T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

EDİRNE BÖLGESİNDE YETİŞEN *Trifolium resupinatum* L. var. *microcephalum* BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL İNCELENMESİ

Fatma Emel IŞIK

DOKTORA TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

I.Danışman : Yrd.Doç.Dr. Temine ŞABUDAK

II.Danışman : Prof.Dr. Sevil ÖKSÜZ

EDİRNE – 2005

ÖZET

Bu çalışmada Edirne Bölgesi civarında yetişen *Trifolium resupinatum* L. var. *microcephalum* Zoh. bitkisinin fitokimyasal incelemesi yapılmıştır.

Bitki toplandıktan sonra gölgede kurutulmuştur. Kurutulan bitki CH_2Cl_2 ve EtOH ile maserasyon tekniğine göre ekstraksiyon yapılmış ve elde edilen ekstraktlardaki çözücüler evaporatörde uçurulmuştur. EtOH ekstresi su ile sulandırılarak EtOAc ile ekstrakte edildi. CH_2Cl_2 ve EtOAc ekstresine kolon kromatografisi, ince tabaka kromatografisi, preparatif ince tabaka kromatografisi uygulanarak, sekonder metabolitleri ayırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Tek maddelerin saflaştırılma işlemlerinde preparatif ince tabaka kromatografisi ve Sephadex LH-20 kullanılmıştır.

Her iki ekstreden toplam 10 bileşik izole edilmiştir. CH_2Cl_2 ekstresinden 3 tane hidrokarbon, 1 tane steroid, 1 tane triterpen, 1 tane kumarin, 1 tane izoflavon olmak üzere toplam 7 bileşik izole edilmiştir. Etilasetat ile tüketilen kısmından 2 tanesi izoflavon glukozit, 1 tane flavonol glikozit olmak üzere toplam 3 bileşik izole edilmiştir. Bitkiden izole edilen maddelerin yapıları, UV, IR, 1D ve 2D NMR teknikleri ve Mass spektrometresi kullanılarak kimyasal yapıları açıklanmıştır.

CH_2Cl_2 ekstresinden elde edilen 3-metil-1-nonen-3-ol bileşiği ilk defa bu çalışma sonucu bir bitkiden izole edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Trifolium resupinatum, microcephalum*, flavonoid, Edirne, steroid, kumarin, triterpen.

SUMMARY

In this study, *Trifolium resupinatum* L. var. *microcephalum*.Zoh. which grows in Edirne zone have been phytochemically investigated.

First the plant was collected and dried. Then dry plant was extracted by maceration with CH_2Cl_2 and EtOH respectively and extracts were concentrated in an evaparator it vacum. Ethanolic extracts was extracted with EtOAc after diluted with water. The separation process of secondary metabolites were carried out from both extracts by using the coloumn chromatography, thin layer chromatography and preparatif thin layer chromatography methods. Preparative thin layer chromatography and Sephadex LH-20 methods were used to purify compounds.

Totally 10 compounds were isolated from CH_2Cl_2 and EtOH exctract. The 3 hydrocarbons, 1 steroid, 1 triterpene, 1 coumarin, 1 isoflavon compound were isolated from CH_2Cl_2 extract. 2 isoflavon glucosides and 1 flavonol glycoside were isolated from EtOAc extract. The chemical structure of isolated compounds from the plant have been elucidated by using UV, IR, 1D and 2D NMR techniques and mass spectroscopic data.

In this study, 3-metil-1-nonen-3-ol compound was obtained from *Trifolium resupinatum* L. var. *microcephalum* for the first time.

Key Words: *Trifolium resupinatum, microcephalum*, flavonoid, Edirne, steroid, coumarin, triterpen.

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam boyunca engin bilgi ve tecrübeleriyle daima yol gösteren, her konuda yardımcı olan Sayın hocam Prof.Dr.Sevil ÖKSÜZ'e teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım süresince bana fikirleri ve deneyimleriyle destek olan, vakit ayıran ve her konuda yardımını gördüğüm Sayın hocam Yrd.Doç.Dr.Temine ŞABUDAK'a çok teşekkür ederim.

519 numaralı Proje çalışmamızı destekleyen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam süresince bildiği her şeyi paylaşan, hem fikir hem de bilgilerinden yararlandığım arkadaşım Araş.Gör.Özlem DEMİRKIRAN' a çok teşekkür ederim.

Bitkimizi teşhis eden ve bitkinin tanımı ile ilgili kısmın yazılımında yardımcı olan Sayın hocam Yrd.Doç.Dr. Nesibe BAŞAK, Yrd.Doç.Dr. Hayati ARDA, Araş.Gör.Hüseyin ERSOY' a teşekkürlerimi sunarım.

Organik Kimya Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr.Ömer ZAİM' e, çalışmalarıma yardımcı olan ve desteklerini esirgemeyen Kimya Bölümündeki arkadaşlara teşekkür ederim.

İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Genel Kimya bölümünden Yrd.Doç.Dr. Aslı BARLA ve Emel YUVARLAK'a gerekli olan literatürlerin temin edilmesi ve gönderilmesindeki tüm yardımları için, çalıştığım okullarda ders programlarımın düzenlenmesine yardımcı olan ve destek veren okul müdürüm ve yöneticilerime teşekkür ederim

Son olarak hayat arkadaşım, sevgili eşim Fikret IŞIK' a doktora çalışmam boyunca benimle beraber tüm sıkıntılara katlanıp gösterdiği sabırdan dolayı, ayrıca manevi desteğini canlı tuttuğu ve desteklediği için, varlıklarıyla beni her zaman mutlu eden kızım Elif Nur ve oğlum Barış Emre'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Özet i
Summary ii
Teşekkür iii
İçindekiler iv
Şekil Listesi viii
Tablo Listesi xi
Simgeler Dizini xii

1.GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI 1

2. KURAMSAL TEMELLER VE ÖNCEKİ ARAŞTIRMALAR 3

2.1.Bitkinin Tanımı ve Yayılışı 3

2.1.1. Fabaceae (Leguminosae) Familyasının Özellikleri 3
2.1.2. Türkiye'de Fabaceae Familyası 4
2.1.3. Fabaceae Familyasının Kullanım Alanları 4
2.1.4. *Trifolium* L. Cinsinin Genel Özellikleri 5
2.1.4.1. Türkiye'de *Trifolium* L. Cinsi 6
2.1.4.2. Trakya Bölgesinde *Trifolium* L. Cinsi 6
2.1.4.3. *Trifolium resupinatum* L. 7

2.2. *Trifolium* Türlerinden Daha Önce İzole Edilen Bileşikler 9

2.2.1. *Trifolium alexandrinum* Türünden İzole Edilen Bileşikler 9
2.2.2. *Trifolium repens* Türünden İzole Edilen Bileşikler 13
2.2.3. *Trifolium pratense* Türünden İzole Edilen Bileşikler 16
2.2.4. *Trifolium resupinatum* Türünden İzole Edilen Bileşikler 18

2.3. Genel Bilgiler 19

2.3.1.Terpenoid Bileşikler 19
2.3.1.1. Terpenoid Bileşiklerin Biyosentezi 19
2.3.1.2.Terpenoid Bileşiklerin İzolasyonu 23
2.3.1.3. Triterpenler 25
2.3.1.4. Triterpenlerin Tanınmaları 25
2.3.2. Kumarinler 29
2.3.2.1. Kumarinlerin Tanınmaları 31
2.3.3. Steroidler 32
2.3.3.1. Steroidlerin Tanınmaları 33
2.3.4. Fonksiyonlu Grup İçeren Hidrokarbonlar 34
2.3.5. Flavonoid Bileşikler 37
2.3.5.1. Flavonoidlerin Doğada Bulunuşu ve Kullanım Alanları 37
2.3.5.2. Flavonoidlerin Yapısal Özellikleri ve Sınıflandırılması 39
2.3.5.3. Flavonoidlerin Biyosentezi 41
2.3.5.4. Flavonoidlerde Yapı Çeşitliliği 42
2.3.5.5. Flavonoidlerin Tanınmaları 44

3. MATERYAL VE METOD 47

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 47

3.2. Kullanılan Yöntemler 47

3.2.1. Kolon Kromatografisi 47
3.2.2. İnce Tabaka Kromatografisi 48

3.3. Kullanılan Belirteçler 48

3.3.1. Kromatografi İşlemlerinde Kullanılan Belirteçler 48
3.3.2. UV Spektrumu Kayma Belirteçleri 49

3.4. Kullanılan Cihazlar 49

3.4.1. NMR Spektrometresi 49
3.4.2. Ultraviyole Spektrometresi 49
3.4.3. Kütle Spektrometresi 49
3.4.4. Erime Noktası Cihazı 49
3.4.5. Infrared Spektrofotometresi 50
3.4.6. UV Lambası 50

3.5. Çözücüler 50

4. DENEYSEL BÖLÜM 51

4.1. Bitkinin Ekstre Edilmesi 51

4.2. Diklormetan Ekstratındaki Bileşiklerin İzolasyonu ve Saflaştırılması 51

4.3. Etilasetat Ekstratındaki Bileşiklerin İzolasyonu ve Saflaştırılması 52

4.4. Kimyasal Reaksiyonlar 53

4.4.1. Asetilleme Reaksiyonu 53

4.5. Araştırma Bulguları 54

4.5.1. Fonksiyonlu Grup içeren Bileşikler 54
4.5.1.1. 1 Numaralı Bileşik: Fitil-1-hekzanoat 54
4.5.1.2. 2 Numaralı Bileşik: 3-metil-1-nonen-3-ol 60
4.5.1.3. 7 Numaralı Bileşik: 2', 3'-dihidroksi propil pentadekanoat 67
4.5.2. Triterpenler 75
4.5.2.1. 3 Numaralı Bileşik: Lupeol 75
4.5.3. Kumarinler 79
4.5.3.1. 4 Numaralı Bileşik : Kumarin 79
4.5.4. Steroidler 86
4.5.4.1. 5 Numaralı Bileşik : β Sitosterol 86

4.5.5. Flavonoidler 89
4.5.5.1. 6 Numaralı Bileşik : Formononetin 89
4.5.5.2. 8 Numaralı Bileşik : Kamferol 3-O-(6"-asetil)-β-galaktozit 94
4.5.5.3. 9 Numaralı Bileşik : Formononetin-7-O-β-glikozit 99
4.5.5.4. 10 Numaralı Bileşik **:** Genistein -7-O-β-glukozit 103

4.6. Elde Edilen Bileşiklerin Spektral Özellikleri 108

4.6.1. Fonksiyonlu Grup İçeren Bileşikler 108
4.6.1.1. 1 Numaralı Bileşik: Fitil-1-hekzanoat 108
4.6.1.2. 2 Numaralı Bileşik: 3-metil-1-nonen-3-ol 108
4.6.1.3. 7 Numaralı Bileşik: 2', 3'-dihidroksi propil pentadekanoat 109
4.6.2. Triterpenler 110
4.6.2.1. 3 Numaralı Bileşik: Lupeol 110
4.6.3. Kumarinler 110
4.6.3.1. 4 Numaralı Bileşik: Kumarin 110
4.6.4. Steroidler 111
4.6.4.1. 5 Numaralı Bileşik: β Sitosterol 111
4.6.5. Flavonoid Bileşikler 111
4.6.5.1. 6 Numaralı Bileşik: Formononetin 111
4.6.5.2. 8 Numaralı Bileşik: Kamferol 3-O-(6"-asetil)-β-galaktozit 112
4.6.5.3. 9 Numaralı Bileşik: Formononetin-7-O-β-glikozit 112
4.6.5.4. 10 Numaralı Bileşik: Genistein -7-O-β-glukozit 113

5. SONUÇ VE TARTIŞMA 114

KAYNAKLAR 116

ÖZGEÇMİŞ 121

ŞEKİL LİSTESİ

ŞEKİL No		Sayfa
2.1.	*Trifolium alexandrinum*' dan izole edilen triterpen glikozitler ve saponinler	9-10
2.2.	***T****rifolium alexandrinum*' dan izole edilen kalkanol glukozitler	11
2.3.	***T****rifolium alexandrinum*' dan izole edilen megastigman glikozitler	12
2.4.	*Trifolium repens*' ten izole edilen fenolik bileşikler	13-14
2.5.	*Trifolium repens*' ten izole edilen kalkon ve flavonoidler	15
2.6.	*Trifolium pratense*' den izole edilen izoflavonlar ve glukozitler	16
2.7.	*Trifolium pratense*' den izole edilen diğer izoflavonoid yapılar	16
2.8.	*Trifolium resupinatum*' dan izole edilen saponinler ve polar bileşikler	18
2.9.	İzopren Birimlerinin Baş-Kuyruk Şeklinde Kondenzasyonu	19
2.10.	Mevalonik asit-5-Pirofosfat oluşumu	20
2.11.	İzopentil pirofosfat oluşumu	20
2.12.	İzopentil Pirofosfatın izomerizasyonu	21
2.13.	Geranil Pirofosfat ve Geraniol Oluşumu	21
2.14.	Farnesil Pirofosfat Oluşumu	22
2.15.	Geranil-geranil pirofosfat oluşumu	22
2.16.	Terpenlerin Oluşumu	24
2.17.	Doğal triterpenik bileşiklerin iskelet yapıları	26
2.18.	Lupan'ın kütle bölünme ürünleri	28
2.19.	Benzo α-piran halkası	29
2.20.	Yapısal özelliklerine göre kumarin halkalarına örnekler	30
2.21.	Eskuletol(6, 7- dihidroksi kumarin)	30
2.22.	Siklopentanoperhidrofenantren	32
2.23.	Kolesterol	33
2.24.	Bazı bitkilerden izole edilen hidrokarbonlar	35
2.25.	Bitkilerden izole edilen asetilenik grup taşıyan hidrokarbo	35
2.26	Seril alkol	36
2.27.	Bazı yağ asitlerinin formülleri	37

2.28. Genel flavonoid iskeleti 39
2.29. Flavonoidlerin farklı iskelet yapıları ile oluşan sınıfları 40
2.30. Flavonoidlerin benzoil (A) ve sinnamoil (B) halkası 41
2.31. Flavonoidlerin Biyosentezi 43
2.32. Flavonoid yapılarında substituentlerin en yaygın yerleşme pozisyonları 44
4.1. 1 Numaralı Bileşik: Fitil-1-hekzanoat 54
4.2. Fitil-1-hekzanoat bileşiğine ait ^{1}H NMR spektrumu 56
4.3. Fitil-1-hekzanoat bileşiğine ait ^{13}C NMR spektrumu 57
4.4. Fitil-1-hekzanoat bileşiğine ait ^{1}H-^{1}H COSY spektrumu 58
4.5. Fitil-1-hekzanoat bileşiğine ait EI-MS spektrumu 59
4.6. 2 Numaralı Bileşik: 3-metil-1-nonen-3-ol 60
4.7. 3-metil-1-nonen-3-ol bileşiğine ait ^{1}H NMR spektrumu 62
4.8. 3-metil-1-nonen-3-ol bileşiğine ait ^{13}C NMR spektrumu 63
4.9. 3-metil-1-nonen-3-ol bileşiğine ait COSY spektrumu 64
4.10.3-metil-1-nonen-3-ol bileşiğine ait COSY spektrumu[4.8-7.6 aralığı genişletilmiş 65
4.11. 3-metil-1-nonen-3-ol bileşiğine ait EI-MS spektrumu 66
4.12.7 Numaralı Bileşik: 2',3'-dihidroksi propil pentadekanoat 67
4.13.2', 3'-dihidroksi propil pentadekanoat bileşiğine ait ^{1}H NMR spektrumu 69
4.14.2', 3'-dihidroksi propil pentadekanoat bileşiğine ait ^{13}C NMR spektrumu 70
4.15.2', 3'-dihidroksi propil pentadekanoat bileşiğine ait DEPT spektrumu 71
4.16.2', 3'-dihidroksi propil pentadekanoat bileşiğine ait COSY spektrumu 72
4.17.2', 3'-dihidroksi propil pentadekanoat bileşiğine ait COSY spektrumu [3-5 ppm arası genişletilmiş] 73
4.18. 2,3-dihidroksi propil pentadekanoat bileşiğine ait EI-MS spektrumu 74
4.19. 3 Numaralı Bileşik: Lupeol 75
4.20. Lupeol bileşiğine ait ^{1}H NMR spektrumu 77
4.21. Lupeol bileşiğine ait ^{13}C NMR spektrumu 78
4.22. 4 Numaralı Bileşik: Kumarin 79
4.23. Kumarin bileşiğine ait ^{1}H NMR spektrumu 81
4.24. Kumarin bileşiğine ait ^{1}H NMR spektrumu [6- 7.7 ppm aralığı genişletilmiş] 82
4.25. Kumarin bileşiğine ait ^{13}C NMR spektrumu 83

4.26. Kumarin bileşiğine ait APT spektrumu 84
4.27. Kumarin bileşiğine ait COSY spektrumu 85
4.28. 5 Numaralı Bileşik: β- sitosterol 86
4.29. β-sitosterol bileşiğine ait ^{1}H NMR spektrumu 88
4.30. 6 Numaralı Bileşik: Formononetin 89
4.31. Formononetin bileşiğine ait ^{1}H NMR spektrumu 91
4.32. Formononetin bileşiğine ait ^{13}C NMR spektrumu 92
4.33. Formononetin bileşiğine ait APT spektrumu 93
4.34. 8 Numaralı Bileşik: Kamferol 3-O-(6"-asetil)-β-galaktozit 94
4.35. Kamferol-3-O-(6"-asetil)-β-galaktozit bileşiğine ait ^{1}H NMR spektrumu 96
4.36. Kamferol-3-O-(6"-asetil)-β-galaktozit bileşiğine ait ^{1}H NMR spektrumu
[4-8 ppm arası genişletilmiş] 97
4.37. Kamferol-3-O-(6"-asetil)-β-galaktozit bileşiğine ait ^{13}C NMR spektrumu 98
4.38.9 Numaralı Bileşik: Formononetin-7-O- β -glikozit 99
4.39. Formononetin-7-O- β -glikozit bileşiğine ait ^{1}H NMR 101
4.40. Formononetin-7-O- β -glikozit bileşiğine ait ^{1}H NMR spektrumu
[1-4 ppm arası genişletilmiş] 102
4.41.10 Numaralı Bileşik: Genistein -7-O-β-glukozit 103
4.42. Genistein-7-O-β-glukozit bileşiğine ait ^{1}H NMR spektrumu 105
4.43. Genistein-7-O-β-glukozit bileşiğine ait ^{13}C NMR spektrumu 106
4.44. Genistein-7-O-β-glukozit bileşiğine ait COSY spektrumu 107

TABLO LİSTESİ

2.1. *Trifolium repens'* deki flavonoid yapılar	15
2.2. *Trifolium pratense*' deki izoflavonlar ve glukozitler	16
2.3. *Trifolium pratense*' deki izoflavon yapılar	17
2.4. Terpenoidlerin sınıflandırılması	23
2.5. Meyvelerde bulunan uçucu esterler	36
2.6. Flavonoidlerin UV spektroskopisindeki absorpsiyon bantları	45

1.GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI

Şifalı bitkilerle tedavi uygulaması, insanlık tarihinde 5000 yıllık bir geçmişe sahiptir. İnsanoğlu gelişiminde önce yakın çevresinde yabani bitkileri tanımış, deneme yanılma yöntemi ile yiyebileceklerini ve yenmemesi gereken zehirli olanları belirlemiştir. Hastalıkları iyileştirmede yakın çevredeki bitkilerden yararlanarak, değişik bitkilerin yapraklarını, çiçeklerini, toprak üstü kısımlarını, meyvelerini, tohumlarını, köklerini ve kabuklarını su ile kaynatarak çay şeklinde veya ezerek macun ya da lapa halinde ilaç olarak kullanmıştır.

Bilimin ilerlemesi ve eczacılık tekniklerinin gelişmesiyle 19. ve 20. yüzyıllarda bitkilerin tedavi edici değere sahip etken maddelerinin saf olarak elde edilmesi sağlanmıştır. Sonraları sentetik ilaçlarda ciddi yan etkilerin yol açtığı medikal ve ekonomik sorunlar veya sanayileşmiş ülkelerdeki çevre kirliliğinin arttırdığı ekolojik kirlilikler, tedavileri henüz mümkün olmayan pek çok kronik hastalığın oluşturduğu tehdit, doğal olması ve yan etkilere yol açmadığı düşüncesi gibi bir çok faktöre bağlı olarak bitkilerle tedaviyi popüler hale getirmiştir. Dolayısıyla bitkilerle tedaviye bir süre ara verilmişse de, yeniden doğaya dönüş, en son farmasötik teknoloji olanakları ve iyi üretim koşulları ile üretilen ürünler nedeniyle, bitkisel ilaçlara rağbet artmıştır.

Günümüzde bitkisel doğal ürünlere olan ilgi her zamankinden daha fazladır. Bitkiler antikarsinojenik, anti-enflamatuar, antiallerjik, antifungal, antibakteriyel etkiler gibi pek çok biyolojik aktif özellikleri nedeniyle bilim adamlarının ilgisini çekmektedirler.

Çalışma konumuz olan Fabaceae familyasında yer alan bitkiler insanlar ve hayvanlar için büyük önem taşımaktadır. Bu bitkiler hayvan sağlığı ve beslenmesinde önemli bir yere sahip olup (Foo, vd., 2000), insan sağlığı açısından da bazı türlerin antidiabetik, antioksidant, anti-inflamatuar özelliği, kalp hastalıklarına ve kansere karşı koruyucu etki gösterdiği belirtilmiştir (Khaled, vd., 2000, Heinonen vd., 2004, Baytop, 1994) .

Fabaceae familyası Türkiye'de 68 cins ve 926 tür ile yayılış göstermektedir. Yapılan literatür çalışmaları sonucunda da *Trifolium resupinatum* L. var. *microcephalum* Zoh. türüyle yapılmış fitokimyasal çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bakımdan, çalışmamızda bu türün fitokimyasal bakımdan incelenmesi, sekonder metabolitlerinin izolasyonu ve moleküler yapılarının açıklanması amaçlanmıştır. *Trifolium resupinatum* L. var. *microcephalum* Zoh. türü, ilk defa tarafımızdan çalışılmıştır.

Ayrıca bu çalışma ile, Türkiye'de yetişen *Trifolium* türlerinin kemotaksonomik bakımdan değerlendirilmesine ve izole edilen yeni bileşiklerin moleküler yapılarının tayini ile organik kimya bilimine katkı sağlanması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE ÖNCEKİ ARAŞTIRMALAR

2.1. Bitkinin Tanımı Ve Yayılışı

2.1.1. Fabaceae (Leguminosae) Familyasının Özellikleri

Fabaceae familyası büyük ve önemli familyalardan birisidir; otsu, çalı ve ağaçsı, otsu veya odunsu sarılıcı bitkilerdir; 450-500 cinsi dahil 1300 kadar türü vardır (Seçmen.,1995). Yapraklar çoğunlukla tüysü, trifoliat (üçgül), ender olarakta basittir. Sürgünlere sarmal veya almaçlı olarak dizilmiştir. Kulakçıklar (stipul) mevcut; yaprak sapında ve pinnanların tabanında özel hareket organları (pulvinus) gelişir. Pulvinuslar sayesinde bazı cinslerde yapraklar niktinastik bazen otonom hareketler yapma yeteneğindedirler. Kök yumrucuklarında havanın serbest azotunu bağlayan *Rhizobium* cinsine ait bakteriler simbiyoz halde yaşarlar. Çiçekler aktinomorf veya zigomorf, hermafrodit (erselik), K_5 C_5 A_{9+1} G_{-1} üst durumludur. Meyva bakla (legümen, apokarp meyva) dır. Tohumlarında endosperm (besi doku) yoktur, besin kotiledonlarda depo edilir.

Bu familya üç alt familyaya ayrılır.

1) **Mimosoideae**: Ağaç, çalı veya otsu bitkilerdir. Yaprakları çift tüysü (katlı tüysü)dür. Çiçekleri aktinomorf, küçük, başçık veya başak tipi çiçek durumu oluştururlar. K_4 C_5 A_{1-8} G_1 çiçek formülüne sahiptirler. Çanak bileşik bazen körelmiştir. Taç az belirgin, stamenler serbest veya bileşik, flamentler uzun ve renkli, polenler kitle halindedir.
Örnek*: Albizzia* Durazz., *Acacia* Willd

2) **Caesalpinioideae**: Ağaç ve çalılar ender olarak otsu bitkilerdir. Yapraklar basit tüysüdür. Çiçekler aktinomorftur. Petaller alttan üste doğru birbirini kiremitvari örterler. Stamenler serbesttir.
Örnek: *Gleditschia* L., *Cercis* L., *Ceratonia* L.

3) **Faboideae (Papilionaceae, Papilionatae)**: Çoğunlukla otsu, yarı çalı veya çalılar, ender olarak ağaçlardır. Yapraklar üçgül, tüysü, basit (tam kenarlı) veya elsidir.

Çiçekleri zigomorf, ender olarak aktinomorftur, salkım tipi çiçek kurulu oluştururlar. $K_{(5)}\ C_5\ A_{(10)}$ veya (9+1) ya da $10G_1$ çiçek formülüne sahiptirler. Petallerin üçü serbest, ikisi birleşiktir. Üst taç yaprak büyük ve dik olup Bayrak (Veksillum), yanlardaki iki küçük taç yapraklar ise Kanat (Ala), en alttaki iki taç yaprak beraber büyür ve kayıkçığı (Karina) oluştururlar. Meyve legümendir. Bu alt familya 10 tribusa ayrılır.

Örnek: *Trifolium* L., *Astragalus* L., *Vicia* L.

Türkiye'de yaşayan familyalar içerisinde Asteraceae'den sonra en fazla türe sahip olan ikinci familyadır. Türkiye'de en fazla endemik tür içeren *Astragalus L.* cinsi de bu familyada yer alır. Endemizm oranı %63' tür (Engin, 1993)

2.1.2. Türkiye'de Fabaceae Familyası

Türkiye coğrafi konumu itibariyle birçok araştırmacının dikkatini çekmiştir. Türkiye florası ile ilgili en kapsamlı çalışma olan "Flora of Turkey and East Aegean Island" (Davis, 1966-1986) adlı eserin 3. cildinde Fabaceae familyası için Türkiye'de 68 cins ve 926 türün yayılışı verilmektedir. Baytop, (1988) "İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumundaki Türkiye Bitkileri" kitabında 68 cins ve 440 türe ait örnek bulunduğunu belirtmektedir.

2.1.3. Fabaceae Familyasının Kullanım Alanları

Fabaceae familyasında yer alan bitkilerin büyük bir kısmı insanlar ve hayvanlar için gıda maddesi olarak önem taşımaktadır. Birçoğu da süs bitkisi olarak değerlendirilmektedir (Baytop,1994). Ayrıca pek çoğunun yan ürünlerinden yararlanılır. Örneğin: Boya, sakız, yağ. Proteince zengin olan türlerin genç sürgünlerinde bol miktarda bulunan süksinik asit (kehribar asiti) hayvansal metabolizma açısından önemlidir. Çünkü bu asit sitrik asit döngüsünde rol oynar. Özellikle *Trifolium repens* L. süksinik asit açısından oldukça zengindir. Bu türler kendilerini sümüklü böcek ve

salyangozlardan korumak için bu siyonojik glikozitleri sentezlerler. Bu sentez bitki ve hayvan etkileşmesi sonucu gerçekleşir. 3.8 kg. yoncadan yaklaşık olarak 3.8 g. siyanojenik glikozit elde edilir (Başak ve Savaş, 2000). Bu glikozitler Linamarin ve Lotaustralindir. Halk tarafından bilinen ve kullanılan türler şunlardır:

-*Trifolium nigrences* Viv.
Kullanılan kısımları: Toprak üstü kısımları (Gövde ve yaprak).
Kullanılma alanı: Hayvan yemi olarak.
Yerel adları: Yonca, Tirfil, Üçgül, Kuş elması.

-*Trifolium pratense* L.
Kullanılan kısımları: Çiçek durumları.
Kullanılma alanı: İnsanlar tarafından yenilmektedir. Çiçekleri balgam söktürücü, antiseptik ve yatıştırıcıdır.
Yerel adları: Çayır dutu.

-*Trifolium repens* L.
Kullanılan kısımları: Toprak üstü kısımları (Gövde ve yaprak).
Kullanılma alanı: Hayvan yemi olarak yetiştirilir. Çiçekli dalları kuvvet verici ve romatizma ağrılarını dindiricidir.
Yerel adları: Yonca, Tirfil, Üçgül, Kuş elması.

-*Trifolium arvense* L.
Kullanılan kısımları: Toprak üstü kısımları (Gövde ve yaprak).
Kullanılma alanı: Kabızlık için kullanılır.

2 1.4. *Trifolium* L. Cinsinin Genel Özellikleri

Tek veya çok yıllık otsu bitkilerdir. Yapraklar trifoliat (üçgül) veya ender olarak 5-9 adet, genellikle dişli yaprakçıktan oluşan digitat tiptedir. Kulakçıklar (stipullar)

belirgin genellikle tam olup, yaprak sapına birleşiktir. Çiçekler sapsız veya saplı, başak yada rasemoz halinde kurul oluştururlar veya ender olarak da teker teker bulunurlar. Brakte bulunur veya bulunmaz. Kaliks varyasyonlar gösterir. Korolla pembe, kırmızı, morumsu, beyaz veya sarı renkli olup genellikle kalıcıdır. Stamenler diadelftir ((9)+1). Legümen düzdür, açılmaz veya gayri muntazam yırtılır. Genellikle Mart-Eylül aylarında çiçek açarlar.

2.1.4.1. Türkiye'de *Trifolium* L.Cinsi

"Flora of Turkey and the East Aegean Island" adlı eserde Zohary tarafından Türkiye'de 101 tür ve 130 taksonun yayılış gösterdiği saptanmış olup, 13 taksonu endemiktir ve endemizm oranı %10'dur (Davis, 1966-1986). Bu eserde 45 türün Trakya'da yayılış gösterdiği belirtilmiştir. "Flora Europaea" adlı eserde ise Türkiye'de 43 taksonun yayılış gösterdiği saptanmıştır (Tutin, vd., 1968). "Trakya Florası" adlı eser ise Trakya'da 51 taksonun yer aldığını göstermektedir (Webb, 1966).

2.1.4.2. Trakya Bölgesinde *Trifolium* L. Cinsi

Marmara Bölgesi'nin Trakya kesimi ile ilgili literatürlerde, bu bölgede bulunan *Trifolium* L. tür sayıları hakkında farklı bilgiler mevcuttur. Davis P.H., (1984) 45, Web, D.A. (1966) 51 ve Özhatay (1996) 67 taksonun Trakya'da yayılış gösterdiğini belirtmiştir. Bu bölgeye komşu olan ülkelerin florasında ise, Bulgaristan'da 44, Yunanistan'da 57 (Webb, 1966) *Trifolium* türü bulunmaktadır. Davis (1984) Edirne il sınırları içinde 4, Özhatay (1996) 20 takson tespit etmiştir. Davis (1984) komşu iller olan Kırklarelin'de 9, Tekirdağ'da 11 ve Çanakkale'de 5 taksona yer vermiştir. Yapılan araştırmalarda 21 tür, 1 alttür, 12 varyete düzeyinde 34 takson tespit edilmiştir (Başak ve Savaş, 2001).

2.1.4.3. *Trifolium resupinatum* L.

Tırmanıcı veya gövdeli, 20-60 cm boyunda, tek yıllık bir türdür. Yaprakçıklar 1.0-2.5 cm, uca doğru daralan dairemsi, baklavamsından ovat-oblonga kadar değişik tiplerde, donuk yeşilimsi-mavi renkli değildir. Çiçek durumu 1.0-1.5 cm genişliğinde, küremsi, çok sayıda çiçekli, involukrumsuz, meyvesi stellata yakın, pedinküller taşıyıcı yapraklardan daha uzundur. Kaliks meyvada şişkinleşir, belirgin ağsı damarlı, tüysüzdür. Korolla 6-10 mm, resupinattır.

Mayıs ayında çiçek açar. Tarlalarda, yol kenarlarında, ekilmemiş boş alanlarda, nemli yerlerde, deniz seviyesinden 1500 m yükseklikleri kadar yetişir.

Türkiye'de genellikle batıda, kuzey batıda, Güney Anadolu'da, Adalarda, yayılış gösteren bir bitkidir. Türkiye dışında Kuzey Irak, Suriye, Lübnan, Kıbrıs, Batı İran'da yayılış göstermektedir. *Trifolium resupinatum* L. türüne ait üç varyete bulunmaktadır. Bunlar;

1) *Trifolium resupinatum* L. var. *majus*

2) *Trifolium resupinatum* L. var. *resupinatum*

3) *Trifolium resupinatum* L. var. *microcephalum*

Trifolium resupinatum L. var. *microcephalum* Zoh. da yaprakçıklar 0.4-2.0 cm, korolla 5-8 mm, gövde boyları 60 cm'ye kadar, meyvalı baş 0.7-1.0 cm çapındadır.



Resim 1. *Trifolium resupinatum* L. var. *microcephalum* bitkisinin yaprak durumu



Resim 2. *Trifolium resupinatum* L. var. *microcephalum* bitkisi

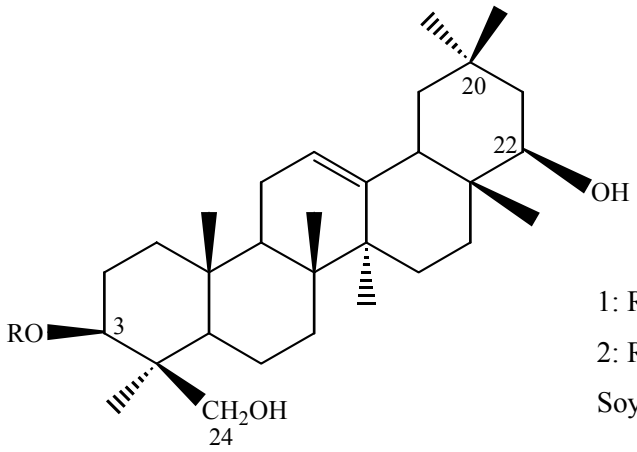


Resim 3. *Trifolium resupinatum* L. var. *microcephalum* bitkisinin meyva durumu.

2.2. *Trifolium* Türlerinden Daha Önce İzole Edilen Bileşikler

2.2.1. *Trifolium alexandrinum* Türünden İzole Edilen Bileşikler

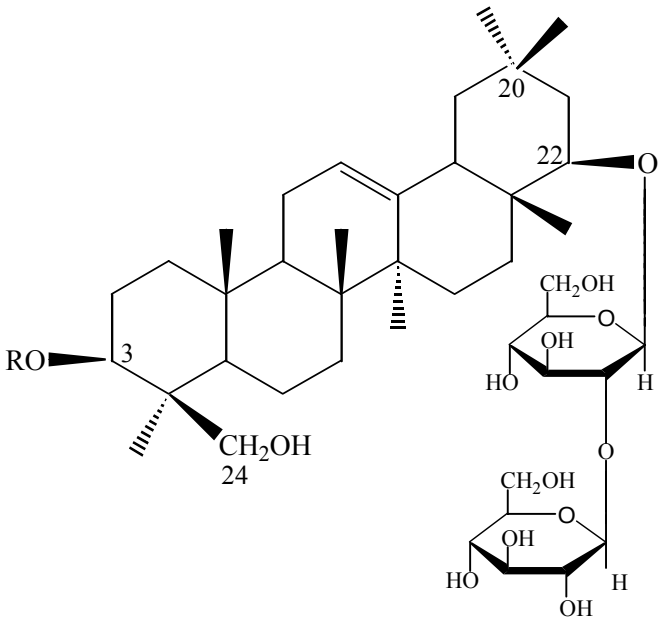
Trifolium alexandrinum' un tohumlarından elde edilen oleanan tipi triterpen glikozitler ve saponinler. (Khaled vd., 1995)



1: R= S-1, R_1= Me (Soyasaponin I metil ester)

2: R= S-2 (Azukisaponin V metil ester)

Soyasapogenol B: R= H

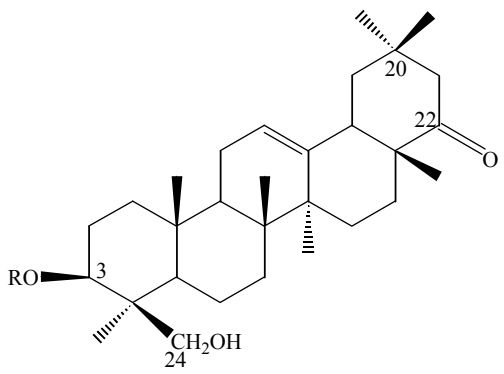


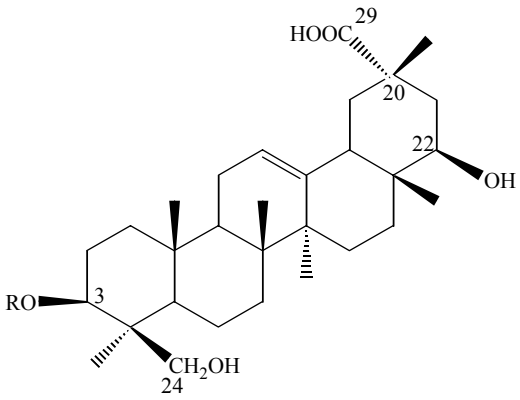
3: R= S-1, R_1= Me (Bersimosid I metil ester)

3a: R= H (Prosapogenin)

4: R= S-2 (Bersimosid II metil ester)

Şekil 2.1. *Trifolium alexandrinum*' dan izole edilen triterpen glikozitler ve saponinler





5: R= S-1, R_1= Me (Dehidrosoyasaponin)

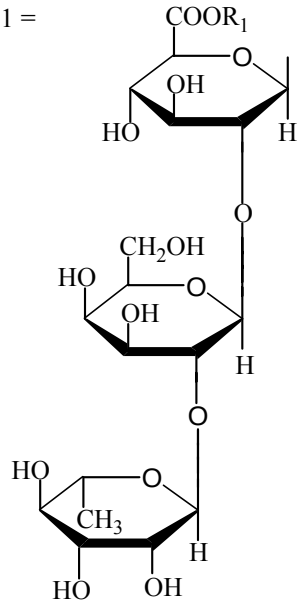
6: R= S-2 (Dehidroazukisaponin V metil ester)

Soyasapogenol E: R= H

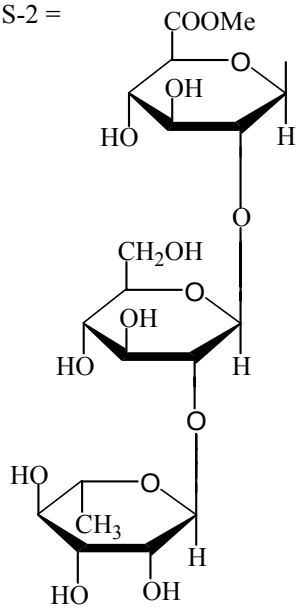
7: R= S-1, R_1= H (Sophoraflavosid II metil ester)

Oksitrogenin: R= H

S-1 =

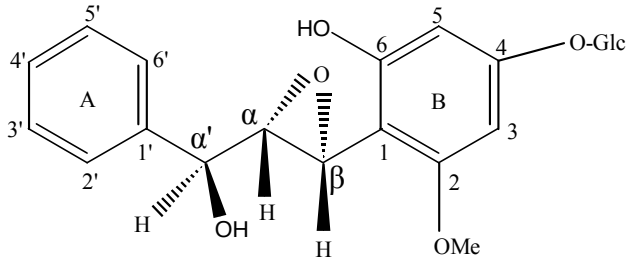


S-2 =

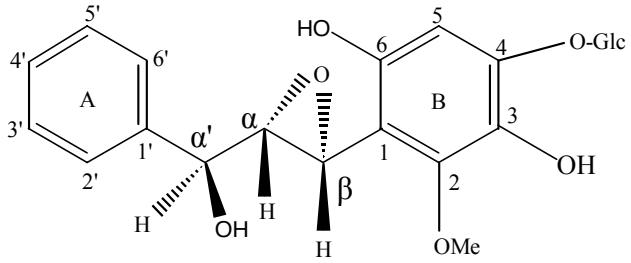


Şekil 2.1. *Trifolium alexandrinum*' dan izole edilen triterpen glikozitler ve saponinler

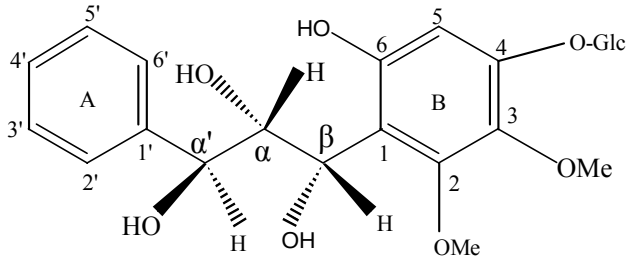
***T**rifolium alexandrinum* bitkisinin tohumlarından elde edilen kalkanol glukozitler. (Khaled vd., 2000)



2-metoksi-4,6-dihidroksi-α'-kalkanol-α, β-epoksit-4-O-β-D-glukopiranozid



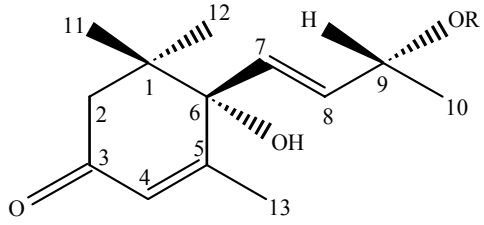
2-metoksi-3, 4, 6-trihidroksi- α'-kalkanol-α,β-epoksit-4-O-β-D-glukopiranozid



2,3-dimetoksi-4,6, -α, β-tetrahidroksi- α'-kalkanol-4-O-β-D-glukopiranozid

Şekil 2.2. ***T**rifolium alexandrinum*' dan izole edilen kalkanol glukozitler

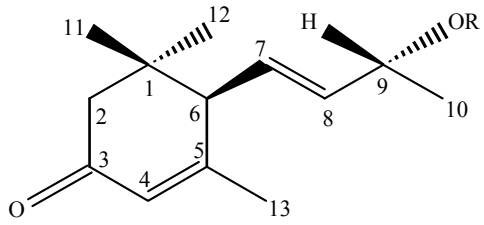
***T**rifolium alexandrinum* bitkisinin tohumlarından elde edilen megastigman glikozitler (Khaled vd., 1999).



1: R= Glc (Roseosid)

1a: R= H

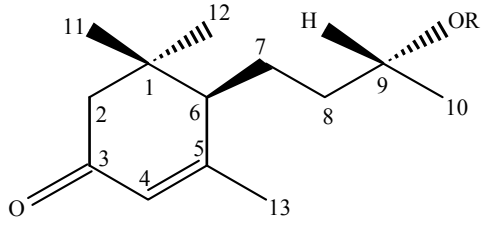
3: R= Glc^{-2} Api (trifostigmanosid I)



2: R= Glc (Roseosid)

2a: R= H

4: R= Glc^{-2} Api (trifostigmanosid II)



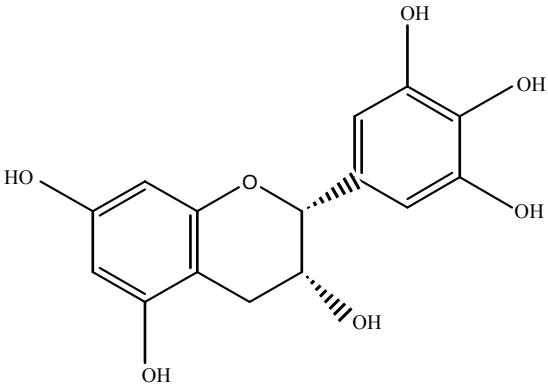
5: R= Glc^{-2} Api (trifostigmanosid III)

5a: R= H

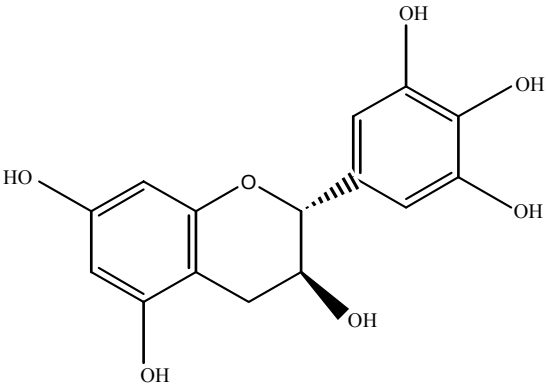
Şekil 2.3. ***T**rifolium alexandrinum*' dan izole edilen megastigman glikozitler

2.2.2. *Trifolium repens* Türünden İzole Edilen Bileşikler

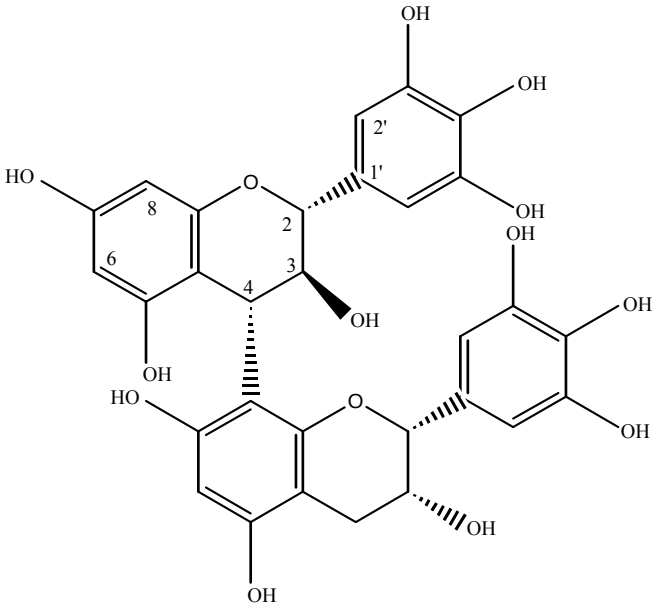
Beyaz yonca çiçeğinden elde edilen fenolik bileşikler (Foo vd., 2000).



