

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TRİFOLIUM PURPUREUM (FABACEAE)
BİTKİSİNİN İÇERDİĞİ DOĞAL BİLEŞİKLERİN
İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Gündüz TAŞKIRAN

Temmuz, 2005

İZMİR

**TRİFOLIUM PURPUREUM (FABACEAE)
BİTKİSİNİN İÇERDİĞİ DOĞAL BİLEŞİKLERİN
İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Gündüz TAŞKIRAN

Temmuz, 2005

İZMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

Gündüz TAŞKIRAN, tarafından Prof.Dr. Mustafa TOPRAK yönetiminde hazırlanan “*Trifolium purpureum* (Fabaceae) Bitkisinin İçerdiği Doğal Bileşiklerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

.....

Yönetici

.....

Jüri Üyesi

.....

Jüri Üyesi

Prof.Dr. Cahit HELVACI

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada değerli yardım ve desteklerinden dolayı danışmanım Prof. Dr. Mustafa TOPRAK'a teşekkür ederim.

Ege üniversitesinde yaptığım çalışmalar boyunca benden yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Süheyla KIRMIZIGÜL'e, asistanı Ömer KOZ'a, yüksek lisans öğrencileri Nazlı BÖKE ve Elçin TÜRKEY'a teşekkür ederim.

Spektral analizlerin yapılmasında emeği geçen Ege Üniv. EBİLTEM-NMR Lab. ve Salerno Üniv. Ecz. Fak. (İtalya) çalışanlarına teşekkür ederim.

Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında yoğun çaba ve katkılarından dolayı Yard. Doç. Dr. İhsan YAŞA'ya (Ege Üniv. Fen Fak. Biyoloji Böl. Mikrobiyoloji A.B.D.), Antioksidan aktivite çalışmalarında göstermiş oldukları yakın ilgi ve yardımlarından dolayı İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Mikrobiyoloji ve Genetik Bölümü'nden Doç. Dr. Nazlı ARDA'ya teşekkür ederim.

Ayrıca GC-Mass analizinde bizlere yön veren ve olanaklarını sunan Gıda Müh. Ahmet ÖĞÜT'e (İzmir Hıfzısıhha Böl. Müd. Araştırma Lab) teşekkür ederim.

Hayatımın en zor anlarında beni hiç yalnız bırakmayan anneme ve babama çok teşekkür ederim.

Dokuz Eylül Üniversitesi Rektörlüğü'ne 04. KB. FEN. 026 no'lu projemize vermiş oldukları maddi destekten dolayı teşekkür ederim.

Gündüz TAŞKIRAN

Trifolium purpureum (FABACEAE)
**BİTKİSİNİN İÇERDİĞİ DOĞAL BİLEŞİKLERİN
İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

ÖZ

Bu çalışmada, *Trifolium purpureum* (Fabaceae) bitkisinin doğal bileşikleri araştırıldı. Kimyasal içeriğinin yanı sıra, mikrobiyolojik özellikleri ve antioksidan kapasiteleri de incelendi. İlk kez çalışılan bu bitkinin izolasyon ve saflaştırma çalışmaları sonucunda iki doğal bileşik elde edildi. Bunlardan ilki bir flavon glikozit olan Bileşik 1 bu cinste, bir triterpen glikozit olan Bileşik 2 ise bu türde ilk kez bulunan doğal bileşiklerdir.

İlgili bileşiklerin yapılarının aydınlatılması çeşitli kimyasal, kromatografik (CC, TLC, VLC, PTLC) ve spektroskopik (UV, IR, 1-D ve 2-D NMR, KÜTLE) yöntemler kullanılarak gerçekleştirildi.

Bitkinin hegzan ekstresi GC-Mass tekniğiyle esansiyel yağ asitleri (EFAs) açısından incelendi. Ekstrenin yüksek oranda ω -3, ω -6 ve ω -9 yağ asidi içerdiği belirlendi.

Bitkinin ham ekstrelerinin mikrobiyolojik aktiviteleri MIC yöntemiyle çeşitli mikroorganizmalara karşı araştırıldı. Standart antibiyotiklerle yapılan karşılaştırmalarda, BuOH ve H₂O fazlarının diğer fazlara göre daha aktif oldukları bulundu.

Bir flavon glikozit olan Bileşik 1'in yüksek antioksidan aktivitesi DPPH[•] radikal sönmüleme yöntemi ile belirlenerek, hesaplandı.

Anahtar Sözcükler: Glikozidik bileşikler, izolasyon, yapı tayini, esansiyel yağ asitleri, antimikrobiyal aktivite, antioksidan aktivite.

ISOLATION AND CHARACTERISATION OF NATURAL COMPOUNDS FROM *Trifolium purpureum* (FABACEAE)

ABSTRACT

In this study, the natural compounds of *Trifolium purpureum* (Fabaceae) were investigated. In addition to the chemical contents of plant, the microbiologic properties and antioxidant capacities were also examined. After the isolation and purification experiments, two natural products were obtained from this plant, which was studied for the first time. The first compound (**1**) was a flavone glycoside and it was isolated for the first time from this genus. The second one (**2**) was a triterpene glycoside and it was isolated for the first time from this species.

The structural elucidation of the pure compounds was carried out using different chemical, chromatographic (CC, TLC, VLC, PTLC) and spectroscopic (UV, IR, 1-D and 2-D NMR, Mass) methods.

The hexane extract of the plant was researched in terms of its essential fatty acids (EFAs) by GC-Mass technique. The ω -3, ω -6 and ω -9 content of the extract was found in a high amount.

The microbiological activities of all the crude extracts of the plant were studied by MIC method against different microorganisms comparing with standart antibiotics. BuOH and H₂O phases were the most active ones than the others.

As a flavone glycoside, the antioxidant capacity of Compound 1 was determined by DPPH[•] radical scavenging method.

Keywords : Glycosidic compounds, isolation, structural determination, essential fatty acids, antimicrobial activity, antioxidant activity.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Yüksek Lisans Tezi Sınav Sonuç Formu	ii
Teşekkür	iii
Öz	iv
Abstract.....	v
İçindekiler	vi
Kısaltmalar	viii

BÖLÜM 1 GİRİŞ

1. Doğal Bileşikler ve Önemi.....	1
1.1 Botanik Bölüm	3
1.1.1 Fabaceae (Leguminosae=Baklagiller).....	3
1.1.1.1 <i>Trifolium</i> L. (Tırfıl, Üçgül, Çayır Üçgülü)	4
1.1.1.1.1 <i>Trifolium purpureum</i>	5
1.2 Kimyasal Bölüm	7
1.2.1 Glikozitler	7
1.2.1.1 Glikozitlerin Genel Özellikleri	7
1.2.1.2 Glikozitlerin Sınıflandırılması	8
1.2.1.2.1 Terpenler ve Glikozitleri	9
1.2.1.2.2 Flavonoidler ve Glikozitleri	15
1.2.2 Esansiyel Yağ Asitleri (EFA)	20
1.2.3 Antioksidanlar	23
1.2.4 Antimikrobiyal Aktivite	25

BÖLÜM 2 MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Bitki Materyali	26
2.2 Genel	26
2.3 İzolasyon ve Saflandırma.....	28

2.4 Hegzan Fazının Yağ Asiti Analizi	33
2.5 Antimikrobiyal Aktivite.....	33
2.6 Antioksidan Aktivite.....	34

BÖLÜM 3

SONUÇLAR

3.1 Bileşik 1	35
3.2 Bileşik 2	48
3.3 Asidik Hidroliz Sonuçları.....	58
3.4 Bitki Ekstrelerinin Mikrobiyolojik Aktivite Sonuçları.....	58
3.5 Antioksidan Aktivite Sonuçları.....	59
3.6 Yağ Asidi Analizleri Sonuçları	59
3.7 Tartışma	60
Kaynaklar.....	64

KISALTMALAR

IR: Infrared

UV: Ultraviolet

NMR: Nuclear Magnetic Resonance

COSY: COrrrelation SpectroscopY

HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Correlation

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

ESI-Mass: Electron Spray Ionization Mass

GC: Gas Chromatography (Gaz Kromatografisi)

TLC: Thin Layer Chromatography (İnce Tabaka Kromatografisi)

PTLC: Preperative Thin Layer Chromatography (Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi)

VLC: Vacuum Liquid Chromatography (Vakum Likit Kromatografisi)

CC: Column Chromatography (Kolon Kromatografisi)

EFA: Essential Fatty Acids (Esansiyel Yağ Asitleri)

UFA: Unsaturated Fatty Acids (Tekli Doymamış Yağ Asitleri)

PUFA: Polyunsaturated Fatty Acids(Çoklu Doymamış Yağ Asitleri)

ALA: α -Linoleik asit

LA: Linoleik asit

GLA : γ - Linolenik asit

SDA: Stearidonik asit

AA: Araşidonik asit

EPA: Eikosapentaenoik asit

DHA: Dokosahegzaenoik asit

DGLA: Dihomogamma-linolenik asit

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1. Doğal Bileşikler ve Önemi:

Doğal bileşikler, canlı organizmalardan çeşitli fiziksel, biyolojik ve kimyasal yöntemler kullanılarak elde edilen organik maddelerdir. Temel kaynakları arasında bitkiler, deniz canlıları, mikroorganizmalar ve diğer bazı hayvansal organizmalar en önemli yeri almaktadır. Çeşitli tekniklerle bu canlıların üretmiş oldukları organik maddeler izole edilmekte, yapıları aydınlatılmakta ve farklı amaçlara yönelik olarak kullanılmaktadır.

Doğal bileşiklerle ilgili yapılan çalışmaların tarihçesi aslında çok eski dönemlere dayanmaktadır. Özellikle hastalıkların tedavisinde bitkilerden faydalanma geçmişte Çin ve Hint medeniyetlerinde oldukça yaygındı. Halen bu ülkelerin doğal bileşik araştırmalarında önemli bir yeri vardır. Ülkemizde de halk arasında hastalıkların sağaltımı amacıyla yönelik olarak kullanılan pek çok bitki türü vardır. “Şifalı bitkiler” olarak adlandırılan bu bitkiler bazı ticari kuruluşlarda başta kalp, tansiyon, şeker, sedef, kanser, romatizma gibi hastalıklar olmak üzere pek çok hastalığın tedavisi için pazarlanmaktadır. Ancak bu uygulamaların teknik ve bilimsel alt yapıları geliştirilmeye muhtaçtır. Halk sağlığını ilgilendiren bu faaliyetlerin denetim altında tutulması, özellikle bitkilerin sınıflandırılması ve saklama koşulları ile ilgili olarak çalışanların bilinçlendirilmesi gereklidir.

Doğal bileşiklerin tarihsel gelişim süreci içinde Endüstri Devrimi önemli bir yer tutmaktadır. Bu süreçte, cehaletin ve ürettiği bağınazlığın yerini artık bilimsel bulgular almaya başlamıştı. Bilimsel bilgi hızla çoğalıyor ve matbaa yoluyla yayılıyordu. Organik kimyanın gelişimi ile önce doğal daha sonra sentetik ürünlerin saf olarak elde edilmesi gerçekleştirilmişti. Hatta doğal öncüllerden daha güvenilir ve daha etkili sentetik maddeler bile elde edilmeye başlamıştı. Bu gelişmeler önce, farmakoloji alanında çalışanların itibar görmesini sağlamış ve bir süre sonra ticari bir oluşum olarak ekonomi alanında farmakoloji şirketlerinin boy göstermesine yol

açmıştır. Sürecin devamında önce bir narkotik analjezik olan morfinin daha sonra enfeksiyon tedavisinde penisilinin doğal kaynaklardan izole edilerek kullanılması tıp tarihinde önemli bir basamağı oluşturmuştur (Rates, 2001)

Günümüzde özellikle bitkilerden izole edilen doğal bileşikler hastalıkların tedavisinde önemli bir yere sahiptir. Örneğin kanser tedavisinde kullanılan Taxol, *Taxus brevifolia*, Vincristine ve Vinblastine *Catharanthus roseus* bitkilerinden izole edilen ilaçlardan bazılarıdır (Phillipson, 2001).

Bugün doğal bileşikler ilaç ham maddeleri olarak kullanılmalarının yanı sıra gıda, kozmetik, boya gibi farklı kesimlere hitap eden geniş bir kullanım alanına da sahiptir. Sentez yoluyla elde edilemeyen pek çok doğal bileşik halen büyük bir ekonomik değeri bünyesinde barındırmaktadır.

Ülkemizin doğal bileşik kaynaklarının, özellikle de bitki örtüsünün zenginliği üzerinde önemle durulması gereken bir konudur. Sayısız endemik bitki türünün varlığı bu önemi açıkça ortaya koymaktadır. Gelecekte ülkemiz kaynaklarından elde edilen doğal bileşiklerin daha etkin ve verimli kullanımını hedefleyen çalışmaların yapılması, ülkemizin ekonomik ve sosyal gelişimine katkıda bulunacaktır.

Bu kadar önemli bir alanda çalışmak aslında pek çok insanın ilgisini çekmiştir. Ancak doğal bileşikler alanında çalışmanın beraberinde getirmiş olduğu ciddi güçlükler de vardır. Bunlardan bazılarını şöyle sıralayabiliriz;

- Birden çok bilimsel disiplinin organize bir ekip olarak çalışmasını gerektirir.
- Pahalıdır.
- Araştırmacı yönünden güçlükleri oldukça fazladır.
- Tüm çabalara rağmen beklentileri karşılamayan sonuçlar elde edilebilir.
- Son yıllarda teknoloji ağırlıklı analiz yöntemlerinin (Mass, GC-Mass, LC-Mass, NMR gibi) kullanılması, verilerin yorumlanmasında, araştırmacıya ek sorumluluk ve bu alanda bilgi birikimi gerekliliği yüklemiştir.

Bu çalışmada *Trifolium purpureum* (Fabaceae) bitkisinin kimyasal içeriği fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler kullanılarak aydınlatılmış, esansiyel yağ asitleri belirlenmiş, mikrobiyolojik ve antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Yapılan literatür çalışmalarında, *Trifolium purpureum* bitkisine ait herhangi bir bilimsel kayda rastlanmamıştır.

1.1 Botanik Bölüm

1.1.1 Fabaceae (Leguminosae=Baklagiller)

Genellikle otsu bitkileri bünyesinde barındırır. Nadiren çalılar veya ağaçlar da bu familyanın üyeleri arasındadır. Yapraklar çoğu zaman pinnat veya trifoliat, nadiren basit, stipüllüdür. Çiçekler erdişi olup, bir simetri düzlemine sahiptir. 5 Sepali birleşik, 5 petali serbesttir. Üst petal genellikle büyüktür. Veksillum (bayrakçık) kanat şeklindedir. Yandaki 2 petal (ala), alttaki 2 petal ile birleşmiş olup, karina (kayıkçık) şeklini alır. Çiçek tomurcuk halindeyken alalar karinayı, veksillum da alaları örter. Genellikle 10 stamenlidir. Bunlar serbest, monodelfus veya diadelfus şeklindedir. Marjinal plasentasyona sahiptir (Seçmen, Gemici, Görk, Bekât ve Leblebici, 2004).

Karmaşıklık sergileyen bu familya 350 cins ve yaklaşık 10,000 tür içerir. Ülkemizde 61 cins ve 900'den fazla türü bulunur (Seçmen ve ark., 2004).

Tohumlarında endosperm yoktur. Bu familya Mimosaceae, Caesalpiniaceae ve Papilionaceae alt familyalarına ayrılır (N. Zeybek ve U. Zeybek, 1994).

İnsanlar ve hayvanlar için gıda maddesi özelliği taşıyan çok önemli türleri vardır. Bazı türleri ilaç, bazı türleri ise süs bitkisi olarak kullanılmaktadır (Seçmen ve ark., 2004).

1.1.1.1 *Trifolium L. (Tırıl, Üçgül, Çayır Üçgülü)*

Bir veya çok yıllık otsu bitkilerdir. Yapraklar trifoliat veya nadiren digitat yapıdadır. Stipüller petiole yapışık, düz kenarlı veya dişlidir. Çiçekler saplı başcıklarda veya kısa rasemuslarda nadiren tektir. Bazı üyelerinde kaliks şişkindir. Stamenler diadelfus. Meyva genellikle kaliksin içinde yer alır (Seçmen ve ark., 2004).

Subtropik ve ılıman bölgelerde yayılış gösterir ve 400 civarında tür içerir. Ülkemizde 95 türü bulunur (Seçmen ve ark., 2004). *T.pratensa*, *T.repens*, *T.purpureum* önde gelenleridir (N. Zeybek ve U. Zeybek, 1994).

Trifolium cinsine ait bazı türler halk arasında tıbbi amaçlı kullanılmaktadır. Kuzey Amerika'da yaşayan yerliler; gut, kanser ve öksürük için, diğerleri ise genellikle astım, bronşit, deri hastalıkları ve bazı fungal rahatsızlıkları gidermek için kullanılmaktadırlar (Wu, Wang ve Simon, 2003). Mısır'da ise halk arasında antidiabetik olarak kullanılmaktadır (Mohamed, Hassaneana, Ohtanib, Kasai ve Yamasaki, 2000).

Epidemiyolojik gözlemler kadar hayvanlarda yapılan incelemeler ve insanlar üzerinde yapılan klinik çalışmalarda günlük diyetle fitoöstrojenlerin alınması, batı toplumlarında çokça görülen arterioskleroz, osteoporoz, kardiyovasküler hastalıklar, bazı kanser türleri, postmenopozal şikayetlerin önlenmesinde yüksek potansiyelin varlığına işaret etmektedir (Krenn, Unterrieder ve Ruprechter, 2002). Çok miktarlarda fitoöstrojen tüketen kadınlarda göğüs kanseri riskinin azaldığı ileri sürülmektedir (Parvu, 2004; Beck, Unterrieder, Krenn, Kubelka ve Jungbauer, 2003). Yine *Trifolium* cinsine ait bazı türler bu açıdan dikkate değer bir öneme sahiptir. Yapılan çalışmalarda bu cinse ait türlerden pek çok flavonoidler, izoflavonlar, flavonoid glikozit ve malonat türevleri, megastigman glikozitler, siyanojenik glikozitler ve triterpen glikozitler çeşitli tekniklerle izole edilmiştir (Simonet, Stochmal, Oleszek ve Macias, 1999; Krenn ve ark, 2002; M. Mohammed, M. H. Mohammed, Ohtani, Kasai ve Yamasaki, 1999; Oleszek ve Stochmal, 2002; Rijke,

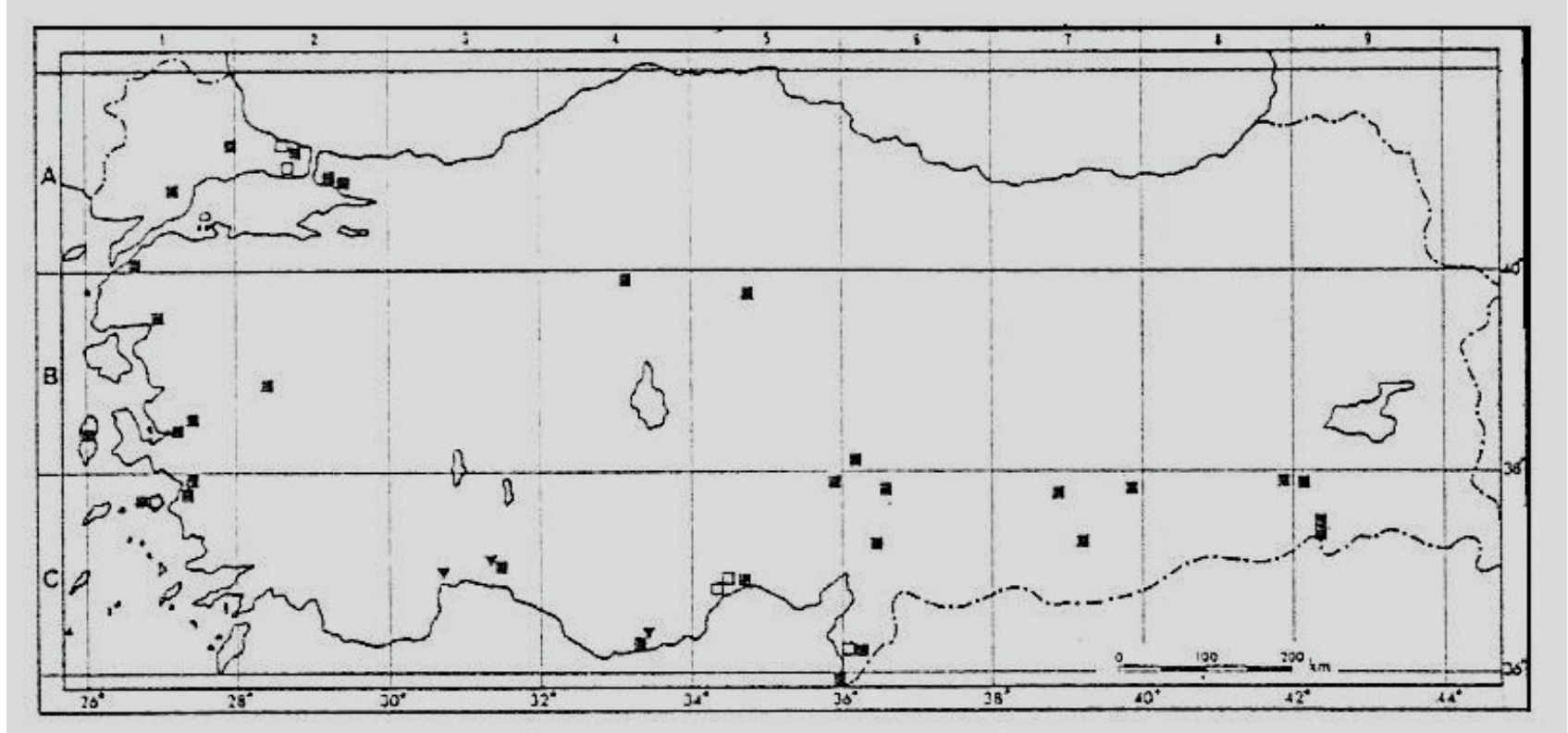
Zafra-Gómez, Ariese, Brinkman ve Gooijer, 2001). Ayrıca *Trifolium* ile ilgili olarak pek çok biyokimyasal, ekolojik ve tarımsal çalışmalar da yapılmıştır

1.1.1.1.1 Trifolium purpureum. 10-50cm boyunda konik biçimli, nadiren yatık, katlı görünümlü, mor çiçekleri olan bir bitki türüdür (**Şekil 1.1**). Bitkiye dağ yamaçlarında 100-500m yüksekliklerde rastlanır.

Trifolium purpureum ve çeşitli varyetelerinin ülkemizdeki dağılımı **Şekil 1.2**' de gösterilmiştir (Davis, 1970).



