

CENTAUREA URVILLEI DC. SUBSP. URVILLEI

FLAVONOİDLERİ,

Adnan ÖZCAN

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Kimya Anabilim dalı
Analitik Kimya Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman : Yrd.Doç.Dr. Ayşe Eren PÜTÜN

Şubat-1990

Adnan ÜZCAN'ın YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırladığı "Centaurea urvillei D.C. subsp. urvillei flavonoidleri" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

..9./02/1990

Üye : Y. Doç. Dr. Ayşe Eren PÜTÜN

Üye : Prof. Dr. Cemil ÖĞRETİŞ
Kimya Bölüm Başkanı

Üye : Prof. Dr. K. İzzet Can BAŞER

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .. 14 SUBAT 1990 .. gün ve
233/3...sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Rüstem KAYA

Enstitü Müdürü

SUMMARY

In this work, *Centaurea urvillei* D.C. subsp. *urvillei* was investigated for its flavonoidal compounds.

Centaurea urvillei D.C. subsp. *urvillei* was collected from Niğde-Çiftehan in June 1982 and a voucher is deposited in the Herbarium of Faculty of Pharmacy, University of Istanbul, ISTE : 50886.

Air dried and powdered above ground part of the plant was extracted in a soxhlet apparatus with ethanol. The crude alcoholic extract, after evaporation in vacuo was re-extracted with petroleum ether, chloroform and ethyl acetate extracts showed the presence of the same flavonoid compounds in thin layer chromatography with various solvent systems. The two extracts were brought together and packed on top of a polyclar column and elution started with chloroform and the polarity of the solvent was increased by gradual addition of ethanol. The further separations of the fractions obtained from polyclar column were done by using either a polyclar or cellulose column and the final purification was made by Sephadex LH-20.

The structures of the flavonoid compounds were determined as, 6-Methoxy apigenin, Apigenin, Apigenin 7-O-glucoside, 6-methoxy luteolin, 6-methoxy apigenin 7,4'-dimethyl ether, 6-hydroxy 4'-methoxy apigenin and 6-methoxy apigenin 4'-methyl ether.

The structures of all compounds were elucidated by using physical methods, colour reactions and spectral methods such as UV, ¹H-N.M.R. The structures were compared with the standart compounds.

TEŐEKKÜR

Tez alıŐmalarım sűresince olumlu tenkit ve uyarılarda bulunarak alıŐmalarıma yűn veren, bűtűn alıŐmalarımda yakın ilgi ve desteęini hibir zaman esirgemeyen danıŐmanım Sayın Hocam Yrd.Do.Dr. AyŐe.Eren PŪTŪN'e; űneri ve yardımlarından dolayı Hocam Do. Dr. Ersan PŪTŪN'e; ayrıca alıŐmalarım sırasında bana hertűrlű kolaylıęı saęlayan Bűlűm BaŐkanımız Sayın Prof.Dr. Cemil ŐĐRETİR'e sonsuz teŐekkűrlerimi sunarım.

Adnan ÖZCAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI	1
1. BİTKİNİN TANIMI VE YAYILIŞI	2
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Dağılımları	5
2.2. Oluşumları	6
2.3. Elde edilmeleri Ve Saflaştırma Yöntemleri	9
2.3.1. Bitkiden tüketme	9
2.3.2.1. Sütun kromatografisi	10
2.3.2.2. Preparatif ince tabaka kromatografisi	10

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.4. Tanınmaları	11
2.4.1. Renk reaksiyonları	11
2.4.2. Spektral yöntemler	11
2.4.2.1. UV spektroskopisi	12
2.4.2.1.1. Metanol spektrumu	14
2.4.2.1.2. Sodyum metoksit spektrumu	14
2.4.2.1.3. Alüminyum klorür, Alüminyum klorür/ hidro- klorik asit spektrumu	14
2.4.2.1.4. Sodyum asetat spektrumu	15
2.4.2.1.5. Sodyum asetat/Borik asit spektrumu	15
2.4.2.2. ¹ H-N.M.R. spektrumu	16
3. CENTAUREA TÜRLERİYLE YAPILMIŞ OLAN ÇALIŞMALAR	19
4. DENEYSEL BÖLÜM	24
4.1 Centaurea urvillei, D.C.subsp. urvillei'den elde edilen flavonoidler	25
U ₁ bileşiği	25
U ₂ bileşiği	28
U ₃ bileşiği	31
U ₄ bileşiği	34
U ₅ bileşiği	37
U ₆ bileşiği	40
U ₇ bileşiği	43
4.2. Uygulanan teknikler	46
4.2.1. Kromatografi	46
4.2.1.1. Sütun kromatografisi	46
4.2.1.2. İnce tabaka kromatografisi	47
4.2.2. Spektroskopi	47
4.2.2.1. UV spektroskopisi	47

İÇİNDEKİLER (devam).

	<u>Sayfa</u>
4.2.2.2. ¹ H-N.M.R. spektroskopisi	48
4.2.3. Belirteçler	48
4.2.4. Kimyasal reaksiyonlar	49
4.2.4.1. Asit hidrolizi	49
4.2.4.2. TMS türevlerinin hazırlanması	50
4.3. Yapılan işlemler	50
4.3.1. Flavonoid bileşiklerin tüketilmesi	50
4.3.2. Flavonoid bileşiklerin elde edilmesi	51
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	54
KAYNAKLAR DİZİNİ	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil. 1.1. Bitkinin Türkiye'deki yayılışı	3
Şekil. 2.1. 2-fenil benzopiron (fenil kromon)	5
Şekil. 2.2. Flavonoid bileşiklerin iskelet yapıları	7
Şekil. 2.3. Flavonoidlerin oluşumu	8
Şekil. 4.1. U_1 bileşiğinin UV spektrumu	26
Şekil. 4.2. U_1 bileşiğinin N.M.R. spektrumu	27
Şekil. 4.3. U_2 bileşiğinin UV spektrumu	29
Şekil. 4.4. U_3 bileşiğinin UV spektrumu	32
Şekil. 4.5. U_3 bileşiğinin N.M.R. spektrumu	33
Şekil. 4.6. U_4 bileşiğinin UV spektrumu	35
Şekil. 4.7. U_4 bileşiğinin N.M.R. spektrumu	36

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
Şekil. 4.8. U_5 bileşiğinin UV spektrumu	38
Şekil. 4.9. U_5 bileşiğinin N.M.R. spektrumu	39
Şekil. 4.10. U_6 bileşiğinin UV spektrumu	41
Şekil. 4.11. U_6 bileşiğinin N.M.R. spektrumu	42
Şekil. 4.12. U_7 bileşiğinin UV spektrumu	44
Şekil. 4.13. U_7 bileşiğinin N.M.R. spektrumu	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge. 2.1. Flavonoid bileşiklerin renk reaksiyonları	13
Çizelge. 4.1. Centaurea urvillei, D.C. subsp. urvillei'den elde edilen flavonoid bileşiklerin miktarları ve Rf değerleri	53

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi.
UV	: Ultraviyole (mor ötesi).
N.M.R.	: Nükleer Manyetik Rezonans.
s (singlet)	: Tek pik.
d (doublet)	: Çift pik.
dd (double of doublets)	: İki çift pik.
sh (shoulder)	: Omuz.
J (coupling constant)	: Etkileşim sabiti.
nm	: nanometre.
ppm (part per million)	: Milyonda bir.
BAW	: n-bütanol-Asetik asit-Su (4: 1:5).
TAB	: Tersiyer bütanol-Asetik asit-Su (3: 1: 1).

GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI

Compositae familyası doğada çok yaygın olup, özellikle flavonoidler ve seskiterpen laktonlar yönünden çok zengindir. Bu familyadaki pek çok türün değişik biyolojik aktivite gösterdiği, idrar söktürücü olarak ve vitamene benzer özellikleri nedeniyle geniş miktarda kullanıldığı bilinmektedir. Ayrıca kumaş boyası olarak da ekonomik değeri olmasına rağmen, günümüze değin bu alanlarda fazla çalışma yapılmamıştır (Haywood, p. 411, 1977 ; Baytop, s. 84, 1980).

Son yıllardaki teknolojik gelişmeye paralel olarak bu familya önem kazanmış ve familyadaki bileşiklerin yapılarını aydınlatmak bitkisel kökenli araştırmaların odak noktasını oluşturmuştur.

Bu çalışmada, Compositae familyasının flavonoidlerini araştırmak amaçlanmıştır. Bunun için ülkemizde yaygın olarak bulunan (Centaurea urvillei D.C. subsp. urvillei) bitkisinin incelenmesi kararlaştırılmıştır.

1. BITKİNİN TANIMI VE YAYILIŞI

Compositae familyası bitkileri yıllık, iki yıllık veya çok yıllık, çoğunlukla otsu ve nadiren çalimsı veya ağaçsıdırlar. En belirgin özelliği çiçeklerinin kapitulum durumunda birarada toplanmış olmasıdır.

Dünya üzerinde çok yaygın olan bu familya, kaynaklarda değişik sayılarda rapor edilmekle beraber (Rendle, 1976; Hickey, 1981; Haywood, 1979) 800-1100 kadar cins ve 14000-25000 kadar tür içerdiği belirtilmektedir. Ülkemizde 129 cins ve 1120 kadar türü vardır (Davis, 1975).

Genus-Centaurea L.

Bu cinsin Dünya üzerinde Asya, Kuzey Afrika ve Amerika'da olmak üzere 600 kadar türü yayılış göstermektedir (Haywood, 1979; Hickey, 1981). Ülkemizde ise bu Centaurea cinsi oldukça yaygın olup, 172 türü bulunmaktadır (Davis, 1975).

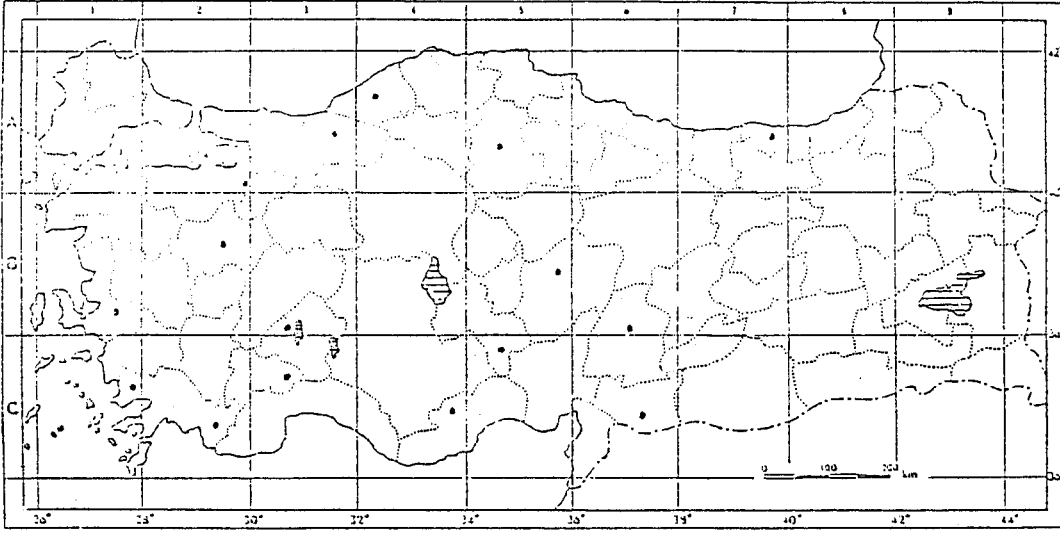
Çalışmamızda bu türlerden sadece *C. urvillei*, *D.C. subsp. urvillei* incelenmiştir.

C. urvillei, *D.C. subsp. urvillei*

Çok yıllık, 5-30 cm boyunda, gövdesi basit veya tabana yakın dallanmış, yaprakları hafifçe ağımsıdır. Dalın ucundaki kısımların üstü pamuk gibi tüylü; üçgenimsi, lirat (kemansı), rombik veya oblong ovat (uzunca ovat) ve küçük loplulu olan yanal kısımları lanseolat (mızraksı), oblong (uzunca) veya lirat (kemansı)'dır. Involukrum 20-40x15-40 mm, ovooidden globosa kadar yuvarlaktır. Apendajları (uzantıları); çok çeşitli, 10-30 mm uzunlukta ve dikensidir. Çiçekleri sert kıllı ve 15-20 mm, rengi pembe-mor veya beyazımsı olup, kenardakiler hafifçe parlaktır. Akenler 4-6 mm uzunlukta; papüs (tüysü çıkıntılar)'leri (5-)8-11(-3) mm, kromozom sayısı $2n = 20$, 40'dır (Davis, 1975).

Çiçek açma zamanı	: Haziran-Temmuz.
Yetiştirme ortamı	: Kayalık yamaçlar, Çam ormanları, 300-2000 m yükseklikte.
Tip örneği	: A-2 (A) Bilecik, Bilecik (Holo G-DC).
Türkiye'deki yayılışı	: Çoğunlukla Orta Anadolu, kısmen Kuzey, Güney-Batı ve Batı Anadolu.
Dünya'daki yayılışı	: Türkiye, Yunanistan ve Adalar.

Bitkinin Türkiye'deki yayılışı (Şekil. 1.1.)'de gösterilmiştir.



Şekil. Bitkinin Türkiye'deki yayılışı.

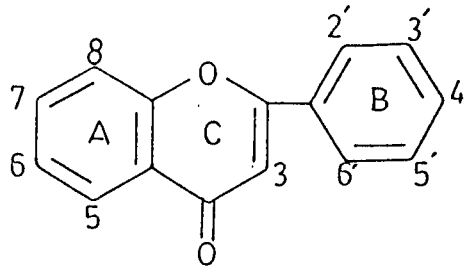
2-GENEL BİLGİLER

FLAVONOİD BİLEŞİKLERİ

2.1. Dağılımları

Sarı renkli olmaları nedeniyle Latince sarı anlamına gelen "flavus" sözcüğünden türetilerek Flavonoid adını alan bileşikler kimyasal bakımdan 2-fenil benzopiron yapısı gösterirler (Şekil.2.1.).

Bu bileşikler kromon iskeleti türevi olan doğal kaynaklı fenolik bileşiklerin en geniş sınıflarından biridir.



Şekil. 2.1. 2-fenil benzopiron (fenil kromon).

Değişik flavonoid bileşiklerine ait iskelet yapılarına bazı örnekler

(Şekil. 2.2.)'de gösterilmiştir.

Flavonoidler yosunların büyük kısmı ile bakteriler hariç hemen her bitki türünde yaygın olarak bulunurlar. Bitkilerdeki yayılışı, hidroksi-sinamikasit türevleri ve ligninlerin yayılışına paraleldir.

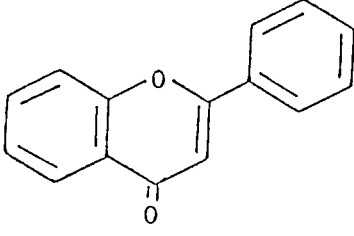
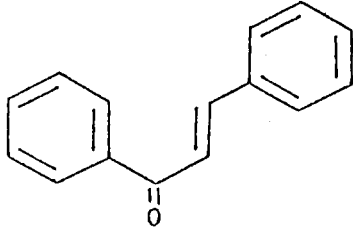
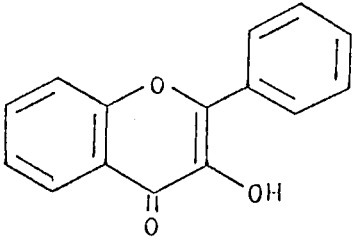
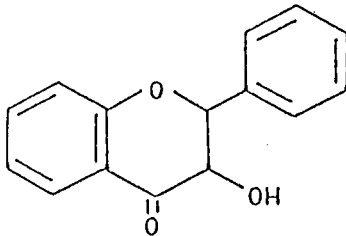
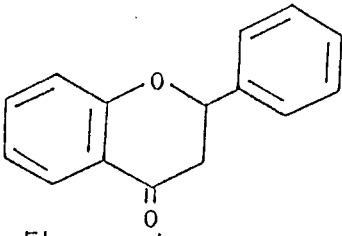
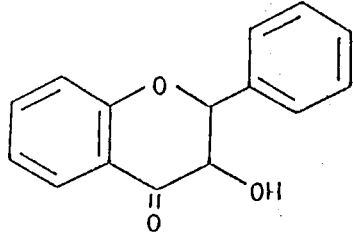
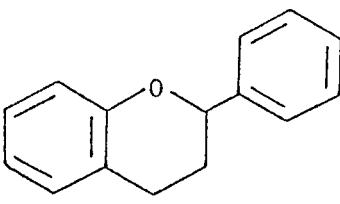
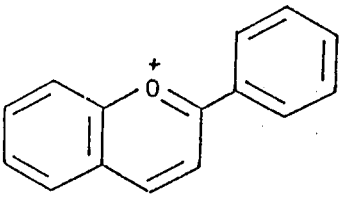
Flavonoidler, doğada aglikonları ya da glikozitleri halinde, bitkilerin kök, sap, çiçek, polen, meyva ve tohum gibi hemen her bölümünde bulunabilirler (Geissman, 1969).

