

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***SARCOPOTERİUM SPINOSUM (L.) SPACH.***  
**BİTKİSİNİN KİMYASAL YAPISININ İNCELENMESİ**

Kimyager Ayben Betül AYCAN

F:B.E. Kimya Anabilim Dalı, Organik Kimya Programında  
hazırlanan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı : Prof.Dr. Süheyla UZMAN

İSTANBUL, 1997

|   | <b><u>Sayfa No</u></b> |
|---|------------------------|
| İÇİNDEKİLER                               | I                      |
| ŞEKİL LİSTESİ                             | IV                     |
| TABLO LİSTESİ                             | VI                     |
| RESİM LİSTESİ                             | VII                    |
| TEŞEKKÜR                                  | VIII                   |
| ÖZET                                      | X                      |
| ABSTRACT                                  | XII                    |
| <b>1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI</b>       | <b>1</b>               |
| <b>2. TEORİK BÖLÜM</b>                    | <b>3</b>               |
| 2.1. BİTKİNİN TANIMI VE YAYILIŞI          | 3                      |
| 2.1.1. Rosaceae Familyası                 | 3                      |
| 2.1.2. Rosoideae Altfamilyası             | 4                      |
| 2.1.3. Sarcopoterium Spinosum (L.) Spach. | 4                      |
| 2.2. BİTKİ ÜZERİNE YAPILAN ÇALIŞMALAR     | 5                      |
| 2.3. GENEL BİLGİLER                       | 9                      |
| 2.3.1. Hidrokarbonlar                     | 9                      |
| 2.3.2. Terpenler ve Steroidler            | 10                     |
| 2.3.2.1. Terpenoid Bileşikler             | 10                     |
| 2.3.2.1.1. Dağılımları                    | 10                     |
| 2.3.2.1.2. Oluşumları                     | 10                     |
| 2.3.2.1.3. Sınıflandırılmaları            | 11                     |
| 2.3.2.1.4. Elde Edilmeleri                | 12                     |
| 2.3.2.1.5. Triterpenler                   | 12                     |
| 2.3.2.1.6. Tanınmaları                    | 13                     |

|  | <b><u>Sayfa No</u></b> |
|--|------------------------|
| 2.3.2.2. Steroid Bileşikler  | 17                     |
| 2.3.2.2.1. Yapıları ve Dağılımları                                       | 17                     |
| 2.3.2.2.2. Steroller   | 18                     |
| 2.3.2.2.3. Kimyasal Reaksiyonları  | 20                     |
| 2.3.2.2.4. Bitkiden Elde Edilmeleri, Ayrılmaları ve<br>Saflaştırılmaları | 20                     |
| 2.3.2.2.5. Tanınmaları   | 21                     |
| 2.3.3. Flavonoidal Bileşikler  | 23                     |
| 2.3.3.1. Yapıları ve Dağılımları   | 23                     |
| 2.3.3.2. Oluşumları  | 29                     |
| 2.3.3.3. Fiziksel, Kimyasal Özellikleri ve Reaksiyonları                 | 30                     |
| 2.3.3.4. Fitokimyasal Ön Denemeler İle Saptanmaları                      | 32                     |
| 2.3.3.5. Elde Edilmeleri   | 33                     |
| 2.3.3.5.1. Bitkilerden Ayrılmaları                                       | 34                     |
| 2.3.3.5.2. Kromatografik Yöntemler                                       | 35                     |
| 2.3.3.6. Tanınmaları   | 39                     |
| 2.3.3.6.1. Renk Reaksiyonları  | 39                     |
| 2.3.3.6.2. Spektral Yöntemler  | 43                     |
| 2.3.3.7. Farmakolojik Özellikleri  | 53                     |
| <b>3. DENEYSEL BÖLÜM</b>   | <b>54</b>              |
| <b>3.1. KULLANILAN YÖNTEMLER</b>   | <b>54</b>              |
| 3.1.1. Kromatografik Yöntemler   | 54                     |
| 3.1.1.1. Kolon Kromatografisi  | 54                     |

|  | <b><u>Sayfa No</u></b> |
|--|------------------------|
| 3.1.1.2. İnce Tabaka Kromatografisi                                      | 55                     |
| 3.1.2. Spektrofotometrik Yöntemler                                       | 56                     |
| 3.1.3. Terpenoid ve Steroid Belirteçleri                                 | 57                     |
| 3.1.3.1. Steroid Belirteçleri  | 57                     |
| 3.1.3.2. Flavonoid Belirteçleri  | 57                     |
| 3.1.3.3. UV Spektrumu Kayma Belirteçleri                                 | 58                     |
| 3.1.4. Uygulanan Kimyasal Reaksiyon                                      | 59                     |
| 3.2. YAPILAN İŞLEMLER  | 59                     |
| 3.2.1. Bitkinin Tüketilmesi ve Ekstrenin Elde Edilmesi                   | 59                     |
| 3.2.2. Ekstrenin Fraksiyonlandırılması ve Bileşiklerin Ayrılması         | 61                     |
| 3.3. BU ÇALIŞMADA ELDE EDİLEN BİLEŞİKLER                                 | 64                     |
| 3.3.1. BH <sub>1</sub> (MK <sub>1</sub> ) Bileşiği = Alifatik Yağ Ketonu | 64                     |
| 3.3.2. MK <sub>2</sub> Bileşiği = Alifatik Yağ Ketonu                    | 68                     |
| 3.3.3. EE <sub>1</sub> Bileşiği  | 72                     |
| 3.3.4. BF <sub>1</sub> Bileşiği  | 81                     |
| 3.3.5. BF <sub>2</sub> Bileşiği  | 89                     |
| 4. SONUÇ VE TARTIŞMA   | 98                     |
| KAYNAKLAR  | 99                     |
| ÖZGEÇMİŞ   |                        |

## ŞEKİL LİSTESİ

|   | <b><u>Sayfa No</u></b> |
|---|------------------------|
| Şekil 2.1. Triterpenoid İskeleti  | 13                     |
| Şekil 2.2. Bazı Triterpenlere Ait Parçalanmalar                                   | 16                     |
| Şekil 2.3. Steroidlerin Halka Sistemi ve Karbon Atomlarının<br>Numaralandırılması | 17                     |
| Şekil 2.4. Sitosterol'ün Yapısı   | 19                     |
| Şekil 2.5. Flavonoidal Bileşikler   | 24                     |
| Şekil 2.6. Flavonoidlerin Hidroksilli Türevleri                                   | 26                     |
| Şekil 2.7. İsoflavon Grubundan Bileşikler   | 28                     |
| Şekil 2.8. Flavonoidlerin Yapısı  | 29                     |
| Şekil 2.9. Flavonoidlere Şekerlerin Bağlanma Şekilleri                            | 30                     |
| Şekil 2.10. Flavonun Alkalilerle Reaksiyonu ve Oluşan Ürünler                     | 32                     |
| Şekil 2.11. Silikajel'in Yapısı   | 35                     |
| Şekil 2.12. Selüloz'un Yapısı   | 36                     |
| Şekil 2.13. Flavonoid Molekülünün Absorpsiyondan Sorumlu<br>Bölgeleri             | 43                     |
| Şekil 2.14. Flavonoidlerin Kütle Spektroskopisinde Parçalanma<br>Yolları          | 52                     |
| Şekil 3.1. BH <sub>1</sub> (MK <sub>1</sub> ) Bileşiği UV Spektrumu               | 66                     |
| Şekil 3.2. BH <sub>1</sub> (MK <sub>1</sub> ) Bileşiği IR Spektrumu               | 67                     |
| Şekil 3.3. MK <sub>2</sub> Bileşiği UV Spektrumu                                  | 70                     |
| Şekil 3.4. MK <sub>2</sub> Bileşiği IR Spektrumu                                  | 71                     |
| Şekil 3.5. EE <sub>1</sub> Bileşiği UV Spektrumu                                  | 74                     |

|  | <b><u>Sayfa No</u></b> |
|--|------------------------|
| Şekil 3.6. EE <sub>1</sub> Bileşiği FTIR Spektrumu   | 75                     |
| Şekil 3.7. EE <sub>1</sub> Bileşiği Asetil Türevi FTIR Spektrumu   | 76                     |
| Şekil 3.8. EE <sub>1</sub> Bileşiği GC/MS Spektrumu  | 77                     |
| Şekil 3.9. EE <sub>1</sub> Bileşiği (GC/MS Spektrumu 14.135 ile 14.325 arası)<br>β-D-Glucopranosyl' in karşılaştırılması | 79                     |
| Şekil 3.10. BF <sub>1</sub> Bileşiği FTIR Spektrumu  | 83                     |
| Şekil 3.11. BF <sub>1</sub> Bileşiği MeOH (—) ve NaOMe (---)<br>UV Spektrumu   | 84                     |
| Şekil 3.12. BF <sub>1</sub> Bileşiği AlCl <sub>3</sub> (—) ve AlCl <sub>3</sub> /HCl (---)<br>UV Spektrumu               | 85                     |
| Şekil 3.13. BF <sub>1</sub> Bileşiği NaOAc (—) ve NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (---)<br>UV Spektrumu             | 86                     |
| Şekil 3.14. BF <sub>1</sub> Bileşiği GC/MS Spektrumu   | 87                     |
| Şekil 3.15. BF <sub>2</sub> Bileşiği FTIR Spektrumu  | 91                     |
| Şekil 3.16. BF <sub>2</sub> Bileşiği MeOH (—) ve NaOMe (---)<br>UV Spektrumu   | 92                     |
| Şekil 3.17. BF <sub>2</sub> Bileşiği AlCl <sub>3</sub> (—) ve AlCl <sub>3</sub> /HCl (---)<br>UV Spektrumu               | 93                     |
| Şekil 3.18. BF <sub>2</sub> Bileşiği NaOAc (—) ve NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (---)<br>UV Spektrumu             | 94                     |
| Şekil 3.19. BF <sub>2</sub> Bileşiği GC/MS Spektrumu   | 95                     |

## TABLO LİSTESİ

|  | <b><u>Sayfa No</u></b> |
|--|------------------------|
| Tablo 2.1. Flavonoid yapısı ve spot rengi arasındaki ilişki                            | 41                     |
| Tablo 2.2. Flavonoidal bileşiklerin renk reaksiyonları                                 | 42                     |
| Tablo 3.1. Bitkinin köklerinden çeşitli çözücülerdeki ekstralarının genel görünüşleri  | 60                     |
| Tablo 3.2. Bitkinin dallarının çeşitli çözücülerdeki ekstralarının genel görünüşleri   | 60                     |
| Tablo 3.3. Bitkinin meyvalarının çeşitli çözücülerdeki ekstralarının genel görünüşleri | 60                     |

## RESİM LİSTESİ

|  | <u>Sayfa No</u> |
|--|-----------------|
| Resim 1.1. Sarcopoterium spinosum bitkisinin yakından görünüşü | 8               |
| Resim 1.2. Sarcopoterium spinosum bitkisinin uzaktan görünüşü  | 8               |
| Resim 3.1. EE <sub>1</sub> bileşiğinin kristal görünümü        | 80              |
| Resim 3.2. BF <sub>1</sub> bileşiğinin kristal görünümü        | 97              |
| Resim 3.3. BF <sub>2</sub> bileşiğinin kristal görünümü        | 97              |

Bu çalışmayı yapma olanağı sağlayan ve çalışmanın yürütülmesinde başından sonuna kadar yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve önerileri ile teşvik ederek yol gösteren Sayın hocam Prof. Dr. Süheyla UZMAN'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Maddelerin yapılarının aydınlatılmasına ve analiz sonuçlarının yorumlanmasına katkılarından dolayı İ.Ü. Eczacılık Fakültesi'nden Prof. Dr. Sevil ÖKSÜZ'e ve çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimlerinden daima yararlandığım Dr. Belkız BİLGİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Herbaryumlarını kullanma olanağı sağlayan ve bitkinin tanınmasında değerli yardımlarını esirgemeyen M.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasotik Botanik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ertan TUZLACI'ya, bu çalışmanın tamamlanması süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Sayın Dr. Oktay ASUTAY'a, ayrıca yardımlarını esirgemeyen tüm arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

## ÖZET

Bu çalışmada *Sarcopoterium spinosum* (L.) Spach. bitkisinin toprak üstü kısımları, kökleri ve özellikle meyvaları hidrokarbon, steroid ve flavonoid bileşikleri açısından incelenmiştir.

*Sarcopoterium spinosum* bitkisi Temmuz 1995'de Çanakkale bölgesinden toplanmıştır. Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmosotik Botanik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ertan TUZLACI tarafından teşhis edilen bitki aynı üniversitenin Herbaryumunda MARE 4734 numarası ile kayıtlıdır.

Kurutulmuş bitkinin kökleri, dalları ve meyvaları ayrı ayrı öğütülerek, sokslet cihazında hekzan, kloroform, etanol ve su ile ekstre edildi. Düşük basınçta koyu şurup kıvamına kadar yoğunlaştırılan ekstreler, ince tabaka kromatografisinde incelendi. Benzer olan ekstreler birleştirilerek silikajel kolonda fraksiyonlandırıldı.

Kök, dal ve meyvaların hekzan ekstrelerinin fraksiyonlarından BH<sub>1</sub> bileşiği elde edildi. Bitkinin meyvalarının kloroform ekstresinden MK<sub>1</sub> ve MK<sub>2</sub> bileşikleri elde edildi.

BH<sub>1</sub>, MK<sub>1</sub> ve MK<sub>2</sub> bileşiklerinin İTK incelemesinden ve UV, IR spektrumlarından yararlanılarak, BH<sub>1</sub> ve MK<sub>1</sub> bileşiklerinin aynı yapıda olduğu ve BH<sub>1</sub> (MK<sub>1</sub>) ile MK<sub>2</sub> bileşiklerinin de hidrokarbon yapısında olduğu bulunmuştur.

Bitkinin kök ve meyvalarının alkol ekstresinin fraksiyonlarından EE<sub>1</sub>, BF<sub>1</sub> ve BF<sub>2</sub> bileşikleri elde edildi.

BF<sub>1</sub>, BF<sub>2</sub> ve terpenoidal EE<sub>1</sub> bileşiklerinin yapıları kromatografik ve spektroskopik yöntemler kullanılarak yorumlandı.



## ABSTRACT

*Sarcopoterium spinosum* is examined with respect to its chemical constituents of hydrocarbon, steroidal and flavonoidal nature.

The plant samples were collected in July 1995, in Çanakkale region and identified by Prof. Dr. Ertan TUZLACI of Marmara University. The plant is registered in Marmara University Herbarium with identification no. MARE 4734.

Air-dried plant roots, stems and fruits were ground separately, and extracted with hexane, chloroform, ethanol and water in the Soxhlet Apparatus. The extracts were concentrated under vacuum, inspected with TLC and similar extracts were combined before fractionating in silicagel columns.

Hexane extracts yielded compound BH<sub>1</sub>, chloroform extracts of the fruits yielded compounds MK<sub>1</sub> and MK<sub>2</sub>.

TLC, UV and IR spectra of BH<sub>1</sub>, MK<sub>1</sub> and MK<sub>2</sub> proved compounds BH<sub>1</sub> and MK<sub>1</sub> to be identical, and also, both compounds BH<sub>1</sub> (MK<sub>1</sub>) and MK<sub>2</sub> to be hydrocarbons.

Ethanol extracts of the fruits and roots gave compounds EE<sub>1</sub>, BF<sub>1</sub> and BF<sub>2</sub>.

The structures of compounds BF<sub>1</sub>, BF<sub>2</sub> and terpenoidal EE<sub>1</sub> were interpreted using spectral and chromatographic methods.

## 1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI

Dünya’da 115 kadar cins ve 3200 kadar türü bulunan Rosaceae familyasının ülkemizde 35 cins ve 250 türü yetişmektedir (Baytop, 1991).

Rosaceae familyasından *Poterium* türünün büyük bir bölümü, Avrupa’ya özellikle de Doğu Akdeniz çevresine yayılmıştır. *Sarcopoterium spinosum* bitkisi özellikle, rutubetli yerlerde, çayırarda, yol kenarlarında ve bahçelerde yetişir (Karamanoğlu, 1977; Reher 1988).

*Sarcopoterium spinosum* (= *Poterium spinosum*) bitkisi Arapça’da “Belan” olarak adlandırılır (Schlütz et al, 1964). Bitki Kudüs’te halk arasında “Hristiyan Tacı” olarak bilinmektedir (Reher, 1988). Yurdumuzda ise “Çetirdikeni”, “Gerendikeni” ve “Abdestbozanotu” adları ile bilinmektedir (Zeybek ve diğerleri, 1994).

*Poterium spinosum* bitkisi dikenli olduğu için çit yapımında, bahçelere yabancı hayvanların girişini engellemede, bahçe duvarlarının taşları arasındaki boşlukların doldurulmasında kullanılmaktadır. Ayrıca süpürge yapımında ve yanma maddesi (tutuşturucu madde) olarak da kullanılmaktadır (Reher, 1988).

*Poterium spinosum* bitkisinin halk arasında şeker hastalığına karşı tedavi maksatlı olarak kullanıldığı bilinmektedir. Özellikle Bedeviler, *Poterium spinosum*’un köklerinden yapılan çayı içerek hastalıktan kurtulmuşlardır (Reher et al, 1990; Schlütz et al, 1964).

Bitkinin kan şekerini düşürücü etkisi aç bırakılmış diabetli tavşanlar üzerinde denenmiştir. Yapılan incelemeler sonucu bitkinin köklerinde bulunan maddelerin diüretik ve antidiabetik etkisi olduğu kanıtlanmıştır (Reher, 1988).

Bitkinin köklerinden ilk olarak Hollanda'da, daha sonra bazı Avrupa ülkelerinde kan şekerini düşürücü preparatlar yapılmıştır (Zeybek ve diğerleri, 1994).

Bitkinin kök kabuklarında bir saponin karışımı bulunur ve infüzyon (% 5) halinde şeker hastalığına karşı kullanılır. Toprak üstü kısımları ve kökleri de aynı maksatlar için kullanılır (Baytop, 1984).

*Poterium spinosum* bitkisi üzerine yapılan literatür çalışmaları sonucunda bitkinin sadece toprak üstü kısımlarının ve köklerinin incelendiği görülmüştür. Bunun yanında bitkinin meyvaları üzerine yapılan hiç bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Ayrıca yapılan literatür çalışmalarında bitkinin; hidrokarbonlar, steroidler, taninler, triterpenik asitler (ursolik asit, tormentik asit), şekerler, flavonoidler ve aminoasitler (histidin, lizin, aspartik asit, serin ve/veya glisin, glutamik asit, alanin, tirozin, valin, triptofan, fenilalanin,  $\beta$ -D-glukoz, leusin, ornithin) gibi kimyasal bileşik grupları içerdiği görülmüştür.

Yapılan bu çalışmada; *Poterium spinosum* bitkisinin toprak üstü kısımları, kökleri ve özellikle meyvaları incelendi. Bitkinin içerdiği kimyasal bileşik gruplarından da hidrokarbonlar, steroidler ve flavonoidler üzerinde incelemeler yapıldı.

## 2. TEORİK BÖLÜM

### 2.1. BİTKİNİN TANIMI VE YAYILIŞI

#### 2.1.1. Rosaceae Familyası

Rosaceae familyası 115 kadar cins ve 3200 kadar türü içine alan zehirli bitkiler taşıyan bir familyadır. Ülkemizde ise 35 cins ve 250 türü bulunmaktadır (Baytop, 1991).

Akdeniz ve Ege bölgesinde yaygın olarak yetişen otsu bitkiler, çalı veya ağaçlardır. Bitkinin bazı türleri dikenli bazı türleri de tırmanıcıdır. Yapraklar alternan, tam veya pennat, stipula yaprak sapının tabanına birleşik bazen düşürücüdür. Çiçekler erdişi (dişi veya erkek organların her ikisini de içeren), nadiren tek eşeyli, aktinomorf, perigin veya epigin. Erkek organlar genellikle çok sayıdadır. Bitkide ekseriya hipantiyum var. Kaliks 5 sepalli, korolla 5 petalli, stamenler çok adette, bazen 5 veya 10, ovaryum tek ve 1-5 karpelli veya çok sayıdadır. Meyva nuks, drupa veya folikül ve çoğunlukla agregat meyva şeklindedir (Baytop, 1989).

Rosaceae familyası çok geniş bir familya olduğu için dört altfamilya altında incelenebilir.

- i. Spiraeoideae altfamilyası
- ii. Rosoideae altfamilyası
- iii. Pomoideae (Maloideae) altfamilyası
- iv. Prunoideae altfamilyası

### 2.1.2. Rosoideae Altfamilyası

Rosaceae'nin bir altfamilyasıdır ve sarcopoterium spinosum bu altfamilya içinde incelenmektedir. Çukurlaşmış veya çıkıntı halini almış çiçek ekseninden apokarp gelişir. Apokarp ovaryum sayısı az yada çok olabilir. Her bir ovaryumdan bir nuks, nadiren bir drupa meydana gelir. Meyva, agregat meyva halindedir (Baytop, 1983; Zeybek ve diğerleri, 1994).

### 2.1.3. Sarcopoterium Spinosum (L.) Spach.

Yurdumuzda Çetirdikeni, Gerendikeni ve Abdestbozanotu adları ile bilinen bu bitki Ege ve Akdeniz bölgelerinin makiliklerinde özellikle erozyona uğramış yazın kurak yamaçlarında yayılış gösteren alçak boylu dikenli bir çalıdır. Özellikle rutubetli yerlerde, çayırlarda, yol kenarlarında ve bahçelerde yetişir. Boyu normalde 75 cm, bazen de daha uzundur. Kökü, çok uzun ve kalınlığı 1 cm kadardır. Dışı kırmızı-kahverengi, içi grimsi olan tipik dallara ayrılmıştır. Gövdesi çok sert, esas dalları toprak içinde büyüyen, yan dalları ise çok sık ve çatallanmış dikenler şeklinde olan bir bitkidir (Gemici ve diğerleri, 1983; Davis, 1972).

Genç kapalı yapraklar hafifçe tüylü, daha yaşlı açılmış yapraklar 7-8 çiftli ve 18 mm uzunluğunda yumurta şeklindedir. Çiçekler tek eşeyli kısa bir spika durumunda, üst çiçekler dişi, alttakiler erkektir. Çiçekler 2 boyunlu, yumurta formundan silindir formuna kadar olan çiçek başları ana eksende ya da kısa saplardadır. Ginekeum apokarttır, 2 ovaryumludur. Ovaryumlar çukur olan reseptakulumun içindedir. Kaliks 4 parçalı, korolla eksiktir. Meyva olgunlukta kızaran ve en çok etlenen hipantiyum içinde 2 nuks kapalı kalır (Tutin et al, 1968; Reher, 1988).

Dişi çiçekler : Receptaculum tomurcuklanmadan sonra kırmızı, biraz etli.

Erkek çiçekler : Çiçek başının alt kısmında çok fazla sayıda toz yaprakları vardır.

Çiçek zamanı : Mart'tan Nisan'a kadar.

Meyvası : Koyukahve, kapsık meyva, sert, parlak.

## 2.2. BİTKİ ÜZERİNE YAPILAN ÇALIŞMALAR

Poterium spinosum üzerine yapılan çalışmalar daha çok bitkinin yapı tayini ve hipoglisemik etkisi üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu nedenle yapılan çalışmalar iki grup altında incelenebilir.

### Yapı tayini üzerine yapılan çalışmalar

Poterium spinosum bitkisinin toprak üstü ve toprak altı bölümlerinden triterpenoid olan ursolik asit ve tormentik asit elde edilmiştir (Carraz et al, 1968, Reher et al, 1992).

Poterium spinosum bitkisinin yapraklarının alkol ekstresinden kersetin, kersitrin hiperosid flavonoidleri izole edilmiştir. Aynı ekstrenin TLC ile tanınmasından serbest aminoasitler (histidin, lisin, asparatik asit, serin ve/veya glisin, glutamik asit, alanin, tirozin, valin, triptofan, fenilalanin ve leusin) ve sabunlaşmayan maddelerin petrol eteri ekstresinin izolasyonundan da  $\beta$ -karoten ve  $\beta$ -sitosterol elde edilmiştir. (Verykokidou et al, 1981).

Bitkinin köklerinden tormentosit,  $\beta$ -sitosterol ve hidrokarbon elde edilmiştir. Bitki, biri suda çözünen diğeri suda çözünmeyen 2 tip tanin kompleksi içermektedir. Suda çözünmeyen tanin kompleksinden tormentosit maddesi izole edilmiştir (Pourrat et al, 1973).

*Poterium spinosum* bitkisinin kök kabuklarının alkol ekstresinden  $\beta$ -D-glukoz, glisin, alanin, triptofan, fenilalanin ve ornithin aminoasitleri elde edilmiştir (Reher, 1988).

*Poterium spinosum* bitkisinin kök kabuklarının ekstresinden 23-hidroksitormentik asit, 23-hidroksitormentik asit glikozit esteri ve tormentik asit glikozit esteri elde edilmiştir (Reher et al, 1990; Reher et al, 1992).

*Poterium spinosum* bitkisinin kök kabuklarının alkol ekstresinde poli(2,3,3',4,4',5,7-heptahidroksi flavan) (Reher, 1988) ve poli (3,3',4,4',5,7-hekzahidroksi flavan) (Auclair, 1976) polimerleri bulunmuştur. Bu polimerik madde flavonoidlere (özellikle rutoside) benzeyen bir yapıya sahiptir.

Bitkiler üzerinde yapılan çalışmalar sonucu elde edilen maddeler

Triterpenoidler : Ursolik asit, tormentik asit,  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -karoten, tormentosid, 23-hidroksitormentik asit, 23-hidroksitormentik asit glikozit esteri, tormentik asit glikozid esteri.

Hidrokarbonlar :

Flavonoidler : Kersetin, kersitrin, hiperosid, poli(2,3,3',4,4',5,7-hepta-hidroksi flavan), poli (3,3',4,4',5,7-hekzahidroksi flavan).

Aminoasitler : Histidin, lizin, asparatik asit, serin, glisin, glutamik asit, alanin, tirozin, valin, triptofan, fenilalanin, leusin, ornithin.

Hipoglisemik etki üzerine yapılan çalışmalar

*Poterium spinosum* bitkisinin kök kabuklarının hipoglisemik etkisi, şeker hastaları üzerindeki denemelerle klinik olarak saptanmıştır (Quisenberry et al, 1967).

Diabetik tavşanlarda *Potterium spinosum* bitkisinin kök kabuklarının hipoglisemik aktivitesine sadece yaz aylarında rastlanmıştır (Shani et al, 1970). Bitkinin hipoglisemik etkisi aç bırakılmış tavşan grupları üzerinde incelenmiştir ve yapılan kan şekeri tayini sonuçları bitkinin kan şekeri düşürücü etkisini kanıtlamıştır (Menczel, 1963; Schluetz et al, 1964).

Saptanan hipoglisemik etkinin, bitkinin yapısındaki triterpenlerden ileri geldiği düşünülmektedir (Reher, 1988; Carraz et al, 1968).





Resim 1.1. *Sarcopoterium spinosum* bitkisinin yakından görünüşü



Resim 1.2. *Sarcopoterium spinosum* bitkisinin uzaktan görünüşü

## 2.3. GENEL BİLGİLER

### 2.3.1. Hidrokarbonlar

Hidrokarbonlar, yapılarında karbon ve hidrojen bulunduran bileşiklerdir. Bunlar, alifatik, siklik ve aromatik olmak üzere üç sınıfa ayrılırlar. Bitkilerde en çok alifatik doymuş hidrokarbonlara rastlanmaktadır. Bitkiler karbon sayısı tek olan alkanları, çift karbon sayılı alkanlara göre daha fazla içerir. Karbon sayısı 27, 29, 31 ve 33 olan tek sayılı alkanlara bitkilerde çok rastlanırken karbon sayısı 25'den az veya 35'den fazla olan alkanlara ender olarak rastlanmaktadır. Bitkilerde, ayrıca çifte bağlar, üçlü bağlar, hidroksil, karbonil ve epoksit gibi fonksiyonel grup içeren hidrokarbonlar da bulunmaktadır.

Bitkinin, öğütülüp toz haline getirilmiş kısımlarının hekzan veya petrol eteri gibi polaritesi çok düşük çözücülerle ekstre edilmesinden hidrokarbonlar elde edilir. Hidrokarbonlar, kromatografik yöntemlerle ayrılırlar ve saflaştırılırlar. Adsorban olarak silikajel veya alüminyum oksid kullanırken, çözücü olarakta hekzan ya da karbontetraklorür kullanılır. Genellikle hidrokarbon türü bileşiklerin  $R_f$  değerleri çok yüksektir (Kirchner, 1967).

Bitkilerde bulunan alifatik hidrokarbonların erime noktaları çok düşüktür. Bunlar, doymamışlık derecelerine göre UV spektroskopisinde bant verebilirler. IR spektrumlarında  $-(CH_2)_n$  ( $n \geq 4$ ) grubu  $720 \text{ cm}^{-1}$  civarında karakteristik bir veya iki pik verir. Çifte bağ gerilim absorpsiyonu  $1680-1620 \text{ cm}^{-1}$  ve üçlü bağ gerilim absorpsiyonu  $2300-2000 \text{ cm}^{-1}$  'de görülür. NMR spektroskopisi de fonksiyonel grup sayısını ve cinsini, ayrıca bu gruplara komşu proton sayısını ve cinsini saptamak bakımından önemlidir.

## **2.3.2. Terpenoidler ve Steroidler**

### **2.3.2.1. Terpenoid Bileşikler**

#### **2.3.2.1.1. Dağılımları**

Terpenler, birçok bitki ve çiçeklerin karakteristik kokusunu veren bileşiklerdir. Parfüm sanayisinde kullanılan ve genellikle bitkilerin meyva, çiçek, yaprak ve köklerinden su buharı destilasyonu ile elde edilen, uçucu yağ ya da esas yağ olarak bilinen bu yağ hidrokarbonları, alkoller, aldehytleri, ketonları ve esterleri içerir. Bazı yağlar aromatik, bazı yağlar da  $C_{10}H_{16}$  kaba formülüne sahip alisiklik hidrokarbonlardır. Bu tür bileşiklere terpenler denir (Akpoyraz, 1981 ; Ün, 1977).

Terpenler biyogenetik olarak aynı kaynaktan türemelerine rağmen çok değişik yapısal özellikler gösteren geniş bir sınıftır.

Bitkisel ve hayvansal organizmaların hemen hemen hepsinde serbest ya da glikozitleri halinde terpenoid bileşiklere rastlanır (Oskay, 1990).

#### **2.3.2.1.2. Oluşumları**

Terpenoidlerin ana iskeleti beş karbonlu izopren (2-metil-1,3-butadien) birimlerinden oluşur. Dolayısıyla yapılarında izopren birimi bulunan bileşiklere izoprene benzeyen anlamına gelen “izoprenoid” veya “terpenoid” ismi verilmiştir. herhangi bir şekilde oksijen içeren terpenlere ( $C_{10}H_{16}O$ ) de kamforlar (kafurlar) denir (Ün, 1967).

Terpenoidlerin büyük bir kısmı bir ya da daha fazla sayıda fonksiyonel grup (hidroksil, karboksil v.s.) taşıyan halkalı yapılara sahiptirler (Geissman, 1969).

### 2.3.2.1.3. Sınıflandırılmaları

Terpenoidlerin ana iskeleti 5 karbonlu izopren moleküllerinden oluşur. Bu nedenle terpenoidler izopren birimlerinin sayısına göre sınıflandırılırlar (Oskay, 1990).

| <u>İzopren Sayısı</u> | <u>Sınıfı</u>                      | <u>İskelet C Sayısı</u> |
|-----------------------|------------------------------------|-------------------------|
| 1                     | Hemiterpenler                      | 5 C                     |
| 2                     | Monoterpenler                      | 10 C                    |
| 3                     | Seskiterpenler                     | 15 C                    |
| 4                     | Diterpenler                        | 20 C                    |
| 5                     | Sesterpenler                       | 25 C                    |
| 6                     | Triterpenler                       | 30 C                    |
| 8                     | Tetraterpenler<br>(Karatenooidler) | 40 C                    |
| n                     | Politerpenler                      | (5 C) <sub>n</sub>      |

Terpenoid bileşikler, ayrıca fiziksel özelliklerine göre de sınıflandırılabilir.