Şekil 1.1 *Trifolium purpureum* bitkisi

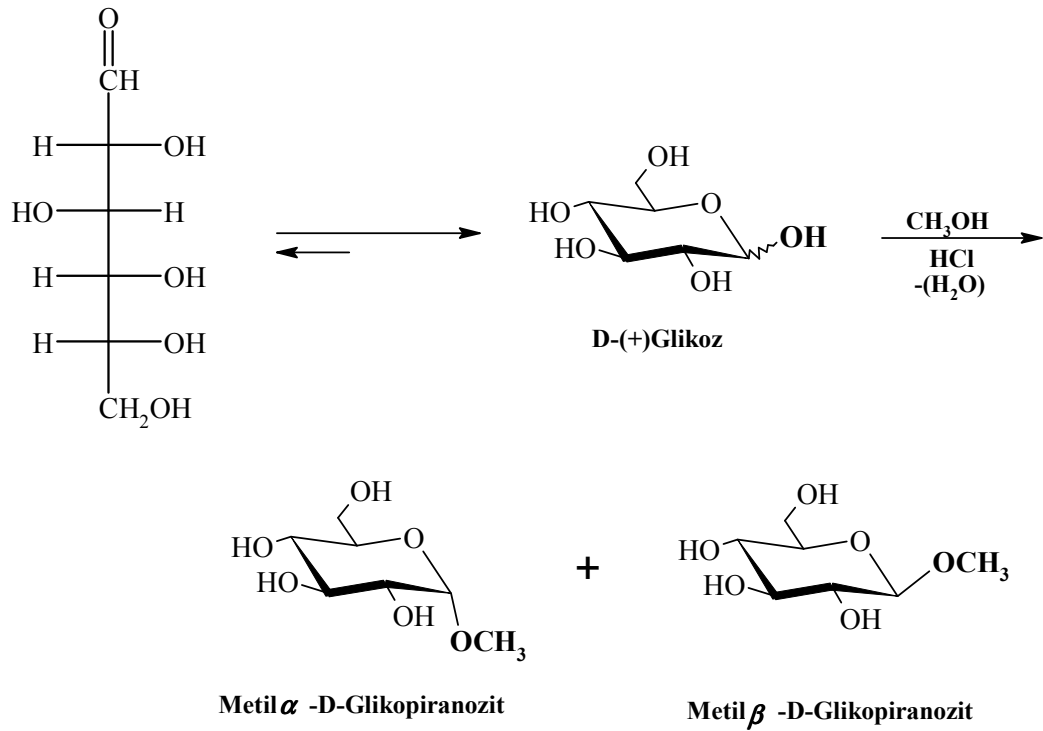


Şekil 1.2 *Trifolium purpureum* varyetelerinin ülkemizdeki dağılımı ■ var. *purpureum* ▼ var. *laxiusculum* □ var. *pamphylicum*

1.2 Kimyasal Bölüm

1.2.1 Glikozitler

Glikozitler, şeker (glikon) ve şeker olmayan (aglikon) kısımlardan oluşan organik bileşiklerdir. Şekerlerin bir kısmı yarı asetal formunda bulunur. Yarı asetal şekerler, alkollerle tam asetallere dönüşürken bir mol su ayrılır. Böylece oluşan asetallere glikozit, bir şeker ve bir alkol arasındaki bağa da glikozit bağı denir (Solomons, 2002).



Şekil 1.3 Glikozit oluşumunu gösterir genel mekanizma

1.2.1.1 Glikozitlerin Genel Özellikleri

Glikozitler doğada bol miktarda bulunurlar. Bitki ve hayvanlardan izolasyonla saf olarak elde edilebilirler. Bu bileşikler karakteristik biyolojik aktif doğalarıyla bilinirler ve yaygın olarak ilaçlarda kullanılırlar. Günümüzde dermatolojik ve damar

hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadırlar (Maul, Sattler, Zerlin, Hinze, Koch, Maier, Grabley ve Thiericke, 1999; Kirmizigul, Anıl, Uçar ve Akdemir, 1996).

Bitkilerde bulunan Glikozitler genellikle katıdır; amorf ve renksiz veya beyaz renklidir. Çok farklı yapılara sahip olduklarından kararlılıkları, çözünürlükleri ve polarize ışığa karşı davranışları farklı olmakla beraber yapılarına göre; su, metanol, etanol, aseton, etilasetat ve piridinde çözünürken petrol eteri ve eter gibi çözücülerde çözünmezler. Çünkü polar bileşiklerdir. Ancak kloroform bazı glikozitleri çözebilmektedir. Glikozitler için genel sayılabilecek çözücü %70-90 etanol'dür. Oksijensiz organik çözücülerdeki çözünürlükleri çok azdır (Conn, 1980).

Bitkilerde değişik miktarlarda tohum, meyve, yaprak, kabuk, kök ve hücre öz suyunda çözünmüş olarak bulunmaktadır. Glikozit miktarının kış ve yaz aylarında değiştiği ve bitkinin yaşı ile ilgili olduğu bilinmektedir (Fang ve Lee, 1991).

Glikozitler ve bir çok doğal bileşik grubu, bitkileri mikrobakteriyel saldırılardan koruma özelliği nedeni ile tarımsal alanda da kullanım bulmuştur. Bitki içeriğinde yer alan fitokimyasalların bazıları parazitlere karşı sığır yetiştiriciliğinde kullanılmaktadır (Marley, Cook, Keatinge, Barrett ve Lampkin 2003; Tschesche ve Wulff, 1973; Woitke, Kayser ve Hiller, 1970).

Glikozit bağlarının konfigürasyonu genelde D şekerlerde β , L şekerlerde α 'dır. Fakat son yıllarda α -D-Glikozidik (Bukharov ve Karlin, 1970), α -D-galaktozidik (Chirva, Kintya ve Kreton, 1971) ve β -L-arabinozidik (Bukharov ve Karneeva, 1971) bağ tipleri de bulunmuştur.

1.2.1.2 Glikozitlerin Sınıflandırılması

Glikozitleri değişik şekillerde sınıflandırmak mümkündür. Glikozidik bağlanmanın oluşumunda söz sahibi atoma göre 4 ana grupta sınıflandırılabilir;

1. N-Glikozitleri (Glikozilaminler)
2. S-Glikozitleri (Tiyoglikozitler)
3. C-Glikozitleri
4. O-Glikozitleri

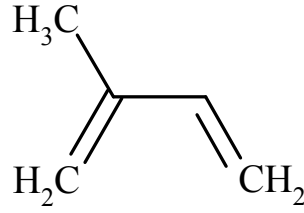
Ancak pek çok bilimsel kaynakta glikozitlerin sınıflandırılması sahip oldukları aglikonlarının yapılarına göre yapılmaktadır.

Glikozitler içerdikleri aglikonların yapısına göre ise dört grupta sınıflandırılabilirler (Aksu, 1972);

1. Triterpenik ve Steroidal Glikozitler
2. Fenolik Glikozitler
3. Siyanogenetik Glikozitler
4. Sülfür Glikozitler

1.2.1.2.1 Terpenler ve Glikozitleri. “Terpen” terimi, önceleri bitkilerde bulunan ve $C_{10}H_{16}$ formülüne sahip hidrokarbonlar için kullanılmıştır. Daha sonra 10 karbonlu terpenlere ($C_{10}H_{16}$) monoterpen, 20 karbonlulara diterpen ($C_{20}H_{32}$), 30 karbonlulara triterpen ($C_{30}H_{48}$), 40 karbonlulara tetraterpen ($C_{40}H_{64}$) ve $(C_5H_8)_n$ formunda olanlara ise politerpen adı verilmiştir. Sonradan; bu hidrokarbonların oksidasyon ve hidrojenasyon ürünü olan türevleri de bulununca bunları ifade etmek üzere kapsamı çok daha geniş olan “terpenoidler” terimi kullanılmıştır.

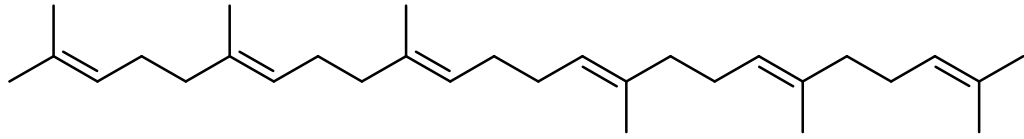
Triterpenler 6 izopren biriminden oluşan 30 karbonlu bileşikler ise de bu yapıların sadece bir kısmına uyan, başka deyimle 30’dan fazla ya da eksik karbonlu birçok bileşik triterpen sınıfından sayılır. Örneğin, nortriterpen ve sekodammaran aglikonları sırasıyla 29 ve 31 karbon içerirler.



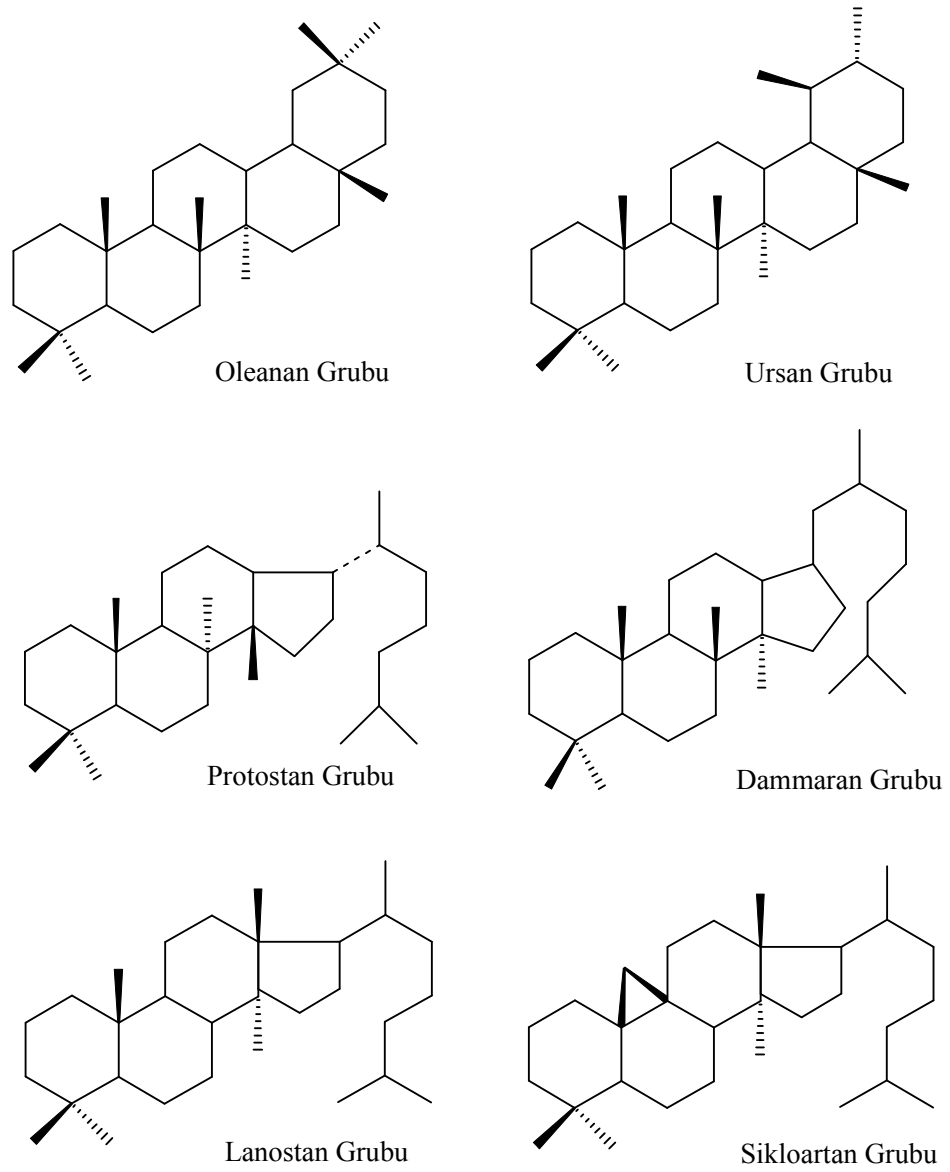
Şekil 1.4 Terpen türevlerinin temel yapı taşı olan izopren

Doğal olarak oluşan maddelerin çok büyük bir biçimi olan triterpenoidler, bitkiler aleminde geniş bir yayılım göstermektedir. Yapısı belirlenen triterpenoidlerin sayısı belki de 500'den fazladır. Lanosterol'ü içeren çok küçük fakat önemli bir grup hayvansal kökenlidir (Newman, 1972; Kırmızıgül ve Anıl, 1993)

Çoğu triterpenoid tetrasiklik ($C_6 - C_6 - C_6 - C_5$), pentasiklik ($C_6 - C_6 - C_6 - C_6 - C_5$ ya da $C_6 - C_6 - C_6 - C_6 - C_6$) iskelet yapısına sahiptir. Fakat asiklik, monosiklik, bisiklik, trisiklik ve hegzasiklik triterpenoidlerde doğal kaynaklardan izole edilmiştir (Xu, Fazio ve Mastuda, 2004). Bunlar, skualen'in halkalaşması ile kurulurlar.



Şekil 1.5 Hegza-en all-trans skualen bütün triterpenoidlerin biyolojik öncüsüdür.

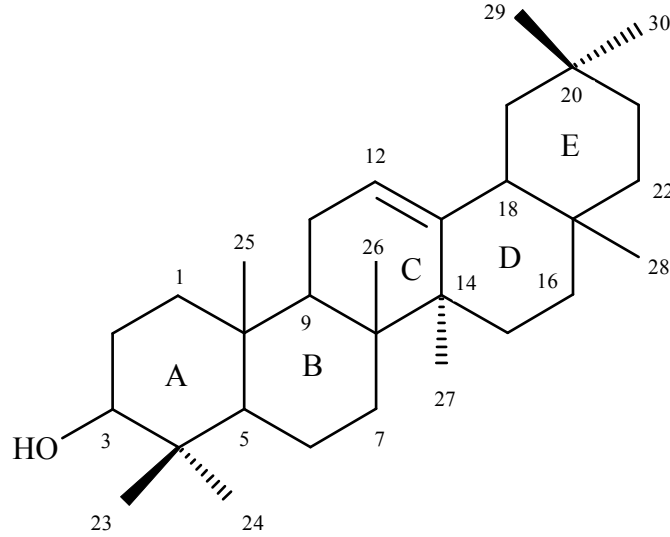


Şekil 1.6 Skualen, oksidoskualen ya da bis-oksidoskualen' in halkalaşması ile oluşan enzimatik ya da doğal triterpenoid iskeletlerinin sayısı 200'dür (Xu ve ark., 2004). Yukarıda bazı triterpen aglikonları verilmiştir.

Triterpenik glikozitlerle ilgili değişik aktivite yayınları mevcuttur. Örneğin *Polyalthia suberosa* (Roxburgh)'nın yaprak ve köklerinin EtOH ekstresinde önemli anti-HIV aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Daha sonra yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda bu etkinin suberosol adı verilen triterpenden kaynaklandığı saptanmıştır (Anıl, Uçar ve Akdemir, Kırmızıgül 1996; Li, N.J Sun, Kashiwada ve L.Sun, 1993) *Polygala senega* var. *latifolia* bitkisinden elde edilen triterpen

glikozitlerin fareler üzerinde hipoglisemik etki gösterdiği bildirilmiştir (Kako, Miura, Nishiyama, Ichimaru, Moriyasu ve Kato,1997)

Bilinen triterpenik aglikonların büyük kısmı β -amiren halkası taşımaktadır. Bu tip triterpenler 3. karbondan bir hidroksil grubu taşırlar.



Şekil 1.7 β -amiren yapısı

Diğer hidroksil grupları D ve E halkalarında genellikle 16., 21. ve 22. karbondan, nadiren 2. ve 15. karbondan bulunur. β - amiren halkasında yer alan 8 metil grubundan, özellikle 23/24, 29/30 ve 28 nolu metil grupları farklı fonksiyonel gruplara yükseltgenebilirler. Bunlar, hidroksil veya karboksil gruplarına, nadiren aldehitlere dönüşürler (Woitke, Kayser ve Hiller 1970). Pentasiklik halka sisteminde keto grubu da bulunabilir. İskeleti oluşturan herhangi bir halkada çift bağ varsa, bu genellikle 12. ve 13. karbonlar arasındadır, nadiren bazı halkalarda 17. ve 18. karbonlar arasında da yer alabilir. Epoksit formu genellikle 13. ve 28. karbonlar arasında meydana gelir. Epoksit taşıyan aglikonlarda çift bağ bulunmaz ya da 10 ile 11. karbonlar arasında yer alır (Kırmızıgül ve Anıl, 1993).

Aglikon yapısına ikinci bir şeker molekülü bağlı olabilir. Bu durumda ikinci şeker zinciri daima karboksil grubu aracılığıyla 17. karbondan bağlıdır. Aglikon ile ikinci şeker zinciri arasındaki bağ O-açılglükozidiktir. 3. karbon üzerinde bağlanma ise O-glikozidiktir (Kırmızıgül ve Anıl, 1993).

β -amiren iskeletinde grupların bağlanma yeri ve şekillerindeki bu farklılıklar triterpenlerin biyokimyasal önemini değiştirmektedir.

Çok geniş bir doğal bileşik grubunu oluşturan triterpen glikozitleri aşağıdaki gibi sınıflandırmak mümkündür.

A. Monodesmozidik Glikozitler

- a) Nötral Glikozitler
- b) Ester Glikozitler
- c) Asidik Glikozitler

B. Bidesmozidik Glikozitler

- a. Nötral bidesmozidik Glikozitler
- b. Asidik bidesmozidik Glikozitler

C. Hayvansal Glikozitler

A. Monodesmozidik Glikozitler

Bu glikozit türünde düz ya da dallanmış şeker zinciri aglikonun 3 numaralı karbonu üzerinde yer alan hidroksil grubuna bir glikozidik bağ ile bağlanmıştır. Bir bitkide sadece bir aglikon iskeletinden türevlenmiş birden çok monodesmozidik glikozit bulunabilir. Örneğin, *Polmetia ridleyi* bitkisinde aglikon olarak oleanolik asitten türevlenmiş 6 farklı monodesmozidik triterpen glikozit bildirilmiştir (Voutquenne, Guinot, Thoison, Sevenet ve Lavaud, 2003).

- a) Nötral Glikozitler: Şeker molekülü 3 numaralı karbonda yer alan hidroksil grubu üzerinden bağlanmıştır. Doğada nadir bulunurlar.
- b) Ester Glikozitler: Oldukça karmaşık bir glikozit türü olup bazılarının yapısal konfigürasyonları tam olarak aydınlatılamamıştır.

c) Asidik Glikozitler: Genellikle aglikon ya da şekerde bir asit grubu içeren glikozitlerdir. Bazen aglikon şeker zincirine 17. karbondaki yer alan karboksil grubu üzerinden bağlanır. Böyle glikozitlere açıl glikozitler adı verilip doğada nadir bulunur.

B. Bidesmozidik Glikozitler

Bitkiler farklı triterpen glikozit sınıflarını yapılarında bulundurabilen canlılardır. Örneğin, *Harpullia austro-caledonica* bitkisi üzerinde yapılan bir araştırmada ender rastlanan 3 bidesmozidik glikozit izole edilmiştir. Aynı bitki üzerinde yapılan bir başka çalışmada bitkinin kabuklarından 8 monodesmozidik glikozit izole edilmiştir (Voutquenne, Guinot, Froissar, Thoison, Litaudon ve Lavaud, 2005)

Bu glikozitler iki şeker zinciri taşır.

a. Nötral bidesmozidik glikozitler: Aglikonları asidik olup iki şeker zincirine sahiptirler.

b. Asidik bidesmozidik glikozitler: Şeker zincirinde çok sayıda monosakkarit birimi bulunan, oldukça polar glikozitlerdir. Bu grup glikozitlerin aglikonu genellikle gipsogenin' dir. Asidik karakteri glikozitin karbonhidrat kısmında yer alan D-glukuronik asitten ileri gelir.

C. Hayvansal Glikozitler

Şeker zinciri, aglikonun 3. karbonundaki hidroksil grubun üzerinden bağlıdır. Şeker zincirinin sonunda bir hidrojen sülfat grubu bulunur. Bu çeşit glikozitler genelde deniz hıyarı ve deniz yıldızı ailelerinde bulunmaktadır (Kitagawa, Koboyashi ve Sugawara, 1978a, 1978b). Özellikle deniz hıyarlarındaki glikozitler oldukça karmaşıktır ve pek çok değişkenle birbirlerinden ayrılmaktadır. Bu değişkenler arasında, karbonhidrat zincirindeki monosakkaritlerin konumu ve sayısı, monosakkaritlere bağlı sülfatların konumu ve sayısı, aglikonun siklik sistemindeki

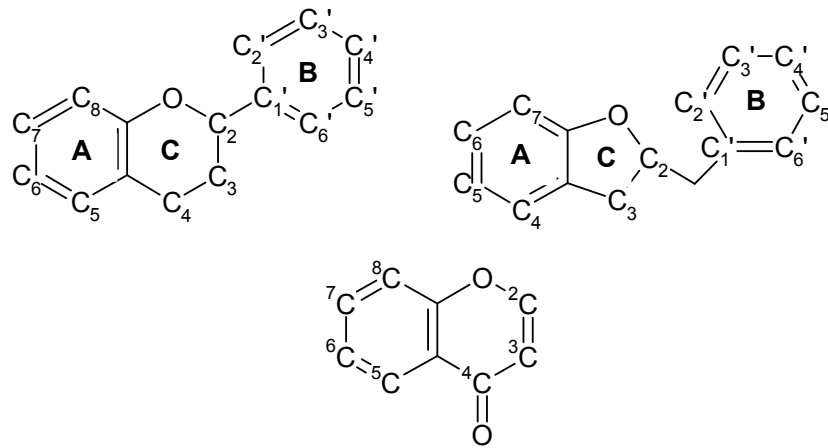
çift bağların konumu ve çok değişik bağlanma noktalarında hidroksi, epoksi, asetoksi ve keton gruplarının varlığı sayılabilir. Yukarıdaki farklılıklar triterpen glikozitlerin, deniz hıyarlarının farklı taksonomik türlerinde karşımıza çıkmasına neden olmaktadır (Moraes ark., 2004).

1.2.1.2.2 Flavonoidler ve Glikozitleri. Flavonoidler fenilalaninden sentezlenen bitki pigmentleridir, genel olarak çiçek petallerinde sergiledikleri olağanüstü renkleri ile bilinirler, UV ışığı ile uyarıldıklarında çoğunlukla parlak floresans özellik gösterirler ve tüm yeşil bitki hücrelerinde değişen miktarlarda bulunurlar (Havsteen, 2002; Harborne, 1964, 1967)

Flavonoidlerin propanoid yapısı iki kaynaşmış halkadan oluşmuştur. Birinci halka A aromatikdir. İkinci halka oksijen içeren heterosiklik bir halka olan C dir. Bu halka karbon karbon bağı ile aromatik B halkasına bağlanmıştır (Peterson ve Dywer, 1998).

Söz konusu yapının birkaç istisnası da vardır. 6 üyeli heterosiklik halkanın izomerik açık formu oluşur ya da beş üyeli bir halka ile yer değiştirir (**Şekil 1.8**).

Flavonoid terimi kromon ile eş anlamlı olan çoğunlukla benzo- γ -piron'lardan türetilmiş bitki pigmentlerinin genel ismidir (Havsteen, 2002).

