

T.C.  
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI

*EBENUS HAUSSKNECHTII* (LEGUMINOSAE) 'NİN  
İZOLASYONU, YAPI BELİRLENMESİ VE BİYOLOJİK  
AKTİVİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZAFER UYAR

Bornova /İZMİR-2004

T.C.  
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI

*EBENUS HAUSSKNECHTII* (LEGUMINOSAE) 'NİN  
İZOLASYONU, YAPI BELİRLENMESİ VE BİYOLOJİK  
AKTİVİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zafer UYAR  
Danışman: Prof. Dr. Süheyla KIRMIZIGÜL

Bornova /İZMİR-2004

**Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,**

Bu araştırma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Başkan:** .....

**Üye:**.....

**Üye:**.....

**Kod No:**

**Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.**

**Enstitü Müdürü:**

## ÖZ

UYAR, Zafer

Yüksek Lisans Tezi, Kimya Bölümü

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Süheyla KIRMIZIGÜL

Ağustos 2004, 87 Sayfa

Türü belirlendikten sonra kurutulan ve öğütülen *Ebenus haussknechtii* (Leguminosae) bitkisi kimyasal ve mikrobiyolojik olarak incelendi. Polar ve apolar kısımları ekstraksiyonla birbirinden ayrıldı. Bu şekilde polaritelerine göre sınıflandırılmış olan fraksiyonlar çeşitli kromatografik yöntemler (CC, PLC, TLC) kullanılarak bileşenlerine ayrılıp saflandırıldı. İzolasyon ve saflandırma teknikleri sonrası, 4 ünün yapısı aydınlatılan 6 doğal bileşik elde edildi. Ayrıca, metillenen heksan ekstresinin GC ve GC-Mass analiz sonuçları faydalı yağ asitleri açısından irdelendi.

Saf bileşiklerin yapı aydınlatılması çeşitli kimyasal, kromatografik ve spektroskopik [IR, UV, NMR (1D ve 2D), ve Mass] yöntemler kullanılarak yapıldı. Kromatografik ve spektroskopik veriler yorumlandıktan sonra bileşiklerin spesifik çevirme açıları ölçüldü.

Çalışmada elde edilen ekstraktların (MeOH, Heksan, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, BuOH ve H<sub>2</sub>O) antimikrobiyel aktiviteleri, agar-disk difüzyon yöntemiyle, Gentamycine (Referans antibiyotik) ile karşılaştırılarak çeşitli bakteri ve mantarlara karşı incelendi.

Anahtar kelimeler: *Ebenus haussknechtii*, triterpen, flavonoid, inositol, glikozid, faydalı yağ asitleri, biyolojik aktivite

## ABSTRACT

UYAR, Zafer

Master of Science Thesis, Chemistry Department

Supervisor: Prof. Dr. Suheyra KIRMIZIGUL

August 2004, 87 Pages

Taxonomically determined, dried and grinded plant material of *Ebenus haussknechtii* (Leguminosae) was studied by means of chemical and microbiological properties. Several extractions were fulfilled to separate polar and apolar parts from each other. Various purification techniques, such as VLC, CC, PLC using different backfill materials according to each case, were carried out to separate and purify the compounds having similar polarity. After the isolation and purification experiments ended, 6 natural products, the structures of 4 of which have been determined, were obtained. In addition, the methylated hexane extract was investigated on the basis of GC and GC-Mass data and determined to contain essential fatty acids.

The structural determination of pure compounds was carried out using different chemical, chromatographic and spectroscopic [IR, UV, NMR (1D and 2D), and Mass] methods. After chromatographic and spectroscopic data were interpreted, the physical properties of the compounds such as specific rotation were measured.

Antimicrobial activity of each extract (MeOH, Hexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, BuOH, and H<sub>2</sub>O) obtained during the work was examined against different bacteria and fungi comparing with Gentamycine as reference by using agar-disc diffusion method.

Key words: *Ebenus haussknechtii*, triterpene, flavonoid, inositol, glycoside, essential fatty acids, biological activity.

## KISALTMALAR

IR	Infrared
UV	Ultraviole
FT-IR	Fourier Transformation Infrared
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
APT	Attach Proton Test
API-ES	Atmospheric Pressure Electron Spray Ionization
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
GC-MSD	Gas Chromatography- Mass Selective Detector
İTK	Thin Layer Chromatography
HTK	Preparative Layer Chromatography
KK	Column Chromatography
Ex	Excitation
Em	Emission
Rt	Retention Time

## TABLO DİZİNİ

Tablo 1: <i>Ebenus haussknechtii</i> nin Hekzan ekstresinin GC-Mass sonuçlarına göre ana bileşenleri.....	32
Tablo 2: <i>Ebenus haussknechtii</i> ekstrelerinin antimikrobiyel aktiviteleri .....	35
Tablo 3: Bileşik 1'in CD <sub>3</sub> OD içinde <sup>1</sup> H NMR ( <sup>1</sup> H ve COSY) ve <sup>13</sup> C NMR (Decoupled, APT ve HMQC ) verileri .....	37
Tablo 4: Bileşik 2'nin CD <sub>3</sub> OD içinde <sup>1</sup> H NMR ( <sup>1</sup> H veCOSY) ve <sup>13</sup> C NMR (Decoupled, APT ve HMQC ) verileri .....	50
Tablo 5: Bileşik 3'ün CD <sub>3</sub> OD içinde <sup>1</sup> H NMR ( <sup>1</sup> H ve COSY) ve <sup>13</sup> C NMR (Decoupled ve DEPT) verileri .....	59
Tablo 6: Bileşik 4'ün CD <sub>3</sub> OD içinde <sup>1</sup> H NMR ( <sup>1</sup> H ve COSY) ve <sup>13</sup> C NMR (Decoupled, APT, HMQC ve HMBC) verileri .....	68

## SPEKTRUM DİZİNİ

Bileşik 1'in IR spektrumu.....	41
Bileşik 1'in UV ve Fluoreans spektrumu .....	42
Bileşik 1'in <sup>1</sup> H-NMR spektrumu .....	43
Bileşik 1'in <sup>13</sup> C-NMR spektrumu.....	44
Bileşik 1'in COSY spektrumu.....	45
Bileşik 1'in HMQC spektrumu -a.....	46
Bileşik 1'in HMQC spektrumu -b.....	47
Bileşik 1'in HMQC spektrumu -c.....	48
Bileşik 2'nin IR spektrumu.....	53
Bileşik 2'nin UV ve Fluoresans spektrumu.....	54
Bileşik 2'nin <sup>1</sup> H-NMR spektrumu .....	55
Bileşik 2'nin APT spektrumu.....	56
Bileşik 2'nin COSY spektrumu .....	57
Bileşik 2'nin HMQC spektrumu.....	58
Bileşik 3'ün IR spektrumu .....	61
Bileşik 3'ün UV ve Fluoresans spektrumu .....	62
Bileşik 3'ün <sup>1</sup> H-NMR spektrumu .....	63
Bileşik 3'ün <sup>13</sup> C-NMR spektrumu .....	64
Bileşik 3'ün DEPT spektrumu .....	65
Bileşik 4'ün IR spektrumu .....	71
Bileşik 4'ün UV ve Fluoresans spektrumu .....	72
Bileşik 4'ün <sup>1</sup> H-NMR spektrumu .....	73
Bileşik 4'ün <sup>13</sup> C-NMR spektrumu .....	74
Bileşik 4'ün DEPT spektrumu .....	75
Bileşik 4'ün COSY spektrumu .....	76
Bileşik 4'ün HMQC spektrumu .....	77



## İÇİNDEKİLER

ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
KISALTMALAR.....	III
TABLO DİZİNİ.....	IV
SPEKTRUM DİZİNİ.....	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. Botanik Kısım .....	1
1.2. Kimyasal Kısım .....	3
1.2.1. Triterpen Glikozidler.....	5
A. Monodesmosidik Glikozidler.....	6
B. Bisdesmosidik Glikozidler.....	7
C. Hayvansal Glikozidler.....	7
1.2.2. Fenolik Glikozidler.....	7
Flavonoid Glikozidler.....	9
a. Flavon ve flavonol Glikozidler... ..	10
b. C-glikozilflavonoidler... ..	10
c. Çalkon ve Avron Glikozidler.....	11
d. Isoflavonoid Glikozidler.....	12
1.2.3 İnositol.....	13
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>15</b>
2.1. Genel.....	15
2.2. Bitki Materyali.....	17
2.3. İzolasyon ve Saflandırma.....	17
2.3.1. Bileşik 1 (Triterpen Glikozid).....	23
2.3.2. Bileşik 2 (Flavonoid Glikozid).....	25
2.3.3. Bileşik 3 (Metilinositol).....	28
2.3.4. Bileşik 4 (Flavonoid Glikozid).....	29
2.3.5. Hegzan Ekstresindeki Doymamış Yağ Asitleri .....	32
2.4. Asidik Hidroliz.....	33

2.5. Hegzan Ekstresinin Metillenmesi.....	34
2.6. Mikrobiyolojik Analiz.....	34
<b>3. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>36</b>
3.1. Bileşik 1.....	36
3.2. Bileşik 2.....	49
3.3. Bileşik 3.....	59
3.4. Bileşik 4.....	66
3.5. Hegzan Ekstresindeki Doymamış Yağ Asitleri.....	78
3.6. Tartışma.....	79
<b>ÖZET.....</b>	<b>80</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>81</b>
<b>REFERANSLAR.....</b>	<b>82</b>
<b>TEŞEKKÜR.....</b>	<b>86</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>87</b>

# 1.GİRİŞ

## 1.1 Botanik Kısım

*Ebenus* cinsinin merkezi Anadolu'dur. 6 tür hariç tüm *Ebenus* türleri Türkiye'ye endemiktir. Yaprakları, üç yapraklı veya 3-15 yaprakçıklı tüylü yapraklardır. Çiçekler yoğun olarak sap şeklinde başlar veya başaklar olarak oluşur. Taçyapraklar sarı veya morumsudur ve tipik olarak geniş ucu yukarı doğru, sivri ucu sapa saplanmış şekilde yani ters yumurtamsıdır. Bitki şekli iplik veya lif şeklinde, içe doğru eğimli olup tepeciği küçük ve uç kısımdadır. Meyveler küçük ve çiçek zarfına yapışık, düz, zarımsı, pürüzsüz, çok az tüylü, 1 tohumludur ve kendi kendine açılmaz.

*Ebenus haussknechtii* 20-30 cm boyunda olup, kısa, yoğun ve gri-beyaz tüylerle kaplıdır. Eliptik veya mızrak biçiminde, kıvrık, sivri uçlu ve hafif keskin (2- ) 3-4 çift yaprakçığa sahip yaprakları vardır. Çiçek başları meyve dönemi uzayan küresel ile yumurtamsı şekil arasında bir şekildedir. Çiçek yaprakları yumurtamsı ve sivri uçludur. Çiçek zarfı taçyapraklardan daha uzundur. Dişler eşit değildir ve üstteki ikisi 7-8 mm iken alttaki ikisi 10-11 mm uzunluğundadır. Taçyapraklar 10-12 mm uzunluğunda, mor, tüysüz ve yaprak ayası tırnakların yarısı uzunluğundadır. Genelde 900-1800 m yükseklikte kayalık kireçtaşı eteklerde bulunur.

Tip: Türkiye **B7** Elazığ: Elazığ-Pertek, Steppe 24 km N von Elazığ, 910 m, 24 vi 1951, *Huber- Morath* 11151 (holo. Hb. Hub.-Mor.). E. Anatolia. **B7** Sivas: Divriği, 1000 m, *Bornm.* 1892: 3320! Erzincan: Kota nr. Eğin (Kemaliye), *Sint.* 2792! Tunceli: Munzur Da., in Aksu De. Above Ovacık, 1800 m, *D.3148!* Elazığ: Kharput, 1865, *Hausskn.!*

Endemik; Ir.-Tur. element. *E. laguroides*'e benzer . (Davis, 1970)



*Ebenus haussknechtii* (Leguminosae)

## 1.2 Kimyasal Kısım

Leguminosae ailesi Graminae ailesinden sonra ekonomik olarak en önemli yere ve tür sayısı olarak ta Compositae'den sonra en önemli yere sahiptir. Yeryüzünde *Ebenus* L. (Leguminosae- subfamily Papilionoideae)'nin 20 türü vardır. 13'ü tür, 2'si cins olmak üzere 15 tanesi; *E. plumosa* var. *plumosa* Boiss. and Bal., *E. plumosa* var. *speciosa* Hub.- Mor., *E. macrophylla* Jaub. and Spach., *E. barbiger* Boiss., *E. reesei* var. *reesei* Hub.-Mor., *E. reesei* var. *minor* Hub.-Mor., *E. haussknechtii* Bornm. ex. Hub.-Mor., *E. depressa* Boiss. and Bal., *E. bourgaei* Boiss., *E. cappadocica* Hasskn. and Siehe ex. Bornm., *E. boissieri* Barley, *E. longipes* Boiss. and Bal., *E. argentea* Siehe ex. Bornm., *E. hirsuta* Jaub. and Spach., *E. laguroides* Boiss., *E. pisidica* Hub.-Mor., Türkiye'de mevcuttur. Bunlardan 13'ü Türkiye'ye endemiktir. Karadeniz bölgesinin en kuzeyi ve Güneydoğu Anadolu hariç Anadolu'nun bütün bölgelerinde *Ebenus* türleri yetişir. *Ebenus* türü milkvetch (Astragalus) türlerine benzerliğinden dolayı yerel halk tarafından "Morgeven" veya "Sarigeven" olarak adlandırılır. *Ebenus* çiçekçilik ve peyzaj süslemesinde kullanılır. *Ebenus* türleri ile ilgili sadece bir kaç kimyasal çalışma kaydedilmiştir (Azcan, et al., 2001, Mitrocotsa, et al, 1999).

*Ebenus haussknechtii* (Leguminosae)'nin su ekstresi genel olarak Türkiye'de dermatolojik, hipertansiyon ve mide hastalıklarını önlemede halk ilacı olarak kullanılmaktadır.

Bununla beraber, Türkiye'ye endemik olan *Ebenus* türleri ile ilgili kimyasal bir çalışma olduğuna dair hiçbir kayıt bulunmamaktadır.

Bu çalışmada *Ebenus haussknechtii*'den çeşitli doğal bileşikler izole edilmiştir. 1 triterpen glikozid, 4 flavonoid glikozid ve metilinositol doğal bileşiklerini izole etmek ve saflaştırmak için bazı kromatografik metodlar kullanıldı.

Glikozidler doğada bulunabilir ve bitki ve hayvanlardan izole edilebilirler. Bu bileşikler karakteristik biyolojik aktif doğalarıyla bilinirler ve yaygın olarak ilaçlarda kullanılırlar. Günümüzde dermatolojik ve dammar hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Maul et al., 1999; Kirmizigul et. al., 1996). Ayrıca, bitkileri mikrobakteriyel saldırılardan korur. Bunlar ayrıca tarımsal alanlarda ve sığır yetiştiriciliğinde de kullanım alanına sahiptir (Tschesche and Wulff, 1973; Woitke et al., 1970). Saflaştırılması zor olan glikozidlerin izolasyonu ve saflaştırılması için çok

çeşitli kromotografik yöntemler mevcuttur. Ancak bugün bile glikozid bileşiklerinden bazılarını izole etmek hala mümkün değildir (Kirmizigul, 1993; Barton, 1955).

Glikozidler aglikon ve genin denilen bir hidrofobik kısım ve hidrofilik karakterli şeker zinciri veya zincirlerinden oluşur. Glikozidlerde monosakkarit zincir ve aglikon kısım arasındaki bağlar glikozidiktir. Bu glikozidik bağlar bir alkolik hidroksi grup ve yarı asetal hidroksil grup arasından bir molekül suyun eliminasyonu ile oluşur. Şimdiye kadar glikozidlerde D-glikoz, D-galaktoz, D-ramnoz, D-arabinoz, D-ksiloz, D-fukoz, D-kinovoz, D-glikuronik asit, D-galakturonik asit and D-riboz gibi pek çok monosakkarit bulunmuştur. Glikozit bağlarının konfigürasyonu normalde D şekerlerde  $\beta$ , L şekerlerde  $\alpha$ 'dır. Fakat son yıllarda  $\alpha$ -D-glikozidik (Bukharov and Karlin, 1970),  $\alpha$ -D-galaktozidik (Chirva et al., 1971) ve  $\beta$ -L-arabinozidik (Bukharov and Karneeva, 1971) bağ tipleride bulunmuştur. Glikozidler içerdikleri aglikonların yapısına göre dört grupta sınıflandırılabilirler. (Aksu, 1972);

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

Triterpenik glikozidler aşağıdaki gibi sınıflandırılabilirler.

A. Monodesmosidik Glikozidler

- a. Nötral Glikozidler
- b. Ester Glikozidler
- c. Asidik Glikozidler
  - Şeker Zincirinde Uranik Asit Taşıyan Glikozidler
  - Asit Grubuna Sahip Aglikonlu Glikozidler
  - Asit Grubuna Sahip Aglikonlu ve Şeker Zincirinde Uranik Asit Taşıyan Glikozidler

d. Açıl Glikozidler

B. Bisdesmosidik Glikozidler

- a. Nötral bisdesmosidik Glikozidler
- b. Asidik bisdesmosidik Glikozidler

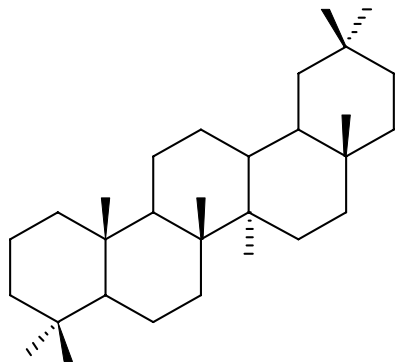
C. Hayvansal Glikozidler

Fenolik Glikozidler aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir.

