

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOĞNOZİ ANABİLİM DALI

***TRIFOLIUM PRATENSE* L.'NİN FİTOTERAPİDEKİ ÖNEMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. ONUR KADIOĞLU

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Nurgün ERDEMOĞLU

ANKARA
2008

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOĞNOZİ ANABİLİM DALI

***TRIFOLIUM PRATENSE* L.'NİN FİTOTERAPİDEKİ ÖNEMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. ONUR KADIOĞLU

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Nurgün ERDEMOĞLU

ANKARA
2008

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında yol gösterici olan, değerli bilgilerini benimle paylaşan danışman hocam Doç. Dr. Nurgün Erdemoğlu'na,

Çalışmama verdiği destek ve ilgiden dolayı Prof.Dr.Turhan Baykal'a,

İlgi ve katkıları için Doç.Dr. Ayşegül Güvenç'e,

Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı imkanlarından faydalanarak HPLC analizlerinin yapılmasına olanak sağlayan Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Nilgün Günden Göğer ve Yard. Doç. Dr. Uğur Tamer'e,

Kullanılan bitkisel materyallerin toplanmasında ve teşhisindeki katkılarından dolayı Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Nezaket ADIGÜZEL ve Arş. Gör. Barış BANİ'ye,

Eğitim ve öğrenim hayatımın her aşamasında gösterdikleri fedakarlık, hoşgörü, güven ve destek için sevgili babam Mete Kadioğlu, annem Yıldız Kadioğlu ve kardeşim Gizem Kadioğlu'na,

Gösterdiği sonsuz sevgi, sabır, fedakarlık ve anlayışla hep yanımda olan sevgili eşim Ela Kadioğlu'na,

Ve Biricik Kızım'a

TEŞEKKÜR EDERİM.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Resimler ve Şekiller	IV
Tablolar	VI
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. BOTANİK KISIM	4
2.1.1. Leguminosae Familyası	4
2.1.2. <i>Trifolium</i> L. Cinsi	7
2.1.3. <i>Trifolium pratense</i> L.	8
2.2. KİMYASAL KISIM	13
2.2.1. <i>Trifolium</i> Türlerinin Kimyasal Bileşimi Üzerine Yapılan Çalışmalar	13
2.2.1.1. Fenolik Bileşikler	13
2.2.1.1.1. Basit Fenolik Bileşikler ve Flavonoitler	13
2.2.1.1.2. Kumarinler	25
2.2.1.2. Saponinler	25
2.2.1.3. Siyanogenetik Heterozitler	30
2.2.1.4. Uçucu Bileşikler	31
2.2.1.5. Lipitler	32
2.2.2. İzoflavonoitler	34
2.2.2.1. İzoflavonoitlerin Kimyasal Yapıları	34
2.2.2.2. İzoflavonoitlerin Analiz Yöntemleri	37
2.2.2.3. İzoflavonoitlerin Analizi için Geliştirilen HPLC Sistemleri	39
2.3. <i>Trifolium pratense</i> 'nin Biyolojik Aktiviteleri	40
2.3.1. Östrojenik Etkileri	40
2.3.2. Menopoz Semptomları Üzerine Etkileri	42
2.3.3. Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri	45

2.3.4. Kemoprotektif Etkileri	47
2.3.4.1. Prostat Hiperplazisi ve Prostat Kanseri Üzerine Etkileri	49
2.3.5. Bağışıklık Sistemi Üzerine Etkileri	51
2.3.6. Biyoyararlanım ve Biyotransformasyonu	52
2.3.7. Preparatları	53
2.3.8. Uyarı ve Advers Etkiler	55
2.3.9. Kontraendikasyonları	56
3. GEREÇ ve YÖNTEM	57
3.1. Materyal	57
3.1.1. Bitkisel Materyal	57
3.1.2. HPLC Analizinde Kullanılan Standartlar	58
3.1.3. HPLC cihazı	58
3.1.4. HPLC Analizinde Kullanılan Solvanlar	58
3.2. Yöntemler	59
3.2.1. HPLC Analizi İçin Ekstrelerin Hazırlanması	59
3.2.1.1. Metanol ile ekstraksiyon	59
3.2.1.2. Asit taşıyan metanol ile ekstraksiyon	59
3.2.2. Standart Çözeltilerinin Hazırlanması	60
3.2.3. HPLC Yöntemi	61
4. BULGULAR	62
4.1. Kalibrasyon Eğrileri	62
4.2. HPLC ile Miktar Tayini	68
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	73
6. ÖZET	75
7. SUMMARY	76
8. KAYNAKLAR	77
9. ÖZGEÇMİŞ	86

RESİMLER ve ŞEKİLLER

Resim/Şekil No:	Resim/Şekil Adı:	Sayfa No:
Resim 1	<i>Trifolium pratense</i> L. 1) Genel görünüş, 2) Çiçek, 3) Stilus ve stigma, 4) Stamenler, 5) Ginekeum, 6) Tohum	10
Resim 2	<i>Trifolium pratense</i> L. var. <i>pratense</i> A) Genel görünüş, B) Çiçek	11
Resim 3	<i>Trifolium pratense</i> L. var. <i>sativum</i> Schreb. A) Genel görünüş, B) Çiçek	12
Şekil 1	<i>Trifolium repens</i> çiçeklerinden elde edilen fenolik bileşikler	14
Şekil 2	<i>Trifolium repens</i> çiçeklerinden elde edilen proantosyanidinler	15
Şekil 3	<i>Trifolium repens</i> 'ten izole edilen kalkon ve flavonoitler	16
Şekil 4	<i>Trifolium pratense</i> köklerinden izole edilen izoflavonoitler	17
Şekil 5	<i>T. pratense</i> , <i>T. repens</i> , <i>T. dubium</i> ve <i>T. corniculatus</i> 'dan izole edilen izoflavonoitler	18
Şekil 6	<i>Trifolium pratense</i> ' den izole edilen izoflavonlar	20
Şekil 7	<i>Trifolium pratense</i> 'den izole edilen izoflavonlar ve glukozitler	21
Şekil 8	<i>Trifolium alexandrinum</i> 'dan izole edilen megastigman glikozitleri	23
Şekil 9	<i>Trifolium alexandrinum</i> tohumlarından izole edilen kalkanol glukozitleri	24
Şekil 10	<i>Trifolium resupinatum</i> 'dan izole edilen saponinler ve polar bileşikler	27
Şekil 11	<i>Trifolium alexandrinum</i> 'dan izole edilen triterpenik saponinler I	28

Şekil 12	<i>Trifolium alexandrinum</i> 'dan izole edilen triterpenik saponinler II	29
Şekil 13	Temel flavonoit yapıları	35
Şekil 14	<i>Trifolium. pratense</i> 'den izole edilen başlıca izoflavonoitler	36
Şekil 15	Genistein ve 17 β -östradiol'ün yapısal benzerliği	41
Şekil 16	Standart daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A'nın HPLC kromatogramı	63
Şekil 17	Standart daidzein kalibrasyon grafiği ve doğru denklemi	64
Şekil 18	Standart genistein kalibrasyon grafiği ve doğru denklemi	65
Şekil 19	Standart formononetin kalibrasyon grafiği ve doğru denklemi	66
Şekil 20	Standart biokanin A kalibrasyon grafiği ve doğru denklemi	67
Şekil 21	<i>Trifolium pratense</i> var. <i>pratense</i> E ₁ ekstresinin HPLC kromatogramı	69
Şekil 22	<i>Trifolium pratense</i> var. <i>pratense</i> E ₂ ekstresinin HPLC kromatogramı	70
Şekil 23	<i>Trifolium pratense</i> var. <i>sativum</i> E ₁ ekstresinin HPLC kromatogramı	71
Şekil 24	<i>Trifolium pratense</i> var. <i>sativum</i> E ₂ ekstresinin HPLC kromatogramı	72

TABLÖLAR

Tablo No:	Tablo Adı:	Sayfa No:
1	İzoflavonoitlerin Analizi için Geliştirilen HPLC Sistemleri	39
2	Postmenopozlu kadınlarda Promensil'in plasebo-kontrollü klinik çalışmaları	44
3	HPLC analizinde uygulanan gradient elüsyon	61
4	Kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında daidzein için kullanılan pik alanları	64
5	Kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında genistein için kullanılan pik alanları	65
6	Kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında formononetin için kullanılan pik alanları	66
7	Kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında biokanin A için kullanılan pik alanları	67
8	<i>Trifolium pratense</i> var. <i>pratense</i> ve <i>Trifolium pratense</i> var. <i>sativum</i> ekstralarında % daidzein, genistein formononetin ve biokanin A miktarları	68

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Trifolium pratense L. (Fabaceae) Avrupa ve Asya'da geniş yayılışlı olup, Kuzey Amerika ve Avustralya'da da kültürü yapılan bir bitkidir. Amerikan yerlileri tarafından, çiçeklerinin beslenme amaçlı ve merhem şeklinde haricen yaralarda ve cilt hastalıklarında kullanıldığı kayıtlıdır. Haricen, psöriazis ve ekzema gibi kronik cilt hastalıklarında *Arctium lappa*, *Rumex crispus* gibi diğer bitkilerle birlikte kullanılmaktadır. Ayrıca çiçeklerinin dahilen solunum yolları rahatsızlıklarında ekspektoran etkisinden dolayı kullanıldığı da bildirilmiştir¹⁻³.

Fabaceae familyasındaki bitkilerin büyük bir kısmı insanlar ve hayvanlar için gıda maddesi olarak kullanılmakta, bir çoğu da süs bitkisi olarak yetiştirilmektedir. Ülkemizde genel olarak "yonca" Türkçe adıyla bilinen *Trifolium* türleri halk arasında tıbbi amaçlarla da kullanılmaktadır. *T. arvense* bitkisinin kabız, *T. pratense* (kırmızı yonca, çayır tırfılı, çayır dutu) çiçeklerinin balgam söktürücü, antiseptik, yatıştırıcı, *T. repens* (beyaz yonca) çiçekli dallarının kuvvet verici, romatizma ağrılarını dindirici olarak kullanımları kayıtlıdır. Ayrıca, *T. pratense* ve *T. ambiguum*'un çiçek durumları Erzurum, Kars yöresinde yenmekte, *T. repens* ve *T. nigrescens* ise hayvan yemi olarak yetiştirilmektedir⁴.

Vücutta östrojen eksikliğine bağlı olarak ortaya çıkan menopoz şikayetleri, kemik yoğunluğunun azalması, sıcak basması, terleme, huzursuzluk gibi tipik belirtilere yol açar. Sentetik östrojenlerle yapılan hormon replasman tedavisinin (HRT) meme ve endometrium kanseri, yanısıra kardiyovasküler hastalıkların oluşma riskini arttırdığı bilinmektedir. Bu nedenle alternatif tedavi yöntemleri araştırılmaya devam edilmektedir. Polisiklik, non-steroidal yapıda, yapısal ve fonksiyonel olarak memeli östrojenini taklit eden, östrojen benzeri biyolojik aktivitelere sahip olan "fitoöstrojenler" olarak bilinen bileşikleri taşıyan bitki ekstraktları, bugün

HRT'de menopozal şikayetleri gidermek üzere yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, fitoöstrojenlerin kanser, kalp hastalıkları ve osteoporoz'un önlenmesinde önemli etkilerinin olduğu bildirilmiştir (6-8,22). Soyanın 5000 yıldır bilindiği ve sürekli tüketildiği Asya ülkelerinde, meme kanseri, prostat kanseri, osteoporoz ve menopoz semptomları görülme sıklığı, batı ülkeleri ile karşılaştırıldığında, belirgin bir şekilde azdır. Soya tüketimi ve kanser görülme sıklığı arasındaki bu ilişkiyi ortaya çıkaran çalışmaları takiben, daidzein, genistein gibi soya ve soya ürünlerinde bulunan izoflavonlar üzerinde pek çok epidemiyolojik çalışma yapılmıştır^{5,6}.

Trifolium pratense (Red clover) östrojenik etkiden sorumlu izoflavonoidler ve bunların glikozitleri bakımından oldukça zengindir. *T. pratense* üzerine yapılan klinik çalışmalarda bitkinin yaprak, çiçek veya toprak üstü kısımlarından hazırlanan standart ekstraktlar kullanılmıştır. Bu ekstraktlar benzer bileşimde olup, başlıca biokanin A ve formononetin ile daha az oranda genistein ve daidzein içerirler. Bugün tüm dünyada *T. pratense*'nin izoflavon ekstraktlarını ihtiva eden preparatlar menopozal şikayetleri gidermek amacıyla kullanılmaktadır^{2,3}.

Ülkemiz florasında *Trifolium* cinsi 96 tür, 4 alttür ve 39 varyete ile temsil edilmektedir⁷⁻⁹. Bu türlerden çalışma konumuzu teşkil eden *T. pratense*, çok değişken bir türdür ve memleketimizde 3 varyetesi bulunmaktadır⁷. Bu çalışmada iki farklı bölgeden toplanan *T. pratense* var. *pratense* ve *T. pratense* var. *sativum*'un toprak üstü kısımlarında daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A'nın HPLC ile miktarlarının belirlenmesi ve böylece izoflavonları bakımından Türkiye'de daha önce üzerinde çalışma yapılmamış olan *T. pratense*'nin bu açıdan değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

“*Trifolium pratense* L.’nin Fitoterapideki Önemi” isimli çalışmamıza ait teorik bilgiler, bitkinin ait olduğu familya ve genusa ait bilgilerin verildiği ve bitkinin morfolojik özelliklerinin açıklandığı Botanik Kısım ile kimyasal ve biyolojik aktivite tayinlerine yönelik araştırmaların yer aldığı Kimyasal Kısım başlıkları altında toplanmıştır.

Trifolium türleri üzerine bugüne kadar yapılan araştırmalar sonucunda elde edilen bileşikler kimyasal gruplarına göre sınıflandırılarak verilmiştir. Bu bölümü, *Trifolium* türlerinin biyolojik aktivitelerinin yer aldığı çalışmalar izlemektedir.

2.1. Botanik Kısım

Trifolium pratense L.'nin sistematikteki yeri⁷

Bölüm:	Spermatophyta
Altbölüm:	Angiospermae
Sınıf:	Dicotyledonae
Altsınıf:	Dialypetalae
Takım:	Fabales
Familya:	Leguminosae
Alt familya:	Papilionoideae
Tribus:	Trifoliae
Cins:	<i>Trifolium</i> L.
Section:	<i>Trifolium</i>
Tür:	<i>Trifolium pratense</i> L.

2.1.1. Leguminosae Familyası (Baklagiller)

Leguminosae familyası, çiçekli bitkiler arasında Compositae'den sonra gelen ikinci büyük familyadır. Aralarında kserofitler ve suda yaşayanlar da bulunur. Tropik, subtropik ve ılıman iklim kuşağında yaygın olan bu familya yaklaşık olarak 600 cins ve 13000 kadar tür bulunur ve bir kısmından önemli droglar elde edilir¹⁰⁻¹².

Birçok Leguminosae bitkisinde karakteristik bir özellik olarak, *Rhizobium* türü bakteri nodülleri bulunur. Bu bakteri havadaki azotu alıp diğer azotlu bileşiklere dönüştürme yeteneğini taşır. Bu nedenle fakir toprakları kuvvetlendirmek amacıyla bu familya bitkilerinden yararlanılır^{3,10}.

Famalya bitkileri çok geniş yayılışlı, ot, çalı, küçük ya da bk a şeklinedir, aralarında tırmanıcı olanlar da bulunur. Yapraklar alternan dizilişli, genellikle stipulalı, pennat, digitat, trifoliat veya basittir. Çiçekler aktinomorf veya zigomorf, genellikle hermafrodit, rasemus, spika veya umbella iek durumlu veya tek çiçeklidir. Sepaller (4-) 5. Petaller (1-) 5, serbest veya nadiren kısmi olarak birleşiktir. Stamenler 4-çok sayıda, genellikle 10, ya hepsi tüp şeklinde birleşik (monodelf) veya st stamen serbest (diadelf) yada hepsi serbesttir. Karpel 1, nadiren birkaç, st durumlu, meyve legmen, bazen lomentum. Tohum 1-çok sayıda¹³.

Leguminosae famlyası bitkileri  alt famlyaya altında toplanır. En zengin olan Papilionoideae (Papilionaceae; Fabaceae) 400 kadar cins, Mimosoideae (Mimosaceae) 50 kadar cins ve Caesalpinioideae (Caesalpiniaceae) 150 kadar cinsi kapsar. Bu alt famlyalar çok geniş olduklarından birer famlyaya olarak da kabul edilir¹⁰⁻¹².

1) Caesalpinioideae (Syn: Caesalpiniaceae): Çoğunlukla odunlu bitkilerdir. Yapraklar imparipinnat, bazen bipennat veya basittir. Çiçekler zigomorf. Petaller tomurcukta yükselici-imbrikat (kiremit) dizili, nadiren petalsız. Stamenler serbest, 5-10 adet. Meyve legmen veya lomentum^{11,13}.

2) Mimosoideae (Syn: Mimosaceae): Çoğunlukla odunlu bitkilerdir. Yapraklar bipennat veya fillodik. Çiçekler aktinomorf. Petaller tomurcukta valvat dizilişli. Stamenler serbest, 4-çok sayıda. Meyve legmen^{11,13}.

3) Papilionoideae (Syn: Papilionaceae; Fabaceae): Bu alt famlyaya bitkilerinin en çarpıcı özelliği çiçeklerinin zigomorf oluşu ve kelebeğe benzemesidir. Geniş yayılış ve değişik hayat formu gösteren bitkilerin, tropiklerde yetişenleri çoğunlukla odunsu, diğerleri ise otsudur.

Yapraklar paripennat, imparipennat, digitat, trifoliat veya tek. Çiçekler zigomorf. Kaliks gamosepal ve 5 lobludur. Korollanın 5 petalinden üçü serbest, ikisi birleşiktir. Şekil bakımından birbirine benzemeyen petaller değişik isimlerle açılırlar. Üstte bulunan petal büyük ve diktir, veksillum (bayrakçık) adını taşır; iki yanda bulunan petaller kanada benzediği için ala (kanatçık) adı verilmiştir; altta bulunan birleşmiş olan iki petal kayığa benzer ve karina (kayıkçık) denir. Tomurcuktayken karinayı kanatlar örter, veksillum da hepsini sarmış durumdadır. Korolla nadiren tek bir veksillum indirgenmiştir. Stamenler (5-)10, monodelf veya diadelf, nadiren serbest. Ovaryum bir karpelden yapılmış, 1 gözlü, tek veya çok ovüllü; meyve legumen veya lomentumdur; legumen meyveler orta damar ve ventral dikiş boyunca açılır^{11,13}.

Yurdumuzda 70 kadar cins ve 1000 kadar tür yetişir. Drog veren bitkiler bakımından da zengin bir altfamilyadır. Yaygın cinsler: *Astragalus* L., *Vicia* L., *Lathyrus* L., *Trifolium* L., *Coronilla* L., *Melilotus* L.^{11,13}.

2.1.2 *Trifolium* L. Cinsi

Bir veya çok yıllık bitkilerdir. Yapraklar trifoliat veya nadiren 5-9 yaprakçıklı digitat, genellikle kenarları dentat. Stipulalar belirgin, petiole yapışık. Çiçekler sapsız veya saplı başçıklarda ya da kısa rasemus, nadiren tek, brakteli veya braktesiz. Kaliks değişken, bazen şişkin, kaliks boğazı açık veya kapalı; kaliks dişleri birbirine eşit veya farklı uzunlukta. Korolla pembe, kırmızıdan eflatuna kadar, beyaz veya sarı. Stamenler diadelf. Meyve genellikle kaliksin içinde, 1-2(-10) tohumlu⁷.

Trifolium genusu her iki yarıkürenin subtropikal ve ılıman bölgelerinde 250-300 kadar tür ile yayılış göstermektedir^{12,14}. Bu türlerden *T. pratense* L., *T. repens* L., *T. incarnatum* L., *T. resupinatum* L., *T. hybridum* L., *T. pannonicum* Jacq., *T. subterraneum* L., *T. fragiferum* L. ve *T. medium*'un L. hayvan yemi olarak kültürü yapılmaktadır¹⁴.

Türkiye Florasının tür sayısı bakımından 9. zengin cinsidir. Ülkemizde doğal olarak yetişen 96 tür, 4 alttür, 39 varyete bulunmaktadır. Toplam takson sayısı 120 olan cins, 11 endemik türe sahiptir⁷⁻⁹.

2.1.3. *Trifolium pratense* L.

Çok yıllık bitkiler. Yapraklar obovattan genişçe eliptike kadar, 1.5-3 cm boyutunda. Çiçek durumu küre şeklinden yumurta şekline kadar. Kaliks 10 damarlı, tüylü; kaliks tüpünün boğazı halka şeklinde tüylü. Korolla kırmızımsı eflatundan pembeye kadar, nadiren beyaz, 13-18 mm. Çiçeklenme dönemi Mayıs-Eylül ayları arasındır. Deniz seviyesinden 2300 m'ye kadar olan yerlerde, çayırlar, orman açıklıkları ve yol kenarlarında yetişir⁷.

T. pratense çok değişken bir türdür. Her üç varyetenin genellikle Kuzey ılıman bölgelerde geniş ölçüde hayvan yemi olarak kültürü yapılmaktadır. *T. pratense*'nin ülkemizde 3 varyetesi bulunmaktadır⁷.

Tür Tayin Anahtarı⁷ :

1. Gövde genellikle 20-40 cm, yoğun tüylü; yaprakçıklar 1.5-3.0 cm
var. *pratense*
1. Gövde 40-70 nadiren 100 cm, belirgin tüylü veya tüysüz; yaprakçıklar 3-5 cm
 2. Gövde tüylü; korolla koyu kırmızı **var. *americanum***
 2. Gövde tüysüz; korolla genellikle pembe **var. *sativum***

Trifolium pratense* L. var. *pratense

Kuzey yarıkürenin ılıman bölgelerinde geniş yayılışlı bir taksondur, geniş olarak ta kültürü yapılır. Ülkemizde Kuzey, İç ve Doğu Anadolu'da yayılış gösterir⁷.

***Trifolium pratense* L. var. *americanum* Harz**

Kuzey Amerika'dan Avrupa'ya kadar çok geniş bir alanda kültürü yapılır. Ülkemizde Kuzeydoğu ve Doğu Anadolu'da yayılış göstermektedir⁷.

***Trifolium pratense* L. var. *sativum* Schreb.**

Kuzey yarıkürede en yaygın kültürü yapılan varyetedir. Ülkemizde Kuzey Anadolu'da yayılış gösterir⁷.



