa hücresi anti-kanser sonuçları.

Anti-kanser test sonuçlarına göre MGT-17 ekstresinin, C6 ve HeLa kanser hücrelerine aktivitesinin MGT-18 ekstresine göre daha iyi olduğu gözlendi. Bir sonraki ayırma işlemine aktivite bakımından yüksek olan MGT-17 ekstresi ile devam edildi.

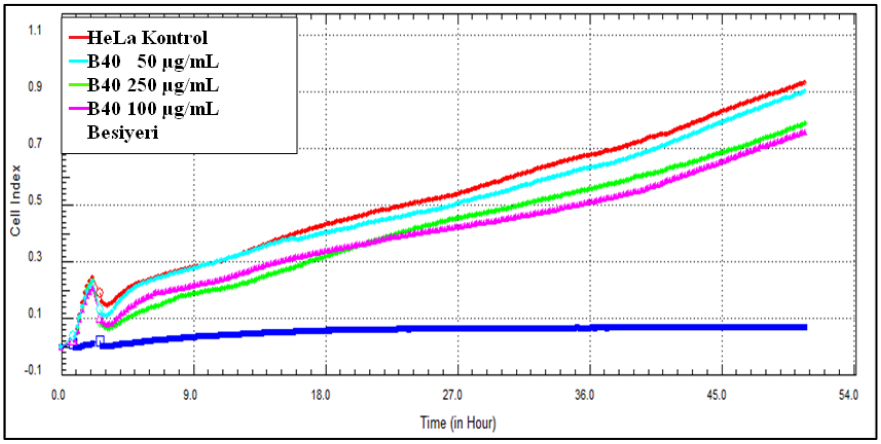
4.1.2.MGT-17'nin flash kromotografisi ile elde edilen ekstrelerin anti kanser testleri

Şekil 4. 5. incelendiğinde, B1 fraksiyonunda doza bağlı olarak aktivitesinde bir artış gözlenmekle birlikte, kontrolle kıyaslandığında HeLa hücrelerine karşı 500 µg/mL konsantrasyonda çok yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.



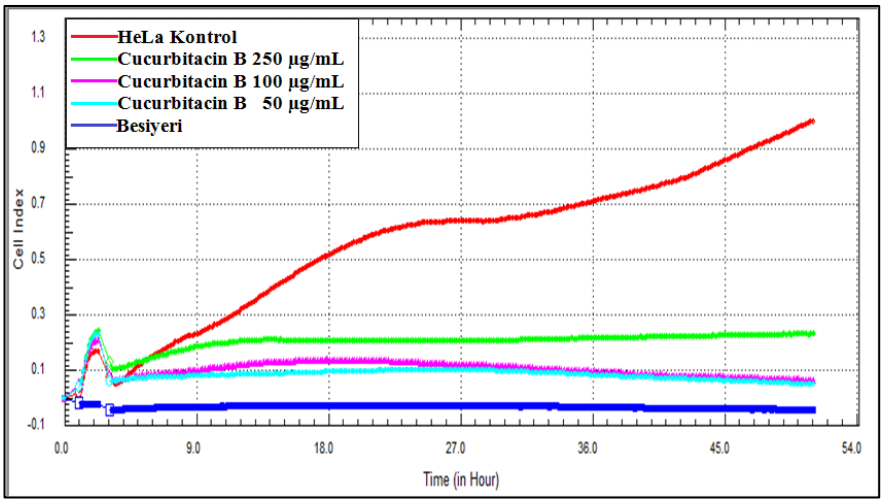
Şekil 4. 5. HeLa hücresi B1 fraksiyonu anti-kanser sonucu

Şekil 4.6'e göre MGT-17 ekstresinin flash ile yapılan ayrım sonucu elde edilen ekstrelerin, anti-kanser aktivitelerine göre en etkili fraksiyon B1 aktivitesi düşük olan fraksiyon ise B40 fraksiyonu çıktı. Dolayısıyla aktivite bakımından yüksek olan B1 fraksiyonundan saflaştırma işlemine gidildi.



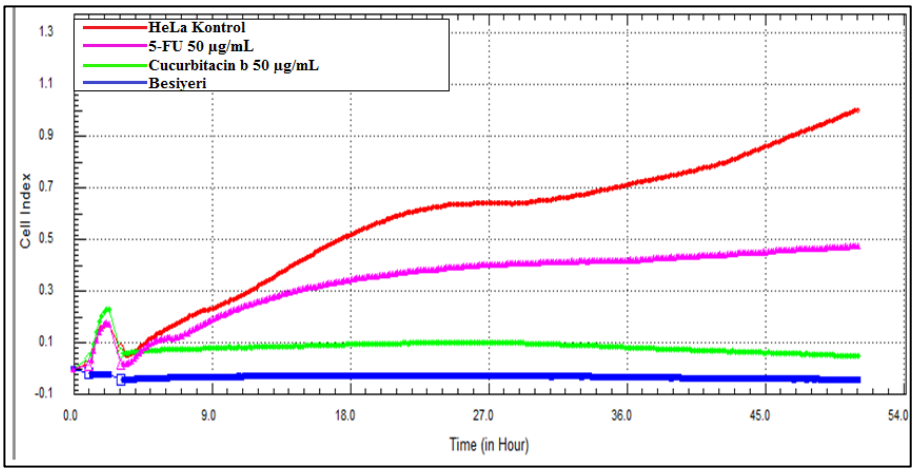
Şekil 4. 6. HeLa B40 fraksiyonu anti-kanser aktivitesi

Şekil 4. 7. incelendiğinde, B1 fraksiyonundan elde edilen Cucurbitacin B molekülünün doza bağlı olarak aktivitesinde bir azalma gözlenmekle birlikte, kontrolle kıyaslandığında HeLa hücrelerine karşı çok yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.



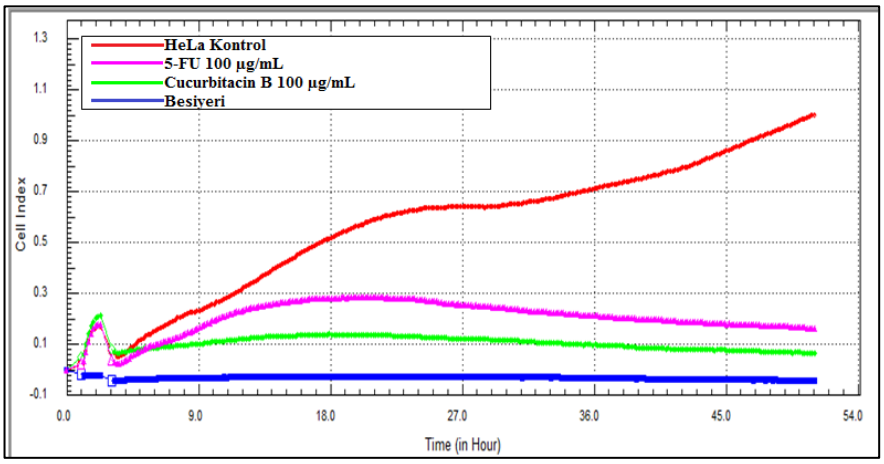
Şekil 4. 7. Cucurbitacin B molekülünün anti-kanser aktivitesi

Şekil 4. 8. incelendiğinde, B1 fraksiyonundan elde edilen Cucurbitacin B molekülü ile standart olarak kullanılan 5-FU kıyaslandığında HeLa hücrelerine karşı çok daha dikkate değer aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.



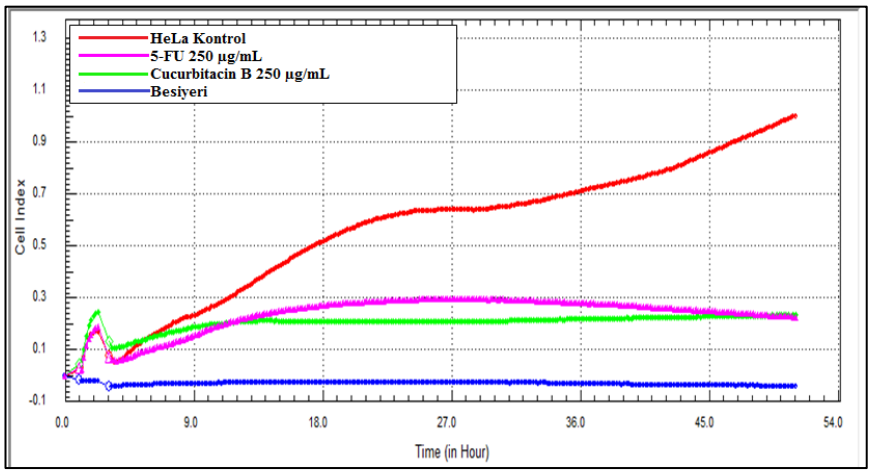
Şekil 4. 8. Cucurbitacin B bileşiğinin 5-FU ile karşılaştırılması 50 µg/ml

Şekil 4.9'daki grafiğe göre 5-FU ile Cucurbitacin B molekülü karşılaştırıldığında, Cucurbitacin B molekülünün aktivite bakımından daha iyi olduğu, fakat konsantrasyonun artmasıyla 5-FU'in aktivitesinin arttığı, Cucurbitacin B molekülünün aktivitesinin ise düştüğü gözlendi.



