

ACROPTILON REPENS (L.) DC.
BITKISININ FLAVONOID BİLEŞİKLERİ

NURGUL UZBAY

YUKSEK LISANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

1991

ACROPTILON REPENS (L.) DC.
BITKISININ FLAVONOID BİLEŐIKLERİ

NURGUL ÜZBAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

1991

ACROPTILON REPENS (L.) DC.
BITKISININ FLAVONOID BİLEŐIKLERİ

NURGUL ÜZBAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

1991

ACROPTILON REPENS (L.) DC. BITKISININ

FLAVONOİD BİLEŐIKLERİ

Nurgul ÖZBAY

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

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Ayşe Eren PUTUN

Şubat-1991

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü

Nurgül ÜZBAY'ın YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırladığı, "Acroptilon repens (L.) DC. bitkisinin flavonoid bileşikleri" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

..4/03/1991

Uye : Y. Doç. Dr. Ayşe Eren PÜTÜN

Uye : Prof. Dr. Cahit ÖĞRETİR

Uye : Y. Doç. Dr. Özgen Bereket

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun **13 MART 1991**

gün ve **270-5** sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Rüstem KAYA

Enstitü Müdürü

ÖZET

Bu çalışmada Temmuz 1989'da Eskişehir Arçelik fabrikası yakınından toplanan *Acroptilon repens* bitkisinin flavonoid bileşikleri incelenmiştir.

Bitkinin kurutulmuş ve toz edilen toprak üstü kısımları bir sükslet apareyinde sırasıyla petrol eteri, kloroform ve etil alkol ile tüketilmiş ve elde edilen özütler vakumda yoğunlaştırılmıştır. Çeşitli çözücü sistemlerinde yapılan ince tabaka kromatografisinde etil alkol ve kloroform özütünün, aynı flavonoid bileşikleri içerdiği saptanmıştır. Bu nedenle sadece etil alkol özütü poliamid sütuna yerleştirildikten sonra yıkama işlemine kloroform ile başlanmış ve artan oranlarda etil alkol ilavesi ile yıkamaya devam edilmiştir. Bu sütundan elde edilen karışık fraksiyonlar selüloz veya poliamid sütundan geçirilerek temizlenmiş, elde edilen tek maddeler sefadeks LH-20 sütunlarında metanol ile yıkanarak saflaştırılmıştır.

Elde edilen bileşiklerin yapılarının isoramnetin, isoramnetin 7-O-glikozit ve apigenin 7-O-glikozit olduğu renk reaksiyonları ve spektroskopik yöntemler ile (UV, ¹H-N.M.R.) belirlenmiş, yapısı standart maddeler ile kıyaslanarak doğrulanmıştır.

SUMMARY

In this work, *Acroptilon repens* was investigated for its flavonoidal compounds.

Acroptilon repens was collected from Eskişehir Industrial district in June 1989.

Air dried and powdered above ground parts of the plant was extracted in soxhlet apparatus with petroleum ether, chloroform and ethyl alcohol respectively. Ethanolic extract showed the presence of flavonoid compounds in thin layer chromatography with various solvent systems. The ethanol extract packed on top of a polyclar column elution started with chloroform and the polarity of the solvent was increased by gradual addition of ethanol.

The further separations of the fractions obtained by polyclar column were done by using either a polyclar or a cellulose column and the final purification was made by sephadex LH-20

The structures of the flavonoid compounds were determined as isorhamnetin, isorhamnetin 7-O-glycoside and apigenin 7-O-glycoside .

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

TEŞEKKUR

Tez çalışmalarım süresince yakın ilgi ve desteğini hiç bir zaman esirgemeyen, olumlu tenkit ve uyarılarıyla çalışmalarına yön veren danışmanım Sayın Hocam Yrd. Doç. Dr. Ayşe Eren PUTUN 'e ; önerilerinden dolayı Hocam Doç. Dr. Ergan PUTUN'e; çalışmalarım sırasında bana her türlü kolaylığı sağlayan Bölüm Başkanımız Sayın Prof.Dr. Cemil ÜGRETİR 'e, bitkinin teşhisini yapan Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Uyesi Sayın Doç.Dr. Hulusi MALYER'e ve deneysel çalışmalarım sırasında yardımını esirgemeyen Kimya Bölümü Araştırma Görevlisi Sayın Adnan ÜZCAN'a sonsuz teşekkürlerim sunarım.

Nurgül ÜZBAY

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
SUMMARY	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SIMGELER VE KISALTMALAR	xi
GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI	1
1. BITKİNİN TANIMI VE YAYILIŞI	2
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Dağılımlar	4
2.2. Oluşumları	5
2.3. Elde Edilmeleri Ve Saflaştırma Yöntemleri	8
2.3.1. Bitkiden tüketme	8
2.3.2. Kromatografik yöntemler.....	8
2.3.2.1. Sutun kromatografisi	8
2.3.2.2. İnce tabaka ve kağıt kromatografisi	9
2.4. Tanınmaları	12
2.4.1. Renk reaksiyonları	12
2.4.2. Spektral yöntemler	12
2.4.2.1. UV spektroskopisi	13
2.4.2.1.1. Metanol spektrumu	15
2.4.2.1.2. Sodyum metoksit spektrumu	15
2.4.2.1.3. Alüminyum klorür, Alüminyum klorür/hidroklorik asit spektrumu.....	15
2.4.2.1.4. Sodyum asetat spektrumu	16
2.4.2.1.5. Sodyum asetat/Borik asit spektrumu	16
RESİM DİZİNİ	17

3. DENEYSEL BÖLÜM	20
3.1. Acroptilon repens'den elde edilen flavonoidler ..	21
S ₁ bileşiği	21
S ₂ bileşiği	24
S ₃ bileşiği	26
3.2. Uygulanan teknikler	29
3.2.1. Kromatografi	29
3.2.1.1. Sütun kromatografisi	29
3.2.1.2. İnce tabaka kromatografisi	30
3.2.2. Spektroskopi	30
3.2.2.1. UV spektroskopisi	30
3.2.2.2. ¹ H-N.M.R. spektroskopisi	30
3.2.3. Belirteçler	31
3.2.4. Kimyasal reaksiyonlar	32
3.2.4.1. Asit hidrolizi	32
3.2.4.2. TMS türevlerinin hazırlanması	32
3.3. Yapılan işlemler	32
3.3.1. Flavonoid bileşiklerin tüketilmesi	33
3.3.2. Flavonoid bileşiklerin elde edilmesi ...	33
4. SONUÇ VE ÖNERİLER	36
KAYNAKLAR DİZİNİ	37

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. 2-fenil benzopiron

Şekil 2.2. Flavonoid bileşiklerin iskelet yapıları

Şekil 2.3. Flavonoidlerin oluşumu

Şekil 3.1. S_1 bileşiğin UV spektrumu

Şekil 3.2. S_1 bileşiğin NMR. spektrumu

Şekil 3.3. S_2' bileşiğin UV spektrumu

Şekil 3.4. S_3 bileşiğin UV spektrumu

ÇİZELGELER DİZİNİ

- Çizelge 2.1. Flavonoidlerin ayrılmasında kullanılan çözücü sistemleri
- Çizelge 2.2. , Flavonoid bileşiklerin renk reaksiyonları
- Çizelge 3.1. Acroptilon repens bitkisinden elde edilen flavonoidlerin miktarları ve R_f değerleri.

SIMGELER VE KISALTMALAR

ITK	: Ince Tabaka Kromatografisi.
UV	: Ultraviyole (mor ötesi).
N.M.R.	: Nükleer Manyetik Rezonans.
s (singlet)	: Tek pik.
d (doublet)	: 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).

GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI

Doğada çok yaygın olarak bulunan Compositae familyası özellikle flavonoid ve seskiterpen lakton bakımından zengindir.

Compositae familyasındaki pek çok türün değişik biyolojik aktivite gösterdiği, idrar söktürücü olarak kullanıldığı bilinmektedir. Ayrıca kumaş boyası olarak ekonomik değere sahip olmasına karşılık bu alanda fazla çalışma yapılmamıştır (Heywood, p.411,1977; Baytop s. 84, 1980).

Son yıllardaki teknolojik gelişme ile birlikte bu familya önem kazanmış ve familyadaki bileşiklerin yapılarını aydınlatmak araştırmacıların dikkatini çeken bir konu olmuştur.

