

TESBİH ÇALISI (Styrax Officinalis) TOHUMLARINDAN
BAZI EKSTRAKTİF BİLEŞİKLERİN İZOLASYONU ve
BU BİLEŞİKLERİN
YAPILARININ TANIMLANMASI

HASAN FATİH MUTLU

Yüksek Lisans Tezi
KİMYA ANABİLİM DALI
ISPARTA 2005

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TESBİH ÇALISI (*Styrax Officinalis*) TOHUMLARINDAN BAZI
EKSTRAKTİF BİLEŞİKLERİN İZOLASYONU ve BU BİLEŞİKLERİN
YAPILARININ TANIMLANMASI**

HASAN FATİH MUTLU

**Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı**

ISPARTA, 2005

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

Bu çalışma jürimiz tarafından KİMYA ANABİLİMDALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan :

Üye :

Üye :

ONAY

Bu tez/.....2005 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

..... / / 2005

Prof.Dr. Çiğdem SAVAŞKAN
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETİ.....	3
2.1. Bitki Ekstraksiyonu Hakkında Genel Bilgi.....	3
2.1.1. Katı-Sıvı Ekstraksiyonu.....	3
2.1.2. Çözücü Seçimi.....	6
2.1.3. Ekstraksiyonu Etkileyen Faktörler.....	6
2.2. Ekstraksiyonla Ayrılan Madde Sınıfları.....	10
2.3. Kromatografi.....	11
2.3.1. Kolon (Adsorpsiyon) Kromatografisi.....	11
2.3.2. Adsorban ve Adsorbanın Rolü.....	13
2.4. Bitki Steroitlerinin Ayrıştırılması için Kromatografik Yöntemler.....	15
2.4.1. Genel Saflaştırma Stratejisi.....	17
2.4.2. Brasinosteroidler.....	23
2.4.2.1. Brasinosteroidler için Ekstraksiyon.....	23
2.4.2.2. Brasinosteroidler için HPLC.....	24
2.4.2.3. Brasinosteroidler için GC-MC.....	24
2.4.3. Bufadienolitler.....	25
2.4.3.1. Bufadienolitler için Ekstraksiyon ve Ön Saflaştırma.....	25
2.4.3.2. Bufadienolitler için İTK.....	26
2.4.3.3. Bufadienolitler için HPLC.....	26
2.4.4. Kardenolitler.....	27
2.4.4.1. Kardenolitler için Ekstraksiyon.....	27

2.4.4.2. Kardenolitler için İTK.....	28
2.4.4.3. Kardenolitler için HPLC.....	28
2.4.5. Kukurbitasinler.....	28
2.4.5.1. Kukurbitasinler için Ekstraksiyon.....	29
2.4.5.2. Kukurbitasinler için İTK.....	29
2.4.5.3. Kukurbitasinler için HPLC.....	30
2.4.5.4. Kukurbitasinler için Biyo Tahliller.....	30
2.4.6. Deri Değiştirme Steroitleri (Esidisteroitler).....	31
2.4.6.1. Deri Değiştirme Steroitleri için Ekstraksiyon.....	31
2.4.6.2. Deri Değiştirme Steroitleri için İTK.....	32
2.4.6.3. Deri Değiştirme Steroitleri için HPLC.....	32
2.4.7. Steroit Saponinler.....	33
2.4.7.1. Steroit Saponinler için Ekstraksiyon ve Ayırma.....	35
2.4.7.2. Steroit Saponinler için İTK.....	35
2.4.7.3. Steroit Saponinler için HPLC.....	36
2.4.8. Steroit Alkaloitler.....	36
2.4.8.1. Steroit Alkaloitler için Ekstraksiyon ve Ayırma.....	37
2.4.8.2. Steroit Alkaloitler için İTK.....	37
2.4.8.3. Steroit Alkaloitler için HPLC.....	37
2.4.9. Omurgalı Tip Steroitler.....	38
2.4.9.1. Omurgalı Tip Steroitler için Ekstraksiyon.....	39
2.4.9.2. Omurgalı Tip Ssteroitler için İTK.....	39
2.4.9.3. Omurgalı Tip Steroitler için HPLC.....	39
2.4.10. Vitanolitler (Withasterodiler).....	40
2.4.10.1. Vitanolitler için Ekstraksiyon.....	40
2.4.10.2. Vitanolitler için İTK.....	41
2.4.10.3. Vitanolitler için HPLC.....	41
2.4.11. Bitki Ekstraksiyonu ile İlgili Sonuçlar.....	41
3. MATERYAL ve METOD.....	43
3.1. Materyal.....	43
3.2. Metod.....	43
3.2.1. Çözücü İle Ekstraksiyon.....	43

3.2.2. Tesbih Ağacı Bitkisi Tohumlarının Yağ İçerikleri Yönünden Analizi.....	44
4. BULGULAR.....	46
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	48
6. KAYNAKLAR.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	57

ÖZET

Tesbih Çalısı (Styrax Officinalis) Tohumlarından Bazı Ekstraktif Bileşiklerin İzolasyonu ve Bu Bileşiklerin Yapılarının Tanımlanması

Styrax officinalis (Tesbih Çalısı) orta Amerika, Meksika, Güney ve Batı Anadolu'nun da içinde bulunduğu Akdeniz bölgesinde yetişen bir çalı türüdür. Bu bitkiden elde edilen reçineler, Romalılar, Mısırlılar, Persliler, ve İyonlular tarafından çeşitli hastalıkların tedavisinde ve esans olarak kullanılmıştır. Çalışmamızda gölgede kurutulmuş Tesbih çalısı tohumlarında çeşitli ekstraksiyon yöntemiyle bazı ekstraktif bileşiklerin izolasyonu ve bunların yapısı üzerinde araştırma yapılmıştır.

Deneysel çalışmalarda n-hekzan ile yapılan ekstraksiyon sonucu elde edilen ekstraktın bileşenlerine ayrıştırılmasında ve yapılarının belirlenmesinde kolon kromatografisi, ince tabaka kromatografisi (İTK) ve GC-MS'den yararlanılmıştır.

Çalışmamızda sonuç olarak, 5-[3''-(1c-Metilbütanoiloksi)propil]-7-metoksi-2-(3',4'-metilendifenil)-benzofuran ve 4-[3''-(1c-Metilbütanoiloksi)propil]-2-metoksi-1a-(3',4'-metilendioksifenil)-1a,5b-dihidrobzeno-[3,4]-siklobütaoksiren bileşikleri bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Tesbih çalısı (Styrax officinalis L.), İnce Tabaka Kromatografisi (İTK), HPLC, GC-MS (Kütle Spektroskopisi), Kolon Kromatografisi (CC).

ABSTRACT**The Isolation and Structural Elucidation Extractives From Seeds of *Styrax officinalis***

Styrax officinalis L. is a shrub found in Central America, Mexico, and the Mediterranean region including West and South Anatolia. Its resin was used by Romans, Egyptians, Phoenicians and Ionians as incense and in therapeutics. In our research, it has been investigated the shade dried seeds of *Styrax officinalis* were extracted special extraction methods for isolation of some extractive compounds and structures.

In experimental studies column chromatography, thin layer chromatography (TLC) and GC-MS were used to separate the compounds obtained from extraction with n-hexane and determined the structure of this compounds.

As a result, it has been obtained 5-[3''-(1c-Methylbutanoyloxy)propyl]-7-methoxy-2-(3',4'-methylenedixphenyl)-benzofuran and 4-[3''-(1c-Methylbutanoyloxy)propyl]-2-methoxy-1a-(3',4'-methylenedioxyphenyl)-1a,5b-dihydrobenzo-[3,4]-cyclobutaoxirene.

Key Words: *Styrax officinalis* L., Thin Layer Chromatography (TLC), Column Chromatography (CC), HPLC, Mass Spektrosophy (GC-MS).

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında değerli bilgilerinden yararlandığım ve bana yol gösteren danışman hocam **Yrd. Doç. Dr. Hakan AKTAŞ'a** sonsuz teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca çalışmam boyunca değerli bilgilerinden yararlandığım ve benden yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım **Prof. Dr. Mustafa CENGİZ, Yrd. Doç. Dr. Mustafa AKTÜRK** ve **Doç. Dr. Ahmet GÜLCE'ye** ve tüm hocalarıma teşekkürlerimi sunarım. Yine çalışmam boyunca, ekstraksiyon aşamalarında ve spektrumların alınmasında bana yardımcı olan değerli asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bütün yaşamımda olduğu, eğitim-öğretim hayatım boyunca da bana her türlü desteğini esirgemeyen **Çok Sevgili Aileme** sonsuz teşekkürler ederim.

Hasan Fatih MUTLU

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1. Tesbih çalısının genel bir görüntüsü.....	1
Şekil 2. Tesbih çalısı ve çalıdaki tohumların bir görüntüsü	2
Şekil 3. Bazı bitki steroidlerinin yapıları.....	16
Şekil 4. 3. ve 6. fraksiyonlardan elde edilen bileşiklerin tahmini kimyasal yapıları	47
Şekil 5. Daha önce izole edilmiş bileşiklerin kimyasal yapıları	49
Şekil 6. 3. fraksiyonda elde edilen spektrum (n-hekzan/etilasetat:9/1 oranında)...	51
Şekil 7. 3. fraksiyonda elde edilen spektrum (n-hekzan/etilasetat:9/1 oranında)...	52
Şekil 8. 3. fraksiyonda elde edilen spektrum (n-hekzan/etilasetat:9/2 oranında)...	53
Şekil 9. 6. fraksiyonda elde edilen spektrum (n-hekzan/etilasetat:9/2 oranında)...	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1. Bitkilerin endüstriyel temel operasyonları	5
Çizelge 2. Ekstraksiyonla ayrılan madde sınıfları.....	10
Çizelge3. Bitki steroid polaritelerinin farklı sınıfları	20
Çizelge 4. Bazı çözücü sistemlerinin dağılma oranları.....	20
Çizelge 5. Esidisteroitlerin üç farklı sistemde dağılma oranları.....	21
Çizelge 6. Bazı karşı akım dağılım sistemleri.....	21
Çizelge7. Bazı genel İTK çözücüleri.....	22
Çizelge 8. Çeşitli metodlarla steroidlerin İTK'dan sonra görüntülenmesi.....	22

1. GİRİŞ

Tesbih çalısı (*Styrax officinalis*) L. Styraceae familyasının bir üyesidir. Orta Amerika, Meksika ve Güney ve Batı Anadolu'nun içinde bulunduğu Akdeniz Bölgesinde yetişen bir çalı türüdür (Davis, 1972). Dağlık bölgelerde yetişen tesbih çalısı 1,5-3 m. boyunda bir ağaçtır. Bu bitkiden elde edilen reçineler Romalılar, Mısırlılar, Persliler ve İyonlular tarafından çeşitli hastalıkların tedavisinde ve esans olarak kullanılmıştır (Vardar ve Oflas, 1973). *Styrax* türleri, etkili pyrethrum synergist olarak bilinen egonol ve doğal benzofuran bileşikleri içerir (Takanashi ve Takizawa, 1988).

Çalışmamızda tesbih çalısı tohumunda bulunan çeşitli ekstraktif maddelerin ayrılması ve tanınması araştırılmıştır. Aşağıda tesbih çalısının genel görüntüsü ve çalıdaki tohumların görüldüğü fotoğrafları bulunmaktadır.



Şekil 1. Tesbih çalısının genel bir görüntüsü



Şekil 2. Tesbih çalı ve çalıdaki tohumların bir görüntüsü

2. KAYNAK ÖZETİ

2. 1. Bitki Ekstraksiyonu Hakkında Genel Bilgi

Sayıları oldukça fazla olan bitki türlerinden endüstriyel amaçlı hammadde üretimindeki ortak temel operasyonlar çizelgede 1’de gösterilmiştir.

Çizelge 1’de görülen temel işlemlerdeki operasyonların her birini incelemek oldukça kapsamlı olacağından ve ayrıca bu işlemlerden en önemlisinin katı-sıvı ekstraksiyonu olduğu dikkate alınarak bu bölümde endüstriyel bitkilerin (katı-sıvı) ekstraksiyonu üzerinde durulacaktır.

2.1.1. Katı-Sıvı Ekstraksiyonu

Katı-sıvı ekstraksiyonu, bir katı maddedeki bir yada birden fazla maddenin uygun bir sıvı çözücü tarafından seçici olarak çözülerek ayrılmasıdır. Endüstriyel bitkilerin ekstraksiyonu hücre sel yapıya sahip olmaları nedeniyle diğer inorganik maddelerin ekstraksiyonundan farklılık gösterirler. Genel olarak bir endüstriyel bitkinin ekstraksiyonunda iki fiziksel proses aynı anda gerçekleşir:

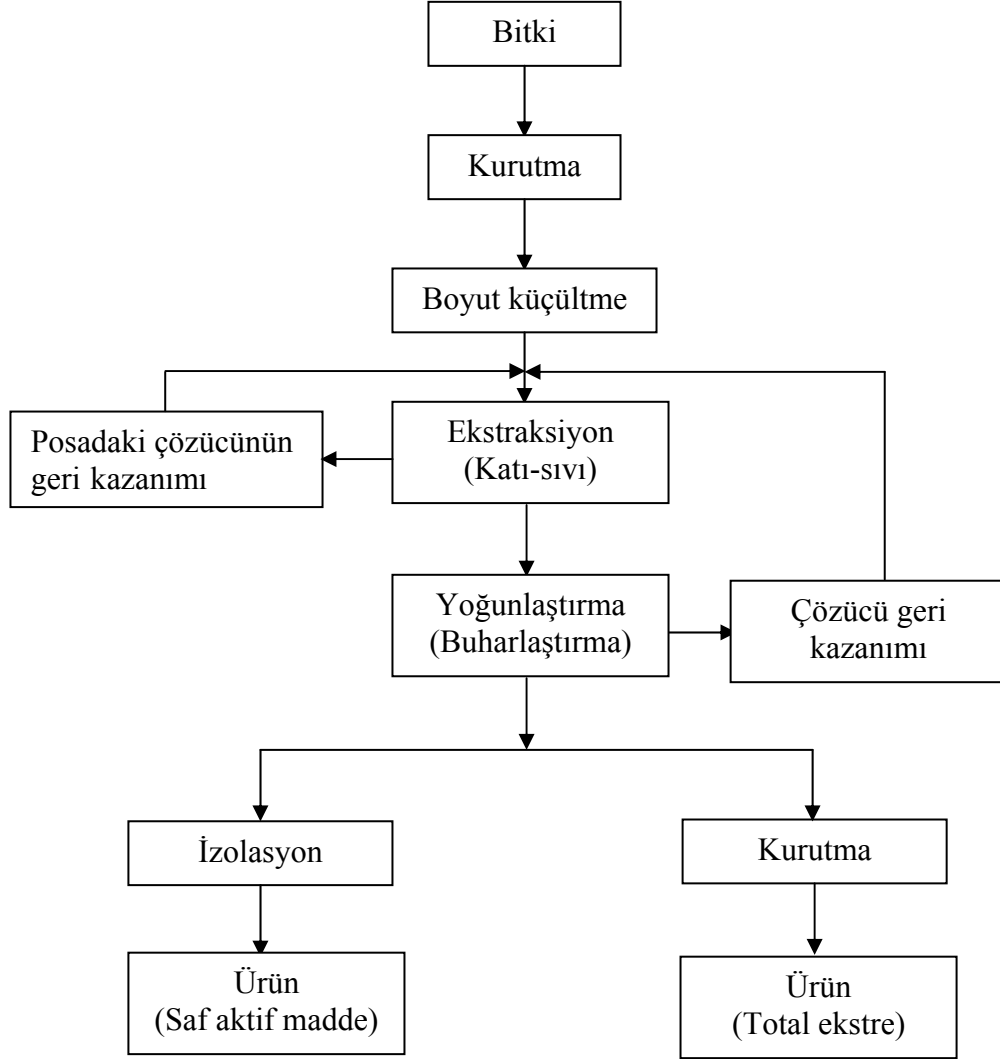
- 1- Boyut küçültme ile parçalanmış bitkisel hücrelerin çözücü tarafından yıkanarak hücrelerdeki çözünebilir maddelerin kolayca çözeltiye geçmesi,
- 2- Parçalanmayan hücrelerdeki çözünebilir maddelerin difüzyonla çözeltiye geçmesi.

Burada parçalanmış hücrelerin çözücü tarafından yıkanması oldukça hızlı olacağından ekstraksiyon süresi de oldukça kısadır. Fakat aynı zamanda istenmeyen bazı çözünebilir maddelerin de çözeltiye geçmesi ileriki saflaştırma kademelerinde zorluklar çıkarabilir.

Parçalanmamış hücrelerde ekstraksiyonda ise çözücü özellikle diffüzyonla hücre içerisine girer, çözünebilen maddeleri çözer ve çözelti yine diffüzyonla hücreden dışarı çıkar. Bu proseste diffüzyonla kütle transferi çok yavaş olduğundan ekstraksiyon hızıda oldukça yavaştır. Fakat istenmeyen maddelerin çözeltiye geçmesi de bir önceki yıkama prosesine göre çok daha azdır (Mutlu, 2002).

Aynı anda gerçekleşen her iki proseste , kütle transferine neden olan itici güç, çözünebilen maddelerin bitkideki çözelti konsantrasyonu ile ana çözeltideki konsantrasyonları arasındaki farktır. Bu fark ekstraksiyon sırasında ne kadar büyük olursa ekstraksiyon hızı da o kadar büyük ve dolayısıyla ekstraksiyon süresi de o kadar kısa olur.

Günümüzde, endüstriyel bitkilerin ekstraksiyonu çok çeşitli yöntemler ve ekstraktörlerle gerçekleştirilmektedir. Bu çeşitliliğin nedenleri ise kullanılan çözücüler, bitki çeşidi ve üretim kapasiteleri şeklinde sıralanabilir(Mutlu, 2002).

Çizelge 1. Bitkilerin endüstriyel temel operasyonları

2.1.2. Çözücü Seçimi

Endüstriyel bitkilerin ekstraksiyonunda kullanılan çözücüler, genellikle normal şartlarda uçucu organik sıvılar olup aşağıdaki özellikleri taşıması gerekir.

- 1- Kaynama noktası, yoğunluk, viskozite, yüzey gerilim katsayısı ve buharlaşma ısısı gibi fiziksel özellikleri uygun olmalı,
- 2- Ekstraksiyonu istenilen etken madde ya da maddeler için seçici olmalı,
- 3- Kolay bulunabilir ve ucuz olmalı,
- 4- Bitkideki maddelerle kimyasal reaksiyona girmemeli,
- 5- Toksik, sağlığa ve çevreye zararlı, yanıcı ve patlayıcı olmamalı. Aksi takdirde çok dikkatli önlemler alınmalı ve son üründe eser miktarda da olsa kalmamalı,
- 6- İstenilen maddeleri çözme hızı ve kapasitesi yüksek olmalıdır.