Şekil 4.9. Cucurbitacin B bileşiğinin 5-FU ile karşılaştırılması 100 µg/ml

Şekil 4.10'deki 5-FU ile Cucurbitacin B molekülü karşılaştırıldığında, 5-FU'in aktivitesinin doz artışına bağlı olarak arttığı gözlenmektedir. Bununla birlikte, Cucurbitacin B molekülün de tam tersi bir etki gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil 4. 10. Cucurbitacin B bileşiğinin 5-FU ile karşılaştırılması 250 µg/ml

4.2. İzole Edilen Molekülün Yapı Tayini

4.2.1. Cucurbitacin B molekülünün yapı tayini

Beyaz renkli kristal olarak elde edilen cucurbitacin B bileşiği, İTK'da 95:5 kloroform-metanol çözücü sisteminde yürütülüp, serik sülfat belirteci püskürtüldükten sonra kırmızı, ısıtıldıktan (100-120 $^{\circ}$C) sonra maddeye ait lekelerde mor renk gözlenmesi yapının steroidal bir iskelete sahip olabileceği belirlendi. Elde edilen kristalden 22 mg alınarak $CDCl_3$ çözücüsünde çözüldü. 1D ve 2D NMR spektrumları kaydedildi. Erime noktası 192-195 ºC olarak belirlendi. Kristal, 1D ve 2D (HETCOR, COSY ve HMBC) spektrumlarının yorumu ile yapının Cucurbitacin B olduğu belirlendi.

HETCOR spektrumunda hangi hidrojenlerin hangi karbona bağlandığı şekil 4.14. ve 4.16. da, HMBC spektrumu yardımıyla, proton-komşu karbon etkileşimi ile hangi karbonla komşu olduğu şekil 4.17'de, COSY spektrumu yardımıyla da proton-komşu proton etkileşimi şekil 4.18'de gösterildi. Bu spektrumlar yorumlanarak (Çizelge 4.1) oluşturuldu.

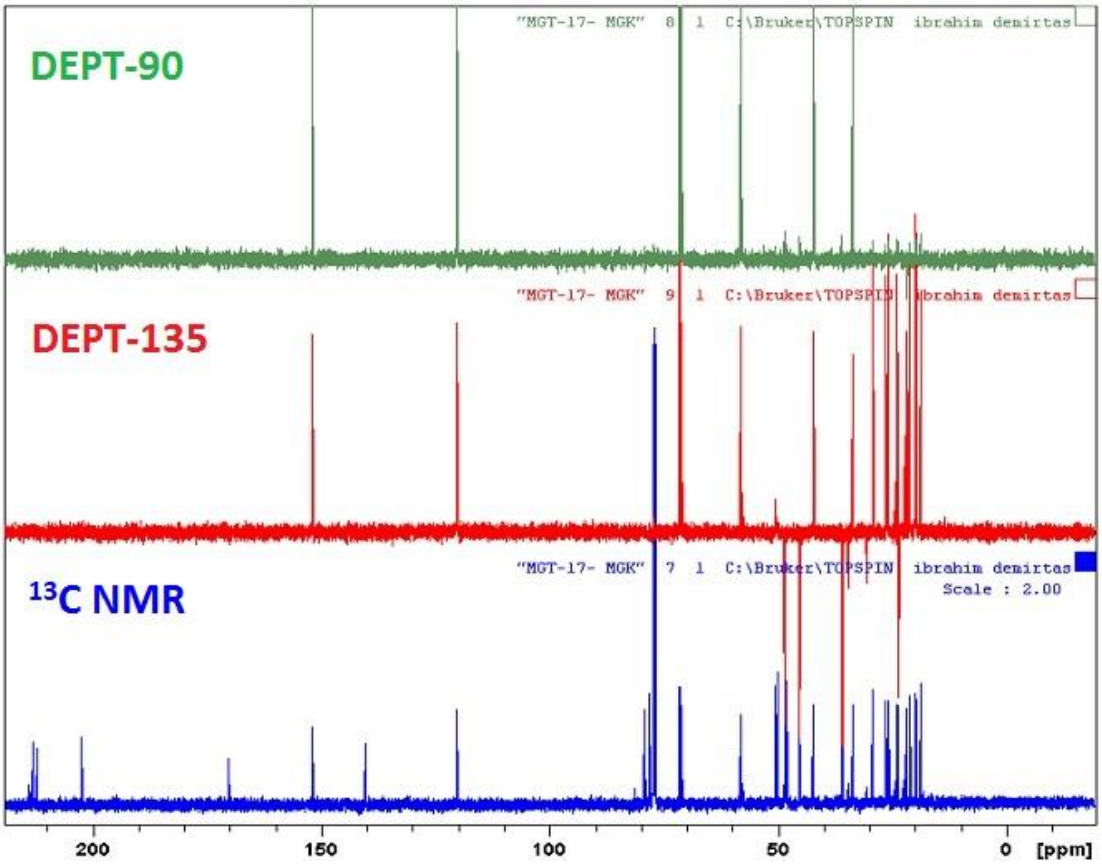
Çizelge 4. 1. Cucurbitacin B molekülünün NMR tablosu

C/H	δ_C	DEPT	δ_H	Cosy	HMBC (H→C)
1	36.00	CH2	1.23/2.30		C-2,C-5,C-10
2	71.64	CH	4.42	2.30/1.230	C-1
3	213.07	C			
4	50,68	C			
5	140.38	C			
6	120.45	CH	5.80 d (*J*= 4.0 Hz)	1.98	C-7,C-8,C-9,C-10,C-29
7	23.87	CH2	2.00/2.38		
8	42.39	CH	1.98	2.38/5.80	
9	50.25	C			
10	33.73	CH	2.74	1.23/2.30	C-1,C-4,C-5,C-11,C-19
11	212.21	C			
12	48.65	CH2	2.69/3.26		C-9,C-12,C-17,C-18,C-30
13	48.11	C			
14	48.45	C			
15	45.33	CH2	1.45/1.89 dd		
16	71.24	CH	4.35 ddd	1.890/2.49	C-13,C-14,C-15,C-20
17	58.20	CH	2.49	4.35	C-13,C-16,C-18,C-20,C-21,C-22
18	19.85	CH3	0.98 s		
19	20.04	CH3	1.08 s		
20	78.28	C			
21	29.37	CH3	1.29 s		
22	202.51	C			
23	120.31	CH	6.49 d (*J*= 15.6 Hz)	7.06	C-22,C-24,C-25
24	151.94	CH	7.06 d (*J*= 15.6 Hz)	6.49	C-22, C-23, -C25, -C26
25	79.34	C			
26	25.99	CH3	1.58 s		
27	26.42	CH3	1.55 s		C-24,C-25, C-26
28	21.26	CH3	1.35 s		
29	23.94	CH3	1.44 s		
30	18.89	CH3	1.36 s		
31	170.26	C			
32	21.94	CH3	2.02 s		

4.2.2.NMR spektrumları

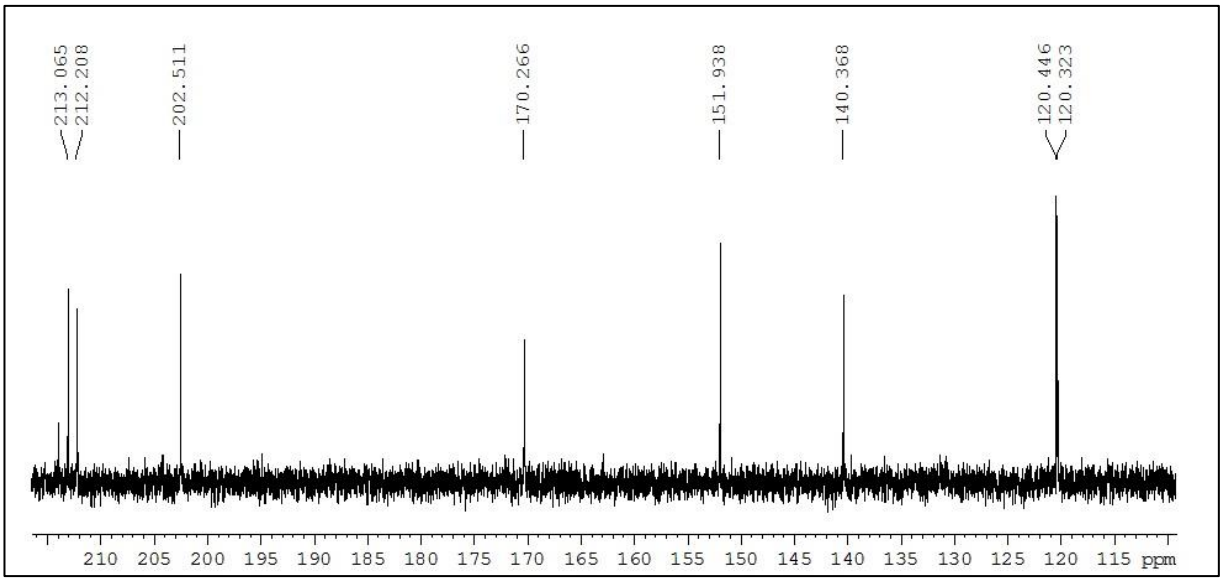
Şekil 4.11.'de ^{13}C ve dept 135 nmr yardımıyla δ_C 213.07 (C-3), 212.21 (C-11), 202.51 (C-22), 170.26 (C-31), 140.38 (C-5), 50.68 (C-4), 50.25 (C-9), 48.11 (C-13), 48.45 (C-14), 78.28 (C-20) ve 79.34 (C-25) 11adet kuaterner karbonu, Dept-135 negatif δ_C 36.00 (C-1), 23.87 (C-7), 48.65 (C-12) ve 45.33 (C-15) 4 CH2, Dept-90 nmr'ıyla δ_C 151.94 (C-24), 120.45 (C-6), 120.31 (C-23), 71.67 (C-2), 71.24 (C-16), 58.20 (C-17), 42.39 (C-

8), ve 33.73 (C-10) 8 CH, ^{13}C, Dept-90 ve Dept-135 yardımıyla δ_C 19.85 (C-18), 20.04 (C-19), 29.37 (C-21), 25.99 (C-26), 26.42 (C-27), 21.26 (C-28) 23.94 (C-29), 18.89 (C-30) ve 21.94 (C-32) 9CH3 ve toplamda 32 adet karbon rezonans olup çizelge 4.1'de verildi.



