

99783

*SCOLYMUS HISPANICUS* 'UN  
LİTOLİTİK ÖZELLİKLERİ YÖNÜNDEN İNCELENMESİ

Zeynep TOPRAKLI

Anadolu Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği Uyarınca  
Farmakognozi Anabilim Dalında  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Y.Doç.Dr.Neş'e KIRIMER

Anadolu Üniversitesi  
Ehliyet

Ağustos-1992

Zeynep TOPRAKLI 'nın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Scolymus hispanicus'un Litolitik Özellikleri Yönünden İncelenmesi" başlıklı bu çalışma jürimizce Lisansüstü Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

24 / 8. / 1992

Üye: Prof Dr. K. Hüsnü Can BASER (imza)

Üye: Yrd Doç Dr. Neşe KIRIMER (imza)

Üye: Yrd Doç Dr. Mustafa ÖÖTNEREN (imza)

---

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun  
25.8.1992...gün ve 192/486.. sayılı kararıyla onaylanmıştır.

(imza)  
Enstitü Müdürü

Prof Dr. Nurettin BASARAN

**ASLI GİBİDİR**  
**25 AGUSTOS 1992**



## ÖZET

1934 yılından beri üretilen bir bitkisel ilaç olan Lityazol Cemil böbrek taşlarını düşürücü olarak kullanılmaktadır. Bu ilacın ham maddesi *Scolymus hispanicus* adlı bitkinin kök kabuklarıdır.

Bu çalışmanın konusunu *Scolymus hispanicus*'un litolitik etki gösteren maddelerinin ekstraksiyonu ve izolasyonu oluşturmaktadır. *Scolymus hispanicus* kök kabuklarına uygulanan farmakognozik taramada triterpenik maddeler taşıdığı tespit edilmiştir. Bu maddelerin ekstraksiyonu için uygun ve verimli yöntem araştırılmıştır. % 70'lik etanol ile kaynatmalı ekstraksiyonun uygun olduğu belirlenerek ham ekstre bu yolla hazırlanmıştır. Bu ekstrenin fraksiyonlanmasında biyolojik aktivite kontrolleri esas alınmıştır. İzole sıçan ileumu üzerinde gevşetici etki gösteren fraksiyondan kromatografik metodlarla etken maddeler izole edilmiştir. Bu maddelerden biri üzerinde UV, IR, <sup>1</sup>H-NMR ve Kütle spektrumları alınarak yapı tayini gerçekleştirilmiş ve  $\alpha$ -amirin asetat olduğu tespit edilmiş, izole sıçan ileumunda gevşetici etkisi gözlenmiştir.

Etanollü ekstre ve Lityazol Cemil'deki  $\alpha$ -amirin asetat miktarını belirlemek için İTK Densitometrik yöntem kullanılmıştır. İzole edilen  $\alpha$ -amirin asetat'ın standart olarak kullanıldığı bu çalışma sonunda ham ekstrede % 0.15, Lityazol Cemil'de % 0.01 oranında bulunduğu belirlenmiştir.

Ayrıca Lityazol Cemil'in alkol miktarı % 39.7, alkol derecesi 50° ve LD50 değeri 10 ml/kg (ip) olarak saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Scolymus hispanicus* ,  $\alpha$ -amirin asetat, Alkol Miktar Tayini, İTK-Dansitometre, UV,IR, <sup>1</sup>H NMR, Kütle Spektroskopisi.

## SUMMARY

Lityazol Cemil, a herbal pharmaceutical, has been produced and used in Turkey since 1934 to pass kidney stones. It is an alcoholic extract of the root bark of *Scolymus hispanicus*.

The present study concerns the extraction and isolation of litholytic substances from *Scolymus hispanicus*. Since the plant is known to contain triterpenic compounds, best yielding and suitable methods have been investigated for their extraction. Boiling with 70 % ethanol was found to be the best method of extraction, therefore crude extract was prepared this way. Bioassay guided fractionation was applied to detect the active substances. Bioactive compounds were isolated by chromatographic techniques from the fraction which exhibited relaxation on isolated rat ileum. One of these compounds was proved to be  $\alpha$ -amyrin acetate after UV, IR,  $^1\text{H}$  NMR and Mass Spectrometric analysis. This compound also exhibited relaxant effect on isolated rat ileum.

A TLC-densitometric method was developed for the assay of  $\alpha$ -amyrin acetate in Lityazol Cemil and the ethanolic extract. The  $\alpha$ -amyrin acetate isolated was used as standard and its content in the pharmaceutical and the extract were found as 0.15 % and 0.01 %, respectively.

Alcohol content, alcohol degree and LD<sub>50</sub> of Lityazol Cemil were determined as 39.7 %, 50° and 10 ml/kg (i.p.), respectively.

Key words: *Scolymus hispanicus* ,  $\alpha$ -amyrin acetate, Alcohol Determination, TLC-Densitometry, UV,IR,  $^1\text{H}$  NMR, Mass Spectrometry.

## TEŞEKKÜR

Çalışmalarım için gereken her türlü imkanı sağlayan ve büyük destek gösteren Tıbbi Bitkiler Araştırma Merkezi Müdürü Prof. Dr. K.H.C. BAŞER'e,

Yüksek Lisans öğrenimim süresince büyük ilgi ve destek göstererek konuyu yönlendiren danışmanım Yard. Doç. Dr. Neş'e KIRIMER'e,

Farmakolojik çalışmalarım sırasında ilgi ve desteklerini esirgemeyen Anadolu Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Doç. Dr. İpek CİNGİ, Doç. Dr. Kevser EROL ve Farmakoloji bölümünde görev yapan tüm arkadaşlarıma,

Bitkisel materyal ve Lityazol Cemil numunelerinin teminini sağlayan Dr. Cemil Şener Laboratuvarı Limited Şirketi-MANİSA yetkililerine,

NMR ve Kütle Spektrumlarının çekilmesinde yardımcı olan Prof. Dr. Ayhan ULUBELEN, Prof. Dr. Bilge ŞENER ve Doç. Dr. Şeref DEMİRAYAK'a,

Analitik çalışmalar ve tezin hazırlanması süresince yardımcı olan Kim. Y. Müh. Berrin BOZAN ve TBAM'daki tüm arkadaşlarıma,

Çalışmalarım süresince göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı aileme ve Serdar'a

En içten Teşekkürlerimi sunarım.

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. Etanol Ekstresinin İleum Preparatı Üzerine Etkisi.....	31
Şekil 2. Etanol Ekstresinin İleum Preparatındaki Histogramı.....	31
Şekil 3. Butanol Ekstresinin İleum Preparatı Üzerine Etkisi.....	32
Şekil 4. Butanol Ekstresinin İleum Preparatındaki Histogramı.....	32
Şekil 5. Sulu kısmın İleum Preparatı Üzerine Etkisi.....	33
Şekil 6. Lityazol Cemil'in İleum Preparatı Üzerine Etkisi.....	33
Şekil 7. Lityazol Cemil'in İleum Preparatındaki Histogramı.....	34
Şekil 8. Liyofilize İlacın İleum Preparatı Üzerine Etkisi.....	34
Şekil 9. Liyofilize ilacın İleum Preparatındaki Histogramı.....	35
Şekil 10. $\alpha$ -Amirin Asetatın İleum Preparatı Üzerine Etkisi.....	36
Şekil 11. $\alpha$ -Amirin Asetatın İleum Preparatındaki Histogramı.....	36
Şekil 12. $\alpha$ -Amirin Asetatın İleum Preparatı Üzerine Doz Bağımlı Etkisi.....	37
Şekil 13. $\alpha$ -Amirin Asetatın oluşturduğu İnhibisyonun Histogramı.....	38

## TABLOLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1. Test Edilen Etken Maddeler ve Uygulanan Reaksiyonlar.....	15
Tablo 2. Ekstraksiyon Yöntemleri, Çözücüler ve Ekstraksiyon Süreleri.....	7
Tablo 3. Soxhlet Ekstraksiyonu % Verimleri.....	21
Tablo 4. Kaynatmalı Ekstraksiyon % Verimleri.....	22
Tablo 5. Maserasyon % Verimleri.....	22
Tablo 6. $\alpha$ -Amirin Asetatın Daha Önce İzole Edilmiş Olduğu Bitkiler.....	25
Tablo 7. Numunelerin Organda Oluşturduğu Cevaplar.....	35
Tablo 8. $\alpha$ -Amirin Asetat ile Yapılan Kümülatif Çalışma Sonucu Elde Edilen Veriler.....	37

## TEZDE ADI GEÇEN KISALTMALAR

Deiyonize su	H <sub>2</sub> O
Metanol	MeOH
Amonyak	NH <sub>3</sub>
Sülfürik Asit	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Vanilin Fosforik Asit Reaktifi	VPA
Vanilin Sülfürik Asit Reaktifi	VSA
Kamorowsky Reaktifi	KOM
İnce Tabaka Kromatografisi	İTK
Letal Doz	LD50
Kloroform	CHCl <sub>3</sub>
Etil Asetat	EtAcO
<i>n</i> -Butanol	<i>n</i> -BuOH
<i>n</i> -Propanol	<i>n</i> -PrOH
Glasiyel Asetik Asit	gl-AcOH



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	iii
SUMMARY.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	vii
TEZDE ADI GEÇEN KISALTMALAR.....	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	2
2.1. <i>Scolymus hispanicus</i> 'un Botanik Özellikleri ve Yayılışı.....	2
2.2. Kimyasal Çalışmalar.....	4
2.3. Farmakolojik ve Klinik Çalışmalar.....	9
2.4. İlacın Üretimi.....	10
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	11
3.1. Kimyasal Çalışmalarda Kullanılan Bitkisel Materyal, Kimyasal Madde, Reaktif ve Aletler.....	11
3.1.1. Bitkisel Materyal ve Lityazol Cemil.....	11
3.1.2. Kimyasal Maddeler.....	11
3.1.3. Kimyasal Reaktifler.....	12

3.1.4. Kullanılan Aletler.....	13
3.2. Farmakolojik Çalışmalarda Kullanılan Materyal, Çözücü, Solüsyon ve Aletler.....	13
3.2.1. Kullanılan Deney Hayvanları.....	13
3.2.2. Kullanılan Çözücüler.....	13
3.2.3. Kullanılan Fizyolojik Solüsyon.....	13
3.2.4. Kullanılan Numuneler.....	14
3.2.5. Kullanılan Aletler.....	14
3.3. Kimyasal Çalışmalar.....	15
3.3.1. Droğun Kimyasal İncelemesi.....	15
3.3.2. Nem Miktar Tayini.....	16
3.3.3. Ekstraksiyon Yöntemleri.....	16
3.3.4. İzolasyon.....	17
3.3.5. İlacın Alkol Miktarının Tayini.....	19
3.3.6. İzole Edilen Maddenin Yapı Tayini.....	19
3.3.6.1. Ultraviyole Spektrofotometrisi (UV).....	19
3.3.6.2. İnfrared Spektroskopisi (IR).....	19
3.3.6.3. <sup>1</sup> H-Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi.....	19
3.3.6.4. Kütle Spektroskopisi.....	20
3.3.6.5. Optik Çevirme.....	20
3.3.6.6. Erime Noktası Tayini.....	20
3.4. Farmakolojik Çalışmalar.....	20
4. DENEYSEL BULGULAR.....	21
4.1. Ekstraksiyon.....	21
4.1.1. Droğun Kimyasal İncelemesi.....	21

4.1.2.	Uygun Ekstraksiyon Yönteminin Seçimi.....	21
4.1.2.1.	Nem Miktar Tayini.....	21
4.1.2.2.	Soxhlet Ekstraksiyonu.....	21
4.1.2.3.	Kaynatmalı Ekstraksiyon Yöntemi.....	22
4.1.2.4.	Maserasyon.....	22
4.1.3.	İlacın Alkol Miktarının Tayini.....	23
4.2.	İzolasyon.....	23
4.2.1.	<i>n</i> -Butanol ile Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu.....	23
4.2.2.	Kolon Kromatografisi.....	24
4.2.3.	İzole Edilen Maddenin Yapı Tayini.....	25
4.2.4.	İTK-Dansitometrik Miktar Tayini.....	30
4.3.	Farmakolojik Çalışmalar.....	31
4.3.1.	Etanol Ekstresi ile Yapılan Çalışma.....	31
4.3.2.	Butanol Ekstresi ile Yapılan Çalışma.....	32
4.3.3.	Sulu Kısım ile Yapılan Çalışma.....	33
4.3.4.	Lityazol Cemil ile Yapılan Çalışma.....	33
4.3.5.	Liyofilize İlaç ile Yapılan Çalışma.....	34
4.3.6.	$\alpha$ -Amirin Asetat ile Yapılan Çalışma.....	34
4.3.7.	Akut Toksikite Testi.....	38
5.	SONUÇ VE TARTIŞMA.....	39
	KAYNAKLAR DİZİNİ.....	41

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Lityazol Cemil, 1934 yılından beri üretilmekte olan bir Türk bitkisel ilacıdır. Böbrek taşlarını düşürücü olarak kullanılan ilaç ülkemizde Trakya, Orta Anadolu ve sahil bölgelerinde yaygın olarak yetişen *Scolymus hispanicus* adlı bitkinin kök kabuklarından hazırlanmaktadır.

İlaca adını veren ve ilacın mucidi olan Dr. Cemil Şener 1928 yılında Manisa yöresinde halkın "Şevketi Bostan" adını verdiği bitkinin yaygın şekilde kullanımını gözlemiştir. Yöre halkı bitkinin kökünü suyla kaynatıp içmekte, kök kabuğunun salatasını ve etli yemeğini yapmakta ve böbrek ile mesanedeki kum ve taşları düşürdüğünü söylemektedir. Dr. Şener bu bilgilere dayanarak üç yıl süren bir araştırma sonunda bu bitkinin kök kabuklarının ekstre fluidinin etkili maddeleri taşıdığını gözlemleri ile doğrulamış ve Sağlık Bakanlığına ruhsat almak için başvurmuştur. İki yıl süren incelemeler sonunda, 1934'de ilaç "Lityazol Cemil" adı ile ruhsatlandırılmıştır. Ancak bu ruhsatta bitkinin latince adı *Kardiyyus mariyyanus (Carduus marianus)* olarak bildirilmiştir.

1988 yılında mirasçının ruhsatı kendi adına tescil başvurusu üzerine Sağlık Bakanlığı ilacın hammaddesini oluşturan bitkiyi teşhis edilmek üzere Tıbbi Bitkiler Araştırma Merkezi'ne göndermiştir. Burada yapılan inceleme ve literatür taraması sonucu kullanılan bitkinin *Scolymus hispanicus* olduğu tespit edilmiştir (9).

Bu çalışmanın konusu ve amacını "Lityazol Cemil" adlı müstahzarın hammaddesi olan *Scolymus hispanicus* 'un kök kabuklarının taşıdığı etken maddelerin izolasyonu, yapı tayini ve farmakolojik etkilerinin araştırılması oluşturmaktadır.

## 2. KAYNAK TARAMASI

### 2.1. Botanik Özellikleri ve Yayılışı

*Scolymus* cinsi Compositae familyasına dahildir. Bu familya çoğu otsu, az bir kısmı çalı veya ağaç tipindeki bitkilerden oluşmaktadır (10). Evrimi devam eden gruplardan olup 20000 kadar türü dünyanın birçok yerinde yayılış gösterir (105).

*Scolymus* L.

Dikenli bir, iki veya çok yıllık otlardır. Gövde dikensi kanatlı. Yapraklar sert, pinnatifit, dikensi dişli. Kapitula homogamus, ligulat, sessil. İnvolutrum, fillarisleri çok seriatalı, imbrikat. Reseptakulum konik yada elongat, paleseus. Brakteoller ovat, etrafi akenlerle çevrili. Çiçekler sarı. Akenler dorsalden basılmış. Pappus yok veya birkaç sert kıl halinde. Bazı örnekler, Cardueae üyelerine benzer (24).

Türkiye florasında üç türü kayıtlıdır. Bu üç türün tayin anahtarı şu şekilde verilmektedir;

1) Gövdeler kanatlı ve beyaz kalınlaşmış kenar yapraklı. En üstteki yapraklar düzenli, tarak dikenli dişli. Korollalar dış yüzeyde siyah tüylü. Pappus yok.

1. *maculatus*

1) Gövdeler kanatlı ve yapraklar hemen hemen kalın kenarlı veya kalınlaşma yok. En üstteki yapraklar düzensiz, dikenli dişli. Korollalar dış yüzeyde beyaz tüylü. Pappus var.