- Uçucu Terpenler : Uçucu olan ve su buharı ile sürüklenebilen küçük molekülü monoterpenler ve bir kısım seskiterpenler.
- Uçucu Olmayan Terpenler : Seskiterpenler, triterpenler.

#### **2.3.2.1.4. Elde Edilmeleri**

Bitkinin kurutulmuş ve toz haline getirilmiş kısımlarının değişik polaritedeki çözücülerle elde edilen ekstreleri kromatografik yöntemlerle saflaştırılabilirler.

Terpenik yapılar için polar olmayan çözücüler ; hidroksil, karboksil gibi polar gruplar taşıyan ve glikozit yapısında olan terpenler için de etilasetat, alkol gibi daha polar çözücüler kullanılır.

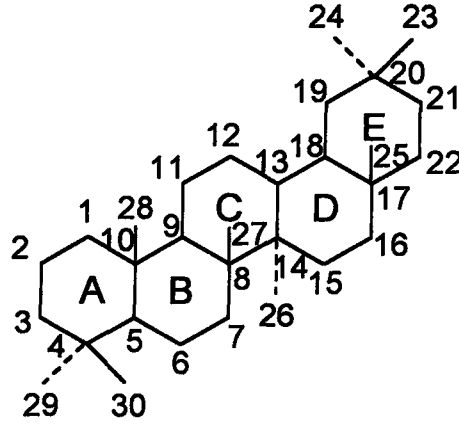
Saflaştırmada kullanılacak kromatografik yöntemler, kolon ve preparatif ince tabaka kromatografileridir. Adsorban olarak başlıca silikajel ve daha az olarak alüminyum oksit, magnezyum silikat ve talk kullanılabilir.

Gaz kromatografisi, uçucu olan ya da uçucu türevleri haline getirilebilen terpenlerin ayrılma ve tanınmalarında kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemle izomerlerin birbirinden ayrılması mümkündür.

Karotenoid bileşikler ve bazı lakton yapısındaki terpenler kolayca bozulduklarından tüketme ve saflaştırma çalışmaları özel şartlarda (soğukta, inert atmosferde, ışıktan korunarak) dikkatlice yapılmalıdır.

#### **2.3.2.1.5. Triterpenler**

Triterpenler altı izopren biriminden oluşmuş 30 karbonlu iskelete sahip yapılardır. Bitkilerde serbest veya bağlı olarak bulunurlar.



Şekil 2.1. Triterpenoid İskeleti

Serbest triterpenler asit, alkol, aldehit, keton, epoksit ve lakton fonksiyonel gruplarından birini veya birkaçını birarada taşıyabilirler ya da hiçbir süstitüent taşıyamazlar, bunlara triterpenik hidrokarbonlar denir.

Triterpenler, taşıdıkları halka sayısına göre başlıca trisiklik, tetrasiklik ve pentasiklik olarak üç gruba ayrılabilirler.

#### 2.3.2.1.6. Tanınmaları

##### Renk Reaksiyonları

Triterpenlerin tanınma reaksiyonlarından en önemlisi ve en çok kullanılanı Liebermann-Burchard reaksiyonudur. Bu reaksiyonu steroidler de verir. Ancak, triterpenlerde reaksiyon daha hızlıdır ve rengin mavi-yeşil-mor şeklinde değişmesi çok belirgindir. Triterpenler, ayrıca seriksülfat belirteci ile de tanınabilir.

### **Gaz Kromatografisi**

Kolon ve ince tabaka kromatografileri kullanılarak triterpenlerin benzer yapıda olanlarını birbirinden ayırmak oldukça zordur. Bu tür triterpenleri gaz kromatografisi ile daha iyi ayırabiliriz.

Gaz kromatografisi uçucu bileşiklere uygulanabileceğinden bileşiğin uçucu bir türevi (metil esteri, asetili v.b.) haline getirilmesi gerekir.

### **Spektroskopik Yöntemler**

İskelet yapıları aynı olan triterpenlerin spektrumları birbirine çok benzerler ve bunlar konjuge çifte bağlar ve oksokrom gruplar taşımazlar. Bu nedenle triterpenlerin tanınmasında UV-spektrumları pek kullanılmaz. Triterpenlerdeki izole çifte bağlar 200-220 nm de absorpsiyon yaparlar.

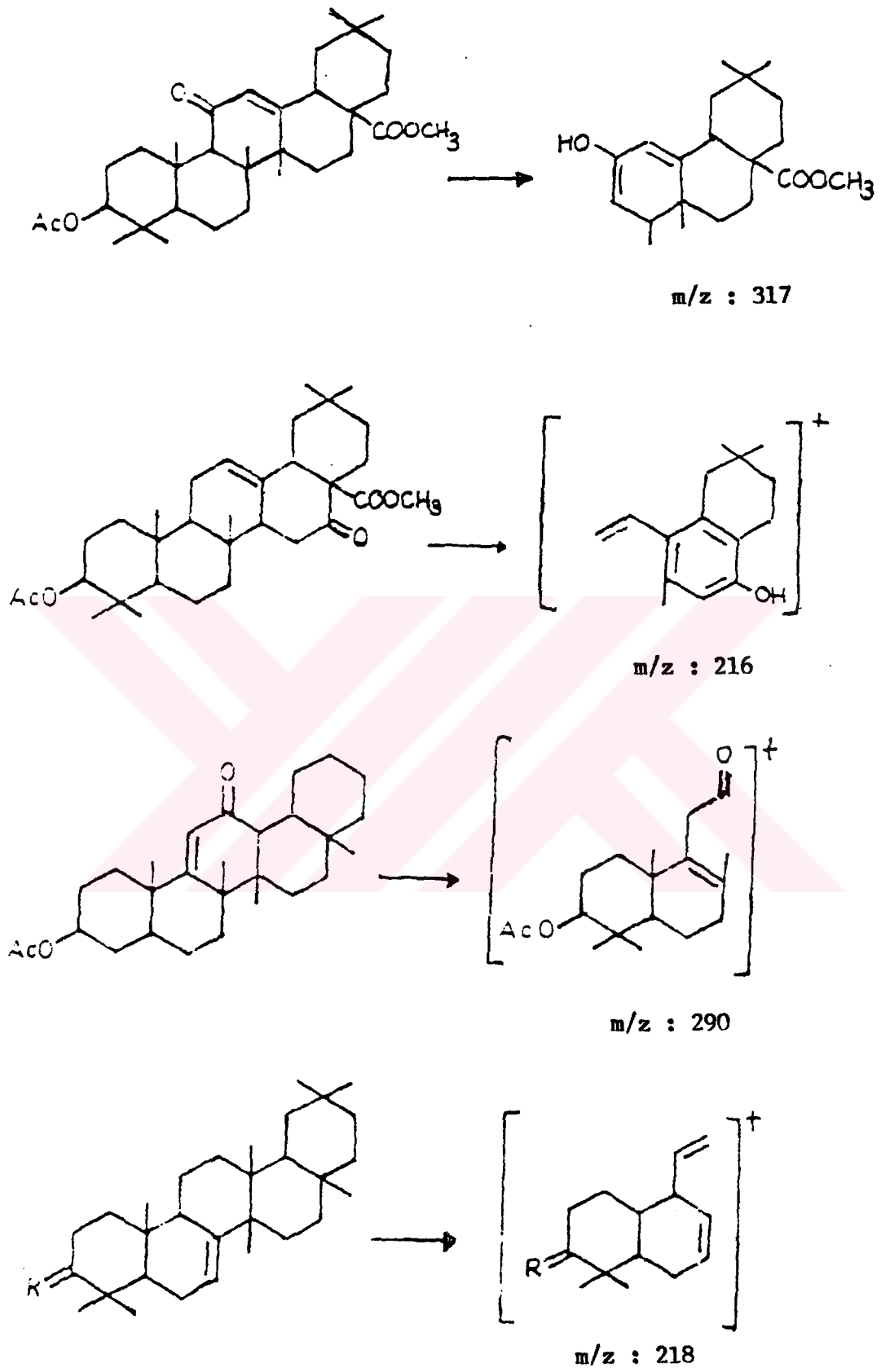
Triterpenlerdeki yapı benzerliğinden dolayı bunların IR spektrumları da pek farklılık göstermez. Fakat, parmak izi bölgesinde ( $1600-700\text{ cm}^{-1}$ ) bileşiğin yapısına özgü bantlar görülür.  $3350-3550\text{ cm}^{-1}$  arasında serbest ya da hidrojen bağı yapan hidroksil grupları,  $1685-1700\text{ cm}^{-1}$  de asit karbonilleri,  $1710$  ve  $1740\text{ cm}^{-1}$  ve  $1240-1270\text{ cm}^{-1}$  de ester grupları ve  $1640-1650\text{ cm}^{-1}$  de çifte bağlara ait bantlar görülür.

NMR spektrumu, triterpenlerin yapı tayininde çok önemli bir rol oynar. Triterpenlerin metil grupları  $^1\text{H}$  NMR spektrumunda  $0.5-1.2$  ppm arasında vinilik metil grupları,  $1.65-1.70$  ppm de halka dışı metilen protonları,  $4.5-5.0$  ppm arasında ayrı ayrı geniş singletler halinde gözlenirken hidroksile ve ester gruplarına komşu protonlar  $3.0-5.0$  ppm arasında bulunurlar. Son yıllarda  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopisi yöntemi doğal ürünlerin yapı tayininde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Kütle spektrumu, elementel analiz sonucu bulunmuş olan kapalı formülü doğrulayarak molekül ağırlığının bulunmasında yardımcı olur. İskelet üzerindeki çifte bağın yerinin farklı olmasından dolayı farklı parçalanmalar görülür. Ayrıca bileşikte asit, alkol, hidroksil gibi çeşitli gruplara ve özgün iskelet yapısına göre değişik parçalanmalar görülmektedir. Bu parçalanmalara göre bileşiğin yapısı hakkında fikir edinilebilir. Şekil 2.2 de bazı triterpenlere ait parçalanmalar verilmiştir.

Bileşiğin spektral analizlerinden elde edilen sonuçların doğrulanması için kimyasal reaksiyonlar (yükseltgenme, indirgenme ve halka parçalanması) kullanılır.

Elde edilen sonuçların doğruluğu, standart maddelerin spektral analiz sonuçlarıyla karşılaştırılarak desteklenebilir.



Şekil 2.2. Bazı Triterpenlere Ait Parçalanmalar

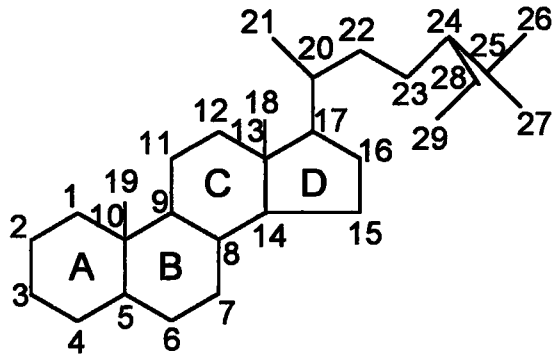
### 2.3.2.2. Steroid Bileşikler

#### 2.3.2.2.1. Yapıları ve Dağılımları

Steroidler, siklopentanoperhidrofenantren iskeletine sahip, hayvanlarda ve bitkilerde yaygın olarak bulunan önemli biyolojik etkilere sahip tetrasiklik doğal ürünlerdir. Doğal veya sentetik steroidler, kimyasal terapide geniş ölçüde kullanılmaktadır. Bu bileşikler “biyolojik düzenleyici” özelliğe sahiptirler. Organizma yaşamını idare ederek önemli fizyolojik etkiler gösterirler (Solomons, 1988).

Steroid iskeletinde bir çok farklı pozisyon bulunduğu için iskelete bağlı grupların yerini değiştirerek daha az fizyolojik etkiye yol açan ya da yepyeni fizyolojik etkiler gösteren steroid sentezleri de yapmak mümkündür (Oskay, 1990).

Steroid molekülleri iskelet ve yan gruplardan oluşur. Normal steroid iskeleti, üçü altı karbonlu, biri beş karbonlu dört halkanın kondenzasyonundan meydana gelmiştir. Bunlar, gonan veya steran diye adlandırılır. Halkalar A, B, C ve D olarak isimlendirilir.



Şekil 2.3. Steroidlerin Halka Sistemi ve Karbon Atomlarının Numaralandırılması

Basit steroid iskeleti, hidrojenlenmiş 1,2-siklopentilfenantren yapısına benzemektedir. 10. ve 18. karbon atomlarında birer metil grubu vardır. 17. Karbon atomuna ise bir yan zincir bağlıdır (Akpoyraz, 1981).

#### **2.3.2.2.2. Steroller**

Steroller, steroid iskeletine bağlı hidroksil içeren bileşiklerdir. Steroller, doğal olarak bulunan steroidlerin önemli bir grubunu oluştururlar. Sterollerin yapısında C-3'de bir hidroksi grubu ve C-5'de bir çifte bağ vardır. C-17'den alifatik bir yan zincir bağlıdır ve bu yan zincir genellikle izooktil ya da süstitüe izooktildir. Sterollerin bazılarının yan zincirdeki C-22 veya C-24'de doymamışlık olabilir.

Bunların bir kısmında ise C-24 'e metil ya da etil grupları bağlıdır (Gilman, 1943; Cram et al., 1959).

Bütün sterollerin ortak özelliği, tamamen doymuş haldeki kaynaşmış fenantren ve siklopentandan oluşan bir halka sisteminden türemeleridir (Ün, 1967).

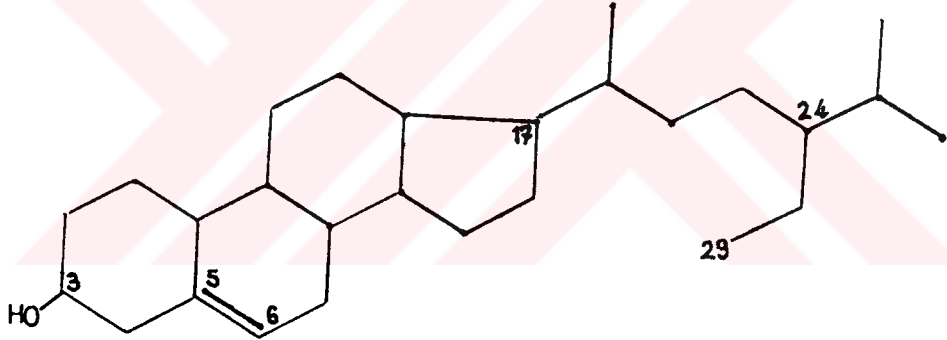
Steroller buldukları kaynaklara göre sınıflandırılmışlardır :

- i. Zoo-steroller (Hayvansal kaynaklı steroller)
  - ii. Fito-steroller (Bitkisel kaynaklı steroller)
  - iii. Miko-steroller (Maya ve mantarlarda bulunan steroller)
  - iv. Marin-steroller (Deniz bitkileri ve hayvanlarında bulunan steroller)
- (Jakubke, 1983; Beyer, 1963)

Bu sınıflandırma kesin değildir. Bir grupta çok fazla miktarda bulunan bazı steroller, diğer bir grupta çok daha az miktarda bulunabilir.

Hayvansal kaynaklı sterollerin, vücudun normal fonksiyonlarının yürüyebilmesindeki önemi çok büyüktür. Hayvansal kaynaklı sterollerin en önemlisi kolesteroldür ve safra taşlarının önde gelen yapı taşlarındandır. Serbest halde veya esterleri halinde insan vücudundaki dokuların hemen tümünde ve özellikle beyinde ve sinir sisteminde daha çok bulunur (Karlson, 1988; Gözükara, 1989; Ün, 1967).

Bitkilerden elde edilen en önemli sterol fraksiyonu sitosterol'dür. Sitosteroller, bitkilerde çok geniş bir alana dağılmışlardır. Bunlar, buğday tohumu, çavdar tohumu, mısır, pamuk ve diğer tohum yağlarında bulunurlar.



Şekil 2.4. Sitosterol 'ün yapısı

Sitosteroller, belirli doymuş steroller ile başlıca  $\beta$ - sitosterol karışımıdır.  $\beta$ -sitosterol genel steroid yapısındadır. Molekülde 17. karbon atomunda bir yan zincir, A halkasında 3. karbon atomunda hidroksil grubu ve 5 ile 6 pozisyonlarında bir çifte bağ bulunmaktadır. Suda çözünmeyen, beyaz renkli, tatsız, kokusuz bir tozdur.  $\beta$ -sitosterol, özellikle kırmızı ve yeşil yosunlar başta olmak üzere deniz organizmalarında da yaygın olarak görülmüştür (Gilman, 1943; Claus et al., 1965; Scheuer, 1973).

Sitosteroller, antihiperkolesterolemik ajandır ve kan damarlarının iç çeperlerinde kolesterolün depolanmasını önlerler ve damar tıkanıklığını tedavi edebilecek değerdedir.  $\beta$ -sitosterol, ilaç sanayiinde “cytellin” adı altında kullanılır (Billups, 1977; Claus et al.; Modell, 1976).

### **2.3.2.2.3. Kimyasal Reaksiyonları**

Steroidler, çifte bağların, hidroksil ve keto gruplarının gösterdikleri reaksiyonların tümünü gösterirler.

C-3'deki hidroksil grubu, kullanılan reaktiflere göre bir çok reaksiyona girebilir. Eğer C-17'ye bağlı yan zincirde çifte bağ varsa ozonlama yapılır. Bu yan zincirin yapısı, ozonlama sonucu oluşan uçucu aldehitlerin incelenmesi ile tanınabilir.

Asetillenmiş doymuş sterollerin ya da doymuş hidrokarbonların kromik asit ile oksidasyonu sonucu yan zincirde parçalanma olur. Parçalanma ürünü olarak uçucu ve uçucu olmayan ketonlar ile asidik bileşiklerden oluşan bir karışım meydana gelir. Bunlardan uçucu ketonlar, yan zincirin yapısının aydınlatılmasında yardımcı olurlar (Gilman, 1943).

### **2.3.2.2.4. Bitkilerden Elde Edilmeleri, Ayrılmaları ve Saflaştırılmaları**

Steroidler, kurutulduktan sonra öğütülen bitkinin değişik polaritedeki çözücülerle ekstre edilmesinden elde edilirler.

Steroller için tüketme genellikle polar olmayan çözücülerle yapılır. Fakat steroid molekülünde hidroksil, karboksil gibi grupların bulunması ya da molekülün glikozid yapısında olması halinde etilasetat ve alkol gibi daha polar çözücüler kullanılır.

Steroidlerin genellikle hepsi, benzer yöntemlerle birbirlerinden ayrılabilirler. Ayırma ve saflaştırma işlemleri, kolon ve ince tabaka kromatografileri ile yapılır. Adsorban olarak başlıca silikajel, daha az olmak üzere alüminyum oksid, magnezyum silikat, magnezyum trisilikat, kiselgur, selüloz ya da poliamid kullanılır. Çözücü ise molekülün yapısına bağlı olarak : petrol eteri, siklohekzan, karbontetraklorür, benzen, kloroform, dietil eter, diizopropil eter, etilasetat, aseton, etanol ve metanol gibi çeşitli polaritedeki çözücülerden seçilir. Ayırma ve saflaştırma işlemleri için ayrıca gaz kromatografisi, gaz-likid kromatografisi ya da HPLC gibi daha modern yöntemler de kullanılır (Kirchner, 1967; Stahl, 1969; Hupe, 1980).

### **2.3.2.2.5. Tanınmaları**

#### **Renk Reaksiyonları**

Steroller, tanıma ve kantitatif analiz için faydalı olan bir çok renk reaksiyonlarını verirler. Fakat bu reaksiyonlar steroller için tanı değeriinde değildir. Bu testlerde  $H_2SO_4$  ve diğer güçlü asitler kullanılır. Eğer madde halokromik bir tuz ise renklenme görülür. Uygulanan renk reaksiyonları arasında Salkowski Reaksiyonu, Liebermann-Burchard Reaksiyonu ve Rosenheim Testi sayılabilir (Neher, 1964; Stahl, 1969).

Salkowski Reaksiyonu, sterol'ün kloroformdaki çözeltisine aynı hacimde derişik  $H_2SO_4$  ilave edilmesi ile oluşabilir. Liebermann-Burchard Reaksiyonu'nun Salkowski Reaksiyonu'ndan farkı ise bu karışıma bir kaç damla asetanhidrid eklenmesidir. Reaksiyon yavaş ilerler ve renk mavi-yeşil-mor şeklinde değişir. Rosenheim testi, serbest sterol veya sterol'ün kloroformdaki çöeltisi, % 90'lık trikloroasetik asid ile muamele edilmesidir. Reaksiyonun oluşması, ortamda bir

konjuge karbon atomu sisteminin bulunduğunu gösterir (Gilman, 1943; Harborne, 1988).

### **Spektroskopik Yöntemler**

Steroidlerin yapı tayininde, spektroskopik yöntemlerden yararlanılır.

UV spektroskopisinde steroidler 3-OH 'dan ötürü 200 nm'nin altında ve  $\epsilon$  değeri 8000-2200 civarında olan bir maksimum verirler (Uluben et al., 1971). Çifte bağlar genellikle izole durumda olup 200-210 nm arasında kuvvetli bir uç absorpsiyon verirler. Bunun dışında genellikle konjugasyon olmadığı için UV spektrumları fazla önemli değildir.

IR spektrumu bileşiğin fonksiyonel gruplarının saptanması açısından önemlidir. Parmak izi bölgesi steroidler için karakteristik ve oldukça karışıktır. IR spektrumunda serbest ya da hidrojen bağı yapan -OH grupları  $3550-3350\text{ cm}^{-1}$  de, karbonil bandı  $1700\text{ cm}^{-1}$  civarında, metilen grupları ise  $1450-1350\text{ cm}^{-1}$  de görülürler.

NMR spektrumunda metil bandları 0.5-1.5 ppm arasında, metilen bandları 1.5-2.5 ppm arasında çıkar. Steroidler de metilen pikleri çok karmaşık ve yaygındırlar.

Kütle spektrumunda başlıca  $M^+$ ,  $(M-CH_3)^+$ , hidroksil grubu taşıyorsa  $(M-H_2O)^+$ , asetil grubu taşıyorsa  $(M-CH_3CO)^+$  ve  $(M-CH_3COOH)^+$  ayrıca (M-D halkası + yan zincir)<sup>+</sup>, (M-D halkası-H)<sup>+</sup> ve (M-D halkası + H-H<sub>2</sub>O)<sup>+</sup> bantları ve ayrıca steroidin taşıdığı çifte bağı konumuna göre özel bölünmeler gözlenebilir (Yamaguchi, 1970).

### 2.3.3. Flavonoidal Bileşikler

#### 2.3.3.1. Yapıları ve Dağılımları

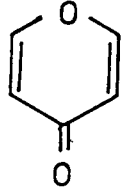
Flavonoidlere, yosunların büyük bir kısmı ile bakteriler hariç hemen her bitki türünde yaygın olarak rastlanmaktadır. Bitkilerde flavonoid bileşiklerin yayılışı, hidroksisinnamik asit türevlerinin ve ligninlerin yayılışına benzemektedir. (Harborne et al, 1975).

Flavonoidler, kromon türevi olan doğal kaynaklı bileşiklerdir. Kromon iskeleti 15 karbon atomundan meydana gelen benzo- $\gamma$ -piron yapısındadır.

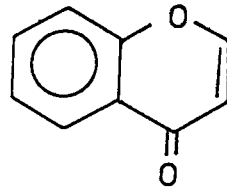
Flavonoidler bitkilerin kök, sap, çiçek, polen, meyva, yaprak, odunsu kısım, kök ve tohumlarında bulunabilirler. Flavonoidler doğada genellikle serbest hidroksil grupları, metil esterleri yada glikozidleri halinde görülebilirler.

Flavonoidlerin yapısı, flovanlara benzemektedir. 1,5-Dihidroksi-3-keton'un anhidridi olan  $\gamma$ -piron (I), flavonoidal bileşiklerin ana maddesini oluşturmaktadır.  $\gamma$ -piron, renksiz katı bir maddedir.  $\gamma$ -piron'un kromon adı ile bilinen en basit aromatik türevi benzopiron (II) yapısındadır. Benzopiron halkasının 2 numaralı karbon atomuna, bir fenil grubunun bağlanması ile flavon (2-fenilbenzopiron) (III) halkası oluşmaktadır. Flavon halkasının 3 numaralı karbon atomuna bir hidroksil grubu bağlandığı zaman ise flavanol (3-hidroksiflavon) (IV) halkası meydana gelmektedir.

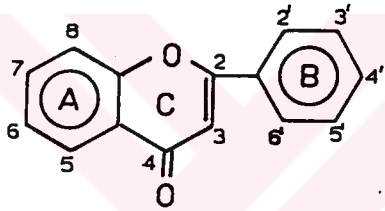
Küçük yapısal farklılıkları olan bir çok flavonoidal bileşik bilinmektedir. Bunlardan en yaygın olanları : İzoflavon (V), flavonon (VI), dihidroflavonol (VII), kalkon (VIII), auron (IX), antosiyanidin (X) ve antosiyanin (XI) halkalarıdır (Şekil 2.5). Bu gruplardan flavon ve flavonollere bitkilerde çok rastlanmaktadır.



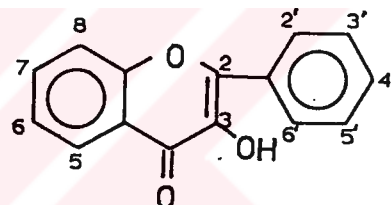
I



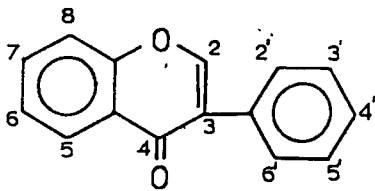
II



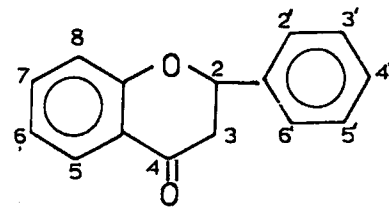
III



IV

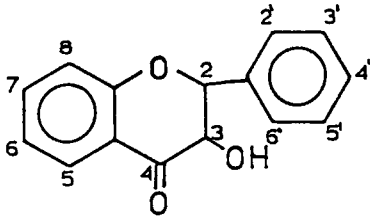


V

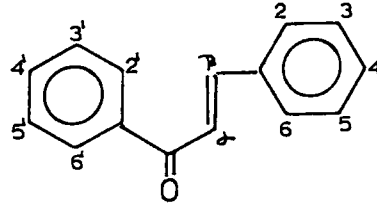


VI

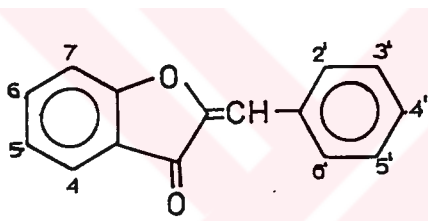
Şekil 2.5. Flavonoidal Bileşikler



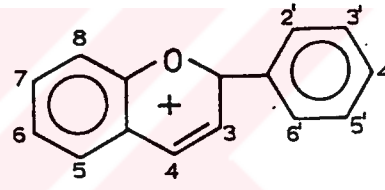
VII



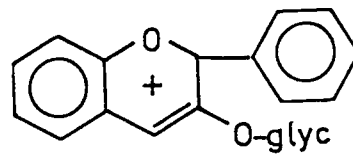
VIII



IX



X

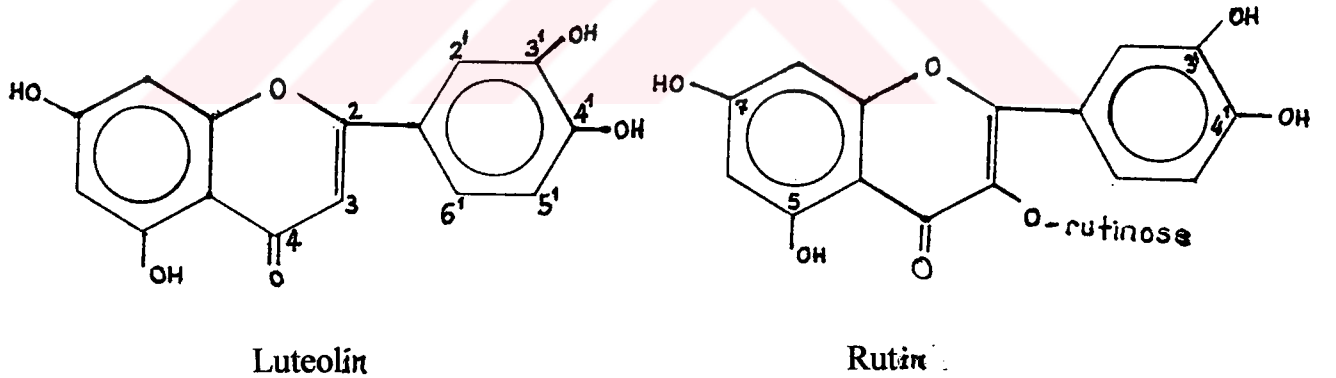


XI

Şekil 2.5'in devamı

Flavonoidlerin yapılarındaki fenil ve benzo radikallerinde hidrojen atomlarının yerine hidroksil gruplarının geçmesi ile değişik flavonoid bileşikleri oluşmaktadır.

Flavonun kendisine bitkilerde çok az rastlanmasına rağmen hidroksilli türevlerine yaygın olarak rastlanmaktadır. Bu hidroksilli türevler, kromon halkasında iki ya da daha fazla hidroksil grupları taşımaktadırlar. Flavonlar, hidroksil gruplarını üçüncü konumun dışında taşıyan hidroksilli türevler grubuna girerler. Flavonların monohidroksi türevleri ender olarak görülmektedir. Buna karşılık iki, üç, dört, beş hidroksilli türevleri yaygın olarak bulunur. Bunlara örnek olarak luteolın (5,7,3',4'-tetrahidroksiflavon) ve rutin (3,5,7,3',4'-pentahidroksiflavon-3-rutinoside) verilebilir (Gilman, 1943; Tanker ve diğerleri, 1973; Auclair et al, 1976).



Şekil 2.6. Flavonoidlerin Hidroksilli Türevleri

Bitkilerde, flavonun hidroksilli türevlerinden başka metil türevlerine de rastlanmaktadır. Bunlar, kromon halkası üzerindeki karbon atomuna bağlı bir metil grubu içeren flavon bileşikleridir. Fakat izole edilen bu tür flavonların sayısı çok azdır. Ayrıca bitkilerde, hidroksilli flavonlar, furanoflavonlar ve flavonoidal alkaloidlere de çok az da olsa rastlanmaktadır (Tanker ve diğerleri, 1973).

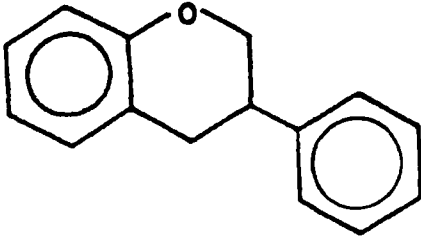
3-Hidroksiflavonlar, genellikle 5. ve 7. konumlarda birer hidroksil grubu daha taşırlar. Bu tip flavonoller fenil halkasındaki (B halkası) hidroksil gruplarına göre sınıflandırılırlar. Bitkilerde rastlanan diğer flavonoller ise 6. konumda 8. konumda, hem 6. hem de 8. konumda ve 2' konumda hidroksil grubu taşıyan bileşiklerdir.

Flavanonlar, 2-fenilbenzopiran-4-on yapısında olup doğada çok az rastlanmaktadır. Doğada rastlanan en basit flavanon 7-hidroksiflavanondur. Flavanonlar, ikinci karbon atomunun asimetrik konumundan dolayı optikçe aktiftirler. Dihidroflavonoller, flavanon ile aynı halka sistemine sahip bileşikler olup bu bileşiklerin üçüncü karbon atomuna bir hidroksil grubu bağlıdır. Dihidroflavonoller iki tane asimetrik karbon atomuna sahiptirler. 7-Hidroksi-dihidroflavonol bu tür bileşiklerin en basit üyelerindendir.

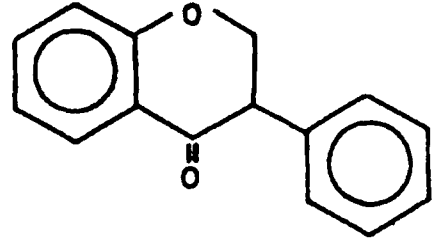
Flavanon ve dihidroflavonoller, B halkasındaki hidroksil sayısına göre sınıflandırılırlar. Bunlar, B halkasında hidroksil taşımayanlar, bir, iki ve üç tane hidroksil grubu taşıyanlar olmak üzere dört gruba ayrılırlar (Harborne et al, 1975; Tanker ve diğerleri, 1973).

İsoflavon türü bileşiklerin ana iskeleti flavon türü bileşiklerin iskeletinden farklılık gösterirler. Bu tür bileşikler, üç karbonlu bir zincire iki benzen halkasının bağlanması ile oluşmaktadır. İsoflavonoidler grubuna giren değişik bileşik grupları arasında isoflavonlar (XII), isoflavanonlar (XIII), rotenoidler (XIV), pterokarpanlar (XV) ve kumestanlar (XVI) sayılabilir (Şekil 2.7).

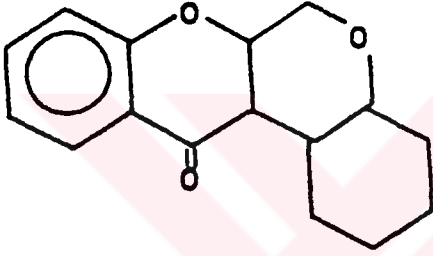
Kalkonlar, ana iskeletlerinde flavonlar gibi aynı sayıda karbon atomu taşıyan bileşiklerdir. Bu bileşiklerdeki A ve B halkaları, açık bir zincir yardımı ile birbirlerine bağlanmışlardır. Bu zincir üç karbon atomundan meydana gelmiştir ve  $\alpha$  ve  $\beta$  karbon atomları arasında bir çifte bağ bulunmaktadır.



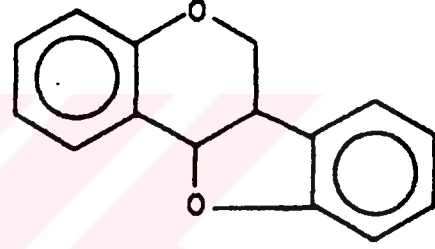
XII



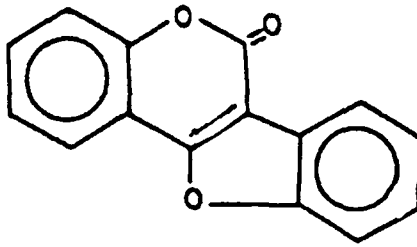
XIII



XIV



XV



XVI

Şekil 2.7. İsoflavon Grubundan Bileşikler

Kalkonlardaki A halkasının 2',4' ve 6' konumlarına hidroksil grubu bağlanabilir. B halkasında ise hidroksil grubu ya hiç bulunmaz ya da bir, iki veya üç tane bulunabilir.

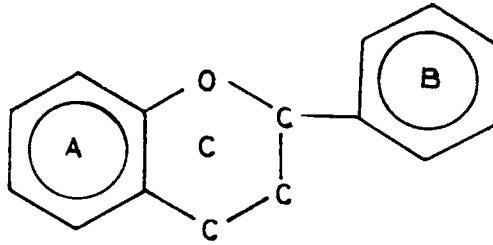
Dehidrokalkonlar da flavonlar ile aynı sayıda karbon atomu taşıyan bileşiklerdir. Bu bileşikler kalkonların indirgenmiş türevleri şeklindedirler.

Auronlar da flavonlar ile aynı sayıda karbon atomu içermektedirler. Fakat bu tür bileşikler halka sistemi olarak piron yerine furanon halkası taşırlar (Tanker ve diğerleri, 1973).

### 2.3.3.2. Oluşumları

Flavonoidler, bitkilerin ikincil metabolitlerindedir. Flavonoidler, bitkilerin fotosentezle oluşturdukları ve hayatsal faaliyetleri için gerekli olan karbohidrat, aminoasit v.b. gibi birincil metabolitlerden oluşmuşlardır.

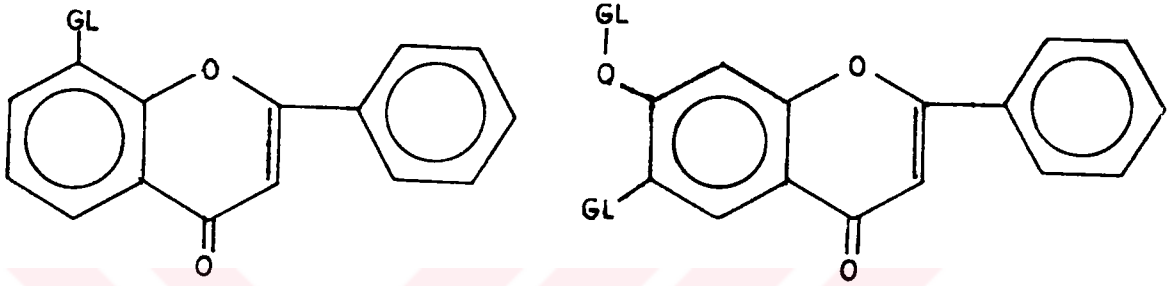
Flavonoidlerin karbon iskeleti A, C ve B halkalarından oluşmaktadır. Bu halkalar sırasıyla 6, 3 ve 6 tane karbon atomuna sahiptirler (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Flavonoidlerin Yapısı

Flavonoidal iskeleti iki ana birimden oluşur. Bunlar ;  $C_6, C_3$  (B ve C) ve  $C_6$  (A) birimleridir. Bu birimlerin her biri doğada bakterilerden yüksek bitkilere kadar birçok organizmada bulunur. Fakat mikroorganizmalarda, bakterilerde ve alglarda flavonoidlere rastlanmamaktadır (Geissman, 1962).

Flavonoid bileşikleri, beyaz, sarı ya da krem rengi çiçekleri olan yüksek bitkilerin bütün bölümlerinde (kök, sap, yaprak, çiçek, polen, meyva, tohum, odunsu kısım ve kabuk) glikozidleri halinde bulunabilirler. Glikozitleşme ya eter bağları arasında (O-glikozidler) ya da karbon bağları arasında (C-glikozidler) görülebilir (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Flavonoidlere Şekerlerin Bağlanma Şekilleri

Flavonoidler, bitkilerdeki sarı renkten sorumlu bileşiklerdir. Bunun sebebi, flavonoidlerin hidrosilasyon, metilasyon ve glikolizasyon gibi basit modifikasyonlar sonucunda belirgin sarı renk oluşturan maddeler olmasıdır. Ayrıca bu tür bileşikler, petallerde de glikozid formunda bulunurlar ve bunların renkli olmasını sağlarlar (Gilman, 1943; Harborne, 1967; Harborne, 1988).

### 2.3.3.3. Fiziksel, Kimyasal Özellikleri ve Reaksiyonları

Flavonoidlerin çoğu, kristal halinde sarı renkli katı maddelerdir. Erime noktaları çok yüksektir (en > 200 °C). Bunlar genellikle suda, alkolde, seyreltik mineral asitlerde ve alkalilerde çözünürler.

Flavonoidler alkali ortamda (NaOH ve KOH çözeltileri ile) havada koyulaşan sarı bir renk vererek çözünürler. Ortam asitlendirildiğinde ise renginde bir açılma görülür ve çökeltme oluşur.

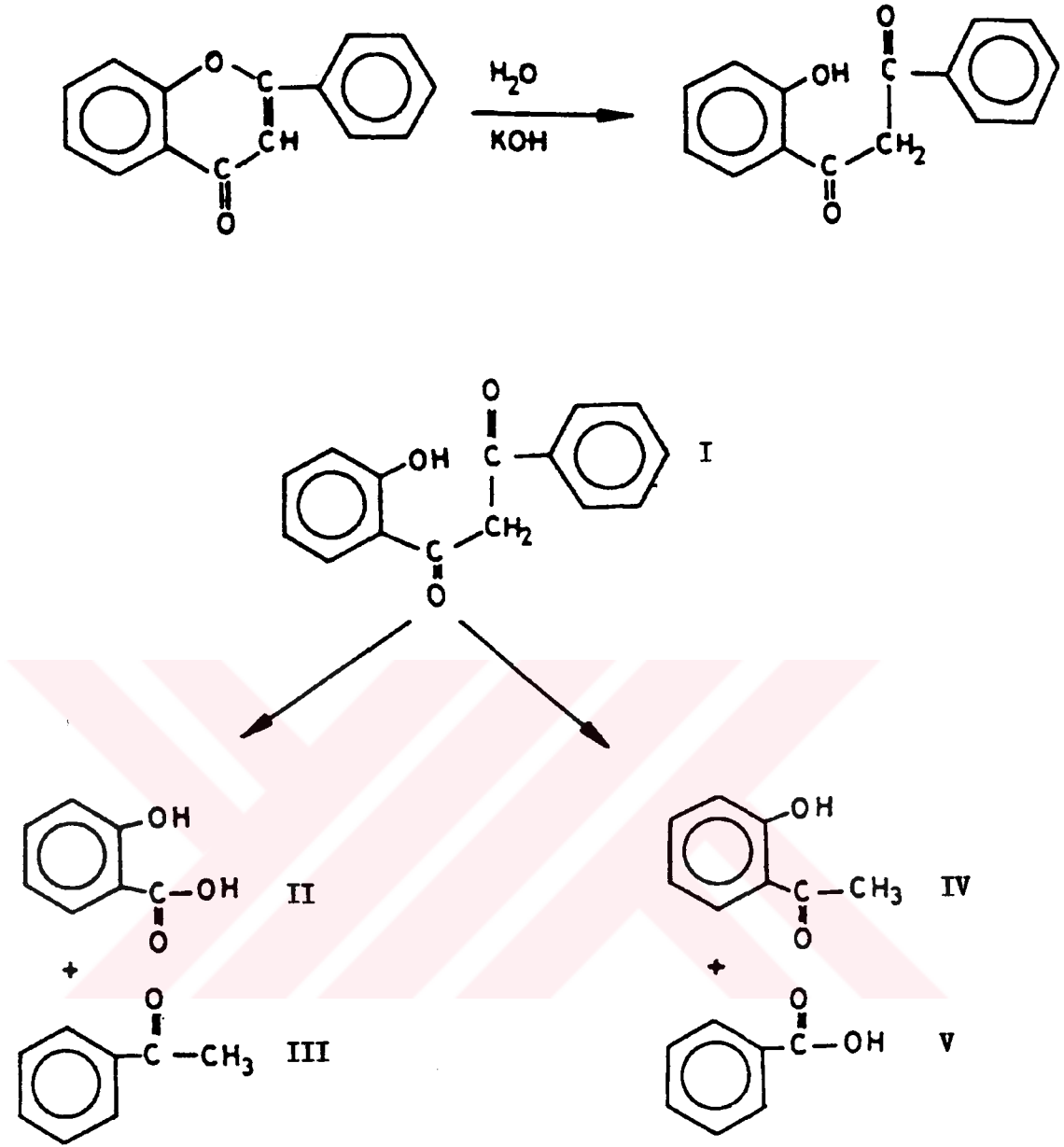
Flavonoidlerin asitlerle çözünmesinin nedeni,  $\gamma$ -piron çekirdeğindeki oksijen atomunun bazik özellik göstermesidir. Oksijen atomu asitlerle katılma ürünleri yaparak oksonyum tuzlarını meydana getirir. Bu tuzlar, kendilerini oluşturan bazlara göre daha renklidirler.

Flavonlar, alkaliler ile kaynatıldıkları zaman heterohalka sistemleri açılarak, genellikle bir fenol ve aside dönüşürler. Örneğin, flavon bu reaksiyona girdiği zaman önce o-hidroksidibenzoilmetan (I) daha sonra kısmen salisilik asit (II) ile asetofenon (III) ve kısmen de o-hidroksiasetofenon (IV) ile benzoik asit (V) meydana gelir (Şekil 2.10) (Gilman, 1943; Tanker ve diğerleri, 1973; Oskay, 1990).

Flavon molekülünde bulunan A ve B halkaları, genellikle aromatik halkalar gibi reaksiyona girerler. Hidroksiflavonlar ve bunların eterleri süstitüsyon reaksiyonlarında fenoller ya da eterleri gibi davranırlar. Bu tür bileşikler nitrolama, sülfolama ve bromlandırma reaksiyonları yapabilirler. Ayrıca, hidroksi flavonların diazonyum tuzları ile kenetlenme reaksiyonuna girebilirler.

Piron halkaları karbonil grubuna sahip olmasına rağmen flavon, hidroksilamin, semikarbazid ve fenilhidrazin gibi karbonil reaktifleri ile bir reaksiyon oluşturamazlar.

Flavonlarda bulunan çifte bağlar ve karbonil grupları, hidrojen atomunun farklı yollarla katılabileceği konjuge bir sistem oluşturmuştur (Gilman, 1943; Finar, 1973).



Şekil 2.10. Flavonun Alkalilerle Reaksiyonu ve Oluşan Ürünler

#### 2.3.3.4. Fitokimyasal Ön Denemeler ile Saptanmaları

Fitokimyasal denemeler için bitki örneğinin % 5'lik infüzyonu kullanılır. % 5'lik infüzyon hazırlarken, kaba toz haline getirilmiş 5 g örnek üzerine 100 ml sıcak su eklenir. Oluşan karışım 5 dakika sıcak su banyosunda bekletilir ve soğuduktan sonra süzgeç kağıdından süzülür. Elde edilen infüzyon üzerinde çeşitli bileşik sınıflarına ait ön denemeler yapılabilir.

Flavonoid bileşikleri (flavon, flavonol, flavonon) için aşağıda verilen tanıma reaksiyonları kullanılabilir. Cyanidin reaksiyonu genellikle polifenolik bileşikler için olumlu sonuçlar vermektedir. Bu nedenle, cyanidin reaksiyonu spesifik bir reaksiyon olarak bilinmektedir.

- 1) 5 ml infüzyon üzerine birkaç damla NaOH çözeltisi ilave edilir, infüzyonun koyu sarıya dönen rengi kaydedilir.
- 2) 5 ml infüzyon üzerine birkaç damla % 2'lik FeCl<sub>3</sub> çözeltisi ilave edilir, oluşan renk kaydedilir (yeşil, mavi, siyah). Polifenollerde 5. konumda serbest hidroksil mevcut ise koyu yeşil renk görülür.
- 3) 5 ml infüzyon bir kapsüle konur ve su banyosu üzerinde kuruluğa kadar uçurulur. Oluşan çökelti az miktarda aseton ile çözülerek üzerine spatül ucu ile ince toz halindeki borik asit ile okzalik asit ilave edilir ve yine su banyosu üzerinde kuruluğa kadar uçurulur. Oluşan sarı renkli çözelti 10 ml eterde çözülür. Eğer eterli çözeltide 5-hidroksiflavonol ve 5-hidroksiflavon varsa UV (366 nm) de ışık altında fluoresan sarı-yeşil renk görülür. Bu reaksiyon 5-hidroksiflavononların varlığında gerçekleşmez.
- 4) Cyanidin Reaksiyonu : Flavon, flavonol ve flavonon taşıyan drogların sulu etanollü ekstresi üzerinde yapılır. Bu ekstre HCl'li ortamda Mg metali ile turuncu-kırmızı veya mor bir renk alır. Bu işlem bir deney tüpünde yapılır. Tüpteki infüzyon üzerine 5 ml etanol-derişik HCl-su (1:1:1) karışımı ile az miktarda Mg metali ilavesi ile reaksiyon başlatılır. Flavon varlığında renk turuncu, flavonollerde kırmızı, flavononlarda mor renk oluşur (Tanker ve diğerleri, 1973).

#### **2.3.3.5. Elde Edilmeleri**

Flavonoidlerin elde edilmelerinde geleneksel yöntemler dışında gelişen teknikler sonucu ortaya çıkan kromatografik yöntemler (örneğin HPLC) bu alanda da

kullanılmaya başlanmıştır.

#### **2.3.3.5.1. Bitkilerden Ayrılmaları**

Kurutulduktan sonra öğütülen bitki maserasyon şeklinde ya da Sokslet cihazı ile sırasıyla polar olmayan çözücünden polar çözücüye doğru ekstre edilir. Bu işlem esnasında bitkideki flavonlar polaritelerine göre kabaca bir ön ayrılmaya uğramış olurlar.

Ekstraksiyonda kullanılacak çözücüler, izole edilecek flavonoidin polaritesine göre seçilir. Eğer flavonoid glikozidleri ayrılacak ise daha az polar çözücüler kullanmak uygun olur. Polaritesi düşük olan aglikonlar (örneğin; isoflavonlar, dihidroflavonoller veya yüksek derecede metillenmiş flavonlar ve flavononlar) genellikle benzen, kloroform, dietileter veya etilasetat gibi çözücülerle ekstre edilir (Harborne et al., 1975; Tanker ve diğerleri, 1973).

Bitki materyalinde bulunan steroller, karatenoidler ve klorofiller gibi bileşenlerin uzaklaştırılması petrol eteri veya hekzan gibi polar olmayan çözücülerle bir ön ekstraksiyon sonucu mümkün olur. Fakat bu sırada önemli flavonoid aglikonları da ayrılabilir.

Hidroksillenmiş flavonlar, flavonoller, biflavonoidler, auronlar ve kalkonlar gibi daha polar olan flavonoid glikozidleri aseton, alkol-su veya bu çözücülerin kombine sistemleri ile ekstre edilerek izole edilirler. Bu bileşik grupları için en uygun çözücü sistemi metanol-su (1:1) karışımıdır.

Flavonoid glikozidlerinin ekstraksiyonunda çözücü içine bazen asit ilave edilir. Bu işlem genellikle antosiyaninler için kullanılır. Fakat bu arada glikozidler hidrolize uğrayabilirler (Harborne et al., 1975).

### 2.3.3.5.2. Kromatografik Yöntemler

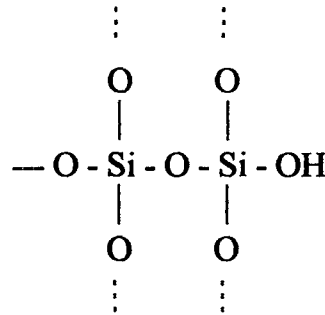
Bitki ekstrelerinden flavonoidlerin ayrılması ve saflaştırılması için kromatografik yöntemler kullanılır. Büyük miktarlardaki flavon eldesi için kolon kromatografisi, küçük miktarlar için preparatif ince tabaka ya da kağıt kromatografisinden yararlanılır.

#### Kolon Kromatografisi

Ham bitki ekstresinden çok fazla miktardaki flavonoidlerin izolasyonu için kolon kromatografisi en çok kullanılan yöntemdir. Kolondan flavonoidlerin ayrılması için kullanılan adsorbanlar ; silikajel, kiselgur, magnezyum silikat, selüloz, alüminyum oksid, poliamid, sefadeks ve iyon değiştirici reğinelerdir. Bu adsorbanlar arasında en çok tercih edileni ise sırasıyla silikajel, poliamid, selüloz ve sefadekstir (Harborne et al., 1975).

#### **Silikajel**

Silikajel genellikle isoflavon, flavonon, dihidroflavonol ve yüksek derecede metillenmiş (asetillenmiş) flavon ve flavonoller gibi apolar flavonoid aglikonlarının ayrılmasında kullanılır.



şekil 2.11. Silikajel'in Yapısı

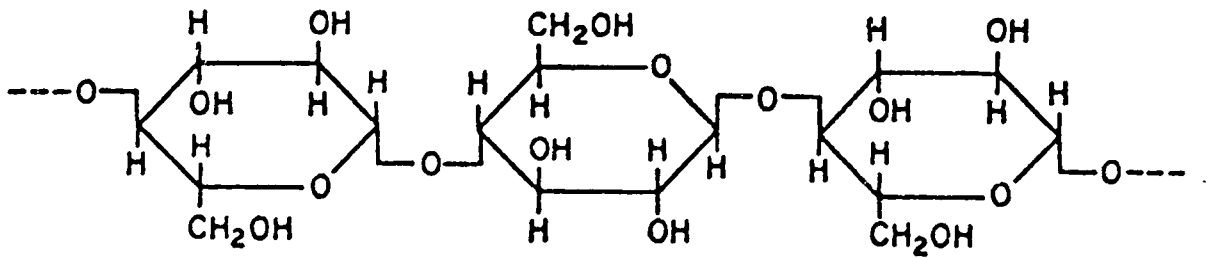
Silikajel kolonlarda kullanılan çözücü sistemleri sırasıyla ; petrol eteri, karbontetraklorür, benzen, kloroform, dietileter, etilasetat, piridin, aseton, n-propanol, etanol, metanol, su şeklindedir (Harborne et al., 1975).

Silikajel kolon kromatografisi, polihidroksiflavonoller veya glikozidler gibi polar flavonoidlerin ayrılması için uygun değildir. Fakat glikozidlerin hidrolizi ile elde edilen bir çok flavonoid aglikonların saflaştırılması için uygun bir yöntemdir. Silikajel üzerindeki flavonoid aglikonlarının ayrılması çözücü sistemindeki metanol oranının artışıyla sağlanabilir (Mebry et al., 1970).

### Selüloz

Bütün flavonoid ve glikozidlerinin ayrılması için selüloz kolon kromatografisi en uygundur. Kağıt kromatografisi için kullanılan çözücülerin hepsi kolon kromatografisi için de kullanılabilir. Selüloz kolon için kullanılan en yaygın çözücüler ise sulu alkol ve asit karışımlarıdır (Harborne et al., 1975).

Diğer bir çok polimer gibi selüloz da alkol, su gibi düşük molekül ağırlıklı sıvılarda ve kendi molekülleri arasında hidrojen bağları oluşturabilirler. Hidrojen bağları yapan serbest -OH grupları selülozun yapısına polar özellik kazandırır (Oskay, 1990).



Şekil 2.12. Selüloz'un Yapısı

## **Poliamid**

Poliamid, flavonoid bileşikler için yüksek ayırma gücüne sahip olduğundan kolon kromatografisinde en çok kullanılan adsorbandır. Poliamid molekülündeki  $-NH_2$  ve  $C = O$  grupları fenolik  $-OH$ 'larla hidrojen bağı yaparak flavonların ayrılmasını sağlarlar.

Kromatografide kullanılan poliamidler yapıları açısından üç tiptir. Bunlar ;

Perlon tipi (polikaprolaktam)

Naylon tipi (polihekzametilendiamin)

Poliklar tipi (polivinilpirolidon, PVP) 'dir.

Poliamidler, moleküller arası hidrojen bağlarının oluşması sonucu metanol, etanol, aseton ve dimetilformamid gibi hidrofilik çözücülerde yeteri derecede çözünemezler. Fakat bu tür çözücülerde şişebilme özelliklerini gösterebilirler. Poliamid tipi adsorbanlarda yıkama çözücüsü olarak çeşitli oranlardaki metanol-su karışımları kullanılabilir. Bu çözücü karışımı ile isoflavon, flavon, flavonol, dihidroflavonol ve flavononların aglikon ve glikozidlerinin kompleks karışımlarını ayırabiliriz (Harborne et al., 1975; Mabry et al., 1970).

## **Sefadeks**

Sefadeks, yüksek sayıda çapraz bağları olan bir dekstran maddesidir. Sefadeks kolonda ayırma molekül büyüklüğüne göre gerçekleşir. Buna göre, kolondan sırasıyla önce büyük moleküller sonra küçük moleküller ayrılır.

Sefadeks tipleri genellikle hidroksil grupları içerdiği için kuvvetli hidrofilik özellik gösterirler. Bu nedenle aminoasitler, nükleik asitler, hormonlar ve flavonoidler gibi maddelerin ayrılması için kullanılırlar.

Sefadeks, hem analitik hem de preparatif flavonoid çalışmalarında kullanılan yüksek kapasiteli etkin bir adsorbandır. Bu kolonda, metanol ile flavonoidlerin aglikon ve glikozidleri ayrılabilir. Flavonoidlerdeki adsorpsiyon, serbest fenolik hidroksil grupları ile gerçekleşmektedir (Stahl, 1969; Zweig et al., 1972).

### **İnce Tabaka ve Kağıt Kromatografisi**

Flavonoidal bileşiklerin ince tabaka kromatografisi ile preparatif olarak ayrılmasında en çok kullanılan adsorbanlar silikajel, poliamid ve selülozdur.

Flavonoidlerin ayrılması ve analizi için kullanılan bir başka yöntem de kağıt kromatografisidir. Kağıt kromatografisinde adsorban kağıt olduğundan analitik çalışmalar için normalden daha kalın kağıtlar kullanılmaktadır. Daha iyi ayrımlar için çift dimensiyonlu kağıt kromatografisi tercih edilmektedir.

İnce tabaka kromatografisinde kullanılan plaklar üzerinde flavonoid spotlarının saptanması, kağıt kromatografisinde olduğu gibi plakanın doğrudan ya da  $\text{NH}_3$  buharı ve NA (difenilborik asit-2-aminoetilester) belirteci püskürtülerek UV (366 nm) ışık altında incelenmesiyle yapılabilir.

Preparatif çalışmalar sonucu flavonoidal bileşiklerden çok az miktarda elde edilebilmektedir. Elde edilen madde miktarı çok az olduğu için UV ve kütle spektrumları ile yapıları aydınlatılabilmektedir.

Uçucu türevleri haline getirilmiş flavonoidler için gaz-likid kromatografisi ya da yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılmaktadır (Mabry et al., 1970; Harborne et al., 1975).

### 2.3.3.6. Tanınmaları

#### 2.3.3.6.1. Renk Reaksiyonları

Flavonoidal bileşikler yapılarına bağlı olarak bir çok renk reaksiyonları gösterirler. Flavonoidlerin ince tabaka ve kağıt kromatografileri yapıldıktan sonra elde edilen kromatogramlarındaki lekeler önce UV ışık altında doğrudan incelenir, daha sonra sırası ile  $\text{NH}_3$  buharına tutulur ve NA belirteci püskürtülür. Sonuçta gösterdikleri renk değişimleri UV (366 nm) ışık altında incelenir. Böylece flavonoid bileşiğinin tipi ve süstitusyonları hakkında kabaca ön bilgi elde edilmiş olur. Bu bilgiler Tablo 2.2 de verilmektedir (Mabry et al., 1970).

Sarı renkli olan flavonoidler arasında kalkonlar ve auronlar kolay bir şekilde tanınabilirler. Çünkü bunlar  $\text{NH}_3$ 'lı ortamda kırmızı ve turuncuya dönen bir renk değişimi yaparlar.

Flavonların 5 numaralı karbonunda hidroksil grubu bulunuyorsa bunlar UV ışık altında mor renk verirler. 5,4'-dihidroksil durumunda  $\text{NH}_3$  buharı ve NA belirteci ile sarı ; 5,4',3'-trihidroksi durumunda  $\text{NH}_3$  buharı ile sarı, NA belirteci ile turuncu renk verirler.

5-Deoksi, 5-O-glikozid ve 5-OCH<sub>3</sub> süstitüsyonlarında Uv ışık altında parlak mavi ya da parlak yeşil renklerde görünürler.

Hidroksil gruplarını 6. ve 8. konumlarda içeren flavon ve flavonoller sarı renkli olup kromatogramları UV ışık altında koyu renkli absorpsiyon spotları verir. Bu spotlar  $\text{NH}_3$  buharından etkilenmezler. Fakat 6. ya da 8. konumlarda hidroksil grupları içeren flavonoller genellikle buldukları bitki grupları bakımından farklılık gösterirler (Harborne et al., 1975).

Flavanoller, UV ışık altında sarı renkte görünmeleriyle flavonlardan ayrılabilirler. 5. konumda hidroksil içeren flavonoller,  $\text{NH}_3$  buharı ve NA belirteci ile sarı, 5,3',4'-trihidroksil içeren flavoneller ise  $\text{NH}_3$  buharı ile sarı, NA belirteci ile turuncu renk verirler.

Flavonollerde 3. konumdaki hidroksil serbest halde ise UV ışık altında sarı renk vererek flavonlardan ayırt edilebilirler. 3' ve 4-OH flavonoller ise  $\text{NH}_3$  buharı ile sarı, NA belirteci ile turuncu renk verirler (Mabry et al., 1970).

Flavonoidlerin bir çoğu  $\text{AlCl}_3$  ile kelat oluşturabilirler. Flavonoidler, alkollü  $\text{AlCl}_3$  ile muamele edildiği zaman yoğun sarı-yeşil fluoresans gösterirler. Fakat bileşiklerin tanınması için faydalı bir yöntem değildir. Çünkü bu tür bileşiklerin hepsi aynı reaksiyonu gösterirler (Harborne et al., 1975).

Flavonoidlerin bazı renk reaksiyonları ise etanoldeki çözeltilerine sulu NaOH, derişik  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , Mg/HCl ve Na-Hg (sonra asit) belirteçlerinin ilave edilmesi ile gerçekleşir (Tablo 2.3). Bu reaksiyonlar bileşğin türü ve süstitüsyonları hakkında ön bilgi vermeleri bakımından önemlidir (Geissman, 1962).

Tablo 2.1. Flavonoid Yapısı ve Spot Rengi Arasındaki İlişki (Mabry et al., 1970)

| UV                   | UV/NH <sub>3</sub>         | UV/NA           | Flavonoid Bileşik   |
|----------------------|----------------------------|-----------------|---|
| Koyu Mor             | Koyu Mor                   | Koyu Mor        | 5-OH açık, 3-OH yok ya da kapalı, 3'-4'-OH yok veya kapalı.               |
| Koyu Mor             | Koyu Mor                   | Sarı            | 5-OH açık, 3-OH yok ya da kapalı, 4'-OH kapalı, 3'-OH açık.               |
| Koyu Mor             | Sarı                       | Sarı            | 5-OH açık, 3-OH yok ya da kapalı, 4'-OH serbest, 3'-OH yok, ya da kapalı. |
| Koyu Mor             | Sarı                       | Turuncu         | 5-OH açık, 3-OH yok ya da kapalı, 3'-4'-OH açık.                          |
| Koyu Mor             | Koyu kahverengi            | Turuncu         | 5-6 -OH var, 3-OH yok ya da kapalı, 3'-4 -OH var.                         |
| Koyu Mor             | Koyu kahverengi            | Kahverengi      | 5-6 -OH var, 3-OH yok ya da kapalı, 3'-4' -OH açık.                       |
| Sarı                 | Sarı                       | Sarı            | Serbest 3 ve 5 -OH var.   |
| Sarı                 | Sarı                       | Kırmızı-turuncu | 3 ve 5 -OH açık, 3'-4' -OH var.   |
| Parlak florasan mavi | Parlak florasan mavi-yeşil | Mavi            | 5-OH yok, ya da kapalı, 3-OH yok ya da kapalı.                            |
| Parlak florasan mavi | Parlak florasan mavi-yeşil | Mavi-yeşil      | 5-OH yok, ya da kapalı, 3-OH yok ya da kapalı, 3'-4'-OH var.              |
| Parlak florasan sarı | Daha parlak florasan sarı  | Mavi            | 5-OH yok, ya da kapalı, 3'-4'-OH yok.                                     |
| Parlak florasan sarı | Daha parlak florasan sarı  | Mavi-yeşil      | 5-OH yok, ya da kapalı, 3'-4'-OH var.                                     |

Tablo 2.2. Flavonoidal Bileşiklerin Renk Reaksiyonları (Geissman, 1962)

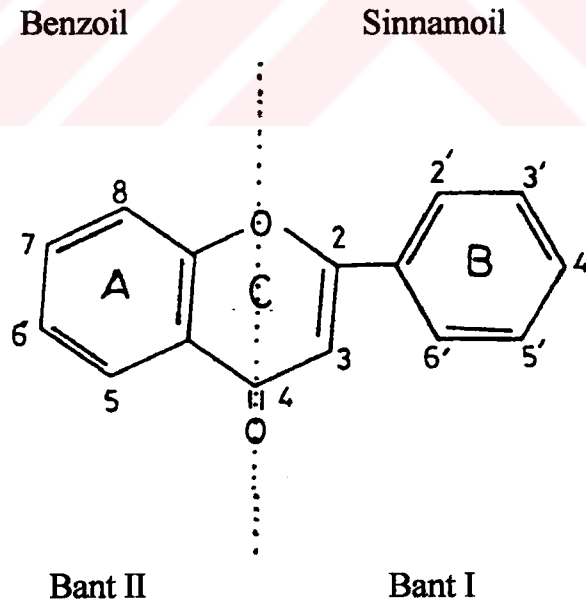
| Flavonoid Tipi | Sulu NaOH   | Derişik H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                            | Mg-HCl                                    | Na-Hg (sonra asit) |
|----------------|---|---|---|--------------------|
| Flavonon       | Soğukta; sarı→turuncu, sıcakta; koyu kırmızı veya mor | Turuncu→koyu kırmızı  | Kırmızı, morumsu<br>Kırmızı, menekşe mavi | Kırmızı            |
| Flavon         | Sarı  | Siddetli sarı→turuncu<br>çözelti sık sık karakteristik floresans. | Sarı→kırmızı                              | Kırmızı            |
| Flavonol       | Sarı→turuncu<br>(hava oksidasyonu ile kahverengi)     | Siddetli sarı→turuncu<br>çözelti sık sık karakteristik floresans. | Kırmızı→morumsu<br>kırmızı                | Sarı→soluk kırmızı |
| Flavononol     | Çok soluk sarı, kahverengiye çok çabuk değişme        | Kırmızımsı sarı   | Kırmızı→morumsu<br>kırmızı                | Kahverengimsi-sarı |

### 2.3.3.6.2. Spektral Yöntemler

#### UV Spektroskopisi

Flavonoidler, konjuge aromatik sistemler olduğu için spektrumun görünür ve UV bölgelerinde şiddetli absorpsiyon bantları gösterirler. UV spektroskopisi ile çok az madde kullanılarak flavonoidal bileşiğin yapısı hakkında önemli bilgiler edinilebilir (Harborne, 1988).

Flavonoidal bileşiğin ana iskeleti ve süstitüentleri hakkında geniş bilgiler elde etmek için; bileşiğin uygun bir çözücüdeki (metanol) çözeltisinin spektrumuna ve bu çözeltiliye özel belirteçler ilavesi ile alınan çeşitli spektral eğrilerde gözlenen kaymalara, piklerin şiddetine ve şekilleri arasındaki farklılıklara bakılması gerekmektedir (Mabry et al., 1970).



Şekil 2.13. Flavonoid Molekülünün Absorpsiyondan Sorumlu Bölgeleri

Flavonoid bileşiklerin UV spektrumunda genel olarak biri uzun dalga boyunda, diğeri kısa dalga boyunda olmak üzere iki büyük absorpsiyon bandı gözlenir. Bunlardan uzun dalga boyunda olan pik flavonoidin B halkası (sinnamoil sistemi) absorpsiyonları ile ilgili olup Bant I adını alır. Kısa dalga boyunda olanı ise A halkası (benzoil sistemi) absorpsiyonları ile ilgilidir ve Bant II adını alır (Şekil 2.13) (Harborne, 1967; Mabry et al., 1970).

Flavonoid bileşiklerde uzun dalga boylarına kayma (batokromik kayma) A ve B halkalarında hidroksil sayısı ile doğru orantılı olarak değişebilir. Özellikle 3,5 ve 4' konumlarındaki hidroksil gruplarının süstitüe olması ile Bant I ve Bant II'de daha kısa dalga boylarına (hipsokromik kayma) kaymalar görülebilir.

### **Metanol Spektrumu**

Flavonoid bileşiğin metanol spektrumu özellikle iskelet tipi hakkında bilgi verir.

Flavon ve flavonoller metanol spektrumlarında 200-400 nm arasında iki büyük pik verirler. Bant I, flavonlarda 304-350 nm arasında, flavonollerde 3-OH grubu serbest ise 352-385 nm arasında, 3-OH grubu süstitüe olmuş ise 328-357 nm arasında gözlenir. B halkasındaki oksijen fonksiyonlarının sayısının artması ile Bant I uzun dalga boyuna kayabilir.

Flavon ve flavonollerin oksijen içeren süstitüentleri daha az oksijen içeren süstitüentlerine oranla daha uzun dalga boyunda absorpsiyon yapabilirler.

Flavon ve flavonollerin A halkasında oksijenli süstitüent bulunması metanolde belirgin bir Bant II ve zayıf bir Bant I spektrumu göstermesi beklenebilir. Fakat B halkasında da oksijenli süstitüent bulunuyorsa Bant I daha belirgindir ve daha

uzun dalga boyuna kayar. Flavon ve flavonollerde B halkasına eklenen oksijen fonksiyonları Bant I'in batokromik kaymasına neden olabilir. A ve B halkalarının her ikisinde de hidroksil grubu bulunuyor ise bantların şiddetinde belirgin bir azalma gözlenir.

A halkasının 6. ve 8. konumlarından oksijenlenmesi Bant II'nin uzun dalga boyuna kaymasına neden olur. Örneğin, 6-OCH<sub>3</sub> süstitüsyonunda Bant II 270-275 nm arasında gözlenir (Mabry et al., 1970).

6-OH flavonollerde 8-12 nm'lik bir hipsokromik kayma gözlenirken 6-OCH<sub>3</sub> flavonollerde kayma gözlenmez. 8-OH flavonollerde ise 13-16 nm'lik bir batokromik kayma gözlenir (Harborne et al., 1982).

Flavonoid çekirdeği üzerindeki 3,5 ve 4'- hidroksil gruplarının metillenmesi veya glikozillenmesi özellikle Bant I'de hipsokromik kaymaya sebep olur. 3-OH grubunun süstitüsyonu ile ilgili kayma genellikle 12-17 nm kadardır. 4'-OH grubunun metilasyonu ya da glikolizasyonu Bant I'de 3-10 nm'lik, 5-OH grubunun süstitüsyonu ise Bant I ve Bant II'nin her ikisinde de 5-15 nm'lik hipsokromik kayma gözlenebilir. 3., 5. ve 4'. dışında diğer pozisyonlardaki hidroksil gruplarının süstitüsyonunun UV spektrumu üzerine etkileri azdır.

A ve B halkaları arasında konjugasyon bulunmayan isoflavonlar, flavononlar ve dihidroflavonollerin UV spektrumları flavonların UV spektrumlarından kolaylıkla ayrılabilirler. Bant I absorpsiyonu, Bant II pikinde düşük şiddette bir omuz şeklinde görülür. Bant II 245-270 nm ve Bant I omuzu 300-340 nm bölgesinde ortaya çıkar.

Kalkonlar ve auronların UV spektrasından belirgin karakteristik özelliği, etkin bir Bant I absorpsiyonu ve daha düşük bir Bant II absorpsiyonu vermesidir.

Auronlarda Bant I genellikle 370-430 nm bölgesinde görülür. Eğer bu bileşikler doğal olarak bulunuyor ise Bant I 388 nm 'den 413 nm 'ye kadar değişebilir.

### **Sodyum Metoksid Spektrumu**

Sodyum metoksid kuvvetli bir baz olduğu için flavonoid çekirdeği üzerindeki bütün hidroksil gruplarını iyonize edebilir. Flavon ve flavonollerdeki 3 ve 4'-OH gruplarının saptanması için sodyum metoksid spektrumu kullanılabilir. Bileşigin metanoldeki çözeltisine NaOMe ilavesi ile bütün absorpsiyon bantlarında batokromik kayma gözlenebilir.

Flavon ve flavonollerde serbest 4'-OH grubu bulunuyorsa Bant I'de 40-60 nm'lik bir batokromik kayma gözlenir, bunun yanında pik şiddetinde hiç bir azalma gözlenmez. Serbest 4'-OH grubu içermeyen flavonollerdeki 3-OH grubu Bant I'de 50-60 nm'lik batokromik kaymaya ve pik şiddetinde azalmaya neden olur.

Flavon ve flavonollerde 7-OH grubu serbest halde ise Bant I'in kısa dalga boyuna bakan kısmında 305-350 nm arasında bazen omuz, bazen de düşük şiddetli bir pik halinde Bant III görülebilir.

3,4'-dihidroksi flavonoller NaOMe'de kararsızdırlar ve NaOMe'deki absorpsiyon pikleri birkaç dakika sonra bozunur. 3,3',4'-trihidroksil gruplarını içeren flavonoller ise NaOMe ile oksitlenirler ve şiddetleri zamanla azalan bantlar verirler.

İsoflavon, flavonon ve dihidroflavonollerdeki esas bantda kayma olmaması A halkasında hidroksillenme olmadığını gösterir. Bu tür bileşiklerde 5,6,7- ve 5,7,8-trihidroksil sistemlerinin varlığı NaOMe spektrumunun zamanla bozunması ile anlaşılabilir.

Auronların 4'-OH grubu ve kalkonların 4-OH grubu Bant I'de sırası ile 80-95 nm ve 60-100 nm'lik batokromik kaymalarla anlaşılabilir.

2 ya da 4'-OH grupları içeren fakat 4-OH grupları içermeyen kalkonlar, Bant I'de 60-100 nm'lik batokromik kayma ve pik şiddetinde azalma gösterirler. 4'-OH içeren kalkonlarda kayma, 2'-hidroksil ya da 4-alkoksil grubu bulunduğu zaman 40-50 nm olur.

### **Aluminyum Klorür ve Aluminyum Klorür/Hidroklorik Asit Spektrumu**

Flavon ve flavonollerin B halkasındaki orto dihidroksil gruplarının varlığı  $AlCl_3$  spektrumu ve  $AlCl_3/HCl$  spektrumunun karşılaştırılması ile saptanabilir.

5. Karbonda ve 3. karbonda hidroksil grupları ve B halkasında orto dihidroksil grupları içeren flavon ve flavonoller  $AlCl_3$  ile ayrı ayrı kompleks oluştururlar. Asit ilavesi, B halkasındaki orto dihidroksil gruplarının  $AlCl_3$  ile oluşturduğu kompleksin bozunmasına ve Bant I'in 30-40 nm'lik hipsokromik kaymasına neden olur. 3. ya da 5. karbondaki hidroksil gruplarının  $AlCl_3$  ile oluşturduğu kompleks kararlı olduğu için asit ilavesi ile bozunmaya uğramaz. Ayrıca 4. karbondaki keto grubunun da  $AlCl_3$  ile meydana getirdiği kompleks asit karşısında dayanıklıdır.

A halkasındaki orto dihidroksil gruplarının  $AlCl_3$  ile oluşturduğu kompleksler de asit varlığında bozunurlar. Sonuç olarak ; metanol spektrumunda Bant I ve Bant II'de değişmeden kalan bir kayma, flavonoidlerde 3- ve/veya 5-hidroksil gruplarının varlığını gösterir.  $AlCl_3/HCl$  spektrumunun metanol spektrumu ile aynı olması ise 3- ve/veya 5-hidroksil gruplarından her ikisinin de olmadığını ya da süstitüe olduğunu gösterir.

$AlCl_3/HCl$  spektrumunda Bant II'deki batokromik kayma, 5-hidroksil grubu içeren isoflavonlarda 10-14 nm, flavonon ve dihidroflavonollerde 20-26 nm civarındadır. Orto hidroksil grupları sadece A-halkasında (6,7- ya da 7,8- pozisyonlarında) bulunduğu zaman saptanabilir. Bunların  $AlCl_3$  spektrumlarının Bant II'deki kayması,  $AlCl_3/HCl$  spektrumlarındaki kaymalarının 11-30 nm kadar daha fazlasıdır.

2'-Hidroksil grubu bulunan kalkonların ve 4-hidroksil grubu bulunan auronların Bant I'deki ( $AlCl_3/HCl$  spektrumundaki) batokromik kaymaları sırası ile 48-64 nm ve 66-70 nm arasındadır (Mabry et al., 1970; Harborne et al., 1975).

### **Sodyum Asetat Spektrumu**

Sodyum asetat, sodyum metoksitten daha zayıf bir baz olduğu için daha asidik hidroksil gruplarını etkiler. Sodyum asetat spektrumu, 7. karbondaki hidroksil gruplarının varlığını gösterir.

7-Hidroksil gruplarına sahip flavon ve flavonollerde, Bant II'de 5-20 nm arasında batokromik kayma gözlenir. Flavonlarda (flavonoller hariç) 6. ve 8. karbonlarda oksijenlenmiş süstitüentlerin bulunması, NaOAc ilavesi ile oluşan batokromik kaymanın küçük olmasına neden olur.

3- ya da 7- OH grupları serbest olmayan ve 4'-OH grubuna sahip flavon ve flavonoller genellikle NaOAc varlığında Bant I'in uzun dalga boyu tarafında belirgin bir omuz gösterirler. 4'-OH grubunun serbest olup olmamasına bakılmaksızın 7-OH grubu serbest ise Bant I'de de kayma gözlenir.

5,6,7- , 5,7,8- ve 3,3',4'- trihidroksil sistemleri gibi alkaliye duyarlı gruplar bulunduğu zaman NaOAc spektrumu kısa bir süre sonra bozunur (Geissman, 1962).

Flavon ve flavonollerde NaOAc ilavesi ile elde edilen spektrumun Bant I'i, NaOMe spektrumundaki Bant I'e göre daha düşük dalga boyuna kayar.

Kalkonlarda 4'- ve/veya 4- karbonlarında, auronlarda ise 4'- ve/veya 6- karbonlarındaki hidroksil grupları Bant I'de batokromik kayma meydana getirirler veya uzun dalga boyunda bir omuz görülür (Mabry et al., 1970; Harborne et al., 1975).

### **Sodyum Asetat/Borik Asit Spektrumu**

Sodyum asetat varlığında, flavonoid çekirdeği üzerindeki 5. ve 6. karbon atomları dışındaki tüm pozisyonlarda bulunabilen orto dihidroksi grupları ile borik asit kompleks oluşturur.

B halkasında orto dihidroksi grubu varsa flavon ve flavonollerde Bant I 12-30 nm kadar uzun dalga boyuna kayar. A halkasında 6,7- veya 7,8- karbonlarındaki hidroksil grupları bulunan flavonoidlerde bu kayma daha da artar (Mabry et al., 1970).

İsoflavon, flavonon ve dihidroflavonoller (sadece A halkasında) Bant II'de 10-15 nm kadar kayma meydana getirirler. Fakat bu kayma 5,6-dihidroksil gruplarının varlığında gözlenmez.

Auronlar ve kalkonlar (B halkasında) Bant I'de 28-36 nm arasında bir kayma gösterirler (Harborne et al.,1975).

### **IR Spektroskopisi**

Flavonoidlerin yapılarının belirlenmesinde IR spektrumu pek kullanılmaz. Çünkü IR spektrumunun yorumu zordur ve kaymalar tahmin edilemez. 5. karbon atomunda hidroksil grubu içermeyen flavonlar, 5. karbon atomunda hidroksil grubu içeren flavonlardan IR spektrumları yardımıyla kolaylıkla ayrılabilirler. Çünkü karbonil grubuna ait absorpsiyon frekansı  $1653\text{ cm}^{-1}$  ya da daha yukarı olması gerekirken, 5. konumdaki hidroksil grubunun etkisi ile  $1620-1639\text{ cm}^{-1}$  de bulunur. Ayrıca, B halkasında süstitüe olmamış flavonların  $680-870\text{ cm}^{-1}$  bölgesindeki C-H deformasyon bantları, 4'-süstitüe flavonlarınkine oranla çok farklıdır (Harborne, 1967).

### **NMR Spektrumu**

Flavonoidlerin yapısal analizleri için NMR spektrumu önemli bilgiler veren bir metoddur. Flavonoid bileşiklerin büyük bir kısmı polar karakterde olduğundan ve NMR spektrumu için uygun çözücü bulunamamasından dolayı önceleri sadece polar olmayan flavonoidlerin analizi yapılabiliştir. Daha sonraları  $d_6$ -dimetilsülfoksid (DMSO- $d_6$ ) gibi polar çözücüler kullanılarak polar karakterdeki flavonoidlerin de NMR spektrumları yapılabiliştir. Ayrıca, asetil türevleri ve tetrametilsilan (TMS) türevleri haline getirilebilen tüm flavonoid bileşiklerin NMR spektrumlarının da analizleri sağlanabiliştir.

Flavonoid bileşiklerde hidroksil gruplarının varlığı,  $d_6$ -dimetilsülfoksit çözücüsü kullanıldığı zaman saptanabilir. Ancak bu çözücünün flavonoid bileşiklerde zaman zaman bozunmaya neden olması ayrıca kaynama derecesinin yüksek oluşu nedeni ile analizi yapılan bileşiğin geri kazanılmasının zorluğu, ayrıca  $d_6$ -dimetilsülfoksitin havanın nemini kolayca adsorbe ederek NMR spektrumunda kuvvetli su bantları vermesi gibi nedenlerle günümüzde oldukça az kullanılmaya başlanmıştır.

TMS türevleri halinde flavonoidler polar olmayan çözücülerde ve  $CCl_4$  gibi ucuz olan çözücülerde çözülüp incelenirler, ayrıca analizden sonra bileşikler kolayca geri kazanılabilirler (Mabry et al., 1970).

TMS eteri halinde  $CCl_4$ 'de çözülerek alınan NMR spektrumunda; normal olarak bütün flavon protonları 0-9 ppm arasında gözlenir, ancak serbest -OH grupları gözlenmez.

$^{13}C$ -NMR sinyalleri 0-200 ppm gibi geniş bir alanda gözlendiklerinden  $^1H$ -NMR sinyallerine göre daha iyi ayırım verebilirler. Fakat  $^1H$ -NMR'ın aksine özel önlemler alınmadan  $^{13}C$ -NMR spektrumlarının integrasyonları nicel bir bilgi veremez (Harborne et al., 1982).

### **Kütle Spektrumu**

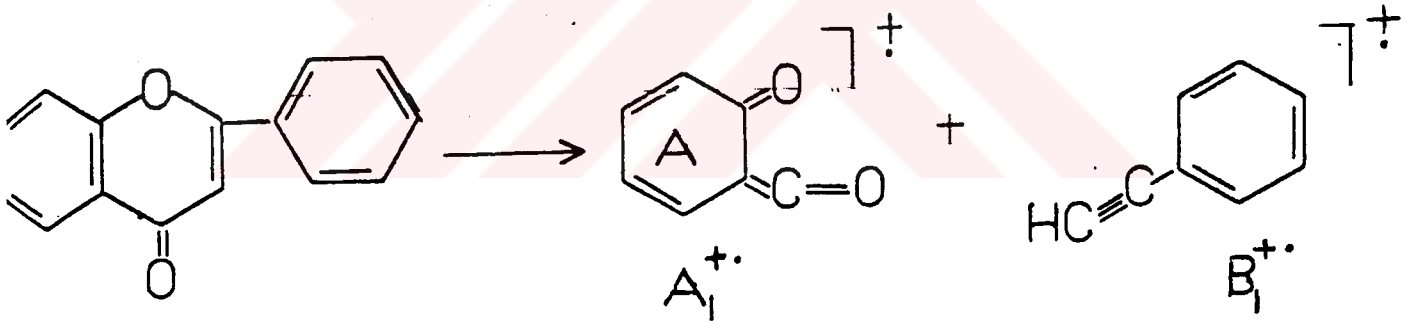
Flavonoid aglikon ve glikozitlerinin kütle spektrumları bu tür bileşiklerin yapılarının aydınlatılmasında çok küçük miktardaki (1 mg'dan daha az) maddelere uygulanabilen bir yöntemdir.

Flavonoid aglikonlarının bir çoğu kuvvetli moleküler iyon piki ( $M^+$ ) verirler, bu genellikle spektrumdaki ana piktir. Flavonoid aglikonlarının moleküler iyondan başka gözlenen belirgin pikleri  $(M-H)^+$  ve  $(M-CO)^+$ , metoksi flavonlar için  $(M-CH_3)^+$  ve  $(M-CO-CH_3)^+$  pikleridir.

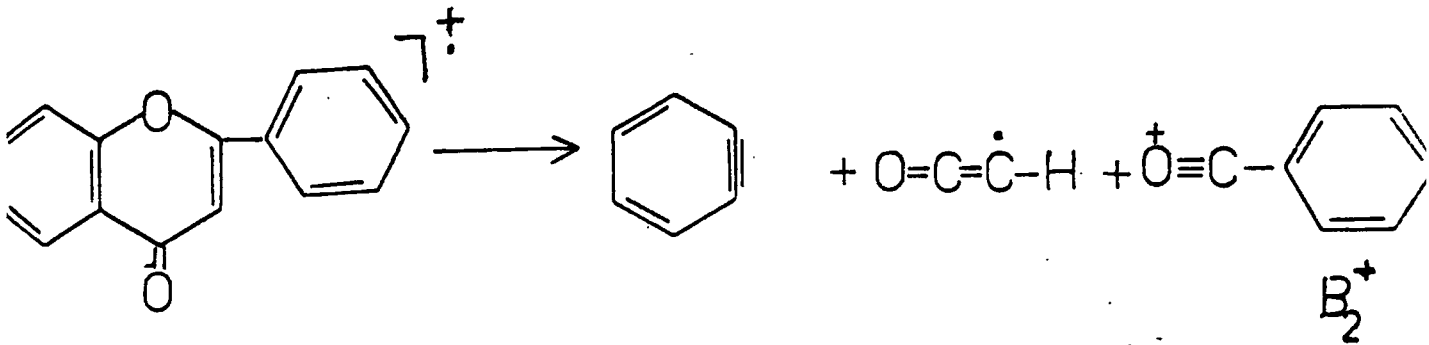
Flavonoid bileşikteki bu iyonların dışında A ve B halkaları koparak bir seri iyon oluşturur, bu iyonlar A ve B halkalarının süstitüsyon durumunu belirlerler.

Flavonoid aglikonların A ve B iyon serilerini oluşturması genelde iki yoldan olur. Bu yollardan birincisi retro-Diels-Alder bölünmesidir (Şekil 2.13) (Harborne et al., 1975).

#### I. YOL : retro-Diels-Alder Bölünmesi



#### II. YOL :



Şekil 2.14. Flavonoidlerin Kütle Spektroskopisinde Parçalanma Yolları

Flavonoid bileşiklerin moleküler iyonu, A ve B serilerinin piklerine karşılık gelen kütle ünitelerine, hatta bu piklerin şiddetlerine bakılarak yapıları hakkında bilgi edinmek mümkündür.

### **2.2.3.7. Farmakolojik Özellikleri**

Flavonoidler, insan ve hayvanlar için toksik değildir. Farmakolojik aktiviteleri alkaloidler gibi diğer bitkisel maddelere kıyasla daha zayıftır. Bir çok flavonoidal bileşik diüretik ve diyaforetik (terletici) etki gösterir. Bazıları ise antispazmotik özelliktedirler.

Flavonoidlerin P vitamini aktivitesi göstermeleri 3' ve 4' karbonlarındaki hidroksil gruplarından ileri gelmektedir. Bu maddeler hidroksil gruplarından dolayı hidrojen transportörü olarak rol oynarlar.

Flavonoidlerin, bazı mikroorganizmalara karşı antibiyotik etki gösterdiği deneylerle saptanmıştır. Flavonoidal bileşiklerin iltihap azaltıcı, sinirleri yatıştırıcı, çarpınmayı önleyici, ağrı kesici ve kalp uyarıcı etkilerinin de olduğu belirlenmiştir. Flavonoidlerin, bazı kanserli hücreler üzerinde etkili oldukları son yıllarda yapılan çalışmalarla saptanabilmektedir. Ancak bu etkiler çok belirgin değildir (Harborne et al., 1975; Tanker ve diğerleri, 1973).

### **3. DENEYSEL BÖLÜM**

#### **3.1. KULLANILAN GENEL YÖNTEMLER**

##### **3.1.1. Kromatografik Yöntemler**

*Sarcopoterium spinosum (L.) Spach.* bitkisinin içerdiği bileşiklerin ayrılması için adsorpsiyon tekniğine dayanan kolon kromatografisi ve ince tabaka kromatografisinden yararlanıldı.

##### **3.1.1.1. Kolon Kromatografisi**

Kurutulmuş bitkiden tüketilerek (sokslet cihazı ile çekme işlemi sonucu) elde edilen ve yoğunlaştırılarak koyu şurup kıvamına getirilen hekzan, kloroform ve etanol ekstralarının içerdiği madde karışımlarının kaba fraksiyonlandırılması için kolon kromatografisi uygulandı.

##### **Kullanılan Adsorbanlar**

Silikajel 60, parçacık büyüklüğü 0.063-0.200 mm (70-230 mesh ASTM) (Merck).

Poliklar (Polyclar)

## **Kolonların Hazırlanması**

### **Silikajel Kolon**

Koyu şurup kıvamındaki ekstre çok az miktar silikajel ile karıştırılarak homojen bir karışım haline getirildi. Karışımın çözücüsü de kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Kolona yerleştirilecek ekstrenin yaklaşık altmış katı kadar alınan silikajel adsorban, kolon boyunun 2/3'sini dolduracak şekilde yerleştirildi. Kolonun üst kısmına da adsorban konularak kolon, polaritesi gittikçe artan değişik çözücülerle yıkandı.

### **Poliklar Kolon**

Poliklar adsorban, kloroform-etanol (2:1) çözücü sisteminde 48 saat bekletilerek çözücü ile tamamen şişmesi sağlandı. Daha sonra ekstre miktarına uygun olarak seçilen kolonun 2/3'sini dolduracak şekilde şişmiş haldeki poliklar adsorban yerleştirildi. Polikların kolona yerleştirilmesi, uzun süre alttan alınan çözücünün üstten devrettirilmesi ile sağlandı. Bir pipet yardımıyla ekstre çözeltisi kolonun üstünden poliklara yerleştirildi. Bu işlemler tamamlandıktan sonra kolon elüsyon çözeltisi ile yıkandı.

### **3.1.1.2. İnce Tabaka Kromatografisi**

İnce tabaka kromatografisi kalitatif ya da preparatif amaçlı olarak kullanılır. Kalitatif amaçlı çalışmalarda kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlar ince tabaka plaklar üzerine tatbik edilir. Daha sonra fraksiyonlarda kaç madde olduğunu görmek amacı ile uygun çözücü sistemlerinde yürütülürler. Preparatif amaçlı çalışmalarda ise çözücü sisteminin belirlenmesi yani fraksiyonlardaki

spotların kromatogram üzerinde uygun bir şekilde ayrılması ile spotlara ait bileşiklerin saflaştırılması mümkün olabilir. Flavonoidal bileşikler için adsorban olarak genellikle silikajel, selüloz ve poliamid kullanılır.

### **3.1.2. Spektrofotometrik Yöntemler**

#### **UV Spektrofotometresi**

Bileşiklerin metanolde çözülerek hazırlanan çözeltilerinin UV spektrumları PHILIPS, PU 8740 UV/VIS Spektrofotometre aletinde ölçüldü. Ayrıca flavonoid bileşiklerinin kayma spektrumlarının alınabilmesi için bileşiklerin metanoldeki çözeltisine sırasıyla NaOMe, AlCl<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub>/HCl, NaOAc ve NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> ilave edildi.

#### **IR Spektrofotometresi**

Bileşiklerin spektrumları PHILIPS, PU 9714 Infrared Spektrofotometresi'nde KBr tabletleri halinde veya NaCl kristalleri arasında ölçüldü.

#### **FTIR Spektrofotometresi**

Bileşiklerin FTIR spektrumları MATTSON 1000 FTIR spektrofotometresi'nde KBr tabletleri halinde ölçüldü.

#### **GC/MS**

Bileşiklerin GC/MS spektrumları Hewlett Packard GCMS, GC : 5890 plus II, MS : 5972 MSD'de ölçüldü.

### **3.1.3. Terpenoid ve Steroid Belirteçleri**

#### **3.1.3.1. Steroid Belirteçleri**

##### **Liebermann-Burchard Belirteci**

Bileşğin kloroformdaki çözeltisine birkaç damla asetanhidrid ilave edildikten sonra derişik sülfürik asid ile faz oluşturulur.

##### **Seriksülfat Belirteci**

2 g seryum (IV) sülfatın, % 10'luk 100 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'de çözülmesi ile hazırlanan belirteç, kromatografi plağına püskürtüldükten sonra plak 105 °C'deki etüvde 5-10 dakika lekeler belirinceye kadar bekletilir.

#### **3.1.3.2. Flavonoid Belirteçleri**

##### **NH<sub>3</sub> Buharı**

Kromatografi plakları NH<sub>3</sub> buharına tutulduktan sonra doğrudan ve UV (366 nm) ışık altında incelenir.

##### **NA Belirteci (Naturstoffreagenz A, difenil borik asit-2-aminoetilester)**

100 mg NA belirteci 100 ml metanol veya etanolde çözülerek hazırlanır.

Kromatografi plağı önce NH<sub>3</sub> buharına tutulur ve UV (366 nm) ışık altında incelenir. Daha sonra NA belirteci püskürtülür ve yine UV (366 nm) ışık altında incelenir.

### **3.1.3.3. UV Spektrumu Kayma Belirteçleri**

Bu belirteçler sadece flavonoidal bileşikler için kullanılır.

#### **Sodyum Metoksid Belirteci**

Küçük parçacıklar halinde yeni kesilen 2.5 g metalik sodyum 100 ml saf metanolde çözülerek hazırlanır.

#### **Aluminyum Klorür Belirteci**

5 g susuz aluminyum klorür (III)'ün, 100 ml saf metanolde çözülmesi ile hazırlanır.

#### **Hidroklorik Asit Çözeltisi**

50 ml derişik HCl, 100 ml distile suda çözülerek hazırlanır.

#### **Sodyum Asetat Belirteci**

Susuz, toz halinde saf sodyum asetat, kullanılmadan önce porselen bir krozede eritilerek asetik asitten kurtarılır.

#### **Borik Asit Belirteci**

Borik asit susuz, toz halinde veya 100 ml saf metanolde doymuş çözeltisi hazırlanarak kullanılabilir.

### 3.1.4. Uygulanan Kimyasal Reaksiyon

#### Asetilleme

5-10 mg bileşik, kuru bir erlen içerisinde konularak 1 ml susuz piridinde çözülür. Üzerine 1 ml asetanhidrid ilave edilir ve ağzı kapalı olarak 24 saat oda ısısında bekletilir. Bu sürenin sonunda 15-20 ml distile suya dökülerek kloroform ile ekstre edilir. Piridinden kurtarmak için birkaç kez su ile yıkanır ve kloroform vakumda uçurulur.

## 3.2. YAPILAN İŞLEMLER

### 3.2.1. Bitkinin Tüketilmesi ve Ekstrenin Elde Edilmesi

Bu çalışma, Çanakkale ili sahillerinin taşlık bölgelerinden Temmuz-Ağustos, 1995'de toplanan *Sarcopoterium spinosum* (L.) Spach. bitkisi üzerinde yapılmıştır. Çalışılan bitki, Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmosotik Botanik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ertan TUZLACI tarafından teşhis edildi ve aynı üniversitenin herbaryumunda MARE 4734 numarası ile kayıt edilmiştir.

Bitki kuru iken toplandı. Bitkinin kök, dal ve meyvaları ayrı ayrı öğütülerek inceleme yapıldı.

Bitkinin ; 110 g kök, 38 g dal ve 75 g meyva kısımları ayrı ayrı Sokslet cihazında n-hekzan, kloroform, etanol ve su çözücülerini ile ekstre edildi. Elde edilen ekstratlar düşük basınçta koyu şurup kıvamına kadar yoğunlaştırıldı. Daha sonra etüvde (düşük sıcaklıkta) çözücülerini tamamen uzaklaşmaya kadar bekletildi.

Tablo 3.1. Bitkinin köklerinin çeşitli çözücülerdeki ekstralarının genel görünüşleri

| <b>Çözücü</b> | <b>Görünüş</b>  |
|---------------|---|
| n-Hekzan      | Sarı-beyaz renkli, yağimsı  |
| Kloroform     | Sarı-kahverengi, yoğun, yağimsı   |
| Etanol        | Koyu kırmızı-kahverengi, yoğunlaştırılınca aynı renkte yapışkanimsı çökelti |
| Su            | Koyu kırmızı-kahverengi   |

Tablo 3.2. Bitkinin dallarının çeşitli çözücülerdeki ekstralarının genel görünüşleri

| <b>Çözücü</b> | <b>Görünüş</b>                     |
|---------------|------------------------------------|
| n-Hekzan      | Bulanık sarı-beyaz renkli, yağimsı |
| Kloroform     | Bulanık sarı-kahverengi, yağimsı   |
| Etanol        | Koyu kırmızı-kahverengi, çok yoğun |
| Su            | Koyu kırmızı-kahverengi            |

Tablo 3.3. Bitkinin meyvalarının çeşitli çözücülerdeki ekstralarının genel görünüşleri

| <b>Çözücü</b> | <b>Görünüş</b>                                       |
|---------------|--|
| n-Hekzan      | Açık sarı renkli, yağimsı                            |
| Kloroform     | Kızıl sarı, yağimsı, yoğun                           |
| Etanol        | Koyu kırmızı, yoğunlaştırılınca yağimsı ve çok yoğun |
| Su            | Koyu kırmızı-kahverengi                              |

*Sarcopoterium spinosum* bitkisinin kök, dal ve meyvalarından elde edilen ekstrelerde, bulunabilecek bileşikler hakkında ön fikir edinebilmek için silikajel ve selüloz plaklarda değişik çözücülerle ince tabaka kromatografileri yapıldı. Bunun sonucunda benzer özellikler gösteren ;  
kök, dal ve meyvaların hekzan ekstreleri,  
kök ve dalların kloroform ekstreleri,  
meyvaların ve köklerin alkol ekstreleri,  
dalların alkol ekstreleri ve meyvaların kloroform ekstreleri  
ayrı ayrı kolonlarda fraksiyonlandırıldı.

### **3.2.2. Ekstrelerin Fraksiyonlandırılması ve Bileşiklerin Ayrılması**

#### **Hekzan Ekstresi**

Bitkinin kök, dal ve meyvalarının birleştirilmesi ile elde edilen 2.42 g hekzan ekstresi çok az miktar hekzanda çözülerek aynı miktar silikajel ile karıştırıldı. Çözücüsü kuruluğa kadar buharlaştırıldı.

62 x 4.5 cm boyutlarındaki cam kolona yaş yöntem ile silikajel dolduruldu. Yaş yöntemde, hekzan ile karıştırılan silikajel homojen halde yavaş yavaş kolona yerleştirildi. Silikajelin tamamen yerleşmesi için kolon çözücü ile tekrar tekrar yıkandı ve hazırlanan hekzan ekstresi kolona yerleştirildi. Elüsyona hekzan ile başlandı ve % 10 artan oranlarda kloroforma kadar geçilerek 100 ml'lik kısımlar halinde 94 tane fraksiyon alındı. Fraksiyonlar ince tabaka kromatografisi ile doğrudan UV ışık altında ya da seriksülfat belirteci püskürtülerek etüvde (105 °C) 5-10 dak. yakılarak inceleme yapıldı. Ekstrelerden BH<sub>1</sub> bileşiği izole edildi.

### **Kloroform Ekstresi**

Bitkinin meyvalarının 1.80 g'lık kloroform ekstresi 68 x 3.4 cm boyutlarındaki cam kolonda incelendi. Kolon, yaş yöntem kullanılarak silikajel ile dolduruldu. Kloroform ekstresi kolona tamamen yerleştikten sonra elüsyona kloroform ile başlanıp % 10 artan oranlarda etanole kadar geçildi. 100 ml'lik kısımlar halinde 63 tane fraksiyon alındı. Fraksiyonlar ince tabaka kromatografisi ile hem doğrudan UV ışık altında hem de seriksülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105 °C de 5-10 dak. yakılarak incelendi. Ekstrelerden MK<sub>1</sub> ve MK<sub>2</sub> bileşikleri izole edildi.

### **Etanol Ekstresi**

Bitkinin köklerinin ve meyvalarının birleştirilmesi ile elde edilen 16.3 g alkol ekstresi 62 x 4.5 cm boyutlarındaki cam kolonda incelendi. Yaş yöntem kullanılarak silikajel kolona yerleştirildi. Elüsyona 2:1 Kloroform : Etanol çözücü sistemi ile başlandı. Etanol oranı artırılarak tamamen etanole ve tekrar % 10'luk artışlarla metanole kadar geçildi. 100 ml'lik kısımlar halinde 98 tane fraksiyon alındı. Fraksiyonlar ince tabaka kromatografisi ile doğrudan UV ışık altında ve seriksülfat belirteci püskürtülerek incelendi. Benzer spot gösteren maddeler birleştirildi ve önemli görülenler 20 x 2.5 cm boyutlarındaki poliklar kolonda ve selüloz plaklarda temizlendi. Bu ekstrelerden EE<sub>1</sub>, BF<sub>1</sub> ve BF<sub>2</sub> bileşikleri izole edildi.

Elde edilen bileşiklerin kristal görüntüleri Leitz DMRP & RXP Polarizasyon mikroskobu ve WILD MPS 48/52 kamerası ile alındı. Bileşiklerin erime ve bozunma noktaları da yine aynı mikroskobun Linkam ısıtıcı tablası üzerinde incelendi.

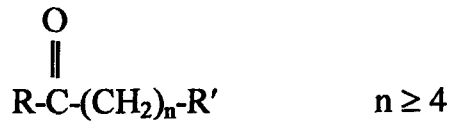
**BU ÇALIŞMADA KULLANILAN KİMYASAL MADDELER**

- Hekzan (n-Hexane extra pure, Merck, 4368)  
Kloroform (Chloroform extra pure, Merck, 2431)  
Etanol (CaO üzerinden destillenerek saflaştırıldı)  
Metanol (Methanol extra pure, Merck, 6008)  
Benzen (Benzene extra pure, Merck, 1782)  
Dietileter (Diethylether extra pure, Merck, 926)  
Etilasetat (Ethylacetat extra pure, Merck, 864)  
Asetik asit (Acetic acid % 90 extra pure, Merck, 58)  
Sülfürik asit (sulfuric acid extra pure, Merck, 713)  
Hidroklorik asit (Hydrochloride acid fuming extra pure, Merck, 314)  
Amonyak (Ammonia sol. extra pure, Merck, 5422)  
Borik asit (Boric acid cryst. extra pure, Merck, 160)  
Sodyum asetat (Sodium acetate anhydrous, Merck, 6268)  
Sodyum (Sodium rod diameter 2.5 cm, Merck, 6260)  
Aluminyum klorür (Pure cryst., Riedel, 11016)  
Seryum (IV) sülfat (extra pure, Merck, 2267)  
NA (2-Aminoethyl diphenylborinate, Merck, 42810)  
Asetik asit anhidridi (Acetic anhydride for synthesis, Merck, 822278)  
Piridin (extra pure, Merck, 7462)  
Kalsiyum oksid (Merck, 2112)

### 3.3. BU ÇALIŞMADA ELDE EDİLEN BİLEŞİKLER

#### HİDROKARBONLAR

##### 3.3.1. BH<sub>1</sub> (MK<sub>1</sub>) Bileşiği = Alifatik Yağ Ketonu



R' = H veya alkil

Bileşik, bitkinin hekzan (BH<sub>1</sub>) ve kloroform (MK<sub>1</sub>) fraksiyonlarında bulundu. Bileşiğin ince tabaka kromatografisinde polaritesi düşük çözücülerle R<sub>f</sub> değeri yüksek bulunmuştur. Bu da BH<sub>1</sub> bileşiğinin hidrokarbon olabileceğini düşündürdü.

Bileşik sarı yağmsı görünümde sıvı bir maddedir. Seryum (IV) sülfat belirteci ile kahverengi leke görülmektedir.

#### Bileşiğin Spektral Özellikleri

Bileşiğin UV spektrumunda (Şekil 3.1), 242 nm'de maksimum adsorpsiyon piki verir. IR spektrumunda (Şekil 3.2) 2900-2850 cm<sup>-1</sup>'de (C-H) gerilim bandları, 1710 cm<sup>-1</sup>'deki keskin pik (C = O) grubuna ait bandlardır. 740 cm<sup>-1</sup>'de ise karakteristik yağ piki görülür.

Elde edilen sonuçlar BH<sub>1</sub> bileşiğinin yukarıda verilen yapıda olabileceğini doğrulamıştır.

**Bileşğin Fiziksel Özellikleri**

Renk = Sarı yağimsı sıvı

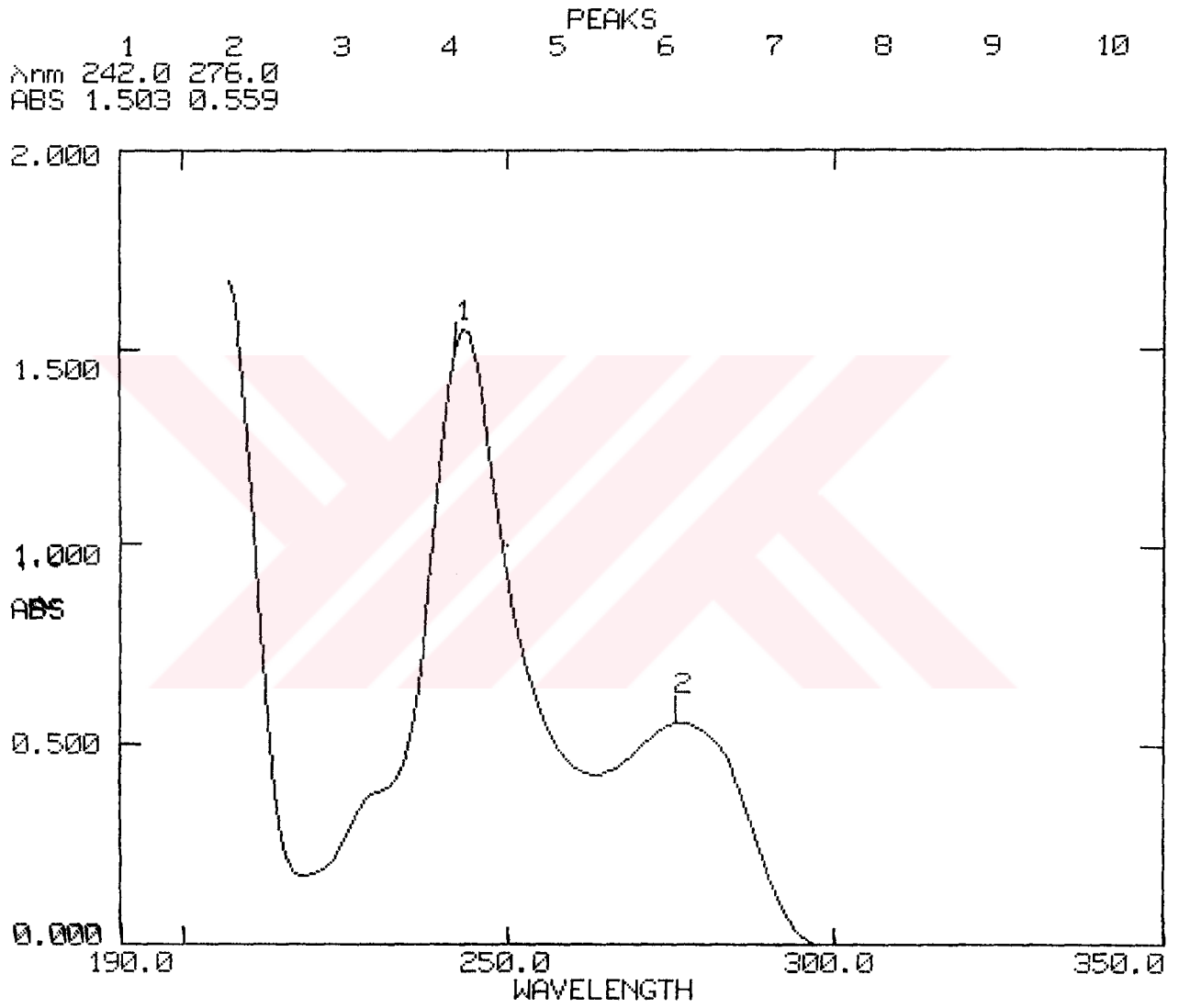
e.n. = 48 °C

R<sub>f</sub> değeri = 0.49 (1: 4 : 4 Kloroform/Hekzan/Benzen)

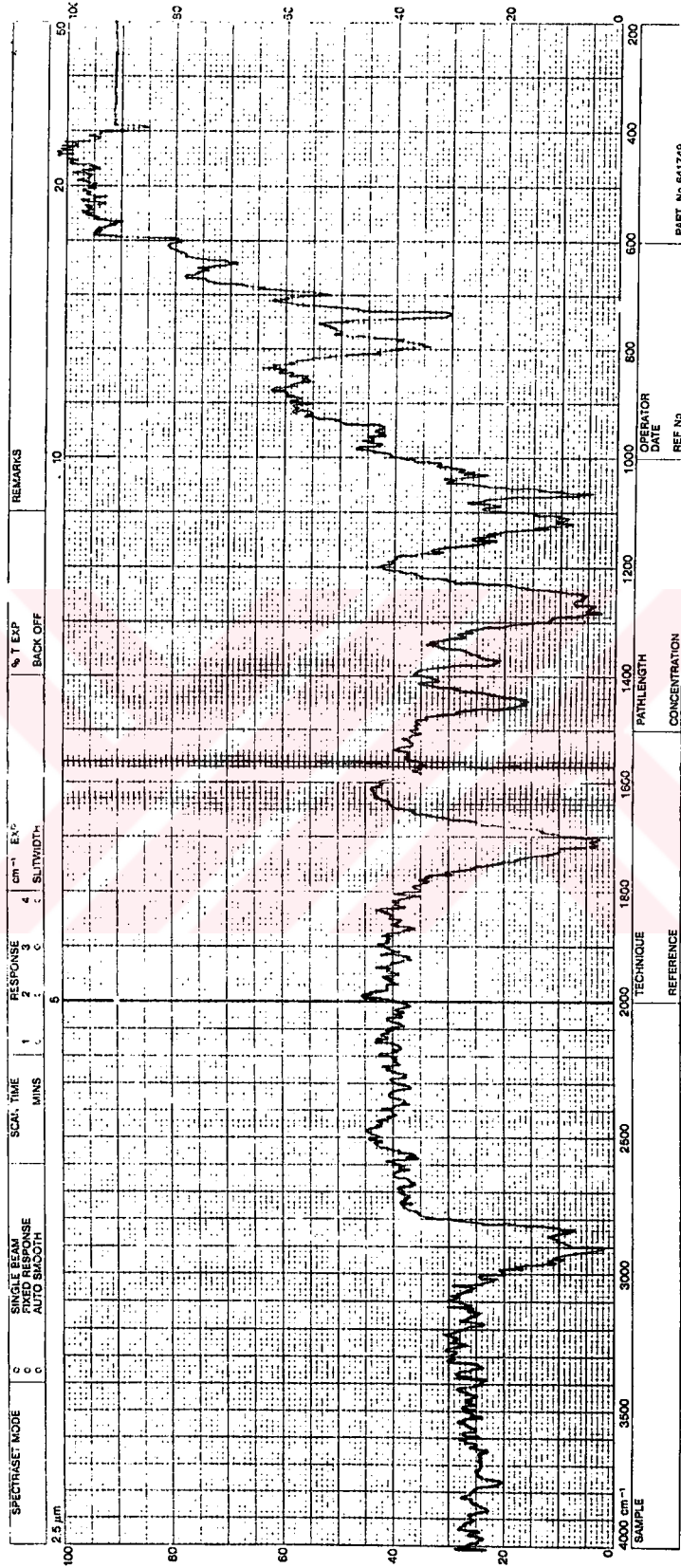
UV (254) = açık kahverengi

Seryum (IV) sülfat belirteci = kahverengi



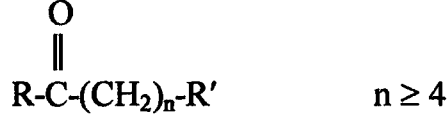


Şekil 3.1. BH<sub>1</sub> (MK<sub>1</sub>) Bileşiği UV Spektrumu



Şekil 3.2. BH<sub>1</sub> (MK<sub>1</sub>) Bileşiği IR Spektrumu

### 3.3.2. MK<sub>2</sub> Bileşiği = Alifatik Yağ Ketonu



R' = H veya alkil

Bitkinin meyvalarının kloroform fraksiyonundan elde edilen MK<sub>2</sub> bileşiğinin, apolar çözücüler ile yapılan ince tabaka kromatografilerinde plağın üst kısımlarına kadar yürüdüğü görüldü. MK<sub>2</sub> bileşiği sarı renkli katı bir maddedir. Seryum (IV) sülfat belirteci ile kahverengi leke görülmektedir.

#### Bileşiğin Spektral Özellikleri

UV spektrumunda (Şekil 3.3), 206 nm'de absorpsiyon piki görüldü. Bileşiğin IR spektrumunda (Şekil 3.4), 1710 cm<sup>-1</sup>'de (C = O) piki, 740 cm<sup>-1</sup>'de ise karakteristik yağ piki verir.

Kromatografik ve spektral incelemeler sonucu, MK<sub>2</sub> bileşiğinin yukarıda verilen formül yapısında olduğunu göstermiştir.

MK<sub>2</sub> bileşiği, BH<sub>1</sub> bileşiğine benzemesine rağmen, R<sub>f</sub> değeri, UV ve IR spektrumları farklı olan yağımsı bir katıdır. Bu farklılıkların karbon sayılarının farklı olmasından kaynaklandığı düşünölmüştür.

**Bileşimin Fiziksel Özellikleri**

Renk = Sarı yağimsı katı

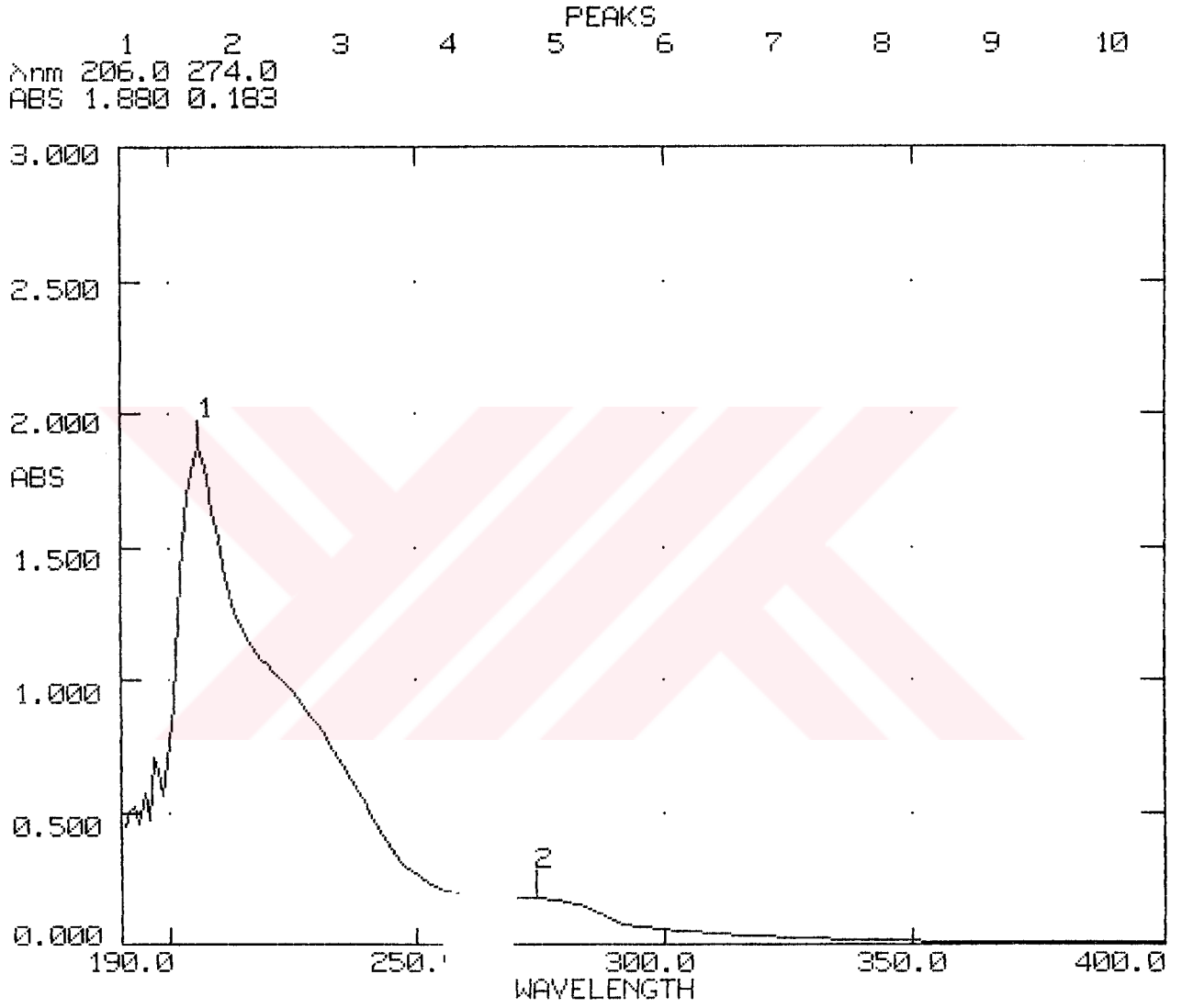
e.n. = 103 °C

R<sub>f</sub> değeri = 0.84 (1 : 10 Kloroform/Etanol)

UV (254) = açık kahverengi

Seryum (IV) sülfat belirteci = koyu kahverengi



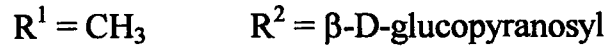
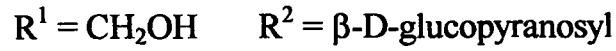
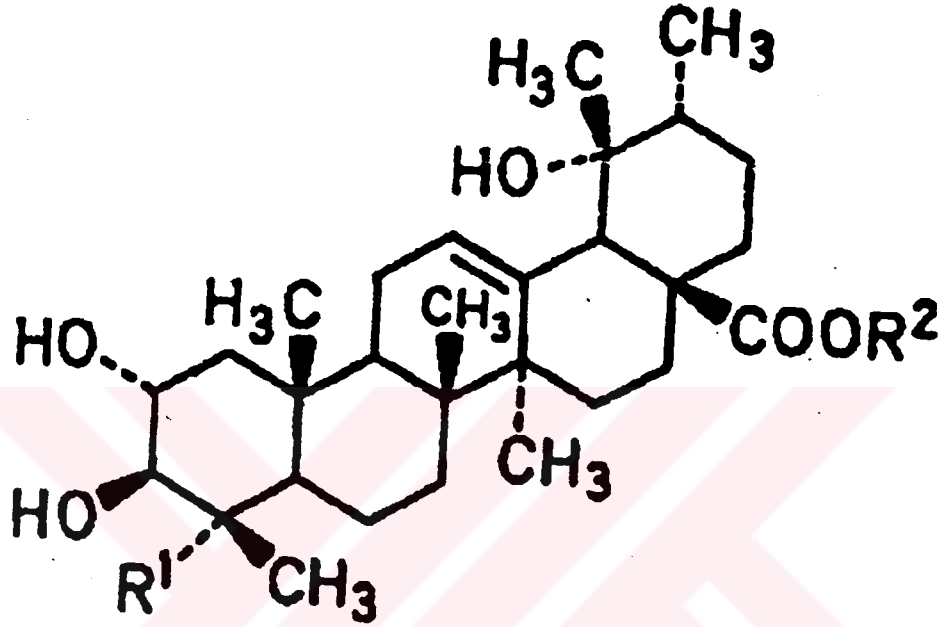


Şekil 3.3. MK<sub>2</sub> Bileşiği UV Spektrumu



## TERPENOİD BİLEŞİĞİ

### 3.3.3. EE<sub>1</sub> Bileşiği



Bitkinin alkol ekstresinin ilk fraksiyonlarının (2-18) küçük bir kolonda tekrar fraksiyonlandırılması (2-8) ile elde edilen bu maddenin TLC'de yürütülmesi tek bir spot gösterdi.

Bu maddenin UV ışık (366 nm) altında renkli spot göstermemesi ve alkol ekstresinin ilk fraksiyonlarından alınmış olması EE<sub>1</sub> bileşiğinin Reher ve arkadaşlarının (1991) çalışmalarında izole ettikleri triterpenoidlerin yapısında olabileceğini düşündürmüştür.

### **Bileşğin Spektral Özellikleri**

EE<sub>1</sub> bileşğinin UV spektrumunda (Şekil 3.5) 220 nm'de maksimum absorpsiyon piki görölmüştür. IR spektrumunda (Şekil 3.6) 3413 cm<sup>-1</sup>'de (OH), 1728 cm<sup>-1</sup>'de (-COO-) ve 1620 cm<sup>-1</sup>'de (C = C) bantları bulunmaktadır.

EE<sub>1</sub> bileşğinin asetil türevinin IR spektrumunda (Şekil 3.7) ise hidroksil piki kaybolmuş, 1750 cm<sup>-1</sup>'de asetil bandı ile ester bandı birleşerek belirgin bir bant görölmüştür.

Bileşğın total GC/MS spektrumunda (Şekil 3.8) görölen belirgin piklerin ayrı ayrı GC/MS'leri çekildi. Ayrıca total GC/MS'in 14.135 ile 14.325 kısımları β-D-glucopyranosyl ile karşılaştırıldı (Şekil 3.9) ve büyük bir oranda benzerlik göröldü. Spektrumdaki bölünmeler triterpenlerin bölünmelerine uymaktadır (Persaud, 1968).

### **Bileşğın Fiziksel Özellikleri**

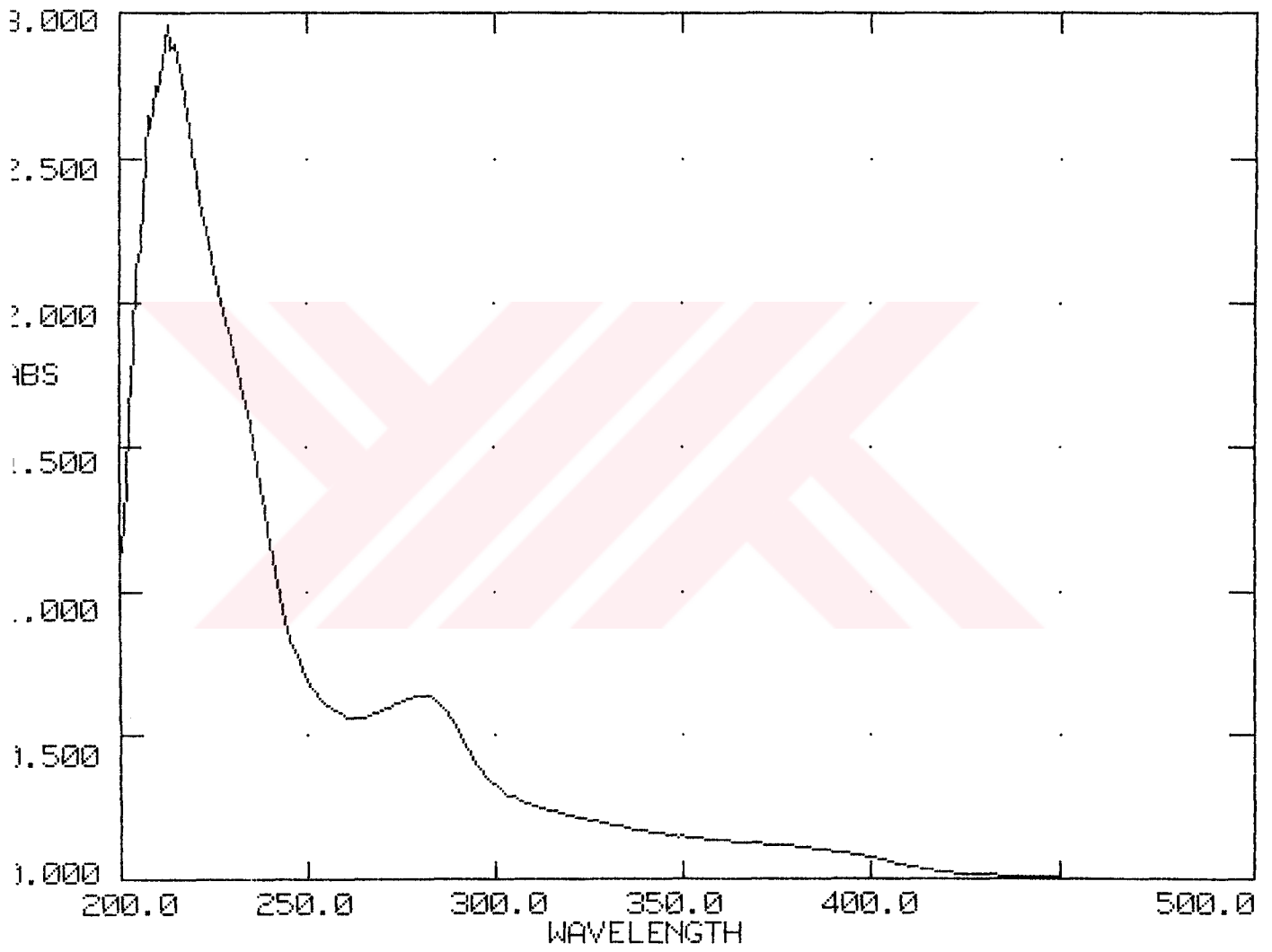
Renk = Sarı, amorf, katı

e.n. = 278 °C

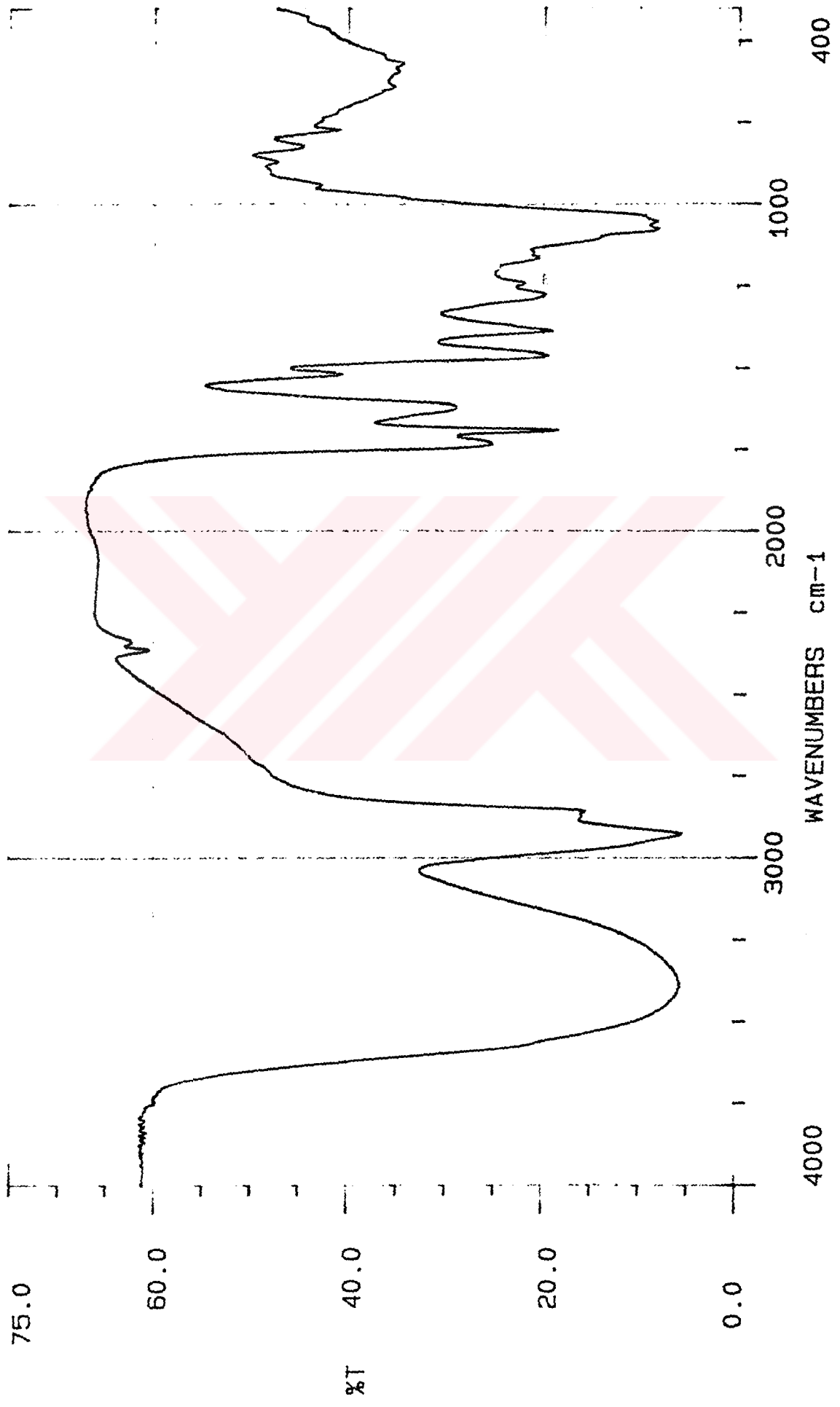
R<sub>f</sub> değeri = 0.88 (1 : 10 Kloroform/Etanol)

UV (254) = koyu kahverengi

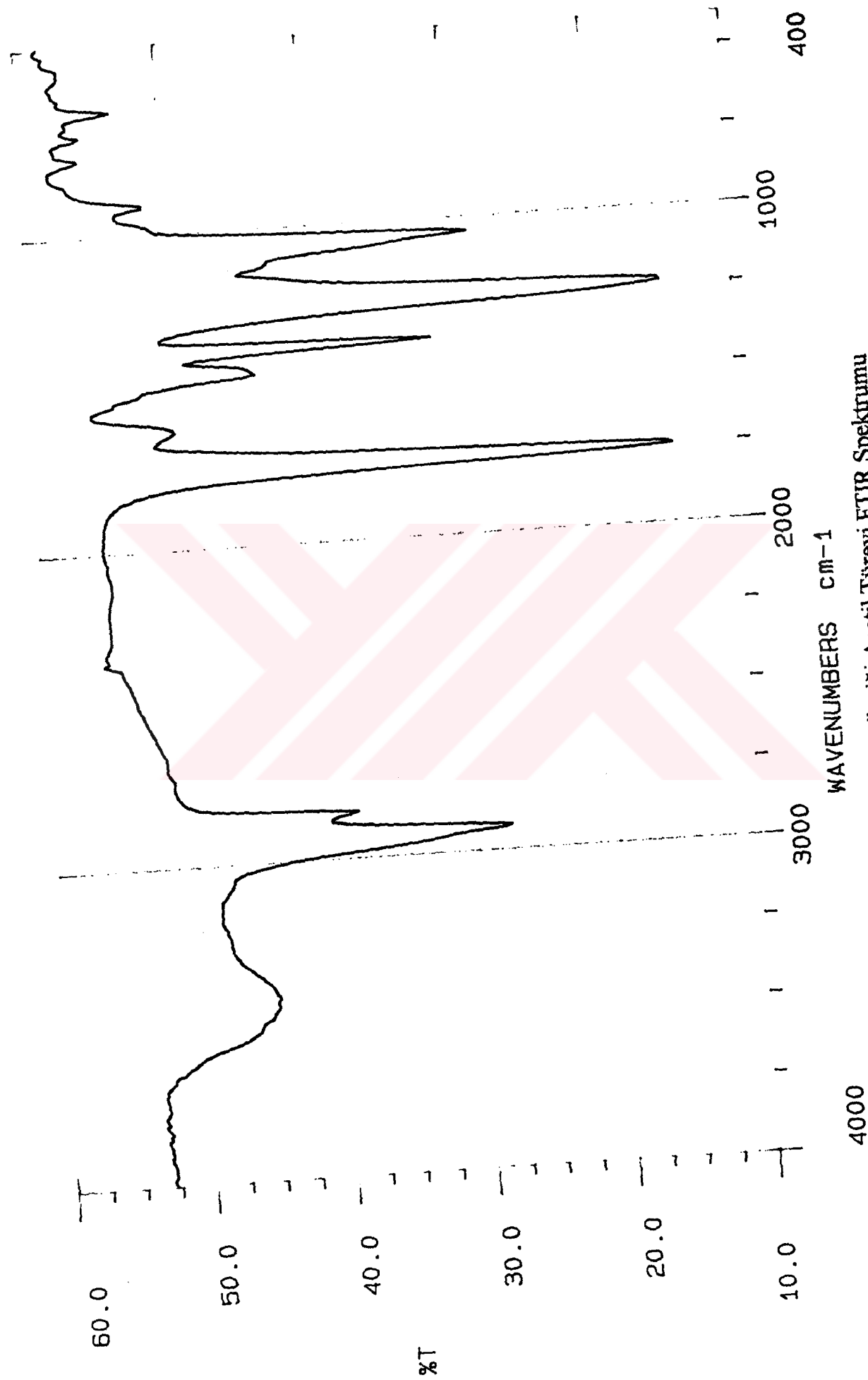
Seryum (IV) sülfat belirteci = kızıl kahverengi



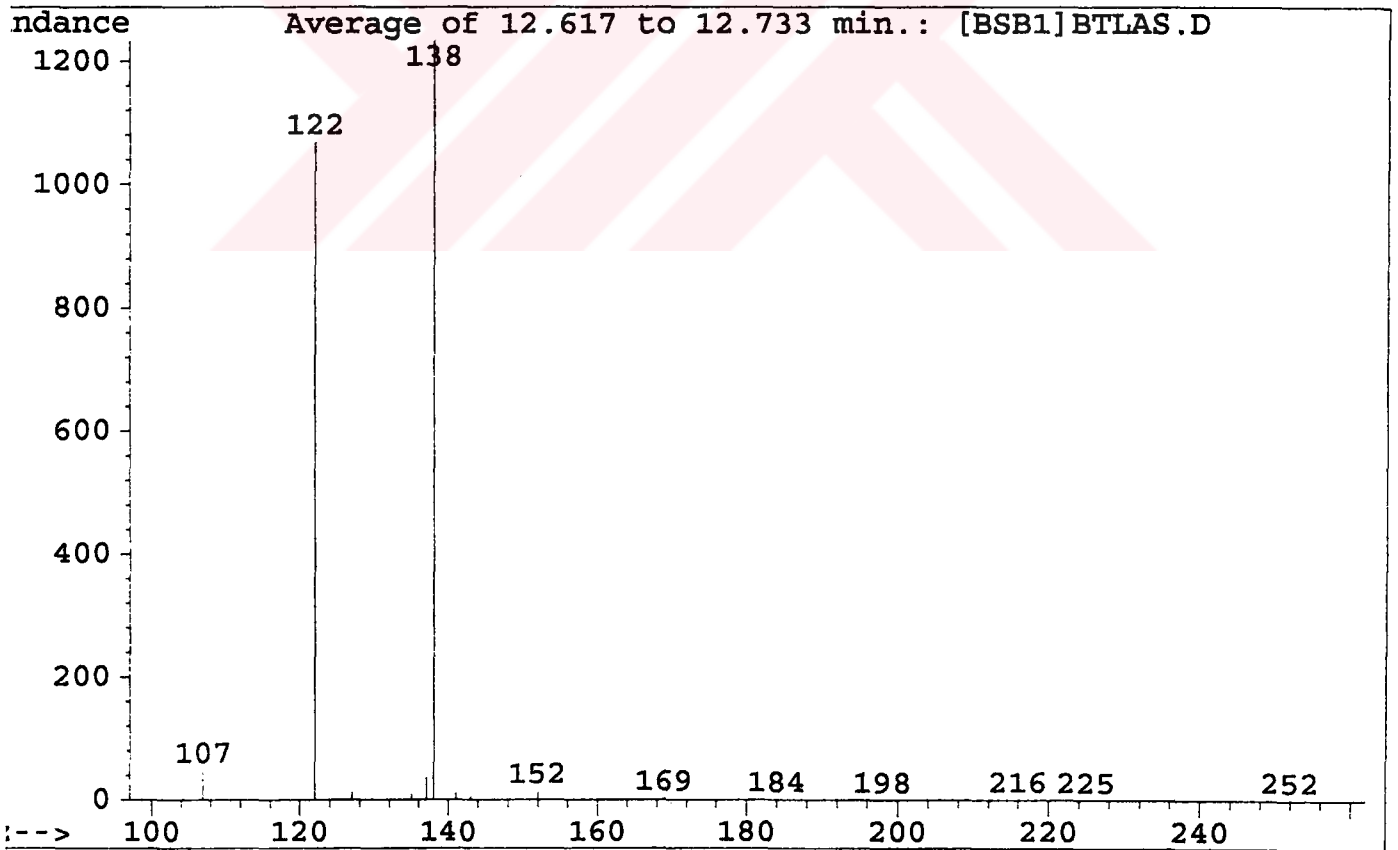
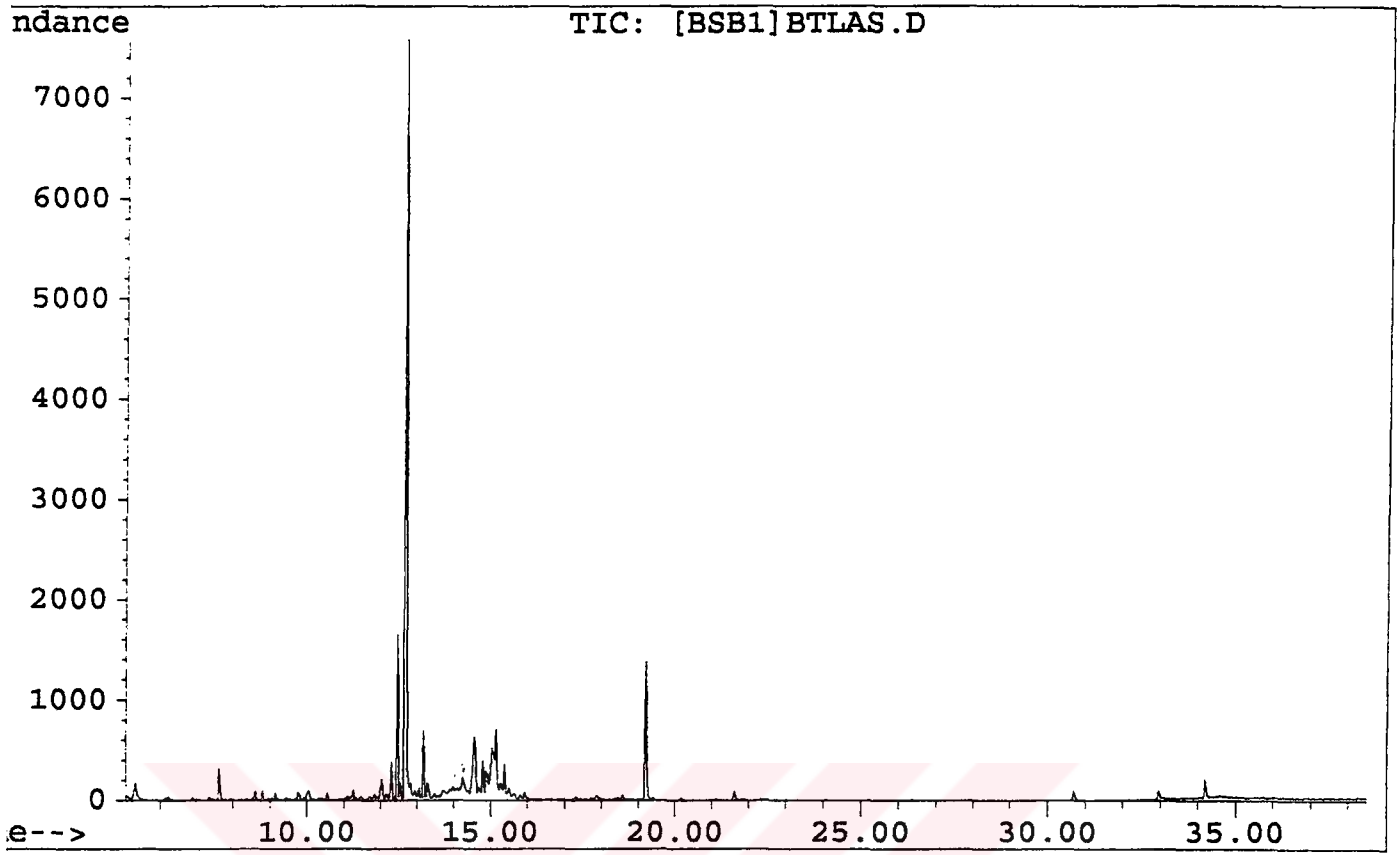
Şekil 3.5. EE<sub>1</sub> Bileşiği UV Spektrumu



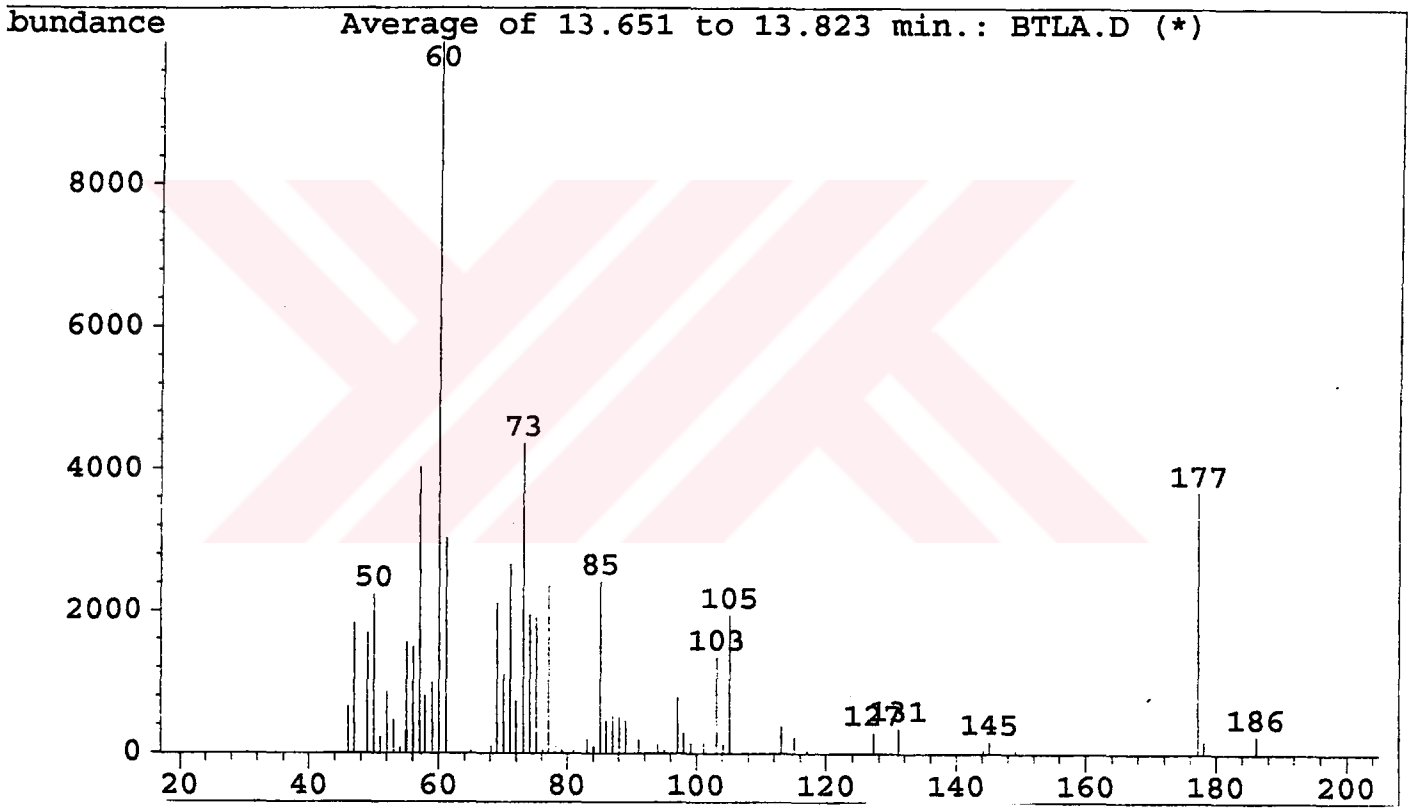
Şekil 3.6. EE<sub>1</sub> Bileşiği FTIR Spektrumu



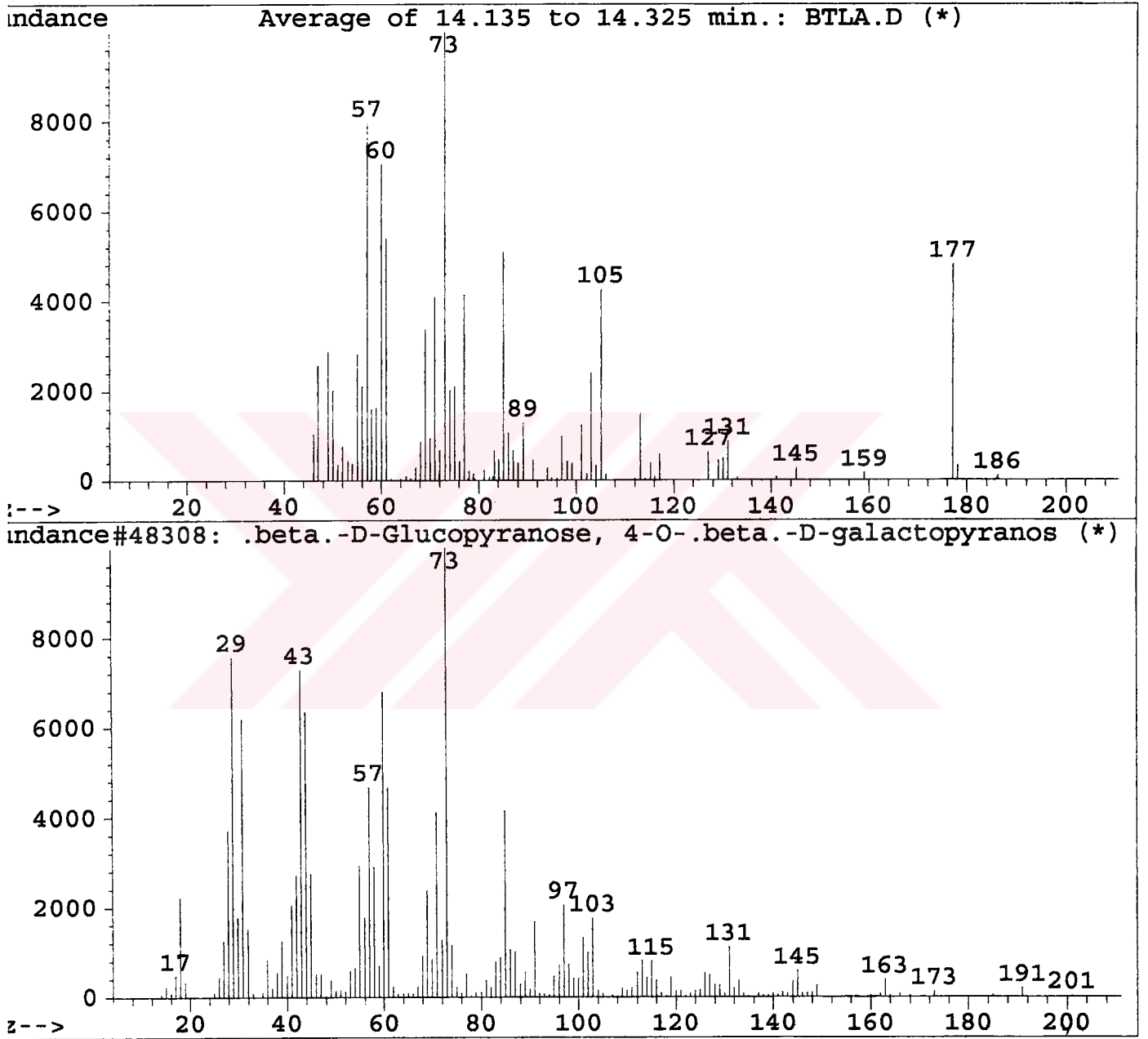
Şekil 3.7. EE<sub>1</sub> Bileşiği Asetil Türevi FTIR Spektrumu



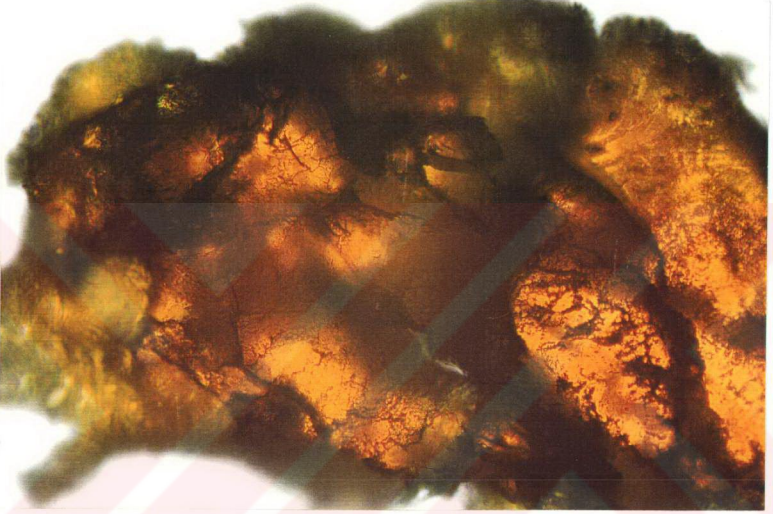
Şekil 3.8. EE<sub>1</sub> Bileşiği GC/MS Spektrumu



Şekil 3.8'in devamı



Şekil 3.9. EE1 Bileşiği (GC/MS Spektrumu 14.135 ile 14.325 arası) ile  $\beta$ -D-Glucopranosyl'in Karşılaştırılması

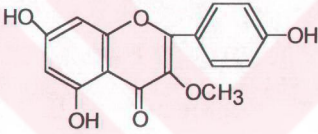


Resim 3.1. EE<sub>1</sub> bileşğinin kristal görünümü.

## FLAVONOİDAL BİLEŞİKLER

BF<sub>1</sub> ve BF<sub>2</sub> bileşiklerinin kromatografik ve spektroskopik yöntemlerle elde edilen sonuçları, bu bileşiklerin flavonoidal yapıda olduğunu göstermiştir. BF<sub>1</sub> ve BF<sub>2</sub> bileşiklerinin yapılarında flavonoidlerin tanınması için kullanılan yöntemlerden yararlanılarak yapılmıştır.

### 3.3.4. BF<sub>1</sub> Bileşiği



Renk = Kızılımsı sarı

Bozunma Noktası = 210-235 °C

R<sub>f</sub> Değeri = 0.53 (%60 AcOH)

UV (366 nm) = Koyu mor

NH<sub>3</sub>/UV = Sarı

NA/UV = Turuncu

Sarı renkli olan BF<sub>1</sub> bileşiği UV ışık altında koyu mor, NH<sub>3</sub> buharı ile sarı ve NA belirteci ile turuncu renk vermektedir. Bileşiğin bu renk reaksiyonlarını göstermesi sonucu 5-OH açık, 3-OH yok ya da kapalı ve 3',4'-OH açık olabileceğini söyleyebiliriz. Bileşiğin metanolde çözülerek alınan UV spektrumunda Bant I'in 330 nm'de ve Bant II'nin 280 nm'de absorpsiyon bantları vermesi ayrıca renk reaksiyonları göstermesi flavon yapısını doğrulamaktadır.

Bileşğin IR spektrumunda (Şekil 3.10)  $1620\text{ cm}^{-1}$ 'de pik görülmesi 5-OH varlığını gösterir.  $2950\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen pik yapıdaki  $-\text{OCH}_3$  grubundan ileri gelmektedir.

Metanol spektrumunda (Şekil 3.11) Bant I'in  $330\text{ nm}$ 'de görülmesi 3-OH'ın sübstitüe olduğunu, belirgin bir Bant II'nin görülmesi de A halkasında oksijenli sübstitüentlerin varlığını gösterir. Ayrıca  $280\text{ nm}$ 'de görülen tek pik yapıda 4'-OH olabileceğini ortaya çıkarır.

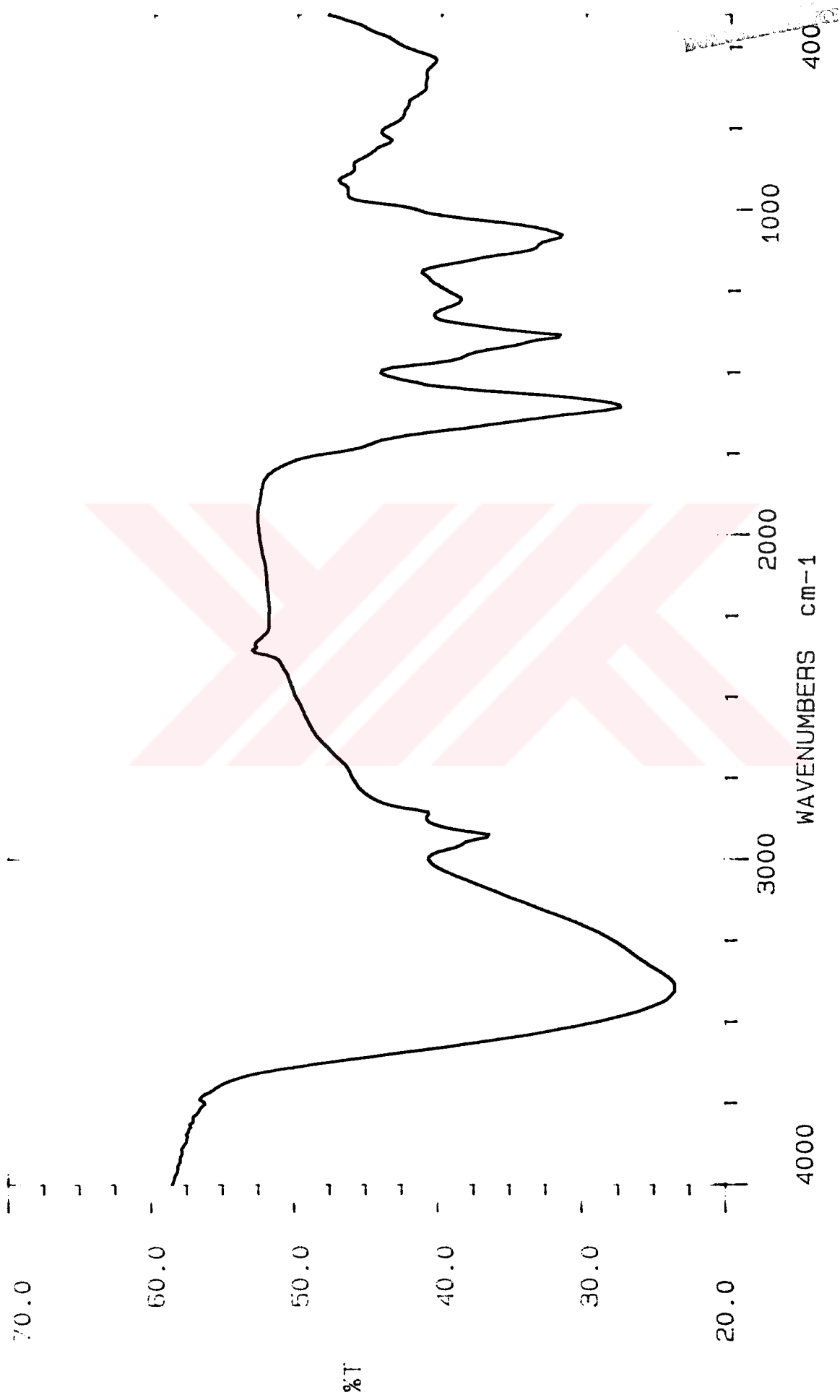
NaOMe spektrumunda, Bant I'in  $35\text{ nm}$ 'lik batokromik kayma göstermesi 4'-OH'ın varlığını ve  $330\text{ nm}$ 'deki pik de 7-OH varlığını gösterir.

$\text{AlCl}_3$  spektrumunda (Şekil 3.12) Bant I'in metanol spektrumuna göre uzun dalga boyuna kayması 5-OH'ın açık olduğunu ve  $\text{AlCl}_3$  spektrumu ile  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$  spektrumunun hemen hemen aynı görülmesi bileşikte o-dihidroksi konumunda hidroksiller olmadığını gösterirken, NaOAc spektrumunun NaOAc/ $\text{H}_3\text{BO}_3$  spektrumuna göre (Şekil 3.13) Bant I'e ait pikinde uzun dalga boyuna doğru bir kayma göstermemesi o-dihidroksi gruplarının olmadığını doğrulamaktadır.

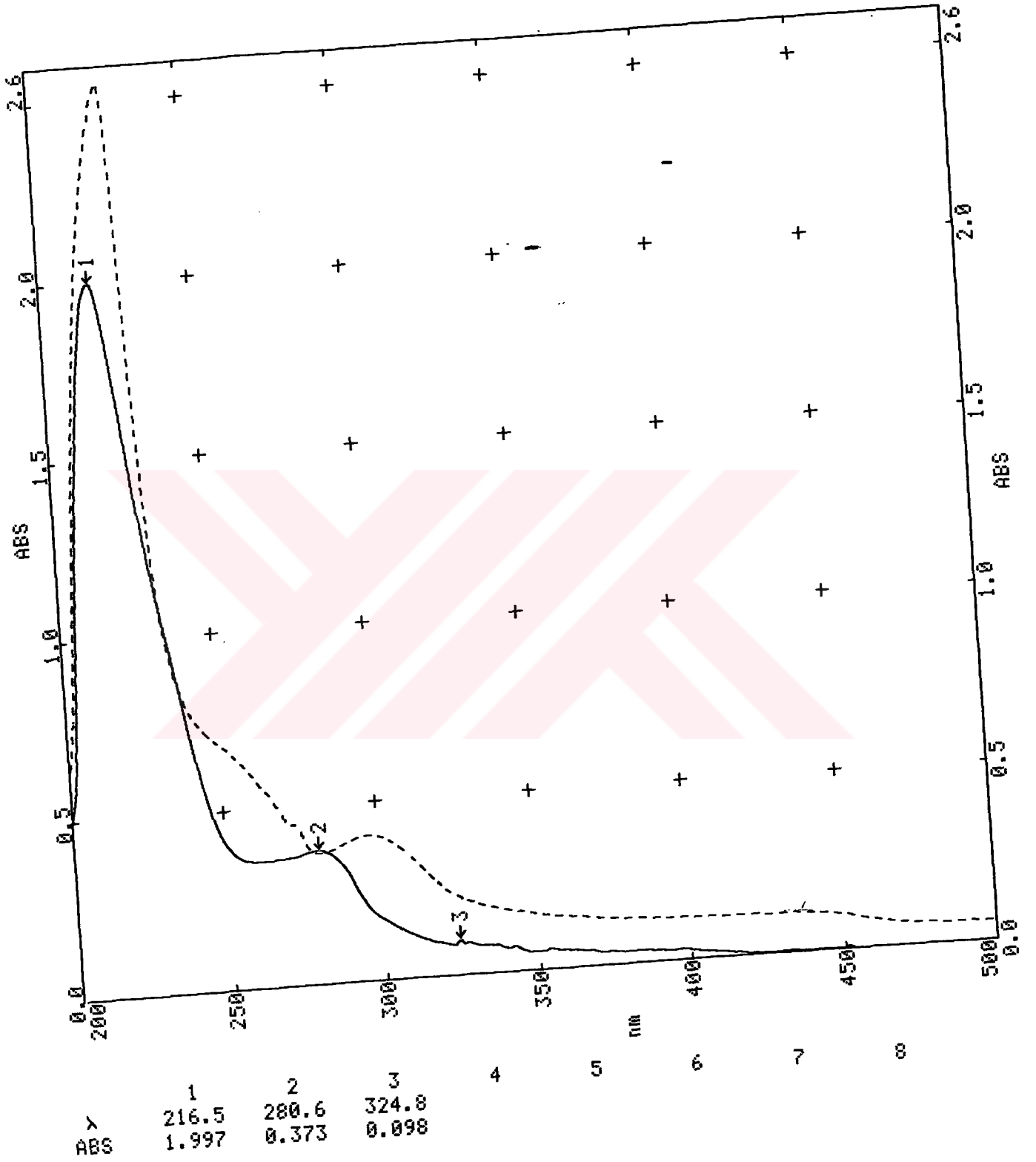
Bileşğin GC/MS spektrumunda (Şekil 3.14) ;

|   |   |
|---|---|
| GC/MS : $m/z = 299$ $[\text{M}-\text{H}]^+$ | $m/z = 267$ $[\text{M}-\text{OCH}_3]^+$   |
| $m/z = 207$ $[\text{M}-93]^+$               | $m/z = 177$ $[\text{M}-93-31]^+$          |
| $m/z = 149$ $[\text{B}_1]^+$                | $m/z = 133$ $[\text{A}_1-\text{OH}]^{++}$ |
| $m/z = 91$ $[\text{B}_1-56]^+$              |   |

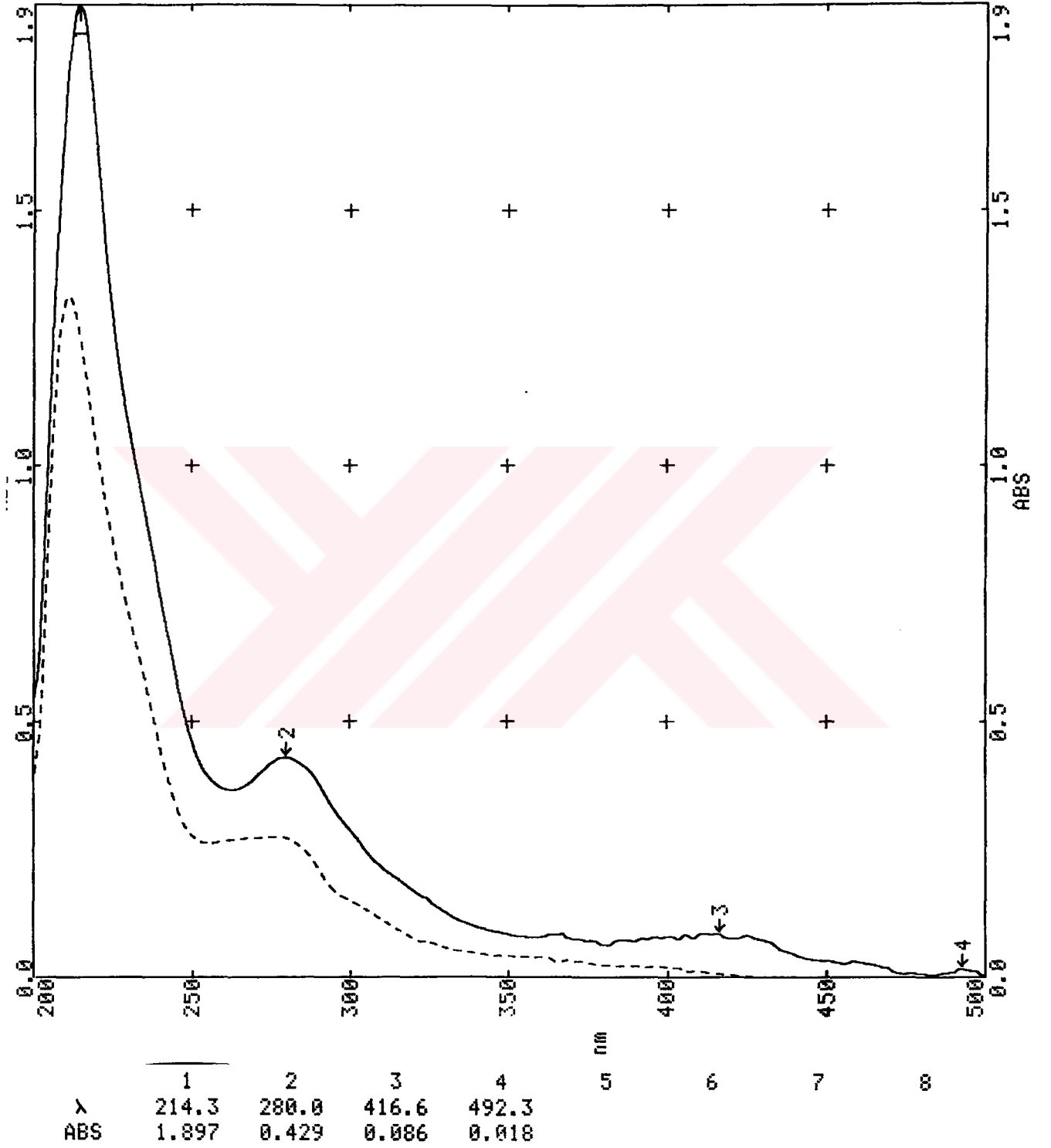
Bütün bu veriler sonucu yapının 5,7,4'-trihidroksi, 3-metoksi flavonol olabileceği ortaya çıkmaktadır.



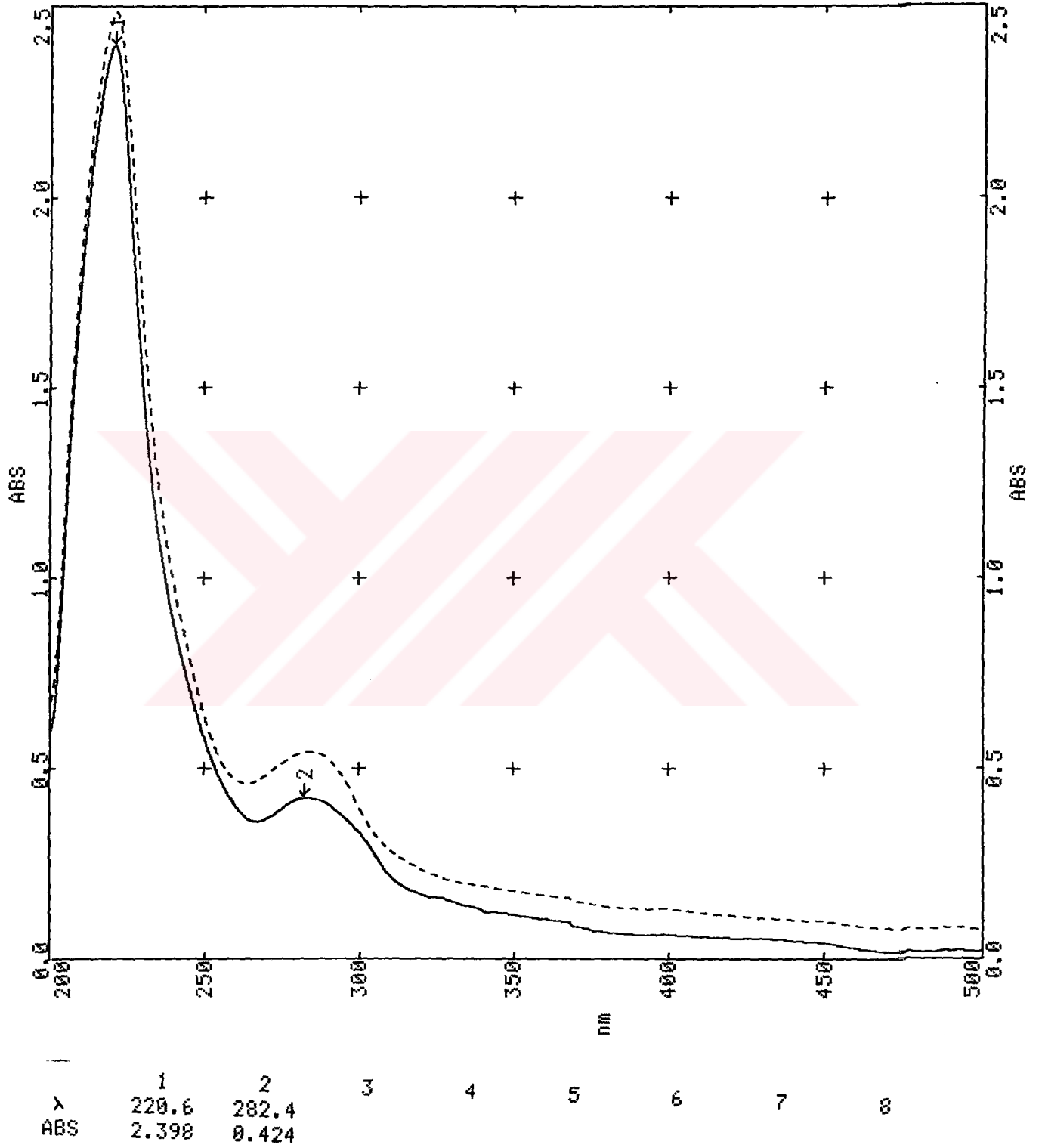
Şekil 3.10.  $\text{BF}_1$  Bileşiği FTIR Spektrumu



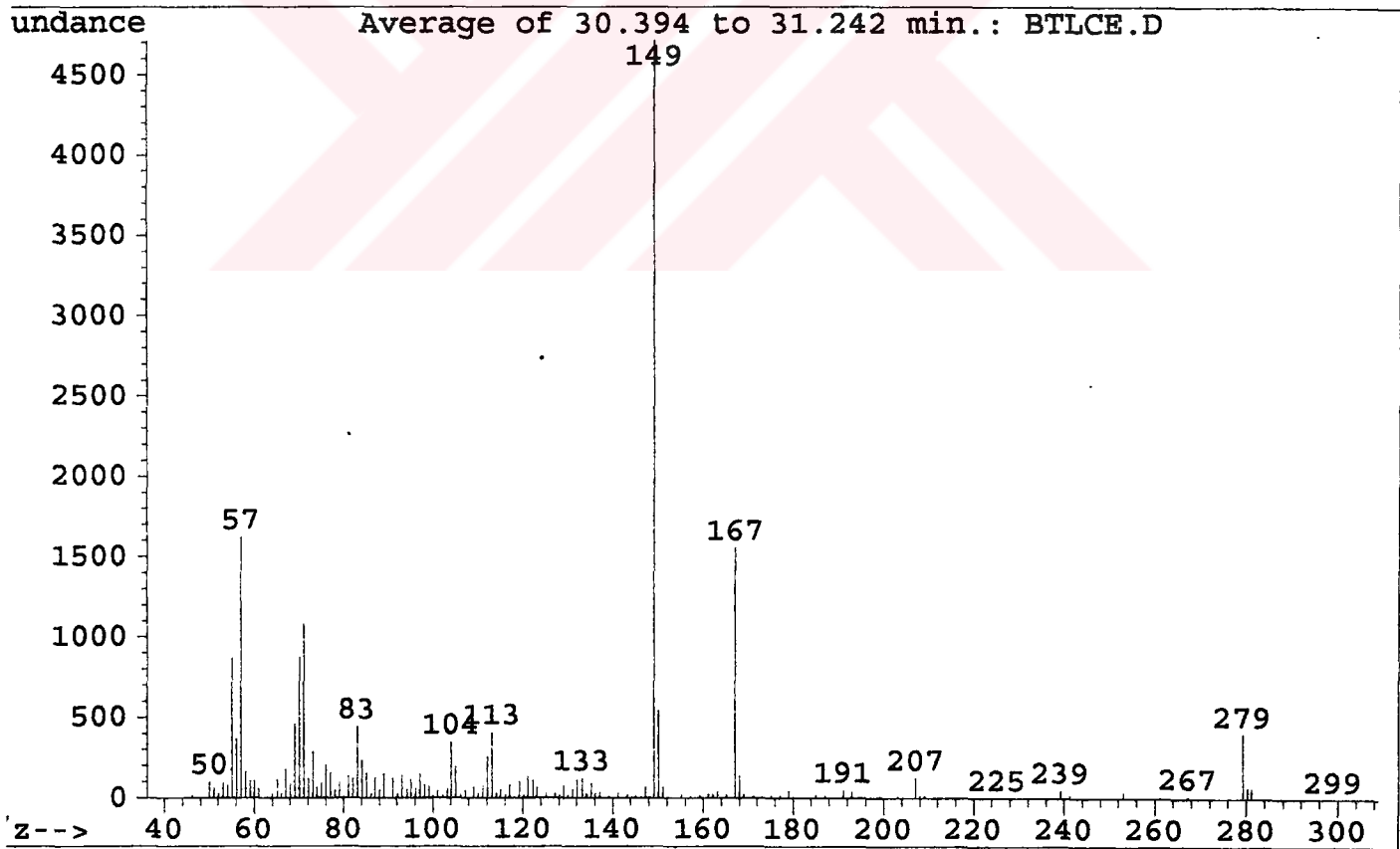
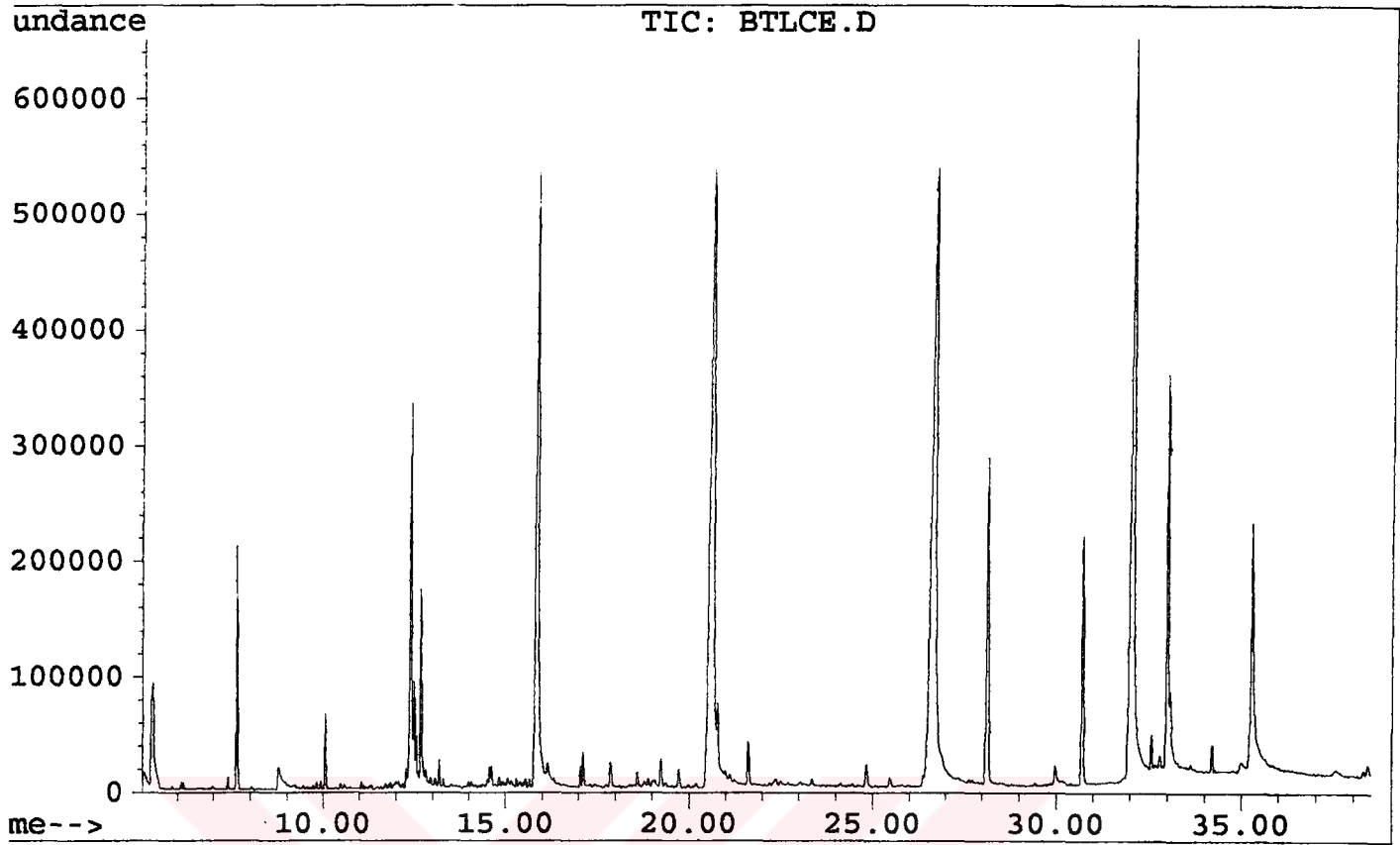
Şekil 3.11.  $BF_1$  Bileşiği MeOH ( — ) ve NaOMe ( - - ) UV Spektrumu



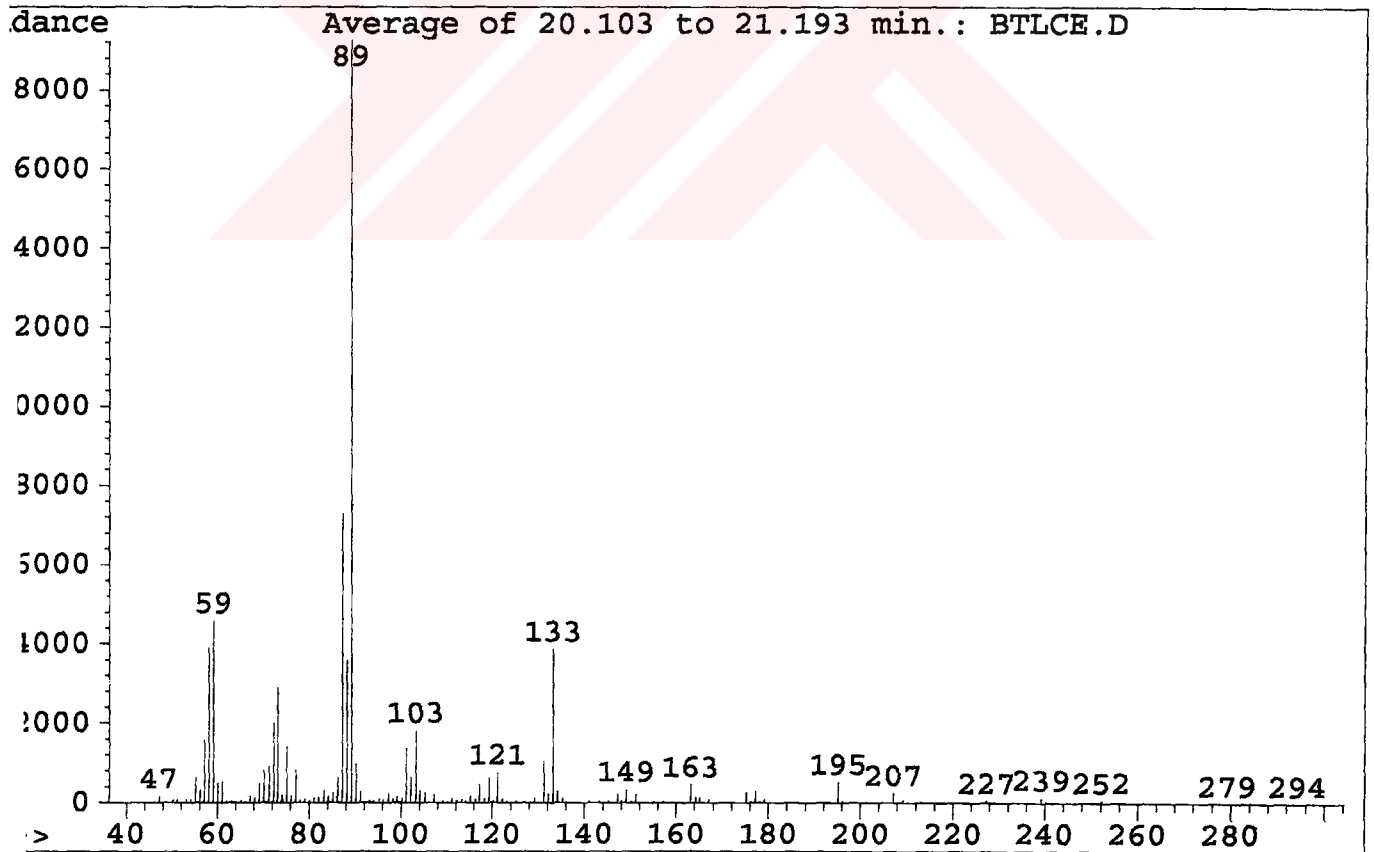
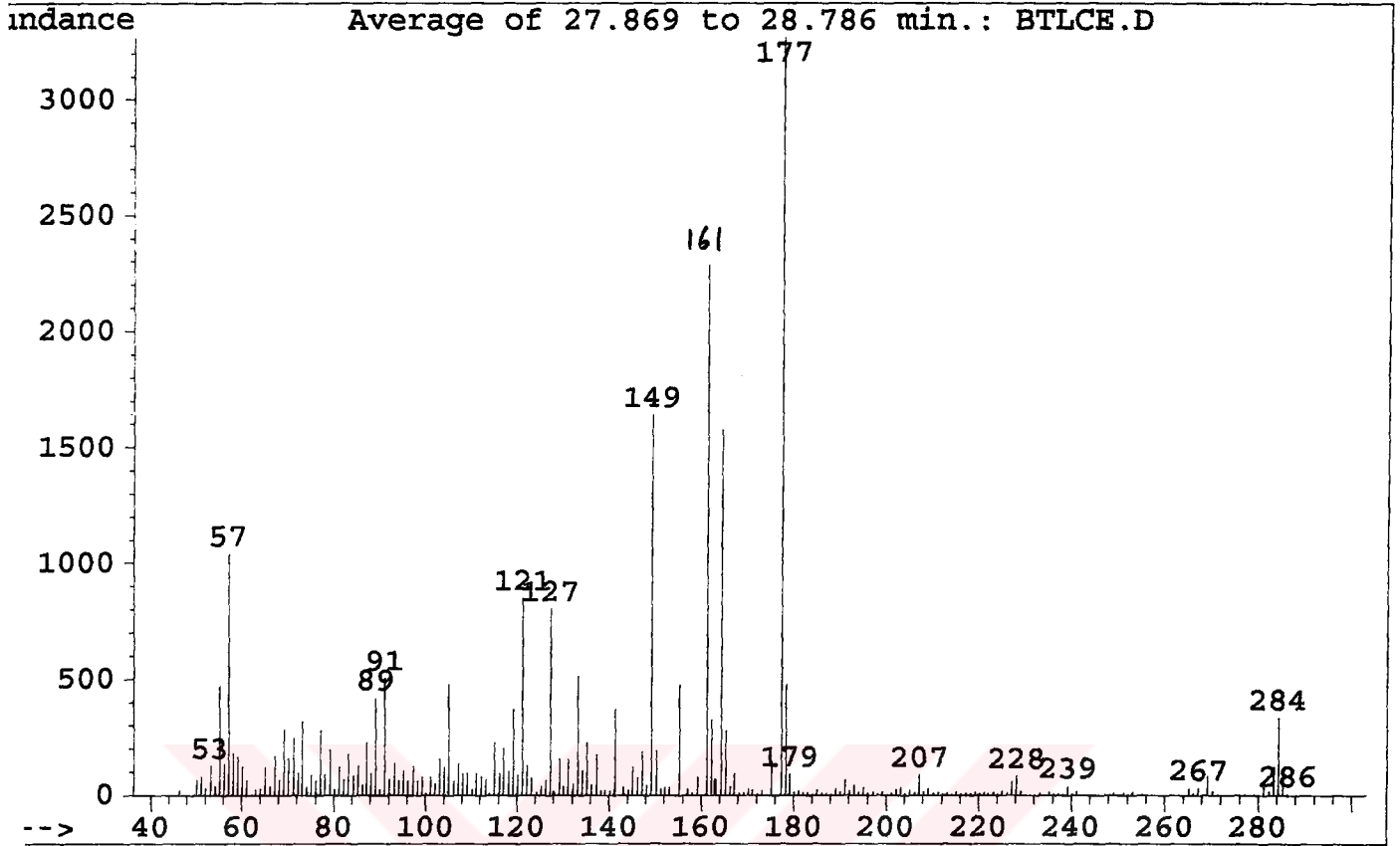
Şekil 3.12. BF<sub>1</sub> Bileşiği AlCl<sub>3</sub> (—) ve AlCl<sub>3</sub>/HCl (---) UV Spektrumu



Şekil 3.13.  $BF_1$  Bileşiği NaOAc (—) ve NaOAc/ $H_3BO_3$  (---) UV Spektrumu

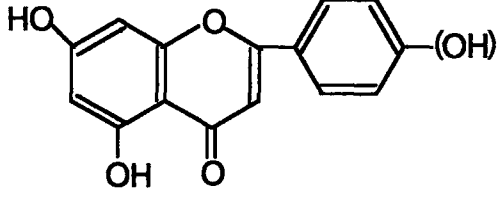


Şekil 3.14. BF<sub>1</sub> Bileşiği GC/MS Spektrumu



Şekil 3.14'ün devamı

### 3.3.5. BF<sub>2</sub> Bileşiği



Renk = Kızılımsı sarı

Bozunma Noktası = 225-245 °C

R<sub>f</sub> Değeri = 0.47 (%30 AcOH)

UV (366 nm) = Mor

NH<sub>3</sub>/UV = Mor

NA/UV = Sarı

Sarı renkli olan BF<sub>2</sub> bileşiği UV ışık altında koyu mor, NH<sub>3</sub> buharı ile mor ve NA belirteci ile sarı renk göstermektedir. Bu renk reaksiyonları sonucu bileşiğin 5-OH açık, 3-OH yok ya da kapalı, 4'-OH kapalı ve 3'-OH açık biçiminde kabaca formülünü çıkartabiliriz. Bileşiğin renk reaksiyonlarını vermesi ve metanolde çözülerek çekilen UV spektrumunda Bant I'in 355 nm'de ve Bant II'nin 265 nm'de absorpsiyon bantları vermesi flavon yapısında olabileceğini göstermektedir.

Bileşiğin IR spektrumunda (Şekil 3.15) 1650 cm<sup>-1</sup>'de görülen pik 5-OH varlığını gösterir. 2950 cm<sup>-1</sup>'de pik görülmemesi yapıda alifatiklik olmadığını belirtir.

Metanol spektrumunda (Şekil 3.16) Bant I'in 355 nm'de görülmesi 3-OH içermediğini doğrular. Bant II'nin daha belirgin çıkması bileşiğin A halkasında fazla oksijenli süstitüentlerin olduğunu gösterir. Aynı spektrumun 265 nm kısmındaki geniş pik yapıda 3'-OH varlığını belirtir.

NaOMe spektrumunda, Bant II'deki batokromik kayma yapıda 5,7-dihidroksi grupları olduğunu gösterir.

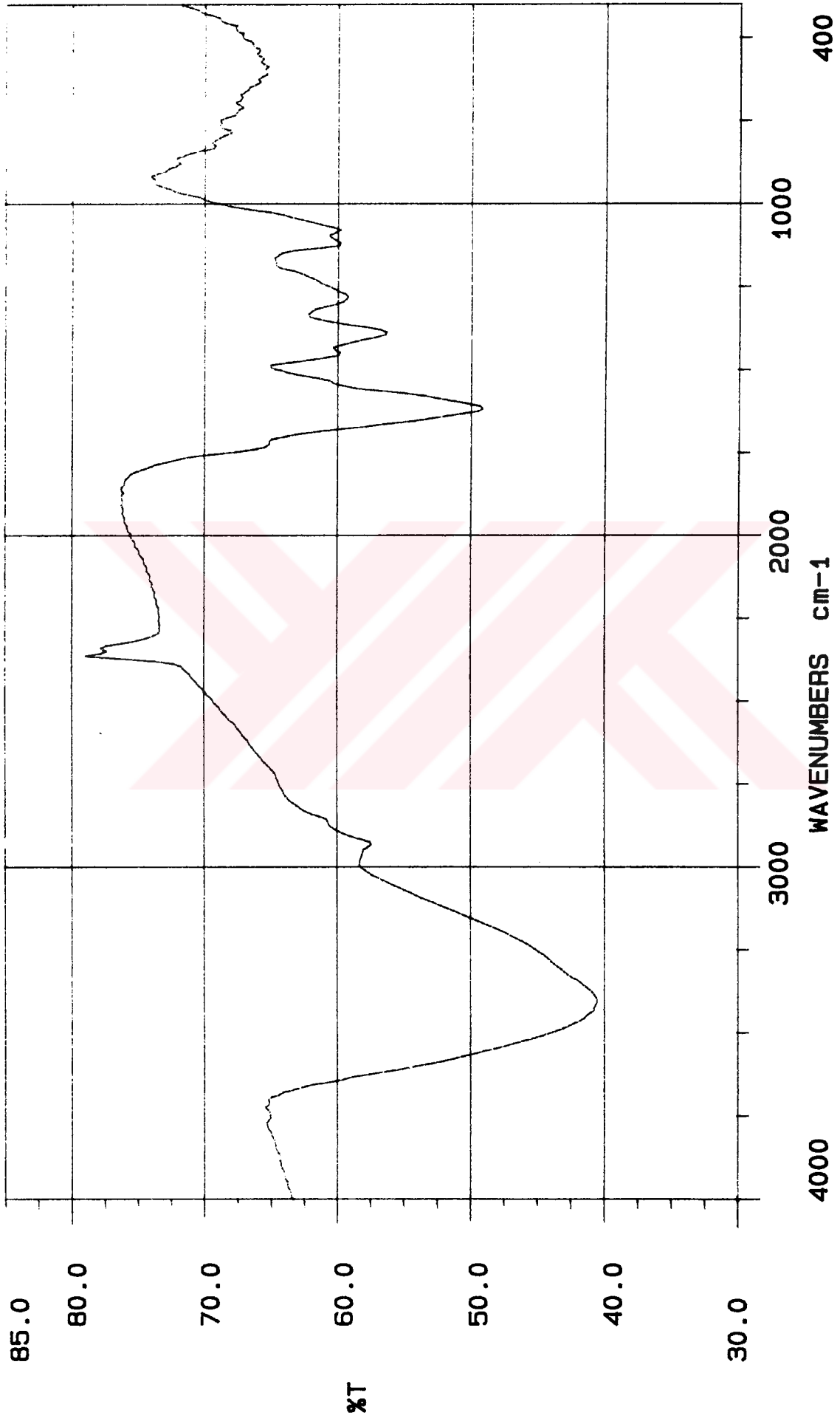
5-OH'in varlığı,  $\text{AlCl}_3$  spektrumundaki (Şekil 3.17) Bant I'in metanol spektrumuna oranla daha uzun dalga boyunda çıkmasıyla kanıtlanabilir.

NaOAc spektrumunda (Şekil 3.18) Bant II'nin metanol spektrumuna oranla 10 nm batokromik kayması 5,7-dihidroksi gruplarının varlığını gösterir.

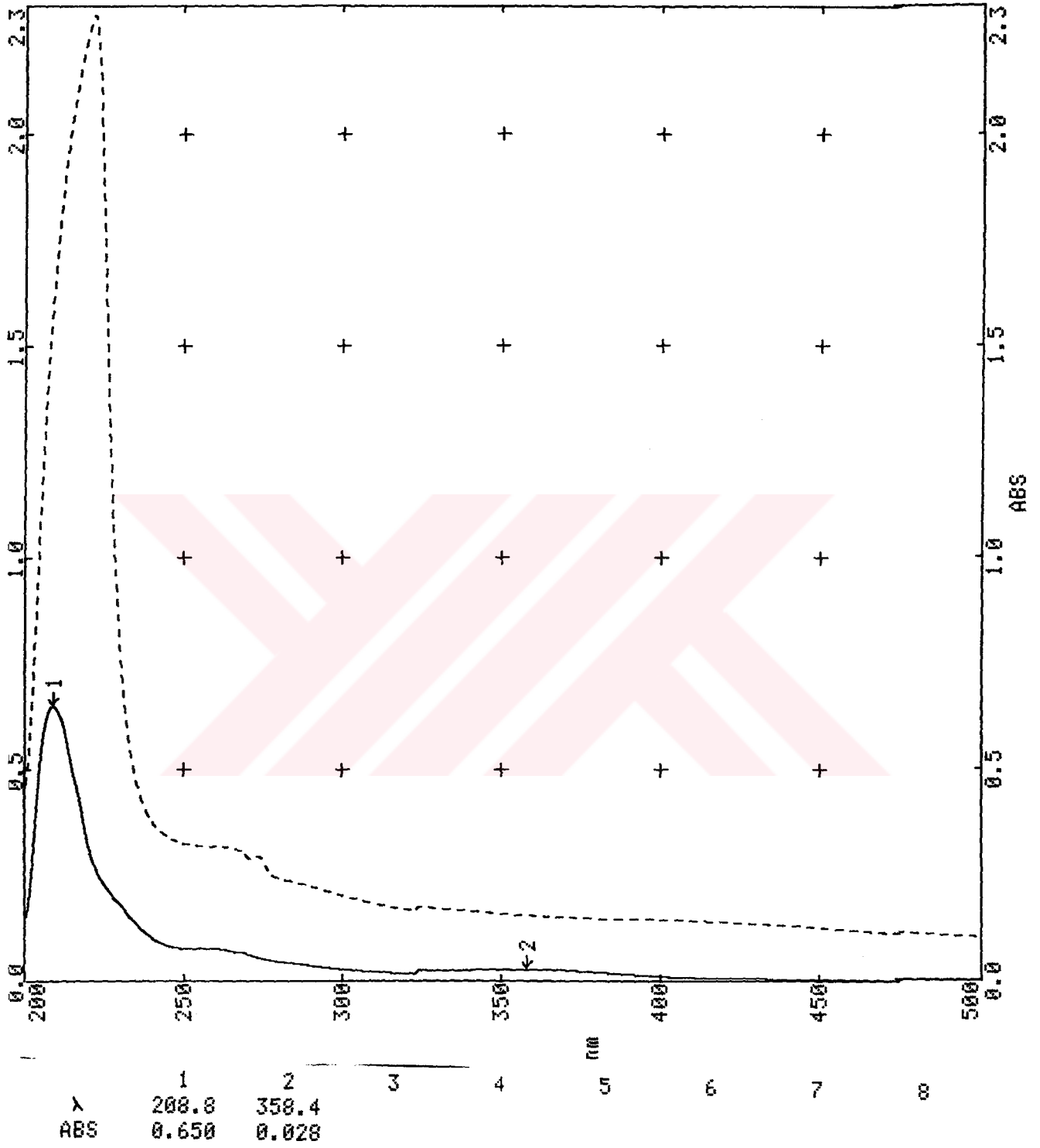
Bileşiğin GC/MS spektrumunda (Şekil 3.19) ;

GC/MS :  $m/z = 267$   $[\text{M-H}]^+$        $m/z = 25367$   $[\text{M-OH}]^+$   
           $m/z = 221$   $[\text{M-3OH}]^+$        $m/z = 149$   $[\text{A}_1]^+$   
           $m/z = 119$   $[\text{B}_1]^+$

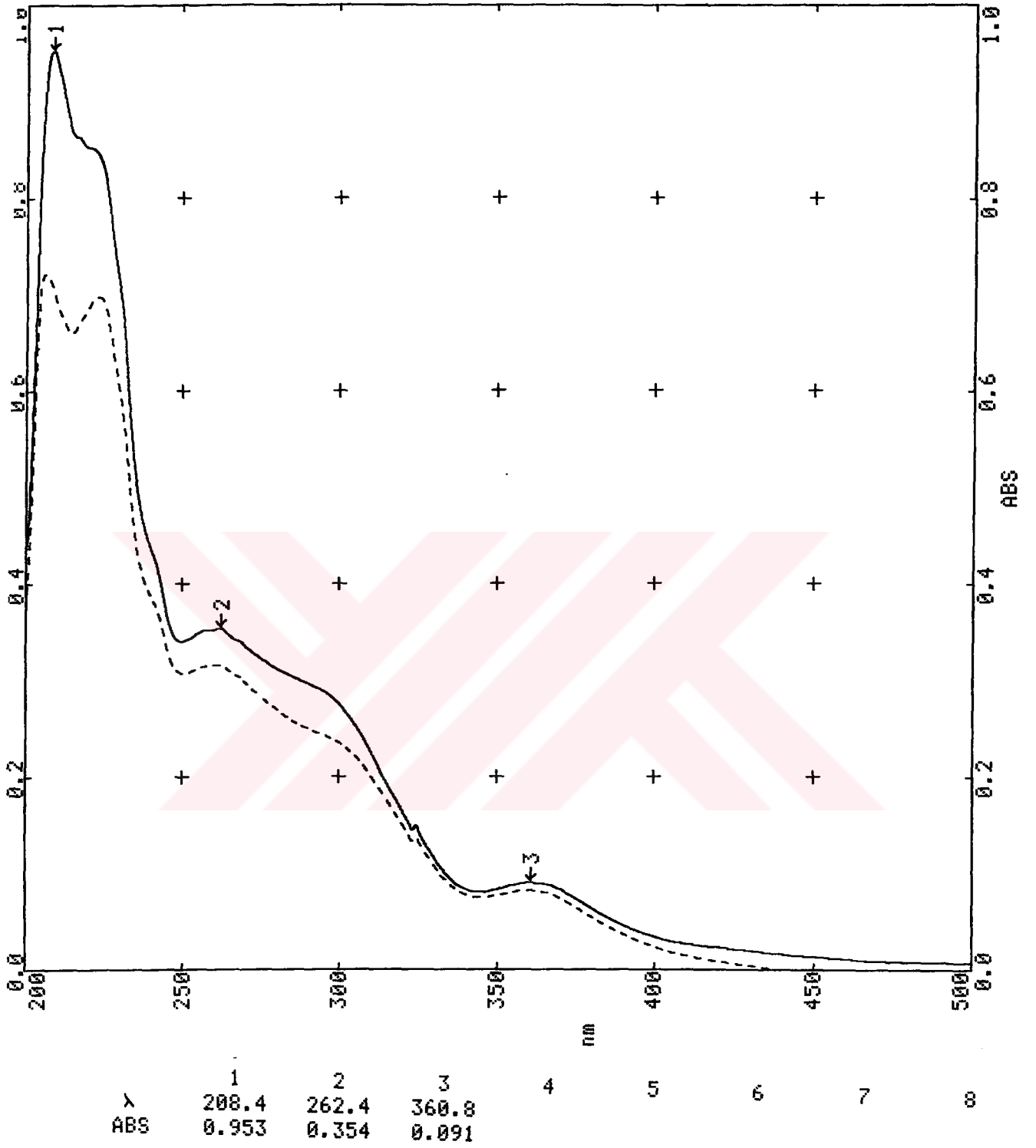
Elde edilen veriler sonucu  $\text{BF}_2$  bileşiğinin 5,7,4'-trihidroksiflavon yapısında olabileceği düşünüldü.



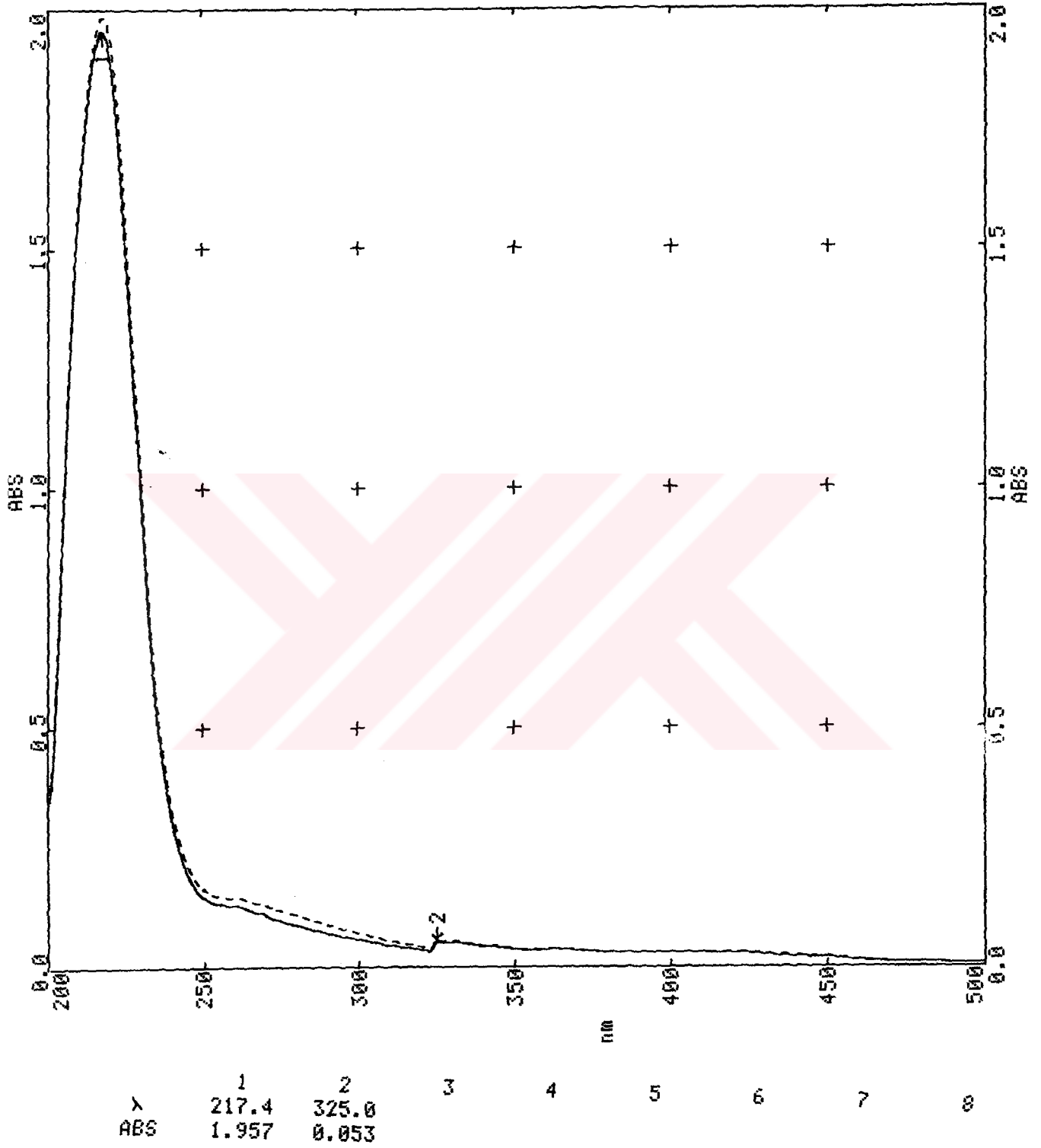
Şekil 3.15.  $\text{BF}_2$  Bileşiği FTIR Spektrumu



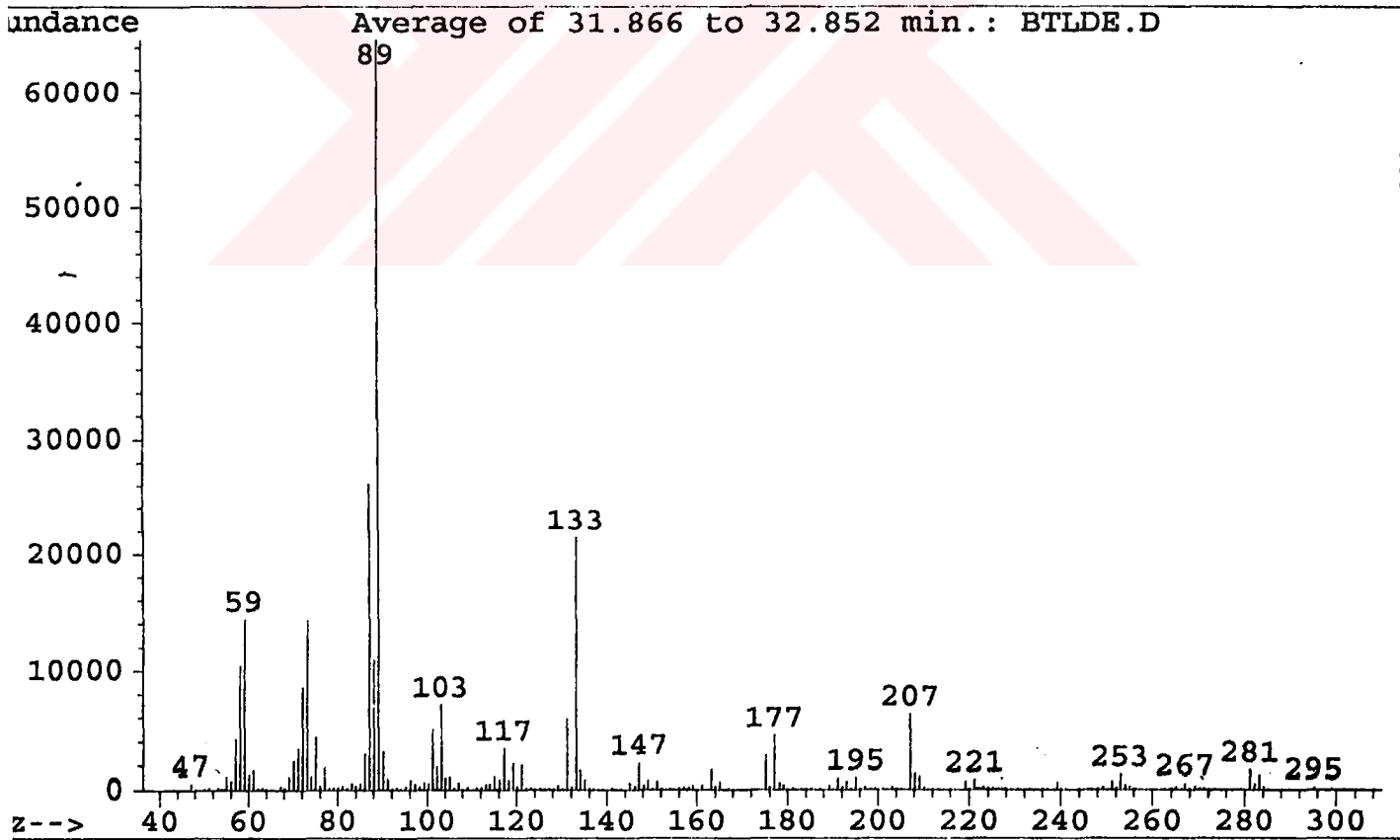
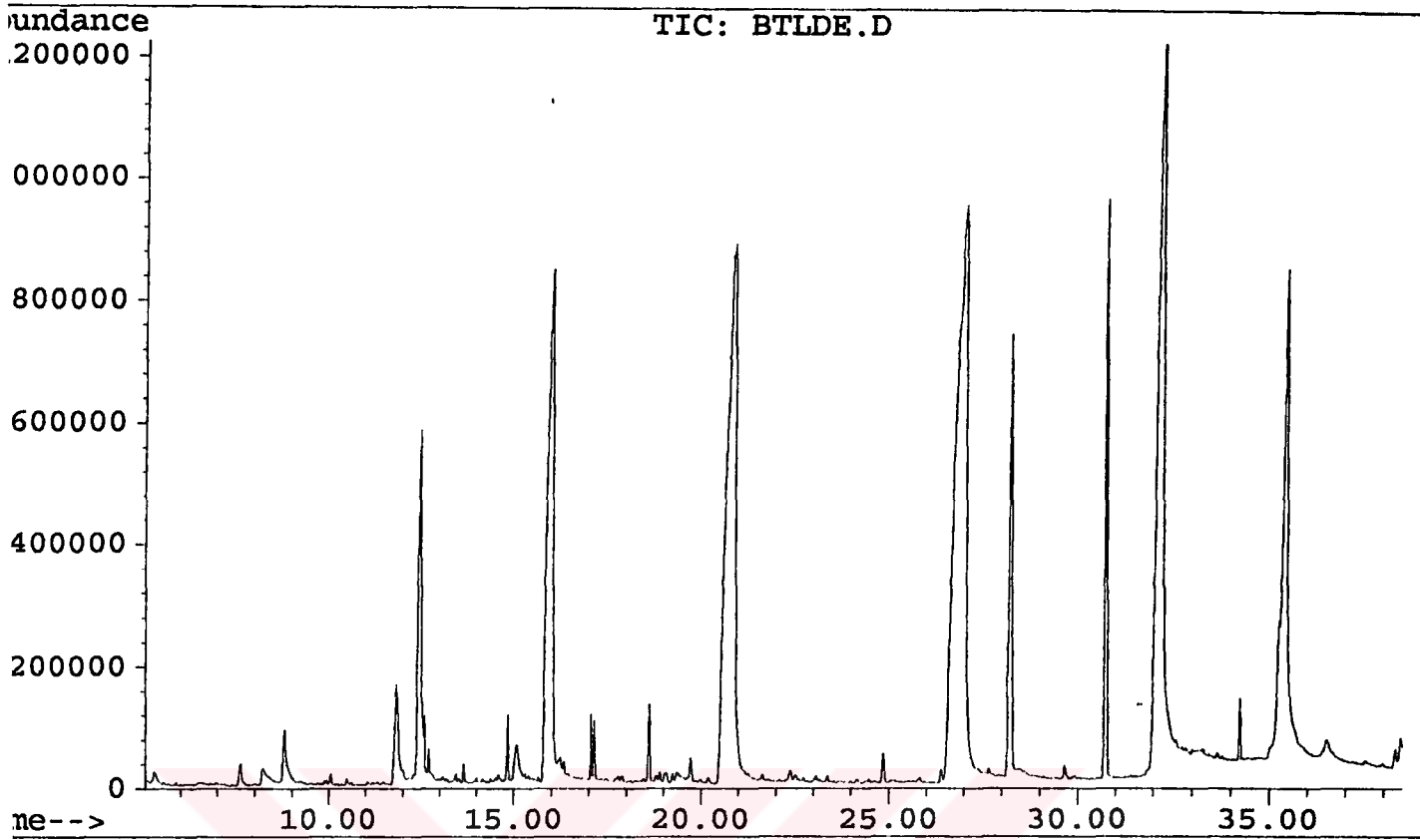
Şekil 3.16.  $\text{BF}_2$  Bileşiği MeOH ( — ) ve NaOMe ( - - ) UV Spektrumu



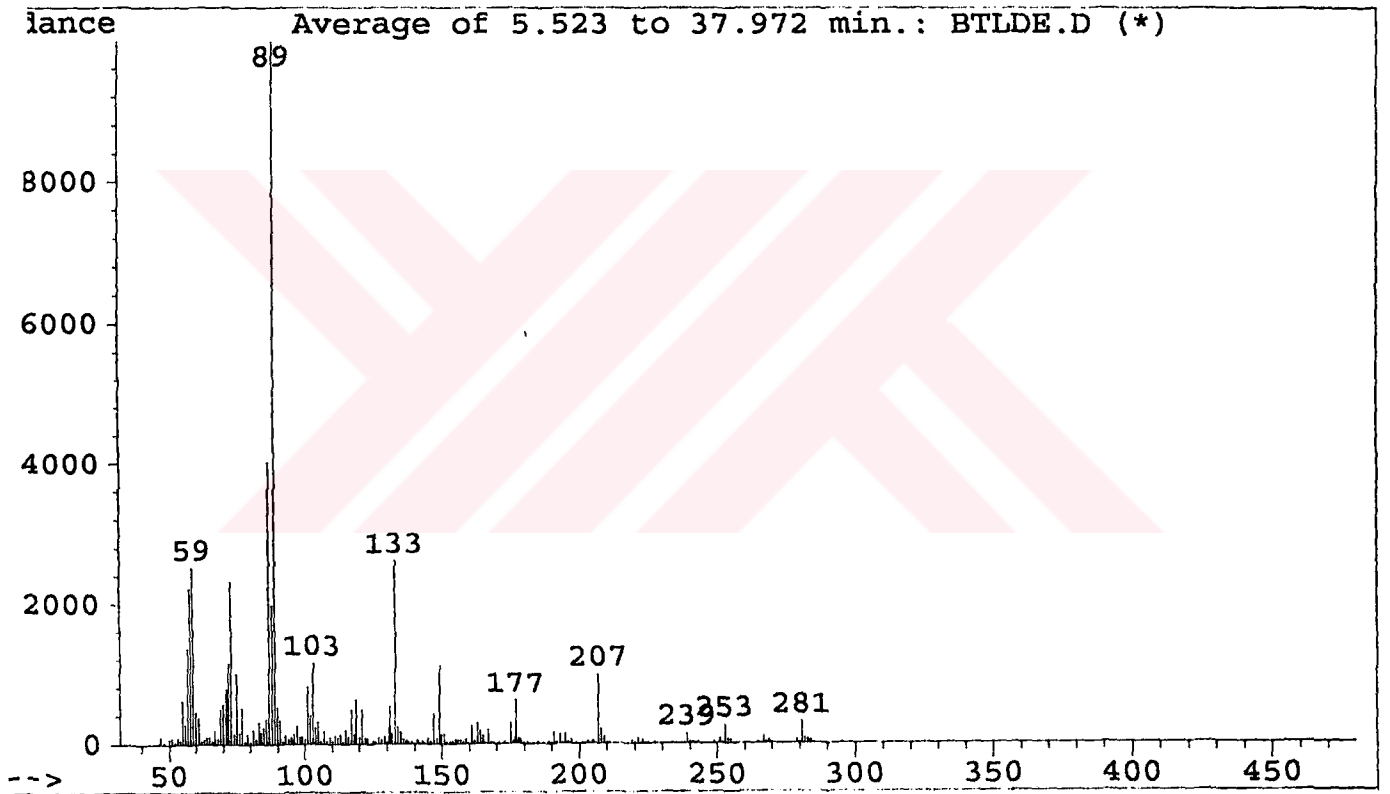
Şekil 3.17.  $\text{BF}_2$  Bileşiği  $\text{AlCl}_3$  (—) ve  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$  (---) UV Spektrumu



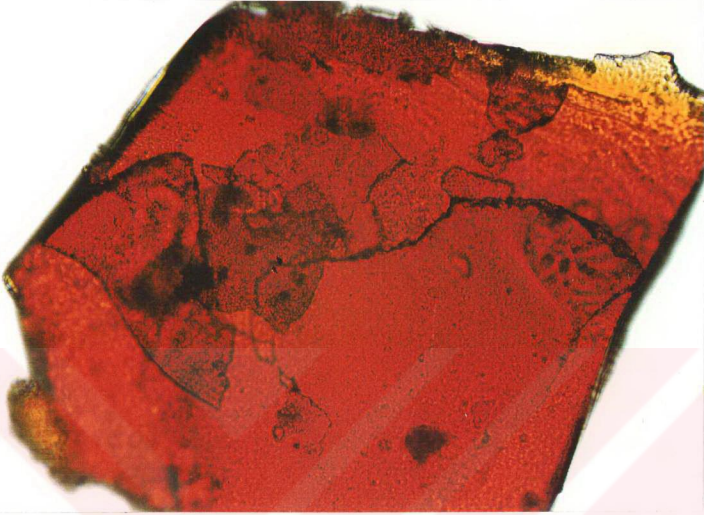
Şekil 3.18.  $\text{BF}_2$  Bileşigi NaOAc (—) ve NaOAc/ $\text{H}_3\text{BO}_3$  (---) UV Spektrumu



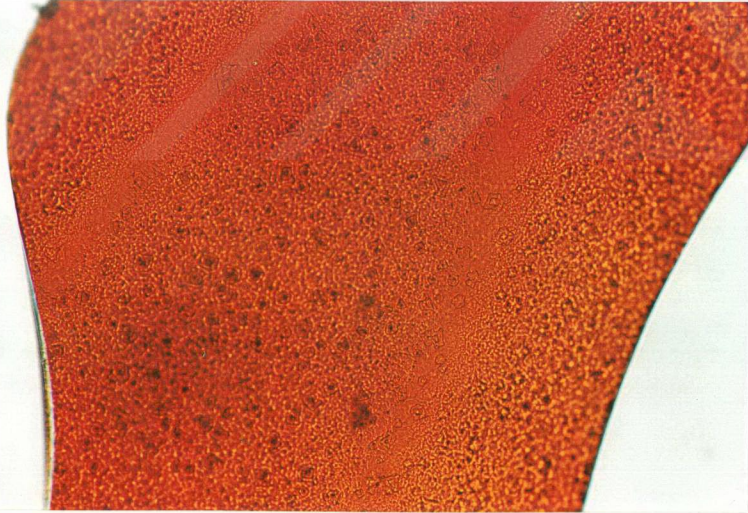
Şekil 3.19. BF<sub>2</sub> Bileşiği GC/MS Spektrumu



Şekil 3.19'un devamı



Resim 3.2.  $BF_1$  Bileşigi Kristal Görünümü



Resim 3.3.  $BF_2$  Bileşigi Kristal Görünümü

#### 4. SONUÇ VE TARTIŞMA

*Sarcopoterium spinosum* (L.) Spach bitkisinin kimyasal yapısının incelenmesi amacıyla yapılan bu çalışmada iki tane hidrokarbon bir tane terpenoik madde ve 2 tane de flavonoid olabileceği düşünülen madde elde edildi.

Bitkinin hekzan ekstresinden elde edilen BH<sub>1</sub> bileşiği ile kloroform ekstresinden elde edilen MK<sub>1</sub> bileşiğinin aynı olduğu kromatografik ve spektroskopik yöntemlerle saptanmıştır.

Bitkinin meyvalarının kloroform ekstresinden elde edilen MK<sub>2</sub> bileşiğinin de yine kromatografik ve spektroskopik yöntemler sonucu hidrokarbon olduğu görülmüştür.

EE<sub>1</sub> bileşiği, bitkinin kök ve meyvalarının etanol ekstresinden elde edilmiştir. Bileşiğin kromatografik ve spektroskopik özellikleri Reher ve arkadaşlarının (1991) buldukları triterpenoide benzer özellikler göstermektedir.

Bitkinin kök ve meyvalarının etanol ekstresinden elde edilen BF<sub>1</sub> ve BF<sub>2</sub> bileşiklerinin yapıları IR spektrumu, metanol ve kayma belirteçleri ile alınan spektrumlar ve GC/MS spektrumları sonucu yorumlanmıştır.

**KAYNAKLAR**

- Akpoyraz, M., 1981. Organik Kimya, Ankara Üniv. Tıp Fakültesi Yayınları, Ankara.
- Auclair, M. C.; Dechezlepretre, S.; Laouressergues, H.; Lemeignan, M.; Lechat, P., 1976. Therapie, 31(5), 647-58, France.
- Baytop, A., 1983. Farmasötik Botanik, İst. Üniv. Yayınları, İstanbul.
- Baytop, T., 1984. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, İst. Üniv. Yayınları, İstanbul.
- Baytop, T., 1989. Türkiye’de Zehirli Bitkiler, Bitki Zehirlenmesi ve Tedavi Yöntemleri, İst. Üniv. Yayınları, İstanbul.
- Baytop, A., 1991. Farmasötik Botanik, İst. Üniv. Yayınları, İstanbul.
- Beyer, H., 1963. Organik Chemistry, Verlag Harri Deutsch, Frankfurt, 555-57.
- Billups, N. F., 1977. American Drug Index, T. B. Lippincott Company, Philadelphia-Toronto.
- Carroz, G.; Boucherle, A.; Dardas, A., 1968. Comptes Rendus des Seancesdel, Academie des Sciences. Series D., 293-294.
- Claus, E. P.; Tyler, V. E., 1965. Pharmacognosy, Lea-Fehiger, Philadelphia, 182.
- Cram, J. D.; Hammond, S. G., 1959. Organic Chemistry, MCGraw-Hill Book Company, New York.
- Cram, J. D.; Hammond, S. G., 1964. Organic Chemistry, MCGraw-Hill Book Company, New York, 517-602.
- Davis, P. H., 1972. Flora of Turkey and East Aegean Islands, Edinburgh at the University Press, 4.

- Finar, 1973. Organic Chemistry, Longman Group Limited, (Sixth Edition), London, 1, 469-71.
- Finar, I. L., 1975. Organic Chemistry, William Clowes and Sons Limited, London, 517-602.
- Geissman, T. A., 1962. The Chemistry of Havonoid Compounds, The Macmillan Company, New York.
- Gemici, Y.; Seçmen, Ö., 1983. Doğa Bilim Dergisi, Temel Bilimler Seri A, Cilt 7, Sayı 3, Bornova-İzmir.
- Gilman, H., 1943. Organic Chemistry, John Wiley-Sons Inc., New York 2.
- Gözükara, E. M., 1989. Biyokimya, Repromat Ltd. Şti., Ankara, 271-72.
- Harborne, J. B., 1967. Comparative Biochemistry of the Flavonoids, Academic Press, London-New York.
- Harborne, T. B.; Mabry, T. J.; Mabry, H., 1975. The Flavonoids, Chapman and Hall Ltd., London.
- Harborne, T. B.; Mabry, T. J., 1982. The Flavonoids Advances in Research, Chapman and Hall Ltd., London.
- Harborne, T. B., 1988. Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis, Chapman and Hall Ltd., London-New York.
- Hupe, K. P.; Laver, H. H.; Zeah, K., 1980. "Isolation of compounds from complex sample mixtures for identification purposes-the semi-preparative separation of natural products", Chromatographia, 13(7), 413-20. Ref. C. A., 93, 106504c.
- Jakubke, H.D.; Edit. Brewer, M.; Scott, T., 1983. Consice Encyclopedia of Biochemistry, Walter de Gruyter, New York.
- Jakubke, H.D.; Edit. Brewer, M.; Scott, T., 1983. Consice Encyclopedia of Biochemistry, Walter de Gruyter, New York.
- Karamanoğlu, K., 1977. Genel Botanik, Çağlayan Kitabevi, 1977.

- Karlson, P.; Çev. Telefoncu, A., 1988. *Biyokimya*, Sermet Matbaası, Kırklareli, 250-53.
- Kirchner, J. G., 1967. *TLC, Technique of Organic Chemistry*, Interscience Publishers a Division of John Wiley-Sons, New York, 12.
- Mabry, T. J.; Markham, K. R.; Thomas, M. B., 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer-Verlag, Berlin.
- Menczel, E., 1963. *Bulletin of the Research Council of Israel, Section E*, Englang, 102, 235-6.
- Neher, R., 1964. *Steroid Chromatography*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam-London-New York, 133-35, 214-15.
- Oskay, E. 1990. *Organik Kimya*, hacettepe Üniv. Yayınları, Ankara.
- Persaud, K., 1968. *Advances in Mass Spectrometry*, 4, 171-82, England.
- Pourrat, A.; Pourrat, H.; Potier, P., 1973. *Annales Pharmaceutiques Francaises*, 31(4), 321-4, (Fr).
- Quinsenberry, M.; Grerstad, G., 1967. *Quarterly Journal of the Crude Drug Res* 7(1), 957-64, England.
- Reher, G., 1988. *Duetsche apotheker Zeitung*, Hamburg, 1354-1358.
- Reher, G.; Reznicek, G.; Baumann, A., 1991. *Planta Medica*, 506.
- Reher, G.; Budesinsky, M., 1992. *Phyochemistry*, 3909-3914.
- Scheuer, P. J., 1973. *Chemistry of Marine, Natural Products*, Academic Press, New York-London, 72-73.
- Schluetz, G. O.; Vunulet, J., 1964. *Experientia*, 20(2), 78-9, German.
- Shani, J.; Joseph, B.; Sulman, F. G., 1970. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, 185(2), 344-9, England.
- Solomons, T. W. G., 1988. *Organic Chemistry*, John Wiley-Sons, New York, 1053-55.

- Stahl, E., 1969. Thin-Layer Chromatography, A Laboratory Hand Book, New York, 346-47.
- Tanker, N.; Tanker, M., 1973. Farmakognozi, Cilt I, Özişik Matbaası, İstanbul.
- Tutin, T. G.; Heywood, V. H.; Burges, N. A.; Moore, D. M.; Valentine, D. H.; Walters, S. M.; Webb, D. A.; Ball, P. W.; Chater, A. O.; Ferguson, I. K., 1968. Flora Europaea, Cambridge at the University Press, 2.
- Ulubelen, A.; Öksüz, S.; Samek, Z.; Holub, M., 1971. Tetrahedron letter, 46, 4455-6.
- Ün, R., 1984. Organik Kimya, Fatih Yayınevi.
- Vervakidou, E.; Vitsoropoulou, Phyllianus, S., 1981. Plantes Medicinales et Phytotherapie, 16-20.
- Yamaguchi, K., 1970. Spectral Data of Natural Products, Elsevier Publishing Company, Amsterdam-London-New York, 212-16.
- Zeybek, N.; Zeybek, U., 1994. Farmasötik Botanik, Ege Üniv. Yayınları, İzmir.

## ÖZGEÇMİŞ

- Doğum Tarihi : 15 Aralık 1971
- Doğum Yeri : Kahramanmaraş
- İlk Öğrenim : Fatih İlkokulu, 1978-1983
- Orta Öğrenim : Gazi Ortaokulu, 1983-1986
- Lise Öğrenim : Kahramanmaraş Lisesi, 1986-1989
- Yüksek Öğrenim : Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi  
Kimya Bölümü, 1990-1994
- Lisansüstü Öğrenim : Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü  
Organik Kimya Anabilim Dalı, 1994-

Halen yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim. Aynı zamanda M.E.B.'na bağlı bir devlet lisesinde Kimya Öğretmeni olarak görev yapmaktayım.