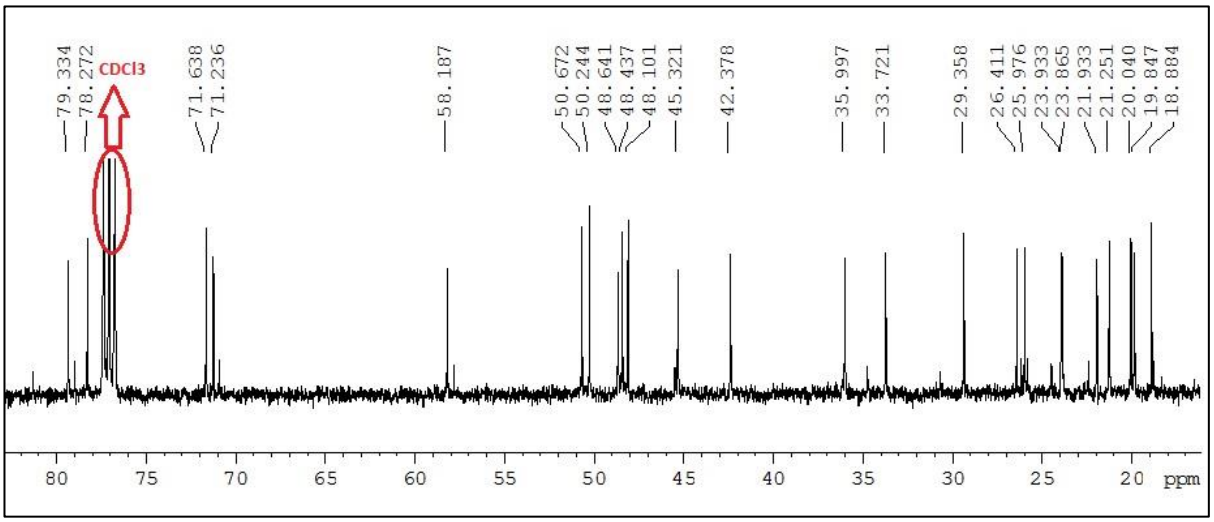
Şekil 4. 11. DEPT ve ^{13}C NMR spektrumları

^{13}C NMR spektrumunda (Şekil 4.12) δ_C 213.07 (C-3), 212.21 (C-11) ve 202.51 (C-22) rezonans olurken, ester grubuna ait karbonil 170.36 (C-31)'de rezonans olduğu görüldü. Ayrıca ester grubu FT-IR'da 1720 cm^{-1}'de ve 1251 cm^{-1} pikin (Şekil 4.25) verilerinin literatürde karşılaştırılması ile yapıda bir asetat olduğu ve bu asetat karbonilinin δ_C 170.36 (C-31) belirlendi.



Şekil 4. 12. ^{13}C NMR spektrumu 214-110 ppm arası

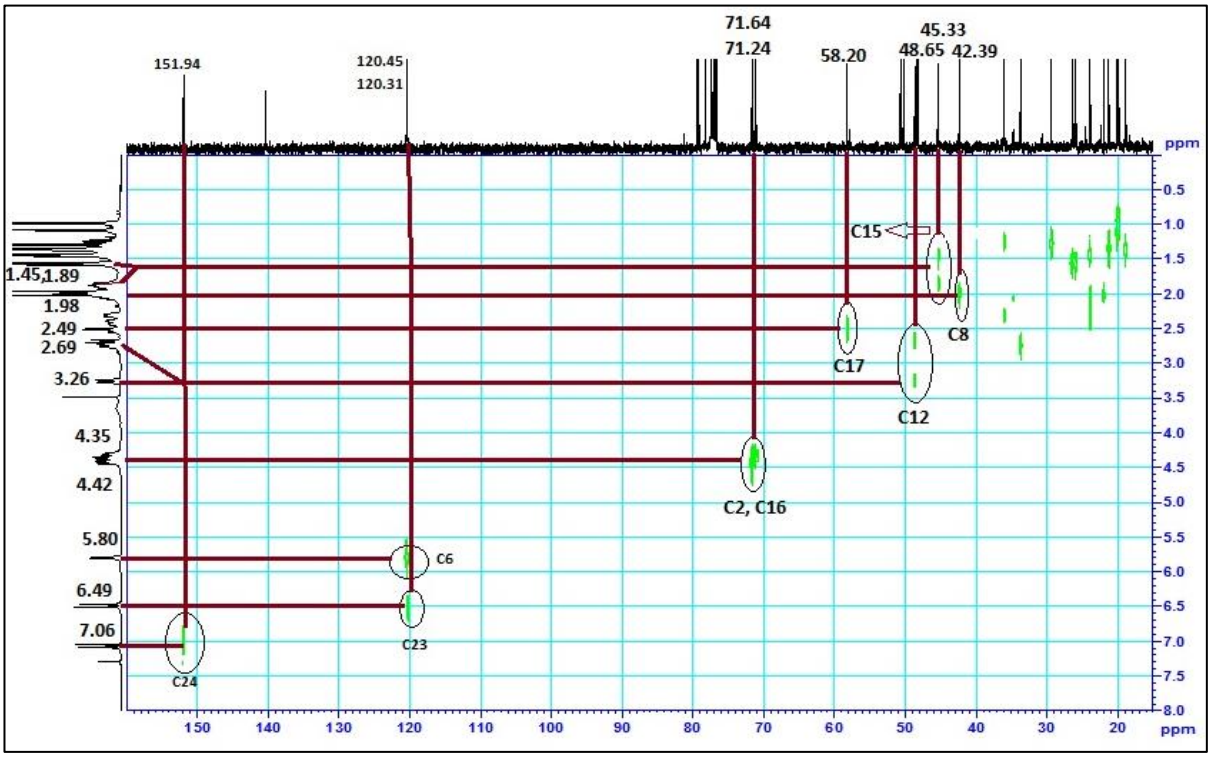
Bununla birlikte, hidroksil gruplarının bağlı olduğu karbonlardaki protonlar beklenildiği gibi diğer alifatik protonlara göre daha aşağı alanda (4.42, 4.35) rezonans olduğu görüldü. Aynı şekilde karbon atomlarıda, alifatik karbon atomlarına göre daha aşağı alanda geldi. (71.64 C-2, 71.24 C-16).



Şekil 4. 13. ^{13}C NMR spektrumu 83-15 ppm arası

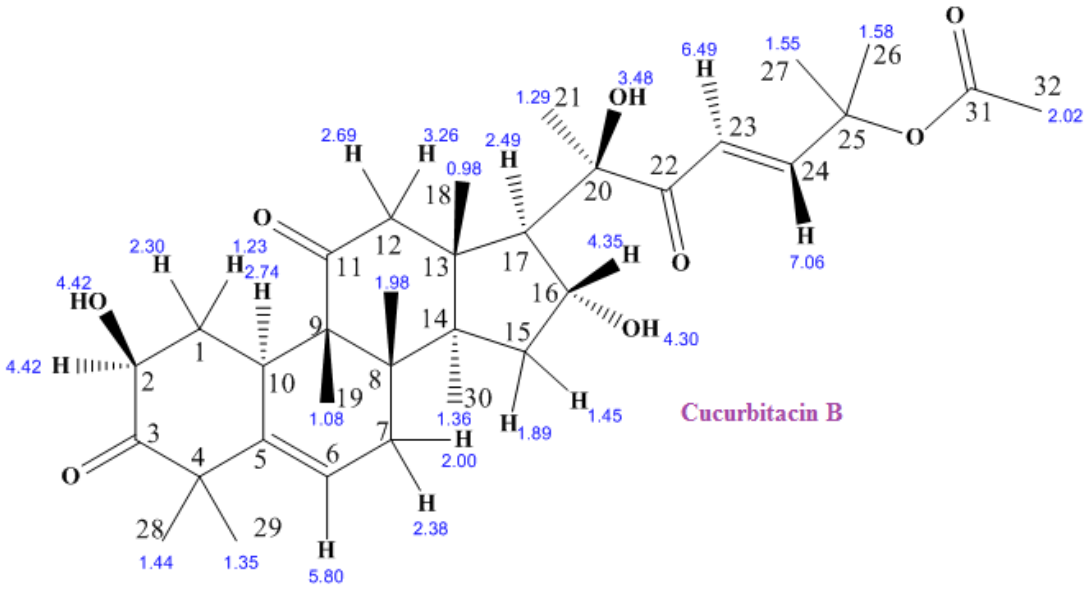
δ_C 140.38 (C-5), 120.45 (C6), 120.31 (C-23) ve 151.94 (C-24)'de gözlenen karbon sinyalleri ve HETCOR spektrumunda δ_C 120.45 (C6) protonunun δ_H 5.80 (1 H, d, *J*= 4.0

Hz, H-6) ve δ_C 120.31 (C-23) ve 151.94 (C-24) protonlarının sırasıyla δ_H 7.06, 6.49 (Şekil 4.2.10) (1H, d, *J*=15.6 Hz H-23, H-24)'de ortaya çıkmasıyla molekülde 2 çifte bağın varlığına, 4 Hz'lik yarılmanın gözlendiği çifte bağın steroid iskeletinin içinde, 15.6 Hz lik yarılmanın ise karbonile komşu alfa ve beta protonların trans konumda rezonans oldukları belirlendi.



