ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

ASTRAGALUS PONTICUS PALL. TÜRÜNÜN ANTİPROLİFERATİF ETKİSİNİN İNCELENMESİ VE BİYOAKTİF BİLEŞENLERİN İZOLASYONU

Serkan KOLDAŞ

KİMYA ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2020

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Serkan KOLDAŞ tarafından hazırlanan "***Astragalus ponticus* Pall. türünün antiproliferatif etkisinin incelenmesi ve biyoaktif bileşenlerin izolasyonu**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

Jüri Üyeleri:

Başkan: Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

Üye: Prof. Dr. Şevki ARSLAN

Üye: Prof. Dr. Mehmet Emin DURU

Üye: Prof. Dr. Ahmet Ceyhan GÖREN

Üye: Doç. Dr. Ayşe ŞAHİN YAĞLIOĞLU

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Dr. Öğr. Üyesi İlkay ÇORAK ÖCAL
Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "***Astragalus ponticus* Pall. türünün antiproliferatif etkisinin incelenmesi ve biyoaktif bileşenlerin izolasyonu**" 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, tezi Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünden 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 Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim. (09.07.2020)

Serkan KOLDAŞ

ÖZET

Doktora Tezi

ASTRAGALUS PONTICUS PALL. TÜRÜNÜN ANTİPROLİFERATİF ETKİSİNİN İNCELENMESİ VE BİYOAKTİF BİLEŞENLERİN İZOLASYONU

Serkan KOLDAŞ

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

Bu tez çalışmasında biyoaktivite yönlendirmeli izolasyon yöntemi ile *Astraglus ponticus* Pall. bitkisinin kök kısmından ikisi yeni (**B5**, 2,3',4'-trihidroksi-4-metoksikalkon ve **B8**, 2',5-dihidroksi-2,4'-dimetoksikalkon) ve ikisi bilinen (**B1**, 3-deoksisappankalkon ve **B6**, izolikuiritigenin) 4 adet kalkon, bir adet bilinen izoflavankinon (**B2**, pendulon), bir adet bilinen auron (**B3**, 2-(2,5-dihidroksibenzil)-6-metoksiauron), iki adet bilinen izoflavan (**B10**, izomukronulatol ve **B15**, millepurpan), bir adet bilinen sikloartan glikozit (**B7**, siklogaleginosit B) ve bir adet bilinen steroid türevi (**B14**, ergosterol peroksit) olmak üzere 10 adet bileşik saflaştırılmıştır. Bunlara ek olarak aktif olmayan fraksiyonlardan da 3 adet bilinen sikloartan tipinde bileşik (**B11**, astrasieversianin II; **B12**, astrasieversianin VI ve **B13**, astrasieversianin IV) izole edilmiştir. Bu bileşiklerin yapıları MS, 1D ve 2D NMR ve X-Ray Tek Kristal Kırınım Spektroskopisi yöntemleri ile aydınlatılmıştır. Elde edilen bu bileşiklerin insan rahim kanseri (HeLa) hücreleri üzerine antiproliferatif etkileri incelenmiştir. Bu bileşiklerden HeLa hücrelerine karşı en yüksek antiproliferatif aktiviteyi **B5**, **B7**, **B8** ve **B12** kodlu bileşikler sırasıyla 36.6, 34.8, 20.6 ve 52.6 µM'lık IC_{50} değerleriyle göstermişlerdir. Diğer bileşikler 105.4-161.5 µM arasında değişen IC_{50} değerlerine sahipken **B3** ve **B14** kodlu bileşikler HeLa hücreleri üzerine proliferatif bir etki göstermiştir.

2020, 164 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Antiproliferatif aktivite, *Astragalus ponticus* Pall., doğal ürünler, HeLa, izolasyon, karakterizasyon

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

INVESTIGATION OF ANTIPROLIFERATIVE EFFECT OF *ASTRAGALUS PONTICUS* PALL. SPECIES AND ISOLATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS

Serkan KOLDAŞ

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

Supervisor: Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

In this thesis study, two new chalcones (2,3',4'-trihydroxy-4-methoxychalcone (**B5**) and 2',5-dihydroxy-2,4'-dimethoxychalcone (**B8**)), two known chalcones (3-deoxysappanchalcone (**B1**) and isoliquiritigenin (**B6**)), two known isoflavanes (isomucronulatol (**B10**) and millepurpan (**B15**), one known aurone (2-(2,5-dihydroxybenzyl)-6-methoxyaurone (**B3**)), one known isoflavanquinone (pendulone (**B2**)), one known cycloartane glycoside (cyclogaleginoside B (**B7**)), and one steroid derivative (ergosterol peroxide (**B14**)) were isolated from *Astragalus ponticus* Pall. species by using bioactivity-guided fractionation. Also, from the non-active fractions, three known cycloartane-type compounds, namely astrasieversianin II (**B11**), astrasieversianin IV (**B13**) and astrasieversianin VI (**B12**), were isolated. Molecular structures of these isolated compounds were revealed by using spectroscopic methods like MS, 1D and 2D NMR and Single Crystal X-Ray Diffraction. Furthermore, these isolated compounds were tested *in vitro* for their antiproliferative activities against human cervical cancer cells (HeLa). **B5**, **B7**, **B8** and **B12** showed the highest activites with 36.6, 34.8, 20.6 ve 52.6 µM IC_{50} values, respectively. Whereas **B3** and **B14** showed no activity, the rest had IC_{50} values between 105.4-161.5 µM.

2020, 164 pages

KEY WORDS: Antiproliferative activity, *Astragalus ponticus* Pall., characterization, HeLa, isolation, natural products

TEŞEKKÜR

Öncelikle doktora eğitimim boyunca gerek ders aşamasında ve gerek de tez aşamasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım danışman Hocam Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Çankırı'da bulunduğum sürenin hatırı sayılır kısmını hem laboratuvarda hem de sosyal ortamlarda birlikte geçirdiğim laboratuvar arkadaşlarım Öğr. Görevlisi Dr. Fatih GÜL ve Öğr. Görevlisi Ali Rıza TÜFEKÇİ'ye teşekkürlerimi bir borç bilirim. Saflaştırma ve yapı aydınlatma aşamalarındaki katkıları paha biçilemezdi. NMR analizleri esnasındaki emeklerinden dolayı Ömer Talat AKAR, Yaşar İPEK ve M. Ali DEMİRCİ'ye, *p*-HPLC çalışmaları için laboratuvar kullanımında kolaylık sağlayan Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğü'ne ve çalışmalardaki yardımlarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin AKŞİT'e, saf bileşiklerin antiproliferatif aktivite testlerinin yapılmasındaki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Şevki ARSLAN ve Doğukan MUTLU'ya, X-Ray analizleri için Doç. Dr. Hakan ÜNVER'e ve bu tez çalışmasında kullanılan bitki materyalini teşhis eden Ankara Üniversitesi'nden Uzm. S. Tuğrul KÖRÜKÇÜ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Çankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne de desteğinden dolayı teşekkürlerimi sunarım (Proje no: 2013/11).

Son olarak sadece eğitim hayatım boyunca değil tüm yaşamımda verdiğim kararlarda beni destekleyerek arkamda duran ve bana maddi manevi katkılarını hissettiren aileme sevgi ve minnetlerimi yolluyorum. İyi ki varlar...

Serkan KOLDAŞ

Çankırı, Temmuz 2020

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **xi**
1. KURAMSAL TEMELLER **1**
1.1 *Astragalus* Cinsi **4**
1.2 *Astragalus ponticus* Pall. **5**
1.3 *Astragalus* Türlerinin Kimyasal İçerikleri **6**
1.3.1 Triterpenoidler **7**
1.3.2 Sikloartan Tipi Triterpenoidler **8**
1.3.3 Oleanan Tipi Triterpenoidler **9**
1.3.4 Flavonoidler **11**
1.3.5 Polisakkaritler **12**
1.4 *Astragalus* Türlerinden İzole Edilen Moleküller **15**
1.5 *Astragalus* Türleri ve Kanser **33**
2. MATERYAL ve YÖNTEM **41**
2.1 Genel **41**
2.2 İTK plakalarının hazırlanması **41**
2.3 xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Yöntemi **42**
2.4 MTT Antiproliferatif Aktivite Testi Yöntemi **42**
2.4.1 Hücre Kültürü **42**
2.4.2 Antiproliferatif Aktivite Testi **43**
2.4.3 Sonuçların Değerlendirilmesi **43**
2.5 Bitki Materyali **44**
2.7 *Astragalus ponticus* Pall. Kök Kısmı Kaba Ayrım Çalışması **44**
2.8 *Astragalus ponticus* Kök Kısmının Ana Ekstresinin Hazırlanması **45**
2.9 AsPoKök Ana Ekstresi ile Yapılan Çalışmalar **45**
2.9.1 AsPoKök ana ekstresinin kaba fraksiyonlandırılma işlemi **45**
2.9.2 AsPoKök EtOAc fraksiyonlarının birleştirilmesi ve fraksiyonların HPLC-TOF/MS analizleri **46**
2.9.3 AsPoKök EtOAc fraksiyonlarının antikanser testleri **46**
2.9.4 İzolasyon Çalışmaları **46**
2.9.4.1 EA.A2 fraksiyonu ile yapılan izolasyon çalışmaları **48**
2.9.4.2 EA.A7 fraksiyonu ile yapılan izolasyon çalışmaları **50**
2.9.4.3 EA.A1 fraksiyonu ile yapılan izolasyon çalışmaları **50**
2.9.4.4 Sikloartan tipi triterpen glikozitlerin elde edilmesi **51**
3. BULGULAR ve TARTIŞMALAR **53**
3.1 *Astragalus ponticus* Pall. Bitkisinin Aktif Kısımlarının Belirlenmesi **53**
3.2 AsPoKök Ekstresinin Aktif Fraksiyonunun Belirlenmesi **55**
3.3 AsPoKök EtOAc Fraksiyonlarının Antikanser Testleri **59**
3.4 Antiproliferatif Aktiviteye Sahip Fraksiyonlardan Saflaştırılan Yeni Bileşiklerin Yapı Tayini **61**

3.4.1 B5 Bileşiğinin Yapı Tayini 61
3.4.2 B8 Bileşiğinin Yapı Tayini 73
3.5 *Astragalus ponticus* Pall. Bitkisinden İzole Edilen Bileşiklerin Antiproliferatif Aktiviteleri 103
4. SONUÇ 113
KAYNAKLAR 116
EKLER 121
EK 1 B1 bileşiğinin MS-MS spektrumu 121
EK 2 B1 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (metanol-d_4) 122
EK 3 B1 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (metanol-d_4) 123
EK 4 B2 bileşiğinin MS-MS spektrumu 124
EK 5 B2 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (kloroform-d) 125
EK 6 B2 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (kloroform-d) 126
EK 7 B3 bileşiğinin MS-MS spektrumu 127
EK 8 B3 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (DMSO-d_6) 128
EK 9 B3 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (DMSO-d_6) 129
EK 10 B6 bileşiğinin MS-MS spektrumu 130
EK 11 B6 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (metanol-d_4) 131
EK 12 B6 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (metanol-d_4) 132
EK 13 B7 bileşiğinin MS-MS spektrumu 133
EK 14 B7 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (metanol-d_4) 134
EK 15 B7 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (metanol-d_4) 135
EK 16 B10 bileşiğinin MS-MS spektrumu 136
EK 17 B10 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (metanol-d_4) 137
EK 18 B10 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (metanol-d_4) 138
EK 19 B11 bileşiğinin MS-MS spektrumu 139
EK 20 B11 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (metanol-d_4) 140
EK 21 B11 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (metanol-d_4) 141
EK 22 B12 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (metanol-d_4) 142
EK 23 B12 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (metanol-d_4) 143
EK 24 B13 bileşiğinin MS-MS spektrumu 144
EK 25 B13 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (metanol-d_4) 145
EK 26 B13 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (metanol-d_4) 146
EK 27 B14 bileşiğinin MS-MS spektrumu 147
EK 28 B14 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (kloroform-d) 148
EK 29 B14 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (kloroform-d) 149
EK 30 B15 bileşiğinin MS-MS spektrumu 150
EK 31 B15 bileşiğinin ^{1}H Nmr spektrumu (kloroform-d) 151
EK 32 B15 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (kloroform-d) 152
EK 33 B15 bileşiğinin Tek Kristal X-Ray analizi verileri 153
Ek 34 B15 bileşiğindeki molekül içi ve moleküller arası H bağı etkileşimleri 154
EK 35 B8 bileşiğinin Tek Kristal X-Ray analizi verileri 155
EK 36 B8 bileşiğinin bazı bağ uzunlukları ve bağ açıları 156
EK 37 B8 bileşiğindeki molekül içi ve moleküller arası H bağı etkileşimleri 157
EK 38 B5 bileşiğinin TOF/MS spektrumu 158
EK 39 B8 bileşiğinin TOF/MS spektrumu 159
EK 40 B10 bileşiğinin TOF/MS spektrumu 160
EK 41 B15 bileşiğinin TOF/MS spektrumu 161

ÖZGEÇMİŞ 162

SİMGELER DİZİNİ

J	Eşleşme sabiti
α	Alfa
β	Beta
rpm	Dakikada dönüş sayısı
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
brs	Geniş singlet
brd	Geniş dublet
g	Gram
HSQC	Heteronükleer Tek Kuantum Tutarlılığı
HMBC	Heteronükleer Çoklu Bağ Uyumluluğu
İTK	İnce tabaka kromatografisi
IC_{50}	%50 inhibisyon derişimi
2D-NMR	İki Boyutlu Nükleer Manyetik Rezonans
kg	Kilogram
COSY	Korolasyon Spektroskopisi
MS	Kütle Spektroskopisi
L	Litre
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
ppm	Milyonda Bir
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
p-HPLC	Preparatif Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
ºC	Santigrat Derece
s, d, dd, t, m	Singlet, dublet, dubletin dubleti, triplet, multiplet
1D-NMR	Tek boyutlu Nükleer Manyetik Rezonans
%	Yüzde

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Morfin (1), penisilin G (2), kinin (3), salisin (4) 3
Şekil 1.2 Deniz canlılarından izole edilen bazı biyoaktif bileşikler: Halomon (5), tedanolide (6), ecteinascidin-743 (7) 4
Şekil 1.3 *Astragalus ponticus* Pall. (Fotoğraf yazar tarafından çekilmiştir) 6
Şekil 1.4 İzopren'in (8) yapısı 7
Şekil 1.5 Bazı terpen ve terpenoidler: Limonen (9), monoterpen; karvon (10), monoterpenoid; humulen (11), seskiterpen; taksadien(12), diterpen; skualen(13), triterpen 8
Şekil 1.6 Sikloartenol (17) 9
Şekil 1.7 Bazı sikloartan tipi bileşikler ve elde edildikleri *Astragalus* türleri: Hareftosit A, *A. hareftae* (18); siklokuivinosit A, *A. chivensis* (19); astramembranosit B, *A. membranaceus* (20); kaspikusit I, *A. caspicus* (21) 9
Şekil 1.8 (+)-Oleanan (22) 10
Şekil 1.9 Bazı oleanan tipi bileşikler ve elde edildikleri *Astragalus* türleri: Soyasapojenol B, *A. caprinus* (23); azukisaponin V, *A. cruciatus* (24); astragaloside V, *A. flavescens* (25) 10
Şekil 1.10 Sulfuretin (26), izolikuiritigenin (27), pendulon (28) 11
Şekil 1.11 *Astragalus* türlerinden elde edilen bazı flavonoid yapılı bileşikler: Cosmosiin (29), astragalin (30), naringenin (31), afrormosin (32), maackiain (33), astragalukinon (34) 12
Şekil 1.12 Glukoz birimlerinden oluşan amiloz'un (35) yapısı 13
Şekil 1.13 a) İşkembedeki mikroorganizmalar tarafından yükseltgenme, b) Karaciğer enzimleri tarafından yükseltgenme 14
Şekil 1.14 Swainsonin (39) 14
Şekil 1.15 1-Hidroksi-5-metilolbenzol-2-*O*-β-D-glukozit (40) ve (3R, 4R)-4,7-hidroksi-20,30-dimetoksiisoflavan-40-*O*-β-D-glukozit (41) 15
Şekil 1.16 İzoramnetin-3-gentiobiosit (42), rutin (43) ve narsisin (44) 16
Şekil 1.17 Soyasaponin III (57), izoramnetin-3-*O*-glukozit (58), izoramnetin-3-*O*-rutinosit (59), sorbifolin (60), soyasaponin I (61), apigenin-7-*O*-β-D-glukopiranoz-(1'''-3'')-β-D-glukopiranozit (62), 8-metoksivestitol (63), stigmasterol (64) 17
Şekil 1.18 Sikloorbikosit G (74) ve siklosieversiosit A (75) 18
Şekil 1.19 Xiao ve arkadaşlarının Radix Astragali'den elde ettikleri flavonoid glikozitler 19
Şekil 1.20 Formononetin (67) 20
Şekil 1.21 Lakeosit (81) 20
Şekil 1.22 Kültüre edilmiş ve vahşi *A. gombiformis* farklı organlarının kantitatif analiz sonuçları (WAP: vahşi, topraküstü; CAP: kültür, topraküstü; WL: vahşi, yaprak; CL; kültür, yaprak; WS: vahşi gövde; CS: kültür gövde) (Montoro et al. 2013) 21
Şekil 1.23 3-*O*-α-L-arabinozil-(1→6)-β-D-galaktopiranozit-7-metoksikamferol (92) ve 3-*O*-α-L-ramnopiranozil-7-*O*-α-L-ramnopiranozil-(1→6)-β-D-galaktopiranozitkamferol (93) 22
Şekil 1.24 Gülcemal ve arkadaşlarının *Astragalus tauricolus* bitkisinden elde ettikleri oleanan glikozitler 24

Şekil 1.25 Chen ve arkadaşlarının *Astragalus adsurgens* bitkisinden izole ettikleri bazı bileşikler 25
Şekil 1.26 Tang ve arkadaşlarının *Astragalus membranaceus* bitkisinden elde ettikleri bileşikler 27
Şekil 1.27 Xiao ve arkadaşlarının *Astragalus englerianus* bitkisinden elde ettikleri bileşikler 29
Şekil 1.28 Ghasemian-Yadegari ve arkadaşlarının *Astragalus maximus* bitkisinden elde ettikleri bileşikler 30
Şekil 1.29 Pu ve arkadaşlarının *Astragalus taipaishanensis* bitkisinden elde ettikleri bileşikler 31
Şekil 1.30 El Dib ve arkadaşlarının *Astragalus abyssinicus* bitkisinden elde ettikleri yeni bileşikler 32
Şekil 1.31 Karabey ve arkadaşlarının *Astragalus schottianus* Boiss. bitkisinden elde bettikleri sikloartan glikozitler 33
Şekil 1.32 Astragalosit IV (36) 34
Şekil 1.33 Graziani ve arkadaşlarının *Astragalus boeticus* bitkisinden elde ettikleri yeni sikloartan glikozitler 36
Şekil 1.34 Spinokumarin I (164) 36
Şekil 1.35 Astragalosit III (171) 37
Şekil 1.36 Yalçın ve arkadaşları *Astragalus stereocalyx* Bornm. bitkisinden elde ettikleri yeni sikloartan glikozitler 39
Şekil 2.1 *Astragalus ponticus* Pall. bitkisinin kök kısmı ile yapılan biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlandırma aşamaları 47
Şekil 2.2 EA.A2 fraksiyonunun Sephadex LH-20 kolonda alt fraksiyonlara ayrılması şeması 48
Şekil 3.1 AsPoÇi antikanser test sonucu 54
Şekil 3.2 AsPoGöv antikanser test sonucu 54
Şekil 3.3 AsPoKök antikanser test sonucu 55
Şekil 3.4 *Astragalus ponticus* kök kısmı MeOH/$CHCl_3$ ana ekstresinin diklorometan (DCM), etilasetat (EA) ve metanol (M) fraksiyonlarının HeLa hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri 56
Şekil 3.5 AsPoKök MeOH/$CHCl_3$ ana ekstresinin etilasetat fraksiyonlarının HPLC-TOF/MS kromatogramları 58
Şekil 3.6 *Astragalus ponticus* Pall. kök kısmı MeOH/$CHCl_3$ ekstresinin etilasetat fraksiyonlarının HeLa hücreleri üzerine antiproliferatif etkileri 60
Şekil 3.7 B5 bileşiğinin MS-MS spektrumu 61
Şekil 3.8 B5 bileşiği için önerilen MS-MS parçalanma ürünleri 62
Şekil 3.9 B5 bileşiğinin yapısı 63
Şekil 3.10 B5 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu 65
Şekil 3.11 B5 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu 66
Şekil 3.12 B5 bileşiğinin DEPT spektrumu 67
Şekil 3.13 B5 bileşiğinin HSQC spektrumu 68
Şekil 3.14 B5 bileşiğinin COSY spektrumu 69
Şekil 3.15 B5 bileşiğinin COSY etkileşimleri 70
Şekil 3.16 B5 bileşiğinin 1. Bölge HMBC etkileşimleri 71
Şekil 3.17 B5 bileşiğinin 2. Bölge HMBC etkileşimleri 72
Şekil 3.18 B8 bileşiğinin MS-MS spektrumu 73
Şekil 3.19 B8 bileşiği için önerilen MS-MS parçalanma ürünleri 74

Şekil 3.20 B8 bileşiğinin yapısı 75
Şekil 3.21 B8 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu 77
Şekil 3.22 B8 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu 78
Şekil 3.23 B8 bileşiğinin DEPT spektrumu 79
Şekil 3.24 B8 bileşiğinin HSQC spektrumu 80
Şekil 3.25 B8 bileşiğinin COSY spektrumu 81
Şekil 3.26 B8 bileşiğinin COSY etkileşimleri 82
Şekil 3.27 B8 bileşiğinin 1. Bölge HMBC etkileşimleri 83
Şekil 3.28 B8 bileşiğinin 2. Bölge HMBC etkileşimleri 84
Şekil 3.29 B8 bileşiğinin 3. Bölge HMBC etkileşimleri 85
Şekil 3.30 B8 bileşiğinin 4. Bölge HMBC etkileşimleri 86
Şekil 3.31 B8 bileşiğinin kristal yapısı 87
Şekil 3.32 B8 bileşiğinin molekül içi ve moleküller arası H bağı etkileşimleri (Å) 87
Şekil 3.33 B1 bileşiğinin yapısı 88
Şekil 3.34 B2 bileşiğinin yapısı 89
Şekil 3.35 B3 bileşiğinin yapısı 90
Şekil 3.36 B6 bileşiğinin yapısı 91
Şekil 3.37 B7 bileşiğinin yapısı 92
Şekil 3.38 B10 bileşiğinin yapısı 93
Şekil 3.39 B10 bileşiğinin kristal yapısı 94
Şekil 3.40 B10 bileşiğinin molekül içi ve moleküller arası H bağı etkileşimleri (Å) 95
Şekil 3.41 B11 bileşiğinin yapısı 95
Şekil 3.42 B12 bileşiğinin yapısı 97
Şekil 3.43 B13 bileşiğinin yapısı 99
Şekil 3.44 B14 bileşiğinin yapısı 101
Şekil 3.45 B15 bileşiğinin yapısı 102
Şekil 3.46 HeLa hücreleri üzerine B1 bileşiğinin etkisi 104
Şekil 3.47 HeLa hücreleri üzerine B5 bileşiğinin etkisi 104
Şekil 3.48 HeLa hücreleri üzerine B6 bileşiğinin etkisi 104
Şekil 3.49 HeLa hücreleri üzerine B8 bileşiğinin etkisi 105
Şekil 3.50 Vogel et al. (2008) sentezledikleri kalkon türevleri 106
Şekil 3.51 HeLa hücreleri üzerine B10 bileşiğinin etkisi 108
Şekil 3.52 HeLa hücreleri üzerine B15 bileşiğinin etkisi 108
Şekil 3.53 Kanneakam ve arkadaşlarının *Dalbergia velutina* biktisinden izole ettikleri izoflavanlar 109
Şekil 3.54 HeLa hücreleri üzerine B7 bileşiğinin etkisi 110
Şekil 3.55 HeLa hücreleri üzerine B11 bileşiğinin etkisi 111
Şekil 3.56 HeLa hücreleri üzerine B12 bileşiğinin etkisi 111
Şekil 3.57 HeLa hücreleri üzerine B13 bileşiğinin etkisi 111
Şekil 3.58 HeLa hücreleri üzerine B3 bileşiğinin etkisi 112
Şekil 3.59 HeLa hücreleri üzerine B14 bileşiğinin etkisi 112

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Doğal ürün kullanımının tarihsel gelişimi (Sarker et al. 2006) 2
Çizelge 1.2 Pu ve arkadaşlarının *Astragalus taipaishanensis* bitkisinden elde ettikleri bileşiklerin antioksidan test sonuçları 31
Çizelge 1.3 Wang ve arkadaşlarının elde ettikleri antiproliferatif test sonuçları 37
Çizelge 1.4 Wang ve arkadaşlarının elde ettikleri apoptoz test sonuçları 37
Çizelge 2.1 AsPoKök ana ekstresinin MeOH fraksiyonundan elde edilen etilasetat alt fraksiyonları ve miktarları 51
Çizelge 3.1 AsPoKök etilasetat altfraksiyonu miktarları 57
Çizelge 3.2 AsPoKök MeOH/$CHCl_3$ ekstresinin etilasetat fraksiyonlarının HPLC-TOF/MS kromatogramlarına göre birleştirilme tablosu 59
Çizelge 3.3 B5 bileşiğinin ^{1}H ve ^{13}C NMR rezonans değerleri 64
Çizelge 3.4 B8 bileşiğinin ^{1}H ve ^{13}C NMR rezonans değerleri 76
Çizelge 3.5 B1 bileşiğinin karşılaştırmalı ^{1}H ve ^{13}C NMR rezonans değerleri 88
Çizelge 3.6 B2 bileşiğinin karşılaştırmalı ^{1}H ve ^{13}C NMR rezonans değerleri 89
Çizelge 3.7 B3 bileşiğinin karşılaştırmalı ^{1}H ve ^{13}C NMR rezonans değerleri 91
Çizelge 3.8 B6 bileşiğinin karşılaştırmalı ^{1}H ve ^{13}C NMR rezonans değerleri 92
Çizelge 3.9 B7 bileşiğinin karşılaştırmalı ^{1}H ve ^{13}C NMR rezonans değerleri 93
Çizelge 3.10 B10 bileşiğinin karşılaştırmalı ^{1}H ve ^{13}C NMR rezonans değerleri..... 94
Çizelge 3.11 B11 bileşiğinin karşılaştırmalı ^{1}H ve ^{13}C NMR rezonans değerleri..... 96
Çizelge 3.12 B12 bileşiğinin karşılaştırmalı ^{1}H ve ^{13}C NMR rezonans değerleri..... 98
Çizelge 3.13 B13 bileşiğinin karşılaştırmalı ^{1}H ve ^{13}C NMR rezonans değerleri..... 100
Çizelge 3.14 B14 bileşiğinin karşılaştırmalı ^{1}H ve ^{13}C NMR rezonans değerleri..... 101
Çizelge 3.15 B15 bileşiğinin karşılaştırmalı ^{1}H ve ^{13}C NMR rezonans değerleri..... 102

1. KURAMSAL TEMELLER

Doğal ürünler, canlı organizmalardan (bitki, hayvan, bakteri v.d.) elde edilen ve geleneksel ve modern tıpta hastalıkların tedavisinde veya hastalıkların önlenmesinde kullanılan etken bileşenlerdir. Bunlar ilaç etken maddeleri gibi saf moleküller olabileceği gibi özüt veya karışımlar da olabilirler. Doğal ürünler *i*) kurutma gibi basit bir saklama işlemi dışında herhangi bir işleme maruz kalmamış tüm bir organizmayı (bir bitki, hayvan veya mikroorganizma), *ii*) bir organizmanın bir bölümünü (bir bitkinin yaprak/çiçek kısmı veya bir hayvanın organı), *iii*) bir organizmanın tümü veya bir parçasının ekstresini ve *iv*) saf bileşikleri (alkaloidler, kumarinler, flavonoidler, glikozitler, lignanlar vb.) kapsar. Ancak doğal ürün denildiğinde genellikle, herhangi bir organizma tarafından üretilen ve organizmanın yaşamsal fonksiyonları için elzem olmayan küçük moleküller (< 2000 akb) yani *ikincil metabolitler* kastedilir (Sarker et al. 2006).

İkincil metabolitler bakteri, mantar veya bitkiler tarafından üretilen organik bileşiklerdir. Bunlar organizmanın normal büyüme, gelişme ve çoğalma işlevlerinde yer almazlar. Birincil metabolitlerin (proteinler, yağlar, karbohidratlar) aksine ikincil metabolitlerin yokluğu organizmanın ani ölümüne neden olmayan, sadece uzun dönemde onun yaşamsal faaliyetlerinde aksamalara, dış görünüşünde değişikliklere, verimliliğinde azalmalara neden olabilen, bazı durumlarda hiç etkisi olmayan moleküllerdir. İkincil metabolitler organizmaya başka canlılar tarafından yapılan saldırılara karşı kendini korumada, rekabette, ve türlerarası etkileşimde - çiftleşme veya tozlaşma zamanlarında salgılanan feromonlar gibi - yardımcı olur.

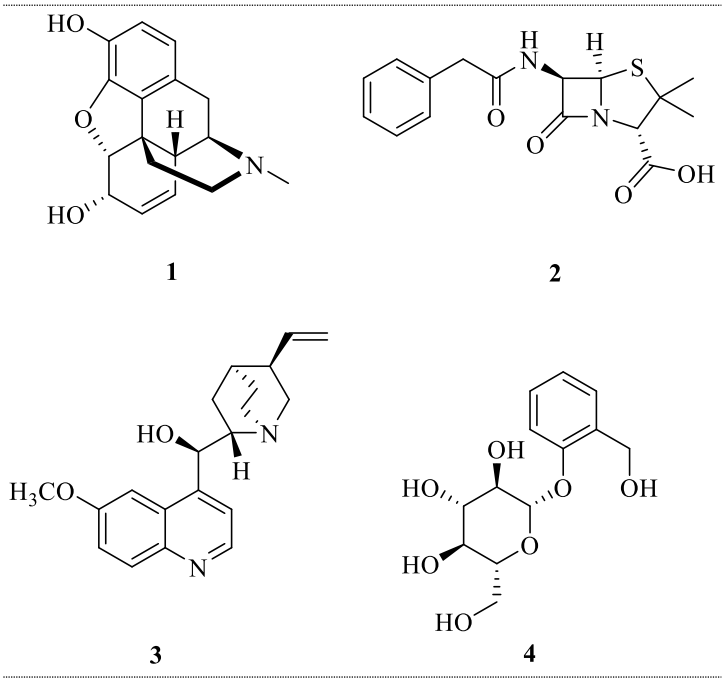
Doğal ürünler ilaçların geliştirilmesinde etken olan lider üretim kaynaklarıdır. Halihazırda birçok ürün özellikle antikanser ve enfeksiyon önleyici madde olarak klinik deney aşamasındadır (Harvey 2008).

Çizelge 1.1 Doğal ürün kullanımının tarihsel gelişimi (Sarker et al. 2006)

Dönem	Tip	Tanım
M.Ö. 3000 öncesi	*Ayurveda* (Yaşamın bilgisi) *Geleneksel Çin Tıbbı*	Bitkilerin ve diğer doğal ürünlerin tedavi edici özelliklerinden bahseder.
M.Ö. 1550	*Ebers Papirüsleri*	Doğal kaynaklardan elde edilen pek çok ham ilaçtan bahseder (Hint yağı bitkisi, Arap zamkı).
M.Ö. 460-377	*Hipokrat* "Tıbbın Babası"	İlaç kaynağı olabilecek pek çok bitki ve hayvan tanımlamıştır.
M.Ö. 370-287	*Theophrastus*	İlaç kaynağı olabilecek pek çok bitki ve hayvan tanımlamıştır.
M.S. 23-79	*Yaşlı Pliny*	İlaç kaynağı olabilecek pek çok bitki ve hayvan tanımlamıştır.
M.S. 60-80	*Dioscorides*	600'den fazla tıbbi bitkiyi tanımlayan *De Materia Medica*'yı yazmıştır.
M.S. 131-200	*Galen*	Bitkisel tıbbı uygulamış ve Batı'da ünlendirmiştir.
15. Yüzyıl	*Kräuterbuch* (Bitki Kitabı)	Tıbbi bitkilerin resim ve bilgilerini sunar.

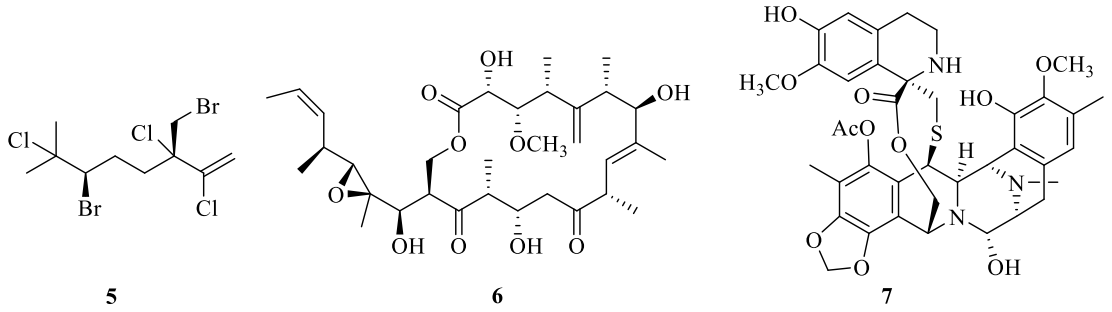
Potansiyel biyoaktif kimyasalların keşfedilmesinde geleneksel tıbbın rolü oldukça önemlidir. Doğal ürünlerin kullanımı tarihsel olarak Antik Mısır ve Çin uygarlıklarında bile görülürken modern anlamda kullanımları 1800'lü yılların hemen başında bir eczacı çırağının haşhaş - *Papaver somniferum* - bitkisinden morfin (**1**) bileşiğini izole etmesiyle başlamıştır (Li and Vederas 2009). 1600'lü yıllardan beri sıtma hastalığının tedavisinde kullanılan kınakına (*Cinchona succirubra*) ağacının kabuklarından 1820 yılında izole edilen kinin molekülü sıtma tedavisinde kullanılan ilaç aktif maddesidir. Ebers Papirüsleri'nde (Mısır eczacılık kayıtları, M.Ö. 1500) söğüt ağacı yapraklarının ateş düşürücü olarak kullanıldığından bahsedilir (Tesso 2005). Bu bilgiyi kullanan araştırmacılar söğüt ağacı (*Salix alba*) kabuğundan salisin molekülünü izole etmişler, bu molekül de hidroliz ve yükseltgenme basamaklarından sonra salisilik aside dönüştürülerek dünya çapında ateş düşürücü etkisinden dolayı üretilip kullanılmaya başlanmıştır. Salisilik asidin zamanla asetilsalisilik asit'e (Aspirin) dönüştürülmesiyle aspirin dünyada en çok üretilip kullanılan ilaçlardan birisi haline gelmiştir.

Sonrasında, farmasotik araştırmalar penisilinin keşfinin verdiği ümitle birlikte 2. Dünya Savaşı'ndan sonra mikroorganizmaların yeni antibiyotiklerin keşfedilmesi amacıyla test edilmesiyle artış göstermiştir (Li and Vederas 2009).



Şekil 1.1 Morfin (**1**), penisilin G (**2**), kinin (**3**), salisin (**4**)

Karada yaşayan organizmalar erişilebilirliklerinden dolayı uzun yıllar detaylı bir şekilde araştırılmış ve bunlardan birçok yeni bileşik izole edilmiştir. Dünyamızın %70'ten fazlasının sularla kaplı olması ve teknolojinin de gelişmesiyle birlikte son yıllarda araştırmacılar gözlerini okyanus ve denizlere çevirerek doğal ürün araştırmalarında materyal olarak deniz organizmalarını seçmişlerdir. 1970'li yıllardan bu yana sucul canlılardan pek çok yeni bileşik ve yeni bileşik iskeletleri keşfedilmiştir (Boufridi and Quinn 2018).



5 **6** **7**

Şekil 1.2 Deniz canlılarından izole edilen bazı biyoaktif bileşikler: Halomon (**5**), tedanolide (**6**), ecteinascidin-743 (**7**)

Doğal ürünlerin sentetik olanlarına karşı sahip oldukları avantajlarından birisi, bunların metabolit özelliği gösterebilmeleridir. Bu özellikleri doğal ürünlere vücut içinde yabancıdan ziyade biyolojik sistemin bir parçası gibi davranabilme ve en basit örnek olarak hücre içinde veya hücrelerarası sıvıda taşınabilme/metabolize olabilme yeteneği verir. Bu özelliklere ek olarak doğal ürünler bir dizi farmakofor (moleküllerdeki belirli biyolojik aktiviteye sahip olan veya sahip olabileceği öngörülen üç boyutlu düzenlemeye sahip atom veya gruplar) gruplar ve stereo merkeze sahiplerdir. Bu nedenle doğal ürünlerin biyolojik sistemlerde enzim akif bölgesi ve reseptör gibi üçboyutlu bağlantı noktaları üzerinden tepkime, iletim, taşınma vb. işlemlerin gerçekleştirilmesinde aktif rol alabilme olasılıkları yüksektir.

Doğal ürün araştırmaları, beraberinde bir dizi kazanç da getirmiştir. İnsanlığın kullanımına sunduğu kullanışlı ilaçların yanında *i*) ayırma ve saflaştırma alanındaki gelişmelere, *ii*) molekül yapılarının aydınlatılmasında kullanılan spektroskopi yöntemlerinin geliştirilmesine ve *iii*) doğal ürün temelli sentetik ürünlerin veya doğal ürün sentezlerinin ilerlemesi alanında sentetik organik kimyaya çok büyük katkılar sağlamıştır.

1.1 *Astragalus* Cinsi

790,000 km^2'lik yüzölçümüyle Türkiye hem Asya'da (Anadolu) hem de Avrupa'da (Trakya) toprağı olan bir ülkedir. Ülkemiz Akdeniz, Karadeniz ve Ege Denizleriyle

çevrilmiş olup doğu ve kuzey bölgeleri kısmen yüksek rakımlı dağlık, buna nispeten batı ve güney bölgeleri daha düşük rakımlı düzlüktür ve ülkenin güneyinden geçen Toros Sıradağları bulunmaktadır (ortalama yükseklik 1,130 m). Ülkede üç ana fitocoğrafik bölge bulunmaktadır. Bunlar İran-Turan bölgesi (Doğu ve iç Anadolu ekseninde), Akdeniz Havzası (Batı-Güney Batı ekseninde) ve Kafkas (Kuzey Doğu ekseninde) bölgeleridir (Noroozi et al. 2019). İşte bu farklı coğrafi özellikler Türkiye'de farklı iklimlerin bulunmasına ve ülkemizin çok zengin bir bitki florasına sahip olmasına neden olmuştur.

Türkiye'de bulunan bitki taksonu sayısı 12,000 civarındadır. Yukarıda bahsedilen yeryüzü özelliği çeşitliliğinden dolayı da bu türlerin endemizm oranı %32 civarındadır (Avcı 2005). Bu oran bazı Avrupa ülkeleriyle karşılaştırıldığında hayli yüksek görünmektedir: Yunanistan %14.9, Fransa %2.9, İspanya %18.6, Polonya %0.1 (Avcı 2005). İşte bu çeşitlilik içerisinde *Astragalus L.* (Fabaceae ailesinin en geniş cinsi) cinsinin yeryüzünde bulunan 3000'in üzerinde tür çeşitliliği Türkiye Bitkileri Veri Servisi'ne (TÜBİVES) Türkiye florasında 447 tür (www.tubives.com 2020) ve yaklaşık %50'lik bir endemizm oranı ile temsil edilmektedir (Gülcemal et al. 2013). *Astragalus* bitki kökleri çok eski zamanlardan bu yana özellikle Geleneksel Çin Tıbbı'nda yaygın kullanım alanları bulmuştur ve antiperspirant, antidiüretik olarak ve diyabet, lösemi ve rahim kanseri gibi rahatsızlıkların tedavisinde kullanılagelmiştir (Calis and Sticher 1996). Ayrıca, Çin'de *Astragalus membranaceus* ve *A. sinicus* köklerinin suda kaynatılarak elde edilen kürleri diş ağrısı ve ağız sağlığı için reçetelere eklenmektedir (Avunduk et al. 2008). Türkiye'de ise en çok kitre zamkı üretmek amacıyla kullanılmışlardır. Bu amaçla en yaygın kullanılan *Astragalus* türü *A. microcephalus* olmuştur.

1.2 *Astragalus ponticus* Pall.

Bitki çok yıllık, dik gövdeli, 25-100 cm. Stipüller şeritsi-mızraksı, 12-30 mm, özellikle de kenarlarında seyrek basık tüylüdür. Yaprakları 7-35 cm, yaprak sapları 7-30 mm; yaprakçıkları 9-23 çift, dikdörtgensi, darca yumurtamsı, küt uçlu, 7-40 x 3.5-12 mm,

üstte yüzeyi tüysüz, alt yüzey basık basit tüylüdür. Çiçek durumu sapı 0.5-1 cm. Rasem küremsi veya yumurtamsı, çiçekler sapsızdır. Brakteler mızraksı-yumurtamsı veya şeritsi, 2-7 mm, kenarları sillidir. Brakteoller mevcut değildir. Çanak yaprakları tüpsü, tüp meyvede hafifçe şişkin, villoz; dişler 1-3 mm, şeritsi, sillidir. Taç yaprakları sarı, bayrakçık 18-22 x 6 mm, dar tırnaklı, tüysüzdür. Kanat 18 x 3 mm. Keel 17-18 x 2-5 mm, filamentler 16-17 mm, tüysüz, beyaz-sarımsı; anterler sarı, dorsifikstir. Ovaryum 5 mm, yumurtamsı, yoğun beyaz tüylü; stilüs 15 mm, tabana kadar tüylü, stigma kapitattır. Legüm (meyve) 10 x 4-4.5 mm, yumurtamsı, basık, kaliks içinde, tüylü, iki bölmeli; gaga kıvrık, 4-5 mm uzunluğundadır. Tohumlar böbreksi, 4 x 2.5-3 mm, açık kahverengi ve düzdür. Çiçeklenme dönemi Mayıs-Ağustos arasındadır (Akan and Aytac 2014).



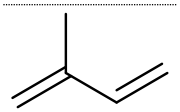
Şekil 1.3 *Astragalus ponticus* Pall. (Fotoğraf yazar tarafından çekilmiştir)

1.3 *Astragalus* Türlerinin Kimyasal İçerikleri

Astragalus türlerinden izole edilen bileşikler temel olarak üç ana grupta toplanmaktadır. Bunlar; 1) Triterpenoidler, 2) Flavonoidler ve 3) Polisakkaritlerdir.

1.3.1 Triterpenoidler

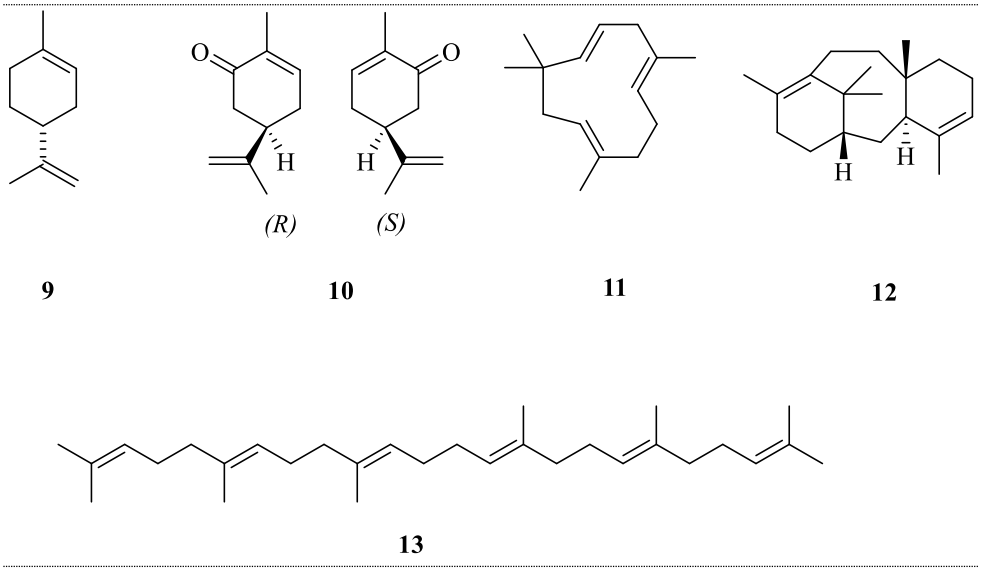
Triterpenoid yapılı bileşikler *Astragalus* türlerinden izole edilen bileşikler içinde en çok sayıya sahip bileşiklerdir. İzopren (Şekil 1.4) birimlerinden oluşan doğal ürün kaynaklı bileşikler terpenler olarak tanımlanmaktadır ve bunlar hidrokarbonlardır. Terpenoidler ise terpenlerin genellikle oksijenli bir fonksiyonel grup taşıyan türevleridir.



8

Şekil 1.4 İzopren'in (**8**) yapısı

Terpenler, izopren (**8**) (C_5) birimlerinin biyosentetik yolaklarda biraraya gelmesiyle sentezlenirler. Barındırdıkları izopren birimlerinin sayısına göre adlandırılırlar: Hemiterpenler, C_5; monoterpenler, C_{10}; seskiterpenler, C_{15}; diterpenler, C_{20}; sesterterpenler, C_{25}; triterpenler, C_{30}; tetraterpenler (karotenoidler), C_{40} ve politerpenler, C_{5n} (Moss et al. 1995).

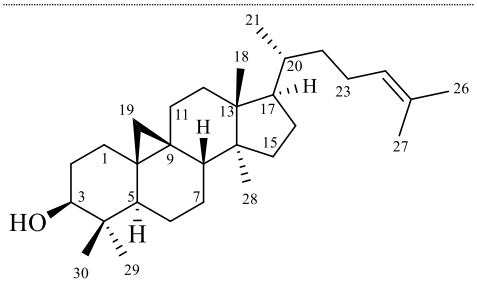


Şekil 1.5 Bazı terpen ve terpenoidler: Limonen (**9**), monoterpen; karvon (**10**), monoterpenoid; humulen (**11**), seskiterpen; taksadien(**12**), diterpen; skualen(**13**), triterpen

Triterpenoidler *Astragalus* cinsinin ana kimyasal bileşenleridir. Bu bileşiklerin *Astragalus* cinsinde ağırlıklı olarak bulunanları sikloartan tipinde ve oleanan tipinde olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Bu bileşikler bitkilerde serbest halde bulunabildikleri gibi glikozit halinde de bulunabilirler.

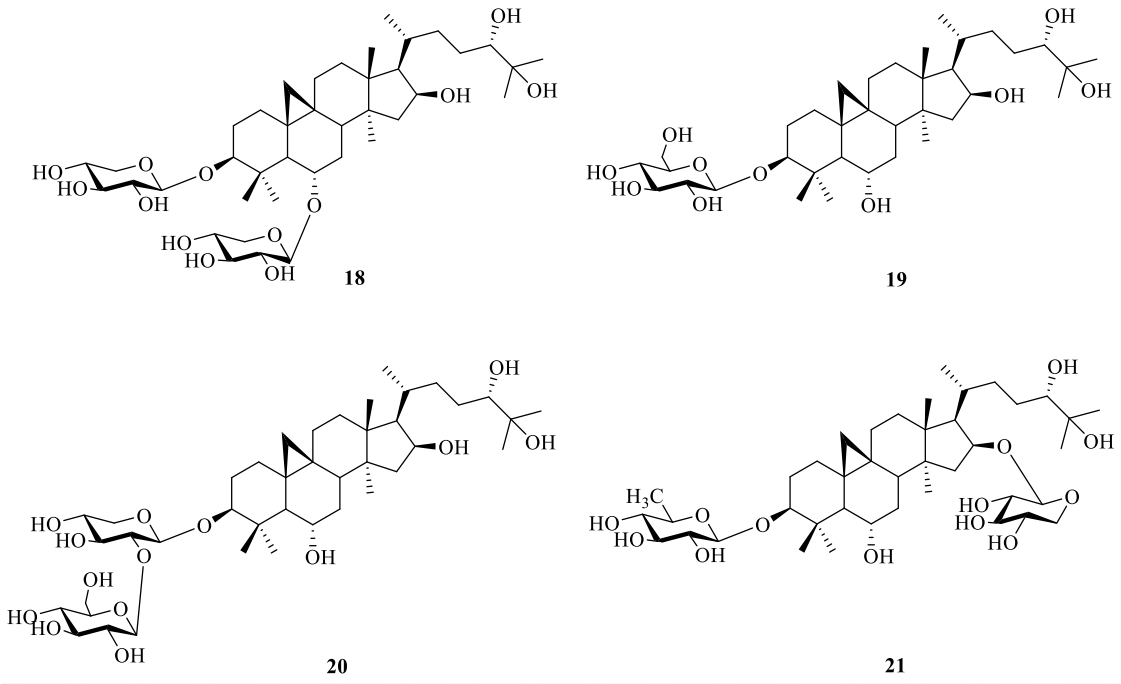
1.3.2 Sikloartan Tipi Triterpenoidler

Sikloartan triterpenoidler ilk olarak *Astragalus* türlerinden izole edilmiştir ve bu cinsten elde edilen triterpenoid sınıfı bileşiklerin baskın çoğunluğu sikloartan triterpenoid sınıfındandır (Yang et al. 2013). Sikloartan tipi bileşikler kardiyotonik/kalp güçlendirici, kolesterol düşürücü, antidepresif, bakteri gelişimini önleyici ve bağışıklık sistemini düzenleyici etkilerinden dolayı araştırmacıların ilgisini çekmektedir (Li et al. 2014). Bu bileşikler sikloartenol'ün (Şekil 1.6) C(6), C(16), C(20), C(23) veya C(24) karbonlarında yükseltgenmesiyle ve halka kapanmalarıyla oluşurlar. Oluşan yapılar 20,24-epoksit (sikloastragenol (**14**)), 20-25 epoksit, 16,24;20,24-diepoksit (sikloalpigenin (**15**)) veya 16,23;16,24-diepoksit (sikloorbigenin B (**16**)) türevleridir.



17

Şekil 1.6 Sikloartenol (**17**)

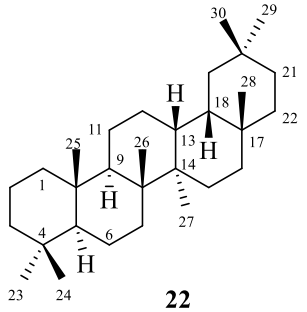


18 **19** **20** **21**

Şekil 1.7 Bazı sikloartan tipi bileşikler ve elde edildikleri *Astragalus* türleri: Hareftosit A, *A. hareftae* (**18**); siklokuivinosit A, *A. chivensis* (**19**); astramembranosit B, *A. membranaceus* (**20**); kaspikusit I, *A. caspicus* (**21**)

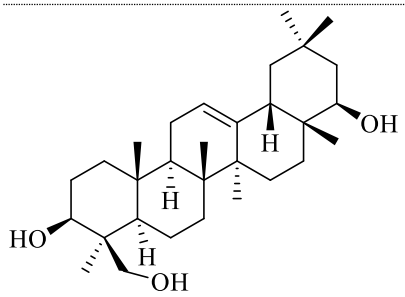
1.3.3 Oleanan Tipi Triterpenoidler

Astragalus türlerinde sikloartan tipi bileşikler kadar yaygın olmamakla birlikte oleanan tipi triterpenoidler de bulunmaktadır. Bu tipteki bileşiklerin ana iskeleti olan oleanan bileşiği 6 adet izopren biriminin bağlanmasıyla oluşan 5 halkalı bir triterpenoittir (Şekil 1.8).

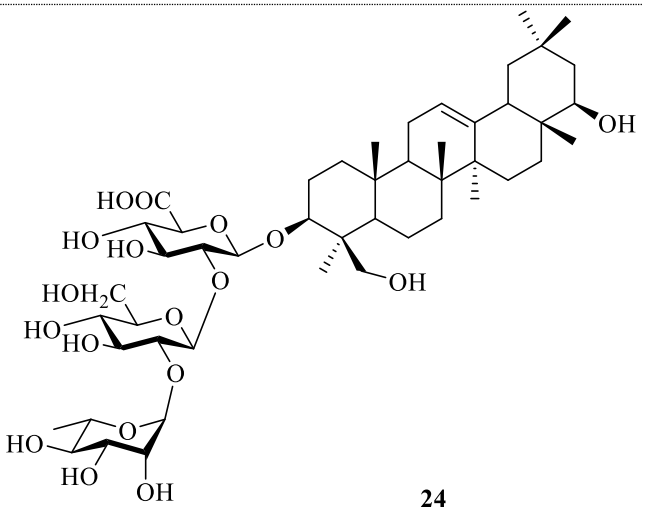


22

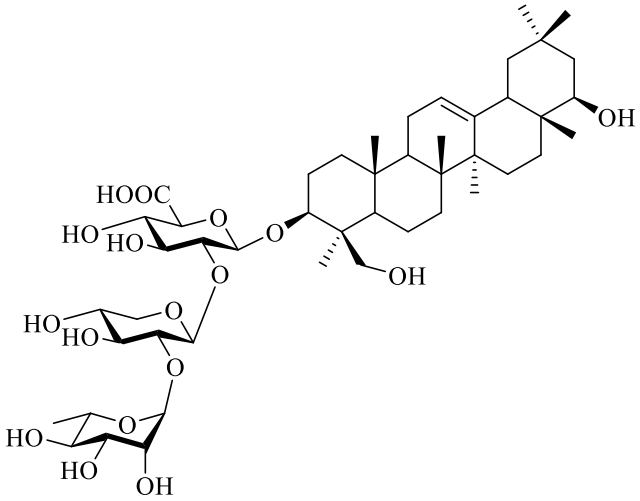
Şekil 1.8 (+)-Oleanan (**22**)



23



24

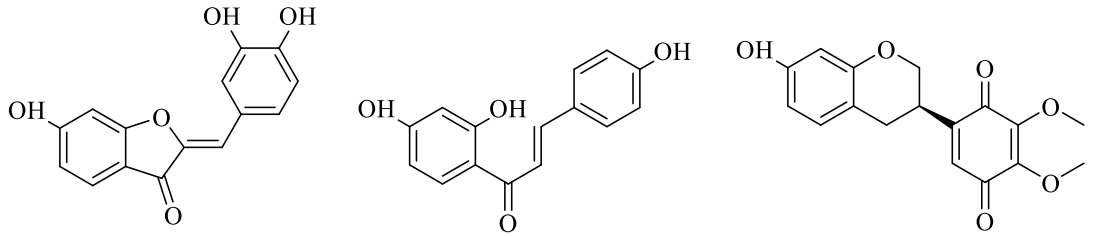


25

Şekil 1.9 Bazı oleanan tipi bileşikler ve elde edildikleri *Astragalus* türleri: Soyasapojenol B, *A. caprinus* (**23**); azukisaponin V, *A. cruciatus* (**24**); astragaloside V, *A. flavescens* (**25**)

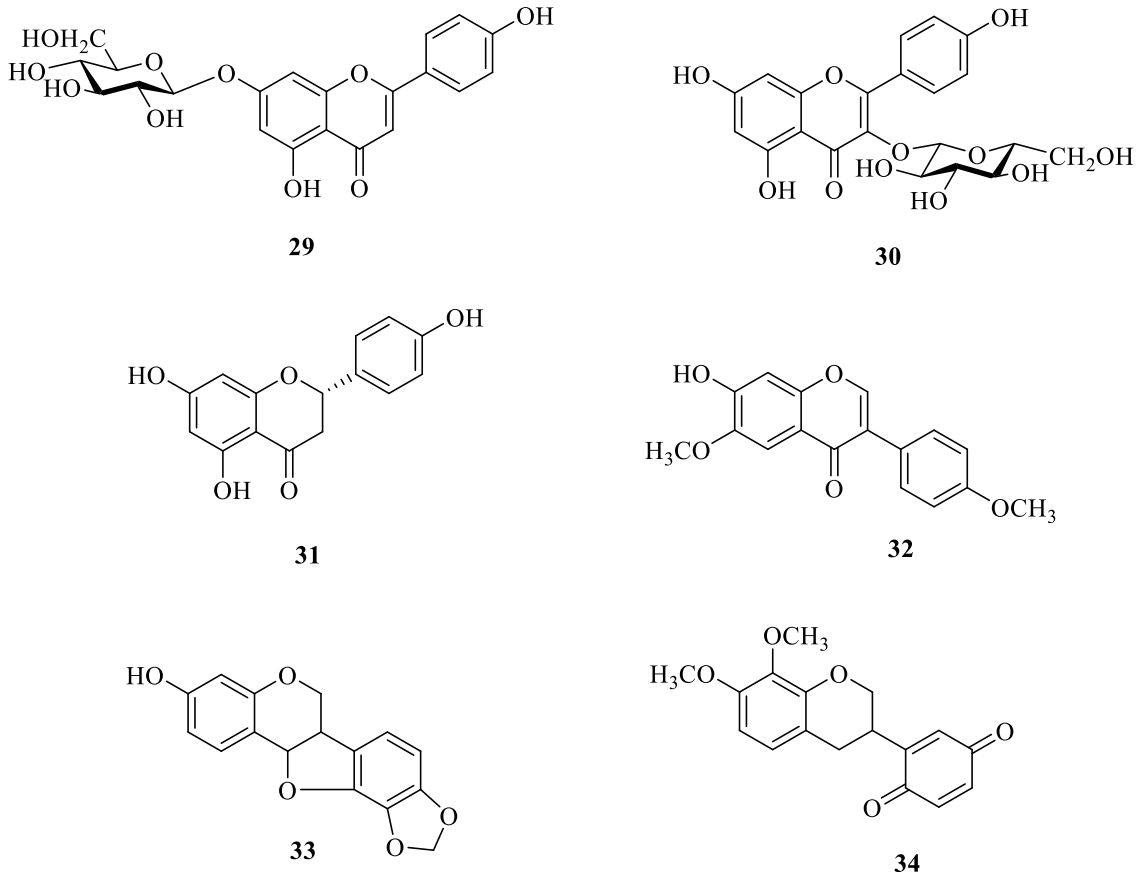
1.3.4 Flavonoidler

Tüm bitkilerde olduğu gibi *Astragalus* türlerinde de flavonoid iskeletine sahip bileşikler bulunmaktadır. Ancak bunların sayısı triterpenoid bileşiklere kıyasla daha düşüktür. Flavonoidler doğal ürünlerin büyük bir grubunu oluşturan düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Bunlar tüm damarlı bitkilerde ve bitkilerin hemen tüm organlarında, fakat çoğunlukla yaprak ve çiçek kısımlarında bulunurlar (Pistelli 2002). *Astragalus* cinsinde bulunan flavonoidler flavonol, flavon, flavonon ve izoflavonoidlerdir. Bunlara ek olarak auron (sulfuretin (**26**)), kalkon (izolikuiritigenin (**27**)) ve izoflavankinon (pendulon (**28**)) gibi bileşik gruplarının üyeleri de bulunmaktadır (Li et al. 2014) (Şekil 1.10).



26 **27** **28**

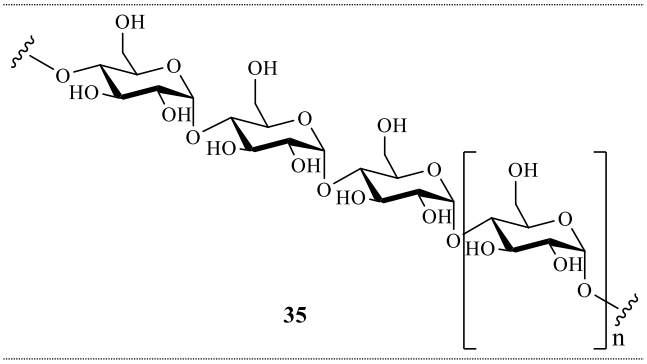
Şekil 1.10 Sulfuretin (**26**), izolikuiritigenin (**27**), pendulon (**28**)



Şekil 1.11 *Astragalus* türlerinden elde edilen bazı flavonoid yapılı bileşikler: Cosmosiin (**29**), astragalin (**30**), naringenin (**31**), afrormosin (**32**), maackiain (**33**), astragalukinon (**34**)

1.3.5 Polisakkaritler

Polisakkaritler basit şeker birimlerinden oluşan polimerik karbohidrat yapılarıdır. Bu şeker birimleri glikozidik bağlarla birbirlerine bağlanırlar (Şekil 1.12).



35

Şekil 1.12 Glukoz birimlerinden oluşan amiloz'un (**35**) yapısı

Polisakkaritler damarlı bitkilerden elde edilen en önemli bağışıklık artırıcılardır (Pistelli 2002). Bitkiler polisakkaritleri sıklıkla kök kısımlarında sentezlerler ve bu polisakkaritlerin bileşimleri iklime göre değişiklik gösterebilir.