Resim 1: *Trifolium pratense* L. 1) Genel görünüş, 2) Çiçek, 3) Stilus ve stigma, 4) Stamenler, 5) Ginekeum, 6) Tohum



A



B

Resim 2: *Trifolium pratense* L. var. *pratense* A) Genel görünüş, B) Çiçek



A



B

Resim 3: *Trifolium pratense* L. var. *sativum* Schreb. A) Genel görünüş, B) Çiçek

2.2. Kimyasal Kısım

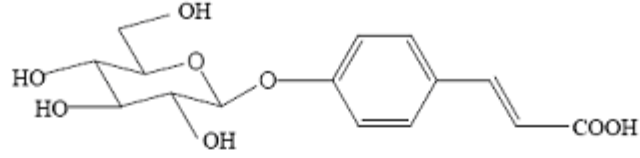
2.2.1. *Trifolium* Türlerinin Kimyasal Bileşimi Üzerine Yapılan Çalışmalar

Trifolium genusu üzerindeki kimyasal çalışmalar genellikle fenolik bileşikler ve saponinler üzerinde yoğunlaşmıştır. Birçok *Trifolium* türünden bugüne kadar fenolik bileşik olarak; basit fenolik bileşikler, başlıca izoflavonoitler olmak üzere çeşitli flavonoit türevi bileşikler ve kumarinler izole edilmiştir. Genusun taşıdığı saponinler ise genellikle oleanan tipinde triterpenik bileşiklerdir. Bu bileşikler yanında *Trifolium* türlerinden siyanogenetik heterozitler, megastigman glikozitleri, çeşitli uçucu bileşikler ve lipitler tespit edilmiştir.

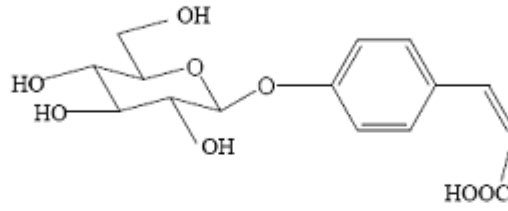
2.2.1.1. Fenolik Bileşikler

2.2.1.1.1. Basit Fenolik Bileşikler ve Flavonoitler

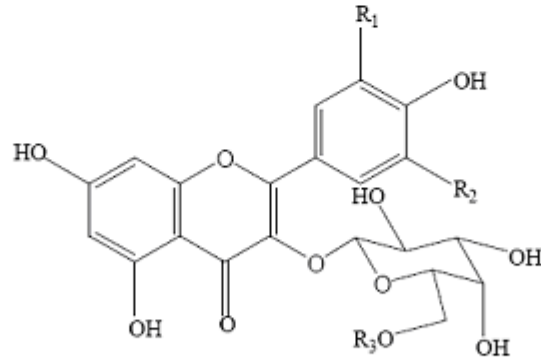
T. repens çiçeklerinden fenolik bileşik yapısında cis- ve trans-*p*-kumarik asit 4-O- β -D-glukopiranozit izole edilmiştir. Bu bileşikler yanında flavonoit yapısında; bilinen bileşikler olarak mirisetin 3-O- β -D-galaktopiranozit, kersetin 3-O- β -D-galaktopiranozit ve kemferol 3-O- β -D-galaktopiranozit, yeni bileşikler olarak mirisetin 3-O-(6"-asetil)- β -D-galaktopiranozit ve kemferol 3-O-(6"-asetil)- β -D-galaktopiranozit elde edilmiştir (Şekil 1). Ayrıca çiçeklerden gallokateşin, epigallokateşin, gallokateşin-(4 α -8)-epigallokateşin ve bu bileşiklerin polimerleri de izole edilerek yapıları spektral tekniklerle aydınlatılmıştır (Şekil 2)¹⁵.



trans-p-kumarik asit 4-O- β -D-glukopiranozit

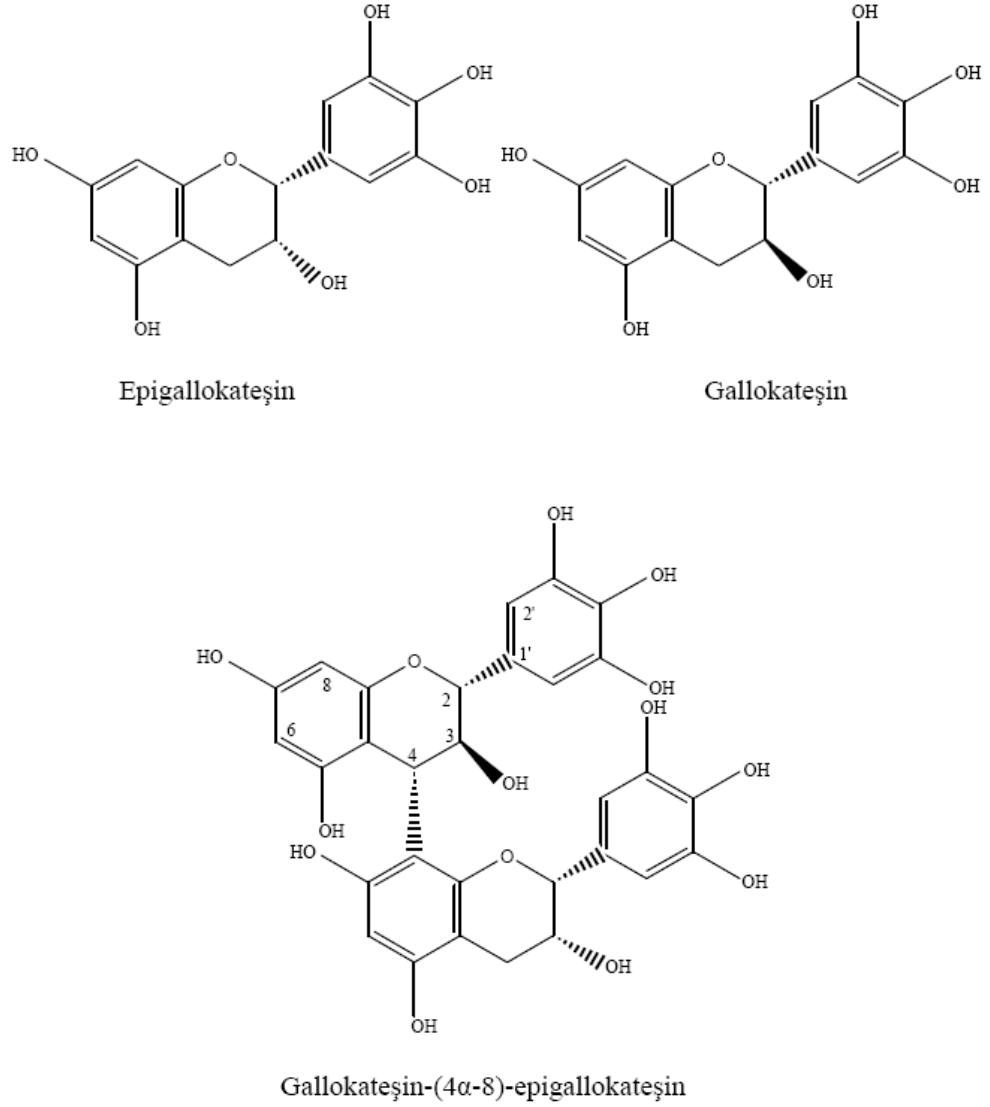


cis-p-kumarik asit 4-O- β -D-glukopiranozit



- 1: $R_1 = R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{H}$ (Mirisetin 3-O- β -D-Galaktopiranozit)
- 2: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = R_3 = \text{H}$ (Kersetin 3-O- β -D-Galaktopiranozit)
- 3: $R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$ (Kemferol 3-O- β -D-galaktopiranozit)
- 4: $R_1 = R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{COCH}_3$ (Mirisetin 3-O-(6"-asetil)- β -D-galaktopiranozit)
- 5: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{COCH}_3$ (Kersetin 3-O-(6"-asetil)- β -D-galaktopiranozit)
- 6: $R_1 = R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{COCH}_3$ (Kemferol 3-O-(6"-asetil)- β -D-galaktopiranozit)

Şekil 1: *Trifolium repens* çiçeklerinden izole edilen fenolik bileşikler

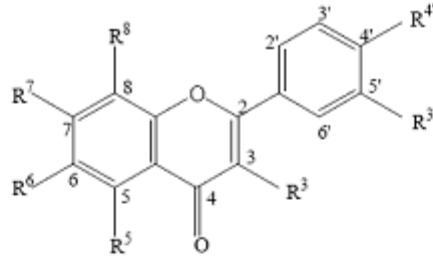


Şekil 2: *Trifolium repens* çiçeklerinden izole edilen proantosiyadinler

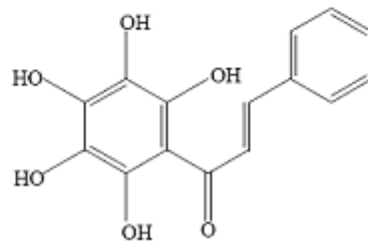
Oleszek ve ark. tarafından 57 *Trifolium* türünün tohumlarında flavonoitleri üzerine yapılan bir çalışmada, bu türlerin hepsinin flavonoit türevi bileşikleri taşıdığı belirtilmiştir¹⁶.

T. repens bitkisinin filizleri ve köklerinden çeşitli flavon türevi bileşikler; 4',5,6,7,8-pentahidroksi-3-metoksiflavon, 5,6,7,8-tetrahidroksi-3-metoksiflavon, 3,7-dihidroksi-4'-metoksiflavon, 5,6,7,8-tetrahidroksi-4'-metoksiflavon, 3,5,6,7,8-pentahidroksi-4'-metoksiflavon ve 2',3',4',5',6'-

pentahidroksikalkon, 6-hidroksikemferol, 4',5,6,7,8-penta-hidroksiflavon ve 3,4'-dimetoksikemferol elde edilmiştir (Şekil 3). Ekstrelerin analizi sonucunda bitkinin yetiştirme koşullarına göre flavonoit içeriğinin farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Kersetin, akasetin ve ramnetin fungus olarak *Glomus intraradices* ile inokule edilmiş bitkilerin köklerinde birikirken, bu bileşiklere aynı fungus ile inoküle edilmemiş bitkilerde rastlanmamıştır¹⁷.



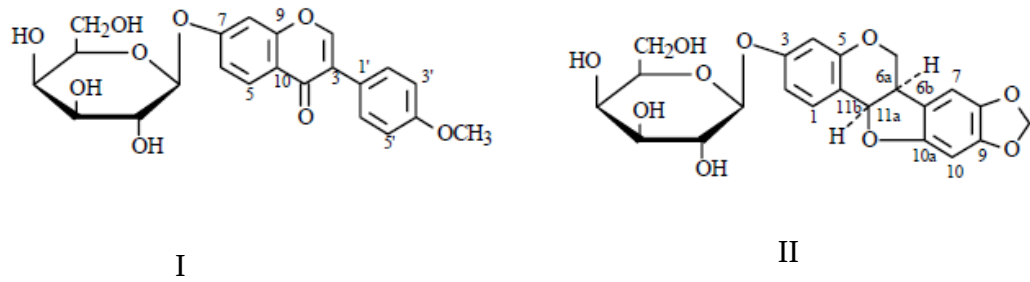
Bileşik	R ³	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸	R ^{3'}	R ^{4'}
4',5,6,7,8-pentahidroksi-3-metoksiflavon	OCH ₃	OH	OH	OH	OH	H	OH
3,5,6,7,8-pentahidroksi-4'-metoksiflavon	OH	OH	OH	OH	OH	H	OCH ₃
3,7-dihidroksi-4'-metoksiflavon	OH	H	H	OH	H	H	OCH ₃
5,6,7,8-tetrahidroksi4'-metoksiflavon	H	OH	OH	OH	OH	H	OCH ₃
6-hidroksikemferol	OH	OH	OH	OH	H	H	OH
5,6,7,8-tetrahidroksi-3-metoksiflavon	OCH ₃	OH	OH	OH	OH	H	H
4',5,6,7,8-pentahidroksiflavon	H	OH	OH	OH	OH	H	OH
3,4'dimetoksikemferol	OCH ₃	OH	H	OH	H	H	OCH ₃
Kersetin	OH	OH	H	OH	H	OH	OH
Akasetin	H	OH	H	OH	H	H	OCH ₃
Ramnetin	OH	OH	H	OCH ₃	H	OH	OH



2', 3', 4', 5', 6'-pentahidroksi-kalkon

Şekil 3: *Trifolium repens*' ten izole edilen kalkon ve flavonoitler

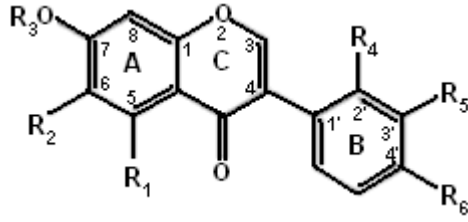
Son yıllarda yapılan bir çalışmada, *T. pratense* köklerinden formononetin ve iki yeni izoflavonoit glikoziti, formononetin-7-O-β-D-galaktopiranozit (I) ve inermin-3-O-β-D-galaktopiranozit (II) izole edilmiştir (Şekil 4)¹⁸.



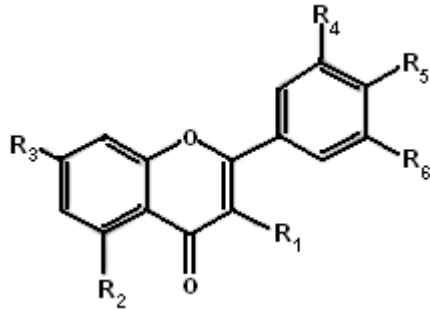
Şekil 4: *Trifolium pratense* köklerinden izole edilen izoflavonoitler

T. pratense'den 7-β-D-glikozil-5,7-dihidroksi-4'-metoksiisoflavon ve bu bileşiğin 5-malonat türevinin varlığı tespit edilmiştir¹⁹. *T. pannocinum*'un yapraklarından flavonoit glikozitleri olarak, apigenin-7-O-glikozit, luteolin-7-O-glikozit ve genistin izole edilmiştir²⁰. *T. repens*'den yeni bir açilli izoflavon türevi bileşik olarak, genistein 7-(2''-p-kumaroilglukozit) izole edilmiştir²¹.

T. pratense, *T. repens*, *T. dubium* ve *T. corniculatus*'un taşıdığı flavonoitleri belirlemek amacıyla, bitkilerin yapraklarından hareketle metanollü ekstreleri hazırlanmış ve bu ekstreler C-18 ters faz kolonlarda, sıvı kromatografi (Liquid Chromatography, LC) uygulanarak incelenmiştir. Bileşikler diot array (DA) UV absorbans, floresans, kütle spektrometresi kullanılarak üç farklı modda analiz edilmiştir. Bitkilerde varlığı tespit edilen flavonoit ve izoflavonoit türevi bileşikler aşağıda verilmiştir (Şekil 5)²².



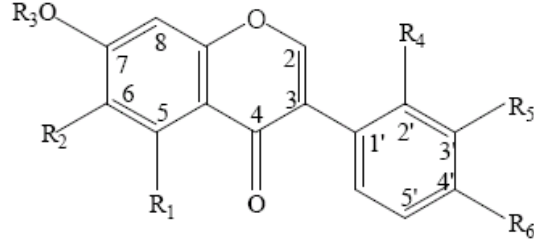
İzoflavon	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Afrormosin	H	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃
Biokanin A	OH	H	H	H	H	OCH ₃
Kalikosin	H	H	H	H	OH	OCH ₃
Daidzein	H	H	H	H	H	OH
Formononetin	H	H	H	H	H	OCH ₃
Genistein	OH	H	H	H	H	OH
Glisetin	H	OCH ₃	H	H	OH	OH
İrilin B	OH	OCH ₃	H	OH	H	H
İrilon	OH	O-	CH ₂ -	H	H	OH
3-Metillorobol	OH	H	H	H	OCH ₃	OH
Pratensein	OH	H	OH	H	OH	OCH ₃
Psödobaptigenin	H	H	H	H	O-	OCH ₂ -
Teksasin	H	OH	H	H	H	OCH ₃



Flavon	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Hesperidin	H	OH	7-O-B-D-Glupyr	OH	OCH ₃	H
Hesperitin	H	OH	OH	OH	OCH ₃	H
Naringin	H	OH	7-O-B-D-Glupyr	H	OH	H
Naringenin-7-glukozit	H	OH	7-O-B-D-Glupyr	H	OH	H
Naringenin	H	OH	OH	H	OH	H
Rutin trihydrate	7-O-B-D-Glupyr	OH	OH	OH	OH	H
Kemferol	OH	OH	OH	H	OH	H
Kersetin	OH	OH	OH	OH	OH	H
Mirisetin	OH	OH	OH	OH	OH	OH
İzoramnetin	OH	OH	OH	OCH ₃	OH	H

Şekil 5: *T. pratense*, *T. repens*, *T. dubium* ve *T. corniculatus*'dan izole edilen izoflavonoitler

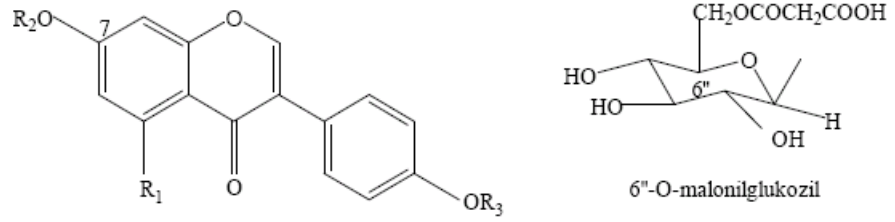
Bir başka çalışmada *T. pratense*'nin topraküstü kısımlarından katı-faz ekstraksiyon (solid-phase extraction) metodu ile hazırlanan ekstraktlerde, C-18 ters faz kolonlar kullanılarak LC-MS tekniği ile 14 izoflavon malonat glikoziti ve 6 izoflavon asetil glikozitinin tespiti yapılmıştır (Şekil 6)²³.



Bileşik	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Daidzin	H	H	Glc	H	H	OH
Glisetin-7-O-B-D-Glc	H	OCH ₃	Glc	H	H	OH
Kalkosin-7-O-B-D-Glc	H	H	Glc	H	OH	OCH ₃
Genistin	OH	H	Glc	H	H	OH
Daidzein-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	H	H	Glc-Mal	H	H	OH
3-Metilorobol-7-O-B-D-Glc	OH	H	Glc	H	OCH ₃	OH
Prateasin-7-O-B-D-Glc	OH	H	Glc	H	OH	OCH ₃
Kalkosin-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	H	H	Glc-Mal	H	OH	OCH ₃
Pseudobaptigenin-7-O-B-D-Glc	H	H	Glc	H	O-	OCH ₂ -
Daidzein-7-O-B-D-Glc-6"-O-Asetat	H	H	Glc-O-Ac	H	H	OH
Ononin	H	H	Glc	H	H	OCH ₃
Genistein-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	OH	H	Glc-Mal	H	H	OH
Orobo-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	OH	H	Glc	H	OH	OH
3-Metilorobol-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	OH	H	Glc-Mal	H	OCH ₃	OH
Prateasin-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	OH	H	Glc-Mal	H	OH	OCH ₃
Daidzein	H	H	H	H	H	OH
İrilon-4'-O-7-O-B-D-Glc	OH	O-	CH ₃	H	H	Glc
Pseudobaptigenin-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	H	H	Glc-Mal	H	O-	OCH ₂ -
Glistein	H	OCH ₃	H	H	H	OH
Orobo	OH	H	H	H	OH	OH
Formononetin-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	H	H	Glc-Mal	H	H	OCH ₃
Afromosin-7-O-B-D-Glc	H	OCH ₃	Glc	H	H	OCH ₃
Sissotrin(Biokanin A-7-O-B-D-Glc)	OH	H	Glc	H	H	OCH ₃
İrilin B-7-O-B-D-Glc	OH	OCH ₃	Glc	OH	H	H
İrilon-4'-O-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	OH	O-	CH ₂ -	H	H	Glc-Mal
Trifosid	OH	H	CH ₃	H	H	Glc
Pseudobaptigenin-7-O-B-D-Glc-6"-O-Asetat	H	H	Glc-O-Ac	H	O-	OCH ₂ -
Formononetin-7-O-B-D-Glc-6"-O-Asetat	H	H	Glc-O-Ac	H	H	OCH ₃
Teksasin-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	H	OH	Glc-Mal	H	H	OCH ₃
İrilin B-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	OH	OCH ₃	Glc-Mal	OH	H	H
3'-Metilorobol	OH	H	H	H	OCH ₃	OH
Genistein	OH	H	H	H	H	OH
Biokanin A-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	OH	H	Glc-Mal	H	H	OCH ₃
Pratensein	OH	H	OH	H	OH	OCH ₃
Prunetin-4'-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	OH	H	CH ₃	H	H	Glc-Mal
Pseudobaptigenin	H	H	H	H	O-	OCH ₂ -
İrilon-4'-O-B-D-Glc-6"-O-Asetat	OH	O-	CH ₂ -	H	H	Glc-O-Ac
Formononetin	H	H	H	H	H	OCH ₃
Prunetin-4'-O-B-D-Glc-6"-O-Asetat	OH	H	CH ₃	H	H	Glc-O-Ac
Biokanin A-7-O-B-D-Glc-6"-O-Asetat	OH	H	Glc-O-Ac	H	H	OCH ₃
İrilon	OH	O-	CH ₂ -	H	H	OH
Biokanin A	OH	H	H	H	H	OCH ₃

Şekil 6: *Trifolium pratense*' den izole edilen izoflavonlar

Diğer bir çalışmada *T. pratense* yapraklarının izoflavonlar, glukozitleri ve glukozit malonatlarını taşıdığı tespit edilmiştir (Şekil 7)²⁴.

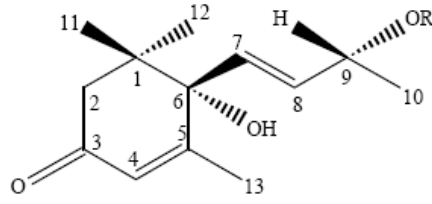


Bileşik	R ₁	R ₂	R ₃
Daidzein	H	H	H
Daidzin	H	7-O-β-D-glc	H
Genistein	OH	H	H
Genistin	OH	7-O-β-D-glc	H
Formononetin	H	H	CH ₃
Ononin	H	7-O-β-D-glc	CH ₃
Formononetin-7-O- B-D-Glc-6''-O-Mal	H	7-O-β-D-glc-6''-O-mal	CH ₃
Biyokanin A	OH	H	CH ₃
Sissotrin	OH	glc	CH ₃
Bivokanin A -7-O-B-D-Glc-6''-O-Mal	OH	7-O-β-D-glc-6''-O-mal	CH ₃

Şekil 7: *Trifolium pratense*'den izole edilen izoflavonlar ve glukozitler

T. alexandrinum tohumlarından kersetin, kersitrin ve yeni bir flavanonol türevi bileşik olarak 6'-hidroksimetil-2*R*,3*R*-trans-dihidrokersetin (trifoleksin) izole edilmiştir. Bileşiklerin yapıları spektroskopik metotlarla aydınlatılmıştır²⁵.