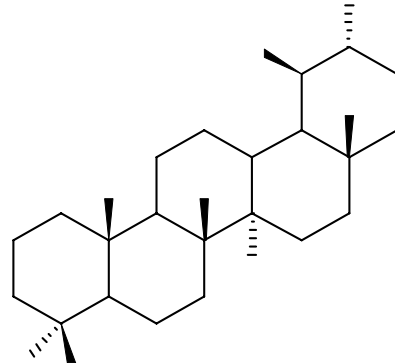
- A. Flavonoid Glikozidler
  - a. Flavon and flavonol Glikozidler
  - b. C-glikozilflavonoidler
  - c. Çalkan ve aurone Glikozidler
  - d. İzoflavonoid Glikozidler
- B. Basit Fenolik Glikozidler
- C. Antosiyanin Glikozidler
- D. Kumarin Glikozidler
- E. Antrakinon Glikozidler

### 1.2.1 Triterpen Glikozidler

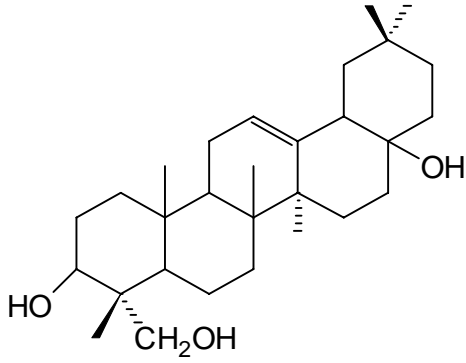
Doğada, glikozidler çoğunlukla triterpenik yapılı aglikonlar taşır (Zechmeister et al., 1973). Triterpenik aglikon genellikle C<sub>30</sub>- iskelet yapısına sahiptir fakat bazen nortriterpen (C<sub>29</sub>- iskeleti) ve C<sub>31</sub>-sekodammaran tiplerinde sıradışı triterpen aglikonlar da içerir (Hiller, 1987; Takemoto, 1983). Bu çeşit glikozidlerin izolasyonları ve kimyasal ve biyolojik özellikleri üzerindeki araştırmalar son yıllarda büyük gelişmeler göstermiştir. Bazı triterpenik glikozidler DNA bağlayıcı ikincil metabolitler olarak önemli bir role sahiptir (Maul et al., 1999). Karakteristik ve sıradışı triterpen aglikon iskeletlerine örnek olarak aşağıdakiler verilebilir.



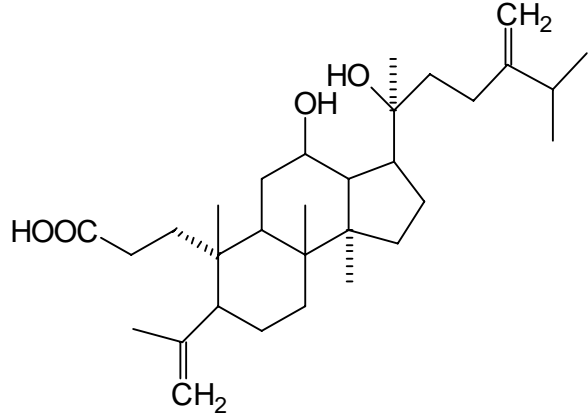
Oleanan



Ursan



C<sub>29</sub>-nortriterpene tipi



C<sub>31</sub>-sekodammaran tipi

Triterpenik aglikonların çoğu  $\beta$ -amiren iskeleti taşır. Bu tip triterpenlerde bir OH grubu 3. karbona bağlıdır. Diğer hidroksil grupları D ve E halkalarında, normalde 26, 22 ve 21 nolu karbonlarda nadiren 2 ve 15 nolu karbonlarda bulunur.  $\beta$ -amiren yapısında 23/24, 29/30 ve 28 ile numaralandırılan sekiz metal grubu farklı fonksiyonel gruba yükseltgenebilirler. Bu gruplar hidroksil ve karboksil gruplarına ve ara sıra aldehitlere dönüşürler (Woitke et al., 1970). Eğer herhangi bir halkada bir çift bağ varsa bu genellikle 12. ve 13. karbonlar arasındadır. Bununla birlikte bazı halkalarda 17. ve 18. karbonlar arasında olabilir.

Triterpenik glikozitler monodesmosidik yada bidesmosidik olabilirler. İkinci şeker zinciri daima karboksil grubu boyunca 17. karbondan bulunur. O-açıl glikozidlerde ikinci şeker zinciri ile aglikon arasında bağlanma vardır

#### A. Monodesmosidik Glikozidler

Bunlar düz veya dallanmış şeker zincirine sahip aglikonlara 3. karbondaki hidroksil grubu ile glikozidik bir bağla bağlanmış glikozidlerdir.

- a. Nötral Glikozidler
- b. Ester Glikozidler
- c. Asidik Glikozidler



## B. Bisdesmosidik Glikozidler

Bu glikozidler iki şeker zinciri taşır.

- a. Nötral bisdesmosidik glikozidler
- b. Asidik bisdesmosidik glikozidler

## C. Hayvansal Glikozidler

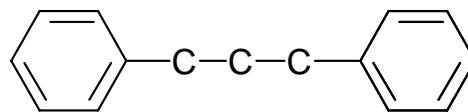
Şeker zinciri 3. karbondaki hidroksil grubuyla aglikona bağlıdır. Şeker zincirinin sonunda bir hidrojen sülfat grubu bulunur. Bu çeşit glikozidler genelde Deniz hıyarı ve deniz yıldızı ailelerinde bulunmaktadır (Kitagawa et al., 1978a, 1978b).

Glikozid yapılarının tanımlanması ve belirlenmesi için aşağıdaki özellikler dikkate alınmalıdır.

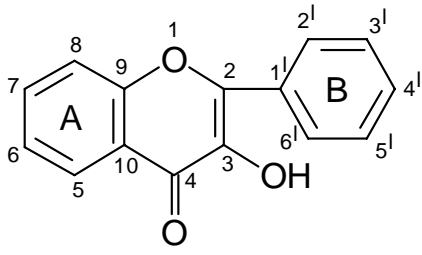
- Aglikonun yapısı
- Monosakkarit birimlerinin sayısı ve tipi
- Monosakkarit birimlerinin ard arda dizilişi ve bağlanma noktaları
- Glikozidik bağların konfigürasyonu
- Eğer aglikon birden fazla hidroksil grubuna sahipse, şeker zincirinin aglikona bağlantı noktası

### 1.2.2 Fenolik Glikozidler

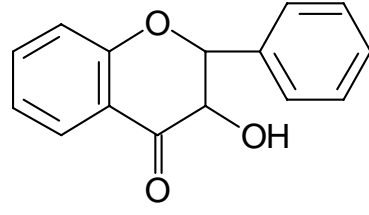
Fenolik glikozidlerin aglikonları flavonoid yapıli bileşiklerdir. Flavonoid bileşikleri C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> şeklinde değerlendirilebilen C<sub>15</sub> bileşikleridir. Bunlarda her C<sub>6</sub> kısmı bir benzen halkası iken, bunların C<sub>3</sub> kısmına bağlanması her bileşiğin sınıfını ve özelliğini belirler (İkan, 1991).



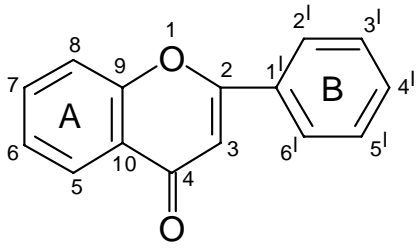
Temel flavonoid yapısı



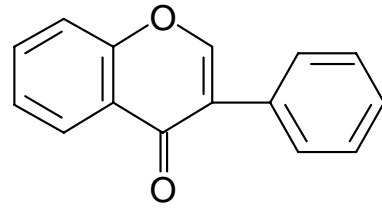
Flavonol



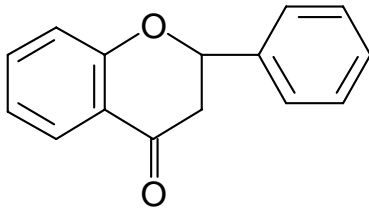
Flavanonol



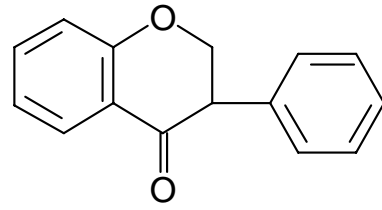
Flavon



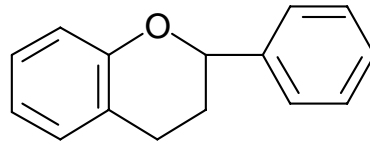
Isoflavon



Flavanon



Isoflavanon



Flavan

Bu bileşiklerin doğada dağılımı, izolasyonları, saflaştırılmalarında kullanılan teknikler, yapılarının belirlenmesi, sterokimyası ve sentezleri organik kimyada önemli bir yer tutar.

Flavonoidler, algler ve mantarlar dışında tüm bitki aleminde bulunurlar (Markham, 1982). Flavonoid bileşikler ve ilgili kumarinler bitkilerde genellikle bir

veya daha fazla hidroksil grubunun şekerlerle birleşik halde olduğu glikozitler olarak bulunurlar. B halkası yaygın olarak 3<sup>1</sup>-4<sup>1</sup> konumlarının her ikisinde veya 4<sup>1</sup> konumunda hidroksil ve alkoksi grupları taşırken, A halkasında hidroksil grupları daima 5 ve 7 konumlarında bulunur. Flavonoid bileşiklerin glikozidleri uygun hidroksil gruplarından biri ile şeker bağlayabilir (İkan, 1991). Flavonoidler'in Flavon ve flavonoller gibi bazı sınıfları isoflavonoid gibi diğer türlerinden daha yaygındırlar (Harborne, 1973).

Diğer çoğu flavonoidlerin tersine isoflavonoidlerin bitkilerde bulunuşlarının Leguminosae'un alt familyası olan Papilionodeae ile kısıtlanmış olması ve nadiren diğer iki alt familya olan Caesalpinoideae ve Mimosoideae'de görülmeleri bunların bitki aleminde yayılımını kısıtlı olduğunu göstermiştir. İsoflavonoidler 3-fenil kroman'a dayalı değişik C<sub>15</sub>-iskeletine sahip olmaları sebebiyle diğer flavonoidlerden ayrılırlar. İsoflavonoidler biyolojik özellikler bakımından geniş bir yelpazeye sahiptirler fakat en önemli 3 tanesi; basit flavonlar ve kumestan'ların östrojenik aktiviteleri, isoflavonoid fitoaleksinlerin antifungal ve antibakteriyel özellikleri ile rotenoidlerin insektisidal özellikleridir. Biyolojik olarak aktif izoflavonoidlerin çoğu Leguminosae'dan izole edilmektedir, fakat bu onların diğer bitki ailelerinde bulunmadıkları anlamına gelmez. Bilinen çok çeşitli flavon ve flavonol glikozitlerle karşılaştırıldığında, kaydedilmiş izoflavonoid glikozitlerin sayısı azdır. Bunlar çoğunlukla izoflavonlardır ve 48 tane glikozid kayıtlıdır. İzoflavanonlar, izoflavonlardan çok daha az bulunurlar. Şimdiye kadar kaydedilen 51 yapıdan çoğu antifungal aktiviteye sahiptirler. İzoflavonoller izoflavonoid biyosentezinde önemli ara ürünlerdir fakat kolaylıkla halkalaşarak pterokarpanlara dönüşmesi muhtemelen bu sınıfa ait pek çok örneğin izolasyonunu imkansız kılar (Williams and Harborne, 1989; Markham, 1989; Harborne 1973).

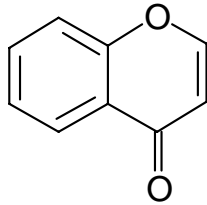
### **Flavonoid Glikozidler**

- a. Flavon ve flavonol glikozitler
- b. C-glikozillflavonoidler
- c. Çalkon ve avron glikozitler
- d. İzoflavonoid glikozitler

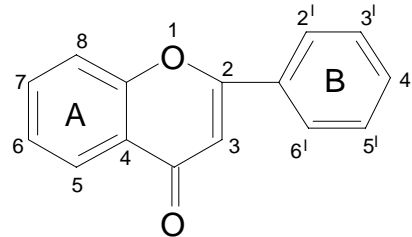
### a. Flavon ve Flavonol Glikozitler

Flavonlar ve flavonollar, flavonoidlerin %80'ini içeren moleküllerdir. A halkasındaki C-5 ve C-7 karbonları iki fenolik hidroksil grubunu bağlar. Bu hidroksil grupları serbest veya esterleşmişlerdir ve bu hidroksil gruplarından biri glikozidik bağ oluşturabilir.

Antioksidanlar olarak da bilinen flavonlar bitki aleminde bulunan sarı pigmentlerdir. Flavonlar doğal olarak serbest halde veya glikozit olarak bulunur. Kimyasal olarak, flavonlar anhosiyeninlerle oldukça yakından ilgilidir; flavonlar kısmen alkillenmiş flavon(2-fenil-4-kromon)'un hidroksillenmiş türevleridir. Hemen hemen bütün durumlarda, 5 ve 7 konumları ve sık olarak 3',4' ve 5' konumlarının bir veya birden fazlası hidroksillenmiştir. 5,7 ve 4'konumları genellikle metillenmemiştir fakat 3' ve 5' sık olarak metillenmiştir.



Kromon



Flavon

Flavonların yapısını tanımlayan genel yöntem antosiyaninlerin yapısını gösteren yöntemle benzerdir. İlk olarak serbest fenolik grupların sayısı ve metoksi gruplarının sayısı belirlenir. Daha sonra alkali füzyon veya hidroliz ile elde edilen ürünler incelenir (Finar et al., 1983).

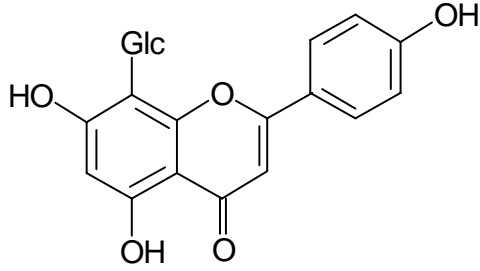
Flavon ve flavonol glikozidler kumaş boyamada kullanılmaktadır. Gütümüzde diuretic etkilerinden faydalanılır ve vitaminlerinkine benzeyen etkilerinden dolayı yaygın olarak kullanılırlar (Baytop, 1980).

### b. C-glikozilflavonoidler

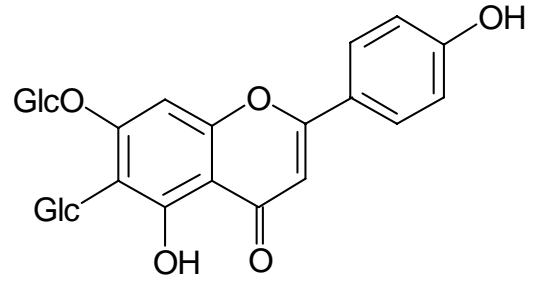
Tüm O-glikozidlerin hidroliz olduğu şartlar altında C-glikozilflavonoidlerin asitlerle muamele edilmesi sonucunda herhangi bir flavonoid aglikonu elde edilemez ve bu reaksiyon her zaman onların karakterizasyonunu belirlemek için kullanılırlar. Bir çok

C-glikozilflavonoidler izomerizasyonun sonucu olarak ortaya çıkarlar. Aglikonun alkali füzyonu sonucunda flavonoid'in A ve B halkalarından türeyen sırasıyla bir polifenol ve bir sübstitüe benzoic asit oluşur (Harborne et al, 1975).

C-glikozilflavonoidler bir veya iki şeker molekülü bağlayabilir ve doğada O-glikozid olarak bulunabilir.



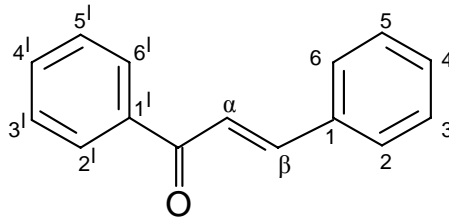
Viteksin



Saponarin

### c. Çalkon ve Avron Glikozidler

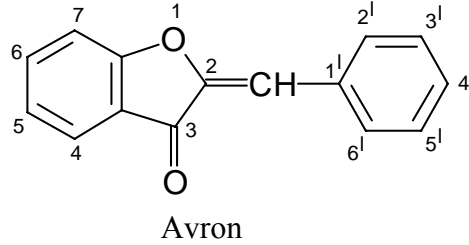
Çalkonlar ve dihidroçalkonlar merkezi heterosiklik halkası olmayan C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> bileşikleridir. Maalesef bu bileşikler üzerindeki konumlar bu bileşiklere has bir numaralandırma sistemi kullanılarak belirlenir. Çalkonlar, halka karbonları asal sayılarla belirlenen asetofenonlarla görünüşte yapısal olarak benzer oluşlarıyla tanınırlar. Bundan dolayı, çalkon ve dihidroçalkonların A halkasındaki karbonlarda asal sayılarla belirtilirler. B halkasındaki karbonlar asal olmaya sayılarla belirtilirler. Bu sistem aşağıda gösterilmektedir.