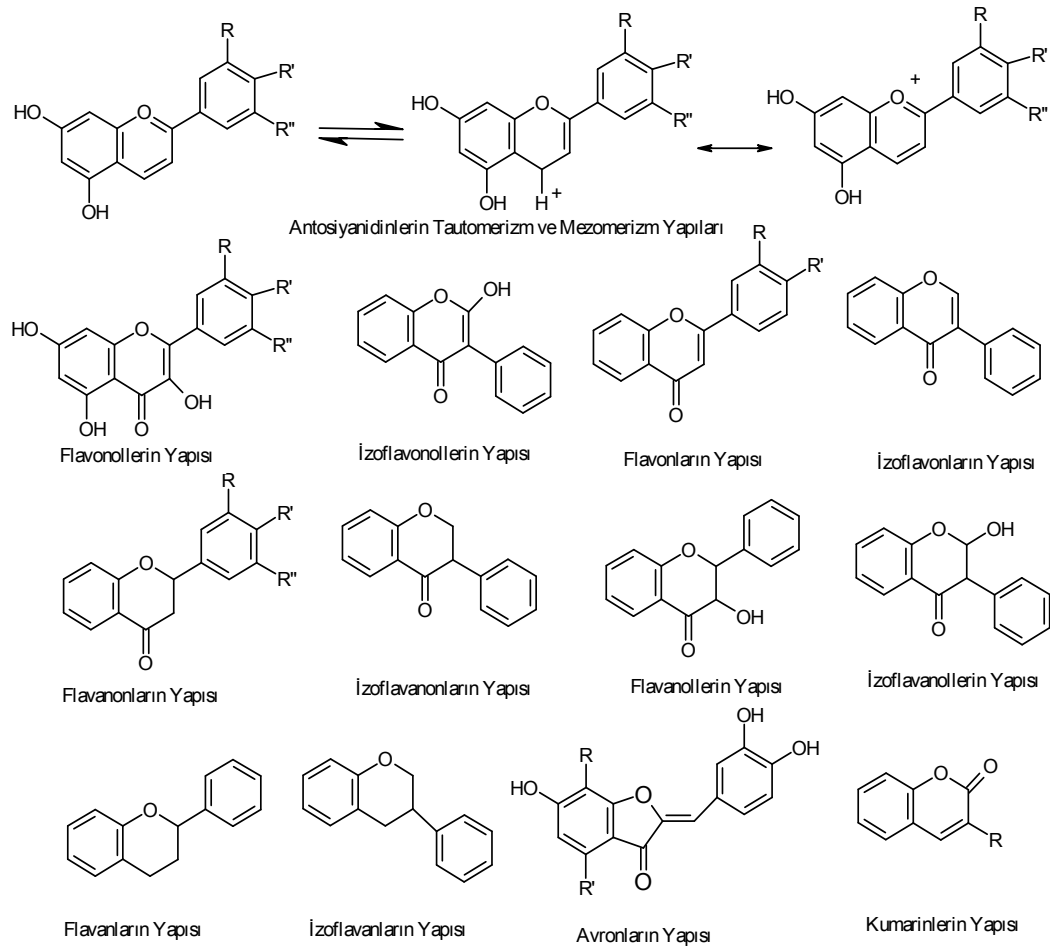


Şekil 1.8 Genel flavonoid iskeletleri ve benzo- γ -piron yapısı

Bu grup bileşikler, antosiyanidinler, hidroksi-4-dihidroflavonoller; antosiyanidler, antosiyanidinlerin glikozitleri; flavonoller, 3-fenil-2-hidroksi-kromonlar; flavonlar, 2-fenil-kromonlar; izo-flavonlar, 3-fenil-kromonlar; flavanlar, 2-fenil-3-dihidro-kromonlar, 2-fenil-flavononlar; izo-flavonlar, 3-fenil-2-dihidro kromonlar; flavanoller, 2-fenil-3-hidro-3-hidroksi-kromonlar(kateşinler); izoflavanoller, 2-hidro-2-hidroksi-3-fenil-kromonlar; flavanlar, 2-fenil-di-hidro-benzo- γ -piranlar; izo-flavanlar, 3-fenil-di-hidro- γ -benzo piranlar; auronlar, benzo-furonlar; ve kumarinler, benzo- γ -piron türevlerinden oluşmaktadırlar (Havsteen, 2002; Croft 1998; Harborne, 1964, 1967).

Son yıllarda flavonoid türevleri üzerinde yapılan bilimsel çalışmaların sayısı hızla artmaktadır. Bu çalışmalar flavonoid türevlerinin, antibakteriyal, antiviral, anti-enflamatuar, antikanser ve antialerjik gibi çeşitli biyolojik etkilere sahip olduklarını göstermektedir (Montoro, Braca, Pizza ve De Tomasi, 2005; Di Carlo, Mascolo, Izzo ve Capasso, 1999, Havsteen, 1983). İn vitro ve hayvan çalışmaları da flavonoidlerin antioksidan ve antimutajenik aktivitelere sahip olduğunu göstermektedir (Peterson ve Dywer, 1998).

Flavonoidler'in Flavon ve flavonoller gibi sınıfları bazı flavon türlerinden (izoflavonoid gibi) daha yaygındırlar (Harborne, 1973). Buna karşın, baklagillerdeki flavonoidlerin major grubu izoflavonoidlerdir. İzoflavonoidler, flavonoidlerin en çok östrojenik aktiviteleri ile bilinen farklı bir sınıftır (Peterson ve Dywer, 1998).



Şekil 1.9 Flavonoid Çeşitleri

Bilindiği gibi flavonoidler, fenolik bileşiklerdir. Sınıflandırılmalarında da bu bileşikler fenolik glikozitlerin bir üyesi olarak değerlendirilebiliriz.

Fenolik glikozitler aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir.

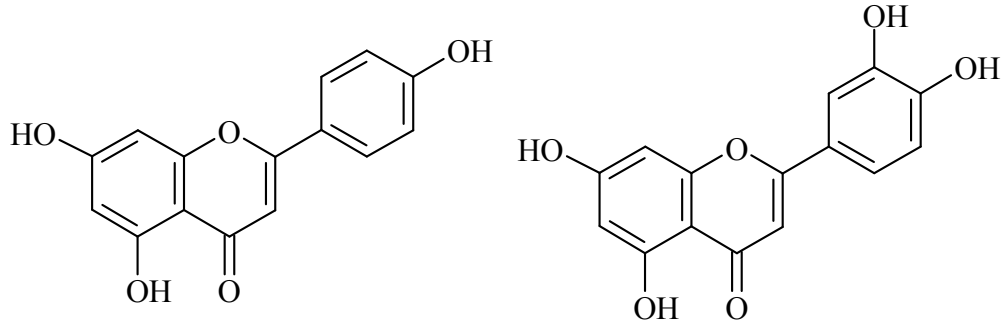
A. Fenolik Glikozitler:

- Flavon ve Flavonol Glikozitler
- C- flavonoid Glikozitler
- Çalkon ve auron Glikozitler
- İzoflavonoid Glikozitler

a. Flavon ve Flavonol Glikozitler

Flavonoid türleri içinde en bol bulunanlardır. A halkasındaki C-5 ve C-7 karbonlarına iki hidroksil grubu bağlanabilir. Kapalı tohumlu bitkilerde flavon glikozitlerden sadece apigenin ve luteolin yaygın olarak bulunmaktadır.

Antioksidan özellikleri ile de bilinen flavonlar bitki aleminde bulunan sarı renkli pigmentlerdir. Flavonlar doğada aglikonları ya da glikozitleri halinde bulunurlar. Apigenin ve luteolin yapılarından da görülebileceği gibi genellikle 5, 7, 3',4' ve 5' konumlarından birinde ya da bir kaçında hidroksil grubu içerebilirler.



Şekil 1.10 Apigenin ve Luteolin Yapıları

5, 7 ve 4' konumları genellikle metil grubu içermezken, 3' ve 5' karbonları çoğunlukla metillenmiş halde bulunur.

Flavonoller sebze ve meyvelerde oldukça yaygın olan bir flavonoid türüdür. Kuersetin bütün flavonoidlerin en yaygın olanıdır (Peterson ve Dwyer, 1998).

Flavon ve flavonol glikozitler kumaş boyama gibi farklı bir kullanım alanına da sahiptirler. Günümüzde diüretik etkilerinden de faydalanılmaktadır (Baytop, 1980).

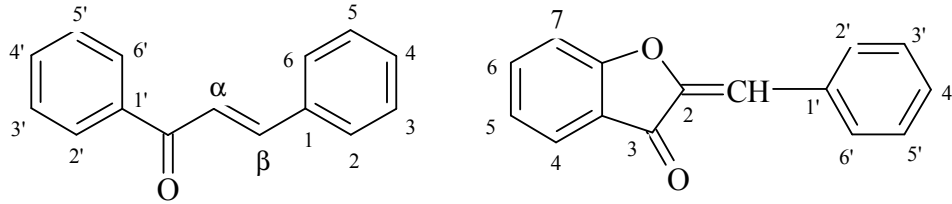
Bunların yanı sıra, pek çok flavonol glikozit antioksidan aktif özellik göstermektedir. Örneğin *Saururus chinensis* bitkisinden izole edilen üç flavonol glikozitin (kuersetin mikuelianin, kuersitrin) DPPH• ve O₂•⁻ radikallerine karşı sönmüleyici etki gösterdiği rapor edilmiştir (Kang, Cho, Oh, Sohn, ve Kim, 2004).

b. C- Flavonoid Glikozitler

C-Flavonoid glikozitler bir veya iki şeker molekülü bağlayabilen glikozitlerdir. Tüm O-glikozitlerin hidroliz olduğu koşullarda C-glikozid flavonoidlerin asitlerle hidrolizi sonucunda herhangi bir flavonoid aglikonu elde edilemez (Harborne ve Mabry, 1975).

c. Çalkon ve Auron Glikozitler

Çalkonlar, heterosiklik C halkasına sahip olmadıklarından flavonoidler içinde nadir bir sınıfı oluşturmaktadırlar. Antioksidan özelliklerine ilişkin pek fazla araştırma yoktur. Bu araştırmalarda göstermiş oldukları antioksidan aktivite α β arasında bir çift bağa sahip olmalarına ve halkasal yapılarında hidroksi ve metoksi grupları içermelerine bağlanmıştır. Buna rağmen Orta ve Güney Amerika'nın tropikal bölgelerinde yetişen *Macluria tinctoria* (Chlorophora) ağacından izole edilen çalkon glikozitlerin, içerdiği flavanonlardan daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip oldukları bulunmuştur (Cioffi, Escobar, Braca ve De Tommasi, 2003).



Şekil 1.11 Çalkon ve auron iskeletleri

Auronlar flavonoidler içinde en az rastlanan türdür. Doğada yaygın değildirler. Ancak *Uvaria hamiltonii*'dan izole edilen bir auron antikanser aktivitesi gösteren Combretastatin reaktifine benzerliği ile dikkat çekmektedir. Bunun yanı sıra auronların analjezik etkiye sahip oldukları da bildirilmektedir (Lawrence, Rennison, McGown ve Hadfield, 2003).

d. İzoflavonoid Glikozitler

İzoflavonoidler bitkilerde yer alan doğal bileşikler içinde büyük bir sınıfı oluşturmaktadır. Bitkilerde bilinen 3000'den fazla flavon ve 700'den fazla izoflavon vardır ve Leguminosae familyasında izoflavonlar geniş bir dağılıma sahiptir. Yapıları 3-fenilbenzopiron'a (3-fenilkromon) benzer. Bu ana yapıda metilasyon, hidroksilasyon ve glikolizasyon dereceleri farklıdır. Bitkilerde izoflavonların sentezi bir izoflavonoidin karbon iskeletine ve üç merkez atomunun oksidasyon derecesine bağlıdır. *Trifolium pratense*'daki izoflavon yapıları östrojenik özelliklere sahiptir. Menopozal sendromların ılımlı seyretmesinde, kanserin önlenmesinde, ve diğer sağlık sorunları üzerinde önemli rol oynamaktadır (Parvu, 2004; Wu Wang ve Simon, 2003; Klejdus, Vitamvasova-Sterbova ve Kuban, 2001; Ingram, Sandres, Kolybaba, Lopez ve Lancet, 1997; Cassidy, Bingham ve Setchell, 1994).

1.2.2 Esansiyel Yağ Asitleri (EFAs)

İnsan vücudu trigliseritlerin farklı kombinasyonlarını besinlerle alır ve çeşitli metabolik süreçlerde yardımcı olacak farklı türden yağlara dönüştürür. Yağların temel yapı taşları yağ asitleridir. Yağ asitleri, doymuş ve doymamış yağ asitleri olarak sınıflandırılabilir. Esansiyel yağ asitleri, pek çoğu insan vücudu tarafından sentezlenmeyen (EFA) doymamış, yani yapısında bir ya da daha fazla çift bağ taşıyan yağ asitleridir (**Tablo 1.1**). Beslenme yoluyla alınmaları gereklidir. Bu yağ asitleri tekli doymamış yağ asitleri (UFA) ve çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) olarak gruplandırılabilir.

Dihomo-gamma-linolenik asit (DGLA) gibi çoklu doymamış yağ asiti içeren araşidonik asit (AA) ve Eikosapentaenoik asit (EPA), biyolojik olaylarda sıkça kullanılan eikosanoidlerin biyosentezinde öncü rolü oynamaktadır. Membranların EPA bileşenleri eikosanoid sentezi için bir kaynak oluştururken dokosaheksaenoik asit (DHA) içeriği bu sentez için doğrudan ya da dolaylı olarak yardımcı olabilir. Çok iyi açıklanamamış bir konu olmakla beraber, DHA oksijen içeren çeşitli

eikosanoid metabolitlerine dönüşümünü sağlayacak olan bir geri dönüşüm tepkimesi ile EPA oluşumuna bir kaynak da olabilmektedir (Youdim, Martin ve Joseph, 2000).

Tablo 1.1 Bazı esansiyel yağ asitleri

Karbon Zincirinin Uzunluğu	Omega-3 (ω -3)	Omega-6 (ω -6)	Omega-9 (ω -9)
18	α -linolenik asit(ALA)	Linoleik asit(LA)	Oleik asit
18	Stearidonik asit(SDA)	γ - linolenik asit(GLA)	-
20	Eikosatetraenoik asit	Dihomogamma-linolenik asit (DGLA)	-
20	Eikosapentaenoik asit (EPA)	Araşidonik asit(AA)	-
22	Dokosahegzaenoik asit (DHA)	Dokosapentaenoik asit	-

Bitkiler özellikle yağlı tohumlular, ω -6 yağ asitleri yönünden zengin kaynaklardır. Bazı yapraklı sebzeler ve meyveler ile pek çok deniz canlısı ω -3 yağ asidi içerir (Youdim, Martin ve Joseph, 2000).

α -linolenik asit (ALA), EPA ve DHA, balık ve bitkilerde bulunan ω -3 esansiyel yağ asitleri olarak bilinir. Bu yağ asitlerinin kalp üzerinde koruyucu etkisi vardır. Kandaki kolesterol, trigliserit seviyelerini düşürmesi ve kan basıncını azaltması böylece kalp rahatsızlıklarının gidermesinde kullanımı yararlı etkilerinden bazılarıdır (Heuer, Yaniv ve Ravina, 2002).

Beslenmede linolenik asit içeriğinin yüzde olarak düşük olması ya da yetersizliği ise aşağıdaki etkilerin ortaya çıkmasına neden olur.

- Gelişim bozuklukları
- Öğrenme güçlüğü
- Eller ve ayaklarda karıncalanma
- Kol ve bacak gibi vücut bölümlerinin koordinasyonunda yetersizlikler.
- Görmede zayıflık

AA, DGLA, γ -linolenik asit (GLA) ve Linoleik asit (LA) ω -6 yağ asitleridir.

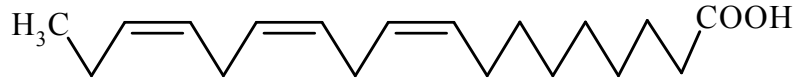
Bu yağ asitlerinin faydalarından bazıları şunlardır;

- Aşırı kilolu kimselerde kilo vermeyi kolaylaştırır.
- Depresyon ve şizofreni belirtilerini azaltır.
- Adet öncesi sendromu belirtilerini hafifletir.
- Alkol bağımlılığını azaltır.
- Trombosit kümelenmesini önler.

Eksiklerinde; çocuk düşürme, akne kişilik ve davranışlarda değişimler, artrit; safra kesesinde fonksiyon bozukluğu, gelişim bozuklukları, yaraların geç iyileşmesi, erkeklerde kısırlık, deri hastalıkları, kardiyovasküler ve böbrek problemleri , prostat inflamasyonu gibi etkiler görülür.

Bunlardan anlaşılacağı gibi, esansiyel yağ asitlerinin yeterince kullanılmaması sonucunda pek çok ciddi rahatsızlık oluşur. Esansiyel yağ asitlerinin uzun süreli eksikliği ölüme yol açabilecek kadar tehlikelidir. Olumsuz etkiler yeterli miktarda yağ asitlerinin kişiye verilmesiyle ortadan kalkar veya azalır.

Bu nedenlerle, esansiyel yağ asitlerine ne kadar ihtiyaç duyulduğu bireyin beslenme biçimine ve fiziksel aktivitesine bağlıdır. Yine bir diğer önemli nokta bu yağ asitlerinin gıdalarla alınan diğer besin maddeleri ile sinerjik etkileridir. Örneğin B₃, B₆, C, A vitaminleri ve çinko gibi bazı mineraller yönünden dengeli bir beslenme şekli esansiyel yağ asitlerinin vücutta daha etkili olarak kullanımına yardımcı olur.



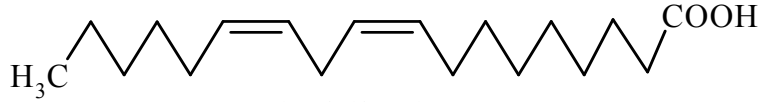
α – Linolenik asit (ALA; 18:3n-3)



Eikosapentaenoik asit (EPA; 20:5n-3)



Dokosahegzaenoik asit (DHA; 22:6n-3)



Linoleik asit (18:2n-6)



Araşidonik asit (20:4n-6)

Şekil 1.12 Omega-3 ve omega-6 yağ asitlerinin formülleri.

Formüllerde yer alan 3n-3, 5n-3 gibi kısaltmalar yağ asidi zincirinin metil ucundan başlayarak ilk çift bağın konumunu ve zincirdeki çift bağ sayısını gösterir.

1.2.3 Antioksidanlar

Bilindiği gibi antioksidanlar insan vücudunda hücre hasarına yol açan zararlı serbest radikallerden vücudu korumaya yardım eden biyoorganik moleküllerdir. Aslında insan vücudunda radikal oluşumu her zaman gerçekleşmektedir. Esas sorun serbest radikal üretimi ile vücut savunma sistemi arasında bir dengesizliğin ortaya çıkmasıdır. Çünkü böyle bir durumda oksidatif hasar tüm hücrel hedeflere (Proteinler, lipidler, DNA molekülleri gibi) (Amić, Davidović- Amić, Bešlo ve Trinajstić, 2003) yayılır.

Kanser, atheroskleroz, kardiyoloji ve serebrovasküler hastalıklar, diyabet türleri, immün sistem yetersizliği, Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklar, artrit ve erken yaşlanma gibi sağlık sorunları aşırı reaktif serbest radikallerin tahrip edici etkilerine bağlanabilir (Amić ve ark., 2003 ; Benavente-Garcia, Castillo, Marine Ortuno ve Del Rio, 1997).

İnsan vücudunda radikallerin olumsuz etkilerini giderebilen bazı enzimatik mekanizmalar vardır. Buna ilave olarak tükettiğimiz besinlerde antioksidan kapasiteye sahip çeşitli organik maddeler de bulunmaktadır. C ve E vitamini en çok bilinen antioksidan maddelerdir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda flavonoidlerin güçlü antioksidanlar olduğuna dikkat çekilmektedir. Bu çalışmalarda flavonoid türü bileşiklerin otooksidasyon reaksiyonlarını inhibe edebildiğine ve serbest radikalleri sönmüleyebildiğine ancak yapı ile aktivite ilişkisinin açık olmadığına işaret edilmektedir. Flavonoidler reaktif oksijen ve azot radikal türlerini sönmülemde birden çok özelliğe sahip olabilir. Flavonoid molekülünün B halkasında orto hidroksilasyonu, serbest hidroksil gruplarının çokluğu, karbon halkasında 2 ve 3 numaralı karbonlar arasında bir çift bağın ya da 3. karbondaki bir hidroksil grubunun varlığı genel olarak antioksidan ve antiradikal aktivitelerin nedeni olarak sıralanmıştır (Burda ve Oleszek, 2001).

Genistein flavonoidine yönelik olarak yapılan çalışmalarda eikosapentanoik asitle sinerjik bir etki göstererek in vitro koşullarda hızla artan göğüs kanserin inhibe ettiği gösterilmiştir. Aynı yayında *Genistein*'in pankreas kanser hücrelerinin artışı da yeni bir yolla inhibe ettiği belirtilmiştir (Reddy, Odhav ve Bhoola 2003; Nakagawa, ve ark., 2000).

Trifolium cinsi üzerinde yapılan çalışmalarda flavonoid ve triterpen içeriğinin zenginliği dikkati çekmektedir. Flavonoidler ve bazı diğer doğal bileşik grupları antioksidan kapasiteleri açısından son derece önemlidir (Oleszek ve Stochmal, 2002; Burda ve Oleszek, 2001).

Sağlıklı bir yaşam için antioksidanların düzenli olarak besinler yoluyla vücuda alınması gerekir. Özellikle bitkisel kaynakların bu açıdan zengin oluşu fitokimyasalların önemini bir kez daha ortaya koymaktadır.

1.2.4 Antimikrobiyal Aktivite

Pek çok Antimikrobiyal aktivite testi bitkilerin halk arasında kullanımına paralel sonuçlar vermektedir. Bu aktivite testlerinden en önemlileri Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC) ve Agar Disk Diffüzyon yöntemleriyle gerçekleştirilir (Thiem ve Goslinska, 2004). Bazı doğal bileşikler özellikle glikozidik bileşikler Antimikrobiyal aktif bileşiklerdir(Rai ve Mares, 2003).

Genellikle halk arası kullanımına yönelik olarak seçilen bitki çalışmalarında özellikle bakılması gereken aktivite testi Antimikrobiyal aktivite testi dir. Bu testleri *in vivo* ve *in vitro* koşullarda yapılan başka aktivite testleri takip eder.

Trifolium cinsine ait aktivite testlerine ait çalışmalar olmasına rağmen *Trifolium purpureum* Antimikrobiyal olarak ilk kez incelenmiştir.

BÖLÜM 2

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Bitki Materyali

Trifolium purpureum örneği (Leguminosae) İzmir, Bozdağ-Sırtlankaya mevkiinde 150-200m den, Mayıs 2003 de toplanıp, Ege Üniversitesi Herbaryum merkezinde Herb. No: 38463 numarası ile depolandı.

2.2 Genel

Bu çalışmada *Trifolium purpureum* bitkisinin toprak üstü ve toprak altı kısımları bir arada çalışılmıştır. Bitki materyalinden 2 bileşik izole edilerek yapıları aydınlatılmıştır. Yapı aydınlatma çalışmaları sırasında çeşitli spektral analiz yöntemleri kullanılmıştır. Bu analiz yöntemleri için kullanılan aletler ve çözgenler ile kromatografik ve kimyasal analizler için kullanılan dolgu maddeleri ve çözgenler aşağıda verilmiştir (**Tablo 2.1**).

Spektroskopik çalışmalardan IR analizleri için Mattson 1000, FT-IR system cihazı kullanıldı. UV spektrumları, UV-160A UV-Visible spectrophotometresi'nde alındı. 1D (¹H ve ¹³C) ve 2D (COSY, HMQC, HMBC) NMR spektrumları Varian AS 400 MHz ve Bruker 400 MHz NMR spektrometrelerinde kaydedildi. Kütle analizi PerkinElmer / Sciex API III and Biomolecular Analyzer ESI / APCI Triple Quadruple ve Agilent 1100 Series LC-MSD cihazları kullanılarak gerçekleştirildi.

GC-Mass analizi dimetilsiloksan ile doldurulmuş 30m x 0,25mm x 0.25µm boyutlarındaki HP-5 MS apolar kolon kullanılarak Hewlett Packard kombine sisteminde[GC (6890) – MSD (Mass Selective Detector)] gerçekleştirildi.

Örneklerin optik çevirme açıları [(Model WZZ-1S (1SS)) SOIF W2Z-2S. Automatic Polarimeter cihazı ile ölçüldü.

İnce tabaka kromatografisi için Silicagel F₂₅₄ (Merck 5554) ve RP-18 F₂₅₄ (Merck 5560) hazır tabakalar kullanıldı. Kolon kromatografisi için Silicagel 60 (Merck 7743), Polyamide 6 (Fluka 2395), Sephadex-LH 20 (Fluka 84952), Aluminium oxide 90 active neutral (Merck 1077) ve LiChroprep RP-18 (Merck 9303) dolgu maddeleri kullanıldı.

Kimyasal ve kromatografik (Vakum likid kromatografi, ince tabaka kromatografisi, kolon kromatografisi) çalışmalarda aşağıdaki çözücü sistemlerinden yararlanıldı.