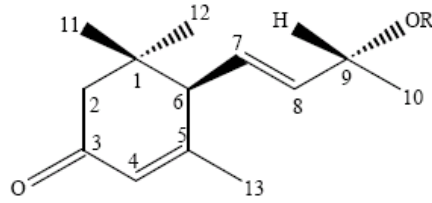
T. alexandrinum bitkisinin tohumlarından megastigman glikoziti yapısında 5 bileşik izole edilmiş ve yapıları spektral tekniklerle aydınlatılmıştır. Bu bileşiklerden iki tanesi bilinen yapılar; (6*S*, 7*E*, 9*R*)-6,9-dihidroksimegastigma-4,7-dien-3-on-9-O-β-D-glukopiranozit (roseozit) ve (6*R*, 7*E*, 9*R*)-9-dihidroksimegastigma-4,7-dien-3-on-9-O-β-D-glukopiranozit'tir. Diğer 3 bileşik şeker grubu olarak apiofuranozil-(1→2)-glukopiranozil taşıyan yeni bileşikler olup, trifostigmanozit I-III olarak isimlendirilmişlerdir (Şekil 8)²⁶.



1: R= Glc (Roseosid)

1a: R= H

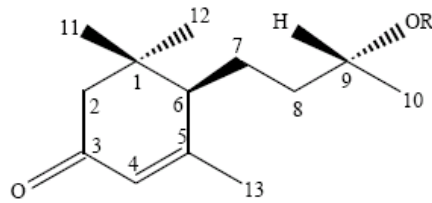
3: R= Glc⁻² Api (trifostigmanosid I)



2: R= Glc (Roseosid)

2a: R= H

4: R= Glc⁻² Api (trifostigmanosid II)

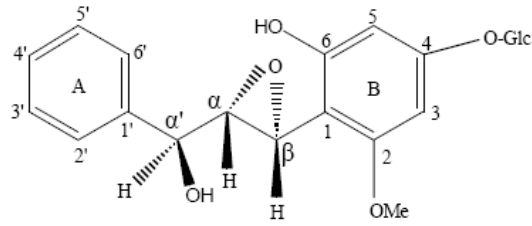


5: R= Glc⁻² Api (trifostigmanosid III)

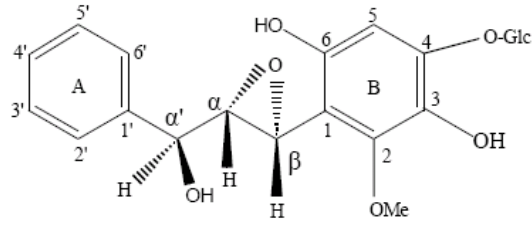
5a: R= H

Şekil 8: *Trifolium alexandrinum*'dan izole edilen megastigman glikozitleri

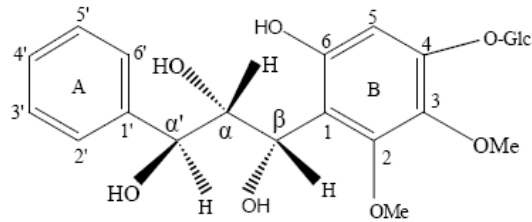
T. alexandrium tohumlarından 3 kalkanol glikoziti izole edilmiştir. Bunlardan ikisi α' -kalkanol- α,β -epoksitleri ve üçüncüsü de α,β -dihidroksi- α' -kalkanol (Şekil 9)'dür. İzole edilen bileşiklerin yapıları spektral analizleri ile aydınlatılmıştır²⁷.



2-metoksi-4,6-dihidroksi- α' -kalkanol- α,β -epoksit-4-O- β -D-glukopiranozid



2-metoksi-3, 4, 6-trihidroksi- α' -kalkanol- α,β -epoksit-4-O- β -D-glukopiranozid



2,3-dimetoksi-4,6, - α,β -tetrahidroksi- α' -kalkanol-4-O- β -D-glukopiranozid

Şekil 9: *Trifolium alexandrinum* tohumlarından izole edilen kalkanol glukozitleri

2.2.1.1.2. Kumarinler

Bazı *Trifolium* türlerinin kumarin içeriği üzerine yapılan bir çalışmada, *T. pratense*, *T. repens*, *T. alpestre*, *T. arvense*, *T. montanum* ve *T. spadiceum*'un sırasıyla % 0.217, 0.337, 0.185, 0.152, 0.173 ve 0.75 oranlarında hidroksi kumarinleri taşıdığı saptanmıştır²⁸.

T. repens'ten kumarin türevi bileşik olarak bikumol (7,7'-dihidroksi-6,8'-bikumarinil) izole edilerek yapısı spektral tekniklerle aydınlatılmıştır. Ayrıca bitkide umbelliferon (7-hidroksikumarin) varlığı da bildirilmiştir²⁹. Yine aynı bitkiden dafnoretin³⁰ ve kumestrol 6',7'-dihidroksibenzofuro [3',2',4] kumarin³¹ izole edilmiştir. *T. repens*'in topraküstü kısımlarının etanollü ekstresinden repensin A ve B olarak adlandırılan iki yeni bikumarin izole edilmiştir³².

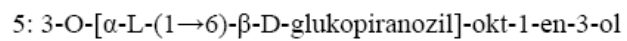
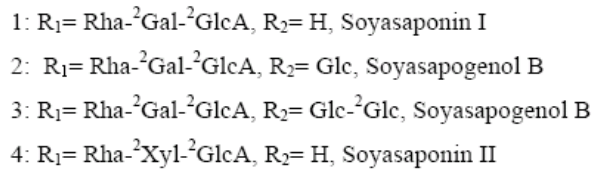
2.2.1.2. Saponinler

T. pratense L. köklerinden asit hidroliz neticesinde triterpen saponin yapısında soyasapogenol B, C, D, E ve F izole edilmiştir³³. *T. repens* L. toprak üstü kısımlarından triterpen saponin yapısında beş bileşik, kloversaponin I-V, bunun yanında 4 bilinen saponin; β -D-glukuronopiranozil soyasapogenol B, soyasaponin I, soyasaponin II ve azukisaponin II ile bu bileşiklerin metil esterleri izole edilmiştir³⁴. Aynı bitki üzerinde Zhan ve ark. tarafından yapılan bir başka fitokimyasal çalışmada, triterpen yapısında, daukosterol, soyasapogenol B, soyasaponin I, azukisaponin V, ve bu bileşikler yanında 9,10-antrasenedion ve üridin izole edilmiştir³⁵. *T. incarnatum* tohumlarından 3-O-[α -L-ramnopiranozil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-galaktopiranozil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glukuronopiranozil]-22-O-[β -D-glukopiranozil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glukopiranozil]olean-12-en-24-ol, 3-O-(β -D-

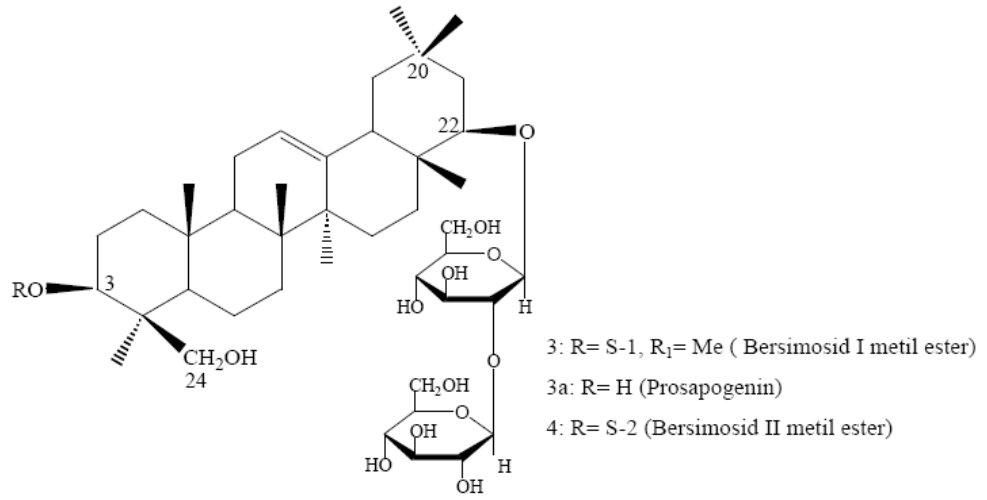
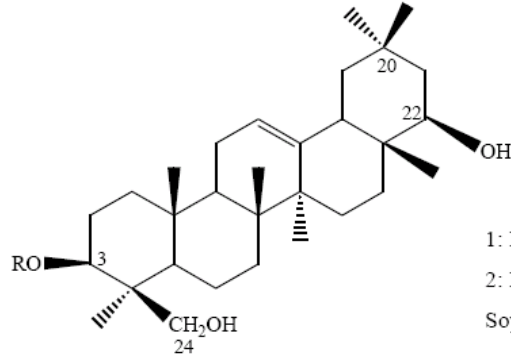
glukuronopiranozil) olean-12-en-22,24-diol, soyasaponin I ve soyasaponin III izole edilmiştir³⁶.

Oleszek ve ark. tarafından 57 *Trifolium* türünün tohumlarında triterpen saponinler üzerine yapılan bir çalışmada, incelenen bütün türlerde soyasaponin I ve bazı türlerde astragalozit VIII ve soyasaponin I'in 22-O-glukozit ve 22-O-diglukozitini taşıdığı belirlenmiştir. Ayrıca soyasapogenol B glikozitlerinin Fabaceae familyası için kemotaksonomik olarak ayırıcı özellikte olabileceği bildirilmiştir¹⁶.

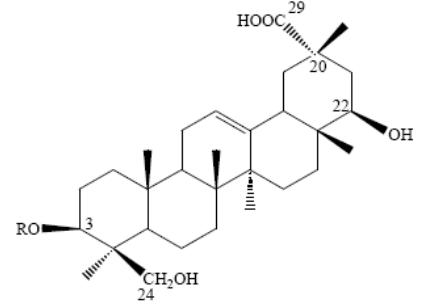
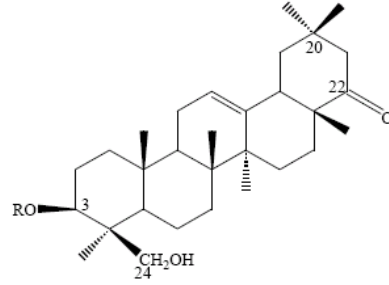
T. resupinatum L. tohumlarından triterpenik saponin yapısında yeni bir bileşik olarak 3-O- α -L-ramnopiranozil(1→2)- β -D-galaktopiranozil(1→2)- β -D-glukuronopiranozil]-22-O- β -D-glukopiranozil soyasapogenol B, yanı sıra bilinen saponinler; soyasaponin I, 3-O-[α -L-ramnopiranozil(1→2)- β -D-galaktopiranozil(1→2)- β -D-glukuronopiranozil]-2-O-[β -D-glukopiranozil(1→2)- β -D-glukopiranozil] soyasapogenol B, soyasaponin II, 3-O-[α -L-arabinopiranozil-(1→6)- β -D-glukopiranozil]okt-1-en-3-ol ve polar bileşikler olarak 3-O- β -D-glukopiranozil stigmasterol ve 3-O- β -D-glukopiranozil sitosterol (Şekil 10) izole edilmiştir³⁷.



27



Şekil 11: *Trifolium alexandrinum*'dan izole edilen triterpenik saponinler



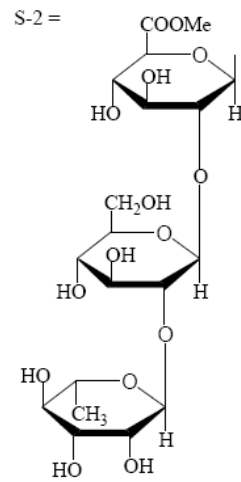
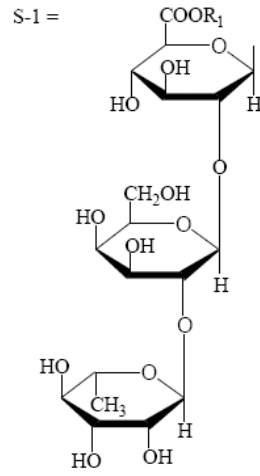
5: R= S-1, R₁= Me (Dehidrosoyasaponin)

6: R= S-2 (Dehidroazukisaponin V metil ester)

Soyasapogenol E: R= H

7: R= S-1, R₁= H (Sophoraflavosid II metil ester)

Oksitrogenin: R= H



Şekil 12: *Trifolium alexandrinum*'dan izole edilen triterpenik saponinler

2.2.1.3. Siyanogenetik Heterozitler

Siyanogenetik heterozitlere özellikle *T. repens* L. türünde rastlanmıştır¹⁶.

T. repens L, siyanogenetik heterozit içeren bitkiler grubuna girer. Zararlı olan hidrosiyanik asit, sindirim borusunda siyanogenetik glikozitlerin hidrolizi sonucunda açığa çıkar. Bu nedenle bu bitkilerin yetiştirilmesi sırasında bu bileşiklerin içeriğinin izlenmesi önemlidir. *Trifolium* türlerinde bu içerik kuru maddede 50 mg/100 g oranını geçmemelidir. *Trifolium* türlerinin farklı kısımlarında farklı konsantrasyonlarda siyanogenetik glikozitlere rastlanmaktadır. En yüksek konsantrasyonların yapraklarda (34 mg/100 g), köklerde, petiollerde ve pedinkullarda (19 mg/100 g) olduğu gözlenmiştir³⁹.

T. repens'deki siyanogenetik glikozitlerin varlığını tespit etmek amacıyla hızlı ve yarı-kantitatif bir yöntem geliştirilmiştir. Bu prosedür pikrat yöntemi esasına dayanmaktadır ve pikrat kağıdın üzerinde standart çözeltiler ile siyanid arasındaki renk reaksiyonu ile oluşan spektral yoğunluk (kırmızı, yeşil, mavi bant) arasındaki kalibrasyon ilişkileri kullanılarak, *T. repens* yaprağındaki hidrosiyanik asit konsantrasyonu belirlenebilmektedir⁴⁰. Tava ve ark. siyanogenetik potansiyelin belirlenmesinde kullanılan ve pikrat reaksiyonun gözle değerlendirilmesi esasına dayanan kolorimetrik yöntemin yanında spektrofotometreye dayalı metodun bitki tarafından salınan net hidrojen siyanid miktarının belirlenebilmesini sağladığından daha geçerli olabileceğini bildirmişlerdir⁴¹.

Siyanogenetik bileşiklerin varlığı 48 *Trifolium* türünde ve doğal popülasyonda *T. repens* varyetelerinde incelenmiştir. *Trifolium* türlerinden sadece *T. nigrescens*'in yüksek miktarda siyanogenetik

heterozit taşıdığı, kalan diğer türlerin ise düşük düzeyde siyanogenetik heterozit içerdiği belirlenmiştir⁴².

2.2.1.4. Uçucu Bileşikler

T. pratense kök ekstresinde uçucu bileşik olarak; n-butil asetat (0,35-0,31 µg/ml), E-2-hekzenal (0,76-2,12 µg/ml), α-pinen (0,11-0,21 µg/ml), benzaldehit (0,44-0,79 µg/ml), 6-metil-5-hepten-2-on (0,30-0,35 µg/ml), limonen (0,26-0,68 µg/ml), asetofenon (0,13-0,27 µg/ml), metil benzoat (0,25-0,31 µg/ml), oktanoik asit (0,43-0,56 µg/ml), dekanal (0,12-0,50 µg/ml) varlığı tespit edilmiştir⁴³.

T. pratense ve *T. repens* türlerindeki uçucu yağlar analiz edilmiş ve 50'den fazla bileşik taşıdığı belirlenmiştir. *T. pratense* çiçeklerinde en fazla rastlanan bileşikler, maltol (% 8.2), linalool (% 4.2), 1-feniletil alkol (% 3.2), fenol (% 2.9), feniletilasetat (% 2.7), asetofenon (% 2.4) ve (z)-3-hekzenil asetat (% 2.2); *T. repens* çiçeklerinde ise maltol (% 5.3), linalool (% 3.8), 1-feniletil alkol (% 2.8), fenol (% 3.6) ve feniletilasetat (% 3.3) olarak belirlenmiştir⁴⁴.

T. pratense ve *T. repens* türlerinde 15 hidrokarbon, 8 aldehit, 2 keton, 7 alkol, 37 ester, 1 fenol ve 20 organik asit olduğu GC/MS ile belirlenmiştir. *p*-Ksilen, *p*-simen, furfural, verataldehit, benzaldehit, propan-2-on, benzil, benzoat, benzil asetat, fenol, *o*-kresol, veratik asit ve benzoik asit başlıca bileşikler olarak tespit edilmiştir⁴⁵.

T. pratense ve *T. repens*'te bulunan uçucu yağlar analiz edilmiş ve 80 kadar bileşik tanımlanmıştır. Bunlar asitler, fenoller, aldehitler, ketonlar, alkoller, esterler, hidrokarbonlar ve diğerleridir. Her iki esansiyel yağ da aldehit, alkol ve ester bileşenlerinde farklılıklar göstermiştir. Esansiyel yağ asitlerinde yapılan incelemeler *T. pratense*'nin

hidrokarbonlar açısından, *T. repens*'in ise alkol ve esterler açısından zengin olduğunu göstermiştir⁴⁶. Diğer bir çalışmada, *T. repens*'ten elde edilen esansiyel yağın 18 terpenik bileşiği içerdiği belirlenmiştir⁴⁷.

Adam ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, *T. pratense*'nin kurutulmuş yapraklarının esansiyel yağ bileşiminde % 26.83 1,4-sineol, % 8.3 mentol, % 16.93 menton ve %12.78 α -tuyon bulunmuştur⁴⁸.

T. glanduliferum, *T. strictum* ve *T. subterraneum* türlerindeki uçucu bileşikler incelenmiş ve alkol, aldehit, keton, asit, oksijenli heterosiklik bileşikler ve terpen türevlerine rastlanmıştır⁴⁹.

2.2.1.5. Lipitler

Thomson ve ark. *Trifolium* türlerinin yapraklarındaki yüzey lipitlerini incelemişlerdir. *T. pratense* ve *T. resupinatum* türlerindeki yağ asit içeriğini sırasıyla % 27.7 ve % 30.3; ester içeriğini ise sırasıyla % 26 ve %14 olarak belirlemişlerdir. Ayrıca hidrokarbonların 11 n-alkenlerini içerdiğini ve zincir uzunluklarının C25 ile C35 arasında olduğunu bildirmişlerdir⁵⁰.

T. pratense yapraklarının asetonda çözünmeyen fraksiyonunun içeriği incelenmiş ve ağırlık olarak % 23'ünün mum, % 25'inin galaktolipit ve % 52'sinin fosfolipit olduğu belirlenmiştir⁵¹. *T. pratense* yapraklarındaki total fosfolipitlerden metil esterleri gaz kromatografisi ile fraksiyonlanmıştır. % 13.3 oranında bilinmeyen ester salisilik asit-AgNO₃ metoduyla çözünmüş ve her bir fraksiyon gaz kromatografisi ile analiz edilmiştir. Bilinmeyen asit fraksiyonunun hidrojenasyonu saf metil palmitat ürününü vermiştir. *Trans*-3-hekzadesenoik asitin metil esterine fotosentetik dokularda rastlanmış, ancak fosfatidil gliserol fraksiyonu içinde bulunmuştur⁵².

Weenink ve ark. *T. pratense* yapraklarında asetonda çözünen lipitlerin minör miktarlarda sterol esterleri, trigliseritler, digliseritler, serbest steroller ve hidrokarbonlar içerdiğini bildirmişlerdir. Bu lipitlerin, total ekstrenin sırasıyla % 0.57, 1.50, 0.60, 0.80 ve 0.38'inde bulunduğu belirlenmiştir. Fraksiyonların yağ asidi içeriği, digliseritlerin % 50 oranında palmitik asit; sterol esterlerinin ve trigliseritlerin ise ana bileşen olarak linoleik asit ve linolenik asit içerdiklerini göstermiştir⁵³.

T. pratense yapraklarının asetonda çözünen lipitlerinin büyük oranda galaktozil-1-gliserol ve bu bileşiğin linoleat türevini içerdiği belirlenmiştir. Galaktolipitlerin yağ asidi içeriğinin ise % 95.8 linolenik, % 1.9 linoleik ve % 2.3 palmitik asit olduğu gözlenmiştir. Oleik, stearik ve palmitoleik asite rastlanmamıştır. Hekzanda çözünen fraksiyonda ise % 4.2 galaktoz, % 2.4 gliserol, % 43.3 sabunlaşmayan kısım ve % 26 yağ asidine rastlanmıştır, kalan kısım ise asidik, yağ olmayan materyal olarak belirlenmiştir⁵⁴.

Türkiye'de 2007 yılında yapılan bir çalışmada Sabudak ve ark. *T. resupinatum* L. var. *microcephalum*'un topraküstü kısımlarının diklorometanlı ekstresinden ikisi yeni ve lipit bileşeni olmak üzere altı bileşenin varlığını göstermişlerdir. Yeni bileşenler 3-metil-1-nonen-3-ol ve 2',3'-dihidroksi propil pentadekanoat olarak belirlenmiştir⁵⁵.

2.2.2. İzoflavonoitler

2.2.2.1. İzoflavonoitlerin Kimyasal Yapıları

Flavonoitler difenilpropan yapısında olup, piran halkasının oksidasyon derecesine ve fenil halkasının piran halkasına 2. veya 3. konumdan bağlanmasına göre aşağıda belirtildiği gibi sınıflandırılmaktadır. Şekil 13'de temel flavonoit yapıları verilmektedir⁵⁶.