Epigallokateşin

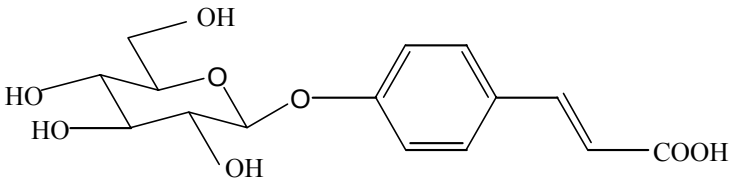


Gallokateşin

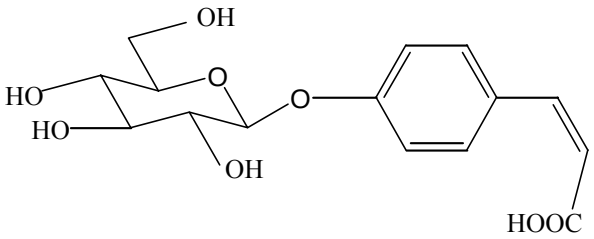


Gallokateşin-(4α-8)-epigallokateşin

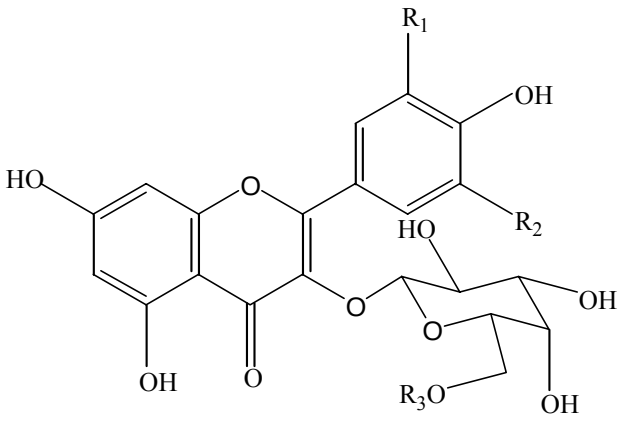
Şekil 2.4. *Trifolium repens*' ten izole edilen fenolik bileşikler



trans-p-kumarik asit 4-O-β-D-glukopiranozit



cis-p-kumarik asit 4-O-β-D-glukopiranozit



1: R_1= R_2= OH, R_3= H (Mirisetin 3-O-β-D-Galaktopiranozit)

2: R_1=OH, R_2= R_3= H (Kersetin 3-O-β-D-Galaktopiranozit)

3: R_1= R_2= R_3= H (Kamferol 3-O-β-D-galaktopiranozit)

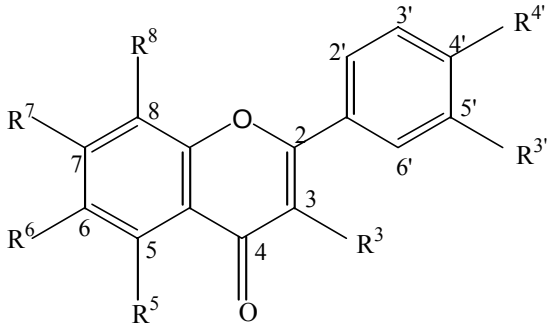
4: R_1= R_2= OH, R_3= $COCH_3$ (Mirisetin 3-O-(6"-asetil)-β-D-galaktopiranozit)

5: R_1= OH, R_2= H R_3= $COCH_3$(Kersetin 3-O-(6"-asetil)-β-D-galaktopiranozit)

6: R_1= R_2= H, R_3= $COCH_3$ (Kampferol 3-O-(6"-asetil)-β-D-galaktopiranozit)

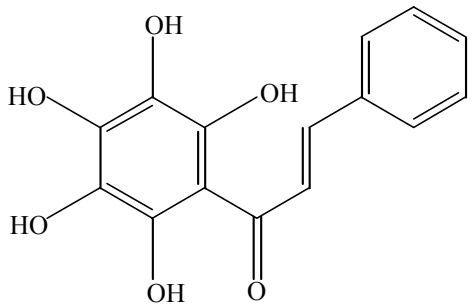
Şekil 2.4. *Trifolium repens*' ten izole edilen fenolik bileşikler

Beyaz yoncanın köklerinden ve filizlerinden elde edilen kalkon ve flavonoidler (Ponce vd., 2004).



Tablo 2.1. *Trifolium repens*' teki flavonoid yapıları

Bileşik	R^3	R^5	R^6	R^7	R^8	$R^{3'}$	$R^{4'}$
4',5,6,7,8-pentahidroksi-3-metoksiflavon	OCH_3	OH	OH	OH	OH	H	OH
3,5,6,7,8-pentahidroksi-4'-metoksiflavon	OH	OH	OH	OH	OH	H	OCH_3
3,7-dihidroksi-4'-metoksiflavon	OH	H	H	OH	H	H	OCH_3
5,6,7,8-tetrahidroksi4'-metoksiflavon	H	OH	OH	OH	OH	H	OCH_3
6-hidroksikamferol	OH	OH	OH	OH	H	H	OH
5,6,7,8-tetrahidroksi-3-metoksiflavon	OCH_3	OH	OH	OH	OH	H	H
4',5,6,7,8-pentahidroksiflavon	H	OH	OH	OH	OH	H	OH
3,4'dimetoksikamferol	OCH_3	OH	H	OH	H	H	OCH_3
Kersetin	OH	OH	H	OH	H	OH	OH
Asesetin	H	OH	H	OH	H	H	OCH_3
Ramnetin	OH	OH	H	OCH_3	H	OH	OH

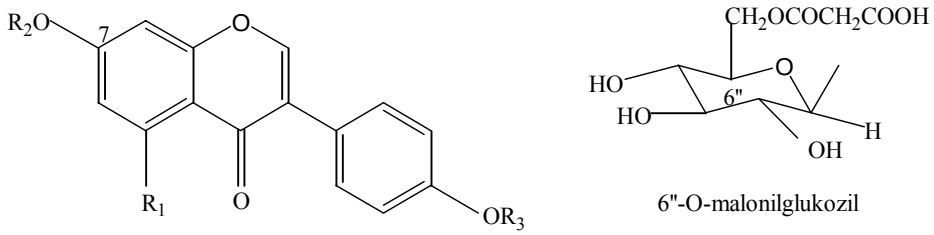


2', 3', 4', 5', 6'-pentahidroksi-kalkon

Şekil 2.5. *Trifolium repens*' ten izole edilen kalkon ve flavonoidler

2.2.3. *Trifolium pratense* Türünden İzole Edilen Bileşikler

Kırmızı yoncanın yapraklarından elde edilen izoflavonlar, glukozitleri ve glukozit malonatları (Rijke vd., 2001).

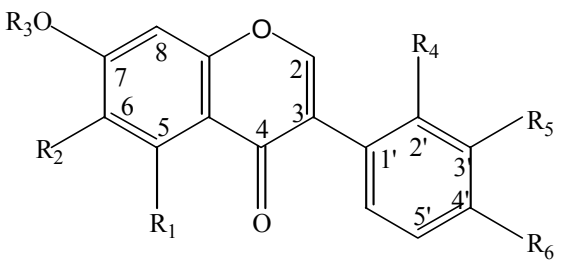


Şekil 2.6. *Trifolium pratense*' den izole edilen izoflavonlar ve glukozitler

Tablo 2.2. *Trifolium pratense*' deki izoflavonlar ve glukozitleri

Bileşik	R_1	R_2	R_3
Daidzein	H	H	H
Daidzin	H	7-O-β-D-glc	H
Genistein	OH	H	H
Genistin	OH	7-O-β-D-glc	H
Formononetin	H	H	CH_3
Ononin	H	7-O-β-D-glc	CH_3
Formononetin-7-O- B-D-Glc-6"-O-Mal	H	7-O-β-D-glc-6"-O-mal	CH_3
Biyosiyanin A	OH	H	CH_3
Sissotrin	OH	glc	CH_3
Biyosiyanin A-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	OH	7-O-β-D-glc-6"-O-mal	CH_3

Aynı bitkiyle yapılan başka bir çalışmadan elde edilen izoflavonlar (Klejdus vd.,2001).



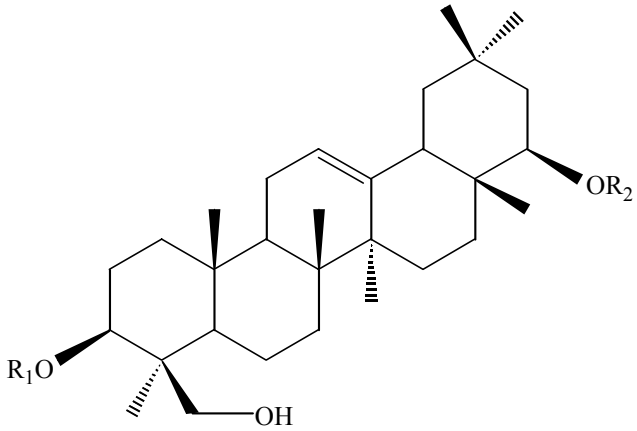
Şekil 2.7. *Trifolium pratense*' den izole edilen diğer izoflavonoid yapısı

Tablo 2.3. *Trifolium pratense*' deki izoflavon yapıları

Bileşik	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6
Daidzin	H	H	glc	H	H	OH
Glisetin-7-O-B-D-Glc	H	OCH_3	glc	H	H	OH
Kalkosin-7-O-B-D-Glc	H	H	glc	H	OH	OCH_3
Genistin	OH	H	glc	H	H	OH
Daidzein-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	H	H	glc-Mal	H	H	OH
3-Metilorobol-7-O-B-D-Glc	OH	H	glc	H	OCH_3	OH
Pratensin-7-O-B-D-Glc	OH	H	glc	H	OH	OCH_3
Kalkosin-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	H	H	glc-Mal	H	OH	OCH_3
Pseudobaptigenin-7-O-B-D-Glc	H	H	glc	H	O-	OCH_2-
Daidzein-7-O-B-D-Glc-6"-O-Asetat	H	H	glc-OAc	H	H	OH
Ononin	H	H	glc	H	H	OCH_3
Genistein-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	OH	H	glc-Mal	H	H	OH
Orobol-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	OH	H	glc	H	OH	OH
3-Metilorobol-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	OH	H	glc-Mal	H	OCH_3	OH
Pratensin-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	OH	H	glc-Mal	H	OH	OCH_3
Daidzein	H	H	H	H	H	OH
İrilon-4'-O- B-D-Glc	OH	O-	CH_2-	H	H	glc
Pseudobaptigenin-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	H	H	glc-Mal	H	O-	OCH_2-
Glistein	H	OCH_3	H	H	H	OH
Orobol	OH	H	H	H	OH	OH
Kalkosin	H	H	H	H	OH	OCH_3
Formononetin-7-O- B-D-Glc-6"-O-Mal	H	H	glc-Mal	H	H	OCH_3
Afrormosin-7-O- B-D-Glc	H	OCH_3	glc	H	H	OCH_3
Sissotrin(Biyosiyanin A-7-O-B-D-Glc)	OH	H	glc	H	H	OCH_3
İrilin B-7-O- B-D-Glc	OH	OCH_3	glc	OH	H	H
İrilon-4'-O- B-D-Glc-6"-O-Mal	OH	O-	CH_2-	H	H	glc-Mal
Trifosid	OH	H	CH_3	H	H	glc
Afrormosin-7-O- B-D-Glc-6"-O-Mal	H	OCH_3	Glc-Mal	H	H	OCH_3
Pseudobaptigenin-7-O-B-D-Glc-6"-O-Asetat	H	H	glc-OAc	H	O-	OCH_2-
Formononetin-7-O- B-D-Glc-6"-O-Asetat	H	H	glc-OAc	H	H	OCH_3
Texasin-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	H	OH	glc-Mal	H	H	OCH_3
İrilin B-7-O- B-D-Glc-6"-O-Mal	OH	OCH_3	glc-Mal	OH	H	H
3'-Metilorobol	OH	H	H	H	OCH_3	OH
Genistein	OH	H	H	H	H	OH
Biyosiyanin A-7-O-B-D-Glc-6"-O-Mal	OH	H	glc-Mal	H	H	OCH_3
Pratensein	OH	H	OH	H	OH	OCH_3
Prunetin-4'-O- B-D-Glc-6"-O-Mal	OH	H	CH_3	H	H	glc-Mal
Pseudobaptigenin	H	H	H	H	O-	OCH_2-
İrilon-4'-O- B-D-Glc-6"-O-Asetat	OH	O-	CH_2-	H	H	glc-OAc
Formononetin	H	H	H	H	H	OCH_3
Prunetin-4'-O- B-D-Glc-6"-O-Asetat	OH	H	CH_3	H	H	glc-OAc
Texasin	H	OH	H	H	H	OCH_3
Biyosiyanin A-7-O-B-D-Glc-6"-O-Asetat	OH	H	glc-OAc	H	H	OCH_3
İrilon	OH	O-	CH_2-	H	H	OH
Prunetin	OH	H	CH_3	H	H	OH

2.2.4. *Trifolium resupinatum* Türünden İzole Edilen Bileşikler

Trifolium resupinatum' dan elde edilen saponinler ve polar bileşikler(Simonet vd., 1999).

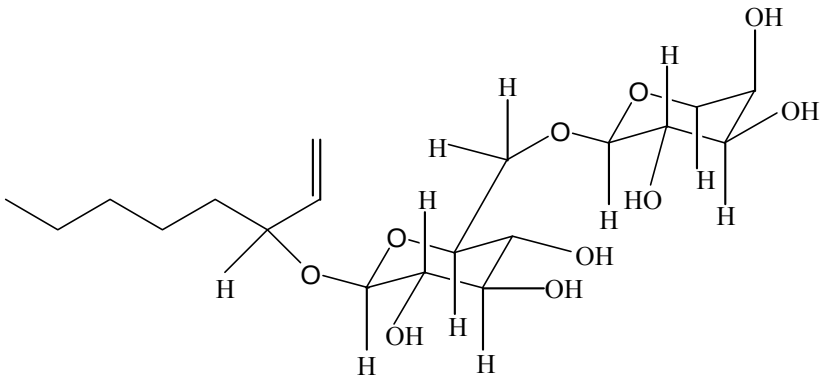


1: R_1= Rha-^{2}Gal-^{2}GlcA, R_2= H, Soyasaponin I

2: R_1= Rha-^{2}Gal-^{2}GlcA, R_2= Glc, Soyasapogenol B

3: R_1= Rha-^{2}Gal-^{2}GlcA, R_2= Glc-^{2}Glc, Soyasapogenol B

4: R_1= Rha-^{2}Xyl-^{2}GlcA, R_2= H, Soyasaponin II



5: 3-O-[α-L-(1→6)-β-D-glukopiranozil]-okt-1-en-3-ol

Şekil 2.8. *Trifolium resupinatum*' dan izole edilen saponinler ve polar bileşikler

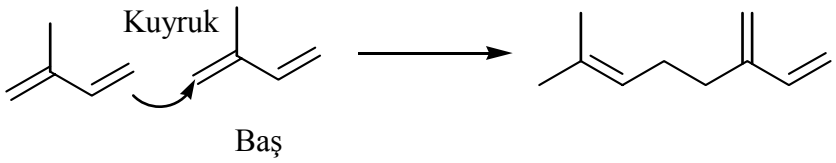
2.3. Genel Bilgiler

2.3.1.Terpenoid Bileşikler

Bitkilerde yaygın olarak bulunan terpenoid bileşikler değişik yapısal özellikler gösteren ve biyolojik önemi olan bileşik sınıflarından birisidir. Tüm canlı organizmalarda bulunduklarından dolayı, çok fazla araştırılmaktadırlar.

Terpenler bitki dokularında çoğunlukla serbest olarak, bazıları glikozitleri yada organik asit esterleri halinde, bazen de proteinlerle birleşmiş olarak bulunmaktadırlar. 10 ya da 15 karbonlu olan uçucu terpenler bitkilerden su buharı destilasyonu ile, daha fazla karbonlu uçucu olmayan terpenler ise ekstraksiyon yöntemiyle izole edilmektedirler.

Terpenoid bileşiklerin ana iskeleti, beş karbonlu izopren (2-metil-1, 3-butadien) birimlerinin baş-kuyruk kondenzasyonu reaksiyonuyla oluşmuştur. Yapısında izopren birimi bulunan bileşiklere izoprene benzeyen anlamına gelen izoprenoid veya terpenoid adı verilmektedir (Şekil 2.9).



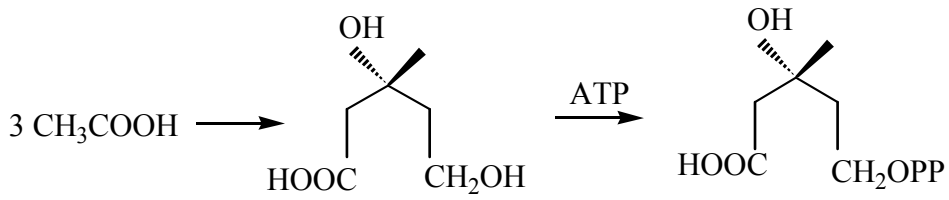
Şekil 2.9. İzopren Birimlerinin Baş-Kuyruk Şeklinde Kondenzasyonu

2.3.1.1. Terpenoid Bileşiklerin Biyosentezi

Mevalonik asit terpenlerin biyosentezinde önemli rol oynamaktadır. 3 mol asetik asid'in kondenzasyonu ile oluşan mevalonik asit (Şekil 2.10) H_2O ve CO_2 kaybı ile izopren birimlerini oluşturmaktadır.

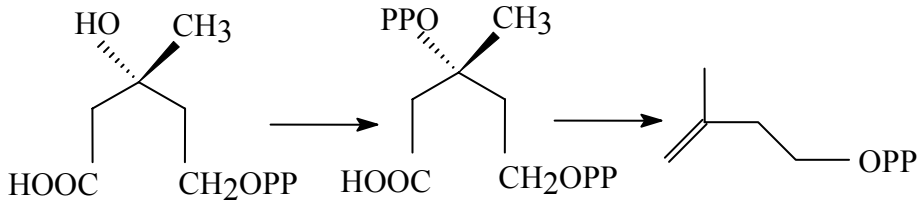
Mevalonik asit eldesinde başlangıç maddesi olan asetil koenzimA (CH_3CO-SCoA) pek çok doğal bileşiğin biyosentezinde rastlanan bir madde olup şekerlerin oksidatif degredasyonundan oluşur ve sonunda CO_2'e okside olur (Tresa vd.,1987). Asetil koenzim A'nın doğal bileşiklerin oluşumunda önemli rolü vardır. Asetil koenzim A birçok doğal bileşiğin yapı taşıdır. Mevalonik asit ise yalnız terpenlerin oluşumunda rol oynar. Mevalonik asit terpen biyozentezini diğer metabolik yollardan ayıran bir bileşiktir (Geisman, vd.,1969, Tedder, vd.1972). Şekil 2.16 asetil koenzim A'dan hareketle terpenlerin oluşumunu göstermektedir.

Mevalonik asitin ATP (adenosintrifosfat) ile reaksiyonundan mevalonik asit-5-pirofosfat oluşur (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Mevalonik asit-5-Pirofosfat oluşumu

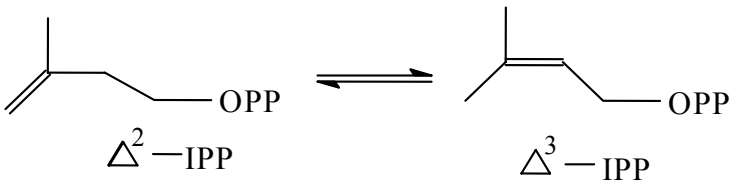
Tersiyer OH grubunun fosforlanması bunu takiben dekarboksilasyonu ve dehidrasyonu ile izopentil pirofosfat oluşmaktadır (Şekil 2.11).



Mevalonik Asit-5-Pirofosfat Mevalonik Asit-3,5-difosfat İzopentenil Pirofosfat

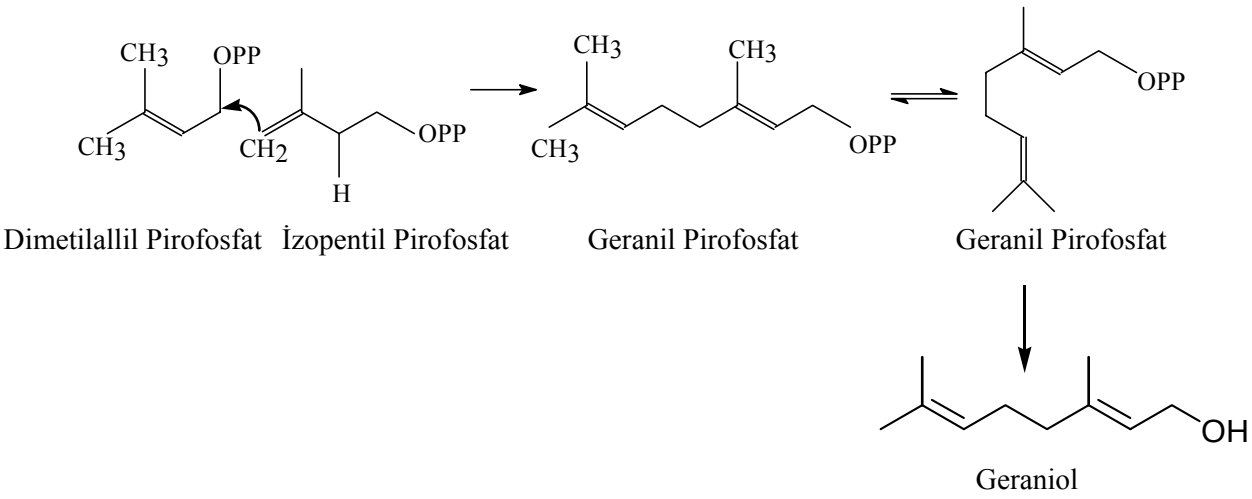
Şekil 2.11. İzopentil pirofosfat oluşumu

İzopentil pirofosfat, bir enzim yardımıyla izoprenoid biyosentezini gerşekleştirmektedir. İzopentil pirofosfatın enzim ile izomerizasyonu sonucu dimetilallil esteri oluşmaktadır (Şekil 2.12) (Geisman, vd.,1969, Francis vd.,1996).



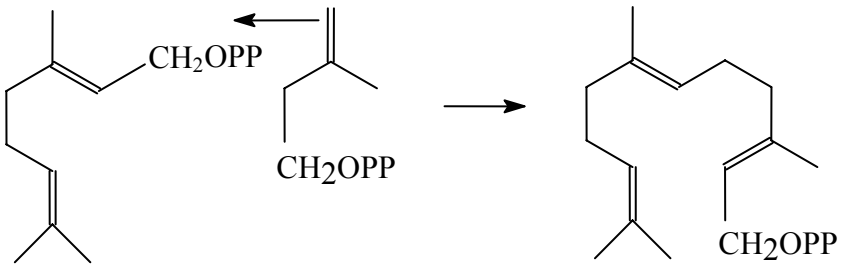
Şekil 2.12. İzopentil Pirofosfatın izomerizasyonu

Bu iki izomerin kondenzasyonu sonucu geranil pirofosfat, geranil pirofosfat'ın dehidrasyonu sonucuda geraniol meydana gelmektedir. Bu madde monoterpenlerin biyosentezinde rol oynamaktadır (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. Geranil Pirofosfat ve Geraniol Oluşumu

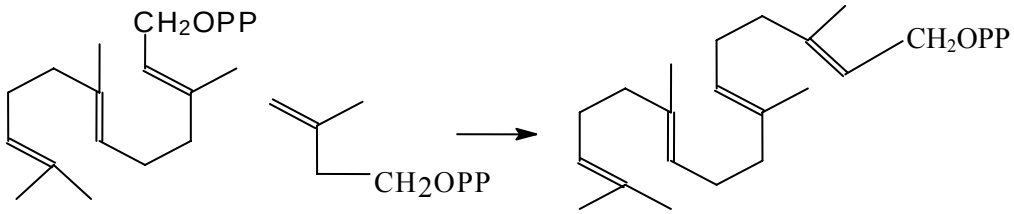
Geranil pirofosfat ile izopentenil pirofosfatın kondenzasyonu farnesil pirofosfatı vermektedir. Bu ürün seskiterpenlerin biyosentezinde rol oynamaktadır (Şekil 2.14).



Geranil Pirofosfat İzopentil Pirofosfat Farnesil Pirofosfat

Şekil 2.14. Farnesil pirofosfat oluşumu

Farnesil pirofosfatın tekrar izopentenil pirofosfat ile kondenzasyonu geranil-geranil pirofosfatı vermekte ve bu ürün diterpenleri oluşturmaktadır (Şekil 2.15).



Farnesil Pirofosfat İzopentil Pirofosfat Geranil-geranil Pirofosfat

Şekil 2.15. Geranil-geranil pirofosfat oluşumu

İzopentenil, geranil ve farnesil pirofosfat moleküllerinin birbirleriyle değişik kondenzasyonları sonucu daha yüksek yapılı terpenoidler oluşmaktadır. Asetil koenzim A'dan başlayarak biyosentez yoluyla oluşan maddeler Şekil 2.16 da gösterilmektedir.

İzopentenil pirofosfat moleküllerinden iki, üç, dört, beş, altı ve sekiz izopentil pirofosfat molekülünün birleşmesi sonucunda, açık zincirli yada halkalı terpenoid bileşikleri meydana gelmektedir. Terpenoidlerin ana iskeletleri 5 karbonlu izopren

birimlerinden oluştuğundan sınıflandırılmaları izopren birimlerinin sayısına göre yapılmaktadır. "İzopren Kuralına" göre bütün terpenik bileşiklerin karbon iskeletleri izopren birimlerinin iki ya da daha fazlasının birleşmesi ile oluşmaktadır (Boiteu, vd., 1964).

Tablo 2.4. Terpenoidlerin sınıflandırılması

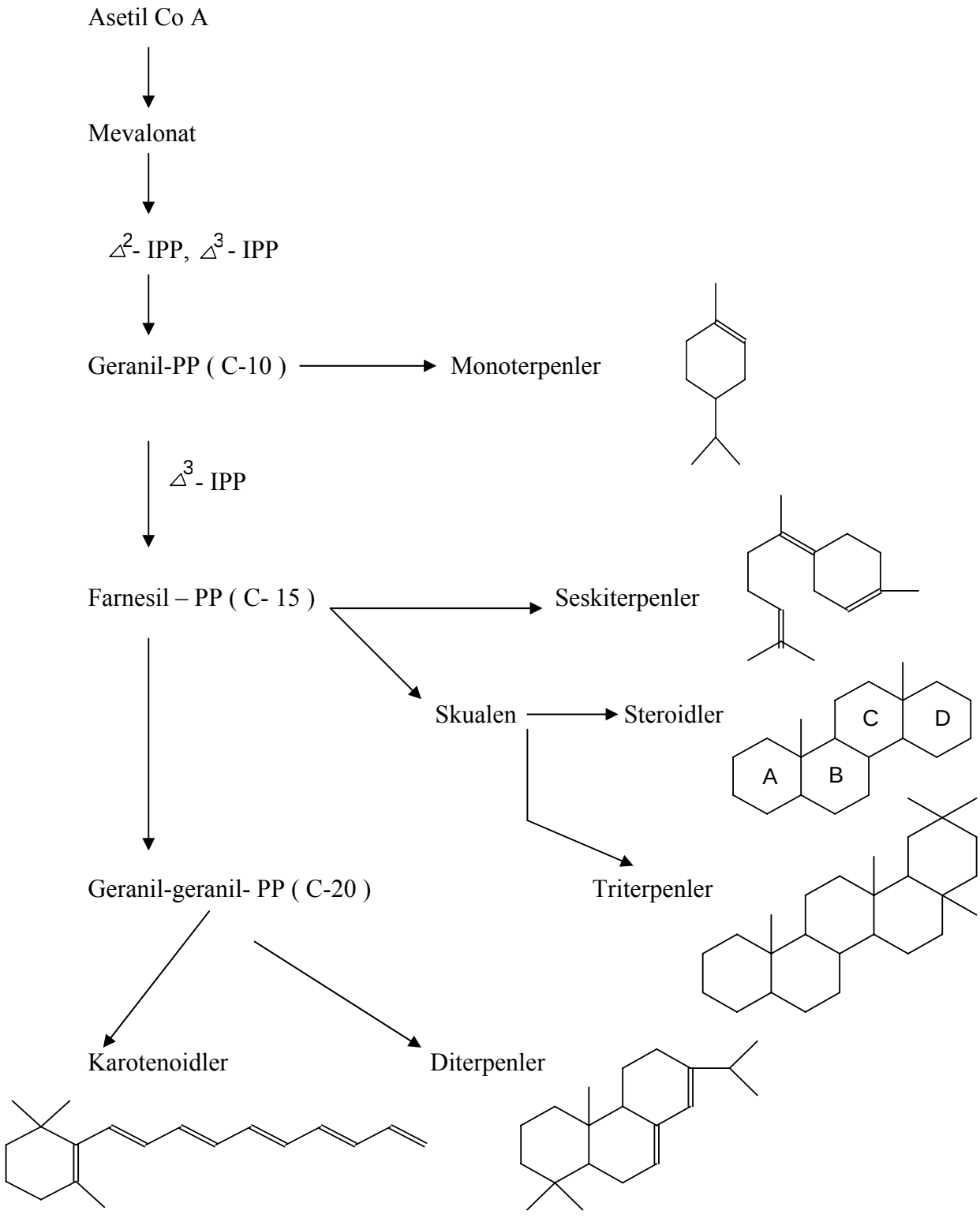
İzopren sayısı	SINIFI	C SAYISI
1	Hemitrepenler	5
2	Monoterpenler	10
3	Seskiterpenler	15
4	Diterpenler	20
5	Sesterterpenler	25
6	Triterpenler	30
8	Tetraterpenler(Karotenoidler)	40
n	Politerpenler	(5)n

2.3.1.2.Terpenoid Bileşiklerin İzolasyonu

Terpenoid bileşiklerin bitkiden izolasyonu için, öncelikle bitkisel materyal küçük parçalara kesilir veya toz haline getirilir. Toz haline getirilmiş olan bitki metanol ile maserasyon yöntemi kullanılarak ekstrakte edilir. Metanol ekstresi nonpolar bir çözücü kullanılarak (petrol eteri veya hekzan) ile ekstraksiyona tabii tutulur ve içindeki apolar maddeler bu çözücüye çekilir. Daha sonra polarite arttırılarak daha polar bir çözücüyle (diklorometan veya aseton) aynı işlem tekrarlanır. Bu şekilde apolar ve polar terpenik bileşikler içeren ekstreler elde edilmiş olur.

Daha sonra bu ekstrelere kromatografik ayırma ve saflaştırma yöntemleri uygulanarak tek madde izolasyonu yapılır. En çok kullanılan yöntem kolon ve preparatif ince tabaka kromatografisi olup, adsorban olarak silikajel kullanılmaktadır.

Uçucu olan ya da uçucu türevleri haline getirilebilen ve miktarı az olan terpenlerin izolasyonunda, gaz kromatografisi, polar bileşiklerin izolasyonunda ise yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemleri de kullanılmaktadır. Karotenoid bileşikler ve bazı lakton yapısındaki terpenler kolay bozundukları için, ekstraksiyon ve saflaştırma çalışmaları özel şartlarda (soğukta, inert atmosferde, ışıktan korunarak) dikkatlice yapılmalıdır.



Şekil 2.16. Terpenlerin Oluşumu

2.3.1.3. Triterpenler

Triterpenler halka sayısı ve taşıdıkları fonksiyonel gruba göre sınıflandırılmaktadır. Halka sayısına göre trisiklik, tetrasiklik ve pentasiklik olmak üzere üç grupta toplanırlar (Şekil 2.17). Triterpenler hiç sübstitüent taşımazlarsa triterpenik hidrakarbonlar olarak adlandırılırlar.

Bitkilerde serbest olarak bulunabildikleri gibi triterpenik saponinler olarak isimlendirilen glikozitleri halinde de bulunabilirler. Serbest triterpenler, karboksilli asit, alkol, aldehit, karbonil, epoksi ve lakton gruplarından bir ya da bir kaçını bir arada bulundurabilirler (Boiteu, vd., 1964).

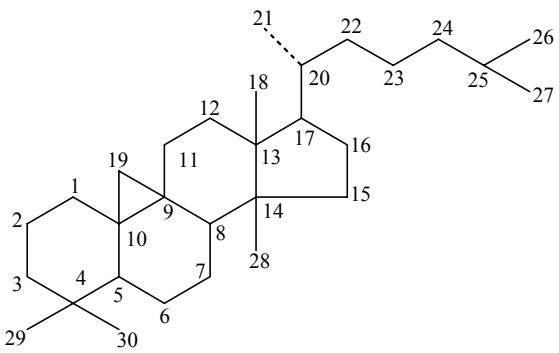
Triterpenler benzer yapıda olmaları ve genellikle az sayıda fonksiyonel grup taşımaları nedeniyle kolon ve ince tabaka kromatografisi yöntemleri ile birbirlerinden güçlükle ayrılırlar. Bu sebeple triterpenlerin ayrılmalarında yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemleri tercih edilmektedir. Uçucu olan ya da uçucu türevi haline getirilen triterpenlerin ayrılması için gaz kromatografisi yöntemleri de kullanılmaktadır.

2.3.1.4. Triterpenlerin Tanınmaları

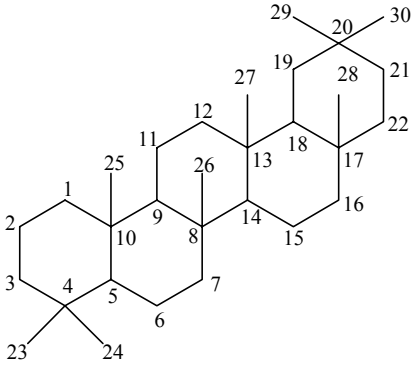
Lieberman-Burchard reaksiyonu triterpenlerin tanınmasında özellikle steroidlerden ayrılmasında en çok kullanılan renk reaksiyonudur. Mavi-yeşil renk triterpenlerin varlığını gösterirken (Boiteu, 1964), steroidlerde ise bu reaksiyon hem yavaş yürümekte hem de kızıl kahve bir renk vermektedir.

UV spektrumu, triterpenlerin büyük bir kısmı konjuge çifte bağa ve oksokrom gruplara sahip olmadığından yapı analizinde fazla bilgi vermemektedir.

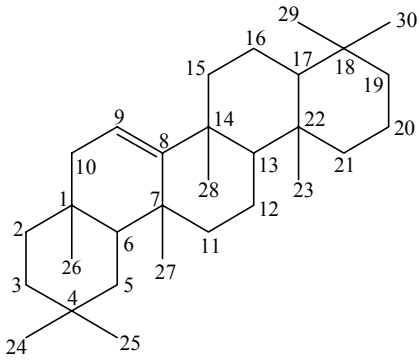
IR spektrumu, yapıdaki fonksiyonel gruplar (karbonil, alkol, karboksilik asit, ester v.b.) hakkında bilgi vermektedir. Hidroksil grupları 3000-3500 cm^{-1}, alifatik C-H bağlarının gerilme titreşimleri 2850-2900 cm^{-1}, ester karbonilinin C=O gerilme titreşimi 1700-1750 cm^{-1}, izole keton gerilim titreşimi 1653-1750 cm^{-1}, ester karbonilinin C=O gerilim titreşimini destekleyen C-O eğilim titreşimleri 1450, 1370, 1250 cm^{-1}'lerde, doymamışlığa ait bantlar ise 1600-1650 cm^{-1} de izlenmektedir.



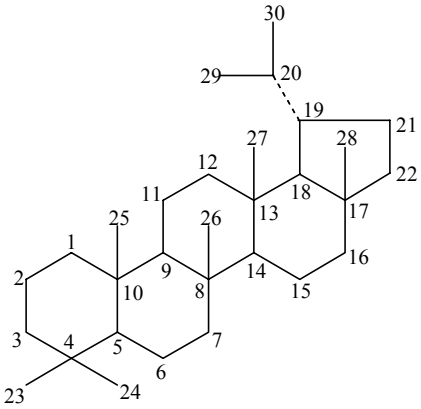
Sikloartan



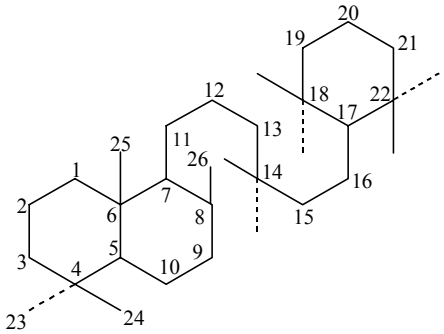
Oleanan



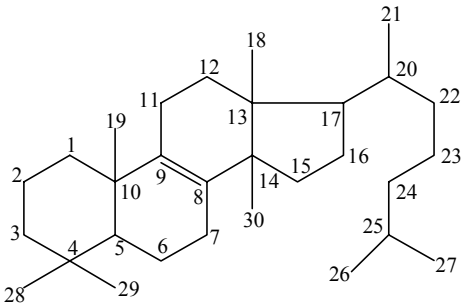
Tarakseran



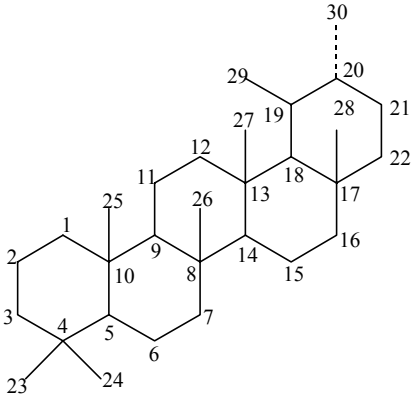
Lupan



Ambran(Trisiklik)



Lanostan(Tetrasiklik)



Ursan(Pentasiklik)

Şekil 2.17. Doğal triterpenik bileşiklerin iskelet yapıları

Triterpenler için ^{1}H NMR spektrumu oldukça önemlidir. Karakteristik "metilen zarfları" bileşiğin steroid veya triterpen olduğu hakkında yaklaşık bir bilgi vermektedir. Metilen zarfı geniş ise steroid, daha sivri ise triterpen olduğu düşünülmektedir. Triterpenlerin yapılarında en az 8 metil grubu bulunmaktadır. Bu nedenle ^{1}H NMR spektrumunda ilk önce 8 metil grubu aranır. Fakat bu metil grupları, bazen aldehit, asit ya da alkol gibi gruplara dönüşmüş olabilirler ya da metil hidrojenleri başka gruplarla yer değiştirebilirler. Metil gruplarının kimyasal kaymaları ve bölünme durumları iskelet hakkında bilgi vermektedir. Örneğin 20(29)en-Lupan tipi triterpenler de, 1.69 ppm civarında izlenen vinilik metil grubuna ait pik ile 4.50-4.60 ppm civarındaki iki adet genişlemiş singlet yapıdaki ekzometilen grubunun varlığını gösterir.

Triterpenin yapısına şeker bağlı olduğunda, şekerin anomerik karbonuna bağlı proton iki oksijen fonksiyonu arasında kaldığından 4.00-5.5 ppm civarında izlenmektedir.

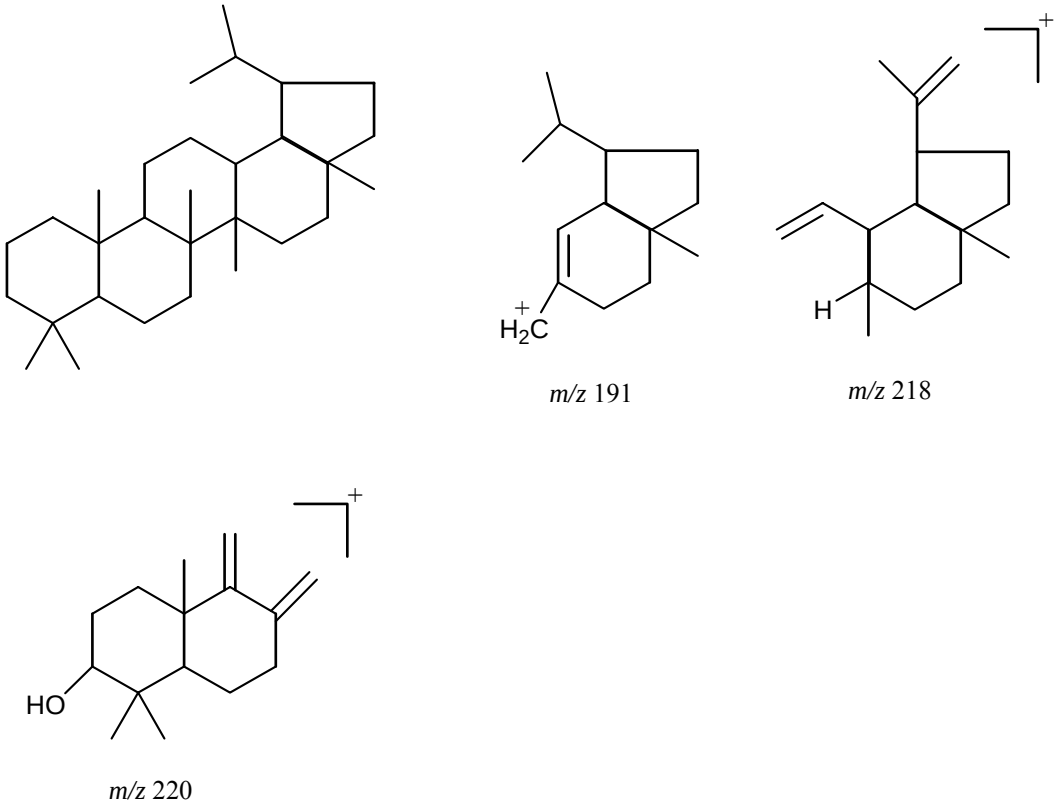
^{13}C NMR spektrumunda yapının kaç karbonlu olduğu ve karbonil, ester, karboksilik asit, oksimetin, hidroksimetin gibi grupların varlıkları gözlenmektedir. Spektrumda 10-30 ppm civarında metil pikleri, 30-50 ppm civarında metilen grubuna ait pikler, eğer metoksi grubu varsa 53-60 ppm civarında, 60-85 ppm aralığında oksijene komşu karbonlar, yapıya şeker bağlıysa şekerin anomerik karbonu iki oksijen arasında kaldığı için 104 ppm civarında gözlenmektedir. 105-150 ppm arasında çift bağ ve aromatik karbonlar izlenmektedir. Ester karbonili 160-175 ppm de, asit karbonili 180-190 ppm civarında, aldehit karbonili 190-210 ppm civarında gözlenirken izole keton karbonilleri 175-230 ppm civarında gözlenmektedir (Erdik, 1993).

Kütle spektrumunda, moleküler pikin yanı sıra iskelet üzerinde çifte bağın yeri farklı parçalanmalara neden olduğundan triterpenik yapının iskeleti hakkında bilgi edinilip belirlenebilir (Budzikiewicz, vd.,1963).

Pentasiklik triterpenler oleanan ve ursan iskeletlerinde Retro-Diels-Alder bölünmesi C-12 deki çifte bağ üzerinde olmaktadır. Standart olarak bu iskeletlerde temel pik olarak *m/z* 218 piki izlenecektir (Ogunkoya, 1981).

Pentasiklik bir triterpen olan lupan tipi iskeletlerde, önce E halkasının kopması nedeniyle isopropil veye isopropenil grubunun ayrılması söz konusu olmaktadır. Bu nedenle moleküler iyon pikinin yanı sıra *m/z* 43 piki $[M\text{-}C_3H_7]$ ve $[M^{+}\text{-}CH_3]$ pikleri de gözlenir. Aşağıda Lupan tipi triterpenlerin karakteristik bölünmeleri verilmektedir

(Şekil 2.18) (Budzikiewicz, vd., 1963). Lupan tipi triterpenlerde C-20 ve C-29 arasında çifte bağ varsa temel pik *m/z* 189 da izlenmektedir (Budzikiewicz, vd., 1964).



m/z 191 *m/z* 218

m/z 220

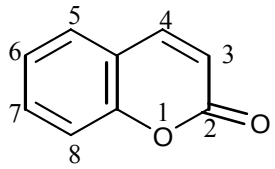
Şekil 2.18. Lupan'ın kütle bölünme ürünleri

2.3.2. Kumarinler

Kumarinler bitkilerde serbest ya da glikozitleri halinde bulunmaktadırlar. Serbest kumarinler bitkilerden petrol eteri, benzen, kloroform veya eter ile ekstrakte edilir. Glikozitleri ise, metanol, etanol veya etanol-su karışımı ile ekstrakte edilmektedirler.