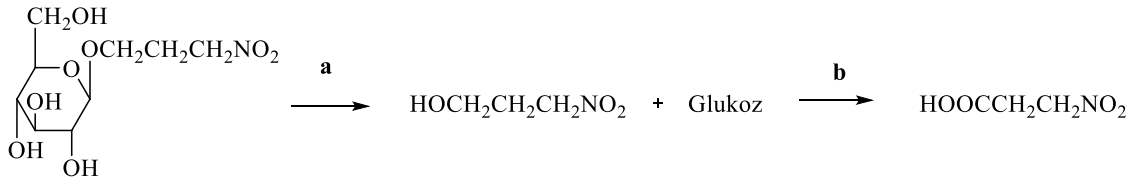
Li ve arkadaşları *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) bitkisinden AX-I-3b olarak isimlendirdikleri bir polisakkarit izole etmişlerdir (Li et al. 2019). Bu polisakkaritin monomer bileşimini 10.4:79.3:1.1 mol oranlarında arabinoz, ksiloz ve glukoz olarak belirlemişler ve bağlanmalarını da [→2,3,4)-β-D-Xylp-(1→, →4)-β-D-Arap-(1→, →)-β-D-Glcp-(1→] olarak bulmuşlardır. Bu polisakkarit akciğer kanserine karşı *in vitro* ve *in vivo* koşullarda antitümör aktivite göstermiştir. Ayrıca aynı amaç için kullanılan cisplatinin etkisini sinerjistik olarak arttırmıştır.

Yao ve arkadaşları *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. Var *mongholicus* (Bge) Hsiao türünden elde ettikleri polisakkariti gaz kromatografisiyle analiz ederek monomerlerin arabinoz, fruktoz, glukoz ve mannozdan oluştuğunu ve bunların mol oranlarının 1:10.309:24.667:0.462 olduğunu göstermişlerdir (Yao and Wang 2012).

Bunlara ek olarak bazı *Astragalus* türleri zehirli bileşikler ve zehir etkisi gösterebilecek bileşiklerin öncüllerini de sentezleyebilmektedir. Bu bileşikler hayvan sürülerine büyük zararlar verebilir ve kimisi de hayvanların tüketilmesi yoluyla insanlara geçebilir. Bahsedilen bu *Astragalus* türleri 3 gruba ayrılabilir:

- Alifatik nitro bileşikleri sentezleyen türler

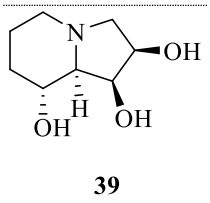
Alifatik nitro bileşikleri *Astragalus* türlerinde bulunan bir grup toksinlerdir. 470'ten fazla türün bu bileşikleri sentezleyebildiği bilinmektedir (Niknam et al. 2003). Zehir etkisi gösteren 3-nitropropanol (**37**) ve 3-nitropropionik asit (**38**), miserotoksin'in (**36**) sırasıyla işkembe (**a**) ve karaciğerde (**b**) dönüşüme uğraması sonucu açığa çıkar (Şekil 1.13).



Şekil 1.13 a) İşkembedeki mikroorganizmalar tarafından yükseltgenme, b) Karaciğer enzimleri tarafından yükseltgenme

- Deliotu (locoweed) zehirlenmesine neden olan türler

Deliotu zehirlenmesine neden olan türler swainsonin (**39**) denilen indolizidin alkaloidi içerirler (Şekil 1.14). Bu molekülü sentezleyen bitki türleri *Astragalus* ve *Oxytropis*'lerdir (Horo 2013).



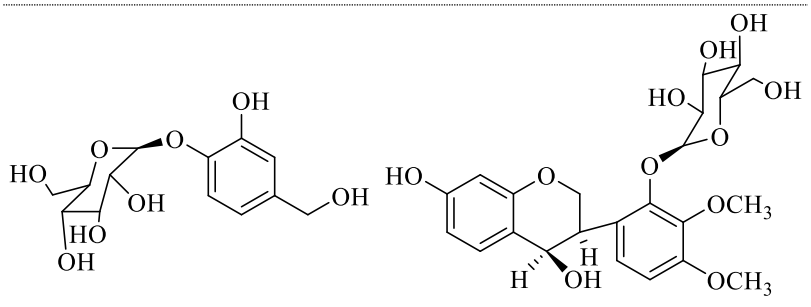
Şekil 1.14 Swainsonin (**39**)

- Selenyum metabolitleri toplayan türler

Bu türler selenyumlu topraklarda yetişen ve birkaç bin ppm düzeyinde selenyum biriktirebilen türlerdir. Örnek olarak *A. bisulcatus, A. saurinus, A. praelongus, A. flavus* ve *A. tenellus* verilebilir (Horo 2013).

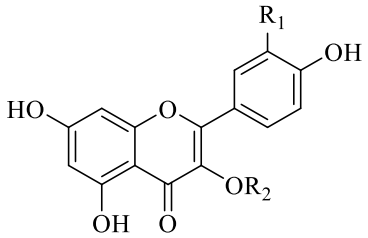
1.4 *Astragalus* Türlerinden İzole Edilen Moleküller

Qing-Hu ve arkadaşları geleneksel Çin Tıbbı'nda en çok kullanılan bitkilerden olan *Astragalus membranaceus* (Fisch) Bge. var. *mongholicus* (Bge) Hsiao bitkisi ile fitokimyasal bir çalışma yapmışlar ve 1-hidroksi-5-metilolbenzol-2-*O*-β-D-glukozit (**40**) ve (3R, 4R)-4,7-hidroksi-20,30-dimetoksiisoflavan-40-*O*-β-D-glukozit (**41**) bileşiklerini saflaştırmışlardır (Şekil 1.15) (Wang and Wang 2014). Yazarlar elde ettikleri bileşiklerin bir tür deniz yosunundan elde edilen gıda katkı maddesi karragenan'ın neden olduğu iltihabı giderici özelliklerini fareler üzerinde incelemişlerdir. Bileşik **40**, pozitif kontrol olarak kullanılan diklofenak ilacından daha yüksek bir iltihap giderici etki gösterirken bileşik iki bu standarda yakın bir etki göstermiştir.



40 **41**

Şekil 1.15 1-Hidroksi-5-metilolbenzol-2-*O*-β-D-glukozit (**40**) ve (3R, 4R)-4,7-hidroksi-20,30-dimetoksiisoflavan-40-*O*-β-D-glukozit (**41**)



Bileşik	R_1	R_2
İzoramnetin-3-gentibiosit	OCH_3	Glc-Glc
Rutin	OH	Glc-Rha
Narsisin	OCH_3	Glc-Rha

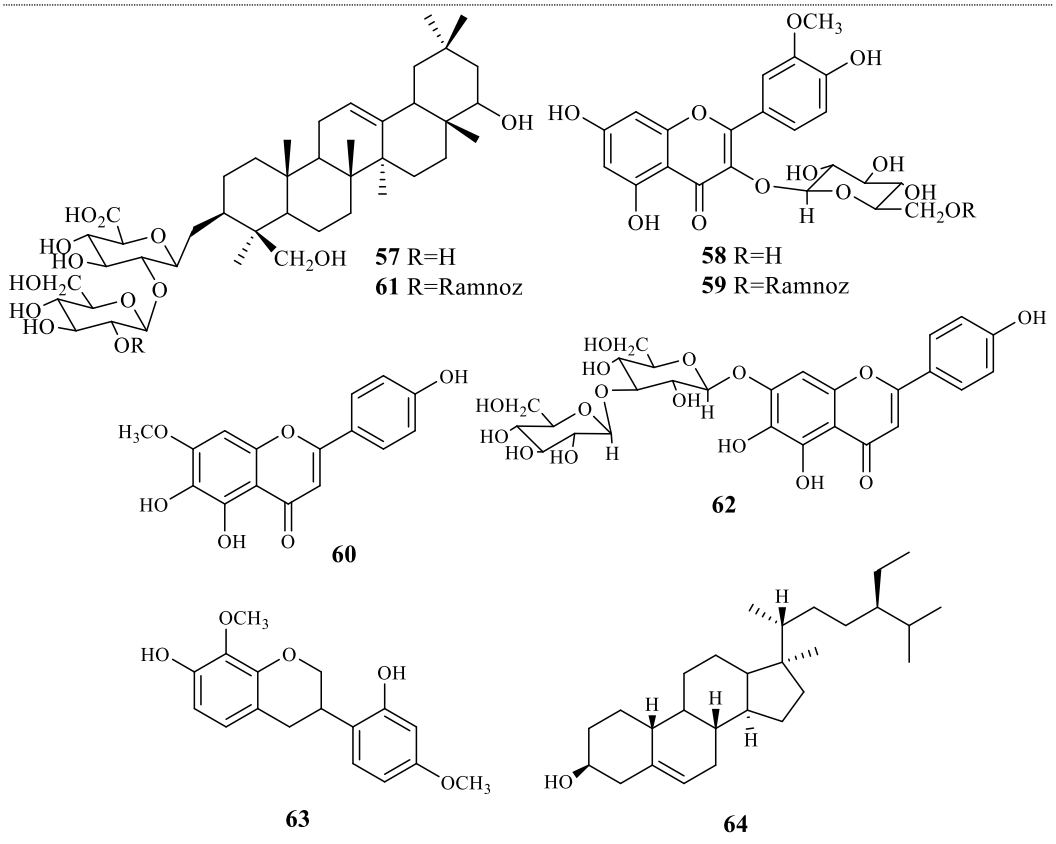
Şekil 1.16 İzoramnetin-3-gentiobiosit (**42**), rutin (**43**) ve narsisin (**44**)

Yang ve arkadaşları antioksidan testi kullanarak biyoaktivite yönlendirmeli izolasyon yöntemiyle *Astragalus altaicus* Bunge bitkisinden izoramnetin-3-gentiobiosit (**42**), rutin (**43**) ve narsisin (**44**) bileşiklerini elde etmişlerdir (Şekil 1.16) (Yang et al. 2012). Yazarlar çalışmalarında Yüksek Hızlı Ters Akış Kromatografi (HSCCC) tekniğini kullanmışlar ve faz seçimlerini klasik Silika jel ince tabaka kromatografisi kullanarak yapmışlardır. ABTS radikal katyonu giderme testinde izoramnetin-3-gentiobiosit (**42**), rutin (**43**) ve narsisin (**44**) bileşiklerinin üçü de pozitif kontrol askorbik asitten daha yüksek aktivite (IC_{50} değerleri sırasıyla 33.43, 22.15, 40.97 µg/mL ve askorbik asit için 17.10 µg/mL) göstermiştir.

Bourezzane ve arkadaşları Cezayir'in yarı kurak bölgelerinde yetişen *Astragalus monspessulanus* L. bitkisinden tümü bilinen nikotiflorin (**45**), kalendosit III (**46**), rutin (**43**), kamferol 3-*O*-(4-*O*-α-L-ramnopiranozil-β-D-glukopiranozil) (**47**), kuersetin-3-*O*-(2,6-α-L-diramnopiranozil-β-D-glukopiranozil) (**48**), 3',5'-di-*C*-β-D-glukopiranosilfloretin (**49**), hovetrikosit C (**50**), solarisiresinol 9'-*O*-β-D-glukopiranosit (**51**), soyasaponin I (**52**), dehidrosoyasaponin I (**53**), β-sitosterol (**54**), β-sitosterol-3-*O*-glukozit (**55**) ve lupeol (**56**) bileşiklerini izole etmişlerdir (Bourezzane et al. 2018).

El-Hawiet ve arkadaşları Mısır'da yetişen *Astragalus annularis* Forssk. ve *Astragalus trimestris* L., Fabaceae türlerinden sekiz bileşiği ilk kez izole etmişler (Şekil 1.17) ve bu bileşikleri *Staphylococcus aureus, Esherichia coli* ve *Candida albicans* bakteri türlerine

karşı test etmişlerdir (El-Hawiet et al. 2010). Sonuçlara göre **61** nolu bileşik *E. coli* türüne karşı ortalama bir aktivite gösterirken *C. ablicans* türüne karşı **61** ve **62** nolu bileşikler yine ortalama aktivite göstermiş ancak *S. Aureus* türüne karşı hiçbir bileşik aktivite göstermemiştir.

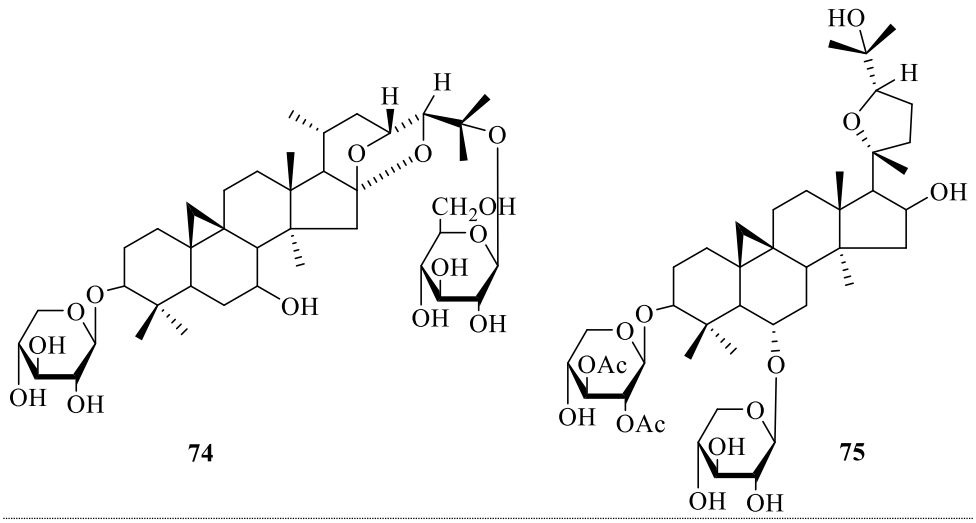


Şekil 1.17 Soyasaponin III (**57**), izoramnetin-3-*O*-glukozit (**58**), izoramnetin-3-*O*-rutinosit (**59**), sorbifolin (**60**), soyasaponin I (**61**), apigenin-7-*O*-β-D-glukopiranoz-(1'''-3'')-β-D-glukopiranozit (**62**), 8-metoksivestitol (**63**), stigmasterol (**64**)

Lee ve arkadaşları *Astragalus membranaceus* bitkisinden kalikosin (**65**), kalikosin-7-*O*-β-D-glukozit (**66**), formononetin (**67**), formononetin-7-*O*-β-D-glukozit (**68**), adenozin (**69**), 3-(β-D-ribofuranozil)-2,3-dihidro-6H-1,3,oksazin-2,6-dion (**70**), asetilastragalosit I (**71**), astragalosit I (**72**) ve astragalosit II (**73**) bileşiklerini izole etmişler ve bu bileşikleri, pankreatik β-hücrelerinden glukozla uyarılmış insülin salınımı (GSI) aktiviteleri için *in vitro* koşullarda test etmişlerdir (Lee et al. 2019). Test sonuçlarına

göre kalikosin-7-*O*-β-D-glukozit (**66**), formononetin (**67**) ve adenozin (**69**) GSI salınımında önemli bir artışa sebep olmuştur.

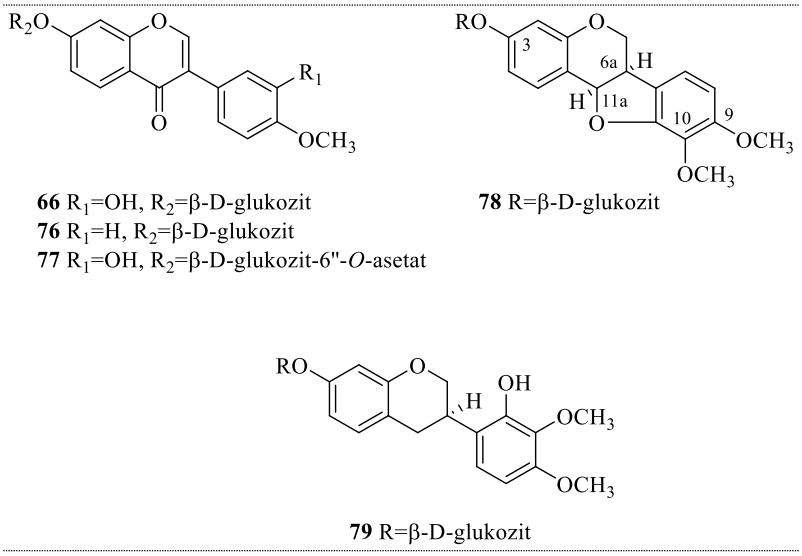
Tsaruk ve arkadaşları *Astragalus orbiculatus* Ledeb. ve *Astragalus sieversianus* Pall. bitkilerinin köklerinden sırasıyla sikloorbikosit G (**74**) ve siklosieversioit A (**75**) bileşiklerini izole etmişlerdir (Şekil 1.18) (Tsaruk et al. 2010). Elde ettikleri bu bileşiklerin *in vivo* koşullarda fare kalp kasındaki metabolik süreçlere etkisini incelemişlerdir. Deneylerinde hem sağlıklı fareler hem de enerji bozukluğu hastalığına sahip fareler kullanmışlardır. Bulguları sikloorbikosit G ve siklosieversioit A'nın özellikle patojenli farelerde, pozitif kontrol olarak kullanılan riboksin'den daha yüksek aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.



Şekil 1.18 Sikloorbikosit G (**74**) ve siklosieversiosit A (**75**)

Zhao ve arkadaşları Tibet bölgesindeki besi hayvancılığına büyük zararlar veren *Astragalus strictus* bitkisinden, bitkiye bu toksik özelliği verdiğini düşündükleri swainsonin (**39**) bileşiğini izole etmişlerdir (Zhao et al. 2009). Ayrıca 1D ve 2D NMR teknikleri ile ^{1}H ve ^{13}C sinyallerini tam olarak belirlemişler ve H-8a protonunun α konformasyonunda olduğunu göstermişlerdir.

Xiao ve arkadaşları yüksek hızlı ters akış kromatografi (HSCCC) tekniği ve büyük gözenekli reçine kullanarak Radix Astragali'den (*Astragalus membranaceus* (Fish.) Bge. veya *Astragalus membranaceus* (Fish.) Bge. Var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao) 5 flavonoid glikozit (Kalikosin-7-*O*-β-D-glukozit (**66**), ononin (**76**), kalikosin-7-*O*-β-D-glukozit-6''-*O*-asetat (**77**), (6aR, 11aR)-9,10-dimetoksipterokarpan-3-*O*-β-D-glukozit (**78**) ve (3R)-2'-hidroksi-3',4'-dimetoksiizoflavan-7-*O*-β-D-glukozit (**79**)) izole etmişlerdir (Şekil 1.19) (Xiao et al. 2009). Araştırmacılar bitki ekstresini ilk olarak NKA-12 büyük gözenekli reçine üzerinde fraksiyonlandırarak bu beş flavonoid glikozitçe zengin fraksiyon elde etmiş, sonrasında bu fraksiyonlardan HSCCC tekniği ile söz konusu bileşikleri saflaştırmışlardır.



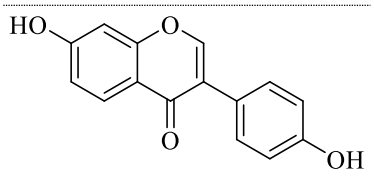
66 R_1=OH, R_2=β-D-glukozit
76 R_1=H, R_2=β-D-glukozit
77 R_1=OH, R_2=β-D-glukozit-6''-*O*-asetat

78 R=β-D-glukozit

79 R=β-D-glukozit

Şekil 1.19 Xiao ve arkadaşlarının Radix Astragali'den elde ettikleri flavonoid glikozitler

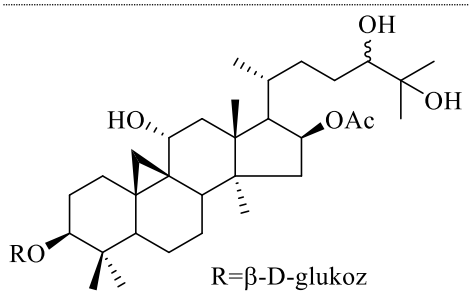
Lai ve arkadaşları *Astragalus membranaceus* bitkisi ile yaptıkları çalışmada bu bitkiden iltihap giderici fraksiyonlar ve formononetin (**67**) (Şekil 1.20), kalikosin (**65**) ve astragalosit IV (**80**) bileşiklerini elde etmişlerdir (Lai et al. 2013). Formononetin ve fraksiyonlar iltihap giderici etki gösterirken kalikosin ve astragalosit IV herhangi bir etkiye neden olmamıştır.



67

Şekil 1.20 Formononetin (**67**)

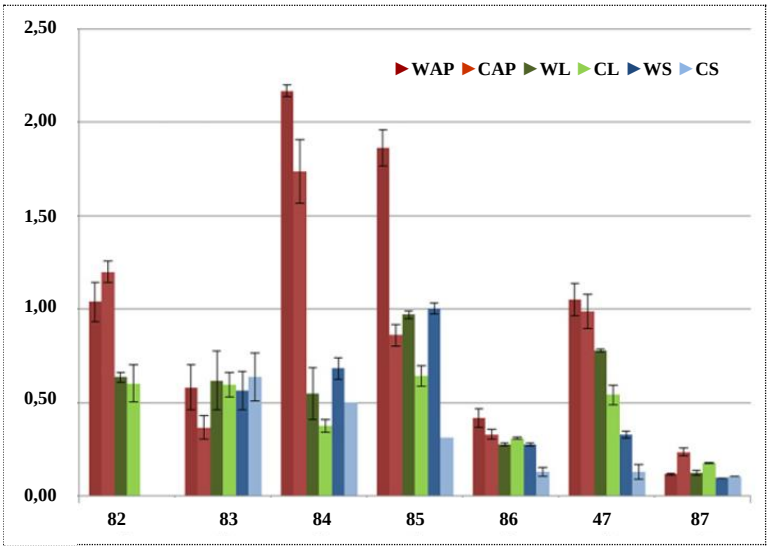
Ahmad ve arkadaşları *Astragalus tephrosioides* Boiss. var. *lacei* (Ali) Kirchoff bitkisinden yeni bir sikloartan saponin izole etmişlerdir (Şekil 1.21) (Ahmad et al. 2019). Araştırmacılar yaptıkları literatür karşılaştırmasına dayanarak bu bileşiğin *24R* konfigürasyona sahip olduğunu önermişlerdir.



81

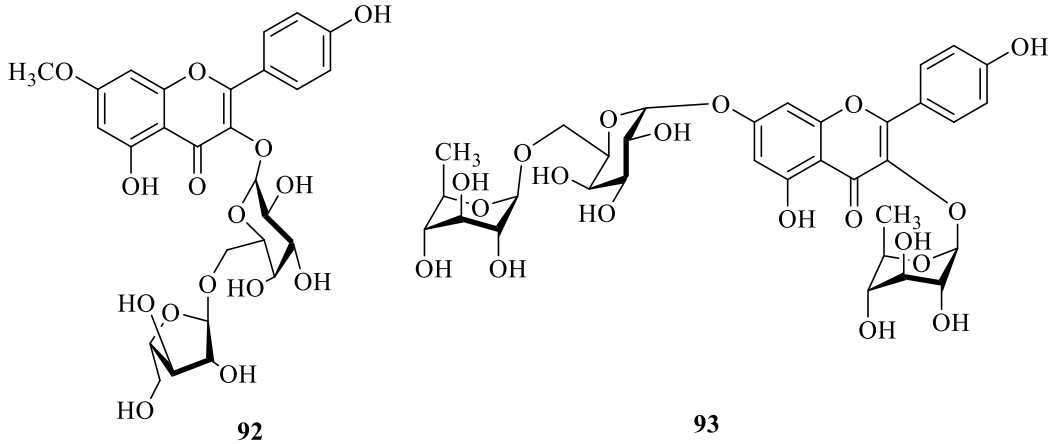
Şekil 1.21 Lakeosit (**81**)

Montoro et al. (2013) *Astragalus gombiformis* bitkisinin topraküstü kısmının metanol ekstresinden 7 adet flavonoid (3-*O*-α-L-ramnopiranozil-(1→2)-[6-*O*-(3-hidroksi-3-metilglutaril)-β-D-galaktopiranositkamferol (**82**), 3-*O*-α-L-ramnopiranozil-(1→2)-β-D-galaktopiranozit-7-metilkersetin (**83**), 3-*O*-α-L-ramnopiranozil-(1→2)-β-D-galaktopiranozit-7-metilkamferol (**84**), 3-*O*-α-L-ramnopiranozil-(1→2)-[6-*O*-(3-hidroksi-3-metilglutaril)-β-D-galaktopiranozit]-7-metilkamferol (**85**), 3-*O*-β-D-galaktopiranozit-7-metilkersetin (**86**), kamferol (**47**) ve 3-*O*-α-L-ramnozil-(1→2)-[6-*O*-(3-hidroksi-3-metilglutaril)-β-D-galaktopiranozit-7-metilkersetin (**87**)) izole etmişler ve bu bileşiklerin vahşi ve kültüre edilmiş bitkinin farklı organlarındaki miktarlarını belirlemiş ve sonuçları karşılaştırmalı profiller olarak vermişlerdir (Şekil 1.22).



Şekil 1.22 Kültüre edilmiş ve vahşi *A. gombiformis* farklı organlarının kantitatif analiz sonuçları (WAP: vahşi, topraküstü; CAP: kültür, topraküstü; WL: vahşi, yaprak; CL; kültür, yaprak; WS: vahşi gövde; CS: kültür gövde) (Montoro et al. 2013)

Janibekov ve arkadaşları *Astragalus turkestanus* ve *Astragalus xanthomeloides* türlerinden 5 bilinen bileşiğe (daucosterol (**88**), stigmasterolglikozit (**89**), D-pinitol (**90**), azukisaponin V (**24**), 3-*O*-β-D-glukopiranozit-7-metoksikamferol (**91**)) ek olarak iki yeni flavonoid glikozit (sırasıyla 3-*O*-α-L-arabinozil-(1→6)-β-D-galaktopiranozit-7-metoksikamferol (**92**) ve 3-*O*-α-L-ramnopiranozil-7-*O*-α-L-ramnopiranozil-(1→6)-β-D-galaktopiranozitkamferol (**93**)) izole etmişlerdir (Şekil 1.23) (Janibekov et al. 2018). Ayrıca bu moleküllerin *in silico* moleküler modelleme ve *in vitro* koşullarda α-Glukozidaz inhibisyon aktivitelerini test etmişlerdir. Sonuçlara göre her iki yeni bileşik de moleküler modelleme çalışmalarında α-Glukozidaz enziminin aktif bölgesine bu enzimin inhibitörü olan akarboz'a yakın derecede uyum göstermiştir. *In vitro* çalışmalarında da bu modelleme sonuçlarına benzer şekilde **92** nolu bileşik akarboz' a yakın bir sonuç verirken **93** nolu bileşik moleküler modelleme sonuçlarından sapma göstermiştir: **92**, **93** ve akarboz için IC_{50} değerleri sırasıyla 50.31, 79.60, 30.57 µg/mL.

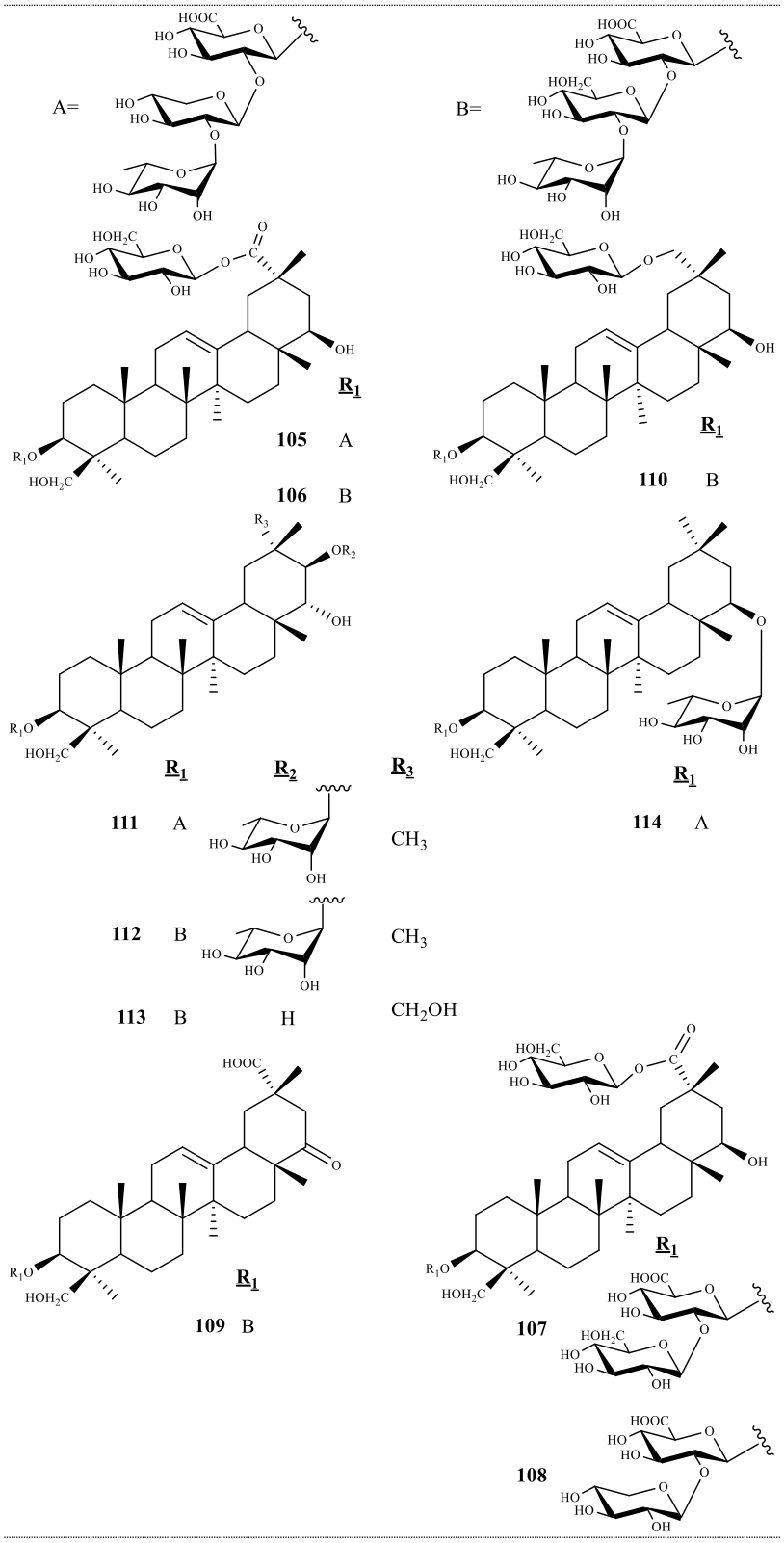


92 **93**

Şekil 1.23 3-*O*-α-L-arabinozil-(1→6)-β-D-galaktopiranozit-7-metoksikamferol (**92**) ve 3-*O*-α-L-ramnopiranozil-7-*O*-α-L-ramnopiranozil-(1→6)-β-D-galaktopiranozitkamferol (**93**)

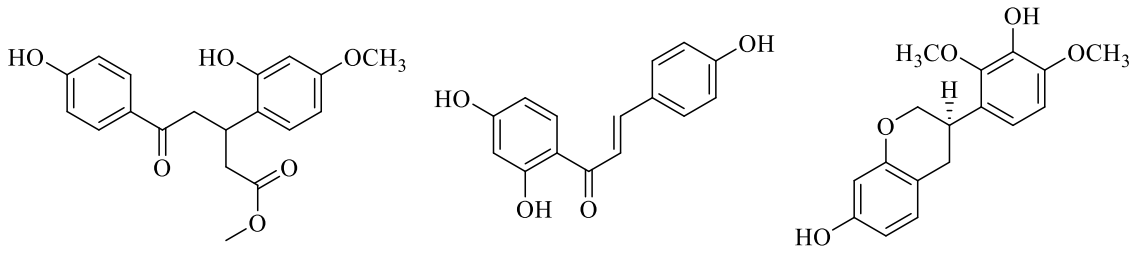
Gülcemal ve arkadaşları *Astragalus tauricolus* bitkisinden bilinen 12 oleanan tipi glikozite (astrojanosit A (**94**), melilotus saponin O2 (**95**), 3-*O*-[α-ramnopiranozil-(1→2)-β-ksilopiranozil-(1→2)-β-D-glukuronopyranozil]-3β,21β,22α,24,29-pentahidroksiolean-12-en (**96**), azukisaponin V (**24**), wistariasaponin B2 (**97**), astragalosit VIII (**98**), wistariasaponin B1 (**99**), kloversaponin IV (**100**), azukisaponin II (**101**), wistarisaponin D (**102**), dehidroazukisaponin V (**103**) ve 3-*O*-β-D-glukuronopiranozil-soyasapogenin B (**104**)) ek olarak on yeni oleanan glikozit (3-*O*-[α-L-ramnopiranozil-(1→2)-β-D-ksilopiranozil-(1→2)-β-D-glukuronopiranozil]-29-*O*-β-D-gluko-piranozil-3β,22β,24-trihidroksiolean-12-en-29-oik asit (**105**), 3-*O*-[α-L-ramnopiranozil-(1→2)-β-D-glukopiranozil-1(1→2)-β-D-glukuronopiranozil]-29-*O*-β-D-glukopiranozil-3β,22β,24-trihidroksiolean-12-en-29-oik asit (**106**), 3-*O*-[β-D-glukopiranozil-(→2)-β-D-glukuronopirano-zil]-29-*O*-β-D-glukopiranozil-3β,22β,24-trihidroksiolean-12-en-29-oik asit (**107**), 3-*O*-[β-D-ksilopiranozil-(1→2)-β-D-glukuronopiranozil]-29-*O*-β-D-glukopiranozil-3β,22β,24-trihidroksiolean-12-en-29-oik asit (**108**), 3-*O*-[α-L-ramnopiranozil-(1→2)-β-D-glukuronopiranosil]-3β,24-dihidroksiolean-12-en-22-okso-29-oik asit (**109**), 3-*O*-[α-L-ramnopiranozil-(1→2)-β-D-glukopiranozil-(1→2)-β-D-glukuronopiranozil]-29-*O*-β-D-glu- kopiranozil-3β,22β,24,29-tetrahidroksiolean-12-en (**110**), 3-*O*-[α-L-ramnopiranozil-(1→2)-β-D-ksilopiranozil-(1→2)-β-D-glukuronopiranozil]-21-*O*-α-L-ramnopiranozil-3β,21β,22α,24-tetrahidroksiolean-12-en (**111**),

3-*O*-[α-L-ramnopiranozil-(1→2)-β-D-glukopiranozil-(1→2)-β-D-glukoronopiranozil]-21-*O*-α-L-ramnopiranozil-3β,21β,22α,24-tetrahidroksiolean-12-en (**112**), 3-*O*-[α-L-ramnopiranosil-(1→2)-β-D-glukopiranozil-(1→2)-β-D-glukuronopiranozil]-3β,21β,22α,24,29-pentahidroksiolean-12-en (**113**), 3-*O*-[α-L-ramnopiranozil-(1→2)-β-D-ksilo-piranozil-(1→2)-β-D-glukonopiranozil]-22-*O*-α-L-ramnopiranozil-3β,22β,24-trihidroksiolean-12-en (**114**)) izole etmişlerdir (Şekil 1.24) (Gülcemal et al. 2013). Sikloartan tipi glikozitler *Astragalus* türlerinin ana bileşenleridir. Araştırmacılar yaptıkları izolasyon çalışmasında bu tipteki bileşiklere rastlamamışlardır ve *A. tauricolus* türünün, sikloartan tipi glikozit içermeyen sınırlı sayıdaki *Astragalus* türünden biri olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca elde edilen yeni ve bilinen molekülleri U937 insan lösemi hücre hattına karşı antiproliferatif aktivite testine tabi tutmuşlardır. Sadece **113** no'lu bileşik 22 µM'lık bir IC_{50} ile aktivite göstermiştir.



Şekil 1.24 Gülcemal ve arkadaşlarının *Astragalus tauricolus* bitkisinden elde ettikleri oleanan glikozitler

Chen ve arkadaşları *Embellisia astragali* ile infekte edilmiş *Astragalus adsurgens* bitkisi üzerine izolasyon çalışması yapmışlar, izole ettikleri bileşenlerin antibakteriyel ve sitotoksik özelliklerini test etmişlerdir. Bu bitkiden bir tanesi yeni olmak üzere (astrasurnin (**115)**) onbeş adet bileşik izole etmişlerdir. Bunlar içerisinden iki tanesi (4,2',4'-trihidroksikalkon **(116)** ve (R)-mucronulatol (**117**)) (Şekil 1.25) en yüksek antibakteriyel aktiviteyi gösterirken ondört bileşik insan kan kanseri (HL-60) ve insan karaciğer kanseri (SMMC-7721) hücrelerine karşı sitotoksik aktivite göstermiştir (Chen et al. 2012).



115 **116** **117**

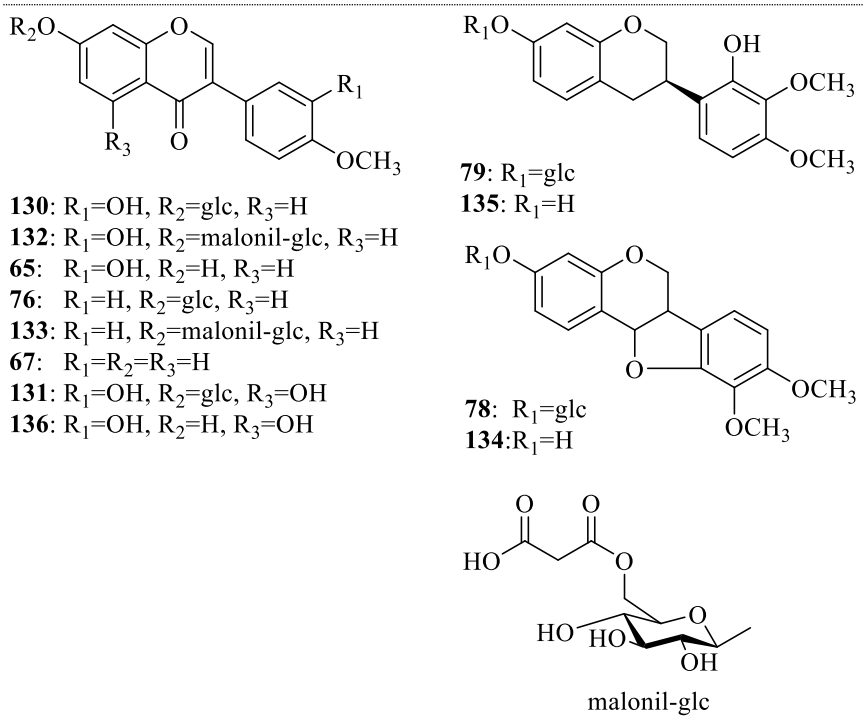
Şekil 1.25 Chen ve arkadaşlarının *Astragalus adsurgens* bitkisinden izole ettikleri bazı bileşikler

Un ve arkadaşları *Astragalus pennatulus* türünden her biri yeni olmak üzere 4 sikloartan tipinde ve 1 oleanan tipinde molekül izole etmişlerdir (Un et al. 2016). İzole ettikleri bileşikler şunlardır: 3-*O*-β-D-ksilopiranozil-6-*O*-β-D-glukopiranozil-3β,6α,16β-trihidroksi-24-okso-20(R),25-epoksisikloartan (**118**), 3-*O*-[β-D-glukoronopiranozil-(1→2)-β-D-ksilopiranozil]-3β,16β,24α-trihidroksi-20(R),25-epoksisikloartan (**119**), 3-*O*-[β-D-glukuronopira-nozil-(1→2)-β-D-ksilopiranozil]-3β,16β,25-trihidroksi-20(R),24(S)-poksisikloartan (**120**), 3,25-di-*O*-β-D-glukopiranozil-6-*O*-β-D-ksilopiranozil-3β,6α,16β,25-tetrahidroksi-20(R),24(S)-epok-sisikloartan (**121**) ve 29-*O*-α-L-ramnopiranozil-abrisapojenol B (**122**).

Gülcemal ve arkadaşları *Astragalus aureus* Willd türünden 10 adet bilinen sikloartan yapılı molekülün yanında 8 adet yeni sikloartan yapılı triterpen glikozit (3-*O*-[α-L-ramnopiranozil-(1→2)-α-L-arabinopiranozil-(1→2)-β-D-ksilopiranozil]-6-*O*-β-D-

ksilopiranozil-3β,6α,16β-24(S),25-penta-hidroksisikloartan (**123**), 3,6-di-*O*-β-D-ksilopiranozil-3β,6α,16β,24(S),25-pentahidroksisikloartan, 3,6-di-*O*-β-D-ksilopiranozil-25-*O*-β-D-glukopiranozil-3β,6α,16β,24(S),25-pentahidroksisikloartan (**124**), 3-*O*-β-D-ksilopiranozil-6,25-di-*O*-β-D-glukopiranozil-3β,6α,16β,24(S),25-pentahidroksisikloartan (**125**), 6-*O*-β-D-glukopiranozil-3β,6α,16β,24(S),25-pentahidroksisikloartan (**126**), 3-*O*-[α-L-arabinopiranozil-(→2)-β-D-ksilopiranozil]-3β,6α,16β,24α,tetrahidroksi-20(R),25-epoksisikloartan (**127**), 6-*O*-β-D-glukopiranozil-3β,6α,16β,24α-tetrahidroksi-20(R),25-epoksisikloartan (**128**), 6-*O*-β-D-ksilopira- nozil-3β,6α,16β,24α-tetrahidroksi-20(R),25-epoksisikloartan (**129**)) izole etmişlerdir (Gülcemal et al. 2011).

Tang ve arkadaşları *Astragalus membranaceus* türüyle yaptıkları çalışmada bitkinin kök kısımının %80 EtOH ekstresinde ilk olarak UHPLC-DAD-ESI-MS cihazı kullanarak 12 adet izoflavonoid glikozit belirlemişler (kalikosin-7-*O*-β-D-glikozit (**130**), pratensein-7-*O*-β-D-glikozit (**131**), kalikosin-7-*O*-β-D-glikozit-6"-*O*-malonat (**132**), ononin (**76**), (6αR,11αR)-9,10-dimetoksipterokarpan-3-*O*-β-D-glikozit (**78**), kalikosin (65), (3R)-7,2'-dihidroksi-3',4'-dimetoksiizoflavan-7-*O*-β-D-glikozit (**79**), formononetin-7-*O*-β-D-glikozit,6"-*O*-malonat (**133**), formononetin (**67**), (6αR,11αR)-9,10-dimetoksipterokarpan (**134**), (3R)-7,2'-dihidroksi-3',4'-dimetoksiizoflavon (**135**), pratensein (**136**)), sonrasında yaptıkları izolasyon çalışmasında bu 12 bileşikten 8'ini (**65**, **67**, **76**, **78**, **79, 130, 134, 135**) saflaştırmışlardır (Şekil 1.26) (Tang et al. 2018).



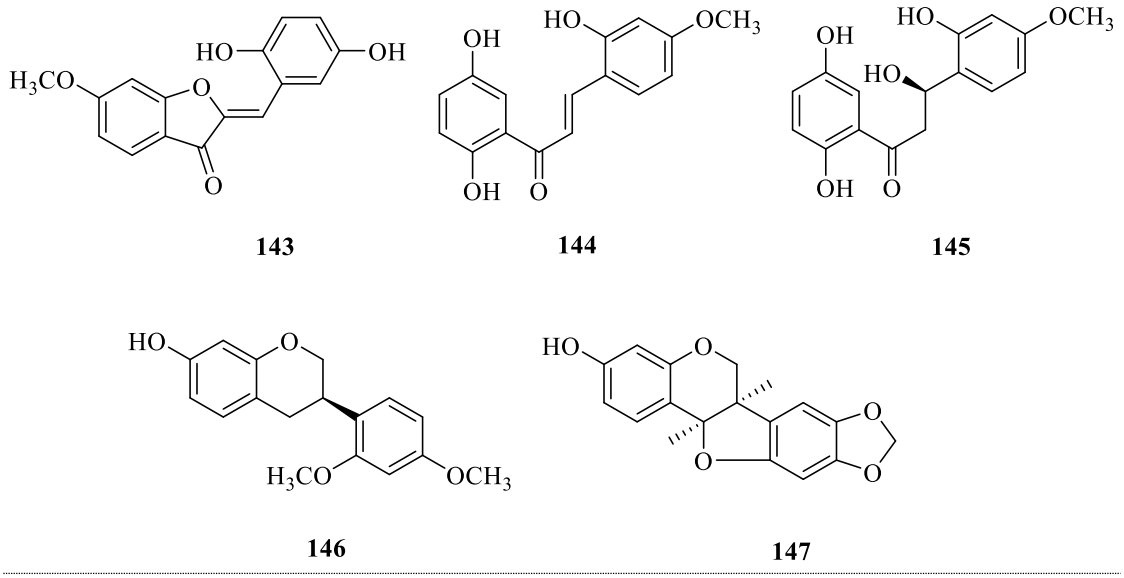
Şekil 1.26 Tang ve arkadaşlarının *Astragalus membranaceus* bitkisinden elde ettikleri bileşikler

Mezanjiyal hücreler böbreklerde bulunan süzme sistemin bir parçasıdır (Scindia et al. 2010). Böbrek sağlığına etki eden bir dizi etmenler bu mezanjiyel hücrelerinin çoğalarak böbrekte birikimine ve sonucunda böbrek rahatsızlığı ortaya çıkmasına neden olurlar. Bu etmenlerden birisi de glikoz seviyesindeki artıştır. Glikoz seviyesindeki artışlar hücre içinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyelerinde artışa ve bu da diyabetik böbrek rahatsızlığına yol açar (Tang et al. 2018). Tang ve arkadaşları *A. membranaceus* bitkisinden elde ettikleri izoflavonoid bileşiklerin mezanjiyal hücrelere karşı antiproliferatif etkilerini incelemişler ve **65**, **67** ve **135** moleküllerinin aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır (Tang et al. 2018). Bu çalışmaya ek olarak bir dizi antioksidan testi gerçekleştirmişler ve *A. membranaceus* izoflavonoidlerinin bu antiproliferatif etkilerinin sitotoksik değil antioksidan özelliklerinden kaynaklandığını göstermişlerdir.

Yalçın ve arkadaşları *Astragalus stereocalyx* Bornm. türünden 6 yeni ve 6 bilinen sikloartan yapısında triterpen glikozit izole etmişlerdir (Yalçın et al. 2012). İzole

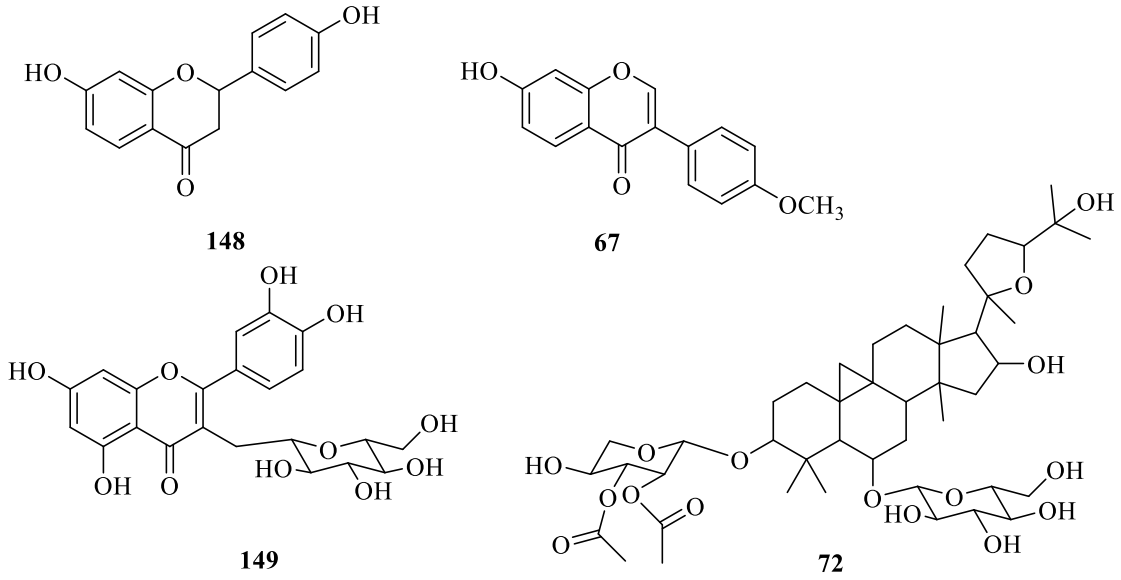
ettikleri yeni bileşikleri şu şekilde rapor etmişlerdir: 3-*O*-[α-L-arabinopiranozil-(1→2)-β-D-ksilopiranozil]-16-*O*-β-D-glukopiranozil-3β,6α,16β,20(S),24(R),25-hekzahidroksisiklo-artan (**137**), 3-*O*-[α-L-arabinopiranozil-(1→2)-β-D-ksilopiranozil]-3β,6α,16β,20(S),24(R),25-hekzahidroksisikloartan (**138**), 3-*O*-[α-L-arabinopiranozil-(1→2)-β-D-glukopiranozil]-3β,6α,16β,20(S),24(R),25-hekzahidroksisikloartan (**139**), 3-*O*-[α-L-arabinopiranozil-(1→2)-β-D-glukopiranozil]-24-*O*-β-D-glukopiranozil-3β,6α,16β,24(R),25-pentahidroksisikloartan (**140**), 3-*O*-[α-L-arabinopirano- zil-(1→2)-β-D-glukopiranozil]-16-*O*-β-D-glukopiranozil-3β,6α,16β,24(R),25-pentahidroksisikloartan (**141**) ve 3-*O*-(α-L-ramnopiranozil-(1→4)-[α-L-arabinopiranozil-(1→2)]-β-D-glukopira-nozil)-3β,6α,16β,24(R),25-pentahidroksisikloartan (**142**).

Xiao ve arkadaşları *Astragalus englerianus* bitkisi ile yaptıkları izolasyon çalışmasında üçü yeni ((Z)-2',5',dihidroksi-6-metoksiauron (**143**), 2,2',5'-trihidroksi-4-metoksi-kalkon (**144**), (βR)-2,2',5',β-tetrahidroksi-4-metoksidihidrokalkon (**145**)) ve ikisi bilinen ((3R)-sativan (**146**), (6aR,11aR)-maackiain (**147**)) olmak üzere 5 adet flavonoid elde etmişlerdir (Şekil 1.27) (Xiao et al. 2014). İzole edilen tüm bileşikler kan paraziti öldürücü (İng.: schistosomidical) etkilerini gözlemlemek için *in vitro* koşullarda test edilmiş ve yalnızca **144** ve **146** no'lu bileşikler 12 saat içinde parazit kurtçuklarını öldürücü etki göstermiştir (sırasıyla 0.70 ve 0.77 mM derişim). Yapılan bu çalışmada ayrıca bileşiklerin antioksidan özellikleri incelenmiş, **143** ve **144** no'lu bileşiklerin (sırasıyla IC_{50} = 35.9±11 ve 12.2±1.1 µM) pozitif standart olarak kullanılan C vitamininden (IC_{50} = 48.9±1.1 µM) daha yüksek aktiviteye sahip oldukları, **3** no'lu bileşiğin zayıf aktiviteye (IC_{50} = 871.1±25.6 µM) ve **146** ve **147** no'lu bileşiklerin inaktif oldukları gösterilmiştir.



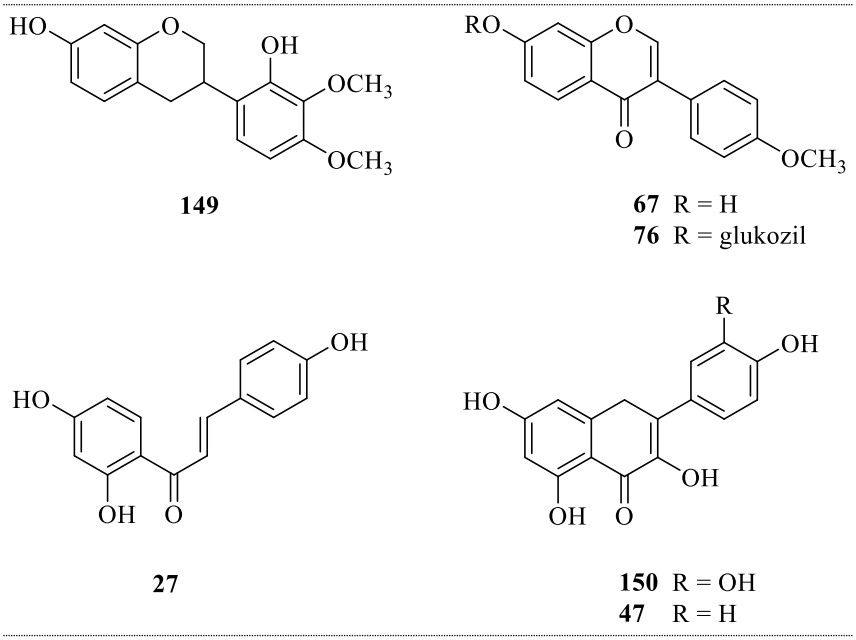
Şekil 1.27 Xiao ve arkadaşlarının *Astragalus englerianus* bitkisinden elde ettikleri bileşikler

Ghasemian-Yadegari ve arkadaşları *Astragalus maximus* bitkisinin kök kısmının etil asetat ekstresi ile yapıtıkları izolasyon çalışması sonucu likuiritigenin (**148**), formononetin (**67**), izokuersitrin (**149**) ve açillenmiş bir sikloartan tipi bileşik olan astragalosit I (**72**) bileşiklerini izole etmişlerdir (Şekil 1.28) (Ghasemian-Yadegari et al. 2017).



Şekil 1.28 Ghasemian-Yadegari ve arkadaşlarının *Astragalus maximus* bitkisinden elde ettikleri bileşikler

Pu ve arkadaşları *Astragalus taipaishanensis* türü ile yaptıkları biyo aktivite yönlendirmeli izolasyon çalışmasında 8 fenolik bileşik -7,8'-dihidroksi-3',4'-dimetoksiizoflavan (**149**), formononetin (**67**), izolikuiritigenin (**27**), kersetin (**150**), kamferol (**47**), ononin (7**6**), *p*-hidroksibenzoik asit (**151**) ve vanilik asit (**152**)- elde etmişler ve bu bileşiklerin antioksidan özelliklerini incelemişlerdir (Şekil 1.29) (Çizelge 1.2) (Pu et al. 2015).

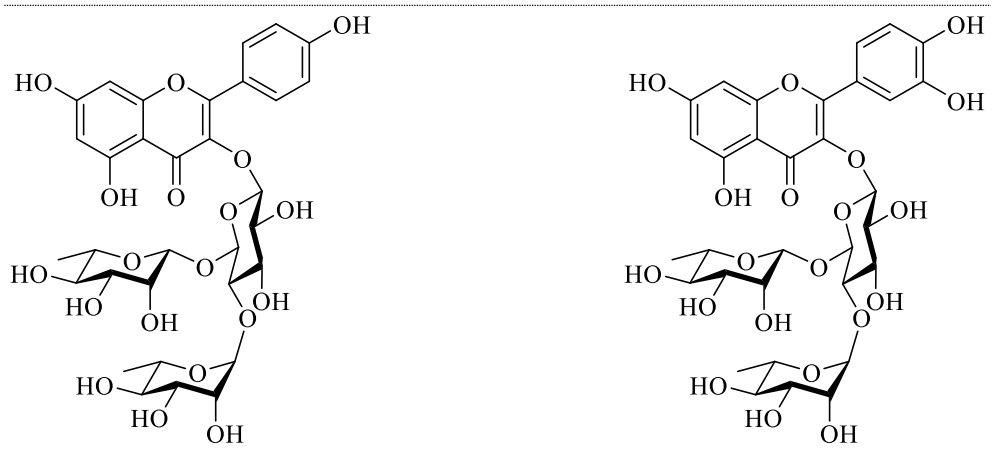


Şekil 1.29 Pu ve arkadaşlarının *Astragalus taipaishanensis* bitkisinden elde ettikleri bileşikler

Çizelge 1.2 Pu ve arkadaşlarının *Astragalus taipaishanensis* bitkisinden elde ettikleri bileşiklerin antioksidan test sonuçları

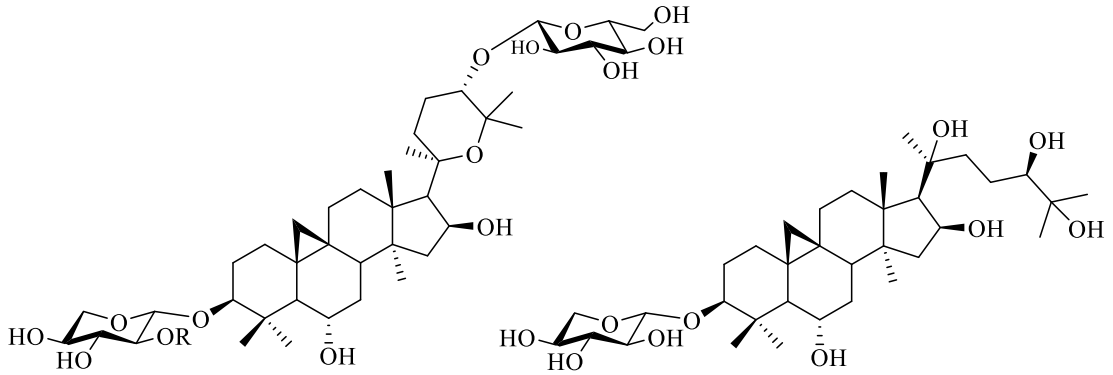
Bileşik	**ABTS** **mmol troloks/g**	**FRAP** **mmol troloks/g**	**DPPH** **IC_{50} (µM)**	**Lipid peroksidasyon** **IC_{50} (µM)**
149	28.62 ± 0.27	10.77 ± 0.11	0.30 ± 0.003	1.87 ± 0.07
67	14.18 ± 0.20	3.27 ± 0.05	1.16 ± 0.009	2.69 ± 0.11
27	18.83 ± 0.18	3.83 ± 0.05	0.83 ± 0.007	2.29 ± 0.13
150	34.66 ± 0.20	14.18 ± 0.13	0.09 ± 0.001	1.65 ± 0.08
47	31.79 ± 0.13	14.13 ± 0.16	0.14 ± 0.002	1.30 ± 0.09
76	12.67 ± 0.16	1.10 ± 0.03	1.52 ± 0.06	2.73 ± 0.11
BHA	4.24 ± 0.10	5.83 ± 0.08	7.54 ± 0.38	0.68 ± 0.05
TBHQ	3.36 ± 0.08	6.57 ± 0.13	3.66 ± 0.16	0.69 ± 0.03

El Dib ve arkadaşları *Astragalus abyssinicus* türünün topraküstü kısmından 2 yeni (kamferol-3-*O*-(4",6"-di-*O*-α-L-ramnopiranozil)-β-D-glikopiranozit (**153**) ve kersetin-3-*O*-(4",6"-di-*O*-α-L-ramnopiranozil)-β-D-glikopiranozit (**154**)) ve 3 bilinen (rutin (**43**), kamferol-3-*O*-β-D-rutinosit (**155**) ve 5,7,4'-trihidroksi-3'-metoksiizoflavon (**156**)) fenolik bileşik izole etmişlerdir (Şekil 1.30) (El Dib et al. 2015).



Şekil 1.30 El Dib ve arkadaşlarının *Astragalus abyssinicus* bitkisinden elde ettikleri yeni bileşikler

Karabey ve arkadaşları *Astragalus schottianus* Boiss. bitkisinin kök kısmından 3 adet yeni sikloartan tipinde triterpen glikozit (20(R),25-epoksi-3-*O*-β-D-ksilopiranozil-24-*O*-β-D-glukopiranozil-3β,6α-16β-24α-tetrahidroksisikloartan (**157**), 20(R),25-epoksi-3-*O*-[β-D-glukopiranozil(1→2)]-β-D-ksilopiranozil-24-*O*-β-D-glukopiranozil-3β,6α,16β,24α-tetrahidroksisikloartan (**158**) ve 3-*O*-β-D-ksilopiranozil-3β,6α,16β,20(S),24(S),25-hekzahidroksisikloartan (**159**)) izole etmişler ve yapılarını aydınlatmıştır (Şekil 1.31) (Karabey et al. 2012).



R

157 H

158 β-D-Glc

159

Şekil 1.31 Karabey ve arkadaşlarının *Astragalus schottianus* Boiss. bitkisinden elde ettikleri sikloartan glikozitler

1.5 *Astragalus* Türleri ve Kanser

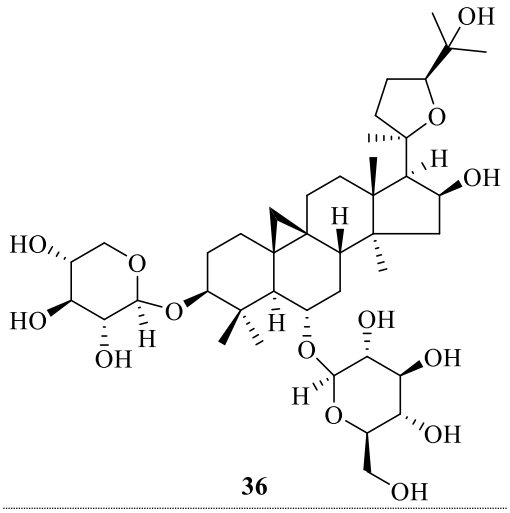
Kanser, bir dizi gen mutasyonu sonucunda kontrolsüz hücre bölünmesi ve anormal hücre büyümesinden kaynaklanan karmaşık ve çok yaygın bir hastalıktır. Doğal ürünler içerdikleri özgün moleküllerden dolayı kansere karşı etkili olma potansiyeline sahiptir ve doğal kaynaklı/metabolizma ürünü olmalarından kaynaklı olarak düşük toksisite ve daha az/ılıman yan etki göstermeleri olasıdır.