2.2. Oluşumları

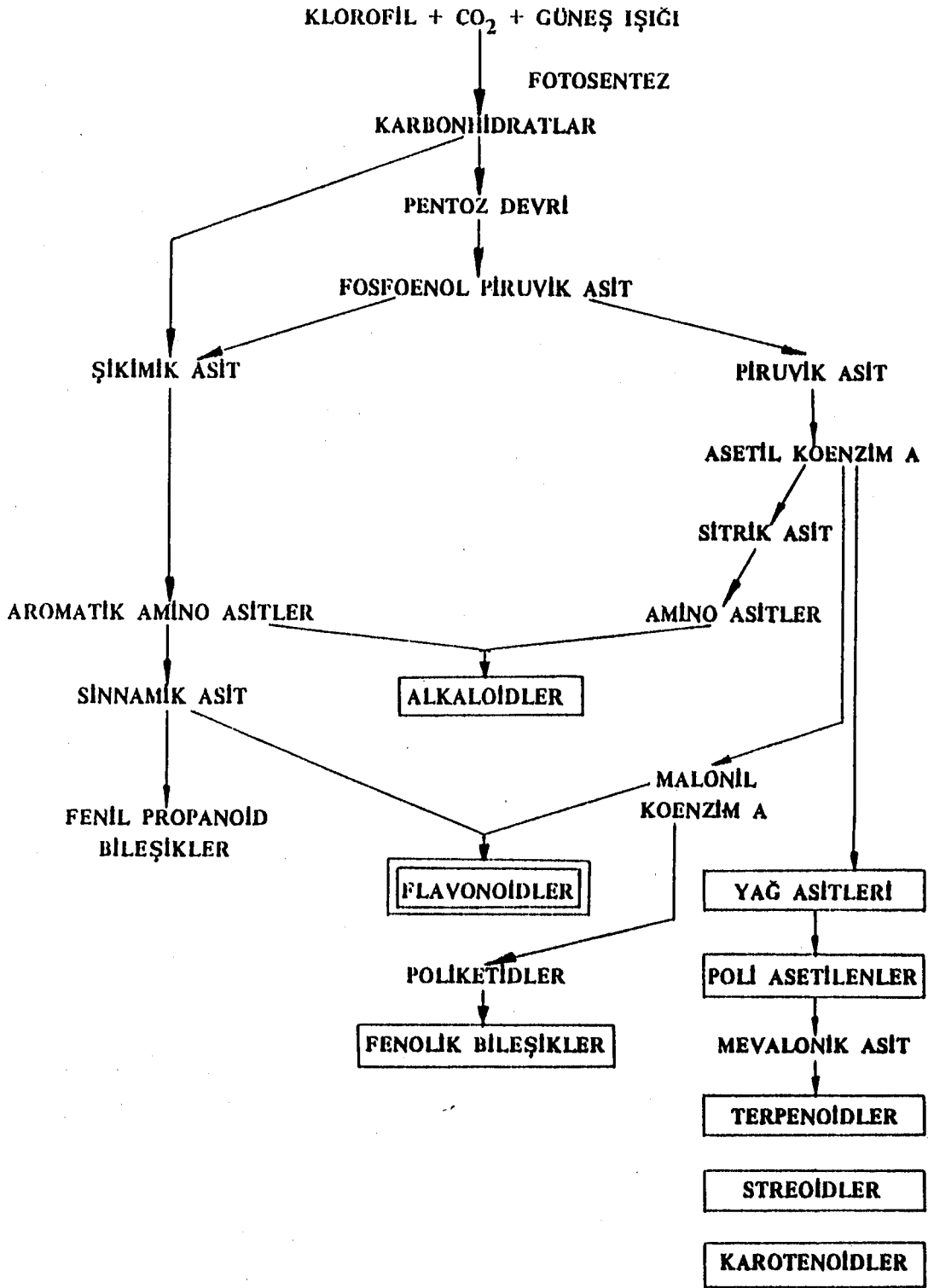
Flavonoidler bitkilerin ikincil metabolitlerindedir. Bitkilerin fotosentez ile oluşturdukları ve hayatsal gereksinimleri için kullandıkları karbonhidratlar, amino asitler, v.b. gibi birincil metabolitlerden türerler (Geissman, 1969).

Flavonoidlerin oluşumu, diğer doğal kaynaklı bileşiklerle birlikte (Şekil. 2.3.)'de genel olarak gösterilmiştir (George, 1978).

Flavonoidlerin karbon iskeleti sırasıyla A, C ve B halkalarını oluşturan C6 - C3 - C6 şeklindedir (Şekil.2.1.). Biyosentez araştırmalarından elde edilen bilgilere göre flavonoidlerin A halkasının asetil koenzim-A moleküllerinden veya üç molekül malonil koenzim-A'dan, B ve C halkalarının ise şikimik asit üzerinden oluşan sinamik asit gibi fenil propanoid bileşiklerinden oluştuğu saptanmıştır. A halkasını oluşturan asetat üniteleri ile B ve C halkalarını oluşturan fenil propanoid bileşiklerinin kondensasyonu ile flavonoidler oluşur (Geissman, 1969; Harborne, 1975).

Bileşimin adı	Bileşimin formülü
 <p>Flavonlar</p>	 <p>Kalkonlar</p>
 <p>Flavonoller</p>	 <p>Dihidroflavonoller</p>
 <p>Flavanonlar</p>	 <p>Kateşinler.</p>
 <p>Flavanlar</p>	 <p>Antosiyanidinler</p>

Şekil. 2.2. Flavonoid bileşiklerin iskelet yapıları.



Şekil.2.3. Flavonoidlerin oluşumu.

2.3. Elde Edilmeleri Ve Saflaştırma Yöntemleri

2.3.1. Bitkiden tüketme

İncelenecek bitkisel materyal, önce kurutulup toz edilir, sonra % 96'lık etanol ile tüketilir. Vakumda kısmen yoğunlaştırıldıktan sonra sırasıyla petrol eteri, kloroform, etil asetat gibi çözücülerle tekrar tüketilir. Tüketme maserasyon şeklinde veya sokset aparatında yapılır. Böylece flavonoid bileşikler polaritelerine göre kabaca bir önayırma uğramış olurlar.

Materyaldeki sterol, karotenoit, lipid, klorofil gibi yan maddeler petrol eteri özütüne geçerler. Fakat bazen metillenmiş flavon veya flavonollerin de bu özüte geçtiği görülür (Thomas, 1968; Herz, 1972).

Polar olmayan flavonoid aglikonları, izoflavonlar, flavononlar, dehidroflavononlar ve metoksiflavonlar, kloroform ve bazen de etil asetat özütüne geçerler.

Daha polar flavonoidler, yani polar aglikonlar ve glikozitleri ise etil asetat gibi daha polar çözücü ile tüketilerek elde edilirler (Harborne, 1975).

2.3.2. Kromatografik yöntemler

Flavonoidlerin elde edilen ham özütten ayrılması ve saflaştırılması için kromatografik yöntemlerden yararlanılır. Büyük miktarda flavonoid eldesi için yaygın olarak sütun kromatografisi kullanılır. Küçük miktarlar içinse preparatif ince tabaka ya da kağıt kromatografisinden yararlanılır (Geissman, 1962).

2.3.2.1. Sütun kromatografisi

Flavonoidlerin ayırımı için kullanılan bu yöntemde adsorban olarak silikajel, selüloz, poliklar ve sefadeks tercih edilir.

Silikajel: İzoflavonlar, polimetoksiflavonlar, flavononlar ve dihidroflavonoller için kullanılır.

Selüloz (Mikrokristal): Tüm flavonoid aglikon ve glikozitlerinin ayırımında kullanılabilir. Yıkama için, su-alkol, su-asit veya su-aseton karışımlarından yararlanılır.

Poliklar (polivinil poliprolidon): Flavonoid bileşikler için yüksek ayırma gücüne sahip olduğundan sütun kromatografisinde en çok kullanılan adsorbandır (Markham, 1968). Flavonoidlerin ayrılmasında rol oynayan faktör, polikların yapısında bulunan amid gruplarının içerdiği karbonil fonksiyonlarının fenolik hidroksil grupları ile hidrojen bağı yapmasıdır.

Sefadeks LH-20: Flavonoid bileşiklerin temizlenmesinde ve ayrılmasında kullanılır. Hidroksi propillenmiş dekstran yapısında olup, molekül büyüklüğüne göre ayırım sağlar. Özellikle organik çözücüyle çalışma olanağı sağladığından kullanımı kolay ve yaygındır (Jonston, 1968). Bu adsorbanlardan başka bazı durumlarda alumina, magnezyum silikat ve iyon değiştirici reçineler de flavonoidlerin ayırımalarında kullanılmaktadır (Harborne, 1975, p. 1-14).

2.3.2.2. Preparatif ince tabaka kromatografisi

Bu yöntemle az miktarda ve karışım halinde bulunan flavonoidler, poliklar,

silikajel, mikrokristalin selüloz gibi adsorbanlarla preparatif ince tabaka kromatografisinde birbirlerinden ayrılabilirler (Mabry, 1970, p. 20).

Kullanılan çözücü sistemleri flavonoidin tipine göre değişir. Kromatogramdaki flavonoidler UV ışığında, amonyak buharına tutularak ve reaktif püskürtülerek tanınırlar (Harborne, 1982, p.5-6).

2.4. Tanınmalar

2.4.1. Renk reaksiyonları

Flavonoidlerin ince tabaka kromatografisindeki lekeleri önce 336 nm UV ışığında doğrudan incelenir. Daha sonra bu lekelerin UV ışığı altında amonyak buharına (Mabry, 1970, p.13) ve MA (Maturstoffreagenz A: Difenil borik asit β -amino etil ester) belirtecine karşı göstermiş olduğu renk değişimleri gözlenir (Mabry, 1980). Böylece yapılarına göre değişik renklerde floresans veren flavonoid bileşiğinin tipi ve süstitüentleri hakkında kabaca ön bilgi edinmek mümkün olabilir (Çizelge.1)(Mabry, 1980).

2.4.2. Spektral yöntemler

Saf halde elde edilen flavonoidin yapısı, UV, N.M.R. ve Kütle Spektrometresi ile yapılan analizlerle aydınlatılır. Eğer aglikon bilinen bir bileşikse UV spektrumları ve kromatogramlardaki Rf değerlerinin standart maddeler ile karşılaştırılması yeterli olmaktadır.

Elde edilen madde bir glikozit ise, aglikon ve şekerin ayrı ayrı tanımlanabilmesi için glikozit hidroliz edilir. Bu işlem sonucu şeker grubu aglikondan kopar ve hem aglikon hem de şeker grubunun ayrı ayrı yapıları

saptanır (Mabry, 1970, p. 24).

Glikozitin aglikonunun ve şekerlerinin tanınmasından sonra, glikozitin UV spektrumları ile aglikonun UV spektrumlarının karşılaştırılmasıyla şeker veya şekerlerin aglikona bağlanma yerleri saptanır.

Ayrıca, glikozitin trimetil silil eter türevi halinde karbontetraklorür, dötero kloroform veya dötero dimetil sülfoksit de alınan $^1\text{H-N.M.R.}$ spektrumu da şekerin cinsini, bağlı olduğu konumu, α veya β durumunu belirler (Wagner, 1973 ; Chari, 1977).

2.4.2.1. UV spektroskopisi

Bu yöntem flavonoidlerin yapılarının aydınlatılmasında önemli temel bilgiler verdiği ve az miktarda (0,1 mg kadar) madde gerektirdiği için çok kullanılmaktadır.

Bu amaçla, bileşiğin önce metanol çözeltisinin spektrumu alınır. Sonra bu çözeltiliye sırasıyla sodyum metoksit, alüminyum klorür, alüminyum klorür/hidroklorik asit, sodyum asetat, sodyum asetat/borik asit reaktifleri ayrı ayrı eklenerek alınan spektrumlarda gözlenen kaymalar, bileşiğin ana iskeleti ve süstitüentleri hakkında geniş bilgi verir.

Flavonoid bileşiklerinin UV spektrumlarında iki büyük absorpsiyon bandı gözlenir. Bunlardan biri uzun dalga boyunda, diğeri kısa dalga boyundadır. Uzun dalga boyunda olanı Bant-I adını alır ve flavonoidin B halkası (sinnamoil) için bilgi verir. Kısa dalga boyunda olanı ise Bant-II adını alır ve A halkası (benzoil) ile ilgili bilgi verir (Geissman, 1962, p.107-155).

UV	UV/NH ₃	UV/NA	FLAVONOİD BİLEŞİK
koyu mor	koyu mor	koyu mor	5-OH serbest,3-OH yok ya da sübstitüe,3'4'-OH yok ya da sübs. ,
koyu mor	koyu mor	sarı	5-OH serbest,3-OH yok ya da sübs. , 4'-OH sübs. ,3'-OH serbest
koyu mor	sarı	sarı	5-OH serbest,3-OH yok ya da sübs. , 4'-OH serbest,3'-OH yok ya da sübs.
koyu mor	sarı	turuncu	5-OH serbest,3-OH yok ya da sübs. , 3'4'-OH serbest.
koyu mor	koyu kah-verengi	kahve-rengi	5,6-OH serbest,3-OH yok ya da sübs. 3'-OH yok ya da 4'-OH serbest.
koyu mor	koyu kah-verengi	turuncu	5,6-OH serbest,3-OH yok ya da sübs. 3'4'-OH serbest.
sarı	sarı	sarı	3,5-OH serbest.
sarı	sarı	kırmızı-turuncu	3,5-OH serbest,3'4'-OH serbest.
parlak flo-resan mavi	parlak flo-mavi-yeşil	mavi	5-OH yok ya da sübstitüe, 3-OH yok ya da sübstitüe.
parlak flo-resan mavi	parlak flo-mavi-yeşil	mavi-yeşil	5-OH yok ya da sübstitüe, 3-OH yok ya da sübstitüe,3'4'-OH serbest.
parlak flo-resan sarı	daha parlak flo. sarı	mavi	5-OH yok ya da sübstitüe, 3'4'-OH serbest.
parlak flo-resan sarı	daha parlak flo. sarı	mavi-yeşil	5-OH yok ya da sübstitüe,3'4'-OH serbest.

ÇİZELGE. 2.1. FLAVONOİD BİLEŞİKLERİN RENK REAKSİYONLARI

(Harborne, 1982, p. 241). B halkasının 3 ve 4 pozisyonlarında serbest hidroksil grubunun bulunması Bant-II'nin genellikle ikiye bölünmesine neden olur (Mabry, 1970, p. 44). Ayrıca Bant-I, 6-hidroksi flavonollerde 8-12 nm, flavonlarda ise 9 nm kısa dalga boyuna kayar. Bu kayma 6-metoksi flavonollerde görülmez (Harborne, 1982).

2.4.2.1.2. Sodyum metoksit spektrumu

Sodyum metoksit kuvvetli bir baz olduğundan flavonoid molekülündeki tüm hidroksil gruplarını iyonize eder (Mabry, 1970, p. 45). Özellikle 4'-hidroksil taşıyan bileşiklerde Bant-I'in 40-65 nm kadar uzun dalga boyuna kayması ve şiddetinin artması çok karakteristiktir. Serbest 3-hidroksil grubuna sahip flavonoidlerde, 4'-hidroksil serbest olmasa bile 50-60 nm'lik bir kayma gözlenir, fakat bant şiddeti azalır. Eğer 305-350 nm arasında düşük şiddetli bir üçüncü bant veya omuz varsa, bileşikte 7-hidroksil grubu bulunmaktadır (Bacon, 1976). Bu bant yoksa 7-hidroksil grubunun hidrojeni, metil veya şeker kökü ile yer değiştirmiştir.

2.4.2.1.3. Alüminyum klorür ve Alüminyum klorür/hidro- klorik asit spektrumu

Alüminyum klorür reaktifi, flavonoid molekülündeki 5-hidroksi-4-keto,

3-hidroksi-4-keto ve B halkasındaki orto-dihidroksil grupları ile ayrı ayrı kelat oluşturur. Orto-dihidroksil gruplarıyla oluşan kelat zayıf olduğundan seyreltik hidroklorik asit eklenmesiyle bozunur (Mabry, 1970, p. 52). Orto-dihidroksil grupları içeren flavonoidlerde, alüminyum klorür spektrumundaki Bant-I, hidroklorik asit eklenmesiyle 30-40 nm kısa dalga boyuna kayar.

