

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

34736

SMİLAX EXCELSA L. BİTKİSİNİN İÇERDİĞİ
FLAVONOİDAL BİLEŞİKLER

Kimyager Günay BAĞ

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı: Prof.Dr.Süheyla UZMAN

İSTANBUL, 1994

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL LİSTESİ	I
TABLO LİSTESİ	II
TEŞEKKÜR	III
ÖZET	V
ABSTRACT	VII
1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI	1
2. TEORİK BÖLÜM	2
2.1. BİTKİYE AİT GENEL BİLGİLER	2
2.1.1. Liliaceae Familyası	2
2.1.2. Smilax Cinsi	3
2.1.3. Smilax Excelsa L.	3
2.2. SMİLAX TÜRLERİNİN FARMAKOLOJİK ÖZELLİKLERİ VE HALK ARASINDA KULLANIMI	4
2.3. SMİLAX TÜRLERİ İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR	6
2.4. GENEL BİLGİLER	7
2.4.1. Flavonoidler	7
2.4.1.1. Yapıları	7
2.4.1.2. Dağılımları ve Oluşumları	12
2.4.1.3. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	15
2.4.1.4. Fitokimyasal Ön Denemeler ile Saptanmaları	17
2.4.1.5. Elde Edilmeleri	18
2.4.1.5.1. Bitkiden Ayrılmaları	18
2.4.1.5.2. Kromatografik Yöntemler	19
2.4.1.6. Tanınmaları	25

2.4.1.6.1.	Renk Reaksiyonları	25
2.4.1.6.2.	Spektral Yöntemler	29
2.4.1.7.	Farmakolojik Özellikleri	36
3.	DENEYSEL BÖLÜM	38
3.1.	GENEL YÖNTEMLER	38
3.1.1.	Kromatografik Yöntemler	38
3.1.1.1.	Kolon Kromatografisi	38
3.1.1.2.	İnce Tabaka Kromatografisi	39
3.1.2.	Belirteçler	39
3.1.2.1.	TLC Belirteçleri	39
3.1.2.2.	UV Spektrumu Kayma Belirteçleri	40
3.2.	YAPILAN İŞLEMLER	41
3.2.1.	Bitkinin Tüketilmesi	41
3.2.2.	Alkol Ekstresine Uygulanan İşlemler	41
3.2.3.	Bileşiklerin Fraksiyonlandırılması ve Tanınması	42
3.2.4.	Uygulanan Kimyasal Reaksiyon	42
3.3.	ÇALIŞMADA ELDE EDİLEN BİLEŞİKLER	45
3.3.1.	F ₁ Bileşiği: Kersetin-3,3'-dimetil eter	45
3.3.2.	F ₂ Bileşiği: Kersetin-3-O-glikozid	50
	SONUÇ VE TARTIŞMA	58
	KAYNAKLAR	59
	ÖZGEÇMİŞ	61


ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 2.1. Flavonoidal bileşikler
- Şekil 2.2. Flavonoidlerin hidroksilli türevleri
- Şekil 2.3. İsoflavon grubundan bileşikler
- Şekil 2.4. Flavonoidlerde şekerlerin bağlanma şekilleri
- Şekil 2.5. İkincil metabolitlerin oluşumu
- Şekil 2.6. Flavonun bozunma ürünleri
- Şekil 2.7. Flavonoidal bileşiğin borik asit ile oluşturduğu kompleks
- Şekil 2.8. Silikajel yapısı
- Şekil 2.9. Selüloz yapısı
- Şekil 2.10. Perlon tipi poliamid üzerinde ayırma esası
- Şekil 2.11. Sefadeks yapısı
- Şekil 2.12. Flavonoid molekülünün absorpsiyondan sorumlu bölgeleri
- Şekil 3.1. F₁ Bileşiği MeOH (-) ve NaOMe (---) UV Spektrumu
- Şekil 3.2. F₁ Bileşiği AlCl₃ (-) ve AlCl₃/HCl (---) UV Spektrumu
- Şekil 3.3. F₁ Bileşiği NaOAc (-) ve NaOAc/H₃BO₃ (---) UV Spektrumu
- Şekil 3.4. F₂ Bileşiği MeOH (-) ve NaOMe (---) UV Spektrumu
- Şekil 3.5. F₂ Bileşiği AlCl₃ (-) ve AlCl₃/HCl (---) UV Spektrumu
- Şekil 3.6. F₂ Bileşiği NaOAc (-) ve NaOAc/H₃BO₃ (---) UV Spektrumu
- Şekil 3.7. Hidroliz edilen F₂ Bileşiği MeOH (-) ve NaOMe (---) UV Spektrumu
- Şekil 3.8. Hidroliz edilen F₂ Bileşiği AlCl₃ (-) ve AlCl₃/HCl (---) UV Spektrumu
- Şekil 3.9. Hidroliz edilen F₂ Bileşiği NaOAc (-) ve NaOAc/H₃BO₃ (---) UV Spektrumu


TABLO LİSTESİ

- Tablo 2.1. Flavonoid yapısı ve spot rengi arasındaki ilişki
- Tablo 2.2. Flavonoidal bileşiklerin renk reaksiyonları





Bu çalışmanın yapılmasında büyük katkı ve desteğini esirgemeyen ve çalışma süresi boyunca bilgi ve nerileri ile yol gösteren Sayın hocam Prof.Dr.Süheyla UZMAN'a, çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimleri ile büyük katkıları olan İ.. Eczacılık Fakültesi ğretim yesi Sayın Prof.Dr.Ayhan ULUBELEN'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.



Herbaryumlarını kullanma olanağını sağlayan ve bitkinin toplanmasında, tanınmasında değerli yardımlarını esirgemeyen İ.Ü. Orman Fakültesi Öğretim Üyesi Sayın Doç.Dr.Asuman EFE'ye teşekkürü bir borç bilirim.

ÖZET

Bu çalışmada *Smilax excelsa* bitkisinin meyvaları flavonoidal bileşikler yönünden incelendi.

Smilax excelsa bitkisinin meyvaları Kasım 1992'de İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesine ait Arboretum'dan toplandı (Bahçeköy). İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Botanik Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr.Asuman EFE tarafından teşhis edilen bitki aynı üniversitenin Herbaryumunda İSTO-3926 numarası ile kayıtlıdır. Meyvalar açık havada kurutulduktan sonra kaba toz haline getirildi. Daha sonra kaba toz haline getirilen materyalin %5'lik infüzyonu üzerinde fitokimyasal ön denemeler yapıldı. Bu denemeler meyvaların flavonoidal bileşikler açısından zengin olduğunu gösterdi.

Kaba toz haline getirilen *Smilax excelsa* bitkisinin meyvalarının içermiş olabileceği flavonoidal bileşikler dışındaki diğer bileşenleri uzaklaştırmak için bir ön ekstraksiyon yapıldı. Flavonoidal bileşikler meyvedan özellikle etanol ile ayrılışı için hekzan ve kloroform ile ekstraksiyondan sonra etanol ile de ekstraksiyon yapıldı. Ekstre düşük basınçta koyu şurup kıvamına gelinceye kadar yoğunlaştırıldı. Yoğunlaştırılan ekstreye etilasetat-su partisyonu uygulandı. Elde edilen etilasetat ekstresi üzerinde yapılan ince tabaka kromatografisi flavonoidal bileşiklerin varlığını gösterdi.

Elde edilen etilasetat ekstresi Egger çözümü sistemi (2:1 CHCl₃/EtOH) ile şişirilen poliamid kolona yerleştirildi. Elüsyona bu sistemle başlandı. Giderek artan oranlarda etanol ve suya geçildi. Kolondan 115 adet fraksiyon toplandı. İki bileşik (F₁ ve F₂) elde edildi. Bu bileşikler preparatif ince tabaka kromatografisi ve sefadeks kolon kromatografisi uygulanarak saflaştırıldı.

Saf olarak elde edilen flavonoidal bileşiklerin yapıları UV Spektrumları ve standart ile kıyaslama yapılarak saptandı.

Bileşik F₁'in Kersetin-3,3'-dimetil eter olduğu saptandı.
Bileşik F₂'nin Kersetin-3-O-glikozid olduğu saptandı.

ABSTRACT

The fruits of *Smilax excelsa* L. were examined for flavonoids. The fruits of *Smilax excelsa* L. were gathered in November 1992 from İstanbul University Forestry Faculty Arboretum in Bahçeköy. The plant was identified by Assoc.Prof.Dr.Asuman EFE and is registered in İstanbul University Forestry Faculty Herbarium with the number İSTO-3926.

The fruits were air dried and ground. A 5% infusion of the material was used for phytochemical determinations. These experiments showed that the fruits are rich in flavonoidal compounds.

The ground fruits were extracted first with n-hexane, then with chloroform to remove compounds other than flavonoids.

Ethanol was used to extract the flavonoidal compounds from the fruits. The extract was concentrated to a thick syrup under vacuum. To this concentrated extract ethylacetate-water partition was applied. The TLC chromatogram of the ethylacetate showed the presence of flavonoidal compounds.

The ethylacetate extract was fed to a column containing polyamide expanded with the Egger Solution (2:1 CHCl₃/EtOH). Elution was started with this system, then EtOH, EtOH/Water mixtures and water were used respectively, and 115 fractions were collected. Two compounds (F₁ and F₂) were obtained from these fractions. The compounds were purified using Thin Layer and Column chromatography.

The purified compounds were identified by comparing with standards, UV Spectroscopy.

Compound F₁ was identified as Quercetin-3,3'-dimethyl ether. Compound F₂ was identified as Quercetin-3-O-glycoside.

1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI

Liliaceae familyasının ülkemizde 32 cinsi ve 200 kadar türü yetişmektedir (Baytop, 1983).

Smilax türlerinin (S.febrifuga, S.ornata, S.medica ve diğerleri) güneşte veya hafif ateşte kurutulması ile elde edilen ve "Saparna kökü" adı verilen kökler Radix Sarsaparillae adı ile Türk Kodeksine kayıtlıdır ve tıbbi amaçlı olarak kullanılmaktadır. Sudorifik, diüretik, kuvvet verici ve saponinlerden ötürü kan temizleyici özellikleri vardır. Eskiden antisifilitik olarak frengi tedavisinde kullanılırdı. Bugün bu kullanım terk edilmiştir. (Tanker ve diğerleri, 1973; Baytop, 1983; Baytop, 1984).

Smilax türlerinden olan ve Anadolu'da yetişen Smilax excelsa ve Smilax aspera saponin içermelerine rağmen tıbbi amaçlı kullanımları yoktur. Ancak Smilax aspera bitkisinin genç sürgünleri pazarda sebze olarak satılmaktadır. Ayrıca bitkinin tohumları üzerinde bulunan zar "Gıcır" ismiyle tanınan ve elastikiyet vermek için sakız ile birlikte çiğnenen maddeyi içerir (Baytop, 1984).

Türkiye'de yaygın olarak bulunan ve şimdiye kadar sadece saponinleri saptanan Smilax excelsa bitkisi üzerinde kimyasal ve yapı araştırmaları yapılarak, bitkinin flavonoidal bileşiklerinin incelenmesi amaçlanmış ve çalışma bu yönde yapılmıştır.

2. TEORİK BÖLÜM

2.1. BİTKİYE AİT GENEL BİLGİLER

2.1.1. Liliaceae Familyası

Liliaceae 240 kadar cins ve 4000 kadar türü içine alan bir familyadır. Ülkemizde 32 cinsi ve 200 kadar türü bulunmaktadır (Baytop, 1983).

Liliaceae familyasına ait bitkiler dünyanın her bölgesinde yayılmış olan, fakat sıcak bölgelerde daha çok bulunan, çoğu çok yıllık otsu ve az bir kısmı odunsu bitkilerdir. Toprak altında kormus, rizom, soğan veya yumruları bulunur. Yapraklar yassı ve şeritsi, bazen kalp şeklinde, bazen de küçük zarımsı pul şeklinde veya etlidir. Çiçekler erdişi (dişi organ ve erkek organların her ikisini de içeren), aktinomorf. Dış 2 halka bir perigon şeklinde, tepaller serbest veya birleşiktir. Stamenler 6 adet, ovaryum üst durumlu, sinkarb, 3 karpelli, 3 gözlü, plasentalanma marjinal ve sentral. Ovül çok sayıda. Meyva septisit ve lokulisit kapsula veya bakka şeklindedir (Baytop, 1983; Davis, 1984).

Liliaceae familyasının bitkileri bazı alkaloidler, glikozidler, steroidler, flavonoidler ve diğer biyolojik aktivite gösteren bileşikleri taşırlar (Gibbs, 1974).

2.1.2. Smilax Cinsi

Smilax türleri tırmanıcı ve dikenli gövdeli, çok yıllık bitkilerdir. Dallar genellikle odunsu ve alt kısımları dikenlidir. Yapraklar alternat dizilişli, saplı ve kalp şeklindedir. Çapraz damarcıkların ağ şebekesi yaparak bağlandığı birbirine paralel 5-7 damara sahiptir. Petioller (yaprak sapı), bir çift karşılıklı tendril oluşturur. Çiçekler, yaprakların koltuğunda, basit umbella veya panikula durumundadır. Meyva etli ve zarlı, kabuksuz tane şeklinde olup üç tohum içerir (Baytop, 1983; Davis, 1984).

2.1.3. Smilax excelsa L.

Boyu 20 m'ye ulaşabilen, tırmanıcı uzun bitkidir. Gövde ve dalların alt kısımları dikenli. Yapraklar geniş yüzeyli olup yuvarlak, oval ve kısmen kalp biçiminde. 4-11x3-10 cm, genellikle Smilax aspera'dakinden daha ince ve kenarları pürüzsüz. 2-14 sayıda çiçek, tek bir umbelde taşınarak dal ile yaprak sapı arasında (petiol) 5-15 mm yada daha uzun bir sap ile bağlıdır. Erkek organ soluk, açık kahverengi 5.5-7 mm'dir. Meyveler taneli olup kırmızı renklidir, 3 tohum bulundurur (Davis, 1984; Baytop, 1984).

Türkiye'de, Suriye'den yayılmıştır. Güney ve Güney Batı Anadolu ile Türkiye'nin kuzeyinde bulunur. Bulunduğu yerler; Tekirdağ, İstanbul (Belgrad ormanları, Alemdağı), Bolu (Akçakoca), Zonguldak, Sinop, Trabzon, Çoruh, Aydın, Muğla, Marmaris, Antalya, Hatay. Bulgaristan, Yunanistan, Suriye (Lazkiye), Transkafkasya (Azerbeycan, Gürcistan, Ermenistan), Kuzey İran, Karadeniz kıyılarıdır (Davis, 1984).

2.2. SMİLAX TÜRLERİNİN FARMAKOLOJİK ÖZELLİKLERİ VE HALK ARASINDA KULLANIMI

Bazı Smilax türlerinin (*S.febrifuga*, *S.medica*, *S.ornata* ve diğerleri) kök ve rizomlarının güneşte veya hafif ateşte kurutulması ile elde edilen droga "Saparna kökü" adı verilir. Bu kök *Radix sarsaparillae* adı altında Türk Kodeksine kayıtlıdır. Bu türler dikenli ve tırmanıcı bitkiler olup bilhassa Orta Amerika, Meksika ve Brezilya'nın bataklık ormanlarında yetişmektedir. Genellikle kalem kalınlığında, üzeri boyuna buruşuklu, grimsi esmer veya sarımsak kırmızı renkli çubuklar veya parçalar halindedir. Üzerlerinde yan köklerin artıkları azdır. Kokusuz ve acı lezzetlidir. Bileşimlerindeki nişasta, rezin ve saponin türevleri (sarsaponinler) taşımaktadır. İnfüzyon halinde sudorifik, diüretik, kuvvet verici ve saponinlerden ötürü kan temizleyici özelliklere sahiptir. Eskiden antisifilitik olarak kullanılırdı. Bugün bu şekilde kullanılışı terkedilmiştir (Baytop, 1983; Baytop, 1984).

Dünya üzerinde Smilax türlerinin farmakolojik etkileri üzerine birçok çalışma yapılmıştır ve yapılmaktadır. Bu türlerden *S.aristoclochiaefolia*, *S.aspera*, *S.china*, *S.officinalis*, *S.regelii*, *S.siphilitica*'nın kanser üzerindeki etkileri;

S.lanceaefolia, *S.aspera*, *S.officinalis* ve *S.zarzaparilla*'nın antineoplastik etkileri araştırılmıştır (Hartwell, 1982).

Smilax türlerinden olan ve Anadolu'da yetişen *Smilax aspera* bitkisinin kökleri saponin içermesine rağmen tıbbi amaçlı olarak kullanılmamıştır. Ancak bitkinin genç sürgünleri sebze olarak satılmaktadır. Sebzeye Batı Anadolu'da "Silcan" yada "Sircan" adı verilmektedir. Bitkinin tohumları üzerinde bulunan zar "Gıcır" ismi ile bilinen ve elastikiyet vermek için sakız ile birlikte çiğnenen maddeyi içerir. Ayrıca bitkinin meyvaları İstanbul'da yılbaşı zamanında çiçekçilerce çok kullanılır. Bu meyvalar, *Ruscus aculeatus* dallarının tepesine ve *Ilex aquafolium* dallarının yaprak koltuklarına bağlanır ve bu dallar süs bitkisi olarak satılır (Tanker ve diğerleri, 1973; Baytop, 1983; Baytop, 1984).

2.3. LİLİACEAE FAMILİYASINDAN SMİLAX TÜRLERİ İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR

Şimdiye kadar Smilax türlerinin özellikle toprak altı kısımları ağırlıklı olarak çeşitli bileşikler (özellikle saponinler) yönünden incelenmiştir. Smilax türlerinin yaprak ve dalları üzerinde de çalışmalar yapılmıştır, ancak toprak altı kısımlarına oranla bu çalışmalar daha az sayıdadır. Meyvalar üzerinde yapılan çalışmalar ise yok denecek kadardır.