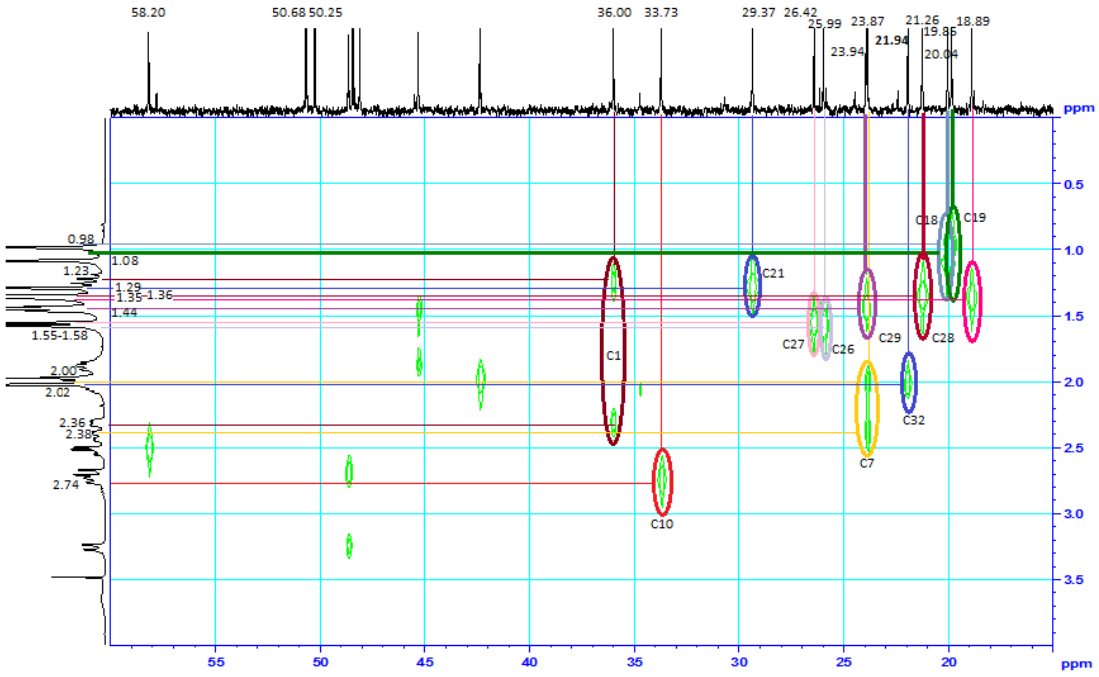
Şekil 4. 14. Hetcor spekturumu-1

HETCOR spektrumunda, proton-karbon etkileşimlerinin bir kısmı şekil 4.14'de gösterildiği gibi δ_H 7.06 (H-24) protonu δ_C 151.94 (C-24), δ_H 6.49 (H-23) protonları δ_C 120.31 (C-23), δ_H 5.80 (H-6) protonu δ_C 120.45 (C-6), δ_H 4.42 (H-2) protonu δ_C 71.64 (C-2) ve δ_H 4.35 (H-16) protonu δ_C 71.24 (C-16) ile etkileşimleri gözlendi. Elde edilen veriler çizelge 4.1'dedir.



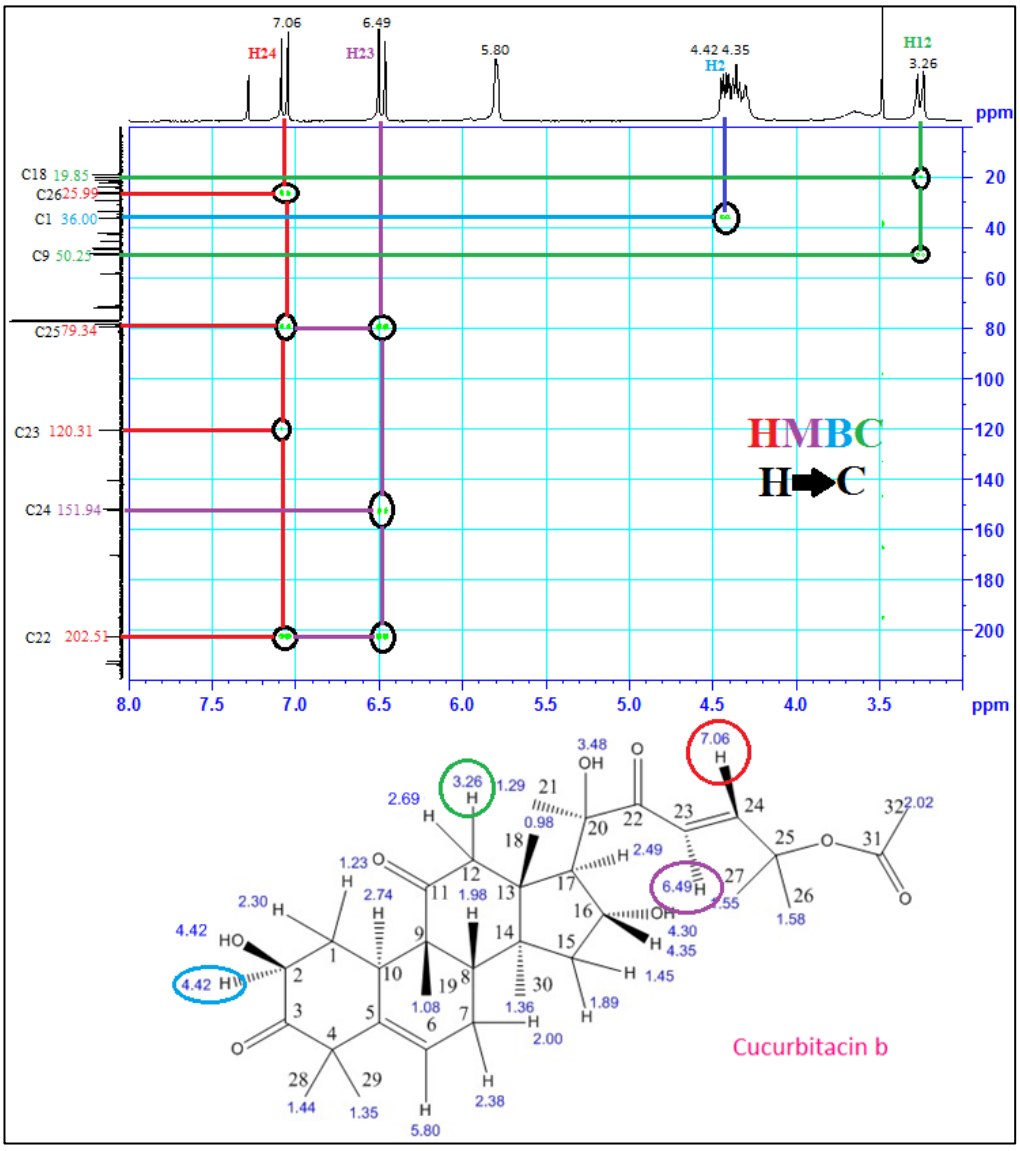
Şekil 4. 15.Cucurbitacin B molekülü proton değerleri ile birlikte gösterilmesi

HETCOR yardımıyla δ_H 2.02 (3H, s, H-32), δ_H 1.58 (3H, s, H-26) 1.55 (3H, s, H-27) hidrojenleri elektronegatif bir gruba komşu olduklarını, bu ise karbonil karbonuna ve ester grubunu oluşturan oksijenin etkisinden dolayı aşağı alana kaydıklarını gözlendi.



Şekil 4. 16. HETCOR spektrumu-2

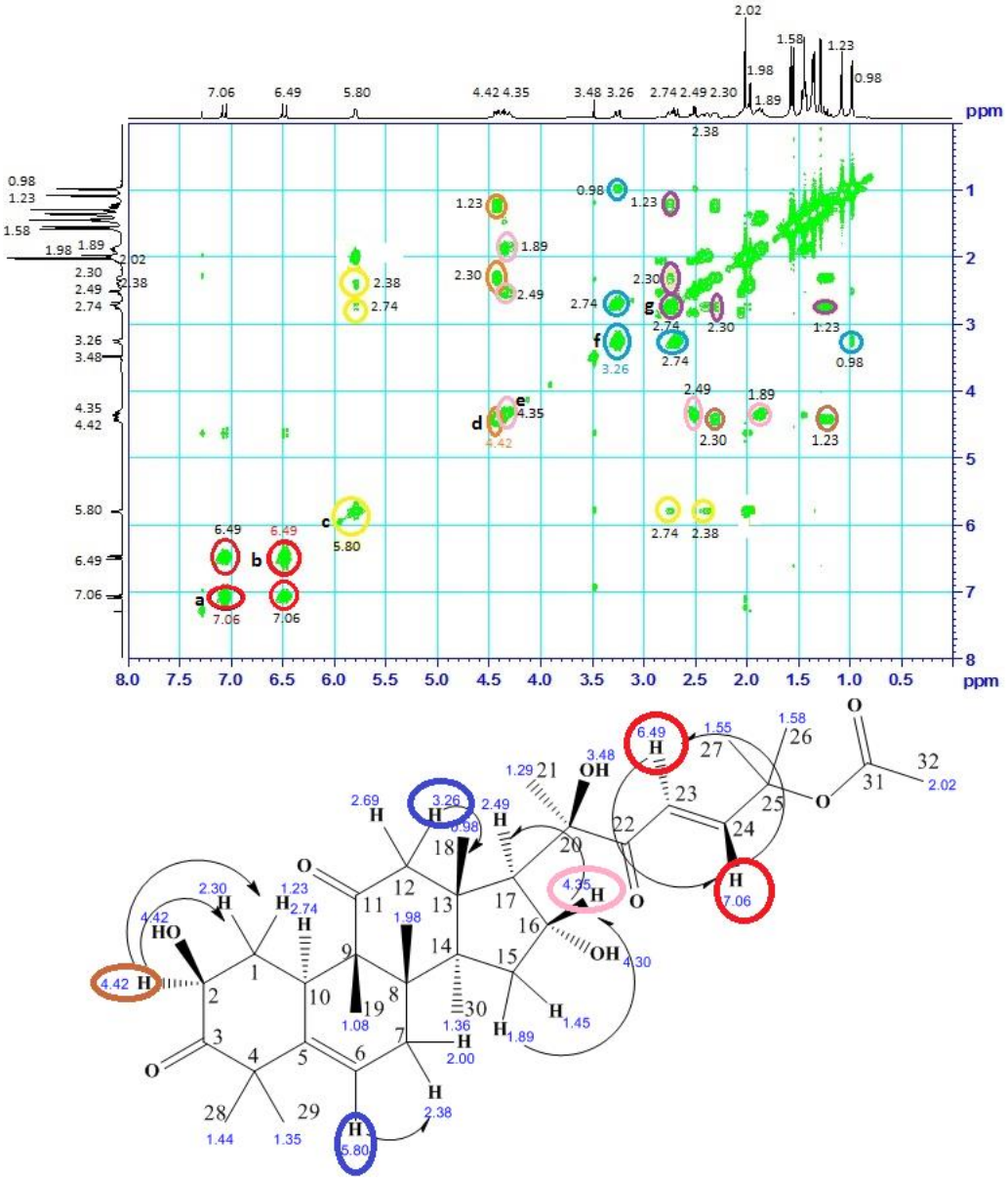
HETCOR spektrumunda, proton-karbon etkileşimlerinin bir kısmı şekil 4.2.6'da gösterildiği gibi δ_H 1.23/2.36 (H-1) protonları δ_C 36.00 (C-1), δ_H 2.74 (H-10) protonları δ_C 33.73 (C-10), δH 1.29 (H-21) protonu δ_C 29.37 (C-21) ve δ_H 1.55 (H27) protonu δ_C 26.42 (C-27) ile etkileşimleri gözlendi. Elde edilen değerler çizelge 4.1'de görülmektedir.



