

VISCUM ALBUM L.(ÖKSEOTU)' DEKİ
FLAVONOİDLERİN ARAŞTIRILMASI

Cavit UYANIK

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Kimya Anabilim Dalı
Organik Kimya Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Orhan Bilgiç

Anadolu Üniversitesi
Merkez Kütüphane

Şubat 1990

Cavit Uyanık'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Viscum Album L.(Ökseotu)' deki flavonoidlerin araştırılması" başlıklı çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

.13/4/1990

Üye : **Prof. Dr. Cem İLİNER**

Üye : Prof. Dr. Serim Bilge

Üye : Ydr. Doç. Dr. Orhan Bilge

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun.....
2 .MAYIS 1990 gün ve .242/2 .sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Rüstem KAYA
Enstitü Müdürü

ÖZET :

Bu çalışmada *Viscum Album L.*'deki flavonoid maddelerin ve fenolik asitlerin izolasyonunu ve yapılarının aydınlatılması amaçlanmıştır. Eskişehir Orman Fidanlığı'ndan toplanan *Viscum Album L.* incelenmiştir.

Özütleme ile *Viscum Album L.* yapraklarından elde edilen özüt; su, eter I ve eter II fazlarına ayrılmıştır. Su fazı kullanılmamıştır. Eter I ve eter II fazlarının analitik ince tabaka kromatografisi(SiO_2) ile incelenmesi eter I fazında dört, eter II fazında bir madde varlığını göstermiştir. Daha sonra preparatif ince tabaka kromatografisi(SiO_2) ile maddelerin ayırımı yapılmıştır. Ayırım için en iyi çözücü sisteminin eter I fazı için benzen:metil-etil keton:metanol (60:26:14), eter II fazı için benzen:asetik asit:su(125:72:3) olduğu bulunmuştur.

Saf olarak kabul edilebilecek (8-12 ve 15 mg.) beş madde izole edilmiştir. Bu maddelerin IR ve UV spektrumları alınmıştır. Bes maddenin IR spektrumunda karakteristik karbonil ve aromatik absorpsiyon bantları gözlenmiştir. I, II ve III'nolu maddelerin UV spektrumlarında baz(NaOH) eklenmesi ile uzun dalga boyuna kayma gözlenmiştir ve asit(HCl) eklenmesi ile başlangıç UV spektrumu elde edilmiştir. IV ve V'nolu maddelerin UV spektrumlarında baz(NaOH) eklenmesi ile kısa dalga boyuna kayma gözlenmiştir ve asit(HCl) eklenmesiyle V'nolu madde başlangıç spektrumu verirken, IV'nolu madde de başlangıç spektrumu elde edilememiştir.

SUMMARY :

This work contains the isolation and identification of the structures of flavonoid compounds and phenolic acids in *Viscum Album L.* that was collected from Orman Fidanlığı in Eskişehir was investigated.

Extract that was extracted from the leaves of *Viscum Album L.* was separated into water, ether I and ether II phases. Water phase wasn't used. The analytical thin layer chromatography(SiO_2) of ether I and ether II was shown the presence of four compounds in ether I and one compound in ether II phases. Then, the separation of the compounds was done by the preparative thin layer chromatography(SiO_2). It was found that the best solvent system was benzen:methyl-ethyl ketone:methanol(60:26:14) for ether I phase, benzen:acetic acid:water(125:72:3) for ether II phase.

Five compounds which could be accepted as pure(8-12 and 15 mg) were isolated IR and UV spectra of these compounds were taken. In the IR spectrum of the five compounds characteristic carbonyl and aromatic absorption bands were observed. In the UV spectra of compounds I, II, and III shifts to longer wavelength was observed with the addition of base(NaOH) and with the addition of acid(HCl) the original spectrum was obtained. In the UV spectra of compound IV and V shifts to shorter wavelengths were observed with an addition of base(NaOH) and while the original spectrum was with an addition of acid(HCl) in compound V, in compound IV the original spectrum could not be obtained.

TEŞEKKÜR

Viscum Album L.(Ökseotu)'in içindeki flavonoid ve fenolik asitlerin izolasyonu ve yapı aydınlatılması konusundaki bu deneysel çalışma, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde, Yrd. Doç. Dr. Orhan Bilgiç'in danışmanlığında yürütülmüştür.

Bu çalışmada, kıymetli vakitlerini ayırıp, yakın ilgi gösteren, her türlü desteği sağlayan ve çalışmalarımı yönlendiren Danışman Hocam Yrd. Doç. Dr. Orhan Bilgiç'e minnet ve şükranlarımı sunarım.

Yine deneysel ve teorik çalışmalarımda, yakın ilgi gösterip, büyük yardımlarını gördüğüm Değerli Hocam Prof. Dr. Sevim Bilgiç'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca deneysel çalışmalarım sırasında Kimya Bölümü laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan, başta Sayın Dekanımız Prof. Dr. Ersoy Canküyer olmak üzere, Bölüm Başkanımız Prof. Dr. Cemil Öğretir'e ve Kimya Bölümü Elemanlarına teşekkürü borç bilirim.

Cavit Uyanık

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	iv
SUMMARY.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. FLAVONOİD BİLEŞİKLER.....	1
1.1. Flavonlar.....	5
1.2. Flavanonlar.....	6
1.3. İzoflavonlar.....	7
1.4. Flavanlar.....	8
1.5. Antosiyanidinler.....	9
1.6. Flavenler.....	11
1.7. Flavilyum katyonu.....	11
1.8. Flavonoid Bileşiklerin Tanınması.....	11
2. FENOLİK ASİTLER.....	13

İÇİNDEKİLER (devamı)

	<u>Sayfa</u>
3. VISCUM ALBUM (Ökseotu).....	14
3.1. Bitkinin Tanımı.....	14
3.2. Bitkinin Kimyası.....	17
3.3. Tıbbi Kullanım Alanları.....	23
4. ÇALIŞMANIN AMACI.....	30
5. DENEL BÖLÜM.....	31
6. DENEYSEL ÇALIŞMA.....	32
6.1. V. Album'un Özütlenmesi ve Su, Eter Fazlarına Ayrılması.....	32
6.2. Eter I Fazının İ.T.K. ile İncelenmesi.....	32
6.2.1. Eter I Fazının Preparatif İ.T.K. ile Ayrılması.....	34

İÇİNDEKİLER(devamı)

Sayfa

6.3. Eter II Fazının İ.T.K. ile İncelenmesi.....	36
6.3.1. Eter II Fazının Preparatif İ.T.K. ile Ayrılması.....	37
7. TARTIŞMA.....	47
8. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	53
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1.	Viscum album L.'in görünümü	17
Şekil 6.1.	Eter I fazının analitik İ.T.K.'sı	34
Şekil 6.2.	Eter II fazının analitik İ.T.K.'sı	37
Şekil 6.3.	I nolu maddenin IR spektrumu	39
Şekil 6.4.	II nolu maddenin IR spektrumu	40
Şekil 6.5.	III nolu maddenin IR spektrumu	41
Şekil 6.6.	IV nolu maddenin IR spektrumu	42
Şekil 6.7.	V nolu maddenin IR spektrumu	43
Şekil 6.8.	I nolu maddenin UV spektrumu	44
Şekil 6.9.	II nolu maddenin UV spektrumu	44
Şekil 6.10.	III nolu maddenin UV spektrumu	45
Şekil 6.11.	IV nolu maddenin UV spektrumu	45
Şekil 6.12.	V nolu maddenin UV spektrumu	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 7.1. Maddelerin **IR** spektrum değerleri**52**

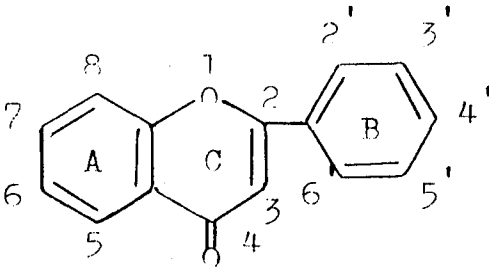
Çizelge 7.2. Maddelerin **UV** spektrum değerleri**52**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

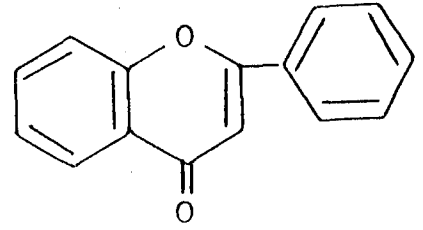
cm ⁻¹	Dalga Boyu
nm	Nanometre
IR	Infrared
UV	Ultraviyole
İ.T.K.	İnce Tabaka Kromatografisi
ML I	Mistletoe Lectin I
ML II	Mistletoe Lectin II
ML III	Mistletoe Lectin III
E-1 S	Ekstre 1 Sarı
E-1 T	Ekstre 1 Turuncu
E-1 KY	Ekstre 1 Koyu Yeşil
E-1 AY	Ekstre 1 Açık Yeşil
E-2	Ekstre 2

1. FLAVONOİD BİLEŞİKLER

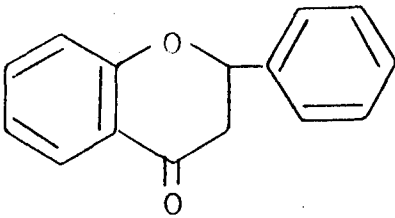
Flavonoid bileşikleri $C_6-C_3-C_6$ maddeleri olarak düşünülebilirler(1). C_6 'lar benzen halkasıdır. Bu yapıdaki bileşiklerin; flavon(2), flavanon(3), flavonol(4), flavan(5), flavanonol(6), izoflavon(7), kalkon(8), dihidrokalkon(9), auron(10), antosiyanidin(11), katesin(12) ve flaven(13) yapılarında olduğu bildirilmiştir(Ikan, 1969).



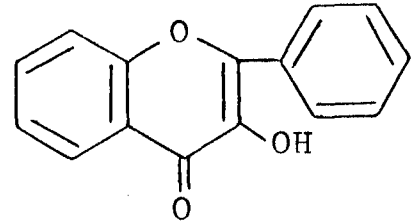
1



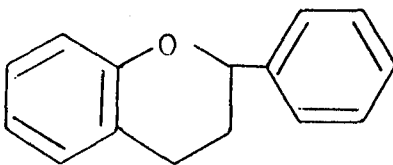
2



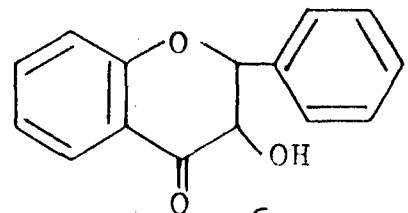
3



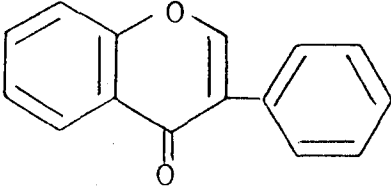
4



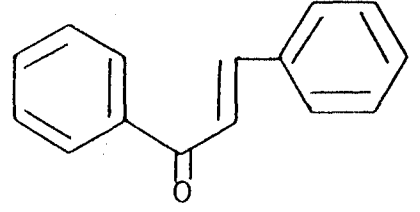
5



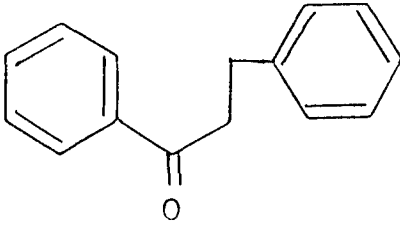
6



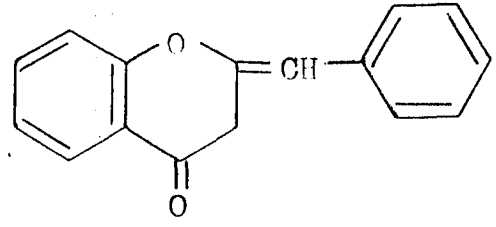
7



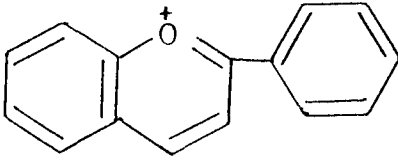
8



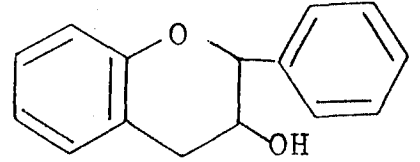
9



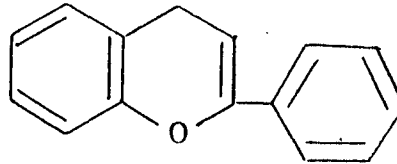
10



11



12



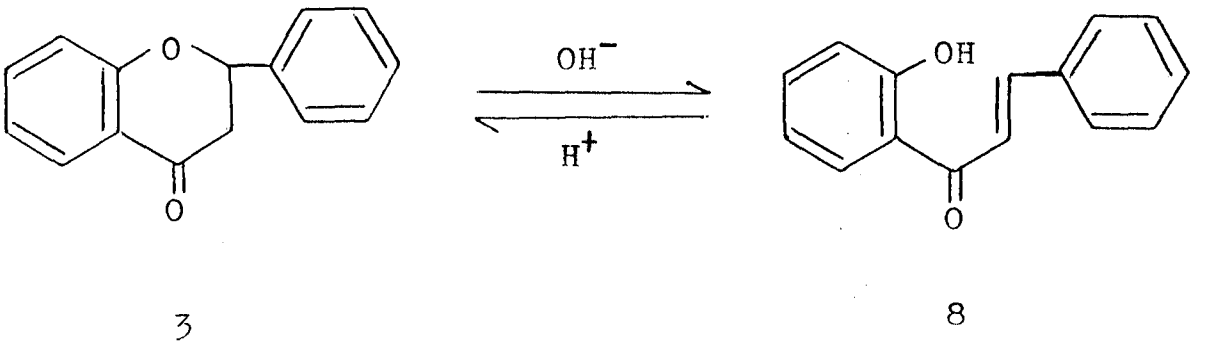
13

Bitki dünyasında fazla yaygın olan bu bileşiklere genellikle sarı renkli olmalarından dolayı Latince de sarı anlamına gelen "flavus'tan" türeyen flavon ismi verilmiştir

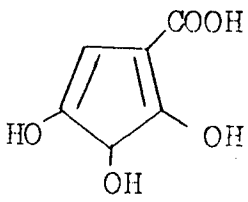
(Oskay, 1979).

Flavonoid bileşikler hidrojen grubu içerirler. A halkasının besinci karbonunda her zaman için OH grubu vardır. B halkası ise 3. ve 4. pozisyonlarında OH veya alkoksi grubu içerir. Flavonoidler bitkinin meyvesi, poleni, kökleri ve ağaç kısmı dahil bütün kısımlarında bulunurlar ve çok fazla sayıda fizyolojik aktivitenin nedenini oluştururlar. Örneğin bazı flavonlar zayıf kapiler kan damarlarını kuvvetlendirirler. Fazla hidroksil grubu içerenler ise diüretik ve yağlar için anti-oksidant olarak kullanılırlar. Flavonların buğday tohumlarının yeşermesine etki ettiği de önerilmiştir.

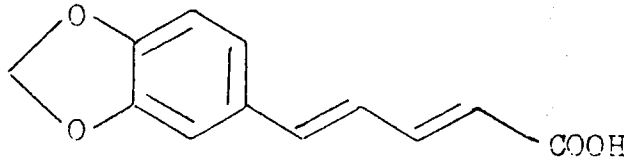
Spektroskopik ölçümle bazı flavonoid maddelerin yapılarının tayini mümkündür. Absorbsiyon spektroskopisi ile flavonoidlerin bazla ısıtılmaları sonucu oluşan o-hidroksi benzoil ketonların teşhisiyle bazı yapı tayinleri yapılmıştır. Bu maddelerin bazla daha uzun süre temasta kalması ketonik asidik bileşikler oluşur ve flavonoid maddelerin yapı tayininde oldukça önemlidirler. Böylece flavanon(3) ve kalkonlar(8) birbirinin izomeridir ve birbirlerine çevrilebilirler.



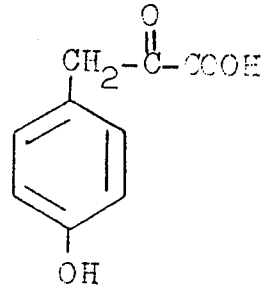
Biosentetik olarak flavonoid bileşikler, C_6-C_3 parçasından yani şikimik asit(14) üzerinden oluşurlar. Örneğin p-hidroksi sinnamik asidin(15) altı karbon atomunun üç asetat birimi ile birleşmesi sonucu flavonoid bileşikler(5) elde edilir(Ikan, 1969).



