

278899

T.C.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

Saponaria kotschy BOISS.
ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR

DOKTORA TEZİ

FARMAKOGNOZİ PROGRAMI

Eczacı
İhsan ÇALIŞ

ANKARA - 1977

T.C.
HACETTEPE UNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

Saponaria kotschy BOISS.
ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR

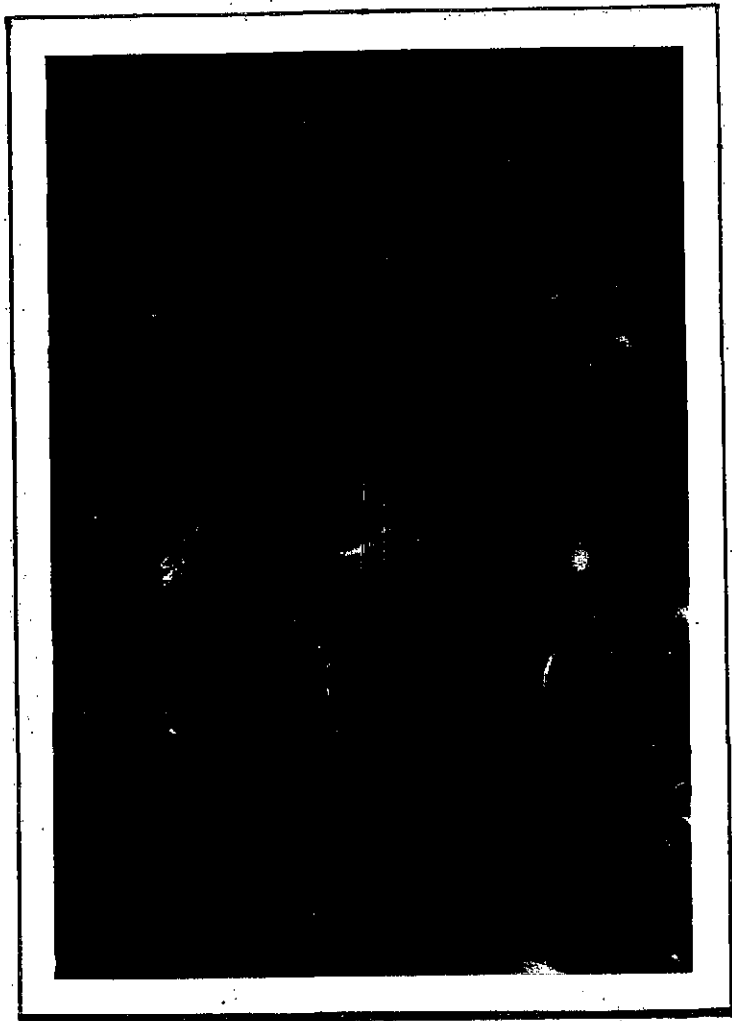
DOKTORA TEZİ
FARMAKOGNOZİ PROGRAMI

Eczacı

İhsan ÇALIŞ

Rehber Öğretim Üyesi
Doç. Dr. Ekrem SEZİK

ANKARA - 1977



Saponaria kotschyi Boiss.

Başlangıçtan bugüne kadar çalışmalarımın her safhasında, her türlü bilgi ve yardımlarından yararlandığım değerli hocam Doç. Dr. Ekrem SEZİK'e teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışma arkadaşlarıma, başta Dr. Akın ÇUBUKÇU olmak üzere, çalışmalarım sırasında gösterdikleri yakın ilgi, yardım ve anlayışlarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Gaz kromatografik ve kütle spektrofotometrik çalışmaların yapılmasına imkan sağlayan Dr. Hüseyin ANIL ve Prof. Dr. Tetsuya KOMORI'ye ; IR ve kütle spektrumlarının değerlendirilmesi için kıymetli zamanını ayıran sayın Prof. Dr. Ayhan ULUBELEN'e teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No.</u>
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
BOTANİK BÖLÜM	
<u>Caryophyllaceae</u> Familyası	3
<u>Saponaria</u> Cinsi	4
<u>Saponaria kotschyi</u> Boiss.	5
Yayıllışı	7
Kök Morfolojisi	8
Kök Anatomisi	8
KİMYASAL BÖLÜM - TEORİK BİLGİLER	
Saponozitler	11
I. Steroidal Saponozitler	14
A. Spirostanol Saponozitleri	15
B. Furostanol Saponozitleri	16
C. Nuatigenin Saponozitleri	17
D. Polipodo Saponozitleri	17
II. Triterpenik Saponozitler	18
A. Monodesmozidik Saponozitler	
1. Nötral Saponozitler	21
2. Ester Saponozitler	22
3. Asidik Saponozitler	23
4. Açıl Saponozitler	26
B. Bisdesmozidik Saponozitler	
1. Nötral Bisdesmozidikler	27
2. Asidik Bisdesmozidikler	27
C. Hayvansal Saponozitler	28
Yapı Tayinleri	
Genel	30
Total Hidroliz	31
Kısmî Hidroliz	37
Permetilleme	38
Ozlar Arasındaki Bağların Durumu	42
Kütle Spektrometresi	42

	<u>Sayfa No.</u>
<u>Caryophyllaceae Saponozitleri</u>	44
<u>Saponaria officinalis</u>	
Genel	47
Saponozitlerle ilgili Çalışmalar	48
Oligoholozitlerle ilgili Çalışmalar	56
KİMYASAL BÖLÜM - PRATİK ÇALIŞMALAR	
MATERYEL	58
YÖNTEM	59
Köpürme İndeksi	60
Hemoliz İndeksi	61
Saponozitler	
Genel	63
Ekstraksiyon	63
Tanım	66
İzolasyon	68
Yapı Tayini	70
Total Hidroliz	71
Aglikonun Elde Edilmesi Ve Tanımı	71
Oz Zincirinin Yapısı	73
Zayıf Asit Hidroliz	76
Alkali Hidroliz	77
Metilleme	81
Şahit Olarak Kullanılan Metillenmiş Ozların Hazırlanması	83
Permetilleme Ürünlerinin Kolon Kromatografik Ayırımı ..	88
Aglikonun Hidroksil Grubuna Bağlı Metillenmiş Ozlar ...	89
Aglikonun Karboksil Grubuna Bağlı Metillenmiş Ozlar ..	91
Kütle Spektrometrik Çalışmalar	93
BULGULAR	94
SONUÇ VE TARTIŞMA	115
ÖZET	119
SUMMARY	121
LİTERATÜR	124

G İ R İ Ş V E A M A Ç

Türkiye, triterpenik yapıda saponozit taşıyan bitkiler yönünden zengindir. Caryophyllaceae familyası, 32 cins ve 500'e yakın türle floranın en yaygın ve en zengin topluluklarından biridir (42). Saponaria, familyanın çok sayıda türü bulunan ve yaygın olan cinslerindedir. Buna karşılık, Saponaria türleri üzerinde Türkiye'de herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Diğer ülkelerde yapılan araştırmalar da, hemen hemen sadece S. officinalis üzerinde yoğunlaşmıştır.

Türkiye'de yedi tane iki veya çok yıllık Saponaria türü bulunur: S. officinalis L., S. pumilio Boiss., S. pamphylica Boiss.&Heldr., S. pinetorum Hedge, S. prostrata Willd., S. glutinosa Bieb., S. kotschyi Boiss.

S. officinalis üzerinde yeterli araştırmalar yapılmıştır. Bu yüzden tekrar araştırmaya lüzum görülmemiştir. S. kotschyi, Anadolu'da Antalya, Burdur, Isparta, Konya ve İçel bölgelerinde yaygın olarak yetişen, 2 yıllık, gelişmiş kök sistemine sahip endemik bir türdür. Büyük topluluklar halinde bulunmaktadır. Diğer türler dar bir alanda yetişir (S. pamphylica, S. pinetorum), bazıları çok küçüktür

(S. pumilio). S. prostrata'nın ise 3 alt türü bulunmaktadır: prostrata, anatolica, calvertii. Yaygın olan alttürün (prostrata) 1 ve 2 yıllık fertlerinin karışık olarak bulunması, kimyasal yapı bakımından farklılıklara sebep olabileceği için, bu tür de araştırmamızın konusu dışında bırakılmıştır.

Böylece, saponozitleri bakımından araştırılmaya en uygun türün S. kotschyi olduğu tespit edildi. Diğer taraftan, ön çalışmalarımız bitkinin köklerinin uygun oranda (62) saponozit taşıdığını gösterdi.

Farmakognozik araştırmalarımızda, köklerin taşıdığı ana saponozitin yapısını tayin etmek esas gaye olmuştur. Bunun yanında, S. kotschyi bitkisinin botanik, köklerinin anatomik özellikleri, kök ve köklerden elde edilen ham saponozitin fizikokimyasal özellikleri de incelenmiştir.

BOTANİK BÖLÜM

B O T A N İ K B Ö L Ü M

Caryophyllaceae Familyası

Otsu, çoğunlukla çalimsı bitkiler. Yapraklar genellikle karşılıklı, basit, tam, bazı türlerde stipulalı (Telephium, Spergula) çoğunlukla stipulasız (Scleranthus, Arenaria, Silene, Gypsophilla, Dianthus ve Saponaria). Çiçekler aktinomorf, genellikle hermafrodit, Dianthus türlerindeki gibi tek tek veya simoz durumlarda. Sepaller 4 - 5, serbest veya tubulat. Petaller 4 - 5, bazen eksik (Ortegia), serbest, genellikle tırnaklı veya iç yüzeylerinde çıkıntılar (ligula = koronal pulcuk) bulunur. Stamen 3 - 10, bazen yok. Ovaryum üst durumlu, 1 gözlü veya tabanda 2 - 5 göze bölünmüş. Plasentasyon serbest sentral, ovüller çok sayıda, nadiren birkaç tane. Petaller, stamenler ve ovaryum genellikle bir karpofor üzerinde çıkmış, nadiren perigin. Stilus 2 - 5, serbest veya kısmen birleşik. Meyva kapsula, bakka veya aken, kapsulalar dış veya kapakla açılan ya da düzensiz kırılan, dış veya kapak sayısı stilus veya stilusun 2 katı sayıda. Tohumlar 1 veya çok sayıda (42, 160).

Saponaria Cinsi

Yıllık, iki yıllık veya çok yıllık otsu bitkiler. Çıplak veya tüylü. Yapraklar basit, tam. Çiçek durumu simoz, panikula veya kapitulum. Kaliks braktesiz, tubulat, 15 - 25 damarlı, damarlar arası bazen birleşik. Petaller 5, kaliksdan kısa veya uzun, genellikle pembe renkli bir lamina ile kaliks içinde kalan renksiz bir tırnak kısmından meydana gelmiş. Bazen laminanın tırnakla birleştiği yerde koronal pullu. Stamen 10. Ovaryum, çok sayıda, ender olarak birkaç ovüllü. Stilus 2, serbest. Meyve, oblongdan ovata kadar değişen, üstten 4 kısa kapak veya dişle açılan kapsula. Tohumlar birkaç tane veya çok sayıda, reniform, yassı, yüzeyi pürtüklü (16, 42, 160). Türkiye'de şimdiye kadar tespit edilen tür sayısı 18'dir (42).



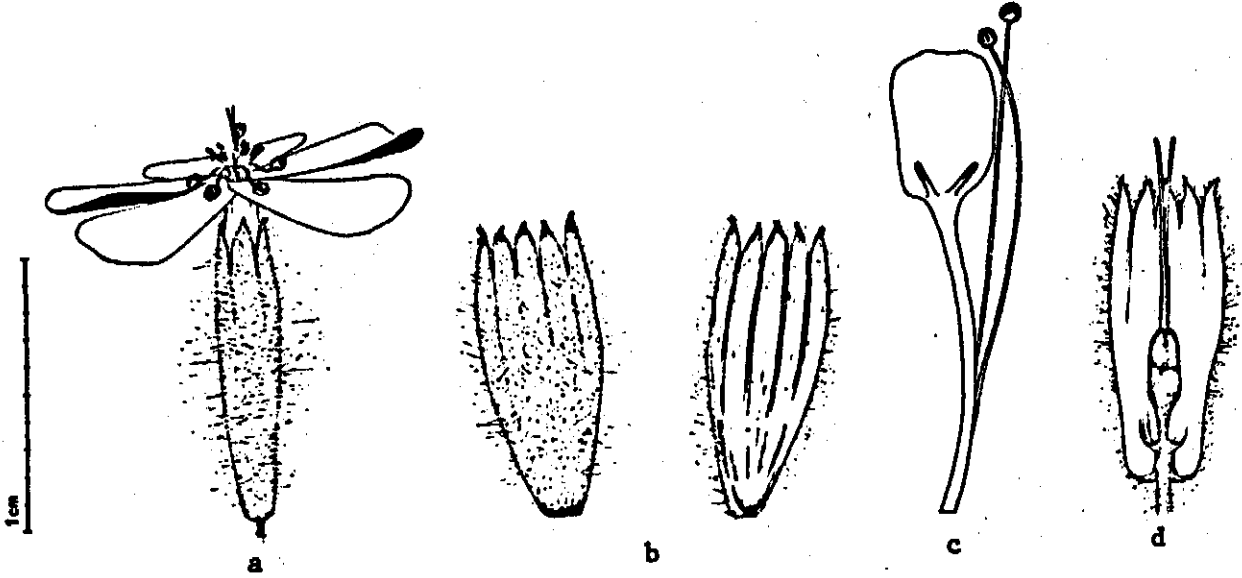
Şekil - 1

Saponaria kotschyi Boiss.

Saponaria kotschyi Boiss.

Syn: S. intricata Freyn.

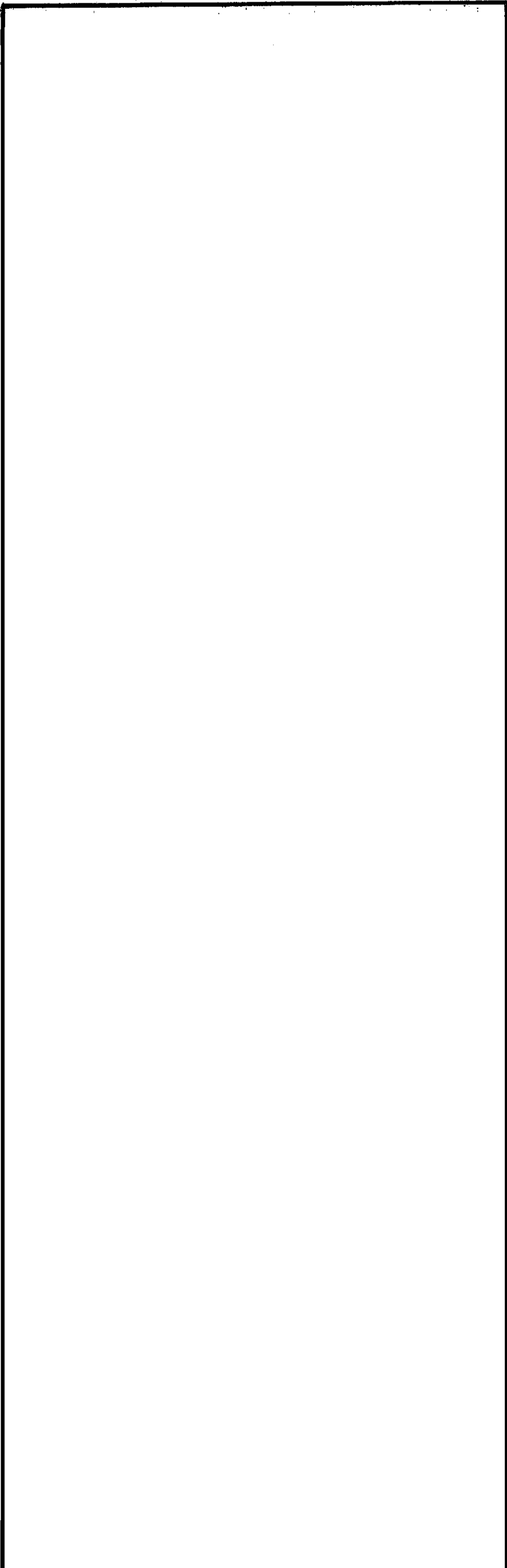
Yıllık veya iki yıllık otsu bitkiler. Gövde tabandan başlayarak dikotom dallanmış, örtü ve salgı tüyleri ile kaplı, tüyler tabanda kısa ve seyrek, üst kısımlarda uzun, sık ve salgı tüyleriyle birlikte (Şekil 1,3). Dallar yaygın ve uçlarda yükselici. Taban yaprakları petiolat, çıplak, obovattan spatulata kadar; üst yapraklar sapsız, sık tüylü, oblongdan eliptike kadar değişir. Korimbus çok çiçekli. Pediseller 2 - 4 mm, dik. Kaliks 9 - 12 mm boyunda, dar silindirik, 5 kısa akut dişli, yüzeyi sık örtü ve salgı tüyleri ile kaplı (Şekil - 2b). Korolla 5 ayrı petalli, pembe renkli. Petaller tam, obovat bir lamina ile kaliks içinde kalan beyaz renkli ince uzun bir tırnaktan meydana gelmiş, tırnakla laminanın birleştiği yerde iki koronal çıkıntı bulunur (Şekil - 2c). Stamen 10, filamentler kaliksin dışında. Ovaryum üst durumda, bir karpofor üzerinde (Şekil - 2d). Meyve, dar uzun oblong bir kapsula. Tohumlar 1 - 2 (16, 17, 42).



Şekil - 2

S. kotschyi Çiçek Kısımları

- (a) Çiçek, (b) Kaliks, İçten ve Dıştan Görünüşü,
(c) Petal, Stamenlerle Birlikte, (d) Ovaryum.

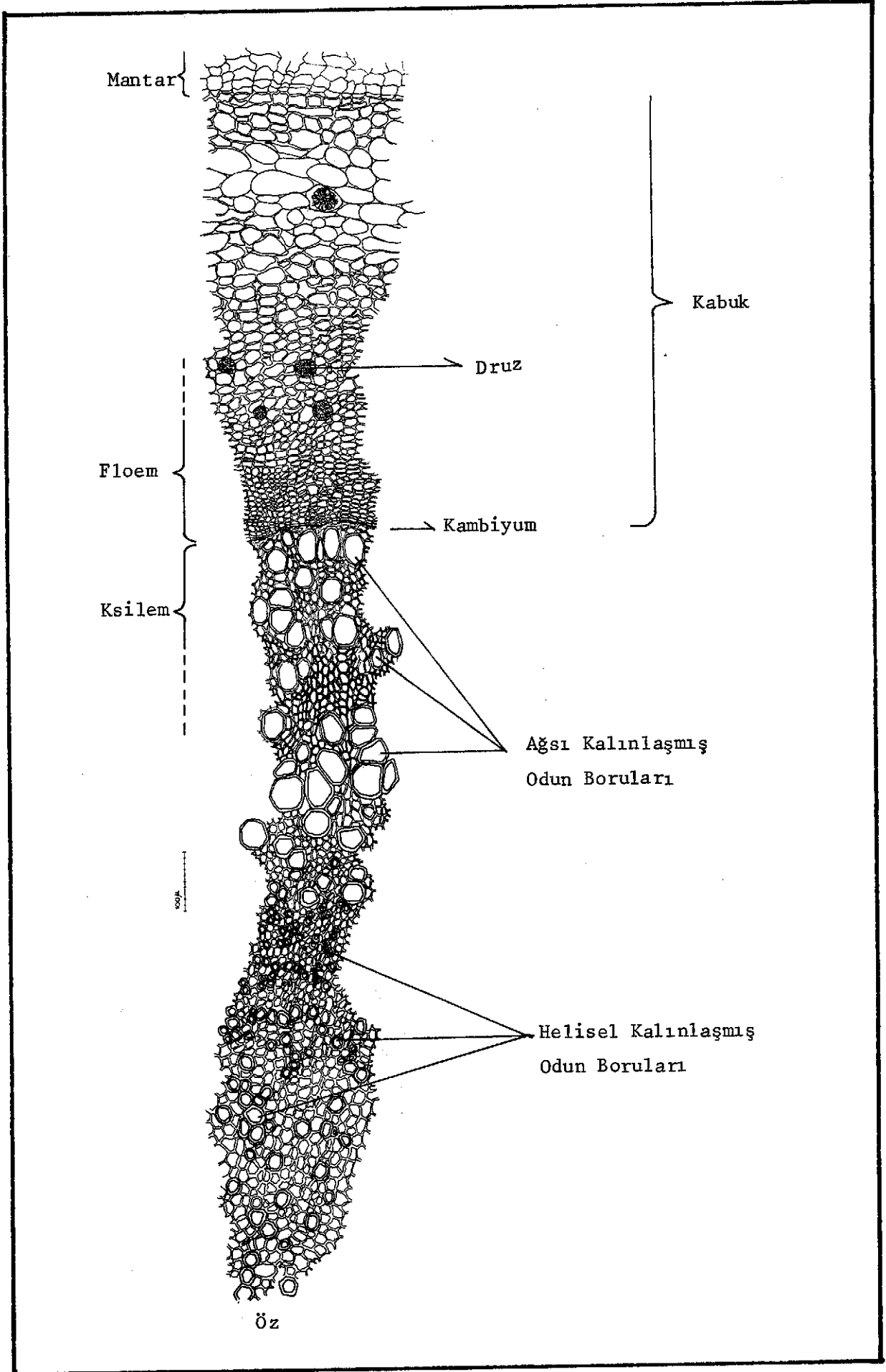


Kök Morfolojisi

Sarımsı kahverengi, ince uzun, 10 - 15 cm uzunluğunda, üstte 2 - 5 mm çapında, kazık kök, yan kök izleri taşır. Topraktan çıkarıldığında çok esnek, kuruyunca kolayca kırılabilir, üzeri boyuna buruşuklu. Yüzeyinde yer yer burulmalar görülür. Kırılma yüzeyi düz. Dışta ince bir mantar tabakası, altında beyaz renkli bir kabuk bölgesi, kambiyum ve sarı renkli merkezi silindir ayırt edilir. Gövdeye yakın yerlerde öz genellikle boş.

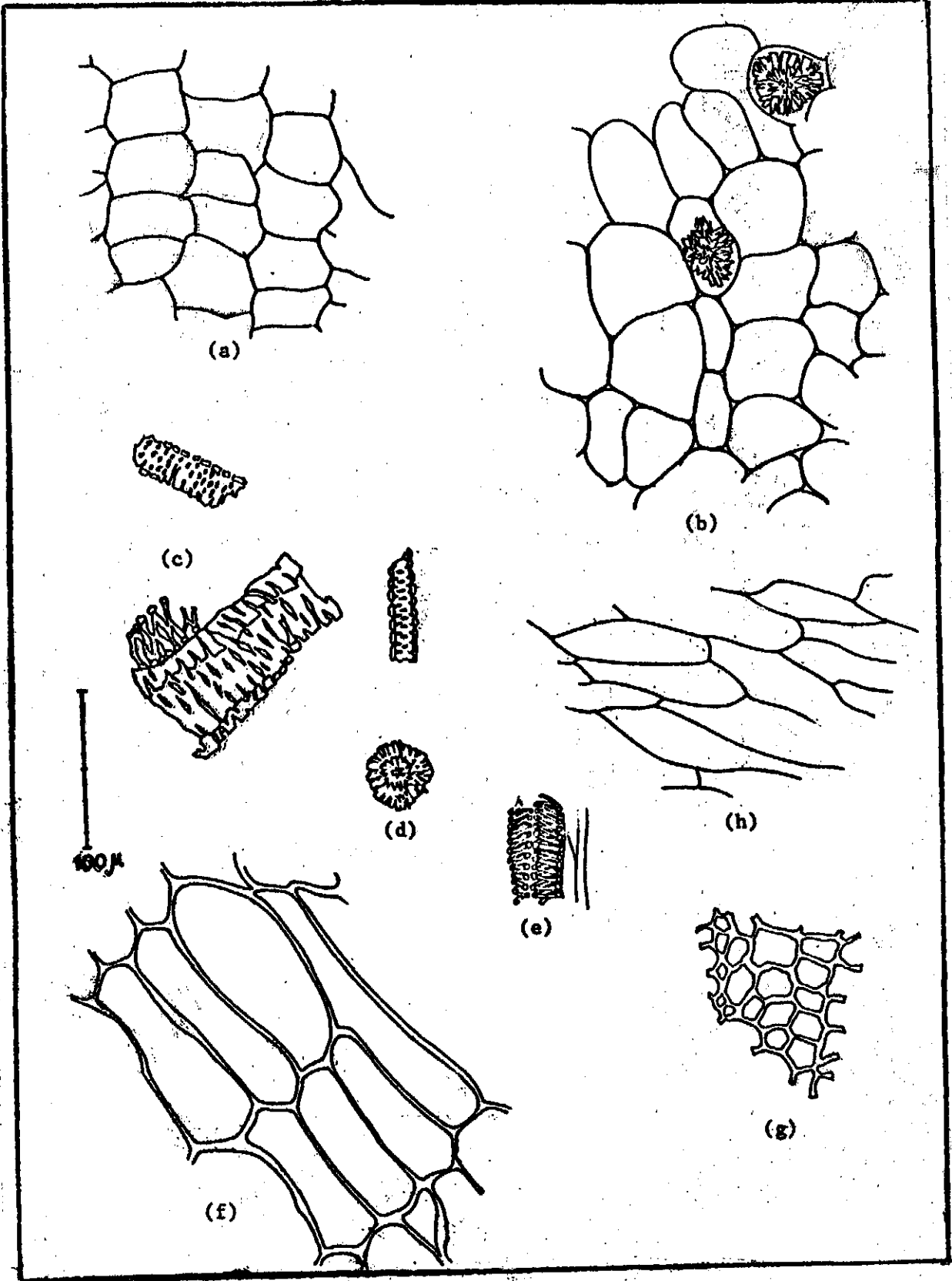
Kök Anatomisi

Enine kesitte (Şekil - 5) 50-120 μ kalınlığında, köşeli hücrelerden meydana gelmiş birkaç sıralı mantar tabakası görülür. Kabuk parenkiması hücreleri selülozik kalınlaşmış. Druzarlar 30-40 μ büyüklüğünde, parenkima hücreleri içinde, seyrek. Kambiyum yer yer ezilmiş. 30-50 μ çapında, ağsı kalınlaşmış odun boruları birleşerek merkezi silindiri meydana getirmiş. Merkezi silindirin altında, öze doğru cidarları selülozik kalınlaşmış hücreler görülür. Bu bölgede bulunan odun boruları helisel kalınlaşmış, dağınık. Gövdeye yakın kısımlarda öz boş. Nişasta ve öz kolları yok.



Şekil-5

Saponaria kotschy Boiss.-Kök, Enine Kesit



Şekil-6

Saponaria kotschyi Boiss. - Kök Tozu Elementleri

(a) Mantar, (b) Druz Taşıyan Parenkima Hücreleri, (c) Ağısı Kalınlaşmış Odun Borusu, (d) Druz, (e) Helisel Kalınlaşmış Odun Borusu, (f) Çeperleri Selülozik Kalınlaşmış Hücreler, (g) Çeperleri Odunlaşmış Hücreler, (h) Parenkima Hücreleri.

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

Sudaki çözeltileri çalkalandığı zaman kalıcı bir köpük meydana getiren, genellikle hemolitik etkiye sahip, nötral veya hafif asidik karakterli O-heterozitleridir. Mukozayı tahriş ettiklerinden dolayı aksırtıcı özelliktedirler. Kolesterol ile kompleks yaparlar. Hemolitik etkileri, kolesterol ile birleşerek alyuvarların çeperini hemoglobine karşı permeabl hale getirmelerinden dolayıdır (129, 157). Barsakta absorbe olmadıkları için bu tesir ağızdan alındıklarında görülmez. Soğuk kanlı hayvanlar özellikle balıklar üzerinde toksik etkileri vardır. Antibiyotik ve fungusit etkidedirler (59, 158, 168 -170, 172). Amorf, kokusuz ve renksizdirler. Su, etanol ve metanol gibi polar çözücülerde çözünür, oksijensiz çözücülerde pratik olarak çözünmezler. Polarizlenmiş ışığı etkilerler. Erime alanları genellikle yüksektir (200 - 350° C).

Bitkiler aleminde çok yaygındırlar. Orta Asya ve Güney Kazakistan bitkileri üzerinde yapılan sistematik bir araştırmada, 104 familyanın 1730 türü araştırılmış, 627 triterpenik ve 127 steroidal saponozit bulunduğu gösterilmiştir. Araştırılan familyalardan yetmiş dokuzunun saponozit taşıdığı (% 75,9), saponozit miktarının % 0,1 ile % 30 arasında değişen oranlarda bulunduğu belirtilmiştir. Araştırma sonucu, saponozit taşıyan bitkiler üzerinde yapılacak daha ileri çalışmaların Caryophyllaceae, Primulaceae, Iridaceae, Liliaceae, Umbelliferae, Scrophulariaceae, Solanaceae, Boraginaceae, Zygophyllaceae, Leguminosae, Ranunculaceae ve Labiatae familyaları bitkilerinde yapılmasının uygun olacağı ileri sürülmüştür (54). Son on yıldır yapılan araştırmalar, deniz hayvanlarında da saponozit bulunduğunu göstermektedir (127,128).

Heterozit yapısında olan saponozitler, hidroliz edildikleri zaman bir veya daha fazla sayıda oz ünitesi yanında, polisiklik halka sisteminden türemiş sapogenin (sapogenol) olarak adlandırılan bir aglikona parçalanırlar.

Oz kısımlarında D-glikoz, D-galaktoz, L-arabinoz, D-ksiloz, D-fukoz, L-ramnoz, D-kinovoz, D-glikuronik asit, D-galakturonik asit ve riboz bulunmuştur (11, 59, 158, 167, 172).

Saponozitlerin aglikonu steroidal veya triterpeniktir. Başlangıçtan bu güne kadar yapılan sınıflandırmalarda, ilk büyük grup ayırımında aglikonların yapısı gözönüne alınmıştır (59, 157, 158, 172). İlk sınıflandırmalarda, bugün glikoalkaloit olarak ayrı bir grupta incelenen steroidal alkaloitler de yer almıştır (59, 172). Halen, başlıca iki grup altında (11, 158) incelenmektedirler: Steroidal ve triterpenik saponozitler.

Bu kısımda, saponozitlere ait genel bilgiler, triterpenik olanlara ağırlık verilerek kısaca incelenecektir. Saponozitler aşağıdaki gibi sınıflandırılırlar:

I. Steroidal saponozitler

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

II. Triterpenik Saponozitler

A. Monodesmozidikler

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

a. Uronik Asit Taşıyanlar

b. Asit Aglikonlu Saponozitler

c. Aglikonu Asidik Olan ve Uronik asit taşıyan Saponozitler.

4. Açıl Saponozitler (Açilozitler)

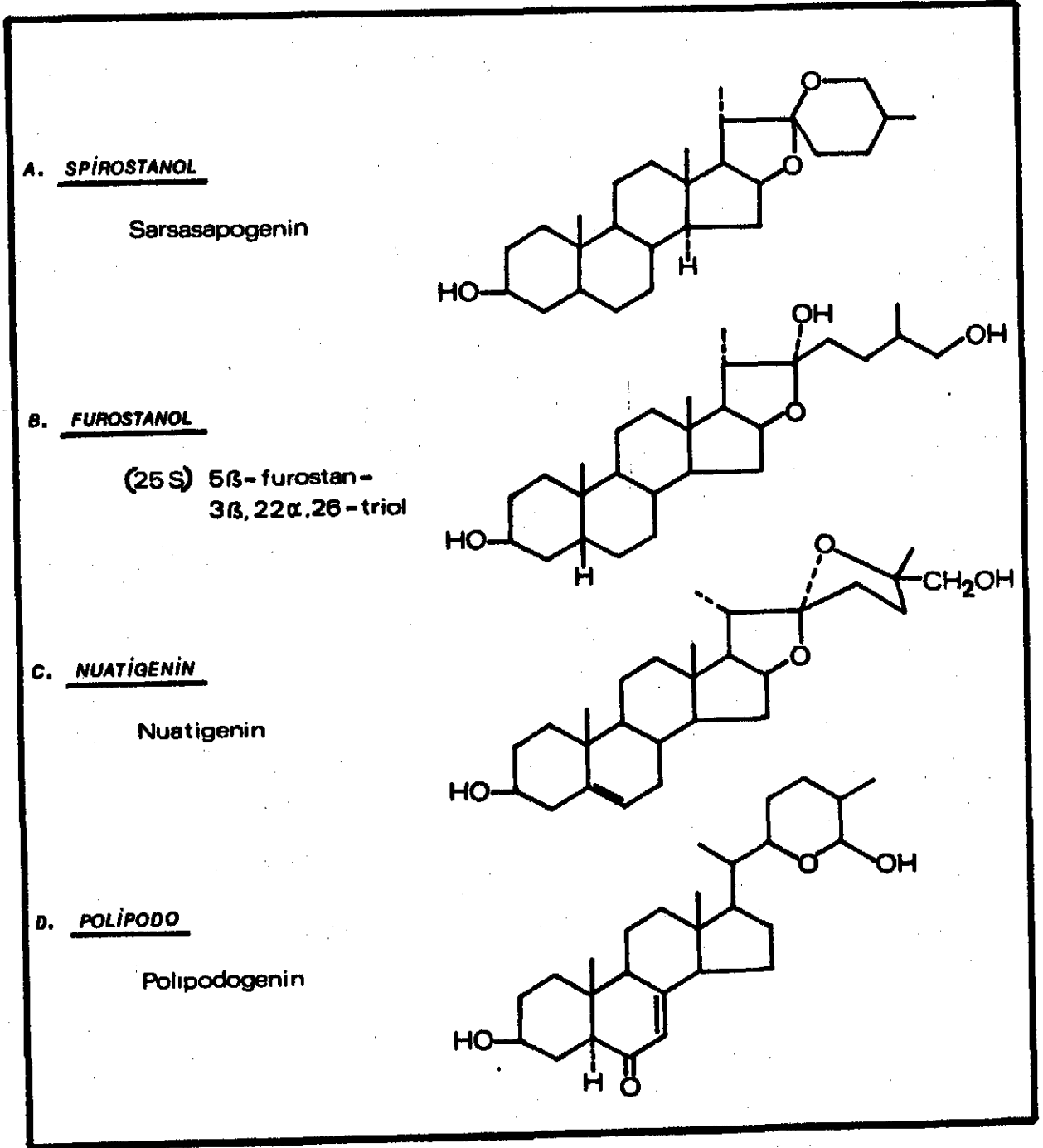
B. Bisdesmozidikler

- 1. Nötral Bisdesmozidikler
- 2. Asidik Bisdesmozidikler

C. Hayvansal Saponozitler

I. Steroidal Saponozitler

Liliaceae, Dioscoreaceae ve Amaryllidaceae gibi monokotil bitkilerin bulunduğu familyalarda yaygındırlar (18). Aglikonlarına göre başlıca dört grupta incelenmektedirler (Tablo - 1) (158).



Tablo - 1

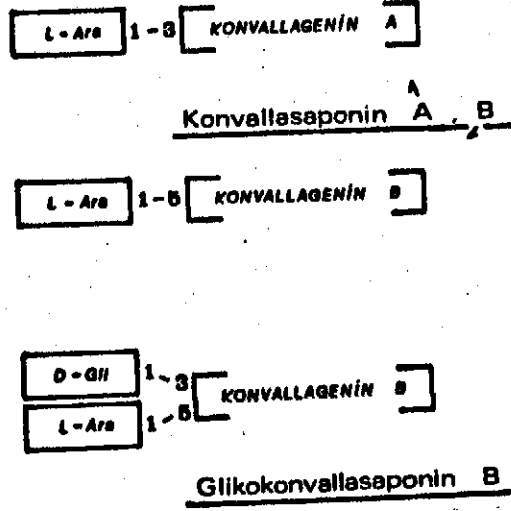
Steroid al Saponozitlerin Sınıflandırılması

A. Spirostanol Saponozitleri: Bilinen aglikonlar arasında 90 dan fazla spirostanol tipi vardır. Bunlardan bazıları TABLO - 2 de gösterilmiştir. Heterozit, en çok 3. (C) daki hidroksil grubu üzerinden meydana gelmektedir (Tablo - 2). Bu gruba heksozlar veya pentozlar bağlanır. Bu güne kadar en çok 5 oz taşıyanlarına rastlanmıştır. Bazı heterozitlerde, 3. (C) yerine 1., 2., 5., 6. veya 11.(C) da bulunan hidroksil grupları üzerinden ozlar bağlanır. Aglikonun iki hidroksil grubu üzerinden, ozların iki zincir halinde bağlı olduğu saponozitler de vardır (77) (Şekil - 7). Bu bağlanma şekil olarak bisdesmozidiktir. Bununla beraber, her iki oz zincirinin bağlı olduğu hidroksil grupları A ve B halkalarında olursa, yapı monodesmozidik olarak kabul edilir (158).

Spirostanol Aglikon	Konfigürasyon				
	C(25)	C(5)	OH	C≡O	cift bağ
Sarsasapogenin	S	β	3β	-	-
Diosgenin	R	-	3β	-	5
Digitogenin	R	α	2α, 3β, 15β	-	-
Gitogenin	R	α	2α, 3β	-	-
Yonogenin	R	β	2α, 3β	-	-
Konvallagenin-A	S	β	1β, 3α, 5β	-	-
Konvallagenin-B	S	β	1β, 3β, 4β, 5β	-	-
Hekogenin	R	α	3β	12	-

Tablo - 2

Spirostanol Aglikonlar

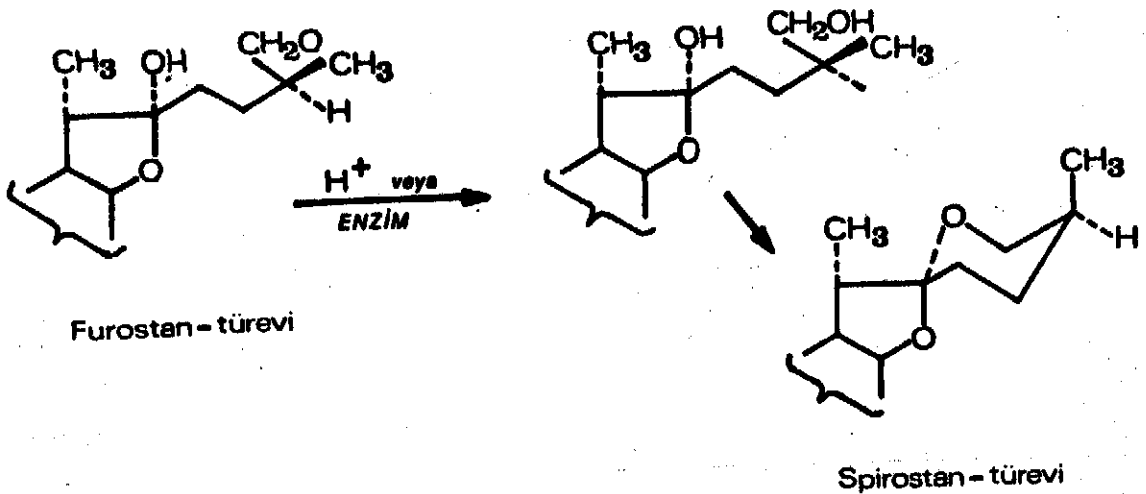


Şekil - 7

Spirostanol Saponozitleri

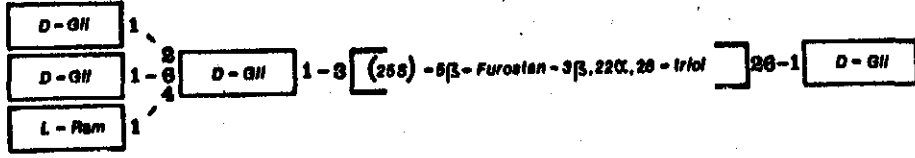
(Gli) Glikoz, (Ara) Arabinoz

B. Furostanol Saponozitleri : Spirostanollerin F halkalarının açılması ile meydana gelen steroidal bir aglikon taşırlar. Spirostanollerden farklı olarak 26. (C) da bir oz bulunur. Yapılan araştırmalar, bu ozun genellikle D-glikoz olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, furostanol saponozitleri bisdesmozidiktir. Asidik veya enzimatik hidrolizle D-glikoz aglikondan ayrılırsa, halka kapanması sonucu monodesmozidik spirostanol saponozitlerine dönüşürler (Şekil - 8)(172). Bu gruptan tanınmış bir madde sarsaparillozittir (Şekil - 9) (150).