Şekil 4. 17. HMBC spekturumu

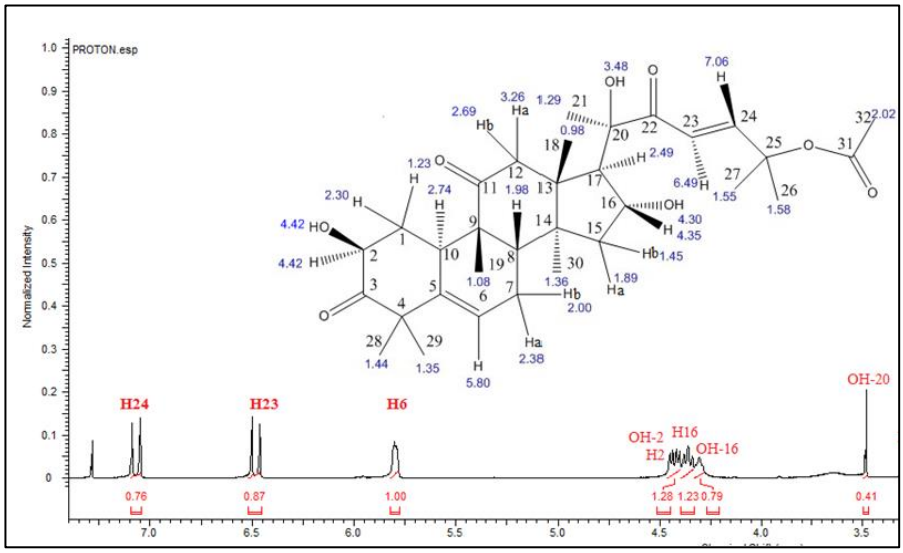
HMBC spektrumunda, proton-komşu karbon etkileşimlerinin bir kısmı şekil 4.17'de gösterildiği gibi δ_H 7.06 (H-24) protonu, δ_C 25.99 (C-26), 79.34 (C-25), 120.31 (23),

202.51 (C-22), δ_H 6.49 (H-23) protonu δ_C 79.34 (C-25), 151.94 (C-24), 202.51 (C-22), δ_H 4.42 (H-2) protonu δ_C 36.00 (C-1), δH 3.26 (H-12) δ_C 19.85 (C-18) ve 50.25 (C-9) ile etkileşimleri gözlendi.



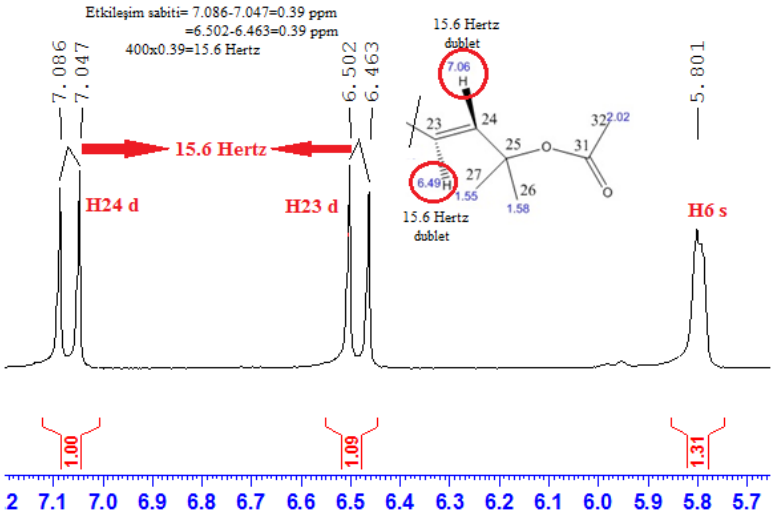
Şekil 4. 18. COSY spektrumu ve molekül üzerinde protonların etkileşimi

Şekil 4.18'de HETCOR spektrumu ile belirlemiş olduğumuz hidrojenlere komşu olan protonlar belirlendi, Şekil üzerinde etkileşimler gösterilerek veriler çizelge 4.1'e eklendi.



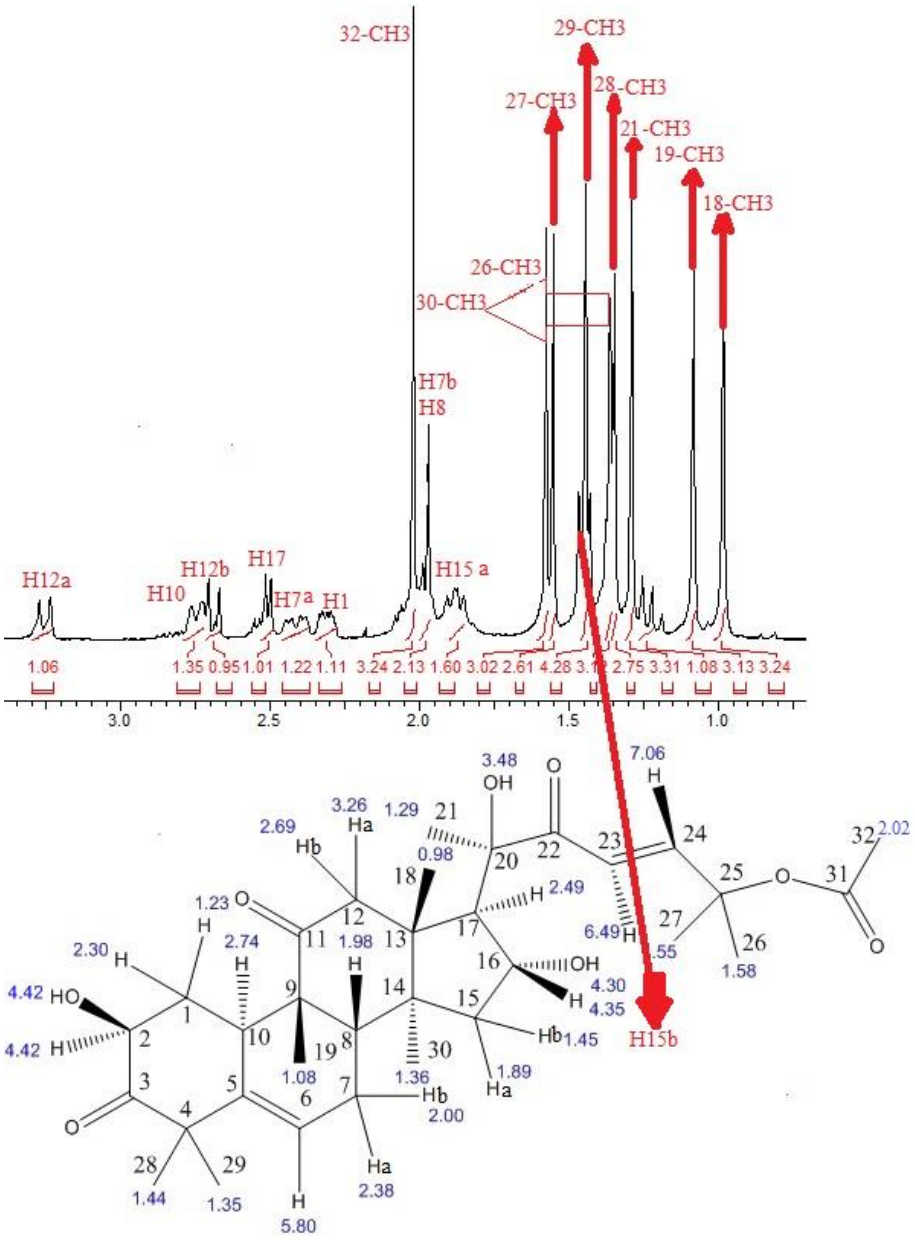
Şekil 4.19. Aromatik bölge ^{1}H NMR spektrumu

Şekil 4.19'da C6 üzerideki hidrojen ve C-23 ve C-24 karbonlar üzerindeki trans-hidrojenler, proton NMR'ında gösterildi.



Şekil 4. 20. Trans hidrojenlerin ^{1}H NMR spektrumu

Şekil 4.20 deki proton NMR'ında 7.06 ve 6.49 ppm'de dublet vermesi ile H-23 ve H-24 birbirine komşu, çift bağ üzerindeki trans hidrojenler oldukları, eşit olarak 15.6 Hz. yarılmadan tespit edildi.