Çözücünün bu özellikleri ekstraktör kapasitesini, işletme giderlerini, geri kazanımı ve ürün kalitesini doğrudan etkileyecektir. Yukarıda sıralanan özelliklerin tamamına sahip olan ideal bir çözücü bulmak hemen hemen imkansız olduğundan genellikle yapılacak kıyaslama ile uygun çözücü seçilebilir. Bitki ekstraksiyonunda kullanılan sık kullanılan çözücüler ise genellikle, hidrokarbonlar ya da bunların alkol, eter, ester, keton ve halojenli hidrokarbonlar gibi türevleridir.

2.1.3. Ekstraksiyonu Etkileyen Faktörler

Endüstriyel bitkilerin ekstraksiyonunda, öncelikle bitki çözücü ile temas getirilip bitkideki çözünen maddelerin çözücüye transferi, daha sonra da elde edilen çözeltinin geri kalan posadan ayrılması gerekir. Ayrıca bu iki prosese ek olarak endüstriyel bitkinin ekstraksiyon için hazırlanması ve çözeltide çözünen maddelerin ayrılması da ekonomik ve pratik bir tasarım için göz önünde bulundurulması gereken konulardır. Bu bağlamda ekstraksiyonu etkileyen faktörler aşağıda sıralanmıştır.

Çözücü: Kullanılacak çözücünün seçiminde daha önce bahsedilen kriterlere dikkat edilmelidir. Çözücünün saf olmaması, karışım olması halinde en uygun konsantrasyonun belirlenmesi gerekir.

Parçacık büyüklüğü ve dağılımı: Teorik olarak kütle transferi katı ve sıvı faz arasındaki ara yüzey ile orantılıdır. Bu ara yüzey ise parçacık boyutunun küçültülmesiyle yani bitkinin çok ince öğütülmesiyle arttırılabilir. İnce öğütülme ile önemli miktarda bitkisel hücrenin de parçalanacağı ve dolayısıyla ekstraksiyon hızının daha büyük olacağı açıktır. O halde, eğer daha sonraki süzme ve etken maddeyi saflaştırma aşamalarında zorlukla karşılaşılmayacaksa prensip olarak bitkinin ince öğütülmesi tercih edilebilir. Fakat bazı ekstraksiyon yöntemlerinde, özellikle perkolasyon yönteminde, ince öğütülmüş bitkinin ekstraksiyonu hemen hemen imkansızdır. Perkolatöre yüklenerek oluşan ince öğütülmüş katı yatak, çözücünün yatak yüksekliği boyunca akışını engelleyecek ve böylece ekstraksiyon işlemi gerçekleşmeyecektir. Ayrıca, perkolatörde kullanılacak parçacık büyüklüğü dağılımının da mümkün olduğu kadar dar sınırlar içerisinde tutulması yani homojen bir parçacık büyüklüğü istenir. İrili ufaklı parçacıklar tıkanmalara ve kanallanmalara neden olacağından etkin bir ekstraksiyon uygulanamaz.

Bir bitkinin ekstraksiyonu için çok ince öğütülmesi gerektiğinde ise ya karıştırılmalı ekstraktör tipleri tercih edilmeli ya da öğütülen bitki özel yöntemlerle preslenerek ince pulcuklar haline getirilmelidir. Bazı bitkilerin de ekstraksiyon öncesi çözücü ile ıslatılarak genişletilmesi ve hücre kapillerlerinin genişleyerek difüzyonun hızlandırılması sıkça uygulanır.

Sıcaklık: Bilindiği gibi birçok maddenin bir çözücü içindeki çözünürlüğü ve çözünme hızı sıcaklıkla artar. Bu nedenle çoğu bitki ekstraksiyonu çözücünün kaynama noktasına yakın sıcaklıklarda gerçekleştirilir. Fakat sıcaklığın arttırılmasıyla istenmeyen inert maddelerin de çözeltilmeye geçişinin artacağı ve ileriki saflaştırma işleminde zorluk çıkaracağı ve ayrıca ısıtmak için enerji gereksinimi de göz önünde tutularak ekstraksiyon için uygun sıcaklığın belirlenmesi gerekmektedir. Yüksek

sıcaklıklarda karşılaşılabilecek çözücü kayıpları ve aşırı güvenlik önlemleri alınması gereken masraflı tedbirler de dikkate alınmalıdır.

Katı / Sıvı Oranı: Belirli miktardaki bitkinin ekstraksiyonunda çözücü miktarının arttırılması, başka bir deyimle, katı/sıvı oranının azaltılması, ekstraksiyon verimini arttıracak ve çözünebilir bütün maddelerin çözültüye geçmesini sağlayacaktır. Bu ilk bakışta bir avantaj gibi gözükse de ekstraksiyon sonucunda elde edilen çok seyreltik çözültünün buharlaştırılarak konsantre edilmesi sırasında aşırı miktarda enerji gerekmektedir.

Çözücünün pH değeri, sürfaktan, tuz gibi özel katılar, bitkideki inert katı maddenin yüzeyinde, çözünen maddelerin adsorpsiyonu ve ekstraksiyon süresi endüstriyel bitkilerin ekstraksiyonunda göz önünde tutulması gereken diğer önemli parametrelerdir.

Bu bağlamda Goncharenko 1879 yılında valerian köklerinden izovalerik asitin ekstraksiyonunda sıcaklık, ekstraksiyon süresi ve parçacık büyüklüğünün ekstraksiyon sonuçlarını önemli derecede etkilediği halde katı/sıvı oranının ekstraksiyon süresini değiştirmediğini saptamıştır.

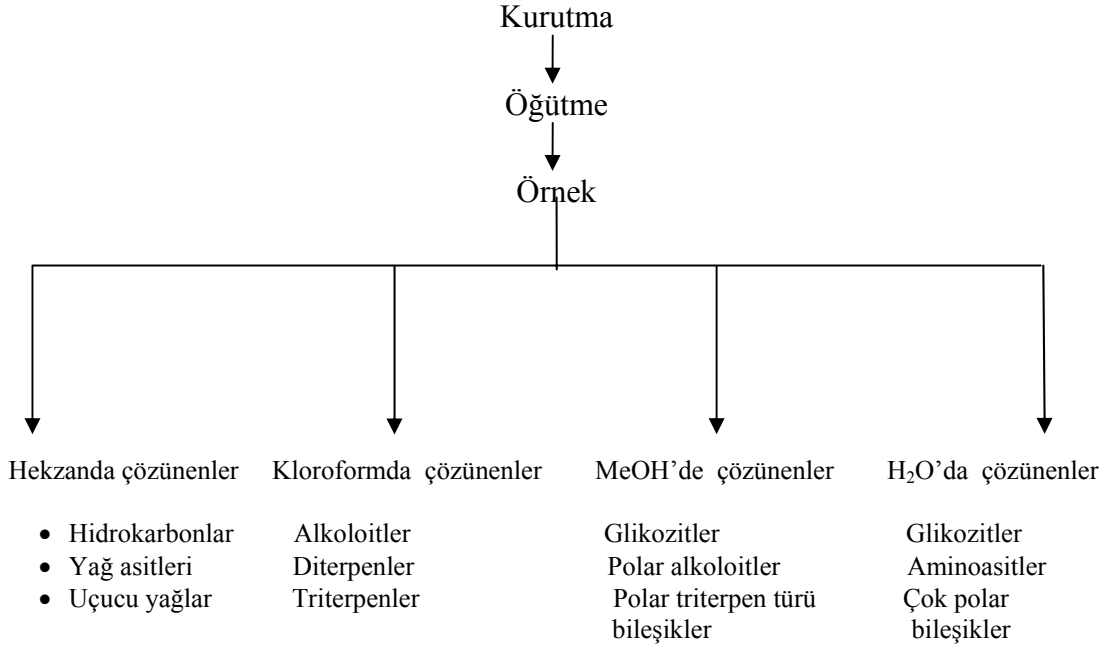
Katı – Sıvı Temas Yöntemleri

Endüstriyel bitki ekstraksiyonunda, bitkiye parçacık büyüklüğüne bağlı olarak genellikle iki katı-sıvı temas yöntemi uygulanabilir. Bunlardan biri bitkinin sabit bir katı yatak oluşturduğu, diğeri ise bitkinin çözücü içerisinde karıştırma ile dağıtıldığı yöntemlerdir. Sabit yatak sisteminde ya çözücü yatak üzerine püskürtülerek yatak boyunca akışı sağlanır ya da yatak çözücü ile tamamen kaplanır. Püskürtmeli sistemde çözücü ya da çözültü sürekli olarak bitkiden oluşan yatak üzerine püskürtülen yatağın altından da sürekli olarak çözültü uzaklaştırılır.

Karıştırmalı sistemlerde belirli kapasitedeki bir tankta bulunan çözücü ve bitki uygun tasarlanmış bir karıştırıcı tarafından karıştırıldığı gibi, tankın kendisi de içerisinde bulunanlarla birlikte bir eksen etrafında döndürülerek katı ve sıvının iyice karıştırılması sağlanabilir. Ekstraksiyon ve perkolasyon hızı hangi yöntemin kullanılması gerektiğini belirler. Kabaca öğütülmüş parçacıkların oluşturduğu sabit yataktan sıvı kolaylıkla akacağı için perkolasyon hızı yüksektir ve ekstraksiyon hızı da yeterli ise bu yöntem tercih edilebilir. Bazı bitkilerin etkin bir şekilde ekstraksiyonu için oldukça ince öğütülmesi gerekmektedir. İnce öğütülmüş bitkinin oluşturacağı sabit yatağın geçirgenliği hemen hemen hiç yoktur. Bu nedenle perkolasyonla ekstraksiyon mümkün olmadığı için karıştırmalı ekstraksiyon yöntemi uygulanmalı fakat ekstraksiyon sonrası çözeltiyi posadan ayırmadaki zorluklar da göz ardı edilmemelidir.

2.2. Ekstraksiyonla Ayrılan Madde Sınıfları

Çizelge 2. Ekstraksiyonla ayrılan madde sınıfları (Mutlu, 2002)



I. önce İTK ile çözgen sistemi bulunur.

Örneğin; kloroform;MeOH;H₂O

II. sonra kolon kromatografisi ve preparatif fonksiyonlandırmayla veya ikinci bir kolonla ve preparatifle temizleme yapılır (Mutlu, 2002).

- Daha sonra madde safsa spektroskopik analiz yapılır.
- Madde safsa türevlendirme ve spektroskopik analiz yapılır.
- Hedeflenen bileşik sınıfına göre belirleyici reaktifler seçilir ve hazırlanır.

2.3. Kromatografi

Kromatografi kelimesi, bir çok ayırma metodlarını ve tekniklerini ihtiva eder. Bundan dolayı kromatografinin iyi bir tarifini yapmak oldukça güçtür, ama kaba da olsa bir tarif yapılabilir. Kromatografi çeşitli maddelerin, hareketli bir faz yardımıyla, sabit bir faz üzerinde değişik hızlarla hareket etmeleri veya sürüklenmeleri esasına dayanır. Kromatografi yardımıyla başka metotlarla birbirinden ayrılmaları çok zor ve hatta imkansız olan maddeleri, saf olarak ayırmak mümkündür.

Kromatografi metotları cam veya metal borular içinde gerçekleştirilir. Cam veya metal borular, bu amaçla ince veya gözenekli bir katıyla iyice doldurulurlar. Böyle bir dolguya kolon denir. Sistem ya bu haliyle kullanılır veya bu katıya bir sıvı emdirilir ve bu sıvı faz gibi kullanılır. Bu gözenekli sabit fazın yerini, özel olarak yapılmış kalın süzgeç kağıtları veya cam levha üzerine tutturulmuş toz halinde maddelerden meydana gelmiş ince bir tabakada alabilir. Bu fazların içinden hareketli bir faz geçirilerek veya yürütülerek maddeler ayrılır. Bu kromatografi çeşitlerinden başlıcaları şunlardır:

- a) Adsorpsiyon (kolon)
- b) Dağılma
- c) Kağıt
- d) İnce tabaka
- e) İyon değiştirme
- f) Gaz

Çalışmamızda daha çok kolon kromatografisi kullanılacağından bura da bunun üzerinde biraz duracağız.

2.3.1. Kolon (Adsorpsiyon) Kromatografisi

Kolon kromatografisi ilk uygulanan kromatografik yöntemdir ve bu nedenle kromatografinin başlangıcını oluşturur. 1906 yılında botanikçi Tswett tarafından keşfedilmiştir. Tswett yeşil yaprakları kıyarak petrol eteriyle muamele etmiş elde ettiği renkli çözeltiyi (ekstraktı) toz halinde kalsiyum karbonatla doldurduğu bir

kolondan geçirerek yaprakta bulunan renkli maddelerin çeşitli yerlerinde bantlar halinde toplandığını ve karotenin de çözücüyle kolayca aşağıya geçtiğini görmüştür. Bitki yapısında bulunan renkli pigmentler kolon boyunca aşağı hareket ederken renkli bantlar oluşturmuş olduklarından buna kromatografi adı verilmiştir. Daha sonra birçok ayırma tekniğini bu kapsama dahil etmek amacıyla kromatografinin amacı ve tanımı genişletilmiştir. Fakat bu tekniklerin tamamında hareketli bir faz ile sabit faz arasında meydana gelen denge esastır. Ayrıştırmanın gerçekleşmesi için hareket zorunludur ve bu amaçla hem sıvılar hemde gazlar kullanılır. Sabit faz bir katıdır veya katıya tutturulmuş bir sıvıdır. Burada bizi ilgilendiren konu sabit fazın katı olduğu kromatografik tekniktir. Yani sıvı-katı adsorpsiyon kromatografisidir. Sıvı-katı adsorpsiyon kromatografisi deneysel olarak sıvı-sıvı ve iyon değiştirme tekniklerine benzer. Öyleki bu yöntemde kullanılan cihazların çoğu birbirlerinde kullanılabilir. Kromatografinin ilk uygulanan bu tekniği 1930'lu yıllardan sonra hızla gelişmiş ve çok sayıda maddenin ayrılmasında kullanılmıştır.

Zamanımızda bu metotla çalışmalarda sabit faz olarak ince ezilmiş kalsiyum karbonat, aliminyum oksit, talk, silikajel gibi maddeler, hareketli faz olarak da, su, alkol, aseton, kloroform, nitrobenzen, toluen, benzen gibi çözücüler kullanılmaktadır. Bu fazların seçimi oldukça ampriktir. Hangi hareketli fazda sabit fazın iyi sonuç verdiği ancak denenerek bulunur. Seçilen sabit faz, bir büretin alt kısmına pamuk veya cam pamuğu konduktan sonra sıkıca doldurulur. Ondan sonra kromatogramı yapılacak maddelerin çözüldüğü çözücüyle iyice ıslatılır ve bir kere daha sabit fazın iyice yerleşmesi sağlanır. Ondan sonra ayrılması istenen maddeleri ihtiva eden çözelti kolonun üstüne konur.

Çeşitli maddelerin adsorplayıcı veya sabit tabaka üzerinde adsorplanma dereceleri farklı olduğundan, kromatografi esnasında yukarıdan aşağıya farklı yerlerde toplanırlar. Maddeler farklı renklerdeyse yerleri kolayca tespit edilir. Renkli değillerse, kullanılan bir ayıraç vasıtasıyla renklendirilip veya ultraviyole ışınlarla tutulup yerleri tespit edilir. Ayrılmanın kesin olmadığı, yani maddelerin kolon üzerinde birbiri üzerinde veya birbirine çok yakın mesafelerde bulunduğu hallerde, tekrar çözelti konarak maddelerin yavaş yavaş aşağıya inmeleri beklenir. Yine de iyi

bir ayırma olmamışsa, daha polar bir çözücü kullanılır. Maddeler birbirinden iyice ayrıldıktan sonra, bunların kolon ve adsorplayıcıdan iyice ayrılması sağlanır.

Adsorpsiyon ve dağılma kromatografisi çok çeşitli sentetik ve biyokimyasal maddelerin ayrılmasında kullanılan yaygın bir yöntemdir. Bu iki teknik arasındaki fark, adsorpsiyon kromatografisi, bir örnekte bulunan maddelerle adsorban yani sabit faz arasındaki etkileşme esasına dayanır. Hareketli olan sıvı faz, sabit faza daha zayıf bağlanmış olan karışımdaki maddeleri rahat bir şekilde taşıyarak maddeleri ayırır. Sıvı-katı kromatografisi hareketli bir sıvı faz ve yüzey alanın geniş olması için çok ince hazırlanmış ve gözenekli bir yapıya sahip katı adsorbandan meydana gelir. Ayrılmayı yönlendiren denge, örnek moleküllerin sıvı faz ile katı fazın yüzeyindeki dağılımı adsorpsiyon esasını oluşturmaktadır.

Sıvı-katı kromatografisinin hızı ve kapasitesi gaz-sıvı kromatografisinden daha düşüktür. Fakat yüksek kaynama noktasına sahip ve termal olarak kararsız bileşiklerin ayrılmasını sağladığından avantajları da vardır. Sıvı-katı kromatografisi özellikle az polar, suda çözünmeyen hidrokarbonlar, lipidler ve steroidlerin ayrılmasında oldukça kullanışlıdır. Ayrıca polar bileşikler içinde yaygın olarak kullanılır. Fakat molekül ağırlığı 2000'in üzerinde olan bileşikler için sıvı-katı kromatografisinin kullanılması tartışılabilir. Gaz-sıvı kromatografisinde ayrılacak maddenin molekül ağırlığı önemli olduğu halde sıvı-katı kromatografisinde ayrılacak maddenin çeşitliliği de önemlidir. Bu yöntem homolog serilerin ayrılması için uygun bir yöntem değildir. Bu yöntemde ayrılmanın sağlanabilmesi için molekül yapılarında küçük farklılıkların olması gerekir. Bilinen bileşiklerin %85'i termal olarak kararsız olduğu için sıvı-katı kromatografisi yaklaşık olarak %85 oranında kullanılıyor demektir.

2.3.2. Adsorban ve Adsorbanın Rolü

Sıvı kromatografisinde en yaygın olarak kullanılan adsorban silikajeldir. Silikajel ile beraber polar olmayan hidrokarbonlardan, çok polar olan sulu sistemlere kadar bir çok sıvı, hareketli faz olarak kullanılmaktadır. Klasik adsorpsiyon sistemleri Synder

adlı bir araştırıcının çalışmaları ile belli bir düzene oturtulmuştur. Daha kompleks molekül yapısına sahip organik bileşiklerin adsorpsiyon özelliklerinin yorumlanmasında bazı güçlükler vardır. Çünkü ayırmada önemli olan etkiler adsorpsiyon, dağılma ve çözücü etkisi gibi faktörlerin toplamından oluşmaktadır. Adsorbanın ayırma işlemi üzerindeki özelliğini incelemek için Synder'in yaptđı çalışmaların ışığı altında daha kompleks sistemler incelenebilir. Adsorbanın ayırma işlemi üzerindeki özelliğini anlamak için adsorbanın üç temel özelliğini incelemek gerekir.