Çalkon

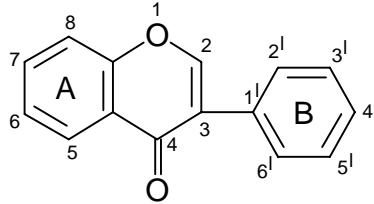
Avronlar aşağıda gösterilen 2-benzilidenkumaranon yapısına dayanır. Avronlarda karbonların konumları B halkası için asal sayılar ve A halkası için asal olmayan sayılar kullanılarak belirlenir; bu açıdan avronlar normal flavonoidlerdir. Fakat

avronlardaki 4 konumu biyosentetik olarak normal flavonoidlerdeki 5 konumuna eşdeğerdir. Bu kısımda avronlarla ilgili şu söylenebilir; avronoller avronlara çok benzeyen fakat bir hidroksillenmiş heterosiklik halkaya sahip bileşiklerdir (Harborne, 1988).

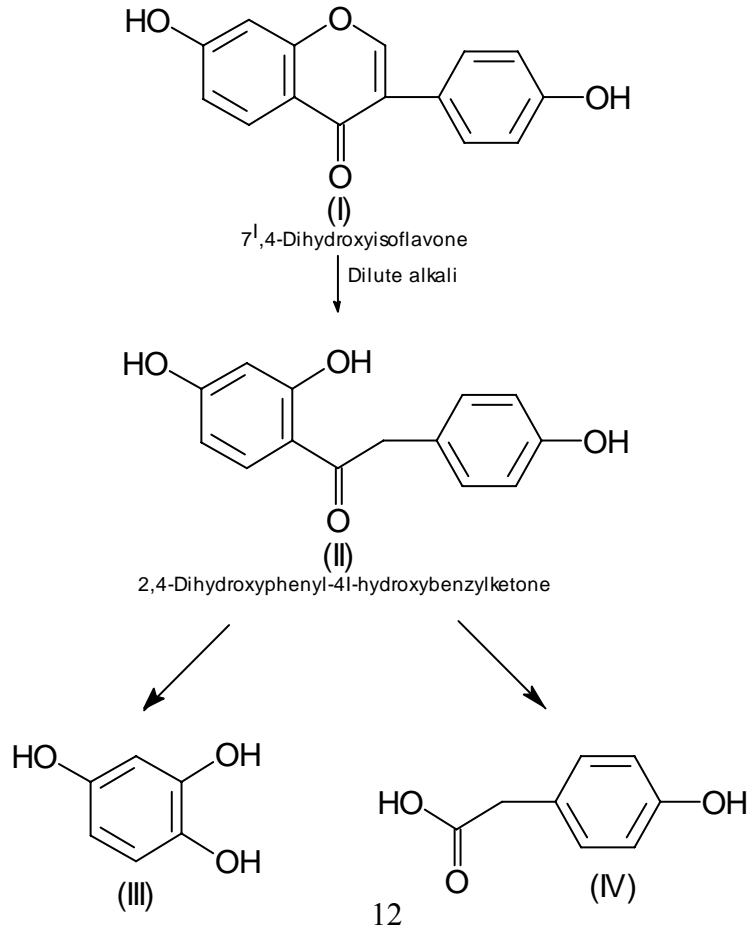


#### d. Isoflavonoid Glikozidler

İzoflavonlar benzopiron çekirdeğinin 3 numaralı konumunda fenil grubuna sahiptirler.



Izoflavon (3-fenilbenzopiron)



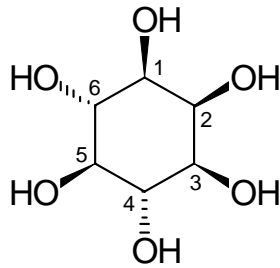
İzoflavonlar'ın karakteristik bir özelliği de ılımlı şartlar altında alkalilerle muamele edilmesi sonucu nicel olarak bir mol formik asit ve alkalilerle daha fazla muamele edilmesi sonucunda hidroksillenmiş fenilasetik asit ve polihidrik fenol'e indirgenen bir mol hidroksillenmiş benzil-o-hidroksifenilketon oluşmasıdır. Bu sebeple daidzein (I) ilk olarak ara ürün keton (II) ve formik asit ve son olarak da 1,2,4-trihidroksibenzen (III) ve *p*-hidroksifenilasetik asit (IV). (Gilman, 1943)

Flavon'un bu hidroksillenmiş türevleri kısmi olarak alkillenmiş olabilir. İzoflavonlar serbest veya glikozid olarak bulunan flavonlar kadar yaygın olmasa da doğal olarak bulunurlar.

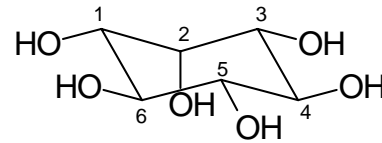
### 1.2.3 İnositol

İnositoller her zaman her yerde bulunan temeli 6 karbonlu halka yapısı olan halkalı karbohidratlardır. Aslında İnositol'ün 9 izomeri vardır. Biri memelilerin merkezi sinir sisteminde çok miktarda bulunan myo-inositol'dür. Myo-inositol 2 no'lu karbonunda tek aksiyel bir hidroksi grubu bulundurması ile farklıdır.

İnositol fosfatidilinositol halkasında haberci metabolik bir anahtar olan glikozun basit bir izomeridir. Anti depresan özellikleri olduğu belirlenen ve monoamin nörotransmitter habercisi olan L-dopa ve tryptophan'ın aksine, İnositol hücreler arası ikinci mesaj sistemidir. Fosfotidil İnositol döngübir çok nörotransmitter için ikinci mesaj sistemidir (Baraban, et al, 1989).



İnositolün Howarth Projeksiyonu



İnositolün Sandalye Konformasyonu

İnositol genellikle B vitamini kompleksinin bir parçası olarak değerlendirilir. Kolinle birlikte vücuttaki lesitin'in oluşumu için gerekli olduğu düşünülmektedir. İnositol kalsiyum taşınmasında yer alır. İnositol yağların yakılmasına, kandaki kolesterolün düşürülmesine ve hatta saç incelmesinin önlenmesine yardım eder.

Eksikliği kanda yüksek oranda kan kolesterolü, kabızlık, egzema ve saç kaybına yol açabilir.

Biyokimyasal ve beslenmedeki son gelişmeler İnositol'un önemli bir diyetsel ve hücrel yapıtaşı olduğunu belgelemiştir. Memelilerin dokularındaki İnositol ve türevlerine ait metabolizma prosesinin canlı organizmalarda ve enzimatik düzeyde gerçekleştiği belirlenmiştir. Biyolojik zarlardaki fosfatidilinositol için tanımlanmış biyokimyasal fonksiyonlar enzim aktivitesi ile çeşitli proteinler arasındaki ilişkiyi düzenlediği kadar, dış uyarı ve sinir iletimine verilen tepkileri de düzenler. İnositol üretimindeki bozulmanın kişide şeker hastalığı, kronik böbrek fonksiyonlarının yitirilmesi, galaktosemi ve sinir sistemi hastalıklarına sebep olduğu rapor edilmiştir. İnositol'un depresyon, Alzaymır hastalığı, panik atak, obsesif kompulsif bozukluğu gibi merkezi sinir sistemi bozukluklarının tedavisinde etkili olduğu kanıtlanmıştır. Pediatrik solunum depresyon sendromunda faydalı olduğu belgelenmiştir. Ayrıca son zamanlarda yapılan araştırmalar İnositol'un ağrı kesici olarak faydasını da ortaya koymuştur. İnositol, lityum terapisinden kaynaklanan bazı olumsuz etkileri hafifletmek için potansiyel tedavi olarak yaygın bir şekilde çalışılmıştır. Hamile kadınların İnositolü kullanıp kullanmamaları gerektiği henüz tam olarak açıklık kazanmamıştır. Embriyo farelerde sinirsel tüp kusurlarını engellediği belgelenmiş olmasına rağmen, uterus kasılmalarını azaltma riski hamilelikte kullanımını kısıtlamaktadır (Colodny, et al., 1998; Barkai, et al, 1978; Levine, et al., 1993a; Levine, et al., 1993b).

İnositol'un merkezi sinir sistemindeki oranının değişmesi beyin sinyallerinde bir değişikliğe ve nihayetinde sinirsel bozuklukların oluşmasına yol açabilir. İnositol'un etkinliğini değerlendiren çalışmalar İnositolün;

- depresyon
- Alzaymır hastalığı
- Panik atak
- obsesif kompulsif bozukluk
- otizm
- ileri travmatik stres bozukluğu
- ve ağrı

tedavisinde etkili olabileceğini göstermiştir.



## MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1 Genel

Spektroskopik çalışmalarda, IR verileri bir PerkinElmer Spectrum BX, FT-IR system cihazı yardımıyla alındı. Bir Jasco V-530 UV/VIS spektrofotometresi kullanılarak örneklerin UV spektrumları alındı. Floresans emisyon spektrumları için, bir PTI-QM1 Fluorescence cihazından faydalanıldı. Bir ve iki boyutlu NMR spektrumları bir Varian AS 400 MHz ve bir Bruker 400 MHz NMR spektrometresi kullanılarak elde edildi.

Kütle analizi bir PerkinElmer / Sciex API III and Biomolecular Analyzer ESI / APCI Triple Quadruple ve bir Agilent 1100 Series LC-MSD cihazı kullanılarak APCI (Atmospheric pressure chemical ionization) ve API-ES (Atmospheric pressure electron spray ionization) metotlarıyla gerçekleştirildi.

GC-Mass analizi dimetilsiloksan ile doldurulmuş HP-5 MS apolar kolonlu (30m x 0.25mm x 0.25µm) Hewlett Packard Combine System; GC (6890) – MSD (Mass Selective Detector) ile yapıldı.

Örneklerin polarize ışığı çevirme açıları bir Schmidt-Haensch Polartronic-E polarimetresi kullanılarak ölçüldü.

İnce tabaka kromatografisi için, Siligacel F<sub>254</sub> (Merck 5554) precoated tabakalar kullanıldı. Hazır tabaka kromatografisi için Silicagel 60 (Merck 7747) kullanılırken kolon kromatografisi için Silicagel 60 (Merck 7743), Polyamide 6 (Fluka 02395), Sephadex-LH 20 (Fluka 84952) ve Aluminium oxide 90 active neutral (Merck 1077) dolgu maddeleri kullanıldı. LiChroprep RP-18 (Merck 9303) dolgu maddesi kullanılarak Vakum Likit Kromatografisi gerçekleştirildi.

İzolasyon, saflandırma ve kromatografik çalışmalarda (HTK, İTK, KK) aşağıdaki çözücü sistemleri kullanıldı.

A	Diklormetan: Metanol	9: 0.5
B	Diklormetan: Metanol	9: 1
C	Diklormetan: Metanol	9: 1.5
D	Diklormetan: Metanol	9: 2
E	Metanol: H <sub>2</sub> O	1: 9

F	Metanol: H <sub>2</sub> O	2: 8
G	Metanol: H <sub>2</sub> O	3: 7
H	Metanol: H <sub>2</sub> O	4: 6
I	Metanol: H <sub>2</sub> O	1: 1
J	Metanol: H <sub>2</sub> O	6: 4
K	Metanol: H <sub>2</sub> O	7: 3
L	Metanol: H <sub>2</sub> O	8: 2
M	Metanol: H <sub>2</sub> O	8.5: 1.5
N	Metanol: H <sub>2</sub> O	9: 1
O	Metanol: H <sub>2</sub> O	9.5: 0.5
P	BuOH: H <sub>2</sub> O	1: 1
Q	Diklormetan: Metanol: H <sub>2</sub> O	61:32:7
R	Diklormetan: Metanol: H <sub>2</sub> O	61:35:7
S	Diklormetan: Metanol: H <sub>2</sub> O	64:50:10
T	Diklormetan: Metanol: H <sub>2</sub> O	65:35:5
U	Diklormetan: Metanol: H <sub>2</sub> O	70:30:3
V	Diklormetan: Metanol: H <sub>2</sub> O	70:30:4
W	Diklormetan: Metanol: H <sub>2</sub> O	75:25:3
X	Diklormetan: Metanol: H <sub>2</sub> O	80:20:2
Y	Diklormetan: Metanol: H <sub>2</sub> O + Metanol	61:32:7 + % 5
Z	Diklormetan: Metanol: H <sub>2</sub> O + Metanol	61:32:7 + % 10
A <sup>1</sup>	Diklormetan: Metanol: H <sub>2</sub> O + Metanol	61:32:7 + % 20
B <sup>1</sup>	Kloroform: Metanol: H <sub>2</sub> O	61:32:7
C <sup>1</sup>	Kloroform: Metanol: H <sub>2</sub> O	61:35:7
D <sup>1</sup>	Kloroform: Metanol: H <sub>2</sub> O + Metanol	61:32:7 + % 5
E <sup>1</sup>	Kloroform: Metanol: H <sub>2</sub> O + Metanol	61:32:7 + % 10

F <sup>1</sup>	Kloroform: Metanol: H <sub>2</sub> O + Metanol	61:32:7 + % 20
G <sup>1</sup>	Etil asetat: MeOH: H <sub>2</sub> O	50:30:10
H <sup>1</sup>	Etil asetat: MeOH: H <sub>2</sub> O	60:25:10
I <sup>1</sup>	Etil asetat: MeOH: H <sub>2</sub> O	100:13:5

TLC tabakalarındaki lekeler etanol içinde % 40 lık H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve % 50 lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi püskürtüldükten sonra tabakaları yaklaşık olarak 3 dakika 150 °C de ısıtarak belirgin hale getirildi. UV aktif bileşenler için, lekeler ve bantlar UV lamba altında 254 ve 366 nm de gözlemlendi.

## 2.2. Bitki Materyali

Bu çalışmada, *Ebenus haussknechtii* Mayıs 2002 de Sivas ili Çengerli Dağı 2400 m de Emrah KÖK tarafından toplandı. Bitkinin botanik özellikleri Serdar Gökhan ŞENOL tarafından teşhis edildi ve numune vesikası 37653 numarasıyla Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi Herbaryum Merkezinde depolandı.

## 2.3. İzolasyon ve Saflandırma

Bu çalışmada, üst kısımları, kökü ve çiçekleri olmak üzere bitkinin tamamı çalışıldı. Havayla kurutulmuş 1 kg bitki öğütüldü ve 6 litre %80lik MeOH ve 40 ml H<sub>2</sub>O karışımıyla 3 kez tekrarlanarak oda sıcaklığında ekstraksiyon yapıldı. Her ekstraksiyon bitkiyi bir gece çözeltide bekletilerek gerçekleştirildi ve daha sonra süzüldü. Birleştirilen ekstreler yaklaşık 40 °C de bir döner evaporatörle düşük basınç altında uçuruldu. Klorofil ve yağlı kısımları uzaklaştırmak için kalan şurubumsu kısım hekzan(23 x 100 ml) ile ekstraksiyon yapıldı. Hekzan ekstresi metillendi ve ekstredeki doymamış yağ asitleri GC-Mass analizi verileri doğrultusunda incelendi. Klorofili ve yağları uzaklaştırıldıktan sonra kalan yağsız kalıntı, apolar kısımları polar kısımlardan tamamen ayırmak için CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 x 100 ml) ile ekstraksiyon yapıldı. Kalan polar kısım 1:1 / BuOH: H<sub>2</sub>O çözücü sistemiyle ekstraksiyon yapıldı. Yüksek polaritesinden dolayı en polar kısımları yakalaması için inorganik bir çözücü olan H<sub>2</sub>O kullanıldı. Biyolojik olarak en aktif olan BuOH inceleme altına alındı. BuOH ekstresinde yüksek apolariteye

sahip kısım kalmadığından emin olmak için ekstre 40 ml H<sub>2</sub>O + 80 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> karışımıyla ekstraksiyon yapıldı. Böylece yağlı kısımlar CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fazıyla ekstreden uzaklaştırıldı. Kalıntı E-O aralığındaki çözücüler kullanılarak VLC ile 13 fraksiyona ayrıldı. Fraksiyon 1, fraksiyon 2, fraksiyon 9 ve fraksiyon 10'un önemli olduğu ve daha fazla incelenmesi gerektiği düşünüldü. Fraksiyon 1 + fraksiyon 2 ve fraksiyon 9 + fraksiyon 10 TLC tabakasında aralarındaki büyük benzerlikten dolayı birleştirildi.

Fraksiyon 9 ve fraksiyon 10'un birleştirilmesiyle elde edilen fraksiyonu saflandırmak için bir kolon kromatografisi yapıldı. Sonuç olarak 6 fraksiyon elde edildi ve her fraksiyon tekrar kolon kromatografisi ile saflandırıldı. Buradan elde edilen 2. fraksiyonun saflandırma çalışmaları sonucunda saf bileşik E.H-S-2, fraksiyon 4 ve fraksiyon 5'ten ise ayrı ayrı E.H.-S-1 elde edildi.

Z harfiyle kodlanan birleştirilmiş fraksiyon 1 ve fraksiyon 2, CHCl<sub>3</sub> ve H<sub>2</sub>O ile ekstrakte edildi. Z.2 kodlu H<sub>2</sub>O ekstresi kolon kromatografisi (1m x 4cm) ile saflandırıldı. Bu kolon kromatografisi prosedürü sonucunda 5 fraksiyon (Z.2.1, Z.2.2, Z.2.3, Z.2.4 ve Z.2.5) elde edildi. Buradan elde edilen her fraksiyonu saflandırmak için farklı dolgu maddeleri ile doldurulan bir çok kolon kromatografisi gerçekleştirildi. Saf bileşikler olan E.H-S-3 ve E.H-S-4 sırasıyla Z.2.1 ve Z.2.4 fraksiyonlarından elde edildi.