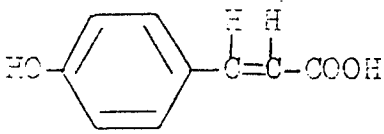
14



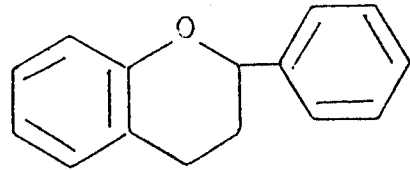
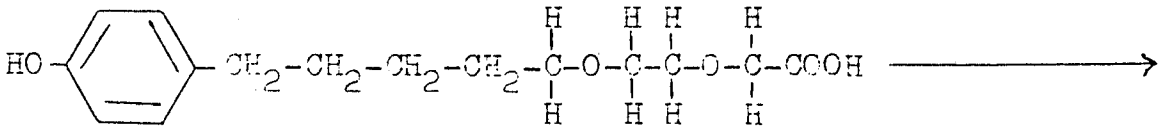
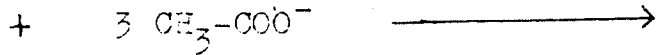
16



17



15



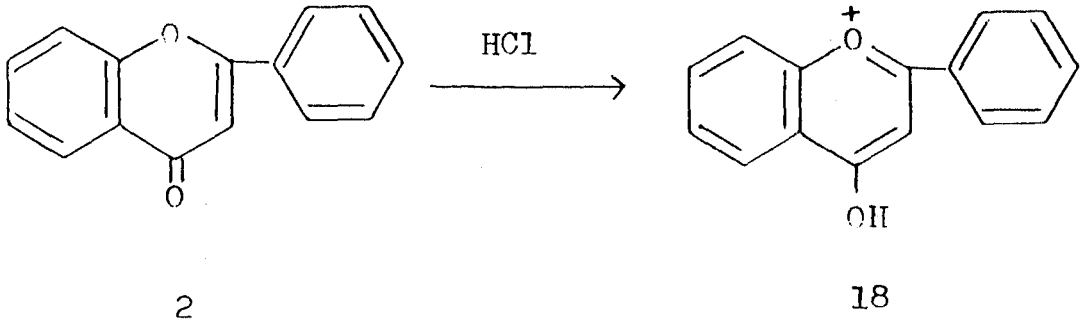
5

Aşağıda şikimik asit üzerinden biosentez yoluyla türetilerek elde edilen bileşikler genel olarak gösterilmiştir.

Şikimik asit(14)--> prepenik asit(16)--> p-hidroksi-fenol prüvik asit(17)--> p-hidroksifenil asetik asit--> p-hidroksi sinnamik asit--> flavonlar(2),(Ikan, 1969).

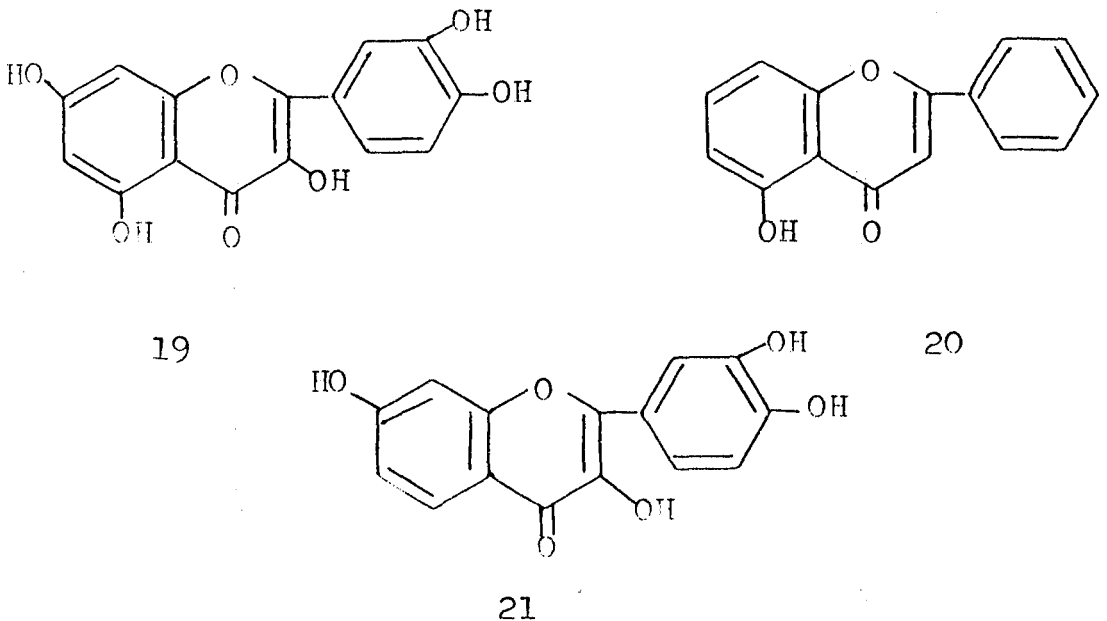
1.1 Flavonlar

Flavon(2) halkasındaki karbon baziktir ve HCl ile pirilyum tuzunu(18) oluşturur.



Bundan dolayı flavonun karbonil grubu hidroksilamin gibi karbonil reaktifleri ile reaksiyona girmez. Ancak normalde Grignard reaktifleri ile reaksiyona girerler.

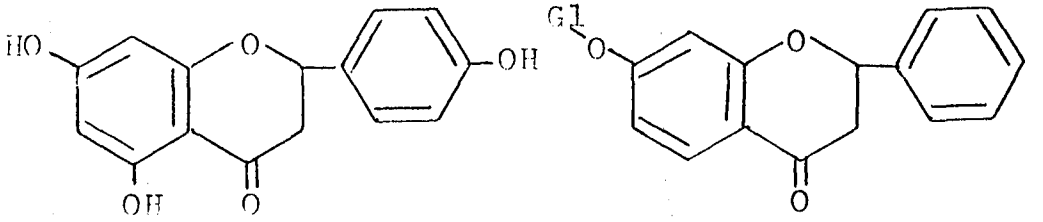
En yaygın flavon kuersetindir(19). Primuletin(20) ve fisetin(21) gibi bazı flavonların sadece A halkasında bir hidroksil grubu vardır(Ikan, 1969).



1.2. Flavanonlar

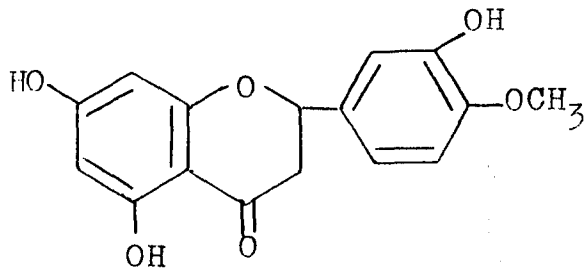
Flavanonlara doğada su ana kadar rastlanmamıştır. Ancak hidroksitlenmiş flavanonların serbest veya glikozid haline doğada rastlanmıştır. Doğada karşı geldikleri flavonlarla birlikte bulunurlar.

Doymamış flavonların(2) tersine doymuş flavanonların (3) dördüncü konumundaki karbonil grubu reaktiftir. Flavanonların(3) baza karşı davranışı flavonlardan(2) farklıdır. Flavanonlar(3) zor şartlarda benzaldehit, asetik asit ve fenole parçalanır. Halbuki flavonlar(2) fenol ve sinnamik asidi(15) verirler. Flavanonların(3) dehidrojenasyonu ile oluşan yeni flavanon, bilinen standart flavon ile karşılaştırılarak kısa sürede tanınabilir. Aşağıda naringin(22), prumin(23), hesperidin(24) gibi flavanonların birkaçı verilmiştir(Ikan, 1969).



22

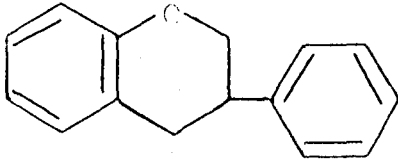
23



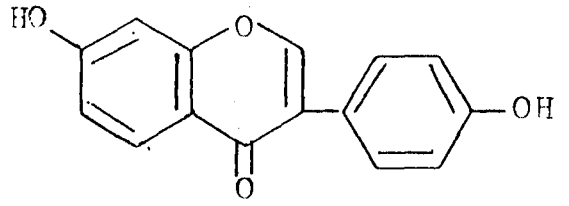
24

1.3. İzoflavonlar

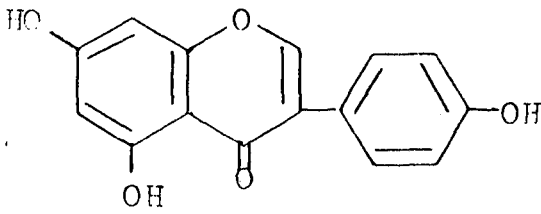
İzoflavonlar(7) 3-fenil kromanlardır(25). Doğada bazı bitkilerde sarı renkli pigmentler halinde bulunurlar. Doğada bulunan izoflavonlardaki hidroksil grupları çoğunlukla C-5, C-7 ve C-4' ' ünde, nadiren C-6, C-2' ve C-3' ' ünde serbest, metillenmiş ya da glikozitlenmiş haldedir. Bilinen izoflavonlar; diadzein(26), genistein(27) ve tlanlankuayin(28) izoflavonlarının formülleri verilmiştir.



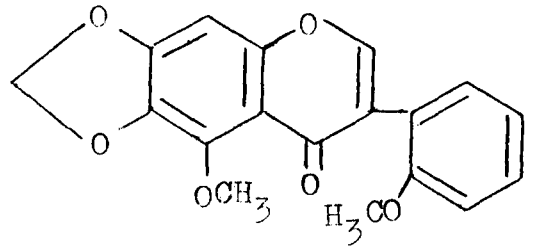
25



26

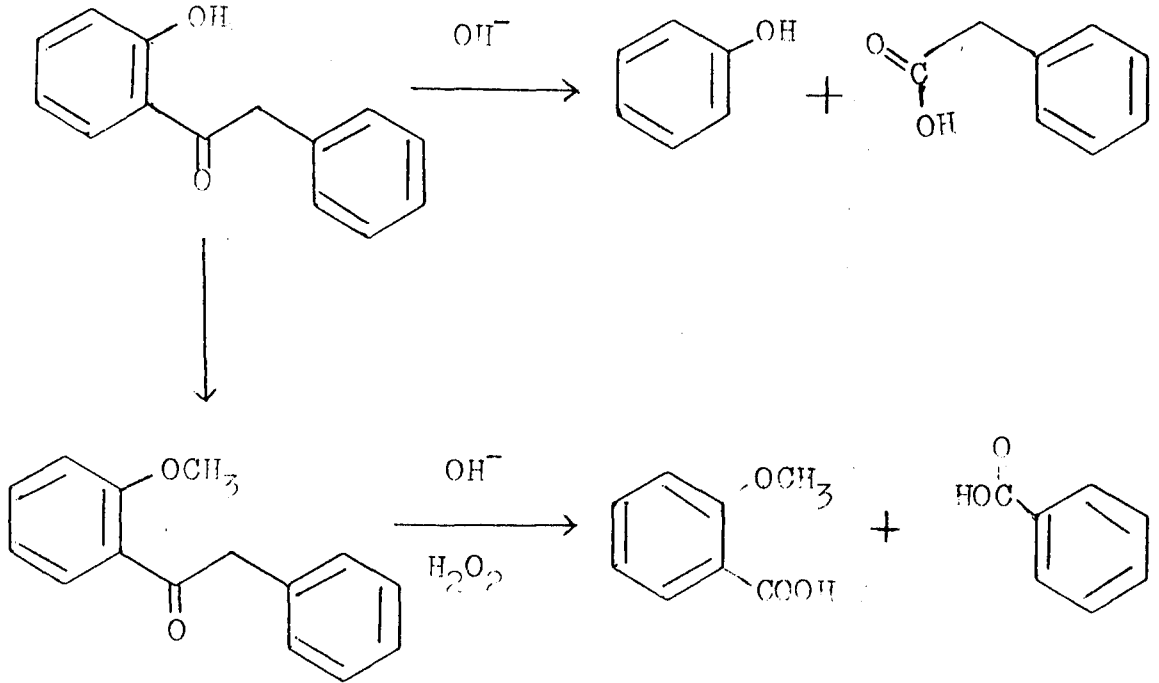
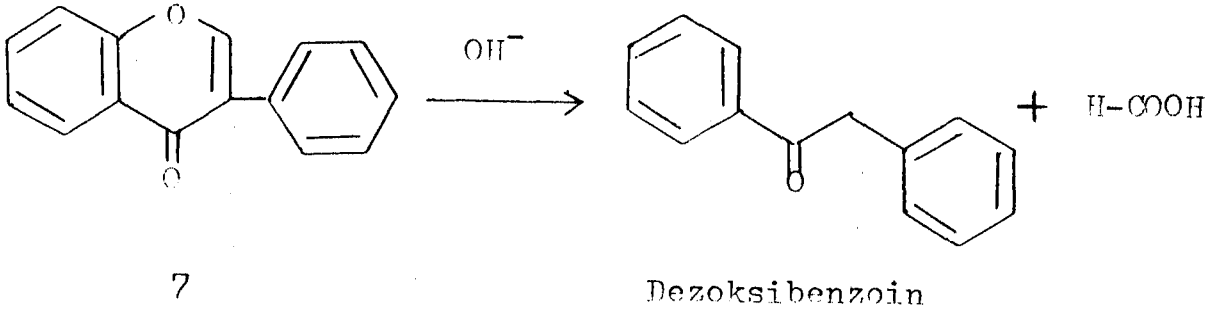


27



28

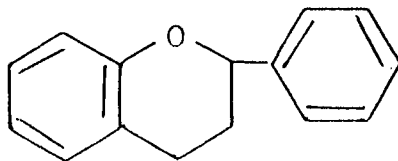
İzoflavonlar bazik ortamda aşağıdaki reaksiyonda olduğu gibi parçalanır.



İzoflavonların östrojenik, insektikidal ve antifungal aktiviteleri vardır. Bazıları balık zehiri olarak kullanılır(Ikan, 1969).

1.4. Flavanlar

2-fenil kromana Flavan adı verilir(5). Flavanın po-

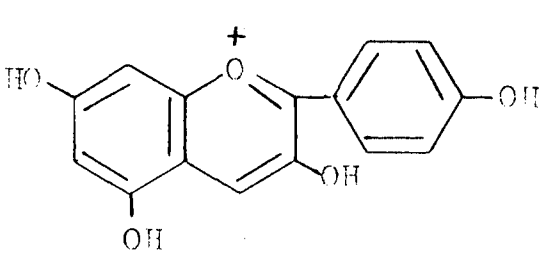


lihidroksi türevlerine doğada bazı bitkilerde sarı renkli pigmentler halinde rastlanır. Flavanda genellikle C-3, C-5, C-7, C-4' çoğukez C-2, C-4, C-3' ve bazende C-5' konumlarında hidroksil grupları serbest, metillenmiş veya glikozidlenmiş olarak bulunur(İkizler, 1985).

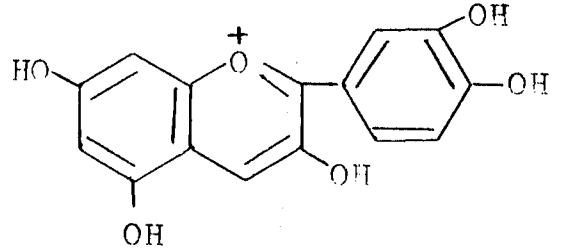
1.5. Antosiyanidinler

Bir çok çiçek ve meyveden glikozid karakterli boyar maddelerin hidrolizlenmesiyle şeker ve antosiyanidinler elde edilir. Doğada mavi, mor, menekşe ve hemen hemen bütün çiçek, meyve ve yapraklarda görülen tüm kırmızı renkler çözülmüş haldeki antosiyanidin boyasıdır.

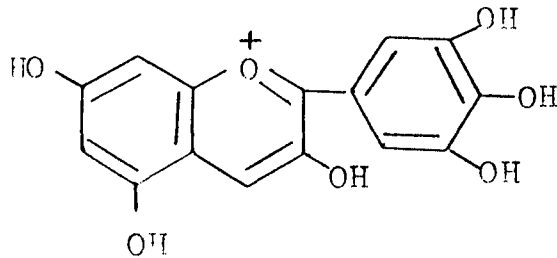
Doğal antosiyanidinler; petargonidin(29), siyanidin(30) ve delfinidin(31) olmak üzere üç gruba ayrılırlar.