Sınıflandırılmaları:

2-Fenilbenzopirilyumlar (örn: antosiyaninler)

2-Fenilkromonlar

Flavonlar, flavonoller ve dimerleri

Flavononlar ve dihidroflavonoller (2,3-dihidrotürevleri)

İzoflavonlar ve izoflavononlar (3-fenilkroman türevleri)

2-Fenilkromanlar

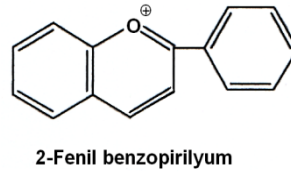
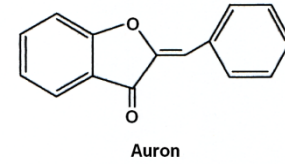
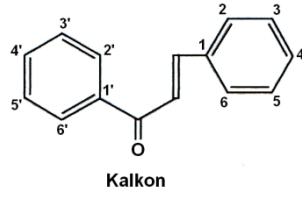
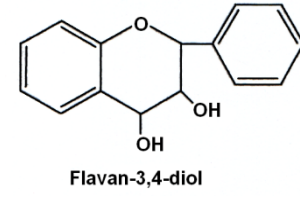
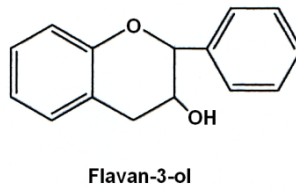
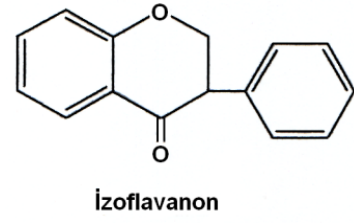
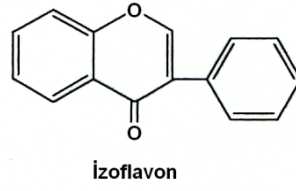
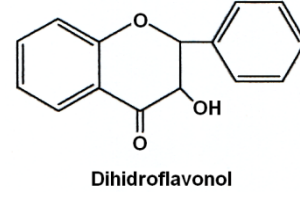
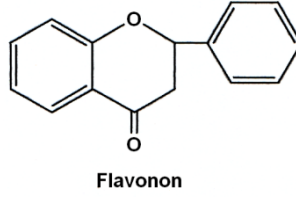
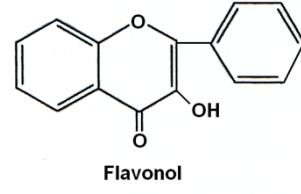
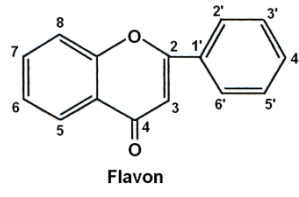
Flavanlar

Flavan-3-oller ve flavan-3,4-dioller (oligomer ve polimerler)

Kalkonlar ve dihidrokalkonlar (piran halkası açık)

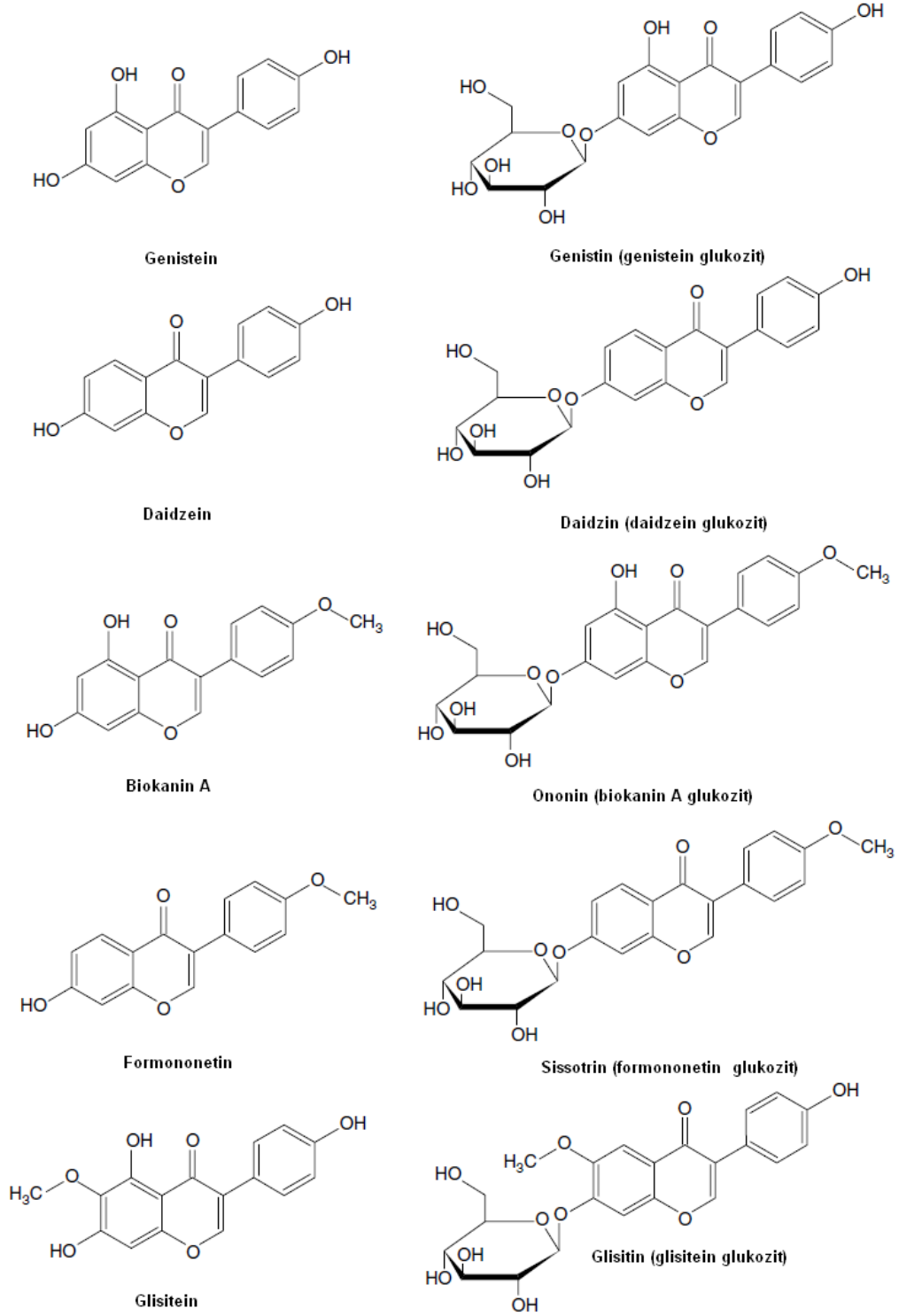
2-Benziliden kumaranonlar (auronlar)

İzoflavonoitler 3-fenilkroman iskeletine sahip, bitkiler aleminde dar yayılışlı ve özellikle Fabaceae familyasında sık rastlanan bileşiklerdir. Doğada en sık rastlanan yapılar serbest veya heterozit halinde bulunan izoflavonlardır. Dar yayılışlarına rağmen doğadan 1600 kadar izoflavonoit yapısı bildirilmiştir^{56,57}.



Şekil 13: Temel flavonoit yapıları

T. pratense'de bulunan başlıca izoflavanoit yapıları Şekil 14'de verilmiştir.



Şekil 14: *Trifolium pratense*'de bulunan başlıca izoflavonoitler

2.2.2.2. İzoflavonoitlerin Analiz Yöntemleri

İzoflavonoitlerin analizi sırasıyla şu prosedürleri içermektedir:

(i) örneklerin toplanması (ii) bitki dokularının parçalanması ve örneğin homojenizasyonu (iii) ham ekstratların elde edilmesi ve saflaştırılması (iv) bileşiklerin ayrılması ve tanımlanması (v) bileşiklerin tespiti ve miktar tayini ve (vi) sonuçların yorumlanması basamaklarından oluşur⁵⁸.

Bitkisel materyalden izoflavonoitlerin ekstraksiyonunda, solvan ekstraksiyonu sıklıkla kullanılan bir metottur. Bu amaçla, izoflavonoitin kimyasal yapısına göre farklı polaritede solvanlar kullanılmaktadır. Örn., % 80 etanol, % 10 butanol: % 90 etil asetat, hekzan, 2-propanol ve hekzan:2-propanol (3:2) gibi^{59,60}.

İzoflavonoitlerin ayrılmasında ince tabaka kromatografisi ve poliamid dolgu materyalinin kullanıldığı kolon kromatografisi uygulanan metotlar arasındadır. Günümüzde ters faz kolonların kullanıldığı (en çok tercih edilen C₁₈ kolonlar) yüksek basınçlı sıvı kromatografi teknikleri (HPLC) ve modern sistemlerin modifikasyonu aglikonlar ve glikozitlerinin ayrımında çok tercih edilen yöntemlerdendir. Sıvı kromatografi yöntemleri izoflavonların miktar tayinlerinde de sıklıkla kullanılmaktadır^{58,61,62}. High-speed counter-current kromatografi (HSCCC) de flavonoitlerin ayrılmasında günümüzde kullanılan tekniklerden birisidir⁶³.

İzoflavonoitlerin deteksiyonunda UV-Vis dedektörler, çoğunlukla da diyot-array dedektörler (DAD) geniş dalga boyunda ölçüm sağladıkları için tercih edilirler. Pek çok izoflavonoitin UV-Vis spektrumu benzer olduğundan ve bitki materyallerinde birçok izoflavonoit bulunduğundan UV-Vis dedektörlerin kullanımı oldukça sınırlıdır. Mass (MS) dedektörler ise aglikonların, türevlerinin veya glikozitlerinin ve diğer konjugatların tayininde kullanılır. Yanı sıra MS/MS teknikleri de

izoflavonoitlerin tanımlanmasında sıklıkla tercih edilmektedir. Klasik UV-Vis yöntemlerin yanında, floresans dedektörlerin kullanımı da söz konusudur. Bunların yanında kemilüminesans teknikler de izoflavonoitlerin tayinlerinde hassas olarak kullanılan metotlardandır⁵⁸.

İmmünokimyasal analiz, izoflavonoitlerin bitki materyalinde ve farmasötik peraparatlarda tanımlanmasını sağlayan önemli tekniklerden bir diğeridir. Geçmişte kullanılan radyoaktif işaretleme (RIA: radioimmunoassay) yöntemlerin yerini, günümüzde enzyeme-linked immunosorbent assay (ELISA) almıştır⁵⁸.

2.2.2.3. İzoflavonoitlerin Analizi için Geliştirilen HPLC Sistemleri

İzoflavanoitlerin analizi için geliştirilen bazı HPLC sistemleri

Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1: İzoflavonoitlerin Analizi için Geliştirilen HPLC Sistemleri

Sistem	Kolon	Çözücü sistemi	Dedektör	Kaynak
HPLC	Bondapak (4.2x250 mm, 5 µm)	A: deiyonize su/asetonitril/glasiyel asetik asit (85:15:0.1, v/v/v) B: deiyonize su/asetonitril/glasiyel asetik asit (50:50:0.1, v/v/v) Gradient elüsyon	PDA, 254 nm	64
HPLC	NovaPak C18 (3.9 mm x 150 mm, 4 µm)	A: %0.1 asetik asit içeren su B: %0.1 asetik asit içeren asetonitril	PDA, 260 nm	65
HPLC	RP-18e (125 mm x 3mm i.d., 5µm)	A: formik asit B: asetonitril	PDA, 255 nm	66
HPLC	Hypersil BDS-C ₁₈ (250 x 4 mm, 5 µm)	A: Sülfürik asit (pH:2.7) B: Asetonitril	PDA, 254 nm	67
HPLC	Luna C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 µm)	A: %0.1 formik asit B: asetonitril	UV, 260 nm	68
HPLC	Phenonex Luna fenilhekzil (250 mm x 30 mm, 10 µm)	A: %0.1 formik asit B: asetonitril	UV, 254 nm	69
HPLC	C-18 symmetryshield (150x2.1mm, 5µm)	% 0,25 asetikasit taşıyan asetonitril (A) % 0,25 asetikasit taşıyan su (B) Linear gradient elüsyon	PDA, 260nm	70
HPLC	Zorbax SB C ₁₈ (75x4.6 mm, 3.5 µm)	Asetonitril (+15 mM fosfat tamponu) %0.5 Asetik asit %0.1 trifloroasetik asit	PDA, 280 nm	61
U-HPLC	Waters BEH C ₁₈ (50x2.1 mm, 1.7 µm)	A: %0.3 asetik asit B: metanol	PDA, 270 nm	71
HPLC	Nova-Pak (3.9x150 mm, 4 µm)	A: Asetonitril (20:80:0.01) B: Asetonitril:trifloroasetik asit (100:0.1)	PDA, 260 nm	72
HPLC	Atlantis C ₁₈ (20 mm x 2.1 mm, 3 µm)	A: %0.3 asetik asit B: Asetonitril	PDA, 270 nm	73
HPLC	Atlantis C ₁₈ (20 mm x 2.1 mm, 3 µm)	A : %0.2 asetik asit B : Metanol	PDA, 254 nm	62

PDA : Photodiod-array

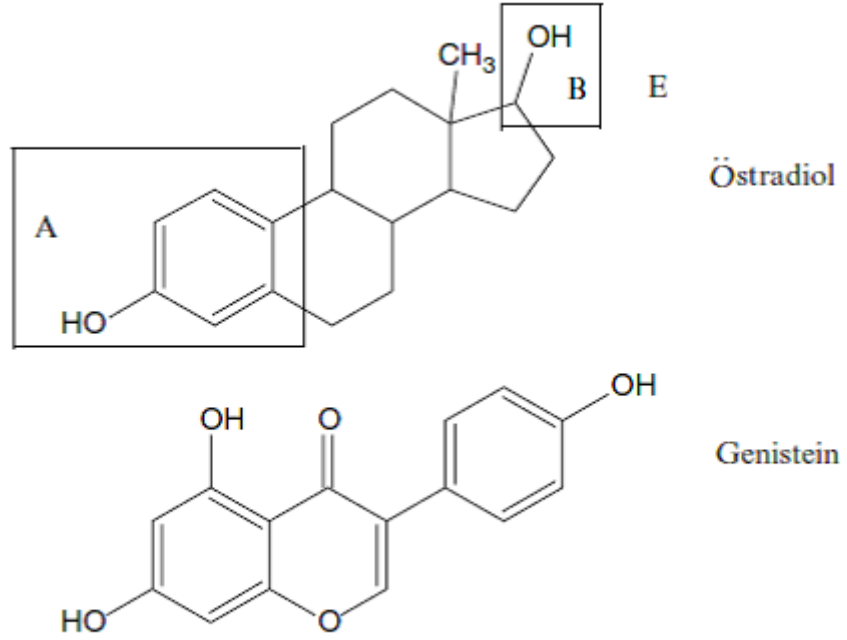
2.3. *Trifolium pratense*'nin Biyolojik Aktiviteleri

2.3.1. Östrojenik Etkileri

Flavonoitlerin östrojenik etkisi ilk olarak, koyunların bazı yonca türlerini yediklerinde kısırlaştıklarının saptanması ile ortaya çıkmıştır. Fitoöstrojenler ve östrojenler ortak bir etki mekanizmasına sahiptir. Bunun nedeninin, 17β -östradiol'ün steroid çekirdeği ile izoflavonların polifenolik halkasının yapısal benzerliği olduğu düşünülmektedir. 4' ve 7 konumlarında hidroksil bulunan flavonoitlerin östrojenik etkili olduğu, bu etkinin 5 konumunda hidroksil sübstitüenti olan flavonoitlerde arttığı belirlenmiştir⁷⁴.

Menopozda östrojenin yoksunluğu sıcak basması, kemik erimesi gibi semptomlara sebep olabilir. Fitoöstrojenler östrojenik aktivite gösteren ve menopoz tedavisinde kullanılan bir grup doğal bileşiktir⁷⁵.

İzoflavonlar, 17β -östradiol'e benzer kimyasal yapıda oldukları için östrojenik aktivite gösterirler (Şekil 15). 17β -östradiol steroidal iskeletin 3. konumunda fenolik bir grup ve 17. konumunda bir sekonder alkol grubu taşır, hidrofobik ve esnek olmayan bir yapıya sahiptir. İzoflavonlar vücutta eksik olan östrojenin yerini alabilirler. Östrojen reseptörü β ($ER\beta$)'ya, östrojen reseptörü α ($ER\alpha$)'dan daha fazla afiniteleri vardır. Menopoz sonrası gibi vücutta östrojen üretiminin az olduğu durumlarda östrojen reseptörlerine bağlanırlar ve böylece östrojenik etki gösterirler. Premenopoz gibi vücutta östrojenin fazla olduğu durumlarda ise izoflavonlar doğal östrojen ile yarışabilirler ve zayıf östrojenik aktiviteye sahip olduklarından antiöstrojenik etki gösteriler⁵.



Şekil 15: Genistein ve 17β-östradiol'ün yapısal benzerliği

Bir hipoteze göre, endometrium ve meme hücreleri proliferasyonu, ERβ aktivasyonu ile artmamaktadır. Progestin reseptörü (PR) ve androjen reseptörü (AR)'ne ilgi, Hormon Replasman Tedavisi (HRT)'nde yaygın olarak kullanılan Premarin®'in faydalı bir özelliği olarak kabul edilmektedir. *T. pratense* ürünleri, tamamen farklı bileşikler içermesine rağmen, benzer bir etki şekli göstermiştir⁷⁶.

Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile izoflavon içeriğinin % 9 (kuru ağırlık) olduğu saptanan standardize edilmiş bir preperatla (Menoflavon®) yapılan çalışmada, östrojenik aktivite, maya iki plazmit sistemi ile ERα ve ERβ kullanılarak değerlendirilmiştir. ERα için, yaklaşık 1 g *T. pratense* ekstresi başına 18 µg 17β-östradiol ve ERβ için; 1 g *T. pratense* başına 78 µg 17β-östradiole karşılık gelen transaktivasyonel kapasiteye bağlı östrojenik aktivite elde edilmiştir. Ortaya çıkan farklılık, ERβ'nın izoflavonlara daha yüksek ilgi göstermesi ile açıklanmıştır.

Yüksek izoflavon içeriği ve ER β 'ya ER α 'dan daha yüksek transaktivasyonel etkisi nedeniyle, bu tip ekstrelerin HRT için ilgi çekici adaylar olduğu ortaya konulmuş ve bu alternatif terapötik ajanın potansiyeli ile ilgili daha fazla çalışma yapılması gerekliliği belirtilmiştir⁷⁷.

T. pratense (red clover) ekstresi intrasellüler estradiol reseptörlerine bağlanarak östrojen agonisti gibi davranmaktadır. Red clover ekstresi, progestin aktivitesinde son ürün olan alkalın fosfatazın progesteron indüksiyonunu *in vitro* olarak inhibe ettiğinden dolayı antiprogestin olarak tanımlanmıştır. Red clover'ın dişi koyunlarda uterin ağırlığını ve meme ucu çevresini arttırdığı, ayrıca servikal mukoza viskoelastisitesini azalttığı gözlenmiştir².

Flavon ve izoflavonoitlerle yapılan bir tayinde, östrojenik aktivite açısından sıralama şu şekilde bulunmuştur: genistein > kemferol > naringenin > apigenin > daidzein > biokanin A > formononetin > luteolin > fisetin > kateşin/taksifolin > hesperetin⁷⁸.

2.3.2. Menopoz Semptomları Üzerine Etkileri

T. pratense ve soya gibi Fabaceae familyasında bulunan bazı bitkiler hafif östrojenik aktivitesi olan izoflavonlar içermektedir. Menopoz sırasında östrojen seviyesinin düşmesi nedeniyle, bu fitoöstrojenlerin, sıcak basması, terleme, kardiyovasküler şikayetler, halsizlik, vertigo, kas ve eklem ağrısı, idrar tutamama, vajinal kuruluk ve vajinal epitelyumun atrofisi gibi menopoz semptomlarını azaltacağı düşünülmektedir. Asya diyetinin total izoflavonoit içeriğinin 25-45 mg/gün, Batı diyetinin ise <5 mg/gün olduğu tahmin edilmektedir. Epidemiyolojik veriler, menopoz semptomlarının Japon kadınlarda Batı'daki kadınlara göre daha az gözlenmesinin nedeninin, diyetle soya izoflavonoitlerinin tüketilmesine bağlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca Güneydoğu Asya'da

kardiyovasküler hastalıkların daha az gözlenmesinin de soya ağırlıklı beslenme ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Çünkü bu tür diyetler düşük plazma kolesterol seviyesi ile ilişkili bulunmuştur⁷⁹.

12 aydan uzun bir süredir amenoresi ve günde beş defadan fazla sıcak basması şikayeti olan 30 kadınla yapılan randomize, çift kör, plasebo kontrollü çalışmada, kadınlara ilk dört hafta plasebo tablet verilmiştir. Takip eden 12 hafta boyunca ise, ya plasebo ya da 80 mg *T. pratense* izoflavonları içeren preparat (Promensil®) verilmiştir. İlk dört haftalık dönemde sıcak basmaları % 16 azalırken, daha sonraki 12 haftalık sürede, plasebo grupta daha fazla bir düşüş olmamış, izoflavon grubunda, % 44 dolayında istatistiksel olarak belirgin bir azalma gözlenmiştir⁸⁰.

Diğer bir çalışma, günde en az 3 defa sıcak basmasının gözleendiği 37 kadın hastanın 3 ay izlenmesi ile yapılmıştır. Bu bireyler plasebo, 40 mg *T. pratense* ekstresi (bir tablet Promensil®) ve 160 mg *T. pratense* ekstresi (4 tablet Promensil®) alan gruplar olmak üzere 3'e bölünmüştür. Üç ay süre sonunda gruplar arasında sıcak basmaların insidansı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Aynı zamanda vajinal pH veya FSH ya da seks hormonu bağlayıcı globulin (SHBG)'in serum düzeyleri de fark etmemiştir. Ancak bu çalışmada kontrol grubunda diyetle izoflavon tüketimine bağlı artmış üriner flavon seviyesi gözlenmiş ve çalışmanın sonucu, kontrol grubu seçimindeki bu yanlışlığa bağlanmıştır⁸¹. Bir diğer çalışma randomize, çift-kör bir çalışmadır. Bu çalışmada günde 3 kereden fazla sıcak basmasının gözleendiği 51 kadın seçilmiştir. Bireyler 3 ay süreyle günde 1 tablet Promensil veya plasebo alan iki gruba bölünmüştür. Yine sıcak basması, vajinal kuruluk veya ultrason tetkikleri açısından gruplar arasında bir fark gözlenmemiştir⁸².

Tice ve ark. ise yaptıkları çalışmada rastgele seçilen ve haftada 35 kezden fazla sıcak basması şikayeti gözlenen 252

postmenapoz hastasında Promensil (günde 82 mg), Rimostil (günde 57 mg) veya plasebo etkisini 12 hafta boyunca izlemişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda her üç grupta da sıcak basması sıklığına karşı anlamlı bir iyileşme gözlenmemiştir⁸³. Başka bir çalışmada da 16 hafta boyunca Promensil (günde 40 mg) kullanan 30 hastada gözlenen etkiler plasebo grubu ile karşılaştırılmış ve sıcak basması sıklığında ve şiddetinde anlamlı bir düşüş gözlenmiştir⁸⁴.