1. Adsorbanın kimyasal eşitliliği
2. Adsorbanın yüzey alanı
3. Adsorbanda bulunan su miktarı

Kromatografide en yaygın kullanılan adsorbanlar: silikajel ve alüminadır.

Kimyasal yapı farklılığından dolayı bu adsorbanların yüzeyinde bulunan fonksiyonel gruplarda farklıdır. Bu da adsorban ile adsorplanan madde arasındaki etkileşmenin çeşitliliği anlamına gelir.

Silikajelin birçok yönden avantajları vardır: İnerit olması, adsorpsiyon kapasitesinin yüksek olması, çeşitli gözenek büyüklüğüne sahip tiplerinin kolay hazırlanabilmesi, yüzeyinin gerektiğinde başka bir madde ile kaplanabilmesi. Kolonun hazırlanmasında kullanılacak olan silikajel saf olmalıdır. Gerektiğinde seyreltik NaOH, CHCl₃, MeOH ve destile su ile yıkanır ve kurutulur.

2.4. Bitki Steroitlerinin Ayırıştırılması İçin Kromotografik Yöntemler

Yapılan çalışmalarda brasinosteroid, büfadienodolit, kardenolit, kukurbitasin, esidisteroid, steroidal saponin, steroidal alkoloit, omurgalı tip steroidler ve vitanolit gibi bitki kaynaklarından yalıtılmış fitosteroidlerin farklı sınıflarının saflaştırılması için farklı prensipler uygulanmakta ve özel metotlar kullanılmaktadır.

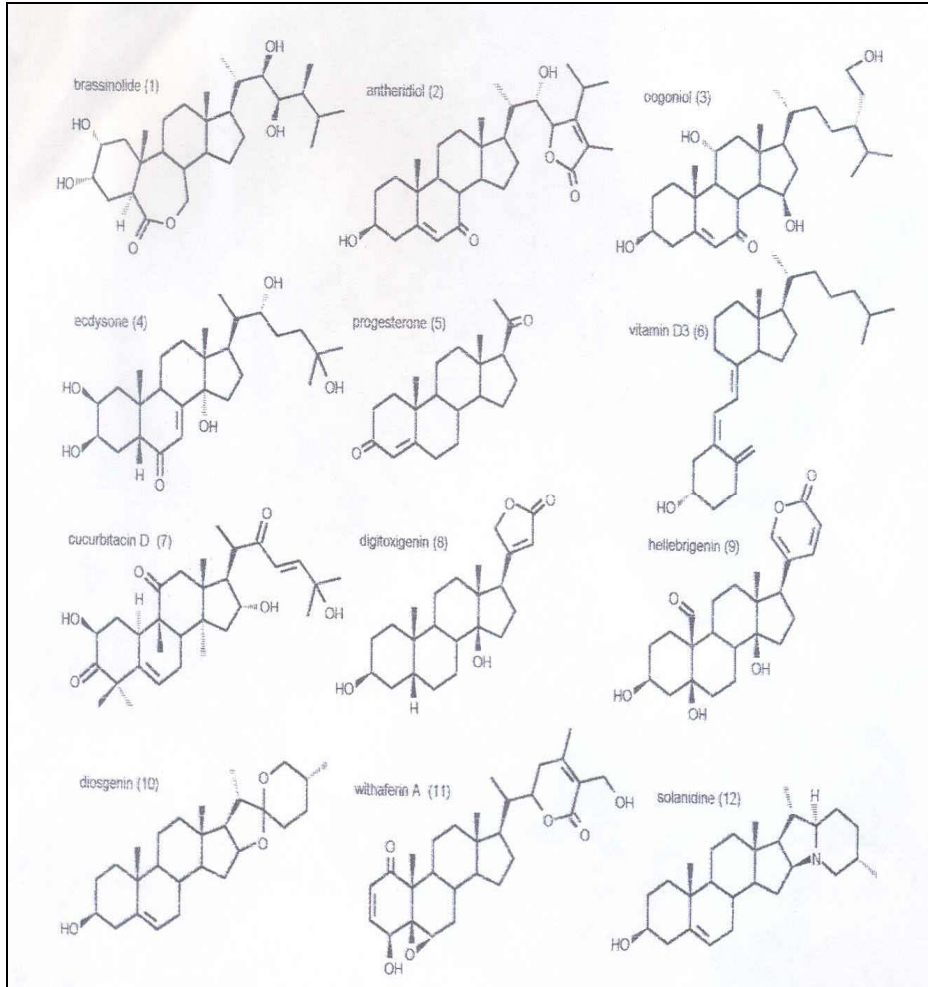
Her sınıf için; karakteristik yapı özellikleri tespit edilir, bitki dünyasındaki dağılımları ve onların biyolojik etki ve uygulamaları çıkarılır. Bir çok sınıf “solanaceae’lı vitanolit” gibi bir veya birkaç bitki ailesiyle bağlantılıdır. Bir bileşik sınıfının çok kapsamlı çalışıldığı yerde, bir grup türün çok sayıda benzeri (analogu) bulunur.

Bitki steroidlerinin ayırıştırılması için gerekli üstün metotlar, devamında kolon (sütun) kromatografisi ve ince tabaka kromatografisi/HPLC’nin olduğu çözücü ekstraksiyonu/partisyon’dur.

Bitkiler biyolojik durumlarına göre üç gruba ayrılabilen bir çok farklı steroid molekülleri üretirler (Şekil 3).

- 1) Bitkiler kendiliğinden fizyolojik rolleri olan hormon ve feromon gibi maddeler içerirler. Bu yüzden brassinosteroidler (1) büyüme düzenleyici fitohormonlardır. Oysa antheridiol (2) ve oogonioller (3) sulu lifli mantarlardaki feromondurlar.
- 2) Hayvansal hormonlarla ilgili olan allelokimyasallar: ecdysteroid böcek deri değiştirme hormonları ile benzerdir. Halbuki antrojen, östrojen, progesteron, kortikosteroid ve cholecalciferoller omurgalı hormonları ile bağlantılıdır.
- 3) Fitofagus hayvanlar veya parazitik mantarlara karşı sık sık koruyucu (uzaklaştırıcı, toksik, antifeedant) rol oynayan bitkiye özel allelokimyasal maddeler: bunlar örneğin, kardenolitler (8), büfadienolitler (9), saponinler(10), vitanolitler, (11) ve steroidal alkoloitler (12).

Dikkate alınacak ilk konu deneyin ölçeğidir: 1 mg veya birkaç mg’ in ayırıştırılması uygun metotlar gerektirir. Şu bilinmelidir ki spektroskopik metotların gelişmesi



Şekil 3. Bazı bitki steroidlerinin yapıları.

kütle spektrometre (MS) ve nükleer manyetik rezonans (NMR)) sayesinde, herhangi bir saf steroidin 1 mg'ı kendi yapısını kanıtlamak için genellikle yeterlidir, oysa sadece 10 yıl önce gerekli miktar en az bir veya 2 kat daha yüksek değerdı. Ulaşılması gereken saflık da önemlidir: bir maddeyi %90, %95 veya >%99 saflıkta elde etmek aynı iş değildir ve bunun kullanılan prosedürler için önemli sonuçları vardır.

Dikkate alınacak ikinci konu ise, bitki içindeki bileşiğın konsantrasyonudur. Hormonlar ve feromonlar sadece çok düşük konsantrasyonlarda bulunurken (pg/g-ng/g), allelokimyasal maddeler (ikincil metabolitler) çok daha yüksek konsantrasyonlara ulaşabilir. (örneğin $\mu\text{g/g}$ - mg/g) ve hatta bazen bitkinin kuru kütlelerinin %1-5 ine kadar ulaşabilir. Maddelerin az miktarlarda bulunması durumunda, büyük numuneler (örneğin kg, veya daha fazlası) işlenmelidir, halbuki büyük parçalar için birkaç gram yeterlidir. Sonuç olarak, kullanılacak ölçek ve prosedürlerin çeşitliliği bir çok durumda tamamen farklıdır.

Son olarak, dikkate alınacak üçüncü konu ilgili bileşiklerin polaritesi ile ilgilidir: bitki steroidlerinde apolar, polar, veya hatta çok polar (suda çözünebilir) moleküller bulabiliriz ve tabii ki saflaştırma metotları her bir spesifik durum için adapte edilmelidir (Çizelge 3).

2.4.1. Genel Saflaştırma Stratejisi

Saflaştırma stratejisi; bitki numunesinden saf bileşiklere kadar daima ekstraksiyon, ön saflaştırma ve daha sonra bir veya birkaç kromatografik basamağı kapsayan çok basamaklı prosedürler içerirler.

Böylece taze veya kuru numune;

- Organik çözücülerle (belki artan polarite aralığıyla), suyla, veya süper kritik CO₂ ile ekstraksiyondan,
- Az veya daha çok polar bileşikleri uzaklaştırma için çözücü partisyonlarından,

- İlk kromatografik basamaklardan [flaş kromatografisi, counter-current (karşı-akım) kromatografisi veya düşük basınçlı kolon kromatografisi] veya İlk kromatografik basamaklardan [flaş kromatografisi, counter-current (karşı-akım) kromatografisi veya düşük basınçlı kolon kromatografisi]
- TLC veya HLPC ile son saflaştırma'dan önce parçalanacak veya toz haline getirilecektir. Bu genel strateji bitki moleküllerinin diğer sınıfları için kullanılan ile benzerdir, örneğin polipeptitler gibi. Ekstraksiyon, (işlenmiş, kuru materyal'in) aralarında alkollerin daha yaygın olarak kullanıldığı çok çeşitli çözücülerin kullanımı ile yerine getirilir. Polar steroidleri (çizelge 3), ilk olarak polar olmayan bileşikler ayıracak olan apolar çözücülerle ve sonra daha polar olanlarla (alkol gibi) ekstrakte etmek mümkündür. Bu prosedürün, daha sonra tarif edilecek dağılma basamakları ile bazı bağlantıları vardır.

Konsantrasyondan sonra, ikinci bir basamak genellikle, karışmayan iki çözücü arasında bir partiyon gerektirir. Bu tür bir basamağın amacı numunenin boyutu ne olursa olsun kullanılabilmesidir ve eğer iki tamamlayıcı partiyon basamağı kullanılıyorsa hem daha çok hem daha az polar kirletenlerin uzaklaştırılmasında çok etkilidir (çizelge 4). Örneğin: İzobutil asetat-su (su fazında kalırlar), daha sonra n-bütanol-su (bütanol fazına geçerler) (2-4). Partiyon sisteminin seçimi ilgili bileşiklerin polaritesine bağlıdır. Bu durum ayrıca -OH gruplarının molekül üzerindeki pozisyonlarına dayanmasına rağmen, -OH gruplarının sayısından da kolayca tahmin edilebilir (çizelge 5). Çizelge 5'te üç dağılma sistemi için organik tabaka içinde ekstrakte edilmiş bileşiklerin (esidisteroitlere ilişkin) yaklaşık oranları gösterilmiştir.

Üçüncü basamakta, kromatografik prosedürler kullanılmaya başlanmıştır. Küçük ölçekli deneyler hazır İTK kullanabilirler, fakat büyük miktardaki numuneler genellikle alumina veya silika üzerinde düşük basınçlı kolon kromatografisi (CC) ile saflaştırılır. Alternatif olarak, bileşiklerin organik ve su fazları arasındaki dağılımına dayanarak birkaç karşı akım kromatografisi (CCC) teknikleri de kullanılabilir (çizelge 6). Örneğin: DCCC ve RLCC. Örneğin esidisteroitler ve

kardenolitler için örnekler bulunabilir Bu teknikler spesifik ekipmanların hazır bulunmasını gerektirir (Zhang, Stout ve Kubo, 1992).

Düşük basınçlı kolon kromatografisi genellikle normal faz sistemlerini kullanır. Alternatif olarak ters faz sistemleri bazen, polar olmayan sabit fazlar (C_{18} bağlı silika, sephadexs LH-20 veya Amberlite gibi bir reçine) ile kullanılır. Aslında normal faz sistemleri iyi performanslarından ziyade muhtemelen eskiden beri kullanıldıklarından dolayı, genelde daha çok kullanılır. Bunun gibi bir veya belki iki basamaktan sonra özellikle de uygun parçalardan kristalize edildilerse büyük bileşikler genellikle yeterince saf kabul edilebilirler. Bununla birlikte, yapısal olarak bağlantılı olan bileşiklerin kompleks karışımlarında, bu metotlar yeterince etkili değildirler ve daha fazla kromatografik basamaklara ihtiyaç duyulur.

İTK hem bileşiğin saflığını kontrol etmekte hem de bazen ek bir saflaştırma basamağı olarak da kullanılabilir. (çizelge 7); analitik deney sırasında bileşiklerin göçünü gözlemlemek için birkaç izleme prosedürü kullanılabilir (çizelge 8). 1-100 mg aralığındaki saf bileşiklerin geri dönüşümüne izin vermesi ve en güçlü tekniği sergilemesinden dolayı HPLC daha yaygın kullanılır. İlişkili bileşiklerin karışımları farklı seçicilik sistemlerini kullanan, birkaç HPLC basamağını muhtemelen isteyecektir.

Çizelge 3. Bitki steroit polaritelerinin farklı sınıfları

Özellikler	Örnekler
Polar olmayan	BS (yağ asiti esterleri), BU, CA (genins),VS
Kısmi polar	BS, CU, ES, SA, WI
Polar'dan çok polar'a	BS (glikozitler), CA (glikozitler), ES (glikozitler/sülfatlar),SS
<p>Çeşitli steroit sınıflarının kısaltmaları: BS: brasinosteroitler; BU: bufadienolitler; CA: kardenolitler; CU: kukurbitasinler; ES: esidisteroitler; SA: steroidal alkaloidler; SS: steroidal saponinler; VS: omurgalı tip steroitler; WI: vitanolitler</p>	

Çizelge 4. Bazı çözücü sistemlerinin dağılım oranları

Çözücü sistemi ^a	Organik faz	Su veya MeOH _(aq) fazı
n-Hexane-80% MeOH	Polar olmayan lipitler, steroller	BS, ES, WI
Dietil eter-MeOH _(aq)	WI	
Kloroform-su	BS, VS, CU, WI	ES
İzobutil asetat-su	VS	ES
Etil asetat-su	(ES), VS, CA	ES
Kloroform- MeOH-su	ES	
n-BuOH-su	ES, SS, SA	
<p>^aBu sistemler organik fazın artan polaritesine göre sıralandı. Kısaltmaların açıklımları çizelge 3' de dir.</p>		

Çizelge 5. Esidisteroitlerin üç farklı sistemde dağılıma oranları

-OH sayısı	CHCl ₃ - su (1:1)	EtOAc – su (1:1)	n-BuOH – su (1:1)
2	90	t.e.	t.e.
3	20	20	t.e.
4	2.9	4	t.e.
5	0.06	0.4	10
6	0.015	0.1	5.3
t.e.: tespit edilmedi			

Çizelge 6. Bazı karşı akım dağılım sistemleri

Örnek	Tip ^a	Bileşik
CHCl ₃ - MeOH - su (13:4:4)	D	ES
CHCl ₃ - MeOH - su (13:7:2)	A	SS
CHCl ₃ - MeOH - su (13:7:4)	A	ES
CHCl ₃ - MeOH - su (4:4:4)	D	BU
CHCl ₃ - MeOH - su (7:13:8)	D	SS
CHCl ₃ - MeOH - su (5:10:6)	A	BU
CHCl ₃ - MeOH - PrOH - su - NH ₄ OH (35:65:40:5:1)	A	SA
CHCl ₃ - C ₆ H ₆ - EtOAc - MeOH - su (45:2:3:60:40)	D	ES
C ₆ H ₆ - CHCl ₃ – MeOH – su (5:5:7:2)	D	ES
^a A: Artan; D: Azalan		

Çizelge 7. Bazı genel İTK çözücülerini

İTK tip	Çözücü Örnekleri	Bileşik ^a
Silikajel	Hekzan-Et ₂ O Toluen-EtOAc CHCl ₃ – MeOH CH ₂ Cl ₂ – MeOH (97:3) CHCl ₃ – MeOH-formamit(93:6:1) EtOAc-MeOH-su (81:11:8) EtOAc-MeOH (97:3) CHCl ₃ – MeOH-su (14:6:1)	VS CA, CU CA,WI,ES,SA,SS VS CA BU CA SS, SA
Polar olmayan C ₁₈ 'e bağlı silika	MeOH-su (7:3)	CU, ES, WI
^a Steroid sınıflarına ait kısaltmalar çizelge 3'de gösterilmiştir.		

Çizelge 8. Çeşitli metodlarla steroidlerin İTK'dan sonra görüntülenmesi

Metot	Uygulama modu	Bileşikler ^a
Floresans ışığı ile doyurma	ZnS içeren silika	ES,CA,WI, VS
Spesifik olmayan renk reaksiyonları	Anizaldehit H ₂ SO ₄ SbCl ₃	ES, SS ES, SA, SS BU, WI, SS, SA CA, ES, SS, VS
	Vanilya – %95 EtOH - H ₂ SO ₄ Kloramin T- H ₂ SO ₄ Karbazol-H ₂ SO ₄	SA, VS VS
Spesifik reaksiyonlar	3,5-Dinitrobenzoik asit alkolde CeSO ₄ (H ₂ SO ₄ 'de) 2,4,2',4'-Tetradinitrofenil (toluen'de) Çeşitli metodlar (NH ₄) ₂ CO ₃ (floresans İndüksiyon) Mavi (3-keton grubu için) 2,4-Dinitrofenildrazin → sarı(keton grubu için) Trifeniltetrazolyum klorit → kırmızı (keton grubu için) Dragendorff ayırıcı 4-(4-Nitrobenzil)-pridin	CA CA CA CU ES ES ES ES WI, SA WI

2.4.2. Brasinosteroidler

Kolza poleninden (4 mg dan 40 kg a kadar) brasonolit ayrıştırılmasından bu yana brasinosteroid ailesinden 40 farklı bileşik ayrıştırılmıştır. Bunların hepsi iki komşu diol, bir 6-keto veya bir 6-oksalakton grup halka B'de, pozisyon 24'teki çeşitli substituentli (yer değiştirme) (24S-metil, 24R-metil, 24-metilen..) 5 α - kolastonun'un (2 α ,3 α ve 22R,23R) türevleridir. Bunların meydana gelmeleri bitki aleminde genelde görülür. Bunlar spermafıtlardan başka, fiteridofit ve klorofıtlardan de ayrıştırılırlar. Brasinosteroidler steroid ailesinin içerisinde yegane bitki büyüme düzenleyici sınıfını temsil etmektedirler (Adam, Schmit, Schneider ve Moore, 1999).