Z.2.5 için yapılan kolon kromatografisi sonucunda 2 fraksiyon elde edildi ve bu fraksiyonlar Z.2.5.A ve Z.2.5.B olarak kodlandı. Daha sonra Z.2.5.A. hazır tabaka kromatografisi ile saflandırıldı ve bu aşamadan sonra saf bileşikler E.H-S- 5 ve E.H-S-6 elde edildi.

*Ebenus haussknechtii*'den elde edilen doğal bileşikler kimyasal ve spektroskopik veriler ışığında analiz edildi ve çeşitli spektroskopik sonuçların yorumlanması sonucunda ne oldukları saptandı.

Çalışma proses diyagramı aşağıda detaylı olarak verilmiştir.











### 2.3.1. Bileşik 1 (Triterpen Glikozid)

Bileşik 1 karboksil grubuna bağlanmış olan 3 şekerli bir triterpen glikoziddir. Bu doğal bileşik sırasıyla VLK ve KK ile izole edilip saflandırıldı. Bu triterpen glikozid beyaz renkli şekilsiz bir katı madde olarak elde edildi. Verim 16.20 mg.  $[\alpha]_D^{20} = +14$ , (c 0.160, MeOH + 10% H<sub>2</sub>O)

#### UV (MeOH+10% H<sub>2</sub>O):

$$\lambda_{\max} = 300 \text{ nm}$$

#### Fluoresans Emisyon (MeOH+10% H<sub>2</sub>O):

$$\lambda_{\max (\text{Ex})} = 202 \text{ nm}$$

#### IR (KBr):

$\nu = 3456$	$\text{cm}^{-1}$	-OH
$\nu = 1675$	$\text{cm}^{-1}$	-C=O
$\nu = 1054-1030$	$\text{cm}^{-1}$	-C-O-

#### <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD):

$\delta = 5.15$	ppm	$-\text{C}=\overset{ }{\text{CH}}-$
$\delta = 5.05$	ppm	Anomerik H ( $\alpha$ -Glikozidik, bs)
$\delta = 4.87$	ppm	Anomerik H (Çözelti Altında)
$\delta = 4.38$	ppm	Anomerik H ( $\beta$ -Glikozidik, $J=7.8$ Hz.)
$\delta = 4.2 - 3.3$	ppm	$-\text{CH}_2-\text{O}$ ve $-\overset{ }{\text{CH}}-\text{O}$ (Aglikon ve Şeker)
$\delta = 3.1 - 1.13$	ppm	$-\overset{ }{\text{CH}}-$ ve $-\text{CH}_2-$ (Aglikon)
$\delta = 1.80$	ppm	1 x $-\text{CH}_3$ (Asetill)
$\delta = 1.12$	ppm	1 x $-\text{CH}_3$ (Ramnoz, d, $J= 4.14$ )
$\delta = 1.02 - 0.60$	ppm	7 x $-\text{CH}_3$ (Aglikon)

**<sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD):**

$\delta = 170.74$	ppm	– <u>C</u> = O
$\delta = 145.52$	ppm	= <u>C</u> – (C <sub>13</sub> )
$\delta = 124.10$	ppm	= <u>CH</u> – (C <sub>12</sub> )
$\delta = 105.39$	ppm	Anomerik C <sub>1</sub> '
$\delta = 103.05$	ppm	Anomerik C <sub>1</sub> '''
$\delta = 102.66$	ppm	Anomerik C <sub>1</sub> ''
$\delta = 92.75$	ppm	C-3
$\delta = 79.90$	ppm	C-4'
$\delta = 78.50$	ppm	C-4''
$\delta = 78.31$	ppm	C-3''
$\delta = 77.60$	ppm	C-3'
$\delta = 77.35$	ppm	C-5''
$\delta = 76.70$	ppm	C-5'
$\delta = 74.66$	ppm	C-2'
$\delta = 74.60$	ppm	C-4'''
$\delta = 73.90$	ppm	C-2''
$\delta = 72.90$	ppm	C-3'''
$\delta = 72.58$	ppm	C-2'''
$\delta = 71.98$	ppm	C-5'''
$\delta = 69.70$	ppm	C-28
$\delta = 62.62$	ppm	C-6' ve C-6''
$\delta = 57.50$	ppm	C-5 (-)
$\delta = 50.30$	ppm	C-9 (-)
$\delta = 47.41$	ppm	C-19 (+)
$\delta = 47.20$	ppm	C-18 (-)
$\delta = 45.12$	ppm	C-14 (+)
$\delta = 43.75$	ppm	C-8 (+)
$\delta = 42.25$	ppm	C-4 (+)
$\delta = 41.15$	ppm	C-1 (+)
$\delta = 40.90$	ppm	C-10 (+)

$\delta = 40.10$	ppm	C-17 (+)
$\delta = 38.98$	ppm	C-21 (+)
$\delta = 37.88$	ppm	C-30 (-)
$\delta = 33.45$	ppm	C-7 (+)
$\delta = 31.75$	ppm	C-22 (+)
$\delta = 31.12$	ppm	C-20 (+)
$\delta = 31.10$	ppm	C-23 (-)
$\delta = 30.85$	ppm	C-2 (+)
$\delta = 29.45$	ppm	C-27 (-)
$\delta = 27.26$	ppm	C-15 (+)
$\delta = 24.11$	ppm	C-11 (+)
$\delta = 23.83$	ppm	C-29 (+)
$\delta = 20.78$	ppm	C-16 (+)
$\delta = 19.90$	ppm	O=C- <u>C</u> H <sub>3</sub> (-)
$\delta = 18.66$	ppm	C-6'''
$\delta = 17.93$	ppm	C-6 (+)
$\delta = 16.84$	ppm	C-24 (-)
$\delta = 14.80$	ppm	C-26 (-)
$\delta = 13.90$	ppm	C-25 (-)

**API-ES-Mass:**  $[M]^+ = 977.25 [M+23]^+$

$m/z$  954.25  $[M-23]^+$

### 2.3.2. Bileşik 2 (Flavonoid Glikozid)

Bileşik 2 iki şekerli bir flavonoid glikoziddir. Bu doğal bileşik sırasıyla VLK ve KK kullanılarak elde edildi. Bu glikozid sarı renkli şekilsiz olarak toz halinde elde edildi. Verim 27.30 mg.  $[\alpha]_D^{20} = + 42.8$  (c 0.053, MeOH + 10% H<sub>2</sub>O)

**UV (MeOH+10% H<sub>2</sub>O):**

$\lambda_{\max} = 357 \text{ nm}$

$\lambda_{\max} = 258 \text{ nm}$

**Fluoresans Emisyon (MeOH+10% H<sub>2</sub>O):**

$\lambda_{\max (\text{Ex})} = 258 \text{ nm}$

**IR (KBr):**

$\nu = 3430$	$\text{cm}^{-1}$	-OH
$\nu = 2930$	$\text{cm}^{-1}$	-C-H
$\nu = 1736$	$\text{cm}^{-1}$	-C=O
$\nu = 1364-1008$	$\text{cm}^{-1}$	-C-O-
$\nu = 909-831$	$\text{cm}^{-1}$	( <i>o</i> - ve <i>m</i> - subst.)

**<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD):**

$\delta = 7.66$	ppm	H-2' (1H, d, $J = 2.0 \text{ Hz}$ )
$\delta = 7.62$	ppm	H-6' (1H, dd, $J = 8.8 \text{ Hz}, 2.0 \text{ Hz}$ )
$\delta = 6.87$	ppm	H-5' (1H, d, $J = 8.8 \text{ Hz}$ )
$\delta = 6.38$	ppm	H-8 (1H, d, $J = 2.0 \text{ Hz}$ )
$\delta = 6.19$	ppm	H-6 (1H, d, $J = 2.0 \text{ Hz}$ )
$\delta = 5.09$	ppm	H-1'' ( $\beta$ -Anomerik H, $J = 7.4 \text{ Hz}$ )
$\delta = 4.51$	ppm	H-1''' ( $\alpha$ -Anomerik H, $J = 1.6 \text{ Hz}$ )
$\delta = 3.40$	ppm	H-6'' (2H, m, -CH <sub>2</sub> O-) (Şeker)
$\delta = 3.70-3.20$	ppm	(8H, m, -CH <sub>2</sub> O-) (Şeker)
$\delta = 1.11$	ppm	H-6''' (3H, d, $J = 6.4 \text{ Hz}$ )

**<sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD):**

$\delta = 178.19$	ppm	C-4
$\delta = 165.09$	ppm	C-7
$\delta = 161.78$	ppm	C-5
$\delta = 158.12$	ppm	C-9
$\delta = 157.34$	ppm	C-2
$\delta = 148.63$	ppm	C-4'
$\delta = 144.66$	ppm	C-3'
$\delta = 134.44$	ppm	C-3
$\delta = 122.37$	ppm	C-6'
$\delta = 121.93$	ppm	C-1'
$\delta = 116.50$	ppm	C-2'
$\delta = 114.87$	ppm	C-5'
$\delta = 104.37$	ppm	C-10
$\delta = 103.57$	ppm	C-1''
$\delta = 101.23$	ppm	C-1'''
$\delta = 98.85$	ppm	C-6
$\delta = 93.74$	ppm	C-8
$\delta = 77.01$	ppm	C-3''
$\delta = 76.03$	ppm	C-5''
$\delta = 74.54$	ppm	C-2''
$\delta = 72.75$	ppm	C-4'''
$\delta = 71.05$	ppm	C-2'''
$\delta = 70.91$	ppm	C-3'''
$\delta = 70.20$	ppm	C-4''
$\delta = 68.53$	ppm	C-5'''
$\delta = 67.37$	ppm	C-6''
$\delta = 16.70$	ppm	C-6'''

**API-ES-Mass:**  $[M]^+ = 633.3 [M+23]^+$   
 $m/z$  611.1  $[M-23]^+$   
465.3  $[M-23-146]^+$   
303.3  $[M-23-146-162]^+$  (Aglikon)

### 2.3.3. Bileşik 3 (Metilinositol)

Bileşik 3 glikozun izomeri olan inositolün bir türevidir. Bu doğal bileşik çeşitli kromotografik teknikler kullanılarak elde edildi. Metilinositol sarı renkli şekilsiz bir katı madde olarak elde edildi. Verim 18.20 mg.  $[\alpha]_D^{20} = + 71.1$  (c 0.032, MeOH + 10% H<sub>2</sub>O)

#### **UV (MeOH+H<sub>2</sub>O %10):**

$\lambda_{max} = 272$  nm (Çok küçük omuz)

#### **Fluoresans Emisyon (MeOH+H<sub>2</sub>O %10):**

$\lambda_{max (Ex)} = 205$  nm

#### **IR (KBr):**

$\nu = 3380$	$cm^{-1}$	-OH
$\nu = 2921-2850$	$cm^{-1}$	-C-H
$\nu = 1071$	$cm^{-1}$	-C-O-

#### **<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD):**

$\delta = 3.88$	ppm	(5H, s, -OH)
$\delta = 3.75-3.68$	ppm	H-2, H-6, (2H, m, CH-O)
$\delta = 3.60$	ppm	(3H, s, -OCH <sub>3</sub> )
$\delta = 3.58$	ppm	H-3, H-4, H-5 (3H, t, CH-O)
$\delta = 3.24$	ppm	H-1, (1H, t, CH-O)

### **<sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD):**

$\delta = 83.74$	ppm	C-1
$\delta = 73.10$	ppm	C-5
$\delta = 72.59$	ppm	C-3
$\delta = 72.29$	ppm	C-4
$\delta = 71.37$	ppm	C-2
$\delta = 70.85$	ppm	C-6
$\delta = 59.63$	ppm	C-7

### **2.3.4. Bileşik 4 (Flavonoid Glikozid)**

Bileşik 4, 2 şekerli ve 2 aglikonlu bir flavonoid glikoziddir. Bu doğal bileşik çeşitli kromoptografik yöntemler kullanılarak elde edildi. Bu glikozid sarı renkli şel,kilsiz bir toz olarak elde edildi. Verim 125.80 mg.  $[\alpha]_D^{20} = + 41.8$  (c 0.054, MeOH + 10% H<sub>2</sub>O)

### **UV (MeOH+10% H<sub>2</sub>O):**

$$\lambda_{\max} = 365 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\max} = 259 \text{ nm}$$

### **Fluoresans Emisyon (MeOH+H<sub>2</sub>O %10):**

$$\lambda_{\max (\text{Ex})} = 260 \text{ nm}$$

### **IR (KBr):**

$\nu = 3357$	cm <sup>-1</sup>	-OH
$\nu = 2926$	cm <sup>-1</sup>	-C-H
$\nu = 1654$	cm <sup>-1</sup>	-C=O
$\nu = 1205-1059$	cm <sup>-1</sup>	-C-O-C
$\nu = 839- 810$	cm <sup>-1</sup>	( <i>o</i> - ve <i>m</i> - subst.)

**<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD):**

$\delta = 7.91$	ppm	H-3' (1H, d, $J = 2.0$ Hz)
$\delta = 7.58$	ppm	H-5' (1H, dd, $J = 8.8$ Hz, $2.0$ Hz)
$\delta = 6.87$	ppm	H-6' (1H, d, $J = 8.8$ Hz)
$\delta = 6.34$	ppm	H-8 (1H, d, $J = 2.0$ Hz)
$\delta = 6.16$	ppm	H-6 (1H, d, $J = 2.0$ Hz)
$\delta = 5.19$	ppm	H-1''' ( $\beta$ -Anomerik H, d, $J = 7.2$ Hz)
$\delta = 4.52$	ppm	H-1'''' ( $\alpha$ -Anomerik H, bs, $J = 1.6$ Hz)
$\delta = 3.92$	ppm	-OCH <sub>3</sub>
$\delta = 3.44$	ppm	H-6''' (2H, m, -CH <sub>2</sub> O-) (Şeker)
$\delta = 3.33$	ppm	-OCH <sub>3</sub>
$\delta = 3.80-3.22$	ppm	(8H, m, -CH <sub>2</sub> O-) (Şeker)
$\delta = 1.10$	ppm	H-6'''' (3H, d, $J = 6.4$ Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD):**

$\delta = 177.84$	ppm	C-4
$\delta = 174.66$	ppm	C-1''
$\delta = 164.61$	ppm	C-7
$\delta = 161.49$	ppm	C-5
$\delta = 160.08$	ppm	C-9''
$\delta = 157.40$	ppm	C-9
$\delta = 156.98$	ppm	C-2
$\delta = 149.42$	ppm	C-4'
$\delta = 146.85$	ppm	C-2'
$\delta = 134.16$	ppm	C-3



$\delta = 131.05$	ppm	C-7" ve C-11"
$\delta = 122.62$	ppm	C-5'
$\delta = 121.54$	ppm	C-1'
$\delta = 114.78$	ppm	C-6'
$\delta = 114.71$	ppm	C-8" ve C-10"
$\delta = 113.20$	ppm	C-3'
$\delta = 104.29$	ppm	C-10
$\delta = 103.24$	ppm	C-1'''
$\delta = 101.14$	ppm	C-1''''
$\delta = 98.66$	ppm	C-6
$\delta = 93.64$	ppm	C-8
$\delta = 76.78-68.41$	ppm	8 x (-CH-O-), (Şeker)
$\delta = 68.36$	ppm	C-6''' (Şeker)
$\delta = 55.41$	ppm	-OCH <sub>3</sub>
$\delta = 48.55$	ppm	-OCH <sub>3</sub>
$\delta = 38.88$	ppm	C-5"
$\delta = 35.65$	ppm	C-2"
$\delta = 28.75$	ppm	C-4"
$\delta = 25.36$	ppm	C-3"
$\delta = 16.56$	ppm	C-6''''

**API-ES-Mass:** [M]<sup>+</sup> = 814.5 [M+H]<sup>+</sup>

*m/z* 621.1 [M - Aglikon 2]<sup>+</sup>

475.4 [M - Aglikon 2 - 146]<sup>+</sup>

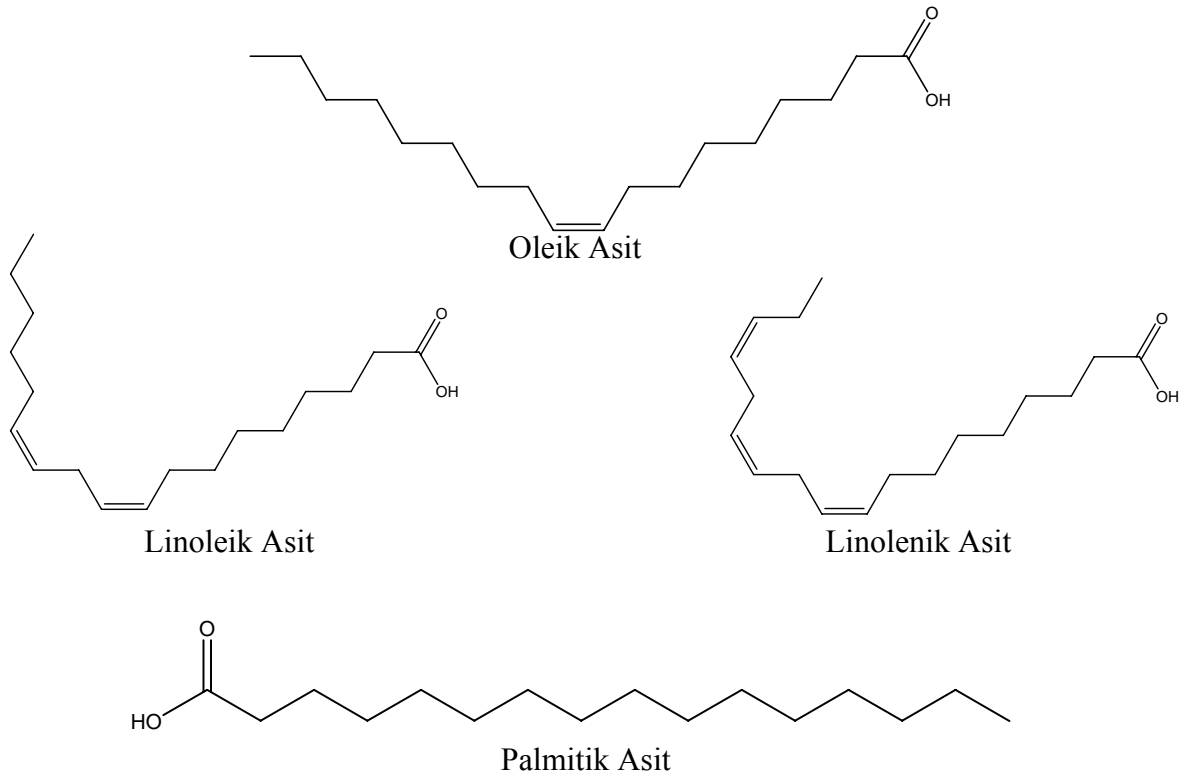
314.3 [M - Aglikon 2 - 146 - 162]<sup>+</sup>, (Aglikon 1+ OCH<sub>3</sub>)

### 2.3.5. Hegzan Ekstresindeki Doymamış Yağ Asitleri

GC-Mass kromotogramından elde edilen verilere göre 12.091 dakika, 13.816 dakika, 13.904 dakika ve 14.000 dakika alıkonma sürelerine ait piklerin metilenmiş doymamış yağ asitlerinin toplam yüzdesinin % 75'ini oluşturduğu saptandı. Bu GC pikleri sırasıyla kütle pikleri, standart metilenmiş doymamış yağ asitlerinin alıkonma süreleri ve kütüphane (Wiley and NIST Data Library) alıkonma süresi verileri ile karşılaştırılarak incelendiğinde, aşağıda gösterilen sonuçlar elde edilmiştir.

