

2298

T. C.
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANADOLU'NUN
ARISTOLOCHIA TÜRLERİNİN
ALKALOİTLERİ

DOKTORA TEZİ

Ecz. Muzaffer ÖĞÜTVEREN

T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi

Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Eskişehir, 1987

İÇİNDEKİLER

I.	BÖLÜM	
I.1.	GİRİŞ	1
I.2.	BOTANİK BÖLÜM	2
I.2.1.	<u>ARISTOLOCHIA</u> L.	2
I.2.2.	<u>ARISTOLOCHIA</u> CİNSİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ	2
I.2.3.	<u>ARISTOLOCHIA</u> TÖRLERİNİN AYIRIM ANAHTARI	3
I.2.4.	ÇALIŞMADA KULLANILAN <u>ARISTOLOCHIA</u> TÖRLERİNİN TÜRKİYE'DE YAYILIŞI	7
I.3.	<u>ARISTOLOCHIA</u> TÖRLERİNİN KİMYASAL ÖZELLİKLERİ	18
I.3.1.	<u>ARISTOLOCHIA</u> TÖRLERİNİN KİMYASAL BİLEŞİKLERİ	19
I.3.1.a.	Aristolohik Asitler	19
I.3.1.b.	Aristolaktamlar	22
I.3.1.c.	Diğer Aristolohik Asit Türevleri	22
I.3.1.d.	Alkaloidler	23
I.3.1.e.	Seskitерpenler	29
I.3.1.f.	Steroller	29
I.4.	<u>ARISTOLOCHIA</u> TÖRLERİNİN FARMAKOLOJİK ÖZELLİKLERİ	29
II.	BÖLÜM : DENEYSEL KISIM	
II.1.	KULLANILAN TEKNİKLER	34
II.1.1.	KROMATOĞRAFİK ÇALIŞMALAR	34
II.1.1.a.	İnce Tabaka Kromatografisi	34
II.1.1.b.	Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi	35
II.1.1.c.	Sütun Kromatografisi	36
II.1.1.d.	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi	36

II.1.2.	SPEKTRAL ANALİZLER	37
II.1.2.a.	Ultraviyole Spektrofotometresi	37
II.1.2.b.	Infrared Spektrofotometresi	37
II.1.2.c.	¹ H-Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi.....	37
II.1.2.d.	Kütle Spektrometresi	37
II.1.3.	ERİME NOKTASI TAYİNİ	37
II.1.4.	ÇÖZÜCÜLER	37
II.2.	BİTKİLERİN TOPLANMASI	38
II.3.	EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİ VE UYGUN YÖNTEMİN SECİMİ	39
II.4.	STANDART ARİSTOLOHİK ASİTİN TANIMLANMASI	40
II.5.	BİTKİLERDE ARİSTOLOHİK ASİT MİKTARININ TAYİNİ	42
II.5.1.	SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM	42
II.5.1.a.	Materyal	42
II.5.1.b.	Ekstraksiyon ve Örneğin Hazırlanışı	42
II.5.1.c.	Kromatografik Ayırma	42
II.5.1.d.	Spektrofotometrik Miktar Tayini	45
II.5.2.	YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ	54
II.5.2.a.	Materyal	54
II.5.2.b.	Ekstraksiyon ve Örneğin Hazırlanışı	54
II.5.2.c.	Kromatografik Ayırma	54
II.5.2.d.	Sonuçlar ve Kromatogramlar	57
II.6.	<u>A. MAURORUM L.</u> 'NİN METANOLLO EKSTRESİNİN İNCELENMESİ	63
II.6.1.	MATERYAL	63
II.6.2.	BİTKİNİN EKSTRAKSİYONU VE FRAKSİYONLANMASI	63
II.6.2.a.	Non-Asidik Fraksiyonların İncelenmesi	64
II.6.2.b.	Asidik Fraksiyonların İncelenmesi	69
II.6.2.c.	Kuaterner Alkaloidlerin Ayrıştırılması	70

II.6.2.d.	Arafazın Ayrıştırılması	71
II.6.2.e.	İzole Edilen Maddelerin Özellikleri	72
II.7.	<u>A.MAURORUM L. EKSTRESİNDEN ARİSTOLOHİK ASİT</u> İZOLE EDİLMESİ	73
II.8.	<u>ARİSTOLOCHIA</u> TÜRLERİNDEN SAKKAROZ ELDESİ	75
III.	BÖLÜM	
	SONUÇ VE TARTIŞMA.....	76
	ÖZET	83
	ABSTRACT	84
	TEŞEKKÜR	85
	KAYNAKLAR	86

TABLÖLAR:

TABLO I	: Doğadaki ve <u>Aristolochia</u> Türlerindeki Aristolohik Asitler	25
TABLO II	: Doğadaki ve <u>Aristolochia</u> Türlerindeki Aristolaktamlar	26
TABLO III	: <u>Aristolochia</u> Türlerindeki Seskiterpenlerin Dağılımı	27
TABLO IV	: <u>Aristolochia</u> Türlerindeki Sterollerin Dağılımı ...	28
TABLO V	: <u>Aristolochia</u> Türlerinin Dünyadaki Tıbbi Kullanımları	32
TABLO VI	: Çalışmada Kullanılan <u>Aristolochia</u> Türlerinin Toplandığı Yerler ve Kuru Drog Miktarları	38
TABLO VII	: <u>Aristolochia</u> Türlerinden Elde Edilen Ekstre Miktarları ve Verimleri	41
TABLO VIII	: UV Spektrofotometresinde Standart Doğrunun Çizilmesi İçin Okunan Absorbans Değerleri	44
TABLO IX	: YBSK Yönteminde Standart Doğrunun Çizilmesi İçin Verilen Standart Madde Konsantrasyonları, Karşı Gelen Pik Alanları ve Madde Miktarları	55
TABLO X	: Sakkaroz İçeren <u>Aristolochia</u> Türleri ve İçerdikleri Sakkaroz Miktarları	75
TABLO XI	: ITK + UV Yönteminde, İncelenen <u>Aristolochia</u> Türlerinde Bulunan Aristolohik Asit Miktarları	81
TABLO XII	: YBSK ile <u>Aristolochia</u> Kök Ekstrelerinde Bulunan Toplam Aristolohik Asit Miktarları	82

ŞEKİLLER

Şekil 1, 2	: Bazı <u>Aristolochia</u> Türlerinin Morfolojik Karakterleri	4,5
Şekil 3	: Aristolohik Asitlerin Kimyasal Yapısı	20
Şekil 4	: Aristolaktamların Kimyasal Yapısı	21
Şekil 5	: Aristolohik Asit Türevleri	22
Şekil 6	: <u>Aristolochia</u> Türlerindeki Alkaloitler	24
Şekil 7	: Standart Aristolohik Asitin UV Spektrumu ve YBSK Kromatogramı	40
Şekil 8	: Aristolohik Asitin İTK ile Ayrılması	43
Şekil 9	: Aristolohik Asitin Kalibrasyon Doğrusu (UV)	44
Şekil 10	: Aristolohik Asitin Kalibrasyon Doğrusu (YBSK)	57
Şekil 11	: <u>A.maurorum</u> L.'un Analiz Şeması	65
Şekil 12	: Eterli Faz I ve Eterli Faz II'deki Asidik ve Non-Asidik Fraksiyonların Ayrılması	66
Şekil 13	: M19A'nın Kromatogramı	72
Şekil 14	: Aristolohik Asit II'nin UV Spektrumu ve YBSK Kromatogramı	74

I. BÖLÜM

I.1. GİRİŞ

Bitkiler çok eski zamanlardan beri halk arasında tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Bu nedenle tıp tarihinde önemli yerleri vardır. Bitkilerden çeşitli biyolojik aktif kimyasal maddelerin elde edilmesi için yapılan çalışmalara bir çok örnek gösterilebilir. Bunlardan biri de Aristolochiaceae familyasından Aristolochia türleri üzerindeki çalışmalardır.

Dünyanın tropikal ve ılıman bölgelerinde dağılım gösteren yaklaşık 500 kadar Aristolochia türü vardır (1, 2, 3). Ülkemizde ise 11'i endemik olmak üzere 23 Aristolochia türü yetişmektedir (4). Aristolochia adı, "Aristos" en iyi "lochia" da doğum anlamında iki Yunanca sözcükten türemiştir. Bu sözcükler bitkinin doğum kolaylaştırıcı özelliğini vurgulamaktadır.

Aristolochia türleri çok eskiden beri halk arasında tıbbi amaçla kullanılmaktadır. Bilimsel açıdan ilk olarak Pliny ve Dioscorides Aristolochia türlerinin kullanım yerlerini araştırmışlar, kök ve yapraklarının terapötik özelliklerini açıklamışlardır (5). Aristolochia türleri üzerinde bugüne kadar yapılan çalışmalarda, yapılarında Aristolohik asit, aristolaktam, alkaloid, seskiterpen, sterol ve uçucu yağ bulunduğu ortaya çıkarılmıştır (6). Aristolochia türleri fizyolojik etki ve kimyasal yapı bakımından çeşitli alkaloidleri içerdiğinden (özellikle Aristolohik asit) alkaloid araştırmalarında önemli yeri olan

bir bitkidir. Ülkemizde 23 türü olduğu bilinen Aristolochia üzerinde bugüne kadar herhangi bir kimyasal araştırma yapılmamıştır. Bu çalışmada 17 tür Aristolochia toplanarak, 16 türden, Aristolohik asit izole edilmiş, tanımlanmış ve miktarları tayin edilmiştir. Ayrıca daha önce diğer araştırmacılar tarafından incelenmiş olup, ülkemizde de yetişen türlerin alkaloitleri ile de karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada kullanılan türlerin kesin teşhisi, kimyasal çalışmalara geçmeden önce belirlenmiştir.

I.2. BOTANİK BÖLÜM

I.2.1. ARISTOLOCHIA L. Sp.Pl. (1753)

Aristolochia cinsi, Dicotyledonae sınıfı, Aristolochiales takımı, Aristolochiaceae familyasında yer almaktadır (1, 2, 3, 7).

Cinsin dünya üzerinde ve çoğu tropik bölgelerde olmak üzere 500 kadar türü yayılım göstermektedir (1, 2, 3). Türkiye'de ise 23 türü bulunmaktadır (4). Bunlardan 11'i endemik olup, çok lokal bir yayılım gösterir. Aynı zamanda yakın doğudaki Aristolochia türlerinin büyük çoğunluğunun yayılımının da Anadolu'da merkezileştiği görülmektedir (8, 9). Birkaç Kserofitik tür hariç, türlerin en yoğun olduğu bölge Akdeniz bölgesidir. Türkiye'de yayılımı görülen 23 türden 16'sı Akdeniz elementi, 3'ü Euxine, 2'si İran - Turan, 1'i Euro - Sibirien elementidir.

Çalışmamız, Türkiye'de saptanan bu 23 türden 17'si üzerinde yaptığımız gözlemlere dayanmaktadır.

I.2.2. ARISTOLOCHIA CİNSİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Çok yıllık otsu veya odunsu tırmanıcı bitkiler. Ana kök silindi-

rik, yuvarlak, uzunca veya iğimsi şekillerde olup depo kök halindedir. Sadece A. clematitidis'de kökler bir rizom'dan çıkarlar. Yapraklar gövde üzerinde sıralanmış olup 3 temel karakteristik şekil gösterirler. 1. Kordat-ovat 2. Kordat-deltoid 3. Lanseolat veya linear lanseolat; tabanda kulakçıklı, petiollu, yaprak laminası tüysüz veya tüylüdür. Çiçekler gövde üzerinde genellikle tek tek veya birkaçı birarada bulunurlar. Çiçek zigomorf, epigin, genellikle borazan şeklinde; perigon, altta utrikül adı verilen şişkinleşmiş bir kısmı ve bunun üzerinde daralmış düz veya U şeklinde kıvrık bir tüp kısmı ile üstte laminaya doğru genişler; stamenler genellikle 6, sapsız; anterler ekstrors olup 5-6 loblu bir stilus sütununa yapışarak bir ginostemyum oluştururlar. Ovaryum uzamış. Meyva 5-6 valvalı, septisid veya lokulusid kapsül. Tohumlar basık, üçgen şeklinde olup sert endospermalıdır.

Bitkinin yaprak ve çiçek morfolojileri taze materyallerde oldukça önemlidir. Örneğin; yaprakların genel şekilleri ve tabandaki kulakçıkların durumuna göre özellikleri ile perigonun rengi, genel şekli ve laminasının kulakçıklı olup olmaması türlerin teşhislerinde kullanılan belirgin karakterlerdir. Bu özellikler kuruma esnasında bozulduklarından teşhiste taze materyallerin morfolojik karakterleri not edilerek belirtilmesi gereken faktörlerdir. (Şekil 1,2)

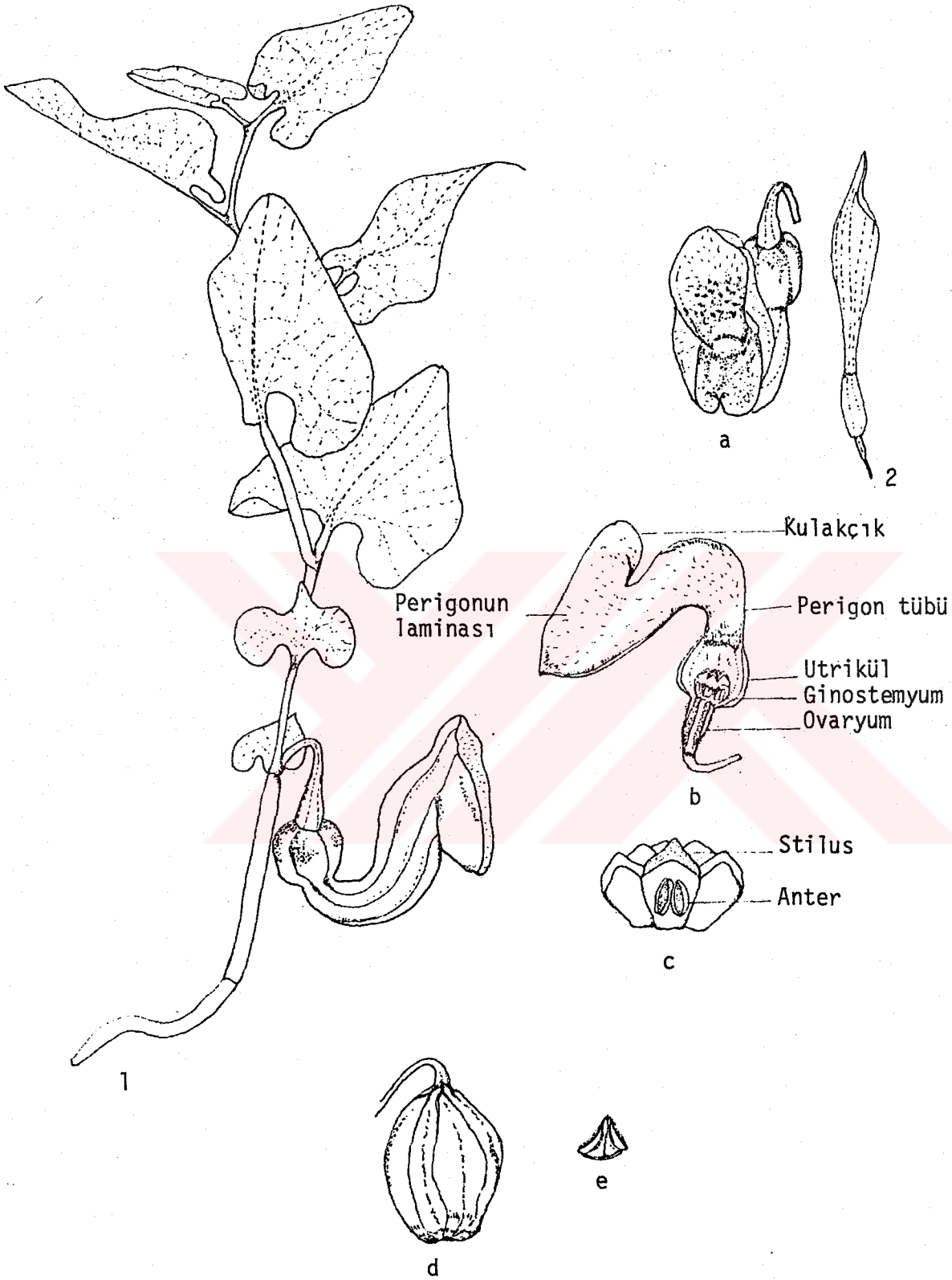
1.2.3. ARISTOLOCHIA TÜRLERİNİN AYIRIM ANAHTARI

Üzerinde çalışılan Aristolochia türleri arasındaki farklılıklar aşağıdaki şekilde bir ayırım anahtarı halinde düzenlenmiştir:

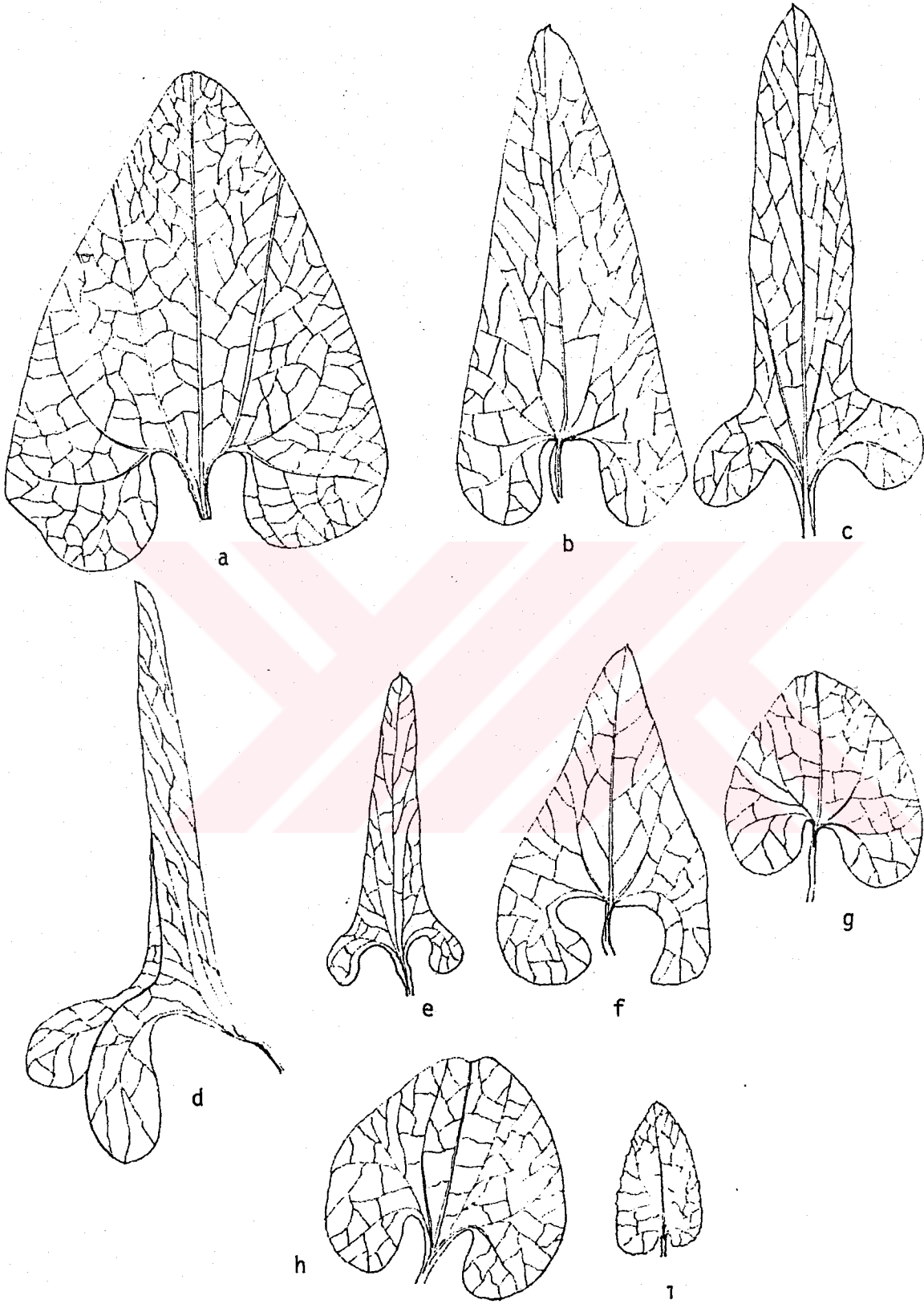
1. Çiçekler eksen üzerinde 2 ila 8 5. A.clematitidis

1. Çiçekler eksen üzerinde tek.

2. Perigon tübü düz veya utrikülün üst tarafında hafif kıvrık.



Şekil 1. Aristolochia L. (X1): 1. A. bodamae, bitkinin genel görünüşü
a. Çiçek b. Çiçek boyuna kesit c. Ginostemyum d. Meyva
e. Tohum 2. A. pallida'nın çiçeği



Şekil 2. Bazı Aristolochia L. türlerinin yaprak şekilleri (X1).

- a. A. bodamae b. A. cilicica c. A. polunii d. A. maurorum
e. A. lycica f. A. stenosphon g. A. krausei h. A. pallida
1. A. parvifolia

3. Perigonun lamina kısmının uzunluğu, hemen hemen genişliği kadar olup iki kısa yuvarlak kulakçıklı1. A.auricularia
3. Perigonun laminası, genişliğinden daha uzun, kulakçiksız.
4. Gövde ipliksi, yatık; yapraklar 1-3 cm, ovat-oblong; perigonun laminası, perigon tübünden daha uzun.....14. A.parvifolia
4. Gövde hemen hemen dik, yapraklar 2-6 cm, ovat; perigonun laminası hemen hemen tübün uzunluğu kadar.....13. A.pallida
2. Perigon tübü belirgin olarak U şeklinde kıvrık.
5. Perigonun laminası kulakçiksız.
6. Perigon tübü dışta tüysüz veya ancak damarlar üzerinde tüylü.
7. Yapraklar uzunca-lanseolat; perigonun laminası tübün uzunluğu kadar veya daha kısa.....6. A.cilicica
7. Yapraklar ovat-kordat; perigonun laminası tübden daha uzun..
.....9. A.incisa
6. Perigon tübü dışta tüylü veya papilloz.
8. Yapraklar genişliğinden daha uzun; perigonun laminası içte tüylü8. A.hirta
8. Yaprakların uzunluğu genişliği kadar; perigonun laminası içte tüysüz.....2. A.billardieri
5. Perigonun laminası belirgin kulakçıklı.
9. Yaprakların uzunluğu hemen hemen genişliği kadar.
10. Yapraklar kordat-ovat, kulakçıklar genellikle düz.
11. Perigon en az 5 cm uzunluğunda.....16. A.pontica
11. Perigon 5 cm den daha az uzunlukta.
12. Perigonun laminası yuvarlak-kordat, 1.2 cm uzunluk ve genişlikte.....7. A.quichardii
12. Perigonun laminası uzunca, 1.8-2 x 0.8-1 cm.....