Tablo 2.1 Çözgen sistemleri

Kod	Çözgen Sistemi	Oranlar
A	MeOH : H ₂ O	100 : 0
B	MeOH : H ₂ O	90 : 10
C	MeOH : H ₂ O	80 : 20
D	MeOH : H ₂ O	70 : 30
E	MeOH : H ₂ O	60 : 40
F	MeOH : H ₂ O	50 : 50
G	MeOH : H ₂ O	40 : 60
H	MeOH : H ₂ O	30 : 70
I	MeOH : H ₂ O	20 : 80
J	MeOH : H ₂ O	10 : 90
K	H ₂ O : MeOH	100 : 0
L	MeOH + CH ₃ COOH	100 + %5
M	CH ₂ Cl ₂ : MeOH : H ₂ O	70 : 30 : 3
N	CH ₂ Cl ₂ : MeOH : H ₂ O	70 : 30 : 4
O	CH ₂ Cl ₂ : MeOH : H ₂ O	65 : 30 : 5
P	CH ₂ Cl ₂ : MeOH : H ₂ O	61 : 32 : 7
R	CH ₂ Cl ₂ : MeOH : H ₂ O + MeOH	61 : 32 : 7 + %5
S	CH ₂ Cl ₂ : MeOH : H ₂ O + MeOH	61 : 32 : 7 + %10
T	CH ₂ Cl ₂ : MeOH : H ₂ O + MeOH	61 : 32 : 7 + %20

İnce tabaka kromatografisinde (TLC) farklı çeşitli çözgen sistemleriyle yürütülen tabakalar 254 ve 366 nm dalga boylarında UV ışığı altında incelendi. UV ışığında görülemeyen lekeler, etanol'de hazırlanmış % 20' lik H_2SO_4 çözeltisi püskürtüldükten sonra yaklaşık 3 dakika $150^0 C$ ' de bekletilerek görülebilir hale getirildi.

2.3 İzolasyon ve Saflandırma

700g bitki materyali kurutularak öğütüldükten sonra önce 3x2L MeOH ile ekstrakte edildi. Daha sonra posa 1:1 / MeOH : H_2O (2L) ile ekstrakte edildi. Her iki süzüntü 40^0C ' de döner buharlaştırıcı ile kuruluğa getirildi. MeOH ekstresinden, klorofil ve yağimsı maddeleri ayırabilmek için önce hegzan (20 x 100mL) daha sonra CH_2Cl_2 (20 x 100mL) ile ekstraksiyon yapıldı. Ekstreler kuruluğa getirildi. Kalan kısım BuOH: H_2O /1:1 ile ekstrakte edildi. BuOH ve H_2O fazları ayrılarak çözgenleri uzaklaştırıldı. Her ekstreden antimikrobiyal aktivite için kuru halde 0,5g örnek alındı.

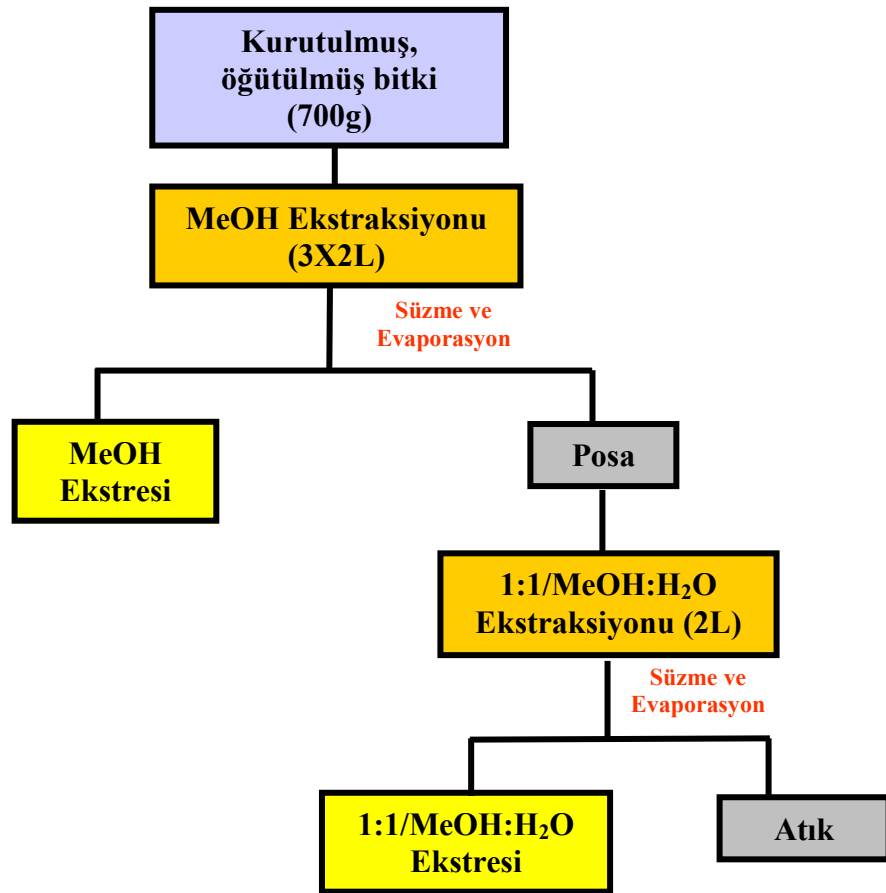
TLC gözlemlerine dayanarak BuOH'ün H_2O fazından izole edilmesi uygun görülen bir bileşik belirlendi. Şeker artıklarından ayırabilmek için MeOH ile çöktürme yapıldı. TLC sonucu çözünen kısımda izole etmeyi hedeflediğimiz bileşiğin daha yoğun olduğu görüldü. Çözünen kısım poliamid dolgu maddesi ve B, C, D, E, F, G, H, I, J çözgen sistemlerini kullanarak artan polaritede kolondan elüe edildi. İşlem sonrası 9 fraksiyon elde edildi. Fr6'nın izole edilmesi hedeflenen bileşik yönünden daha zengin olduğu görüldü. Fr6 için silikajel-60 dolgu maddesi ile kolon hazırlandı. Sırasıyla M, N, O, P, R, S, T çözgen sistemleri ile elüe edildi. Toplanan 5 fraksiyondan ikincisi saf olarak elde edildi (Bileşik 1).

Pek çok doğal bileşik çalışmasında BuOH fazının daha polar bileşikler içerdiği belirlenmiştir. Bu çalışmada da TLC analizinde R_f değerleri oldukça küçük olan bir çok bileşiğin varlığı görüldü. BuOH fazının, A, F, I, K, L çözgen sistemleri ile artan polaritede nötral Al_2O_3 üzerinden elüsyonu yapıldı. TLC değerlendirmelerinde farklı çözgen sistemleriyle toplanan fraksiyonlardan F çözgen sistemi ile elüe edilenler

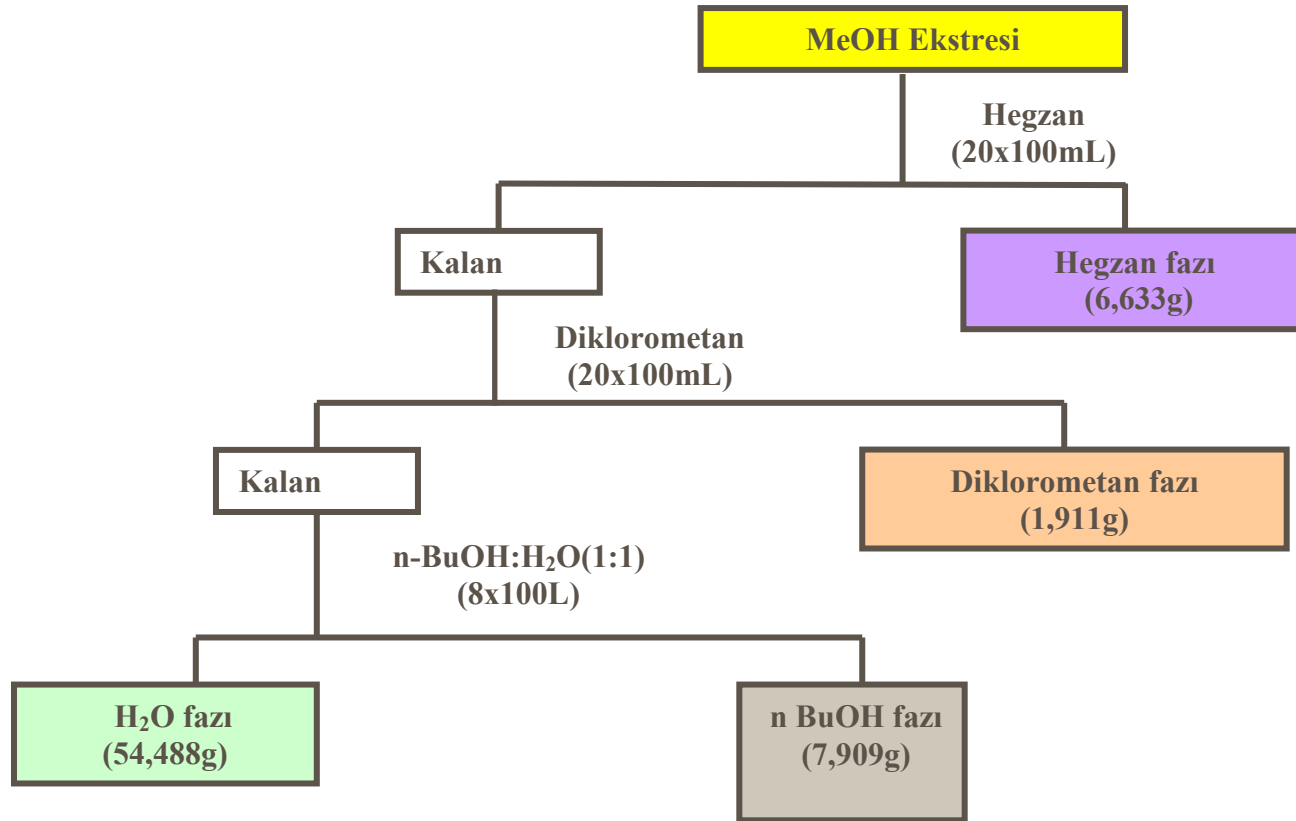
hariç diğerlerinin oldukça karmaşık ve ayrılması güç olduğu saptandı. Bu sebeple F çözgen sistemiyle toplanan tüm fraksiyonlar birleştirildi ve Fr2 adı verildi.

MeOH-C₃H₆O çöktürmesi yapıldı. Çöken kısım için silikajel dolgu maddesi ve P, R, S, T çözgen sistemleri kullanılarak kromatografik ayırma yapıldı. 9 fraksiyon elde edildi. Fr4'e Sephadex LH-20 kolon uygulandı. Burada da P, R, S çözgen sistemleri kullanıldı. 8 Fraksiyon toplandı. Bunlardan 5 numaralı fraksiyona poliamid kolon ve C, E, G, I çözgen sistemleri uygulandı. Elde edilen 6 fraksiyondan 3. sü saf olarak izole edildi (Bileşik 2).

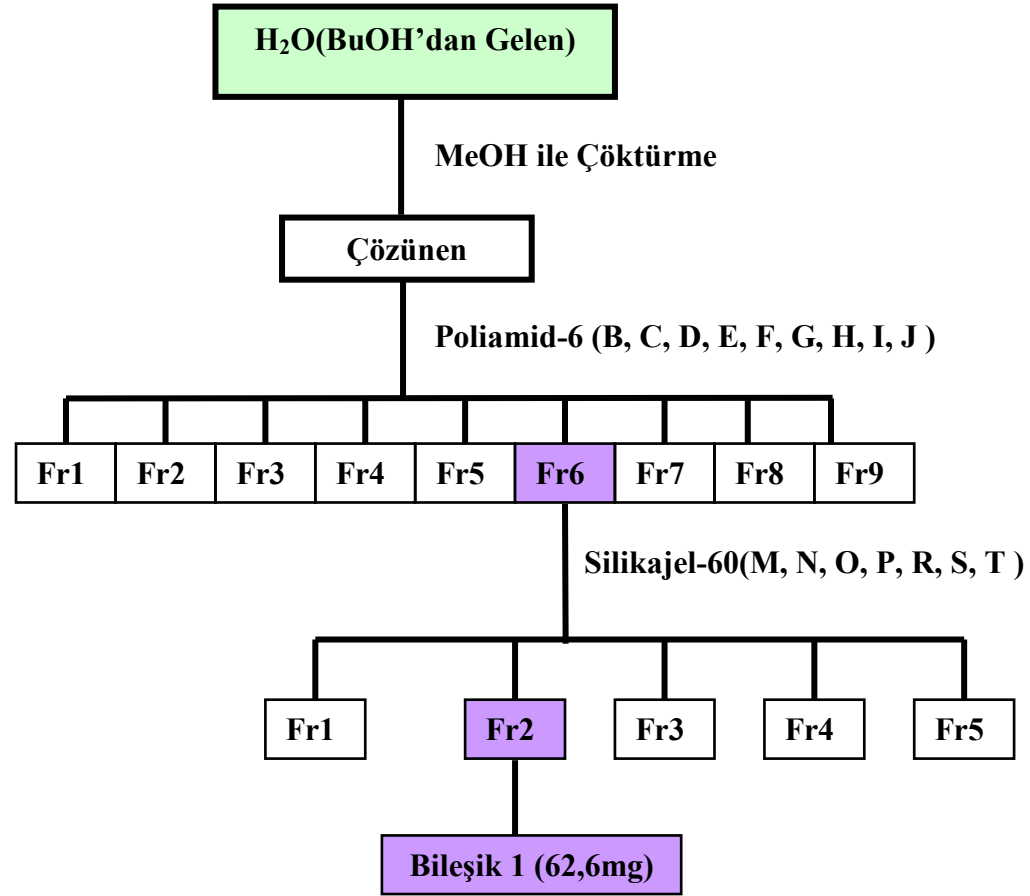
Bileşik 1 ve Bileşik 2 nin yapıları çeşitli spektral yöntemler kullanılarak aydınlatıldı.



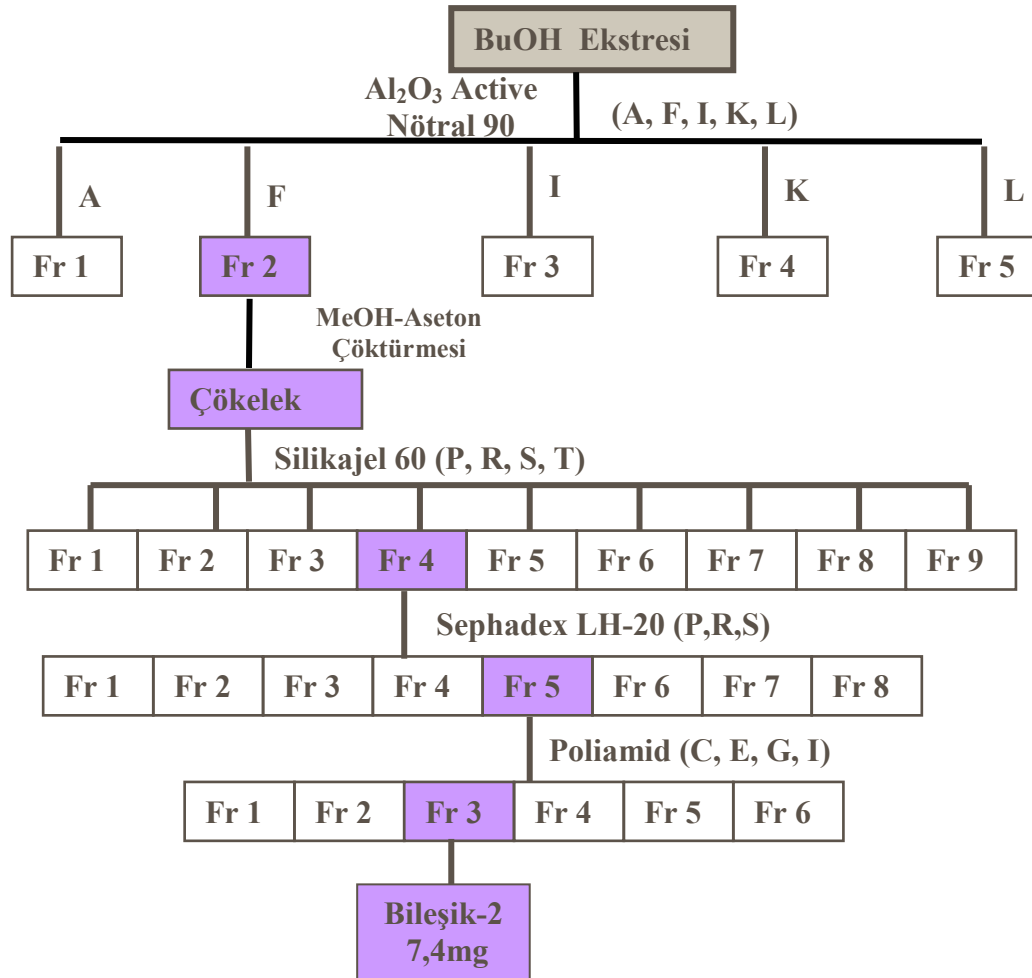
Şekil 2.1 Ana ekstrelerin oluşumu



Şekil 2.2 Hegzan, diklorometan, butanol ve su ekstrahların oluşumu



Şekil 2.3 Bileşik 1 İzolasyon Şeması



Şekil 2.4 Bileşik 2 izolasyon şeması

2.4. Hegzan Fazının Yağ Asiti Analizi

Bu çalışmada bitkinin hegzan fazı, IOOC (International Olive Oil Council) ve IUPAC raporlarına uygun olarak trans-esterifikasyon prosesine göre metillenmiştir. Buna göre örnek hegzan içinde çözüldü. Oda sıcaklığında, 2M metanollü KOH ile 30 saniye çalkalandı (David, Sandra ve Wylie, 2003). Metillenmiş hegzan fazı GC ve GC-Mass yöntemleriyle analiz edildi. Yapılan GC - Mass çalışması sonucunda alıkonma zamanları (R_t = Retention time) 11,95; 13,67; 13,74; 13,86 olan doymamış yağ asitleri (UFA, EFA) ile R_t 13,97 olan doymuş yağ asidi belirlendi.

Sonuçlar, GC kromatogramındaki her pikin kütlesi alındıktan sonra her kütle spektrumunun içerdiği pikler, metillenmiş standart yağ asitlerinin alıkonma süreleri, kütleleri ve kütle fregmanları aletin bilgi bankasındaki (Wiley and NIST Data Library) veriler ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

2.5 Antimikrobiyal Aktivite:

Bitkinin MeOH, H₂O, CH₂Cl₂, Hegzan, BuOH ve H₂O (BuOH-H₂O ekstrasyonu sonucu elde edilen) ekstratlarının Antimikrobiyal aktiviteleri MIC yöntemi ile belirlendi.

Bu yöntemle göre önce her örnekten belli konsantrasyonda çözeltiler hazırlandı. Sonra bu ana stok çözeltilerden giderek azalan konsantrasyonda çözeltiler hazırlandı. Her mikroorganizma için bir seri kullanılarak organizmanın üreyemediği en düşük konsantrasyon belirlendi. Böylece o örnek için kullanılan mikroorganizmanın üreyemediği belirlenen bu en düşük konsantrasyon o mikroorganizma için MIC değeri olarak kabul edildi (Wistreich, (1997). Sonuçlar, test mikroorganizmaları olarak seçilen *Escherichia coli* (ATCC11230), *Staphylococcus aureus* (ATCC29213), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC12228), *Enterococcus faecalis* (ATCC29212), *Pseudomonas aureginosa* (ATCC27853), *Candida albicans* (ATCC10239) bakteri ve mantarlarına karşı µg/mL cinsinde belirlendi. Karşılaştırma standardı olarak Ampisilin ve Fluktasin kullanıldı.

2.6 Antioksidan Aktivite

Bu çalışmada 1,1-Difenil 2-Pikrilhidrazil (DPPH[•]) Radikal Yöntemi kullanılarak bir flavon glikozit olan Bileşik 1 in antioksidan aktivitesi incelendi. Yönteme göre DPPH[•]'ın Etanol'deki 10⁻⁴M'lık çözeltisi ile ölçümü yapılacak madde karıştırıldı. Madde-DPPH[•] oranı 5,5 : 1, şahit-DPPH[•] oranı 0,5 : 1 olacak şekilde hazırlandı. Şahit olarak % 0,001'lik α -tokoferol ve 3-terbutil-4-hidroksi anisol (BHA) kullanıldı. Örnekler karanlıkta, 30⁰C sıcaklıkta, 15 dakika inkübe edildi ve spektrofotometrede 517 nm' de absorbansları DPPH[•] ve Etanolle (1:1) hazırlanmış köre karşı ölçüldü. Örneklerin radikal sönmüleme kapasiteleri DPPH[•] in inhibisyon yüzdesi dikkate alınarak belirlendi. Bunun için örnek ve körün absorbans değerleri aşağıda verilen formüle göre hesaplandı (Koleva, Beek, Linssen, Groot ve Evstatieva, 2002).

$$\text{İnhibisyon Yüzdesi} = [(A_B - A_A) / A_B] \times 100$$

A_B : Örneğin absorbans değeri

A_A : Körün absorbans değeri

BÖLÜM 3

SONUÇLAR

3.1 Bileşik 1

Bitkinin, 1:1 / BuOH-H₂O ekstrasyonu sonucunda oluşan fazları kuruluğa getirildi. Bunlardan H₂O fazı, önce artan polaritede B, C, D, E, F, G, H, I, J çözgen sistemleri kullanılarak Poliamid-6 kolon kromatografisi ile 9 fraksiyona ayrıldı. Sonra ayrılan 9 fraksiyondan 6. sına M, N, O, P, R, S, T çözgen sistemlerini kullanarak uygulanan Silikajel 60 dolgu maddeli kolon kromatografisi ile bir bileşik saflandırıldı. Bu çalışma sonucunda Bileşik 1 62,6mg verimle elde edildi. C₂₆H₂₈O₁₄ kapalı formülüne sahip, sarı amorf görünümünde bir flavon glikozit olarak bulunan Bileşik 1'in yapısı çeşitli spektroskopik (UV, IR, 1D ve 2D NMR, Kütle) ve kimyasal yöntemlerle belirlendi. $[\alpha]_D^{26} = -101,12$ (c. 0,22, DMSO) (Şekil 3.1).