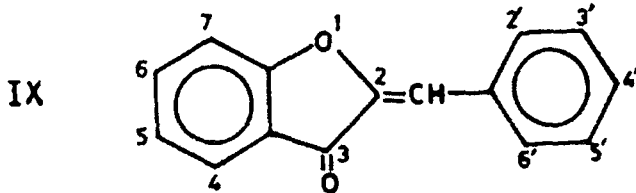
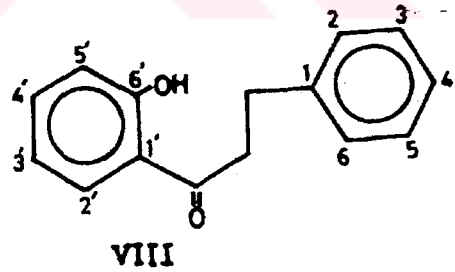
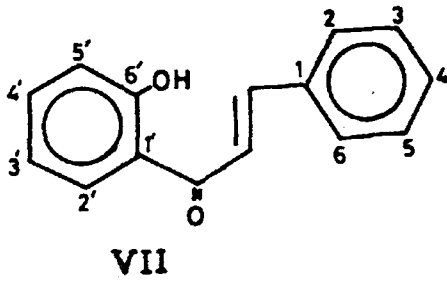
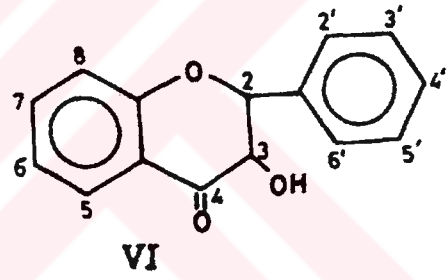
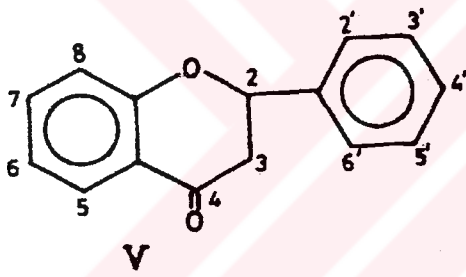
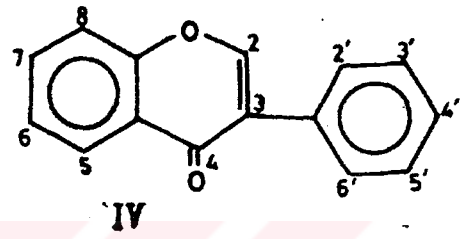
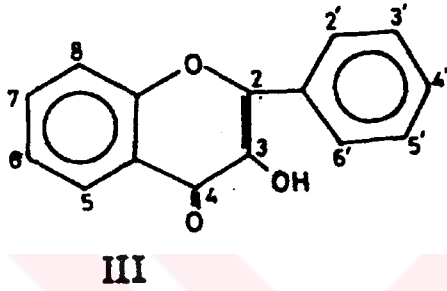
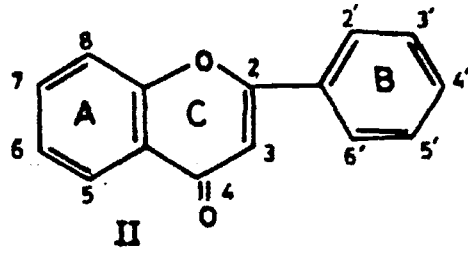
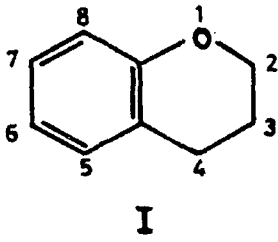
Smilax türleri üzerinde özellikle saponin türü bileşikler araştırılmıştır. Yapılan literatür taramalarında flavonoidal bileşikler ile ilgili sadece tek bir çalışmaya rastlanmıştır. Bu da Smilax glabra'nın yapraklarından elde edilen kersetin ve kamferol'dür (Chien et al, 1979).

2.4. GENEL BİLGİLER

2.4.1. Flavonoidler

2.4.1.1. Yapıları

Flavonoidler kromon (I) türevi bileşiklerdir. Kromon 9 karbon atomundan meydana gelen benzopiran'dır. Benzopiran'da 2 ve 3 no.lu karbon atomları arasına bir çifte bağ, 4 no.lu karbon atomuna bir keto grubunun girmesi ile benzo- γ -piron meydana gelir. Benzo- γ -piron'da γ -piron çekirdeğinin 2 nolu pozisyonunda bir fenil grubunun süstitüe olması ile flavon (2-fenilbenzopiran) (II) oluşur. Flavon iskeleti 15 karbon atomundan meydana gelmiştir. Flavonun γ - piron halkasının 3 nolu karbon atomu üzerindeki hidrojen bir hidroksil grubu ile süstitüe olduğunda flavonol (3-hidroksi flavon) (III) meydana gelir. Çeşitli flavonoidler arasında isoflavonlar (IV), flavanonlar (V), dihidroflavonoller (VI), kalkonlar (VII), dihidrokalkonlar (VIII) ve auronlar (IX) olarak sayılabilir (Şekil 2.1).

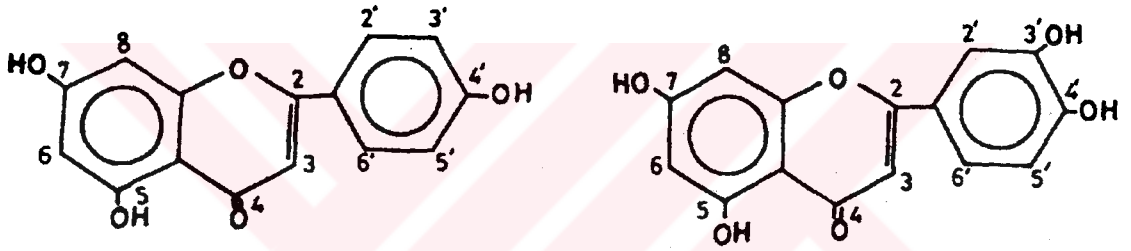


Şekil 2.1. Flavonoidal bileşikler.

Flavonun kendisine bitkilerde çok ender rastlanır. Fakat hidroksilli türevleri oldukça yaygındır. Bu hidroksilli türevler, kromon halkasında iki veya daha fazla hidroksil grubu taşırlar. Flavonlar grubuna giren hidroksilli türevler bu hidroksilleri 3. konumun dışında taşıyan bileşiklerdir. Flavonların monohidroksi türevlerine ender olarak rastlanmaktadır. Çoğunlukla iki, üç, dört, beş hidroksilli türevler yaygındır (Gilman, 1943; Tanker ve diğerleri, 1973). Örneğin;

Apigenol : 5,7,4' - trihidroksi flavon

Luteolol : 5,7,3',4' - tetrahidroksi flavon



Apigenol

Luteolol

Şekil 2.2. Flavonoidlerin Hidroksilli Türevleri.

Flavon türevi bileşiklerin bir grubu da kromon halkası üzerinde karbon atomuna bağlı bir metil grubu içeren flavonlardır. Bu gruptan flavonlar arasında izole edilenlerin sayısı çok azdır. Ayrıca az sayıda olmak üzere izoprenit süstitüenti içeren hidroksilli flavonlar, furanoflavonlar ve flavonoidal alkaloidler de bulunmaktadır (Tanker ve diğerleri, 1973).

3- hidroksi flavon olan flavonoller genellikle 5.ve 7. konumlarda birer hidroksil grubu daha taşırlar. Bu tip flavonoller fenil halkasındaki (B halkası) hidroksil gruplarına göre sınıflandırılırlar. Bitkilerde rastlanan diğer flavonoller 6., 8. konumda, hem 6. hem de 8. konumda ve 2 . konumda hidroksil grubu taşıyanlardır.

Flavanon 2-fenil benzopiran-4-on yapısındadır. Bu maddeye doğada rastlanmamıştır. Doğada rastlanan en basit flavanon 7-hidroksi flavanondur. Flavanonlar C-2'de asimetric karbon atomundan dolayı optikçe aktiftirler. Dihidroflavonoller ise flavanon ile aynı halka sistemini taşırlar ancak 3. konumunda bir hidroksil grubu bulunur. En basit üyesi 7-hidroksi dihidroflavanoldür. Dihidroflavonollerin iki asimetric karbon atomu vardır.

Flavanon ve dihidroflavonoller B halkasındaki hidroksil sayısına göre sınıflandırılırlar ve B halkasında hidroksil taşımayanlar, bir, iki ve üç hidroksil taşıyanlar olmak üzere dört grupta toplanırlar (Harborne et al., 1975; Tanker ve diğlerleri, 1973).

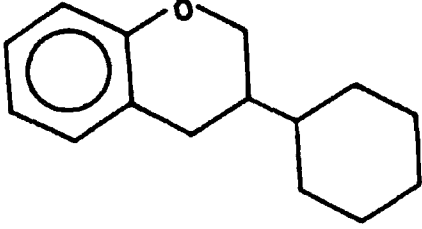
İsoflavonlarda ana iskelet flavonlardan farklılık gösterir. Bunlar iki benzen halkasının üç karbonlu bir zincire bağlanması şeklinde özetlenebilir. İsoflavonoidler içinde değişik gruplardan bileşikler bulunmaktadır. Bunlar arasında isoflavanlar (I'), isoflavanonlar (II'), rotenoidler (III'), pterokarpanlar (IV') ve kumestanlar (V') sayılabilir (Şekil 2.3)

Kalkonlar ana iskelette flavonlar ile aynı sayıda karbon atomu taşırlar fakat A ve B halkaları açık bir zincir yardımı ile birleşmiştir. Üç karbondan meydana gelen bu zincir α ve β karbonlar arasında bir çifte bağ taşır. Kalkonlar fenil stiril ketonlar olarak düşünülebilir.

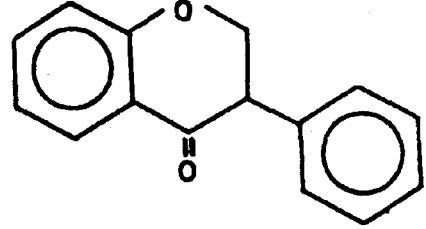
Kalkonlarda A halkasının 2', 4', 6' konumlarında hidroksil süstitüsüyonu söz konusudur. B halkası ise ya hiç hidroksil taşımaz ya da bir, iki veya üç hidroksil grubu taşır.

Dihidroalkon'lar flavonlar ile aynı sayıda karbon atomu taşıyıp kalkonların indirgenmiş türevleridir.

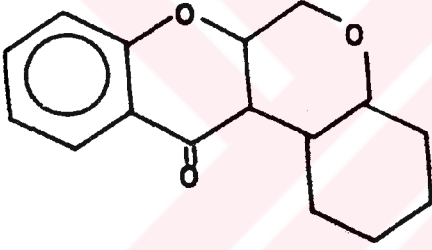
Auron'lar da flavonlar ile aynı sayıda karbon atomu içerip halka sistemi olarak piron yerine furanon halkası taşırlar (Tanker ve diğlerleri, 1973).



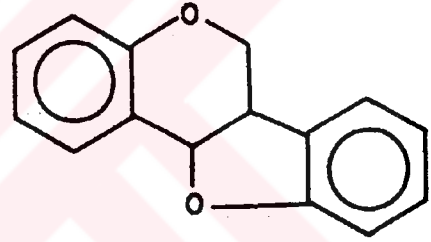
I'



II'

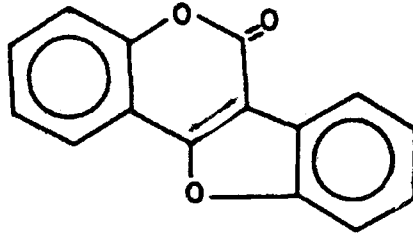


III'



IV'

V'

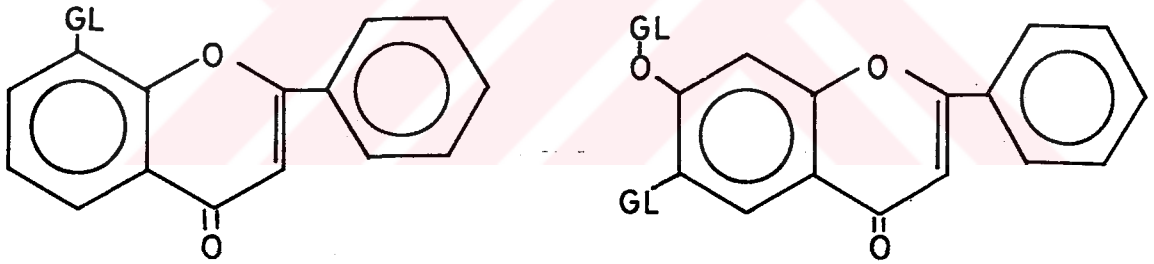


Şekil 2.3. İsoflavon Grubundan Bileşikler.

2.4.1.2. Dağılımları ve oluşumları

Flavonoidler bitkilerin yapısında yaygın olarak bulunan bileşiklerdir. Flavon'lar sarı bitki pigmentleridir. Birçok doğal bitkisel boyaların ana maddesidir. Flavonoidler hemen her bitki türünde yaygın olarak bulunurlar. Flavonoid'ler bitkilerin bütün kısımlarında yapraklarında, dallarında, köklerinde, meyvalarında, çiçeklerinde, sert kabuklarında ve liflerinde hidroksil gruplarını serbest olarak yada metil eteri veya glikozidleri halinde taşırlar (Geissman et al., 1969; Harborne, 1975).

Flavonoidler daha çok glikozidleri halinde bulunurlar. Glikozidleşme ya eter bağı ile (O-glikozidler) ya da karbon bağları arasında (C-glikozidler) olur.



Şekil 2.4. Flavonoidlerde Şekerlerin Bağlanma Şekilleri.

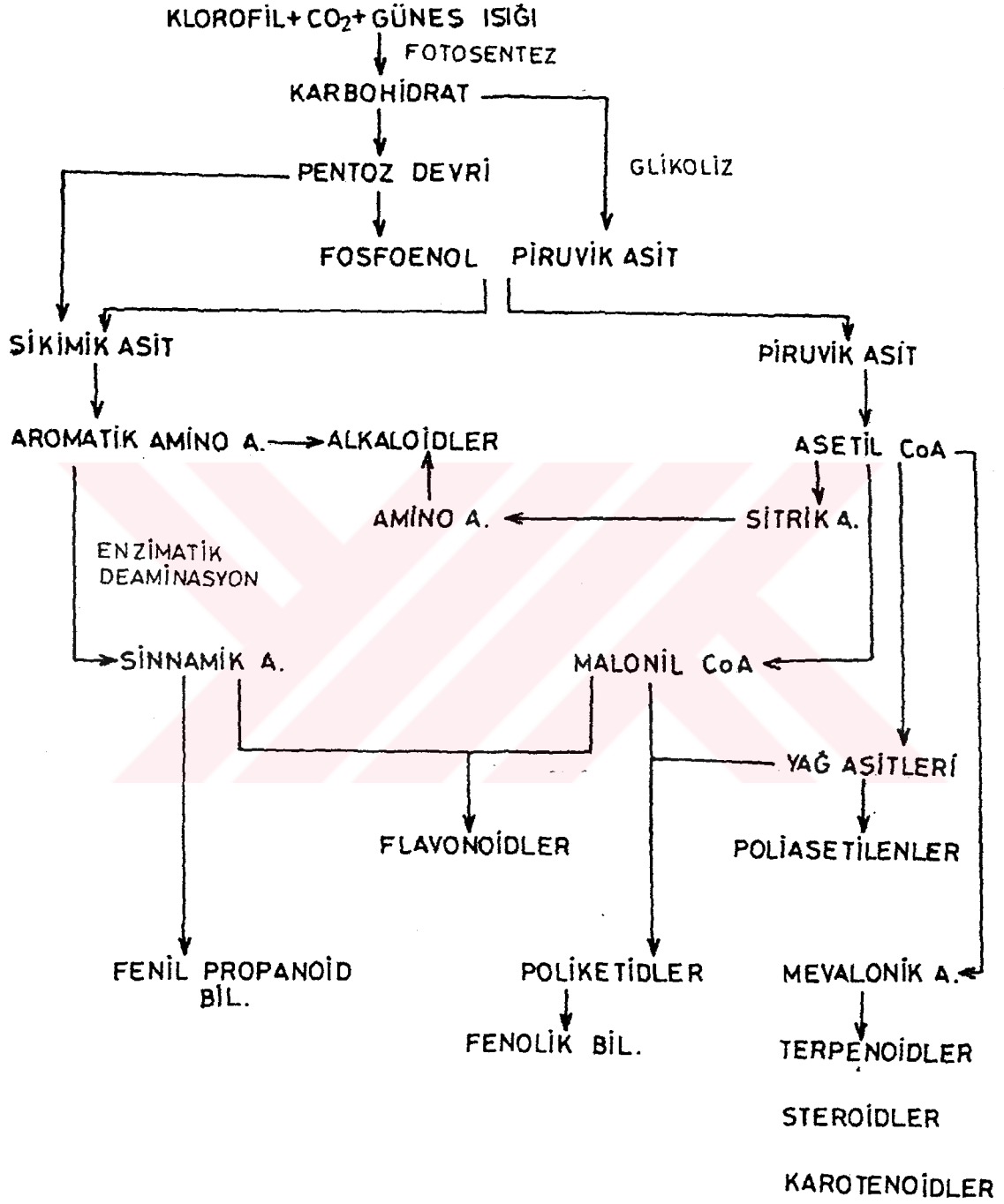
Glikozidlerde rastlanan ozlar genellikle glikoz, galaktoz, galakturonik asit, ksiloz, ramnoz ve arabinoz'dur. Glikozidlerde bu oz türevleri tek başına yer aldığı gibi ikisi veya üçü birarada, diglikozit veya triglikozit halinde de molekül yapısına girerler (Harborne, 1967; Tanker ve diğerleri, 1973). Flavonoidlerde rastlanan

Diglikozitler: Glukoz-Glukoz
Ramnoz-Glukoz
Ksiloz-Glukoz
Ksiloz-Glaktoz
Arabinoz-Glukoz

Triglikozitler: Glukoz-Glukoz-Glukoz
Ramnoz-Ramnoz-Galaktoz'dur.

