**ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

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

**Elifay SERT**

**Danışman: Doç. Dr. Ayşe ŞAHİN YAĞLIOĞLU**

**Kimya Anabilim Dalı**

**ÇANKIRI**
**2019**

**Her Hakkı Saklıdır.**

**TEZ ONAYI**

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

**Danışman** **:** Doç. Dr. Ayşe ŞAHİN YAĞLIOĞLU

**Jüri Üyeleri**

**Başkan** **:** Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

**Üye** **:** Doç. Dr. Ayşe ŞAHİN YAĞLIOĞLU

**Üye** **:** Doç. Dr. Ferda ESER

**Yukarıdaki sonucu onaylarım.**

**Prof. Dr. Tamer KEÇELİ**
**Enstitü Müdürü**

## ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

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

Elifay SERT

# ÖZET

**Yüksek Lisans Tezi**

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

**ELİFAY SERT**

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Ayşe ŞAHİN YAĞLIOĞLU

Bu çalışmada endemik *Astragalus dipsaceus* Bunge bitkisinden sekonder metabolitlerinin biyolojik aktivite yönlendirmeli izolasyonu amaçlandı. Bu amaçla bitkinin tamamı kurutuldu ve maserasyon yöntemi ile MeOH:$CHCl_3$ (1:1) karışımında ekstrakte edildi. Elde edilen ham ekstre saf suda çözüldü ve sırasıyla hekzan, diklorometan, etilasetat, n-bütanol ve su ile ekstrakte edildi. Hazırlanan tüm ekstreler (hekzan ekstresi, diklorometan ekstresi, etilasetat ekstresi, n-bütanol ekstresi ve su ekstresi) C6 ve HeLa hücresine karşı antikanser aktiviteleri incelendi. Yüksek aktivite gösteren etil asetat ekstresi çeşitli kromatografik yöntemlere (İTK, kolon kromatografisi vb.) tabi tutuldu ve izole edilen bileşiklerin yapıları spektroskopik-kromatografik yöntemlerle (GC-MS, 1D-2D NMR) belirlendi. Bu ekstreden sikloalpiosid-D, sikloalpiosid, ve genistein molekülleri tespit edildi. Daha sonra elde edilen bileşiklere C6 (sıçan beyin kanser hücresi) ve HeLa (insan rahim ağzı kanser hücresi) hücrelerine karşı antikanser aktivite testleri yapıldı. Pozitif kontrol olarak 5-FU kullanıldı. Bu testler sonucunda izole edilen moleküller ve 5-FU ile kıyaslandığında; C6 hücresine karşı genistein molekülünün, HeLa hücresine karşı ise sikloalpiosid molekülünün en yüksek aktiviteye sahip olduğu gözlendi. Ayrıca sikloalpiosid ve genistein moleküllerinin 5-FU den daha düşük toksisiteye sahip olduğu belirlendi.

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

## ABSTRACT

**Master of Science Thesis**

**PHYTOCHEMICAL ANALYSİS and BİOLOGİCAL ACTİVİTİES of ENDEMİC *Astragalus dipsaceus* Bunge**

**ELİFAY SERT**

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

Supervisors: Doç. Dr. Ayşe ŞAHİN YAĞLIOĞLU

In this study, bioassay guided isolation of secondary metabolites from endemic *Astragalus dipsaceus* Bunge plant was aimed. For this purpose, the whole plant was dried and extracted in a mixture of MeOH: $CHCl_3$ (1: 1) by maceration. The crude extract was dissolved in pure water and extracted with hexane, dichloromethane, ethyl acetate, n-butanol and water, respectively. All the prepared extracts (hexane extract, dicholoromethane extract, ethylacetate extract, n-butanol extract and water extract) were investigated for the anticancer activities against C6 and HeLa cells. Ethyl acetate extract which had the highest activity was subjected to various chromatographic methods (TLC, column chromatography, etc.) and the structures of the isolated compounds were determined by spectroscopic-chromatographic methods (GC-MS, 1D-2D NMR). From this extract the cycloalpiosid-D, cycloalpiosid, and genistein molecules were detected. Then, anticancer activity tests were performed to the compounds against C6 (rat brain cancer cell) and HeLa (human cervical cancer cell) cells. 5-FU was used as a positive control. As a result of these tests, genistein exhibited the highest activity against C6 cells and Cycloalpioside showed the highest actvity against HeLa cells among the other isolated compounds and 5-FU, respectively. In addition, cycloalpioside and genistein molecules were determined to have lower toxicity than 5-FU.



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

## TEŞEKKÜR

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

NMR yapı aydınlatma kısmında ve laboratuvar bilgisi konusunda olan yardımları ve değerli zamanlarını ayırmış oldukları için sayın Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ ve Arş. Gör. Serkan KOLDAŞ hocalarıma teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum.

Son olarak benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen bu hayattaki en büyük şansım olan aileme; babam Ali Aykut SERT, annem Emine SERT, ağabeyim Ömür SERT ve ablam Bilgi SERT KARAKULAK'a sonsuz teşekkürler…

Bu çalışma, Çankırı Karatekin Üniversitesi Yüksek Lisans Tez Projeleri (Proje no: FF200217L02) ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (Proje no: TÜBİTAK 114Z198) tarafından desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER


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

## SİMGELER DİZİNİ

| Simge | Açıklama |
|---|---|
| L | Litre |
| µg | Mikrogram |
| µM | Mikromolar |
| µL | Mikrolitre |
| mg | Miligram |
| g | Gram |
| GC-MS | Gaz Kromatografisi - Kütle Spektrometresi |
| İTK | İnce Tabaka Kromatografisi |
| NMR | Nükleer Manyetik Rezonans |
| HeLa | İnsan Rahim Kanseri Hücresi |
| C6 | Sıçan Beyin Tümör Hücresi |
| EtOAc | Etil asetat |
| n-BuOH | n-Bütanol |
| $CHCl_3$ | Kloroform |
| $CH_2Cl_2$ | Diklorometan |
| $IC_{50}$ | Hücre Bölünmesini %50 İnhibe Eden İlaç Konsantrasyonu |
| $IC_{75}$ | Hücre Bölünmesini %75 İnhibe Eden İlaç Konsantrasyonu |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| 5-FU | 5-Floro urasil |
| DMSO | Dimetil sülfoksit |
| % | Yüzde |

## ŞEKİLLER DİZİNİ


| | | |
|---|---|---|
| Şekil 1.1 | *Astragalus dipsaceus* Bunge…… | 3 |
| Şekil 1.2 | *Astragalus dipsaceus* Bunge bitkisinin Türkiye'de yayılış gösterdiği iller…….. | 4 |
| Şekil 1.3 | *Astragalus dipsaceus* Bunge bitkisinin Türkiye'de yayılış gösterdiği bölgeler…… | 5 |
| Şekil 2.1 | *A. membranaceus*……. | 6 |
| Şekil 2.2 | *A. spinosus*..…… | 7 |
| Şekil 2.3 | *A. sinicus*…….. | 7 |
| Şekil 2.4 | *A. pinetorum*..... | 8 |
| Şekil 2.5 | *A. argyroides*..... | 9 |
| Şekil 2.6 | *A. bicolor*..... | 9 |
| Şekil 2.7 | *A. galegiformis*..... | 9 |
| Şekil 2.8 | *A. ponticus*..... | 9 |
| Şekil 2.9 | *A. macrocephalus*..... | 9 |
| Şekil 2.10 | (a) *A. polysaccharides* in (b) Standart numunenin HPLC kromatogramı…… | 10 |
| Şekil 2.11 | *A. polysaccarides* ve siRNA'nın antitümör etkinliği…… | 11 |
| Şekil 2.12 | *A. lagurus*..... | 11 |
| Şekil 2.13 | *A. lagurus*..... | 12 |
| Şekil 2.14 | *A. campylosema*..... | 13 |
| Şekil 2.15 | *A. christianus*..... | 13 |
| Şekil 2.16 | *A. campylosema*..... | 14 |
| Şekil 2.17 | Selenyum..... | 15 |
| Şekil 2.18 | Selenyum..... | 15 |
| Şekil 2.19 | *A. membranaceus*..... | 15 |
| Şekil 2.20 | *A. flavescens*..... | 16 |
| Şekil 2.21 | *A. verus*..... | 17 |
| Şekil 2.22 | *Trichophyton verrucosum*..... | 17 |
| Şekil 2.23 | *T. Verrucosum lezyolu* dana..... | 17 |
| Şekil 2.24 | Wistar sıçan..... | 18 |
| Şekil 2.25 | Anti diyabetik..... | 19 |
| Şekil 2.26 | *A. membranaceus*..... | 19 |
| Şekil 2.27 | El ve parmaklarda romatoid artrit..... | 19 |
| Şekil 2.28 | *Astragalus pelecinus*..... | 21 |
| Şekil 2.29 | *A. armatus* Willd. subsp. *numidicus*..... | 22 |
| Şekil 2.30 | *A. armatus* Willd. subsp. *numidicus* bitkisinden izole edilen bileşikler…..... | 23 |
| Şekil 2.31 | *A. tauricolus* Bitkisinden İzole Edilen Bileşikler…….. | 25 |
| Şekil 2.32 | *A. englerianus*……. | 26 |
| Şekil 3.1 | Ekstraksiyon işlemi……. | 29 |
| Şekil 3.2 | Evaporatörden çözücü uzaklaştırılması…….. | 30 |
| Şekil 3.3 | Elde edilen ekstreler…… | 30 |
| Şekil 3.4 | $CH_2Cl_2$ ekstresinin kolon kromatografisi……... | 31 |
| Şekil 3.5 | Sikloalpiosid molekülü……... | 32 |
| Şekil 3.6 | Genistein molekülünün İTK'sı ……..... | 32 |
| Şekil 3.7 | Çalışma şeması ……..... | 33 |
| Şekil 3.8 | Besiyeri…….. | 34 |

| | | |
|---|---|---|
| Şekil 3.9 | Steril T75 flasklarda HeLa ve C6 hücresi …….. | 35 |
| Şekil 3.10 | Tripsin EDTA çözeltisi ……. | 35 |
| Şekil 3.11 | Tripan mavisi solüsyonu …… | 36 |
| Şekil 3.12 | Thoma lamına hücre pipetleme işlemi …….. | 36 |
| Şekil 3.13 | 96 kuyucuklu plakaya hücre pipetleme ……. | 37 |
| Şekil 3.14 | Plakaların inkübe edilmesi…….. | 37 |
| Şekil 4.1 | *A. dipsaceus* Bunge bitkisinden elde edilen ekstreler ve ekstre verimleri..... | 39 |
| Şekil 4.2 | *A.dipsaceus* Bunge bitkisinin aktif ekstreleri……. | 41 |
| Şekil 4.3 | Genistein molekülü……. | 46 |
| Şekil 4.4 | Genistein molekülünün $^{1}$H NMR spektrumu (600 MHz, DMSO-d6)… | 47 |
| Şekil 4.5 | Genistein molekülünün $^{13}$C NMR spektrumu (150 MHz, DMSO-d6)... | 48 |
| Şekil 4.6 | Genistein molekülünün DEPT NMR spektrumu (150 MHz, DMSO-d6)……... | 49 |
| Şekil 4.7 | Genistein molekülünün HMBC NMR spektrumu (150 MHz, DMSO-d6) ..... | 50 |
| Şekil 4.8 | Genistein molekülünün HMBC NMR spektrumu…….. | 51 |
| Şekil 4.9 | Genistein molekülünün HSQC NMR spektrumu (150 MHz, DMSO-d6)……... | 52 |
| Şekil 4.10 | Sikloalpiosid molekülü……... | 53 |
| Şekil 4.11 | Sikloalpiosid molekülünün $^{1}$H NMR spektrumu…… | 54 |
| Şekil 4.12 | Sikloalpiosid molekülünün $^{13}$C NMR spektrumu……... | 55 |
| Şekil 4.13 | Sikloalpiosid molekülünün DEPT NMR spektrumu…….. | 56 |
| Şekil 4.14 | Sikloalpiosid molekülünün HMBC NMR spektrumu…… | 57 |
| Şekil 4.15 | Sikloalpiosid molekülünün HMBC etkileşimi…… | 58 |
| Şekil 4.16 | Sikloalpiosid molekülünün HMBC NMR spektrumu…… | 58 |
| Şekil 4.17 | Sikloalpiosid molekülünün COSY NMR spektrumu…….. | 59 |
| Şekil 4.18 | Sikloalpiosid molekülünün HSQC NMR spektrumu…….. | 60 |
| Şekil 4.19 | Sikloalpiosid-D molekülü……..……. | 62 |
| Şekil 4.20 | Sikloalpiosid-D molekülünün $^{1}$H NMR spektrumu…… | 63 |
| Şekil 4.21 | Sikloalpiosid-D molekülünün $^{13}$C NMR spektrumu……... | 64 |
| Şekil 4.22 | Sikloalpiosid-D molekülünün DEPT NMR spektrumu……..... | 65 |
| Şekil 4.23 | Sikloalpiosid-D molekülünün HMBC NMR spektrumu……..... | 66 |
| Şekil 4.24 | Sikloalpiosid-D molekülünün COSY NMR spektrumu……..... | 67 |
| Şekil 4.25 | Sikloalpiosid-D molekülünün HSQC NMR spektrumu……..... | 68 |
| Şekil 4.26 | EAS-6 fraksiyonunun ana bileşenleri……...……..... | 70 |
| Şekil 4.27 | EAS-6 Proton NMR…… | 71 |
| Şekil 4.28 | EAS-6 $^{13}$C NMR……. | 71 |
| Şekil 4.29 | EAS-7 fraksiyonunun ana bileşenleri……. | 72 |
| Şekil 4.30 | EAS-7 $^{1}$H NMR…….. | 73 |
| Şekil 4.31 | EAS-7 $^{13}$C NMR……. | 73 |
| Şekil 4.32 | EAS-8 fraksiyonunun ana bileşeni……. | 74 |
| Şekil 4.33 | EAS-8 $^{1}$H NMR…….. | 75 |
| Şekil 4.34 | EAS-8 $^{13}$C NMR……. | 75 |
| Şekil 4.35 | EAS-9 fraksiyonunun ana bileşeni……. | 76 |
| Şekil 4.36 | EAS-9 $^{1}$H NMR…….. | 77 |
| Şekil 4.37 | EAS-9 $^{13}$C NMR……. | 77 |
| Şekil 4.38 | *A. dipsaceus* Bunge bitki ekstrelerinin HeLa hücresine karşı | 78 |

antikanser aktivite sonuçları……...
Şekil 4.39 *A. dipsaceus* Bunge bitki ekstrelerinin C6 hücresine karşı antiproliferatif aktivite sonuçları…… 79
Şekil 4.40 *A. dipsaceus* Bunge etilasetat ekstresi ve bu ekstreden izole edilen moleküllerin HeLa hücresine karşı antiproliferatif aktivite sonuçları… 80
Şekil 4.41 *A. dipsaceus* Bunge etilasetat ekstresi ve bu ekstreden izole edilen moleküllerin C6 hücresine karşı antiproliferatif aktivite sonuçları…… 81
Şekil 5.1 Çalışmanın özet şeması……... 86

# TABLOLAR DİZİNİ


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

# 1.GİRİŞ

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

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

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

## 1.1 *Astragalus* ssp. Cinsinin Genel Özellikleri:

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

## 1.2 Tıbbi Kullanımı:

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

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

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

## 1.3 *Astragalus dipsaceus* Bunge Bitkisinin Genel Özellikleri

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

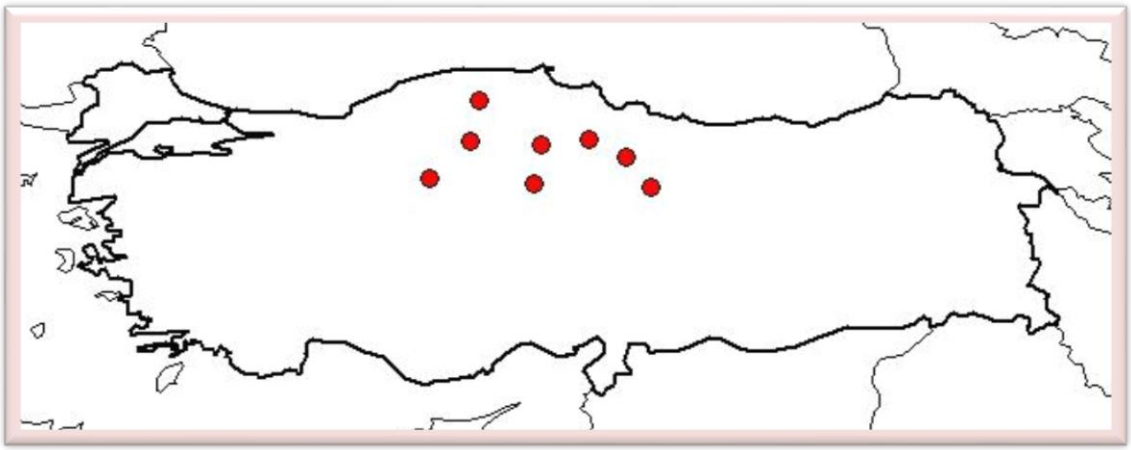


**Şekil 1.1** *Astragalus dipsaceus* Bunge (URL 1)

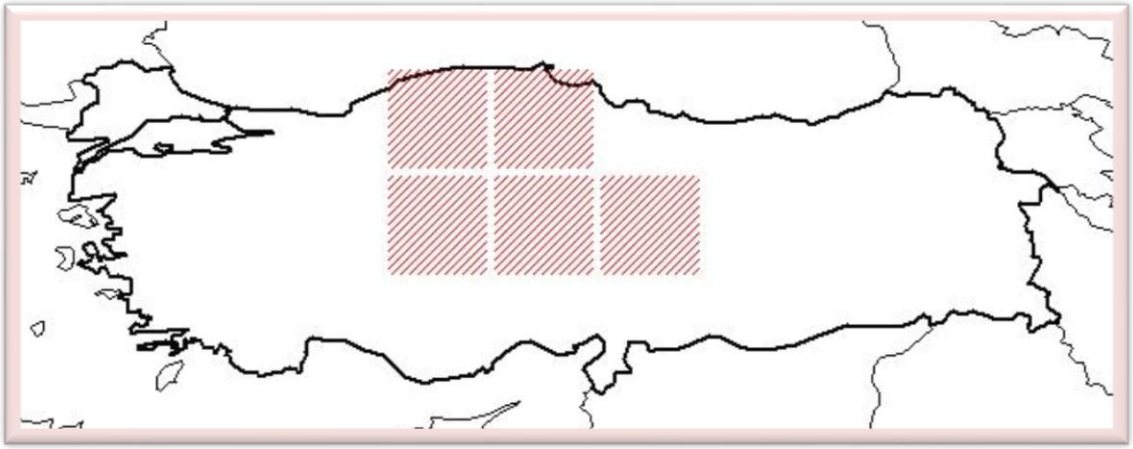
| Taksonomik Sınıflandırma | |
|---|---|
| **Alem** | Plantae |
| **Altalem** | Tracheobionta |
| **Bölüm** | Magnoliophyta |
| **Sınıf** | Magnoliopsida |
| **Altsınıf** | Rosidae |
| **Takım** | Fabales |
| **Familya** | Fabaceae |
| **Cins** | *Astragalus* |
| **Tür** | *Astragalus dipsaceus* Bunge |

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

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



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



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

# 2. KAYNAK ÖZETLERİ

## 2.1 *Astragalus* ssp. Ekstrelerinin Biyolojik Aktivite Çalışmaları

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



**Şekil 2.1** *A. membranaceus* (URL 3)

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

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




**Şekil 2.2** *A. spinosus* (URL 4)

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



**Şekil 2.3** *A. sinicus* (URL 5)

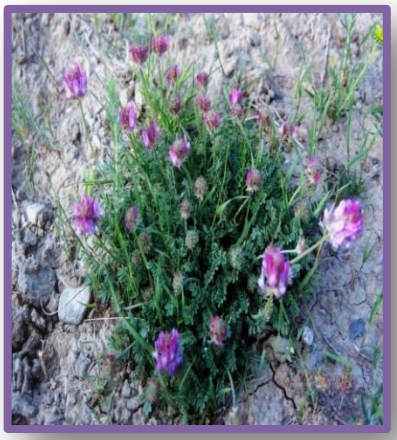
Ozbek ve diğerlerinin 2008 yılında yaptıkları çalışmada *A. pinetorum* (Şekil 2.4), *A. aduncus, A. argyroides* (Şekil 2.5) *, A. atrocorpus, A. bicolor* (Şekil 2.6) *, A. erinaceus, A. galegiformis* (Şekil 2.7) *, A. lagurus, A. macrocephalus, A. microcephalus, A. ponticus* (Şekil 2.8) *, , A. psoraloides*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



**Şekil 2.4** *A. pinetorum* (URL 6)



**Şekil 2.5** *A. argyroides* (URL 7)



**Şekil 2.6** *A. bicolor* (URL 8)



**Şekil 2.7** *A. galegiformis* (URL 9)



**Şekil 2.8** *A. ponticus* (URL 10)

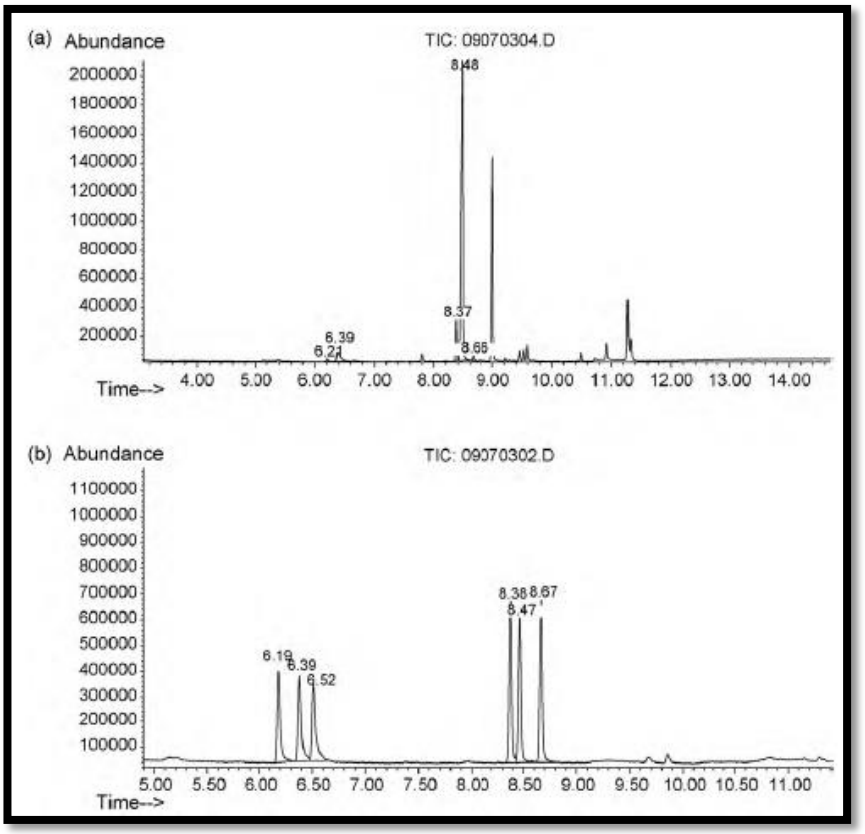


**Şekil 2.9** *A. macrocephalus* (URL 11)

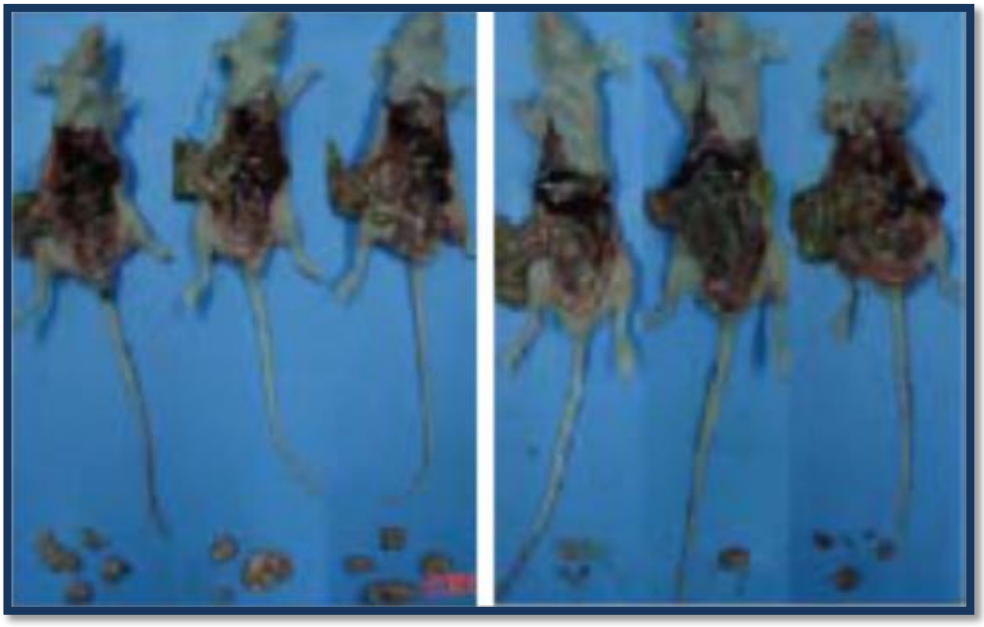
*A.macrocephalus* (Şekil 2.9) bitkisinde en iyi antimutajenik aktivite, bitkinin köklerinden (5 µg/plate doz; 85% inhibisyon) elde edilmiştir (Ozbek vd. 2008 ).