Kumarinler, kolon kromotografisi ile uygun adsorban kullanılarak izole edilirler. Saflaştırmak için preparatif ince tabaka kromotografisi, kolon kromotografisi, Sefadex LH-20 kullanılmaktadır (Murray, 1982).

Kumarinler 5,6-benzo-2-piran (benzo α-piran) halkası taşıyan bileşiklerdir (Şekil 2.19). Doğal kaynaklı kumarinler C-7 de oksijen atomu içermektedirler.

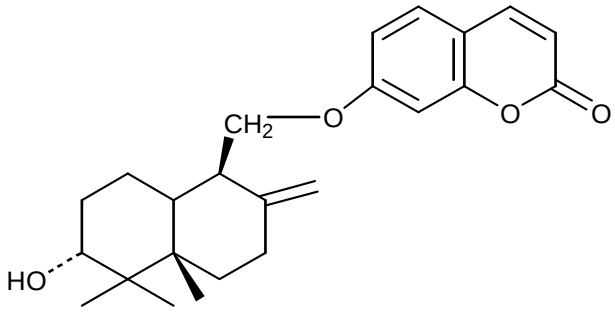


Şekil 2.19. Benzo α-piran halkası

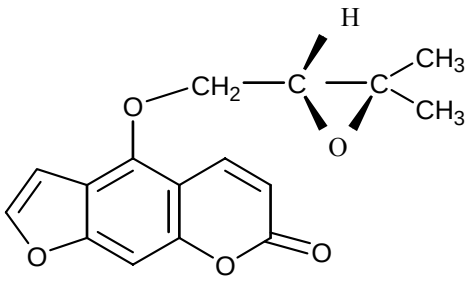
Yapısal özelliklerine göre kumarinler dört gruba ayrılmaktadır (Şekil 2.20).

1) Benzen halkasında sübstitüent taşıyan kumarinler.
2) Furano kumarinler
3) Dihidrofurano kumarinler
4) Dihidropirano kumarinler

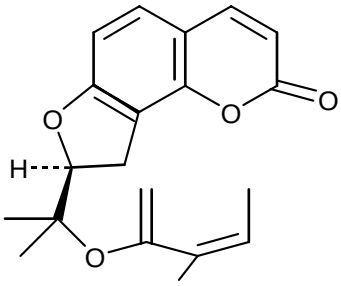
Kumarinlerin bazılarının antikoagülan, diüretik, antibakteriyal, hepatotoksik, sitotoksik etki gösterdikleri literatürde kayıtlıdır (Nielsen, 1970) .



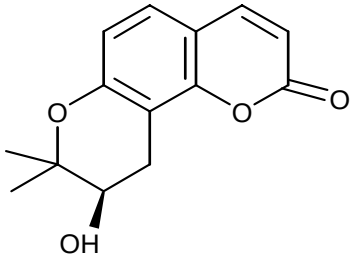
Farnesiferol A



Furano kumarin (oxypeucedanin)



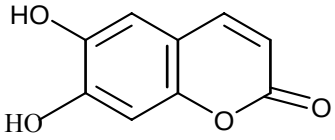
Dihidrofuranokumarin (Columbianadin)



Dihidropiranokumarin (lomatin)

Şekil 2.20. Yapısal özelliklerine göre kumarin halkalarına örnekler

Eskuletol (Şekil 2.21) P vitamini aktivitesi gösterir. Furano kumarinler deride ışığa karşı duyarlılık yaratmakta ve allerjik bir reaksiyon meydana getirmektedir (Nielsen, 1970) .



Şekil 2.21. Eskuletol(6, 7- dihidroksi kumarin)

2.3.2.1. Kumarinlerin Tanınmaları

Kumarinler UV ışıkta (366nm) floresans özellik gösteren maddelerdir. Amonyak püskürtülüp UV ışık altında bakıldığında aldığı renk kumarinin yapısı hakkında bilgi verebilir. Genellikle kumarinler 220 ve 320 nm civarında iki kuvvetli, 250-260 nm arasında daha zayıf bir veya iki adsorbsiyon piki vermektedir (Nielsen, 1970).

Furanakumarinlerde IR spektrumunda üç kuvvetli bant gözlenmektedir. Bunlardan birincisi 1600-1650 cm^{-1} de gözlenen C=C bantı, ikincisi 1700-1750 cm^{-1} deki lakton grubundan ileri gelen banttır. Üçüncü bant ise 3300-3175 cm^{-1} de ve 1613-1639 cm^{-1} de gözlenen C=C geriliminden meydana gelen kuvvetli keskin bantlardır. (Nielsen, 1970).

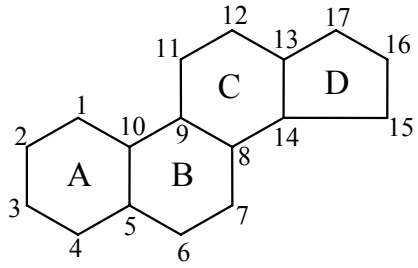
^{1}H NMR spektrumunda C-5 de oksijen fonksiyonu bulunmuyorsa H-3 ve H-4 9.5 Hz'lik iki duplet olarak 6.10-6.40, 7.50-7.90 ppm aralığında gözlenirler. C-5 de oksijen bulunması halinde ise, H-3 ve H-4, 6.10-6.40, 7.90-8.20 ppm aralarında 9.5 Hz'lik iki duplet oluştururlar. C-8 de fonksiyonel grup varsa H-3 ve H-4, 6.60-6.90, 7.10-7.50 ppm aralarında 8.5 Hz'lik iki duplet halinde gözlenmektedir. Diğer aromatik protonlar, halkadaki sübstitüsyona bağlı olarak (hidroksil, metoksi, metilen vb.) kendi kimyasal kaymalarına uygun alanlarda rezonans yapmaktadırlar.

EI-MS spektrumunda, genellikle moleküler iyon pikinden sonra izlenen en belirgin pik lakton karboniline ait $[M-28]^{+}$ kopuşudur. Böylece bileşik benzofuran tipine dönüşmektedir. Bununla beraber bazı durumlarda moleküler iyon piki gözlenmeyebilir. Kütle spektrumu, kumarinlerin molekül ağırlıklarının ve bölünme ürünlerinin saptanmasında kullanılmaktadır.

^{13}C NMR spektrumunda; C-2, 160 ppm civarında; C-3, 115 ppm civarında; C-4, 140 ppm civarında; C-5, 128 ppm; C-6, 125 ppm; C-7, 131 ppm; C-8, 116 ppm civarında çıkmaktadır (Murray, 1982). Bu değerler sübstitüsyonların cinsine ve konumuna bağlı olarak değişiklik gösterebilirler.

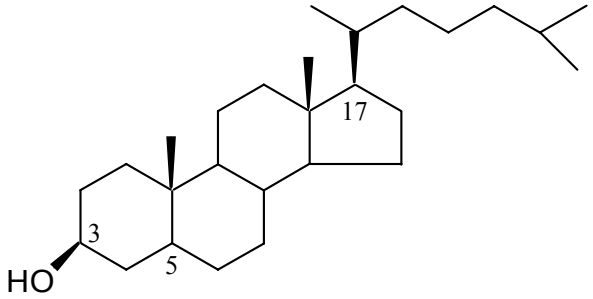
2.3.3. Steroidler

Bitki ve hayvanlarda yaygın olarak bulunan bileşiklerdir. Steroid grubunun içinde, steroller, vitamin D, mide ve safra asitleri, kalp glikozitleri, adrenal korteks hormonları ve cinsiyet hormonları, karsinojik hidrokarbonlar, bazı saponinler yer almaktadır. Steroidlerin temel yapısı siklopentanoperhidrofenantren halka sistemidir ve genelde 29 C atomu ya da 27 C atomundan oluşur. (Şekil 2.22). Bu halka, dört halkanın birleşmesi ile oluşmuştur. Halka sistemi A halkasından başlayarak numara ve harflerle işaretlenir. Substitüentler genellikle C_3, C_7, C_{12} de bulunur.



Şekil 2.22. Siklopentanoperhidrofenantren

Bitkisel steroidler genellikle C-3 de hidroksil, C-5 de çifte bağ ve C-17 de yan zincir taşırlar. Bu bileşiklerde halka üyesi atomlar iki paralel düzlem içersinde bulunurlar ve bunlara bağlı gruplar arasında da, aynen siklohekzan türevlerinde olduğu gibi, *cis* ve *trans* durumlar meydana çıkmaktadır. Bu durumun belirlenmesi, C-10 daki CH_3 grubu ile C-3 deki hidroksil grubuna bakılarak yapılır. C-3 teki hidroksil grubu, C-10 daki metil grubu ile dik açı yaparsa *cis* yapı mevcuttur ve bu konuma β şekli denir. Eğer C-10 daki metil ve C-3 teki hidroksil grubu parallel olursa *trans* yapı ya da α şekli söz konusudur. Yan zincirin konfigürasyonu steroidlerde genellikle β şeklindedir. B ile C halkaları ve C ile D halkaları genellikle *trans* bağlanmıştır (Cram, 1964). Çok iyi bilinen bir steroid olan kolestrolun formülü aşağıda verilmektedir (Şekil 2.23).



Şekil 2.23. Kolesterol

2.3.3.1. Steroidlerin Tanınmaları

Steroidler, bitkiden değişik polaritede çözücülerle ekstrakte edilirler. Genellikle polar olmayan çözücüler kullanılır. Ancak steroid molekülünün hidroksil ve karboksil gibi gruplar içermesi veya steroid molekülüne glikozit bağlı olması durumunda alkol, etilasetat gibi daha polar çözücüler kullanılır.

Steroidlerin yapıları spektroskopik ve kimyasal yöntemlerle tayin edilmektedir.

UV spektroskopisi steroidler için fazla bilgi vermez. Steroidlerin çifte bağları genel olarak izole durumdadır ve 200-210 nm de kuvvetli bir uç absorpsiyon gösterirler (Ulubelen vd, 1971).

IR spektroskopisi, steroidlerdeki sübstitüentlerin açıklanmasında önemli rol oynar, hidroksil grupları 3000-3500 cm^{-1} de, alifatik C-H bağları 2850-2900cm^{-1} de görülürler. Parmak izi bölgesi hayli karışık ve karakteristiktir, molekülde keton grubunun varlığında ise aşağıdaki bantlar gözlenmektedir.

Doymuş ketonlar:

3-CO (5α ve 5β)-1719-1712 cm^{-1}

4-CO (5α) ⟶ 1712 cm^{-1}

6-CO (5α) ⟶ 1713 cm^{-1}

6-CO (5β) ⟶ 1708-1706 cm^{-1}

11-CO (5β) ⟶ 1710-1704 cm^{-1}

α, β doymamış karbonil bileşiği olduğunda:

Δ^1-3-keton: C=O 1684-1680 cm^{-1}, C=C 1609-1604 cm^{-1}

Δ^4-3-keton: C=O 1681-1677 cm^{-1}, C=C 1619-1615 cm^{-1}

Bazı durumlarda molekül iki keton grubu bulundurabilirler (Oyman ve Şabudak, 1999).

3,17-diketon ⟶ 1719-1745cm^{-1}

11,17 -diketon ⟶ 1713-1751cm^{-1}

^{1}H NMR spektrumunda, metil pikleri 0.00-1.5 ppm arasında, metilen bantları 1.0-2.5 ppm arasında çıkar. Steroidlerde metilen pikleri çok karmaşık ve yaygındırlar. Bu nedenle metilen bantları yerine metilen zarfı denilmektedir. Hidroksile komşu hidrojenler 3.5-4.5 ppm de ve doymamışlık bantları 5-6 ppm de görülürler.

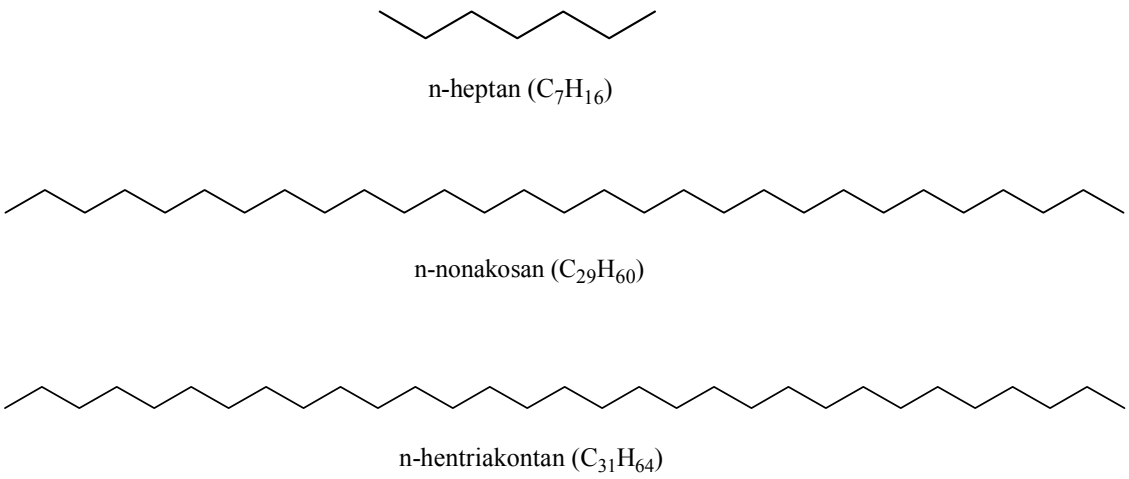
Kütle spektrumunda en önemli bantlar, M^+, $[M\text{-}CH_3]^+$, hidroksil grubu varsa $[M\text{-}H_20]^+$ parçalanma ürünleridir. Diğer parçalanma ürünleri ise, [M-D halkası + yan zincir], [M-D halkası+H]$^+$, [M-D halkası + H-H_20]$^+$ bantlarıdır (Budzikiewicz, vd., 1964).

2.3.4. Fonksiyonlu Grup İçeren Hidrokarbonlar

Bitkilerde bulunan fitokimyasallar arasında , yağlar, hidrokarbonlar, fonksiyonlu grup içeren hidrokarbonlar, terpenler, aromatik bileşikler, fenolik bileşikler, aminler, amino asitler, proteinler ve alkoloidler bulunmaktadır.

Yağlar nonpolar sistemlerde çözünebilen, suda çözünmeyen bileşiklerdir. Yağ moleküllerinin hepsinin yapısında büyük bir hidrokarbon kısmı vardır.

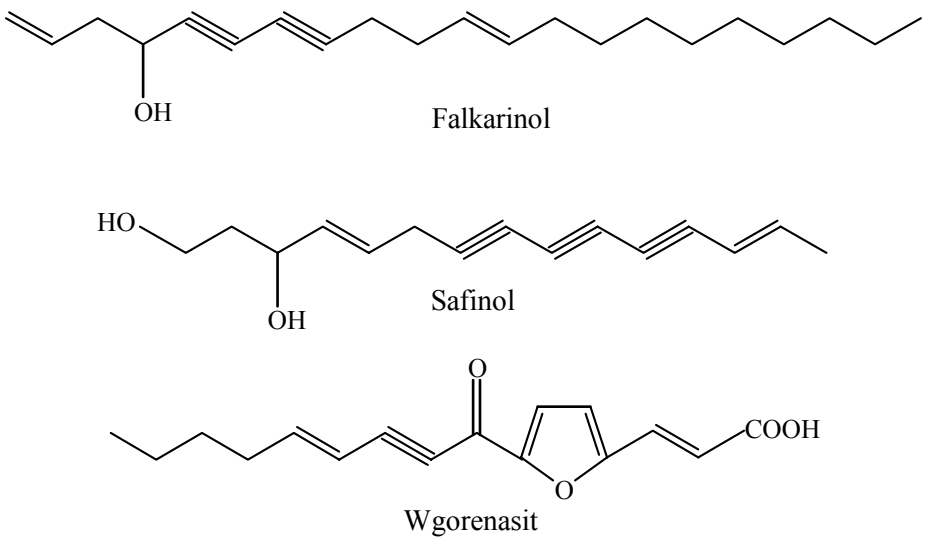
Hidrokarbonlar polaritesi düşük olan organik bileşiklerdir, doymuş veya doymamış yapıda bulunabilirler. İsoprenden türeyen dallanmış hidrokarbonlar, hidrokarbonlar sınıfına girmektedirler. *Pinus jeffreyi* ve *P.sabiniana*' nın temel komponenti olan ve boya çıkarmada kullanılan turpentinler n-heptan gibi basit hidrokarbonlardan oluşmaktadır.



Şekil 2.24. Bazı bitkilerden izole edilen hidrokarbonlar

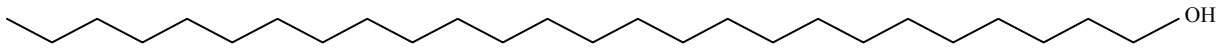
Doymamış hidrokarbonlar çift bağ ya da üçlü bağ içeren hidrokarbonlardır. Doymamış hidrokarbonların en basiti, önemli bir bitki hormonu olan etilendir. Daha büyük doymamış hidrokarbonlar genellikle bitki balmumlarında bulunmaktadır.

Poliasetilenler, yapılarında birden fazla asetilenik grup içeren bileşiklerdir. Havucun temel bileşeni, dört asetilenik karbon bulunduran Falkarinol'dür (Şekil 2.25).



Şekil 2.25. Bitkilerden izole edilen, asetilenik grup bulunduran hidrokarbonlar

Fonksiyonlu grup içeren hidrokarbonlar sınıfından olan seril alkol, bitkilerden izole edilen ve hidroksil grubu içeren hidrokarbonlar arasındadır (Şekil 2.26).



$CH_3(CH_2)_{24}CH_2OH$

Şekil 2.26. Seril alkol

Sülfid içeren hidrokarbonlara bitkilerde az rastlanmaktadır. Sülfid içeren basit hidrokarbonlar, *Allium* türlerinde bulunmaktadır. Hentriakontan-14,16-dion ($C_{31}H_{60}O_2$), karbonil grubu içeren hidrokarbonlar arasında bulunmaktadır. Bu bileşik tahıl türü bitkilerin temel bileşenlerindendir.

Ester grubu içeren hidrokarbonlar alkol ve asitlerin kondenzasyon ürünleridir ve hoş bir kokuya sahiptirler. Çeşitli meyvelerde bulunan uçucu esterler Tablo 2.5' te gösterilmektedir.

Tablo 2.5. Meyvelerde bulunan uçucu esterler

Çilek	Elma	Ananas
Etil bütirat	Etil asetat	Etil asetat
Etilisovalerat	Etil bütirat	Metil isokaproat
İsoamil asetat	Etil valerat	Metil isovalerat
Etil kaproat	Propil bütirat	Metil kaprilat
2-heksenil asetat		Etil akrilat

Yağ asitleri, uzun bir hidrofobik hidrokarbon grubuna bağlı, polar bir hidrofilik baş içeren bileşiklerdir (Kautman, vd., 1999). Bitkilerde en çok bulunan yağ asitleri oleik ve palmitik asittir. Bunlardan 16 karbonlu palmitik asit, yaprak lipidleri içinde ve bazı tohum yağlarında bulunan bir yağ asididir. Bazı yağ asitleri Şekil 2.27'de gösterilmiştir.

Laurik asit $CH_3\text{-}(CH_2)_{10}\text{-}COOH$

Palmitik asit $CH_3\text{-}(CH_2)_5\text{-}CH{=}CH\text{-}(CH_2)_7\text{-}COOH$

Oleik asit $CH_3\text{-}(CH_2)_7\text{-}CH{=}CH\text{-}(CH_2)_7\text{-}COOH$

Linolenik asit $CH_3\text{-}CH_2\text{-}CH{=}CH\text{-}CH_2\text{-}CH{=}CH\text{-}CH_2\text{-}CH{=}CH\text{-}(CH_2)_7\text{-}COOH$

Erustik asit $CH_3\text{-}(CH_2)_7\text{-}CH{=}CH\text{-}(CH_2)_{11}\text{-}COOH$

Sterkulik asit $CH_3\text{-}(CH_2)_7\text{-}C{=}C\text{-}(CH_2)_8\text{-}COOH$

10,16-dihidroksi palmitik asit $CH_2\text{-}(CH_2)_5\text{-}CH(OH)\text{-}(CH_2)_8\text{-}COOH$

Şekil 2.27. Bazı yağ asitlerinin formülleri

Erustik asit, hardalgiller (*Cruciferae*), kolza ve *Tropae oliaceae'* da bulunan bir yağ asitidir. Yüksek konsantrasyonda şalgam tohumu yağında da mevcuttur. Düşük oranda erusik asit içeren, şalgam çeşitleri, efor için kullanılmaktadır. Sterkulik asit, sterklia (kakaogiller) türleri ve ebegümecigiller (*Malvaceae*) de bulunmuştur. 10,16-dihidroksi palmitik asit, keten bitkisinin en önemli bileşenlerinden birisidir (Harborne, 1982).

2.3.5. Flavonoid Bileşikleri

2.3.5.1. Flavonoidlerin Doğada Bulunuşu ve Kullanım Alanları

Flavonoidler en yüksek yapılı bitkilerden basit yapılı mantarlara kadar hemen her bitki türünde yaygın olarak bulunan bileşiklerdir. Bakteri ve yosunların büyük bir kısmında bulunmazlar. Bu sebeble flavonoidler doğal olarak bulunan fenollerin en büyük gruplarından birini oluşturmaktadır. Ayrıca sahip oldukları biyolojik etkinliklerinden dolayı bitkilerin sekonder metabolitleri arasında en önemli bileşik sınıflarından birisini oluşturmaktadır.

Flavonoidler, önceleri çiçeklerin sarı, kırmızı, turuncu, lacivert ve benzeri renklerinden sorumlu olan pigmentler olarak biliniyorlardı. Flavonoidlere genellikle bitkilerin çiçek, yaprak, gövde, kök, kabuk, dal, meyve gibi tüm organlarında rastlanmaktadır.

Flavonoidler bitkilerde antioksidan, enzim inhibitörü ve aynı zamanda ışıktan koruma gibi bazı önemli özelliklere sahip (Harborne, vd., 1975, Harborne. ve Mabry, 1982) oldukları gibi, bitkilerde enerjinin dönüşümüne ve büyüme hormonlarına da etki etmektedirler. Flavonoidler ayrıca solunumu ve fotosentezi düzenleme ve bulaşıcı hastalıklara karşı savunma fonksiyonlarına sahiptirler (Smith ve Banks, 1986).

Flavonoidlerin bitkilerde azotun tutulmasını düzenleyen bakteriyel genlerin aktifleştirilmesinde yer aldıklarını gösteren araştırmalar, flavonoidlerle genler arasında belirgin bir ilişki olduğunu göstermektedir(Firmin vd., 1986, Peters vd., 1986).

Son zamanlarda flavonoidlerin, endüstrinin çeşitli alanlarında kullanılmasıyla ilgili araştırmaların sayısı artmaktadır. Bu bileşiklerin antioksidant özellikleri, tabaklama maddelerinin (tanenlerin) bileşenine katılmalarından dolayı, besin, tekstil, deri, metalürji, tıp, ziraat gibi alanlarda kullanımı ve çeşitli ürün ve malzemeleri boyama yetenekleri, metaller ile tepkimede bulunma gibi özellikleriyle kullanılma olasılıkları artmaktadır.

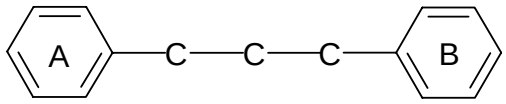
UV ışınlardan koruma özelliklerine sahip olmaları nedeni ile bazı flavonoidler kozmetik ürünlerde, özellikle kremlerde önemli katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Ayrıca flavonoidler metal iyonları ile reaksiyon verme kapasitesine sahip olduklarından analitik amaçla uranyum, zirkonyum, titan ve diğer metallerin tayininde kullanılabilmektedirler. Flavonoidlerin askorbik asitle beraber et ve et ürünlerinin proteolizini hızlandırdığı için et ve konserve endüstrisinde de kullanımı söz konusu olmaktadır.

Flavonoidlerin kullanım amacı göz önüne alınarak incelenmeleri 1970'li yıllarda daha da hızlanmaya başlamıştır. Gerçekleştirilen araştırmalar sonucu flavonoidlerin çok çeşitli biyokimyasal ve farmakolojik aktivitelere sahip oldukları belirlenmiştir. Örneğin, bu tür bileşiklerin antioksidant (Bors ve Saran, 1987, Larson, 1988), antimikrobiyal (Pratt ve Hudson, 1990), antiviral, antiülserojenik, hipolidemik, hepatoprotektif, (Wagner, 1989, Wagner vd., 1991, Hikino ve Kiso, 1988) özelliklere ve iltihaba karşı etkiye (Moroney vd., 1988) sahip oldukları açıklanmıştır. Bunun

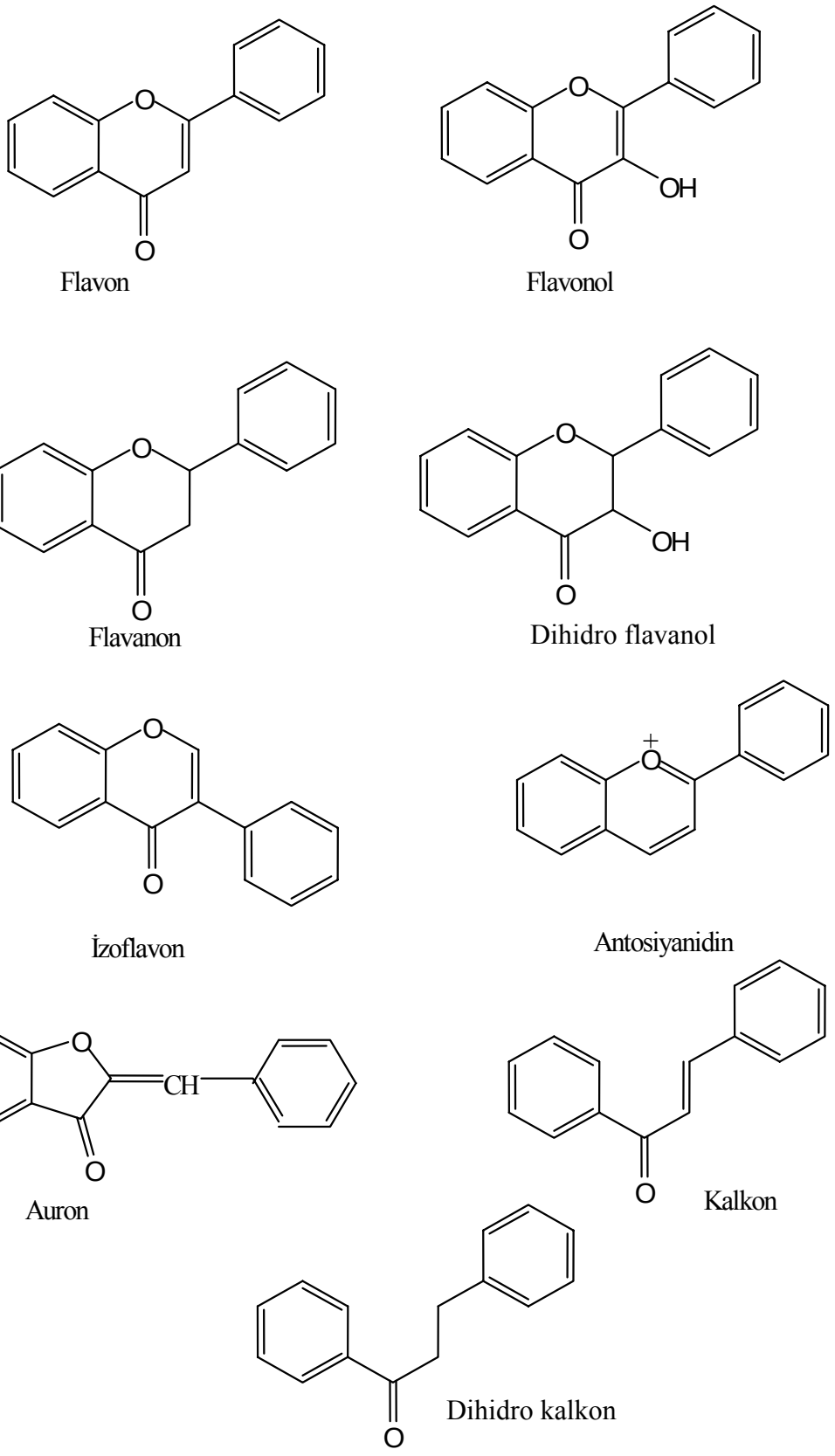
yanında flavonoidlerin (kersetin ve kamferolun) antimutajenetik ve antikarsinojenik etkilere sahip oldukları *in vitro* ve *in vivo* şartlarda belirlenmiştir (Kato vd., 1983, Huang vd., 1983, Verma vd., 1988, Deschner vd., 1991).

2.3.5.2. Flavonoidlerin Yapısal Özellikleri ve Sınıflandırılması

İki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesi sonucu, flavonoidlerin karbon iskeleti oluşmaktadır. 15 karbon atomu içeren flavonoid iskeleti C_6–C_3–C_6 konfigürasyonunda düzenlenmiştir (Şekil.2.28). Üç karbonlu propan zincirinin üçüncü bir halka oluşturması, farklı şekiller alması veya fenil gruplarının farklı pozisyonlarda bağlanması sonucu flavonoidlerin farklı sınıfları oluşmaktadır. (Şekil 2.29)

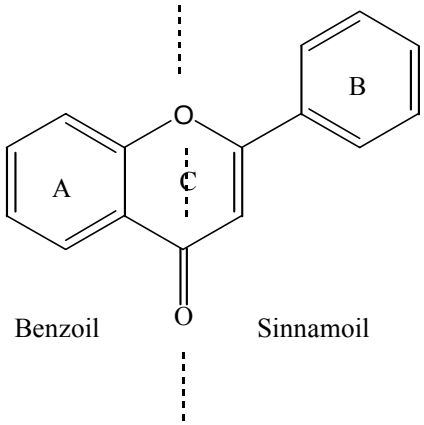


Şekil 2.28. Genel flavonoid iskeleti



Şekil 2.29. Flavonoidlerin farklı iskelet yapıları ile oluşan sınıfları

Kimyasal bakımdan flavonoidler 2–fenilbenzopiran yapısı göstermektedirler (Şekil 2.30), (Mabry vd., 1970).



Şekil 2.30. Flavonoidlerin benzoil (A) ve sinnamoil (B) halkası

Flavon yapılarındaki aromatik halkalar **A** ve **B**, heterohalka ise **C** ile gösterilmektedir. **A** ve **C** halkalarındaki (benzopiran çekirdeğinde) karbon atomları oksijen atomundan başlayarak numaralandırılırken, B halkasındaki atomlar ise (′) rakamlarla numaralandırılmaktadır.

2.3.5.3. Flavonoidlerin Biyosentezi

Bitkilerin sekonder metabolitleri arasında yer alan flavonoidler, fotosentez sonucu meydana gelen karbonhidrat, aminoasit gibi primer metabolitlerden oluşmaktadırlar (Şekil-2.31), (Burbulis, 1986). Bitkilerin fotosentezi sonucu oluşturulan bütün karbonların yaklaşık olarak %2'sinin flavonoidlere veya ilgili diğer bileşiklere dönüştürüldüğü tahmin edilmektedir (Smith, 1972).

Flavonoidlerin biyosentez araştırmaları sonucunda elde edilen verilere göre, fenilalanin gibi aminoasitlerin enzimatik deaminasyonundan oluşan sinnamik asit türevlerinin, asetil CoA ile kondenzasyonundan ya da malonil CoA kondenzasyonundan oluştukları tespit edilmiştir (Dewick, 2001, Harborne, 1975).

Malonil koenzim A'dan gelen kısım benzoil (A) halkasını oluştururken, sinnamik asitden gelen kısım da sinnamoil (B) halkasını meydana getirmektedir (Şekil 2.31).

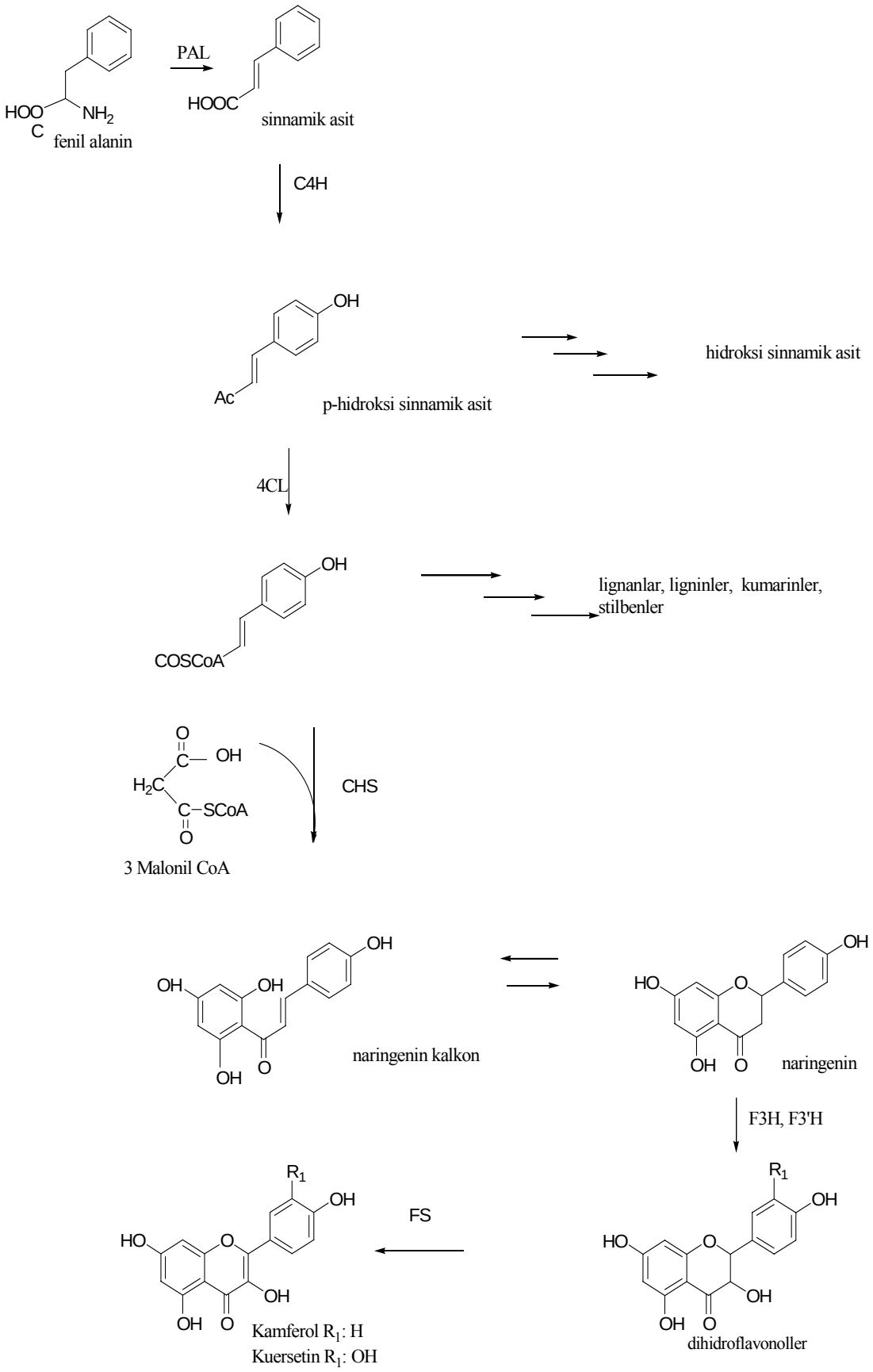
Flavonoidlerin biyosentezi sırasında kalkon/flavon izomerizasyonu, oksidasyonu, çevrilme, alkilasyon ve glikozillenme gibi pek çok ara reaksiyonlar da meydana gelmektedir.

2.3.5.4. Flavonoidlerde Yapı Çeşitliliği

Flavonoidlerdeki yapı çeşitliliği, sadece difenilpropan iskeletinin farklı yapılarda düzenlenmesiyle sınırlı kalmamaktadır. Ayrıca, her sınıf içinde, molekülün aromatik (A ve B) halkalarına bağlanan sübstitüentlerin sayısı, özelliği ve bağlanma pozisyonları flavonoidlerde gözlenen yapı çeşitliliğine neden olmaktadır.

Flavonoid yapılarında gözlenen en yaygın sübstitüentler hidroksil gruplarıdır. Flavonoid yapısında hidroksil gruplarının bulunması biyosentetik yolun sonucudur. Doğal flavonoidlerin en fazla yedi hidroksil gurubu içerdiği bilinmektedir. A halkasının genellikle C-5 ve C-7 pozisyonlarında hidroksillenmeye yatkın olduğu gözlenmektedir. Ancak, A halkasının başka pozisyonlarda da hidroksillendiği flavonoidler, doğada yaygın olarak bulunmaktadır. B halkasında ise genellikle C-4′ pozisyonu, çoğu kez C-3′ ve C-5′ pozisyonlarının hidroksillendiği gözlenmiştir. C-3′ ve C-5′ pozisyonundaki hidroksil grupları çoğu kez metillenmiş halde bulunmaktadırlar. Hidroksil grubu bulundurmayan aromatik halkalar yada C-2′ pozisyonunda hidroksil grubu bulunduran flavonoidler doğada nadir olarak bulunmaktadırlar.

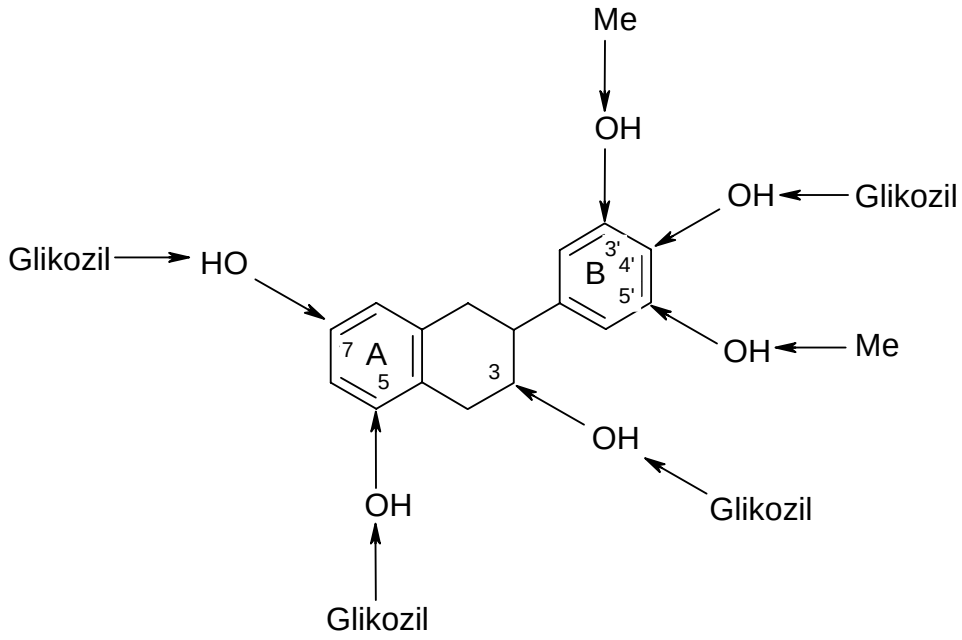
Flavonoidlerin yapısındaki hidroksil gurupları, reaktif özelliklerinden dolayı, kolaylıkla alkillenmekte yada glikozillenmektedirler. Bu nedenle, flavonoidlerin metoksi ve glikozil türevlerine bitkilerde sık rastlanır. Metoksi flavonoidlerin yapılarında birden yediye kadar metoksi grubuna rastlanılmaktadır. Doğada en çok mono-, di- veya trimetoksi flavonoidler gözlenmektedir. Flavonoidlerin C-5 ve C-7 pozisyonlarındaki hidroksil grupları nadir hallerde metillenmiş olarak bulunurlar.



Şekil 2.31. Flavonoidlerin Biyoentezi

Flavonoid yapılarında sübstitüentlerin genel yerleşme pozisyonları Şekil 2.32 de verilmiştir.

Bitkilerde flavonoidlere çoğunlukla mono–O–glikozitler halinde rastlanılmaktadır. Fakat di- ve trisakkaritlerle glikozillenmiş flavonoidler de doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Bitkilerde rastlanan flavonoid glikozitlerin diğer bir türünü de C-glikozitler oluşturmaktadır.



Şekil 2.32. Flavonoid yapılarında substituentlerin en yaygın yerleşme pozisyonları

2.3.5.5. Flavonoidlerin Tanınmaları

Flavonoidler UV ışıkta flouresans göstermektedirler. Ayrıca fenolik yapıları nedeniyle de NH_3 ile renk değiştirirler. Bu özelliklerinden dolayı, ince tabaka ve kağıt kromatografisinde UV ışık (254 ve 366) ile incelenmektedirler. Hidroksil gruplarının bağlı oldukları yerlere göre UV ışıkta, NH_3 buharında ve NA belirteciyle verdikleri renkler değişmektedir.

UV spektroskopisi, flavonoid bileşiklerin yapısı hakkında önemli bilgiler veren bir yöntemdir (Tablo 2.6). Bileşiğin metanoldeki çözeltisine ayrı ayrı NaOMe, susuz $AlCl_3$, $AlCl_3$/HCl, susuz NaOAc ve NaOAc/H_3BO_3 in metanoldeki çözeltilerinden az miktarda ilave edilerek alınan spektrumlarda gözlenen kaymalar, piklerin şiddeti ve şekilleri arasındaki farklar flavonoid bileşiğinin ana iskeleti ve moleküldeki hidroksil gruplarının yerleri hakkında fikir vermektedir (Marbry, vd., 1970).

UV spektrumunda flavonoid bileşikleri biri uzun diğeri kısa dalga boyunda olmak üzere iki absorpsiyon bantı vermektedir. Uzun dalga boyunda olan, flavonoidin B halkasının (Sinnamoil) absorpsiyonu ile ilgilidir ve Bant I adını almaktadır. Kısa dalga boyunda olan ise A halkasının (Benzoil grubu) absorpsiyonu ile ilişkilidir ve Bant II adını almaktadır (Tablo 2.6),(Marbry, vd., 1970).

Tablo 2.6. Flavonoidlerin UV spektroskopisindeki absorpsiyon bantları

	Bant I (nm)	Bant II (nm)
Flavon	304-350	250-270
Flavonol	352-385	250-270
Flavonon	310-330	275-290
Kalkon	360-390	240-260
Auron	390-430	240-260
Antosiyanidin	475-560	275-280
İzoflavon	300-340	245-270

B halkasında oksijen fonksiyonunun artması Bant I'in, A halkasında 6 ve 8 konumunda oksijen fonksiyonunun bulunması Bant II'nin uzun dalga boyuna kaymasına sebep olmaktadır. Her iki halkada da hidroksil grubunun bulunmaması, bantların şiddetinin zayıf olmasına neden olmaktadır. İzoflavonlarda Bant II, 245-270 nm ve Bant I, 300-340 nm de omuz şeklinde izlenirken, C-6, C-7 dioksijene izoflavonlar oldukça şiddetli Bant II absorpsiyonu gösterirler.

NaOMe kuvvetli baz olduğundan, flavon çekirdeğindeki tüm OH gruplarını iyonlaştırmaktadır. Özellikle 4'-OH taşıyan flavonoidler Bant I de 45-60 nm lik

batokromik kayma verdikleri için bant şiddeti artmaktadır. 7-OH flavon ve flavonollerde 305-345 nm arasında düşük şiddette bir bant gözlenmekte olup, bu Bant III olarak tanımlanmaktadır.

$AlCl_3$, A halkasındaki C-3 ve C-5 konumunda serbest hidroksil grupları ve B halkasındaki *orto*-dihidroksi grupları ile ayrı ayrı kelat oluşturmaktadır.

B halkasındaki *orto*-dihidroksi grupları ile oluşan kelat, seyreltik HCl ilavesiyle bozunur. Ayrıca $AlCl_3$/HCl spektrumunda Bant I de oluşan batokromik kayma, metanol ile alınan spektrumdaki Bant I e göre 35-50 nm uzun dalga boyuna kayarsa 5-OH, 6-H gruplarının; 25-30 nm uzun dalga boyuna kayarsa 5-OH,6-OH gruplarının; 16-22 nm kayarsa 5-OH, 6-OMe gruplarının varlığını göstermektedir.

NaOAc, NaOMe'ten daha zayıf bir baz olduğundan, asit karakterdeki fenolik hidroksilleri iyonize etmektedir. C-7 de serbest OH grubu varsa, Bant II de 5-20 nm uzun dalga boyuna kayma yapmaktadır. Eğer C-6 veya C-8 de oksijen fonksiyonu varsa flavonlarda 4-8 nm lik bir kayma gözlenmekte yada hiç gözlenmemektedir (Marbry, vd., 1970). Flavonoid yapısında 4'-OH, 7-OR grubunun bulunması durumunda Bant I, NaOMe Bant I' i ile aynı dalga boyunda çıkmaktadır.