- 11. A.krausei
10. Yapraklar kordat-üçgen şeklinde, kulakcıklar genellikle içe bükülmüş.....6.A.stenosiphon
9. Yaprakların uzunluğu genişliğinden daha fazla.
13. Yapraklar (Kulakcıklar hariç) genişliğinin 3 katı uzunlukta, oblong lanseolat veya linear-lanseolat.
14. Perigonun laminası genişçe ovat, uçta akuminat
.....12. A.maurorum
14. Perigonun laminası farklı.
15. Perigonun laminası 4.5 X 5 cm, yuvarlak-kordat, uçta yuvarlak.....15.A.polluninii
15. Perigonun laminası uzunca ovat,
2-3.5 X 2-3.5 cm, uçta obtus...10.A.lycica
13. Yapraklar (Kulakcıklar hariç) genişliğinin 1-2 katı uzunlukta;
16. Gövde dallanmış; yaprakların kulakcıkları tabana doğru daralmış.....4. A.bottae
16. Gövde basit, dallanmamış; yaprakların kulakcıkları tabana doğru daralmış..3. A.bodamae

I.2.4. ÇALIŞMADA KULLANILAN ARISTOLOCHIA TÜRLERİNİN TÜRKİYE'DE YAYILIŞI

Araştırma sırasında AEF, ANK, ISTE herbaryumlarında bulunan örnekler incelenmiş ve toplanan örneklerle birlikte değerlendirilerek Türkiye'de yayılışı saptanan 17 tür üzerinde gözlemlerde bulunulmuştur.

Çalışmamızda kullanılan örnekler önlerine konulan (x) işareti ile

belirtilmiştir.

Üzerinde çalıştığımız Aristolochia türlerinin Türkiye'deki yayılışı, Davis'in kareleme sistemine ve vilayetlere göre belirtilmiş olup harita üzerinde de ayrıca işaretlenmiştir.

1. A.auricularia Boiss.

* C 4: Konya: Konya-Karaman yolu, Özyurt köyü dağ etekleri, Hacıbaba dağı. 1200-1300 m, 24.5.1983, H.Malyer, M.Öğütveren (ESSE 3080)

C 4: Konya: Konya-Karaman arası, Özyurt köyü girişi, madas tarla ve çayır, 23.4.1984, H.Malyer, M.Öğütveren (ESSE 6301)

C 4: Konya: Ermenek çevresi, kayalık yamaçlar, 1300 m, 13.5.1972 (AEF)!

C 4: İçel: İçel, Silifke, Aydıncık-Gülner yolu, Teknecik köyü, bahçe içleri, 26.4.1984, H.Malyer, M.Öğütveren (ESSE 6304)

2. A.billardieri Jaub et Spach.

* C 5: İçel: Erdemli, Limonlu, Batı Sandal dağı, Batı Sandal köyü üstleri tarla kenarı, 600-800 m, 24.4.1984, H.Malyer, M.Öğütveren (ESSE 6302)

C 6: Hatay: Arsuz, P.brutia ormanı, Amanos dağları, 350 m, 19.4.1968, Y.Akman (ANK: 222)

3. A.bodamae Dingler

A 3: Bilecik: Söğüt: Söğüt-Inhisar yolu 6.km, 600 m, 15.7.1984 K.H. C. Başer, H.Malyer (ESSE 1571)

A 4: Ankara: Kızılcahamam Çamlıdere yolu kavşaktan 1 km çalılık ya-

maçlar, 1100 m, M.Koyuncu 15.5.1981 (AEF)¹

A 4: Bolu: Yeniçay gölü, Gerece yakını 20.5.1962 A.Baytop (ISTE)

B 3: Eskişehir: Bozdağ, 1100 m, 17.6.1982, K.H.C. Başer, M.Öğütveren (ESSE 1678)

B 3: Eskişehir: Gökçekaya D.S.İ. Çeşmesinin arkasındaki küçük de-re yatağı 18.5.1980, K.H.C. Başer (ESSE 221)

* B 3: Afyon: Kayadibi 2.5.1983, H.Malyer, M.Öğütveren (ESSE 2988)

4. A.bottae Jaub et Spach

* B 6: Sivas: Divriği: Mursal yolu girişinden 3 km, nohut tarlası, 1300 m, 5.5.1983 K.H.C. Başer, H.Malyer, M.Öğütveren (ESSE 3371)

B 7: Erzincan: Eğin: Sandık köyü 7.7.1982, K.H.C. Başer, H.Malyer, M.Öğütveren (ESSE 1957)

B 7: Sivas: Divriği, Demirdağ, 2.6.1968, T.Baytop (ISTE)

B 7: Elazığ: Kuyuk köyü, 27.4.1957, A.Baytop.

5. A.clematitis L.

A 1: Edirne: Tavuk ormanı, 22.5.1978, E.Özhatay (ISTE)

A 1: Tekirdağ: Tekirdağ Hayrabolu arası, Tekirdağ'dan 19-20 km ileride dere içi, 21.5.1971, (ISTE)

A 2: Bursa: M.K.Paşa yolu kenarı, 15.5.1983, İ.Demirtaş (ESSE 6564)

A 3: Sakarya: Karasu sahili tarla kenarı, 11.10.1970, A.Baytop (ISTE)

A 5: Amasya: Ziyaret köyü, bağlık yerler, 500 m, R.Alpınar, (ISTE)

* A 6: Samsun: Çarşamba 20.km Ziraî Arşt. Enst. bahçesi 8.6.1983

K.H.C.Başer, H.Malyer, M.Öğütveren (ESSE 3503)

A 8: Rize: Ponas-Fındıklı arası, Kıyı kısımları 11.8.1981 A.Güner
(ANK 4147)

x B 1: Balıkesir: Erdek: Ocaklar köyü, 1 m, 21.5.1985 K.H.C.Başer
(ESSE 2888)

B 5: Yozgat: Gedik civarı, ıslak yerler, 1400 m, 7.6.1979, T.Ekim
(ANK 5330)

6. A.cilicica Davis et Khan

x C 5: İçel: Tarsus: Meşelik-Çamlıyayla 13 km. tarla 11.5.1985 H.Malyer,
M.Öğütveren (ESSE 6837)

C 5: Adana: Pozantı: Çamalan, Pozantı, Çamalan'a 7 km kala 9.5.1985
H.Malyer, M.Öğütveren (ESSE 6836)

C 5: İçel: Tarsus: Belçınar köyü altları, 11.5.1985, H.Malyer,
M.Öğütveren, (ESSE 6842)

7. A.quichardii Davis et Khan

x C 2: Muğla: Fethiye, Esen-Babadağ arası, 19-20 km ve 9 göl mevki
üstleri, P.brutia orman altı, 1.5.1984, H.Malyer, M.Öğütveren
(ESSE 6313)

C 2: Muğla: Fethiye, Babadağ, P.brutia orman altı 600-800 m
1.5.1984, H.Malyer, M.Öğütveren (ESSE 7314)

C 2: Muğla: Muğla, Ula, Gökova-Ula arası, Sakar geçidi rampası, yo-
lun sağ tarafı, Quercus altları, 600 m, 3.5.1984, H.Malyer,
M.Öğütveren (ESSE 6317)

C 2: Muğla: Muğla-Marmaris yolu Gökçe köyü Marmaris arası, 2 km

3.5.1984 H.Malyer, M.Öğütveren (ESSE 6318)

8. A.hirta L.

B 1: İzmir: Bayındır-Ergenli köyü, Ilıca, Zeytinlik yamaçlar

29.5.1980 (ISTE)

B 2: Uşak: 24.5.1983 A.Efe (ESSE 5937)

C 2: Muğla: Yatağan-Çine arası, Gökbel mevki, granit kayalıklar,

300 m, 2.5.1982, M.Koyuncu (AEF)

- x C 3: Antalya: Antalya, Kumluca, Çavuş köyü (Andrasan köyü) Köy içi mahallesi, Yeni köy sırtları, meşelik altları 30.4.1984, H. Malyer, M.Öğütveren (ESSE 6311)

9. A.incisa Duchartre

- x C 2: Denizli: Honaz: Kocabaş-Aydınlar köyü arası, tarla içleri, 800-900 m, 4.5.1984, H.Malyer, M.Öğütveren (ESSE 6320)

C 2: Denizli:Honaz, Aydınlar köyü üstleri, tarlalar 1300 m, 4.5.1984

M.Öğütveren, H.Malyer (ESSE 6319)

C 2: Denizli: Honaz dağı, Aydınlar köyü ilerisi, tarla kenarı 1350

m, 8.5.1974 E.Tuzlacı (ISTE)

10. A.lycica Davis et Khan

- x C 3: Antalya: Antalya, Dağ nahiyesi, Gökova mevki, kayalıklar ve yamaçlar, 29.4.1984 H.Malyer, M.Öğütveren (ESSE 6310)

11. A.krausei P.H. Davis

- * C 5: İçel: Silifke, Cambazlı Limonlu çıkışı, Kayalıklar, 800 m,
25.4.1984, H.Malyer, M.Öğütveren (ESSE 6303)

12. A.maurorum L.

- A 3: Bilecik: Söğüt: Söğüt-İnhisar yolu 6 km tarla kenarı, 600 m,
K.H.C. Başer, H.Malyer (ESSE 6501)
- A 4: Ankara: Kızılcahamam, Işık dağı tarlalar, 1400 m, 12.6.1976
F.Demircioğlu (AEF)
- A 4: Çankırı: Çerkeş Ören köyü, Kapıağzı mevki, 31.5.1970 Ç.Kılıç
(ISTE)
- A 5: Çorum: Delice Sungurlu 21 km 4.5.1966 (ISTE)
- * B 3: Eskişehir: Bozdağ-Sarıcakaya yolu, 17.6.1982, K.H.C. Başer,
M.Öğütveren (ESSE 1677)
- B 3: Eskişehir: Seyitgazi-Bardakçı köyü, tarla 14.5.1985, S.Yıldırım
(ESSE 2170)
- B 5: Nevşehir: Örgüp: Örgüp-Kayseri Topuz dağı. geçidi. 31.5.1983,
H.Malyer, M.Öğütveren (ESSE 3183)
- B 5: Niğde:Aksaray: Güzelyurt Çiftlik arası, Güzelyurttan 8-9 km
sonra 1600 m, 31.5.1983, H.Malyer, M.Öğütveren (ESSE 3155)
- B 6: Sivas: Divriği: Divriği'ye 11 km kala 1100 m 3.6.1983, K.H.C.
Başer, H.Malyer, M.Öğütveren (ESSE 3263)

C 3: Isparta: Eğridir: Ispartaya 10 km kala, 20.5.1965 A.Baytop
(ISTE)

C 3: Konya: Beyşehir'e 8 km kala 17.5.1973, M.Koyuncu (AEF)

C 4: Konya: Karaman Özyurt köyü, dağ etekleri, 2100-1300 m,
25.5.1983, H.Malyer, M.Öğütveren (ESSE 3093)

C 4: Konya: Karaman: Salur köyü ve sırtları kale çevresi, 1000-
1600 m, 25.5.1981, H.Malyer, M.Öğütveren (ESSE 3104)

C 5: Adana: Haruniye-Fevzipaşa 700 m, 18.4.1957 (ANK 26815)

13. A.pallida Willd.

A 2: İstanbul: Alemdağ, taşlık yerler, 27.4.1978, A.Baytop (ISTE)

A 3: Bilecik: Osmaneli-İçmeler yamaçları, 19.5.1982, K.H.C. Başer
(ESSE 1511)

A 4: Ankara: Kızılcahamam, Çamlıdere yolu kavşaktan 1 km sonra,
1100 m, 15.5.1981, N.Tanker, M.Coşkun (AEF)

A 6: Sivas: Zara-Suşehri arası, Zara'dan 19 km, 1.6.1975, T.Baytop
(ISTE)

B 1: İzmir: Ödemiş Bozdağ, 1500 m, M.Koyuncu (AEF)!

B 2: Uşak: Karakuyu Akya Mev. 700-750 m, 21.5.1985, M.Acar (ESSE
6629)

* B 3: Eskişehir: Bozdağ: Sarıcakaya yolu 20 km, 27.5.1983, K.H.C.
Başer, M.Öğütveren (ESSE 6453)

14. A.parvifolia Sm.

C 3: Antalya: Kumluca, Çavuş köyü (Adrasan), 30.4.1984, H.Malyer, M.Öğütveren (ESSE 6312)

C 3: Antalya: Kumluca, Antalya'nın 96 km batısı, 30 m, 6.5.1980, A.Baytop (ISTE)

C 4: Antalya: Gazipaşa: Çobanlar köyü çevresi, meşe altları, 27.4.1984, H.Malyer, M.Öğütveren (ESSE 6308)

C 4: Antalya: Gazipaşa-Alanya arası, Alanya'ya 16 km kala deniz kenarı, 1-2 m, 27.4.1984, H.Malyer, M.Öğütveren (ESSE 6309)

* C 4: Adana: Tarsus Çamlıyayla Murat Köprüsü II. Kadıncık santralı çevresi, Kızılyer mevkii, 29.5.1983, H.Malyer, M.Öğütveren (ESSE 3127)

15. A.polluninii Davis et Khan.

* C 2: Muğla: Muğla, Ula, Gökova, Gökova-Akyaka arası, yol kenarı, 50-100 m, 2.5.1984, H.Malyer, M.Öğütveren (ESSE 6315)

C 2: Muğla: Muğla, Ula, Gökova üstleri, taşlık yamaçlar, 100 m, 2.5.1984, H.Malyer, M.Öğütveren (ESSE 6316)

16. A.pontica Lam.

* A 2: Bursa: Bozüyük-İnegöl yolu, Mezit 8 köprüsü, yolun solu, orman altı, 8.5.1983, K.H.C.Başer, M.Öğütveren (ESSE 2926)

A 3: Kocaeli: Kuzuyayla- Keltepe (Zirveye çıkış), 25.5.1973, A.Baytop (ISTE)

A 3: Bolu: Abant gölü, orman altı, 1700 m, 13.6.1981, M.Coşkun
(AEF)

A 4: Kastamonu: Cide-Kızılcasu, Kanıköy, 950 m, 12.6.1979,
O.Ketenoglu (AEF)

A 4: Zonguldak: Yenice Keltepe, 800 m, 20.5.1973, A.Baytop (ISTE)

17. A.stenosiphon Davis et Khan.

* C 4: İçel: Silifke, Aydınçık, Aydınçık-Gülınar yolu, Teknecik köyü
yol ayırımıından, Teknecik köyüne 2 km, 3 baş mevki, nohut
tarlası, 26.4.1984, H.Malyer, M.Öğütveren (ESSE 6306)

C 4: İçel: Silifke, Aydınçık, Aydınçık-Gülınar yolu, Teknecik köyü
yol ayırımına varmadan yolun solundaki boğazın üstlerindeki
meşelik altları, 26.4.1984, H.Malyer, M.Öğütveren (ESSE 6307)

C 4: Konya: Ermenek-Keşlik mahallesi üzeri, 1100 m, 29.6.1978,
M.Vural (ANK 602)

NOT: Çalışılan türler haricinde Türkiye'de bulunan diğer Aristolochia
türleri şunlardır:

A.brevilabris Bornm.

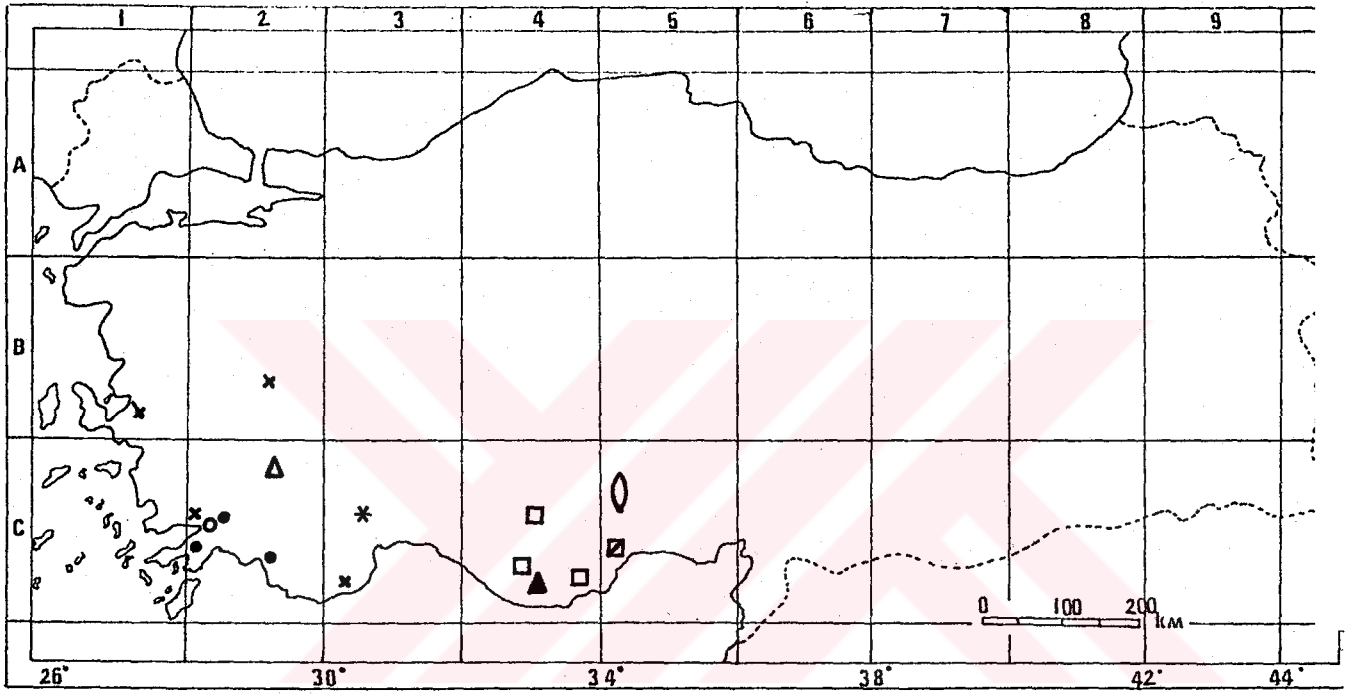
A.iberica Fisch. and Mey. ex Boiss.

A.paecilantha Boiss.

A.rotunda L.

A.samsunensis Davis (endemik)

A.sempervirens L.



□ A. auricularia

△ A. incisa

▲ A. stenosiphon

× A. hirta

○ A. polluninii

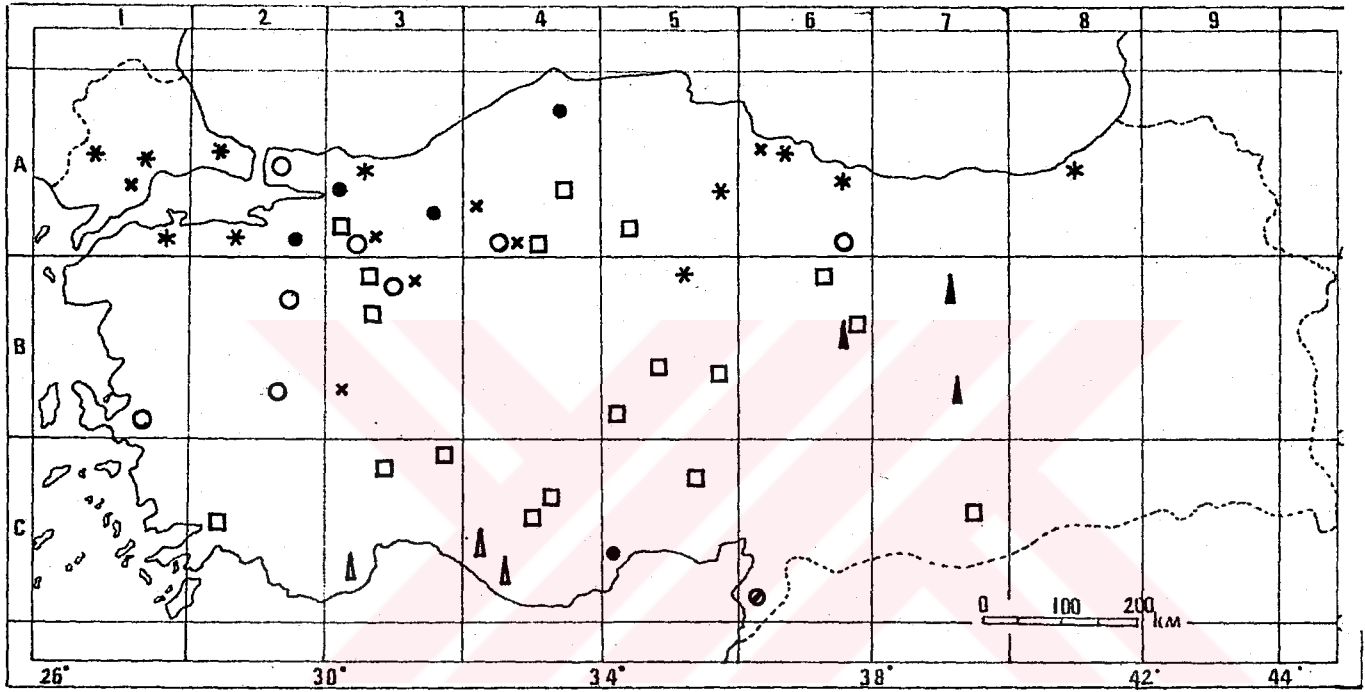
◻ A. krausei

● A. guichardii

* A. lycica

○ A. cilicica

Üzerinde çalışılan endemik Aristolochia türlerinin yayılışı



□ A. maurorum

* A. clematitis

• A. pontica

○ A. pallida

▲ A. bottae

△ A. parvifolia

× A. bodamae

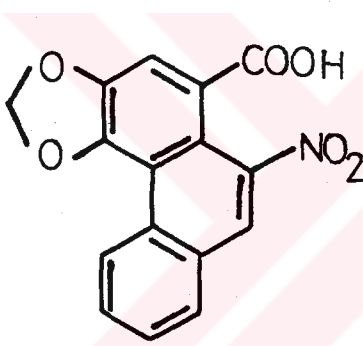
◉ A. billardieri

Özerinde çalışılan Aristolochia türlerinin yayılımı

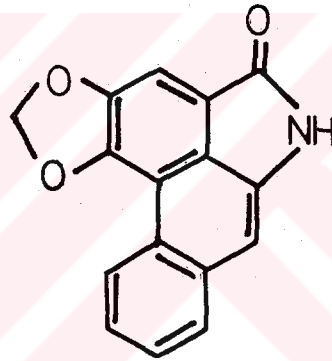
I.3. ARISTOLOCHIA TORLERİNİN KİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Aristolochia türlerinden bugüne kadar çeşitli aristolohik asitler, aristolaktamlar, aristolohik asit türevleri, alkaloit, seskiterpen, sterol ve uçucu yağlar rapor edilmiştir.

Aristolochia türlerinin hepsinin Aristolohik asit ve Aristolaktam içerdiği tespit edilmiştir. Aristolohik asitler, nitrofenantren grubu içeren bileşiklerdir. Aristolaktamlar ise bu asitlerin laktamlarıdır. Bu iki tip bileşiğin kimyasal yapısı aşağıda gösterilmiştir.