Şekil - 8

Furostanol Türevi Saponozitlerin Hidrolizi

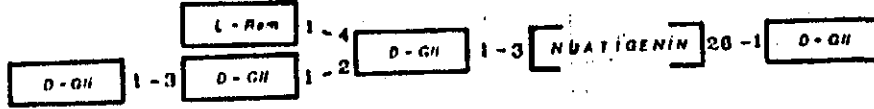


Şekil - 9.

Sarsaparillozit

(Gli) Glikoz, (Ram) Ramnoz

C. N u a t i g e n i n S a p o n o z i t l e r i : Bu grup saponozitlerde F halkası beşlidir. 26.(C) da bir hidroksil grubu vardır. İlk olarak Solanum sisymbriifolium'dan izole edilmiştir (153). Avena sativa'dan izole edilen, bisdesmozidik yapıda olan avenakozit B, bu grup saponozitlere örnek olarak gösterilebilir (Şekil 10) (149).

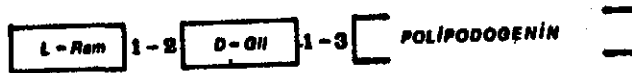


Şekil - 10

Avenakozit B

(Ram) Ramnoz, (Gli) Glikoz

D. P o l i p o d o S a p o n o z i t l e r i : İlk olarak Polypodium vulgare rizomlarından elde edilmiştir (66). Yeni bir saponozit tipi olarak kabul edilen yapı, kolesterolün 8 (C) atomlu yan zincirinin siklo-yarıasetal-altılı halka meydana getirmesiyle türemişlerdir (şekil - 11).



Şekil - 11

Polipodosaponin

(Ram) Ramnoz, (Gli) Glikoz

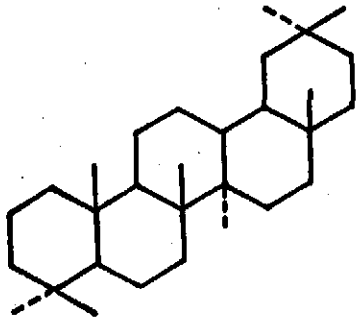
II. Triterpenik Saponozitler

Genel

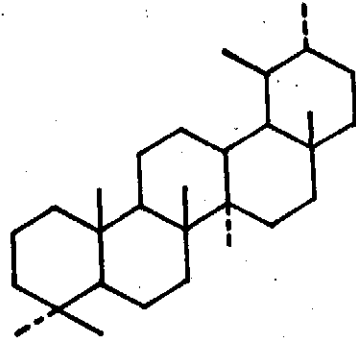
Caryophyllaceae, Hippocastanaceae, Polygalaceae, Primulaceae, Sapindaceae ve Sapotaceae gibi dikotil bitkileri taşıyan familyalarda bulunurlar (18). Doğada bu güne kadar bulunan saponozitlerin daha çok triterpenik yapıda aglikon taşıdıkları tespit edilmiştir (158). Şimdiye kadar 110 dan fazla triterpenik saponozit ve prosapogenolun yapısı aydınlatılmıştır. Bu grup saponozitler yüz yıldan fazla bir süreden beri bilinmektedir. İzolasyonları ve izole edilen maddelerin kimyasal yapı ve davranışları, biyolojik özellikleri üzerindeki araştırmalar son yıllarda büyük gelişmeler göstermiştir (11).

Triterpenik aglikon tipleri Tablo 3 de gösterilmiştir. Bu güne kadar yapılan araştırmalar sonunda 105 oleanan, 8 ursan, 3 dammaran türevi aglikon bulunmuştur. Hopan, lanostan veya lupeol türevi aglikon taşıyan bir grup saponozitin yapısı henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

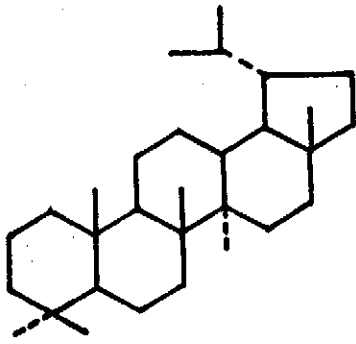
Tablo-4 de görüldüğü gibi, bilinen triterpenik aglikonların büyük kısmı β - amiren halkası taşımaktadır. Bu tip triterpenler 3. (C) da bir hidroksil grubu taşırlar. Diğer hidroksil grupları D ve E halkalarında genellikle 26., 21. ve 22.(C) da, nadiren 2. (Presenegenin) ve 15. (C) da bulunur. β -Amiren halkasında yer alan 8 metil grubundan, özellikle 23/24, 29/30 ve 28 nolu metil grupları yüksek oksidasyon



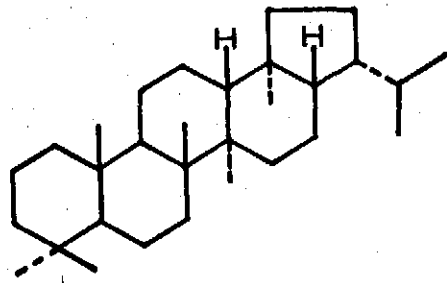
Oleanan



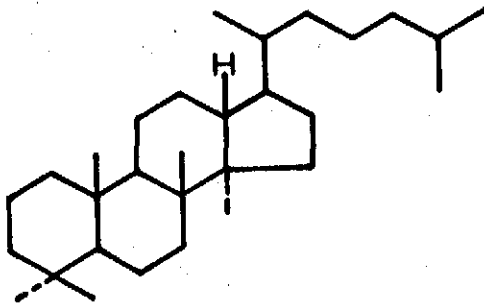
Ursan



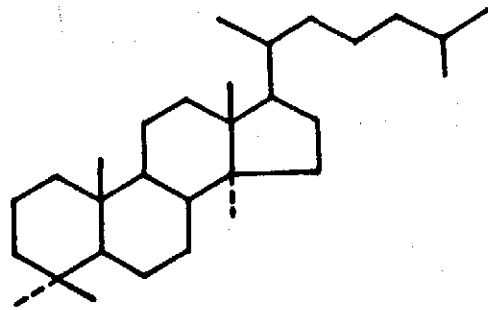
Lupan



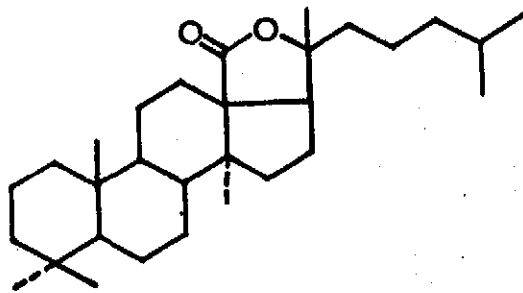
Hopan



Dammaran



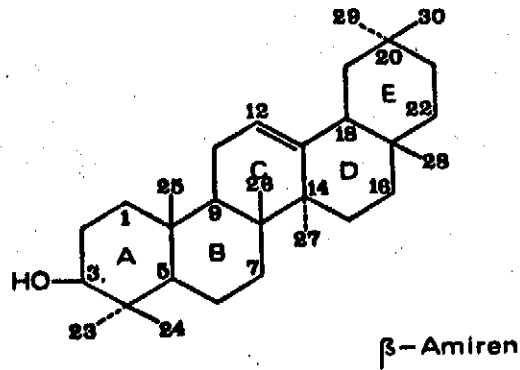
Lanostan



Holostan

Tablo - 3

Triterpenik Aglikon Tipleri



Aglikon	OH	COOH	C = O	Diğer
Gipsogenin	-	28	23	-
Gipsogenik Asit	-	23, 28	-	-
Hederagenin	23	28	-	-
Oleanolik Asit	-	28	-	-
Kilayik Asit	16	28	23	-
Presenegenin	2, 27	23, 28	-	-
Glisirretik Asit	-	30	11	-
Bassik Asit	2, 23	28	-	Δ ⁵
Siklamiretin A [*]	16	-	30	13, 28 epoksi

Tablo - 4

Önemli Δ¹² Triterpenik Aglikonlar

* Siklamiretin A'da epoksi köprüsü olduğundan, 12. (C) ile 13. (C) arasındaki çift bağ yoktur.

basamağındadırlar. Bunlar, hidroksil veya karboksil gruplarına, nadiren aldehitlere dönüşürler (167). Pentasiklik halka sisteminde, glisirretik asitte olduğu gibi, keto grubu bulunabilir. Halkada çift bağ varsa, bu daima 12. ve 13. (C) lar arasındadır, nadiren bazı halkalarda 18. (C) da yer alır. Epoksit, 13. ve 28. (C) lar arasında meydana gelir. Epoksit taşıyan aglikonlarda çift bağ bulunmaz veya 11. (C) na itilmiştir (148,155).

Triterpenik saponozitler, monodesmozidik veya bisdesmozidiktirler. İkinci oz zinciri, daima 17. (C) daki karboksil grubuna bağlıdır. Bu bağlanma O-açilozidiktir. 3. (C) daki hidroksil grubu üzerinden bağlanma ise ozidiktir. Sadece, Panax ginseng den elde edilen dammaran tipi saponozitin her iki oz zinciri de ozidik bağla hidroksil grupları üzerinden bağlanmıştır ve bu tip aglikonlarda aldehit veya karboksil grupları da bulunmaz (109, 136, 142).

Hayvansal triterpenik saponozitlerle, deniz hayvanlarından izole edilmişlerdir. Tipik saponozit özellikleri gösterdikleri için bu grupta incelenirler.

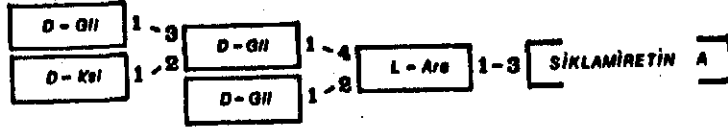
Bu güne kadar izole edilen, yapısı tayin edilmiş triterpenik saponozitler arasında, oz zincirinde 11 ve 12 oz ünitâ taşıyanlar bilinmektedir. Bu nedenle, yapısında dörtten fazla oz taşıyan saponozitler, KOCHETKOV ve KHORLIN tarafından OLİGOZİTLER olarak da isimlendirilmişlerdir (86-88).

A. M o n o d e s m o z i d i k S a p o n o z i t l e r

1. Nötral Saponozitler :

Nötral saponozitlerde, oz kısmı aglikonun 3. (C) undaki hidroksil grubuna bağlıdır. Bu tip saponozitlere tabiatta az rastlanmıştır. Kimyasal yapıları ve özellikleri yönünden monodesmozidik steroidal saponozitlere çok benzerler. Kolesterolle çok güç çözünen kompleks meydana getirirler, kuvvetli hemolitik etkiye sahiptirler.

Cyclamen europaeum'dan elde edilen siklamin (Şekil - 12) kristalize olarak izole edilebilen nadir saponozitlerdendir. Bu madde diğerlerine oranla önemli derecede yüksek bir hemolitik etkiye sahiptir (152).



Şekil - 12

Siklamin

(Gli) Glikoz, (Ksi) Ksiloz, (Ara) Arabinoz.

2. Ester Saponozitler :

Yapı yönünden hemen hemen en karışık grubu meydana getiren bu saponozitlerden bazılarının yapıları tam olarak aydınlatılmamış, bazı yapı tayinleri ise hatalı olmuştur (158).

Esterleşmeyi sağlayan asitlere örnek olarak formik asit, asetik asit, n-bütirik asit, izobütirik asit, izovalerianik asit, α-metil bütirik asit, anjelik asit, tiglik asit, 3,3- dimetilakrilik asit, benzoik asit, 3,4-dimetoksi sinnamik asit, ferulik asit ve N-metil-antranilik asit gösterilebilir.

Bu tip saponozitlerin, önemli fizyolojik etkilerinden dolayı eczacılıkta kullanılış sahaları vardır. Türkiye'de de süs ağacı olarak yetiştirilen Aesculus hippocastanum'un tohumlarından elde edilen eskin de bir ester saponozittir. Eskinin yapısı üzerinde yapılan araştırmalarda, oz kısmında D-glikuronik asit, D-glikoz, D-ksiloz ve D-galaktoz bulunmuştur. Bu ozların molar oranları sırasıyla 1,00:1,58:0,23:0,19 dur. Araştırma sonuçlarına göre D-glikuronik asitin 2. ve 4. durumdaki hidroksillerine birer

D-glikoz bağlıdır. Ayrıca, bu yapının yanında, D-glikozlardan birinin yerine D-ksiloz veya D-galaktoz geçince eskin grubu diğer saponozitler meydana gelmektedir.

Oz kısmı farklılıklar gösteren eskinin, aglikon fraksiyonunda da da Protoeskiyenol ve barringtogenol C olmak üzere iki aglikon elde edilmiştir. Gaz kromatografik çalışmalar, asetik asit, α -metilbütirik asit, izobütirik asit, tiglik asit ve anjelic asitin 8:1:1:6:4 den 10:1,5:1:4:3,5 a kadar değişen oranlarda ester yapan asitler olduğunu göstermiştir.

2 Aglikon, 3 değişik oz zinciri ve 5 ayrı asitten türeyen 30 değişik saponozit karışımının eskinin meydana getirdiği anlaşılmıştır. Bu karışım içinde % oranı en yüksek olarak bulunan yapı (Şekil - 13) eskinin ana saponoziti olarak kabul edilmiştir (173).

Eskin antienflamatuar etkiye sahip bir saponozittir. Ayrıca, bu grup saponozitler arasında kan şekerini düşürücü, ekspektoran ve tümörlere karşı etkili olanlar da kayıtlıdır (158).



Şekil - 13

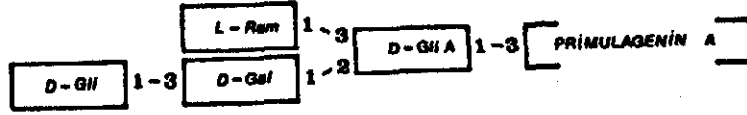
Eskin

(Gli) Glikoz, (Gli A) Glikuronik Asit

3. Asidik Saponozitler

a. Uronik Asit Taşıyanlar: Bu grup saponozitlerde nötral bir aglikon bulunur. Asidik özellik, saponozitin oz kısmında bulunan uronik asitten dolayıdır. Bu asit, glikuronik veya galakturonik asit (177)

olabilir, daima aglikonun 3.(C) unda bulunan hidroksil grubuna bağlıdır. Primula elatior bitkisinin kök ve rizomlarından elde edilen primulasaponin (Şekil 14), bu grup saponozitlere örnek olarak gösterilebilir (158).



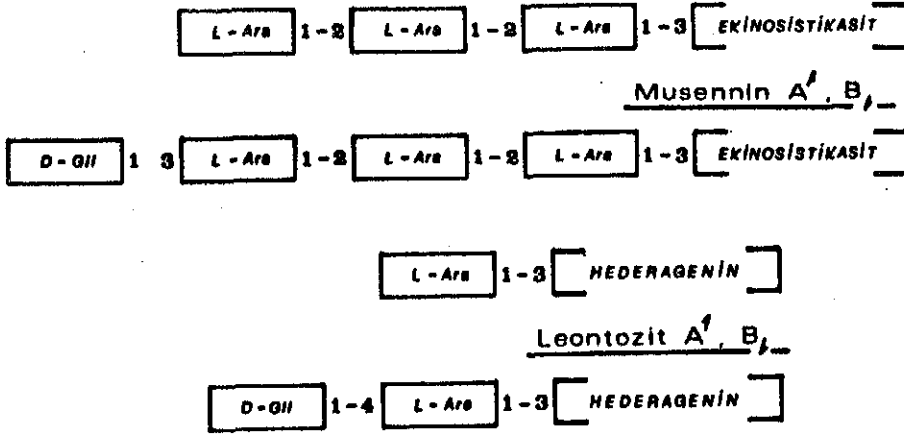
Şekil - 14

Primulasaponin

(Gli) Glikoz, (Ram) Ramnoz, (Gal)Galaktoz, (Gli A) Glikuronik Asit

b. Asit Aglikonlu Saponozitler: Triterpenik saponozitlerin en iyi bilinen ve dolayısıyla en geniş grubudur. Aglikona bağlı bir karboksil saponozite asidik özellik kazandırır. Bu tip aglikonlara oleanolik asit, ursolik asit, ekinosistik asit, hederagenin, gipsogenin ve gipsogenik asit örnek olarak gösterilebilir.

Albizzia anthelmintica'nın kök kabuklarından elde edilen ekstrakt, Afrika'da tenya düşürücü etkisinden dolayı halk arasında kullanılmıştır. Ekstrakt üzerinde yapılan çalışmalar, bu etkinin bir asit saponozit olan musennin A ve B (Şekil 15) den ileri geldiğini göstermiştir (151). Saponaria officinalis'den izole edilen saponarozit (26, 27) ve Leontice evermannii'den izole edilen leontozit A ve B de bu grup saponozitlere örnek olarak gösterilebilir (Şekil 15) (108).



Şekil - 15

Önemli Asit Aglikonlu Saponozitler

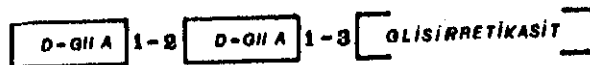
(Ara) Arabinoz, (Gli) Glikoz.

c. Aglikonu Asidik Olan Ve Uronik Asit Taşıyan Saponozitler:

Bu grup saponozitler, hem asidik özellikte bir aglikon hem de oz zincirinde uronik asit taşırlar.

Glycyrrhiza glabra'dan elde edilen Glisirrizin (Şekil 16)

bu grup saponozitlere iyi bir örnektir. Glisirrizin, hem aglikonda taşıdığı keto ve karboksil grupları, hem de oz kısmında bulunan iki mol glikuronik asitten dolayı çok polar bir yapıya sahiptir. Kolaylıkla saflaştırılıp, kristallendirilebilir. Şekerden 150 kere daha tatlıdır. Hidroliz edildiğinde tadı kaybolur. Antimikrobik, antispasmodik ve antienflamatuar etkiye sahiptir. Glisirrizinin bu etkilerinden dolayı, bitkinin kökleri (Radix Liquiritiae) mide ülserinde (antispasmodik), göz banyoları ve ses kısıklığında kullanılır. Drog ayrıca, antispasmodik etkisinden dolayı drastik müshillerle birlikte ağrı azaltmak için de kullanılmıştır.



Şekil - 16

Glisirrizin

(Gli A) Glikuronik Asit

4. Açıl Saponozitler (Açilozitler):

Ender rastlanan saponozitlerdir. Aglikonun 17. (C) undaki karboksil grubuna ozların bağlanmasıyla meydana gelirler. Bu grup saponozitler, monodesmozidik saponozitlerin tipik özelliklerini göstermezler. Hemolitik aktiviteleri ile kimyasal yapıları arasında bir ilgi olduğu sanılmaktadır. Aglikonun karboksil grubunda kuvvetli polar bir gruplaşmanın olması ile, tipik saponin özelliğinin azaldığı açıklanmaktadır. Bu nedenle, özellikleri yönünden bisdesmozidiklere benzerler. Asiyatik asit ve medikagenik asit gibi aglikonların A halkasındaki kuvvetli polar gruplar, bisdesmozidiklerdeki polar oz gruplarına karşılık olarak gösterilir.

Bu grup saponozitlerden biri olan asiyatikozeit (Şekil 17) ilk olarak Centella asiatica'dan izole edilmiştir (120). Bitkinin farklı kimyasal varyeteleri bulunduğu için, asiyatikozeitin elde edilmesinde sadece Madagaskar'da yetişen türlerden faydalanılmıştır.

Biyokimyasal bir çalışmada, asiyatikozeitin heksozmonofosfat (HMP) siklusunu uyarıcı bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur (67). Bu etkinin, diğer yüzey aktif ajanların etki mekanizmaları ile karşılaştırılarak, muhtemelen asiyatikozeitin lökosit membranına etkisiyle meydana geldiği gösterilmiştir. Bu da, asiyatikozeitin saponozit yapısında olmasıyla açıklanmıştır.



Şekil - 17

Asiyatikozit

(Gli) Glikoz, (Ram) Ramnoz.

B. B i s d e s m o z i d i k S a p o n o z i t l e r

1. Nötral Bisdesmozidikler:

Aglikonu asidik özellik gösteren monodesmozidik saponozitler, bu özelliği veren gruplarına ozların bağlanmasıyla nötral bisdesmozidik saponozitler meydana gelir. Triterpenik saponozitlerin önemli bir grubunu meydana getiren bu grup saponozitlerden, yapısı aydınlatılanların en önemlilerinin aglikonu oleanolik asit, onbirinin hederagenindir. Çoğunlukla bu iki aglikona birlikte rastlanır (158).

Kolapanax septemlobum köklerinden elde edilen kolapanakssaponin B, (Şekil 18) bu tip saponozitler için iyi bir örnektir (187).



Şekil - 18

Kolapanakssaponin B

(Ram) Ramnoz, (Ara) Arabinoz, (Gli) Glikoz.

2. Asidik Bisdesmozidikler:

Çok polar saponozitlerdir. Aglikona çok sayıda oz bağlanmıştır. Özellikle yıkama sularında deterjan, ateş söndürme cihazlarında köpük

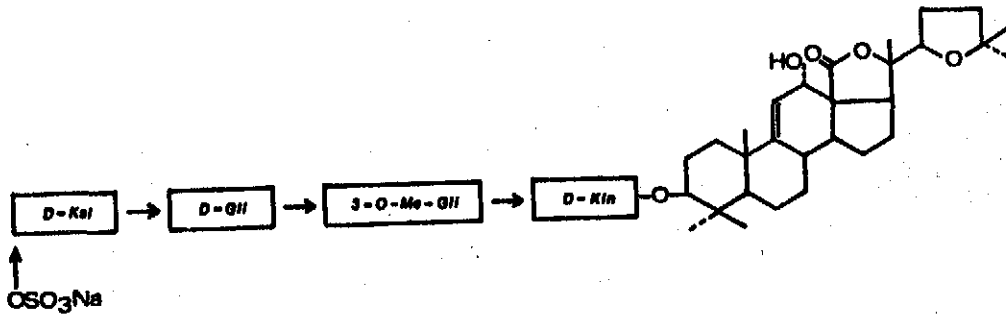
yapıcı ajan olarak, film endüstrisinde ışığa karşı hassas tabakaların yapılmasında kullanılır.

Asidik özellikleri, oz zincirindeki D-glikuronik asitten dolaydır. Bu grupta en çok bilinen saponozit, ilk olarak Gypsophila pacifica'-dan izole edilen gipsozit A dır (73, 89, 91). Bu saponozitin aglikonu gipsogenindir. Bu madde Caryophyllaceae familyasında birçok türde bulunmuştur (2-4, 25, 27, 74, 176).

C. H a y v a n s a l S a p o n o z i t l e r

Son yıllarda ilkel deniz hayvanlarından izole edilen heterozitlerin, saponozitlerle aynı özelliklere sahip olduğu görülmüştür. Bu maddelerin köpürme özelliklerinin yanında, hemolitik ve fungusit etkiye sahip olmaları, kolesterol ile kompleks meydana getirmeleri nedeniyle bu grupta incelenmeleri teklif edilmiştir. Hayvansal saponozit olarak kabul edilen bu maddeler, Echinodermata (Derisi dikenliler) sınıfının Holothuroidea (Deniz kadayıfı) ve Asteroidea (Deniz yıldızı) familyalarında bulunmuştur.

Yapıları tam olarak aydınlatılamamıştır. Aglikonun yapısı henüz tartışılmaktadır. Bununla beraber, izole edilen saponozitlerin aglikonları lanostan veya kolestan tipidir. Bundan başka, aglikonun (muhtemelen 3.C daki) hidroksil grubuna bağlı bir oz zinciri ve bu zincirin sonunda sodyum hidrojen sülfat kalıntısı taşımaktadır (Şekil - 19). Deniz hıyarından elde edilen holoturin A, kuvvetli fizyolojik aktivite göstermektedir. Biyolojik önemleri yönünden, diğer deniz hayvanlarına karşı bir toksin olarak kabul edilmektedir (158).



Şekil - 19

Holoturin A

(Ksi) Ksiloz, (Gli) Glikoz, (Me) Metil, (Kin) Kinovoz.

Yapı Tayinleri

Genel

Saponozitlerin yapılarının tam olarak tayin edilmesi için, şu soruların aydınlatılması gerekir: Bağlı ozlar, varsa asitler ve aglikonun cinsi ve yapıları. Aglikonun yapısı aydınlatıldıktan sonra, ozların cinsi ve miktarı, birbirleriyle yaptıkları bağlanma şekilleri, zincirde buldukları sıra, meydana getirdikleri halka tipleri (piranoz veya furanoz) ve aglikona bağlı oldukları yer veya yerler tayin edilir. Eğer ester cinsinden bağlı asitler varsa, cins ve miktarları, aglikona bağlı oldukları yerler tespit edilir. Bu şekilde, saponozitin kimyasal yapısı ortaya çıktıktan sonra, son olarak ozlar arasındaki bağlanma şekilleri (ozların Konfigürasyonları) hesaplanarak tam yapı açıklanır.

Bu soruların cevaplandırılması için, önce asidik veya enzimatik hidroliz yapılır. Aglikonun teşhis edilmesinden sonra, ozlar kalitatif ve kantitatif olarak tayin edilir. Alkali hidrolizle ayrılan asitler teşhis edilir. Metilleme ve asit hidroliz, ozların birbirleriyle yaptıkları bağlanmanın şekli, meydana getirdikleri halka şekilleri ve aglikona bağlı buldukları yerler hakkında fikir verir. Moleküler çevirme, enzimatik hidroliz ve NMR araştırmaları α ve β bağlarının tipini açıklamada yardımcı olur.

T o t a l H i d r o l i z

Aglikonların Tanımı: Saponozitlerin seyreltik mineral asitlerle kaynatılmasıyla, aglikon ve oz ünitelerine parçalanması sağlanır. Bazen, ester olarak bağlı bulunan asitler bu şartlar altında aglikondan kısmen ayrılırlar. Bu nedenle alkali bir hidroliz ile serbest hale getirilmeleri gerekir.

Aglikonların teşhisinde kolay ve iyi bir yol asetat türevlerinin hazırlanmasıdır. Asit karakterli sapogeninlerin asetat-metilesterleri de yapılmaktadır. Bu türevlerin düşük ve kesin erime noktalarına sahip olmaları, teşhisi kolaylaştırır. Şayet bilinmeyen bir aglikonla karşılaşırsa UV (70, 71, 107, 111, 162), IR (40, 138), NMR (30, 31, 46, 51, 63, 64, 68, 105, 124, 125, 135, 159), Kütle (21.-23, 44, 68, 118, 163), ORD (43, 137) ve X- ışınları (110) gibi spektroskopik yöntemlerden de yararlanılmaktadır.

Çoğunlukla, asidik hidroliz sonunda aglikonların değişikliğe uğramasıyla sekonder ürünler meydana gelir (gipsogenin yerine gipsogenin laktonun elde edilmesi gibi). Bu durumlarda, aglikonların izolasyonlarında orta derecede hidroliz, periyodat parçalanması gibi koruyucu yöntemler kullanılmıştır.

Koruyucu parçalanmaya, enzimatik hidroliz de örnek olarak gösterilebilir. Tam hidroliz için karışık enzim preparatları kullanılmıştır. Saponaria officinalis bitkisinin köklerinden elde edilen saponozit D nin yapı aydınlatılmasında, diastaz ve Rhizopus arrhizus mantarı enzima-

tik hidrolizlerde kullanılmıştır (34). Triterpenik saponozit olan musenninin yapısının açıklanmasında, β -glikozidaz (emülsin) (151), Agrostemma githago saponozitinin üzerinde yapılan çalışmada Aspergillus wentii den elde edilen enzim karışımı (154), siklaminlerin oz zincirlerinin analizlerinde de aynı şekilde bir seri enzim karışımı kullanılmıştır (152).

Bazı durumlarda, özel bakteri kültürlerinden yararlanılmıştır (175). Ancak, aglikonlarda mikroorganizmaların etkisiyle değişikliklerin meydana gelmesi ihtimali de vardır.

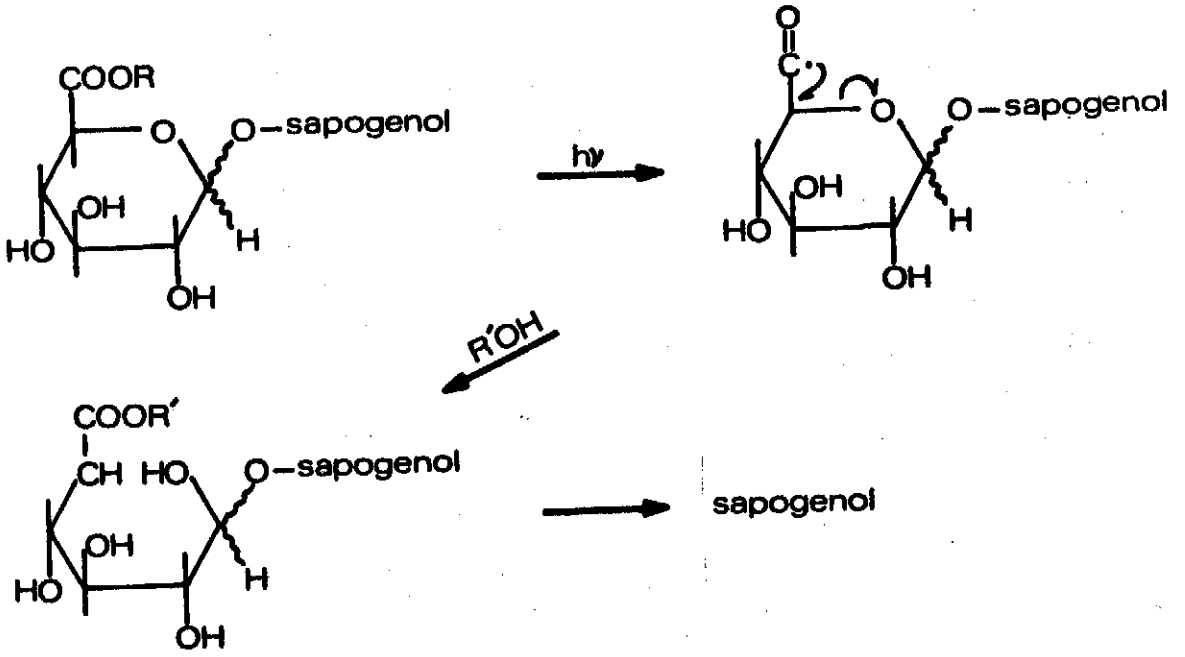
Bazen, hidroliz sırasında ozlar kopar kopmaz ani olarak aglikonda halka kapanması olur (furostan tipi saponozitlerden spirostan tipi aglikon elde edilmesi gibi) (57). Bu gibi durumlarda, kimyasal reaksiyonlarla aglikonun yapısı tayin edilir. IR, NMR ve Kütle gibi spektroskopik yöntemlerden de önemli ölçüde yararlanılır.

1973 Yılında KITAGAWA ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada, asit hidroliz sırasında sekonder dönüşümleri önlemek için bir fotokimyasal hidroliz yönteminin kullanılması gerektiği ileri sürülmüştür (83). Ultraviyole ışınlarından faydalanılarak gerçekleştirilen bu işlem, bazı oleanan tipi triterpenik saponozitler için uygun bir hidroliz yöntemi olarak gösterilmektedir.

Primula sieboldi saponozitlerinin metanoldeki çözeltisi, kuartz bir tüp içinde, ultraviyole ışınlarıyla fotokimyasal olarak etkilenildiğinde, yüksek verimle protoprimulagenin A elde edilmiştir. Aynı araştırmacı grubu tarafından daha sonra soyasaponoziti üzerinde yapı-

lan araştırmalarda, hidroliz için aglikona direkt olarak bağlı bir glikuronik asitin gerekli olduğu belirtilmiştir (82).

Ultraviyole hidrolizde, fotokimyasal olayın aşağıdaki şekilde ytitirdüğü düşünülmektedir (şekil - 20).



şekil - 20

Fotokimyasal Hidroliz

Oksijen akımının ve alkali katılmasının, fotokimyasal olayı belirgin bir şekilde indirgediği de gōsterilmiřtir.

UV hidrolizin geliştirilmesinden sonra, TSCHESCHE ve arkadaşları daha Önce yapısını aydınlattıkları Primula elatior saponoziti Őzerinde benzeri bir çalışma yapmışlardır (147). İlk çalışmalarında primulagenin.A olarak tayin edilen aglikonun hidroliz sırasında asit etkisiyle meydana gelen bir yan ũrũn olduğu anlaşılmıştır. Ultraviyole ışınlarıyla yapılan hidroliz sonucu, Primula elatior saponozitinde de aglikon olarak Proto-primulagenin A izole edilmiştir.

UV hidrolizinin gerçekleştirilmesinden sonra, KITAGAWA ve arkadaşları glikuronit bağının seçici olarak hidrolizi için yeni bir yöntem geliştirmiştir (80, 81). Araştırma, glikuronik asit taşıyan saponozitlerin permetillenmiş türevlerinin alkali ile reaksiyonundan sonra kurşun tetraasetat oksidasyonu sonucu, glikuronit bağının seçici olarak yarılması esasına dayanır. Bu yöntemle, metillenmiş sapogenol çok iyi bir verimle elde edilmiştir. Aynı araştırmacı grubu, glikuronit bağının seçici olarak hidrolizi için yukarıda kısaca açıklanan iki yönteme ilave olarak, üçüncü bir yöntem geliştirmişlerdir (79). Çalışmada asetik asit anhidriti ve piridin kullanılmıştır. Yöntemin esası, glikuronik asitin 2. ve 4. karbonunda oz taşıyan ve karboksil grubu serbest olan bir glikuronit-saponinin, sapogenol ve glikuronit kısımlarının asetillenmiş türevlerine dönüştürülmesidir.

Ozların Tanımı: Bu güne kadar yapılan çalışmalarda saponozitlerin oz kısmında D-glikoz, D-galaktoz, L-arabinoz, D-ksiloz, D-fukoz, L-ramnoz, D-kinovoz, uronik asitler ve riboz bulunmuştur (11, 59, 157, 158, 172). Ozların kalitatif teşhisi en kolay ve en emin şekilde kağıt kromatografisi ile yapılmaktadır (29, 34, 41, 93, 104). Bu işlemin tek mahzuru uzun sürmesidir. İnce tabaka kromatografisi de aynı amaçla kullanılmaktadır (12, 65, 164).

Ozların kantitatif analizi, gaz kromatografisi sayesinde kolaylaşmıştır. İlk olarak SWEELEY ve arkadaşları, ozların trimetilsilil türevlerini hazırlayarak gaz kromatografisinde teşhislerini sağlayan bir araştırma yapmışlardır (143). Bu yöntem, daha sonra heterozitlerin oz kısmının kantitatif analizinde uygulanmak üzere geliştirilmiştir. WULF (171), KIMURA ve arkadaşları (75), GOROVITS (52,53)

tarafından yapılan çalışmalarda, üzerinde önemle durulan ilk nokta uygun bir hidrolizin geliştirilmesi olmuştur. Hidroliz sırasında ozların asitlerle parçalanmasından ve nötralleştirmedeki kayıplardan dolayı, yapay oz karışımlarından hareketle, aynı şartlar altında çalışılarak düzeltme faktörleri hesaplanmıştır. Böylece, ozların kantitatif analizlerinde hata oranı minimuma indirilmiştir. WULLF, düzeltme faktörlerinin hesaplanması için, serbest ozların hidroliz şartları altında tutulma sürelerinin, heterozitlere oranla daha kısa olması gerektiğini açıklamıştır. Buna sebep, heterozitlerde bağlı halde bulunan ozların daha yavaş serbest hale geçmelerine karşılık, serbest ozların ilk andan itibaren asitle temasta olmasıdır. WULLF'a göre, kantitatif bir analiz için, su-suz metanölli ortamda hazırlanmış % 5 lik hidroklorik asit çözeltisiyle yapılan asit hidroliz (95° C de 5 saat) en uygundur. Bu şekilde hata oranının % 3 ü aşmadığı belirtilmektedir. KIMURA ve arkadaşları ise, steroidal saponozitlerin hidrolizi için (2N sülfürik asit; dioksan) karışımını teklif etmişlerdir ($95-100^{\circ}$ C, 5 saat). Bu şartlar altında çalışıldığında, başlangıç maddenin % 90 dan fazlasının tekrar kazanıldığı gösterilmiştir.

Uygun bir asit hidrolizden sonra oz karışımları silil türevleri halinde gaz kromatografisine uygulanır. Bunun için, asidik hidrolizle elde edilen oz karışımları iyice kurutulur, piridinde çözülür, hekzametildisilazan ve trimetilsililklorür ile silillenir. Sililleme süresi SWEELEY'e göre 5 dakika, WULLF'a göre 95° C de 1 saat, KIMURA ve arkadaşlarına göre oda ısısında 5 saattir. Daha sonra, silillenen karışım ya doğrudan doğruya (143), ya da sililleme ajanları ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra benzol (171) ve n-hekzan (75) gibi çözücüler yardımıyla gaz kromatografisine uygulanır. Tablo 5 de bu araştırmacılar tarafından uygulanan gaz kromatografisi şartları özetlenmiştir.

YÖNTEM	Kolon ve Boyutları	Sıvı fazlar ve Dolgu maddeleri	Taşıyıcı Gaz ve Akış hızı	Çalışma sıcaklığı	Lit.
WULFF	Çelik 2m x 3mm	% 15 silikon yağı DC Celite 545(60-80 mesh)	Helyum 34 ml/dak	190°C	171
KIMURA	a. Çelik 1.5mx4mm	%1,5 SE-30 Chromo sorb-W (60-80 mesh)	Azot 35 ml/dak	140°C	75
	b. Çelik 2.25mx4mm	% 5 CNSİ Gas chrom-P (100-110 mesh)		120°C	
	a. Bakır 1mx4mm	% 5 SE-30 Celite 545 (40-60 mesh)	Hidrojen 36 ml/dak	162°C	52
	b.	% 5 Silikon faz g= 30M Diaphorite (0,20-0,315 mm)	Hidrojen 55 ml/dak	170°C	33

Tablo - 5

Ozların GLC ile Tanımı Yöntemleri

Ozlar, silil türevleri veya silil türevlerinin, metil ozitleri halinde gaz kromatografisiyle incelendiklerinde, kompleks oz karışımlarının açıklanması anomer piklerden dolayı zor olmuştur. Bu nedenle, ozlar anomer şekilleri olmayan alditol asetatlarına veya alditol trifloroasetatlarına indirgenerek (5, 15, 126) veya kapiler kolonlar kullanılarak (145) analiz edildiklerinde daha iyi sonuçlar alınmıştır. İlk olarak SAWARDEKER ve arkadaşları, etilen glikol süksinat poliesterinin kopolimerini ve bir nitril silikon polimerini (ECNSS-M) stasyonere

faz olarak kullanmışlardır (126). Oz karışımları sodyum borohidür ile indirgendikten sonra, asetik anhidrit ve piridinde asetillenmiş, çözelti soğutulmuş, analiz için doğrudan doğruya gaz kromatografisine uygulanmıştır. BJÖRNDAL ve arkadaşları tarafından, kısmen metillenmiş oz alditollerinin asetatları, aynı şekilde bir nitril silikon polimeri (ECNSS-M) kolonda denenmiştir. Metoksil gruplarının yerine geçen asetoksil gruplarının alıkonma sürelerinde (Rt) uygun artışlara sebebi olması, tetra-, tri-, ve di-O-metil hekzitol asetatların pentitol asetatlar gibi iyi ayrılmalarını sağlamıştır (15).