2. Gövde kanatları aralıklı, fillarisler seyrek tüylü.

2. *hispanicus*

2. Gövde kanatları sürekli, fillarisler yoğun scabrous.

3. *grandiflorus*

*Scolymus hispanicus* L. , Sp. Pl. 813 (1753)

70-80 cm'ye kadar yükselebilen (11), tüylü, dikenli, iki veya çok yıllık otsu bir bitki. Görünüş itibarı ile devedikenine benzer (50,74). Gövdeler diken dişli kanatlarla kaplı. Yapraklar ovat, oblong-lanseolat, pinnatifit, derince dişli, dikenli (24). Çiçekler sarı renkli, sapsız (50,74), gövde boyunca düzenli olarak sıralı ve yaprakların koltuklarında bulunur (24) ve üç dikenli brakte ile çevrili (50,74). İnvolutrum 1-2cm genişliğinde (24). İnvolutkral brakteler tüysüz (75). Fillarisler, seyrek ince tüylü, lanseolat, sivri. Korolla dış yüzeyde beyaz tüylü. Brakteol tepeye doğru daralmış. Akenler 3-5 mm. Pappus 2-4 sert kıllı.



*Scolymus hispanicus* L.

(Compositae)

Çiçeklenme zamanı: 6-8, (14)

Yetiştirme ortamı: Harap ve kumlu alanlar, ekilmemiş tarlalar, yol kenarları, 1600m

Yayılışı: A1: Tekirdağ, Balıkesir, İstanbul, A3: Zonguldak, A4: Kastamonu, A5: Sinop, A6: Samsun, A7: Trabzon, B1: İzmir, B3: Isparta, B4: Ankara, C3: Antalya, C4: İçel, C5: Adana, C6: Hatay (74) (Harita 1).

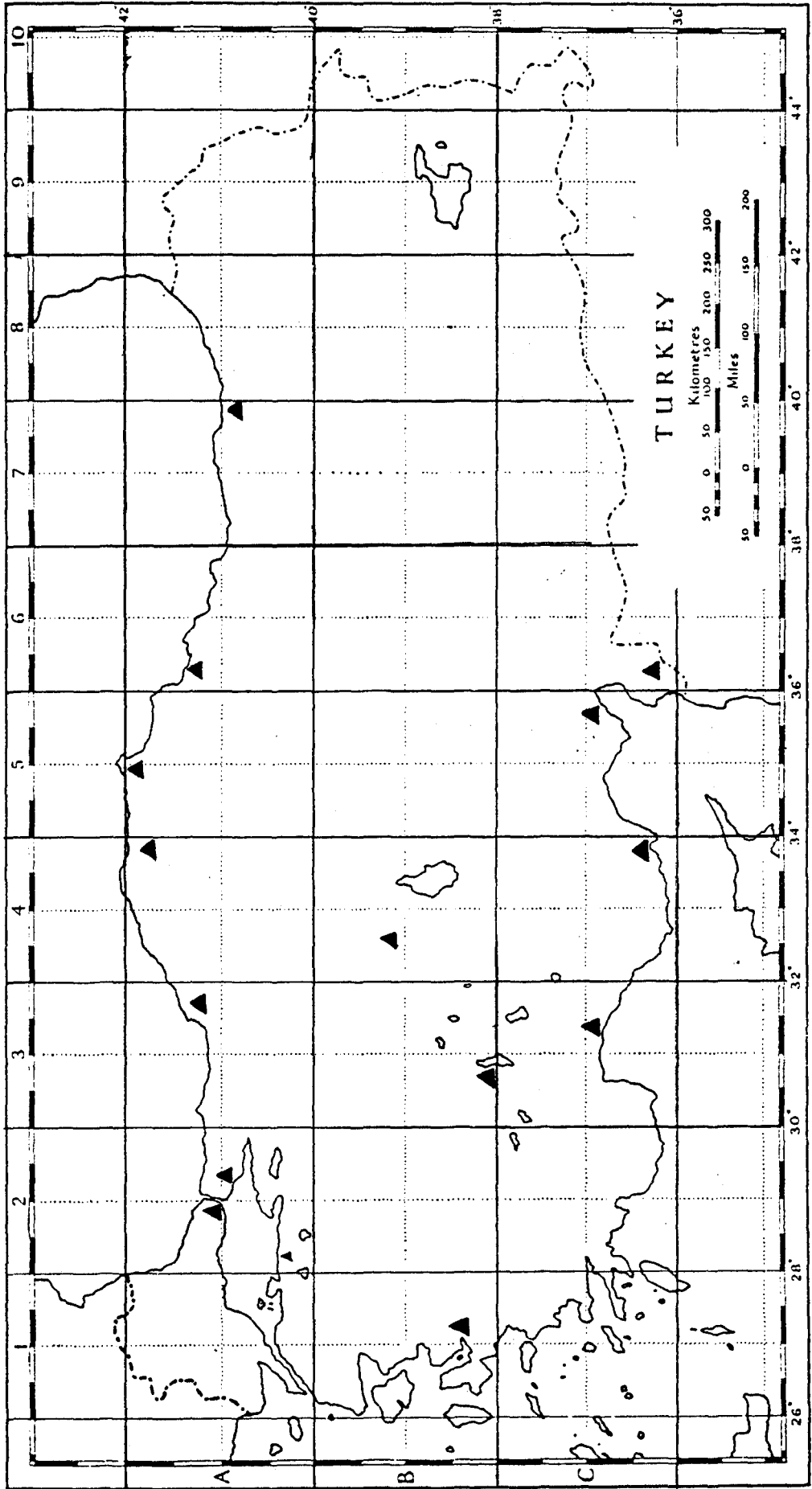
*Scolymus hispanicus*, halk arasında genel olarak "Altın diken, Sarı diken" olarak bilinmesinin yanında (11); İzmir, Manisa yöresinde "Şevketi Bostan", Balıkesir yöresinde "Akkız", Bigadiç, Savaştepe yöresinde "Sarıcakız", Konya Akşehir yöresinde ise "Akdiken" adıyla bilinmektedir (9).

## 2.2. Kimyasal Çalışmalar

Literatür taraması sırasında *Scolymus hispanicus* ile yapılmış çok az sayıda kimyasal çalışmaya rastlandı.

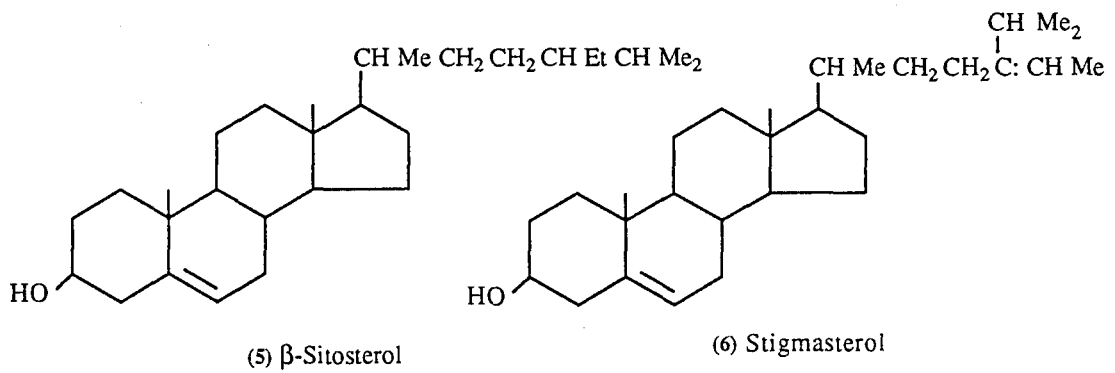
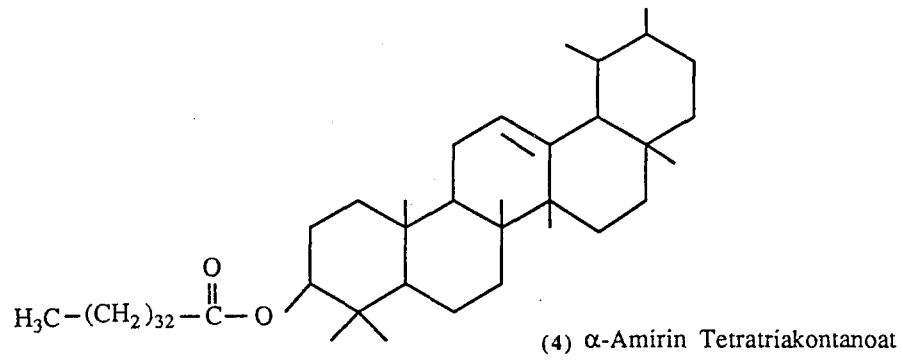
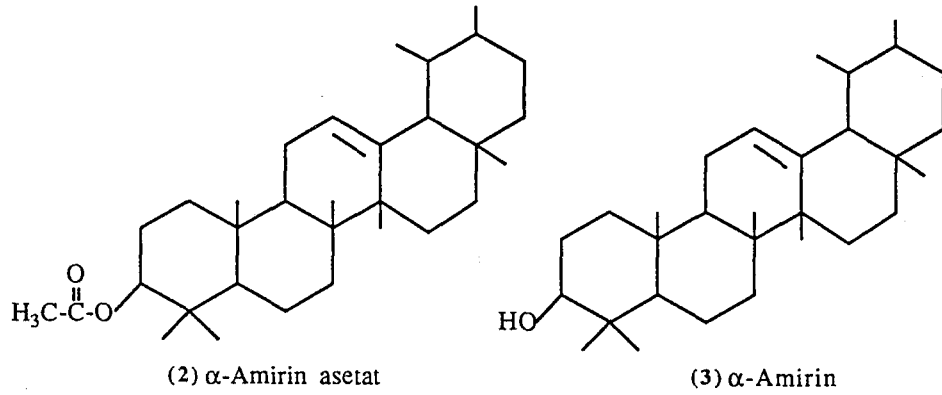
*Scolymus hispanicus*'un kök kabuklarının petrol eterli ekstresinde; n-nonakosan (1),  $\alpha$ -amirin asetat (2),  $\alpha$ -amirin (3),  $\alpha$ -amirin tetratriakontanoat (4) ve bir sterol karışımı olan  $\beta$ -sitosterol (5) ile stigmasterol (6), kloroform ekstresinde; oleanolik asit (7), alkol ekstresinde; fruktoz (8) ve galaktozdan (9) oluşan serbest şekerler ve mannitol (10) varlığı rapor edilmektedir (33). Bitkinin toprak üstü kısımlarından; 6,8-di-C-glukosilapigenin (11), biorobin (12), trifolin (13), saksifragin (14) isimli flavonoid glikozitlerinin izole edildiği belirtilmektedir (78). Petallerle yapılan bir çalışmada rosmarinik asit (15), orientin (16), kuersetin 5- glukozit (17) ve izoramnetin 3-galaktozit rapor edilmektedir (79). Compositae familyası bitkilerinin meyvalarında yapılan bir çalışmada *Scolymus hispanicus* meyvalarının flavanolignan taşımadığı belirtilmektedir (65).

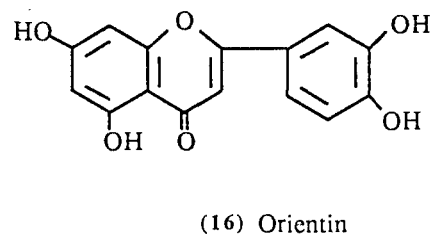
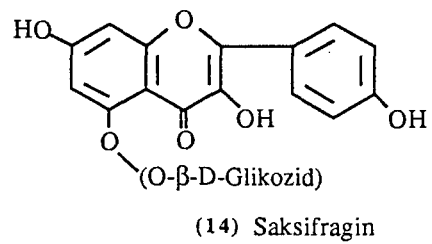
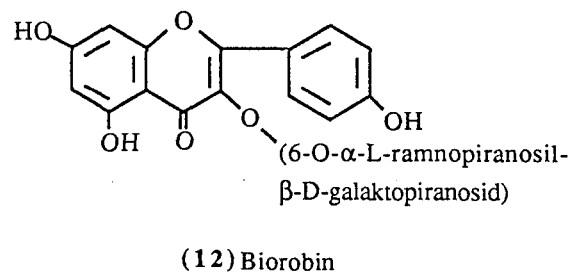
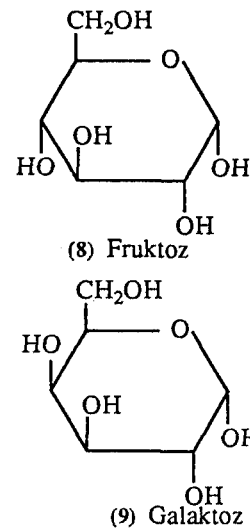
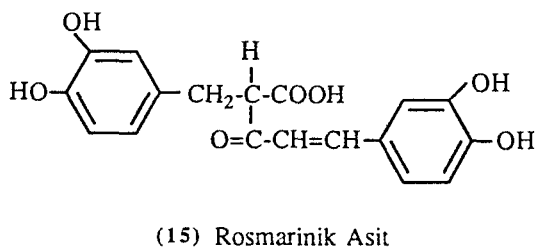
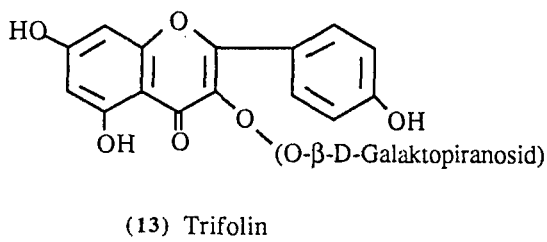
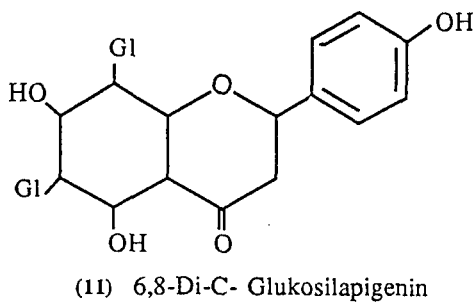
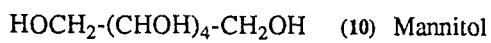
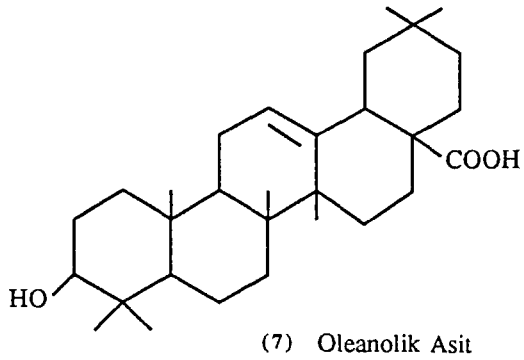
Ancak yukarıda sözü edilen literatür bilgilerinden daha önceki tarihlere rastlayan bazı kimyasal ve farmakolojik araştırmalarda bitki adı *Cnicus benedictus* (Syn: *Carduus benedictus*) olarak verilmektedir. Fakat Lityazol Cemil'i üreten firma yetkilileri adı geçen araştırmalarda kullanılan droğun kendileri tarafından temin edildiğini ifade etmektedirler. Bu araştırmalarda bitkinin petrol eterli ekstresinde;  $\alpha$ -amirenon (19),  $\alpha$ -amirin asetat (2),  $\alpha$ -amirin (3), kloroform ekstresinde; oleanolik asit (7), multiflorenol (20), multiflorenol asetat (21), sitosteril-3- $\beta$ -D-glikozit (22) varlığı rapor edilmektedir (15, 93).