UV(MeOH):

$$\lambda_{\max} = 233 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\max} = 270 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\max} = 332 \text{ nm}$$

IR(KBr) :

$$\bar{\nu} = 3459,56 \text{ cm}^{-1} \quad \text{-OH Gerilme}$$

$$\bar{\nu} = 2931,29 \text{ cm}^{-1} \quad \text{-C-H Gerilme}$$

$$\bar{\nu} = 1658,49 \text{ cm}^{-1} \quad \text{C=O Gerilme}$$

$$\bar{\nu} = 1612,21 \text{ cm}^{-1} \quad \text{-C=C- Gerilme}$$

$$\bar{\nu} = 1180,23 \text{ cm}^{-1} \quad \text{-C-O- Gerilme}$$

$\bar{\nu} = 850\text{-}500 \text{ cm}^{-1}$ (o- ve m- substitüsyon)

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{d}_6\text{-DMSO}$):

$\delta = 7,90$	ppm	H-2' ve H-6' (2H, d, $J = 9.2 \text{ Hz}$,)
$\delta = 6,93$	ppm	H-3' ve H-5' (2H, d, $J = 8.8 \text{ Hz}$)
$\delta = 6,79$	ppm	H-3 (1H, s)
$\delta = 6,77$	ppm	H-8 (1H, d, $J = 2,0 \text{ Hz}$)
$\delta = 6,38$	ppm	H-6 (1H, d, $J = 2,0 \text{ Hz}$)
$\delta = 5,33$	ppm	H-1''' (1H, d, $J = 1,6 \text{ Hz}$) (anomerik proton)
$\delta = 5,12$	ppm	H- 1'' (1 H, d, $J = 7,2 \text{ Hz}$) (anomerik proton)
$\delta = 3,88\text{-}3,30$	ppm	(11 H, m, -CH-O-ve -CH ₂ -O-) (Şeker)

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{d}_6\text{-DMSO}$):

$\delta = 182,66$	ppm	C-4
$\delta = 163,34$	ppm	C-2
$\delta = 162,21$	ppm	C-7
$\delta = 161,82$	ppm	C-5
$\delta = 161,81$	ppm	C-4'
$\delta = 157,61$	ppm	C-9
$\delta = 129,23$	ppm	C-2', 6'
$\delta = 121,61$	ppm	C-1'
$\delta = 116,98$	ppm	C-3', 5'
$\delta = 109,44$	ppm	C-1'''
$\delta = 106,05$	ppm	C-10
$\delta = 103,75$	ppm	C-3,8
$\delta = 100,12$	ppm	C-6
$\delta = 98,85$	ppm	C-1''

$\delta = 80,00$	ppm	C-3'''
$\delta = 77,71$	ppm	C-5''
$\delta = 77,49$	ppm	C-3''
$\delta = 76,80$	ppm	C-2'''
$\delta = 76,49$	ppm	C-2''
$\delta = 74,69$	ppm	C-4'''
$\delta = 70,51$	ppm	C-4''
$\delta = 64,95$	ppm	C-5'''
$\delta = 61,20$	ppm	C-6''

COSY (^1H - ^1H - NMR) (Proton - Proton Homonükleer Korelasyon):

δ 5,33 H-1''' nin H-2''' ile (pentoz)

δ 5,12 H-1'' nin H-2'' ile (hegzoz)

δ 3,88-3,30 aralığında, Şekerlerin diğer -CH-O- ve CH₂-O- korelasyonları

δ 7,90- 6,93 aralığında, 2' ve 6' ile 3' ve 5', B halka protonlarının korelasyonu

HMQC (^1H - ^{13}C - NMR) (Proton - Karbon Heteronükleer Korelasyon):

δ 129,23 ppm de (C-2' ve 6') karbonları, 6,79 ppm deki H-2' , 6' protonları ile

δ 116,23 ppm de (C-3' ve 5') karbonları, 6,93 ppm deki H-3' , 5' protonları ile

δ 103,75 ppm de (C-3), 6,79 ppm deki H-3 protonu ile

δ 103,75 ppm de (C-8), 6,77ppm deki H-8 protonu ile

δ 100,12 ppm de (C-6), 6,38 ppm deki H-6 protonu ile

δ 109,44 ppm deki karbonun 5,33 ppm H-1''' deki 1.şekerin anomerik protonu ile

δ 98,85 ppm deki karbonun 5,13 ppm H-1'' deki 2. şekerin anomerik protonu ile

etkileşirken;

şekerlerin 80,00-61,20 ppm aralığındaki diğer karbonlarının 3,88-3,30 ppm

aralığındaki kendi protonlarıyla etkileşimleri gözlenmektedir.

Bu verilerin yanı sıra, kuaterner karbonlara ait herhangi bir etkileşim gözlenmemiştir. Bunlardan en önemlileri aşağıdadır:

δ 182,58 ppm'de (C-4) korelasyon yok

δ 163,34 ppm de (C-2) korelasyon yok

δ 162,21 ppm'de (C-7) korelasyon yok

δ 161,82 ppm'de (C-5) korelasyon yok

HMBC (^1H - ^{13}C - NMR) (3 Bağ, Proton - Karbon Heteronükleer Korelasyon):

3 ve 2 bağ ötesi proton karbon etkileşimi gösteren bu metotda en önemli kontürler :

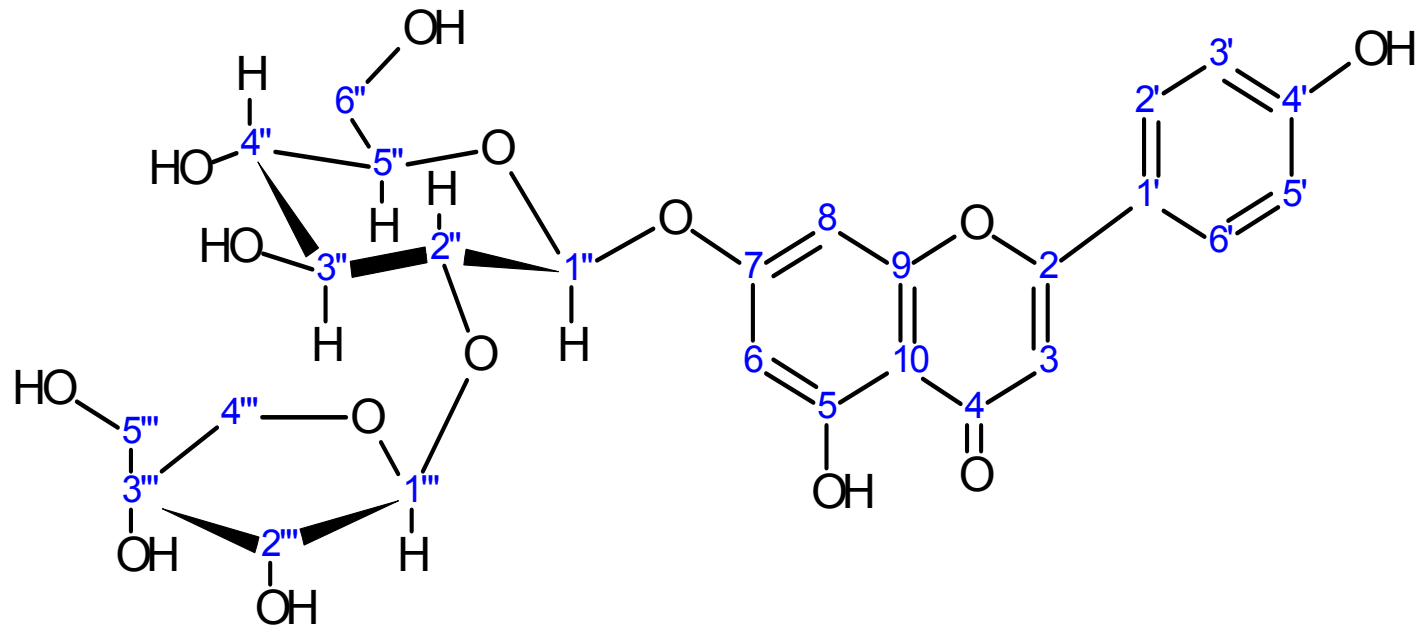
H-2' ve H-6' protonlarının C-4' karbonuyla

H-3 protonunun C-1' karbonuyla

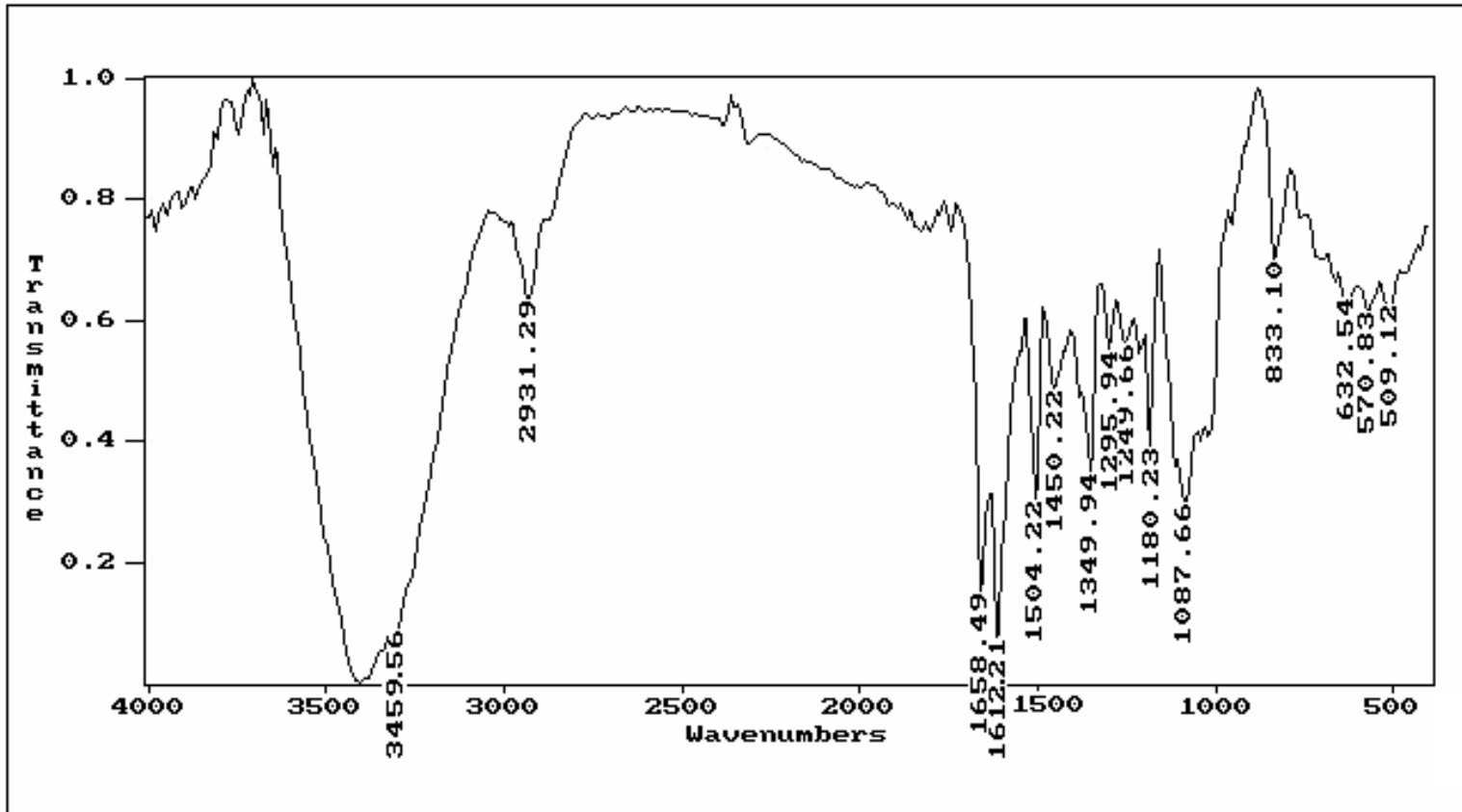
H-1" 1. şekerin anomerik protonunun C-7 karbonuyla

H-1'" 2. şekerin anomerik protonunun C -2" karbonuyla

gerçekleşmiş olup, 3 bağ ötesi etkileşimleri gösterir verilerdir.



Şekil 3.1 Chrysoeriol 7-O-β-D-apiofuranosil (1→2)- β-D-glikopiranozit



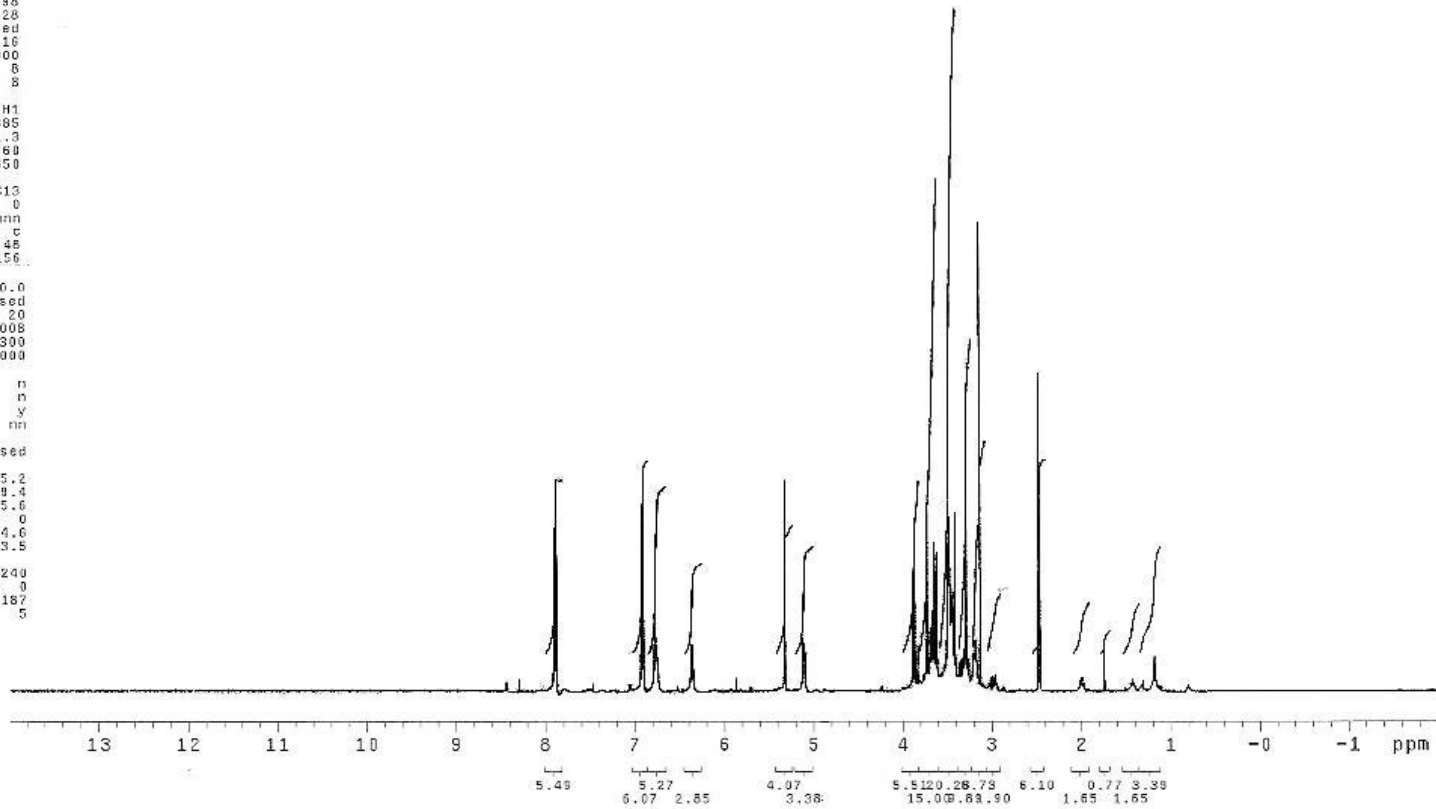
Şekil 3.2 Bileşik 1'in IR spektrumu

```

exp5  s2pu1

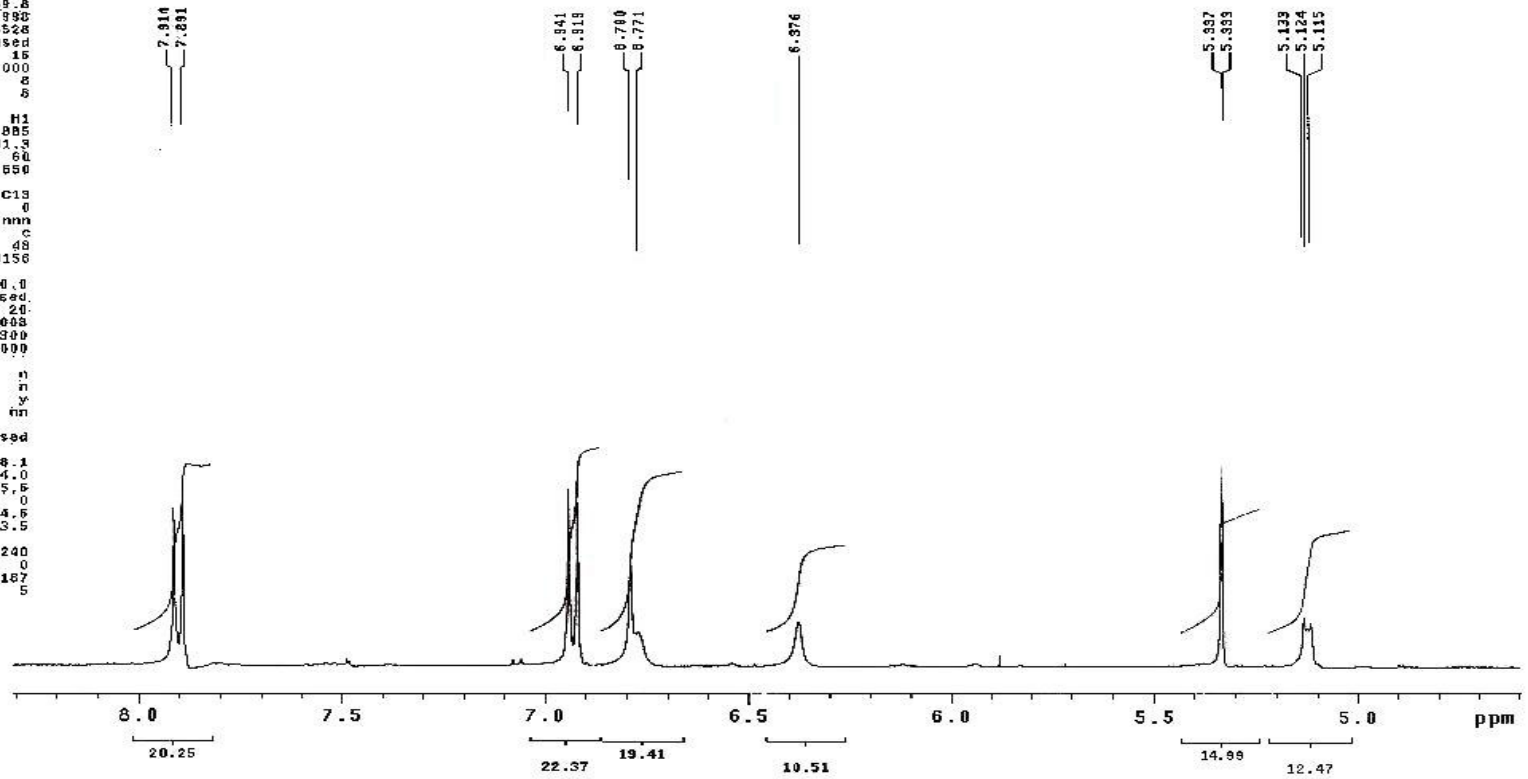
SAMPLE
date   Jan 26 2005
solvent DMSO
file   exp
ACQUISITION
sw      600.13
at      1.335
np      25528
fb      not used
bs      16
d1      1.000
nt      8
ct      8
TRANSMITTER
tn      H1
sfrq    399.895
tof     431.3
tpwr    60
pw      7.650
DECOUPLER
dn      C13
dol     0
dm      nnn
dmm     c
dpwr    45
dmf     13156
SPECIAL
temp    30.0
gain    not used
spin    20
hst     0.008
pw90    15.300
alpha   20.000
FLAGS
f1      n
f2      n
f3      n
f4      n
f5      n
f6      n
f7      n
f8      n
f9      n
f10     n
f11     n
f12     n
f13     n
f14     n
f15     n
f16     n
f17     n
f18     n
f19     n
f20     n
f21     n
f22     n
f23     n
f24     n
f25     n
f26     n
f27     n
f28     n
f29     n
f30     n
f31     n
f32     n
f33     n
f34     n
f35     n
f36     n
f37     n
f38     n
f39     n
f40     n
f41     n
f42     n
f43     n
f44     n
f45     n
f46     n
f47     n
f48     n
f49     n
f50     n
f51     n
f52     n
f53     n
f54     n
f55     n
f56     n
f57     n
f58     n
f59     n
f60     n
f61     n
f62     n
f63     n
f64     n
f65     n
f66     n
f67     n
f68     n
f69     n
f70     n
f71     n
f72     n
f73     n
f74     n
f75     n
f76     n
f77     n
f78     n
f79     n
f80     n
f81     n
f82     n
f83     n
f84     n
f85     n
f86     n
f87     n
f88     n
f89     n
f90     n
f91     n
f92     n
f93     n
f94     n
f95     n
f96     n
f97     n
f98     n
f99     n
f100    n
PROCESSING
fn      not used
DISPLAY
sp      -785.2
wp      8380.4
rf1     785.6
rf2     0
rf3     -14.6
rf4     -53.5
PLOT
wc      200
sc      0
vs      187
th      5
ai      cdc ph

```



Şekil 3.3 Bileşik 1'in ^1H -NMR spektrumu

TP2
 exp5 .b2pu1
 SAMPLE
 date Jan 20 2005
 solvent DMSO
 f1la exp
 ACQUISITION
 sw 6389.8
 at 1.990
 np 25528
 fb not used
 bs 15
 d1 1.000
 nt 8
 ct 8
 TRANSMITTER
 tn H1
 srfq 399.885
 tcf 491.3
 tpwr 60
 pw 7.650
 DECOUPLER
 dn C13
 wcf 0
 dm nnn
 dnm c
 dpwr 48
 dmf 13156
 SPECIAL
 temp 30.0
 gain not used
 spin 20
 hst 0.008
 pw90 15.300
 alfa 20.000
 FLAGS
 f1 n
 f2 n
 f3 n
 f4 y
 f5 nn
 PROCESSING
 fin not used
 DISPLAY
 sp 1898.1
 wp 1484.0
 rfl 785.6
 rfb 0
 rp -14.6
 tp -53.5
 PLOT
 wc 240
 sc 0
 vs 187
 th 5
 af cdc ph

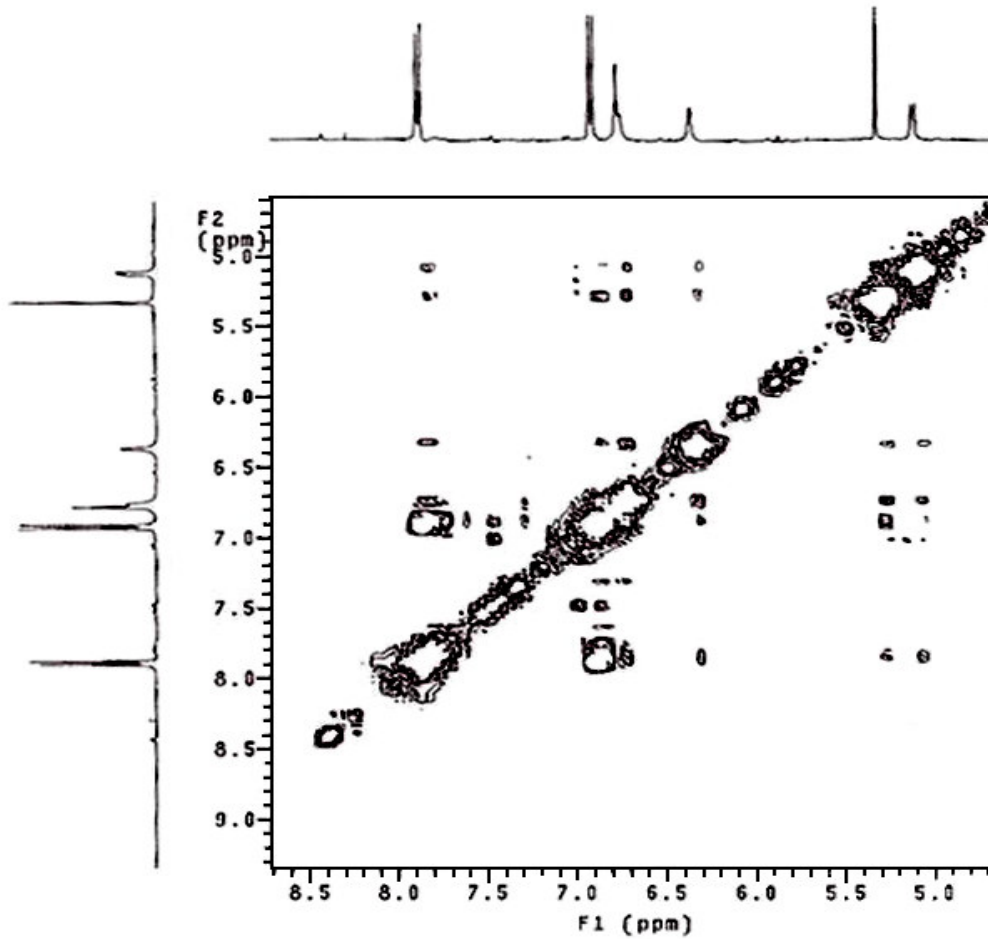


Şekil 3.4 Bileşik 1'in ¹H-NMR spektrumu

```

TP2
exp6 gCOSY
SAMPLE
date Jan 25 2005 hs FLAGS nn
solvent DMSO sspul n
sample TP2-COSY_25- hsglv1 992
Jan2005 SPECIAL
ACQUISITION temp 30.0
sv 3986.2 gain 12
at 0.131 spin 0
np 1024 f2 PROCESSING
fb not used sb 0.056
ss 16 sbt not used
dl 1.000 fn 1024
nl 8 f1 PROCESSING
2D ACQUISITION sb1 0.028
sv1 3986.2 sbt1 not used
nl 128 proc1 1p
TRANSMITTER fn1 1024
tn H1 DISPLAY
sfrq 353.884 sp 1836.9
tof -136.8 wp 1833.7
tpwr 60 sp1 1853.7
pw 15.300 wp1 1632.7
GRADIENTS rff 123.9
g2lv11 992 rfp 0
g11 0.001000 rff1 130.0
gstab 0.000500 rfp1 0
DECOUPLER C13 PLOT
dn C13 wc 110.4
da nnn sc 6.8
wc2 110.4
sc2 0
vs 768
th 4
a1 cdc av