Astragalus türlerinin antikanser aktivitesi ile ilgili bir literatür taraması yapıldığında yapılan çalışmalara hakim olan türün *Astragalus membranaceus* ve alt türlerinin olduğu görülmektedir. Bunun ana sebebi bu türün Geleneksel Çin Tıbbında Radix Astragali adıyla kayıt altına alınmış ve yüzyıllardır reçetelerde yerini almış olmasıdır (Auyeung et al. 2016). Bu bitki çeşitli hastalıklarda ya tek başına ya da başka bitkilerle karışım halinde kullanılmaktadır. Literatürde *Astragalus membranaceus* ile ilgili çalışmalar yanında diğer *Astragalus* türleri ile ilgili çalışmalar da mevcuttur.

Zhang ve arkadaşları *Astragalus membranaceus* bitkisinden elde ettikleri formononetin (**67**) molekülünün yumurtalık kanseri hücrelerine karşı anti-proliferatif, anti-migrasyon

ve anti-invazyon etkilerini incelemişlerdir (Zhang et al. 2018). MTT testleri sonucunda formononetin'in yumurtalık kanseri hücreleri üzerinde 48 saatin sonunda önemli bir anti-proliferatif etkide (A2780 hücre hattı için IC_{50} = 186.1 µM ve SKOV3 hücre hattı için IC_{50} = 209.3 µM) bulunduğunu göstermişlerdir. Formononetin bu etkiyi apoptos mekanizmasını tetikleyerek göstermiştir. Ayrıca formononetin hücrelerin göçme ve yayılma kabiliyetlerini de inhibe etmiştir.

Jiang ve arkadaşları *Astragalus membraneceus* (Fisch.) Bungede türünden elde edilen 6-*O*-asetil-3-*O*-β-D-ksilopiranozilsikloastragenol (AS-IV) (**36**) (Şekil 1.32) molekülünün karaciğer kanserine olan etkisini incelemişlerdir (Jiang and Mao 2019). Sonuçlarına göre AS-IV 25-100 nmol/L aralığındaki derişimlerde HepG2 ve Hep3B karaciğer kanseri hücre hatlarının büyümesini apoptotik hücre ölümü mekanizmasını tetikleyerek yavaşlatmıştır. AS-IV ayrıca bu hücrelerin göçme ve yayılma özelliklerini de inhibe etmiştir.



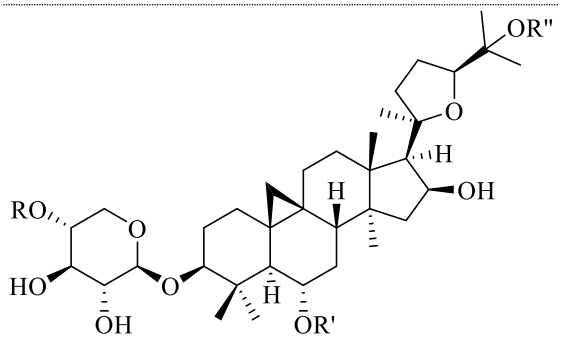
36

Şekil 1.32 Astragalosit IV (**36**)

Zhu ve arkadaşları *Astragalus complanatus* bitkisinin flavonoid içeriğinin göğüs kanseri üzerine olan etkisini incelemişlerdir (Zhu et al. 2015). *A. complanatus* R.Br (AC) türünün çekirdeklerinden %50 etil alkol/su ile elde ettikleri ekstreden kristallendirme ile elde etikleri flavonoid içeriği 3 farklı göğüs kanseri hücre hattına (MDA-MB-468,

MDA-MB-361 ve BT-20) uygulamışlardır. Flavonoid fraksiyonun 2 mg/mL derişimde göğüs kanseri hücrelerinin büyümesini kontrol grubuna kıyasla %50 oranında durdurduğunu göstermişlerdir.

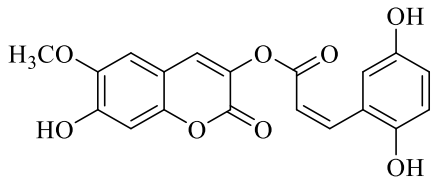
Graziani ve arkadaşları *Astragalus boeticus* türü ile yaptıkları çalışmada 3 yeni sikloartan glikozit -6-*O*-asetil-3-*O*-(4-*O*-malonil)-β-D-ksilopiranozilsikloastragenol (**160**), 3-*O*-(4-*O*-malonil)-β-D-ksilopiranozilsikloastragenol (**161**), 6-*O*-asetil-25-*O*-β-D-glikopiranozil-3-*O*-β-D-ksilopiranozilsikloastragenol (**162**)- ve iki bilinen bileşik -6-*O*-asetil-3-*O*-β-D-ksilopiranozilsikloastragenol (**36**), 3-*O*-β-D-ksilopiranozilsikloastragenol (**163**) izole etmişlerdir (Şekil 1.33) (Graziani et al. 2019). Elde ettikleri bu bileşiklerin farklı kolon kanseri hücre hatlarına (Caco-2, HT-29 ve HCT-116) (Bu hücre hatlarının farkları elde edildikleri donörlerin ve genlerindeki mutasyonların farklı olmasından kaynaklanmaktadır.) karşı sitotoksik aktivitelerini incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre bu 5 bileşik içinden sadece **160** ve **36** no'lu bileşikler bahsedilen hücre hatlarına karşı sitotoksik aktivite göstermiştir. Şekil 1.33'de de görüleceği üzere bileşikler **160** ve **36** arasındaki fark ilkinde C4' karbonunda bir malonil grubunun olmasıdır. Araştırmacılar da **160** no'lu bileşiğin aktivitesini bu bileşiğin hücre içinde C4'-malonil grubunu kaybederek **36** no'lu bileşiğe dönüşmesine atfetmektedirler.



	R	R'	R"
160	malonil	asetil	H
161	malonil	H	H
162	H	asetil	β-D-glc
36	H	asetil	H
163	H	H	H

Şekil 1.33 Graziani ve arkadaşlarının *Astragalus boeticus* bitkisinden elde ettikleri yeni sikloartan glikozitler

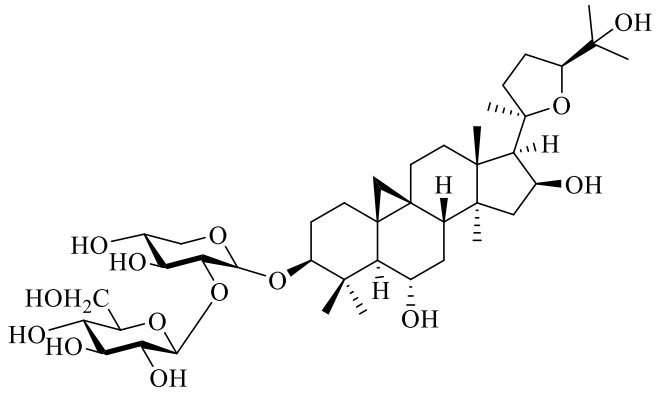
Radwan ve arkadaşları *Astragalus spinosus* Forssk. türünden elde ettikleri 1 yeni kumarin türevi (Spinokumarin I (**164**)) (Şekil 1.34) ve 9 bilinen molekülün (formononetin (**67**), sikloastrajenol (**165**), stigmasterol (6**4**), stigmasterol-3-*O*-glukozit (**166**), astrasieversianin VI (**167**), astragalosit I (**72**), astrasieversianin II (**168**), trigonosit II (**169**) ve trigonosit III (**170**)) A2780 yumurtalık kanseri hücre hattına karşı antiproliferatif aktivitesini incelemiştir (Radwan et al. 2007). Bileşikler, yumurtalık kanseri hücre hattına karşı 40.9-47.0 µg/mL aralığında değişen IC_{50} değerlerinde zayıf antiproliferatif etki göstermiştir.



164

Şekil 1.34 Spinokumarin I (**164**)

Wang ve arkadaşları *Astragalus membranaceus* bitkisinden elde edilen astragalosit III (**171**) molekülünü MCF-7 göğüs kanseri hücrelerine karşı antiproliferatif etkisini ve etki mekanizmasını incelemişlerdir (Şekil 1.35) (Wang et al. 2015). Çizelge 1.3'te görüldüğü gibi sonuçları astragalosit III'ün hücre yaşamını zaman ve derişim bazında azalttığını göstermektedir. Ayrıca bu etkiyi apoptotik hücre ölümü mekanizmasını tetikleyerek göstermiştir (Çizelge 1.4).



171

Şekil 1.35 Astragalosit III (**171**)

Çizelge 1.3 Wang ve arkadaşlarının elde ettikleri antiproliferatif test sonuçları

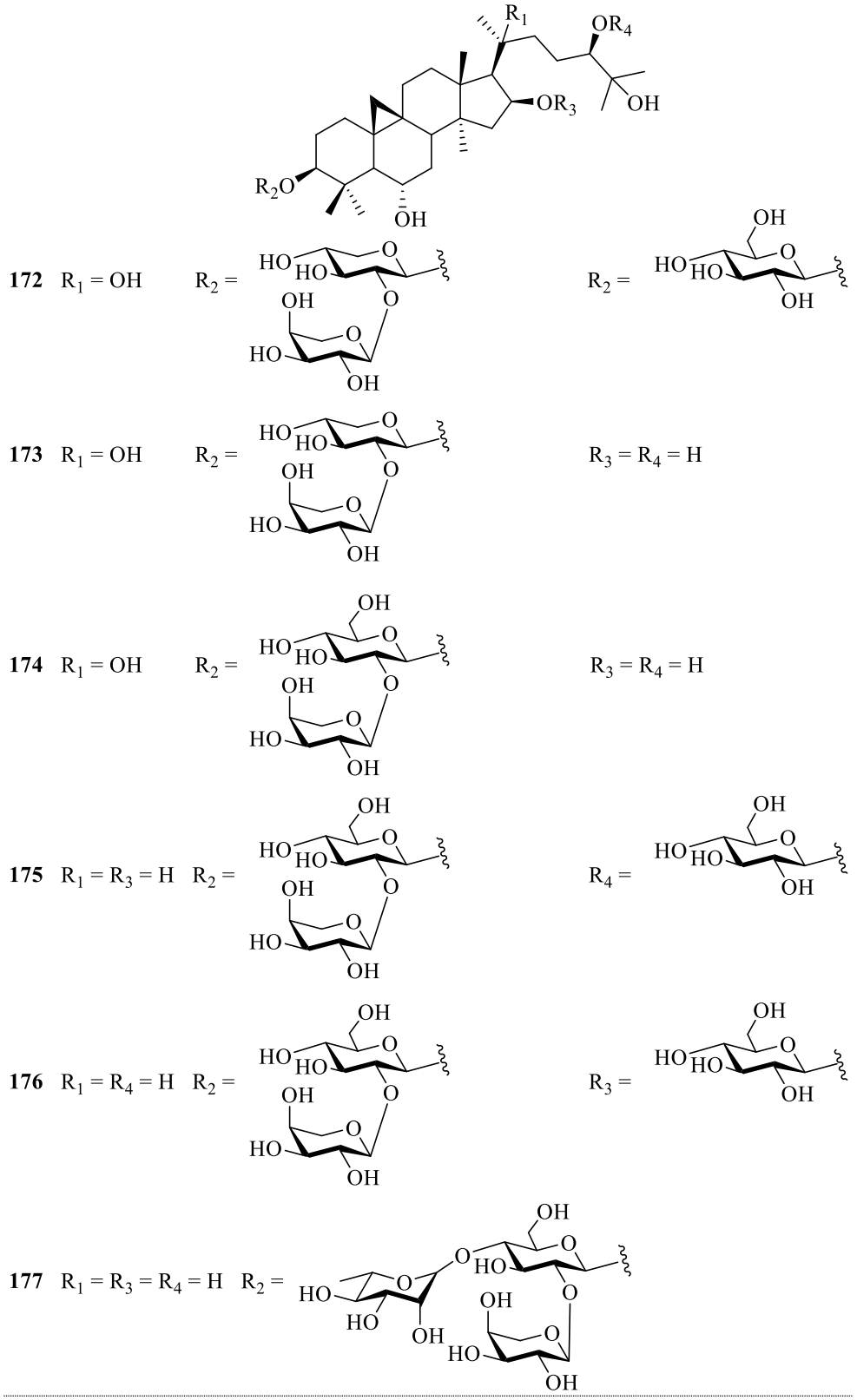
	24 h				**48 h**			
	Kontrol	Astragalosit III (171) (ng/mL)			**Kontrol**	Astragalosit III (171) (ng/mL)		
		10	50	100		10	50	100
Canlı hücre (%)	99.6±0.3	57.0±7	42.1±6	27.7±5	99.4±0.1	48.2±7	36.6±3	17.8±6

Çizelge 1.4 Wang ve arkadaşlarının elde ettikleri apoptoz test sonuçları

	Salin	**Astragalosit III (171) 10 mg/kg**	**Astragalosit III (171) 20 mg/kg**
Apoptotik hücre (%)	2.4±0.5	28.6±6.7	39.2±10.2

Yalçın ve arkadaşları *Astragalus stereocalyx* Bornm. türünden izole ettikleri 6 yeni sikloartan yapısındaki triterpen glikozit bileşiğin HeLa (insan rahim kanseri),

HT-29 (insan kolon kanseri), U937 (insan kan kanseri) ve H446 (insan akciğer kanseri) hücre hatlarına karşı antiproliferatif aktivitesini incelemişlerdir (Yalçın et al. 2012). Bileşiklerden sadece bileşik **177** (Şekil 1.36) HeLa hücrelerine karşı kayda değer bir antiproliferatif aktivite göstermiştir, IC_{50} = 29,9 µM.



Şekil 1.36 Yalçın ve arkadaşları *Astragalus stereocalyx* Bornm. bitkisinden elde ettikleri yeni sikloartan glikozitler

Bu tez çalışmasında ilaç etken maddesi olarak kullanılabilecek potansiyel biyoaktif moleküller elde etmek amacıyla *Astragalus ponticus* Pall. bitkisinin MeOH/$CHCl_3$ (1:1) ekstresinden biyoaktivite yönlendirmeli izolasyon yöntemi ve çeşitli kromatografi yöntemleri kullanılarak insan rahim kanseri (HeLa) hücrelerine karşı antiproliferatif etkiye sahip moleküllerin saflaştırılması, saflaştırılan bu moleküllerin yapılarının 1D ve 2D NMR, X-Ray ve MS spektroskopik yöntemleriyle aydınlatılması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Genel

İzolasyon işlemlerinde kullanılan tüm çözücüler teknik saflıktadır ve destillenerek kullanılmıştır. HPLC ve *p*-HPLC analizlerinde kullanılan çözücüler HPLC saflıktadır. Tüm dötero çözücüler Merck KGaA firmasından temin edilmiştir. Sephadex LH-20 ve poliamid kolon dolgu maddeleri Sigma-Aldrich firmasından, açık kolon ve *p*-İTK hazırlamada kullanılan Silika jel-60 dolgu maddeleri Merck KGaA firmasından temin edilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan besi yeri, fetal bovin serum ve penisilin-streptomisin Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

^{1}H, ^{13}C ve 2D (COSY, HMBC, HSQC, DEPT, TOCSY ve NOESY) NMR analizleri Agilent Premium Compact NMR cihazında (proton için 600 MHz, karbon için 150 MHz frekans) yapılmıştır. NMR FID dosyaları MestReNova 11.0 programı kullanılarak işlenmiştir. Preparatif HPLC çalışmaları Shimadzu LC-20AR cihazında ve GL Sciences Intersil ODS-3 (5 µm, 20 x 150 mm) kolonu kullanılarak yapılmıştır. Ayrıca ara fraksiyonların HPLC profillerinin belirlenmesinde Agilent 6210 TOF-MS dedektöre sahip Agilent 1260 Infinity HPLC sisteminde Agilent Zorbax SB-C18 kolonu (3.5 µm, 4.6 x 100 mm) kullanımıştır. Kütle analizleri Agilent 6460 Triple Quad marka ve model LC-MS-MS cihazında pozitif ve negatif modda yapılmıştır. X-Ray analizi Bruker Marka D8 Venture model tek kristal X ışını kırınım ölçer cihazı ile yapılmıştır. Açık kolon kromatografi işlemlerinde Silikajel 60 ve Sephadex LH-20 dolgu maddeleri kullanılmıştır.

2.2 İTK plakalarının hazırlanması

15 g ince silika jel (UV indikatörsüz) 45 mL saf su ile karıştırıldıktan sonra 20 x 20 cm cam plaka üzerine eşit bir şekilde yayılmıştır. Bir gece oda sıcaklığında bekletildikten sonra etüvde 110 °C'da kurutulmuştur.

2.3 xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Yöntemi

Antikanser testlerinde HeLa hücreleri kullanılmıştır ve testler xCelligence RTCA Hücre Analiz Cihazında yapılmıştır. E-plate 96 kuyucuklarına ilk olarak 50 µL besi yeri (DMEM + %10 Fetal Sığır Serumu + %2 Penisilin-Streptomisin) koyulmuş ve plaka steril kabinde yarım saat bekletildikten sonra inkübatör içindeki xCelligence Hücre Analiz Cihazına yerleştirilerek arka plan okuması yapılmıştır. Sonrasında kuyucuklara, kuyucuklardaki hücre sayısı 25.000 olacak şekilde 100 µL hücre süspansiyonu eklenmiş ve plaka yarım saat steril kabinde bekletilmiştir. Bundan sonra plaka istasyona yerleştirilerek 80 dakikalık ölçüm başlatılmıştır. Bu süre zarfında hücreler normal büyüme sürecine girmişlerdir. Daha sonra istasyondan alınan plakanın kuyucuklarına, ekstrelerin kuyucuklardaki son derişimleri 250, 100, 50 ve 10 µg/mL olacak şekilde ekstre çözeltileri eklendikten sonra kuyucuklardaki son hacim besi yeri ile 200 µL'ye tamamlanmıştır. Bundan sonra 48 saatlik ölçüm süreci başlatılmıştır. Analizlerde standart olarak 5-florourasil ve Cis-Pt kullanılmıştır.

2.4 MTT Antiproliferatif Aktivite Testi Yöntemi

2.4.1 Hücre Kültürü

Astragalus ponticus Pall. bitkisinin kök kısmından saflaştırılan moleküllerin HeLa hücrelerine karşı antiproliferatif aktivite testleri Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden Prof. Dr. Şevki ARSLAN tarafından yapılmıştır.

HeLa (insan rahim kanseri) 37 °C'de, %5 CO_2 ve %95 nem içeren ortamda inkübe edilmiştir. Hücrelerin gelişimi ve çoğaltılması %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin içeren Roswell Park Memorial Enstitü (RPMI-1640) besiyeriyle gerçekleştirilmiştir. Her 2-3 günde bir, hücre yoğunluğuna ve deneysel ihtiyaçlara bağlı olarak pasajları gerçekleştirilmiştir. Steril 100 mm'lik kültür petri kabında üretilen hücreler yaklaşık %80-90 yoğunluğa ulaşıncaya kadar beslenmiş, ancak bu yoğunluktan sonra Tripsin-EDTA yardımıyla yüzeyinden kaldırılmış ve santrifüjde çöktürme

işleminden sonra yine besi ortamı içerisinde yeni bir petri kabına aktarılmıştır. Böylece hücrelerin çoğalması sağlanmıştır. Kültürleme işlemi sırasında hücreler fosfat tamponlu tuz (PBS) ile yıkanmıştır. Hücre sayımı ise tripan mavi solüsyonu ile toma lamında gerçekleştirilmiştir.

2.4.2 Antiproliferatif Aktivite Testi

Astragalus ponticus bitkisinden saflaştırılan moleküllerin HeLa hücreleri üzerinde *in vitro* antiproliferatif etkileri MTT testi uygulanarak tespit edilmiştir. MTT (3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromid) testi dolaylı olarak hücre büyümesi ve/veya hücre ölümünü değerlendirmeyi sağlayan, hücre kültürü esasına dayanan bir ilaç duyarlılığı testidir. Bunun için 96 kuyucuklu mikroplakanın, her bir kuyucuğuna $1x10^4$ hücre/100µl olacak şekilde ekilen hücreler 37 °C'de %5 CO_2'li etüvde 24 saat süre ile inkübe edilmişlerdir. 24 saatin sonunda ortamdaki besiyeri uzaklaştırılmış ve farklı derişimlerdeki test maddeleri uygulanmıştır. 37 °C'de %5 CO_2'de 24 saat süre ile inkübe edildikten sonra besiyeri yenilenmiş (100 µl) ve mikroplakanın her kuyucuğuna 10 µl MTT çözeltisi eklenmiştir. 150 rpm'de 5 dk çalkalandıktan sonra 4 saat süre ile 37 °C'de inkübe edilmiştir. Kuyucuklardaki süpernatant uzaklaştırılmış ve 500 µl DMSO ilave edilerek 150 rpm'de 5 dk çalkalanmıştır. Formazon kristallerinin açığa çıkardığı rengin şiddeti 590 nm'de mikroplaka okuyucuda ölçülmüştür. Çalışmalar 3'er tekrarlı 3 bağımsız deney halinde yapılmıştır.

2.4.3 Sonuçların Değerlendirilmesi

Test edilen bileşikler ile çözücü (DMSO) kontrol grubunun absorbans değeri kıyaslanarak % cinsinden ölen hücre sayısı (inhibisyon-derişim, bağıl inhibisyon aktivitesi, IC) hesaplanmıştır. Test örneği yerine test maddesinin çözeltisini içeren kuyucukların (DMSO kontrollerin) absorbans değerleri %100 canlılığı gösterir. Bu deneyde kullanılan çözücünün (DMSO) ortamdaki oranı %1 olarak belirlenmiştir.

2.5 Bitki Materyali

Astragalus ponticus Pall. bitkisi 2015 yılı Ağustos ayında Çankırı ili Oğlaklı-Eldivan arası karaçam meşçeresi kenarından toplanmıştır (Yükselti 1180 m, Koordinatlar: 40 30 472 N, 33 31 032 E). Toplanan bitki örnekleri Ankara Üniversitesi'nden Herbaryum uzmanı Selçuk Tuğrul Körükçü tarafından teşhis edilerek Ankara Üniversitesi herbaryumuna kaydedilmiştir (Herbaryum No: 60503). Toplanan bitkiler güneş görmeyen bir yerde ve oda sıcaklığında kurutulmuştur.

2.6 *Astragalus ponticus* Pall. Bitkisinin Farklı Organlarının Antikanser Ön Deneme Çalışmaları

Bitki, çiçek (AsPoÇi), gövde+yaprak (AsPoGöv) ve kök (AsPoKök) olmak üzere üç kısıma ayrılmıştır. Her bir kısımdan 10'ar g'lık örnek sıvı azot ile parçalanmış, Soxhlet ekstraksiyonu ile apolar bileşenlerinden arındırılan örneklerin MeOH/$CHCl_3$ ekstreleri hazırlanmıştır. Bunun için Soxhlet ekstraksiyonundan sonra kurutulan materyaller 350 mL MeOH:$CHCl_3$ (1:1) karışımı ile üçer defa, manyetik karıştırıcı üzerinde 24 saat karıştırılarak ekstreler hazırlanmıştır. Elde edilen ekstre çözeltilerinin çözücüleri döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırılarak ham ekstreler elde edilmiştir. Elde edilen bu ekstrelerin insan rahim kanseri (HeLa) hücrelerine karşı antiproliferatif etkileri xCELLigence cihazı ile belirlenmiştir.

2.7 *Astragalus ponticus* Pall. Kök Kısmı Kaba Ayrım Çalışması

Oda koşullarında ve gölgelik bir ortamda kurutulan 570 g *Astragalus ponticus* kök kısmı sıvı azot ile parçalanmış, MeOH:$CHCl_3$ (1:1) ile ekstrakte edilmiş (4 L x 4) ve vakum altında çözücüsü uzaklaştırılmıştır. Elde edilen 41 g (%7.7 verim) ekstre minimum miktarda MeOH:$CHCl_3$ (1:1) ile çözülerek homojen bir çözelti hazırlanmış, bu çözeltiye 50 g Silika jel 60 eklenmiş ve karışımın çözücüsü uzaklaştırılarak ana ekstrenin silika jel ile karışması sağlanmıştır. Silika jel 60 ve hekzan kullanılarak bir kromatografi kolonu hazırlanmış (96 cm, R=1.05 cm) ve hazırlanan silika jel-ana ekstre

karışımı bu kolona yüklenerek yürütmeye başlanmıştır. Sırasıyla 8 L hekzan, 10 L diklorometan, 12.5 L etilasetat ve 7.5 L metanol kullanılarak fraksiyonlandırma yapılmıştır. Elde edilen bu fraksiyonlardan diklorometan, etilasetat ve metil alkol fraksiyonlarının insan rahim kanseri (HeLa) hücrelerine karşı antiproliferatif testleri yapılmıştır.

2.8 *Astragalus ponticus* Kök Kısmının Ana Ekstresinin Hazırlanması

Oda sıcaklığında ve gölgelik bir ortamda kurutulduktan sonra küçük parçalar haline getirilen *Astragalus ponticus* kök kısmı (AsPoKök) (2.54 kg) cam kavanozlar içinde MeOH:$CHCl_3$ (1:1) (4 x 12 L) ile oda koşullarında ve karanlıkta maserasyon yöntemi ile ekstrakte edilmiştir. Elde edilen ekstrenin çözücüsü vakum altında uzaklaştırıldı ve 133 g AsPoKök MeOH/$CHCl_3$ ana ekstresi elde edilmiştir.

2.9 AsPoKök Ana Ekstresi ile Yapılan Çalışmalar

2.9.1 AsPoKök ana ekstresinin kaba fraksiyonlandırılma işlemi

Elde edilen 133 g AsPoKök ana ekstresi homojen bir çözelti hazırlamak için yeterli miktarda MeOH:$CHCl_3$ (1:1) ile çözülmüş ve toplamda 168 g Silika jel 60 ile karıştırıldıktan sonra kuruluğa kadar çözücüsü uzaklaştırılmıştır. Kaba fraksiyonlandırmada kullanılacak olan kromatografi kolonu 1560 g Silika jel 60 ve hekzan kullanılarak hazırlanmıştır (50 cm, R=4.5 cm). AsPokök ekstresi– Silika jel karışımı bu kolona yüklenmiş ve hekzan ile yürütme başlatılmıştır. Kolondan 2.5 L hekzan, 25 L diklorometan, 28 L etilasetat (11 fraksiyon halinde toplandı: EtOAc 1-EtOAc 11) ve 10 L metanol ile fraksiyonlandırma yapılmıştır.

2.9.2 AsPoKök EtOAc fraksiyonlarının birleştirilmesi ve fraksiyonların HPLC-TOF/MS analizleri

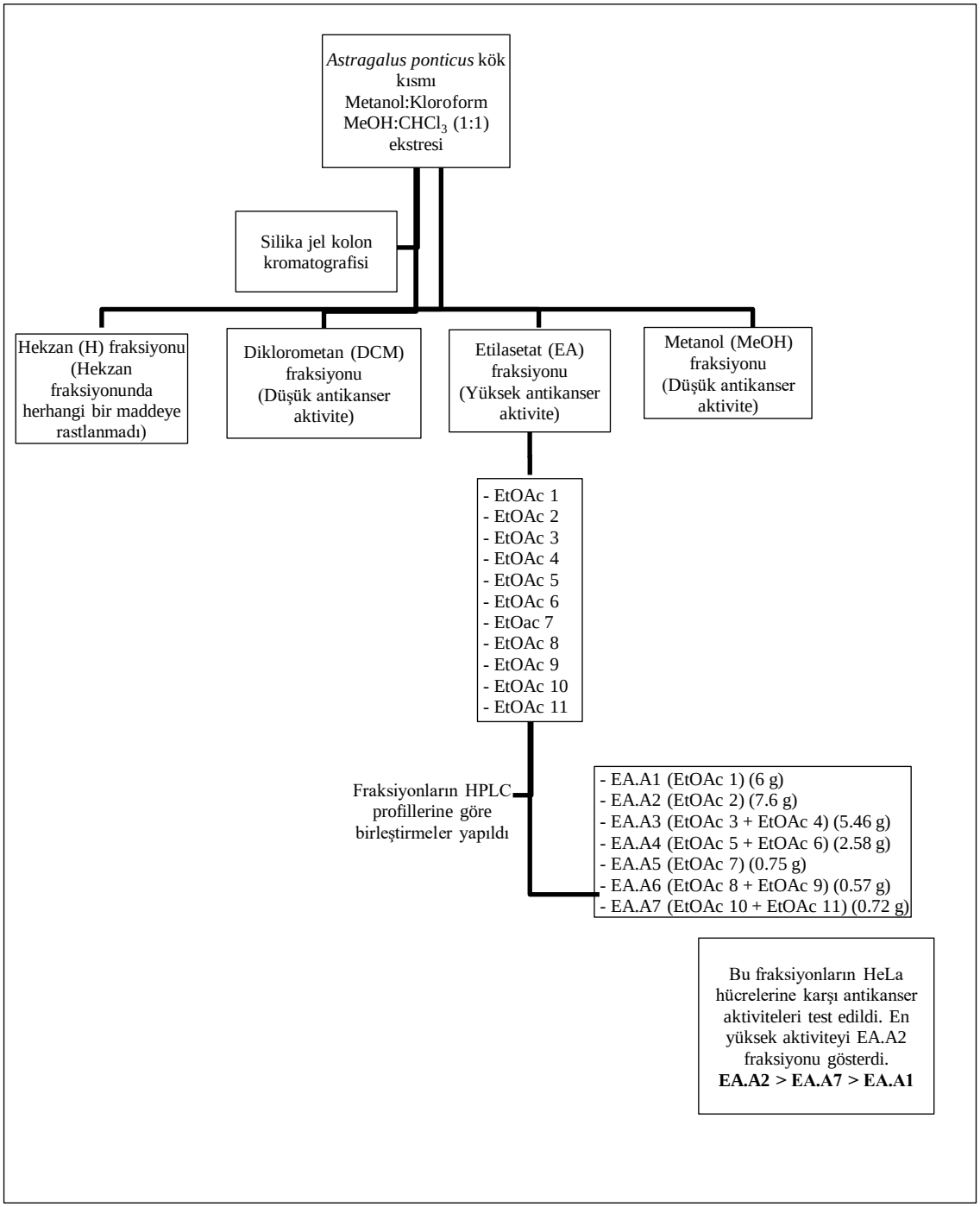
AsPoKök fraksiyonlarının birleştirilmelerinden önce HPLC profilleri belirlenmiştir. Kullanılan hareketli fazlar A ve B sırasıyla %0.1 formik asit içeren ultra saf su ve asetonitrildir. Kullanılan çözücü programı 0-1 dak., %10 B; 1-20 dak., %50 B; 20-23 dak., %80 B; 23-25 dak., %10 B; 25-30 dak., %10 B şeklindedir. Analizler negatif modda yapılmıştır. Enjeksiyon hacmi 0.6 mL ve kolon sıcaklığı 35 °C'tır. Analiz için 1 mg/mL derişiminde örnek çözeltileri hazırlanmış (MeOH içinde) ve 5 kat seyreltildikten sonra analiz yapılmıştır.

2.9.3 AsPoKök EtOAc fraksiyonlarının antikanser testleri

AsPoKök etilasetat fraksiyonlarının HeLa hücrelerine karşı antiproliferatif aktivite testleri xCELLigence Gerçek zamanlı Hücre Analiz sistemi kullanılarak 250, 100 ve 50 µg/mL derişimlerinde yapılmıştır.

2.9.4 İzolasyon Çalışmaları

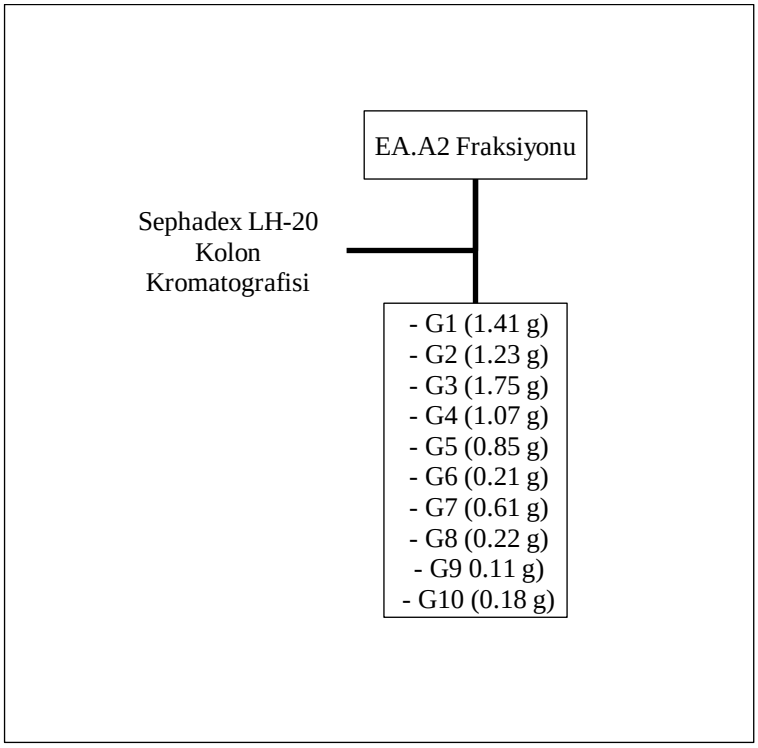
AsPoKök ana ekstresi ile yapılan çalışmaların özeti Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1 *Astragalus ponticus* Pall. bitkisinin kök kısmı ile yapılan biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlandırma aşamaları

2.9.4.1 EA.A2 fraksiyonu ile yapılan izolasyon çalışmaları

EA.A2 fraksiyonunun alt fraksiyonlara ayrılmasında Sephadex LH-20 kolon dolgu maddesi kullanılmıştır. Öncelikle 50 g Sephadex LH-20 fraksiyonlandırmada hareketli faz olarak kullanılan MeOH:$CHCl_3$ (1:1) içinde bir gece bekletilmiştir. Sonrasında kolona doldurularak yaklaşık 210 cm^3 hacminde bir dolgu maddesi doluluğu elde edilmiştir. EA.A2 (7.6 g) 65 mL MeOH:$CHCl_3$ (1:1) içinde çözülmüştür. Bu çözeltinin yaklaşık 5.5 mL'si kolona yüklenmiş ve fraksiyonlar toplanmıştır. Bu işlem on iki kez, tüm EA.A2 çözeltisi bitinceye kadar tekrarlanmıştır. Her işlemde ortalama 50 fraksiyon toplanmış ve İTK profillerine göre birleştirmeler yapılarak her uygulama için 12 grup elde edilmiştir. Fraksiyonlandırma işlemi sonunda bu gruplar yine İTK profillerine göre birleştirilerek Şekil 2.2'de verilen gruplar elde edilmiştir.



Şekil 2.2 EA.A2 fraksiyonunun Sephadex LH-20 kolonda alt fraksiyonlara ayrılması şeması

EA.A2.G5 (850 mg) fraksiyonu Sephadex LH-20 kolona (45 cm x R=2.6 cm) yüklenmiş, $CHCl_3$:MeOH (75:25) ile elüsyon yapılarak 70 fraksiyon toplanmıştır. 45-54 arası fraksiyonlar birleştirildikten sonra Sephadex LH-20 kolona yüklenmiş ve EA:MeOH:H_2O (100:20:1) sistemi ile 80 fraksiyon toplanmıştır. 3-9 arası fraksiyonlardan **B2** (2 mg) bileşiği elde edilmiştir. 39-54 arası fraksiyonlar birleştirilerek *p*-İTK plakasına uygulanmış ve $CHCl_3$:MeOH (10:1) sistemi ile yürütülmüştür. Ana maddeyi içeren bant kazınmış, Sephadex LH-20 kolona (30 cm x R=2.6 cm) yüklenmiş ve Hekzan:$CHCl_3$:MeOH (7:4:1) sistemi kullanılarak **B1** (7 mg) bileşiği elde edilmiştir.

EA.A2.G6 fraksiyonu (210 mg) 700 mg Celite 545 ile karıştırılmış ve kurutulmuştur. Bu karışım diklorometan (DCM) ile hazırlanan silika jel kolona (80 g, 2,6 cm x 34 cm) yüklenmiş ve DCM:MeOH (100:0, 99:1, 98:2, 97:3, 96:4, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20 ve 75:25 oranlarında) sistemi ile 380 fraksiyon toplanmıştır. Bu fraksiyonlar iki ana grupta birleştirilmiştir. Birinci grup ilk olarak Sephadex LH-20 kolona (50 cm x R=2.6 cm) yüklenmiş ve $CHCl_3$:MeOH (65:35) ile elüsyon yapılmıştır. Buradan elde edilen ve ana bileşeni içeren fraksiyonlar birleştirildikten sonra poliamid kolona (32 cm x R=3.8 cm) yüklenmiş ve toluen-MeOH ile gradient elüsyon yapılarak **B5** (22 mg) bileşiği elde edilmiştir. İkinci grup Sephadex LH-20 kolona (50 cm x R=2.6 cm) yüklenmiş ve $CHCl_3$:MeOH (65:35) ile elüsyon yapılarak **B6** (14 mg) (izolikuiritigenin) bileşiği elde edilmiştir.

EA.A2.G7 (600 mg) silika jel kolona (38 cm x 2.6 cm) yüklenmiş ve DCM:MeOH (10:1.5) sistemi ile izokratik elüsyon yapılarak 60 fraksiyon toplanmıştır. 19-24 arası fraksiyonlar Sephadex LH-20 kolona (28 cm x R=1.8 cm) yüklenerek Hekzan:Ace:MeOH (4:8:1) sistemi ile elüsyon yapılarak **B3** (18 mg) bileşiği elde edilmiştir.

2.9.4.2 EA.A7 fraksiyonu ile yapılan izolasyon çalışmaları

EA.A7 (500 mg) Celite üzerine emdirildikten sonra silika jel 60 ile hazırlanan kolona (19 cm x R=2.6 cm) yüklenmiş ve DCM:MeOH (100:0, 100 mL; 95:5, 200 mL; 90:10, 400 mL; 70:30, 250 mL) ile elüsyon yapılarak 75 adet fraksiyon toplanmıştır. 49-57 arası fraksiyonlar birleştirilerek (51 mg) 10 g silika jel 60 ile hazırlanan kolona yüklenmiş ve $CHCl_3$:MeOH (10:1) izokratik sistemi ile elüsyon yapılarak ve **B7** (6 mg) bileşiği elde edilmiştir.

2.9.4.3 EA.A1 fraksiyonu ile yapılan izolasyon çalışmaları

EA.A1 fraksiyonu metil alkol ile çözülmüş ve süzülmüştür. Çözünen kısım silika jel 60 kolona (25 cm x R=3.3 cm) yüklenmiş (silika jele emdirilmiş halde) ve H:İPA (100:2.5) ile izokratik elüsyon yapılmıştır. **B14** (11 mg) bileşiği buradan alınan 10-15 arası fraksiyonlardan (79 mg) *p*-HPLC ile saflaştırılmıştır: A fazı %0.1 formik asit eklenmiş H_2O, B fazı MeOH; 0-60 dk arası %40 B, 60-75 dk arası %100 B'ye artış, 75-95 dk arası %100 B.

26-29 arası fraksiyonlar (86 mg) Sephadex LH-20 kolona (19 cm x r=2.6 cm) yüklenmiş ve EA:MeOH (90:10) ile elüsyon yapılmış ve ana maddeyi içeren fraksiyonlar birleştirilmiştir. Elde edilen bu karışım 10 g silika jel 60 ile hazırlanan kolona yüklenmiş ve H:EA (3:1) ile elüsyon yapılmıştır. Ana maddeyi içeren kısımdan hekzan/asetondan kristallendirme ile **B15** (10 mg) bileşiği elde edilmiştir.

35-50 arası fraksiyonlar (400 mg) Sephadex LH-20 kolona (33 cm x R=2.6 cm) yüklenmiş, %100 metil alkol ile elüsyon yapılmıştır. Toplanan fraksiyonlardan 30-34 arası fraksiyonlar (90 mg) *p*-İTK plakasına yüklenmiş ve H:EA (2:1) ile yürütme yapıldıktan sonra ana maddenin bandı kazındıktan sonra aseton ile karıştırılarak süzülmüştür. **B10** (30 mg) bileşiği bu süzüntüden *p*-HPLC ile saflaştırılmıştır: A fazı %0.1 formik asit eklenmiş H_2O, B fazı MeOH; 0-60 dk arası %40 B, 60-75 dk arası %100 B'ye artış, 75-95 dk arası %100 B. 39-45 arası fraksiyonlardan **B8** (6 mg) bileşiği

p-HPLC ile saflaştırılmıştır: A fazı %0.1 formik asit eklenmiş H_2O, B fazı MeOH; 0-60 dk arası %40 B, 60-75 dk arası %100 B'ye artış, 75-95 dk arası %100 B.

2.9.4.4 Sikloartan tipi triterpen glikozitlerin elde edilmesi

A. ponticus MeOH/$CHCl_3$ ekstresinin fraksiyonlandırılmasında elde edilen metanol fraksiyonu ılık suda çözülmüş, çözünmeyen kısım süzüldükten ve karışım soğuduktan sonra sırasıyla diklorometan (DCM), etilasetat (EtOAc) ve n-bütanol (n-BuOH) ile ekstrakte edilmiştir. Bu işlemden; 3.5 g DCM, 8.4 g EtOAc ve 18.5 g n-BuOH ekstreleri elde edilmiştir. EtOAc fraksiyonu 3 g silika jel ile karıştırılmıştır. Bu karışım 175 g silika jel ile hazırlanan kolona yüklenmiştir. Hareketli faz olarak H:DCM:MeOH; 15:85:0→0:80:20 kullanılarak toplam 180 fraksiyon toplanmış ve İTK çalışmalarına göre aşağıdaki birleştirmeler yapılmıştır.

Çizelge 2.1 AsPoKök ana ekstresinin MeOH fraksiyonundan elde edilen etilasetat alt fraksiyonları ve miktarları

Fraksiyon	Kod	Miktar (mg)
59-104	I.Grup	2.90
105-114	II.Grup	0.77
115-125	III.Grup	0.77
126-138	IV.Grup	0.59
139-175	V.Grup	0.79

500 mg 1. Grup fraksiyon Sephadex LH-20 kolona (40 cm x R=2.6 cm) yüklenmiş ve $CHCl_3$:MeOH (1:1) sistemi ile elüsyon yapılmıştır. Ana maddeyi içeren fraksiyonlar birleştirilmiş, Sephadex LH-20 kolona (40 cm x R=2.6 cm) yüklenerek ve %100 metanol ile elüsyon yapılarak **B11** (113 mg) bileşiği elde edilmiştir.

100 mg 2. Grup fraksiyon Sephadex LH-20 kolona (40 cm x R=2.6 cm) yüklenmiş ve $CHCl_3$:MeOH (1:1) sistemi ile elüsyon yapılmıştır. Ana maddeyi içeren fraksiyonlar

birleştirildikten sonra 10 g silika jel ile hazırlanan kolona yüklenmiş ve $CHCl_3$:MeOH (14:1) sistemi ile izokratik elüsyon yapılarak **B13** (33 mg) bileşiği elde edilmiştir.

65 mg 4. Grup fraksiyon Sephadex LH-20 kolona (40 cm x R=2.6 cm) yüklenmiş ve %100 metanol ile elüsyon yapılmıştır. Ana bileşeni içeren fraksiyonlar birleştirildikten sonra 10 g silika jel ile hazırlanan kolona yüklenmiş ve $CHCl_3$:MeOH (10:1) sistemi ile izokratik elüsyon yapılarak **B12** (18 mg) bileşiği elde edilmiştir.

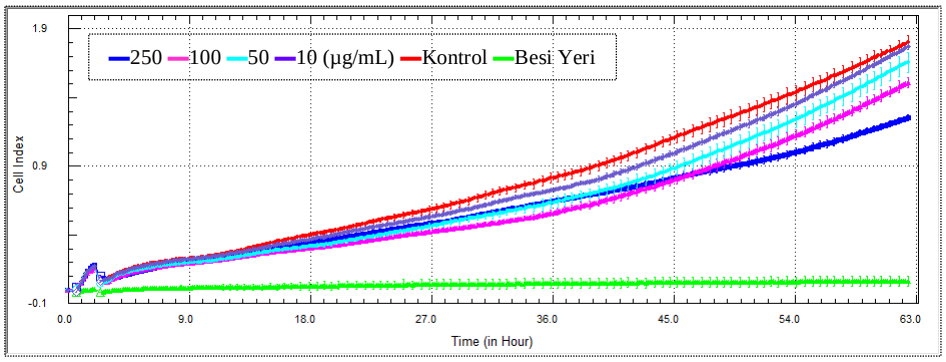
3. BULGULAR VE TARTIŞMALAR

3.1 *Astragalus ponticus* Pall. Bitkisinin Aktif Kısımlarının Belirlenmesi

Bu çalışmada *Astragalus ponticus* Pall. bitkisi üzerine biyoaktivite yönlendirmeli izolasyon çalışmaları yapılmıştır. Bunun için bitki ilk olarak çiçek (AsPoÇi), gövde+yaprak (AsPoGöv) ve kök (AsPoKök) kısımlarına ayrılarak her bir kısmın MeOH:$CHCl_3$ (1:1) ekstreleri hazırlanmış, bu ekstrelerin HeLa insan rahim kanseri hücrelerine karşı antiproliferatif etkileri incelenmiştir.

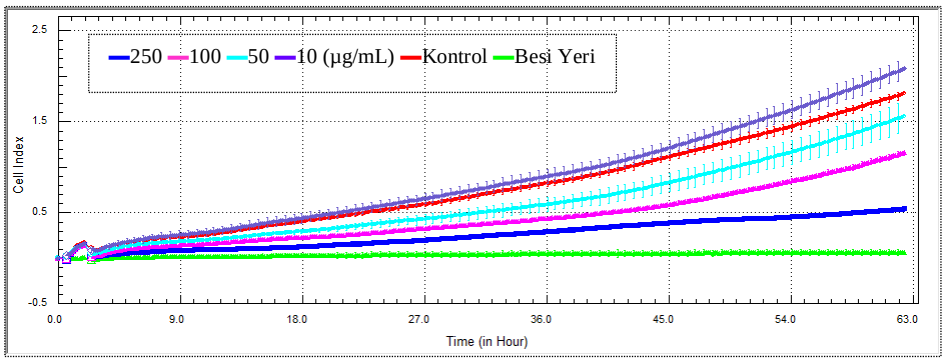
Antikanser ön denemelerinde kullanılacak ekstre hazırlama işlemlerinden 10'ar g'lık AsPoÇi, AsPoGöv ve AsPoKök kısımları için elde edilen ekstre miktarları ve verimleri sırasıyla 2.01 g (%20), 1.74 g (%17) ve 0.32 g (%3) şeklindedir.

Astragalus ponticus Pall. bitkisinin farklı kısımlarından elde edilen ekstrelerin HeLa hücrelerine karşı antiproliferatif test sonuçları Şekil 3.1, 3.2 ve 3.3'te verilmiştir. Bu grafiklerdeki kırmızı çizgi, içinde sadece hücre ve besi yerinin bulunduğu kontrol grubunu; yeşil çizgi, içinde sadece besi yerinin bulunduğu besi yeri grubunu temsil etmektedir. Mavi, pembe, turkuaz ve mor çizgiler ise sırasıyla 250, 100, 50 ve 10 µg/mL derişimlerini temsil etmektedir. Grafik, X ekseni olan zamana karşılık Y ekseni olan CI (Hücre İndeksi, Cell Index) olarak çizilmiştir. CI değerinin artması hücrelerin büyüdüğünü göstermektedir. Sonuçlara göre AsPoÇi herhangi bir etki göstermemiştir. Test edilen 250, 100, 50 ve 10 µg/mL derişimlerinin uygulandığı kuyucuklardaki hücreler tüm kontrol grubuyla benzer bir büyüme eğilimi göstermiştir.

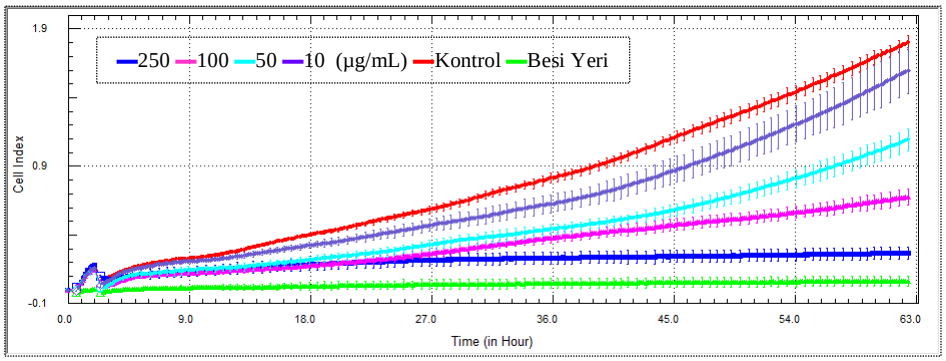


Şekil 3.1 AsPoÇi antikanser test sonucu

AsPoGöv ve AsPoKök kısımlarının antiproliferatif test sonuçlarına bakılacak olursa (sırasıyla Şekil 3.2 ve Şekil 3.3) bu ekstrelerin her ikisinin de benzer bir antiproliferatif etki gösterdiği düşünülebilir. Ancak grafiğin CI değerleri incelendiğinde aralarında belirgin bir fark olduğu anlaşılmaktadır. AsPoKök ekstresinin 250 ve 100 µg/mL derişimlerinde sırasıyla 0.1 ve 0.7 CI değerleri elde edilmişken AsPoGöv ekstresinin 250 ve 100 µg/mL derişimlerinde sırasıyla 0.6 ve 1.1 CI değerleri elde edilmiştir. Buna ek olarak AsPoGöv ekstresi 10 µg/mL derişiminde kontrol grubundan fazla bir büyümeye neden olmuştur. AsPoKök ekstresinin daha yüksek aktivite göstermesinden dolayı izolasyon çalışmaları için AsPoKök kısmı seçilmiştir.



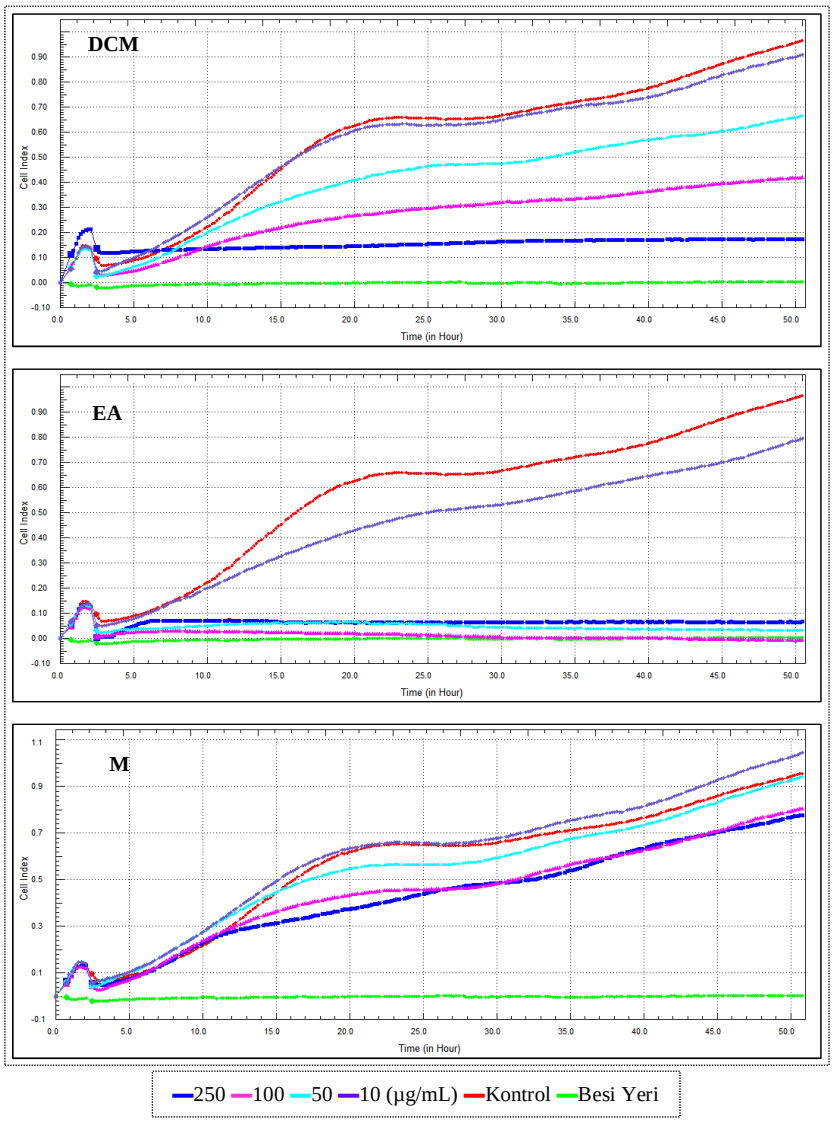
Şekil 3.2 AsPoGöv antikanser test sonucu



Şekil 3.3 AsPoKök antikanser test sonucu

3.2 AsPoKök Ekstresinin Aktif Fraksiyonunun Belirlenmesi

AsPoKök ekstresinin aktif fraksiyonlarını belirlemek için ilk olarak 570 g AsPoKök kısmının MeOH:$CHCl_3$ (1:1) ekstresi hazırlanmış ve 41 g ekstre elde edilmiştir. Sonrasında bu ekstre silikajel 60 kolonda fraksiyonlandırmaya tabi tutularak hekzan (H, 0.04 g), diklorometan (DCM, 0.4 g), etilasetat (EA, 3.9 g) ve metanol (M, 29.7 g) fraksiyonları elde edilmiştir. Bu fraksiyonlardan antiproliferatif aktiviteye sahip olanını bulmak için yapılan test sonuçları Şekil 3.4'te görülmektedir. Sonuçlar açıkça göstermektedir ki M ekstresi 4 derişimde de aktivite göstermezken DCM ekstresi 250 µg/mL derişiminde aktivite göstermiş, etilasetat ekstresi ise 250, 100 ve 50 µg/mL derişimlerinin üçünde de yüksek aktivite göstermiştir. Bu yüzden çalışmaya AsPoKök MeOH/$CHCl_3$ ekstresinin etilasetat fraksiyonu ile devam edilmiştir.



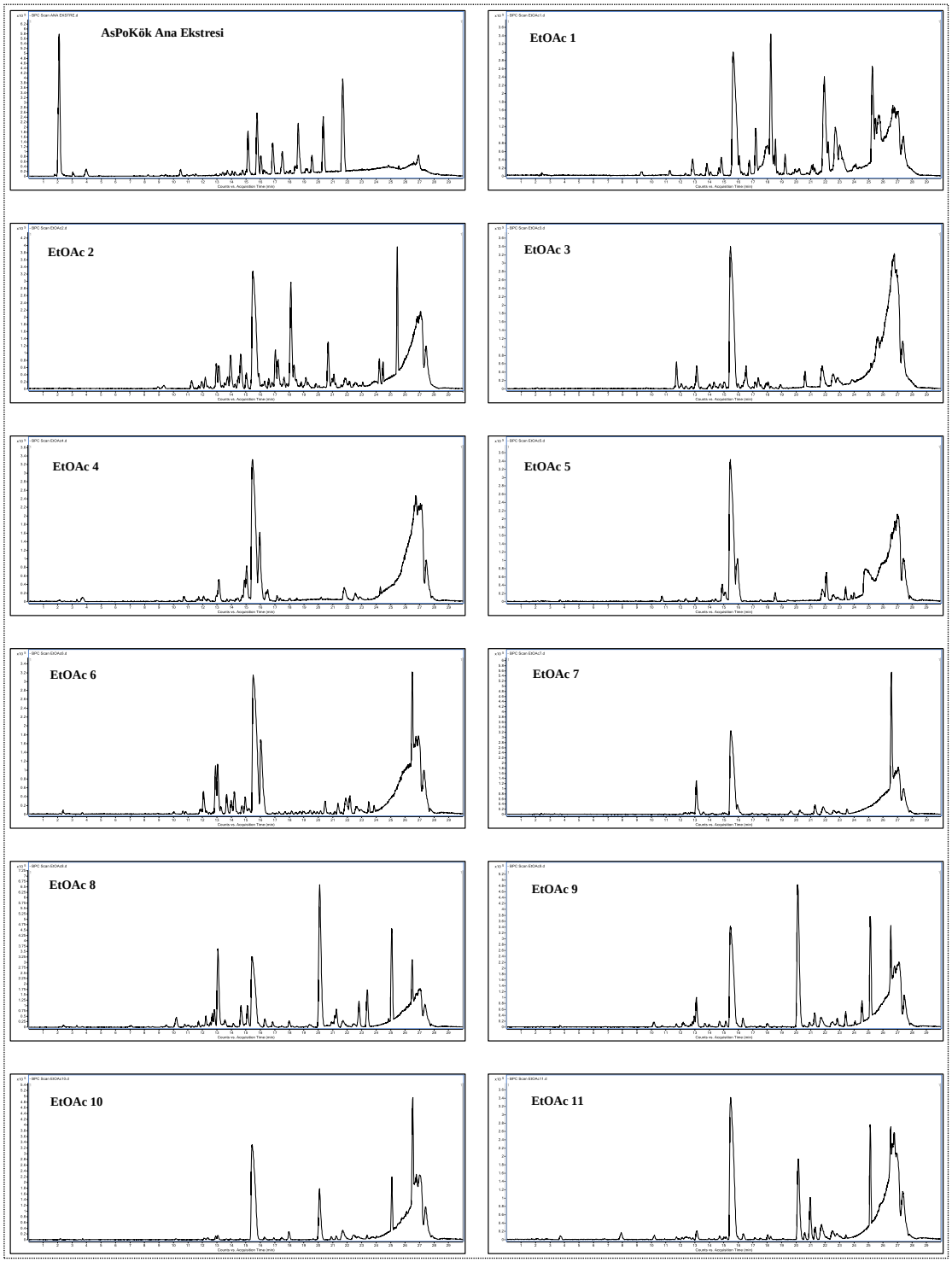
Şekil 3.4 *Astragalus ponticus* kök kısmı MeOH/$CHCl_3$ ana ekstresinin diklorometan (DCM), etilasetat (EA) ve metanol (M) fraksiyonlarının HeLa hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri

570 g AsPoKök ile başlanılan ekstraksiyon çalışmasından elde edilen 3.9 g'lık etilasetat ekstersinin miktarı az olduğundan 2.54 kg AsPoKök kullanılarak yeni bir ekstre hazırlanmış ve 133 g'lık bir ekstre elde edilmiştir. Saflaştırma çalışmasına bu ekstre ile devam edilmiştir. Bu ana ekstrenin silikajel açık kolon kullanılarak yapılan fraksiyonlandırma çalışmasında etilasetat fraksiyonları 11 fraksiyon şeklinde toplanmıştır. Bu fraksiyonlandırma çalışmasının sonucunda elde edilen miktarlar Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 AsPoKök etilasetat altfraksiyonu miktarları

Fraksiyon Kodu	Miktarı (g)
EtOAc 1	6,00
EtOAc 2	7,86
EtOAc 3	2,82
EtOAc 4	2,64
EtOAc 5	1,43
EtOAc 6	1,15
EtOAc 7	0,75
EtOAc 8	0,26
EtOAc 9	0,31
EtOAc 10	0,35
EtOAc 11	0,37

Elde edilen bu fraksiyonlar daha sonra HPLC-TOF/MS cihazı ile negatif modda analiz edilmiş ve her bir fraksiyonun kromatogramları elde edilmiştir. Bu fraksiyonlar, kromatogramlarındaki ortak piklere ve piklerin bağıl büyüklüklerine göre birleştirilmiş, bir kısmı birleştirilmeden bırakılmıştır. AsPoKök MeOH/$CHCl_3$ ana ekstresi ve EA fraksiyonlarının HPLC-TOF kromatogramları Şekil 3.5'te verilmiştir.



Şekil 3.5 AsPoKök MeOH/$CHCl_3$ ana ekstresinin etilasetat fraksiyonlarının HPLC-TOF/MS kromatogramları

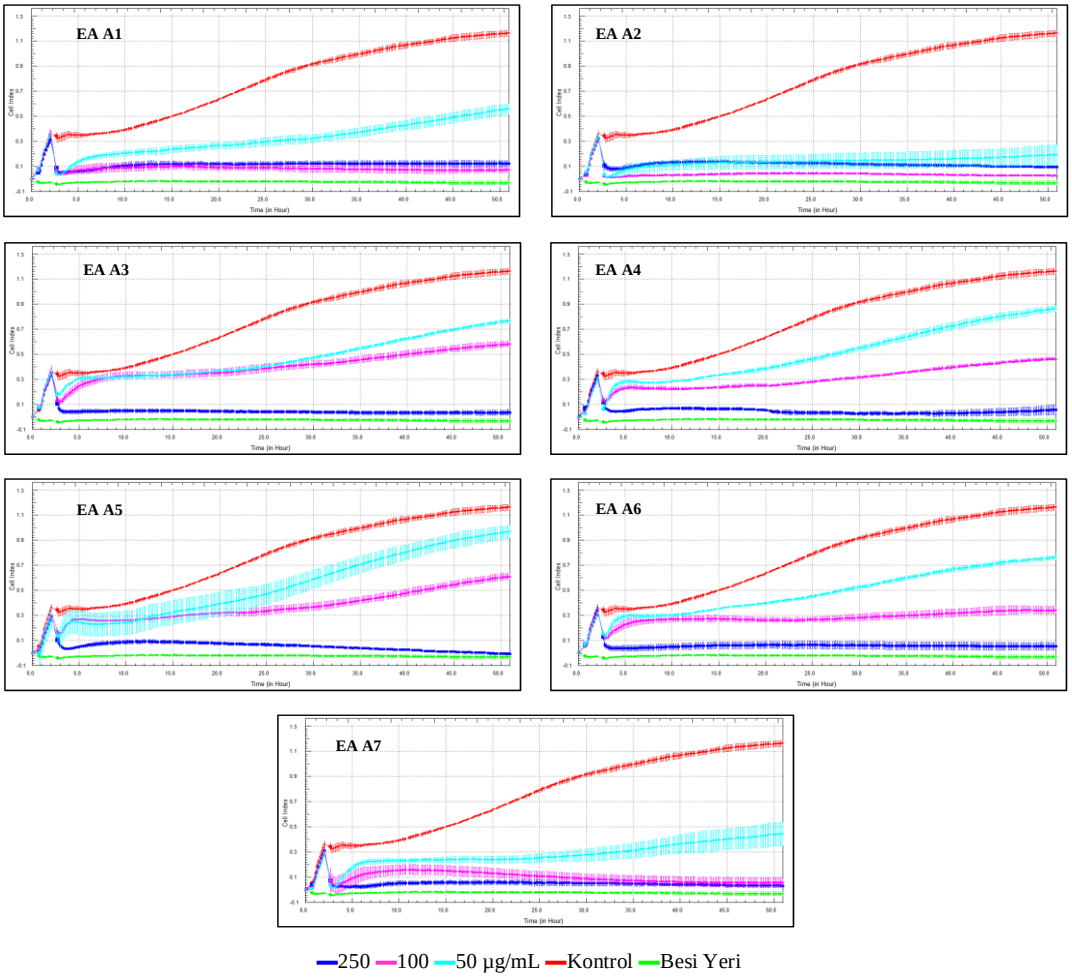
Fraksiyonların HPLC-TOF profillerine göre Çizelge 3.2'de görülen birleştirmeler yapılmıştır.