Bunların biyosentetik yolları, uygun radyolabelli haberciler ve çeşitli Arabidopsis çüce mutantlarla yapılmış metabolik çalışmaların bir kombinasyonu tarafından tamamen aydınlatılmıştır. Brasinosteroidler, ecydsteroidlerle bazı kimyasal benzerlikleri paylaşmaktadırlar ve böcek ecydsteroid reseptörlerine bağlanabilirler. Orada zayıf sıkıntı verici veya düşman olarak davranırlar.

2.4.2.1. Brasinosteroidler için Ekstraksiyon

Kolza poleni hariç, brasinosteroid konsantrasyonları genellikle çok düşüktür. (ng'den μ g/kg- örneğin, Arabidopsis tohumlarında ki kastasteron, 360 ng/kg). Böylece saflaştırılmaları çok basamaklı bir prosedür gerektirir. Örnek olarak, bitki materyali, metanolle ekstraksiyondan önce, kurutulur ve öğütülür. Metanolik ekstrakt vakumla kurutulur ve kalıntı su ve kloroform arasında bölünür. Kloroform faz kurutulur kalıntı hekzan ve %80'lik sulu MeOH arasında bölünür. Sulu MeOH fazındaki kalıntı sırasıyla (1) silikajel kromatografisi (CHCl₃ den MeOH'a eğilimli), (2) LH-20 kromotografisi, (3) DEAE iyon-değişim kromatografisi ve (4) hazır HPLC'e tabi tutulur. Brasinosteroidler son olarak saflaştırmadan sonra gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ile analiz edilir. Bu prosedür esidisteroidler için kullanılan prosedürle bazı benzerlikleri paylaşır, halbuki ikincisi daha polardır ve kloroform-su kullanıldığında aynı fazda bölünmez. Bunların ayrıştırılması biyolojik kökenli

prosedürlere dayanır ve bunların bitki parçalarından olan analizinde başlıca GC-MS kullanır (Schmidt, Altman ve Adam, 1997).

2.4.2.2. Brasinosteroidler için HPLC

HPLC, explantlarla ve hücre suspansiyon kültürleri ile yapılan metabolik çalışmalarda kullanılmaktadır. Bu çalışmalar hem 6-oxo'nun 6 β -OH'a redüksiyonuna, hidroksilasyonuna (C-20,C-25 veya C-26 da), şekerler (C-2,C-3 ve C-25 de) veya yağ asitleri (C-3 de) ile birleşmesine hem de C-20 ve C-22 arasında ki yan-zincir ayrılmasını göstermektedir. Metabolitlerin bu geniş görünümü klasik ters faz (RP) HPLC prosedürleri tarafından çözülmüştür.

Brasinosteroidlerin kromofor ve florofor eksikliği, onların HPLC analizinde ortaya çıkarılmalarında kaygı verici bir problemdir. Bu gibi durumlarda, ortaya çıkarılabilir türevler üretmek için kolon öncesi saflaştırma kullanılabilir. Kullanılan reaksiyonlar 2 α ,3 α ve 22R,23R pozisyonlarında ki 2 komşu cis-diol'un varlığından avantaj kazanmaktadır. Bu pozisyonlar, boronik asit türevleri (bisnaftalinboronatlar, bisfenantrenboronatlar veya bisferrosenboronatlar) ile kolayca reaksiyona girebilirler. Bu türevler UV, floresan veya elektrokimyasal dedektörler ile ortaya çıkarılabilir ve asetonitril-su karışimli RP-HPLC ile etkili bir şekilde ayrılabilirler.

2.4.2.3 Brasinosteroidler için GC-MC

Küçük biyolojik numunelerin analitik çalışmaları çok hassas teknikler gerektirir ve bu anlamda GC-MS seçilmiş iyon görüntüleme (Selected Ion Monitoring) modunda özellikle çok etki sağlamaktadır. Tekli hidroksil grubu olan uçucu türevler, moleküllerin 2 cis-diol'e sahip olduğu bismetanboronatlarıdır. Bu trimetilsilil etere dönüştürülmelidir. Sonraki analiz spesifik fragmanların kütle spektrometresi ile birleştirilmiş GC kullanır. Bu teknik brasinosteroidlerin bitki alemindeki dağılım çalışmaları için çok değerli olduğunu ispatlamıştır.

2.4.3. Bufadienolitler

Bufadienolitler tipik polihidroksi C₂₄ steroidleri ve onların glikozitleridir. Bunlar C-17 β halkasına yerleşmiş 6-üyelik laktonun (α -piron) varlığına göre karakterize olurlar. Bu kromoforik halkadan dolayı, karakteristik bir UV absorpsiyonuna sahiptirler. Bir çoğu 5 β -hidroksi (A/B- cis halka birleşmesi), bir trans-B/C halka birleşmesi, 14 β -hidroksi (C/D- cis halka birleşmesi) ve C-19 da bir aldehidik gruba sahiptirler. (Örneğin, hellebrijenin, 9 şekil,3). Bufadienolitler hem hayvansal hemde bitkisel kaynaklardan ayrıştırılabilir. 250 Bufadienolitten fazlası tanımlanmıştır. Bunların 160 tanesi bitkilerden ayrıştırılmıştır. Bunlar 6 bitki ailesinin örneklerinden keşfedilmiştir. Toplam Bufadienolidelerin konsantrasyonları kuru kütlenin %1 inden fazla olabilir Ayrıca şeker ve glikozit zincirlerinin 5 β -OH'ye bağlı bulunmalarına rağmen, bitki kaynaklı birçok bufadienolit jenin'in 3-hidroksil zincirine bağlı bir ile üç şekerli glikozittir (Krenn ve Kopp, 1998).

Son olarak 19-nor bufadienolitler helleborus torquatosdan ayrıştırılmıştır. Bunlar kardiyak glikozitleri olarak hareketlerinde önemlidir. Orada kalbin kontraktil gücünü Na⁺ /K⁺ -ATPazı inhibe ederek artırırlar. Helleberin, helleborus spp. den ayrıştırılmıştır, daha önceleri kalp ritmi düzensizliklerinin tedavisinde tıbben kullanılmaktaydı. Endojen kardiyotonik steroidlerin memelilerde adrenal korteks tarafından üretildiği ve bunların hipertansiyonun düzenlemesini içerecek yeni bir steroid hormon sınıfı olabileceği bile öne sürülmektedir. Bazı bufadienolitler antitümör etkisine sahiptirler. Bunlar ayrıca bitki öldürücü etkilere ve kuvvetli böcek öldürücü özelliklere sahiptirler. Ayrıca antimikrobik etkilere de sahiptirler.

2.4.3.1. Bufadienolitler için Ekstraksiyon ve Ön Saflaştırma

Genellikle bufadienolitler (serbest ve glikozit) metanolla bitki kaynaklarından ekstrakte edilirler (Kissmer ve Wichtl, 1999). Saflaştırma CHCl₃-MeOH karışımı (aglikon için) veya EtOAc-MeOH karışımı (glikozit için) ile elue edilmiş silikajel kromatografisi ile başarılabılır. DCCC (CHCl₃-MeOH-su, 4:4:4: azalan oran ile) de ayrıca helleborus bufadienolitlerin saflaştırılması için kullanılabilir. CHCl₃-

MeOH-su ile DCCC ise (5:10:6 yükselen oranla) *Urginea*'dan bufadienolid glikozidlerin saflaştırılması için kullanılabilir. Son saflaştırma İTK veya HPLC yoluyla yapılabilir.

2.4.3.2. Bufadienolitler için İTK

İTK (TLC) bufadienolitlerin kaliteli analizleri için kullanılmaktadır. Bu yaklaşım bufadienolitlerin bitkilerdeki kemotaksonomik (kimyasal sınıflandırma) öneminde uygulama bulmuştur ve bu silikajel, EtOAc-MeOH-su ile geliştirilmiş (81:11:8) ve $SbCl_3$ ayırıcı ile püskürtme ve ısıtma yoluyla keşfedilmiştir. Karakurbağası bufadienolitlerinin ayrılması için RP-yüksek performans (HP)-TLC uygulanmaktadır (Dias, Graca ve Goncalves, 2000).

2.4.3.3. Bufadienolitler için HPLC

Silika sütunlar üzerinde piklerin gözlenmesi nedeniyle, RP-HPLC bufadienolitlerin ayrılması için daha uygun görünmektedir. Araştırmacılar *urginea marittimadan* alınan kompleks bufadienolit karışımının analizi için birkaç RP (C_{18}) sistemi araştırmışlardır. Tittel ve Wagner *scilla spp.*'nin farmasotik preparasyonlarından alınmış bufadienolitlerin ayrılması için uygun ters-faz metotlar geliştirmişlerdir. %10- dan %60'a MeOH ve su ile elue ederek C_{18} sütun kullanmışlar ve ayrılmaları 280 veya 300 nm'de görüntülemişlerdir. Çeşitli bufadienolitlerin elüsyon sırası, bulunan şeker birimlerinin sayısından daha çok aglikon üzerindeki fonksiyonel grupların sayısına ve tipine göre belirlenmiştir. Nicel analizler için, suda %25'lik asetonitril'li (ACN) izokratik elüsyon en uygulanabilir bulunmuştur. Tittel sofistik kardiyak glikozit (bufadienolit ve kardenolit) analizleri için bitki materyallerine dayanan iki farmasotik preparasyonda bir metot geliştirmiştir. C_{18} kolonu elüe etmek için suda %10 dan %50 ACN'ye doğrusal eğilim kullanıldı ve dışarı akan sıralı fotodiyot detektörde görüntülendi. 220 nm'de emilim kardenolit varlığını ortaya çıkarmak için kullanıldı. 300 nm'de emilim bufadienolit varlığını ortaya çıkarmak için kullanıldı ve bufadienolitlerin keşfini ve nitelendirilmesini engelleyen flavonoidler varsa diye 340 nm'de emilim gösterildi. C_{18} kolonu üzerinde ACN-su

ile elüe edilmiş geniş sayıda bitki bufadienolitlerinin muhafaza süreleri tespit edilmiştir (Kopp, Krenn ve Jurenitsch, 1990).

2.4.4. Kardenolitler

Kardenolitler, yapısal olarak bufadienolitlere yakından bağlıdırlar fakat C-17B'de yerleşik beş üyeli bir lakton (butenolit) halkasına sahiptirler. Bu, metanolde 220 nm'de karakteristik bir UV (ültraviyole) absorpsiyonu verir. A/B ve C/D halka birleşimleri, bir 14 β -hidroksil ve bir 5 β -H ile, cis-birleşimlidir (örneğin dijitoksijenin, 8: Şekil 3). Kardenolitler, bitki dünyasında oldukça yaygın olarak dağılmışlardır. Bitkilerde, kardenolit 3-O-glikozitler baskın olurlar fakat 2,3-çift-bağlı glikozitler de oluşurlar ve 3-O-sülfat esterler, yakın zamanda tanımlandılar. En önemli uygulama, kalp kasılmalarını düzene sokmak için Na⁺ /K⁺ -ATPaz'ın inhibitörleri (engelleycileri) olarak türevleri (asetil ve metildijoksin) ve dijoksinin iyileştirici kullanımınıdır. Tıbbi önemi nedeniyle, bu bileşikler, doğal ve sentetik kardenolit benzerleri kullanarak aktivite çalışmaları-kapsamlı yapı ve eylem şeklinin nitelendirilmesi ile araştırma dikkatinin önemli bir kısmını aldılar. Kardenolitler, ayrıca Afrika'daki, Güney Amerika'daki ve Güney doğu Asya'daki yerliler tarafından ok/küçük ok uçlarına uygulanan zehirlerdeki başlıca aktif karışım maddeleridirler. En iyi bilinen kardenolit, ouabaindir ve bufadienolit kısmında ki bölümde yukarıda söz edildiği gibi, kalp glikozitleri gibi endojen (gelişen) hormonlar ouabain gibi bir bileşiği içine alarak, insan plazmasından tespit edildiler. Kardenolitler, anti bakteriyel aktiviteye de sahip olurlar ve böcek uzaklaştırıcı olarak işlevde bulunabilirler (Hug, Jabbar, Rashid ve Hasan, 1998).

2.4.4.1. Kardenolitler için Ekstraksiyon

Genel olarak, kardenolitler EtOH, MeOH ya da %70 sulu MeOH ile bitkilerden ekstrakte edilirler. Bu, çoğunlukla EtOAc fazına ayrılan kardenolitlerle, EtOAc ve su arasında bölünme ile takip edilir.

2.4.4.2. Kardenolitler için İTK

Hem silikajel (CHCl_3 -MeOH, 19:1 yada toluen-EtOAc ile, 1:1, hem de RP-8 tabakaları üzerindeki İTK, kardenolitlere uygulandı. Keşif metotları çizelge 6'da gösterilmiştir. İTK, *Asclepias*'ın { (1) CHCl_3 -MeOH-formamit (93:6:1) yada (2) EtOAc-MeOH (97:3) ile çoklu gelişimli silikajel G, morfolojik olarak benzer iki türünün kardenolit içeriğini karşılaştırmak için kullanıldı, %50 MeOH'deki %10'luk KOH ve toluendeki %0,4 2,4,2',4'-tetradinitrodifenil ile püskürterek takip edildi .

2.4.4.3. Kardenolitler için HPLC

HPLC metotları, 220 nm'de keşif ve ACN-su elüsyonu ile bir C_{18} kolonu kullanarak *Convallaria majalis*'te mevcut kardenolitlerin analizi için geliştirildiler. *Digitalis obscura*'daki kardenolitlerin analizi için, 230 nm'de belirleme ile su içinde 30'dan %60 ACN'ye doğrusal olmayan bir eğilimli bir C_{18} kolonu uygulanması için bulundu. *Asclepias fruticosa*'da mevcut kardenolitlerin karışık karışımı, sabitlenen dalga uzunluğu (220 nm) ve fotodiyot düzen monitörle izlemeli bir C_{18} kolonu üzerinde bir ACN-su eğimi ile ayrıldı. Katı faz ekstraksiyonu (SPE), *Digitalis lanata*'dan HPLC'den önce kardenolitler için bir ön saflaştırma basamağı olarak kullanıldı.

2.4.5. Kukurbitasinler

Kukurbitasinler, bir 19(10 \rightarrow 9 β)-abeo-10 α -lanost-5en iskeleti (ve C-4'te jem-dimetil grubu ve ileri metiller C-9'da ve C-14'te içine alarak) son derece oksijenlenmiş C_{30} triterpenoitlerin bir grubudur. Tüm kukurbitasin cinsler, bir 5(6)-çift bağa da sahip olurlar (örneğin, kukurbitasin D, 7: şekil 3). Tam olarak, steroidal değildirler. Çünkü bir metil grubu, C-10'dan ziyade C-9'da yerleşiktir. Kukurbitasinler, kukurbitasaye'deki türlerle en yaygın şekilde ilişkisi olanlardır fakat *Begoniasaye*'nin, *Krusiferaye*'nin, *Datiskasaye*'nin, *Desfontainasaye*'nin, *Elaeokarpesaye*'nin, *Polemonisaye*'nin, *Primulasaye*'nin, *Rosaye*'nin, *Rubiasaye*'nin, *Skrofulariasaye*'nin ve *Sterkuliasaye*'nin üyelerinde de bulundular. Kukurbitasinlerin

arasındaki yapısal farklılık, önceden gözden geçirildi. Yaklaşık olarak 50 tane benzeş tespit edildi fakat B ve D kukurbitasinler, doğada en yaygın şekilde bulunurlar. Büyüyen bitkilerde kukurbitasinler, genellikle glikozitler gibi mevcuttur (sıklıkla 2 β -O-glikozitleri) fakat eğer bitkide coşma eylemi mevcutsa, bunlar, sık sık genini vermek için ekstraksiyon üzerinde hidroliz edilirler. Serbest kukurbitasinler, tohumların içinde doğal olarak oluşurlar. Kukurbitasinler, bir çok tıbbi ve tedavi edici ve iyileştirici etkilere sahiptirler. Tatları aşırı derecede acıdır ve bugün hala bu amaç için kullanılan *Momordica* spp. İçeren- kukurbitasin ve pürгатif (müshil) özellikleri için yüzyıllardır kullanıldılar. Kukurbitasinler, güçlü sitotoksik aktiviteye ve antitümör özelliğine sahiptirler. Kukurbitasinler, antimikrobik, antihepatoksik, antiyanıcı, antigiberellin (bir çeşit bitki hormonu) ve antihelmintik aktivitelere de sahiptirler. Bazı kanatlı böcekler (kukurbitasinler üzerinde uzmanlaşanlar), düşükten orta konsantrasyona doğru cezbedilmelerine rağmen, bir çok böcek türü de, beslenmede kukurbitasinlerin varlığı ile öldürülürler yada vazgeçirilirler. Yakın zamanda, kukurbitasinler, deri değiştirme steroid reseptör muhalifler olarak hareket etmek için gösterildiler. Kukurbitasinler, (birkaç türden meydana gelen) cinsleri içeren kukurbitasin deki bitki türleri arasında farklılaşmadaki kemo tasnifli değere de sahiptirler (Dinan, Whiting, Lafont ve Mugat, 1997).

2.4.5.1. Kukurbitasinler için Ekstraksiyon

Kukurbitasinler, genel olarak metanol veya etanolla bitki maddesinden ekstrakte edilirler. Cinsler, suda düşük bir çözünürlüğe sahiptirler fakat bu iki çözücü arasındaki bölünme, CHCl₃'teki kayda değer çözünürlük, sık sık, alkollü bitki özlerinden kukurbitasinleri kısmen arındırmak için kullanılır. Sonradan, kukurbitasinler, genellikle silikajel, alüminyum oksit yada florisil üzerinde açık kolon kromatografisi ile yada aynı yolla İTK ile arındırıldılar.

2.4.5.2. Kukurbitasinler için İTK

A halkasındaki ve/veya kenar zincirindeki alfa, beta doymamış ketonların sık sık tekrarlanan oluşumu, yaklaşık 230 nm'de bir λ_{max} ile önemli UV absorbanı verir

fakat bir çok kukurbitasin benzeri, bundan farklı olanları mevcuttur yada 210 nm üzerinde bir maksimuma sahip olmazlar. Çeşitli solvent sistemlerindeki sık sık rastlanan kukurbitasinlerin (B, D, E, I, J, K, L ve tetrahidro-I) birkaçının nispi değişkenlikleri karşılaştırıldı. Bu, TLC tabakaları üzerindeki kukurbitasinler için uygun çeşitli keşif metotlarını da özetler. Tersine çevrilmiş faz (C₁₈ F₂₅₄) HPTLC MeOH-su ile geliştirilen, 7:3) ve normal faz (silika F₂₅₄) HPTLC (toluen-EtOAc ile geliştirilen, 25:75) sistemleri, sıklıkla rastlanan kukurbitasinlerin birkaçının analizine uygulanmışlardır.