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

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




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



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

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



**Şekil 2.12** *A. lagurus* (URL 14)

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




**Şekil 2.13** *A. lagurus* (URL 15)

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

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




**Şekil 2.14** *A. campylosema* (URL 16)

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




**Şekil 2.15** *A. christianus* (URL 17)

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



**Şekil 2.16** *A. campylosema* (URL 18)

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




**Şekil 2.17** Selenyum (URL 19)



**Şekil 2.18** Selenyum (URL 20)

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



**Şekil 2.19** *A. membranaceus* (URL 21)

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




**Şekil 2.20** *A. flavescens* (URL 22)

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

**Antimutagenik aktivite için;** Ames / Salmonella mikrozom test sistemi uygulandı.

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

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





**Şekil 2.21** *A. verus* (URL 23)

**Şekil 2.22** *Trichophyton verrucosum* (URL 24)

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



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

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



**Şekil 2.24** Wistar sıçan (URL 26)

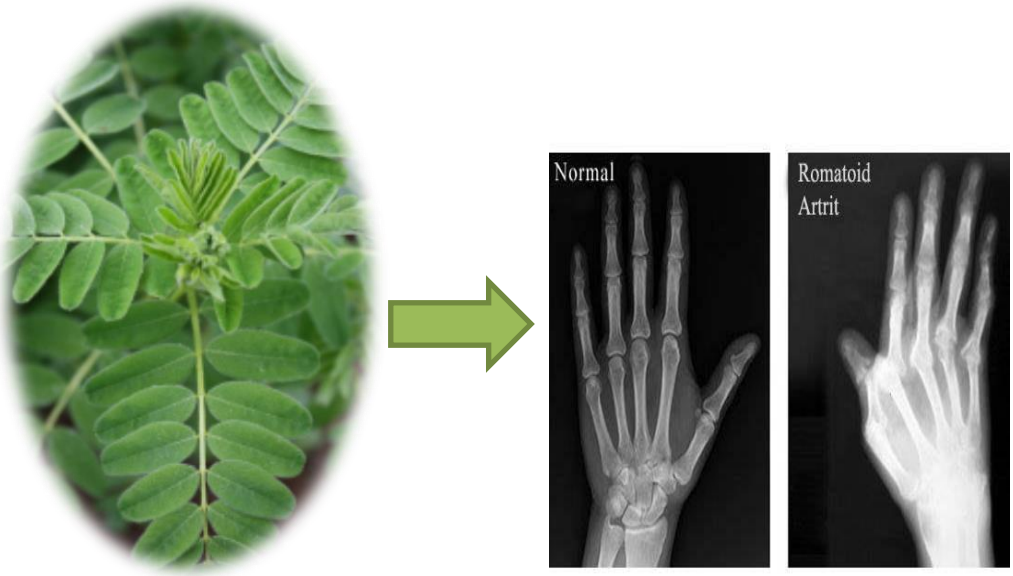
Çalışma şu şekilde yapılmıştır. Otuz beş erkek wistar sıçan (Şekil 2.24) beş gruba ayrılmış ve formalin enjeksiyonundan önce farklı dozlarda *A. arbusculinus* sakızı ekstresiyle ön muamele edilmiştir. Pençe ödemi, 0 ve 8 gün sonra piezometre ile ölçülerek ve kontrollerle karşılaştırılmıştır. Ekstrenin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

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




**Şekil 2.25** Anti diyabetik (URL 27)

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




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

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

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

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



**Şekil 2.28** *Astragalus pelecinus* (URL 30)

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

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

## 2.2 *Astragalus* ssp. Ekstrelerinin İzolasyon Çalışmaları

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



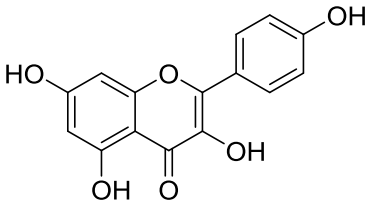
**Şekil 2.29** *A. armatus* Willd. subsp. *numidicus* (URL 31)

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

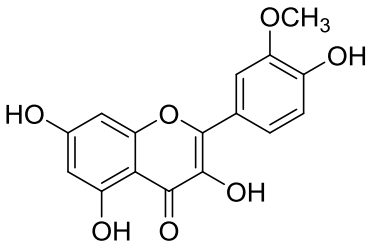
Sonuç olarak;

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

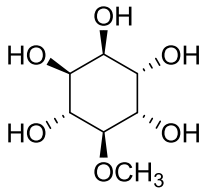
Bu çalışmada *A. armatus* Willd. subsp. *numidicus* bitkisinden Isorhamnetin (**1**), isorhamnetin-3-*O*-α-L-ramnopiranosil-(1→6)-β-D- galaktopiranozid (**2**), isorhamnetin-3-*O*-β-D-apiofuranosil-(1 → 2)-[α-L-ramnopiranosil-(1→6)]-β-D-galaktopiranozid (**3**), kamferol-3-*O*-(2,6-di-*O*-α-L-ramnopiranosil)-β-D-galaktopiranozid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




İzorhamnetin (1)



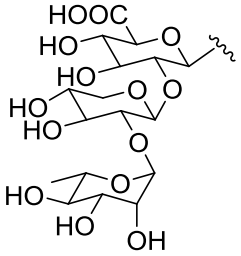

Kamferol (5)



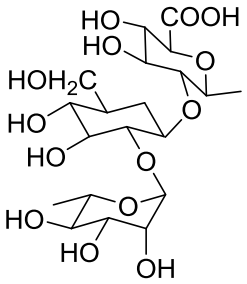

Pinitol (6)

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

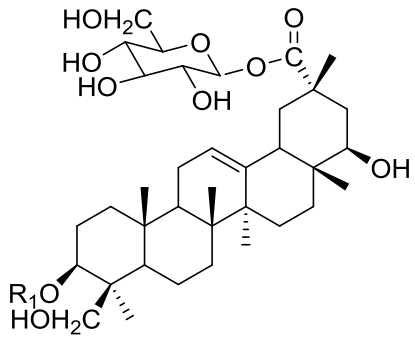
Gülcemal vd. (2013) *A. tauricolus* türü üzerine yapmış oldukları bir çalışmada, 22 adet oleanan tipi triterpen glikozit izole etmişler ve yapılarını ESIMS, HRMS analizleri ve 1D -2D NMR tekniklerini kullanarak belirlemişlerdir. Ayrıca izole etmiş oldukları 22 bileşiğin (Şekil 2.31) insan lösemi kanser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



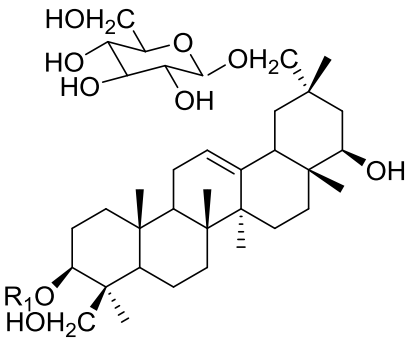

**A**



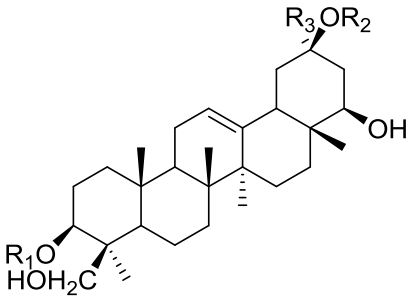

**B**

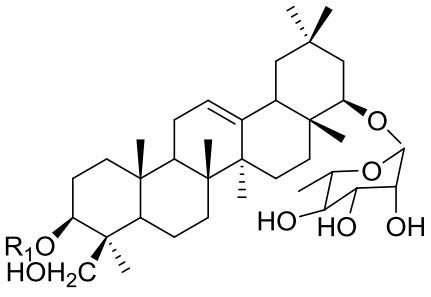


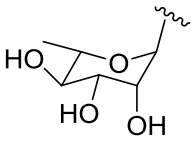
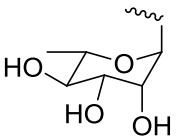

2 ➔ R1:A
6 ➔ R1:B




3 ➔ R1:B

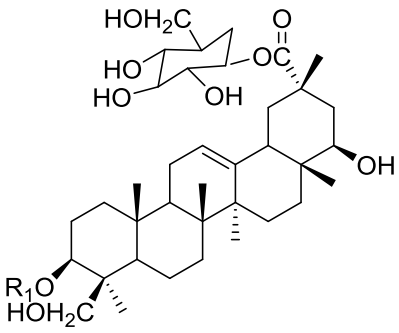



| | R1 | R2 | R3 |
|---|---|---|---|
| 4 | A |  | CH3 |
| 5 | B |  | CH3 |
| 11 | B | H | CH2OH |

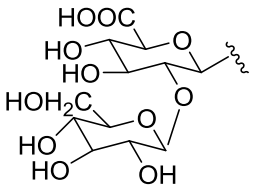


7 R1:A

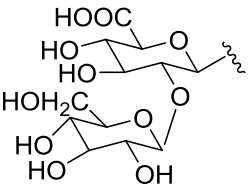


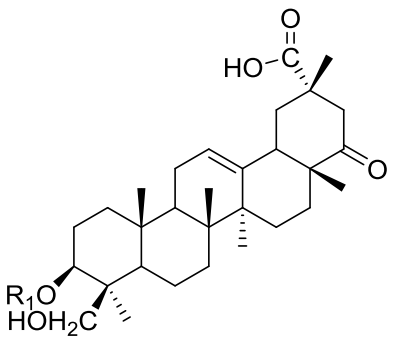

R1

12




14




9 ➔ R1:B

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

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




**Şekil 2.32** *A. englerianus* (URL 32)

Sonuç olarak *A. englerianus* köklerinin etil asetat fraksiyonu ile metanol ekstresinden 29 bileşik elde edilmiştir. Teşhis edilen bu bileşikler izolikiritigenin **(1)**, 4'-hidroksi-2,4-dimetoksikalon **(2)**, ksenognozin **(3)**, formononetin **(4)**, kaliksin **(5)**, prunetin **(6)**, (3R) – vestitol **(7)**, likiritigenin **(8)**, (6aR,11aR)-medikarpin-3-0-p-D-glikopiranosid **(9)**, olean-12-en-3β, 22β, 24-triol **(10)**, Friedelin **(11)**, β-sitosterol **(12)**, stigmasterol **(13)**, 7β-hidroksisitosterol **(14)**, 7-oksositosterol **(15)**, 3β-sitosteril (9'Z) -9'-heptadekenoat **(16)**, stigmast- 4-en-3-on **(17)**, 5a, 8a-epidivoksi-ergosta-6,9,22E-trien-3p-ol **(18)**, 5a, 8a-epidioksi-ergosta-6,22E-dien-3β- **(24)**, oleik asit **(25)**, linoleik asit **(26)**, sitrik asit **(24)**, sitrik asit **(26)**, sitrat **(22)**, D-2-0-metilinositol **(20)**, oktakozanol , A-linolenik asit **(27)**, tripalmitin **(28)** ve trilinolein **(29)** dir.

# 3. MATERYAL VE YÖNTEM

## 3.1 Kullanılan Araç ve Malzemeler

Çeşitli cam malzemeler (erlen, beher, cam tüpü, huni, baget vb.)
Hazır İTK plakaları (Silika gel 60 $F_{254}$)
İTK yürütücü kabin

## 3.2 Kullanılan Kimyasallar

### 3.2.1 İzolasyon İşleminde Kullanılan Kimyasallar

Hekzan (Merck), $CH_2Cl_2$ (Merck), EtOAc (Merck), n-bütanol (Merck), su (Destile) ekstraksiyon işleminde kullanıldı.

### 3.2.2 Biyolojik Aktivite Testlerinde Kullanılan Kimyasallar ve Hücreler

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

antikanser aktivite testleri için kullanılan kimyasallardır.

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

antikanser aktivite testleri için kullanılan hücrelerdir.

### 3.3 Kullanılan Cihazlar

NMR (Agilent 600 MHz)
ELISA Mikroplate Okuyucu: (Awareness Chromate, USA)
GC-MS: Agilent 7890A gas chromatography and 5975C inert MSD, with Triple-Axis detector (Agilent Technology)
İnkübatör $CO_2$ Water-Jacketed (Nuaire US Autoflow)
Mikroskop ( Olympus CX21 )
Steril Kabin (Esco class II type A2)
Otoklav (Panasonic)
Döner buharlaştırıcı
Santrifüj
Manyetik karıştırıcı
Etüv
Isıtıcı
pH metre
Ultrasonik Banyo

### 3.4 Bitkinin Toplanması, Kurutulması ve Tür Teşhisi

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

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

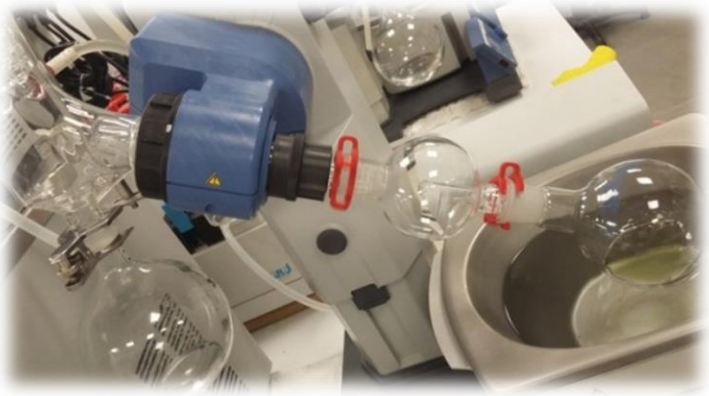
### 3.5 Bitkinin Özütlenmesi (Ekstraksiyon) İşlemi

1 kg tüm kuru bitki maserasyon yöntemi kullanarak Metanol - Kloroform (MeOH $CHCl_3$, 1:1) çözücü sisteminde oda sıcaklığında 2 gün aralıklarla 2 kez ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu. Daha sonra bitki posası süzülerek ortamdan ayrıldı ve çözücü döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı. Elde edilen ham ekstre saf suda çözülerek sırasıyla hekzan, diklorometan ($CH_2Cl_2$), etilasetat (EtOAc) ve n-bütanol ile ekstrakte edildi (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1** Ekstraksiyon işlemi

Oluşan çözeltilerin çözücüleri uzaklaştırılarak hekzan, $CH_2Cl_2$, EtOAc, n-Bütanol ve su ekstresi elde edildi (Şekil 3.2).



**Şekil 3.2** Evaporatörden çözücü uzaklaştırılması



**Şekil 3.3** Elde edilen ekstreler

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



**Şekil 3.4** $CH_2Cl_2$ ekstresinin kolon kromatografisi

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

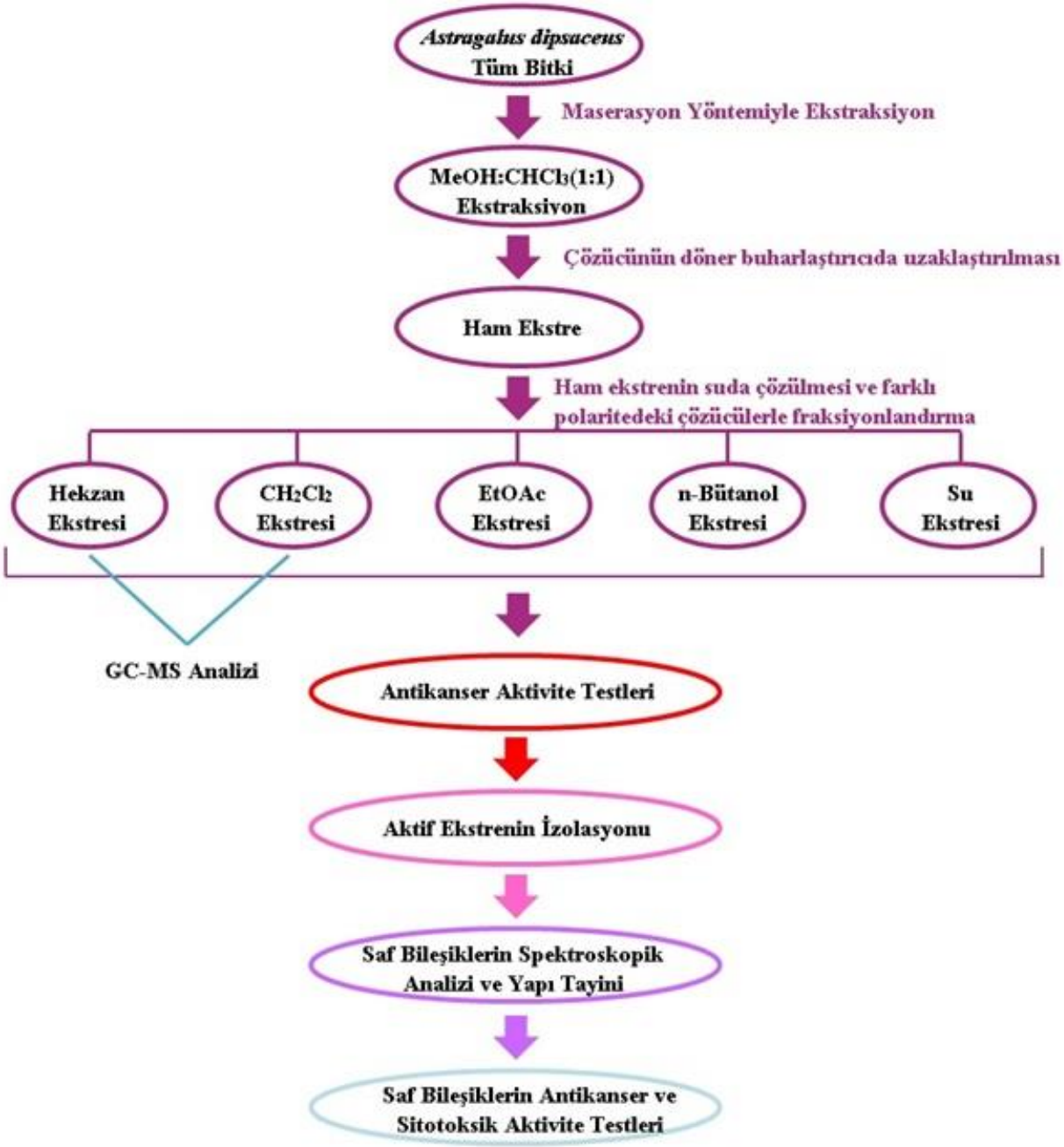


**Şekil 3.5** Sikloalpiosid molekülü



**Şekil 3.6** Genistein molekülünün İTK'sı

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




**Şekil 3.7** Çalışma şeması

### 3.6 Antiproliferative Aktivite Testlerinin Yapılması

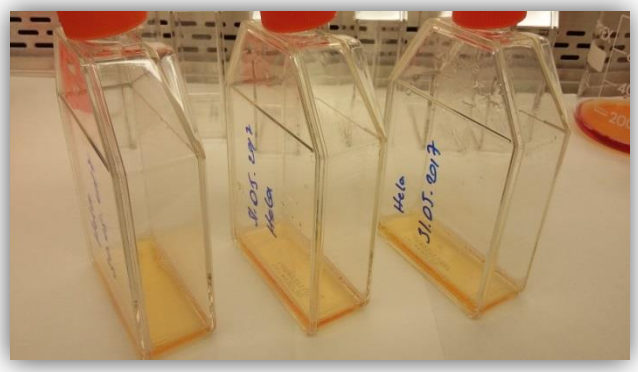
#### 3.6.1 Hücre Kültürü

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



**Şekil 3.8** Besiyeri

Hücreler, steril T75 hücre kültür flasklarında (Şekil 3.9) 37$^{o}$C de %5 $CO_2$ ortamında 4-5 gün inkübe edilip konfluent hale geldiğinde, flasklardaki besi yeri 10 ml Tripsin-EDTA solüsyonu (Şekil 3.10) ile değiştirilerek, 5 dakika inkübe edildi.



**Şekil 3.9** Steril T75 flasklarda HeLa ve C6 hücresi

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



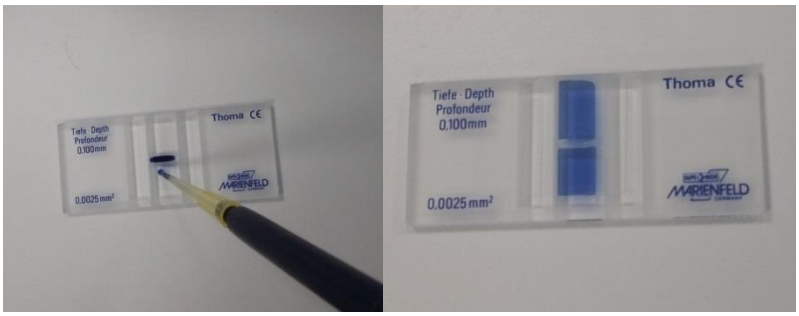
**Şekil 3.10** Tripsin EDTA çözeltisi

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

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




**Şekil 3.11** Tripan mavisi solüsyonu

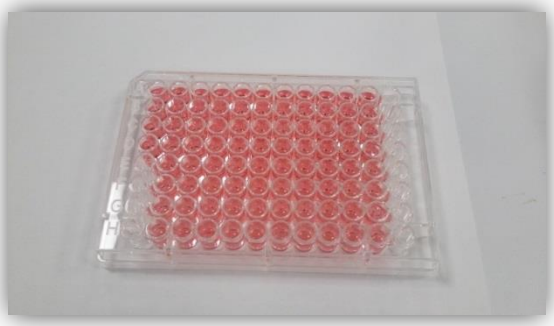



**Şekil 3.12** Thoma lamına hücre pipetleme işlemi

Sayım işlemiden sonra yeni bir steril 15 ml lik Falcon tüp içinde çalışılacak hücre stok süspansiyonu hazırlandı. Eğer hücreler sadece split edilecekse ana hücre stoğundan $1x10^6$ hücre/ml olacak şekilde seyreltilerek, 1 ml hücre içinde 20 ml taze medyum bulunan kültür flasklarına pipetlenerek 37$^oC$ de %5 $CO_2$ ortamında 4-5 gün inkübe edildi.

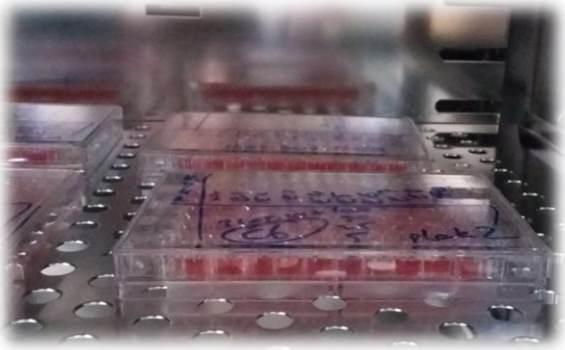
### 3.6.2 *In vitro* antikanser aktivite (antiproliferatif aktivite) testi dizaynı

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



**Şekil 3.13** 96 kuyucuklu plakaya hücre pipetleme

Pipetleme işlemi tamamlandıktan sonra plakalar 37$^{o}$C de %5 $CO_2$ ortamında 24 saat inkübe edildi (Şekil 3.14).



**Şekil 3.14** Plakaların inkübe edilmesi

### 3.6.3 BrdU Cell ELİZA hücre proliferasyon deneyi

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

### 3.6.4 $IC_{50}$ konsantrasyonunun belirlenmesi:

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

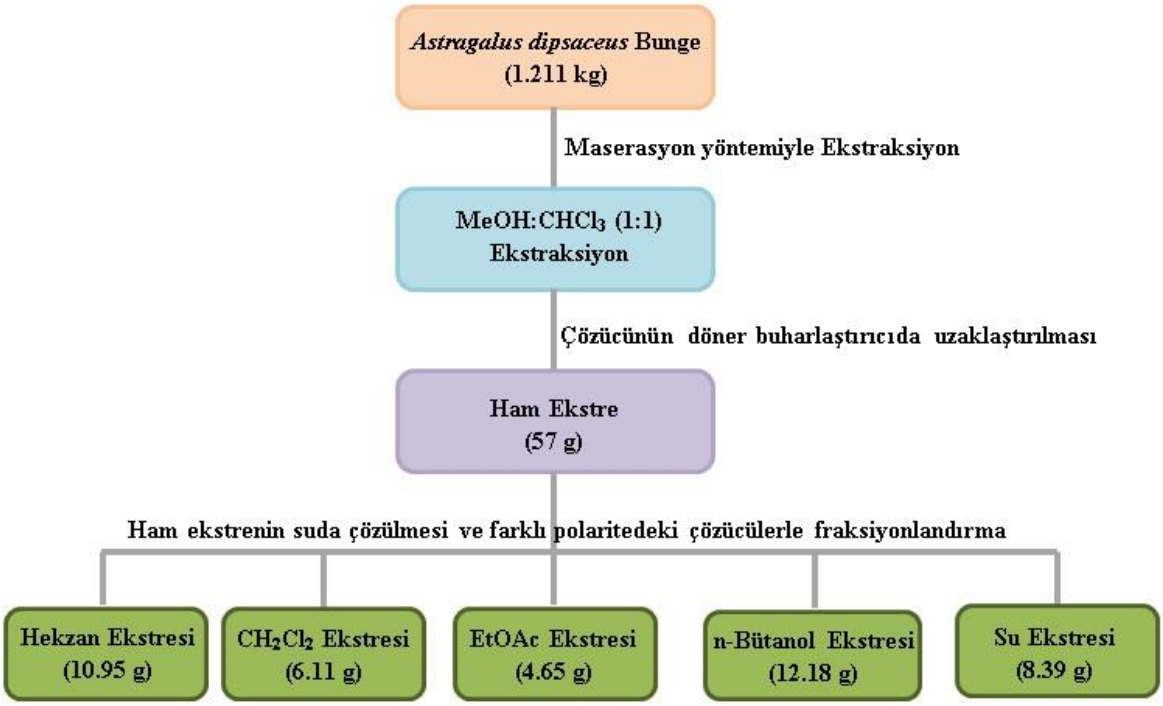
## 3.7 Sitotoksik Aktivite Testlerinin Yapılışı

Test maddelerinin sitotoksik aktivitesinin belirlenmesi için, hücreler test maddesinin $IC_{50}$ konsantrasyonunun altında ve üstünde seçilecek konsantrasyonlarda LDH Cell Cytotoxicity Assay (Roche 04 744 926 001, Germany) kullanarak üretici firmanın prosedürüne göre belirlenerek % sitotoksisite hesaplandı.