Asitlerin Tanımı: Saponozitlerle esterleşmiş asitlerin analizi, alkali bir hidrolizden sonra elde edilen serbest veya metil esterlerinin gaz kromatografisi yardımıyla incelenmesi şeklinde yapılmıştır (61, 173). Ayrıca, ince tabaka ve sütun kromatografisinden, IR, NMR, ve kütle Spektrofotometresinden de faydalanılmıştır (19).

Kı s m i H i d r o l i z : Uzun oz zincirlerinde metilleme ile sonuç alınamadığında, kısmi hidroliz uygulanır. Bu işlem, mineral asitler veya % 10 luk okzalik asitle yapılır.(34, 38, 87). Böylece, uzun oz zincirleri bioz, trioz ve tetrozlara parçalanmakta, izole edilen bu oligoholozitler tayin edilerek zincirin yapısı aydınlatılabilmektedir.

Enzimatik hidroliz çoğunlukla oz kısmi zengin olmayan heterozitlerin yapısının aydınlatılmasında kullanılmıştır. Primula elatior saponozitinin oz kısmının aydınlatılmasında, β -glukozidaz ve β -galaktozidaz ile ardarda yapılan enzimatik hidrolizden yararlanılmıştır (87).

Dallanma noktalarının aydınlatılması için periyodat oksidasyonundan faydalanılmıştır (34, 89). Bu yöntemde temel prensip, zincirin glikol yapısı göstermeyen ozlara kadar parçalanmasıdır. SMITH yöntemine göre,

saponozitin sulu çözeltisi sodyum periyodat ile reaksiyona sokulur, sodyum borohidrür ile indirgenir, meydana gelen poliöl çok seyreltik asitlerle oda ısısında hidroliz edilir. Bu şekilde elde edilen ürünün hidrolizi ile, aglikona bağlı ilk ozlar açıklanabilir.

Diğer bir yol, asetillenmiş saponozitin hidrobromik asit/asetik asit etkisiyle oz ve oligoholozitlere parçalanmasıdır. Daha sonra, asetil grupları koparılır, elde edilen ürünlerin tayininden saponozitin yapısına geçilir (146, 152, 156).

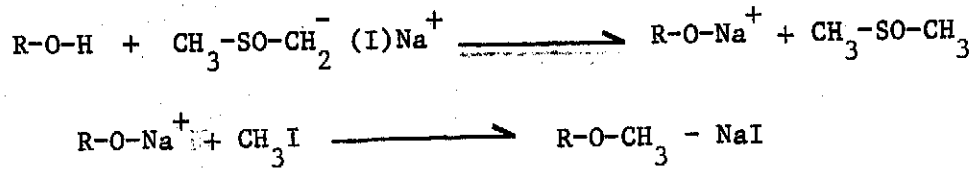
Bisdesmozidik triterpenik saponozitlerin yapıları, 17. (C) a bağlı karboksil grubu ile oz zinciri arasındaki açilozit bağının koparılmasıyla incelenmektedir. İşlem ya alkali hidroliz ile (34,87,100), ya da metil türevine lityum alüminyum hidrür etkisiyle yapılır (29,33). Böylece, hem oz zincirlerinin yapısı ayrı ayrı incelenmekte, hem de karboksil grubuna bağlı ilk oz, reaksiyon sonucu alkolüne dönüştüğü için kolaylıkla açıklanabilmektedir.

P e r m e t i l l e m e : Saponozitlerde, oz zincirlerinin aydınlatılması için önemli bir yöntem metillemedir. Genel olarak, total bir metilleme işleminden sonra, asit hidroliz ile kısmen ve tamamen metillenmiş ozlar elde edilir. Ozların metillenme derecelerinden, zincirdeki yerleri tahmin edilir. En önemli sorun, metillenmenin tam ve başarıyla uygulanması, elde edilen metil ozların doğru olarak tayin edilmesidir.

PURDIE ve IRVINE tarafından, metil iyodür ve gümüş oksitle yapılan metilleme, başarıyla uygulanmaktadır (121). KUHN ve arkadaşları tarafından geliştirilen yöntemlerde, değişik çözücüler ve metilleyici ajanlar denenmiştir (96, 97, 165). Bu araştırmacı grubu tarafından, dimetil formamit ve dimetil formamit ve dimetil sülfid

foksit metilleme sırasında kullanılan en iyi çözücüler olarak teklif edilmiştir. Gerekirse, bu iki çözücünün karışımlarının da kullanılacağı belirtilmiştir. Metilleyici ajanlardan dimetil sülfatın, metil iyodürden daha ucuz ve daha etkili olması nedeniyle tercih edilmesi istenmiştir. Ayrıca, baryum oksit/baryum hidroksitin gümüş oksitten ve stronsiyum oksit/stronsiyum hidroksitten daha uygun olduğu ve deneysel olarak gösterilmiştir (96). Diğer bir metilleme yöntemi, diazometan/boron triflorür kullanılarak yapılmaktadır (106).

Son zamanlarda en çok kullanılan metilleme yöntemi, HAKOMORI tarafından geliştirilmiştir (55). Reaksiyonun oda sıcaklığında, basit bir cihazda yapılması, kısa zamanda sonuçlanması diğer yöntemlere göre büyük bir üstünlük olarak gösterilmektedir. Yöntemin esasları, dimetil sülfoksitte dimetil sülfonil karbanionla ilk önce alkoksit teşekkülünün sağlanması, daha sonra metil iyodürle metillemenin gerçekleştirilmesidir. Reaksiyon şu şekilde meydana gelir:



Metillemenin tamamlanıp tamamlanmadığı, IR, ince tabaka kromatografisi ve metoksil gruplarının tayini ile kontrol edilir.

Metillenmiş ürünler, daha sonra uygun bir asit hidrolizle metillenmiş oz ünitelerine ayrılır. Elde edilen, değişik derecelerde metillenmiş ozlar kağıt (Tablo -6), ince tabaka (Tablo - 7) ve gaz kromatografisi (7, 49, 60, 78, 113). ile tayin edilirler. Metillenmiş ozlar, kütle spektrometresi yardımıyla da kesin olarak tayin edilebilmektedir (85, 92). Aynı amaçla, gaz kromatograf - kütle spektrometresi kombinasyonları da kullanılır (57). Burada, gaz

kromatografında ayrılan fraksiyonlar, kütle spektrometresinde değerlendirilerek daha kesin sonuç elde edilmektedir. Diğer bir yol, metillenmiş ozların kolon kromatografisi ile ayrı ayrı izole edilmelerinden sonra, erime noktaları ve spesifik çevirmelerinden faydalanılarak teşhis edilmesidir. Ayrıca, metillenmiş ozlar boron triklorür gibi ajanlar kullanılarak demetillenir (1). Bu şekilde, elde edilen ozun teşhisi ile, hangi ozun metillenmesiyle meydana geldiği tespit edilebilir (28,37).

Uronik asitlerin metillenmiş türevleri, heksozlara indirgenerek teşhis edilirler. Çünkü, glikoz ve galaktozun metil türevlerinin teşhisi daha kolaydır.

Solvan Sistemleri	Oran	Kağıt	Lit.
n-BuOH : H ₂ O : CCl ₄	4:4:3	SS	8,146,151,152,156
C ₆ H ₆ : EtOH : H ₂ O : % 25 NH ₃	200:47:14:1	SS	146,151,152,156
Et - CO - Me / H ₂ O	% 2 NH ₃	SS	151,152
n-BuOH : EtOH : H ₂ O	5:1:4	TR	76
Revelatör	Anilin hidrojen ftalat		114
	110°C, 5-10'		

Tablo - 6

Metillenmiş Ozların Kağıt Kromatografisi

SS : Schleicher - Schüll 2043 b

TR : Toyo Roshi 51

Solvan Sistemleri	Oran	Adsorban	Lit.
$C_6H_6 : Me_2CO$	1:1	KG	8,146
$C_6H_6 : Me_2CO$	2:1	KSK	34,37
$C_6H_6 : EtOH$	8:2	KG	8
$i-Pr_2O : MeOH$	5:1	KG	8,156
$CHCl_3 : MeOH$	9:2	KG	152
$Et-CO - Me/H_2O$	% 1 NH_3	KG	144,152
$Et_2O : C_6H_5CH_3$	2:1	WG	76,77
Revelatör	Anilin hidrojen ftalat 110°C, 5-10'		114

Tablo - 7

Metillenmiş Ozların İnce Tabaka Kromatografisi

KG : Kieselgel G

KSK : Silikajel

WG : Wako - Gel B-5

Değişik derecelerde metillenmiş ozların teşhisi ile, zincirdeki dallanmalar ve ozlar arasındaki bağlanmalar açıklanmış olur.

Metillenmiş ürünün hidroliz edilmesi ile, aglikona bağlı ilk ozlar ve bunların aglikondaki bağlanma noktaları da açıklanabilir. Serbest hale geçen aglikona ait hidroksil grupları, asetatlarına çevrilerek NMR ve kütle spektrometresiyle aydınlatılır. Hidroksil grupları, ketonlara oksitlenerek, oksidasyon ürünü IR, NMR, kütle spektrometresi ve ORD ile de tayin edilebilir.

O z l a r A r a s ı n d a k i B a ğ l a r ı n
D u r u m u : Saponozitin yapısı ortaya çıktıktan sonra yapılan işlem, ozlar arasındaki bağların durumunun tespit edilmesidir. Bu işlem, oz bakımından zengin saponozitlerde zordur. Ozların sayısı az olduğunda, bağlanma şekilleri KLYNE kuralına göre tayin edilmiştir (84). Bu yöntemle göre, heterozit, aglikon ve yapıdaki ozların α -ve β -metil ozitlerinin mol çevirmeleri karşılaştırılarak sonuca gidilmiştir. Molekül büyüdükçe bu işlemden yararlanılamamış, hatalı sonuçlarla karşılaşmıştır.

Diğer bir yol , özel enzimlerin kullanılmasıyla yapılır. Bu yolla da tüm ozlar için olumlu sonuçlar elde edilememiş, dallanmış zincirlerde zorluklarla karşılaşmıştır.

Ozlar arasındaki ozidik bağların kofigürasyonların hesaplanmasında NMR dan yararlanan bu yöntemde kullanılır. NMR yöntemi, bazı ozlarda C-1 protonunun farklı kenetlenme sabiti göstermesi esasına dayanır (α ozidik bağda \sim 3Hz, β ozidik bağda \sim 6-7 Hz). Bu yol kenetlenme sabiti sinyallerinin çakışması nedeniyle, molekülde en çok 2 oz bulunması halinde kullanılabilir.

Genel olarak, heterozitlerde D-ozlar β - ve L-ozlar α -glikozit bağları yapmaktadırlar. Son yıllarda, α -D-glikozidik, α -D-galaktozidik ve β -L-arabinozidik bağların da tayin edilmesiyle, bu genellemenin istisnalarının olduğu ortaya konmuştur (158).

K ü t l e S p e k t r o m e t r e s i: Saponozitlerin yapıları, yukarıda da anlatıldığı gibi total asit hidroliz, total metilleme ve değişik kısmi hidroliz yöntemleri ile aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu alanda, KOMORI ve arkadaşlarının steroidal saponozitlerin metil ve asetat türevleri ile yaptığı kütle spektrometrik çalışmalar çok

ilginçtir (94). Araştırmada, molekül ağırlığı 650 üzerinde olan steroid saponozitler kullanılmış, hem aglikon hem de oz kısmının yapısı hakkında başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Aynı araştırmacı grubu tarafından daha sonra, kütle spektrometresi yardımıyla oleanan tipi mono- ve bisdesmozidik triterpenik saponozitlerin yapıları da incelenmiştir (58).

Bilindiği gibi, daha önce aglikonlar ve saponozitlerin metil türevlerinin asit hidroliziyle elde edilen kısmen metillenmiş oz üniteleri, kütle spektrometresiyle ayrı ayrı incelenebilmekteydi. KOMORI ve arkadaşları, bu iki ayrı açıklamayı bir spektrumda göstererek, yapı aydınlatılmasına büyük kolaylık göstermişlerdir.

Caryophyllaceae Saponozitleri

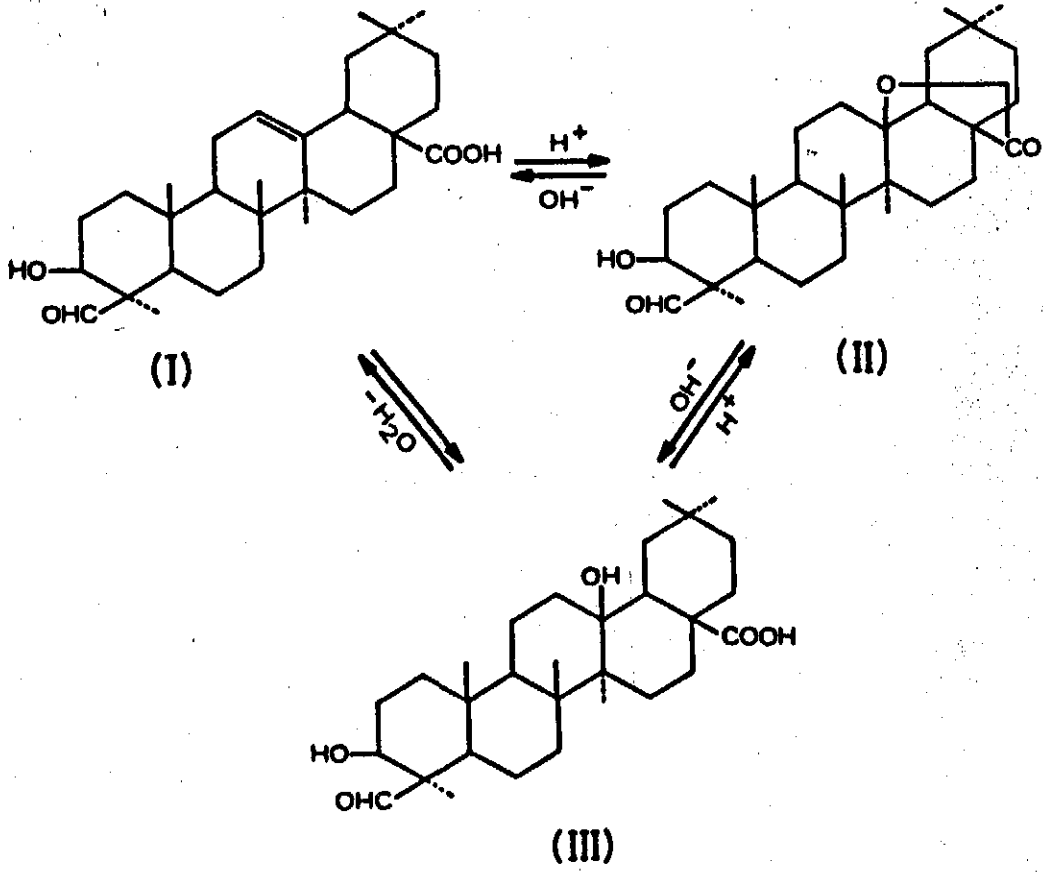
Yapılan araştırmalar, Caryophyllaceae familyasının triterpenik saponozit taşıyan bitkiler yönünden çok zengin olduğunu göstermiştir (54, 56, 176). Özellikle Gypsophila türleri, yüksek oranda saponozit taşımasıyla dikkati çeker.

Caryophyllaceae saponozitleri için en tipik örnek gipsozittir. İlk olarak Gypsophila pacifica'dan izole edilmiştir (73). Aglikonu gipsogenin olan bu saponozite 9 oz bağlıdır. İlk araştırmada, KHORLIN ve arkadaşları tarafından, toplam saponozitlere gipsozitler denmiştir. Kromatografik çalışmalar, bu karışımın A, B ve C gipsozitlerinden meydana geldiğini göstermiştir.

Kimyasal yapısının araştırılması için, önce asit hidrolize tabi tutulmuştur. Aglikon olarak gipsogenin-lakton elde edilmiş gipsogenin-laktonun potasyum hidroksit ile muamelesinden sonra gipsogenin elde edilebilmiştir. Bu arada üçüncü bir maddenin de, alkalinin gipsogenin-laktona etkisiyle meydana geldiği görülmüştür. Bu da 12, 13-dihidro-13-hidroksigipsogenindir. Bu üç maddenin kolaylıkla birbirlerine dönüşmesi ile, gipsozit A, B ve C nin karışıklı olarak birbirlerine dönüşmeleri arasında bir ilgi olduğu düşünülmüştür(Şekil-21).

Gipsozit A, B ve C karışımının hidroliziyle, 7 değişik oz teşhis edilmiştir. Bunlar glikoz, galaktoz, ksiloz, arabinoz, ramnoz,

fukoz ve glikuronik asittir. KOCHETKOV ve arkadaşları tarafından, gipsozitlerin oz kısmının yapı ve miktar tayini ile ilgili bir çalışmada, sadece ksilozun diğer ozlara göre iki veya üç mol olduğu tespit edilmiştir (90).

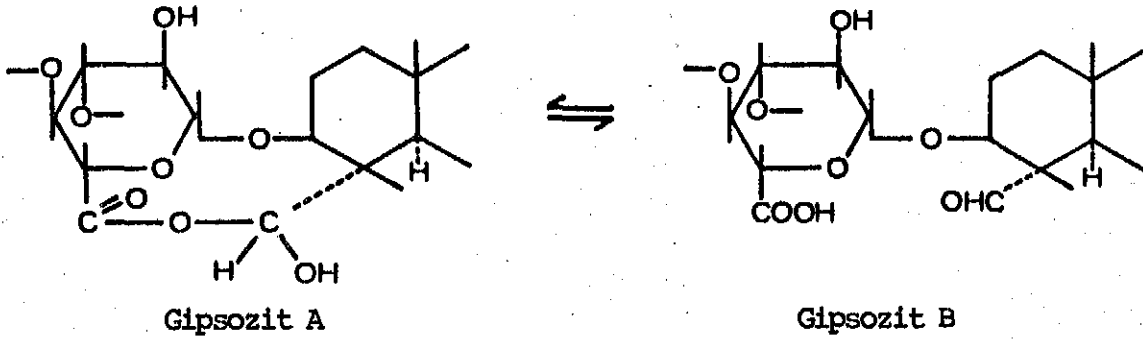


Şekil - 21

Gipsozitlerin Birbirine Dönüşü

- (I) Gipsogenin, (II) Gipsogenin-lakton
(III) 12,13-dihidro-13-hidroksigipsogenin

Gipsozitin yapısı, 1963 yılında KOCHETKOV ve arkadaşları tarafından yayınlanan bir çalışmada kesin olarak aydınlatılmıştır (Şekil-25) (89). Aynı çalışmada, gipsozitlerin, pH'nın etkisi ile kolaylıkla birbirine değişebilen, aldehit grubunun serbest olup olmamasıyla birbirinden ayrılan aynı madde olduğu belirtilmiştir. Bu kolay dönüşüm, glikuronik asitin karboksil grubu ile aglikonun aldehit grubu arasında dönüşebilir bir yarı-asetal gruplaşmanın meydana gelmesi ile yeterli bir şekilde açıklanmaktadır (Şekil-22). Aynı yıl yayınlanan diğer bir çalışmada, Gypsophila paniculata bitkisinden izole edilen triterpenik saponozitlerin de gipsozitle aynı olduğu gösterilmiştir (74).



Şekil - 22

Gipsozit A ve B nin Birbirine Dönüşümü

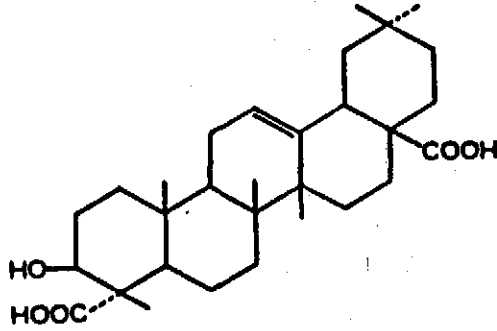
Gipsozit, daha sonra diğer Gypsophila türlerinde ve birçok Caryophyllaceae familyası bitkisinde bulunmuştur (2-4, 25, 27, 176).

Aynı familya bitkilerinin birçoğunda bulunan bu saponozitin, değişik araştırmalarda farklı fizikokimyasal özelliklerle belirtilmesi üzerinde duran CHIRVA ve arkadaşları, Gypsophila acutifolia saponozitleri üzerinde çalışmışlardır. Elde edilen saponozit (akutifoliyozit) in aglikonu, gipsozitte de olduğu gibi gipsogenin, ozları da galaktoz, glikoz, ksiloz, arabinoz, ramnoz, fukoz ve glükuronik asittir. Fakat, saponozitin yapısı incelendiğinde gipsozitten farklı olduğu görülmüştür (35).

Saponaria, Silene, Dianthus, Vaccaria gibi diğer Caryophyllaceae bitkilerinde yapılan çalışmalarda da aynı aglikon (gipsogenin) ve aynı ozlardan meydana gelen, sadece ozların sayı ve dizilişlerinde farklılık gösteren benzer saponozitler izole edilmiştir.

1967 Yılında yayınlanan bir çalışmada, Acanthophyllum türlerinde, ilk defa aglikonu gipsogenik asit (Şekil - 23) olan bir saponozit bulunduğu gösterilmiştir (13). Daha sonra, Saponaria officinalis bitkisinin köklerinden izole edilen saponozitin aglikonunun da gipsogenik asit olduğu görülmüştür (26, 27).

Sonuç olarak Caryophyllaceae familyası bitkilerinde bulunan triterpenik saponozitler için bir genelleme yapılacak olursa, aglikonlarının genel olarak gipsogenin, ender de olsa gipsogenik asit ; oz kısımları galaktoz, glikoz, arabinoz, ksiloz, ramnoz, fukoz ve glikuronik asit gibi ozlardan meydana gelmektedir. Saponozitin yapısında glikuronik asit varsa, daima gipsogeninin hidroksil grubuna doğrudan doğruya bağlıdır.



Şekil - 23
Gipsogenik Asit

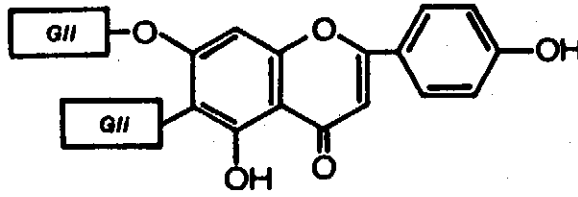
Saponaria officinalis

Genel

Bitki, Orta ve Güney Avrupa, Balkan Ülkeleri, Rusya, Asya ve Kuzey Amerika'da yetişir. Kökleri ve herbası drog olarak kullanılmaktadır.

Kökler ve herba triterpenik saponozitler yönünden zengindir. Saponozitler dışında, yapraklarından bir flavonozit izole edilmiştir (10). Saponarin (Şekil - 24) adı verilen bu madde, bir C-heterozitidir. Yapraklarda ayrıca C-vitamini vardır. Köklerdeki saponozit miktarı, ortalama % 5 kadardır (14,48,62).

Bu miktar Nisan ve Mayıs aylarında en yüksek değerlere (% 7,74- % 8,18) ulaşmaktadır (117). Bu aylar, bitkinin çiçeklenme devresinden önceki günleridir. Çiçeklenme devresi olan Temmuz ve Ağustos aylarında, saponozit oranının en düşük orana (% 2,29) indiği de aynı çalışmada gösterilmiştir. Ayrıca, oligoholozitler (% 10,7), redüktör ozlar (% 2,8), zamklar (% 2,6), uçucu yağ (% 0,2) ve yağsı maddeler (% 0,1) ve % 2 anorganik madde taşır (48).



Şekil - 24
Saponarin

Bitkinin yaprakları, deri hastalıklarında ve ekspektoran olarak kullanılmıştır. Kökleri de aynı şekilde ekspektoran, kuvvetli irritan, diüretik, laksatif ve kolagog etkilidir. Haricen kronik deri hastalıklarında (ekzema, temriye, kan çıbanı) kullanılmıştır. Mide bulantısı, kusma ve karın ağrılarında etkilidir. Az dozda ekspektoran, aşarısında emetik olarak kullanılmıştır (14, 62, 178).

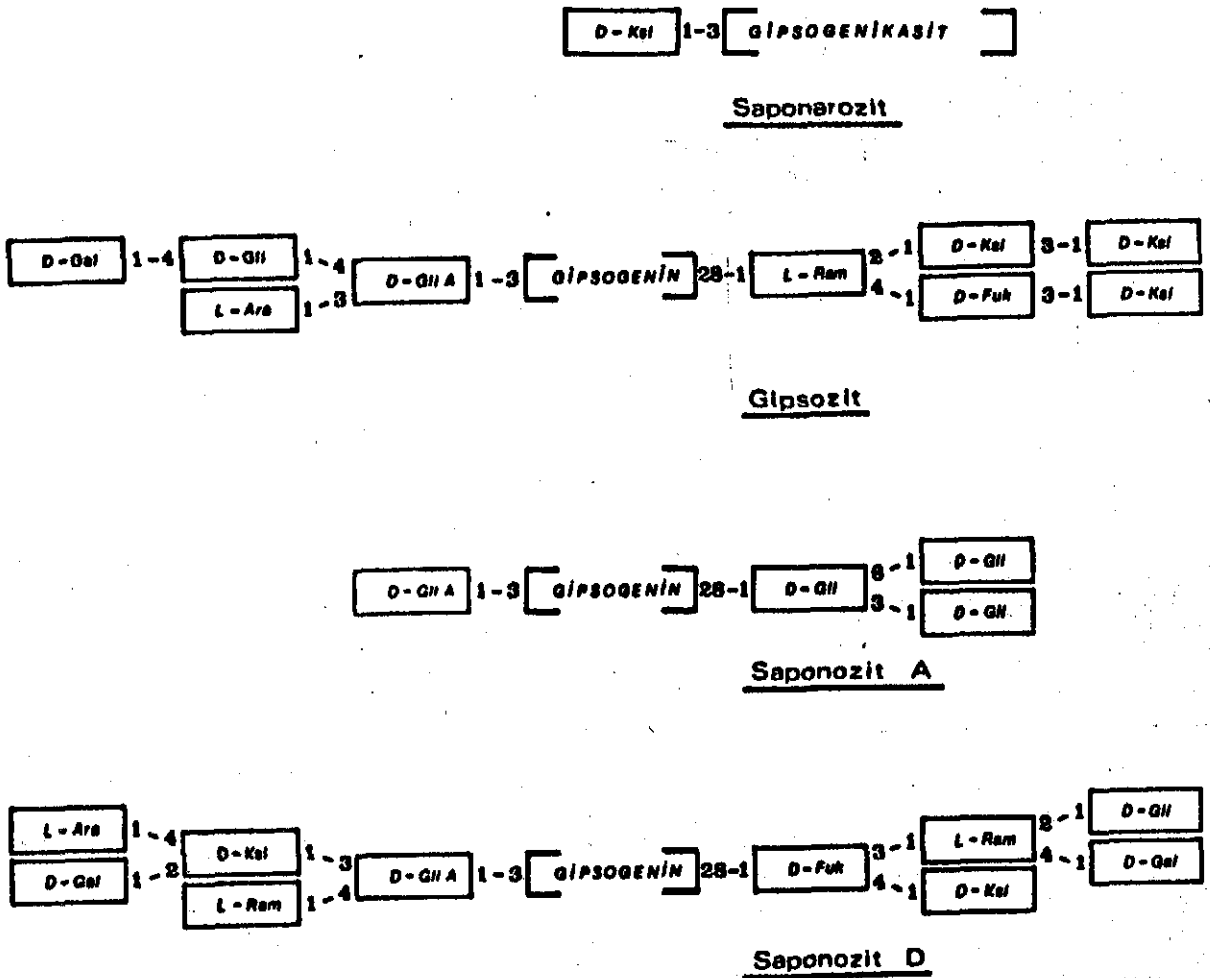
Halk arasında, köpürme özelliklerinden dolayı leke çıkartıcı olarak yıkama işlemlerinde kullanılmıştır.

Bitki üzerinde yapılan kimyasal çalışmalar, kökler üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalar iki grupta toplanabilir: Saponozitlerle ve oligoholozitlerle ilgili olanlar.

S a p o n o z i t l e r l e İ l g i l i Ç a l ı Ő m a l a r :

Saponozitlerle ilgili ilk kimyasal çalışma, KON ve SOPER tarafından 1940 yılında yayınlanmıştır (95). Araştırmada, köklerden elde edilen metanollü ekstreden asit hidroliz sonunda izole edilen aglikonun, daha önce Gypsophila saponozitinden elde edilen gipsogenin ile aynı olduğu gösterilmiştir.

Bitkinin triterpenik saponozitlerinin tam yapısı ile ilgili çalış-
malar, 1969 yılından sonra yayınlanmaya başlamıştır (36). İki ayrı araştı-
rıcı grup tarafından incelenen köklerden, 4 farklı saponozit izole edil-
miştir. (Şekil - 25) de görüldüğü gibi, saponozitlerden üçünün aglikonu
gipsogenin, birinin aglikonu gipsogenik asittir. Saponozitlerden birinin
yapısı Gypsophila pacifica'dan izole edilen gipsozitle aynıdır. Saponozit
D ise, gipsozite çok benzer bir yapıdadır.



Şekil - 25

Saponaria officinalis'den İzole Edilen Saponozitler

(Gli A) Glikuronik Asit, (Gli) Glikoz, (Gal) Galaktoz,
(Ksi) Ksiloz, (Ara) Arabinoz, (Ram) Ramnoz, (Fuk) Fukoz.

BUKHAROV ve SHCHERBAK tarafından yapılan bir araştırmada: Açık havada kurutulmuş ve toz edilmiş kökler önce kloroformla ekstre edilerek apolar maddelerden kurtarılmış, tekrar kurutulan kökler, daha sonra kaynar metanolla ekstre edilerek saponozitleri ekstre edilmiş, metanollü ekstraktın, silika jel kaplı plaklarla yapılan ince tabaka kromatografisinde antimon triklorürle mavi mor renk veren iki madde (saponarozit ve gipsozit) teşhis edilmiştir (27).

Maddelerden az polar olanı, kuruluğa kadar uçurulan metanol ekstraktının suda çözülmesinden sonra, sulu çözeltiden etil asetatla ekstre edilerek ayrılmış, iyon değiştirici reçineden geçirilerek temizlenmiştir. Renksiz ve kristalize olan bu bileşiğe araştırmacılar tarafından saponarozit adı verilmiştir.

Saponarozitin asit hidroliziyle elde edilen aglikonun IR spektrumunda, 1725 cm^{-1} de aldehit grubu için karakteristik absorpsiyon bandının görülmemesi nedeniyle gipsogeninden farklı olduğu düşünölmüştür. Kapalı formöllü $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_5$ olarak bulunan aglikonun alkali ile titrasyonunda, serbest iki karboksil grubu taşıdığı, daha önce Acanthophyllum türlerinden izole edilen gipsogenik asitle aynı olduğu görölmüştür.

Moleköl ağırlığı 620 olarak bulunan saponarozitin, oz kısmında sadece bir mol ksiloz taşıdığı, total metilleme işleminde sonra ksilozun gipsogenik asite 3. (C) de bulunan hidroksil grubu üzerinden bağlandığı anlaşılmıştır.

Aynı araştırmada, polar olan ikinci saponozitin izolasyonu için, etil asetat ekstraksiyonundan sonra geri kalan sulu ekstrakt n-butanol ile ekstre edilmiş, elde edilen ürün iyon değiştirici reçineden geçirilerek asidik bir fraksiyon kazanılmıştır. Fraksiyon, partitasyon kromatografisi ile silika jel kolonda saflaştırılmış, elde edilen

amorf maddenin asidik hidroliz, alkali hidroliz ve metilleme işlemlerinden sonra, G.pacifica bitkisinden izole edilen gipsozitle aynı yapıda olduğu gösterilmiştir.

Bitkinin saponozitleri ile ilgili bir diğer araştırma, aynı yıllarda CHIRVA ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (36). Kurutulmuş ve toz edilmiş kökler, önce petrol eteri ile apolar maddelerden kurtarılmış, sonra metanol ile ekstre edilerek saponozitler tüketilmiştir. % 25 Verimle elde edilen hem saponozitin silika jel kaplı plaklarla yapılan ince tabaka kromatografide farklı polaritede dört saponozitin bulunduğu anlaşılmış, bu maddelere artan polaritelerine göre saponozit A, B, C ve D adı verilmiştir. Bu dört saponozitin asit hidrolizinde, aglikon olarak sadece gipsogenin elde edilmiştir (36). Daha sonra yapılan araştırmada, bu dört saponozitin, gipsozitte de olduğu gibi (Şekil-22) aslında iki saponozite ait asidik ve siklik yarı asetal şekilleri olduğu gösterilmiştir (32). Dolayısıyla, saponozit A ile B ve C ile D benzerdirler.

Bu nedenle sonraki çalışmalarda, sadece saponozit A ve D üzerinde durulmuştur (33, 34, 37, 98).

Saponozit A, saponozitler karışımından silika jel kolonda n-butanol: etanol: su (10:2:5) solvan sistemi ile elue edilerek izole edilmiştir. Maddenin asit hidrolizinde gipsogenin yanında, glikuronik asit ve glikoz, alkali hidrolizinde gipsogenin-glikuronozit elde edilmiştir. Bundan, gipsogeninin hidroksil grubuna sadece glikuronik asitin, karboksil grubuna bir veya birkaç mol glikozun bağlandığı sonucu çıkartılmıştır.

Karboksil grubuna bağlı oz kısmının yapısını aydınlatmak için, saponozit önce KUHN yöntemine göre metillenmiş, elde edilen metillenmiş saponozit A asit hidrolizinde 2,3,4,6- tetrametil-D- glikoz,

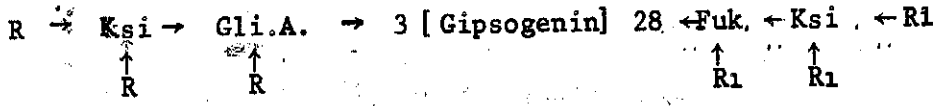
2,3,4- trimetil-D-glikuronik asit metil esteri ve 2,4-dimetil-D-glikoz vermiştir. Metillenmiş saponozit A, daha sonra lityum alüminyum hidrür ile indirgenmiş, hidroliz sonucu 2,4-dimetil-D-glikozun 3. ve 6. (C) larından birer mol glikozun bağlı olduğu anlaşılmıştır. Bu sonuçlar periyodat oksidasyonu ile doğrulanmış, saponozit A'nın yapısı açıklanabilmiştir (33).

Saponozit D'nin yapısı, ancak bir seri çalışma sonunda açıklanabilmiştir (34,36,37, 98). İlk araştırmada saponozitin aglikonu gipsogenin olarak bulunmuş, sonraki çalışmalarda oz kısmının yapısı üzerinde durulmuştur. Saponozit D, önce KUHN yöntemine göre netillenmiş, elde edilen metillenmiş saponozitin asidik hidrolizi sonucu, silika jel kaplı plaklarda yapılan ince tabaka kromatografisinde, metillenmiş ozlara ait 7 leke tespit edilmiştir. Metillenmiş ozlar karışımı süda çözülerek kloroformla ekstre edilmiş, böylece tamamen metillenmiş ozlar, demetillendiğinde galaktoz, glikoz, arabinoz ve ramnoz (terminal ozlar), sulu fazdaki kısmen metillenmiş ozlar demetillendiğinde fukoz, ksiloz ve glikuronik asit elde edilmiştir.

Metillenmiş saponozit D, lityum alüminyum hidrürün karboksil grubuna etkisi sonucu, indirgenmiş bir saponozit ve indirgenmiş bir oligoholozite parçalanmıştır. İndirgenmiş saponozitin hidroliz ürünleri arasında, ince tabaka ve gaz kromatografisi yardımıyla 2,3,4-trimetil-ramnoz, 2,3,4-trimetil-arabinoz, 2,3,4,6- tetrametil-galaktoz (terminal ozlar) ile metil-monometil-glikuronik asit ve monometil-ksiloz bulunmuştur. (gipsogeninin hidroksil grubuna bağlı ozlar). İndirgenmiş oligoholozitin asit hidrolizinde ise 2,3,4-trimetil-ramnoz, 2,3,4,6-tetrametil-glikoz, 2,3,4,6- tetrametil-galaktoz (terminal ozlar) ile monometil-

ksiloz ve 2-metil-fusitol [☆] elde edilmiştir (gipsogeninin karboksil grubuna bağlı ozlar). Bu sonuçlar alkali hidrolizle de doğrulanmıştır (Tablo 8).

Saponozit D, zayıf asidik şartlarda hidroliz edildiğinde gipsogenin-glikuronozit elde edilmiş, dolayısıyla gipsogeninin hidroksil grubuna glikuronik asitin bağlı olduğu açıklanmıştır. Bu çalışmalar sonunda, saponozit D nin yapısı kısmen açıklanabilmektedir (Şekil-26)(34).



R= Ram, Gal, Ara

R₁ = Ram, Gal, Gli

Şekil - 26

Saponozit D'nin Yapısı

(Gli A) Glikuronik Asit, (Gli) Glikoz, (Gal) Galaktoz,
(Ksi)Ksiloz, (Ara)Arabinoz, (Ram) Ramnoz, (Fuk)Fukoz

Daha sonraki araştırmalar, ksiloz ve glikuronik asite ait olduğu önceki çalışmada açıklanan kısmen metillenmiş ozların 3-metil-ksiloz ve metil 2-metil-glikuronik asit olduğu sonucunu vermiştir (98).

Periyodat oksidasyonunda glikuronik asit, ksiloz ve fukozun aglikona bağlı olarak değişmeden kaldığı, dolayısıyla ksiloz ile fukoz

[☆]Fukozun alkolüne dönüşmesi, onun karboksile bağlı ilk oz olduğunu göstermektedir.

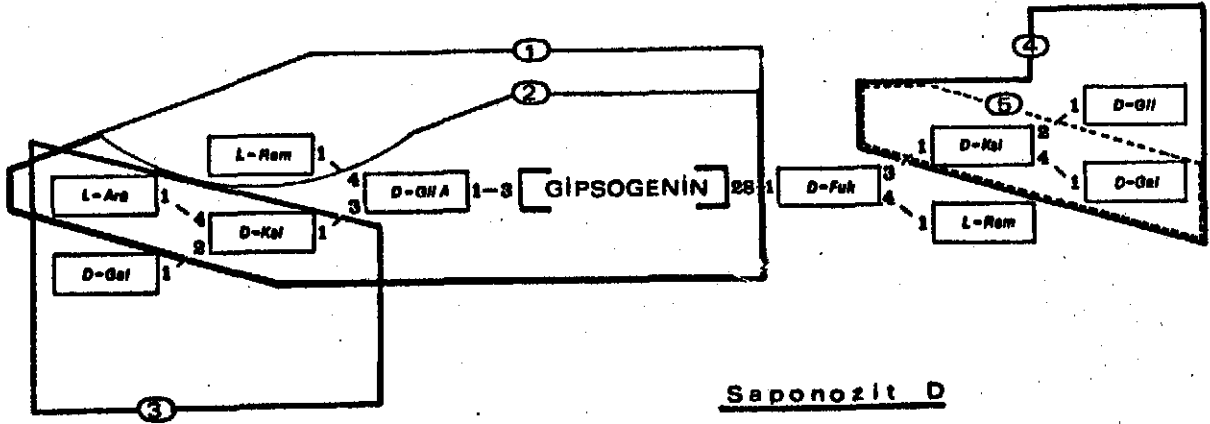
arasında 1-3 bağı olduğu, ksilozun her iki oz zincirinde dallanma noktasında yer aldığı açıklanmıştır (Tablo-8).