```



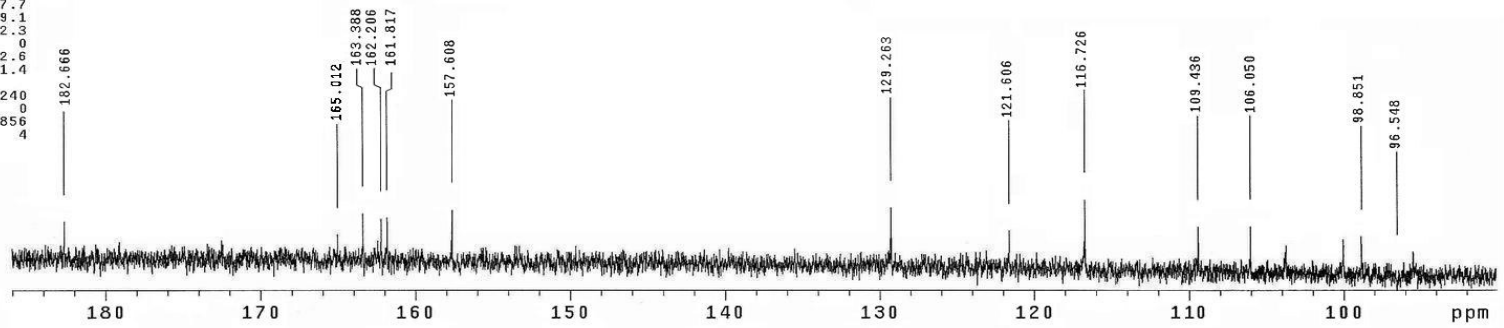
Şekil 3.5 Bileşik 1'in COSY spektrumu

```

TP1
exp7 s2pu1

SAMPLE
date Nov 25 2004
solvent DMSO
file exp
ACQUISITION
sw 25125.6
at 1.199
np 60270
fb 13800
bs 64
dl 2.000
nt 12000
ct 12000
TRANSMITTER
tn C13
strq 100.562
tof 1553.6
tpwr 60
pw 8.250
DECOUPLER
dn H1
dof 0
dm yy
dmm w
dpwr 46
dmf 12270
SPECIAL
temp 30.0
gain not used
spin 0
hst 0.008
pw90 16.500
alfa 20.000
FLAGS
il n
in n
dp y
hs nn
PROCESSING
lb 1.00
fn not used
DISPLAY
sp 9057.7
wp 9649.1
rf1 1502.3
rfp 0
rp -112.6
lp -271.4
PLOT
wc 240
sc 0
vs 856
th 4
al no ph

```



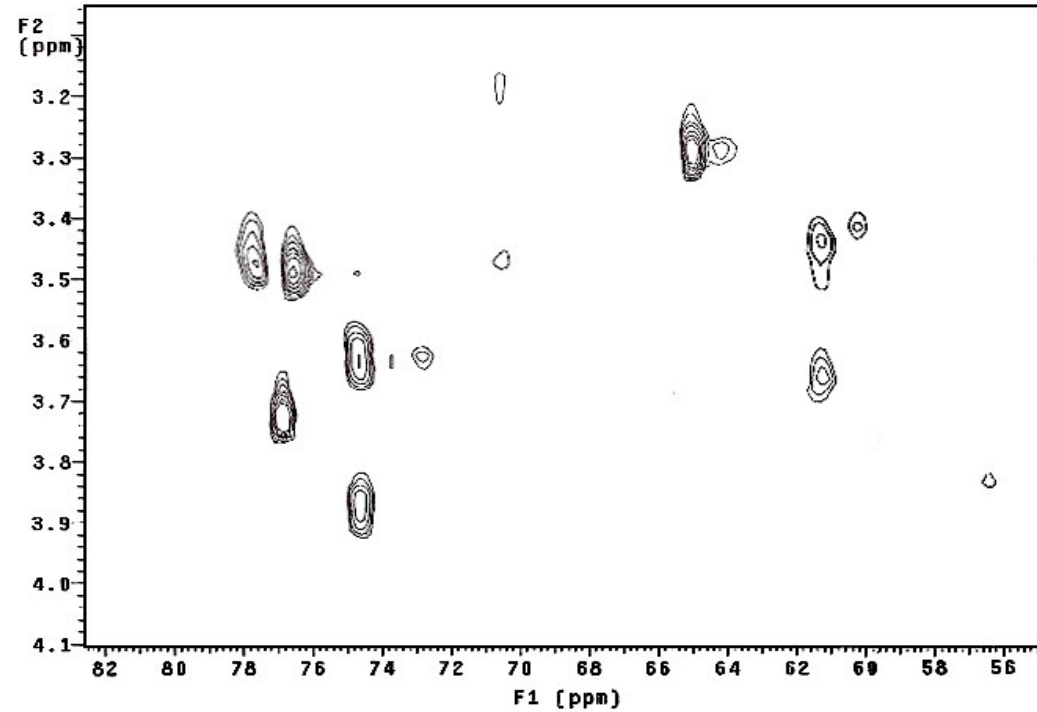
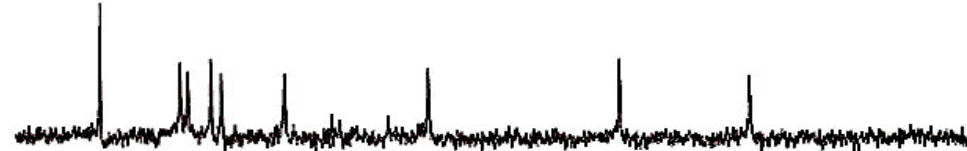
Şekil 3.6 Bileşik 1'in ^{13}C Spektrumu

TP-2

exp8 gHNQC

SAMPLE		FLAGS	ACQUISITION		ARRAYS
date	Jan 17 2005	hs	n	array	phase
solvent	DMSO	sspul	y	arraydim	512
sample	TP2-2D_1734	PFGRtg	y		
	02005	hsglv1	002	1	phase
			1	2	1
					2

ACQUISITION		SPECIAL	GRADIENTS
sw	300.2	temp	30.0
at	0.131	gain	38
np	1024	spin	0
fb	not used		
ss	32	g2lv11	882
d1	1.000	gt1	0.001000
nl	32	g2lv13	487
		gt3	0.001000
2D ACQUISITION		gstab	0.000500
sw1	24154.6		
n1	256	F2 PROCESSING	
phases	arrayes	gf	0.061
TRANSMITTER		gfs	not used
tn	M1	fn	1024
vfrq	399.884	F1 PROCESSING	
tof	-121.8	gf1	0.020
tpwr	60	gfs1	not used
pw	15.300	procl	1p
DECOUPLER		fn1	1080
dn	C13	DISPLAY	
dof	1050.8	sp	1220.8
dm	mv	wp	415.4
dmm	CC9	sp1	5583.3
dmf	13156	wp1	2783.4
dpr	48	rfl	108.3
pwxlv1	60	rff	0
pwx	15.500	rff1	1511.5
		rffp1	0
13kh	HMOC	PLOT	
nullf1g	140.0	yc	154.4
	y	sc	60
		wc2	110.4
		sc2	8
		vs	2783
		th	3
		a1	cdc ph

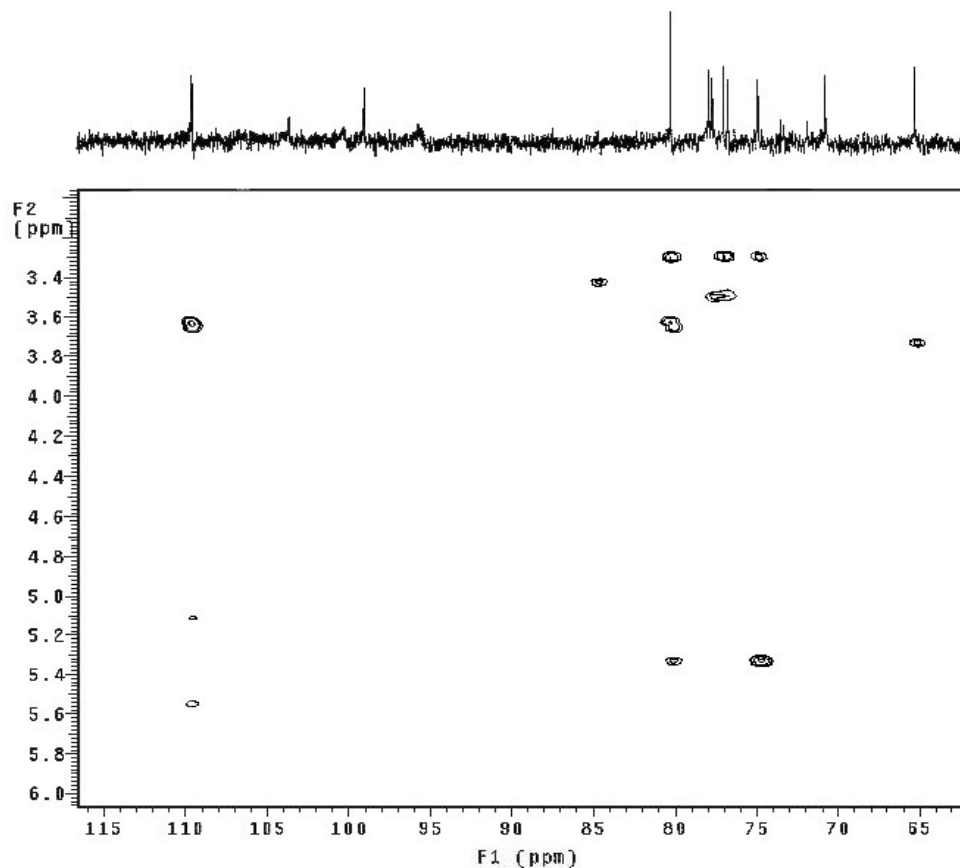


Şekil 3.7 Bileşik 1'in HMQC Spektrumu

TP-2

exp7 gINBO

SAMPLE		FLAGS	
date	Jan 18 2005	hs	n
solvent	DMSO	sspu1	n
sample	TP2-2D_173a	PFOF1g	y
	n2005	hsq1v1	992
ACQUISITION		SPECIAL	
sw	3808.2	temp	30.0
at	0.131	gobn	28
np	1924	spin	0
fb	not used	GRADIENTS	
ss	32	gz1v12	802
d1	1.000	gt1	0.001000
nl	8	gz1v13	437
2D ACQUISITION		gt2	0.001000
sw1	24154.6	gstab	0.000500
ni	400	F2 PROCESSING	
phase	0	sb	0.068
TRANSMITTER		sbs	not used
tn	H1	fn	1824
sfreq	399.884	F1 PROCESSING	
tof	-121.8	sb1	0.008
tpwr	80	sbs1	not used
pw	15.900	fn1	2048
DECOUPLER		DISPLAY	
dn	D13	sp	1182.6
dof	1050.8	wp	1243.6
dm	nnh	sp1	8198.3
dmm	ccc	wp1	5518.7
dmf	12150	rfl	108.9
dpwr	46	rfp	0
pw1v1	60	rfl1	1519.5
pw1	16.500	rfl1	0
HNBO		PLOT	
j1kh	140.0	wc	154.4
jnxh	8.0	sc	6.8
		wc2	110.4
		sc2	0
		ve	2783
		ch	13
		al	cdc av

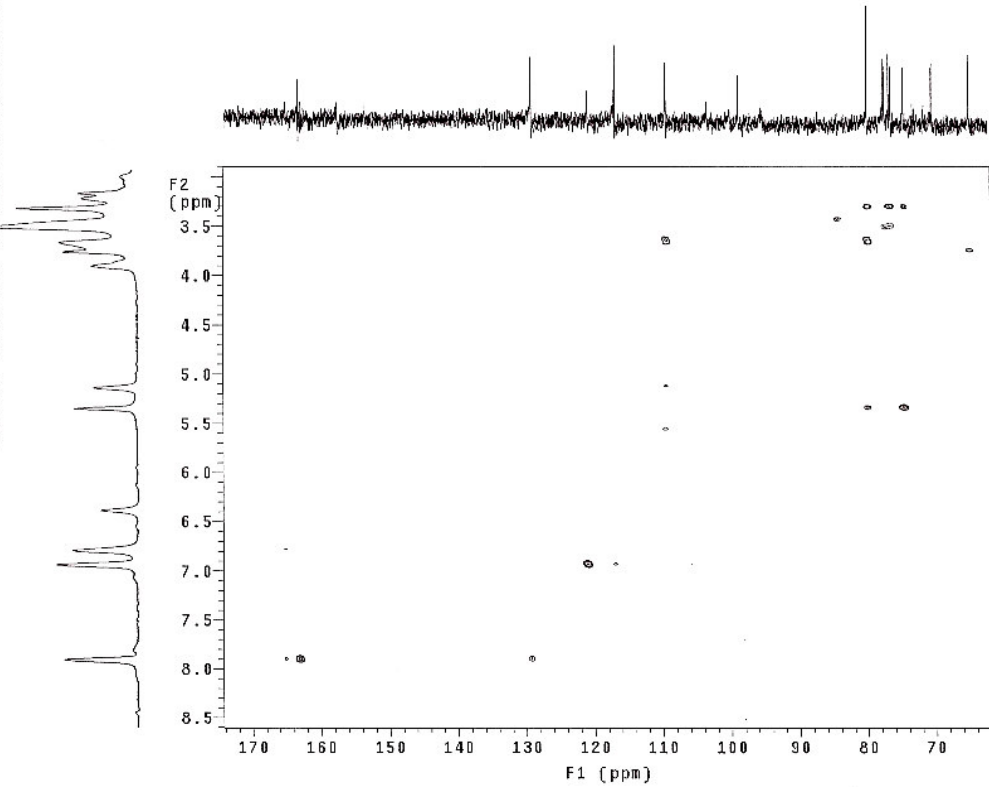


Şekil 3.8. Bileşik 1'in HMBC Spektrumu

```

TP-2
exp7  gHMBC
SAMPLF          FLAGS
date   Jan 18 2005  hs          n
solvent  DMSO      sspul       n
sample  Tp2-20_173a~ PFGf1g    y
n2005    hsglv1     992
ACQUISITION      SPECIAL
sw      390.2      temp      30.0
at      0.131     gain      36
np      1024     spin       0
fu      not used   GRADIENTS
ss      32       gz1v11     992
d1      1.000     gt1       0.001000
n1      8        gz1v13     487
2D ACQUISITION  gt3       0.001000
sw1     24154.6   gstab     0.000500
n1      400      F2 PROCESSING
phase   0        sb         0.066
TRANSMITTER    sb         not used
tn      H1      fn         1024
sfrq    399.864  F1 PROCESSING
tof      -121.8  sb1       0.000
tpwr     60     sbs1      not used
pw      15.300  fn1       2046
DECOUPLER      C13      sp         1159.6
dof      1050.8  wp         2281.2
dm      nmh     spl         6241.1
dmh      ccc     wpl         11275.3
dmf      13156  rfl         106.9
dpwr     48     rfp         0
pwxlv1    60    rfl1        1519.5
pwx      16.500  rfp1         0
HMBC          PLOT
j1xh      140.0  wc         154.4
j1xh       8.0   sc         6.8
          wc2        110.4
          sc2         0
          vs         2788
          th
          al cdc av    13

```



Şekil 3.9. Bileşik 1'in HMBC Spektrumu

3.2. Bileşik 2

Bileşik-2, (Şekil 3.10) BuOH-H₂O ekstrasyonu sonucunda elde edilen BuOH fazına sırasıyla Silikajel 60, Sephadex LH-20 ve Poliamid-6 gibi kolon dolgu maddeleri ile, A, F, I, K, L; P, R, S, T; P, R, S; C, E, G, I çözücü sistemleri kullanılarak 7,40 mg Bileşik 2 izole edilmiş ve saflandırılmıştır. C₄₇H₇₆O₁₇ kapalı formülüne sahip bir triterpen glikozit olan ve üç şeker birimi içeren bu bileşiğin yapı tayini çeşitli spektroskopik (UV, IR, 1D ve 2D NMR, Kütle) ve kimyasal yöntemler kullanılarak belirlenmiştir. $[\alpha]_D^{20} = -8,824$ (c. 0,068, MeOH) (Şekil 3.10).

UV(MeOH):

$$\lambda_{\max} = 267 \text{ nm}$$

IR(KBr) :

$$\bar{\nu} = 3500-3000 \text{ cm}^{-1} \quad \text{-OH Gerilme}$$

$$\bar{\nu} = 2938,46; 2892,23 \text{ cm}^{-1} \quad \text{-C-H Gerilme}$$

$$\bar{\nu} = 1707,69 \text{ cm}^{-1} \quad \text{C=O Gerilme}$$

$$\bar{\nu} = 1612,21 \text{ cm}^{-1} \quad \text{-C=C- Gerilme}$$

$$\bar{\nu} = 1384,62; 1046,15 \text{ cm}^{-1} \quad \text{-C-O- Gerilme}$$

¹H-NMR (CD₃OD):

$\delta = 5,28$	ppm	C=CH
$\delta = 5,21$	ppm	H-1''' (1H, d, $J=1,20 \text{ Hz}$) (Anomerik proton)
$\delta = 4,82$	ppm	H-1'' (1H, d, $J=7,00 \text{ Hz}$) (Anomerik proton)
$\delta = 4,43$	ppm	H-1' (1H, d, $J=7,20 \text{ Hz}$) (Anomerik proton)
$\delta = 4,16-3,13$	ppm	(13H, CH ₂ - O, ve CH- O) (Şeker)
$\delta = 2,40-1,45$	ppm	(24 H, CH ve CH ₂) (Aglikon)

$\delta = 3,35$	ppm	H-3 (1H, m)
$\delta = 1,29$	ppm	H-6''' (3H, d, $J=1,24$ Hz)
$\delta = 1,25-0,86$	ppm	(21 H, s, 7x CH ₃)

¹³C-NMR (CD₃OD):

Aglikon karbonları:

δ 144,70	ppm	C-13
δ 123,50	ppm	C-12
δ 92,00	ppm	C-3
δ 57,10	ppm	C-5
δ 48,80	ppm	C-9
δ 47,50	ppm	C-19
δ 46,60	ppm	C-18
δ 44,80	ppm	C-4
δ 43,00	ppm	C-14
δ 42,60	ppm	C-21
δ 41,20	ppm	C-8
δ 40,20	ppm	C-1
δ 38,20	ppm	C-17
δ 37,00	ppm	C-10
δ 34,20	ppm	C-7
δ 31,40	ppm	C-20
δ 30,10	ppm	C-16
δ 26,20	ppm	C-15
δ 26,00	ppm	C-2
δ 25,00	ppm	C-11
δ 18,77	ppm	C-6

Şeker karbonları:

δ 176,83	ppm	C-6' , COOH
δ 105,00	ppm	C-1'
δ 102,90	ppm	C-1''
δ 101,60	ppm	C-1'''
δ 79,30-66,60	ppm	CH-O ve CH ₂ -O (12 C, şeker)
δ 18,15	ppm	1x CH ₃ (Ramnoz)

HMQC (¹H-¹³C- NMR) (Proton - Karbon Heteronükleer Korelasyon):

Bu metotla yapılan analiz sonunda pek çok kontür gözlemlendi. Bunlardan en önemlileri aşağıda verilmiştir:

105,00 ppm deki C-1' karbonu H-1' protonu ile

102,90 ppm deki C-1'' karbonu H-1'' protonu ile

101,60 ppm deki C-1''' karbonu H-1''' protonu ile

92,00 ppm deki C-3 karbonu H-3 protonu ile

123,50 ppm deki C-12 karbonu H-12 protonu ile

18,15 ppm deki C-6''' karbonunun H-6''' protonları ile,

79,30-66,60 ppm aralığındaki şekerlerin diğer karbonlarının, 4,16-3,13 ppm

aralığındaki diğer şeker protonlarıyla etkileşimleri gözlenirken,

kuaterner karbonlara ait hiçbir etkileşim gözlenmemiştir. Bunlar aşağıda verilmiştir:

δ 144,70 (C-13), δ 44,80 (C-4), δ 43,00 (C-14), δ 41,20 (C-8),

δ 38,20 (C-17), δ 37,00 (C-10), δ 31,40 (C-20).

HMBC (^1H - ^{13}C - NMR) (3 Bağ, Proton - Karbon Heteronükleer Korelasyon):

3 ve 2 bağ ötesi proton karbon etkileşimi gösteren bu metotta en önemli etkileşimler:

H-1' (δ 4,43) protonunun C-3 (δ 92,00) aglikon karbonuyla,

H-1'' (δ 4,82) protonunun C-2' (δ 78,10) şeker karbonuyla,

H-1''' (δ 5,28) protonunun C-2'' (δ 79,30) şeker karbonuyla,

H-28 (δ 19,90) metil protonlarının C-16 (δ 30,10), C-18 (δ 46,60) ve C-22 (δ 76,90) karbonlarıyla gözlenen etkileşimlerdir.

ESI - KÜTLE

Elde edilen tüm veriler kütle spektrumu verileri ile desteklenmektedir.

