

191296

T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

Polygala pruinosa Boiss. subsp. pruinosa J. Cullen
ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ÇALIŞMALAR

DOKTORA TEZİ

FARMAKOGNOZİ PROGRAMI

Eczacı
Erdem YEŞİLADA

ANKARA - 1979

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

Polygala pruinosa Boiss. subsp. pruinosa J.Cullen
ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ÇALIŞMALAR

DOKTORA TEZİ
FARMAKOGNOZİ PROGRAMI

Eczacı
Erdem YEŞİLADA

Rehber Öğretim Üyesi
Doç. Dr. Ekrem SEZİK

ANKARA-1979



Polygala pruinosa Boiss. subsp. pruinosa J.Cullen

Çalışmalarımın her safhasında değerli yardımlarını esirgemeyen hocam sayın Doç. Dr. Ekrem SEZİK'e, gösterdikleri yardım ve anlayıştan dolayı çalışma arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Yapı aydınlatma çalışmalarım sırasında gerekli analizlerin yapılmasını sağlayan Dr. Hilseyin ANIL (Bonn), Prof. Dr. Tetsuya KOMORI (Fukuoka), Dr. Eric KLEIN (Holtsminden-DRAGOCO), Prof. Dr. Junzo SHOJI (Tokyo)'ye ayrıca teşekkür ederim.

İ Ç İ N D E K İ L E R

Sayfa No:

GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
BOTANİK BÖLÜM	
<u>Polygalaceae</u> Familyası.....	3
<u>Polygala</u> Cinsi.....	7
<u>Polygala pruinosa</u> subsp. <u>pruinosa</u>	9
Yayılışı.....	12
Kök Morfolojik Özellikleri.....	14
Kök Mikroskopik Özellikleri.....	14
KİMYASAL BÖLÜM - TEORİK BİLGİLER	
Saponozitler.....	17
Genel.....	17
Steroidal Saponozitler.....	20
Triterpenik Saponozitler.....	21
İzolasyon ve Saflaştırma Yöntemleri.....	24
Ham Saponozitin Elde Edilmesi.....	26
Saponozit Karışımının Ayırımı.....	30
Kantitatif Tayin Yöntemleri.....	31
Yapı Tayin Yöntemleri	
Genel.....	36
Hidroliz Yöntemleri.....	38
Total Asit Hidroliz.....	38
Enzimatik Hidroliz.....	40
Mikrobiyolojik Hidroliz.....	40
Diğer Kimyasal Yöntemler.....	41
Aglikonun Yapısının Tayini.....	44
Asitlerin Yeri ve Yapıları.....	47
Ozların Teşhisi.....	48
Ozların Yapısının Tayini.....	49
Permetilleme.....	49
Kısmi Hidroliz.....	52
Periyodat Oksidasyonu.....	53

Diğer Yöntemler.....	53
Aglikon ve Oz Zinciri Arasındaki Bağın Cinsi ve Yerinin Tayini.....	53
Ozidik Bağların Konfigürasyonu.....	54
<u>Polygalaceae</u> Familyası Bitkilerinin Kimyasal Birleşimi:	55
Genel.....	55
<u>Polygala senega</u> Kökünün Yerine Kullanılabilecek Türler.....	57
Saponozitler	
<u>Polygala senega</u> Saponozitleri.....	60
<u>Polygala senega</u> var. <u>latifolia</u> Saponozitleri:	77
<u>Polygala senega</u> var. <u>typica</u> Saponozitleri....	82
Diğer Cins ve Türlerin Taşıdığı Saponozitler:	85
Oz ve Türevleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar.....	93
Lignanlar Üzerinde Yapılan Çalışmalar.....	101
Ksantonlar Üzerinde Yapılan Çalışmalar.....	105
Diğerleri	
Flavonozitler.....	111
Antosiyanozitler.....	112
Sabit Yağlar ve α - Spinasterol.....	113
Aminoasitler.....	114
Polifenoller.....	115
Alkaloitler.....	118
KİMYASAL BÖLÜM - PRATİK ÇALIŞMALAR	
MATERYAL.....	120
YÖNTEM	
Köpürme İndeksi.....	122
Hemoliz İndeksi.....	123
Saponozitler.....	
Genel.....	125
Solvan Sistemleri.....	125
Ekstraksiyon.....	125
Tanım.....	128
Saponozit Karışımından Pl'in Ayırımı.....	131

Diazometan Hazırlanması.....	134
Diazometan ile Saponozitin Metillenmesi.....	135
Yapı Tayini	
Genel.....	135
Aglikonun Elde Edilmesi ve Tanımı.....	137
Oz Zincirinin Yapısının Tayini.....	140
Total Hidroliz.....	140
Kağıt Kromatografisi.....	141
Gaz Kromatografisi.....	142
Alkali Hidroliz.....	144
Permetilleme.....	148
Permetillenmiş P1 Hidrolizatındaki Me- tillenmiş Ozların Ayırımı.....	152
Aglikonun Hidroksil Grubuna Bağlı Metil- lenmiş Ozlar.....	154
Aglikonun Karboksil Grubuna Bağlı Metil- lenmiş Ozlar.....	155
Oz Zincirinin Dallanma Noktasındaki Ozların Belirlenmesi.....	157
p-Metoksi Sinnamik Asit.....	160
Sakaroz.....	161
Poligalitol.....	162
BULGULAR.....	164
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	183
ÖZET.....	191
SUMMARY.....	193
LİTERATÜR.....	195
EKLER.....	214
İNDEKSLER.....	217

G İ R İ Ő V E A M A Ç

Triterpenik saponozit taşıyan bitkiler Türkiye'de geniş bir yayılış gösterir. Polygalaceae, Caryophyllaceae ve Primulaceae familyalarında bulunan bitkiler, bunların en yaygın olanları ve en önemlileridir. Polygalaceae familyası Türkiye'de sadece Polygala cinsi ile temsil edilmektedir (32). Polygala türlerinden elde edilen en önemli drog R. Senegae'dir. Bu drog P. senega'dan elde edilir. İki asıra yakın bir süredir ilaçların yapısına girmiştir. R. Senegae ekspektoran olarak kullanılmış ve kullanılmaktadır (85) (Ek -1, Ek -2). Son yıllarda P. senega'dan elde edilen saponozitlerin antifungal-antibiyotik (210) ve nezle virüsüne karşı antiviral etkilerinin (139) bulunduğu tespit edilmiştir. Diğer taraftan, Polygala türleri yetiştikleri ülkelerde halk ilacı olarak değişik gayelerle yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (7,85, 135). Bu da bu bitkilerin kullanılış şekillerinin doğru olup olmadığıni tespit ve yeni kullanılış alanlarının sağlanması için kimyasal yapılarının araştırılması gerektiği gerçeğini ortaya çıkarmaktadır.

Offisinal olan Polygala türü (P. senega) Türkiye'de bulunmamaktadır. Buna karşılık Polygala cinsinin 11 türü Anadolu ve Trakya'da yayılmıştır. Bulunan türlerden P. monspeliaca tek yıllık, diğer 10 tür iki veya çok yıllıktır. Bu türlerin en yaygınları P. pruinosa ve P. anatolica dir. (32). P. pruinosa'nın iki alt türü Türkiye'de bulunmaktadır : megaptera ve pruinosa. Bu alt türlerden megaptera çok dar bir alanda yetişmektedir (İsparta-Dedegöl civarı, Konya) (32). P. pruinosa subsp. pruinosa bitkisi ise P. anatolica

lica'dan daha büyük köklere sahiptir ve yetiştiği bölgelerde P. anatolica'ya göre daha büyük topluluklar halinde bulunmaktadır. Diğer taraftan ön denemelerimiz bize taşıdığı ham saponozit oranının P. anatolica'dan fazla olduğunu da göstermiştir. Bu yüzden, P. pruinosa subsp. pruinosa üzerinde farmakognozیک bir araştırma yapılması planlanmıştır.

P. anatolica ve P. pruinosa'nın yaygın olması daha önce T. BAYTOP'un da dikkatini çekmiş ve bu türler üzerinde kimyasal araştırmalar yapıp R. Senegae yerine kullanılabilcek bir droğun tespiti gereğine işaret edilmiştir (10). Bu da, bu araştırmaya yönelişimizi doğrulayan bir husustur. Diğer taraftan P. senega yetişmeyen bazı ülkelerde de yaptığımız araştırmaya benzer araştırmalar ile offisinal olabilecek Polygala türlerinin kimyasal yapısı aydınlatılmaya çalışılmıştır (16,17,24,63, 73,167,202).

Yukarıda kısaca belirtilen hususlar göz önüne alındığında, araştırmamızın amacı belirlenmiş olmaktadır: Köklerin etken maddesi olan ana saponozitin yapısını aydınlatmak, bitkinin botanik, köklerin anatomik özelliklerini ve köklerin farmakope standartları bakımından önemli fizikokimyasal özelliklerini tespit etmek. Araştırmamız yukarıda belirtilen gayeyi gerçekleştirmeye yönelik olarak yürütülmüştür.

BOTANİK BÖLÜM

B O T A N İ K B Ö L Ü M

Polygalaceae Familyası

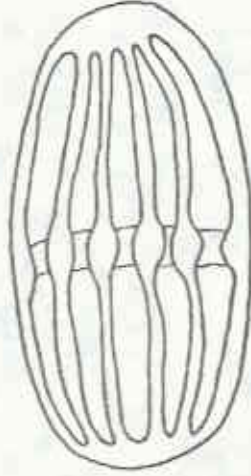
Genellikle otsu, çalimsı, nadiren küçük ağaçlar veya tırmanıcı, sarılıcı, klorofilsiz ve saprofit (Malaya'da yetişen Epirrhizanthus türleri) bitkilerdir.

Yapraklar genellikle alternan, bazen oppozit, nadiren vertisillat, basit, ekseri stipulasız, nadiren kısa diken şeklinde stipulalı.

Çiçekler hermafrodit, zigomorf. Her çiçek tabanında 1 brakte ve 2 brakteol taşır. Çiçek durumu spika veya rase-moz, bazen panikula. Kaliks zigomorf, imbrikat. Sepaller 5(4-7), korisepal, içteki 2 sepal dıştakilerden daha büyük ve petaloit. Petaller genellikle 3, nadiren 5; 2 tanesi üstte, diğeri altta yer almış, sinpetal. Alttaki petal kayık şeklinde, genellikle tamamen veya kısmen androkeum ile birleşmiş.

Stamenler 8(-10), bazen beşli 2 halka meydana getirmiş, genellikle hepsi (nadiren 3-7) tüp şeklinde birleşmiş

(monadelf). Anterler bazifiks, 1-gözlü, apikal veya subterminal bir por ile açılır. Nadiren görülen 2-gözlü anterler uzunlamasına yarıdır. Polen şekilleri çok karakteristik ve CHODAT'a göre (79) familyanın en belirgin özelliğidir. Polenler elipsoidal ve tepesinde bir çukur taşır, dikey bantlar ekvatoryel bir halka ile kesilir (Şekil - 1).



Şekil - 1

Polygala alba-Polen^a

Ovaryum üst durumlu, pistil 1, karpel ve lokulus genellikle 2 (bazen 1,3 veya 5); plasentasyon aksilar. Her lokulus tek ovüllü (nadiren 2-6), ovüller sarkık, anatrop. Stilus 1, stigma (veya stigma lobları) karpel sayısı kadar. Meyva 2-tohumlu lokulusit kapsula, nadiren samara, nuks veya drupa. Tohumlar ekseri tüylü, genellikle arilluslu; embriyo düz ve merkezi, endosperma mevcut.

^a: R.O.Kapp, *How To Know Pollen and Spores*, W.M.C. Brown Company Publishers (1969).

Polygalaceae, DATTA (31) ve DRAGENDORFF (47) tarafından Geraniales, HAYEK (78) ve RENDLE (141) tarafından Terebinthales (Sapindales), BENTHAM ve HOOKER (141) tarafından Parietales ve Caryophyllinae, ENGLER (54) tarafından ise Rutales ordosunun Polygalinae subordosunda incelenmiştir. CHODAT sistematik durumdaki bu değişiklikleri açıklamış ve familyanın diğerleri ile yakınlık gösteremeyecek kadar özel karakterleri olduğunu belirtmiştir (79). Bu nedenle taksonomik değer itibariyle en iyi tasnif sistemi HUTCHINSON'un kabul ettiği şekilde (87) Polygalales ordosu içinde incelemektedir. Bu ordoda Polygalaceae'den başka Trigoniaceae ve Vochysiaceae familyaları bulunmaktadır.

Familya, 10 cins ve 800 kadar türü ile geniş bir yayılış gösterir. Yeni Zelanda ve Güney Pasifik Adalarının Güney Kutbuna; Asya ve Amerikanın Kuzey Kutbuna yakın kısımları dışında bütün dünyada yayılmıştır. Üç alt familyaya ayrılarak incelenebilir:

- a. Polygaleae: kaliks serbest, stamenler tüp şeklinde birleşmiş,
- b. Xanthophylleae: kaliks serbest, stamenler tüp şeklinde birleşmemiş,
- c. Moutabeae: kaliks korolla ile birleşmiş.

Son iki alt familyaya dahil birer cins bulunmaktadır; Xanthophyllum Roxb. ve Moutabea Aubl., Kuzey Avustralya ve Hindistan'da 40 türü bulunan Xanthophyllum Roxb. cinsi, bazen 15 m'ye kadar yükselebilen ağaçlardır. Bazı sistematik-

çiler (204) familyanın bazı genel özelliklerinden gösterdiği farklılık nedeniyle, bu cinsi ayrı bir familya olarak düşünmüşlerdir (Xanthophyllaceae). Polygaleae alt familyasına dahil cinsler stamen sayısına göre sınıflandırılabilir:

<u>Stamenler Sayısı</u>	<u>Cinsler</u>
(4 + 4)	<u>Polygala</u> , <u>Bredemeyera</u> , <u>Securidaca</u> ,
(7) veya (5)	<u>Muraltia</u> , <u>Mundia</u> , <u>Carpolobia</u> ,
(4-5)	<u>Salomonina</u> (= <u>Epirrhizanthus</u>).

475 türü ile Polygala (Tournef.) L. bu familyanın en önemli cinsidir. Bredemeyera Willd. daha çok Güney Amerika, Avustralya ve Antillerde yetişen, familyanın diğer önemli bir cinsidir. Securidaca L. cinsi 30 türü bulunan tropikal bir sarmaşıktır. Salomonina Lour. (= Epirrhizanthus Bl.) cinsi pulsu yaprakları ve terminal spikaları bulunan klorofilsiz küçük saprofit bitkilerdir. Güney Çin, Japonya, Endonezya civarında yayılmışlardır. Carpolobia G.Don sadece Güney Afrikada yetişir. Monnina Ruiz et Pavon, Diclidanthera Mart. ve Comesperma Labill. familyanın önemli olmayan cinsleridir.

Polygala Cinsi

Polygala, Grekçe *polys-* (çok) ve *gala* (süt) kelimelerinden türemiştir. Bu ismin süt verimini arttırıcı olarak kullanılması sebebiyle verildiği düşünülebilir. Diğer dillerde de genellikle latince adına benzer şekilde isimlendirmeler yapılmıştır (ital. Poligala, İng. Milkwort, Fr. Herbe au lait, Alm. Kreuzblume).

Bir veya çok senelik, bazen çalimsı, otlardır. Yapraklar alternan, tam kenarlı veya kenarlarda çok az parçalı, stipulasız, sarmal dizilişte.

Çiçekler, zigomorf, brakteli ve iki brakteollü; terminal veya aksilar rasemoz durumunda, hipogin. Kaliks kalıcı, sepaller 5 serbest (korisepal); "kanat" adı verilen içteki iki sepal büyük ve petaloit, dıştaki 3 sepal ise daha küçük, "kayıkçık" şeklinde, genellikle yeşil. Petaller 3, alt kısımları birleşmiş, gemi omurgası şeklinde bir korolla tüpü, üst kısımları ise serbest ve genellikle 2 petal birleşip "saçaklı ibik" meydana getirmiştir.

Androkeum 6-8 stamenden meydana gelmiş, filamentler 1 veya 2 grup halinde kısmen veya tamamen birleşip staminal tüp meydana getirmiş. Staminal tüp arka kısımda, filamentlerin birbiri ile tamamen birleşmemesinden doğan, bir "yarık" meydana getirmiş ve korolla tübü ile kısmen birleşmiş.

Polygala pruinosa Boiss. subsp. pruinosa J.Cullen

Syn.: P.ramulosa Boiss et Bal.

Polygala pruinosa subsp. pruinosa, E.BOISSIER tarafından P.ramulosa olarak isimlendirilmiştir. J.CULLEN "Flora of Turkey" (32) de bu türü P.pruinosa ile birleştirmiş ve Türkiye'de bu bitkinin 2 alt türü bulunduğunu kabul etmiştir. Bu alt türlerin birbirinden ayırımı şu şekilde yapılır:

- a1. Kapsulanın kanatları 0.5-1 mm genişlikte, rasemler (7) 10-30 çiçekli, çiçek açma zamanı nisan-temmuz..... subsp. pruinosa.
- a2. Kapsulanın kanatları 2-3 mm genişlikte, rasemler 5-10 çiçekli, çiçek açma zamanı temmuz-ağustos..... subsp. megaptera.



Şekil - 2

Polygala pruinosa Boiss.subsp. pruinosa J.Cullen

Polygala pruinosa subsp. pruinosa'nın özellikleri aşağıda verilmiştir.

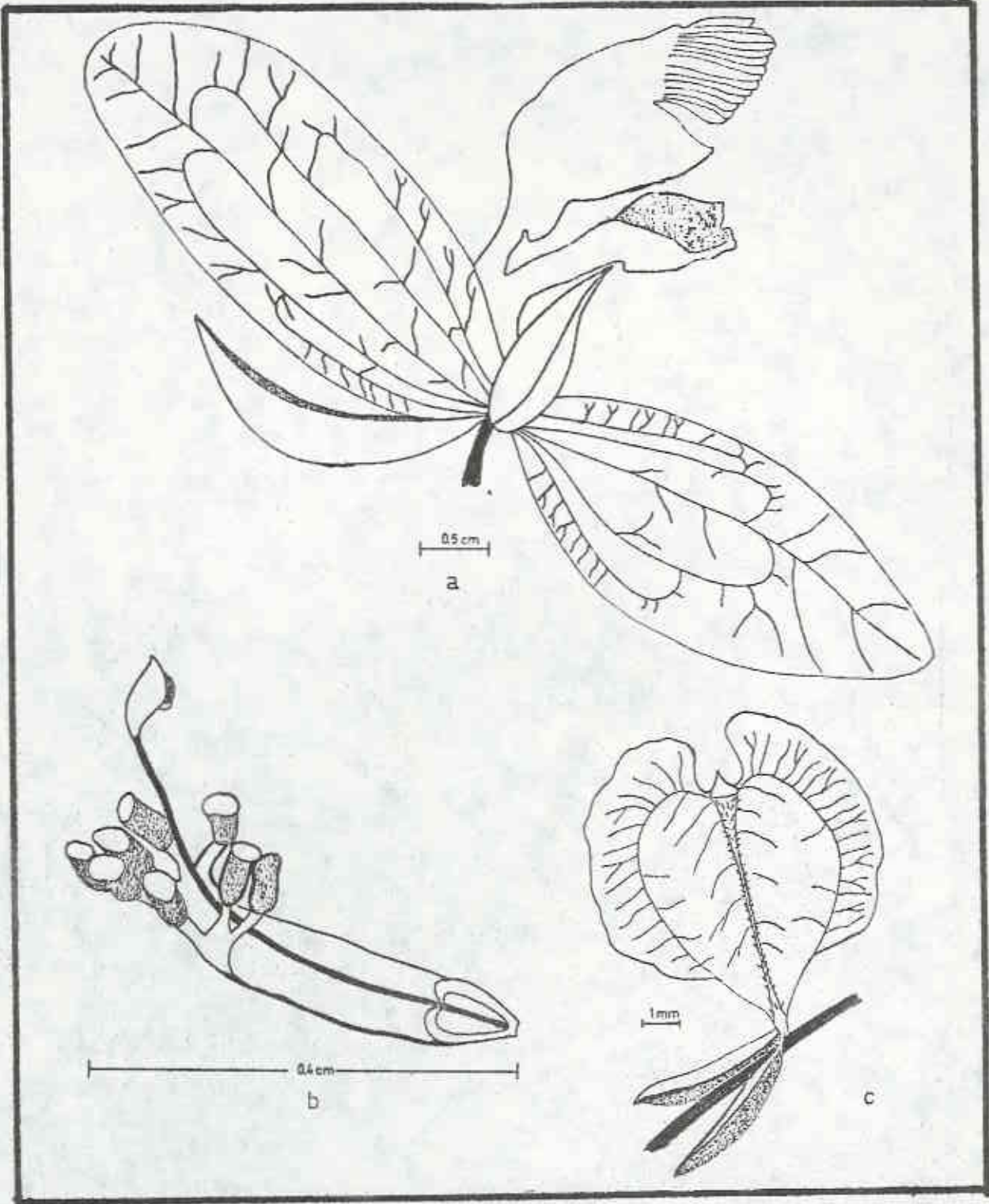
Bitki, çok senelik; Gövde yükselici, pubenkens. Alt yapraklar ovattan obovata; üst yapraklar eliptikten lineara kadar değişen şekillerde. Üst yapraklar alt yapraklardan daha büyük. Rasemler genellikle terminal, seyrek (7) 10-30 çiçekli. Brakte 3 tane, pediselden kısa, yeşil bazen morumsu. Pedisel seyrek tüylü. Dış sepaller dış bükey. İç sepaller oblong-obovat, mavimsi-mor, çok kısa saplı, belirgin damarlı, damarlar orta damardan çıkmış ve tekrar orta damar ile, genellikle uca doğru, birleşmiş (anastomoz). Korolla iç sepaller kadar veya biraz kısa. Stamen 8; anterler kısa saplı, filamentler 3/4'üne kadar birleşerek tüp teşkil etmiş. Polenler anterin üst kısmından kapakla dökülür. Meyva kapsula, sapsız, obkordat, kanatları 0.5-1 mm genişlikte, farklı uzunlukta (13,32).



Şekil - 3

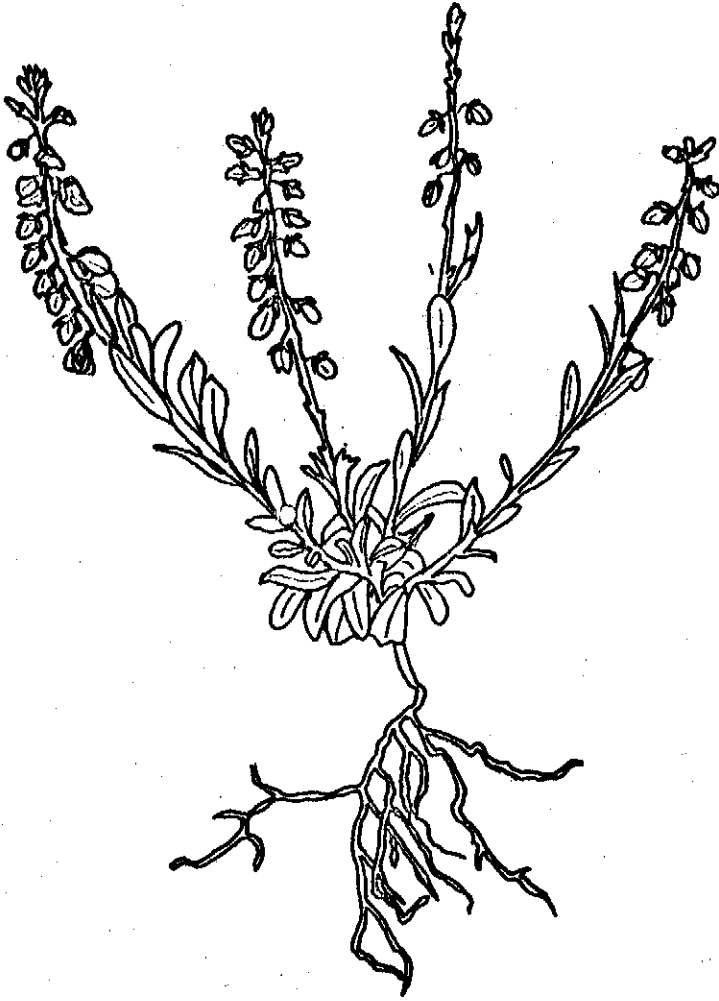
P. pruinosa Boiss. subsp. pruinosa J.Cullen

Meyva



Şekil - 4

P. pruinosa subsp. pruinosa-Çiçek ve Meyva Kısımları
a) Çiçek b) Ovaryum ve Androkeumunun Durumu
c) Meyva



Şekil - 5

Polygala pruinosa Boiss. subsp. pruinosa J. Cullen



Şekil - 6

Polygala pruinosa Boiss subsp. pruinosa J.Cullen-Habitat

Yayılişı

A3 Bolu : Abant Gölü civarı, çeşme arkası tepeler,
11.5.1975, E. Sezik, E.Yeşilada, İ.Çalış, (HÜEF 548!), Zon-
guldak: Kozlu'nun 10 km batısı, Davis, (D.37544) (32), Ankara:
Ankara-Ayaş yolu, 44.ncü km, yol kenarı, 15.5.1979, E.Yeşil-
ada, A. Başaran, (HÜEF 1610 !), A5 Amasya: Amasya, 4-600 m,
Bormüller (181,2727) (32), A6 Tokat : Tokat, Nöe. (32),
B2 Kütahya : Gediz, 850,m, Davis, (D.36906) (32), B3 Afyon:
Sultandağı, mezarlık arkası, tepeler, 1200 m., 19.6.1973.
İ. Çalış, E. Yeşilada, (HÜEF 497!), Afyon: Sultandağı, Kırçalı

Köyü arkası, tepeler, 9.6.1974, E.Yeşilada, (HÜEF 660 !),
Afyon: Afyon-Dinar yolu, Dinar'ın 12 km kuzeyi, ca.1050 m,
11.6.1975, R.Çetik, (ANK 3520 !), Eskişehir: Eskişehir,
800 m, Krause, (40) (32), B4 Ankara: Beynam Ormanı, 14.6.1975,
E.Sezik, (HÜEF 711!), B5 Kırşehir: Mucur, Davis, (D.21826)
(32), Kırşehir: Mucur, Davis, (D.21826) (32), Kırşehir, Mu-
cur, 17.6.1954, (ANK 21826!), Kayseri: Erciyes Dağı'nın ku-
zey yamaçları, Bozdağ, Ana kaya ca.2200 m, 15.7.1974, R.Çe-
tik (ANK 4123!), B6 Sivas: Gürün, 1400 m, Stn., Hend., (5216)
(32), B7 Elazığ: Elazığ-Pertek arası, 1000 m m, Davis,
(D.29170) (32), C2 Antalya: Elmalı, Bourgeau, (106) (32), C3
Burdur: Bucak, 1000 m, Little, (208) (32), Konya: Şarkikara-
ağaç, Feleköy, Kel Yayla, 2000 m, 13.6.1975, A.Çubukçu,
E.Yeşilada, (HÜEF 710!), Konya: Üzümlü, yol kenarları,
7.6.1978, A.Çubukçu, E.Yeşilada, A.Başaran, (HÜEF,1426!),
C4 Konya: Konya-Beyşehir yolu, Beyşehir'e 58 km kala, yol
kenarı ve yamaçlar, 6.6.1978, E.Yeşilada, H.Koçak, (HÜEF
1425!), Antalya: Ovacık-Söğütçüması arası, 1100-1300 m.
Davis, (D.15232) (32), Adana: Bürücek, 1800 m, Balls (B.1246)
(32), C6 Maraş: Fevzi Paşa'nın 25 km batısı, 750 m, It.leyd.
(1959: 1352) (32), C8 Mardin: Halak, Chiovenda (32).

Kök

Morfolojik Özellikler

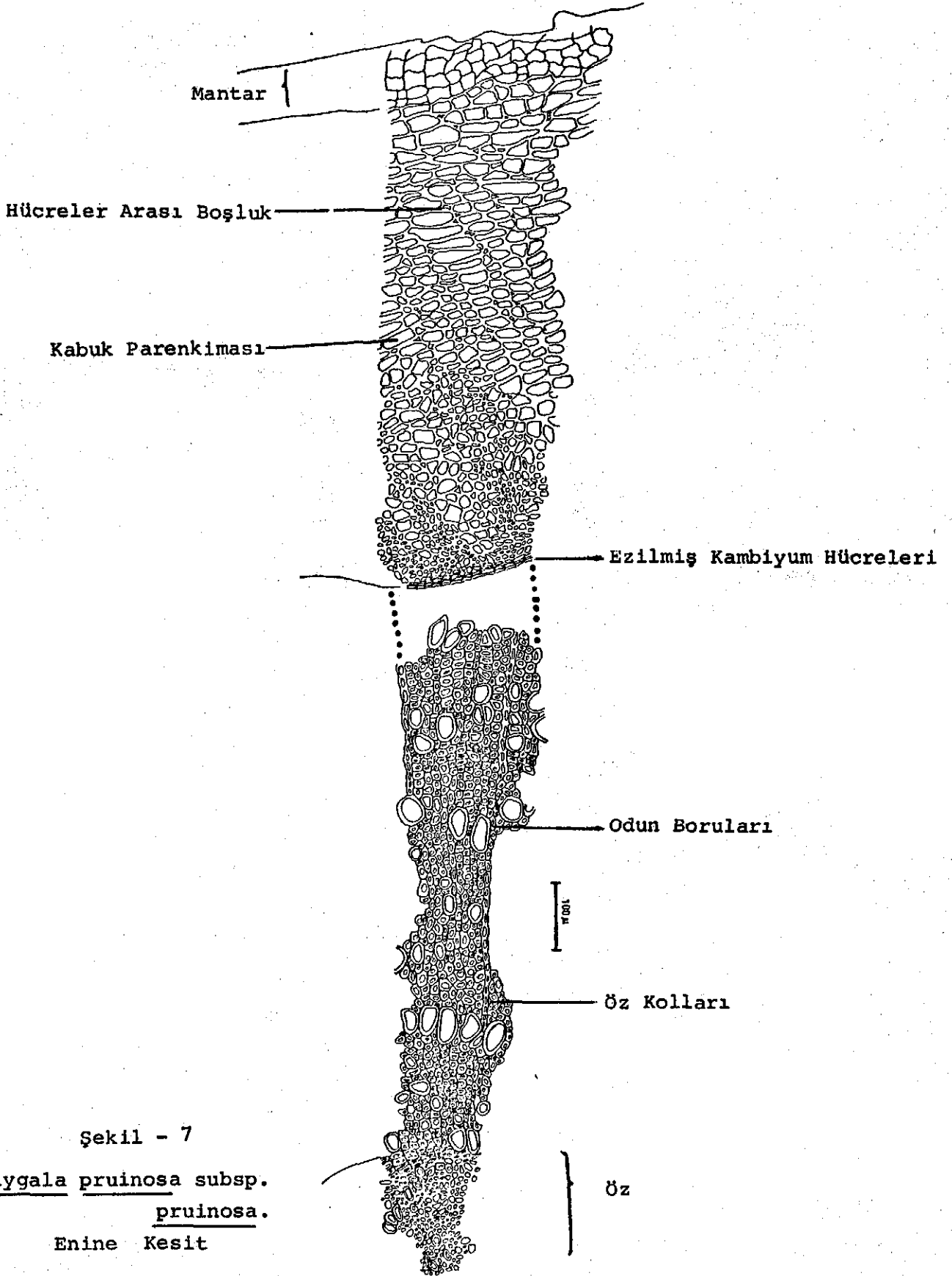
Dışta mantar tabakası devamlı, açıktan koyu kahverengine kadar değişen renklerde, Gövdeye en yakın kısımda 0,1-1 cm çapta; 8-16 cm uzunluğunda, uca doğru daralmakta. Yan kökler 0,02 - 0,1 cm çapında, seyrek, taze halde çok esnek, düzgün kırılmaz; kuruyunca kolayca düzgün olarak kırılabilir.

Mikroskopi

Sabit yağ taşıyan parenkima hücreleri çok sayıda, değişik büyüklük ve hafif kalınlaşmış çeperleri var, enine kesit olanlarda yuvarlak veya oval, hücrelerin aralarında üçgen veya dörtgen şeklinde hücreler arası boşluklar var, boyuna kesit olanlarda hücreler uzamış ve uçları genellikle sivrilmiş.

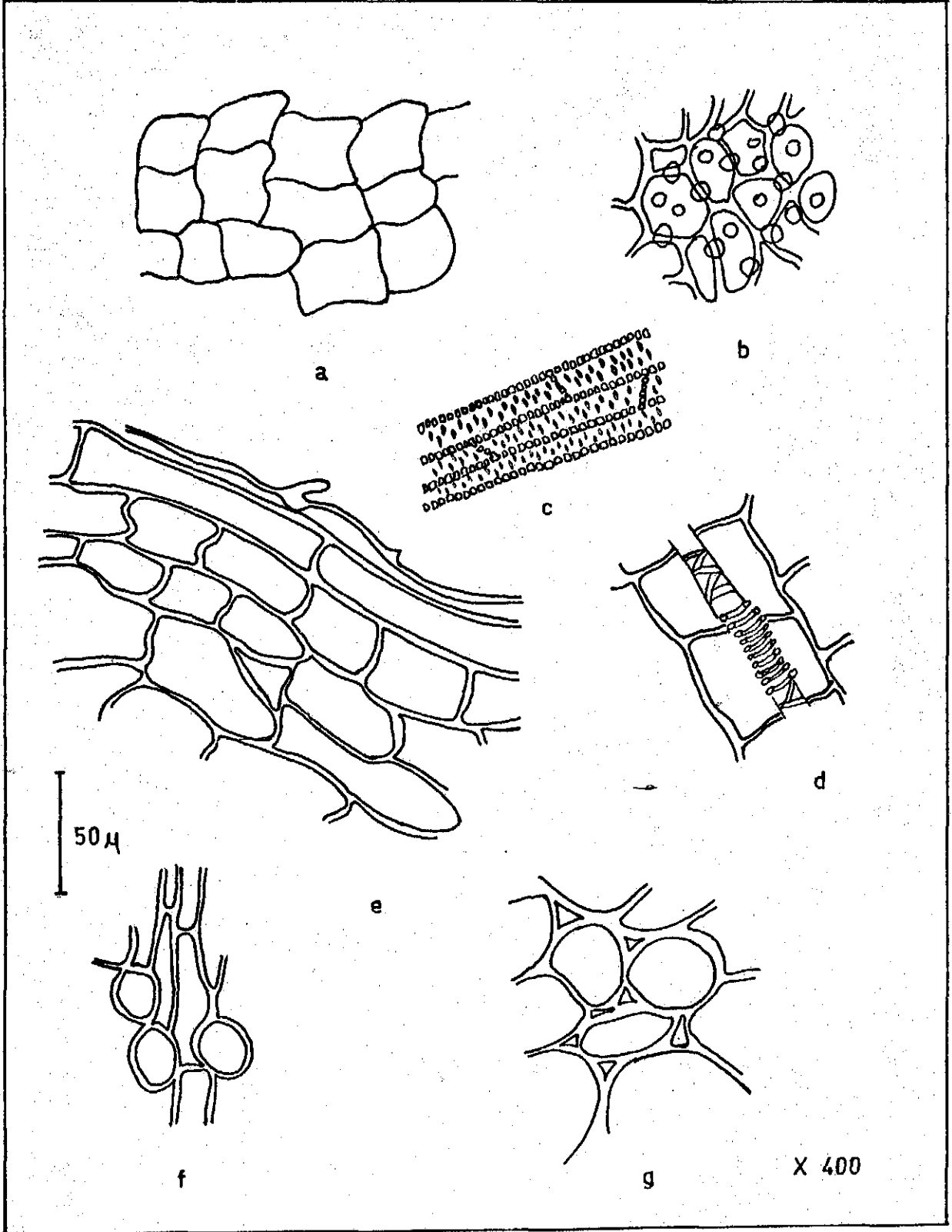
Sarımsı-kahverengi görünüşte mantar tabakası ince çeperli hücrelerden meydana gelmiş, uzamış dörtgen şeklinde.

Odun boruları ve trakeitler genellikle gruplar halinde ve çok sayıda, büyük odun boruları ağsı kalınlaşmış görünüşte, küçük olanlar ve trakeitler çok sayıda yarık şeklinde delikler taşımakta (Şekil-7, Şekil-8).



Şekil - 7

Polygala pruinosa subsp.
pruinosa.
Enine Kesit



Şekil - 8

P. pruinosa Boiss. subsp. pruinosa J. Cullen

Kök Tozu Elementleri

- a) Mantar, b) Sabit Yağ Taşıyan Parenkima Hücreleri,
c) Trake, Trakeit, Ksilem Parenkiması d) Kabuk Parenkiması ve
Trakeit, e) Trikom ve Kabuk Parenkiması, f) Kabuk Parenkiması
g) Kabuk Parenkiması

K İ M Y A S A L B Ö L Ü M
T E O R İ K B İ L G İ L E R

K İ M Y A S A L B Ö L Ü M
T E O R İ K B İ L G İ L E R

Saponozitler

Genel

Saponozitler, sulu çözeltileri çalkalandığında kalıcı köpük veren, alyuvarları hemoliz eden, genellikle triterpenik ve steroidal bir aglikona sahip heterozitlerdir. Yukarıda belirtilen özelliklerin yanında kolesterin ile kompleks meydana getirmeleri, soğuk kanlı hayvanlar, özellikle balıklar, üzerinde toksik etki ve son zamanlarda tespit edilen antifungal-antibiyotik aktiviteleri tipik özellikleri arasında sayılabilir (190,210,212).

Saponozitler, önceleri sadece bitkiler aleminde bulunduğu zannedilirdi. Son zamanlarda yapılan çalışmalar bazı deniz hayvanlarında da bulunduğunu [Echinodermata (derisi dikenliler), Holothuroidae, (deniz kadayıfı), Asteroides (deniz yıldızı) familyaları] göstermiştir (190).

Saponozitler, renksiz, kokusuz, amorf, optikçe aktif maddelerdir. Genellikle suda kolay, metanol ve etanolde, sapon-

nozitin tipine göre, farklı oranda çözünürler. Daha az polar organik solvanlarda çok az veya hiç çözünmezler.

Saponozitler, O-heterozitleridir. Hidrolizleri ile aglikon (sapogenol) ve ozlara ayrılırlar. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar oz kısmına *D-glikoz, D-galaktoz, D-ksiloz, D-fukoz, L-ramnoz, L-arabinoz, D-kinovoz, D-gliküronik asit, D-galak-türonik asit ve riboz* bulunduğunu göstermiştir (82,190). Saponozitlerin aglikonu steroidal veya triterpenik yapıda olabilir. Steroidal alkaloitler de son zamanlara kadar bir üçüncü tip olarak incelenmekteydi. Ancak azotun bazik karakteri nedeniyle, yakın kimyasal yapılarına rağmen ayrı bir grup olarak kabul edilmişlerdir.

Saponozitler aşağıdaki gibi sınıflandırılırlar (190):

I. Steroidal Saponozitler

- A. Spirostanol Saponozitler
- B. Furostanol Saponozitler
- C. Nuatigenin Saponozitler
- D. Polipodo Saponozitler

II. Triterpenik Saponozitler

A. Monodesmozidikler

- 1. Nötral Saponozitler
- 2. Ester Saponozitler
- 3. Asidik Saponozitler

a. Üronik Asit Taşıyanlar

b. Asit aglikonlu Saponozitler

c. Aglikonu Asidik Olan ve Üronik Asit Taşıyan

Saponozitler

4. Açıl Saponozitler (Açilozitler)

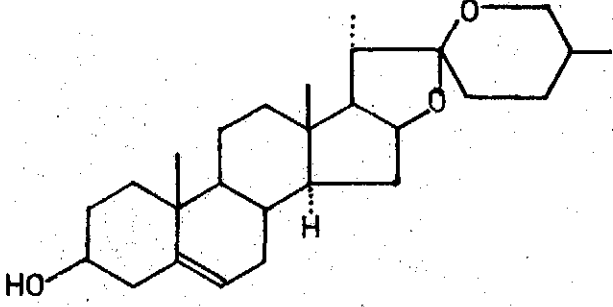
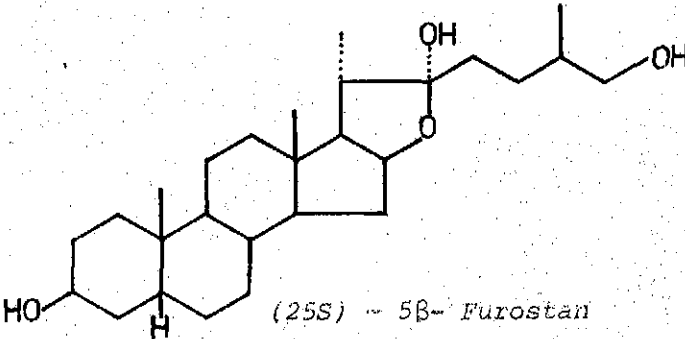
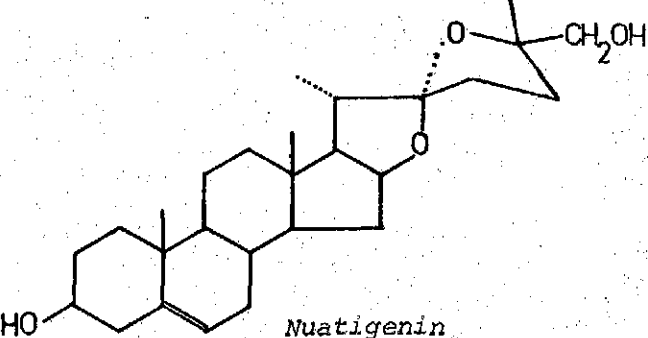
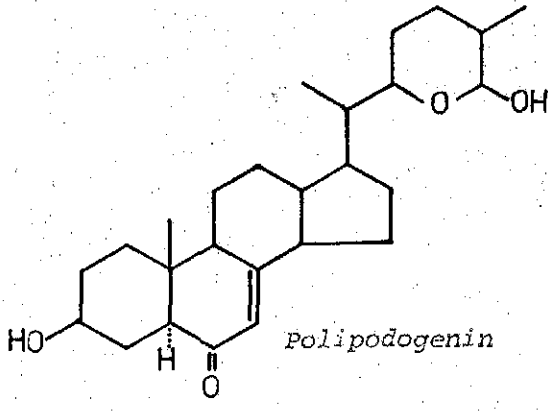
B. Bisdesmozidikler

1. Nötral Bisdesmozidikler

2. Asidik Bisdesmozidikler

C. Hayvansal Saponozitler

I. Steroidal Saponozitler

<p>A. STEROSTANOL SAP.</p> <p><i>Scrophulariaceae,</i> <i>Dioscoreaceae,</i> <i>Liliaceae, Solanaceae</i> (<i>Anemarrhena, Metanarthe-</i> <i>tikum</i>) <i>Amaryllidaceae</i></p>	 <p><i>Diosgenin</i></p>
<p>B. FUROSTANOL SAP.</p> <p><i>Liliaceae,</i> <i>Scrophulariaceae,</i> <i>Dioscoreaceae,</i></p>	 <p>(25S) - 5β- Furostan 3β, 22α, 26 - triol</p>
<p>C. NUATIGENİN SAP.</p> <p><i>Graminae,</i> <i>Solanaceae</i></p>	 <p><i>Nuatigenin</i></p>
<p>D. POLİPODO SAP.</p> <p><i>Polypodiaceae</i></p>	 <p><i>Polipodogenin</i></p>

Tablo - 1

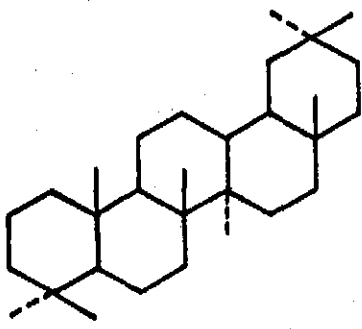
Steroidall Saponozitlerin Sınıflandırılması

II. Triterpenik Saponozitler

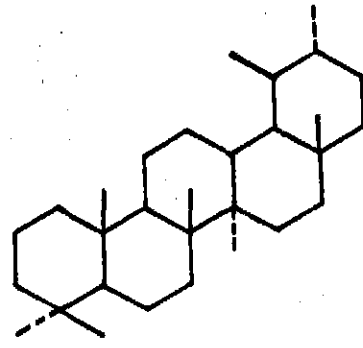
Triterpen terimi, 6 izopren ünitesinden oluşan 30 karbon atomu taşıyan bir grup doğal ürüne verilen isimdir. Ancak, son yıllarda 30 dan az veya fazla karbon atomu ihtiva eden ve tam anlamıyla izopren kaidesine uymayan, fakat triterpenik karakterde maddelerde izole edilmiştir (61).

Bitkiler aleminde çok geniş bir yayılış gösterirler. En az 500 bitki türünde triterpenik yapıda saponozitlerin varlığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar bu saponozitlerin daha çok β -amirin grubu olduğunu göstermiştir. Ursan ve dammaran türevi saponozitlere ait bir kaç saponozitin de yapısı tayin edilmiştir. Diğer triterpenik saponozitler, hopan, lanostan ve lupeol tip aglikon taşıyanlar üzerinde çalışmalar ancak son zamanlarda artmıştır. (Tablo -2).

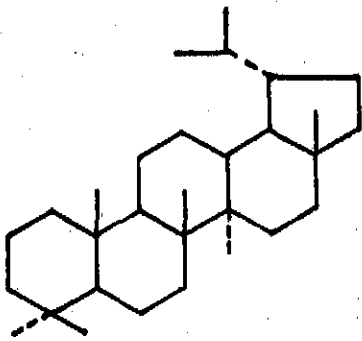
β -Amirin tipine ait şimdiye kadar bilinen bütün saponozitler, C-3 atomunda bir hidroksil grubu taşırlar. Diğer hidroksil grupları genellikle D ve E halkalarında C-16,21 ve 22, nadiren C-2 (presenegenin) ve C-15 (barrigenol A₁ ve R₁)'den bağlanmıştır. β -Amirin halka sistemine bağlı 8 metil grubundan bilhassa 23/24,29/30 ve 28 nolu metil grupları yüksek oksidasyon basamağındadır. Bunlar hidroksil veya karboksil, nadiren de, aldehit grubuna dönüşmektedir. Keza, pentasiklik halka sisteminde çok farklı yerlerde keto fonksiyonunun bulunduğu da görülmektedir (glisiretik asit C-11 keto grubu). β -amirin tipi aglikonlarda çift bağ varsa bu genellikle C-12



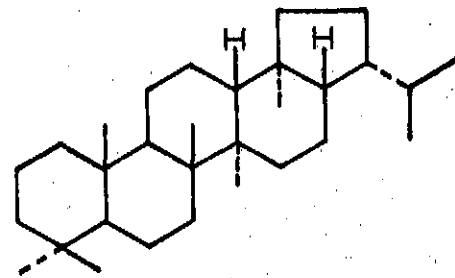
Oleanan



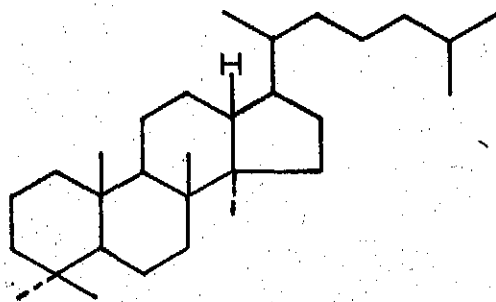
Ursan



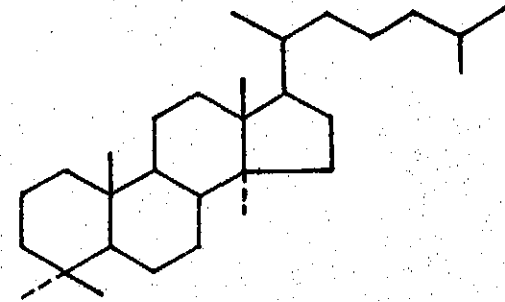
Lupan



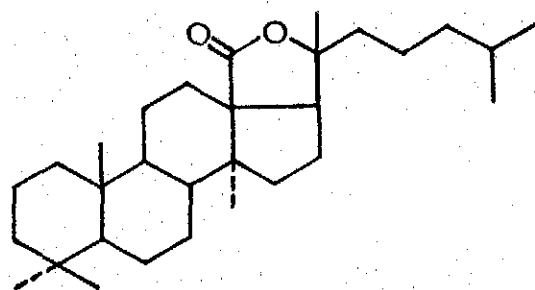
Hopan



Dammaran



Lanostan



Holostan

Tablo - 2

Triterpenik Aglikon Tipleri

ve C-13 arasındadır. Nadiren saponozitler görülebilir (morolik asit $\Delta^{18(19)}$). Saponozitlerde epoksit köprülerinin bulunduğu da kayıtlıdır ve C-13 ve C-28 arasında görülür. Bu durumlarda çifte bağ kaybolur (siklamiretin A) veya Δ^{11} 'e kayar (saikogenin) (209).

Aglıkona bağlı ozlar bir veya daha fazla sayıda, düz veya dallanmış, bir veya iki bağımsız zincir halinde bulunabilir. WULFF (212) bu durumu belirlemek amacıyla "monodesmozidik" ve "bisdesmozidik" terimlerini öne sürmüştür^a. C-3 hidroksil grubu üzerinden ozidik bağ ile bağlanmış tek oz zinciri taşıyan saponozitler monodesmozidik, C-17 karboksil grubuna O-açıl ozidik olarak bağlanmış ikinci bir oz zinciri taşıyan saponozitler ise bisdesmozidik olarak tanımlanmışlardır. Daha sonra TSCHESCHE ve WULFF (186), monodesmozidiklerin "in" ve bisdesmozidiklerin "id" soneki ile isimlendirilmesi suretiyle kolaylıkla tanımlanabileceklerini öne sürmüşlerdir (parillin, sarsaparillozit). Dammaran tipi saponozitlerde ise farklı olarak her iki oz zincirinin de aglıkona ozidik bağla bağlandığı görülmüştür (212).

Son zamanlarda, alkali hidroliz suretiyle organik asit ortaya çıkan saponozitler de izole edilmiştir. Ester saponozitler olarak isimlendirilen bu grup saponozitlerde organik asit aglikonun ve aglıkona bağlı ozların hidroksil grubu ile esterleşmiştir. Yapılan araştırmalarda şimdiye kadar bulunan organik asitler; *formik asit, asetik asit, n-butirik*

^a *desmos* = zincir

asit, izobütirik asit, izovaleryanik asit, α -metil bütirik asit, anje-
lik asit, 4-metoksi-sinnamik asit, 3,4-dimetoksi-sinnamik asit, 3,4,5-
trimetoksi-sinnamik asit, ferulik asit ve N-metil-antranilik asit'tir(212).

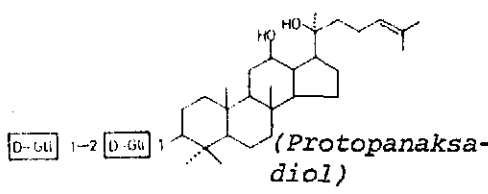
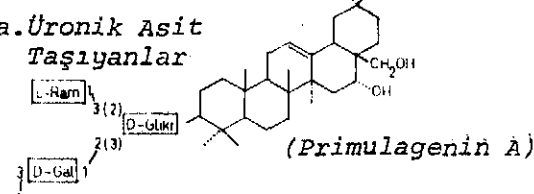
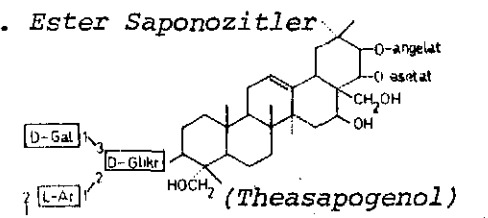
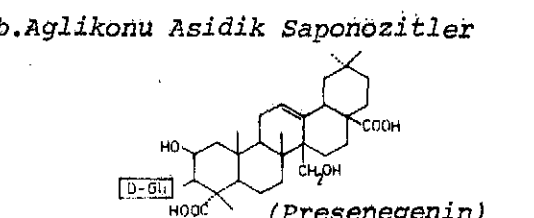
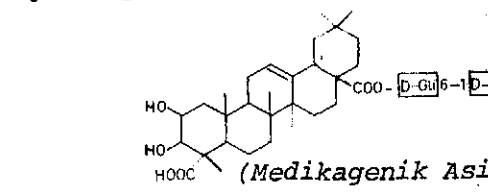
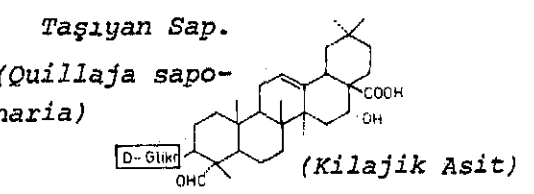
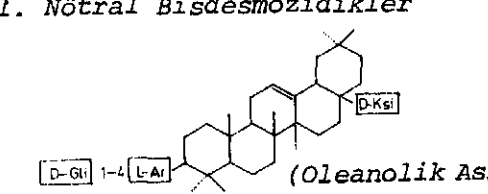
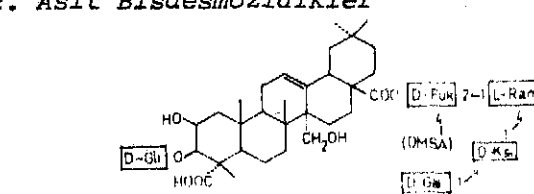
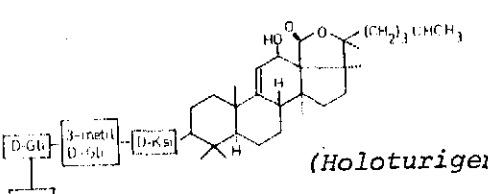
Teorik bilgilerde, Bilim Dalımızda daha önce yapılan araştırmalarda (20,29,182) geniş bir şekilde incelendiği için, tekrarlardan kaçınmak üzere sadece izolasyon ve yapı tayini ile ilgili bilgiler verilmiştir.

Triterpenik saponozit tiplerine ait örnekler (Tablo-3) de incelenmiştir:

Izolasyon ve Saflaştırma Yöntemleri

Saponozitler buldukları bitkilerde, tabiattaki di-
ğer maddelere göre, oldukça yüksek oranda bulunurlar. Ancak tabiattan karışım halinde elde edilebilirler. Bu karışım, saponozit yanında, oligoholozitleri, bazı fenolik maddeleri, anorganik maddeleri vs. taşır. "Ham Saponozit Karışımı"ndan bu yan maddelerin uzaklaştırılmasından sonra elde edilen kıs-
ma "Saponozitler Karışımı" adı verilir.

Saponozitler karışımından her saponozitin ayrı ayrı elde edilmesi zor ve uzun süren işlemlerin ardarda uygulanma-
sını gerektirir. Çünkü saponozit taşıyan bir bitkide, genel-
likle oz zincirindeki küçük farklılaşmalardan ileri gelen, polariteleri birbirine yakın, dolayısıyla kromatografik dav-
ranışları büyük benzerlik gösteren saponozitler bulunmakta-
dır.

A. MONODESMOZİDİK SAPONOZİTLER	
<p>1. Nötral Saponozitler</p>  <p>(Protopanaksadiol) Ginsenosid-R₂ (<i>Panax ginseng</i>)</p>	<p>4. Asit Saponozitler</p> <p>4a. Üronik Asit Taşıyanlar</p>  <p>(Primulagenin A) Primulasaponin (<i>Primula elatior</i>)</p>
<p>2. Ester Saponozitler</p>  <p>(Theasapogenol) Theasaponin (<i>Thea sinensis</i>)</p>	<p>4b. Aglikonu Asidik Saponozitler</p>  <p>(Presenegenin) Tenuifolin (<i>Polygala tenuifolia</i>)</p>
<p>3. Açıl Saponozitler</p>  <p>(Medikagenik Asit) Hernariasaponin I (<i>Hernaria glabra</i>)</p>	<p>4c. Aglikonu Asidik ve Üronik Asit Taşıyan Sap.</p> <p>(Quillaja saponaria)</p>  <p>(Kilajik Asit) Kilajik Asit gliküronit</p>
B. BISDESMOZİDİK SAPONOZİTLER	
<p>1. Nötral Bisdesmozidikler</p>  <p>(Oleanolik Asit) Kalendulozit B (<i>Calendula officinalis</i>)</p>	<p>2. Asit Bisdesmozidikler</p>  <p>(Presenegenin) Senegin II (<i>Polygala senega</i> var. <i>latifolia</i>)</p>
C. HAYVANSAL SAPONOZİTLER	
 <p>(Holuturigenin) Holuturin A (<i>Holothuridae</i>)</p>	

Tablo - 3
Triterpenik Saponozit Tipleri

Saponozit taşıyan bitkilerdeki saponozitlerin elde edilmesi için klasik kitaplarda genel yöntemler verilmişse de izolasyonun yapıya göre değiştiğini belirtmek gerekir. Teorik bilgilerin bu kısmında elde etme yöntemleri hakkında geniş bir bilgi verilmiştir. Bu yöntemlerin uygun şekilde düzenlenmesi ile iyi bir ayırım sağlanabilir.