Flavonoid'ler bitkilerin ikincil metabolitlerindendir. Bitkilerin fotosentez ile oluşturdukları ve hayatsal gereksinimleri için kullandıkları karbohidrat, aminoasitler v.b. gibi birincil metabolitlerden türerler. Diğer doğal kaynaklı bileşiklerle birlikte flavonoidlerin oluşumu şekil 2.3' de genel olarak gösterilmiştir (Geissman, 1969).

Biyosentez araştırmalarından elde edilen bilgilere göre flavonoidler, fenilalanin gibi amino asitlerin enzimatik deaminasyonlarından oluşan fenil propanoidlerin (sinnamik asit türevleri) önce asetil koenzim A, sonra 3-malonil koenzim A molekölü ile kondensasyonu sonucu oluşurlar (Geissman, 1967; Harborne, 1967).



Şekil 2.5. İkincil Metabolitlerin Oluşumu.

2.4.1.3. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Flavonoidlerin çoğu kristal halde katı maddelerdir. Halka yapılarına göre açık veya koyu sarı renklidirler. Erime noktaları 200° C'nin üstündedir. Genellikle suda, alkolde, mineral asitlerde ve alkalide çözünürler.

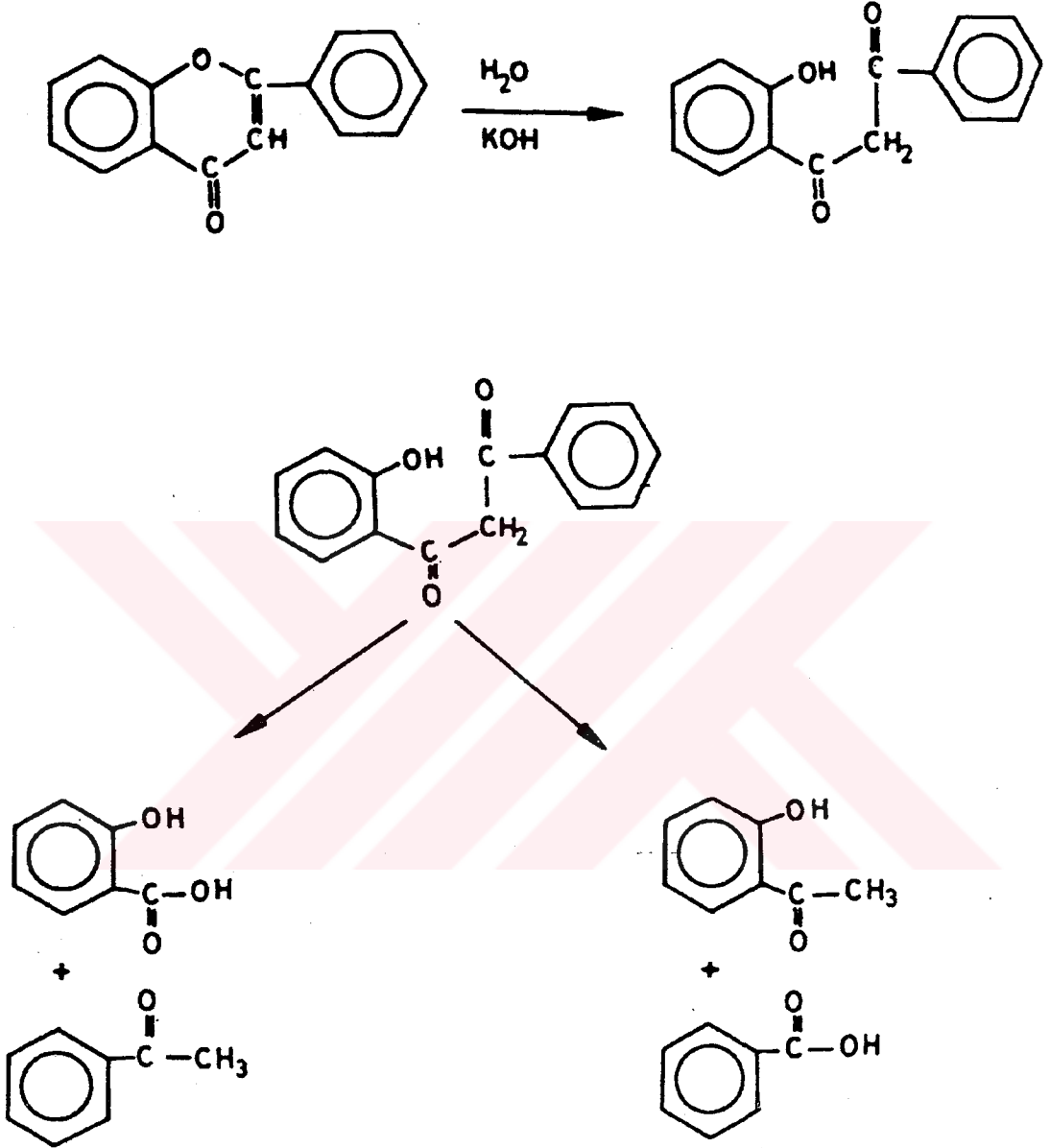
Flavonoidler alkali ortamda NaOH veya seyreltik KOH çözeltileri ile havada koyulaşan sarı bir renk vererek çözünürler. Ortam asitlendirilirse renk açılır ve çökerler (Gilman, 1943, Tanker ve diğerleri, 1973).

Flavonoid'lerin asitlerdeki çözünürlüğü γ -piron çekirdeğindeki oksijen atomunun bazikliğinden dolayıdır. Oksijen atomu asitlerle katılma ürünleri yaparak oksonyum tuzlarını meydana getirir. Bu tuzlar türetildikleri bazlara göre daha renklidir (Gilman, 1943).

Flavonlar alkali ile kaynatıldıkları zaman heterohalka sistemleri açılarak, genellikle bir fenol ve aside bozunurlar. Örneğin flavon bozunduğu zaman önce o-hidroksi dibenzoilmetan (I) daha sonra kısmen salisilik asit (II) ile asetofenon (III) ve kısmen de o-hidroksiasetofenon (IV) ile benzoik asit (V) meydana gelir (Şekil 2.6.).

Flavon molekülünde bulunan A ve B halkaları genellikle aromatik halkalar gibi reaksiyona girerler. Özellikle, hidroksi flavonlar ve bunların eterleri, sübstitüsyon reaksiyonlarında fenoller yada eterleri gibi davranırlar. Bu tür bileşiklerden birçoğunun nitrolama, sülfolama ve bromlandırma reaksiyonları yapılabilmektedir. Ayrıca hidroksiflovanların diozanyum tuzları ile kenetlenme reaksiyonları başarı ile denenmiştir. Sonuç olarak A-halkası hidroksil gruplarına sahipse, bu halka hücum için tercih edilir. 5. yada 7. konumda bulunan hidroksil grubu 8. konuma sübstitüentleri yöneltir ve ikinci bir sübstitüsyon

6,8- disübstitüe türevini verir.



Şekil 2.6. Flavonun Bozunma Ürünleri.

Piron halkası bir karbonil grubuna sahip olmasına rağmen flavonlar, hidroksilamin, semikarbazid ve fenilhidrazin gibi karbonil reaktifleri ile reaksiyon vermezler (Gilman, 1943; Finar, 1973).

2.4.1.4. Fitokimyasal ön Denemeler ile Saptanmaları

Fitokimyasal ön denemeler genellikle drogun % 5'lik infüzyonu üzerinde uygulanır. Bu amaçla % 5'lik infüzyon hazırlamak için 5 g. kaba toz edilmiş drog üzerine 100 ml sıcak su koyulur, karışım 5 dakika sıcak su banyosunda bekletilir ve soğuduktan sonra süzgeç kağıdından süzülür. Elde edilen infüzyon üzerinde çeşitli bileşik sınıflarına ait ön denemeler uygulanır.

Flavonoid bileşikleri için (flavon, flavonol, flavonon) aşağıda verilen tanıma reaksiyonları genellikle polifenolik bileşikler için de olumlu sonuç verdiğiinden, bunlar arasında Cyanidin reaksiyonu en spesifik reaksiyon olarak kabul edilir.

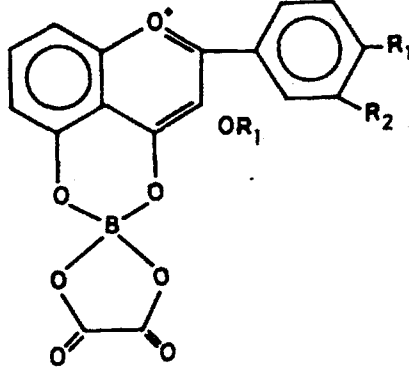
1- 5 ml infüzyon üzerine birkaç damla NaOH çözeltisi ilave edilir, infüzyonun koyu sarıya dönen rengi not edilir.

2- 5 ml infüzyon üzerine birkaç damla % 2 FeCl₃ ilave edilir, meydana gelen renk not edilir. (Yeşil, mavi, siyah) Polifenollerde 5. konumunda serbest hidroksil mevcut ise, koyu yeşil renk görülür.

3- 5 ml infüzyon, bir kapsülde su banyosu üzerinde uçurulur, bakiye az miktar asetonda çözülür, üzerine spatül ucu ile ince toz edilmiş borik asit ve ince toz edilmiş okzalik asit ilave edilir ve tekrar kuruluğa kadar uçurulur, sarı renkli bakiye 10 ml eterde çözülür. Eterli çözelti, 5-hidroksi flavonol ve 5-hidroksi flavonlar varlığında UV (366nm) ışık altında sarı-yeşil fluoressan gösterir. 5-hidroksi flavononlar ise reaksiyon vermez.

4- Cyanidin Reaksiyonu: Flavon, flavonol, flavonon taşıyan drogların sulu etanollü ekstresi, HCl'li ortamda Mg metali varlığında, turuncu kırmızı veya mor bir renk alır. Bu işlem bir deney tüpünde, infüzyon üzerine 5 ml (etanol- derişik HCl-

su; 1:1:1) karışımından koymak ve üzerine az miktarda Mg metali ilave edilerek yapılır. Flavon varlığında renk turuncu, flavonollerde kırmızı, flavononlarda mor renk meydana gelir (Tanker ve diğerleri, 1973).



Şekil 2.7. Flavonoidal Bileşiğin Borik Asit İle Oluşturduğu Kompleks.

2.4.1.5. Elde Edilmeleri

2.4.1.5.1. Bitkiden ayrılmaları

Flavonoidler bitkinin her organında bulunabildiğinden bunların izolasyonu buldukları mataryele ve izole edilecek flavonoidin tipine bağlıdır. Ayrıca izolasyonda kullanılacak çözücüler ile ekstraksiyon tekniği yine flavonoidin tipine göre değişmektedir (Harborne et al., 1975).

Kurutulduktan sonra kaba toz haline getirilen bitki mataryeli ya Soxhlet cihazında devamlı ekstraksiyona tabi tutulur ya da maserasyon uygulanır. Eğer flavonoidler yüzey yağları veya vakslarla beraber bulunuyorsa ve yüzeyde ise polar çözücülerle ve basitçe yıkanarak alınabilir. Yüzeyde değil ise ekstraksiyon tekniklerinden biri uygulanır.

Ekstraksiyon kullanılacak çözücüler izole edilecek flavonoidin polaritesine göre seçilir. Aglikonlar için genellikle azpolar

çözücüler ekstraksiyon için kullanılır. Eğer flavonoid glikozidleri ayrılacak ise daha polar olan çözücüler kullanılır. İsoflavonlar, flavanonlar, dihidroflavonoller ile flavon ve flavonollerin metillenmiş türevleri gibi az polar olan aglikonlar için genellikle benzen, kloroform, eter veya etilasetat gibi çözücüler kullanılır (Harborne et al., 1975; Tanker ve diğerleri, 1973).

Bitki materyalinde bulunan steroller, karotenoidler ve klorofiller gibi bileşenlerin uzaklaştırılması petrol eteri veya hekzan gibi polar olmayan çözücülerle bir ön ekstraksiyon ile mümkün olur. Ancak bu arada önemli flavonoid aglikonların kaybının sözkonusu olduğu unutulmamalıdır.

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

Bazen flavonoid glikozidlerinin ekstraksiyonu sırasında solvent içine az miktar asit ilave edilir. Asit ilavesi antosiyaninler için kullanışlıdır. Ancak bu sırada glikozidi halinde olan flavonoidler hidroliz olurlar (Harborne et al., 1975).

2.4.1.5.2. Kromatografik Yöntemler

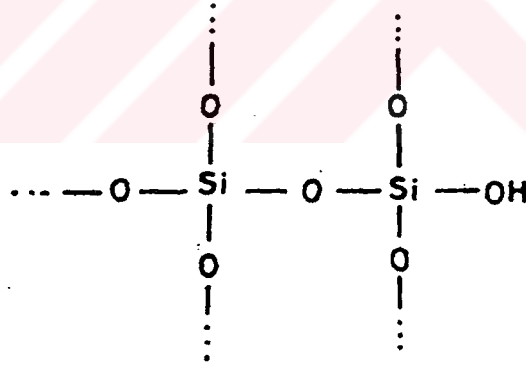
Ekstraksiyon ile elde edilen ekstrelerden flavonoidal bileşiklerin ayrılması ve saflaştırılması için kromatografik yöntemler kullanılır. Eğer fazla miktarda flavonoid elde edilmesi isteniyor ise kolon kromatografisi, küçük miktarlar isteniyor ise preparatif ince tabaka veya kağıt kromatografisinden yararlanılır.

Kolon Kromatografisi

Kolon kromatografisi flavonoidlerin ham bitki ekstraktından çok fazla miktarlarda izolasyonu için kullanılan en faydalı tekniktir. Flavonoidlerin ayrılması için kolonda kullanılan adsorbanlar silikajel, kieselguhr, magnezyum silikat, selüloz, aluminyum oksit, poliamid, sefadeks ve iyon değiştirici reçinelerdir. Bu adsorbanlar arasında en çok tercih edilenler genellikle silikajel, poliamid, selüloz ve sefadeks'tir. (Harborne et al., 1975).

Silikajel

Silikajel yapısında bulundurduğu az sayıda hidroksil gruplarından dolayı genellikle isoflavon, flavonon, dihidroflavonol ve yüksek derecede metillenmiş (asetillenmiş) flavon ve flavonoller gibi nispeten apolar flavonoid aglikonlarının ayrılmasında kullanılır.



şekil 2.8. Silikajel Yapısı.

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

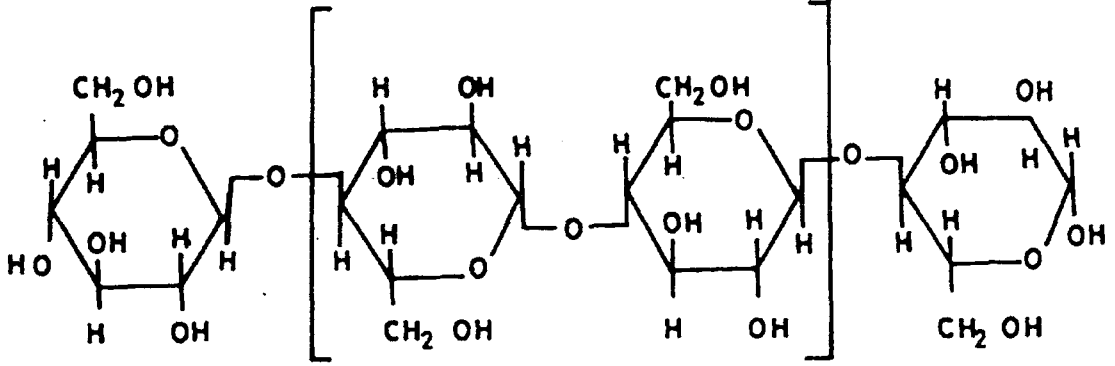
Silikajel kolon kromatografisi, polihidroksiflavonoller yada glikozidler gibi polar flavonoidlerin ayrılması için uygun değildir. Ancak glikozidlerin hidrolizi ile elde edilen birçok flavonoid aglikonların saflaştırılması için uygun bir metod olarak kullanılabilir. Silikajel üzerinde flavonoid aglikonların ayrılması ancak çözücü sisteminin metanol bileşimindeki artışla sağlanabilir. İsoflavon aglikonları çözücü olarak kloroform kullanılarak silikajel üzerinde ayrılabilir. Ancak çözücünün polaritesi eter yada etilasetat ilavesi ile derece derece arttırılır (Mabry et al., 1970).

Selüloz

Selüloz, bütün flavonoid ve glikozidlerin ayrılması için kolon kromatografisinde kullanılır. Hem adsorbsiyon hem de partisyon prensiplerine göre yapılan ayırmalarda kullanılabilir. Kağıt kromatografisinde kullanılmak üzere geliştirilen çözücülerin hepsi, kolon kromatografisi için de uygundur. Selüloz kolon için kullanılan en yaygın çözücüler genellikle sulu alkol ve asit karışımlarıdır (Harborne et al., 1975).

Selüloz çok sayıda sellobioz ünitelerinin β -1,4-glikozidik bağları oluşturmasından meydana gelmiştir. Üniteler hidroksil gruplarının sayısından dolayı hidrofilik karakter kazanmaktadır. Selüloz bundan dolayı hidrofilik bileşiklerin ayrılması için kullanışlıdır.

Diğer birçok polimer gibi selüloz da alkol, su gibi düşük molekül ağırlıklı sıvılarda ve kendi molekülleri arasında hidrojen bağları oluşturabilirler (Stahl, 1969).



Şekil 2.9. Selüloz Yapısı.