Aristolohik asit iskeleti



Aristolaktam iskeleti

Aristolohik asitler sadece Aristolochiaceae familyasında ve bu tür bitkilerle beslenen kelebeklerde bulunmuştur. Aristolaktamların ise Aristolochiaceae familyasından başka Annonaceae, Menispermaceae (Stephania cepharantha Y.Hayata) ve Monimiaceae (Doryphora sassafras Endlicher) (10, 11) de de bulunduğu gözlenmiştir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar sonunda, ikisi metil esteri olmak üzere 14 Aristolohik asit izole edilmiştir. Aristolohik asitlerin, genellikle, doğal kaynaklardan elde edilen 12 Aristolaktamla birlikte bulunduğu tespit edilmiştir (12).

I.3.1. ARISTOLOCHIA TURLERİNİN KİMYASAL BİLEŞİKLERİ

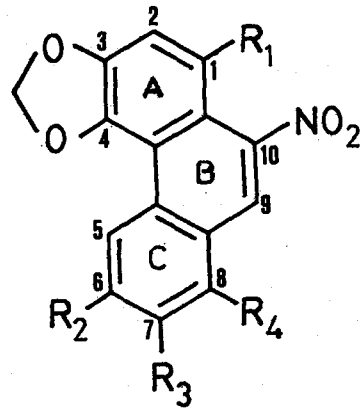
I.3.1.a. Aristolohik Asitler

Aristolohik asit olarak da bilinen Aristolohik asit I (Aristolohik asit-A) ilk olarak Castille tarafından Aristolochia sipho L'Herit' den izole edilmiştir (13, 14). Sonradan Rosenmund ve Reichstein tarafından da aynı bitkiden izole edilen Aristolohik asitin (15), Frukhinger'in (16) "Aristolochia Yellow", Pohl'un (17) "Aristolochine", Hesse'nin (18) "Aristinik Asit" ve Krishnaswamy'nın (19) "Isoaristolochia asit" olarak adlandırdıkları bileşiklerle aynı olduğu gösterilmiştir.

Kimyasal yapısı ilk olarak Pailer tarafından Aristolochia clematis L' den izole edilen bir örnek ile aydınlatılmıştır (20, 21). Bu raporda Aristolohik asitin, nitro grubu içeren fenantroik asit olduğu açıklanmıştır. Daha sonra bu bileşik, üzerinde çalışılan tüm Aristolochia türlerinden izole edilmiştir (Tablo I).

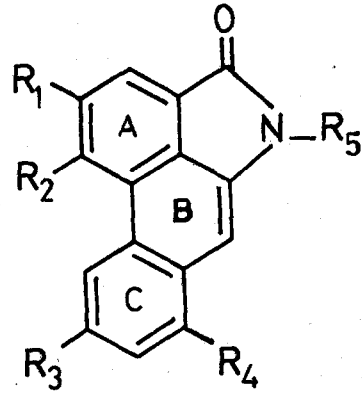
Aristolohik asit I, metillenmiş türevi ile birlikte, özellikle Aristolochia bitkileri üzerinde beslenen kelebek larvalarında da bulunmuştur (22, 23). Aristolohik asit I'in sentezi, substitüe 2-iodostilben'den fotosiklizasyon reaksiyonu sonucu gerçekleştirilmiştir (24, 25). Biyosentezinin aydınlatılması için Aristolochia sipho L' Herit ile yapılan deneyler sonucunda tyrosine, dopa, dopamine, noradrenaline ve norlaudanasoline'in, Aristolohik asit I'in spesifik prekürsörleri olduğu gösterilmiştir (26, 27, 28).

Aristolohik asitlerin kimyasal yapıları Şekil 3'de, doğada ve Aristolochia türlerindeki dağılımları da Tablo I'de verilmiştir.



Şekil 3:Aristolohik asitlerin kimyasal yapısı

İsmi	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Aristolohik asit-Ia	COOH	H	H	OH
Aristolohik asit-I (Aristolohik asit-A)	COOH	H	H	OCH ₃
Aristolohik asit-IIIa (Aristolohik asit-c)	COOH	OH	H	H
Aristolohik asit-II	COOH	H	H	H
Aristolohik asit-III	COOH	OCH ₃	H	H
Aristolohik asit-IV	COOH	OCH ₃	H	OCH ₃
Aristolohik asit-D (Aristolohik asit-IVa)	COOH	OH	H	OCH ₃
Debilik-asit	CH ₂ COOH	H	H	OCH ₃
7-Hidroksi aristolohik asit - A	COOH	H	OH	OCH ₃
7-Metoksi aristolohik asit - A	COOH	H	OCH ₃	OCH ₃
Aristolohik asit-IV Metil ester	COOCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃
Metil aristolohat	COOCH ₃	H	H	OCH ₃
Aristolohik asit-B	COOH	OH	OCH ₃	
Aristolozit	COOH	O	H	OCH ₃



Şekil 4: Aristolaktamların kimyasal yapısı

İsmi	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Aristolaktam		O-CH ₂ -O	H	OCH ₃	H
Aristo-red ^a		O-CH ₂ -O	-	OCH ₃	H
Aristolaktam A-II	OH	OCH ₃	H	H	H
Aristolaktam A-III	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	H
Aristolaktam B-II	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H
Aristolaktam B-III	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	H
Aristolohik asit-D metil ester laktam		O-CH ₂ -O	OCH ₃	OCH ₃	H
Taliscanine	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	H
Aristolaktam N- glikozit		O-CH ₂ -O	H	OCH ₃	glikoz
Aristolohik asit-C laktam N-glikozit		O-CH ₂ -O	OH	H	glikoz
Cepharanone-A		O-CH ₂ -O	H	H	H
Doryflavine ^b	OCH ₃	OH	OH	H	H

a) 3 metoksil grubu C halkasında olup pozisyonu tam olarak bilinmemektedir.

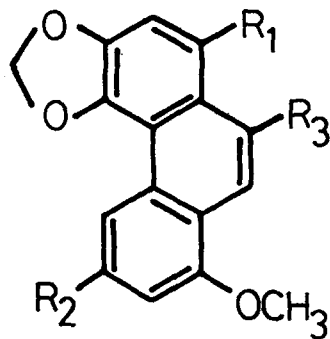
b) Doryflavine'in yapı tayini tam olarak yapılamamıştır.

I.3.1.b. Aristolaktamlar

Aristolaktam ilk kez Çin drogu "Fang-Chi" (A.debilis Sieb and Zucc) de bulunmuş (29, 30), daha sonra A.indica L. (31), A.rotunda L. ve A. argentina Griseb (32) den elde edilmiştir. Kimyasal olarak aristolaktam, aristolohik asitin indirgenmiş ürünüdür (21). Biyogenetik olarak aristolaktamların yükseltgenmesiyle Aristolohik asitlerin elde edilmesi mümkündür (33). Doğada 12 tane aristolaktam bulunmuştur. Bunların kimyasal yapıları Şekil 4'de, doğada ve Aristolochia türlerindeki dağılımları da Tablo II'de gösterilmiştir.

I.3.1.c. Diğer Aristolohik Asit Türevleri

Aristolochia türleri üzerinde yapılan çalışmalarla Aristolohik asit yanında diğer bazı fenantren türevleri de rapor edilmiştir. Nitro grubu içermeyen bir fenantroik asit olan Aristolik asit (34), Aristolik asidin amit şekli Aristolomit, Aristolik asit metil esteri (Metil aristolat) ve 6-Metoksi aristolik asit metil esteri (Aristolonik asit esteri veya metil Aristolinat) de A.indica'da bulunmuştur (34). Diğer Aristolohik asit türevlerinin kimyasal yapıları Şekil 5'de gösterilmiştir.



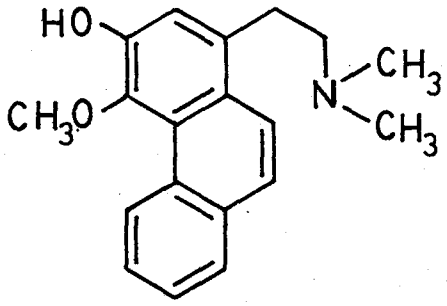
Şekil 5: Aristolohik asit türevleri

İsim	R ₁	R ₂	R ₃
Aristolik asit	COOH	H	H
Aristolamit	CONH ₂	H	H
Aristolohik asit-I metil ester	COOCH ₃	H	NO ₂
Aristolik asit metil ester	COOCH ₃	H	H
6-Metoksiaristolohik asit metil ester	COOCH ₃	OCH ₃	NO ₂
6-Metoksiaristolik asit metil ester	COOCH ₃	OCH ₃	H

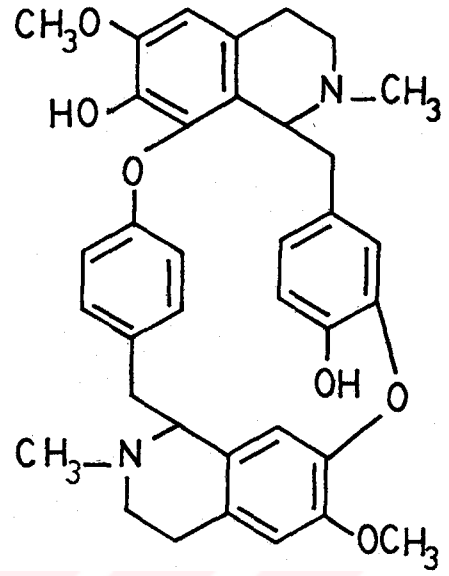
I.3.1.d. Alkaloitler

Aristolochia türleri, Aristolohik asit-Aristolaktam tipi alkaloitler yanında diğer alkaloitleri de içerir. "Aristolochine" olarak tanımlanan bileşikler çeşitli bitki türlerinden farklı araştırmacılar tarafından izole edilmiştir (17, 19, 35, 36). Bunlardan bazıları daha sonra Aristolohik asit I olarak tanımlanmışlardır. 1935 de, Krishnaswamy ve arkadaşları tarafından (19), A indica L. köklerinden "Aristolochine" olarak adlandırılan bir alkaloit izole edilmiş, bileşiğin bazı fiziksel özellikleri verilmiş, fakat kimyasal yapısı açıklanmamıştır (36). 1967'de bu bileşiğin yeniden izole edilme çalışmaları başarılı olmamıştır. İzole edilen örneğin, spektroskopik verilerinden (-)-curine olduğu öne sürülmüştür (37). Ayrıca bazı Aristolochia türlerinde de magnoflorin (26, 38, 39, 40, 41, 42), argentinin (43, 44), cyclanoline (40) rastlanmıştır.

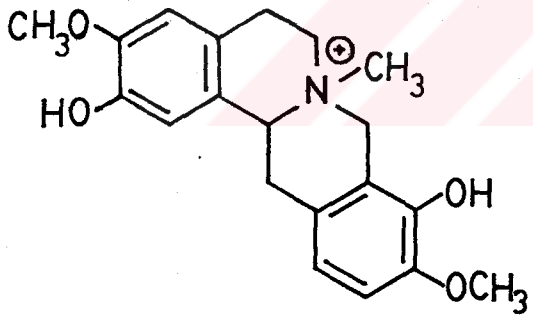
Aristolochia türlerinden elde edilen bazı alkaloitlerin kimyasal yapıları Şekil 6'da gösterilmiştir.



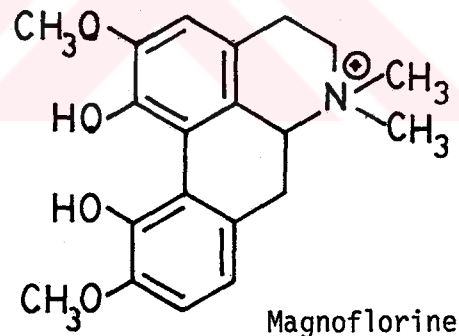
Argentinine



(-) Curine



Cyclanoline



Magnoflorine

Şekil 6 : Aristolochia türlerindeki alkaloidler

		Aristolohik asit-I a	Aristolohik asit-C (Aristolohik asit-IIIa)	Aristolohik asit-I (Aristolohik asit-A)	Aristolohik asit-III	Aristolohik asit-II	7-hidroksiaristolohikasit-A	Aristolohik asit-D (Aristolohik asit-IV a)	Aristolohik asit-B	7-metoksiaristolohik asit-A	Aristolohik asit-IV	Debilik asit	Metil Aristolohat	Aristolohik asit-IV metil ester	Aristolozit
A.acuminata Lam	(12)			x				x							
A.argentina Griseb	(113, 38)	x	x	x	x	x	x	x			x				x
A.bodamae Dingler	(26)			x											
A.baetica L.	(41)			x											
A.bracteata Retz	(49)			x											
A.chilensis	(12)	x		x											
A.clematitis L.	(26,50)			x	x	x		x			x				
A.debilis Sieb and Zucc	(51)		x	x		x	x	x	x	x		x			
A.elegans Mast	(26)			x											
A.esperanzae	(12)			x	x	x		x							
A.fangchi Wu	(12)		x	x					x						
A.fimbriata Cham	(26)			x											
A.indica L.	(22,31,34)			x				x					x		
A.kaempferi Willd	(12)			x											
A.kwangsiensis Chun	(52)			x										x	
A.longa L.	(53)			x		x									
A.manschurensis K.	(54)			x		x		x			x	x			x
A.maurorum L.	(12)			x											
A.maxima L.	(53)			x											
A.mollissima Hance	(55)			x											
A.multiflora Duch	(12)			x				x							
A.pendurata Duch	(53)			x											
A.reticulata Null	(56,57,58)			x											
A.rotunda L.	(26,59)		x	x		x									
A.serpentaria L.	(53,57)			x											
A.sipho L'Herit	(13,14)			x		x									
A.watsonii	(12)		x	x											
A.westandii	(12)			x											
Asarum canadense	(12)			x											
Bragantia wallichii	(12)			x											

TABLO I Doğadaki ve Aristolochia türlerindeki Aristolohik asitler

		Aristolaktam	Aristo-red	Aristolaktam A-II	Aristolaktam A-III	Aristolaktam B-II	Aristolaktam B-III	Aristolohik asit-D metilester Taktam	Taliscanine	Aristolaktam N-glikozit	Aristolohik asit-C Taktam N-glikozit	Cepharanone-A	Doryflavine
Schefferomitra subaequalis	(12)					x							
A.argentina Griseb	(32,39)	x		x	x	x	x						
A.bracteata Retz	(60)		x										
A.debilis Sieb and Zucc	(29,30)	x											
A.fangchi Wu	(12)	x											
A.indica L.	(31,34,48)	x		x				x		x	x		
A.reticulata Nutt	(56,57)		x										
A.rotunda L.	(59)	x											
A.serpentaria L.	(57)		x										
A.taliscanine	(61)								x				
Stephania cepharantha	(40)					x						x	
Doryphora sassafras	(11)												x

TABLO II Doğadaki ve Aristolochia türlerindeki Aristolaktamlar

		Aristolochene	Aristolone	$\Delta^{1,10}$ -Aristolone	Aristolactone	(-)- α -Copaene	Debilone	γ -Elemene	Ishwarane	Ishwarol	Ishwarone	(+)-Ledol	(E)-(R)-Nerolidol	(-)- α -Ylangene	(125)-7,12 secoishwarane-12-ol	3-oxo-ishwarane	(E)- β -Elemene
A.indica L.	(62)	x							x								
	(45)									x	x						
	(46,47)										x						
	(63)											x			x		
A.debilis Sieb and Zucc	(47)						x									x	
	(64)		x														
	(65)			x													
A.mollissima Hance	(66)				x												
A.reticulate Nutt	(67)				x												
A.serpentaria L.	(68)				x												
A.triangularis Cham	(69)					x		x					x	x			x

TABLO III Aristolochia türlerindeki seskiterpenlerin dağılımı

		3-Hidroksistigmast-5-en-7-one	6-Hidroksistigmast-4-en-3-one	β -Sitosterol	β -Sitosterol glikozit (Daucosterol)	Stigmast-4-en-3-one	Stigmast-3,6-dione	Stigmast-4-en-3,6-dione
A.indica L.	(48)	x	x					
A.indica L.	(34)					x		
A.triangularis Cham	(69)					x		
A.serpentaria L.	(70)				x			
A.triangularis Cham	(69)						x	
A.triangularis Cham	(69)							x
A.bracteata Retz	(49)			x				
A.elegans Mast	(71)			x				
A.indica L.	(19,34)			X				
A.rotunda L.	(59)			x				
A.serpentaria L.	(70)			x				

TABLO IV Aristolochia türlerindeki sterollerin dağılımı

I.3.1.e. Seskiterpenler

Aristolochia türlerinden ilk olarak izole edilen seskiterpen (1935) "Ishwarone" dur (45). Fakat, ishwarone'un tetrasiklik yapısı tam olarak ancak 34 yıl sonra aydınlatılabilmektedir (46, 47).

Seskiterpenlerin Aristolochia türlerindeki dağılımı Tablo III de gösterilmiştir.

I.3.1.f. Steroller

A.indica L.'de β -sitosterol yanında, ender rastlanan iki sterol (3-hydroxystigmast -5-en-7-one ve 6-hydroxystigmast-4-en-3-one (48)) de bulunur. Aristolochia türlerinde sterollerin dağılımı Tablo IV'de gösterilmiştir.

I.4. ARISTOLOCHIA TÜRLERİNİN FARMAKOLOJİK ÖZELLİKLERİ

Aristolochia'nın çeşitli türleri, çok eskiden beri halk tarafından tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır. Aristolochia türlerinin yaygın kullanımlarına rağmen farmakolojik çalışmalar bir kaç türle sınırlıdır. İlk olarak Diehl ve Moser A.clematitis L.'nin yaraların tedavisinde iyi sonuçlar verdiğini gözlemişlerdir (72). Daha sonra Mezger, epitelizan etkisini rapor etmiş ve bilhassa ülserlerde Ulcus, Varicosus, Cruris ve Decubitus tedavisinde iyi sonuç verdiğini belirtmiştir (73). Pilorczyk, A.clematitis L.'nin alkollü ve asetonlu ekstrelerinin çok iyi antibakterial aktiviteye sahip olduğunu bulmuştur (74). Bazı türlerin ekstrelerinin Mikrokok, Basil ve Salmonella türü bakterilere karşı antibiotik etki gösterdiği rapor edilmiştir (75,76). A.clematitis L.'nin toprak üstü kısımlarının stafilokoklar üzerinde antimikrobik etkisi olduğu gözlenmiş, ayrıca irinli yaraların tedavisinde Aristolohik asitin fagositozu aktive etme özelliğinden yarar-

lanıldığı belirtilmiştir (77). Neugebaver de Aristolochia'nın damar büzücü etkisi olduğunu açıklamıştır (78).

A.clematitis L.'nin ekstrelerinin tavşanlar ve domuzlar üzerinde immunostimulan etkiye sahip olduğu (79), ayrıca aynı bitkiden elde edilen alkaloit fraksiyonunun koleretik, diüretik ve uterus gevşetici etkinlikleri açıklanmıştır (80). Aristolochia türlerinin eter ve etanol ekstrelerinin, uterus kasılmalarını uyardığı çeşitli araştırmacılar tarafından gözlenmiştir (79, 81, 82, 83). Bunun yanında aseton ekstresinin uterus gevşetme etkisine sahip olduğu da gösterilmiştir (79).

A.eurystoma Duch'ın domuzlarda düşük yapma etkisi gösterdiği rapor edilmiştir (84).

A.taliscana'nın etanol ekstresinin ise antitümör etkinliği öne sürülmüştür (85).

A.rumicifolia'nın ekstresinin kurbağalar üzerinde paralitik etkisi olduğu gözlenmiştir (86).

A.indica L.'nin köklerinin alkollü ekstresinin, adenokarsinom 755'e karşı antitümör aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir (87). Etken maddenin ise Aristolohik asit I olduğu bulunmuştur. Farelerde "Asitik hepatom" a karşı da olduğu ortaya konmuştur. Bu bileşiğin antitümör aktivitesi klinik çalışmaları hızlandırmıştır. Bununla birlikte kanserli hastalara hızlı infüzyonla verildiğinde 2 mg/kg dozun bile böbrekler üzerinde toksik olduğu bulunmuştur (88). Aristolohik asit I'in toksik etkisi tümör hücreleri içeren farklı biyolojik sistemlerde çalışılmıştır (88-91). Antitümör etkinliğinin fosfolipid metabolizması ile bağlantılı olduğu öne sürülmüştür (92).

Öte yandan Aristolohik asit I'in farelerde kanserojenik etki gösterdiği (24), hücre bölünmesini uyardığı (93), hayvanlarda ve insanlarda fagositoz aktivitesini artırdığı (94, 95) in vitro olarak yılan zehirlerinin etkisini yok ettiği (96), haşerelere karşı insektisid etki gösterdiği (97) ve farelerde gebeliği önlediği de açıklanmıştır (98).

A.indica L. köklerinin çeşitli ekstrelerinin döllenmeyi önleyici etkisi açıklanmış, gebelik süresinin yarısından sonra ise bileşiğin farelerde düşük etkisi yapmadığı gözlenmiştir (99, 100). Kloroformlu ekstrelerin farelerde minimum 35-60 mg/kg dozda gebeliği önleyici etkisi olduğu gözlenmiştir (101).

A.indica L.'de bulunan metil aristolat'ın da farelerde döllenmeyi önlediği rapor edilmiştir. Farelerde gebeliğin 6 veya 7. gününde ağızdan 60 mg/kg dozda metil aristolat verildiğinde, düşük etkisinin yüzde yüz olduğu tespit edilmiştir (102, 103).

Bazı Aristolochia türleri; yurdumuzun çeşitli yörelerinde;

A.billardieri ve A.krausei, İçel-Erdemli-Silifke'de karga kulağı, karga kavunu; A.stenosiphon, Silifke-Gülnar'da karga yamsağı; A.lycica, Antalya-Hafızbey'de ve A.hirta, Antalya-Kumluca'da köpek taşı; A.polluninii, Muğla-Gökova'da ördek; A.incisa, Denizli-Honaz'da karga düveleği; A.bodamae, Afyon'da küpeli, kedi taşı; A.mauro-rum, Eskişehir-Bozdağ'da karma, sağır kulak adlarıyla bilinir.

Bunun yanında, Aristolochia türleri halk arasında; adet getirici, idrar artırıcı, müshil, romatizma ağrılarını azaltıcı olarak kullanıldığı gibi, cerahatli yaralar, ekzama ve buna benzer deri hastalıklarının tedavisinde de kullanılmaktadır. Muğla yöresinde ise

akrep ve yılan sokmalarına karşı kullanıldığı bilinmektedir (104).

Aristolochia türlerinin çeşitli ülkelerdeki tıbbi kullanımları Tablo V'de verilmiştir.