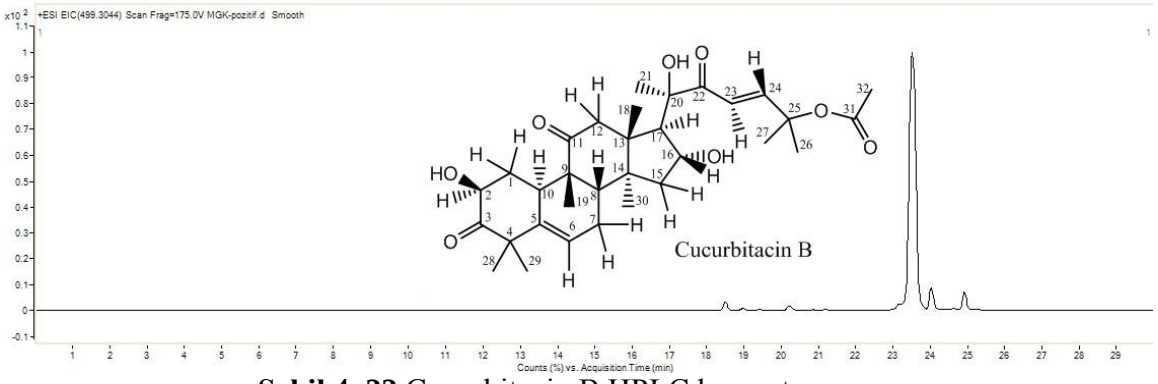


Şekil 4. 21. Alifatik bölge ^{1}H NMR spektrumu

Şekil 4.21.'de proton NMR'ında integrasyon değerleri ile birlikte özellikle metil grupları gösterildi. H15a ve H15b protonları, diastereotopik protonlar olduğu hetcor spektrumundan belirlendi ve enantiotopik proton H16 ile etkileşerek dd şeklinde gözlendi. H16 ise OH'dan dolayı 4.35 ppm'de (şekil 4.21) gözlendi ve komşusundaki 3 protondan dolayı ddd olarak görüldü.

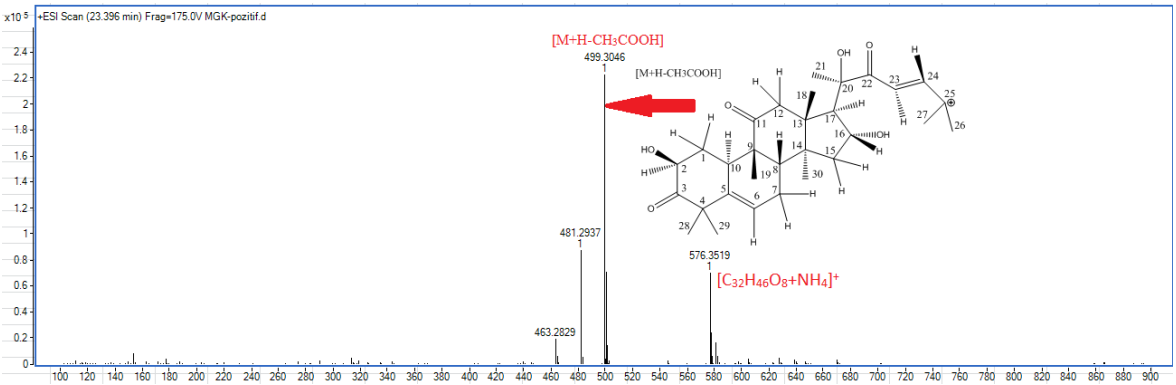
4.2.3. HPLC-TOF/MS analizi

HPLC-TOF/MS spektrumu ile NMR'da tahmin ettiğimiz molekülün kütlesi doğrulandı.



Şekil 4. 22. Cucurbitacin B HPLC kromotogramı

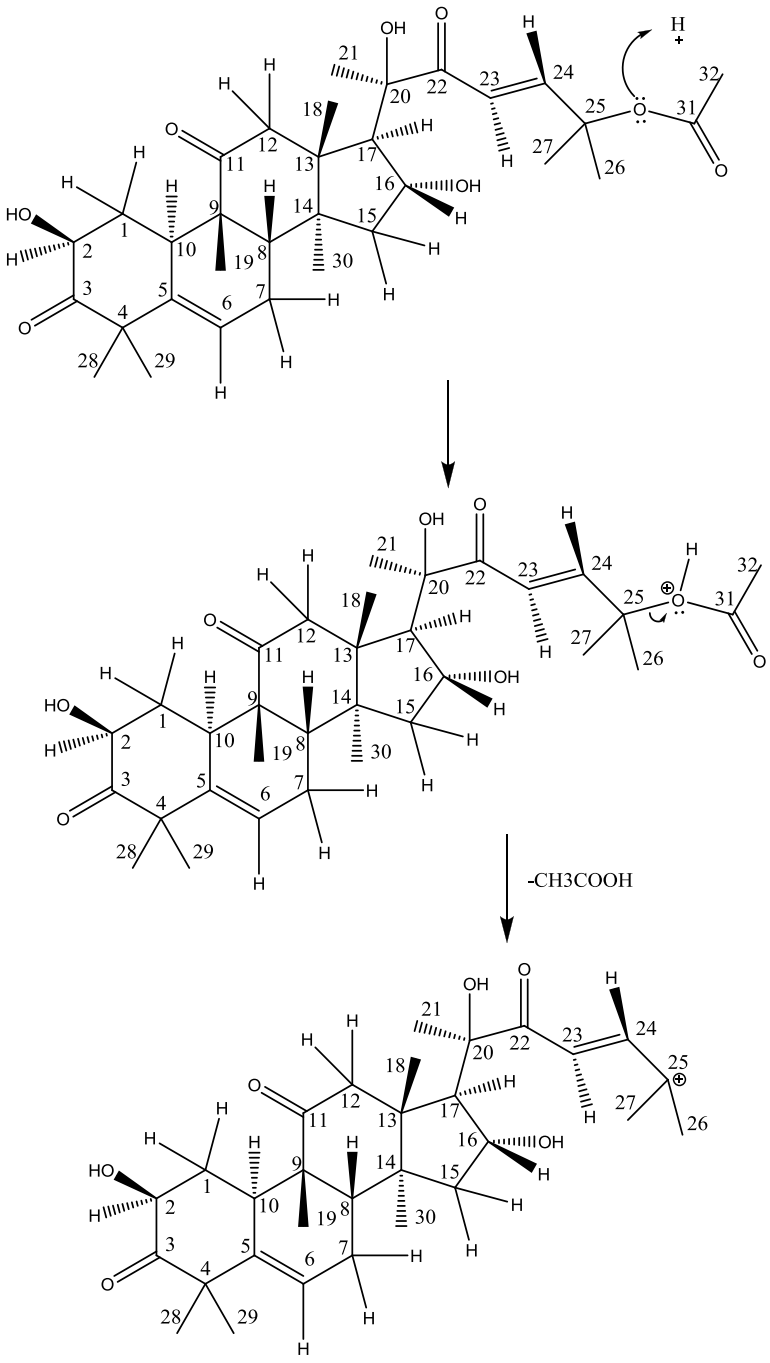
HPLC kromatogramında Cucurbitacin B maddesine ait olan kromotogram şekil 4.22'de gösterildiği üzere, maddemiz 23. dakikadan 25.30. dakikaya kadar geldi. Fakat hem saflık olarak hemde kromotogramın iyi olmasından ötürü 23.396 dakikada gelen kromotogramın kütle spektrumu alındı ve şekil 4.23'de gösterildi.



Şekil 4. 23. Cucurbitacin B HPLC-TOF/MS spektrumu

Temel pik olan 499.3046 molekülü kütüphane'de var olan Cucurbitacin S molekülü ile aynı kütleye sahip olduğundan kütüphane taramasında ana bileşik gözükmekte idi. Fakat NMR verileri bu molekülü doğrulamıyordu. Dolayısıyla Cucurbitacin B molekülünün MS spektrumları araştırıldı. Şekil 4.24'te ki gibi Cucurbitacin B

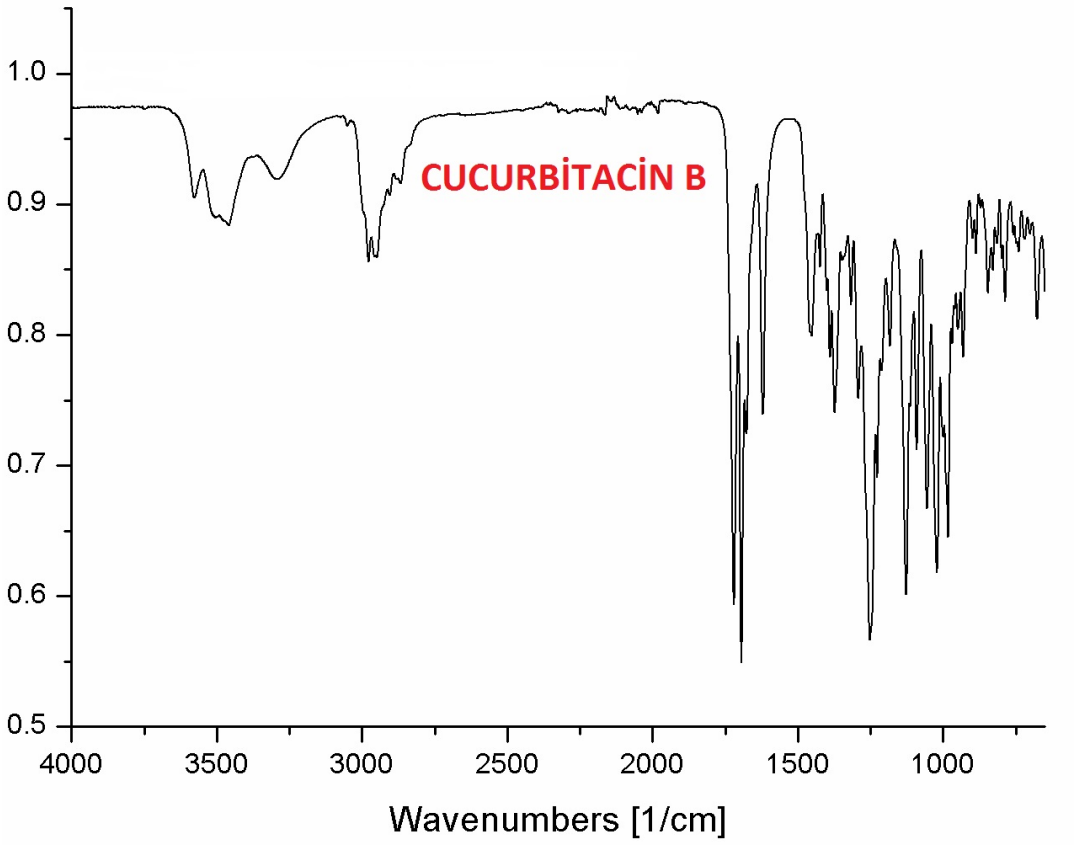
molekülünün iyonlaşmasından dolayı kütle temel iyon pikinin Cucurbitacin B molekülüne ait olduğu belirlendi.