Poliamid

Poliamid yüksek ayırma gücüne sahip olduğundan flavonoidal bileşiklerin ayrılması için kolon kromatografisinde en çok kullanılan adsorbandır. Poliamid molekülündeki $-NH_2$ ve $C=O$ grupları fenolik hidroksil grupları ile hidrojen bağı yaparak flavonların ayrılmasını sağlarlar (Stahl, 1969).

Kromatografi için kullanılan poliamidler 3 tiptir. Bunlar;

Perlon tipi (polikaprolaktam)

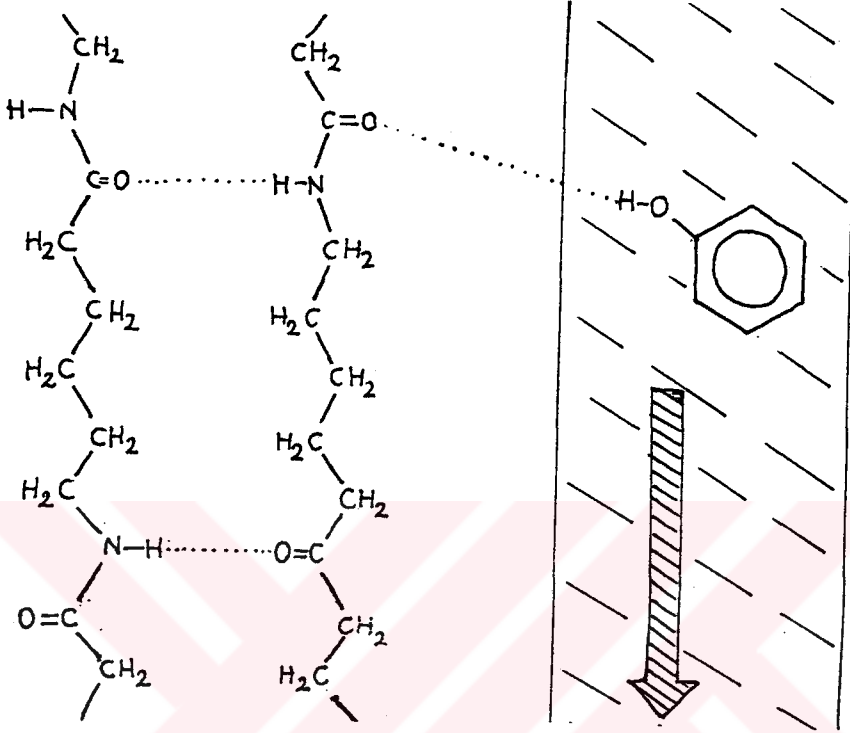
Naylon tipi (polihekzametilen diamin adipat)

Poliklar tipi (polivinil pirolidon, PVP)'dir.

Poliamidler moleküller arası hidrojen bağlarının oluşması sonucu olarak metanol, etanol, aseton ve dimetilformamid gibi hidrofilik çözücülerde yeteri derecede çözünemez ancak şişebilme kabiliyeti gösterir (Harborne et al., 1975; Stahl, 1969).

Poliamid tipi adsorbonlarda elüsyon çözücüsü olarak çeşitli oranlarda metanol-su karışımı kullanılarak flavon, isoflavon, flavonol, dihidroflavonol ve flavononların aglikon ve glikozidlerinin kompleks karışımları başarıyla ayrılabilir (Mabry et al, 1970).

Perlon tipi poliamid üzerindeki ayırma şu şekilde gösterilebilir:

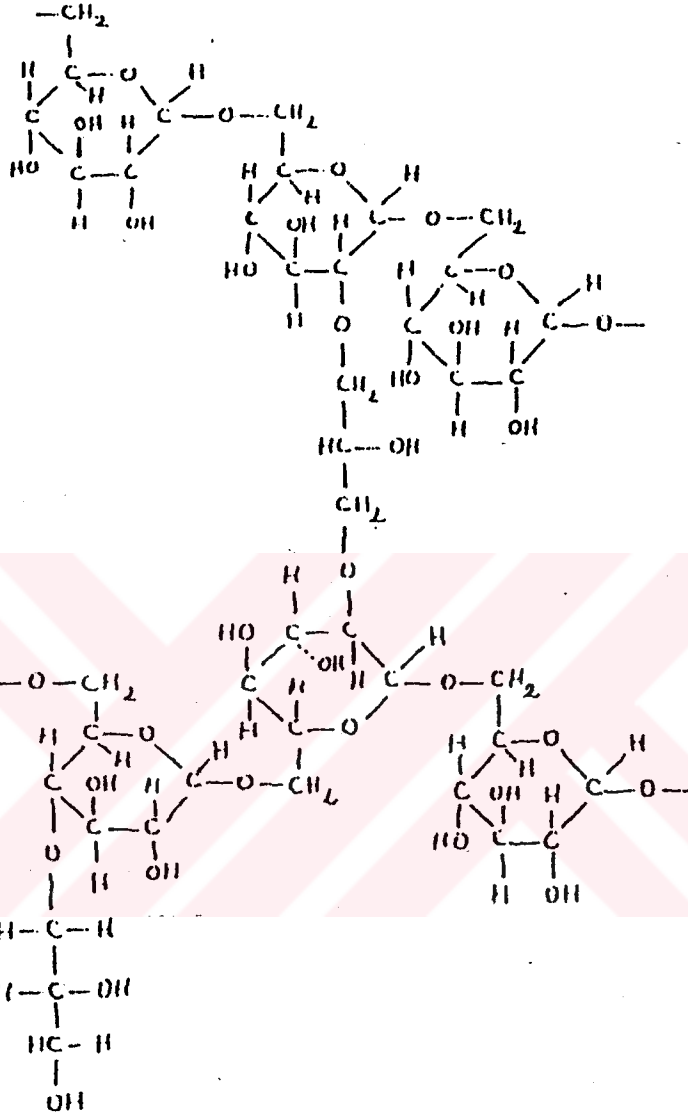


Şekil 2.10. Perlon Tipi Poliamid Üzerinde Ayırma Esası.

Sefadeks

Sefadeks, modifiye edilmiş bakteri kaynaklı dekstrandır ve dekstran moleküllerinin yüksek sayıda çapraz bağlar oluşturmasından meydana gelir. Sefadeks adsorban ile kolon kromatografisinde ayırma molekül büyüklüğüne göre olur. Buna göre, önce büyük moleküller sonra küçük moleküller olmak üzere ayırım gerçekleşir (Stahl, 1969).

Sefadeks tiplerinin birçoğu hidroksil grupları içerdiğinden kuvvetli hidrofiliktirler. Bu nedenle aminoasitler, nükleik asitler, hormonlar ve flavonoidler gibi maddelerin ayrılmasında kullanılırlar (Stahl 1969; Zweig et al., 1972).



Şekil 2.11. Sefadeks Yapısı.

Flavonoidler sefadeks adsorban üzerinde genellikle metanol ile ayrılırlar. Bu kolonda, flavonoidlerin aglikon ve glikozidleri yüksek kapasiteli ve etkin bir şekilde ayrılır. Ayrılma flavonoidlerin serbest fenolik hidroksil gruplarının sefadeks tarafından adsorbsiyonu ile ilgilidir (Harborne et al., 1975).

İnce Tabaka ve Kağıt Kromatografisi

Flavonoidlerin ince tabaka kromatografisi ile tanınmaları ve ayrılmalarında en çok kullanılan adsorbanlar silikajel, poliamid ve selüloz'dur.

Kağıt kromatografisi de flavonoidlerin analiz ve ayırımlarında kullanılan bir yöntemdir. Kağıt kromatografisinde adsorban kağıt olduğundan analitik çalışmalarda normalden daha kalın kağıtlar kullanılır. İyi bir ayırım için çift dimensiyonlu kağıt kromatografisi tercih edilir.

İnce tabaka plaklar üzerinde flavonoid spotlarının saptanması, kağıt kromatografisinde olduğu gibi plakanın doğrudan yada NH_3 buharı ve NA (difenilborik asit 2-amino etilester) belirteçleri püskürtülerek UV (366 nm) ışık altında incelenmesiyle yapılabilir (Mabry et al., 1970).

Preperatif çalışmalarda çok az miktarda flavonoidal bileşikler elde edilebilmekte ve az madde gerektiren UV ve kütle spektrumları ile yapıları aydınlatılabilmektedir.

2.4.1.6. Tanınmaları

2.4.1.6.1. Renk Reaksiyonları

Flavonoidlerin ince tabaka ve kağıt kromatografisi yapıldıktan sonra elde edilen kromatogramlardaki lekeler önce UV ışık altında doğrudan incelenir. Daha sonra sırası ile NH_3 buharına tutularak ve NA belirteci püskürtülerek göstermiş oldukları renk değişiklikleri UV (366 nm) ışık altında incelenir. Böylece flavonoid bileşiğinin tipi ve süstitüsyonları hakkında kabaca ön bilgi elde edilir. Flavonoid bileşiğinin yapısı ve oluşan spot rengi arasındaki ilişki Tablo 2.1.'de verilmektedir. (Mabry et al., 1980).

Flavonoidlerin birçoğu sarı renkli maddelerdir. Ancak bunlar arasından kalkon ve auronlar kolay bir şekilde tanınabilir. Çünkü bu bileşikler NH_3 'lü ortamda kırmızı ve turuncuya dönen bir renk değişimi yaparlar (Harborne et al., 1975).

5 numaralı karbon atomunda hidroksil grubu bulunduran flavonlar UV (366 nm) ışıkta mor renk verirler. 5,4' - dihidroksi durumunda NH_3 buharı ve NA belirteci ile sarı, 5,4',3' - trihidroksi durumunda NH_3 buharı ile sarı, NA belirteci ile turuncu renk verirler.

Hidroksil gruplarını 6. yada 8. konumunda içeren flavon ve flavonoller sarı renkli olup kromatogramları UV ışık altında koyu renkli absorpsiyon spotları verir. Bu spotlar NH_3 buharından etkilenmez. Fakat 6. yada 8. konumunda hidroksil grubuna sahip flavonoller genellikle buldukları bitki grupları bakımından farklılık gösterirler (Harborne et al., 1975).

Flavonoidler (5-deoksi, 5-O-glikozid yada 5-OCH₃) UV ışık altında parlak mavi, parlak yeşil renk verirler.

Flavonollerde 3. konumundaki hidroksil serbest halde ise UV ışık altında sarı renk vererek flavonlardan ayırdedilirler. 3', 4-OH flavonoller NH_3 buharı ve NA belirteci ile sarı, 3',4'-OH flavonoller ile NH_3 buharı ile sarı, NA belirteci ile turuncu renk verirler (Mabry, 1970).

Flavonoidlere ayrıca sulu NaOH, derişik H_2SO_4 , Mg/HCl ve Na-Hg(sonra asit) belirteçlerinin ilave edilmesi ile verdikleri renk reaksiyonlarından flavonoidin tipi ve süstitüsyonları hakkında ön bilgi edinilebilir. Bu bilgiler Tablo 2.2'de verilmiştir. (Geissman 1962).

Tablo 2.1. Flavonoid yapısı ve spot rengi arasındaki ilişki.

UV	UV/NH,	UV/NA	Flavonoid Bileşik
Koyu mor	Koyu mor	Koyu mor	5-OH açık, 3-OH yok ya da kapalı, 3'-4' OH yok veya kapalı.
Koyu mor	Koyu mor	Sarı	5-OH açık, 3-OH ya da kapalı, 4'-OH kapalı, 3'-OH açık.
Koyu mor	Sarı	Sarı	5-OH açık, 3-OH yok ya da kapalı, 4'-OH serbest, 3'-OH yok, ya da kapalı.
Koyu mor	Sarı	Turuncu	5-OH açık, 3-OH yok ya da kapalı, 3'-4' OH açık.
Koyu mor	Koyu kah-verengi	Turuncu	5-6 OH var, 3-OH yok ya da kapalı, 3'-4 OH var.
Koyu mor	Koyu kah-verengi	Kahverengi	5-6 OH var, 3-OH yok ya da kapalı, 3' ya da 4'-OH açık.
Sarı	Sarı	Sarı	Serbest 3 ve 5-OH var.
Sarı	Sarı	Kırmızı-turuncu	3 ve 5-OH açık, 3'-4' OH var.
Parlak florasan mavi	Parlak florasan mavi-yeşil	Mavi	5-OH yok, ya da kapalı, 3-OH yok ya da kapalı.
Parlak florasan mavi	Parlak florasan mavi-yeşil	Mavi-yeşil	5-OH yok, ya da kapalı, 3-OH yok ya da kapalı, 3'-4' OH var.
Parlak florasan sarı	Daha parlak flo-rasan sarı	Mavi	5-OH yok, ya da kapalı, 3'-4' OH yok.
Parlak florasan sarı	Daha parlak flo-rasan sarı	Mavi-yeşil	5-OH yok, ya da kapalı, 3'-4' OH var.

Tablo 2.2. Flavonoidal bileşiklerin renk reaksiyonları.

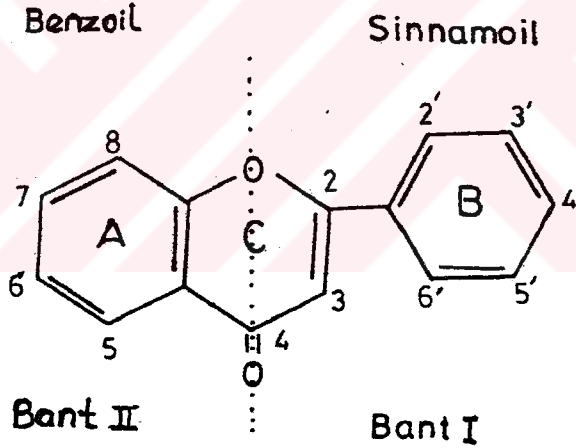
Flavonoid Tipi	Sulu NaOH	Derişik H ₂ SO ₄	Mg-HCl	Na-Hg (sonra asit)
Flavonon	Soğukta; sarı-turuncu, sıcakta; koyu kırmızı veya mor	Turuncu-koyu kırmızı	Kırmızı, morumsu kırmızı, menekşe mavi	Kırmızı
Flavon	Sarı	Şiddetli sarı-turuncu çözelti sık sık karakteristik floresans.	Sarı-kırmızı	Kırmızı
Flavonol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

2.4.1.6.2. Spektral Yöntemler

UV Spektroskopisi

Flavonoidler konjuge aromatik sistemler içerdiklerinden dolayı spektrumun görünür ve UV bölgelerinde şiddetli absorpsiyon bantları gösterirler. Flavonoidal bileşiklerin UV spektroskopisi ile yapılarının tayini oldukça önemlidir. Bu yöntemle çok az miktarda madde kullanılarak flavonoid bileşiğin yapısı hakkında önemli bilgiler edinilir (Harborne, 1988).

Bileşiğin uygun bir çözücüdeki (özellikle metanol) çözeltisinin spektrumu ve özel belirteçler ilavesi ile spektrumlarda gözlenen kaymalar, bileşiğin ana iskeleti ve süstitüentleri hakkında geniş bilgiler verir (Mabry et al., 1970).



Şekil 2.12. Flavonoid Molekülünün Absorpsiyondan Sorumlu Bölgeleri.

Flavonoidler, UV spektrumlarında genel olarak iki büyük absorpsiyon piki gösterirler. Bunlardan biri uzun dalga boyunda, diğeri kısa dalga boyundadır. Uzun dalga boyunda olan pik, flavonoidin B-halkası (sinnamoil sistemi) absorpsiyonları ile ilgili olup Bant I adını alır. Kısa dalga boyunda olanı ise A halkası (benzoil sistemi) absorpsiyonları ile ilgilidir ve Bant II adını alır (Şekil 2.12.) (Harborne 1967; Mabry et al., 1970).

Flavonoidal bileşiklerde uzun dalga boyuna kayma A ve B halkalarının taşıdıkları hidroksil sayısı ile orantılı olarak artar. Özellikle 3,5. ve 4' konumundaki hidroksil gruplarına süstitüent girmesi ile Bant I ve Bant II daha kısa dalga boyuna kayar (Geissman, 1962).

Metanol Spektrumu

Metanol spektrumu özellikle flavonoidal bileşiğin iskelet tipi hakkında bilgi verir.

Flavonlarda Band I 304-350 nm arasında, flavonollerde 3. konumundaki hidroksil serbest değil ise (metilasyon veya glikolizasyon söz konusu olduğunda) Bant I 328-357 nm arasında gözlenir. Bunun sonucunda spektrum flavonların Bant I'i ile üst üste gelir ve spektral eğrinin genel şekli flavonlarınkine yaklaşıır. B halkasında oksijen fonksiyonunun artması Bant I'i uzun dalga boyuna kaydırır.

Oksijen içeriği yüksek olan flavon ve flavonoller daha az oksijenli süstitüenti olanlara oranla daha uzun dalga boyunda absorpsiyon yaparlar. Uzun dalga boyuna kayma A ve B halkalarındaki hidroksil sayıları ile doğru orantılı olarak artar.

A-halkasında oksijen içeren flavon ve flavonoller, metanolde belirgin bir Bant II ve zayıf bir Bant I spektrası verme eğilimindedirler. Ancak B- halkası da oksijen içeriğine sahip ise Bant I daha belirgindir ve daha uzun dalga boyuna kayar.

B-halkasına eklenen oksijen fonksiyonları flavon ve flavonollerde Bant I'in batokromik kaymasına neden olur. Eğer halkaların ikisinde de hidroksil grubu bulunmuyor ise bantların şiddetlerinde bir azalma gözlenir.