# 4. BULGULAR

## 4.1 Elde edilen ekstreler ve ekstre verimleri (%)

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




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

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

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

| | **MeOH-$CH_2Cl_2$ (1:1)** | **Hekzan** | **$CH_2Cl_2$** | **EtOAc** | **n-BuOH** | **Su** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Ekstre Miktarı** | 57 | 10.95 | 6.11 | 4.65 | 12.18 | 8.39 |
| **Verim (%)** | 4.71 | 0.90 | 0.50 | 0.38 | 1.00 | 0.69 |

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

## 4.2 Hekzan ve Diklorometan Ekstrelerinin GC-MS Analiz Sonuçları

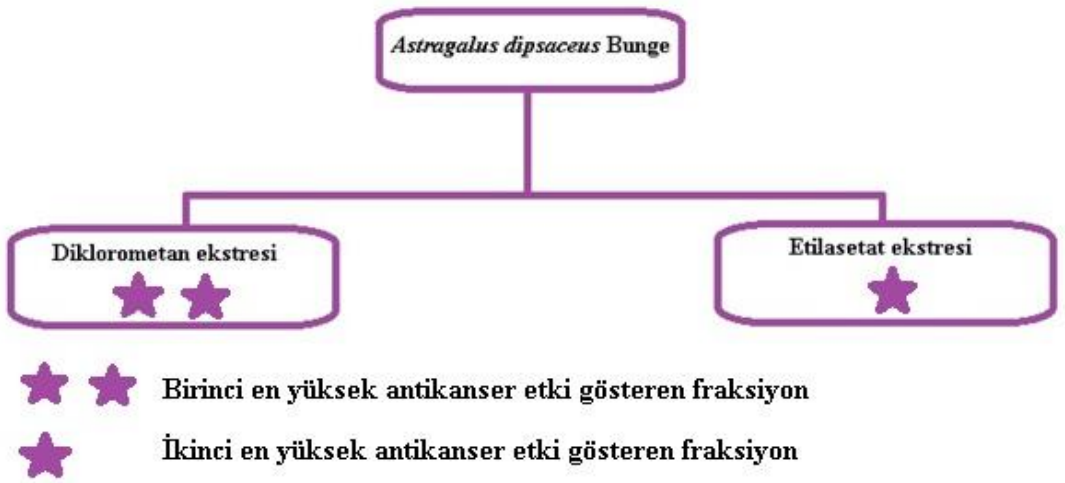
*Astragalus dipsaceus* Bunge (1.211 kg) bitkisinden fraksiyonlandırma işlemi yapılarak Hekzan ekstresi ve Diklorometan ekstresi elde edildi. Hekzan ekstresi gramajı 10.95 g ve Diklorometan ekstresi gramajı 6.11 g olarak tartıldı. Elde edilen her iki ekstrenin GC-MS cihazında analizi yapıldı (Tablo 4.2).

1-Hekzan Ekstresinin GC-MS sonuçlarına göre 13 bileşen tespit edildi. Bu bileşenlerden 2 tanesi doymuş yağ asiti, 1 tanesi çoklu doymamış yağ asiti ve 1 tanesi diğer yağ asitidir. Ana bileşenler ise palmitik asit (%38.75), stearik asittir (%41.60).
2-Diklorometan Ekstresinin GC-MS sonuçlarına göre 20 bileşen bulundu. Bu bileşenlerden 3 tanesi doymuş yağ asiti, 1 tanesi çoklu doymamış yağ asiti ve 16 tane de diğer yağ asitlerindendir. Ana bileşen ise palmitik asit (%39.26), stearik asit (21.84), linolenik asittir (%20.76).

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

| No | RT | Izomer | Bileşik Adı | % Miktar | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Hekzan | $CH_2Cl_2$ |
| **Doymuş Yağ Asiti** | | | | | |
| **1** | 24.39/24.41 | $C_{16}$:0 | Palmitik Asit | 38.75 | 39.26 |
| **2** | 30.39/30.40 | $C_{18}$:0 | Stearik Asit | 41.60 | 21.84 |
| **3** | 20.99 | $C_{14}$:0 | Miristik Asit | | 4.38 |
| | | | **Ara Toplam** | **80.35** | **65.48** |
| **Çoklu Doymamış Yağ Asiti** | | | | | |
| **4** | 29.47/29.69 | $C_{18}$:3 | Linolenik Asit | 9.08 | 20.76 |
| | | | **Ara Toplam** | **9.08** | **20.76** |
| **Diğer Bileşenler** | | | | | |
| **5** | 24.93 | $C_{13}$:3 | Metil 3-(3,5-di-tert-bütil-4-hidroksifenil) Propiyonat | 3.07 | |
| | | | **Ara Toplam** | **3.07** | |
| | | | **Genel Toplam** | **92.5** | **86.24** |

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




**Şekil 4.2** *A.dipsaceus* Bunge bitkisinin aktif ekstreleri

### 4.3 Etilasetat Ekstresinin Kolon Kromatografisi

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

**Tablo 4.3** Etilasetat ekstresi kolonunun fraksiyon aralığına karşılık gelen çözücü sistemi

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

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

**Tablo 4.4** Etilasetat ekstresi kolon kromatografisi sonuçları

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

### 4.4 Diklorometan Ekstresinin Kolon Kromatografisi

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

**Tablo 4.5** Diklorometan ekstresi kolonunun fraksiyon aralığına karşılık çözücü sistemi

| Fraksiyon Aralığı | Çözücü Sistemi |
|---|---|
| **1-44** | Hekzan-$CH_2Cl_2$ (%10) |
| **45-142** | Hekzan-$CH_2Cl_2$ (%20) |
| **143-188** | Hekzan-$CH_2Cl_2$ (%25) |
| **189-234** | Hekzan-$CH_2Cl_2$ (%30) |
| **235-280** | Hekzan-$CH_2Cl_2$ (%40) |
| **281-371** | Hekzan-$CH_2Cl_2$ (%50) |
| **372-417** | Hekzan-$CH_2Cl_2$ (%60) |
| **418-464** | Hekzan-$CH_2Cl_2$ (%70) |
| **465-508** | Hekzan-$CH_2Cl_2$ (%80) |
| **509-554** | Hekzan-$CH_2Cl_2$ (%90) |
| **555-641** | $CH_2Cl_2$ (%100) |
| **642-749** | $CH_2Cl_2$-EtOAc (%10) |
| **750-858** | $CH_2Cl_2$-EtOAc (%20) |
| **859-880** | $CH_2Cl_2$-EtOAc (%30) |
| **881-902** | $CH_2Cl_2$-EtOAc (%50) |
| **903-949** | EtOAc (%100) |
| **950-973** | EtOAc-MeOH (%5) |
| **974-1040** | EtOAc-MeOH (%10) |
| **1041-1088** | EtOAc-MeOH (%20) |
| **1089-1136** | EtOAc-MeOH (%30) |
| **1137-1184** | EtOAc-MeOH (%40) |
| **1185-1209** | EtOAc-MeOH (%50) |
| **1210-1233** | EtOAc-MeOH (%60) |
| **1234-1258** | EtOAc-MeOH (%70) |
| **1259-1282** | EtOAc-MeOH (%80) |
| **1283-1307** | EtOAc-MeOH (%90) |
| **1308-1332** | MeOH (%100) |

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

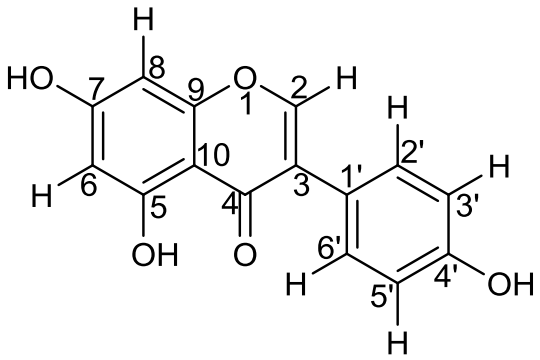
**Tablo 4.6** Diklorometan ekstresi kolon kromatografisinin birleştirilen tüplere uygulanan analizi

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

## 4.5 İzole Edilen Bileşiklerin Fiziksel ve Spektral Özellikleri

### 4.5.1 Genistein

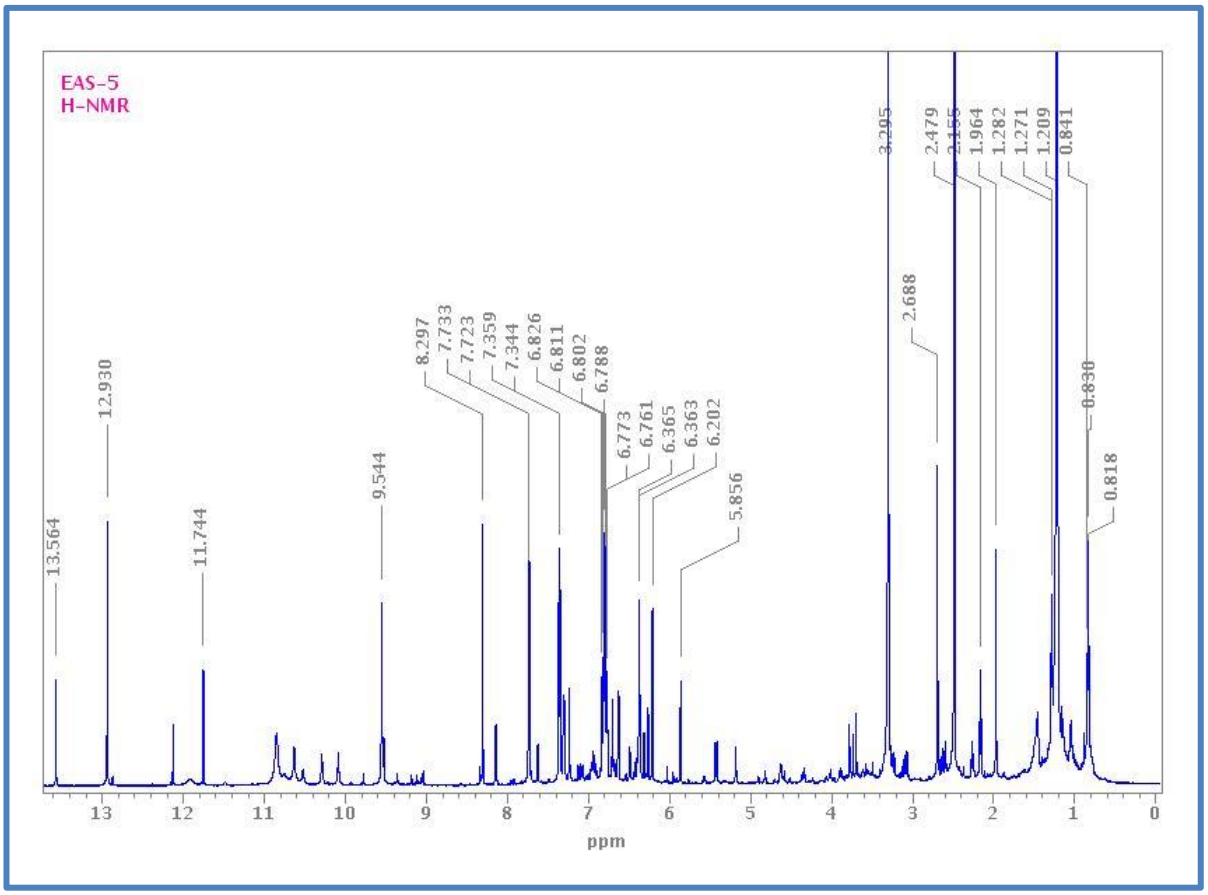
Genistein (4',5,7-Trihydroxyisoflavone) (Şekil 4.3), etilasetat ekstresinin kolon kromatografisinden (180-200 fraksiyon; 10.00 mg) izole edildi. Yapı tayinleri 1 ve 2 D NMR spektroskopisi kullanılarak aydınlatıldı. Elde edilen deneysel değerler literatür ile uyum içindedir (Yasuda et al. 1996).




**Şekil 4.3** Genistein molekülü

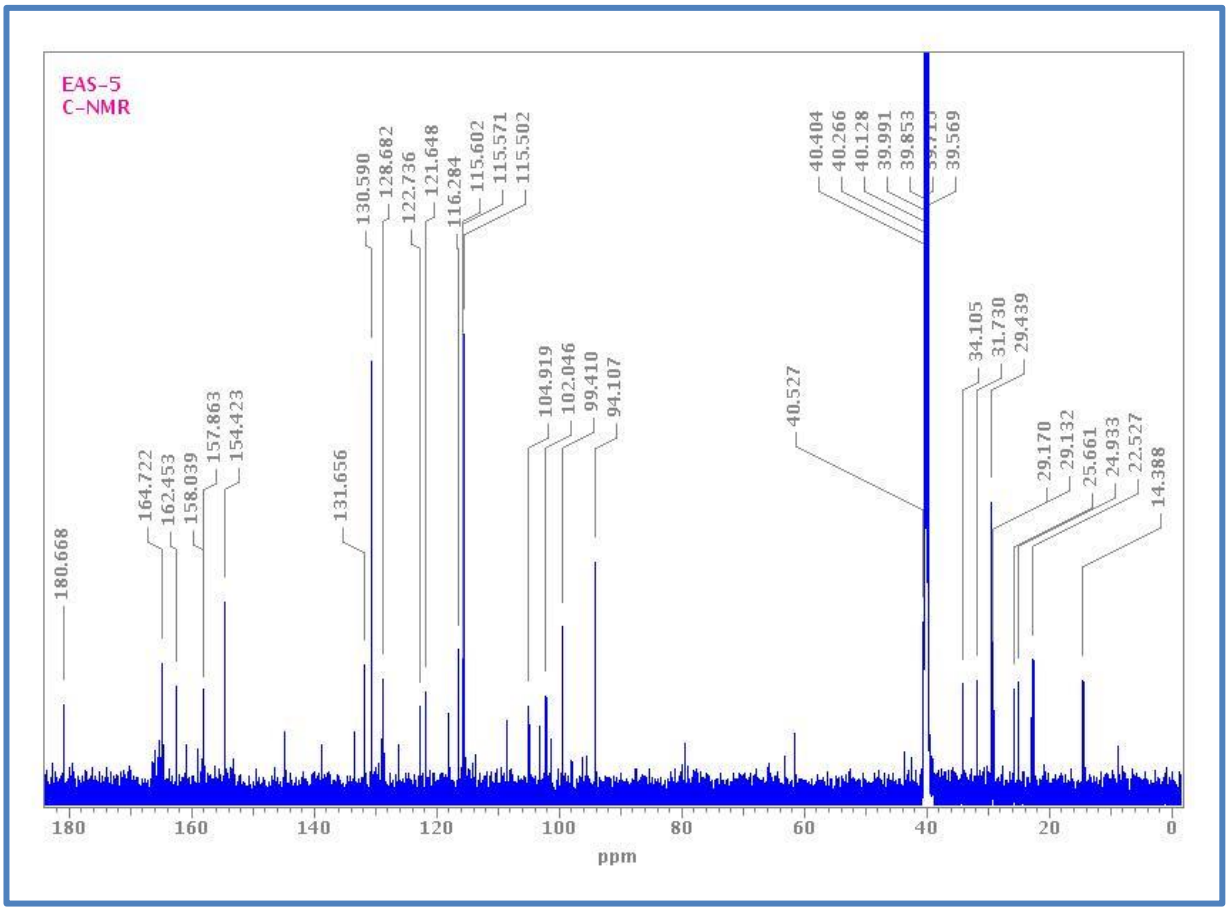
**Tablo 4.7** Genistein molekülünün NMR değerleri

| Karbon Atom | $^{1}H$ (Deneysel) | $^{13}C$ (Deneysel; DMSO-$d_6$) | $^{13}C$ (Yasuda et al. 1996; DMSO-$d_6$) |
|---|---|---|---|
| **C-1** | - | - | - |
| **C-2** | 8.3 s | 154.4 | 153.8 |
| **C-3** | - | 126.1 | 122.1 |
| **C-4** | - | 180.6 | 180.0 |
| **C-5** | - | 162.0 | 161.9 |
| **C-6** | 6.1 s | 99.0 | 99.0 |
| **C-7** | - | 164.0 | 164.7 |
| **C-8** | 6.3 s | 94.1 | 93.6 |
| **C-9** | - | 157.7 | 157.3 |
| **C-10** | - | 105.0 | 104.2 |
| **C-1'** | - | 122.0 | 121.1 |
| **C-2'** | 7.3 d | 130.7 | 130.0 |
| **C-3'** | 6.7 d | 115.7 | 114.9 |
| **C-4'** | - | 157.0 | 157.5 |
| **C-5'** | 6.7 d | 115.7 | 114.9 |
| **C-6'** | 7.3 d | 130.7 | 130.0 |



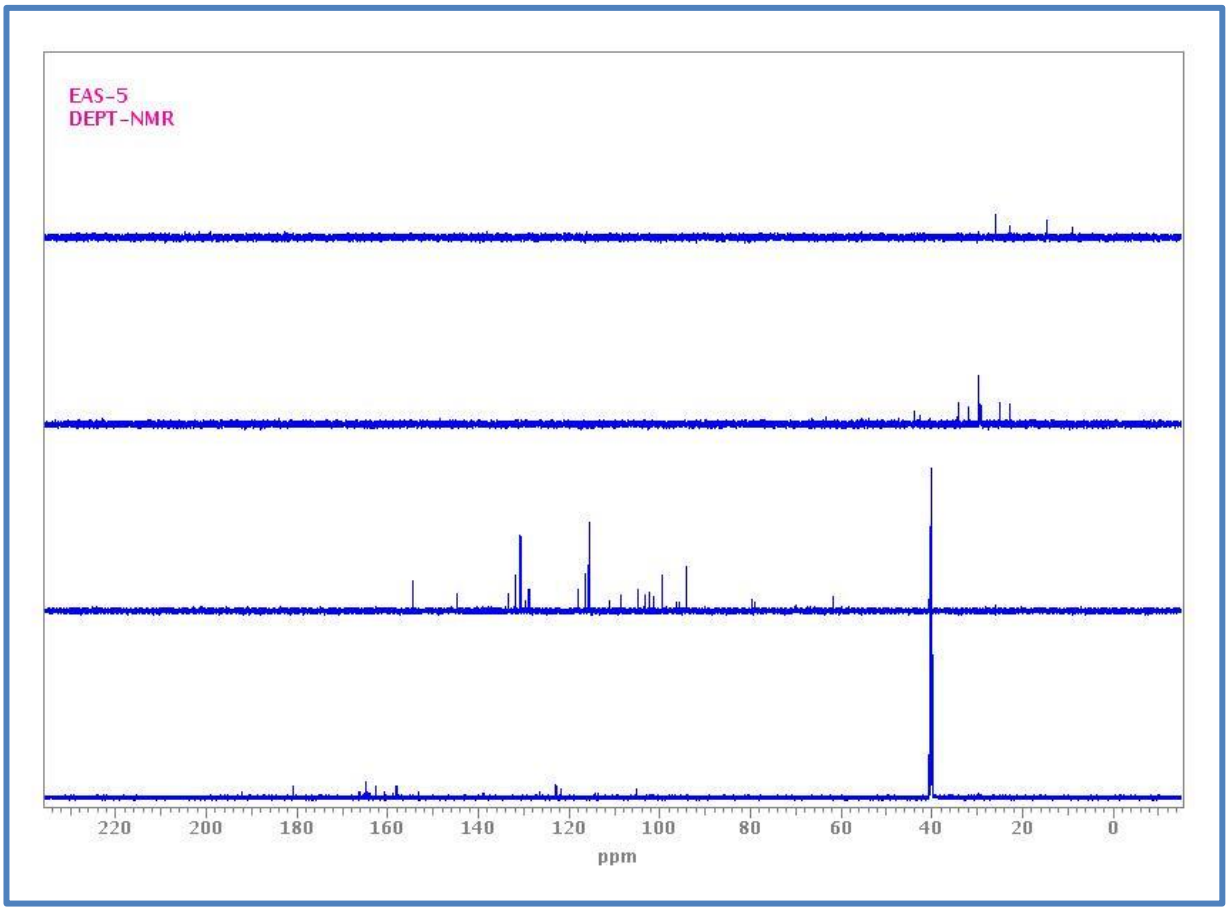

**Şekil 4.4** Genistein molekülünün $^{1}$H NMR spektrumu (600 MHz, DMSO-$d_6$)

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



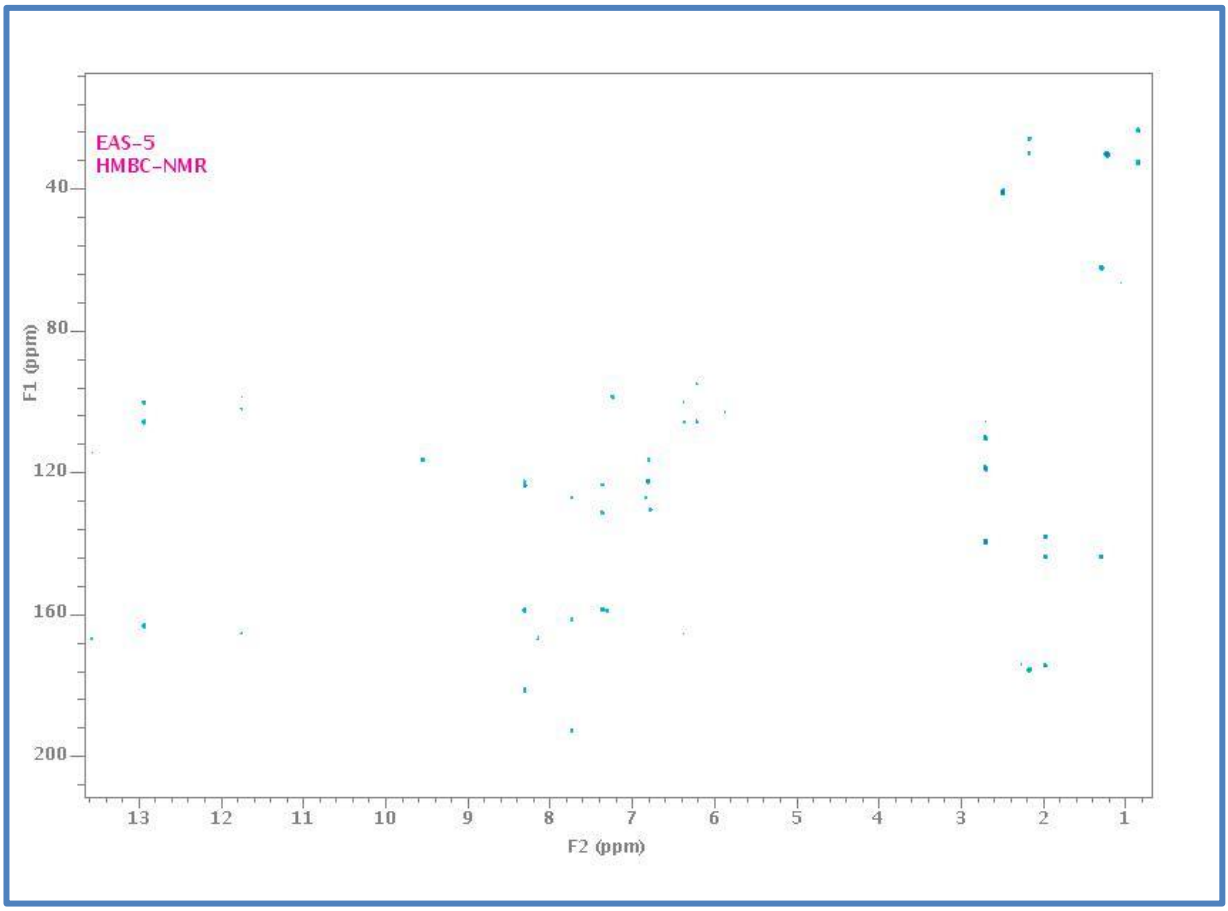

**Şekil 4.5** Genistein molekülünün $^{13}C$ NMR spektrumu (150 MHz, DMSO-$d_6$)

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



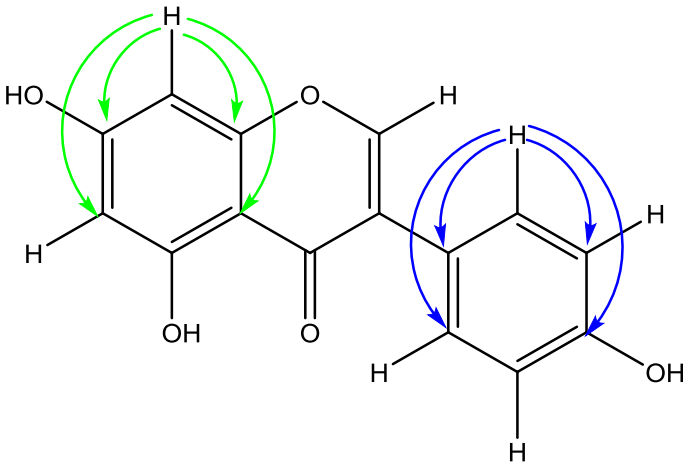

**Şekil 4.6** Genistein molekülünün DEPT NMR spektrumu (150 MHz, DMSO-$d_6$)

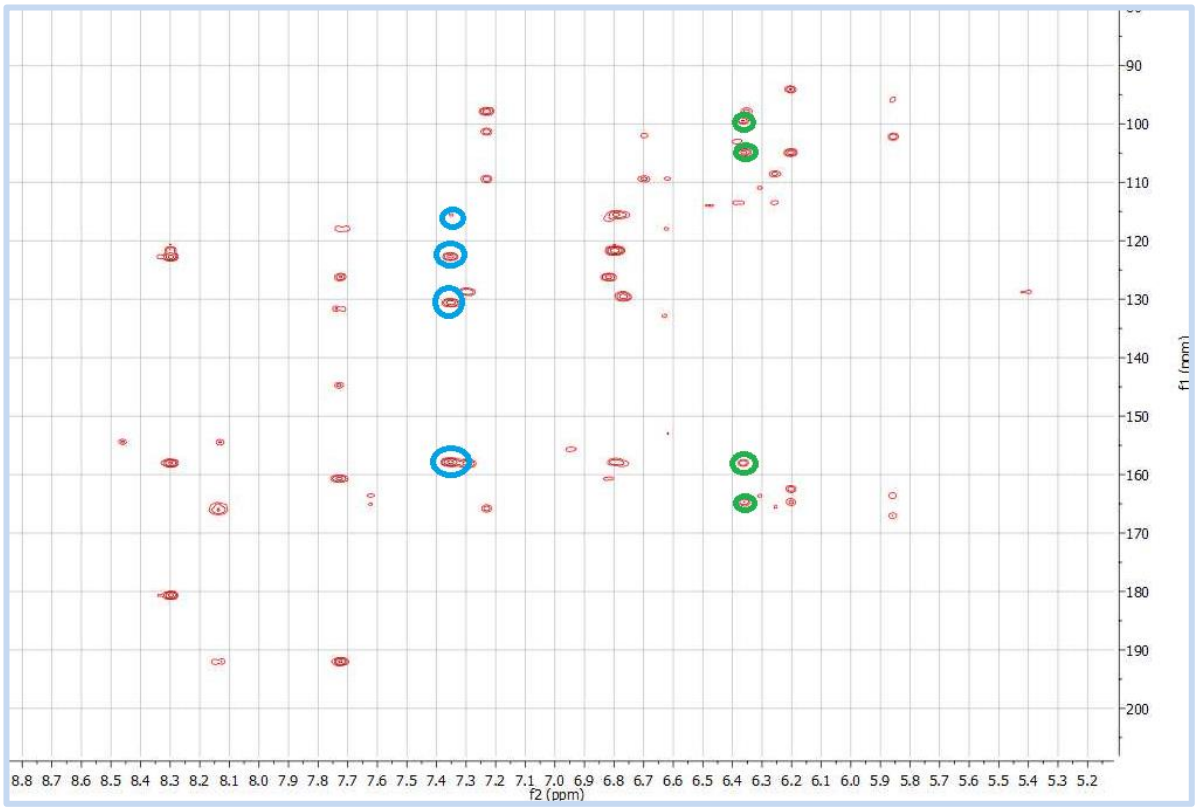
Genistein molekülünün DEPT NMR spektrumu incelendiğinde 15 adet karbon sinyaline rastlanmıştır. 15 karbondan 8 tanesi C karbon atomuna (126.19 ppm, 180.66 ppm, 162 ppm, 164 ppm, 157.7 ppm, 105 ppm, 122 ppm ve 157 ppm), 7 tanesi CH karbon atomlarına (154.42 ppm, 99 ppm, 94.15 ppm, 130.73 ppm, 115.75 ppm,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