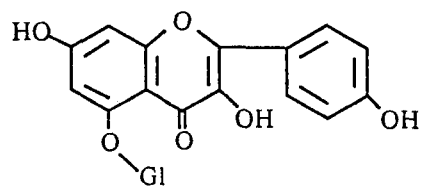




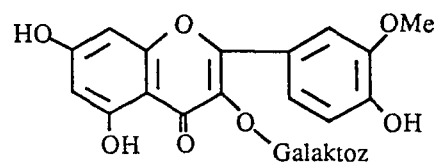
$C_{29}H_{60}$  (1) n-Nonakosan



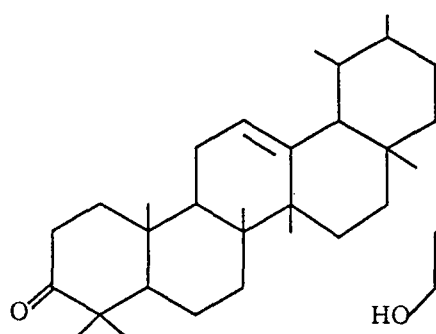
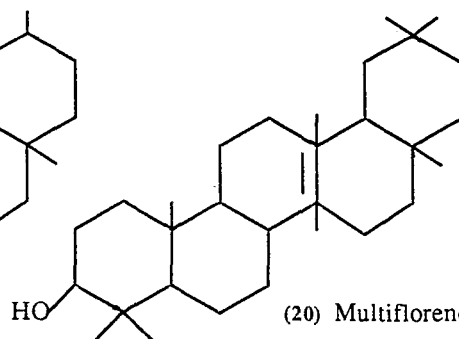




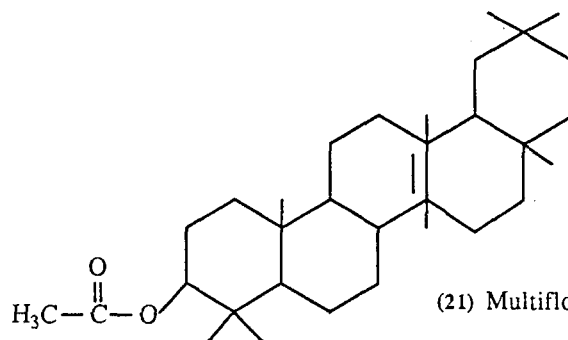
(17) Kuersetin 5-glukozid



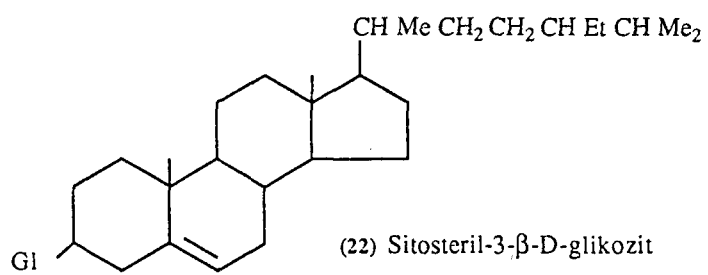
(18) İzoramnetin 5-glukozid

(19)  $\alpha$ -Amirenon

(20) Multiflorenol



(21) Multiflorenol asetat

(22) Sitosteril-3- $\beta$ -D-glikozit

### 2.3.Farmakolojik ve Klinik Çalışmalar

Farmakolojik çalışmaların ilkinde bitkinin sulu ekstresinin İzole kobay ileumu ve izole sıçan duodenumu üzerine antispazmodik ve relaksan, anesteziye edilmiş kedide ise hipotansif etki gösterdiği rapor edilmiştir (14). Daha sonra hazırlanan bir doktora tezinde ise bitkinin sulu ekstresinin aynı izole organlarda benzer etkileri gösterdiği rapor edilmiştir (15).

Bir başka araştırmada ise *Scolymus hispanicus* kök kabuğunun sulu ve etanollü ekstresi ile yapılan farmakolojik çalışmalarda her iki ekstrenin izole sıçan mide fundus şeritlerinde ve sıçan duodenum, ileum ve fundus düz kaslarında kasıcı ve gevşetici etkilerinin olmadığı sonucuna varılmıştır (90).

İlacın akut toksisitesi araştırılmış ve albino farelerle yapılan bu çalışmada LD50: 12 mg/kg (i.p.) olarak bildirilmiştir (91).

İlaç ile yapılmış olan tek klinik çalışma İzmir Devlet Hastanesinde Üroloji kliniğinde 1.1.1983- 31.12.1984 tarihleri arasında 162 hasta üzerinde yapılan klinik araştırmadır. Çalışma, üriner sistem taş hastalığı şikayeti ile kliniğe müracaat etmiş, 17-62 yaş grubu arasında 104 erkek ve 58 kadın hasta üzerinde yapılmıştır. Teşhisler radyolojik ve laboratuvar tetkikleri yapılarak konmuş, üriner sistemde anatomik bozukluğu olmayan hastalar çalışmaya konu edilmiştir. Çalışma grubuna giren hastalar, taşların ebatları 0.3-1cm. olanlar arasından seçilmiştir. 20 günde bir tetkike alınan hastalarda taşların lokalizasyonu gözlenmiştir. İlacın uygulama dozu tedavide 3x10 damla olarak belirlenmiş. Hastalara ayrıca bol su içmeleri, sıcak banyo yapmaları ve bol hareket etmeleri tavsiye edilmiştir. Araştırmaya böbrek taşı, pelvis renalis taşı, ureter ve mesane taşı konu olmuştur. Toplam vaka sayısının 102 si poliklinikten, 60 ı ise klinikten takip edilmiştir. Poliklinikten takip edilen erkek hastaların % 85'inde, klinikten takip edilenlerin ise % 79'unda 2 aylık tedavi sonunda taşların tamamının düştüğü, klinikten takip edilen vakaların % 8'inde ise taşların ureter ucuna takılması yüzünden cerrahi müdahale gerektiği, tüm vakalarda taşların yer değiştirdiği gözlenmiştir. Poliklinikten takip edilen kadın hastaların % 67 sinde, klinikte takip edilenlerin ise % 55'inde 2.5 aylık tedavi sonunda taşların düştüğü, poliklinik hastaların % 5.5'unda, klinik hastaların ise % 13.6'sında taşın ureter alt ucuna takılması yüzünden cerrahi tedavi uygulandığı, diğer tüm vakalarda taşların yer değiştirdiği gözlenmiştir. Tüm hastalar taşın düşme süresi içinde daha az ağrı duyduklarını beyan etmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca, Lityazol Cemil uygulamasında idrar pH sınırın asit tarafa kaymasının özellikle enfeksiyon taşlarının

düşürülmesinde yararlı olduğunu ifade etmişler, ilacın kullanma süresi içinde hiçbir yan etkiye rastlanmadığını belirtmişlerdir (93).

#### 2.4. İlacın Üretimi

Bitkinin kökleri, üretici firmanın talebi üzerine özel toplayıcılar tarafından Susurluk-Manyas yöresinden 15 Eylül tarihinden itibaren toplanıp, kabukları soyulmakta ve bu kabuklar kurutulduktan sonra toplayıcıdan satın alınmaktadır. Bu şekilde 5 kg yağ drogdan 1 kg kuru drog elde edilmektedir.

Toplayıcıdan alınan kök kabukları imalathanedeki etüvlerde yaklaşık 100°C de kurutulmakta ve öğütücülerde kaba toz haline getirilmektedir. Bu toz drog, "1 kg drog için 1 L % 70 lik etanol" oranına göre 24 h maserasyona bırakılmakta, bu sürenin sonunda perkolatörlere yerleştirilmektedir. Bu işlem 20 kg lık konik-bakır perkolatörler kullanılır. Perkolatörlere drog üzerine çıkacak kadar etil alkol ilave edilerek 48 h daha bekletilmekte ve bu süre sonunda dakikada 70 damla akacak şekilde perkolat alınırken alınan perkolat kadar etanol üstten eşit miktarda ilave edilmektedir. Bu şekilde herbir perkolatörden alınan ilk 20 litrelik perkolatlar ayrı olarak saklanmaktadır (1. Perkolat).

İlk perkolat alındıktan sonra yine dakikada 70 damla esasına göre 1 kg droğa 6 L etanol kullanılacak şekilde perkolasyona devam edilmekte, bu işlem yaklaşık 40 gün sürmektedir.

İlk perkolat ayrıldıktan sonra toplanan perkolat, 75 L kapasiteli iç ısı 78°C ye çıkan distilasyon cihazında distile edilerek etanolün bir kısmı geri kazanılmakta, distilasyon işlemi sonucunda balonda kalan sulu kısım yağ banyosu ile kaynatılarak yoğun pekmez kıvamına getirilmektedir (2. Perkolat). Böylece elde edilen yoğun ekstre 1. perkolat ile karıştırılıp filtre kağıdından süzülmekte ve % 0.5 oranında vanillin ilave edilerek 24 h dinlendirilmektedir. Bu süre sonunda süzülmekte ve 24 h dinlendirildikten sonra çökme olduğu takdirde tekrar süzülmektedir.

Böylece elde edilen ilaçta zamanla çökme gözlense bile bu çökelti çalkalama ile giderilebilmektedir. "1 kg drogdan 1kg ilaç eldesi" amacı ile 300 kg drogdan 42 gün sonunda 300 kg ekstre fluid elde edilmektedir.

Elde edilen ürünün özellikleri şunlardır: pH: 5.5- 6.5, özgül ağırlık: 0.96-0,99, Viskozite: 3.25- 4.25. Koyu kahverengi renkli acı lezzetli ilaç, 20 ml'lik damlalıklı şişelerde satışa sunulmaktadır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Kimyasal Çalışmalarda Kullanılan Bitkisel Materyal, Kimyasal Madde, Reaktif ve Aletler

##### 3.1.1. Bitkisel Materyal ve Lityazol Cemil

Bu çalışmada 15-20 Eylül 1991 tarihinde üretici firma tarafından Susurluk-Manyas yöresinden özel toplayıcılara toplatılan ve ilaç yapımında kullanılmak üzere kurutulup kaba toz haline getirilen kök kabukları kullanıldı. Bitki örnekleri, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumunda saklanmaktadır. (ESSE 7050, 7552, 7959,8347, 9566).

Lityazol Cemil ile yapılan çalışmalarda Ağustos-1991 üretim tarihli ilaçlar kullanıldı.

##### 3.1.2. Kimyasal Maddeler

Etanol	(Merck), (Teknik)
Kloroform	(Merck), (Teknik)
Metanol	(Merck), (Teknik)
<i>n</i> -Butanol	(Merck)
<i>n</i> -Propanol	(Merck)
Hekzan	(Merck), (Teknik)
Toluen	(Merck)
Etil asetat	(Merck)
Amonyak	(Merck)
Antimontriklorür	(Merck)
Asetik anhidrit	(Merck)
Asetik asit (glasiyel)	(Merck)
Bakır sülfat	(Merck)
Civa klorür	(Merck)
Formaldehit	(Merck)
Hidroklorik asit	(Merck)

Potasyum tartarat	(Merck)
Silikotunstik asit	(Merck)
Sodyum sülfat (Susuz)	(Merck)
Sodyum tartarat	(Merck)
Sülfürik asit	(Merck)
Silikajel G (Kolon Kromatografisi)	(Merck, 7733)
Silikajel G (İTK)	(Merck, 7731)
Silikajel GF 254 (İTK)	(Merck, 7731)

Teknik çözücüler distile edilip saflaştırıldıktan sonra kullanılmıştır.

### 3.1.3. Kimyasal Reaktifler

**Vanilin-Sülfürik Asit Reaktifi (VSA):** % 5'lik etanolik sülfürik asit solüsyonu (Solüsyon 1) ve % 1'lik etanolik vanillin solüsyonu (Solüsyon 2) hazırlanır. Plaklar üzerine 1 numaralı solüsyon püskürtüldükten sonra 2 numaralı solüsyon püskürtülür ısıtılır ve lekeler belirir (40).

**Vanilin-Fosforik Asit Reaktifi (VPA):** 2 kısım % 24'lük fosforik asit, 8 kısım etanolik vanillin ile karıştırılır ve plaklar üzerine püskürtülür. Isıtıldıktan sonra lekeler belirir (40).

**Kamorowsky Reaktifi (KOM):** % 50'lik etanolik  $H_2SO_4$  çözeltisinden 1 ml alınır ve % 2'lik etanolik 4-hidroksi benzaldehit çözeltisininin 10 ml si ile kullanılmadan hemen önce karıştırılır (40).

**Carr-Price Reaktifi:** 25 g antimontrikorür 75 g kloroformda çözülür (23).

**Fehling Reaktifi:** Fehling A ve Fehling B reaktiflerinin kullanılmadan hemen önce eşit miktarda karıştırılmasıyla hazırlanır (23).

Fehling A: 34.66 g bakır sülfat 200 ml suda çözülür ve 500 ml'ye tamamlanır.

Fehling B: 173 g sodyum tartarat, potasyum tartarat ve 100g NaOH 300 ml suda çözülür ve 500 ml'ye kadar seyreltilir.

**Mayer Reaktifi:** 1.35 g civa klorür 60 ml soğuk suda çözülür ve 100 ml'ye seyreltildikten sonra süzülerek kullanılır (23).

**Molisch Reaktifi:** İki ayrı çözelti halinde uygulanır (23).

1) % 17'den az olmayacak konsantrasyonda H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

2) Timol'ün alkoldeki % 2-20'lik çözeltisi.

**Styassny Reaktifi:** HCl ve formaldehitin (1:2) oranındaki karışımı (23).

### 3.1.4. Kullanılan Aletler

5x60 cm'lik musluklu cam kolon

20x5, 20x15, 20x20 cm boyutlarında cam plak

İTK Seti (J. Bibby Ltd. Science Product)

Elektronik Nem Tayin Cihazı (Shimadzu EB-280 MOC)

UV Spektrofotometresi (Shimadzu UV-240)

IR Spektrofotometresi (Shimadzu IR-435)

<sup>1</sup>H NMR Spektrometresi (<sup>1</sup>H NMR Bruker-200 MHz)

Kütle Spektrometresi (Kratos MS 25)

İTK-Dansitometre (Shimadzu TLC Scanner CS-920 ve Shimadzu CR3A-İntegratör)

## 3.2. Farmakolojik Çalışmalarda Kullanılan Materyal, Çözücü, Solüsyon ve Aletler

### 3.2.1. Kullanılan Deney Hayvanları

Albino sıçan ve fareler kullanıldı.

### 3.2.2. Kullanılan Çözücüler

Dimetilsülfoksit

Distile su

### 3.2.3. Kullanılan Fizyolojik Solüsyon

Krebs Solüsyonu:	NaCl	6.9 g
	KCl	0.35 g
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.14 g



KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.16 g
Glukoz	2 g
NaHCO <sub>3</sub>	2.1 g
CaCl <sub>2</sub>	0.252 g
Distile su a.d.	1000 ml

Yukarıda belirtilen formülasyonda hazırlanan solüsyon izole organ su banyosuna ilave edildi ve ortam (% 95 O<sub>2</sub> + % 5 CO<sub>2</sub>)'lik gaz karışımı ile gazlandırıldı.

#### 3.2.4. Kullanılan Numuneler

Etanol Ekstresi: Droğun % 70'lik etanol kullanılarak kaynatmalı ekstraksiyona ile elde edilen ham ekstrenin sudaki 120 mg/ml'lik çözeltisi.

Butanol Ekstresi: Ham ekstrenin sulu çözeltisinden *n*-butanol ile sıvı- sıvı ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstrenin DMSO'deki 100 mg/ml'lik çözeltisi.

Sulu Kısım: Ham ekstrenin sulu çözeltisinden *n*-butanol ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu sonucu elde edilen sulu ekstrenin sudaki 120 mg/ml'lik çözeltisi.

Lityazol Cemil

Liyofilize edilmiş ilaç: Lityazol Cemil'in kuruluğa kadar yoğunlaştırılması sonucu elde edilen numunenin sudaki 120 mg/ml'lik çözeltisi.

$\alpha$ - Amirin asetat: İzole edilip yapısı tayin edilen  $\alpha$ - amirin asetat'ın dimetilsülfoksitteki 5 mg/ml'lik çözeltisi.

#### 3.2.5. Kullanılan Aletler

İzometrik transducer (Nihon Kohden)

Poligraf (Nihon Kohden): (kağıt Hızı: 5 mm/dak )

İzole organ banyosu

### 3.3. Kimyasal Çalışmalar

#### 3.3.1. Droğun Kimyasal İncelemesi

Droğun kimyasal içeriğinin belirlenmesi için bitkisel materyalin farklı polaritedeki çözücülerle ekstraksiyonu amaçlandı. Kaba toz halindeki drog, sırasıyla dietileter, etanol ve su ile ekstre edildi. Herbir ekstrede gözlenebilecek etken maddeler için özel teşhis reaksiyonları yapıldı (23). Bu reaksiyonlar Tablo.1'de verilmiştir.

Tablo 1. Test edilen Etken maddeler ve Uygulanan Reaksiyonlar

Etken madde	Reaksiyon veya Reaktifler	Beklenen sonuç
<b>Dietileter Ekstresi</b>		
Uçucu yağlar	Koku testi	Aromatik koku
Steroller ve triterpenler	Lieberman-Burchard Reaksiyonu	Mavi-mor halka
Karotenoidler	Carr-Price Reaksiyonu	Önce mavi sonra kırmızı renk
Yağ asitleri	Bakiye kontrolü	Yağlı görünüşte kalıntı
Alkaloidler	Mayer Reaktifi	Sarımsı beyaz çökelti
Flavon Glikozitleri	Shibata Reaksiyonu	Kırmızı veya turuncu renk
Antrasen Glikozitleri	Borntrager Reaksiyonu	Kırmızı renk
Kumarinler	Alkali ortamda	UV lamba altında floresan
<b>Etanol Ekstresi</b>		
Tanenler	Styassny Reaktifi	Koyu mavi veya siyah renk
İndirgenmiş Bileşikler	Fehling Reaktifi	Kiremit rengi çökelti
Alkaloidler	Mayer Reaktifi	Sarımsı beyaz çökelti
Emodoller	Borntrager Reaksiyonu	Kırmızı renk
Kumarinler	Alkali ortamda	UV lamba altında floresan
Steroid veya Triterpenler	Lieberman-Burchard Reaksiyonu	Mavi-mor halka
Flavon Glikozitleri	Shibata Reaksiyonu	Kırmızı veya turuncu renk
Antosiyonidin Glikozitleri	Asidik form	Asidik ortamda kırmızı renk
<b>Su Ekstresi</b>		
Poliüronidler	Etanol ilavesi ile	Mor veya mavi çökelti
İndirgenmiş Bileşikler	Fehling Reaktifi	Kiremit rengi çökelti
Ozlar	Molisch Reaktifi	Kırmızı renk
Saponinler	Lieberman-Burchard Reaksiyonu	Mavi-mor halka
Tanenler	Styassny Reaktifi	Koyu mavi veya siyah renk
Alkaloidler	Mayer Reaktifi	Sarımsı beyaz çökelti

**Lieberman-Burchard Reaksiyonu:** Ekstre asetik anhidrit ile muamele edilip klororm ilave edildikten sonra kuru bir tüpe aktarılır. Bu çözelti üzerine damla damla konsantre sülfürik asit ilavesi ile tabakalandırılır. İki tabakanın temas yüzeyinde mavi-mor bir halkanın gözlenmesi drogda sterol veya triterpenlerin varlığını gösterir.