Flavonoid çekirdeği üzerinde 3.,5. ve 4'. konumlarındaki hidroksil gruplarının metillenmesi veya glikozillenmesi özellikle Bant I'de hipsokromik kaymaya sebep olur. 3. konumundaki hidroksiller süstitüsüyonu ile genellikle 12-17 nm kadar kayma gözlenir, 4'. konumunun metilasyonu yada glikolizasyonu Bant I'de 3-10 nm'lik, 5. konumundaki hidroksilin süstitüsüyonu ise Bant I ve Bant II'nin her ikisinde de 5-15 nm'lik hipsokromik kaymaya neden olur. Bu üç pozisyon dışındaki pozisyonlarda bulunan hidroksil gruplarının süstitüsüyonunun UV spektrumu üzerine etkisi azdır. 5. konumdaki hidroksil grubunun varlığı yada yokluğu Bant I ve Bant II'nin her ikisi üzerinde belirgin bir etkiye sahiptir. Bu grubu içermeyenler içerenlere oranla daha kısa dalga boyunda (Bant I'de 3-10 nm ve Bant II'de 6-17 nm) gözlenir.

İsoflavonların, flavanonların ve dihidroflavonollerin A ve B halkaları arasında konjugasyon söz konusu olmadığından bunların UV spektrumları flavonlarınkinden kolaylıkla ayırt edilir. Bant I absorpsiyonu, Bant II pikinde düşük şiddette bir omuz şeklinde görülür. Bu bileşiklerin spektrası, B-halkasının oksijen içeriğinden ve süstitüsüyondan genellikle etkilenmez. Bant II isoflavonlarda 245-270 nm arasında, flavonlarda ise 270-295 nm arasında yer alır.

Kalkon ve auranlarda Bant I ana absorpsiyon bandı olarak gözlenir. Kalkonlarda Bant II 220-270 nm bölgesinde, Bant I ise 340-390 nm arasındadır. Ancak 300-320 nm arasında küçük bir pik gözlenir.

Auronlarda Bant I genellikle 370-430 nm arasındaki bölgededir. Eğer bu bileşikler doğal olarak bulunuyor ise, Bant I 388 nm'den 413 nm'ye kadar değişiklik gösterebilir (Mabry et al., 1970; Harborne et al., 1975).

Sodyum Metoksid Spektrumu

Sodyum metoksid spektrumu genellikle flavon ve flavonollerde 3. ve 4'. konumlardaki hidroksil gruplarının saptanması amacıyla kullanılır. Güçlü bir baz olduğu için flavonoid çekirdeği üzerindeki bütün hidroksil gruplarını kısmen iyonize eder. Bileşiğin metanoldeki çözeltisine NaOMe ilavesi bütün absorpsiyon bandlarının batokromik kaymasına neden olur.

Flavon ve flavonollerde, 4'. konumunda serbest halde hidroksil grubu bulunduğunda, pik şiddetinde azalma olmadan Bant I'de 40-60 nm'lik bir batokromik kayma görülür. 4'. konumunda hidroksili serbest halde bulunmayan flavonollerde, 3. konumunda bulunan hidroksil Bant I de 50-60 nm'lik batokromik kaymaya sebep olur ancak pik şiddetinde azalma söz konusudur.

Flavon ve flavonollerde 5,6,7 veya 5,7,8- tri hidroksi, 3,4'- dihidroksi ve 3,3',4'- trihidroksi durumları varsa NaOMe'in etkisi ile oksitlenirler, absorpsiyon piklerinin şiddeti zamanla azalır (Mabry et al., 1970).

Flavon ve flavonollerde 7. konumundaki hidroksil grubu serbest halde ise Bant I'in kısa dalga boyuna bakan kısmında bazen omuz, bazen de düşük şiddetli bir pik halinde Bant III gözlenir (Bacon et al., 1977).

İsoflavon, flavonon ve dihidroflavonollerde esas bantda kayma olmaması, A halkasında hidroksillenme olmadığını gösterir. Bu bileşiklerin 5,6,7- ve 5,7,8- trihidroksil süstitüentlerini içermesi NaOMe spektrumlarının zamanla bozunması ile anlaşılır.

Auronlarda bulunan 4' - hidroksil grubu ve kalkonlarda bulunan 4- hidroksil grubu Bant I'de 80-95 nm ve 60-100 nm'lik batokromik kaymalarla anlaşılır.

6-hidroksi auronlar 4' -hidroksi auronlara oranla daha küçük bir kayma yaparlar ve moleküllerde 6,4' -dihidroksil ya da 6-hidroksil, 4' -alkoksil sistemi varsa kayma daha azdır.

4. konumunda hidroksil bulunmayan fakat 2. ve 4'. konumunda hidroksil grubuna sahip olan kalkonlar, pik şiddetinde azalma olmaksızın Bant I'de 60-100 nm kadar batokromik kayma verirler (Harborne et al., 1975).

Aluminyum Klorür ve Aluminyum Klorür / Hidroklorik Asit Spektrumu

Flavon ve flavonollerde 5. konumunda, 3. konumunda ve B halkasındaki orto dihidroksi grupları $AlCl_3$ ile ayrı ayrı kelat oluşturur. Asit varlığı 5. konumdaki ve 3. konumdaki hidroksillerin oluşturduğu kompleksi kararlı kılarken B-halkasındaki orto dihidroksi gruplarının oluşturduğu komplekslerin kararsız olmasına neden olur.

A- ve B-halkalarının orto dihidroksi grupları ile $AlCl_3$ arasında meydana gelen kompleksler, birkaç istisna hariç HCl ilavesi ile bozunur. Bunun aksine 4. konumundaki keto fonksiyonu ve 3. yada 5. konumundaki hidroksil gruplarından biri ile $AlCl_3$ 'ün meydana getirdiği kompleks asit varlığında da kararlıdır.

Flavon ve flavonollerde, B-halkasındaki orto dihidroksi gruplarının varlığı $AlCl_3$ spektrumu ve $AlCl_3/HCl$ spektrumunun karşılaştırılması ile saptanabilir. Asit ilavesi orto dihidroksil gruplarının $AlCl_3$ ile oluşturduğu kompleksin bozunmasına neden olur ve Bant I'de 30-40 nm'lik bir hipsokromik kayma meydana gelir. Aynı şekilde A-halkasındaki orto dihidroksil gruplarının $AlCl_3$ ile oluşturduğu kompleksler de asit ilavesi ile bozunur. Bu yüzden metanol spektrumunda Bant I ve Bant II'de değişmeden kalan bir kayma, flavonoiddeki

serbest 3- ve/veya 5-hidroksil grubunun varlığından dolaydır. $AlCl_3/HCl$ spektrumunun metanol spektrumu ile aynı olması 3- ve/veya 5-hidroksil gruplarından her ikisinin de olmadığını yada sübstitute olduğunu gösterir (Mabry et al., 1970; Harborne et al, 1975).

5. konumunda hidroksil, 6. konumunda metoksil bulunduran flavonoidlerde $AlCl_3/HCl$ belirteci ile Bant I'de meydana gelen batokromik kayma metanol spektrumuna göre 16-23 nm, 5. konumunda hidroksil, 6. konumunda da hidroksil bulunduran sistemde 25-30 nm, 5. konumunda hidroksil, 6. konumunda hidrojen bulunduran sistemde ise 35-55 nm kadardır. (Mabry et al., 1970).

6. konumunda metoksil ya da hidroksil grubundan birini içeren 3-sübstitute flavonoller ile flavonlar, 5-hidroksi, 4-keto sistemi ile $AlCl_3$ (HCl varlığında) kompleksi nedeniyle Bant I'deki kayma metanol spektrumuna oranla 20 nm'dir, aksi takdirde kayma 45 nm kadar olacaktır (Mears et al., 1972).

Sodyum Asetat Spektrumu

Sodyum asetat sodyum metoksid'den daha zayıf bir baz olması nedeni ile daha asidik hidroksil gruplarını iyonize eder. Flavon ve flavonollerde 7. konumundaki serbest hidroksil tanınmasında kullanılır. 7. konumundaki serbest hidroksi grubu sodyum asetat ilavesi ile iyonize olur. Bunun sonucunda Bant II metanol spektrumuna göre 5-20 nm'lik bir batokromik kayma gösterir. Ancak flavonlarda 6. yada 8. konumunda oksijenlenmiş sübstitüentler bulunuyorsa sodyum asetat ilavesi batokromik kaymanın çok küçük olmasına neden olur. Bunun sebebi, 7. konumundaki hidroksil grubunun asitliğinin indirgenmesi olabilir.

3. yada 7. konumundaki hidroksil grupları serbest olmayan ve 4'. konumunda hidroksil grubuna sahip flavon veya flavonoller, genellikle sodyum asetat varlığında Bant I'in uzun dalga boyuna bakan tarafında belirgin bir omuz gösterirler. 4'. konumundaki hidroksil grubunun serbest olup olmamasından etkilenmeyerek, 7. konumundaki hidroksil grubu serbest ise Bant I'de de kayma gözlenir.

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

Flavon ve flavonollerde sodyum asetat ilavesiyle elde edilen spektrumun Bant I'i, sodyum metoksid spektrumundaki Bant I'e göre daha düşük dalga boyuna kayar (Bacon et al., 1976).

Sodyum Asetat / Borik Asit Spektrumu

Borik asit, sodyum asetat varlığında flavonoid çekirdeği üzerinde 5. ve 6. karbon atomları dışındaki bütün orto dihidroksi grupları ile kelat oluşturur.

B halkasında orto dihidroksi durumu varsa flavon ve flavonollerde Bant I 12-30 nm kadar uzun dalga boyuna kayar. A halkasında orto dihidroksi grupları (6,7- ve 7,8- konumlarında) bulunduğu zaman ise Bant I'deki batokromik kayma 5-10 nm kadardır (Mabry et al., 1970; Harborne et al., 1975).

IR Spektrumu

IR spektrumu flavonoidal bileşiklerin yapı belirlemede pek kullanılmaz. Çünkü yorum güçtür ve kaymalar tahmin edilemez. Buna rağmen 5. konumda hidroksil grubu içermeyen flavonlar, 5. konumunda hidroksil grubuna sahip olanlardan kolaylıkla ayrılabilir. Çünkü karbonil fonksiyonel grubuna ait absorpsiyon

frekansı 1653 cm^{-1} ya da daha yukarda olması gerekirken, 5. konumdaki hidroksil grubunun etkisi ile $1620-1639 \text{ cm}^{-1}$ de bulunur. Ayrıca B-halkasında sübstitüe olmamış flavonlar, 4'. konumunda sübstitüe olmuş flavonlardan $680-870 \text{ cm}^{-1}$ bölgesinde oldukça farklıdırlar (Harborne, 1967).

2.4.1.7. Farmakolojik Özellikleri

Flavonoidlerin büyük bir çoğunluğu insan ve hayvanlar için toksik değildir. Bu bileşik grubunun bilinen farmakolojik aktiviteleri az sayıda madde ile sınırlıdır. Farmakolojik aktiviteleri alkaloidler gibi diğer bitkisel maddelerle kıyaslandığında zayıftır.

Birçok flavonoidal bileşik diüretik ve diyaforetik (terletici) etki gösterir. Bazıları antispazmodik tesirlidir.

İsoflovan türevi flavonoidler, halkanın açılmasıyla meydana gelen stilbenik yapı ile gösterilen östrojenik etkiye sahiptirler. Bu özellikten dolayı hayvan yetiştirmede kullanılmıştır. Ancak doğrudan östrojenik etki göstermezler sadece progesteronu bloke ederler.

Flavonoidlerin P vitamini aktivitesi göstermeleri 3', 4'. pozisyonundaki hidroksil gruplarından ileri gelmektedir. Bu maddeler bu gruplardan dolayı hidrojen transportörü olarak rol oynarlar.

Adrenalin kapillerleri normal konstriksiyon halinde tutar ve kapiler cidarının resistansını sağlar. Organizmada oto oksidasyon ile çabuk parçalanır. Flavonoidler bu oto oksidasyonu kuvvetle inhibe ederek adrenalinin damarlar üzerindeki etkisini uzatmış olurlar.

Birçok flavonoidin bazı mikroorganizmalara karşı antibiyotik etkide olduğu da deneylerle gösterilmiştir. Antiviral flavonoidlere örnek olarak kersetol'ü gösterebiliriz. Bazı flavonoidlerin kanserli hücreler üzerinde etkili oldukları son yıllarda yapılan çalışmalarla saptanmıştır. Ancak bu etkiler çok belirgin değildir (Harborne, 1967; Tanker, 1973).



3. DENEYSEL BÖLÜM

3.1. GENEL YÖNTEMLER

3.1.1. Kromatografik Yöntemler

Kromatografik yöntemler genellikle ham bitki ekstraktından bileşiklerin ayrılması için uygulanır. Flavonoidlerin ayrılması için özellikle kolon ve ince tabaka kromatografisinden yararlanılır. Bunların dışında ayırma için kullanılan diğer yöntemler de (HPLC, v.b.) vardır.

3.1.1.1. Kolon Kromatografisi

Kolon kromatografisi ekstre içindeki bileşiklerin kabaca ayırımı için kullanılır. Flavonoidler için kolonda kullanılan adsorbanlar genellikle

Poliklar (Polyclar)

Sefadex (Sephadex LH-20)'dir.

Kolonların Hazırlanması

Poliklar Kolon

Poliklar adsorban genellikle kloroform-etanol (2:1) çözücü sisteminde 48 saat (en az 24 saat) şişirildikten sonra kullanılır. Şişmiş haldeki poliklar ekstre miktarına uygun olarak seçilen kolonun 2/3'sini dolduracak şekilde

yerleştirilir. Polikların kolona iyice yerleşmesi kolonun altından alınan çözücünün devrettirilmesi ile sağlanır.

Sefadeks Kolon

Ekstre miktarına uygun olarak alınan sefadeks adsorban tipine göre ya organik çözücülerin kombine sistemleri ile yada su ile şişirilerek kullanılır. Yine kolonun yerleşmesi adsorbanın şişirilmesinde kullanılan çözücünün devrettirilmesi ile sağlanır. Flavonoidal bileşiklerin saflaştırılması için özellikle LH-20 tipli sefadeks kullanılır.

3.1.1.2. İnce Tabaka Kromatografisi

İnce tabaka kromatografisi ya kalitatif amaçlı olarak yada preparatif olarak kullanılır. Kalitatif çalışmalarda kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlar ince tabaka plaklar üzerine tatbik edilir daha sonra fraksiyonlarda kaç madde olduğunu görmek amacı ile uygun çözücü sistemlerinde yürütülürler. Preparatif çalışmalarda ise çözücü sisteminin belirlenmesi yani fraksiyonlardaki spotların kromatogram üzerinde uygun bir şekilde ayrılması ile spotlara ait bileşiklerin saflaştırılması mümkün olabilir. Flavonoidal bileşikler için adsorban olarak genellikle silikajel, selüloz ve poliamid kullanılır.

3.1.2. Belirteçler

3.1.2.1. TLC Belirteçleri

NH₃ buharı

Kromatografi plakları NH₃ buharına tutulduktan sonra doğrudan ve UV (366 nm) ışık altında incelenir.

NA Belirteci (Naturstoffreagenz A, difenilborik asit-2-aminoetileser)

100 mg NA belirteci 100 ml metanol veya etanol'de çözülerek hazırlanır. Kromatografi plağı önce NH₃ buharına tutulur, UV (366 nm) ışııkta incelendikten sonra NA belirteci püskürtülür ve yine UV (366 nm) ışık altında incelenir.

3.1.2.2. UV Spektrumu Kayma Belirteçleri

Bu belirteçler sadece flavonoidal bileşikler için kullanılır.

Sodyum Metoksid Belirteci

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

Aluminyum Klorür Belirteci

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

Hidroklorik Asit Çözeltisi

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

Sodyum Asetat Belirteci

Susuz, toz halinde saf sodyum asetat, kullanılmadan önce porselen bir krozedede eritilerek asetik asitden kurtarılır.

Borik Asit Belirteci

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

3.2. YAPILAN İŞLEMLER

3.2.1. Bitkinin Tüketilmesi

Smilax excelsa bitkisinin meyvaları Kasım 1992'de İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesine ait Arboretum'dan toplandı. Orman Fakültesi Öğretim Üyesi Doç.Dr.Asuman EFE tarafından teşhis edildi. Bitki İSTO-3926 Herbaryum no.su ile aynı fakültenin Herbaryumuna kayıtlıdır.

Açık havada kurutulan bitkinin meyvalarının kuruma ile ağırlık kaybının yaklaşık olarak % 40 oranında olduğu saptandı. Daha sonra bitkinin meyvaları kaba toz haline getirildi.

233 g kaba toz haline getirilen meyvalar bir ön saflaştırma amacı ile hekzan ve kloroform çözücülerini kullanılarak Soxhlet ekstraksiyon cihazında devamlı ekstraksiyona tabi tutuldu. Daha sonra flavonoidal bileşiklerin çoğunun etanol ile alınacağı düşünülerek etanol ile de ekstre edildi. Ekstre düşük basınçta koyu şurup kıvamına gelinceye kadar yoğunlaştırıldı. Tartıldığında ağırlığının 44,9639 g olduğu görüldü.

3.2.2. Alkol Ekstresine Uygulanan İşlemler

Bir ön ekstraksiyondan sonra etanol ile ekstre edilen bitkinin meyvalarından elde edilen 44,9639 g ağırlığındaki ekstre önce suda süspansiyon haline getirildikten sonra etilasetat ile ayırma hunisinde etilasetat-su partisyonu uygulandı. İşlem

kısım kısım etilasetat ilave edilerek artık etilasetat fazına hiç madde geçmeyinceye kadar sürdürüldü. Bu esnada şekerler dipte çökerek ayrıldı.

Ekstraksiyon ile elde edilen etilasetatlı kısmın çözücüsü tamamen uzaklaştırıldı. Elde edilen ekstre bir pipet yardımı ile Egger çözücü sisteminde (2:1 etanol/kloroform) çözüldükten sonra yine bu sistemle şişirilen poliklar kolona yerleştirildi.