Izolasyon işlemleri iki ana grupta toplanabilir:

- a. Ham saponozitin elde edilmesi ve mümkün olduğu kadar saponozit dışı maddelerin temizlenmesi,
- b. Saponozitler karışımının kromatografik ayırımı.

a. Ham Saponozitin Elde Edilmesi

Ham saponozitin elde edilmesinde genel ilke, bitki numunesinden uygun solvanlarla yapılan tüketmeyi takiben, çöktürme ve benzeri yöntemler ile yan maddelerin mümkün olduğu kadar uzaklaştırılmasıdır.

Saponozit elde edilecek materyalin kuru olması taze olana göre bariz bir üstünlük sağlar. Ekstraksiyonda suyun kullanılması, ozların enzimatik parçalanması için uygun ortam sağlar ve saponozitte değişimlere sebep olabilir. Ayrıca suyun yüksek ısıda kaynaması saponozitin yapısında bozunmalara yol açabilir. Tüketmede alkollerin kullanılmasında asit saponozitlerin alkil esterine çevrilebilmesi (190) mevcut ester gruplarının sabunlaşabilmesi (213) veya açıl-göçüne

sebebi olması (199) gibi sakıncalar görülür. Buna rağmen saponozitlerin tüketilmesinde genellikle % 70-90 lık metanol, etanol veya bunların uygun karışımları kullanılır. Enzimlerin bu şartlar altında denatüre olması bu çözücülerin sağladığına diğer bir üstünlüktür. Son yıllarda dondurulmuş veya taze materyal Ultra-Turrax^a kullanılarak propanol-su veya metanol ile tüketilmektedir. Bu şekilde saponozitler herhangi bir yapı değişikliğine uğrama tehlikesi olmadan ekstre edilebilmektedir (84).

Çok miktarda yağ taşıyan drogların tazeyken sıkılması veya kurutulduktan sonra etilenklorür, petrol eteri gibi çözücüler ile tüketilerek yağından kurtarılması gerekir. Yapraklarda klorofil miktarı fazla olduğundan bu drogların tazeyken ekstre edilmesi ve ardından ekstraktın hemen siklohekzan veya karbontetraklorür ile çalkalanması, veya ısıya dayanıklı saponozitler taşıyorsa, kaynar su ile ekstre edilmesi tavsiye edilir, klorofil su ile ekstraksiyonda çözünmeden kalır.

Ekstraksiyon tamamlanınca ekstrakt kuruluğa kadar uçurulur. Elde edilen ekstre değişik polaritedeki saponozitleri taşıyabilir. Bu husus göz önünde tutularak, ekstre az miktarda suda çözülür. Sulu çözelti önce kloroform sonra n-butanol ile ekstre edilir. Polaritesi düşük olan saponozitler kloroform, polar saponozitler butanol fazına geçerler. Çok polar olanların önemli bir kısmı su fazında kalır. Su fazında kalan saponozitler değişik Sephadex kolonlar (G-25,

^a : Yüksek Devirli Mekanik Karıştırıcı.

G-50, A-25) kullanılarak ham saponozit karışımında bulunan yan maddelerden temizlenebilir.

Ham saponozit karışımına, taşıdığı yan maddelerden kurtarılması için, ihtiva ettiği saponozitlerin tipine göre değişik yöntemler tatbik edilebilir. Mesela; asidik saponozitler taşıyan bir karışımın sulu çözeltisi hazırlanır ve asitlendirilir. Uygun bir pH'ya getirildiğinde saponozitler ya çöker ya da daha kolay ekstre edilebilir hale gelirler. Asidik saponozitler için kullanılan bir başka yol da iyon değiştirici reçineler kullanılarak yapılan temizleme yöntemidir. Anyonik iyon değiştiriciler asidik saponozitleri tutarlar. Tutulan maddeler asetik asit veya sodyum klorür ile elüe edilebilirler (190,213). Katyonik iyon değiştiriciler de temizlemede kullanılabilirler. Bu yöntemde yan maddelerin çoğu tutulur. Saponozitler tutulmadan geçer. Bu yöntemin önemli sakıncası da bazı saponozitlerde kolondan geçme sırasında değişiklikler olmasıdır (207). Mesela, bisdesmozidik triterpenler Dowex-1 kolonlardan geçerken, oza açıl grubunun bağlanması ile parçalanmaktadır (190).

Monodesmozidik steroidal saponozitlerin ekserisi ve bazı monodesmozidik triterpenik saponozitler, alkollü çözeltilerden kolesterin ile kompleks teşkil ederek çöktürülebilirler. Meydana gelen kolesteritler piridin/eter, sıcak toluol veya ksilen ile ısıtarak parçalanır. Bu özellikten saponozitlerin yan maddelerden kurtarılmasında ve bisdesmozidik-monodesmozidik saponozitlerin ayırımında yararlanılır.

Saponozitler toprak alkali tuzları veya hidrokksitle-ri (barit suyu), tanenler ve bilhassa kurşun asetat ile çökelti verirler. Bu, saponozitleri temizlemede kullanılan diğer bir yoldur. Fakat verimin düşük olması nedeniyle ve yapıda bazı değişikliklere sebep olduğu için artık kullanılmamaktadır. Diğer taraftan saponozitler yoğunlaştırılmış metanollü çözeltilerinden soğutulmuş aseton veya eter ile çöktürülebilirler. Bu da apolar kirliliklerin uzaklaştırılması bakımından yararlı bir yoldur.

Saponozitlerin suda kolloidal halde çözünmeleri nedeniyle yarı geçirgen zarlardan geçmemeleri, dializ ve elektrodializ yöntemlerinin de temizleme gayesiyle kullanılmasını sağlar. Bu yolla elektrolitler kolaylıkla uzaklaştırılır.

Saponozitlerin alkollü çözeltilerinin aktif kömür ile ısıtıldıktan sonra süzülmesi suretiyle de bazı yan maddeler uzaklaştırılabilir.

Fenolik yapıdaki yan maddelerin (flavonlar, flavonoller ve heterozitleri) ham saponozitten ayırımı güçtür. Bu amaçla alüminyum oksit kolonlar kullanılabilir. Bu işlem sırasında alüminyum oksitin saponozitleri de tutması mümkündür.

Bazı saponozitlerin kristallenebilmeleri (eskin, siklamin, primulasaponin, digitonin, parillin, lanatasaponin, α -hederin, theasaponin) temizlemede önemli bir özelliktir. Bu suretle kolaylıkla iyi bir temizleme sağlanabilir (190).

Saponozitlerin köpürtme yoluyla temizlenmesi de tek-
lif edilmiştir (108). Ancak bu yöntem sadece endüstriyel
alanda uygulanabilir. Ayrıca flavonozitlerin de köpüğe geç-
mesi, tam bir saflaştırmayı engellemektedir.

b. Saponozit Karışımının Ayırımı

Saponozitlerin yapılarını tayin edebilmek için, ka-
rışımdaki her saponozitin ayrı ayrı elde edilmesi gerekir.
Ancak bu ayırım, karışımdaki saponozitlerin polarite, çözü-
nürlük, stabilite gibi özelliklerine bağlı olarak zorluklar
gösterebilir.

Saponozitin karışımının ayırımında, kristalizasyon
gibi ender durumlar dışında, kromatografik yöntemlerden ya-
rarlanılır. Saponozitleri, yapısını değiştirmeden, birbirin-
den ayırmak çok güç, hatta bazen imkansız olabilir. Bu durum-
larda türevlerinin hazırlanması (metil esteri, benzoat, ase-
tat) daha kolay bir ayırım sağlar. Uygun solvan sistemleri
seçilmesi halinde kağıt kromatografisi ile ayırım tatminkar
olabilirse de ince tabaka kromatografisi süre bakımından
tercih edilir. Silikajel kaplı plaklarda elde edilen sonuç-
lar, aynı solvan sistemi kullanılarak yapılan preparatif
plak ve silikajel kolon kromatografisi ile de sağlanabilir
(oran: 1:100 madde/adsorban). Son yıllarda kloroform/metanol/
su solvan sisteminin çeşitli oranları, saponozit karışımla-
rının ayırımında tercih edilen sistem olmuştur (20,84,190).

Molekül büyüklüğüne göre ayırım sağlayan moleküller elekler (sephadex, zeolit...) ile kromatografi veya yüklerdeki farklılık nedeniyle iyon değiştirici reçineler ve alüminyum oksit kolonların ayırımda kullanılmaları, maddenin stabilitesine bağlı olarak, yapının değişimi ile ilgili problemler yaratabilir. Selüloz kolonlar ile de bazen oldukça başarılı ayırımlar yapılabilirse de neticelerin güç tekrarlanabilir olması kullanılmasını azaltmaktadır (190).

Güç ayırım problemlerinde CRAIG apareyi denenebilir (mesela, kloroform/metanol/su 41,5: 37,5:21) (190).

Kristalizasyonun mümkün olduğu durumlarda yan maddelerin ayırımı genellikle kolaydır. Bazı durumlarda kristallenmeyen saponozitlerin kristalize perasetatları kullanılarak saflaştırma yapılabilir (190).

Kantitatif Tayin Yöntemleri

Saponozit taşıyan bitki ekstralarının eczacılıkta kullanılması, etken madde miktarının kantitatif olarak tayinini gerektirmektedir. Bir kaç yıl öncesine kadar, çok azı dışında, saponozitlerin saf olarak elde edilememesi ve yapılarının genellikle bilinmemesi nedeniyle tam bir kimyasal miktar tayini yöntemi geliştirilememiştir. Genellikle saponozitlerin fizikokimyasal özelliklerine dayanan tayinlerden yararlanılmaktaydı: Yüzey gerilimini azaltması ile köpük meydana getirmesi (Köpürme indisi), hemolitik aktivite

(Hemoliz indisi), balıklara toksisite (Balık indisi) (82). Yapılan araştırmalar, saponozitlerin bu özelliklerinin yapılarına büyük ölçüde bağıllık gösterdiğini ortaya koymuştur. Aglikondaki yapı farklılıkları ve oz zincirinde veya bağılı bulunan asitlerde meydana gelebilecek parçalanmaların (155), açıl göçünün saponozitlerin yukarıda belirtilen özelliklerini etkileyeceğı kesin olarak gösterilmiştir. Bu yüzden saponozit miktarının hesaplanmasında bu yöntemler kullanılamaz. Çünkü bir drog veya taşıdığı saponozitin hemolizan etkisi çok fakat miktarı az olabilir. Bu nedenle yukarıda belirtilen yöntemler saponozit taşıyan drogların mukayesesi ve ofisinal drogların kontrolunda kullanılabilecek yöntemler olarak düşünölmelidir.

Hemolitik aktivitenin tayinine dayanan bir yöntem de "Agar difüzyon yöntemi"dir (178). SZILAGY tarafından geliştirilen bu yöntemde, saponozitlerin alkollü çözeltileri kanlı agar jelözü içinde, hemolitik özelliklerine bağılı olarak, difüzyonla şeffaf lekeler meydana getirir. Bu lekelerin çapları ölçölerek, verilen formöl yardımıyla, (%) saponozit miktarı hesaplanır.

KOFLER (190) saponozitlerin miktar tayinleri için, balıklar üzerindeki zehirleyici etkisine dayanan, "Balık İndeksi" yöntemini öne sürmüştür. Cam kavanozlarda saponozit çözeltisi ile gam hazırlanır ve her kavanoza birer tane akvaryum balığı atılır. Bir saat sonra balıkların ölümüne sebep olan limit dilüsyon tespit edilir. Buradan saponozit miktarı

hesaplanabilir. Fakat bu gün sadece kalitatif amaçla kullanılmaktadır. SCHEIDEGGER ve MÜHLEMANN (152) Tubifex rivulorum adlı balığı kullanarak, KAMINSKI ve KAMINSKA (82) ise saponozitlerin Enchytraeus albidus balığı üzerindeki kontraksiyon ve ödem etkilerinin, digitonin (Merck) ile karşılaştırılmasına dayanan yöntemler geliştirmişlerdir. KARMA ve SCHANTZ (82) ise denek olarak kurbağa larvalarını kullanmışlardır (Xenopus Yöntemi).

SCHANTZ (151) tarafından öne sürülen 'Rhoeo Yöntemi" de bağıl netice veren kantitatif yöntemlerden biridir. Rhoeo discolor bitkisinin taze yapraklarından antosiyanin taşıyan 1 cm uzunluğunda parçaları, saponozit çözeltisi ile hazırlanan gama yerleştirilir. Hücre membranlarında geçirgenliğin değişmesine bağlı olarak renk maddelerinin dışarı çıkması yöntemin esasını teşkil eder.

Bir drogtaki her saponozitin miktarının ayrı ayrı tayini istenen bir husustur. Ancak pratik olarak bu amaca ulaşılması genellikle mümkün değildir. Diğer taraftan saponozitlerin drogtaki miktarlarının gravimetrik olarak tayini tam netice vermez, genellikle elde edilen ham saponozit miktarıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalar neticesinde ekstraktan ince tabaka ve kolon kromatografisi yöntemleri ile ayrılan saponozitlerin uygun renkli türevlerine dönüştürülerek fotometrik olarak tayinleri yapılabilmektedir. Bu yolla, ayırım yöntemine göre, total saponozitlerin kantitatif tayinleri yapılabilmektedir.

Fotometrik yöntemlerle kantitatif analiz çalışmaları ancak bir kaç tip saponozit üzerinde yoğunlaşmıştır. Üzerinde en çok çalışılan drog R.Liquiritiae'dir. Araştırmacılar glisirizin'in 2,6-di-tersiyer-butil-p-krezol veya etanollü vanillin/sülfürik asit reaktifi ile verdiği renkli bileşik üzerinden kolorimetrik miktar tayini yöntemleri geliştirmişlerdir (82). BRIESKORN ve WALLENSTATTER (209) glisirizinin asidin hidrolizi ile meydana gelen β -glisiretinik asidi redükliyerek dezoksiglisiretinik asit elde etmişlerdir. Bu maddenin değiştirilmiş Lieberman-Burchard reaktifi ile verdiği kırmızı-menekşe renkten faydalanarak bir fotometrik yöntem geliştirmişlerdir.

Primula saponozitleri için geliştirilen miktar tayini yöntemlerinde ise, sapanozitlerin renkli bileşiklerini hazırlamak amacıyla, vanillin'in derişik hidroklorik asitteki çözeltisi, vanadin-sülfürik asit-izopropanol, kobalt (II)-klorür veya demir-III-klorür'ün seyreltik asetik veya sülfürik asitteki çözeltisi kullanılmıştır (84).

Aesculus türlerinin tohumlarının tedavideki önemi, eskin'in seçici olarak kantitatif tayinini sağlayan bir yöntemin bulunmasını gerektirmiştir. Bu amaçla, araştırmacılar p-dimetilaminobenzaldehit/asetik asit/ sülfürik asit reaktifi, kobalt-II-klorür/su/asetik asit reaktiflerini kullanmışlardır (82). SCHLEMMER (154) ise eskin'in demir-III-klorür'ün sülfürik asitteki çözeltisi ile verdiği renkten yararlanmışdır. Ancak WINKLER (208), SCHLEMMER (154)'in yöntemi ile

elde edilen eskin'in kromatografi ile kontrolunda bir kaç leke verdiğini ve bunlardan sadece temel lekenin kristalize eskin olabileceğini ileri sürmüştür. Bu nedenle fotometrik yorumlamadan önce yan maddelerin kromatografi yöntemleri ile ayırımlarını önermişlerdir.

HIAI ve ark. (81), Bupleurum falcatum ekstraktlarındaki saikosaponinlerin vanillin/sülfürik asit ile verdiği renk reaksiyonuna dayanarak kolorimetrik bir tayin yöntemi geliştirmişlerdir.

KARTNIG ve ark. (98) saponozit taşıyan droglardan ince tabaka kromatografisi ile ayrılan saponozitlerin % 95 sülfürik asit içindeki çözeltilerini UV-spektrometri yöntemleri ile tayin etmişlerdir. Standart sapma saponozitler için \mp % 2, sapogeninler için \mp % 1,8 bulmuşlardır.

HAMMERSTEIN ve KAISER (77) ince tabaka kromatogramından direkt fluorometrik olarak \mp % 1,5 sapma ile eskin'in miktar tayinini yapmayı başarmışlardır. Silikajel plaklarda ayrılan saponozit ekstraktının kalay klorür püskürtülmesi suretiyle verdiği floresans yöntemin esasını teşkil eder. Yine ince tabaka kromatografisi ile ayırımı takiben kalitatif bir tayin yöntemi FRANCK (60) tarafından verilmiştir. Bu yöntem saponozitin sodyum hidroksit ilavesinden sonra nil mavisini ile verdiği renge dayanmaktadır. Yöntemin tayin limiti 1 μ g saponozite kadardır. NAMBA ve ark. (123) da ince tabaka kromatografisiyle ayırdıkları glisirizini alev iyonizasyon dedektörü yardımıyla tayin etmişlerdir.

Kantitatif tayin amacıyla titrasyon yöntemleri de uygulanabilir. Ancak uygulama sahası sınırlıdır. WINKLER (208) eskin için potansiyometrik titrasyon yöntemine dayanan bir miktar tayini yöntemi geliştirmiştir.

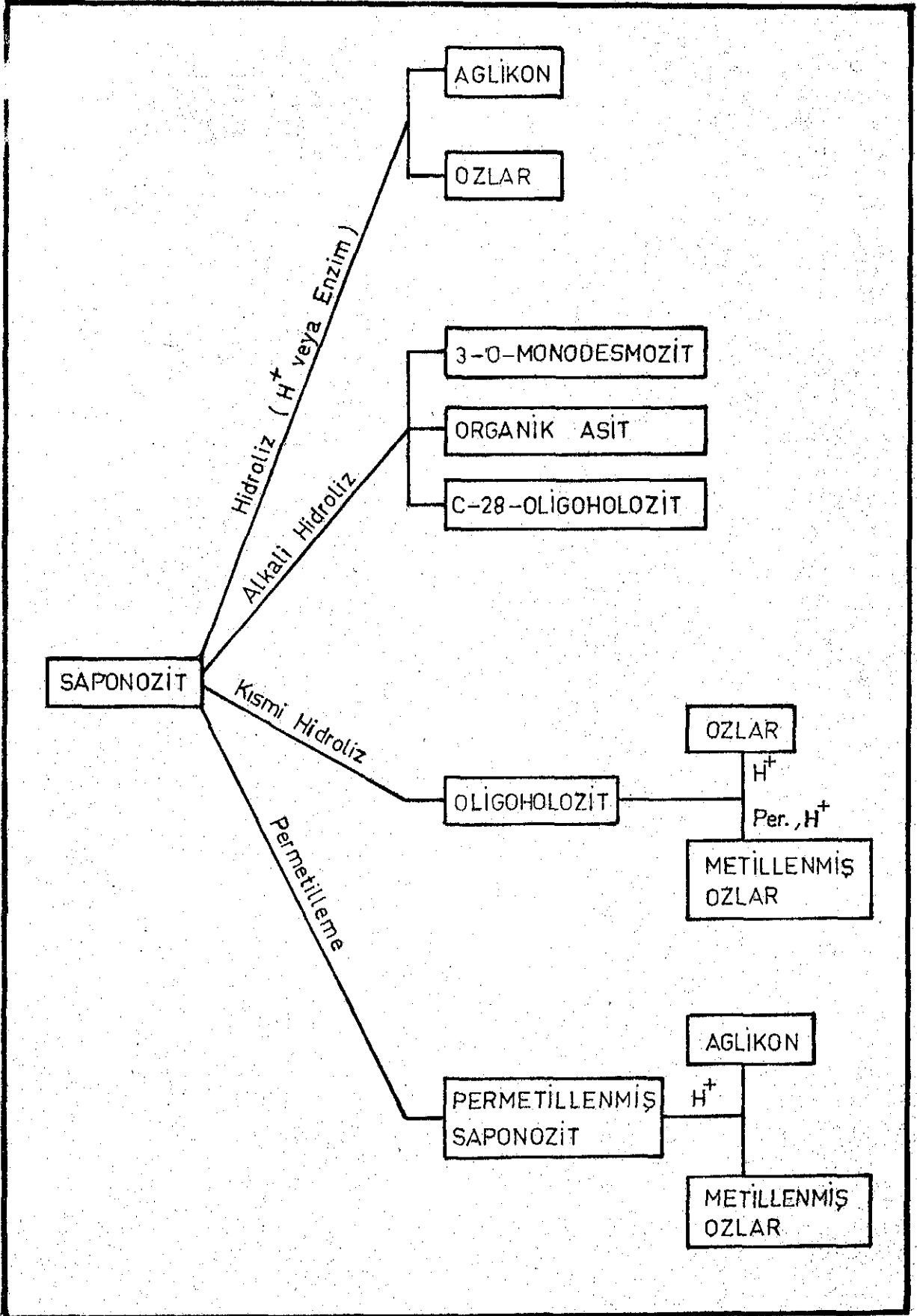
Yapı Tayin Yöntemleri

Genel

Saponozit karışımlarından saponozitlerin ayırımında görülen zorluklar yanında bu maddelerin yapıları reaksiyon şartlarından etkilenecek sekonder ürünler meydana gelir. Bu yüzden yapısı tam olarak aydınlatılmış saponozit sayısı azdır. Enstrumental yöntemlerin yapı tayini amacıyla kullanılabilmesi sonucunda, bu alanda hızlı sayılabilecek gelişmeler kaydedilmiştir.

Bir saponozitin yapısının tam olarak tayini aşağıdaki hususların aydınlatılması ile yapılabilir:

- a. Aglikonun yapısının tayini,
- b. Mevcut ozların cinsi ve sayısı,
- c. Ozların aglikona bağlanış yeri (veya yerleri),
- d. Zincirdeki ozların sayısı ve birbirleri ile bağlanış şekilleri,
- e. Ozların halka büyüklüğü (piranoz veya furanoz),
- f. Ozidik bağların konfigürasyonu,



Tablo - 4

Saponozitlerin Yapı Tayinlerinde Takip Edilecek Genel Yol

Bu soruların cevaplandırmasında takip edilebilecek yol (Tablo-4) de ana hatları ile gösterilmiştir.

Bugün yapıca bilinen saponozitler, genellikle ekino-sistik asit, hederagenin, gipsogenin gibi, nispeten basit substitue aglikonları ihtiva etmektedir. Çok hidroksilli aglikon taşıyan saponozitler genellikle esterleşmiş halde-dirler. Bu gibi karmaşık bir karışımdan her saponozitin te-ker teker ayrılması düşünülemez. Mesela, TSCHESCHE ve WULFF en az 30 saponozitin karışımı olduğu bilinen eskin'de rönt-ge-n yapı analizi yöntemi ile istatistik bir değerlendirme yolunun kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir. Bu yöntemde bileşiklerin baskın özelliklerinden yararlanılıp genel yapı tayin edilebilir (213).

Saponozitlerin yapısının tayininde değişik kademe-lerde çeşitli hidroliz yöntemleri kullanılır. Bu yöntemlere ait genel bilgiler, tekrarlardan kaçınmak için, bir başlık altında toplanarak incelenecektir. Yapı tayini ile ilgili bahislerde hidroliz ile ilgili bilgiler daha kısa bir şe-kilde verilecektir.

1. H i d r o l i z Y ö n t e m l e r i

A. T o t a l A s i t H i d r o l i z : Saponozitler seyreltik mineral asitlerin etkisiyle, kendisini meydana ge-tiren aglikon ve oz kısımlarına ayrılırlar. Bir saponozit, için uygun hidroliz şartlarının ön denemelerle tespit edilmesi

gerekir. Çünkü uygun olmayan şartlarda genin ve progenin karışımlarının yanında, aglikonun sekonder ürünleri de meydana gelebilir.

Hidrolizi etkileyen faktörleri şöyle sıralıyabiliriz: Hidroliz ortamı, asitin cinsi, konsantrasyonu, hidroliz süresi, ısı ve basınç. Total hidroliz için, genellikle %3-5 hidroklorik asit, % 1-10 sülfürik asit veya Kiliani karışımı (glasial asetik asit/su/hidroklorik asit % 35 lik - 35: 55: 10) kullanılır (82). Hidroliz süresi 30 dakika ile 100 saat arasında değişebilirse de 3-6 saatlik bir süre, çoğu kez, yeterli olmaktadır. Hidroliz ortamı olarak, genellikle su, alkol, aseton, dioksan ya da bunların karışımları kullanılır. Bazı şartlarda su yerine dioksan kullanılması koruyucu bir rol oynayabilir. Uygulanan ısı, maddenin yapısına ve stabilitesine bağlı olarak, 50-150°C arasında değişebilir. Genel olarak normal atmosfer basıncında, kullanılan çözücülerin kaynama ısısında, çalışılmaktadır.

Aglikon hidroliz ortamından, genellikle, süzülerek ayrılır. Temizleme işlemi, kristallendirme, değişik solvanlarla ekstraksiyon, alkali tuzları ile tuz teşkil edip ardından asit ile çöktürme, türevlerine geçme veya kromatografik yöntemlerle yapılır. Aglikonundan kurtarılan çözelti ozların teşhisinde kullanılır.

Saponozitlerin mineral asitler ile total hidrolizi bazen aglikonun yapısında asit ile katalizlenen değişimler meydana getirebilir. Bilhassa ester saponozitlerde veya

sapogeninlerde zayıf hidroliz şartlarında bile açıl göçüne rastlanabilmektedir (80). Bu değişimlere en karakteristik örnek Polygala saponozitlerinde presenegenin'in senegenin, senegenik asit, hidroksisenegenin ve siklosenegenin'e dönüşümüdür (Şekil-15).

Asit hidroliz şartlarında sekonder ürünlerin meydana gelmesi nedeniyle, koruyucu hidroliz yöntemleri (enzimatik, mikrobiyolojik ve kimyasal yöntemler) geliştirilmiştir.

B. E n z i m a t i k H i d r o l i z : İyi bir koruyucu hidroliz yöntemi olmasına rağmen, bütün ozlar için uygun hidrolazların bilinmemesi ve dallanmış oz zincirlerinin enzimatik parçalanmasının genellikle zor olması nedeniyle kullanılışı oldukça sınırlıdır. Bununla beraber, Helix pomatia (sümüklü böcek), Helix plectotropis ve funguslardan (Aspergillus wentii, A.oryzae, Rhizopus türleri...) elde edilen kompleks enzim preparatları kullanılarak genellikle tam bir hidroliz mümkün olmaktadır (209).

C. M i k r o b i y o l o j i k H i d r o l i z :

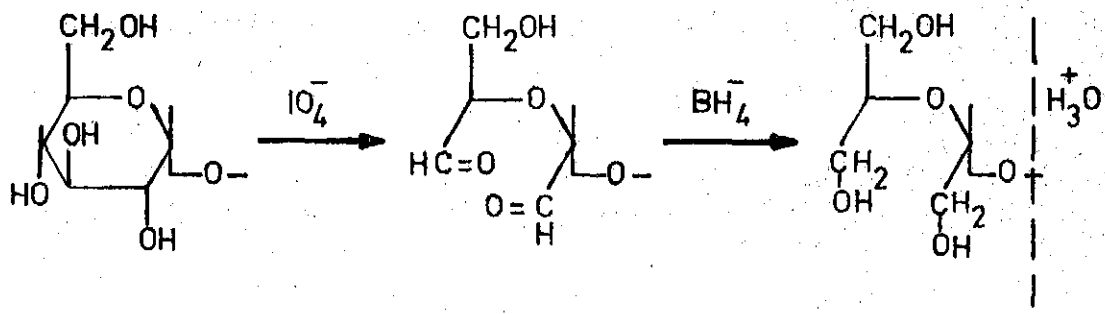
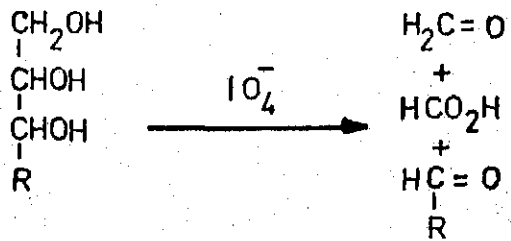
Son yıllarda geliştirilen bir koruyucu hidroliz yöntemidir. Yöntemin esası, karbon kaynağı olarak sadece saponozit bulunan yapay bir ortamda, saponoziti hidroliz edip gerçek aglikonu veren bir toprak bakterisinin kullanılmasına dayanır. Ortamdan aglikon organik solvan ile tüketilir.

Bu yöntem kullanılarak; Polygala senega köklerinden presenegenin (214), Panax japonicum rizomlarından oleanolik asit (214), Aesculus turbinata tohumlarından protoeskigenin, barringtogenol C ve 16-dezoksi barringtogenol (216) Panax ginseng köklerinden S-protopanaksadiol (217) gibi aglikonlar elde edilmiştir.

D. Diğer Kimyasal Yöntemler :

Koruyucu hidroliz yöntemleri arasında en önemlisi periyodat oksidasyonu yöntemidir.

D.1. Periyodat Oksidasyonu : Periyodik asit ve tuzları sadece α -glikol gruplarını parçalar (75).



Reaksiyonda, yukarıda görüldüğü gibi, düz zincir alkil 1,2-diol grupları iki alkil aldehit grubuna, siklik 1,2-diol grupları ise düz zincir α - ω -dialdehite oksitlenir. Periyodat ile, α -hidroksialdehit, α -hidroksiketon ve α -ami-

noalkol grupları da oksitlenir, fakat yöntemin öz kimyasında esas kullanılışı α -glikol gruplarının oksidasyonudur. Her α -glikol grubu bir moleküler oranda periyodat tüketir ve reaksiyon derecesi α -glikol grubunun stereokimyasına bağlıdır. Reaksiyon şartları tam olarak sağlanamazsa kural dışı oksidasyonlar görülebilir. Bu nedenle oksidan, çözücü, ısı, ışık, pH gibi reaksiyonu etkileyen şartların iyi ayarlanması ve bilinmesi gerekir. Bu yüzden bu şartlar aşağıda özetlenmiştir.

Oksidan: Periyodik asit ve tuzlarının seçimi reaksiyon çözeltilisinin pH'sına bağlı olarak değişir. Nötral ve zayıf asidik sulu çözeltiler için sodyum metaperiyodat en uygundur, çünkü alkali çözeltilerde bu madde çözünmez. Buna karşılık potasyum dimezoperiyodat alkali sulu çözeltilerde çözünür. Kuvvetli asidik çözeltiler için periyodik asit kullanılır.

Çözücü: Periyodat oksidasyonu için çözücü olarak su tercih edilir. Suda çözünmeyen bileşikler için etanol, dioksan veya asetik asitin sulu çözeltileri kullanılabilir. Ancak bu solvanlarda reaksiyon hızı daha yavaştır ve kural dışı oksidasyonlar da görülebilir.

Işık: Periyodat çözeltileri gün ışığı ile bariz bir parçalanmaya uğradığından, bütün reaksiyonların karanlıkta yapılması gerekir.

Isı: Yüksek ısıda kural dışı oksidasyonların artması nedeniyle, genellikle oda ısısı tercih edilir. Asit çözeltilerde

asetal bağlarının hidrolizini önlemek veya kural dışı oksidasyonu azaltmak için oda ısısının altındaki sıcaklıklar da kullanılabilir.

pH: Yan ürün meydana gelebilmesi açısından önemli bir husustur. Oksidasyon genellikle en hızlı pH 3-5 de olur. Oksidasyon çözeltisinin pH sınırın ayarlanmasında tampon çözeltiler kullanılır.

Konsantrasyon ve Periyodat Fazlası: Ortamda yüksek konsantrasyonda periyodat bulunması glikol parçalanmasını kolaylaştırır. Konsantrasyon limiti 0,01-0,1 M arasında değişir. Daha yüksek konsantrasyonlar kural dışı oksidasyonları arttırabilir.

Reaksiyon Süresi : Sabit ısı ve pH da oksidasyon hızı glikolün stereokimyasına bağlı olarak değişir. Reaksiyon süresi birkaç dakikadan birkaç güne kadar değişir.

Periyodat oksidasyonu, saponozitler için kullanıldığında yukarıdaki belirtilen şartların yanında bazı değişikliklerle uygulanır.

Saponozitler önce sodyum metaperiyodat ile oksitlenir, ardından alkali hidroliz (52) yapılır. Ürün ya fenil hidrazin ile (125) ya da sodyumborohidür ile (192) redüklenir. Ardından zayıf asit hidroliz (75) ile ozlar birbirinden veya aglikondan koparılır.

Periyodat tuzlarının 1,2 - diol gruplarını parçalaması nedeniyle bu yöntem yapı tayininde oz zincirinin dalanma noktasının tespitinde kullanılmaktadır.

D2.Diğerleri : Bazı durumlarda hidroliz ortamının değiştirilmesi koruyucu hidroliz için yeterli olmaktadır. VARSNEY ve BADHWAR (84), Albizzia lebbek Benth. den elde ettikleri saponozit "Lebbekanin A" nın etanollü hidroklorik asit ile hidrolizinde aglikonun (ekinosistik asit) Δ^{12} - çift bağının Δ^{13} 'e değişimini önlemek için sulu sülfürik asit kullanılmasını teklif etmişlerdir.

Sapogenin - glikuronik asit bağının seçici olarak parçalanması için etkin bir yöntem de , kurşun asetat ile oksidasyonu takiben permetillenmiş saponozitin alkali ile muamelesine dayanır. Burada glikuronit, muhtemelen, enol-eter veya asetat meydana getirmekte, bu da zayıf alkali ile kolaylıkla parçalanarak aglikonu vermektedir (103). Aynı araştırmacılar, saponozitlerin UV- ışınları ile fotoliz suretiyle aglikonuna parçalanmasına dayanan bir yöntem geliştirmişlerdir. Ancak henüz çok yaygın olarak kullanılmamaktadır. Sakurasao saponozitleri üzerinde denenmiş ve protoprimulagenin A elde edilmiştir (102).

Aglikonun Yapısının Tayini : Saponozitlerin parçalanmaları sonucu ortaya çıkan aglikonların stereokimyasal problemleri oldukça karmaşıktır. Çünkü ana yapı 8 tane asimetric karbon atomu taşımakta, bu da teorik olarak 256 konfigürasyona imkan vermektedir. Bu sayı ana iskelede substitüentlerin bağlanması ile daha da artabilmektedir.

Bu grup maddelerin yapılarının aydınlatılmasında kullanılan temel yöntemler yıkım reaksiyonlarına dayanmaktadır. Buna RUZICKA ve ark. tarafından kullanılan selenyum dehidrogenasyonu örnek olarak gösterilebilir (82). Amirin grubu sapogeninler, ana bileşeni 1, 2, 7 - trimetilnaftalin olan aynı dehidrogenasyon ürününü verirler. Bu bileşiklerin yapılarının ispatı, yıkım reaksiyonlarının tersine, sentez yoluyla da yapılabilir. Bu yöntem ile HAWORTH 1937 yılında, yapısı ilk açıklanan triterpen sapogenin olan, oleanolik asidin yapısını tayin etmiştir (82).

Moleküldeki çift bağlar ve substitüentlerin tayinleri bilinen yöntemler ile yapılır. Δ^{12} çift bağı katalitik hidrogenasyona dayanıklıdır. Bu nedenle teşhisi tetranitrometan ile yapılır, miktarı ise perbenzoik asit ile titrasyon suretiyle bulunur (170). Hidroksil gruplarının teşhisi asetil türevlerinin teşekkülü ve karbonil gruplarının oksitlenerek (bilhassa kromik asit oksidasyonu) oksim veya semikarbazon teşekkülü ile veya CLEMMENSEN, WOLFF - KISHNER, HUANG-MINLON veya lityumalüminyumhidrür yöntemleri ile redüksiyon suretiyle yapılır. Karboksil gruplarının tayini ise diazometan ile metil esteri oluşturularak veya redüksiyon reaksiyonları ile yapılabilir (82).

IR (26,173), UV (118,193), ORD (Optical Rotatory Dispersion) (45), CDC (Circular Dichroismus) (209), bilhassa NMR (22,97,162) ve kütle spektroskopik (46,86,162) yöntemlerinin bu amaçla kullanılması aglikonların yapılarının aydınlatılma-

sını kolaylaştırmıştır.

Bu yöntemlerin kimyasal teşhis yöntemleri ile birleştirilerek uygulanması, fonksiyonel grupların yeri ve cinsi, çift bağların yeri hakkında kesin bilgiler elde edilmesini sağlar.

Triterpenik aglikonların yapılarının tayininde çok kullanılan yöntem NMR spektroskopisidir. Aglikonun çeşitli türevlerinin H atomlarının verdiği sinyallerin karşılaştırılması, H atomlarının buldukları yere ve komşu atomlara bağlı olarak rezonanslarında görülen karakteristik kaymalar, fonksiyonel grubun yeri ve tipi hakkında bilgiler verir. R₁-Barrigenol, protoeskigenin, sanikulagenin A aglikonlarındaki 21 ve 22. nci karbonlara bağlı hidroksil gruplarının yeri NMR spektroskopisi ile açıklanmıştır (215).

Yapı tayininde oksidasyon ve redüksiyon ürünlerinin elde edilmesi yanında türevlerinin, bilhassa ester, asetat, asetil asetonit ve ester asetatlarının hazırlanması da başarılı sonuçlar vermiştir. Çok hidroksil grubu taşıyan triterpenlerin yapı tayinlerinde, NMR spektrumlarında daha az çakışma görülmesi nedeniyle, benzoat türevleri tercih edilir (213).

Eğer kristalize halde elde edilen bir aglikonun önemli fiziksel sabitleri (erime noktası, optik çevirmesi), ince tabaka ve kağıt kromatografisiyle elde edilen bulgular, bilinen bir aglikon ile benzerlik gösterirse, bazı türevlerinin hazırlanarak bunların teşhislerinin yapılması o aglikonun

yapısının tayini için yeterlidir. Bu amaçla genellikle metil ve asetil türevleri kullanılır.

Asitlerin Yeri ve Yapıları: Gererek aglikon ve gerekse oz zincirine ester şeklinde bağlanmış asitlerin tayininde ilk basamak saponozitin alkali hidrolizidir. Organik asitler alkali hidroliz ortamından eter ile tüketilerek veya kromatografik olarak ayrılırlar. Karşılaştırma maddesi ile karışım erime noktası ve genellikle kromatografik yöntemler ile teşhis edilirler (209). Bu amaçla kağıt, ince tabaka kromatografisi ve bilhassa serbest asidin (83, 213) veya metil esterinin (213) kalitatif ve kantitatif olarak gaz kromatografisine uygulanması önemli bilgiler verir. Uçuculuğu az olan asitler (senegin'e bağlı p - metoksisinnamik asit ve 3,4- dimetoksisinnamik asit) için kolon kromatografisi ile ayırımı takiben ince tabaka kromatografisi yöntemin-den yararlanılarak teşhis yapılır (165).

Saponozite bağlı asidin yapısı üzerinde yapılan çalışmalarda IR, UV ve kütle spektrometrisi yöntemlerinden yararlanılır (209). Asidin yerinin tayini, açillenmiş aglikonun ve türevlerinin (asetat, asetinit, asetilasetonit), NMR spektroskopik analizi ile tesbit edilebilir (209). WULF ve TSCHESCHE (213) diaçil - protoeskigenin'in diaçil - protoeskigenintribenzoat (veya silül eter) ve protoeskigeninpentabenzonat (veya silül eter) türevlerinin NMR spektroskopik olarak karşılaştırılması suretiyle asidin bağlanış yerini belirlemişlerdir.

O z l a r ı n T e Ő h i s i : Total hidroliz çözel-
tisinden aglikonun ayrılmasından sonra kalan çözelti ozla-
rının teşhisinde kullanılır. Nadiren berrak olan hidroliz
çözeltisi, hiç bir işleme tabi tutulmadan kullanılabilirse
de genellikle, önce bir nötralleştirme gereklidir. Sülfürik
asit hidrolizatları baryum karbonat veya baryum hidroksitle,
hidroklorik asit hidrolizatları ise gümüş karbonat ile nötra-
lize edilir ve gümüş iyonları fazlası hidrojen sülfür ile
uzaklaştırılır. Aynı amaçla iyon değıştirici reçineler de
kullanılabilirse de (183) maddenin kaybolma tehlikesi vardır.
Süzüntünün alçak basınç altında yoğunlaştırılmasından sonra,
genellikle kağıt, nadiren elektroforez (175) ve ince tabaka
kromatografisi ile ozlar, oz numuneleri ile karşılaştırmak
suretiyle teşhis edilir. Uronik asitlerin mevcudiyetinde
FISCHER ve DÖRFEL'e göre çalışılır (57), son zamanlarda IR
(119), NMR (114) ve kütle spektrometrik yöntemler (107) de
ozların teşhisinde kullanılmaktadır.

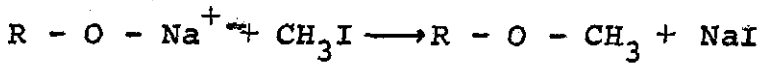
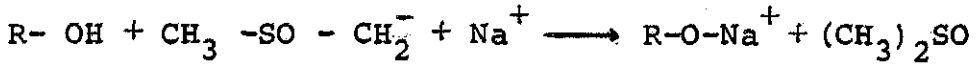
Ozların kantitatif tayinlerinde önemli güçlüklerle
karşılaşılır. Bu tayinde kağıt kromatografisi kullanıldığında
(56) en iyi şartlarda bile elde edilen değerler, ortalama
% 5 - 19 hataya sahiptir. Persilülennmiş oz (126, 177, 211),
persilülennmiş metil saponozit (211) veya perasetillenmiş oz
alkolleri (150) halinde tayin için gaz kromatografisinin
kullanılması daha uygundur. Ancak tamamlanmayan hidroliz, oz-
ların kullanılan asit nedeniyle kısmen parçalanması, hatalı
sonuçlar elde edilmesine neden olabilir. Yapıda mevcut uronik
asitler, redüksiyon suretiyle heksozlarına dönüştürülerek,

gaz kromatografik olarak tayin edilebilirler (213).

O z Z i n c i r i n i n Y a p ı s ı n ı n T a y i -
n i : Total hidroliz ile ozların teşhisi ve kantitatif tayini mümkün olmakla beraber, molekülde bulunan ozların kesin sayısı oz zincirinin yapısının tam olarak aydınlatılması ile belirlenir. Bilhassa gipsozit ve senegin gibi çok sayıda oz taşıyan saponozitler için poliholozit kimyasında kullanılan yöntemler tercih edilir : Metilasyon, periyodat oksidasyonu ve oz zincirinin kısmi hidrolizi gibi yöntemler (206).

a. P e r m e t i l l e m e : Bir heterozitte oz zincirinin yapısının tayininde en iyi yöntem permetilasyonu takiben asit hidroliz ile ortaya çıkan kısmen veya tamamen metillenmiş ozların teşhisidir. Permetilasyonun tam olarak sağlanması ve metillenmiş ozların tayini kademelerinde önemli güçlükler görülür. Bu yüzden permetilasyon için değişik yöntemler teklif edilmiştir. KOCHETKOV ve ark. (108), PURDIE (190)'nin metiliyodür/ gümüşoksit kullanılarak yapılan yöntemi geliştirerek kullanmışlardır. KUHN ve ark. dimetilformamidli ortamda baryum oksit, baryum hidroksit veya gümüş oksit karşısında metiliyodür (112) veya dimetilsülfat (113) kullanarak değişik permetilleme yöntemleri geliştirmişlerdir. Araştırmacılar, dimetilsülfat ile yapılan yöntemi, daha ucuz olması bakımından tercih etmektedirler, fakat en çok HAKOMORI (76) tarafından geliştirilen yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemin, ANDERSON ve CREE (6) tarafından, üronik asit taşıyan

materyal için daha uygun olduğu ileri sürülmüştür. HAKOMORI yönteminde reaksiyon oda ısısında basit bir aparey ile yapılır ve kısa zamanda sonuçlanır. Bu yüzden diğer yöntemlere tercih edilmektedir. Yöntem, dimetilsülfoksit ve sodyum hidrür ile oluşturulan dimetil sülfonilkarbonion vasıtasıyla alkoksit teşekkülü ve takiben metil iyodür ile metilasyona dayanmaktadır (76).



Bu reaksiyonda aglikondaki redüklenebilen grupların da (aldehit veya keto grupları) kısmen veya tamamen redüklenebileceği göz önüne alınmalıdır. Metilasyon sırasında ester şeklinde bağlanmış karboksilik asit genellikle parçalanır ve yerine metil grubu geçer. Bu durumda metilasyon için diazometan / borontriflorür kullanılması uygundur (190). Bu suretle açıl grubu parçalanması önlenir.

Metilasyonun tamamlanıp tamamlanmadığı ince tabaka kromatografisi ve IR spektroskopisi ile hidroksil grubuna ait titreşimlerin varlığının kontrolü ile anlaşılır. Bazı aglikonlarda bulunan hidroksil grupları (mesela, β -amirin grubu 16 α -OH türevleri) çok güç metillenir, dolayısıyla saponozitin tamamen metilasyonu da oldukça zordur ve verim düşüktür. Bununla beraber aglikondaki serbest hidroksil gruplarının tamamen metillenmesi genellikle gereksizdir. Bu gibi

durumlarda sadece oz zincirindeki bütün hidroksil gruplarının tamamen metillenip metillenmediği kontrol edilir. Metillenmiş saponozitin hidroklorik asidin metanoldeki % 5 lik çözeltisi ile veya perklorik asit ile metanolizini takiben çöken aglikon uzaklaştırılır. Sulu kısımdaki metillenmiş holozitler seyreltik asitler ile hidrolize tabi tutularak açığa çıkan metillenmiş ozlar kağıt, ince tabaka ve gaz kromatografisi (8, 200, 213) ile veya kütle spektrometresi yardımıyla (107) teşhis edilirler. Bilhassa gaz kromatografisi - kütle spektrometresi kombinasyonu önemli bir üstünlük sağlar (115).

Kesin tayin, metillenmiş ozların kristalize formda veya kristalize bir türevi halinde izolasyonu ve şahit maddelerle karşılaştırılması suretiyle yapılır.

Üronik asitlerin metillenmiş formları heksozlara reduklendikten sonra tayin edilir. Çünkü D- glikoz ve D-galaktoz türevleri halinde daha kolay karakterize edilebilirler.

Bilinmeyen metillenmiş ozlar, oz kimyasında kullanılan yöntemler ile tayin edilirler.

Metillenmiş ozların teşhisi, ozların zincirdeki bağlanış şekli terminal ozlar ve zincirdeki dallanma hakkında fikir verir. İki terminal ozun ortaya çıkması, tayin edilebilir bir dallanma yoksa, iki ayrı oz zincirinin varlığını açıklar. Bir çok durumlarda izole edilen metillenmiş ozlar, uzun halka büyüklüğü hakkında da bir fikir verebilir. Bir çok saponozitte olduğu gibi sadece arabinoz değil (108), nadir olarak glikoz da, patrinozit C₁ de olduğu gibi, α - furanozidik olarak bağlanmıştır.

Permetilasyon ürününün hidrolizi ile elde edilen aglikonun incelenmesi ile uzun aglikona bağlandığı yer (veya yerler) tespit edilebilir. Serbest hidroksil gruplarının yerinin tespiti için bileşik, asetatına çevrilir, ardından NMR veya kütle spektrometresi ile incelenir. Hidroksil grubunun ketona oksidasyonu ve ürünün IR, NMR, kütle spektrometresi (108,189) veya CDC ve ORD (100) ile incelenmesi de tercih edilen yöntemlerdir.

b. K i s m i H i d r o l i z : Metilasyon verileri uzun bir oz zincirindeki ozların sırası hakkında tam bir fikir veremez. Bu nedenle saponozit seyreltik mineral asitlerle veya % 10 luk okzalik asit ile (106) kısmi hidrolize tabi tutulur. Hidroliz sonucu meydana gelen oligoholozitler ve bağlı bulunan ozların bir kısmı koptuğu için oz sayısı azalmış saponozit birbirinden değişik kromatografik yöntemler kullanılarak ayrılır. Bu ayırımında kağıt, selüloz kolon, karbon-Celite (205) kolonlardan yararlanır. Eğer daha önce yapısı aydınlatılmış bir oligoholozit izole edilmiş ise sonuca daha kolay ulaşmak mümkündür. Bu sebepten oligoholozit taşıyan fraksiyonun şahit oligoholozitlerle karşılaştırmasını yapmak gereklidir. Eğer değişik bir oligoholozit izole edilmişse, bu oligoholozitin yapısı oz kimyasında kullanılan genel yöntemler ile aydınlatılır.

Saponozitlerin kısmi hidrolizi için enzimatik hidroliz yöntemleri de kullanılır. Bu amaçla genellikle mikroorganizmalar veya Helix pomatia'dan elde edilen enzim karışımları kullanılır.

c. P e r i y o d a t O k s i d a s y o n u : D allanmış oz zinciri taşıyan saponozitlerde, oksidasyon suretiyle saponozitin parçalanmasına dayanan, SMITH Degradasyonu (1) ile önemli bulgular elde edilir. Burada oz zinciri periyodat ile parçalanır, reaksiyon ürünü sodyum borohidrür ile redüklenir ve redüksiyon ürünü oldukça seyreltik asit ile parçalanır. Bu yöntemle dallanmamış oz zinciri parçalanır, dallanma nedeniyle 1,2 - glikol yapısı bulunmayan ozlar parçalanmaz. Bu yöntem oz sayısı bakımından zengin saponozitlerin araştırılmasında çok faydalıdır.

d. D i ğ e r Y ö n t e m l e r : Saponozitlerin taşıdığı oz zincirlerinin aglikondan oligoholozitler halinde ayrılmasında kullanılan önemli yöntemlerden biri perasetillenmiş saponozitin hidrobromik asit/ glasiyel asetik asit karışımı ile parçalanmasını takiben ürünün dezasetilasyonuna dayanır (188).

e. A g l i k o n v e O z Z i n c i r i A r a s ı n d a k i B a ğ ı n C i n s i v e Y e r i n i n T a y i n i : Bisdesmozidik triterpenik saponozitlerde bulunan açilozidik bağın seçici olarak parçalanması için en uygun yöntem perasetillenmiş saponozitin lityum alüminyum hidrür redüksiyonudur. Bu suretle C-28 karboksil grubuna bağlanmış oz zinciri ayrılır. C-28 oligoholozitinin aglikona bağlı olan ilk ozu ve karboksil grubu taşıyorsa bu grup ta, primer alkol grubuna redüklenmiş olur.

f. O z i d i k B a ğ l a r ı n K o n f i g ü r a s -
y o n u : Bağlanış tipi, halka tipi ve oz zincirindeki ozla-
rın sırasının tayininden sonra, zincirdeki her ozidik bağın
cinsinin tespiti gerekir. Ancak oz sayısı fazla saponozit-
lerde tam bir tayin yapabilme imkanı sınırlıdır.

Konfigürasyonu bilinmeyen, yapısında 1 - 2 oz taşıyan
saponozitlerde saponozitin, aglikonun ve ozların α - ve β -
metil heterozitlerinin molar çevirmeleri karşılaştırılarak,
KLYNE kuralına göre (104) tayin yapılabilir. Ancak yöntem,
ikiden fazla oz taşıyan saponozitler için, hatalı sonuçlar
vermesi bakımından , kullanışlı değildir. Bu durumlarda en-
zimatik hidroliz yöntemleri de kullanılabilirse de, bütün
ozlar için gerekli enzimlerin bulunmaması ve dallanmış oz
zincirlerinde enzimatik hidrolizin genellikle güç yapıla-
bilmesi gibi engeller bulunmaktadır.

NMR yöntemini kullanarak konfigürasyonun tayini son
zamanlarda geliştirilen bir yöntemdir. Birçok ozlar için (me-
sela; α -ozidik bağlar, 3 Hz ve β -ozidik bağlar, 6-7 Hz) 1.
nci karbon atomundaki protonun sinyalleri için farklı bağ sa-
bitlerinin ortaya çıkması yöntemin temelidir. Bağ sabitleri
sinyallerin üst durumlu olmasından dolayı molekülde iki oza
kadar tayin yapılabilir.

Bir kaç yıl öncesine kadar, saponozitlerin yapı tayin-
lerinde bazı genellemelere dayanarak konfigürasyon açıklanmış-
tır. Mesela, bitki heterozitlerinde D- ozlar β -, L-ozlar ise
 α -ozidik bağlarla bağlanırlar. Bu kaide son yıllarda α -D-gli-
kozidik (190), α -D-galaktozidik ve β -L-arabinozidik bağları
taşıyan heterozitlerin tabiatta bulunması ile geçerliliğini
kaybetmiştir.

POLYGALACEAE FAMILYASI BITKİLERİNİN KİMYASAL BİRLEŞİMİ

Genel

Polygalaceae familyası 10 cins ve 800 kadar türü ile geniş bir yayılış gösterir. Buna mukabil kimyasal çalışmaların büyük bir çoğunluğu Polygala türleri üzerinde yapılmıştır.

Polygala türleri içinde en çok bilineni ve kimyasal yapısı araştırılmış olanı Polygala senega L.'dir. Bu bitki Kuzey Amerikâda yetişir ve tür adını bu bölgede eskiden yaşamış olan "Senega" kızılderililerinden almıştır. Kızılderililer bu bitki köklerini, diüretik ve yayıcı özelliklerinden dolayı, yılan sokmalarına karşı panzehir olarak kullanmışlardır. Polygala senega köklerinin İngilizce isimlendirilmesi de bu kullanılışa uygun olarak yapılmıştır : Snake root (= Yılan kökü)

Drog, Kuzey Amerika'dan Avrupa'ya 18. yüzyılda getirilmiş ve ekspektoran olarak kullanılmıştır. Ekspektoran etki köklerde bulunan saponozitlerin mukozayı tahriş etmesi ve bronşiollede meydana gelen refleks salgının artmasına dayanır (B.P.C.). Bu özellik saponozit taşıyan droglar için karakteristiktir. Ekspektorasyon sağlamak üzere öksürük şuruplarının terkbine girer (Ek - 1), (Ek - 2).

Ekspektoran etkisinden dolayı eczacılıkta kullanılışı son yıllarda azalmıştır. Bu arada taşıdığı saponozitlerin antibiotik

ve antifungal etkilerinin bulunduğu ortaya çıkarılmıştır.

WOLTERS (210), saponozitlerin antibiotik etkileri üzerinde yaptığı bir çalışmada, Polygala amara herbasi ve P. senega köklerini de incelemiştir.

Bitkilerin yukarıda belirtilen kısımlarının metanolik ekstraktları çeşitli funguslara karşı denenmiş ve Tablo - 5 deki sonuçlar alınmıştır.

Tür	Funguslara karşı aktivite								Önleme bölgesi çapı (mm)
	Piricularia oryzae		Trichothecium roseum		Claviceps purpurea		Polyporus versicolor		
<u>P. amara</u>	+++	PA	++		+++	P	++	A	8-13
<u>P. senega</u>	+++	PA	++		++	A	++		7-16

Tablo - 5

Polygala amara ve P. senega'nın Antifungal Aktiviteleri (210)

- (P) - Plasmoptiz (mantar hiflerini parçalayan etki)
- (A) - Permeabiliteyi arttırarak parçalar
- (+++) - Fungusit
- (++) - Fungostatik

Aynı çalışmada metanolik ekstrakt, kolesterin ile kompleks meydana getirmek üzere reaksiyona sokulmuş ve elde edilen kompleksin antifungal aktivitesinin P. amara'da fazla, P. senega'da ise kısmen azaldığı tespit edilmiştir. Bu da etkinin bitkilerin taşıdığı saponozitlerden ileri geldiğini gösterir.

RAO ve arkadaşları (139), β -amirin grubu açıl saponozitlerin nezle virüsü (A₂-Japan 305) üzerindeki antiviral etkilerini in vitro

olarak araştırırken Polygala senega saponozitlerini de incelemiştir. Tablo 6'da sonuçlar görülmektedir.

	Konsantrasyon µg/ml EtOH	Tolere edilebilen en yüksek kons. (µg/ml)	Inhibisyon %
Senegin	12,5	50	34
Prosapogenin	100,0	-	36

Tablo - 6

P. senega'dan Elde Edilen Saponozitlerin Nezle Virüsü (A₂-Japan 305) Üzerindeki Antiviral Etkileri (139) .

Bu neticeler diğer incelenen saponozitlerle karşılaştırıldığında, açıl β- amirin iskeletine sahip triterpenik saponozitlerin büyük bir çoğunluğunda görülen antiviral aktivitenin, açıl grubundan başka aldehit veya karboksil grubunun yapıya girmesi ile azaldığı tespit edilmiştir.

P. senega dışında kalan türler ve diğer Polygalaceae familyası bitkilerinin kullanışı ile ilgili bilgiler Tablo - 7'de gösterilmiştir.