2.4.5.3. Kukurbitasinler için HPLC

Kukurbitasinler, kutuptan orta kutuba bileşenlerdirler. Bu nedenle, ters faz sistemleri, en uygundur. Kukurbitasinler arasındaki UV spektrumlarındaki önemli değişiklikler yüzünden, absorpsiyon maksimumları oldukça değişirler fakat neredeyse tüm kukurbitasinler bu dalga uzunluğunda biraz absorpsiyona sahip olduklarından itibaren, 230 nm'deki monitörle izleme ayrılıkları iyi bir uzlaşma olması için görünür. Kukurbitasinler için HPLC metotları tarif edildiler. Bunlar az sıklıkla rastlanan kukurbitasinlerin (serbest ve glikozitler) analizi için yararlı olan, suda 20'den %50'ye yada %20'den %45 ACN'ye doğrusal bir eğim ile kullanılan C₁₈ kolonudur. Bununla birlikte, bitki özlerinin önceki örnek arındırmadan (çözücü bölünmeleri yada SPE), karışan maddeleri çıkarması istenir. Yakın zamanda, %0.01 trifloroasetik asit (TFA) içindeki ACN'nin bir eğimi ile bir C₁₈ kolonunu kullanarak, HPLC-MS ile kukurbitasinlerin analizi için bir metot geliştirildi. Bu metodun daha büyük seçiciliği, karışan maddelerden doğan karmaşıklıkları azaltacaktır.

2.4.5.4. Kukurbitasinler için Biyo Tahliller

Kukurbitasinlerin anti giberellin aktivitesi, pirinç fideleri yada salatalık kotillerinin ekstraksiyonu ile giberellinin ortak uygulaması için bir biyo tahlilin temeli olarak kullanılmıştır. *Drosophila melanogaster*'in bir deri değiştirme steroidi duyarlı sürekli hücre çizgisine dayanan B₁₁ biyo tahlili, anti deri değiştirme steroid aktivite yolu

ile kukurbitasinlerin nitel ve nicel değerlendirmesi için kullanılabilir. Biyo tahlil tabanlı bu mikro tabaka, kromatografik parçaları monitörle izlemek için elverişlidir.

2.4.6. Deri Değiştirme Steroitleri (Esidisteroitler)

Esidisteroitler, hem hayvanlarda (başlıca Artropotlarda), hem de bitkilerde bulunur ve bu aile, ekdizon ile ilgili 300 farklı molekülden fazlasını kapsar (4, şekil 3) Yaygın özellikleri: (1) bir 7-en-6 bir tane kromofor (MeOH'de 242-243 nm'de maksimum bir absorbans ile), (2) 5 β -hidrojen (cis A/B-halka birleşimi), (3) sık sık fakat her zaman değil, kolesterolün yada C-24'teki homolog durum metil (yada etil) bir grubun tam iskeletinin tutulması (C₂₇ esidisteroitler) ve (4) onları su çözünlüğünden ziyade saflaştırıcı birkaç hidroksil grubunun varlığı bu yaygın özelliklerdendir. Şimdiye kadar incelenen bitki türlerinin %5-6'sında göze çarpan miktarlarda mevcuttur, 50 ng/g'den 30mg/g kuru kütleyle kadar çok (örneğin %3) dağılan konsantrasyonları vardır (Lafont ve Wilson, 1996).

Bitkiler, genellikle daha düşük miktarlarda bulunan yakından ilişkili moleküllerin geniş bir tahlili ile beraber tek bir yada birkaç büyük esidisteroitler içerirler ve bu moleküller, bitkilere adapte olmamış böceklerle beslenmeye karşı bitkileri korumak için düşünülürler.

Fotoesiditeroitlerin izolasyonu, yukarıda tarif edilen genel stratejiye göre uygulanır. Esidisteroitler izolasyonu ve analizi için metotlar, iyi araştırılmıştır ve araştırmacılar bu alandaki çalışmalarını rahatlıkla bulabilirler.

2.4.6.1. Deri Değiştirme Steroitleri için Ekstraksiyon

Kurutulmuş ve öğütölmüş numuneler, çoğunlukla MeOH ve EtOH ile ekstrakte edilirler. Ham özler, hekzan (yada hafif petrol) ve %80 sulu MeOH arasında bir bölünme ile azaltılırlar. Sonra özler, 1-BuOH evresine esidisteroit (ES) bölünme ve 1-BuOH ve su arasında bölünürler. İleriki saflaştırma, kolon kromatografisi (silis yada alüminyum oksit) ile kazanılır, MeOH'taki suyun eğimi ile ters çevrilmiş faz flaş

kromatografisi yada kloroformdaki [MeOH'nin (yada %96 EtOH) ile saflaştırılır fakat çeşitli karşı akım dağılım prosedürleri yada sephadex LH-20 üzerindeki kromatografisi kullanıldı. Tespit edilen fenilborik asit üzerindeki benzer kromatografi, ES durumlu bir 20,22-diolü seçerek tutmak için bir araç sağlayabilir (Murphy, Morgan ve Wilson, 1990).

2.4.6.2. Deri Değişirme Steroitleri için İTK

Silika tabakaları üzerindeki İTK, ES'leri ayırmak için etkili bir yoldur. Bir çok farklı çözücü sistemi tarif edildi. En alışılmış olanları, CHCl_3 -MeOH yada CHCl_3 -%96 EtOH karışımlarıdır. Çeşitli MeOH su karışımı geliştirilmiş ODS bağlı yada parafin kaplı, birkaç randımanlı RP-TLC sistemi de uygundur. En olağan keşif prosedürleri, floresan su verme (söndürme) ve vanilin sülfürik asit sprey ayracıdır (Çizelge 8). Aşırı basınç ince tabaka kromatografisi (OPTLC) de kullanılmıştır. Bu metot, İTK gelişimi için zamanı kısaltır. HPTLC, analitik amaçlar için de ilginç bir tekniktir (Read, Wilson ve Lafont, 1990).

2.4.6.3. Deri Değişirme Steroitleri için HPLC

Güçlü şekilde UV absorpsiyon kromoforu (λ_{mak} . Yaklaşık 242 nm. $E = I \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), ES'lerin hassas keşfine izin verir. Silika kolonları üzerindeki normal faz HPLC'si, CH_2Cl_2 -2-PrOH-su (125:25:2 yada 125:40:3) yada sikloheksan-2-PrOH su (örneğin, 100:40:3) karışımları gibi değişken fazlar kullanarak, çok randımanlı bölünmeler sağlar. 2-PrOH- su bölünmesini yükseltmek yada bir trimetilsilil (TMS) bağlı silika kullanmak, polar ES'lerin uygun bir analizine izin verir.

RP-HPLC, geniş olarak kullanılır ve bunun için bir çok farklı çözücü sistemi tarif edilmiştir. En yaygın olanları, MeOH-su karışımlarıdır (izokratik yada eğilimli şekli) fakat MeOH, farklı seçicilikleri gösteren 2-PrOH yada MeCN ile yeniden yerleştirilebilir ve bazı belirgin seperasyonların (ayırımların) yapılmasına izin verir.

Diğer ayırma metotları, örneğin süper kritik sıvı kromatografisi (SFC) ve kapiler boru (kılcal damar) alanı elektroforezi (CZE), sadece analitik bir derece üzerinde çalışan çok randımanlı ve hızlı bölünme metotlarıdır ve bu nedenle burada tartışılmaya gerek görülmemiştir.

2.4.7. Steroit Saponinler

Steroid saponinler, tipik olarak tayin edilen atomlar ve belirgin iskelet özellikleri ile bir steroid aglikona bağlı bir tane yada daha fazla oligosakaritten oluşan glikoziterdir. Şeker zinciri, çoğunlukla C-3'e bağlıdır ve baskın olarak 2-5 doğrusal yada bölümlü monosakarit birimler içerir. Saponinlerin klasik tanımı, yüzey aktif maddeleri yada deterjan özelliklerine dayanır. Sulu çözeltilerindeki durağan köpük şeklini alır. Bu meydana gelir çünkü hem suda hem de yağda çözünür küçük moleküler parçaları içine alırlar.

Bitki ailesinde ki saponinlerin oluşumu ve dağılımı, hem nitel, hem de nicel anlamda, aşırı derecede sıktır ve yüksektir. 90'nın üzerinde bitki ailesinin saponin içerdiği bilinir ve hala bulunan bir çok yeni oluşum vardır. Saponin içeriği, bir çok faktöre dayanır, örneğin, nem ya da bitkinin coğrafi yeri. Önemli değişim (başlıca nicel), organlarda gözlemlenebilir; yüksek içerikler en çok üreme organlarında (çiçekler, tohumlar) yada yanal köklerde (kök saçları) bitki sap ve gövdelerinde orta seviyelerde ve yapraklarda ve köklerdeki düşük seviyelerde yada çiçek soğanlarında bulunurlar. Steroidal saponinler, doğada, daha sık triterpenoit tipi olarak çok yaygın şekilde dağılırlar. Steroit saponinlerin ana kaynakları, başlıca cinsler alliyum, liliyum, asparagus, liliyum, agave, yukka ve diaskorea türleridir (Hostetmann ve Marston, 1995).

Steroid saponinler, iki ana gruba bölünebilirler. En geniş grup, genel olarak pozisyon C-3'te bulunan bir şeker zincirli spirostan tipin aglikanlarını içeren, spirostanol glikozitlerdir (örneğin, diosgenin, 10:Şekil,3). Spirostanoller için, spiroketal düzenlemenin C-22'de bağlı olduğu tipiktir. Spirostanollerin yapısal değişimleri, esasen R yada S biçimindeki metil gruplu pozisyon C-25'te ve bir 5 α -H yada 5 β -H

biçimli (sırasıyla, A/B trans yada cis halka şekli) B halka C-5 pozisyonunda stereo kimyaya dayanır. Pozisyon 5(6) yada 25(27)'deki bir çift bağın varlığı, en çok 1,2,3,5,6, 11, 12 ve 15'te (ve tekrar alfa- yada Beta- biçiminde), neredeyse herhangi bir durumdaki birden dört taneye kadar hidroksilin varlığı ile arttırılabilen değişkenliği yükseltir. 45 üzerinde spirostanol tip aglikonu, yapısal olarak tespit edilmiştir ve oksidize edilen şekilleri (çoğunlukla 26'da karbonil şekli alan bir lakton ya da 6 ve 12 pozisyonlarındaki karboniller) dikkate alırken de, bu sonra tipler toplam 100 üzerinde olabilirler. Yapısal tiplerin sayısı, pozisyon C-3'te hidroksile bağlı değişken şeker zincirleri ile bile daha fazla yükselebilir.

İkinci tipik grup, iskelet gibi spirostanolün aglikonları fakat açık bir kenar zinciri ile (C-22 asetalden 22-26-diolun hidrolizi ile şekil değiştiren halka F) furostanol glikozitleri içerir. Daha az furostanol aglikon yapısal şekilleri spirostanollerden tespit edildiler fakat şeker zincirleri sadece pozisyon C-3'e değil, sık sık C-26'ya da bağlı olabildiğinden, saponinler daha fazla glikozit çeker. Furostanoller, spirostanellere enzim hidrolizleri esnasında değiştirilebilirler ve kesin şartlar altında da, spirostanoller, furostanollere asit hidrolizi ile değiştirilebilirler. Dahası, pozisyon C-22'deki eterleme de oluşabilir (örneğin, metanol özleri esnasında metil eterlerin oluşması) yada pozisyon C-6'daki hidroksilin kurutulması, 6(7)-en türevler oluşturabilir. Bu tür yan reaksiyonlar, saponin analizi yada ayrılması için metotları seçmede, dikkate alınmak zorunda olan şeyleri oluşturabilir.

Steroid saponinlerin olağan dışı ve küçük bir grubu, hem C-3, hem de C-26 hidroksillerine bağlı şeker zincirli ve ayrılan altı üyeli hemiasetal halka F'li ve açık halka E'li osladin ve polipodosaponin tipleridir. Bu saponinler, polipodiyum vulgare (tatlı zambak) ve p.glycyrrhiza'nın (meyankökü dişisi) çok tatlı tadından sorumludurlar (Nishizawa, Yamada ve Yamasaki, 1996).

Saponinler, sık sık, geleneksel yada modern tıpta, insan ve hayvan beslenmesinde yada örneğin yiyecekteki, eczacılıktaki, kozmetiklerdeki bitkisel ilaçlar yada diğer ticari olarak önemli preparatlar (hazır ilaç) ve ürünler olarak kullanılan bitkilerde

oluşurlar. Böyle amaçlar için, genel yada özel olarak değiştirilen bölünme işlemleri kullanan geniş bir derecede üretilebilirler (örneğin, kolesterol ile çözülür karışımlarda oluşan su). Biyolojik ve eczacılık aktivitelerinin geniş bir çeşitliliğini araştırmak için bitki-böcek etkileşimindeki kemo ekolojik aktiviteler yada diğer anti mikrobik, molluskoit, anti verimlilik aktiviteler, sık sık birkaç tane özel olarak adapte edilmiş analitik ve seperasyon (ayırma) işlemini gerektirir (Lacaille, Oleszek ve Marston, 2000).

2.4.7.1. Steroit Saponinler için Ekstraksiyon ve Ayırma

Steroid saponinler, çoğunlukla su-metanol ile kuru ya da taze bitki maddesinden ekstrakte edilirler. Metanolün büyük bir bölümünü buharlaştırdıktan sonra, su fazı, etil asetata karşı (polar olmayan ögeleri çıkarmak için) ve sonra saponinleri ekstrakte etmek içine n-bütanolüne karşı (diğer polar ögeler ile beraber) ayrılırlar ve şekerleri, tuzları ve diğer yüksek derecede suda çözülür bileşikleri çıkarırlar. Bir çözücünün uçurulmasından sonra, saponinler, eğilimli çözücü sistemi CHCl_3 -MeOH-su (87:12:1-14:6:1) ile yada HPLC ile silika üzerinde açık kolon kromatografisi ile ayrılabilirler.

2.4.7.2. Steroit Saponinler için İTK

Silika üzerindeki İTK, son derece küçük arındırma için yada kısımlara ayırma esnasında saponinleri monitörle izlemek için uygundur. CHCl_3 -MeOH-su (14:6:1) yada CHCl_3 -MeOH (4:1), saponinler ve CHCl_3 -EtOH (20:1), CHCl_3 - Me_2CO (9:1), n-hekzan-EtOAc (1:1) ve aglikonlar için bazen, diğerleri için sıklıkla kullanılan çözücü sistemleridir. Çeşitli ayıraçlar ile kromatografiden sonra keşfedilebilirler: (1) sülfürik asit ile püskürtme, (2) vanilya-sülfürik asit ile, (3) anizaldehit-asetik asit-sülfürik asit ile, (4) kloformda ki SbCl_3 ile ve ısınma ile karakteristik renkli ışıklar veren ayıraç ile (5) Saf ayıraç ile püskürtme (p-dimetilamin benzeldahit) ve ısınma ile keşfedilebilirler.

2.4.7.3. Steroit Saponinler için HPLC

Hem saponinlerin oldukça polar doğası ve yüksek moleküler kütlesi, hem de onların yakın yapısal benzerlikleri (aglikonların yada şeker parçalarının izomerleri yada epimerleri), İTK'da yada CC'da farklılıklara neden olabilirler fakat HPLC'nin daha büyük çözeltisi, bunu, seçim metodu yapar. Tek zorluk, UV keşfi için uygun bir kromofor eksikliğidir. Bu nedenle, elde etme, sapma kontrolü yada MS, HPLC ayırmalarına uygulanırlar. Mobil fazların büyük bir bölümü, Hostetman ve Marston tarafından monografide tekrar gözden geçirilmiştir.

2.4.8. Steroit Alkoloitler

Steroid alkoloidler, bir kenar zinciri yada ögesi olarak ekli yada bir halkaya katılan azotu eksiksiz yada değiştirilen bir steroid iskeletin varlığı ile karakterize edilen geniş bir grubu temsil ederler. Azotun yerleşimine ve iskelet düzenine dayanarak, birkaç alt grup var olur. Azot, basit steroidal temelleri şekillendiren pozisyon 3 ve 20'de (serbest ve metile edilmiş) bir primer NH₂ grubu olarak eklenebilir, iskelet yada kenar zincir karbonuna (sekonder bir NH olarak) yakın halka olabilir yada bir tersiyerüçüncü N (örneğin, solanidin, 12: Şekil,3) olarak iki halkada tekrarlanabilir. Bu, sık sık bileşimin kimyasal karakterini etkiler.

Bitkiler, sık sık glikoalkoloitler olarak glikozit şeklinde alkoloitler içerirler. Bitki steroidal glikoalkoloitlerin ailesindeki yapısal değişim, iki ana grupta sınırlıdır, aglikonun iskelet tipine dayanır. Bir tane spirozolan tip, spirostona benzer (diosgenin olarak. 10: Şekil,3) fakat halka F'deki oksijenin yerindeki azotla (tetrahidrofuran ve piperidin spiro-bağlı bisiklik sistem) benzerdir. İkinci, C-N halkalı E ve F halkalarını şekillendiren her iki oksijen yerinde N'nin spirostan halkaları F ve E'yi bağladığı yerdeki, solanidan tiptir (Solanid, 12. Şekil 3). Dahası, tüm tipler ve çeşitli pozisyonlardaki hidroksilleri ve çift bağlantıları ve steroid saponinlerin durumunda olduğundan, şeker zincirlerini de içine alır. Bununla birlikte, doğal olarak oluşan glikoalkoloitlerin sayısı ve çeşitliliği, steroid glikozitlerin sayısından çok daha düşüktür. Dağılımları, bir çok önemli tarımsal ürün bitkilerini içine alan Solandra

ailesiyle sınırlıdır, patates, domates, patlıcan ve dolmalık biber gibi. En iyi bilinen solasodin, 200 civarında Solanum türünde bulunmuştur. Glikoalkaloitler, çoğunlukla tüm bitki organlarında bulunurlar fakat çiçeklerde, ham etli ve kabuksuz meyvelerde, küçük yapraklarda (metabolik aktif parçalar) en yüksek konsantrasyonlarla bulunurlar. Genellikle zehirlidirler fakat meyvelerde, olgunlaşma esnasında aşamalı olarak azotsuz zehirli olmayan yapıları çürütürler (Schreiber ve Manske, 1968).