Çizelge 3.2 AsPoKök MeOH/$CHCl_3$ ekstresinin etilasetat fraksiyonlarının HPLC-TOF/MS kromatogramlarına göre birleştirilme tablosu

Birleştirmeden Önce	**Birleştirmeden Sonra**
EtOAc 1	EA A1
EtOAc 2	EA A2
EtOAc 3 EtOAc 4	EA A3
EtOAc 5 EtOAc 6	EA A4
EtOAc 7	EA A5
EtOAc 8 EtOAc 9	EA A6
EtOAc 10 EtOAc 11	EA A7

3.3 AsPoKök EtOAc Fraksiyonlarının Antikanser Testleri

AsPoKök MeOH/$CHCl_3$ ekstresinin etilasetat fraksiyonlarının birleştirilmesinden sonra yapılan antiproliferatif aktivite test sonuçları Şekil 3.6'da verilmiştir. Sonuçlara göre EA.A2 fraksiyonu çalışılan tüm derişimlerde HeLa hücrelerine karşı oldukça yüksek bir aktivite göstermiştir. Kontrol grubuna kıyasla bu fraksiyonun uygulandığı hücreler hiçbir çoğalma gösterememiştir. Aktivite açısından EA.A2 fraksiyonunu 250 ve 100 µg/mL derişimlerde aktivite gösteren EA.A7 ve EA.A1 fraksiyonları izlemektedir. Fraksiyonların hepsi 250 µg/mL derişimde belirgin bir aktiviteye sahiptir ancak saflaştırma işlemleri için 250 ve 100 µg/mL derişimlerinde aktivite gösteren EA.A2, EA.A7 ve EA.A1 fraksiyonları seçilmiştir.

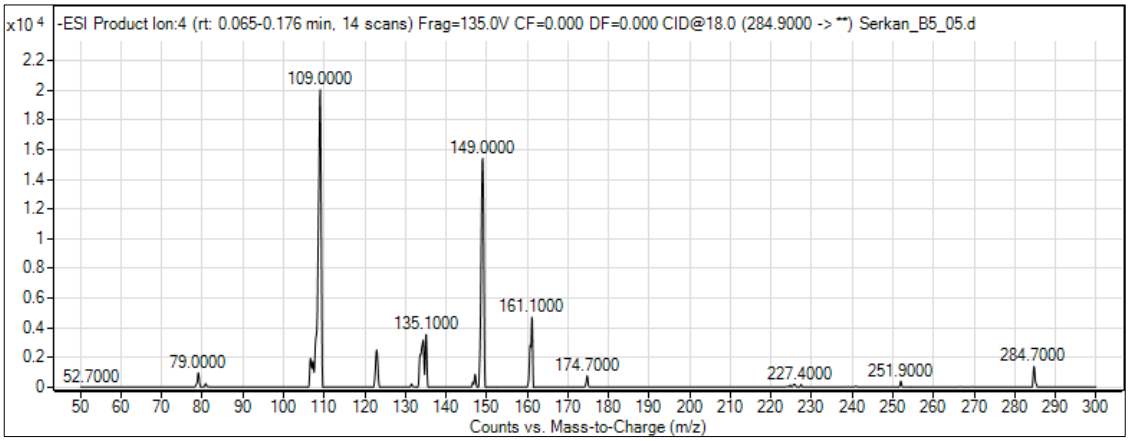


Şekil 3.6 *Astragalus ponticus* Pall. kök kısmı MeOH/$CHCl_3$ ekstresinin etilasetat fraksiyonlarının HeLa hücreleri üzerine antiproliferatif etkileri

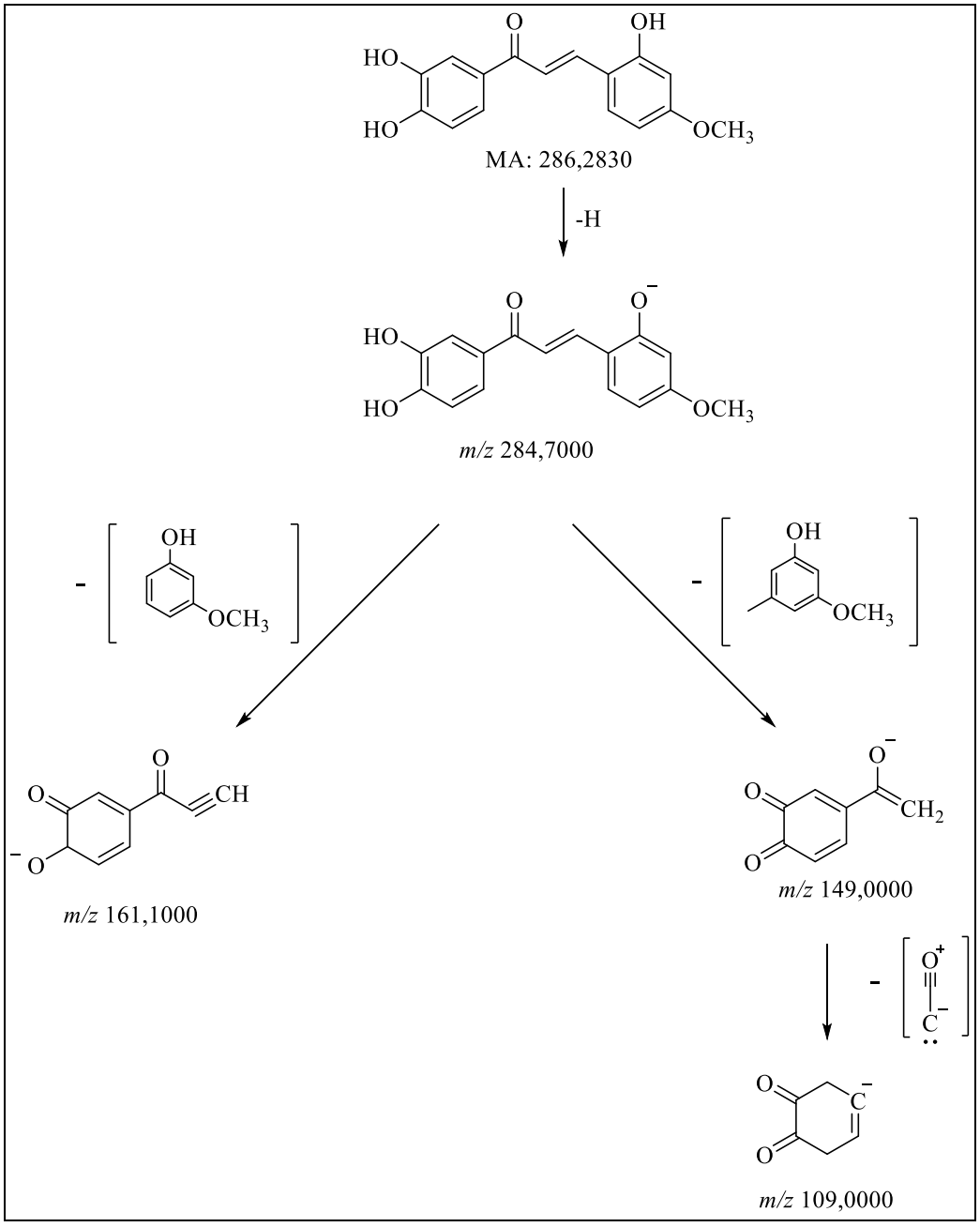
3.4 Antiproliferatif Aktiviteye Sahip Fraksiyonlardan Saflaştırılan Yeni Bileşiklerin Yapı Tayini

3.4.1 B5 Bileşiğinin Yapı Tayini

B5 bileşiğinin kapalı formülü $C_{16}H_{14}O_5$ olarak bulunmuştur. Bu molekül için hesaplanan $[M\text{-}H]^-$ iyon kütlesi 285.0768, bulunan iyon kütlesi 285.0871 olmuştur (EK 38). Şekil 3.7'de **B5** bileşiğinin MS-MS spektrumu, Şekil 3.8'de önerilen MS-MS parçalanma ürünleri verilmiştir.



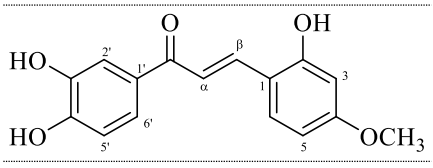
Şekil 3.7 B5 bileşiğinin MS-MS spektrumu



Şekil 3.8 B5 bileşiği için önerilen MS-MS parçalanma ürünleri

B5 bileşiğinin ^{1}H ve ^{13}C NMR spektrumları (Şekil 3.10 ve Şekil 3.11) incelendiğinde bu bileşiğin bir kalkon iskeletine sahip olduğu görülmektedir. Bileşiğin DEPT spektrumunda (Şekil 3.12) 7 adet dördüncül karbon, 8 adet metin karbonu, 1 adet metil karbonu görülmektedir. Karbonil karbonuna α ve β konumunda bulunan protonlar 15.4 Hz'lik bir yarılmayla dublet olarak rezonans olmuşlardır, bu da bu protonların birbirlerine göre trans konumda bulunduklarını gösterir. 6 konumundaki metin

karbonun rezonans değeri 131.5 ppm'dir. Bu denli bir aşağı alana kayma bu karbona meta pozisyonda –OH veya –OR gruplarının olduğunu gösterir (Soĺăniová et al. 1976, Hwang et al. 2011). Buna ek olarak H6 protonunun β karbonu ile olan HMBC etkileşimi bu karbon ve protonun 6 konumunda olduğunu doğrular. H6 protonu H5 protonu ile COSY etkileşimi vermiş ve 8.7 Hz'lik bir *orto* etkileşimi göstermiştir. H3 protonunun da H5 protonu ile verdiği 2.5 Hz'lik *meta* etkileşimi H3, H5 ve H6 protonlarının konumlarının kesin bir şekilde belirlenmesini sağlar. Hβ protonunun 159.5 ppm'deki karbon ile gösterdiği HMBC etkileşimi bu karbonun C2 konumunda olduğunu gösterir. 3.80 ppm'de rezonans olan metil protonlarının da 163.4 ppm'e rezonans olan karbon atomu ile HMBC etkileşimi göstermesi metoksi grubunun C4 konumuna bağlı olduğunu göstermektedir. A halkasının yapısı böylece belirlenmiştir. H2' protonunun C3', C4' ve C6' karbonlarıyla HMBC etkileşimi gösterip C5' karbonuyla herhangi bir HMBC etkileşimi göstermemesi 7.37 ppm (H2') ve 6.81 ppm'deki (H5') protonların birbirlerine göre *para* konumda olduklarını doğrular niteliktedir. H6' protonu H4' protonu ile 8.9 Hz'lik bir *orto* etkileşmesi, H2' protonu ile de 2.9 Hz'lik bir *meta* etkileşmesi göstermektedir. 7.00 ppm'de rezonans olan H6' protonunun 156.1 ppm'de rezonans olan karbon atomuyla HMBC etkileşimi verirken 149.0 ppm'de rezonans olan karbon atomuyla küçük bir HMBC etkileşmesi göstermesi bu karbonların sırayla C4' ve C3' karbonları olduklarını açıkça göstermektedir. Bu etkileşimler ışığında **B5** bileşiğinin yapısı 4-metoksi-2,3',4'-trihidroksikalkon olarak belirlenmiştir.

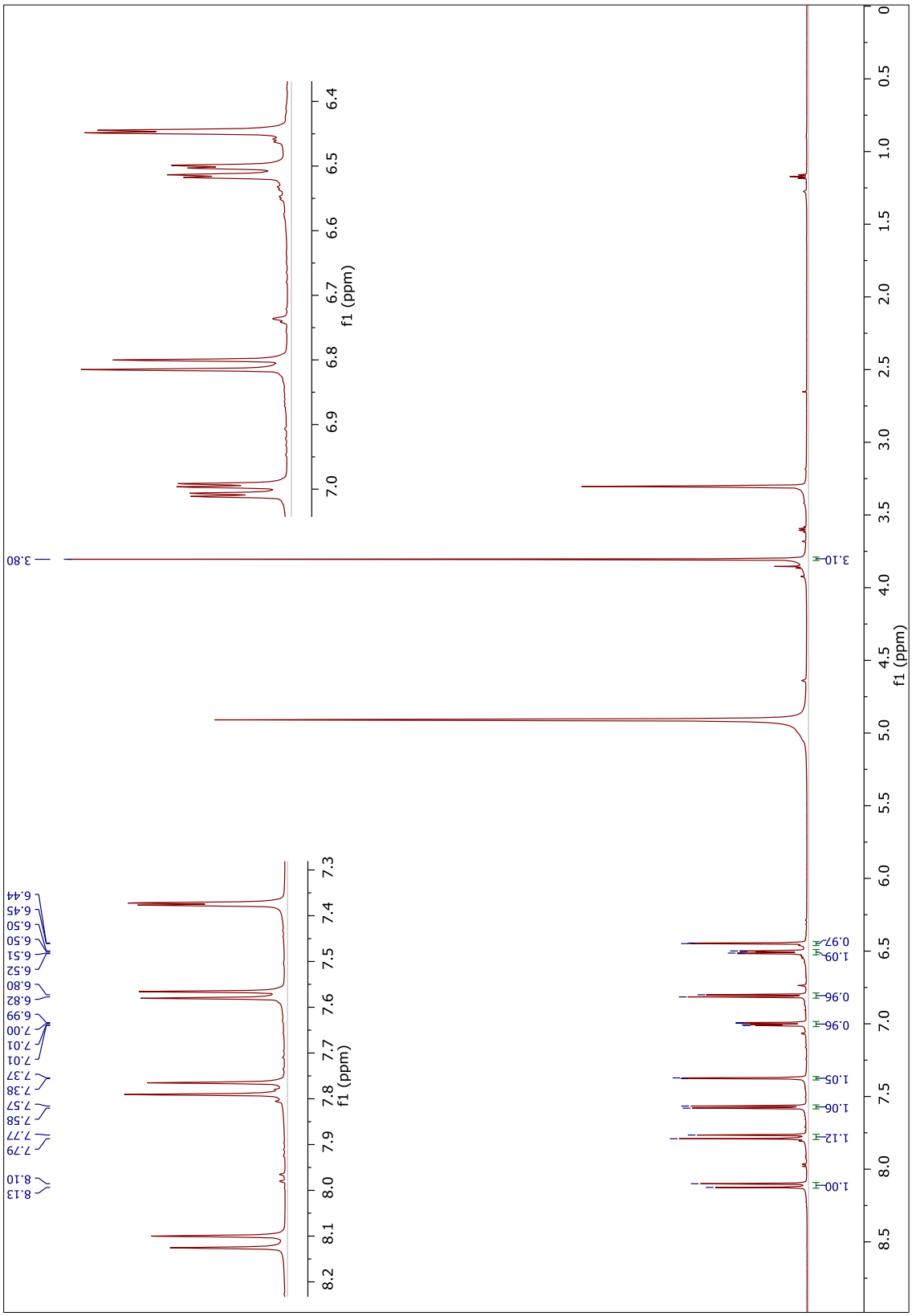


Şekil 3.9 B5 bileşiğinin yapısı

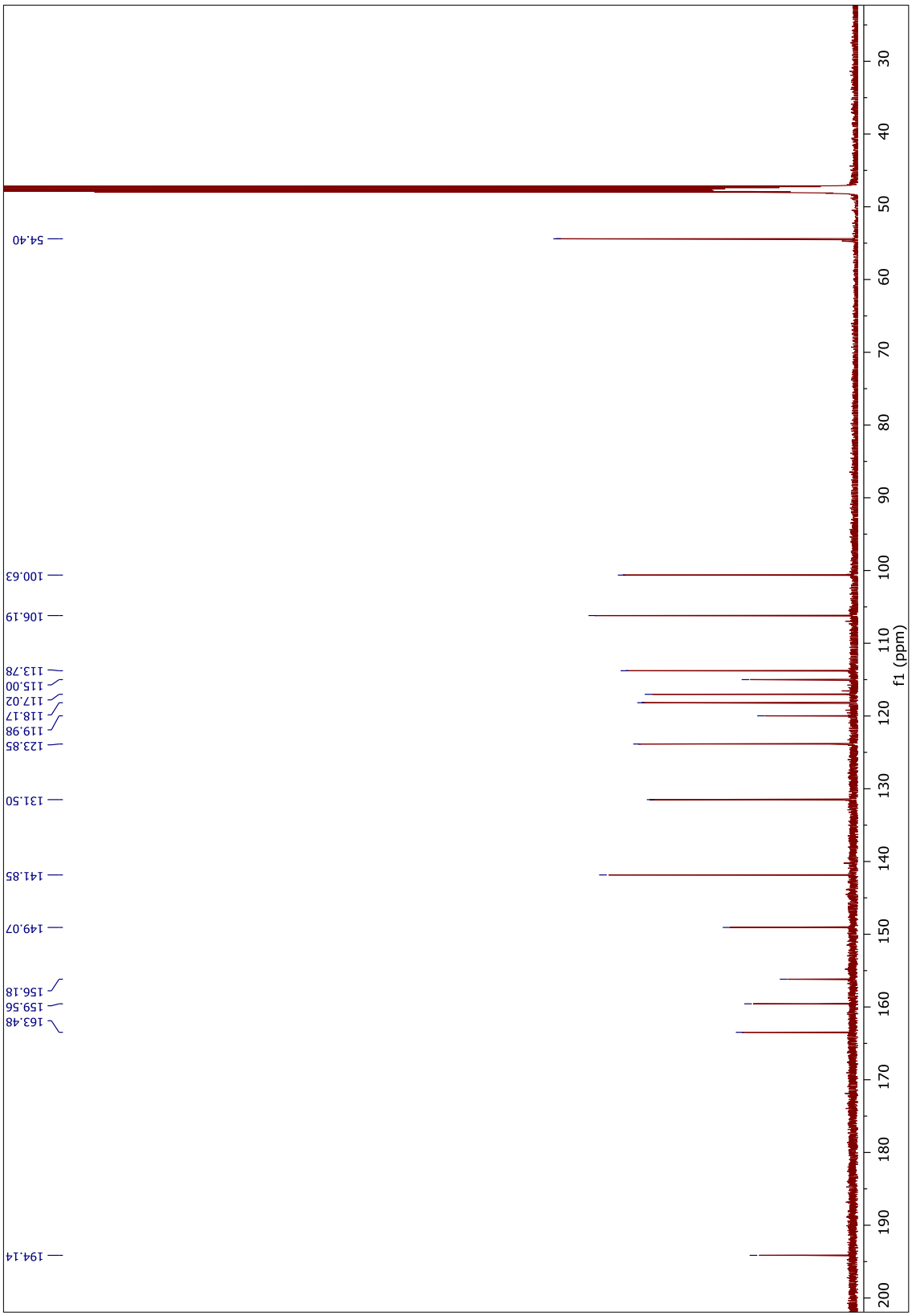
Çizelge 3.3 B5 bileşiğinin ^{1}H ve ^{13}C NMR rezonans değerleri

No	**δ_C (ppm)***	**δ_H (ppm) (*J*, Hz)***
1	115.0	-
2	159.5	-
3	100.6	6.45 (d, 2.5)
4	163.4	-
5	106.1	6.51 (dd, 8.7, 2.5)
6	131.5	7.57 (d, 8.7)
1'	119.9	-
2'	113.7	7.37 (d, 2.9)
3'	149.0	-
4'	156.1	-
5'	118.1	6.81 (d, 8.9)
6'	123.8	7.00 (dd, 8.9, 2.9)
C-4 OCH_3	54.4	3.80 (s)
C=O	194.1	-
α-C	117.0	7.78 (d, 15.4)
β-C	141.8	8.11 (d, 15.4)

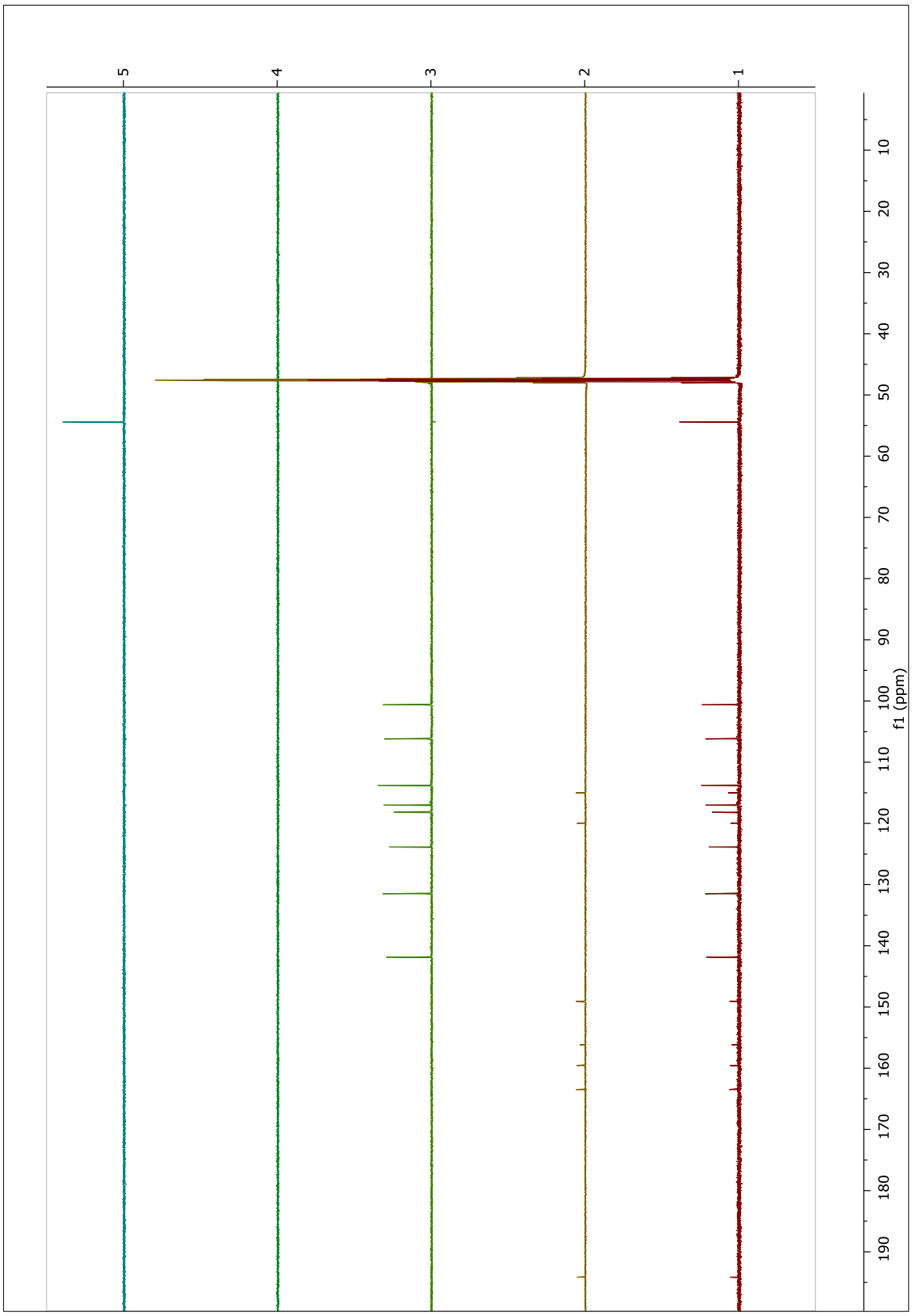
***** Metanol-d_4



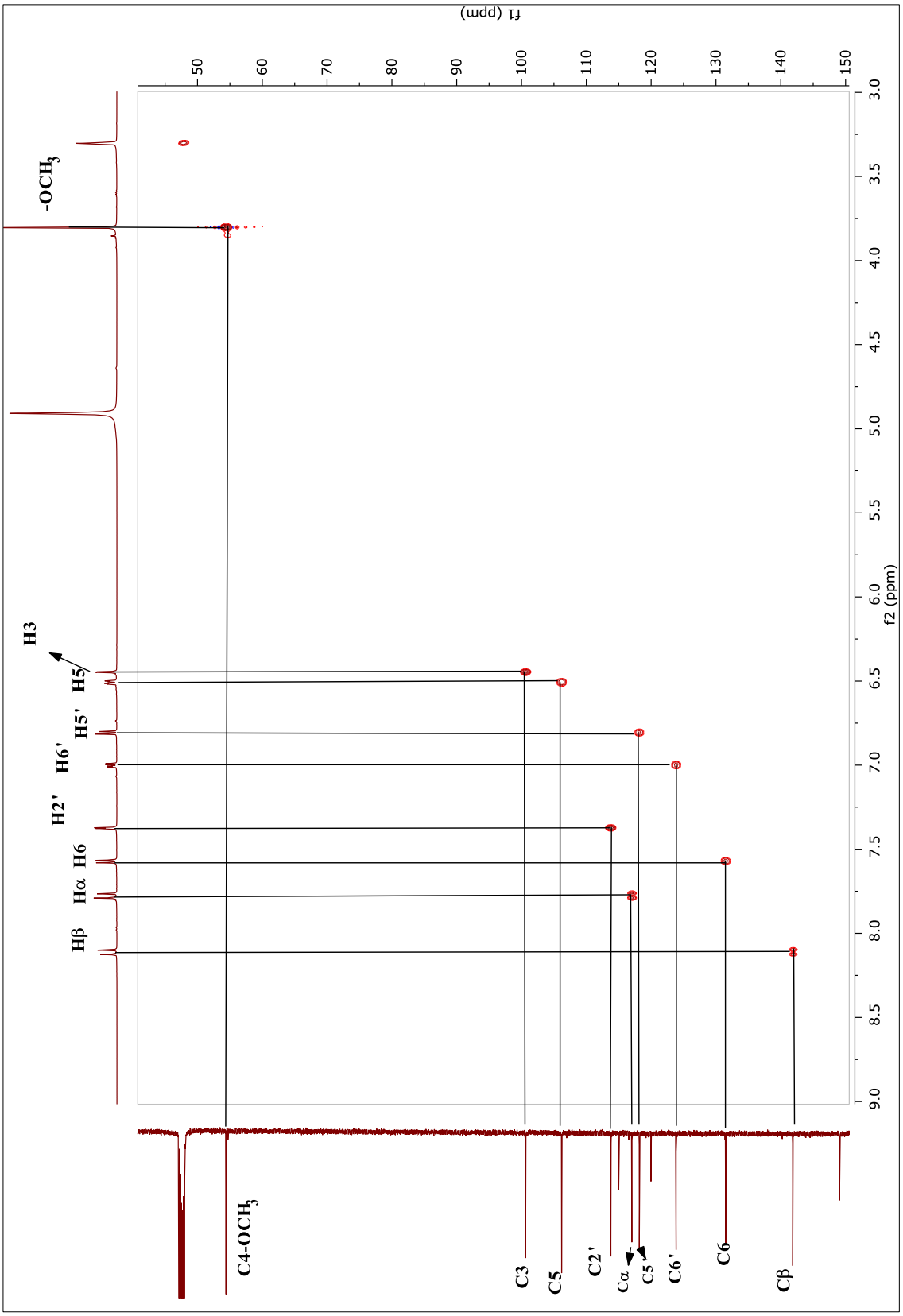
Şekil 3.10 B5 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu



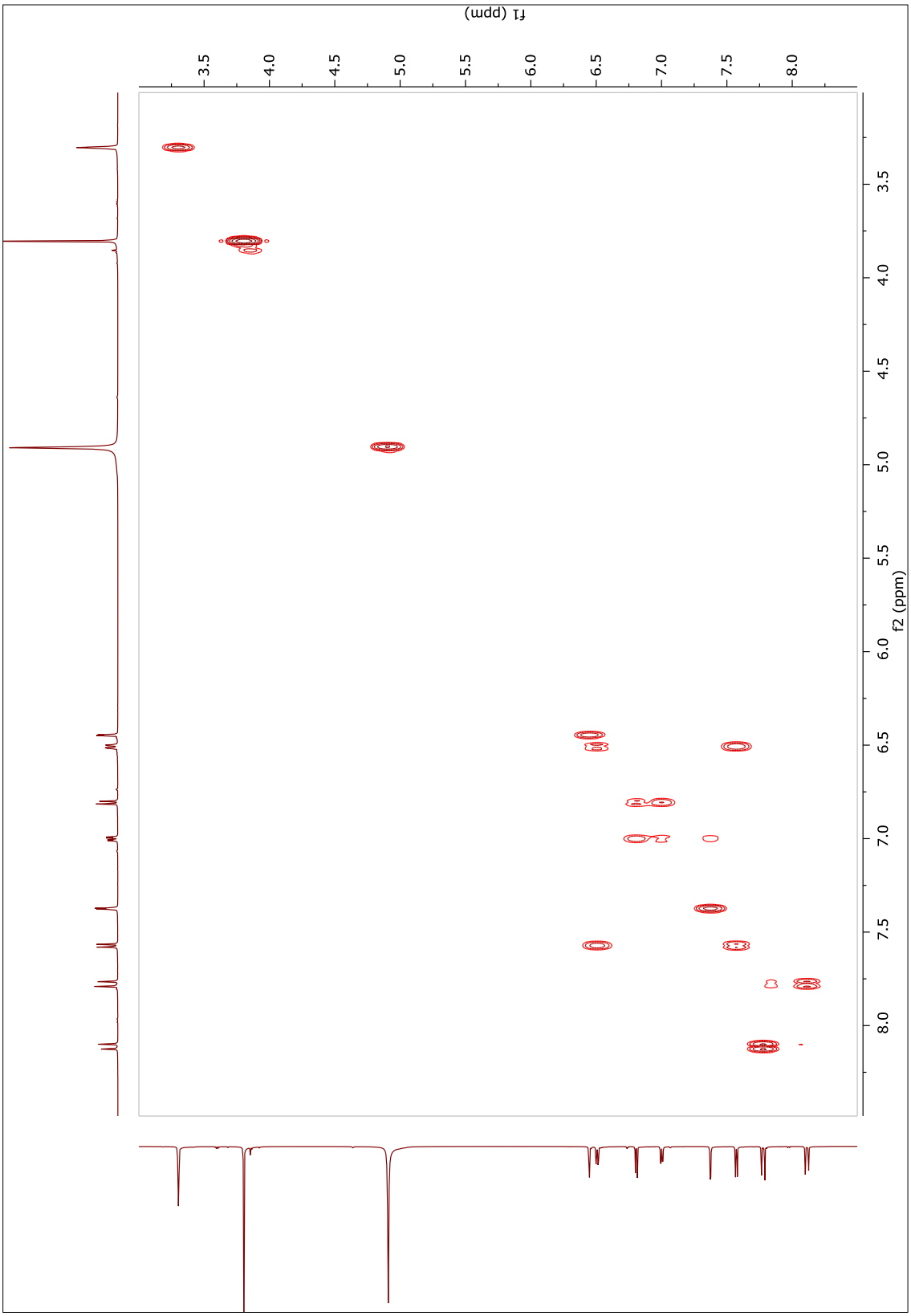
Şekil 3.11 B5 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu



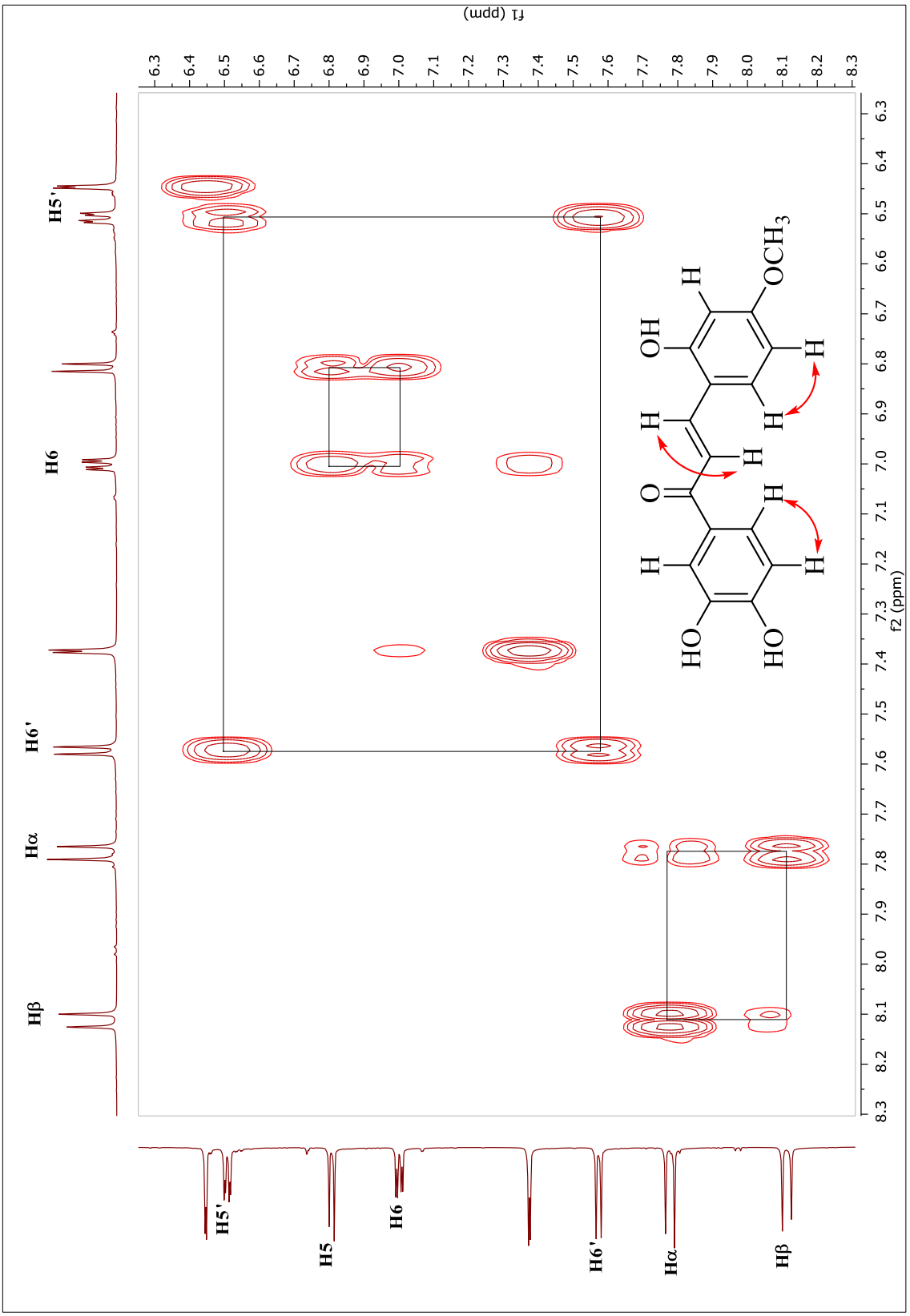
Şekil 3.12 B5 bileşiğinin DEPT spektrumu



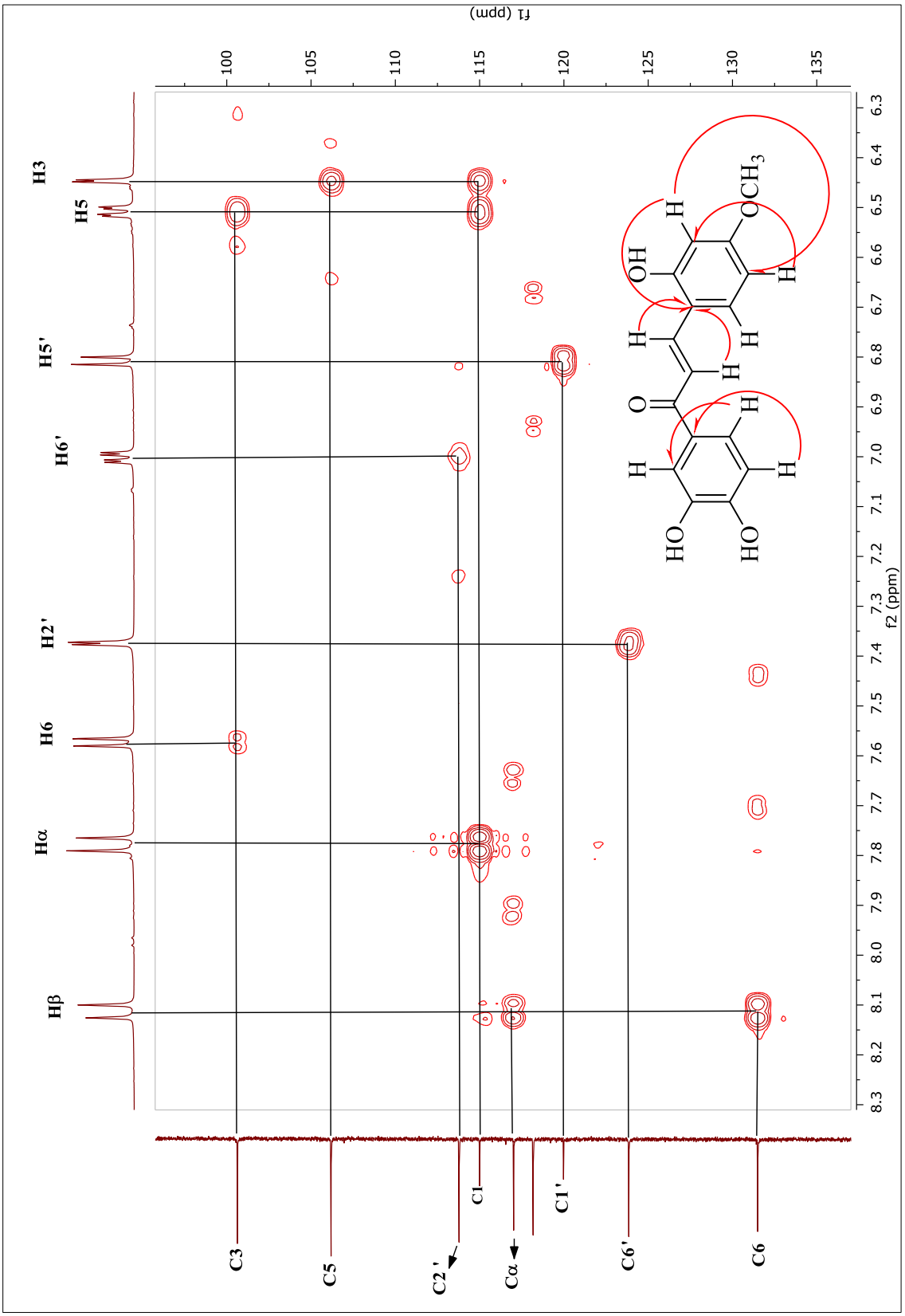
Şekil 3.13 B5 bileşiğinin HSQC spektrumu



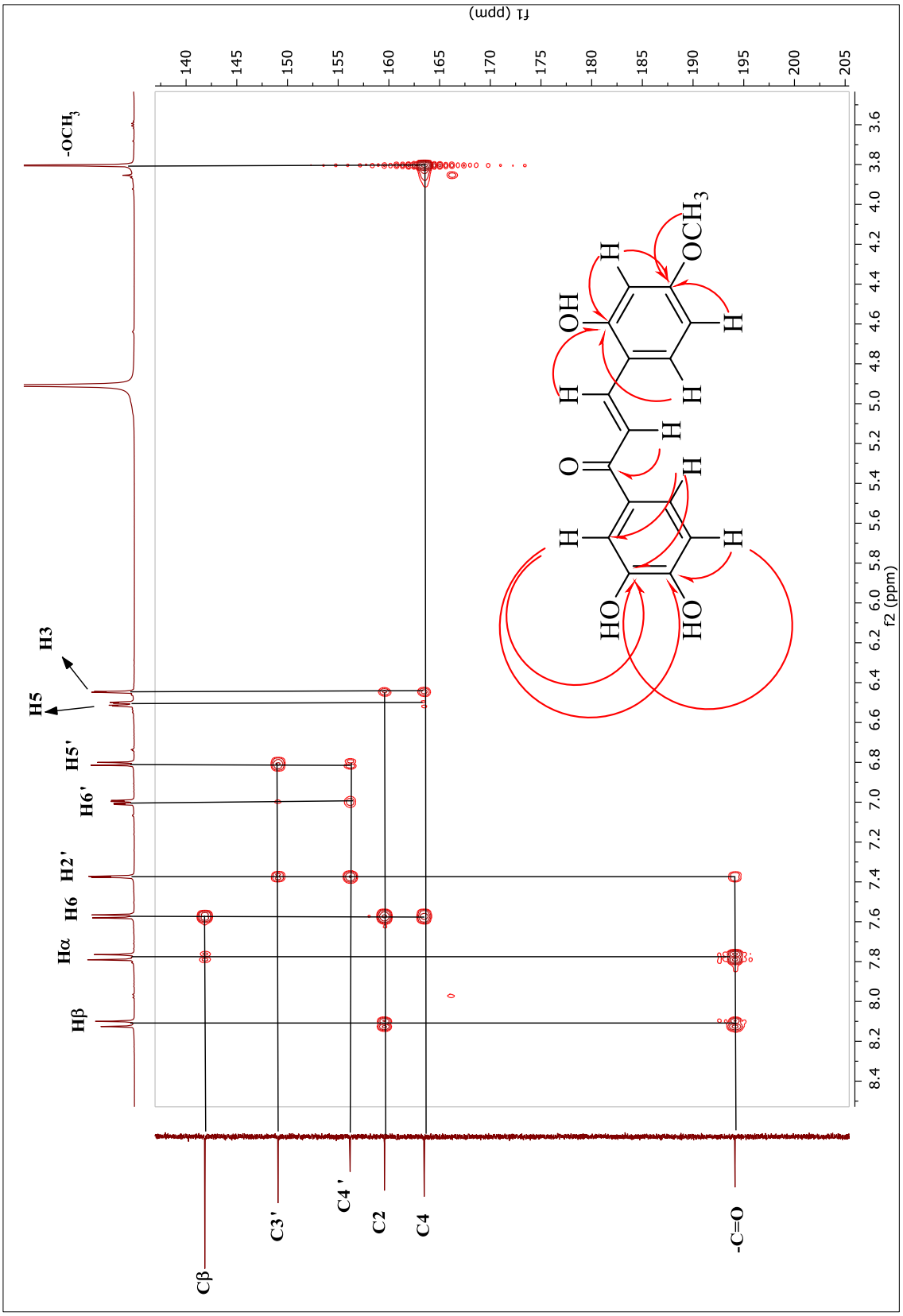
Şekil 3.14 B5 bileşiğinin COSY spektrumu



Şekil 3.15 B5 bileşiğinin COSY etkileşimleri



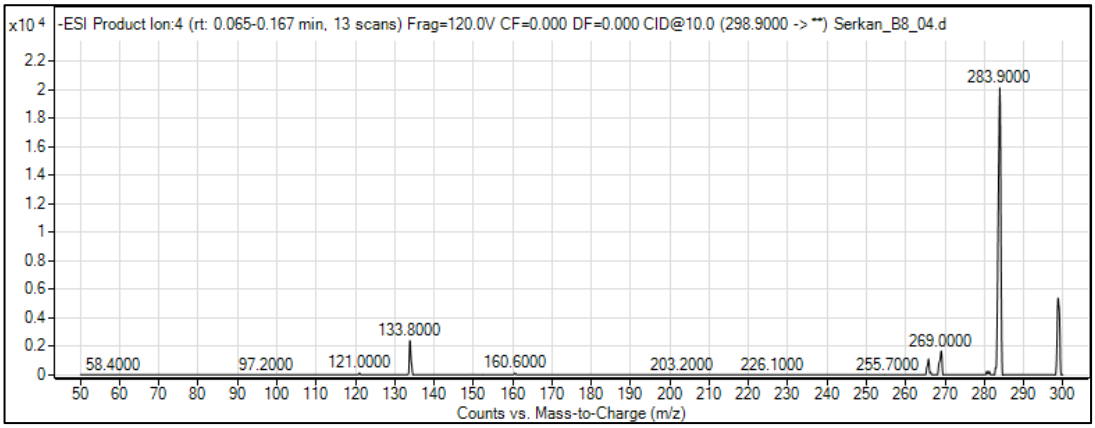
Şekil 3.16 B5 bileşiğinin 1. Bölge HMBC etkileşimleri



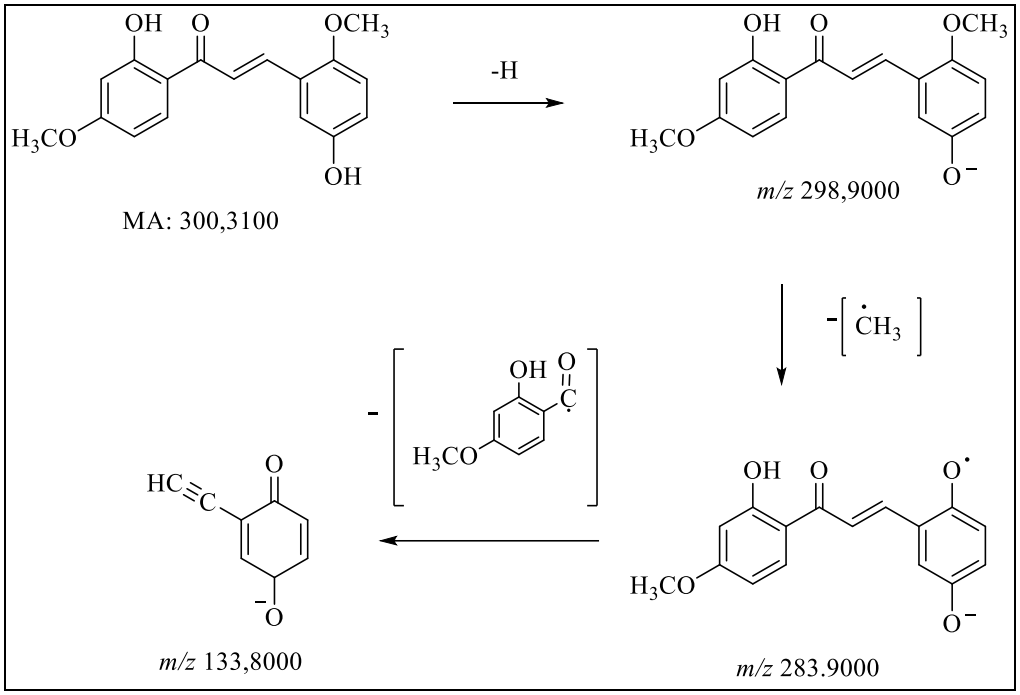
Şekil 3.17 B5 bileşiğinin 2. Bölge HMBC etkileşimleri

3.4.2 B8 Bileşiğinin Yapı Tayini

B8 bileşiğinin kapalı formülü $C_{17}H_{16}O_5$ olarak bulunmuştur. Bu molekül için hesaplanan $[M-H]^-$ iyon kütlesi 299.0925, bulunan iyon kütlesi 299.1018 olmuştur (EK 39). Şekil 3.18'de **B8** bileşiğinin MS-MS spektrumu, Şekil 3.19'da önerilen MS-MS parçalanma ürünleri verilmiştir.



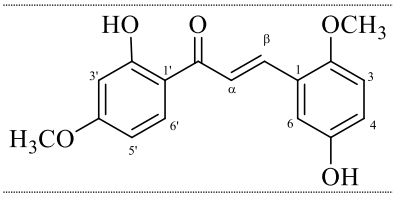
Şekil 3.18 B8 bileşiğinin MS-MS spektrumu



Şekil 3.19 B8 bileşiği için önerilen MS-MS parçalanma ürünleri

B8 bileşiğinin ^{1}H ve ^{13}C NMR spektrumları (Şekil 3.21 ve Şekil 3.22) incelendiğinde bu bileşiğin bir kalkon iskeletine sahip olduğu görülmektedir. Bileşiğin DEPT spektrumunda (Şekil 3.23) 7 adet dördüncül karbon, 8 adet metin karbonu ve 2 adet metil karbonu görülmektedir. α ve β protonlarının 15.6 Hz'lik etkileşimleri bunların trans konumda olduklarını göstermektedir. Bu bileşiğin COSY spektrumunda (Şekil 3.26) 3 adet etkileşim görülmektedir. Bunlardan biri α ve β protonlarına ait olan etkileşim, diğer ikisi ise A ve B halkasındaki aromatik protonlara ait olan etkileşimlerdir. 7.16 ppm'de rezonans olan protonun 139.3 ppm'de rezonans olan β karbonuyla olan HMBC etkileşimi bu protonun konumunun 6 konumu olduğunu göstermektedir. Aynı şekilde 8.12 ppm'de rezonans olan β protonu da 114.0 ppm'de rezonans olan C6 karbonuyla HMBC etkileşimi göstermektedir. H6 protonu 6.86 ppm'de rezonans olan H4 protonu ile 2.9 Hz'lik bir *meta* etkileşimi vermektedir. Yine H4 protonu da H3 protonu ile 8.9 Hz'lik bir *orto* etkileşimi göstermektedir. Böylece B halkasının metin karbon/protonlarının konumları belirlenmiştir. Bu halkadaki –OR konumlarına gelinecek olursa 3.86 ppm'de rezonans olan metil protonları 152.6 ppm'deki dördüncül karbon atomuyla HMBC etkileşimi göstermektedir. Böylece bu metoksi grubunun B halkasında 2 konumunda bulunduğu ortaya çıkar. Ayrıca 8.12

ppm’de rezonans olan β protonunun da bu karbon atomu ile olan HMBC etkileşimi bunun 2 konumunda olduğunu doğrulamaktadır. A halkasındaki 7.97 ppm’de rezonans olan protonun konumu gerek bağlı olduğu karbon atomunun karakteristik olarak aşağı alanda rezonans olmasıyla -kendisine *meta* konumunda iki adet –OR sübstitüsyon mevcuttur- ve gerek de karbonil karbonuyla HMBC etkileşimi göstermesinden dolayı 6' olarak belirlenmiştir. H6' protonunun 6.54 ppm’de rezonans olan proton ile 9.0 Hz’lik *orto* etkileşimi bu söz konusu protonun 5' konumunda olduğunu, H5' protonunun da 6.45 ppm’de rezonans olan proton ile gösterdiği 2.5 Hz’lik *meta* etkileşimi bu protonun konumunun 3' konumu olduğunu açıklığa kavuşturur. Böylece A halkasının da metin karbon ve protonlarının konumları belirlenmiştir. **B8** bileşiğinin HMBC spektrumunda (Şekil 3.27-30) 3.85 ppm’de rezonans olan metil protonları 166.3 ppm’de rezonans olan karbon ile bir etkileşim göstermektedir. 6.54 ppm’de rezonans olan protonun 166.3 ppm’deki karbon ile olan HMBC etkileşimi bu karbonun 4' konumundaki karbon olduğunu gösterir. Bu bilgiler ışığında metoksi grubunun 4' konumunda olduğu ve –OH grubunun da 2' konumunda olduğu bulunur. Sonuç olarak **B8** bileşiğinin yapısı 4',5-dihidroksi-2,2'-dimetoksikalkon olarak bulunmuştur.