Şekil 4. 24. Cucurbitacin B molekülünün iyonlaşması

4.2.4. İnfrared analizi

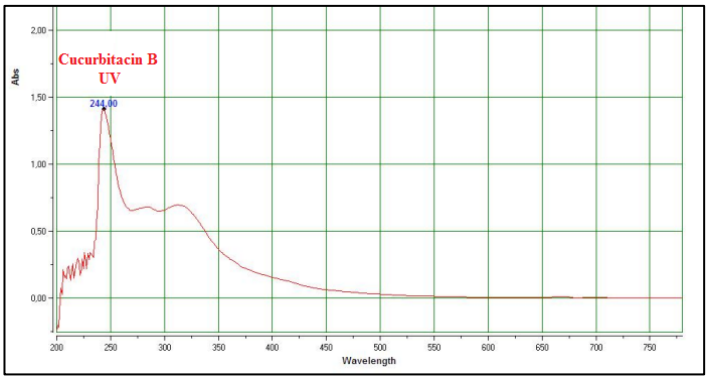
Cucurbitacin B molekülünün infrared analizi PerkinElmer spektrum-100 marka FTIR-ATR cihazında pelet oluşturmadan doğrudan katı halde analizi yapıldı. Spektrumdan 3.458 cm^{-1} de O-H piki, 3000 cm^{-1}'in hemen altında alifatik grup, 1720 cm^{-1}'de ve 1251 cm^{-1} pikin asetat karboniline, 1700 ve 1677 cm^{-1}'deki piklerde keton karbonilleri ve 1620 cm^{-1}'deki pik ise C=C çiftli bağ fonksiyonel gruplara ait gerilimler olduğu belirlendi.



Şekil 4. 2. İnfrared spektrumu

4.2.5. UV analizi

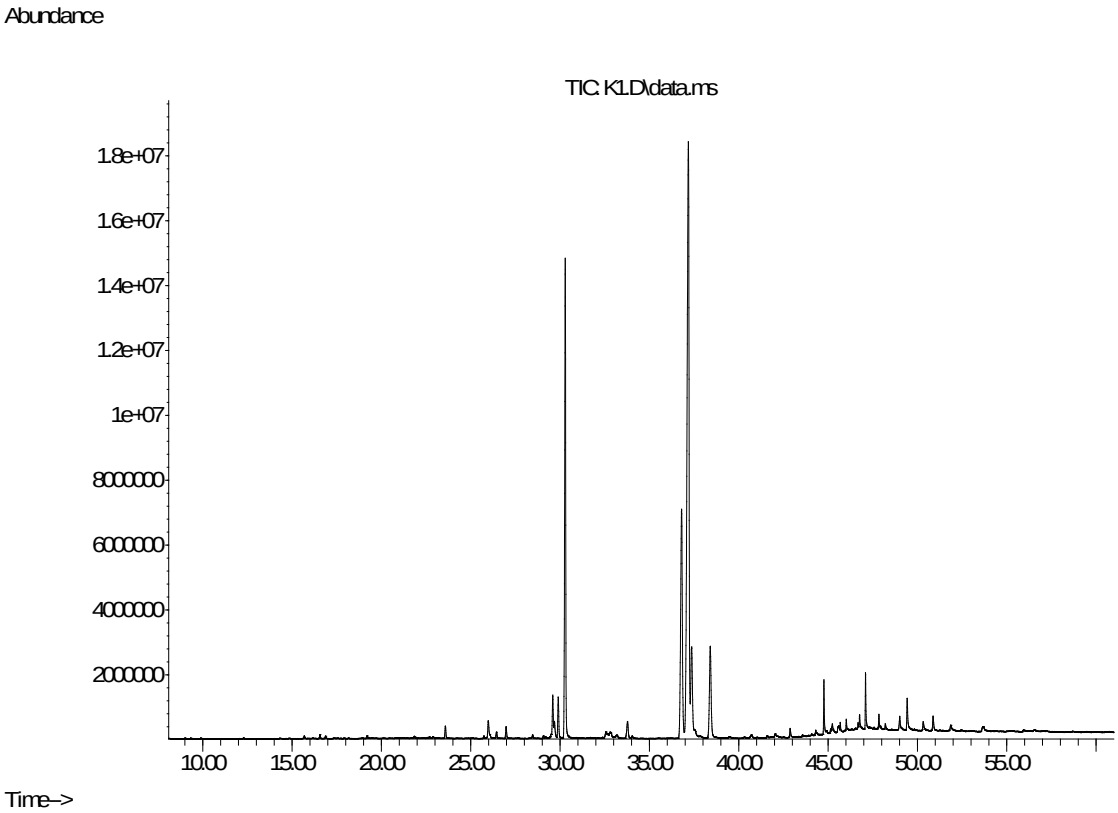
Cucurbitacin B molekülüne ait UV spektrumu şekil 4.26 de gösterildi. UV analizi sonucunda 243-244 nm dalga boyunda Cucurbitacin B molekülüne ait spesifik dalga boyu ile uyumlu olduğu belirlendi.



Şekil 4. 3. Cucurbitacin B UV absorbansı

4.3. *B. multiflora* bitkisinin GC-MS sonuçları ve istatiksel değerlendirilmesi

B. multiflora bitkisinin hekzan ekstrelerine ait GC-MS kromotogramı şekil 4.27'de ve istatiksel analiz sonuçları çizelge 4.2' de verildi.



Şekil 4. 4. BM-Hekzan kök ekstresi GC kromotogramı

B. multiflora bitkisinin kök, gövde, yaprak ve meyve olarak dört kısma ayrıldı. Her branş, hekzan çözücüsü ile muamele edildi. Elde edilen hekzan ekstreleri Agilent marka 5975 C, MSD-7890A model GC-MS cihazı ile üç tekerrürlü olarak analiz edildi. FID sonuçlarına göre, varyans analizi (ANOVA) ($P<0,05$) yapılarak ortalama ve standart hata değerleri hesaplandı. Sonuçlar tablo 4.2. de verildi. Bu veriler kök kısmının temel bileşeninin kütüphane sonuçlarına göre % 32,8 oranında, ***omega-3*** (9,12,15-octadecatrienoic acid, methyl ester) yağ asidinin oluşturduğu, gövde ve yaprak kısmının temel bileşeninin % 29 ve % 14,4 oranında hekzadekanoik asit metil ester olduğu, meyve kısmının temel bileşeni ise; %32 oranında, uzun zincirli bir bileşik olan "dotricontane" bileşiği olduğu belirlendi

Çizelge 4. 2. GC-MS FID analiz tablosu

RT	RI	Yağ asitleri	Kök	Gövde	Yaprak	Meyve
16.532	1312	12:0 lauric acid, methyl ester			0.127±0.110	0.053±0.053
23.576	1490	14:1 myristoleic acid, methyl ester	0.460±0.187	0.250±0.217	0.737±0.068	0.207±0.181
26.981	1486	15:1 pentadecanoic acid, methyl ester	0.343±0.101	0.853±0.051	0.237±0.205	0.080±0.080
29.580	1506	16:1 9-hexadecenoic acid, methyl ester	0.945±0.767			0.800±0.800
29.681	1507	16:1 7-hexadecenoic acid, methyl ester	0.277±0.479	0.787±0.059		
30.280	1582	16:0 hexadecanoic acid, methyl ester	9.930±1.077	26.943±1.384	14.097 0.772	6.107±0.825
32.548	1599	16:0 hexadecanoic acid, ethyl ester		0.703±0.040		0.153±0.153
33.773	1607	17:0 heptadecanoic acid, methyl ester	0.600±0.187	0.673±0.032	0.467±0.031	0.107±0.107
36.788	1627	18:2 linoleic acid, methyl ester	8.807±1.147	1.230±1.230	2.253±0.193	11.093±0.953
37.206	1705	18:3 α-linoleic, methyl ester	30.913±3022	18.610±1.083	12.603±1.590	7.047±0.740
38.403	1637	18:0 steraic acid, methyl ester	3.210±0.308	5.050±0.251	3.230±0.095	1.863±0.306
42.877	1738	19:0 nonadecanoic acid, methyl ester	0.487±0.424		0.283±0.245	0.113±0.113
44.776	1726	20:0 arachidic acid, methyl ester	2.923±0.455	4.123±0.159	2.577±0.366	6.270±4.488
47.105	2002	22:0 behenic acid, methyl ester	1.353±1.353	4.497±0.708	3.373±0.061	5.523±3.011
48.209	2007	23:0 tricosanoic acid, methyl ester	7.333±6.373	5.443±1.240	4.977±0.441	5.250±0.617
49.434	1694	24:0 tetracosanoic acid, methyl ester	4.957±1.978	3.703±0.727	2.777±0.433	3.433±0.302
50.824	2019	25:0 pentacosanoic acid, methyl ester		0.377±0.377	0.583±0.340	0.577±0.517
52.472	1558	26:0 hexacosanoic acid, methyl ester	0.277±0.343	1.210±0.316	0.870±0.075	1.217±0.310
56.895	1648	28:0 octacosanoic acid, methyl ester		1.723±0.185	1.313±0.085	0.227±0.227
		Alkanlar				
19.193	1441	C16 hexadecane		0.443±0.006		
26.100	1478	C18 octadecane		0.703±0.110		
44.313	1746	C23 tricosane			0.777±0.012	
45.680	1993	C24 tetracosane		0.897±1.553	2.713±2.713	
46.662	1681	C25 pentacosane	1.243±1.158		3.877±0.107	1.093±1.093
49.016	2008	C27 heptacosane	4.353±2.236	2.297±0.382	5.990±0.738	5.957±2.127
50.332	2019	C28 octacosane	0.577±0.577	0.557±0.482	0.510±0.510	0.227±0.227
51.894	1489	C29 nonacosane	0.870±0.870	6.4171.013	12.803±0.424	5.253±0.859
55.980	1644	C32 dotriacontane		3.097±0.522	9.677±0.494	30.733±3.795
		Diğer Bileşikler				
27.639	1491	hexahydrofarnesyl acetone		0.357±0.021	0.377±0.012	
30.957	1587	Isophytol			0.423±0.035	
37.658	1707	phytol		1.683±0.179	5.587±0.338	
45.245	1830	9,12,15-Octadecatrien-1-ol	1.367±0.735		0.243±0.243	1.603±1.603
45.629	1912	stigmasterol	4.433±1.802			0.980±0.980
45.686	1993	Desmosterol			2.713±2.713	
45.999	1994	Ethyl iso-allocholate			0.267±0.267	
		TOPLAM	**94.204**	**93.193**	**97.998**	**96.549**

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. İzole Edilen Cucurbitacin B Molekülünün Sonucu

Yapılan bu çalışmada; *Bryonia multiflora* Bois. & Heldr. (Cucurbitacea) bitkisinden bir steroid türü olan Cucurbitacin b molekülü izole edilmiş olup, yapısı 1D-2D NMR, HPLC-TOF/MS, TLC ve ATR-FTIR ile aydınlatıldı.