2.4.8.1. Steroit Alkaloitler için Ekstraksiyon ve Ayırma

Tek glikoalkaloitlerin yada onların aglikonlarının izolasyonu için, aynı ekstraksiyon ve ayırma prosedürleri, steroit saponinler yada sapojeninler konusunda kullanılırlar. Bununla birlikte, kesin durumlarda etkin şekilde kullanılabilen bir avantaj vardır; alkaloitler, asitlerle suda çözülür tuzu oluşturabilirler. Ham alkaloitler, amonyak ile nötrleştirme ile seyreltik asitle sudan daha sonra ekstrakte edilebilirler. Bu prosedürü uygulamada, ılımlı şartları sağlamak ve artfaktların olası şeklini dikkate almak önemlidir.

2.4.8.2. Steroit Alkaloitler için İTK

Steroid glikoalkaloitlerin TLC ile izlenmesi için, aynı metotlar ve çözücü sistemleri, steroit saponinler içinde kullanılabilirler. Keşif ve renk canlandırması için, sülfürik asit yada $SbCl_3-CHCl_3$, kullanılır. Alkaloitlere belirgin püskürtme ayraçları, örneğin, Dragendorff ayıracağı gibi de uygulanabilirler.

2.4.8.3. Steroit Alkaloitler için HPLC

HPLC analizleri ve preperasyonları için, iyi denenmiş steroit saponin sistemleri, alkaloit azotunun varlığı ile zorunlu kılınan değişikliklerle uygulanabilirler. Bazı yaklaşımlarda, NH_2 yada karbonhidrat kolonları yada mobil faza etanolamin takviyeli C_{18} kolonları test edildiler. Bazı yazarlar, bir $CH_3CN-su-KH_2PO_3$ ile NH_2 kolonlarını, çözücü sistemini yada $MeOH-su-H_3PO_3$ ile C_{18} kolonları kullandılar. Solanidin glikoalkaloitlerin nicel HPLC analizi için, küçük örnek miktarları ile

çalışmak için genel olarak uygulanabilir bir metot geliştirilmiştir (Kubo, Fukuhara, Waller ve Yamasaki, 1996).

2.4.9. Omurgalı Tip Steroitler

Bazı bitki türlerinde doğal bileşenler olarak oluşumları ile ilgili biraz şüphe duyulmasına rağmen, bitkilerdeki omurgalı tip steroidlerin varlığı, çok iyibilinmemektedir. Bir çok örnekte, oluşumları, tam kesin olarak hesaba katılmayan düşük etkinlik kromotografik metotların ve renk reaksiyonlarının temelinde kuruludur. Düşük ppb alanında konsantrasyonlar ($\mu\text{g}/\text{kg}$) ve sadece birkaç tür için rapor edilmiştir. Bazı bitki türlerindeki biyo sentezleri için kanıt, kolesterol yada mevalonat ile deneylerle de belgelenir.

Burada iki nokta not edilmeli: (1) bu steroidlerin bazıları, diğer bitki steroidlerinin biyo sentezindeki ara basamak olarak dikkate alınabilir (böylece, progesteron, kardenolitlerin biyo sentezinde bir ara maddedir) ve (2) östrojenlerle biyolojik bir aktiviteli maddeler karşılaştırılabilir (böylece, "foto östrojenler" adı verilir), bununla birlikte steroidlere ait olmayan bitkilerde bulunurlar (örneğin, flavonler, izo flavonlar). Progesteron, pozisyon C-20'de azaltılabilir ve steroidal glikozitlere çekilebilir. Daha genel olarak, steroidal glikozidler, hala orijinal 3-bir-4-en parça taşıyabilirler, tam olarak indirgenebilirler ($3\alpha/3\beta\text{-OH}$ ve $5\alpha/5\beta\text{-H}$ olarak) ve C-3 pozisyonu, daha sonra çeşitli şekerlere bağlanabilir.

Progesteron ve östrojenler elma tohumlarından izole edilmişlerdir. Testosteron ise İskoç çam poleninden izole edildiğinden, aslında bu tür örnekler seyrekdir. D vitamini ile bağlantılı Secosteroidler, (6: Şekil 3) birkaç örnekte izole edilmişlerdir. Tüm bu bileşenler, küçük miktarlarda mevcuttur ve izolasyonları, bağışıklık tahlili/radyo reseptör tahlili yapılır. Diğer taraftan, steroidal glikozitler daha fazla bereketli metabolitlerdir ve onların UV absorbansı ile saflaştırılabilirler (Palter, Lindin ve Fuller, 1972).

2.4.9.1. Omurgalı Tip Steroitler için Ekstraksiyon

D₃ vitamini durumunda metabolitler, *Nicotiano glaucadan*, bir CHCl₃-MeOH (1;2) karışımı ile ekstrakte edildi. İki fazı ve organik fazda steroidleri parçalarına ayırmak için CHCl₃ ve su eklenmiştir. İleriki saflaştırma, bir Sephadex LH-20 kolonu üzerinde uygulanmıştır (hekzan-CHCl₃-MeOH ile elüe edilmiştir, 9:1:1). *Lepisorus issurientes*'tan daha fazla polar sterodial bir glikozit için, MeOH ekstraktı buharlaştırıldı. Kalan çözelti artık, su ve arka arkaya hekzan, CHCl₃ ve n-BuOH arasında bölünmüştür. n-BuOH ekstraktı, daha sonra MeOH'de CHCl₃ ile silikajel kolon kromatografisi ile arındırılır.

2.4.9.2. Omurgalı Tip Steroitler için İTK

Bu teknik, özellikle metabolik çalışmalar için radyoaktif molekülleri kullanan, omurgalı hormonların ayrımı için kullanılmıştır. Bir çok canlandırma prosedürü tasarlanmıştır (Çizelge 6). Benzer İTK teknikleri de bitkilerdeki metalik çalışmalar için kullanılmıştır. Örneğin, Bennett ve Helftmann tarafından mobil fazlar olarak CH₂Cl₂-MeOH yada hekzan-Et₂O (3:7) kullanarak yapılmıştır.

2.4.9.3. Omurgalı Tip Steroitler için HPLC

Seko-steroitler (D vitamini) için Aburjai çalışmalarında, 264 nm'de UV monitörle izlemeli bir Nova-Pak C₁₈ kolonu kullanarak suda MeOH ile elüe etmiştir. Çeşitli MeOH-su karışımları (75:20'den 90:10'a), *Nicoliana glauca*'dan metabolitleri, D vitaminini izole etmek için kullanılmışlardır. *Kentaurea moschuta*'dan bir 4-en-3-bir monoglikozitin izolasyonu için, bir C₁₈ sütunu üzerinde RP-HPLC'nin bir kombinasyonu (çözücü, MeOH-su, 1:1) ve sonra bir C₆ kolonu üzerindeki RP-HPLC (çözücü, MeOH-su, 40:60) yada bir diol bağlı silika üzerindeki NP-HPLC (çözücü, CHCl₃-MeOH, 96:4) kullanılmıştır. Diğer steroidal glikozitler için, kullanılan sistemler, sudaki MeOH yada MeCN yada izokratik MeOH-su (1:1) C₁₈ RP kolonları ile elüe edilmiştir.

2.4.10. Vitanolitler (Withasteroidler)

Vitanolitler, bir 22.26- δ -laktone sahip, tipik olarak C₂₈ ergostan tip steroidlerdir. Yan zinciri, 17 α veya 18 β steroid çekirdeklerine bağlanabilir. Bu moleküller, çok sayıda fonksiyonel grupları (hidroksiller, ketonlar, epoksitler, siklik eterler) içine alan geniş bir alanın varlığı ile de karakterize edilebilirler. Vitanolitler de sık sık C-20'de hidroksil bir gruba sahip olup olmadıklarının temelinde tekrar bölünürler. Bilinen tüm vitanolitlerin %90'ı, bir okso grubuna sahiptir (örneğin, vitaforin A. 11, Şekil 3). Ve 200 üzerinde yapısal olarak benzer bileşik izole edilmiştir. Glikozitler bazı kaynaklardan bilinmelerine rağmen vitanolitler, genelde aglikonlar gibi oluşurlar. Esasen bu türler içine alan yapılar vitanolidin yapraklarında oluşurlar. Bunların yapısal farklılığı, biyo sentezi ve biyolojik aktiviteleri, gözden geçirilmiştir (Anjaneyulu, Rao ve Lequesme, 1998).

Vitanolitler, genelde Solanaksayenin üyeleri ile ilişkilidirler (96 türün dışında 16 tür), fakat yakın zamanda *Tukxa plantajineada*, *Kassia siamarda* (Leguminoese ve *Ajuga parviflora* da keşfedilmişlerdir. Bu türleri içine alan birkaç vitanolit, tıbben ve tedavi edici olarak önemlidir; Vitanolitler, anti tümör, bağışıklık sağlayıcı ve hepo koruyucu maddeler, antebakteriyel özellikler, hücre farklılaşmasının indüksiyonu, böcek besleme koruyucuları ve esidisteroit reseptörler gibi biyolojik aktiviteye de sahiptirler.

2.4.10.1. Vitanolitler için Ekstraksiyon

Vitanolidler, daha sonra genel olarak bitki pigmentlerini ekstrakte etmek için hekzane ile ayrılmaya karşı önce su ile karıştırılan metanol yada etanol ile bitki maddesinden ekstrakte edilirler. Sulu metanol fazı, daha sonra vitanolitleri ekstrakte etmek için dietileter yada CHCl₃, CH₂Cl₂'a karşı ekstrakte edilir. Çözücünün uçurulmasından sonra, vitanolit karışımı HPLC tarafından yada alüminyum oksit yada silis üzerinde açık kolon/flaş kromatografi ile ayrılabilir.

2.4.10.2. Vitanolitler için İTK

Silis üzerindeki İTK, vitanolitlerin analizi için uygundur ve elverişlidir. Sık sık vitanolitlerin son saflaştırılması için yada bölümleri izlemek için kullanılır. CHCl_3 -MeOH (95:5) aglikonlar için ve CHCl_3 -MeOH (90:10) ve glikozitler için sıklıkla kullanılan bir çözücü sistemidir. Aşağıdakilerle: (1) UV absorpsiyonu, (2) Dragendorff ayırıcı ile püskürtme (N içermemelerine rağmen), (3) bir epoksit ayırıcı (4-[4-nitrobenzil]- piridin) yada (4) SbCl_3 'nin çözeltisi ile doyurulmuş bir CHCl_3 ile püskürtme (+ ısınma) ile kromotografiden sonra keşfedilebilirler. İyosroma gesneoriodiyesten vitanolitler için İTK analizi, SiO_2 F₂₅₄ tabakaları (izobutil metil keton-hekzanol-hekzan-asetik asit, 30:30:40:1, su ile doyurulmuş) ve RP₁₈ F₂₅₄ tabakası (MeOH-su, 7:3) ile yerine getirilir.

2.4.10.3. Vitanolitler için HPLC

UV spektrumu, vitanolitlerde oluşabilen kromoforik grupların permütasyonlarının bir sayısı olarak oldukça değişebilir. Halka A'daki ve yan zincirindeki alfa, beta doyurulmamış ketonlu vitanolidler, yaklaşık 220 nm'de UV maksimumuna sahip olurlar (yaklaşık $\epsilon = 18\ 000\ \text{l mol}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$). HPLC, vitanolidlerin arındırılmasında seyrek olarak kullanılmak zorunda gibi görünürler. Bu, belki de daha farklı HPLC ayrılıklarının monitör ile izlenmesini sağlayan en çok vitanolid ile ilişkili düşük UV maksimumunun bir sonucudur. Ayrıca, pozitif vitanolit türlerde mevcut vitanolitlerin konsantrasyonları, normal olarak yeterlidir. İTK'nın daha düşük hassasiyeti bir problem değildir. Bununla birlikte, RP (C₁₈)-HPLC, vitanolitlerin ayırımına uygulanmıştır ve Fisalis vitanolitleri, bir diol kolonu üzerindeki normal faz (NP) HPLC ile ayrılırlar (Baumann ve Meier, 1993).

2.4.11. Bitki Ekstraksiyonu ile İlgili Sonuçlar

(1). Bitkiler, kısmen gelişen hormonlar olarak (düşük miktarlarda) yada alelopotik korunma bileşenleri olarak (çok daha yüksek konsantrasyonlarda) steroidal bileşenlerin çok geniş bir alanının sınıflamasına girebilirler.

(2). Savunma steroidlerinin çeşitli sınıflarının dağılımı, onları içeren bitkilerin organlarında ve türlerde (ekotipler) ve bitki familyasındaki türler arasında değişir. Etkinlik imkanı, doğal ürünlerin analizi ve artımı için modern prosedürler, nispi kolaylıkla her bir sınıftaki çeşitliliği artan fitosteroidlerin tespitine izin verir.

(3). Fitosteroidlerin kromatografik tavrı üzerindeki sistematik ve kapsamlı çalışmalar (özellikle HPLC üzerinde), sadece fitoesiditeroidler için uygulanmışlardır. Fitosteroidlerin diğer sınıfı için bu alandaki tespitler önemli bir araştırmadır.

(4). Fitosteroidler arasında bulunan benzerlerin büyük farklılığı, bitkilerle çalışmada ‘‘birleşimsel biyokimya’’yı yansıtır. Steroidlerin çeşitli sınıflarında gözlemlenen farklı yapılar arasındaki benzerlikler, büyük farklılıkla beslenen, çeşitli biyosentetik yolların daha sonraki aşamalarında bulunabilen aynı enzimleri (yada çok benzer enzimleri) gösterirler. Bu, hem genetik hem de protein seviyelerde hem etkin hem esnek, hem de fazlalığı en alt düzeye getiren bitkilerdeki steroidal ikincil ürünler için biyosentetik bir sistem sağlayacaktır.

(5). Fitosteroidlerin ilginç tıbbi, eczacılık, kimyasal tarım aktivitelerine sahip oldukları açıktır. Rehber bileşenleri tanımlamak için ilerideki çalışmalar bu bileşenler üzerinde garantilidir. Sonra bitkiler, yapı-aktivite çalışmaları için değişen benzeşlerin geniş farklılığının iyi bir kaynağıdır. Genetik olarak değiştirilen (GM) veya GM-olmayan fitosteroidlerin profilleri yada seviyelerin değişimi büyümeye neden olabilir ve ürünler (brasinosteroidler) daha iyi aleofatik etkileri oluşturur (Örneğin, bufadienolitler, kardenolitler, esidisteroidler, steroidal alkoloitler, saponinler, omurgalı tip steroidler ve vitanolitler).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

Araştırmamızda kullanılan Tesbih Çalısı (*Styrax Officinalis*) Bitkisinin tohumları, Isparta'nın Aksu İlçesi ve bu ilçeye bağlı Karağı Köyü civarından 2003 yılının Eylül ayının ilk haftalarında toplanmıştır. Tesbih çalısı tohumlarının ağaçtaki tohumlardan deneylerde kullanılacak örnek boyutlarına getirilinceye kadar şu işlem sırası izlenmiştir:

Tesbih çalısı ağacından yeterli miktarda toplanan tohumlar çuvala doldurulup eve getirilmiş yapraklı kısımları temizlenmiş ve temiz bir bez üzerine serilerek gölgede iki ay boyunca kurutulmuştur. Sonra gölgede kuruyan tohumların yeşil kısımları üzerlerinden sıyrılmış ve üzerinde fındık kabuğu şeklinde sert bir kabuk kalmıştır. Deneylerden önce bu sert kabuklu kısım küçük çekiçlerle kırılmış ve 0,2-0,3 cm çapında tohumlar elde edilmiştir. Hekzanda ıslatma ile ekstraksiyonu yapılacak tohumlar maden mühendisliği bölümünde öğütülmüştür. Yağ içeriği analiz edilecek tohumlar ise presleme ile soxhlet ekstraksiyonu için hazır hale getirilmiştir.

3.2. Metod

3.2.1. Çözücü İle Ekstraksiyon

Tesbih çalısından toplanan tohumlar gölgede kurutulduktan ve kabuklarından ayrıştırıldıktan sonra (300 g) 1 litre n-hekzan içinde oda sıcaklığında 3 gün boyunca ekstrakte edildi. Bu işlem üç defa tekrarlandı. Toplanan ekstraktlar süzüldü ve vakum altında evapore edildi. Yaklaşık 72 g sarı renkte yağimsi madde elde edildi. 11'er gr yağimsi madde alınarak silikajel kolonda (6×100 cm) 6/3 oranında CH₂Cl₂/n-hekzan ile uygulamaya tabi tutuldu ve her seferinde CH₂Cl₂'nin konsantrasyonu arttırıldı. Altı farklı fraksiyon elde edildi. Bu elde edilen fraksiyonların her biri yeniden kromatografik ayırmaya tabii tutuldu. Bunun için uygulanan silikajel kolon kromatografisinde çeşitli çözücü sistemleri kullanıldı (n-hekzan/etilasetat: 9/1, 9/2, 9/3 ve CH₂Cl₂, CHCl₃). Buradan da altı temel fraksiyon elde edildi. Elde edilen

fraksiyonlar vakum altında evapore edildi. Sonuçta bir kısmı çok düşük verimlilikte fraksiyonlar elde edildi. Bu fraksiyonların kütle spektrumları alınarak yapıları analiz edilmeye çalışıldı. Bu spektrumların bazıları şekillerde gösterilmiştir (Şekil 6,7,8,9). Elde ettiğimiz bu spektrumlar, daha önce yapılan benzer çalışmalarda elde edilen bileşikler ile kütle spektrometresinde sahip olduğumuz bilgilerin ışığı altında değerlendirilip yorumlanmaya çalışılmıştır.

3.2.2. Tesbih Çalısı Bitkisi Tohumlarının Yağ İçerikleri Yönünden Analizi

Dünya nüfusunun her geçen yıl hızlı bir şekilde artması ve mevcut kaynakların azalması ve tükenmesi insanları yeni kaynakların bulunmasına ve mevcut olanlarının daha verimli şekilde değerlendirilmesine yöneltmektedir. Bu nedenle insanlar yağ kaynağı olarak da yeni arayışlar içinde olmuşlardır. Bunun için çeşitli bitkilerin tohumlarının yağ analizleri yapılmaktadır. Tesbih çalısı bitkisi içinde azda olsa araştırmalar yapılmaktadır.

Yağ içeriği analizi için deneysel çalışmalarda kullanılan tesbih çalısı bitkisi tohumlarının yağları önce presleme sonra soxhlet ekstraksiyonu yöntemleri ile elde edilmiştir. Elde edilen bu yağ numunelerinin bazı özellikleri tayin edilmiştir.

Kabuk / Tohum Oranı: Bu konuda literatür bilgisine rastlanmamıştır. Isparta – Aksu yöresinden toplanan tesbih çalısı bitkisi tohumları kurutulduktan sonra sert olan dış kısmındaki kabukları kırılmış ve kabuk/tohum oranı değerine bakılmıştır.