29

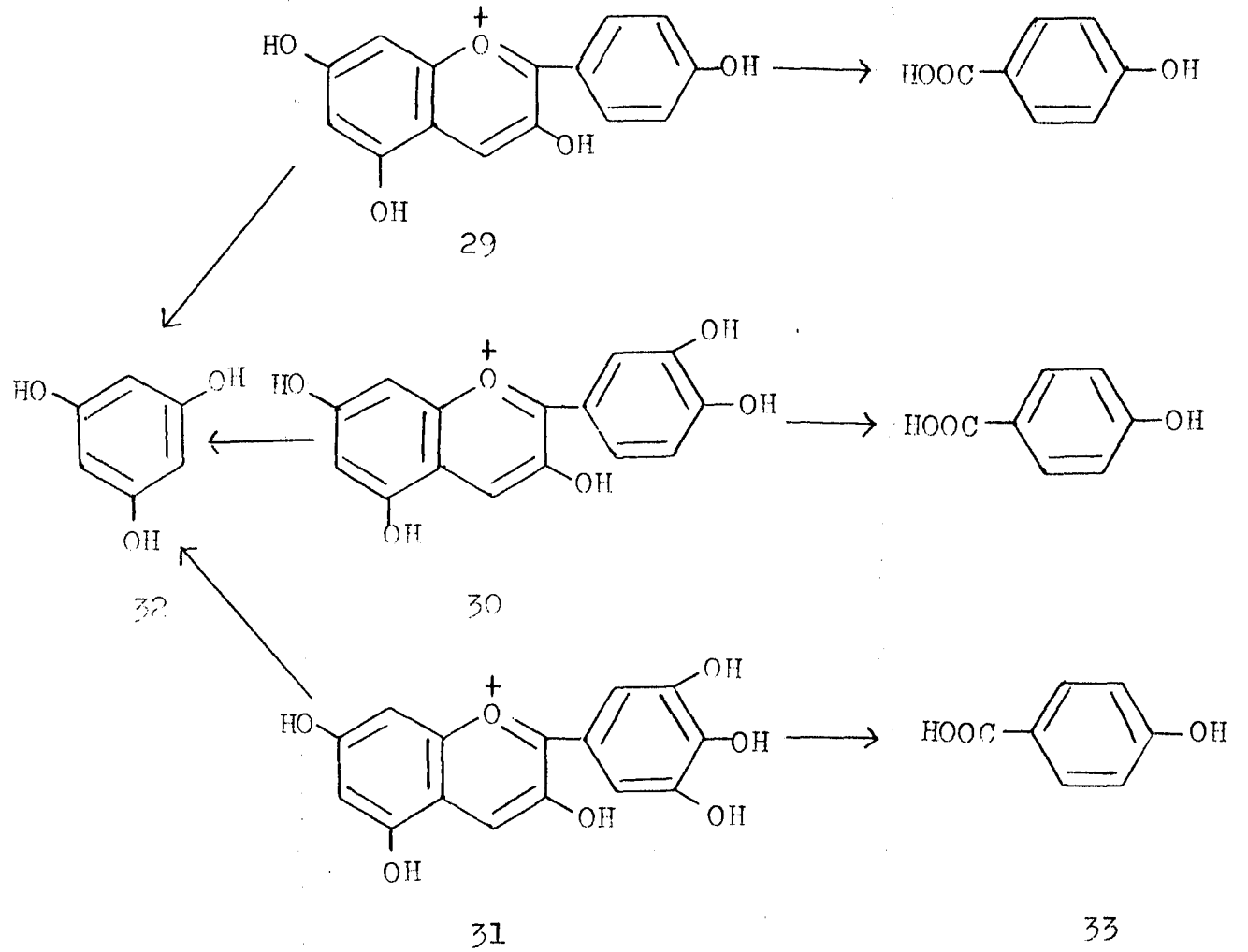


30



31

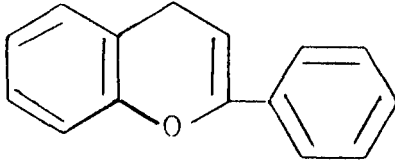
Farklı antosiyanidinler karışmayan iki çözücüde partiyonları, absorpsiyon spektrumları ve bilinen pH'daki tampon çözeltilerde renkleri ile tanımlanabilirler. Antosiyanidinlerle yapı tayininde baz ile floroglusinol(32) ve fenolik asit(gallik asit),(33) oluşur.



Uygun pH'da kompleks oluşturan metaller ve taninler gibi pek çok bileşik antosiyanidinlerin rengine etki eder(Ikan, 1969).

1.6. Flavenler

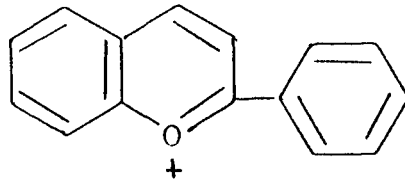
γ -kromenlerin, C-2 konumunda bir fenil grubu bulunan bileşiklerine flaven(13) adı verilir(İkizler, 1985).



13

1.7. Flavilyum Katyonu

2-fenil benzoprilyum iyonuna flavilyum katyonu(34) adı verilir. Doğada bulunan birçok çiçekteki renk verici pigmentler flavilyum tuzlarından(34) oluşmuştur(İkizler, 1985).



34

1.8. Flavonoid Bileşiklerin Tanınması

Pekçok flavonoid günışığında tipik renkleriyle ve UV 365 nm. de anlaşılabilirler. Fenolik gruplar Gümüş

nitrat - Amonyak reaktifi(T.1), Demir(III) klorür reaktifi (T.2) ve Tungustad - Molibdat reaktifiyle(T.3) veya bazı metalik iyonlarla örneğin; Alüminyum klorür çözeltisi, bazık ya da nötr Kurşun asetat ile renkli kompleksler olustururlar. Flavon(2) ve flavanonlara(3) önce Sodyum borohidrür ve % 2 metanol daha sonra Alüminyum klorür çözeltisi püskürtülerek ve 120°C'de 1-2 dakika bekletilmesi suretiyle bu bileşikler tanınırlar. Eğer halkanın beşinci konumunda hidroksil grubu varsa Borik asit - Okzalik asit reaktifi(T.4) püskürtmek suretiyle bileşikler tanımlanır(Macek, 1972).

Borik asit - Okzalik asit reaktifi(T.4) hazırlanışı:

15 ml. sulu %3 lük Borik asit çözeltisi ve 5 ml.

Okzalik asit(% 10) çözeltisi karıştırılır..Püskürtmeden sonra plaka 10-15 dakika 120°C'de ısıtılır ve U.V. ışığında uzun dalga boyunda incelenir(Macek, 1972).

Demir(III) klorür reaktifi(T.2) hazırlanışı:

0,5 ml. % 5 sulu $FeCl_3$, 20 ml. metanolla karıştırılır(Macek, 1972).

Gümüş nitrat - Amonyak reaktifi(T.1) hazırlanışı:

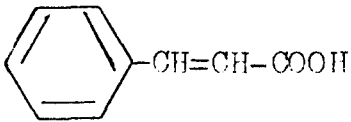
0,1 N $AgNO_3$ ve 5 N NH_3 çözeltisinden eşit hacimlerde alınır. Kullanılmadan önce karıştırılır(Macek, 1972).

Tungustad - Molibdat reaktifi(T.3) hazırlanışı:

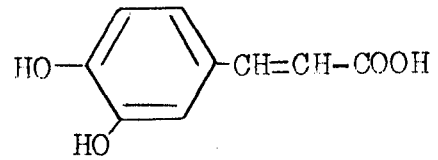
Bu reaktif D(140)'a göre hazırlanır(Macek, 1972).

2. FENOLİK ASİTLER

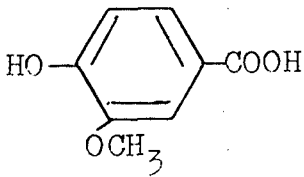
Fenolik asitler yapılarında benzen halkası, karboksilik asit grubu ve değişik konumlarda sübstitüentlerin (-OH, -OCH₃, gibi) bulunduğu bileşiklerdir. Fenolik asitlerden sinnamik asit(tarçın asidi) (35), 3,4- dihidroksi sinnamik asit(kafeik asit) (36), 4- hidroksi - 3- metoksi benzoik asit(vanilik asit) (37), 2,5- dihidroksi benzoik asit(gentisik asit) (38) ve 2- metoksi benzoik asit(o- anisik asit) (39) aşağıda verilmiştir(Becker and Exner, 1980).



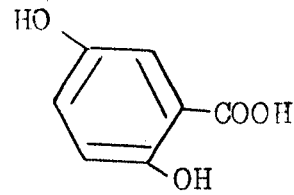
35



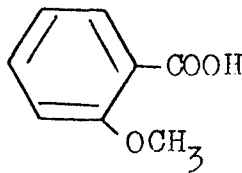
36



37



38



39

3. VISCUM ALBUM L.(Ökseotu)

3.1. Bitkinin Tanımı

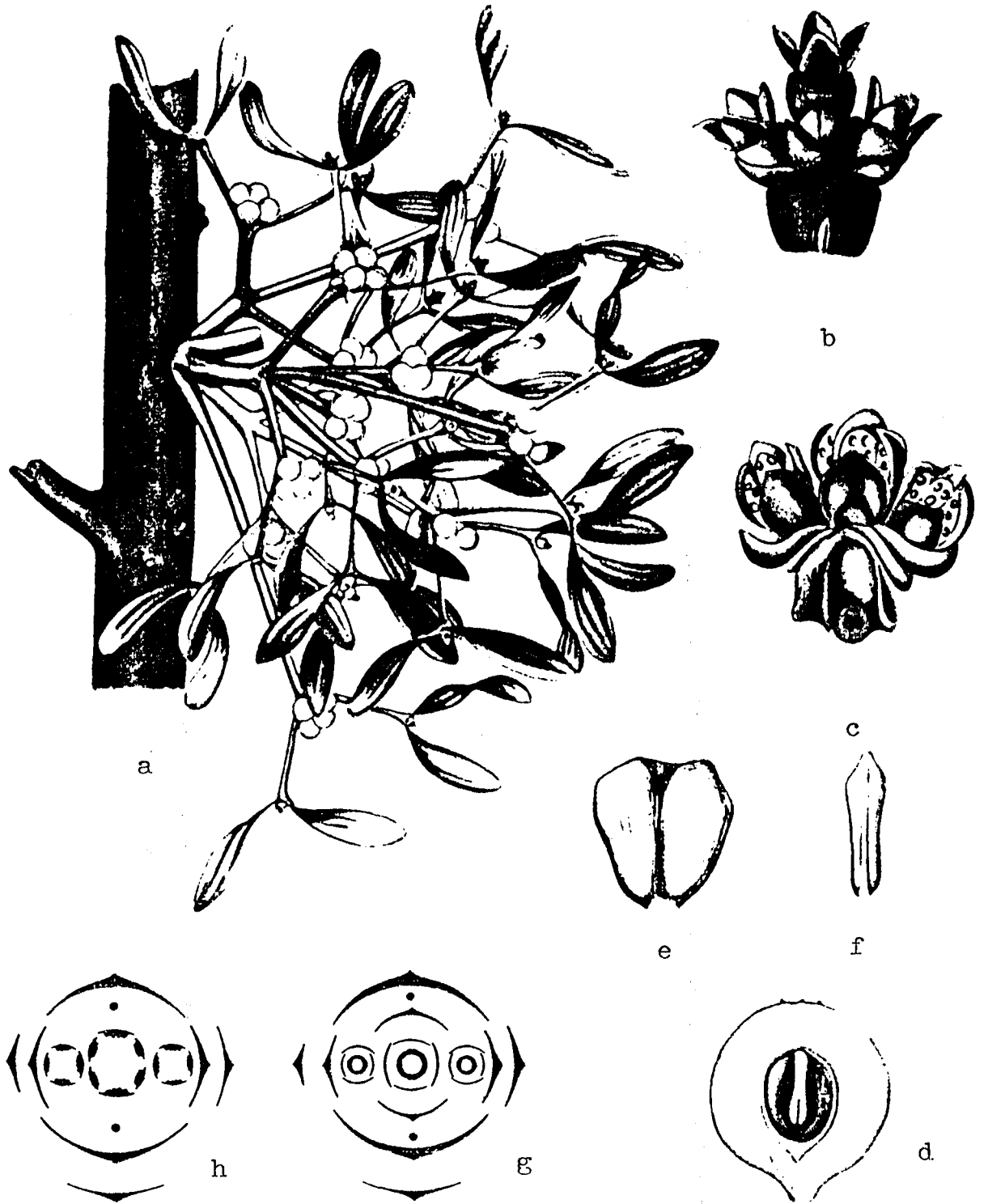
Viscum album L. Lorantaceae türünün kurutulmuş yapraklarıdır. Özellikle odunlu bitkilerin(elma, armut, kiraz, erik, ıhlamur, kavak, meşe, çam, köknar gibi) dalları üzerinde yarı parazit olarak yaşayan ve çalimsı kümeler meydana getiren bir bitkidir. Mart - Nisan aylarında sarımsı renkli çiçekler açan, kışın yapraklarını dökmeyen 30-80 cm. yüksekliğinde çok senelik bir bitkidir. Kendisini üzerinde yaşadığı ağaca havstoryumları vasıtasıyla tespit eder. Bunlar dalların iletme sistemlerine kadar uzanır ve oradan su ile suda olası tuzları temin eder (Şekil 3,1a). İkiye çattallanmış dalları üzerinde, yapraklar karşılıklı dizilmiş, sapsız ve taban kısmına doğru daralan oval biçimli, kenarları tam, ucu küt olan yaprak ayaları kalın ve derimsidir. Çiçekler çok küçük ve tek cinsli olup dalların ucunda, 3-5 tanesi bir arada, küçük durumlar meydana getirirler (Şekil 3,1 b,c). Erkek çiçeklerde 4-6 perigon yaprağından ibaret bir çiçek örtüsü bulunmaktadır. Perigon yapraklarının altında bulunan ve onlarla bir tek yapı meydana getirecek tarzda birleşmiş olan erkek organların filamentleri yoktur. Antenler herbiri bir delikle açılan bir çok polen odasına ayrılmıştır. Dişi çiçeklerde perigon 4 parçalı, ovaryum alta, stilus kısa, stigma şişkincedir. Meyve önce yeşil, sonra beyaz veya sarımsı bir renk alan hücre şeklinde, yalancı

bir bakkadır (Şekil 3,1 d). Yapışkan bir madde taşır. Bu maddenin biyolojik bakımdan önemi, meyveyı yemek için gelen kuşların gagalarına yapışmasını sağlayarak meyva ve tohumların uzaklara kadar dağılmasını temin etmesidir. Kuşların gagalarını temizlemek maksadıyla sürdükleri dallara yapışan tohumlar burada çimlenir. Tohum zarına sahip olmayan tohumlar zengin bir endosperma, bir veya genellikle 2-3 embriyo içermektedir (Şekil 3,1 e,f).

Dağılımı : İstanbul, Tekirdağ, Bursa, Ankara, Bolu, Bilecik, Samsun, Giresun, İzmir ve Adana(Bürücek yaylası) olmak üzere aşağı yukarı bütün Anadoluya yayılmış bulunmaktadır.

Kullanılan kısımları : Yaprakları(Folia Visci), dalları(Stipites Visci) ve yapraklı dalları(Herba Visci) meyveler oluşmadan toplanır ve havadar bir yerde veya fırınlarda kurutulur. Kuru meyveler siyahımtırak renkli, üzeri buruşuk, kokusuz ve tatsız taneler halindedir.

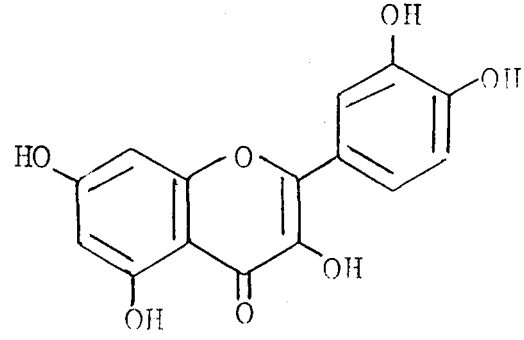
Anadolu'da ökse otu çekem, burç, gevele, gökçe, gövelek ve güvelek isimleriyle bilinmektedir(Yakar, 1964; Baytop, 1963; Zeybek, 1985).



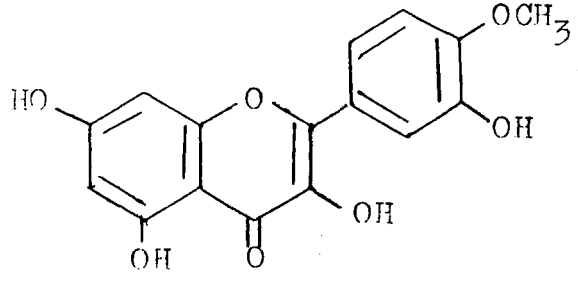
Şekil 3.1. *Viscum album* L.: a) meyva taşıyan dişi bitki, b,c) dişi ve erkek çiçek durumu, d) meyvadan boyuna kesit, e,f) tohumun önden ve yandan görünüşü, g,h) dişi ve erkek çiçek durumunun diyagramı.