Okzalik asitle yapılan kısmî hidrolizde, gipsogenin-glikuronozit, gipsogenin-triozit, gipsogenin-tetraozit ve oligoholozit-1 elde edilmiştir (Tablo-8). Triozitin hidrolizinde glikuronik asit, ksiloz ve arabinoz, tetraozitin hidrolizinde bu ozlara ek olarak ramnoz bulunmuştur. Tetraozit metillendikten sonra hidroliz edildiğinde 2,3,4-trimetil-arabinoz, 2,3,4-trimetil-ramnoz, 2,3-dimetil-ksiloz ve metil 2-metil-glikuronik asit vermiştir. Buna göre, galaktozla ksiloz arasında 1-2 bağı vardır.

Oligoholozit-1, hidroliz edildiğinde ksiloz, arabinoz ve galaktoz elde edilmiştir. Bu da ramnozun doğrudan doğruya glikuronik asite bağlı olduğunu göstermektedir.

Diğer taraftan, saponozit D enzimatik hidrolizle parçalanmış, elde edilen oligoholozit-2 hidroliz edildiğinde galaktoz, ksiloz ve glikoz vermiştir (Tablo-8). Oligoholozit-2, sodyum borohidrür ile indirgendikten sonra hidroliz edildiğinde galaktoz, glikoz ve ksilitol elde edilmiştir. Yine oligoholozit-2, Rhizopus arrhizus mantarıyla enzimatik hidroliz sonucu glikoz yanında bir dioz (oligoholozit-3) vermiştir (Tablo-8). Oligoholozit-3, metillendikten sonra hidroliz edilince 2,3,4,6-tetrametil-galaktoz ve 2,3-dimetil-ksiloz vermiştir. Böylece, glikozla ksiloz arasında 1-2 bağı olduğu anlaşılmıştır. Son olarak, karboksil grubuna bağlı oz zincirinde yer alan ramnozun da fukozla 1-4 bağı yaptığı, elde edilen sonuçlardan çıkartılmıştır.

Ozlar arasındaki bağların konfigürasyonları da KLYNE yöntemine göre tayin edilmiş, saponozit D nin kesin yapısı açıklanmıştır (34).



Zayıf asit hidroliz (% 10 okzalik asit)

- ① Gipsogenin-tetraozit
- ② Gipsogenin-triozit
- ③ Oligoholozit-1

Zayıf asit Hidroliz (% 2 sülfürik asit)

Gipsogenin-3-O-glikuronozit

Enzimatik Hidroliz (diastaz)

- ④ Oligoholozit-2

Enzimatik Hidroliz (Rhizopus arrhisuz)

- ⑤ Oligoholozit-3

Total Asit Hidroliz (% 5 HCL)

Gipsogenin, Gal, Gli, Ksi, Ara, Ram, Fuk, ve Gli A

Alkali Hidroliz (% 10 potasyum hidroksit/70° etanol)

C-3 OH, Gli A, Gal, Ksi, Ram, Ara,

C-17 COOH, Fuk, Ksi, Ram, Gal, Gli.

Tablo - 8

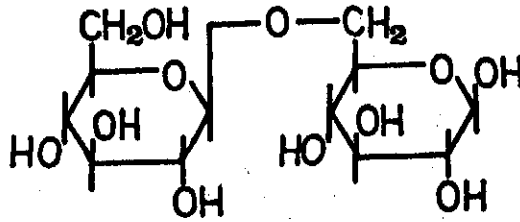
Saponozit D - Yapı Tayininin Esasları

(Gli A) Glikuronik Asit, (Gli) Glikoz , (Gal) Galaktoz,
(Ksi) Ksiloz, (Ara) Arabinoz, (Ram) Ramnoz, (Fuk) Fukoz.

Oligoholozitlerle ilgili Çalışmalar : BUKHAROV ve SHCHERBAK, kökün metanollü ekstraktından, aglikonları gipsogenin ve gipsogenik asit olan iki saponoziti izole ettikten sonra, aynı ekstrede bulunan üç oligoholozitin (A, B ve C) yapısını da incelemişlerdir (28).

İzolasyon için, metanol ekstraktından, n- butanol ile saponozitlerin tüketilmesinden sonra, geriye kalan sulu ekstrakt kullanılmıştır. Ekstrakt, yoğunlaştırılmış, selüloz kolondan, suyla doyurulmuş n- butanol ile elue edilmiştir. Oligoholozitleri taşıyan fraksiyonlar, Sephadex G-25 kolonlarda veya diyalizle temizlenmiştir.

Oligoholozit A'dan, asit hidroliz sonucu sadece glikoz elde edilmiştir. Fiziksel özellikleri, kromatografik davranışı ve elementer analiz sonuçlarına göre bu maddenin gentiobioz (Şekil - 27) ile aynı olduğu anlaşılmıştır.



Şekil - 27

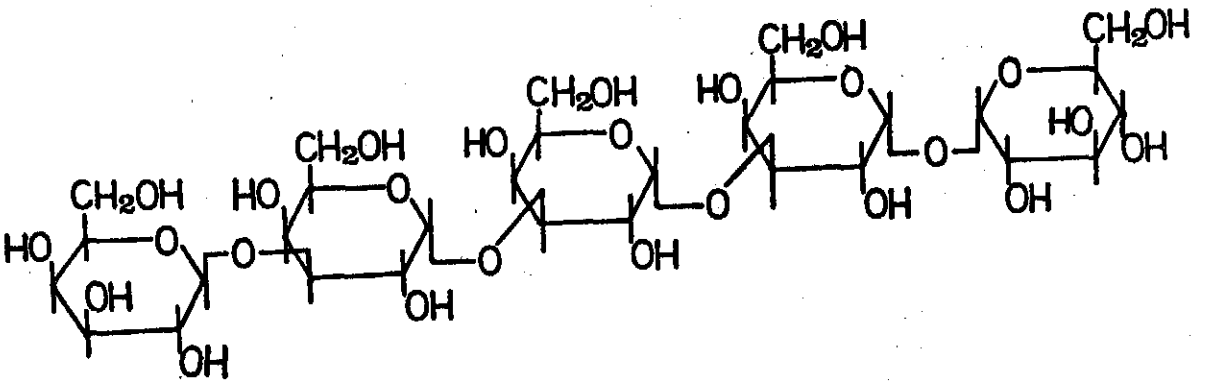
Gentiobioz

Diğer taraftan ekstraktan % 12 sini Oligoholozit C (Saponaroz) nin meydana getirdiği görülmüştür. Miktarı çok az olan oligoholozit B saf olarak elde edilememiştir. Saponarozun asit hidrolizinde, galaktoz ve glikoz (4 : 1 oranında) bulunmuştur. Molekül ağırlığı ve aseta-

tından bir pentaholozit olduğu anlaşılmıştır. Fehling'i indirgememesi fenil osazonu teşekkül etmemesi ve seyreltik alkalilerle değişikliğe uğramaması nedeniyle, bağ tipinin (1 : 1) olduğu anlaşılmıştır.

Metillendikten sonra, hidroliz edildiğinde 2,3,4,6-tetrametil-D-glikoz, 2,4,6-trimetil-D-galaktoz ve 2,3,4,6-tetrametil -D- galaktoz elde edilmiştir. Böylece, glikoz ve 1 mol galaktozun molekülde, terminal olarak yer aldığı, diğer galaktozların ise arada bulunduğu tespit edilmiştir. Aradaki galaktozlar birbirleriyle 1-3 bağı yapmaktadırlar. Bu durum, periyodat oksidasyon sonuçlarıyla da doğrulanmıştır. Potasyum periyodatın bileşik üzerinde etkisi, sonra seyreltik mineral asitlerle hidrolizi sonucu, hidrolizatta sadece galaktoz teşhis edilmiştir. Zayıf asit hidroliz sonucunda, glikozun galaktozla 1-1 bağı yaptığı gösterilmiştir.

Ozidik bağların konfigürasyonları da KLYNE kuralına göre hesaplanmış, saponarozun tam yapısı açıklanmıştır (Şekil - 28).



Şekil - 28

Saponaroz

KİMYASAL BÖLÜM
PRATİK ÇALIŞMALAR

Y Ö N T E M

Köpürme ve Hemoliz İndeksi

Saponozit taşıyan bitki ekstraktlarının eczacılıkta kullanılması, etken olan grubun kantitatif tayin edilmesini gerektirmektedir. Saf olarak elde edilmeleri çok zor olduğundan uygun bir kimyasal bir yöntemde geliştirilememiştir. Bu nedenle, saponozit taşıyan droglar için köpürme indeksi, hemoliz indeksi ve hemoliz değeri ile balık indeksi gibi bazı nümerik değerlerin tayini istenir. Bu değerler, drogların taşıdıkları saponozit miktarına değil, yapısına bağlıdır. Yani, bir drogun taşıdığı saponozit miktarı çok, fakat hemoliz indeksi küçük bir değerde olabilir. Yaptıkları hemoliz ile, kimyasal yapıları arasında ilişki bulunduğu birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (130-134). Bu nedenle ancak, benzer yapıdaki saponozitleri taşıyan drogların taşıdıkları saponozitlerin miktarlarının karşılaştırılmasında kullanılabilirler. Ayrıca, hemolitik aktivite veya köpük yapma özelliklerinin, farmakolojik aktiviteleri ile paralel olarak hareket ettiği yapılan araştırmaların sonucudur (50,161).

Bazı saponozitler için özel miktar tayini yöntemleri geliştirilmiştir (112,116,139). Saponozitler, önce kromatografik olarak ay-

rılmış, sonra uygun reaktifler kullanılarak elde edilen renkli türevleri spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir (116). Benzeri bir yöntem, steroidal saponinlerin kolorimetrik tayini için geliştirilmiştir (112). Bir glikoalkaloit olan tomatin için geliştirilen ve oz kısmı üzerinden yürüyen kolorimetrik yöntem de örnek olarak gösterilebilir (139).

Araştırmamızda, Saponaria kotschyi bitkisinin köklerinde bulunan saponozitlerin, farmakopelerde kayıtlı yöntemler kullanılarak köpürme ve hemoliz indeksleri tayin edilmiştir. Köpürme indeksinin tayini için, Fransız Farmakopesinin, hemoliz indeksinin tayini için de Macar Farmakopesinin verdiği yöntemler kullanılmıştır.

Köpürme İndeksi

500 ml lik bir erlenmayerde 1g toz 100 ml su ile kaynatılır, süzülür, soğuduktan sonra bir balon jojede 100 ml ye tamamlanır. Bu numune çözeltisidir. 10 tüplük bir seri hazırlanır, tüpler 16 cm boyunda ve 16 mm çapındadır. Her tüpe sırasıyla 1, 2, 3, ... 10 ml yukardaki şekilde hazırlanan dekoksiyondan konulur, distile su ile 10 ml ye tamamlanır,

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

her tüp baş parmakla kapatılarak, yatay durumda saniyede iki defa olmak üzere 15 saniye çalkalanır, 15 dakika sonra tüplerdeki köpük yükseklikleri ölçülür. Eğer bütün tüplerde köpük yükseklikleri 1 cm den fazla ise, dekoksiyon daha seyreltik olacak şekilde yeniden hazırlanır. Köpük yüksekliği 1 cm ye en yakın olan 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 konur, her tüp distile su ile 10 ml ye tamamlanır.

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

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

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

A: Dekoksiyondaki drog miktarı (g).

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

Hemoliz indeksi

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

% 2 lik kan süspansiyonu: Geniş ağızlı bir cam kap içinde, taze sığır kanı tahta bir çubukla karıştırılarak fibrinin ayrılması sağlanır. Çift kat tülbentten süzülür, süzüntünün 10 ml si 500 ml lik bir balon jojeye aktarılır, tampon çözeltiyle tamamlanır. Kan süspansiyonu, kullanılabildiği gün taze hazırlanır.

Standard saponin çözeltisi: Tam tartılmış 20 mg Saponinum purum album (Merck 7695), balon jojede tampon çözeltiyle çözülür, 100 ml ye tamamlanır.

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

Ham saponozit çözeltisi: Tam tartılmış 50 mg ham saponozit, balon jojede tampon çözelti ile çözülür, 100 ml ye tamamlanır.

Ön deneme: 6 deney tüpüne 0,2 ml den başlanarak drog ekstraktından koyularak aşağıdaki 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 iyice kurutulmuş olmalıdır. Hazırlanan karışımlar, tüplerin ağzı kuru parmaklarla kapatılarak, aşağı yukarı çevrilmek suretiyle karıştırılır. Köpürmeyi önlemek için 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 arttırılarak bir gam daha hazırlanır. Sınır tüp tespit edilir. Aynı işlemler hem saponozit çözeltisi için de tekrarlanır.

İndeksin tayini: Ön denemeden sonra, gerçek hemoliz indisini tespit etmek amacıyla aynı drog ekstraktından veya hem saponozit çözeltisinden 12 deney tüpü ile bir gam hazırlanır. 12. tüpe, ön denemede sınır olarak tespit edilen dilüsyon kadar, diğerlerine 0,05 ml azaltılarak drog ekstraktından konur. Her tüp, tampon çözeltiyle 5 ml ye tamamlanır, üzerine 5 ml kan süspansiyonu ilave edilir. Ön denemede ki şekilde karıştırılır, 6 saat sonra hemoliz meydana gelen ilk tüp tespit edilir, bu tüpün dilüsyonu hemoliz indeksini verir.

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

(A) Tüpteki sıvı toplamı (10 ml).

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

Aynı denemeler, standart saponin çözeltisi için de uygulanır, kullanılan sığır kanı için hemoliz indeksi hesaplanır.

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

Kan faktörü : $\frac{25\ 000\ (\text{standart saponinin H.İ.})}{\text{Deneyde bulunan H.İ.}}$

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

Hemoliz indeksi = Deneyde bulunan H.İ. x Kan fakt.

Saponozitler

Genel

Köklerde bulunan saponozitlerin ekstraksiyonu, tanımı, izolasyonu ve yapı tayini ile ilgili pratik çalışmalar bu kısımda verilmiştir. Çalışmalarımızda kolon, ince tabaka ve kağıt kromatografisi yöntemleri uygulandığında, kullanılan solvan sistemleri tekrarlardan kaçınmak için, konunun başlangıcında sunulmuştur. Tablo-9 da, çalışmalarımız sırasında kullanılan sistemler bulunmaktadır. Ön çalışmalarımız sırasında, uygun sonuçlar almadığımız sistemler bu tabloda gösterilmemiştir. Tabloda yer alanlar, uygun sonuçlar verdikleri için araştırmamızda kullanılanlardır.

Ekstraksiyon

Toz edilmiş materyelin, yağsı ve reçinemsî maddelerden temizlenmesi için, soxhlet cihazında kloroform veya petrol eteri ile ekstre edildi. Kloroform, daha kısa zamanda ve daha iyi sonuç verdiği tespit edildiğinden, çalışmalarda tercih edildi. Diğer taraftan, kloroform ekstraktında serbest triterpenlerin bulunup bulunmadığı da araştırıldı. Silikajel G kaplı plaklarda, eter: benzen (4:1) solvan sistemi ile yapılan kromatografik araştırmada, serbest triterpen bulunmadığı anlaşıldı.

Apolar maddelerden temizlenen materyel, açık havada bırakılarak kloroformdan kurtarıldı. Tekrar soxhlet cihazına yerleştirilerek, etanol (80°) veya metanol ile saponozitler tüketildi. Metanol ile elde edilen ekstrakt daha kolay temizlendiği için, sonraki ekstraksiyonlar bu çözücü ile yapıldı. İlk 8 saatlik tüketme işleminden sonra solvan yenilenerek, 8 saat süreyle ekstraksiyon tekrarlandı. Ekstreler, sili-kajel G kaplı plaklarda, n-butanol: izopropanol: asetik asit: su (4:2:1:3) solvan sistemi kullanılarak ekstraksiyonun tamamlanıp tamamlanmadığı kromatografik olarak kontrol edildi, saponozit fraksiyonunun tamamen ekstre edildiği ve üçüncü bir ekstraksiyona gerek kalmadığı anlaşıldı.

1 kg toz edilmiş materyel, 0,5 kg lık kısımlar halinde selüloz kartuşlar içinde, her 8 saatte solvan değiştirilerek soxhlet cihazında ikişer litre kloroformla 16 saat devamlı ekstre edilir. Sarımsı yeşil renkteki ekstraktlar birleştirilir, alçak basınçta kuruluğa kadar uçurularak kloroform geri kazanılır.

Ön ekstraksiyondan sonra, materyel açık havada kurutulur. İkişer litre metanol ile soxhlet cihazında 8 saat ekstre edilir. Birinci tüketme işleminden sonra ekstrakt alınır, aynı şekilde ekstraksiyon tekrarlanır. Ekstraktlar birleştirilip, alçak basınçta kuruluğa kadar uçurulur, koyu sarı kahverengimsi renkte, saponozitleri taşıyan bir ekstre elde edilir. Bu saponozit ekstresidir.

Metanol ile elde edilen saponozit ekstraktları, birleştirilip, alçak basınçta kuruluğa kadar uçuruldu. Saponozit ekstresi suda çözüldü, önce etil asetat (sonra n-butanol ile tüketildi. Yapılan kromatografik çalışmalarda, etil asetatlı fazlarda saponozit bulunmadığı anlaşıldığından, sonraki çalışmalarda sulu faz sadece n-butanol ile ekstre edildi. Son olarak, iyi bir temizleme şekli olduğu tespit edilen, soğuk asetondan çöktürmek suretiyle ham saponozit elde edildi.

250 g Saponozit ekstresi, 750 ml suda çözülür, defalarca n-butanol ile ekstre edilir. Ekstraksiyonun bitimi, sili-kajel G kaplı plaklarda n-butanol:izopropanol:asetik asit:

su (4:2:1:3) solvan sistemi kullanılarak, ince tabaka kromatografisi ile kontrol edilir. Seponozitler tamamen tükenince, ekstraksiyona son verilir, n-butanol ekstraktları birleştirilir. Alçak basınçta yoğunlaştırılır, soğuk asetona damla damla ilave edilir, sürekli karıştırılarak çöktürülür. Çökelti, dakikada 3000 devir yapan santrifüjle ayrılır, soğuk asetonda yıkanıp tekrar santrifüje edilir. Alçak basınçta, düşük ısıda kurutularak kirli beyaz renkte, amorf bir toz elde edilir. Bu ham seponozittir (verim yaklaşık % 5).

No	Solvan Sistemleri	Oran	Yöntem	Lit.
1.	Eter : Benzen	4:1	İTK,SK	27,29
2.	n-Butanol : Asetik Asit : Su	4:1:5	İTK,SK	29,34
3.	n-Butanol : i-Propanol : Asetik Asit : Su	4:2:1:3	İTK	
4.	n-Butanol : Etanol : % 25 Amonyak	7:2:5	İTK	34
5.	Kloroform : Metanol : Su	65:35:10	İTK,SK	152
6.	n-Butanol : Piridin : Su	9:5:4	KK	93
7.	Etil Asetat : Piridin : Su	3,6:1:1,5	KK	41
8.	n-Butanol : Etanol : Su	10:3:5	İTK,SK	37
9.	Benzen : Aseton	2:1	İTK	37
10.	Benzen : Aseton	1:1	İTK	146
11.	Benzen : Etanol	8:2	İTK	8
12.	Kloroform : Metanol	9:2	İTK	152
13.	Etil Metil Keton/Suyla doyurulmuş		İTK	99,144
14.	Kloroform : Etanol	50:1	SK	29
15.	Benzen : Etanol	10:1	SK	37
16.	Benzen : Etanol	85:15	İTK	8
17.	Benzen : Aseton	5:1	İTK,SK	154
18.	Kloroform : Etil Asetat	3:1	SK	29
19.	Benzen : Aseton	10:1,..1:1	SK	154
20.	Kloroform : i-Propanol	%1 → %15	SK	29

Tablo - 9

Araştırma Süresince Kullanılan Solvan Sistemleri
(İTK) İnce Tabaka Kromatografisi, (KK) Kağıt Kromatografisi,
(SK) Kolon Kromatografisi.

Tanım

Ham saponozitin, silikajel kaplı plaklarda asidik (n-butanol : asetik asit : su/4 : 1 : 5 ve n-butanol : izopropanol : asetik asit : su/4 : 2 : 1 : 3), bazik (n-butanol : etanol : %25 amonyak/7 : 2 : 5) ve nötral (kloroform : metanol : su/65 : 35 : 10) solvan sistemleri ile kromatografik kontrolünde (Tablo - 10) başlıca iki saponozit taşıdığı tespit edildi. Kromatogramlara sülfürik asidin sudaki %30 luk çözeltisi (59, 167), antimon triklorürün kloroformdaki %25 lik çözeltisi (11, 59, 115, 167) fosfotungstik asidin etanoldeki %20 lik çözeltisi (115) püskürtülüp, 110°C de 5-10 dakika ısıtıldıklarında saponozitlerin bulunduğu yerler mor ve kırmızının değişik tonlarındaki lekeler halinde belirdi. Diğer taraftan, aynı solvan sistemleri kullanılarak elde edilen plaklar, izotonik sodyum klorür çözeltisinde hazırlanmış %2 lik defibrine eritrosit-jelatin suspansiyonu ile kaplandı (115, 141), 2-3 saat sonra, hemoliz meydana gelen lekeler bulunduğu görüldü. Bu hemolizin saponozitlerden ileri geldiği, daha önce kullanılan reaktiflerle mor-kırmızı renk veren lekelerle aynı R_f değerine sahip maddeler olduğu anlaşıldı. Bu saponozitlere (S1) ve (S2) kotları verildi. Diğer revelatörlerle belirlenen ve (S1),(S2) lekelerinin dışında kalan, daha küçük R_f değerine sahip lekeler ise, karışımda bulunan oligoholozitler olarak değerlendirildi. Bunlara (01), (02) ve (03) kotları verildi.

500 ml %09 luk sodyum klorür çözeltisine 22,5 g toz jelatin ilave edilir, 30 dakika kendi halinde şişmeye bırakılır, su banyosunda karıştırılarak 80°C ye ısıtılır, elde edilen çözelti 40°C ye soğutulur, 6 ml defibrine sığır kanı ilave edilir.

Defibrine sığır kanının hazırlanması: Yeni kesilmiş sığırdan 200 ml kan, 1 litrelik geniş ağızlı bir erlene toplanır, tahta çubukla hızlı bir şekilde karıştırılarak fibrinin aglutine olması sağlanır. Jelatinimsi kalıntı, birkaç tabaka tülbentten süzülerek ayrılır. Elde edilen defibrine kan, 3-4°C de 1-2 gün saklanabilir.

Diğer taraftan ham saponozit , silikajel G kaplanmış plaklarda 2,3,4 ve 5 nolu solvan sistemleri kullanılarak ince tabaka kromatografisine uygulanır. Sürüklenmeden sonra, plaklar iyice havalandırılır, solvan uzaklaştırılır, plakla-

rın çevresi 1 cm yüksekliğinde bir bantla çevrilir. Hazırlanan plaklar, düz bir zeminde soğutucu bir blok üzerine yerleştirilir, her plak üzerine yukarıdaki şekilde hazırlanan kan jelatin süspansiyonundan ellişer ml ince bir film meydana getirecek şekilde yayılır.

Birkaç saat içinde, kan jelatin filminde saponozitlerin buldukları yerler saydamlaşarak beyaz lekeler halinde belirir.

Aynı şekilde, ham saponozitin silikajel G kaplanmış plaklarda, aynı solvan sistemleri ile elde edilen kromatogramlarına sülfürik asit, fosfotungstik asit ve antimon tri klorür reaktifleri püskürtülüp, 110 - 120°C de 5 - 10 dakika ısıtılır. Bu reaktiflerle mor-kırmızı renk veren lekeler saponozitlere aittir.

Adsorban	Kieselgel G Tip 60 (Merck)		
Kalınlık	0,3 mm		
Aktivasyon	120°C de 25 - 30'		
Solvan Sistemi-2	n-BuOH : AcOH : H ₂ O	(4:1:5)	
" "	-3 n-BuOH : i-PrOH : AcOH : H ₂ O	(4:2:1:3)	
" "	-4 n-BuOH : EtOH : % 25 NH ₃	(7:2:5)	
" "	-5 CHCl ₃ : MeOH : H ₂ O	(65:35:10)	
Reaktifler	% 30 Sülfürik asit/H ₂ O		
	% 25 Antimon triklorür/CHCl ₃		
	% 20 Fosfotungstik asit/EtOH		
	110°C de 5 - 10'		

Tablo - 10

Ham Saponozitin İnce Tabaka Kromatografisi

İzolasyon

Saponozitlerin (S1 ve S2) teşhisinden sonra, izolasyonları kolon kromatografisi ile yapıldı. Bunun için, değişik adsorbanlar ve solvan sistemleri denendi. Selüloz kolonlarda, suyla doyurulmuş n-butanol ve n-butanol : etanol : su (1:1:1) solvan sistemleri kullanıldı. Alüminyum oksitle doldurulmuş kolonlarda da n-butanol : etanol : su (10 : 2 : 5) (38) solvan sistemiyle çalışıldı, uygun elusyon olmadı. En iyi ayırım silikajel kolonlarda elde edildi. Ham saponozit önce asidik bir solvan sistemi (n-butanol : asetik asit : su/4:1:5) ile oligoholozitlerden kurtarıldı, ardından silikajel doldurulmuş ikinci bir kolonda nötral bir solvan sistemi (kloroform : metanol : su/65:35:10) ile elue edilerek, saponozitler izole edildi.

SK - 1

Adsorban	Kieselgel 60	(0,063-0,125 mm) Merck
Solvan sistemi - 2	n-BuOH : AcOH : H ₂ O	(4:1:5) üst faz
Fraksiyonlar	100 ml	
Kolon boyutları	3,5 X 55 cm	
Elusyon hızı	1,5-2 ml/dak.	
Materyel	Ham saponozit	

Fraksiyonlar, silikajel G kaplı plaklarda solvan sistemi-3 (n-butanol : izopropanol : asetik asit : su/4:2:1:3) ile kromatografik olarak kontrol edildi. Saponozitleri taşıyan fraksiyonlar alındı, gerekenler birleştirildi, yoğunlaştırıldı ve çöktürüldü. (S2) saponozitini daha fazla miktarda taşıyan saponozit fraksiyonundan (S2) yi ayırmak için aşağıdaki kolon ve solvan sistemi kullanıldı (SK-2).

SK - 2

Adsorban	Kieselgel 60 (0,063 - 0,125 mm) Merck
Solvan sistemi - 5	CHCl ₃ : MeOH : H ₂ O (65:35:10) alt faz
Fraksiyonlar	20 ml
Kolon boyutları	3,5 x 40 cm
Elusyon hızı	1,5 - 2 ml/dak.
Materyel	S1 + S2 saponozitleri karışımı

Kolon Hazırlanması (SK - 1)

250 g Kieselgel 60 (0,063 - 0,125 mm) (Merck), n-butanol: asetik asit: su (4:1:5) solvan sisteminin üst fazıyla suspansiyon haline getirilerek kolona aktarılır, homojen bir şekilde yerleşmesi sağlanır. Daha sonra 12,5 g ham saponozit su ve n-butanol karışımında çözülür, 25 g Kieselgel ilave edilir, alçak basınçta kuruluğa kadar uçurulur, havanda iyice homojen hale getirilir, az miktarda solvan sistemi ile kolona tatbik edilir. Aynı solvan sistemiyle elusyona başlanır.

SK-2 kolonu SK-1 kolonu gibi hazırlanır. Yalnız, kolona koyulan adsorban miktarı 150 g dır, 2,6 g saponozit karışımı da 20 g adsorbanla karıştırılarak 5 nolu solvan sisteminin yardımıyla kolona tatbik edilir.

Her iki sistemle de çalışılırken, fraksiyonlardan uygun olanları birleştirilir, alçak basınçta yoğunlaştırılır, yoğun eluat soğuk asetona damlatılır, saponozitler karışımı veya saponozit çöktürülür, 3000 devirli santri-

sfüjde 20 dakikada santrifüje edilir. Çöktürleri, soğuk asetonla yıkanır, tekrar santrifüje edilir, vakumlu etüvde kurutulur. Böylece, kolondan elue edilen saponozitler karışımı veya saponozit elde edilmiş olur.

Yapı Tayini

Bilinmeyen bir saponozitin yapısının aydınlatılması için, ilk yapılan işlem total asit hidrolizdir. Hidroliz sonunda, aglikon ve bağlı ozlar ayrı ayrı fazlarda elde edilebilirler. Aglikon, kolon ve preparatif ince tabaka kromatografisi ile temizlendikten sonra kristallendirilir, yapı araştırma yöntemleri (IR, NMR, Kütle Spekt.) ile ve kromatografik olarak şahit maddelerle karşılaştırılarak açıklanmaya çalışılır. Ayrıca, asetat türevleri karakteristik erime derecelerine sahiptir. Bu nedenle bu türevleri de hazırlanabilir. Bağlı ozların teşhisi ise, en basit şekilde kağıt kromatografisiyle yapılır. Gaz kromatografisi kullanılarak hem teşhisleri, hem de molar oranları tespit edilebilir. Eğer yapı bisdesmozidik ise, her iki oz zincirinin ayrı ayrı incelenmesi gerekir. Bunun için yapı alkali hidroliz ve lityum alüminyum hidrür yarılmaları ile açilozidik bağ seçici olarak parçalanarak, incelenmesi daha kolay olan ürünlere dönüştürülür. Ayrıca, periyodat oksidasyonu, zayıf asit hidrolizler, permetilasyon ve enzimatik hidrolizler oz zincirlerinin, dolayısıyla saponozitlerin yapılarının aydınlatılmasında yararlanan diğer yöntemlerdir. Bütün bunların yanında, saponozitlerin permetil ve perasetil türevlerinden hareketle yapılan kütle spektrofotometrik çalışmalar, yapı hakkında doğrudan doğruya bilgi edinmek için başvurulan önemli bir yoldur.

Total Hidroliz

Saf olarak elde edilen(S2)saponoziti, uygun bir asit hidrolizle aglikon ve ozlarına parçalandı. Hidroliz için,susuz metanolde hazırlanmış % 5 lik gaz hidroklorik asit (a/a) kullanıldı. Total hidroliz için yeterli süre, her saat başı hidrolizattan alınan numunenin kromatografik olarak incelenmesi ile, 6 saat olarak tespit edildi. Hidroliz sonucu, ortama su katılarak aglikon ayrıldı, ozların bulunduğu çözelti 2 saat daha hidroliz edilerek ozidik metil grupları da koparıldı.

100 mg (S2), 10 ml gaz hidroklorik asidin susuz metanoldeki % 5 lik çözeltisi ile 100° C lik yağ banyosunda 6 saat ısıtılarak hidroliz edilir. Sürenin bitiminde ortama 10 ml su ilave edilir, düşük ısı ve alçak basınçta metanol ortamdandan uzaklaştırılır. Çöken aglikon, mavi bantlı süzgeç kağıdından(Schleicher & Schüll No. 589³)süzülerek ayrılır, süzüntü aynı şartlarda 2 saat daha hidroliz edilir. Böylece, susuz metanollü ortamda metil-ozitleri halindeki ozlar, serbest duruma getirilir. Hidrolizat su ile seyreltilir, gümüş karbonat ile turnusol kağıdına karşı nötralleştirilir, çöken gümüş klorür süzülerek ayrılır. Elde edilen berrak süzüntü n-butanol katılarak alçak basınçta kuruluğa kadar uçurulur, artık yeterli miktardaki metanolda çözülür, bu ozları taşıyan çözeltidir.

Aglikonun Elde Edilmesi Ve Tanımı

Aglikon fraksiyonu, silikajel kaplı plaklarda eter: benzen (4:1) solvan sistemi kullanılarak şahit madde ile karşılaştırıldı, kromatogramda gipsogenin ile aynı R_f değerine sahip bir leke görüldü.

Gipsogenin, asidik ortamda gipsogenin-laktone dönüştüğünden (73, 158), kromatogramdaki diğer şiddetli lekenin laktone ait olabileceği düşünüldü. Saponinum purum album (Merck 7695) un aynı şart-

larda total asit hidrolizi ile elde edilen aglikon fraksiyonu, (S2) saponozitinin aglikon fraksiyonu ile ince tabaka kromatografisinde aynı R_f değerlerine sahip lekeleri verdi. Bu nedenle, aglikonu elde etmek için, KON ve SOPER tarafından uygulanan yöntem kullanıldı (95). Daha sonra, silikajel kolonda eter : benzen (4:1) solvan sistemi ile temizlenip, metanolde kristallendirildi, kurutuldu ve aglikon elde edilmiş oldu.

SK - 3

Adsorban	Kieselgel (0,2-0,5 mm) Merck
Solvan sistemi - 1	Et ₂ O : C ₆ H ₆ (4:1)
Fraksiyonlar	5 ml
Kolon boyutları	2 X 20 cm
Elusyon hızı	1,0-1,5 ml/dak.
Materyel	Ham aglikon fraksiyonu

(S2) saponozitinin asit hidrolizi ile elde edilen aglikon fraksiyonları, 50 ml eterde çözülür, eterli çözelti 100 ml 1 N potasyum hidroksit çözeltisi ile çalkalanır, eterli faz aktarılarak ayrılır, atılır, sulu faz, hidroklorik asidin sudaki % 1 lik çözeltisiyle turnusola karşı asitlendirilip, çöken aglikon eterle ekstre edilir. Eter uçurulur, elde edilen artık kaynar metanolde çözülür, aktif kömürle çalkalanır, mavi bantlı süzgeç kağıdından (Schleicher-Schüll No. 589³) süzülür, elde edilen berrak çözeltinin metanolü uçurulur, ham aglikon fraksiyonu, Kieselgel (0,2 - 0,5 mm) doldurulmuş kolona tatbik edilir, eter: benzen (4:1) solvan sistemi ile fraksiyonlanır.

Fraksiyonlar, Kieselgel G kaplı plaklarda aynı solvan sistemi kullanılarak ince tabaka kromatografisi ile kontrol edilir, aglikonu taşıyan fraksiyonlar birleştirilir, kuruluğa kadar uçurulur, çözünebildiği en az miktardaki sıcak metanolde çözülür, oda ısısında kristallanmaya bırakılır. İnce, iğnecikler halinde beyaz kristaller elde edilir.

Oz Zincirinin Yapısı

Total asit hidrolizi ile elde edilen çözeltisinin yarısı kağıt, diğer yarısı gaz kromatografik analizlerde kullanılmak üzere iki kısma ayrıldı.

Kağıt Kromatografisi: Kromatografik çalışmalarda ozları iyi bir şekilde ayıran solvan sistemleri kullanıldı. Çıkan kağıt kromatografisinde etilasetat: piridin: su (3,6:1:1,15)(41), inen-damlayan kağıt kromatografisinde ise n-butanol:asetik asit:su (4:1:5)(29,34) ile n-butanol:piridin:su(9:5:4)(93) solvan sistemleri kullandı (Tablo-11). Galaktoz ile glikozun ayırımı için sistem-6, arabinoz ile fukoza ayırımı için ise sistem-2 nin uygun olduğu görüldü. Reaktif olarak, yapılan araştırmalarda iyi bir renklenme yaptığı tespit edilen β -naftilamin (93) ve anilin hidrojen ftalat (114) reaktifleri kullanıldı.

(S2) saponozinin asit hidrolizi ile elde edilen oz çözeltisi, inen-damlayan veya çıkan kağıt kromatografisine uygulanır. Her ikisinde de 20 X 50 cm boyutlarında kesilmiş Schleicher & Schüll 2043 a mg'l kromatografi kağıtları kullanılır. Inen-damlayan sistemde kağıdın alt ucuna 2 cm büyüklüğünde dişler yapılır, sürüklenme ve damlama kolaylaştırılır. Kağıtlar, solvan sistemi bulunan 20 X 50 X 55 cm boyutlarındaki kromatografi tanklarında 3 - 4 saat doymaya bırakılır. Sistem 2,6 veya 7 ile sürüklenir. Sürükledikten sonra, kağıtlar açık havada kurutulur, β -naftilamin ve anilin hidrojen ftalat reaktifleri püskürtülür, 110 C de 5 - 10 dakika tutulur, lekeler işaretlenir. β -naftilamin reaktifi ile pentoz-

lar pembe, aldoheksozlar kahverengi, uronik asitler kırmızı-kahverengi ; anilin hidrojen ftalat reaktifi ile heksozlar kahverengi, pentozlar pembe-kırmızı, metilpentozlar açık kahverengi, uronik asitler kırmızı-kahverengi renk verirler.

Kağıt	Schleicher & Schüll 2043 a Mgl (20 x 50 cm)
Developman tankı	20 X 50 X 55 cm.

Çıkan KK:

1. Solvan sistemi-7 EtOAc : Py : H₂O (3,6 : 1:1,15)
Sürüklenme süresi 24 saat

İnen ve Damlayan KK

1. Solvan sistemi-2 n-BuOH : AcOH : H₂O (4:1:5) üst faz
Sürüklenme süresi 48 saat

2. Solvan sistemi-6 n-BuOH : Py : H₂O (9:5:4)
Sürüklenme süresi 24 saat

Reaktif Anilin hidrojen ftalat
β - Naftilamin 110°C, 5 - 10'

Tablo - 11

Ozların Kağıt Kromatografisi

Gaz Likit Kromatografisi: Total asit hidroliz sonucu elde edilen oz karışımı, gaz kromatografik analiz için de kullanıldı. Bu amaçla oz karışımları WULEF yöntemine göre silillendi(171), %10 SE-30

Chromosorb kolon kullanılarak gaz kromatografa enjekte edildi. Uygulanan hidroliz için, her oza ait düzeltme faktörleri hesaplanmadığından, kromatogramlar sadece kalitatif olarak değerlendirildi. Şahit olarak, ramnoz, fukoz ve galaktozdan hareketle elde edilen silillenmiş ozlar ve Cycleman neapolitanum ^{*} a bitkisinden izole edilen (6) saponin-C desglükosiklaminin silillenmiş ozlarının karışımı (arabinoz:ksiloz:glüköz/1:1:2) kullanıldı.

Şahit Ozların Silillenmesi: Yirmişer mg galaktoz, ramnoz ve fukoz ayrı ayrı yeterli miktardaki suda çözülür, 24 saat kendi haline bırakılır, alçak basınçta kuruluğa kadar uçurulur. Her biri ayrı ayrı 0,8 ml piridinde çözülür, 0,4 ml heksametildisilazan (HMDS) ve 0,4 ml trimetilklorosilan (TMS) ilave edilir. Karışım, 95°C deki yağ banyosunda 1 saat ısıtılır. Silillenmiş ozları taşıyan çözelti, berraklaşmaya kadar G4 tipi cam filtreden süzülür, 45°C deki su banyosunda alçak basınçta defalarca proanaliz benzol ilave edilerek, piridin kokusu kalmayınca kadar uçurulur. Artık, proanaliz benzolde çözülür, uygun miktarlarda gaz kromatografisine enjekte edilir.

^{*}Cyclamen neapolitanum, Ten. Saponinlerin Yapıları " adlı çalışmada sonucu izole edilen saponin - C nin silillenmiş ozlar karışımı, araştırmayı yapan Dr.H.ANIL'dan temin edilmiştir. Gaz kromatografik çalışmalar, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Kürsüsünde yapılmıştır.