Alüminyum klorür/hidroklorik asit spektrumundaki Bant-I, 5-hidroksi flavon ve 3-sübstitüe flavonollerde metanol spektrumuna oranla 35-55 nm uzun dalga boyuna kayar. Bu kayma 3,5-dihidroksiflavonlarda 50-60 nm arasındadır (Mabry, 1970, p.54). Ayrıca 5-hidroksil, 6-metoksil grubu içeren flavonlarda 16-23 nm (Sakakibara, 1977), 5-hidroksil, 6-hidroksil grubu içeren flavonlarda 25-30 nm (Mears, 1972), 5-hidroksil, 6-hidrojen içerenlerde ise 35-55 nm uzun dalga boyuna kayma gözlenir (Mabry, 1970, p.54).

2.4.2.1.4. Sodyum asetat spektrumu

Sodyum asetat, sodyum metoksitten daha zayıf bir baz olduğundan flavon ve flavonollerin daha fazla asidik hidroksil gruplarına etkilidir. Bu nedenle 7-hidroksil grubunu daha fazla iyonize eder (Rösler, 1985).

Serbest 7-hidroksil grubu taşıyan flavon ve flavonollerde sodyum asetatın eklenmesiyle Bant-II, 5-20 nm uzun dalga boyuna kayar (Farkas, 1966). Ayrıca 7-hidroksil grubu serbest olan 4'-hidroksiflavon ve flavonollerde sodyum asetat spektrumundaki Bant-I, kısa dalga boyuna kayar (Bacon, 1977)

2.4.2.1.5. Sodyum asetat/Borik asit spektrumu

Borik asit-sodyum asetat varlığında, flavonoid molekülündeki C-5 ve C-6 dışındaki tüm orto-dihidroksil gruplarıyla kelat yapar. B halkasında orto-dihidroksil durumu varsa flavon ve flavonollerde Bant-I, 12-30 nm uzun dalga

boyuna kayma gösterir (Mabry, 1970, p. 48).

2.4.2.2. $^1\text{H-N.M.R.}$ spektrumu

Büyük kısmı polar olan flavonoid bileşiklerin $^1\text{H-N.M.R.}$ spektrumu için uygun çözücü bulunamadığından bir süre ancak apolar olan flavonoidlerin analizi yapılabilmektedir (Mabry, 1964). Daha sonraları dötero dimetil sülfoksit ($d_6\text{-DMSO}$) gibi polar çözücüler kullanılarak veya trimetil silyl eter türevleri (TMS) halinde karbontetraklorür, dötero kloroform, dötero benzen, dötero piridin ve bunların karışımları gibi polar olmayan çözücülerle tüm flavonoid bileşiklerin $^1\text{H-N.M.R.}$ analizleri yapılabilmektedir (Mabry, 1970, p. 255).

A halkası protonları

A halkasının 5 ve 7 konumlarında hidroksil grupları içeren flavon, flavonol ve izoflavonların C-6 ve C-8 protonları 6-6,7 ppm arasında iki ayrı dublet verirler. C-6 proton dubleti C-8 proton dubletinden daha yukarı alanda bulunur.

C-5,6,7 veya C-5,7,8 süstitüe flavonoidlerde C-6 veya C-8 protonu 6-6,5 ppm arasında bir singlet olarak gözlenir. Flavonoid sadece 7-hidroksil grubu taşıyorsa C-6 protonu, C-5 ve C-8 protonları ile etkileşeceğinden bir dublet-dublet halinde belirir (Mabry, 1964).

B halkası protonları

B halkası protonları genellikle, A halkası protonlarından daha aşağıda 6,7-7,9 ppm civarında gözlenir. Eğer C-4'-oksijenlenmiş ise C-3' ve C-5'

protonlarının dubleti C-2' ve C-6' protonlarının dubletine göre daha yukarı alanda 6,65-7,1ppm arasında iki dublet halinde bulunur(Mabry, 1970, p. 265).

C-3' ve C-4' 'de oksijen fonksiyonuna sahip flavonoidlerde C-5' protonu 6,7-7,1 ppm arasında bir dublet verir. Genellikle birbiriyle üst üste görünen C-2' ve C-6' protonları 7,2-7,9 ppm arasındadır (Rodriguez, 1972).

C halkası protonları

Flavonlarda C-3 protonu 6,3 ppm civarında keskin bir singlet olarak gözlenir (Mabry, 1964).

Şeker protonları

Flavon glikozitleri şekerlerin bağlanışlarına göre O-glikozitleri ve C-glikozitleri diye sınıflandırılırlar.

O-glikozitlerinde şekerin C-1 protonu 4,8-6,0 ppm civarında dublet olarak, şekere ait diğer protonlar ise daha yukarı alanda 3-4 ppm arasında multipler olarak gözlenir (Mabry, 1970, p. 268). Flavonoid glikozitlerinde C-1 protonunun kimyasal kayma değeri, şekerin bağlanma yeri, cinsi ve stereokimyasal özellikleri hakkında bilgi verir. 3-O glikozitlerinin C-1 protonu 5,8 ppm'de, 4'-O, 5-O ve 7-O glikozitlerin C-1 protonu ise 5-5,1 ppm'de gözlenir.

C-glikozitlerde şeker genellikle C-6 ya da C-8'den bağlanır. C-5,7-dihidroksil mono C-glikozitlerin C-3, C-6 ve C-8 protonlarının veya glikozit asetillendiğinde, şekerin C-2 asetil protonunun gösterdiği farklı kimyasal kaymadan, şekerin 6 veya 8 konumunda olduğunu saptamak mümkün olmaktadır (Harborne, 1975, p. 672 ; Harborne, 1982, p. 480).

Metoksil protonları

Flavonoid molekülüne bağlı metoksil gruplarına ait protonlar 3,5-4,1 ppm arasında sinyal verirler. C-3 metoksil grubu ve orto durumundaki iki metoksil ve hidroksil grupları ya çok küçük bir kayma yaparlar ya da hiç kayma göstermezler. Bununla birlikte en büyük kayma 7 konumundaki metoksil grubunda gözlenir (Rodriguez, 1972).

3-CENTAUREA TÜRLERİYLE YAPILMIŞ OLAN ÇALIŞMALAR

C. pallescens Delile. : Apigenin [Asen, 1967].

C. urvillei D.C. : Apigenin ; 6-metoksi apigenin ; 7-metoksi apigenin (Genkvanin) ; 7-metil eter,6-metoksi apigenin (Sirsimaritin) ; 7,4'-dimetil eter,6-metoksi apigenin (Salvigenin) ; Apigenin 7-glikozit ; Apigenin 7-glukronit ; Apigenin 4'-glukronit ; Luteolin ; 6-metoksi luteolin (Nepetin) ; 7-metil eter,6-metoksi luteolin (Sirsiliol) [Ulubelen, 1982].

C. depressa Bieb. : Apigenin ; 6-hidroksi apigenin (Skutellareyin); 6-hidroksi,5,7-diglukronit apigenin [Bandyukova, 1969].

C. aspera L. : Apigenin [Ficher, 1984] ; 6-metoksi apigenin ; Apigenin 7-glukronit ; Apigenin 4'-glukronit ; 3'-metil eter,6-metoksi luteolin (Yaseosidin) [Ferrerres,1980] ; 6-metoksi luteolin (Nepetin) [Öksüz, 1984]

C. virgata Lam. : Apigenin ; 6-metoksi apigenin ; Apigenin 6-C-arabinozot,8-C-glikozit (İzoşaftozit) ; 6-metoksi luteolin (Nepetin) ; 7,4'-dimetil eter, 6-metoksi luteolin (Öpatarin) ; 3'-metil eter,6-metoksi luteolin (Yaseosidin); 3-metoksi kamferol; Kamferol 3-glikozit [Öksüz, 1984]

C. kilae Boiss. : Apigenin ; 3'-metil eter,6-metoksi luteolin (Yaseosidin); 3',4',7-trimetil eter,6-metoksi luteolin [Öksüz, 1984].

C. inermis Velen. : Apigenin ; 6-metoksi apigenin ; 6-metoksi luteolin (Nepetin) ; 3'-metil eter,6-metoksi luteolin (Yaseosidin) ; 7,4'-dimetil eter,6-metoksi luteolin (Öpatarin) ; 3-metoksi kamferol ; Kamferol 3-glikozit [Öksüz, 1984].

C. cyanus L. : Apigenin ; Apigenin 4'-glikozit,7-glukronit ; 7-metoksi apigenin 6-C-glikozit (Svertisin) ; 7-metoksi apigenin 8-C-glikozit (İzosvertisin) [Asen,1967] ; Luteolin [Hodison,1985].

C. pumilio L. : 6-metoksi apigenin ; Apigenin,7-glukronit ; Apigenin 4'-glukronit ; 3',7-dimetil eter,6-metoksi luteolin [El-Masry, 1980] ; 7-metil eter, 6-metoksi apigenin (Sirsimaritin) ; 7-metil eter,6-metoksi luteolin (Sirsiliol) [El-Masry, 1981].

C. phyllocephala L.: 6-metoksi apigenin ; 6-metoksi luteolin (Nepetin) ; 3'-metil eter,6-metoksi luteolin (Yaseosidin) ; 7-metil eter,6-metoksi luteolin (Sirsiliol) [Kery, 1985].

C. clementei Boiss : 6-metoksi apigenin ; 4',7-dimetil eter,6-hidroksi apigenin [Gonzales, 1985].

C. Cinerarie L. : 8-metoksi apigenin [El-Emary, 1983] ; 5-hidroksi,3',4',6,7-tetrametoksi luteolin ; 4',7-dimetil eter, 6-metoksi apigenin (Salvigenin) ; 3',4'-dimetil eter,6-metoksi luteolin (Öpatilin) ; 3'-metil eter,6-metoksi luteolin (Yaseosidin) [Bruno, 1988].

C. kotschy Boiss., Hledr.: 7-metil eter,6-metoksi apigenin(Sirsimaritin); Kersetin ; 3'-metoksi kersetin (İzorannetin) ;Kersetin 7-glikozit ; 3'-metoksi kersetin 3-galaktozit ; 6-metil eter, 3'-metoksi kersetaetin (Spinasetin) ;

Kersetagetin 7-glikozit ; 6-metil eter,3'-metoksi kersetagetin 7-glikozit [Pütün, 1983] ; 6-metoksi kersetagetin,7-glikozit (Patulitrin) ; 3'-metoksi kersetin,7-glikozit ; 3'-metoksi kersetagetin,7-glikozit [Üksüz, 1987].

C. collina L. : 4'-metil,6-metoksi apigenin ; Kamferol [Kamanzi, 1982] ; Kersetin ; 7-metoksi kersetin (Ramnetin) ; 6-metoksi kersetagetin ; Luteolin, 7-glikozit ; 6-metoksi luteolin,7-glikozit [Kamanzi, 1982-a] ; Kersetin,3-glikozit ; Kersetin, 7-glikozit ; 6-metoksi kersetagetin,7-glikozit [Kamanzi, 1982-b].

C. melitensis L. : Apigenin 6,8-C-diglikozit(Visenin II); Apigenin 6-C-glikozit (İzoviteksin) ; Apigenin 6-C-glikozit,8-C-arabinozit (Şaftozit) ; Luteolin 8-C-glikozit (Orientin) [Kamanzi, 1983] ; 6-metoksi kersetagetin 7-glikozit [Kamanzi, 1982-a].

C. solstitialis L. : Kersetin, 7-glikozit ; Kersetin, 4'-glikozit [Kamanzi, 1976] ; 6-metil eter,3-metoksi kamferol (Vogeletin) ; Kersetin [Kamanzi,1983] ; Kersetin,3-glikozit ; 6-metoksi kersetagetin ; 6-metil eter, 3'-metoksi kersetagetin (Spinasetin) ; 6-metil eter,3-metoksi kersetagetin [Kamanzi,1983-a] ; 3'-metil eter, 6-metoksi kersetagetin, 7-glikozit ; 6-metil eter,3-metoksi kersetagetin,7-glikozit (Aksillarin) 6-metoksi kersetagetin,7-glikozit [Kamanzi,1983-b] ; Apigenin 6-C-glikozit,8-C-arabinozit (Şaftozit) ; Luteolin 8-C-glikozit (Orientin) [Kamanzi,1983-c].

C. calsitrapa L. : Apigenin 7-metil galaktronit [Ahmed, 1970].

C. jacea L. : 6-hidroksi luteolin ; 3'-metil eter,6-metoksi luteolin,7-glikozit (Yaseosit) [Wagner,1971, 1973] ; 3'-metil eter,6-metoksi luteolin (Yaseosidin) [Breton,1968-a] ; 6-hidroksi kamferol ; 3-metil eter, 6-metoksi

kamferol (Fogeletin) ; 3-metil eter,6-metoksi kamferol,7-glikozit ; 3',6-dimetil eter,3-metoksi kersetagetin,7-glikozit (Centaurein) [Farkas, 1964].

C. arguta : 3'-metil eter,6-metoksi luteolin (Yaseosidin) ;3-metoksi kamferol ; 3-metoksi kamferol,7-rutinosit [Rösler, 1971].

C. alexandrina : 3'-metil eter,6-metoksi luteolin (Yaseosidin) ; 3',4'-dimetil eter,6-metoksi luteolin (Öpatilin) [Amer, 1984].

C. nigrescens Willd. : 4'-metil eter, 6-metoksi luteolin [Breton, 1969-a].

C. arbutifolia : 3-metoksi kamferol ;3-metoksi kamferol,7-rutinosit ; 3-metoksi kersetin [Breton, 1969-a].

C. coronopifolia Lam. : 3-metoksi kersetin ; 5-glukopirenosit,3-metoksi kersetin [Rybalko, 1975-a].

C. phrygia L. : 4',6-dimetil eter,3-metoksi kersetagetin [Breton, 1969-a] ; 4',6-dimetil eter,3-metoksi kersetagetin,7-glikozit (Jasein) [Asen, 1974].

C. hyssopifolia : 3',6-dimetil eter,3-metoksi kersetagetin (Yaseidin) ; 3',6-dimetil eter,3-metoksi kersetagetin,7-glikozit (Jasein)[Gonzales,1971-a].

C. aggregata Fisch., Mey. : 4',7-dimetil eter,6-metoksi kersetagetin [Zapesochna, 1977-a].

C. pseudomaculosa : 3',4',7-trimetil eter,6-metoksi kersetagetin [Bohmann, 1967].

C. monogyna : Mirisetin [Hodison, 1985].

C. thracica Hayek in Stoj., Stef. : Apigenin 8-C-glikozit (Viteksin) ; Luteolin 8-C-glikozit ; Apigenin 6-C-glikozit (İzoviteksin) ; Luteolin 7-O-glikozit ; Kersetin 3-O-glikozit ; Luteolin 6-C glikozit (İzoorientin) [A.E., Pütün, 1987].

C. pichleri subsp. pichleri Boiss : 6-metoksi apigenin (Hispidulin); 6-metoksi apigenin,7-O-glikozit ; 6-hidroksi,4'-metoksi apigenin, 7-O-glikozit ; Apigenin ; Luteolin 7-O-glikozit ; Apigenin 7-O-glikozit ; Luteolin ; 6-metoksi apigenin,7-metil eter (Sirsimaritin); 6-metoksi luteolin (Nepetin) [A.E., Pütün, 1987].

C. ragusina L. : Apigenin 8-C-glikozit (Viteksin) [Mahmoud, 1986].

C. floccosa : 6-metoksi apigenin (Hispidulin) ; Kamferol ; Kersetin 3'-metoksi luteolin (Kriseriol) [Negrete, 1987].

C. cuneifolia Sibth., Sm. : 4',7-dimetil eter,6-metoksi apigenin (Salvigenin) ; 3',4'-dimetil eter,6-metoksi luteolin (Üpatilin) ; 3'-metil eter,6-metoksi luteolin (Yaseosidin) ; 4',7-dimetil eter,6-metoksi luteolin (Üpatorin) ; 4'-metoksi apigenin (Acecetin) [Öksüz, 1988].

C. chilensis : Apigenin 7-O-glikozit ; 3'-metoksi luteolin,7-O-glikozit ; 3'-metoksi luteolin (Kriseriol) ; Luteolin ; Kamferol ; Kersetin ; 6-metoksi apigenin (Hispidulin) [Negrete, 1988].