TABLO V
ARISTOLOCHIA TÜRLERİNİN DÜNYADAKİ TIBBİ KULLANIMLARI

İsmi	Kullanılan Kısım	Tıbbi Kullanımı	Kullanılan Ülke
<u>A.argentina</u> Griseb	Kök	emenagog antiseptik diüretik	Arjantin " "
<u>A.boetica</u> Linn		abortif emenagog	Avrupa
<u>A.bracteata</u> Retz	Bütün bitki Kök + gövde	emenagog uterus uyarıcı purgatif anthelmentik	Hindistan " Sudan "
<u>A.championii</u> Merr et Chun	Kök	antiseptik yılan zehirlenmelerine karşı	Çin
<u>A.clematitis</u> L.	Bütün bitki	hipertoni tedavisinde emenagog kontraseptif ekbolik	USSR USA Romanya Fransa
<u>A.debilis</u> Mart	Meyva	ekspektoran antitussif analjezik	Çin " "
<u>A.esperanzae</u> Kuntze	Bütün bitki	emenagog	Arjantin
<u>A.fanchi</u> Wu	Kök	diüretik	Çin
<u>A.indica</u> L.	Kök + rizom	abortif emenagog	Hindistan "

İsmi	Kullanılan Kısım	Tıbbi Kullanımı	Kullanılan Ülke
		yılan zehirlenmele- rine karşı	
	Rizom	afrodizyak	Hindistan-Seylan
<u>A.kaempferi</u> Willd.	Kök	yılan zehirlenmele- rine karşı	Çin
		dijestif	
<u>A.longa</u> L.		emenagog	Çin-İran
<u>A.manhuriensis</u> Koma- rov	Kök	abortif	Çin
<u>A.mexicana</u> Kostel		emenagog	Paraguay
<u>A.pallida</u> Willd.		abortif	Avrupa
		emenagog	
<u>A.patens</u> Klotzsh	Bütün bitki	yılan zehirlenmele- rine karşı	Güney Afrika
	Kök	emenagog	" "
<u>A.rotunda</u> L.	Kök	emenagog	Çin
<u>A.serpentaria</u> L.	Kök	afrodizyak	USA
		emenagog	USA
<u>A.togala</u> Cham	Yaprak	abortif	Filipinler
<u>A.triangularis</u> Cham		abortif	Paraguay
	Gövde	emenagog	
<u>A.trilobata</u> L.	Yaprak	abortif	Trinidad
<u>A.tubiflora</u> Dunn	Kök	yılan zehirlenmele- rine karşı	Çin

II. BÖLÜM

DENEYSEL KISIM

II.1. KULLANILAN TEKNİKLER

II.1.1. KROMATOĞRAFİK ÇALIŞMALAR

II.1.1.a. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

40 gr. Kieselgel 60 HF₂₅₄ (Merck) 80 ml. distile su ile homojen olarak karıştırıldı. Hazırlanan süspansiyon, 15 x 20 cm veya 5 x 20 cm cam plaklar üzerine 0.25 mm kalınlıkta Desaga plak kaplama apareyi ile yayıldı. Plaklar, oda sıcaklığında kurutulduktan sonra, 100°C lik etüvde 1 saat tutularak aktive edildi. Ekstreler ve şahit maddelerin çözeltileri kılcal boru ile, plağın alt kenarından 1.5 cm yüksekliğe uygulandıktan sonra, plaklar, dibinde 1 cm yükseklikte çözücü sistemi bulunan ve iç çeperleri süzgeç kağıdı ile kaplanarak doyurulmuş kromatografi tanklarına konuldu. Developman işlemi tamamlandıktan sonra, plaklar açık havada kurutuldu. Plaklardaki lekeler UV lambası altında incelendi ve Dragendorff reaktifi püskürtülerek belirlendi.

Dragendorff reaktifi:

Stok çözeltiler: A: 1.7 gr. bizmut subnitrat + 20 ml glasiyel asetik asit.

B: 100 ml % 50 potasyum iyodür + 80 ml su

Kullanılan çözelti: Kullanılacağı zaman 5 ml A, 5 ml B, 20 ml glasiyel asetik asit ve 70 ml su karıştırılır.

Elde edilen karışım plakların üzerine püskürtülür. Alkaloitler bu belirteçle turuncu renk verirler.

Mayer reaktifi:

50 gr. potasyum iyodür ve 13.5 gr. civa II klorür, 500 ml suda tamamen çözüldükten sonra su ile 1 litreye tamamlanır. Asit ortamda alkaloitleri çöktürmek amacıyla kullanılır. Alkaloitlerle grimsi süt rengi çökelti oluşturur. Bu çökelti, reaktifin fazlasında çözüldüğünden ve tekrar çöktürülemediğinden dikkatli olmak gerekir.

Bu araştırmada en çok kullanılan çözücü sistemleri şunlardır:

- i Kloroform
- ii Kloroform: Metanol (9:1)
- iii Kloroform: Metanol (8:2)
- iv Benzen: Metanol: Asetik asit (90:8:2)
- v Benzen: Metanol: Asetik asit (85:10:5)
- vi Toluen: Aseton: % 25 amonyum hidroksit (10:10:0.5)
- vii Kloroform: Metanol: % 25 amonyum hidroksit (14:7:1)
- viii Metanol: % 25 amonyum hidroksit: su (8:1:1)
- ix Toluen: Etanol: % 25 amonyum hidroksit (5:5:1)
- x n-Butanol: Asetik asit: su (4:1:1)
- xi Etil asetat: İzopropanol: % 25 amonyum hidroksit (45:35:20)

II.1.1.b. Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi (p. İTK)

İnce tabaka kromatografisinde anlatılan teknikle çalışıldı. Farklı olarak Kieselgel 60 HF₂₅₄ (Merck) 20 x 20 cm veya 20 x 15 cm boyutlarındaki cam plaklara 0.5 mm yada 0.75 mm kalınlıkta yayıldı. Mikropipet yardımıyla alınan belli miktardaki karışım çözeltisi plağın alt

kenarından 1.5 cm yüksekliğe bant halinde uygulandı. Plak kuruduktan sonra, içinde ayırımı sağlayacak çözücü sistemi bulunan ve bu sistemle doyurulmuş kromatografi tankına kondu. Developman sonunda tanktan çıkarılan plak havada kurutuldu. UV lambası altında bantların yeri belirlendi. Plaktan ayrı ayrı kazınan bantlar, Metanol: Kloroform (1:1) karışımıyla tüketildi. Süzülerek adsorbandan ayrıldı. Çözücünün uçurulmasıyla kalan kısım kloroformda çözüldü, susuz sodyum sülfat üzerinden süzüldü ve alçak basınçta çözücünden kurtarıldı.

II.1.1.c. Sütun Kromatografisi

Preparatif amaçlar için kullanıldı. Adsorban olarak Kieselgel 60 (0.2-0.5 mm, 35-70 ASTM) Merck 7734 kullanıldı. Bu adsorban kloroform ile süspansiyon haline getirildi. Hava kabarcıklarının tamamen uzaklaşması sağlandıktan sonra altında cam pamuğu olan sütuna aktarıldı. Adsorbanın sütuna yerleşmesi sağlandı.

Ayrılması istenen ekstreler çözülüp, ağırlığının iki katı adsorbanla akıcı hale getirildi ve sütuna tatbik edildi. Değişik çözücü sistemleri ile 25, 50, 100 ml fraksiyonlar halinde elue edildi. Her bir fraksiyon ince tabaka kromatografisi ile incelendi ve benzer fraksiyonlar birleştirildi.

II.1.1.d. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK)

Ekstrelerde bulunan alkaloitlerin tanınması ve miktarlarının tayininde "Waters Liquid Chromatograph" (U6K Universal Injector, 6000 A Solvent Delivery Pump, 440 Absorbance Detector, YEW 3021 Pen Recorder) cihazı kullanıldı.

II.1.2. SPEKTRAL ANALİZLER

II.1.2.a. Ultraviyole Spektrofotometresi (UV)

Aristolohik asitin tanınması ve miktar tayini için spektrofotometrik ölçümler; Shimadzu UV-120-02 spektrofotometresinde 1 cm lik kuvars küvetler içinde alındı. Ölçümler 250 nm'de yapıldı. Çözücü olarak spektroskopik metanolden yararlanıldı. UV spektral yapı tayinlerinde ayrıca Varian superscan 3 ile Perkin Elmer Lambda 3 spektrofotometrelerinden de istifade edildi.

II.1.2.b. Infrared Spektrofotometresi (IR)

Perkin-Elmer 177 IR spektrofotometresi kullanıldı.

II.1.2.c. ^1H -Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (NMR)

250 MHz spektrumlar, Bruker WM250 cihazında kaydedildi. Referans olarak tetrametilsilan (TMS) ihtiva eden deuterokloroform, deuterometanol ve DMSO-d_6 kullanıldı.

II.1.2.d. Kütle Spektrometresi (MS)

Kütle spektrumları VG Micromass 16 F cihazında ölçüldü. 70 eV (EI) ve 18 eV'ta çekilen spektrumlar bilgisayar "print-out" halinde elde edildi.

II.1.3. ERİME NOKTASI TAYİNİ

"Gallenkamp melting point apparatus" kullanıldı.

II.1.4. ÇÖZÜCÜLER

"Merck" marka çözücüler veya tekrar distile edilmiş yerli malı çözücüler kullanıldı. Spektral analizler için sadece spektroskopik çözücülerle çalışıldı.

II.2. BİTKİLERİN TOPLANMASI

Bu araştırmada 1983-1984 yıllarında çeşitli yörelerden toplanan bitkiler kullanılmıştır. Bu yöreler ve toplanan Aristolochia türleri Tablo VI'da gösterilmiştir. Toplanan türlerin toprak üstü ve toprak altı kısımları oda sıcaklığında kurutularak, kök ve yaprakları ayrı ayrı toz haline getirilmiştir.

TABLO VI : BU ÇALIŞMADA KULLANILAN ARISTOLOCHIA TÜRLERİNİN TOPLANDIĞI YERLER VE KURU DROG MİKTARLARI

İsmi	Toplandığı yer	Toprak altı	Toprak üstü
<u>A.auricularia</u> Boiss	Konya-Kızılyurt	800 gr	400 gr
<u>A.billardieri</u> Jaub et Spach	İçel-Sandal dağı	326 gr	-
<u>A.bodamae</u> Dingler	Afyon-Kayadibi	750 gr	350 gr
<u>A.bottae</u> Jaub et Spach	Sivas-Divriği	4 gr	2100 gr
<u>A.clematitis</u> L.	Balıkesir-Erdek	380 gr	2600 gr
<u>A.cilicica</u> Davis et Khan	Tarsus-Namrun	800 gr	600 gr
<u>A.guichardii</u> Davis et Khan	Fethiye-Babadağ	1080 gr	260 gr
<u>A.hirta</u> L.	Antalya-Adrasan	915 gr	300 gr
<u>A.incisa</u> Duchartre	Denizli-Honoğ	95 gr	14 gr
<u>A.lycica</u> Davis et Khan	Antalya-Hafızbey	460 gr	50 gr
<u>A.krausei</u> P.H.Davis	İçel-Sandal dağı	120 gr	50 gr
<u>A.maurorum</u> L.	Eskişehir-Bozdağ	1000 gr	150 gr
<u>A.pallida</u> Willd	Eskişehir-Bozdağ	200 gr	100 gr
<u>A.parvifolia</u> Sm.	Tarsus-Namrun	150 gr	450 gr
<u>A.polluninii</u> Davis et Khan	Muğla-Gökova	500 gr	800 gr
<u>A.pontica</u> Lam.	Bursa-Mezitler	650 gr	210 gr
<u>A.stenosiphon</u> Davis et Khan	Gülner-Bozağaç	290 gr	230 gr

II.3. EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİ VE UYGUN YÖNTEMİN SEÇİMİ

Toz haline getirilen bitki materyallerinin, kısa sürede, ekonomik ve daha verimli bir şekilde ekstraksiyonunu sağlamak için A.mauro-rum L. kök materyali üzerinde sırasıyla aşağıdaki yöntemler denenmiştir.

1. 200 gr. toz haline getirilmiş kök % 0.5 lik sülfürik asit ile asitlendirilerek, 100'er gramlık iki kısma ayrılmıştır.

a) 100 gramlık kısım bir kartuşa konularak, soxhlet apareyinde önce üç saat süreyle petrol eteri ile, daha sonra da 10 saat süreyle metanol ile tüketilmiştir. Yoğunlaştırıldıktan sonra 14.3 gram ekstre elde edilmiştir.

b) Diğer 100 gramlık kısım, önce petrol eteri ile 1 gün, daha sonra da metanol ile 10 gün maserasyona bırakılmıştır. Metanollü kısım, yoğunlaştırıldıktan sonra 9.3 gr. ekstre elde edilmiştir.

2. a) 100 gr. toz haline getirilmiş kök, petrol eteri ile 1 gün süreyle maserasyona bırakılmıştır. Süzüldükten sonra kalan kısım, Etanol ile 1 gün süreyle ekstre edilmiştir. Etanollü kısım yoğunlaştırıldıktan sonra 7.9 gr. ekstre elde edilmiştir.

b) 100 gr. toz haline getirilmiş kök, kartuşa konularak soxhlet apareyinde petrol eteri ile 6 saat süreyle ekstre edilmiştir. Petrol eterli kısım alındıktan sonra, kalan kısım Metanol ile 12 saat süre ile soxhlet apareyinde ekstre edilmiştir. Yoğunlaştırıldıktan sonra 20.3 gr. ekstre elde edilmiştir. İkinci yöntemde (2b) görüldüğü gibi, soxhlet apareyinde yapılan ekstraksiyon diğer yöntemlerden daha verimli ve pratik olduğundan ekstraksiyon için bu yöntem seçilmiştir.

Bu yöntemle bütün materyaller önce petrol eteri ile (40-60°C),

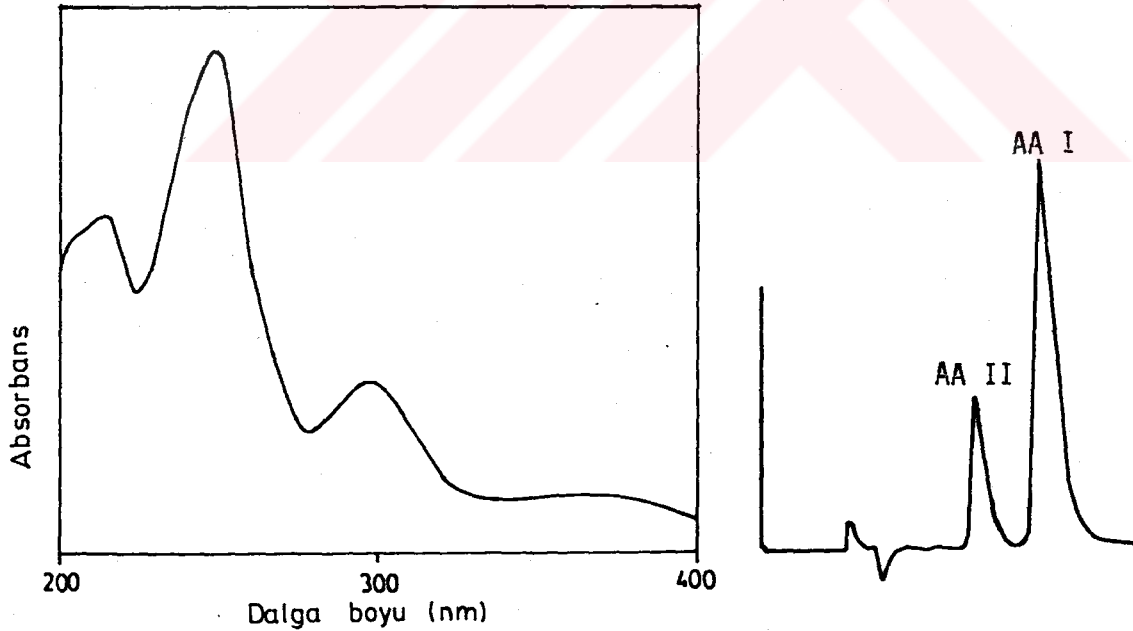
6 saat süreyle kurutulduktan sonra, Metanol ile alkaloit testi olumsuz bulununcaya kadar tüketilmiştir.^x

Aristolochia türlerinden elde edilen ekstre miktarları ve verimleri Tablo VII de belirtilmiştir.

II.4. STANDART ARISTOLOHİK ASİTİN TANIMLANMASI

Aristolohik asit; bir nitrofenantren türevidir. UV absorpsiyon spektrumunda 250, 315 ve 390 nm'de maxima gösterir. Log ϵ sırayla 4.34, 4.08 ve 3.81 dir. (E.n 280°C) (12, 105, 106).

Sigma firmasından sağlanan Aristolohik asit'in alınan UV spektrumu ve YBSK kromatogramı Şekil 7'de gösterilmiştir (Formül Bk. S. 20, Şekil 3).



Şekil 7: Aristolohik Asit'in UV spektrumu ve YBSK kromatogramı.

^x Tüketmenin bütün safhalarında işlemin tamam olup olmadığı DRAGENDORFF belirteciyle kontrol edilmiştir.

TABLO VII

<u>İsmi</u>	<u>Toprak Altı</u>	<u>P.eterli Ekst. miktarı</u>	<u>MeOH Ekst. miktarı</u>	<u>MeOH'lu Ekstrede v</u>
<u>A. auricularia</u> Boiss.	800 gr.	6,9 gr	268,1 gr	% 34
<u>A. billardieri</u> Jaub et Spach.	326 gr	3,2 gr	54,5 gr	% 16,7
<u>A. bodamae</u> Dingler.	750 gr.	5,7 gr	144,5 gr	% 20
<u>A. bottae</u> Jaub et Spach.	4 gr	-	-	-
<u>A. clematitis</u> L.	380 gr.	5 gr	66,9 gr	% 17
<u>A. cilicica</u> Davis et Khan	800 gr	3,1 gr	175,4 gr	% 21,8
<u>A. guichardii</u> Davis et Khan	1080 gr.	12,7 gr	179 gr	% 16,5
<u>A. hirta</u> L.	915 gr.	11,9 gr	128 gr	% 13,9
<u>A. incisa</u> Duchartre	95 gr.	0,8 gr	24,1 gr	% 25,3
<u>A. lycica</u> Davis et Khan	460 gr.	9,2 gr	81,5 gr	% 17,7
<u>A. krausei</u> P.H.Davis	120 gr	5,5 gr	24 gr	% 20
<u>A. maurorum</u> L.	1000 gr.	5,5 gr	231,5 gr	% 23,1
<u>A. pallida</u> Willd	200 gr	1,6 gr	57 gr	% 28,3
<u>A. parvifolia</u> Sm.	150 gr	2,1 gr	38 gr	% 25,3
<u>A. polluninii</u> Davis et Khan	500 gr	9 gr	86 gr	% 17,2
<u>A. pontica</u> Lam	650 gr	1,3 gr	161,3 gr	% 25,7
<u>A. stenosphon</u> Davis et Khan	290 gr	11,2 gr	39 gr	% 13,9

II.5. BİTKİLERDE ARİSTOLOHİK ASİT MİKTARININ TAYİNİ

II.5.1. SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM

II.5.1.a. Materyal

Kimyasal çalışmalarda kullanılan materyaller Botanik bölümde (s.7-15) belirtilen yörelerden toplanan bitki örneklerinden oluşmuştur. Toplanan türlerin toprak altı kısımları kurutularak toz haline getirilmiştir.

II.5.1.b. Ekstraksiyon ve Örneğin Hazırlanışı

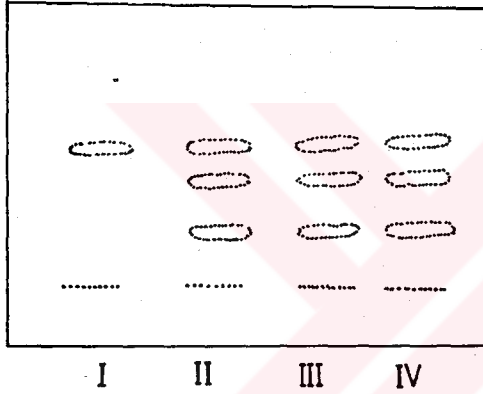
Tüm Aristolochia türleri Bölüm II.3'de belirtilen şekilde Metanol ile ekstre edildi. Her türün ekstresinden bir gram alınarak, her biri 10 ml suda çözülüp pH 3 olana kadar % 3'lük hidroklorik asit ile asitlendirildi. Daha sonra son organik fazlar renksiz olana kadar yeter miktarda kloroform ile (Dragendorff reaktifiyle kontrol edilerek) ekstre edildi. Birleştirilen kloroformlu ekstreler susuz sodyum sülfat üzerinden geçirilerek döner buharlaştırıcıda kuruluğa kadar yoğunlaştırıldıktan sonra bakiye Metanol'de çözüldü.

II.5.1.c. Kromatografik Ayırma

Kieselgel 60 HF₂₅₄ (Merck 7739) adsorbantı, 15 x 15 cm boyutlarındaki cam plaklara 0.5 mm. kalınlığında yayılarak oda sıcaklığında kurutulduktan sonra, etüvde 110°C'de bir saat tutularak aktive edildi.

Her bir metanollü ekstreden 20 µl, 40 µl, 60 µl alınarak üç ayrı plağa çizgi şeklinde uygulandı. Plağın bir kenarına şahit Aristolohik asit numunesi de tatbik edildi. Plaklar, içinde çözücü sistem (v) bulunan ve çeperleri süzgeç kağıdı ile kaplanarak doyurulmuş kromatografi tanklarına konuldu. Developman sonunda tanktan çıkarılan plak

havada kurutulduktan sonra aynı çözücü sisteminde bir kez daha developpe edildi. Ayrılma işlemi tamamlandıktan sonra plak hava akımında kurutulup UV lambası altında 254 nm'de şahit Aristolohik asit ile kontrol edilerek ($R_f = 0.48$) bantların yerleri etrafları çizilerek belirlendi (Şekil 8). Plaktan ayrı ayrı kazınan bantlar 10 ml. metanolle süspansiyon haline getirildi, cam filtreden süzüldükten sonra 10 ml. metanol ile yıkandı. Süzüntüler birleştirilerek döner buharlaştırıcıda kuruluğa kadar yoğunlaştırıldı



Şekil 8

I. Şahit Aristolohik asit

II, III, IV Tayin edilecek Aristolohik asit ekstraları,
(20 µl, 40 µl, 60 µl)

Örnekler uygun miktarda metanolde çözülerek 20 µl, 40 µl, 60 µl'lik örneklerin her birinin ayrı ayrı absorbans değerleri ölçüldü.