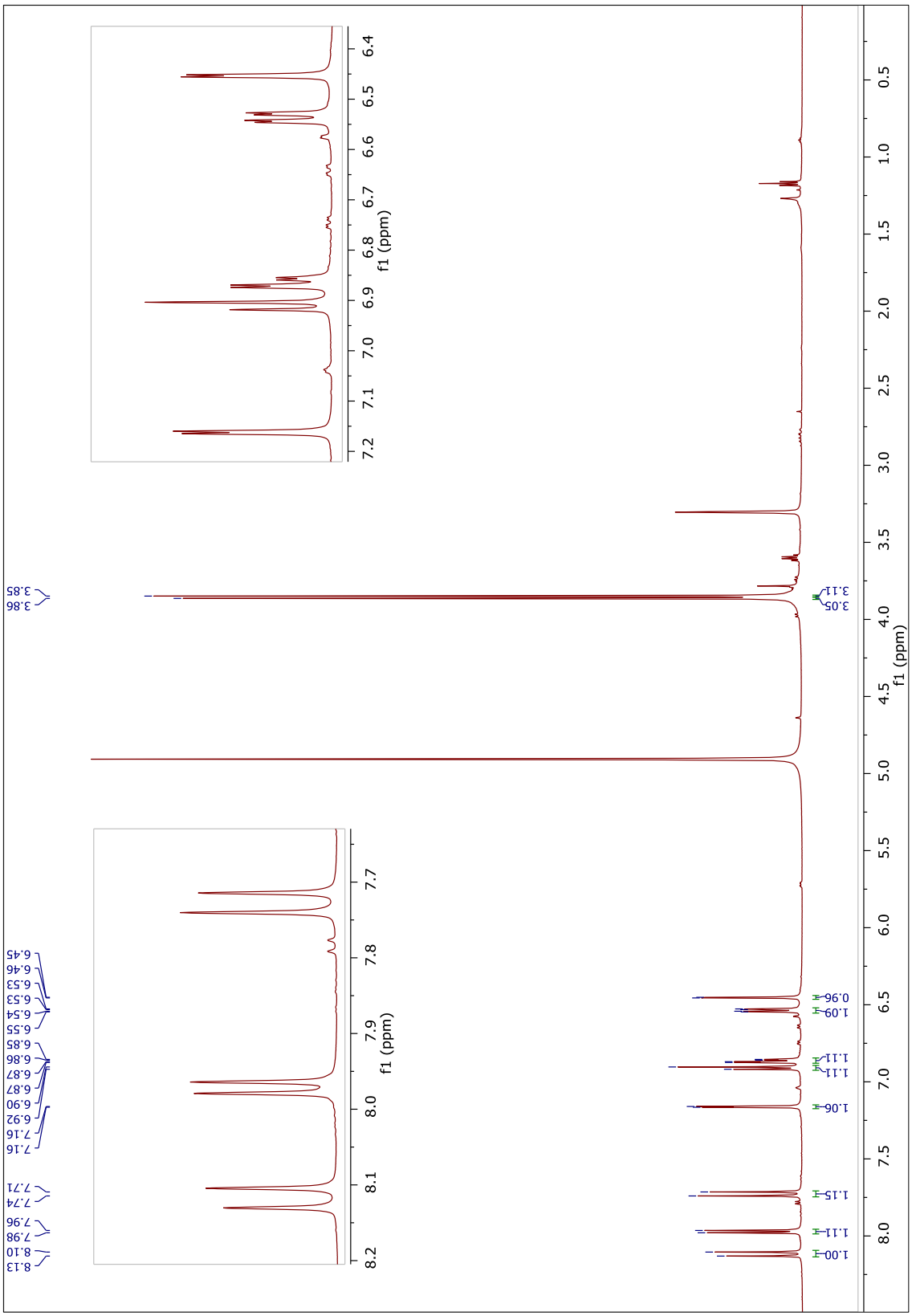


Şekil 3.20 B8 bileşiğinin yapısı

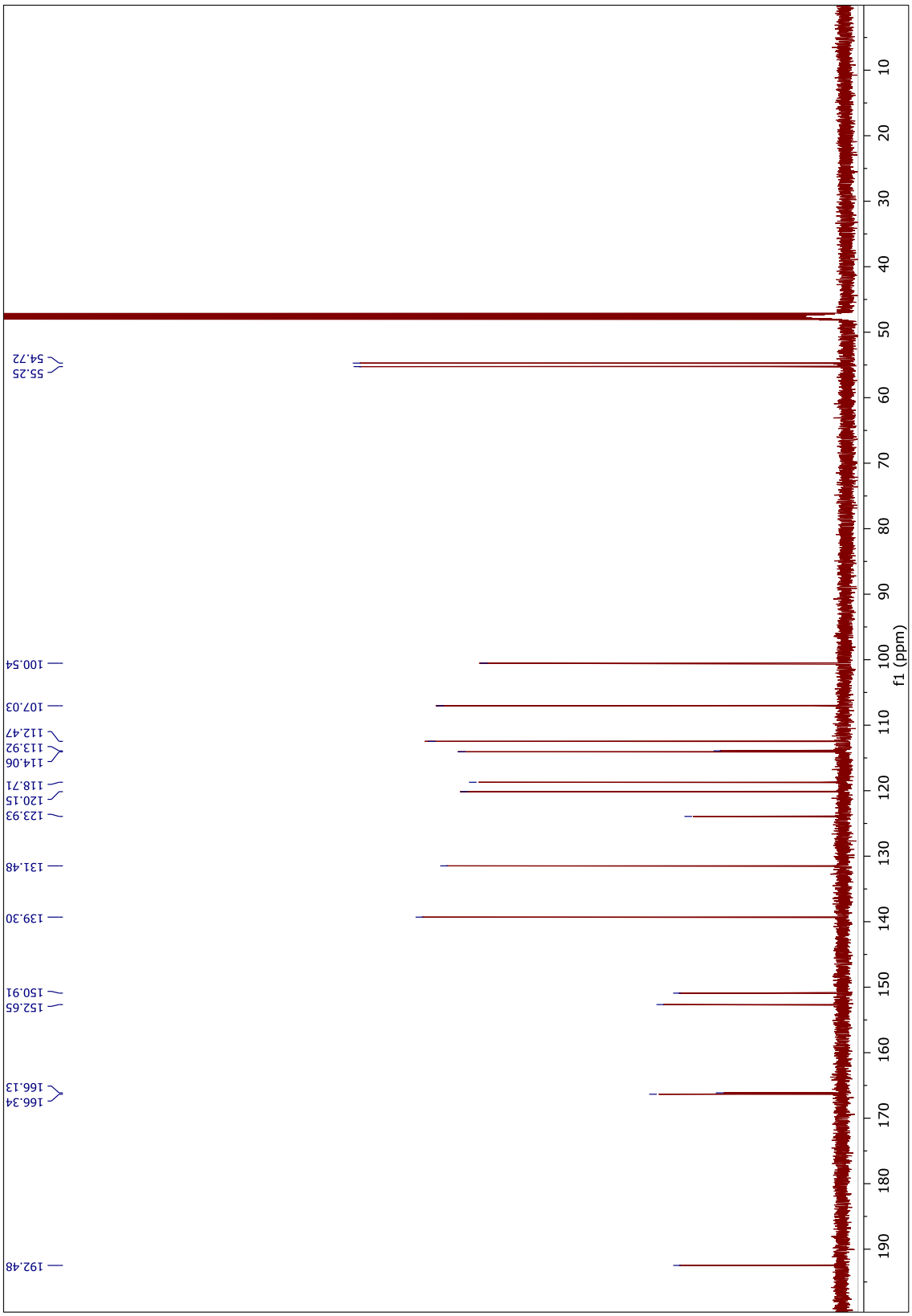
Çizelge 3.4 B8 bileşiğinin ^{1}H ve ^{13}C NMR rezonans değerleri

No	**δ_C (ppm)***	**δ_H (ppm) (*J*, Hz)***
1	123.9	-
2	152.6	-
3	112.4	6.91 (d, 8.9)
4	118.7	6.86 (dd, 8.9, 2.9)
5	150.9	-
6	114.0	7.16 (d, 2.9)
1'	113.9	-
2'	166.1	-
3'	100.5	6.45 (d, 2.5)
4'	166.3	-
5'	107.0	6.54 (dd, 9.0, 2.5)
6'	131.4	7.97 (d, 9.0)
C-2 -OCH_3	55.2	3.86 (s)
C-4' -OCH_3	54.7	3.85 (s)
C=O	192.4	-
α-C	120.1	7.73 (d, 15.6)
β-C	139.3	8.12 (d, 15.6)

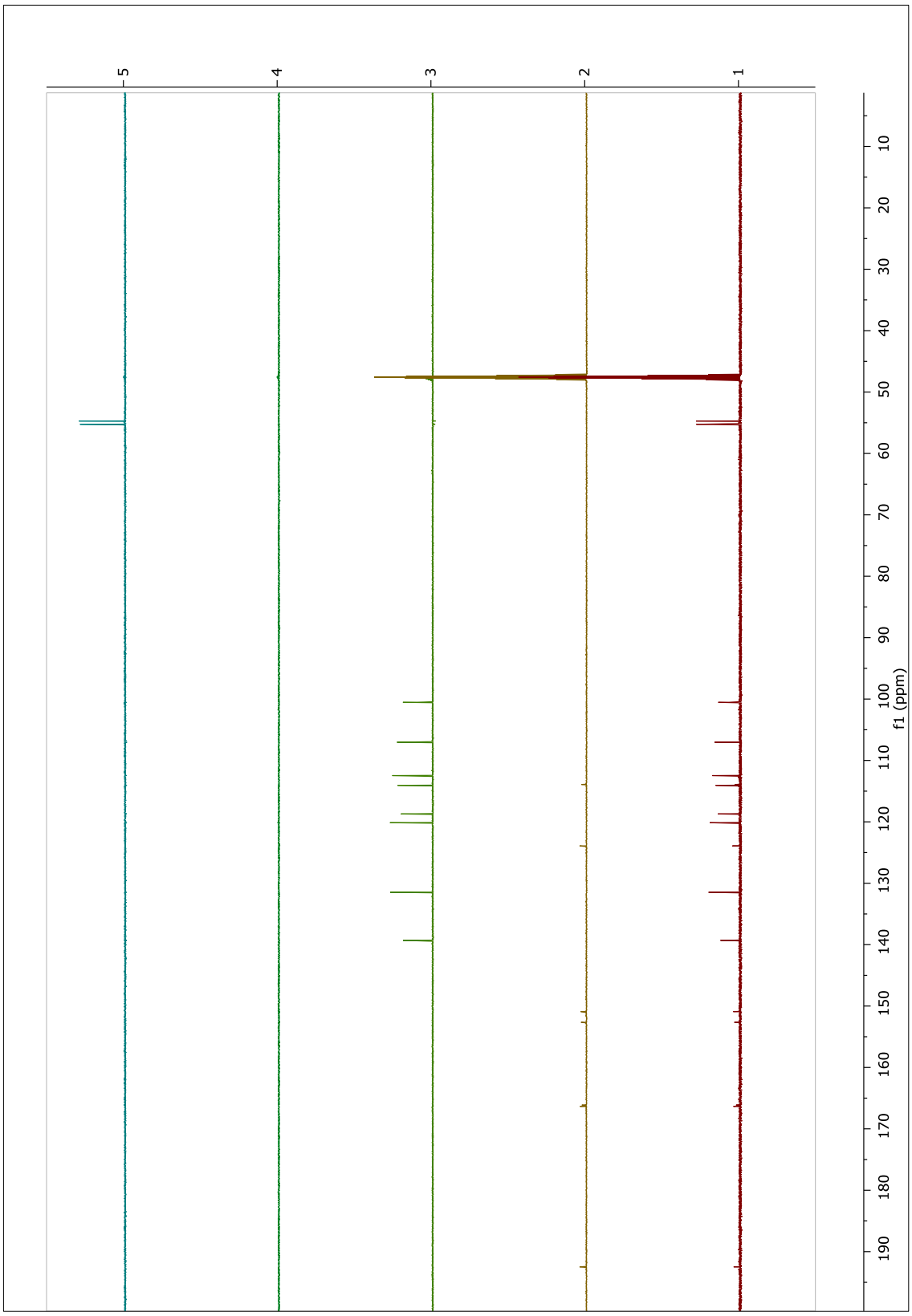
***** Metanol-d_4



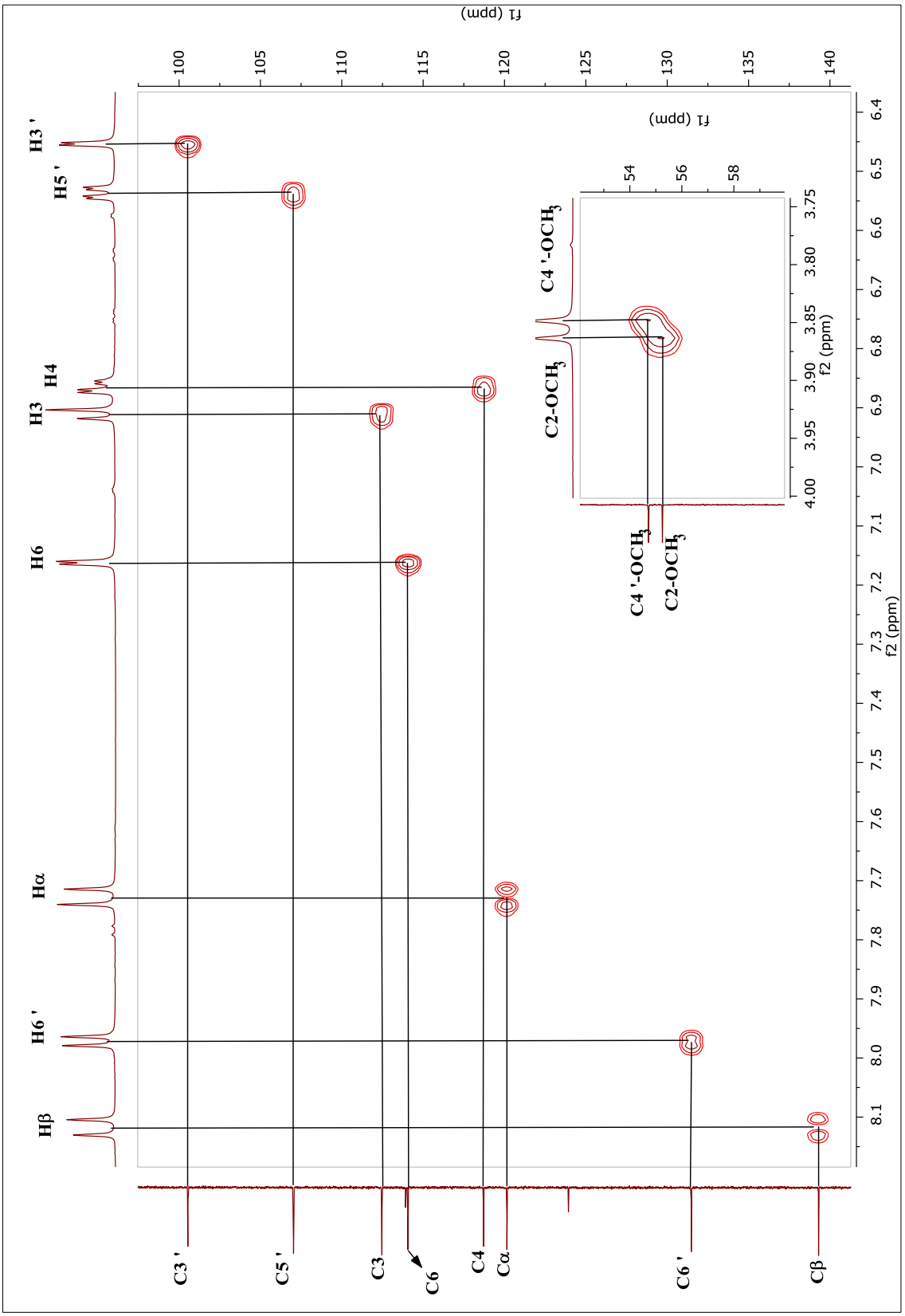
Şekil 3.21 B8 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu



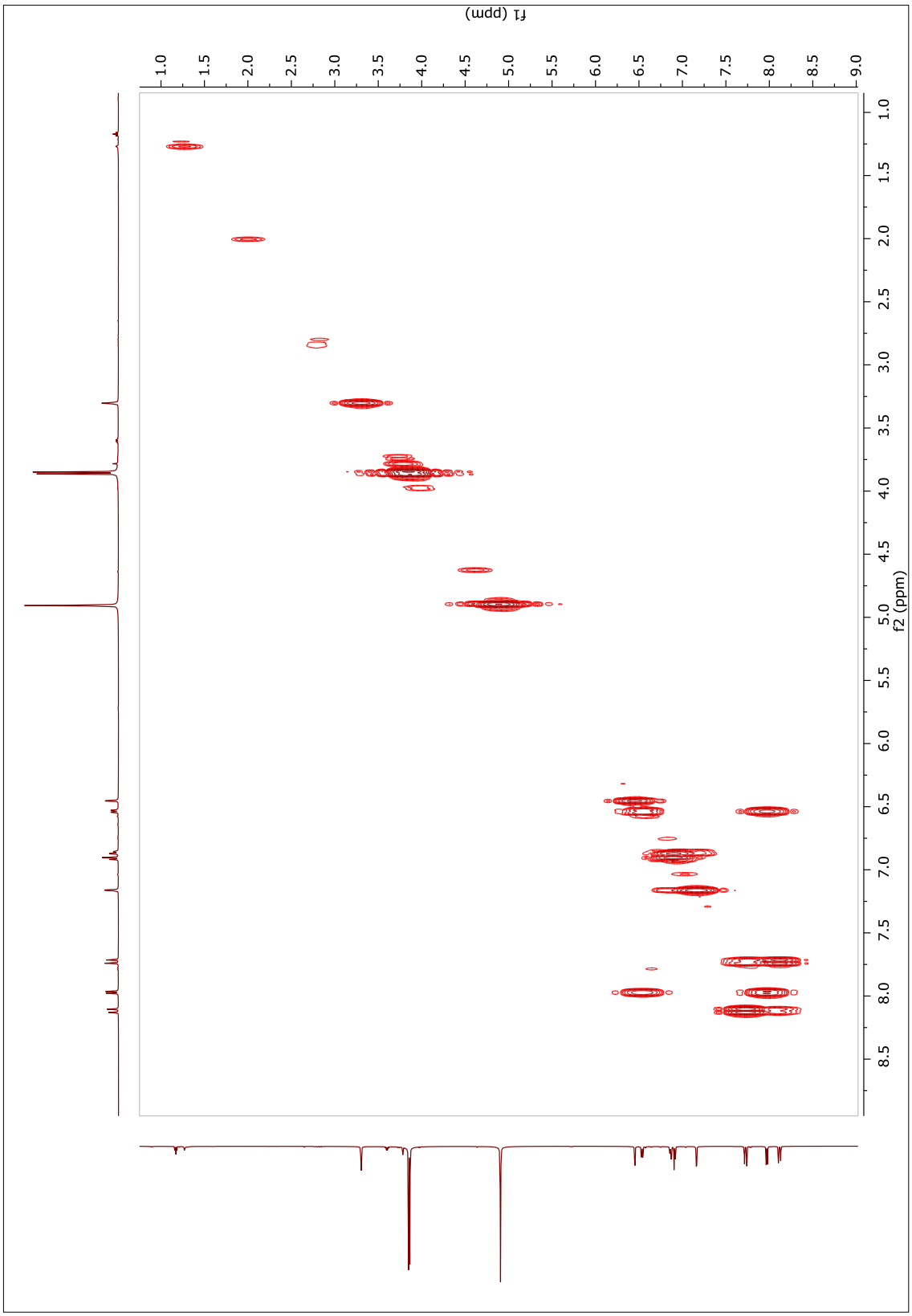
Şekil 3.22 B8 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu



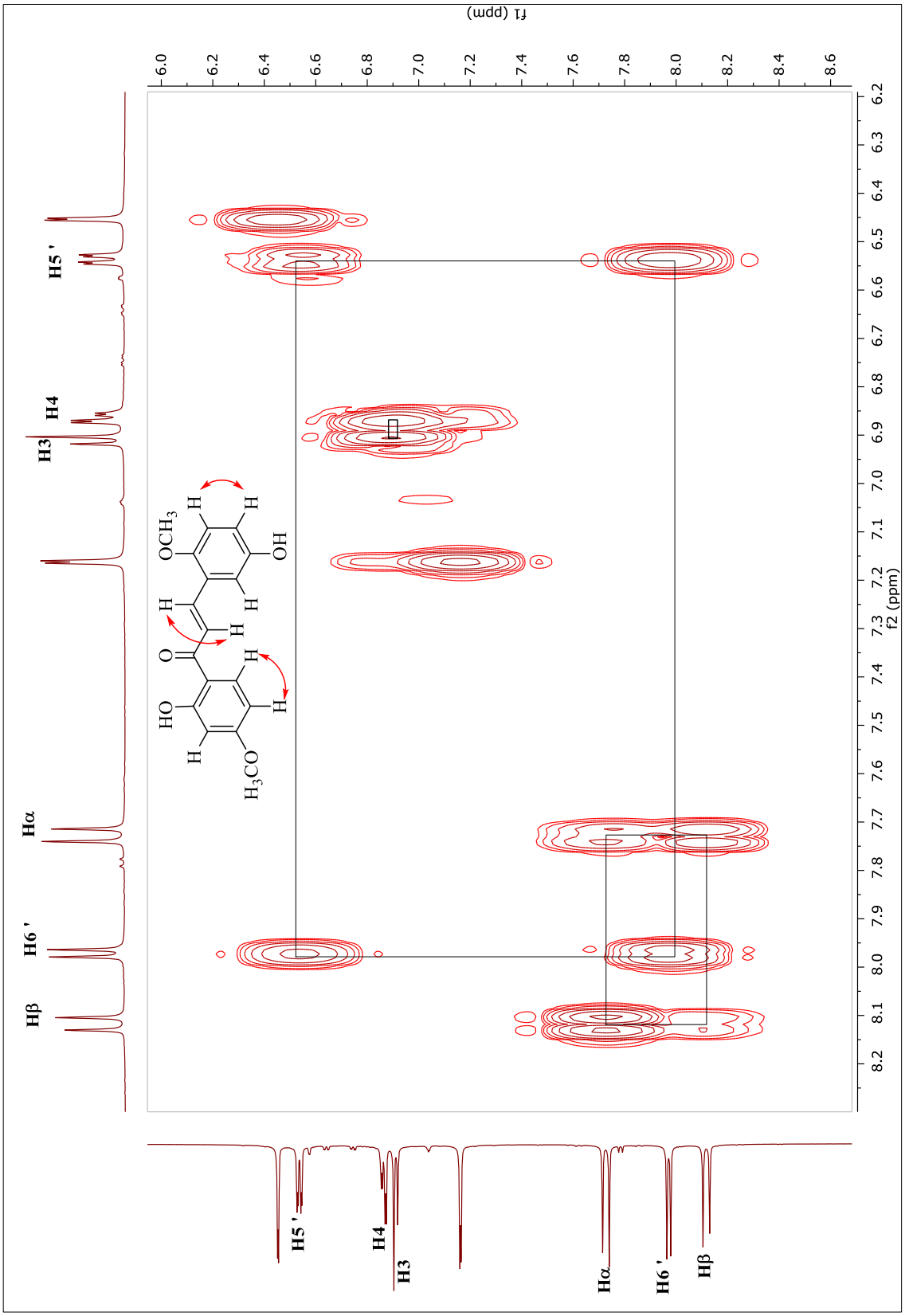
Şekil 3.23 B8 bileşiğinin DEPT spektrumu



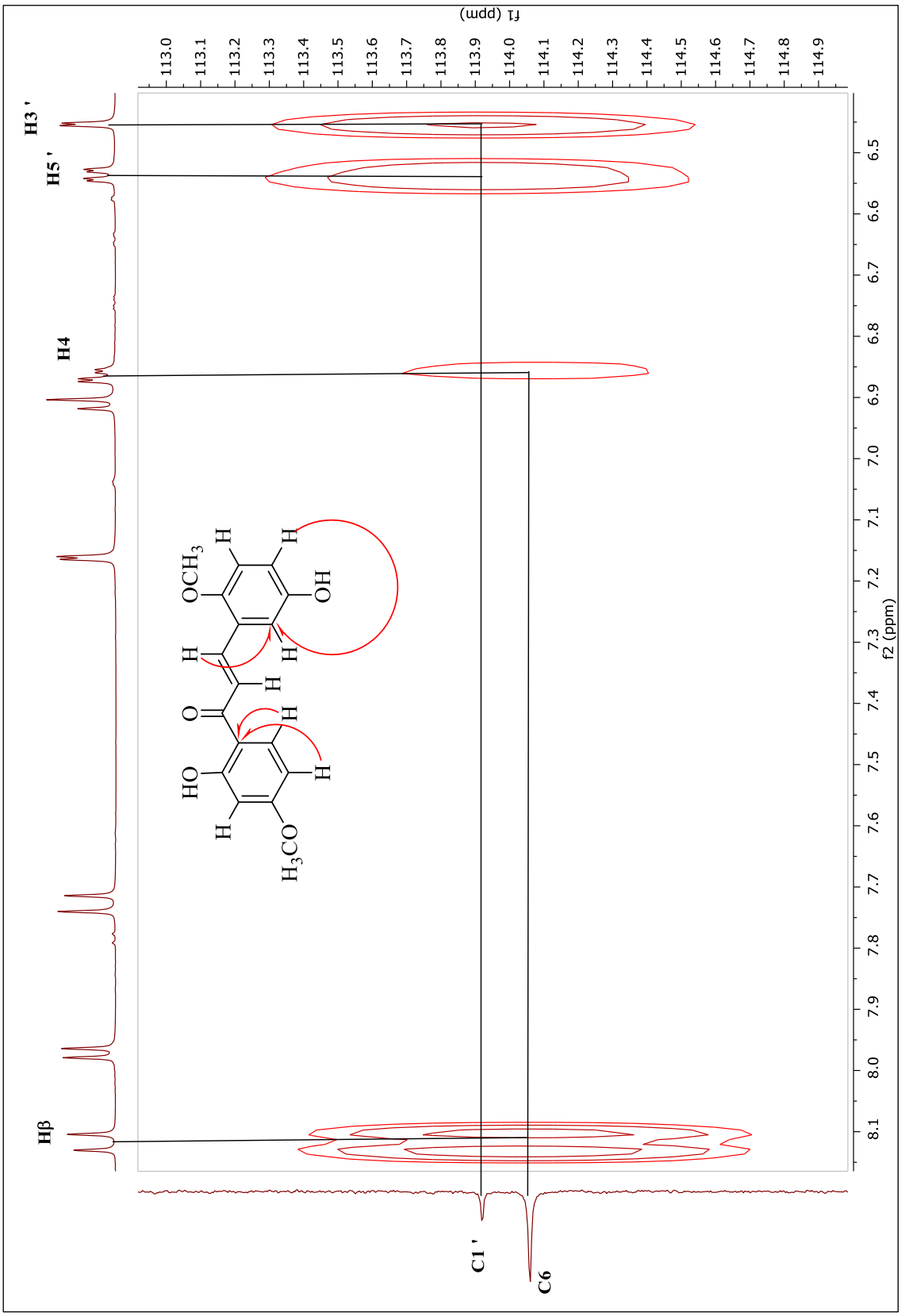
Şekil 3.24 B8 bileşiğinin HSQC spektrumu



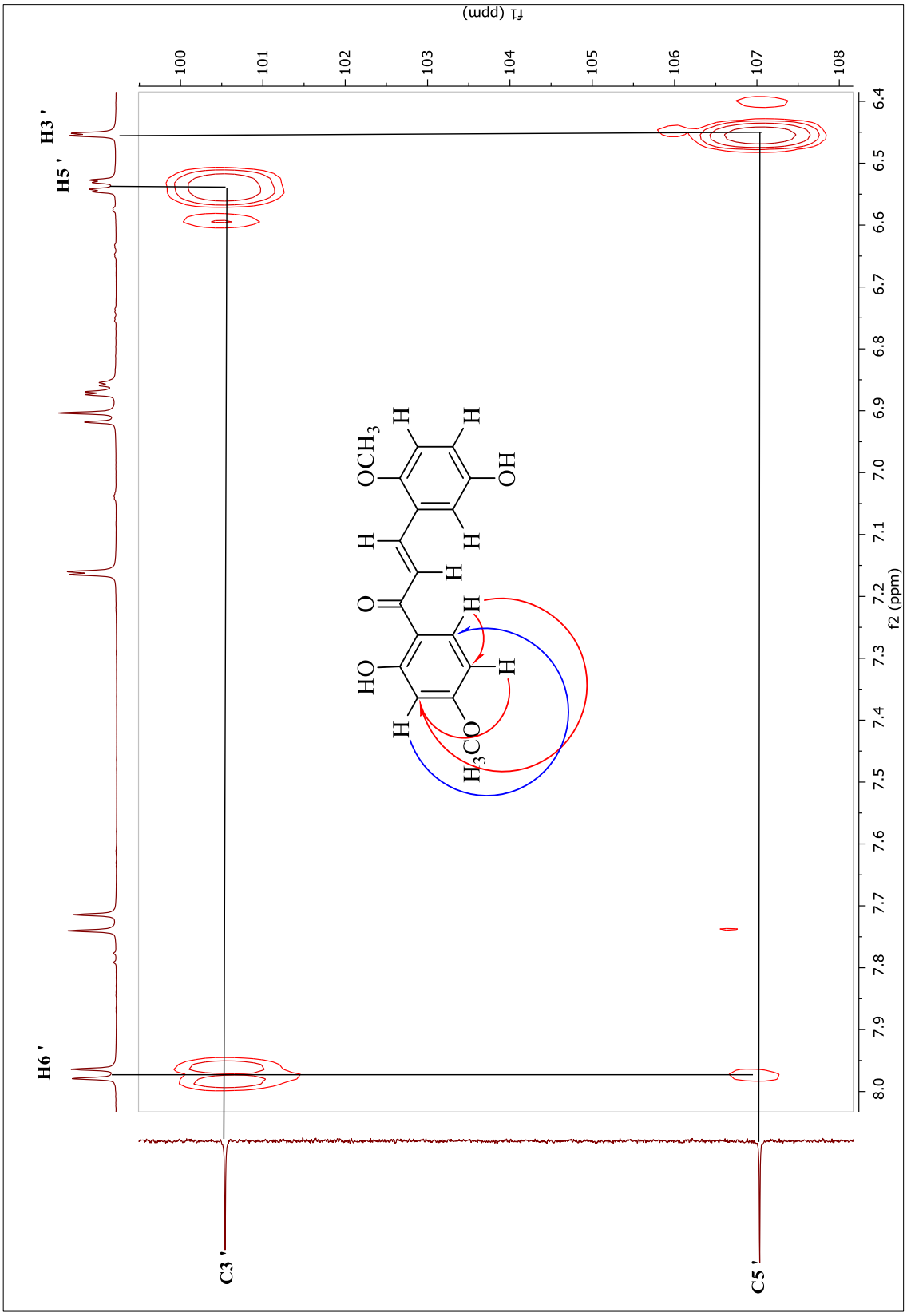
Şekil 3.25 B8 bileşiğinin COSY spektrumu



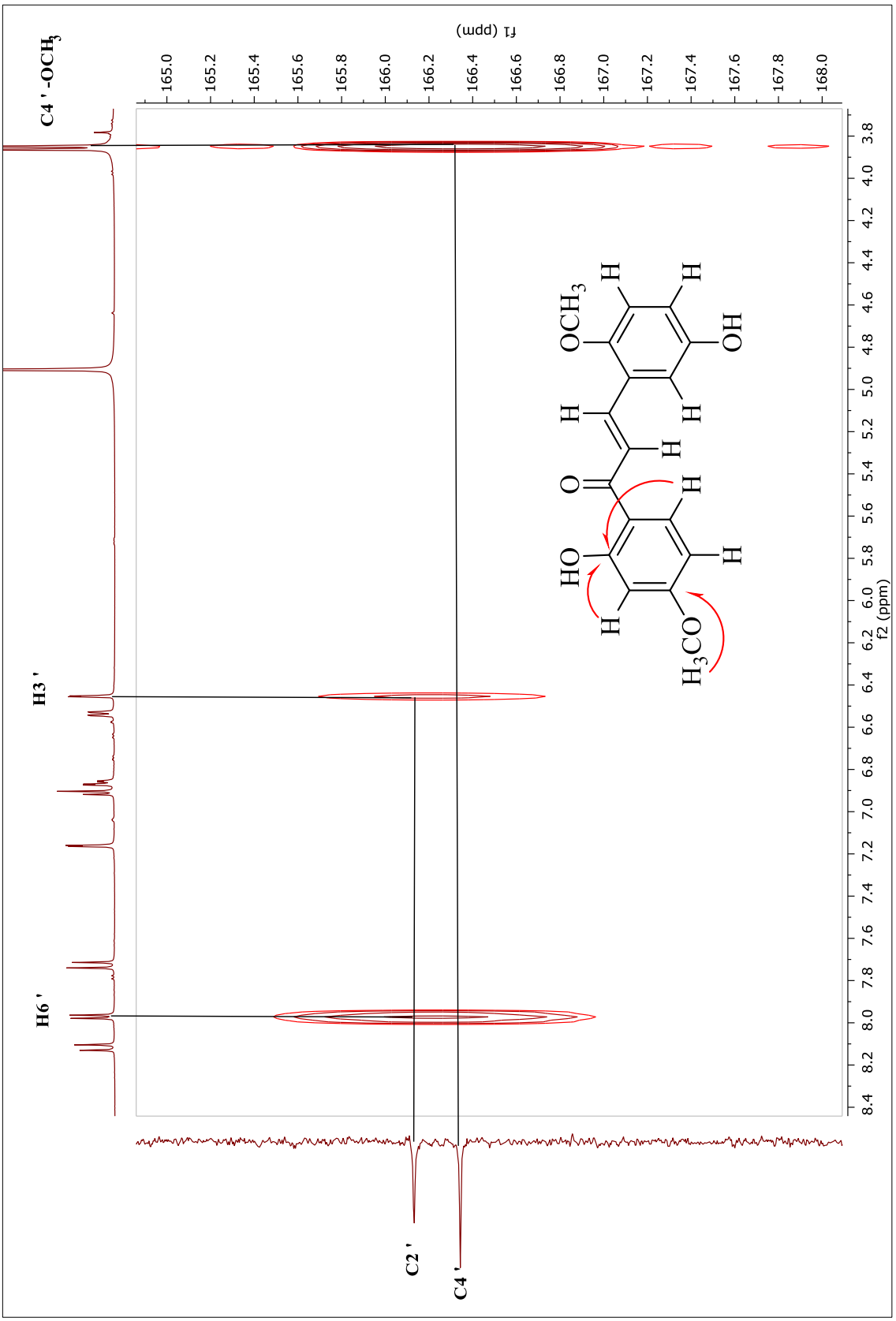
Şekil 3.26 B8 bileşiğinin COSY etkileşimleri



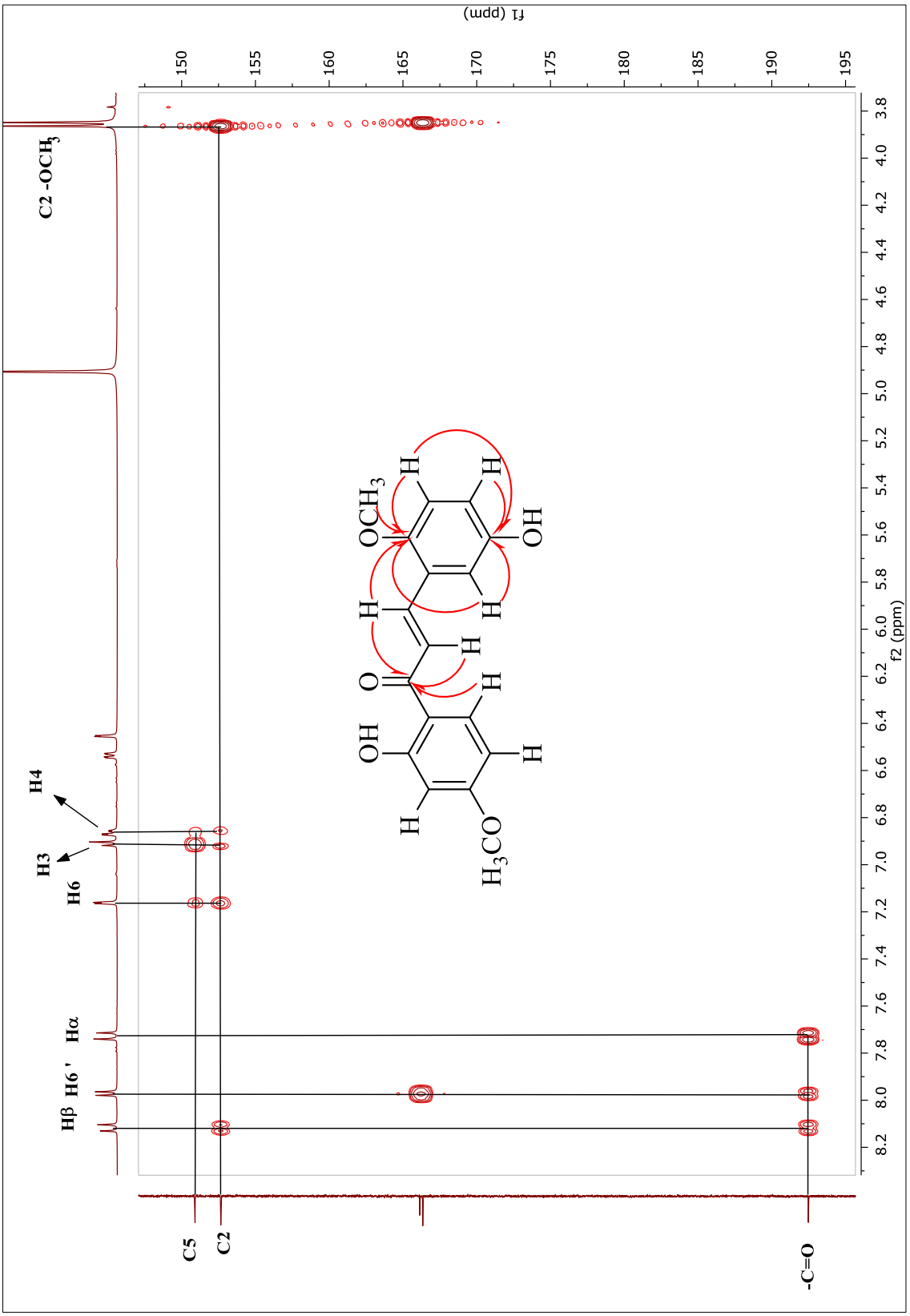
Şekil 3.27 B8 bileşiğinin 1. Bölge HMBC etkileşimleri



Şekil 3.28 B8 bileşiğinin 2. Bölge HMBC etkileşimleri

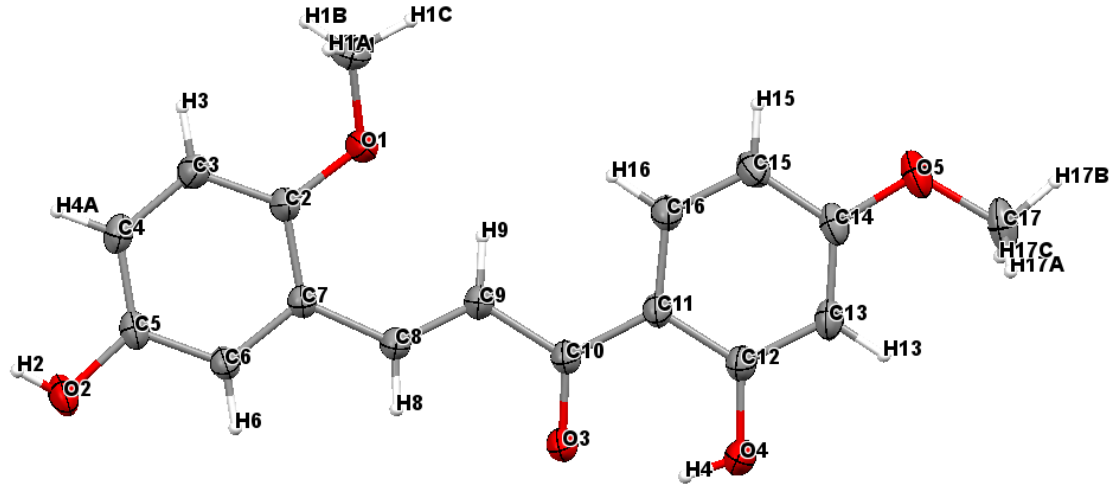


Şekil 3.29 B8 bileşiğinin 3. Bölge HMBC etkileşimleri

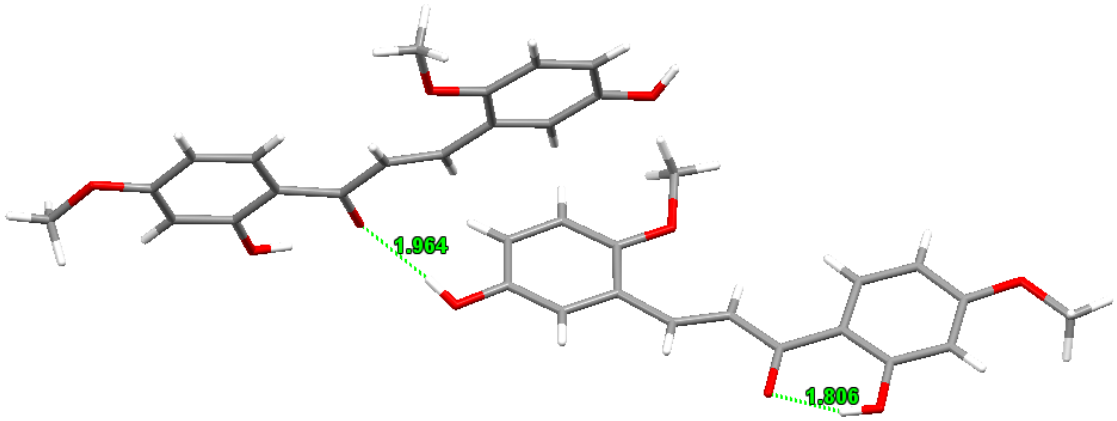


Şekil 3.30 B8 bileşiğinin 4. Bölge HMBC etkileşimleri

B8 bileşiğinin NMR örneğinin NMR tüpünde beklemesiyle tek bir kristal oluşmuştur. Bu kristalin X-Ray analizi yapılmış ve 1D ve 2D NMR spektrumlarının analizi sonucunda belirlenen yapı doğrulanmıştır (CCDC: 1985022) (Şekil 3.31) (X-Ray analiz verileri EK 27-29'da verilmiştir).



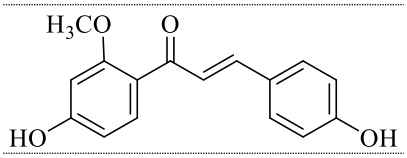
Şekil 3.31 B8 bileşiğinin kristal yapısı



Şekil 3.32 B8 bileşiğinin molekül içi ve moleküller arası H bağı etkileşimleri (Å)

Astragalus ponticus Pall. bitkisinden bu moleküllere ek olarak 11 adet bilinen molekül saflaştırılmıştır. Bu bileşiklerin literatür ile karşılaştırmalı NMR tabloları aşağıda verilmiştir. Bileşiklerin ^{1}H, ^{13}C NMR ve kütle spektrumları ise EKler kısmında verilmiştir.

3-Deoksisappankalkon (B1)



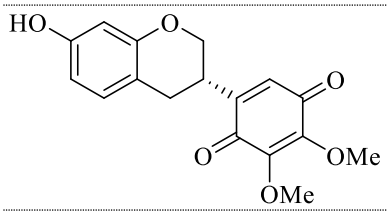
Şekil 3.33 B1 bileşiğinin yapısı

Çizelge 3.5 B1 bileşiğinin karşılaştırmalı ^{1}H ve ^{13}C NMR rezonans değerleri

			Literatür değerleri **	
No	**δ_C (ppm)***	**δ_H (ppm) (*J*, Hz)***	**δ_C (ppm)**	**δ_H (ppm) (*J*, Hz)**
1	126.5	-	125.7	-
2-6	129.9	7.50 (d, 8.6)	130.9	7.59
3-5	115.4	6.81 (d, 8.6)	116.8	6.90
4	159.8	-	160.3	-
1'	120.2	-	122.6	-
2'	163.2	-	161.8/163.2	-
3'	98.6	6.51 (d, 2.2)	100.3	6.58
4'	161.0	-	161.8/163.2	-
5'	107.5	6.45 (dd, 8.5, 2.2)	108.8	6.53
6'	132.3	7.57 (çakışık)	133.4	7.61
C2'-OCH_3	54.6	3.89 (s)	56.2	3.92
C=O	191.6	-	190.0	-
α-C	123.6	7.42 (d, 15.7)	128.3	7.48
β-C	142.6	7.56 (çakışık)	142.0	7.56

Literatür: (Achenbach et al. 1988) ***** Kloroform-d, ****** Aseton-d_6

Pendulon (B2)



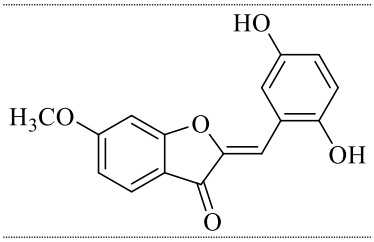
Şekil 3.34 B2 bileşiğinin yapısı

Çizelge 3.6 B2 bileşiğinin karşılaştırmalı ^{1}H ve ^{13}C NMR rezonans değerleri

			Literatür değerleri *	
No	**δ_C (ppm)***	**δ_H (ppm) (J, Hz)***	**δ_C (ppm)**	**δ_H (ppm) (J, Hz)**
2	68.1	4.07 – 4.02 (m) 4.24 (ddd, 10.8, 3.1, 1.0)	68.0	3.90 (dd, 12, 8) 4.13 (dd, 12, 4)
3	30.7	3.43 (tt, 5.9, 2.7)	30.7	3.54 (m)
4	28.9	2.70 (dd, 16.0, 6.7 Hz) 3.03 (dd, 16.0, 6.0 Hz)	28.8	2.60 (dd, 16, 7) 2.91 (dd, 16, 6)
5	130.3	6.90 (d, 8,2)	130.1	6.78 (d, 8)
6	108.7	6.40 (dd, 2.6, 8.2)	108.9	6.31 (dd, 8, 4)
7	154.7	-	156.2	-
8	103.6	6.32 (d, 2.6)	103.1	6.20 (d, 4)
9	155.1	-	154.4	-
10	112.2	-	111.2	-
1'	146.5	-	146.7	-
2'	183.9	-	183.5	-
3'	145.0	-	144.9	-
4'	144.6	-	144.4	-
5'	183.4	-	184.1	-
6'	130.9	6.36 (s)	130.9	6.27 (s)
C3' OCH_3	61.3	4.01 (s)	61.2	3.90 (s)
C4' OCH_3	61.1	4.02 (s)	61.1	3.91 (s)

Literatür: (Rahman et al. 2011) ***** Kloroform-d

(Z)-2',4'-dihidroksi-6-metoksiauron (B3)



Şekil 3.35 B3 bileşiğinin yapısı

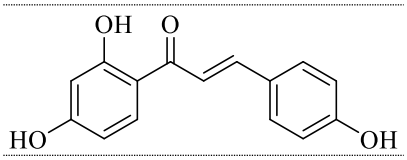
2',4'-dihidroksi-6-metoksiauron bileşiğinde 3 no'lu karbondaki çift bağın E ve Z geometrilerinden birisin sahip olması gerekmektedir. Agrawal (1989) auron tipi bileşiklerin C3 karbonundaki çift bağın geometrisinin tespit edilmesi konusunda 13C NMR rezonans değerlerinin kullanılabileceğini bildirmiştir. Buna göre E izomerisine sahip olan auronların olefinik metin karbonlarının rezonans değerleri 119.8-122.2 ppm aralığındayken Z izomerisine sahip auronların olefinik metin karbonlarının rezonans değerleri yaklaşık 10 ppm'lik bir kayma ile daha aşağı alanda, 108.1-112.8 ppm aralığındadır. Pelter et al. (1979) sentezledikleri bir dizi E ve Z geometrisine sahip auron ile yaptıkları NMR çalışmasında elde ettikleri bulgular da bu yöndedir. Saflaştırılan 2',4'-dihidroksi-6-metoksiauron bileşiğinin olefinik metin karbonu C10 106.2 ppm'de rezonans olduğundan bu molekülün geometrisi Z olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.7 B3 bileşiğinin karşılaştırmalı ^{1}H ve ^{13}C NMR rezonans değerleri

			Literatür değerleri**	
No	**δ_C (ppm)***	**δ_H (ppm) (*J*, Hz)***	**δ_C (ppm)**	**δ_H (ppm) (*J*, Hz)**
2	146.9	-	148.4	-
3	181.9	-	183.1	-
4	125.8	7.68 (d, 8.6)	126.1	7.76 (d, 8.3)
5	113.0	6.85 (dd, 8.6, 2.1)	113.1	6.75 (brd, 8.3)
6	167.6	-	167.9	-
7	97.3	7.07 (çakışık)	97.3	6.53 (brs)
8	168.1	-	168.9	-
9	114.5	-	115.9	-
10	106.2	7.07 (çakışık)	107.7	8.13 (s)
1'	119.3	-	121.6	-
2'	150.9	-	152.4	-
3'	116.8	6.75 (d, 8.7)	117.9	7.20 (çakışık)
4'	119.7	6.71 (d, 8.7, 2.9)	120.8	7.24 (çakışık)
5'	150.3	-	152.8	-
6'	116.6	7.54 (d, 2.9)	118.4	8.42 (brs)
C6 -OCH_3	56.8	3.91 (s)	56.7	3.75 (s)
C2'-OH	-	9.69 (s)	-	-
C5'-OH	-	8.99 (s)	-	-

Literatür: (Xiao et al. 2014) ***** DMSO-d_6, ****** Piridin-d_5

İzolikuiritigenin (B6)



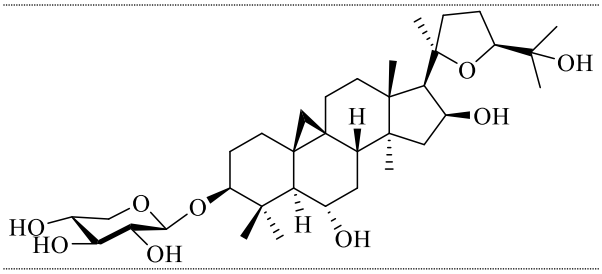
Şekil 3.36 B6 bileşiğinin yapısı

Çizelge 3.8 B6 bileşiğinin karşılaştırmalı ^{1}H ve ^{13}C NMR rezonans değerleri

			Literatür değerleri *	
No	**δ_C (ppm)***	**δ_H (ppm) (*J*, Hz)***	**δ_C (ppm)**	**δ_H (ppm) (*J*, Hz)**
1	126.3	-	128.0	
2-6	130.4	7.57 (d, 8.6)	131.8	7.61 (d, 8.7)
3-5	115.4	6.84 (d, 8.6)	117.0	6.84 (d, 8.7)
4	160.1	-	161.7	-
1'	113.2	-	114.5	
2'	164.9	-	167.4/167.7	
3'	102.3	6.28 (d, 2.6)	104.1	6.27 (d, 2.4)
4'	166.1	-	167.4/167.7	-
5'	107.6	6.41 (dd, 8.9, 2.6)	109.6	6.40 (dd, 8.9, 2.4)
6'	131.9	7.98 (d, 8.9)	133.4	7.95 (d, 8.9)
C=O	192.0	-	193.4	-
α-C	116.8	7.63 (15.3)	118.5	7.59 (d, 15.4)
β-C	144.23	7.79 (15.3)	145.5	7.78 (15.4)

Literatür: (Veitch et al. 2003) ***** Metanol-d_4

Siklogaleginosit B (B7)



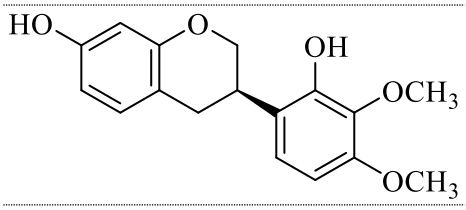
Şekil 3.37 B7 bileşiğinin yapısı

Çizelge 3.9 B7 bileşiğinin karşılaştırmalı ^{1}H ve ^{13}C NMR rezonans değerleri

			Literatür değerleri *	
No	**δ_C (ppm)***	**δ_H (ppm) (J, Hz)***	**δ_C (ppm)**	**δ_H (ppm) (J, Hz)**
3	88.4	3.19 (m)	88.7	3.67 (m)
6	68.1	3.44 (m)	68.4	3.76 (m)
19	30.8	0.38 (bs) - 0.54 (bs)	31.1	0.37 (d, 3.6) - 0.54 (d, 3.6)
20	86.9	-	87.1	-
21	27.0	1.20 (s)	29.3	1.2 (s)
24	81.1	3.75 (m)	81.4	3.99 (m)
25	71.0	-	71.3	-
26	26.2	1.25 (s)	25.6	1.30 (s)
27	25.2	1.11 (s)	25.7	1.27 (s)
28	19.1	0.99 (s)	20.6	1.00 (s)
1’	106.0	4.26 (d, 6.5)	106.3	4.33 (d, 6.1)
2’	74.0	3.18 (m)	74.2	3.99 (m)
3’	76.5	3.28 (m)	76.6	4.28 (d, 7.1)
4’	69.8	3.45 (m)	70.0	3.87 (d, 6.2)
5’	65.2	3.16 (m) - 3.81 (m)	65.5	3.82 (m)

Literatür: (Wang and Chen 2017) * Metanol-d_4

İzomukronulatol (B10)

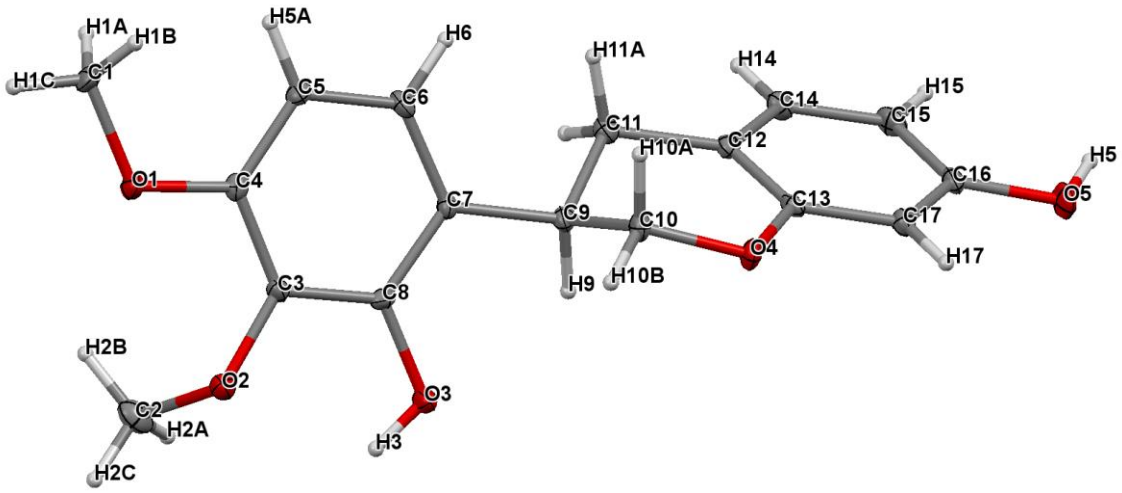


Şekil 3.38 B10 bileşiğinin yapısı

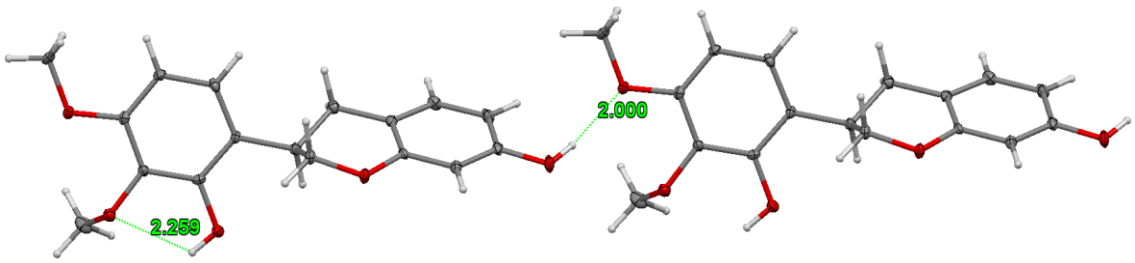
Çizelge 3.10 B10 bileşiğinin karşılaştırmalı ^{1}H ve ^{13}C NMR rezonans değerleri

			Literatür değerleri *	
No	**δ_C (ppm)***	**δ_H (ppm) (*J*, Hz)***	**δ_C (ppm)**	**δ_H (ppm) (*J*, Hz)**
2a	69.5	4.22 (ddd, 10.3, 3.4, 1.9)	69.7	4.34 (ddd, 10.4, 3.2, 1.6)
2b		3.95 (t, 10.3)		4.07 (t, 10.0)
3	32.1	3.44 (tt, 4.25, 10.3)	32.2	3.53
4a	29.8	2.93 (dd, 15.5, 10.8)	30.2	3.00 (dd, 15.6, 10.4)
4b		2.79 (ddd, 15.5, 5.2, 1.9)		2.91 (ddd, 16.0, 5.6, 1.2)
5	129.7	6.86 (d, 8.2)	130.4	6.94 (d, 8.0)
6	107.5	6.30 (dd, 8.2, 2.5)	107.9	6.38 (dd, 8.0, 204)
7	156.1	-	155.3	-
8	102.3	6.21 (d, 2.5)	103.2	6.35 (d, 2.4)
9	154.9	-	154.8	-
10	113.3	-	114.7	-
1'	120.9	-	120.3	-
2'	148.1	-	147.5	-
3'	136.0	-	135.4	-
4'	151.6	-	151.1	-
5'	102.8	6.45 (d, 8.6)	103.7	6.44 (d, 8.8)
6'	121.3	6.77 (d, 8.6)	121.8	6.78 (d, 8.8)
C-3' OCH_3	54.7	3.80 (s)	55.8	3.85 (s)
C-4' OCH_3	59.6	3.78 (s)	61.0	3.92 (s)

Literatür: (Guo et al. 2016) * Metanol-d_4

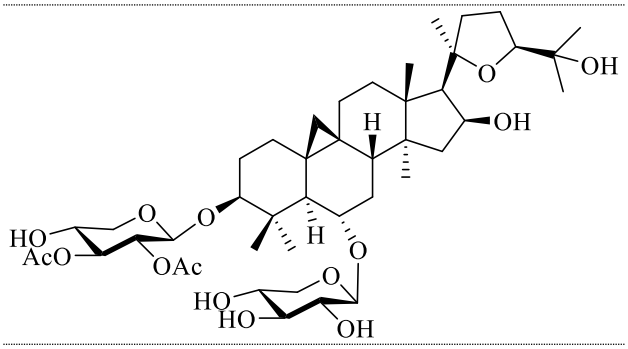


Şekil 3.39 B10 bileşiğinin kristal yapısı



Şekil 3.40 B10 bileşiğinin molekül içi ve moleküller arası H bağı etkileşimleri (Å)

Astrasieversianin II (B11)



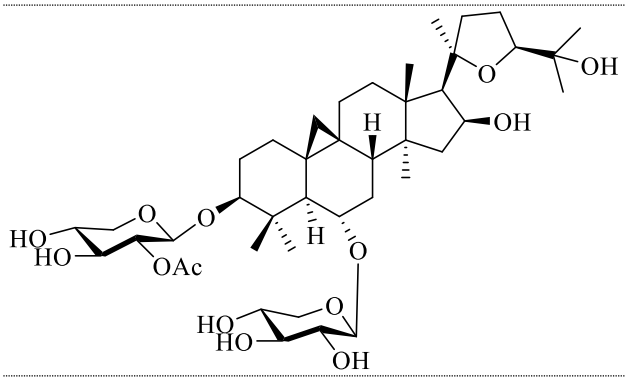
Şekil 3.41 B11 bileşiğinin yapısı

Çizelge 3.11 B11 bileşiğinin karşılaştırmalı ^{1}H ve ^{13}C NMR rezonans değerleri

			Literatür değerleri *	
No	**δ_C (ppm)***	**δ_H (pm) (J, Hz)***	**δ_C (ppm)**	**δ_H (ppm) (J, Hz)**
1	31.2	1.24 (m) - 1.53 (m)	32.7	1.15 (m) - 1.35 (m)
2	28.7	1.63 (m) - 1.91 (m)	30.2	1.60 (m) - 1.8 (m)
3	88.8	3.19 (m)	90.2	3.08 (m)
4	41.3	-	42.7	-
5	51.4	1.60 (m)	52.9	1.50 (m)
6	77.9	3.49 (m)	79.4	3.38 (m)
7	33.1	1.78 (m)	35.5	1.50 (m) - 2.52 (m)
8	44.7	1.87 (m)	46.1	1.83 (m)
9	20.6	-	22.0	-
10	28.2	-	29.6	-
11	25.6	1.36 (m) - 1.87 (m)	27.0	1.85 (m)
12	32.7	1.66 (m)	34.6	1.40 (m) - 1.7 (m)
13	44.6	-	46.0	-
14	45.6	-	47.0	-
15	44.6	1.36 (m) - 1.97 (m)	46.0	1.30 (m) - 1.85 (m)
16	73.1	4.65 (m)	74.5	4.55 (m)
17	57.4	2.35 (d, 7.8)	58.8	2.27 (d, 7.7)
18	19.6	1.23 (s)	21.0	1.14 (s)
19	27.4	0.23 (d, 4.5) - 0.55 (d, 4.5)	28.9	0.15 (d, 4) - 0.46 (d, 4)
20	87.0	-	88.4	-
21	27.0	1.19 (s)	28.6	1.11 (s)
22	34.0	1.60 (m) - 2.60 (q, 10.8)	34.1	1.50 (m)
23	25.3	2.01 (m)	26.8	1.95 (m)
24	81.1	3.75 (dd, 5.8, 8.4)	82.5	3.66 (m)
25	71.0	-	72.4	-
26	26.1	1.25 (s)	27.6	1.16 (s)
27	25.2	1.11 (s)	26.7	1.03 (s)
28	26.7	1.15 (s)	28.2	1.08 (s)
29	15.1	0.88 (s)	16.6	0.79 (s)
30	18.6	1.00 (s)	20.2	0.92 (s)
1'	103.2	4.54 (d, 7.9)	104.6	4.45 (d, 7.7)
2'	72.2	4.77 (dd, 7.9, 9.4)	73.6	4.68 (m)
3'	75.5	4.95 (t, 9.4)	76.9	4.88 (m)
4'	67.9	3.70 (m)	69.3	3.61 (m)
5'	65.1	3.29 (m) 3.88 (dd, 5.5, 11.5)	66.5	3.21 (m) 3.82 (m)
2'-OCH_3	19.5	2.00 (s)	20.9	1.92 (s)
2' –C=O	170.0	-	171.4	-
3' -OCH_3	19.3	2.01 (s)	21.2	1.94 (s)
3' –C=O	170.7	-	172.1	-
1"	104.0	4.26 (d, 7.3)	105.5	4.18 (7.2)
2"	74.0	3.15 (m)	75.4	3.06 (m)
3"	76.7	3.27 (m)	78.1	3.20 (m)
4"	69.7	3.45 (m)	71.1	3.35 (m)
5"	65.2	3.15 (m) 3.80 (dd, 5.2, 11.5)	66.7	3.05 (m) 3.76 (m)

Literatür: (Baratta and Ruberto 1997) * Metanol-d_4

Astrasieversianin VI (B12)



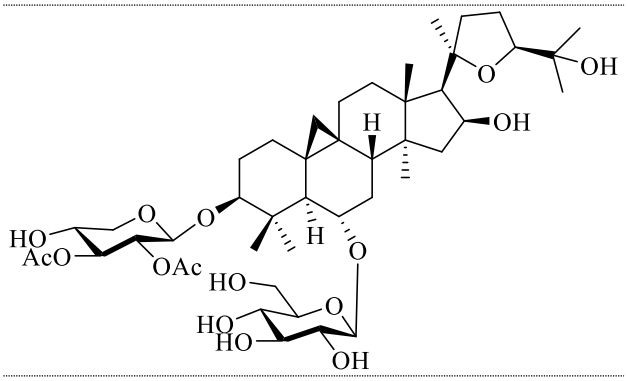
Şekil 3.42 B12 bileşiğinin yapısı

Çizelge 3.12 B12 bileşiğinin karşılaştırmalı ^{1}H ve ^{13}C NMR rezonans değerleri

			Literatür değerleri **	
No	**δ_C (ppm)***	**δ_H (ppm) (J, Hz)***	**δ_C (ppm)**	**δ_H (ppm) (J, Hz)**
1	31.2	1.25 (m) - 1.52 (m)		
2	28.8	1.62 (m) - 1.91 (m)		
3	88.5	3.15 (m)	88.6	-
4	41.3	-		
5	51.4	1.60 (m)		
6	77.9	3.48 (m)	78.5	-
7	33.1	1.78 (m)		
8	44.6	1.87 (d, 4.7, 10.2)		
9	20.6	-		
10	28.1	-		
11	25.6	1.37 (m) - 1.87 (m)		
12	32.7	1.66 (m)		
13	44.5	-		
14	45.5	-		
15	44.5	1.37 (m) – 1.98 (m)		
16	73.1	4.65 (m)	73.4	-
17	57.3	2.36 (d, 7.8)		
18	19.6	1.23 (s)		1.25 (s)
19	27.3	0.23 (d, 4.5) - 0.55 (d, 4.5)		0.23 (d, 4) - 0.48 (d, 4)
20	87.0	-	87.3	-
21	27.1	1.19 (s)		1.23 (s)
22	34.0	1.62 (m) - 2.60 (q, 10.8)		
23	25.4	2.03 (m)		
24	81.1	3.75 (dd, 5.6, 8.5)	81.6	
25	71.0	-	71.3	-
26	25.2	1.12 (s)		1.18 (s)
27	26.2	1.25 (s)		1.36 (s)
28	15.1	0.88 (s)		0.93 (s)
29	26.7	1.16 (s)		1.18 (s)
30	18.7	1.01 (s)		0.98 (s)
1'	103.7	4.41 (d, 7.9)	104.7	
2'	74.2	4.70 (dd, 7.9, 9.5)	76.1	
3'	74.7	3.43 (t, 9.4)	75.5	
4'	69.8	3.53 (m)	71.0	
5'	65.4	3.20 (m) - 3.84 (m)	66.7	
2'-OCH_3	19.9	2.08 (s)	20.9	1.97 (s)
2' -C=O	170.5	-	170.1	-
1''	104.0	4.27 (d, 7.3)	105.7	
2''	74.0	3.15 (m)	75.4	
3''	76.6	3.28 (m)	77.8	
4''	69.7	3.45 (m)	71.3	
5''	65.3	3.15 (m) - 3.81 (m)	67.0	

Literatür: (Li-Xian et al. 1986) ***** Metanol-d_4, ****** ^{13}C NMR için piridin-d_5; ^{1}H NMR için kloroform-d/piridin-d_5

Astrasieversianin IV (B13)



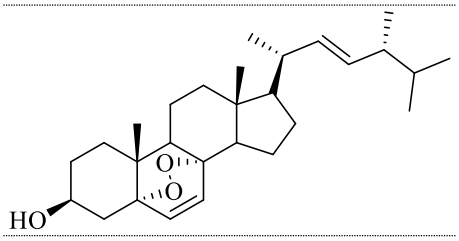
Şekil 3.43 B13 bileşiğinin yapısı

Çizelge 3.13 B13 bileşiğinin karşılaştırmalı ^{1}H ve ^{13}C NMR rezonans değerleri

			Literatür değerleri *	
No	**δ_C (ppm)***	**δ_H (ppm) (J, Hz)***	**δ_C (ppm)**	**δ_H (ppm) (J, Hz)**
1	31.3	1.24 (m) - 1.52 (m)	32.8	1.18 (m) - 1.31 (m)
2	28.7	1.62 (m) - 1.91 (m)	30.2	1.57 (m) - 1.76 (m)
3	88.9	3.19 (m)	90.3	3.07 (m)
4	41.3	-	42.8	-
5	51.7	1.60 (m)	53.1	1.52 (m)
6	78.6	3.50 (m)	80.1	3.43 (m)
7	33.7	1.60 (m) - 1.90 (m)	35.5	1.51 (m) - 2.52 (m)
8	45.3	1.83 (d, 4.7, 10.2)	46.7	1.74 (m)
9	20.7	-	22.1	-
10	28.4	-	29.8	-
11	25.5	1.30 (m) - 1.91 (m)	26.8	1.86 (m)
12	32.7	1.57 (m) - 1.66 (m)	35.2	1.46 (m) - 1.76 (m)
13	44.5	-	46.0	-
14	45.6	-	47.1	-
15	44.7	1.36 (m) - 2.02 (m)	46.1	1.29 (m) - 1.92 (m)
16	73.2	4.63 (q, 7.4, 7.4, 7.5)	74.6	4.56 (m)
17	57.5	2.35 (d, 7)	58.9	2.25 (m)
18	19.9	1.23 (s)	21.4	1.14 (s)
19	28.3	0.25 (d, 4.4) - 0.57 (d, 4.4)	29.8	0.17 (d, 4) - 0.48 (d, 4)
20	87.0	-	88.4	-
21	26.9	1.19 (s)	28.3	1.10 (s)
22	34.0	1.61 (m) - 2.60 (q, 10.8)	34.1	1.52 (m)
23	25.3	2.02 (m)	27.0	1.93 (m)
24	81.1	3.75 (dd, 5.8, 8.4)	82.6	3.64 (m)
25	71.0	-	72.4	-
26	25.2	1.11 (s)	27.6	1.16 (s)
27	26.2	1.25 (s)	26.7	1.02 (s)
28	15.1	0.89 (s)	16.6	0.80 (s)
29	27.0	1.19 (s)	28.3	1.10 (s)
30	18.8	1.00 (s)	20.2	0.91 (s)
1'	103.2	4.53 (d, 7.8)	104.6	4.45 (d, 7.6)
2'	72.2	4.78 (dd, 7.8, 9.4)	73.6	4.70 (m)
3'	75.5	4.97 (t, 9.4)	76.9	4.85 (m)
4'	67.9	3.69 (m)	69.3	3.58 (m)
5'	65.1	3.29 (m) - 3.88 (dd, 5.4, 11)	66.5	3.23 (m) - 3.80 (m)
2'-OCH_3	19.5	2.00 (s)	20.8	1.90 (s)
2' –C=O	170.0	-	171.4	-
3' -OCH_3	19.4	2.02 (s)	21.0	1.91 (s)
3' –C=O	170.7	-	172.1	-
1"	103.5	4.30 (d, 7.7)	104.9	4.26 (d, 7.3)
2"	74.2	3.16 (m)	75.6	3.04 (m)
3"	77.2	3.30 (m)	78.6	3.20 (m)
4"	70.3	3.26 (m)	71.7	3.17 (m)
5"	76.2	3.23 (m)	77.7	3.13 (m)
6"	61.5	3.64 (dd, 5.4, 11) 3.81 (dd, 2.2, 11)	62.9	3.61 (m) 3.69 (m)

Literatür: (Baratta and Ruberto 1997) ***** Metanol-d_4

Ergosterol peroksit (B14)



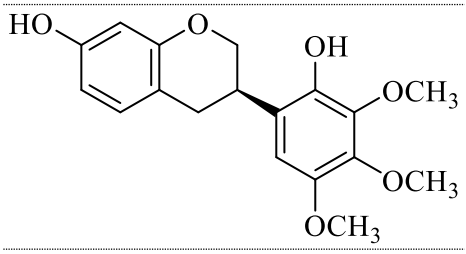
Şekil 3.44 B14 bileşiğinin yapısı

Çizelge 3.14 B14 bileşiğinin karşılaştırmalı ^{1}H ve ^{13}C NMR rezonans değerleri

			Literatür değerleri *	
No	**δ_C (ppm)***	**δ_H (ppm) (J, Hz)***	**δ_C (ppm)**	**δ_H (ppm) (J, Hz)**
1	30.0	1.53 (m) - 1.84 (m)	30.6	
2	36.8	1.92 (m) - 2.10 (m)	35.2	
3	66.4	3.97 (m)	67.0	3.98 (m)
4	34.6	1.69 (m) - 1.94 (m)	37.4	
5	82.1	-	83.4	
6	135.3	6.24 (d, 8.5)	135.9	6.54 (d, 8.3)
7	130.7	6.50 (d, 8.5)	131.2	6.27 (d, 8.3)
8	79.4	-	80.2	
9	51.6	1.56 (m)	51.6	
10	36.9	-	37.4	
11	20.6	1.40 (m) - 1.59 (m)	21.1	
12	39.2	1.22 (m)- 1.94 (m)	39.8	
13	44.5	-	45.1	
14	50.9	1.48 (m)	52.2	
15	23.3	1.22 (m) - 1.50 (m)	23.9	
16	28.6	1.30 (m) - 1.74 (m)	29.2	
17	56.1	1.21 (m)	56.7	
18	12.8	0.80 (s)	13.4	0.82 (s)
19	18.1	0.87 (s)	18.1	0.90 (s)
20	39.7	2.11 (ddd, 1.9, 5.0, 13.7)	40.2	
21	20.8	0.99 (d, 6.5)	21.3	1.0 (d, 6.6)
22	135.1	5.13 (dd, 8.4, 15.2)	135.7	5.19 (m)
23	132.2	5.21 (dd, 7.6, 15.2)	132.8	5.19 (m)
24	42.7	1.83 (m)	43.3	
25	33.4	1.46 (m)	33.6	
26	19.6	0.81 (m)	20.4	0.81 (d, 6.6)
27	19.9	0.83 (d, 6.8)	20.1	0.83 (d, 6.6)
28	17.5	0.90 (d, 6.8)	18.4	0.91 (d, 7.3)

Literatür: (Trigos and Ortega-Regules 2002) ***** Kloroform-d

Millepurpan (B15)



Şekil 3.45 B15 bileşiğinin yapısı

Çizelge 3.15 B15 bileşiğinin karşılaştırmalı ^{1}H ve ^{13}C NMR rezonans değerleri

				Literatür**
No	**δ_C (ppm)***	**δ_H (ppm) (*J*, Hz)***	**δ_C (ppm)**	**δ_H (ppm) (*J*, Hz)**
2a	69.4	4.33 (ddd, 10.4, 3.5, 1.9)	71.4	4.15 (dm, 10.3)
2b		4.09 (t, 10.0)		3.88 (t, 10.3)
3	32.4	3.56 (tdd, 9.7, 5.4, 3.5)	33.2	3.45 (tdd, 10.5, 5.0, 2.0)
4a	30.0	3.01 (dd, 15.7, 10.4)	32.4	2.85 (dd, 15.5, 10.9)
4b		2.92 (ddd, 15.7, 5.9, 1.9)		2.77 (ddl, 15.4, 4.4)
5	130.3	6.94 (d, 8.2)	131.1	6.87 (d, 8.2)
6	107.9	6.39 (dd, 8.2, 2.5)	109.4	6.35 (dd, 8.2, 2.4)
7	155.1	-	158.1	-
8	103.1	6.35 (d, 2.5)	104.0	6.26 (d, 2.4)
9	154.7	-		
10	114.4	-	114.2	-
1'	121.0	-		
2'	141.1	-		
3'	140.0	-		
4'	146.4	-		
5'	140.7	-		
6'	106.3	6.42 (s)		
C-5 OCH_3	60.9	3.88 (s)		
C-6 OCH_3	56.6	3.76 (s)		
C-7 OCH_3	61.28	3.97 (s)		
C2' -OH	-	4.65 (s)		
C4' -OH	-	5.58 (s)		

Literatür: (Gatouillat et al. 2014) * Kloroform-d, ** Metanol-d_4

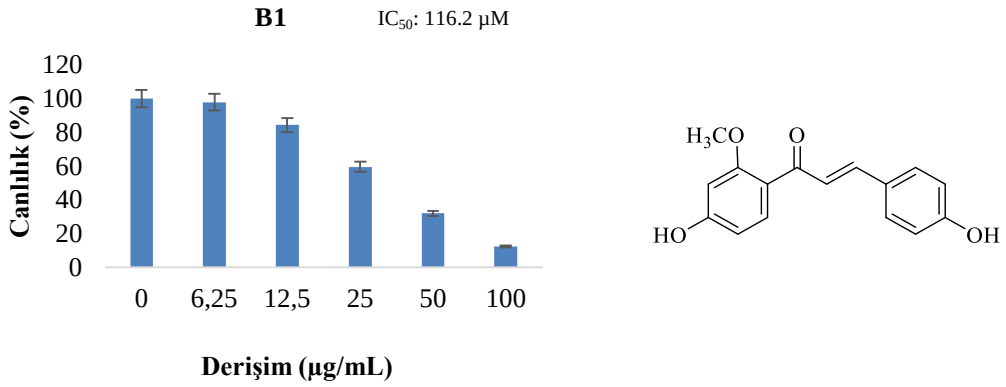
3.5 *Astragalus ponticus* Pall. Bitkisinden İzole Edilen Bileşiklerin Antiproliferatif Aktiviteleri

Astragalus ponticus Pall. bitkisinden biyoaktivite yönlendirmeli izolasyon yöntemiyle 2 tanesi yeni olmak üzere 10 adet ve bunlara ek olarak MeOH fraksiyonundan 3 adet olmak üzere toplam 13 bileşik elde edilmiştir. Elde edilen bu bileşiklerin HeLa (insan rahim kanseri) hücre hattına karşı antiproliferatif aktiviteleri test edilmiştir.