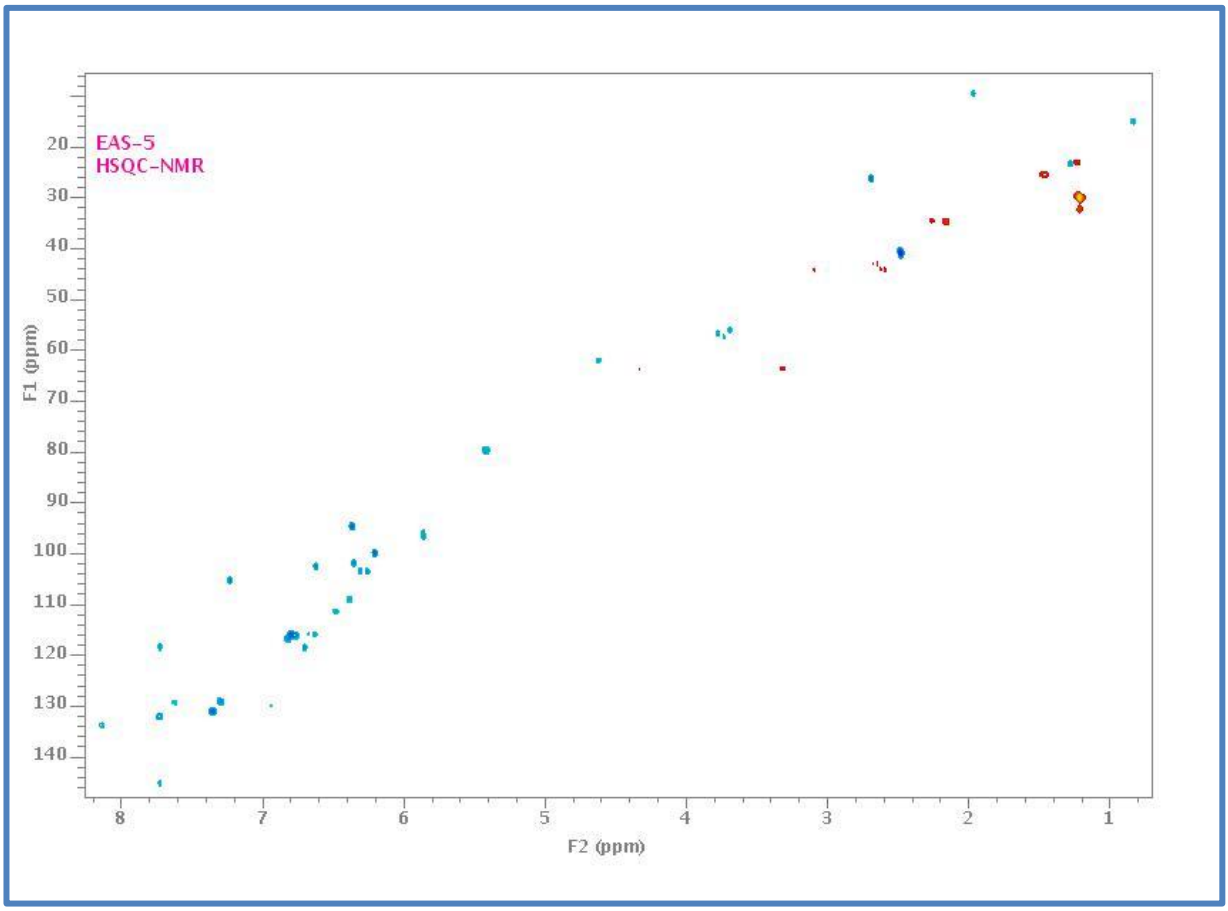

**Şekil 4.7** Genistein molekülünün HMBC NMR spektrumu (150 MHz, DMSO-$d_6$)

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




**Şekil 4.8** Genistein molekülünün HMBC NMR spektrumu



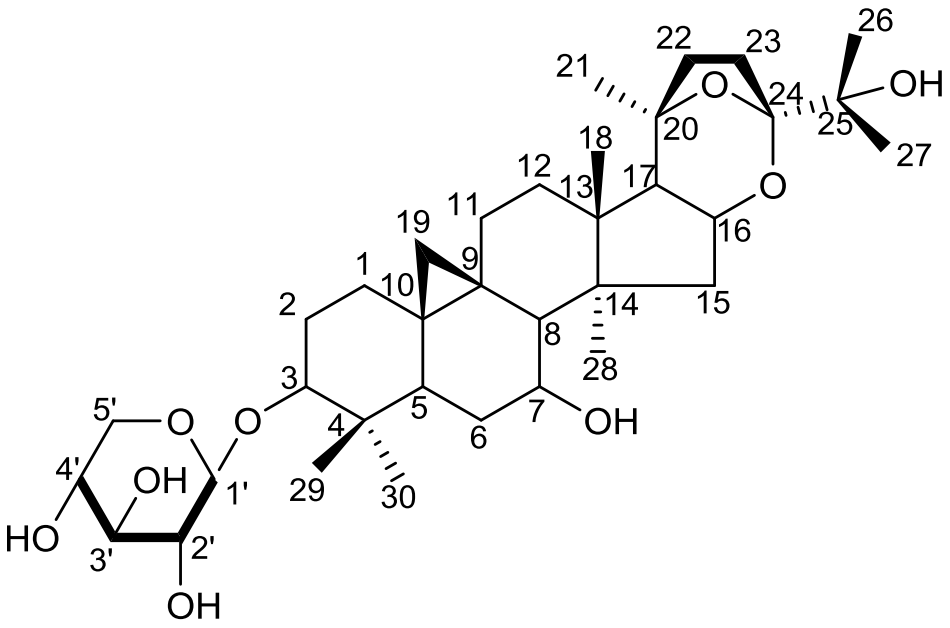

**Şekil 4.9** Genistein molekülünün HSQC NMR spektrumu (150 MHz, DMSO-$d_6$)

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

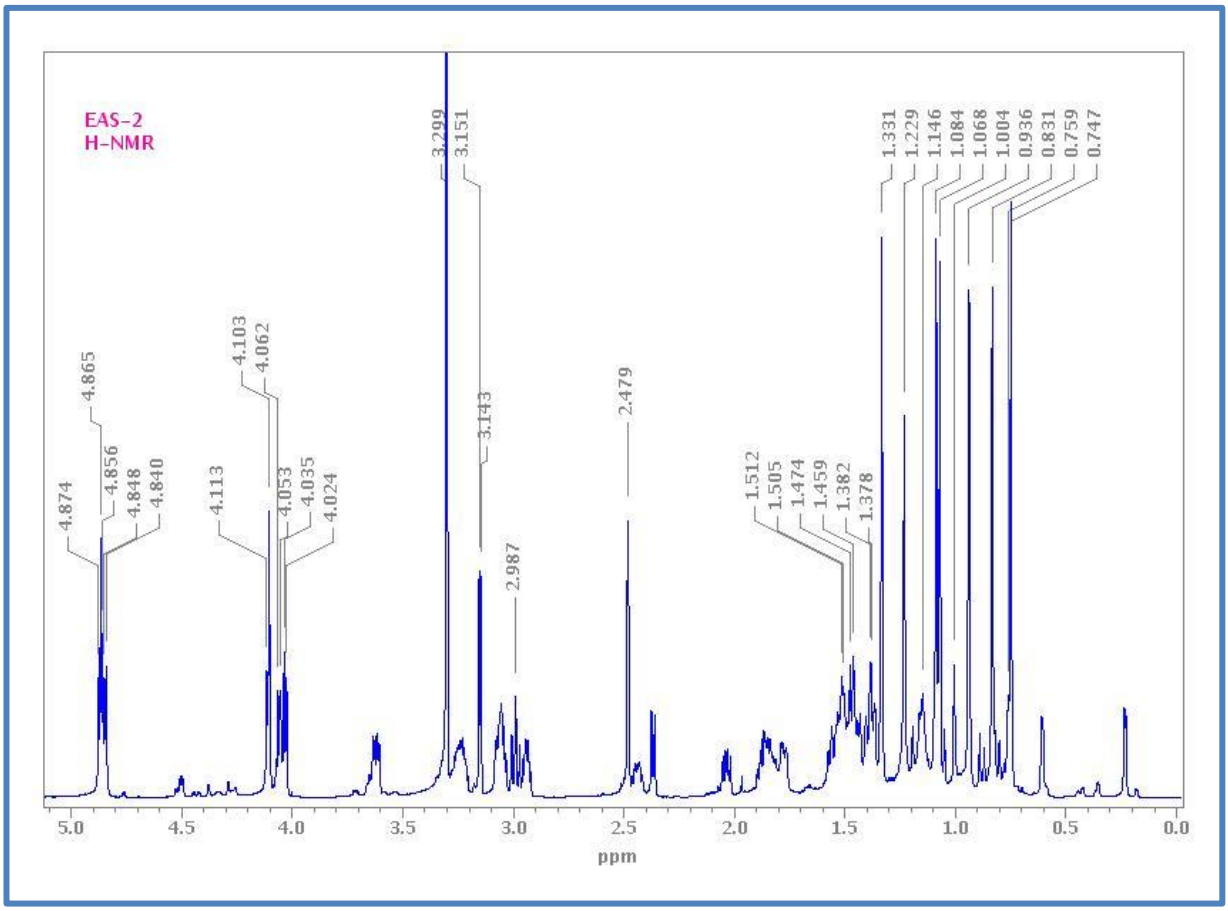
### 4.5.2 Sikloalpiosid

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

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

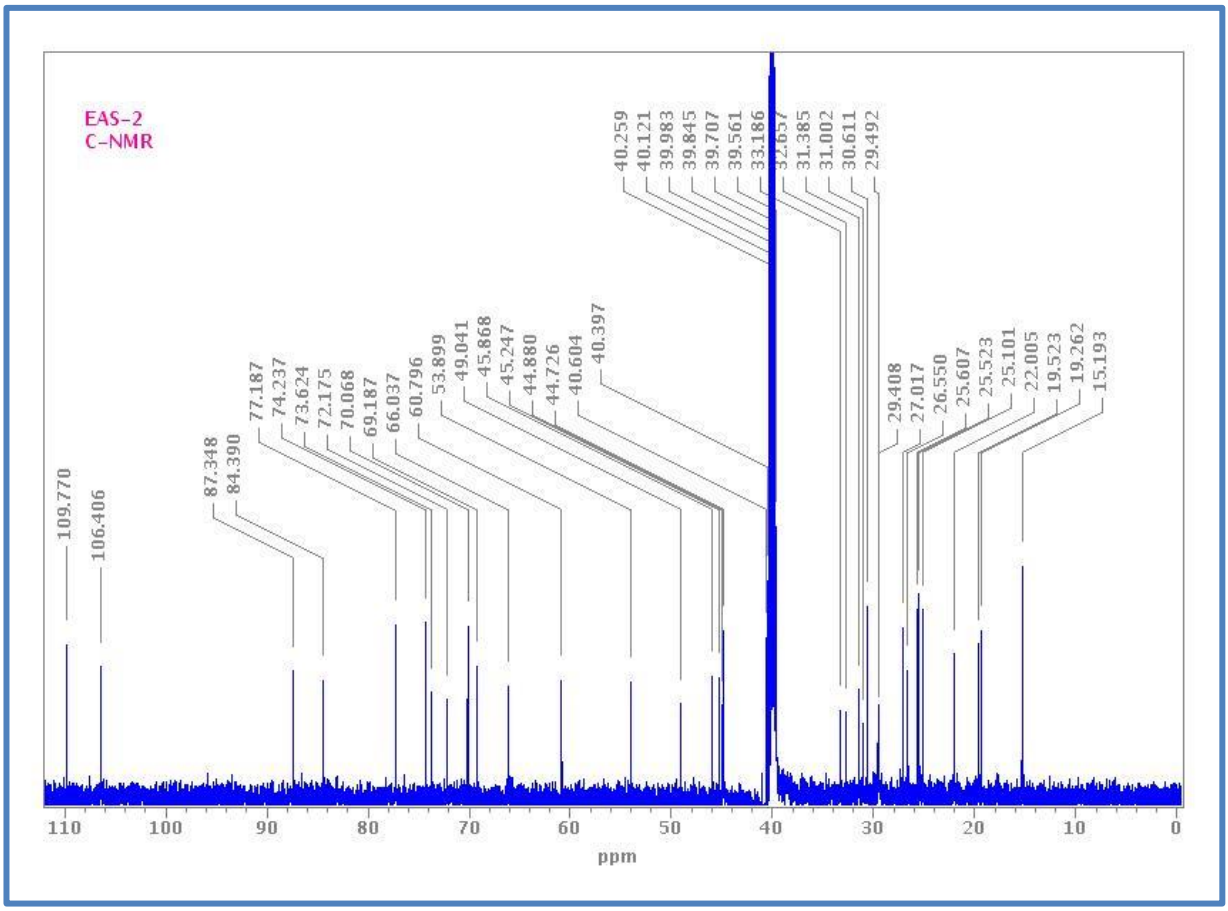



**Şekil 4.10** Sikloalpiosid molekülü



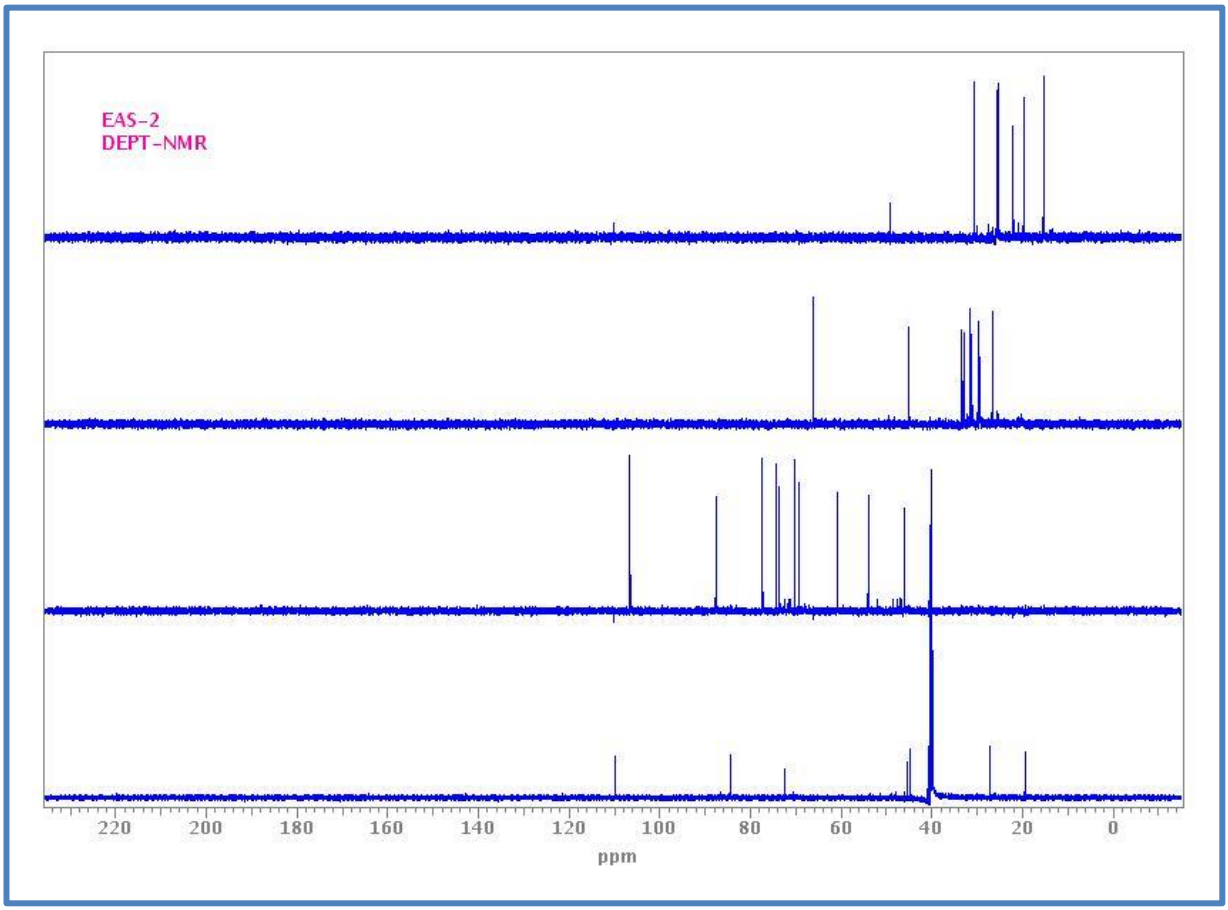

**Şekil 4.11** Sikloalpiosid molekülünün $^{1}$H NMR spektrumu (600 MHz, DMSO-$d_6$)

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



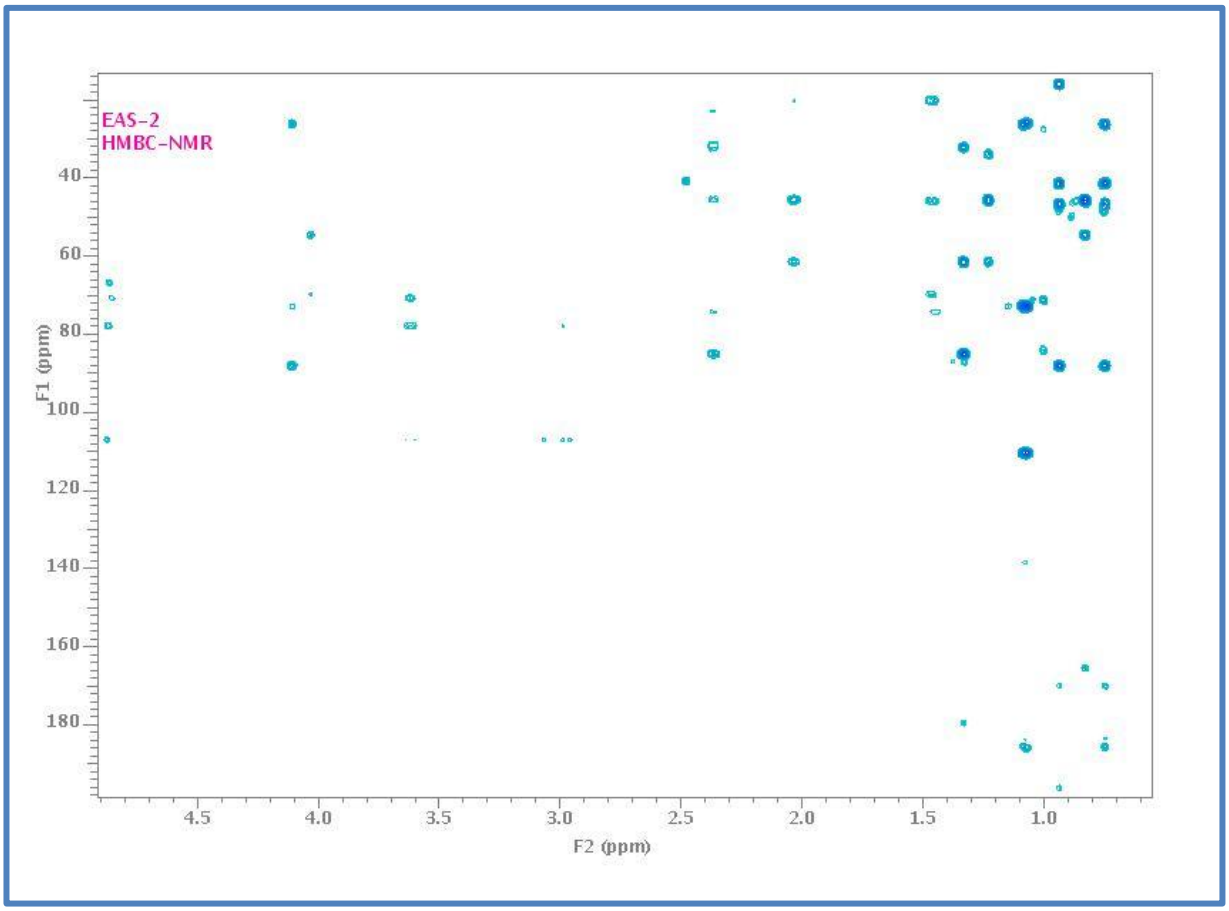

**Şekil 4.12.** Sikloalpiosid molekülünün $^{13}C$ NMR spektrumu (150 MHz, DMSO-$d_6$)

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



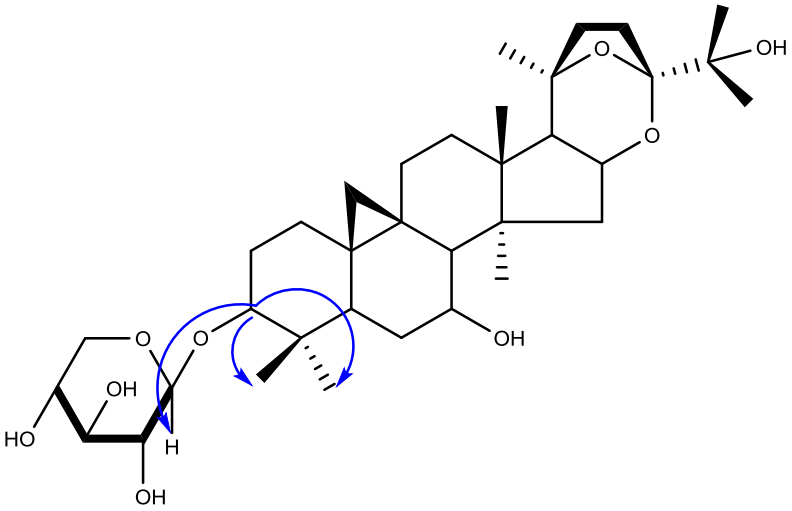

**Şekil 4.13** Sikloalpiosid molekülünün DEPT NMR spektrumu (150 MHz, DMSO-$d_6$)

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

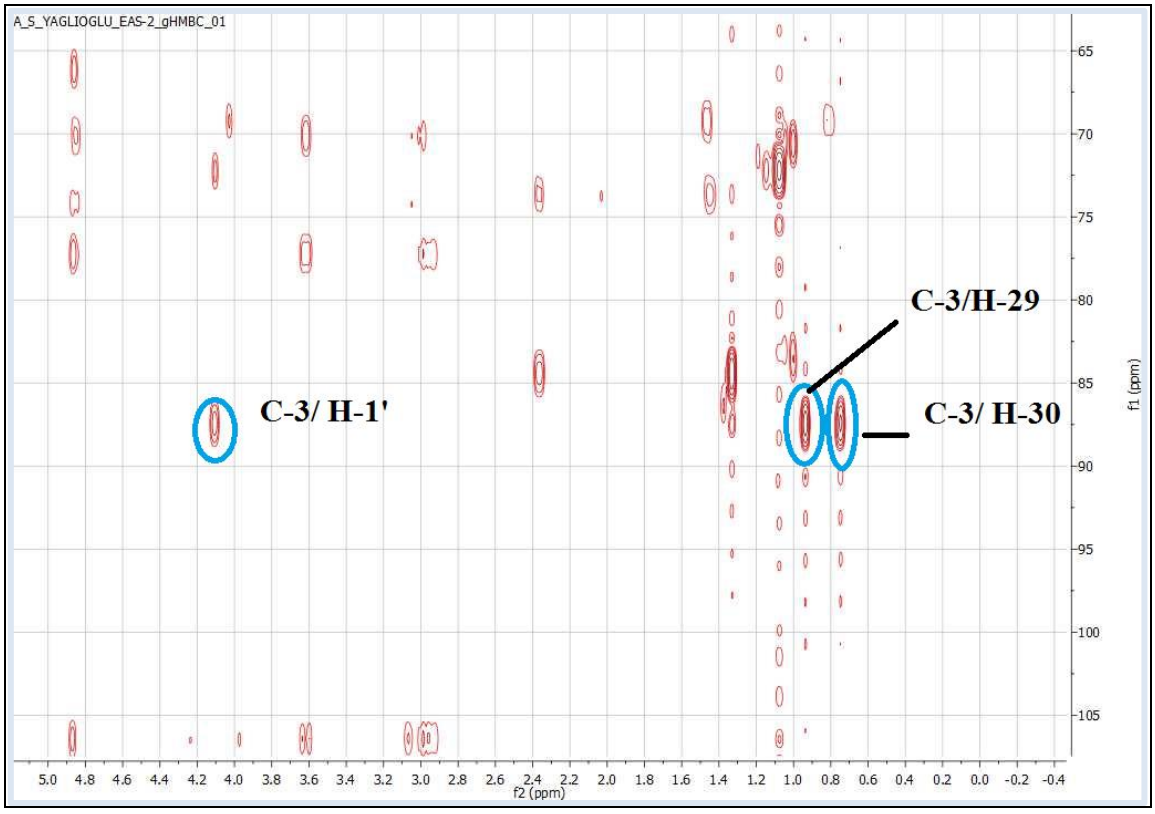



**Şekil 4.14** Sikloalpiosid molekülünün HMBC NMR spektrumu (150 MHz, DMSO-$d_6$)

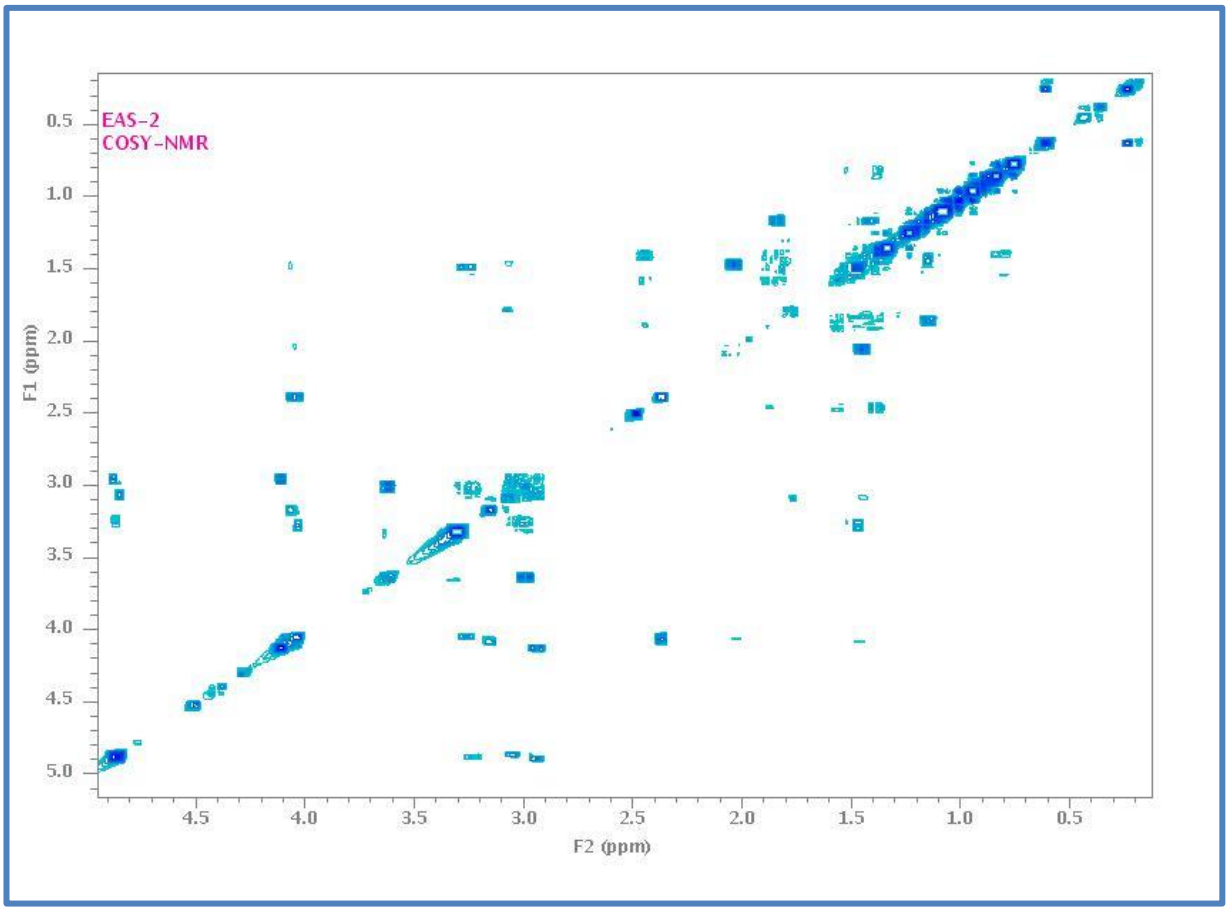
Sikloalpiosid molekülünün HMBC NMR spektrumu (Şekil 4.14) incelendiğinde 87.3 ppm deki C-3 karbonunun 4.10 ppm deki H-1' protonuyla, 0.94 ppm deki H-29 metil protonlarıyla ve 0.75 ppm deki H-30 metil protonlarıyla etkileştiği görülmektedir (Şekil 4.16) (Şekil 4.15).




**Şekil 4.15** Sikloalpiosid molekülünün HMBC etkileşimi

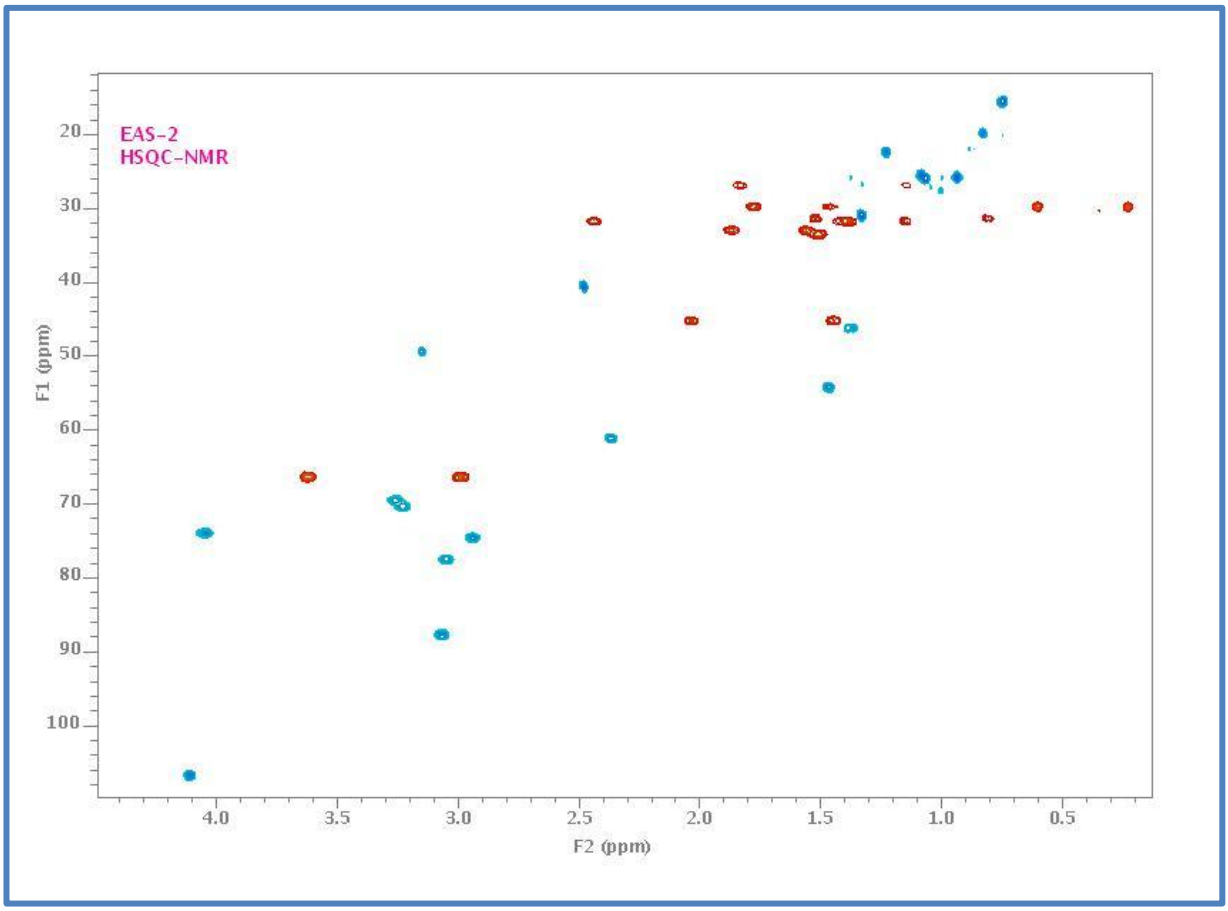



**Şekil 4.16** Sikloalpiosid molekülünün HMBC NMR spektrumu




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

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




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

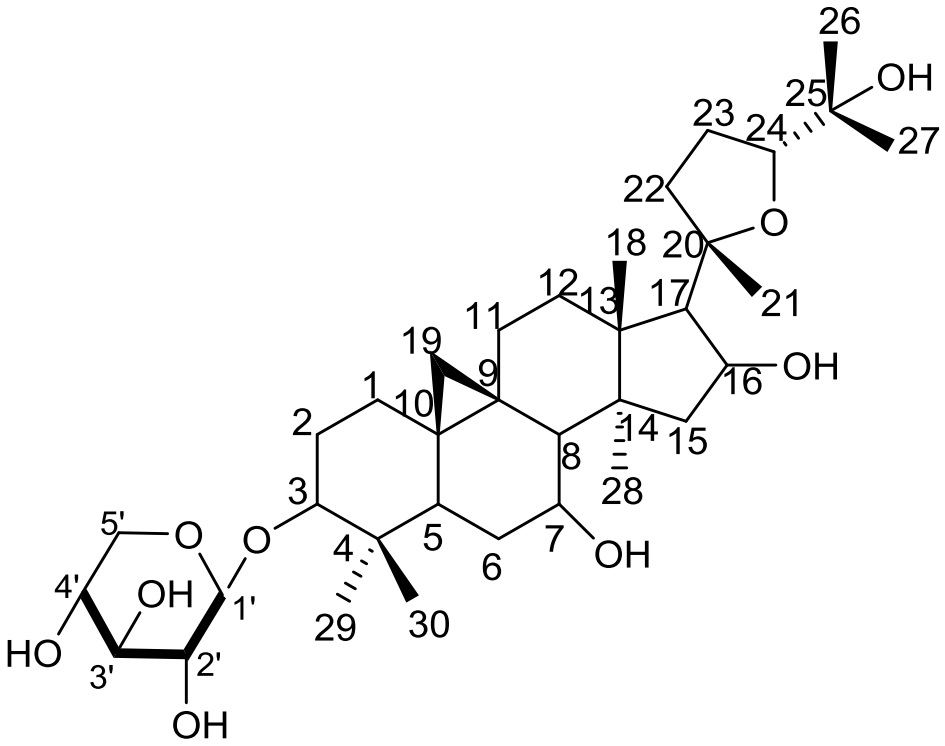
Sikloalpiosid molekülünün HSQC NMR spektrumu incelendiğinde; C-1 karbonu (32.1 ppm) $CH_2$ protonları ile (1.15-1.50 ppm); C-2 karbonu (30.2 ppm) $CH_2$ protonları ile (1.92-2.48 ppm); C-3 karbonu (87.3 ppm) CH protonu ile (3.06 ppm); C5 karbonu (45.26 ppm) CH protonu ile (1.38 ppm); C-6 karbonu (31.06 ppm); $CH_2$ protonları ile (0.8-1.53 ppm); C-7 karbonu (69.22 ppm) CH protonu