DENEYSEL BÖLÜM

U₁ bileşiğinin tanınması

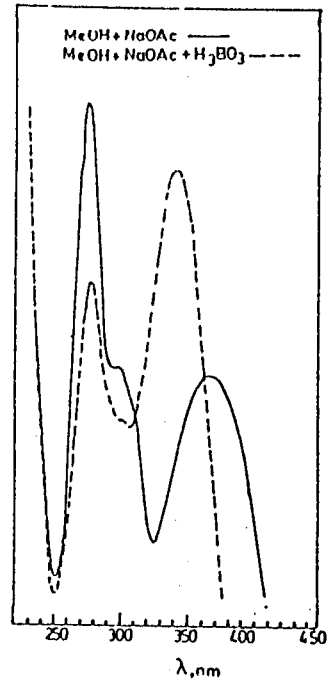
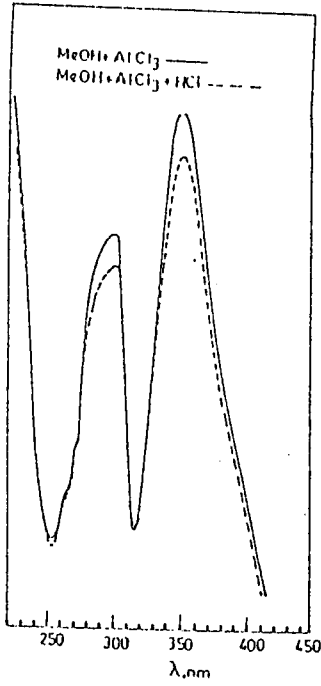
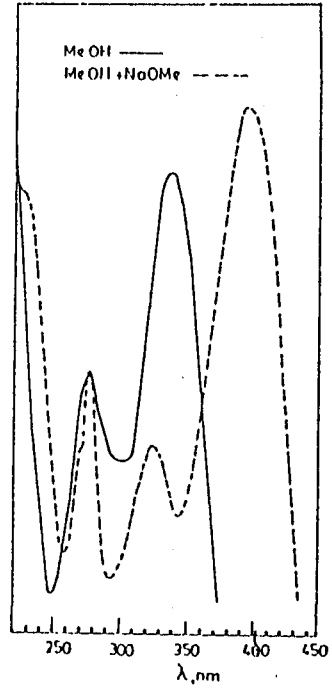
U₁ bileşiğinin İTK'sı UV ışığında incelendiğinde mor olan rengin, NH₃ buharı ve NA belirteci ile sarı-kahveye dönüştüğü gözlemlendi. Bu renk reaksiyonları 4' konumunda serbest hidroksil grubu olabileceğini düşündürmektedir.

Metanolde alınan UV spektrumunda Bant-I'in 336 nm'de çıkması bileşiğin flavon olduğunu, Bant-II'nin 275 nm'de gözlenmesi ise A halkasında üçüncü bir oksijen fonksiyonunun bulunabileceğini göstermektedir (Mears, 1972). Bileşiğin metanol ve kayma belirteçleriyle alınan UV spektrumları (Şekil. 4.1.) 5,7,4' konumlarında serbest hidroksil grupları bulunduğunu, 6 konumunda da bir sübsitüent varlığını belirtmektedir (Mears, 1972). Sodyum metoksit spektrumundaki Bant-I'in metanol spektrumuna göre şiddetinin artması ve 57 nm uzun dalga boyuna kayması 4'-hidroksil grubunu, 325 nm'de Bant-III'ün gözlenmesi de 7 konumunda serbest hidroksil grubu bulunduğunu kanıtlamaktadır.

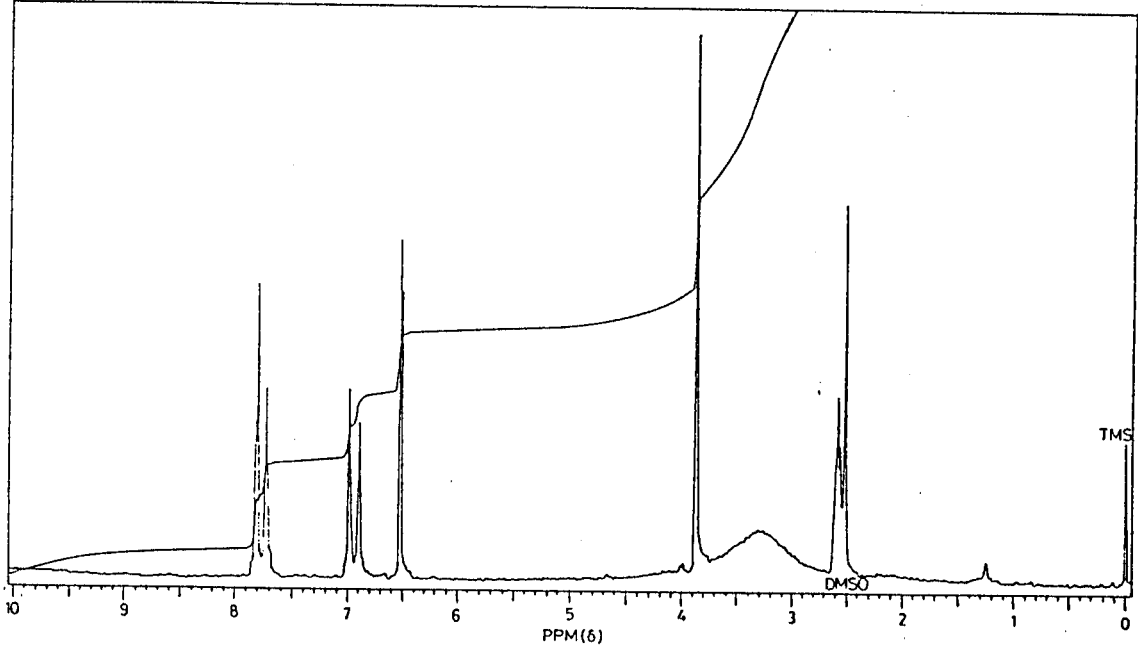
Aluminyum klorür ve aluminyum klorür/hidroklorik asit spektrumlarının aynı olması bileşiğin B halkasında orto-dihidroksil durumu olmadığını göstermektedir.

Sodyum asetat/borik asit spektrumundaki Bant-I'in metanol spektrumuna göre kayma göstermemesi de orto-dihidroksil durumu olmadığını doğrulamaktadır.

MeOH : 336, 275 nm
 NaOMe : 393, 325, 275 nm
 AlCl₃ : 352, 295 nm
 AlCl₃/HCl : 352, 295 nm
 NaOAc : 365, 300(sh.), 275 nm
 NaOAc/H₃BO₃ : 335, 275 nm



Şekil. 4.1. U₁ bileşiğinin UV spektrumu



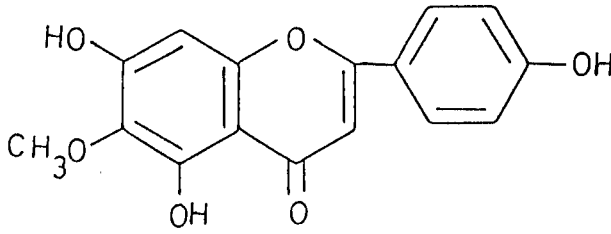
Şekil. 4.2. U_1 bileşiğinin N.M.R. spektrumu

Ayrıca alüminyum klorür/hidroklorik asit spektrumunda Bant-I'in metanol spektrumundaki Bant-I'e göre 16 nm uzun dalga boyuna kayması, 5-hidroksil, 6-metoksil grupları için karakteristiktir (Wagner, 1973).

d_6 -DMSO'de alınan 1H -N.M.R. spektrumunda (Şekil. 4.2.) 3,85 ppm'de üç protonluk bir singlet, bileşikte bir metoksil grubu olduğunu belirler. Kromatografik davranışları ve spektrumda şeker protonlarının görülmemesi bileşiğin bir aglikon olduğunu düşündürmektedir. B halkasının C-2', C-6' ve C-3', C-5' protonları sırasıyla 7,75 ppm'de iki protonluk bir dublet $J=9$ Hz (orto etkileşim) ve 6,90 ppm'de iki protonluk bir dublet $J=9$ Hz (orto etkileşim) göstererek, bu halkada sadece bir oksijen fonksiyonu bulunduğunu, yani bileşiğin bir apigenin türevidir olduğunu belirtmektedir. C-8 ve C-3 protonları 6,5 ppm'de iki protonluk birer singlet olarak gözlenmektedir.

Spektrumda C-6'ya ait bir sinyalin gözlenmemesi ve UV spektrumundan elde edilen bulgular, moleküldeki metoksil grubunun 6 konumundan bağlandığını düşündürmektedir(Collado, 1985).

Elde edilen spektroskopik ve kromatografik bulgulardan bileşiğin 6-metoksi apigenin (Hispidulin) olduğu saptanmış, İTK'de standart madde ile yapılan kıyaslama, bileşiğin aşağıda verilen yapıda olduğunu kesin olarak kanıtlamıştır (Formül 1).



Formül 1

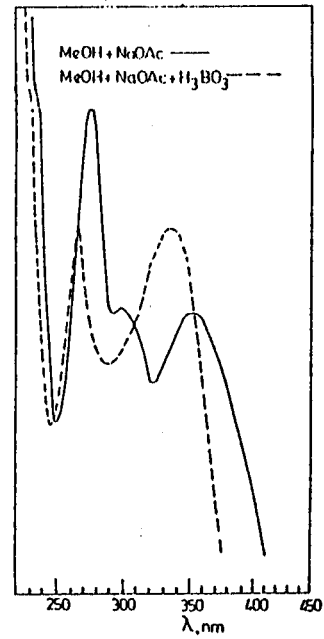
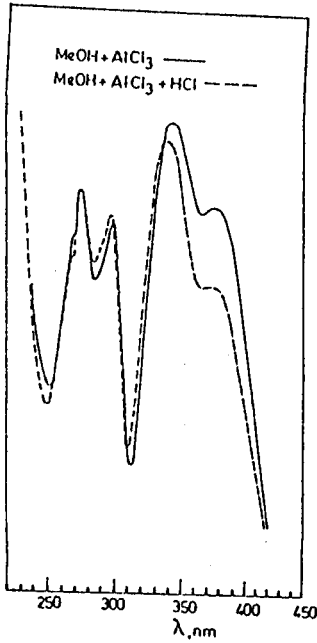
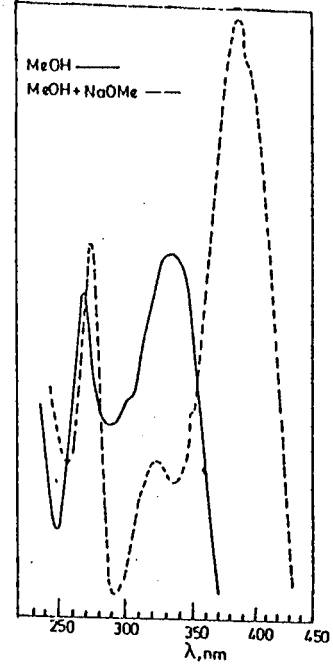
U₂ bileşiğinin tanınması

U₂ bileşiğinin İTK'sı UV ışığında incelendiğinde koyu mor lekenin, NH₃ buharı ile sarı-yeşile, NA belirteci püskürtüldüğünde sarıya dönüştüğü gözlemlendi. Bu renk reaksiyonları 5 ve 4' konumlarında hidroksil gruplarının olduğunu ve 3' konumunda hidroksil grubu olmadığını ya da sübstitüe bir grup olduğunu düşündürmektedir.

Metanoldeki UV spektrumunda (Şekil. 4.3.) Bant-I'in 335 nm'de gözlenmesi bileşiğin ana yapısının flavon olduğunu göstermektedir.

Sodyum metoksit spektrumundaki Bant-I'in şiddetinin artması ve metanol spektrumuna göre 55 nm uzun dalga boyuna kayması, 4' konumunda serbest hidroksil grubu olduğunu kanıtlar.

MeOH	: 335, 298(sh.), 268 nm
NaOMe	: 390, 325, 275 nm
AlCl ₃	: 380, 348, 300, 275 nm
AlCl ₃ /HCl	: 380, 342, 302, 278 nm
NaOAc	: 355, 302(sh.), 273 nm
NaOAc/H ₃ BO ₃	: 340, 305(sh.), 273 nm



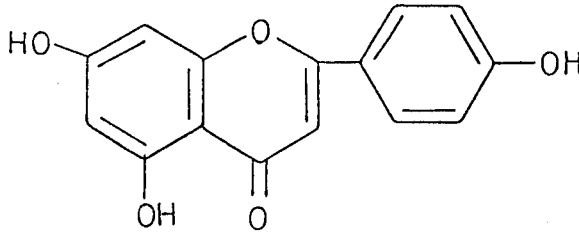
Şekil. 4.3. U₂ bileşiğinin UV spektrumu

Sodyum asetat spektrumundaki Bant-II'nin metanoldeki UV spektrumuna göre 5 nm uzun dalga boyuna kayması ve sodyum metoksit spektrumunda 325 nm'de Bant-III'ün gözlenmesi 7 konumunda serbest hidroksil grubu bulunduğunu işaret etmektedir.

Aluminyum klorür/hidroklorik asit spektrumundaki Bant-I'in metanol spektrumuna göre 45 nm uzun dalga boyuna kayması 5 konumunda serbest hidroksil grubu olduğunu ve 6 konumunda süstitüent olmadığını belirtmektedir.

Sodyum asetat/borik asit spektrumundaki Bant-I'in metanol spektrumu ile hemen hemen aynı olması B halkasının 3'4' konumlarında orto-dihidroksil içermediğini göstermekte, ayrıca aluminyum klorür ve aluminyum klorür/hidroklorik asit spektrumlarının aynı olması da bunu doğrulamaktadır.

U₂ maddesinin kayma belirteçleriyle alınan UV spektrumları (Şekil.4.3.) ve standart örnek ile ince tabaka kromatografisi karşılaştırmaları sonucu apigenin olduğu kanıtlanmıştır (Formül 2).



Formül 2

U₃ bileşiğinin tanınması

U₃ bileşiğinin İTK'sı UV ışığında incelendiğinde gözlenen koyu mor rengin, NH₃ buharı ve NA belirteciyle sarıya dönüştüğü gözlemlendi. Bu renk reaksiyonları 5 ve 4' konumlarında hidroksil grupları olduğunu, 3' konumunda ise hidroksil grubu olmadığını düşündürmektedir.

Metanolde ve kayma belirteçleri ile alınan UV spektrumları (Şekil. 4.4.) bileşiğin 7 konumunun kapalı olduğunu göstermektedir. Metanol spektrumunda Bant-I'in 334 nm'de gözlenmesi bileşiğin flavon olduğunu, sodyum metoksit spektrumunda Bant-I'in metanol spektrumuna göre şiddetinin artması ve 54 nm uzun dalga boyuna kayması 4' konumunda bir hidroksil grubunun varlığını kanıtlamaktadır. Ayrıca sodyum metoksit spektrumunda Bant-III'ün gözlenmemesi ve sodyum asetat spektrumunda Bant-II'nin kayma göstermemesi 7 konumunda bir süstitüent olduğunu doğrulamaktadır.