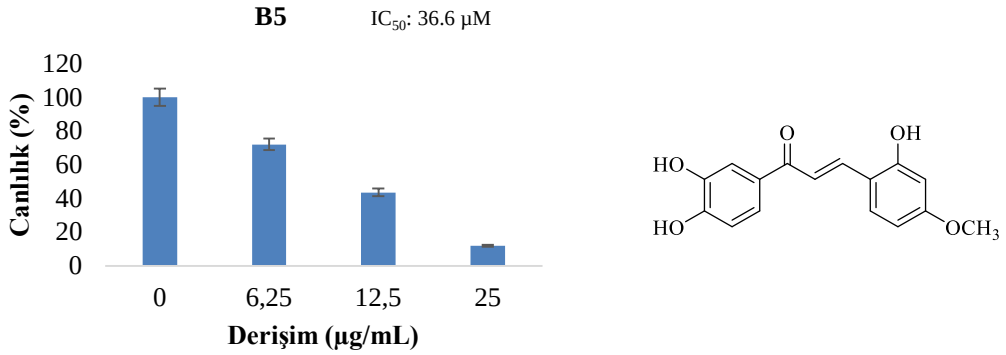
Elde edilen bileşiklerden 4'ü kalkon iskeletine, 1'i auron iskeletine, ikisi lignan (3,4-dihidrobenzofuran türevi) iskeletine, 1'i steroid iskeletine, 1'i izoflavankinon iskeletine ve 4'ü sikloartan iskeletine sahiptir. Bu bileşiklerden kalkon (**B1**, **B5**, **B6** ve **B8**) ve lignan (**B10** ve **B15**) bileşikleri aktiviteye sahipken sikloartan iskeletine sahip bileşiklerden bir tanesi (**B7**) aktiviteye sahip, diğerlerininse (**B11**, **B12** ve **B13**) aktivitesi görülmemiştir. İzole edilen bileşiklerden auron (**B3**) ve steroid (**B14**) ise proliferatif aktivite göstermiştir.

C6-C3-C6 motifi ilaç tasarımında imtiyazlı yapı olarak görülür ve kalkonlar da bu yapıya sahip bileşiklerdir. Kalkonlar 1,3-diaril-2-propen-1-on ana yapısına sahip, cis (Z) ve trans (E) izomerler şeklinde bulunabilen bileşiklerdir. Bu izomerlerden E izomeri termodinamik olarak daha kararlı olduğundan doğal ürünlerden elde edilen kalkonlar genellikle E izomeriye sahiptir. Bu bileşikler basit yapılarından ve bir dizi farmakolojik aktivitelerinden dolayı biyolojik aktivite araştırmalarında önemli bir yere sahiptir (Rao et al. 2009).

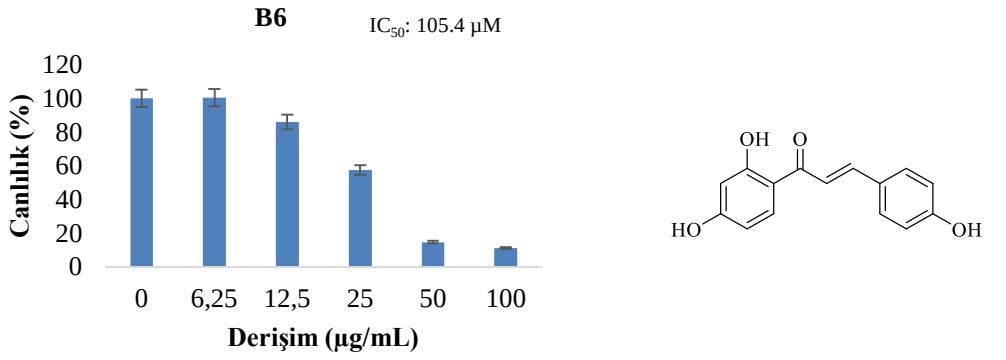
Astragalus ponticus Pall. bitkisinden elde edilen flavonoidlerden kalkon yapılı olanlar **B1** (3-deoksisappankalkon), **B5** (yeni), **B6** (izolikuiritigenin) ve **B8** (yeni) şeklindedir ve bu bileşiklerin HeLa hücrelerine karşı antiproliferatif aktivite testlerinden elde edilen IC_{50} değerleri sırasıyla 116,2, 36,6, 105,4, 20,6 µM'dır (Şekil 3.46-3.49).



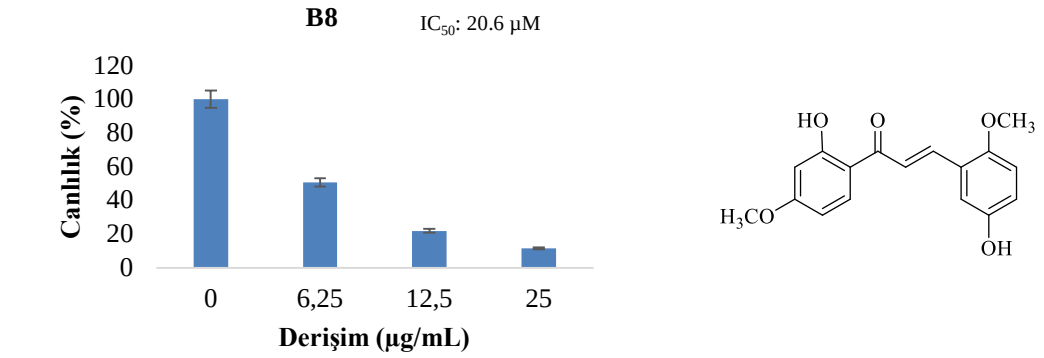
Şekil 3.46 HeLa hücreleri üzerine **B1** bileşiğinin etkisi



Şekil 3.47 HeLa hücreleri üzerine **B5** bileşiğinin etkisi



Şekil 3.48 HeLa hücreleri üzerine **B6** bileşiğinin etkisi



Şekil 3.49 HeLa hücreleri üzerine **B8** bileşiğinin etkisi

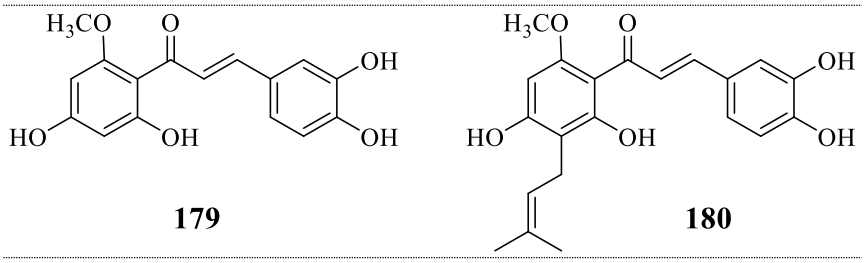
Kalkonlar sahip oldukları antitümör, antimutajen, ağrı kesici, antioksidan, antibakteriyel gibi özelliklerinden dolayı araştırmacılar arasında oldukça popülerdir (Yadav et al. 2011). Bunların arasında antitümör aktivitelerini apoptoz başlatıcı, metastaz engelleyici, anjiyojenez engeleyici, antiprolifeatif etki gibi mekanizmalar üzerinden göstermektedirler (Zhang et al. 2013). Buna ek olarak kalkonların α,β-doymamış karbonil grupları yumuşak elektrofil gibi davranarak hidroksil ve amino gibi sert nükleofillerden ziyade tiyollar gibi yumuşak nükleofillerle etkileşme eğilimindedirler. Bunun anlamı kalkonların, kanser kemoterapisinde sıklıkla kullanılan ve nükleik asitlerde bulunan amin ve hidroksil gruplarıyla tepkime vererek tedavinin aksine mutajenik ve karsinojenik etki ortaya çıkarabilen alkilleme ajanlarına kıyasla daha güvenli ilaç etken maddesi olduklarıdır (Go et al. 2005). Kalkonların farmakolojik özellikleri, A ve B haklasında bulunan sübstitüentlerin değiştirilmesiyle farklılaştırılabilir ve en çok kullanılan sübstitüentler hidroksil, metoksi ve alkil gruplarıdır.

Li et al. (2008) Brezilya kırmızı propolisinden elde ettikleri bir dizi flavonoid bileşiğin çeşitli kanser hücre hatlarına etkilerini incelemişlerdir. 2',4'-dihidroksikalkon için 23.1, 2',4',4-trihidroksikalkon (izolikuiritigenin) için 82.6 ve 4,4'-dihidroksi-2'-metoksikalkon (3-deoksisappankalkon) için 6.9 µM değerlerinde IC_{50} bulmuşlardır ($2x10^3$ hücre/kuyucuk).

Yazarlar kalkonlardaki çift bağın indirgenmesiyle aktivitede azalma olduğunu belirtmişlerdir. Metoksi grubunun da hidroksi grubuna göre daha etkili olduğundan bahsetmişlerdir.

Zhu et al. (2019) sentezledikleri bir dizi flavonoid bileşiklerinin HeLa hücreleri üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Bu bileşiklerden 4'-hidroksi-3'-karboksiamido-4,6-dimetoksikalkon, 4'-hidroksi-3'-karboksiamido-3,4-dimetoksikalkon ve 4'-hidroksi-3'-karboksiamido-3,4,5-trimetoksikalkon bileşikleri sırasıyla 33.33, 31.82 ve 23.30 µM'lık IC_{50} değerlerinde aktivite göstermiştir. Sentezledikleri diğer bileşiklerin antiproliferatif aktivitelerinden yola çıkarak kalkon iskeletinde bulunan elektron çekici grupların aktiviteyi azalttıkları, bunun tersine elektron verici grupların da aktiviteyi arttırdıkları sonucuna varmışlardır. Ayrıca bileşiklerdeki -OH ve karboksiamido gruplarının çözünürlüğü artırarak aktiviteye katkı sağladıklarını belirtmişlerdir.

Vogel et al. (2008) yaptıkları çalışmada prenil grubunun kalkon yapısına bağlanmasıyla elde edilen bileşiklerin HeLa hücreleri üzerine olan aktiviteyi nasıl değiştirdiğini araştırmışlardır. Şekil 3.50'de görülen **179** ve **180** nolu bileşikler sadece prenil grubu açısından fark göstermektedir. **179** ve **180** bileşiklerinin HeLa hücrelerine karşı etkileri sırasıyla 14.8 ve 2.5 µM'lık IC_{50} değerindedir. Sonuçlardan pirenil grubunun aktiviteyi artırdığı görülmektedir.

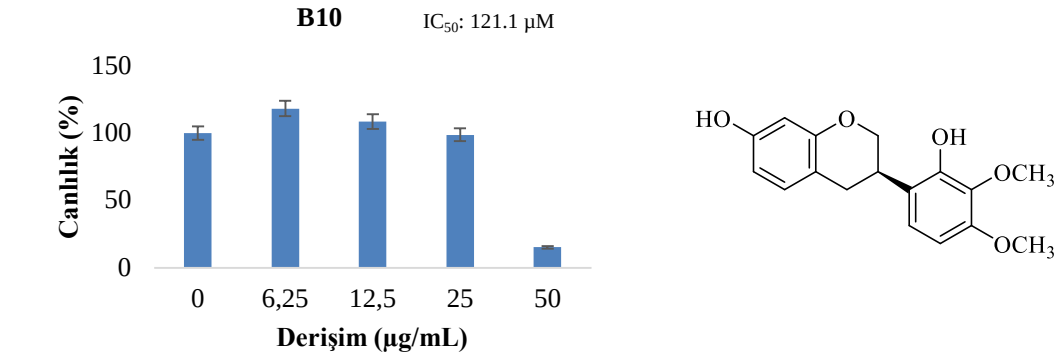


179 **180**

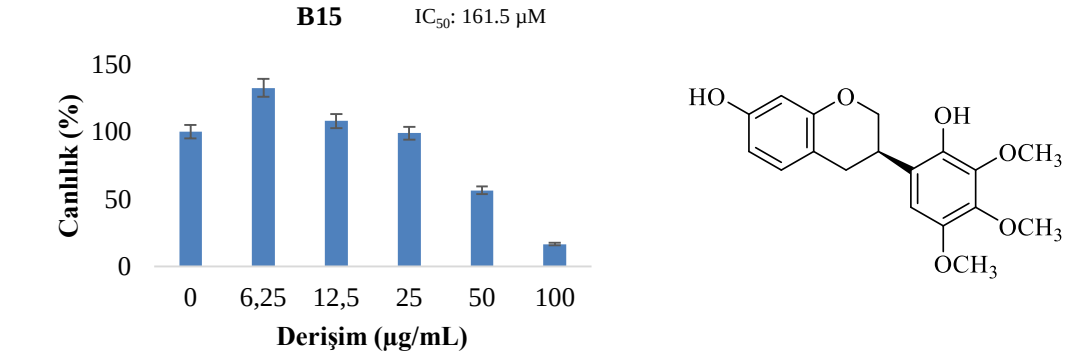
Şekil 3.50 Vogel et al. (2008) sentezledikleri kalkon türevleri

Ye et al. (2004) 2',4'-dihidroksi-6'-metoksi-3',5'-dimetilkalkon (**181**) bileşiğinin HeLa hücreleri üzerine etkisini incelemişlerdir. Bu bileşik HeLa hücrelerine 37.7 µM'lık bir IC_{50} değeriyle etki göstermiştir.

Astragalus ponticus Pall. bitkisinden elde edilen kalkon yapılı bileşiklerin yapı-aktivite ilişkisine bakılacak olursa oksijen sübstitüentlerin sayısındaki artışla birlikte aktivitede de artış görülmektedir: **B5** ve **B8** bileşikleri 4'er oksijenli sübstitüente sahipken (IC_{50} değerleri sırasıyla 36.6 ve 20.6 µM) **B1** ve **B6** bileşikleri 3'er tane oksijenli sübstitüent taşımaktadır. **B1** ve **B6** molekülleri arasındaki fark 2' konumundan kaynaklanmaktadır. Boumendjel et al. (2008) kalkonlarla yaptıkları çalışmalar sonucunda elde ettikleri verilerden 2' konumundaki -OH gruplarının aktiviteyi azaltacağını söylemişlerdir. Buna neden olarak ise 2'-OH ile karbonil oksijeni arasında oluşacak hidrojen bağının moleküldeki O=C-C1' bağındaki serbest dönmeyi engelleyerek düzlemsel bir yapı ortaya çıkaracağını göstermişlerdir. Ancak **B5** ve **B8** moleküllerinin aktivitesi karşılaştırıldığında yapıda meydana gelebilecek düzlemselleşmenin aktiviteye herhangi bir etkide bulunmadığını görülmektedir. Rao et al. (2004)'ın Jurkat (insan lösemi) ve U937 (insan lenfoma) kanser hücreleriyle yaptıkları çalışmaların sonuçları da bu çıkarımı desteklemektedir. Yine Boumendjel et al. (2008) kalkonların A halkasının tüm molekülün farmakodinamik özellikleri üzerindeki etkisi büyük olan bir farmakofor grup olduğunu, B halkasında metoksi sübstitüentin bulunmasının daha az öneme sahip olacağını öne sürmüşlerdir. Sonuçlara bakıldığında B halkasında 4 konumunda sadece -OH grubu taşıyan **B1** ve **B6** moleküllerinin aktivitelerinin B halkasında farklı konumlarda bir -OH ve bir $-OCH_3$ taşıyan **B5** ve **B8** moleküllerinin aktivitelerinden daha düşük olduğu görülebilir. **B1**, **B6** ve **B8** molekülleri kıyaslandığında 4' konumunda metoksi grubunun bulunmasının aktiviteyi önemli derecede artırdığı sonucuna varılabilir.



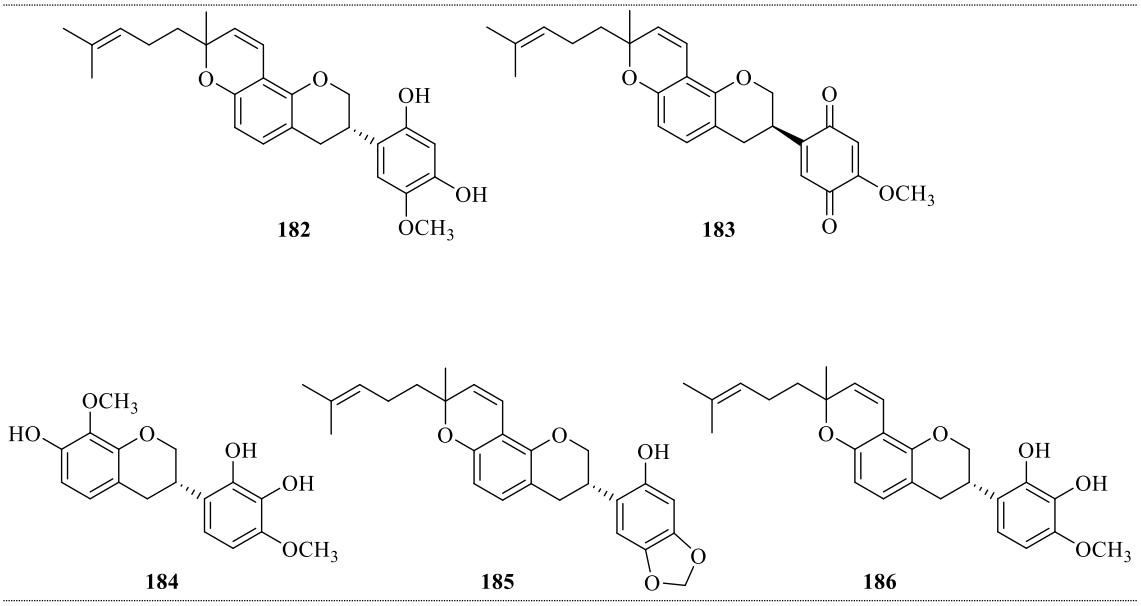
Şekil 3.51 HeLa hücreleri üzerine **B10** bileşiğinin etkisi



Şekil 3.52 HeLa hücreleri üzerine **B15** bileşiğinin etkisi

B10 (izomukrotinol) ve **B15** (millepurpan) molekülleri izoflavan iskeletine sahiptir. İzoflavanlar izoflavonoid sınıfına ait ikincil metabolitlerdir. Şekil 3.51 ve Şekil 3.52'de **B10** ve **B15** moleküllerinin HeLa hücreleri üzerine olan antiproliferatif test sonuçları görülmektedir. Bu moleküller sırasıyla 121.1 ve 161.5 µM'lık IC_{50} değerleriyle zayıf birer antiproliferatif etki göstermişlerdir. 4' konumuna bağlanan metoksi grubu aktivitede ~40 µM'lık bir azalmaya sebep olmuştur. Kanneakam ve arkadaşları yaptıkları çalışmada *Dalbergia velutina* bitkisinden izole ettikleri izoflavan türevi bileşiklerin (Şekil 3.53) bir dizi insan kanser hücre hattı (HeLa-S3, MCF-7, HepG-2 ve HT-29) üzerine sitotoksik etkilerini incelemişlerdir. **186** ve **184** nolu bileşikler HeLa-S3 hücrelerine karşı sırayla 5.17 ve 9.54 µM'lık IC_{50} değerleriyle en yüksek aktiviteyi göstermiştir (Kaennakam et al. 2017). Peng ve arkadaşları *Spatholobus suberectus*

bitkisinden izole ettikleri izoflavanları insan göğüs kanseri hücre hattına karşı sitotoksisite testine tabi tutmuşlar ve elde eettikleri sonuçlardan yapı/aktivite ilişkisi kurmuşlardır (Peng et al. 2019). Elde ettikleri sonuçlardan izoflavanlarda 8 konumunda metoksi grubunun bulunmasının aktiviteyi düşürdüğünü, 2'-OCH_3 grubunun 2'-OH grubuna dönüşmesiyle de aktivitenin kaybolduğunu tespit etmişlerdir.

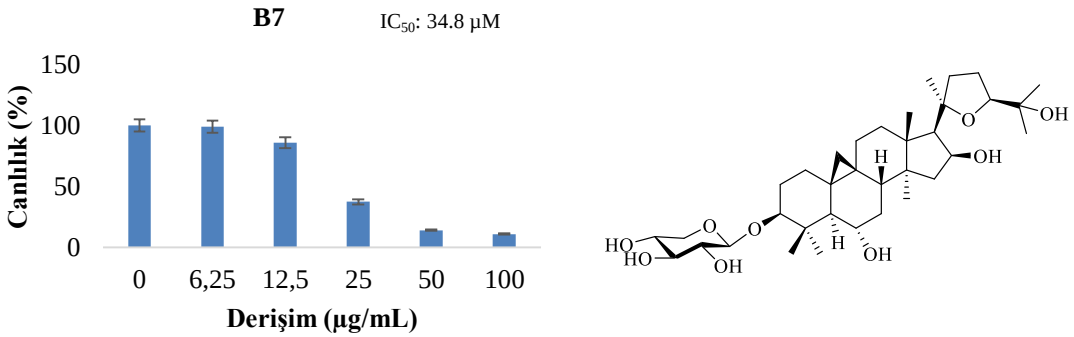


Şekil 3.53 Kanneakam ve arkadaşlarının *Dalbergia velutina* biktisinden izole ettikleri izoflavanlar

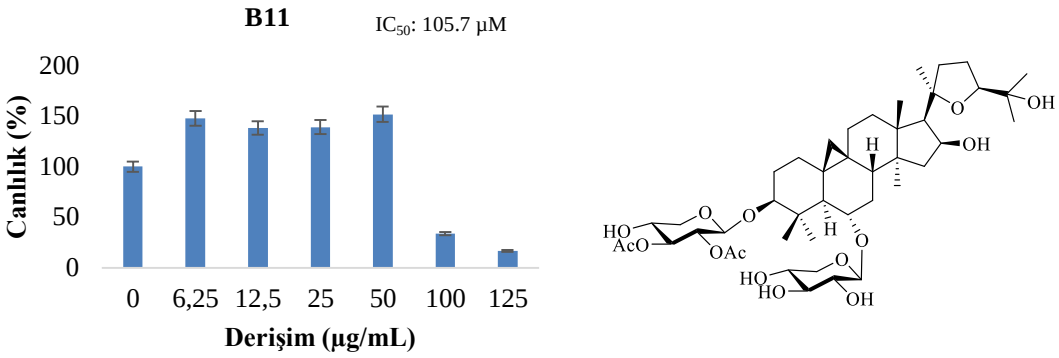
B7 (siklogaleginosit B), **B11** (astrasieversianin II), **B12** (astrasieversianin VI) ve **B13** (astrasieversianin IV) bileşikleri sikloartan yapısına sahip bileşiklerdir ve bunların HeLa hücrelerine karşı antiproliferatif aktivite testlerinden elde edilen IC_{50} değerleri sırasıyla 34.8, 105.7, 52.6 ve 140.2 µM şeklindedir. Bu bileşiklerin yapıları ve IC_{50} değerleri karşılaştırıldığında moleküllerdeki grupların aktiviteler üzerine olan etkileri açıkça görülmektedir (Şekil 3.54-56). İlk olarak şeker moleküllerinin sayısındaki artış aktiviteye ters yönlü bir etki yapmıştır: **B7** molekülü tek şeker grubuna sahip ve 34,8 µM'lık bir değerde aktivite göstermişken **B11**, **B12** ve **B13** molekülleri ikişer şeker gruplarıyla bundan daha yüksek IC_{50} değerlerine sahiptir. Moleküllerin yapıları ve aktiviteleri karşılaştırıldığında 3 konumundaki şeker gruplarında asetillenmenin antiproliferatif aktiviteye aksi yönde etki ettiği görülebilir. **B11** ve **B13** C3-şeker

grubunda C2' ve C3' konumlarında asetil grubu taşıyorken **B12** sadece C2' konumunda bir asetil grubu taşımaktadır. Ve bunun sonucunda 52,6 µM'lık IC_{50} ile antiproliferatif aktivite göstermiştir. **B11** ve **B13** ise sırasıyla 105,7 ve 140,2 µM'lık bir IC_{50} değerine sahiptir. Yapılardan ayrıca glikozit bağlanmasının da aktiviteye etki gösterdiği görülmektedir: Glikozit sayısı ile aktivite ters orantılı olarak değişmektedir. **B7** molekülü 3 konumundan tek şekerli bir molekül iken *A. ponticus* bitkisinden izole edilen sikloartantriterpen moleküller arasında en düşük IC_{50} değerine (34.8 µM) sahiptir. Ancak 3 ve 6 konumlarında birer şeker bağlı olan **B11**, **B12** ve **B13** moleküllerinin IC_{50} değerleri oldukça yüksektir, şeker grupları aktivitede azalmaya sebep olmuştur. Bu sonuç bize 3 konumdaki –OH grubunun önemli bir farmakofor olduğunu göstermektedir. **B11** ve **B13** molekülleri arasındaki tek fark 6 konumundaki şekerlerin farklılığıdır.

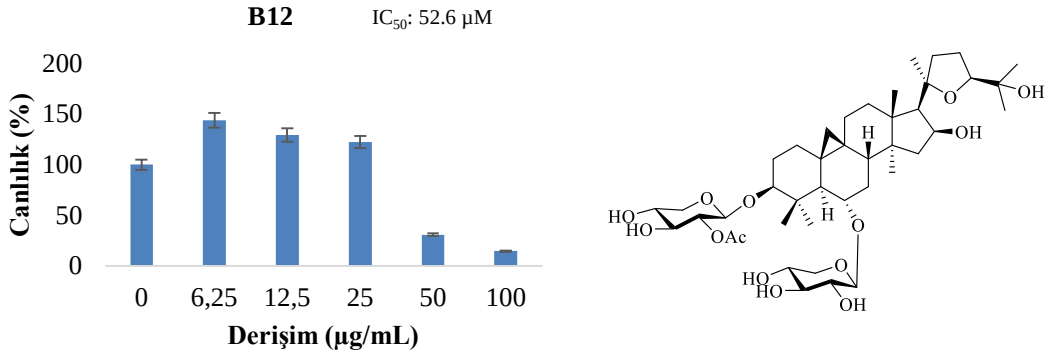
B11 molekülü 6 konumunda bir ksiloz taşıyorken **B13** molekülü 6 konumunda bir glikoz taşımaktadır. 6 konumundaki şekerde bir -CH_2OH grubunun bulunması IC_{50} değerindeki ~35 µM'lık bir artışla aktiviteyi azaltıcı bir etki göstermiştir.



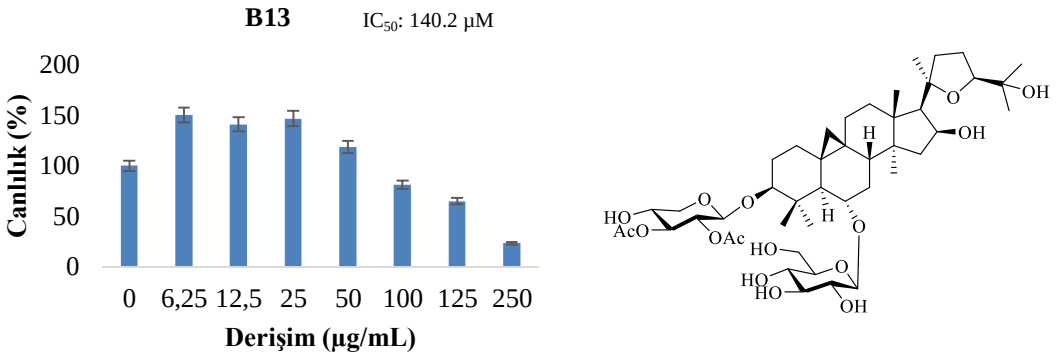
Şekil 3.54 HeLa hücreleri üzerine **B7** bileşiğinin etkisi



Şekil 3.55 HeLa hücreleri üzerine **B11** bileşiğinin etkisi

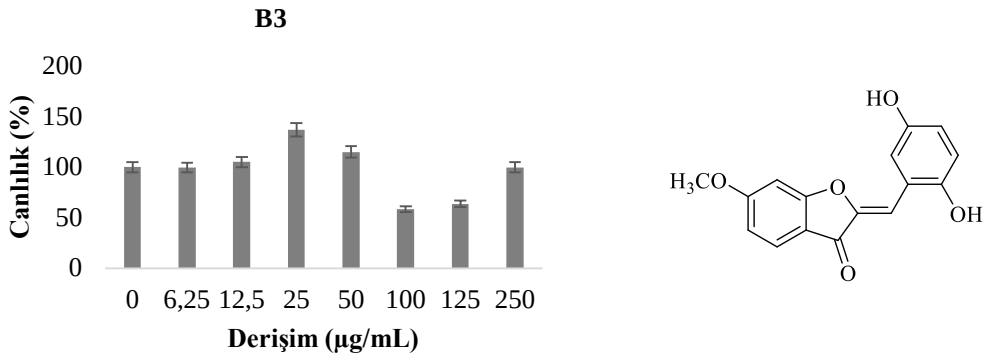


Şekil 3.56 HeLa hücreleri üzerine **B12** bileşiğinin etkisi

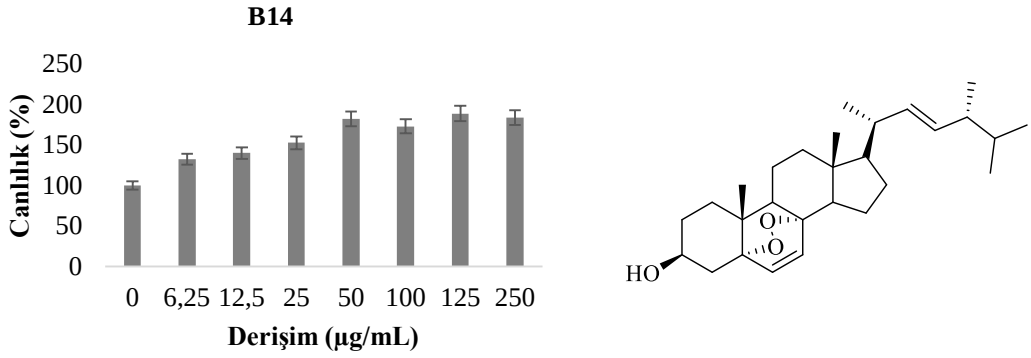


Şekil 3.57 HeLa hücreleri üzerine **B13** bileşiğinin etkisi

Astragalus ponticus bitkisinden elde edilen **B3** (2',5'-dihidroksi-5-metoksiauron) ve **B14** (ergosterol peroksit) bileşikleri HeLa hücreleri üzerinde herhangi bir antiproliferatif etki göstermemiş, aksine proliferatif bir etki göstermiştir (Şekil 3.58 ve 3.59). **B2** molekülünün miktarı az olduğundan antiproliferatif aktivite testi yapılamamıştır.



Şekil 3.58 HeLa hücreleri üzerine **B3** bileşiğinin etkisi



Şekil 3.59 HeLa hücreleri üzerine **B14** bileşiğinin etkisi

4. SONUÇ

Doğal ürünler antik zamanlardan bu yana geleneksel tıpta kullanım alanı bulmuşlardır. Günümüzde de bu eski bilgilerden elde edilen ipuçlarıyla keşfedilen biyoaktif moleküller gerek ilaç etken maddesi ve gerek de ilaç etken maddesi olabilecek moleküllerin öncülleri olarak kullanım alanı bulmaktadır. 1940-2014 yılları arasında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (US FDA) 175 adet düşük molekül ağırlıklı bileşiği antikanser ilacı olarak onaylamıştır: Bu bileşiklerin %37'si sentetik, %63'ü ise doğal ürünlerden elde edilen bileşikler veya doğal ürünlerden elde edilmiş bileşiklerden türetilen yarı sentetik bileşiklerdir (Boufridi and Quinn 2018).

Ancak günümüzde doğal kaynaklardan biyoaktif bileşiklerin elde edilmesi çalışmaları büyük ilaç firmaları tarafından terkedilmektedir. Bunun en büyük sebebi bu çalışmaların zaman alıcı olması ve elde edilen bileşiklerin çok az bir kısmının hedeflenen aktiviteleri gösterebilmesidir. Tüm bunlara rağmen doğal ürünlerin kullanımlarını avantajlı kılan ve unutulmaması gerek bazı özellikleri onları değerli ve ümit verici kılmaktadır. Doğal ürünler yaşayan kaynaklardan elde edildikleri için metabolit özelliği gösterebilirler, böylece vücut içinde sistemin bir parçasıymış gibi hareket ederek hücre içinde veya hücrelerarası sıvılarda taşınabilir/metabolize olabilirler; molekül ağırlıkları düşüktür; insan vücudunda bulunan hedef bölgelerdeki reseptör/aktif bölgelere uyum sağlayabilecek farmakofor gruplara ve stereokimyalara sahip olma potansiyelleri yüksektir.

Doğal ürünlerin bir diğer dezavantajı da söz konusu molekülün ana kaynaktaki miktarının dönemsel ve coğrafi değişikliklere bağlı olarak değişebileceğidir. Ancak bir kez keşfedilen ve biyoaktivitesi saptanan bir molekül gelişen teknolojinin avantajları olarak laboratuvar koşullarında taksol gibi sentetik ve artemisinin gibi biyoteknolojik (*Escherichia coli* bakterisi üzerinden) yöntemlerle ticari olarak üretilip kullanıma sunulabilir.

Bu tez çalışmasında biyoaktivite yönlendirmeli izolasyon yöntemi ile *Astraglus ponticus* Pall. bitkisinin kök kısmından ikisi yeni (**B5**, 2,3',4'-trihidroksi-4-metoksikalkon ve **B8**, 2',5-dihidroksi-2,4'-dimetoksikalkon) ve ikisi bilinen (**B1**, 3-deoksisappankalkon ve **B6**, izolikuiritigenin) 4 adet kalkon, bir adet bilinen auron (**B3**, 2-(2,5-dihidroksibenzil)-6-metoksiauron), iki adet bilinen izoflavan (**B10**, izomukronulatol ve **B15**, millepurpan), bir bilinen sikloartan glikozit (**B7**, siklogaleginosit B) ve bir bilinen steroid türevi (**B14**, ergosterol peroksit) olmak üzere 10 adet bileşik saflaştırılmıştır. Bunlara ek olarak aktif olmayan fraksiyonlardan da 3 adet sikloartan tipinde bileşik (**B11**, astrasieversianin II; **B12**, astrasieversianin VI ve **B13**, astrasieversianin IV) izole edilmiştir.

Elde edilen bu bileşiklerin insan rahim kanseri (HeLa) hücreleri üzerine antiproliferatif etkileri incelenmiştir. Bu bileşiklerden HeLa hücrelerine karşı en yüksek antiproliferatif aktiviteyi **B5**, **B7**, **B8** ve **B12** kodlu bileşikler sırasıyla 36.6, 34.8, 20.6 ve 52.6 µM'lık IC_{50} değerleriyle göstermişlerdir. Diğer bileşikler 105.4-161.5 µM arasında değişen IC_{50} değerlerine sahipken **B3** ve **B14** kodlu bileşikler HeLa hücreleri üzerine proliferatif bir etki göstermiştir.

Astragalus cinsinden bitkiler, özellikle *Astragalus membranaceus* türü, başta antik Çin tıbbında olmak üzere antioksidan, diüretik, antidiyabetik, karaciğer koruyucu, ağrı kesici, bağışıklık düzenleyici, sindirim sistemi koruyucu ve antikanser özelliklerinden dolayı kullanım alanına sahiptir. *Astragalus* cinsinin bu biyoaktivitelerinden dolayı Çankırı'da da yetişen *Astragalus ponticus* Pall. bitkisinin ön demeleri sonucunda HeLa hücrelerine üzerinde antiproliferatif etkilerinin olduğu belirlenmiş ve bu tez için materyal olarak seçilmiştir. Astragalus ponticus türü endemik bir tür olmamasına karşın bununla ilgili detaylı bir fitokimyasal çalışma bulunmamaktadır. Yapılan biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlandırma işlemleri sonucunda kök kısmının etilasetat fraksiyonlarından EA.A2, EA.A7 ve EA.A7 fraksiyonları ile izolasyona başlanmış ve bu fraksiyonlardan 4'ü yeni olmak üzere 10 adet bileşik elde edilmiştir. Bunlardan 4'ü HeLa hücrelerine karşı antiprolifratif etkiye sahiptir. Böylece çalışma sonucunda EA.A2, EA.A7 ve EA.A1 fraksiyonlarının antiproliferatif aktivitelerinin kaynağı olabilecek moleküller saflaştırılmıştır.

Bunlara ek olarak *A. ponticus* Pall. bitkisinin kök kısmının metanol ekstresinden 3 adet bilinen sikloartan tipinde triterpen glikozit izole edilmiştir.

Saflaştırılan bileşikler sikloartan glikozit, kalkon, auron, steroid, izoflavan ve izoflavankinon sınıfına ait bileşiklerdir. Sikloartan tipi triterpen bileşikler *Astragalus* cinsinde en bol bulunan bileşiklerdir. Kalkon, auron izoflavan ve izoflavankinon tipi flavonoidlerin de *Astragalus* cinsinden izole edildiğini gösteren pek çok çalışma mevcuttur. İzole edilen yeni bileşikler literatürde ilk defa rapor edilmiştir.

KAYNAKLAR

Achenbach, H., Stöcker, M. and Constenla, M. A. 1988. Flavonoid and other constituents of *Bauhinia manca*. Phytochemistry, 27 (6), 1835-1841.

Agrawal, P. K. 1989. Carbon-13 NMR of Flavonoids, Elsevier, XVI-564, The Netherlands.

Ahmad, V. U., Mohammad, F. V. and Tareen, R. B. 2019. Laceioside, a new cycloartane saponin from *Astragalus tephrosioides* Boiss. var. *lacei* (Ali) Kirchoff. Natural Products Research, 33 (3), 393-399.

Akan, H. and Aytac, Z. 2014. The revision of the section *Alopecuroidei* of the genus *Astragalus* (Fabaceae) in Turkey. Turkish Journal of Botany, 38 (1), 37-59.

Auyeung, K. K., Han, Q.-B. and Ko, J. K. 2016. *Astragalus membranaceus*: A review of its protection against inflammation and gastrointestinal cancers. The American Journal of Chinese Medicine, 44 (01), 1-22.

Avcı, M. 2005. Çeşitlilik ve endemizm açısından Türkiye'nin bitki örtüsü. İstanbul Üniversitesi Coğrafya Dergisi, (13), 27-55.

Avunduk, S., Mitaine-Offer, A. C., Alankus-Caliskan, O., Miyamoto, T., Senol, S. G. and Lacaille-Dubois, M. A. 2008. Triterpene glycosides from the roots of *Astragalus flavescens*. Journal of Natural Products, 71 (1), 141-5.

Baratta, M. T. and Ruberto, G. 1997. Cycloartane triterpene glycosides from *Astragalus siculus*. Planta Medica, 63 (03), 280-282.

Boufridi, A. and Quinn, R. J. 2018. Harnessing the properties of natural products. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 58 451-470.

Boumendjel, A., Boccard, J., Carrupt, P.-A., Nicolle, E., Blanc, M., Geze, A., Choisnard, L., Wouessidjewe, D., Matera, E.-L. and Dumontet, C. 2008. Antimitotic and antiproliferative activities of chalcones: Forward structure–activity relationship. Journal of Medicinal Chemistry, 51 (7), 2307-2310.

Bourezzane, S., Haba, H., Long, C. and Benkhaled, M. 2018. Chemical composition and antioxidant activity of *Astragalus monspessulanus* L. growing in semiarid areas of Algeria. Journal of the Serbian Chemical Society, 83 (1), 31-38.

Calis, I. and Sticher, O. 1996. Triterpene Saponins from Plants of the Flora of Turkey, In: Saponins Used in Traditional and Modern Medicine. Waller, G. R. and Yamasaki, K., Springer US, pp. 485-500, Boston, MA.

Chen, J., Li, Y., Yang, L.-Q., Li, Y.-Z., Nan, Z.-B. and Gao, K. 2012. Biological activities of flavonoids from pathogenic-infected *Astragalus adsurgens*. Food Chemistry, 131 (2), 546-551.

El-Hawiet, A. M., Toaima, S. M., Asaad, A. M., Radwan, M. M. and El-Sebakhy, N. A. 2010. Chemical constituents from *Astragalus annularis* Forssk. and *A. trimestris* L., Fabaceae. Revista Brasileira de Farmacognosia, 20 (6), 860-865.

El Dib, R., Soliman, H., Hussein, M. and Attia, H. 2015. Two new flavonoids and biological activity of *Astragalus abyssinicus* (Hochst.) Steud. ex A. Rich. aerial parts. Drug Research, 65 (05), 259-265.

Gatouillat, G., Alabdul Magid, A., Bertin, E., Okiemy-Akeli, M.-G., Morjani, H., Lavaud, C. and Madoulet, C. 2014. Cytotoxicity and apoptosis induced by alfalfa (*Medicago sativa*) leaf extracts in sensitive and multidrug-resistant tumor cells. Nutrition and Cancer, 66 (3), 483-491.

Ghasemian-Yadegari, J., Nazemiyeh, H., Hamedeyazdan, S. and Fathiazad, F. 2017. Secondary metabolites from the roots of *Astragalus maximus*. Research Journal of Pharmacognosy, 4 (2), 31-38.

Go, M., Wu, X. and Liu, X. 2005. Chalcones: An update on cytotoxic and chemoprotective properties. Current Medicinal Chemistry, 12 (4), 483-499.

Graziani, V., Esposito, A., Scognamiglio, M., Chambery, A., Russo, R., Ciardiello, F., Troiani, T., Potenza, N., Fiorentino, A. and D'Abrosca, B. 2019. Spectroscopic characterization and cytotoxicity assessment towards human colon cancer cell lines of acylated cycloartane glycosides from *Astragalus boeticus* L. Molecules, 24 (9), 1725.

Guo, K., He, X., Zhang, Y., Li, X., Yan, Z., Pan, L. and Qin, B. 2016. Flavoniods from aerial parts of *Astragalus hoantchy*. Fitoterapia, 114 34-39.

Gülcemal, D., Masullo, M., Napolitano, A., Karayıldırım, T., Bedir, E., Alankuş-Çalışkan, Ö. and 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, 86 184-194.

Gülcemal, D., Alankuş-Çalışkan, Ö., Perrone, A., Özgökçe, F., Piacente, S. and Bedir, E. 2011. Cycloartane glycosides from *Astragalus aureus*. Phytochemistry, 72 (8), 761-768.

Harvey, A. L. 2008. Natural products in drug discovery. Drug Discovery Today, 13 (19-20), 894-901.

Horo, I. K. 2013. Isolation and characterization of saponins from *Astragalus icmadophilus*, *Astragalus hareftae* and *Astragalus lycius* species. PhD thesis (unpublished), Ege University, 207 p., İzmir.

Hwang, D., Hyun, J., Jo, G., Koh, D. and Lim, Y. 2011. Synthesis and complete assignment of NMR data of 20 chalcones. Magnetic Resonance in Chemistry, 49 (1), 41-45.

Janibekov, A. A., Youssef, F. S., Ashour, M. L. and Mamadalieva, N. Z. 2018. New flavonoid glycosides from two *Astragalus* species (Fabaceae) and validation of their antihyperglycaemic activity using molecular modelling and in vitro studies. Industrial Crops and Products, 118 142-148.

Jiang, Z. and Mao, Z. 2019. Astragaloside IV (AS-IV) alleviates the malignant biological behavior of hepatocellular carcinoma via Wnt/β-catenin signaling pathway. RSC Advances, 9 (61), 35473-35482.

Kaennakam, S., Siripong, P. and Tip-pyang, S. 2017. Cytotoxicities of two new isoflavanes from the roots of *Dalbergia velutina*. Journal of Natural Medicines, 71 (1), 310-314.

Karabey, F., Khan, I. A. and Bedir, E. 2012. Cycloartane-type glycosides from *Astragalus schottianus*. Phytochemistry Letters, 5 (2), 320-324.

Lai, P. K. K., Chan, J. Y. W., Cheng, L., Lau, C. P., Han, S. Q. B., Leung, P. C., Fung, K. P. and Lau, C. B. S. 2013. Isolation of anti-inflammatory fractions and compounds from the root of *Astragalus membranaceus*. Phytotherapy Research, 27 (4), 581-587.

Lee, D., Lee, D. H., Choi, S., Lee, J. S., Jang, D. S. and Kang, K. S. 2019. Identification and isolation of active compounds from *Astragalus membranaceus* that improve insulin secretion by regulating pancreatic β-Cell metabolism. Biomolecules, 9 (10), 618.

Li-Xian, G., Xiao-Bing, H. and Yu-Qun, C. 1986. The structures of thirteen astrasieversianins from *Astragalus sieversianus*. Phytochemistry, 25 (10), 2389-2393.

Li, F., Awale, S., Tezuka, Y. and Kadota, S. 2008. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure–activity relationship. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 16 (10), 5434-5440.

Li, J. W.-H. and Vederas, J. C. 2009. Drug discovery and natural products: End of an era or an endless frontier? Science, 325 (5937), 161-165.

Li, K., Li, S., Wang, D., Li, X., Wu, X., Liu, X., Du, G., Li, X., Qin, X. and Du, Y. 2019. Extraction, characterization, antitumor and immunological activities of hemicellulose polysaccharide from *Astragalus radix* herb residue. Molecules, 24 (20), 3644.

Li, X., Qu, L., Dong, Y., Han, L., Liu, E., Fang, S., Zhang, Y. and Wang, T. 2014. A review of recent research progress on the *Astragalus* genus. Molecules, 19 (11), 18850-18880.

Montoro, P., Teyeb, H., Masullo, M., Mari, A., Douki, W. and Piacente, S. 2013. LC–ESI-MS quali-quantitative determination of phenolic constituents in different parts of wild and cultivated *Astragalus gombiformis*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 72 89-98.

Moss, G., Smith, P. and Tavernier, D. 1995. Glossary of class names of organic compounds and reactivity intermediates based on structure (IUPAC Recommendations 1995). Pure and Applied Chemistry, 67 (8-9), 1307-1375.

Niknam, V., Ebrahimzadeh, H. and Maassoumi, A. A. 2003. Toxic nitro compounds in *Astragalus* species. Biochemical Systematics and Ecology, 31 (6), 557-562.

Noroozi, J., Zare, G., Sherafati, M., Mahmoodi, M., Moser, D., Asgarpour, Z. and Schneeweiss, G. M. 2019. Patterns of endemism in Turkey, the meeting point of three global biodiversity hotspots, based on three diverse families of vascular plants. Frontiers in Ecology and Evolution, 7 (159), 1-12.

Pelter, A., Ward, R. S. and Heller, H. G. 1979. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of (Z)- and (E)-aurones. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, 328-329.

Peng, F., Zhu, H., Meng, C.-W., Ren, Y.-R., Dai, O. and Xiong, L. 2019. New isoflavanes from *Spatholobus suberectus* and their cytotoxicity against human breast cancer cell lines. Molecules, 24 (18), 3218.

Pistelli, L. 2002. Secondary metabolites of genus *Astragalus*: Structure and biological activity, In: Studies in Natural Products Chemistry. Elsevier, pp. 443-545,

Pu, W., Wang, D. and Zhou, D. 2015. Structural characterization and evaluation of the antioxidant activity of phenolic compounds from *Astragalus taipaishanensis* and their structure-activity relationship. Scientific Reports, 5 13914.

Radwan, M. M., El-Sebakhy, N. A., Asaad, A. M., Toaima, S. M. and Kingston, D. G. 2007. Spinocoumarin I, a new coumarin Derivative from *Astragalus spinosus* Forssk. Natural Product Communications, 2 (9), 919-922.

Rahman, A. A., Samoylenko, V., Jain, S. K., Tekwani, B. L., Khan, S. I., Jacob, M. R., Midiwo, J. O., Hester, J. P., Walker, L. A. and Muhammad, I. 2011. Antiparasitic and antimicrobial isoflavanquinones from *Abrus schimperi*. Natural Product Communications, 6 (11), 1645-1650.

Rao, Y. K., Fang, S.-H. and Tzeng, Y.-M. 2009. Synthesis and biological evaluation of 3′, 4′, 5′-trimethoxychalcone analogues as inhibitors of nitric oxide production and tumor cell proliferation. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 17 (23), 7909-7914.

Rao, Y. K., Fang, S.-H. and Tzeng, Y.-M. 2004. Differential effects of synthesized 2′-oxygenated chalcone derivatives: Modulation of human cell cycle phase distribution. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 12 (10), 2679-2686.

Sarker, S. D., Latif, Z. and Gray, A. I. 2006. Natural Product Isolation, In: Natural Products Isolation. Sarker, S. D., Latif, Z. and Gray, A. I., Humana Press, pp. 1-25, Totowa, New Jersey.

Scindia, Y. M., Deshmukh, U. S. and Bagavant, H. 2010. Mesangial pathology in glomerular disease: targets for therapeutic intervention. Advanced Drug Delivery Reviews, 62 (14), 1337-1343.

Soĺăniová, E., Toma, Š. and Gronowitz, S. 1976. Investigation of substituent effects of chalcones by 13C NMR spectroscopy. Organic Magnetic Resonance, 8 (9), 439-443.

Tang, D., Shen, Y.-B., Wang, Z.-H., He, B., Xu, Y.-H., Nie, H. and Zhu, Q. 2018. Rapid analysis and guided isolation of *Astragalus* isoflavonoids by UHPLC–DAD–MS and their cellular antioxidant defense on high-glucose-induced mesangial cell dysfunction. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 66 (5), 1105-1113.

Tesso, H. 2005. Isolation and structure elucidation of natural products from plants. PhD Thesis (unpublished), University of Hamburg, 131 p., Hamburg.

Trigos, A. and Ortega-Regules, A. 2002. Selective destruction of microscopic fungi through photo-oxidation of ergosterol. Mycologia, 94 (4), 563-568.

Tsaruk, A., Iskenderov, D., Agzamova, M., Khushbaktova, Z., Syrov, V. and Isaev, M. 2010. Isolation and influence of cycloartane glycosides cycloorbicoside G and cyclosieversioside A on metabolic processes in myocardium. Pharmaceutical Chemistry Journal, 44 (1), 10-13.

TÜBİVES, 2020. Web sitesi. **www.tubives.com** Erişim Tarihi:09.07.2020

Un, R., Horo, I., Masullo, M., Falco, A., Senol, S. G., Piacente, S. and Alankuş-Çalıskan, Ö. 2016. Cycloartane and oleanane-type glycosides from *Astragalus pennatulus*. Fitoterapia, 109 254-260.

Veitch, N. C., Sutton, P. S., Kite, G. C. and Ireland, H. E. 2003. Six new isoflavones and a 5-deoxyflavonol glycoside from the leaves of *Ateleia herbert-smithii*. Journal of Natural Products, 66 (2), 210-216.

Vogel, S., Ohmayer, S., Brunner, G. and Heilmann, J. 2008. Natural and non-natural prenylated chalcones: Synthesis, cytotoxicity and anti-oxidative activity. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 16 (8), 4286-4293.

Wang, L. and Chen, Y. 2017. Efficient biotransformation of astragaloside IV to cycloastragenol by *Bacillus* sp. LG-502. Applied Biochemistry and Biotechnology, 183 (4), 1488-1502.

Wang, Q.-H. and Wang, X.-L. 2014. Anti-inflammatory effects and structure elucidation of two new compounds from *Astragalus membranaceus* (Fisch) Bge. var. *mongholicus* (Bge) Hsiao. Journal of Molecular Structure, 1074 284-288.

Wang, S., Tang, L. and Chen, F. 2015. Astragaloside III from *Astragalus membranaceus* antagonizes breast cancer growth. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 12 (3), 183-186.

Xiao, C.-J., Zhang, Y., Qiu, L., Dong, X. and Jiang, B. 2014. Schistosomicidal and antioxidant flavonoids from *Astragalus englerianus*. Planta Medica, 80 (18), 1727-1731.

Xiao, W., Han, L. and Shi, B. 2009. Isolation and purification of flavonoid glucosides from Radix Astragali by high-speed counter-current chromatography. Journal of Chromatography B, 877 (8-9), 697-702.

Yadav, V. R., Prasad, S., Sung, B. and Aggarwal, B. B. 2011. The role of chalcones in suppression of NF-κB-mediated inflammation and cancer. International Immunopharmacology, 11 (3), 295-309.

Yalçın, F. N., Piacente, S., Perrone, A., Capasso, A., Duman, H. and Çalış, İ. 2012. Cycloartane glycosides from *Astragalus stereocalyx* Bornm. Phytochemistry, 73 119-126.

Yang, C., Yang, Y., Aisa, H. A., Xin, X., Ma, H., Yili, A. and Zhao, Y. 2012. Bioassay-guided isolation of antioxidants from *Astragalus altaicus* by combination of chromatographic techniques. Journal of Separation Science, 35 (8), 977-983.

Yang, L. P., Shen, J. G., Xu, W. C., Li, J. and Jiang, J. Q. 2013. Secondary Metabolites of the Genus *Astragalus*: Structure and Biological-Activity Update. Chemistry & Biodiversity, 10 (6), 1004-1054.

Yao, D. and Wang, H. 2012. Monosaccharide composition in Radix Astragali polysaccharides by gas chromatography. Medicinal Plant, 3 (5), 36-38.

Ye, C.-L., Liu, J.-W., Wei, D.-Z., Lu, Y.-H. and Qian, F. 2004. In vitro anti-tumor activity of 2′, 4′-dihydroxy-6′-methoxy-3′, 5′-dimethylchalcone against six established human cancer cell lines. Pharmacological Research, 50 (5), 505-510.

Zhang, E.-H., Wang, R.-F., Guo, S.-Z. and Liu, B. 2013. An update on antitumor activity of naturally occurring chalcones. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013

Zhang, J., Liu, L., Wang, J., Ren, B., Zhang, L. and Li, W. 2018. Formononetin, an isoflavone from *Astragalus membranaceus* inhibits proliferation and metastasis of ovarian cancer cells. Journal of Ethnopharmacology, 221 91-99.

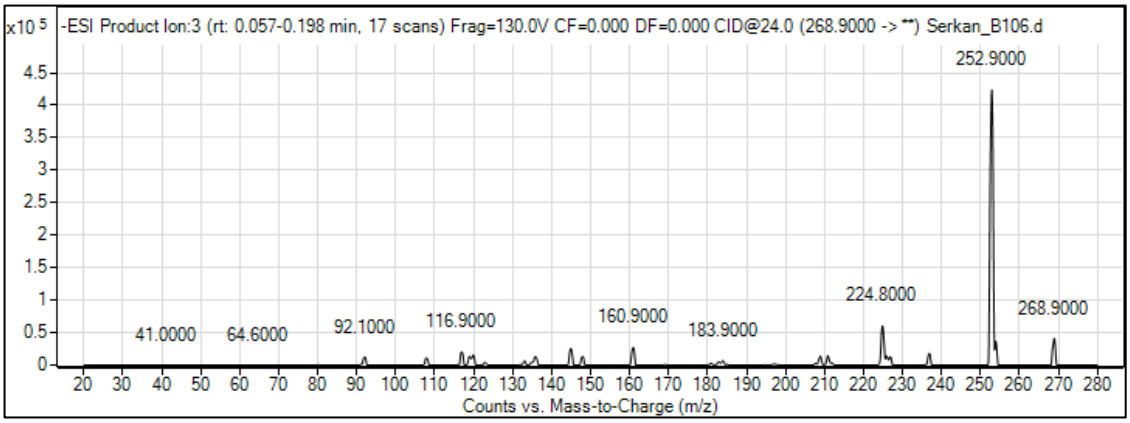
Zhao, B.-Y., Liu, Z.-Y., Wang, J.-J., Sun, L.-S., Wang, Z.-X. and Wang, Y.-C. 2009. Isolation and NMR study on swainsonine from locoweed, *Astragalus strictus*. Agricultural Sciences in China, 8 (1), 115-120.

Zhu, H., Tang, L., Zhang, C., He, D., Zheng, L. and Wei, B. 2019. Synthesis of chalcone derivatives: Inducing apoptosis of HepG2 cells via regulating reactive oxygen species and mitochondrial pathways. Frontiers in Pharmacology, 10 1-13.

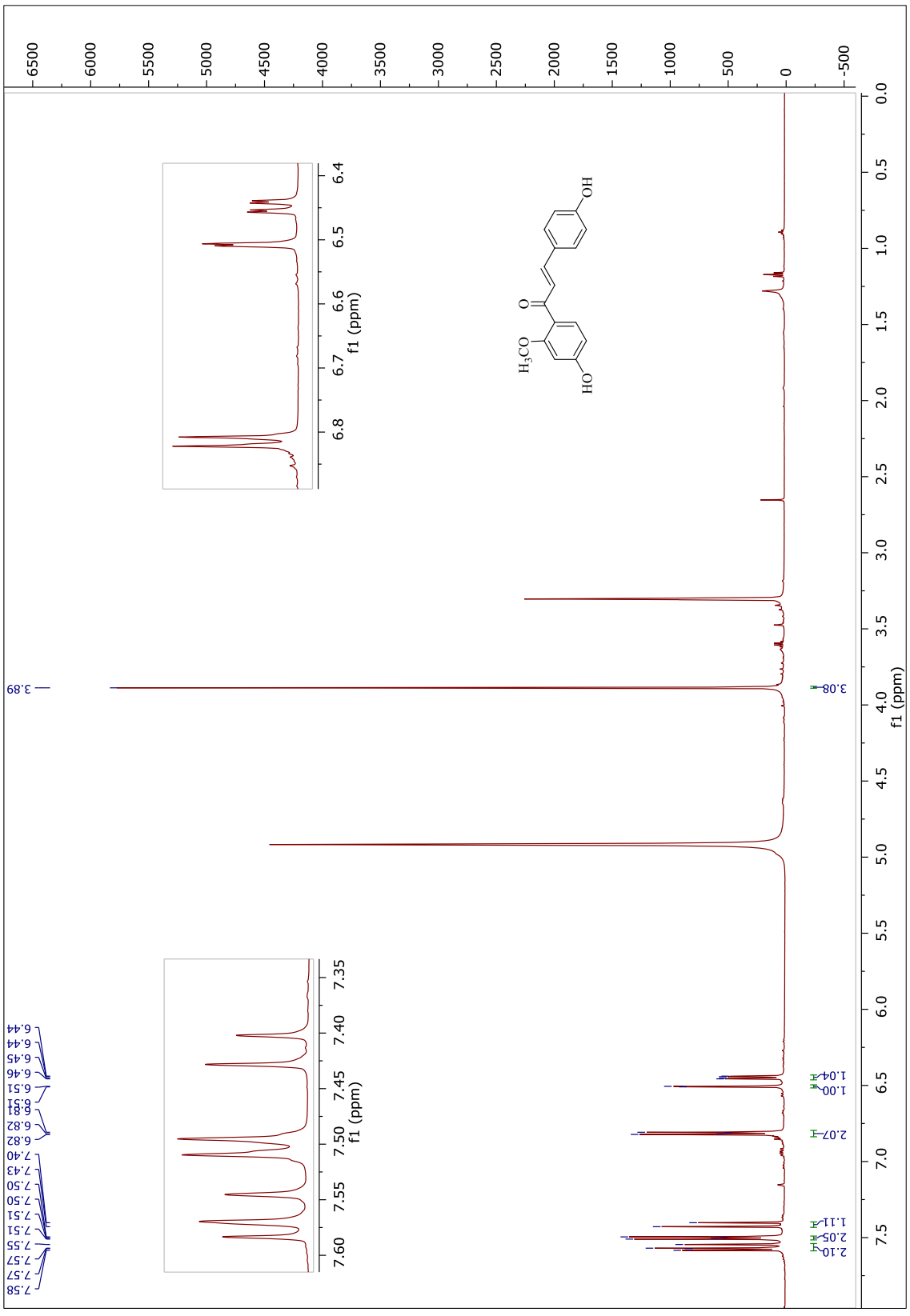
Zhu, J., Zhang, H., Zhu, Z., Zhang, Q., Ma, X., Cui, Z. and Yao, T. 2015. Effects and mechanism of flavonoids from *Astragalus complanatus* on breast cancer growth. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 388 (9), 965-972.

EKLER

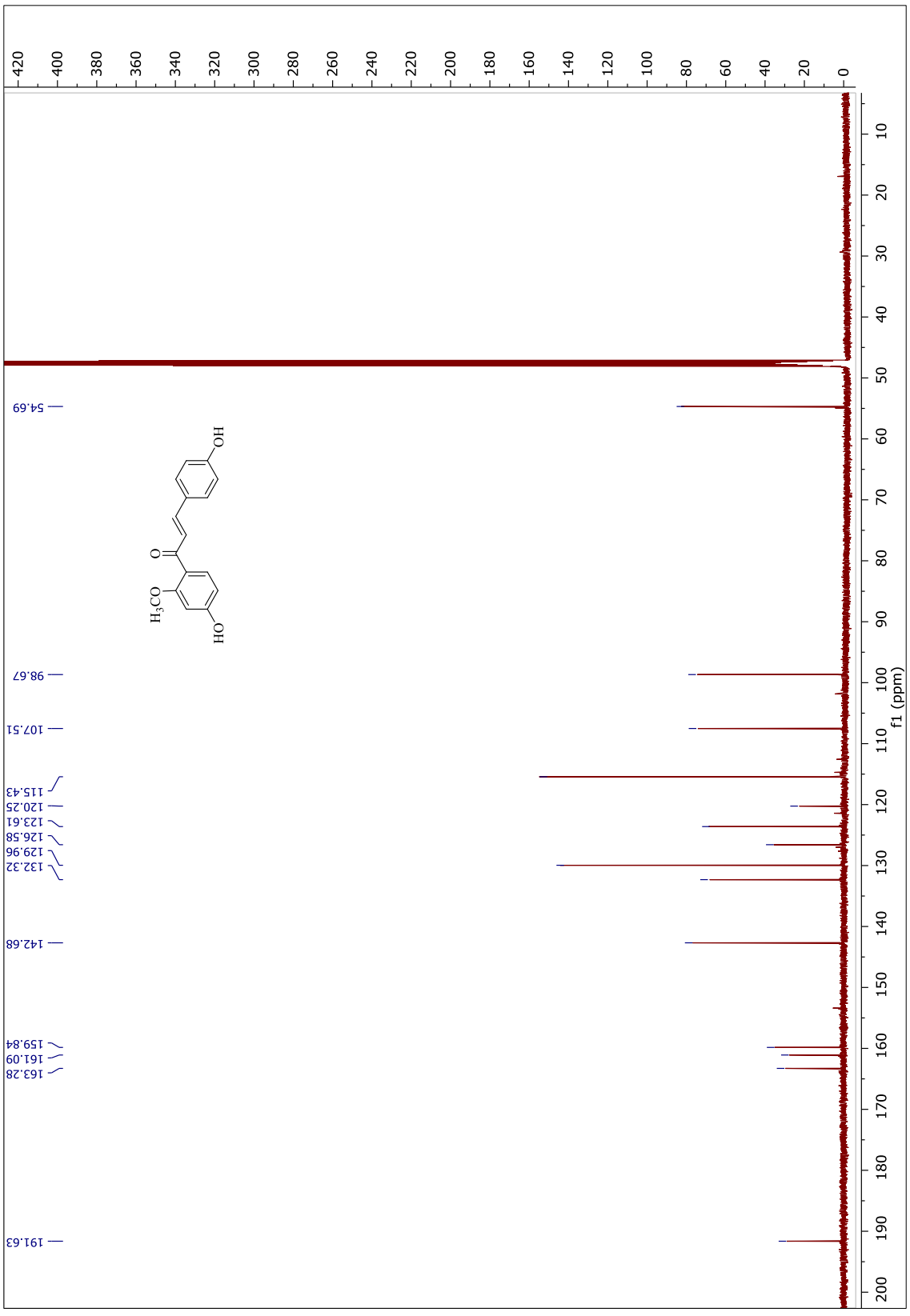
EK 1 B1 bileşiğinin MS-MS spektrumu



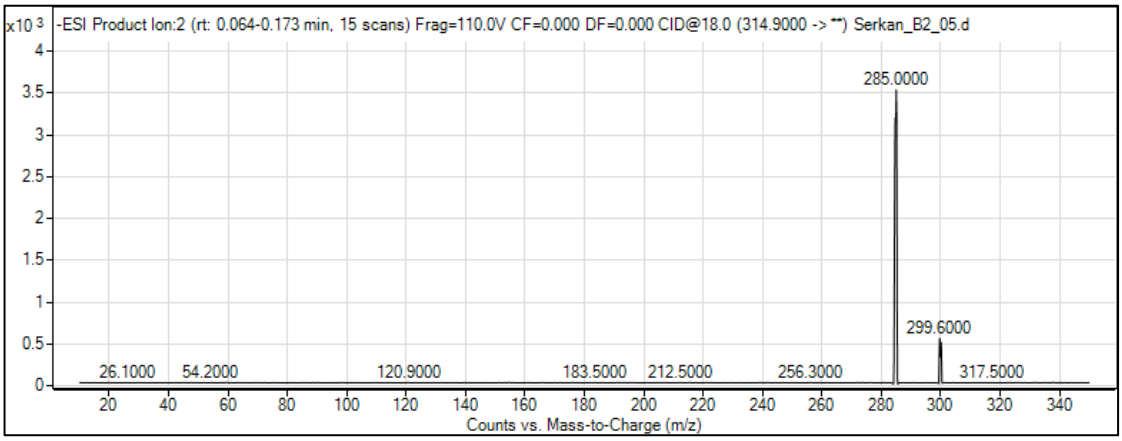
EK 2 B1 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (metanol-d_4)



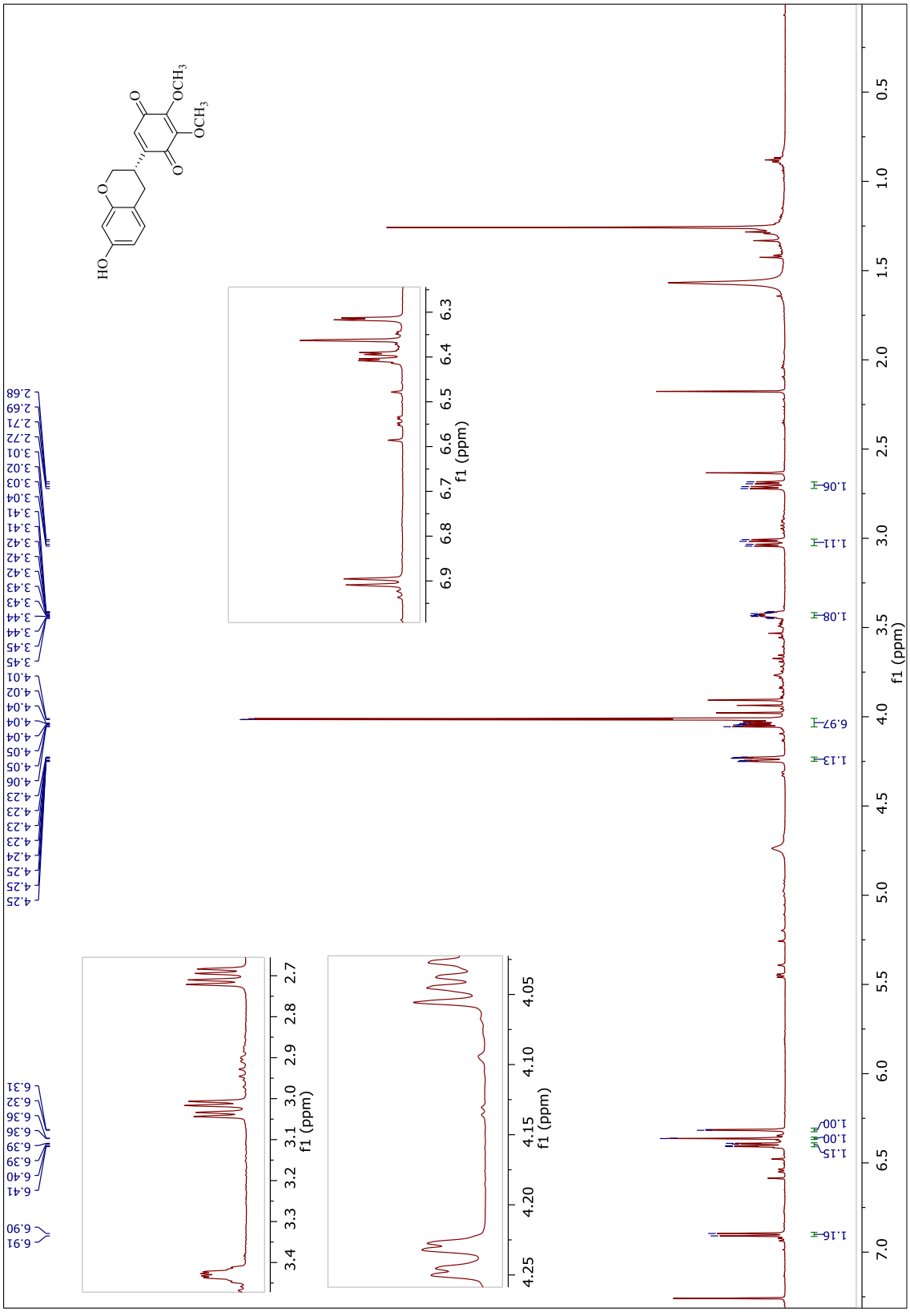
EK 3 B1 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (metanol-d_4)



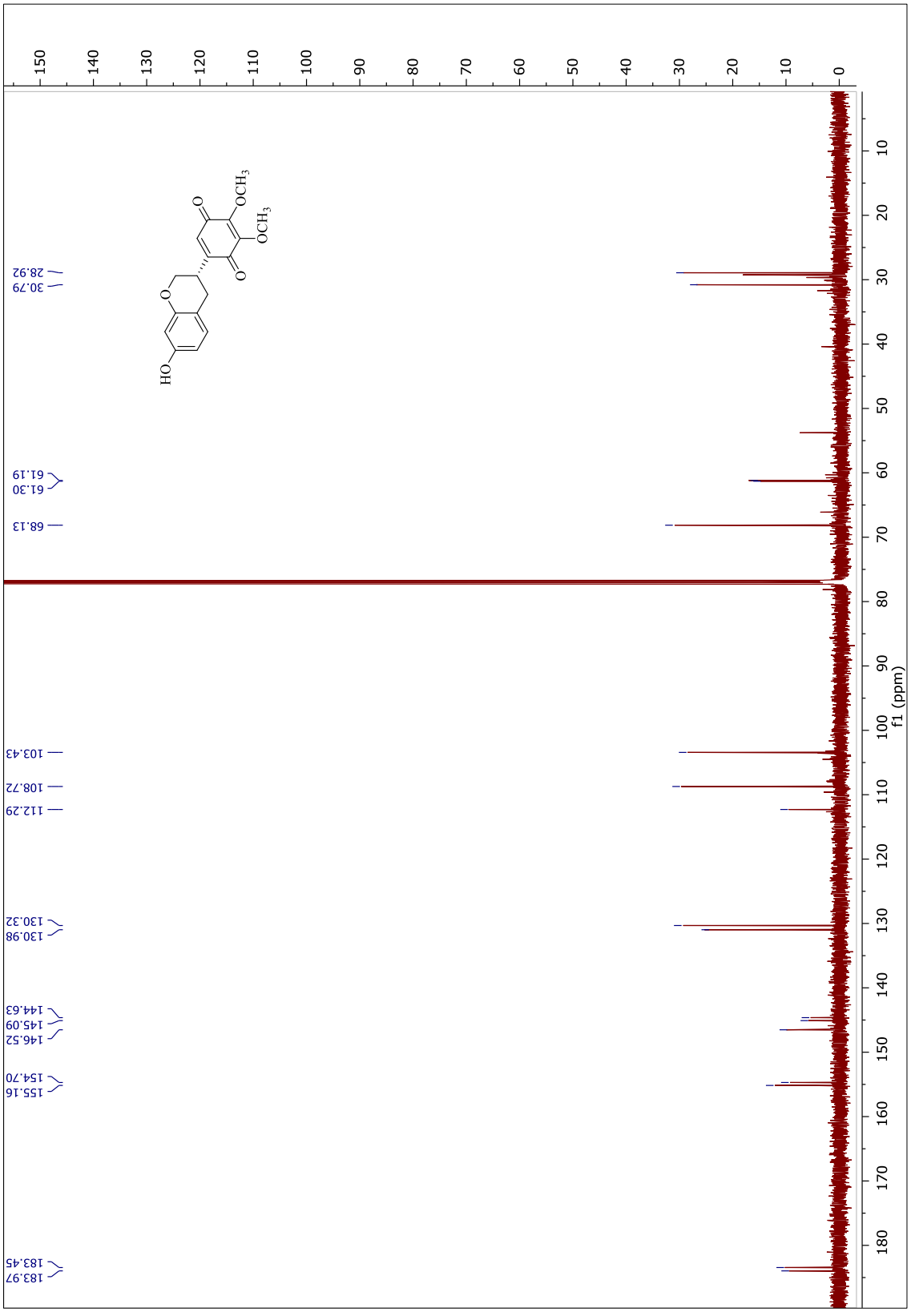
EK 4 B2 bileşiğinin MS-MS spektrumu



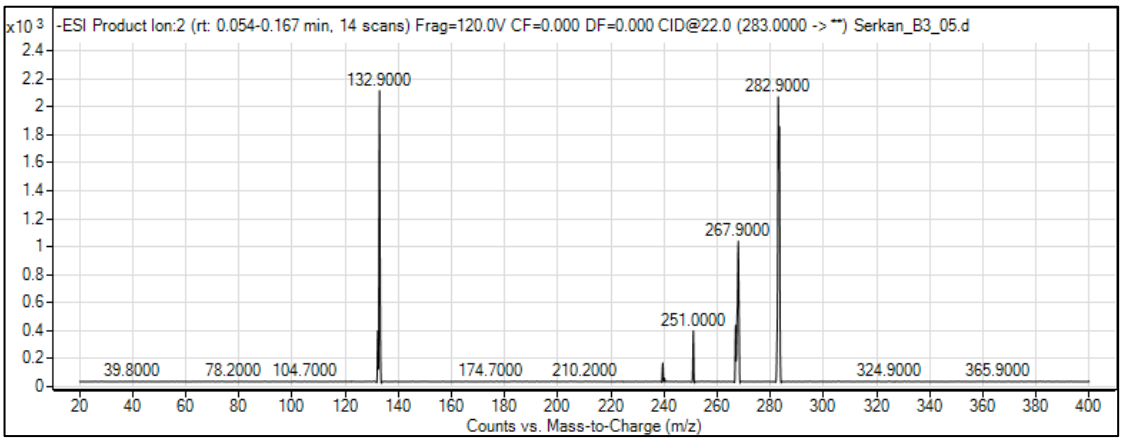
EK 5 B2 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (kloroform-d)



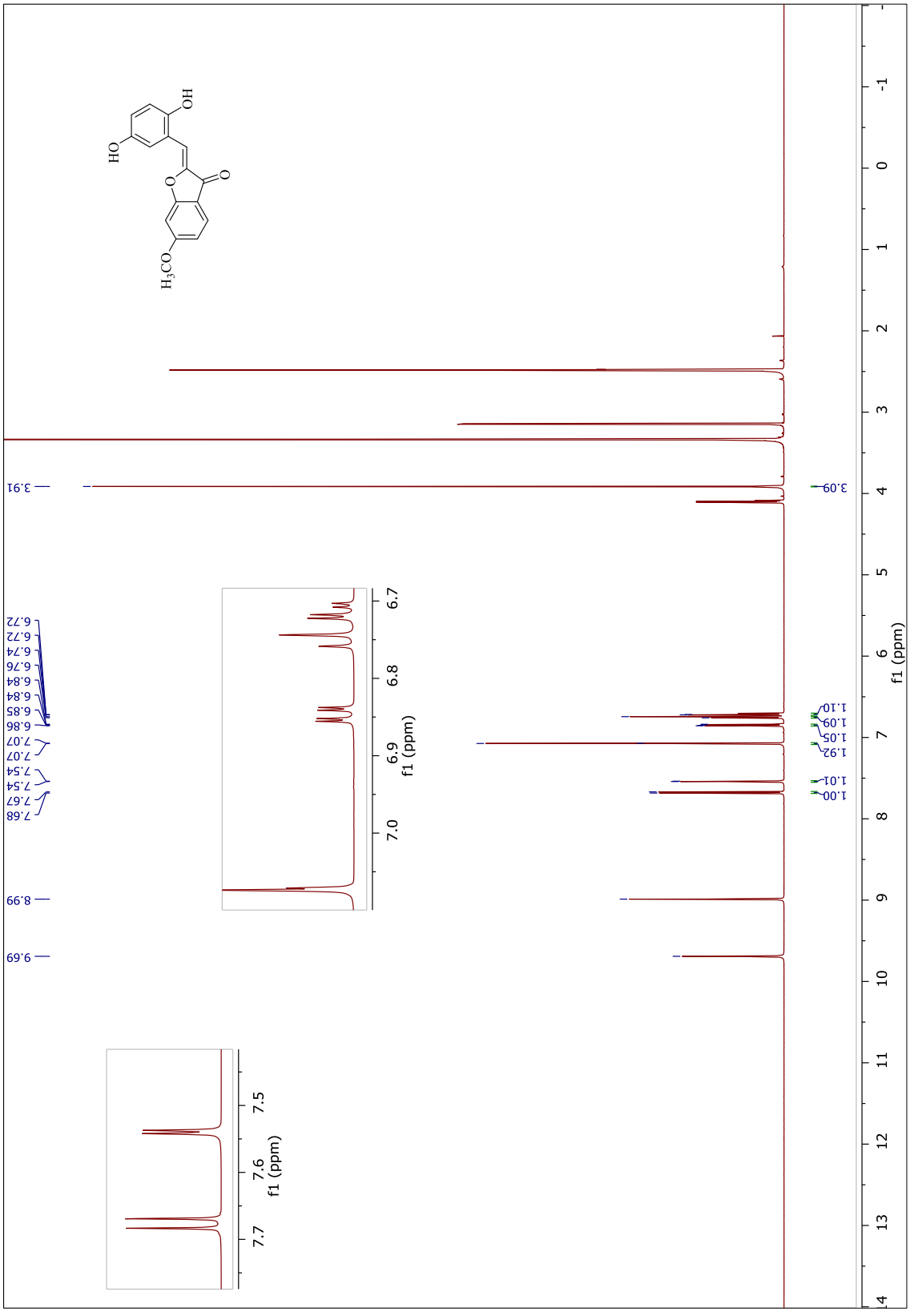
EK 6 B2 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (kloroform-d)



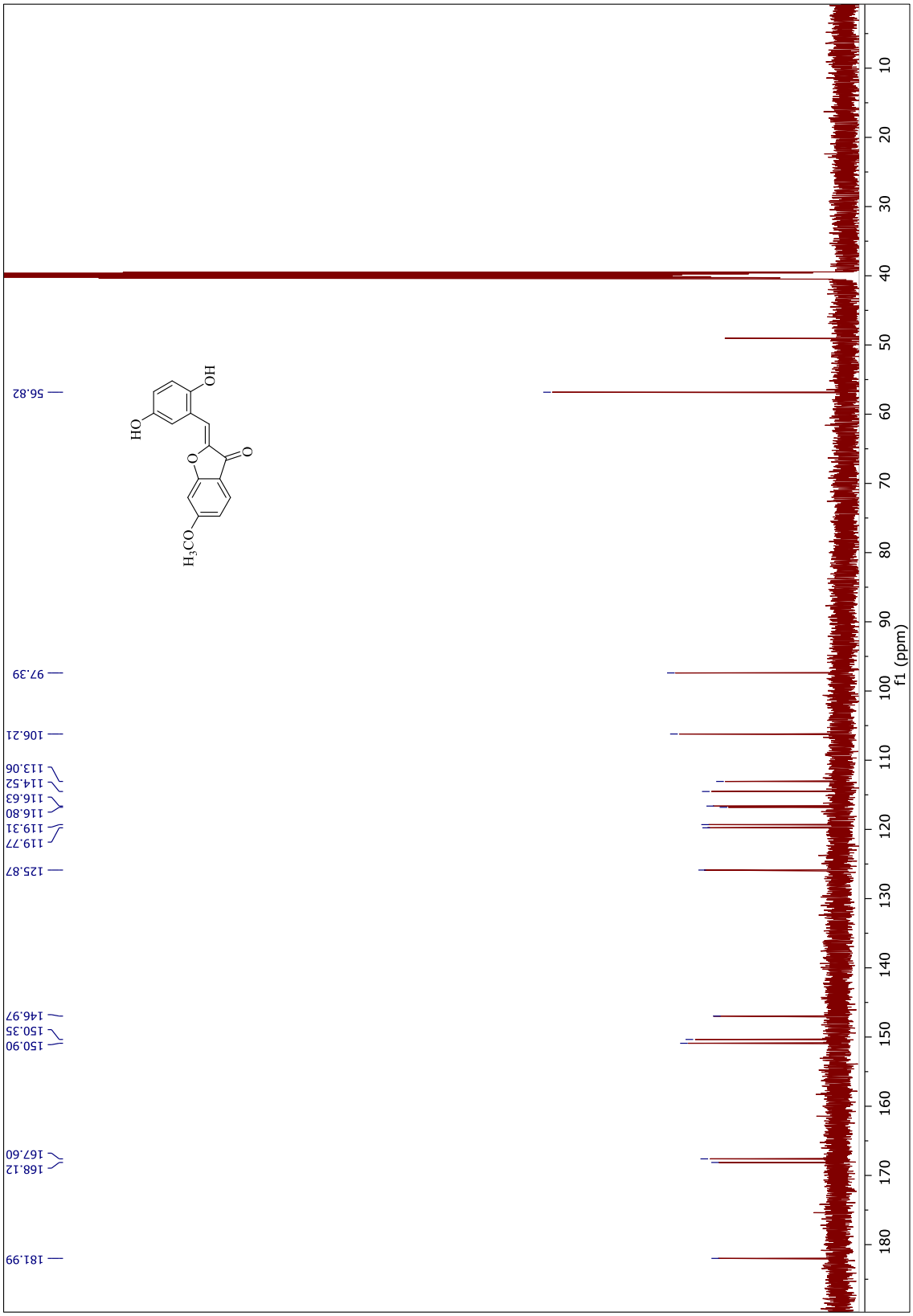
EK 7 B3 bileşiğinin MS-MS spektrumu



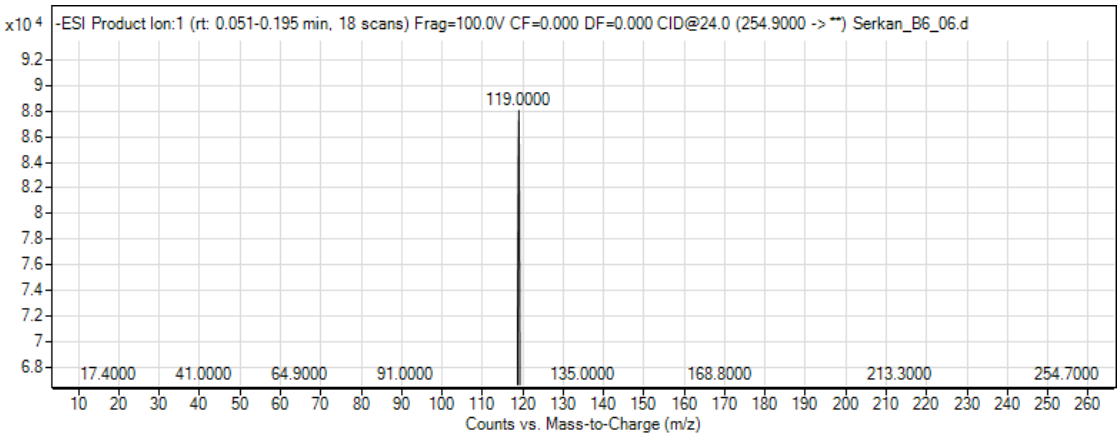
EK 8 B3 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (DMSO-d_6)



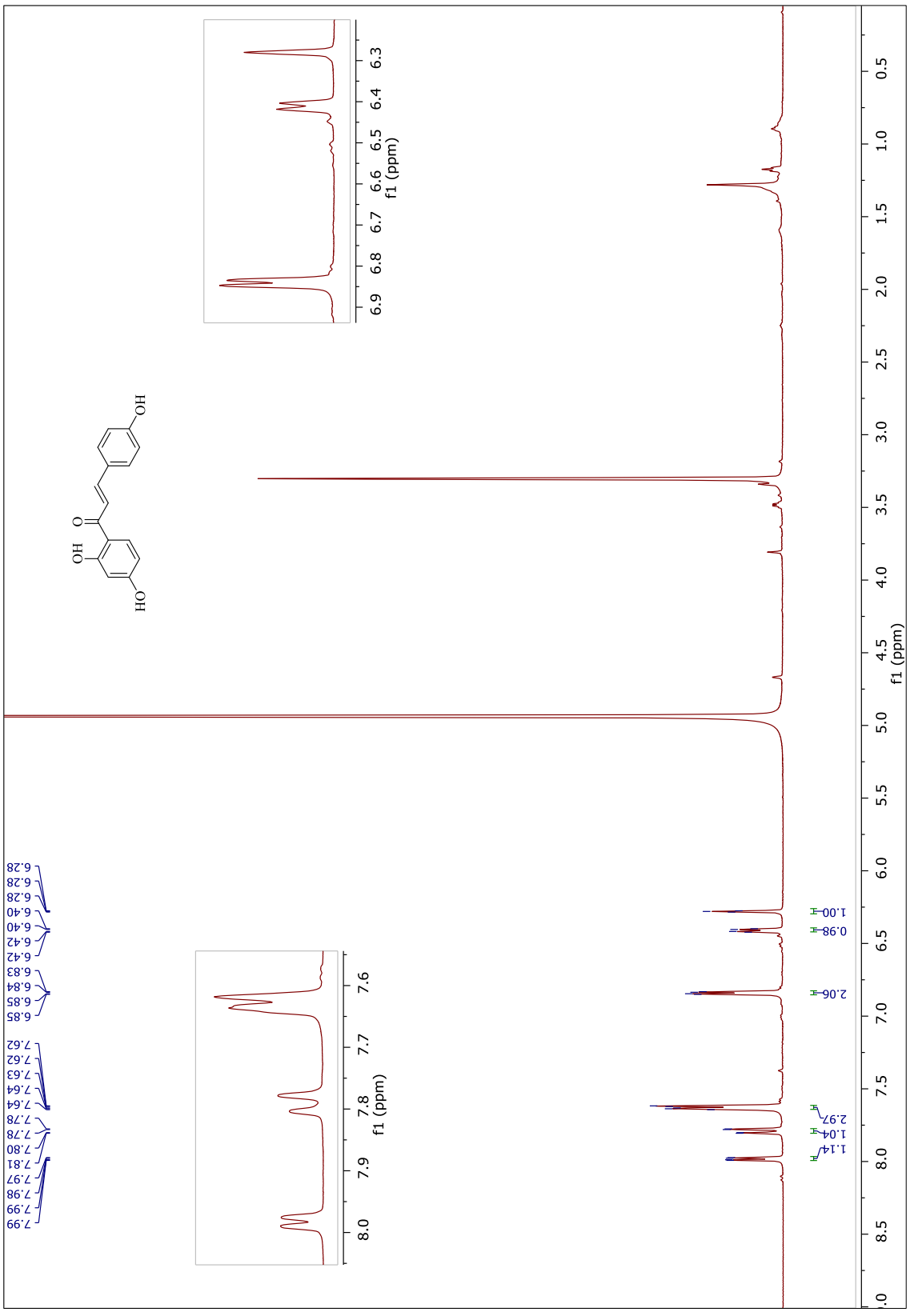
EK 9 B3 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (DMSO-d_6)



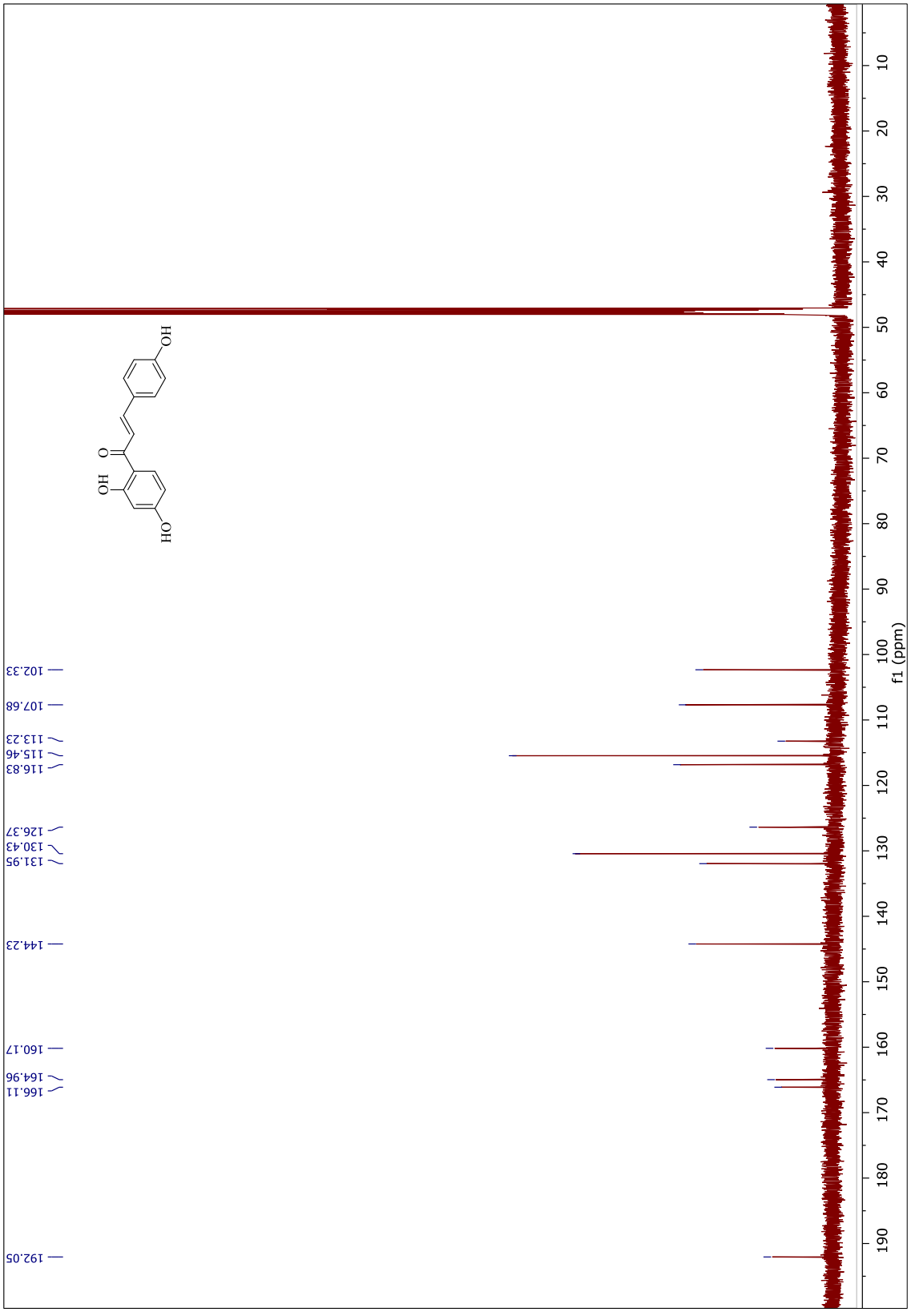
EK 10 B6 bileşiğinin MS-MS spektrumu



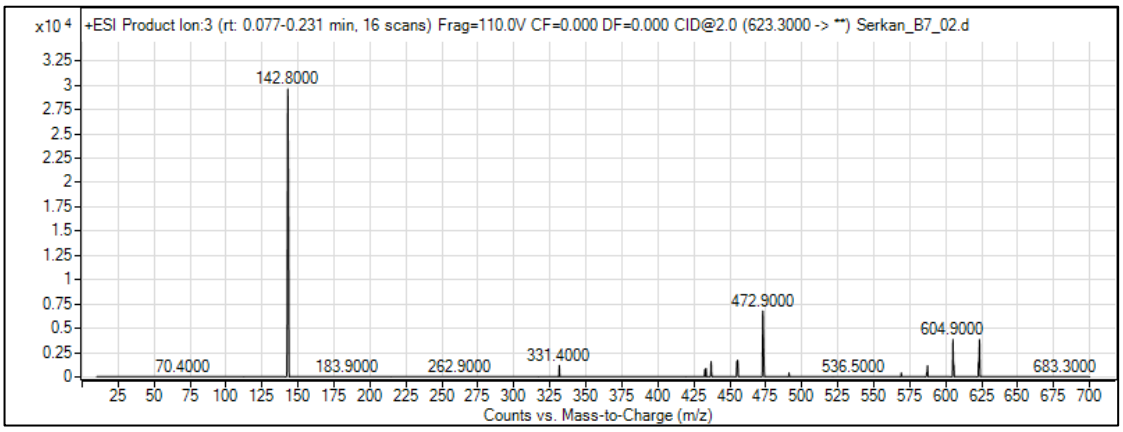
EK 11 B6 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (metanol-d_4)



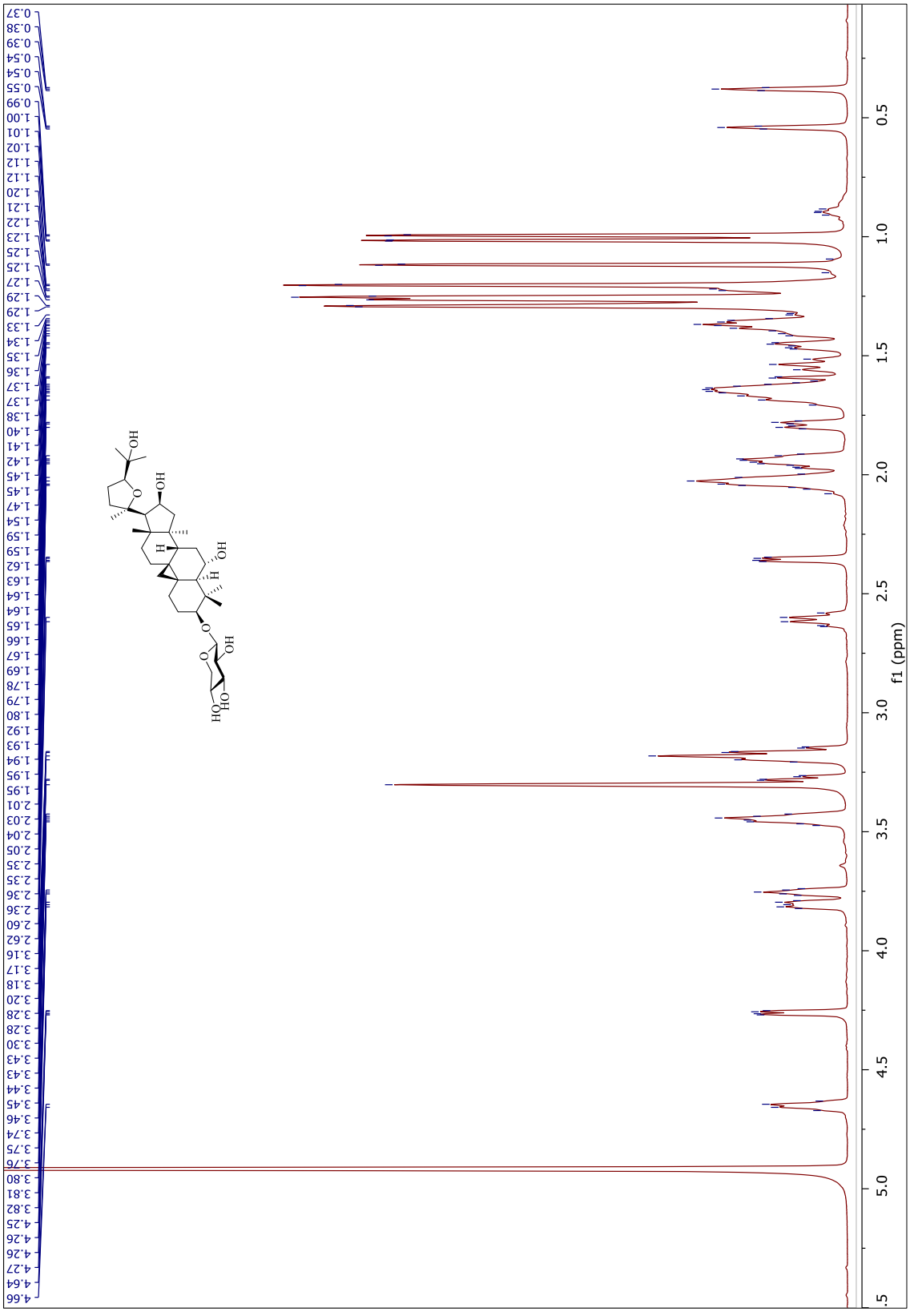
EK 12 B6 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (metanol-d_4)



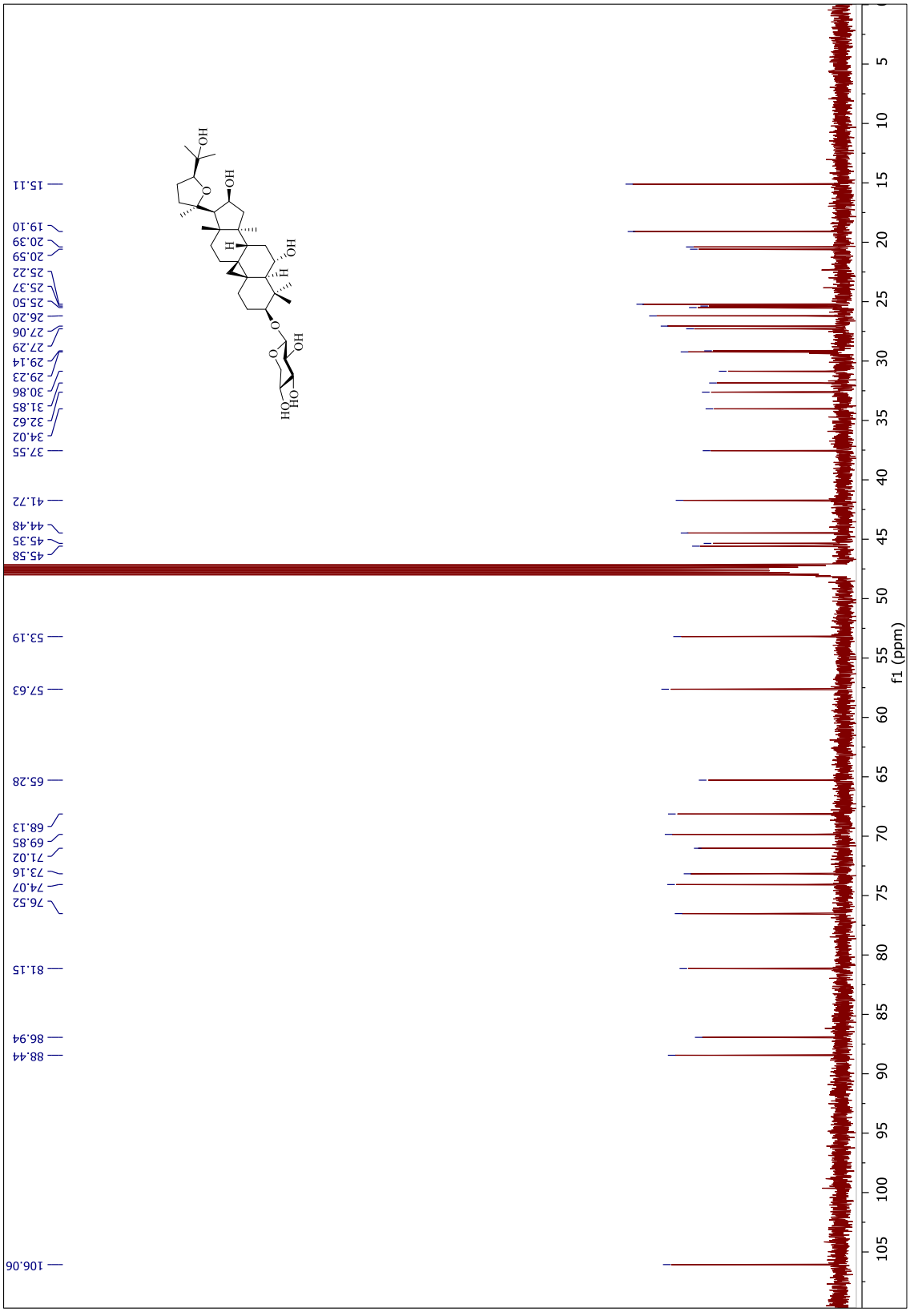
EK 13 B7 bileşiğinin MS-MS spektrumu



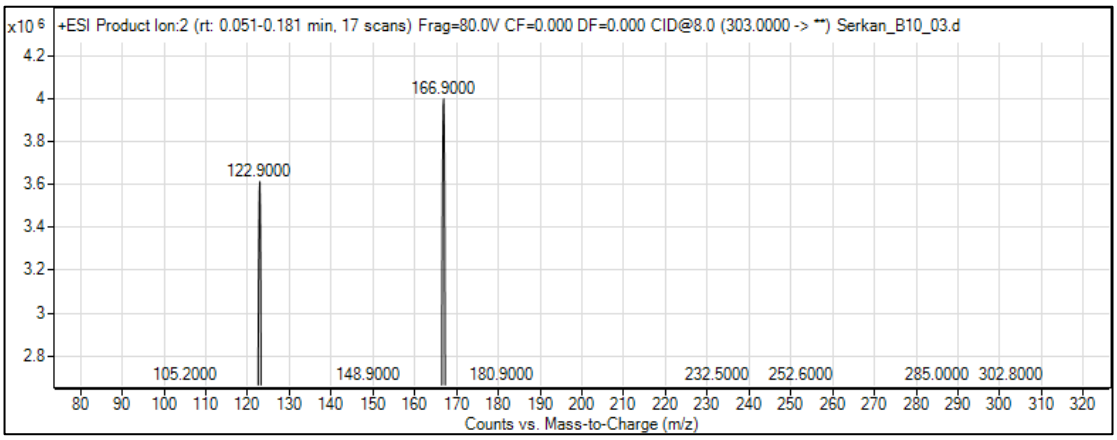
EK 14 B7 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (metanol-d_4)



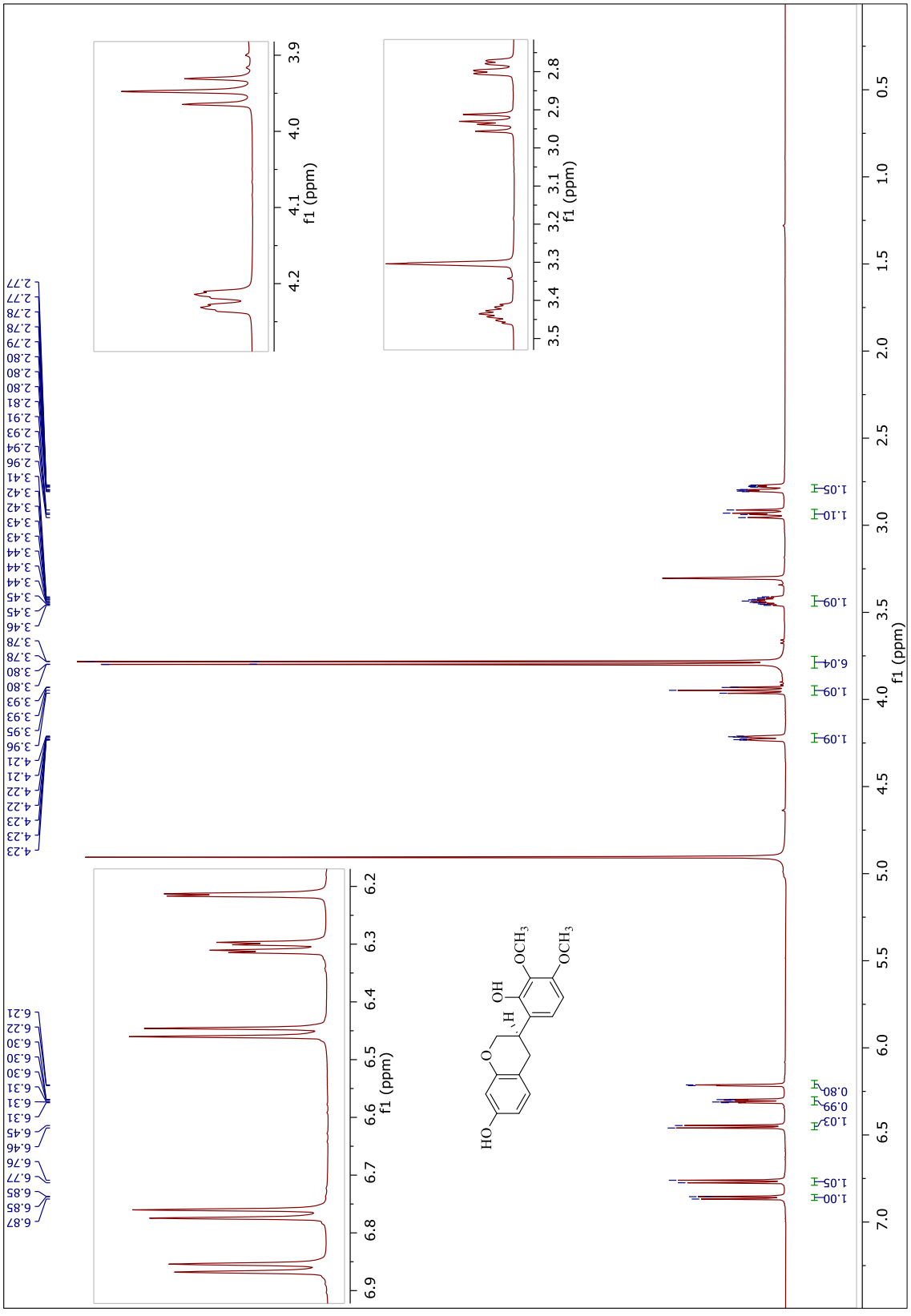
EK 15 B7 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (metanol-d_4)



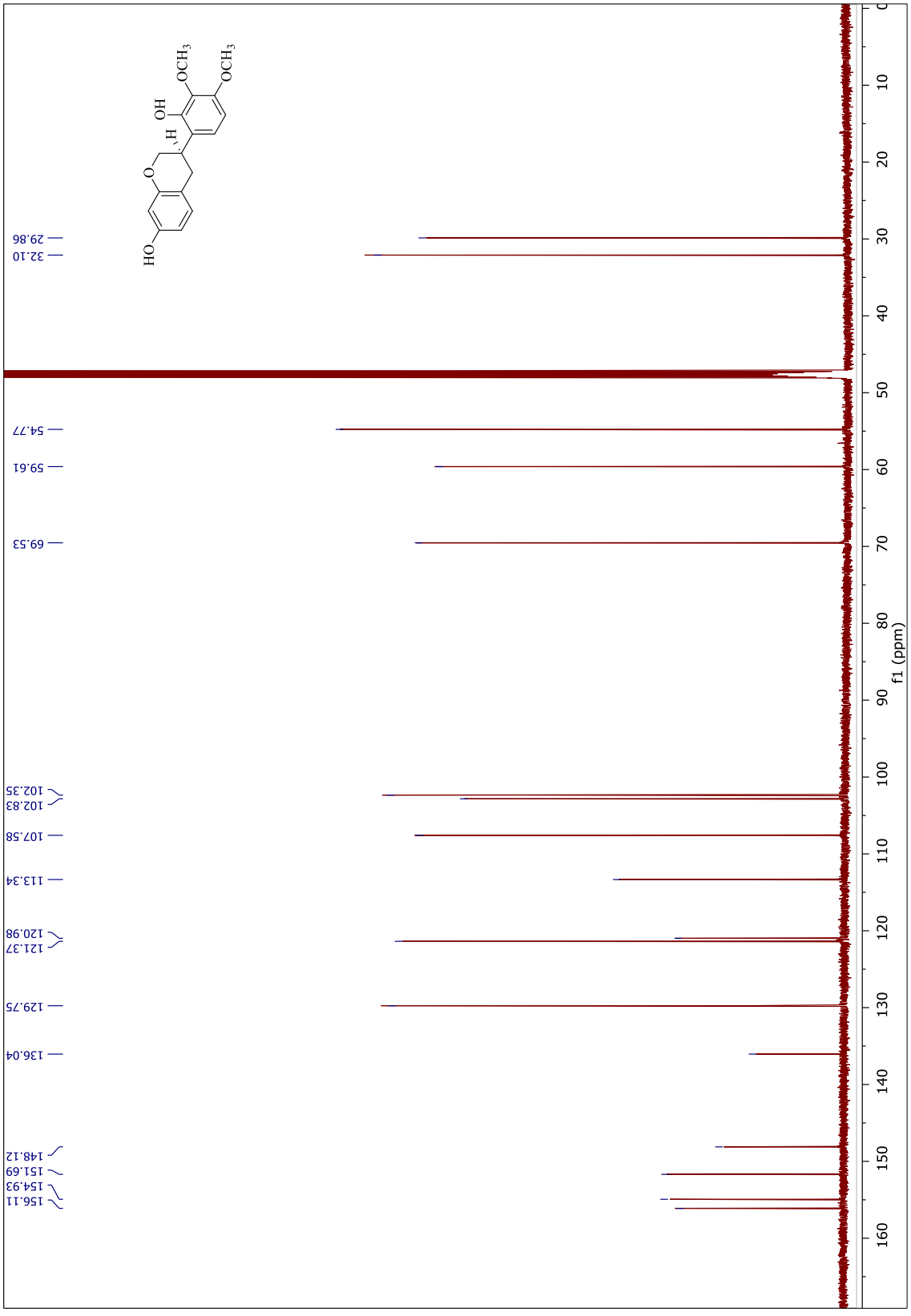
EK 16 B10 bileşiğinin MS-MS spektrumu



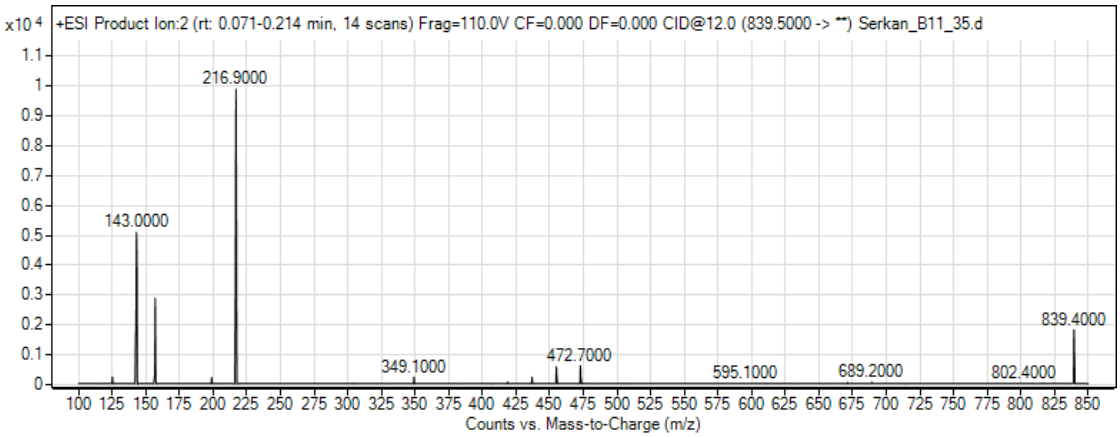
EK 17 B10 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (metanol-d_4)



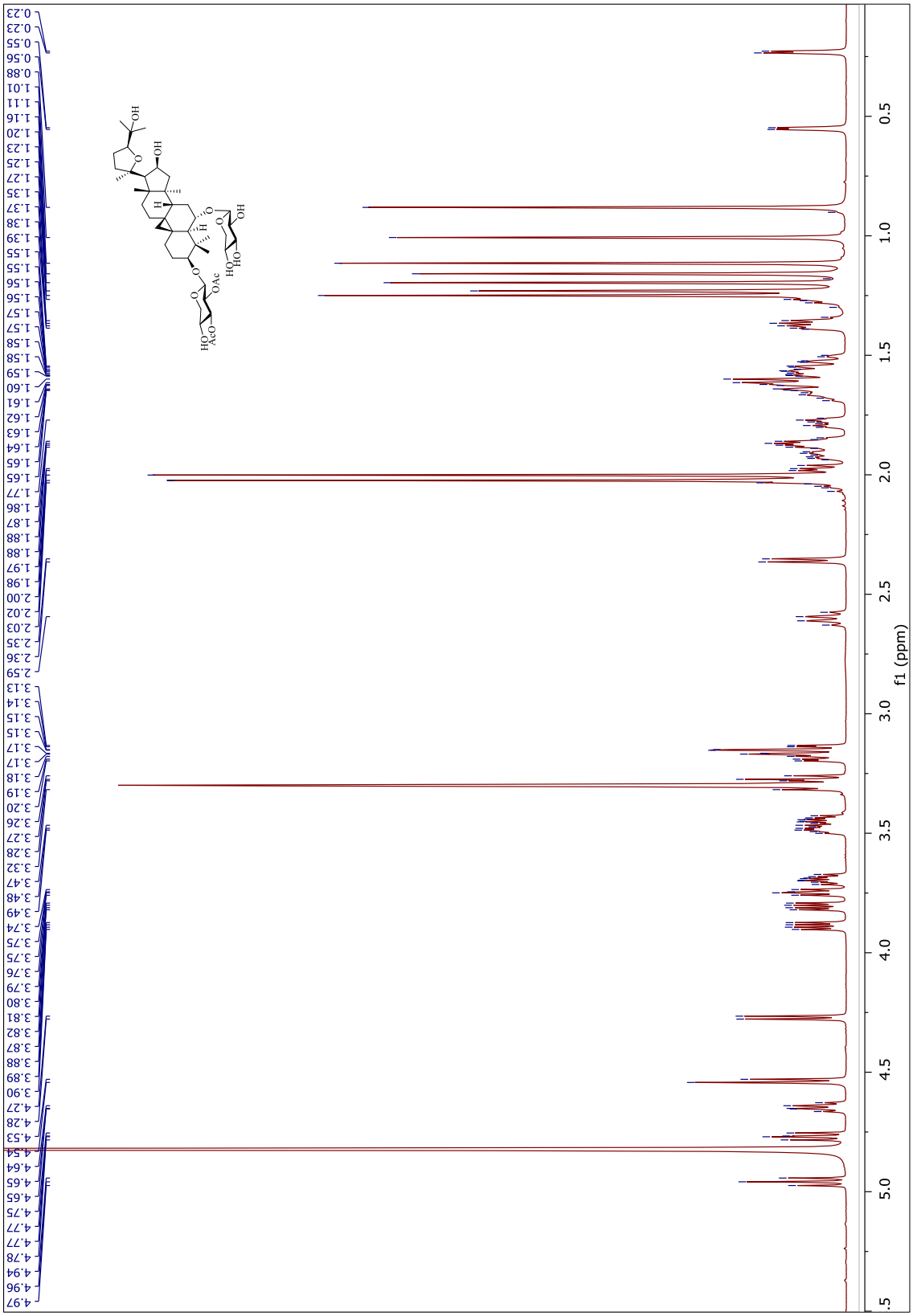
EK 18 B10 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (metanol-d_4)