Polygala senega Kökünün Yerine Kullanılabilecek Türler

Polygala senega'nın Avrupa'ya sadece Amerika'dan ithal edilmekte olması bu droğun sağlanma güçlüklerini ortaya çıkarmıştır. Bu yüzden araştırmacılar benzer etkiye sahip ve Polygala türlerinden elde edilen yeni droglar bulmaya yönelmişlerdir. CHOU ve ark. (24) Kuzey Çin'de halk ilacı olarak kullanılan P. tenuifolia Willd.'den, daha önce P. senega'dan izole edilen senegine

Tür	Kullanılan	Ülke	Kullanılış şekli ve etki	Lit.
<u>P. japonica</u>		Japonya	tonik	85
<u>P. caracasana</u>	Kökler	Venezüella	R. <u>Ipecacuanhae</u> droğunun	85
<u>P. violacea</u>			tağşişinde	
<u>P. spectabilis</u>		Brezilya	hemorroid ve amipli enfeksiyonların tedavisinde	7
<u>P. tenuifolia</u>		Japonya-Çin	soğuk algınlığı, diüretik, kısırlık, amnezi, sedatif, ekspektoran	23
<u>P. paenea</u>	Kökler	Haiti	diüretik, ekspektoran	135
<u>P. elongata</u>	Kökler	Hindistan	kabızlık, safra hastalıkları, yılan sokmaları	23
<u>P. crotalariaoides</u>				
<u>P. chinensis</u>	Kökler	Çin	ateş düşürücü	23
<u>P. glomerata</u>	Herba	Çin-Hindistan	dekoksiyonu halinde çeşitli iltihaplarda	23
<u>P. amara</u>	Herba	Orta Avrupa	süt salgısını arttırıcı, Stomaşik	85
<u>P. vulgaris</u>	Herba	Orta Avrupa	idrar yolları hastalıkları	85
<u>P. tinctoria</u>	Çiçekler	Arap Ülkeleri	boyacılıkta (İndigo'ya benzer)	85
<u>P. butyracea</u>	Tohum	Afrika	yağı (% 18) gıda olarak, sabun endüstrisinde	85
? (Muckoloabo)	Kökler	Afrika	Tüberküloz Tedavisinde	85
<u>Securidaca longepedunculata var. parvifolia</u>	Kökler	Afrika	Intravajinal olarak abortif, analjezik, pürgatif, römatischenestezik	34,121
<u>Xanthophyllum lanceolatum</u>	Tohum	Sumatra	yağı (% 40) gıda olarak ve aft teravisinde.	23

Tablo - 7

Polygalaceae Familyası Bitkilerinin Değişik Yörelerde Kullanılışı ve Etkileri

benzer yapıda, bir saponozit elde etmişlerdir. Fakat verim Amerika kökenli droğun ortalama yarısı kadardır. Türkiye'de yetişen Polygala türlerinin R. Senegae yerine kullanılıp kullanılmayacağı BAYTOP (10) tarafından incelenmiştir. Anadoluda yaygın olarak bulunan ve kökleri nispeten büyük olan P. pruinosa ve P. anatolica'nın R. Senegae yerine kullanılabileceği düşünülmüştür.

Diğer taraftan FUJITA ve NISHIMOTO (63) Japonya'da R. Senegae olarak kullanılmak üzere kültürü yapılan P. senega L. var. latifolia Torr. et Gray kökleri üzerinde araştırma yaptılar. Bu bitkinin köklerinin hemolitik indeksinin P. senega'nın kine eşit olduğunu tesbit ettiler. P. brasiliensis L. ve P. cyparissias A. St. Hill üzerinde WASICKY ve ark. (202) tarafından yapılan araştırmalarda, bu türlerin P. senega'ya hemen hemen yakın hemolitik indeks ve benzeri değerlere sahip oldukları tespit edildi.

Araştırılan türlerden P. senega L. var. latifolia Torr. et Gray, BPC'nin offisinal olarak kabul ettiği ikinci türdür. Martindale "The Extra Pharmacopeia"da P. tenuifolia Willd. (P. sibirica) ve P. chinensis'in de ilaç hazırlamada kullanılabileceği kayıtlıysa da, BRIESKORN ve RENKE (16) tarafından yapılan bir çalışmada P. chinensis köklerinin R. Senegae yerine kullanılamayacağı belirtilmiştir. P. chinensis'in taşıdığı saponozit gerek fiziksel özellikleri (yüzey aktivite ve hemolitik indeks düşük, kolesterin ile kompleks teşkil etmez) ve gerekse bağlı ozları bakımından farklılık göstermektedir.

Senega kökünün sağlanma güçlüklerinden dolayı, değişik bitkilerin kökleri bu drog yerine piyasaya sürülmüştür. Suriye Senegası'nın Spergularia marginata ve S. media (Caryophyllaceae) bitkilerinin kökleri olduğu BOUCHE (15), PARIS ve LYS (100) tarafından ortaya çıkarılmıştır. RIDGWAY ve ROWSON (143) ise Hint Senegası'nın Glinus oppositifolius L. (Aizoaceae) dan elde edildiğini tespit etmişlerdir. Piyasada Hint ve Pakistan Senegası adı altında bulunan köklerin Andrachne aspera L. (Spreng.) (Euphorbiaceae) köklerinden meydana geldiği SHAH ve KHANNA (160) tarafından ortaya çıkarılmıştır. Senega kökünün yerine kullanılan bu köklerin Senega kökü ile en önemli benzerliği dış görünüşleridir. Araştırmacılar mikroskopik inceleme ve hemoliz indekslerini inceliyerek örneklerin Polygala senega'ya ait olmadıklarını kolaylıkla ortaya çıkarmışlardır.

Polygalaceae familyası bitkilerinin taşıdığı maddeler üzerinde yapılan araştırmalarda saponozitler, oz ve oz türevleri, laktonik lignanlar, ksantonlar, polifenolik yapıdaki maddeler (flavonozitler ve basit fenoller), amino asitler, sabit yağlar ve steroller bulunduğunu göstermiştir. Araştırmalar daha çok saponozitler ve bilhassa Polygala senega saponozitleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Konuyu incelerken yukarıda belirtilen kimyasal gruplandırma esas alınmıştır.

A. S a p o n o z i t l e r : Familyanın üzerinde en çok araştırma yapılan bitkisi Polygala senega'dır. Bu sebepten

P. senega ayrı bir başlık altında incelenmiştir.

Polygala senega Saponozitleri: GEHLEN (128), 1804 yılında P. senega'dan saponozit yapısında bir madde izole etmiş ve "Senegin" adını vermiştir. Bu maddenin kimyasal yapısı 160 yıl gibi uzun bir süre sonunda ancak açıklığa kavuşabilmiştir (49). Araştırmalar incelendiğinde P. senega köklerinden elde edilen değişik isimlerde ve değişik yapılarda maddelerin varlığından bahsedildiği görülür. Bu yüzden P. senega'nın saponozitinin yapısının aydınlatılması üzerindeki çalışmalar üç zaman grubunda incelenmiştir.

1804 - 1936

Bu devredeki araştırmalar saponozitin ve aglikonunun elementer analizi ve bazı aktif grupların tespitini sağlamıştır.

1804 yılında GEHLEN senegin adını verdiği maddenin yapısı hakkında herhangi bir bilgi vermemektedir. Sadece maddenin eterle yıkanmış alkollü ekstreden elde edildiğini ve suda çözünmediğini belirtmiştir (128). Ancak bu madde, daha sonra PECHIER'in bahsettiği poligalin (128) ve DULONG'un izole ettiği senegin'den (53) farklıdır. DULONG bu farkı şu şekilde izah etmiştir: "GEHLEN'in kullandığı kökler, P. senega kökleri değildi."

Daha ileri araştırmalarda saponozit adını verebileceğimiz bir maddenin izole edildiğini görmekteyiz. Saponozit terimini ilk kullanan BUSSY (19) olmuştur. BUSSY, QUEVENNE (137,138) ve BOLLEY (14)'in yaptıkları araştırmalarda verdikleri elementer

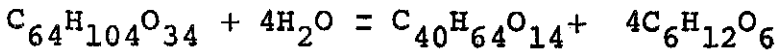
analiz sonuçları Tablo - 8'de gösterilmiştir.

Maddenin adı	% C	% H	Araştırmacı	Lit.No.
Saponozit	51,00	7,4	BUSSY	19
Poligalik asit	55,704	7,529	QUEVENNE	137,138
Senegin	54,00	6,00	BOLLEY	14

Tablo - 8

BUSSY, QUEVENNE ve BOLLEY'in P. senega Saponoziti Üzerinde Yaptıkları Çalışmaların Sonuçları.

FUNARO (65,66), beş senegin örneği üzerinde çalışmış ve % C 54,13, % H 7,45 olarak bulmuştur. Bu miktarlar BOLLEY ve QUEVENNE'in bulduklarından farklıdır. Araştırmacı senegin'i seyreltik asitlerle ısıtmış jelatinimsi bir maddenin çöktüğünü ve glikoz hasil olduğunu tespit etmiştir. Jelatinimsi madde % C 62,26 % H 8,21 yapısındadır. Bu gün ki bilgilerimizle bunun saponozitin aglikonu olduğunu söyleyebiliriz. Hidroliz sonucu senegenin ve glikoz meydana gelmesini FUNARO (65) şu şekilde açıklamıştır :



1912 yılında KOBERG (105) senega kökünün 2 veya 3 saponozit taşıdığını ileri sürmüştür. Bunlar asit karakterdeki "Poligalik asit", nötr yapıdaki "Senegin" ve "Senegon" dur. Araştırmacı Senegon'un muhtemelen senegin'in daha saf şekli ve lakton yapısında olduğunu ileri sürmüştür.

WEDEKIND ve KRECKE (203) 1924'de senegin'i hidroliz edip $C_{26}H_{44}O_6$ kaba formülündeki senegenin'i elde etmişlerdir. Bu maddenin yapısında iki hidroksil ve iki karboksil grubu bulunduğunu da göstermişlerdir. Görüldüğü gibi maddenin kaba formülü, daha önce FUNARO'nun (66) elde ettiğinden farklıdır.

1930'da DAFERT ve KALMAN (30) senegin'in hidrolizatında senegenin'in yanında % 41 glikoz, % 11 arabinoz ve % 11 bir metil pentoz bulunduğunu göstermişlerdir. Bu araştırmacılar KOBERT'in (105) köklerde iki veya üç saponozit bulunabileceği görüşüne karşı çıkmışlar ve tek bir saponozit bulunduğu görüşünü ileri sürmüşlerdir.

1937 - 1963

JACOBS ve İŞLER (90) ticari Senega köklerinden elde ettikleri saponozit fraksiyonunu etanollü hidroklorik asit ile hidroliz etmiş ve iki sapogenol elde etmişlerdir. Bu sapogenollerden birini senegenin diye isimlendirmiş ve diğerine ise herhangi bir isim vermemişlerdir. Elde edilen sapogenollerin özellikleri aşağıda (Tablo -9) gösterilmiştir.

Araştırmacılar maddelerin tetranitrometan reaksiyonunu zayıf olarak vermesi nedeniyle, çift bağın varlığını şüpheli olarak kabul etmiş ve bu yüzden iki kaba formül teklif etmişlerdir. Alkali ile titrasyonda 3 mol alkali sarfedilmesini, araştırmacılar iki karboksil, bir lakton grubu bulunması şeklinde yorumlamışlar, genel yapının tetrasiklik triterpen olduğunu da dehidrogenasyon sonucunda perhidrokrizen meydana gelmesi ile açıklamışlardır.

Madde	Çözünürlük	e.n.	Kaba formülü	-COOH -OH lakton çift bağ.			
				sayısı			
Senegenin	az	290-2°C	C ₃₀ H ₄₄ (46)O ₈	2	2	1	1?
Sapogenin	çok	257°C	C ₃₁ H ₅₀ (48)O ₆	1	2	-	1?

Tablo - 9

JACOBS ve ISLER'in Elde Ettikleri Sapogenollerin Özellikleri (90).

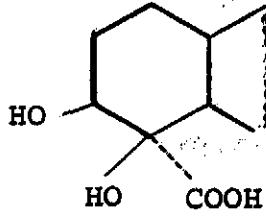
(*) : Etilesteri halinde.

1954'de CROES (28) P. senega'dan elde edilen senegin'in UV-spektrumlarını çekerek özelliklerini araştırmıştır. Bu çalışmada senegin'in özel bir kromofor grup taşıdığı ve bu grubun 315 nm. de kuvvetli bir doruk gösterdiğini tespit etmiştir. Bu doruk senegin'in asit hidrolizi ile kaybolmakta ve elde edilen aglikon (senegenin-C₂₇H₄₀O₇) bir hidroksil grubu taşımaktadır. Bu da, bu çalışmada hidroliz şartlarının aglikon kısmında yapı değişikliklerine sebep olduğunu ortaya koymaktadır. Bu neticeden hareket eden FINHOLT (55), senegin'in değişik pH değerlerindeki stabilitesini hemolitik aktivitede meydana gelen değişikliklerle tespit etmeye çalıştı. Araştırma sonuçlarına göre, senegin % 1'lik sulu çözeltileri halinde pH 3-5 arasında çok dayanıklıdır. pH 1'de dayanıklılığı azalmakta, pH 10 - 13 arasında ise son derece dayanıksızdır. Ozlar en çabuk pH 1'de, en yavaş pH 13'de kopmakta, pH 3 - 10 arasında ise parçalanma olmamaktadır. pH 10 - 13 arasında aglikonun gösterdiği ani

değişme, asit pH'da daha yavaş meydana gelir. Ağılıkonda meydana gelen yapısal değişiklikler hemolitik aktiviteye de tesir etmektedir.

1957'de SIMONSEN ve ROSS (170) senegenin'in yapısını JACOBS ve ISLER'in (90) açıkladığı şekilde kabul etmişler ve bu, klasik bir bilgi olarak ders ve araştırma kitaplarında yer almaya başlamıştır (170, 201).

SHAMMA ve REIFF (140,161) 1960 yılında P. senega'dan elde edilen senegenin'in yapısını enstrumental yöntemlerle araştırmışlardır. Maddenin değişik türevlerinin NMR - spektrumları alınmış ve 2 hidroksil, 2 karboksil grubu ve 1 çift bağın varlığı tespit edilmiştir. IR - spektrumları incelenerek beşli bir lakton halkası değil, altılı bir lakton halkasının varlığı öne sürülmüştür. Çift bağın, hidrogenasyona dayanıklı olması sebebiyle, halka içinde ve trisubstitüe olması gerektiğini ileri sürmüşlerdir. A halkasında ise α -, β - dihidroksi karboksilik asit bulunduğunu göstermişlerdir (Şekil -9)



Şekil - 9

Senegenin A Halkasının Yapısı Üzerinde Öne Sürülen

Şekil (140)

1962 yılında IRWIN (88) P. senega köklerinin taşıdığı ham saponozitlerden üç triterpen izole etmiştir. Bunlar ; senegenin, senegenik asit, poligalik asit etil esteri'dir. IRWIN'in izole ettiği maddelerin özellikleri Tablo - 10'da gösterilmiştir.

	C	H	O	ed.
senegenin	30	44	8	290°C
senegenik asit	29	46	7	240 - 250°C
poligalik asit etil esteri	31	48	6	230°C

Tablo - 10

IRWIN'in İzole Ettiği Maddelerin Özellikleri (88)

P. senega'dan elde edilen ham saponozitin tam fraksiyonlanması yapılmadan, üzerinde bazı fizikokimyasal çalışmalar da yapılmıştır. Bu araştırmalarda, araştırmacıların senegenin dedikleri madde aslında Senega saponozitlerinin karışımıdır. RUYSEN ve JOOS (94, 95, 146, 147, 148, 149) grubu ve MOERMAN (120) senegin'in fizikokimyasal özelliklerini geniş bir şekilde araştırmışlardır. Araştırmaların sonucunda senegin'in köpük verme kabiliyeti, bu özelliğe değişik alkollerin, elektrolitlerin, pH değişmesinin etkileri incelenmiş ve dayanıklı köpük elde edilebilecek şartlar tespit edilmiştir. Diğer taraftan, RUYSEN (148) ve JOOS (96), saponozitlerin kolesterol ile meydana getirdikleri kompleksin membranın yapısı ve permeabilite, hemoliz gibi biyolojik verilere bağlı olarak artışını incelemişlerdir. Senegin'in

kolesterol ile 1 : 1 oranında oluşturduğu kompleks digitoninden çok daha kuvvetle penetre olmaktadır. Senegin'in aksine senegenin'in çok zayıf hemoliz göstermesi alyuvarların saponozitler tarafından hemolizinde, hücre zarının kolesterol ile bir kimyasal reaksiyonunun rol oynadığını ortaya koymaktadır.

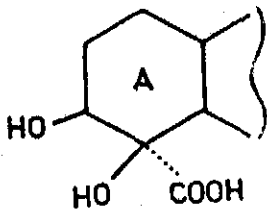
Van DEN BOSSCHE ve ark. kromatografi, IR-, UV- spektrofotometresi yöntemleri kullanarak senegin ve senegenin'in özellikleri üzerinde bir seri çalışma yapmışlardır (194 - 197). Senegin'in % 1-2 sülfirik asit ile 120°C otoklavda hidrolizi sonucu senegenin yanında glikoz, galaktoz, ksiloz, ramnoz ve fukoz tespit ettiler. Aynı araştırmacılar, KAMAROWSKI Yöntemini kullanarak senegin'in kolorimetrik miktar tayinini yaptılar. Senegin'in % 0,1 vanillin / 20 - 25 N sülfirik asit ile verdiği rengin 50 - 75 dakika sonra optimum yoğunluğa eriştiğini tespit ettiler. (10 - 50 mg/l konsantrasyon) (194).

1964 - 1978

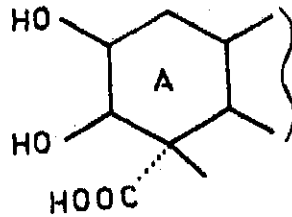
DUGAN ve ark. (49) 'nin 1964 yılında yaptıkları çalışma senegenin'in yapısı hakkındaki çalışmaların dönüm noktası olmuştur. Araştırmacılar bir lakton grubunun varlığını spektrofotometrik yöntemlerle ispat edebilmek için önce senegenin'in sodyum tuzunu elde etmiş ve disodyum tuzunun meydana geldiği görülmüştür. Halbuki tuzun IR- spektrumunda karbonil grubuna ait 1550 cm⁻¹ civarında, karakteristik pik görülmemektedir. Bu yüzden senegenin'de lakton grubu varlığından bahsedilemez. Bu durumda JACOBS ve ISLER (90)'in üç mol alkali tüketimi için hala

uygun bir açıklamaya gerek vardır. Bu kuvvetli asidik fonksiyonun karboksilik olmayan bir gruptan ileri gelebileceğini düşünen araştırmacılar (49), bu düşüncelerini senegenin'in yapısında bir klor atomu tespit ederek doğruladılar. Klorun atom ağırlığı, iki oksijen atomunun ağırlığına yakın olduğundan, daha önce SHAMMA ve REIFF (161) tarafından $C_{30}H_{44}O_8$ olarak gösterilen formül yerine $C_{30}H_{45}O_6Cl$ açık formülünü teklif ettiler.

Araştırmacılar, yine SHAMMA ve REIFF (161) tarafından senegenin'in A halkası için teklif edilen yapının (Şekil -9) yanlış olduğunu, değişik kimyasal yöntemler kullanarak ispat etmişler ve gerçek yapının şekil - 10 daki gibi olması gerektiğini öne sürmüşlerdir (49).^a



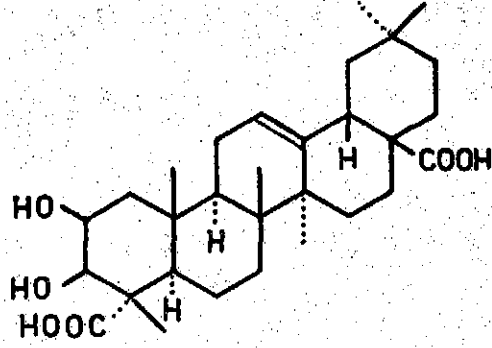
Şekil - 9



Şekil - 10

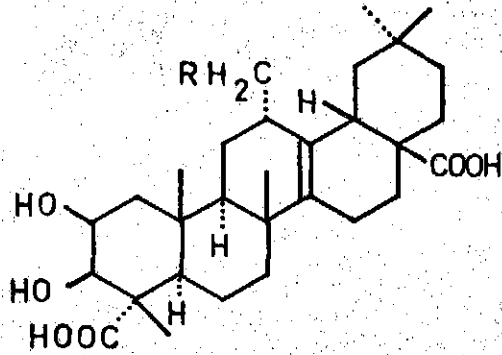
Senegenin A Halkasının Yapısını Açıklamak Üzere İleri Sürülen Şekiller

^a : Yani A halkası SHAMMA ve REIFF'in öne sürdüğü gibi bir α, β -dikarboksilik asit değil, medikagenik asit'e (Şekil -11) tekabül eden bir konfigürasyona sahip β, γ -dihidroksikarboksilik asit yapısındadır.



Şekil - 11
Medikagenik asit

DUGAN ve DE MAYO kısa bir süre sonra (49) klor atomunun halkadaki yerini tespit etmişler ve senegenin'in yapısının (Şekil - 12) gibi olabileceğini ileri sürmüşlerdir (51). Aynı araştırmada senegin'de klor bulunmaması araştırmacıların dikkatini çekmiş ve bu klor atomunun yapıya hidroklorik asit ile hidroliz esnasında girebileceğini belirtmişlerdir.

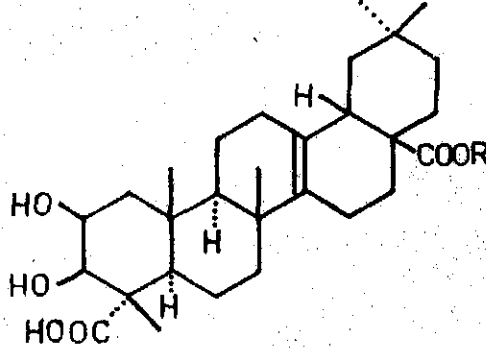


Şekil - 12

R = Cl, senegenin

R = OH, hidroksisenegenin

Aynı grup P. senega köklerinden poligalik asit adı verilen (49) bir sapogenol izole etmiş ve yapısını aydınlatmışlardır (50) (Şekil - 13). Bu madde daha önce IRWIN (88) ve SHAMMA (161)'nin poligalik asit etilesteri (Şekil - 13) dediği madde ile aynı anlamda kullanılmıştır. Araştırmacılar poligalik asit etil esterinin de, senegenin gibi, saponozitin hidroklorik asit ile hidrolizi esnasında bir bozulma ürünü olarak ortaya çıkabileceğini ileri sürmüşlerdir.



Şekil - 13

R = H, senegenik asit (poligalik asit)

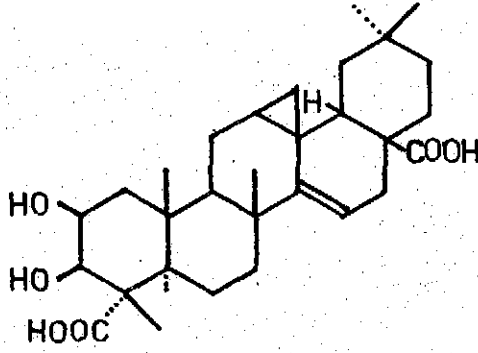
R = C₂H₅, senegenik asit etil esterini

Kısa bir süre sonra yayınlanan^a PELLETIER ve ark. (129)'nin çalışmaları da bu sonucu kesin olarak doğrulamıştır.

Senegenin ve senegenik asit'in, hidroklorik asidin, hidroliz esnasında yapıyı değiştirmesinden meydana gelen maddeler olduğunun anlaşılması (129), aglikonun hakiki yapısının tayini üzerinde yoğun araştırmalar yapılmasına neden olmuştur.

^a: DUGAN ve PELLETIER-, bu araştırmaları birbirlerinden habersiz olarak yapmışlardır. Bu iki araştırma, Tetrahedron Letters mecmuasının 1964/37 ve 41. nci sayılarında yayınlanmıştır. PELLETIER'in belirttiğine göre, DUGAN'ın çalışması yayınlanmadan önce bir kopyasının kendisine gönderildiği ve bu kopyadan yararlanarak yazmakta olduğu çalışmada senegenik asit ile poligalik asit'in aynı olduğunu belirtmiştir.

1964 yılında DUGAN ve ark. (50) "Hidroksisenegenin" (Şekil - 12) ve 1965 yılında SHIMIZU ve PELLETIER (163) "Siklo-senegenin" (Şekil - 14) ile senegenin arasında bir ilişki olup olmadığını incelemişlerdir.

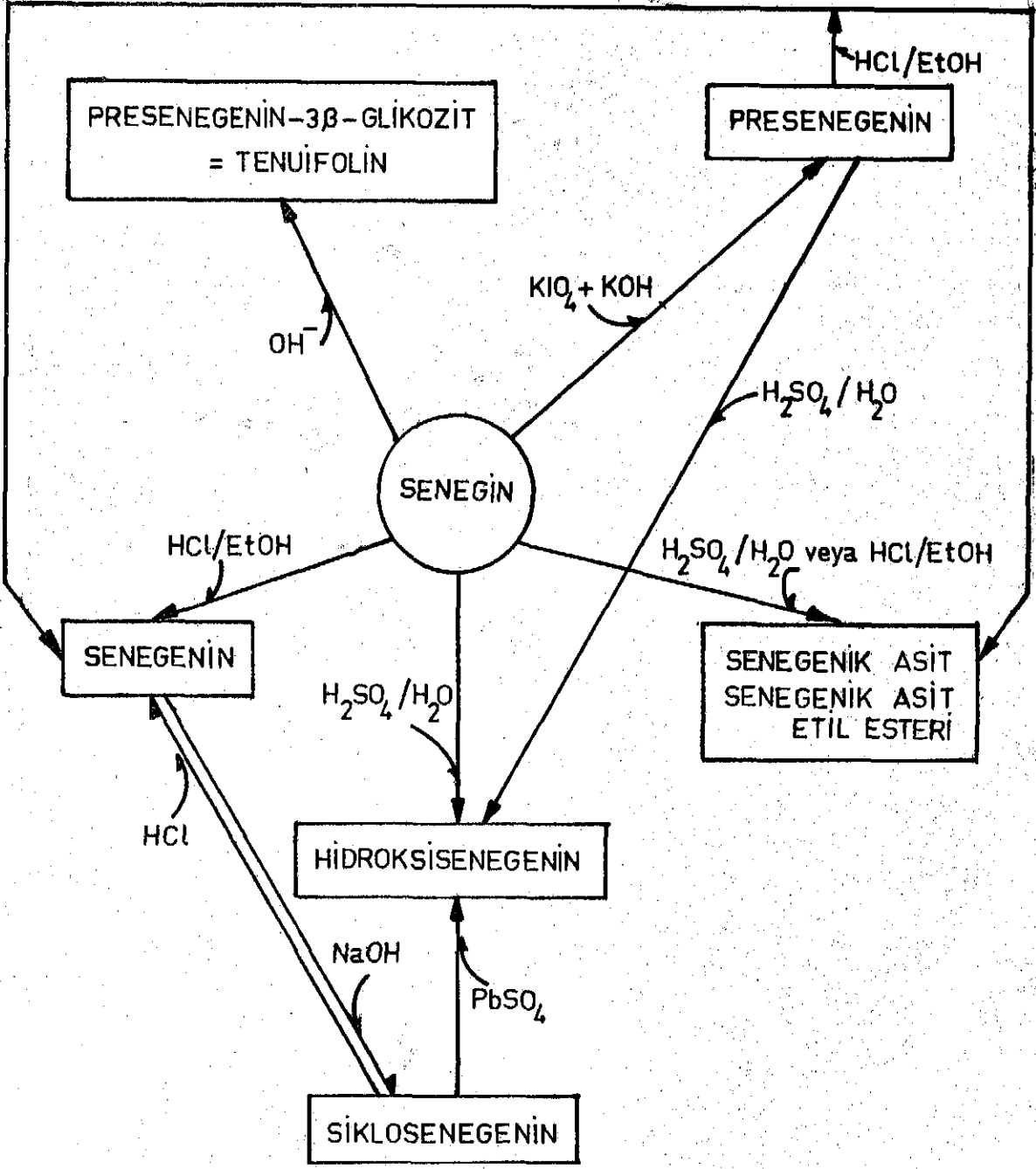


Şekil - 14

Siklo-senegenin

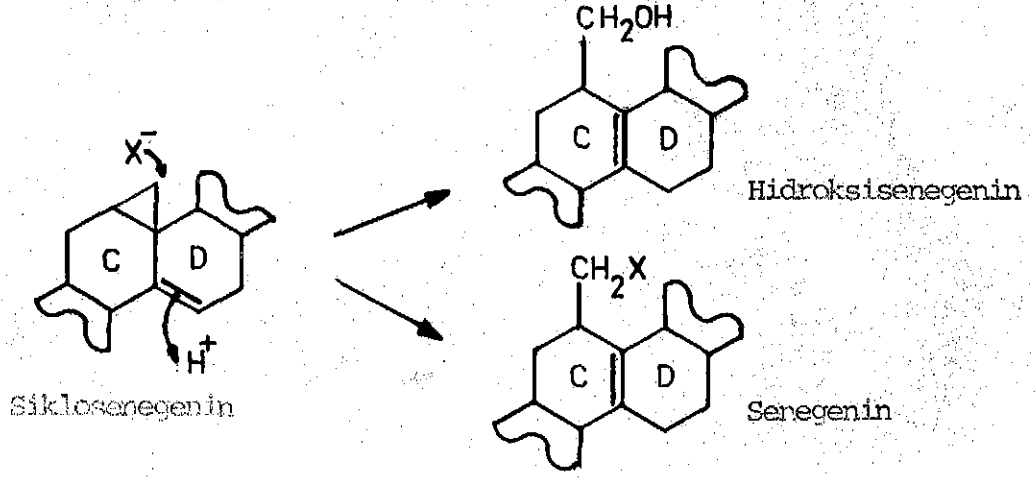
Hidroksisenegenin, senegenin'in sülfürik asit ile hidrolizi neticesinde senegenik asit ile birlikte meydana gelmektedir (Şekil - 15). Ancak bu bileşiğin hidroklorik asit ve kurşun sülfatla muamele edildiğinde senegenin veya senegenik asit meydana getirmemesi, gerçek aglikon olamayacağını gösterir.

Siklo-senegenin, senegenin'in sodyum hidroksit çözeltisi ile muamelesi sonucu meydana gelir (Şekil - 15). Hidroklorik asit ile tekrar senegenin; kurşun sülfat ile hidroksisenegenin verir (163). Siklo-senegenin'den hidroksisenegenin ve senegenin meydana gelmesi, siklopropan halkasında çifte bağın (Şekil - 16) da görüldüğü gibi protonlanması ile Markovnikov Reaksiyonuna uymayan bir şekilde parçalanması neticesinde olur (9).



Şekil - 15

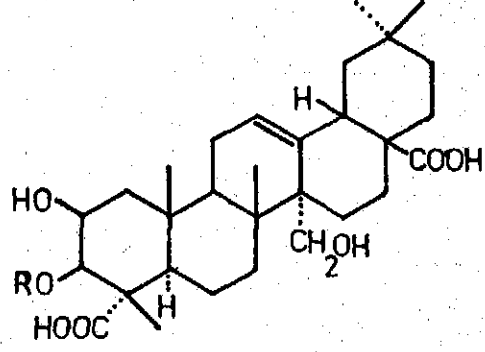
Senegin, Presenegenin ve Yan Ürünleri



Şekil -16

Sikloesenegenin'den Hidroksisenegenin ve Senegenin
Meydana Gelmesi

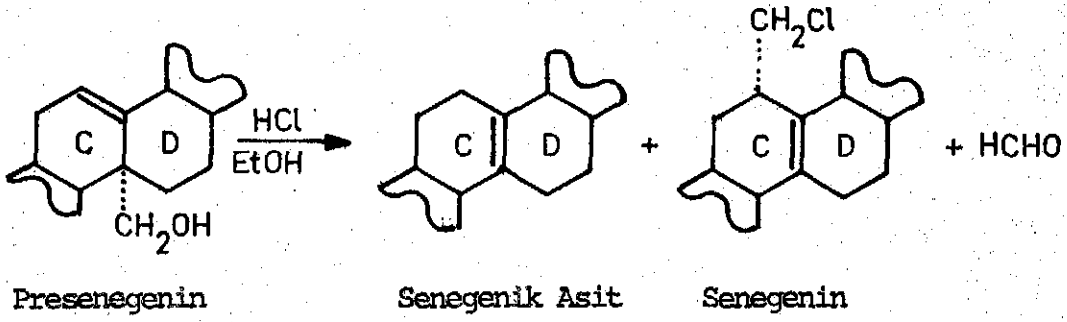
Nihayet, 1965 yılında DUGAN ve DE MAYO (52) gerçek aglikonu ayırmayı başardılar. Presenegenin (Şekil 17), β -amin grubu normal bir triterpendir (2 β -3 β -27-trihidroksiolean-12-en-23,28-dioikasit veya 2 β ,27-dihidroksi-23-karboksi oleanolik asit). Bu aglikon, senegin'in periyodat parçalanması ve takiben potasyum hidroksit ile alkali hidrolizi suretiyle elde edilir. Presenegenin etanollü hidroklorik asit ile ısıtıldığında senegenik asit ve senegenin karışımının yanında formaldehit açığa çıkar. Bunun sebebi, presenegenin ve senegenik asit'in formülleri arasındaki farklılıktır (Şekil 18).



Şekil - 17

R = H, presenegenin

R = β-D- glikoz,(Tenuifolin)



Şekil - 18

Presenegenin'in Etanollü Hidroklorik Asit ile Değişimi

Presenegenin'in senegenin'e dönüşmesi PELLETIER ve ark. tarafından geniş bir şekilde incelenmiştir (130). Araş-

tıricılar bu dönüşümde homoallilik katyonların rol oynadığını ileri sürmektedirler. Presenegenin'den basit 5-basamaklı bir işlem ile medikagenik asit (Şekil 11) elde edilmesi, yapının daha tutarlı bir şekilde açıklanmasını sağlamıştır (164,165).

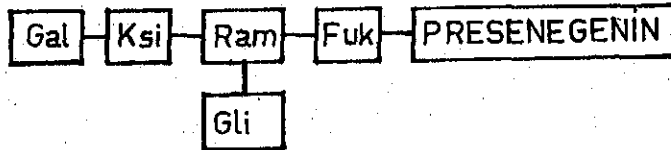
Aynı araştırmacılar P.senega ve P.tenuifolia köklerinden daha önce izole ettikleri (131) prosapogeninin, tenuifolin, yapısını bu yeni bilgiler ışığında tayin etmişler (132), ve presenegenin-3 β -glikozit (Şekil-17) olduğunu tespit etmişlerdir. Tenuifolin'in yapısının aydınlatılması ile ilgili bilgiler P.tenuifolia üzerindeki çalışmalarda verileceği için burada tekrarlanmasına gerek görülmemiştir.

YOSIOKA ve ark. da (214) geliştirdikleri mikrobiyolojik hidroliz yöntemi ile P. senega saponozitlerinden presenegenin izole ederek DUGAN ve ark. (52)'nin bulgularını doğruladılar. 30 kadar toprak numunesinden izole edilen toprak bakterileri, karbon kaynağı olarak sadece saponozit taşıyan sentetik bir vasatta^a küçük miktarlarda üretilir. Seçilen suş, daha büyük miktarlarda çalışılarak, 31°C de 16 gün fermentasyona bırakılır. Kültür vasatı eter ile ekstre edilir. Çözücü uçurulduğunda elde edilen artık metanolle kristallendirilerek temizlenir. Bileşik diazometan ile metillenir. Elde edilen metil esterinin erime derecesi, karışım erime derecesi, IR- ve NMR-spektrometrik yöntemlerle presenegenin dimetilester olduğu tayin edilmiştir.

^a: KH_2PO_4 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,7 g, NaCl 1 g, $(NH_4)_2HPO_4$ 4 g, $Fe SO_4 \cdot 7H_2O$ 0,03 g, saponozit 3 g, distile su 1000 ml, seyreltik HCl ile pH 6,0 ya ayarlanır.

Diğer taraftan, BRIESKORN ve SERG (18), P.senega Saponozitlerinin alkali hidrolizi ile ortaya çıkan tenuifolin (presenegenin -3 β -glikozit) (Şekil-17) üzerinden kolorimetrik bir miktar tayini yöntemi geliştirmişlerdir. Tenuifolin'in nitrofenilaçilesterinin dietilamin ile verdiği menekşe renkli ürünün kolorimetrede 550 nm'da verdiği λ -doruğunun ölçülmesine dayanan yöntem ile R.Senegae'nin % 4,6-7,8 total saponozit ihtiva ettiği tespit edilmiştir.

1971 yılında GOEBELS (74), P.senega köklerinden dört saponozit ayırmayı başarmıştır. Aglikonları presenegenin olan saponozitler p-metoksi sinnamik asit veya 3,4-dimetoksi-sin-namik asit ile esterleşmiş durumdadırlar. Araştırmacı A,B,C,D olarak isimlendirdiği bu saponozitlerden temel sapanozit B' nin 1:1:1:1:1 molar oranlarda glikoz, galaktoz, ksiloz, ramnoz ve fukoz taşıdığını tespit etmiştir. Aynı yıl SCHULZ (156) temel saponozit B üzerinde yaptığı çalışmada, bu ozların dizilişinin (Şekil-19) gibi olabileceğini ileri sürmüştür.



Şekil - 19

Temel Saponozit B'nin Yapısı (156).

Polygala senega Linne var. latifolia Torry at Gray

S a p o n o z i t l e r i : Polygala senega var.

latifolia kökleri Japonya'da halk arasında ekspektoran olarak kullanılmakta ve bitki R.Senegae elde etmek üzere yetiştirilmektedir. Bitkinin köklerindeki saponozitlerin aglikonunun, TSCHESCHE ve GUPTA (184)'nın Bredemeyera floribunda (Polygalaceae) köklerinden izole ettikleri aglikon ile aynı yapıda olduğu FUJITA ve ITOKAWA (64) tarafından gösterilmiştir (Şekil-16).

1969 yılında KITA ve ark. (101) köklerden A ve B adını verdikleri iki saponozit izole etmişlerdir. Bu iki saponozitin erime dereceleri arasında küçük farklılık, A (252-3°C) ve B (256-7°C), bulunmaktadır. Diğer özellikleri ve IR-, UV-spektrometrik bulguları hemen hemen aynıdır. Araştırmacılar, kendi NMR- ve UV- bulgularıyla PELLETIER (165) nin bulgularını karşılaştırarak senegin molekülüne 3,4-dimetoksisinamik asit veya 4-metoksisinamik asit girme ihtimalinden bahsetmektedirler. Senegin'in yapısında böyle bir kromofor grubun varlığı UV-315 nm civarında görülen absorpsiyon doruğu ve bu doruğun presenegenin'in UV-spektrumunda görülmemesi ile açıklanabilir. Bu netice, VAN DEN BOSSCHE (195)'un, senegin'in IR- spektrumunda görülen aromatik bantları da izah etmektedir. KITA ve ark. (101) geliştirdikleri UV-spektrometrik yöntem ile farklı yörelerden toplanan senega köklerinin saponozit oranları ve hemolitik indeksleri bakımından farklılık gösterdiğini tespit etmişlerdir.

1971 yılında AKADA, YUKI ve TAKIURA (2) bitkinin köklerinden dört saponozit ayırmayı başarmışlardır. Bu ayır-
rında aşağıda özetlenen yöntem kullanılmıştır: Metanollü
ekstrakt kolesterin ile çöktürülerek temizlenir, % 3 okzalik
asit taşıyan silikajel kolonda $CHCl_3/MeOH/H_2O$ (26:14:3)
sistemi ile elüe edilir. Aglikonları presenegenin olan ve
saponozit-A,B,C,D isimleri verilen dört saponozit ayrılır.
Bu saponozitlerin özellikleri (Tablo-11) de gösterilmiştir.

	EN (°C)	HI	doruk λ MeOH	ozlar ve molar oranları						
				gli	gal	fuk	ram	ksi	PMSA	DMSA
Saponozit- A	240-4°	13888	314 nm	2	1	2	2	1	1	1
B	253-7°	43478	314 nm	2	1	2	2	1	1	1
C	279-283°	57143	311 nm	3	1	2	2	1	1	-
D	250-6°	1360	-	2	1	2	2	1	-	-

Tablo - 11

Saponozit-A,B,C,D'nin özellikleri (2)
doruk
(EN.-erime noktası , HI-hemolitik indeks, λ_{MeOH} :meta-
nollü çözeltide UV-spektrometrede verdiği doruk (nm) ,
gli-glikoz, gal-galaktoz, fuk-fukoz, ram-ramnoz, ksi-
ksiloz, PMSA-p-metoksisinnamik asit, DMSA- 3,4- dime-
toksinnamik asit.)

Bitkinin ana saponozitlerinin saponozit B ve C olduğu
da hemolitik indekslerinin yüksek olmasından anlaşılmaktadır.

Aynı yıl bitkinin köklerinin metanollü ekstraktının
n-butanol'de çözünen kısmından SHOJI, KAWANISHI ve TSUKITANI

(167) dört saponozit izole etmişlerdir. Araştırmacılar bu saponozitlere senegin (I), (II), (III), (IV) adını vermişlerdir. Bu saponozitlerin aglikonları presenegenin'dir. Bu konuda ardarda yapılan araştırma sonuçları, maddelerin (Tablo-12) de görülen yapı ve özellikte olduklarını göstermiştir (167-169,191-192).

	Moleküler formülü	EN ^o C	α _D ²⁰ (MeOH)	ozlar ve molar oranları					
				gli	gal	ram	ksi	fuk	
Senegin- II	C ₇₀ H ₁₀₄ O ₃₂ .4H ₂ O	247-8 ^o (b)	- 6.2 ^o	1	1	1	1	1	DMSA
- III	69 102 31	247-8 ^o (b)	- 6.6 ^o	1	1	2	1	1	PMSA
- IV	75 112 35	250 ^o (b)	-20.2 ^o	1	1	3	1	1	PMSA

Şekil - 12

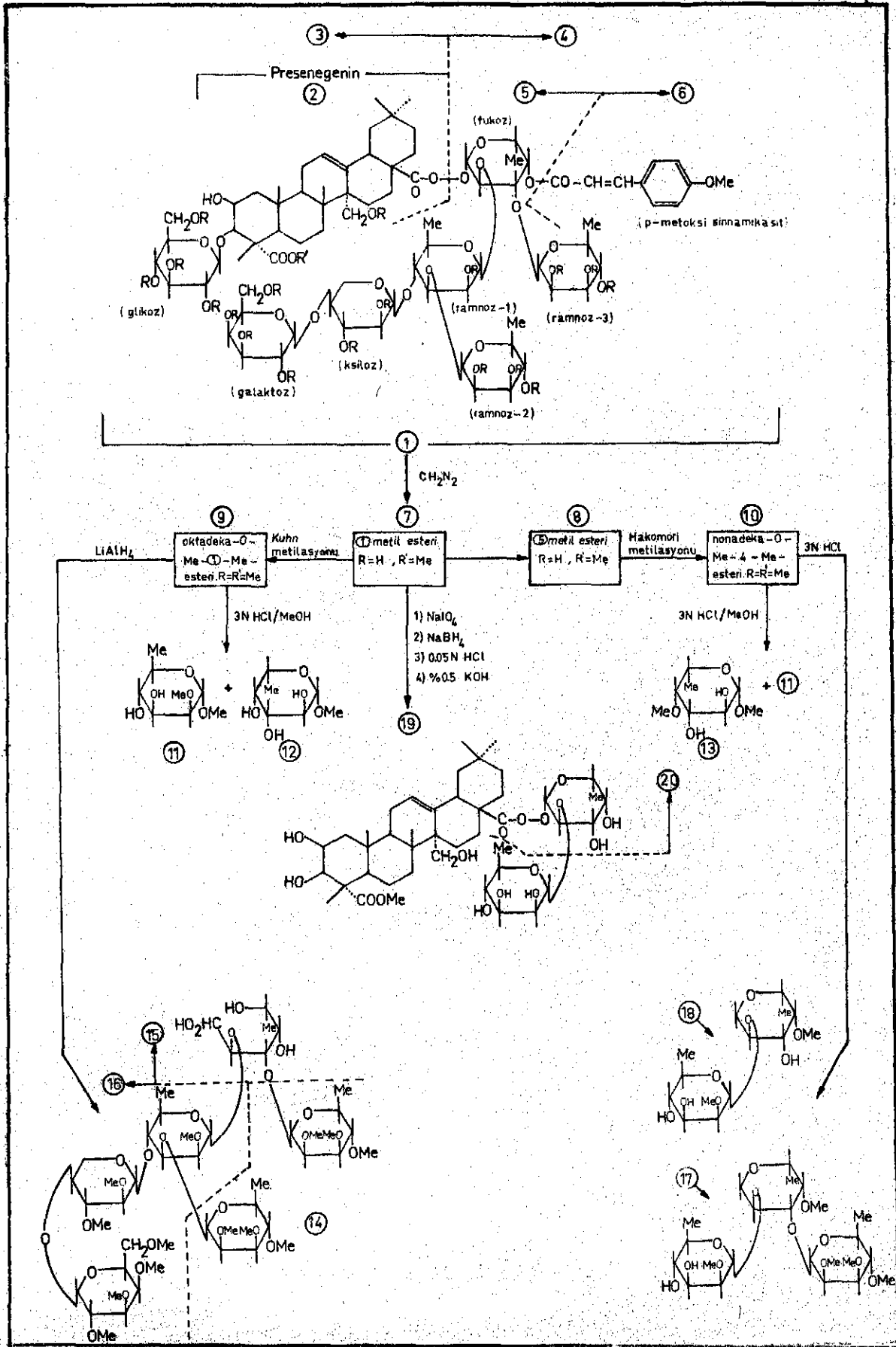
Senegin (II), (III), (IV)'ün özellikleri (167)

(EN.-erime noktası, b.-bozunma ile, α _D²⁰ (MeOH): metanoldeki optik çevirmeleri, gli.: glikoz, gal: galaktoz, ram: rannoz, ksi: ksiloz, fuk: fukoz, PMSA: p-metoksinnamik asit, DMSA: 3,4-dimetoksisinnamik asit)

(Tablo-11 ve 12) karşılaştırıldığında, iki araştırmacının izole ettikleri saponozitlerin fiziksel özellikleri ve ozların molar oranları arasında farklılık bulunduğu görülmektedir. SHOJI ve ark. (167-169,191-192)'nin araştırmaları daha ayrıntılı ve maddelerin yapı tayinlerinde kullanılan yöntem saponozitler için daha uygundur. Bu yüzden P. senega var.

latifolia'dan izole edilen saponozitlerin yapısının bu grup tarafından aydınlatıldığı şekilde olduğu kabul edilmiştir. SHOJI ve ark.'nın bu saponozitlerin yapılarını aydınlatırken takip ettikleri yolu göstermek amacıyla senegin-IV üzerinde yapılan çalışmalar (Şekil-20)'de özetlenmiştir.

- 1) 1'in asit hidrolizi ile birer mol presenegenin 2,p-metoksisinnamik asit 6, glikoz, galaktoz, fukoz, ksiloz ve 3 mol ramnoz açığa çıkar.
- 2) 6'nın 5'e bağlanması, fukozit 13 ile fukozit 12'nin karşılaştırılması suretiyle tespit edilir.
- 3) 7'nin alkali hidrolizi (1 N KOH) ile 3'ün 23-metil-esteri ve bir heksaholozit 4 elde edilir.
- 4) Ramnoz-2'nin, ramnoz-1'e bağlanış durumu, ramnozit 11'in yapısının senegin-III'den (dez-(ramnoz-2)-1) elde edilen 4-O-Me 7 ile karşılaştırılması suretiyle yapılır.
- 5) 14'ün yapısı tri-16 ve tetraholozitlerine metanolizini takiben Hakomori Yöntemi ile permetilasyon ve HCl/MeOH ile metanolizi suretiyle bilinen metillenmiş ozlarına parçalanarak tayin edilir.
- 6) D-fukoz'un konfigürasyonu, 19 daki fukozun anomerik protonunun NMR-spektrumundan ($J = 10$ Hz), β -formunda olduğu anlaşılır.
- 7) 19 ve 20'nin $(M)_D$ değerleri arasındaki farktan, ramnoz-1 anomerik konfigürasyonunun α olduğu anlaşılır.



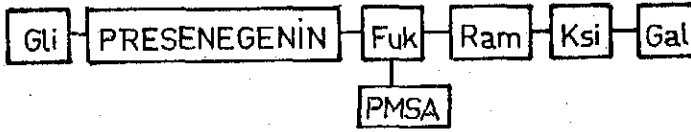
Şekil - 20

Senegin-IV'ün Yapısının Aydınlatılmasında Takip Edilen

Yol (192)

- 8) Ksiloz ve galaktozun anomerik konfigürasyonlarının 14'ün anomerik protonunun NMR-spektrumundaki (J-) değerlerinden, β -formunda olduğu anlaşılır.
- 9) Ramnoz-2 ve ramnoz-3'ün anomerik konfigürasyonlarının α -formunda olduğu, 8 ile senegin-II Me esterinin (ramnoz-2 ve 3'ü ihtiva etmez) (M)_D değerleri arasındaki farktan anlaşılır.

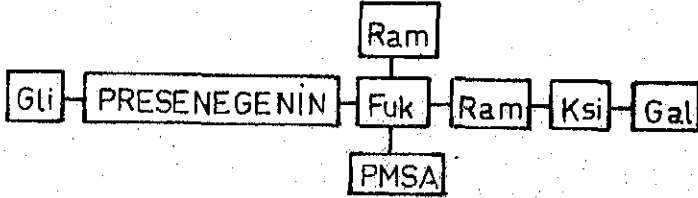
Araştırmacılar aynı yöntem ile senegin-II (Şekil-21) ve senegin-III (Şekil-22)'ün yapılarını tayin ettiler :



Şekil - 21

Senegin-II (191)

Polygala senega var. typica S a p o n o z i t l e r i :
BRIESKORN ve RENKE (16) bitkinin köklerinden elde ettikleri saponozit karışımını kuvvetli bazik anyonik iyon değiştirici kolonda iki kısma ayırmışlardır : (I) kolonda iyon-değiştirici reçine ile bağlanan saponozit karışımı (oran % 42), (II) kolondan bağlanmadan geçen saponozit karışımı (oran % 55).



Şekil - 22

Senegin- III (192)

Aynı aglikona sahip fakat farklı yapıda oz zinciri ihtiva eden saponozitlerde dallanmış oz zinciri moleküle ait bir genişlik gösterir. Araştırmacılar, iyon değiştirici reğinenin bir elek gibi görev alarak dallanmış ve dallanmamış oz zinciri taşıyan saponozitleri birbirinden ayırması gerektiğini düşünmüş ve kolonda tutulmayan saponozitlerin dallanmış oz zincirine sahip olabileceğini ileri sürmüşlerdir.(II) Koles-
terin ile çökelti verir ve hemolitik aktivite gösterirken, (I) bu özellikleri göstermemektedir. Araştırmacıların kolon kromatografisi kullanarak (I) ve (II) kısımlarından ayırdıkları sekiz saponozitin de aglikonları presenegenindir, farklılık sadece oz zincirlerindedir. Bu saponozitlere ait özellikler (Tablo-13) de özetlenmiştir.

Bu saponozitlerin yüzey aktiviteleri de şu sıra ile azalmaktadır: $A > B > C > D > E$. Araştırmacılar, ayrıca Radix

		Bulunduğu fraksiyon	% oran	Ozlar ve molar oranları				
				gli	gâl	ksi	fuk	ram
Saponozit	A	II	17	3	1	2	1	1
"	B	II	37	2	1	1	1	1
"	C	II	4	2	1	1	1	1
"	D	II	30	3	1	1	-	1
"	E	II	12	3	-	1	1	1
"	A'	I	28	3	1	1	1	2
"	B'	I	67	1	1	1	1	1
"	C'	I	5	3	1	-	-	1

Tablo - 13

P. senega var. typica Saponozitleri (16)

Senegae DAB 6, kültür Senegası, P. alba ve P. chinensis köklerinden elde ettikleri saf saponozit karışımlarını birbirleri ile karşılaştırmışlardır. Neticeler (Tablo-14)'de gösterilmiştir.

Araştırmacıların değişik köklerin mukayesesinden çıkardıkları sonuç şu olmuştur: P. senega ve P. senega kültür formlarının saponozitleri kalitatif olarak eşdeğerdedir. Kültür formunun düşük olan hemolitik indeksi, bu materyale R. Senegae ilavesi ile arttırılabilir ve materyal R. Senegae yerine kullanılabilir. R. Polygalae albae'nin hemolitik indeksi ÖAB-9, Ph. Helv. V. Supp. VI'nın değerlerine uymaktadır. Yalnız yapısındaki saponozitler R. Senegae saponozitleri ile

	a	b	c	d	e	ozlar				
						gli	gal	fuk	ram	ksi
<u>R. Senegae</u> DAB 6	35	68	42	45	1:3250	+	+	+	+	+
<u>R. Senegae</u> kültür	31	49	42	45	1:1875	+	+	+	+	+
<u>R. Polygalae albae</u>	41	83	32	52	1:2720	+	+	+	+	+
<u>R. Polygalae chinensis</u>	15	41	54	-	inaktif	+	+	+	+	-

Tablo-14

R.Senegae DAB 6 ile Bazı Polygala Türlerinin Saponozitlerinin Özelliklerinin Karşılaştırılması(16).

(a) MeOH'de çözünürlük (%), (b) ham saponozitte saf saponozitin % miktarı, (c) anyon-değiştirici reçineye bağlanış oranı (%), (d) kolesterin ile çöken kısım (%), (e) hemolitik indeks, (gli) glikoz, (gal) galaktoz, (fuk) fukoz, (ram) ramnoz, (ksi) ksiloz.

ince tabaka kromatografisinde karşılaştırıldığında farklı Rf değerleri vermektedir. Bunun farmakolojik etkiye yansımalarının incelenmesi gereklidir. R.Polygalae chinensis ise R.Senegae yerine kullanılabilecek özelliklere sahip değildir.

D i ğ e r C i n s ve T ü r l e r i n T a ş ı d ı ğ ı

S a p o n o z i t l e r : Diğer Polygala türleri ve familyanın diğer cinslerinin saponozitleri üzerinde yapılan çalışmalar daha az olduğundan beraberce incelenecektir. Bu bitkiler üzerindeki çalışmalar genellikle P. senega yerine kullanılabilecek türlerin tespiti veya yapının Senega saponozitlerinin

zitelere benzerliğinin ortaya çıkarılması gayesiyle yapılmıştır.

1924 yılında GLASER ve KRAUTER (73), Orta Avrupa'da yetişen P. amara köklerinin R.Senegae yerine kullanılıp kullanılmayacağını araştırmışlardır. KOBERT'in (105) yöntemini kullanarak elde ettikleri nötral saponozitin ($C_{34}H_{52}O_{20}$) senegin ve asidik saponozitin ($C_{22}H_{36}O_{10}$) poligalik asit ile aynı olduğunu, dolayısıyla R.Senegae yerine kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir.

1947 yılında CHOU, CHOU ve MEI (24), Kuzey Çin'de "Yuan chih" olarak bilinen droğu veren Polygala tenuifolia Willd.'in sapogeninlerini incelemişlerdir. Saponozitin etanolü hidroklorik asit ile hidrolizi neticesinde tenuigenin A ve B olarak isimlendirilen iki kristalize sapogenin elde etmişlerdir (Tablo-15).

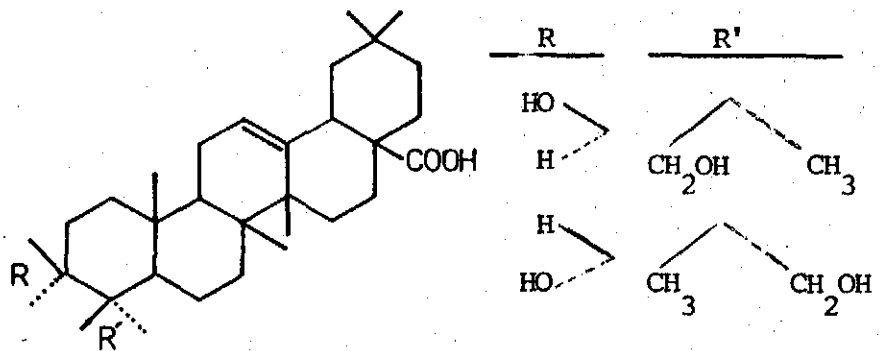
	Moleküler formülü	EN ($^{\circ}C$)	fonksiyonel gruplar		
			-OH	-COOH	lakton
Tenuigenin - A	$C_{27}H_{40}O_8$	272 $^{\circ}$	2	2	1
Tenuigenin - B	$C_{30}H_{46}O_8$	248 $^{\circ}$	2	2	1

Tablo - 15

Tenuigenin-A ve B'nin Özellikleri (24).

(EN) erime noktası

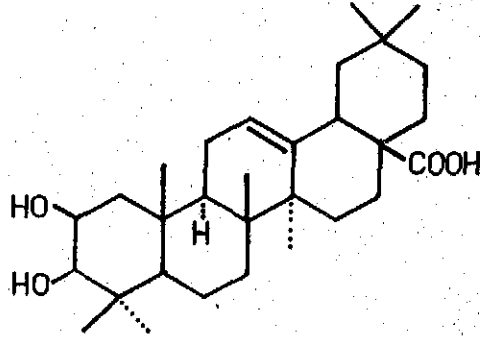
(Tablo-15) den görüldüğü gibi tenuigenin B'nin moleküler formülü JACOBS ve ISLER (90)'in izole ettiği senegenin ile aynıdır (24), fakat erime dereceleri farklıdır (JACOBS ve ISLER'in elde ettiği senegenin 290-2°C de erimektedir). Araştırmacılar bu farklılık için "kimyasal yapıları aynı erime dereceleri ayrı maddeler" ifadesini kullanmışlardır. Daha sonra, 1960 yılında, TSCHESCHE ve GUPTA (184) Bredemeyera floribunda Willd. (Polygalaceae) köklerinden tenuigenin B ile aynı yapıda bir madde izole etmişlerdir. Bredemeyera floribunda üzerinde yapılan ilk çalışma 1948 yılında WASICKY ve FERREIRA (184) tarafından yapılmış ve bir asidik saponozit izole edilmiştir. Daha sonra SCHENK ve HENNIG (153) bu yeni saponoziti incelemişler ve farklı hemolitik indekslere sahip iki bileşene ayırmışlardır. Fakat kristalize halde elde edemedikleri için yapısını tayin edememişlerdir. 1960 yılında TSCHESCHE ve GUPTA (184) saponozitin hidrolizi ile β-amirin grubu iki yeni sapogenin bulmuşlardır. Bunlardan biri dihidroksi-monokarboksilik asit yapısında "Bredemolik asit" (C₃₀H₄₈O₄)'tir (Şekil-23).