3.2.3. Bileşiklerin Fraksiyonlandırılması ve Tanınması

Poliklar kolona yerleştirilen ekstre Egger çözücü sistemi ile elüsyona tabi tutuldu. Elüsyon artan oranlarda etanol ve son olarak su ile tamamlandı. Kolondan 100-150 ml'lik fraksiyonlar halinde 115 adet fraksiyon toplandı. Toplanan fraksiyonların çözücüleri döner buharlaştırıcıda azaltıldıktan sonra selüloz plakalara uygulandı. Plakalar UV ışıktta (366 nm), NH₃ ve NA belirteçleri püskürtüldükten sonra incelendi. Benzer olanlar birleştirildi. Birleştirilen fraksiyonlara preparatif ince tabaka kromatografisi ve sefadeks kolon kromatografisi uygulandı. Bu ekstreden F₁ ve F₂ bileşikleri elde edildi.

3.2.4. Uygulanan Kimyasal Reaksiyon

Hidroliz

2-5 mg bileşik bir beher içine konularak az miktarda alkol ile çözülür. Üzerine 2-5 ml 0.1 normal HCl ilave edilir ve bek üzerinde 10-30 dk. süre ile kaynatılır. Soğuduktan sonra etilasetat ile ekstre edilir. Ayrılan sulu fazda şeker, etilasetatlı fazda aglikon tayini yapılır.

TLC İçin Plak Hazırlanması

Plaklar için Silikajel 60 H (Art.7736, Merck) ve Silikajel 60

HF₂₅₄ (Art. 7739, Merck) kullanıldı. 60 g silikajel (20x20 cm boyutlarındaki 5 plak için) 120-150 ml destile su ile 5-10 dakika sürekli çalkalandı. Camag plak kaplama aygıtı kullanılarak cam plaklar 0.2 mm kalınlığında bu süspansiyon ile kaplandı. Oda sıcaklığında kurutulduktan sonra 105-110°C deki etüvde 1,5-2 saat tutularak aktive edildi.

Hazırlanan cam plaklar sadece preparatif amaçlı kullanıldı. Fraksiyonlardaki bileşik sayılarına ait spotların belirlenmesi için hazır plaklar TLC aluminium sheets Silikagel 60 F₂₅₄ (5554, Merck), TLC aluminium sheets Cellulose (5552, Merck) ve DC-Fertigplatten Cellulose (5716, Merck) kullanıldı.

Plaklar üzerine uygulanan azaltılmış fraksiyonlar uygun çözücü sistemlerinde yürütüldü. Daha sonra tanıma amacı ile serik sülfat belirteci, NH₃ buharı, NA belirteci püskürtüldü. Serik sülfat belirteci püskürtülen plak 105-110° C'deki etüvde 5-10 dakika lekeler belirinceye kadar bekletildikten sonra doğrudan incelendi. Sırası ile NH₃ buharı ve NA belirteci püskürtülen plaklar ise hem doğrudan hem de UV (366 nm) ışıkta incelendi.

Çözücüler

Kolon kromatografisi için kloroform ve etanolün çeşitli oranlardaki sistemleri, artan polarite ile etanol ve suyun yine çeşitli oranlardaki sistemleri kullanıldı.

İnce tabaka kromatografisi için % 15, % 30, % 45 ve % 60'luk asetik asit çözeltileri ile kloroform ve etanolün çeşitli oranları kullanıldı.

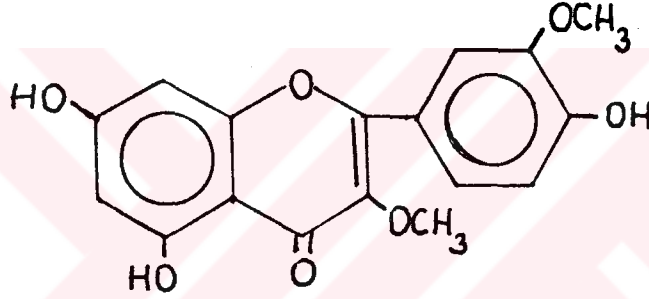
BU ÇALIŞMADA KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Hekzan (n-Hexane extra pure, Merck, 4368)
Kloroform (Chloroform extra pure, Merck, 2431)
Etanol (CaO üzerinden destillenerek saflaştırıldı)
Metanol (Methanol extra pure, Merck, 6008)
Benzen (Benzene extra pure, Merck, 1783)
Dietileter (Diethylether extra pure, Merck, 926)
Etilasetat (Ethylacetat extra pure, Merck, 864)
Asetik asit (Acetic acid % 90 extra pure, Merck, 58)
Sülfürik asit (Sulphuric acid extra pure, Merck, 713)
Klorik asit (Hydrochlorid acid fumig extra pure, Merck, 314)
Amonyak (Ammonia sol. extra pure, Merck, 5422)

Borik asit (Boric acid crisy. extra pure, Merck, 160)
Sodyum asetat (Sodium acetate anhydrous, Merck, 6268)
Sodyum (Sodium rod diameter 2.5 cm, Merck, 6260)
Aluminyum Klorür (Pure cryst., Riedel, 11016)
Seryum (IV) Sülfat (extra pure, Merck, 2267)
NA (2- Aminoethyl diphenlyborinate, Merck, 42810)
Kalsiyum oksit (Merck, 2112)
Sodyum hidroksit (Merck, 6482)
Demir(III) klorür (Merck, 3946)
Magnezyum (Mallinckrodt, Canada)

3.3. ÇALIŞMADA ELDE EDİLEN BİLEŞİKLER

3.3.1 F₁ Bileşiği: Kersetin -3,3' - dimetil eter



Fiziksel ve Kim. Özellikleri

UV Spektrasi nm

Renk	:Koyu sarı	MeOH	:355,254
Miktar	:3 mg	NaOMe	:420,327 (omuz)
R _f değeri	:0.49 (%60 AcOH)	AlCl ₃	:370,360
UV (366nm)	:Koyu mor	AlCl ₃ /HCl	:370,360
NH ₃ /UV	:Sarı	NaOAc	:375 (omuz),270,255
NA/UV	:Sarı	NaOAc/H ₃ BO ₃	:360

Koyu sarı renkli olan F₁ bileşiği UV ışık altında (366 nm) koyu mor, NH₃ ve NA belirteçleri ile sarı renk vermektedir. Bu renk reaksiyonları 5-OH açık, 4' -OH serbest, 3-OH ve 3' -OH'ın yok yada kapalı olduğunu göstermektedir. Gerek bileşiğin görünüşü gerekse renk reaksiyonları ve bileşiğin metanolde çözülerek

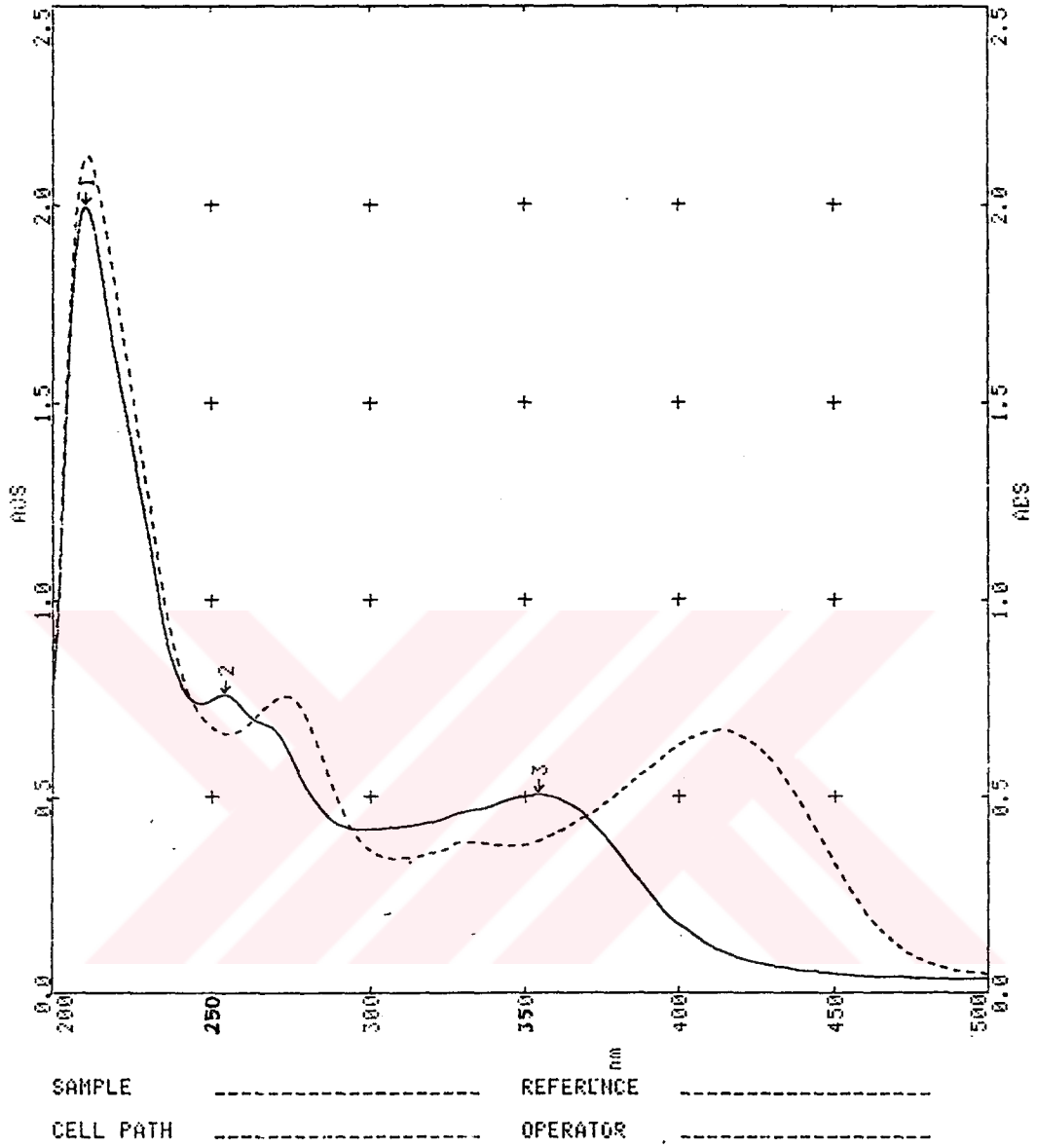
alınan spektrumunda (Şekil 3.2.) Bant I'in 355 nm'de, Bant II'nin 254 nm'de gözlenmesi F_1 'in flavon olduğunu göstermektedir.

Bileşiğin NaOMe spektrumu incelendiğinde (Şekil 3.3.) Bant I'in uzun dalga boyuna 65 nm kayması 4'-OH'in açık olduğunu gösterir. Ayrıca Bant I'in kısa dalga boyuna bakan kısmında 327 nm'de Bant III'ün gözlenmesi 7-OH'in açık olduğunu gösterir.

$AlCl_3$ spektrumunda (Şekil 3.4.) Bant I'in metanol spektrumuna göre uzun dalga boyuna kayması 5-OH'in açık olduğunu gösterir. $AlCl_3/HCl$ spektrumunun (Şekil 3.5.) $AlCl_3$ spektrumu ile hemen hemen aynı görünmesi ve hiçbir hipsokromik kaymanın olmaması ortodihidroksi konumda hidroksillerin mevcut olmadığını gösterir.

NaOAc spektrumunda (Şekil 3.6.) Bant II'nin metanol spektrumuna göre 15 nm uzun dalga boyuna kayması 7-OH'in açık olduğunu gösterir.

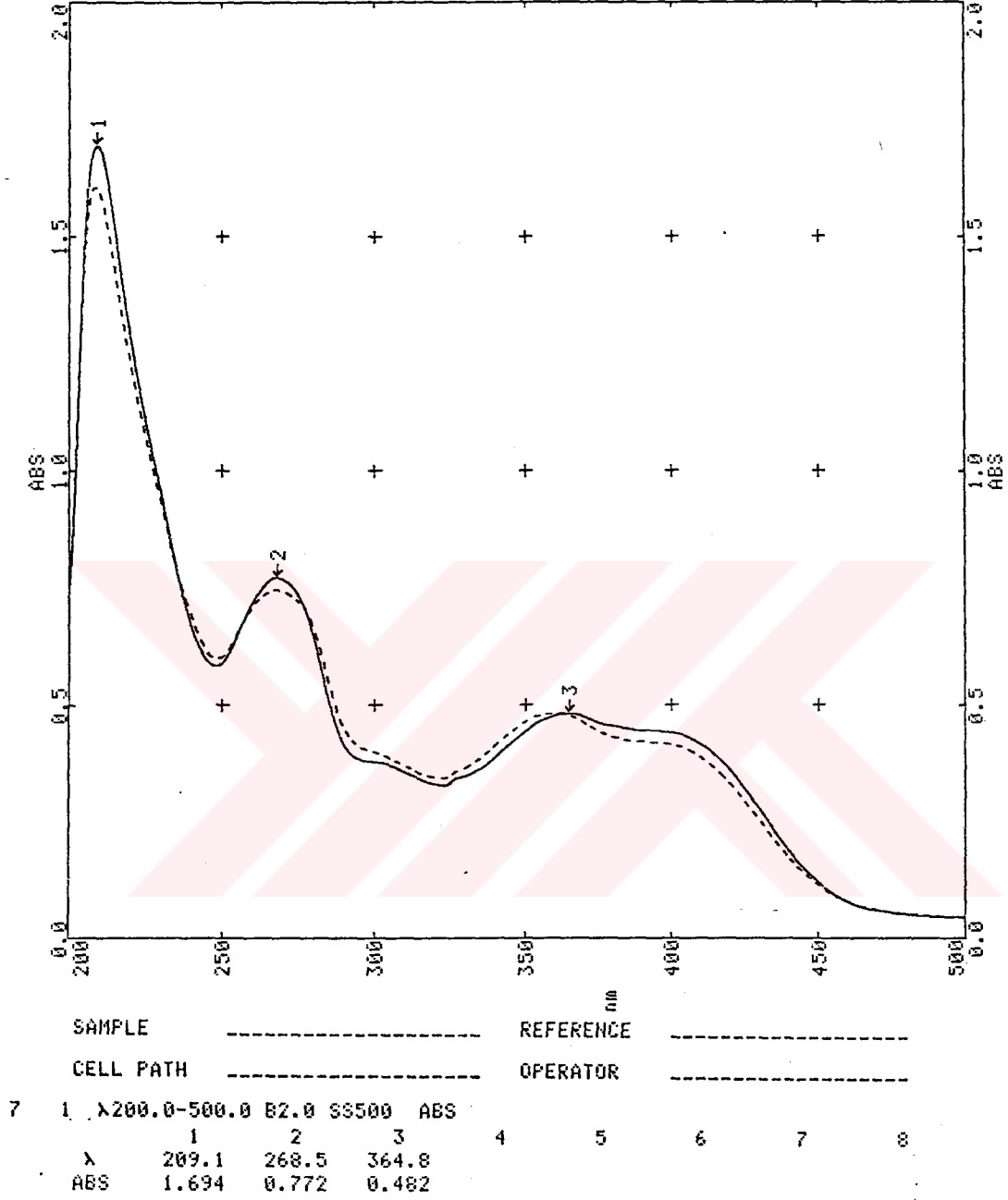
Bileşiğin NaOAc/ H_3BO_3 spektrumu incelendiğinde (Şekil 3.7.) Bant I'in metanol spektrumuna göre daha uzun dalga boyuna kaymaması ortodihidroksi konumlarının olmadığını gösterir. F_1 bileşiğinin standart örnek ile ince tabaka kromatografisi kullanarak karşılaştırılması sonucu aynı R_f değerlerini ve UV ışık altında (366 nm) NH_3 ve NA belirteçleri ile aynı renkleri verdiği görülmüştür. Bileşiğin çeşitli kayma belirteçleri ile alınan UV spektrumları da F_1 bileşiğinin kersetin-3,3'-dimetil eter olduğunu kanıtlamıştır.