Buna göre:

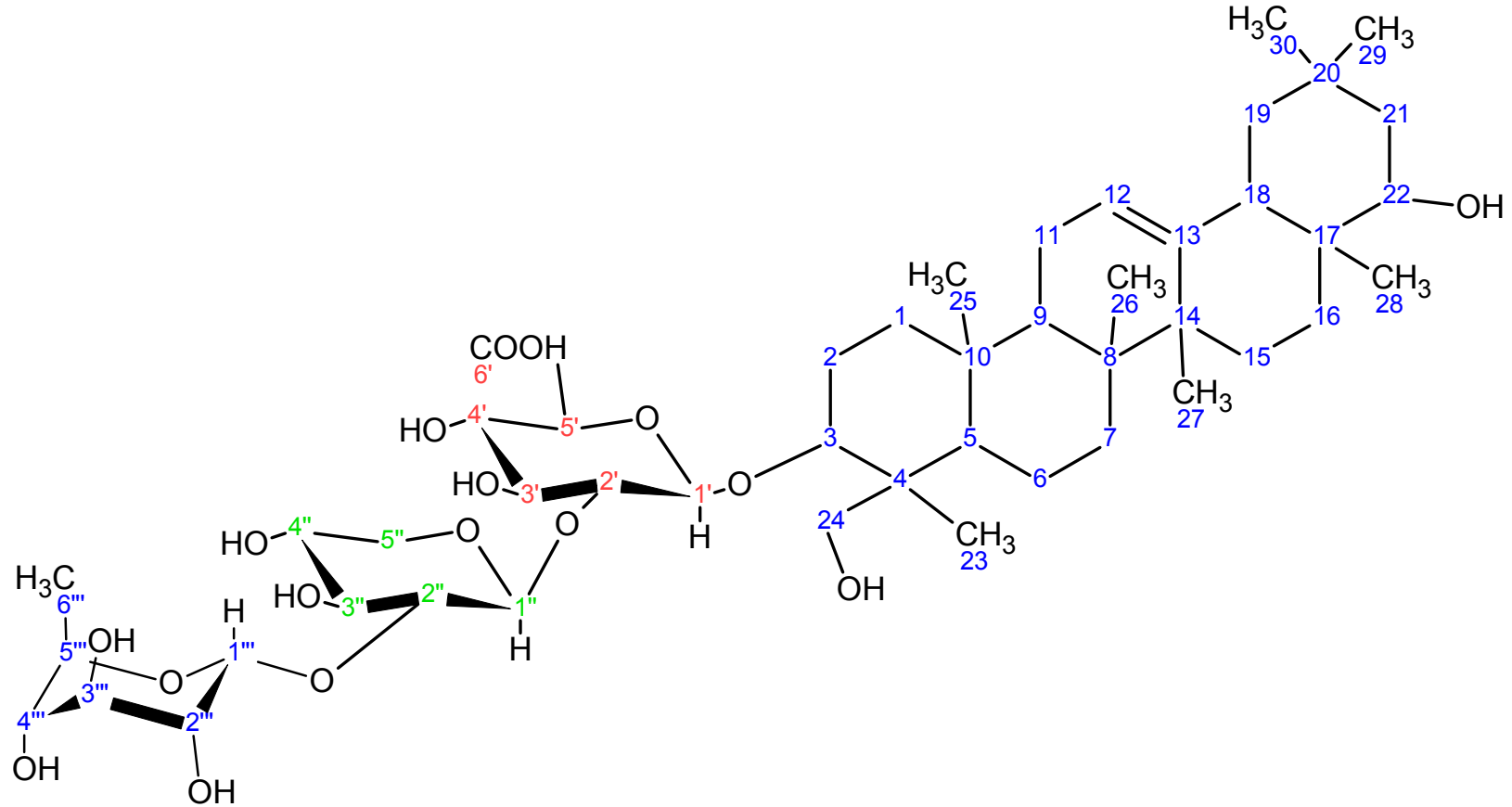
Moleküler İyon Piki: 912 [$\text{M}^+ - 2\text{H}$],

m/z: 850 [$\text{M}^+ - 2\text{H} - \text{H}_2\text{O} - \text{CO}_2$],

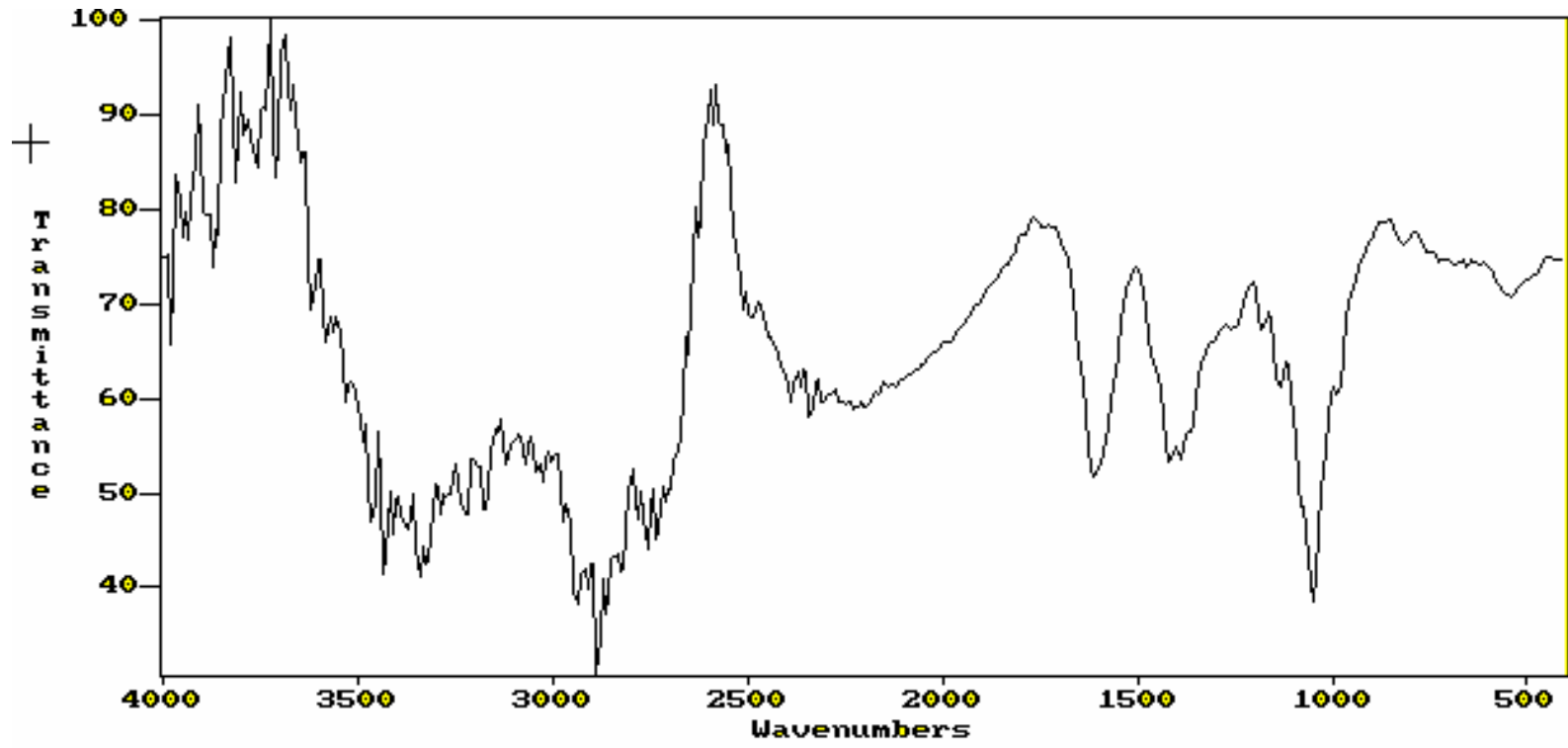
704 [$\text{M}^+ - 2\text{H} - \text{H}_2\text{O} - \text{CO}_2 - \text{Ramnoz}$],

572 [$\text{M}^+ - 2\text{H} - \text{H}_2\text{O} - \text{CO}_2 - 146(\text{Ramnoz}) - 132(\text{Ksiloz})$],

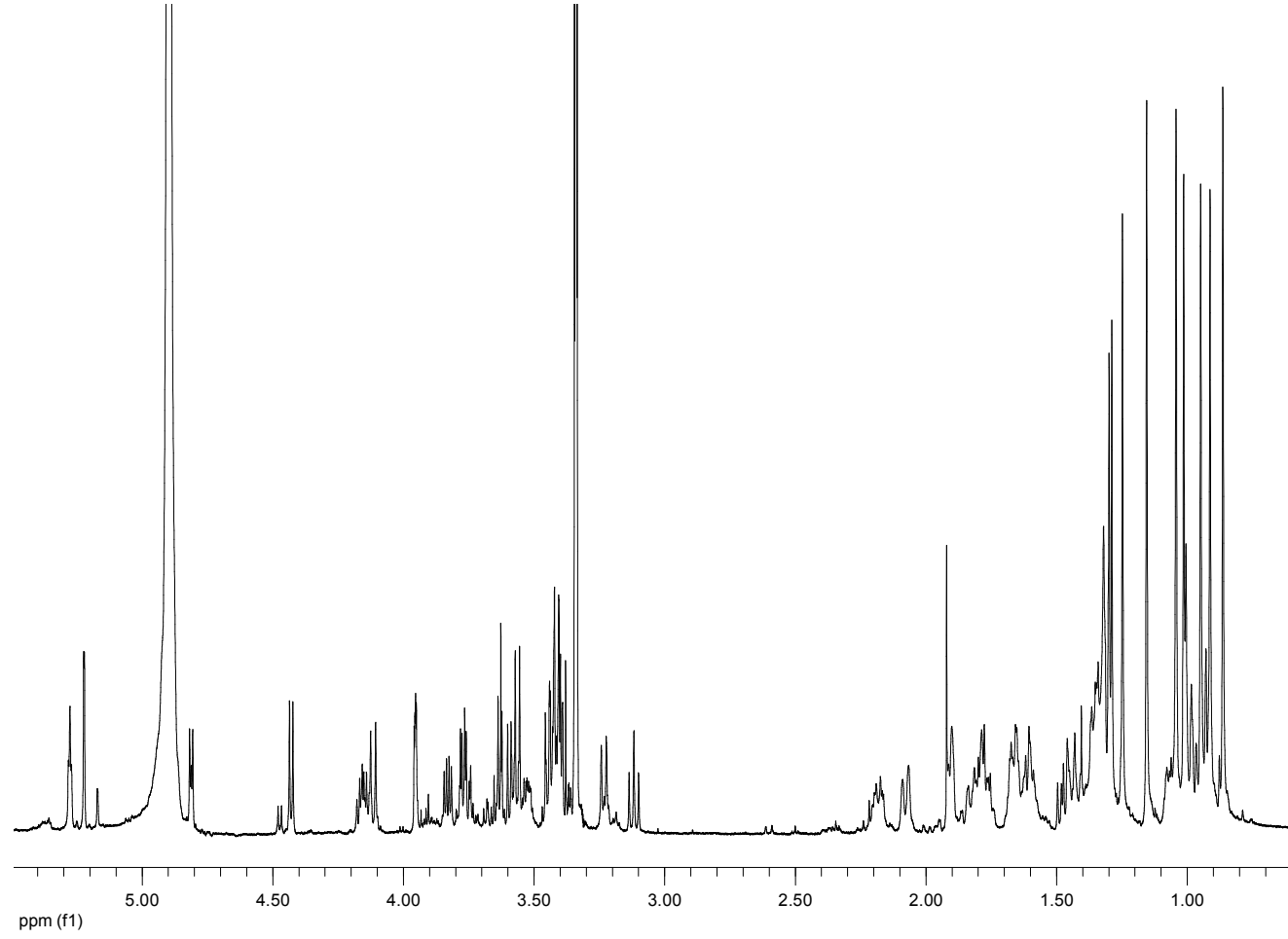
458 [$\text{M}^+ - 2\text{H} - \text{H}_2\text{O} - \text{CO}_2 - 146(\text{Ramnoz}) - 132(\text{Ksiloz}) - 114(\text{Glukuronik asit artığı})$]



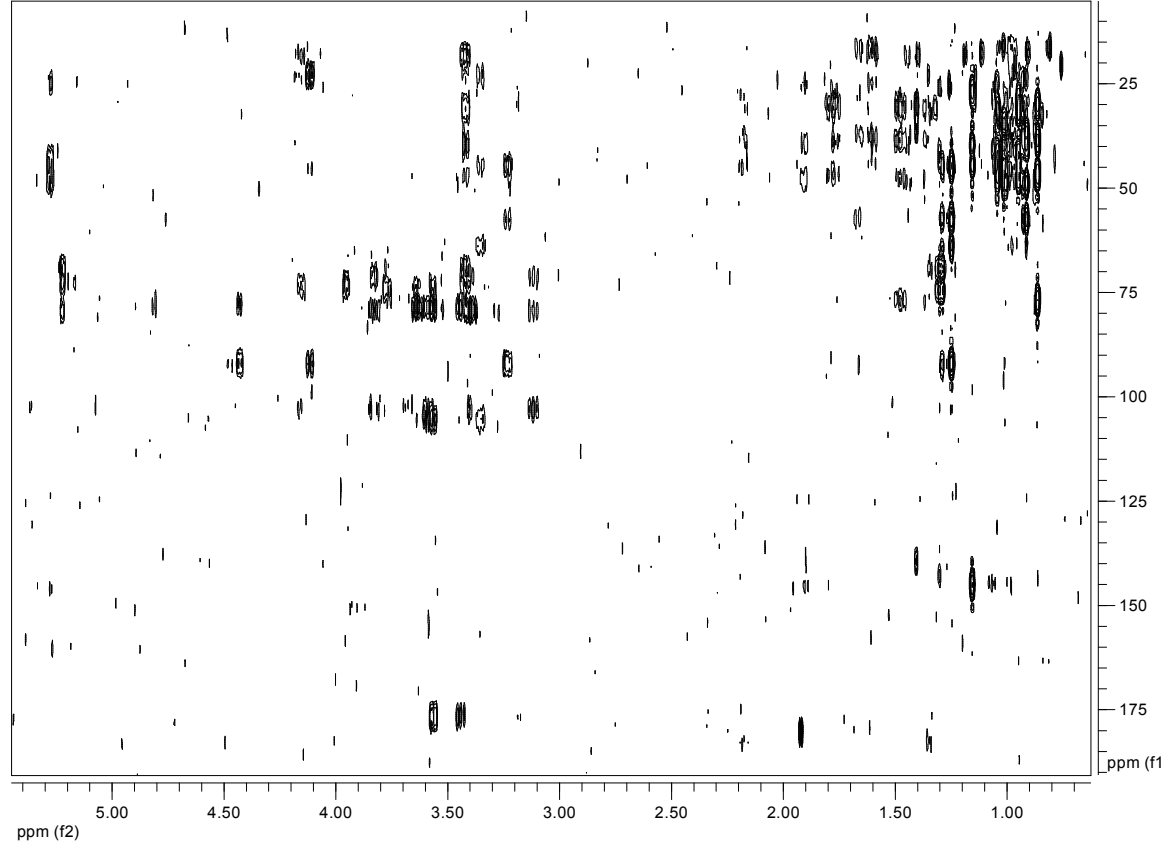
Şekil 3.10 3-*O*- α -L-ramnopranozil(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-ksilopranozil(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glukorunopranozit (Astragaloside VIII)



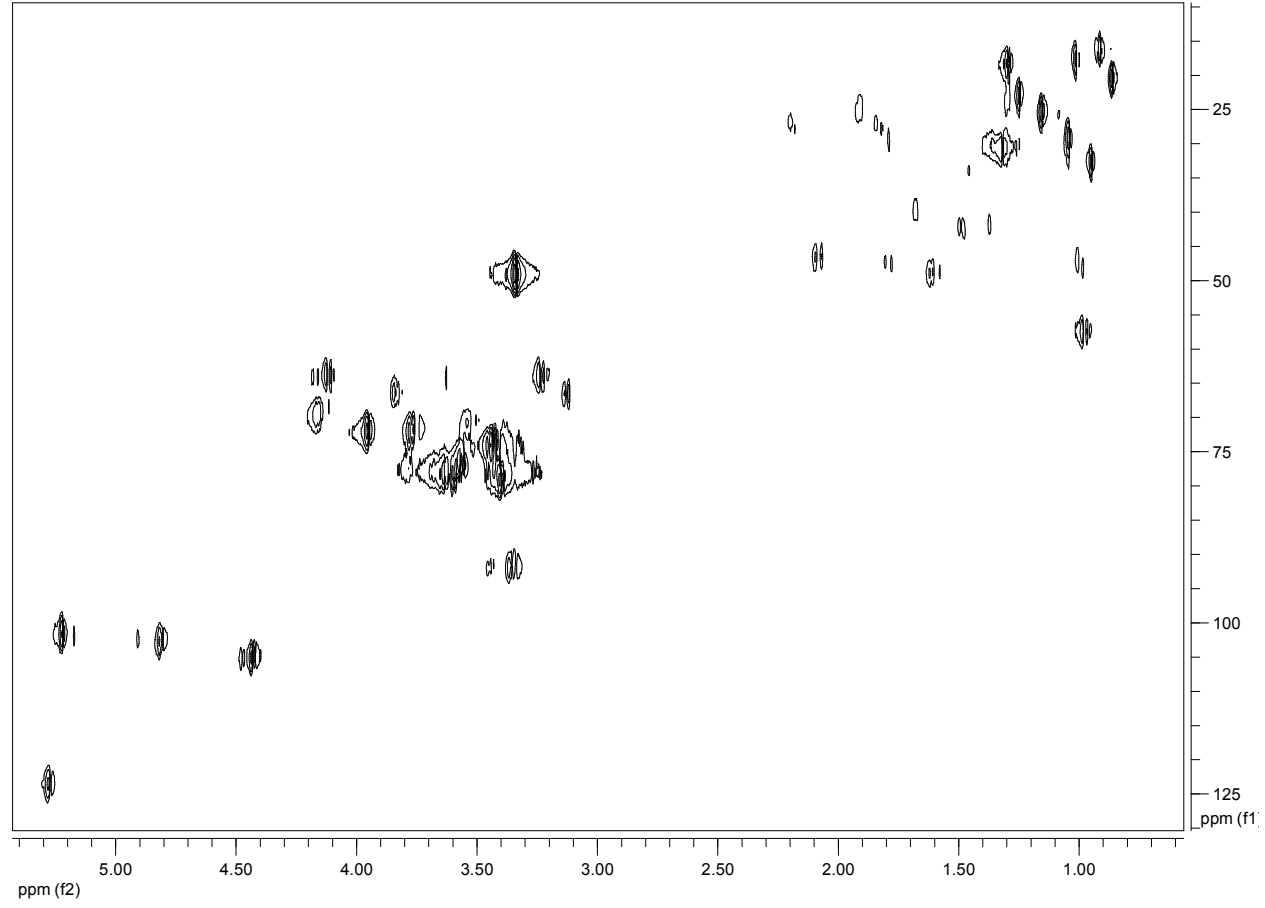
Şekil 3.11 Bileşik 2'nin IR spektrumu



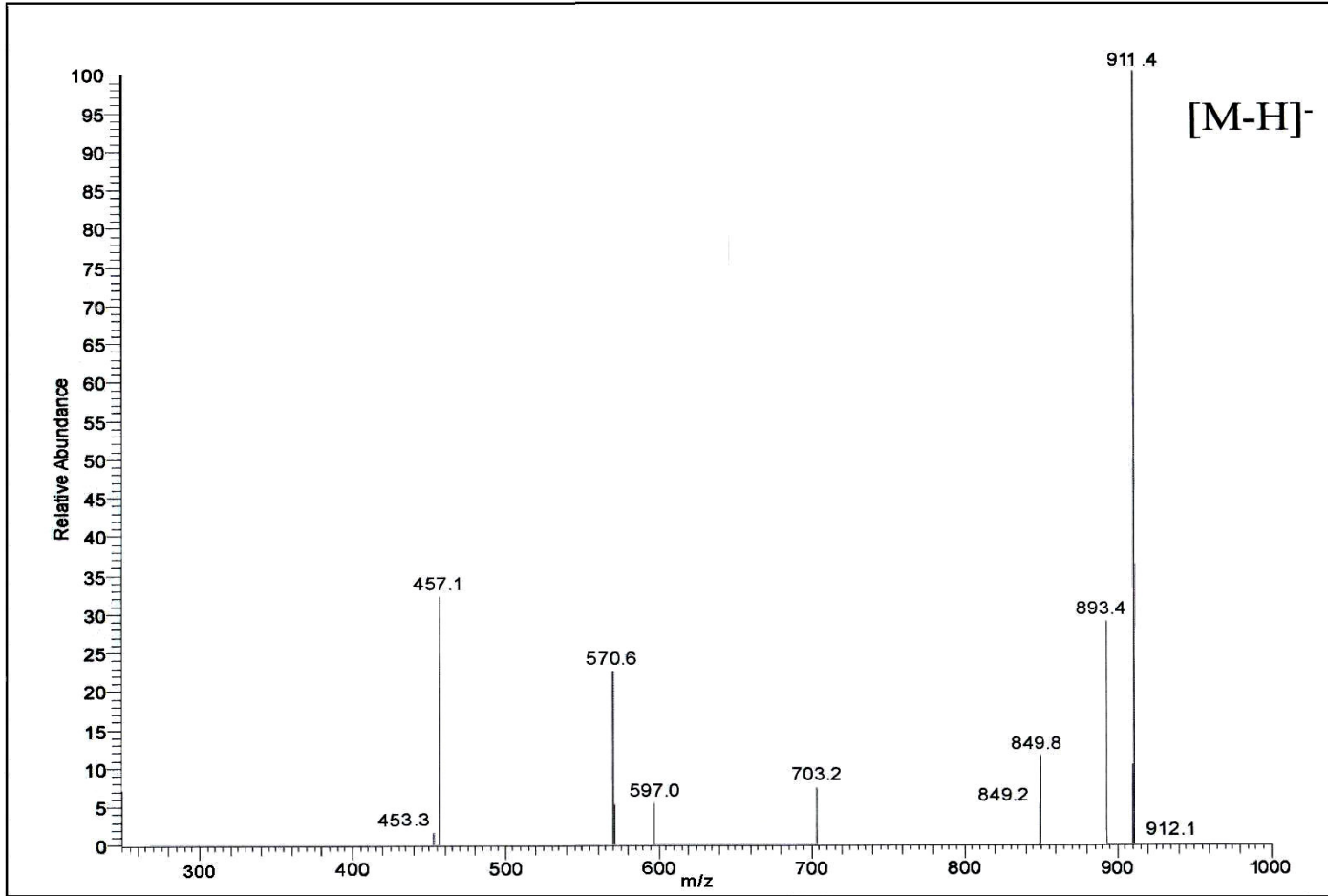
Şekil 3.12 Bileşik 2'nin ^1H -NMR spektrumu



Şekil 3.13 Bileşik 2'nin ^1H NMR spektrumu



Şekil 3.14 Bileşik 2'nin HMBC spektrumu



Şekil 3.15 Bileşik 2'nin ESI-KÜTLE spektrumu

3.3 Asidik Hidroliz Sonuçları

Bileşiklerin şeker analizleri TLC üzerinde uygulanabilen özel bir teknikle gerçekleştirildi. Buna göre saf bileşikler tabakaya (Silikajel 60 F₂₅₄) tatbik edildikten sonra kapalı bir kapta 40 dakika süre ile 60 °C. doymuş HCl buharlarında tutuldu. Soğutulduktan sonra aynı tabakaya standart şekerler tatbik edildi ve tabaka CHCl₃: MeOH: H₂O: gAcH /16:9:2:2 çözgen sisteminde yürütüldü. Lekeler α -naftol-H₂SO₄ çözeltisi püskürtülerek belirtildi. Her şekerin farklı R_f ve renk vermesi nedeniyle ilgili şekerler belirlendi (Su ve ark., 2001)

3.4 Bitki Ekstrelerinin Mikrobiyolojik Aktivite Sonuçları

Bitki ekstrelerinin mikrobiyolojik aktivitesi MIC yöntemiyle belirlendi. Bu yöntemde ham ekstrelerden belirli miktarlarda örnekler alınarak farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlandı. Daha sonra bu örneklerle aynı miktarda çeşitli mikroorganizmalar ilave edildi. Üremenin durduğu en düşük konsantrasyon Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC) olarak belirlendi (Wistreich, 1997).

Tablo 3.1 *E. coli* ATCC11230, *S. aureus* ATCC29213, *S. epidermidis* ATCC12228, *E. faecalis* ATCC29212, *P. aureginosa* ATCC27853 bakterileri ve *C. Albicans* ATCC10239) fungusu için ölçülen antimikrobiyal ve antifungal aktivite değerleri (µg/mL).