**Table 1:** *Ebenus haussknechtii* nin Hekzan ekstresinin GC-Mass sonuçlarına göre ana bileşenleri.

<b>Bileşikler</b>	<b>Alıkonma Süresi</b>	<b>%</b>	<b>M<sup>+</sup></b>	<b>Mass Spektral verileri, m/z (Bağıl Sıddet)</b>
<b>Oleik Asit</b>	14.000	7.12	296	278(4), 236(4), 196(5), 137(3), 123(33), 111(18), 105(4), 95(17), 87(9), 81(26), 71(100), 65(5), 55(46), 45(8)
<b>Linoleik Asit (ω-6)</b>	13.816	12.17	294	263(7), 220(8), 164(7), 150(14), 136(11), 123(16), 109(32), 95(63), 81(87), 74(14), 67(100), 61(5), 55(84), 45(6)
<b>Linolenik Asit (ω-3)</b>	13.904	34.83	292	264(6), 236(6), 173(6), 149(13), 135(16), 121(22), 108(37), 95(55), 87(19), 79(100), 73(6), 67(66), 61(5), 55(73), 45(5)
<b>Palmitik Asit</b>	12.091	21.20	270	227(18), 199(8), 185(8), 171(8), 143(29), 97(12), 87(77), 81(12), 74(100), 67(5), 61(3), 55(42), 45(3)



#### 2.4. Asidik Hidroliz

Monosakkaritleri saptamak için 2 farklı yöntem kullanıldı.

İlk monosakkarit analizi İTK tabakası üzerinde asidik hidroliz tekniği kullanılarak yapıldı. Elde edilen saf bileşikler ve şeker standartları bir İTK (silicagel HF 254) tabakası üzerine uygulandı ve asidik buharla doymuş hale gelmiş kapalı bir kap içerisinde 15 dakika boyunca 100 °C de konsantre HCl buharına maruz bırakıldı. Kap soğutulduktan ve asit buharı tabakadan uzaklaştırıldıktan sonra, CHCl<sub>3</sub>: MeOH: H<sub>2</sub>O (65:30:10 +10% MeOH) çözücü sistemi olarak kullanılarak İTK gerçekleştirildi ve bileşikler anisaldehit ile belirgin hale getirildi (Arda, et al., 1989).

İkinci analiz monosakkaritleri değişik bir asidik hidroliz tekniği kullanarak GC-Mass ile belirlemeye dayanır. 10 mg örnek MeOH içinde çözüldü. Çözeltiyeye 2N HCl eklendikten sonra, 95 °C de 6 saat boyunca reflüks edildi. Sonra, çözelti CHCl<sub>3</sub> ile ekstrakte edildi. İki faz birbirinden ayrıldıktan sonra, her ikisinde nötrleştirildi ve H<sub>2</sub>O fazı uçuruldu. Uçurmadan sonra, H<sub>2</sub>O ekstresi piridin (1ml) varlığında trimetilklorosilan (0.5 ml) ve hegzametildisilazan (0.5 ml) ile silillendi. Silillenmiş örneğe GC-Mass analizi yapıldı (Wulff, 1965).

## 2.5. Hegzan Ekstesinin Metillenmesi

IOOC (International Olive Oil Council) ve IUPAC raporlarına uygun olarak hegzan ekstresi aşağıda gösterilen trans-esterifikasyon prosesine göre metillendi.

Kuru hegzan ekstresi hegzan içinde çözüldü ve 2M metanollü KOH ile oda sıcaklığında 30 saniye ekstrakte edildi. Üst faz GC-Mass spektrometresi ile incelendi (David, et al., 2003)

## 2.6. Mikrobiyolojik Analiz

*Ebenus haussknechtii*'nin çeşitli bileşiklerini içeren bazı ekstrelerin antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri test edildi. Antimikrobiyel aktiviteler, referans antibiyotik Gentamycin ile karşılaştırılarak aşağıdaki test organizmalarına karşı agar disk difüzyon metoduyla gerçekleştirildi.

- *Bacillus cereus* CCM 99
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- *Escherichia coli* (ATCC 11230)
- *Salmonella thyphimirium* (CCM 5445)
- *Pseudomonas aureginosa* (ATCC 27853)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538-P)
- *Enterobacter aerogenes* TEM
- *Enterococcus faecalis* (ATCC 29213)
- *Candida albicans* (ATCC 10239)

Bakteriler Triptik Soya Agar üzerinde üretilirken, maya (*Candida Albicans*) Sabouraud's dextrose agar üzerine inokulum olarak ekildi.

Büyümüş kültürler Petri kaplarına püskürtülerek inoküle edildi ve 6 mm çapındaki ve 10mg/ml extre içeren her bir disk bu kaplar üzerine yerleştirildi. 24-48 saatlik 37 °C deki inkübasyon döneminden sonra, disklerin etrafında oluşan İnhibisyon Bölge Çapları inceleme altına alındı. Sonuçlar aşağıdaki Tablo 2 de verilmiştir.

**Tablo 2:** *Ebenus haussknechtii* ekstrelerinin antimikrobiyel aktiviteleri.

<u>Test edilen</u> <u>Materyal</u>	<u>Inhibisyon Bölge Capı (mm)</u>					
	Hegzan	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	MeOH	BuOH	H <sub>2</sub> O	Gentamycine
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	14	12	13	19
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	9	-	17
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	8	-	13
<i>Salmonella thyphimirium</i>	-	-	7	8	10	11
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	-	-	-	12	-	16
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	11	9	9	12
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-	9	-	13
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	8	9	21
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-

### 3. TARTIŞMA VE SONUÇ

#### 3.1. Bileşik 1

Bileşik 1'in  $^{13}\text{C}$ , DEPT-NMR ve API-ES negatif iyon kütle spektrumlarıyla  $\text{C}_{50}\text{H}_{82}\text{O}_{17}$  moleküler formülüne sahip olduğu bulunmuştur. Bileşik 1'in kütle spektrumu  $m/z$  ve ana (en çok göze çarpan) fragmanların  $m/z$  954.25'de olduğunu göstermiştir. UV spektrumu 300 nm'de zayıf bir absorpsiyon şiddetine sahip bir pik vermiştir. IR spektrumunda spesifik  $-\text{OH}$ ,  $-\text{C}=\text{O}$ , ve  $-\text{C}-\text{O}-$  pikleri sırasıyla  $3456\text{ cm}^{-1}$ ,  $1675\text{ cm}^{-1}$ , ve  $1054-1030\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenmiştir.

$^1\text{H}$ NMR, tersiyer grupların ( $\delta$  0.73, 0.79, 0.80, 0.82, 0.88, 0.91, 1.02 ve  $\delta$  3.30 da, t,  $J= 11.2\text{ Hz}$  bir tane tipik H-3 sinyal)'de olduğunu C-3'deki bir  $\beta$ -OH bağı varlığına uygun olarak göstermiştir. Diğer bir tipik sinyal ise  $\delta$  1.12 (d,  $J= 4.14\text{ Hz}$ ) deki ramnoz sinyalidir. Bunun haricindeki bulgular  $\delta$  5.15'deki olefinik ve  $\delta$  1.81'deki bir asetilenik protonudur. Bu veriler ayrıca C-28 de asetil grubuna sahip bir oleanen varlığını göstermiştir.  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumunda,  $\delta$ 124.10 ve 145.52'deki sinyaller C-12 ve C-13 aittir ve  $\Delta^{12}$  oleanene iskeletinin varlığını doğrulamıştır (Tori, et al., 1974, 1977; Seo, et al., 1978).

$\delta$  170.74'deki sinyaller C-28'deki asetil grubunun varlığını akla getirdi. C-3 ve C-28'deki alkolik fonksiyonun glikozidlendiği ve türevlendiği ilgili karbonların daha aşağı alanlara kaymasıyla doğrulanmıştır Tommasi, et al., 1998). Bileşik 1'in tüm proton ve karbon tayinleri APT, COSY ve HMQC spektrumları tarafından da doğrulanmıştır.

1'in şeker kısmı [ $\delta$  4.38, d,  $J = 7.8\text{ Hz}$  ( $\beta$ -glikozidik);  $\delta$  4.87 (çözücü sinyali altında);  $\delta$  5.05, geniş singlet ( $\alpha$ -glikozidik)]'de üç anomerik protona sahiptir. Diğer şeker sinyalleri  $\delta$  4.20 ve 3.30 arasındaki bölgede üst üste çakışmıştır.  $\delta$  105.39, 103.05 ve 102.66'daki sırasıyla glikoz, ramnoz ve glikoza ait anomerik karbon sinyalleri yukarıda bahsedilen spektroskopik yöntemlerle doğrulanmıştır. Şeker kısımları ayrıca ko-kromatografi ve GC-Mass teknikleriyle de desteklenmiştir. Bunlara ek olarak, ramnozun  $\text{CH}_3$  piki  $\delta$  18.66'da gözlenmiştir.

Tüm elde edilen kanıtların ışığında, bileşik 1'in  $3\beta$ -O-( $\beta$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$  4)- $\beta$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$  4)-rhamnopyranosyl) – 28- acetyloxy-  $\Delta^{12}$ -oleanene olduğu bulunmuştur.

**Tablo 3:** Bileşik 1'in CD<sub>3</sub>OD içinde <sup>1</sup>H NMR (<sup>1</sup>H ve COSY) ve <sup>13</sup>C NMR (Decoupled, APT ve HMQC ) verileri

<sup>1</sup> H NMR		<sup>13</sup> C-NMR	
δ (ppm)	H	Δ (ppm)	C
5.15	$\begin{array}{c}   \\ -\underline{\text{C}}=\underline{\text{CH}}- \end{array}$	170.74	– <u>C</u> =O
		145.52	= <u>C</u> – (C-13)
5.05	Anomerik H (α-Glikozidik, bs)	124.10	= <u>CH</u> – (C-12)
		105.39	Anomerik C-1'
4.87	Anomerik H (Under solvent)	103.05	Anomerik C-1'''
		102.66	Anomerik C-1''
4.38	Anomerik H (β-Glikozidik, J=7.8 Hz.)	92.75	C-3
		79.90	C-4'
4.2 – 3.3	$\begin{array}{c}   \\ -\underline{\text{CH}}_2-\text{O} \text{ ve } -\underline{\text{CH}}-\text{O} \\ \text{(Aglikon ve Şeker)} \end{array}$	78.50	C-4''
		78.31	C-3''
		77.60	C-3'
3.1 – 1.13	$\begin{array}{c}   \\ -\underline{\text{CH}}- \text{ ve } -\underline{\text{CH}}_2- \\ \text{(Aglikon)} \end{array}$	77.35	C-5''
		76.70	C-5'
		74.66	C-2'
1.80	1 x <u>CH</u> <sub>3</sub> (Acetyl)	74.60	C-4'''
		73.90	C-2''
1.12	1 x <u>CH</u> <sub>3</sub> (d, J=4.14 Hz) (Rhamnose)	72.90	C-3'''
		72.58	C-2'''
		71.98	C-5'''
1.02 – 0.60	7 x – <u>CH</u> <sub>3</sub> (Aglikon)	69.70	C-28
		62.62	C-6' ve C-6''
		57.50	C-5 (-)

**Tablo 3 (Devamı):** Bileşik 1'in CD<sub>3</sub>OD içinde <sup>1</sup>H NMR (<sup>1</sup>H ve COSY) ve <sup>13</sup>C NMR (Decoupled, APT ve HMQC ) verileri

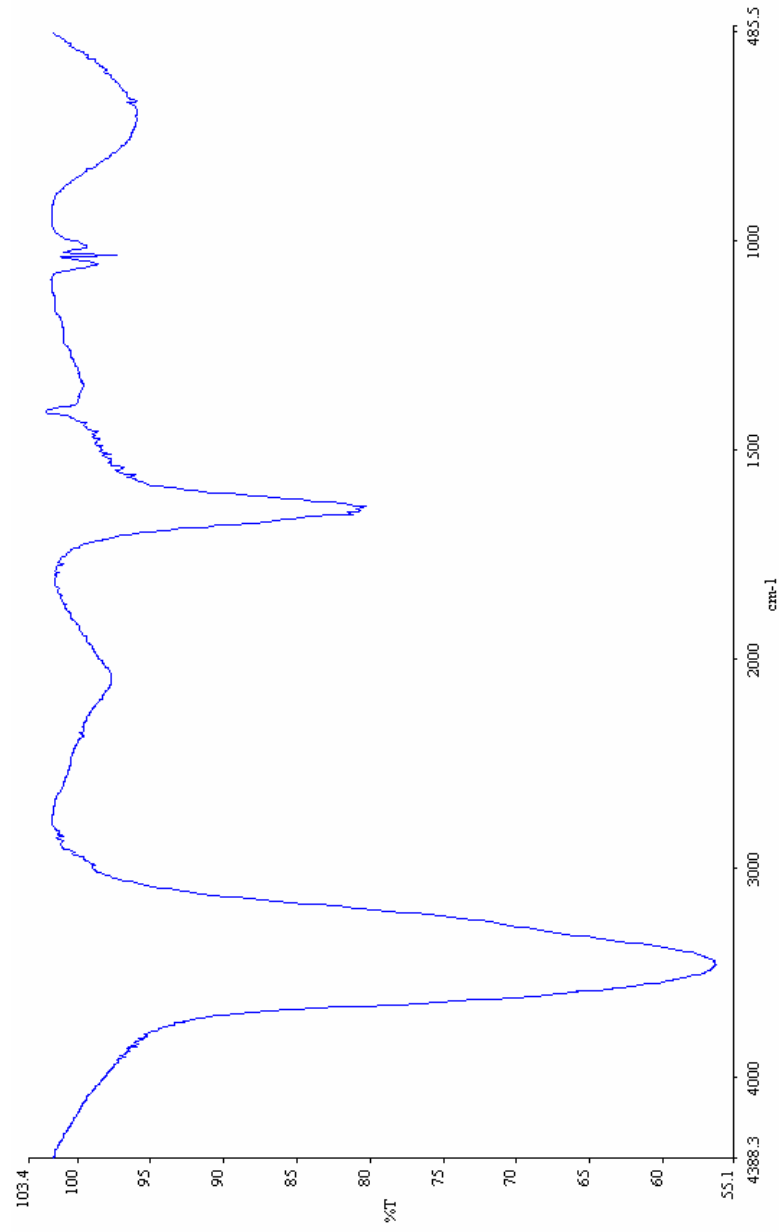
<sup>1</sup> H NMR		<sup>13</sup> C-NMR	
δ (ppm)	H	δ (ppm)	C
		50.30	C-9 (-)
		47.41	C-19 (+)
		47.20	C-18 (-)
		45.12	C-14 (+)
		43.75	C-8 (+)
		42.25	C-4 (+)
		41.15	C-1 (+)
		40.90	C-10 (+)
		40.10	C-17 (+)
		38.98	C-21 (+)
		37.88	C-30 (-)
		33.45	C-7 (+)
		31.75	C-22 (+)
		31.12	C-20 (+)
		31.10	C-23 (-)
		30.85	C-2 (+)
		29.45	C-27 (-)
		27.26	C-15 (+)
		24.11	C-11 (+)
		23.83	C-29 (+)
		20.78	C-16 (+)