Bu molekül, 50, 100 ve 250 µg/mL konsantrasyonlarda Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Cihazı (RTCA) yöntemi ile HeLa kanser hücresine verilmiş olup 50 µg/mL'lik konsantrasyonda yüksek aktivite, daha sonra 100 ve 250 µg/mL'lik konsantrasyona doğru düştüğü gözlendi. Günümüzde kullanılan bir tür kanser ilacı olan 5-FU ile Cucurbitacin B molekülü karşılaştırıldığında, 5-FU'in aktivitesinin doz artışına bağlı olarak arttığı gözlendi. Bununla birlikte, Cucurbitacin B molekülün de tam tersi bir etki gösterdiği tespit edildi.

5.2. GC-MS Sonuçlarının Değerlendirilmesi

B. multiflora bitkisinin kök, gövde, yaprak ve meyvelerinden elde edilen hekzan ekstrelerinin yüzde oranları çizelge 5.1.'de verildi.

Çizelge 5. 1. B. multiflora heksan ekstrelerinin temel bileşiklerinin yüzde oranı.

	Kök % miktar	Gövde % miktar	Yaprak % miktar	Meyve % miktar
1. Anabileşik	18:3 α-linoleic, methyl ester **%32.8**	16:0 hexadecanoic acid, methyl ester **%29**	16:0 hexadecanoic acid, methyl ester **%14.4**	C32 Dotriacontane **%32**
2. Anabileşik	16:0 hexadecanoic acid, methyl ester **%10.54**	18:3 α-linoleic, methyl ester **%20**	C29 Nonacosane **%13.6**	18:2 linoleic acid, methyl ester **%11.50**
3. Anabileşik	18:2 linoleic acid, methyl ester **%9.35**	C29 Nonacosane **%20**	18:3 α-linoleic, methyl ester **%12.86**	18:3 α-linoleic, methyl ester **%7.3**

KAYNAKLAR:

Baykut, M., Biran, M. ve Okçuoğlu, N. 1979. Some investigations in the properties of ecballium elaterium and its constituents. Chimica Acta Turcia, 85, 57-85.

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. and Gontier, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science, 839-851.(5), 161.

Dey, A. and De, J. N. 2012. Ethnobotanical survey of Purulia district, West Bengal, India for medicinal plants used against gastrointestinal disorders. Journal of Ethnopharmacology, 143(1), 68-80.

Ebru Urcana, U. H., Marianthi, S., Reinhard, H. and Harry Scherthanc, F. X. R. 2010. Real-time xcelligence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. Dental Meterials, 7(2 6), 51–58. doi: 10.1016/j.dental.2009.08.007

Faydaoğlu, S. 2011. Geçmisten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. Kastamonu Üni., Orman Fakültesi Dergisi, 2011, 11 (1): 52 - 67, 11, 52-67.

Gonzales, B. R. and Panizo, F.M. 1966. Composition of ecballium elaterium I. introduction. An. Real. Soc. Espan, Fis., Quim, Ser, B., 553-62(62), 4-5.

Gonzales, B. R. and Panizo, F.M. 1968. Composition of ecballium elaterium II. separation of free cucurbitacins. An. Real Soc. 63, 895(Espan, Fis., Quim, Ser, B.), 9-10.

González-Tejero, M. R., Casares-Porcel, M., Sánchez-Rojas, C. P., Ramiro-Gutiérrez, J. M., Molero-Mesa, J. and Pieroni, A., ElJohrig, S. 2008. Medicinal plants in the Mediterranean area: synthesis of the results of the project Rubia. Journal of Ethnopharmacology, 116(2), 341-357.

González, J. A., García-Barriuso, M. and Amich, F. 2010. Ethnobotanical study of medicinal plants traditionally used in the Arribes del Duero, western Spain. Journal of Ethnopharmacology, 131(2), 343-355.

Jeremy M Berg, J. L. T. and Lubert S. 2002. Biochemistry. Newyork: W.H. Freeman.

King, M. W. 2013. Web sitesi.http://themedicalbiochemistrypage.org/steroid-hormones.php Erişim Tarihi: 10.02.2013

Konopa, J., Jereczek Morawska E., Matuszkiewicz A. and Nazarewicz T. 1966. Antitumor substances from Bryonia alba L. Arzneimittelforschung, 335, PubMed - indexed for MEDLINE, 13-13.

Konopa, J., Matuszkiewicz A., Hrabowska M. and Onoszka K. 1974. Cucurbitacines, cytotoxic and antitumor substances from Bryonia alba L. Part II: Biological studies. Arzneimittelforschung, 1741-3, PubMed - indexed for MEDLINE.

Konopa, J., Zieliński, J. and Matuszkiewicz A. 1974. Cucurbitacins, cytotoxic and antitumor substances from Bryonia alba L. I: isolation and identification. Arzneimittelforschung, 1554-7, PubMed - indexed for MEDLINE, 10.

Madhusudana Rao, M.1974. The constituents of Ecballium elaterium L. Part XXIII. Cucurbitacins and hexanorcucurbitacins. Perkin Trans, 2795J. Chem. Soc., 2552-2556. doi: 10.1039/P19740002552

Martins, D., Barros, L., Carvalho, A. M. and Ferreira, I. C. F. R. 2011. Nutritional and in vitro antioxidant properties of edible wild greens in Iberian Peninsula traditional diet. Food Chemistry, 125(2), 488-494.

Rafael, M., Barros, L., Carvalho, A. M. and Ferreira, I. C. F. R. 2011. Topical anti-inflammatory plant species: Bioactivity of Bryonia dioica, Tamus communis and Lonicera periclymenum fruits. Industrial Crops and Products, 34(3), 1447-1454.

Ramachandra Rao, R.S. and Ravishankar, G. A. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances, 20(2), 101–153.

Sabandar, C. W., Ahmat, N., Jaafar, F. M. and Sahidin, I. 2013. Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several Jatropha species (Euphorbiaceae): A review. Phytochemistry, 85(0), 7-29.

Saeidnia, S. and Abdollahi, M. 2013. Toxicological and pharmacological concerns on oxidative stress and related diseases. Toxicology and Applied Pharmacology, 273(3), 442-455.

Sarışen, Ö. ve Çalışkan, D. 2005. Fitothrapy: Herbal Medicine, Attention of in primary health care. Sted, 14(8),182-187.

Sökmen, A. ve Gürel, E. 2001. Sekonder metabolit üretimi. Bitki Biyoteknolojisi. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya.

Verpoorte, R., Van Der Heijden, R., Ten Hoopen, H. J. G. and Memelink J. 1999. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the Production of Fine Biotechnology Letters, 21(6), 467-479.

Wang, H., Zhao, W., Choomuenwai, V., Andrews, K. T., Quinn, R. J. and Feng, Y. 2013. Chemical investigation of an antimalarial chinese medicinal herb Picrorhiza scrophulariiflora. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 23(21), 5915-5918.

Yang, G., Nowsheen, S., Aziz, K. and Georgakilas, A. G. 2013. Toxicity and adverse effects of tamoxifen and other anti-estrogen drugs. Pharmacology & Therapeutics, 139(3), 392-404.

Yang, Y., Zhang, Z., Li, S., Ye, X., Li, X. and He, K. 2014. Synergy effects of herb extracts: Pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. Fitoterapia, 92(0), 133-147.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	:	Mesut GÖK
Doğum Yeri	:	Gercüş
Doğum Tarihi	:	15.09.1984
Medeni Hali	:	Evli
Yabancı Dili	:	İnglizce
Adres	:	Bey Mah. 16037. Sok. No:5 Kat:3 P.K. 01030 Seyhan/ADANA TÜRKİYE
Tel:	:	0544-363-63-58
E-posta	:	mesutgok84@gmail.com

Lise	:	SEYHAN ADASOKAĞI LİSESİ
Lisans	:	Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen-Edebiyat Kimya Bölümü 2010
Yüksek Lisans	:	

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Yayınları (SCI ve diğer)

1- Koldaş S., Tüfekçi A. R., Gül F., Gök M., Demirtaş İ., 2011. *Origanum Vulgare* ssp. viride Bitkisinin Farklı Çözücü Ekstraktlarının Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi, 25. Ulusal Kimya Kongresi, Erzurum

2- Gök M., Tüfekçi A.R., Gül F., Demirtaş İ, 2012. *Bryonia multiflora* bitkisinden elde edilen sabit yağların ve hidrokarbonların GC-MS ile analizi ve antioksidant aktivitelerinin incelenmesi, Kromatografi 2012 kongresi, Tokat