Flavon ve flavonollerde B halkasında *orto*-dihidroksi grupları varsa bunlar borikasit ile kelat oluşturmaktadırlar. Bu durumda Bant I, NaOAc/H_3BO_3 ile 12-30 nm uzun dalga boyuna kaymaktadır. 3'-4' serbest hidroksil grubu yoksa, spektrum MeOH spektrumu ile aynı çıkmaktadır (Marbry, vd., 1970).

Flavonoidlerin ^1H NMR spektrumu, aromatik halka protonlarını ve sübstitüentlerin durumunu göstermektedir. Flavonoidlerde, aromatik halka protonları 5.00-8.00 ppm arasında izlenirken, metoksi grupları 3.8-3.9 ppm civarında singlet olarak görülmektedir. Eğer bir şeker grubu bağlı ise monoglikozitlerde şeker protonları 3.0-4.0 ppm arasında gözlenmekte, şekerin anomerik protonu H-1' daha aşağı alanda 4.8-6.0 ppm de duplet olarak görülmektedir.

Kütle spektrumu, flavonoid aglikon ve glikozitlerin yapıları hakkında önemli bilgiler sunmaktadır. Flavonoid aglikonların çoğu şiddetli moleküler iyon piki $[M]^+$vermektedirler. Moleküler iyon pikine ek olarak, flavon aglikonları $[M-H]^+$ ve $[M-CO]^+$ piklerini de göstermektedirler. Metoksi flavon olması halinde ise $[M-CH_3]^+$ ve $[M-CO-CH_3]^+$ pikleri gözlenmektedir (Harbone, vd., 1975).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Amonyak (Merck)
Hekzan (Teknik)
Petrol eteri(Teknik)
Aseton (Teknik)
Diklormetan(Teknik)
Metanol (Teknik, Merck)
Etanol(Teknik)
Etilasaetat(Teknik)
Kloroform (Teknik)
$AlCl_3$, HCl, CH_3COONa, H_3BO_3, Na (Merck)
Asetik asit (Atabay)
Su (Destile)
Poliamid (50-160 μm, Fluka)
Sefadeks LH-20 (Merck)
Silikajel hazır plaklar GF 254 (Merck 5554)
Silikajel (Kiesel G, E. Merck Type 60)
Silikajel 100 (0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM)

3.2. Kullanılan Yöntemler

3.2.1. Kolon Kromatografisi

Kolon kromatografisi ekstrelerin fraksiyonlandırılarak ayrılması ve saflaştırması aşamalarında kullanıldı. Adsorban olarak Merck silikajel (70-230 mesh), Sefadeks LH-

20 (Merck), poliamid (Fluka) dolgu maddeleri kullanıldı. Silikajel adsorban hekzan veya petrol eteri ile şişirildikten sonra dibine az miktarda pamuk yerleştirilmiş cam kolona tatbik edildi. Poliamid adsorban ise kolona kuru olarak tatbik edildi. Ekstreler, miktarına uygun adsorbanla karıştırıldı ve çözücüsü tamamen uçurulduktan sonra kolonun üst kısmına yerleştirildi. Sefadeks LH-20, metanol içinde bekletilerek kolona konuldu. Bu kolona ekstre sıvı olarak tatbik edildi.

3.2.2. İnce Tabaka Kromatografisi

35 g silikajel G (Kiesel G, E. Merck Type 60) adsorbanı 70 ml destile su ile çalkalanıp 20x20 cm boyutlarındaki cam plaklar üzerine kaplandı. Oda ısısında kurutulup 105°C'de 1 saat aktive edilen plaklar preparatif amaçla kullanıldı. Ayrıca Merck firmasının silikajel GF 254 hazır plaklarından da yararlanıldı.

3.3. Kullanılan Belirteçler

3.3.1. Kromatografi İşlemlerinde Kullanılan Belirteçler

Serik Sülfat Belirteci: 2 g $Ce(SO_4)_2.4H_2O$ 100ml %10'luk H_2SO_4 içinde çözülmesi ile hazırlandı. Belirteç püskürtüldükten sonra kromatografi plağı 100°C'de 5-10 dakika lekeler oluşuncaya kadar bekletildi.

NA Belirteci (Naturstoffreagenz A: Difenil borik asit-β-aminoetil ester): 100 mg toz NA bileşiği 100 ml metanolde çözülerek hazırlandı.

Amonyak (NH_3) Buharları: Kurutulmuş çift boyutlu kağıt kromatogramı, kromatografi tankının içinde, kapağı açık NH_3 şişesi ile birlikte bir kaç dakika bekletildi.

3.3.2. UV Spektrumu Kayma Belirteçleri

Sodyum metoksit (NaOMe) Belirteci : 2.5 g temizlenmiş metalik sodyum küçük parçacıklar halinde 100 ml saf metanole dikkatlice ilave edilerek hazırlandı.
Alüminyum (III) Klorür ($AlCl_3$) Belirteci : 5 g susuz alüminyum (III) klorür 100 ml saf metanolde çözülerek hazırlandı.
Hidroklorik Asit (HCl) Çözeltisi : 50 ml saf derişik HCl'in 100 ml destile su ile karıştırılmasıyla hazırlandı.
Sodyum Asetat (NaOAc) Belirteci : Toz halinde susuz saf sodyum asetat kullanıldı.
Borik Asit (H_3BO_3) : Toz halinde susuz saf borik asit kullanıldı.

3.4. Kullanılan Cihazlar

3.4.1. NMR Spektrometresi: ^{1}H NMR ve ^{13}C-NMR spektrumları Varian Mercury Plus 300 MHz aletinde alınmıştır. Çözücü olarak $CDCl_3$, CD_3OD ve DMSO-d_6 kullanılmıştır**.**

3.4.2. Ultraviyole Spektrofotometresi: Spektrumlar Shimadzu UV-1601 cihazında kuvars küvetlerde alındı. Ölçümler bileşiklerin metanoldeki çözeltilerinde yapıldı. Flavonoid bileşiklerin kayma spektrumlarının alınabilmesi için bileşiğin metanoldeki çözeltisine sırayla NaOMe, susuz $AlCl_3$, $AlCl_3$ / HCl, susuz NaOAc ve NaOAc /H_3BO_3 çözeltileri ilave edildi.

3.4.3. Kütle Spektrometresi: Kütle spektrumları VG-Zapspect (1000 Resolutaion) cihazında alınmıştır.

3.4.4. Erime Noktası Cihazı: Bileşiklerin erime noktalarının ölçümünde Yanaco MP-S3 cihazı kullanılmıştır.

3.4.5. Infrared Spektrofotometresi: IR spektrumları izole edilen maddelerden alınan numunenin nujol ile karıştırılıp sodyumklorür diskleri arasına damlatılmasıyla, KBr ile tablet yapılarak, ayrıca numunenin kloroform ve metanoldeki çözeltileri kullanılarak Schimadzu IR-470 spektrofotometresinde alınmıştır.

3.4.6. UV Lambası: Kromatografi plağındaki lekeler Desega Minuvis UV lambası kullanılarak tayin edilmiştir.

3.5. Çözücüler

Ekstraksiyon işlemlerinde, kolon kromatografisinde ve ön ayırma işlemlerinde teknik çözücüler tekrar destile edildikten sonra kullanılmış, madde saflaştırılmasında Merck çözücüler, spektral analizler için spektroskopik çözücüler kullanılmıştır.

4. DENEYSEL BÖLÜM

4.1. Bitkinin Ekstre Edilmesi

Trifolium resupinatum L.var. *microcephalum* bitkisi Mayıs 2002'de Edirne, Uzunköprü ilçesi Değirmenci Barajı civarından toplandı. Bitkinin tanımlanması Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı tarafından yapıldı (EDTU:8328). Bitki gölgede kurutulduktan sonra bitkisel materyal ufak parçalar halinde kesildi.

1800 gr kuru bitki diklormetan ile her seferinde 3 gün bekletilerek, toplam 4 defa maserasyon yöntemi ile ekstrakte edildi. Çözücü rotaevaporatörde buharlaştırıldıktan sonra 35g ham ekstakt elde edildi.

Diklormetan ekstraktı ayrıldıktan sonra bitki etanol ile aynı işlemden geçirilerek 167 gr ham ekstrakt elde edildi. Etanol ekstraktı su ile seyreltilip etilsetat ile ekstraksiyonu gerçekleştirildi. 27.9g etilasetat ekstraktı elde edildi. Su ekstraktı ayrıldı.

4.2. Diklormetan Ekstratındaki Bileşiklerin İzolasyonu ve Saflaştırılması

Diklormetan fraksiyonu ebatlarına uygun silikajel kolona uygulandı. Elüsyona %100 petrol eteri ile başlanarak giderek artan oranlarda diklormetan, etilasetat ve %100 metanol ilavesi ile kolon fraksiyonlandırıldı. Fraksiyonlar UV ışık (254 nm) altında incelendi, ayrıca serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 110 ºC'de bekletilerek maddelerin renklenmesi izlendi ve benzer fraksiyonlar birleştirildi. Bu fraksiyonlar A, B, C, D olarak isimlendirilen 4 ana grupta toplandı. Fraksiyon A tekrar silikajel kolona tatbik edildi %100 petrol eteri ile başlanarak giderek artan oranlarda diklormetan ilave edildi. Petrol eteri:diklormetan (7:3) çözücü sistemi ile elde edilen 16-18 numaralı fraksiyonların preparatif ince tabaka kromatografisi ile saflaştrılması sonucu 1 numaralı fitil esteri (20 mg) bileşiği elde edildi.Fraksiyon B, hem A hem de C ile aynı maddeleri içerdiği için çalışılmadı.

Fraksiyon C'de silikajel kolona tatbik edildi. Elüsyona petrol eteri ile başlandı ve giderek artan oranda diklormetan ve etilasetat ilave edildi. Petrol eteri:diklormetan (4:6) çözücü sistemi ile elde edilen 29-31 numaralı fraksiyonların preparatif ince tabaka kromotografisi ile saflaştırılması sonucu 2 numaralı 3-metil-1-nonen-3-ol (7.3 mg) bileşiği, petrol eteri:diklormetan (2:8) çözücü sistemi ile elde edilen 48-50 fraksiyonların preparatif ince tabaka kromotografisi ile saflaştırılması sonucu 3 numaralı bileşik Lupeol (5 mg) izole edildi. 51-54 numaralı fraksiyonların saflaştrılması sonucu 4 numaralı Kumarin (9 mg) bileşiği, %100 diklormetan çözücü sistemi ile elde edilen 58-65 fraksiyonlarından 5 numaralı β sitosterol (11 mg) bileşiği elde edildi.

Fraksiyon D'de diğerlerinde olduğu gibi silikajel kolona tatbik edildi. Elüsyona diklormetan ile başlanarak giderek artan oranlarda etilasetat ve metanol ilavesi ile kolon fraksiyonlandırıldı. Diklormetan:etilasetat (98:2) çözücü sistemi ile elde edilen 41-51 fraksiyonlar birleştirilerek preparatif ince tabaka kromotografisi ile saflaştrılması sonucu 6 numaralı Formononetin (7 mg) bileşiği elde edildi. 57-79 numaralı fraksiyonlar ise birleştirilerek tekrar ebatlarına uygun silikajel kolona kondu. 12-16 numaralı fraksiyonlarda birleştirilerek preparatif ince tabaka kromotografisi ile temizlenmesi sonucu 7 numaralı 2',3'-dihidroksi propil pentadekanoat (6.5 mg) bileşiği elde edildi.

4.3. Etilasetat Ekstratındaki Bileşiklerin İzolasyonu ve Saflaştırılması

Etilasetat ekstresine silikajel kolon kromotografisi uygulandı. Hekzan ve artan oranlarda etilasetat ve daha sonrada metanol ilavesi ile kolon fraksiyonlandırıldı. Fraksiyonlar UV ışık (254 nm) altında incelendi, ayrıca serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 110 ºC'de bekletilerek maddelerin renklenmesi izlendi ve benzer fraksiyonlar birleştirildi. Bu fraksiyonlar Et-A, Et-B olarak isimlendirilen iki ana grupta toplandı. Et-A fraksiyonunun önceki fraksiyondan elde ettiğimiz 6 ve 7 numaralı maddeleri içerdiği ince tabaka kromotografisi ile belirlendi ve bu yüzden çalışılmadı. Et-B fraksiyonu tekrar miktarına uygun silikajel kolona tatbik edildi. Kolon hekzan:etilasetat, (75:25) çözücü sistemi ile elüe edilerek giderek artan oranlarda

etilasetat ve metanol ile fraksiyonlandırıldı. Hekzan:etilasetat; (15:85) çözücü sistemi ile elde edilen fraksiyonlar birleştirilerek poliamid kolona tatbik edildi. Kloroform ile başlanarak artan oranda metanol ilavesi ile fraksiyonlandırıldı. Kloroform:metanol (96:4) çözücü sistemi ile elde ettiğimiz 8 numaralı Kamferol glikozit (10.5 mg) bileşiği içerdiği safsızlıklardan uzaklaştırmak amacı ile sefadeks LH-20 kolonda metanol ile yıkandı.

Et-B den hekzan:etilasetat (10:90) çözücü sistemi ile elde edilen fraksiyonlar birleştirilerek poliamid kolona tatbik edildi. Kloroform ile başlanarak giderek artan oranda metanol ile kolon fraksiyonlandırıldı. Kloroform:metanol (98:2) çözücü sistemi ile elde edilen fraksiyonlar preperatif ince tabaka kromotografisi ile saflaştırılarak 9 numaralı Formononetin glikozit (4.5 mg) bileşiği elde edildi. Aynı kolondan kloroform:metanol (94:6) çözücü sistemi ile elde edilen fraksiyonların önce preperatif ince tabaka kromotografisi, daha sonra sefadeks LH-20 kolonda metanol ile yıkanması sonucu 10 numaralı Genistein glukozit (3.9 mg) bileşiği elde edildi. Bu kolondan kloroform:metanol (92:8) çözücü sistemi ile elde ettiğimiz fraksiyonlar birleştirilerek preperatif ince tabaka kromotografisi yöntemi ile temizlenmesi sonucu 11 ve 12 numaralı bileşikler izole edidi. Bu bileşiklerin her ikisine de ayrı ayrı asetilleme reaksiyonu uygulanarak ^{1}H NMR spektrumları alındı. 11 numaralı bileşiğin steroid glikozit ve 12 numaralı bileşiğin alkil glikozit olduğu düşünülmektedir. Ancak bu bileşiklerin yapılarının tam aydınlatılması için gerekli spektroskopik veriler tamamlanmadığından tezde bu bileşiklerden bahsedilmedi.

4.4. Kimyasal Reaksiyonlar

4.4.1. Asetilleme Reaksiyonu

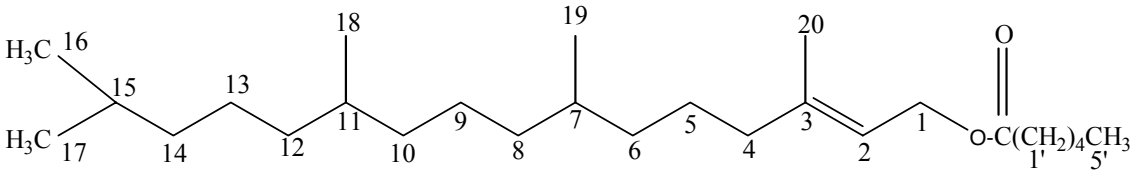
5 mg saf bileşiğe 1 ml asetanhidrit, 1ml piridin ilave edilir ve 3 saat geri soğutucu altında 45ºC'de ısıtılır. Sonra destile suya dökülerek eter ile ekstrakte edilir. Preparatif ince tabaka yöntemi ile safsızlıklar uzaklaştırılır. İnce tabaka kromatografisi yöntemi ile standart madde ile karşılaştırılarak kontrol edilir.

4.5. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.5.1. Fonksiyonlu Grup İçeren Bileşikler

4.5.1.1. 1 numaralı Bileşik

Fitil-1-hekzanoat



Şekil 4.1. Fitil-1-hekzanoat

Bu bileşik beyaz toz halinde olup, UV ışık altında 254 nm' de çok hafif gözükürken, serik sülfat belirteci püskürtülerek etüvde 110°C' de tutulduğunda kahve-gri renkli bir spot oluşturmaktadır.

Bu bileşiğe ait UV spektrumunda (λ_{max} nm, MeOH) 219.5 nm de maksimum absorpsiyon gözlenmiştir.

Bileşiğin IR spektrumunda ise (ν_{max} cm^{-1}, $CHCl_3$) 1721 cm^{-1}de ester karbonili, 1660 cm^{-1}de alken yapısı, 1168 cm^{-1} de ester karboniline ait C-O grubu gözlenmiştir.

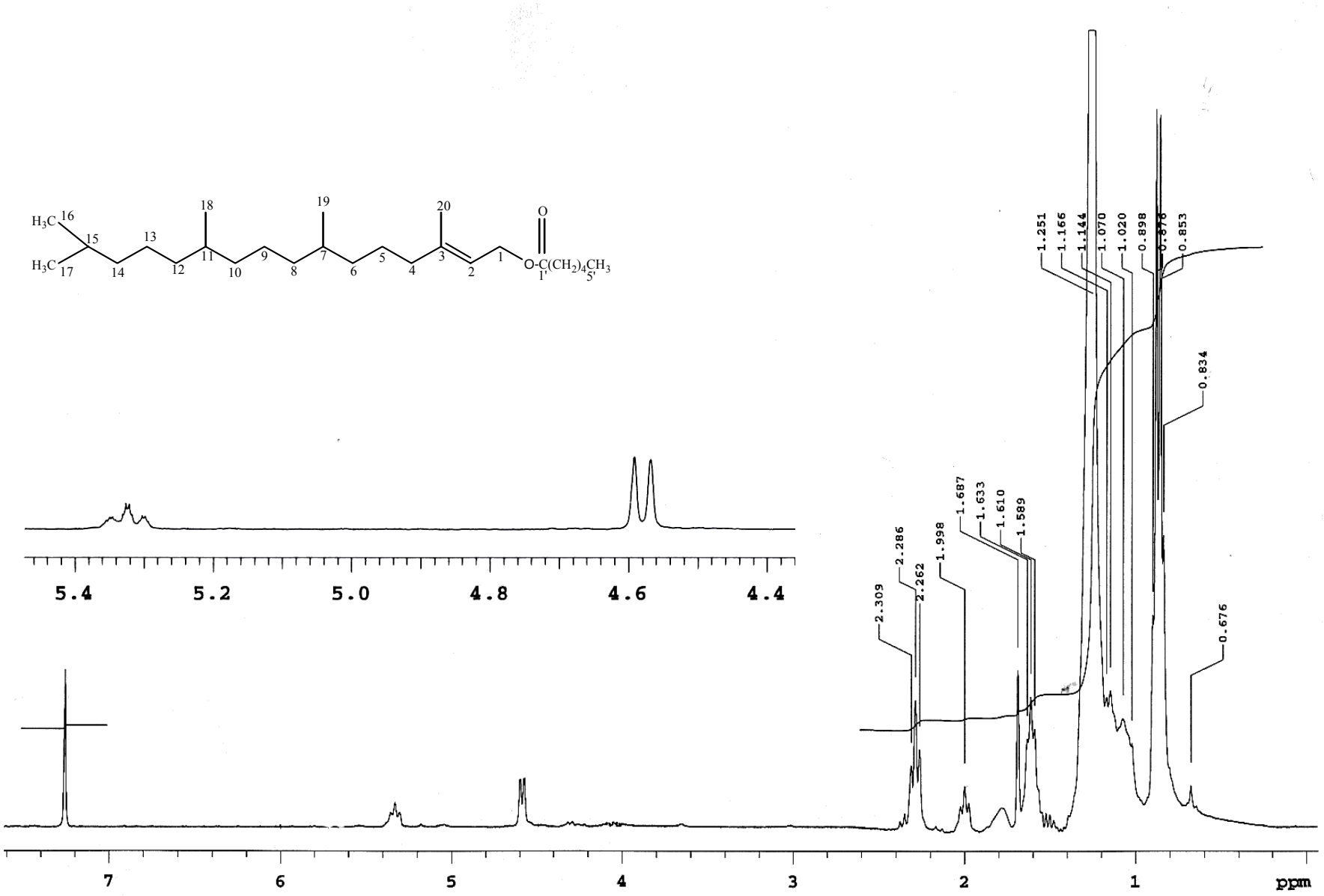
^{1}H NMR spektrumunda ($CDCl_3$, δ(ppm), 300 MHz, Şekil 4.2.) 0.86 ppm (6H, d, *J*= 6.6 Hz) de H-16 ve H-17 metil protonları gözlenirken, 0.85 ppm de (6H, d, *J*= 6.2 Hz) H-18 ve H-19 metil protonları gözlenmiştir. Çifte bağa komşu metil grubu ise 1.68 ppm de singlet olarak gözlenmiştir. 0,84 ppm de (3H, *J*= 7.7 Hz) H-5′ protonu triplet olarak gözlenmiştir. 1.99 ppm de (2H, t, *J*= 6.5 Hz) H-4 protonu gözlenirken, 4.58 ppm de ester grubuna komşu H-1, protonları *J*= 7.6 Hz dublet olarak görülmüştür. 5.34 ppm de ise (1H, ddd, *J*= 1.3, 7.2, 7.2 Hz) H-2 protonu izlenmiştir.

^{13}C NMR spektrumunda ($CDCl_3$, δ(ppm), 300 MHz, Şekil 4.3) ester karbonili 174.21 ppm de gözlenirken, vinilik karbonlar 142.78 ppm ve 118.43 ppm de, ester oksijenine komşu karbon ise 61.39 ppm de izlenmiştir. Metil grupları 14.30, 16.57, 19.91, 19.95, 22.89, 22.82 ppm lerde, diğer $–CH_2$ ve –CH grupları ise 24.68- 40.07 ppm aralığında gözlenmiştir.

Bileşiğin ^{1}H-^{1}H COSY spektrumunda ($CDCl_3$, δ(ppm), 300 MHz, Şekil 4.4) ise 5.34 ppm deki H-2' protonu ve 4.58 ppm deki H-1 protonunun etkileşimleri ile 2.28 ppm deki H-1' ve 1.60 ppm deki H-2' protonlarının etkileşimleri gözlenmiştir.

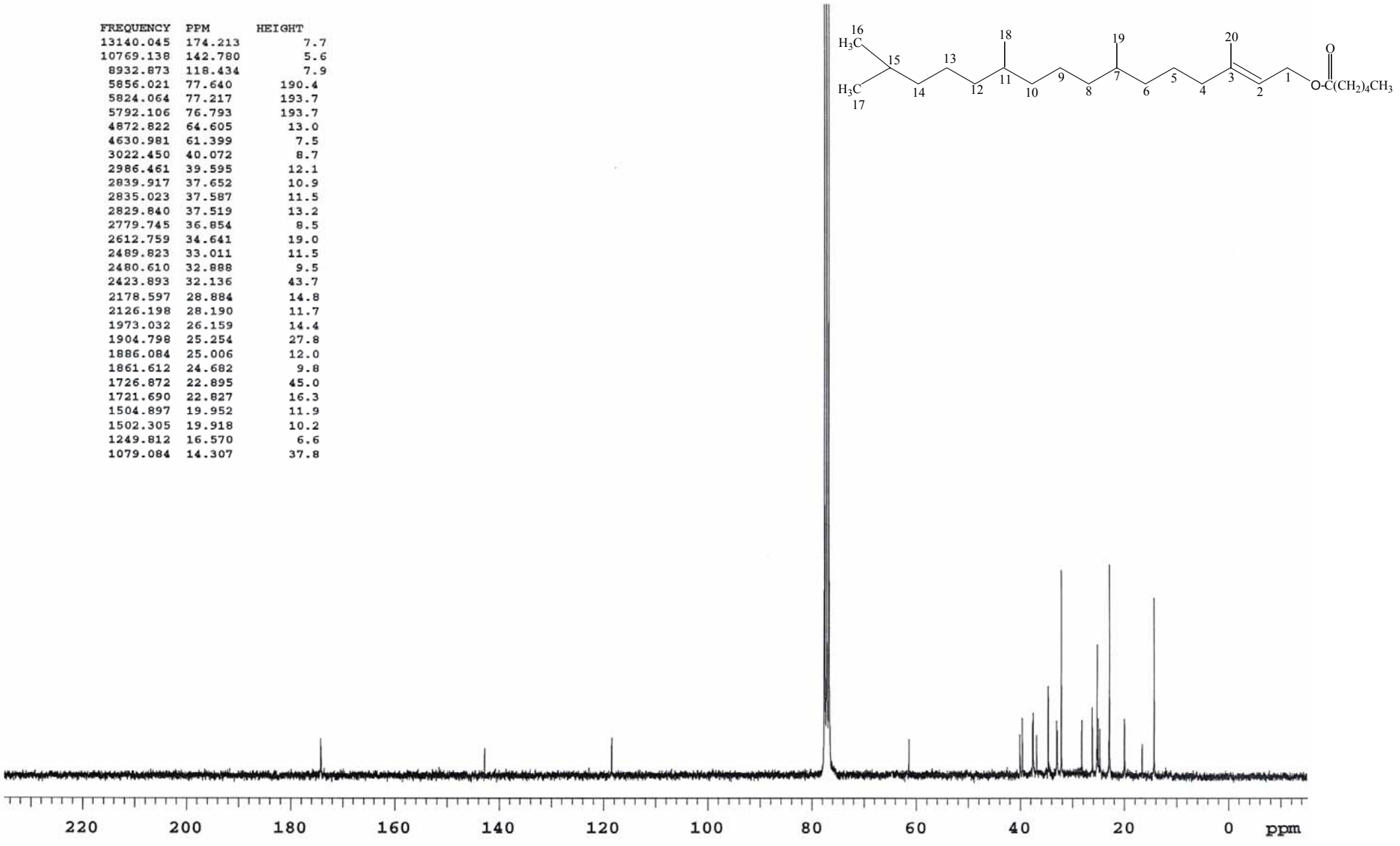
EI-MS spektrumu (Şekil4.5) moleküler iyon pikini *m/z* 396 $[M+2]^+$ vererek, $C_{26}H_{50}O_2$ kapalı formülünü göstermiştir. Diğer parçalanma ürünlerini ise *m/z* 379 $[M-CH_3]^+$, *m/z* 364 $[M-C_2H_6]^+$, *m/z* 351 $[M-C_3H_7]^+$, *m/z* 278 $[M-C_5H_{11}COOH]^+$, *m/z* 239 $[M-C_{11}H_{23}]^+$, *m/z* 71 $[CH_3(CH_2)_4-]$ olarak gözlenmiştir.

Yapılan literatür çalışmaları sonucu bileşiğin fitil-1-hekzanoat olduğu tespit edilmiştir (Itoh, vd., 2000, Arai ,vd., 1998, Buchanan, vd., 1996).

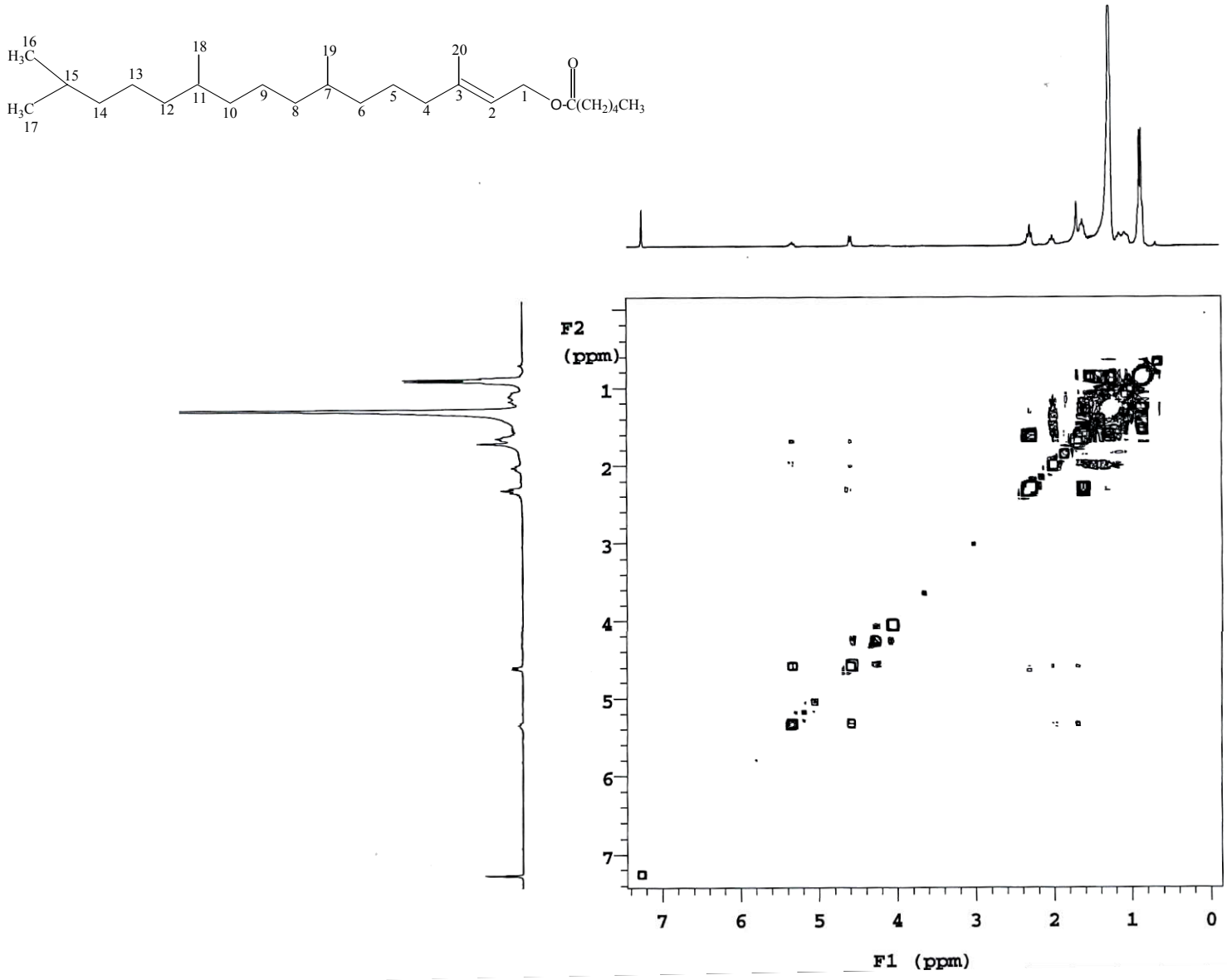


Şekil. 4.2. Fitil-1-hekzanoat bileşiğine ait ^{1}H NMR spektrumu [$CDCl_3$, δ(ppm), 300 MHz]

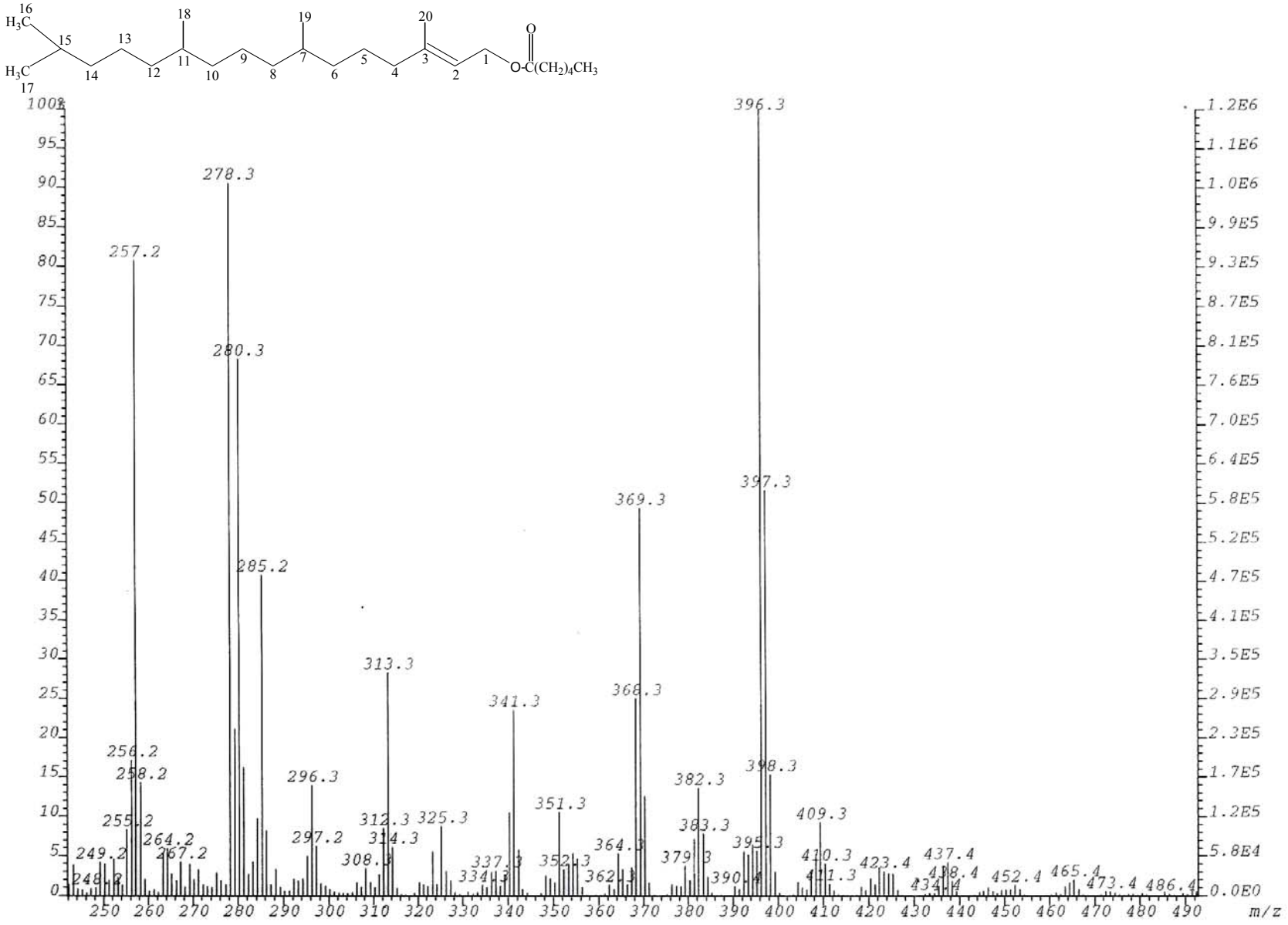
FREQUENCY	PPM	HEIGHT
13140.045	174.213	7.7
10769.138	142.780	5.6
8932.873	118.434	7.9
5856.021	77.640	190.4
5824.064	77.217	193.7
5792.106	76.793	193.7
4872.822	64.605	13.0
4630.981	61.399	7.5
3022.450	40.072	8.7
2986.461	39.595	12.1
2839.917	37.652	10.9
2835.023	37.587	11.5
2829.840	37.519	13.2
2779.745	36.854	8.5
2612.759	34.641	19.0
2489.823	33.011	11.5
2480.610	32.888	9.5
2423.893	32.136	43.7
2178.597	28.884	14.8
2126.198	28.190	11.7
1973.032	26.159	14.4
1904.798	25.254	27.8
1886.084	25.006	12.0
1861.612	24.682	9.8
1726.872	22.895	45.0
1721.690	22.827	16.3
1504.897	19.952	11.9
1502.305	19.918	10.2
1249.812	16.570	6.6
1079.084	14.307	37.8



Şekil 4.3. Fitil-1-hekzanoat bileşiğine ait ^{13}C NMR spektrumu [$CDCl_3$, δ(ppm), 300 MHz]



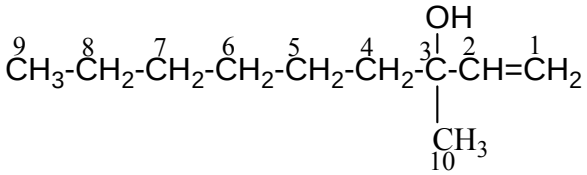
Şekil 4.4. Fitil-1-hekzanoat bileşiğine ait ^{1}H-^{1}H COSY spektrumu [$CDCl_3$, δ(ppm), 300 MHz]



Şekil. 4.5. Fitil-1-hekzanoat bileşiğine ait EI-MS spektrumu

4.5.1.2. 2 Numaralı Bileşik

3-metil-1-nonen-3-ol



Şekil 4.6. 3-metil-1-nonen-3-ol

Bu bileşik beyaz renkli, amorf, silikajel plakta UV (254 ve 366 nm) ışık altında görünmeyen, serik sülfat belirteci püskürtülüp 110 ºC de bekletildiğinde açık kahve renk veren bir bileşiktir.

UV spektrumunda (λ_{max} nm, MeOH) 217 nm'de maksimum absorpsiyon göstermiştir.

IR spektrumunda (ν_{max} cm^{-1}, KBr) 3550 cm^{-1}de tersiyer hidroksil grubu, 2980 cm^{-1}de CH_3-CH_2, 1480 cm^{-1}de alifatik C-H bantları ile 1070 cm^{-1}de tersiyer alkole ait C-O bantları izlenmiştir.

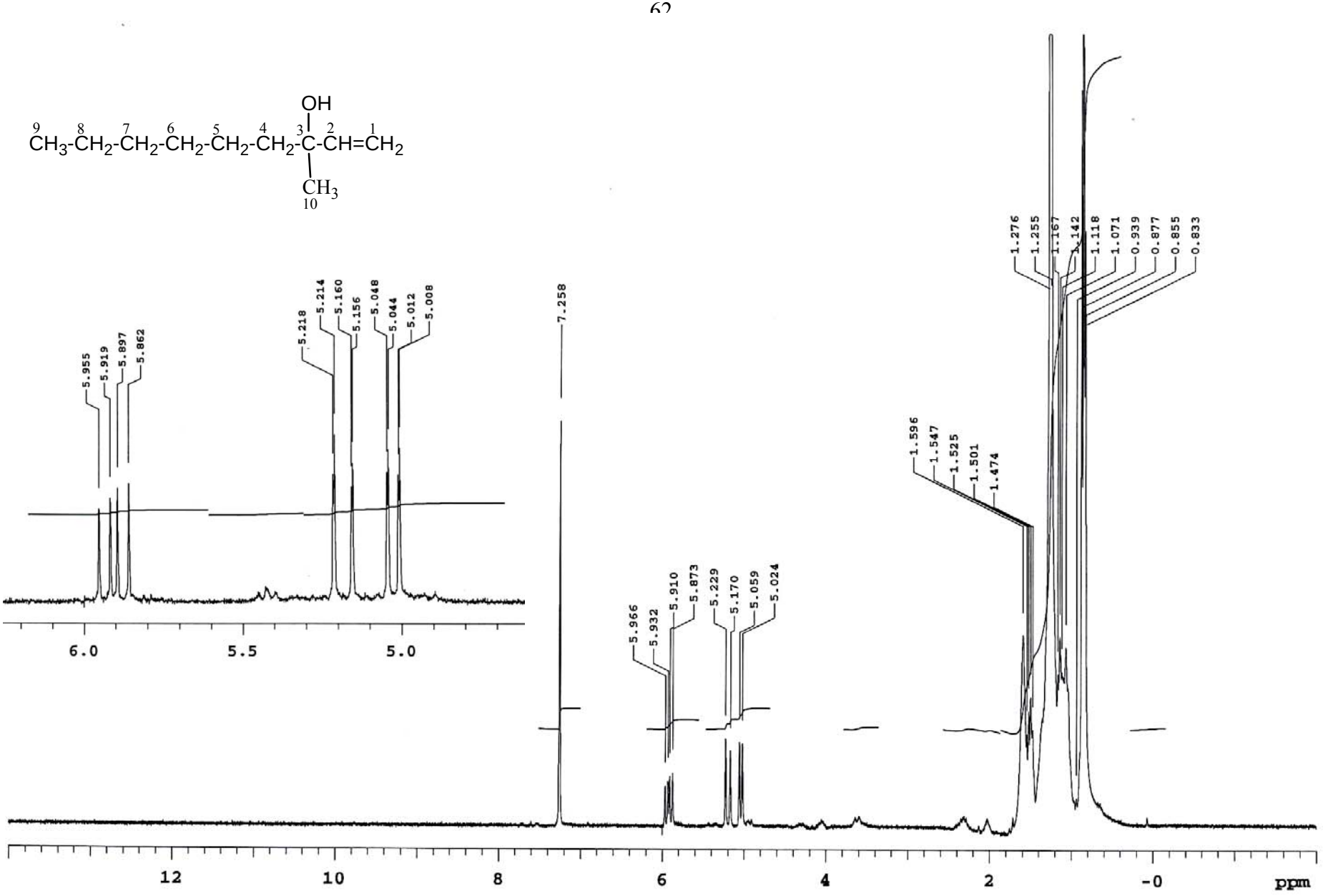
^{1}H NMR spektrumunda ($CDCl_3$, δ(ppm), 300 MHz, Şekil 4.7) 0.85 ppm de 9 numaralı karbona ait protonlar *J*=6.6 Hz lik bir triplet vermiştir. 5.92 ppm de (1H, dd) H-2 protonunun, *J*=10.5 Hz ve *J*=17.1 Hz lik etkileşim sabitlerini göstermesi, yapıda *cis* ve *trans* konumunda çift bağa ait protonların varlığını kanıtlamıştır. Çift bağ protonlarından H-1_a nın 5.20 ppm de (1H, dd, *J*=17.4, 1.2 Hz) H-2 protonu ile *trans* ve H-1_b protonu ile geminal etkileşimi gözlenmiştir. H-1_b nin ise 5.04 ppm de (1H, dd, *J*=10.8, 1.2 Hz) H-2 protonu ile *cis* ve H-1_a protonu ile geminal bölünmeleri izlenmiştir. Bu pikler molekülde, izole bir terminal metilen grubu bulunduğunun kanıtıdır. 1.54 ppm de kuarterner karbona komşu H-4 protonu multiplet şeklinde gözlenirken, 1.07-1.41 ppm aralığında ise H-5, H-6, H-7, H-8 numaralı protonlara ait sinyaller multiplet olarak tespit edilmiştir.

^{13}C NMR spektrumunda ($CDCl_3$, δ (ppm), 300 MHz, Şekil 4.8) 22.81 ve 19.95 ppm de iki tane metil karbonunun gözlenmesi, ^{1}H NMR spektrumunda görünmeyen diğer metil grubunun 1.25 ppm deki silikajel piki altında kaldığını kanıtlamıştır. 111.66 ve 145.53 ppm de vinilik karbonlar, 24.99, 37.50, 37.64, 39.59, 42.94 ppm de 5 tane CH_2 karbonu tespit edilmiştir. Ayrıca, alınan APT spektrumunda da 73.53 ppm de izlenen sinyal de yapıda oksijene komşu kuarterner karbon olduğunu desteklemiştir.

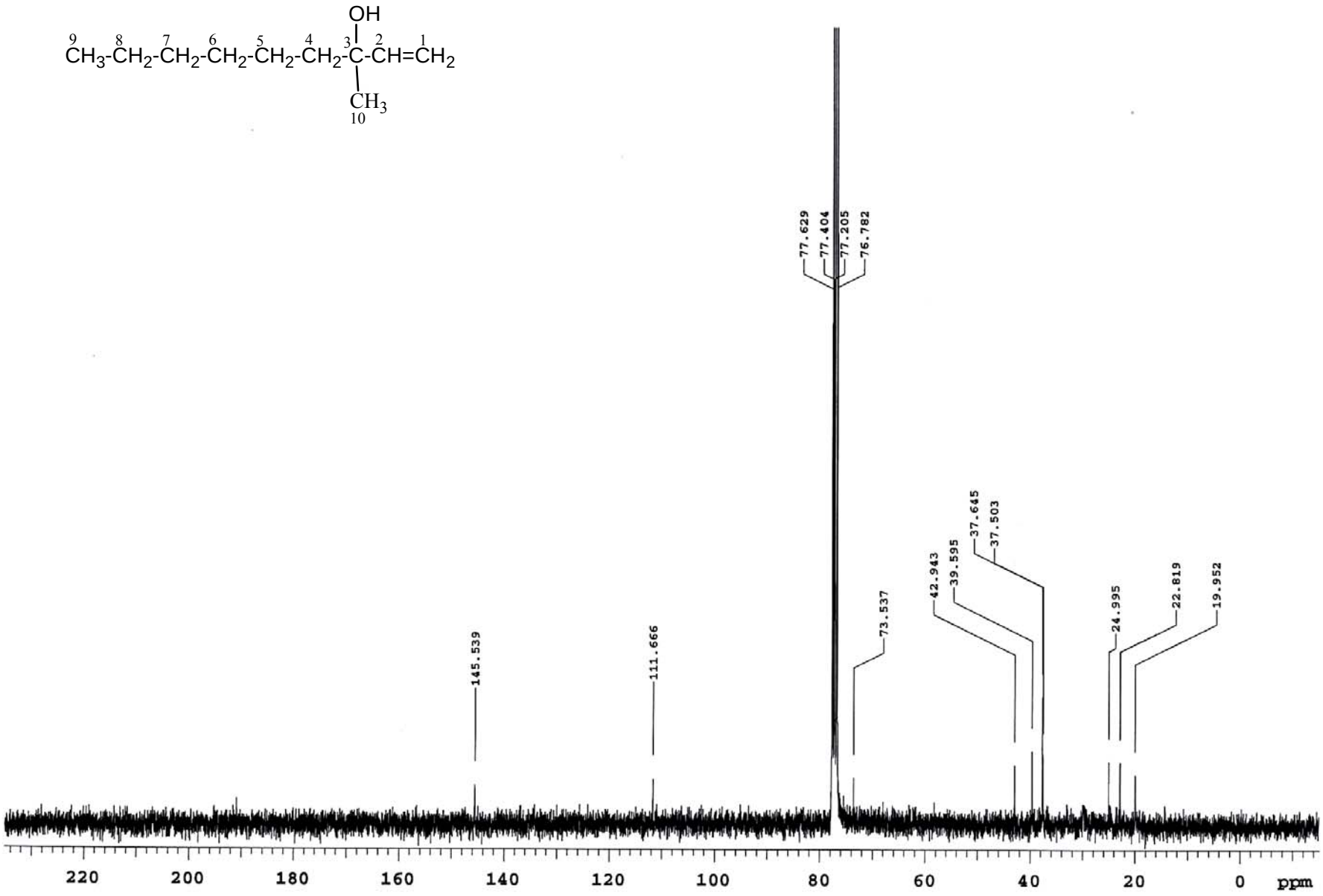
^{1}H-^{1}H COSY spektrumunda (Şekil 4.9, Şekil 4.10) 5.20 ppm deki H-1_a ile 5.04 ppm deki H-1_b nin birbirleriyle etkileşimi izlenirken, 5.92 deki (1H, dd, *J*=10.5, 17.1 Hz) diğer olefinik metin protonununda hem 5.20 ppm deki H-1_a, hemde 5.04 ppm deki H-1_b protonları ile etkileşimleri gözlenmiştir.