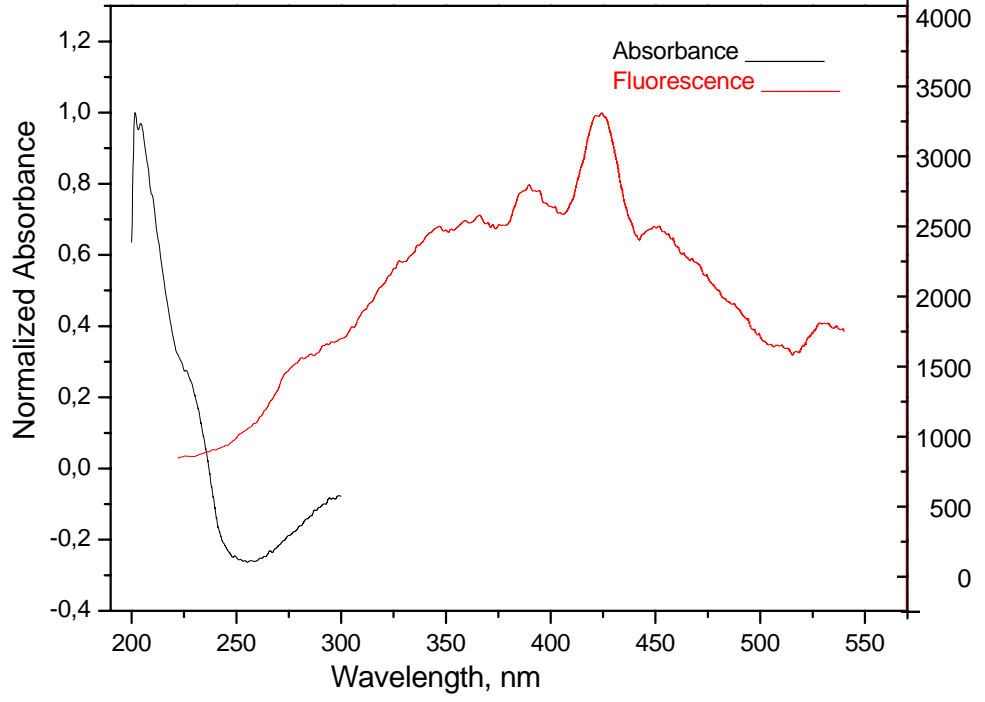
**Tablo 3 (Devamı):** Bileşik 1'in CD<sub>3</sub>OD içinde <sup>1</sup>H NMR (<sup>1</sup>H ve COSY) ve <sup>13</sup>C NMR (Decoupled, APT ve HMQC ) verileri

<sup>1</sup> H NMR		<sup>13</sup> C-NMR	
δ (ppm)	H	δ (ppm)	C
		19.90	O=C-CH <sub>3</sub> (-)
		18.66	C-6'''
		17.93	C-6(+)
		16.84	C-24 (-)
		14.80	C-26 (-)
		13.90	C-25 (-)

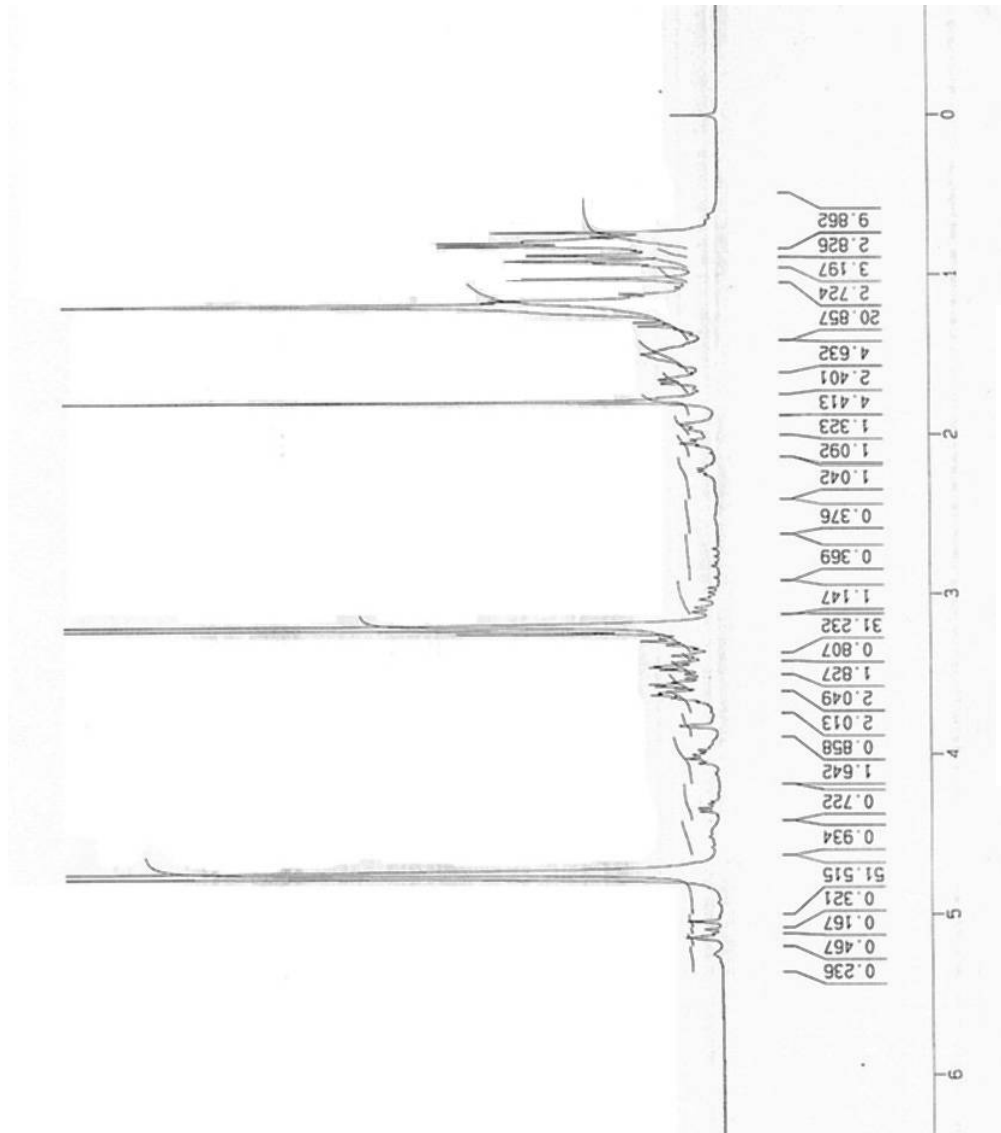
3 $\beta$ -O-( $\beta$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4)-thamnopyransyl) – 28-acetyloxy- $\Delta$ <sup>12</sup>-oleanene



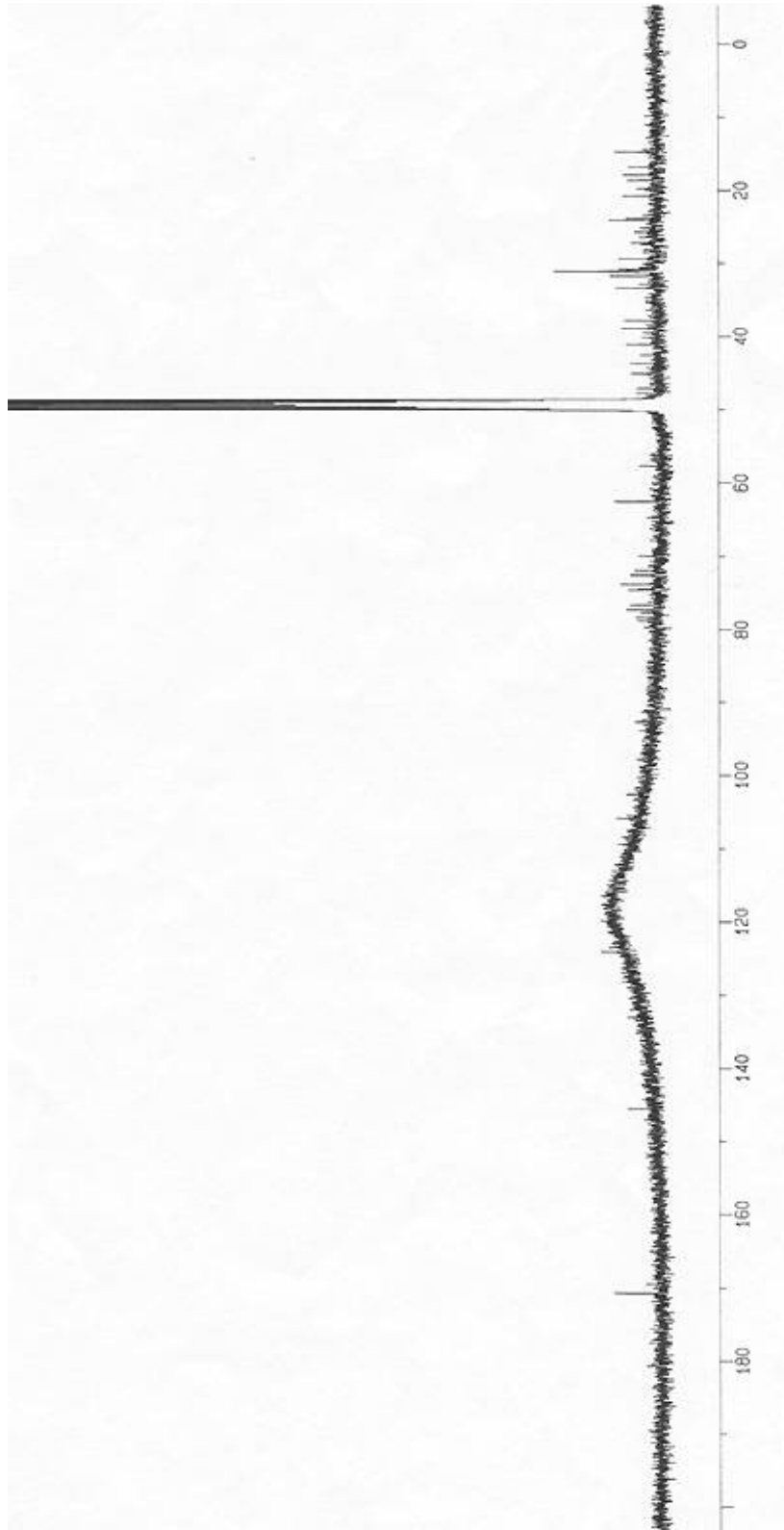
Bileşik 1'in IR Spektrumu



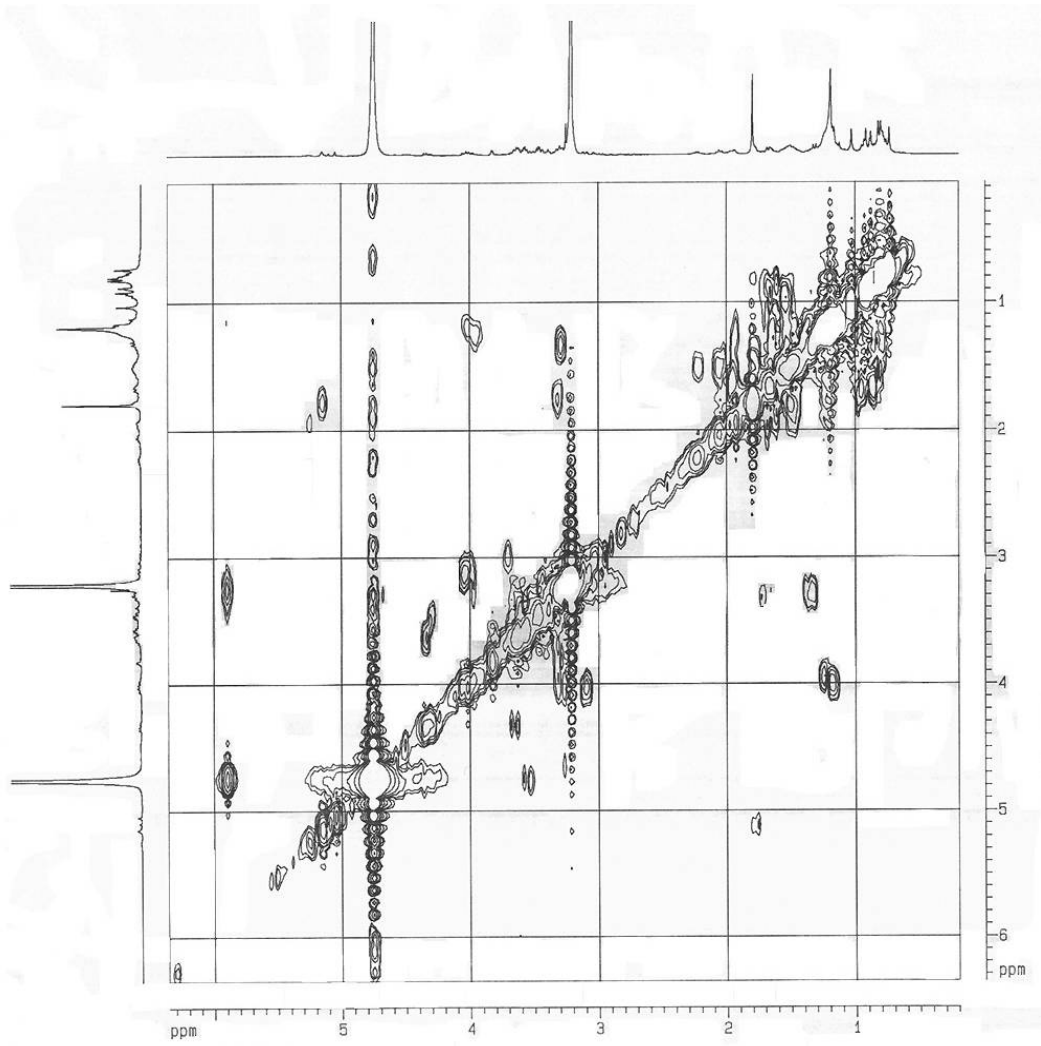
Bileşik 1'in UV ve Floresans spektrumu



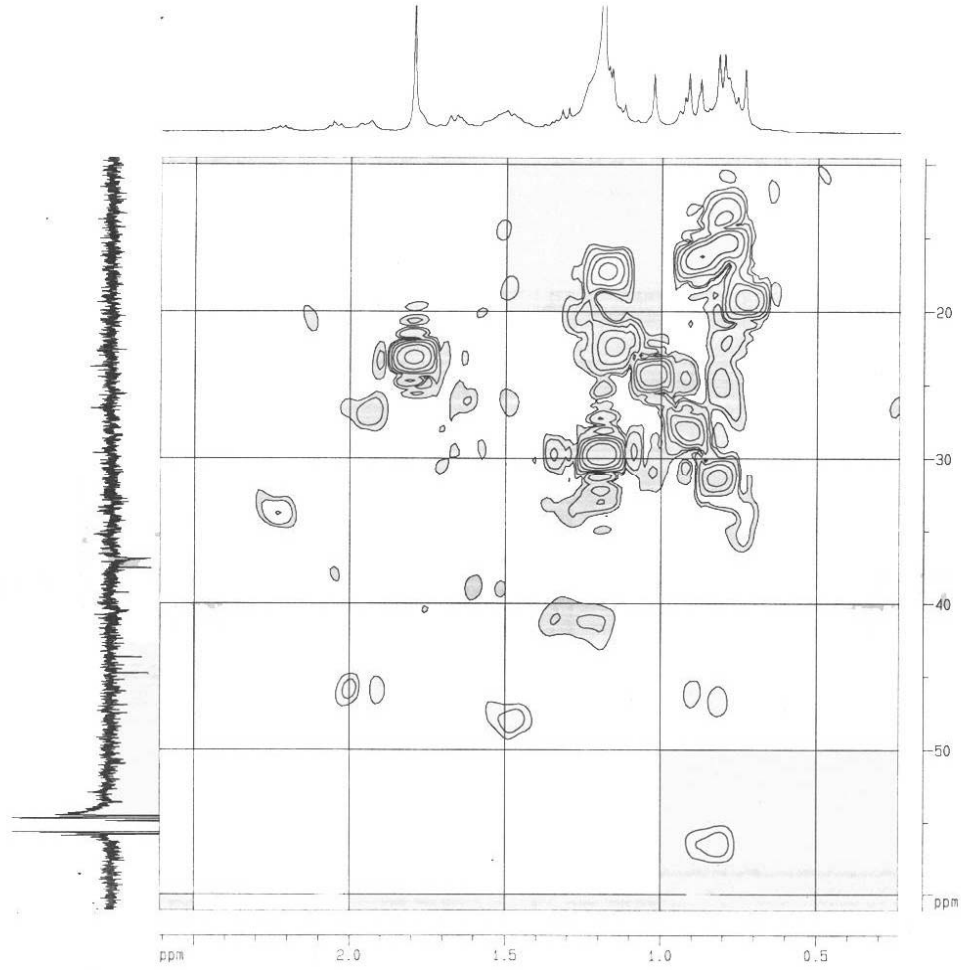
Bileşik 1'in  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu



Bileşik **1**'in  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu

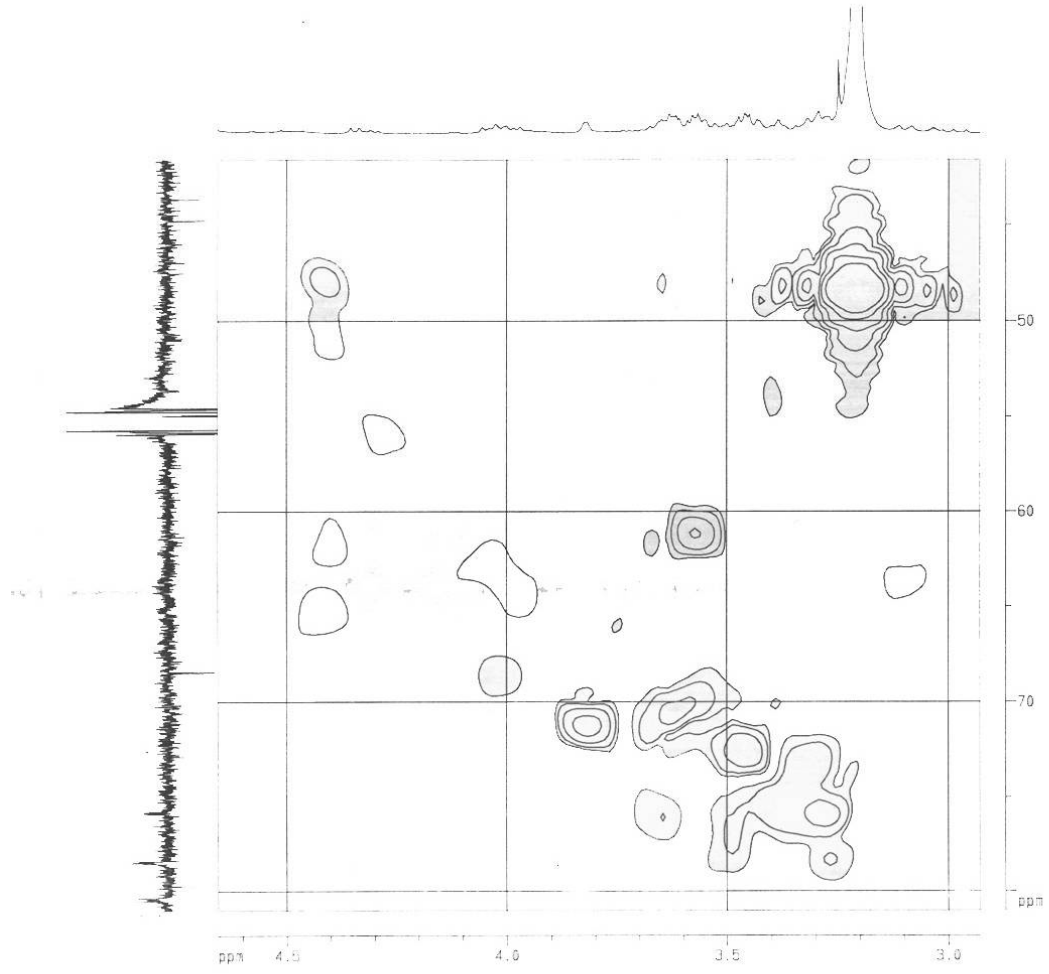


Bileşik 1'in COSY spektrumu

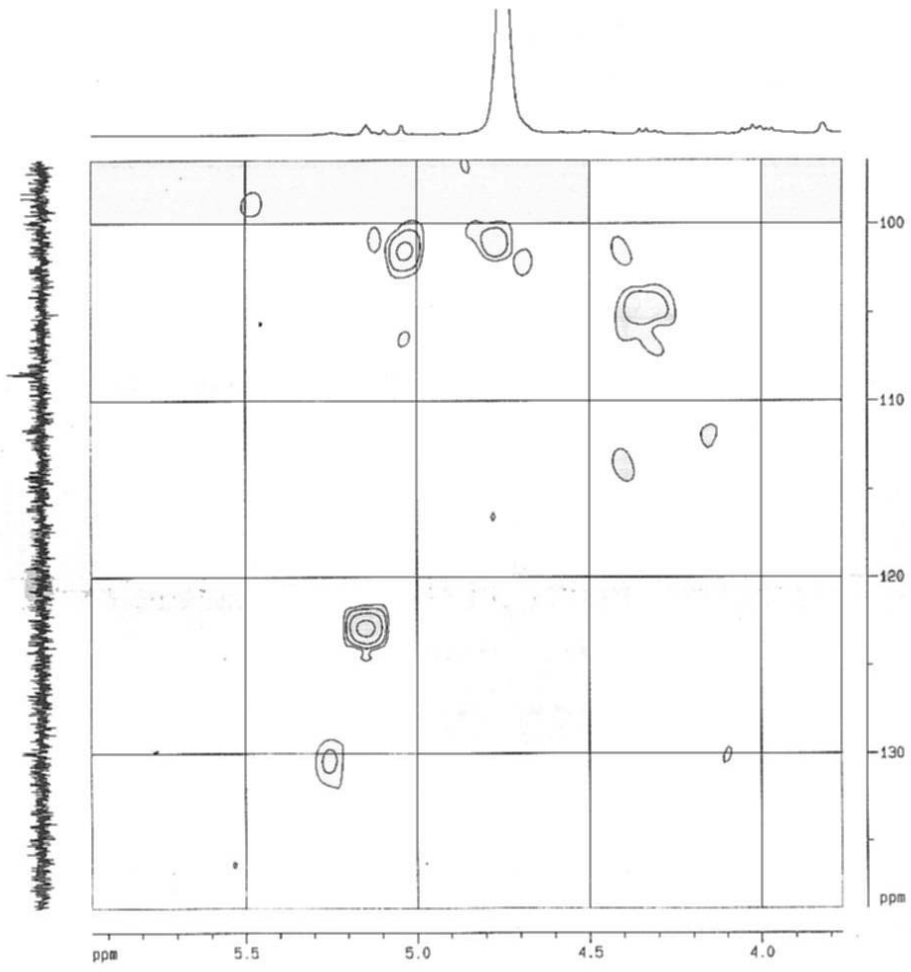


Bileşik 1'in HMQC spektrumu -a





Bileşik 1'in HMQC spektrumu -b



Bileşik 1'in HMQC spektrumu -c

### 3.2. Bileşik 2

Bileşik 2 sarı bir toz olarak elde edildi. 2'nin  $m/z$  633.33 kütlesi (+ polarity mode)'u,  $C_{27}H_{30}O_{16}$  molekül formülüne uygun olarak  $m/z$  611.1, 465.3, ve 303.3'de psodömoleküler iyon pikleri olduğunu göstermiştir. İyon parçaları ramnoz ve galaktoz kayıplarını göstermektedir. IR spektrumunda  $1736\text{ cm}^{-1}$ 'deki pik doymuş bir açıl grubunun varlığını düşündürmektedir. Spesifik OH, CH, ve -C-O- pikleri sırasıyla 3430, 2930 ve  $1364\text{-}1008\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenmiştir. Aromatik *o*- ve *m*- sübtütie sinyallerin  $909$  ve  $831\text{ cm}^{-1}$  arasında olduğu saptanmıştır. UV spektrumu  $258$  ve  $357\text{ nm}$ 'de iki spesifik maksimum soğurmaya sahiptir.  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu A halkasında H-6 [ $\delta$  6.19 (1 H, d,  $J=2.0\text{ Hz}$ )] ile meta bağlı H-8 [ $\delta$  6.38 (1 H, d,  $J=2.0\text{ Hz}$ )]'e ait ve H-2<sup>l</sup> [ $\delta$  7.66 (1H, d,  $J=2.0\text{ Hz}$ )] ile meta, H-5<sup>l</sup> [ $\delta$  6.87 (1H, d,  $J=8.8\text{ Hz}$ )] ile orto bağlı H-6<sup>l</sup> [ $\delta$  7.62 (1H, dd,  $J=8.8, 2.0\text{ Hz}$ )]'e ait 4 aromatik dublete sahiptir. Bu spektral veriler ve COSY bileşik 2'nin temel aglikon iskeletinin bir quersetin olduğunu göstermiştir.  $\delta$  4.51 (1H, d,  $J=1.6\text{ Hz}$ ) ve  $\delta$  5.09 (1H, d,  $J=7.4\text{ Hz}$ )'deki iki anomerik protonun sırasıyla  $\alpha$ -ramnopiranozil ve  $\beta$ - galaktopiranozil birimlerine ait olduğu saptanmıştır. Bileşik 2'ye ait  $^{13}\text{C NMR}$  verileri quersetin verileri ile karşılaştırıldığında, 7-OH'in glikozilasyonu ile C-7'nin yukarı alana kayması gözlenir (Corea, et al, 2003).  $\delta$  103.57 ve 101.23 anomerik karbon değerleri HMQC korelasyonlarıyla uyumlu olarak sırasıyla  $\beta$ -D-Galaktopiranoz ve  $\alpha$ -L-ramnopiranoz'a tekabül etmektedir. Dokuz quaterner karbon atomu  $\delta$  165.09, 161.78, 158.12, 157.33, 148.63, 144.66, 134.44, 121.92, ve 104.37'de yer alır. Karbonil karbonu  $178.19\text{ ppm}$ 'de rezonans olur.  $16.70\text{ ppm}$ 'deki sinyal ramnoz metiline aittir. Kalanlar ise şeker karbonlarını gösterir.

COSY spektrumunda, A halkası üzerindeki H-6 ve H-8; H-5<sup>l</sup> ve H-6<sup>l</sup>; H-6<sup>l</sup> ve H-2<sup>l</sup> arasında korelasyon vardır. HMQC spektrumunda, B halkası üzerinde C-2<sup>l</sup> ve H-2<sup>l</sup>; C-5<sup>l</sup> ve H-5<sup>l</sup>; C-6<sup>l</sup> ve H-6<sup>l</sup> spesifik korelasyonları saptandı. Ramnoz'un anomerik karbonu (C-1<sup>l</sup>),  $\delta$  4.51'deki H-1<sup>l</sup> ile korelasyon göstermektedir.  $\delta$  103,57'deki C-1<sup>l</sup> (galaktoz),  $\delta$  5.09'deki H-1<sup>l</sup> ile korelasyon göstermektedir. Ramnoz'un CH<sub>3</sub> karbonu ( $\delta$  16.70) da  $\delta$  1.11'deki H-6<sup>l</sup> ile spesifik bir korelasyon verir.

COSY ve HMQC verileri Tablo 4 te verilen belirlenmiş değerlere ait proton-proton ve karbon-proton korelasyonlarını desteklemiştir. Tüm bu veriler ışığında, Bileşik 2'nin "quercetin-7-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-galactopyranoside]" olduğu bulunmuştur.

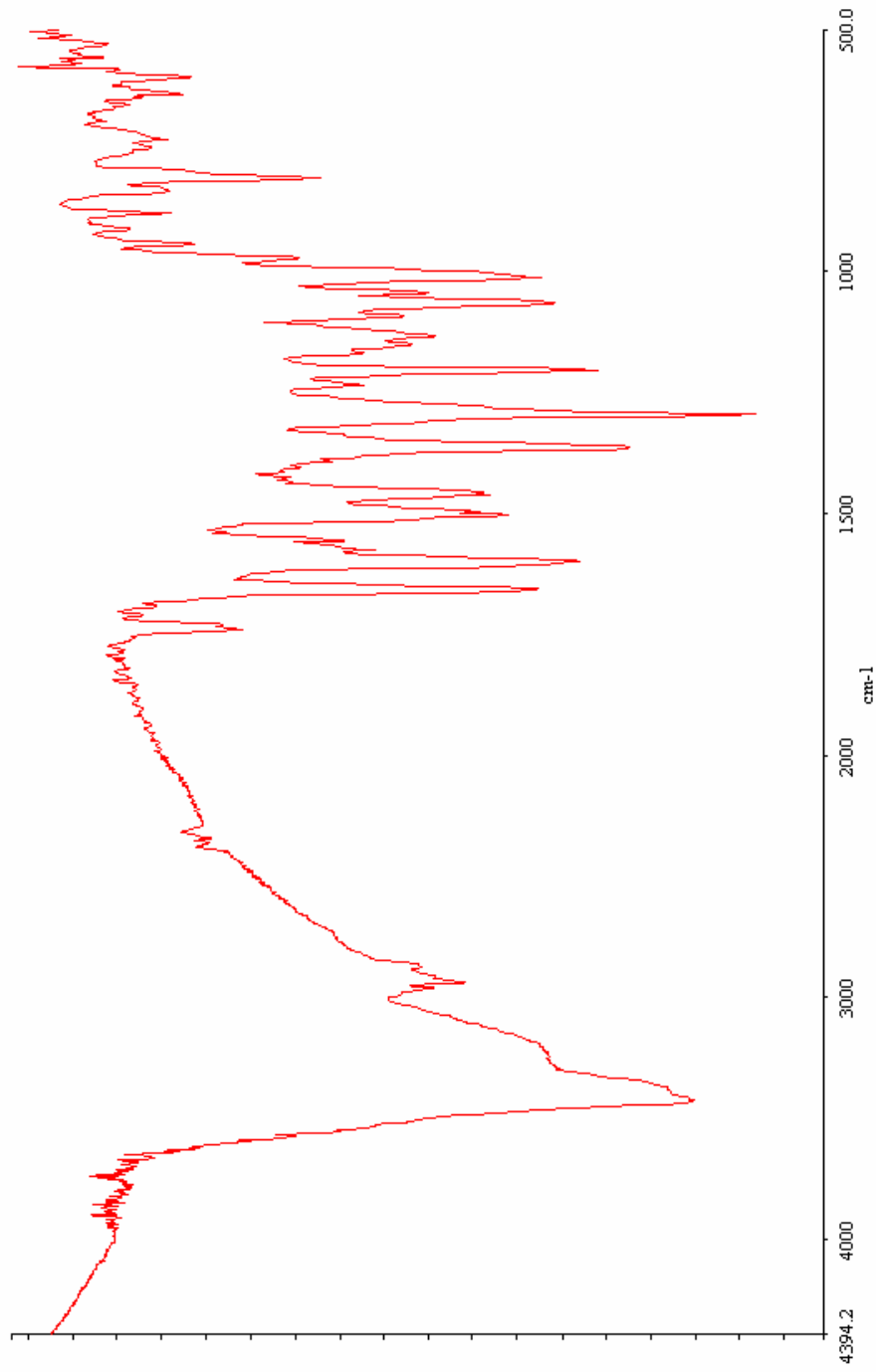
**Table 4:** Bileşik 2'nin CD<sub>3</sub>OD içinde <sup>1</sup>H NMR (<sup>1</sup>H ve COSY) ve <sup>13</sup>C NMR (Decoupled, APT ve HMQC ) verileri

<sup>1</sup> H NMR		<sup>13</sup> C-NMR	
δ (ppm)	H	δ (ppm)	C
7.66	H-2' (1H, d, <i>J</i> = 2.0 Hz )	178.19	C-4
		165.09	C-7
7.62	H-6' (1H, dd, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2.0 Hz)	161.78	C-5
		158.12	C-9
6.87	H-5' (1H, d, <i>J</i> = 8.8 Hz)	157.34	C-2
		148.63	C-4'
6.38	H-8 (1H, d, <i>J</i> = 2.0 Hz)	144.66	C-3'
		134.44	C-3
6.19	H-6 (1H, d, <i>J</i> = 2.0 Hz)	122.37	C-6'
		121.93	C-1'
5.09	H-1'' (β-Anomerik H, <i>J</i> = 7.4 Hz)	116.50	C-2'
		114.87	C-5'
4.51	H-1''' (α-Anomerik H, <i>J</i> = 1.6 Hz)	104.37	C-10
		103.57	C-1''
3.40	H-6'' (2H, m, -CH <sub>2</sub> O-) (Şeker)	101.23	C-1'''
		98.85	C-6
3.70–3.20	(8H, m, -CH-O-) (Şeker)	93.74	C-8
		77.01	C-3''
1.11	H-6''' (3H, d, <i>J</i> = 6.4 Hz)	76.03	C-5''
		74.54	C-2''

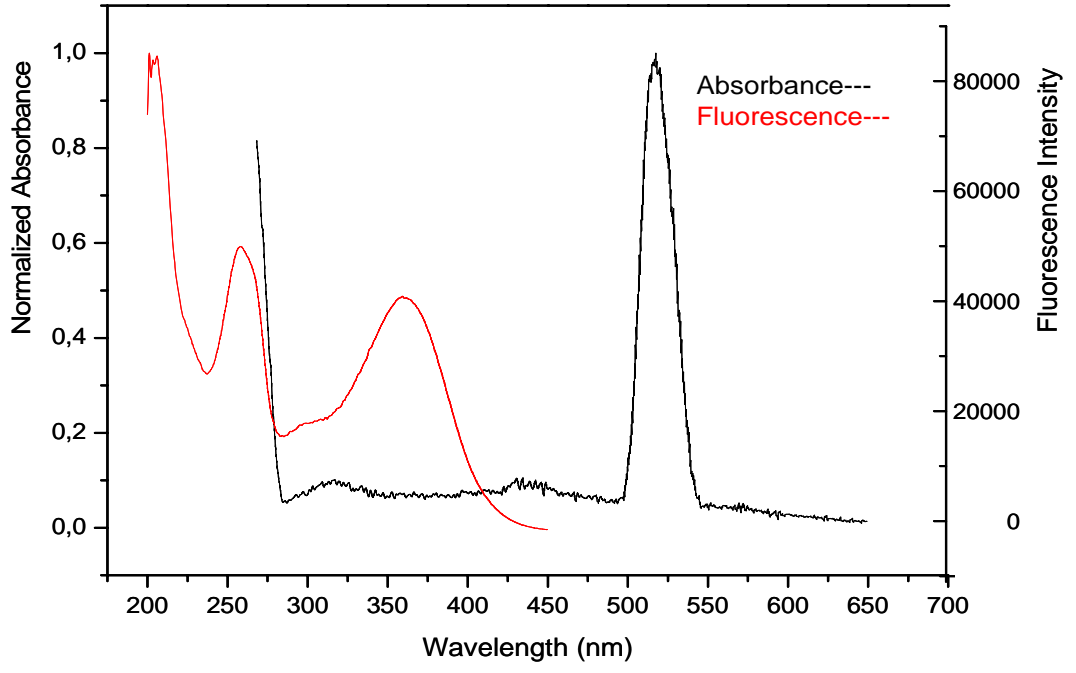
**Table 4(Devamı):** Bileşik 2'nin CD<sub>3</sub>OD içinde <sup>1</sup>H NMR (<sup>1</sup>H ve COSY) ve <sup>13</sup>C NMR (Decoupled, APT ve HMQC ) verileri