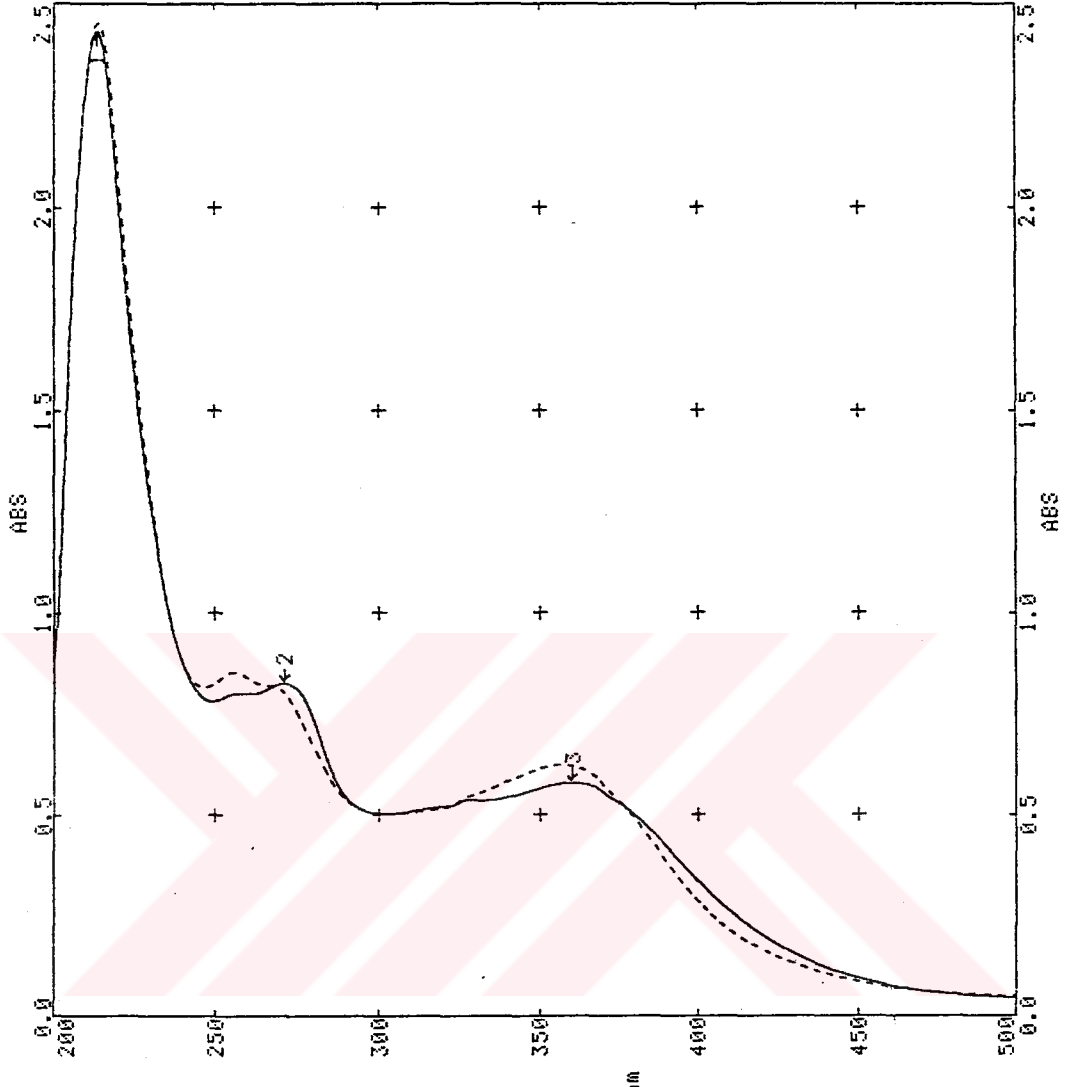
6. 1 λ200.0-500.0 02.0 88500 ABS

	1	2	3	4	5	6	7	8
λ	210.3	254.2	354.5					
ABS	1.993	0.750	0.505					

Şekil 3.1. F₁ Bileşiği MeOH (-) ve NaOMe (---) UV Spekturumu



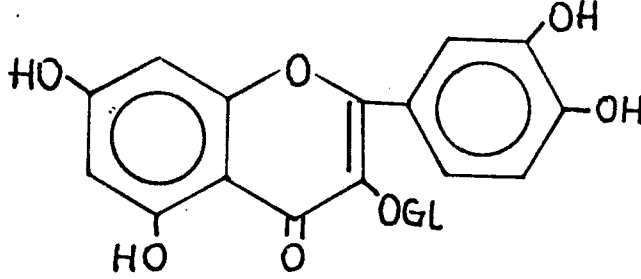
Şekil 3.2. F₁ Bileşiği AlCl₃ (-) ve AlCl₃/HCl (---) UV Spekturumu



SAMPLE ----- REFERENCE -----
 CELL PATH ----- OPERATOR -----

8	1	2	3	4	5	6	7	8
	λ	213.3	271.2	360.0				
	ABS	2.432	0.824	0.579				

Şekil 3.3. F₁ Bileşiği NaOAc (-) ve NaOAc/H₃BO₃ (---) UV Spekturumu

3.3.2. F₂ Bileşiği : Kersetin-3-O-glikozid

Fiziksel ve Kim. Özellikleri

UV Spektrası nm

Renk	: Sarı	MeOH	: 355, 262
Miktar	: 5 mg	NaOMe	: 415, 355, 325 (omuz)
R _f değeri	: 0.64 (%30 AcOH)	AlCl ₃	: 430, 355
UV (366 nm)	: Koyu mor	AlCl ₃ /HCl	: 430, 400
NH ₃ /UV	: Sarı	NaOAc	: 260, 250
NA/UV	: Koyu turuncu	NaOAc/H ₃ BO ₃	: 382

Sarı renkli olan F₂ bileşiği UV ışık altında (366 nm) koyu mor, NH₃ belirteci ile sarı, NA belirteci ile koyu turuncu renk vermektedir. Bu renk reaksiyonları 5-OH, 3'-OH ve 4'-OH'ların açık, 3-OH'ın kapalı yada olmadığını gösterir. Gerek bileşiğin görünüşü gerekse renk reaksiyonları ve bileşiğin metanolde çözülerek alınan spektrumunda (Şekil 3.8.) Bant I'in 355 nm'de, Bant II'nin 262 nm'de gözlenmesi F₂'nin flavon olduğunu göstermektedir.

NaOMe spektrumunda (Şekil 3.9.) Bant I'in uzun dalga boyuna 60 nm kayması 4'-OH'ın açık olduğunu gösterir. Ayrıca 325 nm'de Bant III'ün bulunması 7-OH'ın açık olduğunu gösterir.

AlCl₃ spektrumunda (Şekil 3.10.) Bant I'in metanol spektrumuna

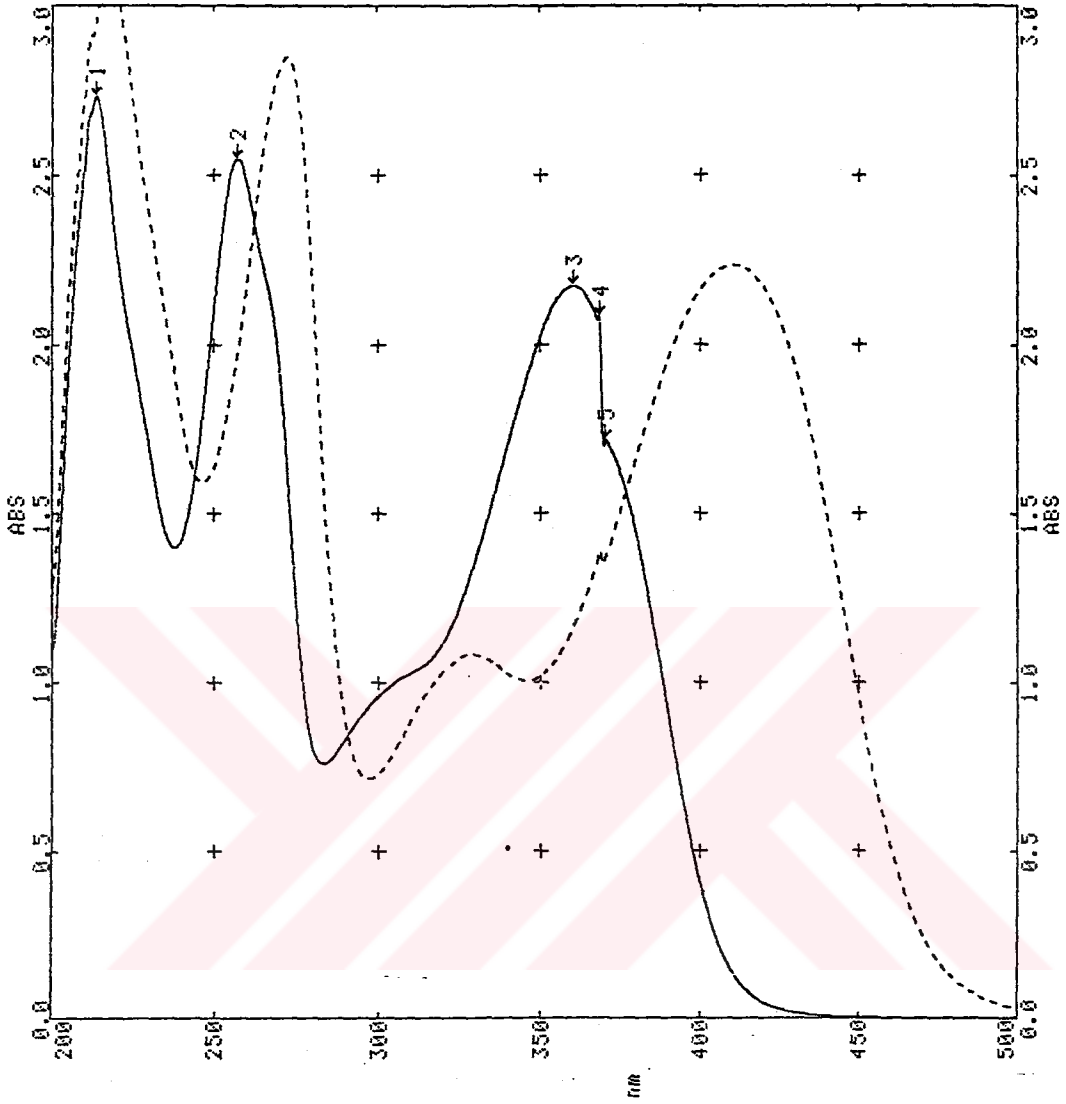
göre uzun dalga boyuna 75 nm kayması 5-OH'in açık olduğunu gösterir. Ayrıca Bant I'in asit ilavesi ile 30 nm hipsokromik kayması 3' ve 4' konumuna ortodihidroksi gruplarının varlığını gösterir.

NaOAc spektrumunda (Şekil 3.11.) Bant II'nin metanol spektrumuna göre 10 nm batokromik kayması 7-OH'in serbest olduğunu gösterir.

NaOAc/H₃BO₃ spektrumunda (Şekil 3.12.) Bant I'in metanol spektrumuna göre 27 nm kadar batokromik kayması ortodihidroksi konumunun varlığını belirtmektedir. Ayrıca AlCl₃ ve AlCl₃/HCl spektrumlarının farklı oluşu bunu doğrulamaktadır.

F₂ bileşiğinin 3 konumundaki süstitüsüyonu hidroliz reaksiyonu ile de kanıtlanmıştır. Hidroliz edilen bileşik UV ışık altında (366 nm) ve NH₃ belirteci ile sarı, NA belirteci ile koyu kırmızı turuncu renk vermiştir. Bu renk reaksiyonları 3 konumundaki glikozidik bağın hidroliz ile koparak hidroksile dönüştüğünü göstermiştir. Ayrıca spektral veriler de yine 3 konumundaki hidroksilin varlığını ispatlamıştır.

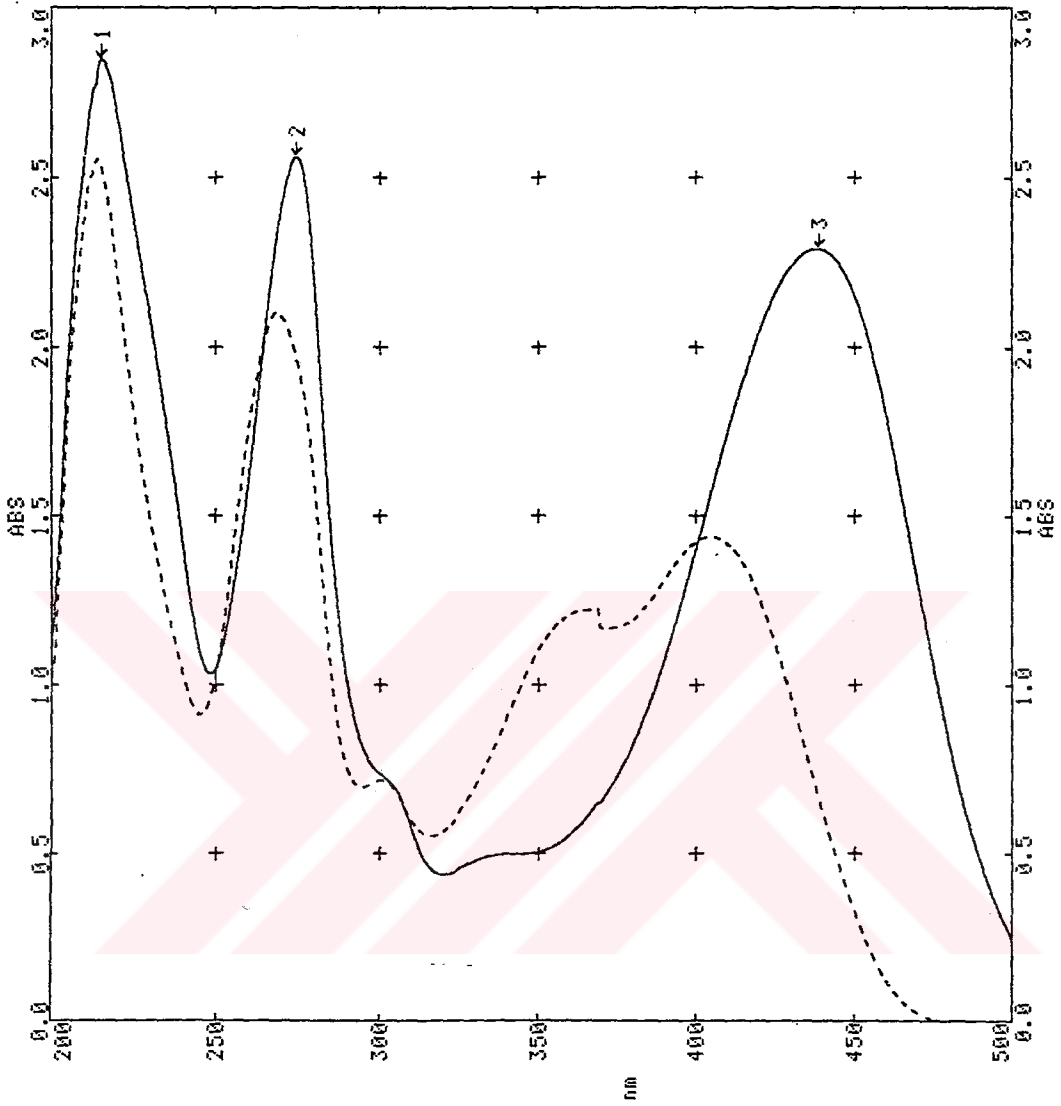
Bu sonuçlara göre F₂ bileşiği ince tabaka kromatografisinde standart örnek ile karşılaştırılmış, R_f değerlerinin ve UV ışık altında (366 nm), NH₃ ve NA belirteçleri ile renk reaksiyonlarının aynı olduğu saptanmıştır. Bileşiğin çeşitli kayma belirteçleri ile alınan UV spektrumlarının standart örneğe olan uygunluğu gözönünde bulundurularak F₂ bileşiğinin kersetin-3-0-glikozid olduğu kanıtlanmıştır.



SAMPLE ----- REFERENCE -----
 CELL PATH ----- OPERATOR -----

6		1 X200.0-500.0 B2.0 33500 ABS							
	1	2	3	4	5	6	7	8	
λ	213.7	257.1	360.0	368.4	370.4				
ABS	2.731	2.548	2.174	2.083	1.719				