**Carr-Price Reaksiyonu:** Kuruluğa kadar yoğunlaştırılmış ekstre üzerine antimontrikorürün kloroformdaki doymuş çözeltisinden 2-3 damla ilave edilir. Önce mavi sonra kırmızı rengin gözlenmesi numunede karotenoidlerin varlığını gösterir.

**Shibata Reaksiyonu:** Numunenin alkollü çözeltisi üzerine 4-5 damla konsantre HCl ve metalik magnezyum ilave edilince oluşan pembe-turuncu renk flavon glikozitlerinin varlığını gösterir

**Borntrager Reaksiyonu:** Numune dietileter ve benzen tipinde bir organik çözücü ile muamele edilerek çözünen kısım kuru bir tüpe aktarılır. Üzerine % 25'lik amonyak ilave edilip karıştırılır. Kırmızı rengin gözlenmesi drogta antresen glikozitlerinin varlığını gösterir (23).

### 3.3.2. Nem Miktar Tayini:

Elde edilen ekstre verimlerinin kuru baz üzerinden değerlendirilmesi için droğun nem miktarı gravimetrik metotla belirlenmiş ve elde edilen sonuçların aritmetik ortalamaları alındı.

### 3.3.3. Ekstraksiyon Yöntemleri

En verimli ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi için üç değişik ekstraksiyon yöntemi izlendi. Bunlar, Soxhlet ekstraksiyonu, geriçeviren soğutucu ekstraksiyonu ve maserasyondur.

Ekstraksiyonlarda çözücü olarak su ve su-etanol karışımları kullanıldı. İşlem sonucu elde edilen ekstrenin miktarı kuru drog üzerinden % verim olarak hesaplandı.

Ekstraksiyonlarda kullanılan çözücüler, süreler ve yöntemler Tablo 2.'de verilmiştir.

**Tablo 2.** Ekstraksiyon yöntemleri, çözücüler ve ekstraksiyon süreleri

Ekstraksiyon yöntemi	Çözücü	Süre
Soxhlet ekstraksiyonu	% 96, % 70, % 50'lik etanol ve deiyonize su	2, 4, 6, 8 saat
Geriçeviren soğutucu ekstraksiyonu	% 96, % 70, % 50'lik etanol ve deiyonize su	2, 4, 6, 8 saat
Maserasyon	% 96, % 70, % 60, % 50'lik etanol ve deiyonize su	2 gün

### 3.3.4. İzolasyon

İzolasyon işlemlerinde analitik ve preparatif İnce Tabaka Kromatografisi, Kolon Kromatografisi'nden yararlanıldı.

#### *Analitik İnce Tabaka Kromatografisi*

Rutin kontroller için 20x20 cm, 20x15 cm veya 20x5 cm abadındaki cam plaklar ve adsorban olarak Silikajel G (Merck) : Silikajel GF 254 (Merck) 1:1 ve Silikajel G kullanıldı. Adsorban karışımının su ile 1:2 oranında karıştırılmasıyla elde edilen koyu süspansiyon plak dökme aпараты ile 0.25 cm kalınlıkta cam plaklar üzerine kaplandı. Kaplanan plaklar oda atmosferinde kurutuldu ve 1 saat 100°C de aktive edildi. Developman işlemi, içine süzgeç kağıdı döşenmiş cam kromatografi tanklarında, tank çözücü sistemi ile doyurulduktan sonra gerçekleştirildi.

Bu çalışmada kullanılan çözücü sistemleri (84, 99):

1. *n*-BuOH: *n*-PrOH: gl-AcOH: H<sub>2</sub>O (4: 2: 1: 3)
2. *n*-BuOH: *n*-PrOH: gl-AcOH: H<sub>2</sub>O: EtAcO (2: 2: 1: 3: 2)
3. CHCl<sub>3</sub>: MeOH: H<sub>2</sub>O (60: 35: 10)
4. CHCl<sub>3</sub>: MeOH: H<sub>2</sub>O (70: 30: 4)
5. CHCl<sub>3</sub>: MeOH: H<sub>2</sub>O (80: 20: 2)
6. CHCl<sub>3</sub>: MeOH (95: 5)

- |     |   |                |
|-----|---|----------------|
| 7.  | CHCl <sub>3</sub> : MeOH                  | (80: 2)        |
| 8.  | CHCl <sub>3</sub> : MeOH                  | (97.5: 2.5)    |
| 9.  | CHCl <sub>3</sub> : EtAcO                 | (60: 40)       |
| 10. | CHCl <sub>3</sub> : MeOH: AcOH            | (96.5: 2.5: 1) |
| 11. | CHCl <sub>3</sub> : MeOH: NH <sub>3</sub> | (97: 2.5: 0.5) |
| 12. | EtAcO: gl-AcOH: H <sub>2</sub> O          | (8: 2: 1)      |
| 13. | Toluen: EtAcO                             | (4: 1)         |
| 14. | Hekzan: EtAcO                             | (4: 1)         |
| 15. | Hekzan: EtAcO                             | (3: 2)         |
| 16. | Hekzan: CHCl <sub>3</sub>                 | (3: 2)         |

Yukarıdaki çözücü sistemlerinde develope edilen plaklar UV lambasında incelendi, Vanilin-Sülfürik asit reaktifi, % 30 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Vanilin- Fosforik Asit ve Kamorowsky Reaktifleri kullanıldı.

**Kolon Kromatografisi:** Preparatif amaçlarla kullanıldı. Çalışılan kolonun özellikleri deneysel kısımda belirtilecektir. İşlem sonucunda alınan fraksiyonlar İnce Tabaka Kromatografisi ile incelendi. Benzer fraksiyonlar birleştirildi.

**İTK Dansitometrik Miktar Tayini:** Miktar tayinlerinde 0.25 mm Silikajel G ile kaplanmış ve 105°C'de 1h süre ile aktif hale getirilmiş plaklar kullanıldı. Çalışmaların görünür alanda yapılması amaçlandı. Bu nedenle numune uygun bir reaktif kullanılarak görünür hale getirildi. Bu amaçla Vanilin-Sülfürik asit reaktifi kullanıldı.

Uygulamalar 2 µl ve 5 µl'lik pipetler ile yapıldı. Developman işleminde hekzan: CHCl<sub>3</sub> (3:2) çözücü sistemi kullanıldı. Püskürtme işlemi otomatik püskürtücü, ısıtma işlemi ise otomatik tabanca ile yapıldı. Plak işlem sonunda İTK-Dansitometre'de 560 nm'de tarandı ve CR3-A İntegratör ile kromatogramları alındı. Çalışmalarda numune olarak, etanol ekstresi ve liyofilize Lityazol Cemil ile izole edilen α-amirin asetat kullanıldı. Değerlendirmeler aletin EXT 2 programı ile yapıldı. Tayinler herbir numune için 3 İTK plağındaki değerlerin ortalaması alınarak gerçekleştirildi.

### 3.3.5. İlacın Alkol Miktarının Tayini

İlaçtaki alkol miktarının tayini için USP XX'de yer alan metod kullanıldı. Bu metod % 30'dan fazla alkol içeren preparatlar ve % 30 veya daha az alkol içeren preparatlar için olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. İlacın içerdiği alkol miktarı hakkında bir bilgi olmadığı için her iki yöntemde kullanıldı. Çalışma sonucu saptanan yoğunluğa karşılık gelen alkol yüzdesi (91) ve alkol derecesi (40) alkalometrik tablolardan belirlendi.

#### % 30'dan fazla alkol içeren preparatlar için alkol miktar tayini

İlaçtan belirli hacimde alınıp ısıtı tespit edildi. Alınan numune hacminin iki misli kadar su ilave edildi ve distilasyona başlandı. Numune miktarının iki mislinden 2 ml eksik distilat alınıncaya kadar işleme devam edildi. Elde edilen distilatın ısıtı belirlendi ve distilat su ile numune hacminin 2 misline kadar tamamlandı ve spesifik ağırlığı saptandı. Bu işlem 2 kez tekrarlanıp ortalama yoğunluk belirlendi. Alkalometrik tablodan, saptanan yoğunluğa karşılık gelen alkol yüzdesi ve alkol derecesi belirlendi. Tablodan saptanan veriler iki ile çarpılarak ilaç içerisinde bulunan alkolün gerçek yüzdesi ve derecesi belirlendi.

#### % 30 veya daha az alkol içeren preparatlar için alkol miktar tayini:

İlaçtan belirli hacimde alınıp ısıtı belirlendi. Üzerine eşit hacimde su ilave edildi ve distilasyona başlandı. Kullanılan ilaç miktarından 2 ml eksik distilat elde edilene kadar işleme devam edildi. Distilat su ile ilaç hacmine tamamlandı. Elde edilen distilatın yoğunluğu belirlendi. Alkalometrik tablodan saptanan yoğunluğa karşılık gelen alkol yüzdesi ve derecesi saptandı.

### 3.3.6. İzole Edilen Maddenin Yapı Tayini

#### 3.3.6.1. Ultraviyole Spektrofotometrisi (UV)

İzole edilen maddenin kloroformdaki çözeltisi 190-700 nm dalga boyları arasında UV spektrumları alındı. İşlem 1 cm lik kuartz küvetler kullanılarak yapıldı.

#### 3.3.6.2. İnfrared Spektroskopisi (IR)

Infrared Spektrumlarının alınması için KBr disk yönteminden yararlanıldı.

#### 3.3.6.3. <sup>1</sup>H-Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (<sup>1</sup>H-NMR)

Referans olarak tetrametilsilan (TMS) ( $\delta$  0.00 ppm) ihtiva eden deuterokloroform kullanıldı.

#### 3.3.6.4. Kütle Spektroskopisi

Kütle Spektrumu 70 eV'ta çekildi.

#### 3.3.6.5. Optik Çevirme

Numunenin kloroformda 4 mg/ml'lik çözeltisi hazırlandı ve 0.025 ml'lik küvet kullanılarak optik çevirmesine bakıldı.

#### 3.3.6.6. Erime Noktası Tayini

Numunenin erime noktası tayin edildi.

### 3.4. Farmakolojik Çalışmalar

Farmakolojik çalışmalarda, Bölüm 3.2.4.'de açıklanan numunelerin izole sıçan ileum preparatları üzerine etkisi ve Lityazol Cemil'in akut toksisitesi araştırıldı.

#### İzole Organ Çalışmalarında Uygulanan Yöntem

150-200 g ağırlığındaki sıçanlar aşırı dozda eter anestezisi ile öldürüldükten sonra ileum preparatları alınıp Krebs solüsyonuna kondu. Daha sonra yaklaşık 1.5 cm boyunda hazırlanan ileum preparatları Krebs solüsyonu ile doldurulmuş izole organ banyosuna asıldı ve preparata 2 g'lık gerilim uygulandı. Ortam % 95 O<sub>2</sub>+ % 5 CO<sub>2</sub> içeren gaz karışımı ile gazlandırıldı ve solüsyonun ısısı 37°C'de sabit tutuldu. Organlar her 15 dakikada bir kez yıkanarak 1 h süre ile inkübe edildi.

Bu şekilde stabil hale getirilmiş organ preparatlarında iki tip çalışma yapıldı;

Birinci tip çalışma, etanol, butanol ekstresi, sulu kısım, Lityazol Cemil isimli ilaç, liyofilize ilaç ile yapıldı. Bu numunelerin ileum preparatları üzerine yaptığı etki, asetikolinin kasıcı etkisiyle karşılaştırıldı. Sonuçlar, asetilkolinin etkisi % 100 kabul edilerek % olarak hesaplandı.

İkinci tip çalışma,  $\alpha$ -amirin asetat ile yapıldı. Numunenin ileum preparatlarını gevşetici etkisi saptanmaya çalışıldı. Bu amaçla asetilkolinin organda oluşturduğu kasılma saptanıp bu kasılmayı inhibe edici etkisi araştırıldı. Sonuçlar, asetilkolinin etkisi % 100 kabul edilerek % inhibisyon olarak hesaplandı.

Lityazol Cemil'in akut toksisitesinin bulunması amacıyla 20-40 g ağırlığındaki albino farelere artan dozlarda ilaç enjekte edildi ve fareler gözlemlendi. Farelerde ölüme sebep olan numune hacmi belirlendi ve LD<sub>50</sub> değeri hesaplandı.

## 4. DENEYSEL BULGULAR

### 4.1. Ekstraksiyon

#### 4.1.1. Droğun Kimyasal İncelemesi

Kaba toz halindeki droğa Tablo 1'de belirtilen teşhis reaksiyonlarının uygulanması sonucunda droğun triterpenik bileşikleri içerdiği belirlendi.

#### 4.1.2. Uygun Ekstraksiyon Yönteminin Seçimi

##### 4.1.2.1. Nem Miktar Tayini

Bölüm 3.3.2.'de anlatıldığı şekilde yapılan nem miktar tayinleri sonucunda ekstraksiyonlarda kullanılan droğun ortalama olarak % 1.6 oranında nem içerdiği belirlendi.

##### 4.1.2.2. Soxhlet Ekstraksiyonu

25 g kaba toz halindeki drog 250 ml kapasiteli cam Soxhlet cihazında 200 ml çözücü ile tabloda belirtilen sürelerde ekstre edildi ve çözücü 40°C'de vakum altında tamamenyoğunlaştırıldı. Elde edilen ekstratlar tartılıp kuru drog üzerinden verim hesabı yapıldı. Ekstraksiyon % verimleri Tablo 3.'de verilmiştir.

Tablo 3. Soxhlet ekstraksiyonu % verimleri

Ekstraksiyon süresi	% 96'lık etanol	% 70'lik etanol	% 50'lik etanol	Distile su
2 saat	6.4	6.3	6.5	10.1
4 saat	11.0	11.0	13.5	15.4
6 saat	12.8	14.3	21.8	24.8
8 saat	15.4	18.5	21.3	27.6



#### 4.1.2.3. Kaynatmalı Ekstraksiyon

25 g kaba toz halindeki drog, 250 ml kapasiteli kaynatmalı ekstraksiyonla tabloda belirtilen çözücülerle 2, 4, 6 ve 8 h ekstre edildi ve sıcakken süzüldü. Geriye kalan posa, o ekstraksiyon için kullanılan çözücü ile yıkanarak süzüntü miktarı 150 ml'ye tamamlandı. Elde edilen süzüntü rotavaporda kuruluğa kadar yoğunlaştırıldı, tartıldı ve kuru drog üzerinden % verim hesaplandı. Ekstraksiyon % verimleri Tablo 4.'de verilmiştir.

Tablo 4. Kaynatmalı ekstraksiyon % verimleri

Ekstraksiyon süresi	% 96'lık etanol	% 70'lik etanol	% 50'lik etanol	Distile su
2 saat	9.0	27.4	34.7	47.3
4 saat	9.9	28.8	38.8	53.4
6 saat	9.6	27.8	38.2	52.8
8 saat	9.9	28.2	37.2	53.4

#### 4.1.2.4. Maserasyon

10 g kadar kaba toz halindeki drog, 250 ml kapasiteli cam balonlarda 2 gün boyunca maserasyona bırakıldı. Bu süre sonunda süzüldü, rotavaporda kuruluğa kadar yoğunlaştırıldı ve kuru drog üzerinden % verim hesaplandı. Ekstraksiyon % verimleri Tablo 5.'de verilmiştir.

Tablo 5. Maserasyon % verimleri

Ekstraksiyon süresi	% 96'lık etanol	% 70'lik etanol	% 60'lık etanol	% 50'lik etanol	Distile su
2 gün	7.7	23.3	23.4	23.6	30.1

Tablo 4.'de en yüksek verimin kaynatmalı ekstraksiyon ile su kullanılarak yapılan ekstraksiyonda alındığı gözlemlendi. Ancak İnce Tabaka Kromatografisi'nde yapılan incelemeler ile % 50-70' lik etanol ile 4h. kaynatmalı ekstraksiyon ile elde edilen ekstrenin daha temiz olduğu gözlemlendi ve daha sonraki basamaklarda % 70' lik etanolla hazırlanan ekstre kullanıldı.