Standart Doğrunun Çizilmesi

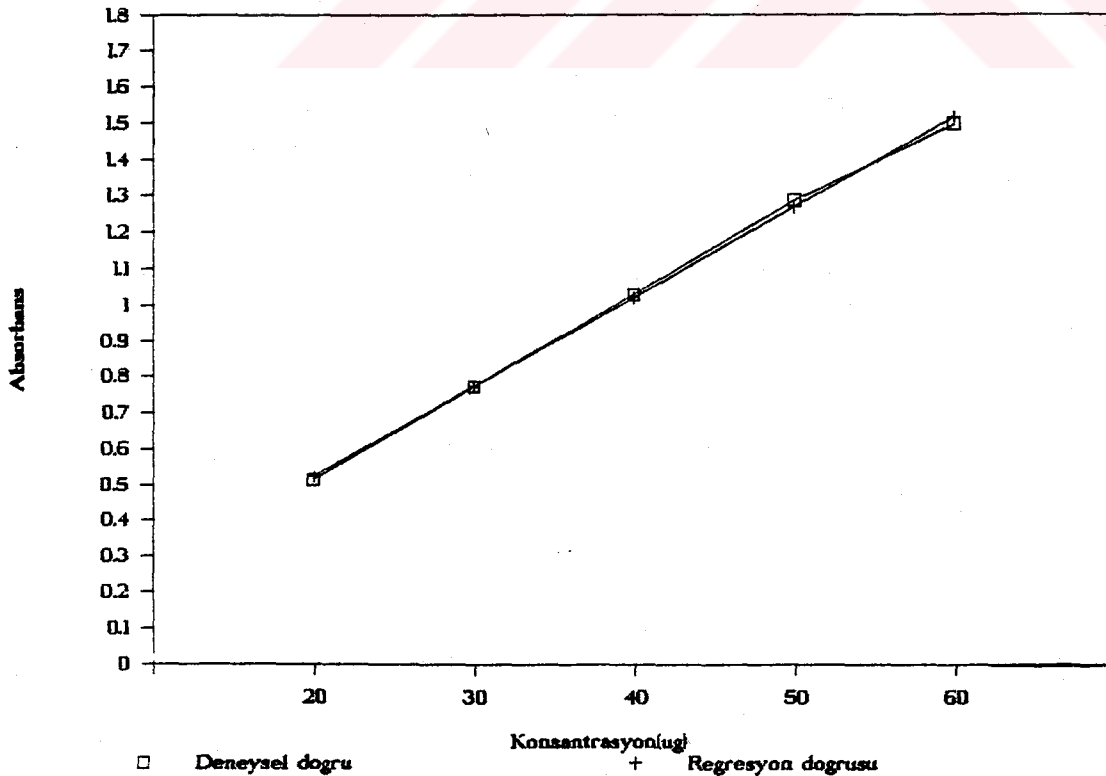
Şahit Aristolohik asit'den 10 mg alınarak 10 ml. Metanolde çözüldü. Konsantrasyonu 1 mg/ml olan bu çözeltiden alınan 20, 30, 40, 50, 60 µl'lik kısımlar, 3 ayrı plağa çizgi şeklinde uygulandı. (Plaklar; Kieselgel 60 HF₂₅₄ 15 x 20 cm Merck 7739). Çözücü sistemi (v) de iki kez developpe edilen plaklardaki bantlar, ayrı ayrı kazındı, ($R_f = 0.48$), 10 ml. Metanolde çözüldü. Cam filtreden süzüldü. Bakiye tekrar 10 ml metanol ile yıkandı, süzüldü. Süzüntüler birleştirildi. Döner buharlaştırıcıda kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Belli hacimde Metanol ilave edilerek, absorbans değerleri ölçüldü.

20, 30, 40, 50, 60 µl çözelti (1 µg/µl) uygulanarak elde edilen ürünlerin içerisinde bulunan etken madde miktarlarına göre okunan absorbans değerleri Tablo VIII'de verilmiştir.

TABLO VIII

Aristolohik asit (µg)	Absorbans
20	0.516
30	0.773
40	1.030
50	1.288
60	1.499

Ölçülen absorbans değerleri, konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek standart doğru çizilmiştir (Şekil 9).



Şekil 9: Aristolohik asit'in kalibrasyon doğrusu

Aristolohik Asit Miktarının Hesaplanması

Tablo VIII değerleri kullanılarak, en küçük kareler yöntemi ile standart doğrunun denklemi bulunmuştur.

Standart doğru $y=mx + b$ şeklinde olduğuna göre, eğimi veren "m" ve kesimi veren "b" ifadeleri,

$$m = \frac{\sum (C_i - \bar{C}_i) (R_a - \bar{R}_a)}{\sum (C_i - \bar{C}_i)^2}$$

$b = \bar{R}_a - m (\bar{C}_i)$ denklemlerinden hesaplanmıştır.

Burada;

C_i = Tekrarlanan her deney için konsantrasyon

R_a = Aletten okunan değer (Burada absorbens değerleri)

$\bar{C}_i$ = Konsantrasyonların ortalaması

$\bar{R}_a$ = Aletten okunan değerlerin ortalaması

Buradan bulunan standart doğru ifadesi

$$y = 0.02481 x + 0.0276 \text{ dır.}$$

x = Konsantrasyon

y = Absorbans değeri

Noktaların birbirleri ile ilişkisini veren korelasyon katsayısı 0.9993 dür.

II.5.1.d. Spektrofotometrik Miktar Tayini

Preparatif İ.T.K. de ayrılan Aristolohik asitin spektrofotometrede gösterdiği absorbens değerlerinden, standart doğru yardımı ile yüzde miktarlarına geçildi.

Her tür üzerinde en az 3 defa yapılan spektrofotometrik miktar tayini sonunda elde edilen sonuçlar aşağıda gösterilmiştir.

A. auricularia Boiss

Plağa tatbik edilmeden önce 20 ml. MeOH'de çözüldü.

Plağa uygulanan miktar(ul)	Okunan Absorbans	1 gr ekstrede Bulunan A.A.(mg)
20	0.563	21.58
40	1.114	21.89
60	1.639	21.65

1 gr. ekstredeki ortalama Aristolohik asit miktarı: 21.7 mg

100 gr toz drogdaki Aristolohik asit miktarı : 0.727 gr

Standart sapma : 0.16

Varyans : 0.026

A.billardieri Jaub et Spach

Plağa tatbik edilmeden önce 10 ml. MeOH'de çözüldü.

Plağa uygulanan miktar (ul)	Okunan Absorbans	1 gr ekstrede bulunan A.A. (mg)
20	0.239	4.26
40	0.460	4.36
60	0.675	4.35

1 gr ekstredeki ortalama Aristolohik asit miktarı: 4.33 mg

100 gr. toz drogdaki Aristolohik asit miktarı : 0.072 gr

Standart sapma : 0.056

Varyans : 0.0031

A.bodamae Dingler

Plağa tatbik edilmeden önce 20 ml MeOH'de çözüldü.

Plağa uygulanan miktar (µl)	Okunan Absorbans	1 gr ekstrede bulunan A.A. (mg)
20	0.336	12.43
40	0.663	12.80
60	0.974	12.72

1 gr ekstredeki ortalama Aristolohik asit miktarı: 12.65 mg

100 gr. toz drogdaki Aristolohik asit miktarı : 0.248 gr.

Standart sapma: 0.195

Varyans : 0.038

A. clematitidis L.

Plağa tatbik edilmeden önce 20 ml. MeOH'de çözüldü.

Plağa uygulanan miktar (µl)	Okunan Absorbans	1 gr. ekstrede bulunan A.A. (mg)
20	0.445	16.82
40	0.886	17.30
60	1.296	17.04

1 gr. ekstredeki ortalama Aristolohik asit miktarı: 17.05 mg

100 gr. toz drogdaki Aristolohik asit miktarı : 0.302 gr.

Standart sapma: 0.24

Varyans : 0.058

A.cilicica Davis et Khan

Plağa tatbik edilmeden önce 10 ml MeOH'de çözüldü.

Plağa uygulanan miktar (µl)	Okunan Absorbans	1 gr. ekstrede bulunan A.A. (mg)
20	0.559	10.71
40	1.107	10.88
60	1.632	10.78

1 gr ekstredeki ortalama Aristolohik asit miktarı: 10.79 mg

100 gr. toz drogdaki Aristolohik asit miktarı : 0.236

Standart sapma: 0.085

Varyans : 0.0072

A.quichardii Davis et Khan

Plağa tatbik edilmeden önce 10 ml. MeOH'de çözüldü.

Plağa uygulanan miktar(µl)	Okunan Absorbans	1 gr. ekstrede bulunan A.A. (mg)
20	0.652	12.58
40	1.294	12.76
60	1.894	12.54

1 gr. ekstredeki ortalama Aristolohik asit miktarı: 12.63 mg

100 gr. toz drogdaki Aristolohik asit miktarı : 0.208 gr.

Standart sapma: 0.117

Varyans : 0. 014

A.hirta L.

Plağa tatbik edilmeden önce 10 ml. MeOH'de çözüldü.

Plağa uygulanan miktar (µl)	Okunan Absorbans	1 gr. ekstrede bulunan A.A. (mg)
20	0.390	7.3
40	0.768	7.5
60	1.136	7.45

1 gr. ekstredeki ortalama Aristolohik asit miktarı: 7.42 mg.

100 gr.toz drogdaki Aristolohik asit miktarı : 0. 104 gr.

Standart sapma: 0.1

Varyans : 0.01

A.incisa Duchartre

Plağa tatbik edilmeden önce 10 ml. MeOH'de çözüldü.

Plağa uygulanan miktar (µl)	Okunan Absorbans	1 gr. ekstrede bulunan A.A. (mg)
20	0.576	11.05
40	1.107	10.88
60	1.636	10.80

1 gr. ekstredeki ortalama Aristolohik asit miktarı: 10.9 mg

100 gr. toz drogdaki Aristolohik asit miktarı : 0.193 gr.

Standart sapma: 0.128

Varyans : 0.0163

A.lycica Davis et Khan

Plağa tatbit edilmeden önce 10 ml. MeOH'de çözöldü.

Plağa uygulanan miktar (µl)	Okunan Absorbans	1 gr. ekstrede Bulunan A.A. (mg)
20	0.416	7.83
40	0.825	8.04
60	1.229	8.07

1 gr. ekstredeki ortalama Aristolohik asit miktarı : 7.98 mg

100 gr. toz drogdaki Aristolohik asit miktarı : 0.113 gr.

Standart sapma: 0. 13

Varyans : 0.017

A.krausei P.H. Khan

Plağa tatbik edilmeden önce 10 ml MeOH'de çözöldü.

Plağa uygulanan miktar(µl)	Okunan Absorbans	1 gr. ekstrede bulunan A.A. (mg)
20	0.300	5.5
40	0.574	5.5
60	0.882	5.7

1 gr. ekstredeki ortalama Aristolohik asit miktarı: 5.57 mg.

100 gr. toz drogdaki Aristolohik asit miktarı : 0.112 gr.

Standart sapma: 0.116

Varyans : 0.0135

A.maurorum L.

Plağa tatbik edilmeden önce 10 ml. MeOH'de çözöldü.

Plağa uygulanan miktar (µl)	Okunan Absorbans	1 gr. ekstrede bulunan A.A. (mg)
20	0.503	9.58
40	0.978	9.57
60	1.460	9.6

1 gr. ekstredeki ortalama Aristolohik asit miktarı: 9.58 mg.

100 gr. toz drogdaki Aristolohik asit miktarı : 0.222 gr.

Standart sapma: 0.016

Varyans : 0.00025

A.pallida Willd.

Plağa tatbik edilmeden önce 10 ml. MeOH'de çözöldü.

Plağa uygulanan miktar (µl)	Okunan Absorbans	1 gr. ekstrede bulunan A.A. (mg)
20	0.310	5.70
40	0.606	5.80
60	0.906	5.90

1 gr. ekstredeki ortalama Aristolohik asit miktarı: 5.80 mg.

100 gr. toz drogdaki Aristolohik asit miktarı : 0.166 gr.

Standart sapma: 0.1

Varyans : 0.01

A.parvifolia Sm.

Plağa tatbik edilmeden önce 20 ml. MeOH'de çözüldü.

Plağa uygulanan miktar (µl)	Okunan Absorbans	1 gr. ekstrede bulunan A.A. (mg)
20	0.343	12.71
40	0.688	13.31
60	1.008	13.17

1 gr. ekstredeki ortalama Aristolohik asit miktarı: 13.06 mg.

100 gr. toz drogdaki Aristolohik asit miktarı : 0.338 gr.

Standart sapma: 0.314

Varyans : 0.098

A.polluninii Davis et Khan.

Plağa tatbik edilmeden önce 10 ml MeOH'de çözüldü.

Plağa uygulanan miktar (µl)	Okunan Absorbans	1 gr. ekstrede bulunan A.A. (mg)
20	0.282	5.13
40	0.554	5.30
60	0.862	5.60

1 gr. ekstredeki ortalama Aristolohik asit miktarı: 5.34 mg.

100 gr. toz drogdaki Aristolohik asit miktarı : 0.092 gr.

Standart sapma: 0.24

Varyans : 0.057

A.pontica Lam.

Plağa tatbik edilmeden önce 10 ml. MeOH'de çözüldü.

Plağa uygulanan miktar (µl)	Okunan Absorbans	1 gr. ekstrede bulunan A.A. (mg)
20	0.581	11.15
40	1.081	10.62
60	1.667	11.0

1 gr. ekstrede bulunan ortalama Aristolohik asit miktarı: 10.92 mg.

100 gr. toz drogdaki Aristolohik asit miktarı : 0.291 gr.

Standart sapma: 0.29

Varyans : 0.075

A.stenosiphon Davis et Khan

Plağa tatbik edilmeden önce 10 ml. MeOH'de çözüldü.

Plağa uygulanan miktar (µl)	Okunan Absorbans	1 gr. ekstrede bulunan A.A. (mg)
20	0.416	7.83
40	0.808	7.86
60	1.244	8.17

1 gr. ekstrede bulunan ortalama Aristolohik asit miktarı: 7.95 mg.

100 gr. toz drogdaki Aristolohik asit miktarı : 0.107 gr.

Standart sapma: 0.19

Varyans : 0.035

II.5.2. YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFISI YÖNTEMİ

II.5.2.a. Materyal

Daha önce Botanik bölümde (s.7-15) belirtilen yörelerden toplanan bitki örneklerinden oluşmuştur.

II.5.2.b. Ekstraksiyon ve Örneğin Hazırlanışı

1 gr. civarında tam tartılmış ham ekstreden Bölüm II.5.1.b. de anlatıldığı şekilde hazırlanmış örnekler 50 ml. Metanol'de çözüldü.

Ultrasonik banyoda çözünme tam olarak gerçekleştiğinden süzmeye gerek kalmadı. Her ekstreden 5 defa 20 µl enjekte edildi.

II.5.2.c. Kromatografik Ayırma

1) Aletin Özellikleri

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Yönteminde, Waters Liquid Chromatograph aletinden yararlanıldı. Kullanılan alete ait özellikler aşağıda verilmiştir:

Pompa: Model 6000 A

Enjektör: Model U6K Universal Injector

Kolon: µBondapak C₁₈

Kolon boyutları: 30 x 3.9; partikül büyüklüğü 10 µm

Kaydedici: YEW Model 3021 Pen Recorder.

2) Çalışma Koşulları

Çalışmada kullanılan su, cam distilasyon aletinden distillendi. Çözücü sistemi (Mobil faz), kullanılmadan önce ultrasonik banyoda degaze edilip Waters Solvent Clarification Kit yardımı ile Millipore filtreden süzüldü ve çalışma esnasında manyetik karıştırıcı ile

devamlı karıştırılarak kullanıldı. (Filtre HAWP 047000-HA 0.45 m)

Çözücü sistem: Metanol, Distile su, saf Asetik asit (65:34:1)

Kolon: μ Bondapak C_{18}

Çözücü akış hızı: 2 ml/min.

Kağıt yürüme hızı: 1 cm/min.

Dedektör dalga boyu: 280 nm.

Dedektör duyarlılığı: $\times 0.5 \times$

Spiral (Loop) hacmi: 20 μ l

3) Hesaplamalar

Pik alanları, pik yüksekliği ile, yarı yükseklikteki genişliğin çarpılmasıyla bulundu. Aristolochia türlerindeki, Aristolohik asit miktarları ise, saf maddenin konsantrasyonları belli, bir seri çözeltisi kullanılarak, pik alanlarına karşı, Aristolohik asit konsantrasyonlarının grafiğe geçirilmesiyle hazırlanan bir standart doğru yardımı ile hesaplandı.

4) Standart Doğrunun Çizilmesi

Sigma firmasından sağlanan saf Aristolohik asitten 10 mg. tartılarak, Metanol ile 10 ml'lik çözeltisi hazırlandı, ultrasonik banyo yardımı ile çözüldü. Bu çözeltiden 5 ml. alınarak, metanol ile 10 ml'ye seyreltildi. Bu çözeltiden, seyreltme yoluyla bir seri çözelti hazırlandı. Her bir çözeltiden 20 μ l enjekte edilerek, pik alanları ölçüldü ve kalibrasyon doğrusu çizildi (Şekil 10).

Tablo IX'da, standart madde konsantrasyonları, karşı gelen pik alanları ve madde miktarları verilmiştir.

TABLO IX

Dedektör Duyarlılığı: 0.5 Aufs.

Stok çözelti (5 mg/10 ml)	C (mg/ml)	s (cm ²)	Madde miktarı (µg/20 µl)
1000 µl	0.50	5.85	10
900	0.45	5.565	9
800	0.40	4.95	8
700	0.35	4.375	7
600	0.30	3.864	6
500	0.25	3.39	5
400	0.20	2.68	4
300	0.15	2.045	3
200	0.10	1.42	2
100	0.05	0.78	1
50	0.025	0.54	0.5

Tablo IX değerleri kullanılarak, en küçük kareler yöntemi ile standart doğrunun denklemi bulunmuştur:

$$y = mx + b$$

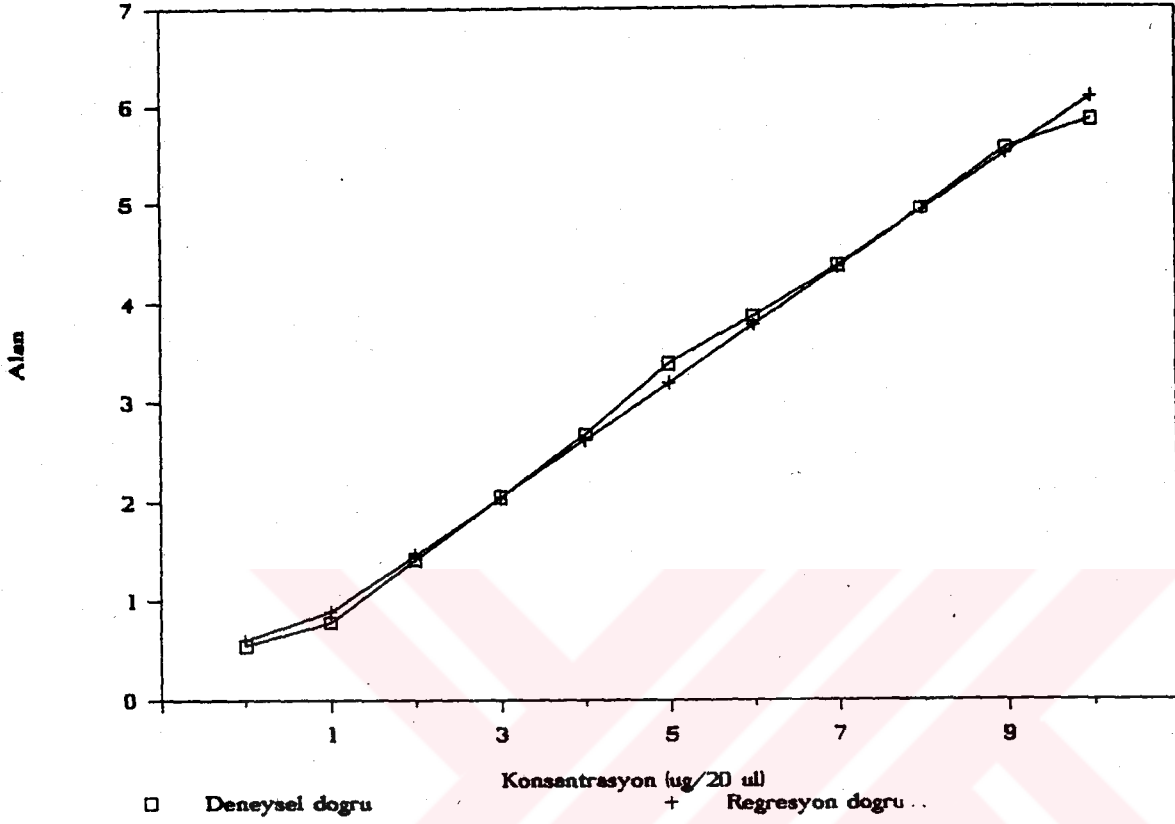
$$y = \text{Alan (cm}^2\text{)}$$

$$x = \text{Konsantrasyon}$$

$$m = 0.577$$

$$b = 0.309$$

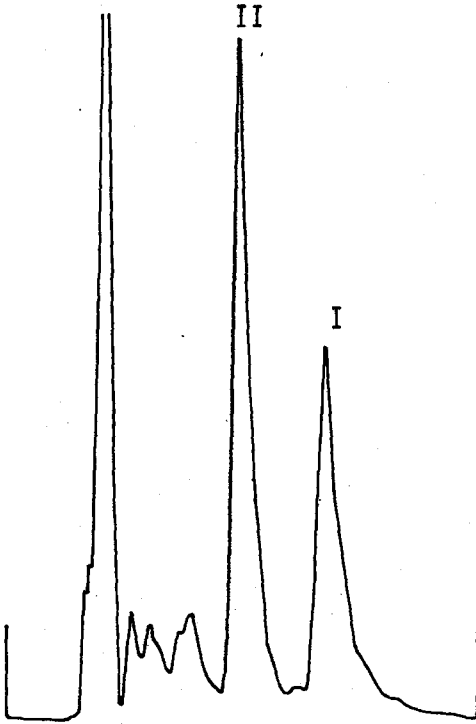
$$\text{Korelasyon katsayısı: } 0.998$$



Şekil 10: Aristolohik asit'in kalibrasyon doğrusu.

II.5.2.d. Sonuçlar ve Kromatogramlar

Her tür için 5 uygulama yapılmış, Aristolohik asit I ve II'ye tekabül eden piklerin toplam alanı alınmış ve standart doğru yardımı ile Aristolohik asit miktarları hesaplanmıştır.



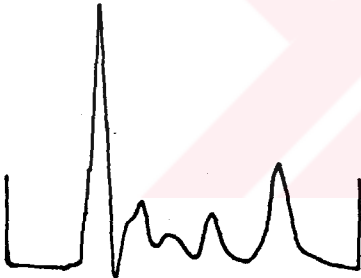
A.auricularia Boiss.