Şekil - 23

Bredemolik asit (184)

Ancak daha sonra TSCHESCHE, HENCKEL ve SNATZKE (185) esas yapının (Şekil-24) gibi olması gerektiğini ortaya çıkarmışlardır.



Şekil - 24

Bredemolik asit (185)

Bu bitkinin köklerinden izole edilen diğer saponozit ise (184) iki asetillenebilen hidroksil grubu , bir Δ^{12} - çift bağı, iki karboksil grubu ihtiva eden "Tenuifolik asit"tir ($C_{30}H_{44}(46)O_8$). İki oksijen atomunun durumu açıklanamamış, karboksil gruplarından birinin C-17 de bulunduğu tayin edilmiştir. Araştırmacılar bu kapalı formülün daha önce CHOU, CHOU, MEI (24) tarafından P.tenuifolia'dan asit hidroliz sonucu elde edilen tenuigenin B ile aynı olduğunu farketmişlerdir. CHOU'dan temin ettikleri tenuigenin A ve B örnekleri ile tenuifolik asidi kağıt kromatografisi yöntemi ile karşılaştırmışlardır. Tenuigenin A ve B'nin kromatogramda gösterdiği üçer leke, B.floribunda saponozitinin asit hidrolizatında da görülmüştür. Tenuigenin B'nin kromatogramında görülen temel leke, tenuifolik asit ile aynı Rf değerine sahipti.

Bu iki maddenin IR-spektrumları da uyuşmaktaydı. Aradaki tek fark, tenuigenin B'nin EN 248°C, tenuifolik asit'in EN 254-6°C olmasındaydı. Araştırmacılar bu farklılığın, tenuigenin B'nin IR-spektrumunda görülen lakton bandının, tenuifolik asit'in spektrumunda görülmemesinden ileri geldiğini öne sürmüşlerdir. Kısa bir süre sonra TSCHESCHE ve STRIEGLER (187), tenuifolik asit ve türevlerini, senegenin ve türevleri ile karşılaştırdıklarında (karışım erime derecesi, IR-spektrumu, değişik solvan sistemleri ile kromatografi) senegenin ile tenuifolik asit arasında bariz bir fark bulunmadığını görmüşlerdir. Araştırmacılar, bir karışıklığa neden olmaması için, tenuifolik asit adının ortadan kaldırılmasını teklif etmişlerdir.

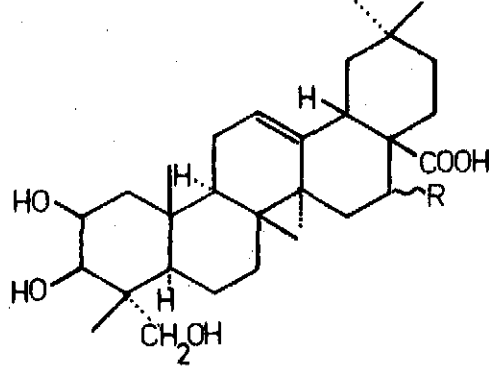
Zaten FUJITA ve ITOKAWA (64) da P. senega, P. senega var. latifolia, P. tenuifolia ve B.floribunda köklerinden hidroliz sonucu elde edilen sapogeninlerin aynı olduğunu ileri sürmüşlerdi. PELLETIER ve arkının araştırmaları (131,132) konuya açıklık getirmiş ve P.senega ve P.tenuifolia köklerindeki sapogenollerin aynı olduğunu göstermiştir. Diğer araştırmacıların bu bitkilerdeki sapogenollerin P. senega var. latifolia ve B.floribunda daki sapogenollerle aynı yapıda olduğunu göstermiş olmaları yukarıda belirtilen bitkilerin aynı aglikonlu saponozitlere sahip olduğu gerçeğini ortaya çıkarmıştır. PELLETIER ve NAKAMURA (131) P. tenuifolia köklerinden, oksidatif ve hidrolitik parçalanma sonucu, presenegenin yanında p-metoksisinamik asit elde etmişlerdir. Aynı çalış-

mada P. senega ve P. tenuifolia saponozitlerinden alkali hidroliz neticesi elde ettikleri yeni bir prosapogenin'in yapısının presenegenin -3 β -glikozit (Tenuifolin) olduğunu 1971 yılında açıklamışlardır (132).

BOICHINOV ve PANOVA (12) Rusya'da yetişen P. major Jacq. üzerinde çalışmışlardır. Bitkinin köklerinden etanol ile ekstre ettikleri saponoziti elektrodializ ile temizlemişler, saponozitin hidrolizi ile elde edilen sapogeninin ($C_{27}H_{46}O_8$) yapısında olduğunu ve D-glikoz, L-arabinoz, L-ramnoz varlığını kromatografi ile tespit etmişlerdir.

Polygala paenea L., Haiti'de yetişen bir çalıdır. Halk arasında "ti-Buis" adı ile diüretik ve ekspektoran olarak kullanılır. POLONSKY ve RONDEST yaptıkları bir seri çalışma ile (135,144,145) bitkinin köklerinden izole ettikleri "Poligalasik asit" ($C_{30}H_{48}O_6$) isimli yeni bir sapogeninin yapısını tayin etmişlerdir (Şekil-25a). Aynı aglikon Xanthopyllum octandrum (Polygalaceae) (34) ve Platyodon grandiflorum A. De Candolle (Campanulaceae) (4,5) bitkilerinde de bulunmuştur. KUBOTA ve KITATANI (111) bu aglikonun yapısı üzerinde yaptıkları çalışmada C-16 OH grubunun, POLONSKY ve RONDEST (145)'in tespit ettiği gibi 16 β -OH değil, 16 α -OH olduğunu ileri sürmüşlerdir (Şekil-25b).

1966'da MÖES (121) Afrika'da halk arasında çok kullanılan Securidaca longepedunculata Fres. var. parvifolia (Polygalaceae) ve P. senega köklerinin saponozit ve sapogeninlerinin IR- ve UV- spektrometresi ve kromatografi ile elde edi-



Şekil - 25

Poligalasik Asit

a. R = — OH b. R = ··· OH

len bulgularının tamamen aynı olduğunu tespit etmiştir.

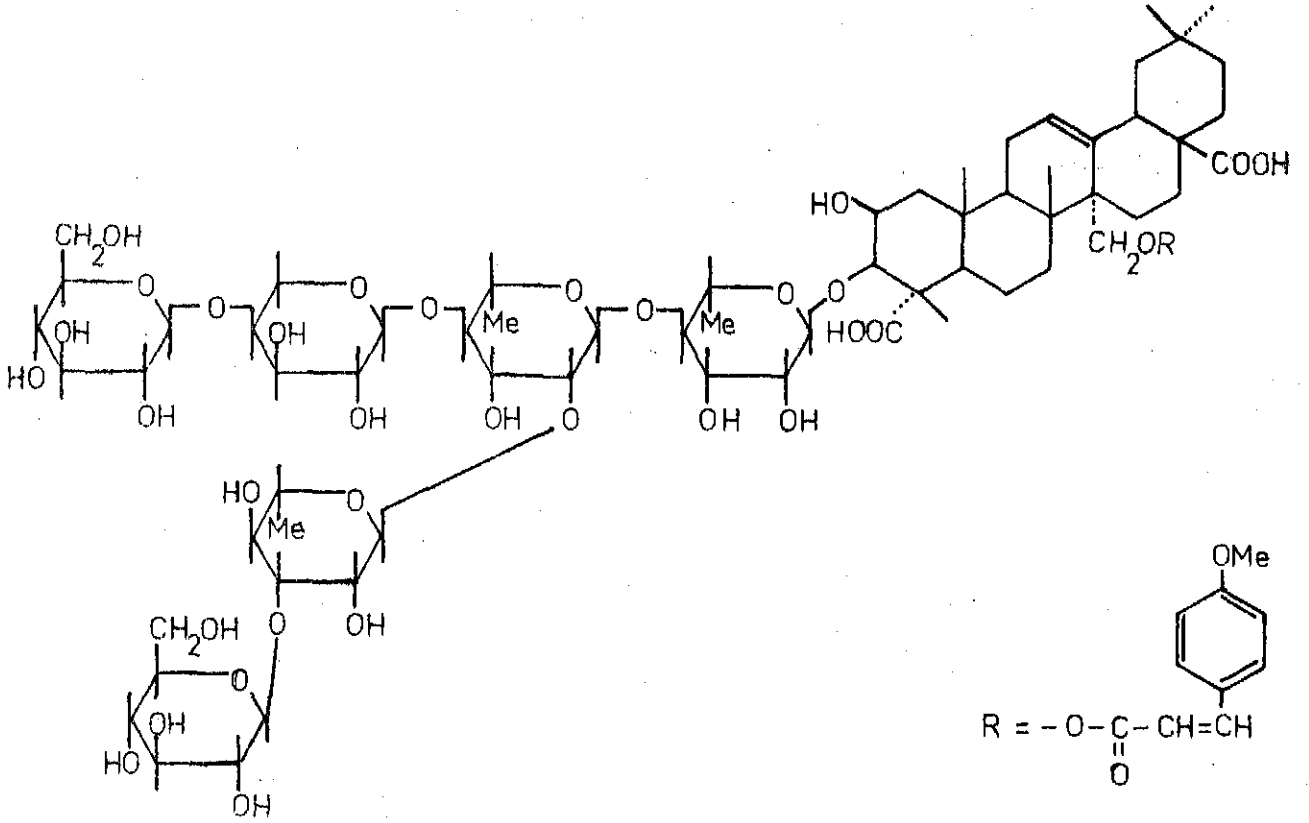
Güney Afrika'lı araştırmacılar, DELAUDE ve DAVREUX, 1971 yılında başladıkları ve halen devam eden çalışmalarında (33-44) Afrika'da yetişen Polygalaceae familyası bitkilerinin saponozitlerini, aglikonları açısından, incelemiştir. Bitkilerin köklerinin etanollü ekstresi dializ, aktif kömür ile kaynatma, eter ile çöktürme ve kolesterin ile kompleks teşkili suretiyle temizlenmiş, elde edilen saponozit karışımları perklorik asit ve hidroklorik asit ile hidroliz edilmiştir. Perklorik asit hidrolizatları P. senega hidrolizatı ile karşılaştırıldığında, incelenen bütün Polygalaceae cins ve türlerinin presenegenin aglikonu ve metil salisilat ihtiva ettiği (sadece Carpolobia türlerinde metil salisilat bulunmamaktadır) görülmüştür. Securidaca velwitschii Oliv.¹(33), S. longepedunculata FRES. var. parvifolia¹, P. acicularis Oliv.¹(34).

¹: Bu türlerin oz olarak glikoz, galaktoz, fukoz, ramnoz, arabinoz, ksiloz taşıdıkları bulunmuştur.

P.erioptera D.C. (35), Carpolobia glabrescens Hutch. et Dalz.¹ (36), P.exelliana Troupin (37), P.persicariifolia D.C. (38), P.macrostigma Chod. (39), P.usafuensis Gürke, P.nambalensis Gürke (40), P.chamaebuxus (41), Carpolobia lutea (42), P.arenaria (43), P.pygmea Gürke (44) bitkileri araştırılmıştır.

BRIESKORN ve KILBINGER, P.chinensis L. köklerinin metanolik ekstraktında bulunan saponozitleri incelemiştir (17). Metanolik ekstrakt aktif kömür ve Sephadex G-25 ile hazırlanmış kolorlarda yan maddelerden kurtarılmış ve saponozit karışımı n-butanol ile çekilmiştir. Butanollü ekstraktan eter ile çöktürülerek temizlenen saponozit karışımı diazometan ile esterleştirilmiş ve silikajel kolonda ayırma tabii tutulmuştur. Ayırım sonucunda 5 değişik saponozit elde edilmiştir. Saponozitlerden dört tanesi araştırma yapılabilecek miktarlarda elde edilemediği için sadece saponozit 1 adı verilen maddenin yapısı tayin edilebilmiştir. Bu yapı (Şekil-26) da görülmektedir.

¹: Bu türlerin oz olarak glikoz, galaktoz, fukoz, ramnoz, arabinoz, ksiloz taşıdıkları bulunmuştur.



Şekil - 26

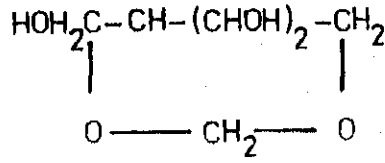
Ana Saponozit 1'in Yapısı (17)

Oz ve Türevleri Üzerinde

Yapılan Çalışmalar : Polygalaceae

familiyası bitkilerinin ihtiva ettiği glusit yapısındaki maddeler: Saponozitlere bağlı olarak bulunan ozların yanında, serbest ozlar, di- ve triholozitler ve Polygala türleri için karakteristik bir itol olan poligalitol'dür.

P o l i g a l i t o l : CHODAT, 1888 yılında Polygala amara L. bitkisinin yaprak ve gövdesinden izole ettiği $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_5$ yapısındaki maddeye "Poligarit" adını vermiştir (93) (Şekil-27).



Şekil - 27

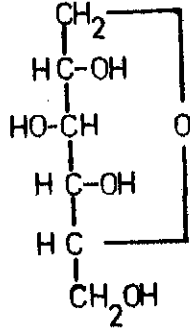
Poligarit (93)

Daha sonra, JONKHEER, VAN BERKHOUT (1918 yılında) (93) P. amarella, PICCARD (1927 yılında) P. vulgaris (93), SHINODA, SATO, SATO (1932 yılında) P. tenuifolia (166)'dan benzer yöntemler kullanarak ayırdıkları maddenin kimyasal yapısını aydınlatmaya çalışmışlardır. Bunlardan SHINODA ve ark. (166) maddeye poligarit adını vermiş olmalarına rağmen kimyasal yapısının 1,5-anhidromannitol olduğunu göstermişlerdir. Bu da CHODAT'ın poligarit'inden farklıdır. Poligalitol elde edilmesinde aşağıda kısaca belirtilen yöntem kullanılmış ve kullanılmaktadır: Bitkinin metanolik ekstresinden eter ilavesi ile saponozitler çöktürülür, süzüntü yoğunlaştırılıp, oda ısısında uzun süre bekletildiğinde meydana gelen poligalitol kristalleri, etanol veya metanol ile tekrar kristallendirilerek temizlenir.

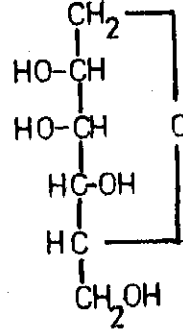
1937 yılında FREUDENBERG ve ROGERS (62) tabii monohexzitollerin yapısı üzerinde yaptıkları çalışmada poligalitol'un 1,5-anhidrosorbitol (Şekil-28) yapısında olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada stirasitol'un 1,5-anhidromannitol yapısında olduğu ve SHINODA ve ark. (166)'nın poligarit için verdiği yapıya eşit olduğu da anlaşılmıştır (62). Poligarit

kelimesi karışıklıklara sebep olacağı için terk edilmiş ve poligalitol (1,5-anhidrosorbitol), stirasitol (1,5-anhidromannitol) isimleri kullanılmaya başlanmıştır. Diğer taraftan, Acer ginnala'dan izole edilen aseritol'ün de poligalitol ile aynı madde olduğu araştırmacılar tarafından gösterilmiştir. Ancak aynı yıl, CARR ve KRANTZ (21), P.senega'nın taze yaprak, gövde ve kuru köklerinden elde ettikleri poligalitol'ün 1,5-anhidromannitol, stirasitol'ün ise 1,5-anhidrosorbitol yapısında olduğunu iddia etmişlerdir.

Poligalitol ve stirasitol'ün yapı ve konfigürasyonu üzerinde yapılan çalışmaların farklı sonuçlar vermesi yeni yöntemlerle yapının aydınlatılmasının gerektiği sonucunu ortaya çıkarmıştır. Bu amaçla RICHTMEYER, CARR, HUDSON (142) poligalitol ve stirasitol'ü periyodik asit ile oksitlediler. Ardından bromlu su ve stronsiyum karbonat ile stronsiyum-D-hidroksimetildiglikolat'ın meydana geldiğini tespit ettiler. Bu, her iki bileşiğin de 1,5-bağlarını taşıdığını ispat etmektedir. Araştırmacılar poligalitol'ün 1,5 anhidrosorbitol yapısında olduğunu ispat etmek için maddenin iki yoldan sentezini yapmışlardır. Her iki yol da yapının 1,5-anhidrosorbitol şeklinde olduğunu göstermiştir. Diğer taraftan ZERVAS (219) 1940 yılında stirasitol'ün 1,5-anhidromannitol yapısında olduğunu sentez yoluyla ispatlamıştır. Böylece maddelerin yapıları sentezlerinin yapılması ile açıklığa kavuşmuştur (Şekil-28,29).



Şekil - 28
Poligalitol



Şekil - 29
Stirasitol

FLETCHER (58) asetobromo-D-glikoz'un potasyumetilksantat ile kondansasyonu sonucu tetraasetil-D-glikopiranozil ksantat elde etmiş ve bunun katalitik deasetilasyonu ile poligalitol tetraasetat elde etmiştir. ZERVAS ve ZIOUDROU (220) tetra-0-asetil- α -D-glikopiranozil bromür'ün palladium siyahı ile katalitik redüksiyonu ile aynı maddeyi elde etmişlerdir. Denenen bütün bu sentez çalışmalarının sonucunda poligalitol'ün 1,5-anhidrosorbitol yapısında olduğu kesin olarak ispatlamıştır.

Son yıllarda, BRIESKORN ve KILBINGER (17) P.chinensis köklerinin eter ekstresinde bol miktarda poligalitol bulunduğunu tespit etmişlerdir.

O z v e O l i g o h o l o z i t l e r : Polygala türlerinin taşıdığı serbest ozlar ve oligoholozitleri üzerinde yapılan çalışmalar poligalitol kadar eski değildir.

Ancak bir kaç araştırmacı P.senega köklerinde sakaroz bulunduğundan bahsetmişlerdir (21). Ozlar hakkında rastlanan ayrıntılı ilk çalışma 1962 yılında JIRACEK ve ark. (93) tarafından yapılmıştır. P.vulgaris bitkisinin çeşitli kısımları ayrı ayrı % 70 lik etanol ile tüketildikten sonra kağıt kromatografisi yöntemi ile taşıdığı oz ve amino asitleri, şahit maddelerle karşılaştırmak suretiyle, teşhis edilmiştir. Buna göre, maltoz, glikoz, fruktoz ve poligalitol bütün organlarda mevcuttur. Sakaroz, kök hariç, az miktarda bütün organlarda bulunmaktadır. Maltoz, glikoz ve fruktoz en yüksek konsantrasyonda gövde ve köklerde, poligalitol ise yaprak ve gövde de görülmüştür. Bulgular (Tablo-16) da özetlenmiştir.

	Maltoz	Sakaroz	Glikoz	Fruktoz	Poligalitol	Tayin edilemeyen madde sayısı
Meyva	+	+	++	+++	+	2
Yaprak	+	+	++	+++	+++	3
Gövde	++	+	+++	++++	+++	3
Çiçek	+	+	++	+++	+	4
Kök	+++	-	++++	+++	++	1

Tablo - 16

P.vulgaris Bitkisinin Değişik Kısımlarında Bulunan Oz ve Oligoholozitler (93)

(+) konsantrasyonun yükseklik ifadesidir.

Dikkat edilirse, araştırıcılar köklerde sakaroz bulunmadığını ileri sürmüşlerdir. Fakat, 1934'de BIENFANG (21), son yıllarda BRIESKORN ve KILBINGER (17) P. chinensis ve P. senega köklerinde sakarozun bulunduğunu göstermişlerdir.

TAKIURA ve HONDO (179), P. tenuifolia köklerinin eter ile yağından kurtarılmış sulu ekstraktını, % 1 kurşunasetat ile temizlendikten sonra, aktif kömür ihtiva eden kolonlarda ayırımına tabi tutmuşlardır. Kolonun su ile elüsyonu neticesinde glikoz ve fruktoz elde edilmiş, % 5 etanol elüatları Dowex 1-X2 (borik asit) formunda) kolonlarda 0,001 M $K_2B_4O_7$ çözeltisi ile elüsyona tabi tutulduğunda poligalitol ve N-asetil-D-glikozamin elde edilmiştir.

Son yıllarda yine TAKIURA ve ark. (180,181), bu defa P. senega var. latifolia köklerinin taşıdığı oligoholozitler üzerinde iki çalışma yapmışlardır. Metanollü ekstrenin saponozitleri ayrıldıktan sonra kalan kısmından %5 kurşunasetat, Amberlit IR-120 ve IRA-45 kolonlar vasıtasıyla ayrılan kısmı kromatografik olarak kontrol edildiğinde poligalitol, arabinoz, fruktoz, glikoz, sakaroz, melibioz, rafinoz ve stahiyoz yanında tabiatta ilk defa rastlanan ikişer yeni di- ve triholozitin varlığı tespit edilmiştir. Oligoholozitlerin ayırımında, daha önceki çalışmalarında olduğu gibi, aktif kömür kolonlar kullanılmıştır. Bu ayırım (Tablo-17) de özet halinde gösterilmiştir.

Asit (% 1-5 H_2SO_4) ve enzimatik hidroliz (α - ve β -galaktozidaz), permetilasyon, TMS eterlerinin GSK ve NMR-, kütle

Fraksiyon	Elüat	% verim	Kağıt Kromatografisi ile Teşhis Edilen Ozlar
1	H ₂ O	41,43	Poligalitol, fruktoz, arabinoz, glikoz
2	%5 ETOH	37,50	<u>Sakaroz</u> (çok), melibioz (az), 1'deki ozlar
3	%5-7,5 ETOH	3,57	<u>Sakaroz</u> (çok), A maddesi (az), D mad- desi (az) 1'deki ozlar (eser)
4	%7,5 ETOH	0,71	Sakaroz (az), A maddesi (çok), D mad- desi (az)
5	%7,5-10 ETOH	0,96	<u>B maddesi</u> (çok), A maddesi (az), D maddesi (eser), maltoz (eser), manni- notrioz (eser)
6	%10 ETOH	0,64	<u>C maddesi</u>
7	%10-15 ETOH	0,75	<u>rafinoz</u>
8	%15 ETOH	1,11	rafinoz (az), <u>stahioz</u> (çok)
9	%15 ETOH	0,36	rafinoz (az), <u>stahioz</u> (çok), E mad- desi (eser)

Tablo - 17

P. senega var. latifolia-Köklerinin Taşıdığı Redüktör
Oz ve Oligoholozitlerin Aktif Kömür Kolonlarda
Ayrırımı (181)

() : fraksiyonların temel maddelerini
gösterir.

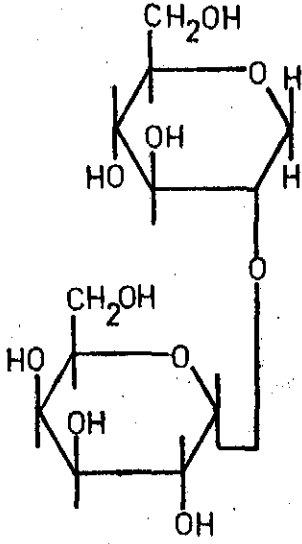
spektrometrisi ile analizleri; A maddesinin (Şekil-30)

2-0- α -D-galaktopiranozil-1,5-anhidro-D-glusitol, B maddesinin

(Şekil - 31) 6-0- β -D-glikopiranozil-1,5-anhidro-D-glusitol,

C maddesinin (Şekil - 32) 1,5-anhidro-(0- α -D-galaktopiranozil

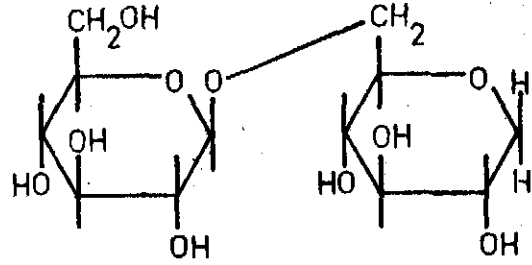
β -1 \rightarrow 2/-0- α -D-galaktopiranozil- β -1 \rightarrow 2/ -D-glusitol yapısında olduklarını göstermiştir. D maddesi ise muhtemelen arabinozil- α -D-galaktozil-D-glikoz yapısında bir triholozittir.



Şekil-30

P. senega var. latifolia

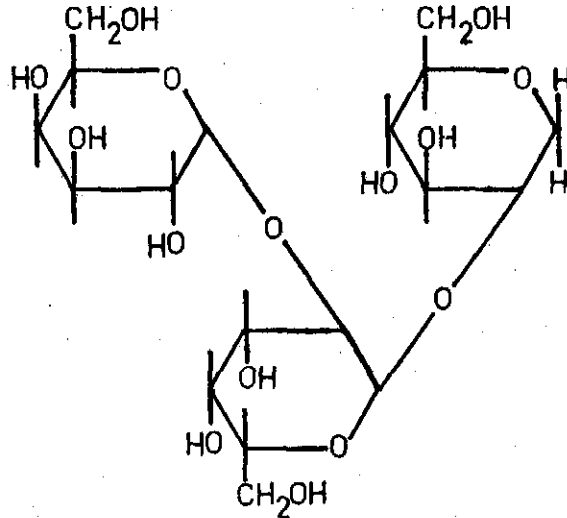
A Maddesi



Şekil-31

P. senega var. latifolia

B Maddesi

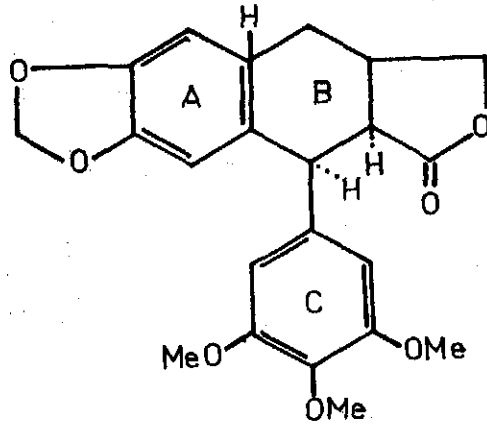


Şekil - 32

P. senega var. latifolia C Maddesi

L i g n a n l a r Ü z e r i n d e Y a p ı l a n
Ç a l ı Ő m a l a r : P o l y g a l a t ü r l e r i n d e b u l u n a n

lignanlar ilk defa 1962 yılında POLONSKY ve MORON'un dikkatini çekmiştir. Araştırmacılar P.paenea köklerinin alkolik ekstresinden, daha önce bahsedilen, poligalasik asit yanında, şıklık lignan ve ksanton yapısında yeni maddeler izole etmişlerdir (136). Alkolik ekstreden kloroform ile ısıtılarak ekstre edilen şıklıklıgnanı araştırmacılar kromatografik yöntemler ile temizlemişlerdir. Elde edilen bileşiğin ve türevlerinin IR-, NMR-spektroskopi ile yapısının araştırılması sonucu; demetil-4- dehidroksi-7' podofilotoksin (Şekil-33) olduğu öne sürülmüştür:



Şekil - 33

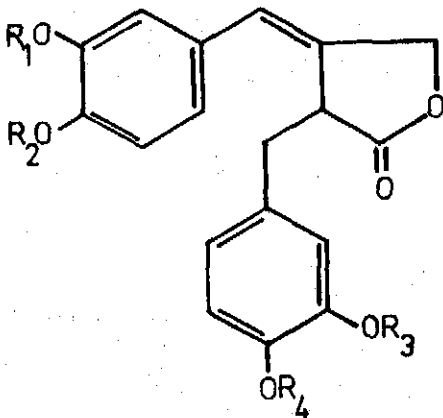
Demetil-4, dehidroksi-7' podofilotoksin

Piridinde çok, organik çözücülerde az çözülen bu bileşik, eterde çözünmemektedir.

POLONSKY ve MORON'un bu çalışmasından sonra uzun bir süre lignanlar üzerinde bir çalışmaya rastlanmamaktadır.

1973 yılında GHOSAL ve ark. (68-70) bir seri çalışma ile *P.chinensis* L. bitkisinin taşıdığı laktonik lignanları ve yapılarını incelemişlerdir. Araştırmacılar bitkinin tamamını petrol eteri (60-80°C) ve ardından etanol ile tüketerek her iki fazın taşıdığı lignanları ayrı ayrı elde etmişlerdir.

Petrol eteri ekstraktından bir hafta içinde çöken sarı çökelti etanol ile kristallendirildiğinde sukilakton (Şekil-34), kisulakton (Şekil-35), kinesin (Şekil-36) ve helioksantin (Şekil-37) adı verilen laktonik lignan yapısında dört maddenin karışımı elde edilmiştir. Karışım, silika-jel kolonlarda, petrol eteri, benzen ve kloroform ile ayırma tabii tutulmuş, sukilakton, UV-, IR-, NMR-, kütle-spektrometresi yöntemleri ile 2-piperoniliden-3-veratril-3S-γ-bütirolakton olarak tayin edilmiştir. Daha önce heliantoidin'in bir parçalanma ürünü olarak bilinen bu madde tabiatta ilk defa bulunmuş oldu. Daha az miktarda elde edilen kisulakton'un renk reaksiyonları, UV-, IR-, NMR yöntemleri ile elde edilen bulgular sukilakton'a benzemekteyse de kütle spektrumları bariz bir farklılık göstermektedir.



Şekil-34 Sukilakton

$$R_1 = R_2 = \text{Me}$$

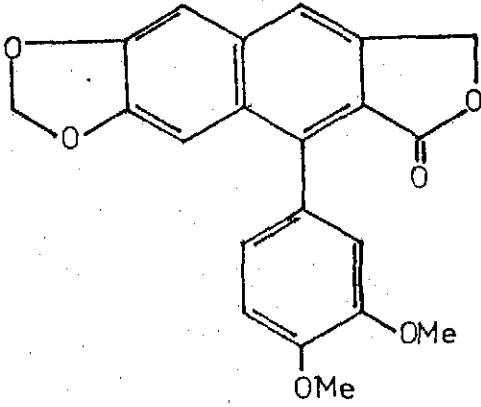
$$R_3 + R_4 = -\text{CH}_2-$$

Şekil-35 Kisulakton

$$R_1 + R_2 = -\text{CH}_2-$$

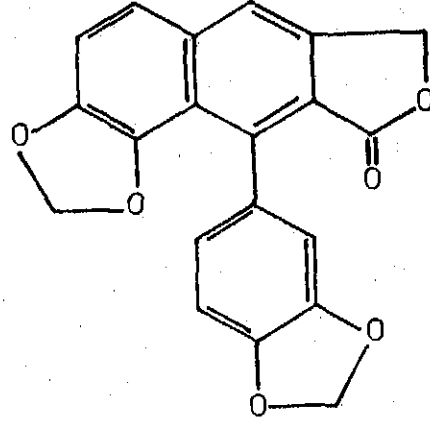
$$R_3 = R_4 = \text{Me}$$

Benzen elüatlarının sonu ile kloroform elüatlarının başında kinensin elde edilmiştir. Spektrometrik bulgular maddenin 1-aril, 2,3-naftalit lignan (Şekil-36) yapısında olduğunu göstermiştir. Petrol eteri ekstraktından elde edilen diğer bir lignan da helioksantin'dir (Şekil-37). Fakat



Şekil-36

Kinensin

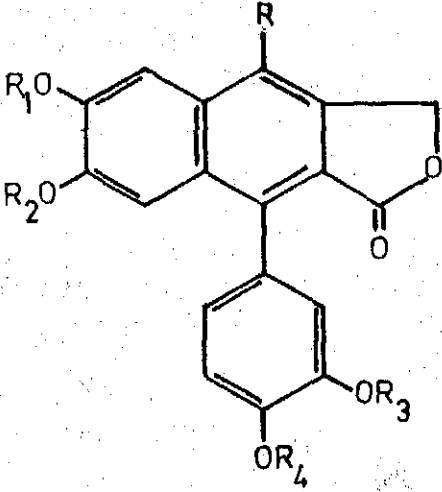


Şekil-37

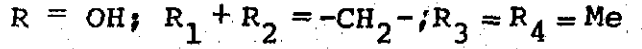
Helioksantin

bu maddenin esas kaynağı alkollü ekstrakttır. Alkollü ekstrakt kloroform ile ekstre edilip, nötral Al_2O_3 kolonda benzen, benzen-kloroform (1:1) ve kloroform ile ayırımaya tabi tutulmuş. Benzen kloroform elüatlarının uçurulup metanol-kloroform ile kristallendirilmesi neticesinde sarı kristaller halinde helioksantin elde edilmiştir. Alkollü ekstratta ayrıca % 0.1 oranında kinensin yanında, iki yeni siklik lignan daha bulunmuştur: Kinensinaftol (% 0,14) (Şekil-38a) ve kinensinaftolmetileteri (% 0,07) (Şekil-38b). Bu bileşiklerin renk reaksiyonları ve UV-spektrometrik bulguları, daha önce HORH tarafından izole edilen difilin'e (Şekil-38c) çok

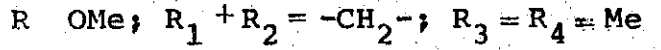
benzemektedir. Diğer spektrometrik bulgular bu iki maddenin difilin'in izomerleri olduklarını göstermiştir.



a. Kinensinaftol



b. Kinesinaftol metileteri



c. Difilin



Şekil - 38

Sukilakton, kisulakton gibi asiklik ve kinensin, heli-oksantin gibi siklik lignanların bitkide birlikte bulunuşu biyogenetik olarak önemlidir. Araştırmacıların ilk çalışmalarında asiklik laktonik lignanları arilnaftalenlignanların biyogenezinde prekürsör olarak düşünmüşlerdir. Hatta, sukilakton miktarı ile kinensin, kinensinaftol ve kinensinaftol metileteri miktarlarının ters orantılı olarak değişmesini bunun bir ispatı olarak göstermişlerdir. Ancak son çalışmalarında bu tekliflerin yanlış olduğunu görmüşlerdir. Siklik lignanların, uygun diariliden-bütrolakton ara ürününün oksidatif siklizasyonu ile meydana geldiği de düşünülebilir. Bu tip bir siklizasyon ile sukilaktondan difilin ve justisidin B'nin meydana gelmesi gerekir. Ancak *P.chinensis*'te bu iki tip siklik lignana rastlanmamıştır. Diğer taraftan, yukarıda be-

lirttiğimiz gibi, sukilakton verimi arilnaftalitlignan miktarı ile ters orantılı olarak değişirken, diğer asikliklignan, kisulakton verimi bağımsız olarak değişmeden kalır. Bu nedenle bu iki asikliklignanın doğal biyosentetik yolda sikliklignanlara yönlendirici bir rol oynadığı düşünülmüştür.

Aynı araştırmacılar, 1974 yılında, aynı bitkinin köklerinden iki laktonik lignan heteroziti izole etmişlerdir. Spektral bulgular yapıların: arktigenin-4'-glikozit (Arktiin), arktigenin-4'-gentiobiozit olduğunu göstermiştir (71).

K s a n t o n l a r ı Ü z e r i n d e Y a p ı l a n

Ç a l ı ş m a l a r : MORON ve POLONSKY (122) Polygala

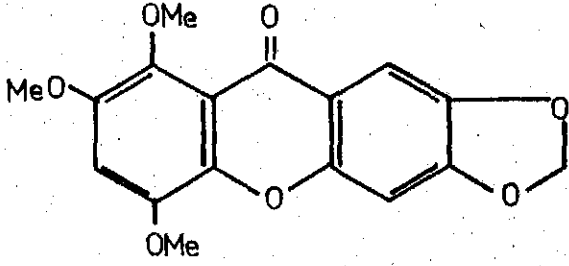
paenea köklerinin alkollü ekstraktından, poligalask asit (sapogenin) ve sikliklignan fraksiyonlarının ayrılmasından sonra kalan kısmın yoğunlaştırılması ile, kristallenen ksanton karışımını incelemişlerdir. Karışımın fraksiyonlu kristalizasyonu veya Magnezyum silikat-Celite (2:1) kolondan kloroform ile elüsyonu sonucu ayrılan iki maddeye, Poligalaksanton- A ve B adını vermişlerdir. Bu maddelere ait özellikler (Tablo-18)'de verilmiştir:

	ed(°C)	der.HCl ile verdiği renk	çözünürlük	pH'sı
Poligalaksanton-A	170°C	sarı	benzen, CHCl ₃ 'de çok, MeOH'de az	nötral
Poligalaksanton -B	120°-1°C	portakalsarısı	"	"

Tablo-18

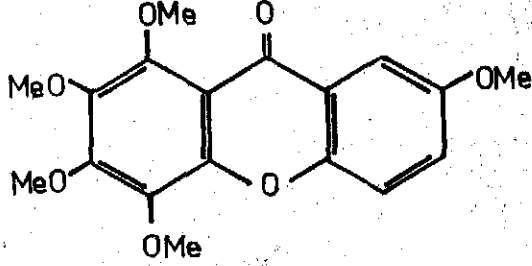
Poligalaksanton-A ve B'nin Özellikleri (122)

UV-IR-spektroskopisi ile elde edilen bulgular neticesi yapıları (Şekil-39) ve (Şekil-40) olarak bulunmuştur.



Şekil-39

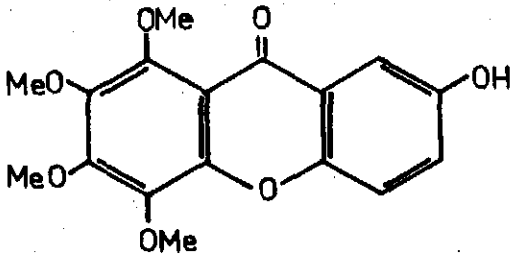
Poligalaksanton-A



Şekil-40

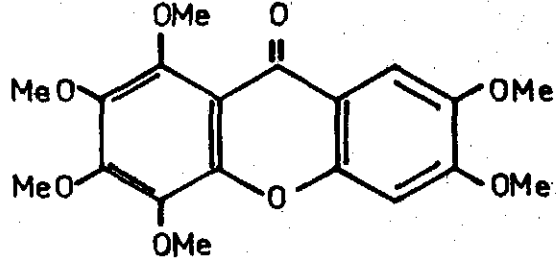
Poligalaksanton-B

1969'da DREYER (48), P.macradenia Gray bitkisinden dört yeni ksanton izole etmiştir. Yoğunlaştırılan asetonlu ekstraktan ksantonlar kloroform ile ekstre edilmiş, kloroformlu ekstrakta heksan ilave edildiğinde bir çökelti meydana gelmiştir. Bu çökelti etilasetat-heksan ile kristallen- dirilerek ksanton-1 elde edilmiştir. Ksanton-1; ed 197-8°C, siyanidin reaksiyonu ve demir-III-klorür çözeltisi ile (+) reaksiyon vermektedir. Ancak UV-spektrumunda flavonoidlerden farklı olarak, sodyum asetat ile kayma görülmemiştir. Fakat sodyum hidroksit ilavesi ile UV-spektrumu değişmiştir. IR- ve NMR-spektrometresi ile elde edilen bulgularla yapısı ta- yin edilmiştir (Şekil-41a). Ana çözeltinin Al₂O₃ kolonda hek- san ile elüsyonu suretiyle ksanton-2 (ed.156-7°C) (Şekil-41b), benzen ile ksanton-3 (ed.250-2°C) (Şekil-41c) ve kloroform ile tekrar ksanton-1 elüe edilmiştir. Ksanton-2 UV-lambasıy- la sarı, ksanton 3 ise yeşilimsi-mavi floresans vermektedir.



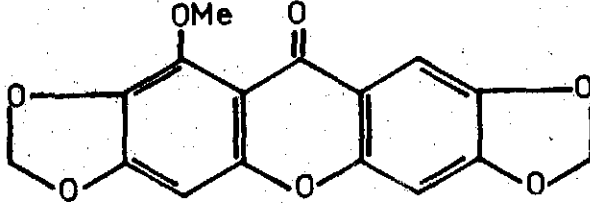
a

Ksanton-1



b

Ksanton-2



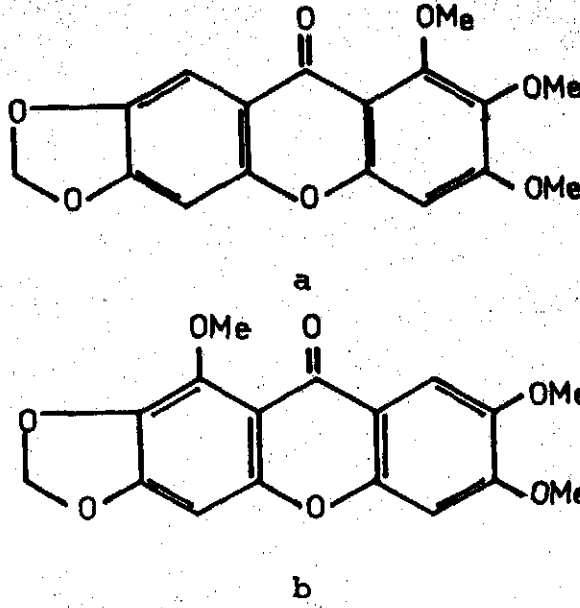
c

Ksanton-3

Şekil - 41

DREYER'in (48) P.macradenia'dan izole ettiği Ksantonlar

Bu maddeler izole edildikten sonra kalan ana çözelti tekrar Al_2O_3 kolonda ayırma tabii tutulduğunda heksan ile ksanton-4 (Şekil-40) yanında az miktarda ksanton-2, ksanton-3 ve ed. $177^{\circ}C$ olan bir minör ksanton elde edilmiştir. UV-spektrumu ksanton-3'e benzeyen bu maddenin NMR-spektrumu metilendioksi gruplarından birinin iki metoksi-grubu ile yer değiştirdiğini göstermiştir. O halde ksanton-5'in yapısı iki şekilde olabilir.



Şekil - 42

Ksanton-5'in Muhtemel Yapısı (48)

Görüldüğü gibi ksanton-4 ile MORON'un (122) Poligala - ksanton-B'si aynı yapıdadır (Şekil-40). (Şekil-42a)'da görülen madde ise Poligalaksanton-A'nın izomeridir.

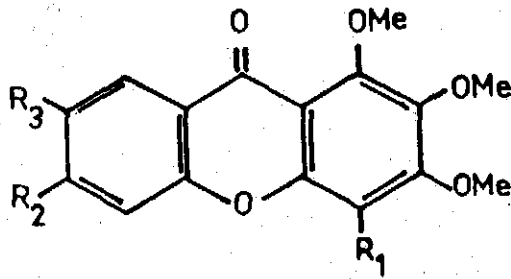
Bu çalışmada bulunan heksametoksiksantonlar, tabiat- ta şimdiye kadar rastlanan en çok substitüe olmuş alkoksik- santonlardır. Permetillenmiş ksantonlar, P.paenea'dan izole edilenlere çok benzemektedir. Bu netice araştırmacıyı Polygala ksantonları üzerinde kemotaksonomik yönden bir seri çalışma yapmaya yöneltmiştir. Ancak P.acanthoclada A.Gray ve P.cornuta Kell.' türlerinde ksanton bulunmaması bütün Polygala türleri için ksantonların kemotaksonomik anahtar önemi olmadığını ortaya koymuştur.

Aynı yıl STOUT ve FRIES (176), MORON ve ark. (122) Poligalaksanton-A için teklif ettikleri yapının yanlış oldu- ğunu ileri sürmüşlerdir. Araştırmacılar gerçek yapının aydın- latılmasında sentez yöntemini kullanarak, Poligalaksanton-A'

yı sentetik olarak elde etmiş ve MORON'dan temin edilen numune ile karşılaştırma, IR-, UV-, NMR- ve kütle spektrometresi yöntemleri ile tam yapıyı aydınlatmışlardır. Bu madde nin, DREYER'in (48) Poligalaksanton-A'nın izomeri olarak nitelendiği yapı ile aynı olduğu (176) ortaya çıkmıştır (Şekil-42a).

Diğer taraftan, JAIN, KHANNA, SESHADRI (91), sentez yoluyla 1,3-dihidroksi-7-metoksiksanton'dan iki hidroksillemeye reaksiyonu ile poligalaksanton-B elde edip yapıyı aydınlatmışlardır.

Ksantonlar üzerinde yapılan çalışmalar son yıllarda artmıştır. ITO ve ark. (89), P.tenuifolia köklerinin eter ekstraktından floresans veren, aşağıda yapı ve özellikleri görülen maddeleri izole etmişlerdir (Şekil - 43).



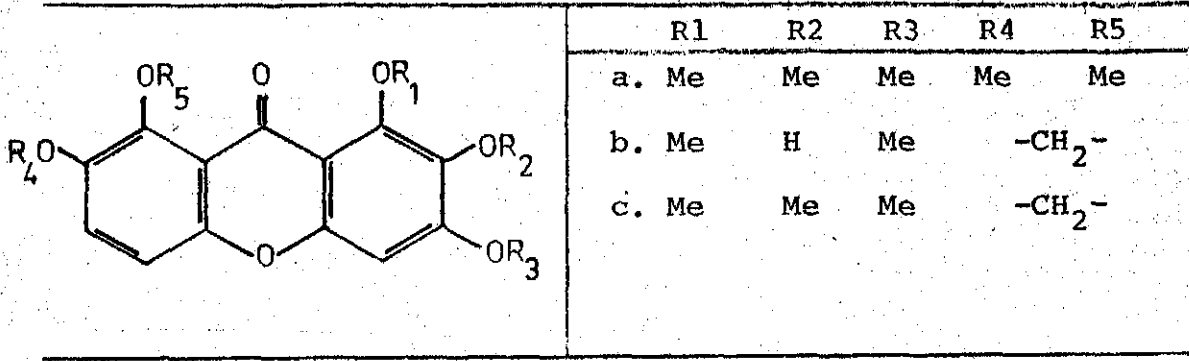
	ed(°C)	UV-fl	R ₁	R ₂	R ₃
Madde-2	225°C	mavi	H	OH	OMe
Madde-3	133°C	beyaz	H	H	OMe
Madde-4	183°C	beyaz	H	OMe	OMe

Şekil - 43

Madde-2,3,4'ün Yapısı ve Özellikleri (89)

(ed) erime derecesi, (UV-fl.) UV-lambasında gösterdiği floresans.

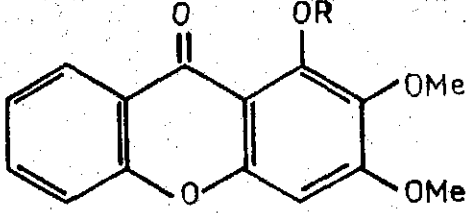
ANDRADE ve ark. (7) ise Brezilya'da yetişen bir çalı olan P.spectabilis D.C. dallarının benzen ekstraktından stigmasterol ve 3 kristalize ksanton elde etmişlerdir. Elemental analiz, IR-,UV-,NMR- ve kütle spektrometrik analizleri neticesinde (Şekil-44 a,b,c) yapısında oldukları bulunmuştur.



Şekil - 44

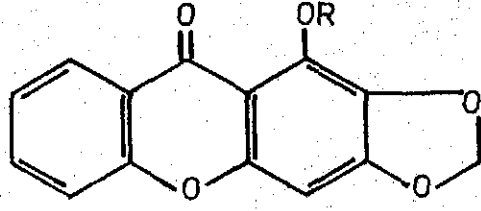
ANDRADE ve ark. (7) İzole Ettikleri
Ksantonlar

Himalayalarda yetişen bir tür olan P.arillata Benth.-Ham. bitkisinin ksantonları ise GHOSAL ve ark. tarafından incelenmiştir (72). Bitkinin petrol eteri ve ardından etanol ile ekstraksiyonundan elde edilen ekstraktlar ayrı ayrı incelenmiştir. Araştırmacılar, petrol eteri ekstraktından ksanton-1 (Şekil-45-I/a), Ksanton-2 (Şekil-45-I/b), ksanton-4 (Şekil-45-II/b), etanol ekstraktından ksanton-1, ksanton-3 (Şekil-45-II/a) ve ksanton-5 (Şekil-46) elde etmişlerdir. Ksanton-2 tabiatta bulunan ilk 1,2,3-trimetoksiksanton, ksanton-5 ise ilk 1,3,4- trimetoksiksanton'dur.



I

- a. R = H
b. R = Me

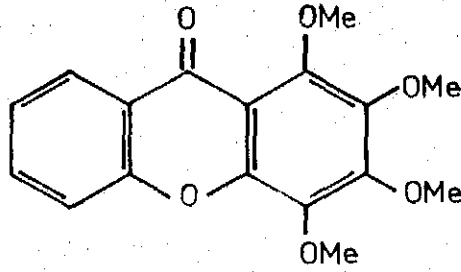


II

- a. R = H
b. R = Me

Şekil - 45

GHOSAL ve ark. (72)'nin P.arillata'den izole ettikleri Ksantonlar



Şekil - 46
Ksanton 5

Diğerleri : Familyaya dahil bitkilerde miktarları az olan veya üzerinde birkaç çalışmaya rastlanabilen yan maddeler bu grup altında incelenecektir.

1. Flavonozitler : GHOSAL ve ark. (71) 1974 yılında P.chinensis köklerinden izole ettikleri laktonik lignan heterozitleri yanında üç flavonozitin varlığını da tespit etmişlerdir. Maddeler ve türevlerinin spektral

(UV-, IR-, NMR-, kütle-) analizleri ile yapıları tayin edilmiş ve kempferol-3-ramnozid (afzelin), mirisetin-3-ramnozid (mirisitrin) ve kersetin-3-rutinozid (rutin) olduğu gösterilmiştir. Bitkinin toprak üstü kısımlarında ise sadece mirisitrin ve rutin bulunmuştur.

2. A n t o s i y a n o z i t l e r : MAURICH ve ark. (117), P. nicaensis Risso ex Koch subsp. mediterranea Chodat bitkisinin çiçek ve braktelerinde çok yaygın olarak görülen polikromizmin nedenini araştırmışlardır. Çiçeklerde menekşe renk hakimdir. (% 70), bazen kırmızı (% 20) veya tamamen beyaz (% 10) olabilmektedir. Bu nedenle her renk çiçekten alınan numuneler 2M hidroklorik asit ile ekstre edilmiş. Mevcut flavonlar etilasetat ile ekstraksiyon suretiyle uzaklaştırılmış, antosiyanozidler sulu fazdan amil alkol ile çekilip kağıt kromatografisine uygulanmıştır. Menekşe renkli çiçeklerin kromatogramlarında 2, kırmızı çiçeklerde 1 leke görülürken, beyaz çiçeklerde hiç bir lekeye rastlanmamıştır. Lekelerin preparatif kağıt kromatografisi yöntemi ile ayrılmasından sonra, kolorimetrede 535 nm ve 546 nm'da verdikleri doruk absorbanlarının literatürde siyanidin ve delfinidin için verilen değerlere uyduğu görülmüştür. Bu iki antosiyanozid daha önce GASCOIGNE (67) tarafından P. vulgaris L. çiçeklerinde de bulunmuştur. O halde menekşe renkli çiçeklerde siyanidin ve delfinidin'in birlikte bulunuşu, kırmızı çiçeklerde sadece siyanidin'in bulunuşu, beyaz

çiçeklerde ise antosiyanozitlerin bulunmaması P.nicaensis çiçeklerinde görülen polikromizmin nedeni açıklamaktadır. Diğer taraftan, kaynağı belli olmamakla beraber, Drogenkunde (85) de P.tinctoria Vahl. çiçeklerinde "Indikan" verilen, $C_{14} H_{17} O_6 N_1$ yapısında bir heterozitin varlığından bahsedilmektedir. Heterozitin yapısı Indoksil ve 1 mol glikozdan meydana gelmektedir. Bu madde Arap ülkelerinde indigo boyasına benzer renginden dolayı boyacılıkta kullanılmaktadır.

3. Sabit Yağlar ve α -Spinasterol:
Yapılan çalışmalar Polygala türlerinin tohum ve köklerinde sabit yağların bulunduğunu göstermiştir. Afrika'da kültürü yapılan P.rarifolia bitkisinin tohumları %18 yağ taşımaktadır. Bu yağ % 30 oleik-, % 55-60 palmitik asit esterlerden meydana gelmiştir (85) ve Maluka yağı adı altında bölge halkı arasında, gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. NAZIROV ve ark. (124) Rusya'da halk arasında kullanılan 4 Polygala türünü, taşıdıkları yağ asitleri bakımından incelemişlerdir. Palmitik-, stearik-, oleik- ve linoleik asit ihtiva eden yağ, fareler üzerinde 12,5 ml/kg dozda pürgafit etki göstermiştir. SMITH ve ark. (172), P. virgata tohumlarından % 74 2-monoasetotrigliserit ihtiva eden, bir sabit yağ elde etmişlerdir. Şimdiye kadar elde edilen tabii kaynaklı bütün trigliseritlerin C-3 pozisyonunda asetat grubu taşıdıkları bilinmektedir. Bu nedenle, C-2 pozisyonunda asetat grubu ta-

şıyan tabii kaynaklı ilk trigliserit taşıması bakımından yağ önemlidir. Aynı araştırmacılar (133-134) daha önce Monnina emarginata (Polygalaceae) tohumlarının taşıdığı yağın bileşimi üzerinde yaptıkları çalışmada, toplam yağ asitlerinin % 30'u oranında rastladıkları S-koriolik asit (13-hidroksi-cis-9, trans-11-oktadekadienoik asit)'in P.virgata da oldukça düşük miktarda (< % 5) bulunduğunu tespit etmişlerdir. BRIESKORN ve KILBINGER (17) P.chinensis köklerinin petrol eteri ekstraktının taşıdığı yağı gaz kromatografisi ile incelemişler, yağın % 4,8 palmitik-, % 2 stearik-, % 65 oleik-, % 26,2 linoleik ve % 1.96 linolenik asit ihtiva ettiğini bulmuşlardır.

SIMPSON (171) P. senega köklerinin alkollü ekstraktının lipit fraksiyonunu incelemiştir. Alkollü çözeltilerden soğukta senegin ayrıldıktan sonra yoğunlaştırılarak zamksı bir kütle elde edilmiş. Bu kütle sodyum hidroksit çözeltisinde çözülüp, eter ile tüketilmiş. Aynı işlem tekrar edilerek temizlenen eter fazı uçurulduğunda elde edilen sabit yağın % 7-8'i kadar yarı kristalize bir kütle elde edilmiştir. Benzoat türevine geçilerek tekrar temizlenmiş ve bu türevin % 5 etanollü potasyum hidroksit ile hidrolizi neticesinde α -spinasterol elde edilmiştir (ed 169-170°C). Asetatı ve p-nitro benzoatının elemental analizi ile maddenin tayini kesinleşmiştir.

4. A m i n o a s i t l e r : JIRACEK ve ark. (93), P.vulgaris'in çeşitli kısımlarını serbest ve bağlı amino-

asitleri bakımından incelemişler ve bitkinin her organını ayrı ayrı % 70'lik etanol ile ekstre edip ardından bağlı aminoasitleri hidroliz etmiş ve kağıt kromatografisi ile bütün aminoasitleri teşhis etmişlerdir. Aminoasitlerin dağılışı bitkinin organlarına göre farklılık göstermektedir. Bütün organlarda yüksek konsantrasyonda serbest γ -metilen glutamik asit, glutamik asit, alanin, valin tespit etmişlerdir. Aynı şekilde asparajinik asit, asparajin, serin ve fenil alanin de oldukça yüksek oranda bulunmuştur. γ -metil glutamik asit, treonin, pirolin, tirozin, γ -aminobütirik asit, izolösin ve lösin daha az miktarlarda bulunmuştur. Bazik aminoasitler (arjirin, lizin, ornitin, histidin), glutamin ve sistein genellikle az veya eser miktarlarda bulunmuştur.

Bağlı aminoasitlerden bilhassa glutamik asit, alanin ve valin bütün organlarda yüksek konsantrasyonda bulunmuştur. Bazı organlarda sistin (yaprak), fenilalanin, izolösin ve lösin (yaprak ve meyvalarda), serin ve treonin (köklerde) yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. Asparajinik asit genellikle düşük konsantrasyonda bulunurken, arjirin, pirolin ve tirozin az, lizin, ornitin ve histidin'in eser miktarlarda bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca kök ve yapraklarda bağlı glisin, sadece köklerde hidrokspirolin bulunmuştur.

5. P o l i f e n o l l e r : CORNER, HARBORNE ve ark.
(27), bitki polifenolleri üzerinde yaptıkları seri çalışma-

lardan birinde P.senega köklerinde en az beş hidroksisinnamoil esterinin bulunduğu bahsetmişlerdir. P.senega köklerinin metanolik ekstraktından kromatografik yöntemlerle dört bileşik (A1,A2,A3,E1) izole edilmiştir. Bunların kromatografi, UV-spektrofotometri ve kimyasal renk reaksiyonlarıyla hidroksisinnamoilesteri yapısında oldukları aydınlatılmıştır. Bu bileşiklerin zayıf alkali hidrolizi ile elde edilen sonuçlar (Tablo-19)'da gösterilmiştir.