Şekil 3.4. F_2 Bileşiği MeOH (-) ve NaOMe (---) UV Spekturumu

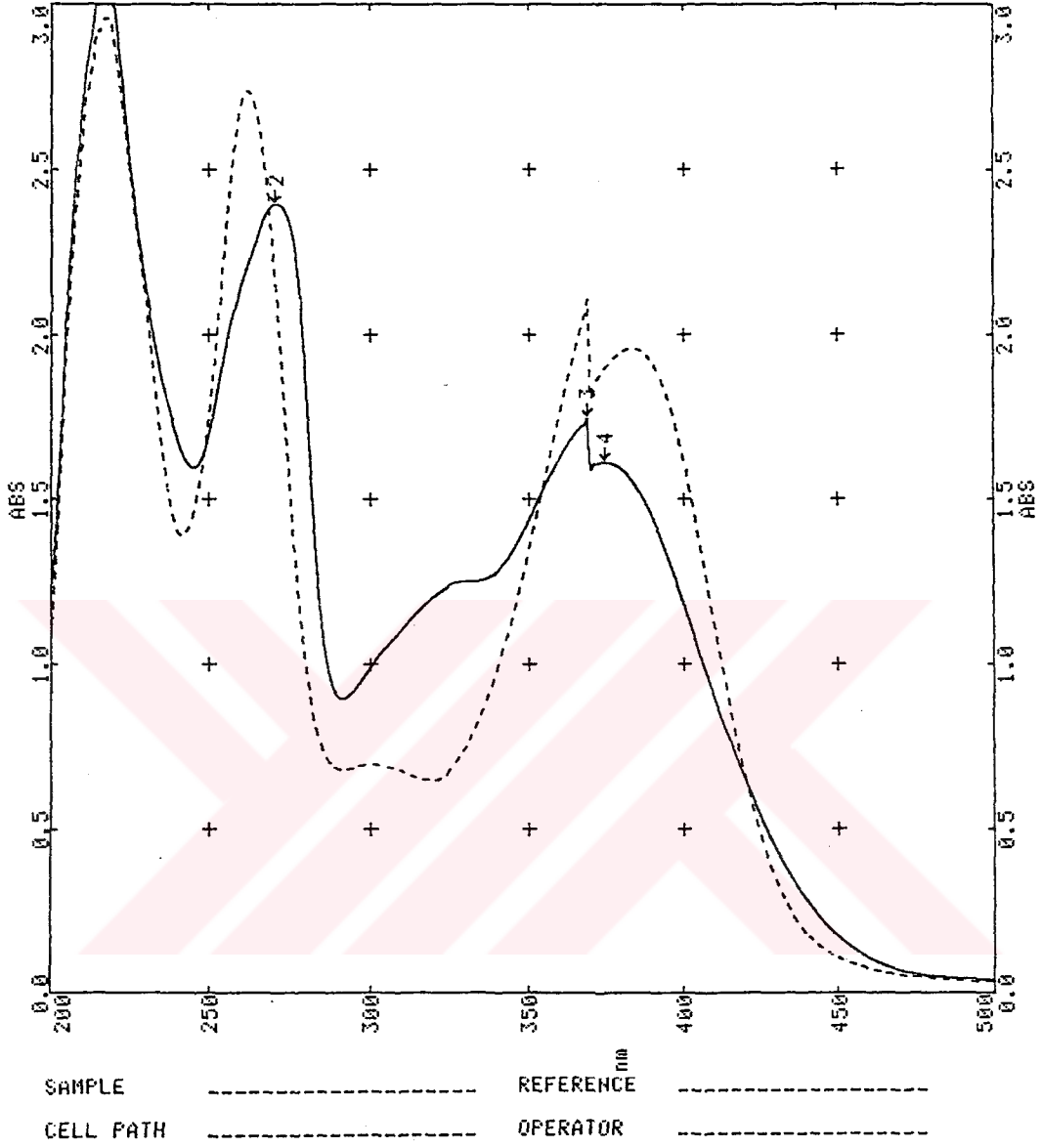


SAMPLE ----- REFERENCE -----
 CELL PATH ----- OPERATOR -----

7 1 λ200.0-500.0 B2.0 S3500 ABS

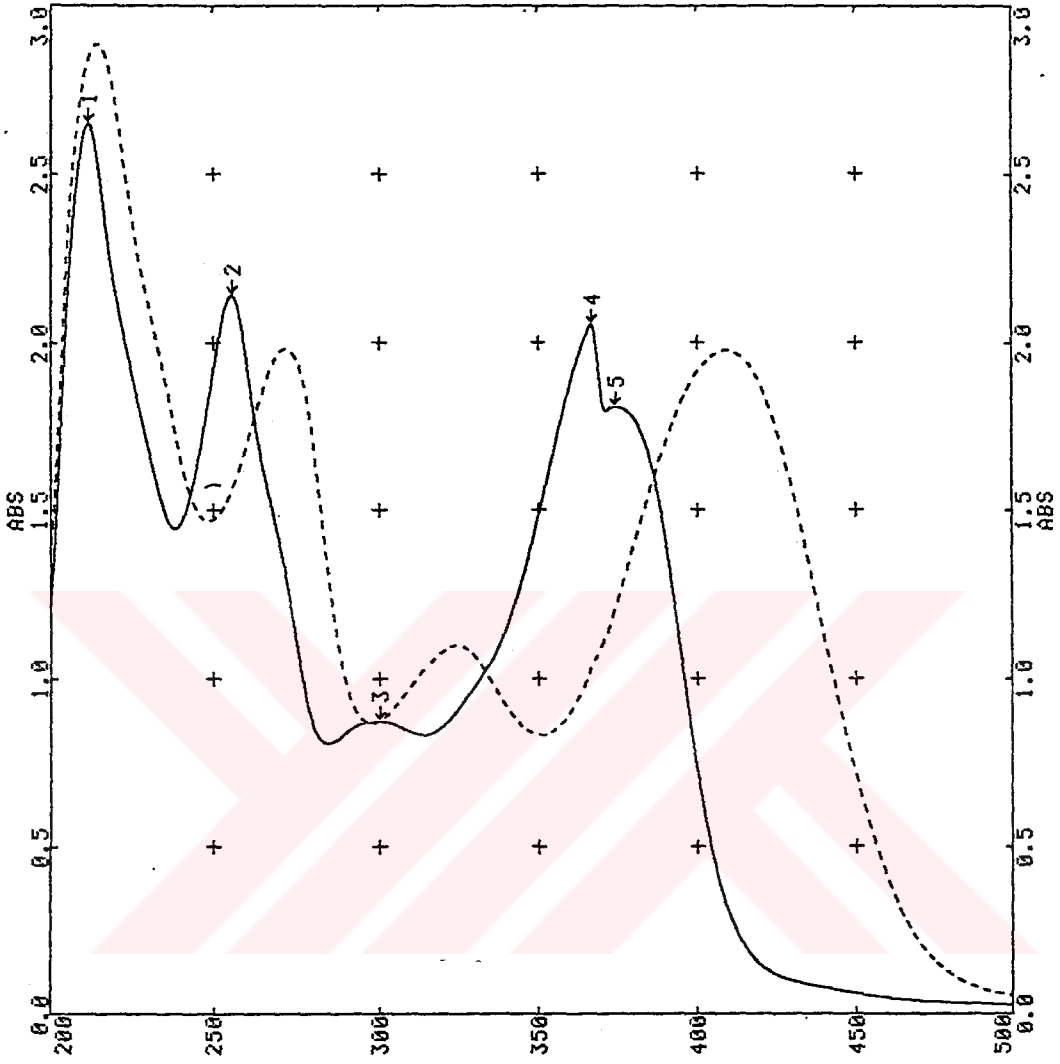
	1	2	3	4	5	6	7	8
λ	214.9	274.5	438.4					
ABS	2.847	2.562	2.290					

Şekil 3.5. F_2 Bileşigi $AlCl_3$, (-) ve $AlCl_3/HCl$ (---) UV Spekturumu



8	1	2	3	4	5	6	7	8
	λ	214.7	270.6	368.5	374.1			
	ABS	3.003	2.394	1.748	1.613			

Şekil 3.6. F_2 Bileşiği NaOAc (-) ve NaOAc/ H_3BO_3 (---) UV Spekturumu

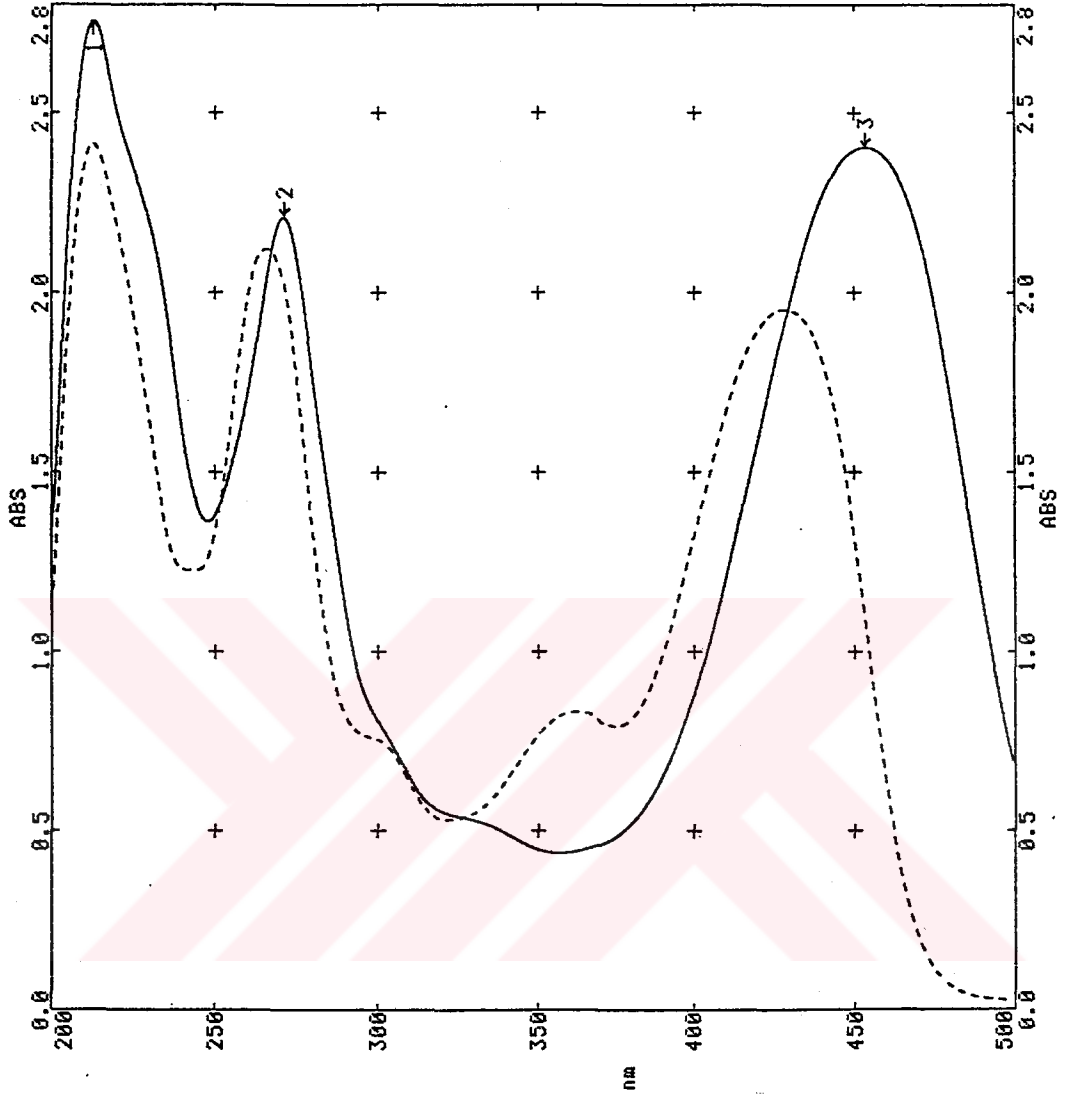


SAMPLE ----- REFERENCE -----
 CELL PATH ----- OPERATOR -----

36 1 λ200.0-500.0 B2.0 SS500 ABS

	1	2	3	4	5	6	7	8
λ	211.5	255.5	300.0	366.6	374.2			
ABS	2.651	2.141	0.872	2.055	1.809			

Şekil 3.7. Hidroliz edilen F_2 Bileşiği MeOH (-) ve NaOMe (---) UV Spekturumu

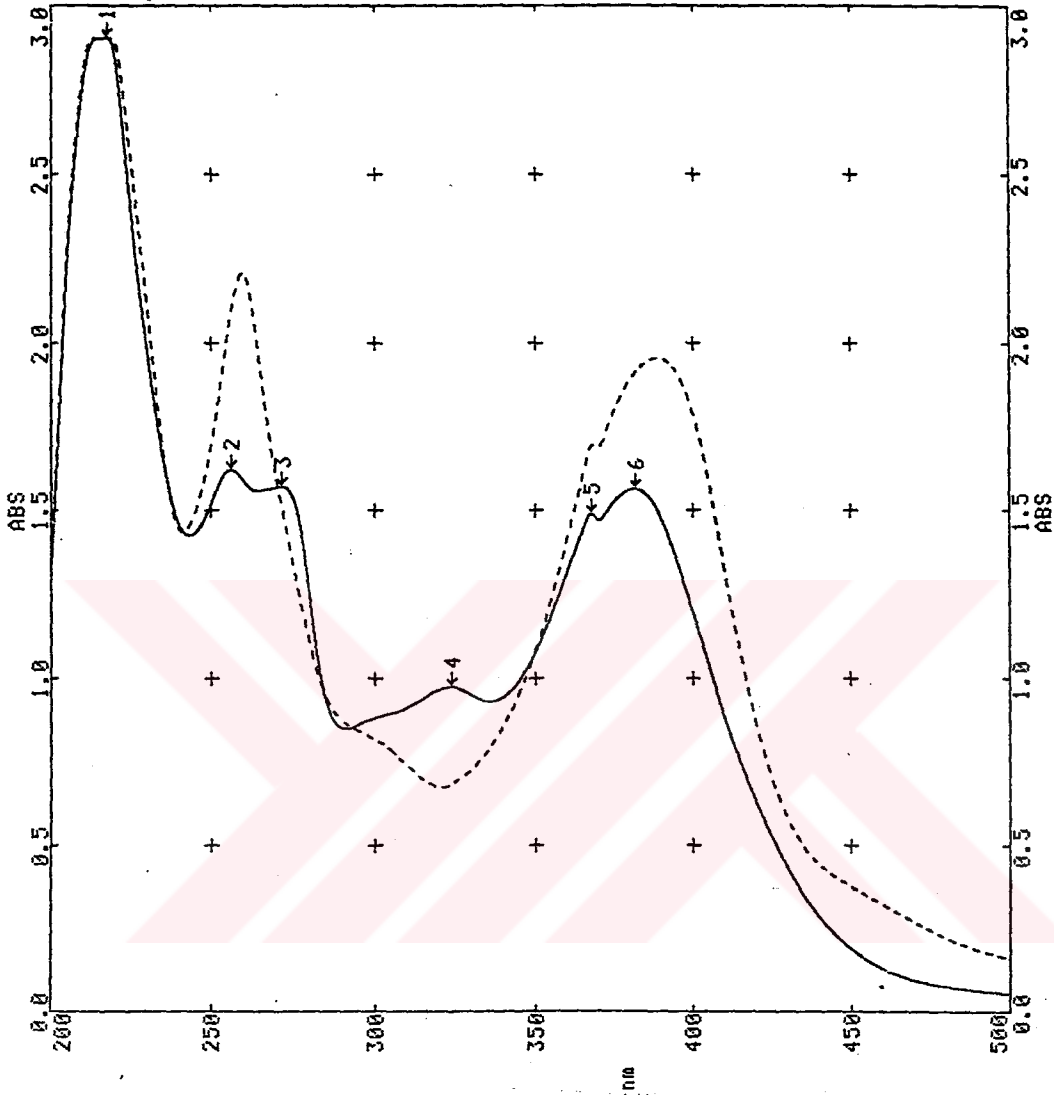


SAMPLE ----- REFERENCE -----
 CELL PATH ----- OPERATOR -----

37 1 λ200.0-500.0 B2.0 S5500 ABS

	1	2	3	4	5	6	7	8
λ	212.8	271.5	453.6					
ABS	2.759	2.209	2.405					

Şekil 3.8. Hidroliz edilen F_2 Bileşiği $AlCl_3$ (-) ve $AlCl_3/HCl$ (---) UV Spekturumu



SAMPLE ----- REFERENCE -----
 CELL PATH ----- OPERATOR -----

41 1 λ200.0-500.0 B2.0 SS500 ABS

	1	2	3	4	5	6	7	8
λ	217.5	256.3	272.0	323.7	367.7	381.6		
ABS	2.906	1.622	1.571	0.974	1.489	1.564		

Şekil 3.9. Hidroliz edilen F_2 Bileşiği NaOAc (-) ve NaOAc/ H_3BO_3 (---) UV Spekturumu

SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, Türkiye'de sınırlı bir yayılış gösteren Smilax excelsa bitkisinin meyvaları üzerinde flavonoidal bileşikler yönünden kimyasal bir araştırma yapılmış ve iki flavonoid bileşiği elde edilmiştir.

Elde edilen flavonoid bileşikleri kersetin-3-3'-dimetil eter (F_1) ve kersetin -3-0-glikozid (F_2)'dir. Bu bileşiklerden F_1 bileşiğinin aglikon yapısında olduğu ince tabaka kromatografisinde standart örnek ile kıyaslanarak ve ayrıca çeşitli kayma belirteçleri ile alınan UV spektrumlarının karşılaştırılması sonucu saptanmıştır. Elde edilen diğer bileşik olan F_2 bileşiğine uygulanan asit hidrolizi bileşiğin şeker taşıdığını göstermiştir. F_2 bileşiği de standart örnek ile karşılaştırılmış ve çeşitli kayma belirteçleri ile alınan UV spektrumları bileşiğin yapısını kanıtlamıştır.

Flavonoidal bileşikler yönünden ilk kez incelenen Smilax excelsa bitkisinin meyvalarından elde edilen flavonoidler diğer Smilax türlerinden olan Smilax glabra'nın yapraklarından elde edilen flavonoidler ile benzerdir. Fakat bu çalışmada elde edilen kersetin-3,3'-dimetil eter (F_1) bileşiğine daha önce çalışılan Smilax türlerinde rastlanmamıştır.

KAYNAKLAR

Bacon, J.D., Mabry, T.J. and Mears, J.A., 1976. Rev. Latinomer Quim. 7, 83.

Baytop, A., 1983. Farmasötik Botanik, İst. Üniv. Yayınları, İstanbul.

Baytop, T., 1974. Farmakognozi, İst. Üniv. Yayınları, İstanbul, 2.

Baytop, T., 1984. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi, İst. Üniv. Yayınları.

Chien, N.Q., Adam, G., 1979. Pharmazie, 34 (12), 841-3, Ref. C.A., 92, 143290e.

Çelebioğlu, S., 1949. Farmakognozi, İst. Üniv. Yayınları, İstanbul.

Davis, P.H., 1984. Flora of Turkey and the East Aegean Islands Edinburg at the University Press, 8.

Finar, 1973. Organic Chemistry, Longman Group Limited, (Sixth Edition), London, 1, 469-71.

Geissman, T.A., Crout, D.H.G., 1969. Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism, Freeman, Cooper and Company, California.

Gibbs, R.D., 1974. Chemotaxonomy of Flowering Plants Mc Gill-Queen's University Press, Montreal-London.

Gilman, H., 1943. Organic Chemistry, John Wiley-Sons, Inc., New York, 2.

Harborne, J.B., 1967. Comparative Biochemistry of the Flavonoids, Academic Press, London and New York.

Harborne, J.B., 1988. Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis, Chapman and Hall, London-New York.

Harborne, J.B., Mabry, T.J., Mabry, H., 1975. The Flavonoids, Chapman and Hall, London.

Hartwell, J.L., 1982. Plants used Against Cancer, Quarterman Publications, Inc., Lawrence-Massachusetts.

Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B., 1970. The Systematic Identification of Flavonoids, Springer-Verlag, Berlin.

Mabry, T.J., Ulubelen, A., 1980. Agric and Food Chem., 28, 188.

Mears, J.A., Mabry, T.J., 1972. "A Procedure for the UV Detection of Hydroxyl and Methoxyl Groups at C-6 in Flavones and 3-O- substituted Flavonols", Phytochemistry, 11, 411-12.

Solomons, T.W.G., 1988. Organic Chemistry, John Wiley- Sons, New York, 1053-55.

Sorenson, N.A., 1963. "The Taxonomic Significance of Acetylenic Compounds", Chemical Plant Taxonomy, Acad. Press, London, 219.

Stahl, E., 1969. TLC, A Laboratory Handbook, New York.

Zweig, G. Sherma J., 1972. CRC Handbook of Chromatography, CRC Press, 2.

ÖZGEÇMİŞ

Doğum Tarihi : 2 Haziran 1968

Doğum Yeri : Gölcük

İlk Öğrenim : Yeşilyuva İlkokulu, 1975-1979

Orta Öğrenim : Küçükçekmece Lisesi, 1979-1985

Yüksek Öğrenim : Yıldız Teknik Üniversitesi,
Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya
Bölümü, 1987-1991

Lisansüstü Öğrenim : Yıldız Teknik Üniversitesi,
Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya
Bölümü, Organik Kimya Anabilim
Dalı, 1991-

Halen yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim. Aynı zamanda Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalında Uzman olarak görev yapmaktayım.