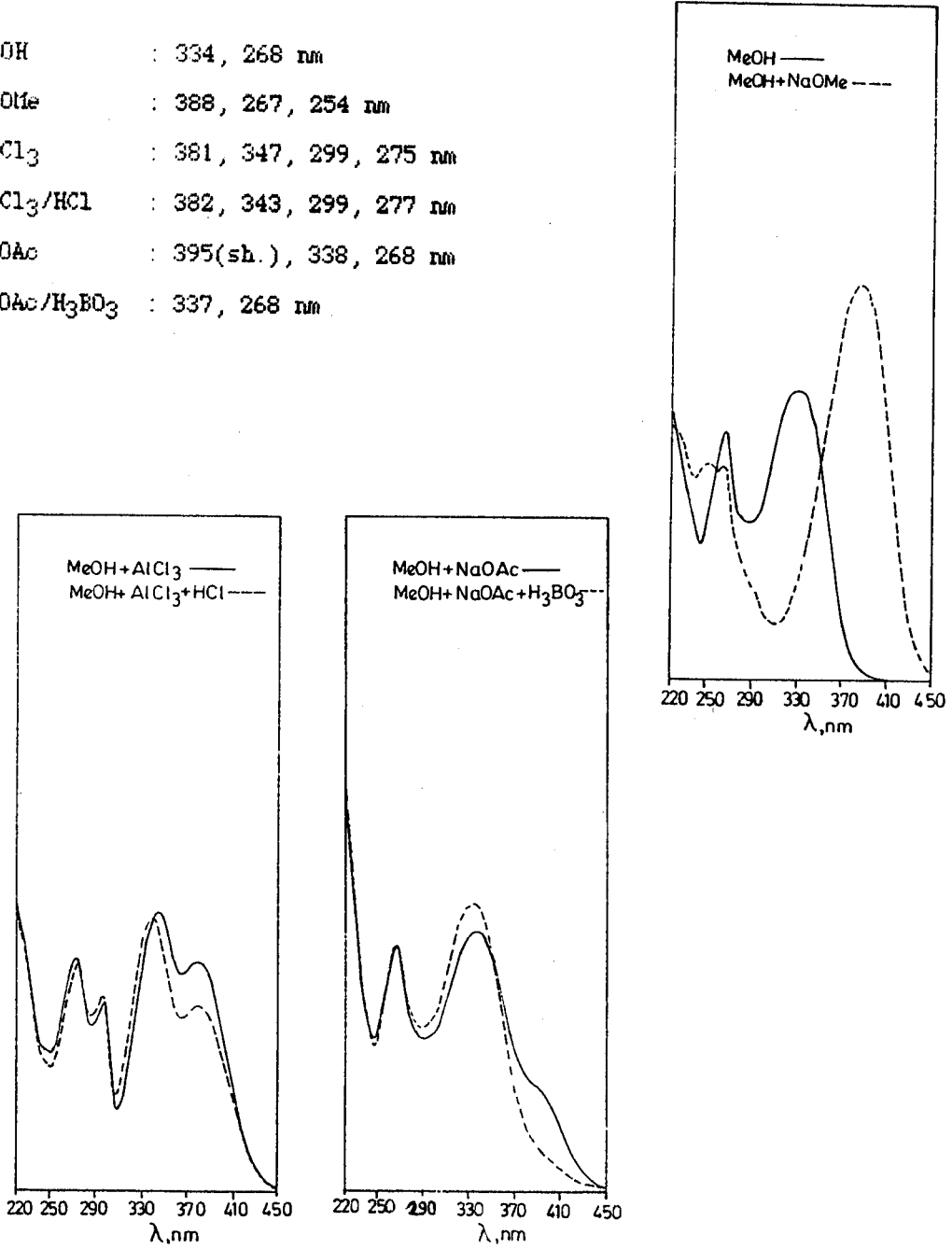
Aluminyum klorür/hidroklorik asit spektrumunda Bant-I'in metanol spektrumuna göre 49 nm uzun dalga boyuna kayması 5-hidroksil grubunun serbest olduğunu ve 6 konumunun süstitüent içermediğini gösterir.

Aluminyum klorür ve aluminyum klorür/hidroklorik asit spektrumlarının aynı olması B halkasında orto-dihidroksil durumunun olmadığını belirtmektedir. Ayrıca sodyum asetat/borik asit spektrumunda Bant-I'in uzun dalga boyuna doğru belirgin bir kayma göstermemesi orto-dihidroksilin olmadığını doğrulamaktadır.

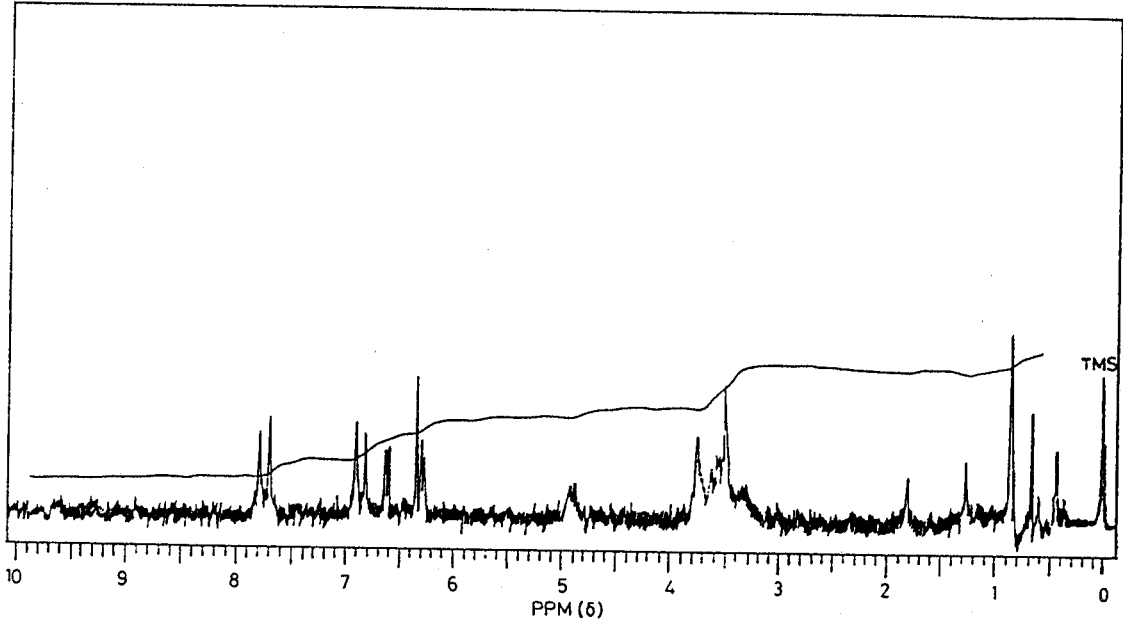
Trimetil silil eteri (TMS) halinde CDCl₃'da alınan ¹H-N.M.R. spektrumunda (Şekil. 4.5.) 3,4-3,8 ppm arasında gözlenen multiplet ve bileşiğin kromatografik davranışları glikozit olduğunu belirler. Şekerin C-1 protonu 5,1 ppm'deki bir protonluk dublet ile gözlenirken, J=7 Hz'lik yarılmaları

aglikona β bağıyla bağlı olduğunu göstermektedir. B halkasındaki C-3', C-5' protonlarını 6,85 ppm'deki dublet, C-2' ve C-6' protonlarını ise 7,75 ppm'deki dublet kanıtlamaktadır.

MeOH	: 334, 268 nm
NaOMe	: 388, 267, 254 nm
AlCl ₃	: 381, 347, 299, 275 nm
AlCl ₃ /HCl	: 382, 343, 299, 277 nm
NaOAc	: 395(sh.), 338, 268 nm
NaOAc/H ₃ BO ₃	: 337, 268 nm



Şekil. 4.4. U₃ bileşiğinin UV spektrumu

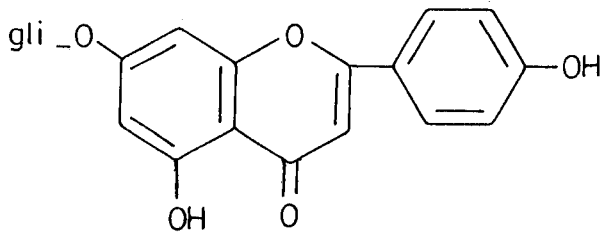


Şekil. 4.5. U₃ bileşiğinin N.M.R. spektrumu

C-3 protonu 6,33 ppm'de singlet olarak gözlenirken, C-6 ve C-8 protonları 6,6 ppm ve 6,25 ppm'de birer protonluk dubletler halinde bulunmaktadır.

Uygulanan asit hidrolizi sonucu bileşikteki şekerin glikoz olduğu ince tabaka kromatografisi ile anlaşılmıştır.

Elde edilen spektral ve kromatografik bulgulardan bileşiğin Apigenin 7-O-glikozit olduğu belirlenmiş, İTK'deki standart örneklerle hidroliz öncesi ve sonrası yapılan kıyaslamalar sonucu aşağıda verilen yapıda olduğu kesin olarak kanıtlanmıştır (Formül 3).



Formül 3

U₄ bileşiğinin tanınması

Bileşiğin İTK'sı UV ışığında incelendiğinde görülen koyu mor leke, 5 konumunda hidroksil grubunun serbest olduğunu, ayrıca 3 konumunda hidroksil grubunun olmadığını ya da bir süstitüent taşıdığını belirtir, NH₃ buharına tutulduğunda sarı, NA belirteci püskürtüldüğünde ise rengin turuncu olması 3' ve 4' konumlarında serbest hidroksil grubu olduğunu göstermektedir.

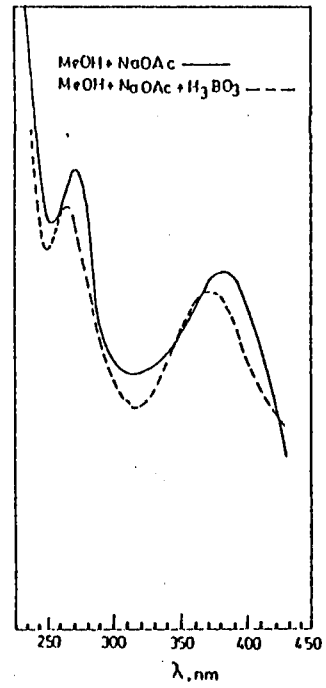
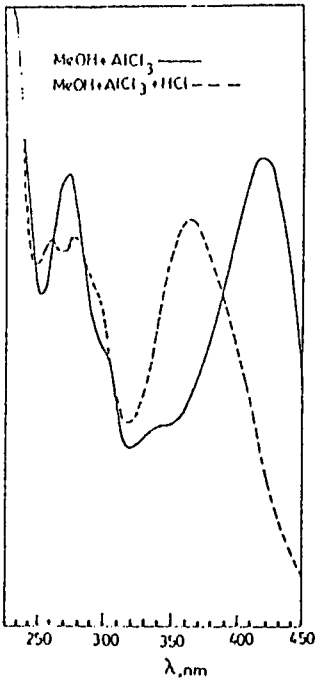
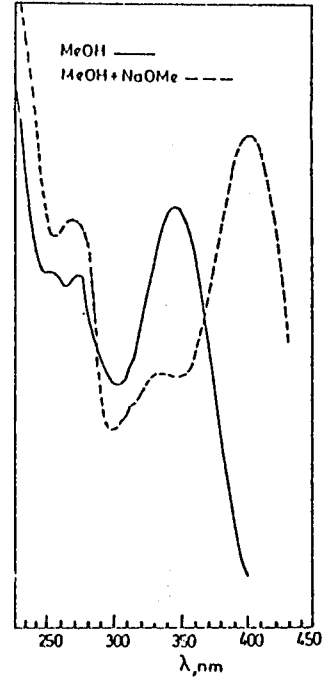
Metanoldeki UV spektrumunda (Şekil. 4.6.) Bant-I'in 350 nm'de çıkması bileşiğin flavon olabileceğini düşündürmektedir. Sodyum metoksit spektrumunda Bant-I'in metanol spektrumuna göre şiddetinin artması ve 50 nm uzun dalga boyuna kayması bileşiğin 4'-hidroksil grubu taşıdığını, ayrıca 330 nm'de Bant-III'ün bulunması 7 konumunda serbest hidroksil grubunun olduğunu göstermektedir.

Aluminyum klorür spektrumundaki Bant-I'in hidroklorik asit eklenmesiyle kısa dalga boyuna kayması, B halkasında orto-dihidroksil varlığını göstermekte ve NA belirteci ile oluşan renk bunu doğrulamaktadır. Ayrıca aluminyum klorür/hidroklorik asit spektrumundaki Bant-I'in metanol spektrumuna göre 20 nm'lik bir kayma göstermesi de 6-metoksil grubunun varlığını kanıtlamaktadır.

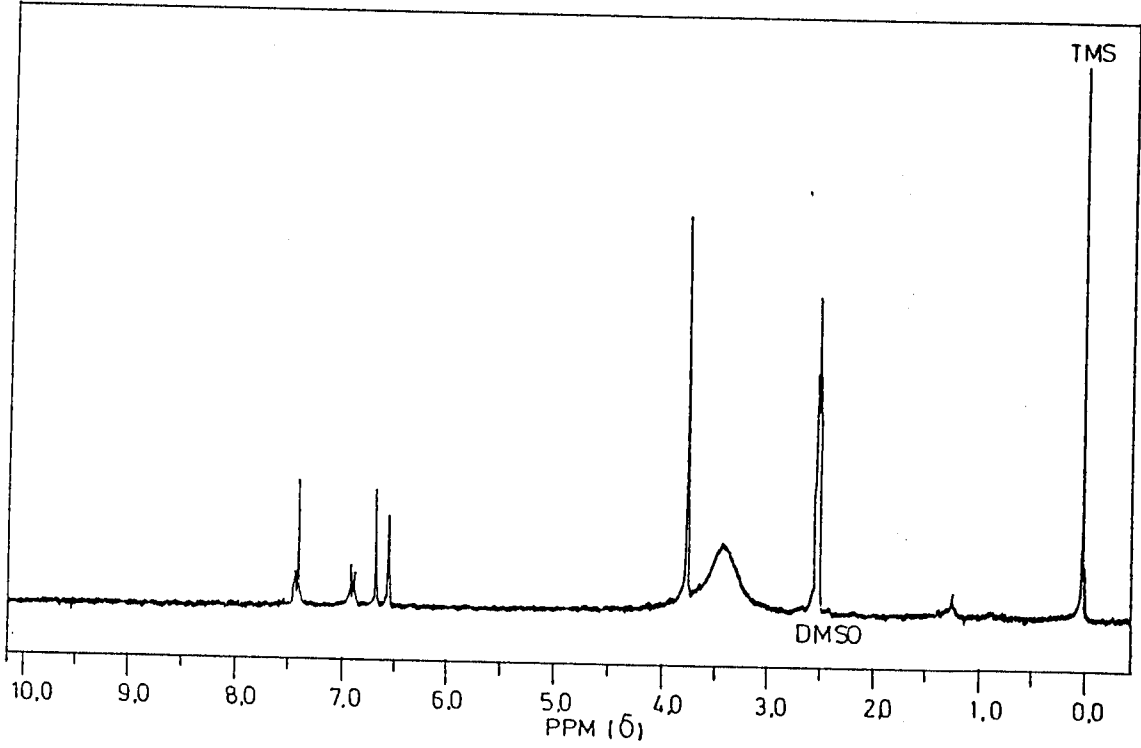
d₆-DMSO'de alınan ¹H-N.M.R. spektrumunda (Şekil. 4.7.) 3,75 ppm'de gözlenen keskin singlet molekülde bir metoksil grubu olduğunu belirler. Bileşiğin kromatografik özellikleri ve 3-4 ppm arasında şeker protonlarına ait multipletin bulunmaması aglikon olduğunu düşündürmektedir.

B halkasının C-2' ve C-6' protonlarına ait dublet 7,4 ppm'de (J=7,5 Hz), C-5' protonuna ait dublet ise 6,9 ppm'de (J=8 Hz) gözlenirken, C-8 ve C-3 protonları sırasıyla 6,7 ppm ve 6,55 ppm'de keskin birer singlet olarak belirlenir.

MeOH	: 350, 275, 250 nm
NaOMe	: 400, 330(sh.), 270 nm
AlCl ₃	: 420, 305(sh.), 275 nm
AlCl ₃ /HCl	: 370, 300(sh.), 280, 265 nm
NaOAc	: 385, 268 nm
NaOAc/H ₃ BO ₃	: 375, 265 nm

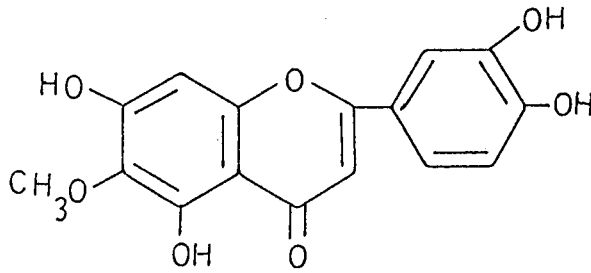


Şekil. 4.6. U₄ bileşiğinin UV spektrumu.



Şekil. 4.7. U_4 bileşiğinin N.M.R. spektrumu

Bileşiğin standart örneği ile kromatografik karşılaştırılması ve spektral bulgularından 6-metoksi luteolin (Nepetin) olduğu kanısına varılmıştır (Formül 4).



Formül 4

U₅ bileşiğinin tanınması

U₅ bileşiği UV ışığında, NH₃ buharı ve NA belirteci püskürtülmesi ile mor renk vermektedir. Bu renk reaksiyonları 5 konumunda hidroksil grubunun serbest olduğunu, 3, 3' ve 4' konumlarında ise hidroksil gruplarının olmadığını düşündürmektedir.

Metanolde alınan UV spektrumunda (Şekil. 4.8.) Bant-I'in 331 nm'de, Bant-II'ninde 277 nm'de gözlenmesi maddenin apigenin türevi bir flavonoid bileşik olduğunu düşündürmektedir (Mears, 1972). Sodyum metoksit spektrumundaki Bant-I'in şiddetinin azalması ve 40 nm uzun dalga boyuna kayması 4' konumunda serbest hidroksil grubunun bulunmadığını, ayrıca Bant-III'ün gözlenmemesi ve sodyum asetat spektrumundaki Bant-II'nin metanol spektrumundaki Bant-II'ye göre kayma göstermemesi de, 7 konumunun kapalı olduğunun bir işaretidir.

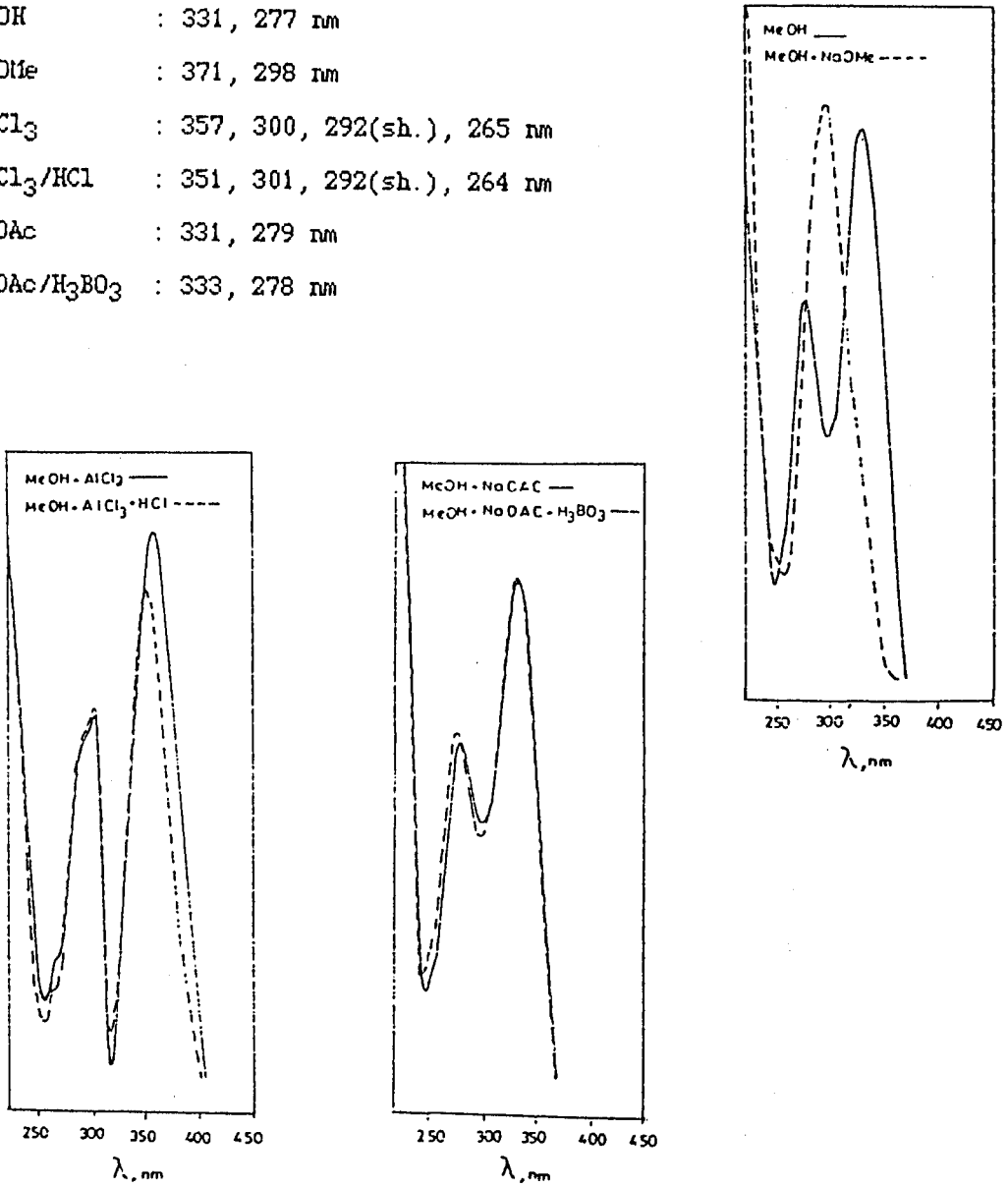
Aluminyum klorür ve aluminyum klorür/hidroklorik asit spektrumlarının aynı olması ve ayrıca sodyum asetat/borik asit spektrumundaki Bant-I'in metanol spektrumuna göre belirgin bir batokromik kayma göstermemesi bu durumu doğrulamaktadır. Ayrıca aluminyum klorür/hidroklorik asit spektrumunda Bant-I'in metanol spektrumundaki Bant-I'e göre 20 nm uzun dalga boyuna kayması, 5-hidroksil, 6-metoksil grupları için karakteristiktir (Wagner, 1973).

Trimetil silil eteri (TMS) halinde CDCl₃'da alınan ¹H-N.M.R. spektrumunda (Şekil. 4.9.) 4,05 ppm, 3,98 ppm ve 3,80 ppm'lerde bulunan singletler bileşikte üç metoksil grubu bulunduğuna işaret etmektedir. Bileşiğin hidroliz olmaması, kromatografik davranışları ve ¹H-N.M.R. spektrumunda 3-4 ppm arasında şeker protonlarının gözlenmemesi aglikon olduğunu kanıtlamaktadır.

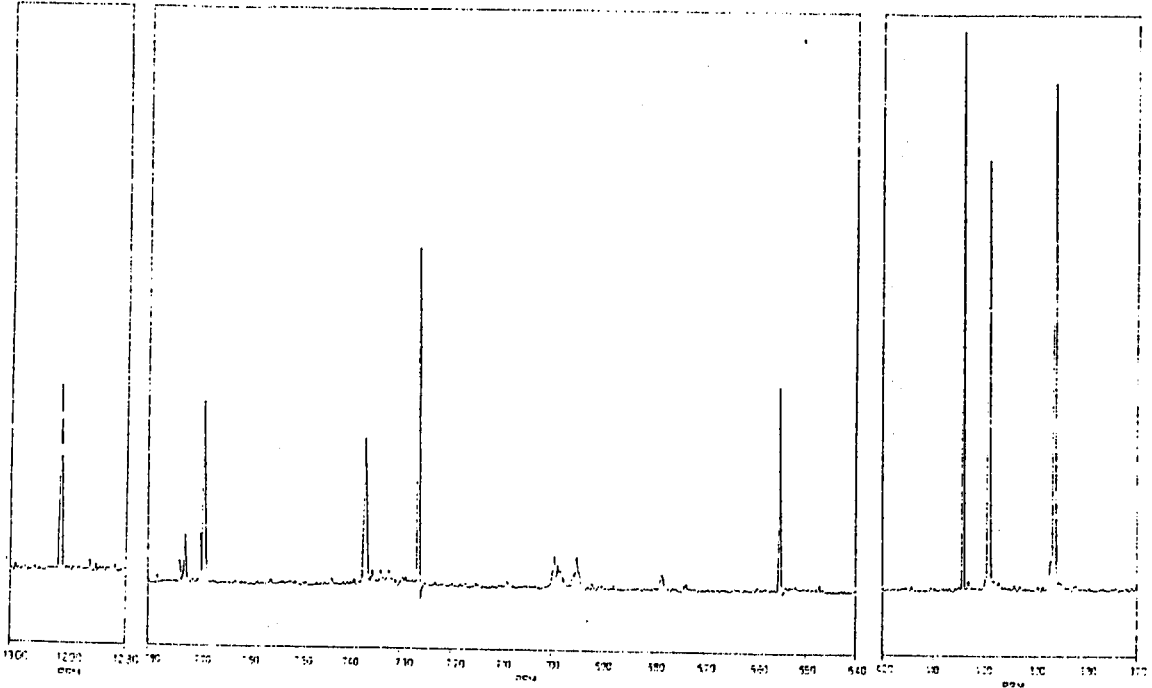
B halkasının C-2', C-6' ve C-3', C-5' protonlarını sırasıyla 7,75 ppm ve 6,98 ppm'de gözlenen çift dubletler (J=8 Hz) belirlemekte, bu durumda B

halkasında sadece 4' konumunda bir oksijen fonksiyonu bulunduğu anlaşılmaktadır. C-8 ve C-3 protonları ise 7,30 ppm ve 6,50 ppm'de birer singlet olarak ortaya çıkmaktadır.

MeOH	: 331, 277 nm
NaOMe	: 371, 298 nm
AlCl ₃	: 357, 300, 292(sh.), 265 nm
AlCl ₃ /HCl	: 351, 301, 292(sh.), 264 nm
NaOAc	: 331, 279 nm
NaOAc/H ₃ BO ₃	: 333, 278 nm

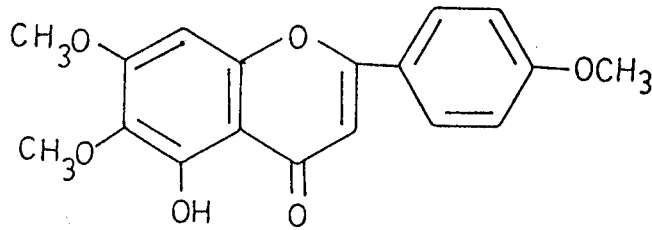


Şekil. 4.8. U₅ bileşiğinin UV spektrumu



Şekil. 4.9. U₅ bileşiğinin N.M.R. spektrumu.

Bütün bu bulguların değerlendirilmesi sonucunda üç metoksil grubunun 6, 7 ve 4' konumlarında bulunduğu ve bileşiğin 6-metoksi apigenin 7,4'-dimetil eter (Salvigenin) olduğu anlaşılmış, ince tabaka kromatografisinde yapılan şahit denemelerle bu düşünce kanıtlanmıştır (Formül 5).



Formül 5

U₆ bileşiğinin tanınması

U₆ bileşiği UV ışığında, NH₃ buharı ve NA belirteci ile mor renk vermektedir. Bu renk reaksiyonları molekülde 6-hidroksil grubu olabileceğini düşündürmektedir (Ulubelen, 1980).

Metanoldeki UV spektrumunda (Şekil. 4.10.) Bant-I'in 330 nm'de çıkması bileşiğin flavon olduğunu belirtmektedir. Sodyum metoksit spektrumundaki Bant-I'in metanol spektrumuna göre şiddetinin artmaması ve 60 nm uzun dalga boyuna kayması 4' konumunda serbest hidroksil grubu olmadığını, ayrıca 308 nm'deki omuz ve sodyum asetat spektrumundaki Bant-II'nin metanol spektrumundaki Bant-II'ye göre değişme göstermemesi de, 7 konumunda serbest hidroksil grubu bulunmamasının bir diğer kanıtıdır.

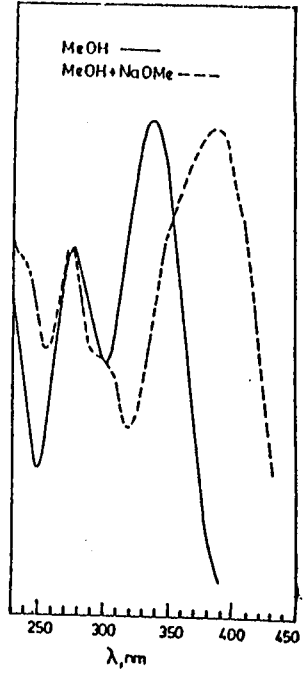
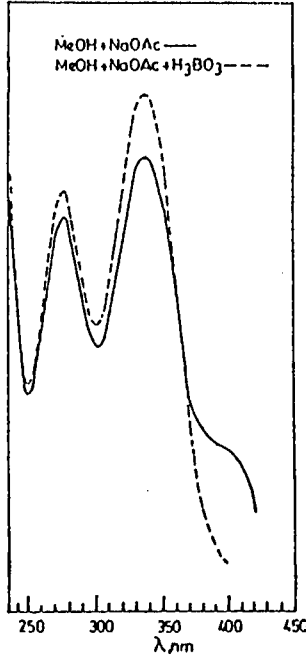
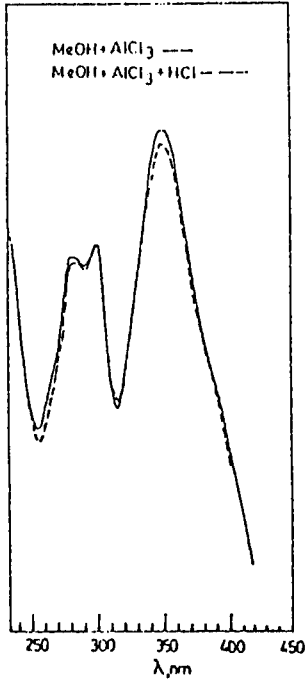
Aluminyum klorür ve aluminyum klorür/hidroklorik asit spektrumlarının aynı olması ve ayrıca sodyum asetat/borik asit spektrumundaki Bant-I'in metanol spektrumuna göre çok az kayma göstermesi B halkasında orto-dihidroksil durumunun olmadığını belirtmektedir. Aluminyum klorür/hidroklorik asit spektrumunda Bant-I'in metanol spektrumu Bant-I'ine göre 25 nm uzun dalga boyuna kayması, 6-hidroksil grubunun varlığını göstermektedir (Sakakibara, 1978).

d₆-DMSO'de alınan ¹H-N.M.R. spektrumunda (Şekil. 4.11.) 3-3.6 ppm arasında gözlenen multiyet ve bileşiğin kromatografik davranışları glikozit olduğunu belirler.

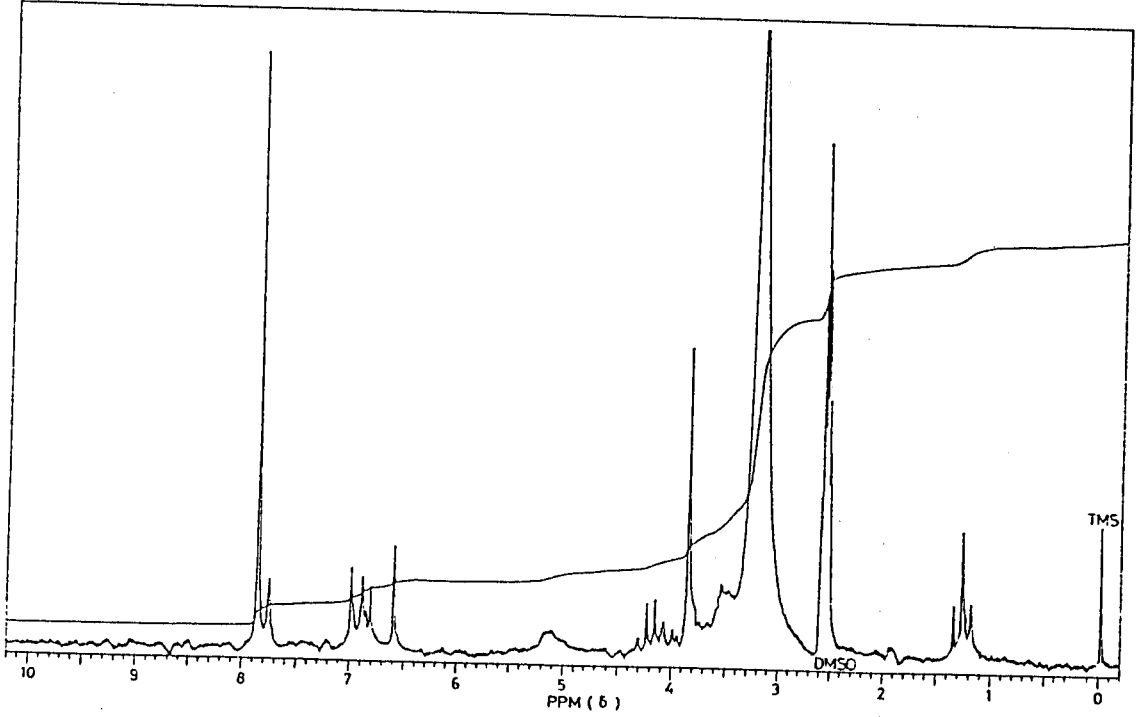
Şekerin C-1 protonu 5,15 ppm'de bir protonluk dublet olarak gözlenirken, etkileşim sabiti J=7 Hz olması β bağlı şekerlerin bir ve iki numaralı protonlarının diaksiyel etkileşimleri için karakteristiktir (Mabry, 1970).

B halkasının C-2',C-6' ve C-3',C-5' protonları sırasıyla 7,8 ppm (J=9 Hz) ve 6,93 ppm'de (J=9 Hz) ikişer protonluk dubletler olarak ortaya çıkarken, C-3 ve C-8 protonlarına ait singletler 6,8 ppm ve 6,6 ppm'de gözlenmektedir. Moleküldeki metoksil grubu $^1\text{H-N.M.R.}$ spektrumunda üç protonluk bir singlet halinde 3,85 ppm'de görülmektedir.

MeOH	: 330, 270 nm
NaOMe	: 390, 308(sh.), 278 nm
AlCl_3	: 355, 270 nm
AlCl_3/HCl	: 355, 300, 280 nm
NaOAc	: 338, 270 nm
$\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3$: 335, 270 nm



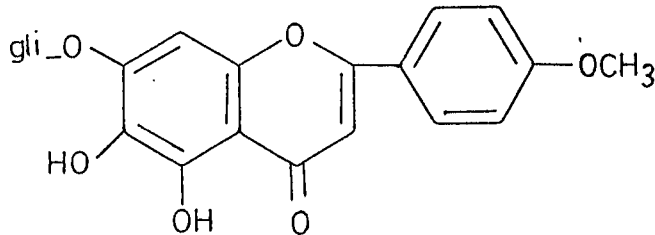
Şekil. 4.10. U_6 bileşiğinin UV spektrumu.



Şekil. 4.11. U_6 bileşiğinin N.M.R. spektrumu.

Asit hidrolizi sonucu moleküldeki şekerin glikoz olduğu ince tabaka kromatografisi ile anlaşılmaktadır. Aglikon kısmının renk reaksiyonlarına bakıldığında NH_3 buharları ve NA belirteci ile bileşik mor renk vermiş, böylece hidroliz sonucu şekerin molekülün 4' konumundan ayrılmadığı kanıtlanmıştır.

Tüm kromatografik ve spektroskopik bulguların değerlendirilmesi sonucu bileşiğin 6-hidroksi, 4'-metoksi apigenin 7-O-glikozit olduğu düşünülmüş ve şahit örnek ile ince tabaka kromatografisinde karşılaştırılması sonucu, U_6 'nın kesin olarak 6-hidroksi, 4'-metoksi apigenin 7-O-glikozit olduğu (Formül 6) tesbit edilmiştir.



Formül 6

U₇ bileşiğinin tanınması

Bileşik UV ışığında, NH₃ buharı ve NA belirteci püskürtülmesi ile mor renk vermektedir. Bu renk reaksiyonları 5 konumunda hidroksil grubunun serbest olduğunu, 3, 3' ve 4' konumlarında ise hidroksil gruplarının olmadığını düşündürmektedir.

Metanolde alınan UV spektrumunda (Şekil. 4.12.) Bant-I'in 332 nm'de, Bant-II'ninde 276 nm'de gözlenmesi maddenin apigenin türevi bir flavonoid bileşik olduğunu düşündürmektedir (Mears, 1972). Sodyum metoksit spektrumundaki Bant-I'in şiddetinin azalması ve 37 nm uzun dalga boyuna kayması 4' konumunun kapalı olduğunu, 294 nm'de gözlenen omuz ise 7 konumunda serbest hidroksil grubu olabileceğini işaret etmektedir.

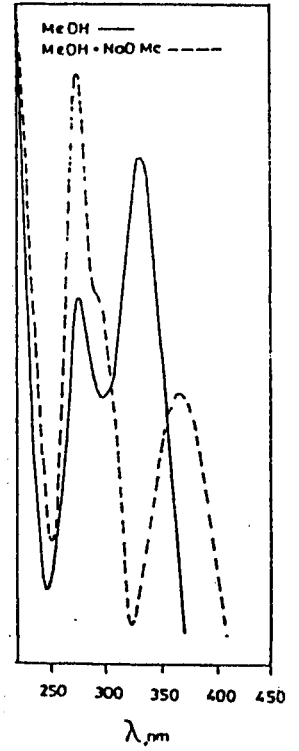
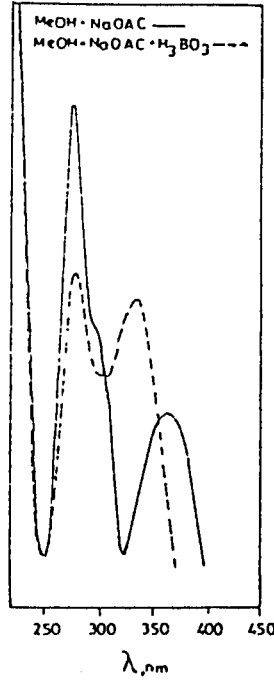
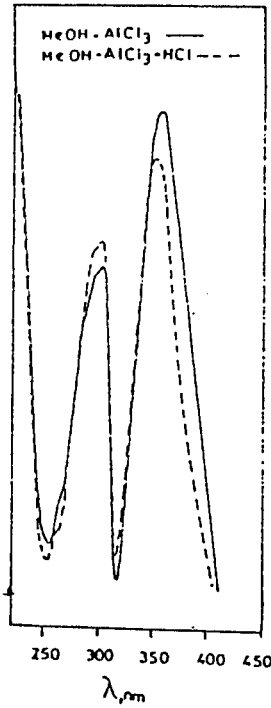
Aluminyum klorür ve aluminyum klorür/hidroklorik asit spektrumlarının aynı olması ve ayrıca sodyum asetat/borik asit spektrumundaki Bant-I'in metanol spektrumundaki Bant-I'e göre çok az kayma göstermesi B halkasında orto-dihidroksil durumu olmadığını belirtmektedir. Ayrıca aluminyum klorür/hidroklorik asit spektrumunda Bant-I'in metanolün Bant-I'ine göre 19 nm uzun dalga boyuna kayması, 5-hidroksil, 6-metoksil grupları için karakteristiktir (Wagner, 1973).

Trimetil silil eteri (TMS) halinde CDCl₃'da alınan ¹H-N.M.R. spektrumunda (Şekil. 4.13.) 3,94 ve 3,74 ppm'de gözlenen iki singlet bileşikte iki metoksil grubu bulunduğu işaret etmektedir. Bileşiğin hidroliz olmaması, kromatografik davranışları ve spektrumda şeker protonlarının görülmemesi bileşiğin bir aglikon olduğunu düşündürmektedir.

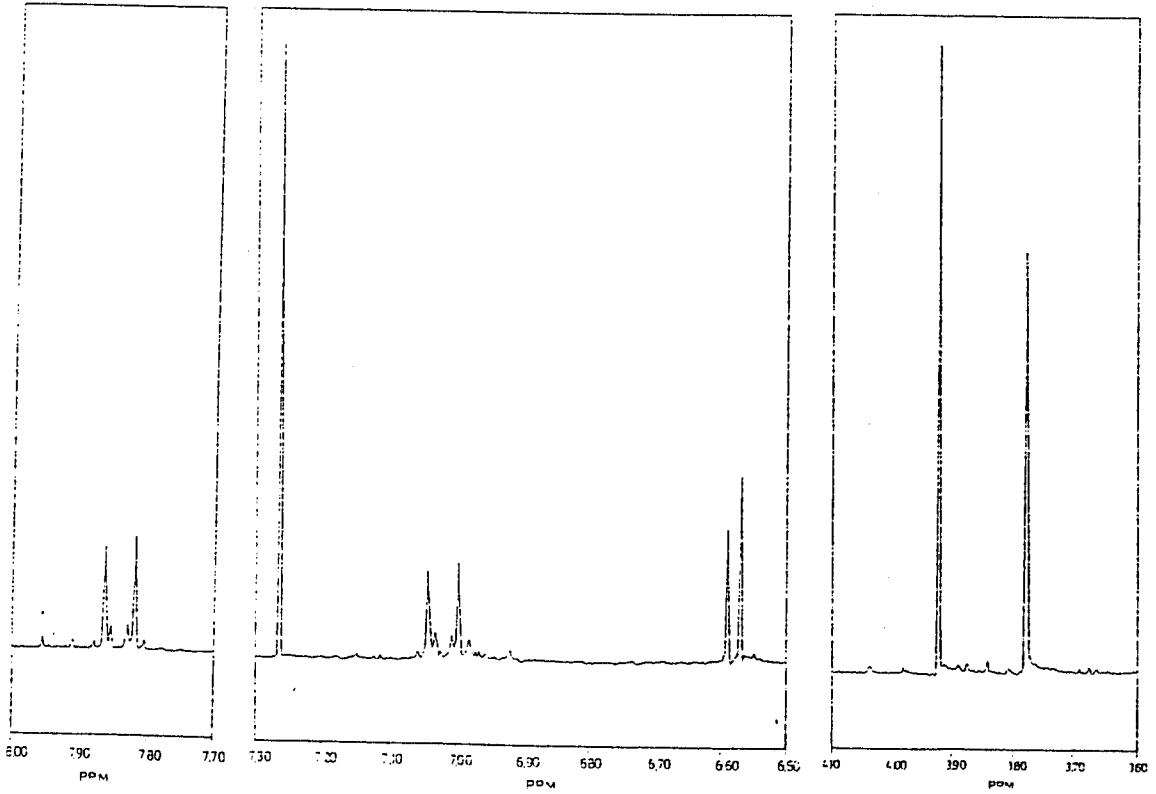
B halkasının C-2', C-6' ve C-3', C-5' protonları 7,85 ppm ve 7,03

ppm'de dublet-dublet olarak belirlemekte, bu durumda B halkasında sadece 4' konumunda bir oksijen fonksiyonu bulunduğu anlaşılmaktadır. C-8 ve C-3 protonlarına ait singletler 6,6 ppm ve 6,57 ppm'de gözlenmektedir.

MeOH	: 332, 276 nm
NaOMe	: 367, 294(sh.), 276 nm
AlCl ₃	: 356, 301, 268(sh.), 262 nm
AlCl ₃ /HCl	: 351, 300, 262 nm
NaOAc	: 362, 295, 277 nm
NaOAc/H ₃ BO ₃	: 334, 278 nm

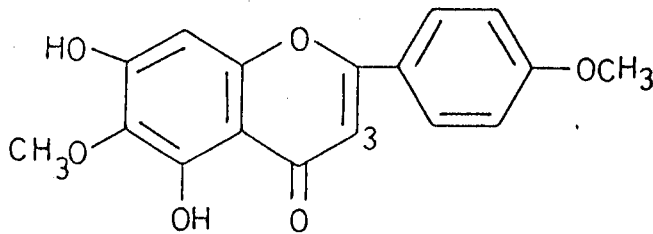


Şekil. 4.12. U₇ bileşiğinin UV spektrumu.



Şekil. 4.13. U₇ bileşiğinin N.M.R. spektrumu.

UV ve ¹H-N.M.R. spektrumlarından elde edilen bulgular ışığında, bileşikteki iki metoksit grubunun 6 ve 4' konumlarında bulunduğu anlaşılmaktadır (Collado, 1985). Buna göre bileşiğin 6-metoksi apigenin, 4'-metil eter (Pectolarinigenin) olduğu anlaşılmış ve ince tabaka kromatografisinde yapılan şahit denemelerle bu düşünce kanıtlanmıştır (Formül 7).



Formül 7

4.2. Uygulanan Teknikler

4.2.1. Kromatografi

4.2.1.1. Sütun kromatografisi

Adsorbanlar

Poliklar (Gaf Corporation).

Sefadeks (Sephadex LH-20) (Pharmacia Fine Chemicals).

Mikrokristalin Selüloz (E. Merck).

Sütunların hazırlanması

Özüt miktarına uygun çap ve uzunlukta cam sütunlar kullanıldı.

Poliklar sütun

Kloroform-etanol (2:1) çözücü sisteminde 24 saat şişirilen poliklar, özüt miktarına uygun olarak seçilen cam sütunun 2/3'ünü kaplayacak şekilde doldurulup, üzerine özütün yoğun çözeltisi eklendi. Özüt adsorbana tamamen emdirildikten sonra sütun elüsyon çözeltisi ile yıkanmaya başlandı.

Sefadeks sütun

Özüte uygun miktarda sefadeks, 48 saat metanolde şişirildi. Sonra sütunun 2/3'ü kaplanacak şekilde doldurulup üzerine özütün derişik çözeltisi eklendi.

Selüloz sütun

Selüloz kuru halde sütuna doldurulduktan sonra, üzerine uygun miktarda selüloz ile karıştırıp kurutulmuş olan özüt yerleştirildi.

4.2.1.2. İnce tabaka kromatografisi

Adsorban

Selüloz (Cellulose Microcrystallin E. Merck).

Hazırlanması

Selüloz plaklar için 30 g mikrokristalin selüloz 90 ml distile su ile 5 dakika sürekli çalkalanıp Camag plak kaplama aygıtıyla (5x20) cm boyutlarındaki cam plaklara dökülerek 0,3 mm kalınlığında kaplandı ve oda sıcaklığında kurutuldu.

4.2.2. Spektroskopi

4.2.2.1. UV spektroskopisi

Spektrumlar Hitachi 150-20 Spektrophotometer aygıtında, 1 cm'lik kuvars kuvvetlerde alındı. Ölçmeler bileşiklerin metanoldeki çözeltilerinde yapıldı. Kayma spektrumlarının alınabilmesi için bileşiğin metanoldeki çözeltisine sıra ile NaOMe, AlCl₃, AlCl₃/HCl, NaOAc ve NaOAc/H₃BO₃ çözeltileri belirli miktarlarda eklendi.

4.2.2.2. $^1\text{H-N.M.R.}$ spektroskopisi

$^1\text{H-N.M.R.}$ spektrumları:

Bruker 200 MHz (U_4, U_5, U_7) [Tübitak-İst.],

Jeol FT 90 MHz (U_1, U_3, U_6) [Leeds School of Chemistry]

aygıtlarıyla alındı.

Çözücü olarak $d_6\text{DMSO}$, CDCl_3 kullanıldı. İç standart olarak tetra metil silan (TMS) (0,00 ppm) eklendi.

4.2.3. Belirteçler

NH_3 buharı

NA belirteci (Naturstoffreagenz A, difenil borik asit β - amino etil ester).

100 mg NA belirteci 100 ml metanolde çözülerek hazırlandı (Mabry, 1980).

Anilin ftalat (şeker belirteci)

1,66 g ftalenhidrit ve 0,93 g taze distillenmiş anilin, suyla doyurulmuş bütanol ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı. $\text{C}_6\text{H}_5\text{N} : \text{EtOAc} : \text{AcOH} : \text{H}_2\text{O}$ (36: 36: 7: 21) veya $n\text{-BuOH} : \text{AcOH} : \text{H}_2\text{O}$ (4:1:5) gibi çözücü sistemlerinde yürütülen kromatografi plağı, belirteç püskürtüldükten sonra 100 $^{\circ}\text{C}$ 'de 10-15 dakika bekletilerek oluşan lekeler saptandı.

Sodyum metoksit

2,5 g temizlenmiş metalik sodyum küçük parçacıklar halinde 100 ml metanolde çözüldü.

Aluminyum klorür

5 g susuz aluminyum klorür 100 ml metanolde çözüldü.

Hidroklorik asit çözeltisi

50 ml derişik HCl 100 ml distile suda çözüldü.

Sodyum asetat

Toz halinde susuz saf sodyum asetat bir krozede eritildi ve asetik asitten kurtarıldıktan sonra kullanıldı.

Borik asit

Toz halinde susuz borik asit kullanıldı.

4.2.4. Kimyasal reaksiyonlar

4.2.4.1. Asit hidrolizi

Asit hidrolizi U_3 , U_6 bileşiklerinin aglikon ve şeker kısımlarının saptanması için uygulandı.

Yaklaşık 2 mg madde 5 ml etanolde çözülüp üzerine 10 ml 0,1 N CF_3COOH eklenerek, küçük armudi bir balonda geri çeviren soğutucu altında su banyosunda ısıtıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra düşük basınçta etanol uçuruldu, kalan sulu karışım etil asetat veya eter gibi bir organik çözücü ile

tüketildi. Organik fazda bileşiğin ağırlık oranı, sulu fazda da şeker kısmı saptandı (Harborne, 1965).

4.2.4.2. Trimetil silil eter (TMS) türevlerinin hazırlanması

Yaklaşık 10 mg bileşik 1 ml susuz pridinde çözülüp üzerine 0,5 ml trimetilklorsilan ile 0,5 ml hegzametildisilazan eklendi ve oda sıcaklığında yarım saat bekletildi. Düşük basınçta ve oda sıcaklığında çözücü ve reaktiflerin fazlası kuruluğa kadar uçurulup, kalan kısım karbontetraklorürde çözüldü. Çözülmeyen tuzlarından küçük bir selit sütundan geçirilerek temizlendi ve TMS eklenmesiyle ¹H-N.M.R. spektrumu alındı (Mabry, 1965).

4.3. Yapılan işlemler

Centaurea urvillei, D.C. subsp. *urvillei* bitkisi 1982'de Niğde Çiftahan'dan toplandı. Bitki Dr. Gülten ÇAKIRER tarafından teşhis edilmiş olup, bir örneği İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Herbarium'unda bulunmaktadır.