Ekstreler	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu(µg/mL)					
	ATCC 11230	ATCC 29213	ATCC 12228	ATCC 29212	ATCC 27853	ATCC 10239
1-MeOH	100	800	200	100	400	400
2-Hegzan	100	100	50	100	400	400
3-CH ₂ Cl ₂	100	100	50	100	400	400
4-H ₂ O(BuOH)	100	800	50	50	400	400
5-BuOH	200	200	100	50	400	200
6-H ₂ O:MeOH	200	200	100	200	400	800
Ampisilin	< 3,12	< 3,12	< 3,12	6,25	6,25	-
Fluktasin	-	-	-	-	-	6,25

Antibakteriyal aktivitenin belirlenmesinde ampisilin, antifungal aktivitenin belirlenmesinde fluktasin standart olarak kullanılmıştır.

3.5 Antioksidan Aktivite Sonuçları

Pek çok bilimsel çalışmada flavonoidlerin yüksek antioksidan kapasitesine yönelik bulgular mevcuttur.

Bir flavon glikozid olan Bileşik 1 için DPPH[•] radikal yöntemine göre yapılan antioksidan aktivite araştırmasında, %84 gibi oldukça yüksek bir değer hesaplanmıştır.

3.6 Yağ Asidi Analizleri Sonuçları

Tablo 3.2 Bitkinin hegzan ekstresinin yağ asitleri içeriği

<u>Bileşikler</u>	<u>Alıkonma Süresi</u>	<u>%</u>	<u>M⁺</u>	<u>Mass Spektral verileri, m/z (Bağıl Şiddet)</u>
Palmitik Asit	11,95	3,83	270	239(5), 227(12), 143(15), 87(75), 74(100), 55(30)
Linoleik Asit (ω-6)	13,67	1,12	294	263(5), 207(22), 135(11), 123(10), 109(30), 95(40), 81(70), 67(100), 55(75)
Linolenik Asit (ω-3)	13,74	2,24	292	263(3), 207(15), 149(10), 135(10), 121(12), 108(30), 95(55), 79(100), 67(70), 55(60)
Fitol (ω-6)+(ω-9)	13,86	44,04	296	278(1), 196(2), 137(3), 123(21), 111(10), 95(13), 81(25), 71(100), 57(30)
Stearik Asit	13,97	1,84	298	255(10), 190(10), 143(20), 97(20), 87(60), 74(100), 55(40)

3.7 Tartışma

Bileşik 1;

Çalışmada elde edilen $C_{26}H_{28}O_{14}$ kapalı formülüne sahip bileşik **1**’ sarı amorf yapılı bir katıdır.

Bileşiğin UV spektrumunda gözlenen üç spesifik 233, 270 ve 332 nm’ lerdeki maksimumlar flavon bileşiklerine özel tipik absorpsiyon değerleridir.

IR spektrumunda gözlenen $3459,56\text{ cm}^{-1}$, $2931,29\text{ cm}^{-1}$, $1658,49\text{ cm}^{-1}$, $1612,21\text{ cm}^{-1}$ ve $1180,23\text{ cm}^{-1}$ pikler sırasıyla -OH, C-H, C=O, -C=C- ve C-O Gerilme pikleridir. 500-850 arasındaki pikler ise benzen halkalarındaki o- ve m-süstitüsyonları gösteren piklerdir.

Bileşiğin $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda iki aromatik dublet dört protona ait olup A aromatik halkasının 7,90 ppm de H-2' ve H-6' (2H, d, $J=9,2\text{ Hz}$) protonları ve 6,93 ppm de H-3' ve H-5' (2H, d, $J=8,8\text{ Hz}$) protonlarıdır. Bu iki proton çifti birbirleriyle m-coupling vermektedir. COSY spektrumunda da bu proton-proton etkileşimleri net bir biçimde görülmektedir. İzole H-3 protonu ise 6,79 ppm de bir singlet vermektedir. 6,77 ve 6,38 ppm deki pikler sırasıyla A aromatik halkasının H-8 (1H, d, $J=2,0\text{ Hz}$) ve H-6 (1H, d, $J=2,0\text{ Hz}$) protonlarına ait olup birbirine göre m-konumdadır. Şeker birimlerinin anomerik protonlarından birisi 5,12 ppm H-1'' (1 H, d, $J=7,2\text{ Hz}$)’ de, diğeri 5,33 ppm H-1''' (1H, d, $J=1,6\text{ Hz}$)’de sinyal vermektedir. J değerleri dikkate alındığında bu şeker birimlerinden ilkinin β ikincisinin de α bağlı şekerler olduğu düşünülmektedir. Bileşiğin asidik hidrolizi sonrası standart şekerlerle yapılan karşılaştırmalarda δ 5,33 de sinyal veren şekerin apioz, diğeri (δ 5,12) de glikoz olduğu anlaşılmıştır. Bu basamakta apioz’un özel durumu dikkate alınmalıdır. Bilindiği gibi apiozun her zaman β konformasyonunda bulunması nedeniyle ilgili şeker, 1,6 Hz lük bir yarıma vermesine rağmen bu özel durumu nedeniyle β konumlanır. İkinci şeker ise düşünüldüğü gibi β -D-glikozdur.

$^{13}\text{C-NMR}$ spektrum değerleri incelendiğinde verilerin Şekil 3.1 deki formül ile uyumlu olduğu görülmüştür. Buna göre; karbonil karbonu 182,66 ppm de, aglikona

ait kuaterner karbonlar ise 163,34; 162,21; 161,82; 161,81;157,61; 121,61; 106,05 ppm de sinyal vermektedir. Şeker karbonları δ 109,44 ve 98,85 de gözlenmektedir. Bu değerlerden ilki apioz şekerine aittir. Bilindiği gibi bu az rastlanan molekülün anomerik karbonu diğer bilinen şekerlerden daha düşük alanda ve genellikle 110 ppm civarında kaydedilmektedir. Bu durum ilgili ^1H -NMR verileri ile de uyumlu olup şekerin β - konformasyonunu doğrulamaktadır. Şeker birimlerine ait diğer karbon sinyalleri ise 80,00-61,20 ppm arasına gözlenmiştir.

HMQC spektrumunda en önemli etkileşimlerin şekerlerin anomerik karbonlarının (C-1", C-1''') anomerik protonlarla (H- 1", H-1'''); C-3, C-6, C-8, C-2', C-6', C-3', C- 5' nolu halka karbonlarının ise kendi protonlarıyla gerçekleştiği görülmüştür.

HMBC spektrumunda ise kaydedilen veriler bileşiğin bağlantılarını belirlemiştir. Buna göre; H- 1" protonunun üç bağ ötesi etkileşimi C-7 ile olması şeker zincirinin aglikona bu karbondan bağlandığını, H- 1''' protonunun üç bağ ötesi etkileşimi C-2" ile olması iki şekerin 1 $\rightarrow$ 2 bağlı olduğunu açıklamaktadır. H-2' ve H-6' nün C-2 ile etkileşimi B halkasının C halkasına bağlantı noktasını belirlemektedir.

Bu bulgular ışığında Bileşik 1'in iki şeker birimli bir flavon glikozit (Chrysoeriol 7-O- β -D-apiofuranozil (1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glukopranozil) olduğu bulunmuştur (Mun'im, 2005).

Bileşik 2;

Bir seri izolasyon ve saflandırma işlemleri sonrası elde edilen beyaz amorf görünümlü Bileşik 2'nin $C_{47}H_{76}O_{17}$ kapalı formülüne sahip olduğu spektroskopik olarak belirlenmiştir. ESI-Kütle spektrumunda moleküler iyon piki m/z $M^+ = 912$ de gözlenirken diğer fregmanlar m/z : 850, 704, 572 ve 458 de yer almıştır. Moleküler pikten H_2O ve CO_2 çıkışını sırasıyla, ramnoz, ksiloz ve H_2O ve CO_2 kaybı sonrası kalan glukuronik asit artığı takip etmektedir.

Bileşiğin UV spektrumunda 267 nm de bir maksimum gözlenmiştir.

IR spektrumunda yapıyı belirlemede etkili en önemli pikler -OH, -C-H, C=O, C=C ve C-O gerilme pikleri olup sırasıyla 3500-3000; 2938,46 ve 2892,23; 1707,69; 1612,21; 1384,62 ve 1046,15 cm^{-1} de kaydedilmiştir.

^1H -NMR spektrumunda 7 x CH_3 protonu 1,25-0,86 ppm aralığında singletler halinde, ramnoz CH_3 protonları ise δ 1,29 da $J=1,24$ Hz lük bir yarıllma veren dublet olarak görülmüştür. Karakteristik anomerik proton sinyalleri düşük alandan yüksek alana doğru 5,21; 4,82 ve 4,43 ppm değerlerinde dubletler halinde yer almış olan ve sırasıyla $J=1,20$ Hz, $J=7,00$ Hz, $J=7,20$ Hz değerlerinde yarıllmalar gösteren α -, β - ve β - konfigürasyonunda birbirine ve aglikona bağlanmış şekerlerdir.

HMQC spektrumunda ilgili şeker piklerinin sırasıyla 101,60; 102,90 ve 105,00 ppm de kontür vermeleri bu yöntem için şekerlere özel en önemli bulgulardır. Bunlara ilave olarak HMQC spektrumunda proton içeren her karbon atomunun etkileşim verdiği de saptanmıştır.

Bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumunda 7 x CH_3 (δ 32,40; 28,90; 24,70; 22,60; 19,90; 17,10 ve 15,70) ile 7 kuaterner karbon atomu (δ 144,70; 44,80; 43,00; 41, 20; 38,20; 37,00 ve 31,40)' nun gözlenmesi teklif edilen aglikon yapısı için çok belirleyici olmaktadır. Bunların yanı sıra normal oleanan iskeletinde farklılık yaratan ve ender rastlanan bir durum da 19,90 ppm de sinyal veren C-28 karbonudur. Bu durum

aglikona ayrıcalık kazandırmaktadır. C-12 ile C-13 arasındaki çift bağ belirleyen özellik ise 144,70 ve 123,50 ppm'lerdeki sinyallerdir. Şekere ve aglikona ait CH₂-O karbonları δ 66,60 ve 64,00 ppm de gözlenirken, CH-O karbonlarının sinyalleri 80,00-66,00 ppm arasında yer almaktadır. Glukuronik asitteki karbonil grubunun karbonuna ait sinyal ise δ 176,83 de kaydedilmiştir.

HMBC spektrumunda ise özellikle 3 bağ, nadiren de 2 bağ ötesi gözlenen proton- karbon etkileşimleri yapının kesinleşmesini sağlamaktadır. Buna göre H-1' şeker protonunun C-3 aglikon karbonuyla; H-1'' şeker protonunun C-2' karbonuyla, H-1''' diğer şeker protonunun C-2'' karbonuyla etkileşimleri sırasıyla; glukuronik asidin aglikona C-3 den, ksilozun glukuronik aside C-2' den ve ramnozun ksiloza C-2'' den glikozidik bağlarla bağlanmış olduklarını kanıtlamaktadır. C-28'deki metil protonlarının 3 bağ ötesi C-16, C-18 ve C-22 ile etkileşimlerinin gözlenmesi oleanan iskeletinde C-28'deki -COOH yerine -CH₃ olması durumunu kesinleştirmektedir. Asidik hidrolizle şeker türleri de tanımlanmış olan Bileşik 2'nin üç şeker içeren bir triterpen glikozit olduğu belirlenmiş ve 3-O- α -L-ramnopranozil(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-ksilopranozil(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glukorunopranozit olarak isimlendirilmiştir (Oleszek ve Stochmal, 2002).

Bitkinin apolar bileşenlerinin bulunduğu hegzan ekstresi esansiyel yağ asitleri içeriği açısından belirlenmiştir. Buna göre [(ω -6)+(ω -9)], (ω -3), (ω -6) yağ asidi yüzdeleri sırasıyla % 44; 2,24; 1,12 olarak önemli değerler elde edilmiştir. Ham ekstraktlar üzerinde MIC yöntemiyle yapılan mikrobiyolojik aktivite çalışmalarında, bitkinin önemli antibakteriyel ve antifungal aktivitesinin olduğu standart antibiyotiklerle karşılaştırılarak belirlenmiştir. Bir flavon glikozit olan Bileşik 1'in antioksidan aktivitesi DPPH• metodu ile hesaplanmış ve % 84 gibi çok önemli bir değer elde edilmiştir. Bütün bu bulgular *Trifolium purpureum*'un mikrobiyolojik aktif, antioksidan özellikli bir bileşik içeren, esansiyel yağ asitlerince zengin bir bitki olduğunu göstermektedir. Yapıları aydınlatılan bileşiklerden Bileşik 1'in bu cinsten, Bileşik 2'nin ise bu türde ilk kez tanımlanan bileşikler olması bitkiyi kimyasal ve biyolojik açıdan önemli kılmaktadır.

KAYNAKLAR

- Aksu, S. (1972), *Bitkisel maddeler kimya ve teknolojisi*, İzmir: Tekel Enst. Yayınları, A-12.
- Amic, D., Davidovic-Amic, D., Beslo, D. ve Trinajstic, N. (2002). Structure-radical scavenging activity relationship of flavonoids. *Croatica Chemica Acta* , 76 (1), 55-61.
- Baytop, T. (1980). *Farmakognozi*. Istanbul: Fatih Yayınevi.
- Beck, V., Unterrieder, E., Krenn, L., Kubelka, W. ve Junbauer, A. (2003). Comparison of hormonal activity(estrogen, androgen and progestin) of standardized plant extracts for large scale use in hormone replacement therapy. *The Journal of Steroid biochemistry & molecular biology*, 84, 259-268.
- Bukharov, V. G. ve Karneeva, L.N.(1971) *Chem. Abstr.* 74 121340.
- Burda, S. ve Oleszek W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of Flavonoids. *J. Agric Food Chem.* 49, 2774-2779.
- Chirva, V. J., Kintya, P. K. ve Kreton, L. G. (1971). *Chem Abstr.* 74 , 31935.
- Cioffi, G., Escobar, L. M., Braca, A. ve De Tommasi, N. (2003). Antioxidant chalcone glycosides and flavanones from *Maclura*(*Chlorophora*) *tinctoria*. *J. Nat. Prod.*, 66, 1061-1064.
- Conn, E. E. (1980). Cyanogenic compounds. *Annu. Rev. Plant Phy.* 31, 433-451.
- Croft, K. D. (1998). The chemistry and biologic effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 854, 435-442.

- David, F., Sandra, P. ve Wylie, P. L. (2003). *Improving the analysis of fatty acid methyl esters using retention time locked methods and retention time databases*. 25 Ocak 2005, <http://www.agilent.com/chem>
- Davis, P. H. (1970). *Flora of Turkey* Edinburg: Edinburg University Press.
- Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A. ve Capasso, F. (1999). Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, *Life science*, 65, 337-353.
- Fang, T. T. ve Lee, Y. H. (1991). Investigation on characteristics of Japanese apricot cultivars in Taiwan. *Journal of the Agricultural Association of China* 156, 69-82.
- Harborne, J. B. (1964). Plant polyphenols XI. The structure of acylated anthocyanins. *Phytochemistry* 3, 151-160.
- Harborne, J. B. (1967). *Comperative biochemistry of the flavonoids*. New York: Academic press.
- Harborne, J. B. (1973). *Phytochemical Methods*, Londra: Chapman and Hall.
- Harborne, J. B. ve Mabry T. J. (1975). *The Flavonoids: Advances in Research*, (2). London : Chapman and Hall Ltd.
- Havsteen, B. (1983). Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology*, 32, 1141-1148.
- Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medicinal significance of the flavonoids, *Pharmacolgy & Therapeutics*, 96, 67-202.
- Heuer, B., Yaniv, Z. ve Ravina, I. (2002). Effect of late salinization of chia (*Salvia hispanica*), stock (*Matthiola tricuspidata*) and evening primrose

(*Oenothera biennis*) on their oil content and quality. *Industrial Crops and Products*, 15 , 163-167.

- Ingram, D., Sanders, K., Kolybaba, M. ve Lopez, D. (1997). Case-control study of phyto-oestrogens and breast cancer. *The Lancet*, 350, 990-994.
- Kako, M., Miura, T., Nishiyama, Yumi., Ichimaru, M., Moriyasu, M, ve Kato, A. (1997). Hypoglycemic activity of some triterpenoid glycosides. *J. Nat. Prod.* 60, 604-605.
- Kang, T. H., Cho, H., Oh, H., Sohn, D. H. ve Kim, Y. C. (2005). Flavonol glycosides with free radical-scavenging activity of *Saururus chinensis*. *Fitoterapia*, 76 , 115-117.
- Kırmızıgül, S. ve Anıl, H. (1993). Doktora Tezi, *Isolation and Structural determination of Cephalaria transsylvanica* L. Glycosides, İzmir: Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Basımevi.
- Kırmızıgül, S., Anıl, H., Uçar, F. ve Akdemir, K. (1996). Antimicrobial and antifungal activities of three new triterpenoid glycosides, *Phytotherapy Research*, 10, 274-276.
- Kitagawa, I., Koboyashi, M. ve Sugawara, T. (1978)a. *Chem. Pharm. Bull*, 26 (6), 1852-1863.
- Kitagawa, I., Koboyashi, M. ve Sugawara, T. (1978)b. *Chem. Pharm. Bul.* 26 (6), 1864-1873.
- Klejdus, B., Vitamvasova-Sterbova, D. ve Kuban, V. (2001). Identification of isoflavone conjugates in red clover (*Trifolium pratense*) by liquid chromatography-mass spectrometry after two dimensional solid-phase extraction. *Analytica Chimica Acta*, 450, 81-97.

- Koleva, I. I. , Beek, T. A., Linssen, J. P. H., Groot, A. ve Evstatieva, L. N. (2002). Screening of plant extracts for antioxidant activity: A comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*, 13, 8-17.
- Krenn, L., Unterrieder, I. ve Ruprecht, R. (2002). Quantification of isoflavones in red clover by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 777, 123-128.
- Lawrence, N. J., Rennison, D., McGown, A. T. ve Hadfield, J. A. (2003). The total synthesis of an aurone isolated from *Uvaria hamiltonii*: Aurones an flavones as anticancer agents. *Biorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13, 3759-3763.
- Li, H. Y., Sun, N. J., Kashiwada, Y. ve Sun, Li. (1993). Anti-aids agents, 9.¹ suberosol, a new C₃₁ lanostane-type triterpene and anti-hiv principle from *polyalthia suberosa*. *J. Nat. Prod.* 56 (7), 1130-1133.
- Marley, C. L., Cook, R., Barrett, J., Keatinge, R., Lampkin, N.H. ve McBride, S. D. (2003). The effect of dietary forage on the development and survival of helminth parasites in ovine faeces. *Veterinary Parasitology*, 118, 93-107.
- Maul C, Sattler I, Zerlin M, Hinze C, Koch C, Maier A, Grabley S, Thiericke, R., (1999), Bimolecular-chemical screening: A novel screening approach for the discovery of biologically active secondary metabolites - III. new DNA-binding metabolites, *Journal of Antibiotics*, 52 (12), 1124-1134.
- Mohammed, K. M., Hassanean, H. A., Ohtani, K., Kasai, R. ve Yamasaki, K. (2000). Chalconol glucosides from seeds of *Trifolium alexandrinum*. *Phytochemistry*, 53, 401-404

- Mohammed, M. K., Mohammed, M. H., Ohtani, K., Kasai, R. ve Yamasaki, K. (1999). Megastigman glycosides from seeds of *Trifolium alexandrinum*. *Phytochemistry*, 50, 859-862.
- Montoro, P., Braca, A., Pizza, C. ve De Tommasi, Nunziatina. (2005). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. *Food Chemistry*, 92, 349-355.
- Moraes, G., Norhcote, P. C., Kalinin, V. I., Avilov, S. A., Silchenko, A. S., Dmitrenok, P. S., ve diğer. (2004). Structure of the major triterpene glycoside from the sea cucumber *Stichopus mollis* and evidence to reclassify the species in to the new genus *Australostichopus*, *Biochemical systematics and ecology*, 32, 637-650.
- Mun'im, A. (2005). Isolasi dan elusidasi struktur senyawa flavonoida dari *crotalaria anagyroides*. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 2 (1), 22-29.
- Nakagawa, H., Yamamoto, D., Kiyozuka, Y., Tsuta, K., Uemura, Y., Hioki, K. ve diğer (2000). Effects of genistein and synergistic action in combination with eicosapentaenoic acid on the growth of breast cancer cell lines. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 126, 448-454.
- Newman, A. A. (Ed.). (1972). *Chemistry of Terpenes* Newyork: Academic Press London and Newyork.
- Oleszek, W ve Stochmal, A. (2002). Triterpene saponins and flavonoids in the seeds of *Trifolium* species. *Phytochemistry*, 61, 165-170.
- Parvu, E. (2004). *Trifolium pratense* for breast disease: A case series. *Homeopathy*, 93, 45-50.

- Peterson, J. ve Dwyer, J. (1998). Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*, 18 (12), 1995-2018.
- Phillipson, J. D. (2001). Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry*, 56, 237-243.
- Rai, M. ve Mares, D. (2003). *Plant derived antimicrobics*, USA: Haworth Press.
- Rates, S. M. K. (2001). Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39, 603-613.
- Reddy, L., Odhav, B. ve Bhoola, K. D. (2003). Natural products for cancer prevention: A global perspective. *Pharmacology & Therapeutics*, 99, 1-13.
- Rijke, E., Zafra-Gómez, A., Ariese, F., Brinkman, U. A. T ve Gooijer, Cees. (2001). Determination of isoflavone glucoside malonates in *Trifolium pratense* L. (red clover) extracts: Quantification and stability studies. *Journal of Chromatography A*, 932, 55-64.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekât, L. ve Leblebici, E. (2004). *Tohumlu Bitkiler Sistematigi* (7.Baskı). İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi.
- Simonet, M. A., Stochmal, A., Oleszek, W. ve Macias, F. A. (1999). Saponins and polar compounds from *Trifolium resupinatum*. *Phytochemistry*, 51, 1065-1067.
- Solomons, G. ve Fryhle, C. (2002). *Organik Kimya*, Ankara: Literatür Yayınevi
- Su, Y., Guo, D., Guo, H., Liu, J., Zheng, J., Koike, K. ve Nikaido, T. (2001). Four new triterpenoid saponins from *Conyza blini*. *J. Nat. Prod.* 64:32-36.
- Thiem, B. ve Goslinska, O. (2004). Antimicrobial activity of *Rubus chamaemorus*. *Fitoterapia*, 75, 93-95.

- Tschesche, R. ve Wulff, G. (1973). Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe. *Springer-Verlag*, Wien, 30.
- Voutquenne, L., Guinot, P., Froissar, C., Thoison, O., Litaudon, M. ve Lavaud, Catherine. (2005). Haemolytic acylated triterpenoid saponins from *Harpullai austro-caledonica*. *Phytochemistry*, 66, 825-835.
- Voutquenne, L., Guinot, P., Thoison, Odile., Sevenet, Thierry. ve Lavaud, Catherine. (2003). Oleanolic glycosides from *Pometia ridleyi*. *Phytochemistry* 64, 781-789.
- Wistreich G. A., (1997). *Microbiology Laboratory*, New Jersey: Prentice Hall Press.
- Woitke, H. D., Kayser, J.P. ve Hiller K. (1970). Fortschritte in der Erforschung der Triterpensaponine. *Pharmazie*, 25, 133.
- Wu, Q., Wang, M. ve Simon, J. E. (2003). Determination of isoflavones in red clover and related species by high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1016, 195-209.
- Xu, R., Fazio, G. C. ve Matsuda, S. P. T. (2004). On the origins of triterpenoids skeletal diversity. *Phytochemistry*, 65, 261-291.
- Youdim, A. K., Martin, A. ve Joseph, A. J. (2000). Essential fatty acids and the brain: Possible health implications, *Int. J. of Devl. Neuroscience*, 18, 383-389.
- Zeybek, N. ve Zeybek, U. (1994). *Farmasötik botanik: Kapalı tohumlu bitkiler (angiospermea) sistematigi ve önemli maddeler* (2.Baskı). İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi.