



YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Türkiye'de yet. aesculus hipp.
bitk. toh. kimy. bil. inc.

Doktora Tezi

A. Mert Acar

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
KÜTÜPHANE DOKÜMANTASYON
DAİRE BAŞKANLIĞI

Kot R 361
:.....102.....
Alındığı Yer :....Fen. Bil. Enstitüsü.....
:.....
Tarih :.....23/3/1992.....
Fatura :.....-.....
Fiyatı :.....25.000 TL.....
Ayniyat No :.....L/1.....
Kayıt No :.....48244.....
UDC :.....
Ek :.....

Y. T. Ü.

KÜTÜPHANE DOK. DAİRE BAŞKANLIĞI

T.C.
YILDIZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YAZARIN

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde değerli katkılarına bulunmuş
Yaz. Danışmanı ve Değerli Hocam Prof. Şirin PAKSOY'a teşekkür
borcuyum. Ayrıca, bu çalışmada yararlanılan kaynakları
kolaylıkla görebilmek için

TÜRKİYE'DE YETİŞEN
AESCULUS HIPPOCASTANUM L. BİTKİSİNİN
TOHUMLARININ KİMYASAL BİLEŞİMİNİN
İNCELENMESİ

102

Alper Mert ACAR
İstanbul, 1991

DOKTORA TEZİ



Kim. Yük. Müh.
ALPER MERT ACAR

Danışman
Prof. Şirin PAKSOY

İstanbul - 1991



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET

IV

SUMMARY

VI

1. GİRİŞ

TEŞEKKÜR

2. GENEL BÖLÜM

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde değerli katkılarda bulunan Tez-danışmanım ve değerli hocam Prof.Şirin PAKSOY'a teşekkür borçluyum. Ayrıca, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım bölümümüz öğretim üyelerine de teşekkür ederim.

2.3.1. Yağlar

2.3.2. Karbonhidratlar

2.3.2.1. Glikozit Mono ve Disakkaritler Alper Mert ACAR

2.3.2.2. Nükleotitler İstanbul, 1991

2.3.3. Amino

2.3.3.1. Karbonhidrat Analizi Metotları

2.3.3.2. Toksikolojik Elde Eten Metotları

2.3.4. Diğer Madde

3. DENEYSEL BÖLÜM

3.1. Toksikolojik İncelenebilir ve Analizlere Hazırlanması

3.2. Karbonhidrat Metotları

3.2.1. Yağlar

3.2.1.1. Karbonhidrat Analizi

3.2.1.2. Fiziksel ve Kimyasal

Özelliklerinin Belirlenmesi.

3.2.1.3. Fiziksel Özelliklerinin Analizi

3.2.1.3.1. IR-Spektrofotometrik Analiz

3.2.1.3.2. GC ile Yağ Asitlerinin Analizi



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET

IV

SUMMARY

VI

1. GİRİŞ

1

2. GENEL BÖLÜM

3

2.1. Aesculus Hippocastanum L.'nin Botanik

3

Özellikleri ve Yayılışı

2.2. Tohumların Kimyasal Yapısı

4

2.3. Bugüne Kadar Yapılan Çalışmalar

11

2.3.1. Yağlar

11

2.3.2. Karbonhidratlar

11

2.3.2.1. Serbest Mono ve Oligosakkaritler

11

2.3.2.2. Nişasta

12

2.3.3. Aescin

13

2.3.3.1. Kantitatif Analiz Metodları

14

2.3.3.2. Tohumdan Elde Etme Metodları

18

2.3.4. Diğer Maddeler

19

3. DENEYSEL BÖLÜM

21

3.1. Tohumların Toplanması ve Analizlere Hazırlanması

21

3.2. Kullanılan Metodlar

21

3.2.1. Yağlar

21

3.2.1.1. Kantitatif Analizi

22

3.2.1.2. Fiziksel ve Kimyasal

22

Özelliklerinin Belirlenmesi.

3.2.1.3. Trigliserit Bileşiminin Analizi

24

3.2.1.3.1. TLC-Spektrofotometrik Analiz

25

3.2.1.3.2. GC İle Yağ Asitlerinin Analizi

26

3.2.2. Karbonhidratlar	27
3.2.2.1. Serbest Mono ve Oligosakkaritlerin Kalitatif Analizi	28
3.2.2.2. Serbest Mono ve Oligosakkaritlerin Kantitatif Analizi	29
3.2.2.3. Nişastanın Kantitatif Analizi	31
3.2.3. Aescin	34
3.2.3.1. Schlemmer'e Göre Kantitatif Analizi	34
3.2.3.2. Yeni Bir Metodla Kantitatif Analizi	36
3.2.3.3. Tohumdan Eldesi ve Standartla Karşılaştırılması	44
3.2.4. Kül Analizi	45
3.3. Bulgular	45
3.3.1. Nem Miktarları	45
3.3.2. Yağlar	46
3.3.2.1. Yağ Miktarları	46
3.3.2.2. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	47
3.3.2.3. TLC-Spektrofotometrik Bulgular	48
3.3.2.4. Yağ Asitleri Bileşimi	49
3.3.3. Karbonhidratlar	53
3.3.3.1. Serbest Mono ve Oligosakkaritlerin Bileşimi	53
3.3.3.2. Serbest Mono ve Oligosakkaritlerin Miktarları	55
3.3.3.3. Nişasta Miktarları	56
3.3.4. Aescin	57
3.3.4.1. Schlemmer Metoduna Göre Bulunan Miktarlar	57

	Sayfa No
3.3.4.2. Yeni Metod ile Bulunan Miktarlar	57
3.3.4.3. Aescin Analizi Metodlarının	58
İstatistik Değerlendirmesi.	
3.3.4.4. Tohumdan Elde Edilen Aescin'in	61
Standart İle Karşılaştırılması.	
3.3.5. Kül Analizi Bulguları	64
4. TARTIŞMA	65
- LİTERATÜR	70
- ÖZGEÇMİŞ	77



ÖZET

Bu çalışmada, Türkiye'de yetişen *Aesculus Hippocastanum* L. bitkisinin tohumlarının kimyasal bileşimi araştırıldı. Tohumların ana bileşenleri olan yağ, nişasta, serbest sakkarit ve aescin miktarları belirlendi.

Tohumların olgunlaşma döneminde, onbeşer gün ara ile üç grup örnek toplandı. Stabilizasyon öncesi toplam nem, sonra kalan nem tayinleri yapıldı. Taze tohumdaki toplam nem % 46,54-50,89 olarak bulundu. Yağ miktarı gravimetrik olarak belirlendi. Yağın kimyasal karakteristikleri tayin edildi. Triglicerit bileşimi TLC-spektrofotometrik ve GC ile araştırıldı. Nişasta miktarı, spesifik çevirme açısı tayininden sonra polarimetrik metodla bulundu. Serbest mono ve oligosakkaritlerin kalitatif analizi TLC ile, kantitatif analizi ise Shaffer-Somogy mikro metoduna göre volümetrik olarak yapıldı. Aescin miktarı, spektrofotometrik olarak Schlemmer metoduna göre tayin edildi. Tohum unundan aescin analizi için daha hızlı ve yüksek prezisyonlu bir metod geliştirildi. Türev spektrofotometrisine dayanan bu metod ile paralel tayinler yapıldı. Bulunan sonuçlar, istatistik olarak değerlendirildi. Aescin izole edilerek, standart ile (Fluka A.G) karşılaştırıldı. Kül miktarı, kuru tohumu göre % 1,99-2,02 olarak bulundu. Külde bulunan sodyum, potasyum, kalsiyum ve magnezyum miktarları alev fotometresi ile belirlendi.



Kuru tohumu göre aescin, nişasta, serbest mono oligosakkarit ve yağ miktarları sırasıyla % 6,20-7,75, % 35,82-44,49, % 7,94-10,27 ve % 4,87-6,07 olarak bulundu. Sözü edilen ana bileşen miktarlarının toplanma zamanına göre değişimi belirlendi. Aescin miktarının, en son toplanan tohumlarda daha yüksek olduğu görüldü.

In the following part of work, the effect of drying on the content of aescin, starch, free mono oligosaccharide and fat in the seed of *Scilla maritima* was investigated. The results showed that the content of aescin, starch, free mono oligosaccharide and fat in the seed of *Scilla maritima* was 6.20-7.75%, 35.82-44.49%, 7.94-10.27% and 4.87-6.07% respectively. The effect of drying on the content of aescin, starch, free mono oligosaccharide and fat in the seed of *Scilla maritima* was investigated. The results showed that the content of aescin, starch, free mono oligosaccharide and fat in the seed of *Scilla maritima* was 6.20-7.75%, 35.82-44.49%, 7.94-10.27% and 4.87-6.07% respectively. The effect of drying on the content of aescin, starch, free mono oligosaccharide and fat in the seed of *Scilla maritima* was investigated. The results showed that the content of aescin, starch, free mono oligosaccharide and fat in the seed of *Scilla maritima* was 6.20-7.75%, 35.82-44.49%, 7.94-10.27% and 4.87-6.07% respectively.

Aescin, starch, free mono oligosaccharide and fat levels of the dry seed of *Scilla maritima* were 6.20-7.75%, 35.82-44.49%, 7.94-10.27% and 4.87-6.07% respectively. Variations



SUMMARY

In the present work, chemical composition of the *Aesculus Hippocastanum* L. plant seeds were investigated. Levels of oil, starch, free saccharide and aescin which are the major components of the seeds were determined.

In the maturation period of seeds, three groups of sample were picked every 15 days. Before stabilization total humidity, and after the remaining humidity levels were determined. The humidity level for the fresh seeds was found as 46,54 % - 50,89 %. The amount of oil was found gravimetrically and the chemical characteristics of the oils were determined. The triglyceride content was investigated by TLC-spectrophotometry and GC. Starch level was determined polarimetrically. Qualitative analysis of mono- and oligosaccharides were performed by TLC and quantitative analysis by Shaffer-Somogy micro method. Aescin level was determined according to Schlemmer spectrophotometric method. A quick and high precision method was improved for aescin analysis from ground seeds. Using derivative spectrophotometric method, parallel determinations were done. Obtained results were investigated statistically. Isolated aescin was compared to the standard aescin (Fluka A.G.). Ash level of dry seed was found as 2,0 %. Sodium, potassium, calcium and magnesium contents of the ash were determined by flame photometry.

Aescin, starch, free mono-oligosaccharide and oil levels of the dry seed were found as respectively; 6,20-7,75 %, 35,82-44,49 %, 7,94-10,27 % and 4,87-6,07 %. Variations of the seed's

major components were determined according to their picking time. It was observed that, the last picked seeds contain more aescin as compared to the previously picked ones.



1. GİRİŞ *

Aesculus Hippocastanum L., Türkiye'de "at kestanesi" adı ile tanınan bir ağaçtır. Park, bahçe ve yol kenarlarında yaygın olarak görülür. Tohum, kabuk, çiçek ve yapraklarında farmakolojik ve kozmetik önemi olan maddeler vardır. Tohumlar, bulundurduğu saponinler açısından, bitkinin diğer kısımlarına göre daha önemlidir.

Tohumlarda ana bileşen olarak saponinlerin yanısıra yağ, nişasta ve serbest mono-oligosakkaritler bulunur. Tohumlar üzerindeki çalışmalar çok eskilere dayanır. 1700'lerin başından beri, çeşitli ülkelerde halk arasında ilaç olarak kullanıldığı bilinmektedir (1). İlk bilimsel yayın; 1835'de Fremy'nin saponinlerin bulunduğunu ispatlayan makalesidir (2). Tedavi amacı ile kullanılışı Rastschow ve arkadaşlarının çalışmaları ile başlamıştır (3). Bulundurduğu saponinlerin yapı aydınlatma çalışmaları, 1970'lerin başlarında tamamlanmıştır. Tohum üzerindeki çalışmalar günümüzde de sürmektedir.

Tohumdaki aktif maddelerin genel farmakolojik etkileri şöyle sıralanabilir : antiödem (4), kapiler permabilite üzerindeki etkisi (15), antienflamatuar (6), antifungal(7) ve sitotoksik (8) etkiler. Bu etkiler dolayısıyla flebit, tromboflebit, farenjit, tonsillit, rinitis, venöz bozuklukları, varis, tromboz, kapiler koruyucu, ven iltihapları, ödem, kafatası travmaları, periferik damar tıkanıklıkları, hemerroid, anal fissör, adele krampları gibi kullanım alanlarına sahiptir (9, 10). Kozmetik olarak da, çeşitli saç, cilt ve diş preparatlarında kullanılmaktadır (11).

* Bülent Yılmaz, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Araştırma Fonu Tarafından Destaklanmıştır (99-A-01-01-01)

Söz konusu tohumun Batı Almanya'daki tüketimi 1800 ton/yıl olarak bildirilmiştir (12). Yine aynı ülkede damar hastalıklarına karşı kullanılan ilaçların % 32'sinde, bitkisel ekstre taşıyan ilaçların ise % 75'inde yer almaktadır (12). Farmakolojik ve kozmetik kullanımı dolayısıyla, ticari öneme sahiptir. Özellikle saponinlerin izolasyonu ve kullanımıyla ilgili pek çok patent alınmıştır.

Türkiye'de bu bitkiden faydalanılmamaktadır. Konu, "VI. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı" (1987) ve "Orman Tali Ürünleri Sempozyumu" (1988) gibi çeşitli toplantılarda dile getirilmekle beraber, henüz bir gelişme yoktur. Türkiye'de yetişen *Aesculus Hippocastanum* L. bitkisinin kimyasal bileşimine ait bir çalışma da kayıtlı değildir.

Bu çalışmada, Türkiye'de yetişen söz konusu bitkinin tohumlarının, kimyasal bileşimi araştırıldı. Ana bileşenlerin miktarları ve yapılarının yanı sıra, bu miktarların toplanma zamanına göre değişimi belirlendi. Tohumdan saponinlerin tayini için bir metod geliştirildi. Böylece, Türkiye'de yaygın olarak bulunan bu bitkiden faydalanılabilmesi için gerekli veriler elde edilmeye çalışıldı.



2. GENEL BÖLÜM

2.1. Aesculus Hippocastanum L.'nin Botanik Özellikleri ve Yayılışı.

Aesculus Hippocastanum L. ağacı, "Hippocastanaceae" familyasındandır. Bu familyanın üyelerinden biri olan Aesculusun, Kuzey Yarım kürenin ılıman bölgelerinde yetişen onüç türü vardır. Türkiye'de bunlardan üçüne rastlanır. Bunlardan Aesculus Pavia L., vatani Kuzey Amerika olan kırmızı-pembe çiçekli bir ağaççıktır. Diğeri ise Aesculus Carnea Hayne'dir. Pembe çiçekli olan bu ağaç A.Pavia L. ile A.Hippocastanum L.'nin melezidir. Vatani Kuzey Amerikadır. Aesculus Hippocastanum L.'nin vatani Balkanlar'dır. Diğeri bir kaynağa göre vatani Hindistan olup, Avrupa'ya (Fransa) ilk defa 17.yüzyıl başlarında İstanbul'dan götürülmüştür. Aesculus Hippocastanum L., diğerlerine göre Türkiye ve Avrupa'da en yaygın olarak bulunan türdür. Bitki, Kafkasya, Balkanlar ve Avrupa'nın bazı bölümlerinde yetişir (13, 14, 15, 16).

AesculusHippocastanum L.türü, 25 m'ye kadar yükselebilen, sık dallı, sık yapraklı ve yapraklarını döken ağaçlardır. Gövde kalın silindirik şeklinde ve gri-kahverengi bir kabukla örtülüdür. Yapraklar parçalı (palmat), 5-9 yaprakçıklı (foliolllü) ve ters ovat şekillidir. Çiçekler piramit şeklinde dik salkım, petaller beyaz, tabanda sarıdan pembeye kadar lekeli-dir. Tohum (meyva), 3-6 cm çapında, dikenli, 1-3 tohumlu lokusit kapsül halindedir. Tohumlar küremsi şekilli, parlak kah-verengi bir tasta ile kaplıdır (17, 18).



Yetiştirilmesi kolay ve nispeten hızlı büyüyen bir ağaç olduğundan bir çok ülkede kültürü yapılmaktadır. Üretilmeleri tohum veya aşı yoluyladır (13, 19).

Bitkinin, kabuk (Cortex Hippocastani), yaprak (Folia Hippocastani) ve çiçeklerinden (Flores Hippocastani) de faydalanılmaktadır. Tohumlar, eylül-ekim aylarında olgunlaşır. Olgunlaşmanın tamamlanmasından sonra dökülür (19).

2.2. Tohumların Kimyasal Yapısı

Tohumların ana bileşenleri yağ, serbest mono- ve oligosakkaritler, nişasta ve saponinlerdir. Taze tohumdaki nem miktarı, yaklaşık olarak ağırlığının yarısı kadardır.

Tohumda bulunan yağlar, lipidlerin Amerikan literatüründeki sınıflandırılmasına göre, basit lipidlerin nötral yağlar (trigliseritler) sınıfına girer. Bunlar, gliserinin yağ asitleri ile vermiş oldukları esterlerdir.

Diğer bir ana bileşen olan sakkaritler, mono- ve oligosakkaritler olarak serbest halde bulunurlar. Bir polisakkarit olan nişasta ise, tohumda en fazla bulunan bileşendir.

Aesculus Hippocastanum L. tohumları üzerinde yapılan çalışmaların büyük bir kısmı, bulundurduğu saponinlerle ilgilidir. Bunun sebebi, tohumdaki saponinlerin, farmakolojik ve kozmetik öneminin yanı sıra, oldukça ilginç bir yapıya sahip olmasıdır.

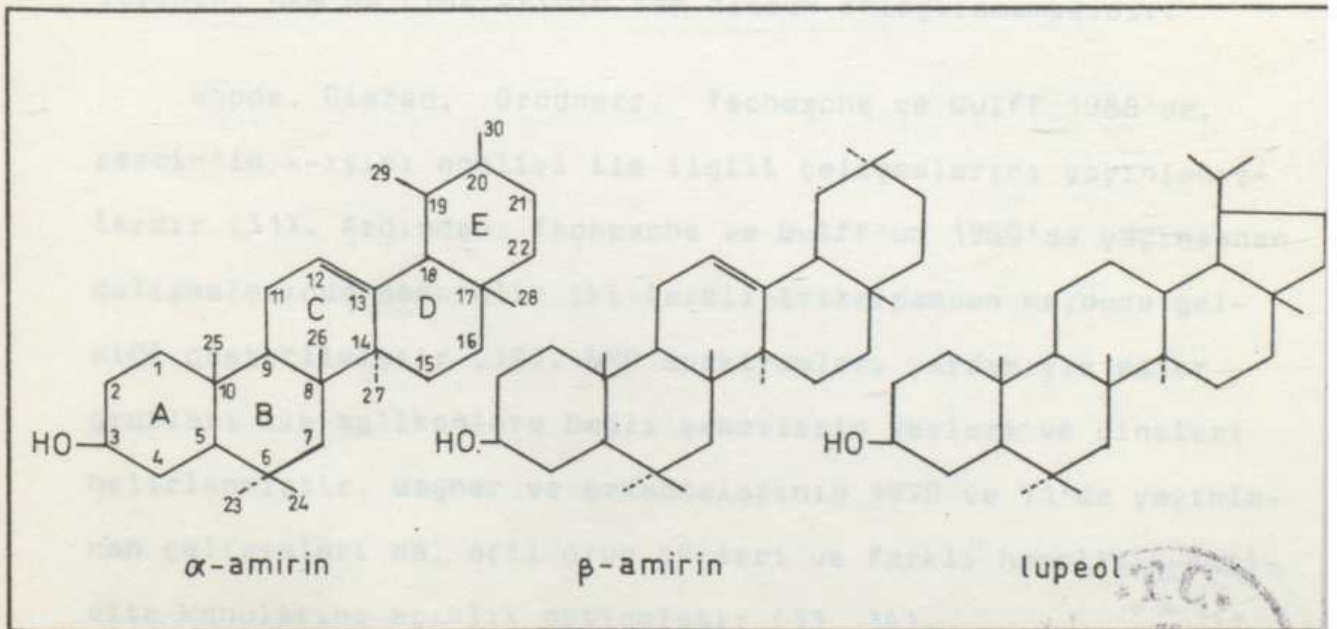


Saponinler, çok sayıda bitki familyasında bulunan glikozit yapısında maddelerdir. "Saponin" adı su ile köpürme özelliğinden gelir. Teschesche ve Wulff; saponinleri, aglikonunun yapısına göre üç gruba ayırmıştır (20):

- 1° Spirostanol Glikozitleri (=Steroid Glikozitleri)
- 2° Steroidalkoloid Glikozitleri
- 3° Triterpen Glikozitleri

İlk iki gruptaki saponinler, hidrojene haldeki fenantren-siklopentan'dan türerler. Triterpenik saponinlerin yapıları ise farklı olup, üç grupta incelenir (Şekil 1).

- a-) α -Amirin'ler
- b-) β - Amirin'ler
- c-) Lupeol'ler



Şekil 1. Triterpenik Saponinlerin Yapıları.

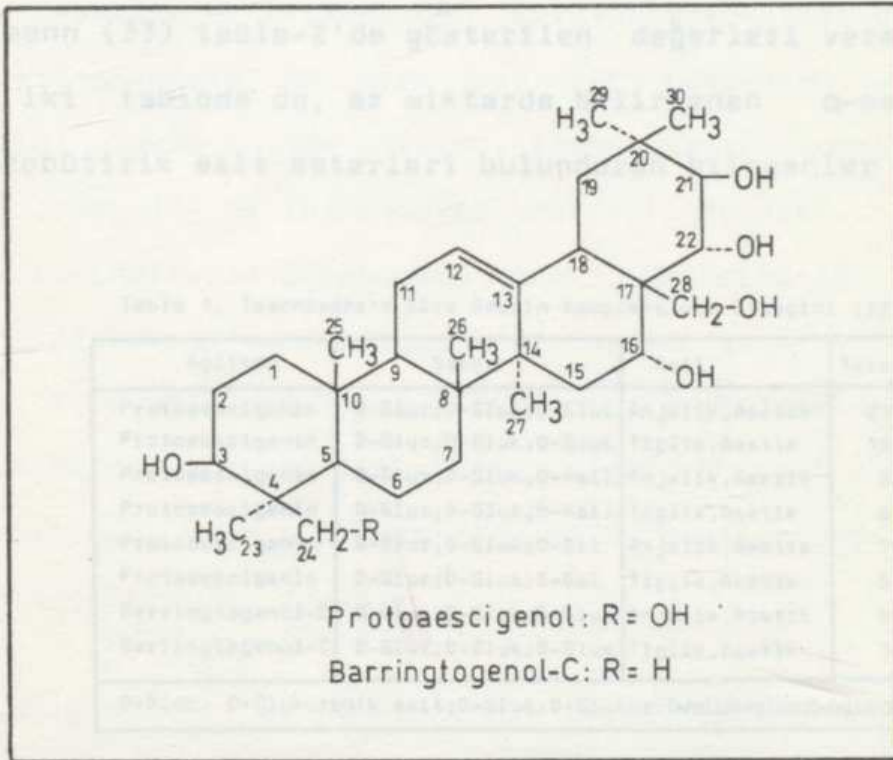
Söz konusu tohumlarda bulunan saponinler, triterpenik grupta bulunan β -amirin yapısındadır. Tohumda, ana halkalara bağlı -OH grupları esterleşmiş olarak bulunan ve heterogen bir yapı gösteren bu saponine "Aescin" adı verilir.

Aesculus Hippocastanum L.tohumlarındaki saponinlerin varlığı, 1835'de Fremy tarafından ortaya konmuştur (2). 1862'de bu saponinlerin glikozit karakterinde olduğu belirlenmiştir(21). Ancak, bağlı şekerlerin neler olduğu ve nasıl bağlandığı uzun süre anlaşılamamıştır. Saponin aglikonunun pentasiklik bir triterpen olduğu, 1942'de Ruzicka tarafından gösterilmiştir (22). 1926'da yayınlanan bir çalışmada bu saponinin, heterogen yapısına işaret edilmiştir (23). Fakat 1960'lı yılların sonlarına kadar, heterogen yapıya sahip olduğunu gösteren çalışmalar (24, 25) yanı sıra, tek bir madde olduğunu bildiren çalışmalar da yayınlanmıştır (26, 27, 28, 29, 30). Bunun sebebi; triterpen halkasına bağlı bulunan asit grupları ve şekerlerin, hem yerlerinin, hem de cinslerinin tam olarak anlaşılamamasıdır.

Hoppe, Gieren, Brodherr, Tschesche ve Wulff 1968'de, aescin'in x-ışını analizi ile ilgili çalışmalarını yayınlamışlardır (31). Ardından, Tschesche ve Wulff'un 1969'da yayınlanan çalışmalarında aescin'in iki farklı triterpenden meydana geldiği gösterilmiştir (32). NMR spektrumları yardımıyla ester grupları ile aglikonlara bağlı şekerlerin yerleri ve cinsleri belirlenmiştir. Wagner ve arkadaşlarının 1970 ve 71'de yayınlanan çalışmaları da, açıl grup güçleri ve farklı hemolitik aktivite konularına açıklık getirmiştir (33, 34).



Aescin'de bulunan iki farklı triterpen, "Protoaescigenol" ve "Barringtonol-C" dir. "Protoaescigenol" 3,16,21,22,24,28-hekza hidroksi- Δ^{12} -oleanen; "Barringtonol-C" ise 3,16,21,22,28-penta hidroksi- Δ^{12} -oleanen dir (Şekil 2).



Şekil 2. Aescin'de Bulunan İki Triterpenik Yapı.

Her iki triterpenik yapıda; 21.konumda bulunan -OH grubu tiglik veya anjelic asitlerle, 22.konumda bulunan -OH grubu çoğunlukla asetik asit, daha az oranda da α -metil bütirik veya izobütirik asitle esterleşmiştir. 3.Konumdaki -OH grubuna ise bir triholozit bağlıdır. Bunun birinci üyesi D-glukuronik asit, ikinci üyesi D-glukozdur. Üçüncü üyesi D-glukoz, D-ksiloz veya D-galaktoz'dur. Buna göre iki aglikon, bes

asitle esterleşip, üç ayrı triholozit ile bağlanarak, 30 tip saponozit meydana getirebilir. Karışımın çoğunluğunu, protoaescigenin'in özellikle anjelik ve asetik asit esterlerinin, D-glukuronik asit-D-glukoz-D-glukoz ile olan saponoziti oluşturur. Aescin kompleksinde bulunan saponozitlerin dağılımı için Tschesche ve Wulf (32) tablo-1'de; Wagner, Schlemmer ve Hoffmann (33) tablo-2'de gösterilen değerleri vermişlerdir. Her iki tabloda da, az miktarda belirlenen α -metil bütirik ve izobütirik asit esterleri bulunduran bileşenler verilmemiştir .

Tablo 1. Tschesche'ye Göre Aescin Kompleksinin Bileşimi (32).

Aglikon	Şeker	Asit	Aescin'de %
Protoaescigenin	D-Glur;D-Gluk;D-Gluk	Anjelik,Asetik	23
Protoaescigenin	D-Glur;D-Gluk;D-Gluk	Tiglik,Asetik	15
Protoaescigenin	D-Glur;D-Gluk;D-Ksil	Anjelik,Asetik	9
Protoaescigenin	D-Glur;D-Gluk;D-Ksil	Tiglik,Asetik	6
Protoaescigenin	D-Glur;D-Gluk;D-Gal	Anjelik,Asetik	7
Protoaescigenin	D-Glur;D-Gluk;D-Gal	Tiglik,Asetik	5
Berringtonenol-C	D-Glur;D-Gluk;D-Gluk	Anjelik,Asetik	5
Berringtonenol-C	D-Glur;D-Gluk;D-Gluk	Tiglik,Asetik	3
D-Glur: D-Glukuronik asit;D-Gluk:D-Glukoz;D-Ksil:D-Ksiloz;D-Gal:D-Galaktoz			

Tablo 2. Wagner'e Göre Aescin Kompleksinin Bileşimi (33).

Aglikon	Şeker	Asit	Aescin'de %
Protoaescigenin	D-Glur;D-Gluk;D-Gluk	Anjelik,Asetik	19
Protoaescigenin	D-Glur;D-Gluk;D-Gluk	Tiglik,Asetik	22
Protoaescigenin	D-Glur;D-Gluk;D-Ksil	Anjelik,Asetik	5
Protoaescigenin	D-Glur;D-Gluk;D-Ksil	Tiglik,Asetik	6
Protoaescigenin	D-Glur;D-Gluk;D-Gal	Anjelik,Asetik	1
Protoaescigenin	D-Glur;D-Gluk;D-Gal	Tiglik,Asetik	1
Berringtonenol-C	D-Glur;D-Gluk;D-Gluk	Anjelik,Asetik	< 1
Berringtonenol-C	D-Glur;D-Gluk;D-Gluk	Tiglik,Asetik	< 1
Berringtonenol-C	D-Glur;D-Gluk;D-Gal	Anjelik,Asetik	3
Berringtonenol-C	D-Glur;D-Gluk;D-Gal	Tiglik,Asetik	4
D-Glur:D-Glukuronik asit;D-Gluk:D-Glukoz;D-Ksil:D-Ksiloz;D-Gal:D-Galaktoz			

Bu karışımı oluşturan heterozitlerden ikisi, diğerlerine göre daha önemlidir. Bunlardan biri " β -aescin", diğeri ise "kriptoescin A" olarak adlandırılır. Her ikisinin aglikonu daprotoaescigenol'dür Her ikisinin de 3.konumunda 1 glukuronik asit ve 2 glukozdan oluşan oz zinciri bağlıdır. 21.Konumda ise tiglik veya anjelic asit vardır. Aralarındaki tek fark; asetik asitin β -aescin'de 22.konumda, kriptoescin-A'da ise 28.konumda esterleşmesidir. Bu fark her iki maddenin hemolitik indeksini büyük ölçüde etkiler. İzomerizasyon şartlarında, asetil grubu 22. ve 28.konumlar arasında göç eder. " α -Aescin" olarak adlandırılan diğeri bir izomer, Wagner'e göre β -aescin ve kriptoescin-A'nın karışımından meydana gelir (33). Bu izomerler; kristallenme kabiliyetleri, optik çevirmeleri, sudaki çözünürlükleri ve hemolitik aktiviteleri yönünden birbirlerinden farklıdır. α ve β -Aescin'in bazı özellikleri tablo-3'de gösterilmiştir (35, 10).

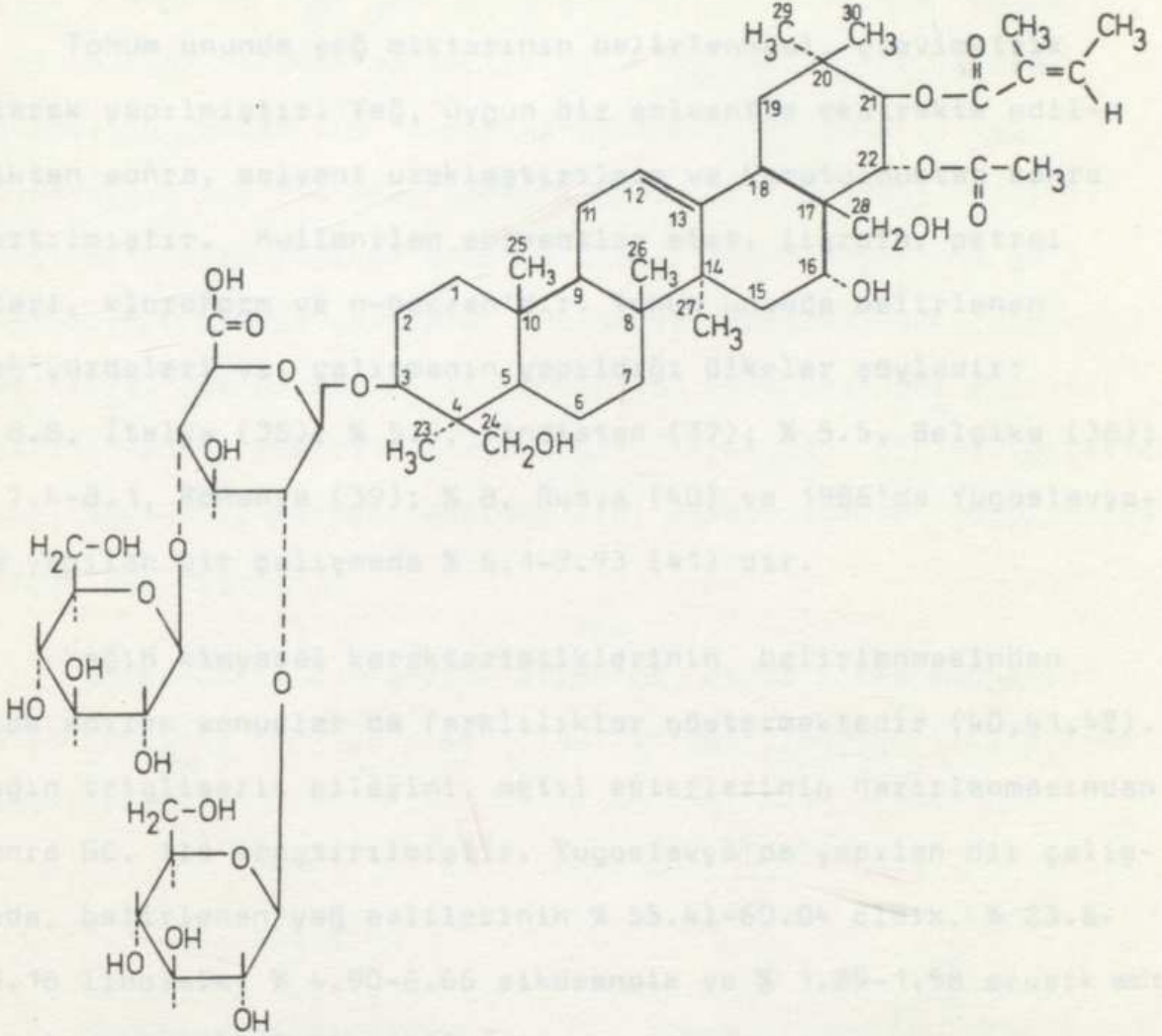
Tablo 3. α - ve β -Aescin'in Özellikleri.

Form	Kristal Hali	e.n.	α_D^{25} (C=5, MeOH)	H.I.	Sudaki Çözünürlük	LD ₅₀ (oral, mg/kg)	
						Fare	Sıçan
α	amorf toz	225-7 °C	-13,5°	1:20.000	+	320	720
β	ince yapraklı (EtOH)	222-3 °C	-23,7°	1:40.000	-	134	400

Aescin'i meydana getiren başlıca glikozitlerden birinin tam formülü şekil 3'de gösterilmiştir.

2.3. Bitkine Madde Yapılan Glikozidler

2.3.1. Yağlar



Şekil 3. Aescin'de Bulunan Başlıca Glikozit :

3-[2'-(β-D-glukopiranozido)-4'-(β-D-glukopiranozido)-β-D-glukuronopiranozido]-21 β-tigloil*-22 α-asetil-protoaescigenin.

(* : veya anjeloil.)



2.3. Bugüne Kadar Yapılan Çalışmalar

2.3.1. Yağlar

Tohum ununda yağ miktarının belirlenmesi, gravimetrik olarak yapılmıştır. Yağ, uygun bir solventle ekstrakte edildikten sonra, solvent uzaklaştırılmış ve kurutulduktan sonra tartılmıştır. Kullanılan solventler eter, ligroin, petrol eteri, kloroform ve n-hekzan'dır. Tohum ununda belirlenen yağ yüzdeleri ve çalışmanın yapıldığı ülkeler şöyledir: % 8.8, İtalya (36); % 5.6, Hindistan (37); % 5.5, Belçika (38); % 7.4-8.1, Romanya (39); % 8, Rusya (40) ve 1986'da Yugoslavya'da yapılan bir çalışmada % 6.1-7.73 (41) dir.

Yağın kimyasal karakteristiklerinin belirlenmesinden elde edilen sonuçlar da farklılıklar göstermektedir (40,41,42). Yağın trigliserit bileşimi, metil esterlerinin hazırlanmasından sonra GC. ile araştırılmıştır. Yugoslavya'da yapılan bir çalışmada, belirlenen yağ asitlerinin % 55.41-60.04 oleik, % 23.6-28.18 linoleik, % 4.90-6.66 eikosenoik ve % 1.29-1.58 erusik asit olduğu bildirilmiştir (41).

2.3.2. Karbonhidratlar

2.3.2.1. Serbest Mono- ve Oligosakkaritler

Bu bileşen üzerindeki çalışmalar kromatografik metodlar kullanılarak yapılmıştır. Miktar tayinlerinde ise volümetrik metodlar kullanılmıştır. Çok küçük miktarlardaki sakkaritlerin tayini için ise GC ve kütle spektrometresi metodları ile çalışılmıştır.



Hindistan'da yapılan bir çalışmada, tohum ununda % 10'-dan fazla glukoz ve sakkaroz olduğu bildirilmiştir (37). Serbest olarak bulunan mono-oligosakkaritler üzerinde detaylı iki çalışma Polonya'da yapılmıştır (43,44). Bu çalışmada, etanol-su sistemi ile şekerler ekstrakte edilmiş ve kağıt kromatografisi ile onüç serbest şeker belirlendiği bildirilmiştir. Toplam serbest şeker miktarı tayini, Somogy'e göre volümetrik olarak yapılarak % 11 bulunmuştur. Şekerlerin ayrılması Carboşorbid-N ve Celite-535 kolonlarından yapılmış, saflaştırmada dializ kullanılmıştır. Fruktoz, glukoz, galaktoz, sakkaroz, maltoz, stakioz gibi sakkaritlerin belirlendiği ifade edilmiştir.

Bu konudaki çalışmalar arasında, birer minör komponent olan 6-kestoz (45) ve nistoz (46)'un belirlendiği literatürde kayıtlıdır.

2.3.2.2. Nişasta

Aesculus Hippocastanum L.'nin tohumlarında en fazla bulunan bileşen, bir polisakkarit olan nişastadır. Tohumdaki nişasta yüzdeleri % 59.1 (36), % 50 (37), % 37,8 (39) ve % 51 (40) olarak çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir. Bu konudaki ilk çalışmalarda, nişastanın fermante edilmesi, hidrolizi ve besin olarak kullanılması üzerinde durulmuştur (47,48,36,37,42,49,50,51,39,52). Bazı fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi ile ilgili bir çalışma 1977'de Kanada'da yayınlanmıştır (53).



Nişasta miktarının tayini için gravimetrik, volümetrik ve polarimetrik metodlar kullanılmıştır. Sodyum sülfid çözeltisi ile izolasyonunun anlatıldığı bir çalışmada, 1 N NaOH deki ($c=0,668$) çevirme ağısı, $+151^{\circ}$ olarak verilmiştir (54).

1979'da Romanya'da, bu komponentle ilgilibir patent alınmıştır. Söz konusu çalışmada ısı ve basınç altında nişastanın hidrolizi anlatılmaktadır: Gazolin ekstraksiyonu ile yağlar, metanol-etanol-sukarışımı ile saponinler uzaklaştırıldıktan sonra, tohum nişastası izole edilmiş ve 130°C sıcaklık, 3 kg/m^2 basınç altında hidroliz edilmiştir. % 15 şeker bulunduran hidrozilatelde edildiğı bildirilmiştir. Bunun % 14,25'inin indirgenmiş şeker olduğı belirtilmiştir (52).

2.3.3. Aescin

Aescin; diğeri bileşenlere göre daha önemli olduğundan, gerek kantitatif tayin metodlarına ait ve gerekse izolasyon metodlarına ait çalışmalar daha fazladır. Aescinin heterogen bir yapıya sahip olması, kantitatif analizinde güçlükler yaratmaktadır. Bu konuda pek çok çalışma yayınlanmış olmasına rağmen, daha sonra refere edilen tek alışma Schlemmer'e aittir (55,56). Aescin'in kantitatif analizi ve izolasyon metodlarına ait çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.



2.3.3.1. Kantitatif Analiz Metodları

Aescin'in kantitatif analizi için yapılan ilk çalışmalar-
da; yüzey gerilimin ölçülmesi, asit sayısının tayini, köpük
testleri ve hemolitik aktivite tayini gibi metodlar teklif edil-
miştir. Bu konuda bir derleme yayınlayan Bichsel, adı geçen
metodları tartışmıştır (57). Metodların, aescin için spesifik
olmamasının yanı sıra, uygun hassasiyette olmadığı belirtil-
mektedir. Hemolitik aktiviteye dayanan metodlar daha sonra mo-
difiye edilmişlerse de (57,58), izomerlerin farklı hemolitik
aktiviteler göstermeleri dolayısıyla geçerlilik kazanamamış-
dır.

Römisch'in 1958'de yayınlanan çalışmasında , gravimetrik-
titrimetrik aescin tayini metodu anlatılmaktadır (59). Bu
metodda; aescin, aescinol'e dönüştürülerek çöktürülür ve sonra
titre edilir. Ancak çökmenin tam olmadığı ve büyük hatalar mey-
dana geldiği gösterilmiştir (56).

Aescin'in ve sodyum tuzunun polarografik analizini anla-
tan bir metod 1962'de yayınlanmıştır. Bu metodla 0.005-0.015 mg
aescin'in tayini edilebildiği belirtilmektedir (60).

Literatürde kayıtlı diğer çalışmalarda; aescin'in önce
beraberindeki maddelerden ayrılması , sonra miktarının belir-
lendiği görülmektedir. Ayırma işi bu metodlardan birinde sol-
vent ekstraksiyonu ile, diğerlerinde kromatografik metodlarla
yapılmaktadır. Miktar tayininde ise fotometrik, fluorimetrik ve



densitometrik metodlar kullanılmaktadır.

Schlemmer tarafından 1963'de (55) ve modifiye edilerek 1966'da (56) yayınlanan çalışmada, spektrofotometrik bir metod teklif edilmiştir. Kullanılan renk reaktifi $\text{FeCl}_3\text{-AcOH-H}_2\text{SO}_4$ karışımıdır. Bu reaktif, 1958'de Crawford tarafından başka maddeler için geliştirilmiştir (61). Benzer yapıdaki triterpenik veya steroidel maddeler analizi etkilediğinden, önce aescin solvent ekstraksiyonu ile ayrılmaktadır. İlk yayında bu ayırmanın, dokuz defa metanollü karışımlarla yapıldığı belirtilmiştir. İkinci yayında ise üçlü bir solvent sistemi geliştirilerek, metodun ayırma kısmı modifiye edilmiştir. Renk reaktifi ile olan reaksiyonun mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber, aescin'in bütün izomerleri için geçerli olduğu bildirilmiştir. Oluşan rengin şiddeti; süre, sıcaklık ve reaktif konsantrasyonu ile standardize edilmeye çalışılmıştır. Daha sonra DAB-8'e de geçen bu metod, bir çok yayında kullanılmaktadır (62,63).

Kartnig'in 1969'da yayınlanan metodunda, aescin TLC ile ayrılmış ve sonra CoCl_2 renk reaktifi ile fotometrik olarak tayin edildiği bildirilmiştir (64).

1970'de yayınlanan Genişius'un çalışmasında ise Winkler'in (65) ayırma metodunun tartışması yapılmış ve TLC ile ayırdıktan sonra Schlemmer'e göre tayin yapıldığı bildirilmiştir (66).



Bogs ve Bremmer'in 1971'de yayınladıkları çalışmalarında; Schlemmer'in metodunda, yağ uzaklaştırılması işlemi için eter yerine kloroform kullanılması önerilmiştir (1).

Hammerstein ve Kaiser, aescin'in kantitatif tayini için yeni bir metod vermişlerdir. 1972'de yayınlanan bu çalışmada, benzer yapıdaki bazı bitki ekstraktlarına uygulanan metodun aescin tayinininde kullanılabileceği bildirilmiştir. Metod TLC ile ayırma ve fluorimetrik tayine dayanmaktadır (67).

Schlemmer 1972'de yayınladığı çalışmasında, kendi metodunu kullanarak bir oto analizör geliştirdiğini bildirmiştir. Özellikle rutin analizlerde faydalı olduğu belirtilmektedir(68).

1973'de yayınlanan iki analiz metodundan birinde TLC-fluorimetri ile(69), diğerinde TLC-kolorimetri ile (70) tayin yapıldığı bildirilmiştir.

1975'de yayınlanan diğer bir metodda, aescin TLC ile ayrıldıktan sonra, nil mavisi reaktifi ile fluorimetrik olarak belirlenmiştir (71).

Boguslavskaya ve Zykova tarafından 1977'de yayınlanan çalışmada, gypsoside için geliştirilen bir metod aescin'e uygulanmıştır. Tohumdan yapılan analizde relatif standart sapmanın % 6.8 olduğu bildirilmiştir (72).

1953'de, Tıbbi bitki ekstraktlarında, biyolojik aktif konstituentlerin kantitatif tayini için yapılan bir çalışmada, TLC-densitometrik bir metod verilmiştir. Renk stabilizasyonunun 10 dk. olduğu bildirilmektedir (73).

1984'de yayınlanan başka bir çalışmada, içlerinde aescin'in de bulunduğu çeşitli triterpenik saponinlerin kantitatif analizi için HPTLC-densitometrik bir metod önerilmiştir (74).

Son yıllarda yayınlanan üç ayrı çalışmada, HPLC ile tayin yapılmaktadır. Bunların ilki 1984'de Steinigen tarafından yayınlanmıştır (75). İkincisi 1985'de yayınlanmış ve tohum unundan çalışma metodu da verilmiştir. Hibar Li Chrospher 100 CH-18/2, 125x4mm kolon ve % 35 asetonitril (litrede 10 ml. 0.1 N H_3PO_4 bulunduran) solventi kullanılmıştır (76). 1987'de yayınlanan metodda ise C_{18} kolon TFA bulunduran asetonitril gradienti uygulandığı bildirilmektedir (77).

Alman kodeksine göre, kurutulmuş tohumlarda % 3.5-5.5 aescin bulunmaktadır (78). Belçika farmakopesinde ise % 10 olarak bildirilmektedir (38). 1970'de Almanya'da yayınlanan bir çalışmada, Aesculus Hippocastanum L.'nin iki türünde aescin değişimi incelenmiş ve % 3.74 ile 7.99 arasında değişen sonuçlar alındığı bildirilmiştir (79). Bu çalışmadaki analizler Schlemmer'e göre yapılmıştır. Yine Almanya'da yapılan bir çalışmada, özellikle değişik bölgelerden alınan örnekler'in analizinde % 4.25-10.77 değerleri verilmiştir (1). Analizler Schlemmer'e göre yapılmıştır. 1987'de yayınlanan diğer bir çalışmada; İtalya'da yetişen Aesculus Hippocastanum L. tohumlarında, yıl içerisinde aescin miktarı değişimi incelenmiştir. % 3.43 ile 7.13 arasında değişen değerler elde edildiği bildirilmiştir (63). Analizler yine Schlemmer'e göre (56) yapılmıştır.



2.3.3.2. Tohumdan Elde Etme Metodları

Aesculus Hippocastanum L. tohumlarından gerek saf aescin'in izolasyonu, gerekse aescince zengin ekstarktların hazırlanmasına ait çalışmaların tamamına yakın kısmı patent olarak kayıtlıdır. Çözünürlük ve hemolitik aktivite farkı sebebiyle, preparatlardaki kullanımı açısından önemli olan α - β dönüşümüne ilişkin çalışmalar da patent halindedir.

Bu konuda yapılan ilk çalışmalar da; alkollü ekstrelerden kurşun tuzları ile çöktürme, eter ile çöktürme, dializ ve asidik hidroliz gibi metodlar kullanılmıştır (34). Tohum unundan aescin izolasyonuna ilişkin ilk patent, Merkel tarafından 1956'da alınmıştır (80). Merkelin metodunda, alkollü ekstreden asidik hidrolizle aescin elde edilmektedir. Verim % 2 dir.

1911'de Yagi (81) ve 1925'de (82) Kofler, kollesterol ile Aesculus saponinlerinin verdiği komplekslerle ilgili çalışmalar yayınlamışlardır. Wagner ve arkadaşları, bu bilgilerden faydalanarak bir metod geliştirmişlerdir. 1962'de patentini aldıkları bu metodda aescin, etanollü ekstreden kollesterol ile çöktürülmektedir (83). Kolesterol daha sonra eterle uzaklaştırılır.

Aescin'in izolasyonuna ilişkin yayınlanan diğer çalışmalarda, solvent ekstraksiyonu ve aescin'in çözünmediği solventlerle çöktürme esasına dayanan metodlar verilmiştir. Tohum unundan ekstraksiyon için MeOH, EtOH, PrOH gibi alkoller veya



bunların çeşitli oranlardaki karışımları kullanılmıştır. Ekstredeki aescin, daha sonra eter, aseton gibi solventlerle çöktürülerek alınmaktadır (84,85,86,87,88,89,90,91,92).

Bu konuda alınan diğer patentlerde; izolasyonun ikinci kademesinde çöktürme yerine, belirli pH'larda üçlü veya ikili solvent karışımları kullanılmaktadır. 1975'de alınan bir patentte metanollü tohum ekstresi, asitlendirilmiş CHCl_3 - MeOH - H_2O karışımı ile ekstrakte edilmektedir (93). Benzer bir patent'de 1977'de alınmıştır (94). Yugoslavya'da 1978'de alınan bir patentde ise $n\text{-BuOH}$ - H_2O karışımı ile ekstraksiyon yapılmaktadır. Daha sonra aescin, pH 5-5.5'da bikarbonat çözeltisi ile organik fazdan alınarak saflaştırılmaktadır (95). Temelde aynı prensibe dayanan ve aynı solventlerin kullanıldığı bir kaç patent daha alınmıştır (96,97). 1981'de Yugoslavya'da alınan bir patentde; $n\text{-BuOH}$ - H_2O karışımı ekstraksiyonu, tohumunun metanollü ekstresine uygulanmaktadır. Tohumundan aescin eldesi için bir pilot tesis de anlatılmıştır (98).

1987'de Japonya'da alınan bir patentde; aescin eldesi için, "Dia-ion HP 20" adlı sentetik bir polimer adsorban geliştirildiği bildirilmiştir. Metanollü tohum ekstresi, bu adsorbandan geçirildiğinde sadece aescin tutulmaktadır. MeOH - H_2O ile elüe edilerek aescin alınmaktadır (99).

2.3.4. Diğer Maddeler

Aesculus Hippocastanum L. tohumlarında; ana bileşenler yanında, çok sayıda minör bileşenin varlığı çeşitli

çalışmalarla gösterilmiştir. Bunların başında flavonoidler gelir. Tohumdaki miktarları % 0.17 ile 0.29 arasında değişir (1). Başlıca flavonoidler, glikozitleri halinde quersetin ve kamferoldür (100,101).

B vitaminleri (102), askorbik asit (103), E vitamini (104) ve diğer vitaminlerin (105,106) yanı sıra, aminopurin (107), adenin,adenozin, guanin, ürik asit (106), triterpenik alkoller (108), bazı steroller (109,110), proantosiyanidin (111) gibi maddelerin varlığı da gösterilmiştir.

Kül miktarının, kuru tohuma göre % 2 olduğu bildirilmiştir. Külün analizinde K,Na,Mg,Ca ve çok az miktarlarda P,Cu,Mn bulunmuştur. Anyon analizinde Cl^- , SO_4^{2-} ve PO_4^{3-} tespit edilmiştir. Külün HCl'de tamamen çözündüğü belirtilmektedir (1).



3. DENEYSEL BÖLÜM

3.1. Tohumların Toplanması ve Analizlere Hazırlanması

Bitkinin çiçek açma zamanı olan mayıs ayında, Yıldız semtinde (İstanbul) bulunan *Aesculus Hippocastanum* L. ağaçlarından çiçek ve yaprak örnekleri alındı. Bunlar, İ.Ü.Eczacılık Fakültesi, Farmasotik Botanik Anabilim Dalı'nda teşhis ettirildi*. Aynı ağaçlardan eylül ve ekim aylarında, 15'er günlük ara ile üç ayrı tohum örneği toplandı. Analizler, üç örnek grubuna da uygulandı.

Bogs ve Bremmer'in muhafaza deneyleri (1) dikkate alınarak, tohumlar stabilize edildi. Buna göre tohumlar, sabit ağırlığa kadar önce gölgede, sonra $40 \pm 1^{\circ}\text{C}$ de kurutuldu. Çene- li tipte bir kırıcı kullanılarak küçük parçalar haline getirildi. Döner bıçaklı bir değirmende, kaba un boyutuna kadar öğütüldü. Işık nem ve ısıdan korunarak analizler için kullanıldı.

Stabilizasyon işlemleri öncesi taze tohumda, ve analizlere hazırlanan tohum unundaki nem tayinleri gravimetrik olarak yapıldı.

3.2. Kullanılan Metodlar

3.2.1. Yağlar

Tohum unundaki yağ miktarı tayini, sokslet aparatında gravimetrik olarak yapıldı. Fiziksel ve kimyasal karakteristikleri tayin edildi. Trigliserit bileşimi ise, kromatografik

* İ.Ü.Eczacılık Fakültesi Herbaryumu, İSTE 59280.

ve spektroskopik metodlarla belirlendi.

3.2.1.1. Kantitatif Analizi

Tartılan tohum unu, yaklaşık kendi ağırlığı kadar susuz Na_2SO_4 ile kartuşa kondu. 20-22 Saat, (Na üzerinden fraksiyonlu destilasyonla saflaştırılmış) petrol eteri ($40-60^\circ\text{C}$) ile ekstrakte edildi. Vakumda evapore edildi. Desikatörde P_2O_5 üzerinden kurutuldu ve tartıldı. Her örnek grubu için üçer paralel tayin yapıldı.

3.2.1.2. Fiziksel ve Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Bu tayinlerin yapılacağı yağ örnekleri, meserasyonla hazırlandı. Çözücü olarak n-hekzan kullanıldı. Çözücü, 24 saatte bir değiştirilerek, 5-6 gün içerisinde yağın tamamı alındı. Birleştirilen maseralar, vakumda evapore ($40-45^\circ\text{C}$) edildi. P_2O_5 üzerinden kurutuldu.

Her örnek grubundan izole edilen yağ örneklerinin yoğunluk ve refraktif indeksi belirlendi.

Asit indeksi (nötralleşme sayısı), genel metoda göre tayin edildi (112). 5-10 gr. yağ örneği hassas tartıldı. 25-50 ml alkol-eter karışımında çözüldükten sonra, fenolftalein indikatörü ve 0.1 N KOH kullanılarak titre edildi. Sonuçlar aşağıdaki gibi hesaplandı:

$$\text{Asit indeksi (mg KOH/gr)} = \frac{56.1 \cdot A \cdot N}{W}$$



Asit derecesi, asitindeksinde bulunan değerlerden hesaplandı:

$$\text{Asit Derecesi (ml. 1 N KOH/100 gr)} = \frac{100.A.N}{W}$$

Burada;

A : ml. cinsinden KOH çözeltisi sarfiyatı

N : KOH çözeltisinin tam normalitesi

W : Yağ örneğinin gr. miktarı'dır.

Sabunlaşma indeksi (Koettstorfer indeksi) genel metoda göre tayin edildi (112). Hassas tartılan 5 gr.'lik yağ örneği, 50 ml. alkolde hazırlanmış 0,5 N HCl ile titre edildi. Aynı şekilde, birde boş deney yapıldı. Sonuçlar şöyle hesaplandı.

$$\text{Sabunlaşma İndeksi (mg KOH/gr.)} = \frac{56,1(a-b).N}{W}$$

Burada;

a : boş deney sarfiyatı

b : örnek sarfiyatı'dır.

Esterleşme indeksi, sabunlaşma indeksi ve asit indeksi sonuçları arasındaki fark şeklinde, her bir örnek için hesaplandı.

İyot indeksi, Hanus metoduna göre tayin edildi (113).

0,1-1 gr. arası hassas tartılmış yağ örneği, cam kapaklı erleninde 15 ml. CHCl_3 'de çözöldü. 25 ml. IBr çözeltisi eklendi. İki örnek ve bir boş aynı anda çalışıldı. Ağız kapatılan



erlenler, arasına çalkalanarak 1 saat karanlıkta bekletildi. 20 şer ml. % 10'luk KI ve 50 ml H₂O eklendi. 0,1 N tiyosülfat ile titre edildi. Sonuçlar aşağıdaki gibi heseplandı.

$$I.I.(gr.I/100 gr.) = \frac{12,69(a-b).N}{W}$$

Burada;

a : örnek sarfiyatı

b : boşun sarfiyatı

N : tiyosülfat çözeltisinin tam normalitesi

W : gr. örnek ağırlığıdır.

Yağın n-hekzandaki çözeltisi, nötral Al₂O₃ (MN 114, aktivite I) kolondan geçirilerek, trigliseritler ayrıldı. Yukarıda anlatılan metodlar kullanılarak, kimyasal karakteristikleri tayin edildi. Ham yağ ve trigliseritlerden elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı.

3.2.1.3. Trigliserit Bileşiminin Analizi

Maserasyonla elde edilen yağlar, nötral Al₂O₃ kolondan geçirilerek trigliseritler elde edildi. AgNO₃'la hazırlanan TLC ile, fraksiyonlarına ayrılarak miktarları belirlendi. Gaz kromatografisi ile de yağ asitleri bileşimi tayin edildi.



3.2.1.3.1. TLC-Spektrofotometrik Analiz

Trigliseritler, AgNO_3 ile hazırlanmış silikajel plakalarda fraksiyonlarına ayrıldı (114). Daha sonra herbir fraksiyonun miktarı spektrofotometrik olarak belirlendi (115).

Tabakaların Hazırlanması : 7 gr. AgNO_3 , 140 ml suda çözülerek, 60 gr silikajel 60 H (Merck 7736) ile homojen bir karışım hazırlandı. 10x40 cm. boyutlarındaki cam plakalara 0,5 mm. kalınlığında kaplandı. Oda sıcaklığında bir süre bekletildikten sonra, 105°C de 2 saat aktive edildi.

Örneklerin Uygulanması : Örneklerin n-hekzandaki % 10'luk çözeltileri bant şeklinde tatbik edildi.

Yürütücü Çözücü : Yapılan ön deneyler sonucu, en uygun ayırmanın, p.eteri ($40^\circ-60^\circ$)/benzen/dietileter (70/20/10) karışımında iki kere yürütme ile olduğu belirlendi.

Renklendirme Reaktifi : 2',7'-diklorofluoressein'in % 0,1'lik MeOH'daki çözeltisi püskürtüldükten sonra, UV ışık altında (254 nm) fraksiyonlar belirlendi.

Her bir fraksiyon kazınarak, içinde dietileter bulunan tüplere alındı. Silikajel 60(70-230, Merck 7734) ile doldurulan kolonlardan geçirilmek suretiyle AgNO_3 ve renk reaktifinden ayrıldı.

Balonjojelere alınan çözeltiler, çizgilerine kadar dietileter ile tamamlandı.

Her bir fraksiyondaki trigliserit yüzdesi, gliserinin spektrofotometrik tayini yoluyla belirlendi. Bunun için, belirli hacimlerde alınan fraksiyonlardan dietileter uçuruldu. Alkolik KOH ile sabunlaştırıldıktan sonra, oluşan gliserin NaIO_4 ile formaldehite dönüştürüldü. Kromotrop asidi ile oluşan kırmızı-mor rengin absorbansı 570 nm.'de ölçüldü. Absorbans değerleri kullanılarak, fraksiyonların relatif yüzdeleri hesaplandı. Ölçümler, Shimadzu Double Beam-UV-150-02 ile yapıldı.

3.2.1.3.2. GC İle Yağ Asitlerinin Analizi

Trigliserit bileşiminde bulunan yağ asitlerinin esterleştirilmek suretiyle uçucu türevleri hazırlandı. Bunun için; Metcalfe ve arkadaşlarının geliştirdiği (116) ve daha sonra Amerikan Yağ KimyagerleriDerneği'nin resmi metodu olarak kabul edilen BF_3 metodu kullanıldı (117). Elde edilen, yağ asiti metil esterleri gaz kromatografisi ile analiz edildi.

GC için Örneklerin Hazırlanması : 0,15-0,20 gr. yağ örneği küçük bir şilifli balona alındı.

0,5 N metanolik NaOH çözeltisinden 5 ml. ilave edildi. Geri soğutucu altında, su banyosu kullanılarak 10 dk. kadar sabunlaştırıldı. BF_3 -metanol (% 20, Merck 801663) çözeltisinden 5 ml. eklenerek 2 dk. kaynatıldı. 5 ml. n-heptan ilave edildi ve 1 dk.



daha kaynatıldı. Oda sıcaklığına soğutulduktan sonra 25 ml.lik jojeye alındı. Balon doymuş NaCl çözeltisi ile yıkanarak jojeye eklendi. Joje çizgisine kadar doymuş NaCl çözeltisi ile tamamlandı. Kapağı kapatılarak birkaç kere çalkalandı ve fazların ayrılması için bekletildi. Üstteki heptan fazından 1-2 ml. alınarak, küçük bir kapaklı cam şişeye kondu. Birkaç kristal susuz Na_2SO_4 konularak kurutuldu. Esterlerin n-heptan-daki bu çözeltisi, doğrudan GC.'ye enjekte edildi.

GC'de Çalışma Şartları ;

Cihaz : Philips, Pye Unicam-PU 4500
Dedektör : FID
Kolon : Carbowax 20 M (kapiler kolon, 25 m)
Taşıyıcı Gaz ve Hızı:He, 2 ml/dk.
Sıcaklıklar
Dedektör : 250°C
Kolon : 200°C
Enjeksiyon Bloku : 225°C
Enjeksiyon Hacmi : 1 µl
Kağıt hızı : 0,5 cm/dk
Entegratör : Spectra

3.2.2. Karbonhidratlar

Serbest mono- ve oligosakkaritlerin kalitatif analizi TLC, kantitatif analizi ise volumetrik olarak yapıldı. Nişasta miktarı ise polarimetrik metodla tayin edildi.



3.2.2.1. Serbest Mono- ve Oligosakkaritlerin Kalitatif Analizi

Serbest mono- ve oligosakkaritlerin tohum unundan ekstraksiyonu için AOAC'de belirtilen nötral $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ metodu kullanıldı (118). Ekstraksiyon, CaCO_3 üzerinden tekrar destillenerek nötralleştirilmiş etanol (% 80) ile yapıldı. Elde edilen ekstrelerden alkol uzaklaştırıldıktan sonra, kalan kısım su ile alındı. Çözünmüş haldeki diğer maddeleri uzaklaştırmak için, doymuş nötral $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ çözeltisi ile muamele edildi. Oluşan çökelti süzülerek atıldı. Süzüntüde bulunan Pb^{2+} fazlası, katı $\text{C}_2\text{O}_4\text{Na}_2$ ile giderildi. Bu şekilde hazırlanan örneklerde, serbest mono- ve oligosakkaritler TLC ile araştırıldı (114).

Tabakaların Hazırlanması a-) 30 gr. Silikajel 60 G (Merck 7731), 60 ml 0,02 M CH_3COONa ile homogen bir şekilde karıştırıldı. 20x20 cm boyutlarındaki cam plakalara 0.25 mm. kalınlığında kaplandı. Önce oda sıcaklığında kurutuldu. Sonra 110°C de 30 dk. aktive edildi.

b-) Silikajel 60 F₂₅₄ (Merck 5554) hazır plakalar, 0,02 M CH_3COONa çözeltisi ile, kromatografi tanklarında emprenye edildi.

Yürütücü Çözücü Karışımları :

(a) Tabakaları ile 1-)etil asetat/izopropanol/su(65/23/



- 2-) n-butanol/asetikasit/su (40/10/22)
- 3-) n-butanol/asetik asit/su (80/12,5/7,5)
- 4-) etilasetat/n-propanol/su (60/25/15)
- 5-) n-butanol/pridin/su (40/32/28)
- 6-) etilasetat/n-propanol/su/asetik asit(60/25/12/3)
- 7-) n-propanol/asetikasit/su (70/5/25)
- 8-) n-propanol/asetik asit/su(80/5/15)

(b) Tabakaları ile 9-)n-butanol/asetik asit/su (55/13/32).

Renk Reaktifi : 0,5 ml. Anisaldehyt, 9 ml. % 95 etanol'de çözüldü. 0,5 ml.der. H_2SO_4 0,1 ml. gl. CH_3COOH ilave edildi. Reaktif püskürtüldükten sonra 90-100°C de 5-10 dk. tutuldu.

Standart ve örnekler yanyana tatbik edildi. Lekeler görünür hale getirildikten sonra, oluşan renk ve hesaplanan Rf değerlerinden tayinler yapıldı.

3.2.2.2. Serbest Mono- ve Oligosakkaritlerin Kantitatif Analizi

Her üç gruba ait örnekler, 3.2.2.1.de anlatılan metodla, serbest şekerlerin kantitatif analizi için hazırlandı (118). Bu örneklerden belirli hacimler alınarak, çözeltinin 5 ml.sinde 0,5-5 mg. glukoz (ya da ekivalenti) olacak şekilde su ile seyreltildi. Analizler Shaffer-Somogy Mikro Metodu'na göre yapıldı (119,120).



Reaktifler :

- 1^o Shaffer-Somogy Karbonat Reaktifi : 25 gr. susuz Na_2CO_3 ve 25 gr. KNa-tartarat $4\text{H}_2\text{O}$, yaklaşık 500 ml. suda çözül-
dü. 100 gr. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ /lt. konsantrasyonundaki çözeltinin
75 ml.'si, bu çözeltinin yüzeyinin altından ilave edildi.
20 gr. NaHCO_3 katılarak çözüldükten sonra, 5 gr. KI ek-
lendi. 0,1 N KIO_3 çözeltisinin 250 ml.'si ilave edildi.
Çözelti, suile litreye tamamlandı. Sinterlenmiş cam huni-
den süzüldü ve kullanılmadan önce bir gece bekletildi.
- 2^o İyot-Okzalot Çözeltisi : 2.5 gr. KI ve 2,5 gr. $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ suda
çözülerek 100 ml.'ye tamamlandı.
- 3^o Standart Tiyosülfat Çözeltisi : 0.1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ çözeltisi
hazırlanarak ayarlandı. Bu stok çözeltiden 0,005 N çözelti
hazırlanarak kullanıldı.
- 4^o Nişasta İndikatörü : 0,5 gr. suda çözünebilir nişasta ve
2 mg. HgI_2 suda çözüldü.
- 5^o 2 N H_2SO_4 : % 98'lik H_2SO_4 'den seyreltilmek suretiyle
hazırlandı.

Çalışma Şekli : 5 ml.'sinde 0,5-2,5 mg. glukoz ya da ekiva-
lent şeker bulunduran çözeltiden 5 ml., 25x200
mm.lik şilifli tüplere alındı. 5 ml. (1) çözelti-
sinden eklendi. 5 ml. su ve 5 ml. (1) ile
bir boş deney hazırlandı. Tüpler, küçük huni-
lerle kapatılarak, kaynayan su banyosunda

15 dk. tutuldu. Akan su altında, sarsmadan
4 dk. soğutuldu. Kapaklar çıkarılarak, tüpün
kenarından 2 ml.(2) ve 3 ml. (5) çözeltisi
ilave edildi. Meydana gelmiş olan Cu_2O 'in
çözünmesi sağlanarak, soğuk su banyosunda
5 dk. tutuldu. Bu sırada bir-iki kez karış-
tırıldı. Nişasta indikatörlüğünde, 0.005 N
tiyasülfat ile titre edildi. Sonuçlar mg.
glukoz cinsinden aşağıdaki gibi hesaplandı :

$$\text{mg. glukoz} = 0,1099.(a-b) + 0,048$$

Burada a : Boş deneydeki tiyasülfat sarfiyatı(ml).
b : Örnek için harcanan tiyasülfat (ml).

Bu şekilde yapılan tayinlerde indirgen şeker miktarları
bulundu. Örnekler % 25'lik HCl çözeltisi ile kaynar su banyosun-
da 15 dk. tutularak, indirgen olmayan şekerlerin inversiyonu
sağlandı. Aynı yolla analiz edilerek toplam şeker miktarları
bulundu.

3.2.2.3. Nişastanın Kantitatif Analizi

Tohum unundaki nişasta miktarı, Hadorn-Doevelaar'ın pola-
rimetrik metodu (121) kullanılarak tayin edildi.

Reaktifler :

1^o 0,31 N HCl

2^o Carrez-I Çözeltisi : 15 gr. $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O} / 100 \text{ ml.}$



3^o Carrez II Çözeltisi : 30 gr. $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ /100 ml.

4^o % 25 HCl

Çalışma Şekli : 2,5000 gr. Örnek, 50'lik jojede 25 ml. 0,31 N HCl ile karıştırıldı. Kaynar su banyosunda 15 dk. çalkalanarak tutuldu. Oda sıcaklığına soğutuldu. 0,5'er ml. Carrez-I ve II çözeltisi ilave edildi. İşaretine kadar su ile tamamlandı. Mavi bant süzgeç kağıdından süzüldü. Berrak süzüntünün çevirme açısı ölçüldü (α_1).

5,0000 gr. Örnek, 50'lik jojede 40 ml. su ile magnetik karıştırıcı kullanılarak 15 dk. karıştırıldı. Magnet çıkarıldıktan sonra, Carrez-I ve II'den 0,5'er ml. eklendi. Suyu çizgisine kadar tamamlandı. Süzülerek, 25 ml. süzöntü ayrı bir 50'lik jøjeye alındı. 1 ml. % 25'lik HCl ilave edildi. Kaynar su banyosunda , 15 dk. çalkalanarak tutuldu. Oda sıcaklığına soğutulduktan sonra, su ile çizgisine kadar tamamlandı. Çevirme açısı ölçüldü (α_2).

Sonuçlar aşağıdaki gibi hesaplandı :

$$\% \text{ nişasta} = (\alpha_1 - \alpha_2) \cdot f$$

Buradaki "f", nişasta cinsine göre değişen bir faktördür. Söz konusu nişasta için bu değer bilinmediğinden, deney şartlarında ayrıca tayin edildi. Bunun için aşağıdaki eşitlikler kullanıldı.

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{100 \cdot \alpha}{l \cdot c}$$



$[\alpha]_D^{20}$: Spesifik çevirme açısı

α : Ölçülen çevirme açısı

l : polarimetre tüpünün boyu (dm)

c : konsantrasyon (gr/100 ml).

$$c = \frac{100 \cdot \alpha}{[\alpha]_D^{20} \cdot l}$$

s : 100 ml.'deki örneğin gr.miktarı

$c \cdot 100/s$: örnekteki nişasta yüzdesi

$$\% \text{ nişasta} = (\alpha_1 - \alpha_2) \cdot \frac{100}{[\alpha]_D^{20} \cdot l} \cdot \frac{100}{s}$$

$$f = \frac{10.000}{[\alpha]_D^{20} \cdot l \cdot s} \quad (l = 1,901 \text{ dm})$$

Tohumda bulunan nişasta, sülfite metodu (54) kullanılarak izole edildi. Saflaştırıldıktan sonra sabit ağırlığa kadar kurutuldu. Nem tayini yapıldı. 0,31 N HCl deki spesifik çevirme açısı belirlendi. Bu değer kullanılarak "f" faktörü hesaplandı.

Polarimetrik ölçümlerde Carl Zeiss polarimetresi kullanıldı. Her bir örnek grubu için üçer paralel tayin yapıldı.



3.2.3. Aescin

3.2.3.1. Schlemmer'e Göre Kantitatif Analizi (56,62).

Renk Reaktifinin Hazırlanması :

100 ml. reaktif için; 75 mg. $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 50 ml. gl. AcOH da çözüldü. Der. H_2SO_4 ile 100 ml'ye tamamlandı. Bu sırada aşırı ısınmadan kaçınmak amacıyla akan su altında soğutuldu. Reaktif, kullanılacağı zaman taze olarak hazırlandı.

Çalışma Eğrisinin Hazırlanması :

Fluka AG aescin standart olarak kullanıldı. Uygun tartımlar alınarak, seyreltmek suretiyle 200,300,400,500 ve 600 $\mu\text{gr/ml}$. 'lik standart çözeltiler hazırlandı. Çözücü olarak gl. AcOH kullanıldı. 25'lik balonjojelere, standart çözeltilerden 5'er ml. kondu. Renk reaktifi ile hacmi çizgisine kadar tamamlandı. Birkaç kereters çevirmek suretiyle reaktifin iyice karışması sağlandı. $60 \pm 1^\circ\text{C}$ 'lik su banyosunda, arada bir tekrar çalkalamak suretiyle 25 dk. tutuldu. Akan su altında oda sıcaklığına soğutuldu. Aynı şekilde bir de boş deney yapıldı. Oluşan koyu mor rengin absorbandsı λ_{max} 540 nm'de, boşa karşı ölçüldü. Aynı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak 5 seri ölçüm alındı. Ölçü eğrisinin denkleminin hesabında, ortalama absorbandslar kullanıldı (Şekil 4).

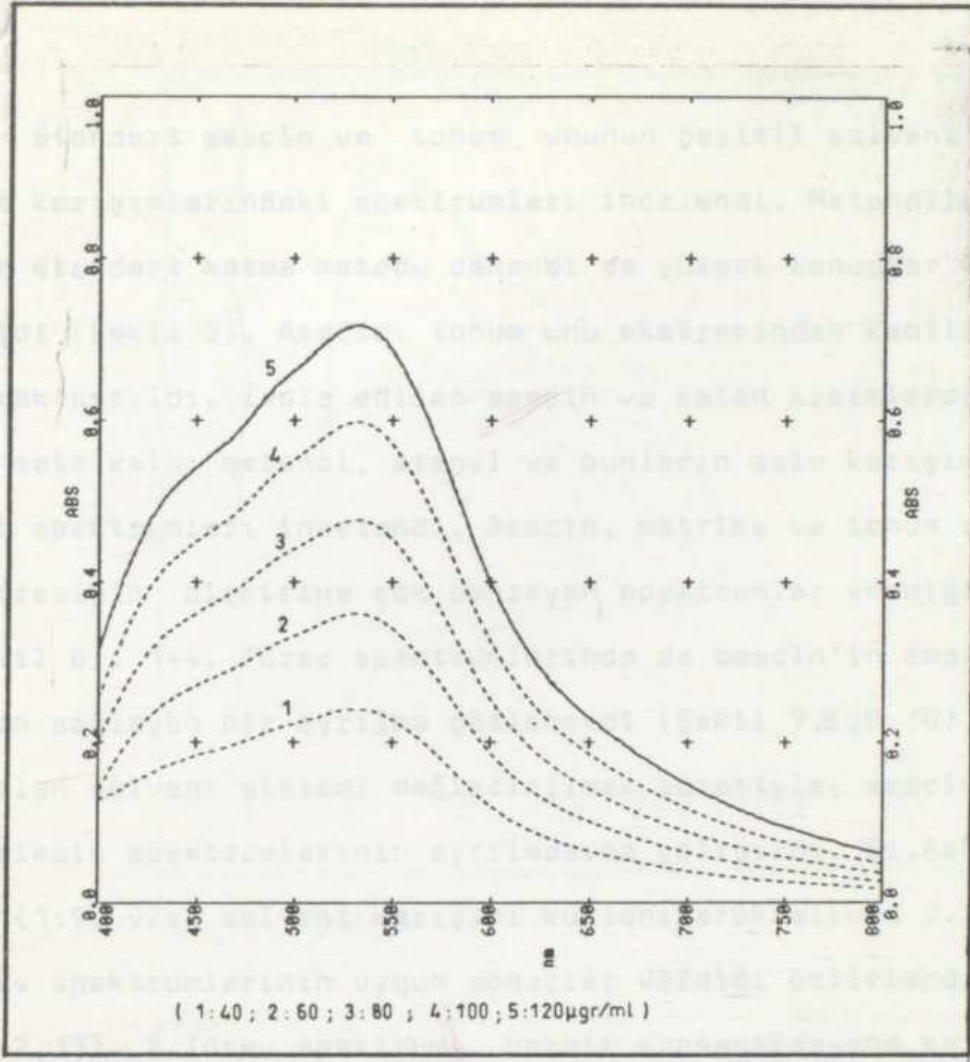
Örneklerin Analize Hazırlanması :

1 gr. hassas tartılmış tohum unu, % 65 MeOH ile 100 ml'ye tamamlandı. Tartıldıktan sonra, su banyosu kullanılarak geri soğutucu altında 30 dk. kaynatıldı. Oda sıcaklığına soğutuldu

ve % 65 lik MeOH ile ilk tartıma getirildi. Mavi bantlı süzgeç kağıdından süzüldü. 30 ml. filtrat alınıp, kuruluğa kadar vakumda evapore edildi. Kalıntı 20 ml. 0,1 N HCl ile çalkalandı. Ayırma hunisinde birleştirilen çözelti üzerine 20 ml. n-propanol ve 50 ml. CHCl_3 ilave edildi. 2 dk. kuvvetlice çalkalandı. Alt faz ayrıldı. Başka bir ayırma hunisinde 30 ml. 0,1 N HCl, 20 ml. n-propanol ve 50 ml. CHCl_3 karışımı 2 dk. çalkalandı. Bunun alt fazı, örnekten gelen üst fazla yeniden 2 dk. çalkalandı. Birleştirilen alt fazlar, kuruluğa kadar vakumda evapore edildi. Kalıntı, iki defa 10'ar ml. dietileter ile (peroksiti giderilmiş) yıkandı. Eterli kısım, mavi bant kırmalı süzgeç kağıdından süzüldü. Süzgeç kağıdı 10 ml. eterle yıkandı. Filtrat atıldı. Balon ve süzgeç kağıdındaki eter uçurulduktan sonra, balondaki kalıntı 3 defa 10'ar ml. gl. AcOH ile alınarak aynı süzgeç kağıdından geçirildi. Filtrat gl. AcOH ile 50 ml.'ye tamamlandı.

Hazırlanan çözeltiden 5 ml. alındı. Renk reaktifi ile 25 ml.'ye tamamlandı. Çalışma eğrisinde olduğu gibi absorbansı ölçüldü. Her üç örnek grubundan, üçer ekstre hazırlanarak paralel tayinler yapıldı. Ölçümler, Philips PU 8700 UV-visible spektrofotometre ile yapıldı.





Şekil 4. Schlemmer'e Göre St. Aescin Spektrumları.

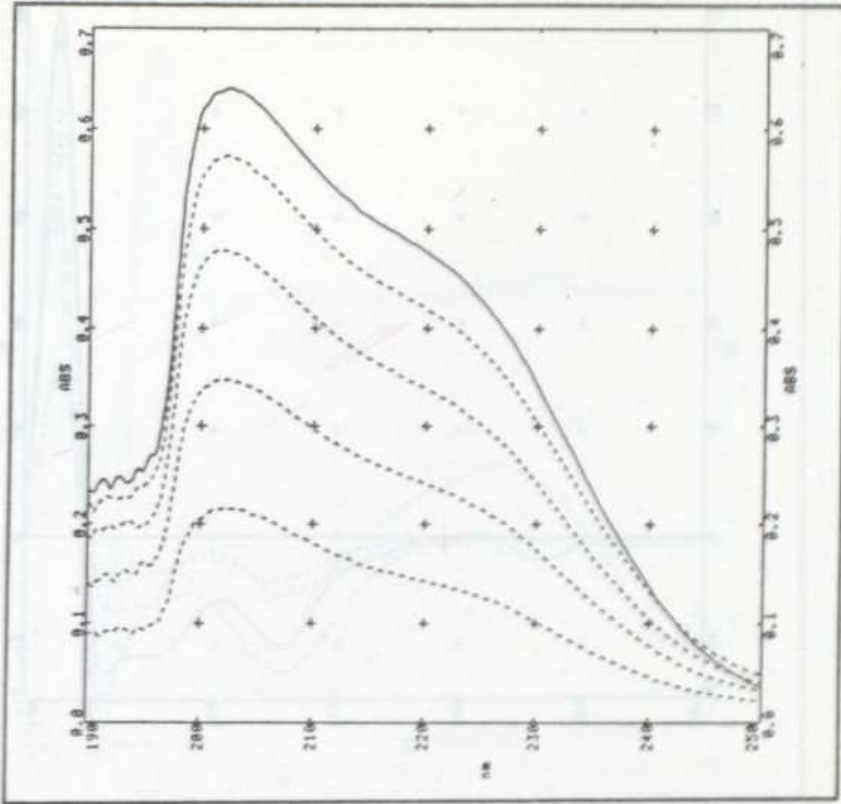
3.2.3.2. Yeni Bir Metodla Kantitatif Analizi

Tohum unu ekstresinden doğrudan analize imkan veren bir metodun, ayırma işlemleri kullanan diğer metodlara göre daha iyi sonuçlar verebileceği düşünüldü. Bu amaçla yola çıkarak yapılan çalışmalar sonucu; özellikle karışımların analizinde iyi sonuçlar verdiği bilinen, türev spektrofotometrisinin kullanıldığı yeni bir metod geliştirildi.

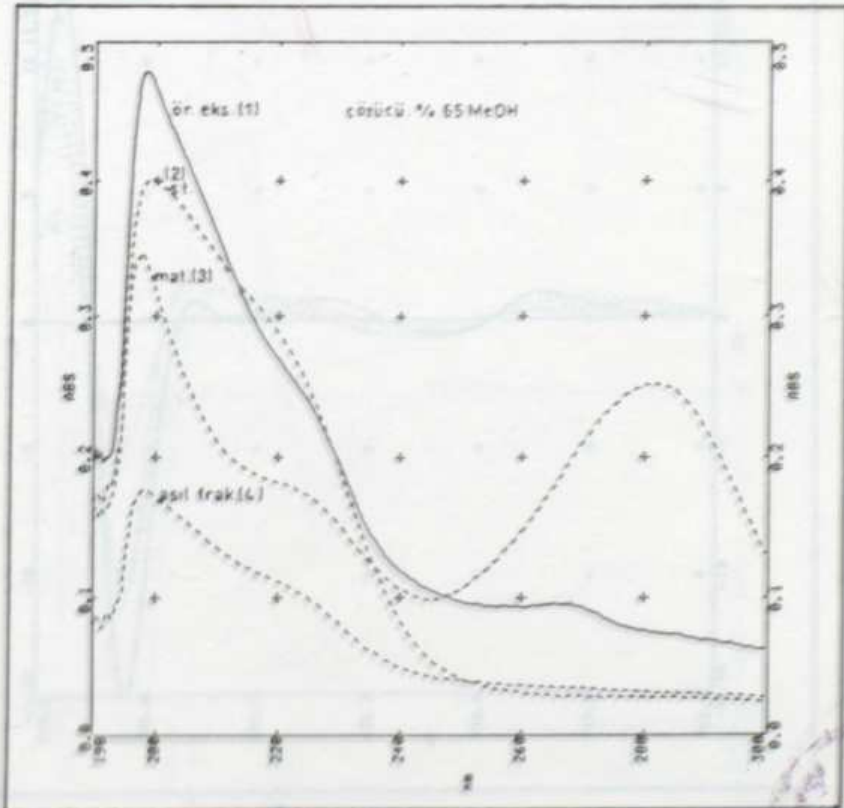


Standart aescin ve tohumunun çeşitli solvent ve solvent karışımlarındaki spektrumları incelendi. Metanollü ekstrelere standart katma metodu denendi ve yüksek sonuçlar elde edildi (Şekil 5). Aescin, tohumunu ekstresinden kantitatif olarak ayrıldı. İzole edilen aescin ve kalan kısımlardan oluşan matriksin; metanol, etanol ve bunların sulu karışımlarındaki spektrumları incelendi. Aescin, matriks ve tohumunu ekstresinin birbirine çok benzeyen spektrumlar verdiği görüldü (Şekil 6). 1-4. Türev spektrumlarında da aescin'in analizine imkan sağlayan bir ayrılma gözlenmedi (Şekil 7,8,9,10). Kullanılan solvent sistemi değiştirilmek suretiyle, aescin ve matriksin spektrumlarının ayrılmasına çalışıldı. Gl.AcOH-0,1 N HCl (1:9, v/v) solvent karışımı kullanılarak alınan 2. ve 4. türev spektrumlarının uygun sonuçlar verdiği belirlendi (Şekil 11,12,13). 2.Türev spektrumu, herbir konsantrasyona karşılık gelen pik yüksekliklerinin daha fazla olması sebebiyle tercih edildi. Standart aescin ve örneğin 220-290 nm.ler arası 2.türev spektrumları alındı. Sıfır çizgisinin üstünde 234.5 nm'de ve altında 240.3 nm'de yan yana bulunan pik-pik toplamlarından kalibrasyon yapıldı. 0-250 µgr/ml. Konsantrasyon aralığındaki değişimin lineer olduğu belirlendi. Absorbans ve türev değerleri 2 saat boyunca izlenerek, sabit kaldığı tespit edildi. Metod iç standart kullanılarak test edildi. Yapılan 5 deney sonucu geri kazanma oranı, ortalama % 99,20 olarak bulundu (s=0,0641). Aynı örneklerden, Schlemmer metodu kullanılarak paralel analizler yapıldı. Sonuçlar istatistik olarak değerlendirildi (bölüm 3.3.4.3).

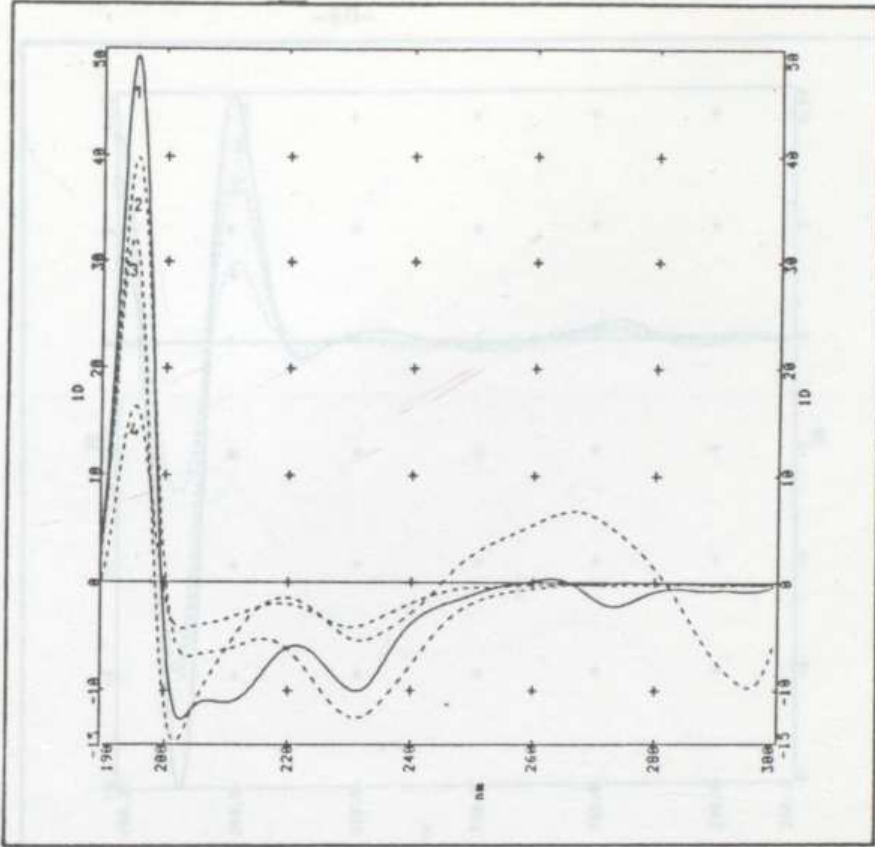




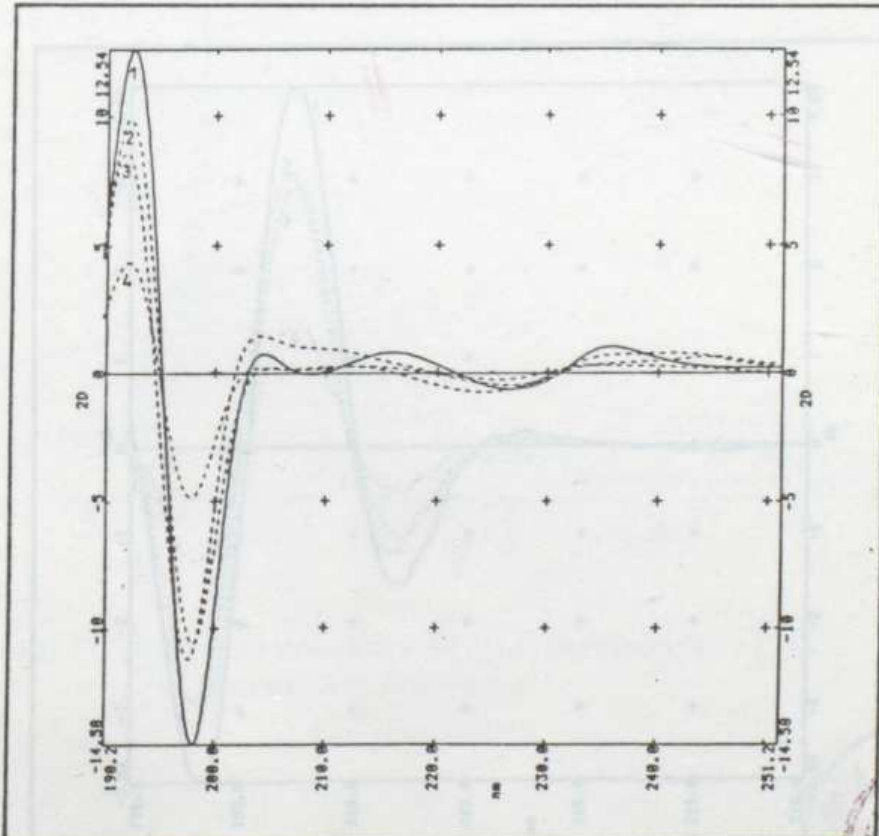
Şekil 5. Standart katma.



Şekil 6. Örnek, standart, metriks, asıl fraksiyon'un spektrumları.

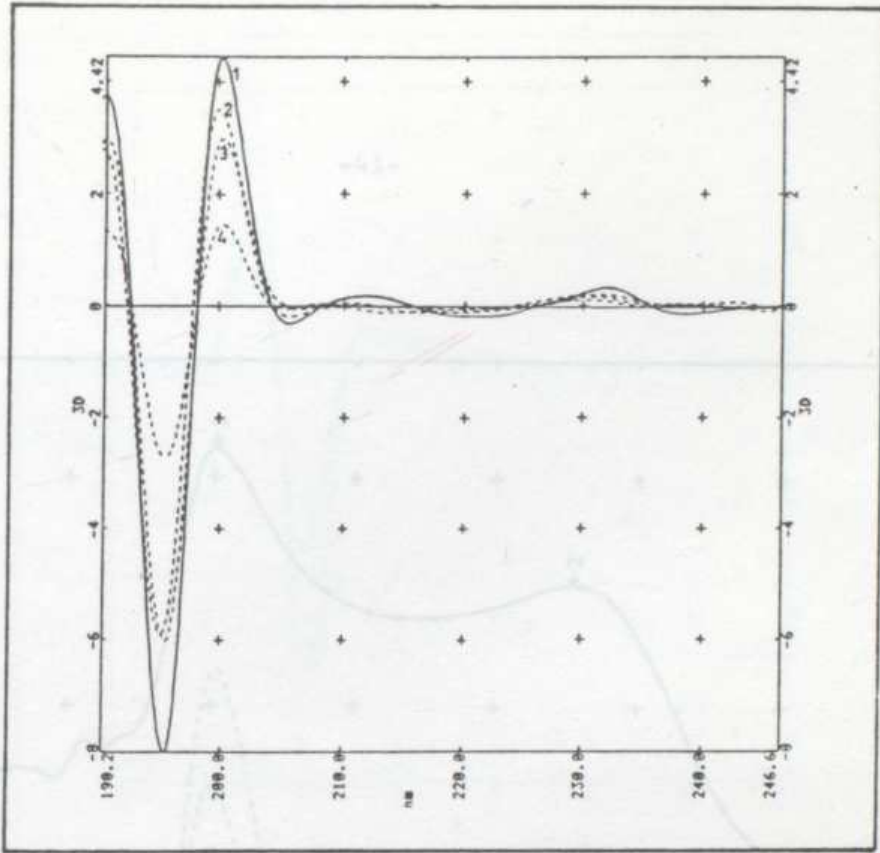


Şekil 7. 1.türev spektrumları.

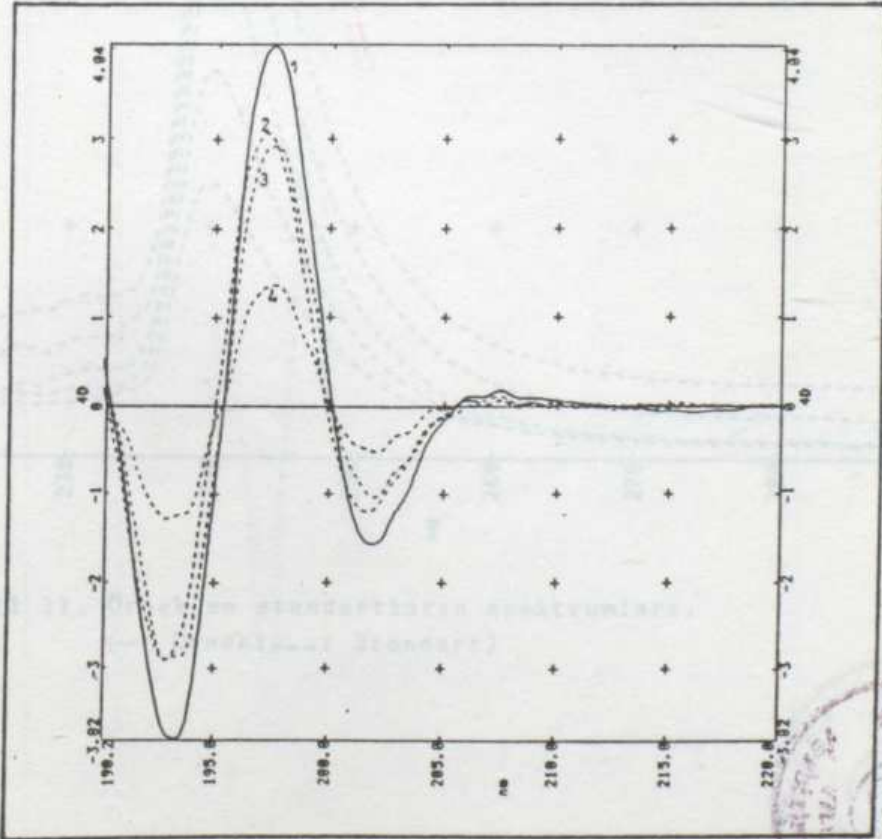


Şekil 8. 2.türev spektrumları.

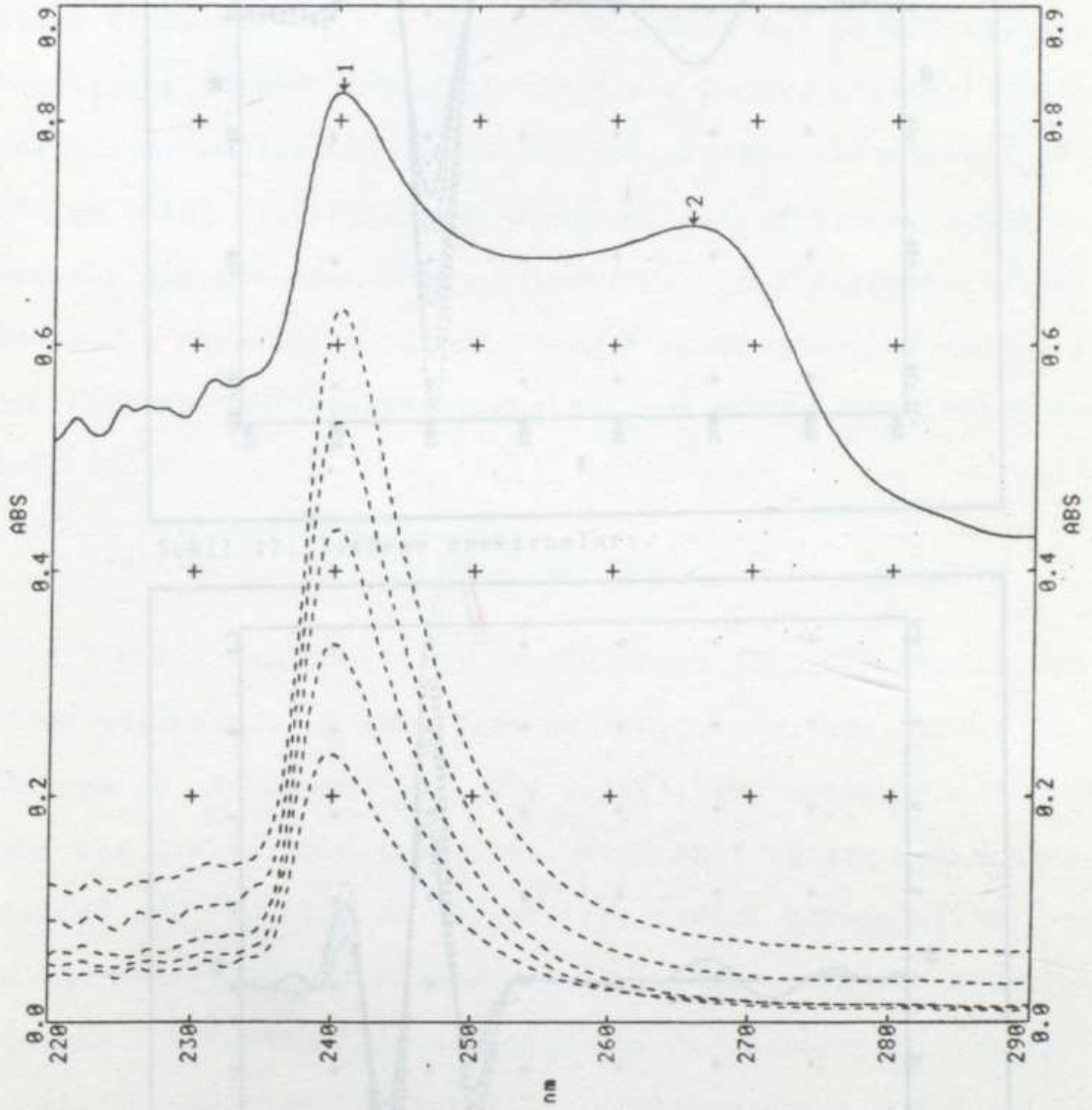




Şekil 9. 3.türev spektrumları.

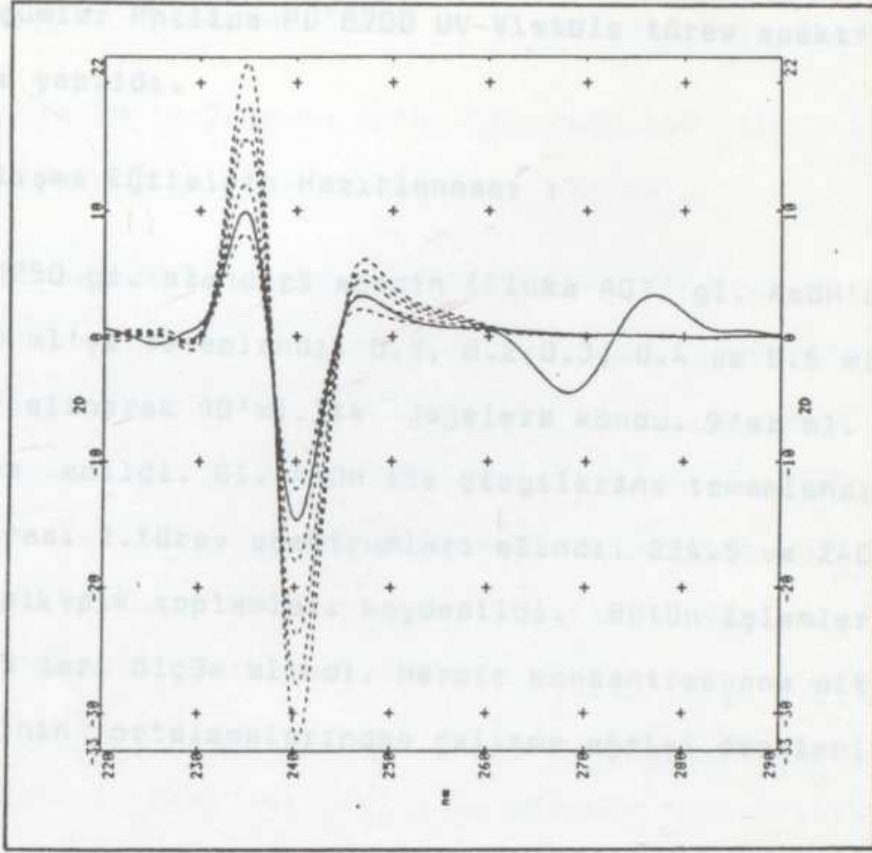


Şekil 10. 4.türev spektrumları.

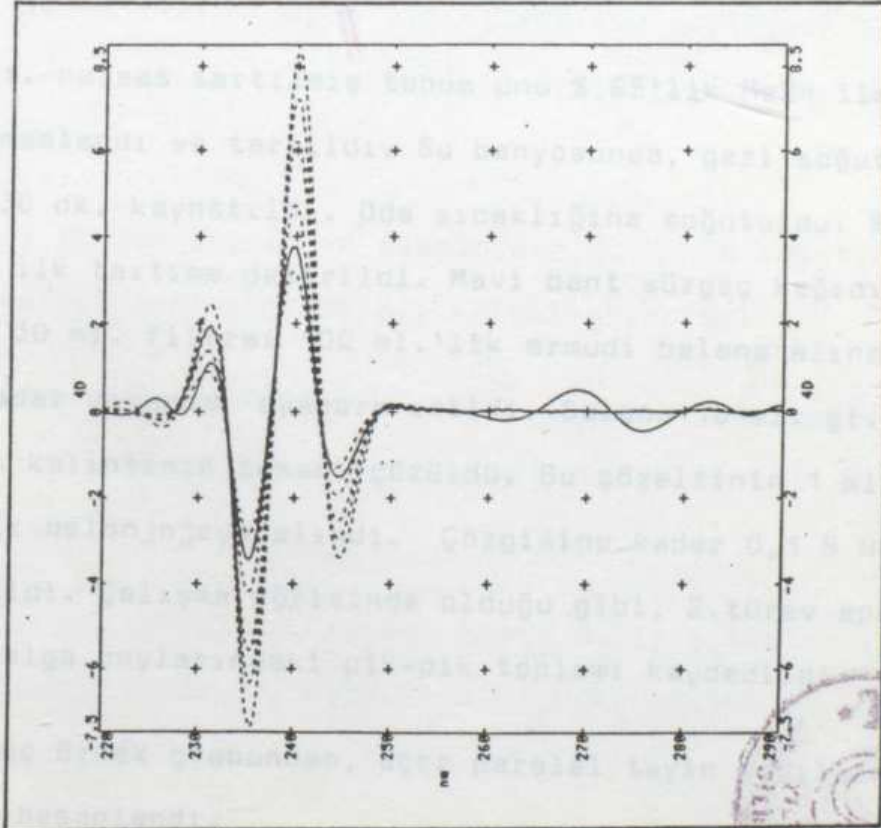


Şekil 11. Örnek ve standartların spektrumları.
(—: Örnek;---: Standart)





Şekil 12. 2.türev spektrumları.



Şekil 13. 4.türev spektrumları.



Ölçümler Philips PU 8700 UV-Visible türev spektrofotometresi ile yapıldı.

Çalışma Eğrisinin Hazırlanması :

0,1250 gr. standart aescin (Fluka AG), gl. AcOH'da çözülerek 25 ml'ye tamamlandı. 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 ve 0.5 ml.'lik hacimler alınarak 10 ml.'lik jojelere kondu. 9'ar ml. 0.1 N HCl ilave edildi. Gl. AcOH ile çizgilerine tamamlandı. 220-290 nm arası 2.türev spektrumları alındı. 234.5 ve 240.3 nm. lerdeki pik-pik toplamaları kaydedildi. Bütün işlemler tekrarlanarak 5 seri ölçüm alındı. Herbir konsantrasyona ait türev değerlerinin ortalamalarından çalışma eğrisi denklemi hesaplandı.

Örneklerin Analize Hazırlanması:

1 gr. hassas tartılmış tohum unu % 65'lik MeOH ile 100 ml'ye tamamlandı ve tartıldı. Su banyosunda, geri soğutucu altında 30 dk. kaynatıldı. Oda sıcaklığına soğutuldu. % 65'lik MeOH ile ilk tartıma getirildi. Mavi bant süzgeç kağıdından süzüldü. 30 ml. filtret 100 ml.'lik armudi balona alındı. Kuruluğa kadar vakumda evapore edildi. Balona 10 ml. gl.AcOH eklenerek kalıntının tamamı çözüldü. Bu çözeltinin 1 ml.si, 10 ml.'lik balonjojeye alındı. Çözgisine kadar 0,1 N HCl ilave edildi. Çalışma eğrisinde olduğu gibi, 2.türev spektrumu ve aynı dalga boylarındaki pik-pik toplamı kaydedildi.

Her üç örnek grubundan, üçer paralel tayin yapılarak miktarlar hesaplandı.



3.2.3.3. Tohumdan Eldesi ve Standartla Karşılaştırılması

Aescin'in izolasyonu için, bir Yugoslav ilaç firmasının patentinde verilen metod kullanıldı (95,96).

Kuru öğütülmüş tohum unu, n-butanol ile doyurulmuş su ve su ile doyurulmuş n-butanol kullanılarak ekstrakte edildi. Ekstraksiyon, HCl ile asitlendirilmek suretiyle pH 3-4'de yapıldı. Organik faz ayrıldıktan sonra, kalan sulu süspansiyon su ile doyurulmuş n-butanol ile tekrar ekstrakte edildi. Organik fazlar birleştirildi ve su ile yıkandı. Etil asetat ilave edildi. pH 5-5,5 arasında tutularak, sulu alkali hidrojen karbonat çözeltisi ile ekstrakte edildi. Aescin'in alkali tuzunu bulunduran sulu ekstrakt, aktif karbon ile renksizleştirildi. Vakumda kuruluğa kadar evapore edildi. Kalıntı metanol ile alındı. Asidik tipte katyon değiştiriciden geçirildi (amberlite-120). Metanol, vakumda evaporasyonla uzaklaştırılarak aescin elde edildi.

İzole edilen aescin ve standardın UV , IR spektrumları, TLC, elementel analiz sonuçları karşılaştırıldı.

UV spektrumları Philips UV 8700, IR spektrumları Philips 9700 spektrofotometrede, elementel analizler Hawlett Packard cihazında yapıldı.

TLC'de silikajel F₂₅₄ (Merck 5554) hazır plakalar ve CHCl₃-MeOH-H₂O(59:33:8), PrOH-EtOAc-H₂O(40:30:30) yürütücü solvent karışımları kullanıldı.



3.2.4. Kül Analizi

Duyarlı olarak tartılan örnekler, Pt krözelerde 600°C de tamamen kül edildi. Sabit tartıma getirildikten sonra tartıldı. Her örnekteki kül yüzdesi için, üçer paralel tayin yapıldı. Külün, der HCl'de tamamen çözündüğü görüldü. Bu şekilde çözeltiliye alınan külde sodyum, potasyum, kalsiyum ve magnezyum analizi yapıldı. Analizlerde Eppendorf alev fotometresi kullanıldı. Her örnek için üçer paralel tayin yapıldı.

3.3. Bulgular

15'er gün ara ile toplanan üç örnek grubu aşağıdaki gibi numaralandı. Elde edilen bulgular, bu numaralar kullanılarak gösterildi.

5 Eylülde toplanan örnekler : I

20 Eylülde toplanan örnekler : II

5 Ekimde toplanan örnekler : III

3.3.1. Nem Miktarları

Taze tohumdaki nem miktarı, her gruptan 5'er tayin yapılarak belirlendi. Sonuçlar tablo 4.'de gösterildi.

Tablo 4. Taze Tohumdaki Nem Yüzdeleri

Örnek no:	% Nem					
	1	2	3	4	5	ort.
I	48.14	49.66	50.53	48.96	47.90	49.04
II	45.37	46.48	47.33	44.42	46.29	45.98
III	48.00	49.06	50.51	50.71	49.13	49.48

Stabilizasyon işlemlerinden sonra, öğütülerek analizlere hazırlanan tohumlardaki nem miktarı aynı şekilde belirlendi. Sonuçlar tablo 5.'de gösterildi.

Tablo 5. Tohum Unundaki Nem Yüzdeleri

Örnek no.	% Nem					
	1	2	3	4	5	ort.
I	10.61	10.74	10.84	10.72	10.81	10.74
II	10.62	10.44	10.57	10.54	10.61	10.55
III	10.42	10.56	10.51	10.38	10.35	10.44

3.3.2. Yağlar

3.3.2.1. Yağ Miktarları

Yağ miktarları, bölüm 3.2.1.1.de anlatılan yolla tayin edildi. Elde edilen değerlerden; taze ve kuru örnekteki yağ yüzdeleri, taze tohum ve tohum unundaki ortalama nem miktarları kullanılarak hesaplandı.

Tablo 6. Yağ Yüzdeleri.

Örnek no.	% Yağ					
	% 10 Nemli Tohum Ununda				Kuru Tohumda	Taze Tohumda
	1	2	3	ort.		
I	4.44	4.26	4.37	4.35	4.87	2.48
II	5.40	5.47	5.44	5.43	6.07	3.28
III	4.68	4.73	4.71	4.70	5.24	2.64

3.3.2.2. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Maserasyonla izole edilen yağların yoğunluk ve refraktif indeksi belirlendi. Değerler tablo 7.de verildi.

Tablo 7. Yağın Fiziksel Özellikleri.

Örnek no.	Yoğunluk gr/ml; 20°C	Refraktif İndeks 40°C
I	0.909	1.4670
II	0.911	1.4668
III	0.907	1.4653

Bulunan asit indeksi, asit derecesi, serbest yağ asitleri yüzdesi (oleik asit cinsinden), sabunlaşma indeksi, esterleşme indeksi ve iyot indeksi (Hanus metoduna göre) sonuçları; yağ ve trigliseritler için tablo 8'de gösterildi. Verilen rakamlar, üçer paralel tayinin ortalamasından hesaplandı.

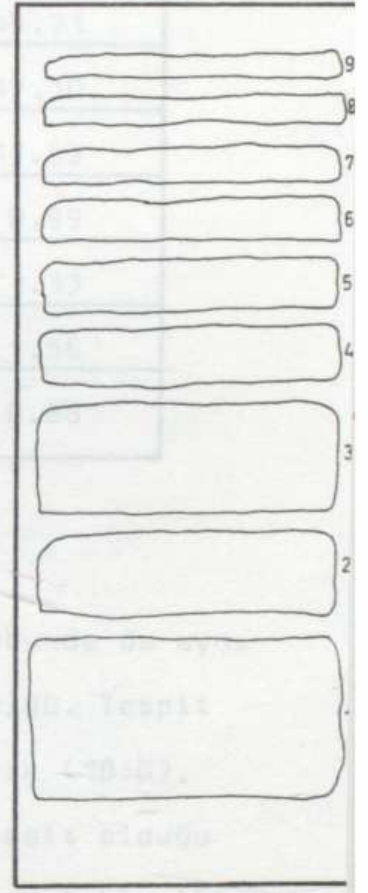
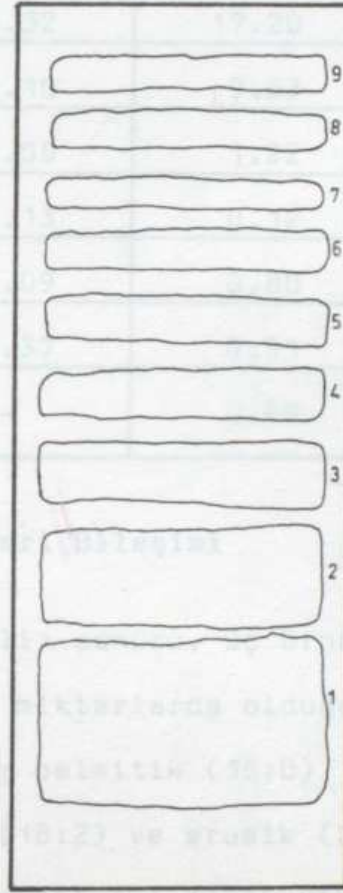
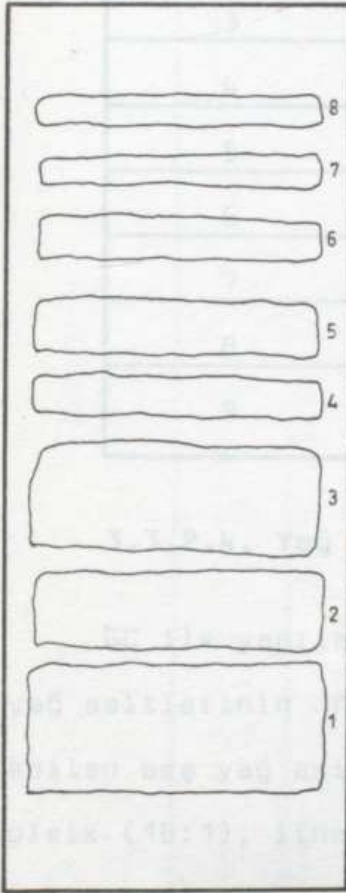
Tablo 8. Yağın Kimyasal Karakteristikleri

Örnek no.	A.I. (mg.KOH/gr)		A.Der. (ml.1 N al- kali/100 gr)		% Ser.Yağ.As. (oleik asit)		S.I. (mg.KOH/gr)		E.I. (mg.KOH/gr)		I.I. (gr./100 gr)	
	Yağ	Trig.	Yağ	Trig.	Yağ	Trig.	Yağ	Trig.	Yağ	Trig.	Yağ.	Trig.
I	8.3	1.5	11.8	3.7	4.19	1.06	173.3	169.7	165.0	168.1	77.06	70.66
II	8.7	1.6	15.5	2.9	4.38	0.84	178.5	166.6	169.8	164.9	85.13	74.35
III	6.5	1.2	11.7	2.1	3.31	0.62	176.6	165.5	170.1	164.3	81.14	73.21



3.3.2.3. TLC-Spektrofotometrik Bulgular

Vağın trigliserit bileşiminin, ince tabaka kromatogram-ları şekil 14,15 ve 16'da gösterildi. I örneğinde 8, II ve III örneklerinde 9 trigliserit fraksiyonu tespit edildi.



Şekil 14. I.örneği.

Şekil 15. II.örneği.

Şekil 16. III.örn

Her bir fraksiyondan yapılan gliserin tayinlerinden hesap-lanan relatif trigliserit yüzdeleri tablo 9'da verildi. Değer-ler, Üçer paralel tayin ortalamasından hesaplandı.

II	7.95	2.32	59.25	23.50
III	7.82	2.21	56.80	25.64



Tablo 9. Relatif Trigliserit Yüzdeleri.

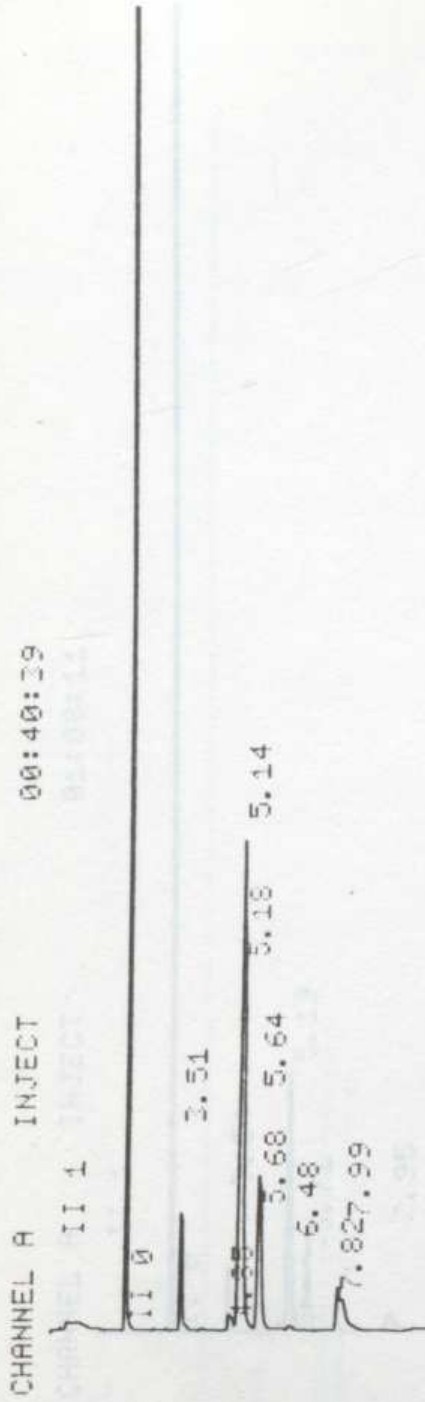
Fraksiyon No:	Relatif Trigliserit Yüzdeleri		
	I	II	III
1	49.67	48.50	36.34
2	38.17	20.85	10.72
3	10.32	17.20	19.71
4	1.10	9.83	17.10
5	0.09	1.22	11.53
6	0.13	0.12	0.99
7	0.09	0.80	1.13
8	0.37	0.51	1.56
9	-	0.89	0.88

3.3.2.4. Yağ Asitleri Bileşimi

GC ile yapılan analiz sonucu, üç örnek grubunda da aynı yağ asitlerinin farklı miktarlarda olduğu görüldü. Tespit edilen beş yağ asidinin; palmitik (16:0), stearik (18:0), oleik (18:1), linoleik (18:2) ve erusik (22:1) asit olduğu belirlendi. Her üç gruba ait yağ asiti miktarları tablo 10'da, kromatogramlar şekil 17, 18 ve 19'da gösterildi.

Tablo 10. Yağ Asitleri Bileşimi

Örnek No	Relatif Yüzde				
	Palmitik Asit (16:0)	Stearik Asit (18:0)	Oleik Asit (18:1)	Linoleik Asit (18:2)	Erusik Asit (22:1)
I	8.55	2.16	60.42	20.10	8.11
II	7.95	2.32	59.55	23.38	6.77
III	7.82	2.21	56.68	26.64	6.53



00:40:29 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN INDEX

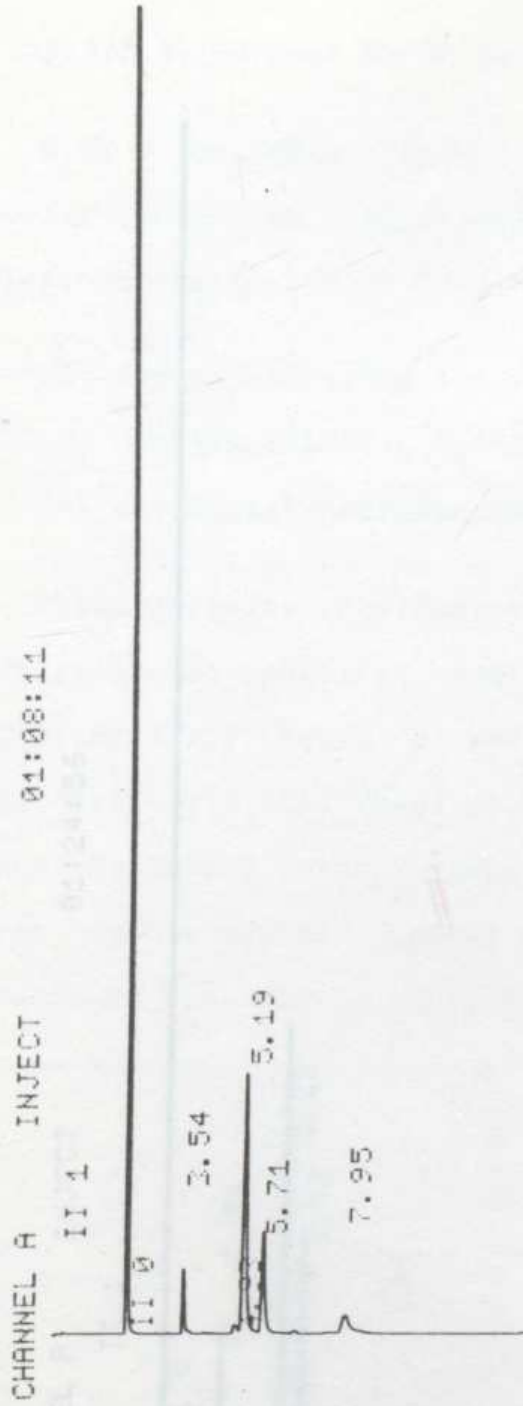
PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.551	2.51	2887	01
2	2.168	4.35	732	02
3	35.426	5.14	11961	03
4	25.063	5.18	8462	03
5	10.349	5.64	3494	03
6	0.753	5.68	3293	03
7	0.575	6.48	194	01
8	6.922	7.83	2237	03
9	1.194	7.99	403	03

TOTAL 100.

33763

Sekil 17. I. örneği.





Sekil 18. II. örneği.

01:08:11 CH= "R" PS= 1.

FILE 1.	METHOD 0.	RUN	INDEX
PEAK#	AREA%	RT	AREA BC
1	7.959	1.04	1270 01
2	2.325	3.53	371 02
3	59.554	5.19	9502 03
4	22.689	5.71	3732 01
5	6.775	7.95	1081 01
TOTAL	100.		15956



3.3.3. Karbonhidratlar

3.3.3.1. Serbest Mono- ve Disakaritlerin Analizi

0.02 M CH₃COOH ile karıştırılan malikajel (Sakay 7731)

plakalar (20/20) ve aşağıda belirtilen yDr91000 solvent keri-
şimlerinden, diğerlerine göre iyi sonuçlar alındı:

(2) n-Bütilanol/asetik asit/7 (40/10/72)

(3) n-Bütilanol/asetik asit/7 (50/12.5/7.5)

(4) etil asetat/n-propanol/7 (50/25/45) (iki defa).

Kromatogramlar incelenerek (Sakay 20,21,22), R_F değerleri

87 değerleri ve reaktivite verildi. R_F değerleri (tablo 1-3, şarh-
larındaki gibi) (tablo 12) aynıdır. Verilen sonuç-

larındaki gibi (tablo 12) aynıdır. Verilen sonuç-

larındaki gibi (tablo 12) aynıdır. Verilen sonuç-

larındaki gibi (tablo 12) aynıdır. Verilen sonuç-

larındaki gibi (tablo 12) aynıdır. Verilen sonuç-

larındaki gibi (tablo 12) aynıdır. Verilen sonuç-

larındaki gibi (tablo 12) aynıdır. Verilen sonuç-

larındaki gibi (tablo 12) aynıdır. Verilen sonuç-

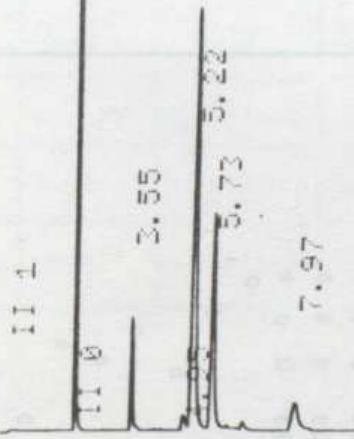
larındaki gibi (tablo 12) aynıdır. Verilen sonuç-

larındaki gibi (tablo 12) aynıdır. Verilen sonuç-

larındaki gibi (tablo 12) aynıdır. Verilen sonuç-

01:24:56

CHANNEL A INJECT



Sekil 19. III. örneği.

CH= "A" PS= 1.

01:24:56

INDEX

RUN

FILE 1. METHOD 0.

AREA BC

RT

AREA:

PEAK#

1	7.925	3.55	55
2	3.215	4.95	55
3	56.683	5.33	55
4	26.64	5.73	55
5	6.625	7.97	55

TOTAL

100.

29303



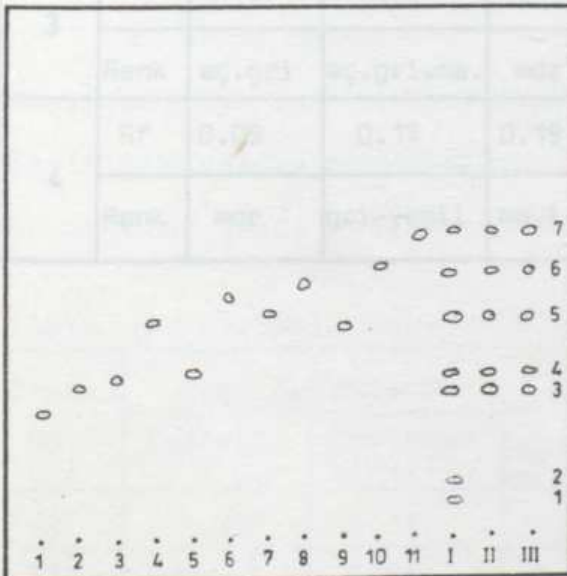
3.3.3. Karbonhidratlar

3.3.3.1. Serbest Mono- ve Oligosakkaritlerin Bileşimi

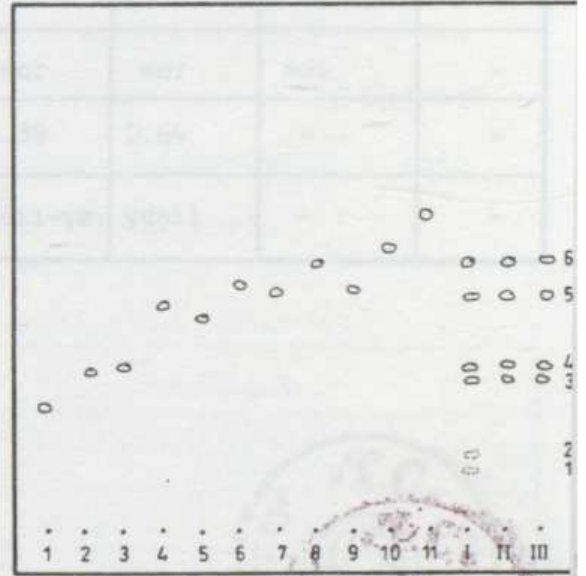
0.02 M CH_3COONa ile hazırlanan silikajel G(Merck 7731) plakalar (20x20) ve aşağıda belirtilen yürütücü solvent karışımlarından, diğerlerine göre daha iyi sonuçlar alındı:

- (2) n-butanol/asetik asit/su (40/10/22)
- (3) n-butanol/asetik asit/su (80/12.5/7.5)
- (4) etilasetat/n-propanol/su (60/25/15);(iki defa).

Kromatogramlar incelenerek (şekil 20,21,22); örneklerin R_f değerleri ve reaktifle verdikleri renkler (tablo 11), standartlarınkilerle (tablo 12) karşılaştırıldı. Yedisi mono-, ikisi disakkarit olan dokuz serbest sakkarit; glukoz, fruktoz, ksiloz, galaktoz, sorboz, ramnoz, arabinoz ve sakkaroz, maltoz olarak teşhis edildi. Serbest sakkarit bileşiminin üç örnek grubunda da aynı olduğu görüldü.

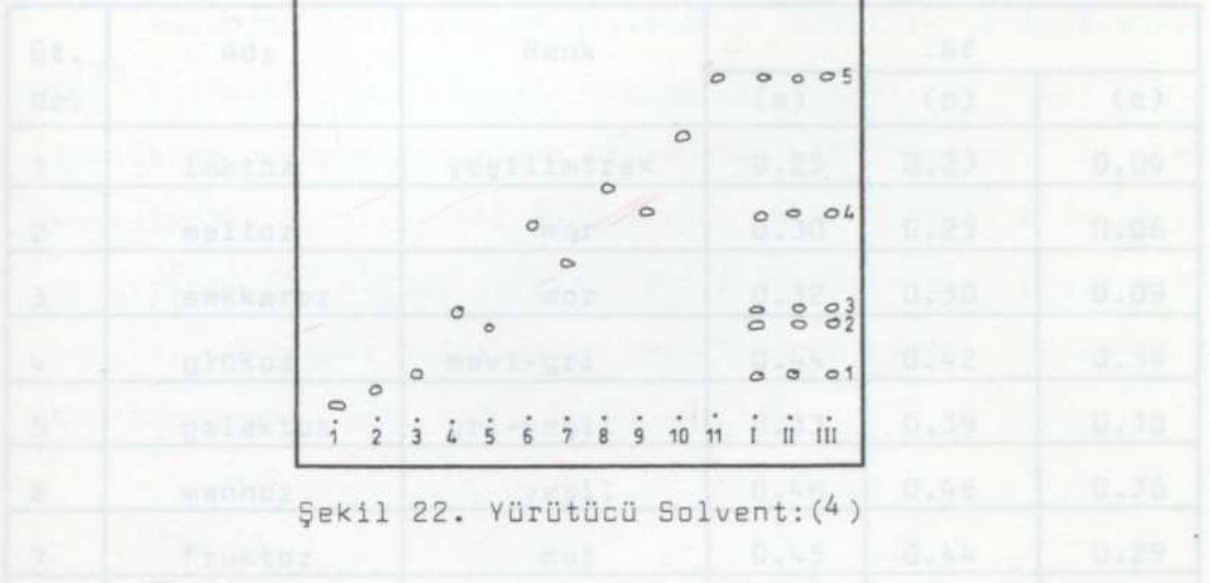


Şekil 20. Yürütücü Solvent:(2)



Şekil 21. Yürütücü Solvent:(3)

Tablo 12. Standartların Rf Değerleri ve Renkleri



Şekil 22. Yürütücü Solvent:(4)

Tablo 11. Örneklerdeki Sakkaritlerin Rf Değerleri ve Renkleri

Yürütücü Solvent		ÖRNEK NO						
		1	2	3	4	5	6	7
2	Rf	0,06	0.10	0.29	0.32	0.44	0.53	0.61
	Renk	aç.mavi	açık mor	mor	mor	mavi-gri	gri	yeşil
3	Rf	0.10	0.13	0.29	0.30	0.44	0.50	-
	Renk	aç.gri	aç.gri.ma.	mor	mor	mor	mor	-
4	Rf	0.09	0.17	0.19	0.39	0.64	-	-
	Renk	mor	gri-yeşil	mavi-gri	sarı-ye.	yeşil	-	-

Tablo 13. Sorbest Kloro- ve Disosentkarbillerin Yürütücü

Örnek No.	Kloro İndirgen			Tari İndirgen	
	İndirgen	İndirgen Olmayan	Tariye	İndirgen	Tariye
I	1.25	6.19	9.94	0.89	
II	1.50	7.94	9.04	0.81	
III	1.72	8.55	10.27	0.86	



Tablo 12. Standartların Rf Değerleri ve Renkleri

St. No.	Adı	Renk	Rf		
			(a)	(b)	(c)
1	laktoz	yeşilimtrak	0.25	0.23	0.04
2	maltoz	mor	0.30	0.29	0.06
3	sakkaroz	mor	0.32	0.30	0.09
4	glukoz	mavi-gri	0.44	0.42	0.19
5	galaktoz	gri-yeşil	0.33	0.39	0.18
6	mannoz	yeşil	0.48	0.46	0.36
7	fruktoz	mor	0.45	0.44	0.29
8	sorboz	mor	0.50	0.50	0.44
9	arabinoz	sarı-yeşil	0.42	0.45	0.39
10	ksiloz	gri	0.54	0.53	0.53
11	ramnoz	yeşil	0.61	0.59	0.65

3.3.3.2. Serbest Mono- ve Oligosakkaritlerin Miktarları

Her örnek grubundan yapılan üçer paralel tayinin ortalamasından, mg. glukoz cinsinden serbest mono- ve oligosakkaritlerin miktarları hesaplandı. Bu değerler, kurutulmuş ve taze örneklerde yüzde sakkarit olarak tablo 13'de verildi.

Tablo 13. Serbest Mono- ve Oligosakkaritlerin Yüzdeleri

Örnek No.	Kuru Tohumda %			Taze Tohumda %		
	İndergen	İndirgen Olmayan	Toplam	İndergen	İndirgen Olmayan	Toplam
I	1.75	6.19	7.94	0.89	3.15	4.04
II	1.50	7.54	9.04	0.81	4.07	4.88
III	1.72	8.55	10.27	0.86	4.32	5.18

3.3.3.3. Nişasta Miktarları

Tohumdan izole edilen nişastanın spesifik çevirme açısı $[\alpha]_D^{20} = 190.56^\circ$ (0.31 N HCl) olarak belirlendi. Bu değer kullanılarak Hadorn Doevelaar metodundaki "f" faktörü "5.52" olarak hesaplandı. Polarimetrik ölçümlerde, şahit çözeltilerin çevirme açılarının "0" olduğu görüldü. Her örnek için üçer paralel tayin yapıldı. Ortalama değerlerden hesaplanan nişasta yüzdeleri, kuru ve taze tohuma göre tablo 14'de verildi.

Tablo 14. Tohumdaki Nişasta Yüzdeleri

Örnek No:	% Nişasta	
	Kuru Tohumda	Taze Tohumda
I	41.99	21.39
II	44.49	24.03
III	35.82	18.09



Tablo 16. Yürüy Metoduyla Göre Aescin Yüzdeleri

3.3.4. Aescin

3.3.4.1. Schlemmer Metoduyla Göre Bulunan Miktarlar

Her örnek grubundan üçer paralel tayin yapıldı. Sonuçlar tablo 15'de gösterildi.

Tablo 15. Schlemmer'e Göre Aescin Yüzdeleri

Örnek No:	Analiz No:	% Aescin			
		Kuru Tohumda		Taze Tohumda	
		ort.%	ort.	ort.%	ort.
I	1	5.79	6.10	2.94	3.10
	2	6.42		3.27	
	3	6.09		3.10	
II	1	6.42	6.13	3.46	3.30
	2	5.81		3.13	
	3	6.18		3.33	
III	1	8.13	7.79	4.10	3.93
	2	7.41		3.74	
	3	7.83		3.95	

3.3.4.2. Yeni Metod İle Bulunan Miktarlar

Her örnek grubundan üçer paralel tayin yapıldı ve sonuçlar tablo 16'da gösterildi.



Tablo 16. Türev Metoduna Göre Aescin Yüzdeleri

Örnek No.	Analiz No.	% Aescin			
		Kuru Tohumda		Taze Tohumda	
		ort. %	ort.	ort. %	ort.
I	1	6.21	6.20	3.16	3.16
	2	6.28		3.20	
	3	6.13		3.12	
II	1	6.28	6.23	3.39	3.38
	2	6.29		3.39	
	3	6.23		3.36	
III	1	7.77	7,75	3.92	3.89
	2	7.86		3.91	
	3	7.64		3.85	

3.3.4.3. Aescin Analizi Metodlarının İstatistik Değerlendirmesi

Schlemmer metoduna göre yapılan analizler için, 40-120 µgr/ml. arası beş standart kullanılarak, beş ayır ölçüm alındı (tablo 17). Ortalama absorbens değerlerinden çalışma eğrisi denklemi hesaplandı.

$$A = 8,4 \cdot 10^{-3} + 5,955 \cdot 10^{-3} C \quad (r= 0.9999)$$



Tablo 17. Schlemmer Metodu Ölçü Eğrisi Değerleri

C µgr/ml	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	$\bar{A}$	s	$\frac{s}{\bar{A}} \cdot 100$
40	0.241	0.254	0.253	0.251	0.240	0.247	$6,76 \cdot 10^{-3}$	2.73
60	0.360	0.374	0.375	0.363	0.355	0.365	$8.79 \cdot 10^{-3}$	2.40
80	0.476	0.501	0.497	0.480	0.448	0.484	$1.40 \cdot 10^{-2}$	2.90
100	0.597	0.626	0.612	0.602	0.594	0.606	$1.30 \cdot 10^{-2}$	2.14
120	0.716	0.739	0.727	0.714	0.714	0.722	$1,09 \cdot 10^{-2}$	1.51

Türev metoduna göre yapılan analizler için, 50-250 µgr/ml arası beş standart kullanılarak, beş ayrı ölçüm alındı (tablo 18). Türev değerleri (pik-pik) ortalamalarından çalışma eğrisi denklemi hesaplandı.

$$D = 7,10 \cdot 10^{-3} + 0,193614 C \quad (r=0,9999)$$

Tablo 18. Türev Metodu Ölçü Eğrisi Değerleri

C µgr/ml	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅	$\bar{D}$	s	$\frac{s}{\bar{D}} \cdot 100$
50	9.688	9.689	9.685	9.691	9.687	9.688	$2,23 \cdot 10^{-3}$	$2,30 \cdot 10^{-2}$
100	19.359	19.360	19.359	19.361	19.355	19.358	$2,28 \cdot 10^{-3}$	$1,17 \cdot 10^{-2}$
150	29.070	29.071	29.067	29.070	29.070	29.069	$1.51 \cdot 10^{-3}$	$5.19 \cdot 10^{-3}$
200	38.720	38.723	38.720	38.722	38.721	38.721	$1.30 \cdot 10^{-3}$	$3,35 \cdot 10^{-3}$
250	48.410	48.408	48.410	48.416	48.408	48.410	$3.31 \cdot 10^{-3}$	$6.80 \cdot 10^{-3}$

Metodları karşılaştırmak amacıyla, aynı örnek grubundan (III) beşer paralel analiz yapıldı. "t" ve "F" testi uygulanarak metodlar karşılaştırıldı. % 95 güven düzeyinde, güven aralıkları hesaplandı. Sonuçlar tablo 19'da verildi.

"t" testi sonucunda, her iki metodla elde edilen aescin yüzdesi değerlerinin aynı popülasyona ait oldukları; "F" testinde ise türev metodunun prezisyonunun daha yüksek olduğu görüldü.

Tablo 19. Metodların İstatistik Karşılaştırması

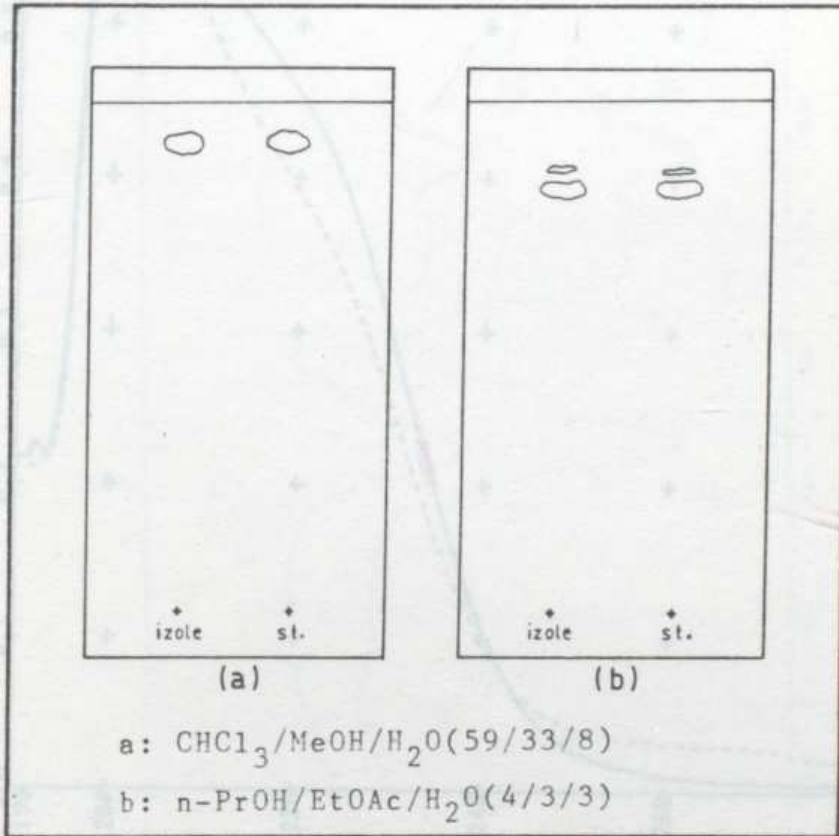
	Türev Met.	Schlemmer Met.
n_1	6.77	6.41
n_2	7.11	7.22
n_3	6.95	6.46
n_4	7.05	7.21
n_5	6.89	6.74
$\bar{x}$	6.95	6.81
S	0.1337	0.3922
$\frac{S}{\bar{x}} \cdot 100$	1.92	5.75
S^2	0.0178	0.1538
$\frac{t \cdot s}{\sqrt{n}}$	± 0.16	± 0.48
güven aralığı	6.79-7.11	6.33-7.29
t_{tablo}	2.776	
t_{bulunan}	1.99	
F_{tablo}	6.39	
F_{bulunan}	8.64	

($\alpha = 0.05$; $n=5$)



3.3.4.4. Tohumdan Elde Edilen Aescin'in Standart İle Karşılaştırılması

Aynı şartlarda çekilen UV (şekil 23) ve IR (şekil 24) spektrumları, ince tabaka kromatogramları (şekil 25) ve elementel analiz (tablo 20) sonuçlarından; izole edilen aescin ile standardın aynı yapıda olduğu görüldü.

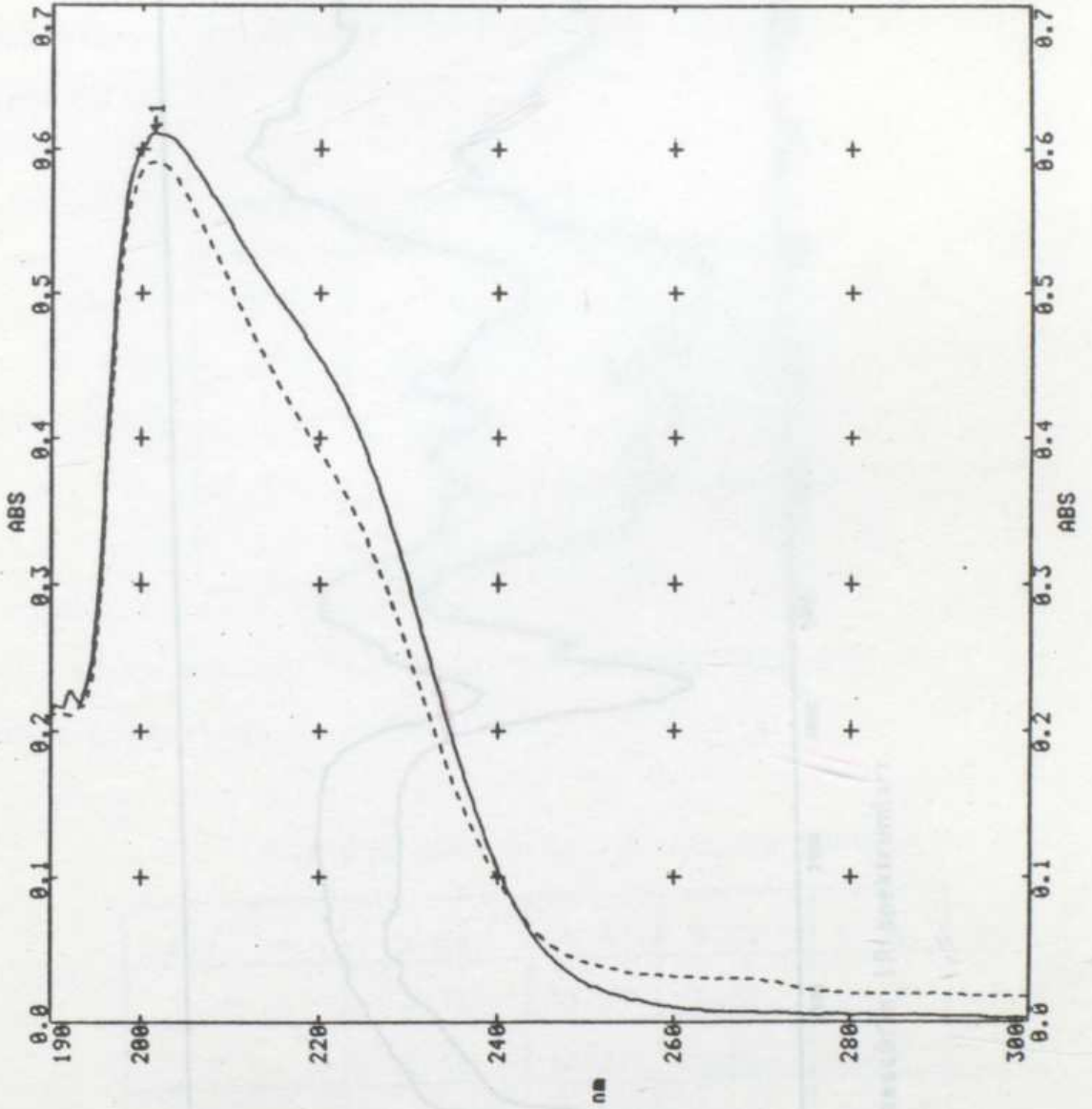


Şekil 25. ST. ve izole aescin'in TLC'leri.

Tablo 20. Elementel Analiz Sonuçları

Element	İzole Aescin	Standart
% C	54.618	54.247
% H	8.065	7.939



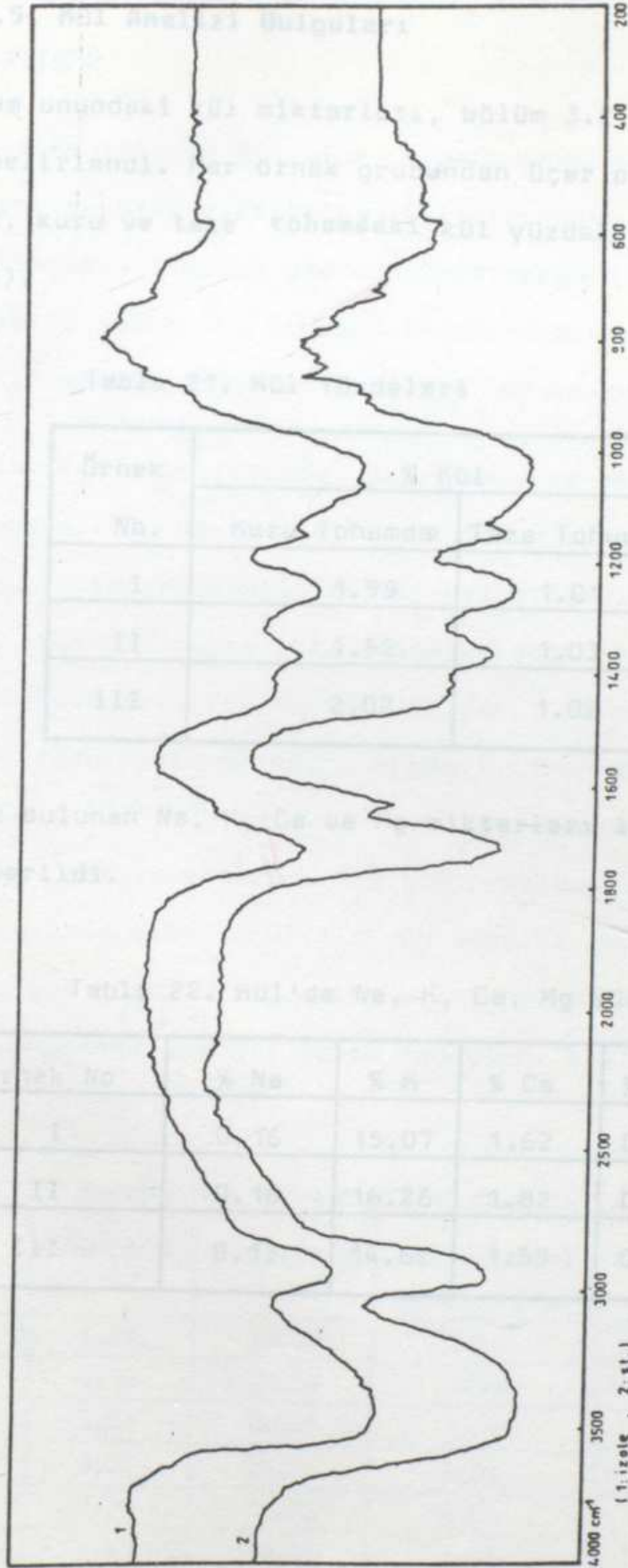


Şekil 23. St ve İzole Aescin'in UV Spektrumları

(—: St.aescin;---:İzole aescin)

(λ : 201nm)





Sekil 24. izole ve st. aescin'in IR spektrumları.



3.3.5. Kül Analizi Bulguları

Tohum unundaki kül miktarları, bölüm 3.2.4.'de anlatılan şekilde belirlendi. Her örnek grubundan üçer paralel tayin yapılarak, kuru ve taze tohumdaki kül yüzdeleri hesaplandı (tablo 21).

Tablo 21. Kül Yüzdeleri

Örnek No.	% Kül	
	Kuru Tohumda	Taze Tohumda
I	1.99	1.01
II	1.92	1.03
III	2,02	1.02

Külde bulunan Na, K, Ca ve Mg miktarları ise tablo 22'de gösterildi.

Tablo 22. Kül'de Na, K, Ca, Mg Yüzdeleri

Örnek No	% Na	% K	% Ca	% Mg
I	0.16	15.07	1.62	0.23
II	0.16	16.26	1.82	0.24
III	0.13	14.62	1.59	0.24



4. TARTIŞMA

Türkiye'de yetişen *Aesculus Hippocastanum* L. bitkisinin tohumlarının kimyasal bileşiminin araştırılması amacıyla yapılan bu çalışmada, tohumun ana komponentlerinin miktar ve bileşimleri belirlenmiştir. Tohumun önemli komponenti olan aescin-in kantitatif analizi için de yeni bir metod geliştirilmiştir.

Tohumlar eylül başlarında olgunlaşır ve ekim ortalarında dökülmeye başlar. Bu dönem içerisinde tohum bileşiminde değişimler olduğu, yapılan analizlerden anlaşılmaktadır. Aescin ve serbest sakkarit miktarında artma, nişasta miktarında ise azalma görülmektedir. Yağ miktarında ise, dönem ortasında bir maksimum görülmekle beraber, aradaki fark fazla değildir. "I", 5 eylülde; "II", 20 eylülde ve "III", 5 ekimde toplanan örnek grubunu göstermektedir. Her komponentin miktarı en az üç paralel tayinle belirlenmiştir. Bu paralel tayinler arasındaki farklar çok küçük olduğundan, ortalamaları kullanılmıştır. Belirlenen komponentlere ait toplu sonuçlar, tablo 23'de gösterilmiştir.

Tablo 23. Tohumun Ana Komponent Yüzdeleri

Örnek		Aescin %	Nişasta %	Top.Serbest Sakkarit %	Yağ %	Kül %	Su %
I	kuru tohumda	6.20	41.99	7.94	4.87	1.99	-
	taze "	3.16	21.39	4.04	2.48	1.01	49.04
II	kuru "	6.23	44.49	9.04	6.07	1.92	-
	taze "	3.38	24.03	4.88	3.28	1.03	45.98
III	kuru "	7.75	35.82	10.27	5.24	2.02	-
	taze "	3.89	18.09	5.18	2.64	1.02	49.48

Nişasta tohumdan izole edilerek, spesifik çevirme açısı $[\alpha]_D^{20} = 190.56^\circ$ (0.31 N HCl) olarak bulunmuştur. Bu değer, aynı şartlarda mısır nişastası için 177.46° , patates nişastasında 181.78° 'dir (121).

Tohumda dokuz serbest sakkarit belirlenmiştir. Kromatogramların ikisinde (şekil 20,21), Rf değerleri mevcut standartlardan küçük iki leke görölmüştür. Bunlar, diğer lekelerden daha belirsiz ve çok açık renktedir. Sakkaroz ve maltozu Rf değerleri ile renkleri birbirine çok yakın olmakla beraber, ikisinin yanyana bulunması, kolayca teşhis edilmelerini sağlamıştır. Glukoz, fruktoz, ksiloz, galaktoz, sarboz, ramnoz ve arabinoz standartlarla karşılaştırılarak teşhis edilmişlerdir. Her üç örnek grubunun da, aynı serbest sakkaritlerin bulunduğu görölmektedir. Sözü edilen iki belirsiz leke saf-sızlık olarak düşünöldüğünde, indirgen olmayan tek sakkaritin sakkaroz olduğu anlaşılmaktadır. Dolayısıyla indirgen olmayan sakkarit miktarı, tohumdaki sakkaroz miktarını göstermektedir (tablo 13).

Tohum yağında, GC ile yapılan analizler sonucu palmitik, stearik, oleik, linoleik ve erusik asit olmak üzere beş yağ asidi belirlenmiştir. Bu yağ asitlerinin miktarları, toplanma zamanına göre biraz değişmektedir (tablo 10). TLC'de I no'lu örnek 8, II ve III nolu örnekler ise 9 trigliserit fraksiyonu göstermiştir (şekil 14,15,16). Buna göre; tespit edilen beş yağ asidi, gliserinle çeşitli kombinasyonlarda esterleşmiş olarak I'nolu örnekte 8, II ve III'nolu örnekte 9 trigliserit



Tablo 24. Bogs-Bremer'in Aescin'in Çözünürlüğü

meydana getirmektedir. Bunların miktarları da tayin edilmiştir (tablo 9). Her üç yağ örneği için tayin edilen kimyasal karakteristikler ve yağ asiti analizi sonuçları uyum içersindedir (tablo 8). Belirlenen yağ asitlerinin; cins ve miktar açısından, literatürde bildirilmiş olanlarla farklılık gösterdiği anlaşılmaktadır. Yugoslavya'da yapılan bir çalışma (41) ile karşılaştırıldığında; oleik ve linoleik asit miktarlarının benzediği, diğer yağ asitlerinin ise cins ve miktarlarının farklı olduğu görülmektedir.

Tohum unundan aescin'in kantitatif tayini için literatürde verilen metodlar, ayırma ve belirleme işlemleri olarak iki aşamalıdır (bölüm 2.3.3.1). Ayırma, TLC veya solvent ekstraksiyonu ile yapılmaktadır. Aescin'in, Rf'leri farklı olabilen otuz kadar izomerden meydana gelmesi, TLC ile ayırmada güçlük yaratır. Solvent ekstraksiyonu ile yapılan ayrımalarda ise madde kaybı olmaktadır.

Literatürde en çok kullanıldığı görülen Schlemmer metodu, aescin solvent ekstraksiyonu ile ayrılmaktadır. Üçlü solvent karışımı ile iki kere ekstraksiyon ve ardından eterle yıkama yapılmaktadır. Bu aşamada madde kaybı olduğu, Bogs ve Bremer tarafından da bildirilmiştir (1). Aescin'in çeşitli solventlerdeki çözünürlüğü için verdikleri rakamlar tablo 24'de verilmiştir.



Tablo 24. Bogs-Bremmer'e Göre Aescin'in Çözünürlüğü

Solvent	% Aescin	
	literatür	bulunan
eter	çözünmez	0.0076
kloroform	çözünmez	0.0077
su	0.007;0.01	0.025
etanol	kolay çözünür	21.7
metanol	kolay çözünür	25.88

Metodun spektrofotometrik tayin kısmında, renk reaktifi ile oluşan ürün ışığa karşı duyarlıdır. Renkli ürünün absorban-sının, ışıkta 1/2 saat sabit olduğu belirtilmekle beraber, bu sürenin daha az olduğu gözlenmiştir. Her iki husus, meto-dun prezisyonunun azalmasına sebep olmaktadır.

Bölüm 3.2.3.2.de anlatılan ve yeni bir metod olarak veri-len türev spektrofotometrisi ile aescin analizinde, ayırma işlemi yoktur. Tohumunun % 65 MeOH ile hazırlanan ekstre-sinden direkt tayin yapılmaktadır. Bu durumda, yapılan işlem-ler basitleşmekte ve analiz süresi kısalmaktadır. Metod, geri kazanma ve Schlemmer metodu ile karşılaştırmak suretiyle test edilmiştir. Geri kazanma oranı, ortalama % 99.20'dir (n=5; s= 0.0641). İstatistik hesaplamalar, Schlemmer ve türev meto-du ile bulunan değerlerin aynı popülasyona ait olduğunu gös-termiştir. Ancak türev metodunun prezisyonu daha yüksektir.



Aescin, tohum unundan izole edilerek, standart (Fluka AG) ile karşılaştırılmıştır. UV ve IR spektrumlarından (122) aynı fonksiyonel grupları bulundurduğu, elementel analizinden ise aynı formülde olduğu görülmektedir. TLC'den bulunan Rf'ler de aynıdır. Bulundurabileceği otuz komponentin miktarları için birşey söylenememekle birlikte (tablo 1,2), aynı yapıda oldukları anlaşılmaktadır.

Ana komponentlerin miktarlarının karşılaştırılması açısından ; bu çalışmada elde edilen sonuçlarla, çeşitli Avrupa ülkelerinde yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçların bazıları tablo 25'de verilmiştir. Çok büyük olmamakla birlikte, ülkeden ülkeye bazı farklılıklar görülmektedir.

Tablo 25. Komponent Miktarlarının Karşılaştırılması

Komponent	Türkiye'de*	Ülke	%	Lit.	Ülke	%	Lit.
Aescin	6.20-7.75	İtalya	3.43-7.13	63	Almanya	4.25-10.77	1
Nişasta	35.82-44.49	İtalya	59.1	36	Romanya	37-38	39
Ser.Sakk.	7.94-10.27	Polonya	11	43,44	-	-	-
Yağ	4.87-6.07	İtalya	8.8	36	Yugoslavya	6.1-7.7	41
Kül	1.99-2.02	Belçika	1.3	38	Almanya	2	1

* Bu çalışmadaki değerler, elde edilen en yüksek ve en alçak değerler olarak verilmiştir.



LİTERATÜR

- 1- Bogs.U.; Bremer, D., Pharmazie, 26(7), 410, 1971.
- 2- Fremy, E., Ann; Ann. Chimie, 58, 101, 1835.
- 3- Ratschow, M., Therap. Woche 1, 206, 1950/51.
- 4- Zoltan, O.; Gorini, S., Arzneim-Forsch. 20(11), 1812, 1970.
- 5- Hampel, V.H.; Hofrichter, G.; Liehn, H.D.; Schlemmer, W.;
Arzneim-Forsch. 20(2), 209, 1970.
- 6- Magliula, E.; Carco, F.P.; Gorini, S.; Barigazzi, G.M.;
Arch.Sci.Med.125(6), 207, 1968 (Ref.C.A.73,107844n).
- 7- Krause, V.H.; Wienert, V., Arzneim-Forsch., 20(5), 703, 1970.
- 8- Konoshima, T.; Lee, K.H., J.Nat.Prod. 49(4), 650, 1986.
- 9- Jacker, H.J.; Zentralbl. Pharm. Pharmakother. Laboratorium-
sdign, 116(9), 959, 1977.
- 10- Merck Index, Eleventh Edition p.581(3644), Merck and Co.Inc.
N.J. USA., 1989.
- 11- Proserpio, G., Fitoterapia, 51(2), 113, 1980.
- 12- Sezik, E.; Yeşilada, E.; Akdemir, Z. ve arkadaşları, VI.Bit-
kisel ilaç Hammaddeleri Toplantısı, s.93-8, Gazi Ü.Yayın
No: 113, Eczacılık Fak. Yayın No: 8, Ankara, 1987.
- 13- Kayacık, H., Orman ve Park Ağaçlarının Özel Sistematiği,
Cilt III, s.140-4. İ.Ü.Yayın.No.1189, Kutulmuş Matbaası, 1966.
- 14- Karamanoğlu, K., Türkiye Bitkileri, Cilt I, s.585, A.Ü.Ecz.
Fak.Yay.No:32, Ankara, 1976.
- 15- Baytop, T., Türkiye'de Bitkilerle Tedavi, 171, Sanal Matbaası,
İstanbul, 1984.
- 16- Emil Flachsmann, A.G., Eflaplant-Extracts of Plants,
Switzerland, 1984.



- 17- Baytop, A., Farmasötik Botanik, s.236, İ.Ü.Yay.No.2311, Ecz.Fak.Yay. No:25, Baha Matbaası, İstanbul, 1977.
- 18- Baytop, T., Türkiye'nin Tıbbi ve Zehirli Bitkileri, s.258-9, İ.Ü.Yay. No:1039, İsmail Akgün Matbaası, İstanbul, 1963.
- 19- Makaklı, B., Tıbbi Bitkilerimizi Değerlendirelim, s.71-5, Akgün Yayınevi, İstanbul, 1982.
- 20- Tschesche, R.; Wulff, G., Planta Med. (Stuttgart), 12,271, 1964.
- 21- Rochleder, F., S.-B.kais. Akad.Wiss.Wien 45,675,1862.
- 22- Ruzicka, L.; Janett, W., Rey, E., Helv. Chim. Acta, 25, 1665, 1942.
- 23- van der Haar, A.W., Ruceil Trav.Chim. Pays-Bas 45, 271, 1926.
- 24- Kuhn, R.; Law, I., Liebigs Ann. 669, 183, 1963.
- 25- Tschesche, R.; Axen, U.; Snatzke, G., Liebigs Ann., 669, 171, 1963.
- 26- Merck Index, 8.Ed., 421, Merck and Co.,Inc., Rahway N.J. USA, 1968.
- 27- Hiller, K.; Keipert, M.; Linzer, B., Pharmazie 21, 713,1966.
- 28- Basu, N.; Rastogi, P.R., Phytochemistry 6, 1249, 1967.
- 29- Orzechowski, G., Deutsche Apotheker 17, 144, 1965.
- 30- MuBgnug, G. Arzneim-Forsch (Drug Res.) 19, 1588, 1969.
- 31- Hoppe, W., Gieren, A.; Brodherr, N; Tschesche, R.; Wulff,G.; Angew. Chem. (Int.Ed.), 7, 547, 1968.
- 32- Wulff, G.; Tschesche, R., Tetrahedron, 25, 415, 1969.
- 33- Wagner, J., Schlemmer, W.; Hoffmann, H.; Arzneim-Forsch 20(2), 205, 1970.
- 34- Wagner, J.; Hoffmann, H.; Loew, I., Arch.Pharm. (Weinheim), 304(11), 804, 1971.



- 35- Wagner, J.; Bosse, J.Z. *Physiol, Chem.* 320, 27, 1960.
- 36- Testoni, M.; Bartolozzi, R., *Ind. Saccar Ital.* 33, 5, 1940
(Ref. C.A.34, 4599).
- 37- Gautrelet, J.; Carayan, A., *Gentil. Bull. Acad. Med.*,
123, 847, 1940 (Ref.C.A.36, 3576).
- 38- Daqueker, R., *Pharmakognostische Commentar op de Belgische
Pharmacopee IV*, 36, 1949.
- 39- Alexa, V., *Acad. rep. populare Române (Cluj)*, *Studii
cercetări stiint.* 3(3/4), 109, 1952 (Ref.C.A.50, 11562).
- 40- Mel'nichuk, O.P., *Trudy L'vav. Med. Inst.* 12, 166, 1957.
(Ref.C.A.55, 23690).
- 41- Lemajie, L., *Arh. Farm*, 36(6), 295, 1986.
- 42- De Buigne, J., *Riv. Ital.Essenze Profumi Piante Offic.* 25,
124. 1943 (Ref.Chem, Zentr. I, 253, 1944).
- 43- Kahl, W., *Diss, Pharm. Pharmacol*, 19(2), 203, 1967.
- 44- Kahl, W., *Diss. Pharm. Pharmacol*, 18(6), 607, 1966.
- 45- Kahl, W., *Carbohydr. Res.*, 10(4), 586, 1969.
- 46- Kamerling, J.P., *Carbohydr. Res.*, 25(2), 293, 1972.
- 47- Kerstan, G., *Planta*, 21, 657, 1934.
- 48- Zabrodskii, G, *Brodilnaya Prom.* 10(4), 10, 1933.
(Ref.C.A.28.7415).
- 49- Weiss, G.; Fador, A., *Studia Univ. Babes.-Bolyai. Ser.Chemia*
9(1), 25, 1964 (Ref.C.A.61, 14839).
- 50- De Buigne, J., *Rev. Prod. Chim.* 53, 202, 1940.
- 51- Benda, H., *Natur u.Nahr.* B2, (No.15), 16, 77, 1948.
- 52- Frey, M., *Rom. RO* 77, 046, 30 Jul. 1981.
- 53- Badenhuizen, N.P.; Staerke, 29(4), 109, 1977.
- 54- Hirst, E.L.; Young, G.T., *J.Chem.Soc.*, 951, 1939.



- 55- Schlemmer, W.; Bosse, J.; Arch. Pharm. 296(11),785, 1963.
- 56- Schlemmer, W., Deut. Apoth. Ztg., 106(38), 1315,1966.
- 57- Bichsel, K.; Untersuchungen über Saponin und atherisches
Öl von Radix Pimpinellae-Promotionsarbeit der Eidgenössischen
Hochschule in Zurich, 1965.
- 58- Finholt, P., Pharm Wbl. 93, 105, 1958.
- 59- Römisch, H., Pharmazie, 13, 707, 1958.
- 60- Kaczmarek, F.; Rutkowska, U.; Wojsa, K., Biul. Inst.
Roslin. Lecznicznych 8(4), 156, 1962 (Ref.C.A.59, 9335).
- 61- Crawford, N., Clin. Chim. Acta 3, 357, 1958.
- 62- Deutsches Arzneibuch, 8 Ausgabe, 428, Deutscher Apot.
heker Verlag Stuttgart Govi-Verlag G.m.b.H., Frankfurt,1978.
- 63- Profumo, P.; Gastaldo, P.; Martinucci, R., Fitoterapia,
58(3), 184, 1987.
- 64- Kartnig, T., Pharm. Zentralh, 108(3), 182, 1969.
- 65- Winkler, W., Arzneim.-Forsch. (Drug.Res.), 18, 1031, 1968.
- 66- Genius, O.B., Arzneim.-Forsch 20(10),1606, 1970.
- 67- Hammerstein, F.; Kaiser,F.; Planta Med. 21(1),5,1972.
- 68- Schlemmer, W.; Kammerl, E., Pharm. Ind. 34(5),356, 1972.
- 69- Minamikawa, T., Eisei Kagaku, 19(5), 247, 1973 (Ref.C.A.
80, 124647).
- 70- Dytkowska, O.; Acta,Pol.Pharm. 30(6), 581, 1973.
(Ref.C.A.81, 29567).
- 71- Franck, P.H., Dtsch. Apoth.-Ztg.,115(33),1206,1975.
- 72- Boguslavskaya, L.I.; Zykova, N., Farm.Zh.(Kiev),6,53,
1977 (Ref.C.A.88,141742).
- 73- Vanhaelen, M., Vanhaelen-Fastre, R.; J.Chromategr. 281,
263, 1983.
- 74- Glasl, H., Pharm. Ztg. 129(43), 2619, 1984.



- 75- Steinigen, M., Paperback APV 11 (Qual. Pflanz. Arzneim.;
Pruef Herstell.-Anforderungen Zulassung) 115, 1984.
- 76- Wagner, H., Dtsch, Apoth. Ztg. 125(30), 1513, 1985.
- 77- Burnauf, R., J.Chrom., 368(2), 433, 1986.
- 78- Deutscher Arzneimittel Codex, 1.Erganzungslieferung,
1973, Hi 1 bis 6.
- 79- Friedrich, Hi, Zeruhn, H., Arch. Pharm. (Weinheim), 404(5),
347, 1971.
- 80- Merkel, J. Ger(East) 11,861, July 16, 1956.
- 81- Yagi, S., Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp. Pathol
Pharmakol. 64, 141, 1911.
- 82- Kofler, L., Biochem. Z.159, 327, 1925.
- 83- Basse, J.; Wagner, J.; Wojahn, F. (Chemische Pharmazeutische
Fabrik Adolf Klinge G.m.b.H.) Ger. 1, 124, 636, Mar.1, 1962.
- 84- Mel'nichuk, O.P., Khim. Farmatsevt. Inst.12, 263, 1960
(Ref. C.A.57,2331).
- 85- Bosse, J.; Wagner, J.; Wojahn, F. (Chemische Pharmazeutische
Fabrik. Adolf Klinge G.m.b.H. Ger.1,133, 503, July 19, 1962.
- 86- Madaus Co. Fr. M 790, Oct.9, 1961.
- 87- Spiridonov, V.N., Med. Prom. SSSR, 17(11), 17, 1963
(Ref.C.A.60, 10474).
- 88- Dziengel, K. (Chemische Fabrik Tempelhof Preuss, Temmler)
Ger.1,182, 385, Nov.26, 1964.
- 89- Dziengel, K. (Chemische Fabrik Tempelhof, Preuss, Temmler)
U.S. 3,170,916, Feb.23, 1965.



- 90- Akacic, B.; Spoljar, B., Acta. Pharm. Jugoslav, 16(4), 111(1966).
- 91- Kamphuis, G.; Patt, P., Oesterr. Apoth. Ztg. 24 (29-30), 535, 538, 1970.
- 92- Schlemmer, W. (Chem-Pharm. Fabrik Adolf Klinge Co.). Ger. 1, 617, 413, 15 Apr. 1971.
- 93- Wagner, J. (Chem. Pharm. Fabrik. Adolf. Klinge Co.) Ger. Offen 2. 339, 760, 06 Mar. 1975.
- 94- Madaus, R., Ger. Offen. 2, 530, 941, 27 Jan. 1977.
- 95- Rucmann, R., Ger. Offen. 2, 733, 204, 16 Feb. 1978.
- 96- LEK Toverna Farm. in Kem. Izd. Fer. Demande 2, 361, 420, 10 Mar. 1978.
- 97- Rucman, R. (LEK Toverna Farm. in. Kem. Izd.) Span. 455, 693, 01 Oct. 1978.
- 98- Rucman, Y., Vestn. Slov. Kem. Drus., 28(4), 417, 1981.
- 99- Susumu, O. (Maruzen Chemical Oil Co. Ltd.) Japan Kokai Tokkyo Koho, JP 8781325 A2, JP 6281325, date 870414.
- 100- Wagner, J.; Z. Physiol. Chem., 335(2), 232, 1964.
- 101- Wagner, J., Arzneim.-Forsch., 17(5), 546, 1967.
- 102- Haenel, H., Pharmazie 9, 489, 1954.
- 103- Istratescu, G., Farmacia, 33(2), 103, 1985.
- 104- Rashdy, I., Ger. Offen. D.E. 3, 522, 572, 02. Jan. 1987.
- 105- Sergeev, A.V.; Deposited Doc. VINITI, 2342-84, 1984 (Ref. C.A. 102, 109855).
- 106- Fiedler, U., Vortrag auf der 2. Tagung der Dtsch. Ges. für Arzneimittelforschung und -therapie. 3.-5. Sept. Karlsruhe, 1954.



- 107- Kühnel, H.J., Arzneimittel-Forsch. 6, 498, 1956.
- 108- Stankovich, S.K., Phytochemistry, 24(1), 119, 1985.
- 109- Stankovich, S.K., Phytochemistry, 24(10), 2466, 1985.
- 110- Stankovich, S.K., Phytochemistry, 23(11), 2677, 1984.
- 111- Arigia, T., Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP.61, 16, 982, 24. Jan. 1986.
- 112- Encyclopaedia of Chemical Industrial Analysis, Vol.12 (Fats and Fatty Oils p.477).
- 113- Keskin, H., Besin Kimyası, Cilt I (5.Baskı) s.103, İ.Ü. Yayın No : 3450, Güryay Matbaacılık, İstanbul, 1987.
- 114- Stahl, E., Thin Layer Chromatography, London, 1980.
- 115- Bandyopadhyay, C., J.Chromatog. 37, 123, 1968.
- 116- Metcalfe, L.D.; Schmitz, A.A.; Pelka, J.R., Analytic. Chem. 38, 514, 1966.
- 117- Link, W.E., Official and Tentative Methods of the American Oil Chemists Society, 3rd. Ed.Vol.I-II U.S.A. 1973.
- 118- Official Methods of Analysis of the Asso Official. Agricul. Chemist. (ADAC), p.31(3.002-b), p.46(3.105). 1980.
- 119- Official Methods of Analysis of the Asso. Official Agricul. Chemist. (AOAC), p.515(31.052, 31.053). 1980.
- 120- Samogyi, M.; J.Biol. Chem., 61, 160, 1945.
- 121- Schormüller, J., Acker, L., Bergner, G.; Handbuch Der Lebensmittelchemie Band II/2. Teil., 444, Springer-Vorlag, 1967.
- 122- Voigtlaender, H.W.; Rosenberg. W., Arzneimittel Forsch 13(5), 385, 1963.
- 

ÖZGEÇMİŞ

1959'da Zonguldak'ta doğdum. İlk ve Orta öğrenimimi burada tamamladım. 1982'de İ.Ü.Mühendislik Fak., Kimya Mühendisliği Bölümü'nden mezun oldum. Bir yıl kadar, özel bir dershanede öğretmenlik yaptım. 1983'de H.Ü.Zonguldak Müh.Fak.'ne araştırma görevlisi olarak girdim. Aynı yıl, H.Ü.Fen-Bilimleri Enstitüsü, Kimya Müh.'de master öğrenimine başladım. 1984'de, geçirmiş olduğum bir kaza sonucu 6 ay kadar öğrenimime ara vermek zorunda kaldım. Daha sonra İstanbul Üniversitesi Fen-Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği'nde master öğrenimime yeniden başladım ve 1986'da mezun oldum. Yine aynı yıl Y.Ü.Fen-Bilimleri Enstitüsü, Anorganik Kimya Anabilim dalında doktora öğrenimine başladım. 1988'de, Y.Ü. Fen-Edebiyat Fak. Kimya Bölümü Anorganik Kimya Anabilim Dalı'na araştırma görevlisi olarak geçtim. Halen bu görevime devam ediyorum. Evli ve bir çocuk sahibiyim.

İstanbul, Ocak 1991.