Hidroliz Ürünlerinin Silillenmesi: Total asit hidroliz sonucu elde edilen oz çözeltisinin yarısı, alçak basınçta n-butanol ilave edilerek kuruluğa kadar uçurulur. Şahit ozların silillenmesinde olduğu gibi silillenir. Eğer gerekiyorsa çözmede kullanılan piridin miktarı 1,5 ml ye kadar çıkarılır.

Kromatografi Şartları:

Kromatograf	JEOL-JGC-20K Gaz Kromatograf
Dedektör	FID
Stasyonier faz	% 10 SE-30
Adsorban	Chromosorb
Kolon	Çelik, spiral 1 m uzunluk, 3 mm çap
Enjektör ısısı	220°C
Kolon ısısı	110-270°C, 4°C/dakika, programlı
Taşıyıcı gaz	Azot
Akış hızı	2,2 kg/cm ²
Hava	2 kg/cm ²
Hidrojen	1,7 kg/cm ² ateşleme 0,6 kg/cm ² ölçüm
Kağıdın yürüme hızı	5 mm/dakika

Zayıf Asit Hidroliz

~~Eğer saponozitlerin~~ oz kısmında uronik asit varsa, bunun doğrudan doğruya aglikonun 3. (C) undaki hidroksil grubuna bağlı olduğu bilinmektedir (158). Saponaria, Dianthus, Gypsophila, ve Acanthaphyllum gibi Caryophyllaceae bitkilerinden elde edilen triterpenik saponozitler üzerinde yapılan araştırmalarda, zayıf asit

hidrolizle gipsogenin -3-0-glikuronozitin elde edilmesi de bunu doğrulamaktadır (33,37,38). Bu nedenle, (S2) saponoziti de aynı şekilde seyreltik mineral asitle hidroliz edildi. Asit olarak genellikle sülfürik asit kullanıldığı için, çalışmamızda da aynı asit kullanıldı. Elde edilen ürünün tanımı için literatürde sadece erime noktası ve spesifik çevirme derecesi kayıtlıdır. Elde edilen maddenin miktarının az olması, spesifik çevirmesini ölçme imkanı vermedi. Buna karşılık, maddenin kütle spektrometresi ile analizi yapılarak formül veznisi, parçalanması incelendi ve daha kesin bir sonucu ulaşma mümkün oldu.

150 mg (S2) saponoziti 15 ml sülfürik asidin sudaki % 2 lik çözeltisinde çözülür, 80°C deki yağ banyosunda 4 saat ısıtılır, hidroliz sonunda çöken kısım mavi bantlı Schleicher - Schüll No.589³ süzgeç kağıdından süzülerek ayrılır, çökelti suyla yıkanır, kaynar metanolde çözülür, soğumaya bırakılır, hidroliz ürünü çöker, çökelti süzülerek alınır, tekrar kaynar metanolde çözülür, çöktürülür ve bu işlem birkaç defa tekrarlanır, son çöktürmeden sonra elde edilen ürün vakumlu etüvde kurutulur.

Zayıf asit hidroliz sonucu elde edilen maddenin kütle spektrofotometresi ile analizi, aglikon için kullanılan cihaz ve şartlarda yapılır.

Alkali Hidroliz

Daha önce Saponaria türlerinden elde edilen saponozitler 17.(C) daki karboksil grubuna bağlı oz zinciri taşımaktadırlar.(S2) maddesinde de aynı bağlanmanın olup olmadığını tespit etmek gayesiy-le alkali hidroliz yapıldı.

Alkali hidroliz ürününün, silikajel kaplı plaklarda n-butanol: etanol:su (10:3:5)(34) solvan sistemi ile yapılan ince tabaka kromatografisinde (S2) saponozitinden daha az polar bir ürünün meydana geldiği görüldü. Böylece, aglikona hem hidroksil, hem de karboksil gruplarından ozların bağlandığı, yani yapının bisdesmozidik olduğu tespit edildi. Bu ön çalışmadan sonra, hidroliz ürünlerinin ayırımı yapıldı. Hidrolizat nötralleştirildi, çözelti izoamil alkol ile ekstre edildi. Alkollü fazlar uçuruldu, elde edilen artık, silikajel kolonda n-butanol:etanol:su (10:3:5)(sistem-8) ile temizlenerek sapogenin-3-O-monodesmozit elde edildi. İzoamil alkolle ekstraksiyondan sonra geride kalan sulu faz başka bir silikajel kolonda önce sistem-8, sonra metanol ile elüe edilerek C-28-oligoholoziti elde edildi.

SK-4

Adsorban	Kieselgel 60 (0,063-0,125 mm) Merck
Solvan sistemi-8	n-BuOH:EtOH:H ₂ O (10:3:5)
" " -5	CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (65:35:10) alt faz
Fraksiyonlar	10 ml
Kolon boyutları	2 X 20 cm
Elüsyon hızı	1,0 - 1,5 ml/dak.
Materyel	Alkali hidroliz, izo-amil alkollü faz

SK -5

Adsorban	Kieselgel 60 (0,063-0,125 mm) Merck
1. Solvan sistemi-8	n-BuOH:EtOH:H ₂ O (10:3:5)
2. Metanol "	
Fraksiyonlar	10 ml
Kolon boyutları	2 x 20 cm
Elüsyon hızı	1,0 - 1,5 ml/dak.
Materyel	Alkali hidroliz, sulu faz

300 mg (S2), 30 ml potasyum hidroksitin 70° lik etanoldeki % 10 luk çözeltisi ile, 80° C deki yağ banyosunda 5 saat ısıtılır. Sürenin bitiminde, sülfürik asitin 70° lik etanoldeki % 1 lik çözeltisi ile turnusol kağıdına karşı nötralleştirilir, çöken potasyum sülfat süzülerek ayrılır, süzüntü izoamil alkol ile ekstre edilir. Ekstraksiyonun bitmesinden sonra, alkollü fazlardan sapogenin-3-0 monodesmozit, geride kalan sulu fazdan C-28-oligoholozit elde edilir.

Sapogenin-3-0-monodesmozitin elde edilmesi

İzoamil alkol ile ekstraksiyon sonunda elde edilen fazlar birleştirilir, alçak basınçta kuruluğa kadar uçurulur. Artık, silikajel kolonda (SK-4)n-butanol : etanol : su (10:3:5) solvan sistemi (Sistem-8) ile temizlenir. Aynı gaye için, kloroform:metanol : su (65:35:10) solvan sistemi (Sistem-5) kullanılabilir. Fraksiyonlamanın sonuçları, aynı solvan sistemleri kullanılarak ince tabaka kromatografisi ile kontrol edilir. Silikajel kaplanmış plaklarda yapılan kromatografik kontrol sonunda, sapogenin-3-0-monodesmoziti taşıyan fraksiyonlar birleştirilir, alçak basınçta kuruluğa kadar uçurulur, beyaz renkte bir madde elde edilir.

C-28-oligoholozitin elde edilmesi

İzoamil alkol ile ekstraksiyondan sonra, geride kalan sulu faz kuruluğa kadar uçurulur. Artık, silikajel doldurulmuş kolondan (SK-5) önce n-butanol:etanol: su (10:3:5) ile, sonra metanol ile elüe edilir. Metanol fraksiyonları birleştirilir, uçurulur, C-28-oligoholozit elde edilmiş olur.

Sapogenin-3-O-monodesmozit, asit hidrolize tabi tutulduğunda saponozitin aglikonu ve 3. (C) a bağlı olan ozlar serbest hale geçer. Hidroliz ve hidrolizden sonra aglikon ve ozların tayini, daha önce uygulanan yöntemlerle yapıldı. Aglikonun yapısı aydınlatıldığı için, daha önce elde edilen aglikon, alkali hidroliz sonucu elde edilen aglikon ve şahit numune (gipsogenin) birbirleriyle kromatografik olarak karşılaştırıldı. Aynı R_f değerleri elde edildiği için diğer enstrümental analizlerin tekrarına lüzum görülmedi. 3.(C) a bağlı ozların analizi, daha önce kullanılan kağıt ve gaz likit kromatografisi yöntemleri ile yapıldı.

C-28-oligoholozitin yapısının tayini için, oligoholozit sülfürik asitin sudaki % 2 lik çözeltisi ile hidroliz edildi. Hidrolizataki ozlar daha önce kullanılan kağıt ve gaz likit kromatografisi yöntemleriyle tespit edildi.

Sapogenin-3-O-monodesmozitin asit hidrolizi

50 mg madde, 5 ml gaz hidroklorik asitin susuz metanoldeki % 5 lik çözeltisi ile 100°C'deki yağ banyosunda 5 saat hidroliz edilir, sürenin bitiminde ortama eşit hacimde su ilave edilir, alçak basınçta metanol ortamdan uzaklaştırılır. Çöken aglikon, süzgeç kağıdından süzülür, ayrılır, süzüntü 2 saat daha aynı ısıda hidroliz edilir. Gümüş karbonat ile turnusol kağıdına karşı nötralleştirilir, süzülür, berrak sulu çözelti n-butanol ilave edilerek kuruluğa kadar uçurulur. Artığın bir kısmı yeterli miktardaki metanolde çözülür, daha önce belirtilen şartlarda solvan sistemi 2,6 ve 7 ile çıkan ve inen-damlayan kağıt kromatografisine, diğer bir kısmı ise gaz likit kromatografisine uygulanır.

C-28-oligoholozitin asit hidrolizi

Silikajel kolondan (SK-5) metanol ile elüe edilen fraksiyonlar birleştirilir, kuruluğa kadar uçurulur. Elde edilen artık, 5 ml sülfürük asitin sudaki % 2 lik çözeltisi ile kaynar su banyosunda 2 saat ısıtılır. Hidrolizat, baryum karbonat ile turnusol kağıdına karşı nötralleştirilir, çöken baryum sülfat süzülerek uzaklaştırılır. Berrak süzüntüye n-butanol katılarak kuruluğa kadar uçurulur. Artığın bir kısmı daha önce belirtilen şartlarda olduğu gibi çıkan ve inen-damlayan kağıt kromatografisine, diğer bir kısmı da gaz likit kromatografisine uygulanır.

Metilleme

(S2) Saponozitinin asit ve alkali hidrolizinden sonra, ozon zincirlerinde bulunduğu belirlenen ozların zincirdeki yerlerini tayin etmek için total metilleme işlemi yapıldı. Metillemede, HAKOMORI yöntemi (55) kullanıldı. Elde edilen ürün, silikajel kolonda kloroform:etanol (50:1) (sistem-14) ile saflaştırıldı. IR spektrumu alınarak, $3200-3400\text{ cm}^{-1}$ deki serbest hidroksil grupları için karakteristik olan absorpsiyon bantları incelenerek, metillenmenin tamamlanıp tamamlanmadığı kontrol edildi.

SK-6

Adsorban	Kieselgel (0,2-0,5 mm)Merck
Solvan sistemi - 14	CHCl_3 :EtOH (50:1)
Fraksiyonlar	10 ml
Kolon boyutları	2 X 20 cm
Elüsyon hızı	1,0 - 1,5 ml/dak.
Materyel	Metillenmiş S2 saponoziti

Permetillenmiş (S2), asit hidrolizle farklı derecelerde metillenmiş oz ünitelerine parçalandı. Hidrolizde, daha önce total asit hidroliz için uygulanan yöntem kullanıldı. Hidrolizatta bulunan metillenmiş ozların teşhisi için ince tabaka kromatografisinden yararlanıldı. Literatür bilgilerimiz ve ön çalışmalarımız sonucu tespit ettiğimiz solvan sistemleri kullanıldı. Bu sistemler aşağıda gösterilmiştir. (Tablo-12).

Hidroliz ürünlerinin yerini daha iyi belirlemek için, lekeler 2,3,4,6-tetrametil-D-glikoz ile karşılaştırıldı ve R_G değerleri hesaplandı.

Adsorban	Kieselgel 60, DC-hazır plak (Merck)
Solvan sistemi -9	C_6H_6 : Me_2CO (2:1)
Solvan sistemi-10	C_6H_6 : Me_2CO (1:1)
" " -11	C_6H_6 : EtOH (8:2)
" " -12	$CHCl_3$: MeOH (9:2)
" " -13	Et-CO-Me/ H_2O ile doyurulmuş
Reaktif	Anilin hidrojenftalat, $110^\circ C$ de 5'

Tablo - 12

Metil Ozların Tanımı

Adsorban, Solvan Sistemleri ve Reaktifler

P e r m e t i l l e m e : Dimetilsülfoksit (DMSO) (Merck 2912). aktivite derecesi 1 olan alüminyum oksit (Merck 1077) kolondan geçirilir, 1 g (S2) saponoziti bu şekilde hazırlanan dimetilsülfoksitin 30 ml sinde çözülür. Çözelti azot atmosferi altında magnetik karıştırıcı ile sürekli karıştırılır, 2 g sodyum hidrür (Merck-Schuchardt 818023) azar azar ilave edilir, bu işlem bittikten 90 dakika sonra 30 ml metil iyodür

damla damla ortama ilave edilir. Hergün sabah ve akşam 200 mg sodyum hidrür ve 2 ml metil iyodür ilave edilerek, reaksiyona 2 gün daha devam edilir. Son ilaveden 6 saat sonra, reaksiyon karışımı 250 ml kloroforma dökülür, 1 gün oda ısısında beklétilir. Çöken sodyum iyodür süzülür, ayrılır, kloroform fazı 10 kere 250 ml su ile (9. yıkama doymuş soydum tiyosülfat çözeltilisiyle yapılır) yıkanır, dimetilsülfoksit uzaklaştırılır. Kloroform fazı anhidr sodyum sülfatla kurutulur, alçak basınçta kuruluğa kadar uçurulur, sarı renkli bir ürün elde edilir.

T e m i z l e m e : Permetillenmiş saponozit, silikajel kolonda (SK-6) kloroform:etanol (50:1) (sistem-14) ile temizlenir. Fraksiyonlar, silikajel kaplı plaklarda benzen:etanol (10:1) solvan sistemi (sistem-15) ile kontrol edilir, metillenmiş saponoziti taşıyan fraksiyonlar birleştirilir, kuruluğa kadar uçurulur. Artık, bir miktar kloroformda çözülür, soğutulmuş petrol eteri ilave edilerek çöktürülür, açık sarı renkli amorf bir toz elde edilir.

A s i t H i d r o l i z : 100 mg permetillenmiş (S2) saponoziti, (S2) saponozitinin total hidrolizi için uygulanan şartlarda hidroliz edilir, nötralleştirilir, süzülür, alçak basınçta ve 45°C'deki su banyosunda yoğunlaştırılır. Yoğun çözeltideki metillenmiş ozların teşhisi, silikajel kaplı plaklarda kromatografik olarak 9,10,11,12 ve 13 nolu solvan sistemleri kullanılarak yapılır.

Şahit Olarak Kullanılan Metillenmiş Ozların Hazırlanması

Holoziçlerin ve saponozitlerin yapısının tayini için, permetilasyondan sonra, hidroliz ürünlerinin tanımında sadece kağıt ve ince tabaka kromatografisi ile şahit maddeler kullanılarak yapılan teşhis ile sonuca ulaşan araştırmalar bulunmaktadır (8, 29, 37). Bu araştırmalarda, standart solvan sistemlerinde elde edilen R_G değerleri metillenmiş ozların teşhisi için kullanılmıştır. Araştırmamızda,

kromatografik bulguları pekiştirmek için, hidrolizatta bulunduğu tespit edilen metillenmiş ozların şahitleri de hazırlanıp, hidroliz ürünleri ile karşılaştırılmıştır. Bunun için maltoz, rutozit, fukoz, ramnoz, arabinoz, ksiloz, galaktoz metillendi, permetil ozlar ve kısmen metillenmiş ozlar elde edildi.

Metil ozlar, genellikle ozların önce alkilenmesi sonra permetillenmesi ve meydana gelen permetil metilozitlerin asit hidrolizi ile elde edilmiştir (119,122,140,166). Diğer taraftan, HAKOMORI yöntemi için, önce yapılan permetilasyon elde edilebilmesi mümkündür. HAKOMORI yönteminde kullanılan sodyum hidrür, aynı zamanda alkilenme işlemini de yapmaktadır (20). Bu sebeple, permetil metilozitlerin hazırlanmasında iki gayeyi de tek işlemde sağlayan HAKOMORI yöntemi kullanıldı. Bu metilozitlerin asit hidrolizi ile de permetil ozlar elde edildi.

Bu amaçla maltoz ve rutozit önce permetillendi, permetilasyon ürünleri asit hidrolize tabi tutuldu. Maltozdan 2,3,4,6-tetrametil-D-glikoz ve 2,3,6-trimetil-D-glikoz, rutozitten 2,3,4-trimetil-L-ramnoz ve 2,3,4-trimetil-D-glikoz karışımları elde edildi. Aynı şekilde, ozlardan hareketle önce permetilasyon sonra asit hidrolizle 2,3,4,6-tetrametil-D-galaktoz, 2,3,4-trimetil-D-ksiloz, 2,3,4-trimetil-L-arabinoz, 2,3,4-trimetil-L-ramnoz ve 2,3,4-trimetil-D-fukoz ayrı ayrı elde edildi. Bu şekilde hazırlanan metillenmiş ozlar, 9,10,11,12 ve 13 nolu solvan sistemleri kullanılarak, ince tabaka kromatografide tetrametil-D-glikoz ile karşılaştırıldı ve R_G değerleri hesaplandı (Tablo - 13).

Adsorban	Kieselgel 60 DC-hazır plak (Merck) 0,25 mm
Solvan sistemi-9	C_6H_6 : Me_2CO (2:1)
" " -10	C_6H_6 : Me_2CO (1:1)
" " -11	C_6H_6 : EtOH (8:2)
" " -12	$CHCl_3$: MeOH (9:2)
" " -13	Et-CO-Me/ H_2O ile doyurulmuş
Reaktif	Anilin hidrojen ftalat, $110^\circ C$ 5'

Hazırlanan Metilli Özler	R_G	Solvan Sistemleri				
		9	10	11	12	13
2,3,4-trime-L-Ram*	1,38	1,18	1,12	-	1,14	
2,3,4-trime-D-Ksi	1,20	1,07	1,04	1,37	1,10	
2,3,4,6-tetrame-D-Gli	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
2,3,4-trime-D-Fuk	0,90	0,92	0,99	-	0,91	
2,3,4,6-tetrame-D-Gal	0,81	0,88	0,97	-	0,88	
2,3,4,7-trime-L-Ara	0,72	0,79	0,86	-	0,85	
2,3,4-trime-D-Gli	0,43	0,61	0,76	-	-	
2,3,6,7-trime-D-Gli	-	0,63	0,72	-	0,78	
Tetrametil-D-Glikoz**	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	

Tablo - 13

Metil Özlerin R_G Değerleri

* Rutin ve ramnozdan hareketle elde edilmiştir.

** Tetrametil-D-Glikoz Bonn Üniversitesi Organik Kimya Enstitüsünden temin edilmiştir.

Monozlar : D-Galaktoz, D-ksiloz, L-arabinoz, L-ramnoz ve D-fukoz aşağıda belirtilen şekilde metillenir.

Permetilleme : 500 mg anhidr oz, 10 ml susuz dimetilsülfoksitte çözülür, azot atmosferi altında magnetik karıştırıcı ile sürekli karıştırılarak, 500 mg sodyum hidrür azar azar ilave edilir. Bu işlem bittikten 1 saat sonra, 5 ml metil iyodür damla damla ortama katılır, 2 saat sonra karışım 100 ml kloroforma alınır, 5 kere 100 ml su ile yıkanır, kloroformlu faz son olarak doymuş sodyum tiyosülfat çözeltisi ile çalkalanır, susuz sodyum sülfatla kurutulur, alçak basınçta uçurulur, permetil metilozit elde edilmiş olur.

Asit Hidroliz : Permetil metilozit, hidroklorik asidin 50 ml sudaki % 5 lik çözeltisinde çözülür, 2 saat kaynar su banyosunda ısıtılır. Hidrolizat, 3 kere 25 ml kloroform ile ekstre edilir, kloroformlu fazlar birleştirilir, susuz sodyum sülfatla kurutulur, yoğunlaştırılır, permetil oz elde edilmiş olur.

Maltoz

Permetilleme : 500 mg maltoz, HAKOMORI yöntemine göre metillenir (10 ml dimetilsülfoksit - 600 mg sodyum hidrür - 5 ml metil iyodür), sarı renkli, viskoz bir şurup elde edilir. Ürün, silikajel kaplı plaklarda benzen : aseton (1:1) (sistem - 10) ile kontrol edilir (Tablo - 14).

Asit Hidroliz : Permetillenmiş ürün, 25 ml suda hazırlanmış % 2 lik sülfürik asit çözeltisiyle, kaynar su banyosunda 2 saat ısıtılarak hidroliz edilir. Hidrolizat baryum karbonat ile nötralleştirilir, çöken baryum sülfat süzülerek uzaklaştırılır. Süzüntü, alçak basınçta kuruluğa kadar uçurulur, kloroformda çözülür. Böylece, 2,3,4,6-tetrametil-D-glikoz ve 2,3,6-trimetil-D-glikoz karışımı elde edilmiş olur. Silikajel kaplı plaklarda solvan sistemi -9,10,11,12 ve 13 kullanılarak R_G değerleri hesaplanır.

R u t o z i t :

P e r m e t i l l e m e : 500 mg rutozit, HAKOMORI yöntemine göre metillenir (10 ml dimetilsülfoksit-600 mg sodyumhidrür-5 ml metil iyodür), açık sarı renkli bir ürün elde edilir. Permetil-rutozitin kontrolü, silika-jel kaplı plaklarda benzen:etanol (85:15) solvan sistemi ile kromatografik olarak yapılır (Tablo - 14).

Adsorban	Kieselgel G (Merck)
Kalınlık	0,3 mm
Reaktif	% 30 sülfürik asit, 110°C 10'
Solvan sistemi-10	(C ₆ H ₆ : Me ₂ CO/1:1)
α - ve β -metil-hepta-O-metil-maltoz için R _f	0,71 ve 0,76
Solvan sistemi-16	(C ₆ H ₆ : EtOH/85:15)
Permetil-rutozit için R _f	0,48 (UV 360 mμ da mavi floresans)

Tablo - 14

Permetil-Maltoz ve -Rutozitin İnce Tabaka Kromatografisi

A s i t H i d r o l i z : Metillenmiş ürün, 25 ml susuz metanolle hazırlanmış %5 lik gaz hidroklorik asit çözeltisiyle 2 saat kaynar su banyosunda ısıtılarak hidroliz edilir. Sürenin bitiminde, ortama bir misli su ilave edilir, çöken tetrametil-kersetin süzülerek ayrılır, Süzüntüdeki metanol alçak basınçta ortamdan uzaklaştırılır, 1 saat daha ısıtılır, gümüş karbonatla nötralleştirilir, süzülür, yoğunlaştırılır. Şurup kıvamındaki artık kloroformda çözülür. Bu çözelti, 2,3,4-trimetil-L-ramnoz ve 2,3,4-trimetil-D-glikoz karışımını taşır. Silikajel kaplanmış plaklarda, metillenmiş ozlar için uygulanan solvan sistemleri kullanılarak kromatografisi yapılır, R_G değerleri hesaplanır.

Permetilleme Ürünlerinin Kolon Kromatografisi ile Ayırımı.

Permetillemeden sonra yapılan asit hidrolizle, terminal ozlar permetil, terminal ozlarla aglikon arasındaki ozlar ise kısmen metillenmiş halde elde edilirler. Bu, zincirin yapısının tayininde yararlı olan önemli bir özelliktir. Permetil türevi halinde elde edilen ozlar, terminal ozlar olarak değerlendirilirler. Permetillenmiş (S2) saponozitin hidroliz ürünü olan ozların kromatografik incelenmesi, bunların dördünün permetil, diğerlerinin ise kısmen metillenmiş türevler olabileceğini göstermiştir. Bu sebepten, permetilasyon ürünlerini saf olarak elde etmek, hangi oza ait olduklarını tespit etmek üzere kolon kromatografisi kullanıldı. Bu amaçla, silikajel kolonda (SK-7a) benzen:aseton karışımında aseton oranı arttırılarak yapılan dereceli elusyon ile, karışımı meydana getiren metillenmiş ozlardan 5 tanesi izole edildi, diğer 3 tanesi karışım halinde elde edildi. Diğer taraftan, karışım silikajel kolonda (SK-7b) kloroform:izopropanol karışımı ile izopropanol oranı % 1 den % 15 e kadar arttırılarak elue edildi. Bu kolonda da aynı sonuç alındı.

SK - 7(a,b)

Adsorban	Kieselgel (0,2 - 0,5 mm) Merck 7733
a/Solvan sistemi -19	C_6H_6 : Me_2CO (10:1, 10:2,..... 1:1)
b/Solvan sistemi -20	$CHCl_3$: i-PrOH (% 1 - % 15)
Fraksiyonlar	15 - 20 ml
Materyel	Metillenmiş Ozlar Karışımı (I - VIII)

Karışım halinde elde edilen metillenmiş ozlardan ikisi, daha önce kromatografik olarak teşhis edilmişti. Teşhis edilemeyenler ise, R_G değeri bakımından kısmen metillenmiş ozlarla uygunluk göstermektedir. Permetillenmiş ve kısmen metillenmiş ozların tanımında optik çevirmelerinin ölçülmesi, demetilleme ve permetilleme kullanılır. Elde edilen ozların miktarının çok az olması, optik çevirmelerini ölçme imkanını vermedi. Bu sebepten, izole edilen ve karışım halinde olan permetillenmiş ozlar, daha önce kullanılan sistemler yardımı ile ince tabaka kromatografisinde teşhis edildiler. Diğer taraftan, kısmen metillenmiş ozlar tekrar metillenerek, permetil türevleri haline geçirildi, daha önce şahit olarak hazırlanan permetil ozlarla kromatografik olarak karşılaştırılarak teşhis edildiler. Bu işlem, terminal ozlarla aglikon arasında hangi ozların bulunduğu hakkında fikir verdi.

Aglikonun Hidroksil Grubuna Bağlı Metillenmiş Ozlar

Metillenmiş ozların, aglikonun hidroksil ve karboksil gruplarından hangisine bağlandıklarını tespit için : Sapogenin-3-O-monodesmozitin de permetillenmesi, hidrolizi ile elde edilen metillenmiş ozların tanımı gerekir. Bu nedenle, daha önce alkali hidrolizle elde edilen sapogenin-3-O-monodesmozit HAKOMORI yöntemine göre metillendi. Permetillenmiş ürün, silikajel kolonda (SK-8) benzen : aseton (5:1) (Sistem-17) ile temizlendi. Total metillenme IR ile kontrol edildi, asit hidrolize tabi tutuldu, metillenmiş oz çözeltisi silikajel kaplı plaklarda benzen:aseton (1:1) (sistem-10) ve benzen:etanol (8:2) (sistem-11) ile kromatografik olarak incelendi. Metillenmiş ozların teşhisi, hidroksil grubuna bağlı ozların hangileri olduğunu gösterdi.

SK - 8

Adsorban	Kieselgel (Merck 9386) 0,063-0,125 mm
Solvan sistemi - 17	C_6H_6 : Me_2CO (5:1)
Kolon boyutları	2 X 20 cm
Materyel	Permetil sapogenin-3-0-monodesmozit

P e r m e t i l l e m e : 200 mg madde, (S2) saponoziti gibi HAKOMORI yöntemine göre metillenir (10 ml dimetilsülfoksit-200 mg sodyum hidrür - 10 ml metil iyodür). Sodyum iyodür ve dimetilsülfoksitin uzaklaştırılmasından sonra açık sarı renkli bir ürün elde edilir. Ürün silikajel kolonda (SK-8) benzen:aseton (5:1) (sistem-17) ile temizlenir. Fraksiyonlar, aynı solvan sistemi kullanılarak, silikajel kaplanmış plaklarda kromatografik olarak kontrol edilir (Permetil sapogenin-3-0-monodesmozit için R_f 0,40). Metillenmiş ürünün bulunduğu fraksiyonlar birleştirilir, kuru luğa kadar uçurulur, hezanda çözülür, petrol eteri ilave edilerek çöktürülür, açık sarı renkli amorf toz elde edilir.

A s i t H i d r o l i z : 100 mg permetil sapogenin-3-0-monodesmozit, 10 ml % 5 lik susuz metanolde hazırlanmış gaz hidroklorik asit çözeltisiyle 100°C deki yağ banyosunda 5 saat ısıtılır, hidroliz sonunda ortama 10 ml su ilave edilir, alçak basınçta metanol ortamdan uzaklaştırılır, çöken aglikon süzülerek ayrılır, süzüntü yukardaki şartlarda 2 saat daha ısıtılır, gümüş karbonatla nötrleştirilir, süzülür, düşük ısı ve alçak basınçta yoğunlaştırılır. Elde edilen metillenmiş ozlara ait çözelti, silikajel kaplı plaklarda sistem 9, 10, 11, 12, ve 13 ile, permetillenmiş (S2) saponozitinin metilli ozlari ve şahit numunelerle kromatografik olarak karşılaştırılır. Bu şekilde, hidroksile bağlı olan metillenmiş ozlar teşhis edilir.

Aglikonun Karboksil Grubuna Bağlı Metillenmiş Ozlar

Permetillenmiş Bisdésmozidik saponozitler, lityum alüminyum hidrür etkisi ile karboksil grubundan ayrılırlar. Bu ayrılma esnasında, karboksile bağlı ilk oz indirgenerek alkolüne dönüşür (37). Permetillenmiş (S2) saponoziti de aynı şekilde lityum alüminyum hidrür etkisi ile ayrıldı, C-28-oligoholozitin metil türevi, aglikona bağlandığı ozu indirgenmiş olarak elde edildi. Ürün, silikajel kolonda (SK-9) kloroform: etil asetat (3:1) (sistem-18) ile temizlendi. Asit hidrolizinden sonra, ince tabaka kromatografisinde (Tablo-15) permetil (S2) saponozitin hidrolizatı (metillenmiş ozlar) ile karşılaştırıldı.

SK - 9

Adsorban	Kieselgel 60 (Merck 9386) 0,063-0,125mm
Solvan sistemi - 18	CHCl ₃ : EtOAc (3:1)
Kolon Boyutları	2 X 20 cm.
Materyel	İndirgenmiş permetil-C-28-oligoholozit

Adsorban	Kieselgel G (Merck 7731)
Solvan sistemi - 10	C ₆ H ₆ : Me ₂ CO (1:1)
Solvan sistemi - 11	C ₆ H ₆ : EtOH (8:2)
Reaktifler	
	1. Anilin hidrojen ftalat, 110° 5-10'
	2. Sodyum meta-periyodat - benzidin

Tablo - 15

İndirgenmiş Permetil-C-28-Oligoholozitin Asit Hidrolizatının
İnce Tabaka Kromatografisi.

Kromatogramlarda, daha önce karboksile bağlı olduğu gösterilmiş ozlardan biri olan monometil-fukozun bulunmadığı tespit edildi. Revelasyon için ilk olarak anilin hidrojen ftalat reaktifi kullanıldı. Aynı kromatograma, itoller için revelatör olarak kullanılan sodyum metaperiyodat-benzidin* reaktifi püskürtüldü, monometil-fukozun itoline (monometil-fusitol) tekabül eden bir leke ortaya çıktı.

300 mg permetil (S2) saponoziti 10 ml kuru dioksanda çözülür, 200 mg lityum alüminyum hidrür ilave edilir, magnetik karıştırıcı ile sürekli karıştırılarak 10 saat 80°C de ısıtılır. Lityum alüminyum hidrürün fazlası, etil asetat ve su katılarak uzaklaştırılır, çözelti kuruluğa kadar uçurulur, artık 15 ml suda çözülür, 7 defa onar ml eterle ekstre edilir. Ekstraksiyondan sonra, kalan sulu faz katyon değiştirici reçine (Merck 4835) ile nötralleştirilir, kuruluğa kadar uçurulur. Artık, silikajel kolonda (SK-9) kloroform:etil asetat (3:1) solvan sistemi ile elue edilir. Kolondan alınan ilk 100 ml lik fraksiyon uçurulur, amorf toz elde edilir.

20 mg madde, 2 ml % 2 lik hidroklorik asidin sudaki çözeltisi ile 2 saat kaynar su banyosunda ısıtılır, hidrolizat gümüş karbonatla nötralleştirilir, süzülür, süzüntü kuruluğa kadar uçurulur, yeterli miktar metanolde çözülür. Çözeltideki metillenmiş ozlar, ince tabaka kromatografisi ile teşhis edilir.

* Sodyum meta - periyodat - benzidin reaktifi (39).

I. Çözelti: %0,1 sodyum meta - periyodatın sulu çözeltisi

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

İşlem : Önce I. çözelti, 5 dakika sonra II. çözelti püskürtülür.

Kütle Spektrometrik Çalışmalar

Kütle spektrometrik çalışmalar birçok kimyasal grubun aydınlatılmasında olduğu gibi saponozitlerinde araştırılmasında kullanılmaktadır. Hem aglikonların (44, 118) hem de total metillemeden sonra asit hidrolizle elde edilen permetillenmiş ve kısmen metillenmiş ozların yapılarının açıklanmasında (57, 85, 92) faydalanılmıştır. Son yıllarda, saponozitler metil veya asetat türevleri halinde doğrudan doğruya kütle spektrometresiyle incelenmiştir. Bu şekilde, hem aglikon hem de oz kısmının yapısı birarada açıklanabilmiştir (58, 94, 174).

Bu nedenle, (S2) saponozitinin ve onun alkali hidrolizi ile elde edilen sapogenin (=gipsogenin)-3-O-monodesmozitin permetil türevlerinin kütle spektrumları alındı. Oz kısmından ve aglikondan dolayı meydana gelen iyonlar incelendi.

Cihaz: JEOL JMS - 01SG (Mattauch-Herzog tip)

İyonlaşma gerilimi: 30 eV, 75 eV.

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, materyel ve yöntemde verildiği için, tekrarlanmaya lüzum görülmemiştir.

Fizikokimyasal Değerler

Köpürme İndeksi

Ön denemede, %1 lik dekoksiyondan hareketle yapılan tayinde 2. tüpte köpük yüksekliğinin 1 cm'den fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu tüpte, 2 ml %1 lik numune çözeltisi vardır. 0,2 ml azaltılarak yapılan ikinci denemede, köpük yüksekliği 1 cm olan tüpün içinde 1,4 ml numune çözeltisi bulunmaktadır. Buna göre:

$$\text{Drogun Köpürme İndisi} = \frac{10 \times 1}{0,014} = 714$$

Hemoliz İndeksi

Ön denemede, %1 lik drog ekstraktından hareketle 2 saat sonra tam hemoliz görülen ilk tüpte 2,8 ml drog ekstraktı vardı. 0,05 ml azaltılarak yapılan ikinci denemede: 2,65 ml %1 lik drog ekstraktı bulunan tüp, tam hemolizin görüldüğü ilk tüp olarak tespit edilmiştir. Buna göre, kullanılan kan için,

$$\text{Drogun Hemoliz İndeksi} = \frac{10}{0,0265} = 377$$

%0,02 lik standart saponin (Saponinum purum album - Merck 7695) çözeltisi ile yapılan ön denemede, 2,2 ml saponin çözeltisi bulunan tüpte tam hemoliz görüldü. 0,05 ml azaltılarak yapılan ikinci denemede 2,15 ml %0,02 lik standart saponin çözeltisi bulunan tüp, tam hemolizin görüldüğü ilk tüp olarak tespit edildi. Buna göre, kullanılan kan için,

$$\text{Standart Saponin Hemoliz İndeksi} = \frac{10}{0,00043} = 23\ 255$$

$$\text{Kan Faktörü} = \frac{25\ 000}{23\ 255} = 1,0750$$

Drogun gerçek hemoliz indeksi ise,

$$\text{Drogun Hemoliz İndeksi} = 377 \times 1,0750 = 405 \text{ bulunmuştur.}$$

Aynı işlemler ham saponozit için uygulanmış, hemoliz indeksi 14 685 bulunmuştur.

Saponozitler

Tanım

Ham saponozitin, değişik solvan sistemleri kullanılarak ince tabaka kromatografisine uygulanması ile elde edilen sonuçlar aşağıda gösterilmiştir.

Madde	R _f Solvan Sistemleri			
	2	3	4	5
S ₁	0,32*	0,59*	0,41*	0,14*
S ₂	0,28*	0,54*	0,37*	0,06*
O ₁	0,12	0,46	0,25	-
O ₂	0,05	0,35	0,17	
O ₃	-	0,28	0,11	

Tablo-16

Ham-Saponozitin İnce Tabaka Kromatografisi

Solvan sistemi -2 n-BuOH : AcOH : H₂O (4:1:5)

3 n-BuOH : i-PrOH : AcOH : H₂O (4:2:1:3)

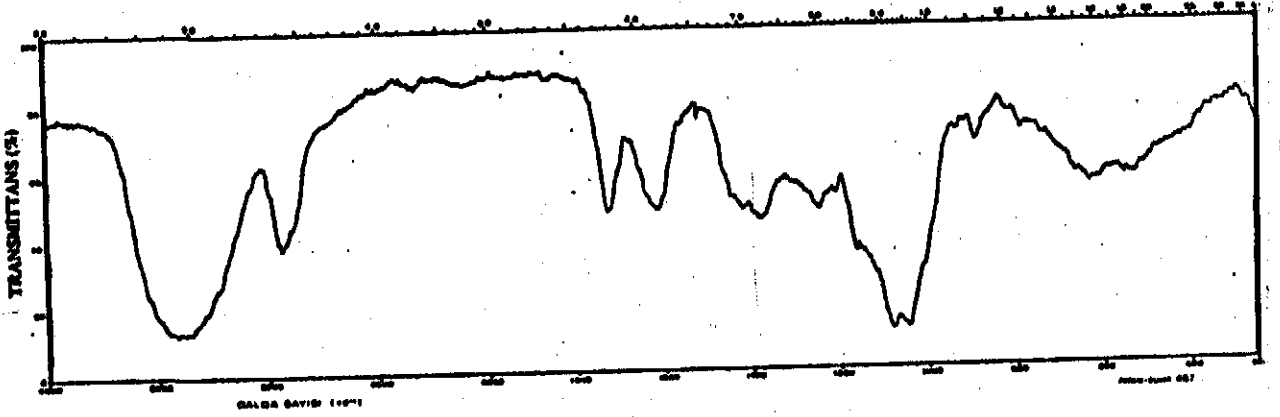
4 n-BuOH : EtOH : %25 NH₃ (7:2:5)

5 CHCl₃ : MeOH : H₂O (65:35:10)

* Kanlı plakta hemoliz yapan saponozitlere ait lekeler.

(S2) Saponoziti

Beyaz renkli amorf toz, erime noktası $238 - 243^{\circ}\text{C}$ (bozunma)
IR S p e k t r u m u : $3200 - 3400 \text{ cm}^{-1}$ de serbest hidroksil, 1640 cm^{-1}
de karboksil ve 1725 cm^{-1} de aldehit grupları için karakteristik absorp-
siyon bantları görüldü. Ayrıca, $1000 - 1100 \text{ cm}^{-1}$ de ozlardan ileri gelen
geniş bir bant var.