EI–MS spektrumu (Şekil 4.11) moleküler iyon piki *m/z* 156 $[M]^+$ vererek $C_{10}H_{20}O$ kapalı formülünü vermiştir. Diğer parçalanma ürünleri ise *m/z* 141 $[M\text{-}CH_3]^+$, *m/z* 99 $[M\text{-}(\text{-}CH_2)_3\text{-}CH_3]^+$, *m/z* 85 $[M\text{-}(\text{-}CH_2)_4\text{-}\ CH_3]^+$, *m/z* 71 $[M\text{-}(\text{-}CH_2)_5\text{-}CH_3]^+$ pikleri halinde gözlenmiş olup moleküldeki CH_2 sayılarının belirlenmesine yardımcı olmuştur.

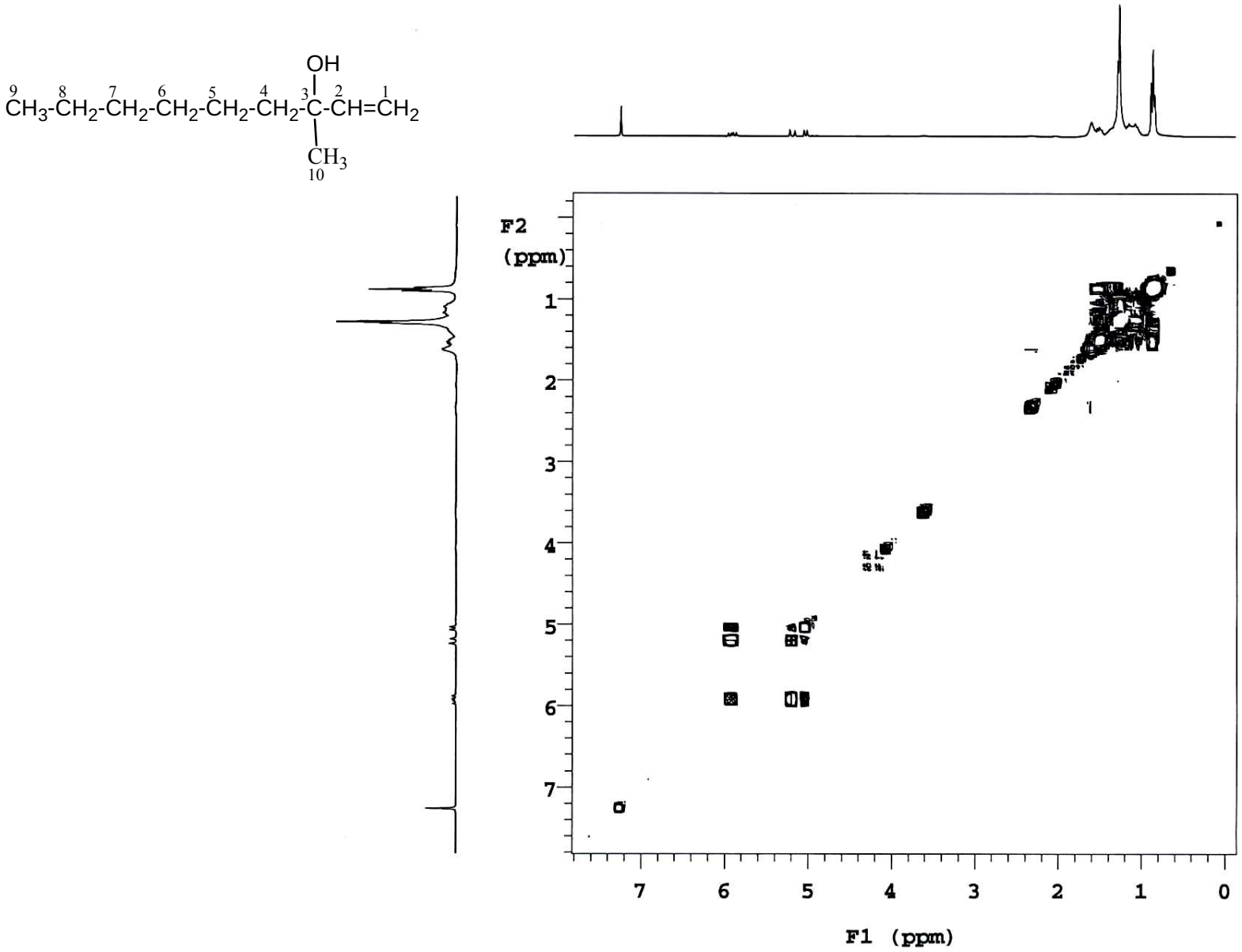
2 numaralı bileşiğin yapısı, yapılan literatür çalışmaları ve spektroskopik bulgular sonucu 3-metil-1-nonen-3-ol olarak tespit edilmiştir (Yadav, vd., 2004, Kanchanapoom, vd., 2001, Wang, vd., 1998, Triguna, vd., 1991).



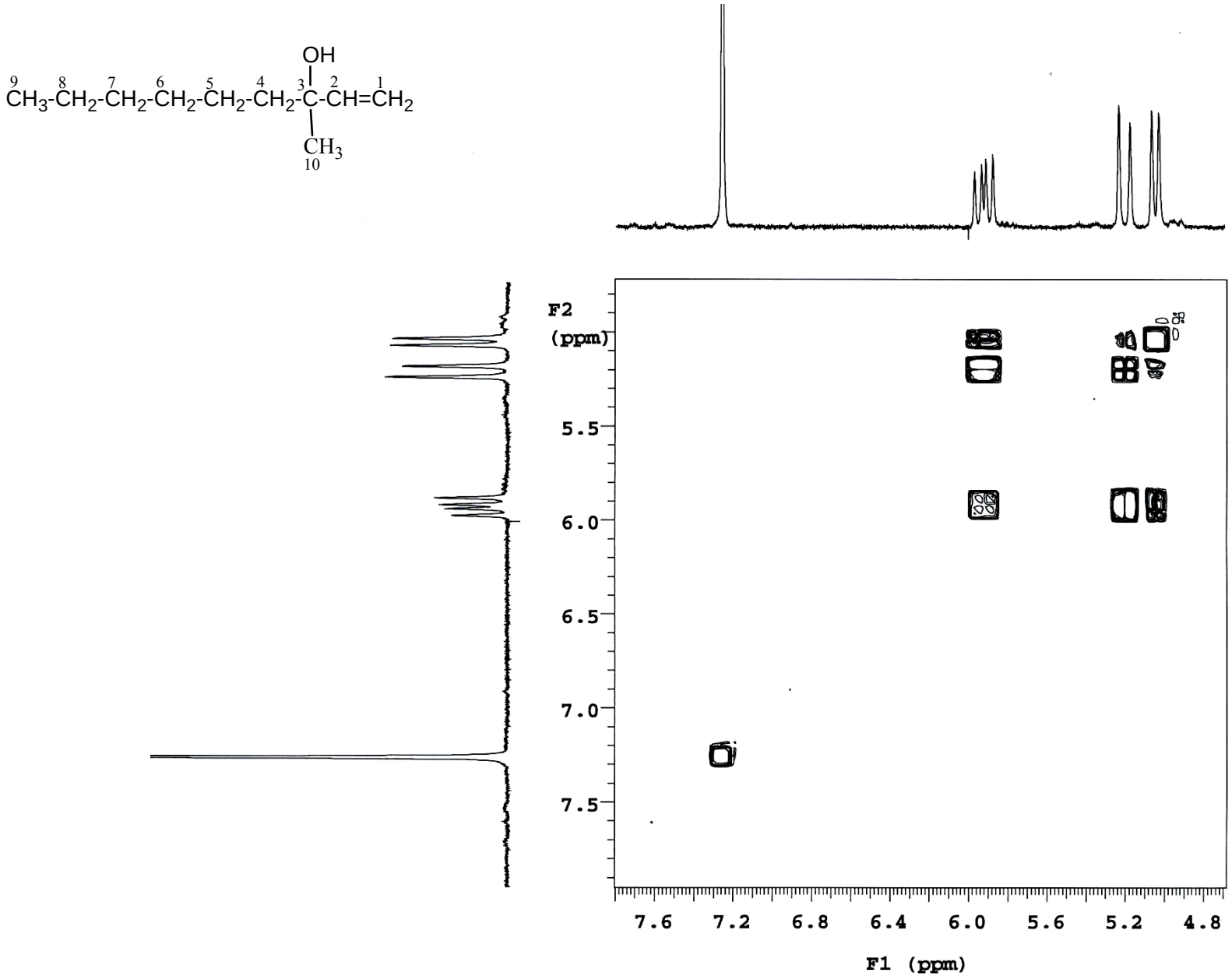
Şekil 4.7. 3-metil-1-nonen-3-ol bileşiğine ait ^{1}H NMR spektrumu [$CDCl_3$, δ(ppm), 300 MHz]



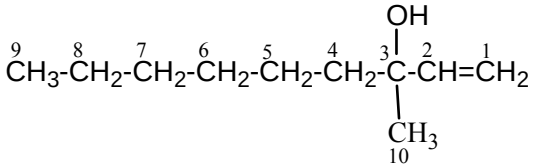
Şekil 4.8. 3-metil-1-nonen-3-ol bileşiğine ait ^{13}C NMR spektrumu [$CDCl_3$, δ (ppm), 300 MHz]

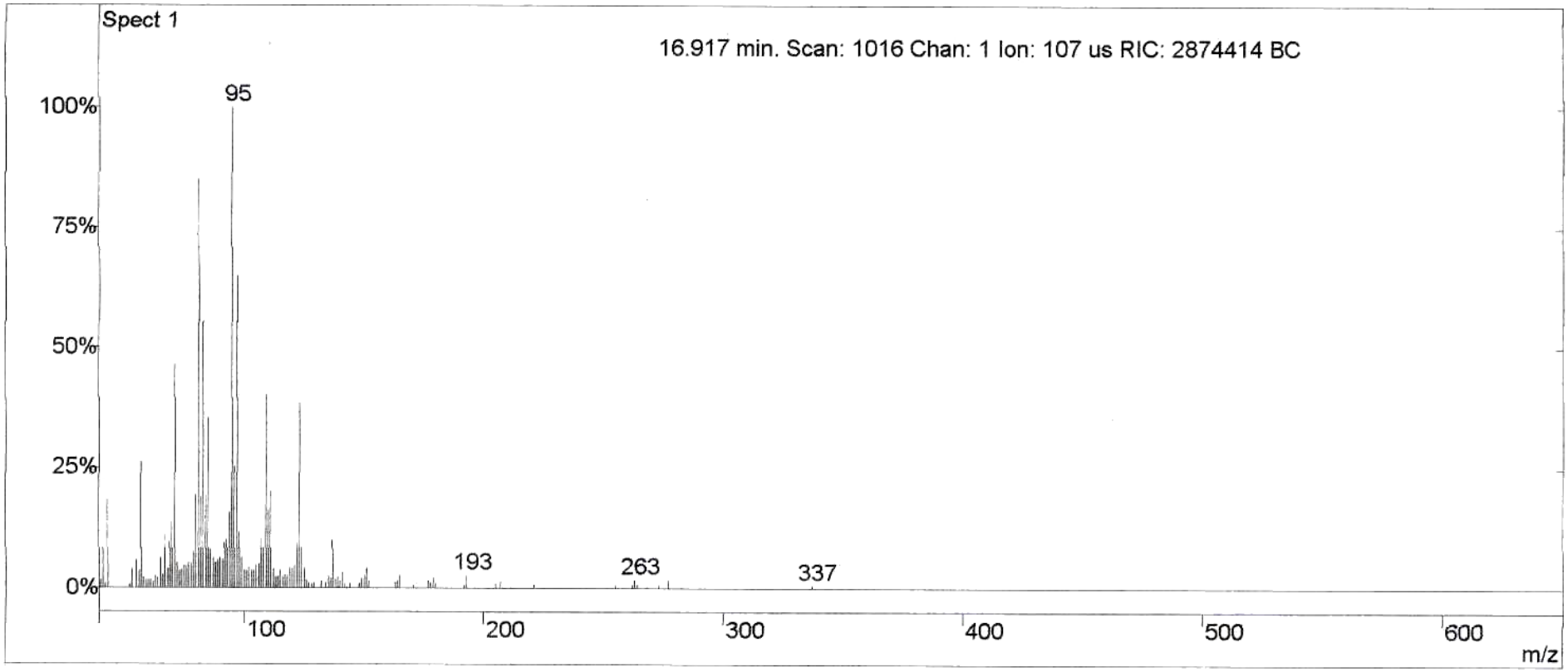


Şekil 4.9. 3-metil-1-nonen-3-ol bileşiğine ait COSY spektrumu



Şekil 4.10. 3-metil-1-nonen-3-ol bileşiğine ait COSY spektrumu [4.8-7.6 aralığı genişletilmiş]

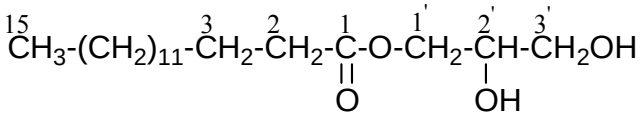




Şekil 4.11. 3-metil-1-nonen-3-ol bileşiğine ait EI-MS spektrumu

4.5.1.3. 7 Numaralı Bileşik

2', 3'-dihidroksi propil pentadekanoat



Şekil 4.12. 2',3'-dihidroksi propil pentadekanoat

Bu bileşik beyaz renkli, amorf, silikajel plakta UV (254 ve 366 nm) ışık altında görünmemiş, serik sülfat belirteci püskürtülüp 110ºC de bekletildiğinde mavimsi-kahverenk vermiştir.

UV spektrumunda (λ_{max} nm, MeOH) 217.5 nm'de uç absorpsiyon göstermiştir.

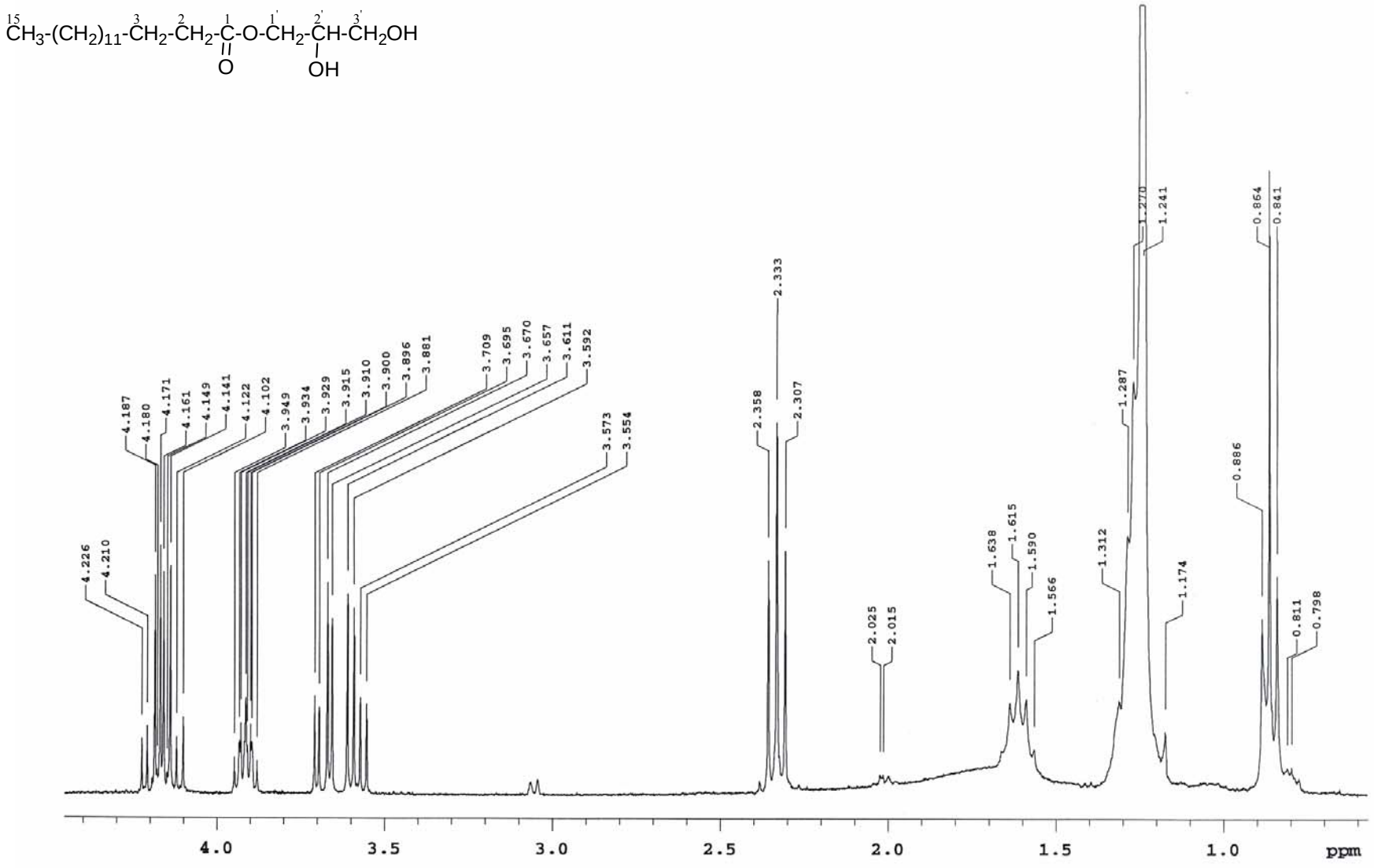
^{1}H NMR spektrumunda ($CDCl_3$, δ (ppm), 300 MHz, Şekil 4.13) 0.86 ppm de (3H, *J*=6.9 Hz) triplet metili molekülde bir $–CH_2$-CH_3 grubunun varlığını gösterirken 1.17-2.33 ppm arasında metilen grupları izlenmiştir. 1.61 ppm de H-3 protonunun, H-2 ve H-4 ile etkileşimi sonucu oluşmuş multiplet şeklinde sinyaller gözlenmiştir. 2.33 ppm de (2H, t, *J*=7.5 Hz) karbonil karbonuna komşu -CH_2 grubu (H-2) sinyalleri, 3.68 ppm de (1H, dd, *J*=11.7, 4.2 Hz) H-3'$_a$ ve 3.58 ppm de (1H, dd, *J*=11.4, 5.7 Hz) H-3'$_b$ protonlarının geminal ve visinal etkileşimleri açıkca izlenerek tespit edilmiştir. 3.92 ppm de ise sekonder hidroksil karbonuna bağlı proton multiplet olarak gözlenirken, 4.19 ppm de (1H, dd, *J*=4.8,11.7 Hz) H-1'$_a$ ve 4.13 ppm de (1H, dd, *J*=6,11.7 Hz) H-1'$_b$ nin gözlenmesi, bu protonların ester grubuna komşu olduğunu göstermiştir.

Bu bileşiğin ^{13}C NMR ve DEPT spektrumu alınmıştır. ^{13}C NMR spektrumunda ($CDCl_3$, δ(ppm), 300 MHz, Şekil 4.14) 174.48 ppm de ester karbonili izlenmiştir. DEPT spektrumunda da (Şekil 4.15) 70.45 ppm de sekonder hidroksil karbonu, 65.34 ppm de ester oksijenine komşu C-1' karbonu ve 63.50 ppm de C-3' karbonunun gözlenmesi, molekülde oksijene komşu metin ve metilen karbonlarının varlığını kanıtlamıştır. 34.31 ppm de karbonile komşu karbon C-2, 14.24 ppm de metil grubu ile 22.83 ppm de C-14 karbonuna ait sinyaller tespit edilmiştir. Metilen karbonları ise 25.07 ile 32.07 ppm arasında izlenmiştir.

^{1}H-^{1}H COSY spektrumunda ($CDCl_3$, δ(ppm), 300 MHz, Şekil 4.16, Şekil 4.17) 3.92 ppm de sekonder hidroksil karbonuna bağlı protonun H-2', 4.19 ile 4.13 ppm deki karbonil oksijenine komşu H-1'$_a$ ve H-1'$_b$ protonları ile etkileştiği ayrıca 3.68 ve 3.58 ppm deki H-3'$_a$ ile H-3'$_b$ protonlarının birbiriyle etkileşimleri görülmektedir. 2.33 ppm deki karbonile komşu karbon protonununda 1.61 ppm deki protonla etkileştiği gözlenmiştir. 1.61 ppm deki protonunda ayrıca 1.17-1.31 ppm arasındaki metilen protonları ile etkileştiği COSY spektrumunda tespit edilmiştir. 0.86 ppm deki metil grubuna ait protonlarında 1.17-1.31 ppm arasındaki metilen gruplarından biriyle etkileştiği gözlenmiştir.

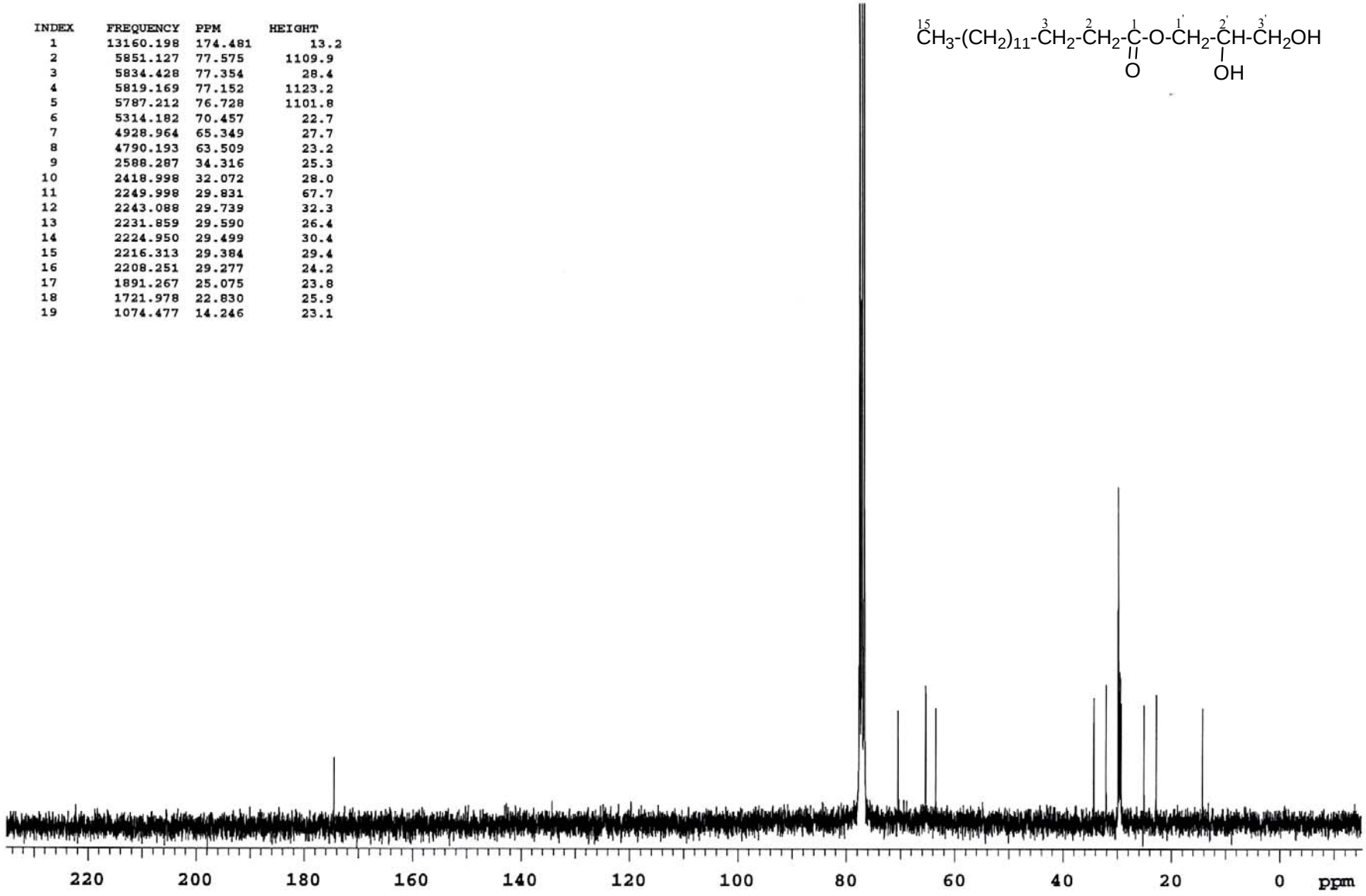
EI-MS spektrumu (Şekil 4.18) moleküler iyon pikini *m/z* 316 $[M]^+$ vererek $C_{18}H_{36}O_4$ kapalı formülünü göstermiştir. Diğer parçalanma ürünlerini ise *m/z* 314 $[M-2]^+$, *m/z* 255 $[M-CHOH-CH_2OH]^+$, *m/z* 75 $[M-CH_3-(CH_2)_{13}-COO]^+$, *m/z* 119 $[M-CH_3-(CH_2)_{13}]^+$ olarak gözlenmiştir.

Tüm spektroskopik veriler bu bileşiğin 2',3'-dihidroksi propil pentadekanoat olduğunu göstermiştir.

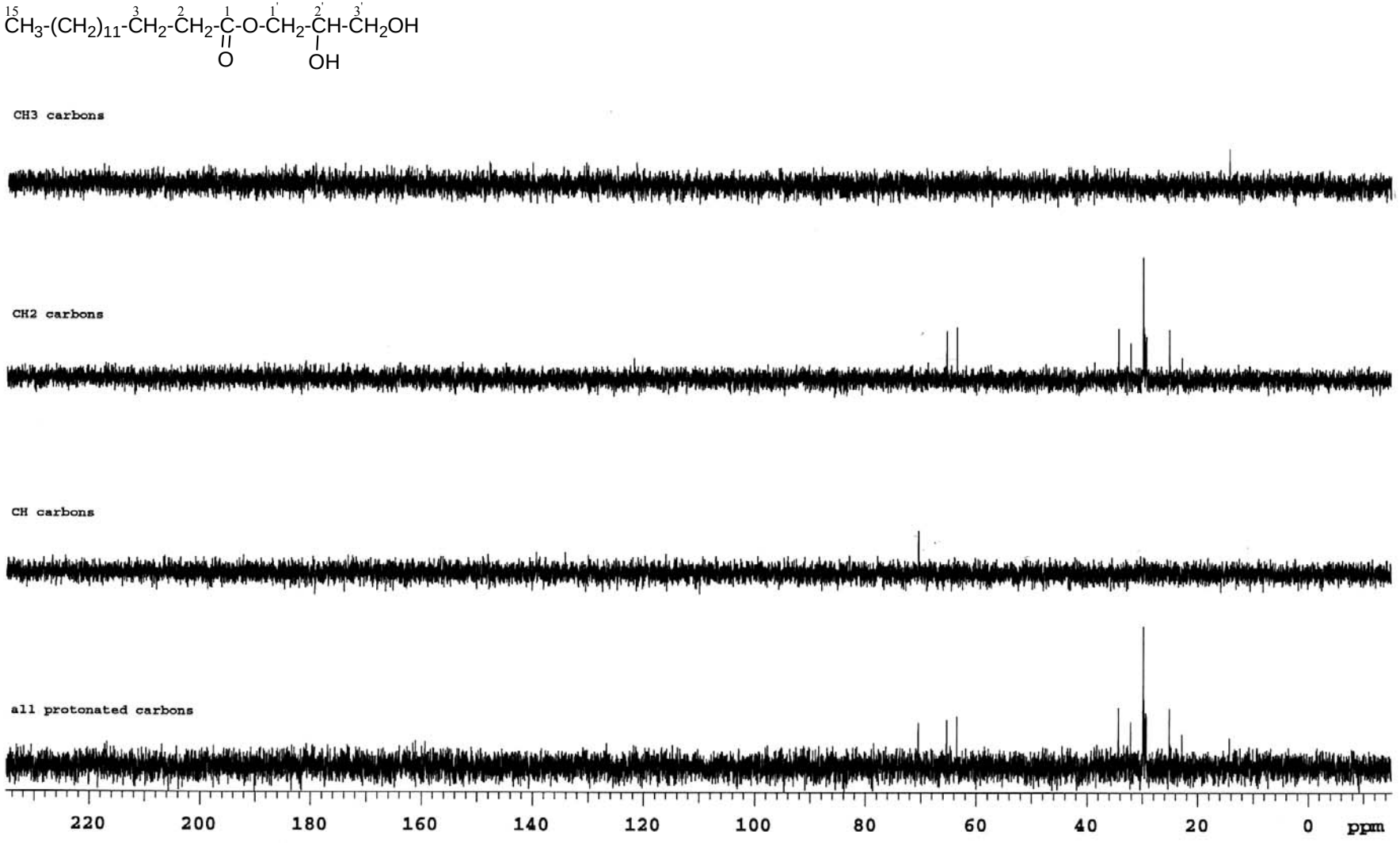


Şekil 4.13. 2', 3'-dihidroksi propil pentadekanoat bileşiğine ait ^{1}H NMR spektrumu [$CDCl_3$, δ (ppm), 300 MHz]

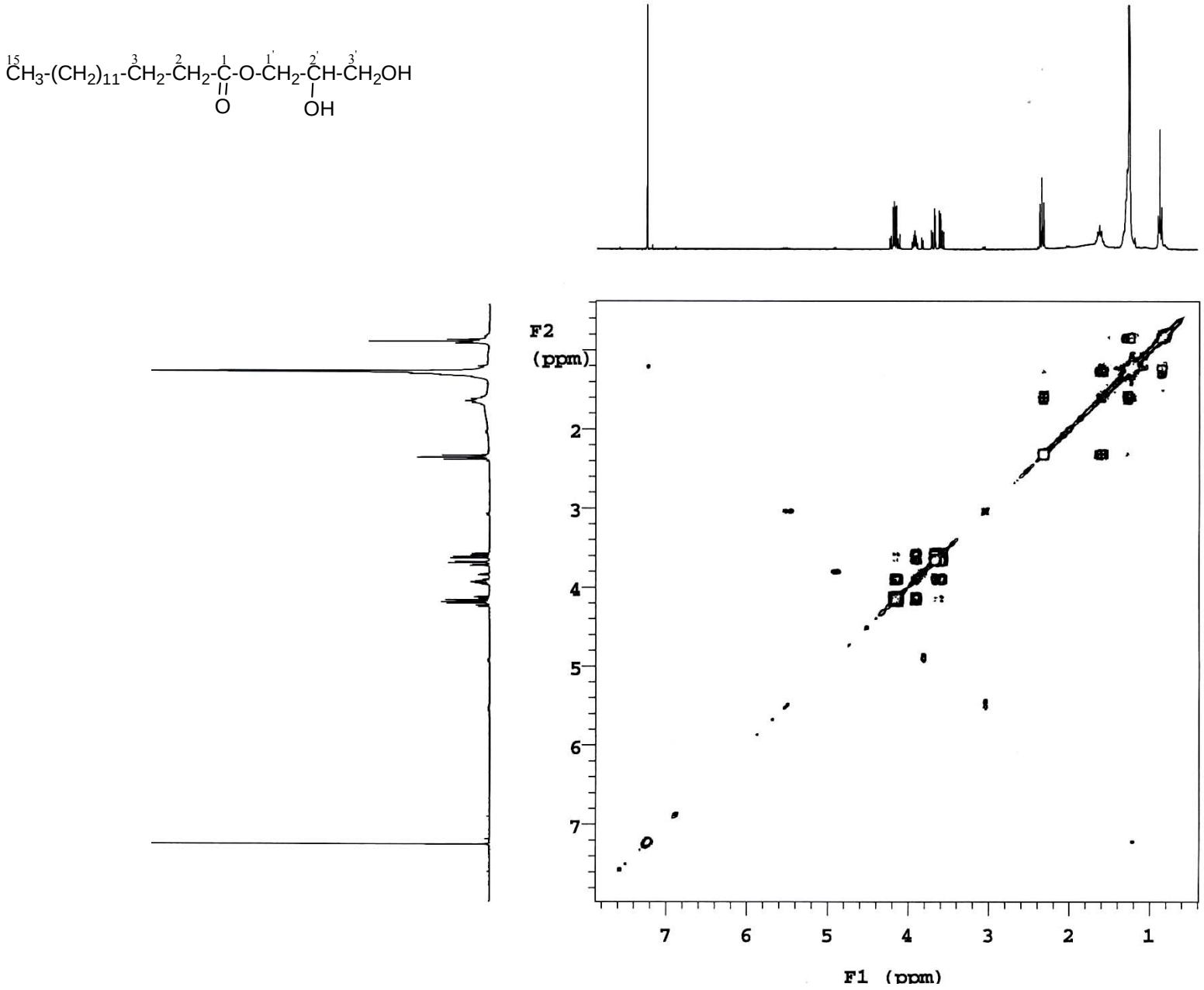
INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT
1	13160.198	174.481	13.2
2	5851.127	77.575	1109.9
3	5834.428	77.354	28.4
4	5819.169	77.152	1123.2
5	5787.212	76.728	1101.8
6	5314.182	70.457	22.7
7	4928.964	65.349	27.7
8	4790.193	63.509	23.2
9	2588.287	34.316	25.3
10	2418.998	32.072	28.0
11	2249.998	29.831	67.7
12	2243.088	29.739	32.3
13	2231.859	29.590	26.4
14	2224.950	29.499	30.4
15	2216.313	29.384	29.4
16	2208.251	29.277	24.2
17	1891.267	25.075	23.8
18	1721.978	22.830	25.9
19	1074.477	14.246	23.1



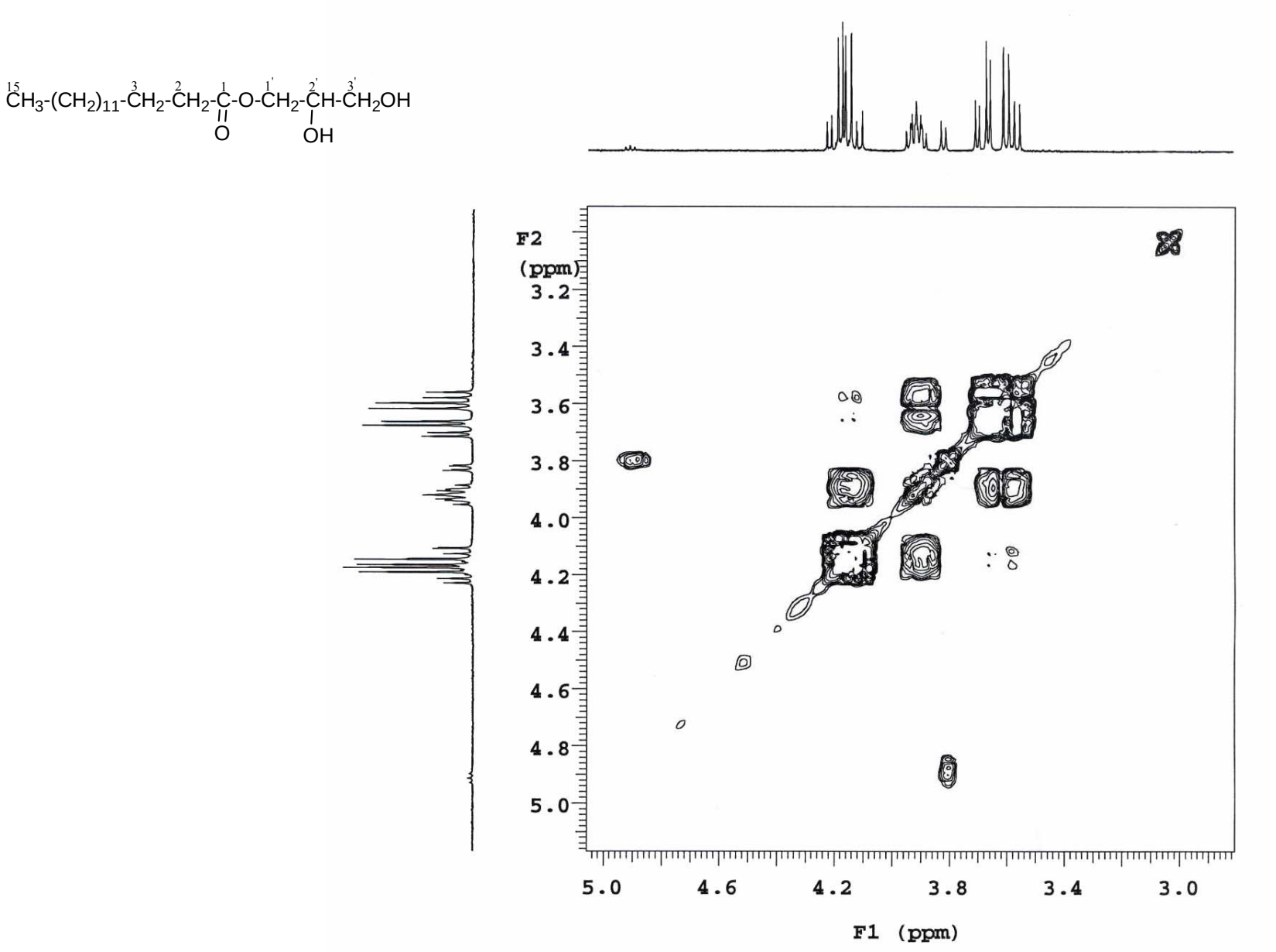
Şekil 4.14. 2', 3'-dihidroksi propil pentadekanoat bileşiğine ait ^{13}C NMR spektrumu [$CDCl_3$, δ(ppm), 300 MHz]



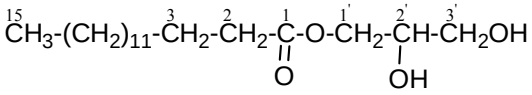
Şekil 4.15 . 2', 3'-dihidroksi propil pentadekanoat bileşiğine ait DEPT spektrumu

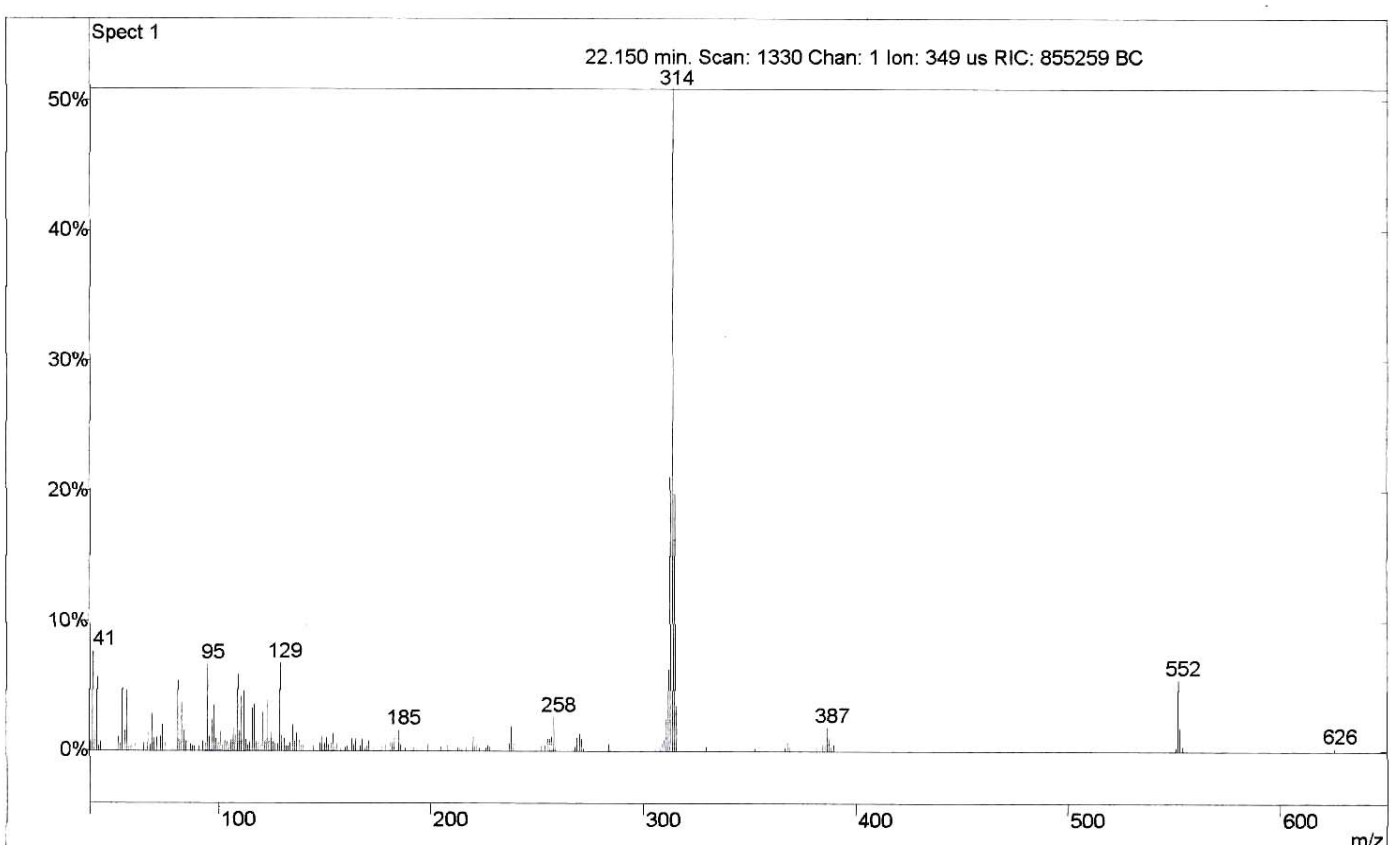


Şekil 4.16. 2', 3'-dihidroksi propil pentadekanoat bileşiğine ait COSY spektrumu



Şekil 4.17. 2', 3'-dihidroksi propil pentadekanoat bileşiğine ait COSY spektrumu [3-5 ppm arası genişletilmiş]



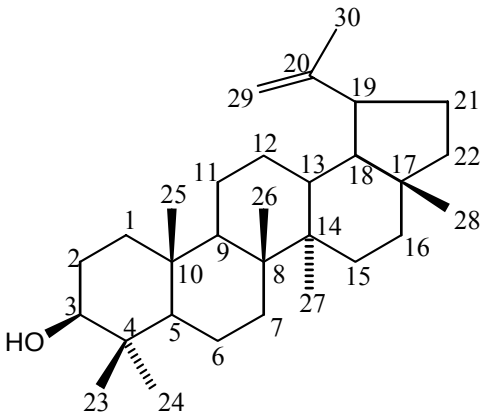


Şekil 4.18. 2,3-dihidroksi propil pentedekanoat bileşiğine ait EI-MS spektrumu

4.5.2. Triterpenler

4.5.2.1. 3 Numaralı Bileşik

Lupeol



Şekil 4.19. Lupeol

3 numaralı bileşik beyaz renkli, amorf yapıda olup, ince tabaka kromatografisinde silikajel plakta UV ışık altında (254 ve 366 nm) absorbansı yoktur. Serik sülfat belirteci püskürtülerek etüvde 110°C' de tutulduğunda bordo renkli spot oluşturması triterpen olabileceğini düşündürmüştür. Erime noktası 212-214ºC olarak gözlenmiştir.

UV spektrumunda (λ_{max} nm, MeOH) 210 nm de maksimum absorpsiyon bantı görülmektedir.

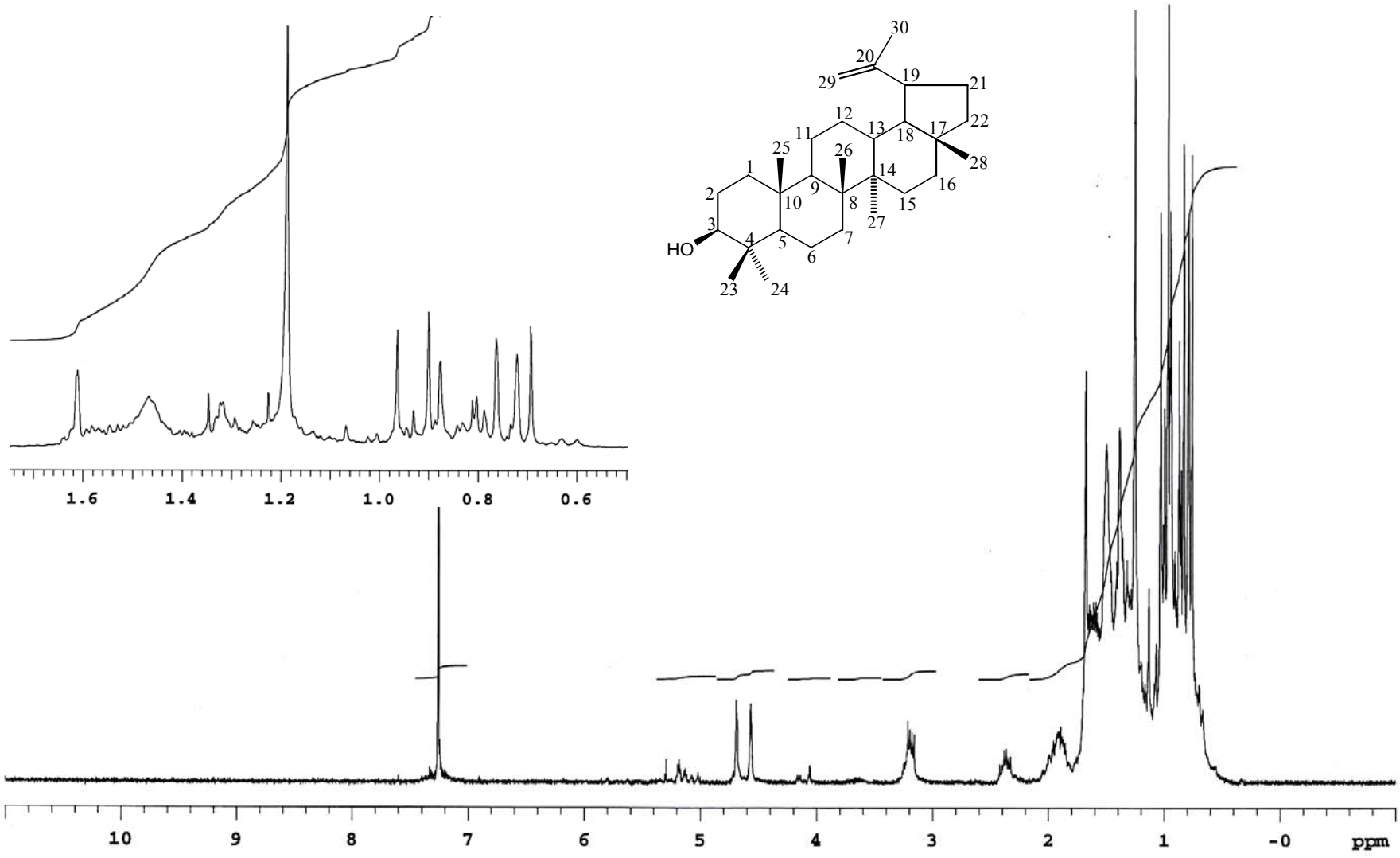
IR spektrumunda (ν_{max} cm^{-1}, nujol) 3300 cm^{-1} de OH grubu, 1635, 875 cm^{-1}de (=CH_2) bantları tespit edilmiştir.

^{1}H NMR spektrumu ($CDCl_3$, δ(ppm), 300 MHz, Şekil 4.20) lupan iskelet yapısının tipik sinyallerini göstermiştir. Vinilik metilen protonları 4.49 ppm (1H, d, *J*= 2.4 Hz) ve 4.61 ppm de (1H, d, *J*= 2.4 Hz) gözlenirken, vinilik metil proton sinyali ise 1.61 ppm de singlet olarak gözlenmiştir. Diğer metil sinyalleri 0.72 (3H, s), 0.76 (3H, s), 0.87 (3H, s), 0.90 (3s, s), 0.96 (3H, s), 0.69 ppm de (3H, s) izlenmiştir. 3.14 ppm de

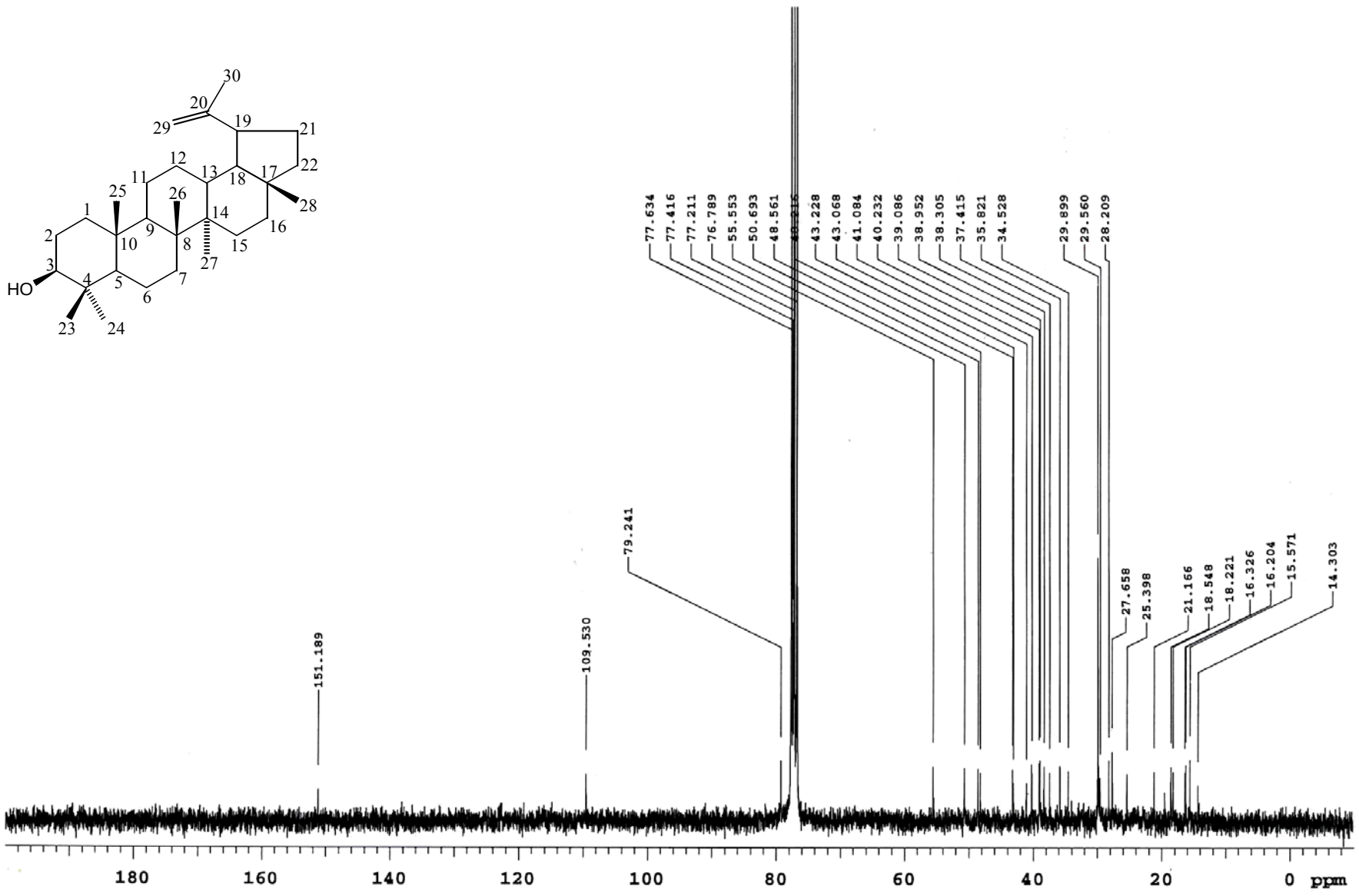
ise (1H, dd, *J*=5.4, 11 Hz) H-3α protonu gözlenmiştir. Bu bölünme hidroksil grubunun, β bağlı olduğunu belirtmektedir.

^{13}C NMR spektrumunda ($CDCl_3$, δ(ppm), 300 MHz, Şekil 4.21) ise 109.53 ppm deki metilen karbonu ile 151.18 ppm de izlenen kuarterner karbon sinyali yapıda bir ekzometilen grubu varlığını açıkça göstermektedir. 79.24 ppm de hidroksile komşu karbon sinyali izlenirken, metil karbonlarına ait sinyaller, 28.20 (C-23), 15.57 (C-24), 16.32 (C-25), 16.20 (C-26),14.30 (C-27), 18.22 (C-28) ppm de gözlenmiştir. Vinilik metil karbonu ise 19.30 ppm de izlenmiştir.

Literatür incelemesi sonucunda 4 numaralı bileşiğinin spektroskopik bulguları yapının Lupeol iskeletine sahip bir triterpen olduğunu gösterdi (Garcia, vd., 1981, Mahato, vd., 1994). Ayrıca daha önce yapılan çalışmalarda bu bileşiğin sitotoksik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Moriarity, vd., 1998).



Şekil 4.20. Lupeol bileşiğine ait ^{1}H NMR spektrumu [$CDCl_3$, δ(ppm), 300 MHz]

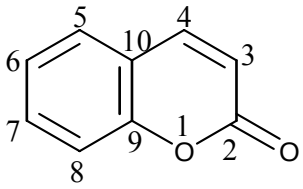


Şekil 4.21. Lupeol bileşiğine ait ^{13}C NMR spektrumunda [$CDCl_3$, δ(ppm), 300 MHz]

4.5.3. Kumarinler

4.5.3.1. 4 numaralı Bileşik

Kumarin



Şekil 4.22. Kumarin

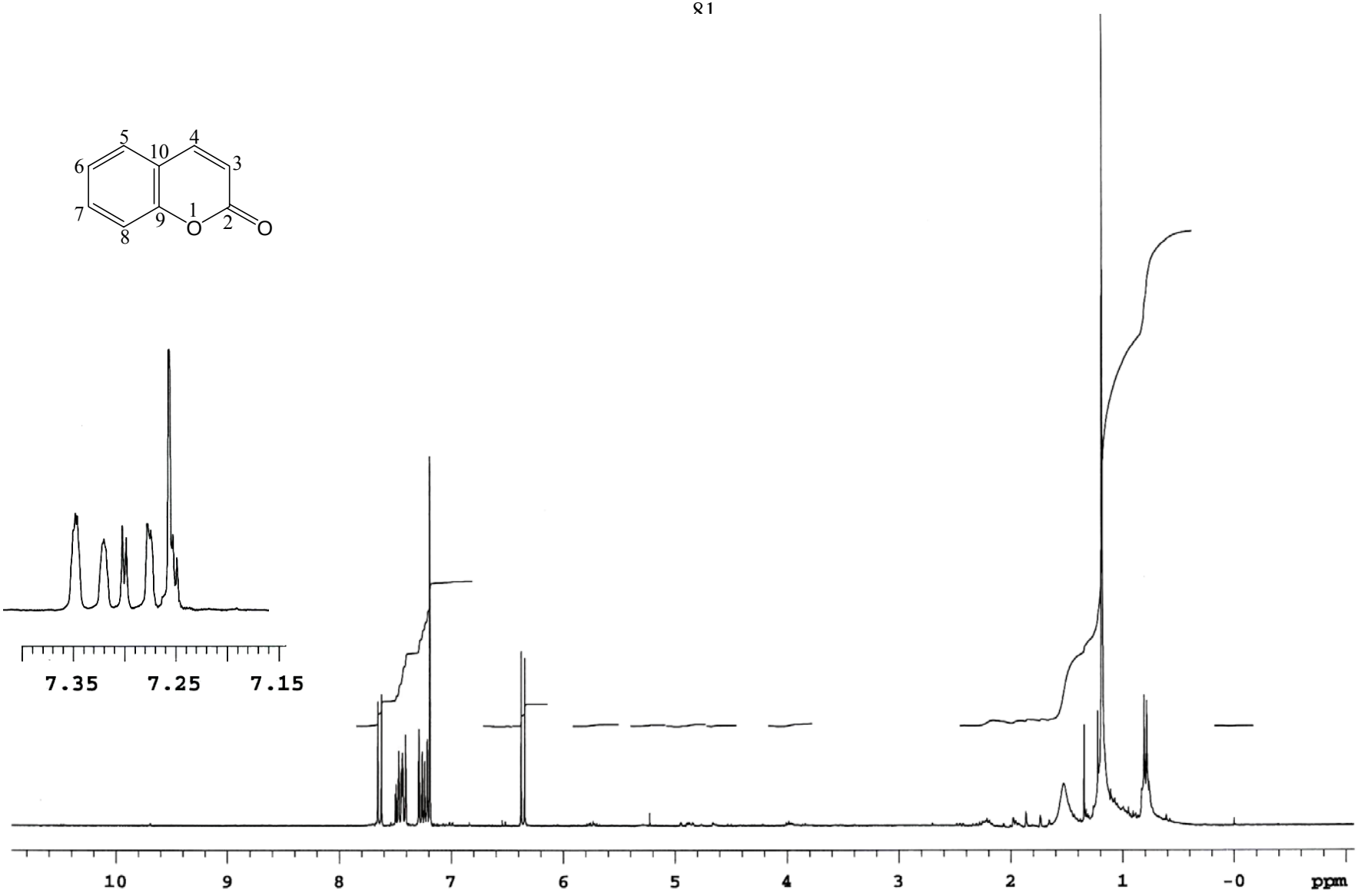
4 numaralı bileşik krem-kahverengi, kristal halde, UV ışık altında (254 ve 366 nm) mor görünüp, serik sülfat belirteci püskürtülerek 110°C lik etüvde bekletildiğinde yanmamaktadır. Erime noktası 68-69.5ºC olarak ölçülmüştür.

^{1}H NMR spektrumunda ($CDCl_3$, δ (ppm) 300 MHz, Şekil 4.23, Şekil 4.24) 7,70 ppm de (1H, d, *J*=9.6 Hz) H-4 ve 6.35 ppm de (1H, d, *J*=9.6 Hz) H-3 protonları kumarin halkasının karakteristik dupletlerini, 7.26 ppm de (1H, dd, *J*=1.2, 7.5 Hz) H-8 protonu, 7.48 ppm de (1H, dd, *J*=1.2, 7.5 Hz) H-5 protonuna ait sinyaller ile 7.33 ppm de (1H, ddd, *J*=1.2, 6.6, 8.1 Hz) H-6 ve 7.53 ppm de H-7 (1H, ddd, *J*=1.2, 7.2, 8.4 Hz) aromatik halka protonları gözlenmiştir.

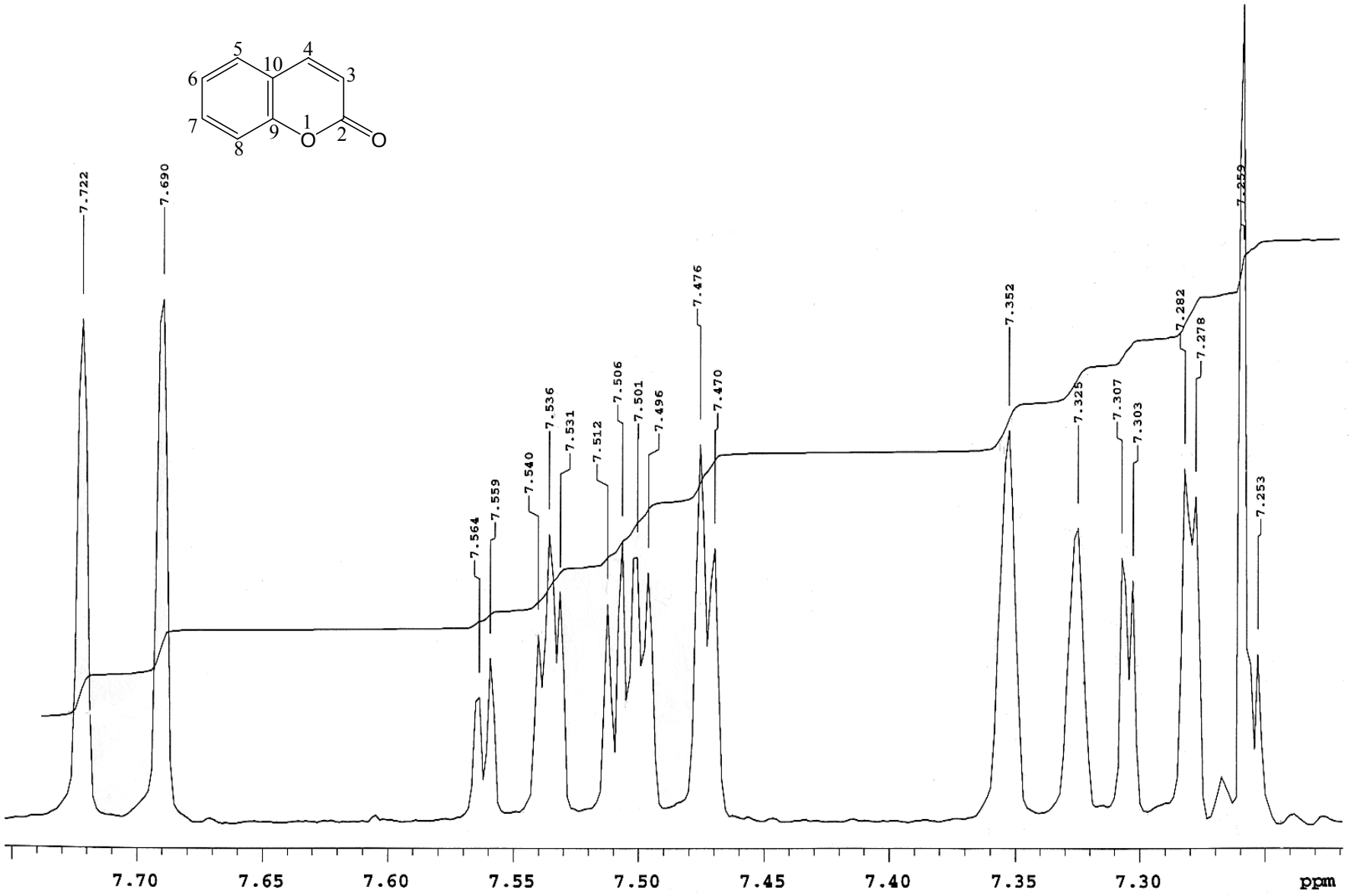
^{13}C NMR spektrumunda ($CDCl_3$, δ(ppm), 300 MHz, Şekil 4.25) 160.94 ppm de karbonil karbonu, 116.97 ppm de C-3, 143.58 ppm de C-4 karbonları ile 124.62, 128.06, 132.04 ppm de (C-6, C-5, C-7) aromatik halka karbonları gözlenmiştir. Çekilen APT spektrumu (Şekil 4.26) ile moleküldeki 154.33 ppm de (C-9), 119.08 ppm de (C-10) kuarterner karbonlar gözlenmiştir.

^{1}H-^{1}H COSY spektrumunda (Şekil 4.27) 7.70 ppm de (1H, d, *J*=9.6 Hz) H-4 protonunun, 6.35 ppm deki (1H, d, *J*=9.6 Hz) H-3 protonu ile etkileşimi, 7.25-7.56 ppm aralığındaki H-5, H-6, H-7 ve H-8 protonlarının birbirleriyle olan orto, meta etkileşimleri görülmüştür.

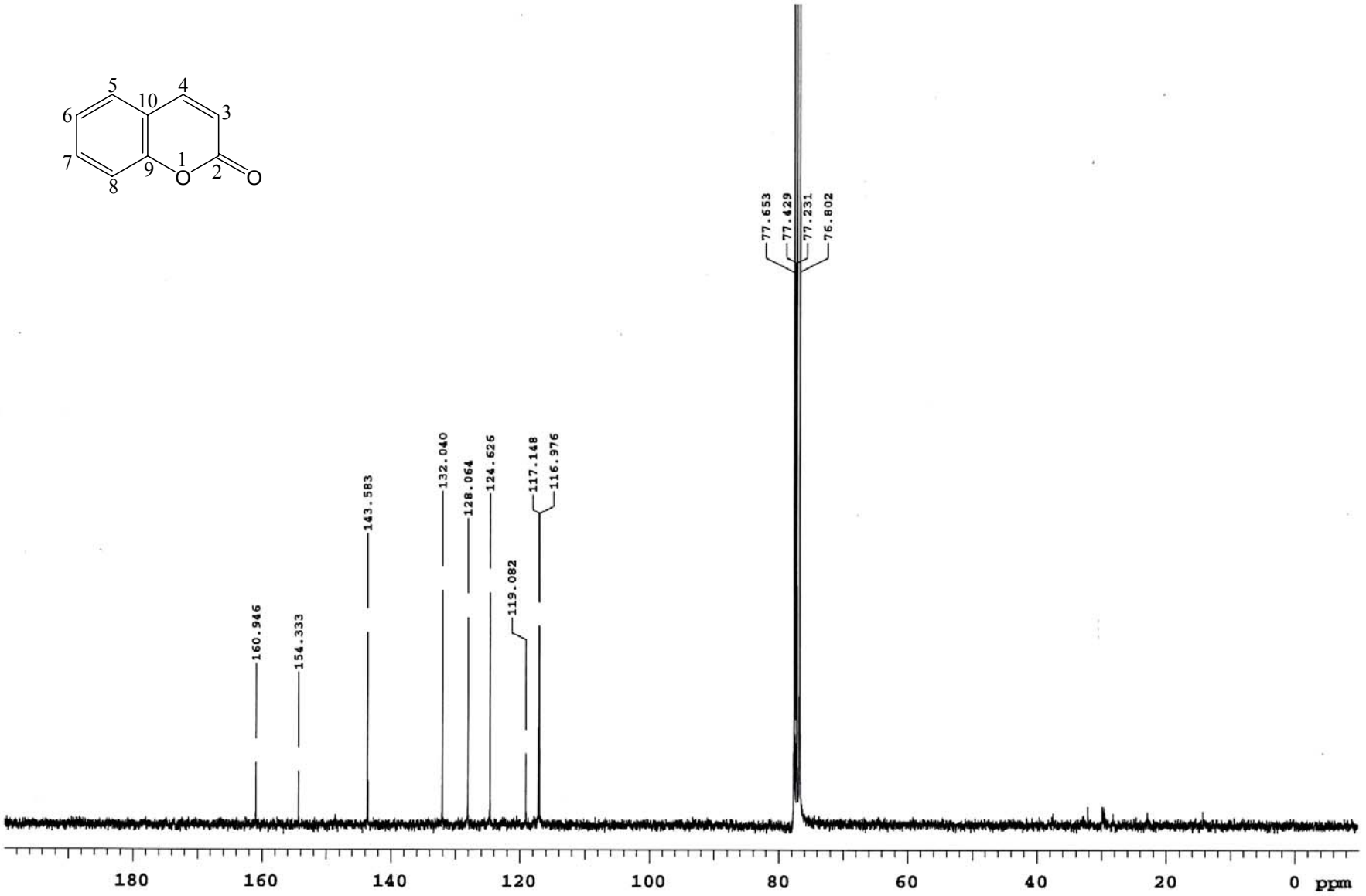
Elde edilen bulguların literatürdeki değerlerle karşılaştırılması sonucu bileşiğin nonsübstitue kumarin olduğu tespit edilmiştir (Gıannını vd., 1977, Pouchert, 1983).



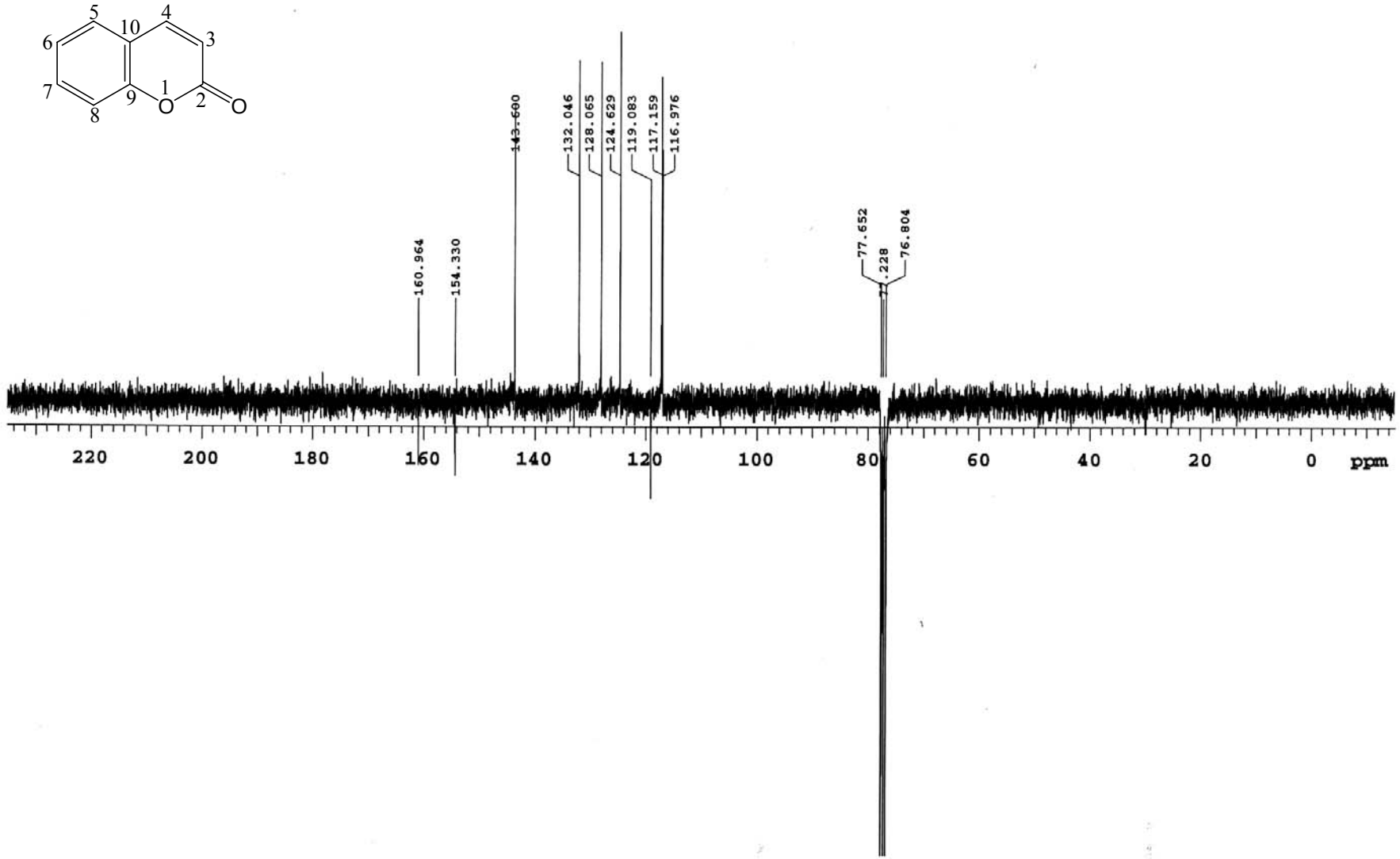
Şekil 4.23. Kumarin bileşiğine ait ^{1}H NMR spektrumu [$CDCl_3$, δ (ppm) 300 MHz]



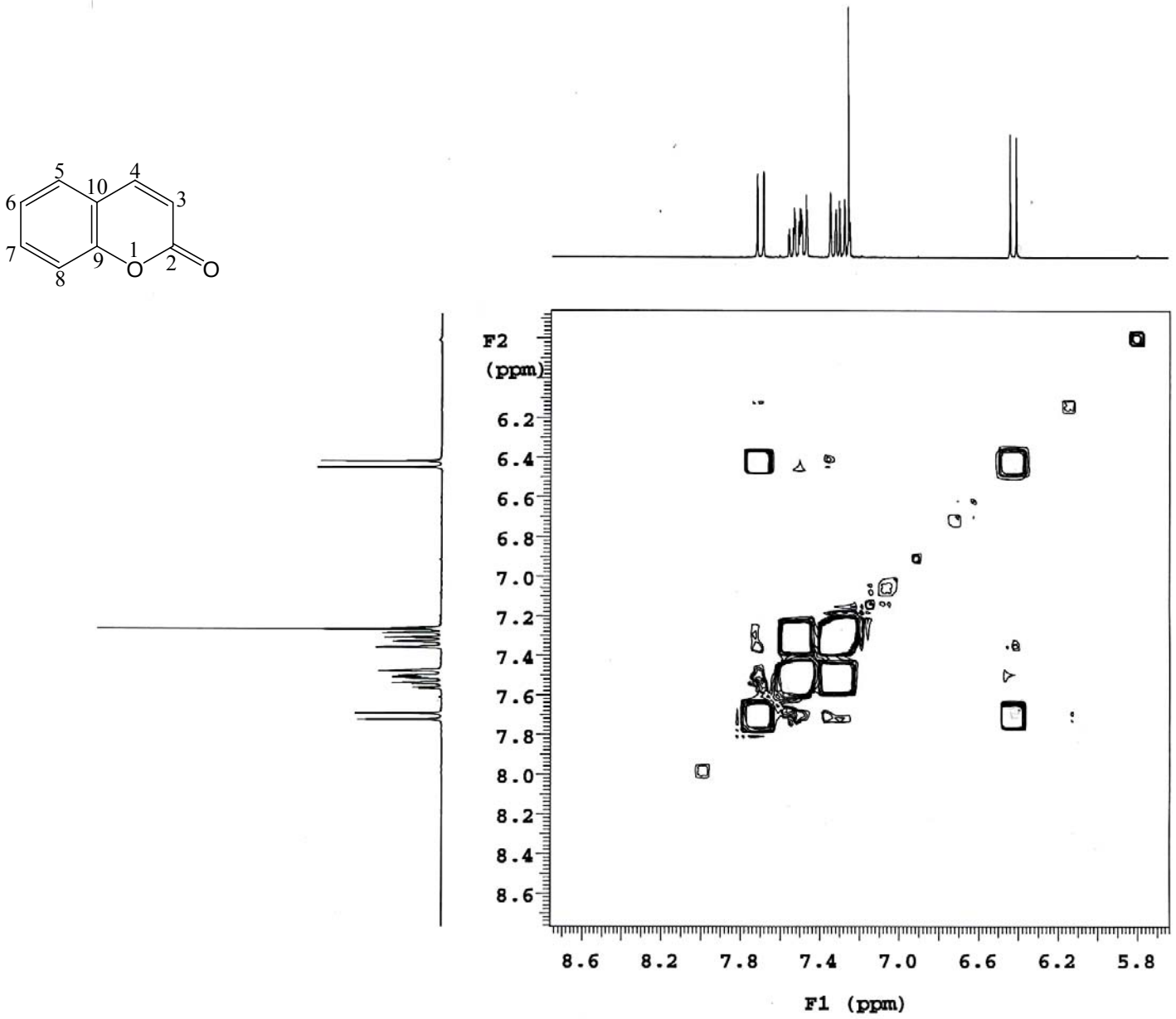
Şekil 4.24. Kumarin bileşiğine ait ^{1}H NMR spektrumu [6- 7.7 ppm aralığı genişletilmiş]



Şekil 4.25. Kumarin bileşiğine ait ^{13}C NMR spektrumu [$CDCl_3$, δ(ppm), 300MHz]



Şekil 4.26. Kumarin bileşiğine ait APT spektrumu

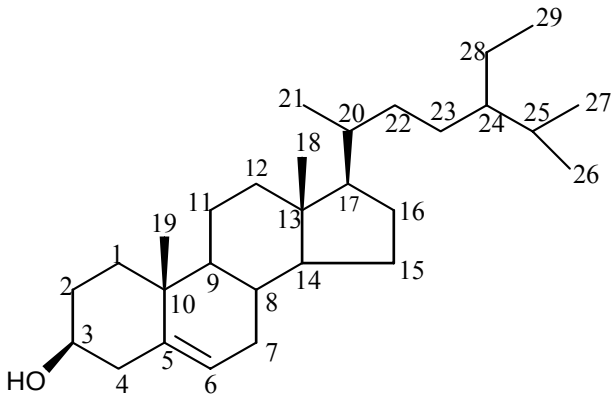


Şekil 4.27. Kumarin bileşiğine ait COSY spektrumu

4.5.4. Steroidler

4.5.4.1. 5 numaralı Bileşik

***β* -Sitosterol**



Şekil 4.28. *β*- sitosterol

5 numaralı bileşik renksiz katı haldedir. Silikajel plakta UV ışık altında (254 ve 366 nm) absorbansı yoktur. Serik sülfat belirteci püskürtülerek etüvde 110°C' de tutulduğunda bordo-kırmızı renk vermesi bileşiğin steroid yapısında olabileceğini düşündürmüştür. Bileşiğin erime noktası 135-136ºC bulunmuştur (Ulubelen, vd.,1976).

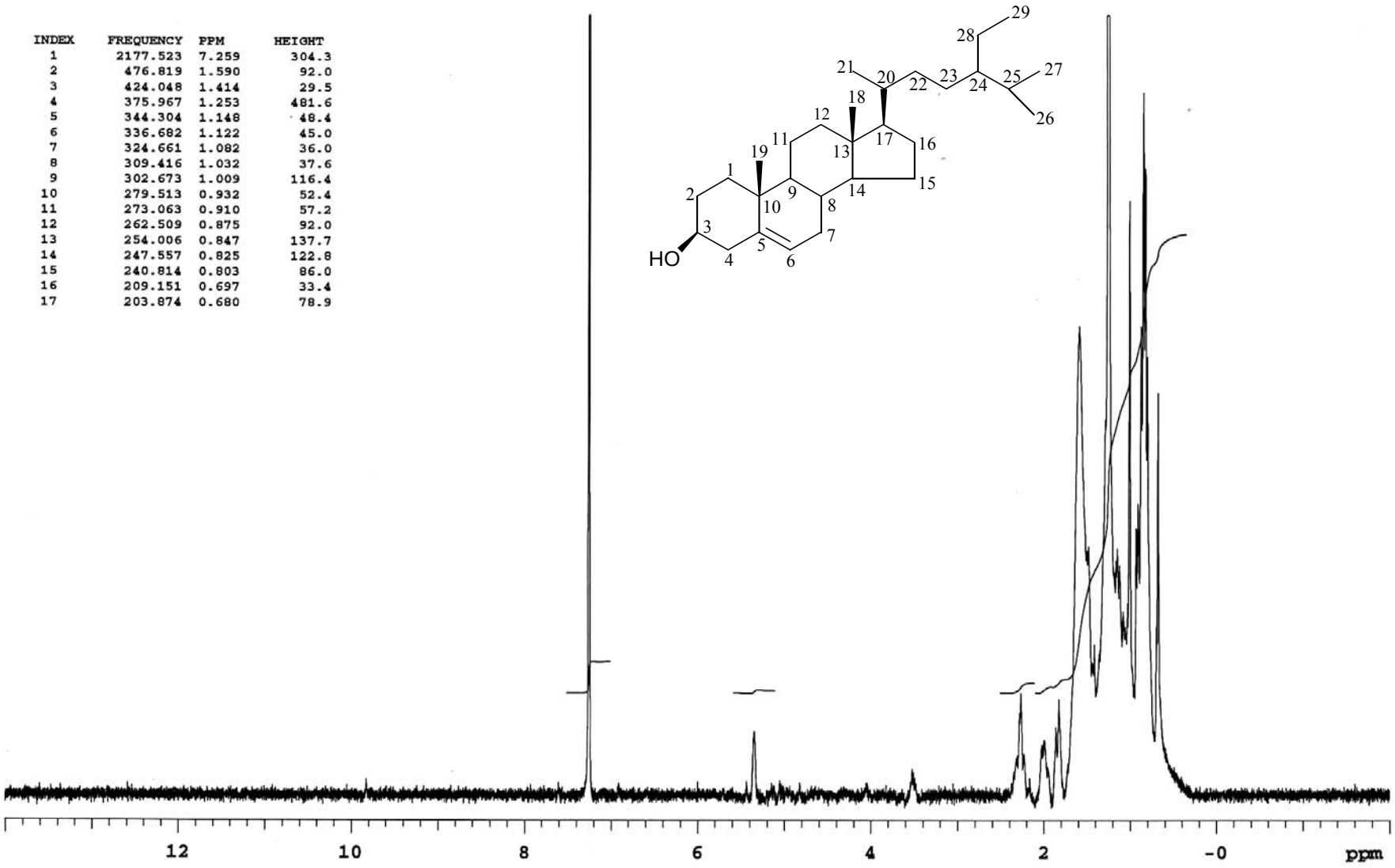
Bileşiğin UV spektrumunda (λ_{max} nm, MeOH) 205 nm de absorbans vermesi molekülde konjugasyon olmadığını belirtmiştir.

IR spektrumunda(ν_{max} cm^{-1}, $CHCl_3$) 3400 cm^{-1} de hidroksil grubu, 1650 cm^{-1} de doymamışlık, 1060-1070 cm^{-1} de (C-O) bantları izlenmiştir.

^{1}H NMR spektrumunda ($CDCl_3$, δ(ppm), 300 MHz, Şekil.4.29) 0.68 ppm (3H, s, H-18), 0.92 ppm (3H, d, *J*=6.6 Hz , H-21), 0.83 ppm (6H, d, *J*=6.6 Hz , H-26, H-27) ve 1,00 ppm (3H, s, H-19) de metil pikleri izlenmektedir. 3.52 ppm de (1H, m) hidroksile

komşu proton olan H-3, 5.34 ppm de (1H, d, J=3.5Hz) vinilik proton H-6 pikleri görülmektedir.

4 numaralı bileşiğinin, standart madde ile yapılan ince tabaka kromotogramı ve literatür çalışmaları sonucunda β-sitosterol olduğu anlaşılmıştır (Öksüz ve Erdem, 1996).

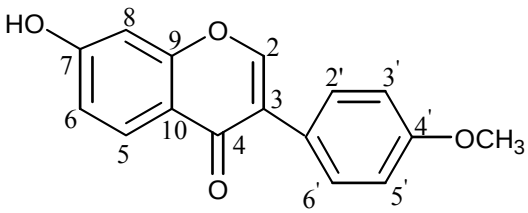


Şekil 4.29. *β*-Sitosterol bileşiğine ait ^{1}H NMR spektrumu [$CDCl_3$, δ(ppm), 300 MHz]

4.5.5. Flavonoidler

4.5.5.1. 6 Numaralı Bileşik

Formononetin



Şekil 4.30. Formononetin

Bileşik beyaz renkli, amorf halde olup, silikajel plakta UV ışık altında 254 nm dalga boyunda mor görünüp, serik sülfat belirteci püskürtülüp 110ºC'lik etüvde bekletildiğinde sarı renkte gözlenmiştir.

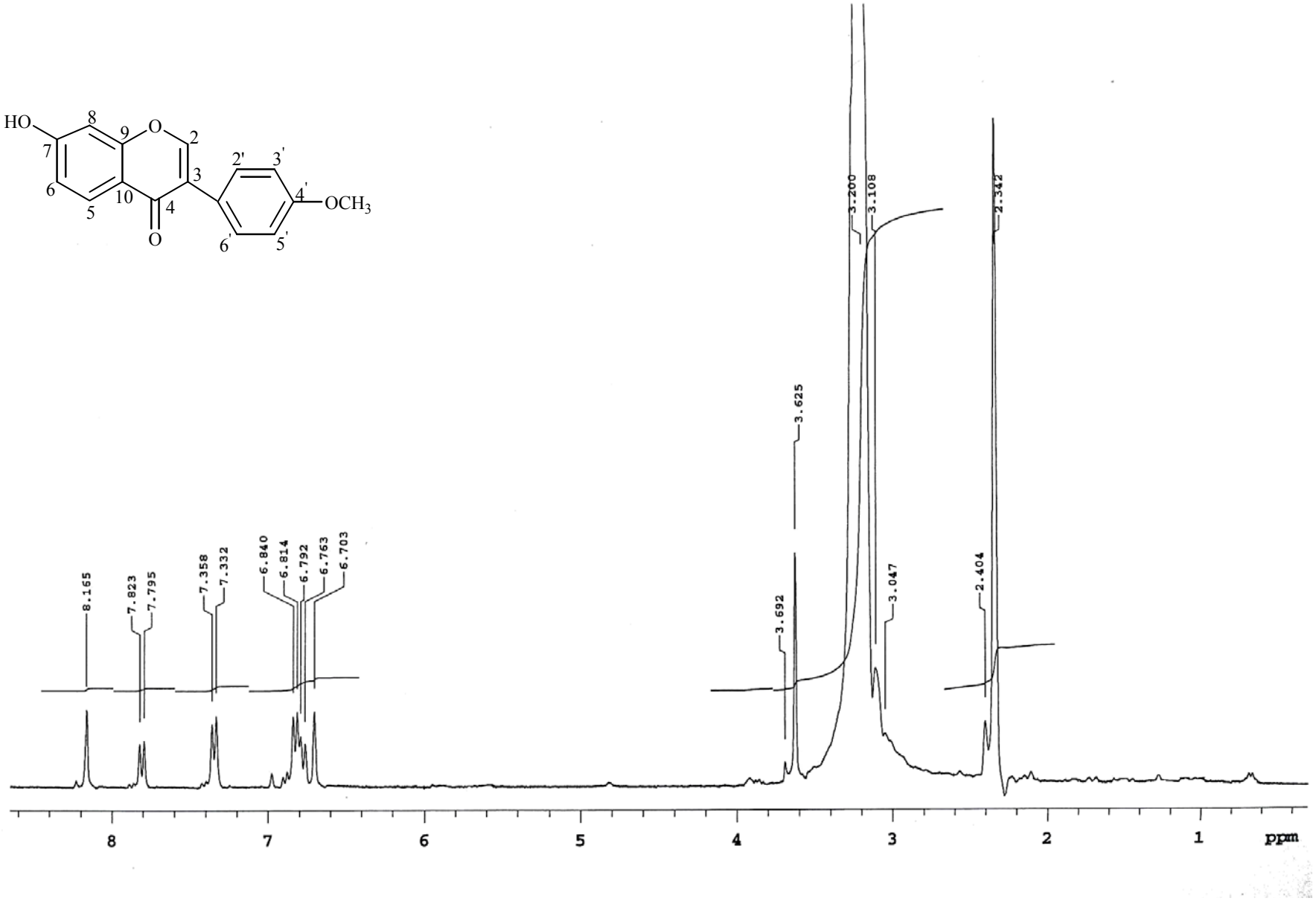
%30'luk CH_3COOH çözeltisinde selüloz plakta yürütülüp, UV lamba (366 nm) altında incelendiğinde görünmeyip, NH_3 buharına tutulduğunda açık mavi flouresans göstermesi, serbest 5-OH sız izoflavon yapısında olduğunu düşündürmüştür.

Bileşiğin MeOH ile alınan UV spektrumunda Bant II'nin 241, 248, 259 nm, Bant I'in 310 nm gözlenmesi izoflavon olabileceğini desteklemiştir. NaOMe ilavesinin ardından Bant I in 336.5 nm'ye kayması B halkasında 4'OH grubunun serbest olmadığını ve 323 nm'de yeni bir Bant oluşması ise serbest 7-OH olduğunu göstermiştir. Bileşiğin $AlCl_3$+MeOH ile alınan spektrumununun, HCl ilavesi ile kayma yapmaması bileşikte o-dihidroksi konumunda ve C-3, C-5 pozisyonunda OH olmadığını kanıtlamıştır.MeOH spektrumunun NaOAc ilavesi ile Bant II deki 15 nm'lik kayma serbest 7-OH varlığının göstergesidir. H_3BO_3 ilavesiyle bu spektrumda bir değişme olmaması ise o-dihidroksi grubu olmadığını göstermiştir (Bilaloğlu ve Harmandar, 1999).

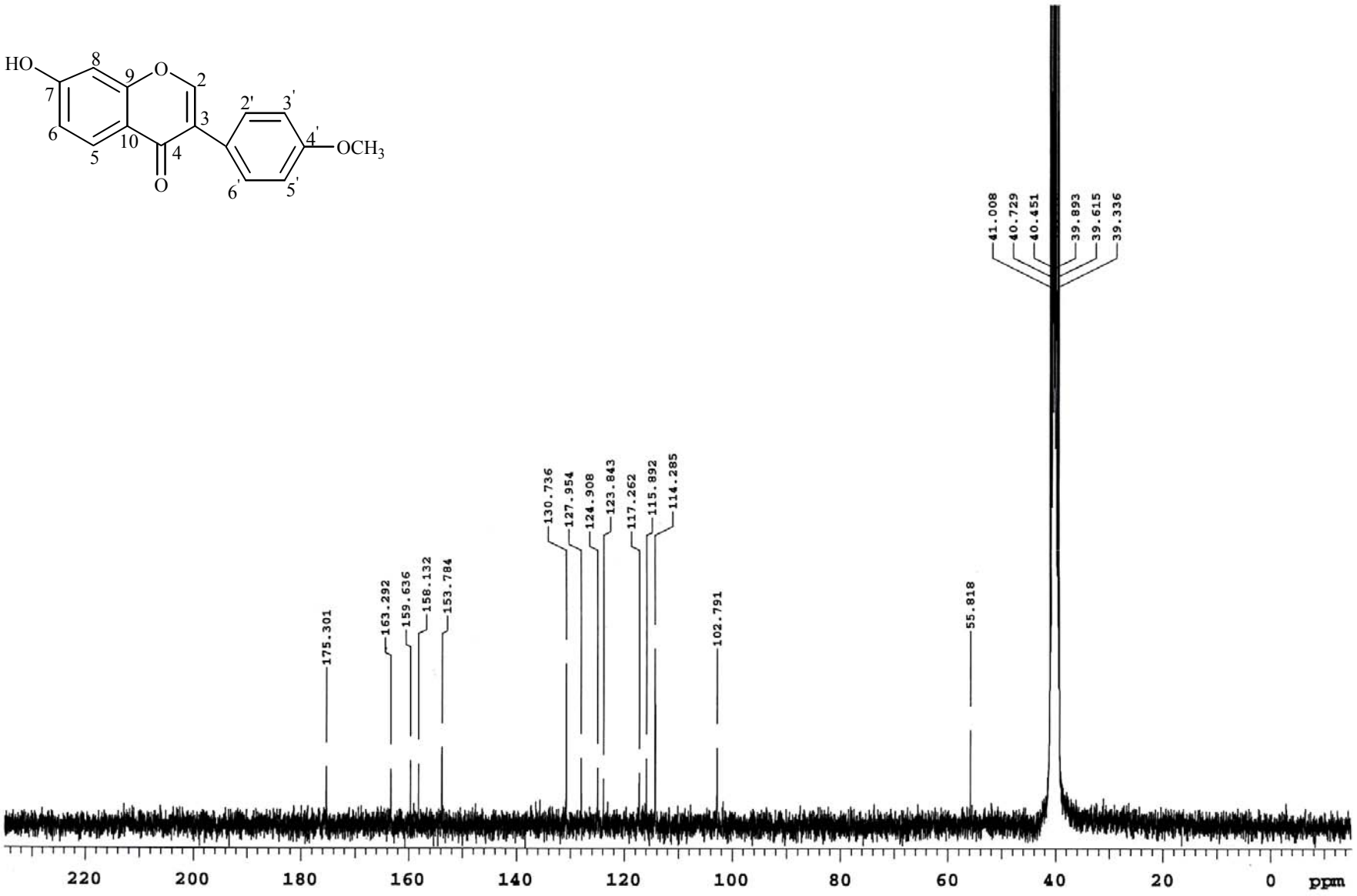
Bileşiğin ^{1}H NMR spektrumunda (DMSO-d_6, δ(ppm), 300 MHz, Şekil 4.31) B halkasına ait 4 proton sinyali δ 6.82 de (2H, d, *J*=7.8 Hz, H-3', H-5') ve δ 7.34 de (2H, d, *J*= 7,8 Hz, H-2′, H-6′) gözlenirken, δ 8.16 de (1H, s) H-2 protonu ve δ 3.62 de singlet olarak bir metoksit grubu gözlenmiştir. A halkasındaki aromatik proton sinyalleri δ 6.70 de (1H, brs) H-8 in H-6 ile meta etkileşimi ve δ 6.78 de ise (1H, brd, *J*= 8.7 Hz) H-6 nın H-5 ile orto etkileşimden kaynaklanan sinyaller olarak tespit edilmiştir. δ 7.81 de ise (1H, d, *J*= 8,4 Hz) H-5 protonlarının sinyalleri gözlenmiştir. Bu bulgular bileşiğin, izoflavon yapısında olduğunu belirtmiştir. İzoflavon halkasının karakteristik protonu H-2 nin δ 8.16 da bir singlet halinde izlenmesi bu bulguyu doğrulamıştır.

^{13}C NMR spektrumunda (DMSO-d_6, δ(ppm), 300 MHz, Şekil 4.32) ise 175.30 ppm de izlenen pik yapıda karbonil karbonunun varlığını, 55.81 ppm de metoksit karbonu, 159.63 (C-4') ve 153.78 (C-2) ppm de oksijen atomuna komşu karbon atomları, 163.29 ppm de C-7 karbon atomu ile 102.79-130.73 ppm aralığında diğer aromatik karbonlar izlenmiştir. DEPT ve APT (Şekil 4.33) spektrumlarından C-9, C-10, C-3, C-1',C-4', C-7 kuarterner karbon atomları açıkça görülmüştür.

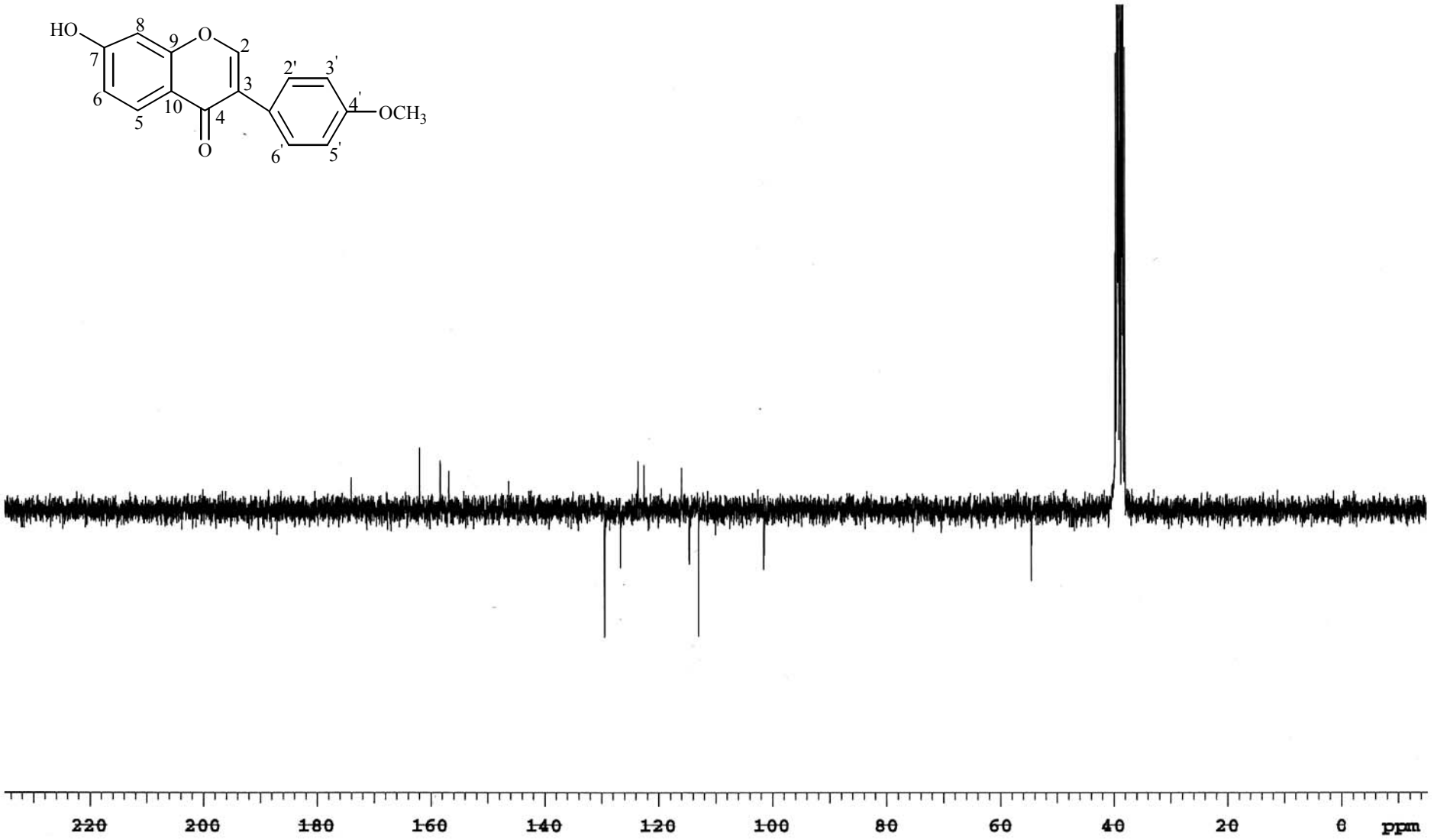
Literatür çalışmaları sonucu bileşiğin formononetin isimli izoflavon olduğuna karar verilmiştir (Xiao, vd., 2005, Xiaofeng, vd., 2003).



Şekil 4.31 Formononetin bileşiğine ait ^{1}H NMR spektrumu [DMSO-d_6, δ(ppm), 300 MHz]



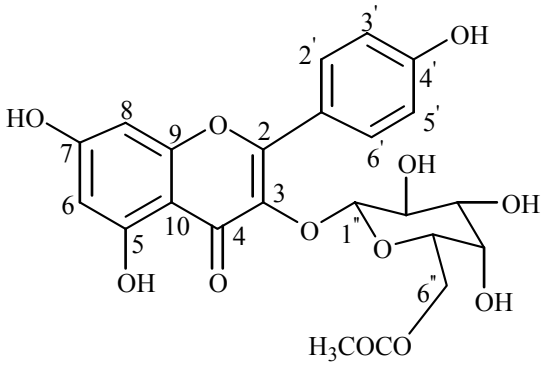
Şekil 4.32. Formononetin bileşiğine ait ^{13}C NMR spektrumu [DMSO-d_6, δ(ppm), 300 MHz]



Şekil 4.33. Formononetin bileşiğine ait APT spektrumu

4.5.5.2. 8 Numaralı Bileşik

Kamferol 3-O-(6''-asetil)-β-galaktozit



Şekil 4.34. Kamferol 3-O-(6''-asetil)-β-galaktozit

8 numaralı bileşik sarı toz formunda olup, silikajel plakta UV ışık altında 254 nm dalga boyunda mor renkli görünmüş ve serik sülfat belirteci püskürtülüp 110ºC lik etüvde bekletildiğinde sarı renkte görünmüştür.

%30'luk CH_3COOH çözeltisinde selüloz plakta yürütülüp, UV lamba (366 nm) altında incelendiğinde koyu mor, NH_3 buharına tutulduğunda sarımsı-yeşil, NA belirteci püskürtüldüğünde sarı-kahve renk vermesi 5-OH, 4'-OH ve 3-OR olabileceğini düşündürmüştür.

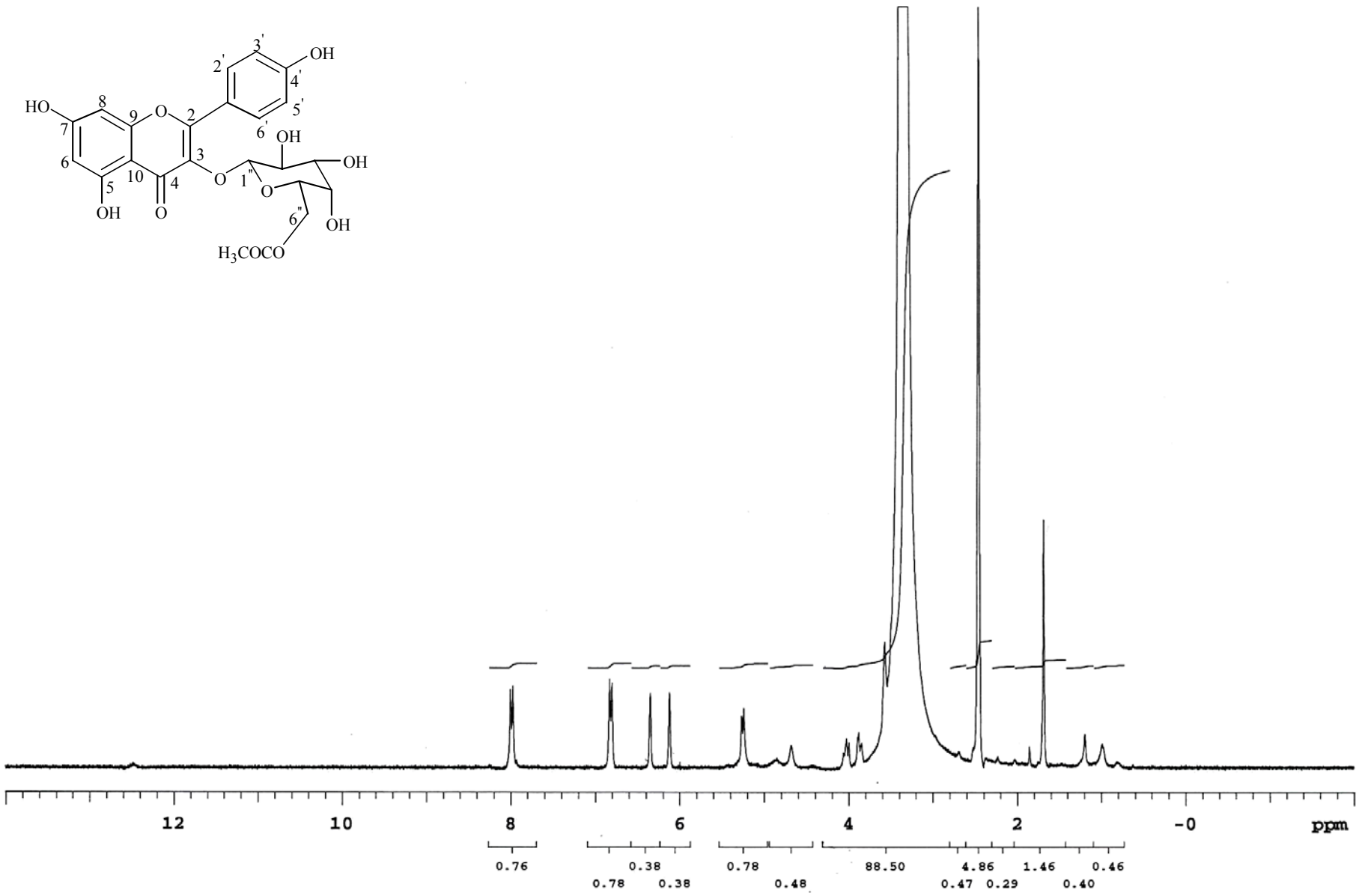
Bileşiğin MeOH ile alınan UV spektrumunda Bant II'in 266.5 nm, Bant I'in 351.5 nm gözlenmesi flavonol olabileceğini düşündürmüştür. NaOMe ilavesi sonucu Bant I'in 50 nm batokromik kayması 4'-OH grubunun varlığını göstermektedir. Ayrıca 323 nm'de düşük şiddette Bant III'ün görülmesi C-7 konumunda serbest hidroksil bulunduğunu göstermiştir. Bileşiğin $AlCl_3$+MeOH ile alınan spektrumunda HCl ilavesi ile Bant I'in MeOH ile alınan spektruma göre 45 nm uzun dalga boyuna kayması 5-OH, 6-H varlığının göstergesidir. MeOH spektrumunun NaOAc ilavesiyle Bant II'deki 11 nm batokromik kayması 7-OH varlığını göstermiştir. NaOAc+H_3BO_3 ilavesinde ise

Bant I de bir değişim olmaması o-dihidroksi yapısının bulunmadığını kanıtlamaktadır (Bilaloğlu ve Harmandar, 1999).

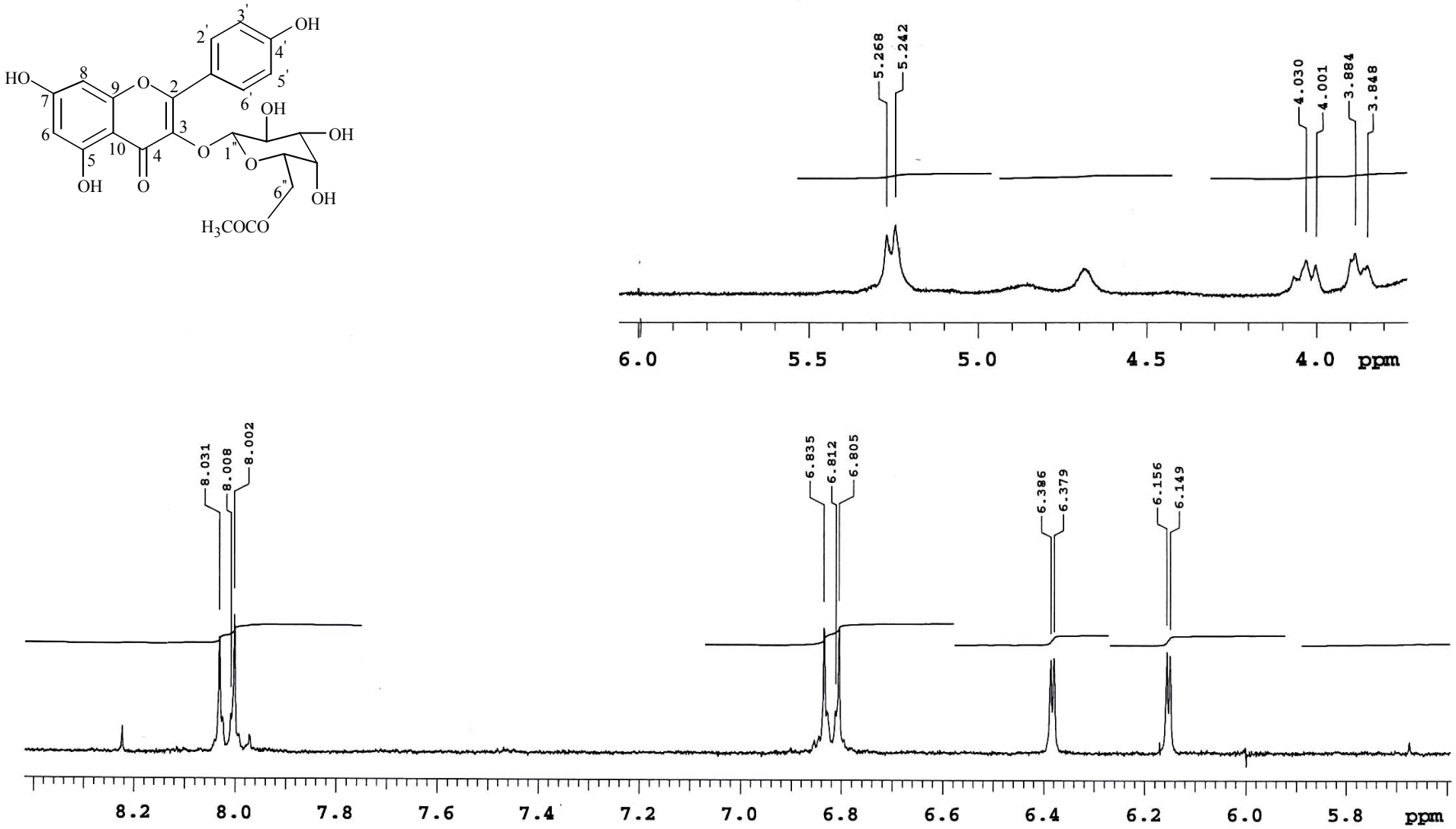
Bileşiğin ^{1}H NMR spektrumunda (DMSO-d_6, δ(ppm), 300 MHz Şekil 4.35, Şekil 4.36) 1.69 ppm de (3H, s) asetil metili singlet olarak gözlenmiştir. Bu durum, moleküldeki serbest hidroksil gruplarından birinin asetilenmiş olduğunu belirtmektedir. 3.30- 4.03 ppm deki multiplet şeklindeki protonlar ile 5.25 ppm deki etkileşim sabiti 7.8 Hz olan duplet (H-1"), yapıda β bağlı şeker molekülü olduğunu göstermiştir. 8.01 ppm de (2H, dd, *J*=8.7, 1.8 Hz, H-2', H-6') ve 6.82 ppm de (2H, dd, *J*=2.1, 9 Hz, H-3', H-5') de B halkasına ait aromatik protonları göstermektedir. H-6 ve H-8 in, 6.15 ppm ve 6.38 ppm de etkileşim sabiti 2.1 Hz olan dupletleri vermesi, moleküldeki 5 ve 7 konumlarının kapalı olduğunu göstermiştir.

^{13}C NMR spektrumunda (DMSO-d_6, δ(ppm), 300 MHz, Şekil 4.37) 71.60 (C-2"), 73.41 (C-3"), 68.77 (C-4"), 73.41 (C-5"), 63.78 (C-6") ppm lerde izlenen pikler ile 102.49 (C-1")'de izlenen anomerik karbona ait pik yapıda şeker molekülünün varlığını doğrulamaktadır. 20.78 ppm de şeker molekülüne bağlı asetil metiline ait sinyal gözlenmiştir. 157.13 ppm de (C-2) oksijene komşu karbon ile 177.93 ppm de (C-4) karbonil karbonu pikleri gözlenmiştir. 161.76 (C-5), 165.96 (C-7), 160.65 (C-4') ppm lerde hidroksil bağlı karbonlara ait pikler ve 94.49, 99.64, 104.04, 115.71, 121.44, 131.55, 133.85 ppm lerde aromatik karbonlar izlenmiştir. 170.54 ppm de izlenen pik yapıda bir asetil karbonilini göstermektedir. Asetil karbonunun C-6" de bağlı olduğu yapılan literatür çalışmaları sonucu kanıtlanmıştır. Aynı bileşik daha önce *Trifolium repens* bitkisinden de izole edilmiştir.

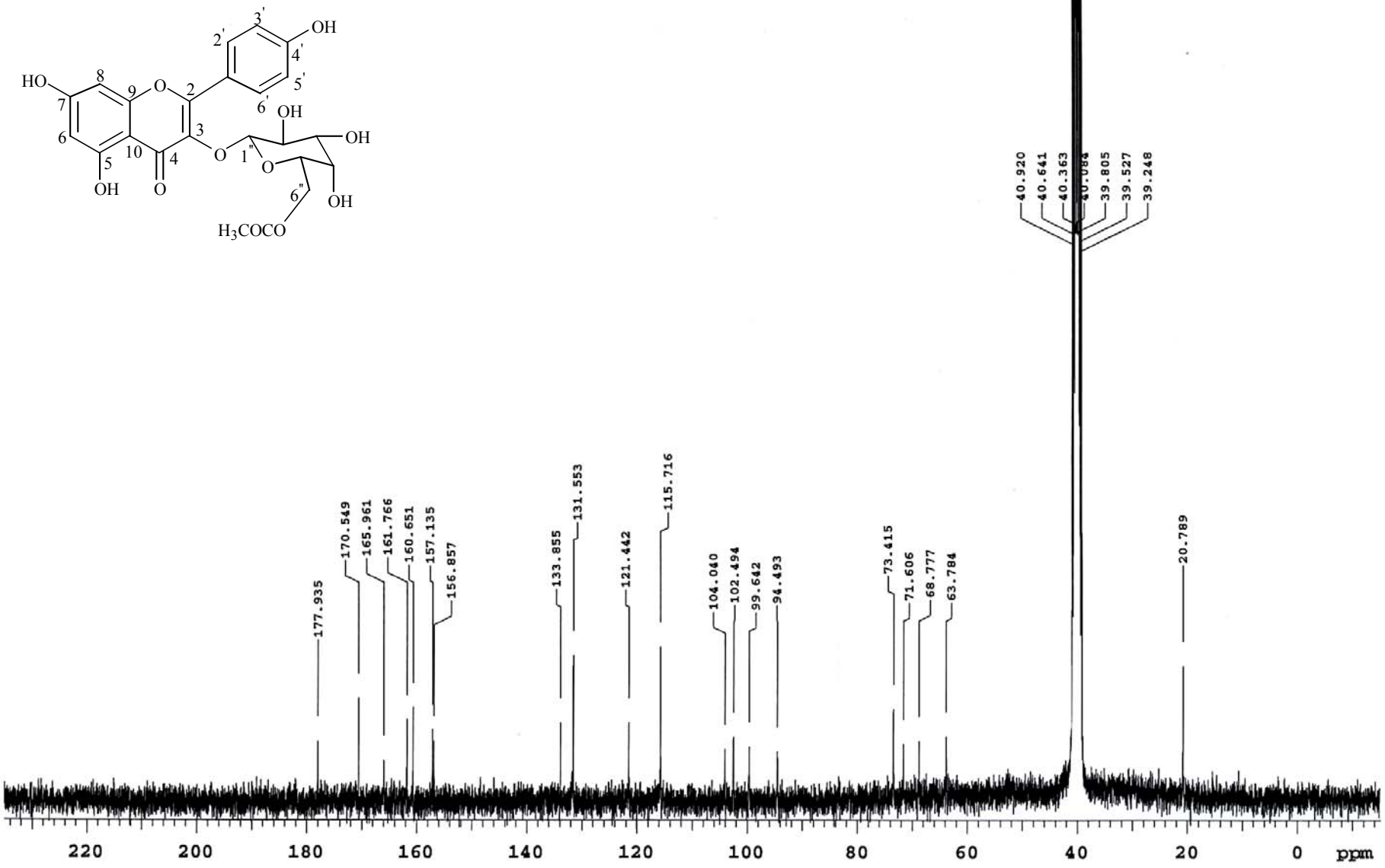
Tüm spektroskopik veriler ve literatür çalışmaları maddesinin yapısının Kamferol 3-O-(6"-asetil)-β-D-galaktozit olduğunu ispatlamıştır (Foo, vd., 2000, Papanov ,vd., 1990).



Şekil 4.35. Kamferol-3-O-(6"-asetil)-β-galaktozit bileşiğine ait ^{1}H NMR spektrumu [DMSO-d_6, δ(ppm), 300 MHz]



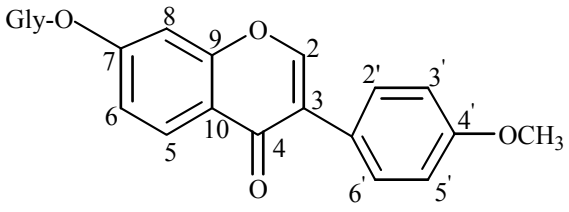
Şekil 4.36. Kamferol-3-O-(6"-asetil)-β-galaktozit bileşiğine ait ^{1}H NMR spektrumu [4-8 ppm arası genişletilmiş]



Şekil 4.37. Kamferol-3-O-(6"-asetil)-β-galaktozit bileşiğine ait ^{13}C NMR spektrumu [DMSO-d_6, δ(ppm), 300 MHz]

4.5.5.3. 9 Numaralı Bileşik

Formononetin-7-O-β-glikozit



Şekil 4.38. Formononetin-7-O-β-glikozit

9 numaralı bileşik açık sarı renkli, amorf yapıda olup silikajel plakta UV ışık altında 254 nm dalga boyunda mor renkli görülmüş ve serik sülfat belirteci püskürtülüp 110ºC de bekletildiğinde sarı-kahve renkte gözlenmiştir.

%30'luk CH_3COOH çözeltisinde selüloz plakta yürütülüp, UV lamba (366 nm) altında incelendiğinde açık mavi, NH_3 buharına tutulduğunda açık mavi flouresans göstermesi, serbest 5-OH sız izoflavon yapısında olduğunu göstermiştir.

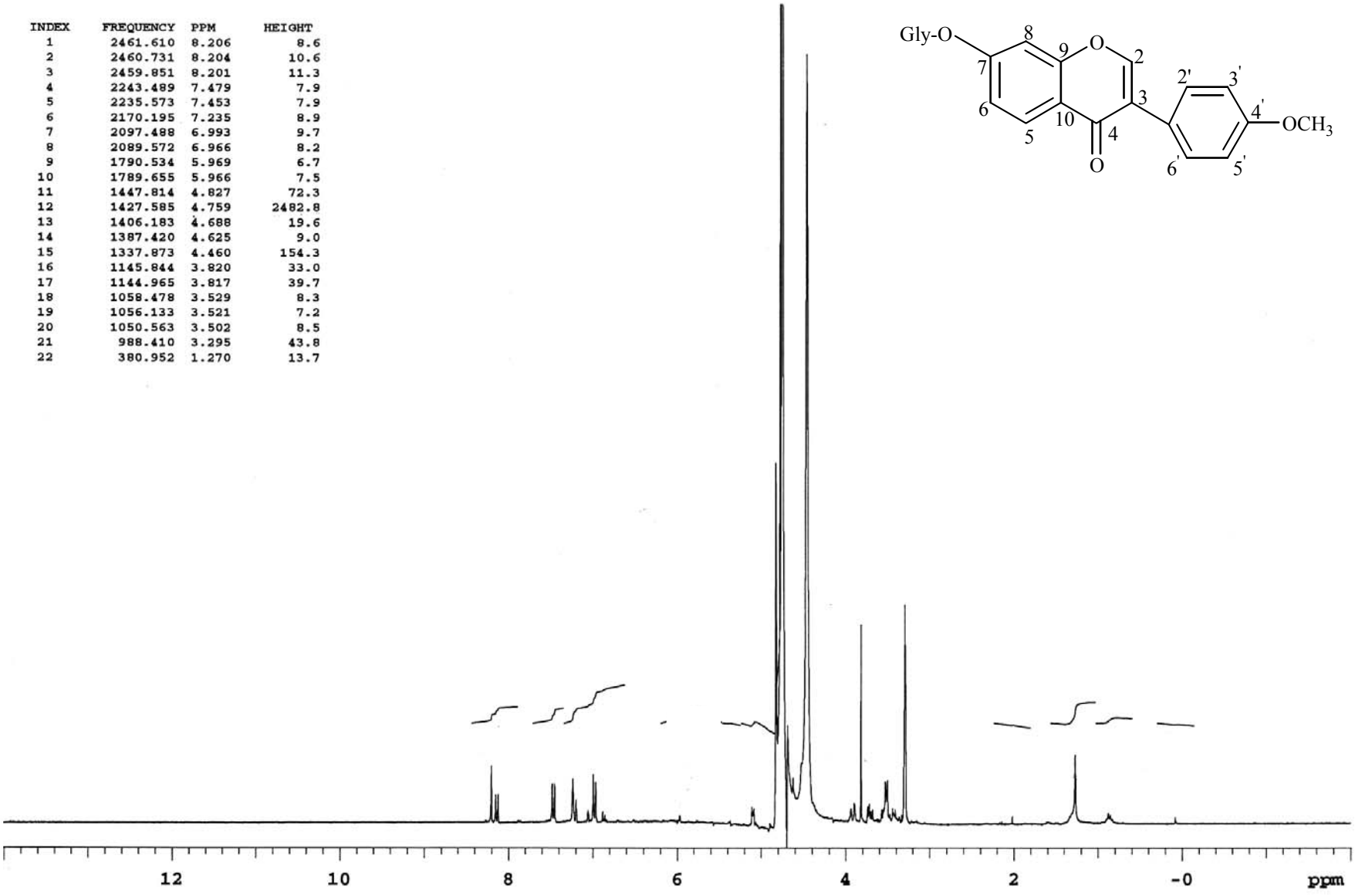
Bileşiğin MeOH ile alınan UV spektrumunda Bant II'in 253-260.5 nm, Bant I nin 302 nm gözlenmesi izoflavon iskelet yapısında olabileceğini düşündürmüştür. NaOMe ilavesi sonucu spektrumda Bant I in 325 nm ye kayması B halkasında 4'-O-substitüe olduğunu göstermiştir. Bileşiğin $AlCl_3$+MeOH ile alınan spektrumunda HCl ilavesi ile de hiçbir kayma yapmaması, bileşikte o-dihidroksi pozisyonunda ve C-3, C-5 konumunda hidroksil olmadığının göstergesidir. NaOAc+MeOH ilavesi ile Bant II'nin kaymaması 7-OH bulunmadığını veya substitüe olduğunu göstermiştir. NaOAc+H_3BO_3 spektrumunda Bant I'in MeOH spektrumuna göre bir değişiklik göstermemesi, A ve B halkasında o-dihidroksi yapısının olmadığını kanıtlamıştır (Bilaloğlu ve Harmandar, 1999).

^{1}H NMR spektrumunda (CD_3OD, δ (ppm), 300 MHz, , Şekil 4.39, Şekil 4.40) 3.40-3.56 ppm'de izlenen multiplet şeklindeki sinyaller yapıda bir şeker molekülünün

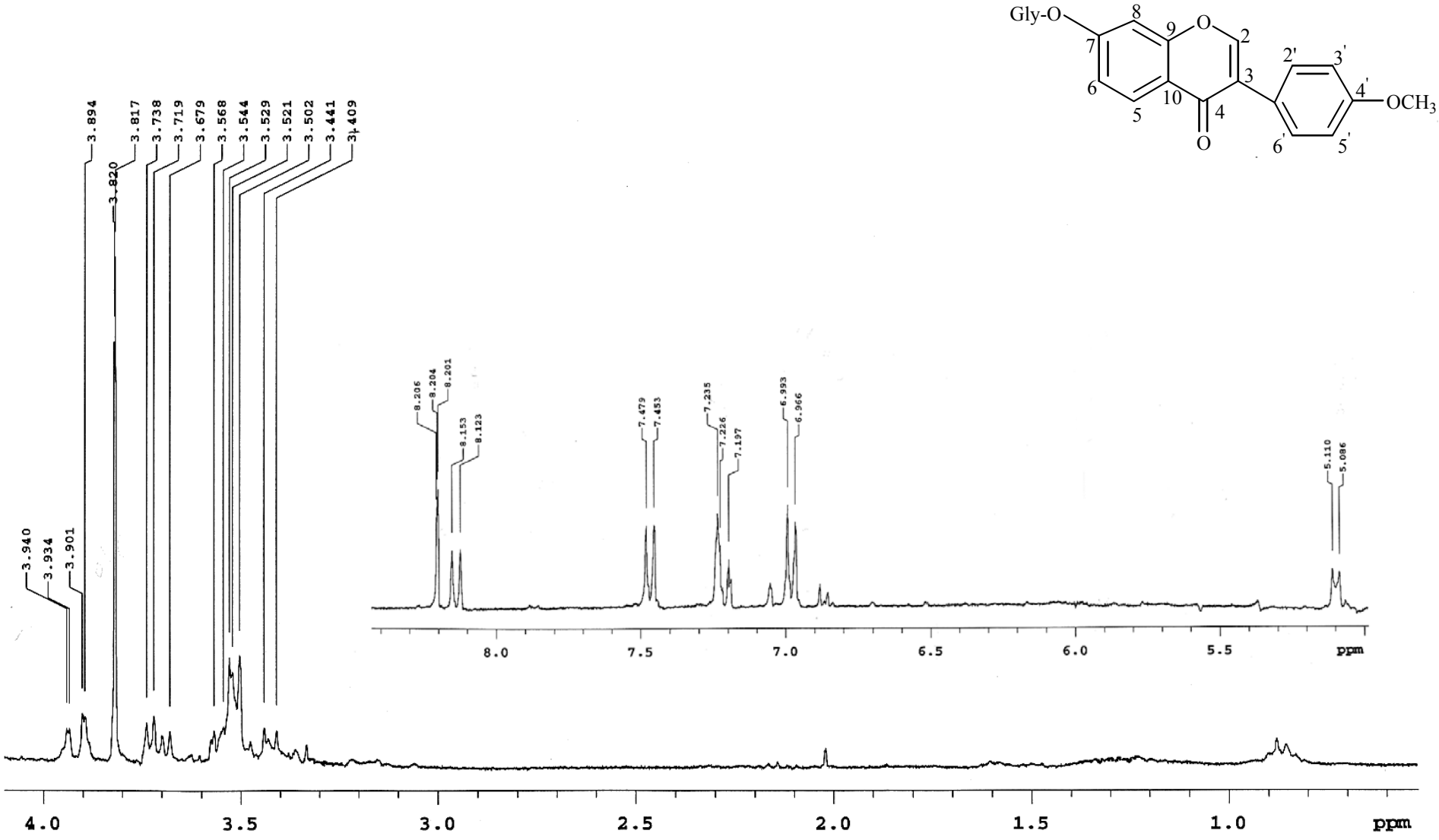
varlığını göstermiştir. 3.71 ppm de (1H, dd, *J*=6, 12 Hz, H-6"$_a$), 3.92 ppm de (1H, dd, *J*=2.1, 12 Hz, H-6"$_b$) şeker molekülünün protonlarını, 5.09 ppm deki sinyal şeker molekülünün anomerik protonunu (1H, d, *J*=7.2 Hz, H-1") göstermiş, ayrıca etkileşim sabitininde 7.2 Hz olması şekerin β bağlı olduğunu belirtmiştir. 6.96-8.20 ppm aralığında ki aromatik halka protonları yapının izoflavon olduğunu göstermiştir. B halkasına ait 4 proton sinyali 6.97 ppm de (2H, d, *J*= 8.1 Hz, H-3', H-5'), 7.46 ppm de (2H, d, *J*= 7.8 Hz, H-2', H-6') gözlenirken, 8.20 ppm de (1H, s, H-2) ve A halkasına ait diğer aromatik proton sinyalleri 7.21 ppm de (1H, dd, *J*= 8.7, 2.7 Hz, H-6), 7.23 ppm de (1H, d, *J*= 2.7 Hz, H-8), 8.13 ppm de (1H, d, *J*= 9 Hz, H-5), 3.81 ppm de ise moleküldeki metoksit grubu singlet olarak izlenmiştir.

Bu bulgular, literatür araştırmaları ile kıyaslanarak, bileşiğin Formononetin-7-O-β-glikozit isimli izoflavon olduğu tespit edilmiştir (Xiaofeng, vd., 2003, Xiao, vd., 2005).

INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT
1	2461.610	8.206	8.6
2	2460.731	8.204	10.6
3	2459.851	8.201	11.3
4	2243.489	7.479	7.9
5	2235.573	7.453	7.9
6	2170.195	7.235	8.9
7	2097.488	6.993	9.7
8	2089.572	6.966	8.2
9	1790.534	5.969	6.7
10	1789.655	5.966	7.5
11	1447.814	4.827	72.3
12	1427.585	4.759	2482.8
13	1406.183	4.688	19.6
14	1387.420	4.625	9.0
15	1337.873	4.460	154.3
16	1145.844	3.820	33.0
17	1144.965	3.817	39.7
18	1058.478	3.529	8.3
19	1056.133	3.521	7.2
20	1050.563	3.502	8.5
21	988.410	3.295	43.8
22	380.952	1.270	13.7



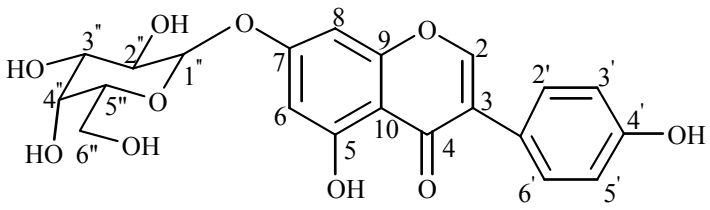
Şekil 4.39. Formononetin-7-O-β-glikozit bileşiğine ait ^{1}H NMR spektrumu [CD_3OD, δ (ppm), 300 MHz]



Şekil 4.40. Formononetin-7-O-*β*-glikozit bileşiğine ait ^{1}H NMR spektrumu [1-4 ppm arası genişletilmiş]

4.5.5.4. 10 Numaralı Bileşik

Genistein -7-O-β-glukozit (Genistin)



Şekil 4.41. Genistein -7-O-β-glukozit

10 numaralı bileşik sarı renkli, amorf, silikajel plakta UV (254 nm) lamba altında incelendiğinde mor görünüp serik sülfat belirteci püskürtülüp 110ºC de bekletildiğinde sarı renk vermiştir.

%30'luk CH_3COOH çözeltisinde selüloz plakta yürütülüp, UV lamba (366 nm) altında incelendiğinde koyu mor, NH_3 buharına tutulduğunda da koyu mor renk görünmüştür.

Bileşiğin MeOH ile alınan UV spektrumunda Bant II nin 262 nm, Bant I' in 332 nm gözlenmesi izoflavon olabileceğini düşündürmüştür. NaOMe ilavesi sonucu Bant I in 41 nm batokromik kayması 4'-OH grubunun varlığını göstermektedir. Bileşiğin $AlCl_3$+MeOH ile alınan spektrumunda HCl ilavesi ile Bant I'in MeOH ile alınan spektruma göre 45 nm uzun dalga boyuna kayması 5-OH, 6-H varlığının göstergesidir. NaOAc+MeOH ilavesi ile Bant II'nin kaymaması 7-O-substitüe olduğunu göstermiştir. NaOAc+H_3BO_3 spektrumunda Bant I'in MeOH spektrumuna göre kaymaması A ve B halkasında o-dihidroksi grubunun olmadığını ispatlanmıştır.

^{1}H NMR spektrumunda (DMSO-d_6, δ(ppm), 300 MHz, Şekil 4.42) 3.13-3.65 ppm aralığında izlenen multiplet şeklindeki protonlar ile 5.01 ppm de izlenen (1H) etkileşim sabiti 7.2 Hz olan duplet, molekülde β bağlı bir şeker molekülü olduğunu göstermiştir. 7.34 ppm (2H, dd, *J*=8.7, 2.1 Hz, H-2', H-6') ve 6.78 ppm deki (2H, dd,

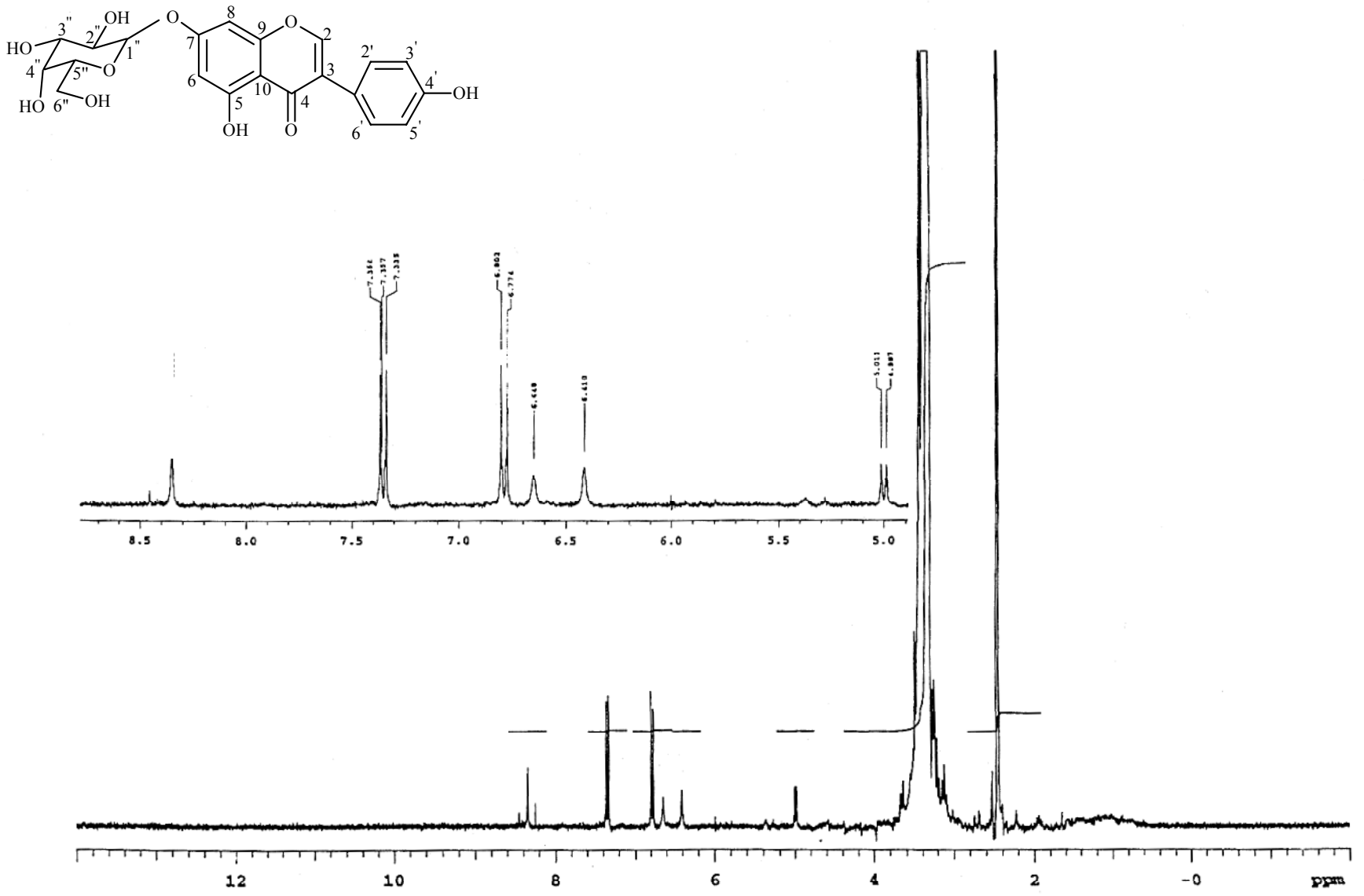
J=8.4, 2.1 Hz, H-3', H-5') aromatik halka protonları ile izoflavon halkasının karakteristik protonu H-2 nin 8.34 ppm de (1H, s, H-2) singlet olarak izlenmesi yapının bir izoflavon olabileceğini düşündürmüştür. A halkasına ait 6.64 ppm de (1H, brs) H-6 ile 6.41 ppm deki (1H, brs) H-8 protonlarının sadece meta etkileşimi yapmış olması 5 ile 7 konumlarının kapalı olduğunu göstermiştir.

Yapılan çalışmalarda 6 ve 8 nolu protonlar ile 3' ve 5' nolu aromatik halka protonlarının kaymaları literatür değerleri ile kıyaslanarak, şeker grubunun 7 nolu karbona bağlı olduğu anlaşılmıştır.

^{13}C NMR spektrumunda (DMSO-d_6, δ(ppm), 400 MHz, Şekil 4.43) 73.72 (C-2"), 76.96 (C-3"), 70.26 (C-4"), 77.80 (C-5"), 61.27 (C-6") ppm lerde gözlenen şeker karbonları ile 100.52 (C-1") ppm de izlenen anomerik karbona ait pik, glikozit bağlı bir yapı olduğunu doğrulamıştır. 181.18 ppm de karbonil karbonu, 157.93 (C-4'), 163.65 (C-7),162.35 (C-5), 158.20 (C-9), 155.20 (C-2) ppm lerde oksijen fonksiyonuna komşu karbonlara ait pikler ile 100.30, 95.17, 106.80, 123.28, 130.85, 115.83 ppm lerde aromatik karbonlar gözlenmiştir.

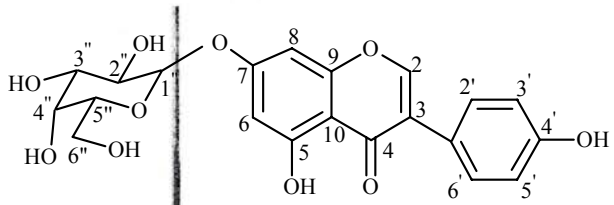
^{1}H-^{1}H COSY spektrumu (Şekil 4.44) 7.34 ppm deki (2H, dd, *J*=8.7, 2.1 Hz) H-2' nün, H-6' protonu ile 6.78 ppm de (2H, dd, *J*=8.4, 2.1 Hz) H-3' nün H-5' protonu ile etkileşimini vermiştir. 6.64 ppm de (1H, brs) H-6 ile 6.41 ppm de (1H, brs) H-8 protonlarının meta etkileşimleri, 5.01 ppm de izlenen (1H, *J*= 7.2 Hz) anomerik şeker protonu ile 3.15 ppm deki multiplet şeklindeki şeker protonlarının etkileşimi de COSY spektrumunda tespit edilmiştir.

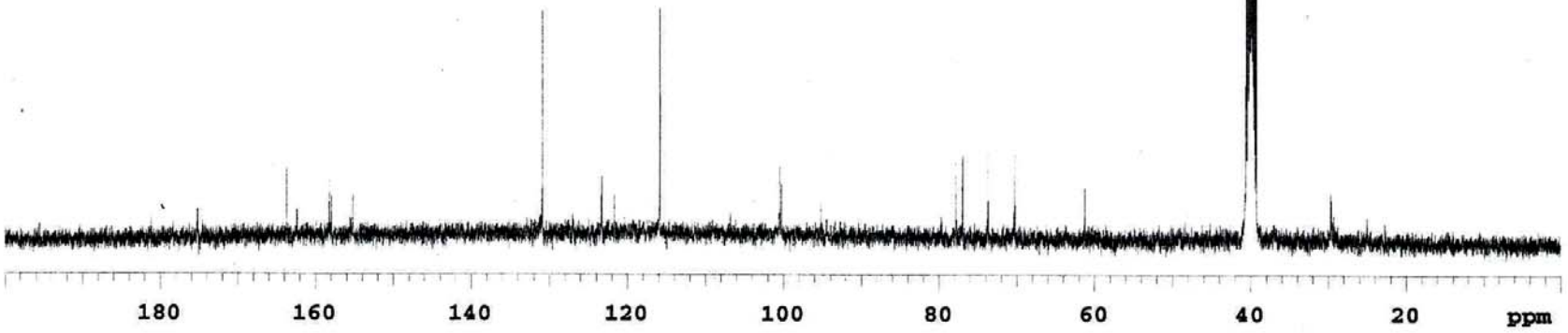
Tüm spektroskopik verilerle literatür çalışmalarının kıyaslanması sonucu maddenin yapısının Genistein-7-O-β-glukozit (Genistin) olduğuna karar verilmiştir. Bu bileşik daha önceden *Trifolium pratense* türünden izole edilmiştir. Ayrıca literatür bilgilerinde bu bileşiğin sitotoksik ve sitostatik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Polkowski , vd., 2004, Wang , vd., 2005, Guliyev , vd).



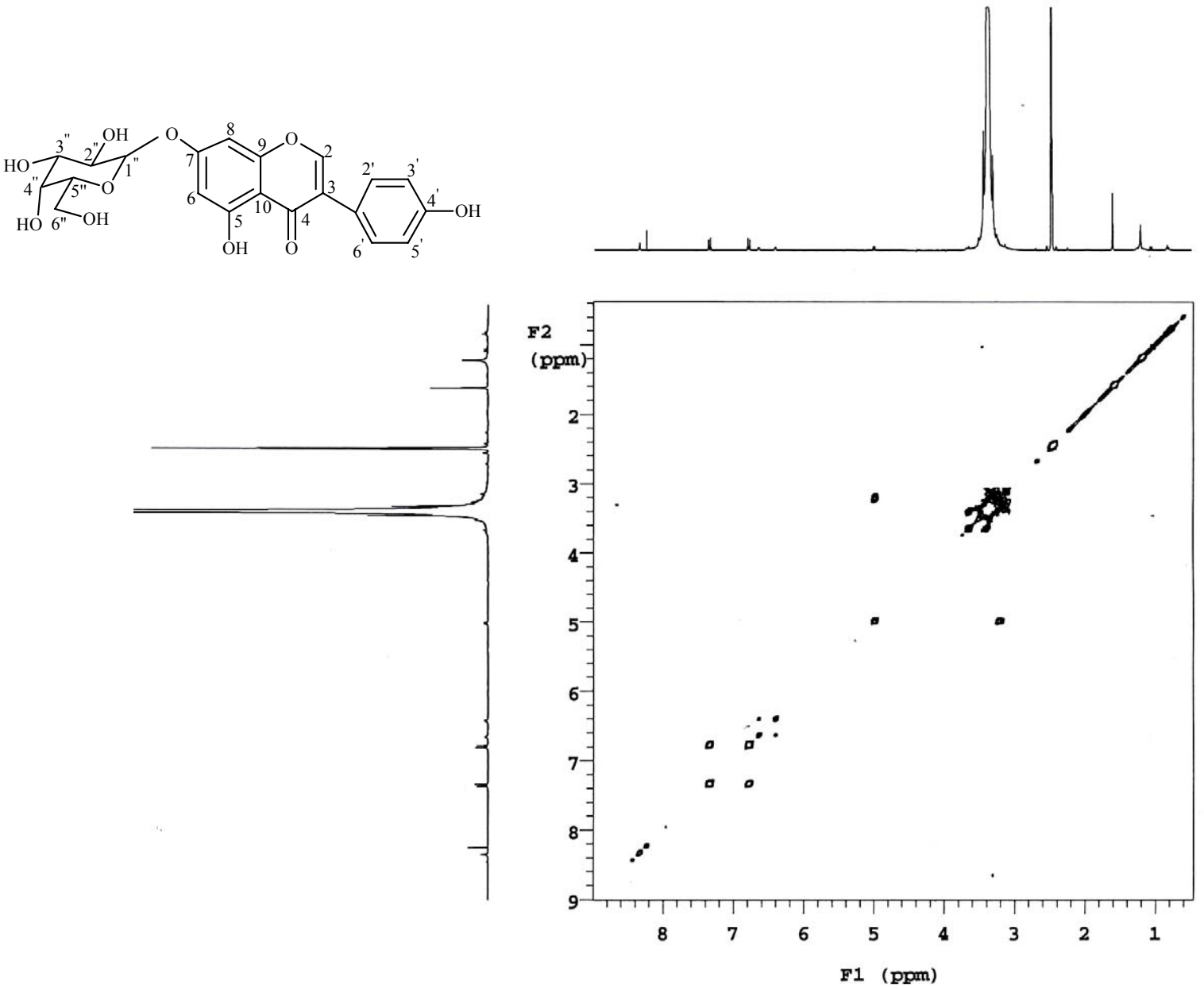
Şekil 4.42. Genistein-7-O-β-glukozit bileşiğine ait ^{1}H NMR spektrumu [DMSO-d_6, δ(ppm), 300 MHz]

INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT	INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT
1	18212.594	181.180	4.235		9493.722	94.444	3.9
2	17610.635	175.192	5.436		9383.859	93.351	3.8
3	17541.208	174.501	3.737		9319.009	92.706	3.6
4	16450.967	163.656	12.038		9266.366	92.183	3.6
5	16320.505	162.358	5.439		8015.909	79.743	4.4
6	15903.177	158.206	10.140		7998.361	79.568	3.8
7	15875.711	157.933	7.541		7821.359	77.807	13.6
8	15632.333	155.512	4.242		7736.673	76.965	14.4
9	15601.053	155.200	7.643		7410.898	73.724	14.5
10	15141.763	150.631	3.744		7079.019	70.423	5.2
11	14686.288	146.100	3.645		7062.997	70.263	14.3
12	14199.533	141.258	3.846		6159.677	61.277	8.9
13	14117.898	140.446	3.647		4079.904	40.587	76.9
14	13581.552	135.110	3.848		4059.305	40.382	225.6
15	13351.144	132.818	4.149		4037.942	40.170	461.2
16	13300.790	132.317	4.050		4016.580	39.957	528.6
17	13153.543	130.852	36.851		3995.981	39.752	463.4
18	13103.952	130.359	3.652		3974.618	39.540	230.7
19	13062.753	129.949	3.653		3954.019	39.335	76.8
20	12857.522	127.908	3.954		2979.745	29.643	8.1
21	12766.733	127.004	4.655		2947.702	29.324	4.5
22	12552.347	124.872	4.256		2515.878	25.028	4.1
23	12392.892	123.285	10.8				
24	12225.046	121.616	7.8				
25	11984.720	119.225	4.1				
26	11913.003	118.511	3.8				
27	11643.686	115.832	37.5				
28	11521.615	114.618	3.9				
29	11011.209	109.540	3.7				
30	10970.010	109.131	4.2				
31	10736.551	106.808	5.0				
32	10104.837	100.524	12.2				
33	10082.712	100.304	9.7				
34	9566.965	95.173	6.8				





Şekil 4.43. Genistein-7-O-β-glukozit bileşiğine ait ^{13}C NMR spektrumu [DMSO-d_6, δ(ppm), 400 MHz]



Şekil 4.44. Genistein-7-O-β-glukozit bileşiğine ait COSY spektrumu

4.6. Elde Edilen Bileşiklerin Spektral Özellikleri

4.6.1. Fonksiyonlu Grup İçeren Bileşikler

4.6.1.1. 1 Numaralı Bileşik: Fitil-1-hekzanoat

UV spektrumu (λ_{max} nm, MeOH): 219.5

IR spektrumu (ν_{max} cm^{-1}, $CHCl_3$): 2944, 1721, 1660, 1459, 1379, 1168, 1113, 1040

^1H NMR spektrumu ($CDCl_3$, δ(ppm), 300 MHz, Şekil 4.2.): 0.86(6H, d, *J*= 6.6 Hz, H-16, H-17), 0.85(6H, d, *J*= 6.2 Hz, H-18, H-19), 1.61(2H, t, *J*=6.6 Hz, H-2'), 1.68 (3H, s, H-20), 0.84(3H, t, *J*= 7.7 Hz, H-5′), 1.99(2H, t, *J*= 6.5 Hz, H-4), 2.28(2H, t, *J*=7.2 Hz, H-1'), 4.58(2H, d, *J*= 7.6 Hz, H-$1_{a,b}$), 5.34(1H, ddd, *J*= 1.3 , 7.2, 7.2 Hz, H-2)

^{13}C NMR spektrumu ($CDCl_3$, δ(ppm), 300 MHz, Şekil 4.3): 61.39(C-1), 118.43(C-2), 142.78(C-3), 37.65(C-4), 25.25(C-5), 37.51(C-6), 32.88(C-7), 34.64(C-8), 24.68(C-9), 39.59(C-10), 33.01(C-11), 37.58(C-12), 25.0(C-13), 40.07(C-14), 26.15(C-15), 22.82 (C-16), 22.89(C-17), 19.95(C-18), 19.91(C-19), 16.57(C-20), 36.85(C-1'), 32.13(C- 2'), 28.88(C- 3'), 28.19 (C- 4'), 14.30(C-5'), 174.21(–COR).

^1H-^1H COSY spektrumu ($CDCl_3$, δ(ppm), 300 MHz, Şekil 4.4): 5.34/4.58 (H-2/ H-1_a, H-1_b), 2.28/1.61 (H-1'/ H-2')

EI-MS m/z (rel.int. %, Şekil 4.5): 396 $[M+2]^+$(98) $C_{26}H_{50}O_2$, *m/z* 379 $[M\text{-}CH_3]^+$ (4), *m/z* 364 $[M\text{-}C_2H_6]^+$ (8), *m/z* 351 $[M\text{-}C_3H_7]^+$ (11), *m/z* 278 $[M\text{-}C_5H_{11}\text{-}COOH]^+$ (90), *m/z* 239 $[M\text{-}C_{11}H_{23}]^+$ (8), *m/z* 71 $[CH_3(CH_2)_4\text{-}]^+$ (85), *m/z* 57 $[M\text{- }CH_3(CH_2)_3\text{-}]^+$ (100).

4.6.1.2. 2 Numaralı Bileşik: 3-metil-1-nonen-3-ol

UV spektrumu (λ_{max} nm, MeOH): 217

IR spektrumu (ν_{max}, cm^{-1}, KBr): 3550, 2980, 1640, 1480, 1070, 780, 740, 730

^{1}H NMR spektrumu ($CDCl_3$, δ(ppm), 300 MHz, Şekil 4.7): 0.85 (3H, t, *J*=6.6 Hz, H-9), 1.07-1.41 (m, H-5, H-6, H-7, H-8), 1.54 (2H, m, H-4), 5.04 (1H, dd, *J*=10.8, 1.2 Hz, H-1_b), 5.20 (1H, dd, *J*=17.4, 1.2 Hz, H-1_a), 5.92 (1H, dd, *J*=10.5, 17.1 Hz, H-2).

^{13}C NMR spektrumu ($CDCl_3$, δ(ppm), 300 MHz, Şekil 4.8): 22.81 (C-10), 24.99, 37.50, 37.64, 39.59, 42.94 (5x -CH_2), 73.53 (C-3), 111.66 (C-1), 145.53 (C-2), 19.95 (C-9),

^{1}H-^{1}H COSY spektrumu ($CDCl_3$, δ(ppm), 300 MHz, Şekil 4.9, Şekil 4.10): 5.20/5.04 (H-1_a/ H-1_b), 5.92/5.20 (H-2/H-1_a), 5.04/5.92(H-1_b//H-2).

EI-MS spektrumu m/z (rel.int. %, Şekil 4.11): *m/z* 156 $[M]^+$ (1), $C_{10}H_{20}O$, *m/z* 141 $[M\text{-}CH_3]^+$ (3), *m/z* 99 $[M\text{-}(\text{-}CH_2)_3\text{-}CH_3]^+$(6), *m/z* 85 $[M\text{-}(\text{-}CH_2)_4\text{-}\ CH_3]^+$(35), *m/z* 71 $[M\text{-}(\text{-}CH_2)_5\text{-}CH_3]^+$(47), $[M\text{-}H_2O]^+$ (6)

4.6.1.3. 7 Numaralı Bileşik: 2', 3'-dihidroksi propil pentadekanoat

UV spektrumu (λ_{max} nm, MeOH): 217.5

^{1}H NMR spektrumu ($CDCl_3$, δ(ppm), 300 MHz, Şekil 4.13): 0.86 (3H,t, *J*=6.9 Hz, H-15), 1.17-1.31 (m, -CH_2 protonları), 1.61 (2H, m, H-3), 2.33 (2H, t, *J*=7.5 Hz, H-2), 3.68 (1H, dd, *J*=11.7, 4.2 Hz, H-3'$_a$), 3.58 (1H, dd, *J*=11.4, 5.7 Hz, H-3'$_b$), 3.92 (1H, m, H-2'), 4.19 (1H, dd, *J*=4.8,11.7 Hz, H-1'$_a$), 4.13 (1H, dd, *J*=6,11.7 Hz, H-1'$_b$).

^{13}C NMR spektrumu ($CDCl_3$, δ(ppm), 300 MHz, Şekil 4.14): 14.24 (C-15), 22.83 (C-14), 25.07-32.07 (metilen karbonları), 34.31 (C-2), 63.50 (C-3'), 65.34 (C-1'), 70.45 (C-2'), 174.48 (ester C=O).

^{1}H-^{1}H COSY spektrumu ($CDCl_3$, δ(ppm), 300 MHz, Şekil 4.16, Şekil 4.17): 3.92 /4.19 (H-2'/ H-1'$_a$), 3.92 / 4.13 (H-2'/ H-1'$_b$), 3.68 /3.58 (H-3'$_a$ / H-3'$_b$), 2.33/1.61 (H-2/H-3), 1.17-1.31/1.61 (-CH_2 grubu /H-3), 0.86/1.17-1.31 (H-15/-CH_2 grubu).

EI-MS spektrumu m/z (rel.int. %, Şekil 4.18): *m/z* 316 $[M]^+$ (4) $C_{18}H_{36}O_4$. *m/z* 314 $[M\text{-}2]^+$ (100), *m/z* 255 $[M\text{-}CHOH\text{-}CH_2OH]^+$ (1), *m/z* 75 $[M\text{-}CH_3\text{-}(CH_2)_{13}\text{-}COO]^+$ (1), *m/z* 119$[M\text{-}CH_3\text{-}(CH_2)_{13}]^+$ (1) olarak gözlenmiştir.

4.6.2. Triterpenler

4.6.2.1. 3 Numaralı Bileşik: Lupeol

UV spektrumu (λ_{max} nm, MeOH): 210, E.n:212-214ºC

IR spektrumu (ν_{max} cm^{-1}, nujol): 3300, 3050, 1635, 1040, 875

^{1}H NMR spektrumu ($CDCl_3$, δ(ppm), 300 MHz, Şekil 4.20): 1.61 (3H, s, H-30), [0.72 (3H, s), 0.76 (3H, s), 0.87 (3H, s), 0.90 (3s, s), 0.96 (3H, s), 0.69 (3H, s) ,6 xCH_3], 3.14 (1H, dd, *J*=5.4, 11 Hz, H-3α), 4.49 (1H, d, *J*= 2.4 Hz, H-29_a), 4.61 (1H, d, *J*= 2.4 Hz, H-29_b).

^{13}C NMR spektrumu ($CDCl_3$, δ, 300 MHz, Şekil 4.21): 38.95 (C-1), 27.65(C-2), 79.24 (C-3), 39.08 (C-4), 55.55 (C-5), 18.54 (C-6), 34.52 (C-7), 41.08 (C-8), 50.69 (C-9), 37.41 (C-10), 21.16 (C-11), 25.39 (C-12), 38.30 (C-13), 43.06 (C-14), 27.65 (C-15), 35.82 (C-16), 43.22 (C-17), 48.56 (C-18), 48.21 (C-19), 151.18 (C-20), 29.89 (C-21), 40.23 (C-22), 28.20 (C-23), 15.57 (C-24), 16.32 (C-25), 16.20 (C-26), 14.30 (C-27), 18.22 (C-28), 109.53 (C-29), 19.30 (C-30)

4.6.3. Kumarinler

4.6.3.1. 4 Numaralı Bileşik: Kumarin

E.n: 68-69.5ºC

^{1}H NMR spektrumu ($CDCl_3$, δ(ppm), 300 MHz, Şekil 4.23, Şekil 4.24): 7,70 (1H, d, *J*=9.6 Hz, H-4), 6.35 (1H, d, *J*=9.6 Hz, H-3), 7.26 (1H, dd, *J*=1.2, 7.5 Hz, H-8), 7.48 (1H, dd, *J*=1.5, 7.5 Hz H-5), 7.33 (1H, ddd, *J*=1.2, 6.6, 8.1 Hz, H-6), 7.53 (1H, ddd, *J*=1.5 7.2, 8.4 Hz, H-7).

^{13}C NMR spektrumunda ($CDCl_3$, δ, 300 MHz, Şekil 4.25): 160.94 (C-2), 116.97 (C-3), 143.58 (C-4), 128.06 (C-5), 124.62 (C-6), 132.04 (C-7), 117.14 (C-8), 154.33 (C-9), 119.08 (C-10).

APT spektrumu ($CDCl_3$, δ, 300 MHz, Şekil 4.26): 160.94 (C-2), 116.97 (C-3), 143.58 (C-4), 128.06 (C-5), 124.62 (C-6), 132.04 (C-7), 117.14 (C-8), 154.33 (C-9), 119.08 (C-10).

^{1}H-^{1}H COSY spektrumu ($CDCl_3$, δ(ppm), 300 MHz, Şekil 4.27): 7.70/6.35 (H-4/H-3), 7.25-7.56 aralığında (H-5/H-6/H-7/H-8).

4.6.4. Steroidler

4.6.4.1. 5 Numaralı Bileşik: *β* Sitosterol

UV spektrumu (λ_{max} nm, MeOH): 205

IR spektrumu (ν_{max} cm^{-1}, $CHCl_3$) 3400, 2925, 2850, 1650, 1375, 1060, 1070

^{1}H NMR spektrumu ($CDCl_3$, δ(ppm), 300 MHz, Şekil4.29): 0.68 ppm (3H, s, H-18), 0.92 ppm (3H, d, *J*=6.6 Hz , H-21), 0.82 ppm (3H, t J=6.6 Hz, H-29), 0.83 ppm (6H, d, *J*=6.6 Hz , H-26, H-27), 1.00 ppm (3H, s, H-19), 3.52 (1H, m H-3), 5.34 ppm de (1H, d, J=3.5 Hz, H-6) .

4.6.5. Flavonoid Bileşikler

4.6.5.1. 6 Numaralı Bileşik: Formononetin

UV spektrumu (λ_{max} nm, MeOH): 241, 248, 259, 310

NaOMe: 257, 275, 323, 336.5

$AlCl_3$: 243, 251, 263, 303

$AlCl_3$+HCl: 244, 251, 263, 303

NaOAc: 256, 313, 335

NaOAc+H_3BO_3: 266, 304

^{1}H NMR spektrumu (DMSO-d_6, δ(ppm), 300 MHz, Şekil 4.31): 6.82 (2H, d, *J*=7.8 Hz, H-3',H-5'), 7.34 (2H, d, *J*= 7.8 Hz, H-2′, H-6′), 8.16 (1H, s, H-2), 3.62 (s, OCH3) , 6.70 (1H, brs H-8), 6.78 (1H, brd, *J*= 8.7 Hz, H-6), 7.81 (1H, d, *J*= 8,4 Hz, H-5).

^{13}C NMR spektrumu (DMSO-d_6, δ(ppm), 300 MHz, Şekil 4.32): 153.78 (C-2), 124.90 (C-3), 175.30 (C-4), 127.95 (C-5), 115.89 (C-6), 163.29 (C-7), 102.79 (C-8), 158.13 (C-9), 117.26 (C-10), 123.84 (C-1'), 130.73 (C-2'), 114.28 (C-3'), 159.63 (C-4'), 114.28 (C-5'), 130.73 (C-6'), 55.81 (OCH_3)

4.6.5.2. 8 Numaralı Bileşik: Kamferol 3-O-(6''-asetil)-β-galaktozit

UV spektrumu (λ_{max} nm, MeOH): 221, 266.5, 351.5

NaOMe: 225.5, 275, 323, 401.5,

$AlCl_3$: 224.5, 273, 396

$AlCl_3$+HCl: 224, 271, 392

NaOAc:222, 271.5, 362.5

NaOAc+H_3BO_3: 222, 267, 361

^{1}H NMR spektrumu (DMSO-d_6, δ (ppm), 300 MHz, Şekil 4.35): 1.69 (3H, s, OAc), 3.30-4.03 (6H, m, şeker protonları), 5.25 (1H, d, *J*=7.8 Hz, H-1''), 6.15 (1H, d, *J*=2.1 Hz, H-6), 6.38 (1H, d, *J*=2.1 Hz, H-8), 6.82 (2H, dd, *J*=2.1, 9 Hz, H-3', H-5'), 8.01(2H, dd, *J*=8.7, 1.8 Hz, H-2', H-6'),

^{13}C NMR spektrumu (DMSO-d_6, δ(ppm), 300 MHz, Şekil 4.37): 157.13 (C-2), 133.85 (C-3), 177.93 (C-4), 161.76 (C-5), 99.64 (C-6), 165.96 (C-7), 94.49 (C-8), 156.85 (C-9), 104.04 (C-10), 121.44 (C-1'), 131.55 (C-2'), 115.71 (C-3'), 160.65 (C-4'), 115.71 (C-5'), 131.55 (C-6'), 102.49 (C-1''), 71.60 (C-2''), 73.41 (C-3''), 68.77 (C-4''), 73.41 (C-5''), 63.78 (C-6''), 20.78 (CH_3), 170.54 ($COCH_3$)

4.6.5.3 9 Numaralı Bileşik: Formononetin-7-O-β-glikozit

UV spektrumu (λ_{max} nm, MeOH): 253, 260.5, 302

NaOMe: 252, 262 ,325

$AlCl_3$: 253, 262, 303

$AlCl_3$+HCl: 253, 260.5, 302.5

NaOAc: 260.5, 303

NaOAc+H_3BO_3: 261.5 303

^{1}H NMR spektrumu (CD_3OD, δ (ppm), 300 MHz, Şekil 4.39, Şekil 4.40): 3.81 (3H, s, OMe), 3.40-3.56 (4H, şeker protonları), 3.71 (1H, dd, *J*=6, 12 Hz, H-6"$_a$), 3.92 (1H, dd, *J*=2.1,12 Hz, H-6"$_b$), 5.09 (1H,d, *J*= 7.2 Hz, H-1"), 6.97 (2H, d, *J*= 8.1 Hz, H-3', H-5'), 7.21 (1H, dd, *J*= 8.7, 2.7 Hz, H-6), 7.23 (1H, d, *J*= 2.7 Hz, H-8), 7.46 (2H, d, *J*= 7.8 Hz, H-2', H-6'), 8.13 (1H, d, *J*= 9 Hz, H-5), 8.20 (1H, s, H-2)

4.6.5.4 10 Numaralı Bileşik: Genistein -7-O-β-glukozit (Genistin)

UV spektrumu (λ_{max} nm, MeOH): 262, 332

NaOMe: 269, 373,

$AlCl_3$: 272, 377, 310

$AlCl_3$+HCl: 273.5, 377, 310

NaOAc: 262, 333

NaOAc+H_3BO_3: 261, 331

^{1}H NMR spektrumu (DMSO-d_6, δ(ppm), 300 MHz, Şekil 4.42): 3.13-3.65 (6H, m, şeker protonları), 5.01(1H, d, *J*=7.2 Hz , H-1"), 6.41 (1H, brs, H-8),), 6.64 (1H, brs, H-6), 6.78 (2H, dd, *J*=8.4, 2.1 Hz, H-3', H-5'), 7.34 (2H, dd, *J*=8.7, 2.1 Hz, H-2', H-6'), 8.34 (1H, s, H-2)

^{13}C NMR spektrumu (DMSO-d_6, δ(ppm), 400 MHz, Şekil 4.43): 155.20 (C-2), 123.28(C-3), 181.18 (C-4), 162.35 (C-5), 100.30 (C-6), 163.65 (C-7), 95.17 (C-8), 158.20 (C-9), 106.80 (C-10), 121.61 (C-1'), 130.85 (C-2'), 115.83 (C-3'), 157.93 (C-4'), 115.83 (C- 5'), 130.85 (C-6'), 100.52 (C-1"), 73.72(C-2"), 76.96 (C-3"), 70.26 (C-4"), 77.80(C-5"), 61.27 (C-6")

^{1}H-^{1}H COSY spektrumu (DMSO-d_6, δ (ppm), 300 MHz, Şekil 4.44): 7.34 (H-2'/H-6'), 6.78 (H-3'/ H-5'), 6.64 /6.41 (H-6/H-8), 5.01/3.13-3.65 aralığı (H-1"/şeker protonları)

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Trifolium resupinatum L. var. *microcephalum* bitkisinin içerdiği bileşiklerin yapılarını aydınlatmak amacı ile yapılan bu çalışmada, diklormetan ve etilasetat ekstraktları incelenmiştir. Diklormetan ekstraktından biri yeni olmak üzere fonksiyonlu grup içeren üç hidrokarbon, bir kumarin, bir triterpen, bir steroid, bir flavon olmak üzere yedi, etilasetat ekstraktından ise üç flavon olmak üzere toplam on bileşik izole edilmiştir.

Bu bileşiklerden steroid olan β sitosterol bitkilerde çok yaygın olarak bulunur. Yapısı standart madde ile kromatografik ve spektroskopik özelliklerinin kıyaslanması yoluyla açıklanmıştır.

Triterpen olan lupeol ise lupan iskelet yapısına sahiptir. Lupan tipi triterpenlerde ise ^{1}H NMR spektrumunda gözlenen C-20 / C-29 arasındaki ekzosiklik bir çifte bağ ve altı metil sinyali yapının aydınlatılmasında önemli bir yere sahiptir. Ayrıca bileşiğin yapısının aydınlatılmasında ^{13}C NMR, UV ve IR spektrumları ile erime noktasından da yararlanılmıştır. Daha önce yapılan bir çalışmada bu bileşiğin sitotoksik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Bir fitil esteri olan fitil-1-hekzanoat bileşiği daha önce *Trifolium balansae* türünden izole edilmiş olup yapısı ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, UV, IR, ^{1}H-^{1}H COSY, EI-MS spektrumlarının yorumlanması ve literatür kıyaslanması ile bulunmuştur.

Kumarin bileşiği nonsubstitüe olup bulunduğu sınıfın en basit üyesini oluşturmaktadır. Kumarin bileşiği bitkilerde bu durumda çok yaygın bulunmamaktadır. Yapı özellikle ^{13}C NMR ve ^{1}H NMR spektrumu değerleri ve bunların literatür değerleri ile kıyaslanması yoluyla açıklanmıştır.

Alifatik alkol olan 3-metil-1-nonen-3-ol bileşiği ile yağ asidi esteri olan 2', 3'-dihidroksi propil pentadekanoat bileşiklerinin yapıları UV, IR, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, ^{1}H-^{1}H COSY, EI-MS, DEPT, APT spektrumlarının yorumlanması ve literatürdeki değerlerle kıyaslanması sonucu açıklanmıştır. Bu bileşiklerden 3-metil-1-nonen-3-ol bileşiği doğadan ilk kez izole edilmiş yeni bir bileşiktir.

Trifolium türlerinde en yaygın bulunan bileşik sınıfı olan flavonoidler, bu bitkiden üçü izoflavon ve bir tanesi flavonol olmak üzere toplam dört tane izole

edilmiştir. Bunlardan formononetin bileşiğinin yapısı UV, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, DEPT, APT spektrumları yardımıyla aydınlatılmış olup, daha önceki çalışmalarda *Trifolium pratense* türünden izole edilmiştir.

Formononetin glikozit bileşiğinde UV ve ^{1}H NMR spektrumları alınmış, madde miktarı yeterli olmadığı için diğer spektrumları alınamamış ve bu yüzden şekerin cinsi tespit edilememiştir. Fakat şekerin bağlı olduğu yer diğer spektroskopik verilerinin yorumlanması ve literatür kıyaslaması ile açıklanmıştır.

Kamferol glikozit bileşiğinin yapısı UV, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR spektrumlarının yorumlanması ve bu değerlerin literatürdeki değerlerle tamamen örtüşmesi sonucu flavanol sınıfına ait olduğu ve daha önce *Trifolium repens* türünden izole edilmiş olan kamferol 3-O-(6"-asetil)-β-D-galaktozit olduğu ispatlanmıştır.

Genistein glikozit bileşiğinin yapısının aydınlatılmasında, UV, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, ^{1}H-^{1}H COSY spektrumlarından yararlanılmıştır. Literatür araştırmaları sonucunda genistein molekülündeki şeker yapısının 7-O- β bağlı glukoz olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca daha önce yapılan bir çalışmada bu bileşiğin kanser hücrelerine karşı sitostatik ve sitotoksik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Formononetin bileşiği gibi bu bileşikte daha önceden *Trifolium pratense* türünden izole edilmiştir.

Ayrıca *Trifolium resupinatum* L. var. *microcephalum* bitkisiyle yapılan fitokimyasal çalışmanın yanında, bitkinin etanol ekstresinin anti-inflamatuar ve antioksidant aktivitesi Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesinin Farmakoloji Bölümünde araştırılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda *Trifolium resupinatum'*un etanol ekstresi, mafsal iltihabı (romatoid artrit) bulunan sıçanlara uygulandığında hayvanın pençesindeki ödemin önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuca göre, *Trifolium resupinatum* L. var. *micracephalum* bitkisinin etanol ekstresinin romatoid artrit'li sıçanlarda anti-inflamatuar ve antioksidant aktivitesi kanıtlanmıştır.

KAYNAKLAR

Arai Y., Nakagava T., Hitosugi M., Shiojima K., Ageta H., Basher O., Halim A., 1998, *Pytochemistry*, Vol 48, No:3, s.471-474

Başak N ve Savaş G., 2000, *Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, Edirne.

Başak N ve Savaş G., 2001, *Plant of The Balkan İnto The Next Milenyum*, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Vol.1, s.121-128.

Baytop A., 1988, *İstanbul Eczacılık Fakültesi Herbaryumundaki Türkiye Bitkileri*, İstanbul, s.60-61

Baytop T., *Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi*, İstanbul Üniversitesi Yayınları, Eczacılık Fakültesi, 1984, İstanbul.

Bilaloğlu G.V., Harmandar, M., 1999, *Flavonoidler,* Aktif Yayınevi, s.190.

Boiteu P., Pasich B., Ratsimamanga A,R., 1964, *Les Triterpenoids*, Gaulthier-Villard, Paris, s.3-32, s.469.

Bors W., Saran M., 1987, *Free Radical Res. Commun.*, 2, 131.

Buchanan M.S., Hashimato T., Asakawa Y., 1996, *Pytochemistry*, vol.41, No:5, s.1373-1376.

Budzikiewicz H., Djerassi C., Williams D.H., 1964, *Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry,* 2, Holden-day Inc., San Francisco, s. 137.

Budzikiewicz H., Wilson J.M. and Djerassi C., 1963, *Journal American Chemical Soc*., 85, 3688-99.

Burbulis I. E., Iacobucci M., Shirley B. W., 1996, *The Plant Cell*, 8, 1013-1025.

Cram J.D., Hammond,.S.G., 1964, *Organic Chemistry*, Mc.Graw-Hill Book Company., Newyork., s.671.

Davis P.H., 1984, *The Flora of Turkey and The East Aegean Island*, Vol 3, s.384-448.

Deschner E. E., Ruperto J., Wong G., Newmark H. L., 1991, *Carcinogenesis,* 7, 1193.

Dewick P. M., 2001, *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, John Wiley, Chichester.

Dubley H.W., Ian F., 1987, *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*, Mc Graw-H., Book Company, U.K.

Engin A., 1993, *Tohumlu Bitkiler Sistematiği*, Samsun.

Erdik E., 1993, *Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler*, Gazi Büro Kitapevi, Ankara, s.234 .

Fessenden R.J., Fessenden J.S., 1990, *Organik Chem.*, Cole Publish Company, California.

Firmin J. L., Wilson K. E., Rossen L., Johnston, A.W.B., 1986, *Nature*, 324, 90.

Foo L.Y., Lu Y., Molan A.L., Woodfield D.R., McNabb W.C, 2000, *Pytochemıstry*, 54 , 539-548.

Francis A. Carey, 1996, *Organik Chemistry*,The Mcgraw-Hill Companies, INC (USA), , s.1070-71.

Garcia B., Marco J.A., Seoane E., Tortajado A., 1981, *Journal Natural Product*. 44, 110.

Geisman T.A., Crout D.H.G., 1969, *Organik Chemistry of secondary plant Metabolism*, Freman,Cooper and Company, California, s.241.

Gıannını D.D., Caın A.H., Roberts J.D., 1977, *Tetrahedron*, Vol.33, 899-906.

Harbone J.B., Marby T.J., Marby H., 1975, *The Flavonoids*, Chapman and Hall, London, s.82.

Harbone, J.B., 1973, *Phytochemical Methods*, Chapman and Hall, London.

Harborne, J. B. ve Marby, T. J., 1982, *The Flavonoids: Advances in Research,* Chapman and Hall, London.

Harmandar M., Bilaloğlu G. V., 1999, *Flavonoidler,* Aktif Yayınevi, 190.

Hikino H., Kiso Y., 1988, *Econ. And Medicinal Plant Research*, Academic Press, London, 2, 39, 698.

Huang M.T., Wood A. W., Newmark, H. L., Sayer, J. M., Yagi, H., Jerina, D. M., Conney A. H., 1983, *Carcinogenesis,* 4, 1631.

Itoh D., Karnagoda R.P., Fushie T., Katoh K., Nabeta K., 2000, *Journal Natural Product*, 63, 1090-1093.

Kanchanapoom T., Kasai R., Picheansoonthon C., Yamasaki K., 2001, *Phytochemıstry*, 58, 811-817.

Kato R., Nakadate T., Yamamoto S., Sugimura T., 1983, *Carcinogenesis*, 4, 1301.

Kaufman P.B., Cseke L.J., Warber S., Duke J.A., Brielmann H.L., 1999, *Natural Product from Plants*, 2-9.

Khaled M. M., Mahmoud H. M., Kazuhiro O., Ryoji K., Kazuo Y., 1999, *Phytochemistry,* 51, 1193.

Khaled M. M., Hashim A. H., Kazuhiro O., Ryoji K., Kazuo Y., 2000, *Phytochemistry,* 53, 401-404.

Khaled M. M., Kazuhiro O., Ryoji K. and Kazuo Y., 1995,*Phytochemistry,* 40, 1237-1242.

Klejdus B., Vitamvasva-Sterbova D., Kuban V., 2001, *Analytica Chimica Acta*, 450, 81-97.

Larson R. A., 1988, *Phytochemistry*, 27, 969.

Ma X., Tu P., Chen Y., Zhang T., Wei Y., Ito Y, 2003, *Journal of Chromatography A* 992 (193-197).

Mahato S.B., Kundu A. P., 1994, *Phytochemistry*, 37, 1517-1575.

Marbry T.J., Markham K.R and Thomas M.B., 1970, *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer-Verlag, New York, s. 46, 48,51, 258.

Moriarity D.M., Huang J., Yancey C. A., Zhang P., Setzer W.N., Lawton R.O., Bates R.B., Caldera S., 1998, *Planta Medica*, 64, 370-372.

Moroney M. A., Alcanaz M. J., Forder R. A., Carey F., Hoult J. R. S., 1988, *J. Pharm. Pharmacol.*, 40, 787.

Murray R.D., Mendez J., Brown, S.A.,1982, *The Natural Coumarins*, John Willey&Sons Ltd. ,s.24, s.44.

Nakanishi K., 1964, *Infrared Spectroscopy*, Holden-Day, Inc. San Francisco and Nankodo Company Limited, Tokyo.

Nielsen B.E., 1970*, Coumarins of Umbelliferous Plants*, s. 51,42,21.

Ogunkoya L., 1981, *Phytochemistry*, 20, 121-126.

Oyman Ü., Şabudak T., 1999, *Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,* Doktora Tezi, Edirne.

Öksüz S., Erdem E., 1996, *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

Özhatay N., Başak N., Dalgıç G., Dane F., 1996, *Trakya'nın Eğrelti ve Çiçekli Bitkilerin Listesi* "*Flowering Plants & Ferns of European Turkey"* İstanbul.

Papanov G., Lavaud C., Massıot K., Malakov P., 1990, *Plantes Medicinales et Phytotherapie,* Tome XXIV, nº 3,139-144.

Peters N. K., Forst, J. W., Long, S. R., 1986, *Sience*, 233, 978.

Polkowski K., Popiolkiewicz Joanna., Krzeczynski P., Ramza J., Pucko W., Zegrocka-Stendel O., Boryski J., Skierski J., Mazurek A.P., Grynkiewicz G., 2004, *Cancer Letters,* 203, 59-69.

Ponce M. A., Scervino J. M., Erra-Balsells R., Ocampo J. A., Godeas A. M., 2004, *Phytochemistry*, 65, 1925-1930.

Pouchert C.J:, 1983, *The Aldrich of NMR Spectra Edition II*, Vol.2, s.309.

Pratt D. E., Hundson B. J. F., 1990, *Food Antioxidants*, Elsevier, London, 171.

Rijke E., Zarfa-Gomez A., Ariese F., Brinkman U. A. And Gooijer C., 2001, *Journal of Chromotography A,* 932, 55-64.

Sakar K.M .ve Tanker M., 1991, *Fitokimyasal Analizler*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara.

Seçmen Ö., 1995, *Tohumlu Bitkiler Sistematiği*, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.

Simonet A. M., Stochmal A., Oleszek W., Macias F. A., 1999, *Phytochemistry*, 55, 1065-1067.

Smith D. A., Banks S. W., 1986, *Plant Flavonoids in Biology and Medicine Biochemical, Pharmacological and Structure Activity Relationship*, 113-124.

Solomon T.W.G, Fryle C.B., 2002, *Organik Kimya*, Literatür Yayıncılık, İstanbul.

Stahl, E., 1969, *Thin Layer Chromatograpy*, Springer-Verlag, Newyork.

Tedder J.M., Nechvatal A., Murroy A.W., Carnduff, 1972, *Basic Organik Chemıstry,* Belfast.

Tresa J. De Pascual, Urones J.G., Marcos I.S., Basabe P., Cuadrado M[a] J. Sexmero and Moro R. Fernandez, 1987, *Phtochemistry,* 26, 1767-1776.

Triguna N.M., Ram S.S., Hari S.P., 1991, *Phtochemistry,* vol.30, No:2, s.541-543.

Tutin T.G., Haywood V.H., Burges N.A., Moore D.M., Valentine D. H., Walters S.M., Webb D.A., 1968, *Flora Europaea*, Cambridge University Press, s.80-82-159.

Tyler V.E., Brady L.R, Robbers J.E., 1977, *Pharmacognosy*, Lea and Febiger, Philadelphia.

Ulubelen A., Uygur I., 1976, *Planta Medica*, vol.29, 318-320.

Ulubelen A.,Öksüz S., Samek Z. and Holub M., 1971, *Tetrahedron Letters*, 12, 4455-4456.

Varro E.T., Lynn, R.B., James, E.R., 1976, *Pharmacognasy*, Lea& Febiger, Philadelpia.

Verma A. K., Johnson J. A., Gould M. N., Tanner M., 1988, *Cancer Res.*, 48, 5784.

Wagner H., 1989, *Planta Med.,* 55, 235.

Wagner H., Elbi G., Lotter H., Guinea N., 1991, *Pharm. Pharmacol*.,1, 15.

Wang S., Ghisalberti E.L., Ridsdill-Smith J., 1998, *Journal Natural Product*, 61, 508-510.

Wang S.F., Ye Y.H., Zhang Z., Tan R. X., 2005, *Ultrasonics Sonochemısty*, XXX (2005) XXX-XXX

Webb D.A., 1966, *The Flora of Europen Turkey Proceeding of the Royal Irish Academy,* Dublin

Xiao H.B., Krucker K., Putzbach K., Albert K., 2005, *Journal of Chromatography A,*1067, 135-143.

Xiaofeng M., Pengfei T., Yingjie C., Tianyou Z., Yun W., Yoichiro I., 2003, *Journal of Chromatography A ,* 992, 193-197.

Yadav J.S ve Srihari P., 2004, *Tetrahedron Asymetry*, 15, 81-89.

ÖZGEÇMİŞ

1970 yılında İstanbul'da doğdum. 1981 yılında Çatalca Kaleiçi İlköğretim Okulu, 1987 yılında Çatalca Lisesini bitirdim. 1988 yılında Trakya Üniversitesi Kimya Bölümünü kazandım, 1991 yılında stajımı Gebze Tübitak Araştırma Merkezinde Bitki Kimyası üzerine yaptıktan sonra 1992 yılında mezun oldum.

1993-1994 yılında tekstil boyaları üreten bir firmada çalıştım. 1993 Yılı Ekim ayında Sağlık Bilimleri Enstitüsüne bağlı olarak Eczacılık Fakültesi Genel Kimya Bilim Dalında yüksek lisans eğitimime başladım ve Şubat 1996 yılında mezun oldum. Aynı yıl Eylül ayında Trakya Üniversitesi Organik Kimya Anabilim Dalında doktora programına başladım. Ayrıca 1996 yılından beri kimya öğretmeni olarak görev yapmaktayım. Halen Edirne Süleyman Demirel Fen Lisesinde çalışmaktayım.

Yüksek lisans çalışma konum olan "*Centaurea amanicola* Bitkisinin Fitokimyasal İncelenmesi" isimli çalışmam 2000 yılında İstanbul Eczacılık Fakültesi dergisinde yayımlanmıştır.

Evli, 9 yaşında bir kız ve 5 yaşında bir erkek çocuk annesiyim.