T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HEDYSARUM PYCNOSTACHYUM(FABACEAE) BİTKİSİNİN İÇERDİĞİ DOĞAL BİLEŞİKLERİN İZOLASYONU, YAPILARININ AYDINLATILMASI VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ

Fatma TUMBUL

KİMYA ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2016

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HEDYSARUM PYCNOSTACHYUM(FABACEAE) BİTKİSİNİN İÇERDİĞİ DOĞAL BİLEŞİKLERİN İZOLASYONU, YAPILARININ AYDINLATILMASI VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ

Fatma TUMBUL

KİMYA ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2016

.....danışmanlığında,.....'ın hazırladığı "....." konulu bu çalışma ...../...../ ..... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü ..... Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Unvan Adı SOYADI …….

Üye : Unvan Adı SOYADI …….

Üye : Unvan Adı SOYADI …….

Bu Tezin ..... Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım

Prof. Dr. .....
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma HÜBAK Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: 13112

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇİNDEKİLER i
ÖZET iii
ABSTRACT iii
TEŞEKKÜR iv
SİMGELER DİZİNİ v
ŞEKİLLER DİZİNİ vi
ÇİZELGELER DİZİNİ viii
1.GİRİŞ 1
1.1.Botanik Kısım 1
1.2.Kimyasal Kısım 3
1.2.1.Bitkilerin İçerdiği Doğal Bileşikler 3
1.2.1.1.Glikozitler 3
A. Fenolik Glikozidler 4
B. Siyanogenetik Glikozidler 4
C. Sülfür Glikozidler 4
D. Triterpenik ve Steroidal Glikozidler 4
i.Steroit Glikozitleri 5
1.2.1.2. Saponinler 5
A.Steroidal Saponinler 6
B.Triterpenik Saponinler 6
Saponinlerin bitkilerdeki rolleri ve farmokolojik etkileri 6
1.3.Uçucu Yağ Asitleri 7
1.3.1. Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri 7
1.4.Biyolojik Aktivite Kısmı 8
1.4.1.Antimikrobiyel Aktivite Çalışmaları 9
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 13
3.MATERYAL ve YÖNTEM 16
3.1 Genel 16
3.2.Bitki Materyali 18
3.3.İzolasyon ve Saflaştırma 18
3.4.NMR Analizleri 24
3.4.1.Bileşik 1 25
3.5.Heksan Ekstresinin GC-MS Analizi 26
3.6.Mikrobiyolojik Analiz: Antimikrobiyel Aktivite 26
Gram-Negatif Bakteriler 26
Gram- Pozitif Bakteriler 27
Maya 27
3.6.1. Disk Diffüzyon Testi 27
3.6.2. Minimum İnhibitor Konsantrasyonu (MİK) 27
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 29
4.1. Karakterizasyon 29
4.1.1 Bileşik 1 29
4.1.2.Bileşik 2 37
4.2.Heksan Ekstresinin GC-MS Analizi 41
4.3. Mikrobiyolojik Analiz: Antimikrobiyel Aktivite 55
4.3.1.Disk Difüzyon Testi Analizi 56
4.3.2.Minimum İnhibitor Konsantrasyonu (MİK) Testi Analizi 58
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 60
KAYNAKLAR 62
ÖZGEÇMİŞ 73

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

HEDYSARUM PYCNOSTACHYUM(FABACEAE) BİTKİSİNİN İÇERDİĞİ DOĞAL BİLEŞİKLERİN İZOLASYONU, YAPILARININ AYDINLATILMASI VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ

Fatma TUMBUL

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Zafer UYAR
Yıl:2016, Sayfa:73

Türü belirlendikten sonra kurutulan ve öğütülen *Hedysarum Pycnostachyum* (Fabaceae) bitkisi kimyasal ve mikrobiyolojik olarak incelendi. Sırasıyla metanol (MeOH), heksan, diklorometan (CH_2Cl_2), bütanol (BuOH) ve su (H_2O) çözücüleri ile bir dizi seçici katı-sıvı ve sıvı-sıvı ekstraksiyonları yapılarak bu çözücülerin ekstreleri hazırlandı. Bu şekilde polaritelerine göre sınıflandırılmış olan bu ekstreler kullanılarak kolon kromatografisi, preparatif tabaka kromatografisi, ince tabaka kromatografisi, vakum-sıvı kromatografisi gibi çeşitli kromotografik yöntemlerle doğal bileşik saflaştırılma ve izolasyon çalışmaları yapıldı. İzolasyon ve saflaştırma teknikleri sonrasında üç tane doğal bileşik elde edildi ve bunların iki tanesinin yapısı aydınlatıldı. Ayrıca, heksan ekstresinin metil esterleri hazırlanarak, GC-MS analizi yapıldı ve analiz sonuçları faydalı yağ asitleri açısından irdelendi. Saflaştırılan doğal bileşiklerin yapı aydınlatılması IR, UV, NMR (1D ve 2D), ve MALDI-TOF Mass gibi çeşitli kimyasal, kromotografik ve spektroskopik yöntemler kullanılarak yapıldı.
Son olarak elde edilen ekstrelerin antimikrobiyel aktiviteleri agar-disk difüzyon yöntemi ve Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu yöntemi kullanılarak çeşitli antibiyotik ve antifungal referanslarla karşılaştırılarak bazı bakteri ve mantarlara karşı incelendi.

ANAHTAR KELİMELER: *Hedysarum Pycnostachyum*(Fabaceae),Uçucu yağlar, Antimikrobiyel aktivite, Doğal Bileşikler, Biyolojik Aktivite.

ABSTRACT

MSc Thesis

THE ISOLATION, DETERMINATION OF STRUCTURE AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF NATURAL PRODUCTS FROM *HEDYSARUM PYCNOSTACHYUM* (FABACEAE)

Fatma TUMBUL

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Assistant Professor Zafer UYAR
Year: 2016, Page:73

After taxonomically determined, dry and ground *Hedysarum Pycnostachyum* (Fabaceae) plant material was studied in terms of chemical and microbiological properties. A series of selective solid-liquid and liquid-liquid extractions were carried out with methanol (MeOH), hexane, dichloromethane (CH_2Cl_2),butanol (BuOH), and water (H_2O)solvents to prepare corresponding extracts. Natural compound isolation and purification studies were carried out by various purification techniques, such as column chromatography (CC), preparative thin layer chromatography (PTLC), thin layer chromatography (TLC), vacuum-liquid chromatography(VLC) using these extracts. Three natural compounds were obtained by these isolation and purification techniques and structures of two compounds were determined. Also methyl esters of the hexane extract was prepared and and its GC-MS analysis was done and the results were investigated based on its essential oils. The structural determination of pure compounds was carried out using different chemical, chromatographic and spectroscopic [IR, UV, NMR (1D and 2D), and MALDI-TOFMass] methods. After chromatographic and spectroscopic data were interpreted, the physical properties of the compounds such as specific rotation were measured.
Finally, antimicrobial activity of each extract (MeOH, Hexane, CH_2Cl_2, BuOH, and H_2O) was examined against different bacteria and fungi comparing with Gentamycine as reference by using agar-disc diffusion and Minimum Inhibitory Concentration methods.

KEY WORDS: *Hedysarum Pycnostachyum* (Fabaceae), Essential oils, Antimicrobial activity, Natural Compounds, Biological Activity.

TEŞEKKÜR

Danışmanım Yrd. Doç. Dr. Zafer UYAR' a sonsuz sabrı, araştırmaya çalışmaya teşviği, yaklaşımı ve bu çalışma dışında dahi hayata dair azim ve kararlılıkta bana ilham olması sebebiyle şükranlarımı sunarım.

Laboratuar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen ve dostlukları ile bu çalışmada yanımda olan Dr. Ayşegül KUTLUAY BAYTAK,Tarık KARABULUT, Ayşe YILMAZ ve Ülkü ARSLAN'a tüm yaptıkları için teşekkür ederim. Gerek çalışmalarım esnasında verdiği değerli tavsiye ve önerilerinden dolayı gerekse saflaştırılan bileşiklerin yapı aydınlatması aşamasındaki yardım ve emeklerinden dolayı Bursa Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü'nden Doç. Dr. Ömer KOZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, aileme bitmek tükenmek bilmeyen sabrından dolayı ve bu çalışma esnasındaki bazı durumlarda ve tüm eğitim hayatım boyunca bana yol göstermelerinden dolayı her daim teşekkürü bir borç bilirim.

SİMGELER DİZİNİ

AMP	Ampicillin
BuOH	Bütanol
CH_2CI_2	Diklorometan
DCM	Diklorometan
DMSO	Dimetil sülfoksit
FC	Fluctosine
HPLC	Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi
IR	İnfrared
KK	Kolon Kromatografisi
LPS	Lipopolisakkarit
MeOH	Metanol
MİK	Minimum İnhibitor Konsantrasyonu
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
PSY	Hedysarum Pycnostachyum
PTLC	Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi
RPC	Ters Faz Kromatografisi
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
UV	Ultraviyole
VLC	Vakum Likid Kromatografisi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Hedysarum pycnostachyum (Fabaceae) bitkisinin Türkiye'de yetiştiği bölgeler.....1

Şekil 1.2. Hedysarum sınıfına ait örnek bazı bitkiler (a) Hedysarum elegans, (b) Hedysarum huetii (c) Hedysarum boveanum subsp. europaeum 2

Şekil 1.3. Siklopentano (perhidro) fenantren halkası 5

Şekil 1.4. Steroidal ve Triterpenik Saponinler 6

Şekil 1.5. Enfeksiyon hastalıklarının sebep olduğu ölüm sayıları.....10

Şekil 1.6. Bakterilerin Sınıflandırılması.....12

Şekil 3.1.Hedysarum pycnostachyum bitkisinden elde edilen ekstrelerin 61:32:7 (Diklorometan:metanol:su) çözücü sistemi ile yürütülerek elde edilen TLCsonuçları a) Ham metanol-Heksan ekstreleri b) Ham metanol-diklorometanekstreleric) Su-bütanol ekstreleri.....19

Şekil 3.2. Hedysarum pycnostachyum bitkisinin ekstraksiyon şeması 20

Şekil 3.3. Hedysarum pycnostachyum bitkisinden elde edilen bütanol ekstresinin metanolçözücüsü ile yürütülerek elde edilen TLC sonuçları a) Metanolde çöken kısım b) Metanolde çözünenkısım.....21

Şekil 3.4 .Hedysarum pycnostachyum bitkisinden elde edilen bütanol ekstresinin (metanolde çözünen kısım) 61:32:7 ve 85:15:1,5 (Diklorometan:metanol:su) çözücü sistemi ile yürütülerek elde edilen TLC sonuçları.....22

Şekil 3.5. Hedysarum pycnostachyum bitkisinden elde edilen bütanol ekstresinden doğal bileşiksaflaştırma ve izolasyonu proses şeması.....23

Şekil 3.5 (devam). Hedysarum pycnostachyum bitkisinden elde edilen bütanol ekstresinden doğalbileşik saflaştırma ve izolasyonu proses şeması.....24

Şekil 3.6. Elde edilen Bileşik 1'in kimyasal yapısı [3-O-(β-D-glucopyranosyl)-β-sitosterol].....25

Şekil 4.1. Bileşik 1'e ait 1H NMR spektrumu (Çözücü: DMSO) 32

Şekil 4.2. Bileşik 1'e ait 13C NMR spektrumu(Çözücü: DMSO) 33

Şekil 4.3. Bileşik 1'e ait iki boyutlu HSQC spektrumu (Çözücü: DMSO) 34

Şekil 4.4. Bileşik 1'e ait iki boyutlu HSQC spektrumu ve protonlar arası etkileşim değerleri (ppm) (Çözücü: DMSO) 35

Şekil 4.5. Bileşik 1'e ait iki boyutlu HMBC spektrumu(Çözücü: DMSO) 36

Şekil 4.6. Bileşik 2'ye ait 1H NMR spektrumu(Çözücü: DMSO) 37

Şekil 4.7. Bileşik 2'ye ait 13C NMR spektrumu (Çözücü: DMSO) 38

Şekil 4.8. Bileşik 2'ye ait iki boyutlu HSQC spektrumu(Çözücü: DMSO) 39

Şekil 4.9. Bileşik 2'ye ait iki boyutlu HMBC spektrumu (Çözücü: DMSO) 40

Şekil 4.10.Hedysarum pycnostachyumbitkisinin Heksan ekstresinin GC-MS spektrumu.....41

Şekil 4.11. Hedysarum pycnostachyumbitkisinden elde edilen Heksan ekstresinde bulunan Palmitoleik asit'in, yapısı ve GC-MS spektrumu 45

Şekil 4.12 .Hedysarum pycnostachyumbitkisinden elde edilen Heksan ekstresinde bulunan Palmitik asit'in, yapısı ve GC-MS spektrumu 46

Şekil 4.13.Hedysarum pycnostachyumbitkisinden elde edilen Heksan ekstresinde bulunanLinolenik Asit'in, yapısı ve GC-MS spektrumu 47

Şekil 4.14.Hedysarum pycnostachyumbitkisinden elde edilen Heksan ekstresinde bulunan alfa-Linolenik Asit'in, yapısı ve GC-MS spektrumu.....48

Şekil 4.15.Hedysarum pycnostachyum bitkisinden elde edilen Heksan ekstresinde bulunanOleikAsit'in, yapısı ve GC-MS spektrumu.....50

Şekil 4.16. Hedysarum pycnostachyumbitkisinden elde edilen Heksan ekstresinde bulunan Fitol'ün yapısı ve GC-MS spektrumu 51

Şekil 4.17. Hedysarum pycnostachyumbitkisinden elde edilen Heksan ekstresinde bulunanStearik Asit'in, yapısı ve GC-MS spektrumu 52

Şekil 4.18. Hedysarum pycnostachyumbitkisinden elde edilen Heksan ekstresindebulunanDokosanoik(Behenik) Asit'in, yapısı ve GC-MS spektrumu 53

Şekil 4.19. Hedysarum pycnostachyumbitkisinden elde edilen Heksan ekstresinde bulunanParinarik Asit'in, yapısı ve GC-MS spektrumu 54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 4.1. Bileşik 1'e ait karbon ve protonların kimyasal kaymaları ve bunlarınHMBC etkileşimleri 30

Çizelge 4.1(devam) Bileşik 1'e ait karbon ve protonların kimyasal kaymaları ve bunlarınHMBCetkileşimleri 31

Çizelge 4.2. Hedysarum pycnostachyum bitkisinin heksan ekstresinin GC-MS analizinegöre içerdiği doğal bileşikler (Analiz için bileşenlerin metil esterleri hazırlandığı içinsonuçlar metoksi(-OCH3) kısmı yani metilester kısmı uzaklaştırılmışhaldeverilmiştir.) 42

Çizelge 4.2(devam) Hedysarum pycnostachyum bitkisinin heksan ekstresinin GC-MS analizinegöre içerdiği doğal bileşikler (Analiz için bileşenlerin metil esterleri hazırlandığı içinsonuçlar metoksi (-OCH3) kısmı yani metilester kısmı uzaklaştırılmışhalde verilmiştir.) 43

Çizelge 4.3.Hedysarum pycnostachyum bitkisinin Heksan ekstresinin GC-MS analizinegöre % 70'lik kısmını oluşturan ana bileşenler 44

Çizelge 4.4.Hedysarum pycnostachyum ekstrelerinin disk diffüzyon metoduyla antimikrobiyelaktiviteleri 56

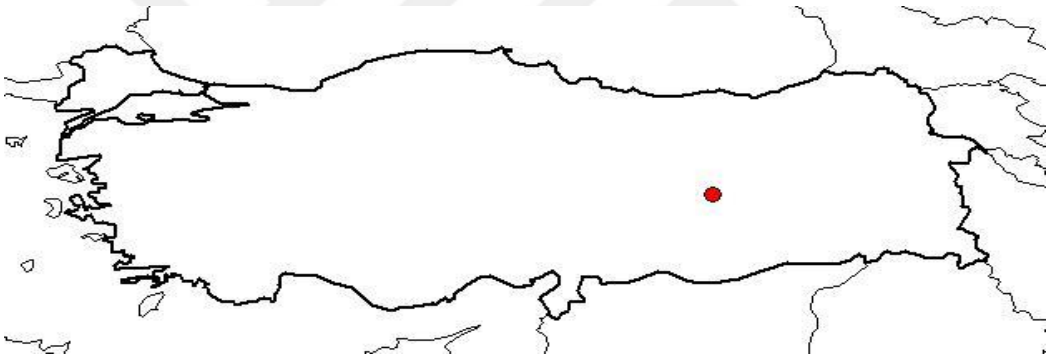
Çizelge 4.5.Hedysarum pycnostachyum ekstrelerinin disk diffüzyon metoduyla antimikrobiyelaktiviteleri (Aktivite İndeksi olarak) 57

Çizelge 4.6. Hedysarum pycnostachyum ekstrelerinin minimum inhibisyon konsantrasyonu 58

1. GİRİŞ

1.1. Botanik Kısım

Fabaceae ailesinin Hedysareae takımına ait olan Hedysarum cinsi yaklaşık olarak 200 tür içermektedir ve genel olarak Avrupa'nın soğuk dağlık bölgelerinde, Akdeniz Bölgesi, Kuzey Amerika, Asya ve özellikle Ortadoğu'da yayılım gösterir (Vassiljeva, 1987; Yakovlev ve ark., 1996; Choi ve Ohashi, 2003). Türkiye'de 11 çeşit endemik Hedysarum türü bulunmaktadır (Anonim,1983). Bu türlerden birisi olan *Hedysarum pycnostachyum* (Fabaceae) Doğu Anadolu bölgesine endemik olup Türkiye'de küçük bir dağlık alanda yetişir (Anonim, 2014).



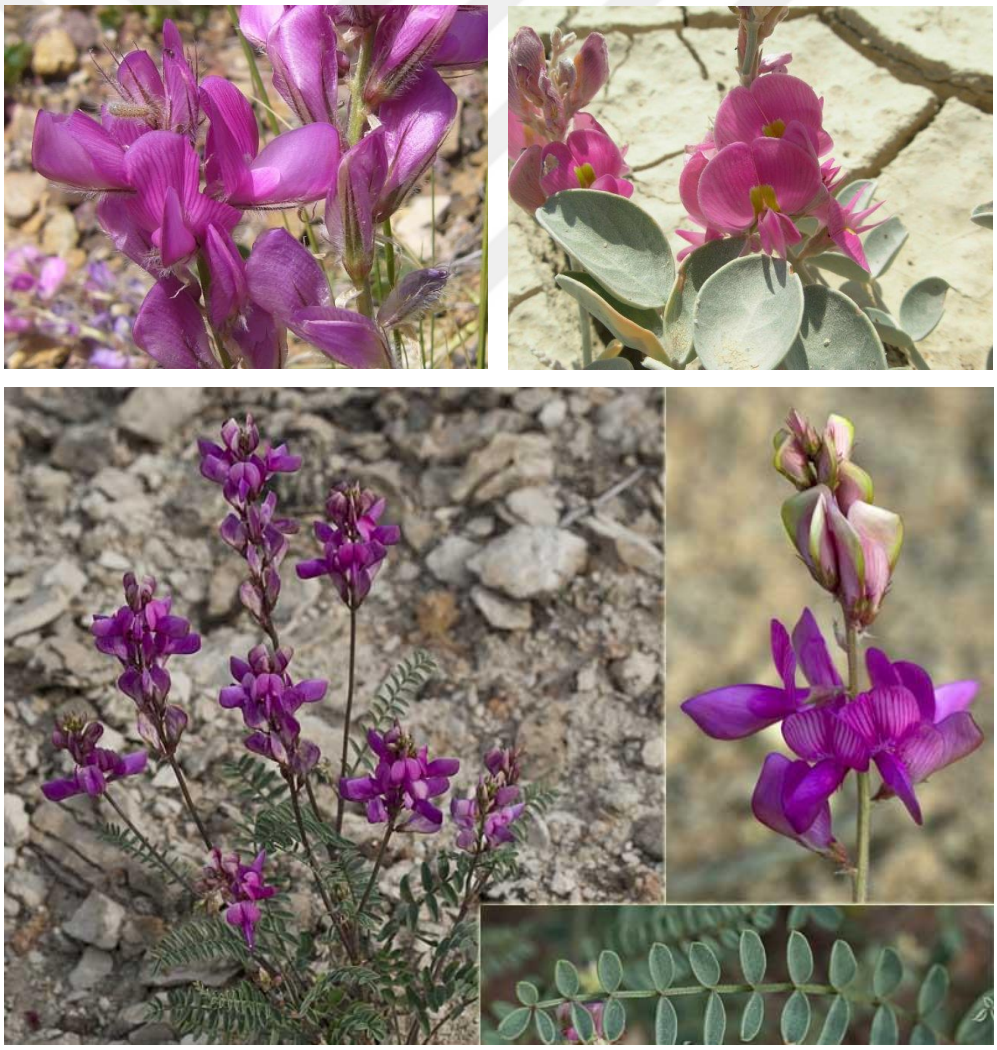
Şekil 1.1. *Hedysarum pycnostachyum* (Fabaceae) bitkisinin Türkiye'de yetiştiği bölgeler.

Tip: Türkiye **B7** Elazig: d. Baskil, Elazığ Malatya yolu üzerinde Malatya'nın 51 km doğusundaki köprüye yakın alanlarda Fırat'ın sol kıyı tarafındaki kayalıklarda, 680 m, 16 vi 1949, *Huber- Morath* 9064 (Hedge ve Hub.-Mor, 1996).

Hedysarum pycnostachyum çok yıllık otsu bir bitki olup Haziran ayı civarlarında çiçeklenir. Bitki 680 m yükseklikte kayalıklar ve nehir kenarında yetişir. *Hedysarum pycnostachyum* 45-60 cm boyunda olup gövdesi dik ve alt kısımları odunsudur. Yapraklar 4-8 çift yapıda olup şekli doğrusal-dikdörtgen yaprakçıklı ve her iki yüzeyi tüylüdür. Yaprak boyutu 8x2 mm olup yaprak sapı dibinde bulunanstipül yapıları kuru ve soluk kahverengi özelliktedir. Çiçek sapları yaprakları

çok aşar. Çiçeklenme kısmen meyve dönemi uzayan piramit şeklinde yoğunlaşır. Çanak yapraklar 2 mm uzunluğundaki neredeyse eşit dişleri ile 5 mm uzunluğundadır. Taçyapraklar sarı, tipik olarak 7 mm, kanatları 5 mm, yaprak damarları 10 mm uzunluğundadır. Yumurtalıkları tüylüdür**.** Meyveler yoğun olarak tüylü olup 12x8 mm boyutundadır ve 1 tohumlu ve 2 mm uzunluğunda kırmızımsı ince dikenlidir (Hedge ve Hub.-Mor, 1996).

Endemik; Ir.-Tur. Element. Gövdenin alt kısımları odunsu olup yıllık dalları otsu yapıdadır. Piramit şeklinde çiçeklenme, küçük sarıçiçekleri ve standart oranları, kanatları ve yaprak damarından dolayı familyasında yakın benzerleri olmaksızın çok farklı bir türdür. Bir çekirdekli ve kısa tüylü meyve özelliklerinden dolayı kısmen Hedysarum ve Onobrychis arası benzerlik gösterir (Hedge ve Hub.-Mor, 1996).



Şekil 1.2. Hedysarum sınıfına ait örnek bazı bitkiler (a) *Hedysarum elegans*, (b) *Hedysarum huetii* (c) *Hedysarum boveanum* subsp. europaeum

1.2. Kimyasal Kısım

Leguminosae ya da fasulye ve bakla ailesi olarak da adlandırılan Fabaceae ailesi 36 takım, 727 cins ve 19327 türe sahip olup kapalı tohum bitkilerinin en büyük üçüncü ailesidir (Lewis ve ark., 2005). Son zamanlarda yapılan filogenetik çalışmalarla bu sınıflandırmanın güvenilirliği desteklenmiştir (Doyle ve ark., 2000; Kajita ve ark., 2001; Wojciechowski, 2003; Wojciechowski ve ark., 2004). Legumler insanlar tarafından hasadı yapılan ve hayvanlar tarafından tüketilen birçok türe sahip olup yağ, lif, yakıt, gübre, kereste, ilaç, kimyasal ve bahçıvancılık alanlarında kullanıma sahiptir ve zirai ve ekonomik açıdan da değerlendirilir (Lewis ve ark., 2005).

Bu çalışmada *Hedysarum pycnostachyum*'dan çeşitli kromotografik metodlar kullanılarak üç tane doğal bileşik izole edilmiştir. Bunlardan bir tanesinin yapısı tam olarak aydınlatılarak bir bitkisel sterol (fitosterol) olan Beta-sitosterol glikozid olduğu bulunmuş ve diğer iki doğal bileşiğin yapı aydınlatma çalışmaları devam etmektedir. Bu çalışmada CC (Kolon Kromatografisi), PTLC (Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi), Flash Kromatografisi, VLC (Vacuum Liquid Chromatography), RPC (Reversed Phase Chromatography), TLC (İnce Tabaka Kromatografisi), Ekstraksiyon, Çöktürme (Precipitation), Kristallendirme (Recrystallization) gibi çeşitli kromotografik ve saflaştırma yöntemlerinden uygun olanları kullanılarak doğal bileşik saflaştırılması yapıldı.

1.2.1.Bitkilerin İçerdiği Doğal Bileşikler

1.2.1.1. Glikozitler

Monosakkaritlerin redüktör grubu ile karbonhidrat yapısında olmayan bir maddenin birleşmesinden, bir molekül su çıkışı ile meydana gelen bileşiklerdir. Glikozit bileşikleri asit veya enzim etkisi ile bir molekül su alıp hidrolize uğrayarak şeker (glikon) ve **aglikona** (genin=genol=şeker olmayan kısım) ayrılırlar. Glikozitler aglikonlarının yapısına göre, meydana geliş şekillerine göre ve şekerlerine göre çeşitli şekillerde isimlendirilir ve sınıflandırılır. Meydana geliş şekillerine göre

sınıflandırılmalarında aglikonun -OH (hidroksil grubu), -SH (tiyol grubu), -NH_2 (amin grubu), -CH grupları ile monosakkaritin -OH grubu arasında bir bağ meydana gelmesi durumuna göre isim alırlar. Daha sonraki alt sınıflandırmalar aglikonun yapısına göre olmaktadır.

Glikozidler içerdikleri aglikonların yapısına göre dört grupta sınıflandırılabilirler. (Aksu, 1972);

A.Fenolik Glikozidler

A. Flavonoid Glikozidler
    a. Flavon and flavonol Glikozidler
    b. C-glikozilflavonoidler
    c. Çalkan ve aurone Glikozidler
    d. Izoflavonoid Glikozidler
B. Basit Fenolik Glikozidler
C. Antosiyanin Glikozidler
D. Kumarin Glikozidler
E. Antrakinon Glikozidler

B.Siyanogenetik Glikozidler

C.Sülfür Glikozidler

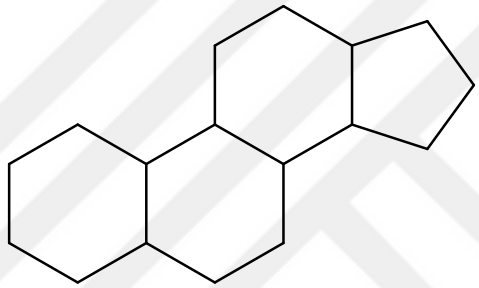
D.Triterpenik ve Steroidal Glikozidler

A. Monodesmosidik Glikozidler
    a. Nötral Glikozidler
    b. Ester Glikozidler
    c. Asidik Glikozidler
        - Şeker Zincirinde Uranik Asit Taşıyan Glikozidler
        - Asit Grubuna Sahip Aglikonlu Glikozidler
        - Asit Grubuna Sahip Aglikonlu ve Şeker Zincirinde Uranik Asit Taşıyan Glikozidler
    d. Açil Glikozidler

B. Bisdesmosidik Glikozidler
    a. Nötral bisdesmosidik Glikozidler
    b. Asidik bisdesmosidik Glikozidler
C. Hayvansal Glikozidler

i. Steroit Glikozitleri

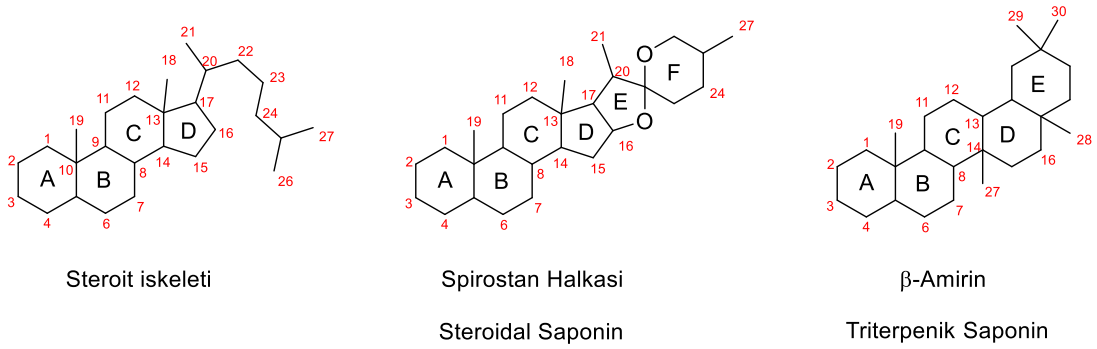
Siklopentano (perhidro) fenantren halkası içerirler. Kardiyotonik glikozitler ve saponinler olmak üzere iki grupta incelenirler.



Şekil 1.3. Siklopentano (perhidro) fenantren halkası

1.2.1.2. Saponinler

Saponinler, su ile çalkalandıklarında kalıcı köpük veren glikozit yapısında ve bitkiler âleminde oldukça yaygın olan bileşiklerdir. Köpük verme özelliklerinden dolayı bu adı almışlardır. Bu bileşikler nötral ya da hafif asit karakterde, renksiz, amorf, tahriş edici, acı lezzette olan, oksijensiz çözücülerde çözünmeyen, genellikle su, metanol, etanol gibi polar çözücülerde çözünen maddelerdir. Saponinler seyreltik asit ya da enzimlerle hidroliz edildiklerinde sapogenin denilen aglikona ve şeker ya da üronik asitlere ayrılırlar. Şekerler genellikle glikoz, bazen de galaktoz, arabinoz ramnoz ya da üronik asit (glikuronik asit) olabilir. Aglikona bağlı monosakkarit ya da uronik asit sayısı 2-12 arasındadır. Saponinler, aglikon (saponin) yapısına göre 2 grupta incelenir. Şeker her iki grupta da 3. karbon atomuna bağlıdır.



Şekil 1.4. Steroidal ve Triterpenik Saponinler

A. Steroidal saponinler: Genellikle 27 karbonlu spirostan halkası taşırlar. Halkaya bağlı karboksil grubu bulundurmadığından bu tip saponinlere "Nötral saponinler" denilmektedir. Doğadaki yaygınlıkları triterpenik saponinlerden daha azdır. Steroidal saponinler yapı bakımından kortizon, D vitamini, kalp glikozitleri ve seks hormonları ile benzer olduklarından çok önemlidir. Bu tip maddelerin sentezinde, sentez başlangıç maddesi olarak kullanılmaktadırlar.

B. Triterpenik Saponinler: Steroidal saponinlerin aksine triterpenik saponinler Monocotyledonae sınıfı bitkilerde az, Steroidal Dicotyledonae sınıfı bitkilerde yaygındırlar. Triterpenik saponinlerin yapısı β-amirin, α-amirin ve lupeol olmak üzere 3 halde bulunabilir. 4, 17, 20 no'lu karbonlara bağlı metil grubunun karboksil grubu ile yer değiştirmesi sonucutriterpenik asitler oluşur.

Bitkilerdeki Rolleri: Diğer maddeler gibi Saponinler de bitki hayatında önemli rol oynarlar. Hücre fizyolojisindekanı hemoliz etme özellikleri önemli rollerindendir. Canlı hücrelerde saponinlerin kolesterol üzerine bağ kurucu, bloke edici etkisi olduğu sanılmakta ayrıca Fosfolipidlerin (Lesitinler) değişimi üzerinde etki göstermektedirler. Bazı araştırmacılaragöre bitkilerde fitoserinlerin ve bazı vitaminlerin biyosentezinde steroidal saponinlerin yer aldığı ve bazı teorilere göre ise bitkilerde saponin oluşmasının nedenlerinin şeker bloke edilmesi, rezerv kaynağı olarak ya da bitki için zararlı maddelerin biriktirilmesi amacıyla olduğu belirtilmiştir.

Farmakolojik Etkileri: Özellikle soğukkanlı hayvanlara (balıklara) toksik etki gösteren Saponinlerin çoğu kan zehiridir. Kolesterol ya da lesitin ile birleşerek alyuvar çeperini hemoglobine geçirgen hale getirirler. Bundan dolayı halk arasında balık zehiri olarak kullanılırlar. Genellikle sulu çözeltileri kanı hemoliz ettiği halde, hemoliz yapma özelliği olmayan hatta hemolizi önleyen saponinler de bulunmaktadır. Saponinler mukoz membranı irite ederler. Yapılarında hem hidrofilikhem de hidrofobik grup içerdiklerinden yüzey gerilimini azaltıcı etki gösterirler. Bu özelliklerinden dolayı emülsiyon stabilizatörü, köpük yapıcı ajan, ıslatıcı toz ve deterjan olarak kullanılırlar.

1.3. Uçucu Yağ Asitleri

Uçucu yağlar bitkilerden veya bitkisel droglardan elde edilen özel kokulu, oda sıcaklığında sıvı, genellikle renksiz uçucu maddeler karışımıdır. Uçucu yağlar; etanolde, organik çözücülerin çoğunda ve yağlarda çok çözünürken, genellikle suda az çözünür. Uçucu yağlar bitkinin çiçek (flos), yaprak (folia), meyve (fructus), toprak üstü kısımları (herba), kabuk (cortex), odun (lignum), rizom (rhizoma) ve kök (radix) gibi her organında bulunabilirler. Bitkinin bulunduğu familyanın özelliklerine göre salgı tüylerinde, salgı ceplerinde, salgı kanallarında, salgı hücrelerinde veya epiderma ya da parenkima hücrelerinde dağılmış olarak bulunurlar.

1.3.1.Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri

Uçucu yağlar bitkilerden; ısıya dayanıklılıklarına, bileşenlerin özelliklerine ve miktarlarına bağlı olarak değişik şekillerde elde edilebilirler. Uçucu yağlar, yağı taşıyan bitki kısımlarından, genellikle distilasyon yolu ile elde edilirler. Uygulanan yöntem, bitkinin ısıya dayanıklılığı, yağın uçucu olması, suda çözünüp çözünmemesi ve distilasyon koşullarıyla bağlantılıdır. Uçucu yağ eldesinde kullanılan yöntemler başlıca üç ana grupta verilebilir.

Bunlar;

• Distilasyon

• Ekstraksiyon

• Sıkma'dır.

Bu yöntemlerin dışında Mikrodalga distilasyon, Mikrodistilasyon ve Likens-Nickerson sürekli distilasyon, ekstraksiyon yöntemi de kullanılmaktadır (Anonim,2015).

1.4. Biyolojik Aktivite Kısmı

Bitkilerin antimikrobiyel, antineoplastik ve antioksidan etkileri gibi biyolojik aktiviteleri ile ilgili araştırmalar son zamanlarda büyük ilgi uyandırmaktadır. Özellikle son yıllarda patojenik bitki hastalıklarına karşıda etkileri denenmiş ve etkili oldukları ortaya konulmuştur. Yapılan bazı araştırmalarda ülkemizde yetişen ve önemli potansiyel bir kaynak olan bazı bitki sekonder metabolit ve ekstralarının antimikrobiyel etkileri olduğu belirtilmiştir. Ekstreler, bitkilerden bitkisel droglardan, su veya su buharı distilasyonu ya da çeşitli polaritede çözücüler ile elde edilen, normal koşullarda sıvı, bazen donabilen, kuvvetli kokulu ve yağımsı karışımlardır (Tanker ve Tanker, 1990). Uçucu yağlar, farklı bileşenleri içeren kompleks karışımlar olduklarından biyolojik etkileri yönünden de farklılık göstermektedir. Etki dereceleri içerdikleri etken maddenin özelliğine bağlı olarak değişiklik gösteren pek çok uçucu yağın, antimikrobiyal özelliğe sahip olduğu belirtilmektedir (Bağcı ve Dığrak, 1997). Antimikrobiyel aktivite gösteren bitkiler gıdalarda koruyucu madde, tıbbi amaçlı, anti-helmintik, anti-fungal olarak ve bitki zararlılarına, yabancı otlara karşı mücadelede kullanılmaktadır. Dünya sağlık teşkilatı'nın 91 ülkenin farmakopilerine ve tıbbi bitkileri üzerinde yapılmış olan bazı yayınlara dayanarak yaptığı bir araştırmaya göre, tedavi amacıyla kullanılan tıbbi bitkilerin toplam miktarı 20.000 civarındadır (Anonim, 1979). Bitkilerin mikroorganizmaları öldürücü ve insan sağlığı için önemli olan özellikleri 1926 yılından bu yana Türkiye'de olduğu gibi diğer ülkelerdeki çeşitli laboratuvarlarda da araştırılmaya başlanmıştır (Vonderbank, 1949).

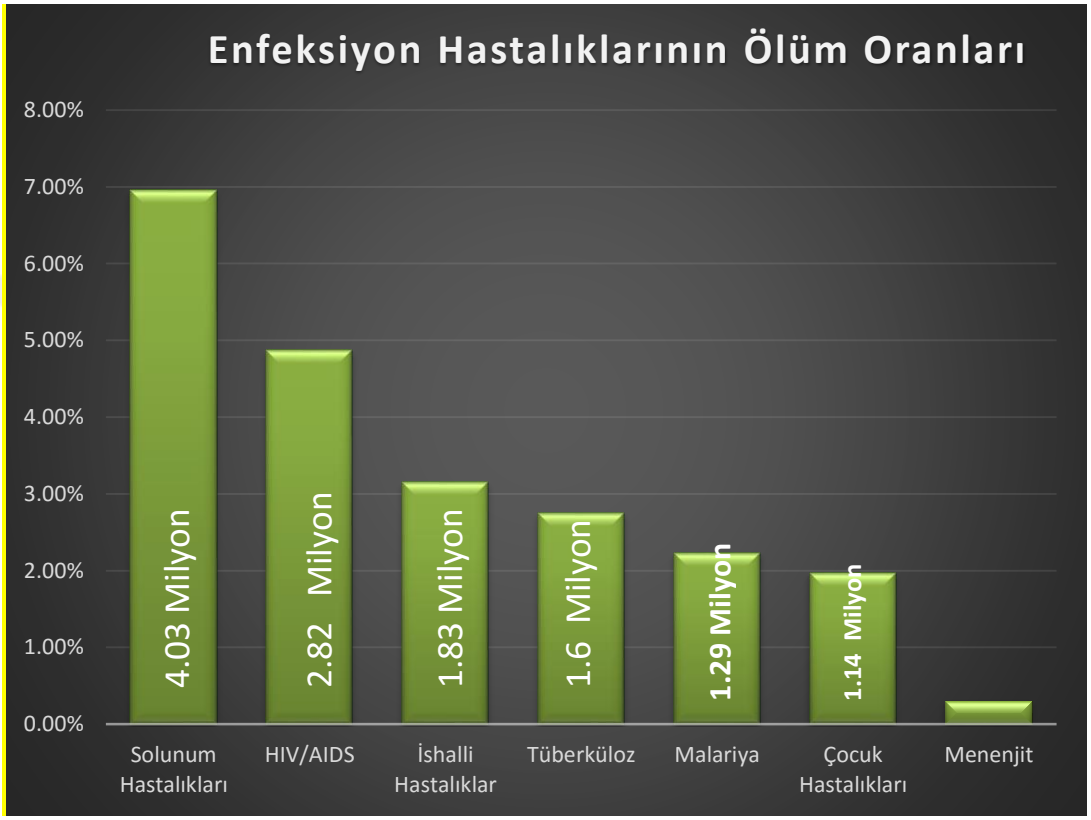
Dünyada olduğu gibi ülkemizde de pek çok araştırıcı halk ilaçlarını değişik açıdan inceleyen çalışmalar yapmıştır ve oldukça önemli sonuçlar elde etmişlerdir. Günümüzde bitkiler ve bitkisel ilaç hammaddeleri, reçete ile satılan ilaçların % 25'ini oluşturmaktadır (Farnsworth ve ark., 1985). Son yıllarda artan hastalıklara karşı sentetik yapılı ilaçların yetersiz kalması ve yan etkilerinin saptanması doğal ürünlerin kullanma zorunluluğunu arttırmıştır. Bu amaçla birçok bitki mikrobiyolojik farmakolojik yönlerden hatta biyolojik savaşın gündemde olduğu son yıllarda bitki savunma mekanizması bakımından da çok yönlü araştırılmaktadır. Teknoloji ve tıp ne kadar ilerlerse ilerlesin doğal zenginliklerin tükenmesi ve ekonomik olarak ülkelerin girdikleri çıkmazlar, doğal ürünlerin çok amaçlı kullanılmalarını zorunlu kılmıştır. Günümüz dünyasında tıbbi bitkiler, folklorik tıbbın ve alternatif tıbbın temel tedavi aracı olmasının yanı sıra bir ölçüde çağdaş bilimsel tıbbın ilgi alanına da girmiş bulunmaktadır. Bu bitkilerin hastalıklardan kurtulma veya daha sağlıklı olma yolunda kullanımına yönelik ilgi giderek daha geniş kitlelere mal olmaktadır. Ayrıca, tedavi amaçlı kullanılacak olan bitkiler ve bitkisel ürünler kesin bir şekilde test edilmeden kullanılmamalıdır.

1.4.1. Antimikrobiyel Aktivite Çalışmaları

Çeşitli mikroorganizma türleri bulunmaktadır. Bu türlerden bazıları insan sağlığı açısından olumsuz sonuçlara sebep vermektedir. Mikroorganizmalar atmosfer tabakalarında ve yer kürede yaşamaktadırlar. Mikroorganizmalar, denizlerde, okyanusların derinliklerinde, atmosferin birçok tabakasında, yer kürenin oldukça dip kısımlarında, gelişmiş canlıların deri ve bağırsaklarında ve ekosistemin her bölgesinde yaşamlarına devam edebilmektedirler. Yaşam alanlarına dikkat edildiğinde, boyutları mikroskobik olan bu tür canlılar yaşamımızın her alanında yaşayabilmektedirler (Christner ve ark., 2008).

Türü ne olursa olsun bazı mikroorganizmalar ekosistemde yaşamın devamı için gerekli iken bazı mikroorganizmalar da patojenik olup çok tehlikeli hastalıklara hatta insan, hayvan ve bitkilerin ölümlerine neden olmaktadır (Anonim, 2002). Mikroplar kızamık, çocuk felci, kolera, grip, uçuk, Hepatit B, Aids, Verem gibi birçok hastalığa sebep olmaktadırlar. Hastalığa sebep olan zararlı mikroorganizmalar, virüs ve bazı

bakterilerdir. Mikroorganizmalar çeşitli yollarla insan vücuduna girerler. Tükettiğimiz gıda ve yiyeceklerle ağız yoluyla, burundan solunum yolu ile havadan, suyolu ile deri yaralanmasında kan ile kirli ortamlarda göz ve kulak yolu ile ayrıca böcekler, pire, veba, sivrisinek, sıtma, karasinek gibi mikrop taşıyıcılar sebebiyle insan vücuduna girerek yukarıda saydığımız birçok hastalığa sebep olurlar.



Şekil 1.5. Enfeksiyon hastalıklarının sebep olduğu ölüm sayıları

Mikroorganizmalar, hücre büyüklüklerine, hücresel yapılarına ve yaşama özelliklerine göre 4 ana sınıfa ayrılırlar:

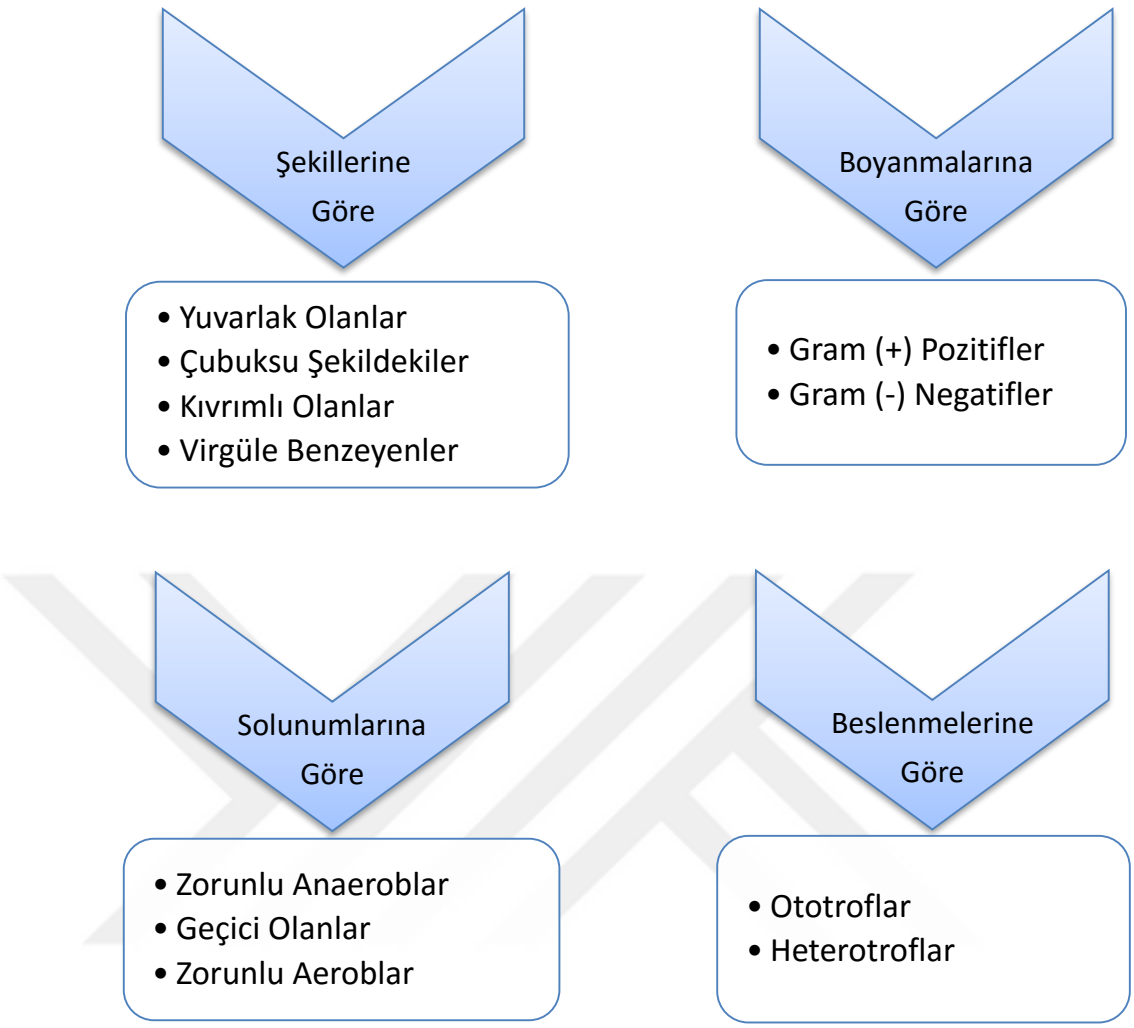
- Mantarlar
- Bakteriler
- Virüsler
- Parazitler

Mantarlarla ilgilenen bilim dalına mikoloji, bakterilerle çalışan bilim dalına bakteriyoloji virüslerle ilgilenen bilim dalına viroloji, parazitlerle ilgilenen bilim dalına parazitoloji ve bağışıklık ile çalışan bilim dalına immünoloji adı verilir.

Bakterilerin sebep olduğu bazı hastalıklar aşağıda verilmiştir.

- Orta Kulak İltihabı
- Çocuk Felci
- Suçiçeği
- Kabakulak
- Soğuk Algınlığı
- SARS (Ağır Akut Solunum Yolu Yetersizliği)
- Kuduz
- Aids
- Zatüre
- Menenjit
- Kızamık

Bakteriler; şekilleri, solunumları, beslenmeleri ve boyanmaları gibi çeşitli özellikleri bakımından sınıflandırılırlar.



Şekil 1.6. Bakterilerin Sınıflandırılması

Gram boyası ile boyandığında mavi-mor renk veren bakterilere gram (+), kırmızı-turuncu renk veren bakterilere ise gram (-) bakteriler denir. Bakterilerin hücre çeperinin özelliklerinden dolayı farklı renkler ortaya çıkmaktadır. Gram (+) bakteriler kalın ve peptidoglikandan oluşmuş tek katmanlı bir çepere sahipken, gram (-) bakterilerde ise ilk tabaka karbonhidrat ve proteinlerden, ikinci tabaka ise yine peptidoglikandan oluşmak üzere iki ince katmanlı hücre çeperi bulunmaktadır (Gram, 1884; Hugenholtz, 2002).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Fabaceae ailesi (Leguminosae ya da fasulye ve bakla ailesi olarak da adlandırılır) kapalı tohum bitkilerinin en büyük üçüncü ailesidir. Aile 36 takım, 727 cins ve 19327 türe sahiptir (Yakovlev ve ark., 1996) ve bu sınıflandırmanın güvenilirliği son zamanlarda yapılan filogenetik çalışmalarla da desteklenmiştir (Choi ve Ohashi, 2003; Anonim, 1983; Anonim, 2014; Hedge ve Hub.-Mor, 1996). Zirai ve ekonomik açıdan değerlendirildiğinde, legumler insanlar tarafından ekin olarak hasat edilen ve hayvanlar tarafından tüketilen birçok türe sahip olup yağ, lif, yakıt, gübre, kereste, ilaç, kimyasal ve bahçıvancılık alanlarında da kullanıma sahiptir (Yakovlev ve ark., 1996). Bitki için yapılan literatür taraması sonucunda *Hedysarum pycnostachyum* hakkında yapılmış herhangi bir bilimsel çalışma olmadığı tespit edildi.

Bununla beraber Hedysarum cinsine ait diğer tür bitkilerle yapılan izolasyon çalışmalarında saponinler, pinitoller, inositoller, isoflavonoidler, alkaloidler, kumarinler, sakkaridler, proteinler, polisakkaridler, glikozidler, tanninler, asitler, flavonoidler (Wang ve ark., 2007; Jiang ve ark., 2007; Liu ve ark., 2007; Liu ve ark., 2006; Chan ve ark., 2005; Khamidullina ve ark., 2002; Ma ve ark., 2000; Wang ve ark., 1988; Wollmann ve ark., 1972) gibi zengin bir doğal bileşik yelpazesine sahip ürünler elde edilmiştir. İzolasyon çalışmalarının yanısıra, Hedysarum cinsine ait diğer türlerle yapılan aktivite çalışmaları da önemli bulgular vermiştir. Bu türler anti tümör (Wasser, 2002; Li ve ark., 2009; Yao ve ark., 2008; Li ve ark., 2008; Li ve ark., 2008; Lee ve ark., 2008) immün stimülasyon (Wasser, 2002; Yamada, 1994), antioksidan aktiviteleri (Li ve ark., 2003; Liu ve ark., 1997; Ma ve ark., 2010; Liu ve ark., 2010; Xue ve ark., 2010; Han ve ark., 2008; Chen ve ark., 2007), hipoglisemik, immünolojik, anti kanser, antioksidan, anti aging (Cui ve ark., 1998; Huang ve ark., 1992; Jin ve ark., 2004; Lan ve ark., 1987; Song ve ark., 2000; Wang ve ark., 1989; Zhou ve ark., 2006), referans gen seçimi (çeşitli stres ve gelişim aşamaları altında) (C. Louime ve ark., 2008), karyolojik çalışmalar (Badr ve ark., 1997;Abou-El-Enain, 2002), anti-helmintik (Ayers ve ark., 2008; Paolini ve ark., 2003; Mckellar ve Jackson, 2004;Jackson ve Coop, 2000; Waller, 1997; Akhtar ve ark., 2000; Jegede ve

ark., 2009), biyoyakıt özelliği (Cao ve ark., 2011), toprak-enzim aktivitesi (Caove ark., 2011; Li ve ark., 2010; Cao ve ark., 2007; Quan ve ark., 2006; Cao ve ark., 2006), fitoterapi (bitkisel tıbbi tedavi) (Fedorova ve ark., 2010), radyasyon dirençleri (Li ve Yingdong, 2010), enzim inhibitör aktivite (Dorogina ve ark., 2010), antidiyabet (Hu ve ark., 2010), antiviral (Glyzin ve ark., 1995), antimikrobiyel (Gonchig ve ark., 2008), aktiviteleri açısından incelenmiş ve çok önemli sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca bu bitki cinsi üzerine yapılan farmakolojik araştırmalar (Wei ve ark., 2009; Chen ve ark., 2008;Wang, 2007; Ko, 2007; Lei, 2002; Yanve ark.,2007; Zhong ve Yu, 2007) bu bitki cinsinin ilaç olarak birçok alanda etkili olabileceğini göstermiştir.

Omega 3 (alfa-linolenik asit), Omega 6 (linoleik asit) ve Omega 9'dan (oleik asit) oluşan omega yağ asitlerinin beyin gelişimi, koroner kalp hastalıklarının önlenmesi ve bağışıklık sisteminin güçlenmesi gibi fonksiyonları bulunmaktadır. Yetersizliklerinde öğrenme eksikliği, ciltte kuruma gibi bazı deri hastalıkları, astım, artritis, büyümede gerileme, şeker ve kanserin bazı türleri görülmektedir (Watkins, 1991). Omega-3 yağ asitlerinin, kırmızı hücrelerin dayanıklılığını arttırdığı, kanın viskozitesini azalttığı ve bu sayede kılcal damarlarla beslenen dokulara oksijen teminini kolaylaştırdığı da bilinmektedir. Bu yağ asitleri ayrıca hipertansiyona da iyi gelirler (Leaf ve Weber, 1988). Omega-3 yağ asitinin sinirsel bozukluklarını önlediği, kalp-damar hastalıklarına ve allerjiye iyi geldiği, bağışıklık sistemini güçlendirdiği bilinmektedir.

Doğal kan inceltici özelliğe sahip olan esansiyel yağ asitleri, kalp krizine yol açabilen kan pıhtılaşmasını önleyebilmektedirler. Yetersizliklerinde kepek, egzema, çatlak tırnaklar, mat ve kırılgan saçlar gibi deri sorunları ortaya çıkar. İnsanlar omega-3, omega-6, omega-9 gibi yağ asitleri yönünden zengin gıdalar tüketmelidirler. Doymamış yağ asitleri bakımından zengin besinler tüketildiğinde, kan plazmalarında HDL artışına bağlı olarak kolesterol miktarında düşüş görülür.

Angustifolia, Sonora bölgesinden (Meksika'nın kuzeyi) bir alkollü içki olan "bacanora"nın detaylandırmasında kullanılır (Barraza-Morales ve ark., 2006). Öte yandan bu tür Meksika'nın güneyinde "mezcal" üretimi için "mescal bölgesi"nde kullanılır. Ayrıca angustifoliameksika geleneksel tıbbında burkulma ve kırık kemiklerin tedavisi için kullanılır (Cano, 1998; Monroy-Ortriz ve Castillo-España, 2007). Bu bitkinin kimyasal ve farmakolojik öncülleri Angustifolia yapraklarının aglikon veya glikosil bileşenleri şeklinde triterpen ve steroid saponin yapısına ayrıldığını gösterir (Abdel ve ark., 2010). Tıpkı steroid saponin:25*R*-5α-spironstan-12-one-3β-ol-3-*O*-[β-D-xylopyranosyl-(1→4)-β-D-galactopyranosyl-(1→3)-{β-Dxylopyranosyl-(1→3)-β-D-glucopyranosyl-(1→2)}-β-glucopyranoside] ayrılmıştır ve onların saponin kesirleri belirgin anti-iltihaplı, analjezik, kan paraziti öldürücü sekaryal ve mirisidyalaktivitelere neden olmuştur (Abdel ve ark., 2010).

E.*rheedie* bitkisinin sarılık, ishal (Dash ve Padhy, 2006), kas-iskelet problemleri (Uprety ve ark., 2010), kabakulak (Shivanna ve Rajakumar, 2001) tedavisi gibi çeşitli tıbbi kullanımı vardır.

Sarcococca cinsi bitkiler yerel halk tarafından sıtma, romatizma ve deri enfeksiyonu (Cordell, 1981) gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde ve halkın tedavi sisteminde yararlı bir ilaç olarak kullanılır ve ayrıca antiülser, antitümor ve sinir düğümü engelleyici (Qiu ve ark., 1994), antikolinesteraz (Ur-Rahman ve ark., 2002) ve antibakteriyal (Jayasinghe ve ark., 1998; Ur-Rahman ve ark., 1998) faaliyet sunar.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Genel

Ekstraktların hazırlanmasında kullanılan metanol, Heksan, diklorometan çözücüleri kullanılmadan önce distillendi. Bütanol Merck'ten satın alındığı gibi kullanıldı. Su ekstraktının hazırlanmasında saf su kullanıldı.

Antimikrobiyel aktivite için kullanılan tüm mikroorganizmalar Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümünden temin edildi. Muller-Hinton agar besi yeri, Muller-Hinton sıvı besi yeri, DMSO, Nutrient agar plakaları, Sabouraud Dextrose Agar plakaları ve 96 kuyucuklu mikro plakalar Merck'ten satın alındı. Steril kâğıt diskler Hi-Media'dan alındı. Standart ilaçlar Ampicilin antibiyotik ve flucytosine antifungal ajan Sigma-Aldrich'ten satın alındı.

Heksan ekstresinin yağ asitlerinin metil esterlerinin analizi, HP-5MS kolon (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) ile kombine edilmiş Agilent 7890A ve Agilent 5975C inert XL MSD (mass selective detector-kütle seçici dedektör) kullanılarak gerçekleştirildi. Taşıyıcı gaz olarak saf helyum gazı (99.999%) 1 mL/dk sabit akış hızında kullanıldı. Fırın sıcaklığı 60 °C'de 5 dk sonrasında 5 °C/dk hızla 220 °C'ye ve orada 5 dakika kalacak şekilde programlandı. 1 µL örnek (heksanda) 20:1 split oranlı split modunda cihaza enjekte edildi. Bileşikler NIST–Wiley veri kütüphanesi sonuçlarına göre tanımlandı.

İnce tabaka kromotografisi için, TLC Siligacel 60 F_{254} (Merck 5554) precoated tabakalar kullanılırken kolon kromotografisi için Silicagel 60 (Merck 7734) (63-200 µm) dolgu maddeleri kullanıldı. Vakum Likit Kromotografisi için LiChroprep RP-18 (Merck 9303) (25-40 µm) dolgu maddesi kullanıldı. İzolasyon, saflandırma ve kromotografik çalışmalarda (İTK, KK, VLC) aşağıdaki çözücü sistemleri kullanıldı. Kullanılan tüm çözücüler fraksiyonlu distilasyon düzeneği ile damıtıldıktan sonra kullanıldı.

Tek boyutlu ^{1}H, ^{13}C ve iki boyutlu HMBC, HSQC NMR analizleri bir Agilent 400 MHz NMR spectrometresi ile yapıldı.

Çizelge 3.1. İzolasyon ve saflaştırma işlemlerinde kullanılan çözücü sistemleri

A	Diklormetan: Metanol	9: 0.5
B	Diklormetan: Metanol	9: 1
C	Diklormetan: Metanol	9: 1.5
D	Diklormetan: Metanol	9: 2
E	Metanol: H_2O	1: 9
F	Metanol: H_2O	2: 8
G	Metanol: H_2O	3: 7
H	Metanol: H_2O	4: 6
I	Metanol: H_2O	1: 1
J	Metanol: H_2O	6: 4
K	Metanol: H_2O	7: 3
L	Metanol: H_2O	8: 2
M	Metanol: H_2O	8.5: 1.5
N	Metanol: H_2O	9: 1
O	Metanol: H_2O	9.5: 0.5
P	BuOH: H_2O	1: 1
Q	Diklormetan: Metanol: H_2O	61:32:7
R	Diklormetan: Metanol: H_2O	61:35:7
S	Diklormetan: Metanol: H_2O	64:50:10
T	Diklormetan: Metanol: H_2O	65:35:5
U	Diklormetan: Metanol: H_2O	70:30:3
V	Diklormetan: Metanol: H_2O	70:30:4
W	Diklormetan: Metanol: H_2O	75:25:3
X	Diklormetan: Metanol: H_2O	80:20:2

Çizelge 3.1. (devam) İzolasyon ve saflaştırma işlemlerinde kullanılan çözücü sistemleri

Y	Diklormetan: Metanol: H_2O + Metanol	61:32:7 + % 5
Z	Diklormetan: Metanol: H_2O + Metanol	61:32:7 + % 10
A[l]	Diklormetan: Metanol: H_2O + Metanol	61:32:7 + % 20
B[l]	Kloroform: Metanol: H_2O	61:32:7
C[l]	Kloroform: Metanol: H_2O	61:35:7
D[l]	Kloroform: Metanol: H_2O + Metanol	61:32:7 + % 5
E[l]	Kloroform: Metanol: H_2O + Metanol	61:32:7 + % 10
F[l]	Kloroform: Metanol: H_2O + Metanol	61:32:7 + % 20
G[l]	Etil asetat: MeOH: H_2O	50:30:10
H[l]	Etil asetat: MeOH: H_2O	60:25:10
I[l]	Aseton: MeOH	1:1

TLC tabakalarındaki spotlar % 5 lik H_2SO_4 çözeltisi püskürtüldükten sonra tabakalar 180 ^oC de ısıtılarak belirgin hale getirildi. UV aktif bileşenler için, spotlar ve bantlar UV lamba altında 254 ve 366 nm'de gözlendi.

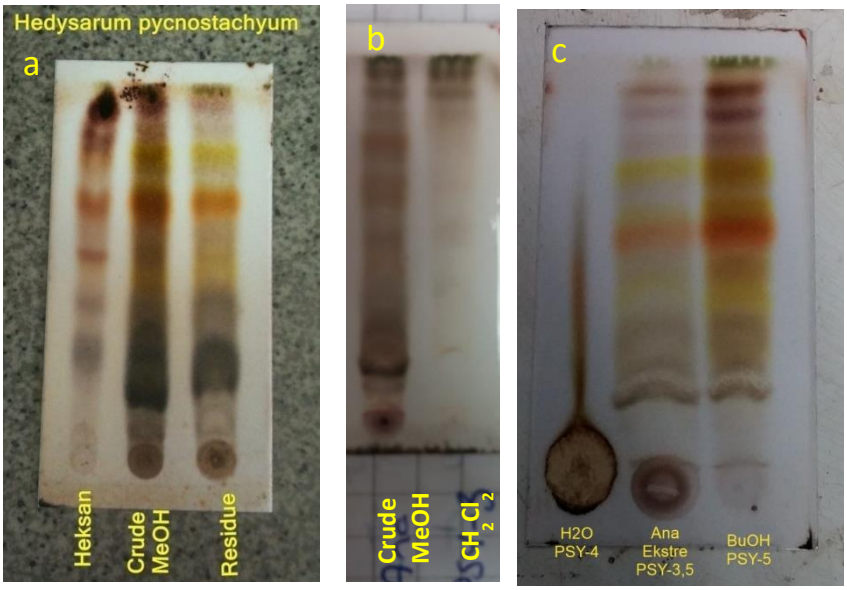
3.2. Bitki Materyali

Bu çalışmada, *Hedysarum pycnostachyum* Haziran 2011'de Elazığ Malatya yolu Kömürhan köprüsü yakınlarından toplandı. Bitkinin botanik özellikleri Dr. Murat KÜRŞAT tarafından teşhis edildi ve numune vesikası Bitlis Eren Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji bölümünde depolandı.

3.3. İzolasyon ve Saflaştırma

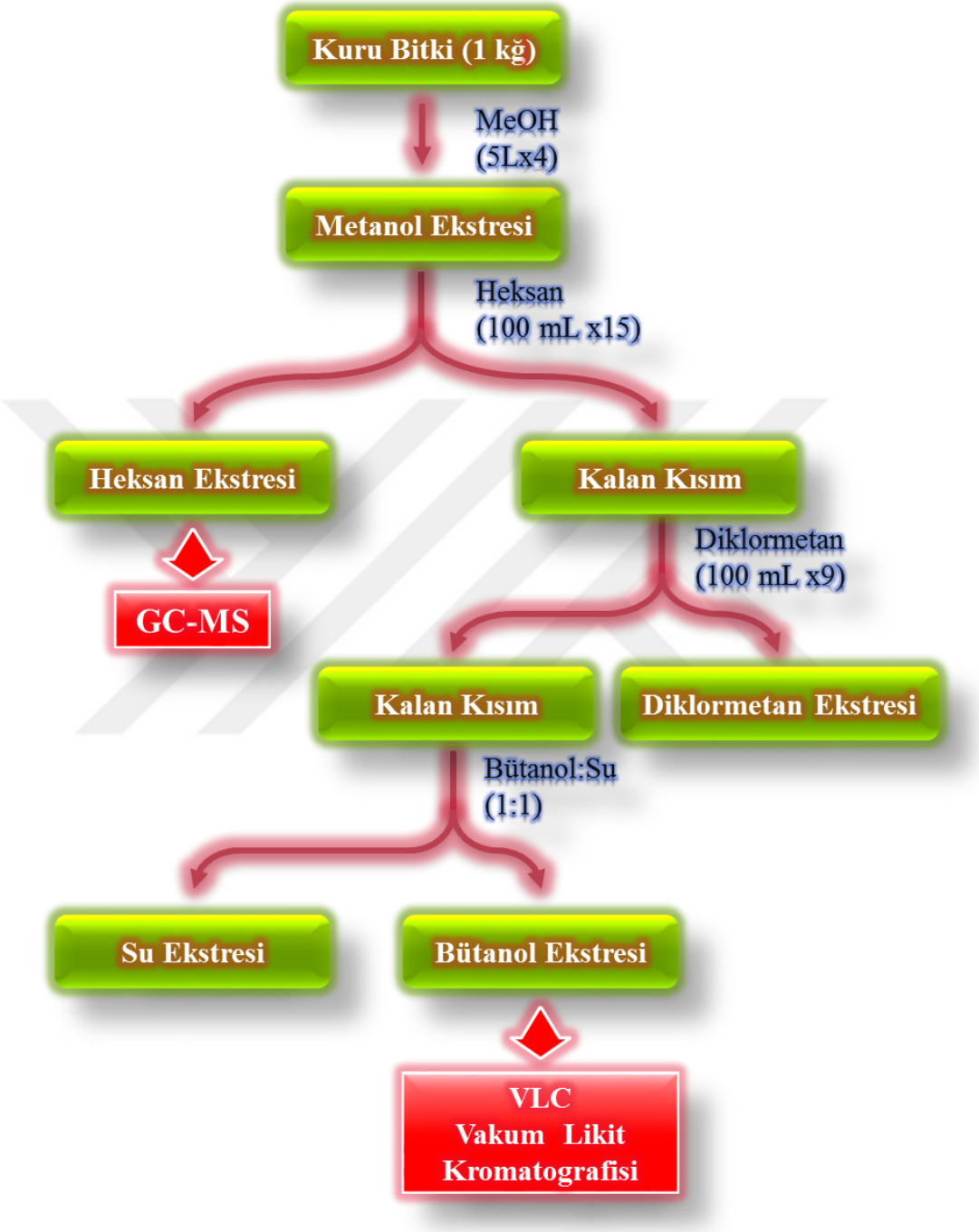
Bu çalışmada, bitkinin toprak üstü kısımları çalışıldı. Bitki materyali yeterli havalandırmaya sahip bir odada güneş ışığından uzak bir şekilde muhafaza edilerek ortam sıcaklığında kurutuldu ve daha sonra öğütülerek toz haline getirildi. Toz halindeki 1 kg bitki materyali üzerine oda sıcaklığında 5 litre metanol eklenerek bir

gece bekletildi ve süzüldü. Süzüldükten sonra kalan posa üzerine bu işlem 3 kez daha tekrarlanarak elde edilen ekstreler her seferinde birleştirildi. Elde edilen çözelti düşük basınç altında ve 40 ^{o}C sıcaklığı geçmeyecek şekilde bir rotary evaporatör yardımıyla kuruluğa getirilerek 140 gram ham metanol ekstresi elde edildi. Bu noktadan sonra bir seçici sıvı-katı ekstraksiyon yöntemi uygulandı. Kuru ham metanol ekstresi küçük porsiyonlar halinde heksan (15 x 100 ml) ile yıkanarak lipofilik kısımlar, uçucu yağlar ve klorofilli kısımlar ekstreden uzaklaştırıldı. Birleştirilen heksan porsiyonları da aynı şekilde rotary evaporatör ile kuruluğa getirilerek 5.25 gram heksan ekstresi elde edilmiş oldu. Heksan ekstresi uzaklaştırıldıktan sonra kalan yağdan arındırılmış kısım bu kez yine küçük porsiyonlar halinde diklorometanla (9 x 100 ml) yıkanarak serbest aglikonlar gibi orta polaritedeki bileşikler ekstrakte edildi. Aynı şekilde bu porsiyonlar da kurutularak 1.35 gram diklorometan ekstresi elde edildi. Son olarak kalan oldukça polar kısım 1:1 oranında bütanol:su karışımıyla ekstraksiyon yapıldı. Böylece şeker bileşikleri su fazına geçerken ağırlıklı olarak organik bileşiklerden oluşan ikincil metabolitler organiz faz olan bütanol içerisinde kaldı. Bir ayırma hunisi ile ayrılan fazlar kuruluğa getirilerek 82.5 gram su ve 37 gram bütanol ekstreleri elde edildi. Ekstrelere ait TLC sonuçları şekil 3.2a' da verilmektedir.



Şekil 3.1. *Hedysarum pycnostachyum* bitkisinden elde edilen ekstrelerin 61:32:7 (Diklorometan:metanol:su) çözücü sistemi ile yürütülerek elde edilen TLC sonuçları a) Ham metanol ve heksan ekstreleri b) Ham metanol ve diklorometan ekstreleri c) Su ve bütanol ekstreleri

Çalışma proses diyagramı aşağıda detaylı olarak verilmiştir.



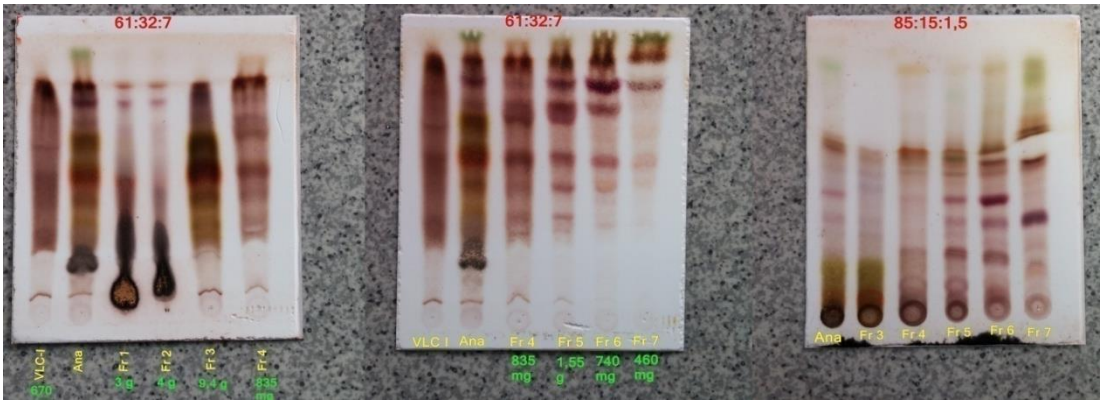
Şekil 3.2. *Hedysarum pycnostachyum* bitkisinin ekstraksiyon şeması.

Biyolojik olarak en aktif olan bütanol ekstresi inceleme altına alındı. 25 gram bütanol ekstresi VLC kolona verilmeden önce 60 ml metanol içerisinde çözündü. Daha sonra bu karışım tüplere alınarak santrifüjlendi. Santrifüjlemeden sonra üstte kalan çözelti kısmı (24 gram) çöken kısımdan (1 gram) ayrıldı. Şekil 3.3.'de bu kısımlara ait TLC verilmektedir.



Şekil 3.3. *Hedysarum pycnostachyum* bitkisinden elde edilen bütanol ekstresinin metanol çözücüsü ile yürütülerek elde edilen TLC sonuçları (a) Metanolde çöken kısım (b) Metanolde çözünen kısım

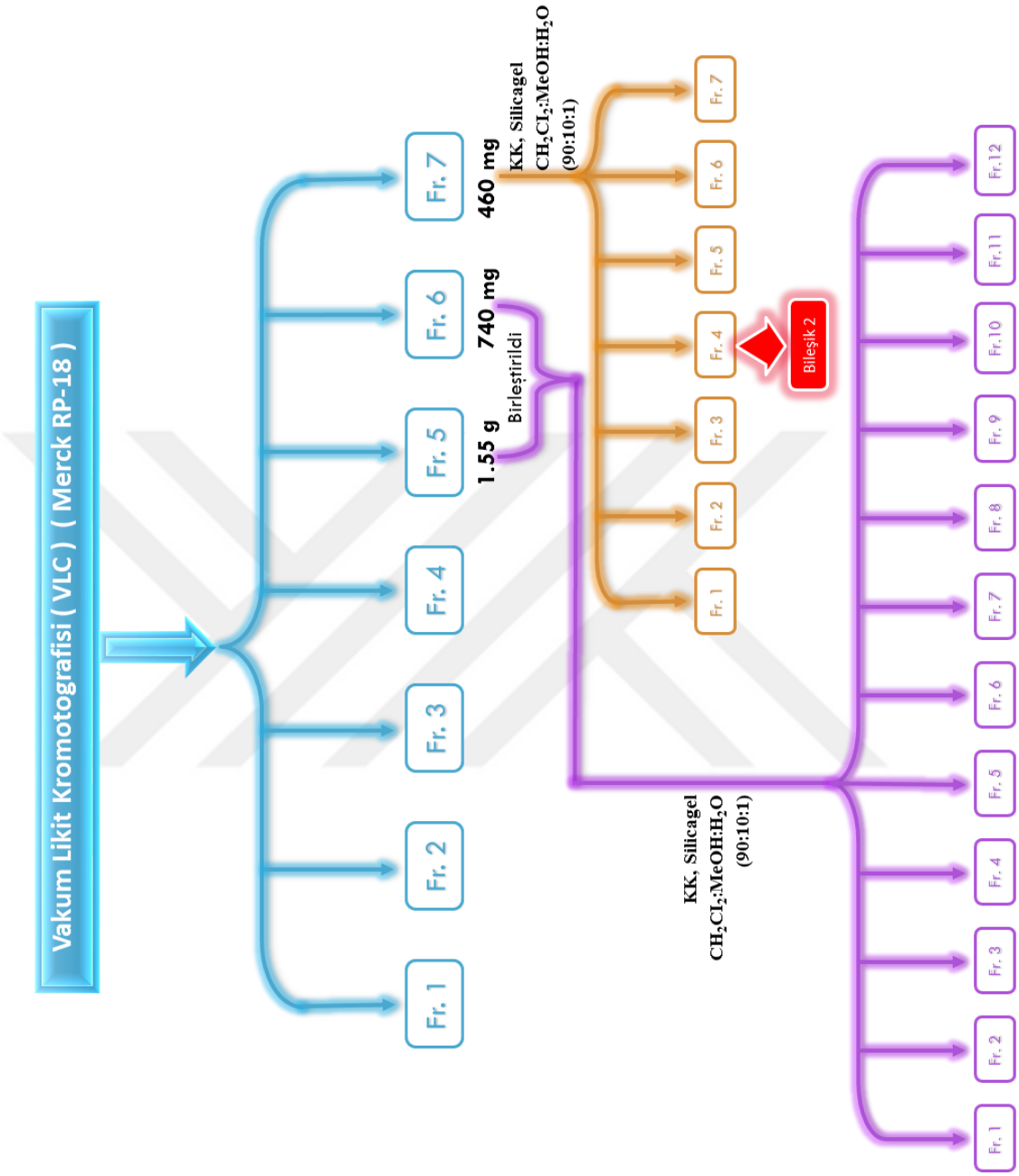
Bu çözünen kısmın yarısı (12 gram 30 ml metanol içerisinde) daha önceden % 70:30 metanol:su çözelti karışımı ile şartlandırılmış VLC kolona verildi ve vakum uygulanarak metanol tamamen elue edildi. Daha sonra 30 ml metanol içerisindeki bütanol ekstresinin ikinci porsiyonu da kolona yüklendi ve vakum ile aynı işlem tekrarlanarak kolon kurutuldu. Daha sonra su ile başlayarak fraksiyonlama yapıldı. E-Q aralığındaki çözücüler kullanılarak 7 fraksiyon elde edildi. Toplanan fraksiyonlara ait TLC'ler Şekil 3.4'de görülmektedir.



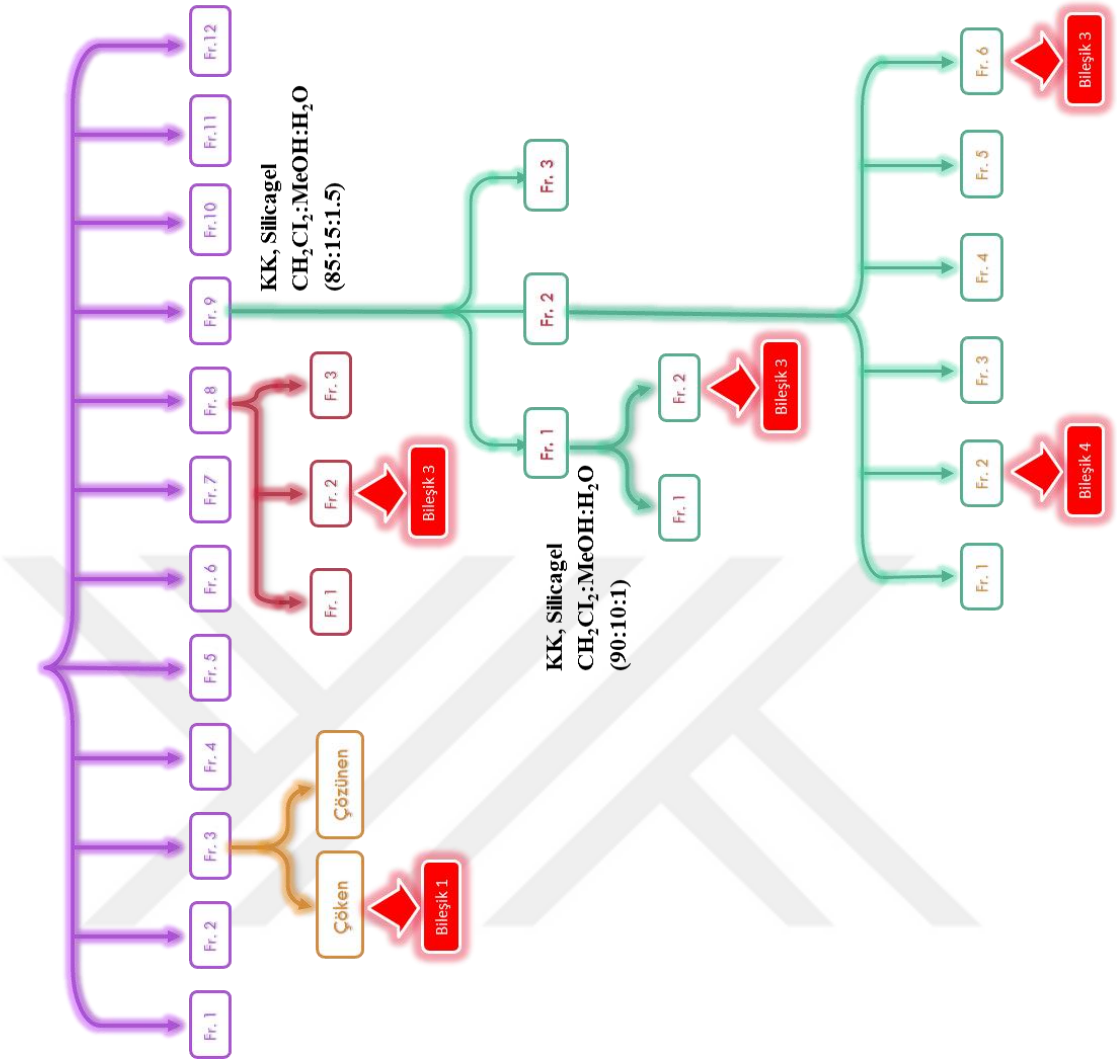
Şekil 3.4. *Hedysarum pycnostachyum* bitkisinden elde edilen bütanol ekstresinin (metanolde çözünen kısım) 61:32:7 ve 85:15:1,5 (Diklorometan:metanol:su) çözücü sistemi ile yürütülerek elde edilen TLC sonuçları

Fraksiyon 5, fraksiyon 6 ve fraksiyon 7'nin önemli olduğu ve daha fazla incelenmesi gerektiği düşünüldü. Fraksiyon 5 + fraksiyon 6 TLC tabakasında aralarındaki büyük benzerlikten dolayı birleştirildi. Buradan elde edilen her fraksiyonu saflandırmak için birçok kolon kromatografisi gerçekleştirildi.

Çalışma proses diyagramı Şekil 3.5'de detaylı olarak verilmiştir.



Şekil 3.5 *Hedysarum pycnostachyum* bitkisinden elde edilen bütanol ekstresinden doğal bileşik saflaştırma ve izolasyonu proses şeması.



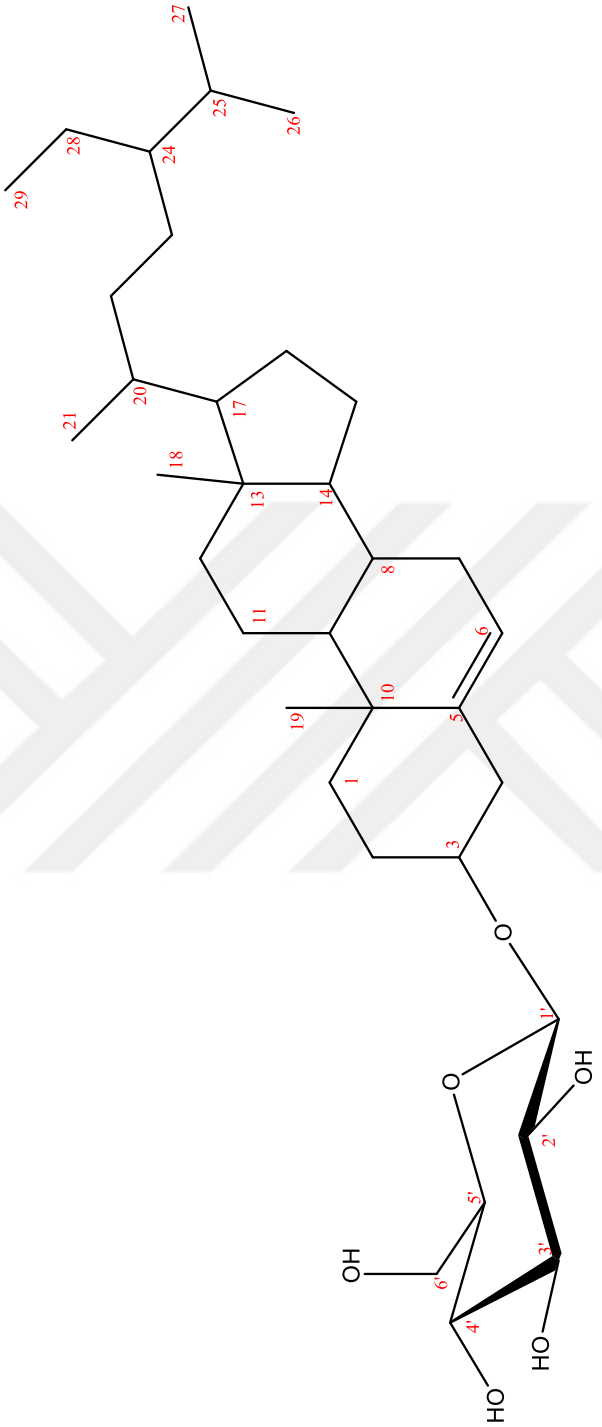
Şekil 3.5(devam) *Hedysarum pycnostachyum* bitkisinden elde edilen bütanol ekstresinden doğal bileşik saflaştırma ve izolasyonu proses şeması

Hedysarum pycnostachyum'dan elde edilen doğal bileşikler kimyasal ve spektroskopik veriler ışığında analiz edildi ve çeşitli spektroskopik sonuçların yorumlanması sonucunda yapıları belirlendi.

3.4. NMR Analizi

Bileşik **1** ve Bileşik **2**'nin yapı aydınlatılmasında DMSO-d6 çözücü içerisinde tek boyutlu ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR ve iki boyutlu HMBC, HSQC NMR analizleri kullanıldı.

3.4.1. Bileşik 1



Şekil 3.6. Elde edilen Bileşik 1'in kimyasal yapısı [3-*O*-(*β*-D-glucopyranosyl)-*β*-sitosterol]

3.5.Heksan Ekstresinin GC-MS Analizi

Yağ karışımı içeren heksan ekstresi Uluslararası Yağ Komisyonu (IOOC) ve IUPAC tarafından yayınlanan trans esterifikasyon prosesi raporlarına göre türevlendirilerek metil esterlerine dönüştürüldü (Paquat ve ark., 1992; Anonim 2001).

Bu prosedüre göre 5 mL'lik bir vidalı kapaklı test tüpü içerisine yaklaşık olarak 0.1 g kuru heksan ekstresi kondu. 2 mL heksan eklenip sallayarak heksan ekstresi çözüldü. Daha sonra oda sıcaklığında 0.2 mL 2M Metanolik KOH eklenip kapağı kapatıldı ve bir teflon bant ile iyice sıkılaştırıldıktan sonra şiddetli bir şekilde 30 saniye sallanarak ekstrakte edildi. Üst faz berraklaşıncaya kadar fazlar ayrılmaya bırakıldı. Metil esterleri içeren üst kısım dekantasyon ile alındı ve GC-MS ile analiz edildi.

Gaz kromatografi analizi yapılıncaya kadar örnek buzdolabında saklanabilir fakat 12 saatten daha uzun süreyle örneğin depolanması tavsiye edilmez.

3.6.Mikrobiyolojik Analiz: Antimikrobiyel Aktivite

Hedysarum pycnostachyum'dan elde edilen Metanol, Heksan, Diklorometan, Bütanol ve Su ekstrelerinin antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri "Agar Disk Diffüzyon" ve "Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Tespiti" testleri ile tayin edildi. Bu çalışmada antimikrobiyel aktivite tayini için aşağıda gösterilen dört gram-pozitif ve üç gram-negatif bakteri ve antifungal aktivite tayini için ise bir maya kullanıldı. Pozitif kontrol olarak (referans) Disk Diffüzyon Metodunda **Ceftazidime** antibiyotiğive **Nystatin** mantar ilacı kullanılırken, Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Tespiti metodunda **Ampicillin** antibiyotiği ve **Fluctosine** mantar ilacı kullanıldı.

Gram-Negatif Bakteriler:

- *Salmonella thyphimurium* CCM 5445,
- *Escherichia coli* ATCC 25922,
- *Escherichia coli* 0157H7,

Gram-Pozitif Bakteriler:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923,
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212,
- *Enterococcus faecium* DSM 13590,

Maya:

- *Candida albicans* ATCC 10239.

3.6.1. Disk Diffüzyon Testi: Muller Hinton Agar besiyeri 9 cm çaplı petri kaplarına 20 ml olacak şekilde döküldü. Test mikroorganizmaları Mueller-Hinton Broth (MHB) (Oxoid) içerisinde 18-24 saat aktifleştirildi. 0,5 McFarland standart yoğunluğuna ayarlanıp herbir aktif mikroorganizma kültürlerinden 100 µL (yaklaşık $1x10^8$ colony forming unit (cfu)/ml) agar üzerine bırakılarak cam bagetle yayma işlemi yapıldı. Steril 6mm'lik disklere (Oxoid Antibacterial Suspectibility Blank Test Disk) DMSO içerisinde çözünmüş bitki ekstrelerinden 20µl emdirilerek kurutuldu. Sonrasında kurutulan diskler, steril penslerle test mikroorganizmalarının yaydırıldığı besiyeri yüzeyine belli aralıklarla yerleştirildi. 37 ^{0}C'de 24 saat inkübasyondan sonra disklerin etrafında oluşan zon çapları milimetrik olarak ölçülerek sonuçlar alındı. Pozitif kontrol olarak Ampicillin (Sigma Aldrich St. Louis, MI, USA) and nystatin (NS20) kullanıldı. Sonuçlar aşağıda Tablo 1' de verilmiştir.

3.6.2. Minimum İnhibitor Konsantrasyonu (MİK):18-24 saatlik inkübasyondan sonra sıvı besiyerinde (Mueller-Hinton Broth) gelişen kültürler, 0,5 Mc Farland (yaklaşık 10^8 cfu/ml) yoğunluğuna ayarlandı. Deney için 96 adet "U" tipi kuyucuklara sahip steril mikroplateler kullanıldı. Öncelikler her bir kuyucuğa 80µl çift kuvvet olarak hazırlanmış MHB aktarıldı. Son hacmi 80 µl olacak şekilde bitki ekstrelerinin seri dilüsyonları (0.9 µg/ml-500 µg/ml) hazırlandı. Dilüsyonlar hazırlandıktan sonra her bir kuyucuğa mikroorganizma kültürlerinden 20'şer µl pipetlendi. Ayrıca standart antibiyotik olan Ampicillin (Sigma) bakteriler için,

standart antifungal madde olan fluctosine de (Sigma) *C. albicans* için pozitif kontrol olarak test edildi. Mikroplatelerde son sütun mikroorganizma kontrolüne, ilk sütun ise test maddesinin kontrolüne ayrıldı. Bu işlemlerden sonra mikroplateleri kapakları kapatılarak 37^{o}C de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon test maddemizin MIC değeri olarak hesaplandı.

4.ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Karakterizasyon

4.1.1. Bileşik 1

Bileşik **1'**in ^{1}H, ^{13}C, HMBC, HSQC NMR ve API-ES negatif iyon kütle spektrumlarıyla $C_{35}H_{60}O_6$ moleküler formülüne sahip olduğu bulunmuştur. Bileşik **1**'in kütle spektrumu *m/z* ve ana (en çok göze çarpan) fragmanların *m/z* 575.56'da olduğunu göstermiştir.

^{1}HNMR'da (Şekil 4.1.)δ 0.65 ve 0.95 ppm'de singlet pikler veren tersiyer gruplara ait (18 ve 19. pozisyon) karbon pikleri^{13}C NMR'da (Şekil 4.2.) 11.66 ve 19.09 ppm'de gözlenmiştir. Tipik bir sinyal olan β-OH bağının bağlı bulunduğu 3 numaralı pozisyondaki H-3 sinyali 3.46 ppm'de gözlenirken, bu pozisyondaki karbonun ^{13}C NMR'da 76.94 ppm'de rezonans verdiği gözlemlenmektedir. Her iki NMR spektrumundaki sinyalin de alkolik fonksiyondan dolayı daha aşağı alanlara kaydığı görülmektedir. Diğer bir tipik sinyal ise 6 nolu pozisyona ait δ 5.32'deki olefinik piktir. Bu olefinik bağı paylaşan 5 ve 6 nolu karbonlara ait karbon pikleri sırasıyla ^{13}C NMR spektrumunda 140.44 ve 121.17 ppm'de gözlemlenmiştir.

Bileşik 1'in şeker kısmında 1' pozisyonundaki anomerik proton δ 4.22' de [d, J=7.74 Hz (β-glikozidik)] şeklinde sinyal vermiştir. Diğer şeker protonları δ2.90 [H-2'], 3.12 [H-3'], 3.05 [H-4'], 3.05 [H-5'], 3,65 ve 3,42 [H-6']'de sinyal vermektedir ve bu pikler iki boyutlu HMBC, HSQC analizleri yardımıyla belirlenmiştir. Şeker kısmına ait karbon sinyalleri sırasıyla δ100.81, 73.45, 76.76, 70.07, 76.73, 61.06'de gözlemlenmiştir. Bu veriler ışığında Bileşik 1'in şeker kısmının β-D-glikoz olduğu sonucuna varılmış ve bu sonuç ko-kromatografi ile desteklenmiştir.

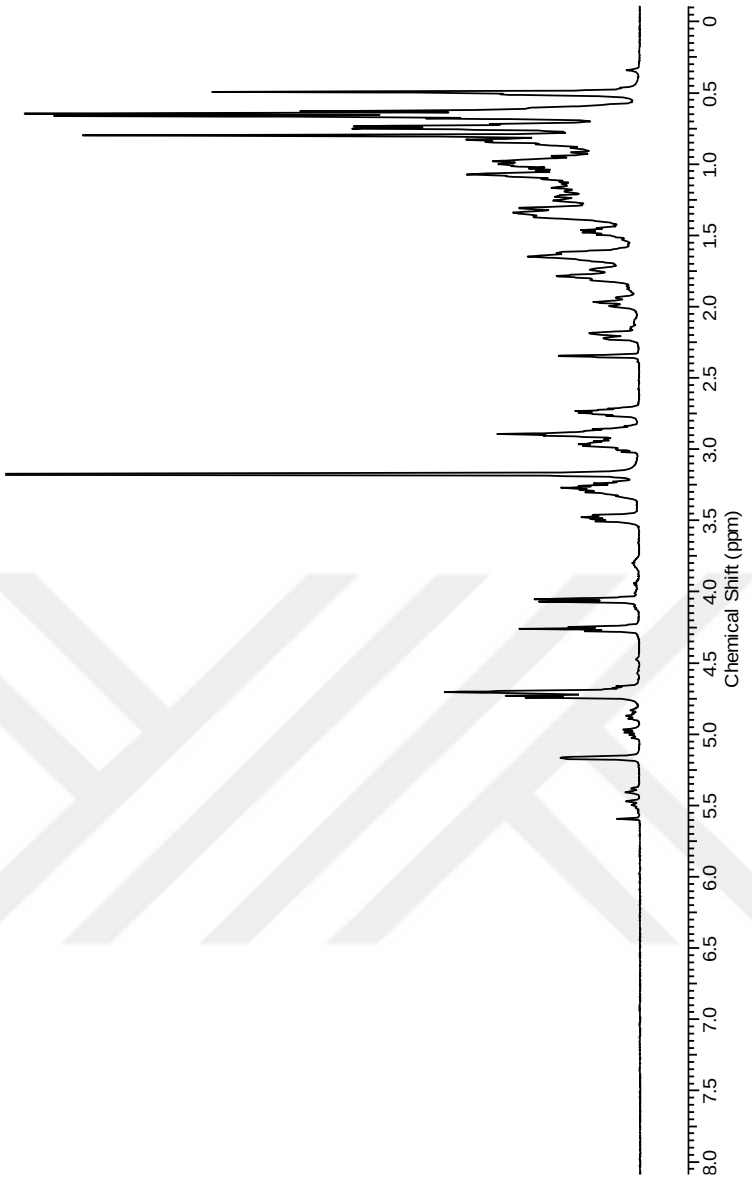
Bileşik **1**'in tüm proton ve karbon tayinleri HSQC ve HMBC spektrumları (Şekil 4.3, 4.4, ve 4.5) tarafından da doğrulanmıştır. Bileşiğe ait olan diğer tüm piklerin vermiş olduğu proton ve karbon rezonansları ve bunların uygun atamaları Çizelge 4.1.'de ayrıntılı olarak verilmiştir. Tüm bu veriler ışığında Bileşik **1**'in 3-*O*-(β-D-glucopyranosyl)-β-sitosterol olduğu bulunmuştur.

Çizelge 4.1. Bileşik 1'e ait karbon ve protonların kimyasal kaymaları ve bunların HMBC etkileşimleri

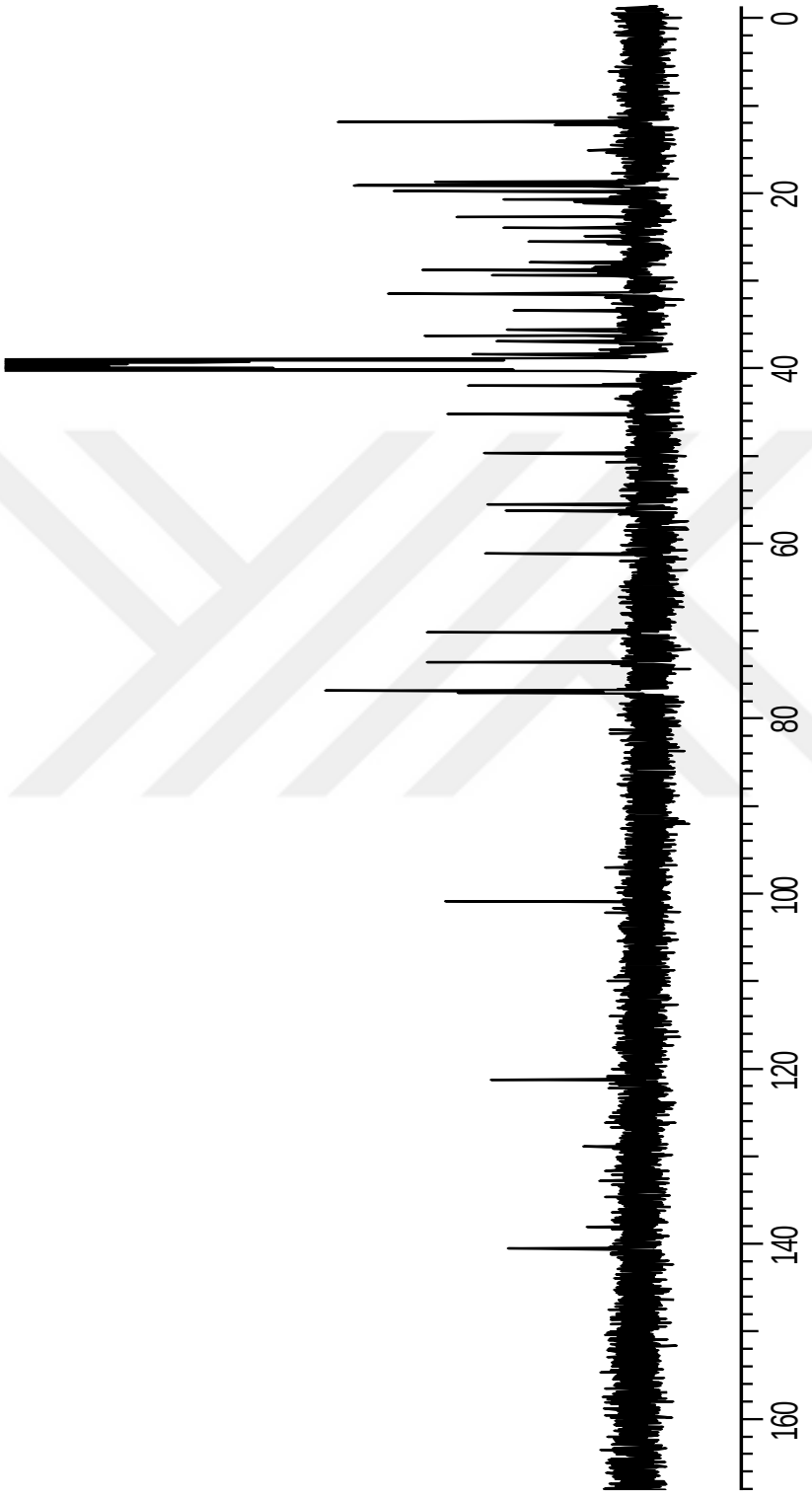
Position	13C nmr	1H nmr	C Türü	HMBC
1	36.84	1,79 0,98	CH2	
2	29.27	1,49 1,46	CH2	
3	76.94	3,46	-CH—O	29,27
4	38.32	2,36 2,13	CH2	
5	140.44	-	=C--	
6	121.17	5,32	=CH-	38,32 / 36,21 / 31,42 / 31,38
7	31.38	1,94 1,89	CH2	
8	31.42	1,38	CH	
9	49.61	0,88	CH	
10	36.21	---	C	
11	20.60	1,47 1,38	CH2	
12	39.18	1,95 1,13	CH2	
13	41.85	---	C	
14	56.18	1,01	CH	0,65
15	23.88	1,53 1,02	CH2	
16	27.80	1,82 1,23	CH2	
17	55.44	1,11	CH	0,65 / 0,89 d
18	11.66	0,65 s	CH3	56,18 / 55,44 / 41,85 / 39,14
19	19.09	0,95 s	CH3	140,44 / 49,61 / 36,84 / 36,21
20	35.49	1,33	CH	0,89
21	18.61	0,89 d	CH3	55,44 / 35,49 / 33,36
22	33.36	1,30 1,00	CH2	0,89
23	25.46	1,22 1,14	CH2	
24	45.15	0,91	CH	
25	28.71	1,62	CH	
26	18.93	0,78 s	CH3	45,15 / 28,71 / 19,70
27	19.70	0,80 s	CH3	45,15 / 28,71 / 18,93
28	22.61	1,24 1,20	CH2	

Çizelge 4.1. (devam) Bileşik 1'e ait karbon ve protonların kimyasal kaymaları ve bunların HMBC etkileşimleri

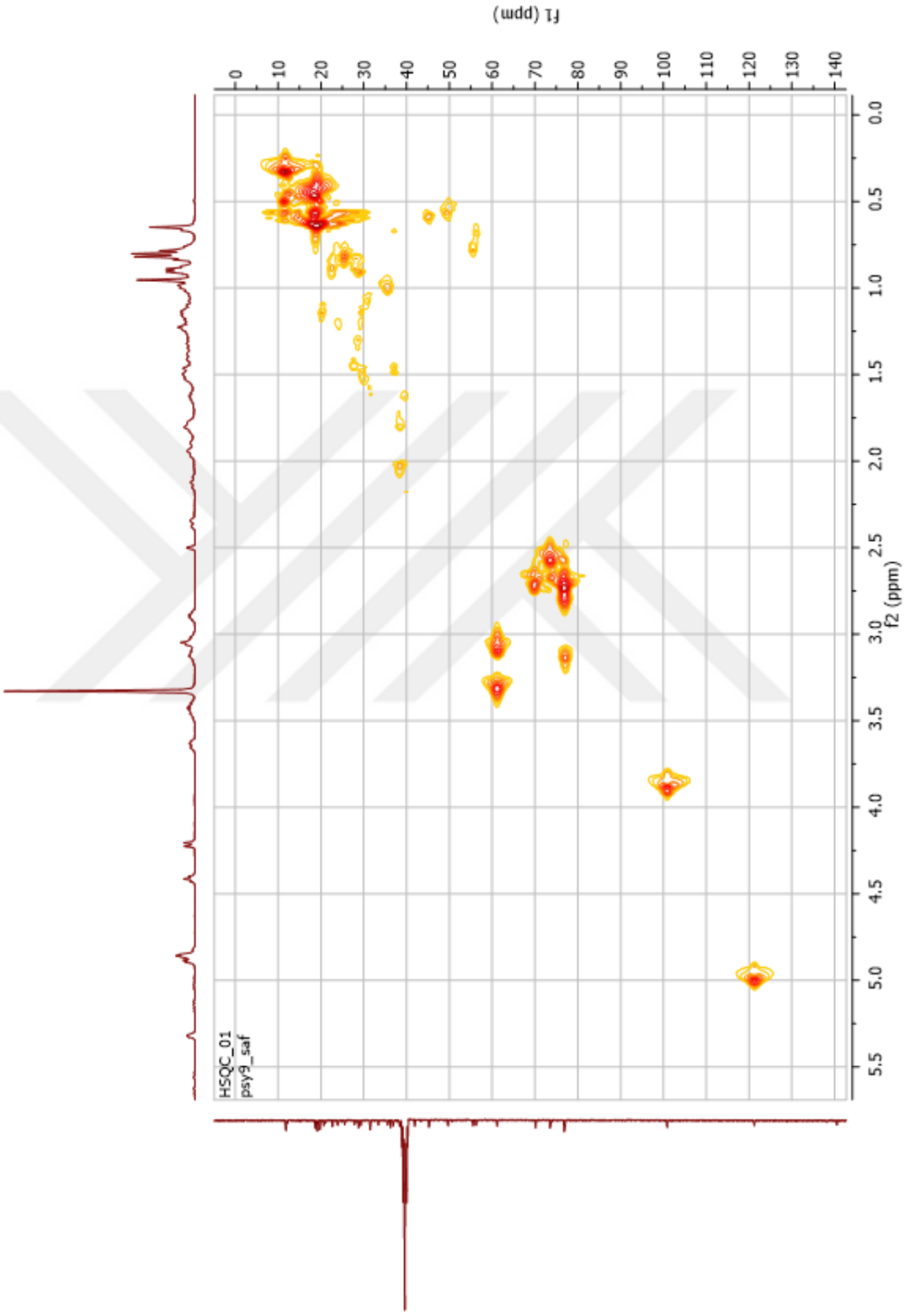
29	11.77	0,82 s	CH3	45,15 / 22,61
1'	100.81	4.22, d, J=7.74Hz	-CH—O	3,46 / 3,05 / 2,90
2'	73.45	2,90	-CH—O	
3'	76.76	3,12	-CH—O	
4'	70.07	3,05	-CH—O	
5'	76.73	3,05	-CH—O	
6'	61.06	3,65 3,42	-CH2-O	



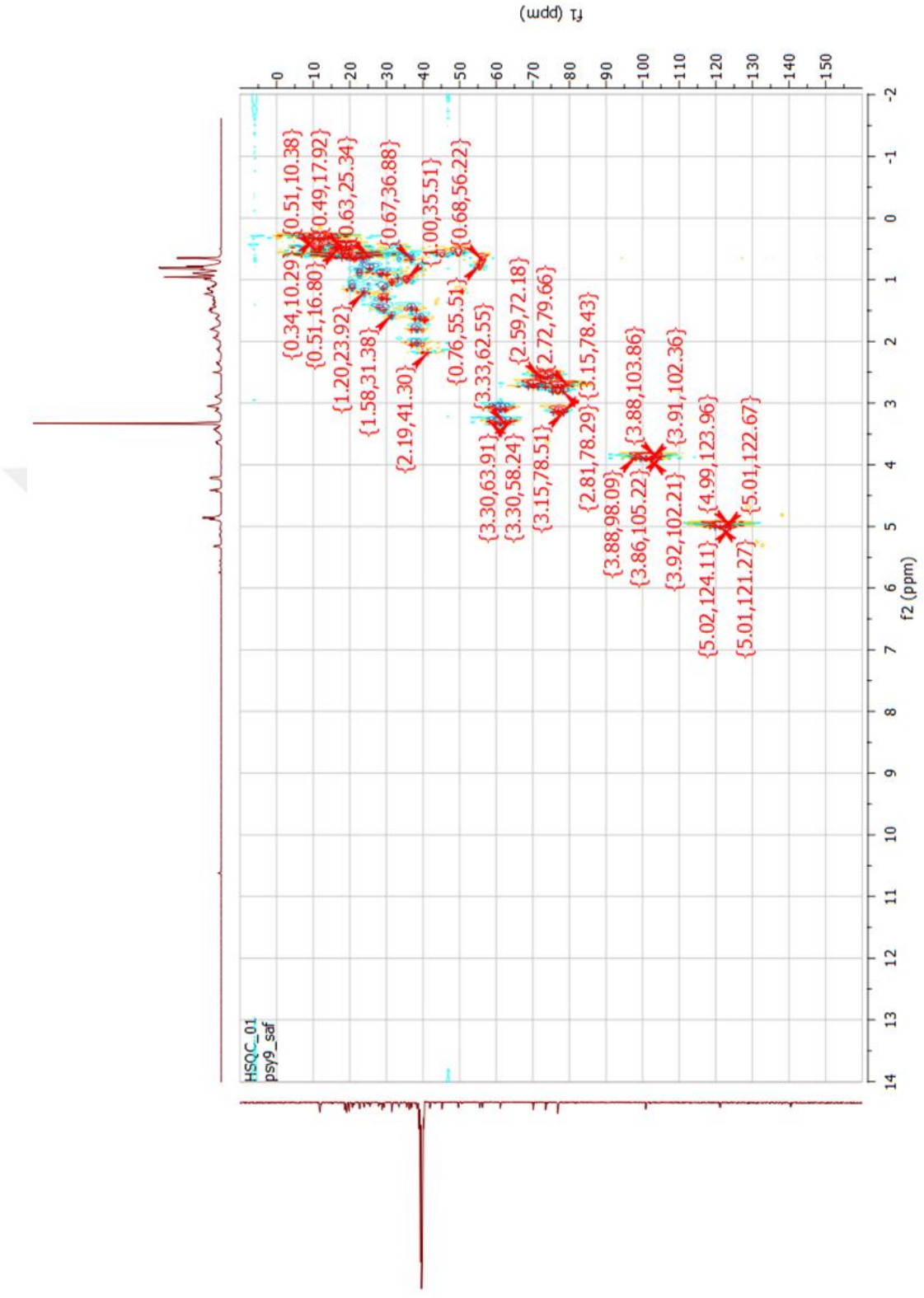
Şekil 4.1. Bileşik 1'e ait ^{1}H NMR spektrumu (Çözücü: DMSO)



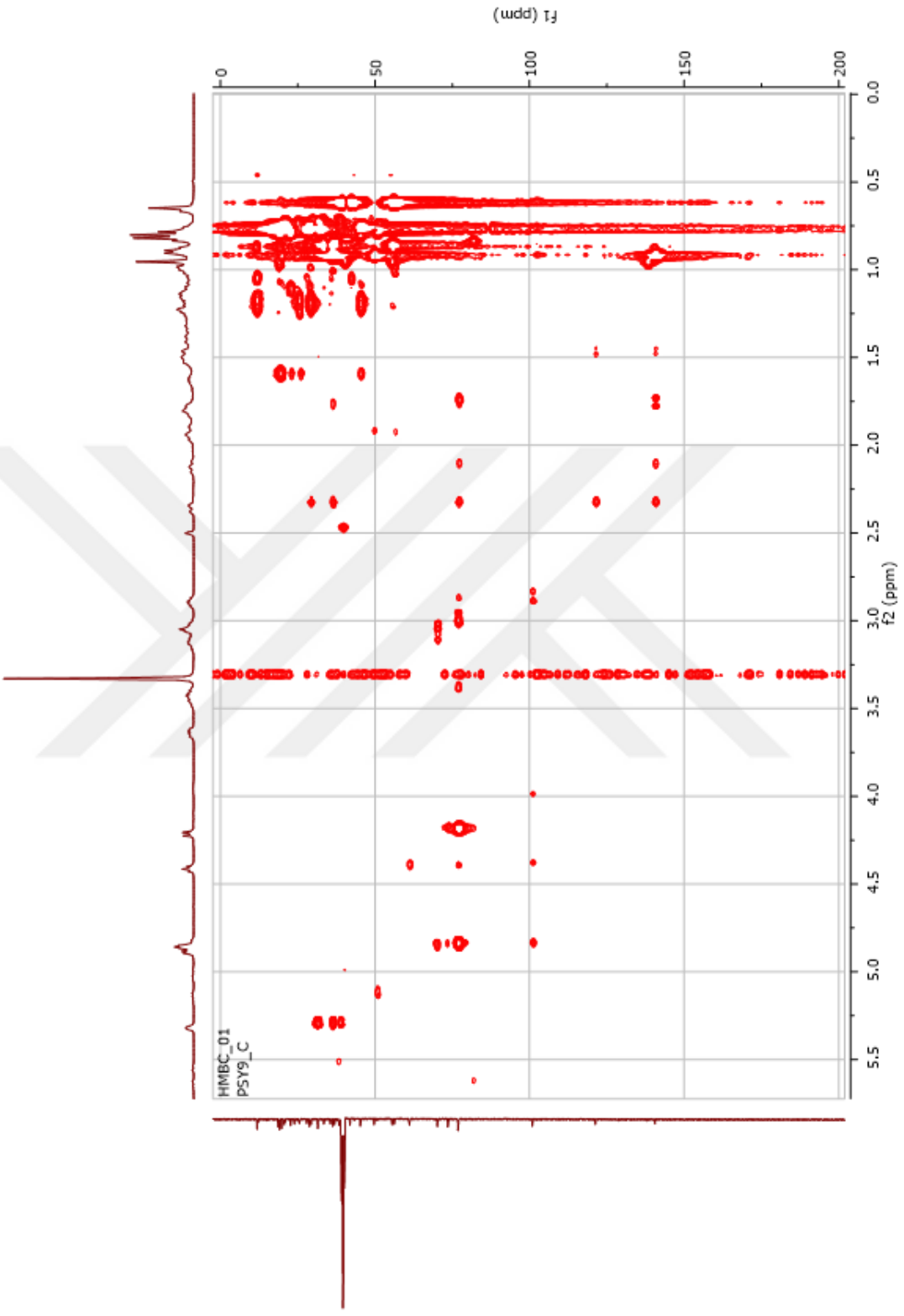
Şekil 4.2. Bileşik 1'e ait ^{13}C NMR spektrumu (Çözücü: DMSO)



Şekil 4.3. Bileşik 1'e ait iki boyutlu HSQC spektrumu (Çözücü: DMSO)

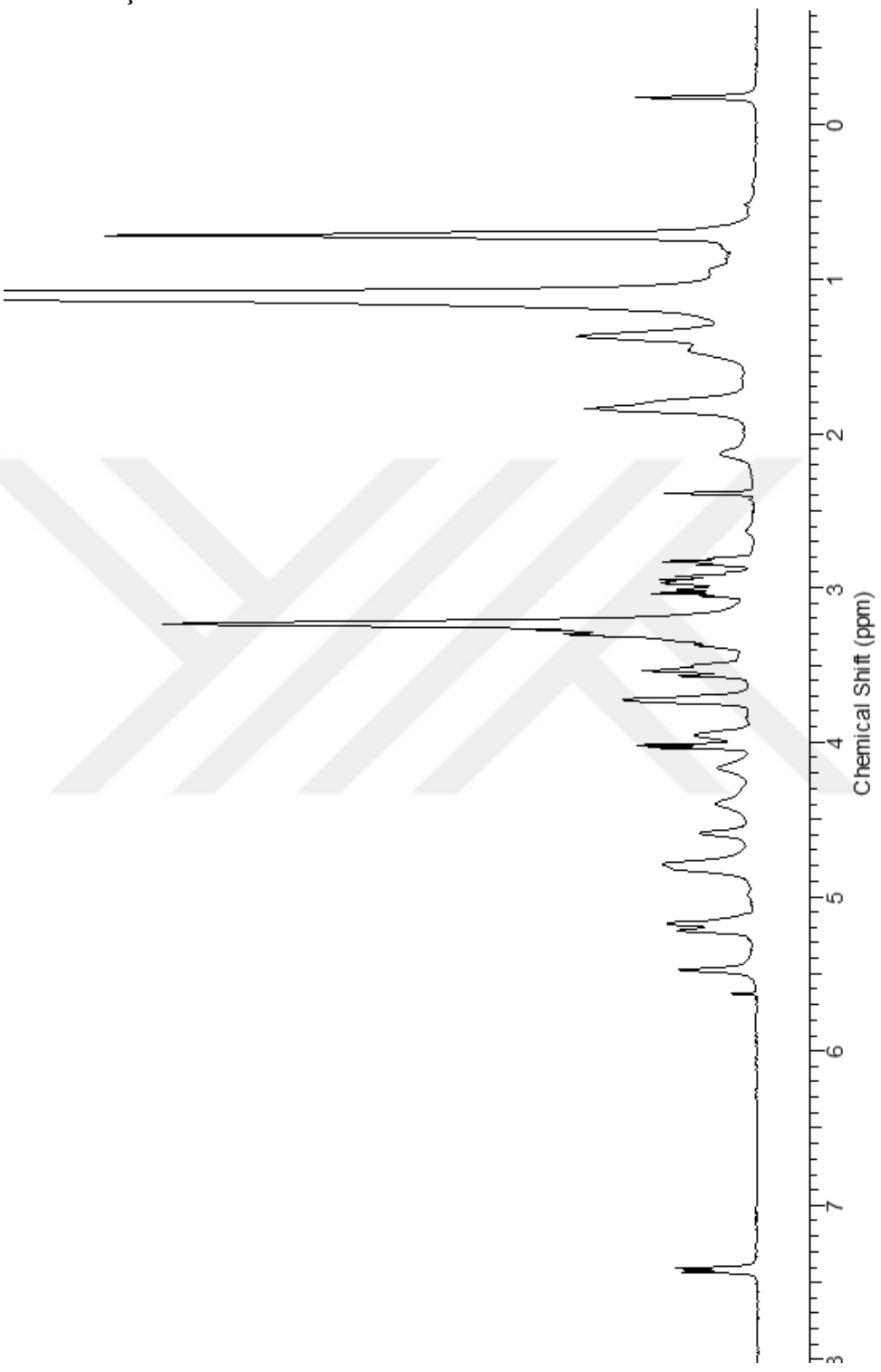


Şekil 4.4. Bileşik 1'e ait iki boyutlu HSQC spektrumu ve protonlar arası etkileşim değerleri (ppm) (Çözücü: DMSO)

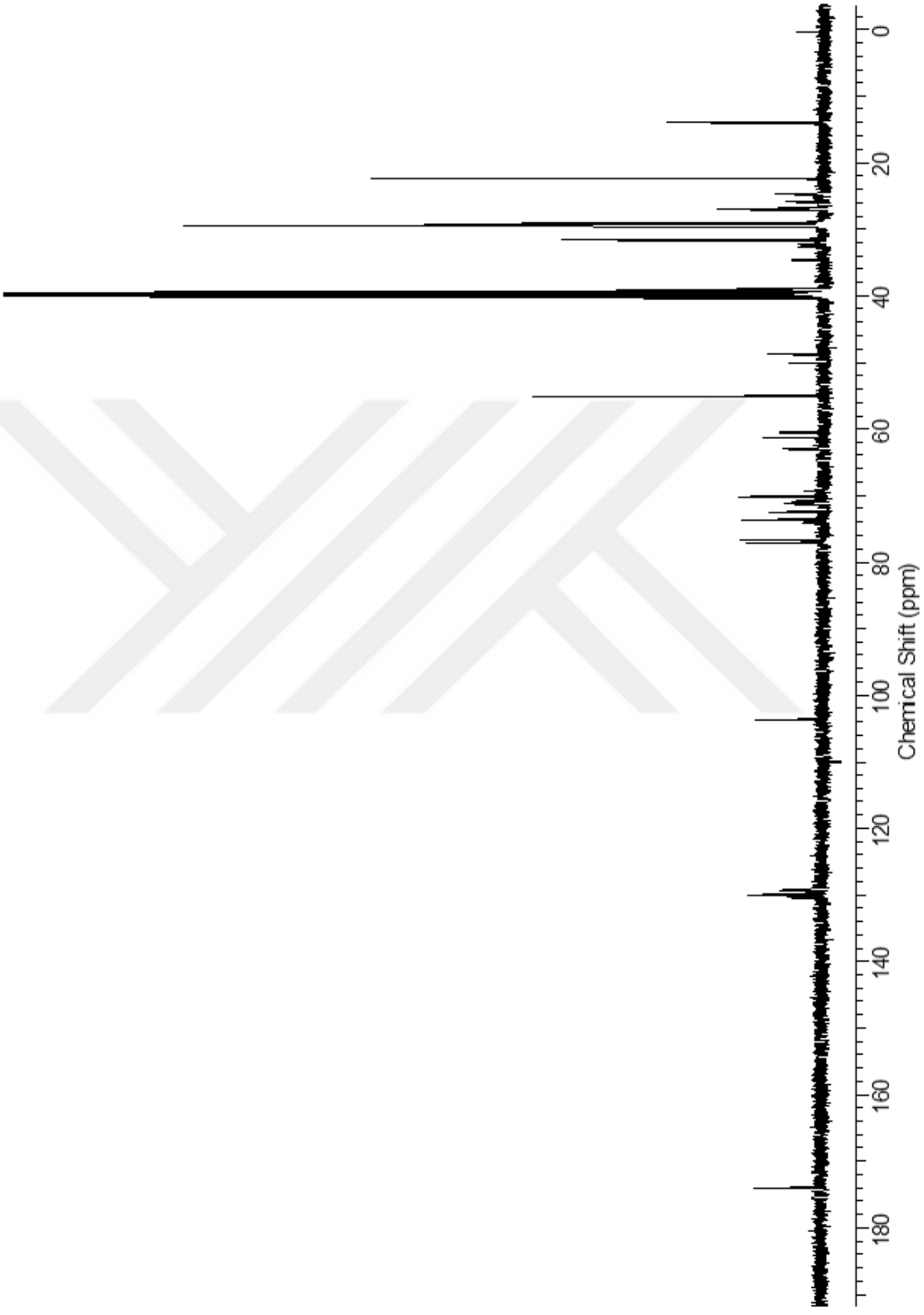


Şekil 4.5. Bileşik 1'e ait iki boyutlu HMBC spektrumu(Çözücü: DMSO)

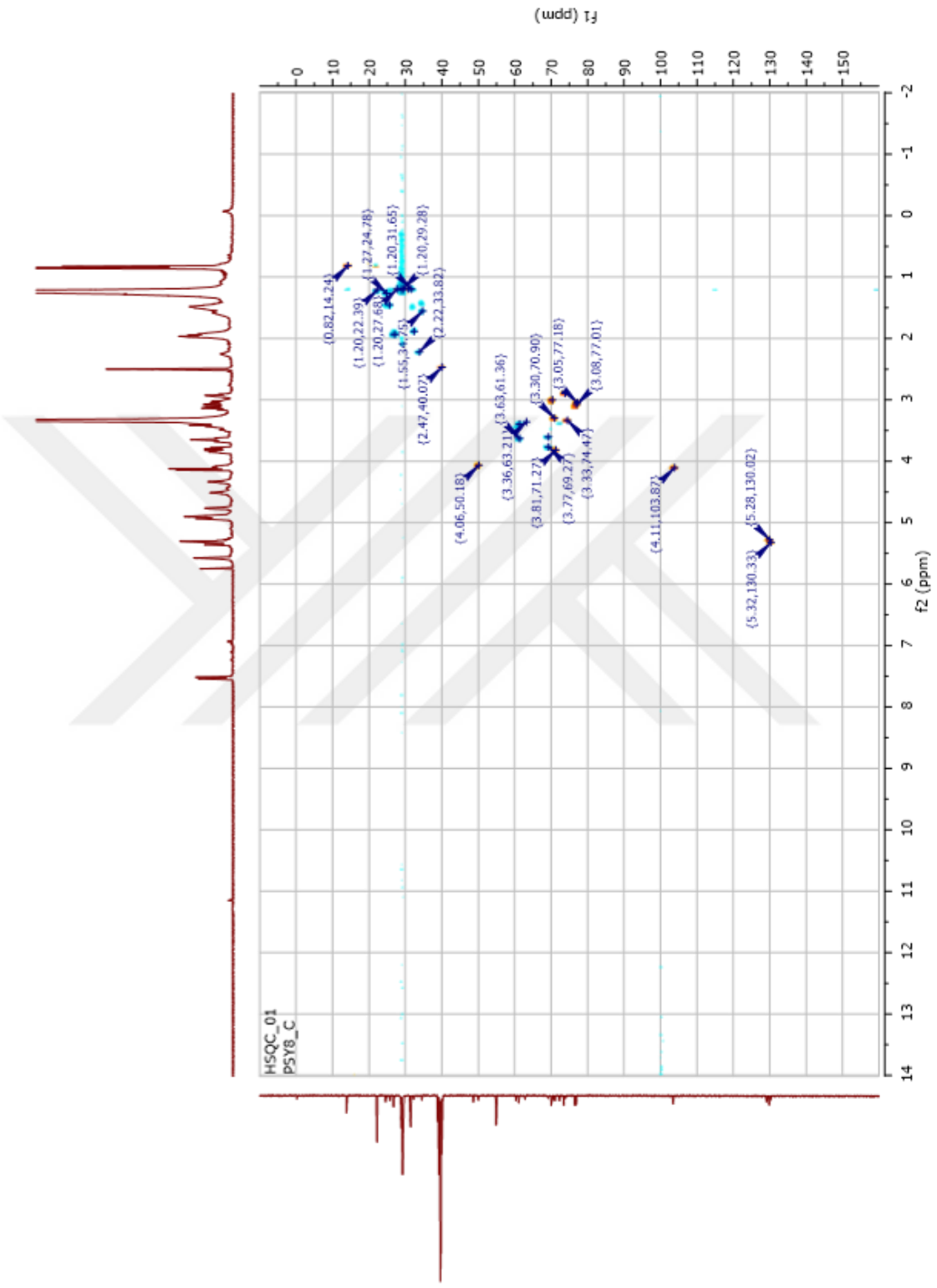
4.1.2. Bileşik 2



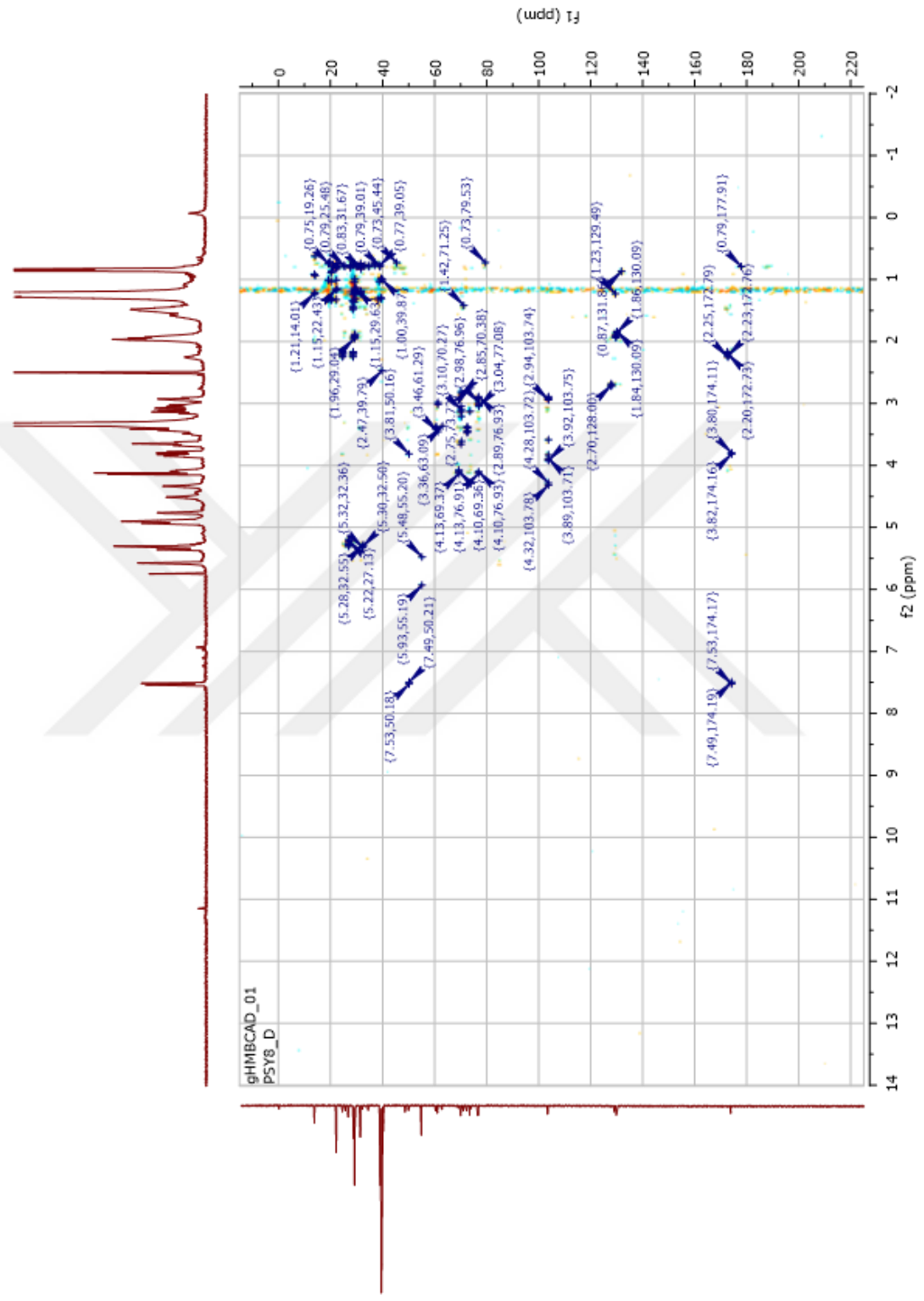
Şekil 4.6. Bileşik 2'ye ait ^{1}H NMR spektrumu(Çözücü: DMSO)



Şekil 4.7. Bileşik 2'ye ait ^{13}C NMR spektrumu (Çözücü: DMSO)



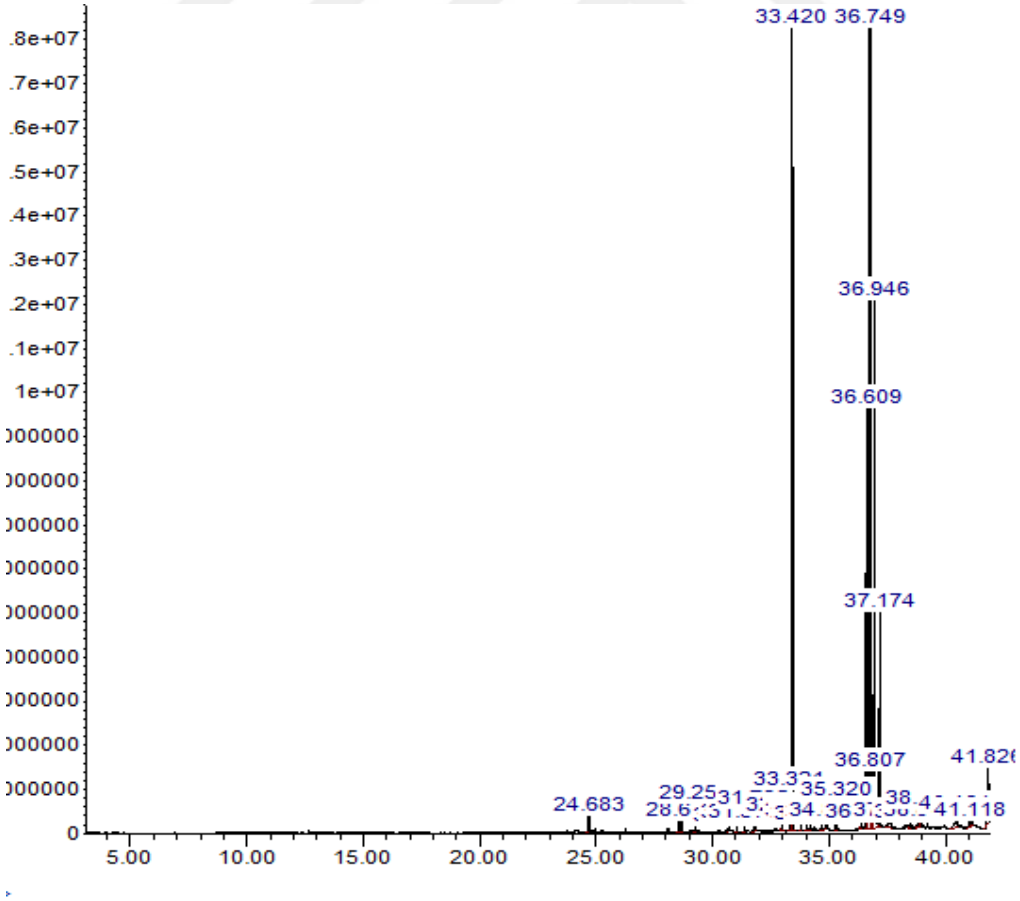
Şekil 4.8. Bileşik 2'ye ait iki boyutlu HSQC spektrumu(Çözücü: DMSO)



Şekil 4.9. Bileşik 2'ye ait iki boyutlu HMBC spektrumu (Çözücü: DMSO)

4.2. Heksan Ekstresinin GC-MS Analizi

Hedysarum pycnostachyum bitkisinden elde edilen Heksan ekstresinin trans esterifikasyon sonrası elde edilen metil esterlerine ait GC-MS spektrumu Şekil 4.10'da vebu analiz sonucunda heksan ekstresinin içerdiği bileşikler ve bunların ekstredeki yüzde miktarı Çizelge4.2'de verilmektedir. Bileşiklerin alıkonma sürelerine göre cihazın veri bankasından alınan verilere göre farklı miktarlarda olmak üzere toplamda Heksan ekstresinde 28 tane bileşen tespit edilmiştir. Bu bileşenlerden miktarları yüksek olan 9 bileşik (major bileşenler) ve oranları ayrıca Çizelge4.3'de sunulmaktadır. Burada verilen 9 tane bileşen ekstredeki tüm bileşenlerin miktar olarak % 70'ini teşkil etmekte olup, bunların 1 tanesi (Phytol) halkalı olmayan bir diterpen alkol olup diğer 8 tanesi ise uçucu yağ asitleridir. Özellikle alpha-Linolenik asit, Palmitik asit, Linoleik asit, Phytol ve Stearik asit bileşikleri toplam bileşen miktarının % 65'ini teşkil etmektedir.



Şekil 4.10. *Hedysarum pycnostachyum* bitkisinin Heksan ekstresinin GC-MS spektrumu

Çizelge 4.2. *Hedysarum pycnostachyum* bitkisinin heksan ekstresinin GC-MS analizine göre içerdiği doğal bileşikler (Analiz için bileşenlerin metil esterleri hazırlandığı için sonuçlar metoksi (-OCH_3) kısmı yani metilester kısmı uzaklaştırılmış halde verilmiştir.)

Sıra	Bileşik Adı	Alıkonma Süresi (dk)	% Miktar	Moleküler Formül
1	Dodecanoic acid, methyl ester	24.682	0.32	$C_{12}H_{24}O_2$
2	Bisiklo[4.3.1]decan-10- one	28.688	0.16	$C_{16}H_{32}O$
3	Tetradecanoic acid, methyl ester	29.253	0.62	$C_{15}H_{30}O_2$
4	1-Octadecene	30.686	0.09	$C_{19}H_{36}O_2$
5	Cis-5- Dodecenoic acid, methyl ester	31.038	0.18	$C_{13}H_{24}O_2$
6	Pentadecanoic acid, methyl ester	31.370	0.17	$C_{16}H_{32}O_2$
7	2-Pentadecanone,6,10,14-trimethyl	31.785	0.60	$C_{18}H_{36}O$
8	Methyl heksadec-9-enoate	32.979	0.33	$C_{17}H_{32}O_2$
9	11-Heksadecenoic acid, methyl ester	33.316	**0.97**	$C_{16}H_{30}O_2$
10	Hexadecanoic Acid (Palmitic acid)	33.420	**19.82**	$C_{16}H_{32}O_2$
11	Methyl Ester Of 3-(3,5-Di-Tert-Butyl-4-Hydroxyphenyl)-Propionic Acid	33.788	0.17	$C_{18}H_{28}O_3$
12	8-Dodecen-1-ol,(Z)	34.053	0.16	$C_{12}H_{24}O$
13	Z-1,6-Tridecadiene	34.203	0.15	$C_{13}H_{24}$
14	Octadecyl 2,2,2-trifluoroasetat	34.681	0.15	$C_{20}H_{37}F_3O_2$
15	Cis-10-Heptadecenoic acid, methyl ester	34.878	0.22	$C_{17}H_{32}O_2$
16	Heptadecanoic acid, methyl ester	35.319	0.61	$C_{17}H_{34}O_2$
17	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester(Linoleic Acid)	36.606	**9.20**	$C_{18}H_{32}O_2$
18	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)(Linolenic Acid)	36.746	**21.33**	$C_{18}H_{30}O_2$
19	9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	36.808	**1.07**	
20	2-Heksadecen-1-ol,3,7,11,15-tetrametil-,[R-[R*,R*-(E)]](Phytol)	36.943	**10.85**	$C_{20}H_{40}O$

Çizelge 4.2. (devam) *Hedysarum pycnostachyum* bitkisinin heksan ekstresinin GC-MS analizine göre içerdiği doğal bileşikler (Analiz için bileşenlerin metil esterleri hazırlandığı için sonuçlar metoksi (-OCH_3) kısmı yani metilester kısmı uzaklaştırılmış halde verilmiştir.)

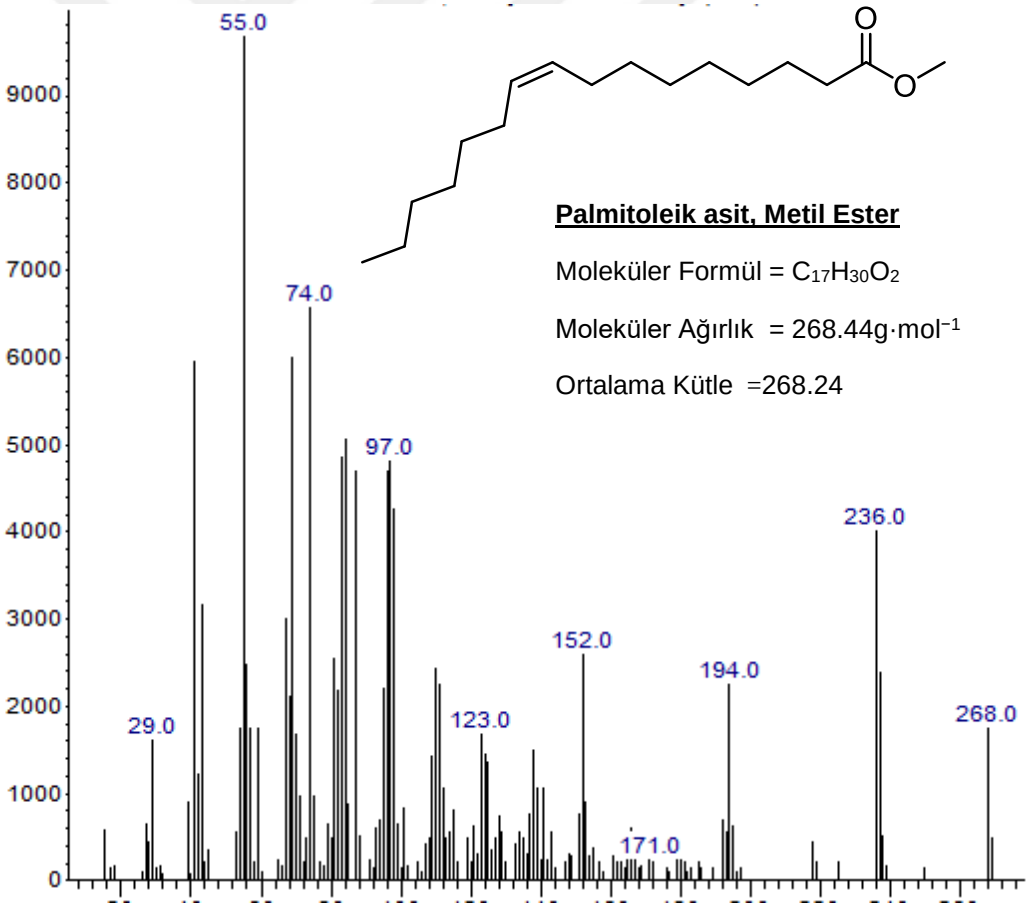
21	Octadecanoic acid, methyl ester	37.171	**4.30**	$C_{19}H_{34}O_2$
22	Tricosanoic acid, methyl ester	37.581	0.58	$C_{24}H_{48}O_2$
23	1-Docosene	38.473	0.22	$C_{22}H_{44}$
24	n-Eicosane	38.852	0.28	$C_{20}H_{42}$
25	Methyl (9Z)-9-Heksadecenoate	38.935	0.37	$C_{17}H_{32}O_2$
26	Docosanoic acid, methyl ester	40.460	**1.03**	$C_{23}H_{46}O_2$
27	Cis-11-Eicosenoic, methyl ester	41.115	0.03	$C_{21}H_{40}O_2$
28	Methyl 18-methylnonadecanoate	41.820	**1.93**	$C_{21}H_{42}O_2$

Çizelge 4.3. *Hedysarum pycnostachyum* bitkisinin Heksan ekstresinin GC-MS analizine göre % 70'lik kısmını oluşturan ana bileşenler

	BİLEŞİK ADI	Alıkonma Süresi (dk)	% Miktar	Moleküler Formül	Moleküler Formül (Metillenmiş	M^+
1	11-Heksadecenoic acid, methyl ester (Palmitoleic acid)	33.316	0.97	$C_{16}H_{30}O_2$	$C_{17}H_{32}O_2$	268
2	Heksadecenoic acid, methyl ester (Palmitic acid)	33.420	19.82	$C_{16}H_{32}O_2$	$C_{17}H_{34}O_2$	270
3	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester (Linoleic acid)	36.606	9.20	$C_{18}H_{32}O_2$	$C_{19}H_{34}O_2$	294
4	9,12,15-Octadecatrienoic acid , methyl ester, (Z,Z,Z) (alpha-Linolenic acid)	36.746	21.33	$C_{18}H_{30}O_2$	$C_{19}H_{32}O_2$	292
5	9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester (Oleic acid)	36.808	1.07	$C_{18}H_{34}O_2$	$C_{19}H_{36}O_2$	296
6	2-Heksadecen-1-ol,3,7,11,15-tetrametil-,[R-[R*,R*-(E)]] (Phytol)	36.943	10.85	$C_{20}H_{40}O$	$C_{20}H_{40}O$	278
7	Octadecanoic acid, methyl ester (Stearic acid)	37.171	4.30	$C_{18}H_{36}O_2$	$C_{19}H_{38}O_2$	298
8	Docosanoic acid, methyl ester (Behenic Acid)	40.460	1.03	$C_{22}H_{44}O_2$	$C_{23}H_{46}O_2$	354
9	Parinaric Acid (9c,11t,13t,15c- 18:4)	41.820	1.93	$C_{18}H_{28}O_2$	$C_{19}H_{30}O_2$	326

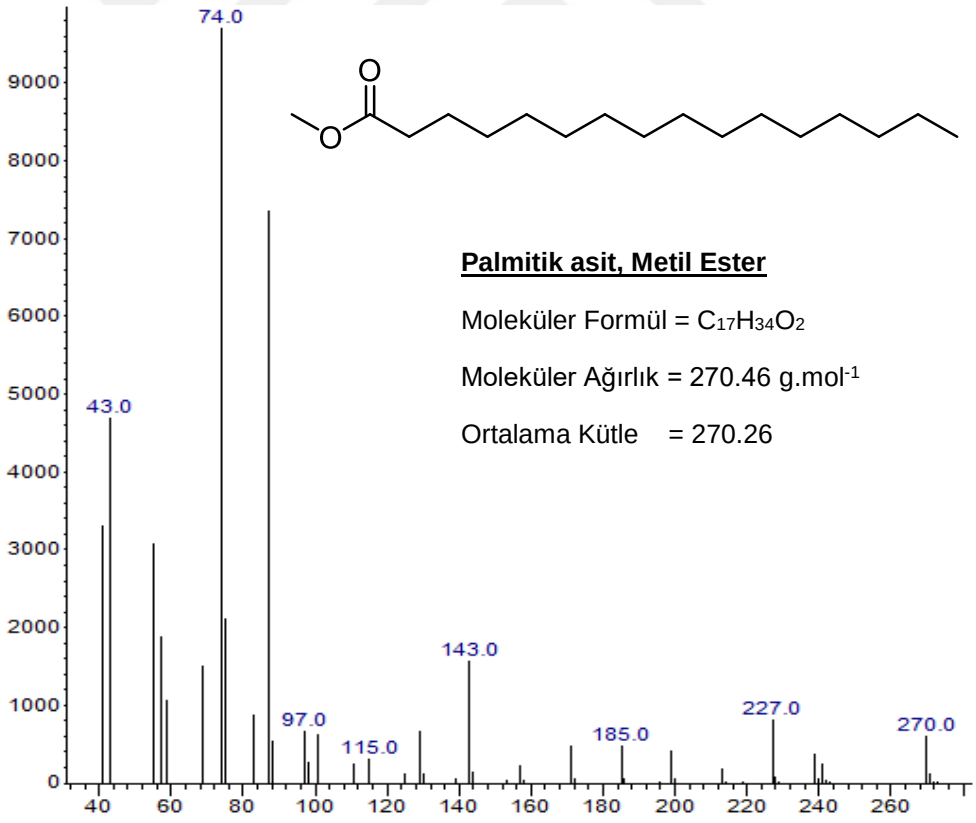
Heksan ekstresinin toplamda % 70'lik kısmını oluşturan bu 9 bileşenden bir diterpen alkol olan Phytol hariç geri kalan 11-Heksadecenoic acid, Heksadecenoic acid, 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, 9,12,15-Octadecatrienoic acid, 9-Octadecenoic acid (Z)-, 2-Heksadecen-1-ol,3,7,11,15-tetrametil-,[R-[R*,R*-(E)]],Octadecanoic acid, Tricosanoic acid, Docosanoic acid, Methyl 18-methylnonadecanoate bileşikler temel (esansiyel) yağ asitleridir ve bunlara ait yapılar ve GC-MS spektrumları Şekil 4.11-4.19 arasında sunulmaktadır.

Heksan ekstresinin yaklaşık %1'ini oluşturan Palmitoleik asit'in; insulin duyarlılığını geliştirdiği, hiperglisemi ve hipertriglisemik gelişimini iyileştirdiği ve vücut ağırlık artışını arttırdığı görülmektedir. Ayrıca, hepatik özellikleri önemli ölçüde etkilediği, karaciğer ve hepatik trigliserid ağırlık düzeylerinin kontrol grup (araç ve palmitik asit gruplar) ile karşılaştırıldığında palmitoleik asit grubunda düşük olduğu bulunmuştur. Sonuçlar açık bir şekilde palmitoleik asidin hepatik lipid birikmesini azalttığını gösterdi. Ayrıca, palmitoleik asidin beyaz adipoz dokularında ve lipogenik genlerde (SREBP-1, FAS, ve SCD-1 yağ asidi sentez genleri), yağ hücresi genlerinin (TNFα and resistin) sistemik iltihaplanmasında görevli mRNA ekspresyonunu azalttığı saptanmıştır. (Yang ve ark., 2011).



Şekil 4.11. *Hedysarum pycnostachyum* bitkisinden elde edilen Heksan ekstresinde bulunan Palmitoleik asit'in, yapısı ve GC-MS spektrumu

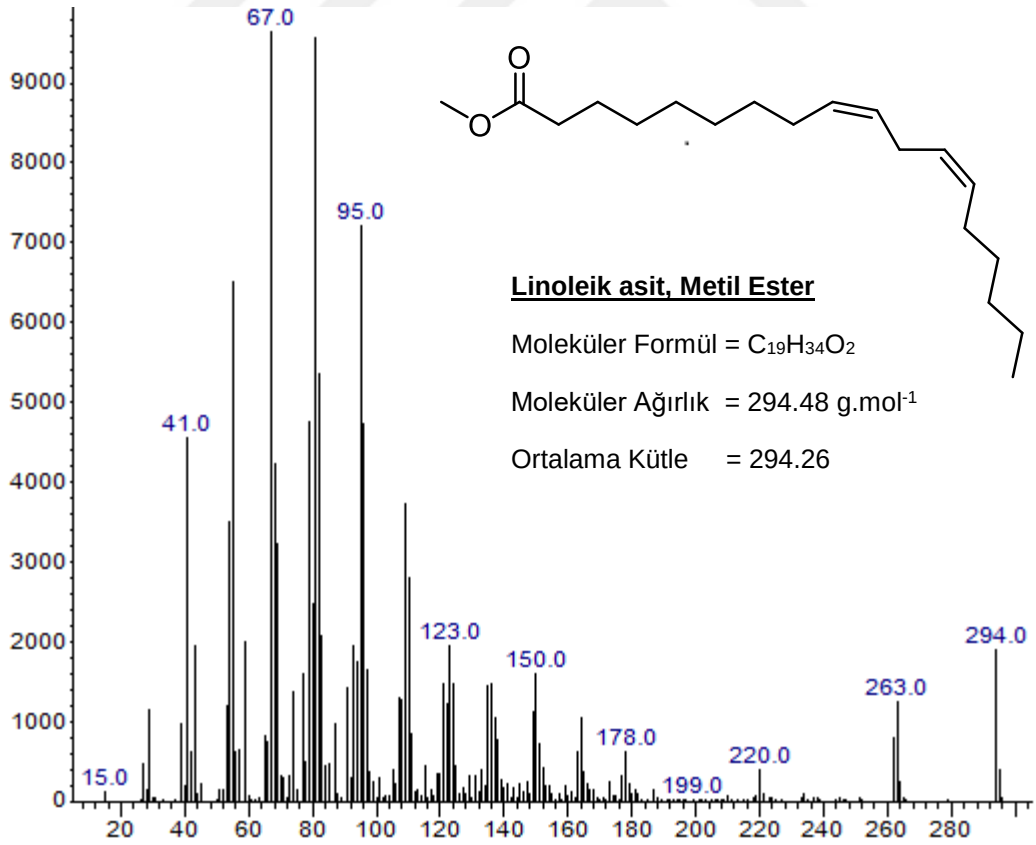
Heksan ekstresinin yaklaşık % 19.82'sini oluşturan Palmitik asit'in IUPAC adı heksadekanoik asittir. Bitki, hayvan ve mikroorganizmalarda en yaygın bulunan doymuş yağ asididir (Gunstone ve ark., 2007).16:0 yapısında bir lipid zincirine sahip olan palmitik asitismini çokça bulunduğu palmiye ağaçlarından alır. İnsan hücrelerindeki karbonhidratların aşırısını palmitik aside çevrilmektedir. Bu nedenle palmitik asit hayvansal hücrelerin temel bileşenlerindendir. Yapılan bir çalışma palmitik asitin insan depo yağlarının %21-30'unu oluşturduğunu göstermektedir (Kingsbury ve ark., 1961) ve bu yağ asidi anne sütünün önemli bir bileşenidir (Jensen ve ark., 1978). Sabun, kozmetik ve yüzey kayganlaştırıcı olarak kullanım alanlarına sahip olan palmitik asit son zamanlarda paliperidon palmitat adı verilen ve şizofren tedavisinde kullanılan bir antipsikotik ilaç yağlı palmitat esteri kullanılarak sentezlenmiştir. Dünya sağlık örgütüne (2003) göre palmitik asit tüketimi kalp damar hastalıkları riskini arttırdığından trans yağ asitleri ile aynı kategoriye konulmaktadır.



Şekil 4.12. *Hedysarum pycnostachyum* bitkisinden elde edilen Heksan ekstresinde bulunan Palmitik asit'in, yapısı ve GC-MS spektrumu

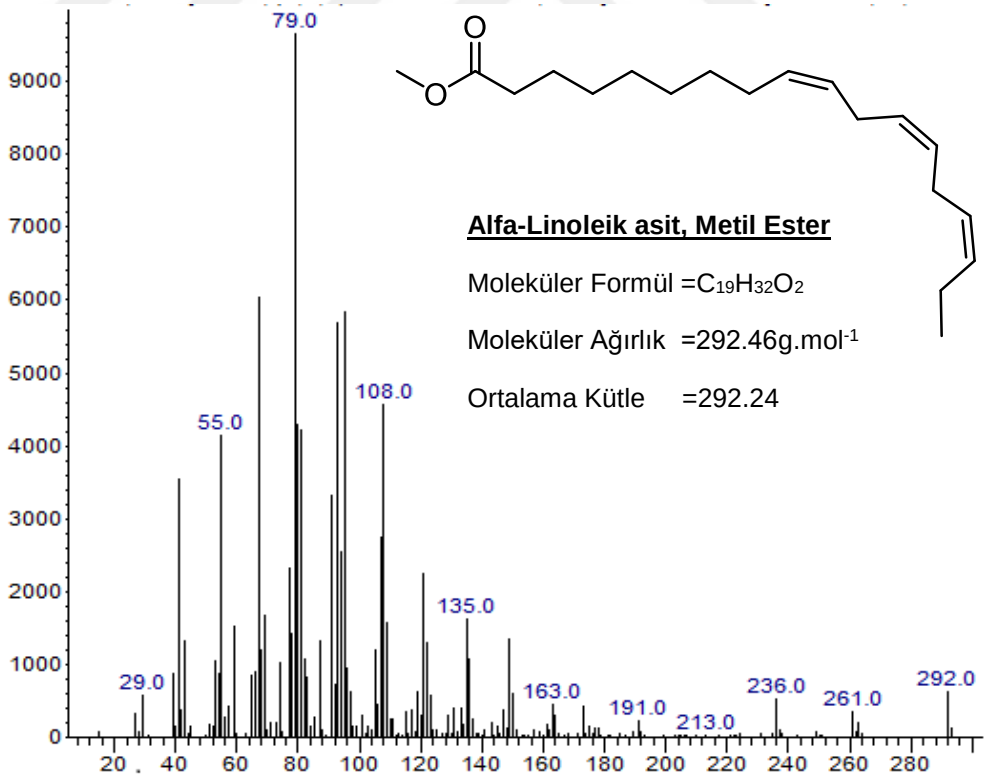
Linoleik asit bir doymamış omega-6 yağ asidi olup heksan ekstresinin % 9.20'sini oluşturmaktadır. Fizyolojik literatürde, lipid zinciri 18:2 ($\Delta^{9,\ 12}$) yapısına sahip linoleik asit oda sıcaklığında renksiz bir sıvı ve kimyasal olarak 18 karbon zincirine ve iki cis yapılı çifte bağa sahip bir karboksilik asittir. Bu çifte bağlardan ilki zincirin metil ucundan itibaren 6. karbonda yer aldığından omega-6 yağ asdi olarak adlandırılır (Anneken ve ark., 2006).

Linoleik asit insan vücudu tarafından sentezlenemeyen ve dışarıdan besinlerle alınması gereken ve sağlıklı bir yaşam için tüketilmesi gereken temel yağ asitlerindendir (Burr ve ark., 1930). Linoleat (linoleik asidin tuz formu) bulundurmayan bir besin maddesinin tüketilmesi deride hafif pullanma ve saç dökülmesi (Cunnane ve Anderson, 1997) ve farelerde yaralarıniyileşmesinin yavaşlaması (Ruthig ve Meckling-Gill, 1999) gibi etkiler doğurabilmektedir. Hamam böcekleri öldükleri zaman Oleik asit ile beraber linoleik asit salgılarlar ve bu diğer hamam böceklerine o bölgeden uzak durmaları sinyalini verir (Anonim, 2009).



Şekil 4.13. *Hedysarum pycnostachyum* bitkisinden elde edilen Heksan ekstresinde bulunan Linolenik Asit'in, yapısı ve GC-MS spektrumu

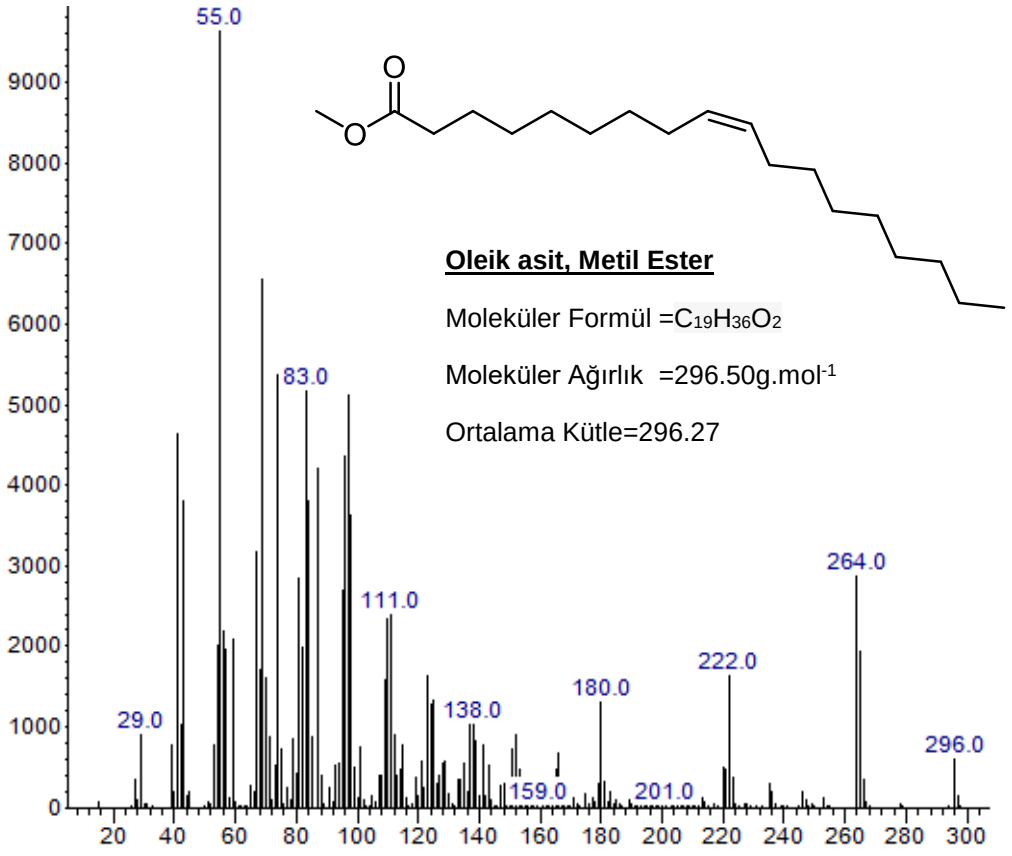
Heksan ekstresinin yaklaşık olarak % 21.33'ünü oluşturan alfa-linolenik asit bir omega-3 doymamış bir yağ asidi olup, 18:3 ($\Delta^{9,12,15}$) lipid zinciri yapısına sahiptir. Yapı olarak 9,12,15-Oktadekatrienoik asit olarak adlandırılırken fizyolojik literatürde 18:3 (n−3) şeklinde adlandırılır. 18 karbonlu bir zincire ve üç tane çifte bağa sahip bir karboksilik asit olan alfa-linolenik asit ilk çifte bağ zincirin n ucu olarak da adlandırılan metil ucundan itibaren üçüncü karbonda yer alır. Bundan dolayı linolenik asit n-3 yani omega-3 yağ asidi olarak adlandırılır.Aşırı miktarda alfa-linolenik asit alımının prostat kanseri riskini arttırdığını savunan (Ramon ve ark., 2000; Brouwer ve ark., 2004) çalışmanın aksine, Koralek ve ark. (2006) oldukça kapsamlı bir çalışma ile aslında alınan toplam alfa-linolenik asit miktarı ile prostat kanseri arasında bir ilişki olmadığını göstermiştir. Simon ve ark. (2009) alfa-linolenik asit ile prostat kanseri arasında ilişki kurulmasının abartıldığını göstermişlerdir. Alfa-linolenik asit tüketiminin az da olsa kalp ve damar hastalıkları oluşumunu engelleyici etkisi olduğuna dair kanıtlar da bulunmaktadır (Reiner ve ark., 2014).



Şekil 4.14. *Hedysarum pycnostachyum* bitkisinden elde edilen Heksan ekstresinde bulunan alfa-Linolenik Asit'in, yapısı ve GC-MS spektrumu

Oleik asit, çeşitli hayvansal ve bitkisel katı ve sıvı yağlardan doğal olarak elde edilenbir yağ asitidir. Kokusuz ve renksiz bir yağ asidi olanOleik asit'in ticari örnekleri sarımsı olabilir. Kimyasal olarak, omega-9 doymamış yağ asidi olup 18:1 (Cis-9) lipid zinciri yapısına sahiptir. $CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$ formülüne sahiptir (Thomas, 2000). Her ne kadar sızma zeytinyağı içerisindeki serbest asit formu %2'den daha az olsa da, oleik asid trigliseridleri zeytinyağının ana bileşenlerini oluşturmaktadır. Bu oran daha yüksek konsantrasyonlarda olduğu zaman zeytinyağı yenilemez olarak değerlendirilir.

Ayrıca oleik asid trigliseridleri pekan yağının % 59-75'ini(Villarreal-Lozoya ve ark., 2007) kanola yağının %61'ini (Anonim, 2008), fıstık yağının % 36-67'sini (Moore ve Knauft, 1989), Avustralya fındığı yağının % 60'ını ve Ayçiçek yağının % 20-85'ini, üzüm çekirdeği yağının, çay dikeni yağının ve susam yağının % 15-20'sini(Thomas, 2000)ve haşhaş tohumunun % 14'ünü oluşturmaktadır (Untoro ve ark.,2006).Hayvansal yağlarda da yüksek oranlarda bulunmaktadır. Tavukta ve hindide % 37'den % 56'ya kadar (Nutter ve ark., 1943), domuz yağında ise % 44-47 oranında bulunmaktadır. Oleik asit insan yağ dokusu hücrelerinde en çok bulunan yağ asididir (Kokatnur ve ark., 1979) ve toplam hücrelerinde ise palmitik asitten sonra en çok bulunan yağ asididir (Oliveira ve ark., 2015).



Şekil 4.15. *Hedysarum pycnostachyum* bitkisinden elde edilen Heksan ekstresinde bulunan Oleik Asit'in, yapısı ve GC-MS spektrumu

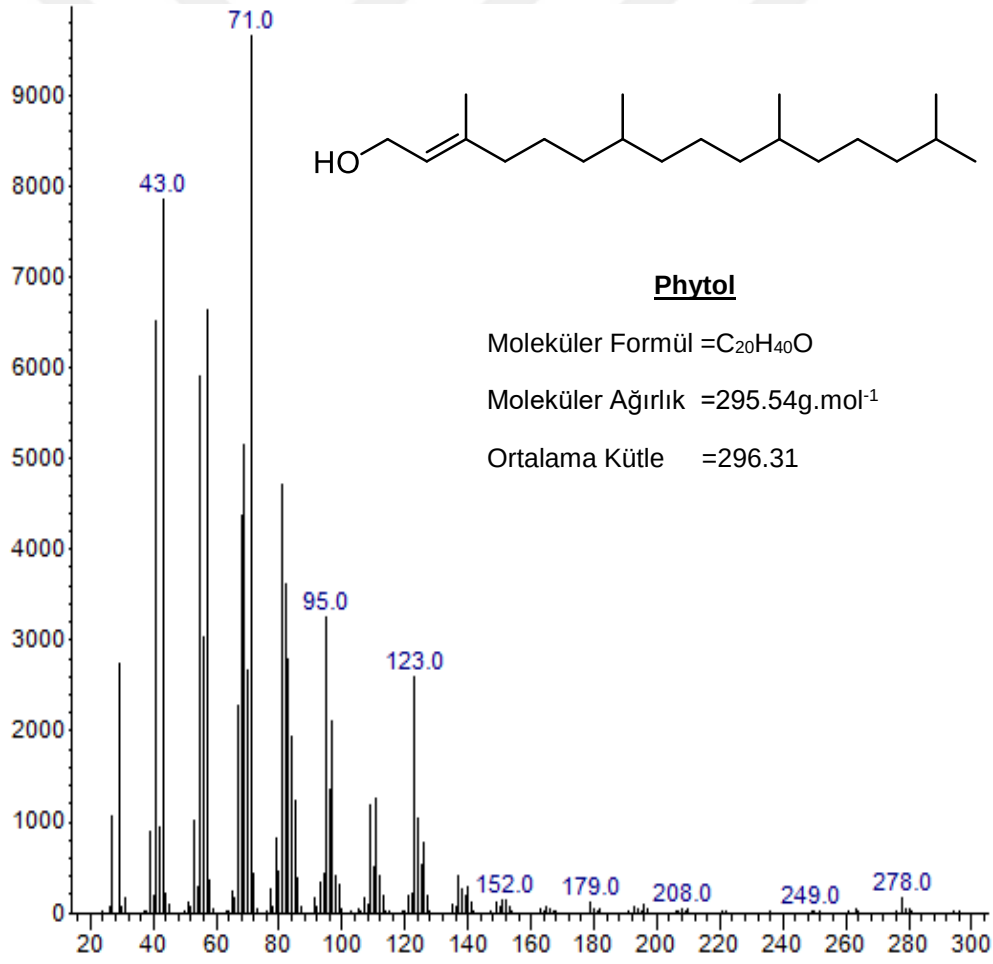
E vitamini ve K1 vitamini sentetik formlarının üretiminde kullanılan halkalı olmayan bir diterpen alkol olan fitol (Pythol) heksan ekstresinin yaklaşık % 10.85'ini oluşturmaktadır (Daines ve ark., 2003; Netscher, 2007). Geviş getiren hayvanlarda ve yenilen bitkilerin bağırsaklarda fermentasyonu esnasında klorofilden Fitol açığa çıkarılır ve sonrasında yağlarla beraber depolanmak üzere Fitanik aside dönüştürülür (Brink ve Wanders, 2006).

Refsum hastalığı, dokularda yüksek miktarda fitanik asit birikmesinden kaynaklanmaktadır ve bu hastalık beyincik ataksisi (beyincik kaynaklı kaslarda uyumsuzluk), retinis pigmentosa (görme kaybı ya da körlüğe neden olan bir göz hastalığı), anosmia (koku alamama) ve işitme kaybı gibi sorunlara sebep olabilmektedir (Wierzbicki 2007). Doğada birçok canlı savunma amaçlı bu kimyasalları kullanmaktadır. Sumak piresi gibi bazı böceklerin fitol ve fitanik asit

gibi bileşikleri avlanmaya karşı caydırıcı kimyasal olarak kullandığı rapor edilmiştir (Venci ve Morton, 1998).

Jeokimyasal marker (işaretleyici) olarak ta kullanılan fitol muhtemelen biyosferdeki en çok bulunan izoprenoid bileşiktir ve bunun bozunma ürünleri sulak alanlarda biyojeokimyasal bir gösterge olarak kullanılır (Rontani ve Volkman, 2003).

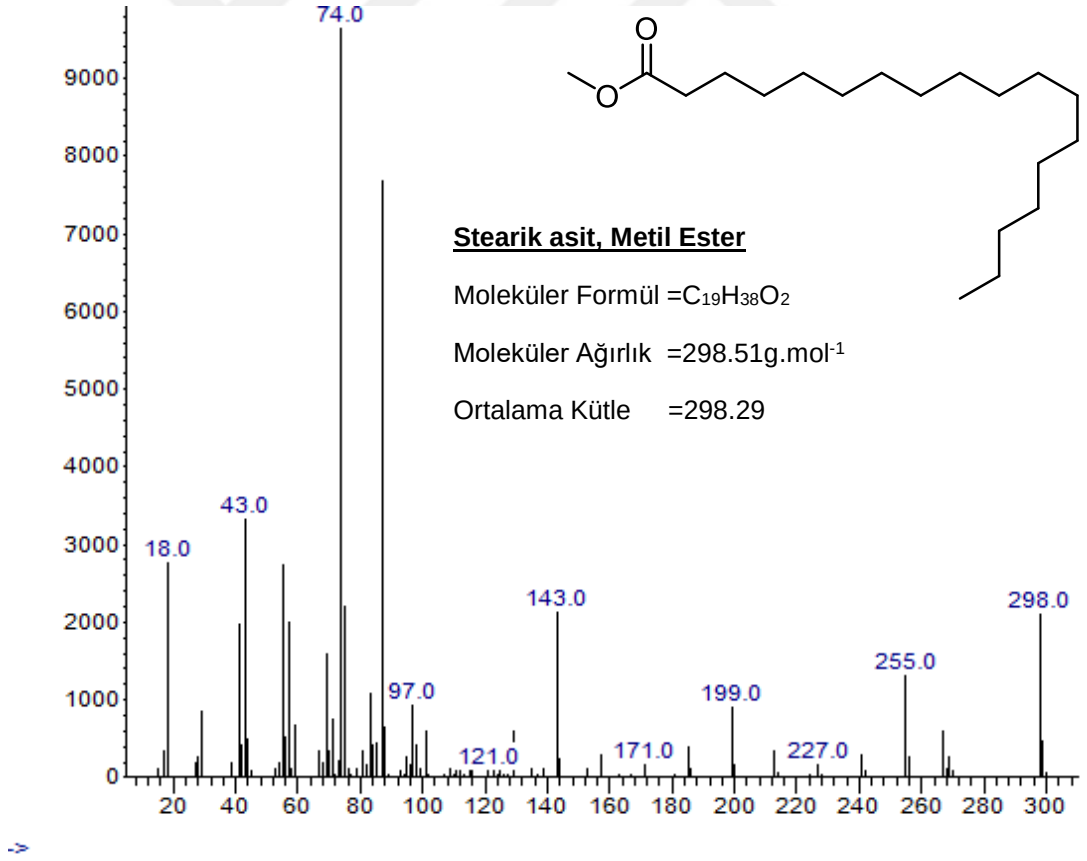
Fitol güzel koku endüstrisi yanısıra kozmetiklerde, şampuanlarda, tuvalet sabunlarında, ev temizlik ürünlerinde ve deterjanlarda kullanılır (McGinty ve ark., 2010). Dünya çapındaki kullanımının yaklaşık olarak yıllık 0.1-1.0 metrik ton olduğu tahmin edilmektedir (Anonim, 2004).



Şekil 4.16 *Hedysarum pycnostachyum* bitkisinden elde edilen Heksan ekstresinde bulunan Fitol'ün yapısı ve GC-MS spektrumu

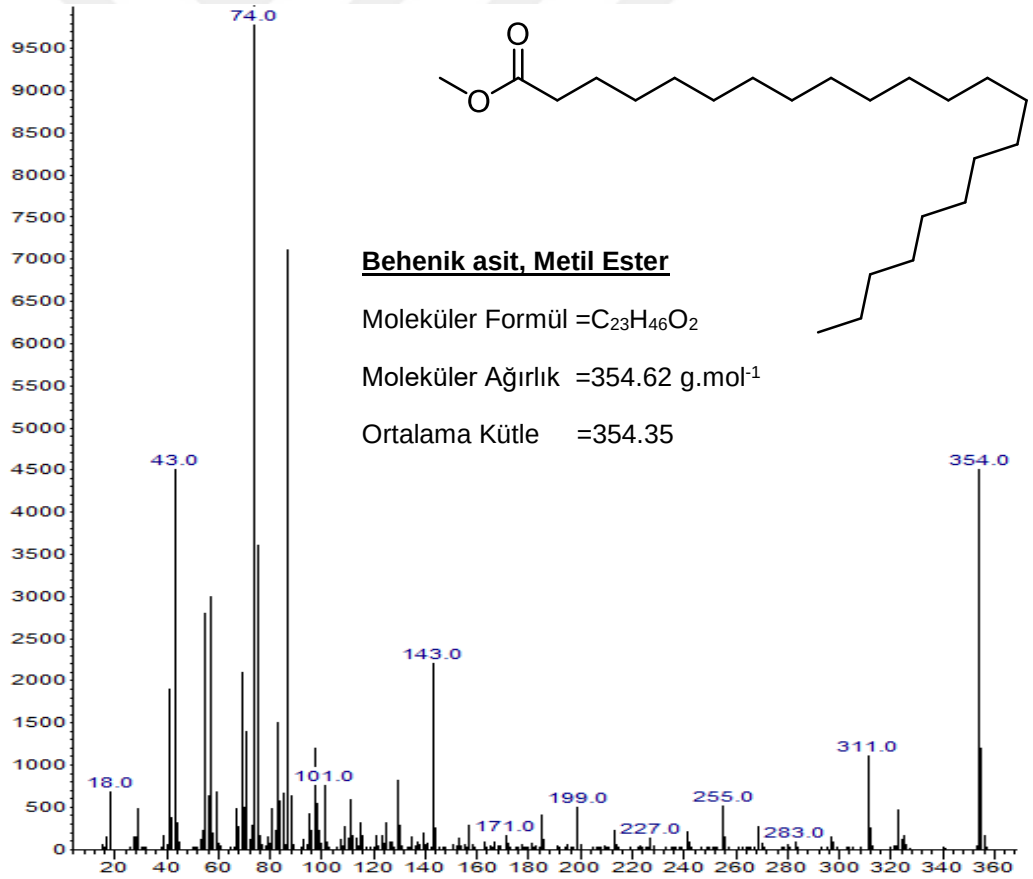
Stearik asit, kimyasal adı oktadekanoik asit olan 18-karbon ($C_{17}H_{35}CO_2H$) zincirine sahip doymuş bir yağ asitidir. "Stear", Yunanca bir kelime olup donyağı anlamına gelmektedir. Stearik asitin esterleri ve tuzlarına stearat adı verilir. Stearik asit, palmitik asitten sonra doğada bulunan en yaygın doymuş yağ asitidir (Gunstone ve ark., 2007).Üç molekül stearik asitten meydana gelen trigliseride stearin adı verilir. Stearik asit ayrıcakursun asitli akulerin üretiminde negatif plaka katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Hamur hazırlanırken 1 kg oksit başına 0.6 g stearik asit katılır (L.T. Lam).

Stearik asit diyet takviyeleri üretmek için kullanılır. Havai fişeklerde alüminyum ve demir gibi metal kaplama tozları olarak kullanılır. Stearik asit seramik tozlarının enjeksiyon, kalıplama ve preslenme esnasında yaygın olarak kullanılan bir kayganlaştırıcıdır (Tsenga ve ark.,1999). Stearik asit ayrıca taş kalıplara dökülen köpük lateks maddesini kalıptan ayırmak için de kullanılır.

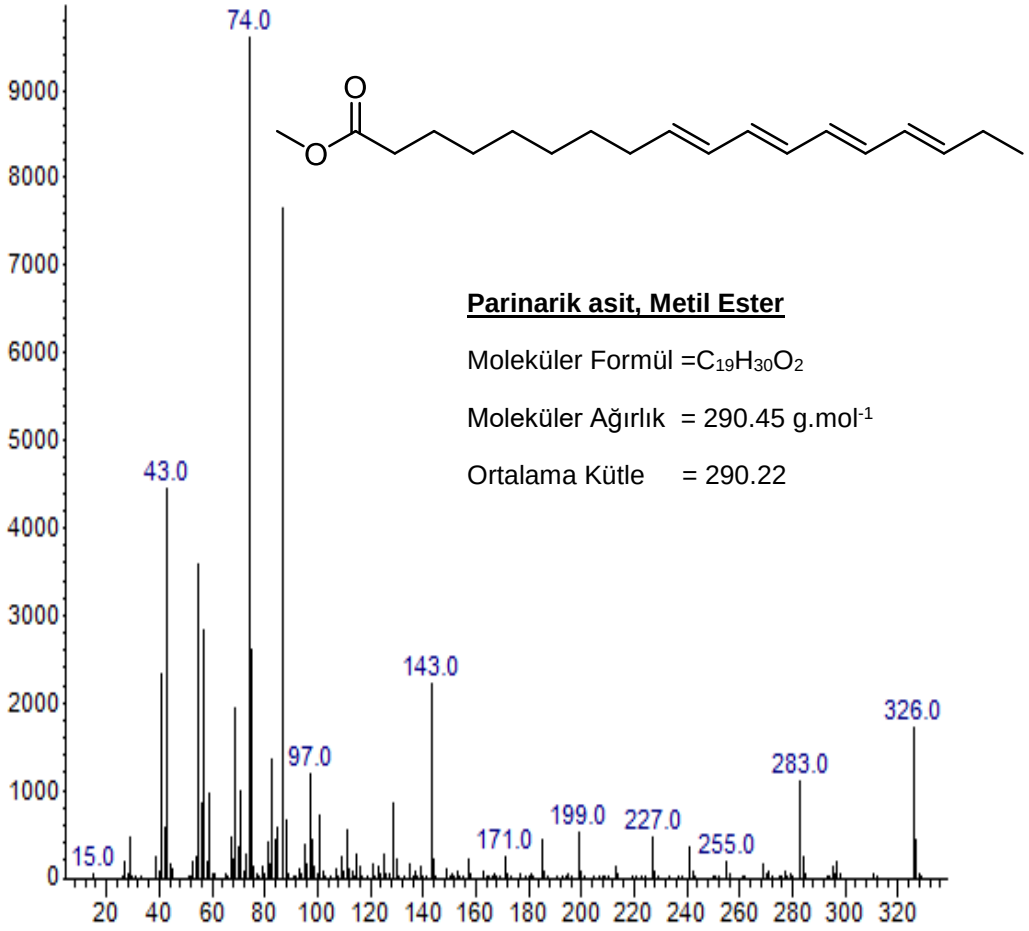


Şekil 4.17. *Hedysarum pycnostachyum* bitkisinden elde edilen Heksan ekstresinde bulunan Stearik Asit'in, yapısı ve GC-MS spektrumu

Heksan ekstresinin yaklaşık %1'ini oluşturan Dokosanoik (Behenik) Asit'in formülü $C_{21}H_{43}COOH$ olup doymuş yağ asidi yapısında bir karboksilik asittir. Bu asit 80 °C erime noktasına ve 306 °C kaynama noktasına sahip, görünüşü beyaz-krem renkte olan kristaller ya da tozdan oluşmaktadır. Ticari olarak behenik asit, saç kremleri ve nemlendiricilere yumuşatma özelliklerini vermek için kullanılır (USDA Scientists Find Treasure in Peanut Skins).Yağlama sıvıları içinde ve boya sökücülerde buharlaşmayı geciktirici bir çözücü olarak kullanılır. Behenik asit'in amitleri; zemin cilalamada, damlatmaz mumlarda ve deterjanlarda anti-köpük ajanı olarak kullanılır. Behenik asit'in azalması behenil alkol oluşumuna yol açar.



Şekil 4.18. *Hedysarum pycnostachyum* bitkisinden elde edilen Heksan ekstresinde bulunan Dokosanoik(Behenik) Asit'in, yapısı ve GC-MS spektrumu



Şekil 4.19. *Hedysarum pycnostachyum* bitkisinden elde edilen Heksan ekstresinde bulunan Parinarik Asit'in, yapısı ve GC-MS spektrumu

4.3. Mikrobiyolojik Analiz: Antimikrobiyel Aktivite

Hedysarum pycnostachyum bitkisinden elde edilen metanol, butanol, heksan ve su ekstrelerinin antimikrobiyel aktivitelerinin incelenmesinde Agar Disk Diffüzyon Metodu ve Minimum İnhibitor Konsantrasyonu olmak üzere iki yöntem kullanıldı.

"Kirby-Bauer Antibiyotik Testi (KB test)" veya "Disk Diffüzyon Antibiyotik Duyarlılık Testi" de denilen Agar Disk Diffüzyon Testi için bakterilerin bitki ekstresinden etkilenip etkilenmediğini test etmek için ekstre emdirilmiş özel kâğıt diskler kullanılır. Bu testte, ekstreyi içeren kâğıt diskler daha önceden bakterilerin yerleştirildiği bir agar plaka üzerine yerleştirilir ve tabaka inkübasyona bırakılır. Eğer ekstre bakterinin üremesini durduruyor ya da bakteriyi öldürüyorsa diskin etrafında bakterinin üremediği gözle görülür bir bölge olacaktır. Bu bölgeye inhibisyon bölgesi (inhibition zone) denir ve bu bölgenin çapının büyüklüğü ekstrenin ne kadar etkili antibiyotik aktiviteye sahip olduğunun göstergesidir. Antimikrobiyel aktivitesi yüksek olan ekstre daha büyük bir inhibisyon bölgesi çapı oluşturacaktır. Elde edilen inhibisyon çapı bilinen bir antibiyotik ilaç ile karşılaştırılır ve bu bilgi kullanılarak herhangi bir hastalığa özgü uygun antibiyotiği seçmek için kullanılabilir (Mohanty ve ark., 2010).

Agar Disk Difüzyon oldukça yaygın ve verimli bir yöntem olmakla beraber bazı eksiklikleri mevcuttur. Disk Diffüzyon Metodunun hassaslığı sadece test edilen maddenin (ekstre, kimyasal, ilaç vb.) antimikrobiyel gücüne bağlı değil aynı zamanda o maddenin diffüze olabilme yeteneğine de bağlıdır. Bileşikler çok iyi antimikrobiyeller olsa bile eğer polar agar ortam içerisinde iyi diffüze olamıyorsa o zaman sonuç ya negatif çıkacaktır (aktivite göstermeyecektir) ya da elde edilen küçük inhibisyon çapından dolayı aktivite çok zayıf bulunacaktır. Bu sebepten dolayı mikro ve makro dilüsyon metodları çok önem arz etmektedir.

MİK (Minimum inhibisyon konsantrasyonu) bir antimikrobiyelin bir gecelik bir inkübasyondan sonra bir mikroorganizmanın üremesini engellediği en düşük konsantrasyon demektir. Minimum İnhibisyon konsantrasyonları hem mikroorganizmaların bir antimikrobiyele dirençlerini tespit etmek hem de yeni antimikrobiyel maddelerin aktivitesini tayin etmek açısından önem arz etmektedir

(Andrews, 2001). MİK testi hem Disk Diffüzyon ile elde edilen sonuçların doğrulanması açısından hem de ekstrelerin etkin olduğu en düşük konsantrasyonun tespit edilmesi açısından önemlidir.

4.3.1. Disk Difüzyon Testi Analizi

Disk Difüzyon Testi sonucunda elde edilen antimikrobiyel aktivite sonuçları Çizelge 4.4'de verilmektedir. Daha kolay anlaşılabilmesi ve aktivitelerin daha kolay karşılaştırılabilmesi için Disk Difüzyon Testi Analiz sonuçları ayrıca % Aktivite İndeks çizelgesi olarak da çizelge 4.5'de verilmektedir. Aktivite indeksi;

$$\%\ Aktivite\ indeksi = \frac{Örneğin\ inhibisyon\ çapı}{Standardın\ inhibisyon\ çapı}\ x\ 100$$

formülü ile hesaplandı.

Çizelge 4.4. *Hedysarum pycnostachyum* ekstrelerinin disk diffüzyon metoduyla antimikrobiyel aktiviteleri.

	Mikroorganizmalar	İnhibisyon Bölge Çapları(mm)*						
		MeOH ekstresi	BuOH ekstresi	Heksan ekstresi	H_2O ekstresi	DCM ekstresi	CF	NYS
Gram Negative	*Salmonella thyphimurium CCM 5445*	10	9	11	9	11	14	-
	Escherichia coli ATCC 25922	9	9	10	8	9	14	-
	Escherichia coli 0157H7	11	10	12	8	11	13	-
Gram Positive	*Staphylococcus aureus ATCC 25923*	12	8	10	8	11	20	-
	Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	13	8	12	8	10	12	-
	Enterococcus faecalis ATCC 29212	10	9	10	8	9	17	-
	Enterococcus faecium DSM 13590	10	8	10	7	9	15	-
Yst	*Candida albicans ATCC 10239*	12	10	12	8	11	-	18

Bitki ekstreleri (20µg/disc); CF: Ceftazidime (20 mg yada 30 µg/disc); NYS: Nystatin (25 µg/disc).
* Filtre kağıdı disk çapını da içermektedir (6 mm).

Yeşil Renk:İyi; Sarı Renk: Orta; Kırmızı Renk: Düşük antimikrobiyel aktivite

Çizelge 4.5. *Hedysarum pycnostachyum* ekstrelerinin disk diffüzyon metoduyla antimikrobiyel aktiviteleri (Aktivite İndeksi olarak)

	Mikroorganizmalar	Aktivite İndeksi (%)						
		MeOH ekstresi	BuOH ekstresi	Heksan ekstresi	H_2O ekstresi	DCM ekstresi	CF	NYS
Gram Negative	*Salmonella thyphimurium CCM 5445*	72	64	79	64	79	100	-
	Escherichia coli ATCC 25922	64	64	72	57	64	100	-
	Escherichia coli 0157H7	85	77	92	62	85	100	-
Gram Positive	*Staphylococcus aureus ATCC 25923*	60	40	50	40	55	100	-
	Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	108	67	100	67	83	100	-
	Enterococcus faecalis ATCC 29212	59	53	59	47	53	100	-
	Enterococcus faecium DSM 13590	67	53	67	47	60	100	-
Yst	*Candida albicans ATCC 10239*	67	56	67	44	61	-	100

Hedysarum pycnostachyum'dan elde edilen ekstrelerin tamamı farklı derecelerde olmak üzere test edilen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel aktivite göstermiştir. Çizelge 4.4'e bakıldığında heksan ekstresinin diğer ekstrelere göre daha büyük inhibisyon çapları oluşturduğu görülmektedir. Dolayısıyla Heksan ekstresinin diğer ekstrelere göre nispeten daha yüksek aktiviteye sahip olduğu söylenebilir. Heksan ekstresini ham metanol ekstresi takip etmektedir. Antimikrobiyel aktivite açısından diklorometan ekstresi üçüncü aktif ekstre olarak karşımıza çıkmaktadır. Sonuçlar bize bütanol ve özellikle su ekstresinin antimikrobiyel aktivite açısından en zayıf ekstreler olduğunu göstermektedir.

Bu sonuçlar bize bitkinin içerdiği apolar bileşenlerin polar bileşenlere göre testedilen bakteri ve mantarların üremesini daha iyi inhibe ettiği bilgisini vermektedir. Dolayısıyla en apolar bileşenleri içeren Heksan ekstresi en yüksek antimikrobiyel aktivite gösterirken, biraz daha düşük apolaritedeki bileşenleri içeren diklorometan ekstresi biraz daha düşük aktivite göstermektedir. Metanol ekstresinin, Heksan ekstresi de dâhil olmak üzere diğer tüm ekstrelerin içerdiği bileşenleri muhteva ettiği gözönünde bulundurulursa bu ekstrenin yüksek aktivite göstermesi

sürpriz bir durum değildir. Bütanol ekstresi yüksek polariteye sahip fenolik ve flavonoid sekonder metabolitlerini içerdiğinden bu ekstrenin literatürde karşılaşılan yüksek antioksidan aktivitesine karşı düşük antimikrobiyel aktivite gösterdiği gözlenmiştir. En düşük aktiviteye sahip olan su ekstresinin bu davranışı muhtemelen su ekstresinin sahip olduğu yüksek miktardaki son derece yüksek polariteye sahip şeker bileşiklerinden kaynaklanmaktadır.

4.3.2.Minimum İnhibitor Konsantrasyonu (MİK) Testi Analizi

Minimum inhibitor konsantrasyonu (MİK) Testi sonucunda elde edilen antimikrobiyel aktivite sonuçları Çizelge 4.6'da verilmektedir.

Çizelge 4.6. *Hedysarum pycnostachyum* ekstrelerinin minimum inhibisyon konsantrasyonu

	Mikroorganizmalar	**Bitki ekstreleri ve referans antimikrobiyellerin MIC değerleri (µg/ml)**						
		MeOH ekstresi	BuOH ekstresi	Heksan ekstresi	H_2O ekstresi	DCM ekstresi	AMP	FC
Gram Negative	*Salmonella thyphimurium CCM 5445*	62.5	62.5	15.6	250	15.6	3.9	-
	Escherichia coli ATCC 25922	125	125	62.5	250	125	1.9	-
	Escherichia coli 0157H7	62.5	62.5	31.2	250	62.5	3.9	-
Gram Positive	*Staphylococcus aureus ATCC 25923*	31.2	125	62.5	250	31.2	3.9	-
	Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	15.6	62.5	15.6	250	15.6	1.9	-
	Enterococcus faecalis ATCC 29212	62.5	125	62.5	250	62.5	7.8	-
	Enterococcus faecium DSM 13590	31.2	62.5	31.2	125	31.2	3.9	-
Yst	*Candida albicans ATCC 10239*	15.6	62.5	15.6	125	15.6	-	7.8

AMP: Ampicillin, FC: Flucytosine, -: Not determined

Yeşil Renk:İyi; Sarı Renk: Orta; Kırmızı Renk: Düşük antimikrobiyel aktivite

Mikro dilüsyon yöntemi organizmaların üremesini engelleyen en düşük madde konsantrasyonunun tespit edilmesi amacıyla yapılmaktadır. En yüksek antimikrobiyel aktiviteye sahip olan madde doğal olarak diğer maddelere göre dahadüşük konsantrasyonlarda bile organizmaların üremesini engelleyebilmektedir. Dolayısıyla bu denemede en düşük MIC (Minimum Inhibitory Concentration) değerine sahip olan ekstreler en yüksek antimikrobiyel aktiviteye sahiptir. Bu bilgiler ışığında, bu yöntemden elde edilen verilere bakıldığında, bu sonuçların Disk Diffüzyon yöntemi ile elde edilen sonuçlarla oldukça uyumlu olduğu görülmektedir. Aynen disk diffüzyon yönteminde olduğu gibi en apolar ekstre olan heksan ekstresi en yüksek antimikrobiyel aktiviteyi göstermiştir. Aktivite sıralaması yüksekten düşüğe doğru sırasıyla heksan, diklorometan, metanol, bütanol ve su ekstreleri şeklindedir. Ekstrelerin polarite dereceleri de aynı sıralamada artış göstermektedir. Su ekstresinin oldukça düşük antimikrobiyel aktivite gösterdiği açık bir şekilde göze çarpmaktadır.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Hedysarum pycnostachyum bitkisi Türkiye'ye endemik bir bitki olup hakkında daha önce herhangi bir kimyasal ya da biyolojik çalışma yapılmamıştır. Bu bitki ilk defa tarafımızdan çalışılmış olup elde edilen veriler oldukça değerli ve literatürde ilktir. Sekonder metabolitleri içeren bütanol ekstresinden doğal bileşik izolasyon ve saflaştırma çalışmaları sonucunda bitkiden elde edilen bileşiklerden ikisinin yapısı aydınlatılmış ve literatüre kazandırılmıştır. Elde edilen diğer fraksiyonlardan da başka bileşiklerin saflaştırılıp yapısının aydınlatılması potansiyeli bulunmaktadır.

Çalışmanın kimyasal kısmının diğer bir ayağını oluşturan uçucu yağlar ve temel yağ asitlerinin tayini çalışmaları Heksan ekstresinin GC-MS analizi ile yapıldı. Bu sonuçlar bitkinin oldukça zengin bir uçucu yağ asidi içeriğine sahip olduğğunu göstermektedir. Birer temel yağ asidi olan Linolenik asit (omega-3), Palmitik asit, Linoleik asit (omega-6) ve bir diterpen alkol olan Phytol sırasıyla % 21.33, % 19.82, % 9.20 ve % 10.85 orana sahip olup heksan ekstresinin toplam bileşenlerinin % 61.2'sini oluşturmaktadır. Bu bileşenler farmakolojik açıdan oldukça önemli olup vücut için gerekli olan yağ asitleridir ve insan hücrelerinde sentezlenemediklerinden dışarıdan hazır olarak gıdalarla alınması gerekmektedir. Literatürde bu bileşiklerin ayrıca anti-inflamatuar, kalp ve damar hastalıkları oluşumunu engelleyici, iştah artışını baskılayıcı, nem tutucu ve akne azaltıcı gibi etkilere sahip olduğu tespit edilmiştir. Doymamış yağ asitlerinin eksikliğinin insan vücudunda zararlı ve anormal değişimlere neden olduğu uzun süredir bilinmektedir. Bu bileşenlerin eksikliği saç dökülmesi, yaraların yavaş iyileşmesi ve deride hafif pullanma gibi etkilere sebep olabilmektedir. Doymamış yağ asitleri sağlık açısından faydalarının yanısıra ayrıca endüstride ilaç, kozmetik, yüzey kayganlaştırıcı ve sabun olarak kullanılmaktadır.

Çalışmanın biyolojik kısmında ise bitkiden elde edilen metanol, heksan, diklorometan, bütanol ve su ekstrelerinin çeşitli gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı antibakteriyel ve *Candida albicans*'a karşı antifungal aktivitesi incelendi. Ekstrelerin antimikrobiyel aktiviteleri Disk Difüzyon testi ve mikro dilüsyon metodu olmak üzere iki farklı yöntem ile tespit edildi. Her iki yöntemden elde edilen sonuçlar birbiri ile uyumlu olup, tüm ekstrelerin iyi ya da orta derecede antimikrobiyel aktiviteye sahip olduğunu gösterdi. Antimikrobiyel aktivitenin artan

polarite ile ters orantılı olduğu gözlemlendi. Yani en düşük polariteye sahip heksan ekstresi en yüksek aktiviteye sahip iken en yüksek polariteye sahip su ekstresi ise en düşük aktiviteye sahiptir.

Sonuç olarak, *Hedysarum pycnostachyum* (Fabaceae) Türkiye'nin Elazığ-Malatya ve Fırat Nehri çevresineendemik olup içerdiği doğal bileşikler ve biyolojik aktiviteleri hakkında bilinen bir çalışma yoktur. Bu çalışma halk arasında halk ilacı olarak kullanılan Ranunculaceae ailesi üyesi olan *Hedysarum pycnostachyum'un* içerdiği doğal bileşiklerin izolasyonu, uçucu yağlarının tespiti ve antimikrobiyel etkisinin incelenmesi açısından ilk çalışmadır.

KAYNAKLAR

ABDEL, K.S., MELEK, F., MİYASE, T., GABER, N. and MİNA, S., 2010. New steroidal saponin from *Agave angustifolia*. *Planta Med, 76*: 446.

ABOU-EL-ENAIN, MM., 2002. Chromosomal criteria and their phylogenetic implications in the genus Onobrychis Mill.sect. Lophobrychis (Leguminosae), with special reference to Egyptian species. Botanical Journal of the Linnean Society, 139: 409–414.

AKHTAR, M. S., IQBAL, Z., KHAN, M. N., and LATEEF, M., 2000. Anthelminthic activity of medicinal plants with particular reference to their use in animals in the Indo Pakistan subcontinent. Small Ruminant Research 38: 99–107.

AKSU, S., 1972. Bitkisel Maddeler Kimya ve Teknolojisi, Tekel Enst. Yayınları, A-12.

ANNEKEN, D. J., BOTH, S., CHRISTOPH, R. and FIEG, G., 2006. Udo Steinberner, Alfred Westfechtel "Fatty Acids" in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim.

ANONİM, 1979. World Health Organization, Chronicle 33, Inventory of Medicinal Plants, Selection And Characterization.

ANONİM, 1983. Council of Europe. List of rare, threatened and endemic plants in Europe (1982 edition).Strasbourg, 357s.

ANONİM, 2002. World Health Organization, WHO mortality data.

ANONİM, 2008. *"Comparison of Dietary Fats Chart"*. Canola Council of Canada *(2008-09-03)*.

ANONİM, 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 19th informational supplement. Approved Standard M100-S19 NNCLS (National Committee for Clinical Standards), Wayne PA January.

ANONİM, 2014. http://turkherb.ibu.edu.tr/index.php?sayfa=1&tax_id=131

(10.09.2014'de ulaşıldı).

ANONİM, 2015. http://ue.anadolu.edu.tr/eKitap/KIM205U.pdf

ATTA-UR-RAHMAN, ANJUM, S., FAROOQ, A., KHAN, M. R., PARVEEN, J. and M. I. 1998. Choudhary, *Journal of Natural Products*, Vol **61**: 202-206.

ATTA-UR-RAHMAN, ZAHEER-UL-HAQ, KHALİD, A., ANJUM, S., KHAN, M. R. and CHOUDHARY, M. I., 2002. *Helvetica Chimica Acta*, Vol 85: 678-88.

BADR A, KHLIFA SF, ABOEL-ATTA AI. and ABOU-EL-ENAIN MM., 1997. Chromosomal criteria and taxonomic relationships in the Solanaceae. Cytologia, 62: 103–113.

BAĞCI, E. and DIĞRAK, M., 1997. Bazı Göknar türleri uçucu yağlarının in vitro antimikrobiyal etkileri. Tr. J. of Biology, 21: 273-281.

BARRAZA-MORALES, A., SÁNCHEZ-TEYER, F.L., ROBERT, M., ESQUEDA, M. and GARDEA, A., 2006. Variabilidadgenética en *Agave angustifolia* Haw. de la sierra Sonorense, Mexico, determinada con marcadoresAFLP. *Rev. Fitotec. Mex*, *29*: 1–8.

BRINK, D. M. and WANDERS, R. J. A., 2006. "Phytanic acid: Production from phytol, its breakdown and role in human disease". Cellular and Molecular Life Sciences, 63(15): 1752–1765.

BROUWER, I. A., KATAN, M. B. and ZOCK, P. L., 2004. "Dietary alpha-linolenic acid is associated with reduced risk of fatal coronary heart disease, but increased prostate cancer risk: a meta-analysis". *The Journal of nutrition*, 134(4): 919–22.

BURR, G. O., BURR, M. M. and MILLER, E., 1930. "On the nature and role of the fatty acids essential in nutrition". J. Biol. Chem, 86(587): 1–9.

C. LOUIME, H.K.N., VASANTHAIAH, Y., JITTAYASOTHORN, J., LU, S.M., BASHA, P. THIPYAPONG. and N. BOONKERD., 2008. A simple, A simple and efficient protocol for high quality RNA extraction and cloning of chalcone synthase partial cds from muscadine grape cultivars (Vitis rotundifolia Michx.), Eur. J. Sci. Res. 22: 232–240.

CANO, L., 1998. *Flora Medicinal de Veracruz. Inventario Etnobotánico*, 1st ed.; Universidad Veracruzana: Xalapa Ver, Mexico, 49–50.

CAO, CHENGYOU; CHEN, JIAMO; SHAO, JIANFEI; CUI, ZHENBO., 2011. Seasonal dynamics of soil microbial biomass and enzyme activities in four sand-fixation plantations on Horqin sandy land. Shengtaixue Zazhi, 30(2), 227-233.

CAO, CHENG-YOU., JIANG, DE-MING., ZHU, LI-HUI., TENG, XIAO-HUI., FU, YAO., CUI, ZHEN-BO., GAO, FEI-FEI. and GAO, EN-LIANG., 2007. Amelioration effect of sand-fixing Hedysarum fruticosum plantations on soil nutrient contents and biological activities. Yingyong Shengtai Xuebao, 18(8): 1739-1744.

CAO, CHENG-YOU; TENG, XIAO-HUI; CHEN, JIA-MO; CUI, ZHEN-BO., 2006. Influences of different sand-fixation plants on biological activity of soil. Dongbei Daxue Xuebao, Ziran Kexueban, 27(10): 1157-1160.

CHAN, PUI-KWONG; MAK, MAY SUNG; WANG, YUN., 2005. Composition comprising Xanthoceras sorbifolia extracts, compounds isolated from same, methods for preparing same, and uses thereof. U.S. Pat. Appl. Publ. US 20050276872 A1 20051215,

CHEN, CHE; DONG, JIANYONG; LIU, KAI; LIU, YONGQI; WANG, YALI., 2007. Antioxidant effect of total flavonoids of Hedysarum polybotrys on human umbilical vein endothelial cells injured by hydrogen peroxide. Zhongyaocai, 30(9), 1099-1102

CHEN, CHE; YANG, YA-LI; CHU, HUI-YUAN; WANG, YA-LI; DONG, JIAN-YONG., 2008. Protective effect of total flavonoids of Hedysarum polybotrys on oxidized LDL related to endothelial cells injury. Zhongyiyao Xuebao, 36(1): 19-21.

CHOİ BH, OHASHİ H., 2003. Generic criteria and an infrageneric system for Hedysarum and related genera (Papilionoideae-Leguminosae). *Taxon, 52: 567–576.*

CHRISTNER, B. C., MORRIS, C. E., FOREMAN, C. M., CAI, R. and SANDS, D. C., 2008. "Ubiquity of biological ice nucleators in snowfall", 319 (5867): 1214.

CUI, X. M., WANG, Z. P., ZHANG, Z. H., REN, Y., MA, J. and HUANG, Z. L., 1998. Effect of radix hedysari polysaccharide (HPS) enhancing cytotoxicity of LAK cell on bladder cancer in vitro. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 14: 19–20.

CUNNANE, S. and ANDERSON, M., 1997. "Pure linoleate deficiency in the rat: influence on growth, accumulation of n-6 polyunsaturates, and (1-14C) linoleate oxidation". J Lipid Res, 38(4): 805–812.

DAINES, A. M., 2003. The synthesis of naturally occurring Vitamin K and Vitamin K analogues. Current Organic Chemistry, 7: 1625-1634.

DASH SK, PADHY S., 2006. Review on ethnomedicines for diarrhoea disease from Orissa: prevalence versus culture. J Hum Ecol, 20: 59–64.

DOROGINA, O. V. and ZHMUD, E. V., 2010. Trypsin inhibitor activity of some specimens of Fabaceae. Rastitel'nye Resursy, 46(1): 126-133.

DOYLE, J. J., CHAPPİLL, J. A., BAİLEY, C. D. and KAJİTA, T., 2000. Towards a comprehensive phylogeny of legumes: evidence from rbcL sequences and non-molecular data. Pages 1 -20 in Advances in legume systematics, part 9, (P. S. Herendeen and A. Bruneau, eds.). *Royal Botanic Gardens, Kew, UK.*

FARNSWORTH, N.R., AKEREV, O., BİNGEL, A.S., 1985. The Bulletiion of WHO, 63: 9865-9871.

FEDOROVA, YU. S., SUKHIKH, A. S. and KUZNETSOV, P. V., 2010. Method for preparing phytopreparations from Hedysarum theinum and Hedysarum neglectum. Russ. RU 2402344 C1 20101027.

G. A. Cordell "*Introduction to Alkaloids*" Wiley Interscience, New York. 1981, 907

GLYZIN, VLADIMIR I.; SMIRNOVA, LILIYA P.; OB'EDKOVA, EKATERINA F.; SHEMERYANKINA, TATYANA B., 1995. Method for extracting mangiferin with antiviral activity. Russ. RU 2032413 C1 19950410

GONCHIG, ENKHMAA; ERDENEBAT, SARNAIZUL; TOGTOO, OUYNTSETSEG; BATAA, SUKHKHUU; GENDARAM, ODONTUYA; KIM, YOUNG SUP; RYU, SHI YONG., 2008. Antimicrobial activity of Mongolian medicinal plants. From Natural Product Sciences, 14(1), 32-36.

GRAM, H. C., 1884. "Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten". Fortschr. Med, 2: 185–189.

GUNSTONE, F. D., JOHN L. HARWOOD, AND ALBERT J. Dijkstra "The Lipid Handbook with Cd-Rom. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, 2007.

HAN, GANG; DANG, QING; ZHAO, ZHONG., 2008. Response of antioxidation protection system of Hedysarum scoparium to drought stress. Xibei Zhiwu Xuebao, 28(5): 1007-1013.

HEDGE & HUB.-MOR. in Notes R.B.G Edinb., (1996). 29: 36, f. 1,2

HU, FANGDI; LI, XIAODONG; ZHAO, LIANGGONG; FENG, SHILAN; WANG, CHUNMING., 2010. Antidiabetic properties of purified polysaccharide from Hedysarum polybotrys. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 88(1): 64-72.

HUANG, Z. L., CUI, Z. M., REN, Y., ZHANG, J., GAN, M., QI, W. X. and ET AL., 1992. Empirical study of hedysari polysaccharide on anti-aging function. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 23: 469–473.

HUGENHOLTZ, P., 2002. "Exploring prokaryotic diversity in the genomic era". Genome Biology, 3(2): 1–8

JACKSON, F., AND COOP, R. L., 2000. The development of anthelminticresistance in sheep nematodes. Parasitology, 120, 95–107

JEGEDE, O. C., AGBEDE, R. I. S., AJANUSI, J. O. AND ADAUDI A. O., 2009. Anthelmintic screening of fractions of Spigelia anthelmia Linn extracts against experimental Nippostrongylus braziliensis in rats. Veterinari arhiv, 79, 189–197

JENSEN, R. G., HAGERTY, M. M., and MCMAHON. K. E., 1978. "Lipids of human milk and infant formulas: a review". Am J Clin Nutr, 31(6): 990-1016.

JIANG, YAN; CHAO. and RUO-BING., 2007. Comparison of contents of astragaloside IV and total saponins in Astragalus membranaceus. Huaxi Yaoxue Zazhi, 22(3): 322-324.

JIN, Z. S., LI, Y. D., RU, Y. Q., CHU, H. Y., WU, L. W., MA, J. and ET AL., 2004. Influence of Hedysari polybotrys polysaccharide on nitric oxide, nitric oxide synthase, superoxide dismutase, and malondialdehydeof renal tissue in diabetic rat. China Journal of TraditionalChinese Medicine and Western Medicine in Critical Care, 11: 141–144.

KAJİTA, T., H. OHASHİ, Y. TATEİSHİ, C. D. BAİLEY. and J. J. DOYLE., 2001. rbcL and legume phylogeny, with particular reference to Phaseoleae, Millettieae, and allies. *Systematic Botany,* 26: 515-536.

KHAMIDULLINA, E. A., ZINCHENKO, S. V. and SEMENOV, A. A., 2002. Qualitative composition of saponin fraction from above-ground part of Hedysarum alpinum L. Rastitel'nye Resursy, 38(1): 78-82.

KINGSBURY, K. J., PAUL, S., CROSSLEY, A. and MORGAN, D. M., 1961. "The fatty acid composition of human depot fat". Biochemical Journal, 78: 541–550.

KO, JANG HO., 2007. Medicinal herb beverage capable of increasing resistance against endocrine disruptor and stress. Repub. Korea, KR 696830 B1 20070330

KOKATNUR, MG., OALMANN, MC., JOHNSON, WD., MALCOM, GT. and STRONG, JP., 1979. *"Fatty acid composition of human adipose tissue from two anatomical sites in a biracial community"*. The American Journal of Clinical Nutrition, **32** (11): 2198–205.

KORALEK, D. O., PETERS, U. and ANDRIOLE, G., 2006. "A prospective study of dietary α-linolenic acid and the risk of prostate cancer (United States)". Cancer Causes & Control, 17 (6): 783–791.

LAM , L.T., 1998. Journal of Power Sources, 73: 36–46.

LAN, Z. F., ZHANG, Z. L., CHENG, G. Q., WANG, F. L. and XI, S. F., 1987. Effects of radix hedysari polysaccharide on immunological function and transplanted tumors in mice. Acta Pharmacological Sinica, 8: 275–277.

LEAF, A. and WEBER, P.C., 1988. Cardiovascular effects of ω-3 fatty acids. The New Engl. J. Of Med, 318: 549-557.

LEE, YEAN-JANG; TSENG, TSUI-HWA; CHANG, CHIA-FU., 2008. Cytotoxic effect of crude extracts or synthetic hedysarimcoumestans on tumor cells. Abstracts of Papers, 235th ACS National Meeting, New Orleans, LA, United States, April 6-10, MEDI-291.

LEI, XUEJUN., 2002. Antiaging water containing natural medicinal components and its preparation. Zhuanli Shenqing, CN 1335141 A 20020213.

LEWİS, G., B. SCHRİRE, B. MACKİNDE. and M. LOCK (EDS). 2005. Legumes of the world. *Royal Botanical Gardens, Kew, UK*.

LI, LIANG; BAO, YAOXIAN; LIAO, CHAOYING; ZHAO, ZHIQIANG; TANG, HAIBIN., 2010. Soil microorganism and enzyme activities under different artificial forests in the northeast of Ulan Buh desert. Xibei Zhiwu Xuebao , 30(5), 987-994

LI, YINGDONG., 2010. Application of ultrafiltration-membrane-filtered extract of Angelica sinensis and Hedysarum polybotrys for resisting radiation. Faming Zhuanli Shenqing, CN 101822709 A 20100908.

LI, YUNZHI; HUANG, JING; GUO, HONGCHUAN; REN, BO., 2009. Chemical constituents from Hedysarum polybotrys and their antitumor activities. Zhongcaoyao 40(8), 1195-1198.

LIU, F., OOI, V. E. C. and CHANG, S. T., 1997. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. Life Sciences, 60: 763–771.

LIU, YI; ZHANG, QINGYING; CHEN, HUBIAO; WANG, BIN; AN, DONGGE. and ZHAO, YUYING., 2006. Structural determination of saponins from Hedysarum polybotrys. Magnetic Resonance in Chemistry, 44(12): 1128-1130.

LIU, YI; ZHANG, QING-YING; ZHAO, YU-YING; WANG, BIN; HAI, LI-QIAN; YING, YA-PIN. and CHEN, HU-BIAO., 2007. Saponins from the roots of Hedysarum polybotrys. Biochemical Systematics and Ecology, 35(6): 389-391.

LIU, YI; ZHANG, ZHENG; ZHANG, QINGYING; PU, XIAOPING; ZHAO, YUYING., 2010. Study on chemical constituents and antioxidative activity of Radix Hedysari. Zhongguo Yaoshi (Beijing, China), 24(6): 543-545, 549.

Lİ, SHİ-GANG; WANG, DE-GUİ; TİAN, WEİ; WANG, XUE-Xİ; ZHAO, JİAN-XİONG; LİU, ZHONG; CHEN, RU., 2008. Characterization and anti-tumor activity of a polysaccharide from Hedysarum polybotrys Hand.-Mazz. Carbohydrate Polymers 73(2): 344-350.

QİU, M., NİE, R. and Lİ, Z., 1994. *YUNNAN ZHİWU YANJİU*, 16: 286-300.

MA, X. Q., DUAN, J. A., ZHU, D. Y., DONG, T. X. and TSIM, K. W. K., 2000. Chemical comparison of Astragali radix (Huangqi) from different regions of China. Natural Medicines (Tokyo), 54(5): 213-218.

MA, YANHUA; LI, YINGDONG; ZHAO, JIANXIONG; WANG, TING., 2010. Protection of ultra-filtration extract mixture from Angelica sinensis and Hedysarum polybotrys on oxidative damage in cardiomyocytes of neonatal rats and its mechanism. Zhongcaoyao, 41(4): 602-607.

MCKELLAR, Q.A. and JACKSON, F., 2004. Veterinary anthelmintics: Trends in Parasitology, 20: 456–461.

MONROY-ORTRİZ, C. and CASTİLLO-ESPAÑA, P., 2007. *Plantas Medicinales Utilizadas en el Estado de Morelos*;Universidad Autónoma del Estado de Morelos: Cuernavaca Mor, Mexico, 25–26.

MOORE, K. M. and KNAUFT, D. A., 1989. "The Inheritance of High Oleic Acid in Peanut". *The Journal of Heredity, 80 (3): 252–3.*

NETSCHER, T., 2007. Synthesis of Vitamin E. Vitamins & Hormones, 76: 155-202.

NUTTER, MARY K., LOCKHART, ERNEST E. and HARRİS, ROBERT S., 1943. "The chemical composition of depot fats in chickens and turkeys". Oil & Soap 20 (11): 231–4.

OLİVEİRA, AF; CHUNHA, DA; LADRİERE, L; ET AL. (May 2015). *"In vitro use of free fatty acids bound to albumin: A comparison of protocols"*. BioFeedback. BioTechniques (Letter to the Editor) 58: 228–33.

PAOLINI, V., BERGEAUD, J. P. and GRISEZ, C., 2003. Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with Haemonchus contortus .Veterinary Parasitology, 113: 253–261.

PAQUAT, C. and HAUTFENNE A., 1992. International Union of Pure and Applied Chemistry. Blackwell Scientific Publications, London.

QUAN, GUI-JING; CAO, CHENG-YOU., 2006. Relationships between soil enzyme activity and vegetation in Horqin sandland. Shenyang Huagong Xueyuan Xuebao, 20(4): 258-260,271.

RAMON, J. M., BOU, R., ROMEA, S., ALKIZA, M. E., JACAS, M., RIBES, J. and OROMI, J., 2000. "Dietary fat intake and prostate cancer risk: a case-control study in Spain". Cancer causes & control : CCC 11(8): 679–85.

REINER, M. F., STIVALA, S., CAMICI, G. G. and BEER, J. H., 2014. "[The effects of Omega-3 fatty acids in clinical medicine]". Praxis (Bern 1994) 103(6): 329–35.

RONTANI, J. F. and VOLKMAN, J. K., 2003. Organic Geochemistry. Phytol degradation products as biogeochemical tracers in aquatic environments, 34: 1-35.

RUTHIG, D. J. and MECKLING-GILL, K. A., 1999. "Both (n-3) and (n-6) fatty acids stimulate wound healing in the rat intestinal epithelial cell line, IEC-6". Journal of Nutrition, 129(10): 1791–1798.

SHİVANNA MB, RAJAKUMAR N. Traditional medico-botanical knowledge of

SIMON, J. A., CHEN, Y. H. and BENT, S., 2009. "The relation of alpha-linolenic acid to the risk of prostate cancer". *American Journal of Clinical Nutrition*, 89(5): 1558–1564.

SONG, Q. H., KOBAYASHI, T., XIU, L. M., ET AL., 2000. Effects of Astragali root and Hedysari root on the murine B and T cell differentiation. Journal of Ethnopharmacology, 73(1): 111–119.

THOMAS, ALFRED (2000). "Fats and Fatty Oils". *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.

TSENGA, WENJEA J.; MO LİUA, DEAN; HSUB, CHUNG-KİNG (1999)."Influence of stearic acid on suspension structure and green microstructure of injection-molded zirconia ceramics". *Ceramics International* **25** (2): 191–195.

U. L. B. JAYASİNGHE, M. NADEEM, ATTA-UR-RAHMAN, M. I.CHOUDHARY; H. D. RATNAYAKE AND Z. AMTUL, *Natural ProductLetters*,1998, Vol. 12 (2): 103-109.

UNTORO, J; SCHULTİNK, W; WEST, CE; GROSS, R; HAUTVAST, JG (2006). *"Efficacy of oral iodized peanut oil is greater than that of iodized poppy seed oil among Indonesian schoolchildren"*. The American Journal of Clinical Nutrition, 84 (5): 1208–14

UPRETY, Y., ASSELİN, H., BOON, EK., YADAV, S. and SHRESTHA, KKJ., 2010. Indigenous usesand bio-efficacy of medicinal plants in Rasuwa district, Central Nepal.Ethnobiol Ethnomed, 6:3.

VASSİLJEVA LI., 1987. Flora Partis Europaea URSS, Vol. 6. *Leningrad: Nauka*.

VENCI, F. V. and MORTON, T. C., 1998. The shield defense of the sumac flea beetle, Blepharida rhois (Chrysomelidae: Alticinae). Chemoecology, 8: 25-32.

VİLLARREAL-LOZOYA, JOSE E., LOMBARDİNİ, LEONARDO. and CİSNEROS-ZEVALLOS, LUİS., 2007. "Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan Carya illinoinensis (Wangenh.) K. Koch] cultivars". Food Chemistry, 102 (4): 1241.

VONDERBANK, H., 1949. Ergebnisse der Chemotherapie der Tuberculose. Pharmazie, 4: 198-207.

WALLER, J. P. J., 1997. Anthelmintic resistance. Veterinary Parasitology, 72: 391-412

WANG, J. Z., ITO, H. and SHIMURA, K., 1989. Enhancing effect of antitumor polysaccharide from astragalus or radix hedysarum on C3 cleavage production of macrophages in mice. Japanese Journal of Pharmacology, 51: 432–434.

WANG, RUI; CHEN, YAOZU., 1988. Analysis of the constituents of Hedysarum polybotrys. Lanzhou Daxue Xuebao, Ziran Kexueban 24(3): 46-50.

WANG, WEI; HAI, LIQIAN; ZHAO, YUYING; CHEN, HUBIAO; WANG, BIN; LIANG, HONG., 2007. Saponins from roots of hedysarum multijugum. Zhongguo Zhongyao Zazhi, 32(4): 315-317.

WANG, XIAOGUANG., 2007. An edible nutritious food beneficial for heart with health promoting effect. Faming Zhuanli Shenqing, CN 101053395 A 20071017.

WASSER, S. P., 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor andimmunomodulating polysaccharides. Applied Microbiology and Biotechnology, 60: 258–274.

WATKİNS, B. A., 1991. Importance of essential fatty acids and their derivates in poultry. Journal of Nutrition, 121: 1475-1485.

WEI, SHAO-YIN; ZHANG, PEI-XUN; HAN, NA; DANG, YU; ZHANG, HONG-BO; ZHANG, DIAN-YING; FU, ZHONG-GUO; JIANG, BAO-GUO., 2009. Effects of Hedysari polysaccharides on regeneration and function recovery following peripheral nerve injury in rats. Journal of Chinese Medicine, 37(1): 57-67.

WIERZBICKI, A. S., 2007. "Peroxisomal disorders affecting phytanic acid α-oxidation: A review". Biochemical Society Transactions, 35(5): 881–886.

WOJCİECHOWSKİ, M. F., 2003. Reconstructing the phylogeny of legumes (Leguminosae): an early 21st century perspective. Pages 5-35 in Advances in Legume Systematics, part 10, higher level systematics (B. B. Klitgaard and A. Bruneau, eds.). *Royal Botanic Gardens, Kew, UK.*

WOJCİECHOWSKİ, M. F., LAVİN, M. and SANDERSON, M. J., 2004. A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid matK gene resolves many well-supported subclades within the family. *American J. Botany,* 91: 1846-1862.

WOLLMANN, ELDON W., SCHERMEISTER, LEO J. and SCHMIESS, ELMER G., 1972. Phytochemical studies of poisonous plants of North Dakota. Proceedings of the North Dakota Academy of Science, 25(PT. 2): 17-28.

XUE, FULING; LIN, ZHIDUO; HAN, MING; WU, DONGQING., 2010. Determination of trace elements in three kinds of Chinese herbal medicine and antioxidant activity of their polysaccharides. Zhongyaocai, 33(2): 293-296.

XUE, FULING; LIN, ZHIDUO; HAN, MING; WU, DONGQING., 2010. Antioxidant activities of three types of Chinese herbal medicines polysaccharides. Shipin Keji, 35(2): 138-140, 143.

XUE, FULING; LIN, ZHIDUO; HAN, MING; WU, DONGQING.,2010. Antioxidant activities of three types of Chinese herbal medicines polysaccharides. Shipin Keji, 35(2): 138-140, 143.

YAKOVLEV, GP., SYTİN, AK. and ROSKOV YR., 1996. Legumes of northern Eurasia, a check-list. *Royal Botanic Gardens, Kew, UK.*

YAMADA, H., 1994. Pectic polysaccharides from Chinese herbs: Structure and biological activity. Carbohydrate Polymers, 25: 269–276.

YAN, QIAOJUAN; JIANG, ZHENGQIANG; QI, XIAOWEI; HAN, LUJIA., 2007. Method for manufacturing glycoprotein AmPR-10 with ribonuclease activity. Faming Zhuanli Shenqing, CN 1928079 A 20070314.

YANG ZH, MİYAHARA H, HATANAKA A (2011). "Chronic administration of palmitoleic acid reduces insulin resistance and hepatic lipid accumulation in KK-Ay Mice with genetic type 2 diabetes".

YAO, BAO-TAI; ZHAO, JIAN-XIONG; WANG, XUE-XI; LEI, FENG-FENG(2008),. Experimental study on anti-tumor activity of total Hedysarum polybotrys saccharide in vivo. Zhonghua Zhongyiyao Zazhi, 23(7): 627-629.

ZHONG, SHOUMING; YU, HONGWEN., 2007. A botanical drug or dietary supplement for treatment or prevention of liver disorder and quality control methods, application thereof. Brit. UK Pat. Appl. GB 2428974 A 20070214.

ZHOU, Q., JIN, Z. S., ZHANG, D. P., & LI, J., 2006. The effect of radix hedysari polysaccharide improve insulin resistance of type 2 diabetes mellitus rats with high-fat-feed. Journal of Pediatrics of Traditional Chinese Medicine, 2: 24–27.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Fatma TUMBUL
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Şanlıurfa – 08.01.1990
Telefon : 0 544 317 14 44
e-mail : fatmatumbul@hotmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	:Şanlıurfa Lisesi, Merkez, Şanlıurfa	2007
Üniversite	:Harran Ünv. Fen-Eedebiyat Fakültesi Kimya Bölümü	2012
Yüksek Lisans	:Harran Ünv. Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği (Pedagojik Formasyon)	2012
	Harran Ünv.Fen-Eedebiyat Fakültesi Kimya Bölümü (Biyokimya Anabilim Dalı)	2016

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2015	Eyyüp Göncü Anadolu Lisesi	Öğretmen

İLGİ ALANLARI

Okumak, sinema, seyahat, müzik