Postmenopozlu kadınlarda Promensil'in plasebo-kontrollü klinik çalışmalarına ait sonuçlar Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2: Postmenopozlu kadınlarda Promensil'in plasebo-kontrollü klinik çalışmaları

Hasta Sayısı	Kontrol	Muamele	Ölçülen parametreler	Sonuçlar	Kaynak
252	Plasebo (12 hafta)	Promensil (82 mg/gün izoflavon) veya Rimostil (57 mg/gün izoflavon) 12 hafta	Sıcak basma sıklığı Yaşam kalitesinde değişiklik	Anlamlı bir fark yok	83
30	Plasebo (12 hafta)	Promensil (80 mg/gün izoflavon) 12 hafta boyunca	Sıcak basma sıklığı GMSS	Sıcak basma sıklığında anlamlı düşüş (p<0.01) GMSS'de değişiklik yok	80
30	Plasebo (16 hafta)	Promensil (40 mg/gün izoflavon) 16 hafta	Sıcak basma sıklığı ve şiddeti	Sıcak basma sıklığı ve şiddetinde anlamlı azalma (p<0.001)	84
37	Plasebo (12 hafta)	Promensil (160 mg/gün izoflavon) veya Promensil (40 mg/gün izoflavon) 12 hafta	Sıcak basma sıklığı GMSS	Anlamlı bir fark yok	81
51	3 ay plasebo veya aktif, sonra 1 ay plasebo, 3 ay aktif	Promensil (40 mg/gün) izoflavon)	Sıcak basma sıklığı GMSS	Anlamlı bir fark yok	82

GMSS: Grene Menopoz Semptom Skoru

2.3.3. Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri

Genistein, daidzein, formononetin, biokanin A içeren preperat (Rimostil®), 46 menopoz sonrası kadına, tek kör plasebo ve arınma dönemleri arasında, çift kör olarak verilmiş, hastalar, rastgele ayrılarak 6 ay boyunca, 28.5 mg, 57 mg veya 85.5 mg fitoöstrojen almışlardır. Altı ayın sonunda, serum yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL), artış büyüklüğü doza bağlı olmaksızın ($p=0.005$, $p=0.043$, $p=0.007$), % 15.7 ile % 28 oranında artmıştır. Aynı şekilde artış büyüklüğü doza bağlı olmaksızın ($p=0.007$, $p=0.002$, $p=0.027$), serum apolipoprotein B belirgin şekilde, % 11.5-17 arasında düşmüştür. Proksimal radius ve dirsek kemiğinde kemik mineral yoğunluğunun da; 57 mg/gün dozda % 4.1 oranında ($p=0.002$), 85.5 mg/gün dozunda ise % 3.0 oranında ($p=0.0239$) arttığı saptanmıştır. Tüm dozlarda endometriyal kalınlık artmıştır. Ancak bu sonuçlar yorumlanırken, bir kontrol grubu eşliğinde çalışılmadığı göz önünde bulundurularak temkinli olunması gerektiği belirtilmiştir⁸⁵.

Menopozla birlikte bozulan arteriyel uyumun, sistolik hipertansiyona yol açtığı ve sol ventrikülün çalışma yükünü arttırdığı bilinmektedir. İzoflavon alımının arttırılması ile menopoz döneminde artan bu kardiyovasküler riskin azaltılma olasılığı olup olmadığının araştırıldığı bir araştırmada, 40 mg ve 80 mg/gün doz uygulanarak, 17 kadındaki arteriyel uyum ölçülmüştür. 5 haftalık plasebo döneminin ardından, 5 haftalık tedavi döneminde, basınç (karotid arter) ve hacim (aorta akış) ilişkisi ultrason ile ölçülerek her dönem sonrasında arteriyel uyum saptanmıştır. Plazma lipitleri her dönemde iki kez ölçülmüş, izoflavonların idrarla atılım miktarı da saptanmıştır. Çalışmada 3 kadın plasebo kontrol olarak yer almıştır. Diğer kadınlar 5 hafta süresince, sırasıyla önce 40 mg daha sonra 80 mg *T. pratense*'den elde edilen izoflavonlar ile tedavi edilmiş, arteriyel uyum, 80 mg dozda, plaseboya göre % 23 oranında artmıştır. 40 mg'da ise az miktarda daha düşük bulunmuştur (plasebo,

19.7±1.5, 40 mg 23.7±0.7, 80 mg, 24.4±1.4). Plazma lipitleri ise belirgin olarak değişmemiştir. Bu çalışmada elde edilen sonucun menopoza sonrası kardiyovasküler fonksiyonun tedavisi için yeni bir gelişmeye ışık tutabileceği belirtilmiştir⁸⁶.

16 menopoza sonrası dönemdeki tip II diabet hastası kadın (diyet veya oral hipoglisemikle tedavi gören), rastgele, çiftkör, çapraz çalışmaya katılarak, 4 hafta boyunca günde 50 mg *T. pratense* izoflavonu almışlardır. Her tedavi dönemi sonunda, 24 saat kan basıncı kayıtları alınmış ve asetilkolin, nitroprusit ve L-nitromonometilarginin'e (L-NMMA) önkol vasküler cevap ölçülmüştür. Plasebo ile karşılaştırıldığında, günlük ortalama sistolik ve diastolik kan basıncı belirgin şekilde daha düşük bulunmuştur. Ayrıca, L-NMMA'yı takiben önkol vasküler cevabındaki artışın da belirgin oranda olduğu saptanmıştır. Bu da bazal endotelial fonksiyonların daha iyi duruma geldiğini göstermiştir. Plazma lipoproteinleri, şekere bağlı hemoglobin, asetilkolin ve nitroprusite yanıt plaseboyla karşılaştırıldığında belirgin bir farklılık göstermemiştir. Bu verilerle, menopoza sonrası tip II diyabetli kadınlarda *T. pratense* ile izoflavon takviyesinin, kan basıncını ve endotelial fonksiyonu olumlu yönde etkileyebileceği sonucuna varılmıştır⁸⁷.

T. pratense'den elde edilen izoflavonların 17 menopozal kadında arteriyel işlevleri düzenlediği gösterilmiştir. Bu çalışmada plazma lipoprotein seviyelerinin, ortalama vücut-kitle indeksinin ve arteriyel basıncın değişmediği gözlenmiştir².

Çift-kör, plasebo-kontrol olarak yapılan bir pilot çalışma, en az bir yıldır postmenopoz evresinde olan ve kardiyovasküler bir hastalığı bulunmayan 13 kadın üzerinde yapılmıştır. Bir grup 5 hafta boyunca plasebo, ikinci grup 5 hafta süresince 1 tablet Promensil®, üçüncü grup ise 5 hafta 2 tablet Promensil® almıştır. Kontrol grubu ise 15 hafta boyunca

plasebo almıştır. Çalışmanın sonucu, Promensil® alan grupta ana arterlerin elastikiyetinin plasebo gruba göre arttığını, ancak iki doz grubu arasında herhangi bir farkın olmadığını göstermiştir. Plazma lipid seviyelerinde ise herhangi bir fark gözlenmemiştir⁸⁶.

Başka bir çalışmada ise, 14 sağlıklı premenopoz hastasına plasebo veya günde 2 tablet *T. pratense* verilmiştir. Çalışmanın sonucunda LDL oksidasyonu, total kolesterol veya trigliserit seviyelerinde herhangi bir değişikliğe rastlanmamıştır. Ancak HDL-3 seviyesinde artış gözlenmiştir⁸⁸.

2.3.4. Kemoprotektif Etkileri

Red clover ekstresinden izole edilen temel aktif bileşik olan biokanın A'nın, karsinojen bir bileşik olan benzo(a)piren'in hücre kültüründeki aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu kemoprotektif etkinin, biokanın A'nın karsinogenezis metabolizmasını inhibe ederek DNA'ya bağlanmasını engellemesi ile gelişmiş olabileceği düşünülmüştür².

Araştırmalarda, vejeteryanların plazmasında seks hormonları bağlayıcı globulin (SHBG) seviyelerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. Buna bağlı olarak seks hormonları yıkımının azaldığı ve meme ve prostat kanseri riskinin düştüğü gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, genistein'in *in vitro* olarak, insan hepatokarsinom (Hep-G2) hücrelerinin SHBG oluşturmaya ve hücre proliferasyonuna etkileri araştırılmıştır. Genistein'in, Hep-G2 hücrelerinin SHBG yapımını belirgin ölçüde arttırmanın yanında, bu kanser hücrelerinin proliferasyonunu da baskıladığı görülmüştür. Bu sırada SHBG yapımı da yüksek kalmaya devam etmiştir⁸⁹.

Başka bir çalışmada, izoflavonların insan meme karsinom hücre serileri, MDA- 468 (östrojen reseptörü negatif) ve, MCF-7 ve MCF-7-D-40 (östrojen reseptörü pozitif) gelişimi üzerine etkileri incelenmiştir. Genistein'in tüm hücre serilerinde güçlü inhibitör etkisi ($EC_{50} = 6.5-12.0 \mu g/ml$) görülmüştür. Biokanin A ve daidzein ise daha zayıf inhibitör etki ($EC_{50} = 20-34 \mu g/ml$) göstermişlerdir. İzoflavon β -glikozitleri, genistin ve daidzin'in ise çok az etkili oldukları ($EC_{50} > 100 \mu g/ml$) gözlenmiştir. İzoflavonların MDA-468 ve MCF-7 hücreleri karşılaştırılarak, tümör hücresi oluşumunu inhibe etmeleri için, östrojen reseptörü varlığı gerekmediği saptanmıştır⁹⁰.

So ve ark., 6 farklı flavonoidin (hesperetin, galangin, naringenin, kersetin, baikalein, genistein), östrojen reseptör pozitif MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkilerini ölçmüşlerdir. Etki mekanizmalarını saptayabilmek amacıyla, fazla östrojen ilavesinin, flavonoidlerin inhibe ettiği hücre proliferasyonu üzerine etkilerini incelemişlerdir. Flavonoidlerin zayıf östrojenler olarak hareket ettikleri düşünüldüğünden, ilave edilen 17β -östradiol'ün, hücre proliferasyonunda meydana gelen inhibisyonu tersine çevirmesi beklenmiştir. Beklenen bu etki sadece genistein ile muamele edilen hücrelerde ve yaklaşık % 100 oranında görülmüştür. Genistein'in *in vitro* olarak östrojen reseptörlerine bağlandığı, diğer flavonoidlerin ise reseptöre bağlanmak için östrojenle yarışmayıp daha farklı bir etki mekanizması ile antiproliferatif etki gösterdiği sonucuna varılmıştır⁷⁴.

Farklı *T. pratense* ekstraktları, osteoblastik osteosarkom hücrelerini (HOS58) uyarma yeteneği açısından test edilmiştir. Osteoblastisite açısından işaretleyici olarak alkalik fosfat (ALP) aktivitesi seçilmiştir. Tüm ekstraktlar izoflavon içeriği açısından incelenmiştir. Butanol ve metanol ekstraktlarının ALP veya hücre protein üretimi üzerine hiçbir etkileri olmazken, kloroform ekstraktının,

inkübasyonda enzim aktivitesini belirgin ölçüde arttırdığı gözlenmiştir. Elde edilen bulgular, *T. pratense* izoflavonoitlerinin osteoblastik hücre aktivitesini uyarmada rolü olduğunu açıkça göstermiştir⁹¹.

2.3.4.1. Prostat Hiperplazisi Ve Prostat Kanseri Üzerine Etkileri

Prostat kanseri sıklığında doğu ile batı arasında görülen epidemiyolojik farklılıklar, kısmen Asya'da tüketimi daha fazla olan fitoöstrojenlere bağlanmaktadır. Yüksek miktarda pirinç, soya ürünleri, balık ve sebze ile beslenen Japonlarla yapılan bir çalışmada, gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) yöntemi ile 10 kadın, 9 erkekte enterolakton, enterodiol, daidzein, ekuol, o-desmetilangolesin'in idrarda atılan miktarı ölçülmüştür. Lignanların atılım oranı düşük, izoflavonoitlerin miktarı ise yüksek bulunmuştur. Çalışma sonucunda, meme ve prostat kanserinden ölümlerin düşük olmasının, soya ürünlerinin yüksek oranda tüketimine bağlı olabileceği belirtilmiştir⁹².

Yöresel gıdalarla beslenen Portekizli, Çinli ve İngiliz erkekler üzerinde yapılan karşılaştırmalı çalışmada, GC-MS ile plazma ve prostat sıvısındaki lignan ve izoflavon yapısındaki fitoöstrojen konsantrasyonları ölçülmüştür. Prostat sıvısında, enterolakton miktarı, sırasıyla Hong Kong, Portekiz ve İngiltere için ortalama 31, 162, 20.3 ng/ml, daidzein miktarı ise sırasıyla 70, 4.6 ve 11.3 ng/ml olarak saptanmıştır. Daidzein'in plazma seviyeleri de yine Hong Kong'dan gelen örnekte (31.3 ng/ml), Portekiz (1.3 ng/ml) ve İngiltere (8.2 ng/ml)'ye kıyasla çok daha yüksek bulunmuştur. Enterolakton'un plazmadaki seviyesi ise benzer bulunmuştur (sırasıyla 6.2, 3.9 ve 3.9 ng/ml). Sonuç olarak, Hong Kong'lu erkeklerin plazma ve prostat sıvılarındaki daidzein ve ekuol konsantrasyonları daha yüksek bulunmuştur. Enterolakton ise Portekiz'den gelen örneklerde daha yüksek oranda saptanmıştır. Asya ve Akdeniz ülkelerinde prostat kanserinin daha az görülmesinin nedeni bu olabileceği ve dolayısıyla soyadaki

izoflavonların prostat kanserine karşı koruyucu özelliğe sahip olabileceği düşünülmüştür⁹³.

97 Benign prostatik hiperplazi (BPH) ve 97 prostat kanser hastası olan, toplam 194 erkek üzerinde yapılan bir kontrol çalışmasında serumdaki daidzein, genistein ve enterolakton seviyeleri floroimmünoassay yöntemi ile tayin edilmiş ve paralel olarak serum endokrin çalışması da yapılmıştır. Değerler BPH hastalarında daha yüksek bulunmuş, ancak istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır. Fitoöstrojenler ile prostat spesifik antijen (PSA), luteinleştirici hormon (LH), total testosteron ve östradiol arasında korelasyon gözlenmemiştir. Ancak, daidzein ($p=0.019$), genistein ($p=0.002$) ve tüm fitoöstrojenlerin toplamı ($p=0.005$), folikül stimüle edici hormon (FSH) ile pozitif olarak ilişkili bulunmuştur. Bu veriler, fitoöstrojenlerin, prostat kanseri patojenezinde etkili olduğunu ve PS'yi önlemedeki potansiyelini ortaya koymuştur. FSH ve fitoöstrojenler arasındaki yakın ilişki, potansiyel bir dengeleme mekanizması olduğuna işaret etmektedir⁹⁴.

İzoflavonların uzun süreli kullanımda prostat, hormon seviyeleri, cinsel fonksiyon ve karaciğer fonksiyonlarına etkisinin incelendiği bir çalışmaya, prostat biyopsisinde yüksek PSA ve prostatik intraepitelyal neoplazma (PIN) seviyeleri saptanan 12 hasta katılmıştır. Hastalara 6 ay boyunca günde 160 mg *T. pratense* izoflavon ekstresi verilmiştir. Başlangıçta ve her üç ayda bir PSA, total testosteron, östrojen, LH, FSH, dehidroepiandrosteron sülfat (DHEA-s), karaciğer transaminazları (GOT, GPT, gGT), transrektal prostat volumetrisi, uluslararası prostat semptom skoru (IPSS) ile incelenmiştir. Ortalama PSA seviyeleri, başlangıçta 3. ve 6. aylarda sırasıyla, 7.7 ng/ml, 6.9 ng/ml ve 6,5 ng/ml (-% 10) bulunmuştur. Prostat hacminde 6 aydan sonra küçük bir azalma (-% 6) görülmüş, tüm seks hormonlarında düşüş olmuştur. Testosteron % 5, DHEA-s, % 25, östrojen, % 30, LH % 5, FSH % 30

oranlarında düşmüştür. Tüm transaminazlar 3 ve 6 aydan sonra artmış, IPSS 6 aydan sonra % 15 gerilemiştir. Cinsel fonksiyonlarda bir değişiklik görülmezken, ortalama hayat kalitesinin, IPSS anketlerinden alınan cevaplara göre, 6 aydan sonra daha iyiye gittiği gözlenmiştir⁹⁵.

Cerrahi müdahale ve ilaç tedavisinin potansiyel risk ve yan etkileri ve gıda takviyelerinin prostat sağlığına potansiyel faydalarının anlaşılması nedeniyle, doğal tedavileri tercih eden benign prostat hiperplazisi (BPH) hastalarının sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Kırmızı yonca ekstresi, diğer bitki ekstrelerine göre 4 ana izoflavon (genistein, daidzein, formononetin ve biokanin A) içerir, aglikon izoflavonlar reseptör seviyesinde aktiftirler. Katz, *T. pratense* ekstrelerinin BPH belirtilerini azalttığı yönünde çalışmalar olduğunu ve iyi tolere edildiğini belirtmektedir⁹⁶.

2.3.5. Bağışıklık Sistemi Üzerine Etkileri

Murin modeli kullanılarak yapılan bir çalışmada, oral olarak 20-40 mg/kg vücut ağırlığı dozunda uygulanan daidzein, spesifik olmayan murin bağışıklığını uyararak, humoral bağışıklığı aktive etmiş ve hücrel bağışıklığı arttırmıştır³².

Başka bir çalışmada, daidzein ve genistein'in ayrı ayrı ve ikisinin birarada, mitojenler tarafından aktive edilen murin splenositlerinin proliferasyonuna ve interlökin-2 (IL-2) ve IL-3 salgılanmasına etkileri incelenmiştir. Daidzein'in, uygun fizyolojik konsantrasyonlarda (0,01-10 µM) lenfosit aktivasyonunu arttırdığı görülmüştür. Bu bağışıklığı uyarıcı etki, daidzein'in kanseri önlemede rol oynayabileceğini ortaya koymuştur⁷⁸.

2.3.6. Biyoyararlanım ve Biyotransformasyonu

Flavonoit ve izoflavonoitler su ve organik çözücülerde fazla çözünmezler. En iyi çözündükleri solvanlarda (etanol, metanol, asetonitril) dahi orta derecede çözünürler. Gıdalarda genelde, aglikonlarına nazaran suda daha çok çözünen glikozit konjugatları halinde bulunurlar ve bunların şeker kısmı, emilimden önce memeli veya mikrobiyal glukozidazlar tarafından enzimatik parçalanmaya uğrarlar. Gıdalarda major olarak bulunan izoflavonoit glikozitlerinin insan plazması ve idrarında saptanmaması da bu enzimatik yıkılma ile açıklanabilir. İzoflavon ve flavonoitler, genistein tüm bu fenolik bileşikler için bir model olarak düşünülürse; gastrointestinal mukozada hızla ve büyük oranda glukuronidasyona uğrayabilir. Genistein ve daidzein glukuronatları, fare rahmindeki sitosolik östrojen reseptörüne bağlanmalarından anlaşıldığı kadarıyla, aglikonlarına nazaran daha az östrojeniktirler⁷⁸.

Son yıllarda, yararlı etkileri saptanan izoflavonların gıda desteği olarak tüketiminde artış görülmüştür. *T. pratense*'de benzer izoflavon glikozitlerini içermektedir. Bunlar, formononetin, biokanin A ve daha az oranda daidzein ve genistein glikozitleridir. Ancak, insan metabolizmasında bu glikozitler hidroliz olarak aglikonlarına dönüşür; formononetin ve biokanin A'da, daidzein ve genistein'e metabolize olur. Daidzein ise, barsaktaki mikroorganizmalar tarafından daha güçlü östrojenik etkiye sahip olan ekuol'e metabolize olur. İzoflavon absorpsiyonu kişiler arasında değişkenlik göstermektedir. Soya ve *T. pratense*, gıdalarda veya gıda destek ürünlerinde artarak kullanılmaya başlandığı için, bu bitkilerden elde edilen izoflavonların absorpsiyonu arasında farklılık olup olmadığı 14 denek üzerinde yapılan bir çalışmayla incelenmiştir. Tek kör, randomize, plasebo kontrollü ve çapraz yapılan bu çalışmada, soya fasulyesi izoflavon glikozitleri (28.5 mg/gün izoflavon - aglikon olarak hesaplanmıştır) ve *T. pratense* aglikonları (30 mg/gün

izoflavon) içeren kahvaltılıklar hazırlanmıştır. Bu kahvaltılıklar, her iki grup tarafından, 2 haftalık kontrol ve 2 haftalık arınma dönemleri arasındaki 2 hafta süresince tüketilmiştir. İdrarda 24 saatlik izoflavon atılımı ölçülmüş, her izoflavonun % 25'i idrarda saptanmıştır. Bu sonuç, izoflavonların, glikozit/aglikon yapısı veya elde edildikleri kaynaklardan bağımsız olarak (soyadaki daidzein ve genistein, *T. pratense*'deki formononetin ve biokanin A) benzer miktarlarda absorbe edildiklerini düşündürmektedir. Bireylerarası farklılık yüksek olsa da, 2 türden izoflavon tüketimi ile atılan miktarlar birbiriyle karşılaştırıldığında ($r=0.69$; $P=0.007$), farklılık azdır⁹⁷.

2.3.7. Preparatları

T. pratense izoflavonlarını ihtiva eden ekstreler, fitoöstrojen özellikte izoflavonları nedeniyle bugün özellikle menopozal şikayetlerin giderilmesinde oldukça yaygın bir biçimde kullanılmaktadır^{2,3}. Yetişkinlerde;

- 1-2 çay kaşığı kurutulmuş çiçekten hazırlanan infüzyonu günde 2-3 bardak içilebilir.
- Toz edilmiş bitki kapsül içerisinde günde 40-160 mg veya 28-85 mg red clover izoflavonu kullanılabilir.
- 1:5 oranında %30 alkol ile hazırlanan tentürü günde 3 kez 60-100 damla (3-5 ml) sıcak su içerisine eklenerek çay olarak içilebilir.
- 1:1 oranında hazırlanan sıvı ekstresi günde 3 kez 1 ml sıcak suya katılarak çay olarak içilebilir.
- %10-15 çiçeklerini içeren infüzyon, sıvı ekstre veya merhemi topikal olarak psoriasis veya ekzema tedavisinde kullanılır⁹⁸.

Standardize red clover izoflavon ekstraları:

T. pratense ekstraları, total 40 mg izoflavon içerecek şekilde standardize edilmiştir. Bileşiminde 4 mg genistein, 3.5 mg daidzein, 24.5 mg biokanin A ve 8 mg formononetin içermektedir.

T. pratense, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)'nın Gıda Takviyesi Statüsü Listesinde, "genellikle güvenilir olarak kabul edilen" (GRAS) statüsündedir⁹⁹. Çeşitli ülkelerde farklı isimlerde preparatları bulunmaktadır.