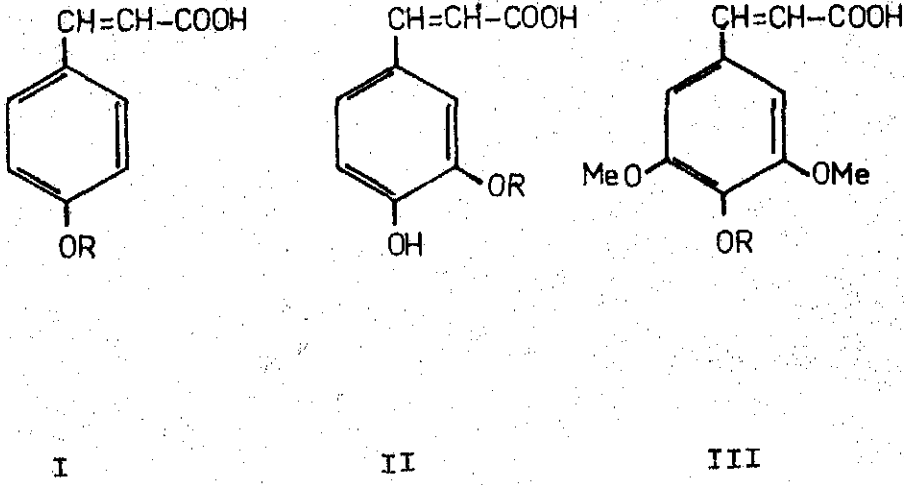
Ester	Hidroliz Ürünü ve Molar Oranları
A1	Sinapik asit (Şekil 47/III-a) (1,0), 3,4,5-trimetoksi sinnamik asit (Şekil-47/III-b) (0,97), glikoz (0,17)
A2	Sinapik asit (2,0), glikoz (3,45)
A3	Ferulik asit (Şekil-47/II-b), glikoz
E1	Ferulik asit, p-kumarik asit (Şekil-47/I-a), glikoz
X1	3,4,5-trimetoksi sinnamik asit (1,0), glikoz (0,93)
X2	Sinapik asit (1,0), glikoz (1,30)

Tablo - 19

P.senega Köklerinden İzole Edilen Polifenollerin Alkali Hidroliz Ürünleri (27)

[X1,A1'in ve X2,A2'nin esteraz (antosiyamaz) enzimi ile enzimatik hidrolizi sonucu meydana gelen mono-esterler]

Araştırma güçlükleri bu esterlerin yapılarının tam olarak aydınlatılmasını engellemiştir. Ancak A1 ve A2'nin



Şekil - 47

- Ia R = H p-kumarik asit; Ib R = CH_3 p-metoksi sinnamik asit
IIa R = H Kafeik asit ; IIb R = CH_3 Ferulik asit
IIIa R = H Sinapik asit ; IIIb R = CH_3 3,4,5-trimetoksi sinnamik asit

sinapoil ve 3,4,5- trimetoksi sinnamoil kısımları ihtiva eden D-glikoz polisinnamoil türevleri oldukları bellidir. Bu durum, muhtemelen gallik asit ve D-glikozdan türeyen hidroliz olabilen tanenlerin mevcudiyetini göstermektedir.

P. senega'dan elde edilen esterler, doğal kaynaklı diğer hidroksisinnamik asitlerin oz türevlerinden iki noktada farklılık göstermektedir. Şimdiye kadar bulunan hidroksi sinnamik asitler, sadece monoesteri halinde C-1 den heterozidik olarak bağlanmış glikoz, rutinoz veya gentiobioz taşımaktadır.

P. senega'da bulunan beş sinnamik asidin yapıları, bitkide fenolik-O-metilasyona biyosentetik olarak bir eğilim olduğunu göstermektedir. Bitkiden p-metoksi sinnamik asit (Şekil-47/Ib) ve 3,4,5- trimetoksi sinnamik asitin izo-

lasyonu ve bir çok bitkide bulunan, metoksi grubu taşımayan, kafeik asidin (Şekil-47/IIa) bulunmaması bu teoriyi ispatlamaktadır. Diğer taraftan, doğal olarak şimdiye kadar sadece Rauwolfia alkaloitlerinden reskinamin ve reskidin'de bulunan, 3,4,5-trimetoksi sinnamik asidin P.senega'da bulunuşu ilginç bir noktadır. Biyosentetik olarak bir çok doğal ürünün meydana gelmesinde önemli rol oynadığı bilinen sinnamik asit esterlerinin bitkide nasıl bir rol oynadığı incelenmemiştir.

6. A l k a l o i t l e r : Yapılan bazı genel çalışmalarda, Polygala türlerinin alkaloit taşımadığı belirtilmiştir. Ancak, KIM (99) yaptığı bir çalışmada Polygala tenuifolia bitkisinden "Tenuidin" adı verilen bir indol alkaloidi izole etmiştir. Maddenin IR-spektrumunda indol, kinolidin ve benzen halkalarının varlığı tespit edilmiş, moleküler formülünün $C_{21}H_{31}O_5N_3$ olduğu tayin edilmiştir.

K İ M Y A S A L B Ö L Ü M
P R A T İ K Ç A L I Ş M A L A R

K İ M Y A S A L B Ö L Ü M
P R A T İ K Ç A L I Ş M A L A R

M A T E R Y A L

Polygala pruinosa Boiss. subsp. pruinosa J. Cullen bitkisi, 1975 - 1978 yıllarının 3 - 10 Haziran tarihleri arasında, Konya, Şarkikaraağaç, Feleköy, Namazlık ve Kelyayla tepelerinden toplandı^a. Toprak üstü kısımları ve kökleri ayrıldı. Kökler açık havada kurutulup, ince toz edildi. Köklerin bileşiminin, toplandığı yıllara ve bölgelere göre bir farklılık taşıyıp taşımadığı metanollü ekstratın ince tabaka kromatografisine tatbiki ile araştırıldı. Ekstraktlar, Silikajel G kaplı plaklarda kloroform / metanol / su (65: 35: 10) solvan sistemi ile sürüklendi. Metanollü ekstraktlar arasında hiç bir fark bulunmadığı tespit edildi.

^a : P. pruinosa Boiss. subsp. pruinosa J. Cullen (C 3 KONYA, Şarkikaraağaç, Feleköy, Kelyayla (HÜEF 710 !)).

Y Ö N T E M

Köpürme ve Hemoliz İndeksi

Saponozit taşıyan droglar eczacılıkta kullanılacağı zaman drog içindeki miktarının tespit edilmesi gerekir. Ancak karmaşık yapıları nedeniyle saf olarak elde edilebilmeleri zor olduğundan, klasik miktar tayini yöntemlerinin uygulanması güçtür. Miktar tayini amacıyla, uzun yıllar, saponozitlerin fiziksel özelliklerine dayanan yöntemlerden yararlanılmıştır : Hemoliz indeksi, hemoliz değeri, köpürme indeksi, balık indeksi. Ancak bu yöntemler ile elde edilen neticeler bağıl değerlerden ileri gidememektedir. Saponozitlerin hemolizan özelliklerinin yapıya bağlı olarak büyük farklılık gösterdiğinin tespit edilmesi, bu indeksin önemini kaybetmesine neden olmuştur. Buna rağmen, saponozitler üzerindeki çalışmalarda, köpürme ve hemoliz indekslerinin tespit edilmesi farmakope yöntemi olması bakımından gereklidir. Bu amaçla, çalışmamızda hemoliz indeksinin tayininde Macar Farmakopesi, köpürme indeksinin tayininde ise Fransız Farmakopesinin verdiği yöntemler kullanılmıştır.

Köpürme İndeksi

500 ml lik bir erlenmayerde 100 mg toz 100 ml su ile kaynatılır, süzülür, soğuduktan sonra bir balon jöjede 100 ml. ye tamamlanır : Numune çözeltisi. 16 cm x 16 mm boyutlarında tüplerden 10 tüplük bir seri hazırlanır. Her tüpe sırasıyla 1,2,3.. .. 10 ml yukarıdaki şekilde hazırlanan dekoksiyondan konur, distile su ile 10 ml. ye tamamlanır. Her tüp baş parmakla kapatılarak, yatay durumda saniyede iki defa olmak üzere 15 saniye çal-

Deney tüpü No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Numune çözeltisi (ml.)	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0
Distile su (ml.)	9,0	8,0	7,0	6,0	5,0	4,0	3,0	2,0	1,0	-

kalanır, 15 dakika sonra tüplerdeki köpük yüksekliği ölçülür. Eğer bütün tüplerde köpük yüksekliği 1 cm. den fazla ise, dekoksiyon daha seyreltik olarak yeniden hazırlanır. Köpük yüksekliği 1 cm. ye en yakın tüp sınır olarak kabul edilir, 6 tüplük ikinci bir seri hazırlanır. 6. tüpe sınır olarak kabul edilen tüpteki kadar, diğer tüplere 0,2 ml. azaltılarak numune çözeltisinden ilave edilir, her tüp distile su ile 10 ml. ye tamamlanır.

Deney tüpü No.	1	2	3	4	5	6
Numune çözeltisi (ml.)	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Distile su (ml.)	9,9	9,8	9,6	9,4	9,2	9,0

Ön denemede yapıldığı gibi, her tüp çalkalanır, 15 dakika sonra 1 cm. köpük yüksekliği olan tüp tayin edilir, aşağıdaki formüle göre droğun köpürme indeksi hesaplanır.

$$\text{Köpürme İndeksi} = \frac{10 \times A}{B}$$

A = Dekoksiyondaki drog miktarı (g).

B = 1 cm. köpük görülen tüpteki drog miktarı (g).

Hemoliz İndeksi

Drog ekstraktının hazırlanması : 1,0 g ince toz edilmiş numune 250 ml lik bir erlende 100 ml tampon çözelti ile, arada sırada çalkalanarak, su banyosunda 30 dakika ısıtılır, sıcakken 100 ml lik balon jojeye pamuktan süzülür, 100 ml ye tamamlanır.

Tampon çözeltisi : 1,743 g potasyum dihidrojen fosfat, 9,496 g disodyum hidrojen fosfat ve 9,0 g sodyum klorür bir miktar su da çözülür, balon jofede distile su ile 1000 ml ye tamamlanır (pH 7,4).

Standart saponin çözeltisi : Tam tartılmış 20 mg Saponinum purum album (Merck 7695), balon jofede tampon çözeltide çözülür, 100 ml ye tamamlanır.

Ham saponozit çözeltisi : Tam tartılmış 100 mg ham saponozit, balon jofede tampon çözelti ile çözülür, 100 ml ye tamamlanır.

% 2 lik kan süspansiyonu : Taze siğir kanı, tahta bir çubukla karıştırılarak, fibrinin ayrılması sağlanır. Çift kat tülbentten süzülür, süzüntünün 10 ml si 500 ml lik balon jofede tampon çözelti ile 500 ml ye seyreltilir. Kan süspansiyonu, kullanılacağı gün taze olarak hazırlanır.

Ön Deneme : 6 deney tüpüne 0,2 ml den başlanarak drog ekstraktından konular. Aşağıdaki gibi bir gam hazırlanır:

Deney tüpü No.	1	2	3	4	5	6
Drog ekstraktı (ml)	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2
Tampon çözelti (ml)	4,8	4,6	4,4	4,2	4,0	3,8
Kan süspansiyonu (ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0

Deney tüpleri, sabunlu su, su ve alkol ile yıkanmış ve kurutulmuş olmalıdır. Hazırlanan karışımlar, tüplerin ağzı parmakla kapatılarak, yumuşak hareketlerle, aşağı yukarı çevrilmek suretiy-

le karıştırılır. Köpürmeyi önlemek amacıyla kuvvetli çalkalamalardan kaçınılmalıdır. Daha sonra, 2 saat içindeki sonuçlar incelenir, berrak olan ilk tüp sınır olarak tespit edilir. Eğer tam hemoliz görülen tüp yoksa, drog ekstraktının miktarı artırılarak, bir gam daha hazırlanır. Sınır tüp tespit edilir. Aynı işlemler ham saponozit çözeltisi için de tekrarlanır.

İndeksin tayini : Ön denemeden sonra, gerçek hemoliz indeksini tayin edebilmek amacıyla aynı drog ekstraktından ve ham saponozit çözeltisinden 12 tüplük bir gam hazırlanır. 12. tüpe, ön denemede sınır olarak tespit edilen dilüsyon kadar, diğerlerine 0,05 ml azaltılarak drog ekstraktından konur. Her tüp, tampon çözelti ile 5 ml ye tamamlanır, üzerine 5 ml kan süspansiyonu ilave edilir. Ön denemedeği gibi karıştırılır, 6 saat sonra hemoliz meydana gelen ilk tüp tespit edilir, bu tüpün dilüsyonu hemoliz indeksini verir.

$$\text{Hemoliz indeksi} = \frac{A}{B}$$

(A) Tüpdeki sıvı toplamı (10 ml)

(B) Tam hemoliz görülen ilk tüpdeki drog miktarı (g).

Aynı işlemler, standart saponin çözeltisi için de tekrarlanarak kullanılan sığır kanı için hemoliz indeksi hesaplanır.

Kan faktörünün hesaplanması : Standart saponin (Merck 7695), bu yöntemle göre kabul edilen hemoliz indeksi 25.000 dir. Bu nedenle, bu değer deneyde standart saponin için bulunan hemoliz indeksine bölünerek kan faktörü bulunur.

$$\text{Kan faktörü} = \frac{25.000}{\text{Deneyde bulunan H.İ.}}$$

Numune için bulunan değer, kan faktörü ile çarpılmasıyla da gerçek hemoliz indeksi tayin edilmiş olur.

$$\text{Hemoliz indeksi} = \text{Deneyde bulunan H.İ.} \times \text{Kan faktörü.}$$

S a p o n o z i t l e r

Genel

Köklerdeki saponozitlerin ekstraksiyonu, tanımı, izolasyonu ve yapı tayini ile ilgili bilgiler bu kısımda incelenecektir. Çalışmada kullanılan ayırım sistemlerine ait bilgiler, konular ilerledikçe tekrarlardan kaçınmak için, başlangıçta verilmiştir (Tablo -20). Diğer taraftan ön çalışmalarımız sırasında da değişik sistemler kullanılmıştır. Bu sistemlerden bazıları olumlu sonuç vermiş, bazıları ise iyi sonuç vermemiştir. Sonuçları yararlı olmayan sistem ve yöntemlerden bahsetmeye gerek görülmemiştir.

Ekstraksiyon

Kökler toz edildikten sonra soxhlet apareyinde önce petrol eteri (40 - 60°C) ve ardından eter ile ekstre edilerek yağsı ve reçinensi maddelerden kurtarıldı. Her iki ekstraktta da serbest triterpen bulunmadığı ince tabaka kromatografisi ile tespit edildi (Sistem -1).

Polygala türlerinin karakteristik maddesi olan poligalitol'un büyük bir kısmı eter ekstraktında bulunmaktadır. Bu yüzden bu ekstrakt poligalitol elde edilmek üzere ayrıldı.

Petrol eteri ve eter ile apolar kirliliklerden kurtarılan materyalden saponozit % 90 lık metanol ile ekstre edildi. İlk 15 saatlik tüketmeyi takiben solvan yenilenecek ekstraksiyona devam edildi. Silikajel G plaklarda (Sistem -2) ile yapılan kontroller sonucu 40 saatlik bir ekstraksiyon süresinin yeterli olduğu tespit edildi.

No.	Solvan Sistemleri	Oran	Yöntem	Adsorban	Lit.
1.	Eter : benzen	4:1	İTK	7731	29
2.	Kloroform : Metanol : Su	65:35:10 (Alt faz)	İTK,SK	7731,7734	17
3.	n-Butanol : n-Propanol : gl. Asetik Asit:Su	4:2:1:3	İTK	7731	195
4.	n-Butanol : gl.Asetik Asit : Su	4:1:5	İTK,KK	7731,S.S.	17
5.	Etil Asetat : Metanol : Su	70:15:15	İTK,SK	7731,7734	*
6.	n-Butanol : Piridin : Su	9:5:4	KK	S.S.	17
7.	Etil Asetat : Metanol	85:15	SK	7734	*
8.	Kloroform : Metanol : Su	65:25:1	İTK,SK	7731,7734	17
9.	" " "	70:20:2,5	İTK,SK	7731,7734	17
10.	Petrol eteri : eter	4:6	SK	7734	17
11.	" " "	2:8	SK	7734	*
12.	Aseton : Hekzan	1:1	SK	7734	*
13.	Kloroform : Metanol	7:1	İTK,SK	7731,7734	*
14.	Benzen : Metanol : Asetik Asit	2:2:6	İTK	Tamponlu	174
15.	Benzen : Metanol	100:5	SK	7734	17
16.	Benzen : Metanol	10:1	İTK	7731	17
17.	Kloroform : Metanol	50:1	İTK,SK	7731,7734	17
18.	Metanol	-	SK	7734	29
19.	Benzen : Aseton	2:1	İTK	7731	174
20.	" " "	1:1	İTK	7731	174
21.	Benzen : absolu Etanol	8:2	İTK	7731	174
22.	Kloroform : Metanol	9:2	İTK	7731	174
23.	Etil Metil Keton : Su	Doymuş	İTK	7731	174
24.	Benzen : Aseton	10:1,10:2,..1:1	SK	7734	191
25.	Benzen : Metanol	10:0,2	SK	7734	*
26.	" " "	10:0,5	SK	7734	17

Tablo -20

Araştırmada Kullanılan Solvan Sistemleri ve Adsorbanlar

(İTK) İnce Tabaka Kromatografisi, (KK) Kağıt Kromatografisi, (SK) Kolon Kromatografisi, (gl.) Glasiyel, (7731) Kieselgel G- Merck 7731, (7734) Kieselgel 60-0,063-0,2 mm-Merck 7734, (S.S.) Schleicher und Schüll 2043 angl., (Tamponlu) 0,1 M Borik Asit Tamponu ile Hazırlanmış Kieselgel G Plak, (*) Tarafımızdan Geliştirilen Sistemler

1 kg toz edilmiş materyal, selüloz kartuşlar içinde, soxhlet apareyinde önce petrol eteri (40 -60°C) ile 2 defa 15 saat, daha sonra eter ile 2 defa 15 saat ekstre edilir. Son ekstraksiyondan sonra materyal açık havada eterinden kurtarılincaya kadar birkılır.

Daha sonra materyal % 90 lık metanol ile 15 saat soxhlet apareyinde ekstre edilir. Süre sonunda solvan yenilenerek ekstraksiyona tekrar 15 saat devam edilir. Metanolik ekstraktların her ikisinin kromatografik olarak (Sistem -2) aynı oldukları belirlendikten sonra birleştirilir. Alçak basınç altında yoğunlaştırılır.

Polygala saponozitlerinin izolasyonunda metanollü ekstrakt yoğunlaştırılıp soğukta bekletildiğinde bazı çökeltieler olmaktadır. Bu çökeltieler ayrıldıktan sonra elde edilen çözelti, Polygala saponozitlerini taşıyan ana ekstrakt olarak kabul edilmektedir. Bu sebepten, bu ilk çökeltieler çalışma dışı bırakılmıştır.

Metanollü ana çözelti alçak basınç altında kuruluğa kadar uçurulur; koyu kahverengi yoğun bir ekstre elde edilir. Bu S a p o n o z i t E k s t r e s i olarak isimlendirilir.

Saponozit ekstresi suda çözüldü ve birkaç damla hidroklorik asit ile pH 4,5'a ayarlandı. Çünkü asit saponozitler bu pH'da daha iyi temizlenebilmektedirler. Su fazı önce kloroform ile tüketilerek temizlenmek istendi. Ancak bu yöntemin faydası görülmediğinden, saponozitler n-butanol ile ekstre edilerek, n-butanole çekildi. Kuruluğa kadar uçurulan n-butanol ekstraktları, metanolden eter ile çöktürülerek saponozit karışımı elde edildi. Saponozitlerin çöktürülerek temizlenmesinde aseton da kullanılır. Bu solvan, çöktürmede kullanıldığında, bir kısım saponozit de kirlilikler ile birlikte aseton fazında çözünmektedir. Bu yüzden, çöktürmede aseton kullanılmamıştır.

Saponozit ekstresi, 500 ml suda çözülür, yeterli miktar n-butanol ile çok sayıda tüketilir. İnce tabaka kromatografisi (Sistem-2) kullanılarak kontrol edilir. Saponozit lekesinin görüldüğü n-butanol ekstraktı alındığında, ekstraksiyona son verilir (10- 15 ekstraksiyon). n-Butanol ekstraktları birleştirilir ve su ile 2 - 3 defa yıkanır. Alçak basınç altında yarısına kadar yoğunlaştırıldığında görülen çökelti santrifüj ile ayrılır. Üst fazdan aynı yolla çöktürülen kısım tekrar santrifüje edilir. Kalan üst fazlar yoğunlaştırılır. Çökelti meydana gelmeyinceye kadar bu işleme devam edilir. Sistem-2 ile ince tabaka kromatografisinde, son elde edilen fazın saponozit taşıyıp taşımadığı tespit edilir. Ayrılan çökelti birleştirilir, kurutulur: H a m S a p o n o z i t K a r ı Ő i m i (60 g).

Ham saponozit karışımı metanolde ısıtılarak çözülür. Buz banyosunda 0°C ye soğutulmuş etere damla damla, karıştırılarak ilave edilir. Meydana gelen çökelti santrifüj ile ayrılır. Aynı işlem 3 defa daha tekrarlanır. Kirli sarı renkli çökelti birleştirilir, kurutulur: S a p o n o z i t K a r ı Ő i m i (31g).

Tanım

Saponozit karışımı, silikajel G kaplı hazır plaklarda (Merck, 5724), kloroform/metanol/su (65:35:10, alt faz) solvan sistemi ile 5 saponozit lekesi ; n - butanol/n-propanol /glasiyel asetik asit /su (4:2:1:3) ve n- butanol/ asetik asit/su (4:1:5) sistemi ile 2 saponozit lekesi; etilasetat/metanol/ su (70:15:15) solvan sistemi ile ise 4 saponozit lekesi vermektedir. O halde, iyi ayırım sağlayan kloroform/metanol/su (65:35:10, alt faz) solvan sistemi ince tabaka kromatografisi kontrollerinde tercih edilmelidir. 5 lekeye alttan yukarı doğru P1,P2,P3,P4,P5 isimleri verildi. Temel saponozit P1 en çok, P3 daha az mik-

tarlardadır. Diğerlerinin miktarları ise çok azdır. Silikajel G kaplanmış plaklarda, ayırımı takiben, lekeler UV-366 nm ve revelatörler ile belirlenir. Polygala saponozitleri taşıdıkları kromofor grup, sinamik asit türevleri nedeniyle UV-366 nm'da parlak mavi floresans vermektedir. Kromatogramlarda revelatör olarak, saponozitler için çok kullanılan, sülfürik asidin sudaki % 30 luk çözeltisi ; vanilin'in derişik sülfürik asitteki % 1 lik çözeltisi; 1 kısım klorosülfonik asit ile 2 kısım glasiyel asetik asit karışımı; fosfotungstik asidin etanoldeki (96°) % 20 lik çözeltisi kullanılmıştır. Bu revelatörler ile görülen renkler (Tablo-21) de gösterilmiştir:

Adsorban

cinsi	: Kieselgel G Tip 60 (Merck 5724)
Kalınlığı	: 0,3 mm
Solvan Sistemi-2	: kloroform / metanol /su (65:35:10, alt faz)
" " -3	: n-butanol/n-propanol/gl. asetik asit / su (4:2:1:3)
" " -4	: n-butanol/gl. asetik asit/ su (4:1:5, üst faz)
" " -5	: etilasetat/metanol/su (70:15:15)

Revelatörler

	Görülen renk
%30 sülfürik asit /su	Kahverengi
%1 Vanillin / sülfürik asit	mor - menekşe
%20 Fosfotungstik asit/etanol 96°	menekşe
Klorosülfonik asit/gl. asetik asit (1:2)	Kahverengi-menekşe

Tablo - 21

Saponozit Karışımının İnce Tabaka Kromatografisi

Sapozozit lekelerinin daha iyi tanımlanabilmesi amacıyla "Kanlı plak" yöntemi kullanıldı (174). Yukarıdaki solvan sistemleri ile sürüklenen plaklar izotonik sodyum klorür çözeltisi ile hazırlanmış %2 defibrine eritrosit - jelatin süspansiyonu ile kaplandı. 2-3 saat sonra 2 lekenin hemoliz gösterdiği görüldü. Daha önce de belirttiğimiz gibi sapozozit karışımında ki sapozozitlerin Rf değerleri çok yakın olduğundan, miktarları daha fazla olan P1 ve P3 sapozozitlerin sebep olduğu hemoliz, muhtemelen, diğerlerinin hemoliz etkisini örtmektedir.

100 ml % 0,9 luk sodyum klorür çözeltisi, 4,5 g jelatin tozu ile 30 dakika şişmeye bırakılır, süre sonunda su banyosunda 80°C ye kadar, karıştırarak, ısıtılır. Takiben 40°C ye soğutulur ve 6 ml defibrine sığır kanı ilave edilir, karıştırılır.

Daha önce belirtilen solvan sistemleri ile sapozozit karışımı sürüklenir, plaklar iyice havalandırılarak solvanın uzaklaşması sağlanır. Plakların etrafı 1 cm kalınlığında band ile çevrilir ve plaklar soğutucu blok üzerinde düz bir zemine konur. Kan - jelatin süspansiyonunun 50 ml'si plağa, ince bir film teşkil edecek şekilde, dökülür.

En geç 1 saat sonra kırmızı kan - jelatin filmi sapozozitlerin bulunduğu yerlerde saydamlaşır, diğer kısımlar ise opak ve kırmızıdır.

Aynı solvan sistemleri ile sürüklenmiş diğer plaklara ise re-velatör püskürtülerek karşılaştırma yapılır. Sapozozitlere ait karakteristik renkleri veren lekelerin kan-jelatin süspansiyonu ile hemoliz meydana getirdiği gözlenir.

Defibrine Kan Hazırlanması : Yeni kesilmiş sığırdan 200 ml kan geniş ağızlı bir erlene toplanır, tahta bir çubukla hızlı bir şekilde, fibrin aglutine oluncaya kadar karıştırılır. Jelatinimsi bakiye çok kat-

lı tülbentten süzülerek ayrılır. Elde edilen defibrine kan 3-4°C de 1 - 2 gün saklanabilir.

Saponozit Karışımından Pl ' in Ayırımı:

Saponozit karışımında bulunan 5 saponozitin Rf değerlerinin çok yakın olması ve asidik saponozit karakterinde olmaları ayırımlarını güçleştirmiştir.

Ayırımı gerçekleştirebilmek için çeşitli adsorban ve solvan sistemleri denenmiştir. Alüminyum oksit kolonlarda, etilasetat/metanol (% 1 - 100) ve selüloz kolonlarda, n- butanol/su ve n - butanol/glasiyel asetik asit/su (4:1:5, üst faz) solvan sistemleri ile yapılan elüsyonlar amacına ulaşamadı. Selüloz kolonlar ile bazen iyi neticeler elde edildiyse de, tekrarlanabilir sonuçlar vermemesi nedeniyle terkedildi. Silikajel kolonlarda çeşitli solvan sistemleri denendi. Kloroform/metanol/su (65:35:10, alt faz) ile iyi bir ayırım sağlandı. Ancak verimin oldukça düşük ve ayırım süresinin çok uzun olması nedeniyle vazgeçildi. Diazolan saponozit karışımı ile yapılan ayırım çalışmalarında değişik oranlarda kullanılan kloroform /metanol/su solvan sistemleri (65:35:10, 70:20:2,5, 65:25:1) olumlu sonuç verdi. Fakat fraksiyonların çoğunun, karışımlar halinde gelmesi nedeniyle verim çok düşüktü. Nihayet saponozit karışımının silikajel kolonda etilasetat/metanol/su (70:15:15) solvan sistemi ile elüsyonu olumlu sonuç verdi ve Pl saponoziti izole edildi.

SK - 1

Adsorban : Kieselgel 60 (0,063 - 0,2 mm) (Merck 7734)
Solvan sistemi : 1. EtOAc /MeOH (% 15)
2. EtOAc/MeOH/H₂O (70:15:15)
Fraksiyonlar : 20 - 100 ml
Kolon boyutları : 140 x 5,5 cm
Elüsyon hızı : 2-3 ml/dakika
Materyal : Saponozit karışımı
Madde /adsorban oranı : 1/50 (a/a)

Toplanan fraksiyonlar, silikajel G plaklarda sistem -2 ve sistem -5 kullanılarak, kontrol edildi. Saponozit taşıyan fraksiyonlar, benzerliklerine göre, birleştirildi. Kolondan P1 saponozitinin tek olarak geldiği fraksiyonlar ayrıldı. Bazı fraksiyonlarda, yüksek konsantrasyonda P1 yanında, P2 ve P3 ünde bulunduğu görüldü. Bu fraksiyonlardan P1 in ayrılması amacıyla karışım diazometan ile muamele edildi. Diazometan hazırlanmasında çeşitli yöntemler kullanılır. Bu yöntemlerden nitrozometilüre' den hareket eden yöntem araştırmamızda kullanıldı (198). Diazometan ile C-23 serbest karboksil grubu esterleştirilerek P1- monometilesteri hazırlandı. Bu madde PD1 olarak isimlendirildi. Bu suretle, saponozitlerin sistem -2, 'deki Rf değerlerinin arttığı ve kromatogramda saponozitlerin arasındaki mesafenin açıldığı görüldü. Ayrıca, asidik karakter örtüldüğünden, ayırım daha kolay olmaktadır. Takiben diazolanmış karışım (PD1, PD2, PD3) SK-2

kolonda ayırma tabi tutuldu.

SK - 2

Adsorban	: Kieselgel 60 (0,063 - 0,2 mm) (Merck 7734)
Solvan sistemi-8	: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:25:1)
Fraksiyonlar	: 15 - 25 ml
Kolon boyutları	: 3,50 X 40 cm
Elüsyon hızı	: 1,5 - 2 ml/ dakika
Materyal	: SK-1 kolondan elde edilen P1, P2, P3 karışımı (diazolanmış)

1,300 kg Kieselgel 60 (0,063-0,2 mm) (Merck 7734) % 15 metanol taşıyan etilasetat içinde süspanse edilir ve homojen bir şekilde kolona doldurulur. Daha sonra 31 g saponozit karışımı yeterli miktar metanolde çözülür, az miktarda adsorban ilavesi ile alçak basınç altında kuruluğa kadar uçurulur. Toz edilen bakiye, ince bir tabaka halinde, az solvan yardımıyla kolona tatbik edilir, aynı solvan ile elüsyona başlanır. Saponozit UV- 366 nm da mavi floresans verir, maddenin sürüklenişi UV- lambası ile takip edilir. Başlangıçta fraksiyonlar 500'er ml olarak alınır. Kullanılan bu solvan sistemi saponoziti çok az sürükler, fakat saponozit karışımında bulunan sarı renkli yan maddelerin ilerlediği görülür. Takiben etilasetat / metanol / su (70:15:15) solvan sistemine geçilerek polarite arttırılır, böylece saponozit lekesi sürüklenmeye başlar. Elüsyonun ilerleyişi sistem - 2 ile ince tabaka kromatografisinde kontrol edilir. Sadece P1 ihtiva eden fraksiyonlar birleştirilir, kuruluğa kadar uçurulur, metanolde çözülür ve soğuk etere, karıştırarak damlatılır. Çöken P1 saponoziti santrifüj ile ayrılır ve kurutulur : (1,95 g.).

Diazometan Hazırlanması :

Nitrozometilüre Hazırlanması (Asetamid Yöntemi) : 4 l lik balonda 59 g asetamid'in 88 g (28 ml) brom içindeki çözeltilisine, 40 g sodyum hidroksit'in 160 ml sudaki çözeltisi damla damla ilave edilir. Bu arada reaksiyon kabı çalkalanır. Sarı renkli reaksiyon karışımı su banyosunda, geri çeviren soğutucu altında, gaz çıkışı görülünceye kadar asıtılır, ısıtmaya 2 - 3 dakika daha devam edilir. Su banyosundan indirilen reaksiyon kabında derhal kristalizasyon meydana gelmeye başlar, 1- 2 saat buzdolabında bekletilir. Buchner hunisinden süzülerek ayrılan kristaller, az miktar buzlu su ile yıkanır ve açık havada kurutulur : ürün renksiz asetilmetilüre'dir (EN 178-180°C) (50 g).

Elde edilen asetilmetilüre'nin tamamı, 50 ml derişik hidroklorik asit ile karıştırılır ve su banyosunda ısıtılarak çözülür. Çözünme tamamlandıktan sonra ısıtmaya 3-4 dakika daha devam edilir. (toplam ısıtma süresi 8 - 12 dakikayı geçmemelidir). Çözelti 50 ml su ile seyreltilir ve buz banyosunda 10°C nin altına soğutulur. 38g sodyum nitrit'in 55 ml sudaki çözeltisi, yavaş yavaş ve karıştırarak, çözeltiliye ilave edilir. Son ilaveden sonra karışım 5 - 10 dakika daha karıştırılır. Meydana gelen kristaller Buchner hunisinden süzülerek ayrılır, 8 - 10 ml buzlu su ile yıkanır : açık sarı renkli kristaller, vakum desikatöründe kurutulur (EN. 123 - 4 °C) (verim 34 g).

Diazometan Hazırlanması :

35 ml Potasyum hidroksit'in sudaki % 40 lik çözeltisi ve 100 ml eter (içinde potasyum hidroksit pastilleri taşır) 500 ml lik bir erlende, tuz-buz banyosunda 0-(-5)°C ye soğutulur. Bir manyet vasıtasıyla daimi karıştırılarak, 0,1 mol (= 10,3 g) nitrozometilüre, ufak porsiyonlar halinde, ilave edilir. Karışım 1/2 saat buzlukta bekletilir. Üstteki eter fazı aktarılıp ayrılır ve potasyum hidroksit pastilleri ilave edilerek buzlukta 1-2 saat bekletilir (suyun uzaklaştırılabilmesi için). Eterli faz diazometanı çözülmüş olarak taşır. Sulu fazda da az miktarda diazometan kalır, bu yüzden sarı renk kayboluncaya kadar damla damla glasiyel asetik asit ilave edilerek diazometan fazlası parçalanır.

Diazometan İle Saponozitin Metil-
lenmesi : 1 g (P1, P2, P3) saponozitleri karışımı yeterli mik-
tar susuz metanolde çözülür. Tuz-buz banyosunda 0°C ye soğutulur ve
diazometanın eterdeki çözeltisi azar azar ilave edilir. Saponozit çö-
zeltisine diazometan ilavesi ile meydana gelen sarı renk kaybolma-
yınca ve gaz çıkışı görülmeyinceye kadar diazometan ilavesine de-
vam edilir. Oda ısısında 1/2 saat bekletilir. Metilasyonun tamamlanıp
tamamlanmadığı ara ara alınan numunelerin sistem -2 ile ince taba-
ka kromatografisinde kontrolü suretiyle anlaşılır. Gerekliyse meti-
lasyon tekrarlanır. Ortamdaki diazometan fazlası 1 - 2 damla glasi-
yel asitik asit ilavesi ile uzaklaştırılır. Çözelti alçak basınç al-
tında kuruluğa kadar uçurulur. Diazolanmış (P1, P2, P3) saponozitle-
ri karışımı

SK - 2 K o l o n H a z ı r l a n m a s ı : 50 g Kieselgel
60 (Merck 7734) ile SK-1 kolonda bahsedildiği şekilde hazırlanan ko-
lona 1,15 g PD1, PD2, PD3 karışımı tathik edilir. Solvan sistemi
olarak kloroform / metanol / su (65:25:1) kullanılır. Kolonda ayırım,
UV - 366 nm da verdiği floresanstan yararlanarak, UV - lambası ve sis-
tem - 2 ile kromatografik olarak kontrol edilir. Benzer fraksiyonlar
birleştirilerek diazolanmış P1 (PD1) saponoziti elde edilir.

Yapı Tayini

G e n e l : Saponozitlerin yapılarının tayininde kulla-
nılan yöntemlerden "Teorik Bilgiler" kısmında bahsedilmişti. Bu
yöntemlerden uygun olanların, yapısı tayin edilecek saponozite
göre seçilip, madde kaybını önleyecek bir şekilde sıralanıp,
uygulanması yapının açıklığa kavuşmasını sağlar.

Saponozitlerin yapılarının aydınlatılmasında ilk kademe, genel olarak, total hidrolizdir. Bu yolla saponozitler kendilerini meydana getiren aglikon ve ozlara ayrılırlar. Ancak bazı saponozitlerde total asit hidroliz şartlarında, aglikonun yapısında bazı değişiklikler neticesi sekonder ürünler meydana gelmektedir. Polygala saponozitlerinin de böyle bir değişimle sene- genik asit gibi sekonder ürünler meydana getirdiğinden daha önce bahsedilmişti. Gerçek aglikonun elde edilebilmesi için oksidatif ve hidrolitik hidroliz yöntemleri (periyodat oksidasyonu, perklorik asit hidrolizi vs ...) yanında enzimatik hidroliz yöntemleri de başarı ile kullanılmıştır. Bu suretle elde edilen aglikon, kolon kromatografisi ile saflaştırılıp kristallendirilir. Aglikon ve türevlerinin erime dereceleri, IR, NMR, kütle spektrometri yöntemleri ile yapısı tayin edilir.

Saponozitin yapısındaki ozlar total asit hidrolizi takiben kağıt, ince tabaka kromatografisi ve GSK (trimetilsilül eteri, metil eteri, alditol asetatı) kullanılarak tespit edilir. GSK ile aynı zamanda ozların molar oranları da belirlenebilir. Oz zincirinin yapısının tayininde zayıf asit veya enzimlerle kısmi hidroliz, periyodat oksidasyonu, permetilasyon yöntemlerinden yararlanılır. Bisdesmozidik saponozitlerde alkali hidroliz ve lityum alüminyum hidrür redüksiyonu yöntemleri kullanılarak her iki oz zinciri ayrı ayrı incelenebilir. Permetillenmiş saponozit ve permetillenmiş oz zincirinin NMR, kütle spektrometresi ile incelenmesi, son yıllarda bilhassa C¹³ -NMR'ı, saponozitlerin yapısının tayininde çok kullanılan yöntem olmuştur.

Araştırmamızda yukarıda kısaca belirtilen yöntemler uygun bir sıra içinde, yapı tayinini gerçekleştirmeye yönelik olarak, uygulanmıştır.

A g l i k o n u n E l d e E d i l m e s i v e T a -

n i m i : Polygala saponozitlerinin aglikonunun asit hidroliz şartlarında bozunması nedeniyle uzun yıllar yapısının yanlış tayin edildiği teorik bilgilerde açıklanmıştı. Bu nedenle aglikonun elde edilmesinde enzimatik veya oksidatif hidroliz yöntemlerinin kullanılması zorunludur. Oksidatif hidroliz yöntemlerinden periyodat oksidasyonu, saponozite bağlı oz zincirinin yapısının da aydınlatılmasında yararlanılan bir yol olması nedeniyle, tercih edilmiştir. Periyodat oksidasyonu ile oz zincirindeki 1, 2 - glikol yapısındaki ozlar parçalanır. Bu yapıyı taşımayan, dallanma noktasındaki ozlar ise parçalanmadan elde edilmektedir. Bu suretle hidroliz numunesinde kağıt kromatografisi ile tespit edilen ozların, dallanma noktalarında bulunduğu da belirlenmiş olur.

Başarılı bir periyodat oksidasyonu için gerekli şartların dikkatli bir şekilde temin edilmesi gerekir (75). Bu şartlar, teorik bilgilerde ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır.

Siyah karbon kağıdı ile kaplanmış 500 ml lik bir balona 1 g (Pl) saponozitinin 500 ml % 95 etanoldeki çözeltisi konur. Tuz - buz karışımı ile çözelti + 4°C ye soğutulur. Sürekli karıştırılarak, 2 g sodyum metaperiyodatın 20 ml sudaki çözeltisi azar azar ilave edilir. Karanlıkta 40 saat bekletilir. Süre sonunda Buchner hunisinden süzülerek, çökelti ve süzüntü ayrılır.

Çökelti iyodat fazlası giderilene kadar, su ile yakanır. Potasyum iyodürün sudaki doymuş çözeltisi ile kontrol edilen çökelti, vakumlu etüvde kurutulur (0,930 g) . Kurutulan çökelti sodyum hidroksitin sudaki % 5 lik çözeltisi (30 ml) ile azot gazı altında 1 saat 80°C lik su banyosunda, geri çeviren soğutucu altında, ısıtılır. Buz banyosunda soğutulan çözeltinin pH'sı, fosforik asitin sudaki % 5 lik çözeltisi ile, pH 3,0'e ayarlanır. Bu pH da çöken kısım, sulu çözeltiden eter/etanol (5:1) karışımı ile 3 defa ekstre edilir, organik fazlar birleştirilir, susuz sodyum sülfat ile suyundan kurtarılır, alçak basınç altında 50°C'lik su banyosunda kuruluğa kadar uçurulur (260 mg) (A). Eter/etanol ile ekstraksiyondan sonra kalan su fazı (B) ise daha sonra oz zincirinin yapısının tayininde kullanılır.

(A) Silikajel kolonda ayırma tabi tutulur :

SK-3

Materyal	: 260 mg (A)
Adsorban	: 25 g Kieselgel 60 (0,063-0,2 mm) (Merck 7734)
Solvan Sistemi	: 1. Petrol eteri (40-60°C)/eter (4:6) 2. " " / " (2:8) 3. Aseton/heksan (1:1)
Fraksiyonlar	: 10-500 ml arası
İTK Kontrol	
Solvan Sistemi	: CHCl ₃ /MeOH (7:1)
Revelatör	: Vanilin/ Sülfürik asit % 1

Genel yöntemler ile hazırlanan kolonda fraksiyonların toplanmasında UV- lambasından yararlanılır. Saponozitin taşıdığı organik asit UV- 366 nm da mavi floresans verdiği için, ilk elüsyon solvanı petrol eteri/eter (4:6) ile, bu organik asidin sürüklenmesi UV- lambası yardımıyla takip edilir. Silikajel G kaplanmış plaklarda (sistem - 13) ile kontrol edilir. Ayırım sağlanmış

olan fraksiyonlar birleştirilir (C).(C) kısmı daha sonra incelenenecektir.

SK - 3 kolondan (C) 'nin elüsyonundan sonra, polarite arttırılarak, petrol eteri /eter (2:8) solvan sistemine geçilir. Bu solvan ile hiç bir madde gelmeyinceye kadar kolon yıkanır. Kolonda istenmeyen maddelerin tükenmesi UV ve ince tabaka kromatografisi yardımıyla kontrol edilir. Takiben aseton /heksan (1:1) solvan sistemine geçilir. Fraksiyonlar 20 ml olarak toplanır. 2. ve 3. ncü fraksiyonlarda, (sistem - 13) ile ince tabaka kromatografisinde tek leke halinde görülen maddenin, presenegenin^a numunesi ile aynı Rf değerini verdiği görülür. Fraksiyonlar birleştirilerek alçak basınç altında kuruluğa kadar uçurulur, kloroform'da çözülür, buzdolabında kristallendirilerek temizlenir (3,5 mg). Elde edilen madde(Pl)saponozitinin aglikonudur (D).

Aglikonun Dimetilester Triasetatı

SK-3 kolondan alınan aglikonun bir kısmı yeterli miktar absolu eterde çözülür, diazometan ile, oda ısısında, esterleştirilir. Esterleşmenin tamamlanıp tamamlanmadığı, (sistem - 13) ile ince tabaka kromatografisinde, kontrol edilir. Çözücü alçak basınç altında kuruluğa kadar uçurulur ve aglikonun dimetilesteri elde edilir.

Elde edilen madde, 4 ml piridin ve 2 ml asetik asit anhidridine çözülür. 24 saat oda ısısında bekletilen karışım 20 ml buzlu suya dökülür. Meydana gelen bulanık çözeltilen asetilasyon ürünü eter ile 3 defa ekstre edilir, eter ekstraktları birleştirilir, kuruluğa kadar uçurulur. Artık, kloroform/metanol (1:1) ile buzdolabında kristallendirilir ve aglikonun dimetilester triasetatı elde edilmiş olur.

^a :Şahit madde olarak kullanılan presenegenin numunesi Prof. Dr. Junzo SHOJI' den (Showa Üniversitesi - Japonya) temin edilmiştir.

O z Z i n c i r i n i n Y a p ı s ı n ı n T a y ı -

n i :

T o t a l H i d r o l i z : Daha önce açıkladığımız gibi, Polygala saponozitlerinin total asit hidroliz şartlarında yapısal değişikliğe uğraması nedeniyle, total asit hidroliz neticesinde saponozitin sadece oz kısmı hakkında genel bir fikir elde edilebilir.

(Pl)saponozitinin total asit hidrolizi için en uygun şartlar değişik konsantrasyondaki hidroklorik asit ve sülfirik asit ile yapılan ön çalışmalarla belirlendi. Hidroliz için, susuz metanol ile hazırlanmış gaz hidroklorik asit çözeltisi (a/a) ile 6 saatlik hidroliz süresinin yeterli olduğu tespit edildi. Süre sonunda hidroliz ortamına su ilave edilerek çöken glikon ayrıldı, ozları taşıyan çözelti kısmı sulu hidroklorik asit ile tekrar 2 saat hidrolize tabi tutularak ozidik metil grupları parçalandı.

100 mg (Pl), 10 ml hidroklorik asidin susuz metanoldeki %5 lik çözeltisi ile 100°C yağ banyosunda 6 saat ısıtılır. Hidroliz süresi sonunda 10 ml su ilave edilir, alçak basınç altında, düşük ısıda metanol uzaklaştırılır. Çöken aglikon mavi bandlı süzgeç kağıdından (Schleicher - Schüll, No.589) süzülerek ayrılır. Süzüntü aynı şartlarda 2 saat daha ısıtılarak hidrolize tabi tutulur. Reaksiyon karışımı gümüş karbonat ile turnusol kağıdına karşı nötralleştirilir. Çöken gümüş klörür süzülerek uzaklaştırılır. Süzüntüde kalabilecek gümüş iyonları fazlası hidrojen sülfür gazı geçirilerek çöktürülür, tekrar süzülür. Süzüntü alçak basınç altında kuruluğa kadar uçurulur. Artık yeterli miktar metanolde çözülür. Bu oz numunesi'dir.

Elde edilen oz numunesi kağıt kromatografisi ve gaz kromatografisinde kullanılmak üzere ikiye ayrılır.

K a ğ ı t K r o m a t o g r a f i s i :

(Pl)saponozitinin taşıdığı ozların kalitatif teşhisi için en uygun yöntem kağıt kromatografisidir. Yapılan ön çalışmalar bu amaçla uygun olarak, inen-damlayan kağıt kromatografisinde(sistem-4)ve (sistem - 6)ile tatminkar sonuçlar alınabileceğini gösterdi. Revelatör olarak anilin hidrojen ftalat reaktifi, ozlarla değişik renkler verdiği için, tercih edildi.

18 x 50 cm boyutlarında kesilmiş Schleicher-Schüll 2043 amgl kromatografi kağıtlarının uçlarına, düzgün sürüklenmeyi ve damlamayı sağlamak amacıyla, 2 cm genişliğinde dişler yapılıp(Pl) saponozitinin asit hidrolizi ile elde edilen oz numunesi ve şahit ozlar bu kağıtlara tatbik edilir. Kağıtlar içinde solvan sistemi bulunan 20 x 50 x 55 cm boyutlarındaki kromatografi tanklarında 2 - 3 saat doymaya bırakılır. Süre bitiminde küvetlere solvan ilave edilerek sürüklenmeye bırakılır. Sürüklenme süresi sonunda çıkarılan kromatogramlar açık havada kurumaya bırakılır, anilin hidrojen ftalat reaktifi püskürtülerek 105°C de 10 dakika tutulur. Heksozlar kahverengi, pentozlar pembe-kırmızı, metil pentozlar açık kahverengi renk verirler.

Kağıt	Schleicher - Schüll 2043 a Mgl (18 x 50 cm)
Yöntem	İnen ve damlayan kağıt kromatografisi
Solvan sistemleri	
	Sistem -4 n- BuOH/gl. AcOH/H ₂ O (4:1:5, üst faz) (alt faz tank atmosferini doyurucu olarak kullanılır)
	Sistem-6 n-BuOH/Pir./H ₂ O (9:5:4)
Sürüklenme süresi	Sistem - 4 için 48 saat Sistem - 6 için 24 saat
Revelatör	Anilin hidrojen ftalat, 110°C, 10'

Tablo - 22

Ozların Kağıt Kromatografisi

G a z S ı v ı K r o m a t o g r a f i s i :

(Pl) saponozitinin total asit hidrolizi neticesinde elde edilen oz numunesinin diğer kısmı gaz-sıvı kromatografisi analizinde kullanıldı. Oz numunesindeki ozlar WULFF yöntemi (211) ile silüllandendi ve gaz kromatografisine uygulandı. OV-101 kolon kullanılarak, silülennmiş oz numunesi, silülennmiş şahit ozlarla karşılaştırıldı ve piklerin alanları hesaplanarak numunedeki ozların molar oranları tespit edildi.

Hidroliz ürünlerinin Silülennmesi : Total asit hidroliz sonucu elde edilen oz numunesinin yarısı alçak basınç altında kuruluğa kadar uçurulur. Artık üzerine 5 - 10 ml pro analiz

benzen ilave edilerek tekrar alçak basınç altında kuruluğa kadar uçurulur. Son işlem birkaç defa daha tekrarlanarak numunenin iyice kuruması sağlanır. Oz numunesi 0,8 ml susuz piridinde çözüdür, 0,4 ml heksametildisilazan (HMDS) ve 0,4 ml trimetilklorosilan (TMS) ilave edilir. Karışım, anhidr şartlarda, 95°C lik yağ banyosunda 1 saat ısıtılır. Süre sonunda çöken amonyum klorürü uzaklaştırmak için karışım, berraklaşınca kadar, G4 tipi cam filtreden defalarca süzülür. Alçak basınç altında, 45°C deki su banyosunda kuruluğa kadar uçurulur. Artık üzerine defalarca pro analiz benzen ilave edilerek, alçak basınç altında, uçurmak suretiyle piridin uzaklaştırılır. Neticede elde edilen silülenenmiş oz karışımı gaz kromatografisine uygulanır.

Kromatografi Şartları :

Kromatograf	PYE - Unicam 104
Kolon	Cam kolon (2 m) (hazır kolon) ^a
Stasyonier faz	OV - 101 % 3
Enjektör ısısı	240 °C
Kolon ısısı	155 °C
Detektör ısısı	250°C (FID)
Taşıyıcı gaz	Azot ; 30 ml/dakika
Kağıt hızı	5 mm/ dakika

^a : OV - 101 Hazır cam kolon : Dr. Werner NESS, CH 8700, Küsnacht - İSVİÇRE

Z a y ı f A s i t H i d r o l i z : Total asit hidroliz şartlarında saponozitlere bağılı bulunan bazı terminal ozların parçalandığı bilinmektedir. Bu nedenle total asit hidrolizatın kağıt kromatografisi ile saponozitin taşıdığı ozlar kesin olarak belirlenemez.

Saponozitin zayıf asit hidrolizi ve hidrolizatın kağıt kromatografisi ile bu konuda tamamlayıcı bilgi sağlandı.

60 mg(Pl)saponoziti 6 ml sülfürik asidin sudaki % 2 lik çözeltisi ile 4 saat 80°C lik su banyosunda, geri çeviren soğutucu altında ısıtılır. Süre sonunda elde edilen bulanık çözelti süzülür, süzüntü baryum karbonat ile turnusola karşı nötralleştirilir. Çöken baryum sülfat süzülerek ayrılır, süzüntü, n-butanol ilavesi ile, kuruluğa kadar uçurulur. Artık birkaç ml. metanolde çözülür ve, genel yolla, kağıt kromatografisinde(sistem 4 ve 6)kullanılarak incelenir.

A l k a l i H i d r o l i z : Elde edilen(Pl) saponozitinin monodesmozidik veya bisdesmozidik bir yapıya sahip olduğunu tesbit edebilmek için kullanılan yöntemlerden biri de alkali hidroliz yöntemidir. 17. (C) daki karboksil grubuna bağılı bir oz zinciri varsa alkali hidroliz ile kopar ve C-3 hidroksil grubuna bağılı oz zincirini taşıyan monodesmozidik saponozit ile karboksil grubuna bağılı oz zinciri elde edilir.

Daha önce Polygala türlerinden elde edilen saponozitler hem monodesmozidik hem de bisdesmozidik yapıdadırlar. Bu yüzden(Pl)saponozitinin tipini tespit etmek amacıyla alkali hidroliz yöntemi kullanıldı.

Alkali hidroliz ürünü Silikajel G kaplı plaklarda (sistem - 2) ile ince tabaka kromatografisine uygulandı. Solvanın sürüklenme çizgisi civarında vanillin / sülfürik asit reaktifi ile menekşe renk veren bir lekenin altında, mor renkli ve monodesmozidik saponozite ait olabilecek bir leke ile tatbik noktası civarında esmer renkli bir lekenin bulunduğu görüldü. Hidrolizat pH 2-3'e ayarlanıp, izo amil alkol ile ekstre edildi^a. İzole amil alkol fazına geçen sapogenin 3-0-monodesmozit (sistem - 9) ile silikajel kolonda temizlendi. Bu temizleme işlemi sırasında, eğer eter ile ekstre edilmemişse^a, ortamdaki serbest hale geçmiş, organik asit kolondan elde edilebilmektedir. Kalan su fazından ise metanol ile C-28 oligoholoziti saf olarak elde edildi.

520 mg(Pl) saponoziti 55 ml 1 N sulu potasyum hidroksit ile azot gazı altında 80^o lik subanyosunda 5 saat ısıtılır. Takiben karışımın pH'sı sülfürik asidin sudaki % 2 lik çözeltisi ile 2-3 e ayarlanır, çöken potasyum sülfat süzülerek ayrılır. Sulu fazın izo amil alkol ile ekstraksiyonu suretiyle sapogenin 3-0 monodesmozit ayrılır. Kalan su fazı C-28 oligoholozit zincirini taşır.

Sapogenin 3-0 Monodesmozit'in Elde Edilmesi :

Birleştirilen izo amil alkol ekstraktları alçak basınç altında kuruluğa kadar uçurulur. (Sistem - 2) kullanılarak ince tabaka kromatografisinde, vanillin/sülfürik asit reaktifi ile menekşe renk veren bir leke (Rf 0,85), mor renk veren monodesmozit lekeleri (Rf 0,35) ve kirlilikler görülür. Karışım, sapogenin 3-0-monodesmozitin elde edilmesi için, silikajel kolonda kloroform/ metanol/su (70:20:2,5) solvan sistemi (sistem -9) ile elüe edilir.

^a : Sulu faz, izo amil alkol ile ekstre etmeden önce, eter ile ekstre edilirse, ortamda serbest halde bulunan organik asit de elde edilebilir.

ilk fraksiyonlarda Rf 0,85 olan madde elüe edilir. Daha sonraki fraksiyonlardan ise sapogenin -3-0- monodesmozit saf olarak elde edilir. Fraksiyonlar alçak basınç altında kuruluğa kadar uçurulur ve beyaz renkli amorf toz (62 mg) elde edilir.

SK -4

Adsorban	Kieselgel 60 (0,063 - 0,2 mm) (Merck 7734); 20 g
Materyal	Alkali hidroliz, izo amil alkol fazı
Kolon boyutları	2 x 22 cm
Solvan sistemi	CHCl ₃ / MeOH/H ₂ O (70:20:2,5) (Sistem -9)
Fraksiyonlar	10 ml

Fraksiyonların kontrolü :

ITK	Sistem -2. CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O	(65:35:10)	0,38 Rf
	Sistem -9. " " "	(70:20:2,5)	0,22 Rf

C - 28 Oligoholozitin Elde Edilmesi :

izo amil alkol ekstraksiyonundan kalan su fazı kuruluğa kadar uçurulur ve silikajel kolonda ayırma tabi tutulur. Kolon önce kloroform / metanol / su (70:20:2,5) solvan sistemi ile temizlemeye tabi tutulur. Bu solvan sistemi ile oligoholozit hiç sürüklenmemekte, fakat su fazında kalan az miktarda sapogenin 3-0- monodesmozit ve hidroliz olmamış saponozit gibi kirlilikler elüe edilmektedir. Silikajel kaplı plaklarda (sistem -2) ile kolondan alınan fraksiyonlar kontrol edilir. Vanillin/sülfürük asit ve UV de herhangi bir leke tespit edilmeyinceye kadar elüsyona devam edilir. Sonra, polarite arttırılarak, kloroform / metanol / su (65:35:10) (sistem -2) sistemi ile elüsyon sürdürülür. Ancak bu solvan sistemi ile oligoholozit de sürüklendiğinden fraksiyonlarda oligoholozit lekesi görülür görülmez solvan değiştirilerek metanol ile oligoholozit elüe edilir^a. Elde edilen oligoholozitin ince

^a : Kloroform / metanol / su (65:35:10) sistemi ile elüsyon sürdürülürse oligoholozitin elüsyonu geçikmektedir. Metanol ile aynı elüsyon birkaç fraksiyonda sağlanmaktadır.

tabaka kromatografisi ile kontrolunda silikajel kaplı plaklarda n- butanol/ glasiyel asetik asit/su (4:2:1:3) (sistem -3) sistemi ve vanilin/ sülfirik asit reaktifi kullanılır. Bu reaktif ile oligoholozitler ilk anda kahverengi, bekletilince gri renk verirler.