#### 4.1.3. İlacın Alkol Miktarının Tayini

##### % 30'dan fazla alkol içeren preparatlar için alkol miktar tayini:

İlaçtan 25 ml alınıp ısısının 20°C olduğu belirlendi. Bunun üzerine alınan numune hacminin iki misli kadar su ilave edildi ve distilasyona başlandı. 48 ml distilat alınan kadar işleme devam edildi. Elde edilen distilatın ısısı tekrar ölçüldü ve 21°C olduğu belirlendi. Distilat su ile 50 ml'ye tamamlandı. Bunun yoğunluğu saptandı. Bu işlem aynı distilat üzerinde 2 kez tekrarlandı. Belirlenen herbir yoğunluğa karşılık gelen alkol yüzdesi ve alkol derecesi belirlendi.

d= 0.9698                      Alkol yüzdesi= % 39.2                      Alkol derecesi= 50°

##### % 30 veya daha az alkol içeren preparatlar için alkol miktar tayini:

İlaçtan 25 ml alınıp ısısı ölçüldü. 20°C olduğu belirlendi. Üzerine eşit hacimde su ilave edildi ve distilasyona başlandı. 23 ml distilat elde edilene kadar işleme devam edildi. Elde edilen distilatın ısısı tekrar ölçüldü ve 20°C olduğu belirlendi. Distilat su ile 25 ml'ye tamamlandı. Bunun yoğunluğu belirlendi. Bu işlem aynı distilat üzerinde 2 kez tekrarlandı. Alkalometrik tablodan saptanan herbir yoğunluğa karşılık gelen alkol yüzdesi ve derecesi belirlendi.

d= 0.9337                      Alkol yüzdesi= % 39.7                      Alkol derecesi= 50°

#### 4.2. İzolasyon

##### 4.2.1. *n* -Butanol ile Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu

60 g etanol ekstresi 300 ml sıcak suda çözüldü. Bu çözelti soğuduktan sonra eşit miktarda *n* -butanol ile (6x300 ml) ekstre edildi. Butanollü kısım susuz sodyum sülfattan süzülükten sonra rotavaporda yoğunlaştırıldı.

#### 4.2.2. Kolon Kromatografisi

5x60 cm ebadındaki musluklu cam kolon, hekzan ile süspansiyon haline getirilmiş 500 g slikajel 60 (Art 7733, Merck) ile dolduruldu. 20 g butanol ekstresi kloroform-metanol karışımında çözüldü ve bir miktar silikajel ile karıştırıldı. Su banyosu üzerinde kurutulduktan sonra sütunun tepesine yerleştirildi ve hekzan ile elüsyona başlandı. Çözücü sisteminin polaritesi kloroform ile artırıldı. 500 ml'lik fraksiyonlar toplandı. Yoğunlaştırdıktan sonra İnce Tabaka Kromatografisi'nde incelendi ve benzer fraksiyonlar birleştirildi.

<u>Fraksiyon</u>	<u>Çözücü Sistemi</u>	<u>Miktar (mg)</u>
1-20	Hekzan	109
21-44	Hekzan	188
45-74	Hekzan	375
75-84	Hekzan	127
85-88	Hekzan: CHCl <sub>3</sub> (99.5: 0.5)	120
89-92	Hekzan: CHCl <sub>3</sub> (99.0: 1.0)	
93-96	Hekzan: CHCl <sub>3</sub> (95.0: 5.0)	
97-100	Hekzan: CHCl <sub>3</sub> (90.0: 10.0)	100
101-104	Hekzan: CHCl <sub>3</sub> (75.0: 25.0)	250
105-108	Hekzan: CHCl <sub>3</sub> (50.0: 50.0)	
109-112	CHCl <sub>3</sub>	

Beyaz renkli ve amorf görünümlü 45-74 numaralı fraksiyon İnce Tabaka Kromatografisinde incelendiğinde biri diğerine göre daha belirgin olan iki leke gözlemlendi. Bu fraksiyon 40°C'yi geçmeyen su banyosu ve ultrasonik banyoda metanolle muamele edildi, metanolde çözünmeyen beyaz renkli amorf yapıdaki kısım cam filtreden (Por ebadı: 3) süzülerek alındı. 160 mg olduğu belirlenen bu maddenin İnce Tabaka Kromatografisi'nde Bölüm 3.3.3.'de belirtilen 1,5,9,12,14,16 numaralı çözücü sistemlerinde incelenmesi sonucu tek bir leke gözlemlendi. Yapı tayini çalışmalarında bu madde kullanıldı..

### 4.2.3. İzole Edilen Maddenin Yapı Tayini

#### $\alpha$ -Amirin asetat

Butanol ekstresinden kolon kromatografisi yöntemi ile izole edilen beyaz renkli ve amorf görünüşlü bu madde Lieberman-Burchard reaksiyonu ile mavi-mor renk vererek triterpenik yapıda olduğunu gösterdi. Kütle spektrumunda  $\Delta^{12}$  pentasiklik terpenlerin karakteristik Retro-Diels-Alder pikini ( m/z 218) göstermesi ve  $^1\text{H}$  NMR spektrumunda  $\delta$  5.17 ppm'de triplet halinde gözlenen vinilik protonun varlığı  $\Delta^{12}$ -ursen tipi bir iskeletin varlığını kanıtladı.(3, 28).

$^1\text{H}$  NMR spektrumunda  $\delta$  2.05 ppm'de gözlenen singlet asetil grubunun metiline karşılık gelmektedir (28). IR spektrumunda 1729 ve 1249  $\text{cm}^{-1}$  deki bantlar molekülde ester karbonilinin varlığını desteklemektedir (87).

Kütle spektrumunda m/z 408 piki esterlerin Mc Lafferty çevrilmesiyle oluşturduğu iyon karşılık gelmekte, Retro-Diels-Alder'in sonucu ortaya çıkan m/z 189 piki temel pik olarak gözlenmektedir. (28, 87).

Bu spektral sonuçlar literatür bilgileriyle karşılaştırılarak izole edilen maddenin  $\alpha$ -amirin asetat olduğuna karar verildi.

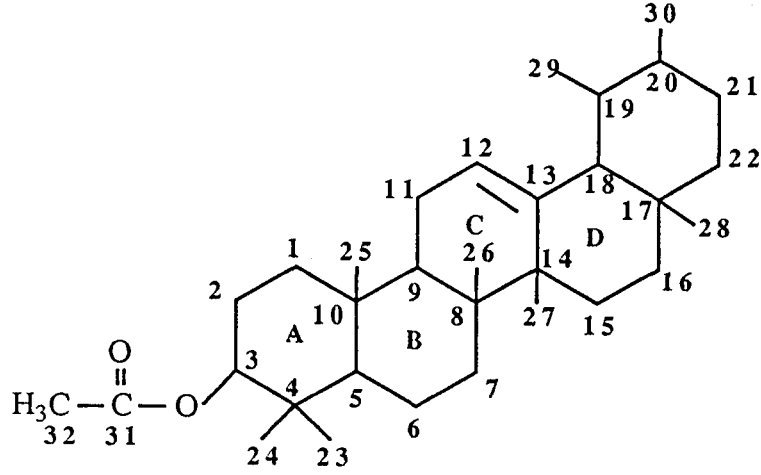
Bu maddenin daha önce hangi bitkilerden izole edildiği Tablo 6. da verilmiştir.

Tablo 6.  $\alpha$ -amirin asetatın daha önce izole edilmiş olduğu bitkiler

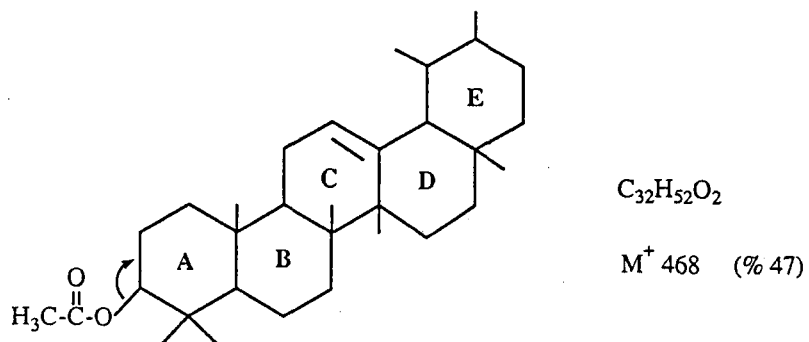
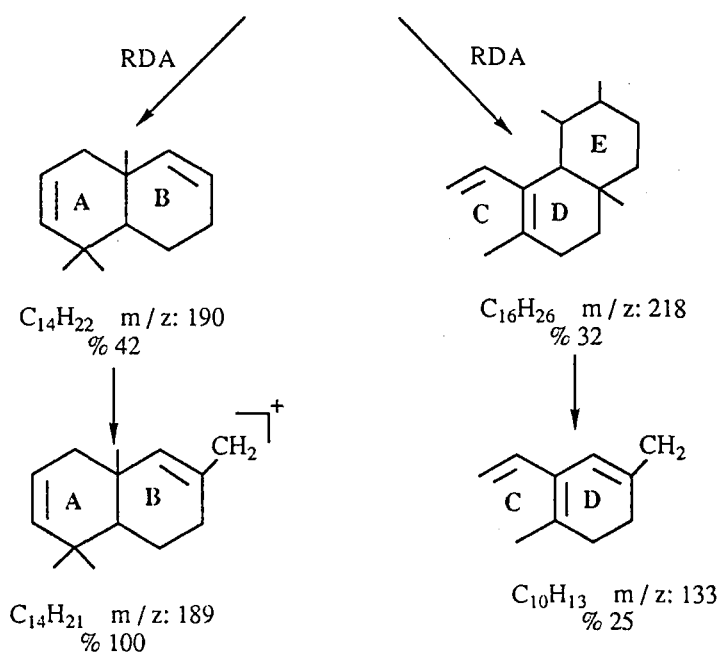
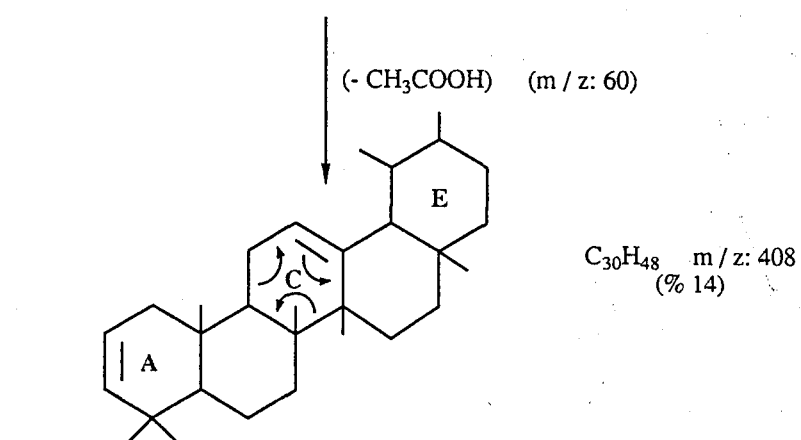
İzole Edildiği Bitki	Ülke	Kaynak No
<i>Achras sapota</i>	Pakistan	77
<i>Alstonia scholaris</i>	Hindistan	89
<i>Alyxia insularis</i>	Tayvan	47
<i>Ambrosia elatior</i>	Japonya	72
<i>Anacampta angulata</i>	Fransa	36
<i>Apocynum androsaemifolium</i>	Rusya	69
<i>Apocynum rannabinum</i>	Rusya	69
<i>Apocynum venetum</i>	Çin	103
<i>Arcticum lappa</i>	Bulgaristan	51
<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>	Hollanda	64
<i>Artemisia argyi</i>	Çin	60
<i>Artemisia vulgaris</i>	Hindistan	57

<i>Arundo donax</i>	Hindistan	20
<i>Asclepias linaria</i>	ABD	1
<i>Asclepias speciosa</i>	ABD	98
<i>Balanophora abbreviata</i>	Hindistan	102
<i>Canarium strictum</i>	Hindistan	43
<i>Capparis corymbosa</i>	Fransa	82
<i>Catharanthus pusillus</i>	Hindistan	34
<i>Catharanthus rosea</i>	Hindistan	56
<i>Chrysanthemum indicum</i>	İspanya	27
<i>Clerodendron nerifolium</i>	Hindistan	35
<i>Cnicus benedictus</i>	Türkiye	94
<i>Conopharyngia durissima</i>	İngiltere	41
<i>Cousinia canescens</i>	Türkiye	97
<i>Cousinia eriosephala</i>	Türkiye	96
<i>Daphne oleosephalus</i>	Türkiye	30
<i>Daphne pontica</i>	Türkiye	29
<i>Daphne tangutica</i>	Çin	100
<i>Diotis maritima</i>	İspanya	26
<i>Drymaria drummondii</i>	Meksika	31
<i>Ecdysanthera rosea</i>	Tayvan	48
<i>Ervatamia mucronata</i>	Filipin	42
<i>Ervatamia officinalis</i>	Çin	106
<i>Euphorbia aphylla</i>	Almanya	37
<i>Ficus racemosa</i>	Hindistan	86
<i>Finlaysonia obovata</i>	Hindistan	76
<i>Hoya australis</i>	Hollanda	17
<i>Ichnocarpus frutescens</i>	Hindistan	59
<i>Ixeris debilis</i>	Hindistan	4
<i>Ixeris dentata</i>	Hindistan	4
<i>Lasiocephalus ovatus</i>	İtalya	25
<i>Launaea resedifolia</i>	Mısır	2
<i>Lavandula pedunculata</i>	İspanya	80
<i>Lavandula stoechas</i>	Türkiye	95
<i>Madhuca latifolia</i>	Hindistan	5
<i>Manilkara hexandra</i>	Hindistan	73
<i>Marsdenia formosana</i>	Japonya	52
<i>Marsdenia koi</i>	Çin	104

<i>Marsdenia sinensis</i>	Çin	32
<i>Mathuca butyracea</i>	Hindistan	6
<i>Mimusops leandra</i>	Hindistan	68
<i>Mimusops manilkara</i>	Hindistan	67
<i>Mimusops manilkara</i>	Hindistan	66
<i>Paravallaris maingayi</i>	İngiltere	53
<i>Perezia coerullescens</i>	İspanya	61
<i>Periploca laevigata</i>	İspanya	16
<i>Planchonella novo zelandica</i>	Yeni Zelanda	18
<i>Podanthus mitique</i>	Şili	44
<i>Pouteria torta</i>	ABD	21
<i>Rholodendron degronianum</i>	Japonya	58
<i>Rothia trifoliata</i>	Hindistan	81
<i>Sambucus nigra</i>	Almanya	101
<i>Sambucus nigra</i>	Almanya	49
<i>Sarcostemma acidum</i>	Hindistan	13
<i>Scolymus hispanicus</i>	Türkiye	33
<i>Sonchus arvensis</i>	Japonya	45
<i>Sonchus asper</i>	Hindistan	12
<i>Spilanthus acemella</i>	Hindistan	92
<i>Streblus asper</i>	Hindistan	8
<i>Tabernaemontana coronaria</i>	Hindistan	88
<i>Tabernaemontana pacifica</i>	İngiltere	54
<i>Tabernaemontana subglobosa</i>	Tayvan	46
<i>Tabernaemontana verticosa</i>	Hollanda	83
<i>Trachomitum venetum</i>	Bulgaristan	71
<i>Tragopogon montanus</i>	Rusya	62
<i>Vernonia volkammeriaefolia</i>	Çin	7
<i>Vernonia fasciculata</i>	ABD	70
<i>Wrightia mollissima</i>	Hindistan	85
<i>Wrightia tomentosa</i>	Hindistan	63

(2)  $\alpha$ -Amirin asetat

İTK Sistemi, Rf	:	(1) 0.72, (5) 0.92, (9) 0.69, (12) 0.97, (14) 0.52, (16) 0.74
Görünüş	:	Beyaz, amorf
Erime noktası	:	211°C
Optik çevirmesi	:	250
UV (CHCl <sub>3</sub> )	:	$\lambda_{\max}$ 247.5 nm
IR (KBr)	:	$\nu_{\max}$ 2938, 1729, 1649, 1477, 1452, 1384, 1249, 1022, 992, 964, 899 cm <sup>-1</sup> .
NMR (CDCl <sub>3</sub> ) (200 MHz)	:	$\delta$ 5.17 (1H, t, H-12) 4.50 (1H, m) 2.05 (3H, s, asetil H) 1.12 (1CH <sub>3</sub> ) 0.96 (2CH <sub>3</sub> ) 0.85 (3CH <sub>3</sub> , s) 0.84 (1CH <sub>3</sub> ) 0.82 (1CH <sub>3</sub> )
Kütle Spektrumu	:	(70 eV) 468 (M <sup>+</sup> , C <sub>32</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub> , % 47) m/z 470 (M+2, % 3), 469 (M+1, % 17), 408 (% 14), 218 (% 32), 190 (% 42), 189 (% 100), 133 (25).