Denoxinal® (Walmark laboratuvarı, Çek Cumhuriyeti) adı altında tabletler halinde **Türkiye**'de satışıdır. Bu tabletler, pektin (50 mg), C vitamini (200 mg), garlic (*Allium sativum* 1 mg), dandelion (*Taraxacum officinale* 12.5 mg), burdock (*Arctium lappa* 12.5 mg), korella (*Cacatua pastinator* 200 mg), milk thistle (*Silybum marianum* 50 mg), *T.pratense* (12.5 mg) içermektedir. Günlük 1 tablet kullanılması önerilmiştir¹⁰⁰.

Promensil® (Novogen laboratuvarı, Avustralya) adı altında, tabletler halinde Amerika'da satışa sunulmuştur. Günde 1 tablet kullanılması önerilmiştir¹⁰¹.

Rimostil® (Novogen laboratuvarı, Avustralya) Günde 57 mg kullanılması önerilmiştir¹⁰¹.

Trinovin® (Novogen laboratuvarı, Avustralya) Günde 1 tablet kullanılması önerilmiştir.

Climadil® (Brezilya)¹⁰¹.

Menoflavon® (Melbrosin laboratuvarı, Avusturya). Günde 40-80 mg kullanılması önerilmiştir¹⁰¹.

Isoflavones® (Boots, İngiltere) Günde 40mg kullanılması önerilmiştir⁷⁵.

Red Clover® (Novogen laboratuvarı, Avustralya) Günde 40 mg kullanılması önerilmiştir⁷⁵.

Rotklee Tablets® Merosan GmbH⁷⁵.

Rotklee Activ Tablets® Hws Otc Service Gmbh⁷⁵.

Dr.Böhm Isoflavone Dragees Bionorica Red clover+Soy bean. Günde 40-90 mg kullanılması önerilmiştir⁷⁵.

2.3.8. Uyarı ve Advers Etkiler

Aynı hormonal reseptör bölgesine yarışmalı olarak bağlanıp beklenmeyen sonuçlar doğurabileceğinden hormonal tedavi gören hastalarda kullanılmamalıdır².

Fertilite üzerine etkileri: Red clover ile beslenen hayvanlarda servikal mukus viskoelastikiyetinde azalma gözlenmiştir. Bu durum spermatozoanın serviks içine girmesine engel olabilir. Red clover'ın aşırı kullanılmasına bağlı olarak fertilite azalabilir¹⁰².

İlaç etkileşimleri:

- Antikoagülanlar, trombolitik ajanlar ve düşük molekül ağırlıklı heparinler ile beraber kullanıldığında kanama artabilir. Bu ilaçlarla beraber kullanımından kaçınılmalıdır². Terapötik indeksi dar olan varfarin için muhtemel etkileşimler önemli olduğundan, pek çok bitkisel ilaçla etkileşimleri incelenmiştir. Red clover, birlikte kullanıldığında kanama riskini ve varfarinin etkisini arttıran bitkiler arasında yer almaktadır¹⁰³.
- Kontraseptifler: Kontraseptif etkide veya yan etkilerde artma gözlenebilir².
- Progesteron: Beraber kullanıldığında etkisi azalabilir².
- Tamoksifen: Hayvan verileri tamoksifenin etkinliğinin azaldığını göstermiştir².

2.3.9. Kontraendikasyonları

Östrojen reseptör pozitif neoplazisi olan hastalarda kullanılmamalıdır².

*Gebelik ve Laktasyonda Kullanımı:*Fetüsün yüksek seviyede izoflavona maruz kalmasının güvenilirliği ile ilgili çalışma yapılmamıştır. Günde 30–100 mg izoflavon tüketen toplumlarda, yüksek izoflavon alımına bağlı fetüs anomalileri ile ilgili bilinen hiçbir epidemiyolojik çalışma yoktur. Ancak, hamile farelerde çok yüksek dozlarda genistein verildiğinde (14-70 mg/kg), doğumda düşük kilo, anogenital mesafenin azalması, ergenliğin başlamasının gecikmesi gibi sonuçlar görülmüştür. Bu çalışmada doğuma, ölü doğum oranına ve yeni doğanda hipofizin gonadotropin serbestleştirici hormona (GnRH) yanıtına ilişkin bir etki bulunmamışsa da, bu konuda kesin veriler olmadığından izoflavon preparatlarının hamilelik süresince kullanılmaması önerilmiştir¹⁰⁴. Ayrıca laktasyonda kullanımı da önerilmemektedir².

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitkisel Materyal

Deneysel çalışmalarımızda bitkisel materyal olarak; *Trifolium pratense* L. var. *pratense* ve *T. pratense* L. var. *sativum* Schreb. olmak üzere 2 adet *Trifolium pratense* alt türü çiçekli evrelerinde toplanmıştır. Toplanan türler teşhis edildikten sonra, gölgede kurutulmuş ve deneysel çalışmalarda bu türlerin toprak üstü kısımları çalışılacağı zaman toz edilerek kullanılmıştır.

Materyallerden hazırlanan herbaryum örnekleri, Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Herbaryumu'nda (GAZI) muhafaza edilmektedir.

Türlerin toplandıkları lokaliteler şöyledir:

T. pratense L. var. *pratense*

B6 Adana: Tufanbeyli, Yamanlı köyü yol ayrımı, İncedere köprüsü çevresi, tarla kenarı, 1550 m, 20.05.2006 (B.B. 2774).

T. pratense L. var. *sativum* Schreb.

C9 Van: Çatak-Eski orman deposu, nemli alanlar, 1500 m, 16.6.2006 (B.B. 1836)

* Tez çalışmalarında kullanılan bitkisel materyallerin toplanmasında ve teşhisindeki katkılarından dolayı Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Nezaket ADIGÜZEL ve Arş. Gör. Barış BANI'ye teşekkürlerimizi sunarız.

3.1.2. HPLC Analizinde Kullanılan Standartlar

Deneysel çalışmalarımızda kullandığımız izoflavonoit standartları olan genistein, daidzein, formononetin ve biokanin A Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) firmasından satın alınmıştır.

3.1. 3. HPLC cihazı

Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakóltesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda bulunan Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi Cihazı (High Performance Liquid Chromatography, HPLC); Agilent Technologies 1200 model sıvı kromatografi cihazı kullanılmıştır ve piklerin alanları otomatik olarak hesaplanmıştır.

3.1. 4. HPLC Analizinde Kullanılan Solvanlar

HPLC analizinde solvan olarak HPLC saflıkta metanol (Merck), analitik saflıkta asetik asit (Merck) ve kromatografik saflıkta bidistile su kullanılmıştır. Solvanlar 0.45 µm filtreden (Millipore, Milford, USA) geçirilip ultrasonik su banyosunda degaze edilmiştir.

* Tez konusunu teşkil eden *Trifolium pratense* ekstralarında izoflavonoit miktar tayini amacıyla Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakóltesi Analitik Kimya Anabilim Dalı imkanlarından faydalanarak HPLC analizlerinin yapılmasına olanak sağlayan Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Nilgün Günden Göğer ve Yard. Doç. Dr. Uğur Tamer'e teşekkürlerimizi sunarız.

3.2. Yöntemler

3.2.1. HPLC Analizi İçin Ekstrelerin Hazırlanması

3.2.1.1. Metanol ile ekstraksiyon

Trifolium türlerine ait kurutulmuş ve toz edilmiş topraküstü kısımları (0.2-0.3 g), 20'şer ml % 80 metanol (Merck) ilave edilerek, 85 °C'ye ısıtılmış manyetik karıştırıcı üzerinde, geri çeviren soğutucu altında iki kez 30 dakika refluks işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen ekstreler filtre kağıdından süzülerek alçak basınç altında 40°C'de kuruluğa kadar yoğunlaştırılmıştır. Yoğun ekstreler HPLC metanolde çözülerek katı-faz ekstraksiyon işlemi için C₁₈ kartuştan (Waters) geçirilmiştir. Bu şekilde temizlenen numuneler yoğunlaştırılmış ve analiz öncesinde HPLC metanolde çözülerek 0.45 µm filtreden (Millipore, Milford, USA) süzülmüştür. Ardından numunelerin uygun dilüsyonları hazırlanarak HPLC kolonuna enjekte edilmiştir (E₁). Hazırlanan ekstreler bitkide bulunan serbest aglikonları ve heterozitleri taşımaktadır.

3.2.1.2. Asit taşıyan metanol ile ekstraksiyon

Trifolium türlerine ait kurutulmuş ve toz edilmiş topraküstü kısımları (0.2-0.3 g), heterozit halinde bulunan izoflavonların hidrolizi için, 20'şer ml % 80 metanol (trifloroasetik asit ile pH 3'e asitlendirilmiş) ilave edilerek, 85 °C'ye ısıtılmış manyetik karıştırıcı üzerinde, geri çeviren soğutucu altında iki kez 30 dakika refluks işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen ekstreler filtre kağıdından süzülerek alçak basınç altında 40°C'de kuruluğa kadar yoğunlaştırılmıştır. Yoğun ekstreler 1 ml HPLC metanolde çözülerek 9 ml deiyonize su ilave edilmiş ve katı-faz ekstraksiyon işlemi için C₁₈ kartuşa (Waters) tatbik edilmiştir. Kartuş 2 kez 10 ml deiyonize su ile yıkandıktan sonra ve kartuşta tutulan izoflavonlar 2 kez 10 ml metanol

ile elüe edilmiştir. Bu şekilde temizlenen numuneler kuruluğa kadar yoğunlaştırılmış ve analiz öncesinde HPLC metanolde çözülerek 0.45 µm filtreden (Millipore, Milford, USA) süzölmüştür. Ardından numunelerin uygun dilüsyonları hazırlanarak HPLC kolonuna enjekte edilmiştir (**E₂**). Hazırlanan ekstreler bitkide bulunan serbest aglikonları ve hidroliz işlemi ile heterozitlerden açığa çıkan aglikonları taşımaktadır.

3.2.2. Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

Daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A standartları 5 mg tam olarak tartıldı ve 1 ml DMSO (Merck) ilave edilerek vortekste tamamen çözümleri sağlandı (Stok çözeltiler). Stok solüsyonlar 4 °C'de karanlıkta saklandı. Stok solüsyonlardan metanol ile 5 farklı konsantrasyonda standartlar karışımı hazırlanarak ayrı ayrı kalibrasyon grafikleri elde edildi. Çalışılan standart solüsyonlar, stok solüsyonlardan günlük taze olarak HPLC metanol ile dilüe edilerek hazırlandı. Bütün dilüsyonlar 0.45 µm filtreden geçirilerek HPLC analizine hazır hale getirildi. Tüm dilüsyonlar 3'er kez enjekte edilerek pik alanları saptandı ve buradan hareketle $y=mx+n$ doğru denklemleri hesaplandı.

3.2.3. HPLC Yöntemi

Trifolium pratense örneklerinden belirli konsantrasyonlarda hazırlanan ekstraler HPLC ile aşağıda belirtilen koşullarda* kantitatif olarak incelenmiştir.

HPLC Analizinde Kullanılan Kromatografik şartlar:

HPLC Cihazı: Agilent Technologies 1200 model Sıvı Kromatografi sistemi

Kolon: Supelcosil™ LC-18 (15cm x 4.6 mm I.D.)

Partikül büyüklüğü: 5 µm

Kolon Sıcaklığı: 25 °C

Mobil Faz: A: % 0,3 Asetik asit, B: Metanol, Gradient elüsyon (Tablo 3)

Detektör: UV-270 nm

Enjeksiyon Hacmi: 5µl

Analiz süresi: 27 dakika

Tablo 3: HPLC analizinde uygulanan gradient elüsyon

Zaman (dk)	Mobil Faz (%)		Akış Hızı (ml/dk)
	A	B	
0:00	50	50	0.6
14:00	50	50	0.6
15:00	50	50	0.8
20:00	35	65	0.8
25:00	30	70	0.8
27:00	50	50	0.8

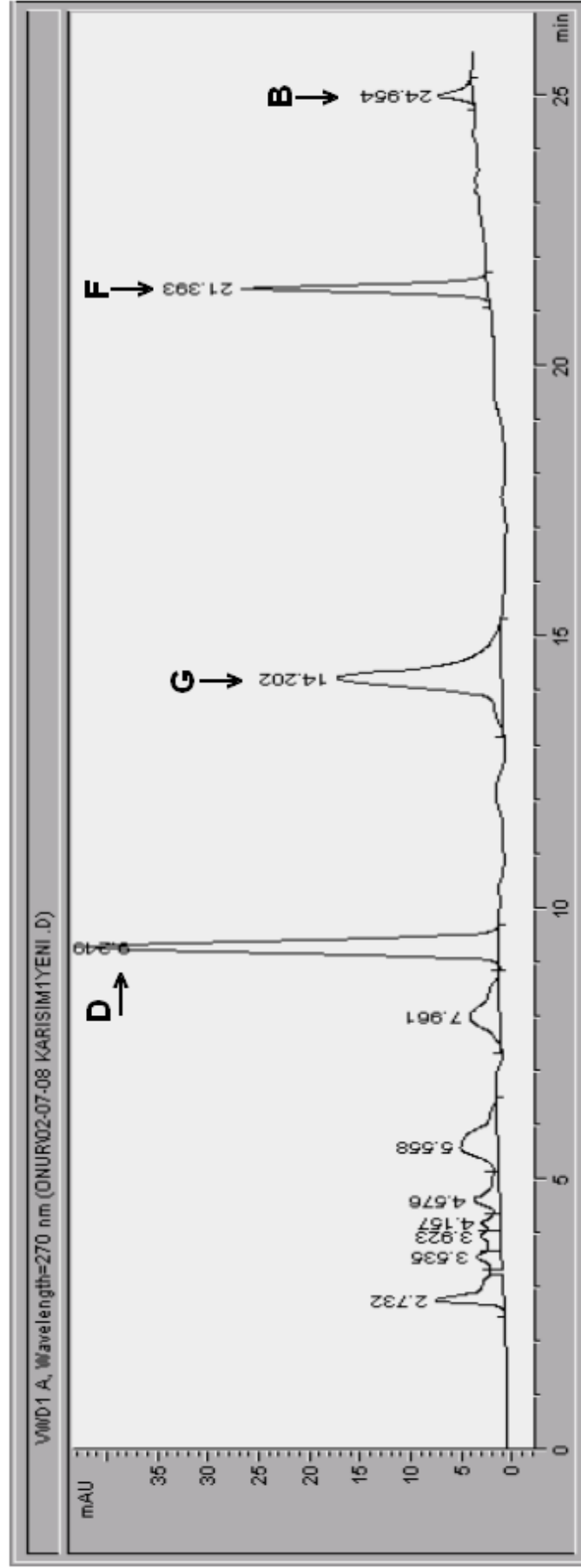
*HPLC koşulları tarafımızdan geliştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Kalibrasyon Eğrileri

Daidzein için 2.17-17.5 µg/ml, genistein için 1.08-8.75 µg/ml, formononetin için 1.08-8.75 µg/ml ve biokanin A için 0.156-12.5 µg/ml konsantrasyonlarda kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir. Standartların HPLC kromatogramı Şekil 16'da verilmiştir.

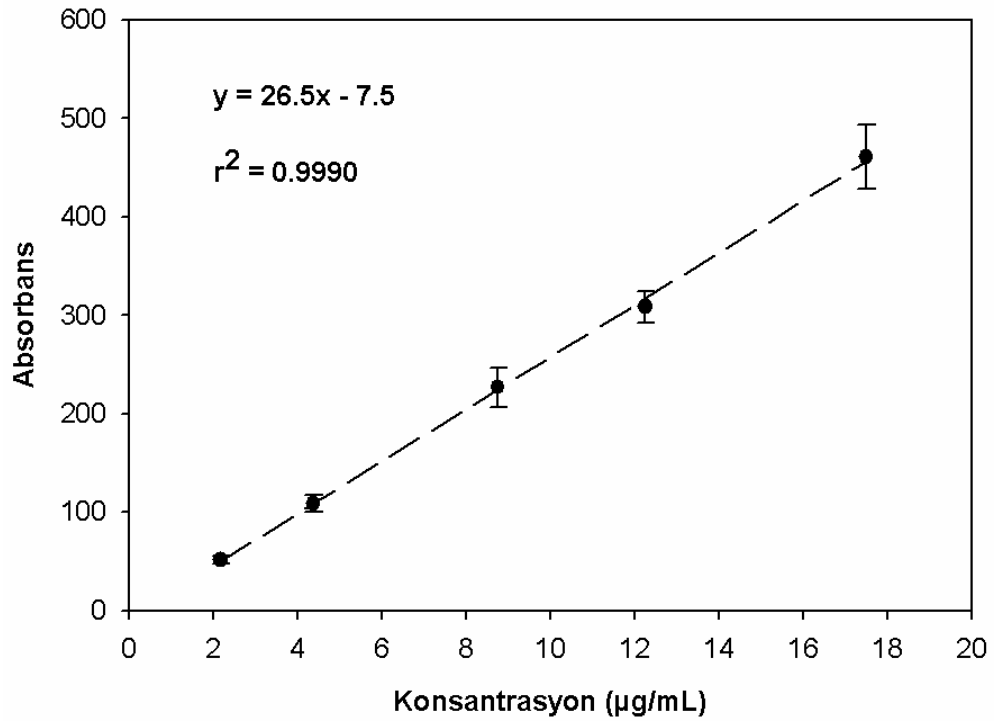
Kalibrasyon eğrilerinin hazırlanmasında standartlar için bulunan pik alanları Tablo 4-7'de ve her bir standart için elde edilen kalibrasyon grafikleri ile doğru denklemleri Şekil 17-20'de verilmiştir.



Şekil 16: Standart daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A'nın HPLC kromatogramı

Tablo 4: Kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında daidzein için kullanılan pik alanları

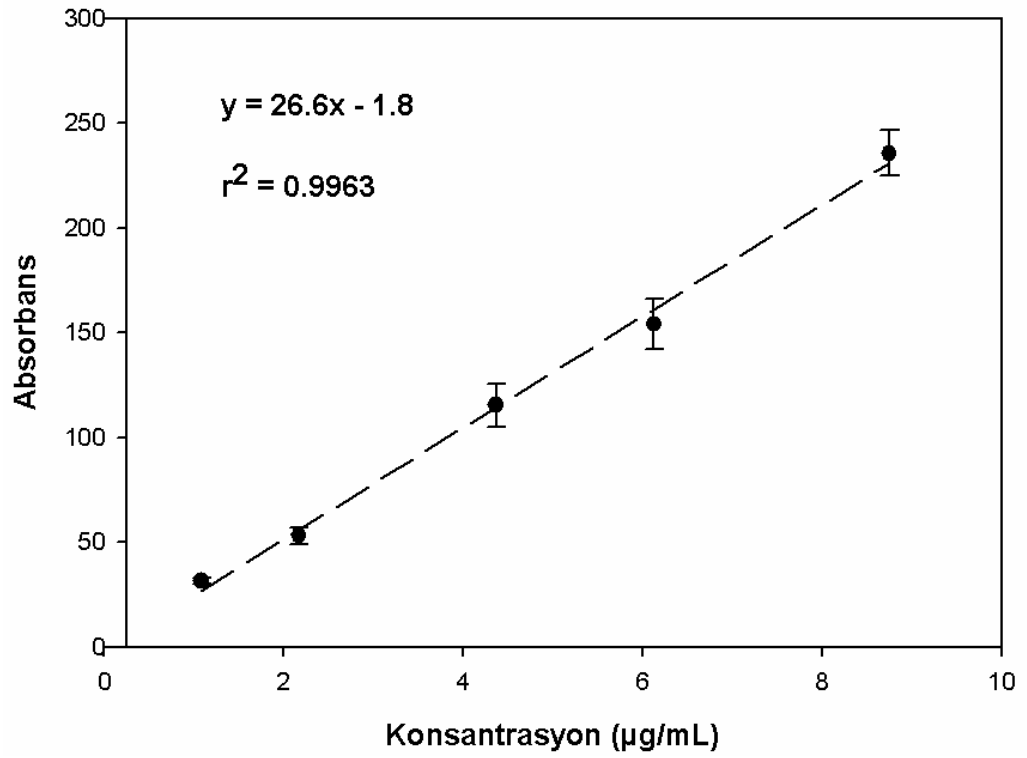
Konsantrasyon (µg/mL)	Daidzein Pik Alanı (n=3)
2.17	51.23
4.37	108.67
8.75	226.91
12.25	308.60
17.5	460.76



Şekil 17: Standart daidzein kalibrasyon grafiği ve doğru denklemi

Tablo 5: Kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında genistein için kullanılan pik alanları

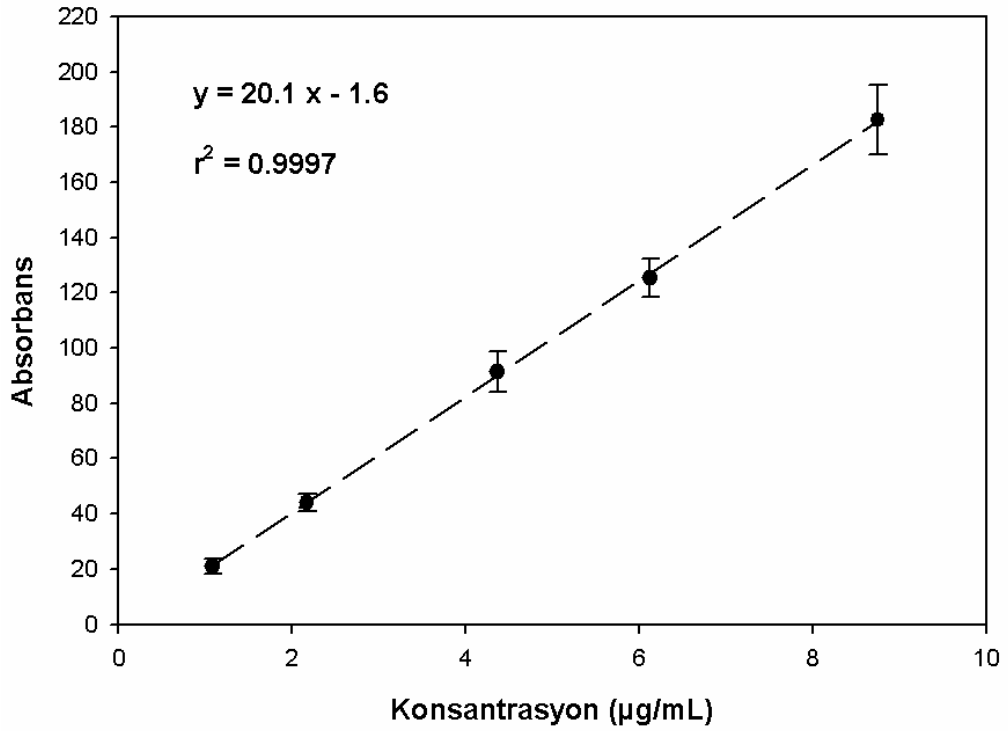
Konsantrasyon (µg/mL)	Genistein Pik Alanı (n=3)
1.08	31.37
2.17	53.04
4.37	115.39
6.125	154.2
8.75	235.53