SK-5

Adsorban	Kieselgel 60 (0,063 - 0,2 mm) (Merck 7734); 20 g
Materyal	Alkali hidroliz, su fazı
Kolon boyutları	2 X 22 cm.
Solvan sistemi	
Sistem - 9	CHCl ₃ / MeOH/H ₂ O (70:20:2,5)
Sistem - 2	" " " (65:35:10)
Sistem - 18	MeOH
Fraksiyonlar	10 - 50 ml
Fraksiyonların kontrolü :	
ITK Sistem - 2	CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O (65:35:10)
Sistem - 3	n - BuOH/n-PrOH/gl. AcOH/H ₂ O (4:2:1:3)

Alkali Hidroliz

Ürünlerinin Asit Hidrolizi :

SK-4 kolondan elde edilen sapogenin-3-0- monodesmozit ve SK-5 kolondan elde edilen C-28 oligoholozitin taşıdığı ozların tespit edilmesi için, her iki madde asit hidrolize tabi tutuldu. Daha önce de belirttiğimiz gibi, asit hidroliz şartlarında aglikon yapısal değişikliğe uğradığından, aglikon üze-

rinde bir fikir ileri sürülemez. Her iki bileşiğin hidrolizatlarında bulunan ozlar, daha önce kullanılan kağıt kromatografisi ve gaz kromatografisi yöntemleriyle tespit edildi.

*S a p o g e n i n - 3 - 0 - M o n o d e s m o z i t i n
A s i t H i d r o l i z i :*

30 mg madde, 5 ml hidroklorik asidin susuz metanoldeki % 5 lik çözeltisi ile, 100 °C lik yağ banyosunda, 5 saat metanolize tabi tutulur. Süre sonunda ortama 5 ml su ilave edilerek, metanol alçak basınç altında uçurulur. Çöken aglikon mavi bandlı süzgeç kağıdından süzülerek ayrılır. Süzüntü aynı şartlarda 2 saat daha hidroliz edilir. Hidrolizat, gümüş karbonat ile, genel yolla, nötralleştirilir, alçak basınç altında kuruluğa kadar uçurulur. Artık, daha önce verilen şartlarda, inen - damlayan kağıt kromatografisi ve gaz kromatografisi ile analiz edilir.

C - 2 8 O l i g o h o l o z i t i n A s i t H i d r o l i z i :

C-28 Oligoholozit fraksiyonunun yarısı, 3 ml sülfürik asidin sudaki % 2 lik çözeltisi ile 100°C lik yağ banyosunda 2 saat ısıtılır. Hidrolizat baryum karbonat ile nötralleştirilir. Çöken baryum sülfat süzülerek ayrılır. Süzüntü alçak basınç altında kuruluğa kadar uçurulur. Bir kaç ml piridinde çözülen, artık inen - damlayan kağıt kromatografisi ile, daha önce verilen şartlarda, analiz edilir.

P e r m e t i l l e m e : Permetilleme oz zincirindeki ozların durumlarının belirlenmesinde çok kullanılan bir yöntemdir. Bu amaçla Pl saponoziti HAKOMORI Yöntemi (146) ile permetillendi. Maddenin C-2 hidroksil grubu, sterik olarak engellen-
diğinden, metillenmemektedir. Dolayısıyla, metilasyonun tamam-

lanıp tamamlanmadığının kontrolunda kullanılan, IR -spektrumundaki 3200 - 3400 cm^{-1} deki hidroksil pikinin kaybolması prensibi , bu madde için geçersizdir. Kontrol amacıyla ince tabaka kromatografisi yöntemleri ile yetinilmiştir.

Metilasyonun tamamlanmasından sonra, ana ürün sistem -15 ile yan maddelerden ayrıldı. Permetillenmiş Pl saponozitinin genel yöntemlerle asit hidrolizi sonucu elde edilen kısmen metillenmiş ozların teşhisleri için ince tabaka kromatografisinden yararlanıldı.

P e r m e t i l l e m e :

250 mg sodyum hidrür (Merck - Schuchardt 818023), 5 ml dimetil sülfoksit (DMSO) (30 g alüminyum oksit "Merck 1077 aktivasyon derecesi I" kolondan 100 ml DMSO geçirilerek suyundan kurtarılır) ile azot gazı akımı altında 65°C lik yağ banyosunda, manyetik karıştırıcı ile sürekli karıştırılarak, geri çeviren soğutucu altında 1 saat ısıtılır. Süre sonunda meydana gelen metil sülfinit karbanion, 570 mg Pl saponozitinin 10 ml DMSO daki çözeltisine ilave edilir ve yine azot atmosferinde 15 dakika daha 65°C de karıştırılır. Takiben oda ısısında, karanlıkta, 2 saat daha karıştırmaya devam edilir. Süre sonunda karışıma 3 ml metil iyodür 30 - 45 dakika süresince azar azar damlatılır. Son ilaveden sonra 2 saat daha azot atmosferinde karıştırılır. Azot akımı kesilir. Her gün sabah ve akşam 200 mg sodyum hidrür ve 3 ml metil iyodür 30 - 45'er dakikalık süre içinde azar azar ilave edilir. 2. gün sonunda vasattan alınan numune silikajel kaplı plaklarda kloroform/ metanol (50:1) (sistem - 17) ve benzen/ metanol (10:1) (Sistem -16) solvan sistemleri ile kontrol edilerek metilasyonun tamamlanıp tamamlanmadığı tespit edilir. Karışım buzlu suya dökülür, çöken permetil saponozit kloroform ile 6 defa ekstre edilir. Toplanan kloroform fazlarının rengi sodyum tiyosülfatın sudaki %5 lik

çözeltisi ile giderilir. DMSO'in vasattan uzaklaştırılması için kloroform fazları 10 defa su ile yıkanır. Organik faz susuz sodyum sülfat ile suyundan kurtarılır ve alçak basınç altında 45°C lik su banyosunda kuruluğa kadar uçurulur ve sarı - esmer renkli bir ürün elde edilir.

SK -6

Adsorban	Kieselgel 60 (0,063 - 0,2 mm) (Merck 7734)
Materyal	Permetillenmiş Pl saponoziti
Kolon boyutları	2 x 22 cm
Fraksiyonlar	15 - 25 ml
Solvan sistemi	1. C ₆ H ₆ 2. C ₆ H ₆ /MeOH (10:0,2) 3. " " (10:0,5)

Kolon Kromatografisi : 20 g silikajel ile genel yöntemlere göre hazırlanan kolona permetillenmiş Pl saponoziti tatbik edilir. Kolon önce benzen ile apolar kirliliklerden temizlenir. Takiben benzen/metanol (10:0,2) ile daha polar kirliliklerden kurtarılır. Permetillenmiş Pl saponoziti kolondan benzen/metanol (10:0,5) solvan sistemi ile elüe edilir. Fraksiyonlar benzen/ metanol (10:1) ve kloroform / metanol (50:1) solvan sistemleri ile silikajel kaplı plaklarda kontrol edilir. Uygun fraksiyonlar birleştirilir ve alçak basınç altında kuruluğa kadar uçurulur. Elde edilen permetillenmiş Pl saponoziti bir miktar kloroformda çözülür ve soğutulmuş petrol eteri ilavesi ile çöktürülür, sarımsı beyaz renkli amorf bir toz elde edilir.

Asit Hidroliz : 100 mg permetillenmiş Pl saponoziti 10 ml hidroklorik asidin susuz metanoldeki % 5 lik çözeltisi ile, genel hidroliz yöntemlerine göre, 6 saat 100°C lik yağ banyosunda metanolize tabi tutulur. Hidrolizat gümüş karbonat ile, genel yolla,

nötralleştirilir, alçak basınç altında 45°C su banyosunda kuruluğa kadar uçurulur. Vakumlu etüvde 30°C de kurutulur : Metilozit karışımı.

Metil ozit karışımı, 2 ml hidroklorik asidin sudaki 2N çözeltisi ile 2 saat 100°C de ısıtılır. Süre sonunda, genel yöntem ile, nötralleştirilir ve 45°C de alçak basınç altında kuruluğa kadar uçurulur. Bir kaç ml kloroformda çözülür ve kısmen metillenmiş ozlar ince tabaka kromatografisi ile silikajel kaplı plaklarda incelenir. Yapılan ön çalışmalar ile tespit edilen amaca uygun solvan sistemleri aşağıda gösterilmiştir. Bu solvan sistemleri kullanılarak, permetillenmiş Pl saporozitinin asit hidrolizi ile elde edilen tamamen veya kısmen metillenmiş ozlar, temin edilebilen bazı metillenmiş oz numuneleri ile^a karşılaştırılmak suretiyle teşhis edilir. Hidroliz ürünlerinin kromatogramdaki yerlerinin daha iyi belirlenmesi için, 2,3,4,6 - tetrametil- D- glikoza göre bağlı Rf değerleri (R_G) hesaplanır.

Adsorban	Kieselgel 60, DC - hazır plak (Merck 5724)
Solvan sistemleri	
Sistem -19	C ₆ H ₆ : Me ₂ CO (2:1)
Sistem -20	C ₆ H ₆ : Me ₂ CO (1:1)
Sistem -21	C ₆ H ₆ : abs. EtOH(8:2)
Sistem -22	CHCl ₃ : MeOH (9:2)
Sistem -23	Et - CO - Me / H ₂ O ile doymuş
Revelatör	Anilin hidrojen ftalat, 110°C de 5 - 10 dakika

Tablo - 23

Metillenmiş Ozların Ayırımında Kullanılan Solvan Sistemleri

^a : 2,3,4,6- tetrametil - D - glikoz : Bonn Univ. Organik Kimya Böl.; mono- metil-O-D-fukoz : Dr. Hüseyin Anıl.

Metil Ozlar	R_G Solvan Sistemleri				
	19	20	21	22	23
2,3,4-trimetil -D- fukoz	0,86	0,91	0,91	0,96	0,90
2,3,4-trimetil-L-ramnoz	1,36	1,21	1,01	0,98	1,10
2,3,4-trimetil-D-ksiloz	1,12	1,12	1,00	0,95	1,08
2,3,4-trimetil-L-arabinoz	0,67	0,75	0,80	-	0,71
2,3,4-trimetil-D-glikoz	0,32	0,54	0,76	0,78	0,82
2,3,4,6-tetrametil-D-galaktoz	0,75	0,82	0,91	0,95	0,82
2,3,4,6-tetrametil-D-glikoz	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Tablo - 24

Metil Ozların R_G Değerleri

Permetillenmiş Pl Hidrolizatındaki
Metillenmiş Ozların Ayırımı :

Permetillenmiş saponozitin total asit hidrolizi neticesinde ortaya çıkar permetillenmiş ve kısmen metillenmiş ozların teşhisinde ince tabaka kromatografisi ve kütle spektrometresinden yararlanılmaktadır. Metilozit karışımının kütle spektromunun yorumlanması, metilozitlerin ince tabaka kromatografisindeki ayırımları yardımıyla saponozitin oz zincirindeki ozlar ve yerleri hakkında bilgi sahibi olunabilir. Bu gayeyi gerçekleştirmek için metilozitlerin karışımı kütle spektrometresine tatbik edildi. Aynı karışım ince tabaka kromatografisine, şahit

numuneler bulunmadığı için, uygulanamadı. Metillenmiş oz numunesi, permetillenmiş ve kısmen metillenmiş şahit ozlar ile, değişik solvan sistemleri (Tablo - 23) kullanılarak karşılaştırılır. Bu suretle, numunedeki ozlar ve metillenme dereceleri tespit edilebilir. Bu teşhisler için veterli şahit metillenmiş oz numunelerinin hepsi temin edilemediğinden karşılaştırmalar elde bulunan şahit metillenmiş ozlar ile yapıldı. Teşhis edilemeyen metillenmiş ozların hangi ozların türevleri olduğunu tespit edebilmek için, metillenmiş oz numunesi kolon kromatografisi ile ayırımına tabi tutuldu. Bu amaçla, silikajel kolonda (SK-7) benzen/aseton karışımı, artan oranlarda aseton ilavesi ile, kullanıldı.

SK - 7

Adsorban	Kieselgel (0,063 - 0,2 mm) (Merck 7734)
Materyal	Metillenmiş oz numunesi
Solvan sistemi - 24	C_6H_6 : Me_2CO (10:1,10:2,.....10:9,1:1)
Kolon boyutları	1,5 x 100 cm
Fraksiyonlar	15 - 30 ml

Karışımı meydana getiren ozlardan ancak iki tanesi tek olarak, diğerleri 2 - 4 oz ihtiva eden karışımlar halinde elde edilebildi. Permetillenmiş olarak bulunan ozların terminal olmaları gerektiği düşünüldü. Bunlar şahit metillenmiş oz numuneleri ile ince tabaka kromatografisinde (Sistem 19-23) karşılaştırılarak teşhis edildi. Kısmen metillenmiş ozların hangi ozlar

olduğunu belirlemek için (SK- 7)kolondan elde edilen 2-4 metillenmiş oz taşıyan karışımlar permetillendi. Kısmen metillenmiş ozlardan elde edilen permetillenmiş ozlar, ince tabaka kromatografisi ile şahit permetillenmiş ozlar ile karşılaştırılarak teşhis edildi.

A g l i k o n u n H i d r o k s i l
G r u b u n a B a ğ l ı M e t i l l e n m i ŝ O z l a r :

Aglikonun C-3 hidroksil grubuna bağlanan ozlar, saponozitin alkali hidrolizi ile elde edilen sapogenin-3-0- monodesmozitin asit hidrolizi ve ardından kağıt kromatografisi, gaz kromatografisi analizleri ile teşhis edilmişti. Bu bulguları kuvvetlendirmek için sapogenin-3-0- monodesmozitin bir kısmı HAKOMORI Yöntemi (76) ile permetillendi. Permetillenmiş ürünün asit hidrolizi ve meydana gelen metillenmiş ozların (sistem -19 ve -21 ile) kromatografik teşhisleri yapıldı.

Permetillenme : 35 mg madde, Pl saponoziti için verilen permetilleme yöntemine göre metillenir (3 ml DMSO , 35 mg sodyum hidrür, 3 ml metil iyodür). Ürün (sistem -17) ile ince tabaka kromatografisi suretiyle kontrol edilir. Açık sarı renkli amorf toz elde edilir.

Asit Hidroliz : Yukarıda elde edilen permetillenmiş-3-0- monodesmozitin tamamı, 3 ml hidroklorik asidin susuz metanoldeki % 5 lik çözeltisi ile 100°C lik yağ banyosunda 5 saat hidrolize tabi tutulur. Süre sonunda ortalama 3 ml su ilave edilerek alçak basınç altında 45°C lik su banyosunda metanol uzaklaştırılır. Çöken aglikon süzülerek uzaklaştırılır. Süzüntü yukarıdaki şartlarda 2 saat daha ısıtılır, gümüş karbonat ile, genel yolla, nötraleştirilir, Hidrolizat 45°C lik su banyosunda alçak basınç altında

kuruluğa kadar uçurulur. (Sistem -19 ve -21) ile metillenmiş ozlar teşhis edilir.

A g l i k o n u n K a r b o k s i l G r u b u n a
B a ğ l a n m ı ŝ M e t i l l e n m i ŝ O z l a r :

Aglikonun C-28 karboksil grubuna bağlanan ozlar, alkali hidroliz sonucu elde edilen C-28 oligoholozitin asit hidrolizi ile kağıt kromatografisi kullanılarak belirlenmişti. Ancak hangi ozun terminal, hangisinin aglikona bağlandığı hakkındaki bilgiler, permetillenmiş C-28 oligoholozitin asit hidrolizi ve permetillenmiş P1 saponozitin lityum alüminyum hidrür reduksiyonu ile tespit edildi. Permetillenmiş C-28 oligoholozitin asit hidrolizi sonucunda, daha önce aglikona ilk bağlı olan oz, permetillenmiş olarak elde edilir. Diğer taraftan, aynı oz, permetillenmiş saponozit lityum alüminyum hidrür etkisiyle karboksil grubundan parçalanırken, itölüne indirgenmiş olarak elde edilir. Indirgenme ürünlerinin elde edilebilmesi için, saponozit lityum alüminyum hidrür ile yarılmaya tabi tutuldu ve elde edilen ürün temizlendi, asit hidrolizi yapıldı. Hidrolizattaki metillenmiş ozlar, permetillenmiş P1 saponozitin asit hidrolizatındaki metillenmiş ozlar ile ince tabaka kromatografisinde (Sistem -19-23) kullanılarak karşılaştırıldı. Anilin hidrojen ftalat reaktifi ile renklendirildiğinde, kromatogramlarda, daha önce karboksil grubuna bağlı olduğu gösterilmiş olan, monometil-fukoz lekesinin bulunmadığı görüldü. Aynı kromatogram, itoller için karakteristik, sodyum metaperiyodat/benzidin Reaktifi^a (25) ile revele edildiğinde

^a : Sodyum metaperiyodat /benzidin reaktifi

I. Çözelti : %0,1 sodyum metaperiyodatın sulu çözeltisi

II. Çözelti : 50 ml su, 20 ml aseton ve 10 ml 0,2 N hidroklorik asit, 1,8 g benzidin'in 50 ml etanoldeki çözeltisi ile karıştırılır.

İşlem : Kromatograma önce I. çözelti, 5 dakika sonra II. çözelti püskürtülür.

mavi zemin üzerinde beyaz leke halinde itol varlığı tespit edildi.

C - 28 O l i g o h o l o z i t i n
P e r m e t i l l e n m e s i :

25 mg C-28 oligoholoziti, Pl saponoziti için verilen permetilleme yöntemine göre metillenir (3 ml DMSO, 25 mg sodyum hidrür, 3 ml metil iyodür).

P e r m e t i l l e n m i ŝ C - 2 8 O l i g o h o -
l o z i t i n A s i t H i d r o l i z i :

Elde edilen permetillenmiş C-28 oligolozitin tamamı, 2 ml hidroklorik asidin sudaki çözeltisi ile 2 saat 95°C lik yağ banyosunda hidroliz edilir. Süre sonunda hidrolizat gümüş karbonat ile, genel yolla, nötralleştirilir, 45°C lik su banyosunda, alçak basınç altında kuruluğa kadar uçurulur. Yeterli miktar kloroform da çözülür, (sistem -19 ve 21) ile ince tabaka kromatografisinde, permetillenmiş Pl saponozitinin asit hidrolizati ile karşılaştırılır.

P e r m e t i l l e n m i ŝ P l s a p o n o z i t i n i n L i t -
y u m A l ü m i n y u m H i d r ü r İ l e Y a r ı l m a s ı :

50 mg, HAKOMORI Yöntemine göre, permetillenmiş Pl saponoziti 10 ml absolü tetrahidrofuranda çözülür. 50 mg lityum alüminyum hidrür ilâve edilir. Karanlıkta, manyetik karıştırıcı ile sürekli karıştırılarak, 2 saat 80°C lik yağ banyosunda ısıtılır. Süre sonunda lityum alüminyum hidrür fazlası etilasetat ilavesi ile parçalanır. Reaksiyon karışımı 40 ml suya dökülür. Sulu faz önce 6 defa eter ile çalkalanarak C-3 hidroksil grubuna bağlı permetillenmiş ozları ihtiva eden redüklenmiş aglikon ekstre edilir. Ardından 6 defa kloroform ile çalkalanan su fazından karboksil grubuna bağlı permetillenmiş oligoholozitin itolü elde edilir.

Her iki organik faz da su ile yıkanır ve susuz sodyum sülfat ile kurutulur, alçak basınç altında, 45°C lik su banyosunda, kuruluğa kadar uçurulur. Kloroform fazı preparatif silikajel G kaplanmış plaklarda (0,60 mm) kloroform/metanol (50:1) (sistem - 17) solvan sistemi ile yan ürünlerden temizlenir.

Elde edilen ürün, permetillenmiş C-28 oligoholozitin asit hidrolizinde olduğu gibi, hidroliz edilir, alçak basınç altında (45°C) kuruluğa kadar uçurulur. (Sistem -19 ve 21) ile ince tabaka kromatografisinde, permetillenmiş Pl saponozitinin asit hidrolizati ile karşılaştırılır. Plaklara ilk önce anilin hidrojen ftalat reaktifi püskürtülür, beliren lekeler işaretlenir. Ardından, aynı kromatograma, sodyum meta periyodat reaktifinin önce çözelti -I;5 dakika sonra çözelti - II kısımları püskürtülür. Mavi zemin üzerinde beyaz leke itolüne dönüşmüş ozu gösterir.

O z Z i n c i r i n d e D a l l a n m a N o k t a - s ı n d a k i O z l a r ı n B e l i r l e n m e s i :

Pl saponozitinin oz zincirinin yapısının tayininde, oz zincirinde bir dallanmanın bulunup bulunmadığı ve varsa hangi ozların dallanma noktalarında bulunduğu tespitini önemli bir husustur. Bu amaçla ozların 1,2 glikol gruplarının periyodik asit ve tuzları ile parçalanarak formaldehit ve formik asit vermesi, 1,2 - glikol grupları taşımayan, dallanma noktalarındaki ozların ise, etkilenmeden kalması özelliğinden yararlanılmaktadır.

Polygala saponozitlerinin asit hidroliz şartlarında yapozal değişikliğe uğraması nedeniyle, gerçek aglikonun elde edilmesinde de periyodat oksidasyonu yönteminden yararlanılmıştır. Bu konu ile ilgili bilgi daha önce verildiğinden burada tekrarlanmaya gerek görülmemiştir. Burada elde edilen çökelti

ve süzüntü kısımları ayrı ayrı çalışıldı. Çökelti kısmından fosforik asit hidrolizi ile ayrılan (A) kısmından aglikon kolon kromatografisi vasıtasıyla temizlenerek elde edilmişti. (B) ve süzüntü kısımları dallanma noktalarındaki ozları, parçalanmamış halde, taşımaktadır. Her iki kısmın taşıdığı ozlar, kağıt ve ince tabaka kromatografisi ile teşhis edildi. Kromatogramlarda tespit edilen ozların dallanma noktalarında bulunduğu, kaybolan ozların ise terminal veya dallanma noktalarında bulunmayan ozlar olduğu belirlendi.

(B) fazı, 3 defa 50 ml n-butanol ile ekstre edilir. Organik fazlar birleştirilir ve su ile yıkanır. 50°C lik su banyosunda, alçak basınç altında, kuruluğa kadar uçurulur. Artık 50 ml % 95 lik metanolde çözülür ve karanlık odada, oda ısısında karıştırılarak 350 mg sodyum borohidrür azar azar ilave edilir. Son ilaveden sonra 2 saat daha karıştırılır. Sodyum borohidrür fazlası aseton ilavesi ile parçalanır. Reaksiyon karışımı 10 ml kadar asetik asidin sudaki % 5 lik çözeltisi ile nötrleştirilir, alçak basınç altında 50°C lik su banyosunda metanol uçurulur. Kalan sulu faz 3 defa 50 ml n-butanol ile ekstre edilir. Birleştirilen n - butanol fazları su ile yıkanır, alçak basınç altında (50°C) kuruluğa kadar uçurulur. (B1).

Süzüntü kısmına etilen glikol ilavesi ile ortamdaki iyodatın fazlası parçalanır, alçak basınç altında 45 - 50°C lik su banyosunda etanol uzaklaştırılır. Elde edilen bulanık çözelti 200 ml su ile seyreltilir ve n -butanol ile (100 ml) 3 defa ekstre edilir. Butanol fazları birleştirilir ve su ile yıkanır, alçak basınç altında kuruluğa kadar uçurulur (50°C de) . Artık 100 ml % 95 lik metanolde çözülür ve karanlıkta, oda ısısında 700 mg sodyum borohidrür karıştırılarak azar azar ilave edilir. Son ilaveden sonra 2 saat daha karıştırılır. Sodyum borohidrür fazlası aseton ilavesi ile parçalanır. Reaksiyon karışımı % 5 asetik asit ile nötrleştirilir. Alçak basınç altında 50°C de metanol uzaklaştırılır. Sulu faz 3 defa n-butanol ile ekstre edilir, ekstraktlar birleştirilir, su ile yıkanır ve alçak

basınç altında kuruluğa kadar uçurulur. Artık % 50 metanol ile hazırlanmış 0,03 N sülfürik asit (200 ml) ile 30 dakika 80°C lik su banyosunda ısıtılır. Hidrolizat baryum karbonat ile nötralleştirilir, alçak basınç altında metanol uzaklaştırılır. Kalan sulu çözelti 3 defa n-butanol ile ekstre edilir, n-butanol ekstraktları su ile yıkanır ve kuruluğa kadar uçurulur (50°C de) (E).

(B1) ve (E) bir kaç ml metanolde çözülür ve kağıt kromatografisi ile kontrol edilir.

Yöntem	İnen-damlayan kağıt kromatografisi	
Adsorban	Schleicher - Schüll 2043 amgl	
Numune	(B1) ve (E)' nin metanollü çözeltileri	
Solvan sistemi		
Sistem -4	n-BuOH/gl.ACOH/H ₂ O	(4:1:5)
Sistem -6	n-BuOH/Piridin/H ₂ O	(9:5:4)
Sürüklenme süresi	Sistem -4 : 24 saat	
	Sistem -6 : 45 saat	
Revelatör	Anilin hidrojen ftalat reaktifi, 110°C de, 5 - 10 dakika	
Standart çözeltiler	D-glikoz, D-galaktoz, D-fukoz, D-ksiloz, L-ramnoz, L- arabinoz	

p-Metoksi Sinnamik Asit

Yapılan çalışmalar, Polygala saponozitlerinin C-14 karbinol grubu ile (17) veya C-17 karboksil grubuna bağlanmış ozların hidroksil grupları ile (191,192) esterleşmiş durumda sinnamik asit türevlerinin bulunduğunu göstermiştir. Yapıya bağlı kromofor grup nedeniyle Polygala saponozitleri UV-366 nm da mavi floresans verirler. P1 saponozitinde de böyle bir kromofor grubun varlığı, P1 saponozitinin UV- spektrumunda 315 nm da görülen doruktan anlaşıldı. Literatürde (191-192) 315 nm da görülen doruğun p-metoksi sinnamik asit olabileceği kayıtlıdır. P1 saponozitinin alkali hidroliz ve periyodat oksidasyon ürünlerinden kolon kromatografisi ile elde edilen ve UV- 366 nm da mavi floresans veren lekenin, (sistem - 13) ile ince tabaka kromatografisinde sentetik olarak elde edilen p-metoksi sinnamik asit ve p-metoksi sinnamik asit numunesi^a ile aynı Rf'i verdiği görüldü.

Aglikonun elde edilmesi sırasında (A) fraksiyonunun kolon kromatografisi ile (SK-3) ayırımında eter/petrol eteri (6:4) sistemi ile elüe edilen (C) maddesi az miktarda etanolde ısıtılarak çözülür, buzdolabında 2 gün kristallenmeye bırakılır. Üst faz santrifüj ile ayrılır, elde edilen kristaller tekrar etanol ile kristallendirilerek temizlenir, kısa iğne şeklinde, renksiz kristaller elde edilir.

P1 saponozitinin LN potasyum hidroksit çözeltisi ile alkali hidrolizi neticesinde elde edilen sulu çözelti eter ile 2 defa ekstre edilir. Eterli faz su ile yıkanır ve susuz sodyum sülfat ile suyundan kurutulur, uçurulur. Artık etanolle, yukarıda bahsedildiği şekilde, bir kaç defa kristallendirilerek temizlenir.

^a : p-metoksi sinnamik asit numunesi Junzo SHOJI (Showa Üniv. Japonya)'dan temin edilmiştir.

P- Metoksi Sinnamik Asit Sentezi (198)

13,6 g anisaldehit (p-metoksi benzaldehit) ve 11 g malonik asit, 50 ml piridinde çözülür, 1 ml piperidin damla damla ilave edilir ve geri çeviren soğutucu altında, su banyosunda yavaş yavaş ısıtmaya başlanır. Reaksiyon şiddetlenmezse daha yüksek ısıda çalışılır. Gaz çıkışı başladığından itibaren 1 saat su banyosunda ısıtılır. Karışım seyreltik hidroklorik asit içine dökülür (asit miktarı piridini nötralleştirecek kadar olmalıdır). Meydana gelen çökelti süzülerek ayrılır ve bir miktar soğuk su ile yıkanır, etanol ile kristallendirilir.

Sakaroz

Bazı Polygala türlerinde sakarozun varlığından genel teorik bölümde bahsedilmişti. Polygala pruinosa subsp. pruinosa'nın köklerinin sakaroz taşıyıp taşımadığı araştırıldı.

Bitki köklerinin metanol ekstraktı alçak basınç altında kuruluğa kadar uçurulur. Yapışkan artık suda çözülür ve saponozitler n-butanol ile ekstre edilir. Kalan sulu çözeltili alçak basınç altında kuruluğa kadar uçurulur. Elde edilen kahverengi zamksı artık metanolde çözülür. 2 hafta oda ısısında bekletildiğinde görülen kirli esmer renkli kristaller, bir kaç defa metanol ile kristallendirilerek temizlenir; renksiz kristaller elde edilir. Kağıt kromatografisinde (sistem -4 ve 6), ince tabaka kromatografisinde (sistem -14) kullanılarak incelendiğinde sakaroz numunesi ile aynı Rf değerine sahip olduğu görülür.

100 mg madde 10 ml % 2 sülfürik asit çözeltisi ile 2 saat 100°C lik yağ banyosunda hidrolize tabi tutulur. Hidrolizat baryum karbonat ile nötralleştirilir, çöken baryum sülfat süzülerek ayrılır. Süzüntü alçak basınç altında kuruluğa kadar uçurulur, bir kaç ml metanolde çözümlü, kağıt kromatografisinde (sistem -4 ve 6) ile görülen ozlar tespit edilir.

Poligalitol

Daha önce yapılan çalışmalarda, 1,5-anhidro sorbitol yapısında bir itol olan, poligalitolün Polygala türleri için karakteristik maddelerden biri olduğundan bahsedilmişti. Polygala pruinosa subsp. pruinosa köklerinde de poligalitolün var olup olmadığı araştırıldı.

Köklerin eter ekstraktından bir müddet sonra, sarımsı beyaz renkli, tatlı lezzette, bir maddenin çöktüğü görüldü. Maddenin etanol ile bir kaç defa kristallendirilerek temizlenmesi neticesinde beyaz, heksagonal kristaller elde edildi. Diğer taraftan, köklerin metanollü ekstraktından saponozitlerin eter ile çöktürülmesinden sonra üstteki eter fazından da beyaz, küremsi kristaller elde edildi. Erime dereceleri aynı olan bu iki farklı kristalize maddenin karışım erime derecesi, IR- spektrometri ve ince tabaka kromatografisi analizleri yapıldı.

Ince toz edilmiş P. pruinosa subsp. pruinosa kökleri, genel saponozit ekstraksiyonu bahsinde ayrıntıları açıklandığı şekilde, petrol eteri ile 30 saat ekstre edilir. Ardından materyal 2 defa 15 saat eter ile tüketilir. Eter ekstraktları yoğunlaştırılır. Oda ısısında renkli şişelerde bekletilen yoğun ekstrakttan 1 ay içinde meydana gelen çökelti süzülerek ayrılır, bir kaç defa eter ile yıkanır. Artık sıcak etanolde çözülür ve buzdolabında kristallendirilir. Santrifüje edilerek ayrılan kristaller, bir kaç defa etanolle kristallendirilerek temizlenir, büyük heksagonal kristaller elde edilir.

Diğer taraftan metanollü saponozit ekstraktından eter ile saponozitlerin çöktürülmesinden sonra santrifüj ile ayrılan üstteki eter fazı kurulduğu kadar uçurulur. Artık, sıcak metanolde çözülür ve buzdolabında kristallendirilir. Aynı işlem tekrarlanarak beyaz, küremsi kristaller elde edilir.

Poligalitol Tetraasetat

Elde edilen maddenin poligalitol olduğunu tam anlamıyla ispat edebilmek için ~~asetatının~~ hazırlanması tercih edilen bir yoldur.

750 mg poligalitol, 5 ml piridinde ısıtılarak çözülür. 25 ml asetik asit anhidrit ilave edilir ve 2 gün oda ısısında bekletilir. Süre sonunda asetik asit anhidrit fazlası, karışım buzlu suya dökülerek, parçalanır. Asetilasyon ürünü sulu fazdan 2 defa kloroform ile tüketilir. Solvan alçak basınç altında uzaklaştırılır, sıcak etanol ile kristallendirilir. Kısa beyaz kristaller elde edilir.

B U L G U L A R

Araştırmamızın bulguları aşağıdaki sıraya göre sunulmuştur: Fizikokimyasal değerler, ana saponozitin tanım, izolasyon ve yapısının tayini. Yapı tayininde, saponoziti meydana getiren aglikonun ve bağlı bulunan ozların yapılarının aydınlatılması ile ilgili bilgiler, alt başlıklar halinde sırayla verilmiştir. Bulgular açıklanırken sonuca ulaştıran işlemlerin yapılışı, materyal ve yöntemde verildiği için, tekrarlanmaya lüzum görülmemiştir.

Fizikokimyasal Değerler

Köpürme İndeksi

% 0,1 lik dekoksasyon ile yapılan ön denemede 1. tüpte 1 cm yüksekliğinde köpük meydana geldi. Bu tüpte 1 ml % 0,1 lik dekoksasyon bulunmaktadır. Bu konsantrasyondan 0,2 ml azaltılarak ikinci deneme yapılır. 1 cm köpük yüksekliğine sahip tüpte 0,4 ml dekoksasyon bulunmaktadır. Köpürme indeksi şu şekilde hesaplanır:

$$\text{Droğun Köpürme İndeksi} = \frac{10 \times 0,1}{0,0004} = 2500$$

Hemoliz İndeksi

Droğun tampon çözeltideki % 1 lik çözeltisi ile yapılan ön denemede hemoliz meydana getiren dilüsyon tespit edildi. Yapılan ikinci denemede 5. nci tüpte hemoliz görüldü. Bu tüpte 0,6 ml drog çözeltisi bulunmaktadır. Standart saponozitle yapılan deneme sonucunda kanın faktörü

$$\text{Kan Faktörü} = \frac{25000}{33548} = 0,7750$$

$$\text{Droğun Hemoliz İndeksi} = \frac{10}{0,006} = 1666,67$$

$$\text{Gerçek Hemoliz İndeksi} = 1666,67 \times 0,7750 = 1291,67$$

Saponozitler

Tanım

Saponozit karışımı için denenen solvan sistemleri içinde en iyi ayırım kloroform / metanol / su (65:35:10) (Sistem -2) ile sağlandı. Denenen diğer solvan sistemleri ile tam bir ayırım sağlanamadığından, sadece (sistem -2) ile saponozit karışımındaki saponozitler ve diazolanmış saponozitlere ait Rf değerleri (Tablo -25) de gösterilmiştir.

Sıra *	Sistem - 2 ile elde edilen Rf - değerleri	
	Saponozit	Diazolanmış Saponozit
5	0,13	0,29
4	0,12	0,28
3	0,11	0,26
2	0,10	0,21
1	0,09	0,18

Tablo - 25

Saponozit Karışımının İnce Tabaka Kromatografisi

*

(: Tatbik noktasına en yakın lekeden başlayarak numaralandırılmıştır)

Pl Saponoziti^a

Beyaz renkli, amorf toz

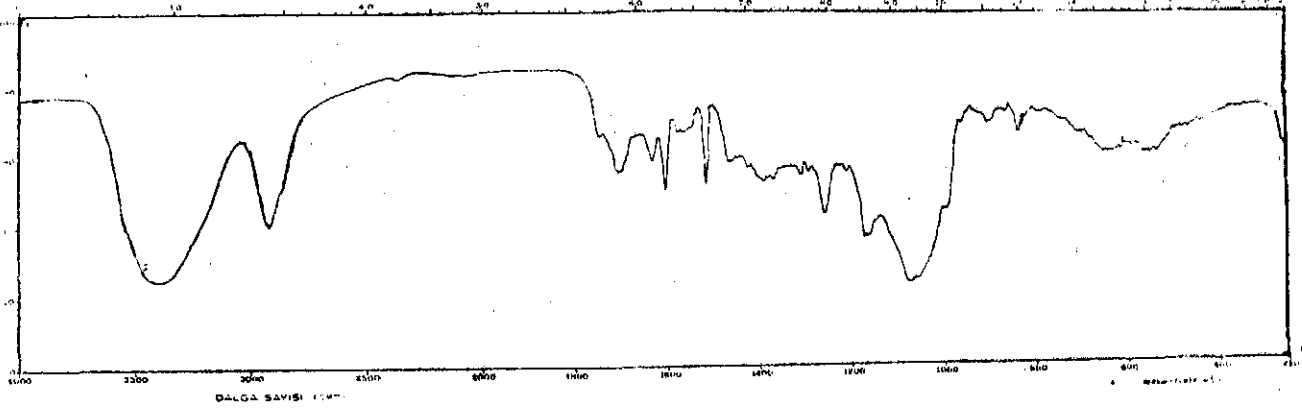
Erime Noktası : 272 - 275°C (bozunma)

^a : Solvan sistemi -2 ile, aşağıdan yukarıya doğru, 1 no'lu leke Pl saponoziti olarak isimlendirilmiştir.

UV - Spektrumu (nm) : λ MeOH doruk 315 nm

IR - Spektrum (cm^{-1}) : 3500 - 3300 (OH), 2940 (-CH,
-CH₂, -CH₃), 1705 (-COOH),
1635 (-C = C-), 1610, 1515
(benzenoid), 1260 (-C-O),
1100 - 1000 (ozlardan ileri
gelen geniş band) (Şekil-48).

Saponozit UV - 366 nm da mavi floresans vermektedir.



Şekil - 48

(P1) Saponozitinin IR Spektrumu

(Perkin Elmer, Model 457, %1 KBr)

PD1 Saponoziti^a

Beyaz renkli amorf toz, UV - 366 nm da mavi floresans verir.

Erime Noktası : 260 - 263°C

^a : P1 saponozitinin diazolanması ile elde edilen saponozit

UV - Spektrumu (nm) : λ MeOH doruk 315 nm

IR - Spektrumu (cm^{-1}) : 3500 - 3300 (-OH), 2930 (-CH, -CH₂, -CH₃), 1710 (-C = O), 1630, 1600, 1510 (-C = C-), 1380, 1253, 1100 - 1000 (-C = O).

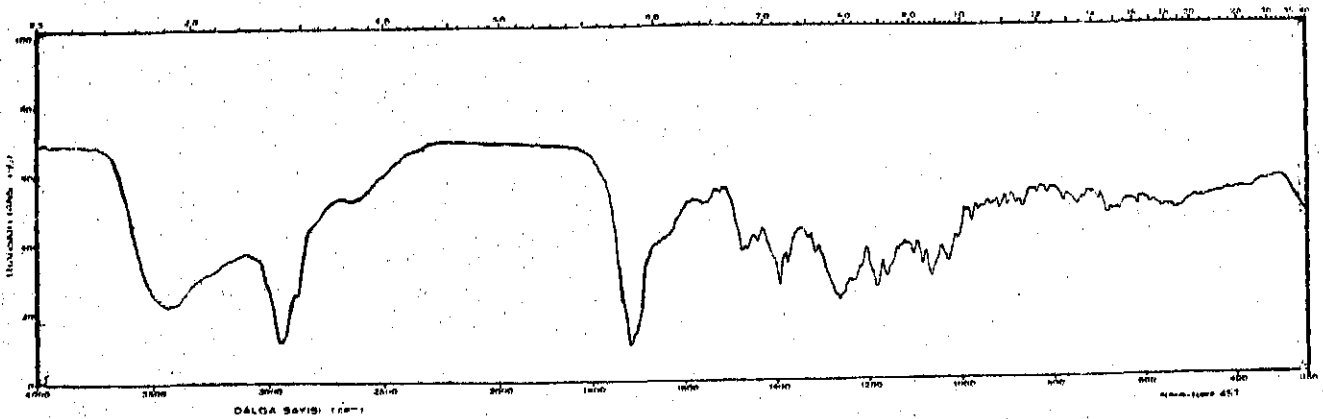
Aglikon

Renksiz, iğne şeklinde kristaller

Erime Noktası : 310-311° C

IR- Spektrumu (cm^{-1}) : 3500 - 3300 (-OH), 2940 (-CH, -CH₂, -CH₃), 1710 (-COOH), 1470, 1390, 1370, 1260 (-C-O), 1175, 1150, 1098, 1065, 1055, (-C-O)

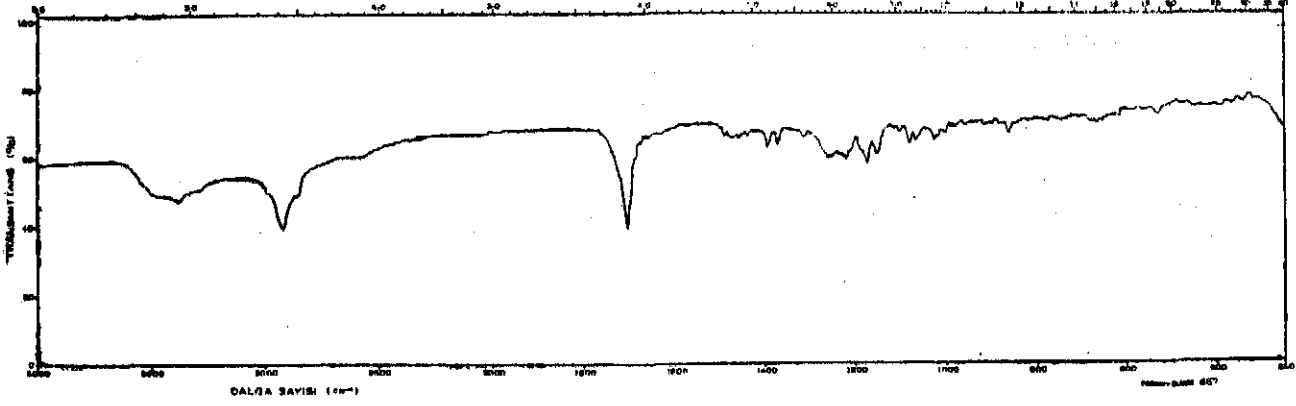
Aglikonun IR - spektrumu (Şekil -49), şahit madde preseneğenin^a IR - spektrumu ile (Şekil -50) karşılaştırıldığında her iki spektrumun birbirine benzediği görülür.



Şekil - 49

Aglikonun IR - Spektrumu
(Perkin Elmer, Model 457, %1 KBr)

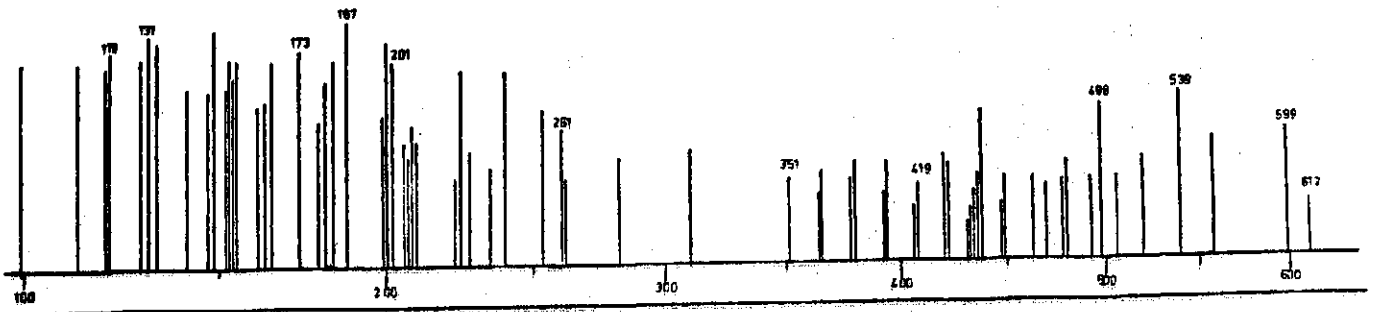
^a : Şahit preseneğenin Junzo SHOJI'den sağlanmıştır. Miktarı az olduğu için IR - spektrumunda görülen pikler zayıf çıkmıştır.



Şekil - 50
Presenegenin-IR Spektrumu
(Perkin Elmer, Model 457, 80,3 KBr)

Presenegenin dimetilester triasetat

Aglikonun presenegenin olduğunu tam olarak tespit edebilmek amacıyla, elde edilen aglikonun türevi hazırlandı. Aglikon önce diazometan ile esterleştirilip ardından asetillendi. Meydana gelen türevin kütle spektrometrik bulguları presenegenin dimetilester triasetatın^a kütle spektrometrik bulguları ile karşılaştırıldığında, her iki spektrumun arasında benzerlik olduğu görüldü (Şekil -51).

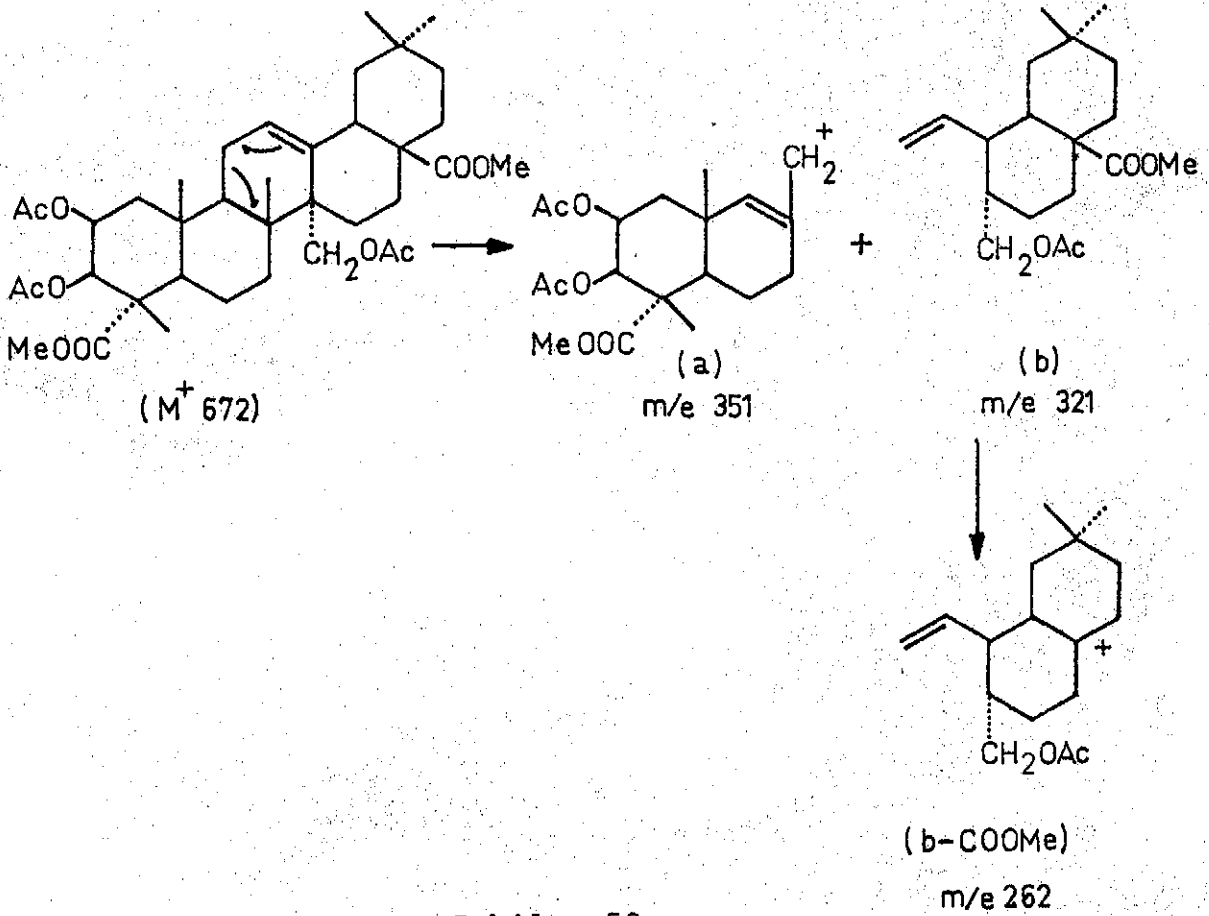


Şekil - 51
Presenegenin Dimetilester Triasetat'ın Kütle Spektrumu
(Jeol, JMS -D 100 Kütle Spektrometresi, İyonlaşma Gerilimi 75 eV).

^a : Presenegenin dimetilester'in kütle spektrometrik bulguları için Dr. W. KILBINGER'in çalışmasından (17) yararlanılmıştır.

Molekül Ağırlığı : 672 (kütle spektrometrik)
Kütle Spektrumu : 612 ($M^+ - CH_3CO_2H$), 599 ($M^+ - CH_2OAc$), 539
($M^+ - CH_2OAc - CH_3CO_2H$), 498 ($M^+ - CH_2OAc - 2$
 CH_3CO_2H), 493, 479, 437 ($M^+ - CH_2OAc - CO_2 -$
 $CH_3 - CH_3CO_2H - CH_3CO^-$), 419 ($M^+ - CH_2OAc - 2$
 $CH_3CO_2H - CO_2CH_3 - H^+$), 351 (a), 261 (b- CH_3
 CO_2H), 262 (b- CO_2CH_3), 201 (b-2 CH_3CO_2H),
200, 187, 173, 133, 131, 119.

Δ^{12} triterpenler için karakteristik retro Diels-Alder parçalanmasına göre presenegenin'den meydana gelen iyonlar (Şekil-52) de gösterilmiştir.



Şekil - 52

Presegenin'in retro Diels-Alder Parçalanması ile Meydana Gelen İyonlar.

Bağlı Bulunan Ozlar

K a ğ ı t K r o m a t o g r a f i s i : (Pl) Saponozitinin ve alkali hidrolizi sonucu elde edilen ürünlerinin (3-0-monodesmozit ve C-28- oligoholozit) total ve zayıf asit hidrolizi ile elde edilen ozlar kağıt kromatografisi ile tespit edildi. Neticeler (Tablo - 26) da gösterilmiştir.

Hidrolizat	Tespis edilen ozlar
(Pl) Saponoziti	D-glikoz, D-galaktoz, L-ramnoz, D-ksiloz, D-fukoz, L-arabinoz
Sapogenin -3-0- monodezmozit	D-glikoz
C- 28 Oligoholozit	D-glikoz, D-galaktoz, L-ramnoz, D-fukoz, L-arabinoz

Tablo -26

(Pl) Saponozitinin Taşıdığı Ozlar

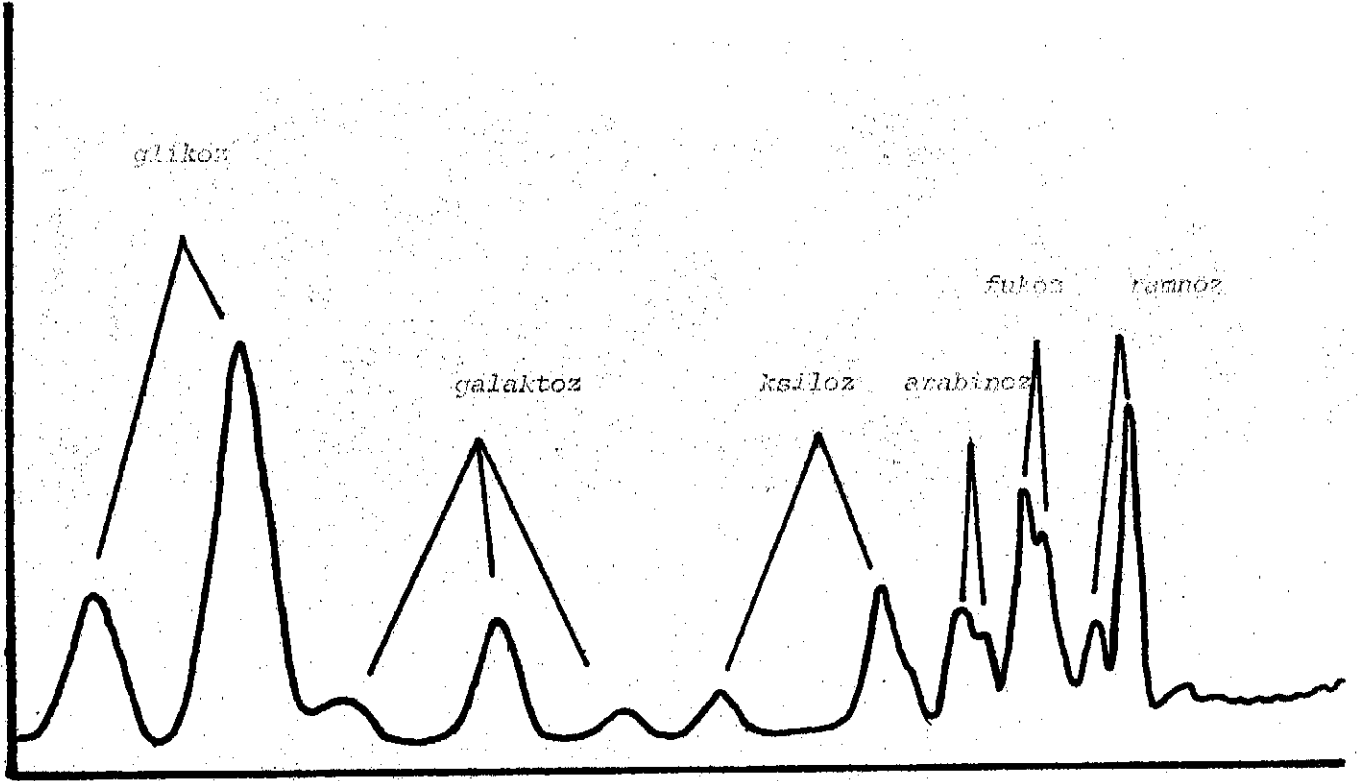
G a z S ı v ı K r o m a t o g r a f i s i : (Pl) Saponoziti ve sapogenin -3-0- monodesmozit'in silüllemiş öz karışımlarının gaz kromatogramları (Şekil -53 ve 54) de görülmektedir. Neticeler kağıt kromatografisi ile elde edilen bulguları doğrulamaktadır. Gaz sıvı kromatografisi ile tespit edilen ozlar ve molar oranları (Tablo -27) de gösterilmiştir.

Hidrolizat	D-gli	D-gal	L-ram	D-ksi	D-fuk	L-ar
(Pl) Saponoziti	2	1	1	1	1	1
Sapogenin-3-0- monodesmozit	1	-	-	-	-	-

Tablo - 27

(Pl) Saponozitinin Taşıdığı Ozlar ve Molar Oranları.

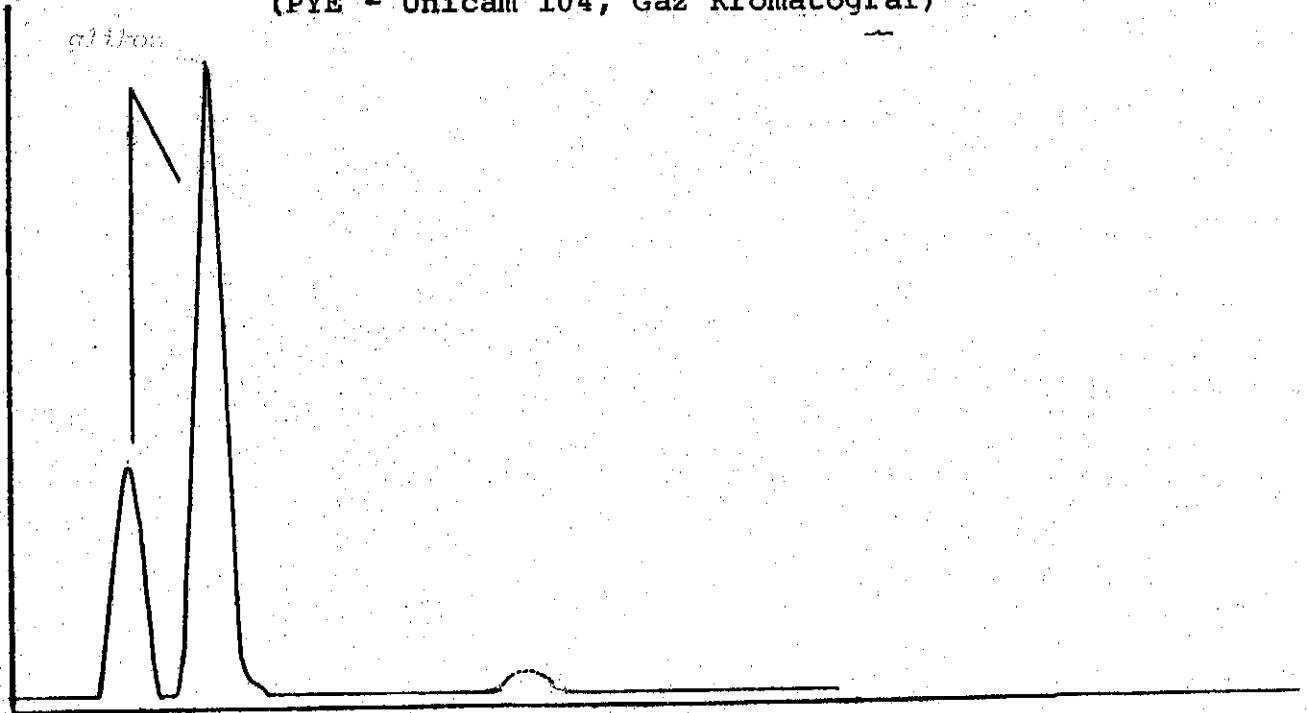
D-gli: D-glikoz, D-gal: D-galaktoz, L-ram: L-ramnoz, D-ksi: D-ksiloz,
D-fuk : D-fukoz, L-ar: L-arabinoz



Şekil - 53

(P1) Saponozitinin Silülennmiş Ozlarının Gaz Kromatogramı

(PYE - Unicam 104, Gaz Kromatograf)



Şekil - 54

Sapogenin-3-0- Monodesmozitin Silülennmiş Ozlarının Gaz Kromatogramı

(PYE - Unicam 104, Gaz Kromatograf)

(Tablo -27) den de görüldüğü gibi, (Pl) saponozitinin taşıdığı iki D-glikozdan biri C-3 OH grubuna bağlanmıştır.