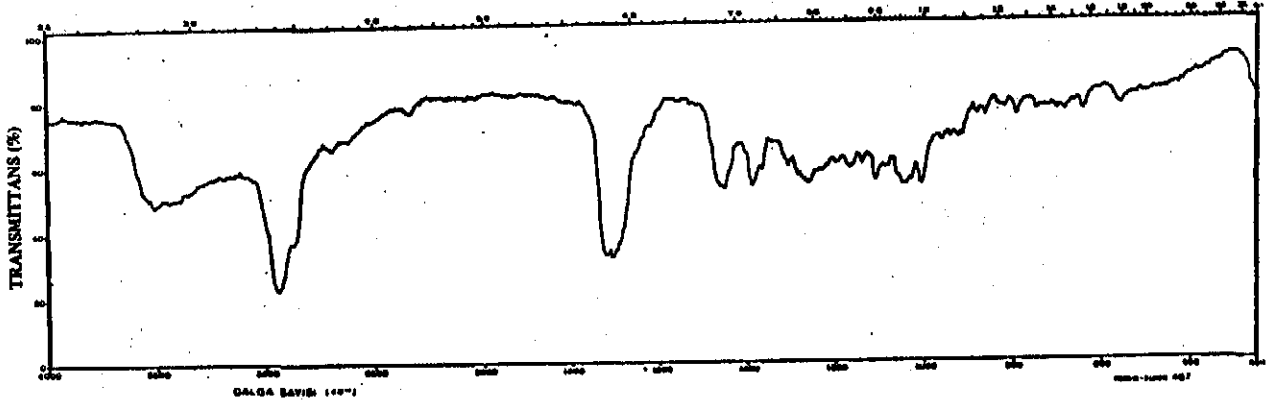
Şekil - 29

(S2) Saponozitinin IR Spektrumu

(Perkin Elmer Model 457, Z1 KBr)

Aglikon

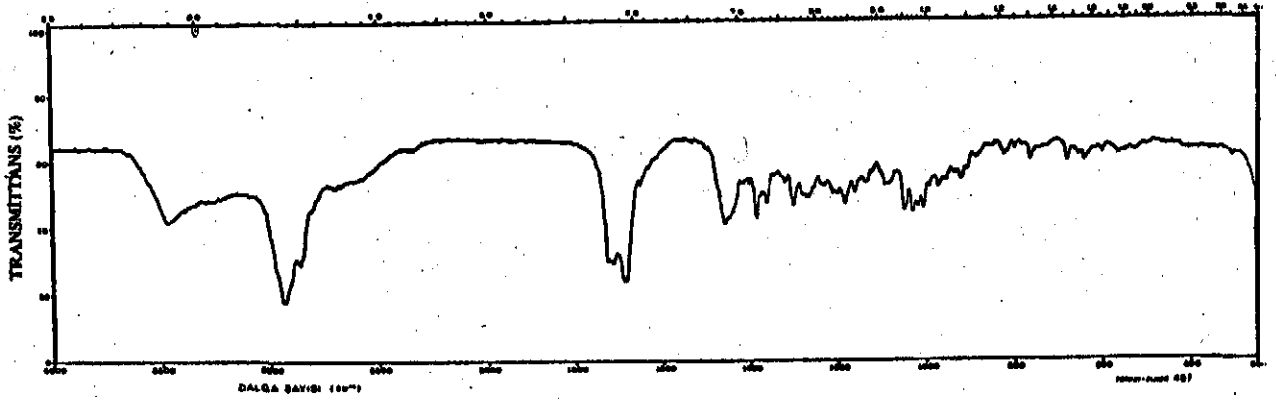
Beyaz iğne şeklinde kristaller, erime noktası $263-265^{\circ}\text{C}$.
M o l e k ü l a ğ ı r l ı ğ ı : 470 (Kütle spektrumuna göre).
IR S p e k t r u m u : 3500 cm^{-1} de serbest hidroksil, 1720 cm^{-1}
de aldehit ve 1700 cm^{-1} de karboksil grupları için karakteristik
absorpsiyon bantları görüldü (Şekil - 30). Şahit madde gipsogeni-
nin IR spektrumu ile de benzerlik göstermektedir (Şekil - 31).



Şekil - 30

Aglikonun IR Spektrumu

(Perkin Elmer Model 457, Z1 KBr)

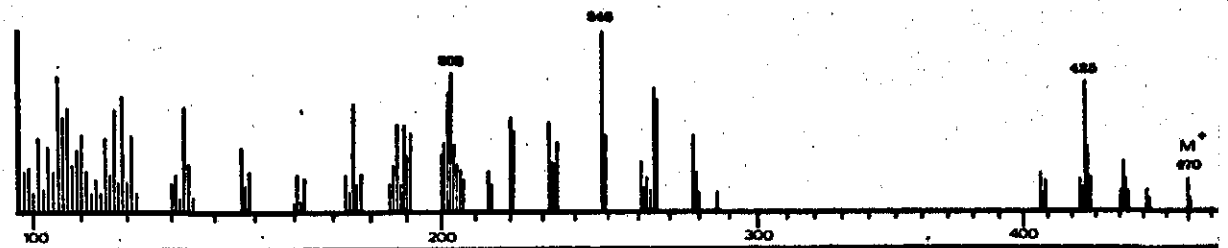


Şekil - 31

Gipsogeninin IR Spektrumu

(Perkin Elmer Model 457, Z1 KBr)

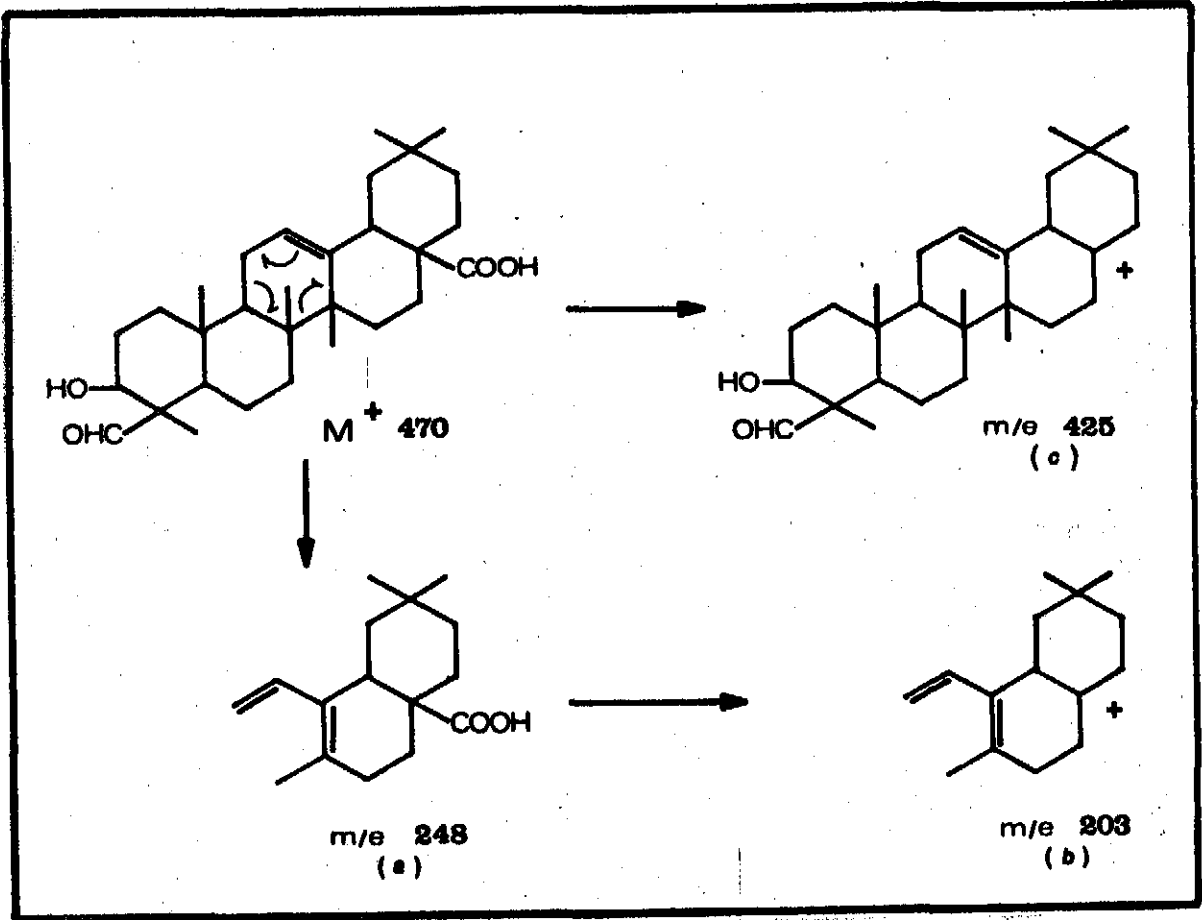
K ü t l e S p e k t r u m u : Moleküler iyon piki (M^+) 470 de görüldü (Şekil - 32). Ayrıca, molekülün karboksil grubunu kaybetmesiyle m/e 425 ($M - COOH^+$) ve Δ^{12} triterpenler için Retro Diels - Alder bölünmesine göre (21, 23, 44, 116), m/e 248 de bas tepe piki ile m/e 203 de görülen pikler gipsogenin için karakteristiktir (Şekil - 33)



Şekil - 32

Aglikonun Kütle Spektrumu

(JEOL JMS - D100 Kütle Spektrometresi, iyonlaşma gerilimi 75 eV)



Şekil - 33

Gipsogeninin Retro Diels - Alder Bölünmesi

Bağlı Bulunan Ozlar

K a ğ ı t K r o m a t o g r a f i s i : (S2) saponozitinin ve alkali hidrolizi ile elde edilen ürünlerin (Sapogenin-3-O-monodesmote, C-28-oligoholozit) asit hidrolizi sonucu elde edilen ozlar aşağıda gösterilmiştir (Tablo - 17)

Hidrolizat	Tehis Edilen Ozlar
(S2) Saponoziti	D-Gli A, D-Gal, D-Gli, D-Ksi, L-Ara, L-Ram, D-Fuk .
Sapogenin-3-O-monodesmote	D-Gli A, D-Gal, D-Ksi, L-Ara .
C-28-oligoholozit	D-Gli, D-Ksi, L-Ara, L-Ram .

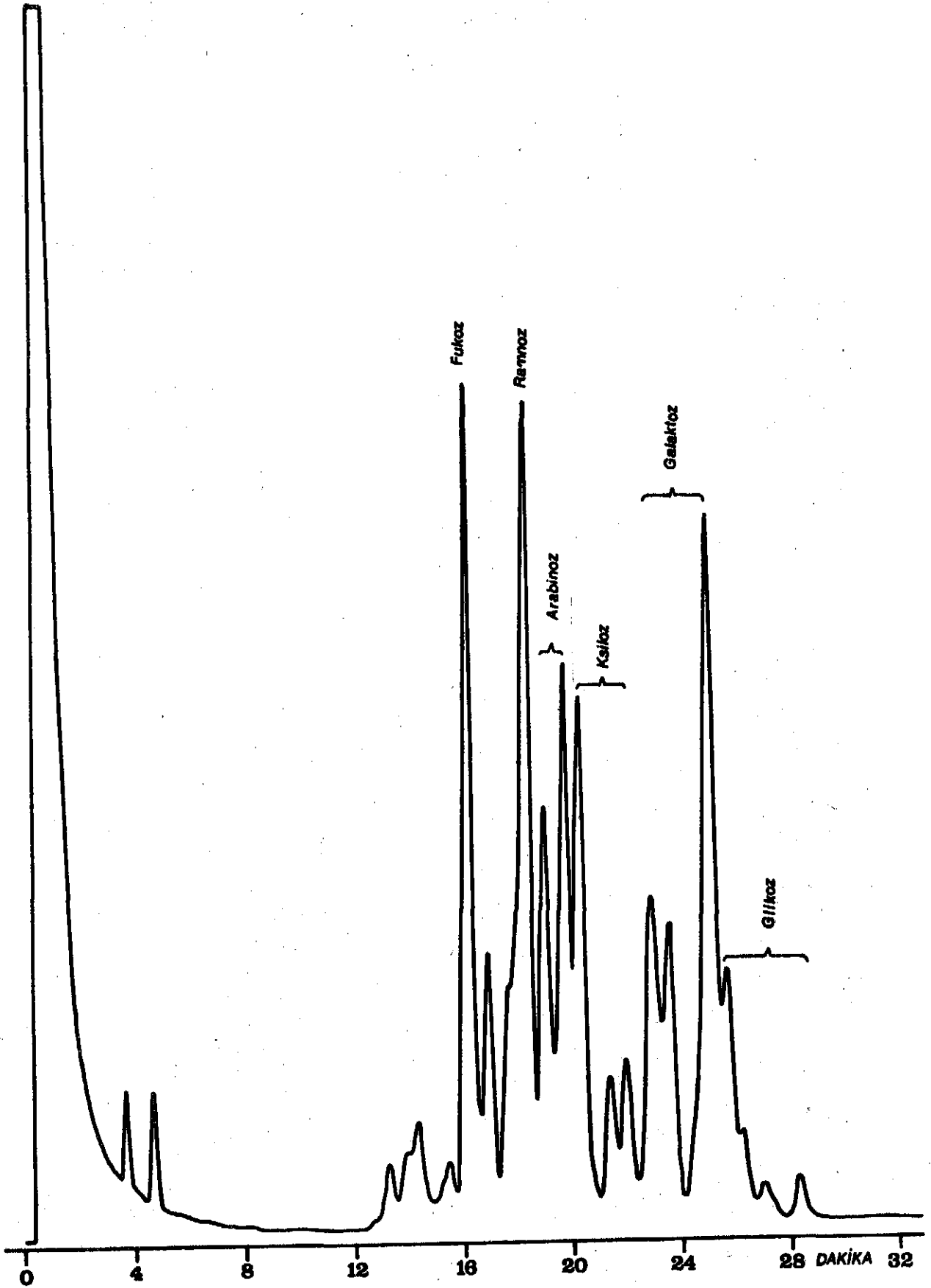
Tablo - 17

(S2) Saponozitinin Aglikonuna Bağlı Ozlar
(Gli A) Glikuronik Asit, (Gal) Galaktoz, (Gli) Glikoz,
(Ksi) Ksiloz, (Ara) Arabinoz, (Ram) Ramnoz, (Fuk) Fukoz.

G a z L i k i t K r o m a t o g r a f i s i : (S2)

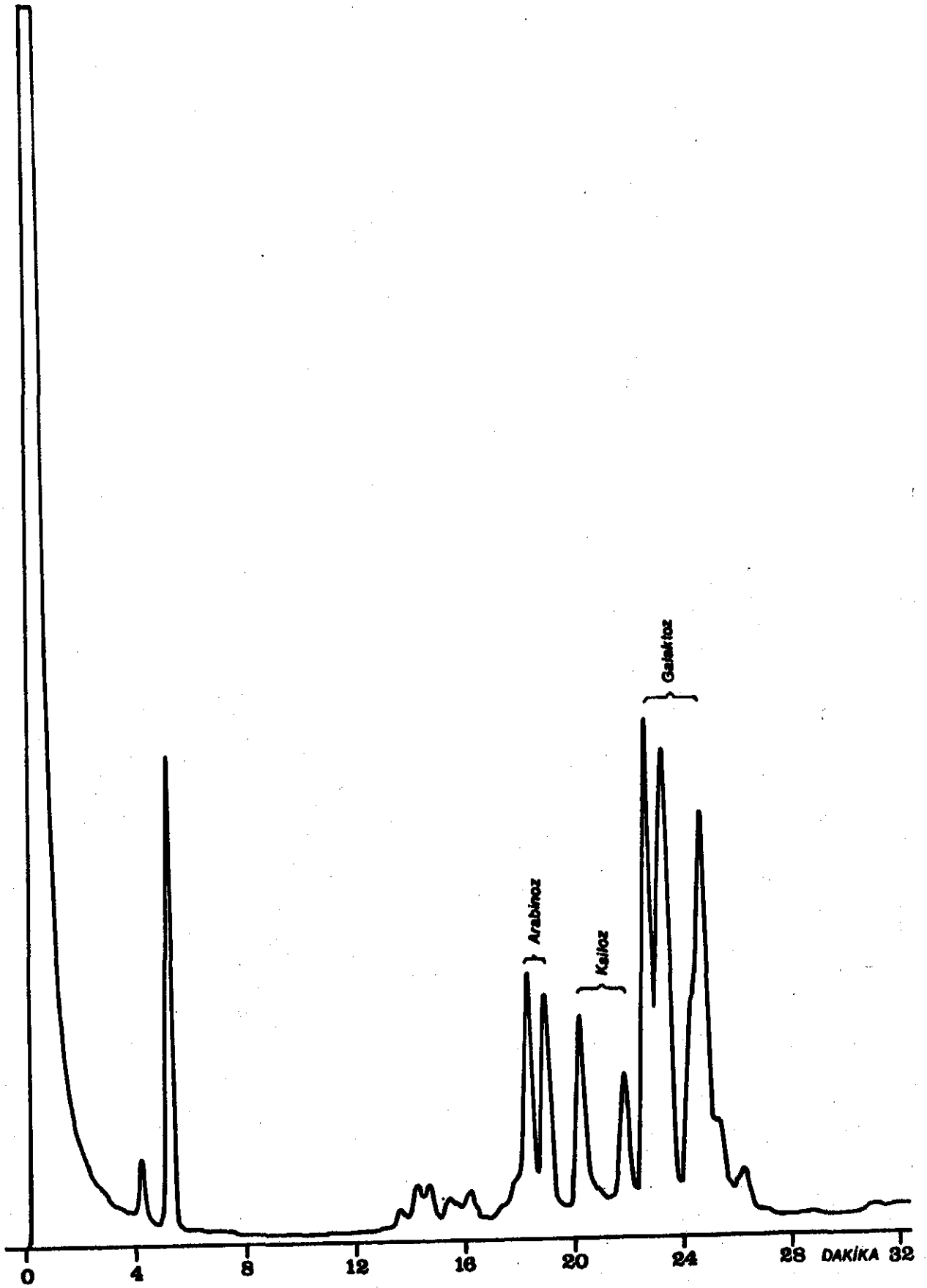
saponoziti, sapogenin-3-O-monodesmozit ve C-28-oligoholozitin silillenmiş oz karışımlarının gaz kromatogramları da aşağıda gösterilmiştir (Şekil - 34, 35 ve 36). Bu kromatogramlarda, glikuronik asite ait pikler görülmektedir. Bunun sebebi, karboksil grubunun esterleştirilmesidir.

Diğer taraftan, total asit hidrolizle elde edilen oz çökeltisinde, her iki kromatografik çalışmada fukoz tespit edilmiştir. Buna karşılık, alkali hidroliz sonunda elde edilen ürünlerin asit hidrolizi ile kazanılan oz çözeltilerinde fukoz yoktur. Bu nedenle, karboksil grubuna bağlı ilk ozun fukoz olabileceği düşünülmüştür. Çünkü, literatüre göre (72) bazı ozlar hidroliz sırasında parçalanmaktadır. Lityum aluminyum hidrür ile, permetil (S2) saponoziti üzerinde yapılan sonraki çalışmalarımız bu ön bulgumuzu doğrulamıştır.



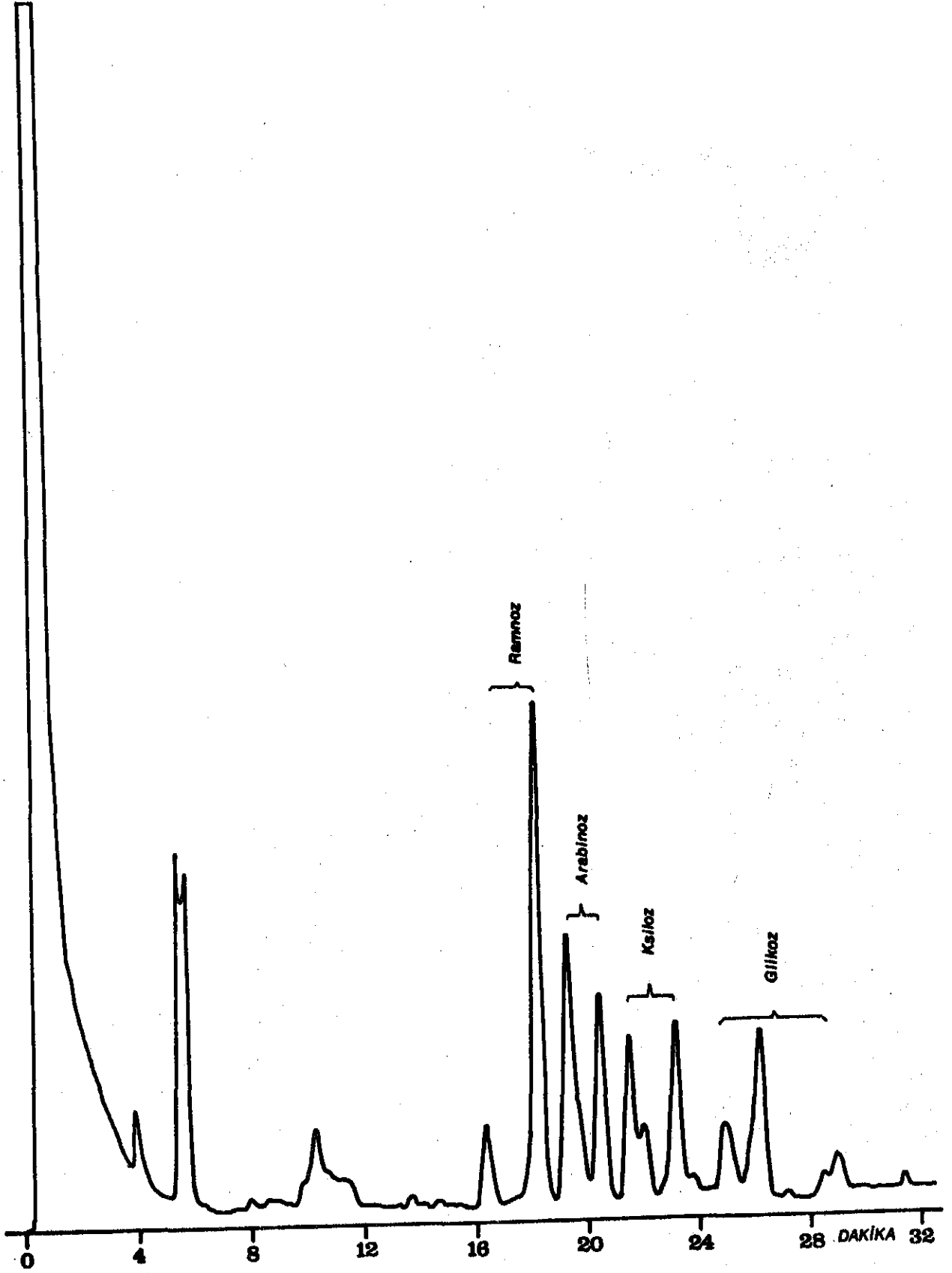
Şekil - 34

(S2) Saponozitinin Silillenmiş Ozlarının Gaz Kromatogramı



Şekil - 35

Sapogenin-3-O-monodesmozitin Silillenmiş Ozlarının Gaz Kromatogramı



Şekil - 36

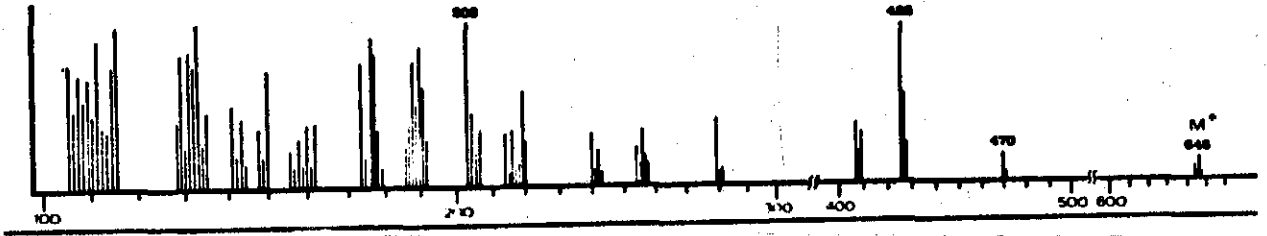
C-28-Oligoholezitin Silillenmiş Ozlarının Gaz Kromatogramı

Z a y ı f H i d r o l i z

Gipsogenin-3-O-Glikuronozit

E r i m e N o k t a s ı : 203 - 205°C

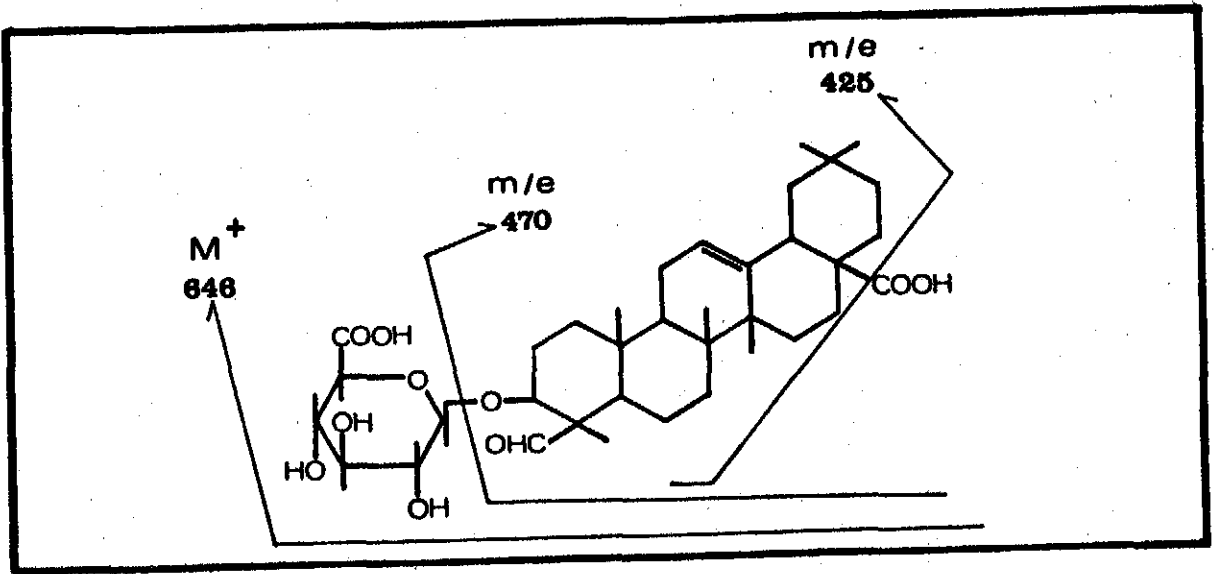
K ü t l e S p e k t r u m u : Maddenin kütle spektrumunda (Şekil - 37), moleküler iyon (M^+) piki 646 da görüldü. Molekülün glikuronik asiti kaybetmesiyle aglikondan dolayı meydana gelen iyon (M -glikuronik asit $^+$) m/e 470 de elde edildi (Şekil - 38). Ayrıca, aglikondan dolayı meydana gelen karakteristik iyon pikleri m/e 425, m/e 203 de görüldü.



Şekil - 37

Gipsogenin-3-O-glikuronozitin Kütle Spektrumu

(JOEL JMS - D100 Kütle Spektrometresi, İyonlaşma Gerilimi 75eV)



Şekil - 38

Gipsogenin-3-O-glikuronozitin Parçalanması

Erime noktasının değerinden ve kütle spektrumundan, gipsogenin-3-0-glikuronozit olduğu tespit edildi. Böylece, (S2) saponozitinde uronik asitin doğrudan doğruya aglikonun hidroksil grubuna bağlı olduğu anlaşıldı.

Ozların Zincirdeki Yerlerinin Tespiti

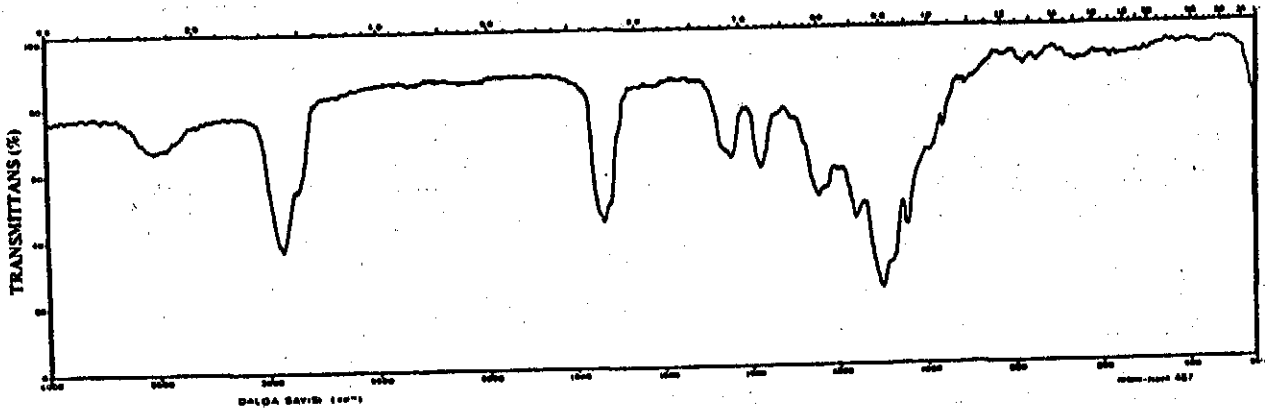
Permetil (S2) Saponoziti

Erime Noktası : 120 - 124°C

İnce Tabaka Kromatografisi

Adsorban	Kieselgel G (Aktive edilmemiş)
Solvan Sistemi-15	C ₆ H ₆ : EtOH (10:1)
Reaktif	% 30 H ₂ SO ₄ /H ₂ O
R _f	0,42

IR Spektrumu : Elde edilen ürünün IR spektrumunda (şekil - 39), 3200 - 3400 cm⁻¹ de serbest hidroksil grupları için karakteristik absorpsiyon bantları görülmedi. Böylece, metillemenin tam olduğu anlaşıldı.



şekil - 39

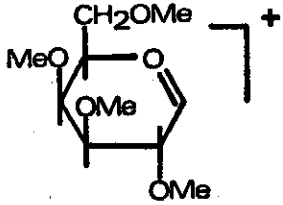
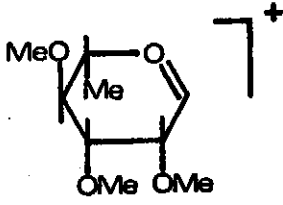
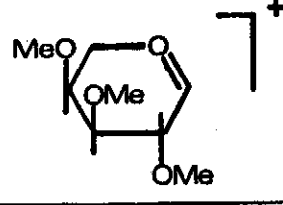
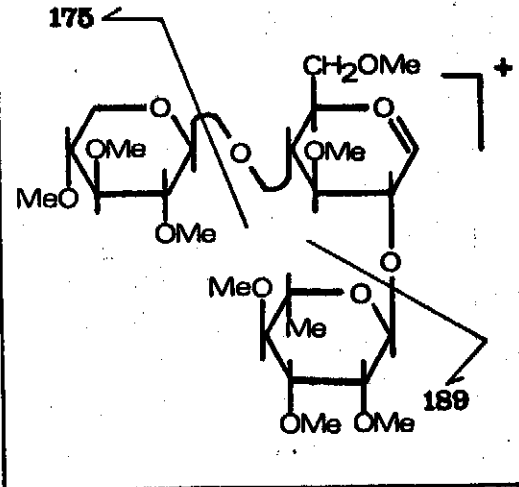
Permetil (S2) Saponozitinin IR Spektrumu

(Perkin Elmer Model 457, %1 KBr).

Kütle Spektrumu

Oz Kısımından Dolayı Meydana Gelen İyonlar: Permetil (S2) nin kütle spektrumu incelendiğinde, oz kısmından dolayı meydana gelen iyonlara ait pikler m/e 175, m/e 189, m/e 219 ve m/e 553 de görüldü. Bunlardan m/e 175 terminal arabinoz

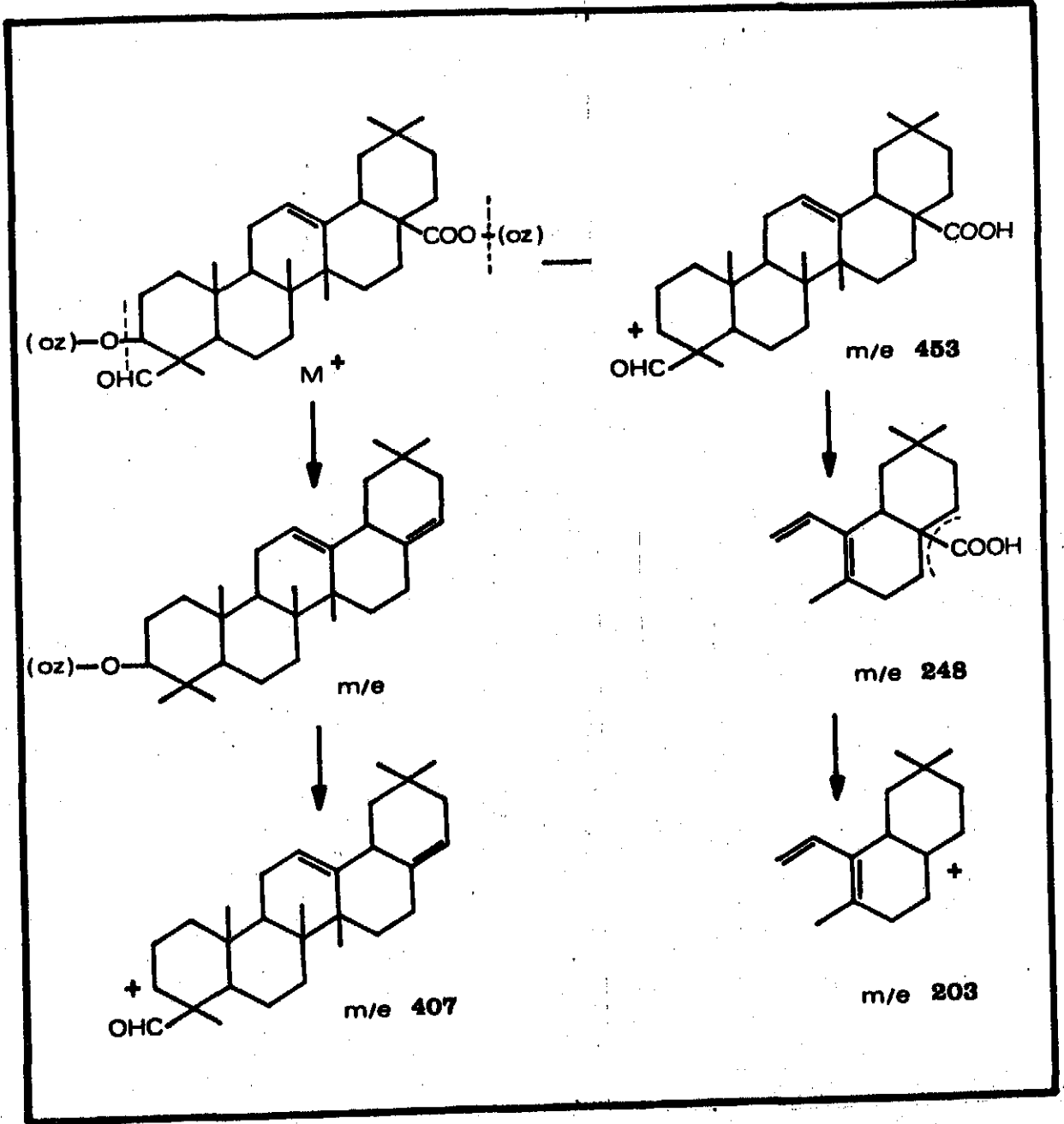
ve/veya ksiloz, m/e 189 terminal ramnoz, m/e 219 terminal galaktozdan dolayı meydana gelen katyonlara aittir (94), m/e 553 ise okta-0-metil-trioza ait katyon pikidir (Şekil-40) (58).

Terminal oz katyonları	m/e	Terminal oz
	219	Tetrametil - heksoz 2,3,4,6 - tetrame - galaktoz
	189	Trimetil - metil pentoz 2,3,4 - trime - ramnoz
	175	Trimetil - pentoz 2,3,4 - trime - ksiloz veya 2,3,4 - trime - arabinoz
	m/e 553	Oktametil - trioz Trime - metil pentoz + trime - pentoz + dime - heksoz

Şekil - 40

Permetil (S2) Oz Kısmından Dolayı Meydana Gelen İyonlar
(dime) dimetil, (trime) trimetil, (tetrame) tetrametil,

Aglıkondan Dolayı Meydana Gelen İyonlar: Permetil (S2) nin kütle spektrumunda, aglıkondan dolayı meydana gelen iyonlara ait pikler m/e 453, 407, 248 ve 203 de görüldü (Şekil - 41).



Şekil - 41

Permetil (S2) Aglıkondan Dolayı Meydana Gelen İyonlar

Permetillenmiş (S2) saponozitinin kütle spektrumları, T. KOMORI (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan) tarafından alınmış ve değerlendirilmiştir.

Permetillenmiş (S2) Saponozitinin Total Asit Hidrolizi: Permetil saponozitin total asit hidrolizi sonunda elde edilen aglikonun, silikajel kaplı plaklarda eter:benzen (4:1) solvan sistemi ile yapılan ince tabaka kromatografisinde gipsogenin ile aynı R_f değerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Oz hidrolizatının ince tabaka kromatografisinde 9, 10, 11, 12 ve 13 nolu solvan sistemleri ile metillenmiş ozlara ait 8 leke tespit edildi, R_G değerleri hesaplandı (Tablo - 18).

Me. Oz	R_G Solvan Sistemleri				
	9	10	11	12	13
I	1,38	1,18	1,12	-	1,14
II	1,20	1,07	1,04	1,37	1,10
III	0,81	0,88	0,97	-	0,88
IV	0,72	0,79	0,86	-	0,85
V	0,53	0,61	0,77	-	0,83
VI	0,53	0,60	0,70	-	0,76
VII	0,33	0,48	0,52	0,92	0,69
VIII	0,20	0,30	0,41	0,83	0,41
TMG	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Tablo -18

Metillenmiş Özlünün İnce Tabaka Kromatografisi

Adsorban	Kieselgel 60 DC-hazır plak (Merck) 0,25mm	
Solvan sistemi - 9	C_6H_6 : Me_2CO (2:1)	
" " 10	C_6H_6 : Me_2CO (1:1)	
" " 11	C_6H_6 : EtOH (8:2)	
" " 12	$CHCl_3$: MeOH (9:2)	
" " 13	Et-CO-Me / H_2O ile doyurulmuş	
Reaktif	Anilin hidrojen ftalat, 110°C 5'	

Hidroliz ürünü olan metillenmiş ozlar (Me.Oz-I-VIII) şahit olarak hazırlanan metillenmiş oz numuneleri ile ince tabaka kromatografisinde R_G değerleri karşılaştırılarak teşhis edildi. Böylece, metillenmiş ozlar arasında 2,3,4-trimetil-L-ramnoz (Me.Oz-I), 2,3,4-trimetil-D-ksiloz (Me.Oz-II), 2,3,4,6-tetrametil-D-galaktoz (Me.Oz-III) ve 2,3,4-trimetil-L-arabinoz (Me.Oz-IV) bulunduğu tespit edildi.

Bu ozlar, permetillenmiş türevleri halindedir, dolayısıyla (S2) saponozitinin oz zincirinde terminal olarak ramnoz, ksiloz, galaktoz ve arabinoz yer alır. Terminal oz sayısının çok olması, oz zincirinde bir dallanma olduğunu göstermektedir. Diğer metillenmiş ozlar (Me.Oz-V, VI, VII, VIII) ise, kısmen metillenmiştir. Bu, ince tabaka kromatografisinde küçük R_G değerine sahip olmalarından anlaşılmaktadır. Kısmen metillenmiş ozlar, oz zincirinde terminal ozlar ile aglikon arasında, hatta dallanma noktalarında bulunabilirler.

Kısmen metillenmiş ozların ince tabaka kromatografisi ile teşhisi, şahit maddelerin çeşidinin az olmasından dolayı tam gerçekleştirilemedi. Bu ozlardan ikisi, permetillendikten sonra veya permetillenmeden önce şahit numunelerle karşılaştırılarak tanımlandı. VIII numaralı metillenmiş oz, silikajel kaplı plaklarda benzen:etanol (8:2) ve kloroform:metanol (9:2) solvan sistemleri ile yapılan ince tabaka kromatografisinde 3-O-metil-fukoz^{*} ile aynı R_G değerini verdi. Silikajel doldurulmuş sütunlarda (SK-7a ve 7b) saf olarak izole edildi. Fakat, elde edilen miktarın azlığından spesifik çevirmesi ölçülemedi. Bunun yerine, serbest hidroksil grupları metillenerek, daha önce hazırlanan

* 3-O-metil-fukoz numunesi Dr. H. Anıl (Ege Ün. Fen Fak. Genel Kim. Kürsüsü) dan temin edilmiştir.

permetillenmiş oz türevleriyle ince tabaka kromatografide karşılaştırıldı. Kısmen metillenmiş oz (Me. Oz-VIII) dan hareketle elde edilen permetil ozun 2,3,4- trimetil-D-fukoz ile aynı olduğu görüldü. Buna karşılık, 2-O- ve 4-O-metil-fukoz ile yukardaki gibi bir karşılaştırma yapılamamıştır. Bu nedenle ince tabaka kromatografisinde 3-O-metil-fukoz ile aynı R_G değeri elde edilmesine rağmen, bu maddenin tanımı monometil-fukoz (muhtemelen 3-O-metil-fukoz) olarak yapıldı.

Saf olarak izole edilmiş olan Me. Oz-VI da metillendi. Elde edilen ürünün ince tabaka kromatografisinde şahit maddelerle karşılaştırılması sonucu, 2,3,4-trimetil-D-ksiloz olduğu görüldü. Buna göre, Me. Oz-VI bir ksiloz türevidir.

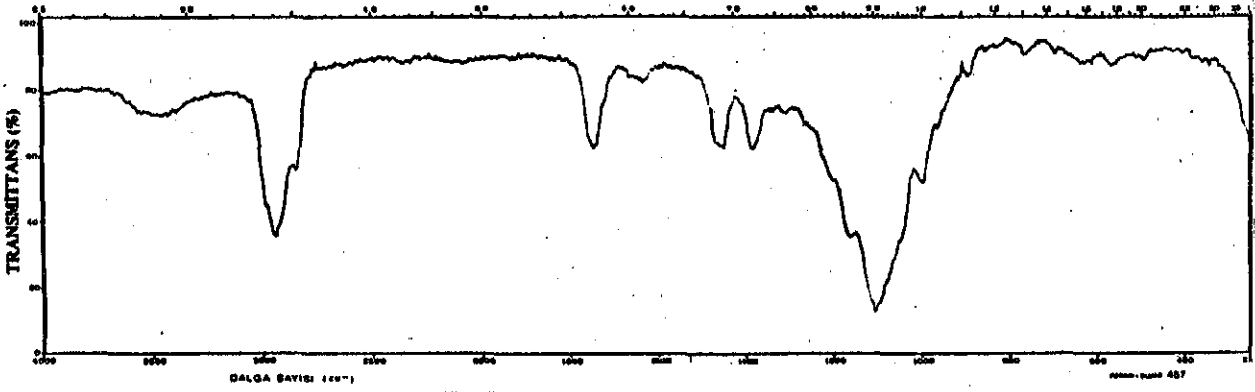
Me. Oz-V ve VII, şahit numunelerle karşılaştırma yapılamadığı ve diğer analizler için yetecek miktarlarda izole edilemediği için teşhis edilemedi.

Permetil Sapogenin-3-O-monodesmozit

E r i m e N o k t a s ı : 105 - 108°C

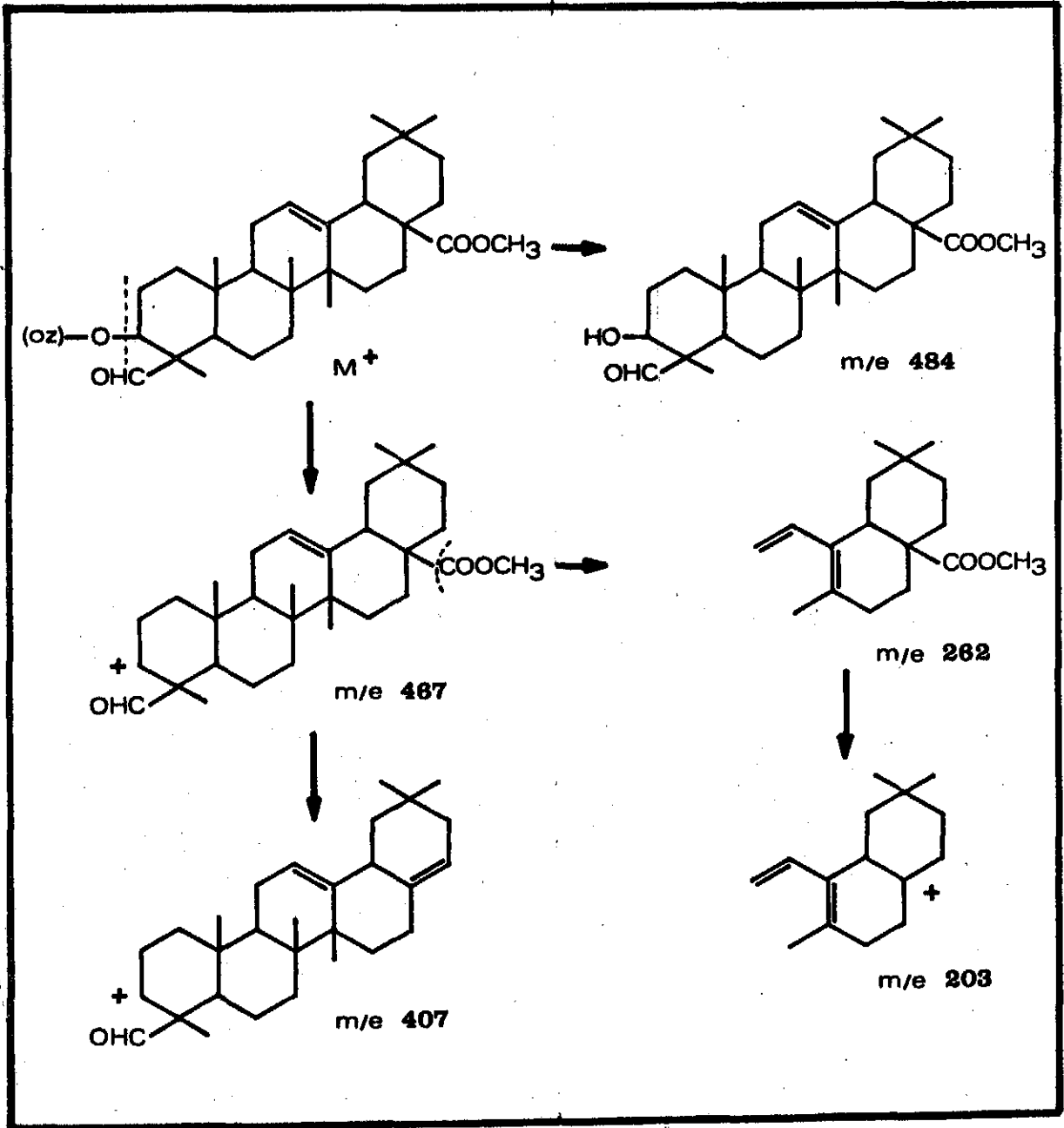
İ n c e T a b a k a K r o m a t o g r a f i s i

Adsorban	Kieselgel G (Aktive edilmemiş)
Solvan sistemi-15	C_6H_6 : EtOH (10:1)
" " 17	C_6H_6 : Me_2CO (5:1)
Reaktif	%30 H_2SO_4/H_2O
R_f	0,51 (sistem-15), 0,40 (sistem-17)



Şekil - 42

Permetil Sapogenin-3-O-monodesmozitin IR Spektrumu
(Perkin Elmer Model 457, Z1 KBr)



Şekil - 43

Permetil-sapogenin-3-O-monodesmozit

Aglıkondan Dolayı Meydana Gelen İyonlar

Permetil sapogenin-3-O-monodesmozitin kütle spektrumu, T. KOMORI tarafından alınmış ve değerlendirilmiştir.

IR S p e k t r u m u : Permetil sapogenin-3-0-monodesmozitin IR spekt-
rumunda, serbest hidroksil grupları için $3200 - 3400 \text{ cm}^{-1}$ de karakte-
ristik absorpsiyon bantları görülmedi (Şekil - 42). Böylece, maddenin
tamamen metillendiği anlaşıldı.

K ü t l e S p e k t r u m u : Permetil sapogenin-3-0-monodesmozitin
kütle spektrumunda m/e 175 de terminal ksiloz ve/veya arabinoz ile m/e
219 da terminal galaktozdan dolayı meydana gelen katyon pikleri görül-
dü (Şekil - 40). Aglikondan dolayı meydana gelen iyonlara ait pikler
m/e 484, 467, 407, 262 ve 203 de görüldü (Şekil - 43).

T o t a l A s i t H i d r o l i z : Total asit hidroliz ürününün
ince tabaka kromatografisine uygulanması sonucunda, 4 metillenmiş oz
tespit edildi. Bu ozlar, şahit numunelerle karşılaştırıldı ve permetil-
lenmiş (S2) saponozitinin total asit hidrolizi sonucu elde edilen II,
III, IV ve VI nolu ozlarla aynı olduğu görüldü.

II - 2,3,4-trimetil-D-Ksiloz,

III - 2,3,4,6-tetrametil-D-galaktoz,

IV - 2,3,4-trimetil-L-arabinoz,

VI - (n) metil-D-ksilozdur.

Buna göre, permetil (S2) saponozitinin hidrolizi ile elde edilen
Me. Oz-II, III, IV ve VI aglikonun hidroksil grubuna bağlıdır. Ksiloz,
galaktoz ve arabinoz permetil türevleri halinde olduğu için terminal
olarak yer almıştır.

Permetil (S2) Saponozitinin Lityum Alüminyum Hidrür ile Yarılması

Yarılma sonucu elde edilen metillenmiş C-28-oligoholozit de asit hidrolizle ozlarına parçalandı. Metillenmiş ozların ince tabaka kromatografisi ile incelenmesinde,

- I -2,3,4-trimetil-L-ramnoz
- II -2,3,4-trimetil-D-ksiloz
- IV -2,3,4-trimetil-L-arabinoz

kesin olarak tespit edilmiştir. Me.Oz-V in tanımı yapılamamıştır.

Daha önceki bulgularımız, oz zincirinde fukozun monometil-fukoz halinde bulunduğunu göstermişti. Lityum alüminyum hidrür yarılması sonucu elde edilen C-28-oligoholozitinin hidroliz ürünleri içinde monometil-fukozun tespit edilememesi, bu ozun aglikona bağlı olduğunu doğrulamıştır. Şöyle ki, fukoz aglikona karboksil grubu üzerinden bağlı ise, $LiAlH_4$ yarılması anında fusitol haline geçmektedir. Hidroliz ürünlerinin kromatogramına sodyum meta-periyodat-benzidin reaktifi püskürtüldüğünde lacivert zemin üzerinde monometil-fukoza yakın R_G değerinde beyaz bir leke meydana geldi. Bu da fukozun fusitol haline geçtiğini gösterdi. Buna göre, aglikonun karboksile bağlı oz zincirinde ilk oz fukoz, terminal ozlar ise ramnoz, ksiloz ve arabinozdur.

SONUÇ ve TARTIŞMA

Çalışmalarımız Botanik ve Kimyasal olmak üzere iki ana bölüme ayrılmıştı. Bulgularımız da aynı esasa göre değerlendirilecek, diğer taraftan ofisinal olan R. Saponariae Rubrae'ye ait değerlerle de karşılaştırılacaktır.

S. kotschy köklerinin anatomik yapısı incelendiğinde, dışta ince bir mantar (50 - 120 μ), altında geniş parenkimatik bir kabuk tabakası görülür. Kabuk, kök yarıçapının $1/3$ 'ü kadar bir kısmını kaplar. Parenkima hücreleri druz (30 - 40 μ) taşır. Merkezi silindirik sarı renklidir, yer yer ezilmiş kambiyum tabakası ile kabuk bölgesinden ayrılır, ağsı kalınlaşmış odun boruları (200 - 300 μ) taşır. Öze doğru, helisel kalınlaşmış odun boruları (30 - 50 μ) görülür. Kökün gövdeye yakın kısımlarında öz bulunmaz. Kökler, öz kolları ve nişasta taşımaz.

S. kotschy'nin S. officinalis'in anatomik özelliklerinden (45, 47, 69) tek farkı, öz parenkimasında druz bulunmamasıdır. Diğer özellikleri S. officinalis ile aynıdır.

S. kotschy'nin kök tozunun köpürme indeksi 714, hemoliz indeksi ise 405 olarak tespit edilmiştir. Bu değerler, ofisinal olan saponozit drogları için uygun değildir. Buna karşılık, elde edilen ham saponozitin hemoliz indeksi 14.865 bulunmuştur. Bu, ham saponozitler için uygun sayılabilecek bir değerdir.

Köklerden elde edilen ham saponozitin taşıdığı ana saponozitin yapısını açıklamak amacıyla yapılan kimyasal çalışmalarımızın sonuçları, şu sıra ile tartışılmıştır: Aglikonun, aglikona bağlı oz zincirlerinin ve saponozitin yapısının tanımı.

Ana saponozitin (S2 saponoziti) total asit hidrolizi ile, aglikon ve ozlar ayrı ayrı elde edilmiştir. Aglikonun, ince tabaka kromatografisinde şahit maddelerle karşılaştırılması, erime noktasının tayini, IR ve kütle spektrumlarından gipsogenin ile aynı olduğu tespit edilmiştir.

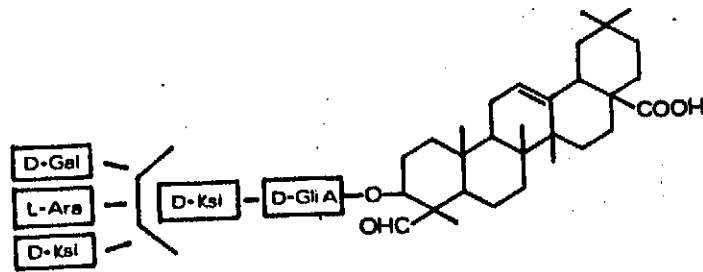
Total asit hidrolizle elde edilen oz kısmının, kağıt ve gaz likit kromatografisi ile incelenmesinden sonra, aglikona glikuronik asit, galaktoz, glikoz, arabinoz, ksiloz, ramnoz ve fukoza bağlı olduğu anlaşılmıştır.

Ana saponozitin alkali hidrolizi ile daha az polar bir ürünün (Sapogenin-3-O-monodesmozit) elde edilmesi, maddenin bisdesmozidik bir yapıda olduğunu göstermiştir. Alkali hidroliz sonucu, aglikonun karboksil grubuna bağlı bir oz zincirinin (C-28-oligoholozit) varlığı da kesinleşmiştir. C-28-Oligoholozitin asit hidrolizi ile glikoz, ksiloz, arabinoz ve ramnoz; sapogenin-3-O-monodesmozitin asit hidrolizi ile glikuronik asit, galaktoz, ksiloz, arabinoz ve gipsogenin elde edilmiştir. Ozların tanımı, kağıt ve gaz likit kromatografisi ile yapılmıştır.

Oz zincirlerinin yapısını tayin için, permetilleme işlemi yapılmış, permetil ürünün asit hidrolizi ile metillenmiş ozlara ait 8 leke elde edilmiştir. 2,3,4-trimetil-L-ramnoz, 2,3,4-trimetil-D-ksiloz, 2,3,4,6-tetrametil-D-galaktoz, 2,3,4-trimetil-L-arabinoz ve monometil-D-fukozun varlığı, ince tabaka kromatografisinde şahit numunelerle karşılaştırılarak kesin olarak tayin edilmiştir. İzole edilen fakat metillenme derecesi tayin edilememiş olan 3 üründen bir tanesi (Me.Oz-VI) permetillenip hidroliz edilmiş, bunun ksiloza ait olduğu bulunmuştur. Diğer iki üründe (Me.Oz-V ve VII), miktar azlığı yüzünden herhangi bir kimyasal işlem yapılamamıştır. Bu sonuçlara göre, Ana saponozitte ramnoz, ksiloz, galaktoz ve arabinoz terminal olarak bulunmaktadır. Bu sonuç, permetil-anasaponozitin kütle spektrumu ile de doğrulanmıştır.

Hidroksil grubuna bağlı oz zincirinde galaktoz, ksiloz ve arabinozun bulunduğu kağıt ve gaz likit kromatografisi yöntemleriyle tayin edilmiştir. Glikuronik asitin varlığı, sadece kağıt kromatografisi ile tespit edilmiş, gaz likit kromatografisinde uygun sonuç alınamamıştır, uygulanan yöntemde glikuronik asit, serbest olan karboksil grubundan dolayı kolonda tutulmaktadır.

Zincirin hangi oz üzerinden aglikona bağlandığını tespit etmek için, Ana saponozitin zayıf asit hidrolizi yapılmış ve elde edilen ürünün erime noktası ve kütle spektrumunun değerlendirilmesiyle, gipsogenin-3-O-monodesmozit olduğu sonucu elde edilmiştir. Bu da, hidroksile bağlı oz zincirinin glikuronik asit üzerinden aglikona bağlandığını göstermektedir. Zincirdeki diğer ozların yerlerinin tayini için, permetilleme işlemi yapılmıştır. Permetillenmiş ürünün (Permetil-sapogenin-3-O-monodesmozit) asit hidrolizi ile, dört metillenmiş oz elde edilmiştir. Bunlardan üçünün, ince tabaka kromatografisiyle yapılan tanımlarında 2,3,4-trimetil-D-ksiloz, 2,3,4,6-tetrametil-D-galaktoz ve 2,3,4-trimetil-L-arabinoz olduğu anlaşılmıştır. Buna göre, galaktoz, ksiloz ve arabinoz hidroksile bağlı oz zincirinde terminal olarak bulunmaktadır. Bu sonuç, kütle spektrumu ile de doğrulanmıştır. Dördüncü metil oz (Me.Oz-VI), permetilleme ve asit hidrolizden sonra 2,3,4-trimetil-D-ksiloz ile ince tabaka kromatografisinde aynı R_G değerini vermiştir. Bu da, Me.Oz-VI'nin ksiloza ait, kısmen metillenmiş bir oz olduğunu gösterir. Bu nedenle, hidroksile bağlı oz zincirinde, muhtemelen terminal ozlarla glikuronik asit arasında ikinci bir ksiloz molekülü bulunmaktadır. Yukarıda tartışılan bulgulara göre, aglikonun hidroksil grubuna bağlı oz zincirinin yapısı aşağıda gösterilen şekilde düşünülebilir.

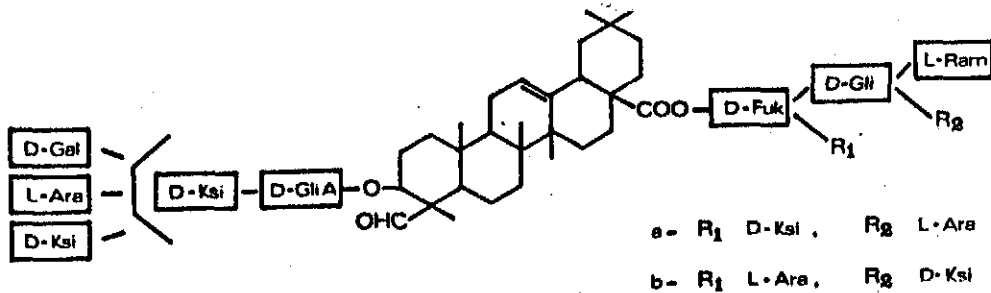


Şekil-44

Sapogenin-3-O-monodesmozit

C-28-oligoholozitin asit hidrolizi sonucu, kağıt ve gaz likit kromatografisi kullanılarak *glikoz, ksiloz, arabinoz ve ramnoz* tespit edilmiştir. Ana saponozitin ve permetil türevinin total asit hidrolizinde, *fukoz* varlığı tespit edilmişti. Hidroksile bağlı oz zincirinde, *fukozun* bulunmadığı kesinlikle gösterilmiştir. O halde, *fukozun* karboksile bağlı oz zincirinde bulunması gerekir. C-28-oligoholozitin asit hidrolizinden *fukozun* elde edilememesi, bu ozun aglikonun karboksil grubuna bağlı ilk oz olabileceğini düşündürmüştür. CHIRVA ve arkadaşlarının yaptığı bir araştırmada (37) da, çalışmalarımızdakine benzer sonuç elde edilmiş; araştırmacılar bu bulguyu *fukozun* karboksile bağlı olabileceği şeklinde değerlendirmişlerdir. Bu sorunu çözmek için, permetil ana saponoziti lityum alüminyum hidrür ile yarılmıştır. Eğer *fukoz* karboksile bağlı ise, bu işlem esnasında *fusitole* dönmesi gerekir. O halde, *fusitolün* varlığının tespiti, *fukozun* karboksile bağlı olduğunu gösterecektir. Çünkü, yarıma sonucu karboksile bağlı olan oz zinciri kopar, ilk oz indirgenir, alkolüne dönüşür. Lityum alüminyum hidrürle yarıma sonucu elde edilen metillenmiş oz zincirinin hidrolizatında, kesin olarak *2,3,4-trimetil-L-ramnoz, 2,3,4-trimetil-D-ksiloz* ve *2,3,4-trimetil-L-arabinoz* ince tabaka kromatografisi yardımıyla tespit edilmiştir. Bu tanımı yapıldığı kromatograma, itollerini belirlemede kullanılan sodyum meta-periyodat-benzidin reaktifi püskürtüldüğünde koyu mavi bir zemin üzerinde beyaz bir leke görülmüştür. Bu lekenin R_G değeri, daha önce permetil ana saponozitin hidrolizatında tanımı yapılan *monometil-fukozun* R_G değeri ile yakındır. Zaten, kromatogramda monometil-fukozun görülmemesi de onun monometil-fusitole dönüştüğünü göstermektedir. Bu şekilde, *fukozun* karboksile bağlı oz zincirinde ilk oz olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca, bir hidroksil grubunun metillenmiş olması bu noktada bir dallanma olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan *2,3,4-trimetil-L-ramnoz, 2,3,4-trimetil-D-ksiloz* ve *2,3,4-trimetil-L-arabinozun* teşhis edilmesi *ramnoz, ksiloz* ve *arabinozun* terminal olarak bulunduğunu gösterir. Bu bulgu, permetil ana saponozitin kütle spektrumunun değerlendirilmesi ile de doğrulanmıştır.

Karboksil grubuna bağlı oz zincirinin yapısı bu şekilde belirlendikten sonra, ana saponozitin yapısı da açıklanmış olmaktadır. Bu yapıda aglikon, aglikona bağlı ozların cinsleri, hidroksil ve karboksile bağlı ilk ozlar ve terminal ozlar kesinlikle tespit edilmiştir. Ozların zincirlerdeki birbirleriyle bağlanma durumları, kısmen metillenmiş ozların yapılarının kesin olarak açıklanamamasından dolayı henüz belirlenmemiştir. Daha önce açıklanan bulgularımıza göre, ana saponozitin muhtemel yapısı şu şekildedir.



Şekil-45

Saponaria kotschy Boiss. - Ana Saponozitin Muhtemel Yapısı

Bu yapı belirlendikten sonra açıklığa kavuşturulması gereken önemli bir husus da, bu maddenin yeni bir saponozit olup olmadığıdır.

Daha önce izole edilen ve oz zincirleri açıklanan, gipsogenin aglikonlu Caryophyllaceae saponozitleri Tablo-19 da gösterilmiştir.

Saponozit	Gipsogenine Bağlı Ozlar												
	3.(C) Hidroksil						17.(C) Karboksil						
Saponozitin Adı	GliA	Gál	Ksi	Ara	Gli	Ram	Fük	Ara	Ksi	Gli	Ram	Gál	Lit
Ana saponozit <i>Saponaria kotschyi</i>	+	+	+	+			+	+	+	+	+		
Saponozit D <i>S. officinalis</i>	+	+	+	+		+	+		+	+	+	+	34
Saponozit A <i>S. officinalis</i>	+									+			33
Gipsozit <i>Gypsophila pacifica</i>	+	+		+	+	+	+		+		+		89
Trikozit A <i>G. trichotoma</i>	+				+							+	103
Trikozit B	+				+					+		+	100
Trikozit C	+				+		+				+	+	101
Trikozit D	+	+	+	+			+		+	+	+	+	102
Diyantozit C <i>Dianthus deltoides</i>	+	+	+				+	+	+		+	+	29
Nutanozit <i>Silene nutans</i>	+	+	+	+			+			+	+	+	24
Vakegezit <i>Vaccaria segetalis</i>	+	+	+	+			+	+				+	9
Akantofilozit B <i>Acanthophyllum gypsophiloides</i>	+	+	+				+		+		+		123
Akantofilozit C	+	+	+		+		+		+		+		123

Tablo - 19
Gipsogenin Aglikonu Taşıyan Caryophyllaceae Saponozitleri

Görüldüğü gibi, ana saponozit bugüne kadar yapısı aydınlatılan saponozitlerden farklı bir oz zinciri taşımaktadır. Saponozit D den, hidroksile bağlı oz zincirinde ramnoz, karboksile bağlı oz zincirinde galaktoz bulunmaması; buna karşılık karboksile bağlı oz zincirinde arabinoz taşınması ile büyük farklılık göstermektedir. Gypsophila trichotoma'dan izole edilen trikozit D'ye, hidroksil grubunda bulunan ozların cinsi bakımından benzerlikteyse de, bu ozların birbiri ile bağlantısı bakımından önemli farklar bulunmaktadır. Diğer taraftan, karboksile bağlı oz zincirinde ana saponozite arabinoz bulunur. Trikozit D de bulunan galaktoz ise bulunmaz. S. kotschyi ana saponoziti, nutanozit, vakegezit ve akantofilozit adlı saponozitlerden de, oz zinciri bakımından çok farklıdır.

Yukarda kısaca tartışılan hususlar S. kotschyi ana saponozitinin Saponaria türleri ve gipsogenin aglikonu taşıyan Caryophyllaceae saponozitleri için yeni bir saponozit olduğu sonucunu vermiştir.

Ö Z E T

1974-1975 yıllarında, 25-30 Haziran tarihleri arasında Isparta, Gölcük krater gölü dolaylarında toplanan Saponaria kotschy Boiss. bitkisinin kökleri üzerinde Farmakognozik araştırmalar yapılmıştır. Botanik çalışmalarda, bitkinin ve köklerinin morfolojik özellikleri, kökün anatomisi incelenmiştir. Anatomik özellikler ofisinal R. Saponaria Rubrae ile karşılaştırılmıştır. Bulunan tek fark S. kotschy köklerinin öz kısmında druz taşımamasıdır.

Kök tozunun köpürme indeksi 714, hemoliz indeksi 405 ve ham saponozitin hemoliz indeksi 14.685 olarak tayin edilmiştir.

Ham saponozitte iki saponozit ve başlıca üç oligoholozit teşhis edilmiş, bu karışımdan ana saponozit (S2 saponoziti) izole edilmiştir. EN 238 - 243°C (bozunma); IR 3200 - 3400 cm⁻¹, 1725 cm⁻¹, 1640 cm⁻¹

Ana saponozitin asit hidrolizi ile aglikon elde edilmiştir. Aglikonun kromatografik davranışı, erime noktası, IR ve kütle spektrumundan, şahit gipsogenin maddesiyle aynı olduğu tespit edilmiştir: EN 263-265°C; IR 3500 cm⁻¹, 1720 cm⁻¹, 1700 cm⁻¹; kütle spektrumu M⁺ 470, m/e 425 (M⁺ - COOH), 248, 203.

Aglikona bağlı toplam ozlar kağıt ve gaz likit kromatografisi ile teşhis edilmiş ve D-glikuronik asit, D-galaktoz, D-glikoz, L-arabinoz, D-ksiloz, D-fukoz, ve L-ramnoz bulunmuştur.

Ana saponozitin zayıf asit hidrolizi sonucu gipsogenin -3-0-glikuronozit elde edilmiştir: EN 203-205°C ; kütle spektrumu M⁺ 646, m/e 470, 425, 248, 203. Bu, glikuronik asitin doğrudan doğruya aglikonun hidroksil grubuna bağlı olduğunu göstermiştir.

Ana saponozitin alkali hidrolizi ile saponenin-3-0-monodesmozit ve C-28-oligoholozit elde edilmiştir. Monodesmozitin asit hidrolizi sonucu gipsogenin, galaktoz, glikuronik asit, ksiloz ve arabinoz (hidroksil grubuna bağlı ozlar), oligoholozitin hidrolizatında glikoz, ksiloz, arabinoz ve ramnoz (karboksil grubuna bağlı ozlar) teşhis edilmiştir. Total hidrolizde bulunan fukozun, alkali hidroliz ürünlerinde bulunmaması, bu ozun doğrudan doğruya gipsogeninin karboksil grubuna

bağlı ilk oz olabileceğini göstermiştir. Bu sonuç, permetil saponozitin lityum alüminyum hidrür yarılması ile doğrulanmıştır.

Ozların zincirde bağlanış sırasını aydınlatmak için, ana saponozit metillenmiştir. Permetil ana saponozitine ait bulgular: EN 120-124°C; IR 3200-3400 cm⁻¹ de serbest hidroksil grupları için karakteristik absorpsiyon bantları yok; kütle spektrumu m/e 453, 407, 248, 203 (aglikondan dolayı meydana gelen iyonlara ait pikler), m/e 553, 219, 189, 175 (oz kısmından dolayı meydana gelen iyonlara ait pikler).

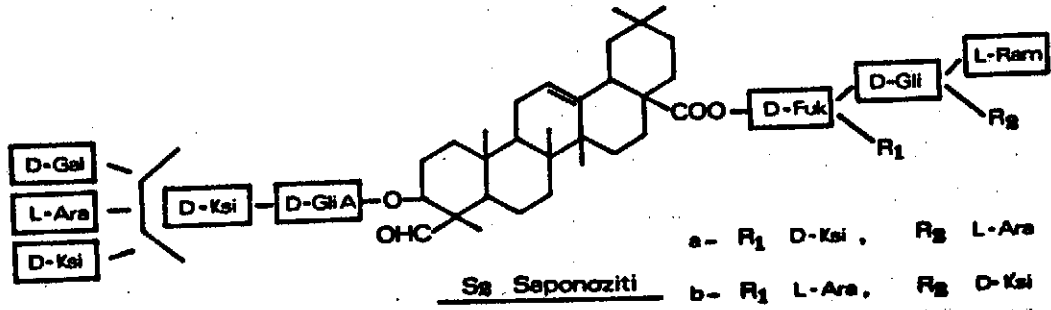
Permetillenmiş ana saponozitin asit hidrolizinden sonra, ince tabaka kromatografisinde sekiz metillenmiş oz (I-VIII) tespit edilmiştir. Şahit maddelerle karşılaştırılarak, permetillenmiş ramnoz (I), ksiloz (II), galaktoz (III) ve arabinoz (IV) ile monometil-fukoz (VIII) teşhis edilmiştir. Böylece, galaktoz, ramnoz, ksiloz ve arabinozun terminal olarak bulunduğu, permetillenmiş halde bulunmalarından ve permetillenmiş saponozitin kütle spektrumunun değerlendirilmesinden ortaya çıkmıştır. Diğer üç maddenin (V,VI,VII) de kromatografik davranışlarından kısmen metillenmiş oldukları anlaşılmıştır.

Kısmen metillenmiş ozları tanımlamak için, metillenmiş ozlar karışımından, kolon kromatografisi kullanılarak I,II,VI,VII ve VIII saf olarak izole edilmiştir. VI ve VIII nolu ozlar önce permetillenmiş, sonra asit hidrolize tabi tutulduktan sonra sırasıyla 2,3,4-trimetil-D-ksiloz ve 2,3,4-trimetil-D-fukoz elde edilmiştir. Bu da, VI'nın bir ksiloz, VIII'in bir fukoz türevidir olduğunu gösterir.

Aglikonun hidroksil grubuna bağlı ozların zincirdeki yerlerini tespit etmek için, Sapogenin-3-O-monodesmozit permetillenmiştir. Ürünün kütle spektrumu ve asit hidrolizatının ince tabaka kromatografisinden, aglikonun hidroksil grubuna bağlı oz zincirinde galaktoz, ksiloz ve arabinozun terminal olarak, ikinci bir ksiloz molekülünün de dallanma noktasında bulunduğu tespit edilmiştir.

Lityum alüminyum hidrür yarılması sonucu elde edilen permetillenmiş C-28-oligoholozitin asit hidrolizatında permetillenmiş ramnoz, ksiloz ve arabinoz teşhis edilmiştir. Bu sonuç, bu ozların karboksil grubuna bağlı oz zincirinde terminal olduğunu göstermiştir. Bu zincirde, glikozun dallanma noktasında bulunduğu, permetillenmiş ana saponozitin kütle spektrumunun değerlendirilmesinden anlaşılmıştır.

Yukarda belirtilen bulgulara göre, *S. kotschyi* bitkisinin ana saponoziti için aşağıdaki formül teklif edilebilir.



Bulgularımız literatürdekiler ile karşılaştırıldığında, ana saponozitin yeni bir triterpenik saponozit olduğu görülmektedir.

S U M M A R Y

Pharmacognosical studies have been made on the roots of *Saponaria kotschyi* Boiss. collected in the vicinities of the Gölçük crater lake, Isparta region during 25th-30th June, from 1974 to 1975. In these botanical studies, the morphological characteristics of the plant and its roots, and the anatomy of the roots were examined. The anatomical features have been compared with these of the officinal *R. Saponariae Rubrae*. The only difference found was that the roots of *S. kotschyi* contained no druse in the central cylinder.

The foaming index, the hemolytic index of the powdered roots and, the hemolytic index of the crude saponoside have been determined to be 714, 405 and 14.685 respectively.

Two saponosides and mainly three oligoholosides have been identified in the crude saponoside, and the main saponoside (S₂) has been isolated from this mixture: mp 238-243°C. (decomp.), IR spectrum 3200-3400 cm⁻¹, 1725 cm⁻¹, 1640 cm⁻¹.

As a result of the acid hydrolysis of the main saponoside, aglycon has been obtained. It has been determined that the aglycon is the same as the authentic sample of gypsogenin with respect to the chromatographic behaviour, melting point, IR, and mass spectra: mp 263-265°C, IR 3500⁻¹, 1720 cm⁻¹, 1700 cm⁻¹, mass spectrum M⁺ 470, m/e 425 (M⁺ -COOH), 248, 203.

All monooses attached to the aglycon have been identified by paper and gas liquid chromatography and found as D-glucuronic acid, D-galactose, D-glucose, D-xylose, L-arabinose, L-rhamnose, and D-fucose.

Following a weak acid hydrolysis of the main saponoside, gypsogenin-3-O-glucuronoside has been obtained: mp 203-205°C, mass spectrum M^+ 646, m/e 470, 425, 248, 203. This result shows that glucuronic acid is directly attached to hydroxyl group of the aglycon.

Sapogenin-3-O-monodesmoside and C-28-oligoholoside have been obtained by alkaline hydrolysis of the main saponoside. The acid hydrolysis of the monodesmoside has yielded gypsogenin (aglycon) glucuronic acid, galactose, xylose and arabinose (attached to the hydroxyl group), and in the hydrolysate of the oligoholoside glucose, xylose, arabinose and rhamnose (attached to the carboxyl group) have been found.

The absence of fucose observed in total acid hydrolysis, in the alkaline hydrolysis products of main saponosides indicates that fucose could be attached to the carboxyl group of the gypsogenin as the first ose. This assesment has been confirmed by the lithium aluminium hydride cleavage of the permethylated main saponoside.

The main saponoside was methylated so as to determine the sequence of the monooses in the ose moiety. The findings concerning the permethylated main saponoside : mp 120-124°C, in the IR spectrum, at 3200-3400 cm^{-1} , characteristic absorption bands of the free hydroxyl groups were not present, mass spectrum m/e 453, 407, 248, 203 (the peaks of the ions occurring by fragmentation of the aglycon), m/e 553, 219, 189, 175 (the peaks of the ions occurring by fragmentation of the methylated ose chain).

The acid hydrolysis of the permethylated main saponoside (S2) yielded eight oses (I-VIII). Permethylated rhamnose (I), xylose (II), galactose (III), arabinose (IV) and monomethyl-fucose (VIII) have been determined by comparing these with the authentic standarts on a thin layer chromatography. In this manner, rhamnose, xylose, galactose and arabinose determined to be permethylated and the interpretation of mass spectrum of permethylated main saponoside suggested that these oses are terminal. It has been understood that the other three oses

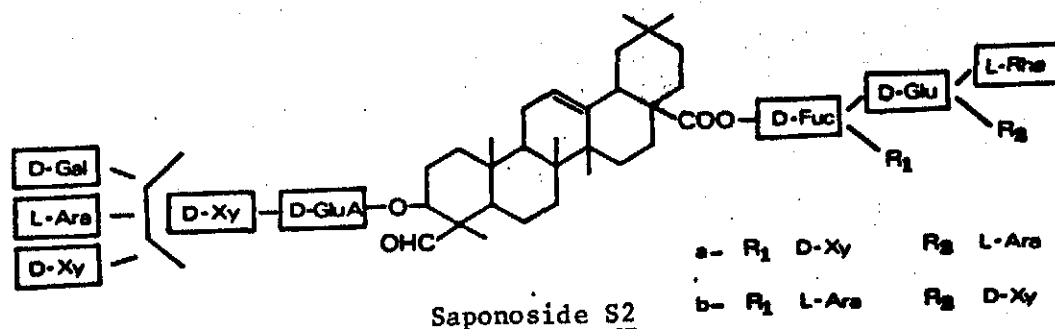
(V, VI, VII) were partially methylated depending on their chromatographic behaviour.

In order to identify the partially methylated oses, I, II, VI, VII, VIII were purely isolated from the mixture of methylated oses by using column chromatography. Oses No. VI, and VIII were first permethylated, then subjected to acid hydrolysis after which 2, 3, 4-trimethyl-D-xylose, and 2, 3, 4-trimethyl-D-fucose have been obtained respectively. This indicates that VI is a derivative of xylose and VIII of fucose.

Sapogenin-3-O-monodesmoside was permethylated in order to determine the sequence of oses attached to hydroxyl group of the aglycon. Then the mass spectrum of the product and thin layer chromatography of its acid hydrolysate clearly displayed that galactose, xylose, arabinose are terminal, and the second xylose molecule is situated at the branching point in ose-chain attached to the hydroxyl group of the aglycon.

In the acid hydrolysis of permethylated C-28-oligoholoside resulting from the cleavage of permethylated main saponoside, permethylated rhamnose, xylose, arabinose have been identified. Considering that these oses were found to be permethylated, it can be concluded that they are terminal in ose-chain attached to the carboxyl group. It has been understood following the evaluation of the mass spectrum of the permethylated main saponoside that the glucose molecule is situated at the branching point of this ose-chain.

In accordance with the findings mentioned above, it is suggested that the structure of the main saponoside of *S. kotschyi* should be given as in the formula below.



When comparing our findings with those in literature, it is observed that the main saponoside is a new triterpenic saponoside.

L I T E R A T Ü R

1. Allen, S., Bonner, T.G., Bourne, E.J., Saville, N.M., Boron Trichloride as a Degradative Reagent for Carbohydrates and Their Derivatives. Chem. Ind. 346 (195).
2. Amanmuradov, K., Gronovich, M.H., The Triterpene Glycoside from Gypsophylla bicolor. Khim. Prir. Sdedin. 5, 449 (1969).
3. Amanmuradov, K., Kondratenko, E.S., Abubakirov, N.K., The Saponin of Acanthophyllum gypsophiloides. Ibid. 1, 143 (1965).
4. Amanmuradov, K., Tanyurcheva, T.N., T Triterpene Glycoside from Acanthophyllum andenophorum. Ibid. 5, 326 (1969).
5. Anderle, D., Chirva, V.J., Identification of Monosaccharides of Triterpenoid Glycosides as alditol Trifluoroacetates. Ibid. 8, 471 (1972).
6. Anıl, H., Cyclamen neopolitanum Ten. Saponin İçinin Yapıları. Doğa 1, 148 (1977).
7. Aspinall, G.O., Gas-Liquid Partition Chromatography of Methylated and Partially Methyl Glycosides. J.Chem. Soc. 1676 (1963).
8. Aurnhammer, G., Konstitutionsaufklärung und Synthese von Rhamnoglicosiden der Flavanon- und Flavonreihe. Dissertations- und Fotodruck, Franz Frank 8 München 13, April (1968).

9. Baeva, R.T., Karryev, M.O., Abubakirov, N.K., Vaccaria segetalis Glycosides. Structure of Vaccego-side C. Izv. Akad. Nauk. Turkm. SSR., Ser.Fiz.- Tekn., Khim. Geol.Nauk. 4, 83 (1975).
10. Barger, G., Saponarin, a New Glucoside, Coloured Blue with Iodin. J.Chem. Soc. 89, 1210 (1906).
11. Basu, N., Rastogi, R. P., Triterpenoid Saponins and Sapogenins. Phytochem. 6, 1249 (1967).
12. Bell, D.J., Talukder, M.Q.-K., Thin-Layer Quantitative Chromatography of Arabinose, Ribose - and xylose in the Presence of Other Sugars. J. Chromatog. 49, 469 (1970).
13. Belous, V.N., Ryabinin, A.A., Gypsogenic Acid from the Roots of Acantophyllum subglabrum and A. gysophiloides. Khim. Prir. Soedin. 3, 95 (1967).
14. Berger, F., Handbuch der Drogenkunde. Erkennung, Wertbestimmung und Anwendung. Wilhelm Maudrich Verlag, Bonn (1960).
15. Björndal, H., Linderberg, B., Svensson, S., Gas-Liquid Chromatography of Partially Methylated Alditols as Their Acetates. Acta Chem. Scand. 21, 1801 (1967).
16. Boissier, E., Flora Orientalis, cilt 1, Thamamiflorae (1867), Réimpression fac-similée, A.Asher and Co. (1963).

17. Idem, Diagnoses Plantarum, Series II. Akademische Druck-u. Verlangsanstalt, Graz-Austria (1969).
18. Boiteau, P., Pasich, B., Ratsimamanga, A.R., Les Triterpenoides en Physiologie Végétale et Animale. Gauthier Villars Editeur, Paris (1964).
19. Brieskorn, C.H., Kilbinger, W., Struktur eines Saponins Polygala chinensis. Arch. Pharmazie 11, 824 (1975).
20. Brimacombe, J.S., Jones, B.D., Stacey, M., Willard, J.J., Alkylation of Carbohydrates Using Sodium Hydride. Carbohydrate Res. 2, 167 (1966).
21. Budzikiewicz, H., Djerassi, C., Williams, D.H., Pentacyclic Triterpenes. Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry, cilt II. Steroids, Terpenoids, Sugars, and Miscellaneous Classes. San Francisco. Holden-Day (1964).
22. Budzikiewicz, H., Takeda, K., Schreiber, K., Massenspektroskopische Untersuchung von Substituierten Steroidsapogeninen. Monatsh. Chem. 101, 1003 (1970).
23. Budzikiewicz, H., Wilson, J.M., Djerassi, C., Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. ~~xxxxi~~. Pentacyclic Triterpenes J. Amer. Chem. Soc. 85, 3688 (1963).
24. Bukharov, V.G., Karneeva, L.N., Structure of Nutanoside. Khim. Prir. Soedin. 7, 412 (1971). Ref.: CA, 75, 152040z (1971).

25. Bukharov, V.G., Shcherbak, S.P., A Triterpene Glycosides from Gypsophylla patrinii. Ibid. 2, 291 (1966).
26. Idem, Gypsogenic Acid Glycoside from Saponaria officinalis. Izv. Akad. Nauk.SSSR.Ser.Khim. 1, 137 (1969).
27. Idem, Triterpene Glycosides from Saponaria officinalis. ~~Chem. Prir. Soedin.~~ 5, 389 (1969); 420 (1971).
28. Idem, Oligosaccharides of Saponaria officinalis. Ibid. 5, 469 (1969).
29. Idem, Triterpene Glycosides of Dianthus deltoides. II. Structure of Dianthoside C. Ibid. 4, 420 (1971).
30. 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).
31. Cheung, H.T., Yan, T.C., Nuclear Magnetic Resonance Signals of Methyl Groups in Structural Determination of Triterpenes. 2α , 3α - and 2β , 3β - Dihydroxyolean-12-en-28-oic Acids. Chemical Communications, 369 (1970).
32. Chirva, V.J., Kintya, P.K., Mutual Transitions of Saponosides A and B,C and D. Issled. Khim. Koord. Soedin. Fiz.-Khim, Metod. Anal. 158 (1969).
33. Idem, Structure of Saponoside A. Khim. Prir. Soedin. 5, 188 (1969).
34. Idem, The Structure of Saponoside D. Ibid. 6, 214 (1970).

35. Chirva, V.J., Kintya, P.K., Cheban, P.L., Triterpene Glycoside from Gypsophila acutifolia. Ibid. 6, 487 (1970).
36. Chirva, V.J., Kintya, P.K., Lazur'evskii, G.V., Triterpene Glycosides of Saponaria officinalis. Ibid. 5, 59 (1969).
37. Idem. The Question of Structure of a Triterpene Glycoside from Saponaria officinalis. Ibid. 5, 494 (1969).
38. Chirva, V.J., Kintya, P.K., Sosnovskii, V.A., The Structure of Xanthoceras Saponin. Ibid. 4, 442 (1971).
39. Cifonelli, J.A., Smith, E., Detection of Glycosides and Other Carbohydrate Compounds on Paper Chromatograms. Anal. Chem. 26, 1132 (1954).
40. Cole, A.R.H., Thornton, D.W., Infrared Spectra of Natural Products. Part VII. The Identification and Location of Ethylenic Double Bonds in Pentacyclic Triterpenoids. J.Chem.Soc. 1332 (1957).
41. Colombo, P., Corbetta, D., Pirota, A., Rufiini, G., Sartori, A., A Solvent for Qualitative and Quantitative Determination of Sugars Using Paper Chromatography. J.Chromatog. 3, 343 (1960).
42. Davis, P.H., Flora of Turkey and the East Aegean Islands. cilt 2, University Press, Edinburg (1965-1975).
43. Djerassi, C., Osiecki, J., Closson, W., Optical Rotatory Dispersion Studies. xxv. Effect of Carbonyl Groups in Pentacyclic Triterpenes. J.Am.Chem.Soc. 81, 4587 (1959).

44. Duffield, A.M., Utilization of Mass Spectrometry in Natural Product Chemistry. Seikel, M.K. Runeckles, V.C., Recent Advances in Phytochemistry, Gilt II, Appleton-Century-Crofts, New York (1969).
45. Escrich, W., Pulver Atlas der Drogen Des Deutschen Arzneibuches Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1966).
46. Fetizon, M., Moreau, G., Moreau, N., Détermination de la Conformation D'Aldéhydes en position 4 β , en Serie Diou Triterpénique. Bull. Soc. Chim. France, 8, 3295 (1968).
47. Fischer, R., Praktikum der Pharmakognosie, Springer - Verlag, Wien (1968).
48. Garnier, G., Bézanger-Beauquesne, L., Debrauk, G., Ressources Médicinales de la Flore Française, cilt I, Vigot Frères Editeurs, 23, Rue de L'Ecole-de-Médecine, Paris VI (1961).
49. Gee, M., Walker, H.G. Jr., Gas-Liquid Chromatography of Some Methylated Mono-, Di-, and Trisaccharides. Analyt. Chem. 34, 650 (1962).
50. Gestetner, B., Assa, Y., Henis, Y., Birk, Y., Bondi, A., Lucerne Saponins. IV.- Relationshpip between Their Chemical Constitution, and Haemolytic and Antifungal Activities. J.Sci. Fd. Agric. 22, 168 (1971).
51. Gonzales, A.G., Bretón, J.L., Fraga, B.M., Resonancia Magnetica Nuclear de Triterpenos. I.- Los Grupos Metilo del Δ 18 (19)- 'Oleaneno. Rev. Latinoamer. Quim. 167 (1971).

52. Gorovits, T.T., Gas-Chromatographic Analysis of the Sugars Entering into the Composition of Natural Glycosides. *Khim. Prir. Soedin.* 5, 49 (1969).
53. Idem, The Gas-Liquid Chromatographic Determination of Sugars and Glucuronic Acid. *Ibid.* 6, 263 (1970).
54. Gubanov, I.A., Libizov, N.J., Gladkikh, A.S., A Search for Saponiferous Plants Among the Flora of Central Asia and South Kazakhstan. *Farmatsia (Moscow)* 19, 23 (1970).
55. Hakomori, S., A Rapid Permethylation of Glycolipid, and Polysaccharide Catalyzed by Methylsulfinyl Carbonion in Dimethyl Sulfoxide. *J. Biochemistry (Tokyo)* 55, 205 (1964).
56. Hegnauer, R., *Chemotaxonomie der Pflanzen, Chemische Reihe*, cilt 3, Birkhäuser Verlag Basel-Stuttgart (1964).
57. Heyns, K., Sperling, K.R., Grützmacher, H.F., Massenspektrometrischen Untersuchungen xix. Mitteilung. Kombination von Gaschromatographie und Massenspektrometrie zur Analyse Partiiell Methylierten Zuckerderivate. Die Massenspektren von Partiiell Methylierten Methylglucosiden. *Carbohydrate Res.* 9, 79 (1969).
58. Higuchi, R., Komori, T., Kawasaki, T., Massenspektren von Triterpensaponin-Permethylat des Oleanantyps. *Chem. Pharm. Bull.* 24, 2610 (1976).
59. Hiller, K., Keipert, M., Linzer, B., Triterpen Saponine. *Pharmazie* 21, 713 (1966).

60. Holligan, P.M., Drew, E.A., Routine Analysis by Gas-Liquid Chromatography of Soluble Carbohydrates in Extracts of Plant Tissues. II. Quantitative Analysis of Standard Carbohydrates, and the separation and Estimation of Soluble Sugars and Polyols from a Variety of Plant Tissues, New Phytol. 70, 271 (1971)
61. Hollstein, E., Keipert, M., Hiller, K., Zum Gaschromatographischen Nachweis der Esterkomponenten von Triterpen-Saponinen. Pharmazie 25, 366 (1970).
62. Hoppe, H.A., Drogenkunde. Cilt 1. Angiospermen. Walter de Gruyter, Berlin - New York (1975).
63. Ito, S., Kodama, M., Sunagawa, M., Correlation of Methyl Signals in 3β -Hydroxyoleanenes. Tetrahedron Letters, 3989 (1967).
64. Ito, S., Kodama, M., Sunagawa, Oba, T., Substituents Effect on the Methyl Signals in the NMR Spectra of Olean-12-en- 3β -ols. Effect of the Hydroxyl and Acetoxy Groups. Ibid. 2905 (1969).
65. Jacin, H., Mishkin, A.R., Separation of Carbohydrates on Borate-Impregnated Silica gel G Plates. J.Chromatog. 18, 170 (1965).
Snatzke, R., Tschesche, R., Wulf, G.,
66. Jizba, J., Dolejš, L., Herout, V., Šorm, F., Fehlhäber, H.-W., Polypodosaponin, ein neuer Saponintyp aus Polypodium vulgare L. Chem. Ber 104, 837 (1971).

67. Karan, A., Özand, P.T., Biochemistry of the Effects of Asiaticoside on Human Polymorphonuclear Leukocytes. *Biochemical Pharmacology* 21, 2773 (1972).
68. Karliner, J., Djerassi, C., Terpenoids. LVII. Mass Spectral and Nuclear Magnetic Resonance Studies of Pentacyclic Triterpene Hydrocarbon 21, 2773 (1972).
69. Karsten. Weber. Stahl., Lehrbuch der Pharmakognosie, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1962).
70. Kartnig, Th., Danhofer-Nöhammer, R., Wegschaider, O., Zur Spektralphotometrischen Bestimmung von Steroiden und Triterpenoiden Verbindungen. *Arch. Pharmaz.* 305, 515 (1972)
71. Kartnig, Th., Mikula, G., Zur Spektralphotometrischen Bestimmung von steroiden und Triterpenoiden Verbindungen. *Ibid.* 303, 767 (1970).
72. Khorlin, A.J., Chirva, V.J., Kochetkov, N.K., *Izv. AN SSSR, Seriya khim.* 811 (1965). Ref. Chirva, V.J., Kinya, P.K., Lazur'evskii, G.V., The Question of the Structure of A Triterpene Glycoside from Saponaria officinalis. *Khim. Prir. Soedin.* 5, 494 (1969).
73. Khorlin, A.J., Ovodov J.S., Kochetkov, N.K., Gypsophila pacifica Kom. Kökünden Saponinlerin Elde Edilmesi ve Saponinler Üzerinde Uygulanan Yöntemler, Araştırmalar ve Elde Edilen Sonuçlar. *Zh. Obs. Khim.* 32, 782 (1961).

74. Khorlin, A.J., Ovodov, J.S., Ovodova, R.G., Identity of Gypsoside and Triterpensaponin from Gypsophila paniculata. Izv. Akad. Nauk. SSSR. Ser.Khim. 1521 (1963).
75. Kimura, M., Hattori, Y., Yoshizawa, I., Tohma, M., Quantitative Analysis of Sugar Components in Steroidal Saponins by Gas-Liquid Chromatography. Chem. Pharm. Bull. 16, 613 (1968).
76. Kimura, M., Tohma, M., Yoshizawa, I., Constituents of Convallaria. V. On the Structure of Convallasaponin-C. Ibid. 14,55 (1966).
77. Kimura, M., Tohma, M., Yoshizawa, I., Akiyama, H., Constituents of Convallaria. x. Convallasaponin-A, -B. and Their Glucosides. Ibid. 16, 25 (1968).
78. Kircher, H.W., Gas-Liquid Partition Chromatography of Methylated Sugars. Anal. Chem. 32, 1103 (1960).
79. Kitagawa, I., Ikenishi, Y., Yoshikawa, M., Im, K.S., Saponin and Sapogenol. xx. Selective Cleavage of the Glucuronide Linkage in Saponin by Acetic Anhydride and Pyridine Treatment. Chem. Pharm. Bull. 25, 1408 (1977).
80. Kitagawa, I., Yoshikawa, M., Ikenishi, Y., Im, K.S., Yosioka, I., A New Selective Cleavage Method of Glucuronide Linkage in Oligoglycoside. Lead Tetraacetate Oxidation Followed by Alkali Treatment. Tetrahedron Letters, 549 (1976).

81. Kitagawa, I., Yoshikawa, M., Im, K.S., Ikenishi, Y., Saponin and Sapogenol. XIX. Selective Cleavage of the Glucuronide Linkage in Saponin by Lead Tetraacetate Oxidation Followed by Alkali Treatment. Chem. Pharm. Bull. 25, 657 (1977).
82. Kitagawa, I., Yoshikawa, M., Imakura, Y., Yosioka, I., Photolysis of Glycosides Linkage in Saponin. Chem. Ind. 276 (1973).
83. Kitagawa, I., Yoshikawa, M., Yosioka, I., Photolysis of Uronide Linkage in Saponin. Tetrahedron Letters, 3997 (1973).
84. Klyne, W., The Configuration of the Anomeric Carbon Atoms in some Cardiac Glycosides. Biochem. J. 47, xli (1950).
85. Kochetkov, N.K., Chizkov, O.S., Mass Spectrometry of Methyl Glycosides-Principles and Analytical Application. Tetrahedron 21, 2029 (1965).
86. Kochetkov, N.K., Khorlin, A.J., Oligosides, A type of Plant Glycosides Dokladi. Akad. Nauk. SSSR. 150, 1289 (1963).
87. Idem, Oligoside, ein neuer Typ von Pflanzenglykosiden. Arzneimittel-Forsch. 16, 101 (1966).
88. Kochetkov, N.K., Khorlin, A.J., Chirva, V.J., Clematoside C- Triterpenic Oligoside from Clematis manshurica. Tetrahedron Letters, 2201 (1965).
89. Kochetkov, N.K., Khorlin, A.J., Ovodov, J.S., The Structure of Gypsoside-Triterpenic Saponin from Gypsophila Pacifica Kom. Ibid. 477 (1963).

90. Idem, ~~Triterpen~~ Saponins. VII. Monosaccharide Decompositions of the Carbohydrate Portion of Gypsoside. VIII. Some Data on the Structure of Carbohydrate Part of Gypsoside. Izv. Akad. Nauk. SSSR. Ser. Khim. 83 (1964).
91. Idem, Triterpene Saponins. Ibid. 1436 (1964).
92. Kochetkov, N.K., Wulfson, N.S., Chizhov, O.S., Zolotarev, B.M., Mass Spectrometry of Carbohydrate Derivatives. Tetrahedron 19, 2209 (1963)
93. Kolahi-Zanouzi, M.A., Recherches sur l'action Transférante de quelques Osidases Agissant sur les Oligosaccharides non Réducteurs. Paris Üniversitesi Doktora Tezi (1962). Ref.: Sezik, E., Türkiye'nin Salepgilleri, Ticari Salep Çeşitleri ve Özellikle Muğla Salebi Üzerinde Araştırmalar. İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Doktora Tezi (1967).
94. Komori, T., Ida, Y., Mutou, Y. (née Inatsu), Miyahara, K., Nohara, T., Kawasaki, T., Mass Spectra of Spirostanol and Furostanol Glycosides. Biomedical Mass Spectrometry 2, 65 (1975)
95. Kon, George, A.R., Soper, H.R., Sapogenins, Part VIII. The Sapogenin of Fuller's Herb. J. Chem. Soc. 617 (1940).
96. Kuhn, R., Egge, H., Brossmer, R., Gauhe, A., Klesse, P., Lochinger, W., Röhm, E., Trischmann, H., Tschampel, D., Über die Ganglioside des Gehirns. Angew. Chem. 72, 805 (1960)
97. Kuhn, R., Trischmann, H., Permethylierung von Inosit und anderen Kohlenhydraten mit Dimethylsulfat. Chem. Ber. 96, 284 (1963).
98. Lazur'evskii, G.V., Kintya, P.K., Chirva, V.J., Structure of Saponoside D, a Triterpenglycoside from Soapwort (*Saponaria officinalis*) Roots. Dokladi. Akad. Nauk. SSSR. 188, 1060 (1969)

99. Liptak, A., Jodal, I.N., Carbohydrate Methyl Ethers. III. Thin-Layer Chromatographic Separation and Quantitative Determination of Glucose Methyl Ethers. *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* 69, 103 (1971).
100. Luchanskaya, V.N., Kondratenko, E.S., Abubakirov, N.K., Triterpen Glycosides of Gypsophila trichotoma. III. Structure of Trichoside B. *Khim. Prir. Soedin.* 4, 431 (1971).
101. Idem, Triterpenoid Glycosides of Gypsophila trichotoma. IV. Structure of Trichoside C. *Ibid.* 7, 608 (1971).
102. Idem, Triterpenoid Glycosides of Gypsophila trichotoma. V. Structure of Trichoside D. *Ibid.* 8, 169 (1972).
103. Luchanskaya, V.N., Kondratenko, E.S., Gorovits, T.T., Abubakirov, N.K., Triterpenoid Glycosides from Gypsophila trichotoma. II. Structure of Trichoside A. *Ibid.* 7, 151 (1971).
104. Macek, K., *Pharmaceutical Application of Thin-Layer and Paper Chromatography*. Elsevier Publ. Comp. Amsterdam-London-New York (1972).
105. Mani, J.C., Étude de la Structure des Triterpènes par Résonance Magnétique Nucléaire. *Ann. Chim.* 10, 533 (1965).
106. Mastronardi, I.O., Flematti, S.M., Deferrari, J.O., Gros, E.G., Methylation of Carbohydrates Bearing Base-Labile Substituents, with Diazomethane-Boron Trifluoride Etherate. I. *Carbohydrate Res.* 3, 177 (1966).
107. Micheli, R.A., Applewhite, T.H., Measurements on Isolated Double Bond Systems: Ultraviolet Absorption Spectra of Steroids and Triterpenoids. *J. Org. Chem.* 27, 345 (1962).

108. Mzhel'skaya, L.G., Abubakirov, N.K., Triterpene Glycosides of Leontice eversmannii. II. The Structure of Leontoside A and Leontoside B. *Khim. Prir. Soedin.* 3, 101 (1967).
109. Nagai, J., Tanaka, O., Shibata, S., Chemical Studies on the Oriental Plant Drugs. XXIV. Structure of Ginsenoside-R_{g1}, a Neutral Saponin of Ginseng Root. *Tetrahedron* 27, 881 (1971).
110. Nishikawa, M., Kamiya, K., Murata, T., The X-Ray Investigation of Eupteleogenin Iodoacetate. *Tetrahedron Letters*, 3223 (1965).
111. Oganessian, E.T., Shinkarenko, A.L., Bandyukova, V.A., Absorption Spectra of Some Pentacyclic Triterpenoids in Sulfuric Acid. *Khim. Prir. Soedin.* 4, 212 (1968).
112. Okanishi, T., Togami, M., Colorimetric Determination of Steroidal Sapogenins. II. *Chem. Pharm. Bull.* 17, 315 (1969).
113. Ovodov, Yu.S., Pavlenko, A.F., Gas-Liquid Chromatography of Methylated D-Galactose Derivatives. *J.Chromatog.* 36, 531 (1968).
114. Partridge, S.M., Aniline Hydrogen Phthalate as a Spraying Reagent for Chromatography of Sugars. *Nature*, 443 (1949).
115. Pasich, B., Triterpenoid Compound in Plant Materials, Part IV. Chromatographic Characterization of the more Important Saponins in Medicinal Plants. *Dissertationes Pharm.* 13, 1(1961).
116. Idem, Absorptiometric Determination of Saponins in Plant Materials. *Planta Med.* 11, 16 (1963).
117. Pawelczyk, E., Drozd, B., Variation in Saponin Content in Saponaria officinalis its Growth Period. *Farm. Polska* 9, 38 (1953).
118. Persaud, K., Structural Determination of Some Pentacyclic Triterpenes of Natural Origin by High Resolution Mass Spectrometry. *Advances in Mass Spectrometry*, 4, 171 (1967).

119. Phelps, F.P., Purves, C.B., The Structure of Alpha-Methylxyloside. J.Chem.Soc. 51, 2443 (1929).
120. Polonsky, J., Sach, E., Lederer, E., Sur la Constitution Chimique de la partie Glucidique de l'Asiaticoside. Bull. Soc.Chim. France 880. (1959).
121. Purdie, T., Irvine, C., The Alkylation of Sugars. J.Chem.Soc. 83, 1021 (1903).
122. Purdie, T., Rose, R.E., The Alkylation of L-Arabinose. Ibid. 89, 1204 (1906).
123. Putieva, Zh.M., Mzhelskaya, L.G., Gorovits, T.T., Kondratenko, E.S., Abubakirov, N.K., Triterpenoid Glycosides of Acanthophyllum gypsophiloides. III. Structure of O-glycoside Carbohydrate Chain of Acanthophyllosides B and C. Khim. Prir. Soedin. 11, 177 (1975). Ref.: CA, 83, 131885d (1975).
124. Savoir, R., Otfinger, R., Tursch, B., Chiurdoğlu, G., Triterpènes X. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire de Composés Triterpéniques. Influence de la Substitution sur les Fréquences de Résonance des Groupes Méthyles en série Δ^{12} -Oléanénique. Bull. Soc. Chim. Belges 76, 335 (1967).
125. Idem, Triterpènes XII. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire de Composés Triterpéniques. Les Groupes Méthyles en Série Ursénique. Ibid. 76, 371 (1967).
126. Sawardeker, J.S., Sloneker, J.H., Jeanes, A., Quantitative Determination of Monosaccharides as Their Alditol Acetates by Gas Liquid Chromatography. Analyt. Chem. 37, 1602 (1965).

127. Scheuer, P.J., The Chemistry of some Toxins Isolated from Marine Organism. Fortshcr. Chem. Org. Naturstoffe 27, 322 (1969).
128. Idem, Toxins from Marine Invertebraten. Naturwissenschaften 58, 549 (1971).
129. Schlösser, E., Interaction of Saponins with Cholesterol, Lecithin, and Albumin, Can.J.Physiol. Pharmacol. 47, 487 (1969).
130. Schlösser, E., Wulff, G., Über die Strukturspezifität der Saponin-hämolyse. I. Triterpensaponine und-aglycone. Z.Naturforsch. 24, 1284 (1969).
131. Segal, R., Mansour, M., Zaitschek, D.V., Effect of Ester Groups on the Haemolytic Action of Some Saponins and Sapogenins. Biochem. Pharmacol. 15, 1411 (1966).
132. Segal, R., Milo-Goldzweig, I., On the Similarity of Hemolysis Induced by Plant Sapogenins and by Neutral Steroids. Ibid. 20, 2163 (1971).
133. Segal, R., Milo-Goldzweig, I., Schupper, H., Zaitschek, D.V., Effect of Ester Groups on the Haemolytic Action of Sapogenins - II. Esterification with Bifunctional Acids. Ibid. 19, 2501 (1970).
134. Segal, R., Shatkovsky, P., Milo-Goldzweig, I., On the Mechanism of Saponin Hemolysis-I. Hydrolysis of the Glycosidic Bond. Ibid. 23, 974 (1974).
135. Shamma, M., Glick, R.E., Mumma, R.O., The Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Pentacyclic Triterpenes. J. Chem. Soc. 27, 4512 (1962).

136. Shibata, S., Tanaka, O., Ando, T., Sado, M., Tsushima, S., Ohsawa, T., Chemical Studies on Oriental Plant Drugs. XIV. Protopanaxadiol, a Genuine Sapogenin of Ginseng Saponins. Chem. Pharm. Bull. 14, 595 (1966).
137. Sliwowski, J., Kasprzyk, Z., ORD and CD Studies on the Structure of Carbonyl Derivatives of Pentacyclic Triterpenes. Tetrahedron 28, 991 (1972).
138. Snatzke, G., Lampert, F., Tschesche, R., Über Triterpene - VIII. Zuordnung von Triterpenen zu den Grundtypen durch IR Spektroskopie. Ibid. 18, 1417 (1962).
139. Sočić, H., Colorimetric Determination of Tomatine in Tomato Plants. Planta Med. 19, 6 (1970).
140. Springer, G.F., Desai, P.R., Kolecki, B., Synthesis and Immunochemistry of Fucose Methyl Ethers and Their Methylglycosides. Biochem. 3, 1076 (1964).
141. Stahl, E., Thin Layer Chromatography, 2. baskı. George Allen and Unwin, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1969).
142. Strigina, L.I., Dzizenko, A.K., Elyakov, G.B., Structure of the Acid Hydrolysis of Panaxoside A. Khim. Prir. Soedin. 4, 352 (1968).
143. Sweeley, C.C., Bentley, R., Makita, M., Wells, W.W., Gas-Liquid Chromatography of Trimethylsilyl Derivatives of Sugars and Related Substances. J. Amer. Chem. Soc. 85, 2497 (1963).
144. Sztaricskai, F., Bognár, R., Puskás, M.M., Structural Investigation of the Antibiotic Ristomycin A. Chemical Structure of the Oligosaccharide Part of Ristomycin A. Acta. Chim. Akad. Sci. Hung. 84, 75 (1975).

145. Tesařík, K., The Separation of Some Monosaccharides by Capillary Column Gas Chromatography. *J.Chromatog.* 65, 295 (1972)
146. Tschesche, R., Balle, G., Über Saponine der Spirostanolreihe - X. Zur Konstitution der Samensaponine von Digitalis lanata Ehrh. *Tetrahedron* 19, 2323 (1963).
147. Tschesche, R., Ballhorn, L., Protoprimulagenin A als Aglykon des Hauptsaponins von Primula elatior. *Phytochem.* 14, 305 (1975).
148. Tschesche, R., Inchaurreondo, F., Wulff, G., Über Triterpene, XVII. Das Aglykon des Cyclamins. *Liebigs Ann. Chem.* 680, 107 (1964).
149. Tschesche, R., Lauven, P., Steroidsaponine mit mehr als einer Zuckerkette, V. Avenacosid B, ein Zweites Bisdesmosidisches Steroidsaponin aus Avena sativa. *Chem. Ber.* 104, 3549 (1971).
150. Tschesche, R., Lüdke, G., Wulff, G., Steroidsaponine mit mehr als einer Zuckerkette, II. Sarsaparillosid, ein bisdesmosidisches 22 - Hydroxyferrostanol - saponin. *Ibid.* 102, 1253 (1969).
151. Tschesche, R., Kammerer, F., J., Über Triterpene, XXVII. Die Struktur von Musennin und Desglucomusennin. *Liebigs Ann. Chem.* 724, 183 (1969).
152. Tschesche, R., Mercker, H.J., Wulff, G., Über Triterpene, XXIV. Die Konstitution der Zuckerkette des Cyclamins. *Ibid.* 721, 194 (1969).
153. Tschesche, R., Richert, K.H., Über Saponine der Spirostanolreihe -XI. Nuatigenin, ein Cholegenin - Analogon des Pflanzenreiches. *Tetrahedron* 20, 387 (1964).

154. Tschesche, R., Schulze, H., Über Triterpene, XXX. Über das Hauptsaponin der Korndrade (Agrostemma githago L.). Chem. Ber. 107, 2710 (1974).
155. Tschesche, R., Striegler, H., Fehlhaber, H.-W., Über Triterpene, XIX. Die Struktur des Cyclamiretins A. Liebigs Ann. Chem. 691, 165 (1966).
156. Tschesche, R., Wulff, G., Über Saponine der Spirostanolreihe -IX. Die Konstitution des Digitonins. Tetrahedron 19, 621 (1963).
157. Idem, Konstitution und Eigenschaften der Saponine. Planta Med. 12, 272 (1964).
158. Idem, Chemie und Biologie der Saponine. Zechmeister, L., Herz, W., Griseback, H., Kirby, G.W., Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe, Cilt 30, Springer - Verlag, New York, Wien (1973).
159. Tursch, B., Dalozé, D., Ottinger, R., Reisse, J., Chiurdoglu, G., Triterpenes IV. Effect Conformationnels sur la Fréquence RMN du Proton Oléfinique en C-12 de Triterpenes du Groupe de la β -Amyrine. Bull. Soc. Chim. Belges 75, 191 (1966).
160. Tutin, T.G., et al., Flora Europaea, cilt 1, University Press, Cambridge (1964).
161. Vacek, L., Sedláč, B., Comparison of Physical, Chemical and Biological Properties of Saponins. Gumma J. Med. Sci. 11, 1 (1962).
162. Vochten, R., Bossche, W. Van Den, Bijdrage tot de Spectrofotometrische Bepaling van Senegine en Sapoalbine. Pharm. Tijdschr. België 42, 93 (1965).

163. Wahlberg, I., Karlsson, K., Enzell, C.R., A Mass Spectral Fragmentation Reaction Characteristic of 11-Oxo α - amyirin and 11 - Oxo - β - amyirin Derivatives. Acta Chem. Scand. 25, 3192 (1972).
164. Waldi, D., Dünnschicht- Chromatographie einiger Zucker und Zuckeralkohole. J. Chromatog. 18, 417 (1965).
165. Wallenfels, K., Bechtler, G., Kuhn, R., Trischmann, H., Egge, H., Permethylierung von Oligomeren und Polymeren Kohlenhydraten und Quantitative Analyse der Spaltungsprodukte. Angew.Chem. 75, 1014 (1963).
166. Williams, S.C., Jones, J.K.N., The Synthesis, Separation, and Identification of the Methyl Ethers of Arabinose and Their Derivatives. Can.J.Chem. 45, 275 (1967).
167. Woitke, H.-D., Kayser, J.-P., Hiller, K., Fortschritte in der Erforschung der Triterpensaponine. Pharmazie 25, 133 (1970).
168. Wolters, B., Die Verbreitung Antibiotischer Eigenschaften bei Saponindrogen. Apoth. - Ztg. 106, 1729w (1966).
169. Idem, Die Wirkung einiger Triterpen- Saponine auf Pilze. Naturwiss. 10, 1 (1966).
170. Idem, Zur Antimikrobiellen Wirksamkeit Pflanzlicher Steroide und Triterpene. Planta Med. 14, 392 (1966).
171. Wulff, G., Über die Quantitative Zuckerbestimmung in Glykosiden und Oligosacchariden mit Hilfe der Gaschromatographie. J.Chromatog. 18, 285 (1965).

172. Idem, Neuere Entwicklungen auf dem Saponingebiet. Apoth.-Ztg. 108, 797 (1968).
173. Wulff, G., Tschesche, R., Über Triterpene, XXVI. Über die Struktur der Rosskastaniensaponine (Aescin) und die Aglykone Verwandter Glycoside. Tetrahedron 25, 415 (1969).
174. Yahara, S., Tanaka, O., Komori, T., Saponins of the leaves of Panax ginseng C.A.Meyer. Chem. Pharm. Bull. 24, 2204 (1976).
175. Yosioka, I., Fujio, M., Osamura, M., Kitagawa, I., A Novel Cleavage Method of Saponin with Soil Bacteria, Intending to the Genuine Sapogenin: on Senega and Panax Saponins. Tetrahedron Letters 6303 (1966).
176. Yukhananov, D.Kh., Sokolskii, I.N., Zinkevich, E.P., Plants of the Family Caryophyllaceae Studied the Presence of the Triterpenoid Saponin, Gypsoside. Rast .Resur. 7, 386 (1971).
177. Zakharov, A.M., Zinkevich, E.P., Ban'kovskii, A.I., A Saponin of Primula turkestanica. Khim. Prir. Soedin. 4, 388 (1968).
178. Zwaving, J.H., The Saponins of Primrose and Soapwort, Well-known Expectorants. Pharm. Weekbl. 106, 629(1971).

İ N D E K S L E R

Şekiller

	<u>Sayfa No.</u>
Şekil-1 <u>Saponaria kotschy</u> Boiss.	4
-2 <u>S. kotschy</u> .- Çiçek Kısımları	5
-3 <u>S. kotschy</u> Boiss	6
-4 <u>S. kotschy</u> Boiss.- Habitat	7
-5 <u>S.kotschy</u> Boiss.-Kök, Enine Kesit	9
-6 <u>S.kotschy</u> Boiss.-Kök Tozu Elementleri	10
-7 Spirostanol Saponozitleri	16
-8 Furostanol Türevi Saponozitlerin Hidrolizi	16
-9 Sarsaparillozit	17
-10 Avenakozit B	17
-11 Polipodosaponin	17
-12 Siklamin	22
-13 Eskin	23
-14 Primulasaponin	24
-15 Önemli Asit Aglikonlu Saponozitler	25
-16 Glisirrizin	25
-17 Asiyatikozit	27
-18 Kolapanakssaponin B	27
-19 Holoturin A	29
-20 Fotokimyasal Hidroliz	33
-21 Gipsozitlerin Birbirine Dönüşü	45
-22 Gipsozit A ve B nin Birbirine Dönüşümü	46
-23 Gipsogenik Asit	47
-24 Saponarin	48
-25 <u>Saponaria officinalis</u> Saponozitleri	49
-26 Saponozit D'nin Yapısı	53
-27 Gentiobioz	56
-28 Saponaroz	57
-29 (S2) Saponozitinin IR Spektrumu	98
-30 Aglikonun IR Spektrumu	99

	<u>Sayfa No.</u>
Şekil-31 Gipsogeninin IR Spektrumu	99
-32 Aglikonun Kütle Spektrumu	99
-33 Gipsogeninin Retro Diels-Alder Bölünmesi	100
-34 (S2) Saponozitinin Silillenmiş Ozlarının Gaz Kromatogramı	102
-35 Sapogenin-3-0-monodesmozitin Silillenmiş Ozlarının Gaz Kromatogramı	103
-36 C-28-Oligoholozitin Silillenmiş Ozlarının Gaz Kromatogramı	104
-37 Gipsogenin-3-0-glikuronozitin Kütle Spekt.	105
-38 Gipsogenin-3-0-glikuronozitin Parçalanması	105
-39 Permetil (S2) saponozitinin IR Spektrumu	106
-40 <u>Permetil</u> (S2) Oz Kısmından Dolayı Meydana Gelen İyonlar	107
-41 <u>Permetil</u> (S2) Aglikondan Dolayı Meydana Gelen İyonlar	108
-42 Permetil Sapogenin-3-0-monodesmozitin IR Spektrumu	112
-43 <u>Permetil-sapogenin-3-0-monodesmozit</u> Aglikondan Dolayı Meydana Gelen İyonlar	112
-44 Sapogenin-3-0-monodesmozit	116
-45 <u>Saponaria kotschy</u> Boiss-Ana Saponozitin muhtemel yapısı	117

Tablolar

Tablo-1 Steroidal Saponozitlerin Sınıflandırılması	14
-2 Spirostanol Aglikonlar	15
-3 Triterpenik Aglikon Tipleri	19
-4 Önemli Δ^{12} Triterpenik Aglikonlar	20
-5 Ozların GLK ile Tanımı Yöntemleri	36
-6 Metillenmiş Ozların Kâğıt Kromatografisi	40
-7 Metillenmiş Ozların İnce Tabaka Kromatogr.	41
-8 <u>Saponozit D</u> - Yapı Tayininin Esasları	55
-9 Araştırma Süresince Kullanılan Solvan Sis.	65

Tablo-10 Ham Saponozitin İnce Tabaka Kromatogr.	67
-11 Ozların Kâğıt Kromatografisi	74
-12 Metil Ozların Tanımı-Adsorban, Şolvan Sistemleri ve Reaktifler	82
-13 Metil Ozların R_G Değerleri	85
-14 Permetil-Maltoz ve -Rutozitin-İnce Tabaka Kromatografisi	87
-15 İndirgenmiş Permetil-C-28-Oligoholozitin Asit Hidrolizatının İnce Tabaka Kromatogr.	91
-16 Ham Saponozitin İnce Tabaka Kromatografisi	96
-17 (S2) Saponozitin Aglikonuna Bağlı Ozlar	100
-18 Metil Ozların İnce Tabaka Kromatografisi	109
-19 Gipsogenin Aglikonu Taşıyan <u>Caryophyllaceae</u> Saponozitleri	118

Kısaltmalar

n-BuOH	normal-Butanol
EtOH	Etanol
Et-CO-Me	Etilmetilketon
Me ₂ CO	Aseton
i-Pr ₂ O	Diizopropileter
Et ₂ O	Dietileter
AcOH	Asetik Asit
i-PrOH	İzo-Propanol
MeOH	Metanol
EtOAC	Etilasetat
Py	Piridin
KK	Kâğıt Kromatografisi
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
SK	Kolon (sütün) Kromatografisi
DMSO	Dimetilsülfoksit
TMS	Trimetilklorosilan
HMSD	Heksametildisilazan
TMG	Tetrametilglükoz

H A Y A T H İ K A Y E S İ

1951 yılında Gerede'de doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Düzce'de yaptım. 1968 yılında Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesine girdim. 1972 yılı Haziran döneminde mezun oldum. Aynı yıl Temmuz ayında Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Bilim Dalına asistan olarak girdim. Halen aynı görevde çalışmaktayım.