Yağ Miktarı: Bölgede yetişen tohumların yağ miktarı kuru tohum oranına karşı tayin edilmiştir.

Kırılma İndisi: Elde edilen yağların kırılma indisleri Abbe refraktometresinde tayin edilmiştir.

Asit Sayısı: Asit sayısı 1 gram yağ içinde bulunan serbest asitleri nötralize etmek için gerekli olan KOH'in miligram olarak miktarıdır.

Bu tayinin yapılmasında sıvı yağdan 10 g tartılır, bir erlende 50 mL. Alkol-eter karışımında çözülür, 2-3 damla fenolftalein eklenir ve konsantrasyonu bilinen KOH ile titre edilir.

Sabunlaşma Sayısı: 1 g yağdaki serbest asit ile sabunlaşma tepkimelerinde açığa çıkan yağ asitlerini nötürleştirmek için gerekli mg KOH miktarıdır. Bu tayinde süzgeç kağıdından süzölmüş nemi ve bulanıklığı giderilmiş 5 g yağ 200 mL'lik düz balonda tartılır. 50 mL KOH eklenir. 30 dakika geri soğutucu altında ılımlı olarak kaynatılır. Zaman zaman karıştırılır. Aynı anda paralel bir boş deneme için 50 mL alkollü KOH benzer şekilde kaynatılır, soğutulur. Her iki balondaki çözeltiler 4-5 damla fenolftalein eklenerek ayarlı HCl ile titre edilir.

4. BULGULAR

Bu çalışmamızda ülkemizde endüstriyel olarak değerlendirilemeyen tesbih çalısı bitkisinin tohumları, bitkinin kullanım alanını artırmak amacıyla laboratuvar ölçekli ekstraktörlerde ekstraksiyonu ve çeşitli yağ analizleri yapılmıştır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar;

Tesbih çalısı bitkisinin içermiş olduğu total ekstre miktarının hesaplama örneği aşağıdaki gibidir,

Bitki örneği miktarı: 80 g

Nem yüzdesi: %6,8

Kuru bitki örneği miktarı: $80(1-0,068) = 74,56$ g

Hekzanda ıslatma sonucu ekstraksiyon değerleri:

Bitki örneği miktarı: 300 g

Total ekstre miktarı: 72 g

Ekstre yüzdesi: %24

Soxhlet ekstraksiyonu sonucu ekstraksiyon değerleri:

Tohum kabuk oranı: 55/45

Bitki örneği miktarı: 72 g

Total ekstre miktarı: 21g

Ekstre yüzdesi: %29,2

Kırılma indisi (N_D^{20}): 1,4815

Asit sayısı: 25,76

Sabunlaşma sayısı: 165,76

Tesbih çalısı tohumları kabuklarından ayrıştırılıp öğütüldükten sonra hekzanda çözülerek bitkideki total yağ miktarı belirlenmiştir ve bazı yağ analizleri yapılmıştır (sonuçlar yukarıda verilmiştir). Çözücü ekstraksiyonu sonucunda kolon kromatografisi ve İ.T.K. yöntemleri kullanılmak suretiyle benzer fraksiyonlar

birleştirilmiştir. Elde edilen altı fraksiyonda madde elde edilmişmiştir ve yeteri kadar saflıkta değildir. Bu fraksiyonların kütle spektrumları alınarak yapıları hakkında bilgi edinilmeye çalışılmıştır.

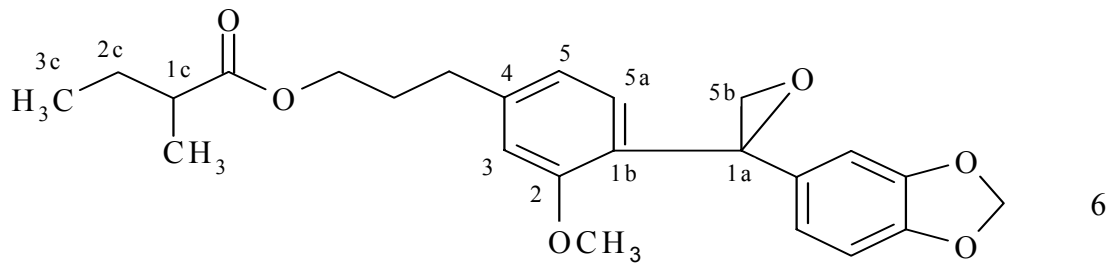
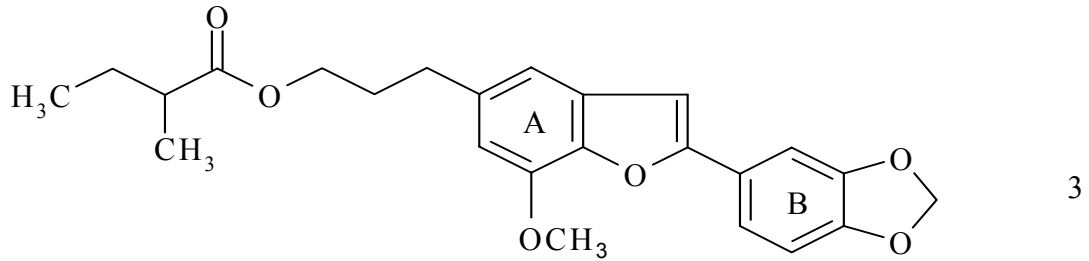
3. ve 6. fraksiyonlardan alınan spektrumlar, kütle spektrometresi ve daha önce tesbih çalışından izole edilmiş bileşiklerden alınan kütle spektrumu değerleri (Akgül ve Anıl, 2003) ışığı altında incelenmiş ve yorumlanmaya çalışılmıştır.

Buna göre bu iki bileşiğin aşağıdaki şekilde olabileceği düşünülmüş ve kütle spektrumu (m/z , $[M+H]^+$) değerleriyle birlikte verilmiştir (Şekil,4).

3. fraksiyondan elde edilen bileşik, 5-[3''-(1c-Metilbütanoiloksi)propil]-7-metoksi-2-(3',4'-metilendifenil)-benzofuran (m/z : 411,1797 $[M+H]^+$),

6. fraksiyondan elde edilen bileşik, 4-[3''-(1c-Metilbütanoiloksi)propil]-2-metoksi-1a-(3',4'-metilendioksifenil)-1a,5b-dihidrobenzo-[3,4]-siklobütaoksiren (m/z : 411,1862 $[M+H]^+$).

Bu bileşiklerden alınan farklı spektrumlar aşağıda gösterilmiştir (Şekil,5,6,7,8).

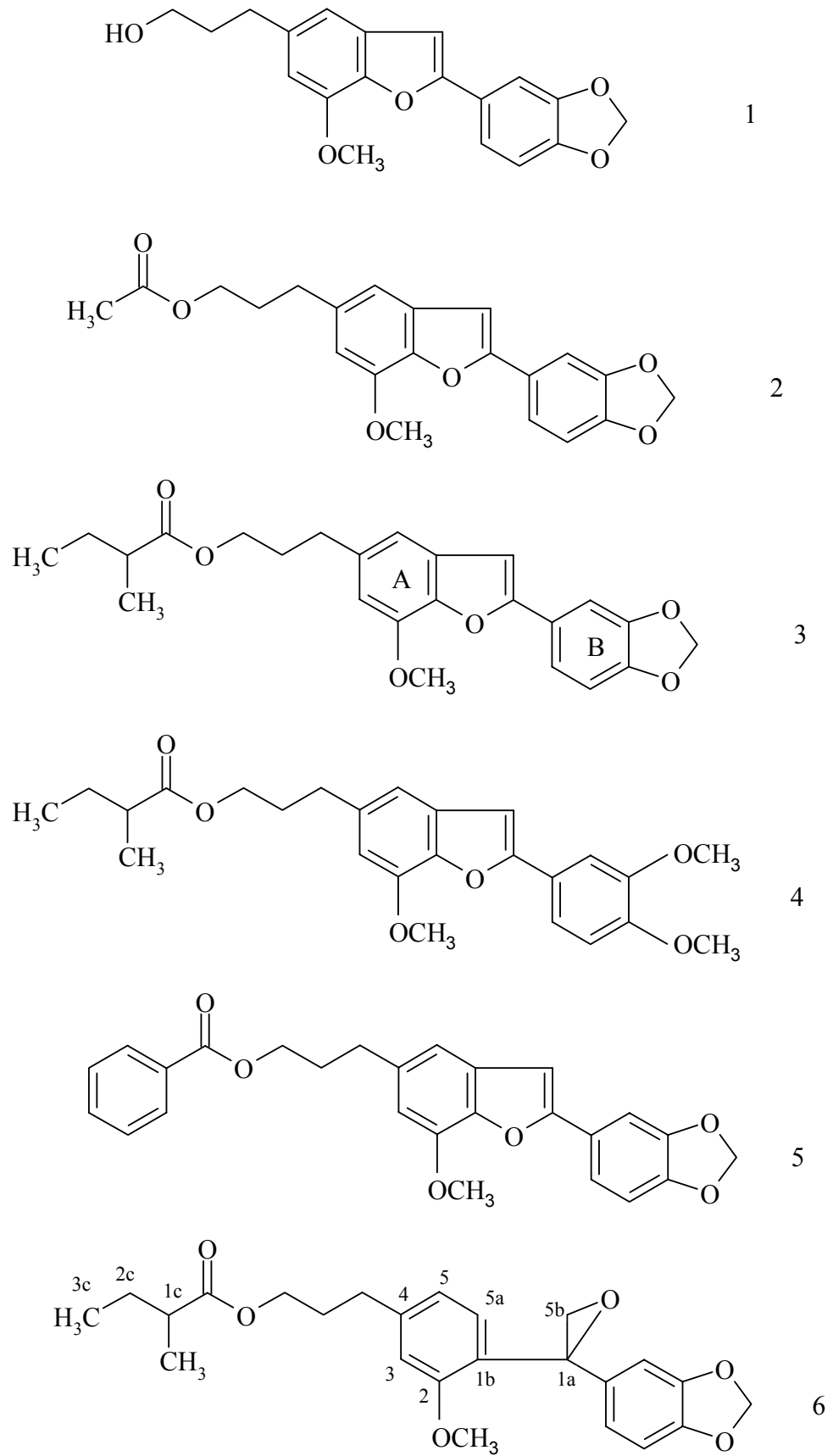


Şekil 4. 3. ve 6. fraksiyonlardan elde edilen bileşiklerin tahmini kimyasal yapıları

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Aşağıda (şekil, 5) tesbih ağacı tohumlarından daha önceki çalışmalarda izole edilmiş bileşikler gösterilmiştir. Bu bileşikler, IR, NMR ve kütle spektrumları alınarak tanımlanıp adlandırılmıştır (Akgül ve Anıl, 2003). Bu bileşiklerden 2. ve 3. bileşik daha önce yaklaşık olarak izole edilmişti (Takanashi ve Takizawa, 1988). Bu bileşiklerin adlandırılmaları şu şekildedir,

1. bileşik, 5-(3"-Hidroksipropil)-7-metoksi-2-(3',4'-metilendioksifenil)-benzofuran,
2. bileşik, 5-(3"-Asetoksipropil)-7-metoksi-2-(3',4'-metilendioksifenil)-benzofuran,
3. bileşik, 5-[3"-(1c-Metilbütanoiloksi)propil]-7-metoksi-2-(3',4'-metilendifenil)-benzofuran, (m/z 411,1797 [M+H]⁺),
4. bileşik, 5-[3"-(1c-Metilbütanoiloksi) propil]-7-metoksi-2-(3',4'-dimetoksifenil)-benzofuran,
5. bileşik, 5-(3"-Benzoiloksipropil)-7-metoksi-2-(3',4'-metilendioksifenil)-benzofuran
6. bileşik, 4-[3"-(1c-Metilbütanoiloksi)propil]-2-metoksi-1a-(3',4' metilendioksifenil)-1a,5b-dihidrobzeno-[3,4]-siklobütaoksiren, (m/z 411,1862 [M+H]⁺).



Şekil 5. Daha önce izole edilmiş bileşiklerin kimyasal yapıları (Akgül ve Anıl, 2003)

Sonuç olarak bu çalışmada;

Tesbih çalısı tohumları kabuklarından ayrıştırılıp öğütüldükten sonra hekszanda çözümlerek bitkideki total yağ miktarı belirlenmiştir ve bazı yağ analizleri yapılmıştır. Çözücü ekstraksiyonu sonucunda kolon kromatografisi ve İ.T.K. yöntemleri kullanılmak suretiyle benzer fraksiyonlar birleştirilmiştir. Elde edilen altı fraksiyon çok düşük verimlilikte gerçekleşmiştir ve yeteri kadar saflıkta değildir. Bu fraksiyonların kütle spektrumları alınarak yapıları hakkında bilgi edinilmeye çalışılmıştır. 3. ve 6. fraksiyonlardan alınan spektrumlar (şekil 6,7,8,9), kütle spektrometresi ve daha önce tesbih ağacından izole edilmiş bileşiklerden alınan kütle spektrumu değerleri (Akgül ve Anıl, 2003) ışığı altında incelenmiş ve yorumlanmaya çalışılmıştır.

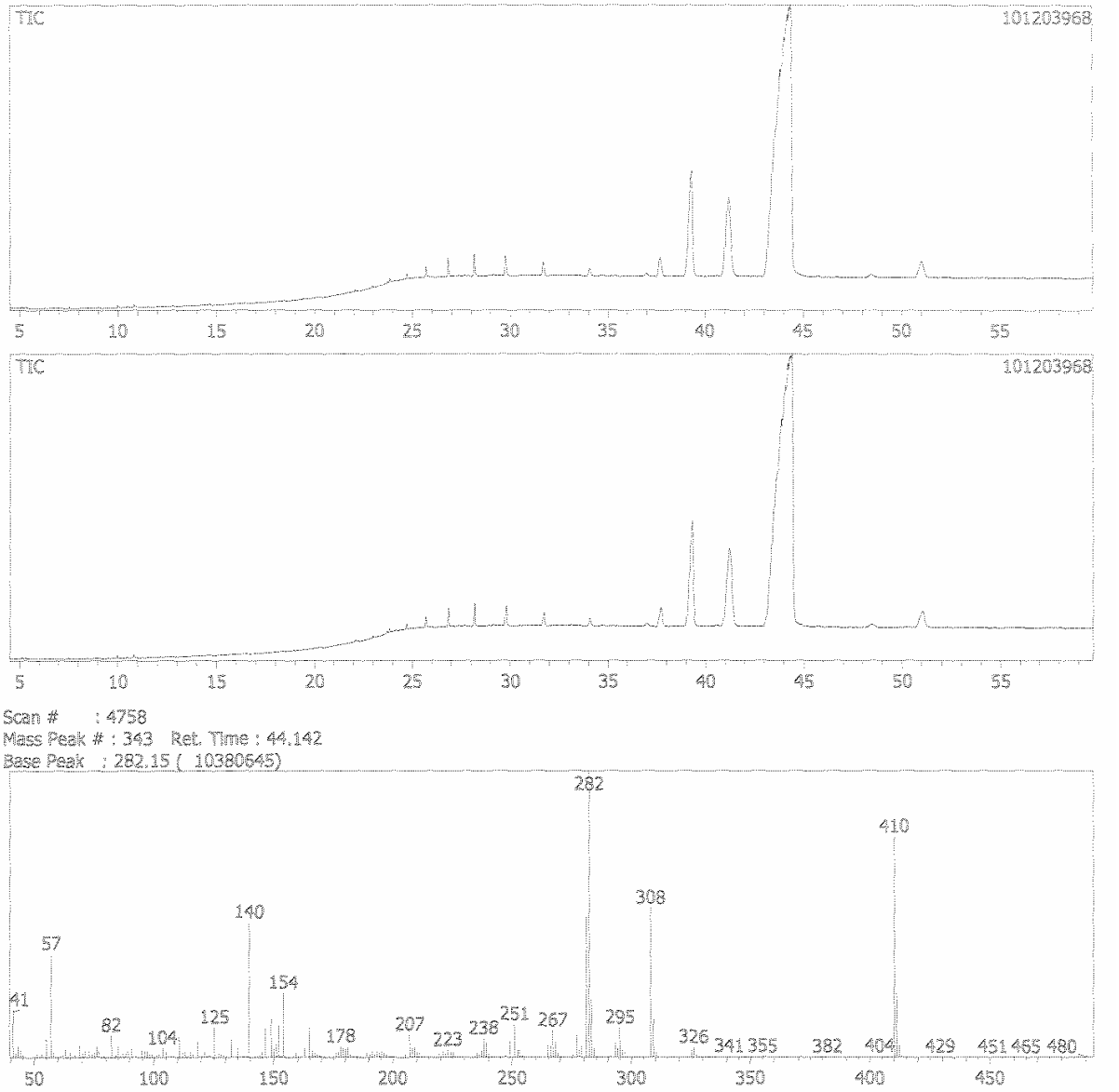
Buna göre bu iki bileşiğin aşağıdaki şekilde olabileceği düşünülmüştür.

3. fraksiyondan elde edilen bileşik (şekil 5,6), 5-[3''-(1c-Metilbütanoiloksi) propil]-7-metoksi-2-(3',4'-metilendifenil)-benzofuran (m/z 411,1797 $[M+H]^+$),
4. fraksiyondan elde edilen bileşik (şekil 7), 4-[3''-(1c-Metilbütanoiloksi)propil]-2-metoksi-la-(3',4'-metilendioksifenil)-la,5b-dihidrobenzo-[3,4]-siklobütaoksiren. (m/z 411,1862 $[M+H]^+$).