3.2. Bitkinin Kimyası

Viscum album abiets ve Viscum album acusicum'un petrol eteri özütü buhar destilatının asetik, propiyonik, bütirik, valerik, izovalerik, koprik, enantrik ve serik asit içerdiği bulunmuştur. V. album'un büyüdüğü bitki yağ asitlerinin oluşumuna etki eder. Örneğin, söğüt ve akça ağaçta büyüyen V. album'da propiyonik asidin olmadığı, ancak kara kavak, armut ve elmada parazit olarak yetişen V. album'da propiyonik asidin olduğu bulunmuştur(Krzaczek and Markowski, 1978). Değişik ağaçlarda büyüyen ökseotunun ince dalları, çiçekleri ve yapraklarında bulunan (havada kurutulmuş) kuersetin(40), 3- metoksi kuersetin, 3,3'- dime-toksi kuersetin, 3,7- dimetoksi kuersetin, 3,3',7- trimetoksi kuersetin, ramnetin(41), izoramnetin ve ramnozin(42) varlığının ağaçlar arasında fazla değişmediği görülmüştür(Becker and Exner, 1977). Ökseotundan yedi flavonoid izole edilmiş ve yapıları tayin edilmiştir. Hepsi de flavanol yapısı içermektedir ve kuersetinden(40), metilasyonla türetilmiştir. Bunun yanısıra beş tane de karboksilik asit izole edilmiş ve bu asitlerin yapıları tayin edilmiştir. Bunlar anisik (39), gentisik(38), vanilik(37), kafeik(36) ve sinnamik(35) asitlerdir. İzole edilen flavonoid ve asitlere dayanarak farklı ağaçlarda büyüyen ökseotunun karşılaştırılması yapılmıştır. Avrupa ve Japon ökseotunda büyük farklılıklar olduğu anlaşılmıştır(Becker and Exner, 1980).



40



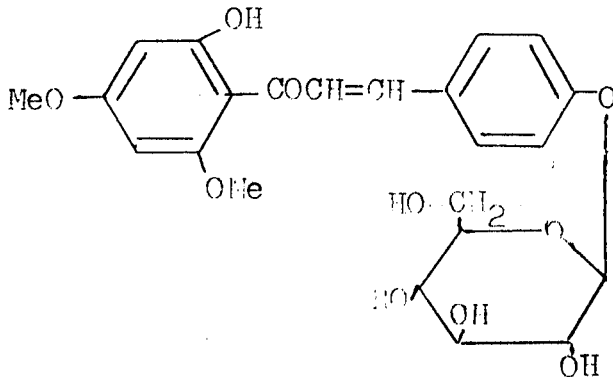
41

Ihlamur, akça ağaç, kara kavak, armut, alıç ve meşe ağaçlarında büyüyen ökseotundaki mono fenolik flavonoid türevlerinin parazit epiderminde aynı olduğu anlaşılmıştır (Tranchet, 1972). Oniki çeşit ağacın yapraklarından elde edilen ökseotundaki flavonoid glikozitleri ve aglukonları İ.T.K. ile incelenmiştir. V. Album ve büyüdüğü ağaçtaki flavonoid glikozitlerinin R_f değerlerinin benzer olduğu anlaşılmıştır. V. album'de bulunan toplam flavonoid miktarı, büyüdüğü ağaca bağlı olarak % 0,075-0,365 oranında bulunmuştur (Hodison and Tamas, 1982).

V. Album yapraklarındaki klorofil miktarı büyüdüğü ağacın yapraklarındaki klorofil miktarından daha az olduğu bulunmuştur. En yüksek miktar Temmuz da elde edilmiştir (ökseotu için). Haziran da ise büyüdüğü ağaçtaki klorofil miktarı en yüksek olarak bulunmuştur (Deliu and Stirban, 1976).

Şimdiye kadar bilinmeyen bir kalkon (2'-hidroksi-4',6'-dimetoksi kalkon-4- glikozid) (43), Avrupa ökseotun-

dan izole edilmiş ve teshisi yapılmıştır(Becker, et al., 1978).



43

Elma ve kavak ile çam ve köknar üzerinde büyüyen Avrupa ökseotundaki ligninlerin(odunsu bitkilerde bulunur bitkinin sertliğini ve dik durmasını sağlar) ^{13}C -NMR spektrumları alınmıştır. Bu iki grup arasında farklılıklar olduğu gözlenmiştir(Nimz, et al., 1974). Ökseotu lignini tipik angiospermdir. Ökseotunun bu özelliği spektroskopik (UV , IR , ^{13}C -NMR) fonksiyonel grup analizlerine ve parçalanma ürünlerine (nitro benzen oksitlenmesi ve asitlendirme) dayanan incelemelerle büyüdüğü ağaçtaki ligninler karşılaştırılmıştır. Avrupa ökseotunun büyüdüğü ağaçtan bağımsız olarak sentezlendiği anlaşılmıştır(Kurado and Higuchi, 1976).

Elektroforez ile saflastırılan V. album lektininin boyama reaksiyonu gözlenmiş ve gaz-sıvı kromatografisi (G.S.K.) ile yapılan ölçümde % 11 karbonhidrat içeren gluko protein bulunacağını göstermiştir. Sodyum dodesil sülfat/ poliamid jel elektroforesi ve sedimentasyon deneyleri lek-

tinin molekül ağırlığının yaklaşık 60.000 olduğunu, iki bazik alt ünitesinin molekül ağırlıklarınınınsa 34.500 ve 29.000 olduğu bulunmuştur. Lektinin izoelektirik noktası 6.1 olup anti β - galaktozil özelliği gösterdiği saptanmıştır (Luther, et al., 1980). Batı Alman ökseotu lektini I, değişik galaktoz analogları ve yapılan hemagglutinasyon çalışmalarında belirtildiği gibi galaktoz C-2, C-3, C-4 konumlarında OH grupları içermelidir. Lektin bağlanması hidroksil gruplarının C-2, C-3, C-4 konumlarında ekvatoryal olması gerektiğini göstermiştir. C-6 hidroksil grubu lektin bağlanması için gerekli değildir. Lektin-disülfür gruplarının kırılması, lektin-tirosil gruplarının modifikasyonu ve lektinin bağlanma kapasitesini engellemesi, bu ortamların lektin bağlanmasında varolduğunu göstermiştir (Ziska and Franz, 1980). Lektin I'e özgü ökseotu A ve B galaktoz zincirleri arasındaki disülfür bağının önce safaroz 4B ile kısmen hidrolize olması ve daha sonra kırılması ile izole edilmiştir. Ayrılan A zinciri karbonhidrat taşınımı için afinite göstermeyip kolonu önce terkettiği gözlenmiştir. Böylece Lektin I'in galaktoza spesifik kısmının B zinciri olduğu bulunmuştur (Franz, et al., 1982).

Viscumini I, ökseotu özütünden asit uygulanmış safaroz 4B üzerinden kolon kromatografisi ile ayrılmıştır. I kolona seçici olarak bağlanmış ve laktozla izole edilmiştir. SDS li ortamda poliakrilamid jel elektroforezinde göç etmiştir (molekül ağırlığı 60.000). Diğer iki bandın molekül ağırlığı 29.000 ve 32.000 olarak bulunmuştur. I, 2- zincirinden disülfür bağı ile oluşmuştur. I'e karşı anti serumla

koruma deneyleri, ökseotundaki esas stotoksik aktivitenin I'den dolayı olduğunu göstermiştir. I, düşük derişimlerde monomer, yüksek derişimlerde dimer olarak bulunur. I hareketli hücre sisteminde protein sentezini engeller. I'in 2-peptid bileşeni poliakrilamid jel'inden elde edilmiş ve hücre - serbest protein sentezini engelleme testi yapılmıştır. Bu özelliğın hızlı hareket eden A-zinciri ile ilişkili olduğu ve diğer zincirin B-zinciri olduğu anlaşılmıştır. A-zinciri protein sentezini ribozomları katalitik olarak inaktive ederek engellendiğı bulunmuştur(Olsnes, et al., 1982).

V. Album'un köklerinden ve tohumlarından iki ayrı lektin özütlenmiştir. Büyük olanı(I), küçük olanından(II) daha büyük hemagglutinasyon aktivitesi göstermiştir. I ile hemagglutinasyon her kaynaktaki D-galaktoz ile engellenmiştir. Fakat II ile hemagglutinasyon N-asetil- D-galaktoz amin ve D-galaktoz ile eşit miktarda engellenmiştir. Her kaynaktaki iki lektin arasında immunolojik(bağışıklık) çapraz reaktivite gözlenmiştir(Samtleben, et al., 1985). V. album lektinin tayininde lektinin bağlanma aktivitesinin ne şekilde olduğunu gösterir yeni ve oldukça özel yöntem geliştirilmiştir(Vang and Boeg-Hansen, 1986).

V. album özütünden kısmen hidroliz edilmiş safaroz ve insan Ig-safarozdan afinite kromatografisi ile üç lektin izole edilmiştir. Lektinlerin moleköl ağırlıkları sırasıyla 115.000, 60.000 ve 50.000 tayin edilmiş ve D-galaktoz, D-galaktoz e/N-asetil-D-galaktozamin ve N-asetil-D-galaktozamine özgü oldukları bulunmuştur. Her üçüde A,B ve O

kan grupları için spesifik olmayıp, insan eritrositleriyle reaksiyona girmektedir(Franz, et al., 1981).

Ökseotu lektini I(ML I), uranly tuzları ile negatif boyanıp elektron mikroskopu ile incelenmiştir. İncelenen protein derişimlerinde monomer ve dimerler arasında denge bulunmuştur. ML I monomer boyutları $80 \times 90 \text{ \AA}$ olan hemen hemen yuvarlak ve üçgen profil göstermiştir. ML I dimerleri silindir benzeri parçacıklar olup iki üçgen şeklindeki parçacığın birbirine karşı birleşmesinden oluşmuştur ve boyutları $175 \times 80 \times 60 \text{ \AA}$ dur(Lutsch, et al., 1984). ML I ökseotunun yapraklarında özel antibody proteini ile vakuolar proteininde depolandığı anlaşılmıştır. Bitkideki lektin miktarındaki mevsimsel değişiklikler ve lektinin yerinin belirlenmesi ML I'in protein depolanmasında rol oynadığını göstermiştir(Neumann, et al., 1986). Ökseotu lektinlerinin preparatlarının hazırlanması, karakterize edilmesi ve ML II'nin sitotoksik A ve B zincirlerinin diğer biyolojik aktiviteleri hakkında ayrıntılı derleme yapılmıştır(Franz, 1986).

Ökseotundan elde edilen D-galaktoz spesifik lektin ve V. faba'dan elde edilen D-mannoz spesifik lektin, karşı geldikleri karbonhidrat kısımlarını içeren serum proteinleriyle tepkime verirler. İnsan serumunun afinite kromatografisi ile sefaroza bağlanmış çözünmez lektinlerin kombinasyonunu kullanarak serum proteinlerini üç gruba ayırmak mümkündür. 1- Lektinlerin her ikisinde tepkime veren proteinlerdir, 2- lektinlerden sadece biriyle tepkime veren proteinlerdir, 3- her iki lektinde hiçbir ilgi göstermeyen proteinlerdir(Ziska and Franz, 1979).

3.3. Tıbbi Kullanım Alanları

V. album'dan elde edilen lektinin eritrositlere ve tümör hücrelerine bağlanma etkisi plazma proteinleri tarafından azaltılır veya tamamen ortadan kaldırılır. Ökseotu çözeltileri(Viscum R, U ve A), kurutulmuş yaprak ve dallardan % 0,9 NaCl özütlemesi ile hazırlanır. Özütler immunoglobulinler ile karıştırılır ve lektin, afinite kromatografisi ile ayrılır. Agglutinasyon(yapıştırma), farelerdeki tümör hücrelerinde test edilir(Franz, et al., 1977). Ökseotu özütlerinin afinite kromatografisinin tümör hücrelerine agglutinasyon özelliğinin olduğu ve hücrelere toksik etkisinin olduğu anlaşılmıştır. Süzüntü, molekül ağırlığı 10.000 den büyük olan eritrositlerden daha çok toksin içerir. Ancak hücreleri agulitine etmez(Luther, et al., 1977).

Öğütülmüş ökseotu bitkisinden galaktoz, bağlı hemogglutininin afinite kromatografisi ile 0,2 M HCl uygulanmış safaroz 4B üzerinden ayrılmıştır. Şeker miktarı %10,1 ve molekül ağırlığı 115.000 olarak tayin edilmiştir. Buna nazaran bu hazırlama insan kan tipleri için spesifik değildir, ancak az miktarda fare ve tavşan eritrositlerine karşı reaktiftir. D-galaktoz, laktoz, rafinoz ve galaktoz için engelleyicidir. Bu madde 30 dakika sürede 50°C de kararlıdır. Sıcaklık 60°C olduğunda kararlılık ortadan kalkar(Ziska, et al., 1978).

Ökseotunun yaprak ve olgun meyvelerinin metanol özütü kromatografi yöntemi ile çeşitli fraksiyonlara ayrılmış, engelleyici ve uyarıcı aktivite incelenmiştir. Max.

engelleyici aktivite yanrak ve meyvelerin suda çözünen fraksiyonunda bulunmuştur. Nötr-eter fraksiyonu indol özelliği ve uyarıcı fonksiyon içermediği bulunmuştur. Asit-eter fraksiyonunda ise ayrılabilen değişik aktiviteler içeren maddeler bulunduğu saptanmıştır. İndol asitleri, gibberalik asitler ve gibberalinler kromatografi yöntemi ile tanımlanmışlardır. Böylece özütün hem bünyeyi uyardığı, hem de engelleyici özelliği olduğu anlaşılmıştır(Krivokapic, 1975).

Ökseotundan elde edilen lektin, tavşan retikuloylarında protein oluşumunu engellemektedir(2,6 μg / mol, derişim % 50 engelleme yapmaktadır). Lektin, 2- merkaptoetanol ile indirgenerek etki artırılmıştır. Lektin aynı zamanda kültürdeki BL8L hücrelerinde 3 saat sonra 7 mg/ml derişimde protein oluşumunu engellemiştir. Böylece ökseotu toksini risine benzemektedir(Stirpe, et al., 1980).

Elma ağacında büyüyen ökseotundan elde edilen protein preparatı olan izorel M'nin iki günde bir(400 mg/ kg) olacak şekilde insan meme kanseri nakledilmiş farelere enjeksiyonu, tümörün büyümesinde engelleyici etki göstermiştir(Pauckova, et al., 1986). Ökseotu özütünün belirli anti-tümör aktivitesinin olduğu in vivo(canlıda) murin tümörlerine, levis akciğer kanserine, kolon adenokarsiroma 38'e ve C3H mammary adenokarsiroma 16/C ye karşı aktivite gösterdiği bulunmuştur. Biyolojik aktivitesi olan alkaloidlerin, ökseotundan özütü için yöntemler bulunmuş ve bunların anti kanser aktivite mekanizmalarına katkıları önerilmiştir. İn vitro - in vivo anti kanser etkisi ayrıntılı olarak der-

lenmiştir(Khwaja, et al.,1986).

ML deki lektin I'in ve bundan izole edilmiş A ve B-zincirlerinin insan mononükleer hücrelerindeki etkileri incelenmiştir(Metzner, et al., 1987).

Ökseotu preparatlarındaki lektin ve şu ana kadar izole edilen Viskotoksinler(alkoloit türü), kantitatif olarak tayin edilmiştir. Iskador(kanserostatik preparat) ve mayalanmış ökseotu özütünden lektinler afinite kromatografisi ile izole edilmiş ve izo elektirik noktaları ile analizleri yapılmıştır. Böylece Iskador ve mayalanmış ökseotu özütünde sadece ML II/III bulunmuştur. ML I'in kompleksine rastlanmamıştır. Lektin miktarı teleradyan immunodifüzyon yöntemi ile tayin edilmiştir. Viskotoksinin tanımı ve kantitatif tayini için HPLC yöntemi uygulanmıştır(Jordan and Wagner, 1986 a). Ökseotu özütünün kanser tedavisinde farmokolojik etkisinin nedeni büyük bir olasılıkla polisakkaritlerden dolayıdır. Bu nedenle taze bitkinin suda çözünen polisakkaritleri ve mayalanmış özel preparatları hazırlanmıştır. Iskador izole edilmiştir ve spektroskopik(^{13}C -NMR olarak yapısı tayin edilmiştir. Viskumun yeşil kısmının esas polisakkariti, esterleşmiş galaktofüronandır. Halbuki meyvesinde kompleks arabinogalaktoz fazla miktarda bulunur. Viskumdaki galaktoz, özel lektin'in(ML I) arabinogalaktoz ile etkileşim gösterebilir. Üç immunolojik test de (gronulokit, kemiluminesans, karbonkleranse testi) polisakkaritlerin, granülasitlerin ve makrofajların fagositik aktiviteleri artmıştır(Jordan and Wagner, 1986 b).

ML lektini insan lenfositleri için mitojen olarak davranır. Aktivitenin hücre membran lektinine bağlanmasını içeriyor gibi görünmez, ancak hidrofobik etkileşimler içerir (Metzner, et al., 1986). Geniş yapraklı ağaçlarda parazit olarak büyüyen ML'nin biyo yapılarının mineral etkileşimleri incelenmiştir (Novacek and Teteroca, 1987).

Ticari olarak hazırlanan ökseotu preparatlarının ELISA testi, preparatların kaynağına bağlı olarak büyük değişiklikler göstermiştir. Bu değişiklikler mevsimsel farklılıklardan, ökseotunun büyüdüğü ağaç tipinden, özütteki hammadde derisiminden veya ticari hazırlama yöntemlerinden kaynaklanmıştır. Böylece toksik ökseotu lektini kanser tedavisinde dikkate alınmalıdır (Ziska and Franz, 1985). Avrupa ökseotu preparatı olan Iskador kanser kemoterapisinde yaygın olarak kullanılmaktadır ve Viskumin yapı ve fonksiyonel olarak çok benzer olan toksik bileşik içerdiği saptanmıştır. Anti-viskumin ortamda bulunduğu zaman ve ro hücreleri kuvvetli ancak tamamen olmayacak bir şekilde Iskadora karşı korunurlar. Iskadordaki esas sitotoksik bileşen Viskumin gibi uç indirgeyici olmayan galaktoz kısmına bağlanır. Böylece ortama galaktoz, laktoz veya melibiyoz gibi şekerlerin eklenmesi sitotoksik aktiviteyi bloke eder. (Hodskok, et al., 1988).

Ökseotundan elde edilen phytohemagglutinin homojen edilmiş ve farelere enjeksiyonu yapılmıştır. Enjeksiyondan (10 µg/kg vücut ağırlığınının) 24 saat sonra kanser hücrelerinin büyümesinin durduğu ancak inokülasyondan 3-5 gün sonra hiç bir etkinin olmadığı anlaşılmıştır (Lutsik, 1975).

Abrin, risin, modesin(her üçüde toksik bitki prote-inleri olup, eukaryotik ribozomla protein sentezini engel-lerler ve kanser hücrelerine toksik özellikleri vardır) ve viscumin enzimatik olarak hücre içi hedefleri inaktive ede-rek etkilerini gösterirler. Toksinler fonksiyonel olarak iki farklı kısım içerirler. Bunlardan birisi bağlama ortamı ve diğeri de disülfür köprüsü ile bağlanan, enzimatik ola-rak aktif ortamdır. Aktif kısım stoplazmaya girer ve prote-in sentezinin bileşenini inaktive eder. Abrin, risin, mode-sin ve viskumin toksinleri 60 S ribozomal alt ünitesini i-naktive ederler. Toksinler limitli sayıda yüzey alanları ile bağ yaparlar. Bitki toksinlerinde alıcılar, uç galak-toz kalıntısı içerirler. Toksinlerin anti kanser özellik-leri vardır. Özellikle toksinlerin kemik ligninine çok az etki ettiği görülmüştür. Toksinler enzimatik mekanizma-larının sonucu olarak bir toksin molekülü, büyük sayıda hü-c-re içi hedef moleküllerini inaktive edebilir. Aslında si-tozoldeki tek toksin molekülü bile hücreyi öldürmeye ye-terlidir. Bazı toksin proteinlerinin hayvan model sistem-lerinde kansero statik olduğu ispat edilmiştir. Ancak bu kötü huylu hücrelere karşı artırılmış seçicilik, sadece toksinin enzimatik olarak aktif olan kısmı ile olur ve bu da kısıtlıdır(Olsnes and Pihl, 1982 a). V. Album ve diğer toksinlerin protein olarak nasıl girdiği ve nasıl öldürdüğü enzimatik olarak açıklanmıştır(Olsnes and Pihl, 1982 b).

Ökseotu özütünden elde edilen lektinin-NH₂, -SH, -SS-, -COOH, fenolik imidazol ve indol gruplarının insan eritro-sitlerine agglutinasyonu(yapışma) özel kimyasal modifikas-

yon teknikleri kullanarak tayin edilmiştir. Sonuçlar tirozin ucunun, hemagglutinasyon(çöktürme) reaksiyonuna katkısı olduğunu göstermiştir. Lektinin alt birimleri azaltılmış hemagglutine özelliği içerdiği bulunmuştur(Ziska, et al., 1979).

Ökseotu özütünün sitotoksik ve yönlendirilmiş fraksiyonlandırılmasında, ham viskotoksinin bazik polipeptid fraksiyonu bitkinin sitotoksik özelliğinden sorumlu olduğu düşünülmüştür. Bu fraksiyon karbometoksi selülöz-iyon-yer-değiştirici kromatografisi ile ayrılması beş sitotoksik bileşeni vermiştir. İzole edilen polipeptidler insan tümör hücrelerinde sitotoksik aktivite göstermiştir(ED_{50} 0,20-1,7 $\mu\text{g/ml}$ değerinde). Hücre kültürü mikoplazma ile kontamine(kirletildiğinde) olduğunda aktivitede büyük azalma olmuştur. Tayin edilen molekül ağırlığı (~ 5000) ve aminoasit maddeleri II, III ve IVb nin viskotoksin B, A-2, A-3 ile aynı olduğunu göstermiştir(Konopa, et al., 1980).

Ökseotu özütünden elde edilen lektin(ML I)' in fluoresin etiketlenmiş, bağlanması karşılaştırılmıştır. İki etiketli lektin dokularla inkübe edilmiş ve bunların dağılımı floresans mikroskopu ile incelenmiştir. Her iki lektininde doku bileşenleri için benzer seçiciliklerinin olduğu bulunmuştur. Lektin-blotting(boyama) tekniği, risin 120'nin plazma membranında fonksiyonu olarak bulunan proteine seçici olarak bağlandığını göstermiştir(Groeger, et al., 1983).

Antispazmatik, tansiyon düşürücü ve idrar söktürücü olarak kullanılmaktadır. Heba viski özütü hipertansiyon tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca kanserositatik prepa-

ratlar(örneğin Iskador) içermektedir.

Meyvaların yakı sakızı ile ezilmesi sonucu elde edilen karışım, Güneydoğu Anadolu bölgesinde yakı halinde romatizma ağrılarınin giderilmesinde kullanılmaktadır. Ezilmiş meyveler çıban üzerine konarak çıbanın açılması ve ce-
rahatın dışarı çıkarılması sağlanır.

Kışın yeşil olan yaprakları hayvanlara yem olarak verildiği gibi yapışkan bir madde içeren meyvaları kuş tutmak için ökse denilen bir çeşit tuzak yapımında kullanılır. Ökseotu ismi buradan gelmektedir. Orman ve meyva ağaçları için zararlı bir bitkidir(Baytop, 1963,1984; Yakar, 1964; Zeybek, 1985).

4. ÇALIŞMANIN AMACI

Bölüm 3.2 de değişik ağaçlarda büyüyen *Viscum Album* L.(Ökseotu) den, yedi flavonoid ve beş karboksilik asit izole edilmiş ve yapıları tayin edilmiştir(bkz. sayfa 17), (Becker and Exner, 1980).

Bu çalışmada Eskişehir Orman Fidanlığı'ndan toplanan ve kara kavak üzerinde büyüyen *Viscum Album*'un yaprakları incelenmek istenmiştir.

5. DENEL BÖLÜM

5.1. Kullanılan Çözücüler

Metanol, etanol ve eter damıtma sonucu saflaştırılmıştır.

Hidroklorik asit(% 37,5), benzen ve metil-etil keton Merck kalitede kullanılmıştır.

Püskürtücü reaktif olarak Borik asit - Okzalik asit reaktifi(T.4), kullanılmıştır(Macek, 1972).

5.2 Fiziksel Verilerin Saptanması İçin Kullanılan Cihazlar

IR Spektroskopisi: 270-30 Hitachi Spektrofotometer (Anadolu Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi) ile spektrumlar alınmıştır.

UV Spektroskopisi: 150-20 Hitachi Spektrofotometer (Anadolu Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi) ile spektrumlar alınmıştır.

Öğütücü: Retsch "ZM-1" markalı cihaz ve 0,5 mm.'lik elek kullanarak(Anadolu Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi), öğütülmüştür.

5.3. Kullanılan Silikagel

İnce Tabaka Kromatografisi için Merck kalitede silikagel(GF.254 60)kullanılmıştır. Preparatif çalışmalar için 0,75 mm., analitik çalışmalar için 0,25 mm. kalınlığında plaka kullanılmıştır.

6. DENEYSEL ÇALIŞMA

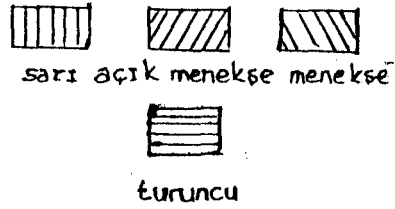
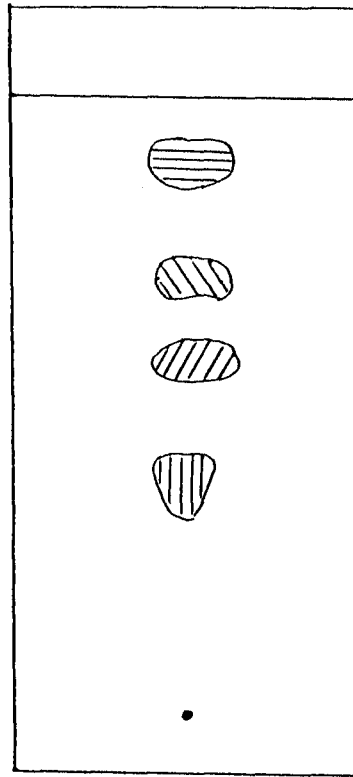
6.1. Viscum Album'un Özütlenmesi ve Su, Eter Fazlarına Ayrılması

Bu çalışmada Eskişehir Orman Fidanlılığı'ndan Temmuz ayı içerisinde toplanan yapraklar, otomatik öğütücüde 0,5 mesh büyüklüğünde öğütüldü. Öğütülen kısımdan 250 gr. alınarak 1200 ml. alkol-su(% 80 metanol) ile cam balonda mazerasyon yöntemi ile (-40°- 0°C) de üç gün süreyle özütlendi. Daha sonra fazların ayrılmasında Becker(1980) yöntemi kullanıldı. Elde edilen karışım süzüldü ve vakum altında buharlaştırıldı. Daha sonra etanol(% 90) ile karıştırıldı, oluşan tortu atıldı ve çözelti yoğunlaştırıldı. Elde edilen maddeye HCl(% 6) eklendi ve geri soğutucu altında bir saat süre ile hidroliz edildi. Karışım soğuduktan sonra eter ilave edilerek su ve eter fazlarına ayrıldı. Su fazı kullanılmadı. Eter fazına NaHCO₃(% 5) ilave edildi. Eter fazı(ETER I: Flavonoidlerin bulunmasında kullanılacak) özütlendi. Su fazına HCl(% 10) eklendi ve bir miktar eter ile karıştırıldı. Tekrar oluşan su fazı kullanılmadı. Eter fazı(ETER II : Fenolik asitlerin bulunmasında kullanılacak) özütlendi(Becker, 1980).

6.2. Eter I Fazının İ.T.K. ile İncelenmesi

Eter I fazının İ.T.K.(SiO₂)'sı değişik çözücü karışımlarında benzen:petrol eteri:metil-etil keton:metanol

(60:26:7:7), benzen:metil-etil keton:metanol (60:26:14) denendi. Ayırımın benzen:metil-etil keton:metanol (60:26:14) de olduğu anlaşıldı. Eter I fazının I.T.K.(SiO₂)'de dört maddenin olduğu gözlemlendi(Şekil 6.2). Bunların gözle görülen renkleri; birinci maddenin sarı, ikinci maddenin önce turuncu sonra yeşil, üçüncü maddenin koyu yeşil ve plakanın en üst kısmında yer alan dördüncü maddenin rengi ise açık yeşil olarak görüldü. Başka bandların olup olmadığının ve önce görülen diğer bandların rengini kesin tespit etmek için püskürtücü reaktif olarak Borik asit-Oksalik asit reaktifi(T.4) püskürtüldü ve 110°C de 10 dakika etüvde bekletildi. I.T.K.(SiO₂)' plakası incelendiğinde dört maddenin varlığı kesin tespit edildi(Şekil 6.2). İlk olarak $R_f=0.576$ da sarı bir nokta halinde bir numaralı madde gözlemlendi. İkinci madde $R_f=0.746$ da hafif menekşe içeren parlak bir nokta, üçüncü madde $R_f=0.805$ de menekşe renkli nokta ve plakanın en üstünde bulunan dördüncü madde $R_f=0.888$ 'de turuncu renkli nokta olarak gözlemlendi.



Şekil 6.1. Eter I fazının analitik İ.T.K.'si.

6.2.1. Eter I Fazının Preparatif İ.T.K. ile Ayrılması

Eter I fazından 2gr. alınarak metanolde çözüldü. 0,75 mm. plakalarda preparatif İ.T.K.(SiO₂)'leri benzen: metil-etil keton:metanol (60:26:14) çözücü karışımlarında alındı. Gözle görülebilen belirgin sarı, turuncu, açık yeşil ve koyu yeşil renkli bantlar görüldü. Başka bantların olup olmadığının anlaşılması ve önce görülen diğer bantların rengini tespit etmek için İ.T.K.(SiO₂) plakası, UV ışının-

da uzun dalga boyunda incelendi. Tespit edilen bandlar ayrı ayrı kazınarak birleştirildi. Süzgeç kağıdından(mavi band) metanol ile alındı. Saf olup olmadıklarını kontrol etmek için analitik İ.T.K.(SiO₂)'sı, benzen:metil-etil keton: metanol (60:26:14) çözücü karışımında alındı. Sonuçta yaklaşık 8-12 mg. madde elde edildi. Daha sonra dört maddenin IR ve UV spektrumları alınıp yapıları tayin edilmeye çalışıldı.

I. MADDE(E-1 S):

Verim: 12 mg. (e.n. alınamadı).

IR ($\bar{\nu}_{\max}$): 3600-3300 cm⁻¹(-OH⁺), 2920-2860 cm⁻¹(=CH), 1710-1690 cm⁻¹(>C=O), 1520-1460 cm⁻¹(aromatik yapı), 1385-1220 cm⁻¹(fenolik-OH⁻) (Şekil 6.3).

UV (MeOH, λ_{\max}) : 280.2, 366.5 nm.

(OH⁻):282.1, 415.5 nm.

(H⁺):280.1, 365.9 nm.(Şekil 6.8).

II. MADDE(E-1 T):

Verim: 8.5 mg. (e.n. alınamadı).

IR ($\bar{\nu}_{\max}$): 3550-3350 cm⁻¹(-OH⁺), 2940-2875 cm⁻¹(=CH), 1740 cm⁻¹(>C=O), 1570-1385 cm⁻¹(aromatik yapı)(Şekil 6.4).

UV (MeOH, λ_{\max}) : 276.3, 375.2 nm.

(OH⁻): 280.9, 400.0 nm.

(H⁺): 277.1, 380.2 nm.(Şekil 6.9).

III. MADDE(E-1 KY):

Verim: 10 mg. (e.n. alınamadı).

IR ($\bar{\nu}_{\max}$): 3600-3250 cm^{-1} (-OH), 2920-2860 cm^{-1} (=CH), 1740 cm^{-1} (>C=O), 1464 cm^{-1} (>C-H), 1383 cm^{-1} (CH₃) (Şekil 6.5.)

UV (MeOH, λ_{\max}) : 398,8 nm.

(OH⁻): 399.5 nm.

(H⁺): 413.2 nm.(Şekil 6.10).

IV. MADDE(E-1 AY):

Verim: 8 mg. (e.n. alınamadı).

IR ($\bar{\nu}_{\max}$): 3600-3300 cm^{-1} (-OH), 2920-2850 cm^{-1} (=CH), 1720 cm^{-1} (>C=O), 1460-1380 cm^{-1} (aromatik yapı)(Şekil 6.6).

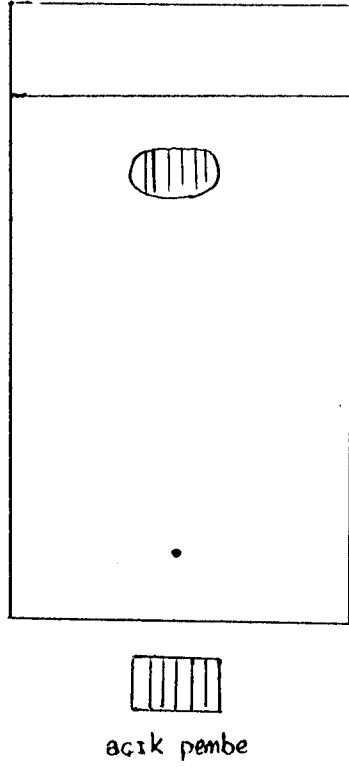
UV (MeOH, λ_{\max}) : 432.0 nm.

(OH⁻): 425.6 nm.

(H⁺): 416.8 nm.(Şekil 6.11).

6.3. Eter II Fazının İ.T.K. ile İncelenmesi

Eter II fazının İ.T.K.(SiO₂) ile incelenmesinde çözücü olarak benzen:asetik asit:su (125:72:3) kullanıldı(Becker, 1980). İ.T.K.(SiO₂) plakası incelendiğinde yeşil renkli tek nokta görüldü(Şekil 6.2). Başka nokta olup olmadığı ve renk tespiti için püskürtücü olarak plakaya borik asit-okzalik asit reaktifi(T.4) püskürtüldü ve 110°C de 10 dakika etüvde bekletildi. İ.T.K.(SiO₂) plakasında tek bir noktanın olduğu gözlemlendi. Bu nokta R_f=0.9584'de açık pembe renkli madde olarak tespit edildi(Şekil 6.2).



Şekil 6.2. Eter II fazının analitik İ.T.K.'si.

6.3.1. Eter II Fazının Preparatif İ.T.K. ile Ayrılması

1 gr. eter II fazından alınarak metanolde çözüldü. 0,75 mm. plakalarda preparatif İ.T.K.(SiO₂)'ları, benzen: asetik asit:su (125:72:3) çözücü karışımında alındı. Gözle görülebilen yeşil renkli bandlar (UV ışınında kontrol edildi, açık pembe renkli) kazınarak birleştirildi. Süzgeç kağıdından(mavi band) metanol ile alındı. Saf olup olmadığını kontrol etmek için analitik İ.T.K.(SiO₂), benzen: asetik asit:su (125:72:3) çözücü karışımında alındı. Sonuçta 15 mg. madde elde edildi, IR ve UV spektrumları alınıp yapısı tayin edilmeye çalışıldı.

V. MADDE(E-2):

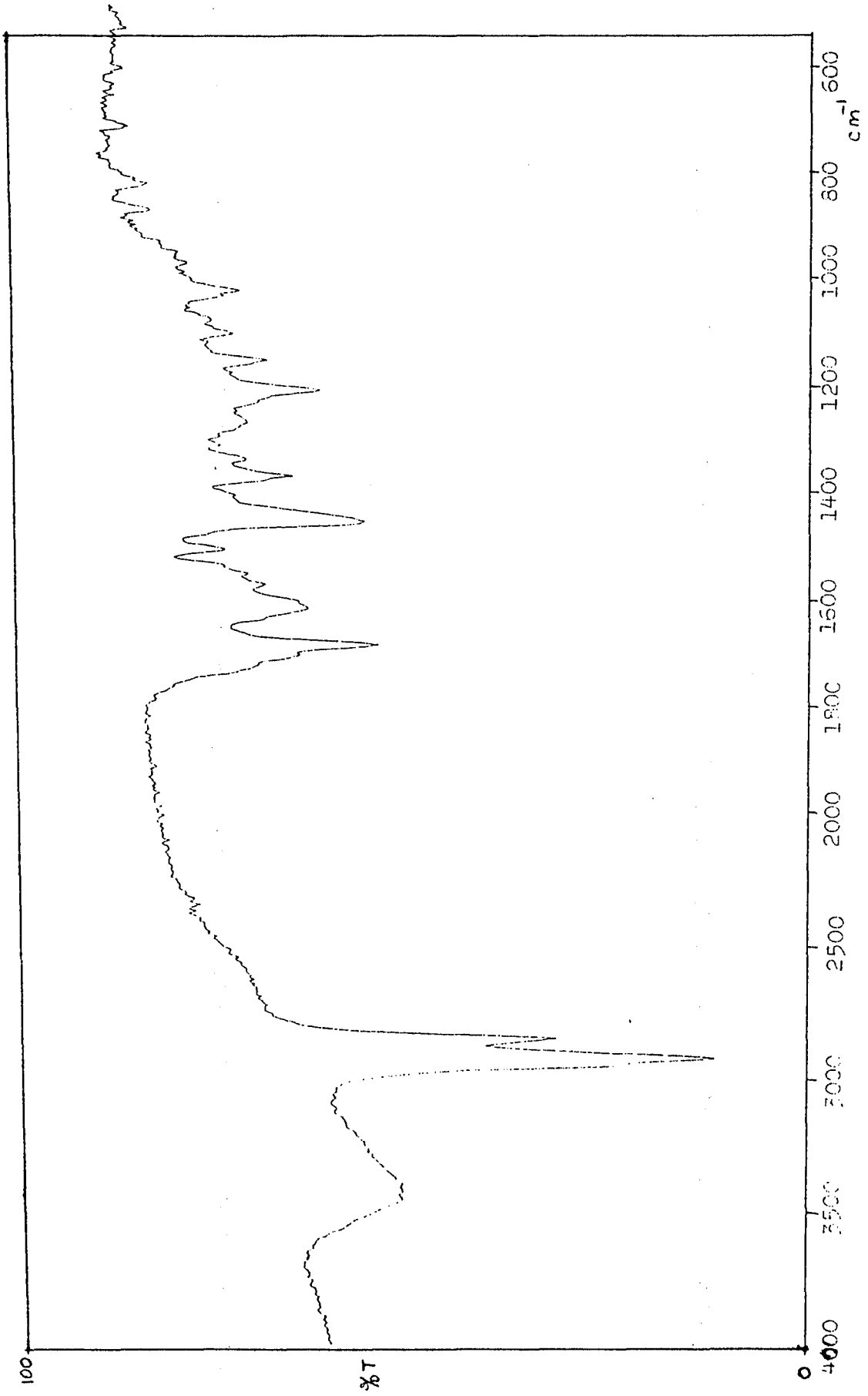
Verim: 15 mg.

IR ($\bar{\nu}_{\text{max.}}$): 3450-3350 cm^{-1} ($-\text{OH}^-$), 2940-2860 cm^{-1} ($=\text{C}-\text{H}$), 1740-1720 cm^{-1} ($>\text{C}=\text{O}$), 1610-1500 cm^{-1} (aromatik halka), 1460-1423 cm^{-1} ($\geq\text{C}-\text{H}$), 880-800 cm^{-1} (para süstitüe benzen). (Şekil 6.7.).

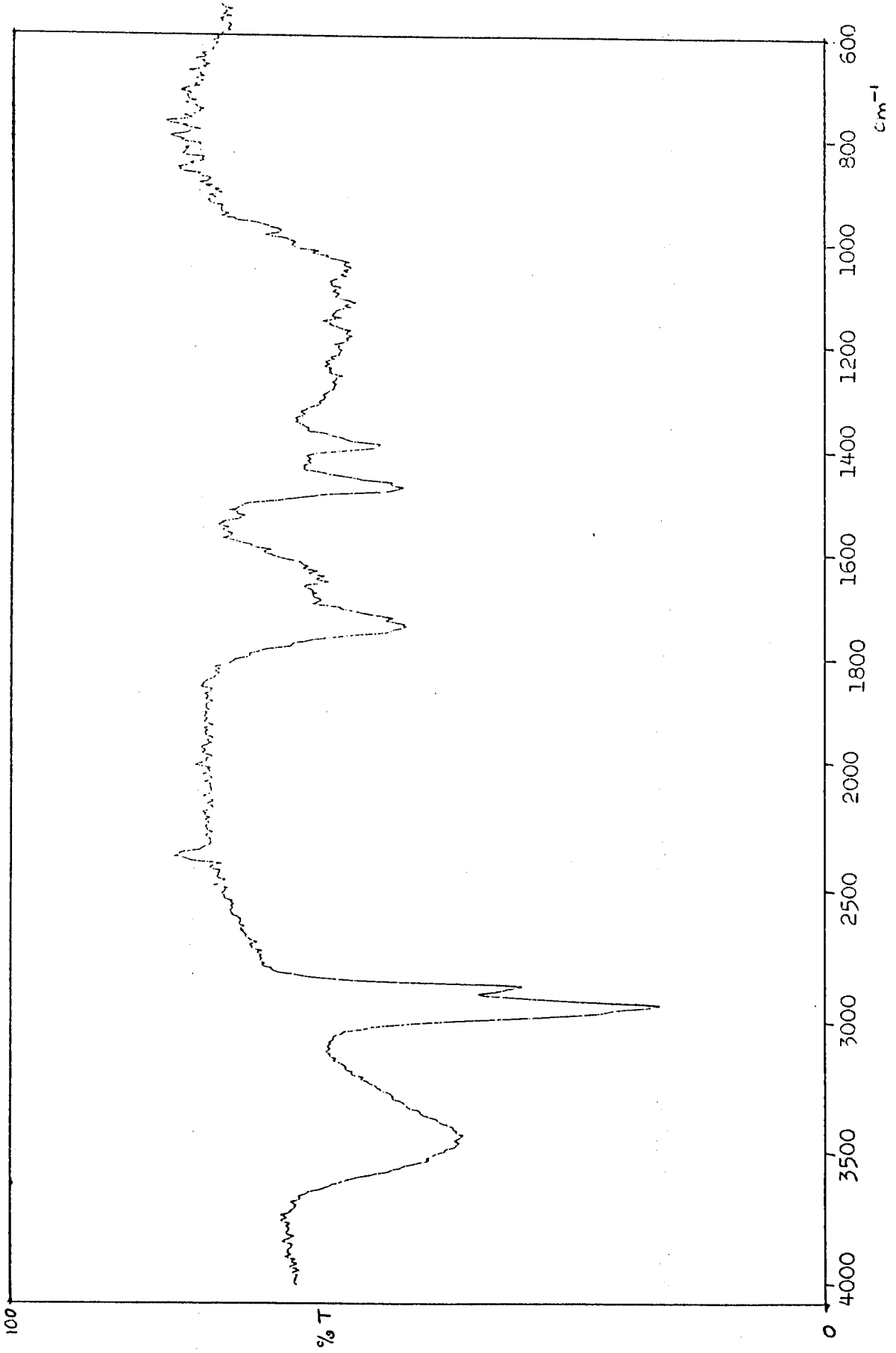
UV (MeOH, $\lambda_{\text{max.}}$): 422.9 nm.

($-\text{OH}^-$): 345.2, 420.1 nm.

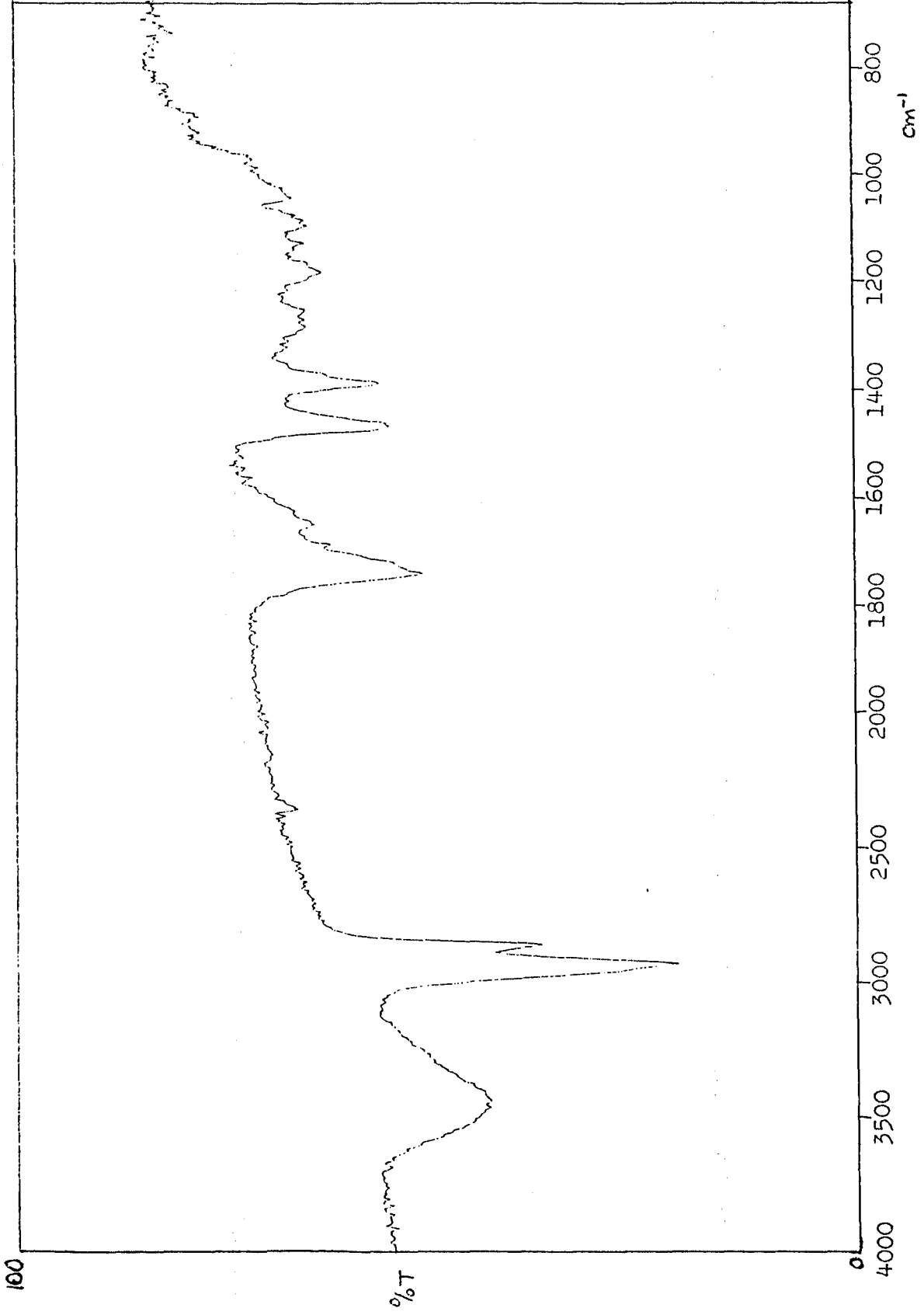
($-\text{H}^+$) : 423.2 nm (Şekil 6.12).



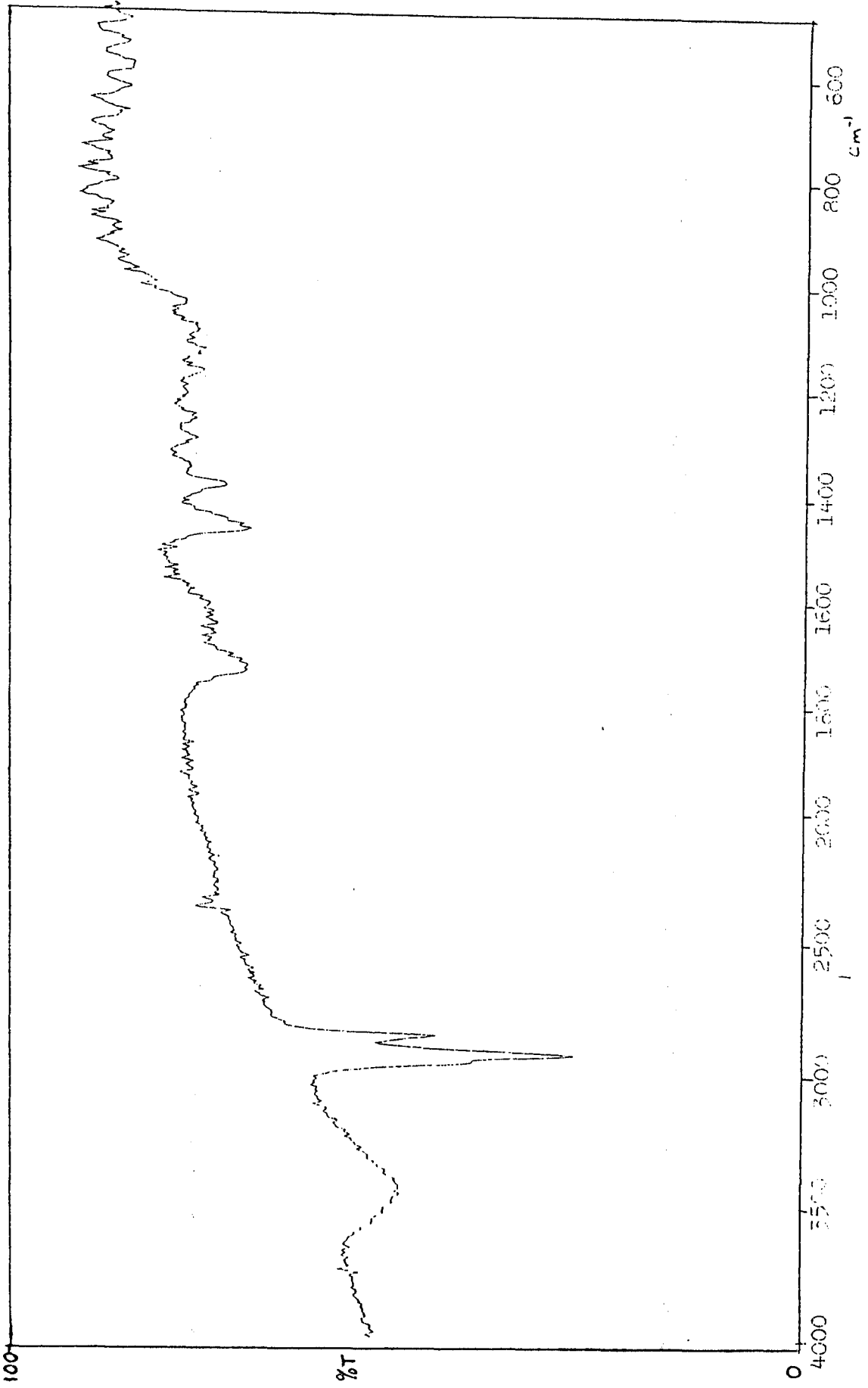
Şekil 6.3. I nolu maddenin IR spektrumu.



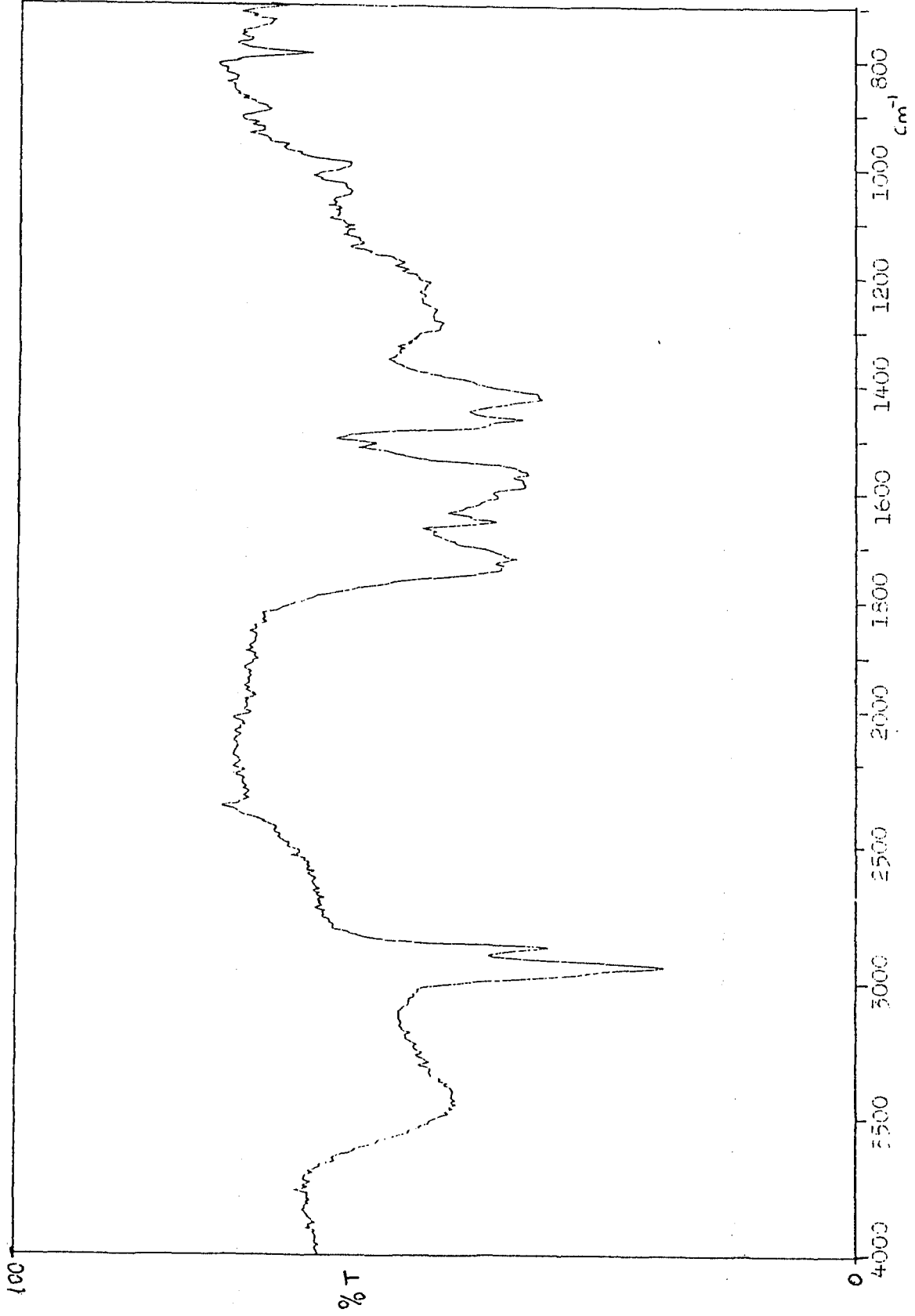
Şekil 6.4. II nolu maddenin IR spektrumu.



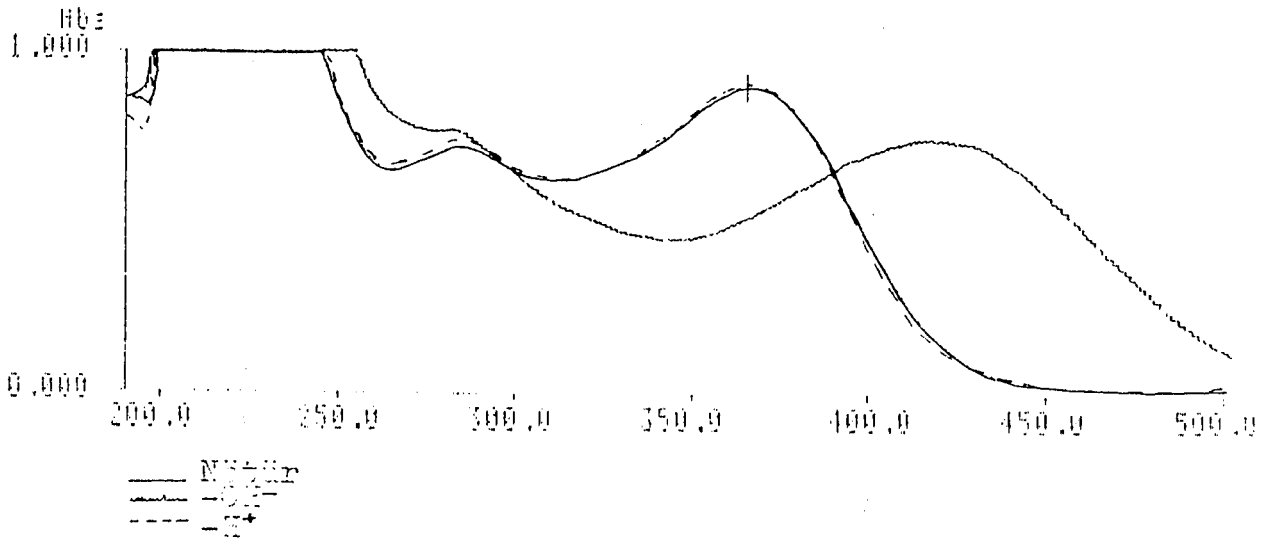
Şekil 6.5. III nolu maddenin IR spektrumu.



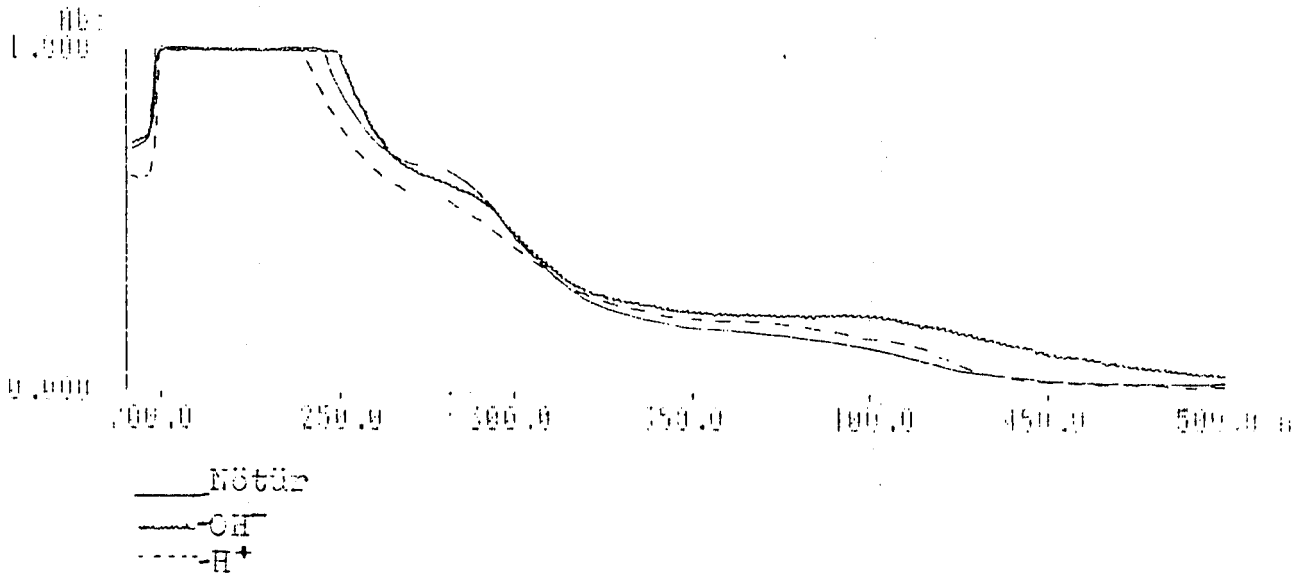
Şekil 6.6. IV nolu maddenin IR spektrumu.



Şekil 6.7. V nolu maddenin IR spektrumu.



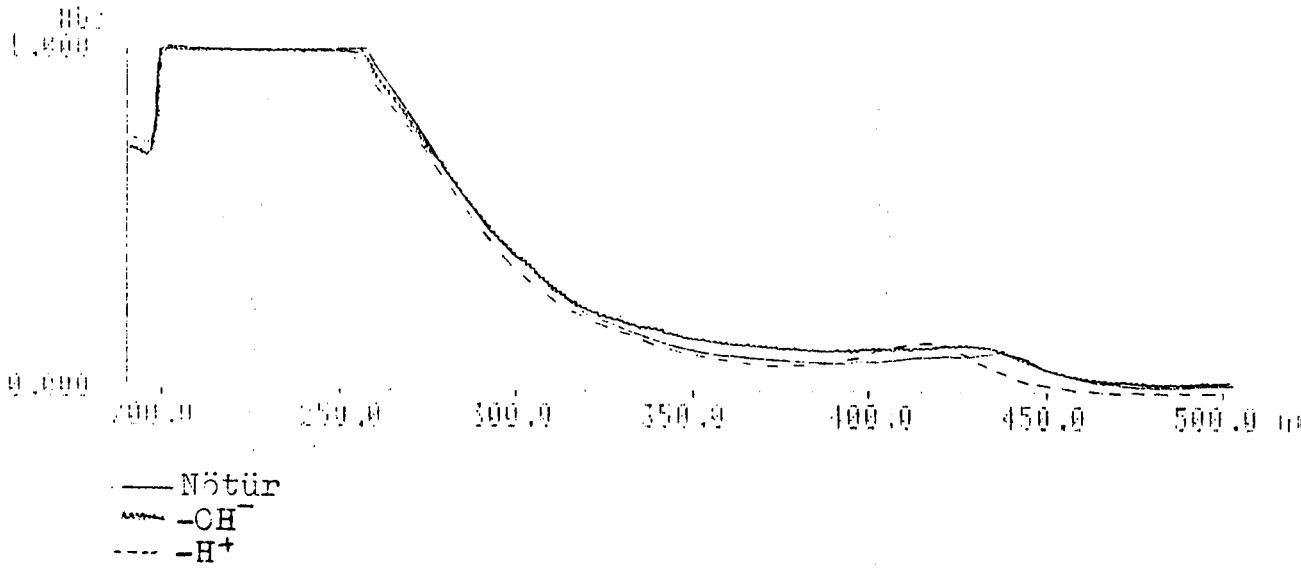
Şekil 6.8. I nolu maddenin UV spektrumu(MeOH).



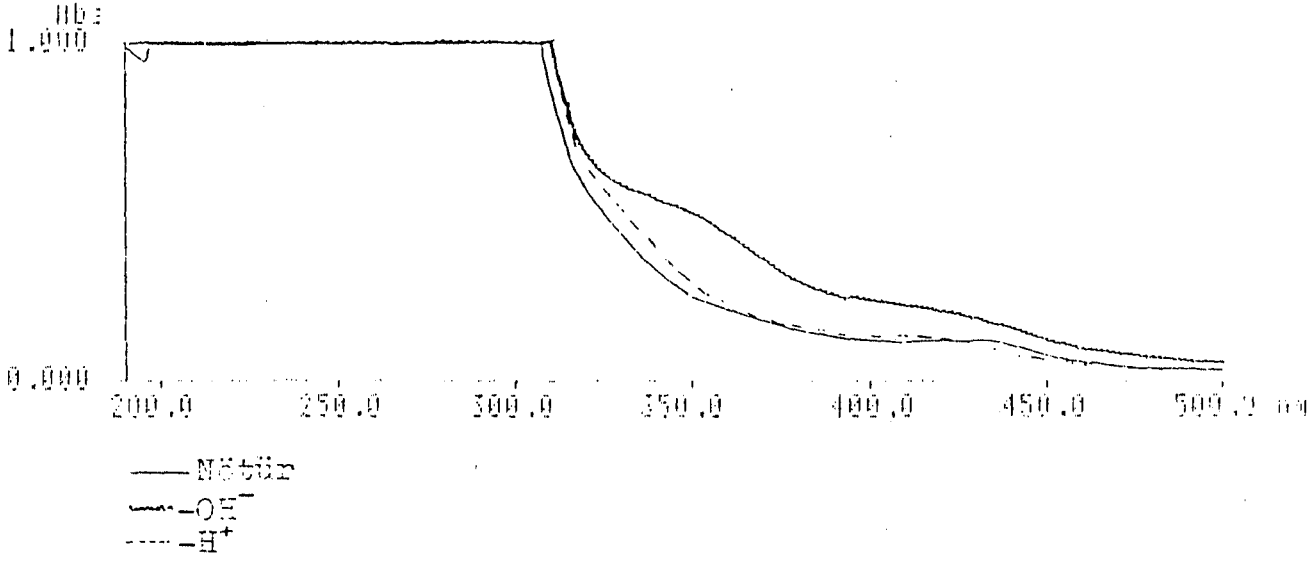
Şekil 6.9. II nolu maddenin U.V. spektrumu(MeOH).



Şekil 6.10. III nolu maddenin UV spektrumu (MeOH).



Şekil 6.11 IV nolu maddenin UV spektrumu (MeOH).



Şekil 6.12. V nolu maddenin UV spektrumu (MeOH).

7. TARTISMA

1. Bölümde belirtildiği gibi bitki dünyasında fazla yayılmış olan flavonoid bileşiklerin bir çok aktivitesi vardır. Bu aktivitelerden bazıları; kan damarlarını kuvvetlendirici, diüretik, yağlar için antioksidant olduğu ve buğday tohumlarının yeşermesine etki ettiği şeklinde belirtilmiştir(Ikan, 1969). Ökseotu özütünün hücrelere toksik etkisinin olduğu(Luther, et al., 1977), tümör büyümesini engellediği bulunmuştur(Pauckova, et al., 1986). Ökseotu özütünün kanser tedavisinde farmakolojik etkilerinin nedeninin büyük bir olasılıkla polisakkaritlerden kaynaklandığı (Jordan and Wagner, 1986), ökseotu özütünün içerdiği lektinin kanser tedavisinde dikkate alınması gerektiği(Ziska and Franz, 1985), ayrıca ökseotu preparatı olan Iskador'un kanser kemoterapisinde yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir(Hodskok, et al., 1988). V. album gibi toksinlerin anti-kanser özelliklerinin bulunduğu, kemik ligninine çok az etki ettiği tespit edilmiştir(Olsnes and Phill, 1982 a). Antispazmatik tansiyon düşürücü ve idrar söktürücü olarak kullanılmaktadır(Zeybek, 1985). Meyvelerin yakı sakızıyla ezilmesi sonucu elde edilen karışım, Güneydoğu Anadolu bölgesinde romatizmal ağrıların giderilmesinde kullanılmaktadır. Ezilmiş meyveler çıban üzerine konarak çıbanın açılması ve cerahatın dışarı çıkarılması için kullanıldığı tespit edilmiştir(Baytop, 1963,1984). Asalak bir bitki olduğundan büyüdüğü ağaç için zararlıdır(Yakar, 1964).

Anadolu'nun her tarafına yayılmış bulunan(bkz. bölüm 3.1, sayfa 15) *Viscum Album L.*'in Eskişehir Anadolu Üniversitesi Orman Fidanlığından toplanan yapraklarındaki flavonoidler ve fenolik asitler incelenmek istenmiştir.

Toplanan ve kurutulmuş yapraklar, otomatik öğütücüde öğütülmüştür. Daha sonra Becker(1980) yöntemine göre özütlenmiş ve eter I, eter II fazlarına ayrılmıştır(bkz. bölüm 6.1, sayfa 32).

Eter I fazının analitik İ.T.K.(SiO₂) ile benzen: metil-etil keton:metanol; 60:26:14 çözücü karışımında incelenmesi yapılmış olup, renkleri ve noktaları tespit etmek için borik asit-okzalik asit reaktifi(T.4) plakaya püskürtülmüş ve 110°C de 10 dakika etüvde bekletilmiştir.

İ.T.K.(SiO₂) plakası incelendiğinde dört maddenin olduğu görülmüştür(bkz. şekil 6.2). Bu maddeler; R_f=0.576 da sarı, R_f=0.746 da açık menekşe, R_f=0.805 de menekşe ve R_f=0.888 de turuncu renkli noktalar olarak tespit edilmiştir. Daha sonra maddeler preparatif İ.T.K.(SiO₂) ile benzen:metil-etil keton:metanol; 60:26:14 çözücü karışımında ayırılmış olup, 8-12 mg. gelen dört madde izole edilmiştir.

Eter II fazının analitik İ.T.K.(SiO₂) ile benzen:asetik asit:su; 125:72:3 çözücü karışımında incelenmesi yapılmıştır. Renkleri ve noktaları tespit etmek için borik asit-okzalik asit reaktifi(T.4) plakaya püskürtülmüş ve 110°C de 10 dakika etüvde bekletilmiştir. İ.T.K.(SiO₂) plakası incelendiğinde tek bir maddenin olduğu tespit edilmiştir(bkz. şekil 6.3). Bu madde R_f=0.958'de açık pembe renkli nokta olarak görülmüştür. Daha sonra maddenin pre-

paratif I.T.K.(SiO₂) ile benzen:asetik asit:su(125:72:3) çözücü karışımında ayırım yapılmış olup 15 mg. gelen madde elde edilmiştir.

Eter I, eter II fazlarından elde edilen beş maddenin IR ve UV spektrumları alınmıştır. Gerek izole edilen maddelerin azlığı, gerekse ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve kütle spektrumlarının alınamaması nedeni ile, yapıları hakkında ayrıntılı spektroskopik bilgiler elde edilememiştir. Bu sebeple maddelerin yapıları tam olarak aydınlatılamamıştır.

Preparatif I.T.K.(SiO₂), benzen:metil-etil keton:metanol(60:26:14) çözücü karışımında alınan birinci maddenin (E-1 S) (R_f=0.576), IR spektrumu(Şekil 6.3.) 3600-3300 cm⁻¹'de -OH⁻ grubuna ait olabileceğini düşündüğümüz yayvan bandı vermiştir. 2920-2860 cm⁻¹'de doymamıslık(=C-H), 1710 cm⁻¹(zayıf) ve 1690 cm⁻¹(kuvvetli)'de konjuge altı üyeli keton karbonili olabileceği düşünülen bandlar gelmiştir. 1520-1460 cm⁻¹'de aromatik halkaya ait bandlar gözlenmiştir. 1385-1220 cm⁻¹'de fenolik (C-OH) bandı gözlenmiştir. Maddenin UV spektrumu(MeOH) (Şekil 6.8) 280.2 ve 366.5 nm'de absorpsiyon maksimumları vermiştir. Maddenin bazik(NaOH) UV spektrumunda 49 nm'lik uzun dalga boyuna kayma gözlenmiştir. Bu da maddenin fenolik -OH grubu içerdiğini ve sodyum hidroksit eklenmesiyle oluşan anyonun aromatik halka ile konjugasyona girdiğini göstermiştir. Bazik UV spektrumuna asit(HCl) eklendiğinde, nötr UV spektrumu ile çakışan spektrum elde edilmesinden dolayı maddenin ilk yapıya dönüştüğü anlaşılmıştır.

II nolu maddenin (E-1 T), (R_f=0.888), IR spektrumu (Şekil 6.4.) 3550-3350 cm⁻¹'de OH'a ait yayvan band, 2940-

2875 cm^{-1} 'de doymamıslık(=C-H), 1740 cm^{-1} 'de altı üyeli ke-ton karbonili ve 1570-1385 cm^{-1} 'de aromatik halkaya ait band-lar gözlenmiştir. UV spektrumu (MeOH) (Şekil 6.9.), 375.2-276.3 nm'de absorpsiyon maksimumları vermiştir. Maddenin ba-zik(NaOH) UV spektrumunda 24.8 ve 16.6 nm'lik uzun dalga boyu-na kaymalar gözlenmiştir. I nolu madde ile karşılaştırıldı-ğında II nolu maddede uzun dalga boyuna kayma daha azdır(14.2 nm). Bu ise ikinci maddedeki fenolik -OH⁻'lerin azlığından kaynaklanmaktadır. Bazik UV spektrumuna asit(HCl) eklendiğin-de, nötür UV spektrumu ile çakışan spektrum elde edilmesinden dolayı maddenin ilk yapıya dönüştüğü anlaşılmıştır.

III nolu maddenin (E-1 KY), ($R_f = 0,746$), IR spektrumu (Şekil 6.5.), 3600-3250 cm^{-1} 'de -OH⁻, 2920-2850 cm^{-1} 'de doy-mamıslık(=C-H), 1740 cm^{-1} 'de altı üyeli keton karbonili, 1464 cm^{-1} 'de(>C-H deformasyonu) ve 1383 cm^{-1} 'de(CH₃'ün si-metrik deformasyonu) bandlarını vermiştir. UV spektrumunda (MeOH) (Şekil 6.10.), 398.8 nm'de absorpsiyon maksimumu göz-lenmiştir. Maddenin bazik(NaOH) UV spektrumunda çok az uzun dalga boyuna kayma ve bazik UV spektrumuna asit(HCl) eklen-diğinde nötür UV spektrumuna kıyasla 14.4 nm'lik uzun dalga boyuna kayma, maddenin yapısında -OCH₃ grubunun olabileceği-ni göstermiştir.

IV nolu maddenin (E-1 AY), ($R_f = 0,813$), IR spektru-munda (Şekil 6.6.), 3600-3300 cm^{-1} 'de yayvan -OH⁻ bandı, 2920-2850 cm^{-1} 'de doymamıslık(=C-H), 1740-1720 cm^{-1} 'de altı üyeli keton karbonili ve 1460-1380 cm^{-1} 'de aromatik halkaya ait bandlar gözlenmiştir. UV spektrumu (MeOH) (Şekil 6.11.) 432.0 nm'de absorpsiyon maksimumu vermiştir. Maddenin bazik

(NaOH) UV spektrumunda 6.4 nm kısa dalga boyuna kayma ve bazik UV spektrumuna kıyasla 15.2 nm kısa dalga boyuna kayması sonucu konjugasyonda azalma gözlenmiştir.

Eter II fazından elde ettiğimiz V nolu maddenin (E-2) ($R_f = 0.958$), IR spektrumuna bakıldığında (Şekil 6.7.) 3450-3350 cm^{-1} 'de $-\text{OH}^-$, 2940-2860 cm^{-1} 'de doymamışlık($=\text{C}-\text{H}$), 1740-1720 cm^{-1} 'de altı üyeli keton karbonili, 1610-1500 cm^{-1} 'de(dörtlü band) aromatik halkaya, 1460-1423 cm^{-1} 'de($\geq\text{C}-\text{H}$ de-formasyonu) ve 880-800 cm^{-1} 'de p-disüstitüe benzen ait band-lar gözlenmiştir. UV spektrumu (MeOH) (Şekil 6.12.), 422.9 nm'de absorpsiyon maksimumu vermiştir. Maddenin bazik(NaOH) UV spektrumunda 2.8 nm'lik çok az kısa dalga boyuna kayması sonucu konjugasyonda azalma göstermiştir. Bazik UV spektruma asit(HCl) eklendiğinde, nötr UV spektrumu ile çakışan spektrum elde edilmesinden dolayı maddenin ilk yapıya dönüştüğü anlaşılmıştır.

Buradan $-\text{OH}^-$ grubu içeren I ve II nolu maddelerin kuersetin(19) yapısında, $-\text{OCH}_3$ grubu içeren III ve IV nolu maddelerin ise metoksi kuersetin yapısında olabileceği düşünülebilir. Ayrıca eter II fazından elde edilen maddenin vanilik asit(37) veya anisik asit(39) olabileceği düşünülebilir.

Çizelge 7.1. I, II, III, IV ve V nolu maddelerin IR spektrumları

Madde	Absorbsiyon Değerleri ($\bar{\nu}_{\max}$, cm^{-1})					
I	3600-3300	2920-2860	1710	1690	1520-1460	1385-1220
II	3550-3350	2940-2875	1740	1570-1385		
III	3600-3250	2920-2860	1740	1464	1383	
IV	3600-3300	2920-2850	1740-1720	1460-1390		
V	3450-3350	2940-2860	1740-1720	1610-1500	1460-1423	880-800

Çizelge 7.2. I, II, III, IV ve V nolu maddelerin UV spektrumları

Madde	Absorbsiyon maksimumları (λ_{\max} , nm)					
	Nötr		Bazik (OH^-)		Asidik (H^+)	
I	280.2	366.5	282.1	415.5	280.1	365.9
II	276.3	375.2	280.9	400.0	277.1	380.2
III	398.8		399.5		413.2	
IV	432.0		425.6		416.8	
V	422.9		345.2	420.1	423.2	

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma *Viscum Album L.* (Ökseotu)'deki flavonoidlerin araştırılması esasına dayanmaktadır. Ökseotu özütleme ile eter I ve eter II fazlarına ayrılmıştır. Eter I fazının İ.T.K. (SiO_2)'sı benzen:metil-etil keton:metanol(60:26:14) çözücü karışımında incelenmiş ve aynı çözücü karışımında preparatif İ.T.K. ile ayrılmıştır. Eter II fazı ise benzen:asetik asit:su(125:72:3) çözücü karışımında İ.T.K.'sı alınmış ve aynı çözücüde preparatif İ.T.K. ile ayrılmıştır. Sonuçta 8-12 ve 15 mg. gelen bes madde elde edilmiştir. Bes maddenin de IR ve UV spektrumları alınmıştır. Ancak $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ ve kütle spektrumları alınamadığından elde edilen maddelerin yapısı tayin edilememiştir. Burada elde edilen maddelerin azlığını da gözönünde bulundurmak gerekir. Aslında UV spektroskopisi ile bu maddelerin yapılarının aydınlatılması mümkün olabilirdi. Fakat Becker yönteminde (Becker, 1980) gerekli olan çözücü karışımları zamanında temin edilemediğinden bu spektroskopiden azami ölçüde faydalanılamamıştır. Madde miktarı zaman ve çözücü kısıtlamasından dolayı arttırılamamış ve gerçek yapı tayini de bu nedenlerle mümkün olmamıştır.

Tıbbi açıdan oldukça önemli olan ökseotunun kimyasal bileşenlerinin ayrıntılı olarak incelenmesinin bilime katkısı büyük olacaktır. Bu nedenle çalışmaların devam ettirilmesinde büyük yarar vardır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Baytop, T., 1963, Türkiye'nin Tıbbi ve Zehirli Bitkileri.
- Baytop, T., 1984, Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi.
- Becker, H. and Exner, J., 1977, Bioflavonoids, Proc. Hung., Bioflavonoid Symp. 5th., 285-9.
- Becker, H. and Exner, J., 1978, Z. Naturforsch., C: Biosci., 771-3.
- Becker, H. and Exner, J., 1980, Z. Pflanzenphysiol Bd., 417-28.
- Deliu, C. and Stirban, M., 1976, Contrib., Bot., Gradina Bot., Univ. Babes-Bolyai Cluj, 243-9.
- Franz, H., Haustein, B., Luther, P., Kuropka, U. and Kindt, A., 1977, Acta Biol. Med., 113-17.
- Franz, H., Ziska, P. and Kindt, A., 1981, Biochem., J. 481-4.
- Franz, H., Ziska, P. and Kindt, A., 1982, Lectins: Biol., Biochem., Clin. Biochem., 771-6.
- Franz, H., 1986, Oncology, 23-34.
- Groeger, B.K., Williams, L.G., Pigott, J., Ziska, P., O'Dell, D.S., Williams, D.J., Franz, H. and Debbage, P.L., 1983, Lectins: Biol., Biochem., Clin. Biochem., 179-87.
- Hodison, V. and Tamas, M., 1982, Clujul Med., 204-7.
- Ikan, R., 1969, Natural Products.
- İkizler, A., 1985, Hetero Halkalı Bilesikler.
- Jordan, E. and Wagner, H., 1986, Arzneim-Forsch., 428-

33.

Jordan, E. and Wagner, H., 1986, *Oncology*, 8-15.

Khwaja, T.A., Dias, C.B. and Pentecost, S., 1986, *Oncology*, 42-50.

Konopa, J., Woynarowski, J.M. and Levandowska-Gumi-
eniak, M., 1980, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1523-33.

Krivokapic, K., 1975, *Plant Growth Regul., Proc. Int.*
Symp; 2nd., 286-94.

Krzaczek, T., Markovski, W., 1978, *Ann. Univ. Marie*
Curie-Sklodawska, Sect. D., 285-9.

Kurado, H. and Higuchi, T., 1976, *Phytochemistry*,
1511-14.

Luther, P., Franz, H., Haustein, B. and Bergmann, K.C.
1977, *Acta Biol. Med.*, 119-25.

Luther, P., Theise, H. and Chatterjee, B., 1980, *Int.*
J. Biochem., 429-35.

Lutsch, G., Noll, F., Zisla, P., Kindt, A. and Franz,
H., 1984, *IEBS Lett.*, 335-8.

Lutsik, M.D., 1975, *B. Dovov. Akad. Nauk Ukr., BSR*,
Ser. B., 541-4.

Macek, K., 1972, *Pharmacoutical Applications of Thin-*
Layer and Paper Chromatography, Vol-2.

Metzner, G., Franz, H. and Kindt, A., 1986, *Lectins:*
Biol., Biochem., Clin. Biochem., 383-9.

Metzner, G., Franz, H., Kindt, A., Schumann, I. and
Fahlbusch, B., 1987, *Pharmazie*, 337-40.

Neumann, D., Zurnieden, U., Ziska, P. and Franz, H.,
1986, *Lectins: Biol., Biochem., Clin. Biochem.*, 67-73.

- Nims, H., Luedmann, H. and Becker, H., 1974, Z. Pflanzenphysiol., 226-33.
- Novacek, F. and Teterova, I., 1987, Lesnictvi, 811-28
- Olsnes, S. and Pihl, A., 1982, Canser Surveys, Vol-1, No:3, 467.
- Olsnes, S., Stirpe, F., Sandvig, K. and Pihl, A., 1982, J. Biol. Chem., 13263-70.
- Oskay, E., 1979, Organik Kimya.
- Pauckova, P., Pospisil, J. and Berger, T., 1986, Cas. Lek. Cesk., 625-7.
- Samtleben, R., Kiefer, M. and Luther, P., 1985, Lectins: Biol., Biochem., Clin. Biochem., 617-26.
- Stirpe, F., Legg, R.F., Onyon, L.J., Ziska, P. and Franz, H., 1980, Biochem. J., 343-5.
- Tranchet, J., 1972, Ann. Sci. Univ. Besancon. Bot., 3-7.
- Vang, O., Pii, K. and Boeg-Hansen, T.C., 1986, Lectins: Biol., Biochem., Clin. Biochem., 637-44.
- Yakar, N., 1964, Renkli Türkiye Bitkileri Atlası.
- Ziska, P., Franz, H. and Kindt, A., 1978, Experientia, 123-4.
- Ziska, P., Eifler, R. and Franz, H., 1979, Acta Biol. Med., 1361-3.
- Ziska, P. and Franz, H., 1979, Acta Biol. Med., 697-700.
- Ziska, P. and Franz, H., 1980, Lectins: Biol., Biochem., Clin. Biochem., Proc. Lectin Meet., 3rd., 115-24.
- Ziska, P. and Franz, H., 1985, Lectins: Biol., Biochem., Clin. Biochem., 473-80.