(2)  $\alpha$ -Amirin aasetat



#### 4.2.4. İTK-Dansitometrik miktar tayini

Miktar tayinlerinde 0.25 mm Silikajel G ile kaplanmış ve 105°C'de 1h süre ile aktif hale getirilmiş plaklar kullanıldı. Uygulamalar 2 µl ve 5 µl'lik pipetler ile yapıldı. Numune tatbik edilmiş olan plaklar, Hekzan: CHCl<sub>3</sub> (3:2) çözücü sisteminde develope edildikten sonra oda ısısında kurutuldu. VSA reaktifi püskürtülüp 4 dak süre ile ısıtıldı. Plak işlem sonunda 5 dak bekletildikten sonra İTK Dansitometresi'nde 560 nm'de tarandı ve CR3-A İntegratör ile kromatogramları alındı.

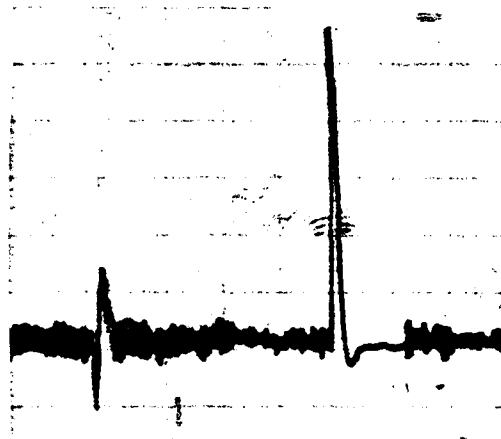
Etanol ekstresi ve ilacın kurutulmuş preparatındaki α-amirin asetat miktar tayini, aletin EXT 2 programı kullanılarak yapıldı. Etanol ekstresindeki tayinlerde İTK plağına standartın 0.2 mg/ml konsantrasyondaki çözeltisinden 2 µl ve 4 µl, ekstrenin 60.9 mg/ml konsantrasyondaki etanolik çözeltisinden 6 µl uygulanarak develope edildi. İlaçtaki tayinlerde ise 0.05 mg/ml ve 0.2 mg/ml konsantrasyondaki çözeltisinden 2 µl, ekstrenin 149.15 mg/ml konsantrasyondaki çözeltisinden ise 10µl uygulandı ve develope edildi. Develope işlemi sonucu her bir plak VSA reaktifi püskürtüldükten sonra 4 dak süre ile ısıtıldı. 5 dak oda ısısında ve karanlıkta soğumaya bırakıldı. İTK Dansitometredeki EXT 2 yöntemi kullanılarak miktar tayinine geçildi.

Etanol ekstresi içerisindeki miktarının % 0.15, ilaç içerisindeki miktarının ise % 0.01 olduğu belirlendi.

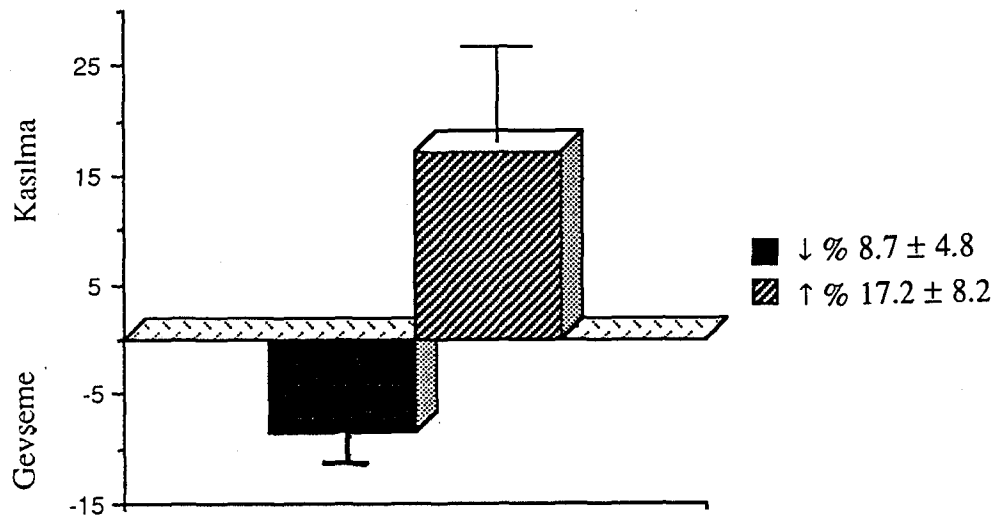
### 4.3. Farmakolojik Çalışmalar

#### 4.3.1. Etanol Ekstresi ile Yapılan Çalışma

Etanol ekstresi banyo konsantrasyonu 1.2 mg/ml olacak şekilde ortama verildi. Numunenin ileum preparatlarında bifazik cevaplar oluşturduğu ve asetilkolinin organda oluşturduğu kasılmaya oranla ortalama olarak  $\% 8.7 \pm 4.8$ 'lik bir gevşemeden sonra  $\% 17.2 \pm 8.2$ 'lik bir kasılma meydana getirdiği saptandı.



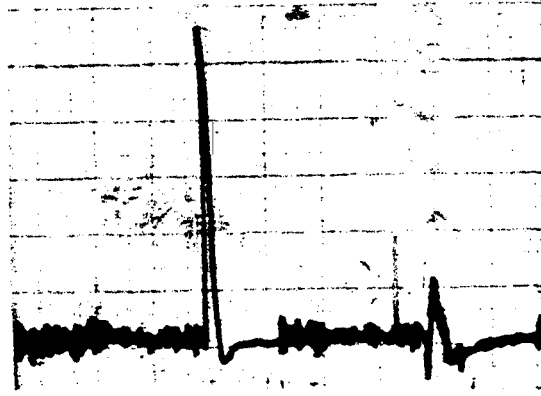
Şekil 1. Etanol ekstresinin ileum preparatı üzerine etkisi



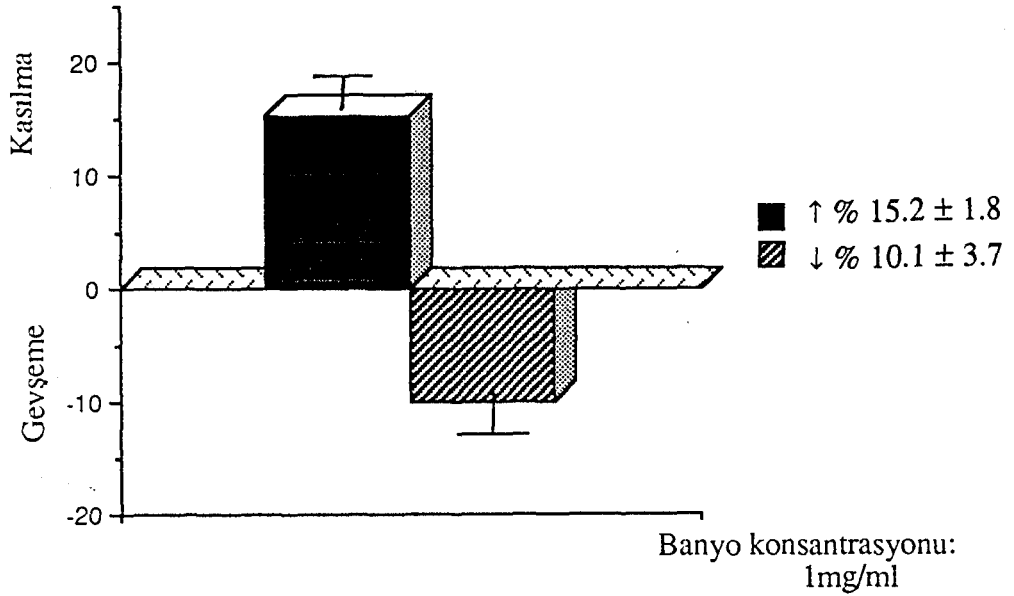
Şekil 2 Etanol ekstresinin ileum preparatındaki histogramı

#### 4.3.2. Butanol Ekstresi ile Yapılan Çalışma

Butanol ekstresi banyo konsantrasyonu 1mg/ml olacak şekilde ortama verildi. Numunenin ileum preparatlarında bifazik cevaplar oluşturduğu ve ortalama olarak % 15.2  $\pm$  1.8'lik bir kasılmadan sonra % 10.1  $\pm$  3.7'lik bir gevşeme meydana getirdiği ve barsak peristaltizmini düşürdüğü saptandı.



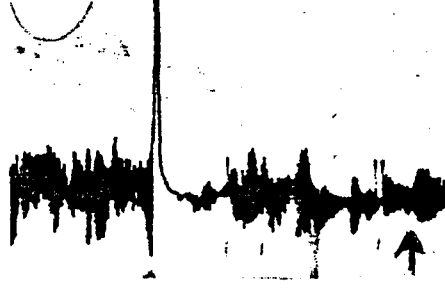
Şekil 3. Butanol ekstresinin ileum preparatı üzerine etkisi



Şekil 4. Butanol ekstresinin ileum preparatındaki histogramı

#### 4.3.3. Sulu Kısım ile Yapılan Çalışma

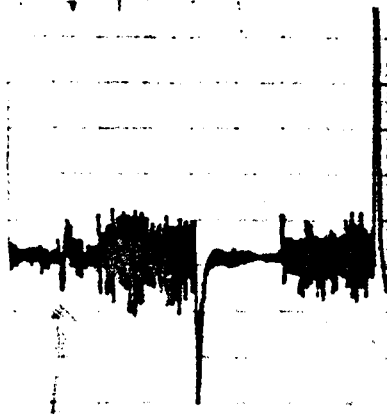
Sulu kısım banyo konsantrasyonu 1.2 mg/ml olacak şekilde ortama verildi. Numunenin preparatta kasıcı veya gevşetici bir etki oluşturmadığı gözlemlendi.



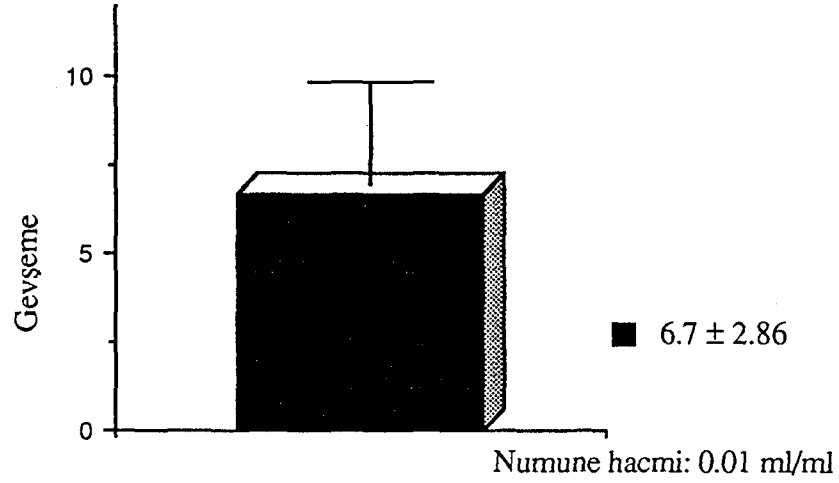
Şekil 5. Sulu kısmın ileum preparatı üzerine etkisi

#### 4.3.4. Lityazol Cemil ile Yapılan Çalışma

Lityazol Cemil 0.1 ml ortama uygulandı ve preparatta oluşturduğu etki gözlemlendi. Numunenin organı %  $6.7 \pm 2.9$  oranında gevşettiği ve barsak peristaltizmini düşürdüğü saptandı.



Şekil 6. Lityazol Cemil'in ileum preparatı üzerine etkisi



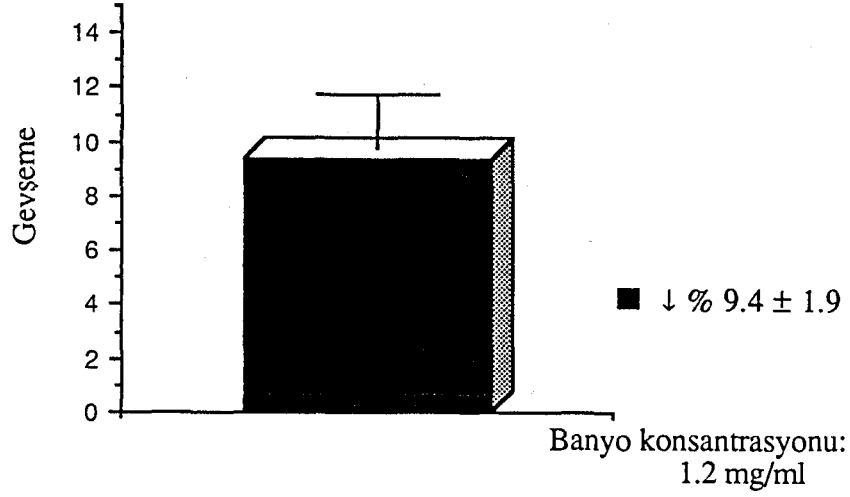
Şekil 7. Lityazol Cemil'in ileum preparatındaki histogramı

#### 4.3.5. Liyofilize İlaç ile Yapılan Çalışma

Lityazol Cemil liyofilize edildi ve 100 ml preparattan 20 g liyofilize ilaç elde edildi. Daha sonra bu ilacın sudaki 120 mg/ml'lik çözeltisi hazırlandı. Banyo konsantrasyonu 1.2 mg/ml olacak şekilde ortama verildi. Elde edilen verilerin değerlendirilmesi sonucunda numunenin organda %  $9.4 \pm 1.9$  oranında bir gevşeme oluşturduğu ve barsak peristaltizmini düşürdüğü saptandı.



Şekil 8. Liyofilize ilacın ileum preparatı üzerine etkisi



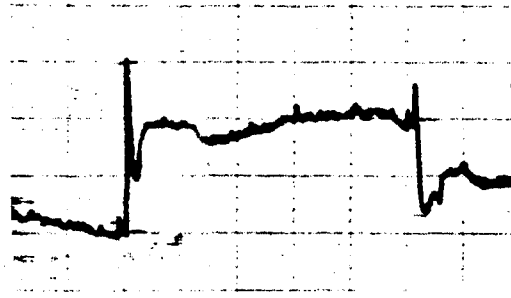
Şekil 9. Liyofilize ilacın ileum preparatındaki histogramı

Tablo 7. Numunelerin organda oluşturduğu cevaplar

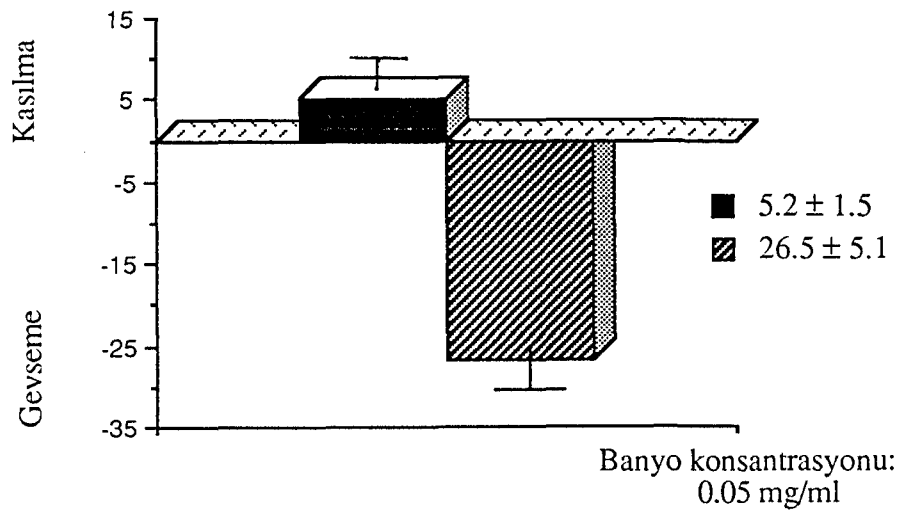
Kullanılan numune	Banyo konsantrasyonu	Direk kasıcı etki (%)	Direk gevşetici etki (%)	Bifazik Cevap (↑↓)	Bifazik Cevap (↓↑)
Etanol ekstresi	1.2 mg/ml	-	-	-	↓ 8.7 ± 4.8 ↑ 17.2 ± 8.6
Butanol ekstresi	1.0 mg/ml	-	-	↑ 26.5 ± 5.1 ↓ 10.1 ± 3.7	-
Sulu kısım	1.2 mg/ml	-	-	-	-
Lityazol Cemil	0.01 ml/ml	-	↓ 6.7 ± 2.8	-	-
Liyofilize ilaç	1.2 mg/ml	-	↓ 9.4 ± 1.9	-	-

#### 4.3.6. $\alpha$ -Amirin Asetat ile Yapılan Çalışma

$\alpha$ -Amirin asetatin DMSO deki 5 mg/ml'lik çözeltisi hazırlandı ve stabil hale getirilmiş preparata 0.1 ml uygulandı. Organda meydana gelebilecek değişiklikler dikkatle gözlemlendi. Alınan verilere göre numunenin organı belirgin bir şekilde gevşettiği saptandı. Bunun üzerine numunenin etkisinin asetilkolinin organda oluşturduğu kasılmayı inhibe etme derecesi araştırıldı. Bu amaçla banyo konsantrasyonu  $1 \times 10^{-6}$  M olan asetilkolin çözeltisi hazırlandı. Stabil haldeki organ bu çözelti ile inkübe edildikten sonra banyo konsantrasyonu  $5 \times 10^{-2}$  mg/ml olan numuneden ortama verildi. Numunenin organda bifazik cevaplar oluşturduğu saptandı. Yapılan hesaplamalara göre numunenin organı  $5.2 \pm 1.5$  oranında kastıktan sonra asetilkolinin organda oluşturduğu kasılmayı  $\% 26.5 \pm 5.1$  oranında inhibe ettiği saptandı.