Bu çalışmada, Compositae familyası ile yapılan çalışmalarımızın bir devamı olarak *Acroptilon repens* (L.) DC. bitkisinin flavonoidleri incelenmiştir.

1. BITKİNİN TANIMI VE YAYILIŞI

Compositae familyası bitkileri yıllık, iki yıllık veya çok yıllık, çoğunlukla otsu, nadiren çalimsı veya ağaçsıdırlar. Çiçeklerinin kapitulum durumunda birarada toplanmış olması en belirgin özellikleridir.

Dünya üzerinde çok yaygın olan bu familya, kaynaklarda değişik sayıda rapor edilmesine rağmen (Rendle, 1976; Hickey, 1981; Heywood, 1979) 800-1100 kadar cins ve 14000-25000 kadar tür içermektedir. Ülkemizde 129 cins ve 1120 kadar türü vardır (Davis, 1975).

Acroptilon repens (L.) DC., Prodr. 6:663 (1838)

Sinonimleri : *Centaurea repens* L. , Sp. Pl.ed. 2: 1293 (1763); *C. picris* Pallas ex Willd., Sp.Pl. 3 : 2302 (1803); *Serratula picris* (Willd.) Bieb., Fl. Taur.-Cauc. 3 : 546 (1819); *Acroptilon picris* (Willd.) DC., op.cit.662 . Ic : Jaub. and Spach, Ill. Pl.Or.1 : t. 10, 11 (1842); Not.Syst. (Leningrad) 7 (3) : f. 4A (1937); both as *A. picris*.

Çok yıllık 16-40 cm boyunda, gövdeleri dik, tabandan dallanmış; yapraklar basit, çok kısa saplı, eliptik -lineer, genellikle alt ve orta kısım serrat, üstte bütün 7x2 cm'ye kadardır. Involukrum 1.5 x 1 cm ye kadar dış yaprakçıklar kısa ve geniş, oblong, içtekiler daha uzun ve dar oblong'dur. Çiçekler pembeden mora kadar (nadiren beyaz) dir. Çıkıntılar (apendaj) enli ay şeklindedir.

Akenler 3-4x2 mm; papus hemen hemen 8-10 mm boyutlarındadır.

Çiçek açma zamanı : Mayıs-Ekim

Yetiştirme ortamı : Çakıllı nehir kenarları, tuz göllerinin kıyıları, stepler ve çöplük alanlar, 800-1600 m yüksekliklerde.

Türkiye'deki Yayılışı : Ankara, Kastamonu, Kars, Kutahya, Eskişehir, Nevşehir, Erzincan, Erzurum, Van, Ağrı, Aydın, Isparta, Antalya, Konya.

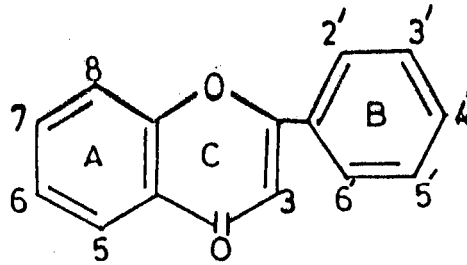
Dünya'daki yayılışı : Güney Rusya, Kırım, Kafkasya, Kuzey Irak, İran, Afganistan, Moğolistan, Hazar Denizi çevresi

2. GENEL BİLGİLER

FLAVONOID BİLEŞİKLERİ

2.1. Dağılımları

Çoğunlukla sarı renkli olan bileşiklere öncelikle genel olarak flavonoid adı verilmiştir. Bu terim köken olarak latince sarı anlamına gelen flavus sözcüğünden türetilmiştir. Bu maddeler kimyasal bakımından 2-fenil benzo piron yapısı gösterirler (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. 2 -fenil benzopiron

Sonradan bu yada benzer yapıya sahip olan bileşikler ister doğal olarak ister sentezle elde edilmiş olsun, renklerine bakılmaksızın flavonoid adı altında toplanmışlardır.

Ancak zaman süresi içinde flavonoid bileşiklerin sayıca çok artması, iskeletlerindeki farklılıklara göre kendi içinde sınıflandırılma zorunluluğu yaratmıştır. Bu bileşiklerin iskelet yapıları (Şekil 2.2.) verilmiştir.

Flavonoidler, doğada aglikonları ya da glikozitleri

halinde, bitkilerin kök, sap, çiçek, polen, meyva ve tohumlarında bulunurlar (Geissman, 1969).

Glikozitleşme ya eter bağı ile (O-glikozitler) ya da karbon bağları arasında (C-glikozitler) olur.

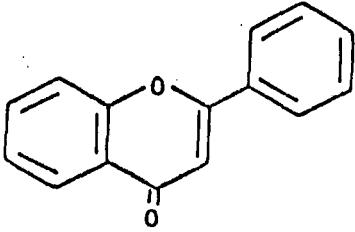
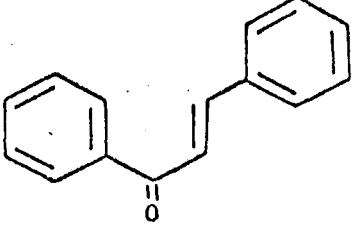
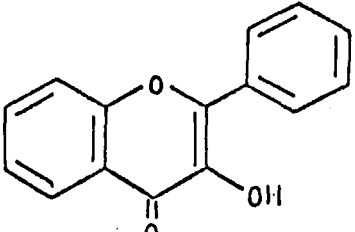
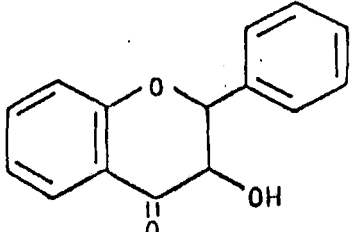
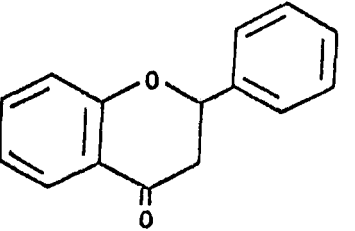
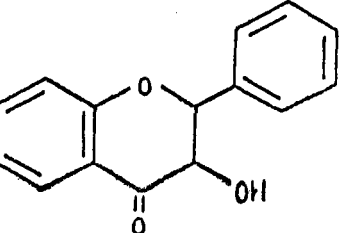
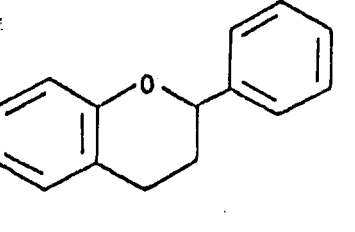
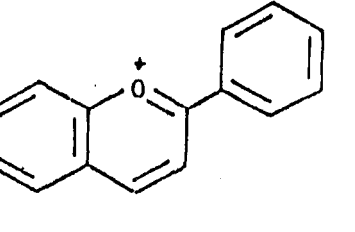
2.2. Oluşumları

Flavonoidler bitkilerin ikincil metabolitlerinden- dir. Bitkilerin fotosentez ile oluşturdukları ve hayatsal gereksinimleri için kullandıkları karbonhidratlar, aminoasitler, v.b gibi birincil metabolitlerinden türeler (Geissman, 1969).

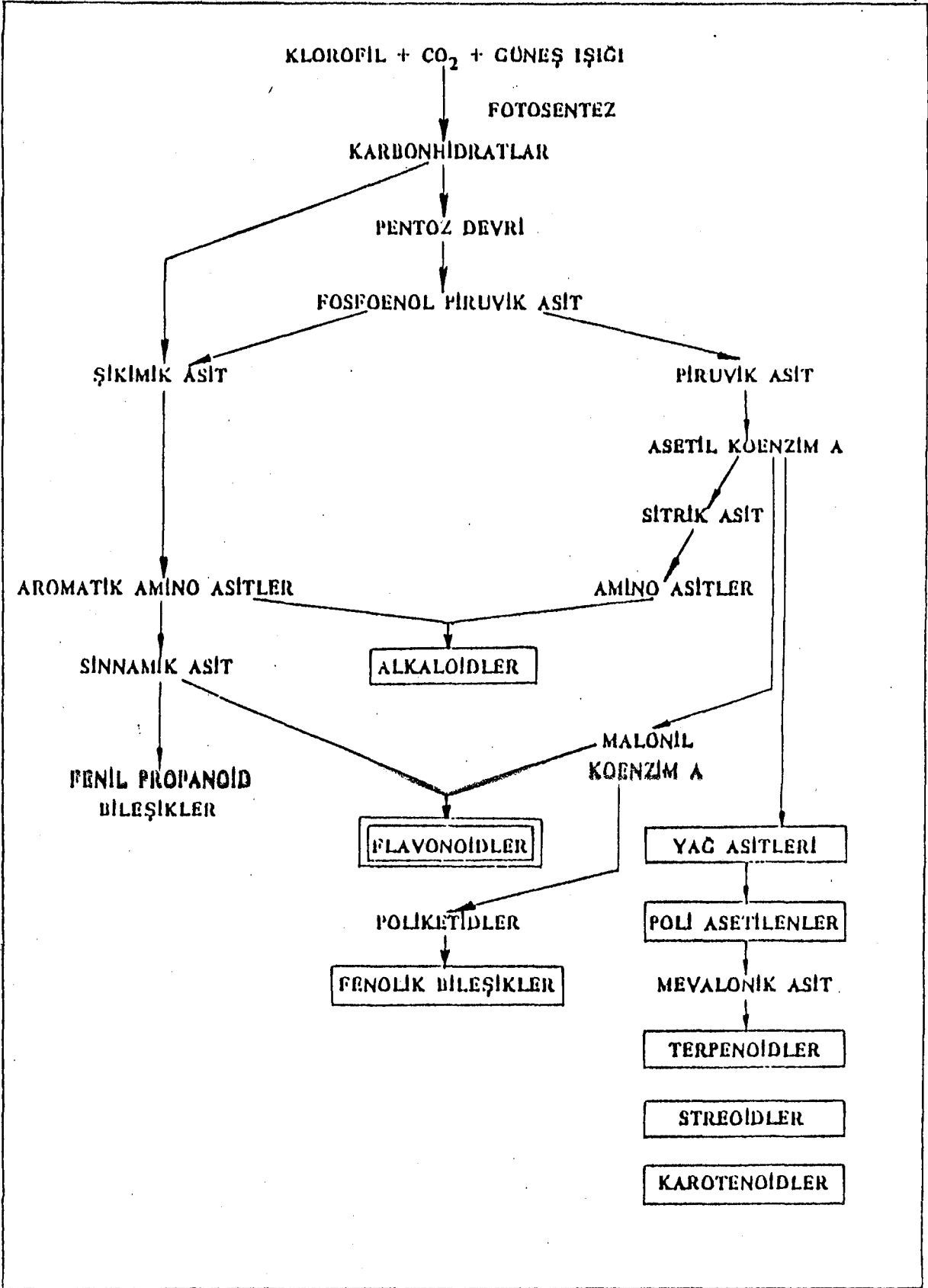
Flavonoidlerin oluşumu, diğer doğal kaynaklı bileşikler- le birlikte (Şekil 2.3) de genel olarak gösterilmiştir (George, 1978).

Flavonoidlerin karbon iskeletlerinin iki ayrı birimden meydana geldiği düşünülebilir. Bunlar B ve C halkalarını oluşturan C_6-C_3 birimi ile A halkasını oluşturan C_6 birimi- dir (Şekil 2.1).

Biyosentez araştırmalarında elde edilen bilgilere göre flavonoidlerin A halkasının asetil koenzim-A moleküllerinden veya 3 molekül malonil koenzim-A dan, B ve C halkalarının ise şikimik asit üzerinden oluşan sinnamik asit gibi fenil propanoid bileşiklerinden meydana geldiği saptanmıştır. A halkasını oluşturan asetat uniteleri ile B ve C halkalarını meydana getiren fenil propanoid bileşiklerinin kondenzasyo- nu sonucu 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. Bazı flavonoid bileşiklerin iskelet yapıları.



2.3. Elde Edilmeleri Ve Saflaştırma Yöntemleri

2.3.1. Bitkiden tüketme

İncelenecek bitkisel materyal, önce kurutulup toz edilir. Bitkinin kurutulmasındaki amaç tüketmenin veriminin arttırılmasıdır. Bu da iki şekilde gerçekleştirilir. Birinci de bitkisel materyal % 96 etanol ile tüketilir. Vakumda kısmen yoğunlaştırıldıktan sonra sırasıyla petrol eteri, kloroform, etil asetat gibi çözücülerle tekrar tüketilir.

İkincide ise materyal sırası ile petrol eteri, kloroform, etanol ile maserasyon veya sokslet apareyinde tüketilerek yapılır. Her iki şekilde de flavonoid yapısındaki bileşikler polaritelerine göre kabaca ayrılmış olurlar.

Materyaldeki sterol, karotenoit, lipit, 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 flavonoidlerin aglikonları, izoflavonlar, flavononlar, dehidroflavonlar, 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

Flavonoid bileşiklerin incelenmesinde; az miktarda madde ile çalışılmasına, karışımların tek tek ayrılmasına, saflaştırılmasına ve tanınmasına olanak verdiği için kromatografik yöntemlerden yararlanılır.

2.3.2.1. Sütun kromatografisi

Flavonoidlerin, bitki özütlerinden ayrılmasın-

Flavonoidlerin sütun kromatografisi ile ayrılmasında çeşitli adsorbanlar kullanılmış ancak bunlar arasında en uygun adsorbanın poliamid, selüloz ve sefadeks olduğu gözlenmiştir (Grassman, 1957).

Selüloz (Mikrokristal), tüm flavonoid aglikon ve glikozitlerinin ayrılmasında kullanılır. Yıkama için su-alkol, su-asit, su-aseton karışımından yararlanır. Selüloz sütun kromatografisinde hem adsorbsiyon hem de partisyon mekanizmasına göre ayırım sağlar.

Poliamid (polivinil poliprolidon), yapısında bulunan amid gruplarının içerdiği karbonil fonksiyonlarından dolayı fenolik hidroksi grupları ile hidrojen bağı yaparak ayırım sağlayan bir adsorbandır. Bu nedenle flavonoid bileşikler için yüksek ayırım gücüne sahip olduğundan sütun kromatografisinde en çok kullanılan adsorbandır (Markham, 1968).

Sefadeks LH-20, hidroksi propillenmiş dekstran yapısındadır. Molekül büyüklüğüne göre ayırım sağlar. Flavonoid bileşiklerin ayrılmasında ve temizlenmesinde kullanılır. Özellikle organik çözücülerle çalışma olanağı sağladığından kullanımı kolay ve yaygındır (Johnston, 1968). Sadece metanol kullanılarak birçok flavonoidin ayrımı sağlanabilir.

2.3.2.2. İnce tabaka ve kağıt kromatografisi

İnce tabaka kromatografisi, flavonoidlerin kalitatif tayinleri ve tanımlarında kullanılır. Silikajel, poliamid ve selüloz en çok kullanılan adsorbanlardır. Flavonoidlerin tipine göre değişik çözücü sistemleri kullanılır. Çizelge 1'de bu çözücü sistemlerine ait örnekler görülmektedir.

Kağıt kromatografisi, sütun kromatografisinden daha kısa sürede sonuç verdiği ve az miktarda madde ile çalışma olanağı sağladığı için flavonoidlerin ayrılmasında ve tanınmasında kullanılan iyi bir yöntemdir. Bu amaçla Whatman No-1 veya 3 MM cins kağıtlar kullanılmaktadır. İyi bir ayırım için çift dimensiyonlu teknik tavsiye edilir.

Kromatogram üzerinde flavonoidlerin tespiti UV ışığında

inceleme, NH_3 buharına tutma veya reaktif puskürtme ile yapılır (Harborne, 1982, p.5-6).

Flavonoid	Çözücü sistemi
Flavonlar	$C_6H_6 : C_6H_5N : HCOOH (36:9:5)$ $EtOAc : C_6H_6 (45:55)$
Flavan-O-glikozitleri	$PrOH : EtOAc : H_2O (3:2:1)$ $MeOH : AcOH : H_2O (18:1:1)$
Flavonoller	$C_6H_6 : C_6H_5N : HCOOH (36:9:5)$ $CHCl_3 : Me_2CO : HCOOH (9:2:1)$
Flavonol-O-glikozitleri	$C_6H_6 : C_6H_5N : HCOOH (36:9:5)$ $EtOAc : MeOH : H_2O (100:16,5:13,5)$
Flavonlar	$C_6H_6 : MeCOEt : MeOH (90:5:5)$
Flavon-O-glikozitleri	$CHCl_3 : MeOH : Butan-2-ol (5:3:1)$ $MeOH : H_2O (1:1)$
Flavonol aglikon ve glikozitleri	$C_6H_6 : PE : MeCOEt : MeOH (60:26:7:7)$ $C_6H_6 : MeCOEt : MeOH (4:3:3)$
Flavon ve Flavonol aglikon ve glikozitleri	$n-BuOH : AcOH : H_2O (4:1:5 \text{ Ust faz})$ $AcOH : H_2O (85:15)$

Çizelge 2.1. Flavonoidlerin Ayrılmasında Kullanılan Çözücü Sistemleri

C_6H_6 : Benzen, C_6H_5N : Piridin, HCOOH formik asit ,
EtOAc : Etil asetat, PrOH : Propanol, MeOH : Metanol,
AcOH : Asetik asit , $CHCl_3$: Kloroform , Me_2CO : Aseton,
MeCOEt : Metil etil keton , PE : Petrol eteri,
n-BuOH : n-butanol

2.4. TANINMALARI

2.4.1. Renk reaksiyonları

Flavonoidlerin ince tabaka ve kağıt kromatografisindeki lekeleri önce 336 nm'de UV ışığı altında incelenir. Daha sonra bu lekelerin 336 nm UV ışığı altında amonyak buharına (Mabry, 1970, P. 13) ve NA (Naturstoff reagenz A : Difenil borik asit, β -amino etil ester) belirteci- ne karşı göstermiş olduğu renk değişiklikleri belirlenir (Mabry, 1980). Böylece yapılarına göre değişik renklerle floresans veren flavonoid bileşimin tipi ve substituentleri hakkında bilgi edinilmiş olur (Çizelge 2.2)(Mabry, 1980).

Flavonlar 5-hidroksil durumunda UV ışığında (336 nm) mor görünümlüdür. 5,4'-dihidroksil ise NH_3 buharı ve NA belirteci- ne karşı sarı, 5, 4', 3'-trihidroksil ise NH_3 buharı ile sarı, NA belirteci ile turuncu renk verirler.

Eğer bileşikte 5-deoksi durumu var ise veya bileşik 5-O glikozit ya da 5-O metoksil grupları taşıyorsa UV ışığında parlak mavi, parlak mavi, yeşil olarak gözükür.

Flavonoller eğer uç konumlarında serbest hidroksil taşıyorlarsa UV ışığında sarı renk verirler. Bu özelliği ile flavonlardan ayırt edilir. 3,4' di hidroksi flavonoller amonyak buharı ve NA belirteci ile sarı, 3,3',4' tri hidroksi flavonoller amonyak buharı ile sarı, NA belirteci ile turuncu renkte gözükürler.

Bunun yanısıra, Shinodo (Siyanidin reak. Mg talaşı/der. HCl) ve Asahina (sodyum amalgam/der, H_2SO_4) reaktifleri ile der. H_2SO_4 ve zirkonyum oksiklorür reaktifleri flavonoid teşhisi için çok kullanılır.

2.4.2. Spektral yöntemler.

Saf olarak elde edilen flavonoidin yapısı UV, NMR, kütle spektrometresi ile yapılan analizlerle aydınlatılır.

Eğer belirlenen bilinen bir bileşik ise UV, spektrumları ve

kromatogramdaki R_f değerleri ile standart maddenin R_f değerlerinin 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 aglikonun hemde şeker grubunun ayrı ayrı yapıları saptanır (Mabry, 1970, p.24).

Glikozitin, aglikonunun ve şekerinin tanınmasından sonra, glikozitin UV spektrumu ile aglikonun UV spektrumunun karşılaştırılması yapılarak şeker veya şekerlerin aglikona bağlanma yerleri saptanır.

Ayrıca glikozitin trimetil silil eter turevi halinde karbontetraklorür, dotoero dimetil sulfoksit de alınan ^1H -N.M.R. spektrumu ile şekerin, bağlı olduğu konumu, α veya β durumunu belirler (Wagner, 1978; Chori, 1977).

2.4.2.1. UV spektroskopisi

Çok az miktarda (0,1 mg) madde kullanılarak değişik reaktiflerle elde edilen spektrumlar, flavonoidin yapısı hakkında son derece yararlı bilgiler verir. Bu nedenle UV spektrumu bu tip bileşiklerin yapı analizlerinde kullanılan en önemli yöntemlerden biridir.

Bu amaçla flavonoidin önce metanol içinde spektrumu alınır. Sonra bu çözeltiye sırasıyla sodyum metoksit, alüminyum klorür, alüminyum klorür/hidroklorik asit, sodyum asetat, sodyum asetat/borik asit reaktifleri ayrı ayrı eklenerek spektrumları alınır. Bu spektrumlarda gözlenen kaymalar değerlendirilerek, flavonoidin yapısı hakkında bilgi edinilir.

Flavonoid bileşiklerin UV spektrumlarında iki büyük absorpsiyon bandı görülür. Bunlardan biri uzun dalga boyu, diğeri kısa dalga boyundadır. Uzun dalga boyunda olan bant-I adını alır ve flavonoidin B halkası için (Sinnamoil) için bilgi verir. Kısa dalga boyunda olanı ise bant-II adını alır ve A halkası için (Benzoil) ile ilgili bilgi verir (Geissman, 1962, P-107-155).

UV	UV/MH ₂	UV/NA	FLAVONOID 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	turunou	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	turunou	5,6-OH serbest, 3-OH yok ya da sübs. 3'4'-OH serbest.
sarı	sarı	sarı	3,5-OH serbest.
sarı	sarı	kırmızı-turunou	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.

Çizelge 2.2. Flavonoid bileşiklerin renk reaksiyonları

2.4.2.1.1. Metanol spektrumu

Flavonoid bileşiminin metanol spektrumu özellikle bant-I'in yeri, bileşimin iskeleti hakkında bilgi verir.

Flavonlarda bant-I 304-350 nm arasında flavonoller de ise 3-hidroksil grubu serbest ise 352-385 nm arasında, serbest değilse 328-357 nm arasında gözlenir (Harborne, 1982, p.241).

B halkasının 3' ve 4' konumlarında oksijen fonksiyonu 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 bazdır. Flavonoid molekülündeki tüm hidroksil gruplarını iyonize eder (Mabry, 1970, p.45). En büyük etki, 4'-hidroksil ve 7-hidroksil grupları üzerine olur. Bu reaktifin eklenmesi ile flavon ve flavonollerde bant-I, metanoldekine göre 40-65 nm'lik uzun dalga boyuna kayma meydana getirmişse ve pik yüksekliğinde artma varsa 4' konumunda serbest hidroksil grubu olduğu anlaşılır.

Serbest 3-hidroksil grubuna sahip flavonoidlerde, 4'-hidroksil grubu serbest olmasa bile 50-60 nm'lik 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).

2.4.2.1.3. Alüminyum klorür ve alüminyum klorür /hidroklorik asit spektrumu

Alüminyum klorür reaktifi, flavonoid molekülündeki 5-hidroksi-4-keto, 3-hidroksi-4-keto ve B halkasındaki orta-α-hidroksil grupları ile ayrı ayrı, kelat oluşturur.

Ortadihidroksil grupları ile oluşan kelat zayıf olduğu için seyreltik hidroklorik asit eklenmesiyle bozunur (Mabry, 1970, p.52). Ortadihidroksil grupları içeren flavonoidlerde, alüminyum klorür spektrumundaki bant-I hidroklorik asit eklenmesi ile 30-40 nm kısa dalga boyuna kayar.

Alüminyum klorür /hidroklorik asit spektrumundaki bant-I, 5-hidroksi flavon ve 3- substitue flavonollerde metanol spektrumuna oranla 35-55 nm uzun dalga boyuna kayar. Bu kayma 3,5 hidroksi flavonlarda 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 kayar (Mabry, 1970, p.54).

2.4.2.1.4. Sodyum asetat spektrumu

Sodyum asetat, sodyum metoksitten daha zayıf bir bazdır. Bu nedenle flavon ve flavonollerin daha fazla, asidik hidroksil gruplarını iyonize eder (Rössler, 1985).

Serbest 7-hidroksil grubu taşıyan flavon ve flavonollerde sodyum asetatın eklenmesiyle metanol spektrumunda bant-II'ye göre 5-20 nm uzun dalga boyuna kayar (Farkas, 1966).

Ayrıca 7-hidroksil grubu serbest olan 4'-hidroksi flavon 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 molekulundeki C-5 ve C-6 dışındaki tüm hidroksil grupları ile kelat yapar. B halkasında orta- dihidroksil durumu varsa flavon ve flavonollerde bant-I 12-30 nm uzun dalga boyuna kayma gösterir (Mabry, 1970, p.48).

2.4.2.2. ¹H - N.M.R spekturumu

Bu yöntem gerek aglikonların, gerekse glikozitlerin yapılarının aydınlatılmasında aromatik halka protonları, metil, metoksi, asetoksi gibi grupları, şeker protonlarını ve fenolik protonların sayılarını ve yerlerini belirlemede kullanılır. Analiz için karbontetraklorür, dötero kloroform, benzen, dötero benzen, piridin, ağır su gibi çözücüler kullanılabilir.

Dötero dimetil sülfoksit (d₆-DMSO) serbest hidroksil grubu içeren flavonoidlerin analizinde çok kullanılan bir çözücüdür. Fakat kaynama noktasının yüksek oluşu, bazı flavonoidlerin bu çözücü içersinde bozunabilmesi ve çözünen maddenin geri kazanılmasının güçlüğü ayrıca d₆-di metil sülfoksitin nem çekici olması gibi dezavantajları vardır. Bu nedenle flavonoidlerin karbontetraklorür içinde spektrumlarının alınması özellikle tercih edilen yoldur.

Bu şekilde dötero çözücü gereksinimi ortadan kalkar ve maddenin geri kazanılması kolaylaşır.

A halkası protonları

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

C-5,6,7 veya C-5,7,8 substitue flavonoidler de 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 halinde belirir (Mabry, 1964).

B halkası protonları

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

dubleti C-2' ve C-6' protonlarının dubletine göre daha yukarı alanda 6,65-7,1 ppm arasında iki dublet halinde bulunur (Mabry, 1970, p.256).

C-3' ve C-4'de oksijen fonksiyonlarına sahip flavonoidlerde C-5' protonu 6,7-7,1 ppm arasında bir dublet verir. Birbirleriyle 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 bağlanmasına göre O-glikozitleri veya C-glikozitleri diye sınıflandırılırlar.

O-glikozitlerinde şekerin C-1 protonu 4,8-6 ppm civarında dublet olarak, şekerin ait protonlar ise daha yüksek alanda 3-4 ppm arasında multipllet olarak gözlenir (Mabry, 1970, p.268).

Flavonoid glikozitlerinde ise C-1 protonunun kimyasal kayma değeri, şekerin bağlanış 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 glikozitlerinin C-1 protonu ise 5-5,1 ppm'de gözlenir.

C-glikozitlerinde şeker genellikle C-6 veya C-8'den bağlanır. C-5,7-dihidroksil mono C- glikozitlerde 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 olduğu anlaşılır (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-8 metoksil

grubu ve orta 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).

DENEYSEL BÖLÜM

3.1. Acroptilon Repens'den Elde Edilen Flavonoidler

S₁ bileşiminin tanınması

UV ışığında mor olan bileşik, NH₃ buharı ve NA belirteci ile sarı renk vermektedir.

Metanoldeki UV spektrumunda (Şekil 3.1) bant-I'in 334 nm de çıkması bileşimin flavon olduğunu göstermektedir.

Sodyum metoksit spektrumunda bant-I'in şiddetinin artması ve 54 nm uzun dalga boyuna kayması da 4'-hidroksil grubunun varlığını belirtmektedir. Ayrıca bu spektrumda bant-III-ün bulunmaması, 7 konumunun hidroksil grubu dışında bir substituent bulundurduğunu göstermektedir.

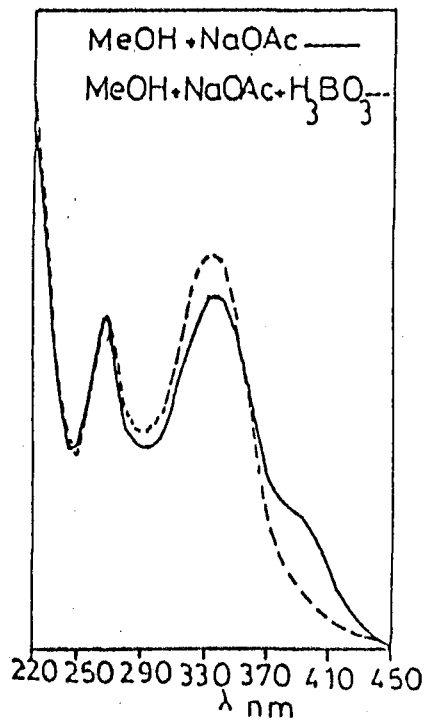
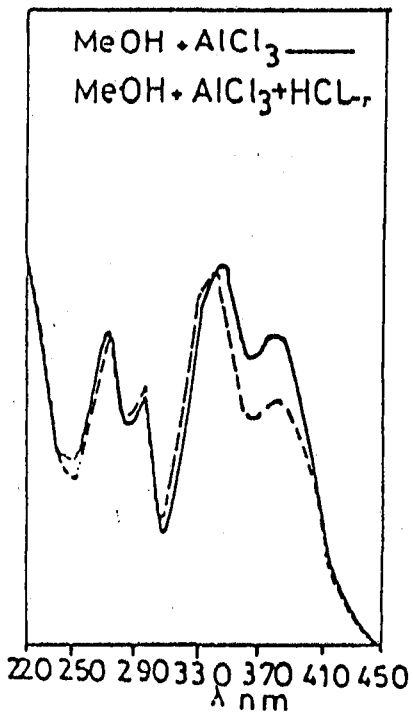
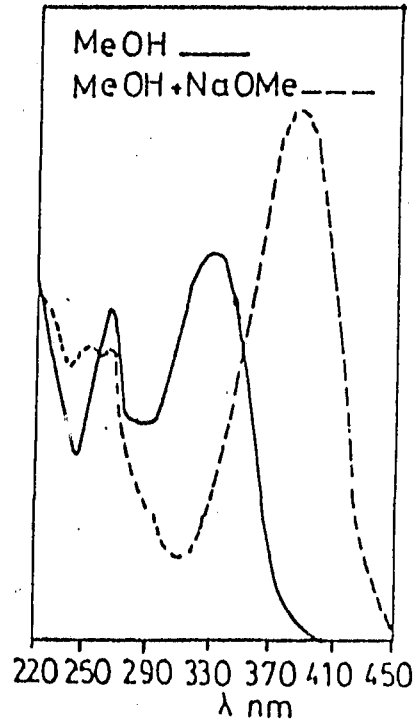
Sodyum asetat spektrumunda bant-II'nin kayma göstermemesi 7 konumunun dolu olduğunu doğrulamaktadır.

Aluminyum klorür ve aluminyum klorür/hidroklorik asit spektrumlarının aynı olması B halkasında orta-dihidroksil olmadığını belirtmektedir. Ayrıca aluminyum klorür/hidroklorik asit spektrumunda bant-I'in 49 nm uzun dalga boyuna kayması 5-hidroksil serbest, 6 konumunda substituent bulunmadığını gösterir.

Sodyum asetat borik asit spektrumunda bant-I'in uzun dalga boyuna doğru belirgin bir kayma göstermemesi orta-dihidroksil olmadığını doğrulamaktadır.

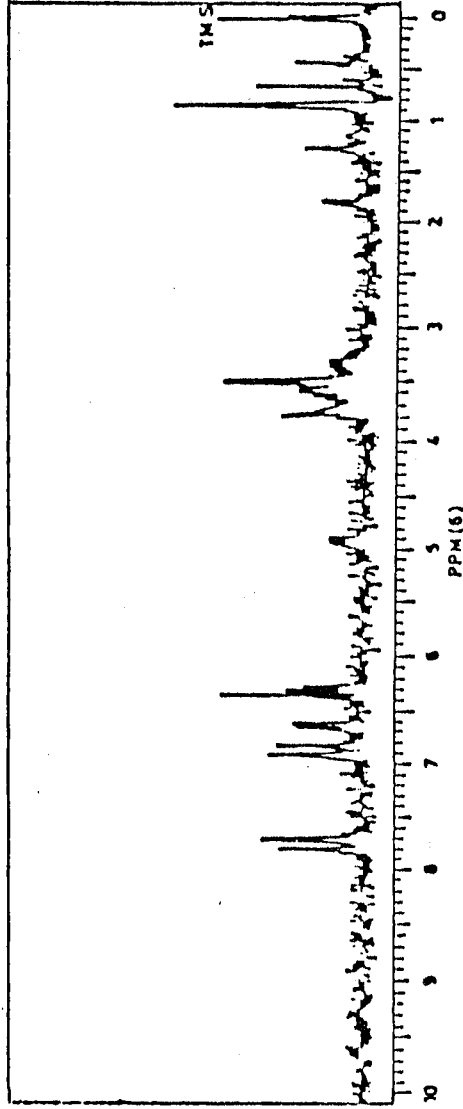
Asit hidrolizinden sonra bileşimin şeker molekülünün standart şeker örnekleriyle yapılan kıyaslamasında glikoz olduğu anlaşılmıştır.

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



Şekil 3.1. S₄ bileşiğinin UV spektrumu

δ ppm	Integration	Multiplicity	Assignment	Coupling Constant (J)
3,3-3,8	6H, m		glikozun protonları	
4,9	1H, d		glikozun H-1 protonu	J = 7 Hz
6,28	1H, d		H-8	J = 2 Hz
6,35	1H, s		H-3	
6,5	1H, d		H-6	J = 2 Hz
6,86	2H, d		H-5', H-5''	J = 9 Hz
7,4	2H, d		H-2', H-2''	J = 9 Hz



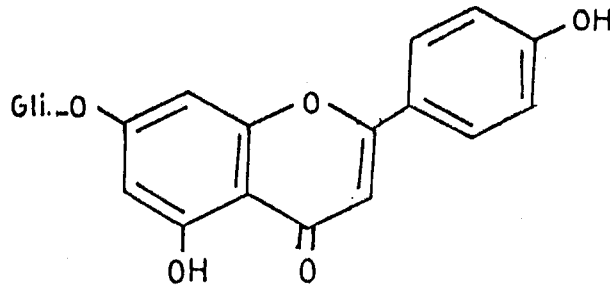
Şekil 3.2. S₁ bileşiğinin N.M.R. spektrumu

Bileşigin $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda (Şekil 3.2.) 3-4-3,8 ppm arasında bir multipletin gözlenmesi şeker bulunduğunu doğrulamaktadır. Şekerin C-1 protonu 5,1 ppm'de dublet olarak ortaya çıkarken $J=7$ Hz'lik yarılama aglikona β bağıyla bağlı olduğunu göstermektedir.

3',5' protonlarının 6,85 ppm'deki, 2' ve 6' protonlarının ise 7,75 ppm'deki dubletler belirtmektedir.

6,8 protonları 6,6 ppm ve 6,25 ppm'de dubletler halinde, 3 protonu ise 6,33 ppm'de singlet olarak gözlenmektedir.

Bileşigin UV ve N.M.R. spektrumları ile şahit bileşiklerle hidroliz öncesi ve sonrası yapılan kıyaslamaları sonucu apigenin 7-O glikozit olduğu saptanmıştır (Formül 1).



Formül 1

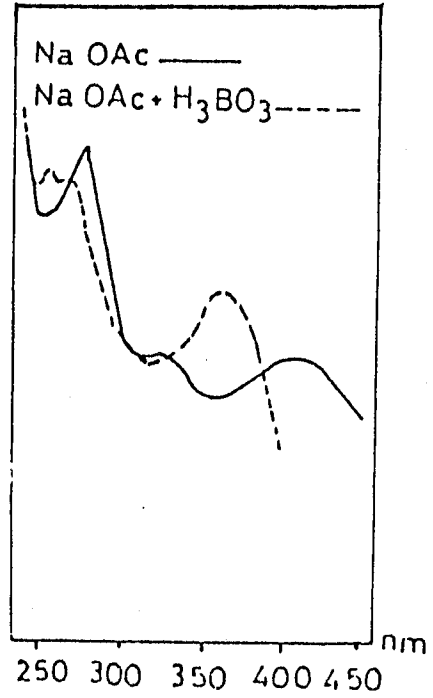
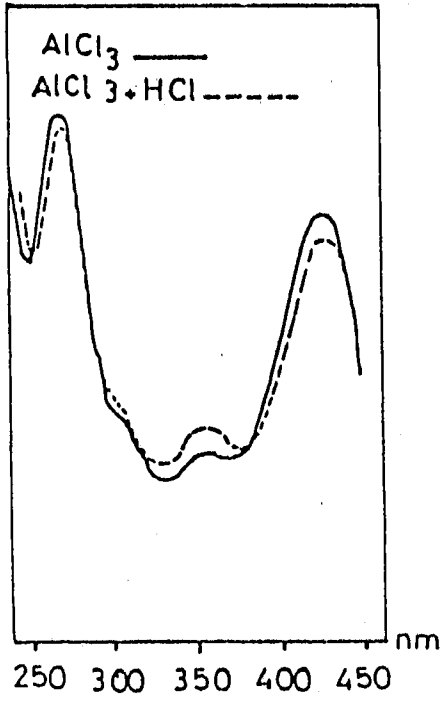
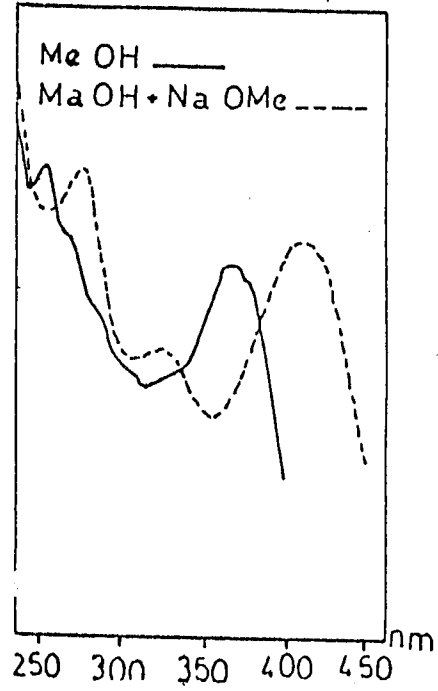
S₂ bileşiginin tanınması

UV ışığında sarı renkli olan bileşik, NH_3 buharına tutulduğunda ve NA belirteci puskurtulduğunda sarı renk vermektedir.

Metanol'deki UV spektrumunda (Şekil 3.3.) bant-I'in 370 nm'de çıkması bileşigin flavonol olduğunu belirtmekte, bant-II'deki omuz B halkasında iki oksijen fonksiyonu olabileceğini göstermektedir.

Sodyum metoksit belirteci ile alınan spektrumunda bant-I'in uzun dalga boyuna kayması ve şiddetinin artması 4'-hidroksil grubunun varlığını, 323 nm'de gözlenen bant-III ise 7-hidroksil grubunun bulunduğunu göstermektedir.

MeOH	: 370, 285, 270, 255 nm
NaOMe	: 410, 323, 275 nm
AlCl ₃	: 425, 360, 305, 267 nm
AlCl ₃ /HCl	: 425, 360, 305, 267 nm
NaOAc	: 421, 330, 275 nm
NaOAc/H ₃ BO ₃	: 370, 305, 270, 255 nm



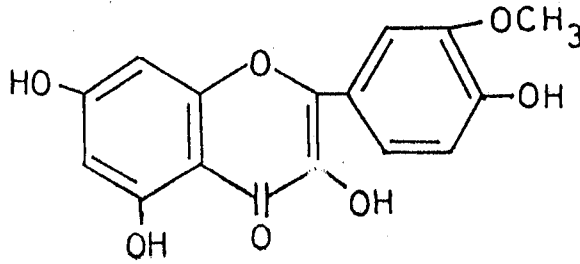
Şekil 3.3. S₂ bileşiminin UV spektrumu

Sodyum asetat ile alınan spektrumda bant-II'nin kayması 7-hidroksil grubunu doğrulamıştır.

Aluminyum klorür ve aluminyum klorür/ hidroklorik asit ile alınan spektrumların aynı olması, sodyum asetat/borik asit ile alınan spektrumda bant-I'de uzun dalga boyuna kayma olmaması B halkasında orta-dihidroksil grubu olmadığını belirtmiştir.

Spektroskopik bulgular ve kromatografik davranışları bileşiğinin bir kersetin türevi olabileceğini düşündürmüştür.

Asit hidrolizi ile bir değişikliğe uğramayan bileşiğin şahit maddelerle değişik çözücü sistemlerinde yapılan kıyaslamalarında isoramnetin olduğu anlaşılmıştır (Formül 2).



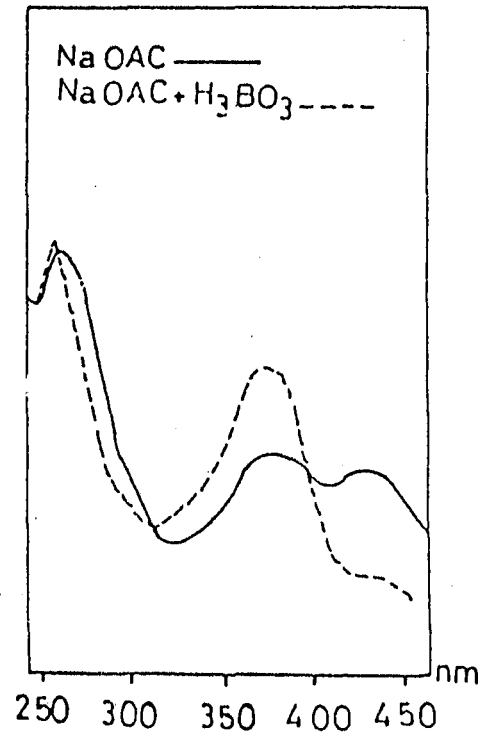
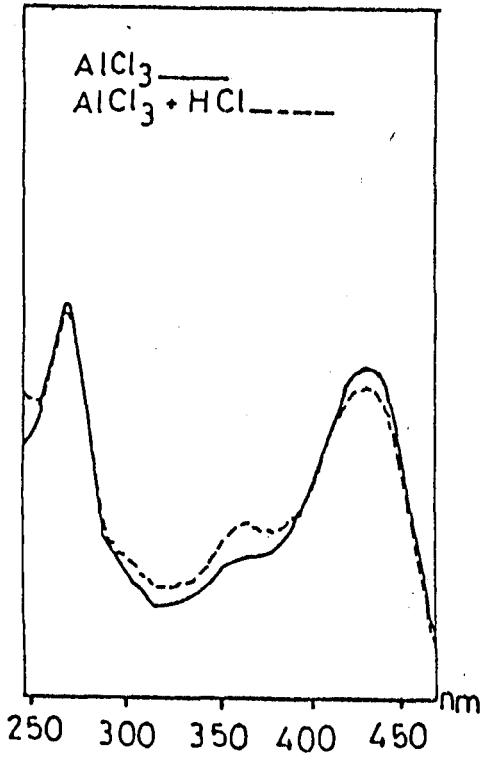
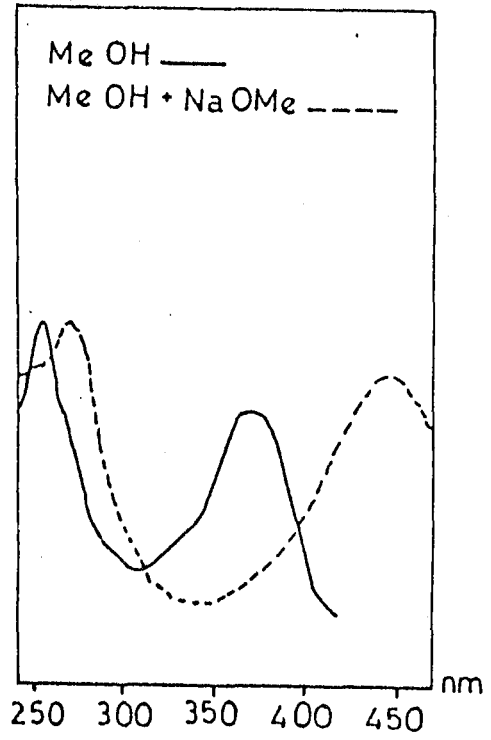
Formül 2

S₃ bileşiğinin tanınması

Sarı renkli amorf görünumlu bileşik UV ışığında, NH₃ buharına tutulduğunda ve NA belirteci puskurtulduğunda sarı renk vermektedir. Bu durum 3 ve 4' konumlarında serbest hidroksil grubu bulunduğunu düşündürmektedir.

Metanol'deki UV spektrumunda (Şekil 3.4.) bant-I'in 370 nm gözlenmesi bileşiğin flavonol olduğunu, bant-II'nin uzun dalga boyunda 269 nm'de omuz vermesi B halkasında orto-oksijen fonksiyonu olabileceğini göstermektedir.

MeOH	: 370, 269, 258 nm
NaOMe	: 455, 270 nm
AlCl ₃	: 435, 362, 265 nm
AlCl ₃ /HCl	: 430, 362, 265 nm
NaOAc	: 430, 378, 258 nm
NaOAc/H ₃ BO ₃	: 370, 255 nm



Şekil 3.4. S₉ bileşiminin UV spektrumu

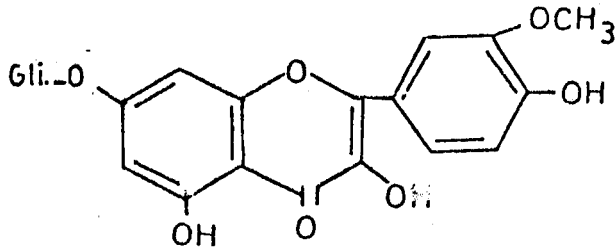
Sodyum metoksit belirteci ile alınan spektrumunda bant-I'in 75 nm uzun dalga boyuna kayması ve şiddetinin fazla olması B halkasında 4'-hidroksil grubunu bant-III'un görülmemesi 7-hidroksilin dolu olduğunu göstermektedir.

Ayrıca sodyum asetat belirteci ile alınan spektrumunda bant-II'de kayma olmaması 7-hidroksil'in dolu olduğunu kanıtlamaktadır.

Aluminyum klorür ve aluminyum klorür/hidroklorik asit ile alınan spektrumlarında bir değişiklik olmaması ve sodyum asetat/borik asit bant-I'inin metanol spektrumundaki bant-I'e göre kayma yapmaması bileşikte orta-dihidroksil grubunun olmadığını kanıtlamaktadır. Böylece B halkasındaki iki oksijen fonksiyonundan birinin dolu olduğu anlaşılmaktadır.

Bileşiğe uygulanan asit hidrolizi sonucu şeker molekülünün glikoz olduğu ince tabaka kromatografisi ile anlaşılmıştır. Aglikon kısmının alınan UV spektrumu ile 7 konumunda serbest hidroksil olduğu sodyum metoksit spektrumunda bant-III'un gözlenmesi ve sodyum asetat spektrumunda bant-II'de kayma olması ile belirlenmiştir. Bu veriler şekerin 7 konumundan bağlandığını 3' konumunda ise metoksi grubu olduğunu açıkça göstermektedir.

UV spektrumları ve kromatografik davranışlarına göre bileşiğin yapısı isoramentin 7-O-glikozit olarak aydınlatılmıştır. Bu yapı şahit madde ile çeşitli çözücü sistemlerinde kıyaslanarak doğrulanmıştır (Formül 3).



Formül 3.

3.2. Uygulanan Teknikler

3.2.1. Kromatografi

3.2.1.1. 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.

Poliamid sütun

Kloroform-etanol (2:1) çözücü sisteminde 24 saat şişirilen poliamid, 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.

3.2.1.2. 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 camağ plak kaplama cihazıyla 5x20 cm boyutlarındaki cam plakalara dökülerek 0,3 mm kalınlığında kaplanır ve oda sıcaklığında kurutulur.

3.2.2. Spektroskopisi

3.2.2.1. UV spektroskopisi

Spektrumlar Varian Techtron 635, Hitachi 150-20 aygıtlarında 1 cm'lik kuvars kuvetlerde alındı. Ölçmeler bileşiklerin metanoldeki çözeltilerinde yapıldı. Kayma spektrumlarının alınabilmesi için bileşiğin metanoldeki çözeltilisine sıra ile NaOMe, $AlCl_3$, $AlCl_3/HCl$, NaOAc ve NaOAc/ H_3BO_3 çözeltileri uygun miktarda eklendi.

3.2.2.2. 1H -N.M.R. spektroskopisi

1H -N.M.R. spektrumları

Jeol FT 90 MHz (Leeds School of Chemistry) aygıtıyla alındı.

Çözücü olarak $CDCl_3$ kullanıldı. İç standart olarak tetrametil silan (TMS 0.00 ppm) eklendi.

3.2.3. Belirteçler

NH₃ 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 ftalanhidrit ve 0,93 gr distillenmiş anilin, suyla doyurulmuş butanol ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

C₆H₅N : EtOAc : AcOH : H₂O (36 : 36 : 7 : 21) veya n-BUOH : AcOH : H₂O (4 : 1 : 5) gibi çözücü sistemlerinde yürütülen kromatografi plağı, belirteç puskurtulduktan sonra 100°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.

3.2.4. Kimyasal reaksiyonlar

3.2.4.1. Asit hidrolizi

Asit hidrolizi S_1 ve S_3 bileşiklerinin aglikon ve şeker kısımlarının saptanması için uygulandı.

Yaklaşık olarak 2 mg madde 5 ml etanolde çözülüp üzerine 10 ml 0,01 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 aglikonu, sulu fazda da şeker kısmı saptandı (Harborne, 1965).

3.2.4.2. Trimetil silyl eter (TMS) türevlerinin hazırlanması

Yaklaşık 10 mg bileşik 1 ml susuz piridinde çözülüp üzerine 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).

3.3. Yapılan işlemler

Acroptilon repens bitkisi 1989'da Eskişehir Arçelik fabrikası yakınlarından toplandı. Bitki Doç. Dr. Hulusi Malyer tarafından teşhis edildi.

3.3.1. Flavonoid bileşiklerin tüketilmesi

Çalışmada bitkilerin tüm kısımları (gövde, yaprak, çiçek) kullanıldı. Kurutulup toz haline getirilen bitkilerin 1200 gramı sokset apareyinde sırasıyla petrol eteri, kloroform ve etanol ile tüketilerek vakumda yoğunlaştırıldı.

Bu özütlerin her biri ince tabaka kromatografisi ile selüloz plakta, % 15 asetik asit, %40 asetik asit ve n-butanol : asetik asit : su (4 : 1 : 5) çözücü sistemleri kullanılarak incelendi.

Herbirinin UV ışığı, amonyak buharları ve NA belirtecine karşı verdiği renklerle flavonoidlerin varlığı kontrol edildi. Petrol eteri özütünün flavonoid bileşik taşımadığı buna karşılık kloroform ve etanol özütünün aynı tür flavonoid bileşik taşıdığı saptandı.

Bu nedenle de sadece etanol özütüyle çalışma yapıldı.

3.3.2. Flavonoid bileşiklerinin elde edilmesi

Egger kloroform-etanol (2:1) çözeltisi ile 24 saat bekletilerek şişirilen poliamid 3,5x55 cm boyutlarındaki sütuna yerleştirildi, üzerine az etil alkolde çözülmüş, 3,57 g etil alkol özütü bir pipet yardımıyla 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.

Böylece 61-70 ; 80-83, 84-99 fraksiyonları elde edildi. Bunlardan 61-70 ve 80-83 fraksiyonlarını kirlilikten kurtarmak ve saflaştırmak için 1,5x30 cm boyutlarında sefadeks LH-20 sütunları kullanıldı. Metanol ile yıkanan sütunlardan saf bileşikler elde edildi. Bu bileşikler sırası ile, S₁ ve

S_2 olarak adlandırıldı.

84-99 fraksiyonundan saf bileşikler elde etmek ve bileşikleri kirlilikten kurtarmak için önce 25x2 cm boyutlarında küçük bir poliamid sütun kullanıldı. Sütun egger çözeltisi ile yıkanmaya başlandı. Yavaş yavaş etanol eklenmesiyle polarite arttırıldı ve en son etanol ile yıkanarak işlem tamamlandı.

Toplanan fraksiyonlar ITK ile kontrol edildi, benzer olanlar birleştirilerek yoğunlaştırıldı. Bu fraksiyonları saflaştırmak için 1,5x30 cm boyutlarında seradeks LH-20 sütun kullanıldı. Metanol ile yıkanan sütundan S_3 bileşiği saf olarak elde edildi.

Yaklaşık 170 fraksiyonun toplandığı bu çalışmada diğer fraksiyonlardaki maddelerin miktarlarının çok az ve karışık olması, bunların izole edilip yapılarının aydınlatılmasına olanak sağlamamıştır.

Maddeler	Miktarları (mg)	Kullanılan Çözücü Sistemler		
		% 15 AcOH	%40 AcOH	BAW
S ₁	32	0.23	0.48	-
S ₂	55	0.02	0.16	-
S ₃	13	0.23	-	0.45

Çizelge 3.1. *Acroptilon repens*'den elde edilen flavonoid bileşiklerin R_f değerleri ve miktarları

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada *Acroptilon repens* bitkisi flavonoidleri bakımından incelenmiştir. Flavonoid bileşikleri tüketme tekniği ne göre bitkinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan özütün kromatografik ve spektroskopik çalışmaları sonucunda uç tane flavonoid bileşik elde edilmiştir.

Elde edilen bileşiklerin biri flavon glikoziti (apigenin 7-O-glikozit), biri flavonol (isoramnetin) biride flavonol glikoziti (isoramnetin 7-O-glikozit) dir.

Bileşiklerin şeker taşıyıp taşımadıklarını anlamak için asit hidroliz yapılmış O-glikozitler hidroliz olmuştur. İnce tabaka kromatografisinde anilin ftalat belirteci ile renk reaksiyonu vermişler ve ¹H-N.M.R. spektrumunda C-1 protonunun verdiği J = 7 Hz'lik yarıлма sonucu β-D-glikozit olduğu anlaşılmıştır.

Elde edilen bileşiklerden ikisi kersetin türevi, diğeri ise apigenin türevidir.

Bu bileşiklerin C-6 konumunda bir oksijen fonksiyonu içermedikleri AlCl₃/HCl spektrumundaki bant-I'in MeOH spektrumundaki bant-I'e göre 50-60 nm'lik kayma yapımaları ile saptanmıştır. Bu durum apigenin 7-O- glikozit için ¹H-N.M.R. spektrumu ile de desteklenmiştir.

Sonuç olarak yapılan çalışmada elde edilen flavonoid bileşiklerin apigenin ve kersetin türevleri olması, C-6 konumlarında bir oksijen fonksiyonunun bulunmaması ve iki tane O-glikozit elde edilmesi *Centaurea* türleri ile daha önce yapılan çalışmalarla paralellik sağlanmaktadır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Ahmed, Z.F., Rimpler, M. and Ismail, S.I., (1970),
phytochemistry, 9, 1955.

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,
1299.

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, Istanbul, 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, 271844-2.

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 Sawsan, 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

Ferreres, F. and Thomas, F., (1980-a, 1980-b), Afinided, 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, Permagon Press., Oxford.

Gonzales, C.I., Macias, F.A., Nassanet, G.M. and Rodriguez, L.F., (1985), Journal of Natural Product, 48,819.

Gonzales, A.G., Bermejo, J., Breton, J.L. and Triana t., (1971-a, 1971-b) An. Quim, 67,795;74,987-e

Grassman, W., Enders, H, Pouuhner, W., and Mathes, Hi Chem.Ber., 90, 1125 (1957).

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, 744 p.

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 Medi*, 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. Mec, 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. Phyother. 17.52;17, 57.

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, 164; 104, 183327-v

Mabry, T.J., Markbam, K.R. and Thamas, 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

Üksüz, S., Ayýıldız, H. and Johansson, C. (1984), *Journal of Natural Products*, 47, 902.

Üksüz, S., Halfon, B. and Terem, B., (1988), *Planta Med.*, 54, 89.

Üksüz, S. and Putun, E., (1987), *Doğa*, 11, 66.

Pioher, M.T., Secane, E. and Tortajada, A., (1984), *Phytochemistry*, 23, 1995.

Putun, E., (1983), *Doktora tezi Istanbul*.

Putun, A.E., (1987), *Doktora Tezi, Eskişehir*.

Rendle, A.B., *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; 62, 20591-k.

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 Eksuz, S., (1982), Journal of Natural Products, 45, 373

Wagner, H. and Seligman, O., (1973), Tetrahedron, 29, 3029.

Wagner, M., Iyenger, m., Challes, E. and Warz, W., (1971), phytochemistry, 10, 2547.

Wagner, Et. all., (1973), Chem. Ber., 106,23

Zapesochnova, G.G., Evstratova, R.I. and Mukhametzhanov, M.N., (1977-a, 1977-b), Khim. Prir. Soedin, 5,706. ; 37, 164248-j.