Ortalama alan : 5.394 cm²

1 gr. ekstrede bulunan
A.A. miktarı : 22.01 mg

Standart sapma : 0.33

Varyans : 0.109



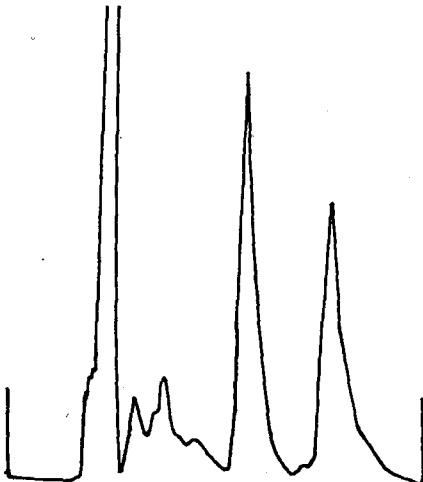
A.billardieri Jaub et. Spach

Ortalama alan : 1.1475 cm²

1 gr. ekstrede bulunan
A.A. miktarı : 3.6 mg

Standart sapma : 0.0071

Varyans : 0.00005



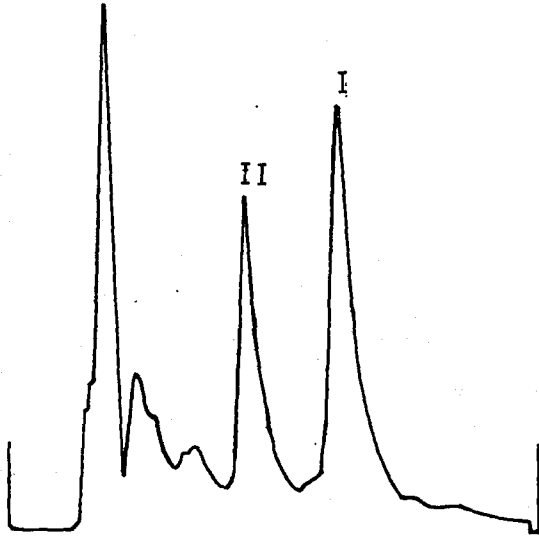
A.bodamae Dingler

Ortalama alan : 3.344 cm²

1 gr. ekstrede bulunan
A.A. miktarı : 13.1 mg

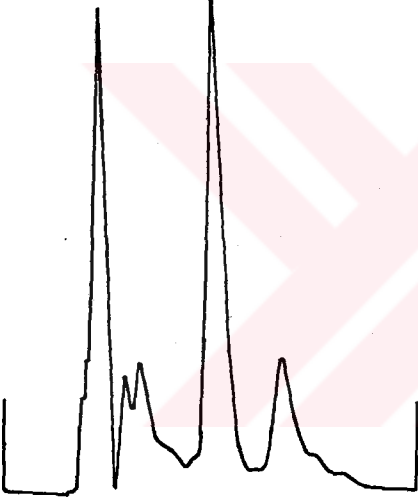
Standart sapma : 0.0074

Varyans : 0.000055



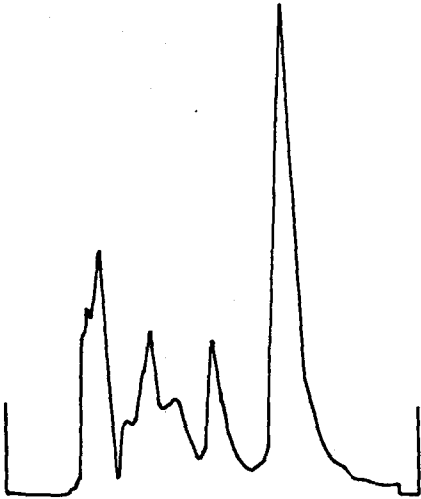
A.clematitidis L.

Ortalama alan : 4.452 cm²
1 gr. ekstrede bulunan
A.A. miktarı : 17.9 mg
Standart sapma : 1.27
Varyans : 1.74



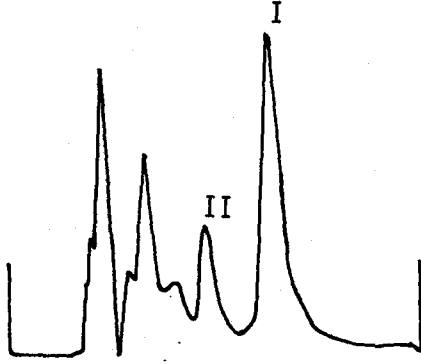
A.cilicica Davis et Khan

Ortalama alan : 2.856 cm²
1 gr. ekstrede bulunan
A.A. miktarı : 11.0 mg
Standart sapma : 0.25
Varyans : 0.063



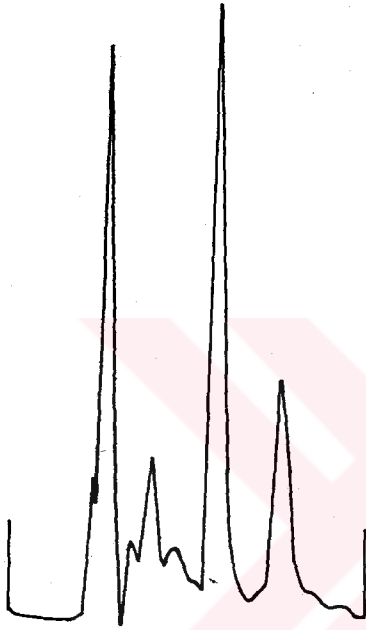
A.guichardii Davis et Khan

Ortalama alan : 3.292 cm²
1 gr. ekstrede bulunan
A.A. miktarı : 12.9 mg
Standart sapma : 0.156
Varyans : 0.024



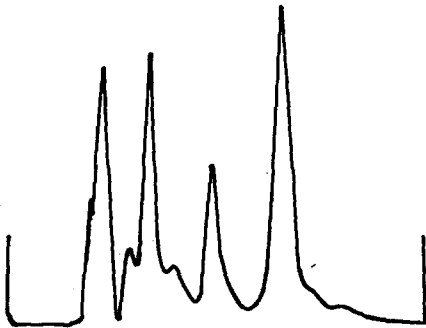
A.hirta L.

Ortalama alan : 2.023 cm²
1 gr. ekstrede bulunan
A.A. miktarı : 7.42 mg
Standart sapma : 0.016
Varyans : 0.00025



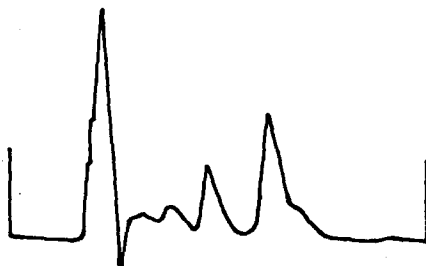
A.incisa Duchartre

Ortalama alan : 3.06 cm²
1 gr ekstrede bulunan
A.A. miktarı : 11.9 mg
Standart sapma : 0.08
Varyans : 0.0064



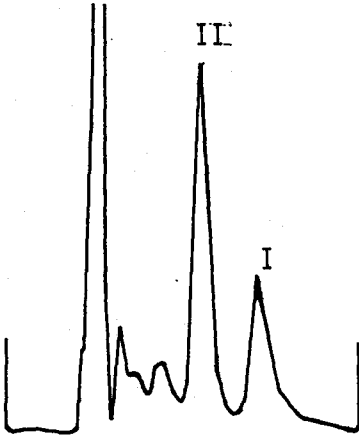
A.lycica Davis et Khan

Ortalama alan : 1.344 cm²
1 gr. ekstrede bulunan
A.A. miktarı : 7.08 mg
Standart sapma : 0.42
Varyans : 0.17



A.krausei P.H. Khan

Ortalama alan : 1.348 cm²
1 gr ekstrede bulunan
A.A. miktarı : 4.501 mg
Standart sapma : 0.52
Varyans : 0.27



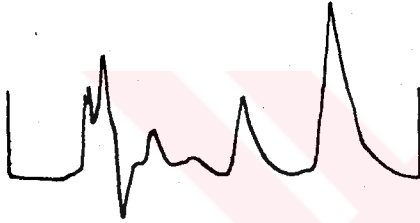
A.maurorum L.

Ortalama alan : 2.423 cm²

1 gr ekstrede bulunan
A.A. miktarı : 9.159 mg

Standart sapma : 0.52

Varyans : 0.27



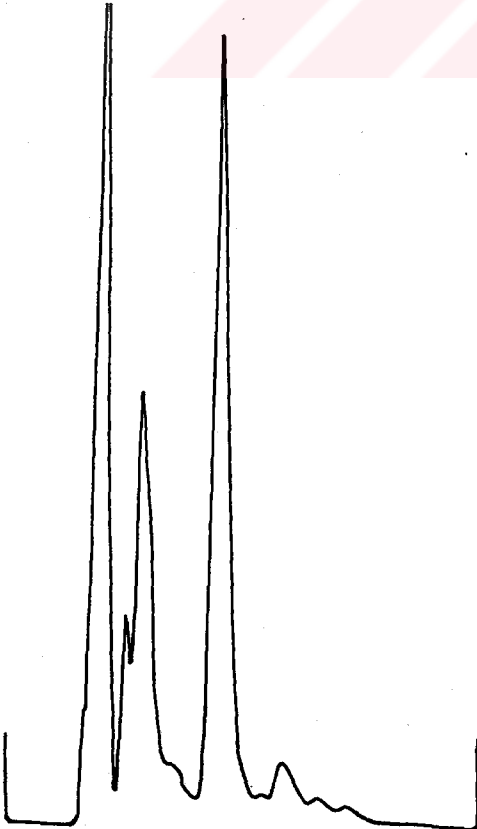
A.pallida Willd

Ortalama alan : 1.667 cm²

1 gr ekstrede bulunan
A.A. miktarı : 5.88 mg

Standart sapma : 0.38

Varyans : 0.14



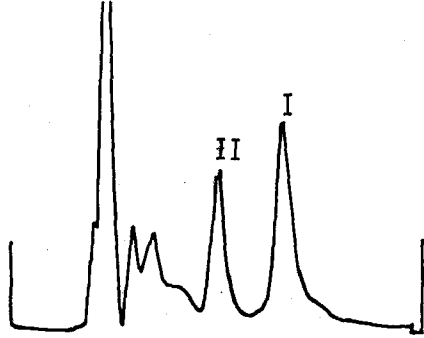
A.parvifolia Sm.

Ortalama alan : 3.413 cm²

1 gr ekstrede bulunan
A.A. miktarı : 13.4 mg

Standart sapma : 0.89

Varyans : 0.79



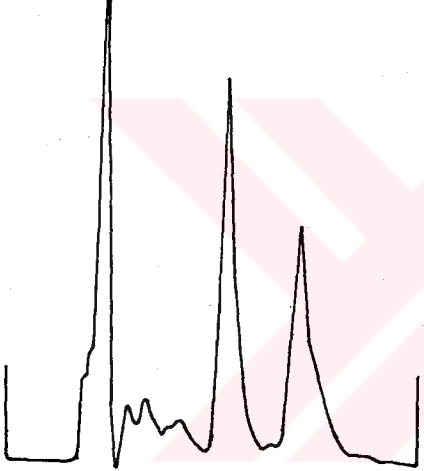
A. polluninii Davis et Khan

Ortalama alan : 1.617 cm²

1 gr ekstrede bulunan
A.A. miktarı : 5.67 mg

Standart sapma : 0.35

Varyans : 0.126



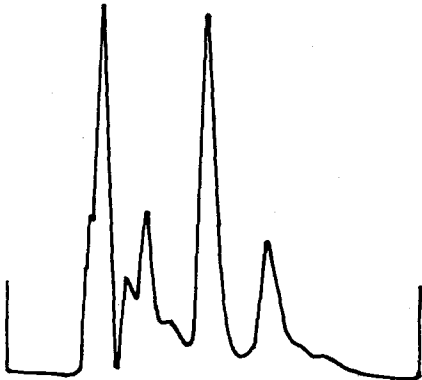
A. pontica Lam.

Ortalama alan : 2.759 cm²

1 gr ekstrede bulunan
A.A. miktarı : 10.6 mg

Standart sapma : 0.52

Varyans : 0.27



A. stenosphon Davis et Khan

Ortalama alan : 2.125 cm²

1 gr ekstrede bulunan
A.A. miktarı : 7.86 mg

Standart sapma : 0.048

Varyans : 0.0023

II.6. A. MAURORUM L.'NİN METANOLLO EKSTRESİNİN İNCELENMESİ

II.6.1. MATERYAL

A.maurorum L. bitkisi, 27 Mayıs 1983 tarihinde Eskişehir'in Bozdağ mevkiinde Sarıcakaya şosesinin 20.km'sinden toplandı. Kökleri toprak üstü kısımlarından ayrılarak temizlendi, açık havada kurutulup toz edildi.

II.6.2. BİTKİNİN EKSTRAKSİYONU VE FRAKSİYONLANMASI

Bölüm II.3'de belirtildiği şekilde yapılan ekstraksiyon sonunda elde edilen metanol'lü ekstreden 200 gr. alındı, ekstre su ile süspansiyon haline getirildi, ayırma hunisinde kloroform ile ekstre edildi (5 x 250 ml). Birleştirilen kloroformlu ekstreler, susuz sodyum sülfat üzerinden geçirildikten sonra, döner buharlaştırıcıda çözücü uzaklaştırıldı. Kloroformda çözünen kısım tartıldı (10.3 gr) (M18A). Sulu faz kuaterner alkaloitlerin aranması için ayrıldı.

Kloroformlu kısım % 25 amonyum hidroksit ilavesiyle bazikleştirildikten (pH 9) sonra eterle ekstre edildi (7 x 200 ml). Birleştirilen eterli fazlar, susuz sodyum sülfat üzerinden geçirildikten sonra çözücü kısmın döner buharlaştırıcıda uçurulmasıyla Eterli Faz I (3.9 gr) elde edildi.

Bazik sulu fazın eterle ekstraksiyonu sırasında oluşan sarı renkli çökelti (5.3 gr) süzgeç kağıdından süzülerek ayrıldı (M19A).

Bazik sulu faz, hidroklorik asit ilavesiyle asitlendirildi (pH 3) ve eterle (5 x 200 ml) yeniden ekstre edildi. Eterli fazlar birleştirildi, susuz sodyum sülfattan geçirilerek kurutulduktan ve çözücü, döner buharlaştırıcıda uçurulduktan sonra Eterli Faz II (1.7 gr) elde edildi. Kalan sulu kısım alkaloitler için "Mayer reaktifi" ile olumlu

sonuç verdi (M19C).

Analiz şeması Şekil 11'de verilmiştir.

Eterli Faz I (3.9 gr) eterde çözülüp % 10 sodyum bikarbonat ile ekstre edildi. Eterli kısım süzülerek döner buharlaştırıcıda kurutuldu. (2.2 gr), [non-Asidik fraksiyon I (M19E)]. Sodyum bikarbonatlı kısım hidroklorik asit ile asitlendirildi (pH 2). Asitli kısım kloroform ile ekstre edildi (3 x 50 ml). Kloroformlu kısımlar sodyum sülfattan geçirildikten sonra döner buharlaştırıcıda kurutuldu (0.13 gr) [Asidik fraksiyon I (M20B)].

Eterli Faz II (1.7 gr), eterde çözülüp % 10 sodyum bikarbonat ile ekstre edildi. Eterli kısım süzülerek döner buharlaştırıcıda kurutuldu (0.3 gr), [non-Asidik fraksiyon II (M20C)]. Sodyum bikarbonatlı kısım hidroklorik asit ile asitlendirildi (pH 2). Asitli kısım kloroform ile ekstre edildi (5 x 50 ml). Kloroformlu kısımlar sodyum sülfattan geçirildikten sonra döner buharlaştırıcıda kurutuldu (0.9 gr) [Asidik fraksiyon II (M21A)]. Eterli Faz I ve Eterli Faz II'de ki asit ve asit olmayan bileşikleri ayırmak için yapılan işlemler Şekil 12'de gösterilmiştir.

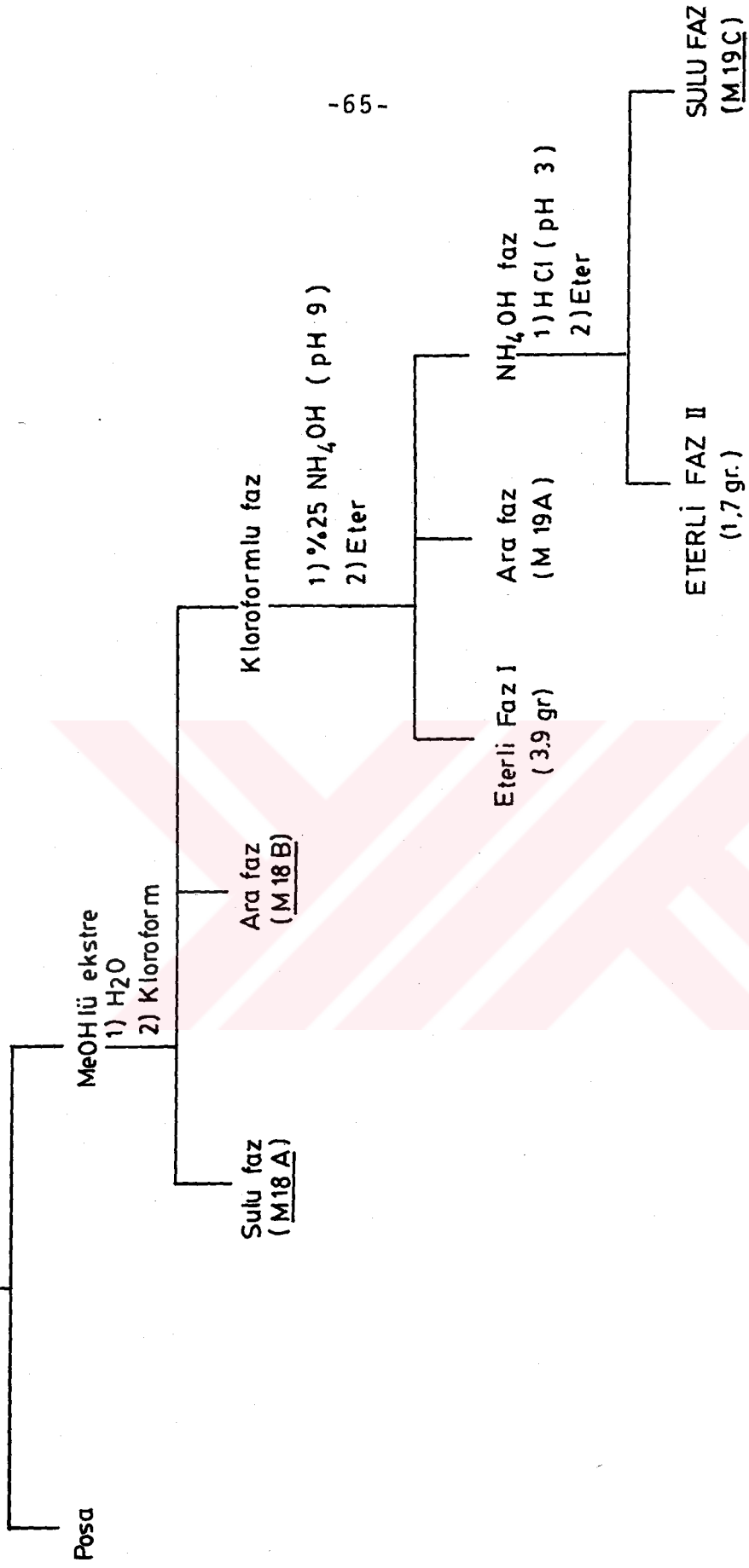
II.6.2.a. Non-Asidik Fraksiyonların İncelenmesi

Non-asidik fraksiyon I ve non-asidik fraksiyon II İTK'de çeşitli sistemlerde kontrol edildi ve birleştirildi (2.5 gr).

Non-Asidik fraksiyonların ayrıştırılması:

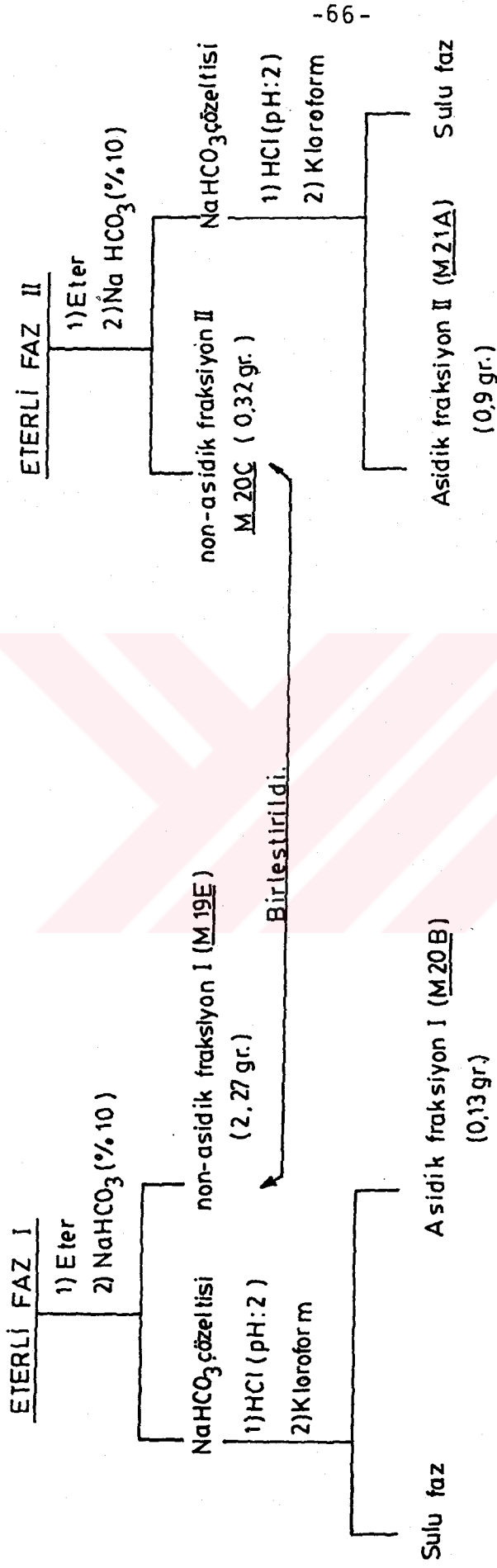
Kloroformla süspansiyon haline getirilmiş 200 gr. Kieselgel 60, cam sütuna konuldu. 2.5 gr. ekstre kloroformda çözülüp bir miktar Kieselgel 60 ile karıştırıldıktan sonra sütuna tatbik edildi ve klo-

NUMUNE



-65-

Şekil 17: A. maurorum L.'nin analiz şeması.



Şekil 12: Eterli Faz I ve Eterli Faz II'deki asidik ve non-asidik fraksiyonların ayrılması.

roform ile elüsyona başlandı. Çözücü sistemin polaritesi tedricen metanol ilavesiyle artırıldı. 100 ml'lik fraksiyonlar halinde 51 fraksiyon toplandı, İTK ile incelendi ve benzer fraksiyonlar birleştirildi.