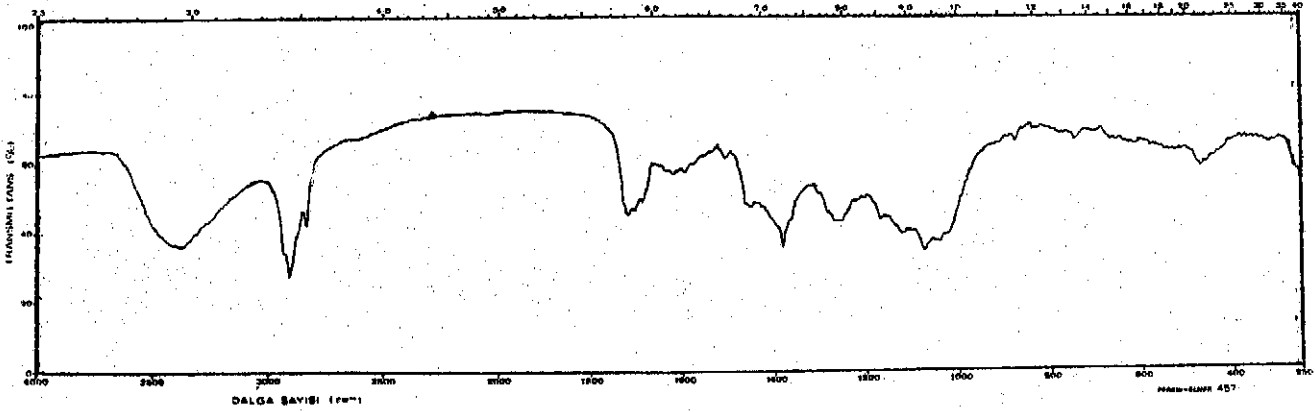
Ozların Zincirdeki Yerlerinin Tespiti

Sapogenin-3-0-Monodesmozit

Beyaz renkli, amorf toz, UV- 366 nm floresans vermemektedir.

Erime Noktası : 298 - 300°C

IR - Spektrumu (cm^{-1}) : 3500 - 3300 (-OH), 2925,2850 (-CH, -CH₂, -CH₃), 1730-1690 (-C = O), 1385, 1260, (-C = O), 1100-1000 (-C-O)
(Şekil - 55).



Şekil - 55

Sapogenin -3-0- Monodesmozitin IR Spektrumu
(Perkin Elmer, Model 457, %1 KBr)

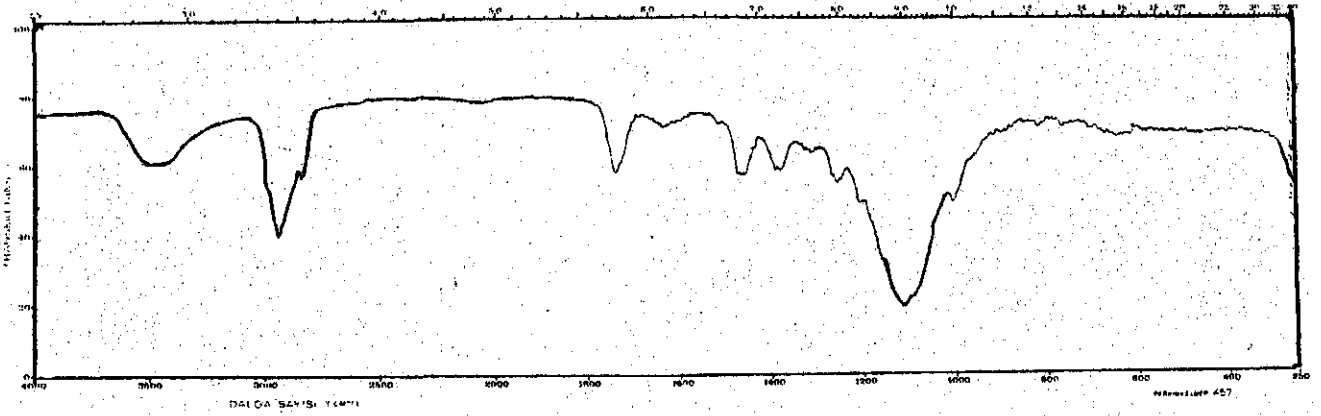
Permetillenmiş (Pl) Saponoziti

Beyaz renkli, amorf toz (petrol eterinden).

Erime Noktası : 104-108°C

IR Spektrumu : 2930 (-CH₂CH₂, -CH₃), 1730 (-COOR),
1460, 1380 (-C-O), 1200 - 1000
(-C-O) (Şekil - 56)

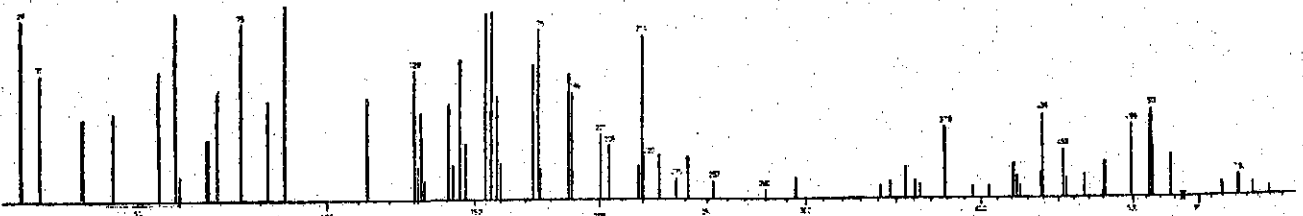
Permetil saponozitlerin IR- spektrumlarında hidroksil bandının ($3500-3300 \text{ cm}^{-1}$) görülmemesi gerekir. Presenegenin'in C-2 hidroksil grubu sterik olarak engelliğinden metillenememektedir. Bu nedenle spektrumda, zayıf da olsa, hidroksil piki görülmektedir.



Şekil - 56

Permetillenmiş (P1) Saponozitinin IR Spektrumu
(Perkin Elmer, Model 457, %1 KBr)

K ü t l e S p e k t r u m u : Permetillenmiş (P1) Saponozitin'in kütle spektrumunda görülen pikler incelenerek aglikon ve oz kısımlarından ileri gelen iyonların pikleri tespit edildi (Şekil - 57).

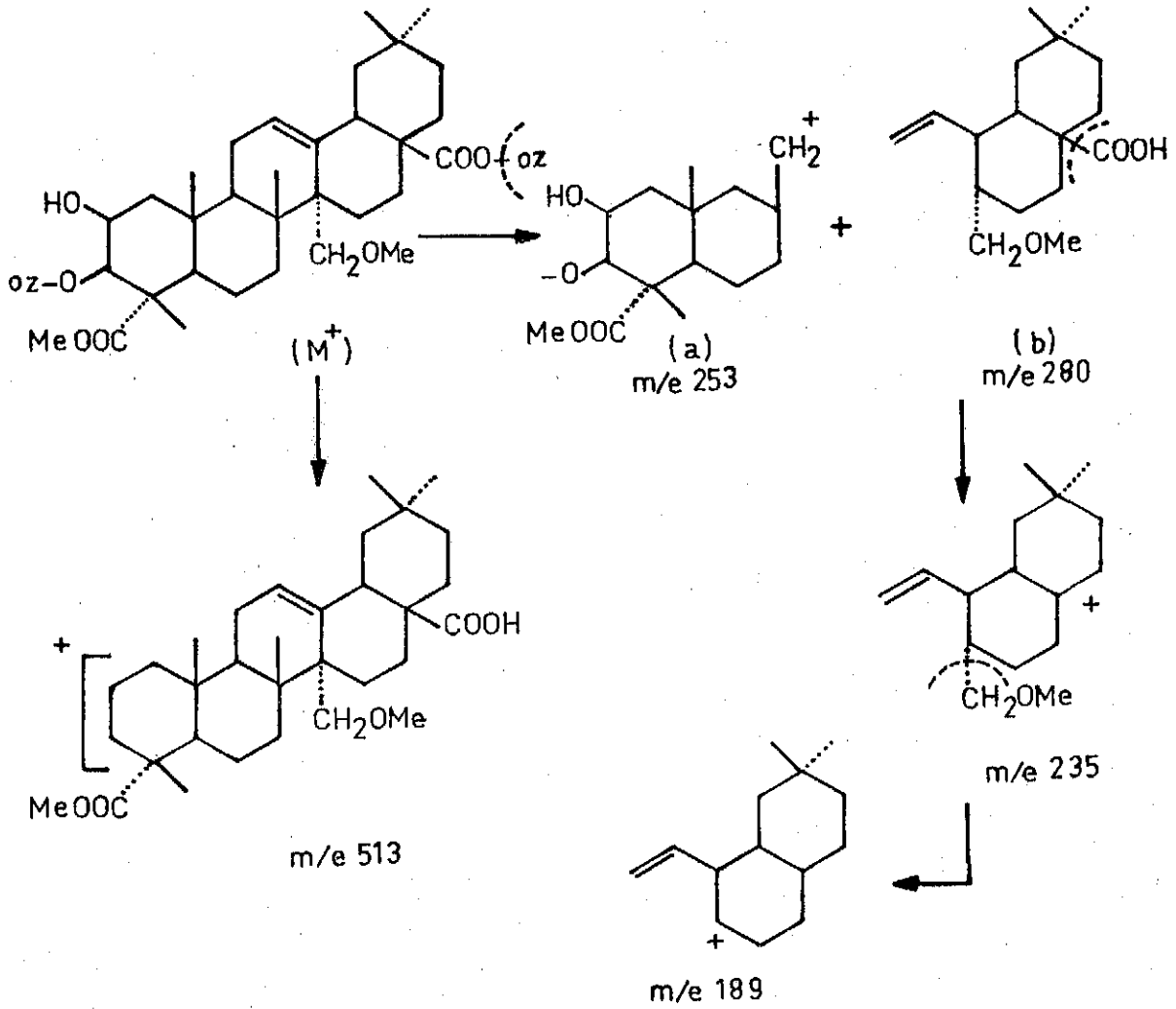


Şekil - 57

Permetillenmiş (P1) Saponozitin'in Kütle Spektrumu^a

^a : Permetillenmiş (P1) Saponozitin'in Kütle Spektrumu, Prof. Dr. T. KOMORI Tarafından Alınmıştır.

(P1) Saponozitinin aglikon kısmından meydana gelen iyonlara ait pikler m/e 513,280,253,235,189 da görüldü. Bu pikleri veren karakteristik iyonlar (Şekil - 58) de görülmektedir.



Şekil - 58

Permetil (P1) Saponozitinin Aglikonundan Meydana Gelen İyonlar

Spektrumda görülen 99,115,125,127,145,155,157,175, ve 219 pikleri dikkati çekmektedir. Bu piklerden 219, 155 tetrametil heksoz, 175,143 trimetil pentoz veya dimetil metil pentozlar için karakteristiktir. Permetil (P1) saponozitinin asit hidrolizi ile elde edilen metil heterozitlerin kütle spektrumunda görülen pikler de bu bulguları doğrulamaktadır.

Metil tetrametil galaktopiranozit veya Metiltetrametil glikopiranozit	219 (M ⁺ -31), 205, 187, 176
Metil dimetil ramnopiranozit	175 (M ⁺ -31)
Metil dimetil ksilopiranozit	160 (M ⁺ -31), 149, 142, 132, 130, 129, 118, 101, 88, 75, 60, 45, 32, 31, 28

Permetillenmiş (Pl) Saponozitinin
Total Asit Hidrolizi: Permetil (Pl) saponozitinin
total asit hidrolizi ile elde edilen metil ozlar ince tabaka kroma-
tografisinde sistem 19,20,21,22,23 kullanılarak, şahit metil ozlar
ile karşılaştırıldı, R_G değerleri hesaplandı (Tablo -28).

Metil Oz	R _G - Solvan Sistemleri					
	19	20	21	22	23	
I	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
II	0,75	0,82	0,91	0,95	0,82	
III	0,80	0,75	0,82	0,77	-	
IV	0,54	0,67	0,76	0,71	0,86	
V	0,23	0,36	0,56	0,48	0,66	
VI	0,07	0,13	0,32	0,33	0,30	
TMG	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	

Tablo - 28

Metil Ozların Ince Tabaka Kromatografisi

Kromatogramlardan 2,3,4,6- tetrametil-D- glikoz, 2,3,4,6-tet-
rametil D- galaktoz ve 2,3,4-trimetil-L-arabinozun varlığı tespit
edildi. Bu ozların permetillenmiş halde bulunmaları, (Pl) saponoziti-
nin oz zincirinde terminal ozların glikoz, galaktoz ve arabinoz
olduklarını ortaya koymaktadır. Kromatogramlardaki diğer metillen-

miş ozların R_G değerlerinin küçük olması bunların kısmen metillenmiş ozlar olduğunu göstermektedir. Bu ozlar zincirde aglikon ile terminal ozlar arasında yer alırlar. Terminal ozların çok olması oz zincirinde dallanmanın bulunduğunu gösterir. Fakat yeterli şahit oz numunesi bulunamadığından kısmen metillenmiş ozların metillenme dereceleri tespit edilemedi. Bu ozların hangi ozlar olduklarını teşhis edebilmek için, metillenmiş oz karışımından kolon kromatografisi ile ayrılan metillenmiş ozlar tekrar permetillenerek ince tabaka kromatografisi vasıtasıyla permetillenmiş şahit ozlar ile karşılaştırılarak teşhis edildi.

- I. 2,3,4,6 -tetrametil-D-glikoz
- II. 2,3,4,6 -tetrametil-D-galaktoz
- III. 2,3,4 -trimetil-L-arabinoz
- IV. ksilöz türevi
- V. ramnoz türevi
- VI. monometil-D-fukoz

Permetillenmiş Alkali Hidroliz Ürünlerinin Asit Hidrolizi:

(Pl)sapozozitinin alkali hidrolizi ile elde edilen sapogenin 3-0-monodesmozit ve C-28 oligoholozit zinciri ayrı ayrı permetillenerek asit hidrolize tabi tutuldu. Hidrolizattaki metillenmiş ozlar , daha önce olduğu gibi, ince tabaka kromatografisinde (sistem 19 -23)kullanılarak teşhis edildi.

Permetillenmiş sapogenin-3-0- monodesmozitin hidrolizatında sadece 2,3,4,6- tetrametil-D-glikoz, permetillenmiş C-28 oligoholozitin hidrolizatında ise I-V ozları yanında dimetil-D-fukoz varlığı görüldü.VI lekesi ise kayboldu. Bu iki hidrolizatın kromatogramları yapı hakkında yeni bilgileri ortaya çıkarmaktadır. Daha önce sapogenin-3-0-monodesmozitin sadece 1 glikoz taşıdığı kağıt kromatografisi ve gaz kromatografisi ile ispat edilmişti. Bu netice de bulgularımızı kesinleştirmektedir. Diğer taraftan C-28 oligoholozitinde aglikona bağlanan ilk ozun fukoz olduğu da ortaya çıkmıştır.

Permetillenmiş(Pl) Saponozitinin Lityum Alüminyum Hidrür ile Yarılması

Permetillenmiş(Pl) saponozitinin lityum alüminyum hidrür ile yarılması sonucu elde edilen C-28 oligoholozit zinciri asit hidrolizé tabi tutularak, metillenmiş ozlarına parçalandı ve ince tabaka kromatografisinde incelendi.

- I. 2,3,4,6 - tetrametil - D - glikoz
- II. 2,3,4,6 - tetrametil - D - galaktoz
- III. 2,3,4 - trimetil - L - arabinoz
- IV. ksiloz türevi
- V. ramnoz türevi

Neticelerden görüldüğü gibi metil oz VI. kaybolmuştur. Daha önceki bulgularımız Me. oz VI. nın monometil - fukoz olduğunu ve aglikonun karboksil grubuna bağlı ilk oz olduğunu göstermişti. Eğer bu bulgumuz doğru ise lityum alüminyum hidrür yarılması sırasında fukozun fusitolüne dönüşmesi gerekir. Kromatograma bu defa, itoller için karakteristik, sodyum meta periyodat - benzidin reaktifi püskürtüldü. Monometil - fukoza yakın R_G değerinde lacivert zemin üzerinde beyaz leke halinde fusitol görüldü. O halde C - 28 oligoholozit zincirinde aglikonun karboksil grubuna bağlanan ilk ozun fukoz olduğu doğrulanmış olur. Bu zincirde terminal ozlar ise glikoz, galaktoz ve arabinozdur.

Dallanma Noktasındaki Ozlar

(Pl)saponoziti periyodat oksidasyonu ile hidrolize tabi tutuldu. Oksidasyon ürününün zayıf asit hidrolizi ile elde edilen ozlar kağıt kromatografisi ile tespit edildi.

Kağıt kromatogramında sadece fukoz ve ksilozun görülmesi dallanma noktasında bu iki ozun bulunduğunu göstermektedir. Diğer taraftan bu iki ozun (B) kısmında görülmesi fukozun aglikona bağlandığını ve ksilozun da buna bağlandığını ortaya koymaktadır.

p- Metoksi Sinnamik Asit

Renksiz iğne şeklindeki kristaller

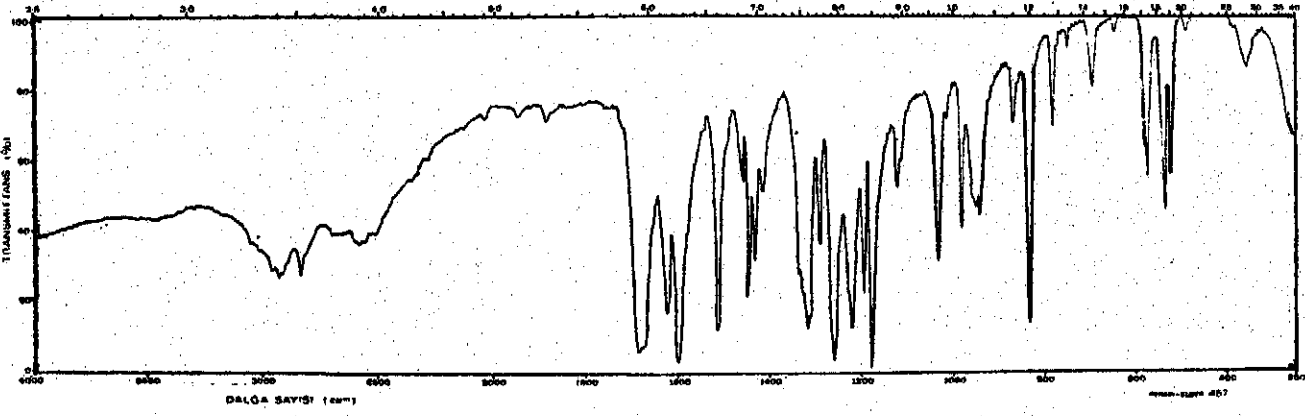
Erime Noktası : 172°C

IR - Spektrumu (cm^{-1}) : 1690 (-C=O), 1625 (aromatik halkaya konjugasyon), 1600, 1515 (-C=C-, aromatik), 1445-1415, 1320, 1260, 1220, 1180, 1030 (-C-O), 980 (CH=CH, trans), 830 (aromatik H) (Şekil - 59)

Molekül ağırlığı : 178 (kütle spektrometrik)

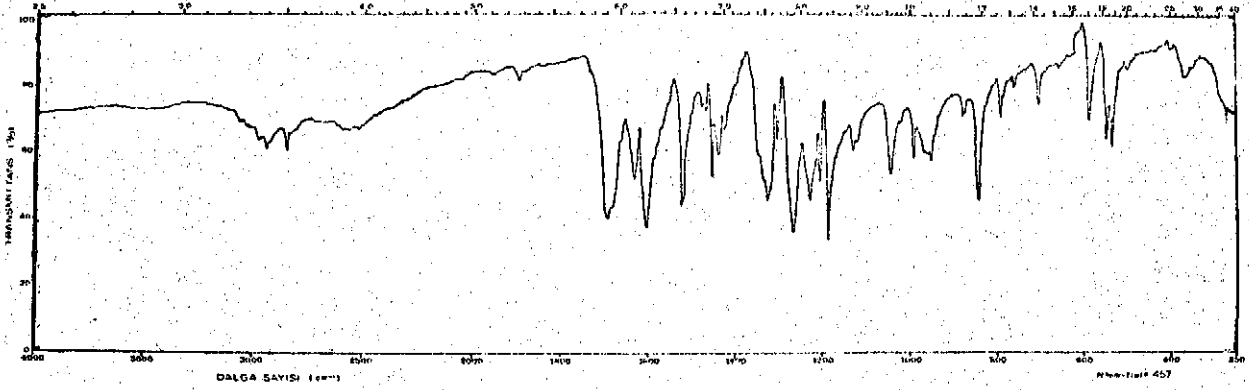
Kütle Spektrumu : M^+ 178, 161 (baz pik), 133, 118, 90, 89, 77, 63, 51, 39, 28 (Şekil-61)

UV - Spektrumu (nm) : 275, 220, 210

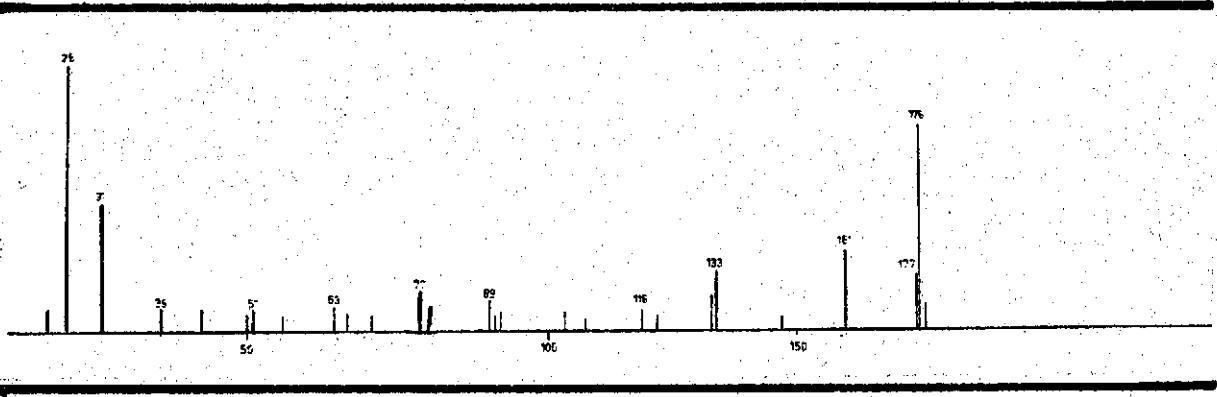


Şekil - 59

p- Metoksi Sinnamik Asidin IR Spektrumu
(Perkin Elmer, Model 457, %1 KBr)



Şekil - 60
Sentetik p - Metoksi Sınnamik Asidin IR Spektrumu
(Perkin Elmer, Model 457, % 1 KBr)



Şekil - 61
p- Metoksi Sınnamik Asidin Kütle Spektrumu^a
(Varian MAT - CH 5, 70 eV)

Sakaroz

Renksiz Kristaller

Erime Noktası : 184 - 5°C

Karışım Erime Nokta : 184 - 5°C (Saccharose, Merck)

Optik Çevirmesi : $(\alpha)_D^{20} + 67^\circ$ (su)

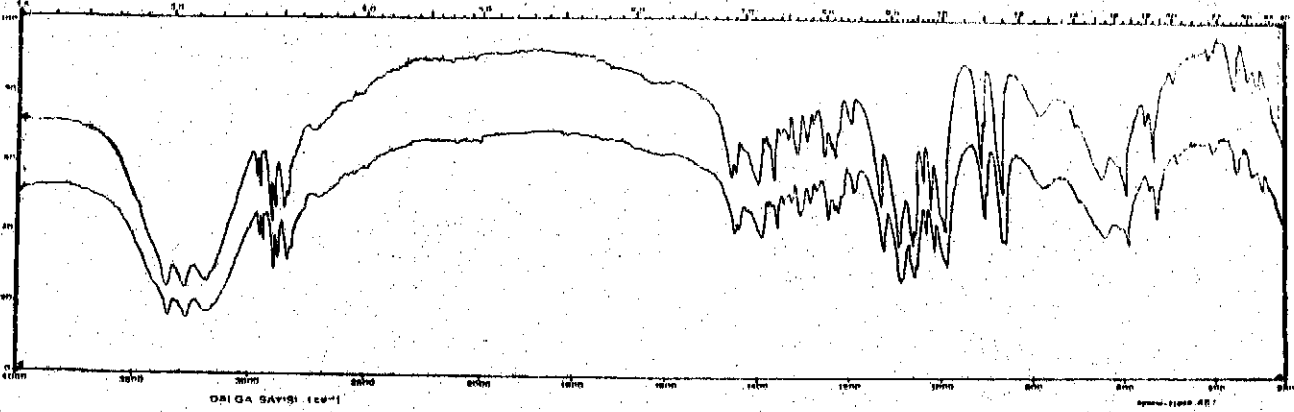
Hidroliz : D-glikoz, D-fruktoz

^a : P - Metoksi Sınnamik Asidin Kütle Spektrumu DRAGOCO Firması Tarafından Alınmıştır.

Poligalitol

Beyaz renkli, büyük heksagonal veya küçük iğne şeklinde kristaller.

- Erime Noktası : 142°C
IR - Spektrumu (cm^{-1}) : 3410-3220 (-OH), 2970, 2930, 2870
(-CH, -CH₂, -CH₃), 1460-1200
(-C = C-), 1140, 1100, 1075, 1030,
1005 (-C-O) (Şekil - 62)
Molekül Ağırlığı : 164 (kütle spektrometrik)
Kütle Spektrumu : 165 ($M^+ + 1$), 146 ($M - 18$), 133,
115, 103, 99, 82, 73 (baz pik), 60,
57, 45, 31, 28 (Şekil - 63)

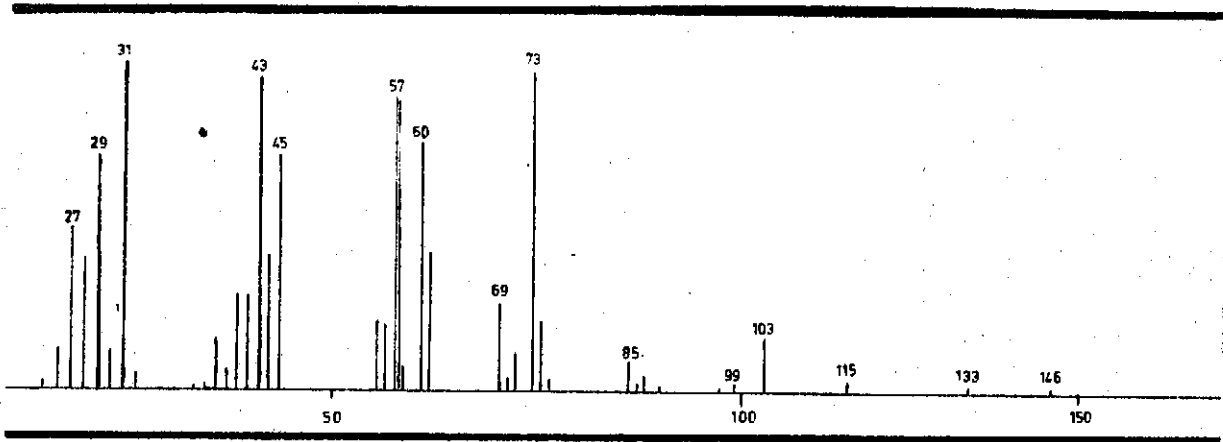


Şekil - 62

Poligalitol'ün IR - Spektrumu

(Perkin Elmer, Model 457, %1 KBr)

(Farklı kristal şekillerinin karşılaştırılması)



Şekil - 63
Poligalitol'ün Kütle Spektrumu^a
(Varian MAT - CH 5,70 eV)

Poligalitol Tetraasetat :

Beyaz renkli iğne kristaller

Erime Noktası : 65 - 69°C (tekrar kristallen-
dirildi 62 - 64°C)

IR-Spektrumu (cm⁻¹) : 2980 - 2880 (-CH, -CH₂, -CH₃),
1740 (COOR), 1370 (-C = C -),
1260-1220 (-C = C -), 1150 ,
1090, 1040 (-C-O)

^a : Poligalitol'ün Kütle Spektrumu DRAGOCO Firmasında Çekilmiştir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Polygala pruinosa Boiss. subsp. pruinosa J. Cullen bitkisinin kökleri üzerinde yaptığımız çalışmalar iki bölüm altında toplanmıştır. Bitkinin Botanik, köklerin Anatomik özelliklerinin incelendiği "Botanik Bölüm" ve köklerin farmakope yöntemleriyle offisinal türden farkının ve taşıdığı ana saponozit (Pl) ile diğer maddelerin yapılarının aydınlatıldığı "Kimyasal Bölüm". Bulgularımızın tartışması da aynı düzen içinde yapılacaktır.

P. pruinosa subsp. pruinosa'nın kökleri, R. Senegae'den daha ince ve kısadır. R. Senegae'nin en önemli makroskopik özelliği olan : Kalın baş şeklindeki rizom kısmı ve yüzeydeki boyuna keskin çıkıntılar (159,160), P. pruinosa subsp. pruinosa köklerinde görülmez.

Köklerin enine kesitinde dışta ince bir mantar tabakasının altında, üçgen ve dörtgen şeklinde hücreler arası boşluklar taşıyan parenkimatik hücrelerden meydana gelmiş bir kabuk görülür. Yer yer ezilmiş fakat düz bir kambiyum tabakası merkezi silindir ile kabuk tabakasını ayırır. Merkezi silindir kökün çapının yarısından fazlasını kaplar ve tek sıralı öz kolları görülür. Ortada ise (Şekil -7) öz kısmı bulunur. Bu elementler ve diziliş şekli R. Senegae ile büyük farklılık göstermez. Anatomik yapının en önemli farkı : R. Senegae'de kambiyum'un öze doğru yaptığı (V) şeklindeki girintinin, P. pruinosa subsp. pruinosa köklerinde görülmemesidir.

P. pruinosa subsp. pruinosa köklerinin köpürme indeksi 2500 ve hemolitik indeksi 1292 olarak bulunmuştur. Bu değer araştırılan diğer Polygala türleri köklerinin hemolitik indeksleriyle karşılaştırılması (Tablo -29) da görülmektedir.

Ph. Helv. V., suppl. VI ve ÖAB-9'da senega köklerinin hemolitik indeksinin en düşük 1 : 2500 olması gerektiği belirtilmiştir. P. pruinosa subsp. pruinosa köklerinin hemolitik indeksi bu değer yaklaşık yarısı kadardır. Diğer taraftan offisinal Polygala kökünün

Bitki	HI	Lt
<u>P. senega</u>	1 : 3250	14
<u>P. senega</u> var. <u>latifolia</u>	1 : 1875	14
<u>P. alba</u>	1 : 2720	14
<u>P. chinensis</u>	1 : 2200	17
<u>P. pruinosa</u> subsp. <u>pruinosa</u>	1 : 1292	-

Tablo - 29

Bazı Polygala Türlerinin Hemolitik İndekslerinin
Karşılaştırılması

(HI) Hemolitik indeks

köpürme indeksinin, Ph. Française VIII'e göre 3000 den aşağı olmaması gerekir. P. pruinosa subsp. pruinosa'nın köklerinin köpürme indeksi bu değere yakındır. Fakat hemolitik indeksin değeri çok düşüktür. Bu yüzden offisinal köklerin yerine kullanılamaz. Ancak R. Senegae'nin yurt dışından getirildiği düşünülürse, bu droğun kullanılması gerektiğinde, en azından iki katı miktarda, aynı gayeyi sağlamak üzere kullanılabileceği teklif edilebilir.

Köklerin 5 saponozit taşıdığı ince tabaka kromatografisi ile tespit edilmiştir. Bunlardan (P1) olarak isimlendirilen ana saponozitin yapısının araştırılmasında şu sıra takip edilmiştir : Aglikonun, aglikona bağlı oz zincirlerinin ve saponozitin yapısı.

Polygala saponozitlerinin aglikonu, total asit hidroliz şartlarında yapıca değişikliklere uğrayarak sekonder ürünler meydana getirmektedir (52). Bu nedenle, elde edilmesinde, periyodat oksidasyonu yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen aglikonun ve dimetil ester triasetat türevinin ince tabaka kromatografisi, IR ve kütle spektrometresi ile şahit maddelerle ve literatür bilgileri (17) ile karşılaştırılması sureti ile "presenegenin" olduğu kesin olarak ortaya çıkmıştır.

(P1) saponozitinin taşıdığı ozlar, saponozitin total asit ve zayıf asit hidrolizatlarının kağıt kromatografisine tatbiki sonucu belirlenmiştir : D- glikoz, D- galaktoz, L- ramnoz, D- ksiloz,

D- fukoz, L- arabinoz. Aynı hidrolizatın gaz sıvı kromatografisine uygulanması sonucu : D- glikoz, D- galaktoz, L- ramnoz, D- ksiloz, D- fukoz varlığı ve, sırasıyla, (2:1:1:1:1) molar oranlarında bulunduğu kesin olarak ispatlanmıştır. Arabinozun gaz sıvı kromatogramındaki yeri, şahit maddelerin bulunmaması yüzünden, tam olarak tespit edilememiştir. Bu maddeye ait muhtemel pik daha önce yapılan bir çalışmaya göre^a kromatogramda işaretlenmiş ve molar oranı da (1) olarak belirlenmiştir.

(P1) saponozitinin alkali hidrolizi, yapısının bisdesmozidik olduğunu ortaya çıkarmıştır. Alkali hidroliz sonucu sapogenin - 3-O- monodesmozit ve C-28 oligoholozit ayrı ayrı elde edilmiş ve ayrı ayrı hidrolize tabi tutulup yapıları incelenmiştir.

Sapogenin-3-O- monodesmozitin hidrolizatında sadece D- glikoz bulunduğu kağıt kromatografisi yöntemi ile tespit edilmiştir. Bu hidrolizatın gaz sıvı kromatografisi ile analizi ve permetillenmiş sapogenin-3-O- monodesmozitin asit hidrolizi, C-3 hidroksil grubuna bir mol D- glikozun bağlandığını ortaya çıkarmıştır. Diğer taraftan sapogenin-3-O- monodesmozitin erime noktasının (298 - 300°C), daha önce izole edilen sapogenin-3-β- glikozit (Tenuifolin) (132) ile aynı olması da bu bulgumuzu doğrulamaktadır.

C-28 oligoholozitin asit hidrolizatında D- glikoz, D- galaktoz, L-ramnoz, D- ksiloz ve L- arabinoz bulunduğu kağıt kromatografisi yoluyla tespit edilmiştir. Bu zincirin yapısının tayin edilmesi amacıyla, ana saponozit HAKOMORI yöntemine göre permetillenmiş ve ürünün asit hidrolizi ile meydana gelen metillenmiş ozlar, şahit maddelerle karşılaştırılmak suretiyle tespit edilmiştir : 2,3,4,6 - tetrametil - D - glikoz, 2,3,4,6 - tetrametil - D - galaktoz, 2,3,4, - trimetil - L - arabinoz, monometil - D - fukoz. Bu bulgular kütle spektrometresi ile de doğrulanmıştır. Bu bulgulara göre D- glikoz, D- galaktoz ve L- arabinoz'un terminal ozlar olduğu kesin olarak açıklığa kavuşmuştur. Hidroliz sonucu elde edilen metillenmiş diğer iki ozun metillenme dereceleri, şahit metil ozlar bulunmadığı için, tayin edilememiştir. Bu ozların kromatogramdaki yerleri permetillenmiş olmalarına imkan vermemektedir.

^a: Dr. E. Sezik'in, Gypsophylla türleri üzerindeki henüz yayınlanmamış bir çalışmasına göre.

Bunların kısmen metillenmiş ozlar olduklarını gösterebilmek için iki ozu taşıyan karışım tekrar metillenmiş, 2,3,4 - trimetil - L-ramnoz ve 2,3,4 trimetil - D - ksiloz oldukları ince tabaka kromatografisi ile tespit edilmiştir. Bu tespit, ozların hem kısmen metillenmiş hem de ksiloz ve ramnoz türevi olduklarını ortaya çıkarmıştır.

Hidroliz sonucu elde edilen bir başka oz da monometil - D - fukozydur. Bu ozun monometil türevi olması ya C - 17 COOH grubuna C - 28 oligoholozitini bağlayan oz olduğunu veya C - 28 oligoholozitinde arada bulunan ozlardan biri olabileceğini gösterir. SHOJI ve ark.'nın (192) araştırmalarında C - 17 COOH grubuna bağlı ilk oz olarak fukozun bulunması, izole ettiğimiz maddede de böyle bir durumun bulunup bulunmadığı bizi araştırmaya sevketti. Bunu tespit gayesiyle : Alkali hidroliz sonucu elde edilen C- 28 oligoholoziti permetillenmiş, ardından yapılan asit hidroliz ile meydana gelen ozlar ince tabaka kromatografisi ile incelenmiştir. Kromatogramda dimetil - D - fukoz lekesinin varlığı tespit edilmiştir. Bu sonuç aglikonun C - 28 karboksil grubuna bağlı ilk ozun fukoz olabileceği ön fikrini ortaya çıkarmıştır. Bu bulguların kesinleştirilmesi için permetillenmiş (P1) saponoziti lityum alüminyum hidrür ile yarılmış, ardından asit hidroliz ile meydana gelen ozlar ince tabaka kromatografisinde kontrol edilmiştir. Kromatogramda monometil D- fukoza ait olan leke kaybolmuştur. Bu, fukozun lityum alüminyum hidrür yarılması sırasında redüklenerek fusitole dönüşebileceğini göstermesi bakımından çok önemlidir. Kromatograma fusitol varlığını belirlemek için, periyodat / benzidin reaktifi (25) püskürtülmüş ve fusitole tekabül eden beyaz bir lekenin meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu bulgu yukarıda belirtilen dönüşümün meydana geldiğini kesin olarak göstermiştir.

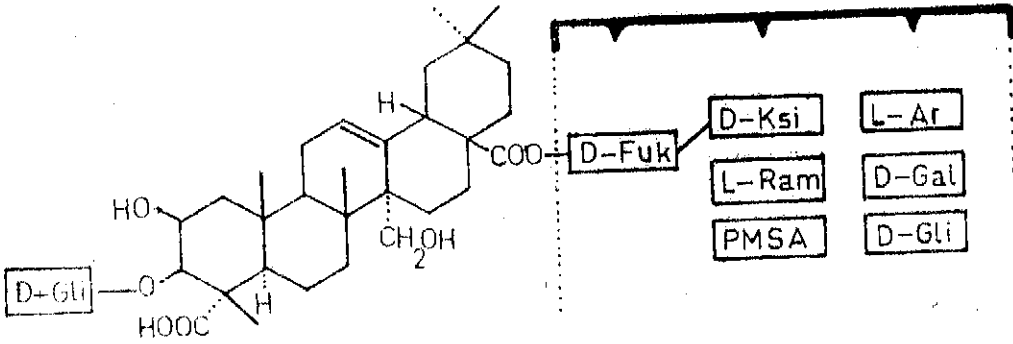
C- 28 oligoholozitinin fukoz vasıtasıyla aglikona bağlandığı, terminal ozların arabinoz, galaktoz ve glikoz olduğu, ramnoz ve ksilozun ise zincirin orta kısmında yer aldığı, yukarıda tartışılan bulguların ışığında ispatlanmış olmaktadır.

Diğer taraftan, (P1) saponozitinin periyodat oksidasyonu sonucu elde edilen ozlar karışımı kağıt kromatografisine tatbik edildiğinde, sadece D- fukoz ve D- ksiloz görülmektedir. Periyodat oksidasyonunda 1,2 - glikol grupları taşıyan ozlar parçalanmakta (206) diğerleri parçalanmadan serbest halde açığa çıkmaktadır. Bu işlem (P1) maddesine uygulandığında, sadece D- fukoz ve D- ksilozun

Birilmesi, bu ozların 1,2 - glikol grubu taşımadıklarını ve oligoholozi-
nin de dallanma noktalarında bulduklarını gösterir. D- fukozun da-
la önce aglikona bağlı olan ilk oz olduğu tespit edilmişti . O hal-
de ksiloz C- 28 oligoholozitin, orta kısmında, dallanma noktasında
ve fukoza bağlı olarak bulunacaktır.

P1 saponozitinin UV spektrumunda 315 nm de bir doruk vermesi,
p- metoksi sinamik asit taşıyabileceğini gösterir (192). Alkali hid-
roliz sonucu elde edilen hidrolizatın ince tabaka kromatografisine
uygulanmasında, p- metoksi sinamik aside tekabül eden bir leke tes-
pit edilmiştir. Bu hidrolizattan ve saponozitin periyodat oksidas-
yonuna tabi tutulmasıyla elde edilen ürünlerin saflaştırılması sonu-
cunda p - metoksi sinamik asit elde edilmiştir. Bu maddenin yapısı
şahit maddelerle kromatografik, IR ve kütle spektrometrelerinde kar-
şılaştırılarak kesin olarak aydınlatılmıştır. p- metoksinnamik asit,
C -28 oligoholozitinde D- fukoz, D- ksiloz veya L- Ramnoza bağlı
olarak bulunmaktadır. Diğer ozlar permetil türevi oldukları için,
bağlanma imkanı yoktur.

Buraya kadar tartışılan bulgular, P. pruinosa subsp. pruinosa'
nın ana saponozitinin yapısının aşağıda gösterilen formüle sahip
olabileceğini ortaya çıkarmıştır.



Şekil - 64

(P1) Saponozitinin Muhtemel Yapısı

(P1) saponozitinin aydınlatılan yapısının Polygala türlerin-
den daha önce elde edilen diğer saponozitlerle aynı olup olmadığının
tartışılması da gereklidir.

Yapılan araştırmalar, Polygala türlerinin saponozitlerinin iki

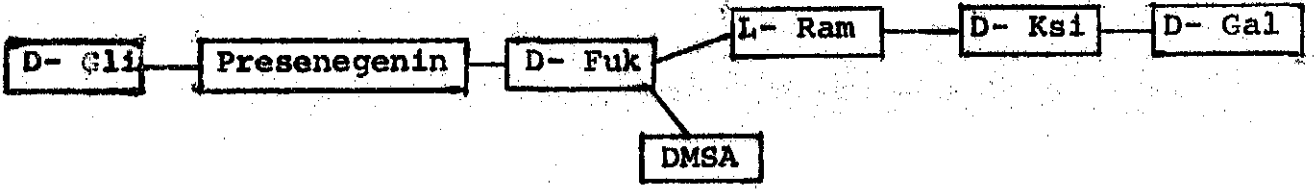
tip aglikon taşıdığını göstermiştir : Polygalasik asit ve presenegenin (52,135)(Pl) saponozitinin aglikonun presenegenin olduğu tespit edildiğinden, polygalasik asit, tartışma dışı bırakılmıştır. Diğer taraftan 1964 yılında gerçek aglikonun presenegenin olduğu tespit edilene kadar yapılar araştırmalar, yanlış aglikon üzerinde yapılan çalışmalar olduğundan tartışılmamıştır. Zaten 1964 yılına kadar oz zincirinin yapısı üzerinde ayrıntılı bir çalışma da bulunmamaktadır.

PELLETIER'in (131) P. tenuifolia'dan, GOEBELS'in (74) P. senega'dan ve KILBINGER'in P. chinensis'ten (17) izole ettiği saponozitler monodesmozidik yapıdadırlar. (Pl) saponoziti ise bisdesmozidik yapıdadır. Bu yüzden (Pl)'in yapısı, sadece Polygala türlerinden elde edilen bisdesmozidik saponozitlerin yapısıyla karşılaştırılacaktır.

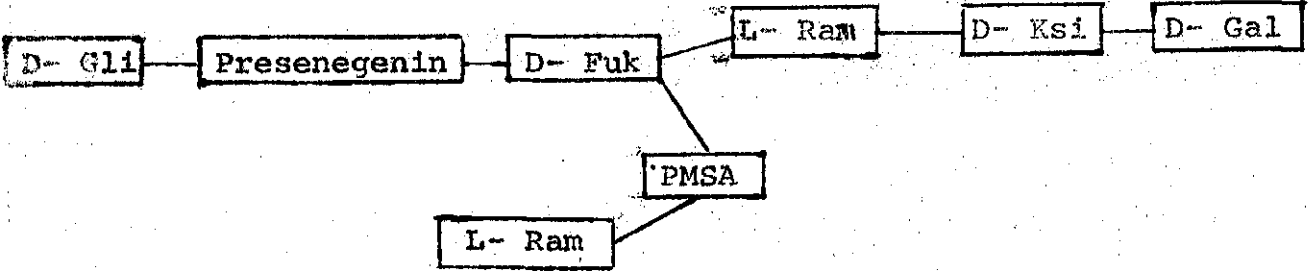
Bir grup araştırmacı da, aglikonun ve bu aglikona bağlı (mono veya bisdesmozidik olup olmadıklarını dikkate almadan) total ozları tayin etmişlerdir (2, 12 , 34). Bu araştırmalar içinde DELAUDE (34)'un çalışmasında, (Pl) saponozitinde bulunan ozlar tespit edilmiştir. Fakat p- metoksi sinnamik asit varlığı ve yapı hakkında ayrıntılı bilgi bulunmamaktadır. Bu yüzden DELAUDE'un P. acicularis'ten izole ettiği maddenin yapısı, (Pl) saponoziti ile karşılaştırılamamıştır.

Diğer taraftan AKADA ve ark. (2) tarafından yapılmış araştırmada saponozit - C adı verilen maddenin yapısında p- metoksi sinnamik asit bulunduğu tespit edilmiştir. Fakat bu saponozitte arabinoz bulunmamaktadır, o halde (Pl) saponozitine benzememektedir.

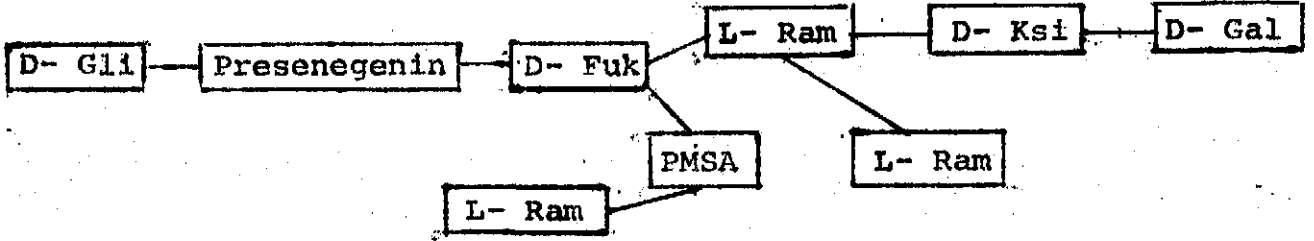
SHOJI ve ark. (167) P. senega var. latifolia'dan aşağıda sematik yapıları verilen saponozitleri izole etmişlerdir. (Şekil-64)'de görüldüğü üzere bunlar, (Pl) saponozitine üç nolu karbonda sadece glikoz taşımaları bakımından benzemektedirler. Fakat C-28 oligoholozit zincirinin arabinoz ve glikoz taşımaması bakımından büyük farklılık göstermektedirler. Yukarıdaki tartışma (Pl) saponozitinin Polygala türlerinden elde edilen yeni bir saponozit olduğu gerçeğini ortaya çıkarmaktadır.



Senegin - II



Senegin - III



Senegin - IV

Şekil - 64

SHOJI'nin izole ettiği Saponozitlerin Yapısı (191,192)

Araştırmamızda, saponozitin elde edilmesi sırasında, hem eter fazından hem de metanol fazından poligalitol elde edilmiştir. Bu maddenin yapısı, EN, IR, kütle spektrumlarının değerlendirilmesiyle ispat edilmiştir. Polygala türleri için poligalitol

karakteristik bir madde olarak kabul edilmektedir. Bulgumuz bu konudaki bilgilere açıklık getirmiştir.

Polygala köklerinin sakaroz taşımadığı öne sürülmüştür. (93). 1934 yılında BIENFANG (21) ilk defa sakaroz varlığını göstermiştir. Bu araştırmadan sonra Polygala köklerinden 1973 yılına kadar sakaroz izole edilmemiştir. Bu yılda KILBINGER P. chinensis, köklerinde sakaroz bulunduğunu tespit etmiştir (17). Araştırmamız sonucu P. pruinosa subsp. pruinosa köklerinde de sakaroz bulunduğunun tespiti, tartışılan bir konuya açıklık getirmesi bakımından önemlidir.

Ö Z E T

Polygala pruinosa Boiss subsp. pruinosa J. Cullen bitkisi 1975 - 1978 yıllarının 3 - 10 haziran tarihleri arasında Konya, Şarkikaraağaç, Feleköy, Namazlık ve Kelyayla tepelerinde toplanmıştır.

Bitkinin ve köklerinin botanik özelliklerinin belirlenmesinden sonra kökler anatomik olarak incelenmiştir. Köklerin offisinal Senega kökünden (R. Senegae) farklı morfolojik ve anatomik özelliklere sahip olduğu görülmüştür.

Kökün fizikokimyasal özellikleri incelenmiş ve köpürme indeksi 2500, hemolitik indeksi 1292 olarak bulunmuştur. Bu değer R. Senegae'nin yaklaşık yarısı kadardır.

Offisinal Polygala kökünün köpürme indeksinin, Ph. Française VIII'e göre 3000 den aşağı olmaması gerekir. P. pruinosa subsp. pruinosa köklerinin köpürme indeksi bu değere çok yakındır. Fakat hemolitik indeksin değeri çok düşüktür. Bu yüzden offisinal köklerin yerine kullanılamaz. Ancak R. Senegae'nin yurt dışından getirildiği düşünülürse, bu droğun kullanılması gerektiğinde, en azından 2 katı miktarda, aynı gayeyi sağlamak üzere kullanılabileceği teklif edilebilir.

Köklerin metanollü ekstraktının 5 saponozit ihtiva ettiği tespit edilmiştir. Bu karışımdan anasaponozit (P1) izole edilmiş, yapısı aydınlatılmıştır. Ana saponozitin EN 272 - 5°C, UV - 366 nm'da mavi floresans verir. $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 315 nm, IR - 3500 - 3300, 2940, 1705, 1635, 1610, 1515, 1260, 1100, 1000 (cm^{-1}).

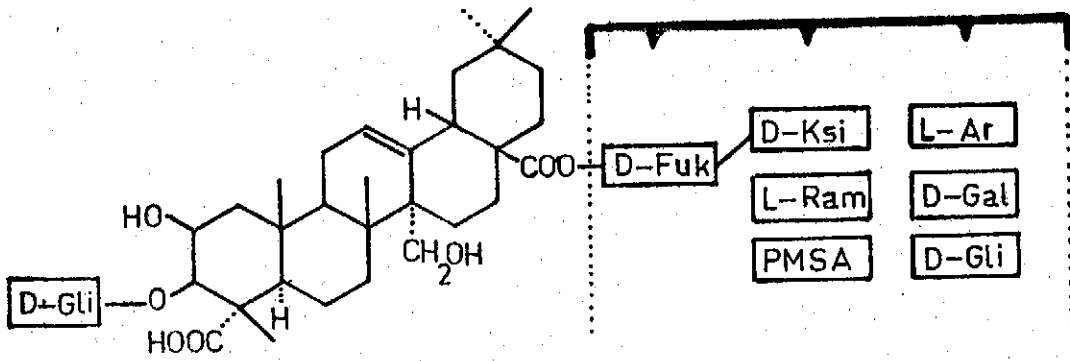
Ana saponozit (P1) den periyodat oksidasyonu ile elde edilen aglikonun ve türevinin kromatografik davranışı, erime noktası, IR, kütle spektrometresi ile elde edilen bulgular şahit maddeler ile karşılaştırılarak presenegenin olduğu belirlenmiştir : EN 310 - 311°C, IR 3500 - 3300 , 2940, 1710 (cm^{-1}). Aglikon dimetilester triasetat M^+ 672.

(P1) saponozitinin total asit ve zayıf asit hidrolizatlarının kağıt kromatografisi ile D- glikoz, D-galaktoz, L- ramnoz, D- ksiloz, D- fukoz ve L- arabinoz taşıdığı belirlenmiştir. Gaz sıvı kromatografisi ile ozların molar oranları, sırasıyla (2:1:1:1:1:1) olarak tespit edilmiştir.

Ana saponozitin alkali hidroliz ürünleri sapogenin 3-O-monodesmozit, C-28 oligoholozit ve p- metoksi sinnamik asit ayrı ayrı elde edilerek incelenmiştir. Sapogenin, 3-O- monodesmozitin presenegenin-3 β -glikozit yapısında olduğu (tenuifolin) tespit edilmiştir. C-28 oligoholozit zincirinin yapısını aydınlatmak, aglikona bağlanan ilk ozun ve terminal ozların belirlenmesi amacıyla Pl saponoziti ve C-28 oligoholoziti ilk önce permetillenmiş ve hidroliz edilmiş, diğer taraftan permetillenmiş saponozit lityum alüminyum hidrür ile muamele edilmiş ve asit hidrolize tabi tutulmuştur. Her üç hidrolizatta bulunan metillenmiş ozlar kromatografik olarak incelenmiştir. Pl saponozitinin periyodat oksidasyonu ürünlerinin kağıt kromatografisi ile görülen ozlar tespit edilmiştir. Elde edilen neticeler şu şekilde özetlenebilir

- C-17 COOH grubuna bağlanan ilk oz D-fukozdur,
- D- ksiloz, C-28 oz zincirinin orta kısmında bulunur ve D- fukoza bağlanmıştır,
- L- ramnoz, C- 28 oligoholozitinin orta kısmında yer alır,
- D- glikoz , D- galaktoz ve L- arabinoz terminal durumdadır.

Yukarıda bahsedilen bulgular, Pl saponozitinin yapısının aşağıda gösterildiği şekilde olabileceğini ortaya çıkarmıştır.



Saponozitin izolasyonu sırasında , metanol ve eter ekstraktlarından, elde edilen maddelerin poligalitol ve sakaroz oldukları yapılan enstrümantal analizler ile tespit edilmiştir.

S U M M A R Y

Polygala pruinosa Boiss. subsp. pruinosa J. Cullen, was collected from the hills of Feleköy, Namazlık, and Kelyayla, Konya-Şarkikaraağaç region, during 3rd - 10th June of 1975 - 1978.

After the botanical properties of the plant and its roots have been established, the roots were examined anatomically. Thus it was shown that they had different morphological and anatomical characteristics from officinal Senega roots (R. Senegae).

The physicochemical properties of the roots examined; the foaming index and hemolytical index were found to be 2500 and 1292, respectively. The latter value is about half of the R. Senegae. According to Ph. Française VIII, the foaming index of the officinal Polygala roots should not be less than 3000. The foaming index of P. pruinosa subsp. pruinosa roots is very similar to that of R. Senegae. But its hemolytical index is far below of the officinal Polygala's hemolytical index. Therefore the roots can not be used instead of officinal R. Senegae. However, due to the difficulties to import R. Senegae, twice quantities of P. pruinosa subsp. pruinosa roots could be used instead, when needed.

It has been shown that methanolic extracts of the roots contain 5 saponins. One of these, P1, the major one, has been isolated and its structure elucidated. The melting point of this major saponin is 272 - 5°C, and it shows a blue fluorescence at UV - 366 nm; $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 315 nm; IR, 3500 - 3300, 2940, 1705, 1635, 1610, 1515, 1260, 1100 - 1000 (cm⁻¹).

The structure of the aglycon obtained from the major saponin by periodate oxidation, was found to be identical with that of presenegenin, by the chromatographic behaviour, melting point, IR, mass spectrometry and the comparison with authentic specimens; mp 310 - 311°C, IR, 3500 - 3300, 2940, 1710 (cm⁻¹). Additional evidence for this structure was obtained by the comparison of the mass spectrums of the dimethylester triacetate derivative with authentic; M⁺ 672.