Şekil 10.  $\alpha$ -Amirin asetatin ileum preparatı üzerine etkisi

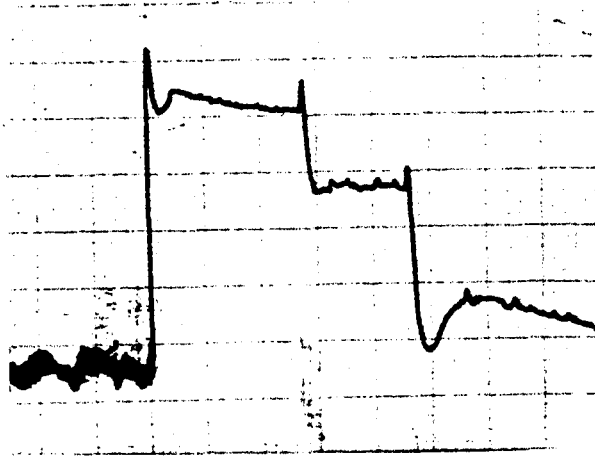


Şekil 11.  $\alpha$ -Amirin asetatin ileum preparatındaki histogramı

Bu etkinin numune konsantrasyonuna bağılı olup olmadığını belirlemek amacı ile kümülatif bir çalışma yapıldı. Asetilkolin çözeltisi ile inkübe edilmiş organa numune çözeltisinden artan konsantrasyonlarda uygulandı. Organda oluşan değişiklikler kaydediciden gözlenerek veriler değerlendirildi. Banyo konsantrasyonu  $5 \times 10^{-2}$  mg/ml olan numunenin organı  $\% 5.2 \pm 1.5$  oranında kastıktan sonra asetilkolinin oluşturduğu cevabı  $\% 26.5 \pm 5.1$  oranında inhibe ettiği buna karşılık banyo konsantrasyonu  $1 \times 10^{-1}$  mg/ml olan numunenin organı aynı oranda kastığı halde asetilkolinin oluşturduğu cevabı  $\% 45.8 \pm 4.2$  oranında inhibe ettiği belirlendi.

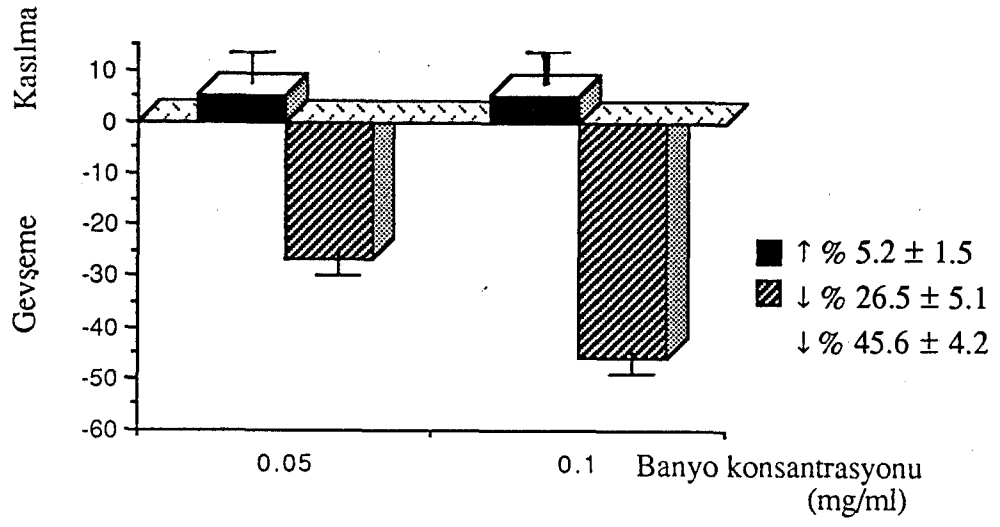
Tablo 8.  $\alpha$ -Amirin asetat ile yapılan kümülatif çalışma sonucu elde edilen veriler

Numune 5	Kasıcı etki ( $\uparrow$ )	İnhibisyon ( $\downarrow$ )
Banyo konsantrasyonu: 0.05 mg/ml	$\% 5.2 \pm 1.5$	$\% 26.5 \pm 5.1$
Banyo konsantrasyonu: 0.1 mg/ml	$\% 5.2 \pm 1.5$	$\% 45.8 \pm 4.2$



Şekil 12.  $\alpha$ -Amirin asetatın ileum preparatı üzerine doz bağımlı etkisi





Şekil 13.  $\alpha$ -Amirin asetatın oluşturduğu inhibisyonun histogramı

4.3.7. Akut Toksikite Testi: Bu çalışmada Lityazol Cemil'in LD50 değeri araştırıldı. Bu amaçla 20-24 g ağırlığındaki albino fareler kullanıldı.

LD50: 10 ml/kg (i.p.) olarak saptandı.

## 5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Lityazol Cemil isimli ilacın hammaddesini *Scolymus hispanicus*'un kök kabukları oluşturmaktadır. Droğun etken maddelerinin neler olabileceğini belirlemek amacıyla bir farmakognozik tarama yapılmış ve triterpenik bileşikler taşıdığı tespit edilmiştir.

Bu bileşiklerin ekstraksiyonu için en uygun yöntem ve çözücünün seçiminde ilacın üretim prosedürü dikkate alınarak çeşitli metodlar denenmiştir. Bunların içinde en yüksek verimin su ile kaynatmalı ekstraksiyonla sağlandığı tespit edilmiş ancak sulu ekstrenin fazla safsızlık içermesi ve yoğunlaştırma güçlüğü sebebiyle tercih edilmemiştir. En uygun verimin 4 saat süre ile % 70'lik etanolle kaynatmalı ekstraksiyon sonucu elde edildiği belirlenmiştir. Ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi ve sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile fraksiyonlama sırasında elde edilen numuneler İTK'den yararlanılarak ilaçla karşılaştırılmıştır.

Bu numunelerin ve ilacın izole sıçan ileumu üzerindeki farmakolojik etkileri araştırılmıştır. İlaçla benzer maddeleri taşıyan ve benzer etkiyi gösteren butanol ekstresi Kolon Kromatografisi ile fraksiyonlanmıştır. İzole edilen bileşiklerden birinin IR, UV, <sup>1</sup>H NMR ve Kütle Spektroskopisi yardımıyla yapısı tayin edilmiş ve bu bileşiğin  $\alpha$ -amirin asetat olduğu belirlenmiştir.

Farmakolojik çalışmalarda droğun % 70'lik etanol ile kaynatmalı ekstraksiyonu sonucu elde edilen ham ekstrenin izole organda bifazik cevap oluşturduğu belirlenmiştir. Bu sonuç drog içinde kasıcı ve gevşetici maddelerin bulunması nedeniyle olabilir. Ham ekstrenin butanol ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu sonucu elde edilen butanol fazı ile alınan cevapta kasılma daha fazla görülmüştür. Butanol ile ekstraksiyon sonucu geride kalan sulu kısmın kasıcı veya gevşetici etki göstermediği gözlenmiştir. Bu durumda farmakolojik etkiyi gösteren etken maddelerin butanol ekstresinde olduğu düşünülerek çalışmalar bu yönde sürdürülmüştür. Lityazol Cemil ile yapılan deneylerde ise sadece gevşetici etki görülmüştür. Bu cevabın ilacın bünyesinde bulunan alkolden oluşabileceği düşünülmüş ve liyofilize edilmiş ilacın sudaki çözeltisi ile tekrarlanan deneylerde gevşetici maddelerin bulunduğu belirlenmiştir. (Tablo 7.).

*Scolymus hispanicus* kök kabukları ile daha önce yapılan çalışmalarda triterpen yapısında  $\alpha$ -amirin,  $\alpha$ -amirin asetat,  $\alpha$ -amirin tetratriakontanoat,  $\alpha$ -amirenon, nonakosan (15,93,78), multiflorenol, multiflorenol asetat (15,93) izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Bu çalışmada izole edilen  $\alpha$ -amirin asetat bu bitki için bilinen bir bileşiktir.  $\alpha$ -amirin asetat ile ilgili literatür taramasının sonuçları Tablo 6.'da verilmiştir. Tabloda da görüldüğü gibi bilinen ve bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan bu bileşiğin

## KAYNAKLAR

- 1) Abbott, T., Peterson, R., Mc Alpine, J., Tjarks, L. and Bagby, M.: Comparing centrifugal countercurrent chromatography, nonaqueous reversed phase HPLC and Ag ion exchange HPLC for the separation and characterization of triterpene acetate. J. Lig. Chromatogr. 12 (12), 2281-301, 1989. CA. 112: 115082b (1990).
- 2) Abd El-Fattah, H., Zaghoul, A.M., Halim, A.F. and Waight, E.S.: Steroid and triterpenoid constituents of *Launaea resedifolia* (L.) Kuntze. Egypt. J. Pharm. Sci. 31 (1-4), 81-91, 1990. CA. 113: 148859j (1990).
- 3) Amdros, M., Girre, R.L.: Structure of two antiviral triterpene saponins from *Anagallis arvensis*. Phytochemistry 26 (3), 787-791, 1987.
- 4) Arai, Y., Kusumoto, Y., Nagao, M., Shiojima, K. and Ageta, H.: Compositae constituents; aliphatics and triterpenoids isolated from the whole plants of *Ixeris debilis* and *I. dentata*. Yakugaku Zasshi 103 (3), 356-9, 1983. CA. 98: 195005j
- 5) Awasthi, Y.C. and Mitra C.R.: *Mathuca latifolia*. Constituents of fruit pulp and nut shell. Phytochemistry 6(1), 121-5, 1967. CA: 66: 52934q (1967).
- 6) Awasthi, Y.C. and Mitra, C.R.: *Mathuca butyracea*. Constituents of the fruit pulp and the bark. Phytochemistry 7 (4), 637-40, 1968. CA. 69: 8885n (1968).
- 7) Bai, Y., Lou, W. and Liu, Y.: Chemical constituents of large leaf ironweed (*Vernonia volkameriaefolia*). Zhongcaoyao 16 (12), 530-2, 1985. CA. 104: 106272w (1986).
- 8) Barud, A.K., Pal, S.K. and Basu, K.K.: Chemical examination of *Streblus asper*. J. Indian Chem. Soc. 45 (1), 87, 1968. CA. 69: 93496h (1968).
- 9) Başer, K.H.C.: 60 Yıllık Bir Türk Bitkisel İlacı. Prof. Dr. Sarım Çelebiođlu Anısına Bilimsel Toplantı. İstanbul, 18 Mayıs 1992.
- 10) Baytop, A.: Farmasötik Botanik. İstanbul Üniversitesi Yayınları No:3158. İstanbul, s. 310, 1991.
- 11) Baytop, T.: Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi. İstanbul Üniversitesi Yayınları No:3255. İstanbul, s. 222, 1984.
- 12) Behari, M., Gupta, R., Itoh, T. and Matsumoto, T.: Benzine extract from *Sonchus asper*. A rich source of pentacyclic triterpenoids. Yukagaku 29 (2), 82-5, 1980. CA. 92: 211784w (1982).
- 13) Beri, R.M. and Sharma, O.P.: Chemical examination of *Sarcostemma acidum*. Indian J. Chem. 1 (11), 501, 1963. CA. 60: 4194f (1964).

- 14) Berkan, D. ve akıroğlu, A.: *Cnicus benedictus* (Linne) Droğları Sulu Ekstrelerin Farmakolojik zellikleri. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 6 (1): 61-70, 1967.
- 15) Berkan, T.: "Şevketi bostan" Bitkisinde Yapılan Farmakolojik alıŐmalar (Tez),1977.
- 16) Bermejo Barrera, J., Breton Funes, J., De la Fuente, G. and Gonzalez Gonzales, A.: Triterpenes and sterols from *Periploca laevigata*. An. Rea Soc. Espan. Fis. Quim.,Ser. B 82 (7-8), 859-64, 1966. CA. 67: 32839e (1967).
- 17) Boas, W.J. and Nieman, G.J.: Investigations on Hoya species. I. Latex lipids of *Hoya australis* R. Br. ex Traill. and the effects of age of the plant part and of environmental factors there upon. Plant. Med. 35 (4), 348-53, 1979. CA. 91: 137119u (1979).
- 18) Cambie, R.C. and Parnell, J.C.: New Zealand phytochemical survey. N.Z.J. Sci. 12 (3), 453-66, 1969. CA. 72: 705v (1970).
- 19) Chaudhari, A., Chaturvedi, A.K., Parmar, S.S. and Brumleve, S.J.: Antiproteolytic activity of amyirin acetate. Pharmacol 7(1), 205-8, 1974. CA. 80: 103847n (1974).
- 20) Chaudhuri, R.K. and Ghosal, S.: Triterpenes and sterols of the leaves of *Arundo donax*. Phytochemistry 9 (8), 1895-6, 1970. CA. 73: 112855w (1970).
- 21) Che, C.T., Koike, K., Cordell, G.A., Fong, H.H.S. and Dobberstein, R.H.: Triterpenes of *Pouteria torta* (Sapotaceae). J. Nat. Prod. 43 (3), 420-1, 1980. CA.93: 66135z (1980).
- 22) Cingi, M.İ. ve Erol, K.: *Scolymus hispanicus* bitkisinin farmakolojik ve toksikolojik ynden değerlendirilmesi. Anadolu Tıp Dergisi 24 (2): 1992 (Baskıda).
- 23) Ciulei, I.: I. Methodology for analysis of vegetable drugs. "Arta Grafica" Printing House, 1982.
- 24) Davis, P.H.: Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburg University Press, Edinburg 5: 624-625, 1975.
- 25) De Bernardi, M., Vidari, G., Vita-Finzi, P., Abdo, S., Marinoni, G. and Mellerio, G.: Metabolites of medicinal plants II. Furanoeremophilanes from *Lasiocephalus ovatus*. Gazz. Chim. Ital. 118 (8), 565-8, 1988. CA. 110: 36726v (1989).
- 26) De Pascual Teresa, J., Barrero, A.F. and San Feliciano, A.: *Diotis maritima* (smith) components. I. An. Quim. 73 (12), 1525-6, 1977. CA. 89: 176303c (1978).

- 27) De Pascual-T., J., Bellido, I.S., Salado, V.J.R., Moliner, F. and Alberdi, M.R.: Components of *Chrysanthemum indicum* Linnaeus (var. cult.). Riv. Ital EPPOS 62 (5), 236-8, 1980. CA. 94: 52674h (1981).
- 28) Dey, P.M., Harbarne, J.B.: Methods in Plant Biochemistry 7, 332-357, New York, 1991.
- 29) Doganca, S. ve Apak, S.: Phytochemical investigation of *Daphne pontica* L. Marmara Univ. Ecz. Derg. 2 (2), 157-60, 1986. CA. 107: 74315f (1987).
- 30) Doganca, S. ve Laloglu, S.: Phytochemical Investigation of *Daphne oleoides* Schreb. subsp. *oleoides*. Marmara Univ. Eczacılık Derg. 3 (1), 71-3, 1987. CA. 110: 218892d (1989).
- 31) Dominguez, X.A., Marroquin, J. and Gutierrez, M.M.: Triterpene acetates and D-(+)-pinitol from *Drymaria drummondii*. Phytochemistry 14 (3), 815-16, 1975. CA. 83: 93847h (1975).
- 32) Du, F., Lou, F., Wu, M., Yong, Z. and Huang, B.: Studies on the constituents of maoluomo (*Marsdenia sinensis*) I. Zhongcaoyao 17 (7), 290-3, 1986. CA. 105:168930p (1986).
- 33) Erciyas, E. and Baysal, M.  $\alpha$ -Amyrin tetratriacontanoate, A New Triterpene from *Scolymus hispanicus* L.. Pharmazie 44: 580 H. 8, 1989.
- 34) G. Don Subramanian, P.S. and Lakshmanan, A.J.: Steroids and triterpenoids of *Catharanthus pusillus*. Indian J. Chem. Sect. B 19 B (4), 331-2, 1980. CA: 93: 201006a (1980).
- 35) Ganapaty, S. and Rao, D.: Triterpenoids of the stem bark of *Clerodendron nerifolium*. Indian J. Pharm. Sci. 47 (4), 167-8, 1985. CA. 105: 21725s (1986).
- 36) Garnier, J., Mahuteau, J. and Moretti, C.: Terpenoids and alkaloids from *Anacampta angulata*. J. Nat. Prod. 47 (1), 191, 1984. CA. 100: 188767r (1984).
- 37) Guelz, P.G., Bodden, J., Mueller, E. and Marner, F.J.: Epicuticular wax of *Euphorbia aphylla* Brouss. ex. Willd., Euphorbiaceae. Z. Naturforsch., C.: Biosci. 43 (1-2), 19-23, 1988. CA. 108: 3779r (1988).
- 38) Gupta, M.B., Bhalla, T.N., Gupta, G.P., Mitra, C.R. and Bhargava, K.P.: Antiinflammatory activity of natural products. I. Triterpenoids. Eur. J. Pharmacol. 6(1), 67-70, 1969. CA. 71: 28933w (1969).
- 39) Gürel, G., Şengül, F. ve Özcan, A.: Lityazol Cemil'in üriner sistem taş hastalığının tedavi ve profilaksisindeki yeri. Üroloji Kongresi -Datça, 1.1.1983-31.12.1984.
- 40) Güven, K.C.: Tıbbi ve Kozmetik Formülleri. Modern Ofset, 418, 1988.

- 41) Hanna, R.: Neutral constituents of *Conopharyngia durissima*. Lloydia 27 (1), 40-6, 1964. CA.61:11009g (1964).
- 42) Herrera, C. L., Capal, T.V., Agustin, R.G., Chanco, G.L. and Santos, A.C.: Triterpene constituents of *Ervatamia mucronata* Merr. and *Ervatamia pandacaqui* Pich. Philipp. J. Sci. 115 (3), 233-42, 1986. CA. 107: 93485c (1987).
- 43) Hinge, V.K., Wagh, A.D., Paknikar, S.K. and Bhattacharyya, S.C.: Terpenoids. LXXI. Constituents of Indian black dammar resin. Tetrahedron 21 (11), 3197-203, 1965. CA. 64: 6698g (1966).
- 44) Hoeneisen, M., Silva, M. and Watson, W.H.: Some constituents of *Podanthus mitique*. Rev. Latinoak. Quim 11 (2), 63, 1980. CA. 93: 210154z (1980).
- 45) Hooper, S.N., Chandler, R.F., Lewis, E. and Jamieson, W.D.: Simultaneous determination of *Sonchus arvensis* L. triterpenes by gas chromatography-mass spectrometry. Lipids 17 (1), 60-3, 1982. CA. 96: 129834m (1982).
- 46) Huang, K.F., Huang, L.J., Lai, J.S. and Chang S.Y.: Constituents of the twigs of *Tabernaemontana subglobosa* Merr. Chung-hua Yao Hsueh Tsa Chih 43 (2), 109-15, 1991. CA. 115: 110630f (1991).
- 47) Huang, K.F., Lai, J.S and Yuh, Y.F.: Studies on the constituents of the stems of *Alyxia insularis* Kanehira and Sasaki. Chung-hua Yao Hsueh Tsa Chih 42 (1), 17-22, 1990. CA. 113: 168941h (1990).
- 48) Huang, K.F., Sy, M.L. and Lai, J.S.: A new pentacyclic triterpene from *Ecdysanthera rosea*. J. Chin. Chem. Soc. (Taipei) 37 (2), 187-9, 1990. CA. 113: 129329v (1990).
- 49) Huneck, S., Snatzke, G.: Triterpenes. IX. The triterpenes from the bark of *Sambucus nigra* and the preparation of 3-eipursolic acid. Chem. Ber. 98 (1), 120-5, 1965. CA. 62: 10469c (1965).
- 50) Huxley, A. and Taylor: *Flowers of Greece and Aegean*. Chatto and Windus. London, p. 137, 1977.
- 51) Iochkova, I., Mladenova, K. Zakhariyeva, E., Tsutsulova, A., Apostolova, B. and Kuleva, L.: Triterpenoids and sterol from roots of *Arcticum lappa*. Dokl. Bolg. Akad. Nauk, 43 (9), 57-9, 1990. CA. 112: 195249z (1990).
- 52) Ito, K. and Lai, J.: Studies on the constituents of *Marsdenia formosana* Masamune. I. Isolation of triterpenoids and structure of marsformol. Yakugaku Zasshi 98 (3), 249-56, 1978. CA. 89: 3158f (1978).

- 53) Jewers, K. and Manchanda, A.M.: Constituents of the Apocynaceae.III.Triterpenoids of *Paravallaris maingayi* bark. Phytochemistry 9(10), 2249, 1970. CA. 74: 50545e (1971).
- 54) Jewers, K., Manchanda, A.M. and Aplin, R.T.: Constituents of the Apocynaceae.I. Petroleum ether extractives of *Tabernaemontana pacifica*. Phytochemistry 8(9), 1833-4, 1969. CA. 71: 109798h (1969).
- 55) Kayaalp, O.: Rasyonel Tedavi Yönünden Tibbi Farmakoloji,1,p.367-369,1989.
- 56) Khan, N. and Chakraborty, D.P.:  $\alpha$ -Amyrin acetate from *Catharanthus rosea* Linn. J. Indian Chem. Soc. 58 (6), 628-9, 1981. CA. 95: 39528s (1981).
- 57) Kundu, S.K., Chatterjee, A. and Rao, A.: Chemical investigation of *Artemisia vulgaris*. J. Indian Chem. Soc. 46 (6), 584-94, 1969. CA. 71: 88415p (69).
- 58) Kurihara, T., Kikuchi, M., Suziki, S. and Toyoda, E.: Studies on the constituents of leaves of *Rhododendron degronianum* Carr. Yakugaku Zasshi 96 (12), 1407-11, 1976. CA. 86: 117585m (1977).
- 59) Lakshmi, D.K.M., Rao, E.V.and Rao, D.V.: Triterpenoid constituents of *Ichnocarpus rutescens*. Indian Drugs 22 (10), 552-3, 1985. CA. 103: 193186s (1985).
- 60) Lao, L., Fujimoto, Y. and Tatsuno, T.: Studies on the *Artemisia argyi* Levl and Vant. Chem. Pharm. Bull. 32 (2), 723-7, 1984. CA. 100: 206503h (1984).
- 61) Lock de Ugaz, O. and Salazar, C.: Isolation and identification of two triterpenes from *Perezia coerulea* Wedd. Bol. Soc. Quim. Peru 48 (3), 139-47, 1982. CA. 99: 136849k (1983).
- 62) Lugovskaya, S.A. and Plekhanova, N.V.:  $\alpha$ -Amyrin acetate from *Tragopogon montanus*. Khim. Prir. Soedin (5),730, 1980. CA. 94: 99789q (1981).
- 63) Maiti, P.C. and Beri, R.M.: Triterpenoids. I.  $\alpha$ -amyrin from *Wrightia*. Current Sci. India 31, 95, 1962. CA. 57: 12555i (1962).
- 64) Malterud, K.E.: The non-polar components of *Arctostaphylos uva-ursi* leaves. Medd. Nor. Farm. Selsk. 42 (1), 15-20, 1980. CA. 93: 146372q (1980).
- 65) Meriçli, A. and Tuzlacı, E.. Cardueae tribusundaki (Compositae) Bazı Türlerin Meyvalarının Flavonolignanlar Yönünden Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Mecmuası 19: 89, 1983.
- 66) Misra, G., Mitra, C.R.: *Mimusops manilkara*, constituents of fruit and seed. Phytochemistry, 8 (1), 249-52, 1969. CA. 70: 54854u (1969).

- 67) Misra, G., Nigam, S.K. and Mitra, C.R.: Constituents of *Mimusops manilkara* leaves and saponins of *Mimusops* seed kernels. Phytochemistry 8 (11), 2255-6, 1969. CA. 72: 51818s (1970).
- 68) Mitra, C.R. and Misra, G.: *Mimusops hexandra*. I. Constituents of fruit and seed. Phytochemistry 4 (2), 345-8, 1965. CA. 63: 927r (1965).
- 69) Murzagaliev, U.M., Tegisbaev, E.T., Patkhullaeva, M. and Abubakirov, N.K.:  $\alpha$ -Amyrin acetate from *Apocynum*. Khim. Prir. Soedin (4), 579-80, 1977. CA. 87: 164246g (1977).
- 70) Narain, N.K.: Pentacyclic triterpenoids of *Vernonia fasciculata* Michx. Can. J. Pharm. Sci 12(1), 18-20, 1977. CA. 86: 167878e (1977).
- 71) Ognyanov, I., Funtarov, D., Hivkov, H. and Danov, D.: Phtochemical studies of the subterranean parts of *Trachomitum venetum*. Planta Med. 15 (3), 287-92, 1967. CA. 67: 97663n (1967).
- 72) Ohmoto, T., Nikaido, T. and Ikuse, M.: Constituents of pollen II Constituents of pollen grains of *Ambrosia elatior*. Yakugaku Zasshi 94 (3), 362-6, 1974. CA. 81:117063m (1974).
- 73) Pant, P. and Rastogi, R.P.: Hexandrin, a new triterpene from *Manilkara hexandra* (Roxb.) Dub. Indian J. Chem., Sect. B 15B(10), 911-13, 1977. CA. 88: 136806s (1978).
- 74) Polunin, O. and Huxley, A.: *Flowers of the Mediterranean*. Chatto and Windus. London, p. 192, 1991.
- 75) Polunin, O. and Smythles, B.E.: *Flowers of South-West Europe*. Oxford University Press, p. 376, 1973.
- 76) Pradhan, B.D. and Mukhopadhyay, M.M.: Chemical investigation on *Finlaysonia obovata* Wall. J. Indian Chem. Soc. 62 (8), 629, 1985. CA. 104: 126584c (1986).
- 77) Rehana, A., Tabassum, S. and Ifzal, S.M.: Studies on *Achras sapota* L.; Part III. Isolation and identification of some triterpenoids from the leaves of *Achras sapota* L. Pak. J. Pharm. Sci. 2 (2), 33-6, 1989. CA. 115: 68399k (1991).
- 78) Romussi, G. and Ciarallo, G.: Flavonoid verbindungen aus *Scolymus hispanicus* L. Pharmazie 33: 685-686 H. 10, 1978.
- 79) Rubio, B., Diaz, A.M., Velazquez, M.P. and L.Villaescusa. Caffeoyl and Flavonoid Compounds in *Scolymus hispanicus*. Planta Medica 57: Supp. issue 2, 1991.



- 80) Sanches, A. and Basabe, P.: "*Lavandula pedunculata* Cav." components. An. Quim. 74 (4), 675-7, 1978. CA. 89: 160109h (1978).
- 81) Sastry, B.S., Bhagavan Raju, M. and Venkata Rao, E.: Chemical examination of the aerial parts of *Rothia trifoliata*. Indian Drugs 23 (10), 581-2, 1986. CA. 106: 23126s (1987).
- 82) Sawadogo, M., Tessier, A.M. and Delaveau, P.: Chemical study of *Capparis corymbosa* Lam roots. Plant. Med. Phytother 15 (4), 234-9, 1981. CA: 97: 3625w (1982).
- 83) Schripsema, J., Hermans-Lokkerbol, A., Van der Heijden, R., Verpoorte, R., Suendsen, A.B. and Van Beek, T.A.: Pharmacognostical studies of *Tabernaemontana* species. Part 18. Alkaloids of *Tabernaemontana vertricos*. J. Nat. Prod. 49 (4), 733-5, 1986. CA. 105: 178282t (1986).
- 84) Sezik, E. ve Toker, G.: Bazı Triterpenik Saponozitlerin İTK ile ayırımı. Eczacılık Bülteni 24 (3): 38-42, 982.
- 85) Sharma, M.P., Srivastava, S.P., Mahesh, V.K., Saluja, M.P. and Sharma, J.C.: Chemical investigation of *Wrightia mollissima*. J. Indian Chem. Soc. 59 (6), 810-11, 1982. CA. 97: 159522w (1982).
- 86) Shrivastava, P.N., Mishra, G.S. and Sukla, Y.N.: Chemical constituents of *Ficus racemosa* Linn. Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. A 47 (1), 1-3, 1977. CA. 89: 176335q (1978).
- 87) Silverstein, R.M., Bassler, G.C., Morrill, T.C.: Spectrometric identification of organic compounds. USA, 1981.
- 88) Talapatra, B., Patra, A. and Talapatra, S.K.: Terpenoids and alkaloids of the leaves of *Tabernaemontana coronaria*. Phytochemistry 14(7), 1652-3, 1975. CA. 84: 14651j (1976).
- 89) Talapatra, S.K., Sengupta, S., Banerjee, S. and Talapatra, Mrs. B.: Terpenoids and related compounds. IV Neutral constituents of the root and root bark of *Alstonia scholaris*. J. Indian Chem. Soc. 45 (12), 1183-5, 1968. CA. 70: 93941v (1969).
- 90) Tanker, M., Yenen, M. ve Sarioğlu, Y. , *Scolymus hispanicus* kök kabukları Ekstrelerinin Farmakolojik Etkileri: Antispazmodik Etki. Pharmazia-JTPA 24: 52(2): 95-104, 1984.
- 91) The United States Pharmacopeia-Twentieth Revision, p.937-938, 1980.
- 92) Tiwari, H.P. and Kakkar, A.: Phytochemical examination of *Spilanthes acemella* (Murr.). J. Indian Chem. Soc. 67 (9), 784-5, 1990. CA. 114: 182120s (1991).

- 93) Ulubelen, A. and Berkan, T.: Triterpenic and Steroidal Compounds of *Cnicus benedictus*. Planta Medica 31: 375-377, 1977.
- 94) Ulubelen, A. and Berkan, T.: Triterpenic and steroidal compounds of *Cnicus benedictus*. Planta Med. 31(4), 375-7, 1977. CA. 90: 76459k (1979).
- 95) Ulubelen, A. ve Olcay, Y.: Triterpenoids from *Lavandula stoechas* subsp. *stoechas*. Fitoterapia 60 (5), 475-6, 1989. CA. 112: 136010s (1990).
- 96) Ulubelen, A. ve Tuzlacı, E.: Flavonoids and terpenoids from *Cousinia eriosephala*. Fitoterapia 59 (4), 350, 1988. CA. 111:93881m (1989).
- 97) Ulubelen, A., Tuzlacı, E. ve Meriçli, A.: Triterpenic and steroidal compounds from *Cousinia canescens*. Fitoterapia 57 (4), 269-70, 1986. CA. 106: 99358q (1987).
- 98) Van Emon, J. and Seiber, J.N.: Chemical constituents and energy content of two milkweeds, *Asclepias speciosa* and , *A. curassavica*. Econ. Both. 39 (1), 47-55, 1985. CA.102: 169624s (1985).
- 99) Wagner, H., Blatt, S. and Zgainski, E.M.: Plant Drog Analysis. Berlin Heidelberg Newyork Tokyo, p. 226-300, 1984.
- 100) Wang, M., Liu, W. and Xin, L.: Chemical constituents of *Daphne tangutica* Maxim. Nanjing Yaoxueyuan Xuebao (2), 1-5, 1984. CA. 102:42903b (1985).
- 101) Willuhn, G. and Richter, W.: The constituents of *Sambucus nigra* II. The lipophilic components of the flowers. Planta Med. 31 (4), 328-43, 1977. CA. 90: 51444p (1979).
- 102) Yadagiri, B., Raj, K. and Rao, G.S.R.: Triterpenoids from *Balanophora abbreviata* and *Balanophora indica*. J. Nat. Prod. 47 (1), 182, 1984. CA. 100: 153855r (1984).
- 103) Yan, X., Mei, X., Luan, X. and Qian, X.: Constituents of the stems of *Apocynum venetum* Linn. Shangai Diyi Yixueyuan Xuebao 12(4), 265-9, 1985. CA. 103: 175427s (1985).
- 104) Yuan, J., Ji, Q., Chen, G. and Ding, W.: Constituents of *Marsdenia koi* Tsiang. Zhongcaoyao, 21 (7), 290-1, 1990. CA. 114: 3477u (1991).
- 105) Zeybek, N.: Farmasötik Botanik. Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınlar No:1. Ege Üniversitesi Basımevi, s. 337, 1985.
- 106) Zhou, Y., Huang, L., Hu, Y., Yang, B., Wang, C., Li, Z. and Tao, G.: Alkaloids of medicinal ervatamia ( *Ervatamia officinalis*). Zhongcaoyao 19 (12), 534-6, 1988. CA. 111: 17218k (1989).