4.3.1. Flavonoid bileşiklerin tüketilmesi

Çalışmada bitkilerin tüm kısımları (gövde, yaprak, çiçek) kullanıldı. Kurutulup kaba toz haline getirilmiş olan bitkiden 800 gramı sokslet aparatında etanol ile tüketildi. Vakumda yoğunlaştırılan özüt bir miktar su ile seyreltildikten sonra ayırma hunisinde sırasıyla petrol eteri, kloroform ve etil asetat ile tüketildi. Böylece bu bitki için üç özüt elde edildi. Bu özütlerin herbiri vakumda yoğunlaştırılarak ince tabaka kromatografisi ile selüloz plakta, % 15 asetik asit, %40 asetik asit, n-bütanol: asetik asit: su (4: 1: 5) çözücü sistemleri kullanılarak incelendi. Herbirinin UV ışığı,

amonyak buharları ve NA belirtecine karşı verdikleri renklerle flavonoidlerin varlığı gözlemlendi. Petrol eteri özütünün flavonoid bileşik taşımadığı, buna karşılık kloroform ve etil asetat özütlerinin aynı flavonoid bileşiklerini taşıdığı saptandı. Sonuç olarak kloroform ve etil asetat özütleri birleştirildi ve çalışmalar bu özütlerle yapıldı.

4.3.2. Flavonoid bileşiklerin elde edilmesi

Etil asetat/kloroform özütü

Egger kloroform-etanol (2: 1) çözeltisi ile 24 saat bekletilerek şişirilen poliklar 3,5x55 cm boyutlarındaki bir sütuna yerleştirildi, üzerine az etanolde çözülmüş 2,6 g etil asetat/kloroform özütü bir pipet yardımıyla dikkatli bir şekilde konuldu.

Yıkamaya kloroform ile başlandı, bir süre sonra karışıma etanol eklenerek polarite arttırıldı ve sonunda saf etanole geçilerek yıkama tamamlandı. Sütundaki bantların hareketleri UV lambası (336 nm) ile izlendi. Farklı maddelere ait olan farklı renklerdeki bantlar ayrı fraksiyonlar olarak toplandı. Genellikle 50-100 ml olarak toplanan fraksiyonlar selüloz ince tabaka kromatografisinde incelendikten sonra benzer olanlar birleştirilerek yoğunlaştırıldı.

4. fraksiyon (20x3) cm boyutlarında selüloz sütuna uygulandı ve sütun % 40 aseton ile yıkandı. Bu sütundan U_5 bileşiği 12 mg olarak elde edildi.

5. fraksiyon ince tabaka kromatografisi ile kontrol edildiğinde birden fazla madde taşıdığı görüldü. Bu fraksiyon da selüloz sütuna uygulanıp % 40 aseton ile yıkandı. Toplanan fraksiyonlar ince tabaka kromatografisiyle

kontrol edildiğinde yine birden fazla madde taşıdığı görüldü. Birleştirilen fraksiyonlar yoğunlaştırıldıktan sonra 18 mg özüt (20x2) cm boyutlarında bir poliklar sütuna konuldu ve kloroform-etanol (3: 1) çözücü sistemi ile yıkanmaya başlandı. Toplanan fraksiyonlardan U₆ bileşiği elde edildi.

Ana sütunun polaritesi arttırılarak yıkamaya devam edildi. Yapılan ince tabaka kromatografilerinde 12-13 fraksiyonlarının aynı maddeleri taşıdığı görüldü. Birleştirilen fraksiyonlar yoğunlaştırıldıktan sonra 31 mg özüt (30x1,5) cm boyutlarında bir poliklar sütuna konuldu ve kloroform-etanol (2: 1) çözücü ile yıkanmaya başlandı. Toplanan fraksiyonlarda sefadeks LH-20 sütunundan geçirilerek U₁ bileşiği elde edildi.

18-22. fraksiyonlarında birden fazla madde taşıdığı görüldü. Birleştirilen fraksiyonlar poliklara uygulandı ve 26 mg U₂, 9 mg U₈ bileşikleri elde edildi. Bu bileşiklerden U₈'in daha önce 12-13. fraksiyonlarda elde edilen U₁ bileşiği ile aynı olduğu saptandı.

Büyük sütun kloroform-etanol (1: 1)ve daha sonra kloroform-etanol (1:2) ile yıkanmaya devam edildi. 29-31 fraksiyonlarının yapılan ince tabaka kromatografisinde iki madde içerdiği görüldü. Birleştirilen fraksiyonlar uçurulduktan sonra (25x2) cm boyutlarında ufak bir poliklar sütuna konuldu ve sütundan alınan fraksiyonlar ayrıca sefadeks sütundan geçirilerek temizlenip, 11 mg U₃ bileşiği saf halde elde edildi.

Daha sonra 29-31 fraksiyonlarından elde edemediğimiz ikinci bileşik 32. fraksiyonda (20x2) cm boyutlarında selüloz sütunda ve yıkama çözültisi olarak % 40 aseton kullanılarak 13 mg U₄ olarak elde edildi.

Kloroform-etanol (1: 3) oranı ile yıkamaya devam edildi. 38. fraksiyon (40x2) cm boyutlarında poliklar sütuna konuldu ve kloroform-etanol ile yıkanmaya başlandı. Sefadeks LH-20 sütunundan geçirilerek 34 mg U₇ bileşiği temiz olarak elde edildi.

Daha sonra etanol ve etanol-su sistemine geçilerek yıkamaya son verildi.

Maddeler	Miktarları (mg)	Kullanılan Çözücü Sistemleri				
		%15 AcOH	%40 AcOH	%60 AcOH	TAB	BAW
U ₁	40	-	0,37	0,67	-	0,95
U ₂	26	0,15	0,30	-	0,87	-
U ₃	11	0,20	0,48	-	-	-
U ₄	13	-	0,26	0,48	-	0,83
U ₅	12	-	0,63	-	-	-
U ₆	18	0,35	0,75	-	-	-
U ₇	34	-	0,61	-	-	-

Çizelge. 4.1. *Centaurea urvillei*, D.C. supsb. *urvillei*'den elde edilen flavonoid bileşiklerin miktarları ve R_f değerleri

SONUÇ VE ÖNERİLER

Centaurea urvillei D.C. subsp. *urvillei* bitkisinin flavonoidleri açısından incelenmesi amacıyla yapılan bu çalışmada, flavonoid bileşikleri tüketme tekniğine göre özütler halinde toplanmış, özütlerde yapılan kromatografik ve spektroskopik çalışmalar sonucu toplam yedi flavonoid bileşik elde edilmiştir.

Elde edilen bileşiklerin beşi flavon (6-metoksi apigenin, apigenin, 6-metoksi luteolin, 7,4'-dimetil eter-6-metoksi apigenin, 4'-metil eter-6-metoksi apigenin), ikisi ise flavon glikoziti (apigenin 7-O-glikozit, 6-hidroksi-4'-metoksi apigenin 7-O-glikozit)'dir. Bileşiklerin şeker taşıyıp taşımadıklarını anlamak için asit hidrolizi yapılmış, O-glikozitleri hidroliz olmuşlar, İTK'de anilin ftalat belirteci ile renk reaksiyonu vermişlerdir. Ayrıca 1H-N.M.R. spektrumunda C-1 protonunun verdiği J=7 Hz'lik yarıma sonucu β -D-glikozit oldukları saptanmıştır.

Bitkiden elde edilen flavonoid bileşiklerden altı tanesi apigenin, birisi ise luteolin türevidir. Bu bileşiklerden beş tanesi C-6 konumunda bir

oksijen fonksiyonu içermektedir. C-6 'da metoksil grubu taşıyan bileşiklerin alüminyum klorür/hidroklorik asit spektrumları, metanol spektrumuna göre, 18-23 nm uzun dalga boyuna kaymakta, bu kayma C-6'da hidroksil grubu içeren bileşiklerde ise 25-30 nm olmaktadır. ¹H-N.M.R. spektrumlarında C-8 protonunun 6,5 ppm dolayında bir singlet olarak gözlenmesi de C-6 konumundaki oksijen fonksiyonu varlığını kanıtlamaktadır.

Sonuç olarak yapılan çalışmada elde edilen flavonoid bileşiklerin biri hariç diğerlerinin apigenin türevidir olması, beş tanesinin C-6 konumlarında bir oksijen fonksiyonunun bulunması ve iki tane O-glikozitin elde edilmesi *Centaurea* türleriyle daha önce yapılan çalışmalar ile paralellik sağlamaktadır. Bitkinin kumaş boyası olarak ekonomik açıdan faydalı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ahmed, Z.F., Rimpler, M. and İsmail, S.I., (1970), *Phytochemistry*, 9, 1595.
- Amer, M.M.A., Salama, O.M. and Omar, A.A., (1984), *Acta Pharm. Jugosl.*, 34, 257.
- Asen, S. and Jurd, L., (1967), *Phytochemistry*, 6, 577.
- Asen, S. and Horowitz, R.M., (1974), *Phytochemistry*, 13, 1219.
- Bacon, J.D., Mabry, T.J. and Mears, J.A., (1976,1977), *Rev. Latinoamer. Quim.*, 7, 83 ; 86, 15873-m.
- Bandyukova, V.A., Khalmatov, K.H. and Alimov, K.H., (1969,1970), *Khim. Prir. Soed.*, 5, 324; 72, 51820-m.
- Baytop, T., (1980), *Farmakognozi*, İstanbul, 240 s.
- Bohmann, F. and Zdero, C., (1967), *Tetrahedron Letters*, 33, 3239.
- Breton, F.J.L., Marero, B.G. and Gonzales, A.G., (1968-a, 1968-b), *An. Quim.*, 64, 187; 69, 271844-z.
- Bruno, M., Herz, W. (1988), *Phytochemistry*, 27, 1873.
- Chari, V.M., Jordon, M., Wagner, H. and Thiest, P.W., (1977), *Phytochemistry*, 16, 1110.
- Collado, G., Macias, F.A., Massanet, G.M. and Luis F.R., (1985), *Journal of Natural Products*, 48, 819.
- Davis, P.H., (1975), *Flora of Turkey and East Eagean Island*, Edinburg, Vol.V, 890 p.
- El-Emary, N.A., Kobayashi, Y. and Ogihara, Y., (1983), *Fitoterapia*, 54, 133.
- El-Masry, Sawsan, O., Omar, A.A. and Abou-Shoer, (1980-1981), *J. Drug. Res.*, 12, 173 ; 95, 93817-w.
- El-Masry and Sawson, O., (1981), *Planta Medica*, 42, 199.
- Farkas, L., Nogradi, M., Sudarsanan, V. and Herz, W., (1966), *Journal of Organic Chemistry*, 31, 3228.
- Farkas, C., Hörhammer, L. and Wagner, H., (1964), *Chem. Ber.*, 97, 610.
- Ferrerres, F. and Thomas, F., (1980-a, 1980-b), *Afinidad*, 37, 368; 93, 217923-h.
- Geissman, T.A. and Crout, D.H.G., (1969), *Organik Chemistry of Secondary Plant Metabolism*, Freeman, Cooper and Company, California, 299 p.
- Geissman, T.A., (1962), *The Chemistry of Flavonoid Compounds*, Pergamon Press., Oxford.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Gonzales, C.I., Macias, F.A., Nassanet, G.M. and Rodriguez, L.F., (1985), *Journal of Natural Products*, 48, 819.
- Gonzales, A.G., Bermejo, J., Breton, J.L. and Triana T., (1971-a, 1971-b) *An. Quim.*, 67, 795; 74, 987-e.
- Harborne, J.B., Mabry, T.J. and Mabry, H., (1975), *The Flavonoids*, Chapman and Hall Ltd., London.
- Harborne, J.B. and Mabry, T.J., (1982), *The Flavonoids, Advances in Research*, Chapman and Hall, New York, 744p.
- Harborne, J.B., (1965), *Phytochemistry*, 4, 107.
- Herz, W., Gibaja, S., Bhat, S.V. and Srivisan, A., (1972), *Phytochemistry*, 11, 2859.
- Heywood, V.H., Harborne, J.B. and Turner, B.L., (1977), *The Biology and Chemistry of the Compositae*, London.
- Heywood, V.H., (1979), *Flowering Plants of the World*, Oxford University Press.
- Hickey, M. and King, C.J., (1981), *100 Families of Flowering Plants*, Cambridge University Press.
- Hodison, V., Tamas, M. and Mester, I., (1985, 1986), *Clujul Med.*, 58, 378 ; 105, 11828-p.
- Jonston, K.M., Stern, D.J. and Waiss, A.C., (1968), *Journal Chromatog.*, 33, 539.
- Kamanzi, K., Raynoud, J. and Voirin, B., (1982), *Plant. Med. Phytother.*, 16, 30.
- Kamanzi, K., Raynoud, J. and Voirin, B., (1982-a, 1982-b), *Pharmazie*, 37, 454 ; 97, 141763-r.
- Kamanzi, K., Raynoud, J. and Voirin, B., (1982-b, 1982-a), *Pharmazie*, 37, 523 ; 97, 178767-w.
- Kamanzi, K., Raynoud, J. and Voirin, B., (1983), *Plant. Med. Phytother.*, 17, 47.
- Kamanzi, K., Raynoud, J. and Voirin, B., (1983-a, 1983-b), *Plant. Med. Phytother.* 17, 52 ; 17, 57.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Kamanzi, K., Raynoud, J. and Voirin, B., (1983-c), *Pharmazie*, 38, 494 ; 99, 191719-t.
- Kamanzi, K. and Raynoud, J., (1976,1977), *ibid.*, 10, 199; 86, 2382-a.
- Kery, A., Twaij, H.A.A., Al-Khazreji and Niran, K., (1985, 1986), *Herba Hung*, 24, 183 ; 104, 183327-v.
- Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B., (1970), *The Systematic Identifications of Flavonoids*, Springer-Verlag, Berlin.
- Mabry, T.J. and Ulubelen, A., (1980), *Agric. and Food Chemistry*, 28, 188
- Mabry, T.J., Kagan, J. and Rösler, H., (1964), *Nuclear Magnetic Resonance Analysis of Flavonoids*, The University Texas Publication.
- Mabry, T.J., Kagan, J. and Rösler, H., (1965), *ibid.*, 4, 177.
- Mahmoud, Z.F., Kasem, F.F., Abdel, S. and Nabil, A., (1986), *Journal Phar. Sci.*, 27, 283-9.
- Markham, K.R. and Mabry, T.J., (1968), *Phytochemistry*, 7, 791.
- Mears, J.A. and Mabry, T.J., (1972), *Phytochemistry*, 11, 411.
- Negrete, R.E., Backhouse, N., Bravo, B., Erazo, S., Garcia, R. and Avendano, S., (1987), *Plant. Med. Phyther.*, 21, 168.
- Negrete, R.E., Latorne, I., Backhouse, N., Pena, R. and Delporte, C., (1988), *Plant. Med. Phytother.*, 22, 1.
- Öksüz, S., Ayyıldız, H. and Johansson, C. (1984), *Journal of Natural Products*, 47, 902.
- Öksüz, S., Halfon, B. and Terem, B., (1988), *Planta Med.*, 54, 89.
- Öksüz, S. and Pütün, E., (1987), *Doğa*, 11, 66.
- Picher, M.T., Seoane, E. and Tortajada, A., (1984), *Phytochemistry*, 23, 1995.
- Pütün, E., (1983), *Doktoro tezi*, İstanbul.
- Pütün, A.E., (1987), *Doktoro tezi*, Eskişehir.
- Rendle, A.B., (1976), *The Classification of Flowering Plants*, Cambridge University Press., Vol-II.
- Rodriguez, E., Carmen, N.J. and Mabry, T.J., (1972), *Phytochemistry*, 11, 409
- Rösler, K.H., Wong, D.P.C. and Mabry, T.J., (1985), *Journal of Natural Products*, 48, 5.
- Rösler, H. and Mabry, T.J., (1971), *Phytochemistry*, 10, 450.
- Rybalko, K.S., Pakalne, D. and Evstratova, R.I., (1975-a, 1975-b), *Rastit Resur*, 11, 131 ; 82, 28591-k.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor).

- Sakakibara, M. and Mabry, T.J., (1977, 1978), *Rev. Latinoamer. Quim.*, 8, 99 ; 88, 117746.
- Thomas, M.B. and Mabry, T.J., (1968), *Tetrahedron*, 24, 3675.
- Ulubelen, A., Kerr, M.K. and Mabry, T.J., (1980), *ibid.*, 19, 1761.
- Ulubelen, A. and Öksüz, S., (1982), *Journal of Natural Products*, 45, 373
- Wagner, H. and Seligman, O., (1973), *Tetrahedron*, 29, 3029.
- Wagner, M., Iyengar, M., Challes, E. and Herz, W., (1971), *Phytochemistry*, 10, 2547.
- Wagner, Et. all., (1973), *Chem. Ber.*, 106, 23.
- Zapesochava, G.G., Evstratova, R.I. and Mukhametzhanov, M.N., (1977-a, 1977-b), *Khim. Prir. Soedin*, 5, 706. ; 87, 164248-j.