<u>Fraksiyonlar</u>	<u>Çözücü sistemi</u>
1 - 4	CHCl_3
5 - 6	CHCl_3
7	CHCl_3
8 - 9	CHCl_3
10 - 11	CHCl_3
12 - 15	CHCl_3 : MeOH (9:1)
16	" "
17 - 18	" "
19	" "
20	" "
21	" "
22	" "
23	" "
24 - 27	" "
28 - 35	CHCl_3 : MeOH (8:2)
36 - 40	" "
41 - 42	CHCl_3 : MeOH (1:1)
43 - 51	MeOH

- 1 - 4 Bu fraksiyondan M24A (0.52 gr) izole edildi.
- 5 - 6 Bu fraksiyonlar çözücü sistemi (ii) de preparatif İTK ile temizlendi, M26A (0.02 gr) ayrıldı.
- 7 Bu fraksiyon çözücü sistemi (i) de preparatif İTK ile temizlendi. M27A (0.029 gr)
- 10-11 Bu fraksiyonlar çözücü sistemi (i) de preparatif İTK ile temizlendi. 3 bant alındı.
M29A (0.003 gr), M29B (0.001 gr), M29C (0.05 gr)
- 12.15 Bu fraksiyonlar çözücü sistemi (ii) de preparatif İTK ile temizlendi. 3 bant alındı.
M30A (0.0022 gr), M30B (0.01 gr), M30C (0.013 gr)
M29A ile M30A İTK'de çeşitli sistemlerde kontrol edildi. Aynı olduğu görüldü. M31A (0.005 gr)
M29C ile M30C İTK'da çeşitli sistemlerde kontrol edildi, birleştirildi. M31C (0.018 gr)
- 18 Çözücü sistemi (ii) de preparatif İTK ile temizlendi. M33B (0.012 gr)
- 20 Bu fraksiyon (ii) sisteminde preparatif İTK ile temizlendi. M36A (0.014 gr)
- 21-22 Bu fraksiyon (ii) sisteminde preparatif İTK ile temizlendi.
M37A (0.0019 gr), M37B (0.002 gr), M37C (0.0016 gr), M37D(0.0009 gr)
- 23 Bu fraksiyon (ii) sisteminde preparatif İTK ile temizlendi. M38D (0.009 gr)
- 24-40 Bu fraksiyonlar birleştirildi. İTK ile kontrol edildi. Preparatif İTK ile temizlendi.
M41A (0.009 gr), M42A (0.005 gr), M42B (0.013 gr), M42C (0.002 gr)

II.6.2.b. Asidik Fraksiyonların İncelenmesi

1) Asidik Fraksiyon I

Kloroformda çözüldü, çözülmeyen kısım ayrıldı. Çözünen kısım (iv) çözücü sisteminde preparatif İTK ile 3 bant halinde ayrıldı.

M44A (0.003 gr), M44B (0.001 gr), M44C (0.02 gr)

Miktarları az olduğu için incelenmedi.

Çözünmeyen kısım Metanol: DMF karışımı ile çözüldü (3:1) ve kristallendirildi. M43A (0.007 gr).

2. Asidik Fraksiyon II

Kloroformla süspansiyon haline getirilmiş 100 gr. Kieselgel 60, cam sütuna konuldu. 0.9 gr ekstre kloroformda çözülüp bir miktar Kieselgel 60 ile karıştırıldıktan sonra sütuna tatbik edildi ve kloroform ile elüsyona başlandı. 25 ml' lik fraksiyonlar halinde 136 fraksiyon toplandı. İTK ile incelendi ve benzer fraksiyonlar birleştirildi.

Fraksiyonlar

Çözücü Sistemi

1-10	CHCl ₃
11-55	CHCl ₃ : MeOH (95:5)
56-76	CHCl ₃ : MeOH (90:10)
77-114	CHCl ₃ : MeOH (80:10)
115-127	CHCl ₃ : MeOH (1:1)
128-136	MeOH

19-23 Bu fraksiyonlar (iv) sisteminde preparatif İTK ile temizlendi.

M49A (0.009 gr), M49B (0.010), M49C (0.014 gr)

24-29 Kloroform-MeOH karışımında kısmen çözüldü. Çözünmeyen kısım

ayrıldı M50A (0.22416 gr). Çözünen kısım preparatif İTK ile temizlendi.

M50B (0.003 gr), M50C (0.011 gr)

30-35 Preparatif İTK ile (iv) sisteminde temizlendi.

M51A (0.038 gr)

36-70 Preparatif İTK ile (v) sisteminde temizlendi.

M51E (0.012 gr), M51F (0.021 gr), M51G (0.008 gr)

71-79 Preparatif İTK ile (v) sisteminde temizlendi.

M52E (0.005 gr), M52B (0.024 gr)

80-93 Preparatif İTK ile temizlendi.

M53A (0.024 gr), M53B (0.005 gr)

94-136 Preparatif İTK ile temizlendi

M55A (0.020 gr), M55B (0.013 gr)

II.6.2.c. Kuaterner Alkaloidlerin Ayrıştırılması

Sulu faz (M18A) % 2 hidroklorik asitle asitlendirildi (pH 2) ve alkaloidler Mayer reaktifi ile çöktürüldü. 4-5 saat buzdolabında dinlendirilen çökelti süzgeç kağıdından süzüldü. Toplanan çökelti, Aseton: MeOH: Su (6:2:1) karışımında çözüldü ve Amberlite IRA 400 (Cl^-) iyon değiştirici reçine sütunundan geçirildi. Döner buharlaştırıcıda yoğunlaştırıldı. (3.1 gr). Kuaterner alkaloid klorürleri elde edildi. M57A (2,1 gr).

İTK'de (vii), (viii) sisteminde şahit magnoflorinle karşılaştırıldı, aynı Rf değerinde olduğu görüldü.

Sulu faz (M19C), pH kağıdı ile kontrol edildi (pH 2-3). Mayer reaktifiyle alkaloidler çöktürüldü, 4-5 saat buzdolabında dinlendi-

rildi. Çökelti süzgeç kağıdından süzüldü. Toplanan çökelti, Aseton: Metanol: Su (6:2:1) karışımında çözöldü ve Amberlite IRA 400 (Cl⁻) iyon değıştirici reçine sütunundan geçirildi. Döner buharlaştırıcıda yoğunlaştırıldı (0.5 gr). Kuaterner alkaloit klorürleri elde edildi. M58A (0.342 gr).

ITK'de (vii), (viii) sisteminde şahit magnoflorinle aynı Rf değeri-
rinde olduğu göröldü. M58A ve M57A ITK'de çeşitli sistemlerde kontrol edildi. UV lambası altında hem kısa hem de uzun dalga boyunda mavi floresan verdi.

M58A metanolde çözöldü. Çözünmeyen kısım ayrıldı. Çözünen kısım preparatif ITK ile (viii) sisteminde temizlendi. Mavi floresan veren en alttaki bant kazınarak alındı ve elüe edilince M59A'yı verdi, (0.00430 gr).

M59A çeşitli çözücü sistemlerinde (viii, ix, xi, vii, x) kromatografiye tabi tutulduğunda referans magnoflorin ile aynı Rf değerleri elde edildiğinden M59A'nın magnoflorin olduğuna karar verildi. UV ve IR spektral değeri bu sonucu doğruladı.

II.6.2.d. Arafazın Ayrıştırılması

Bazik sulu fazın eterle ekstraksiyonu sırasında oluşan sarı renkli çökelti (5.3 gr), Dragendorff reaktifiyle alkaloit reaksiyon verdi. ITK'de Aristolohik asit ile (iv), (v) sistemlerinde mukayese edildi, aynı Rf değeri-nde oldukları göröldü. Daha sonra yapılan UV, NMR, MS analizlerinde bileşğin Aristolohik asit I ve Aristolohik asit II karışımı olduğü göröldü.

Bu karışım Y.B.S. Kromatografisine de tatbik edildi. Alınan kromatogramda Aristolohik asit II'ye tekabül eden pikin daha yüksek

olduğu gözlemlendi.

M19A'nın kromatogramı Şekil 13'de verilmiştir.



Şekil 13: M19A'nın Kromatogramı

II.6.2.e. İzole Edilen Maddelerin Özellikleri

İzole edilen maddelerden M24A (seskiterpen), M26A (sterol), M27A (sterol), M31C (seskiterpen), M36A (flavonoid)'nin , NMR ve MS analizleri sonucunda alkaloid olmadıkları anlaşıldığından yapıları tayin edilmedi.

M41A, M43A, M50C, M55A'nın ise NMR ve MS analizleri sonucunda Aristolohik asit I ve Aristolohik asit II karışımı oldukları görüldü.

M31A'nın ise, NMR ve MS analizleri sonucunda 4-metoksi-t-sinamik asit olduğu anlaşıldı (Formül Bk. s. 79).

NMR (250 MHz, CDCl₃): δ 3.80 (3H, s, OMe)
6.30 (1H, d, J 15.9 Hz, olefinik H)
6.85 (2H, d, J 8.6 Hz, A₂B₂ sistemi)
7.43 (2H, d, J 8.6 Hz, A₂B₂ sistemi)
7.64 (1H, d, J 15.9 Hz, olefinik H)

Kütle Spektromu (18eV): m/z 178 (M⁺, C₁₀H₁₀O₃) (% 61), 147 (100),
119 (30), 91 (17)

M59A'nın UV, NMR ve MS analizleri sonucunda magnoflorin olduğu görüldü (Formül Bk. s. 24 Şekil 6).

UV (MeOH) : $\lambda_{\max}$ 243, 272, 280, 313 nm

NMR (250 MHz, CD₃OD) : δ 2.65 (3H, s, NMe)
3.15 (3H, s, NMe)
3.71 (3H, s, OMe-2)
3.81 (3H, s, OMe-10)
6.35 (1H, s, H-3)
6.40 (1H, d, J 7Hz, H-8)
6.64 (1H, d, J 7Hz, H-9)

Kütle Spektromu (18eV): m/z 341 (M⁺, C₂₀H₂₄O₄N⁺) (% 4), 339 (2), 296
(2), 284 (2), 283 (2), 282 (1), 165 (1),
58 (100).

II.7. A.MAURORUM L. EKSTRESİNDEN ARİSTOLOHİK ASİT İZOLE EDİLMESİ

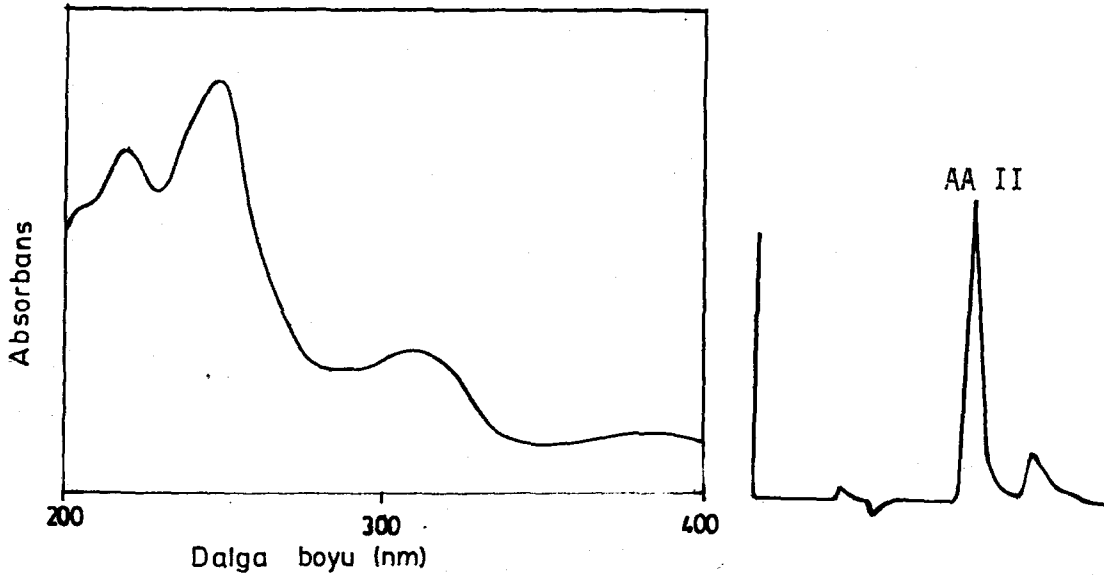
A.maurorum L.'nin metanollü ekstresinden 10 gr. alınarak 15 ml su ve % 15'lik sodyum bikarbonat çözeltisi ilavesiyle su banyosunda ısıtıldı. 0ç kez 70 ml kloroform ile ekstre edilerek, sulu kısım süzgeç kağıdından süzüldü. Berrak koyu kahve renkli çözelti pH 3 olana

kadar asitlendirildi. Ayrılan sarı renkli ham asitler bir gece bekletildikten sonra cam süzgeçten süzüldü. Çökelti su ile yıkanarak kurutuldu. Kurutulan kısım 1/2 saat süreyle 100 ml dioksan ile geri çeviren soğutucu altında kaynatıldı ve süzüldü. Çözünmeyen kısım iki kez daha 50 ml dioksan ile kaynatılarak süzülüp, dioksanlı kısımlar birleştirildi ve yoğunlaştırıldı. Sarı renkli kristaller süzülüp, Dimetil formamid: Metanol (2:5) ile iki kez yeniden kristallendirildi. Böylece sarı renkli, iğnemsiz Aristolohik asit kristalleri elde edildi (0.048 mg).

Ekstreden izole edilip temizlenen maddenin UV, NMR, MS ve Y.B.S. kromatogramları incelendiğinde ana pikin Aristolohik asit II'ye ait olduğu tespit edildi (Formül Bk. s. 20, Şekil 3).

UV (MeOH) : $\lambda_{\max}$ 220, 249, 309, 386 nm

Bu maddenin UV spektrumu ve YBSK kromatogramı Şekil 14'de verilmiştir.



Şekil 14: Aristolohik asit II'nin UV Spektrumu ve YBSK kromatogramı.

NMR (90 MHz, CD₃OD) : δ 6.45 (2H, s, OCH₂O)
7.78 (1H, s, H-2)
7.80-8.30 (3H, m, H-6, H-7, H-8)
8.31 (1H, s, H-9)
9.12 (1H, m, H-5)

Kütle Spektrumu (18eV) : m/z 311 (M⁺, C₁₆H₉O₆N) (% 3), 293(10), 278(6), 267(3), 266(3), 265(9), 264(23), 263(100), 262(5), 237(2), 236(1), 235(4), 209(1), 208(2), 207(4), 180(2), 179(4), 169(7), 164(1), 156(6), 155(2), 154(13), 152(4), 149(2).

II.8. ARISTOLOCHIA TÜRLERİNDEN SAKKAROZ ELDESİ

Bazı Aristolochia türlerinden, Metanollü ekstre soğurken tatlı lezzette kristalize çökeltiler oluştu.

Bu çökeltilerden 25'er mg alındı, suda çözüldü, 2 ml seyreltik sodyum hidroksit çözeltisi ve 3 damla bakır sülfat çözeltisi ilave edildi. Mavi renkli ve berrak çözelti kaynatıldı, sıcak çözeltiye 4 ml seyreltik hidroklorik asit ve 4 ml seyreltik sodyum hidroksit çözeltisi ilave edildi. Meydana gelen portakal rengi, sakkarozun varlığını belirledi.

Sakkaroz içeren Aristolochia türleri ve içerdikleri sakkaroz miktarları Tablo X'da verilmiştir.

TABLO X

İsim	Toz drog miktarı (gr)	Sakkaroz miktarı (gr)	Yerim (%)
<u>A.lycica</u> Davis et Khan	460	30	6.5
<u>A.stenosiphon</u> Davis et Khan	290	15	5.2
<u>A.guichardii</u> Davis et Khan	1080	40	3.7
<u>A.krausei</u> P.H. Davis	120	4	3.3
<u>A.cilicica</u> Davis et Khan	800	9	1.1
<u>A.pollüninii</u> Davis et Khan	500	1	0.2

III. BÖLÜM

SONUÇ VE TARTIŞMA

Türkiye'de 23 türü bulunan ve bunlardan 11'i endemik olan Aristolochia türleri üzerinde ülkemizde bugüne kadar hiç bir bilimsel araştırma yapılmamıştır. Halbuki, bilhassa ABD, Batı Almanya, Hindistan, Arjantin ve Çin Halk Cumhuriyeti gibi ülkelerde, Aristolochia türleri üzerinde kimyasal ve farmakolojik araştırmalar, yıllardır sürdürülmektedir. Halk arasında çocuk düşürücü olarak ve akrep sokmalarında da kullanılan bu bitkinin antiimplantasyon ve immunostimulan etkilerinin tesbiti ile halk arasındaki kullanımının haklılığı ortaya çıkarılmış, yoğunluk kazanan araştırmalar sonucunda da, bu etkilerin, terkininde bulunan Aristolohik asitten kaynaklandığı saptanmıştır (79, 104).

Aristolohik asitin bitkilerden izolasyonu ile, saf Aristolohik asit I ya da Aristolohik asit II değil, genellikle bu ikisinin karışımı elde edilmektedir. Çalışmalarımızda şahit (standart) olarak kullanılan ve Sigma firmasından sağlanan Aristolohik asitin de bu iki alkaloidin bir karışımı olduğu gözlenmiştir.

Türkiye'de yetişen Aristolochia türlerinin toprak altı kısımlarındaki Aristolohik asit miktarını belirlemek için, 9'u endemik olmak üzere 17 tür toplanmış ve 16 türün* havada kurutulan köklerinin metanolle ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktelerde kromatografik ve spektrofoto-

*A.bottae'nin kök materyali çok az (4 gr) olduğundan bu çalışmaya dahil edilmemiştir.

metrik yöntemlerle çalışmalar yapılmış, Aristolohik asit miktarları İnce Tabaka Kromatografisi + UV spektrofotometrisi yöntemi ile saptandıktan sonra Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi yöntemi ile de analiz edilip benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Patt (107), Aristolohik asit I ve Aristolohik asit II'nin, Benzen: Metanol: Asetik asit (85:10:5) çözücü sisteminde, İTK ile ayrılabilceğini rapor etmiştir. Benzer şekilde, A.Kery (108) de A.maurorum üzerinde bir çalışma yaparak, Aristolohik asit I'in aynı çözücü sisteminde ayrılabilceğini göstermiştir. Ancak yaptığımız çalışmalarda aynı sonuçlar elde edilememiş, Aristolohik asit I ve Aristolohik asit II'nin bir karışımı izole edilebilmiştir. Bu sistemin yararı, Aristolohik asit'in diğer maddelerden iyi bir şekilde ayrılmasını sağlamasıdır. Bu ayırımın sağlanmasından sonra elde edilen Aristolohik asit I ve Aristolohik asit II karışımı üzerinde spektrofotometrik yöntemle miktar tayini çalışmaları yapılmıştır. Yani, Aristolohik asit I ve II'nin toplam miktarları hesaplanmış, Aristolohik asit olarak ifade edilmiştir. Bu yöneme göre, incelenen Aristolochia türlerinde bulunan Aristolohik asit miktarları Tablo XI'de verilmiştir.

Analizlerimizde şahit olarak kullandığımız, Sigma firmasından sağlanan Aristolohik asitin yapılan Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi analizinde, Aristolohik asit I ve II'nin bir karışımı olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle, yaptığımız tayinlerde Aristolohik asit I ve II'nin toplam değerlerinin alınmasının daha uygun olacağına karar verilmiş ve tüm işlemler bu esas üzerinden yapılmıştır. Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi ile Aristolochia kök ekstrelerinde bulunan toplam Aristolohik asit miktarları Tablo XII'de verilmiştir.

Tabloların incelenmesinden de anlaşılabacağı gibi her iki yöntemle yapılan analizlerde bulunan toplam Aristolohik asit miktarları birbi-

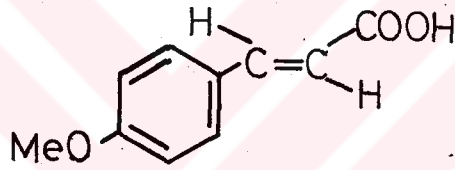
rini tutmaktadır.

Yüksek Basınç Sıvı Kromatogramlarının incelenmesinde görüldüğü gibi, Aristolohik asit I ve II birbirinden oldukça iyi ayrılmış durumdadır. Ancak, her iki alkaloidin saf standart örnekleri elimizde olmadığından yapacağımız miktar tayini hesaplamalarının spekülatif telakki edilebileceği endişesiyle ayrı ayrı miktar tayini yoluna gidilmemiştir.

Her iki yöntemde de, kuru drog üzerinden hesaplanan en yüksek Aristolohik asit miktarı, A.auricularia Boiss (% 0.727), A.parvifolia Sm. (% 0.338), A.clematitis L. (% 0.302) ve A.pontica Lam. (% 0.271)'da tesbit edilmiştir. A.maurorum L. için bulunan miktar (% 0.222), Kery, A., et al.'ın verdiği Aristolohik asit I miktarı (% 0.24) ile hemen hemen aynıdır (108). Bu ilginç bir sonuçtur zira, Kery'nin yaptığı çalışmada Aristolohik asit I'in ana alkaloid olarak izole edildiği rapor edilmiştir. Halbuki, aynı tür üzerinde bizim yaptığımız çalışmada Aristolohik asit II'nin ana alkaloid olduğu bulunmuştur. Bu durum, A.maurorum'un iki kemotipi ile çalışmalar yapılmış olabileceği şeklinde izah edilebileceği gibi, Kery'nin izole edip Aristolohik asit I olarak rapor ettiği alkaloidin Aristolohik asit I ve II'nin bir karışımı olması ihtimali de oldukça büyüktür. Zira, Aristolohik asit I ve II, uyguladığı İTK sisteminde aynı Rf değerini vermektedir. Standart materyal olarak kullandığı Aristolohik asit I'in yapı tayini için yararlandığını bildirdiği iki kaynakta da alkaloidle ilgili UV, IR, NMR ve MS bilgileri verilmemektedir. Bu da ikinci savımızı kuvvetlendirmektedir.

A.maurorum L., Anadolu'da yaygın halde ve bol miktarda bulunduğu ve içerdiği Aristolohik asit miktarı yüksek olduğu için, üzerinde da-

ha detaylı bir çalışma yapılmıştır. Köklerden hazırlanan metanollü ekstrakte üzerinde yapılan araştırmalarda, Aristolohik asit II ve Aristolohik asit I yanında; flavon, sterol ve seskiterpen yapısında maddeler izole edilmiş ancak bu maddeler üzerinde yapı tayini çalışmaları yapılmamıştır. Her ne kadar araştırma konusu, alkaloidleri içermekteyse de elde edilen maddelerden birinin analiz sonuçları, yapısını kesin olarak ortaya koyduğundan tez kapsamına alınmıştır. M31A fraksiyonundan elde edilen bu maddenin yapılan ^1H -NMR ve MS analizi sonucunda 4-metoksi-t-sinamik asit olduğu anlaşılmıştır.



4-metoksi-t-sinamik asit

^1H -NMR analizinde δ 6.85 ve 7.43'de görülen A_2B_2 sistemine ait çifte dublet, aromatik halkada p-süstitüsyon olduğunu göstermiştir. δ 3.80'deki singlet pik, bir adet metoksi grubuna karşı geldiğinden benzen halkasına yerleştirilmiş, p-pozisyonuna ise olefinik yan zincir sokulmuştur. Zira δ 6.30 ve 7.64'de beliren iki dublet J 15.9 H_2 çiftleşme sabiti vermektedir.

Kütle spektrumunda M^+ 178'de gözlenen moleküler iyon piki, NMR bulguları ile uyum gösterdiğinden, analizi yapılan maddenin 4-metoksi-t-sinamik asit olduğu sonucuna varılmıştır (109). Bu maddenin Aristolochiaceae familyasındaki varlığı ilk kez tesbit edilmektedir.