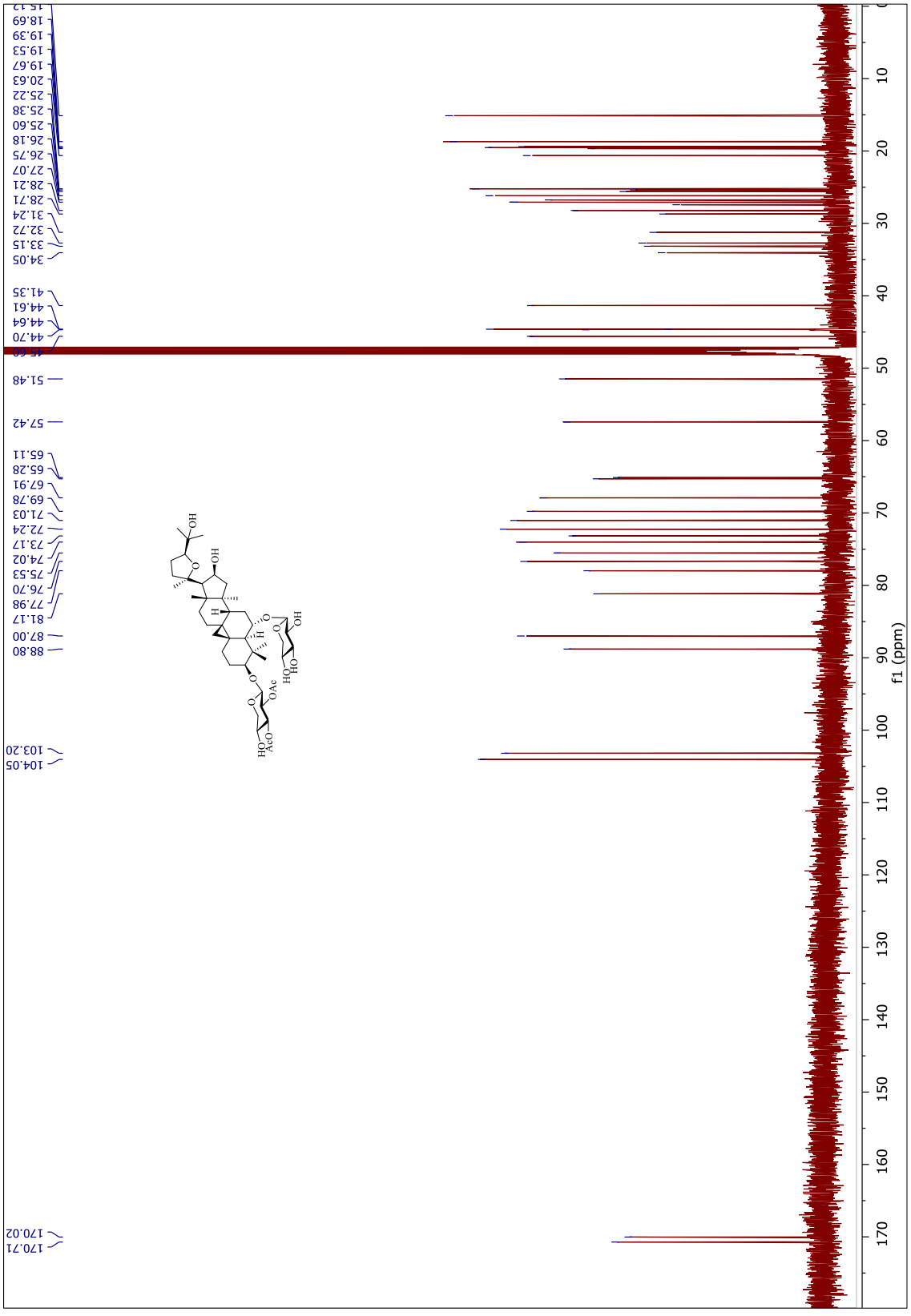
EK 19 B11 bileşiğinin MS-MS spektrumu



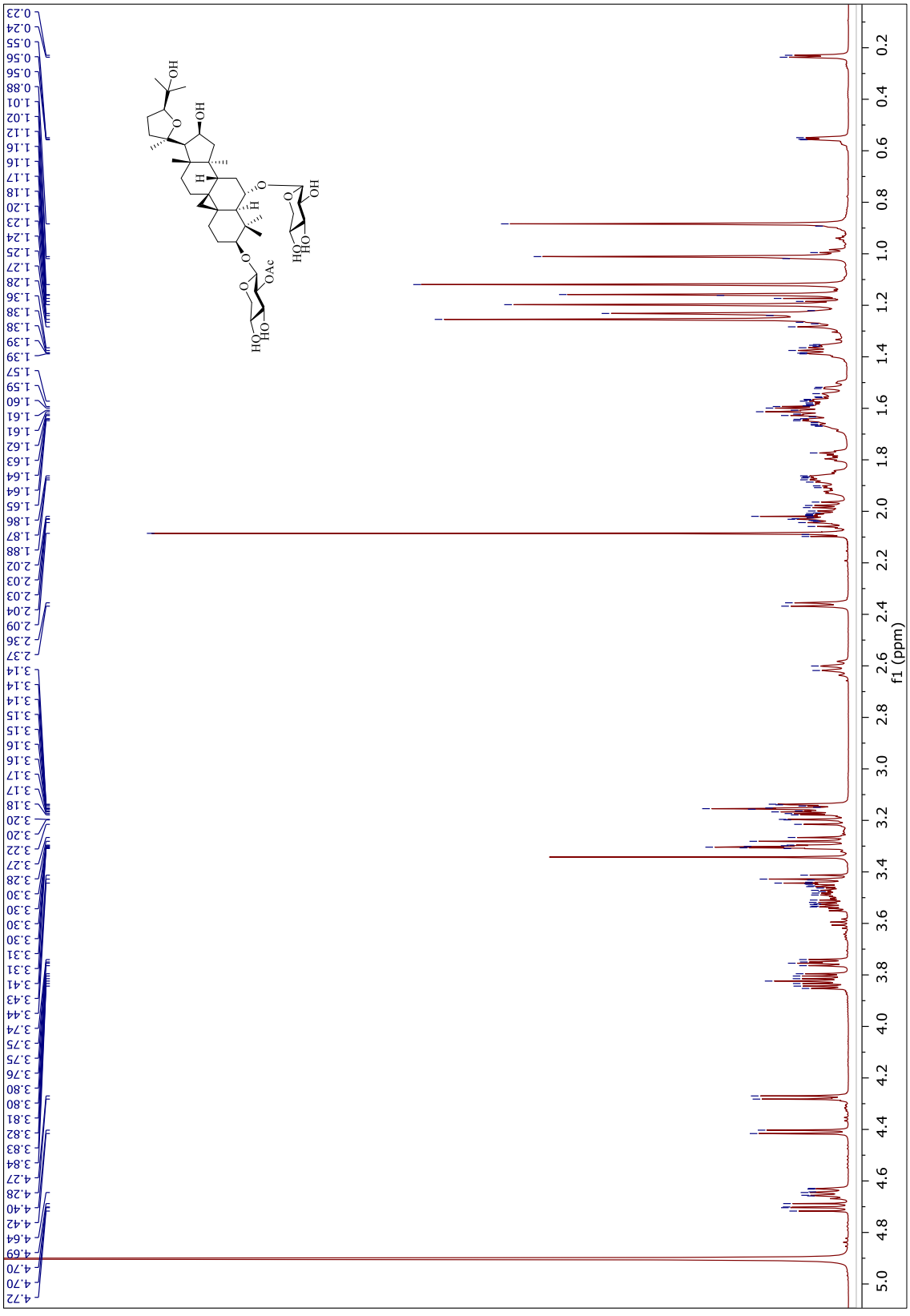
EK 20 B11 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (metanol-d_4)



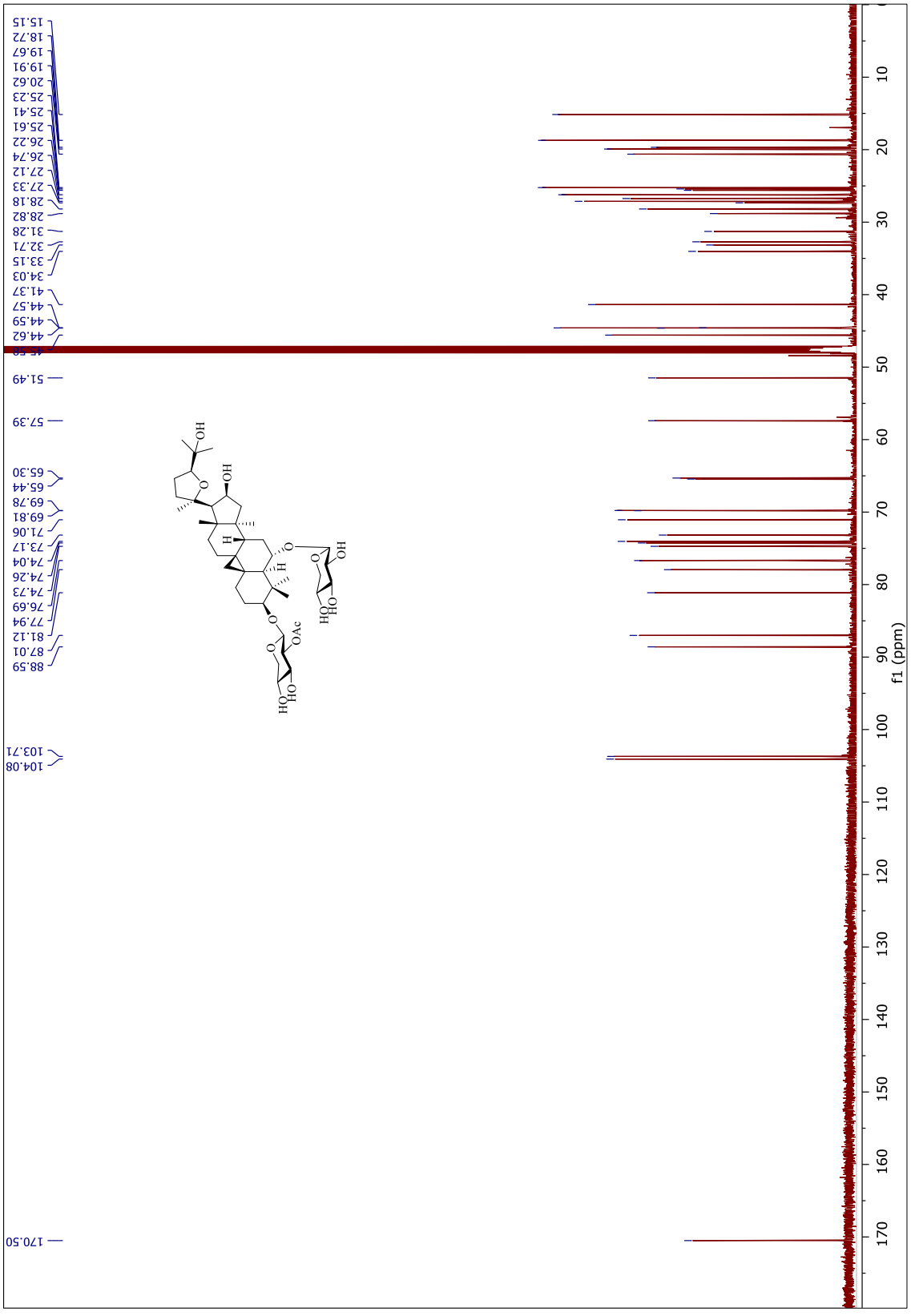
EK 21 B11 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (metanol-d_4)



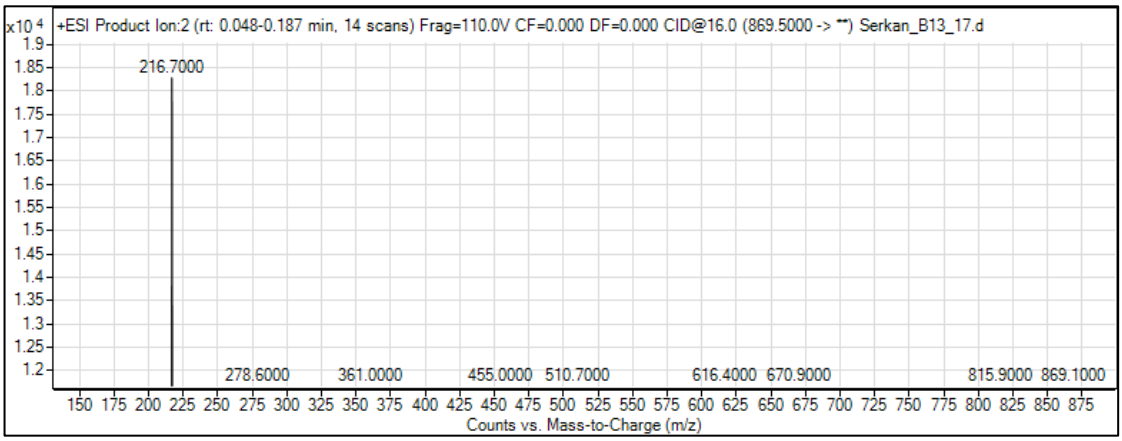
EK 22 B12 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (metanol-d_4)



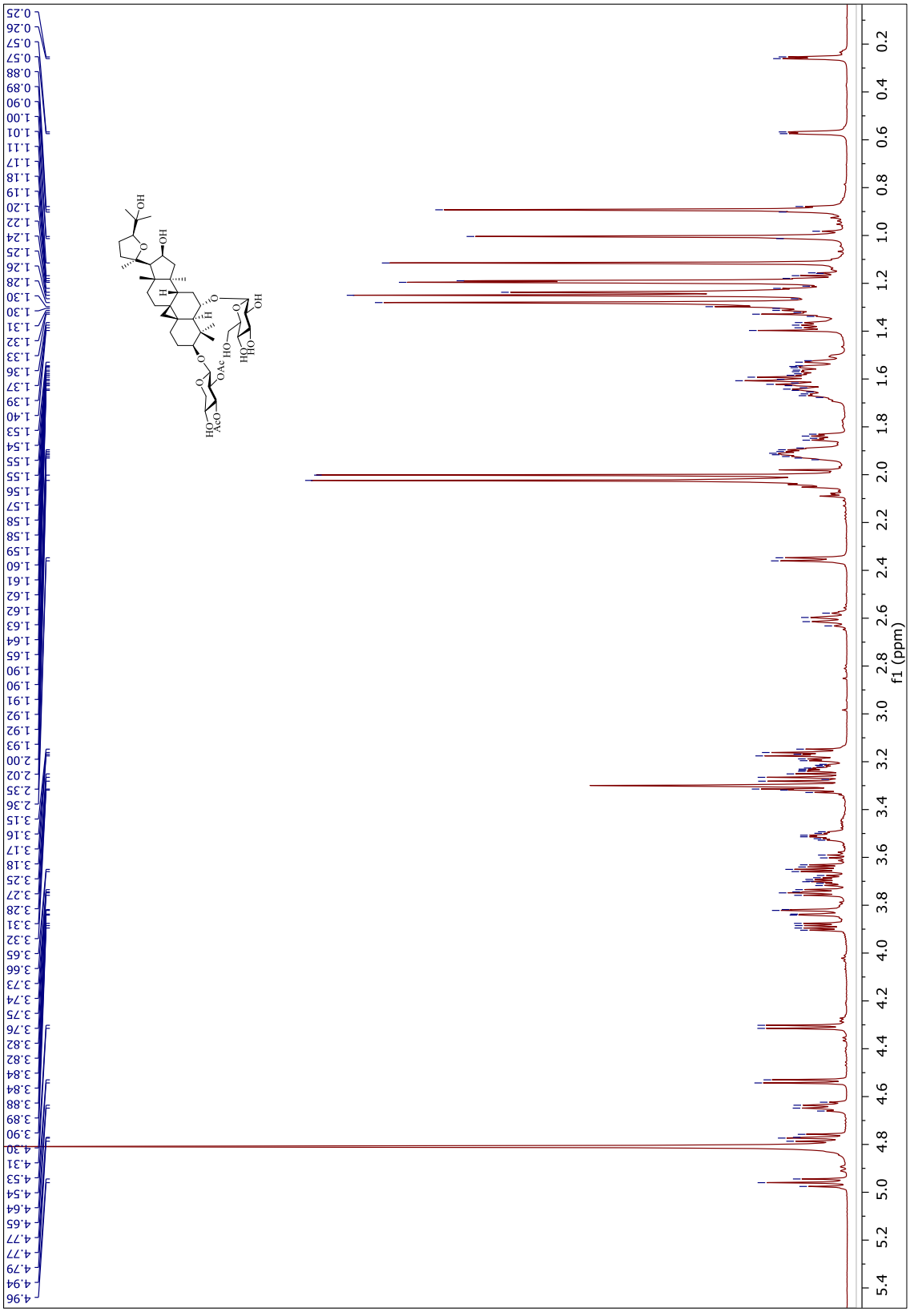
EK 23 B12 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (metanol-d_4)



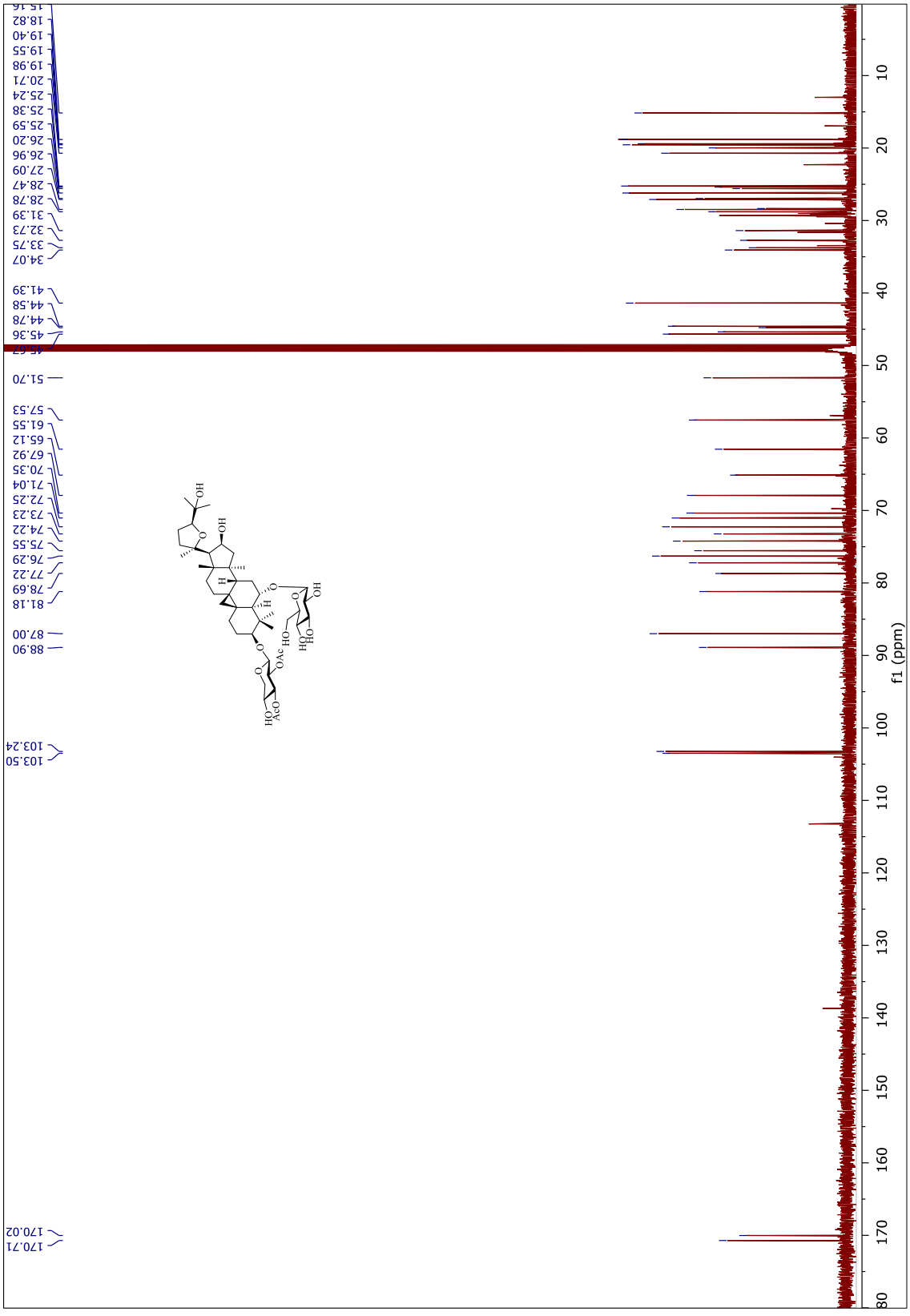
EK 24 B13 bileşiğinin MS-MS spektrumu



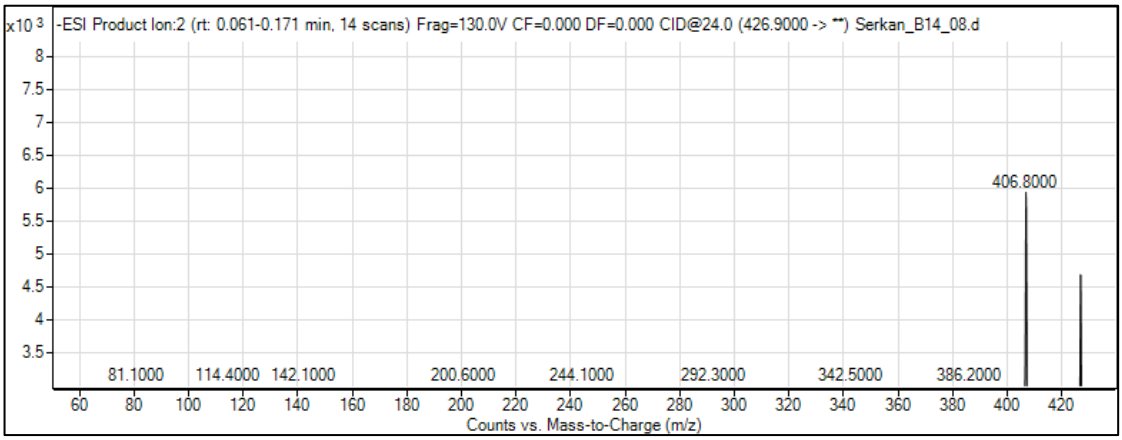
EK 25 B13 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (metanol-d_4)



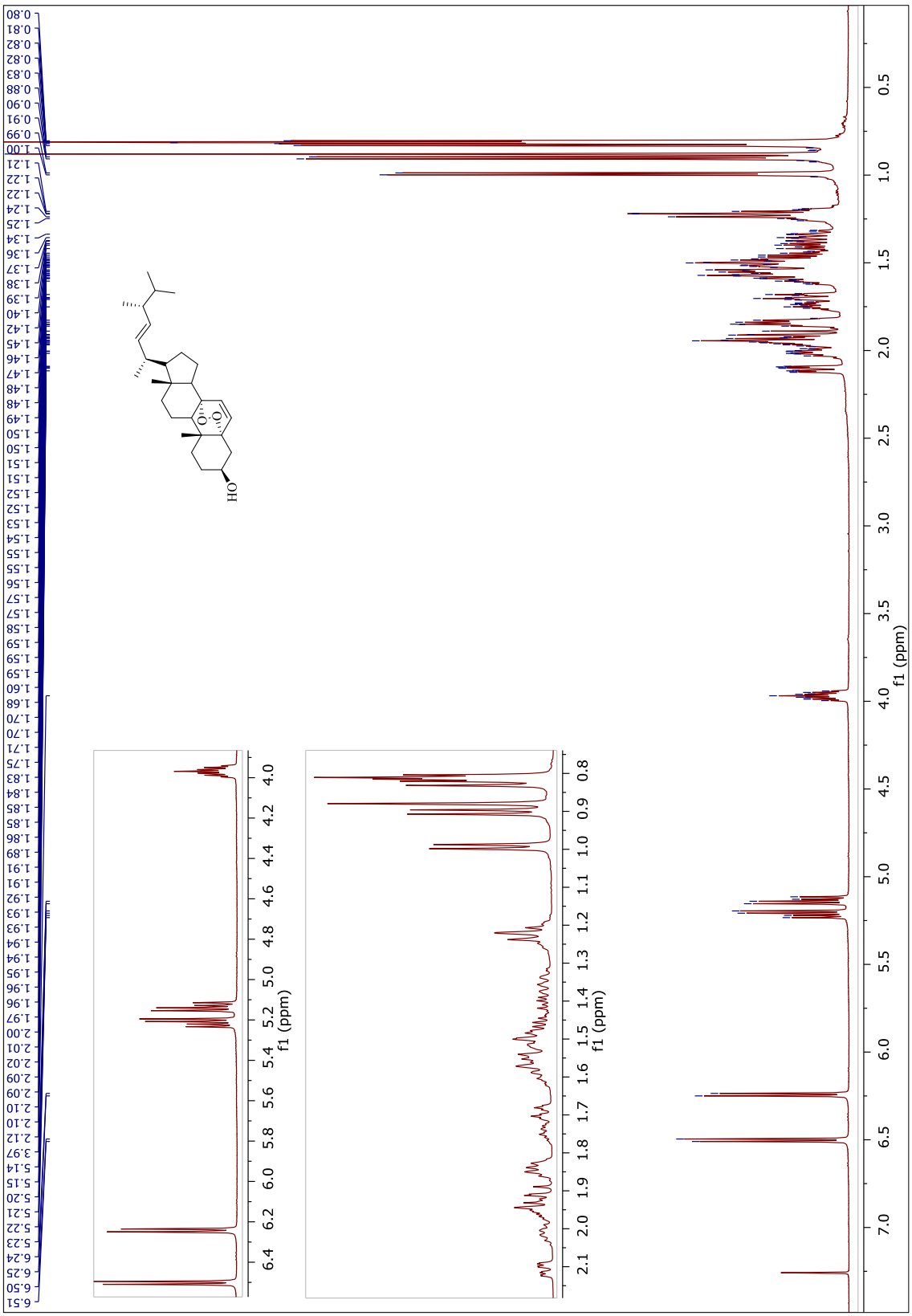
EK 26 B13 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (metanol-d_4)



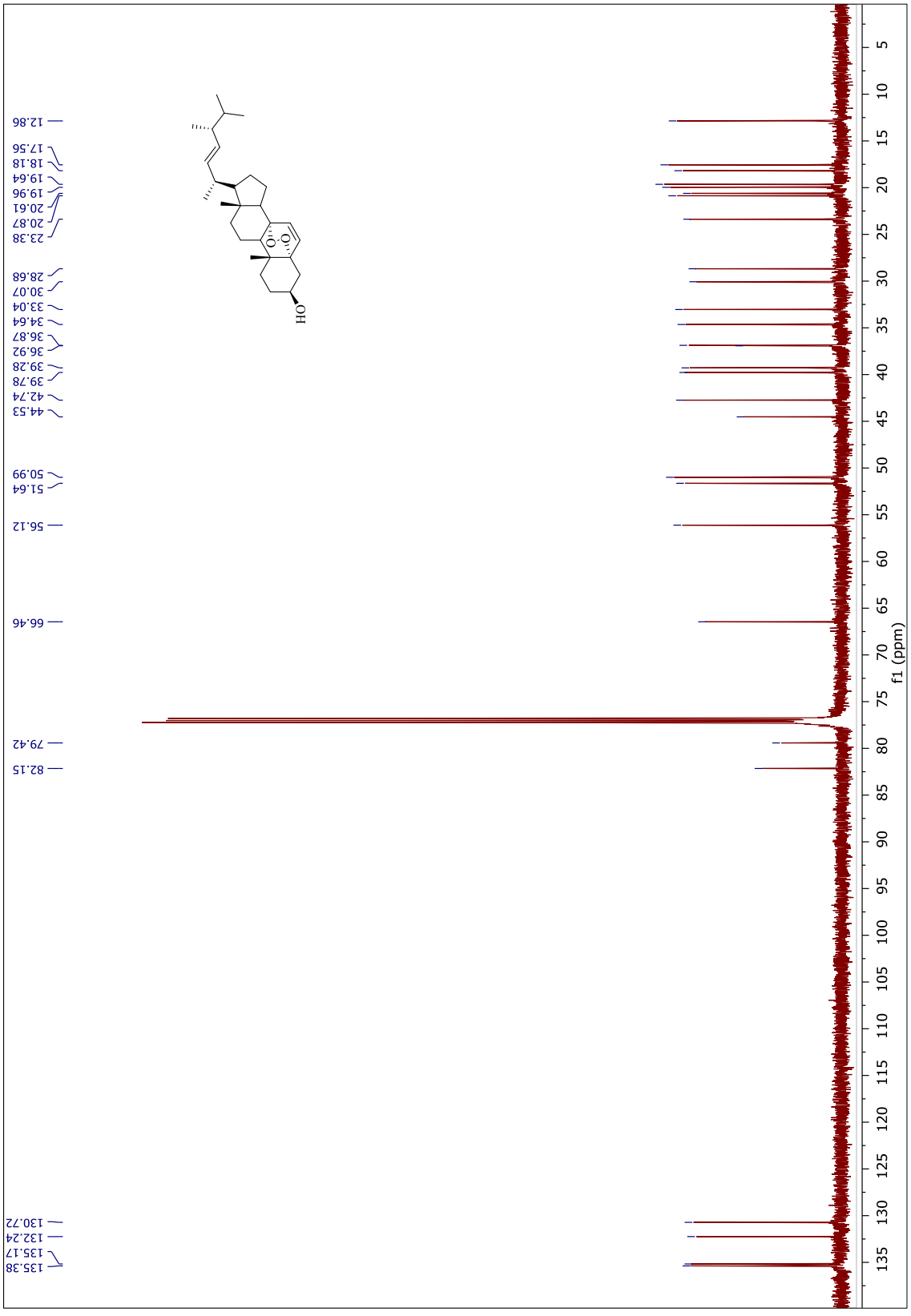
EK 27 B14 bileşiğinin MS-MS spektrumu



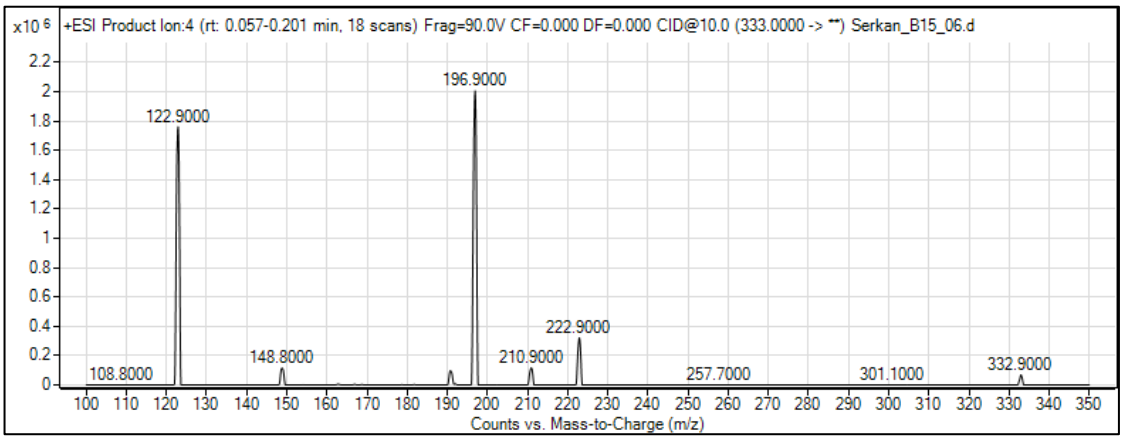
EK 28 B14 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (kloroform-d)



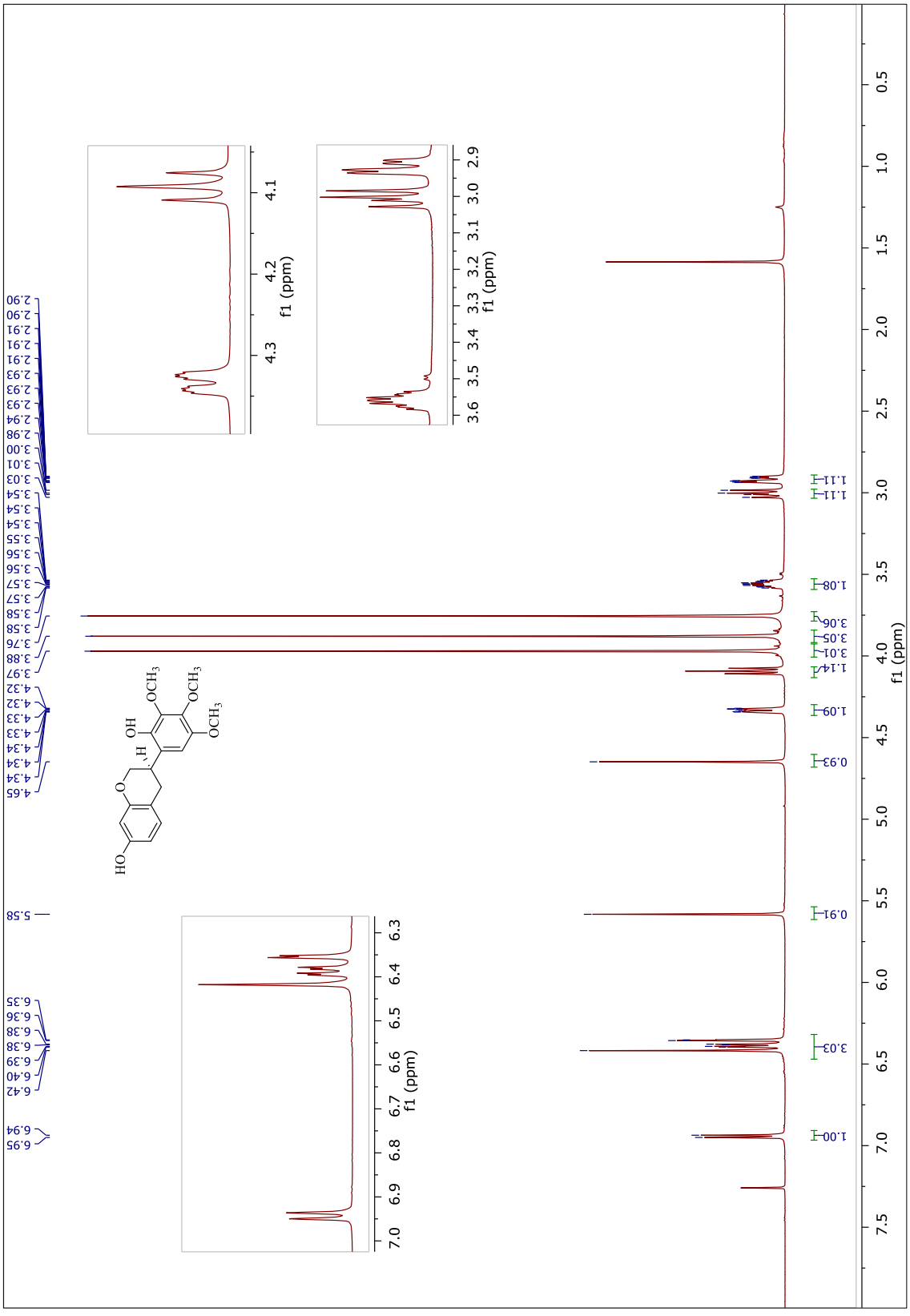
EK 29 B14 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (kloroform-d)



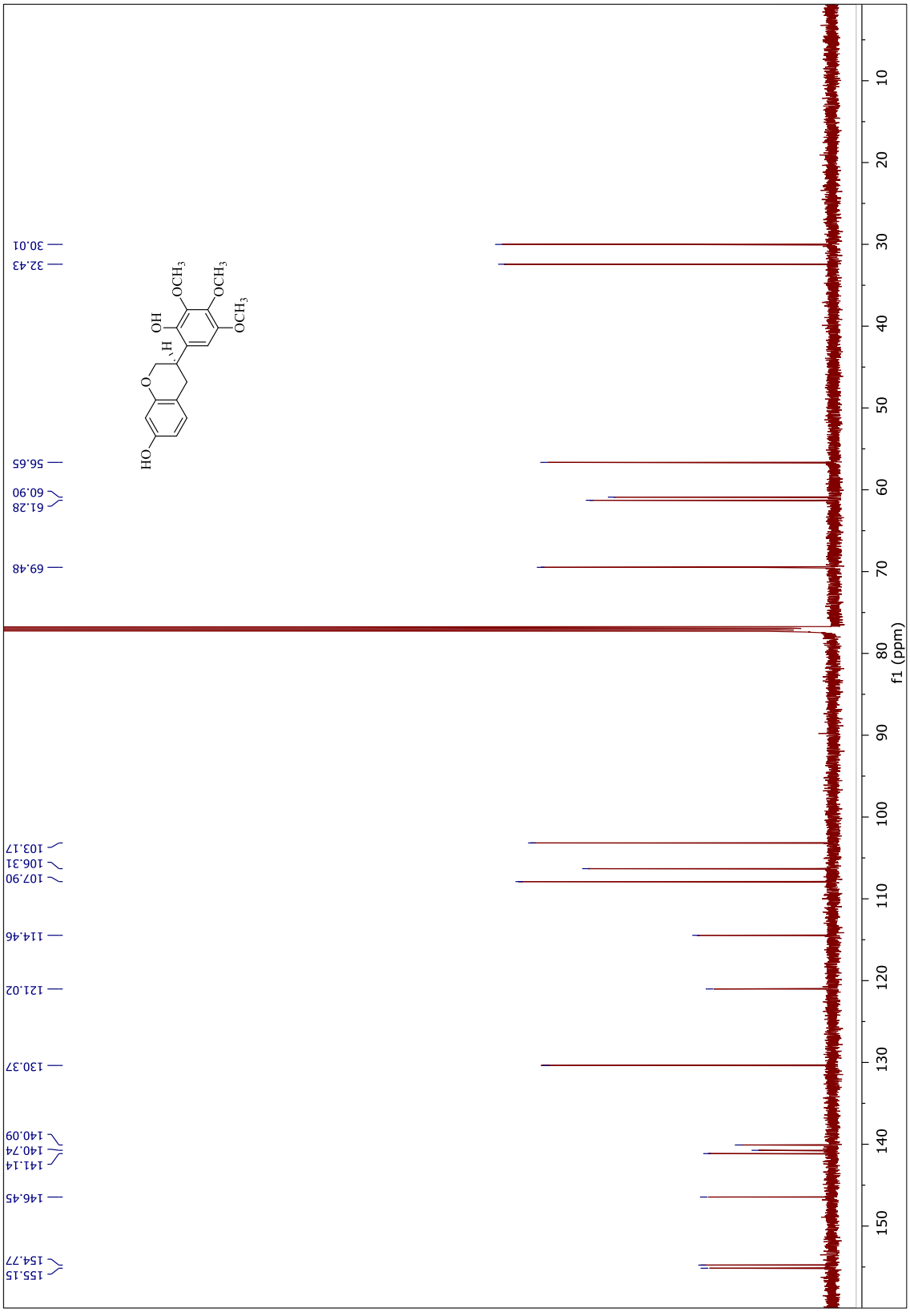
EK 30 B15 bileşiğinin MS-MS spektrumu



EK 31 B15 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (kloroform-d)



EK 32 B15 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (kloroform-d)



EK 33 B15 bileşiğinin Tek Kristal X-Ray analizi verileri

Empirical formula	: $C_{17}H_{18}O_5$	
Formula weight	: 302.31	
Temperature	: 174.01	
Wavelength	: 0.71073 Å	
Crystal system, space group	: Monoclinic, $P2_1$	
Unit cell dimensions	: a = 8.8261(12) Å	alpha = 90 ^{o}
	: b = 8.5520(11) Å	beta = 95.273(4) ^{o}
	: c = 9.7657(13) Å	gamma = 90 ^{o}
Volume	: 731.43(17) A^3	
Z, Calculated density	: 2, 1.373 Mg/m^3	
Absorption coefficient	: 0.101 mm^{-1}	
F(000)	: 320	
Crystal size	: 0.1 x 0.1 x 0.05 mm	
Theta range for data collection	: 5.956 to 56.656 deg.	
Limiting indices	: $-11 \leq h \leq 11$, $-11 \leq k \leq 11$, $-12 \leq l \leq 13$	
Reflections collected / unique	: 11410/ 3638, [R(int) = 0.1023]	
Completeness to theta	: 28.328 99.0 %	
Absorption correction	: Integration	
Refinement method	: Full-matrix least-squares on F^2	
Data / restraints / parameters	: 3638/2/203	
Goodness-of-fit on F^2	: 0.956	
Final R indices [I>2sigma(I)]	: R_1 = 0.0640, wR_2 = 0.1097	
R indices (all data)	: R1 = 0.1602, wR2 = 0.1367	
Largest diff. peak and hole	: 0.22 and -0.28 $e.A^{-3}$	

EK 34 B15 bileşiğindeki molekül içi ve moleküller arası H bağı etkileşimleri

Hidrojen bağı etkileşimleri (Å)	
O(3)-H(3)-----O(2)	2.259 (molekül içi)
O(5)-H(5)-----O(1)	2.000 (moleküller arası-)

EK 35 B8 bileşiğinin Tek Kristal X-Ray analizi verileri

Empirical formula	: $C_{17}H_{16}O_5$
Formula weight	: 300.30
Temperature	: 273.15
Wavelength	: 0.71073 Å
Crystal system, space group	: Orthorhombic, $P2_12_12_1$
Unit cell dimensions	: a = 5.3442(2) Å alpha =90^o
	: b = 8.6235(4) Å beta = 90^o
	: c = 32.7470(15) Å gamma = 90^o
Volume	: 1509.17(11) A^3
Z, Calculated density	: 4, 1.322 Mg/m^3
Absorption coefficient	: 0.098 mm^{-1}
F(000)	: 632
Crystal size	: 0.4 x 0.3 x 0.2 mm
Theta range for data collection	: 6.02 to 56.69 deg.
Limiting indices	: $-7 \leq h \leq 6$, $-11 \leq k \leq 11$, $-43 \leq l \leq 43$
Reflections collected / unique	: 27622/ 3750, [R(int) = 0.0273]
Completeness to theta	: 28.345 99.0 %
Absorption correction	: Integration
Refinement method	: Full-matrix least-squares on F^2
Data / restraints / parameters	: 3750/0/203
Goodness-of-fit on F^2	: 1.025
Final R indices [I>2sigma(I)]	: R_1 = 0.0449, wR_2 = 0.1146
R indices (all data)	: R1 = 0.0565, wR2 = 0.1240
Largest diff. peak and hole	: 0.12 and -0.22 $e.A^{-3}$

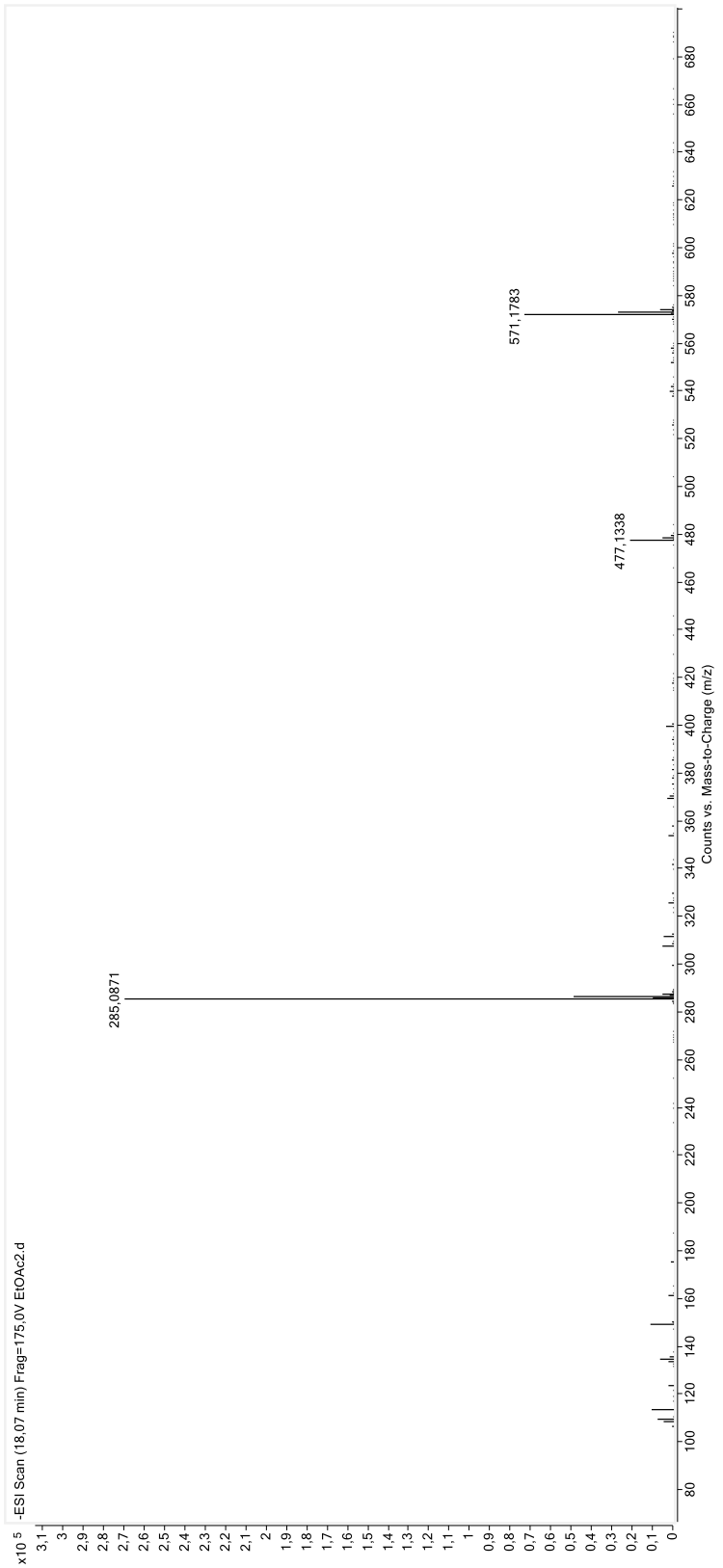
EK 36 B8 bileşiğinin bazı bağ uzunlukları ve bağ açıları

Bağ uzunluğu (Å)		**Bağ açısı (º)**	
C(1)-O(1)	1.397	C(1)-O(1)-C(2)	118.42
C(2)-O(1)	1.367	C(4)-C(5)-O(2)	122.72
C(5)-O(2)	1.370	C(9)-C(10)-O(3)	120.01
C(10)-O(3)	1.257	C(11)-C(12)-O(4)	121.78
C(12)-O(4)	1.346	C(14)-O(5)-C(17)	117.35
C(14)-O(5)	1.362		
C(17)-O(5)	1.435		

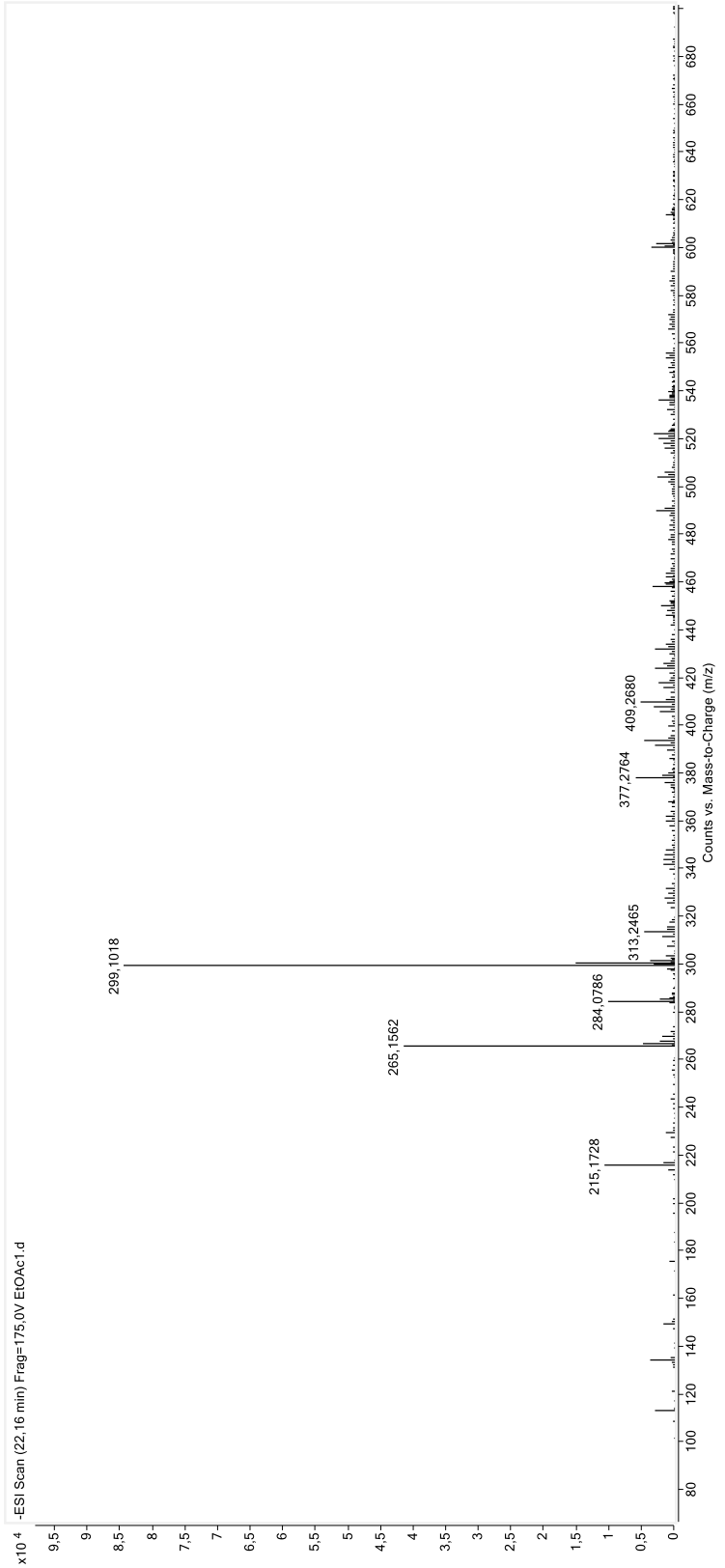
EK 37 B8 bileşiğindeki molekül içi ve moleküller arası H bağı etkileşimleri

Hidrojen bağı etkileşimi	
C(10)-O(3)-----H4	1.806 **Å** (moleküliçi)
C(10)-O(3)-----H2	1.964 **Å** (moleküllerarası)

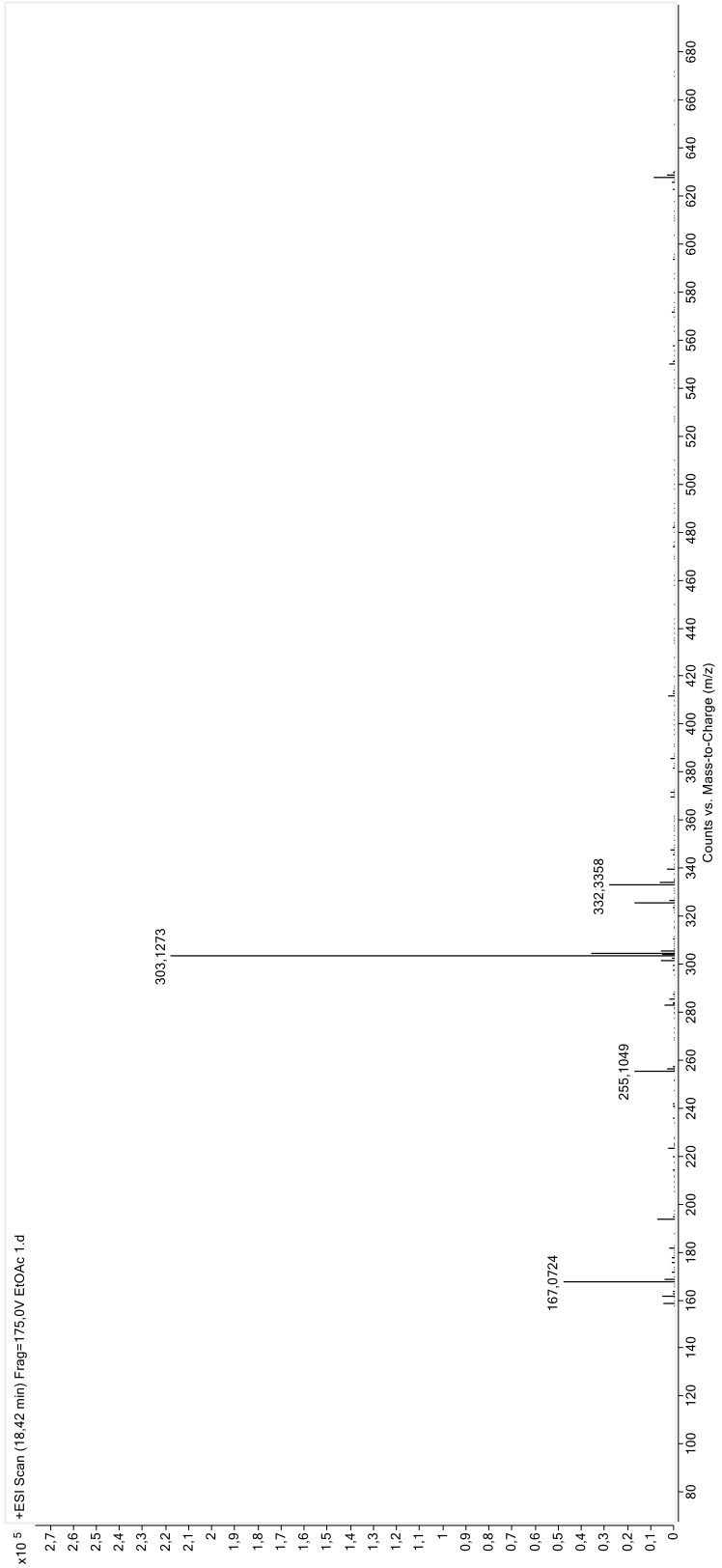
EK 38 B5 bileşiğinin TOF/MS spektrumu



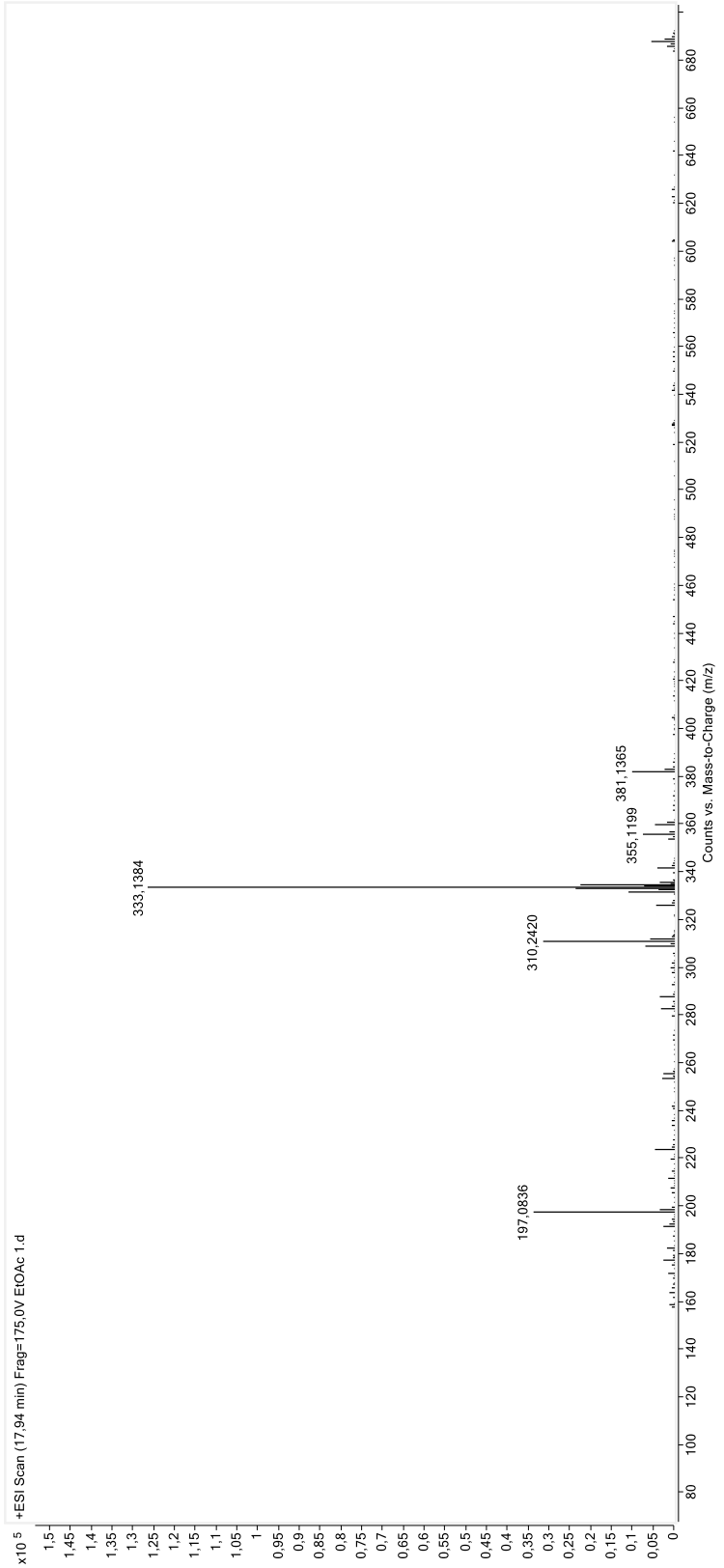
EK 39 B8 bileşiğinin TOF/MS spektrumu



EK 40 B10 bileşiğinin TOF/MS spektrumu



EK 41 B15 bileşiğinin TOF/MS spektrumu



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	Serkan Koldaş
Doğum yeri	Adana
Doğum Tarihi	02.12.1983
Yabancı Dili	İngilizce, almanca
Adres	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü
	Uluyazı Kampüsü Çankırı
Telefon	+90(376) 218 95 00/8053
E-posta	serkan_koldas@yahoo.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise	Adana Borsa Lisesi, 2000
Lisans	Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi
	Kimya Bölümü, 2006
Yüsek Lisans	Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
	Kimya Anabilim Dalı, 2010

Çalıştığı Kurum ve Yıl

Çankırı Karatekin Üniversitesi, 2010 - devam ediyor

Yayınları

1. Zhang, M., Zou, B., Gunaratna, M.J., Weerasekara, S., Tong, Z., Nguyen, T.D.T., **Koldaş, S.**, Cao, W.S., Pascual, C., Xie, X.S., Hua, D.H. (2020). Synthesis of 1,3,4-oxazoles as selective T-type calcium channel ınhibitors. Heterocycles, 101, 145-164.
2. Karakoç, Ö.M., Tüfekçi, A.R., Gül, F., **Koldaş, S.**, Alkan, M. (2020). Essential oil composition and insecticidal activity of *Satureja boissieri* against *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). Bitki Koruma Bülteni, 60(2), 111-117.

3. Lu, J., **Koldaş, S.**, Fan, H., Desper, J., Day, V.W., Hua, D.H. (2019). A one-pot ıntramolecular tandem Michael-aldol annulation reaction for the synthesis of chiral pentacyclic terpenes. Synthesis-Stuttgart, 51(21), 3964-3972.
4. Bulut, F., Demirtaş, İ., **Koldaş S.**, Gül, F., Behçet, L, Özen, T., Öke Altuntaş, F. (2019). The cytotoxicity and antioxidant activity analysis of the isolated constituents and extracts from endemic *Centaurea derderiifolia*. Natural Product Research, 1-4.,
5. Geçibesler, İ.H., Demirtaş, İ., **Koldaş, S.**, Behçet, L., Gül, F., Altun, M. (2019). Bioactivity-guided isolation of compounds with antiproliferative activity from *Teucrium chamaedrys* L. subsp. *sinuatum* (Celak.) Rech. f.. Progress in Nutrition, 21(null), 458-470.
6. Bekhouche, K., Özen, T., Boussaha, S., **Koldaş, S.**, Yenigun, S., Lassed S., Demirtaş İ., Benayache, F., Benayache, S., Zama, D. (2018). Anti-oxidant, DNA-damage protection and anti-cancer properties of n-butanol extract of the endemic *Perralderia coronopifolia*. Bangladesh Journal Of Pharmacology, 13(1), 82-89.
7. Öke Altuntaş, F., Demirtaş, İ., Tüfekçi, A.R., **Koldaş, S.**, Gül, F., Behçet , L., Geçibesler, İ.H. (2016). Inhibitory effects of the active components isolated from *Satureja boissieri* Hausskn Ex Boiss on human cervical cancer cell line. Journal of Food Biochemistry, 40(4), 499-506
8. Lu, J., Aguilar, A., Zou, B., Bao, W., **Koldaş, S.**, Shi, A., Desper, J., Wangemann, P., Xie, X.S., Hua, D.H. (2015). Chemical synthesis of tetracyclic terpenes and evaluation of antagonistic activity on endothelin A receptors and voltage gated calcium channels. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 23(17), 5985-5998.
9. Sara, B., Bekhouche, K., Boudjerda, A., Leon, F., **Koldaş, S.**, Şahin Yağlıoğlu A., Demirtaş, İ., Brouard, I., Marchioni, E., Zama, D., Benayache, S., Benayache, F. (2015). Chemical constituents, in vitro antioxidant and antiproliferative activities of *Perralderia coronopifolia* Coss. Subsp. eu *coronopifolia* M. var typica M extract. Records of Natural Products, 9(3), 312-322.

10. Abay, G., Altun, M., **Koldaş, S.**, Tüfekçi, A.R., Demirtaş, İ. (2015). Determination of antiproliferative activities of volatile contents and hplc profiles of *Dicranum scoparium* Dicranaceae Bryophyta. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, 18(5), 453-463.
11. **Koldaş, S.**, Demirtaş, İ., Özen, T., Demirci, M.A., Behçet, L. (2015). Phytochemical screening, anticancer and antioxidant activities of *Origanum vulgare* L. ssp. *viride* Boiss Hayek: A plant of traditional usage. Journal of the Science of Food and Agriculture, 95(4), 786-798.
12. Abay, G., Karakoç, Ö.C., Tüfekçi, A.R., **Koldaş, S.**, Demirtaş, İ. (2012). Insecticidal activity of *Hypnum cupressiforme* Bryophyta against *Sitophilus granarius* Coleoptera Curculionidae. Journal of Stored Products Research, 51, 6-10.