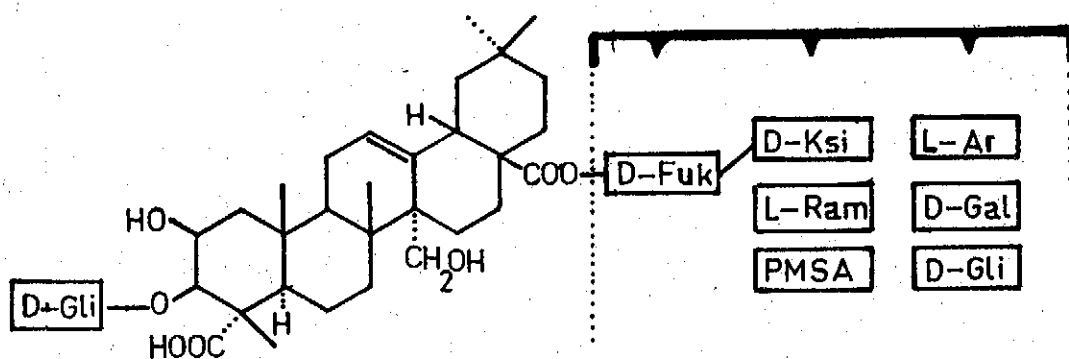
Paper chromatography of the total acid and weak acid hydrolysates, obtained from P1 saponin showed the presence of D- glucose, D- galactose, L- rhamnose, D- xylose, D- fucose, and L- arabinose.

Molar proportions of these sugars were determined by g.l.c. and found to be 2:1:1:1:1:1, respectively.

Alkaline hydrolyses of the major saponin yielded a mixture of three compounds. These were separated and identified as pre-negenin - 3 β - glycoside, a C-28 oligosaccharide and p- methoxy-cinnamic acid. In order to determine the structure of the sugar, directly attached to the aglycon, and the terminal sugars, both saponin P1 and C- 28 oligosaccharide were first permethylated and hydrolysed. Then, permethylated saponin was treated with lithium aluminium hydride and hydrolysed. All the methylated sugars, present in these three hydrolysates were examined by thin layer chromatography. Finally, saponin P1 was oxidized with periodate and the oxidation product was examined by paper chromatography. The results, thus obtained, can be summarized as follows:

- a. The sugar, directly attached to C - 17 COOH must be D- fucose,
- b. D- Xylose must be attached to D- fucose,
- c. L- Rhamnose must be somewhere in the middle of the chain,
- d. D- Glucose, D- galactose, L- arabinose must be terminal.

All the above mentioned results, suggests the following structure for the saponine P1.



Methanolic extracts of the roots yielded some non-sap-
nins as well. Two of these were separated and identified as
polygalitol and saccharose.

LİTERATÜR

1. Abdel - Akher, M., Hamilton, M., Montgomery, J.K., Smith, F., A New Procedure for the Determination of the Fine Structure of Polysaccharides. J. Am. Chem. Soc. 74, 4970 (1952).
2. Akada, Y., Yuki, H., Takiura, K., Gylcon Moiety of Senega Saponins I. Isolation and Purification of the Senega Saponins. Yakugaku Zasshi, 91, 1178 (1971).
3. idem, Glycon Moiety of Senega Saponins II. Composition of Cinnamic Acid Derivatives and Monosaccharides of Purified Saponins and Oligosaccharides Obtained by Partial Hydrolysis of crude Saponin. ibid, 92, 232 (1972). Ref. : CA, 77, 19951 x (1972).
4. Akiyama, T., Iitaka, Y., Tanaka, Q., Structure of Platycodigenin, A Sapogenin of Platycodon grandiflorum A. De Candolle. Tetrahedron Letters, 5577 (1968).
5. Akiyama, T., Tanaka, Q., Shibata, S., Sapogenins of the Roots of Platycodon grandiflorum A. De Candolle and the Stereochemistry of Polygalacic acid. Chem. Pharm. Bull. 16, 2300 (1968).
6. Anderson, D.M.W., Cree, G.M., Studies on Uronic Acid Materials. XIV. Methylation with the Sodium Hydride- Methyl iodide - Dimethylsulphoxid system. Carbohydrate Res. 2, 162 (1966).
7. Andrade, C.H.S., Fo, F.B., Gottlieb, O.R., Silveira, E.P., The Chemistry of Brazilian Polygalaceae I. Xanthenes from Polygala spectabilis. Lloydia. 40, 344 (1977).
8. Aspinal, G.O., Gas Liquide Partition Chromatography of Methylated and Partially Methylated Methyl Glycosides. J. Chem. Soc. 1676 (1963).
9. Barton, D.H.R., Page, J.E. Warnhoff, W.E., Triterpenoids XVIII. The Constitution of Phyllanthol and Cycloartenol. J. Chem. Soc. 2715 (1954).
10. Baytop. T., R. Senegae yerine kullanılabilir yerli senega kökleri hakkında. Folia Pharm. 1, 59 (1950).

11. Bell, D.J. Moderne Methoden der Pflanzen Analyse, cilt 2. Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1955).
12. Boichinov, A., Panova, D., Saponins from Polygala major. Farmaci-ja Sofia, 12, 19 (1962).
13. Boissier, E., Diagnoses Plantarum Orientalium Novarum, Akademi-sche Druck und Verlagsanstalt, Graz (1969) Tıpkı-basım.
14. Bolley, P., Über das Saponin und Senegin. Ann. Chem. 40, 211 (1854).
15. Bouche, F., Etude chimique sur la Saponine d'une falsification de Polygala senega L., J. Pharm. Belg. 10, 169 (1956).
16. Brieskorn, C.H., Fenke, F., Chemischer aufbau Physikalische Eigenschaften und Unterscheidungsmerkmale einiger Polygala saponine. Dtsch. Apoth. Ztg. 108, 1601 (1968).
17. Brieskorn, C.H., Kilbinger, W., Structure eines Saponins aus Polygala chinensis. Arch. Pharmazie 11, 308 (1975).
18. Brieskorn, C.H., Serg, M., Zur Gehaltbestimmung der Saponine von Polygala senega. Planta med. 32A, 25 (1975).
19. Bussy, P., Struthin und Saponin. Berz. Jahr. 13, 316 (1834).
20. Büyükkara, S., Bazı Triterpenik Saponozitlerin Kolon Kromotogra-fisi ile Ayırımı Üzerinde Çalışmalar. H.Ü. Eczacılık Fak., Yük-sek Lisans Tezi, Ankara (1977).
21. Carr, J.C., Krantz, Jr. J.C., Sugar Alcohols XIV. The Isolation of Polygalitol from Polygala senega and the Physicochemical and Biological properties of Polygalitol. J. Am. Pharmac. Assoc. 27, 318 (1938).
22. Cheung, H.T., Williamson, D.G., NMR Signals of Methyl groups of Triterpenes with oxygen functions at position 2,3 and 23. Tetrahedron 25, 119 (1969).
23. Chopra, R.N., Glossary of Indian Medicinal Plants. Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi (1956).

24. Chou, T.Q., Chou, J.H., Mei, P.F., The Sapogenins of Chinese Drug, Yuan chic, Polygala tenuifolia Wild., J. Am. Pharmac. Assoc. 36, 261 (1947)
25. Cifonelli, J.A., Smith, E., Detection of Glycosides and other Carbohydrate Compounds on Paper Chromatograms. Anal. Chem. 26, 1132 (1954).
26. Cole, A.R.H., et al., IR Spectra of Natural Products VI. The Characterisation of Equatorial and Axial 3- Hydroxyl groups in Triterpenoids. J. Chem. Soc. 4868 (1956).
27. Corner, J.J., Harborne, J.B., Humphries, S.G., Ollis, W.D., Plant Polphenols VII. The Hydroxycinnamoyl ester of Polygala senega root. Phytochemistry. 1, 73 (1962).
28. Croes, R., Eigenschappen van Senegine. Pharm. Tijdschr. Belg. 31, 25 (1954).
29. Çalış, İ., Saponaira kotschyi Boiss. Üzerinde Farmakognozik araştırmalar. H.Ü. Sağlık Bilimleri Fak., Doktora tezi, Ankara (1977).
30. Dafert, O., Kalman, E., Über das Senegin und seine Spaltprodukte. Pharm. Acta Helv. 5, 71 (1930).
31. Datta, S.C., A Handbook of Systematic Botany. Asia Publ. House (1970).
32. Davis, P.H., Flora of Turkey and the East Aegean Islands, cilt 1, University Press, Cambridge (1965).
33. Davreux, M., Delaude, C., Contribution to study of the Saponins Contained in the Polygalaceae. Identification of the Saponin Extracted from Securidaca welwitschii Oliv., Bull. Soc. R. Sci. Liege, 40, 498, (1971).
34. Delaude, C., Comparative Study of Saponin Extracts of Two African Polygalaceae : Securidaca longepedunculata var. parvifolia and Polygala acicularis, ibid, 40, 397 (1971).

35. Delaude, C., Davreux, M., Chemistry of Polygala Saponins. Identification of the Saponin Extracted from Polygala erioptera. ibid, 41, 576 (1972).
36. idem, Chemistry of Polygala Saponins. Identification of the Saponin Extracted from Carpolobia glabrescens. ibid, 41, 573 (1972).
37. Delaude, C., Saponin content of the Polygala. Identification of the Saponin Extract of Polygala exelliana. ibid, 42, 631 (1973).
38. Idem, Saponin content of Polygala. Identification of the Saponin Extract of Polygala persicariifolia. ibid, 42, 635 (1973).
39. Idem, Saponins in Polygalaceae. Identification of Saponins Extracted from Polygala macrostigma. ibid, 43, 249 (1974).
40. Idem, Saponins in Polygalaeae. Examination of Saponins of Polygala nambalensis and Polygala usafuensis. ibid, 43, (1974).
41. Idem, Chemical study of Polygalaceae Saponins. Identification of the Polygala chamaebuxus saponin. ibid, 44, 466 (1975).
42. Idem, Chemical study of Polygalaceae Saponins. Identification of the saponin extracted from Carpolobia lutea. ibid, 44, 495 (1975).
43. Idem, Chemical study of Polygalaceae Saponins. Identification of the Polygala arenaria saponin. ibid, 44, 497 (1975).
44. Idem, Contribution to the Chemical Study of Polygalaceae. Identification of the saponin of Polygala pygmaea Guerke. ibid 44, 680 (1975).
45. Ejerassi, C. et al., Optical Rotatory Dispersion Studies XXV. Effect of Carbonyl Groups in Pentacyclic Triterpenes. J. Am. Chem. Soc. 81, 4587 (1959).
46. Ejerassi, C., Budzikiewicz, H., Wilson, J.M., Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. Unsaturated Pentacyclic Triterpenoids. Tetrahedron Letters 263 (1962).

47. Dragendorff, G., Die Heilpflanzen der Verschiedenen Völker und Zeiten. Werner Fritsch - München (1967).
48. Dreyer, D.L., Extractives of Polygala macradenia. Tetrahedron 25, 4415 (1969).
49. Dugan, J.J., De Mayo, P., Starratt, A.N., Terpenoids V. Senegenin, functional groups and parts structure. Can. J. Chem. 42, 491 (1964).
50. Idem, Terpenoids VI. Polygalic Acid. Tetrahedron Letters 2567 (1964).
51. Idem, Senegenin. Proc. Chem. Soc. 264 (1964).
52. Dugan, J.J., De Mayo, P., Terpenoids X. Presenegenin, a quite normal triterpenoid. Can. J. Chem. 43, 2033 (1965).
53. Dulong, A., De la racine du Polygala de virginie, Polygala senega, J.pharm. Sci. 13, 567 (1827).
54. Engler, A., Syllabus der Pflanzenfamilien, cilt 2, Gebrüder Borntraeger - Berlin (1964).
55. Finholt, P., The Stability of Senegin at various pH values. Dansk. Tidsskr. Farm. Suppl. 2, 92 (1956).
56. Fischer, F.G., Dörfel, H., Die Quantitative Bestimmung reduzierenden Zucker auf Papier Chromatogrammen. Z. physiol. Chem. 297, 164 (1954).
57. Idem, Die Papierchromatographische Trennung und Bestimmung der Uronsäuren. Z. physiol. Chem 301, 224 (1955).
58. Fletcher, Jr.H.G., A New Synthesis of Polygalitol tetraacetate. J. Am. Chem. Soc. 69, 706 (1947).
59. Fournier, P., Plantes Medicinales et Veneneuses de France. Cilt 3. P. Lechevalier Ed. (1947).
60. Franck, H.P., Zur Qualitativen und Quantitativen Analytik der Saponine. Dtsch. Apoth. Ztg. 115, 1206 (1975).

61. Fresenius, P., Chemical Nomenclature of Triterpenes. Pharm. Ztg. 118, 7 (1973).
62. Freudenberg, W., Fogers, E.F., The Chemistry of Naturally Occurring Monohydrohexitols. J. Am. Chem. Soc. 59, 1602 (1937).
63. Fujita, M., Nishimoto, K., Studies on Saponin - bearing drugs. I. Morphology of Japanese Senega. Yakugaku Zasshi. 72, 1595 (1952).
64. Fujita, M., Itokawa, H., Saponin - bearing drugs III. Sapogenins of domestic Senega and Polygala, a Chinese drug "Yuan chih". Chem. Pharm. Bull. 9, 1006 (1961).
65. Funaro, A., Senegin, from Polygala senega L., J. Chem. Soc. 58, 262 (1890).
66. Idem, Intorno alla Senegina, Glucoside della Polygala virginiana, Gazz. Chim. Ital. 19, 21 (1889).
67. Gascoigne, R.M., et al., A Survey of Anthocyanins in the Australian Flora. J. Pr. Soc. N.S. Wales 82, 44 (1948).
68. Ghosal, S., Kumarswamy, C., Chauhan, F.B.S., Srivastava, F.S., Lactonic Lignans of Polygala chinensis. Phytochemistry 12, 2550 (1973).
69. Ghosal, S., Chauhan, F.B.S., Srivastava, F.S., Structure of Chinensin; A New Lignanlactone from Polygala chinensis. *ibid*, 13, 2281 (1974).
70. Idem, Two New Aryl Naphthalide Lignans from Polygala chinensis. *ibid*, 13, 1933 (1974).
71. Idem, Extractives of the Polygala IV. Lignan and Flavonol Glycosides of Polygala chinensis. Plant Biochem. J., 1, 64 (1974); Ref. CA 83, 1903 (1974).
72. Ghosal, S., Banerjee, S., Chauhan, R.B.S., Srivastava, F.S., Extractives of Polygala V. New Trioxxygenated Xanthenes of Polygala arillata. J. Chem. Soc. Perkin Trans I., 740 (1977).
73. Glaser, E., Krauter, H., Über die Saponine der Polygala amara. Ber. 57, 1604 (1924).

74. Goebels, L., Über Saponine aus *Polygala senega*. Dissertation, Bonn, (1971). Ref., Brięskorn, C.H., Kilbinger, W., Structure eines Saponins aus *Polygala chinensis*. Arch. Pharmazie 11, 308 (1975).
75. Goldstein, I.J., Hay, G.W., Lewis, B.A., Smith, F., Controlled Degradation of Polysaccharides by Periodate Oxidation, Reduction and Hydrolysis. Whistler, R.L., BeMiller, J.N., Methods in Carbonhydrate Chemistry. Cilt 5, Academic Press, New York-London (1965).
76. Hakomori, S., Permethylation of Glycolipids and Polysaccharides catalyzed by Methylsulfinyl Carbanion in Dimethylsulfoxide. J. Biochem. Tokyo, 55, 205 (1964).
77. Hammerstein, F., Kaiser, F., Quantitative direktauswertung von Arzneipflanzen extrakten auf Dünnschichtchromatogrammen. Planta Med. 21, 5 (1972).
78. Hayek, A., Prodrumus Florae Peninsulae Balcanicae, cilt 1, Verlag des Repertoriums - Berlin (1927).
79. Hegi, G., Illustrierte Flora von Mitteleuropa, cilt 5, Carl Hanser Verlag, München (1955).
80. Hensens, O.D., Lewis, K.G., Acetyl Migration between the 28- and the 16- hydroxyl Groups of Primulagenin A. Tetrahedron Letters, 3213 (1968).
81. Hiai, S. et al., A Simultaneous Colorimetric Estimation of Biologically Active and Inactive Saikosaponins in *Bupleurum falcatum* Extracts. Planta med. 29, 247 (1976).
82. Hiller, K., Keipert, M., Linzer, B., Triterpen Saponine. Pharmazie 21, 713 (1966).
83. Hiller, K., Hallstein, E., Saniculagenin F Ein Neues Estersapogenin. Pharmazie 25, 790 (1970).
84. Hiller, K., Voigt, G., Neue Ergebnisse in der Erforschung der Triterpensaponine. Pharmazie 23, 365 (1977).

85. Hoppe, H.A., Drogenkunde, cilt 1, Walter de Gruyter, Berlin-New York (1975).
86. Huneck, S., Tummler, R., Triterpenes XIX. Molekular Mass Spectrometry of Triterpenes. J. Prakt. Chem. 38, 233 (1968).
87. Hutchinson, J., The Families of Flowering Plants. cilt 1., 2. bas-ki, Clarendon Press, Oxford (1969).
88. Irwin, W., E., The Triterpenes of Polygala senega. Dissertation Abstr. 23, 3619 (1963).
89. Itô, H., Taniguschi, H., Kita, T., Matsuki, Y., Tachikawa, E., Fujita, T., Xanthones and a Cinnamic Acid Derivatives from Polygala tenuifolia. Phytochemistry, 16, 1614 (1977).
90. Jacobs, W.A., Isler, O., The Saponinins of Polygala senega. J. Biol. Chem. 119, 155 (1937).
91. Jain, C.A., Khanna, V.K., Seshadri, T.R., Synthese of Polygalaxanthone-B and Isopolygalaxanthone-A. India J. Chem., 8, 667 (1970).
92. Jentsch, K., Vergleichende Untersuchungen der Antihelminthischen Wirksamkeit von Saponinen in vitro. Arzneimittel-Forsch. 11, 413 (1961).
93. Jiracek, V., Suess, J., Kocourek, J., Sugar and Free and Bound Amino Acids in Polygala vulgaris. Planta med., 10, 298 (1962).
94. Joos, P., Factors of Foam Stability Studied by Different Surfactans. Kon. Vlaam. Acad. Wetenschap., Lett. Schone Kunsten Belg., Kl. Wetensch., 127 (1965).
95. idem, Foamability of Senegin Solutions with Relation to Other Physical - chemical Properties of the Boundary Layer. Verh. Kon. Vlaam. Acad. Wetenschap. Belg., Kl. Wetenschap. 28, 1 (1966).

96. Joos, P., Buysen, R., Spread Mixed Monolayer of Senegin and Senegenin with Cholesterol at the Air - water Interface. Bull. Soc. Chim. Belg. 76, 308 (1967).
97. Karliner, J., Djerassi, C., Terpenoids LVII. Mass Spectral and NMR Studies of Pentacyclic Triterpene Hydrocarbons. J. Org. Chem. 31, 1945 (1966).
98. Kartnig, T., Wegschaider, O., Fl, C.Y., Ein Beitrag zur Bestimmung von Saponinen in Drogen. Planta Med. 21, 29 (1972).
99. Kim, J.H., Alkaloid from Polygala tenuifolia. Yakhak Hoeji, 8, 59 (1964) : Ref. CA 65, 12248 (1964).
100. Kimura, M., Tohma, M., Yoshizawa, I., Akiyama, H., Constituents of Convallaria X. Structure of Convallasaponin A,B and their Glycosides. Chem. Pharm. Bull. 16, 25 (1968).
101. Kita, F., Akiyama, H., Takido, M., Kimura, Y., Standardisation of Crude Drugs XVIII. Quantitative Analysis of Senega Saponins. Yakugaku Zasshi, 89, 1111 (1969).
102. Kitagawa, I. et al., Phytochemical Cleavage of Glycoside Linkage in Saponin I. Photolysis of Some Saponin and Their Structure Features. Chem. Pharm. Bull. 22, 1339 (1974).
103. Kitagawa, I., Yoshima, M., Ikenishi, Y., A New Selective Cleavage Method of Glucuronide Linkage in Oligoglycoside Lead Tetraacetat Oxidation Followed by Alkali Treatment. Tetrahedron Letters, 7, 594 (1976).
104. Klyne, W., The Configuration of the Anomeric Carbon Atoms in Some Cardiac Glycosides. Biochem. J., 47, xli (1950).
105. Kobert, F., Über die Pharmacologische Bedeutung und die Biologische Wertbestimmungen der Sarsaparillen und Ihnen Verwandter Drogen. Ber. 22, 205 (1912).
106. Kochetkov, N.K., Khorlin, A.J., Ovodov, J.S., Structure of Gypsoside from Gypsophyla pacifica. Izv. Akad. S.S.S.R. Ser. Khim. 1436 (1964).

107. Kochetkov, N.K., Chizkov, O.S., Mass Spectrometry of Methylated Methyl Glycosides. Principles and Analytical Application. Tetrahedron 21, 2029 (1965).
108. Kochetkov, N.K., Khorlin, A.J., Oligosides, Ein Neuer Typ von Pflanzenglykosides. Arzneimitell-Forsch. 16, 101 (1966).
109. Kofler, L., Die Saponine, Springer Verlag, Wien (1927) : Ref., Tschesche, R., Wulff, G., Chemie und Biologie der Saponine. Zechmeister, L. et al. Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe, cilt 30, springer verlag - New York, Wien (1973)
110. Kuběckzka, K.H., Beitrag zur Analytik von Saponindrogen. Dtsch. Apoth - Ztg. 110, 1707 (1970).
111. Kubota, T., Kitatani, H., Revised Structure of the Triterpene Polygalacic Acid. Configuration of the C-16 Hydroxyl Group. Chem. Commun. 1005 (1968).
112. Kuhn, R., Egge, H., Brossmer, R., Gahue, A., Trishmann, H., Klesse, P., Lochinger, W., Röhms, F., Tschampel, D., Über die Ganglioside des Gehirns. Angew. Chem. 72, 805 (1960).
113. Kuhn, R., Trischman, H., Permethylierung von Inosit und Anderen Kohlenhydraten mit Dimethylsulfat, Chem. Ber. 96, 284 (1963).
114. Liebert, H., Schuster, I., Schmid, L., Protonen Rezoanz Spektroskopische Untersuchungen von Galaktose Derivativen. Chem. Ber. 101, 1902 (1968).
115. Lindberg, B., Bjorndal, H., Hellerquist, C.G., Svensson, S., Gas - Flüssigkeits - Chromatographie und Massen Spektroskopie bei der Methylierung - analyse von Polysacchariden. Angew. Chem. 82, 643 (1970).
116. Lockwood, G.B., Brain, K.R., Turner, T.P., Simultaneous Estimation of Sterol and Steroidal Sapogenins in Plant Extracts by Densitometric TLC. J. Chromatogr. 25, 250 (1974).

117. Maurich, V., Poldini, L., Sciortion, T., Gratton, S., The Analysis of the Floral Polychromy in Polygala nicaensis. Boll. Chim. Farm. 115, 58 (1976).
118. Micheli, A.R., Applewhite, T.H., Measurements on Isolated Double Bond System. UV Absorption Spectra of Steroids and Triterpenoids. J. Org. Chem. 27, 345 (1962).
119. Michell, A.J., Spektra in the O-H Streching Region of Mono- and Oligosaccharides at Low Temperatures. Austral. J. Chem. 21, 1257 (1968).
120. Moermann, E., Bijdrage tot de Eigenschappen van Senegine. Pharm. Tijdschr. Belg., 39, 143 (1962).
121. Möes, A., Chemical Composition of Polygala senega and Securidaca longepedunculata var. parvifolia, a Congolese Polygalacean. J. Pharm. Belg. 21, 347 (1966).
122. Moron, J., Polonsky, J., Pourrat, H., Polygala Xanthones A and B, New Isolated Xanthones from Polygala paenea. Bull. Soc. Chim. France, 130 (1967).
123. Namba, T., et al, Fundamental Studies on the Evaluation of Crude Drugs IV. Quantitative Analysis of Constituents in the Crude Drugs by Rod TLC with FID (1). Determination of Glycyrrhizin in Liquorice Roots. Yakugaku Zasshi, 95, 809 (1975).
124. Nazirov, Z.N., Khanidova, Kh. A., Zufarov, F.N., Nuritdinova, A.T. Milkwort Family Plants Used in Folk Medicine. Med. Zh. Uzb. 7, 60 (1972), Ref. CA 77, 137353b (1972).
125. O'colla, P.S., The Barry Degradation. Whistler, R.L., BeMiller, J.N. Methods in Carbohydrate Chemistry, cilt 5, Academic Press, New York - London (1965).
126. Ovodov, J.S., Jevtuschenko, E.V., Analysis of Sugar Mixtures by GLC. J. Chromatogr. 31, 527 (1967).
127. Paris, R., Lyse, P., Sur l'origine Botanique et la Composition Chimique du Polygala de Syrie. Ann. pharm. Franç., 12, 171 (1954).

128. Pechier, C., Analytische Untersuchung der Polygale senega Wurzel. Repertorium für die Pharmazie 11, 158 (1821).
129. Pelletier, S.W., Adityachaudhury, N., Tomasz, M., Reynolds, J.J., Mechoulam, R., Senegenic Acid, a Pentacyclic Nortriterpene Acid. Tetrahedron Letters, 3065 (1964).
130. Pelletier, S.W., Nakamura, S., Shimizu, Y., Homoallylic Cations Involved in the Conversion of Presenegenin into Senegenin into Senegenin. Chem. Commun. 727 (1966).
131. Pelletier, S.W., Nakamura, S., A. Prosapogenin from Polygala senega and Polygala tenuifolia. Tetrahedron Letters, 5033 (1967).
132. Pelletier, S.W., Nakamura, S., Soman, R., Constituents of Polygala species : Structure of Tenuifolin, A Prosapogenin from Polygala senega and Polygala tenuifolia. Tetrahedron, 27, 4417 (1971).
133. Philips, B.E., Smith, C.R. Jr., Tjarks, L.W. Fatty Acids of Monnia emarginata Seed Oil. Biochim. Biophys. Acta 210, 353 (1970).
134. Philips, B.E., Smith, C.R. Jr., Glycerides of Monnina emarginata Seed oil: ibid, 218, 71 (1970).
135. Polonsky, J., Pourrat, H., Rondest, J.S., Study of the Constituents of the Roots of Polygala paenea. The Structure of A New Sapogenin. Polygalacic Acid. Compt. Rend. 251, 2347 (1960).
136. Polonsky, J., Moron, J., Pourrat, H., Sur la Demethyl-4 dehydroxy-7' podophyllotoxine, Nouvelle Cyclolignane Isolée de Polygala paenea L. Bull. Soc. Chim. France, 1722 (1962).
137. Quevenne, P., Polygalasäure, J. Prakt. Chem. 12, 427 (1837).
138. Idem, Polygalasäure, Ann. Chem. 28, 248 (1838).

139. Rao, G. S., Sinsheimer, J.E., Coobran, W. K., Antiviral Activity of Triterpenoid Saponins Containing Acylated β -Amyrin Aglycones. *J. pharm. Sci.* 63, 471 (1974).
140. Reiff, L.P., Studies in Structural Determination of Senegenin. Dissertation Abst. 21, 2492 (1961).
141. Rendle, A.B., The Classification of Flowering Plants. cilt 2, University Press, Cambridge, 2. baskı (1967).
142. Richtmeyer, N.K., Carr., J.C., Hudson, C.S., Two Synthesis of Polygalitol. *J. Am. Chem. Soc.*, 65, 1477 (1943).
143. Ridgway, R.M., Rowson, J.M., Glinus oppositifolius Root A Substitute for Senega. *J. Pharm. Pharmacol.*, 8, 915 (1956).
144. Rondest, J.S., Polonsky, J., Constituents of Polygala paenea L. Attachment of Polygalacic Acid the β -Amyrin Series. *Compt. Rend.* 254, 1298 (1962).
145. Idem, Structure de l'acide Polygalacique Nouvel Acid Triterpenique, Isole de Polygala paenea L. *Bull. Soc. Chim. France*, 1253 (1963).
146. Ruyssen, R., La Tensio-activite des Saponines et Leur étalement en Lames Superfacielles. *Bull. Soc. Chim. Belg.* 54, 149 (1945).
147. Ruyssen, R., Lauwers, A., Joos, P., Antifoam Action. *Mededel. Koninkl. Vlaam. Acad. Wetenschop.*, Belg. Kl. Wetenschap. 23, 3 (1961).
148. Ruyssen, R., Joos, P., Penetration of Gaseous Cholesterol Monolayers by saponins. *Mededel. Koninkl. Vlaam. Wetenschap.*, Belg., Kl. Wetenschap. 27, 1 (1965).
149. Idem, Foaming Properties of Saponins. Time and Electrolyte Effect. *Chem. Phys. Appl. Surface Active Subst. Proc. Int. Contr.* 4th, 2, 1143 (1967).
150. Sawardeker, J.S., Sloneker, J.H., Jeanes, A., Quantitative Determination of Monosaccharides as Their Alditol Acetates by GLC, *Anal. Chem.* 37, 1602 (1965).

151. Schantz, M., Die Saponindrogen. Danks. Tidsskr. Farm. 40, 140 (1966).
152. Scheidegger, W., Mühlemann, H., Biologische Wertbestimmung von Saponinen mit Hilfe von Tubifex Würmern, Pharm. Acta Helv. 22, 147 (1947).
153. Schenk, G., Hennig, A., Über das Saponine von Bredemevera floribunda Willd. (2) Arch. Pharmazie 288, 173 (1955).
154. Schlemmer, W., Bosse, J., Zur Quantitativen Bestimmung von Triterpenverbindungen mit Hilfe der Eisenchlorid-Reaktion. Arch. Pharmazie 296, 785 (1963).
155. Schlösser, E., Wulff, G., Über die Struktur Spezifität der Saponin Hämolyse I. Triterpen Saponine und - aglykone. Z. Naturf., 24, 1284 (1969).
156. Schulz, H., Über Saponine aus Polygala senega. Diplomarbeit, Bonn (1971).
157. Shah, C.S., Vyas, L.S., Aghara, L.P., Pharmacognostic Study of Polygala chinensis L. Indian J. Pharm. 19, 10 (1957).
158. Shah, C.S., Vyas, L.S., Pharmacognosy of Polygala chinensis L. and comparison with Chinensis I.P. Indian J. Pharm. 19, 224 (1957).
159. Shah, C.S., Aghara, L.P., Pharmacognosy of Tuticorin Yellow Root. A. Substitutie for Senega - II. Indian J. Pharm. 20, 297 (1957).
160. Shah, C.S., Khanna. P.N., Pharmacognostic Comparison of Indian, Pakistan, and Delhi Senegas. J. Scient. Ind. Res. India, 18C, 121 (1959).
161. Shamma, M., Reiff, L.P., Senegenin, A Tetracyclic Triterpene of Novel Nuclear Structure. Chem. and Ind., 1272 (1960).
162. Shamma, M., Glick, R.E., Mumma, R.O., The Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Pentacyclic Triterpenes. J. Org. Chem. 27, 4512 (1962).

163. Shimizu, Y., Pelletier, S.W., Cyclo-senegenin, A Derivatives of Senegenin in Polygala senega. J. Am. Chem. Soc. 87, 2065 (1965).
164. Idem, Elucidation of the Structure of the Sapogenins of Polygala senega by A Direct Correlation with Medicagenic Acid. Chem. and Ind. 2098 (1965).
165. Idem, Elucidation of the Structure of the Sapogenins of polygala senega by Correlation with Medicagenic Acid. II. J. Am. Chem. Soc. 88, 1544 (1966).
166. Shinoda, J. Sato, S., Sato, D., Über Einen Bestandteil der Polygala tenuifolia. Chem. Ber. 65, 1219 (1932).
167. Shoji, J., Kawanishi, S., Tsukitani, Y., Constituents of Senegae Radix, I. Isolation and Quantitative Analysis of the Glycosides. Yakugaku Zasshi, 91, 198 (1971).
168. Idem, Structure of Senegin II of Polygala senega Root. Chem. Pharm. Bull. 19, 1740 (1971).
169. Idem., On the Structure of Senegin III., of Radix Senegae. Chem. Pharm. Bull. 20, 424 (1972).
170. Simonsen, J., Ross, W.C.J., Senegenin. The Terpenes. cilt 5, University Press, Cambridge (1957).
171. Simpson, J.C.E., The Constituents of Senega Root I. α -Spinasterol. J. Chem. Soc. 730 (1937).
172. Smith, C.R.Jr., Madrigal, R.V., Weisleder, D., Plattner, R.D., Polygala virgata Seed Oil A New Source of Acetotriglycerides. Lipids, 12, 736 (1977).
173. Snatzke, G., Lampert, F., Tschesche, R., Über Triterpen VIII. Zuordnung von Triterpenen zu den Grundtypen durch IR-Spektroskopie. Tetrahedron 18, 1417 (1962).
174. Stahl, E., Thin Layer Chromatography. George Allen and Unwin, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York. 2. baskı (1969).

175. Stefanovich, V.J., Concerning Thin Layer Electrophoresis of Carbohydrates. *J. Chromatogr.* 31, 466 (1967).
176. Stout, G.H., Fries, J.L., Polygalaxanthone A, A Revised Structure. *Tetrahedron*, 25, 5295 (1969).
177. Sweeley, C.C., Bentnley, R., Makita, M., Wells, W.W., GCL of Trimethylsilyl Derivatives of Sugars and Related Substances. *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2497 (1963).
178. Szilagyi, I., Hämolytische Wertbestimmung von Saponinen nach der Agardiffusions Methode. *Planta med.* 19, 42 (1970).
179. Takiura, K., Honda, S., Sugar Components of the Root of Polygala tenuifolia. *Yakugaku Zasshi*, 84, 1223 (1964).
180. Takiura, K., Yamamoto, M., Murata, H., Takai, H., Hondo, S., Yuki, H., Oligosaccharides 13. Oligosaccharides in Polygala senega and Structures of glycosyl-1,5- anhydro-D-glucitols. *ibid*, 94, 998 (1974).
181. Idem, Oligosaccharides 14. New Trisaccharides Found in Senega Root. *ibid*, 95, 166 (1975).
182. Toker, G., Bazı triterpenik Saponozitlerin ince Tabaka Kromatografisi ile Tanımı Üzerine Araştırmalar" Uzmanlık tezi. H.Ü. Sağlık Bilimleri Fak., Ankara (1977).
183. Tschesche, R., Forstmann, D., Musenin, Ein Wurm Wirksames Saponin Aus der Rinde von Albizzia anthelmintica. *Chem. Ber.* 90, 2383 (1957).
184. Tschesche, R., Gupta, A.K., Triterpenes VI. The Sapogenins of Bredemeyera floribunda. *Chem. Ber.* 93, 1903 (1960).
185. Tschesche, R., Henckel, E., Snatzke, G., Über Triterpene XIV. Die Konstitution von Bredemol-und Crataegolsäure. *Liebigs Ann. Chem.* 676, 175 (1964).
186. Tschesche, R., Wulff, G., Konstitution und Eigenschaften der Saponine. *Planta Med.* 12, 272 (1964).

187. Tschesche, R., Striegler, H., Triterpenes XVI. Identity of Tenuifolic Acid with Senegenin. *Naturwiss.* 52, 303 (1965).
188. Tschesche, R., Mercker, H.J., Wulff, G., Über Triterpene XXIV. Die Konstitution der Zuckerkette des Cyclamins. *Liebigs Ann. Chem.* 721, 194 (1969).
189. Tschesche, R., Rehkamper, H., Wulff, G., Über Triterpene XXVIII. Über die Saponine des Spinats. *Liebigs Ann. Chem.* 726, 125 (1969).
190. Tschesche, R., Wulff, G., Chemie und Biologie der Saponine. Zechmeister, L., Herz, W., Grisebach, H., Kirby, G.W., Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe, cilt 30, Springer Verlag, New York, Wien (1973).
191. Tsukitani, Y., Kawanishi, S., Shoji, J., Studies on the Constituents of Senegae Radix II. The Structure of Senegin II, A Saponin from Polygala senega L. var. latifolia Torr. et Gray. *Chem. Pharm. Bull.* 21, 791 (1973).
192. Tsukitani, Y., Shoji, J., Studies on the Constituents of Senegae Radix III. The Structure of Senegin-III and IV, Saponin from Polygala senega L. var. latifolia Torr et Gray. *Chem. Pharm. Bull.* 21, 1564 (1973).
193. Turner, D.W., Spectrophotometry in the Far-UV Region II. Absorption Spectra of Steroids and Triterpenoids. *J. Chem. Soc.* 30 (1959).
194. Van den Bossche, W., Vochten, R., Determination of Saponins: Spectrophotometric Determination of Senegin and Sapoalbin. *Sci. Pharm., Proc.* 25th 1, 375 (1965).
195. Van den Bossche, W., Chromatography and IR Spectra of Senegin and Senegenin. *Ibid*, 1, 381, (1965).
196. Idem, Preparation and Properties of Senegenin. *Pharm. Tijdschr. Belg.* 43, 157 (1966).

197. Van den Bossche, W., Ruysen, R., Composition of the Carbohydrate Moiety of Senegin, A Glycosidic Saponin from Polygala senega. Int. Symp. Chromatogr. Electrophoresis, 5th (1968), 546 (1969).
198. Vogel, I.A., A Textbook of Practical Organic Chemistry. Longman Group Ltd. 2. baskı (1970).
199. Wagner, J., Schlemmer, W., Hoffmann, H., Über Inshaltstoffe des Rosskastanien Samens IX. Structure und Eigenschaften der Triterpenglycoside. Arzneimittel-Forsch. 20, 205 (1970).
200. Wallenfels, K., Bechtler, G., Kuhn, R., Trischmann, H., Egge, H., Permethylierung von Oligomeren und Polymeren Kohlenhydraten und Quantitative Analyse der Spaltungs Produkte. Angew. Chem. 75, 1014 (1963).
201. Wallis, T.E., Textbook of Pharmacognosy, J. and A. Churchill, London (1967).
202. Wasicky, R., Wasicky, M., Polygala brasiliensis L., Eine Saponin reiche Polygala art Brasiliensis. Qual. Plant. et Mater. Veg. 8, 1 (1961).
203. Wedekind, E., Krecke, R., Über das Senegenin, das Endsapogenin aus R. Senegae. Chem. Ber. 57, 118 (1924).
204. Wettstein, R., Handbuch der Systematischen Botanik. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 2. baskı (1962).
205. Whistler, R.J., Durso, D.F., Chromatographic Separation of sugars on Charcoal, J. Am. Chem. Soc. 72, 677 (1950).
206. Whistler, R.L., BeMiller, J.N., Methods in Carbohydrate Chemistry, Academic Press, New York - London (1965).
207. Winkler, W., Patt, P., Zur Gewinnung Säurer Saponine durch Behandlung mit Ionenaustauschern. Naturwiss. 47, 83 (1960).
208. Winkler, W., Die Aescin Bestimmung in Rosskastanien Extrakten und in Extrakt bzw. Aescin Enthalten Zubereitungen. Arzneimittel - Forsch. 18, 1031 (1968).

209. Woitke, H.D., Kayser, J.P., Hiller, K., Fortschritte in der Erforschung der Triterpensaponine. Pharmazie, 25, 133 (1970).
210. Wolters, B., Die Verbreitung Antibiotischer Eigenschaften bei Saponinen Drogen. Dtsch. Apoth. Ztg. 106, 1729 (1966).
211. Wulff, G., Über die Quantitativen Zuckerbestimmung in Glykosiden und Oligosacchariden mit Hilfe der Gas Chromatographie. J. Chromatogr. 18, 285 (1965).
212. Idem, Neuere Ergebnisse auf dem Saponingebiet. Apoth.-Ztg. 108, 797 (1968).
213. Wulff, G., Tschesche, R., Über Triterpene XXVI. Über die Struktur der Rosskastaniensaponine und die Aglykone Verwandter Glykoside. Tetrahedron 25, 415 (1969).
214. Yosioka, I., Fujio, M., Osamura, M., Kitagawa, I., A Novel Cleavage Method of Saponins with Soil Bacteria, Intending to the Genuine Sapogenin. On Senega and Panax Saponins. Tetrahedron Letters, 6303 (1966).
215. Yosioka, I. et al., The Structure of Aescigenin and Protoaescigenin in Relation to the Sapogenols A and B: On the Configuration of Hydroxyl Groups in Ring E. Tetrahedron Letters, 637 (1967).
216. Yosioka, I., Imai, K., Kitagawa, I., On Genuine Sapogenins of Horse Chestnut Saponins by means of Soil Bacterial Hydrolysis and A New Sapogenin : 16-Desoxy-Barringtogenol-C. Tetrahedron Letters, 2577 (1967).
217. Yosioka, I., Imai K., Kitagawa, I., Sugawara, T., Soil Bacterial Hydrolysis Leading to Genuine Aglycone V. on Ginsenosides Rb1, Rb2 and Rc of the Ginseng Root Saponins. Chem. Pharm. Bull. 20, 2418, (1972).
218. Youngken, H.W. Textbook of Pharmacognosy. Blakiston, Philadelphia (1948).
219. Zervas, L., Papadimitriou, Über die Konstitution des Styra-cits. Umwandlung von Aldosen in Ketosen Ber. 73, 174 (1940).
220. Zervas, L., Zioudrou, C., Catalytic Reduction of Acetobromosugars. J. Chem. Sec. 214 (1956).

Ek - 1

Türkiye'de imal edilen ve çeşitli galenik şekillerde Polygala ihtiva eden preparatlar^a.

Arkodin (şurup): Efedrin 0,20 g, benzoat de soude 3g, acetata d'ammonium liq- uide 3 g, sirop de codein 50 g, sirop de Tolu 30 g, sirop de Polygala 25 g, sirop d'ecorce d'orange amere 14 g,

Diocodine (şurup) : Dionine 0,05 g, efedrin Hidroklorat 0,25 g, benzoat de sodium 5 g, extrait fluide te Thyme 10 g, sirop de Dessesartz 30 g, sirop de Polygala 30 g, sirop de Tolu 30 g, sirop de Violette 30 g,

Ekspektorin (şurup) : (150 ml de), benzoat de soude 3 g, extrait fluide de Baume de Tolu 6 g, extrait fluide de Polygala 3 g, extrafl. de Dessesartz 5 g, teint. de Drosera 1 g, acetate d' ammoniaque liquide 6 g, sirop simple 170 g,

Metekodin (şurup) : (150 g da), kodein 0,20 g, benzoat de soude 1 g, efed- rin hidroklorat 0,10 g, aminopirin 1,5 g, sirop de Polygala 20 g, sirop de reglisse 30 g, sirop de Tolu 25 g, sirop de Framboise 25 g, gliserin 15 g, alkol, eau aromat. q.s.p. 150 g,

Pulmobal (şurup) : benzoat de soude 2 g, bromure de potassium 2 g, sirop de Polygala 20 g, sirop de Tolu 15 g, sirop de Dessesartz 15 g, teint. de Drosera 3 g, teint. d'aconite 1 g, teint. de Canelle 3 g, eau de laurier cerise 2 g, alkol 10 g, gliserin 5 g, sirop simple q.s.p. 100 ml.

Tusso-B (şurup) : (15 ml), camphosulfonate de soude 0,30 g, efedrin 0,02 g, sulfaguaicolate de potasse 0,30 g, sirop de codeine 3,5 g, sirop Dessesartz 3,5 g, sirop de Polygala 3,5 g.

Tusso-K (şurup): (5 ml), benzoat de soude 0,15 g, bromure de potassium 0,10 g, sirop de Polygala 0,50 g, sirop de Dessesartz 1,00 g, sirop de Tolu 1,5 g, eau de laurier cerise 0,25, teint. de Drosera 0,05 g,

Ek - 2

Çeşitli ülkelerde imal edilen preparatlarda da, Polygala kök ve herba- larının değişik galenik şekilleri kullanılmaktadır. Bunlara bir örnek olarak B. Almanya'da imal edilen preparatlar incelenmiştir.^b

^a: E.İlkay, V.Tsiokonas, Türkiye Beşeri İlaçlar Kılavuzu 1977, İnkilap ve Aka Kitapevi, İstanbul (1977).

^b: Rote Liste 1969, Verzeichnis Pharmazeutischer Spezialpreparate, Editio Cantor, Aulendorf - Württ.,

- Capval (sirop) : 300 mg Narkotine muadil Narkotin - Resin, extr. Adhotodae vasicae fol. fld. 5 g, chloroform 240 mg, menthol 4 mg, Extr. Senegae fld. 0,4 g, Extr. Scillae fld. 0,3 g, Corrig ad. 100 ml.
- Tussiflorin - Saft (sirop) : Ol. Anisi, Causticum D2, Coprum D6 0,02 g, Teuc. Scorod. 0,00 g, Plantago major 0,1 g, Hypericum 0,3 g, Extr. fld. 1:1 aus: Flor, Stoechados, Herb. Polygalae amar. 0,9 g, Stipites dulcamarae 1,9 g, Herb. Polygoni avic. 3,2 g, Herb. Saniculae 1,8 g, Herb. Galeopsidis 2,3 g, Herb. Equiseti, R. Primulae aa 1 g, F. Farf., R. Liquiritiae, Herb. Millefolii aa 1,8 g, Corrig. ad. 200 g.
- Klüobronchial (damla) : Tinct. Senegae 0,02 g, Extr. fld. Thymi 0,15 g, Acid. benz. 0,004 g, Ol. Pini pum 0,008 g, Tinct. Pimpinellae 0,08 g, menthol 0,008 g, Ephedrin 0,008 g, Elix. e Succo. Liq., Aqua Foeniculi aa ad 15 g. Klüopect (sirop): Tinct. Senegae 0,2 g, Extr. Thymi fld. 0,2 g, Acid benzoic 0,006 g, Ol. pini pum. 0,01 g, Tinct. Pimpinellae 0,1 g, Menthol 0,01 g, Ephedrin 0,01 g, Elix. e Succ. Liq 10 g, Aqua Foeniculi 10 g, Sir. Thymi caps. ad. 100 g.
- Tussiflorin (damla) : Drosera D2, Hypericum D1, Plantago major D2 aa 1 g, Cuprum D6 0,1 g, Extr. fld. 1:1 aus: Herb. Millefolii 0,9 g, Flor. Stoechados, Herb. Polygalae amar. aa 0,45 g, Stipites Dulcamarae 0,95 g, Herb. Polygoni avic. 1,58 g, Herb. Saniculae 0,91 g, Herb. Galeopsidis 1, 11 g, Herb. Equiseti, Rad. Primulae aa 0,5 g, Fol Farf. , Rad. Liquiritiae aa 0,9 g, Corrig ad. 20 g.
- Novotussin (sirop) : Extr. Liquirit. e rad. fld. 0,15 g, Extr. Senegae fld. 0,5 g, Extr. Saponar. spir. sicc. 0,1 g, Extr. Primulae e rad. fld. 0,5 g, Extr. Thymi fld. 15 g, Ammon. chlorat 2 g, Ephedrin, hidrochlorat 1 g, Ol. Eucalypti 0,01 Anisi 0,01 g, Ol. Foeniculi 0,01 g, Extr. Plantaginis fld. 1 g, ad 100 g.
- Pectolitan (sirop) : Ephedrin hidrochlorat 0,1 g, Aminophenazon 0,1 g, Kal. Bromat 0,5 g, Kal. sulfaguajacol 1 g, Extr, Ipec. fld. 0,05 g, Extr. Senegae fld. 0,5 g, Extr. Primulae fld. 0,5 g, Sir. Thymi ad. 100 g.
- Makatussin (damla) : Extr. fld. Senegae 6 g, Coccionellae-Droserae 4 g, Liquir. 15 g, -Pimpinellae 6 g, -Thymi 18 g, Ephedrin hidrochlorat 0,7 g, Acid benzoic 0,5 g, Camphor-Menthol 2,3 g, Ol. Anisi 0,9 g, Ol. Eucalypti 0,6
- Makatussin forte (damla) : Makatussin Sirop + Dihidrocodein hidrochlorat 0,33 g/100 g.

Natursan (sirop) : 1 l 'de : Extr. Hederæ helicis spiss. 3 g, Extr. Cochleariæ arnoraciæ spiss 3 g, Extr. Petasitidis spiss. 2 g, Extr. Thymi spiss 5 g, Extr. Plantaginis spiss. 3 g, Extr. Humuli Lupuli spiss. 2 g, Extr. Menthae Pip. Spiss. 2 g, Extr. Ipecacuanhæ spiss. 0,1 g, Extr. Foeniculi spiss 2 g, Extr. Pimpinellæ spiss. 1 g, Extr. Senegæ spiss. 0,5 g, Ephedrin hydrochlorat 0,075 g, Acid ascorbic 2,5 g, Sorbitum 120 g, Meproester 8 g, Ansatzwein 500 g, Aqua demineralisata 350 g, Silphoscalin (tabletten) : Fr. Amni visn. plv. 2 mg, H. Ephedrae plv. 7 mg, H. Equiseti plv. 17 mg, H. Gaecopsidis plv. 4 mg, H. Polygoni aviculari plv. 11 mg, R. Primulae plv. 1 mg, R. Senegæ plv. 1 mg, S. Erucae plv. 20 mg, Calc. glucon. 4 mg, Calc. glycerino-phosphat 17 mg, Calc. phosphor. 92 mg, Carbo Tiliae 7 mg, Lithium benzoic 7 mg, Thymodrosin (sirop/damla) : Extr. Thymi fld. 5,25 g/13,5, -Plantaginis, -Eryngii plani, -Castaneae àà 0,2 g/2 g, -Droserae, -Violeae, -Primulae àà 0,13 g/1,3 g, -Pimpinellæ 0,06 g/0,7 g, -Gelsemii, -Galeopsidis, -Helenii aa 0,5 g/0,5 g, -Polygalæ, -Verbasci àà 0,03 g/0,3 g, -Salviae, -Salicis, -Saponariae àà 0,02 g/0,2 g, Ephedrin HCl -(0,4 g, Succ. Liquiritiæ -/9 g, Tinct. Pimpinellæ, glycerin àà -/13,5 g, sodium benzoicum 1 g/-.

İ N D E K S L E R

Şekiller

Sayfa No:

Şekil-1	<u>Polygala alba</u> -Polen	4
2	<u>Polygala pruinosa</u> Boiss. subsp. <u>pruinosa</u> J.Cullen	8
3	<u>Polygala pruinosa</u> Boiss. subsp. <u>pruinosa</u> J.Cullen	9
4	<u>P. pruinosa</u> subsp. <u>pruinosa</u> - çiçek ve meyva kısımları	10
5	<u>P. pruinosa</u> subsp. <u>pruinosa</u> J.Cullen	11
6	<u>P. pruinosa</u> subsp. <u>pruinosa</u> - Habitat	12
7	<u>P. pruinosa</u> subsp. <u>pruinosa</u> - Kök, Enine Kesit	15
8	<u>P. pruinosa</u> subsp. <u>pruinosa</u> - Kök, Tozu elementleri	16
9	Senegenin - A Halkasının Yapısı Üzerinde Öne Sürülen Şekil (140)	65
10	Senegenin - A Halkasının Yapısını Açıklamak Üzeri İleri Sürülen Şekiller (49,140)	68
11	Medikagenik asit	69
12	Senegenin, hidroksi-senegenin	69
13	Senegenik asit, senegenik asit etil esteri	70
14	Siklosenegenin	71
15	Senegin, Presenegenin ve Yan Ürünleri	72
16	Siklosenegenin'den Hidroksisenegenin ve senegenin Meydana Gelmesi	73
17	Presenegenin, Tenuifolin	74
18	Presenegenin'in Etanollü Hidroklorik Asit ile Değişimi	74
19	Temel Saponozit B'nin Yapısı (156)	76
20	Senegin - IV'ün Yapısının Aydınlatılmasında Takip Edilen Yol.	81

Şekil-21 Senegin - II (191)	82
22 Senegin - III (192)	83
23 Bredemolik asit (184)	87
24 Bredemolik asit (185)	88
25 Poligalasik Asit	91
26 Ana Saponozit 1'in Yapısı (17)	93
27 Poligarit (93)	94
28 Poligalitol	96
29 Stirasitol	96
30 <u>P. senega</u> var. <u>latifolia</u> - A Maddesi	100
31 <u>P. senega</u> var. <u>latifolia</u> - B Maddesi	100
32 <u>P. senega</u> var. <u>latifolia</u> - C Maddesi	100
33 Demetil - 4, dehidroksi - 7' - podofilotoksin	101
34 Sukilakton	102
35 Kisulakton	102
36 Kinensin	103
37 Helioksanin	103
38 Kinensinaftol	104
39 Poligalaksanton - A	106
40 Poligalaksanton - B	106
41 DREYER'in (48) <u>P. macradenia</u> 'dan İzole Ettiği ksantonlar	107
42 Ksanton - 5'in Muhtemel Yapısı	108
43 Madde - 2, 3, 4'ün Yapısı ve Özellikleri (89)	109
44 ANDRADE ve ark.'nın (7) İzole Ettikleri Ksantonlar	110
45 GHOSAL ve ark.'nın (72) <u>P. arillata</u> 'dan İzole Ettik- leri Ksantonlar	111

Şekil-46 Ksanton - 5	111
47 p-Kumarik asit, p- Metoksisinamik Asit, Kafeik Asit, Ferulik Asit, Sinapik Asit, 3,4,5 - Trimetoksisini- amik Asit	117
48 Pl Saponozitinin IR Spektrumu	167
49 Aglikonun IR Spektrumu	168
50 Presenegenin'in IR Spektrumu	169
51 Presenegenin Dimetilester Triasetat'ın Kütle Spekt- rumu	169
52 Presenegenin'in Retro Diels-Alder Parçalanması ile Meydana Gelen İyonlar	170
53 Pl Saponozitinin Silürlenmiş Ozlarının Gaz Kromo- togramı	172
54 Sapogenin-3-0-Monodesmozit-Silürlenmiş Ozlarının Gaz Kromotogramı	172
55 Sapogenin-3-0 -Monodesmozitin IR Spektrumu	173
56 Permetillenmiş Pl Saponozitin IR Spektrumu	174
57 Permetillenmiş Pl Saponozitinin Kütle Spektrumu	174
58 Permetillenmiş Pl Saponozitinin Aglikonundan Mey- dana Gelen İyonlar	175
59 p- Metoksisinamik Asidin IR Spektrumu	179
60 Sentetik p- Metoksisinamik Asidin IR Spektrumu	180
61 p- Metoksisinamik Asidin Kütle Spektrumu	180
62 Poligalitol'ün IR- Spektrumu	181
63 Poligalitol'ün Kütle - Spektrumu	182
64 (Pl) Saponozitinin Muhtemel Yapısı	187

T A B L O L A R

	<u>Sayfa No:</u>
Tablo-1 Steroidal Saponozitlerin Sınıflandırılması	20
2 Triterpenik Aglikon Tipleri	22
3 Triterpenik Saponozit Tipleri	25
4 Saponozitlerin Yapı Tayinlerinde Takip Edilecek Genel Yol	37
5 <u>Polygala amara</u> ve <u>P. senega</u> 'nin Antifungal Aktiviteleri (210)	56
6 <u>P. senega</u> 'dan Elde Edilen Saponozitlerin Nezle Virüsü Üzerindeki Antiviral Etkiler (139)	57
7 <u>Polygalaceae</u> Familyası Bitkilerinin Değişik Yörelerde Kullanılışı ve Etkileri	58
8 BUSSY, QUEVENNE, ve BOLLEY'in <u>P. senega</u> Saponoziti Üzerinde Yaptıkları Çalışmaların Sonuçları	62
9 JACOBS ve ISLER'in Elde Ettikleri Sapogenollerin Özellikleri (90)	64
10 IRWIN'in İzole Ettiği Maddelerin Özellikleri (88)	66
11 Saponozit - A, B, C, D' nin Özellikleri (2)	78
12 Senegin II, III, IV' ün Özellikleri (167)	79
13 <u>P. senega</u> var <u>typica</u> Saponozitler (16)	84
14 <u>R. Senega</u> - DAB 6 ile Bazı <u>Polygala</u> Türlerinin Saponozitlerinin Özelliklerinin Karşılaştırması (16)	85
15 Tenuigenin A ve B'nin Özellikleri (24)	86
16 <u>P. vulgaris</u> - Bitkinin Değişik Kısımlarında Bulunan Oz ve Oligoholozitler (93)	97

Tablo-17	<u>P. senega</u> var. <u>latifolia</u> - Köklerin Taşıdığı Redüktör Oz ve Oligoholozitlerin Aktif Kömür Kolonlarda Ayırımı (181)	99
18	Poligalaksanton - A ve B' nin Özellikleri (122)	105
19	<u>P. senega</u> Köklerinden İzole Edilen Polifenollerin Alkali Hidroliz Ürünleri (27)	116
20	Araştırmada Kullanılan Solvan Sistemleri ve Adsorbanlar	126
21	Saponozit Karışımının İnce Tabaka Kromatografisi	129
22	Ozların Kağıt Kromatografisi	142
23	Metillenmiş Ozların Ayırımında Kullanılan Solvan Sistemleri	151
24	Metil Ozların R_G - Değerleri	152
25	Saponozit Karışımının İnce Tabaka Kromatografisi	166
26	Pl Saponozitinin Taşıdığı Ozlar	171
27	Pl Saponozitinin Taşıdığı Ozlar ve Molar Oranları	171
28	Metil Ozların İnce Tabaka Kromatografisi	176
29	Bazı <u>Polygala</u> Türlerinin Hemolitik İndekslerinin Karşılaştırılması	184

HAYAT HİKAYESİ

1949 yılında Zonguldak'ta doğdum. İlk öğrenimimi Zonguldak'ta, Orta öğrenimimi Ankara Deneme Lisesinde yaptım. 1967 yılında Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesine girdim. 1972 yılında, yüksek lisans derecesi ile, mezun oldum. Aynı yıl, aynı fakültenin Farmakognози Bilim Dalına asistan olarak girdim. Halen aynı görevi yapmaktayım 1975 yılında evlendim, bir kız çocuğu babasıyım.