A.maurorum L. ekstresinin, Yüksek Basıncı Sıvı Kromatografisi so-

nuçları incelendiğinde, Aristolohik asit II pikinin, Aristolohik asit I'e göre daha büyük olduğu görülmektedir. Bu nedenle, Aristolohik asit II'nin, mümkün olduğu kadar, Aristolohik asit I'den temizlenmesi için yapılan denemeler sonucunda uygun bir yöntem bulunmuştur (Bölüm II.7). Temizlenen Aristolohik asit II'nin yapılan ¹H-NMR, UV ve MS analizleri sonucunda, saflık yönünden, Sigma firmasının standart Aristolohik asit örneğinden daha temiz olduğu görülmüştür. Yani, Sigma firmasının Aristolohik asit örneğinde, Aristolohik asit I/ Aristolohik asit II oranı 3/1 iken, bizim temizlediğimiz Aristolohik asitte bu oran 1/6 olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada, A.maurorum L. köklerinden izole edilen tek izokino-
lin alkaloidi, bir aporfin türevi olan magnoflorindir. Bu alkaloid,
daha önce A.argentine Griseb., A.boetica L., A.bodamae Dingler, A.durior
Hill, A.elegans Mast, A.fimbriata Cham, A.kaemferi Will, A.macedonica
Bornm, A.rotunda L. türlerinden izole edilmiştir (6).

Çalışmalar sırasında, incelenen bazı türlerin metanollü ekstraktları
soğutulurken kristalize bir çökelti oluşmuştur. Daha sonra, bu kristal-
lerin sakkaroz olduğu anlaşılmıştır (110). *Aristolochia* türlerinin kök-
lerinde sakkarozun varlığı daha önceden de bilinmekteydi. Nitekim,
A.longa (111), A. serpentaria (111), A.rotunda (112) köklerinde sakka-
rozun varlığı rapor edilmiştir. İncelenen türlerde bulunan sakkaroz
miktarları Tablo X'da verilmiştir. Tablodan görüldüğü gibi, türlerin
hepsi endemik olup, en büyük miktarda sakkaroz, A.lycica (% 6.5) ve
A.stenosiphon'da (% 5.2) bulunmuştur.

TABLO XI

İsmi	n^1	$\bar{x}^2$	x_1^3	δ^4
<u>A.auricularia</u> Boiss	9	21.7	0.727	0.16
<u>A.billardieri</u> Jaub et Spach	9	4.33	0.072	0.056
<u>A.bodamae</u> Dingler	9	12.65	0.248	0.195
<u>A.clematitis</u> L.	9	17.05	0.302	0.24
<u>A.cilicica</u> Davis et Khan	9	10.79	0.236	0.085
<u>A.quichardii</u> Davis et Khan	9	12.63	0.208	0.117
<u>A.hirta</u> L.	9	7.42	0.104	0.1
<u>A.incisa</u> Duchartre	9	10.91	0.193	0.128
<u>A.lycica</u> Davis et Khan	9	7.98	0.113	0.13
<u>A.krausei</u> P.H.Davis	9	5.57	0.112	0.116
<u>A.maurorum</u> L.	9	9.58	0.222	0.016
<u>A.pallida</u> Willd	9	5.80	0.166	0.1
<u>A.parvifolia</u> Sm.	9	13.06	0.338	0.314
<u>A.polluninii</u> Davis et Khan	9	5.34	0.092	0.24
<u>A.pontica</u> Lam	9	10.92	0.291	0.29
<u>A.stenosiphon</u> Davis et Khan	9	7.95	0.107	0.19

n^1 : Tekrarlanan deney sayısı

$\bar{x}^2$: 1 gr. ekstrede bulunan Aristolohik asit miktarı (mg).

x_1^3 : 100 gr. toz drogdaki Aristolohik asit miktarı (gr).

δ^4 : Standart sapma.

TABLO XII

İsmi	n ¹	x ²	δ ³
<u>A.auricularia</u> Boiss	5	22.01	0.33
<u>A.billardieri</u> Jaub et Spach	5	3.6	0.007
<u>A.bodamae</u> Dingler	5	13.1	0.0074
<u>A.clematitidis</u> L.	5	17.9	1.27
<u>A.cilicica</u> Davis et Khan	5	11.0	0.25
<u>A.guichardii</u> Davis et Khan	5	12.9	0.126
<u>A.hirta</u> L.	5	7.42	0.016
<u>A.incisa</u> Duchartre	5	11.9	0.08
<u>A.lycica</u> Davis et Khan	5	7.08	0.42
<u>A.krausei</u> P.H. Davis	5	4.5	0.52
<u>A.maurorum</u> L.	5	9.16	0.52
<u>A.pallida</u> Willd	5	5.88	0.38
<u>A.parvifolia</u> Sm.	5	13.4	0.89
<u>A.polluninii</u> Davis et Khan	5	5.67	0.35
<u>A.pontica</u> Lam.	5	10.6	0.52
<u>A.stenosiphon</u> Davis et Khan	5	7.86	0.048

n¹ : Tekrarlanan deney sayısı

x² : 1 gr. ekstrede bulunan Aristolohik asit miktarı (mg).

δ³ : Standart sapma.

ÖZET

Bu çalışmada, Türkiye'de yetiştiği bilinen 23 Aristolochia türünden 16'sının toprak altı kısımları metanolle ekstre edilmiştir. Kök ekstrelerinin seyreltik asitle muamelesinden sonra kloroformla yapılan ekstraksiyonlarında Aristolohik asit I ve Aristolohik asit II karışım halinde elde edilmiştir.

Her karışımdaki Aristolohik asit miktarları, hem Aristolohik asitin İTK ile saflaştırılmasından sonra UV spektrofotometresinde, hem de doğrudan Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi yöntemi ile yapılan tayinler sonucunda bulunmuştur. Böylece, Anadolu'nun Aristolochia türlerindeki Aristolohik asit miktarları ilk kez tespit edilmiştir.

Ayrıca, A.maurorum L.'un kök ekstresinin detaylı incelenmesi ile alkaloit ve alkaloit olmayan maddeler elde edilmiştir.

Aristolohik asit haricinde, bu türden, ilk defa aporfin türevi bir izokinolin alkaloiti olan magnoflorin izole edilmiştir. 4-metoksit-sinamik asitin, Aristolochiaceae familyasındaki varlığı ise ilk kez rapor edilmektedir.

ABSTRACT

16 out of 23 Aristolochia species known to grow in Turkey have been assayed for their Aristolochic acid content. Methanolic extracts of the roots were purified with chloroform following treatment with dilute acid and a mixture of Aristolochic acid I and II were obtained.

Aristolochic acid content of each extract was determined employing two different methods; (1) UV spectrophotometric assays were carried out after purification by TLC, (2) Direct determination by HPLC. Hence, Aristolochic acid contents of the Anatolian Aristolochia species have been determined for the first time.

Furthermore, detailed chemical analysis of the A.maurorum L. root extract gave rise to the isolation of alkaloidal and non-alkaloidal compounds. Thus, apart from Aristolochic acid, magnoflorine, an aporphinoid isoquinoline alkaloid was isolated for the first time from this species and 4-methoxy-t-cinnamic acid was characterized for the first time in the family Aristolochiaceae.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince beni yönlendiren, her türlü araştırma imkanı sağlayan, yakın ilgisini hiç bir zaman esirgemeyen, değerli Doktora Tez Yöneticim Prof.Dr. Kemal Hüsnü Can BAŞER'e ;

TBAG-609 nolu projemi, maddi yönden destekleyerek bu çalışmayı yapabilmeme imkan sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu'na ;

Ayrıca, sağladıkları imkanlar ve yardımlar için Fakülte Dekanımız Prof.Dr. İhsan SARIKARDAŞOĞLU'na ;

Bitkilerin toplanmasında benimle tüm Anadolu'yu dolaşan Yard. Doç.Dr. Hulusi MALYER'e ;

İ.Ü. Eczacılık Fakülte'sinde yaptığım YBSK çalışmaları için izin veren Sayın Dekan Prof.Dr. Turhan BAYTOP'a ve çalışmalarım sırasında yardımcı olan Yard.Doç.Dr. Afife MAT'a ;

Değerli fikirleriyle yardımlarını esirgemeyen Doç.Dr. Muzaffer TUNCEL, Doç.Dr. Koray SAKAR ve Doç.Dr. Bilge ŞENER'e;

Laboratuvar arkadaşlarım Yard.Doç.Dr. Neşe KIRIMER ve Araş.Gör. Ayla ERTAN ile Teknisyen Müheddet VATANSEVER'e ;

Tezi özenle daktilo eden Güray ATKOŞAR'a ;

Sonsuz maddi ve manevi desteğinden dolayı sevgili eşime ;

Teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

1. Willis, J.C., A Dictionary of the flowering plants and ferns, 8 th. ed., 92-93, Cambridge University Press, Cambridge (1973).
2. Engler's A., Melchior, H., Syllabus der Pflanzen familien Vol. 2., 152-154, Berlin (1964).
3. Rendle, A.B., The Classification of flowering plants Vol. 2., Cambridge University Press (1975).
4. Davis, P.H., Flora of Turkey and the East Aegean Islands Vol. 7., 551-565, Edinburgh University Press, Edinburgh (1965).
5. Claus, E.P., and Tyler, V.E., Pharmacognosy, Lea and Febiger, Philadelphia (1936).
6. Che, Chun-Tao., Phytochemical Investigation of Aristolochia indica L. and Caulophyllum thalictroides L. Michaux (Doktora Tezi, Illinois University) (1982).
7. Tutin, T.G., Heywood, V.H., Flora Europaea, Vol. 1., 73-74, Cambridge University Press (1964).
8. Davis, P.H., Khan, M.S., Roy. Bot. Gard. Edinburgh 23: 515-546(1961).
9. Heywood, V.H., Flowering Plants of The World, 41-42, Oxford University Press (1979).
10. Akasu, M., Itokawa, H., and Fujita, M., Tetrahedron Lett., 3609-3612 (1974).

11. Chen, C.R., Beal, J.L., Doskotch, R.W., Mitscher, L.A., and Svoboda, G.H., Lloydia 37: 493-500 (1964).
12. Mix, D.B., Guinaudeau, H., and Shamma, M., J.Nat.Prod. 45: 657-666 (1982)
13. Castille, A., Bull. Acad. Roy. Med. Belg. 1: 569-576 (1921). (Chem. Abstr. 16: 1448).
14. Castille, A., J.Pharm. Belg. 4: 569-571 (1922). (Chem. Abstr. 16: 3902).
15. Rosenmund, H. and Reichstein, T., Pharm. Acta Helv. 18:243-261 (1943).
16. Fruklinger, A., Buchners Repert. Pharm. (3) 7: 1 (1851). (Bk. Kaynak 15 ve 21)
17. Pohl, J., Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol. 29: 282 (1982). (Bk. Kaynak 15 ve 21).
18. Hesse, O., Arch. Pharm. 233: 684 (1895). (Bk. Kaynak 15 ve 21).
19. Krishnaswamy, P.R., Manjunath, B.L., and Rao, S.V., J. Indian Chem. Soc. 12: 476-485 (1935).
20. Pailer, M., Belohlav, L., and Simonitsch, E., Monatsh Chem. 86:676-680 (1955).
21. Pailer, M., Belohlav, L., and Simonitsch, E., Monatsh. Chem. 87: 249-268 (1956).
22. Ew, J., Reichstein, T., and Rothschild, M., M., Israel J. Chem. 6: 659-670 (1968).
23. Rothschild, M., Ew, J., and Reichstein, T., Insect Biochem. 2:334-343 (1972).

24. Kupchan, S.M., and Wormser, H.C., J. Org. Chem. 30: 3792-3800 (1965).
25. Kupchan, S.M., and Wormser, H.C., J. Org. Chem. 30: 3933-3935 (1965).
26. Schutte, H.R., Orban, U., and Mothes, K., Eur. J. Biochem. 1: 70-72 (1967).
27. Spenser, I.D., and Tiwari, H.P., Chem. Comm. 55-56 (1966).
28. Comer, F., Tiwari, H.P., and Spenser, I.D., Can. J. Chem. 47: 481-487 (1969).
29. Tseng, K.F., and Ku, Y.T., Yao Hsueh Hsueh Pao 6: 33-38 (1958).
30. Tomita, M., and Sasagawa, S., Yakugaku Zasshi 79: 973-976 (1959). (Chem. Abstr. 53: 21841d).
31. Kupchan, S.M., and Merianos, J.J., J. Org. Chem. 33: 3735-3738 (1968).
32. Priestap, H.A., Ruveda, E.A., Mascaretti, O.A., and Deulofeu, V., An. Asoc. Quim. Argent. 59: 245-250 (1971). (Chem. Abstr. 76:43943w).
33. Shamma, M., and Moniot, J.L., The Alkaloids, Vol. 6, pp. 183-186 London, The Chemical Soc. (1976).
34. Pakrashi, S.C., Ghosh-Dastidar, P., Basu, S., and Achari, B., Phytochemistry 16: 1103-1104 (1977).
35. Ryo, K., Folia Pharmacol. Japon. 4: 123-131 (1927). (Chem. Abstr. 21: 3680).
36. Krishnaswamy, P.R., and Manjunath, B.L., J. Indian Chem. Soc. 14: 39-41 (1937).
37. Govindachari, T.R., and Viswanathan, N., Indian J. Chem. 5:655(1967).
38. Ruveda, E.A., Priestap, H.A., and Deulofeu, V., An. Asoc. Quim.

- Argent.54: 237-239 (1966). (Chem. Abstr. 69:61518w).
39. Crohare, R., Priestap, H.A., Farina, M., Cedola, M., and Ruveda, E.A., Phytochemistry 13: 1957-1962 (1974).
40. Tomita, M., and Fukagawa, K., Yakugaku Zasshi 82: 1673-1675 (1962).
- 41 Carreras, L.M., An. Inst. Bot. A.J. Cavanilles 30: 253-265 (1973). (Chem. Abstr. 80: 24780g).
42. Podolesov, B., and Zdravkovski, Z., Acta. Pharm. Jugosl. 30: 161-162 (1980). (Chem. Abstr. 94: 12804u).
43. Priestap, H.A., Ruveda, E.A., and Albonica, S.M., Chem. Comm. 754-755 (1967).
44. Priestap, H.A., Ruveda, E.A., Albonica, S.M., and Deulofeu, V., An. Asoc. Quim. Argent. 60: 309-316 (1972). (Chem. Abstr. 77: 164898q).
45. Rao, U.S.K., Manjunath, B.L., and Menon, K.N., Indian Chem. Soc. 12: 494-498 (1935). (Chem. Abstr. 30: 233⁹).
46. Ganguly, A.K., Gopinath, K.W., Govindachari, T.R., Nagarajan, K., Pai, B.R., and Parthasarathy, P.C., Tetrahedron Lett. 133-136(1969).
47. Fuhrer, H., Ganguly, A.K., Gopinath, K.W., Govindachari, T.R., Nagarajan, K., Pai, B.R., and Parthasarathy, P.C., Tetrahedron 26:2371-2390 (1970).
48. Achari, B., Chakrabarty, S., and Pakrashi, S.C., Phytochemistry 20: 1444-1445 (1981).
49. Sastry, M.S., Indian J. Pharmacy 27: 264-265 (1965). (Chem. Abstr. 63: 16772g).
50. Schunack, W., Mutschler, E., and Rochelmeyer, H., Pharmazie 20:

685-688 (1965). (Chem. Abstr. 64: 6409d).

51. Ko, T.T., and Tseng, K.F., K'o Hsueh T'ung Pao 568 (1957).
52. Li, S.Y., and Yao, C., Chang Ts'ao Yao 12: 73 (1981).
53. Ganshirt, H., Pharmazie 8: 584-592 (1953). (Chem. Abstr. 53:12478e).
54. Rucker, V.G., and Chung, B.S., Planta Med. 27: 68-71 (1975).
55. Ding, L.S., Ho, M.S., and Lou, F.C., Chung Ts'ao Yao 11: 487 (1980).
(Chem. Abstr. 95: 12636m).
56. Coutts, R.T., Stenlake, J.B., and Willians, W.D., J.Chem. Soc. 4120-4124 (1957).
57. Coutts, R.T., Stenlake, J.B., and Willians, W.D., J.Pharm. Pharmacol. 11: 607-617 (1959).
58. Subbararnam, A.V., and Cook, W.B., J. Med. Pharm. Chem 5:1376-1378 (1962).
59. Carboni, S., Livi, O., Segnini, D., and Mazzanti, L., Gazz. Chim. Ital. 96: 641-661 (1966). (Chem. Abstr. 65: 7625e).
60. Rao, K.V.J., Row L.R., and Murty, Y.S., J.Sci. Ind. Res. (1959).
(Chem. Abstr. 54: 14373a).
61. Maldonado, L.A., Herran, J., and Romo, J., Ciencia (Mex.) 24:237-240 (1966). (Chem. Abstr. 65: 15438e).
62. Govindachari, T.R., Mohamed, P.A., and Parthasarathy, P.C., Tetrahedron 26: 615-619 (1970).
63. Pakrashi, S.C., Ghosh-Dastidar, P.P., Chakrabarty, S., and Achari, B., J.Org. Chem. 45: 4765-4767 (1980).
64. Furukawa, S., and Soma, N., Yakugaku Zasshi 81: 559-573 (1961).

65. Nishida, R., and Kumazawa, Z., Agr. Biol. Chem. 37: 341-344 (1973).
66. Ding, L.S., and Lou, F.C., Chung Ts'ao Yao 11: 484-486 (1980).
(Chem. Abstr. 94: 214457u).
67. Stenlake, J.B., and Williams, W.D., J. Pharm, Pharmacol. 6:1005-1013 (1954).
68. Martin-Smith, M., Mayo, P., Smith, S.J., Stenlake, J.B., and Williams, W.D., Tetrahedron Lett. 2391-2396 (1964).
69. Rucker, G., Langmann, B., and De Siqueira, N.S., Planta Med. 41: 143-149 (1981).
70. Kind, C.A., and Celentano, V.D., J. Org. Chem. 18: 1473-1477 (1953).
71. Hussein, F.T., and El-Sebakhy, N.A., Planta Med. 25: 310-314.
72. Diehl, H., Moser, V.H., Münch med. Wschr. 473-474 (1934).
73. Mezger, I., Hippokrates 27: 450-453 (1956).
74. Pilarczyk, W., Planta Med. 6: 258-299 (1958).
75. Lima, O.G., Larios, C., Zatapa, M., and Dziendzielewsky, U., Ciencia (Mexico) 12:31-33 (1952). (Chem. Abstr. 48: 6492a).
76. Mesa, A.M., Garcia, J.G., Cravioto, R.O., and Torre, J.C., Ciencia Invest. (Buenos Aires) 6: 471-476 (1950). (Chem. Abstr. 45:702h).
77. Donie, B. et al. R.J. Pharmakol., himioterapeut. s-v et toksikol. 9: 729 (1968).
78. Neugebover, H., Pharmazie 4: 137-140 (1949).
79. Iannello, F., Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 28:474 (1952). (Chem. Abstr. 48: 867e).
80. Sokolov, S.D., Uchenye Zapiski Pyatigorski Farm. Inst. 4: 234-239

- (1958). (Chem. Abstr. 56: 904c).
81. Saha, J.C., Savini, E.C., and Kasinathan, S., Indian J. Med. Res. 49: 130-151 (1961).
82. Dutta, N.K., and Sastry, M.S., Indian J. Pharmacy 20: 302 (1958).
83. Shaw, F.H., Aust. J. Pharm. 28: 857-858 (1947). (Chem. Abstr. 42: 6007f).
84. Lalanne, P., and Mathou, T., Bull. Sci. Pharmacol. 41: 460-467 (1934). (Chem. Abstr. 29: 293³).
85. Ionescu, F., Jolad, S.D., and Cole, J.R., J. Pharm. Sci. 66: 1489-1490 (1977).
86. Folkers, K., and Unne, K., Arch. Intern. Pharmacodyn. 61: 370-379 (1939). (Chem. Abstr. 33: 5592⁸).
87. Kupchan, S.M., and Doskotch, R.W., J. Med. Pharm. Chem. 5: 657-659 (1962).
88. Jackson, L., Kofman, S., Weiss, A., and Brodovsky, H., Cancer Chemother. Rept. 42: 35-37 (1964).
89. Lilitis, L.N., and Massagetov, P.S., Vopr. Onkol. 7: 80-81 (1961).
90. Mehes, J., Desci, L., Varga, F., and Kovacs, S., Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol. 234: 548-565 (1958). (Chem. Abstr. 53: 12478f).
91. Angeles, L.T., Canlas, Jr., B.D., m Concha, J.A., Sotto, A.S., and Aligaen, P.L., Acta Med. Philippines 6: 139-148 (1970).
92. Angeles, L.T., Lapuz, R.A., and Villarroja, L.E., Acta Med. Philippines 6: 160-164 (1970).
93. Deufel, J., and Ganshirt, H., Pharmazie 8: 679-682 (1953).

94. Bartfeld, H., Arzneim.-Forsch. 27: 2297 (1977) (Bk. Kaynak 95).
95. Batsford, S., Kluthe, R., and Vogt, A., Planta Med. 39: 234(1980).
96. Tsai, L.H., Yang, L.L., and Chang, C.C., Taiwan K'o Hsueh 34: 40-44 (1980). (Chem. Abstr. 93: 162353q).
97. Saxena, B.P., Koul, O., Tikku, K., Atal, C.K., Suri, O.P., and Suri, K.A., Indian J. Exptl. Biol. 17: 354-360 (1979).
98. Ho, L.H., Hua, W.W., and Hsueh, H.C., Yao Hsueh Hsueh Pao 15: 44 (1980).
99. Pakrashi, A., Chakrabarty, B., and Das Gupta, A., Experientia 32: 394-395 (1976).
100. Pakrashi, A., and Pakrashi, P.L., Indian J. Exptl. Biol. 15: 428-430 (1977).
101. Pakrashi, A., and Chakrabarty, B., Indian J. Med. Res. 66: 991-998 (1977).
102. Pakrashi, A., and Shaha, C., Experientia 34: 1192-1193 (1978).
103. Pakrashi, A., and Shaha, C., IRCS Med. Sci. 7: 78 (1979).
104. Baytop, T., Türkiye'de Bitkilerle Tedavi, 412, Sonal Matbaacılık, İstanbul (1984).
105. Huciung, J.S., Extraction of Aristolochic acid I (Intreprinderea Bioform Bucurest) Rom. 55, 389 (Cl. A. 61k) 25 Apr. (1973) App. 64646 09Oct. (1970) 3 pp. (Chem. Abstr. 81: 111458).
106. Podolesov, B., Micevska, M., Skopje. Met. Fiz. Hem. 22:205-210(1972).
107. Patt, P., Arzneimittel-Forsch 15(1): 90-92 (1965).
108. Kery, A., Askari, A.A., Sharef, K.A., Fitoterapia, 52: 201-207(1981).

109. Grasselli, J.G., Ritchey, W.M., CRC Atlas of Spectral Data and Physical Constants for Organic Compounds, Vol. III., 67, CRC Press (1975).
110. The Pharmaceutical Codex, 11. baskı, London (1979).
111. Lesueur, M., J.Pharm. Chem. 3: 399-403 (1911).
112. Salvalore, C., Oreste, L., Domenico, S., Gazz. Chim. Ital., 96: 641-661 (1966).
113. Priestap, H.A., Phytochemistry, Vol. 26 (2), 519-529 (1987).