ile (3.25 ppm); C-8 karbonu (53.81 ppm) CH protonu ile (1.46 ppm); C-11 karbonu (26.4 ppm) $CH_2$ protonları ile (1.23-1.90 ppm); C-12 karbonu (33.1 ppm) $CH_2$ protonları ile (1.68-2.31 ppm); C-15 karbonu (44.88 ppm) $CH_2$ protonları ile (1.44-2.03 ppm); C-16 karbonu (73.62 ppm) CH protonları ile (4.04 ppm); C-17 karbonu (60.79 ppm) CH protonu ile (2.36 ppm); C-19 karbonu (29.55 ppm) $CH_2$ protonları ile (0.23-0.60 ppm); C-22 karbonu (32.65 ppm) $CH_2$ protonları ile (1.86-1.55 ppm); C-23 karbonu (31.38 ppm) $CH_2$ protonları ile (1.38-2.42 ppm) korele olduğu görülmüştür (Şekil 4.18).

**Tablo 4.8** Sikloalpiosid molekülünün NMR değerleri

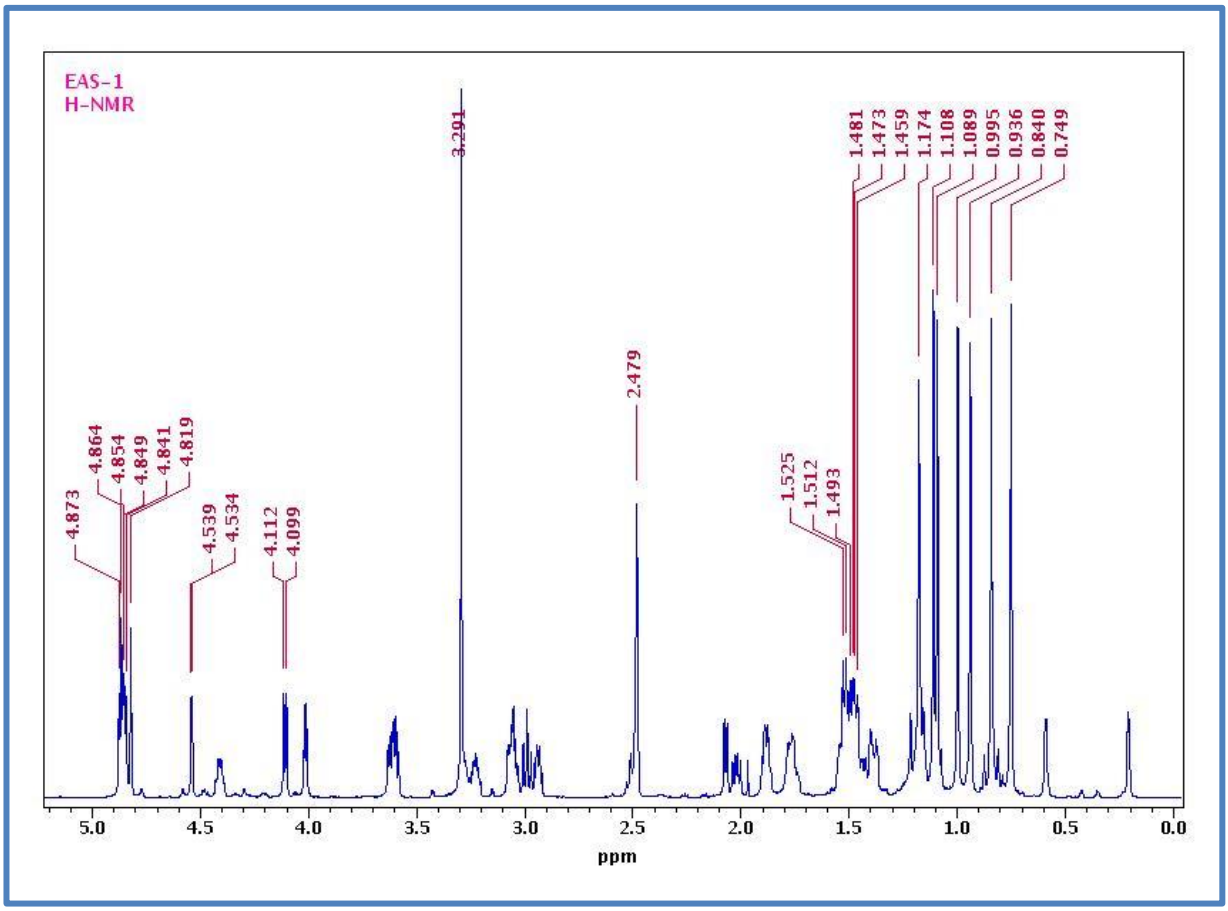
| **Karbon Atom** | | **$^{1}$H (Deneysel)** | **$^{13}$C (Deneysel; DMSO-$d_6$)** | **$^{13}$C (Agzamova and Isaev, 1995; $C_5D_5N$)** |
|---|---|---|---|---|
| **C-1** | $CH_2$ | 1.15-1.50 | 32.10 | 31.83 |
| **C-2** | $CH_2$ | 1.92-2.48 | 30.20 | 29.92 |
| **C-3** | CH | 3.06 dd | 87.30 | 88.13 |
| **C-4** | C | - | 42.70 | 41.03 |
| **C-5** | CH | 1.38 | 45.26 | 46.40 |
| **C-6** | $CH_2$ | 0.8-1.53 | 31.06 | 31.83 |
| **C-7** | CH | 3.25 | 69.22 | 69.95 |
| **C-8** | CH | 1.46 | 53.81 | 54.63 |
| **C-9** | C | - | 19.25 | 19.52 |
| **C-10** | C | - | 27.01 | 27.35 |
| **C-11** | $CH_2$ | 1.23-1.90 | 26.40 | 26.85 |
| **C-12** | $CH_2$ | 1.68-2.31 | 33.10 | 33.10 |
| **C-13** | C | - | 44.88 | 45.11 |
| **C-14** | C | - | 45.24 | 45.59 |
| **C-15** | $CH_2$ | 1.44-2.03 | 44.88 | 45.74 |
| **C-16** | CH | 4.04 q | 73.62 | 74.33 |
| **C-17** | CH | 2.36 d | 60.79 | 61.29 |
| **C-18** | $CH_3$ | 1.23 s | 22.06 | 22.14 |
| **C-19** | $CH_2$ | 0.23-0.60 d | 29.55 | 29.93 |
| **C-20** | C | - | 84.39 | 84.86 |
| **C-21** | $CH_3$ | 1.32 s | 30.68 | 30.57 |
| **C-22** | $CH_2$ | 1.86-1.55 | 32.65 | 31.67 |
| **C-23** | $CH_2$ | 1.38-2.42 | 31.38 | 33.54 |
| **C-24** | C | - | 109.00 | 110.58 |
| **C-25** | C | - | 72.18 | 72.80 |
| **C-26** | $CH_3$ | 1.08 s | 25.22 | 25.59 |
| **C-27** | $CH_3$ | 1.07 s | 25.60 | 25.23 |
| **C-28** | $CH_3$ | 0.83 s | 19.54 | 19.60 |
| **C-29** | $CH_3$ | 0.94 s | 25.60 | 25.70 |
| **C-30** | $CH_3$ | 0.75 s | 15.20 | 15.32 |
| **1'** | CH | 4.10 d | 106.14 | 107.56 |
| **2'** | CH | 2.95 t | 74.23 | 75.52 |
| **3'** | CH | 2.99 t | 78.40 | 78.59 |
| **4'** | CH | 3.22 m | 70.06 | 71.20 |
| **5'** | $CH_2$ | 2.98-3.62 5a t 5e dd | 66.03 | 67.12 |
| **6'** | - | | | |

### 4.5.3 Sikloalpiosid D

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

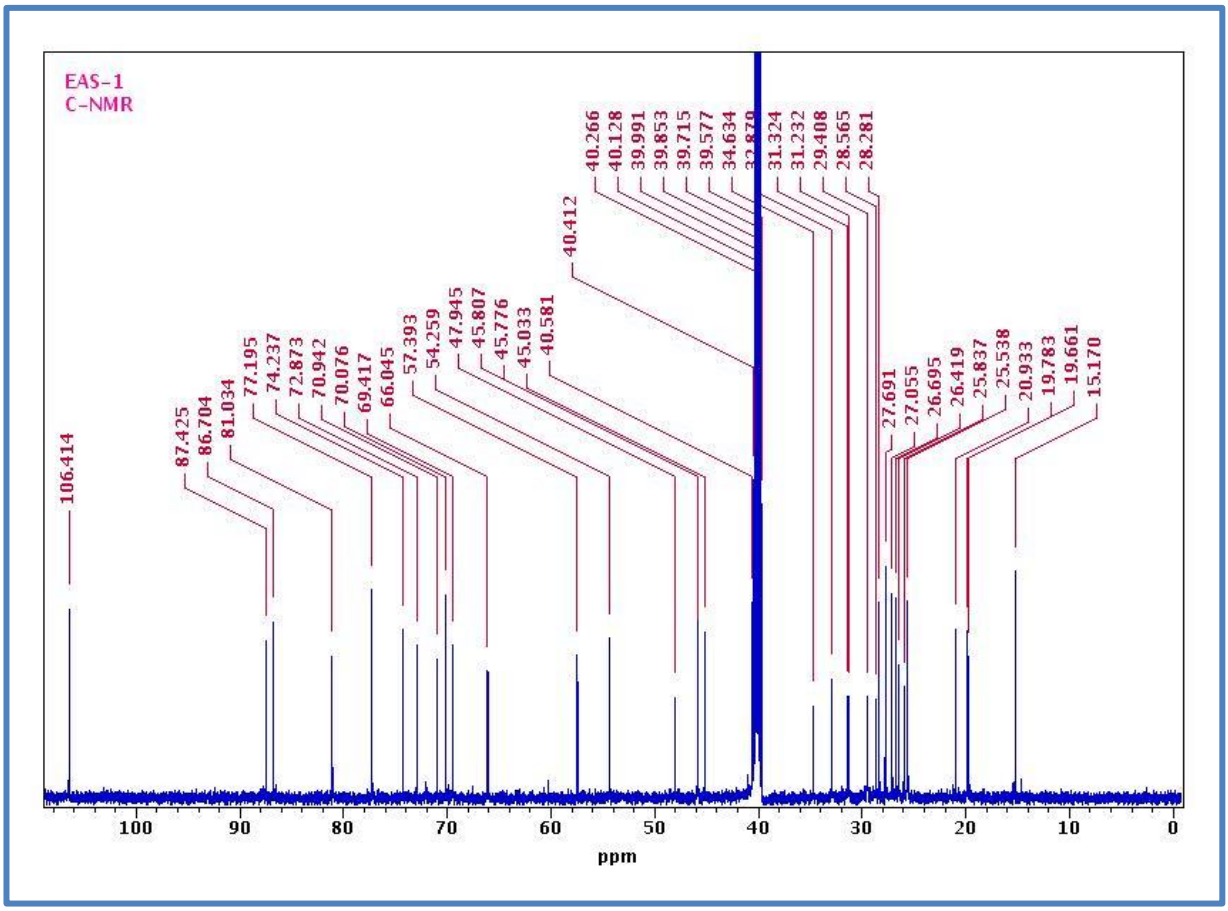



**Şekil 4.19** Sikloalpiosid-D molekülü



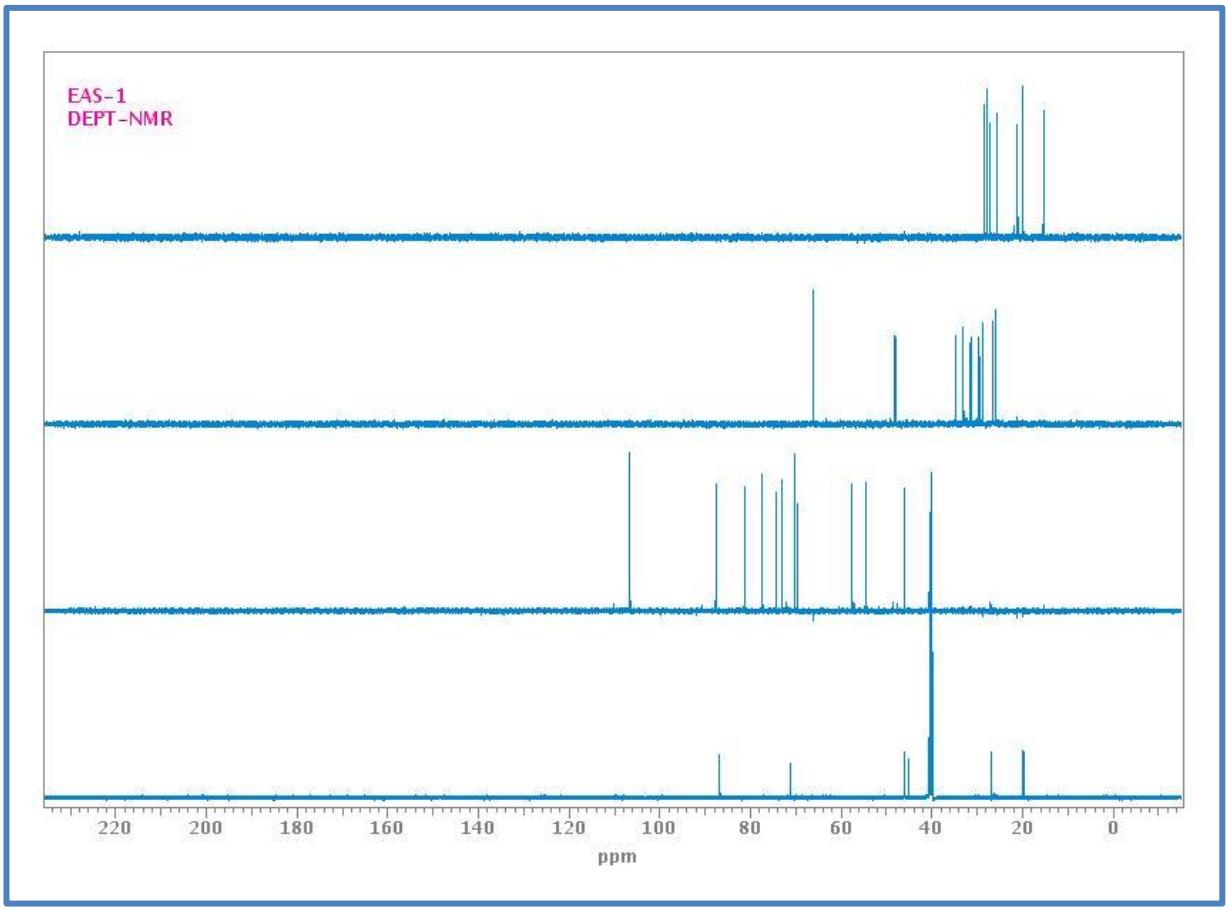

**Şekil 4.20** Sikloalpiosid-D molekülünün $^{1}$H NMR spektrumu (600 MHz, DMSO-$d_6$)

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



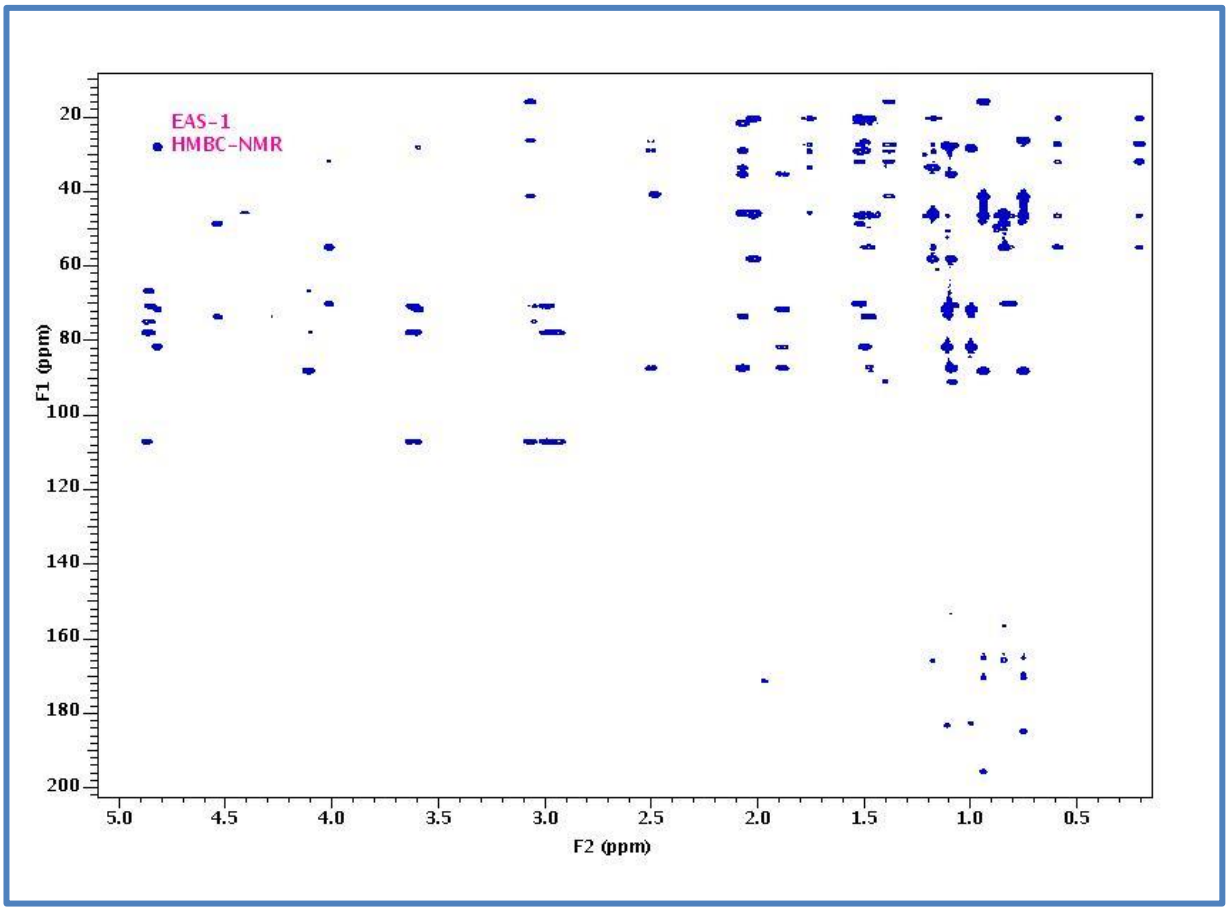

**Şekil 4.21** Sikloalpiosid-D molekülünün $^{13}C$ NMR spektrumu (150 MHz, DMSO-$d_6$)

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



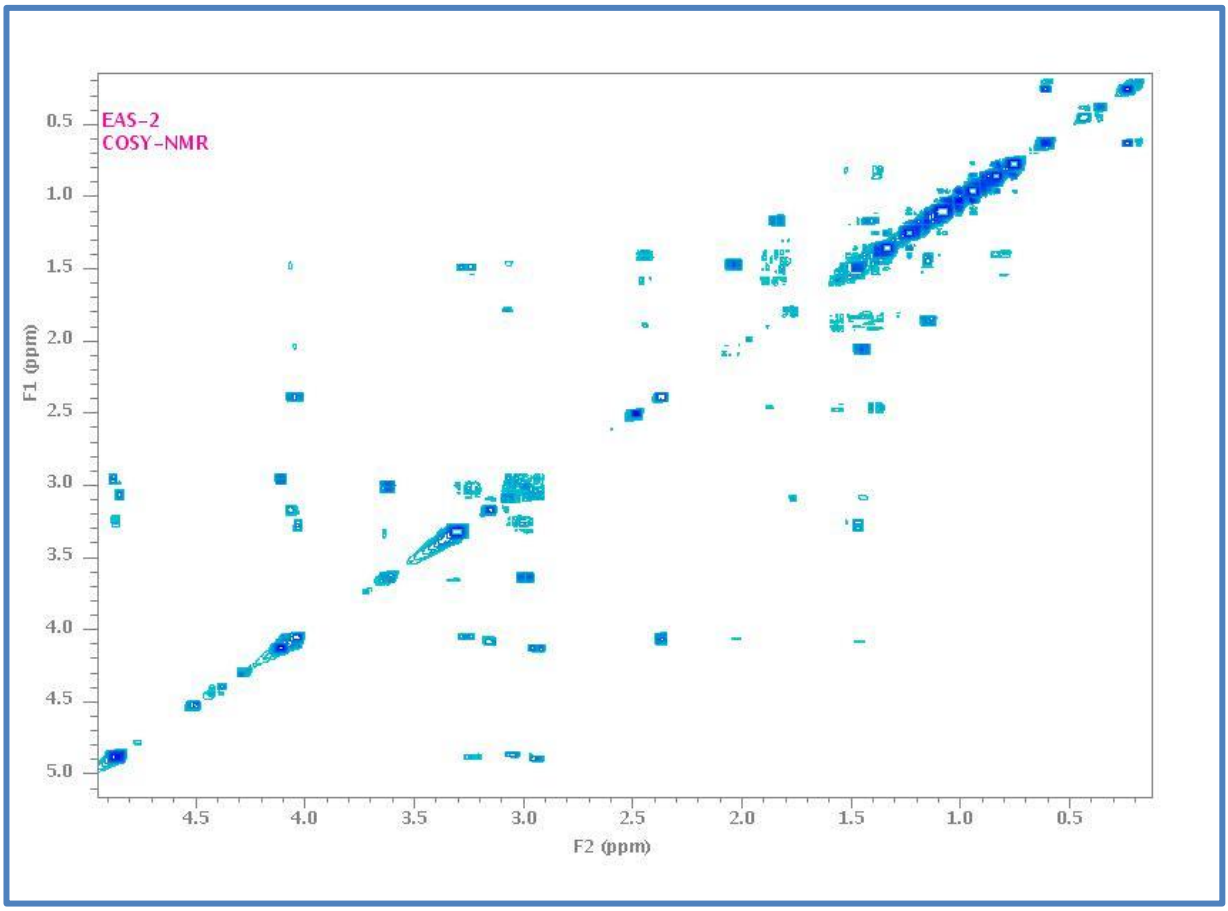

**Şekil 4.22** Sikloalpiosid-D molekülünün DEPT NMR spektrumu (150 MHz, DMSO-$d_6$)

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



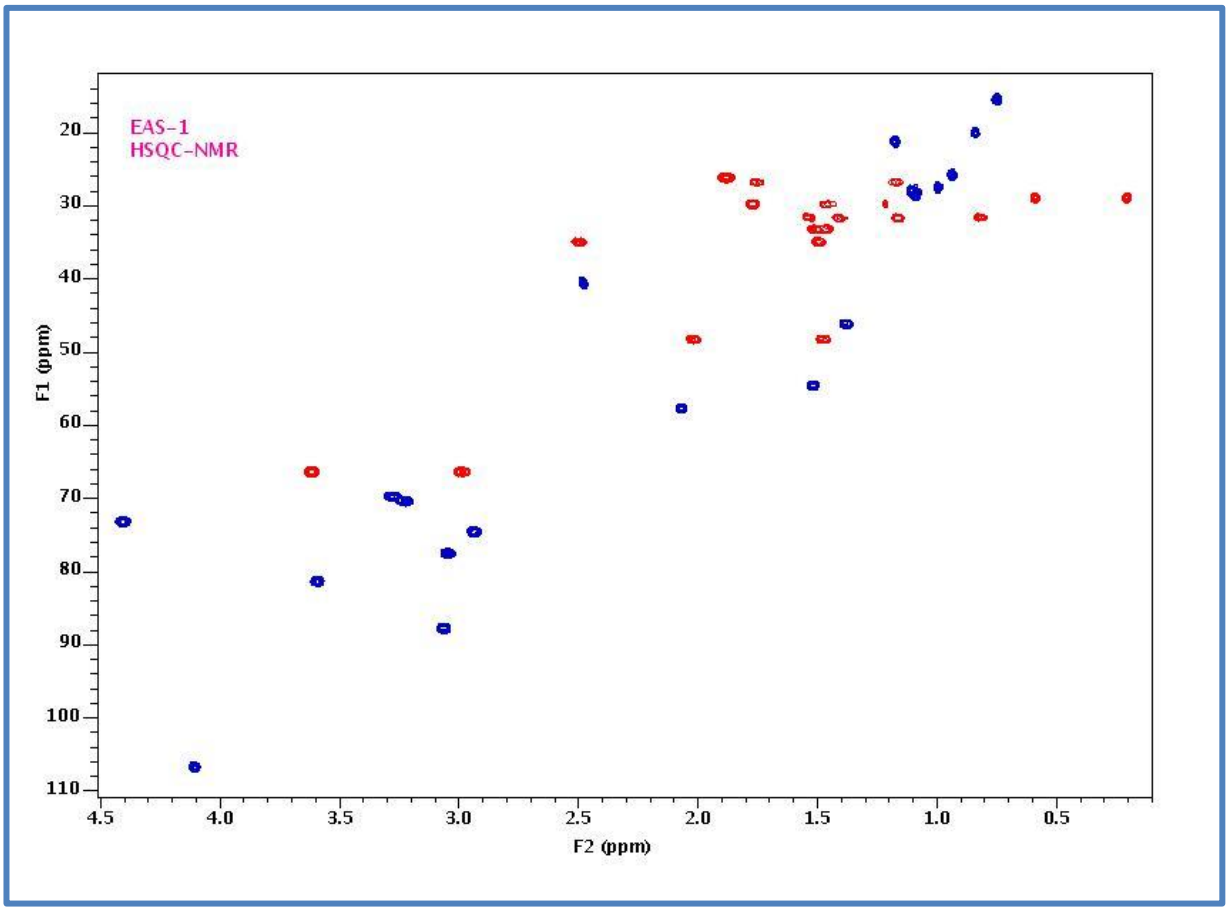

**Şekil 4.23** Sikloalpiosid-D molekülünün HMBC NMR spektrumu (150 MHz, DMSO-$d_6$)

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




**Şekil 4.24** Sikloalpiosid-D molekülünün COSY NMR spektrumu (150 MHz, DMSO-$d_6$)

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




**Şekil 4.25** Sikloalpiosid-D molekülünün HSQC NMR spektrumu (150 MHz, DMSO-$d_6$)

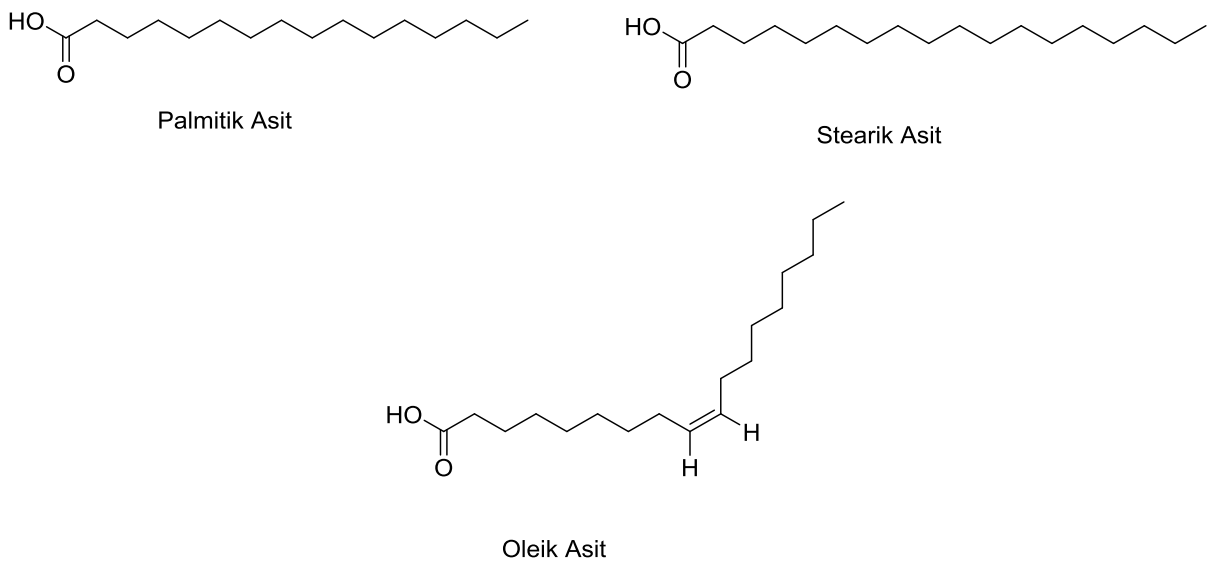
Sikloalpiosid-D molekülünün HSQC NMR spektrumu incelendiğinde C-1 karbonu (32.88 ppm) $CH_2$ protonları ile (1.50-1.45 ppm); C-2 karbonu (26.42 ppm) $CH_2$ protonları ile (1.17-1.75 ppm); C-3 karbonu (87.4 ppm) CH protonu ile (3.06 ppm); C-5 karbonu (45.81 ppm) CH protonu ile (1.38 ppm); C-6 karbonu (31.23 ppm) $CH_2$ protonları ile (0.82-1.53 ppm); C-7 karbonu (69.41 ppm) CH protonu ile (3.27 ppm); C-8 karbonu (54.26 ppm) CH protonu ile (1.52 ppm); C-11 karbonu (26.40 ppm) $CH_2$ protonları ile (1.77 ppm-1.17 ppm); C-12 karbonu (32.90 ppm) $CH_2$ protonları ile (1.46 ppm-1.51 ppm); C-15 karbonu (47.95 ppm) $CH_2$ protonları ile (1.47-2.01 ppm); C-16 karbonu (72.87 ppm) CH protonu ile (4.40 ppm); C-17 karbonu (57.39 ppm) CH protonu ile (2.06 ppm); C-19 karbonu (28.57 ppm) $CH_2$ protonları ile (0.20-0.58 ppm); C-22 karbonu (34.64 ppm) $CH_2$ protonları ile (1.49-2.49 ppm); C-23 karbonu (25.83 ppm) $CH_2$ protonları ile (1.87- 0.99 ppm); C-24 karbonu (81.03 ppm) CH protonu ile (3.59 ppm) korele olmuştur (Şekil 4.25).

**Tablo 4.9** Sikloalpiosid-D molekülünün NMR değerleri

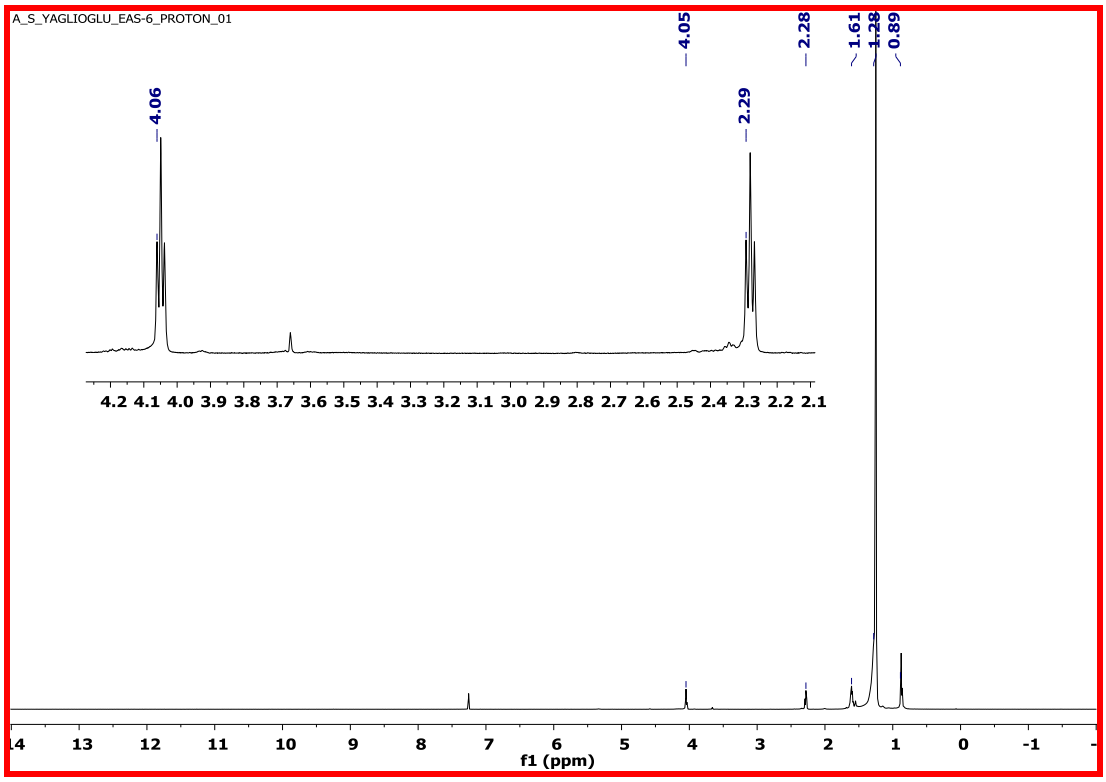
| **Karbon Atom** | | **$^{1}$H (Deneysel)** | **$^{13}$C (Deneysel; DMSO-$d_6$)** | **$^{13}$C (Isaev et al. 2012; $C_5D_5N$)** |
|---|---|---|---|---|
| **C-1** | $CH_2$ | 1.50-1.45 | 32.88 | 31.84 |
| **C-2** | $CH_2$ | 1.17-1.75 | 26.42 | 29.93 |
| **C-3** | CH | 3.06 dd | 87.4 | 88.23 |
| **C-4** | C | - | 40.58 | 41.03 |
| **C-5** | CH | 1.38 | 45.81 | 46.37 |
| **C-6** | $CH_2$ | 0.82-1.53 | 31.23 | 31.75 |
| **C-7** | CH | 3.27 m | 69.41 | 70.23 |
| **C-8** | CH | 1.52 d | 54.26 | 55.10 |
| **C-9** | C | - | 19.69 | 20.04 |
| **C-10** | C | - | 26.69 | 27.08 |
| **C-11** | $CH_2$ | 1.77-1.17 | 26.40 | 26.45 |
| **C-12** | $CH_2$ | 1.46-1.51 | 32.90 | 33.40 |
| **C-13** | C | - | 45.78 | 45.52 |
| **C-14** | C | - | 45.04 | 46.37 |
| **C-15** | $CH_2$ | 1.47-2.01 dd | 47.95 | 48.78 |
| **C-16** | CH | 4.40 q | 72.87 | 73.77 |
| **C-17** | CH | 2.06 d | 57.39 | 57.98 |
| **C-18** | $CH_3$ | 1.17 | 20.93 | 21.25 |
| **C-19** | $CH_2$ | 0.20-0.58 d | 28.57 | 28.86 |
| **C-20** | C | - | 86.70 | 87.31 |
| **C-21** | $CH_3$ | 1.08 | 28.28 | 28.64 |
| **C-22** | $CH_2$ | 1.49-2.49 td | 34.64 | 35.02 |
| **C-23** | $CH_2$ | 1.87-0.99 | 25.83 | 26.75 |
| **C-24** | CH | 3.59 dd | 81.03 | 81.70 |
| **C-25** | C | - | 70.95 | 71.21 |
| **C-26** | $CH_3$ | 1.11 | 27.61 | 27.12 |
| **C-27** | $CH_3$ | 0.99 | 27.06 | 28.22 |
| **C-28** | $CH_3$ | 0.84 | 19.78 | 19.87 |
| **C-29** | $CH_3$ | 0.74 | 15.17 | 25.73 |
| **C-30** | $CH_3$ | 0.94 | 25.5 | 15.30 |
| **1'** | CH | 4.10 | 106.38 | 107.51 |
| **2'** | CH | 3.34 | 74.0 | 78.51 |
| **3'** | CH | 3.18 | 76.4 | 78.55 |
| **4'** | CH | 3.32 | 69.9 | 71.21 |
| **5'** | $CH_2$ | 3.54-3.74 | 66.5 | 67.11 |
| **6'** | - | | | |

### 4.5.4 EAS-6 fraksiyonun GC-MS Analiz sonuçları

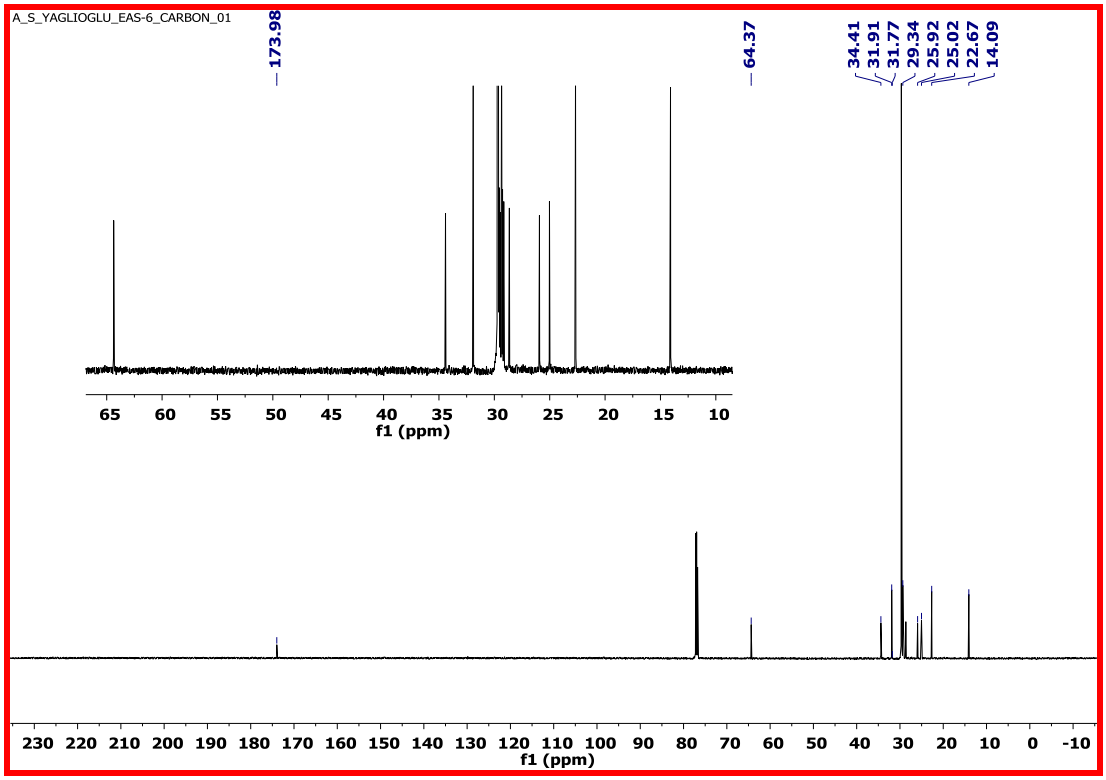
Diklorometan ekstresinin kolon kromatografisinin 80-200. fraksiyonlarının (140 mg; EAS-6) GC-MS analiz sonucunda yağ asitleri karışımı elde edildi (Tablo 4.10). $^{1}H$ ve $^{13}C$ NMR spektrumları ve GC-MS verileri sonucunda ana bileşen olarak palmitik asit, stearik asit ve oleik asit belirlendi (Şekil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




**Şekil 4.26** EAS-6 fraksiyonunun ana bileşenleri




**Şekil 4.27** EAS-6 Proton NMR



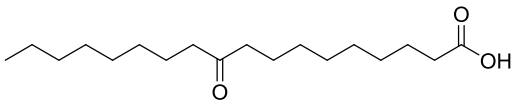

**Şekil 4.28** EAS-6 $^{13}$C NMR

**Tablo 4.10** EAS-6 fraksiyonunun GC-MS analiz sonucu

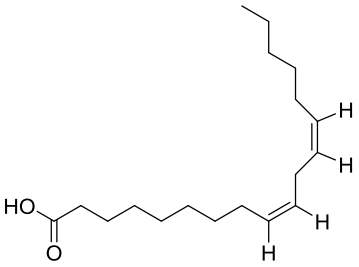
| No | RT | İzomer | Bileşik Adı | % miktar |
|---|---|---|---|---|
| **Doymuş Yağ Asitleri** | | | | |
| **1** | 53.69 | $C_{16}$:0 | Palmitik asit | 6.20 |
| **2** | 59.76 | $C_{19}$:0 | Stearik asit | 11.56 |
| | | | **Ara Toplam** | 17.76 |
| **Doymamış Yağ Asidi** | | | | |
| **3** | 60.44 | $C_{19}$:1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

### 4.5.5 EAS-7 fraksiyonunun GC-MS Analiz sonuçları

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

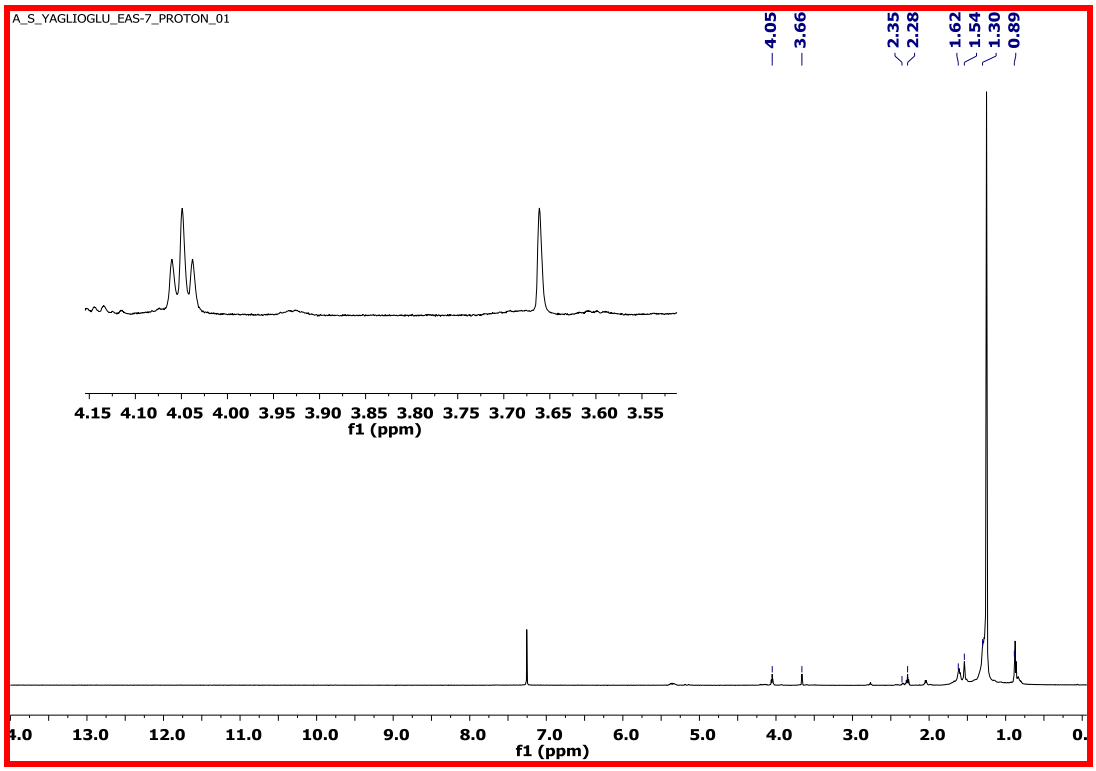



10-Oktadekanoik Asit

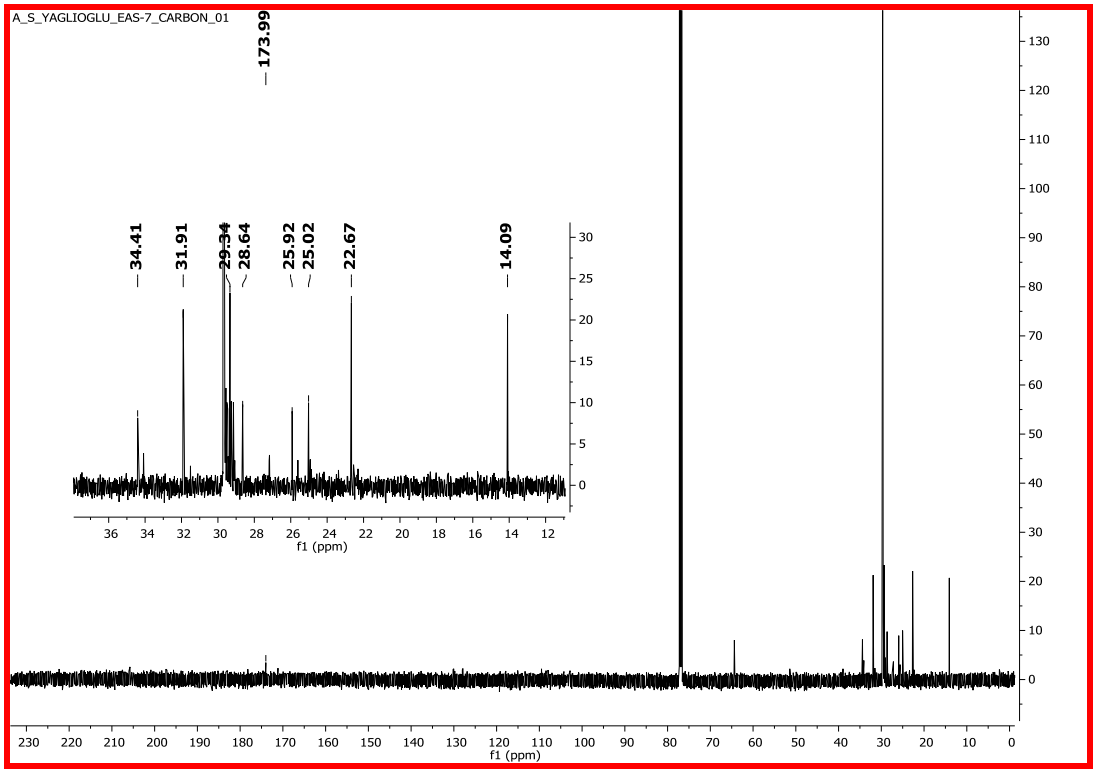



Linoleik Asit

**Şekil 4.29** EAS-7 fraksiyonunun ana bileşenleri




**Şekil 4.30** EAS-7 $^{1}$H NMR




**Şekil 4.31** EAS-7 $^{13}$C NMR

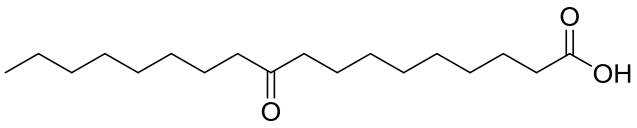
**Tablo 4.11** EAS-7 fraksiyonunun GC-MS analiz sonucu

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

***Nispi Değerlerdir.**

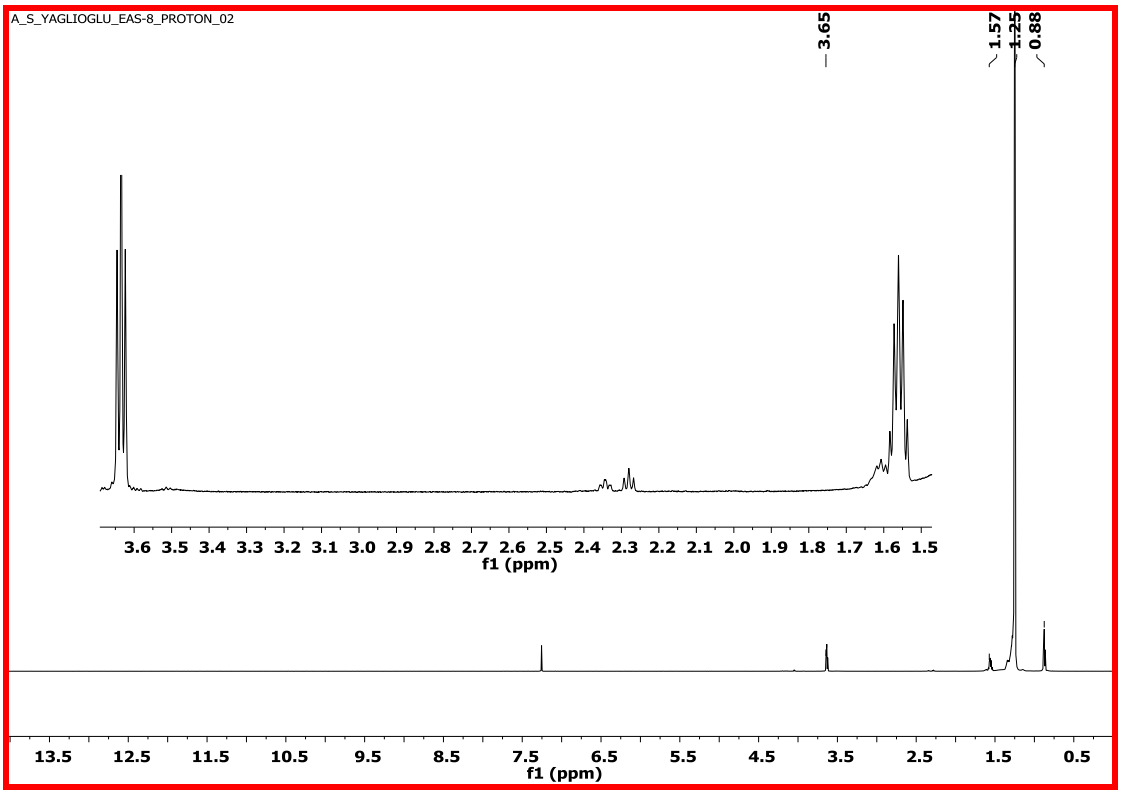
### 4.5.6 EAS-8 fraksiyonunun GC-MS Analiz sonuçları

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

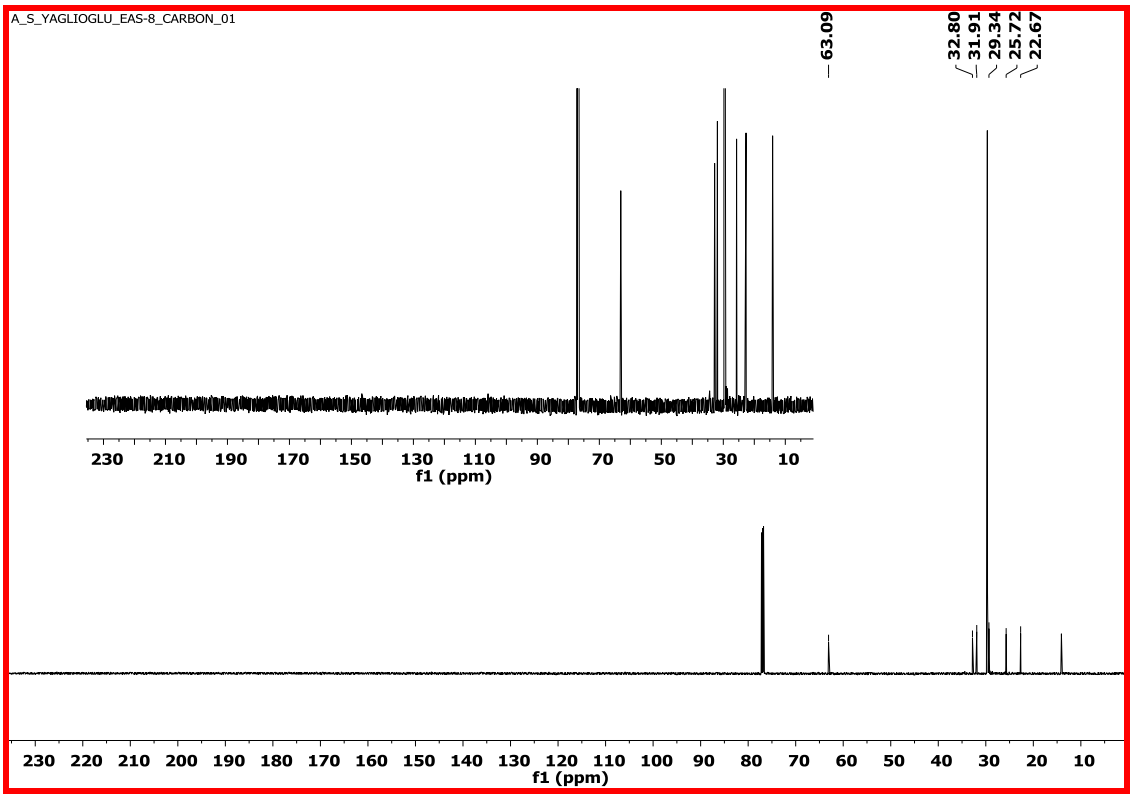



10-Oktadekanoik Asit

**Şekil 4.32** EAS-8 fraksiyonunun ana bileşeni




**Şekil 4.33** EAS-8 $^{1}$H NMR




**Şekil 4.34** EAS-8 $^{13}$C NMR

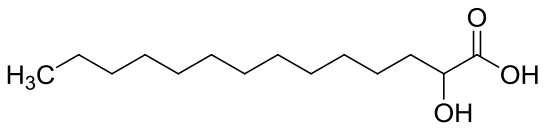
**Tablo 4.12** EAS-8 fraksiyonunun GC-MS analiz sonucu

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

***Nispi Değerlerdir.**

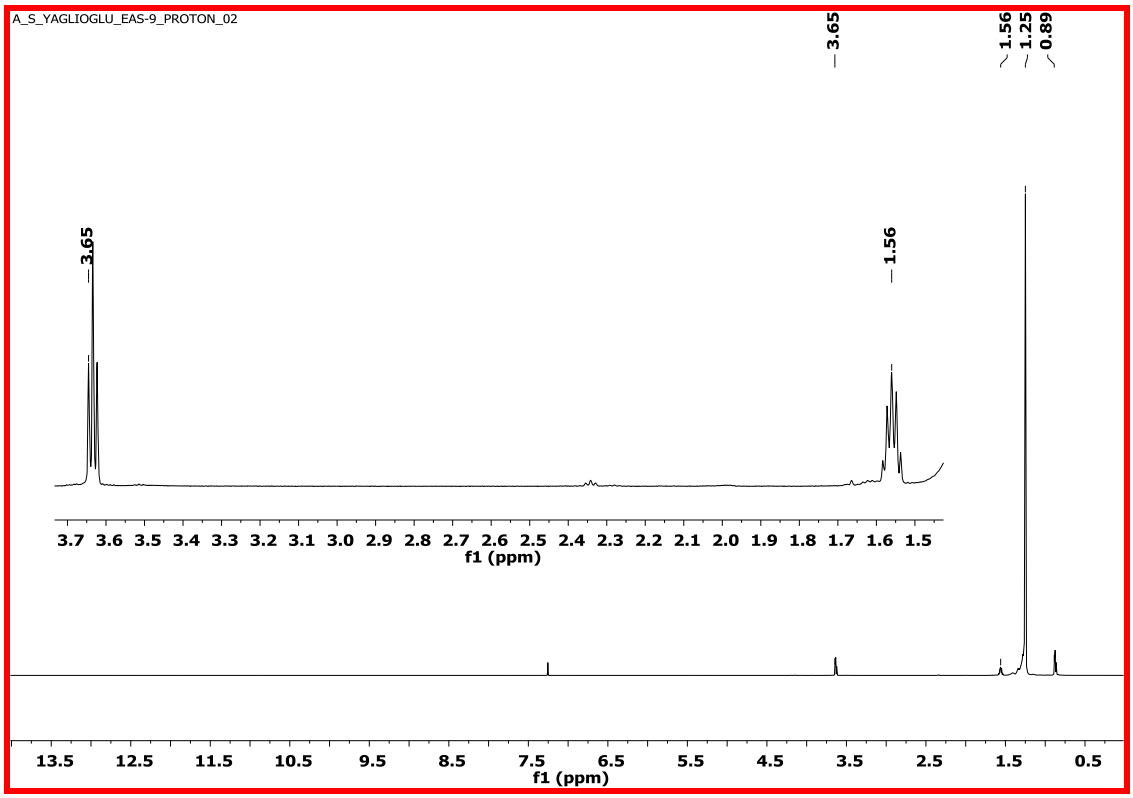
### 4.5.7 EAS-9 fraksiyonunun GC-MS Analiz sonuçları

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

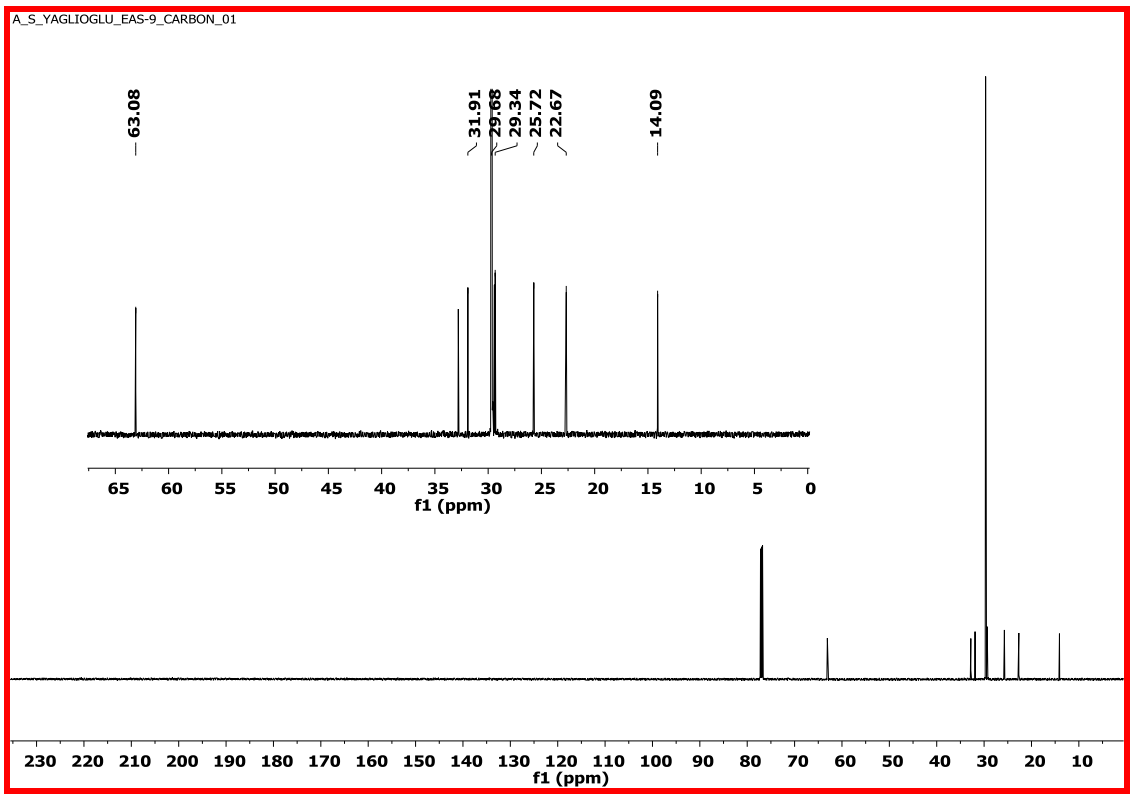



2-Hidroksi Miristik Asit

**Şekil 4.35** EAS-9 fraksiyonunun ana bileşeni




**Şekil 4.36** EAS-9 $^{1}$H NMR




**Şekil 4.37** EAS-9 $^{13}$C NMR

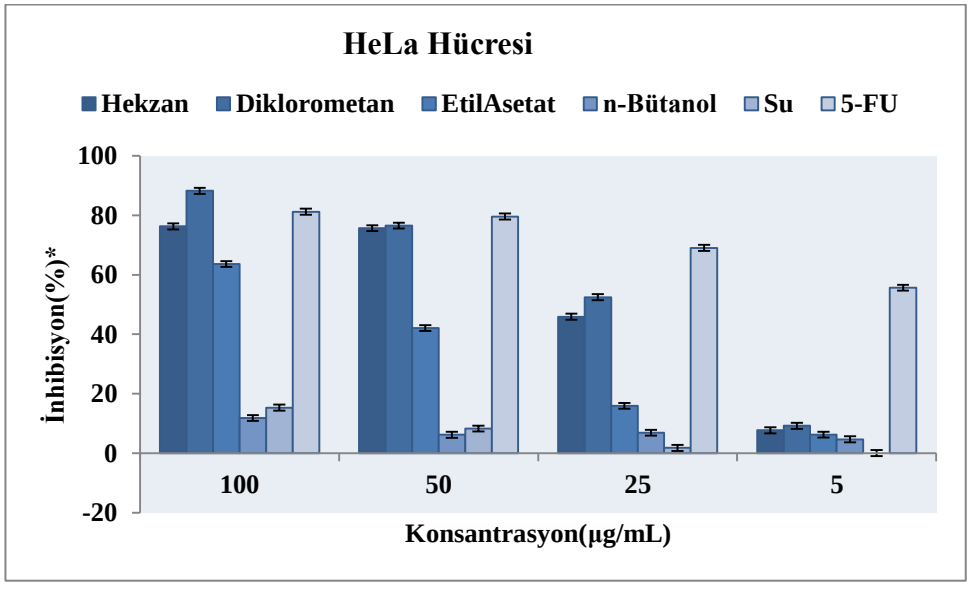
**Tablo 4.13** EAS-9 fraksiyonunun GC-MS analiz sonucu

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

***Nispi Değerlerdir.**

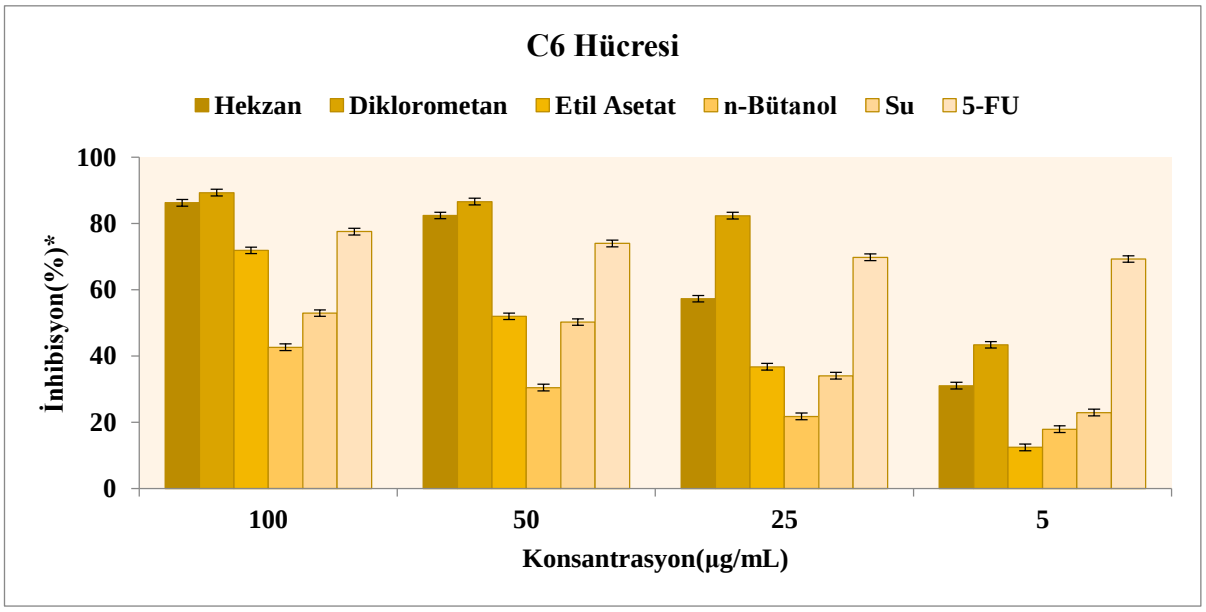
## 4.6 Ekstrelerin Antikanser Aktivite Sonuçları

*Astragalus dipsaceus* Bunge bitkisinden elde edilen Hekzan, Diklorometan, Etil Asetat, n-Bütanol, Su ekstrelerinin ve Etil asetat ekstresinden izole edilen sikloalpiosid, sikloalpiosid-D ve genistein moleküllerinin C6 ve HeLa hücrelerine karşı antikanser aktiviteleri incelendi ve $IC_{50}$ -$IC_{75}$ değerleri Tablo 4.14'te verildi.




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

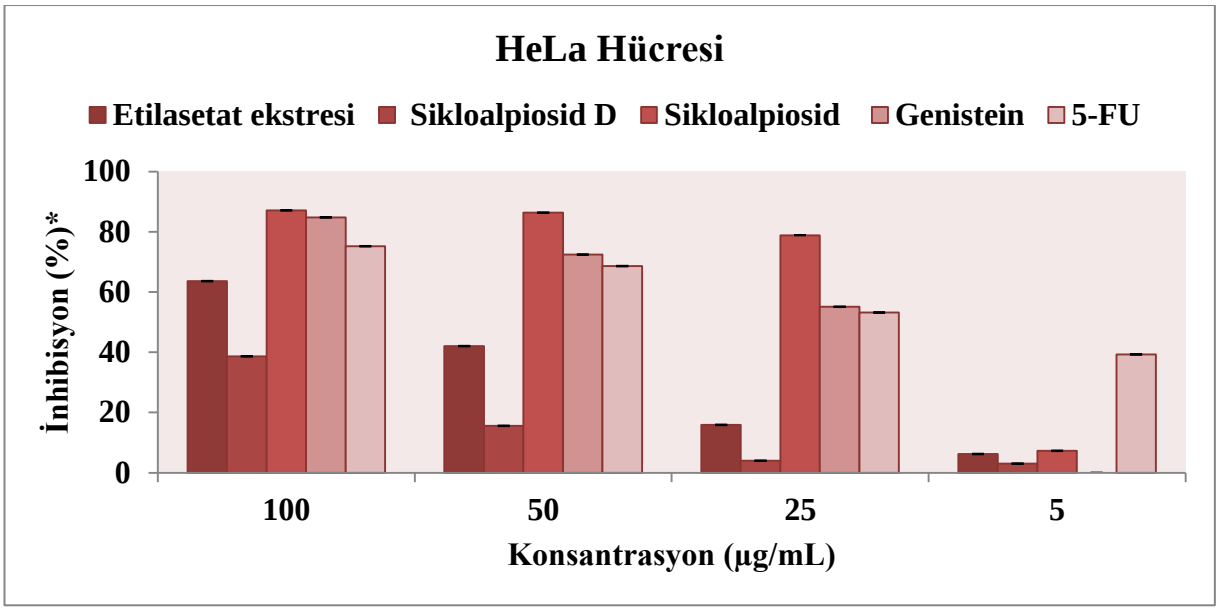
Endemik *A. dipsaceus* Bunge türünden elde edilen hekzan, diklorometan, EtOAc, n-Bütanol ve su ekstrelerinin ve standart olarak kullanılan 5-FU'nun HeLa hücresine karşı antikanser aktiviteleri incelendi. Yapılan testler neticesinde tüm ekstrelerin doz artışına bağlı olarak aktivitelerinde artış gözlendi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




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

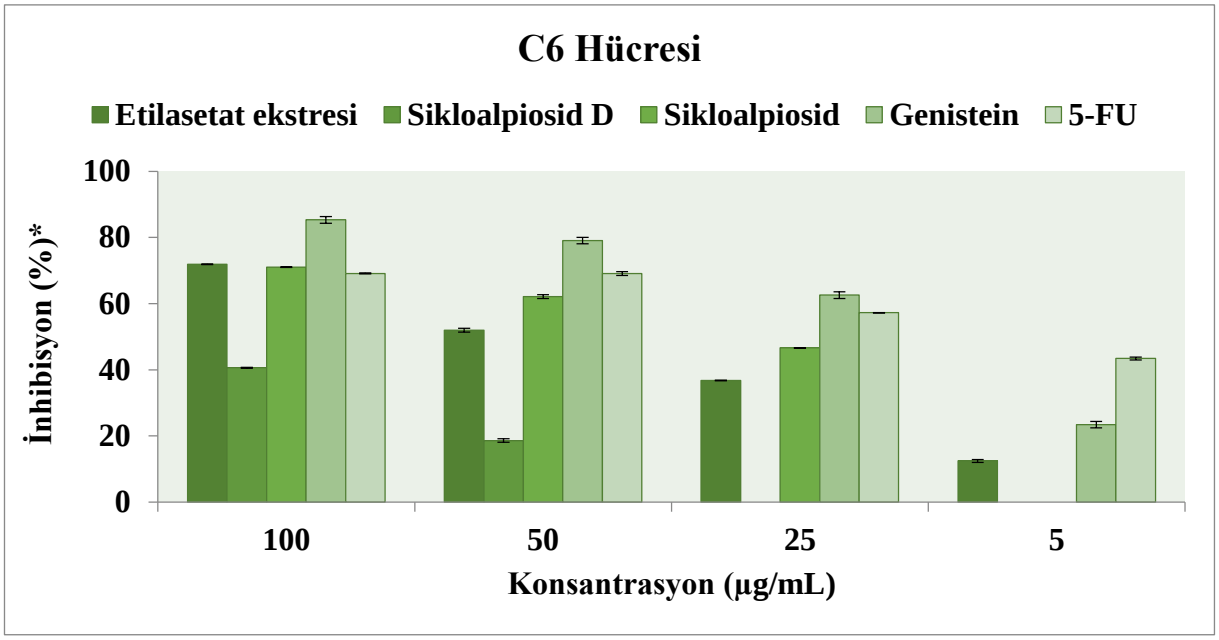
Endemik *A. dipsaceus* Bunge türünden elde edilen hekzan, diklorometan, EtOAc, n-Bütanol ve su ekstrelerinin ve standart olarak kullanılan 5-FU nun C6 hücresine karşı antiproliferatif aktiviteleri incelendi. Yapılan testler neticesinde tüm ekstrelerin doz artışına bağlı olarak aktivitelerinde artış gözlendi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

## 4.7 İzole Edilen Moleküllerin Kanser Aktiviteleri




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

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




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

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

**Tablo 4.14** Ekstre ve izole edilen moleküllerin $IC_{50}$ ve $IC_{75}$ Değerleri

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

*<5µg/mL

## 4.8 Sitotoksik Aktivite Sonuçları

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

**Tablo 4.15** Moleküllerin sitotoksik aktivite sonuçları

| Molekül | % Toksisite |
|---|---|
| **Sikloalpiosid** | 30 |
| **Genistein** | 27 |
| **5-FU** | 51 |

## 5.) TARTIŞMA VE SONUÇ

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

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

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

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

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

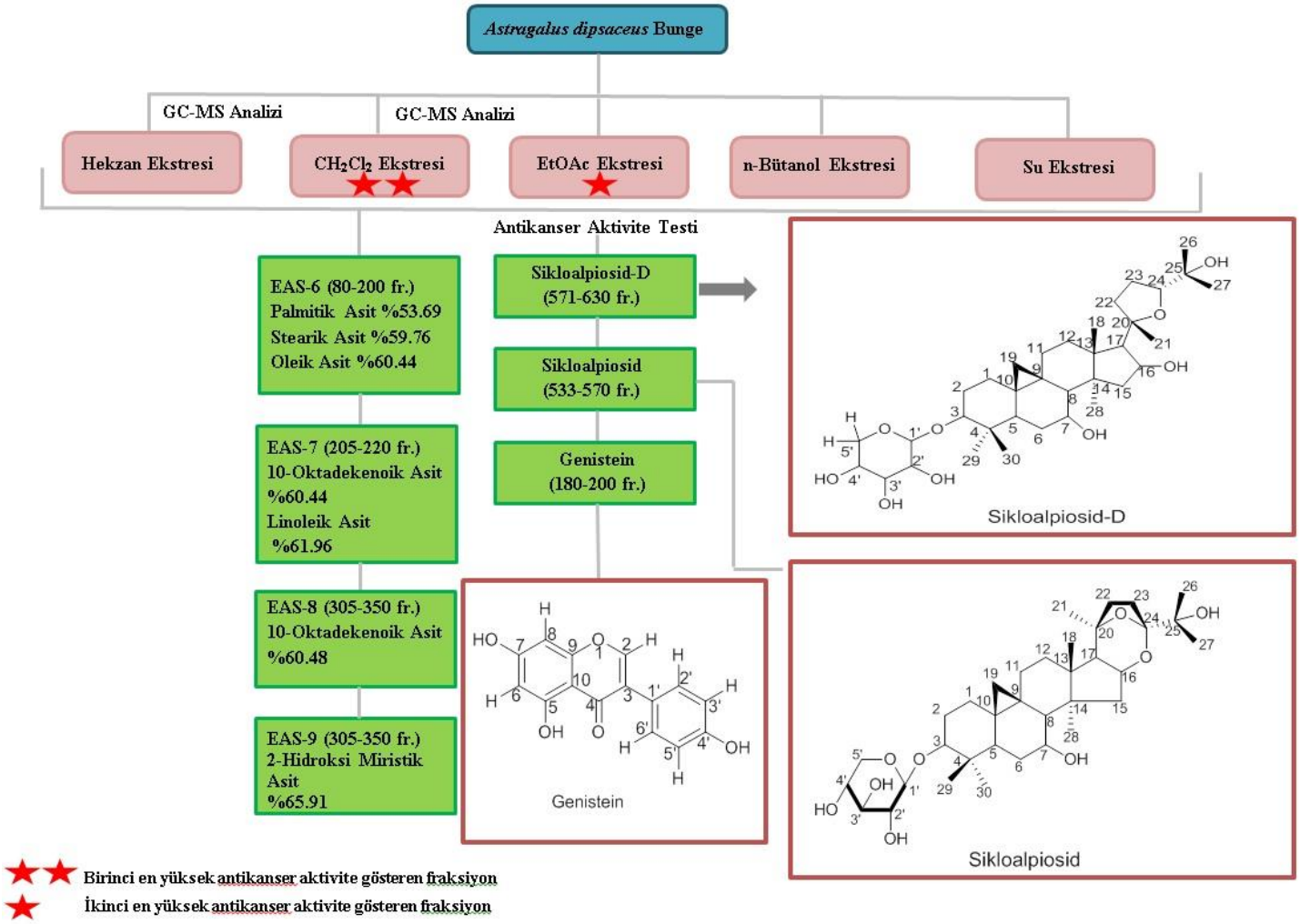
Cycloalpioside-D, Cycloalpioside ve Genistein molekülleri üzerine yapılan biyolojik aktivite çalışmaları araştırıldı. Hsiao et al., yaptıkları çalışmada genisteinin anti-lösemi

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

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

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

Çalışmanın özet şeması Şekil 5.1 de verilmiştir.




**Şekil 5.1.** Çalışmanın özet şeması

## KAYNAKLAR


Agzamova, M. A., Isaev, M. I. 1991. Triterpene glycosides of Astragalus and their genins. XXXVIII. Cycloalpigenin D and cycloalpioside D from Astragalus alopecurus. Chemistry of Natural Compounds, 27(3); 326-332.

Agzamova, M. A., Isaev, M. I. 1995. Astragalus Triterpene glycosides and their genins. I. Structures of Cycloalpigenin and cycloalpioside. Chemistry of Natural Compounds, 31(5); 589-595.

Bratkov, V. M., Shkondrov, A. M., Zdraveva, P. K., Krasteva, I. N. 2016. Flavonoids from the Genus Astragalus:Phytochemistry and Biological Activity. Pharmacognosy Review, 10(19); 11-32.

Akyil, D., Erdogmus, S F., Eren, Y., Ozkara, A., Korcan, E., 2013. Potential antimicrobial and antimutagenic activities of Astragalus flavescens, Fresenius Environmental Bulletin, 22(7), 1868-1873.

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

Gulluce, M., Sokmen, M., Agar, G., Adiguzel, A., Baris, O., Sahin, F., 2008. Antimicrobial and antioxidant activities of methanol and hexane extract of some endemic Astragalus species. Asian Journal of Chemistry, 20(3), 2125-2132.

Gülcemal, D., Masullo, M., Napolitano, A., Karayıldırım, T., Bedir, E., Alankuş-Çalışkan, Ö., Piacente, S. 2013. "Oleanane glycosides from Astragalus tauricolus: isolation and structural elucidation based on a preliminary liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry profiling", Phytochemistry, 86, 184-94.

Hsiao, Y. C., Peng, S. F., Lai, K. C., Liao, C. L., Huang, Y. P., Lin, C. C., Lin, M. L., Liu, K. C., Tsai, C. C., Ma, Y. S., Chung, J. G. 2018. Genistein induces apoptosis in vitro and has antitumor activity against human leukemia HL-60 cancer cell xenograft growth in vivo. Enviromental Toxicology, 34(4); 443-456.

Hu, T., Liu, Q. M., He, X.W., Huang, F., Zhang, M.W., Jiang, J.G. 2017. Identification of bioactives from Astragalus chinensis L.f. and their antioxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative effects. Journal Food Science Technology, 54(13); 4315-4323.

Huang L H., Yan Q J., Kopparapu N K., Jiang Z Q., Sun Y., 2012. Astragalus membranaceus lectin (AML) induces caspase-dependent apoptosis in human leukemia cells. Cell proliferation, 45(1), 15-21.

Isaev, I.M., Agzamova, M. A., Isaev, M. I. 2012. Triterpene glycosides from Astragalus and their genins. XCI. Chemical transformation of cycloartanes. X. Syntheses based on cycloalpioside D and cycloalpigenin D. Chemistry of Natural Compounds, 47(6); 947–954.

Isaev, M. I., Agzamova, M. A. 1995. Cycloartane glycosides from Astragalus amarus and Astragalus alopecurus. Abstracts ofpapers of the american chemical society, 210; 128.

Jaradat, N. A., Al-Masri, M., Zaid, A. N., Eid, A. M., Saleh, A. M., Abu Zer, A. F., Romi1, I. M., Hussien, A. M. A. 2017. Preliminary Phytochemical Screening an,d In-vitro Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities for Astragalus pelecinus from Palestine. Journal of Materials and Environmental Sciences, 8(4); 1492-1497.

Kadıoğlu, B., Kadıoğlu, S., Turan, Y. 2008. " Gevenlerin (Astragalus sp.) Farklı Kullanım Alanları ve Önemi", Atatürk Üniversitesi, Alınteri Zirai Bilimler Dergisi, 14(B), 17-26.

Kai, Z., Michela, P., Antonio, P., Annamaria, P., 2015. Biological Active Ingredients of Traditional Chinese Herb Astragalus membranaceus on Treatment of Diabetes: A Systematic Review. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 15(4), 315-329.

Khan, M. T. H., Choudhary, M. I., Rahman, A., Mamedova, R. P., Agzamova, M. A., Sultankhodzhaevd, M. N., Isaev, M. I. 2006. Tyrosinase inhibition studies of cycloartane and cucurbitane glycosides and their structure–activity relationships. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 14(17); 6085-6088.

Kim, B H., Kim, T Y., Catholic University Industry Academic Cooperation Foundation, S. Korea, 2013. Astragalus sinicus extracts for preventing and treating inflammatory skin diseases, (Patent No: KR 2015017278) (Patent yıl: 16 Şubat 2015).

Kim, J H., Insung Pharma Cential Co., Ltd., S. Korea, 2004. Natural herb extract having rheumatoid-neuroprotection activity consisting of Gastrodia elata, Astragalus membranaceus, vegetable worms, and young antlers of deer. (Patent No: KR 2006018536) (Patent Yıl: 2 Mart 2006).

Labed, A., Ferhat, M., Labed-Zouad, I., Kaplaner, E., Zerizer, S., Voutquenne-Nazabadioko, L., Alabdul Magid, A., Semra, Z., Kabouche, A., Kabouche, Z., Ozturk, M., 2016 Pharmaceutical Biology (Abingdon, United Kingdom).

Li, R., Chen, W., Wang, W., Tian, W., Zhang, X., 2010. Antioxidant activity of Astragalus polysaccharides and antitumour activity of the polysaccharides and siRNA. Carbohydrate Polymers, 82 (2), 240-244.

Li, S., Bian, F., Yue, L., Jin, H., Hong, Z., Shu, G., 2014. Selenium-dependent antitumor immunomodulating activity of polysaccharides from roots of A. Membranaceus. International Journal of Biological Macromolecules, 69(64-72).

Mamedova, R. P., Isaev, M. I. 2004. Triterpenoids from Astragalus Plants. Chemistry of Natural Compounds, 40(4); 303-357.

Mikaeili A., Modaresi M., Karimi I., Ghavimi H., Fathi M., Jalilian N., 2012. Antifungal activities of Astragalus verus Olivier. against Trichophyton verrucosum on in vitro and in vivo guinea pig model of dermatophytosis. Mycoses, 55(4), 318-25.

Ozbek, T., Gulluce, M., Agar, G., Adiguzel, A., Ozkan, H., Sahin, F., Baris, O., 2008. Investigation of the antimutagenic effects of methanol extract of Astragalus L. species growing in eastern Anatolia region of Turkey, Fresenius Environmental Bulletin, 17(12a), 2052-2058.

Pistelli, L.,2002. Secondary metabolites of genus Astragalus: Structure and biological activity. Studies in Natural Products Chemistry, 27, Bioactive Natural Products (Part H).

Radwan, M.M., El-Sebakhy, N.A, Asaad, A.M., Toaima, S.M, Kingston. D.G.I. 2007)."Spinocoumarin I, a new coumarin derivative from Astragalus spinosus Forssk", Natural Product Communications, 2(9), 19-22.

Rios, L.J., Waterman, P.G. 1997. "A review of the pharmacology and toxicology of Astragalus", Phytotherapy Resources,11(6),411-418.

Shojaii, A., Motevalian, M., Rahnama, N., 2015. Evaluation of anti-inflammatory and analgesic activities and the phytochemical study of Astragalus arbusculinus gum in animal models. Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology, 26(4), 369-374.

Un, R., Horo, I., Masullo, M., Falco, A., Senol, S. G., Piacente, S., Alankus-Calıskan, O. 2016. Cycloartane and oleanane-type glycosides from Astragalus pennatulus. Fitoterapia, 109; 254-260.

Xiao, C., Qiu, L., Xu, W., Dong, X., Jiang, B., 2015. Chemical constituents from roots of Astragalus englerianus and their anti-oxidative activities. Zhongcaoyao, 46(1), 22-27.

Yasuda, T., Mızunuma, S., Kano, Y., Saito, K., Ohsawa, K. 1996. Urinary and Biliary Metabolites of Genistein in Rats. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 19(3), 413–417.

Zengin, G., Ceylan, R., Guler, G O.,Carradori, S., Uysal, S., Aktumsek, A., 2016. Enzyme Inhibitory Effect and Antioxidant Properties of Astragalus lagurus Extracts, 12(2), 177-182.

URL 1. https://www.earth.com/earthpedia/plant/bg/astragalus-dipsaceus/ 05.02.2019

URL 2. http://194.27.225.161/yasin/tubives/index.php?sayfa=1&tax_id=2756 06.03.2019

URL 3. https://ast.wikipedia.org/wiki/Astragalus_membranaceus#/ media/File:Astragalus_membranaceus.jpg , 22.12.2016.

URL 4. http://www.colorfulnature.com/picture.jsp?lang=en_ US&category=flowers&picGroupId=Astragalus_Spinosus-m , 22.12.2016.

URL 5. https://species.wikimedia.org/wiki/Astragalus_sinicus#/media/File:Astragalus_sinicus_ja_Renge01.jpg , 11.11.2016.

URL 6. http://flora.org.il/en/plants/ASTPIN/ , 22.12.2016.

URL 7. http://www.plantarium.ru/page/image/id/439155.html , 22.12.2016.

URL 8. http://vanherbaryum.yyu.edu.tr/flora/famgenustur/fab/astragalus/bic/pages/Astragalus%20bicolor%20LAM_%20_jpg.htm, 22.12.2016.

URL 9. http://www.bee-paysage.fr/biblioplantes-fiche-plante.php?nomtaxon=Astragalus%20galegiformis , 22.12.2016.

URL 10. http://www.vanherbaryum.yyu.edu.tr/flora/famgenustur/fab/astragalus/pon/pages/Astragalus%20ponticus%20PALL_%20%20_jpg.htm , 22.12.2016.

URL 11. http://www.agaclar.net/forum/guney-dogu-anadolu-bolgesi/4608.htm , 22.12.2016.

URL 12-URL 13. Li, R., Chen, W., Wang, W., Tian, W., Zhang, X., 2010. Antioxidant activity of Astragalus polysaccharides and antitumour activity of the polysaccharides and siRNA. Carbohydrate Polymers, 82 (2), 240-244.

URL 14. http://www.plantarium.ru/page/image/id/139651.html , 22.11.2016

URL 15. http://www.turkiyebitkileri.com/index.php?dil=tr&id=2&familya=36&cins=194&tur=3059#image-214033 , 22.12.2016.

URL 16. http://www.turkiyebitkileri.com/index.php?dil=tr&id=2&familya=36&cins=194&tur=866#image-23403 , 22.12.2016.

URL 17. http://www.turkiyebitkileri.com/index.php?dil=tr&id=2&familya=36&cins=194&tur=4150#image-219308 , 22.12.2016.

URL 18. http://econews.am/?p=6530&l=en , 22.12.2016.

URL 19. http://www.bilgiustam.com/selenyum-nedir , 22.12.2016.

URL 20. https://en.wikipedia.org/wiki/Selenium#/media/File:SeBlackRed.jpg , 22.12.2016.

URL 21. https://gailfaithedwards.files.wordpress.com/2012/05/004.jpg , 11.11.2016.

URL 22. http://www.turkiyebitkileri.com/index.php?dil=tr&id=2&familya=36&cins=194&tur=2825#image-219314 , 22.12.2016.

URL 23. http://www.allposters.com/-sp/Milk-Vetch-Astragalus-Verus-Posters_i10655781_.htm , 22.12.2016.

URL 24. https://en.wikipedia.org/wiki/Trichophyton_verrucosum , 22.12.2016.

URL 25. https://en.wikipedia.org/wiki/Trichophyton_verrucosum#/media/File:Toplin_des_dieles_tiesse_vea.jpg , 22.12.2016.

URL 26. http://hilltoplabs.com/public/rats.html , 22.12.2016.

URL 27. http://www.indiatimes.com/health/healthyliving/what-is-diabetes-mellitus-239597.html , 22.12.2016.

URL 28. https://gailfaithedwards.com/2012/05/30/495/ , 24.12.2016.

URL 29. https://www.hemensaglik.com/makale/el-ve-parmaklarda-romatoid-artrit , 22.12.2016.

URL 30. http://floraofgibraltar.myspecies.info/file/1278) 04.03.2019

URL 31. http://www.teline.fr/en/photos/fabaceae/astragalus-armatus-subsp.-armatus , 22.12.2016.

URL 32. http://catalog.digitalarchives.tw/item/00/6e/1e/7f.html , 22.12.2016.

## ÖZGEÇMİŞ


**Adı Soyadı** : Elifay SERT

**Doğum Yeri** : Merkez / ÇANKIRI

**Doğum Tarihi** : 06 / 12 / 1992

**Medeni Hali** : Bekâr

**Yabancı Dili** : İngilizce

**Adres** : A.H.R. Mah. Pınar Sk. Çağlar Apt. A/Blok No:14 Çankırı/Merkez

**Tel** : 05465627044

**E-posta** : elifay.sert@gmail.com


**Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)**

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

**Çalıştığı Kurumlar ve Yıl**

Tekinak Gıda – Laborant - Çankırı/Merkez / 2015-2016

Çankırı Nevzat Ayaz Sosyal Bilimler Lisesi / Çankırı Gazi Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi - Kimya Öğretmeni - Çankırı/Merkez / 2017

Turaç Mühimmat Fabrikası - Kimyager – Çankırı/Şabanözü / 2018-2019

**Sertifikalar**

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

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

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

**1.)** Ayşe Şahin Yağlıoğlu, Serhat Ursavaş, Muhammet Ören, **Elifay Sert,** Emiç Saray (2017). Anticancer Activities of *Anomodon viticulosus* (Hedw.)Hook. Taylor Extracts Against Rat Brain Tumour. IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, 26-29 Nisan 2017, İstanbul, TÜRKİYE.

**2.)** Ayşe Şahin Yağlıoğlu, Muhammet Şamil Yağlıoğlu, **Elifay Sert,** (2017). The antiproliferative activities against C6 cell of extracts of *Pinus sylvestris* L., IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, 26-29 Nisan 2017, İstanbul, TÜRKİYE.

**3.)** Ayşe Şahin Yağlıoğlu, Serhat Ursavaş, Muhammet Ören, **Elifay Sert** (2017). In vitro Anticancer Activities against C6 Cell Line of *Plagiomnium affine* (Blandow ex Funck) T.J. Kop. extracts. IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, 26-29 Nisan 2017, İstanbul, TÜRKİYE.

**4.)** Ayşe Şahin Yağlıoğlu, Serhat Ursavaş, Muhammet Ören, **Elifay Sert,** (2017). The Anticancer Activities of *Alleniella complanata* (Hedw.) S.Olsson, Enroth D. Quandt extracts. . IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, 26-29 Nisan 2017, İstanbul, TÜRKİYE.

**5.)** Ayşe Şahin Yağlıoğlu, Muhammet Şamil Yağlıoğlu, **Elifay Sert** (2017). The antiproliferative activities against C6 cell of extracts of *Pinus brutia* Ten., IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, 26-29 Nisan 2017, İstanbul, TÜRKİYE.

**6.)** Ayşe Şahin Yağlıoğlu, Muhammet Şamil Yağlıoğlu, **Elifay Sert** (2017). The biological activities of *Pinus nigra* J.F. Arnold extracts. IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, 26-29 Nisan 2017, İstanbul, TÜRKİYE.

**7.)** Ayşe Şahin Yağlıoğlu, Serhat Ursavaş, Muhammet Ören, **Elifay Sert** (2017). In vitro Anticancer Activities against C6 Cell Line of *Plagiomnium affine* (Blandow ex Funck) T.J. Kop. extracts. IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, 26-29 Nisan 2017, İstanbul, TÜRKİYE.

**8.)** Ayşe Şahin Yağlıoğlu, Serhat Ursavaş, Muhammet Ören, **Elifay Sert** (2017). Evaluation of In vitro Anticancer Activity of *Hylocomium splendens* (Hedw.) Schimp. extracts. . IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, 26-29 Nisan 2017, İstanbul, TÜRKİYE.

**9.)** Ayşe Şahin Yağlıoğlu, Serhat Ursavaş, Muhammet Ören, **Elifay Sert** (2017). Anticancer Activity Evaluation of *Thamnobryum alopecurum* (Hedw.) Nieuwl. ex Gangulee extracts. IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, 26-29 Nisan 2017, İstanbul, TÜRKİYE.

**10.)** Ayşe Şahin Yağlıoğlu, Serhat Ursavaş, Muhammet Ören, **Elifay Sert**, Emiç Saray (2017). The Biological Activities of *Abietinella abietina* (Hedw.) M.Fleisch extracts. IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, 26-29 Nisan 2017, İstanbul, TÜRKİYE.

**11.)** Ayşe Şahin Yağlıoğlu, Muhammet Şamil Yağlıoğlu, **Elifay Sert** (2017). The biological evulation of *Pinus pinea* L. extracts. IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, 26-29 Nisan 2017, İstanbul, TÜRKİYE.

**12.)** Ayşe Şahin Yağlıoğlu, **Elifay Sert**, Melda Dölarslan, İbrahim Demirtaş (2019). Phytochemıcal Analysis and anticancer activities of apolar extracts endemic Astragalus dipsaceus Bunge. Uluslararası Ege Disiplinlerarası İnovatif Bilimsel Araştırmalar Sempozyumu, 26-27 Mart 2019, İzmir,TÜRKİYE.

**13.)** Ayşe Şahin Yağlıoğlu, **Elifay Sert**, Melda Dölarslan, İbrahim Demirtaş (2019). Isolation Of Bioassays Guided Of Endemic *Astragalus dipsaceus* Bunge. Uluslararası Ege Disiplinlerarası İnovatif Bilimsel Araştırmalar Sempozyumu, 26-27 Mart 2019, İzmir, TÜRKİYE.