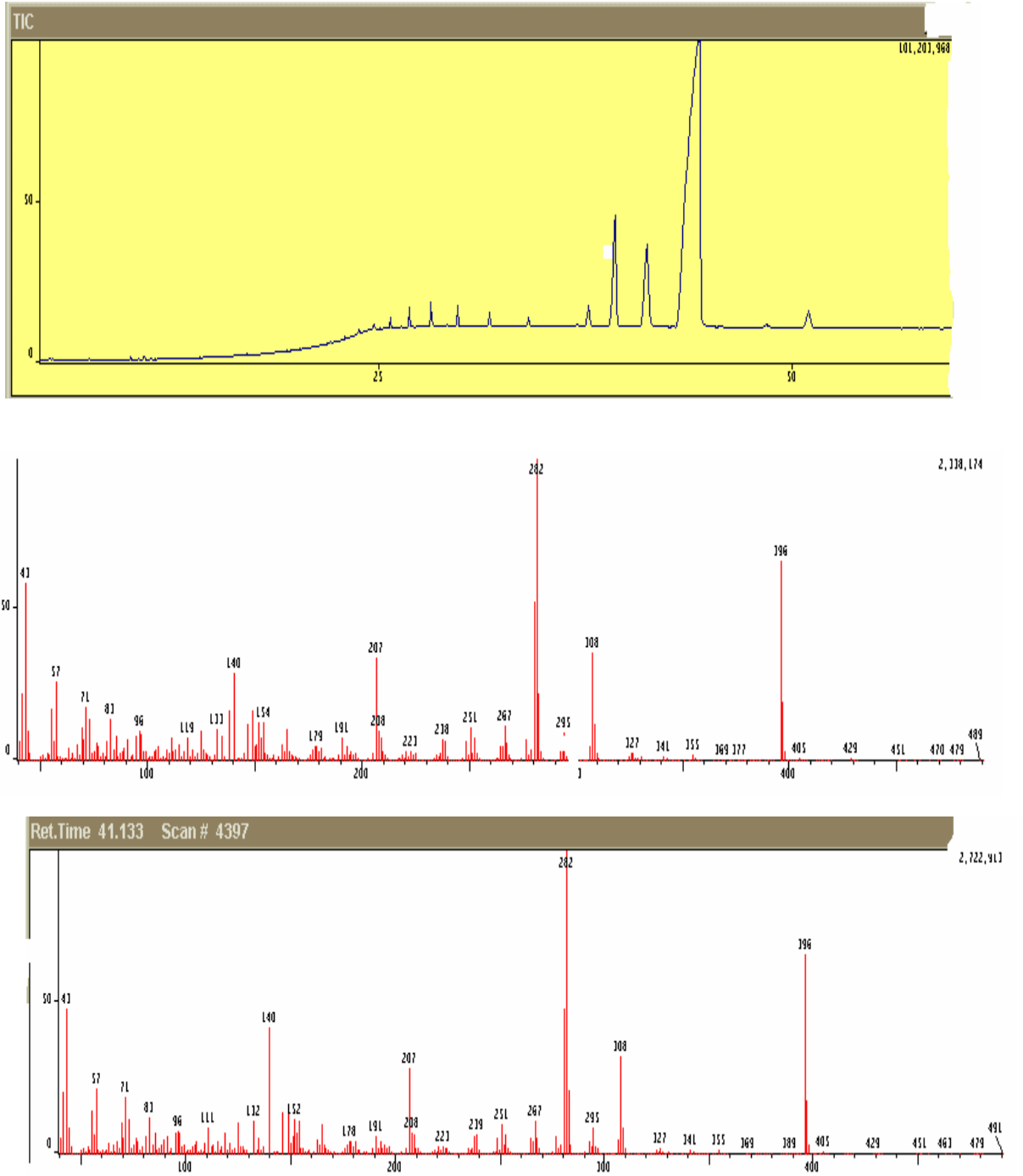
Gerçekten de bu iki bileşikten alınan kütle spektrumları incelendiğinde, bileşikten kopma olasılığı olan muhtemel gruplar dikkate alındığında, (-2-metilbutanoil grup, -butil grup, -3',4'-metilendioksifenil grup, -metoksi grup, -dioksi grup gibi), 410, 308, 282, 207, 57 gibi piklere karşılık gelen yapılar hakkında yorum yapılabilir.

Bu fraksiyonlardaki bileşiklerin tam olarak saflaştırılması ve diğer bileşiklerle birlikte tam olarak yapılarının belirlenmesi gerek zamanın yeterli olmayışı gerekse laboratuvar şartlarından dolayı ileri bir zamana bırakılmıştır.

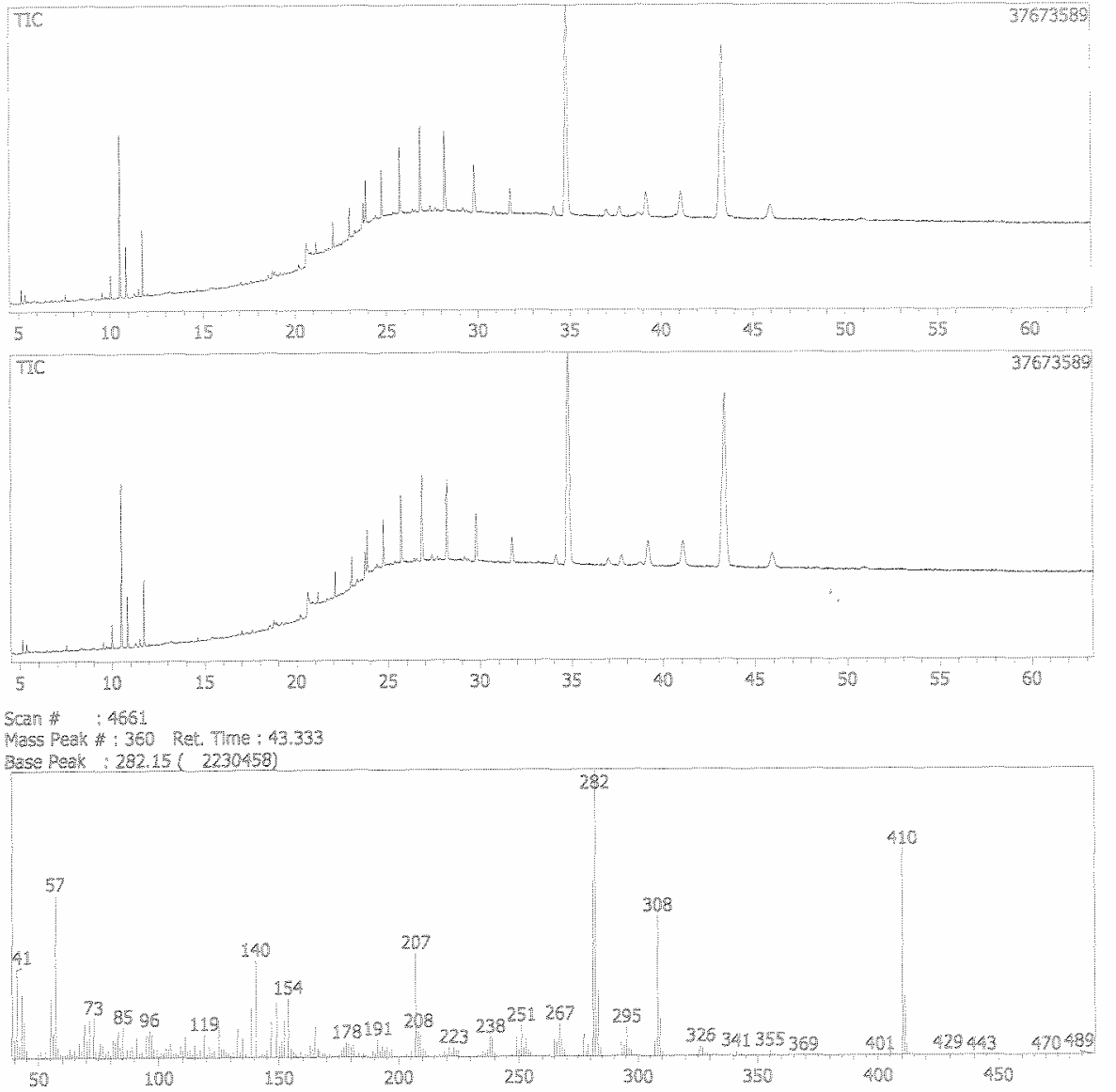
Ayrıca hekszanda ıslatma sonucu yapılan ekstraksiyondan elde edilen ekstre yüzdesi (%24) ile Soxhlet ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstre yüzdesi (29,2) arasında fark vardır.



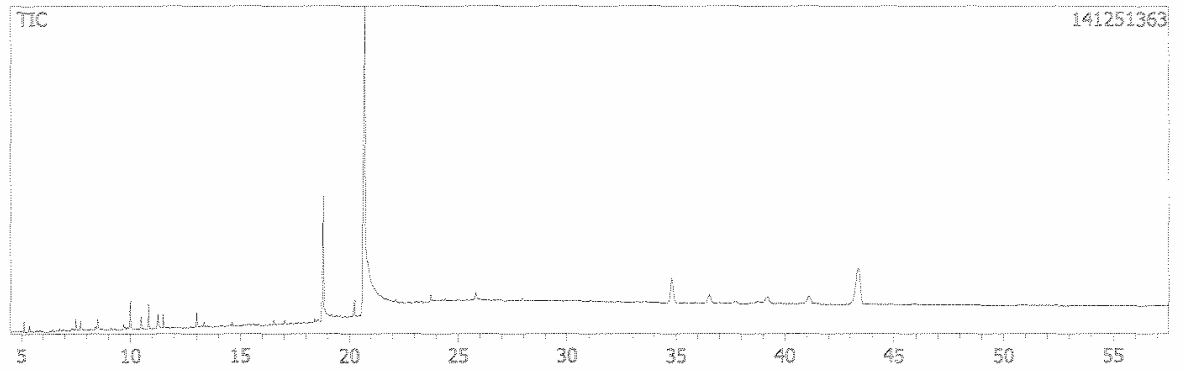
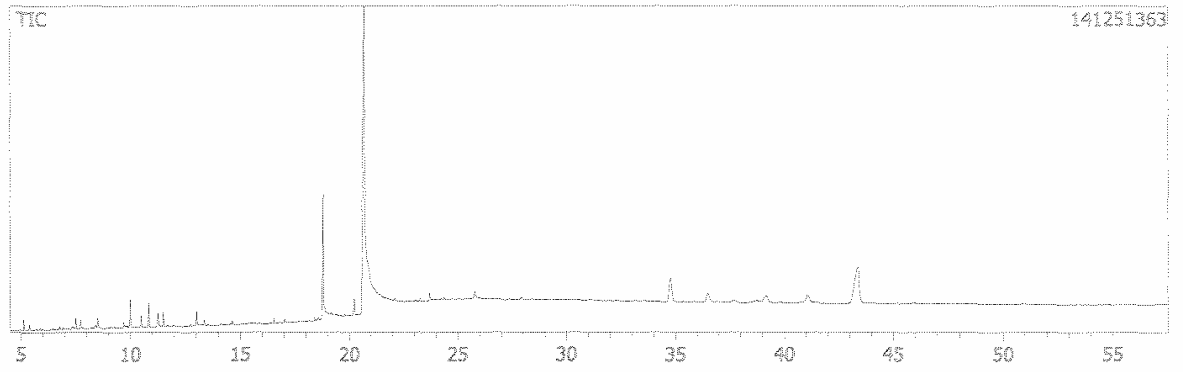
Şekil 6. 3. fraksiyonda elde edilen spektrum (n-hekzan/etilasetat: 9/1 oranında)



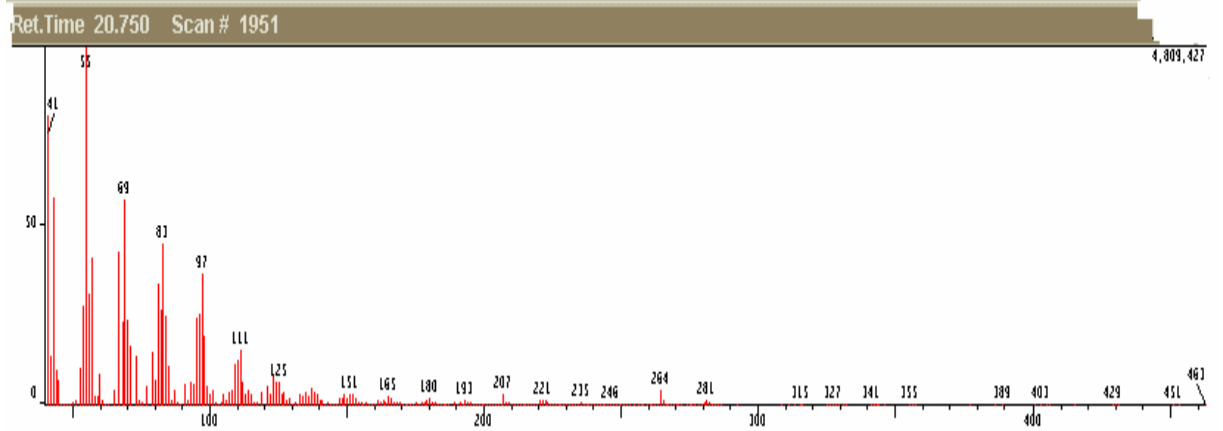
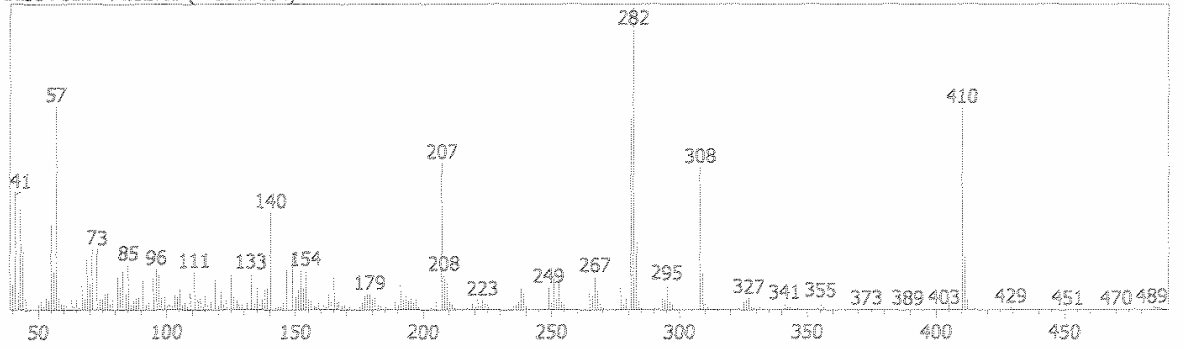
Şekil 7. 3. fraksiyonda elde edilen spektrum (n-hekzan/etilasetat: 9/1 oranında)



Şekil 8. 3. fraksiyonda elde edilen spektrum (n-hekzan/etilasetat: 9/2 oranında)



Scan # : 4658
 Mass Peak # : 357 Ret. Time : 43.308
 Base Peak : 282.15 (1728404)



Şekil 9. 6. fraksiyonda elde edilen spektrumlar (n-hekzan/etilasetat: 9/2 oranında)

6. KAYNAKLAR

- Adam, G., Schmidt, J., Schneider, B., Moore, R.E., 1999. Progress in the Chemistry of Organic Natural Product, Vol. 78. Springer, Vienna, p.1
- Akgül, Y.Y., Anil, H., 2003. A benzofuran from *Styrax officinalis*. *Fitoterapia*, submitted.
- Anil, H., 1980. Four benzofuran glycosides from *Styrax officinalis*. *Phytochemistry* 19, 2784- 2786
- Anjaneyulu, A.S.R., Rao, D.S., Lequesne, P.W., 1998. Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 20, Elsevier, Amsterdam, p. 135.
- Baumann, T.W., Meier, C.M., 1991. *Phytochemistry* 38, 153.
- Davis, P.H., 1972. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol. 4. University of Edinburgh Pres, Edinburgh.
- Dias, C., Graca, J.A., Goncalves, M.L., 1999. *J. Ethnopharmacol* 71, 487.
- Dinan, L., Whiting, P., Girault, J.P., Lafont, R., Mugat, B., 1997. *Biochem. J.* 327, 643.
- Huq, M.M., Jabbar,A., Rashid, M.A., Hasan, C.M., 1998. *Fitoterapia* 69, 545.
- Hostetmann, K., Marston, A., 1995. Saponins, Cambridge University Press.
- Kanchanapoom, T., Kamel, M.S., Kasai, R., Yamasaki, K., Picheansoonthan, C., Higara, Y., 2001. Lignan glucosides from *Acanthus ilicifolius*. *Phytochemistry* 56, 369-372.
- Kissmer, B., wichtl, M., 1986. *Planta Med.* 121, 152.
- Krenn, L., Kopp, B., 1998. *Phytochemistry* 48, 1.
- Kuho, I., Fukuhara, K., Waller, G.R., Yamasaki, K., 1996. Saponins Used in Food and Agriculture, Plenum Pres, New York, p.405.
- Lacaille, MA., Oleszek, W., 2000. Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal Plants, Kluwer, Dordrecht, p. 205.
- Lafont, R., Wilson, I.D., 1996. The Ecdysone Handbook, 2nd ed., Chromatographic Society, Nottingham.
- Murphy, S.J., Morgan, E.D., Wilson,I.D., 1990. Chromatography and Isolation of Insect Hormones and Pheromones, Plenum Press, London, p.131.

- Mutlu, M., 2002. *Tribulus terrestris* L. Bitkisinden Elde Edilen Ekstraktların Kimyasal İçeriklerinin Araştırılması, S.D.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 64 s.
- Nishizawa, M., Yamada, H., Yamasaki, K., 1996. *Saponins Used in Food and Agriculture*, Plenum Press, New York, p. 25.
- Palter, R., Lindin, R.e., Fuller, G., 1972. *Phytochemistry* 11, 819.
- Paluetti, P.M., Araujo, A.R., Young, M.C.M., Giesbrecht, A.M., Bolzani, V., 2000. *nor-Lignans from the leaves of Styrox ferriginous (Styracacea) with antibacterial and antifungal activity. Phytochemistry* 55, 597-601.
- Read, H., Wilson, I.D., Lafont, R., 1990. *Chromatography and Isolation of Insect Hormones and Pheromones*, Plenum Press, London, p. 127.
- Segal, R., Milo-Goldzweig, I., Sokoloff, S., Zistcek, D.V., 1967. A new benzofuran from the seeds of *Styrax officinalis*. *J. Chem. Soc. (C)*, 2402-2404.
- Schmidt, J., Altmann, T., Adam, G., 1997. *Phytochemistry* 45, 1325.
- Schreiber, K., 1968. *The Alkaloids. Chemistry and Physiology*, Vol. X, Academic Press, New York, p. 1.
- Takanashi, M., Takizawa, Y., Mitsuhashi, T., 1974. 5-(3-Hydroxypropyl)-2-(3'4'-methylenedioxyphenyl) benzofurans. *Chem. Lett.*, 869-871.
- Takanashi, M., Takizawa, Y., 1988. New benzofurans related to eganol from immature seeds of *Styrax obassia*. *Phytochemistry* 27, 1224-1226.
- Vardar, V., Oflas, S., 1973. Preliminary studies on the *Styrax* oil. *S. Qual. Plant. Mater. Veg.* 22, 145-148.
- Zhang, M., Stout, M.J., Kubo, I., 1992. *Phytochemistry* 31, 247.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hasan Fatih MUTLU

Doğum Yeri : BURDUR

Doğum Tarihi : 15.08.1977

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise : 1992-1996 Gönen Anadolu Öğretmen Lisesi

Lisans : 1996-2000 S.Ü. Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği

Yüksek Lisans : 2001-..... S.D.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü

Yabancı Dil : İngilizce

İş Deneyimi:

2002-..... : M.E.B. Kimya Öğretmeni