Şekil 18: Standart genistein kalibrasyon grafiği ve doğru denklemi

Tablo 6: Kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında formononetin için kullanılan pik alanları

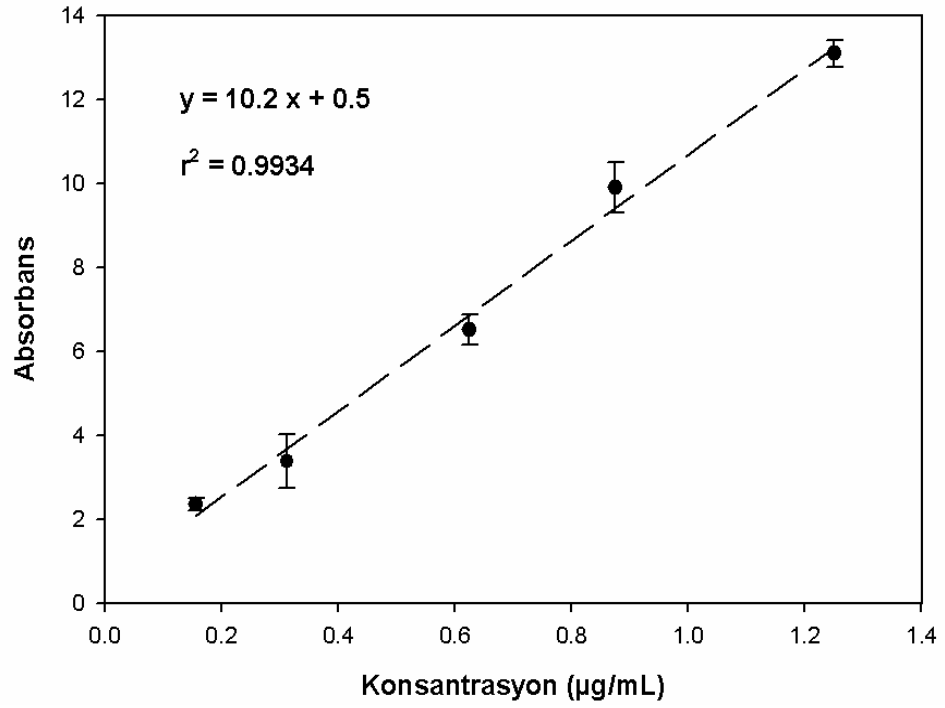
Konsantrasyon (µg/mL)	Formononetin Pik Alanı (n=3)
1.08	20.93
2.17	43.97
4.37	91.46
6.125	125.40
8.75	182.66



Şekil 19: Standart formononetin kalibrasyon grafiği ve doğru denklemi

Tablo 7: Kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında biokanın A için kullanılan pik alanları

Konsantrasyon (µg/mL)	Biokanın A Pik Alanı (n=3)
0.156	2.35
0.312	3.38
0.625	6.52
0.875	9.90
1.25	13.10



Şekil 20: Standart biokanın A kalibrasyon grafiği ve doğru denklemi

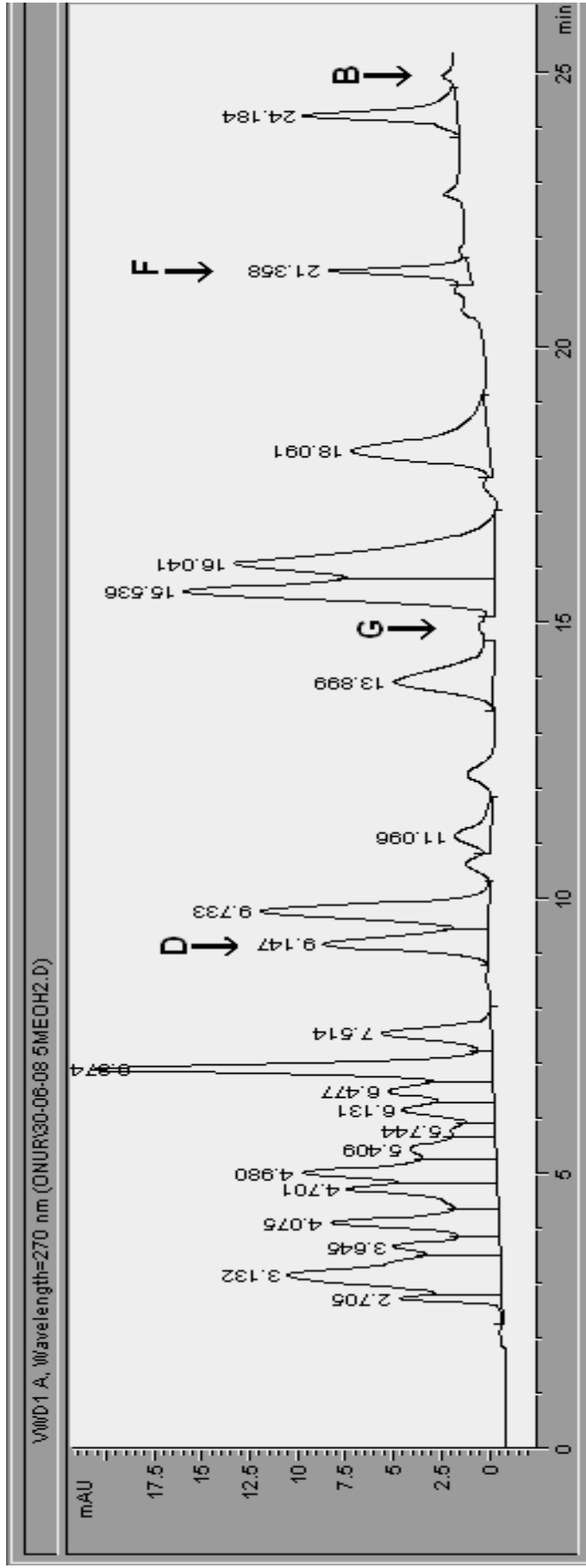
4.2. HPLC ile Miktar Tayini

Trifolium pratense var. *pratense* ve *T. pratense* var. *sativum*'un topraküstü kısımlarından, yöntemler kısmında belirtildiği üzere hazırlanan ekstrelerde daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A miktarları HPLC ile belirlenmiştir. Elde edilen kromatogramlardaki (Şekil 21-24) pik alanlarının konsantrasyonla olan ilişkisinden hareketle, standartlar ile hazırlanan kalibrasyon denklemlerinden yararlanılarak, kuru bitki örneklerindeki yukarıda bahsi geçen dört izoflavonun miktarları % cinsinden belirlenmiş ve Tablo 8'de verilmiştir.

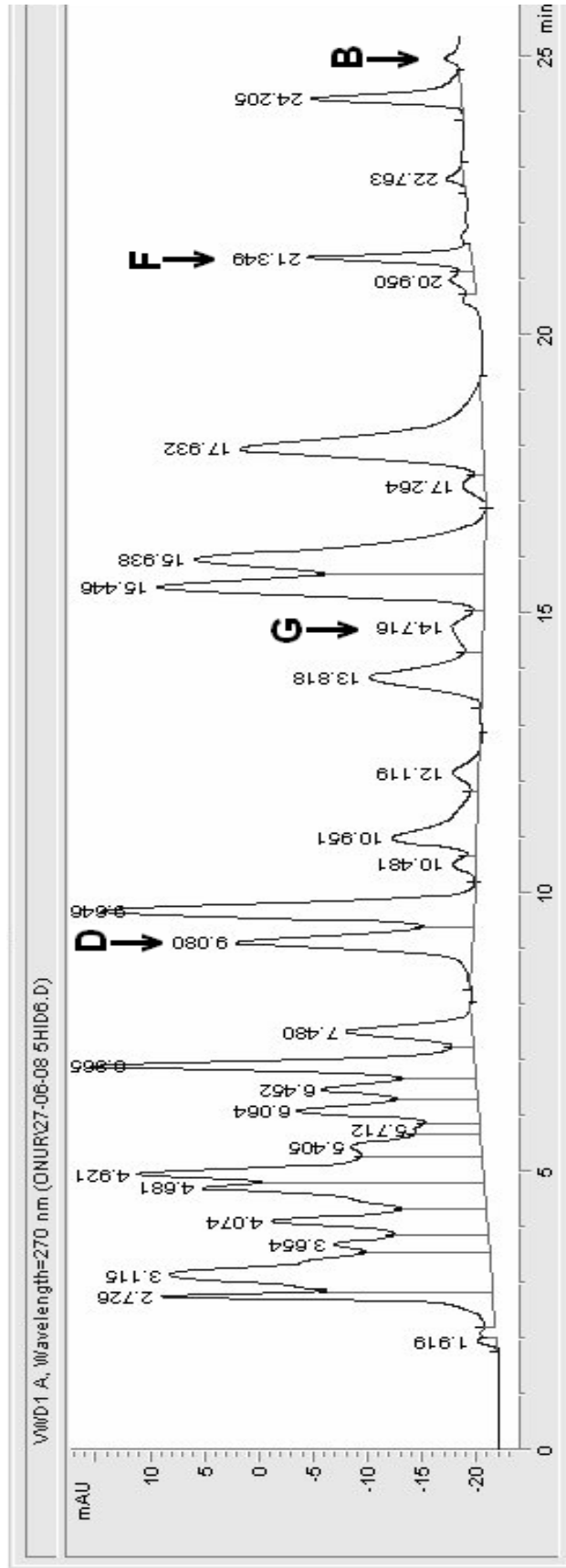
Tablo 8: *Trifolium pratense* var. *pratense* ve *Trifolium pratense* var. *sativum* ekstrelerinde % daidzein, genistein formononetin ve biokanin A miktarları

Ekstreler	Daidzein (Ortalama±SS)	Genistein (Ortalama±SS)	Formononetin (Ortalama±SS)	Biokanin A (Ortalama±SS)
<i>T. pratense</i> var. <i>pratense</i> E ₁	0,0398±0,0022	0,0025±0,0014	0,0175±0,0015	0,0023±0,0002
<i>T. pratense</i> var. <i>pratense</i> E ₂	0,0447±0,0007	0,0115±0,0006	0,0251±0,0008	0,0039±0,0001
<i>T. pratense</i> var. <i>sativum</i> E ₁	0,0204±0,0007	0,0035±0,0026	0,0059±0,0002	0,0022±0,0001
<i>T. pratense</i> var. <i>sativum</i> E ₂	0,0257±0,0028	0,0086±0,0002	0,0079±0,0001	0,0035±0,0003

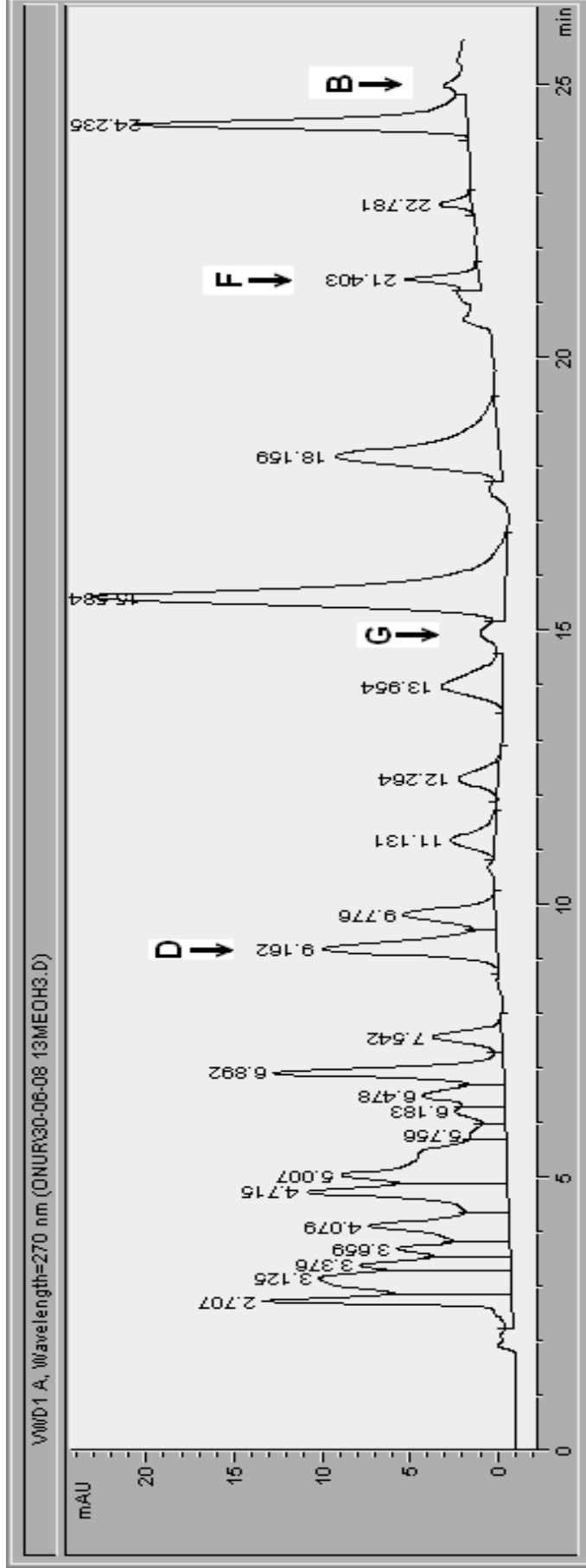
* SS: Standart sapma



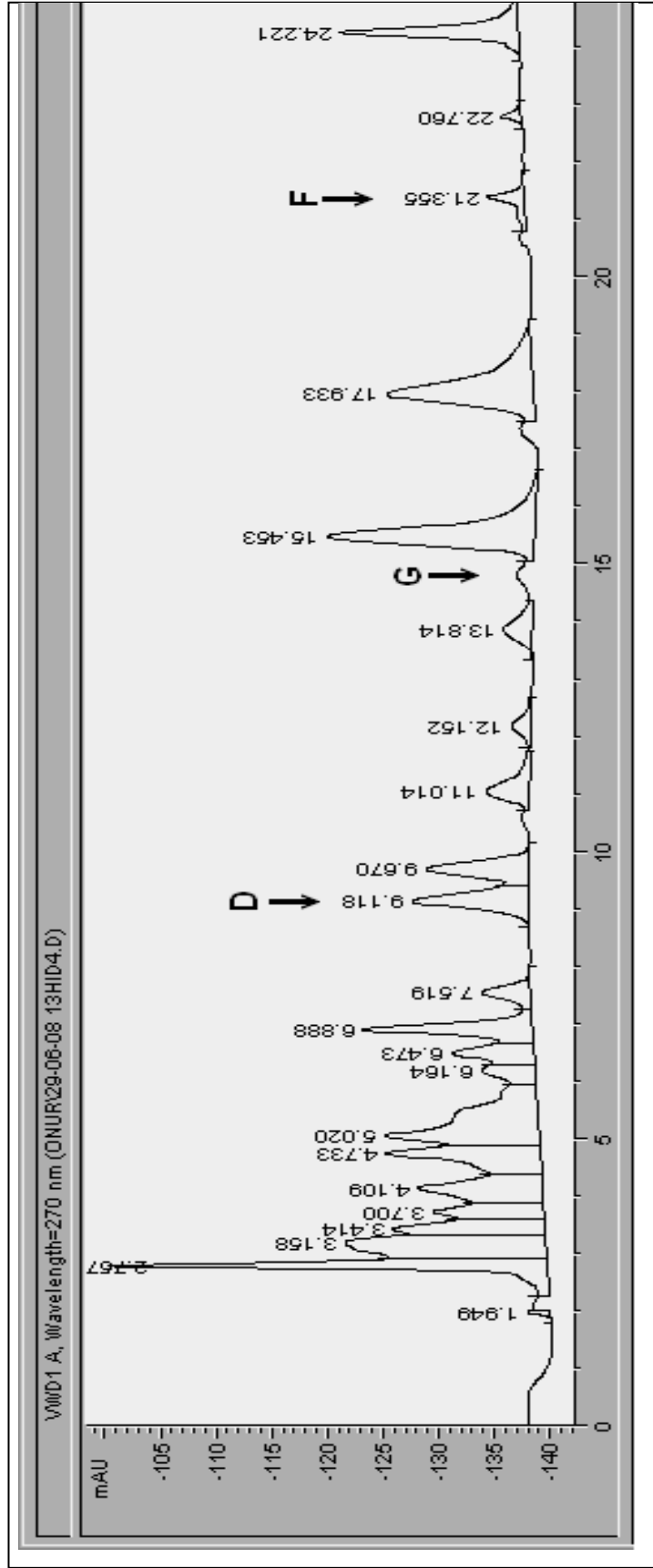
Şekil 21: *Trifolium pratense* var. *pratense* E:ekstresinin HPLC kromatogramı(D:Daidzein, G:Genistein, F:Formononetin, B:Biokanin A)



Şekil 22: *Trifolium pratense* var. *pratense* E₂ ekstresinin HPLC kromatogramı(D:Daidzein, G:Genistein, F:Formononetin, B:Biokanin A)



Şekil 23: *Trifolium pratense* var. *sativum* E₁ ekstrelinin HPLC kromatogramı(D:Daidzein, G:Genistein, F:Formononetin, B:Biochanin A)



Şekil 24: *Trifolium pratense* var. *sativum* E₂ ekstrelinin HPLC kromatogramı (D:Daidzein, G:Genistein, F:Formononetin, B:Biokanin A)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, ülkemizde doğal olarak yetişen ve şimdiye kadar taşıdığı izoflavonları bakımından incelenmemiş olan *Trifolium pratense* L. (Leguminosae) bitkisinin iki farklı bölgeden toplanan varyetelerinin (var. *pratense* ve var. *sativum*) daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A içeriği HPLC yöntemi ile tayin edilmiştir.

Gradient şartlarda karşıt faz kullanılarak yapılan HPLC analiz sonuçları Tablo 8'de verilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A miktarları, her iki varyete için de asit hidroliz ile hazırlanan örneklerde daha yüksek miktarlarda bulunmuştur. Total daidzein ve genistein miktarları sırasıyla en yüksek oranda % 0.0447 ve % 0.0115 ile *T. pratense* var. *pratense*'de tespit edilmiştir. Benzer şekilde yine aynı bitkide total formononetin ve biokanin A sırasıyla % 0.0251 ve % 0.0039 ile en yüksek miktarda belirlenmiştir.

Dünyanın değişik bölgelerinde yetişen *T. pratense* örnekleri üzerinde yapılan çalışmalarda, bitkinin taşıdığı başlıca izoflavonların formononetin ve biokanin A olduğu, bunlar yanında az miktarda daidzein ve genistein bulunduğu görülmektedir. Rijke ve ark.'nın Hollanda'da yetişen *T. pratense* yapraklarında bulunan izoflavonları HPLC yöntemi ile belirledikleri çalışmada, bitkinin daidzein ve genistein içermediği, % 0.06 oranında formononetin ve % 0.033 oranında biokanin A taşıdığı tespit edilmiştir²². Avustruya'da yetişen *Trifolium pratense* örneğinde yapılan bir çalışmada, bitkinin % 0.011 daidzein, % 0.010 genistein, % 0.289 formononetin ve % 0.204 oranında biokanin A taşıdığı bildirilmiştir⁶⁵. Son yıllarda Brezilya'da yetiştirilen *T. pratense* popülasyonlarının incelendiği diğer bir çalışmada ise, yaprakların % 0.00078-0.009131 oranında

daidzein, % 0.0051-0.0171 genistein, % 0.656-2.346 oranında formononetin ve % 0.249-1.033 oranında biokanin A taşıdığı tespit edilmiştir ⁷⁰. Bu çalışmalarda bildirilen izoflavon miktarları ile bulgularımızı karşılaştırdığımızda, üzerinde çalıştığımız *T. pratense* var. *pratense* ve var. *sativum*'daki total formononetin ve biokanin A miktarlarının literatürlerde belirtilen miktarlara oranla daha düşük, daidzein miktarlarının bildirilen miktarlara oranla daha yüksek ve genistein miktarlarının ise literatürlerde bildirilen miktarlarla benzer oranlarda olduğu görülmektedir. Bitkinin taşıdığı izoflavon miktarları üzerinde bitkinin toplandığı zaman, çiçek rengi, bitki kısmı ve kültür koşullarının oldukça etkili olduğu bildirilmiştir ⁶⁴.

Taşıdığı izoflavonları nedeniyle fitoöstrojen olarak bilinen ve bu bileşikleri taşıyan standart bitki ekstrelerini ihtiva eden preparatları, özellikle hormon replasman tedavisinde menopoz şikayetlerini gidermek üzere yaygın olarak kullanılan *Trifolium pratense* (Red clover) kanser, kalp hastalıkları ve osteoporoz'un önlenmesinde de etkileri klinik çalışmalarla kanıtlanmış olan bir bitkidir. Çalışmamız Türkiye'de yetişen *T. pratense*'nin farklı bölgelerden toplanan iki varyetesinin izoflavonları yönünden incelenmesine yönelik yapılmakla beraber, ülkemiz florasında 120 taksonla temsil edilen *Trifolium* cinsinin ⁷⁻⁹ diğer türlerinin de toplanıp izoflavon miktarlarının belirlenmesi, fitoterapide önemi gün geçtikçe artan fitoöstrojenlerin yeni kaynaklarının belirlenmesi bakımından uygun görülmektedir. Çalışmalarımızın bir sonraki aşamasında, bu doğrultuda ilerlemesi planlanmaktadır. Bununla birlikte tıbbi amaçlarla kullanılacak bitki ekstrelerinin standardizasyonu açısından, bitkinin zirai yetiştirme koşullarının optimize edilerek kültüre alınması akılcı bir yaklaşım olacaktır.

6. ÖZET

Trifolium pratense L. (red clover) son zamanlarda, insan sağlığına, özellikle de kadınların sağlığına faydalı, önemli bir izoflavon kaynağı olarak büyük ilgi görmektedir. Bitkinin taşıdığı başlıca izoflavonlar, formononetin ve biokanin A, yanısıra az miktarlarda daidzein ve genistein'dir.

Trifolium cinsi, Türkiye florasında 120 takson ile temsil edilmekte olup, bu türler üzerinde bugüne kadar herhangi bir analitik çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmada, Türkiye'nin farklı yerlerinden toplanan 2 farklı *Trifolium pratense* varyetesi olan *T. pratense* var. *pratense* ve *T. pratense* var. *sativum*'un topraküstü kısımlarından hareketle hazırlanan metanollü ve asit hidroliz yapılmış metanollü ekstraktlarda, daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A adlı dört izoflavonun HPLC ile miktar tayinleri yapılmıştır. Sonuç olarak; en yüksek total daidzein, genistein, formononetin ve biokanin A miktarları sırasıyla % 0.0447, % 0.0115, % 0.0251 ve % 0.0039 olarak *T. pratense* var. *pratense*'de bulunmuştur.

7. SUMMARY

Red clover (*Trifolium pratense* L.) has recently received considerable interest as a valuable source of isoflavones for many human health benefits, particularly in the area of women's health. In red clover, the main isoflavones are formononetin and biochanin A, with smaller concentrations of daidzein and genistein.

This genus is represented by 120 taxons in the flora of Turkey and, up to date, no any analytical study has been performed on Turkish *Trifolium* species. In this study, the methanolic and aside hydrolyzed methanolic extracts prepared from the aerial parts of two varieties of *Trifolium pratense* collected from different parts of Turkey, namely *T. pratense* var. *pratense* and *T. pratense* var. *sativum*, have been analyzed to determine the concentrations of four isoflavones, daidzein, genistein, formononetin and biochanin A, by HPLC. As a conclusion, the highest content of total daidzein, genistein, formononetin, and biochanin A were found as 0.0447, 0.0115, 0.0251 and 0.0039 % in *T. pratense* var. *pratense*, respectively.

8.KAYNAKLAR

1. Stuart, M. *Herbs and Herbalism*. London: Orbis Ltd.;1984.
2. Gruenwald J, Brendler T, Jaenicke C. PDR for Herbal Medicines. Second edition. New Jersey: Thompson-Physicians' Desk Reference; 2000.
3. Heinrich M, Barnes J, Gibbons S, Williamson EM. Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2004.
4. Baytop T, Türkiyede Bitkiler ile Tedavi. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 1999.
5. Cos P, Bruyne TD, Apers S, Berghe DV, Pieters L, Vlietinck AJ. Phytoestrogens: Recent Developments. *Planta Med.* 2003; 69: 589-599.
6. Munro IC, Harwood M, Hlywka JJ, Stephen AM, Dou II J, Flamm G, Adlercreutz H. Soy Isoflavones: A safety Review. *Nutr. Rev.* 2003; 61: 1-33.
7. Zohary M. *Trifolium* L. in: Flora of Turkey and the East Aegean Islands. (Davis PH, eds), Vol. 3, p. 384-482. Edinburgh: Edinburgh University Press 1970.
8. Davis PH, Mill RR, Tan K. *Trifolium* L. in: Flora of Turkey and the East Aegean Islands. (Davis PH, eds), Vol. 10, p. 126. Edinburgh: Edinburgh University Press; 1988.
9. Byfield AJ. *Trifolium* L. in: Flora of Turkey and the East Aegean Islands. (Güner A, Özhatay N, Ekim T, Başer KHC, eds), Vol. 11, p. 95. Edinburgh: Edinburgh University Press; 2000.
10. Tanker N, Koyuncu M, Coşkun M. *Farmasötik Botanik*. 3. Baskı. Ankara: Ankara Üniv. Eczacılık Fak. Yayınları; 2007.
11. Baytop A. *Farmasötik Botanik Ders Kitabı*. 5.Baskı. İstanbul: İstanbul Üniv. Eczacılık Fak. Yayınları; 1996.
12. Evans WC. *Trease and Evans Pharmacognosy*. 15.edition. Edinburgh: Saunders; 2002.

13. Davis PH. Leguminosae in: Flora of Turkey and the East Aegean Islands. (Davis PH, Mill RR, Tan K, eds), Vol. 3, p. 1-10. Edinburgh: Edinburgh University Press; 1970
14. Bisby FA, Buckingham J, Harborne JB. Phytochemical Dictionary of the Leguminosae. London: Chapman and Hall; 1994.
15. Fooa LY, Lua Y, Molanb AL, Woodfieldb GR, McNabbbb WC. The Phenols and Prodelphinidins of White Clover Flowers. *Phytochemistry* 2000; 54: 539-548.
16. Oleszek W, Stochmal A. Triterpene saponins and flavonoids in the seeds of *Trifolium* species. *Phytochemistry* 2002; 61 165–170.
17. Ponce MA, Scervino JM, Balsells RE, Ocampo JA, Godeas AM. Flavonoids from shoots and roots of *Trifolium repens* (white clover) grown in presence or absence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Phytochemistry* 2004; 65: 1925–1930.
18. Drenin AA, Botirov EK, Petrulyak EV. Two new isoflavonoid monogalactosides from *Trifolium pratense* roots. *Chem. Nat. Comp.* 2008; 44(1): 24-27.
19. Tamura, Chang CF, Suzuki A, Kumai S. Chemical studies on clover sickness. I. Isolation and structural elucidation of two new isoflavonoids in red clover. *Agric. Biol. Chem.* 1969; 33(3): 391-397.
20. Miletic S, Milosavljevic S, Vidakovic M. The isolation and identification of flavonoids from the leaves of *Trifolium pannonicum* L. *J. Serbian Chem. Society* 1991; 56(6): 307-10.
21. Saxena VK, Jain AK. Genistein 7-(2"-p-coumaroyl)glucoside) from *Trifolium repens*. *Phytochemistry* 1986; 25(11): 2687-8
22. Rijke E, Zappey H, Ariese F, Gooijer C, Brinkman UAT. Flavonoids in Leguminosae: Analysis of extracts of *T. pratense* L., *T. dubium* L., *T. repens* L., and *L. corniculatus* L. leaves using liquid chromatography with UV, mass spectrometric and fluorescence detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 2003; 10: 216-303.
23. Klejdus B, Sterbova DV, Kuban V. Identification of isoflavone conjugates in red clover (*Trifolium pratense*) by liquid chromatography–mass spectrometry after two-dimensional solid-phase extraction. *Anal. Chim. Acta* 2001; 450: 81–97.

- 24 Rijke E, Zafra-Gomez A, Ariese F, Brinkman UAT, Gooijer C. Determination of isoflavone glucoside malonates in *Trifolium pratense* L. (red clover) extracts: quantification and stability studies. *J. Chromatog. A* 2001; 932: 55-64.
- 25 Maatoq GT. Trifolexin : a new flavanonol derivative from *Trifolium alexandrinum* seeds. *Mansoura J. Pharm. Sci.* 1997; 13(1): 70-78.
- 26 Mohamed KM, Mohamed MH, Ohtani K, Kasai R, Kazuo Y. Megastigmane glycosides from seeds of *Trifolium alexandrinum*. *Phytochemistry* 1999; 50(5): 859-862.
- 27 Mohameda KM, Hassaneana HA, Ohtanib K, Kasaib R, Yamasaki K. Chalconol glucosides from seeds of *Trifolium alexandrinum*. *Phytochemistry* 2000; 53: 401-404.
- 28 Petersone E, Vanaga A, Girudskaya RS, Petersone E. Evaluation of six clover species with respect to quantitative content of hydroxy coumarins. *Nauka-Prakt. Farm.* 1974: 57-62.
- 29 Spencer RR, Witt SC, Lundin RE, Bickoff EM. Bicomol, a new bicoumarinyl, from ladino clover (*Trifolium repens* L.). *J. Agric. Food Chem.* 1967; 15(3): 536-538.
- 30 Livingston AL, Bickoff EM, Jurd L. Isolation of daphnoretin from ladino clover. *J. Agric. Food Chem.* 1964; 12(6): 535-536.
- 31 Bickoff EM, Lyman RL, Livingston AL, Booth AN. Characterization of coumestrol, a naturally occurring plant estrogen. *J. American Chem. Society* 1958; 80: 3969-71.
- 32 Zhan QF, Xia ZH, Wang JL, Lao AN. Two New Bicoumarins From *Trifolium repens* L. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2003; 5 (4): 303–306.
- 33 Oleszek W, Jurzysta M. Isolation, chemical characterization and biological activity of red clover (*Trifolium pratense* L.) root saponins. *Acta Soc. Bot. Poloniae* 1986; 55(2): 247-52.
- 34 Sakamoto S, Kofuji S, Kuroyanagi M, Ueno A, Sekita S. Saponins from *Trifolium repens*. *Phytochemistry* 1992; 31(5): 1773-7
- 35 Zhan Q, Xia Z, Bai H, Lao A. Research of the chemical constituents of *Trifolium repens*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2005; 30 (4): 311-312.

- 36 Jurzysta M, Price K, Ridout C, Fenwick R. Structures of four triterpenoid saponins isolated from the seed of *Trifolium incarnatum*. Acta Soc. Bot. Poloniae 1989; 58(4): 575-82
- 37 Simonet AM, Stochmal A, Oleszek W, Macias FA. Saponins and polar compounds from *Trifolium resupinatum*. Phytochemistry 1999; 51: 1065-1067.
- 38 Mohamed KM, Ohtani K, Kasai R, Kazuo Y. Oleanane glycosides from seeds of *Trifolium alexandrinum*. Phytochemistry 1995; 40: 1237-1242.
- 39 Paplauskiene V, Sprainaitis A. Variability of cyanogenic glucoside content in white clover plants. Biologija 2003; 1: 85-88.
- 40 Ayres JF, Murison RD, Turner AD, Hareden S. A rapid semi-quantitative procedure for screening hydrocyanic acid in white clover (*Trifolium repens* L.). Austr. J. Exp. Agric. 2001; 41(4): 515-521.
- 41 Tava A, Annicchiarico P. Spectrophotometer-aided evaluation of cyanogenic potential in white clover (*Trifolium repens* L.). Phytochem. Anal. 2000; 11(3):169-173.
- 42 Collinge DB, Hughes MA. Developmental and physiological studies on the cyanogenic glucosides of white clover, *Trifolium repens* L. J. Exp. Bot. 1982; 33(132): 154-161.
- 43 Tapia T, Perich F, Palma G, Quiroz A. Identification of volatiles from differently aged red clover (*Trifolium pratense*) root extracts and behavioural responses of clover root borer (*Hylastinus obscurus*) (Marsham) (Coleoptera: Scolytidae) to them. Biochem. System Ecol. 2007; 35 (2): 61-67.
- 44 Buchbauer G, Jirovetz L, Nikiforov A. Comparative Investigation of Essential Clover Flower Oils from Austria Using Gas Chromatography-Flame Ionization Detection, Gas Chromatography-Mass Spectrometry, and Gas Chromatography-Olfactometry. J. Agric. Food Chem. 1996; 44(7): 1827-1828.
- 45 Takayasu K. Components and mass spectrometry of essential oils of forage sorghums and clovers. J. Fac. Appl. Biol. Sci. 1992; 31(1): 1-10.

- 46 Takayasu K. Aromatic constituents of forage crops. 3. Qualitative and quantitative analyses of the essential oils of red and ladino white clovers. J. Agric. Food Chem. 1978; 26(5): 1194-1197.
- 47 Kameoka H, Chi-Pao W, Tokimitsu K. Terpenoids in the essential oil from the flower of *Trifolium repens* L. Agric. Biol. Chem. 1997; 41(9): 1785-1786.
- 48 Adam M, Dobias P, Eisner A, Ventura K. Headspace single-drop microextraction of herbal essential oils. J. Sep. Sci. 2008; 31: 356-363.
- 49 Wang S, Ghisalberti EL, Ridsdill-Smith J. Volatiles from *Trifolium* as feeding deterrents of redlegged earth mites. Phytochemistry 1999; 52: 601-605.
- 50 Thomson AC, Knight WE. Surface lipids of *Trifolium* species. Phytochemistry 1978; 17(10): 1755-1756.
- 51 Weenink RO. Lipids of the acetone-insoluble fraction from red clover leaves. Biochem. J. 1964; 93(3): 606-611.
- 52 Weenink RO, Shorland FB. Isolation of trans-3-hexadecenoic acid from the lipids of red clover (*Trifolium pratense*) leaves. Biochim Biophys. Acta 1964; 84(5): 613-614.
- 53 Weenink RO. Minor constituents of the acetone-soluble lipids of red-clover leaves. Biochemical J. 1962; 82: 523-527.
- 54 Weenink RO. Acetone-soluble lipides of grasses and other forage plants. I. Galactolipides of red clover (*Trifolium pratense*) leaves. J. of the Sci. Food Agric. 1961; 12: 34-38.
- 55 Sabudak T, Işık E, Öksüz S. Lipid constituents of *Trifolium resupinatum* var. *microcephalum*. Nat. Prod. Res. 2007; 21(9): 828-833.
- 56 Bruneton, J. Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. Paris: Technique & Documentation-Lavoisier ; 1995.
- 57 Andersen OM, Markham KR. Flavonoids, Chemistry, Biochemistry and Applications. Florida: CRC Press; 2006.
- 58 Vacek J, Klejdus B, Lojkova L, Kuban V. Current trends in isolation, separation, determination and identification of isoflavones. J. Sep. Sci. 2008; 31: 20054-20067.

- 59 Wu CY, Lai SM. Preparative isolation of isoflavones from defatted soy flakes J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 2007 ; 30 : 1617 – 1640.
- 60 Apers S, Naessens T, Van Den Steen K, Cuyckens F, Claeys M, Pieters L, Vlietinck A. Fast high-performance liquid chromatography method for quality control of soy extracts. J. Chromatogr. A 2004; 1038: 107 – 112
- 61 Klejdus B, Vitamvasova, Kuban V. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of isoflavones in plant materials after isolation by solid-phase extraction. J. Chromatogr. A 1999; 839: 261-263.
- 62 Klejdus B, Vacek J, Benesova L, Kopecky J, Lapcik O, Kuban V. Rapid-resolution HPLC with spectrometric detection for the determination of isoflavones in soy preparations and plant extracts. Anal. Bioanal. Chem. 2007; 389:2277-2285.
- 63 Ma XF, Tu PF, Chen YJ, Zhang TY, Wei Y, Ito Y. Preparative isolation and purification of two isoflavones from *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao by high-speed counter-current chromatography. J. Chromatogr. A 2003; 992: 193 – 197.
- 64 Booth NL, Overk CR, Yao P, Burdette JE, Nikolic D, Chen SN, Bolton JL, Breemen RB, Pauli GF, Farnsworth NR. The Chemical and Biological Profile of a Red Clover (*Trifolium pratense*) Phase II Clinical Extract. J. Altern. Comp. Med. 2006; 12(2): 133-139.
- 65 Delmonte P, Perry J, Rader JI. Determination of isoflavones in dietary supplements containing soy, Red Clover and Kudzu: Extraction followed by basic or acid hydrolysis. J. Chromatogr. A 2006; 1107: 59-69.
- 66 Saviranta NMM, Anttonen MJ, Wright A, Karjalainen RO. Red Clover (*Trifolium pratense* L.) isoflavones: determination of concentrations by plant stage, flower colour, plant part and cultivar. J. Sci. Food and Agric. 2008; 88: 125-132.
- 67 Krenn L, Unterrieder I, Ruprecht R. Quantification of isoflavones in red clover by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. B 2002; 777: 123-128.

- 68 Stürtz M, Lander V, Schmid W, Winterhalter P. Preparative isolation of isoflavones from soy and red clover. *Mol. Nutr. Food Res.* 2006; 50: 356-361.
- 69 Wu Q, Wang M, Simon JE. Determination of isoflavones in red clover and related species by high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* 2003; 1016: 195-209.
- 70 Olasek j, Queiroz EF, Hostettmann K. On-line identification of Phenolic Compounds of *Trifolium* Species using HPLC-UV-MS and Post-column UV-derivatisation. *Phytochem. Anal.* 2007; 18: 13-23.
- 71 Klejdus B, Vacek J, Lojkova L, Kuban V. Ultrahigh-pressure liquid chromatography of isoflavones and phenolic acids on different stationary phases. *J. Chromatogr. A.* 2008; 1195(1-2): 52-9.
- 72 Ramos GP, Dias PM, Morais CB, Fröhlich PE, Dall-Agnol M, Zuanazzi JAS. LC determination of four isoflavone aglycones in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Chromatographia.* 2007; 67: 12-129.
- 73 Klejdus B, Lojkova L, Koblovská R, Moravcova J, Kuban V. Supercritical fluid extraction of isoflavones from biological samples with ultra-fast high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 2005; 28(12): 1334-46.
- 74 So FV, Guthrie N, AF, Carroll KK. Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of excess estrogen. *Cancer Let.* 1997; 112: 127- 133.
- 75 Beck V, Unterrieder E, Krenn L, Kubelka W, Jungbauer A. Comparison of hormonal activity (estrogen, androgen and progestin) of standardized plant extracts for large scale use in hormone replacement therapy. *J. Steroid Biochem. & Mol. Bio.* 2003; 84: 259-268.
- 76 Beck V, Rohr U, Jungbauer A. Phytoestrogens derived from red clover: An alternative to estrogen replacement therapy? *J. Steroid Biochem. & Mol. Bio.* 2005; 94: 499-518.
- 77 Dornstauder E, Jisa E, Unterrieder I, Krenn L, Kubelka W, Jungbauer A. Estrogenic activity of two standardized red clover extracts (Menoflavon ®) intended for large scale use in hormone

replacement therapy. *J. Steroid Biochem. & Mol. Bio.* 2001; 78: 67–75.

- 78 Birt DF, Hendrich S, Wang W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol. Ther.* 2001; 90: 157– 177.
- 79 Barrett M, editors. *Handbook of Clinically Tested Herbal Remedies.Vol.1* New York: The Howorth Herbal Press; 2004.
- 80 Van de Weijer PHM, Barentsen R. Isoflavones from red clover (Promensil®) significantly reduce menopausal hot flush symptoms compared with placebo. *Maturitas* 2002; 42: 187–193.
- 81 Knight DC, Howes JB, Eden JA. The effect of Promensil, an isoflavone extract, on menopausal symptoms. *Climacteric.* 1999;2:79–84.
- 82 Baber RJ, Templeman C, Morton T, Kelly GE, West L. Randomized placebo-controlled trial of an isoflavone supplement and menopausal symptoms in women. *Climacteric.* 1999;2:85–92.
- 83 Tice JA, Ettinger B, Ensrud K, Wallace R, Blackwell T, Cummings SR. Phytoestrogen Supplements for the Treatment of Hot Flashes: The Isoflavone Clover Extract (ICE) Study. *JAMA* 2003; 290: 207-214.
- 84 Jeri AR. The use of an isoflavone supplement to relieve hot flashes. *Female Patient.* 2002;27:35–37.
- 85 Clifton-Bligh PB, Baber RJ, Fulcher GR, Nery ML, Moreton T. The effect of isoflavones extracted from red clover (Rimostil) on lipid and bone metabolism. *Menopause: The J. The North American Menopause Society* 2001; 8(4): 259–265.
- 86 Nestel PJ, Pomeroy S, Kay S, Komesaroff P, Behrsing J, Cameron JD, West L. Isoflavones from Red Clover Improve Systemic Arterial Compliance But Not Plasma Lipids in Menopausal Women. *The J. Clinical Endocrinology & Metabolism* Printed in U.S.A. 1999; 84(3): 895-898.
- 87 Howes JB, Tran D, Brillante D, Howes LG. Effects of dietary supplementation with isoflavones from red clover on ambulatory blood pressure and endothelial function in postmenopausal type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism.* 2003; 5: 325-332.

- 88 Samman S, Lyons Wall PM, Chan GSM, Smith SJ, Petocz P. The effect of supplementation with isoflavones on plasma lipids and oxidisability of low density lipoprotein in premenopausal women. *Atherosclerosis*. 1999; 147(2): 277-283.
- 89 Mousavi Y, Adlercreutz H. Genistein is an effective stimulator of sex hormone-binding globulin production in hepatocarcinoma human liver cancer cells and suppresses proliferation of these cells in culture. *Steroids*. 1993; 58(7): 301-304.
- 90 Peterson G, Barnes S. Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cells: Independence from estrogen receptors and the multi-drug resistance gene. *Biochem and Biophys. Res. Com.* 1991; 179(1): 661-667.
- 91 Wende K, Krenn L, Unterrieder I, Lindequist U. Red Clover Extracts Stimulate Differentiation of Human Osteoblastic Osteosarcoma HOS58 Cells. *Planta Med.* 2004; 70: 1003-1005.
- 92 Adlercreutz H, Honjo H, Higashi A, Fotsis T, Hamalainen E, Hasegawa T, Okada H. Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet. *The Am. J. Clin. Nut.* 1991; 54: 1093-1100.
- 93 Morton MS, Chan PSF, Cheng C, Blacklock N, Matos-Ferreira A, Abranches-Monteiro L, Correia R, Lloyd S, Griffiths K. Lignans and Isoflavonoids in Plasma and Prostatic Fluid in Men: Samples From Portugal, Hong Kong, and the United Kingdom. *The Prostate* 1997; 32: 122/128.
- 94 Madersbacher S, Ponholzer A, Schatzl G, Gsur A, Haidinger G, Vries C, Nijhuis L, Adlerereutz H. Phyto-oestrogens in BPH and Prostate Cancer Patients. *Eur. Uro. Supp.* 2003; 1: 36.
- 95 Engelhardt PF, Riedl CR. Effects of One-Year Treatment with Isoflavone Extract from Red Clover on Prostate, Liver Function, Sexual Function, and Quality of Life in Men with Elevated PSA Levels and Negative Prostate Biopsy Findings. *Urology* 2008; 71: 185-190.
- 96 Katz AE. Flavonoid and Botanical Approaches to Prostate Health. *The J. Alter. Complem. Med.* 2002; 8(6) 813-821.

- 97** Tsunoda N, Pomeroy S, Nestel P. Absorption in Humans of İzoflavones from Soy and Red Clover Is Similar. *J. Nutr.*, 2002; 132: 199-201.
- 98** Baltimore Washington Medical Center [internette]. 2008 [10.07.2008 okundu].
<http://health.bwmc.umms.org/altmed/articles/red-clover-000270.htm>
- 99** Food Additive Status List [internette]. 2008 [28.09.2008 okundu].
<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/eafus.html>
- 100** RX Mediafarma. Ver.2008.77.İzmir: Gemaş Genel Mühendislik; 2008.
- 101** Sweetman SC Martindale: *The Complete Drug Reference* 35. ed. London: Pharmaceutical Press, 2007.
- 102** Adams NR. Organizational and activational effects of phytoestrogens on the reproductive tract of the ewe. *PSEBM*. 1995; 208: 81-87.
- 103** Heck AM, Dewitt BA, Lukes AL. Potential interactions between alternative therapies and warfarin. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 2000; 57: 1221-1227.
- 104** Levy JR, Faber KA, Ayyash L, Hughes CL. The effect of prenatal exposure to the phytoestrogen genistein on sexual differentiation in rats. *Proceed. Soc. Exp. Biol. Med.* 1995; 208: 60-66.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı : ONUR
Soyadı : KADIOĞLU
Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara 1978
Eğitimi : Lisans, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 2000
Lise, Anıttepe Lisesi, 1995
Ortaokul, Anıttepe Ortaokulu, 1992
İlkokul, Mecidiye İlkokulu, 1989

Yabancı Dili : İngilizce