<sup>1</sup> H NMR		<sup>13</sup> C-NMR	
$\delta$ (ppm)	H	$\delta$ (ppm)	C
		72.75	C-4'''
		71.05	C-2'''
		70.91	C-3'''
		70.20	C-4''
		68.53	C-5'''
		67.37	C-6''
		16.70	C-6'''

Quercetin-7-O- $[\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-galactopyranoside]

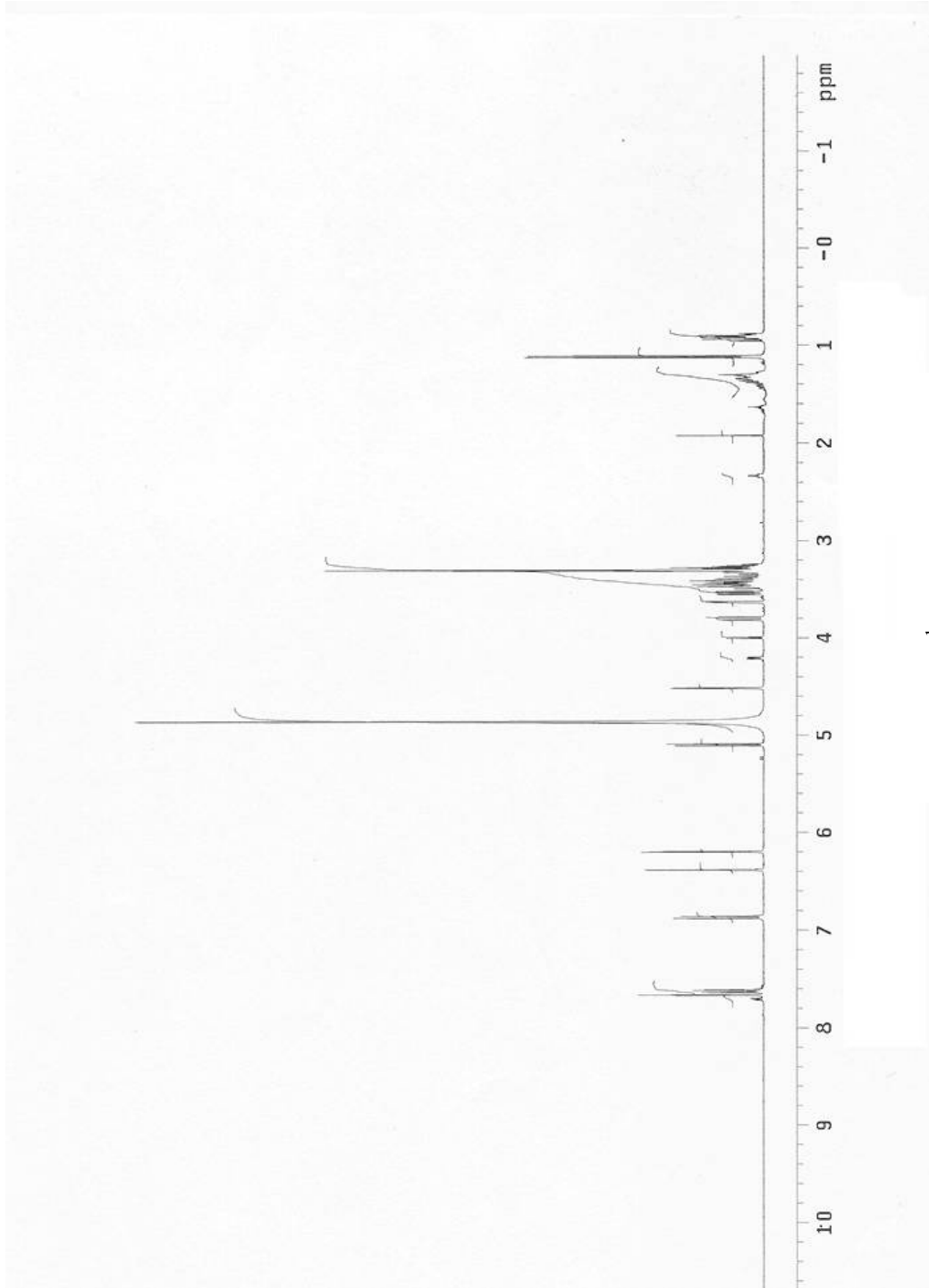


Bileşik 2'nin IR spektrumu

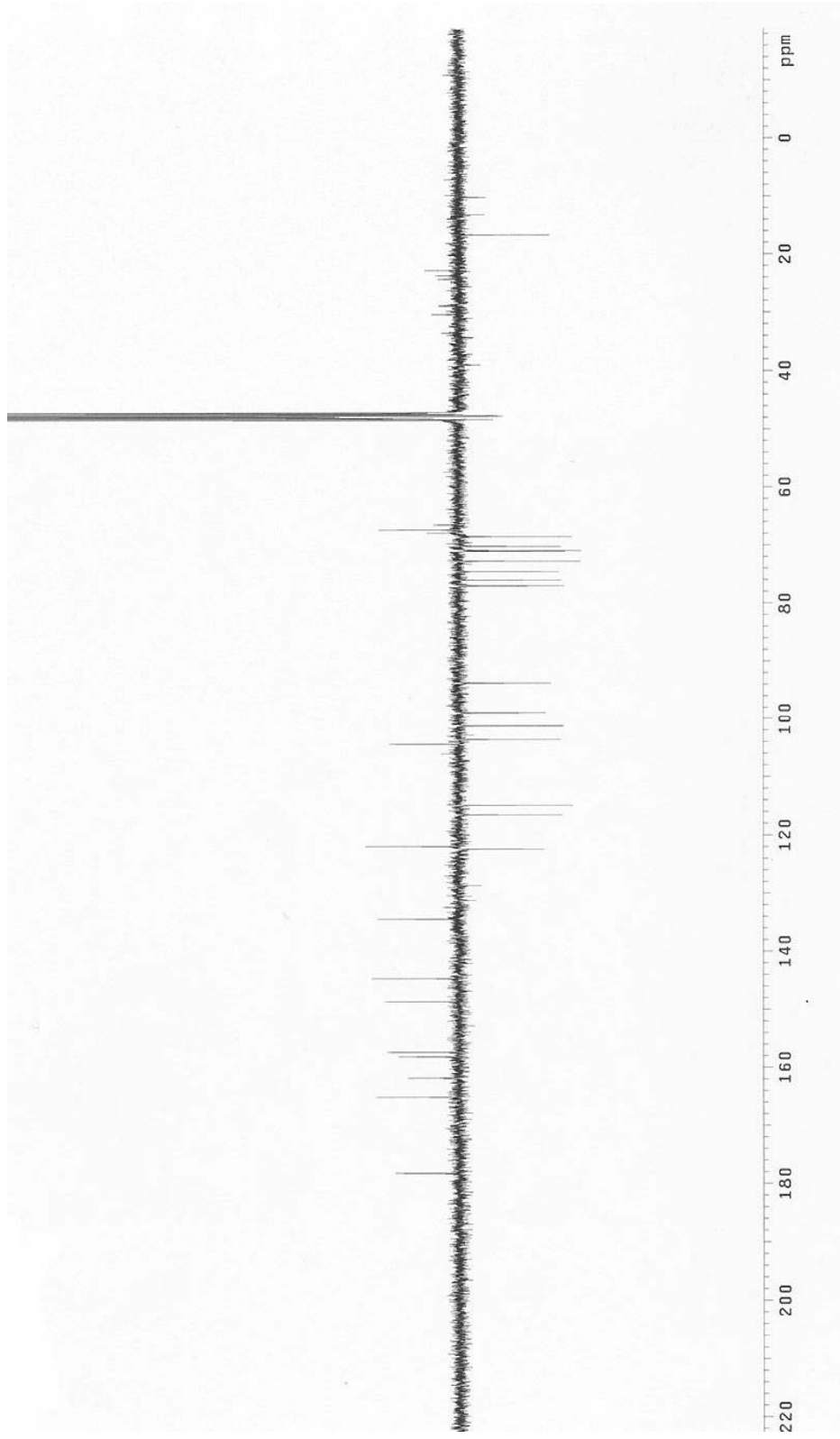


Bileşik 2'nin UV ve Floresans spektrumu

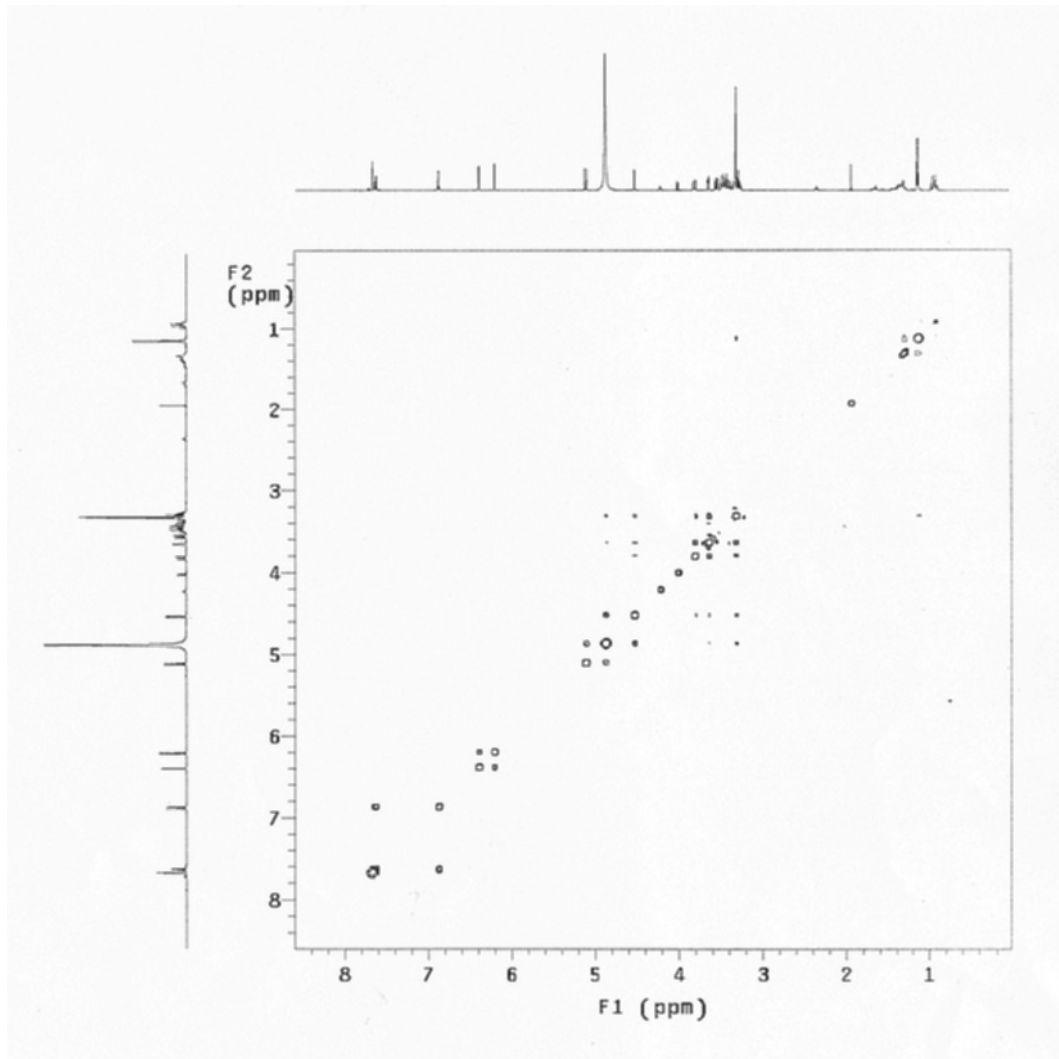




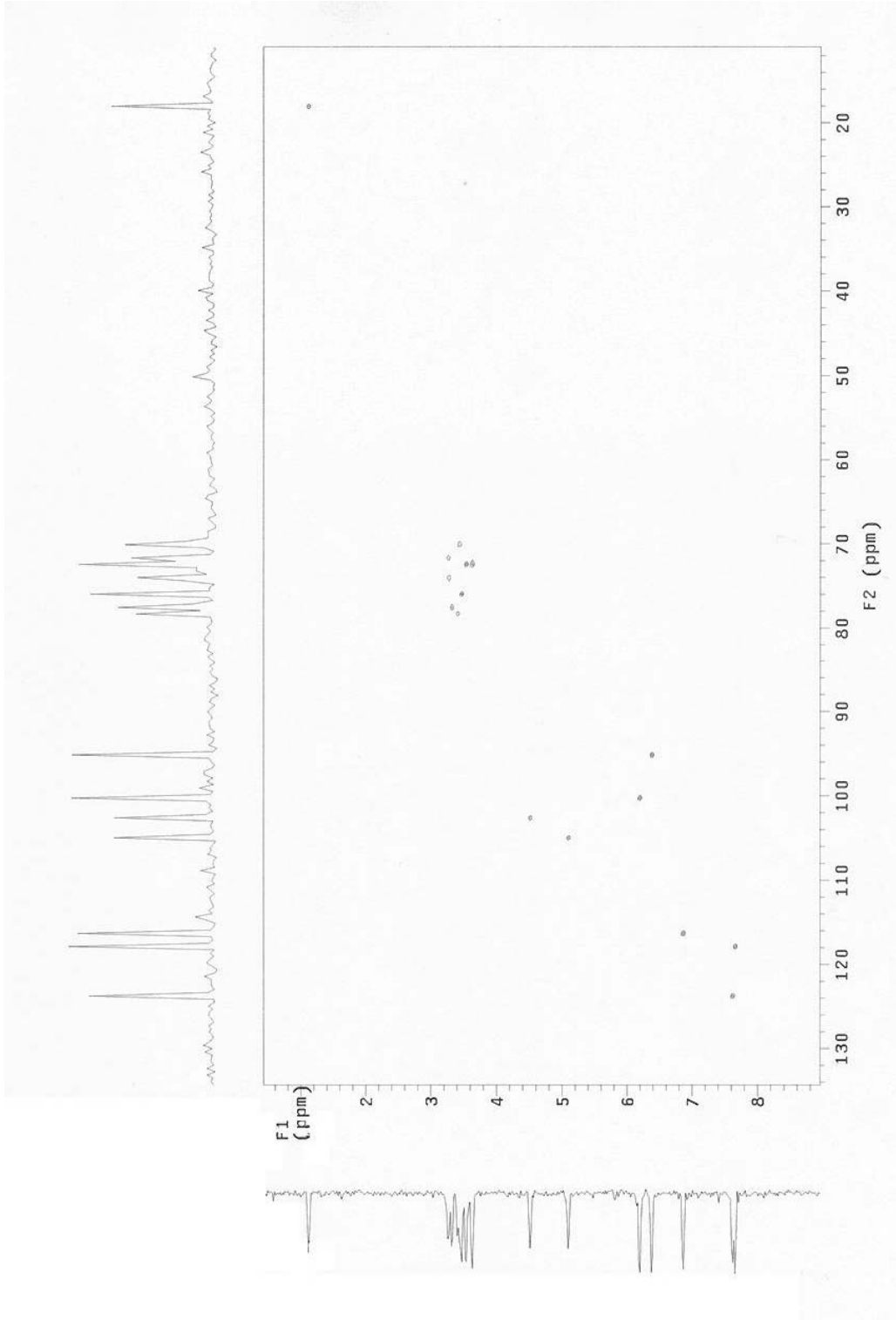
Bileşik 2'nin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu



Bileşik 2'nin APT spektrumu



Bileşik 2'nin COSY spektrumu



Bileşik 2'nin HMQC spektrumu

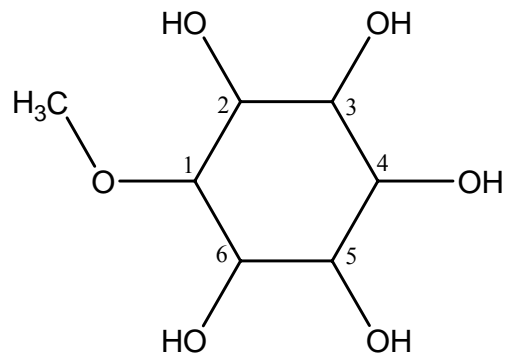
### 3.3. Bileşik 3

Bileşik 3 sarı bir toz olarak izole edildi. IR spektrumu hidroksil gruplarından dolayı küçük bir soğurma bandı vermiştir.  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$ -NMR verilerinde, bir hemiasetal pentahidroksi siklohegzan halkası olduğu ortaya çıkmıştır.  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$ -NMR verilerinden, molekülün metilinositol olduğu ve  $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_6$  molekül formülüne sahip olduğu bulundu.

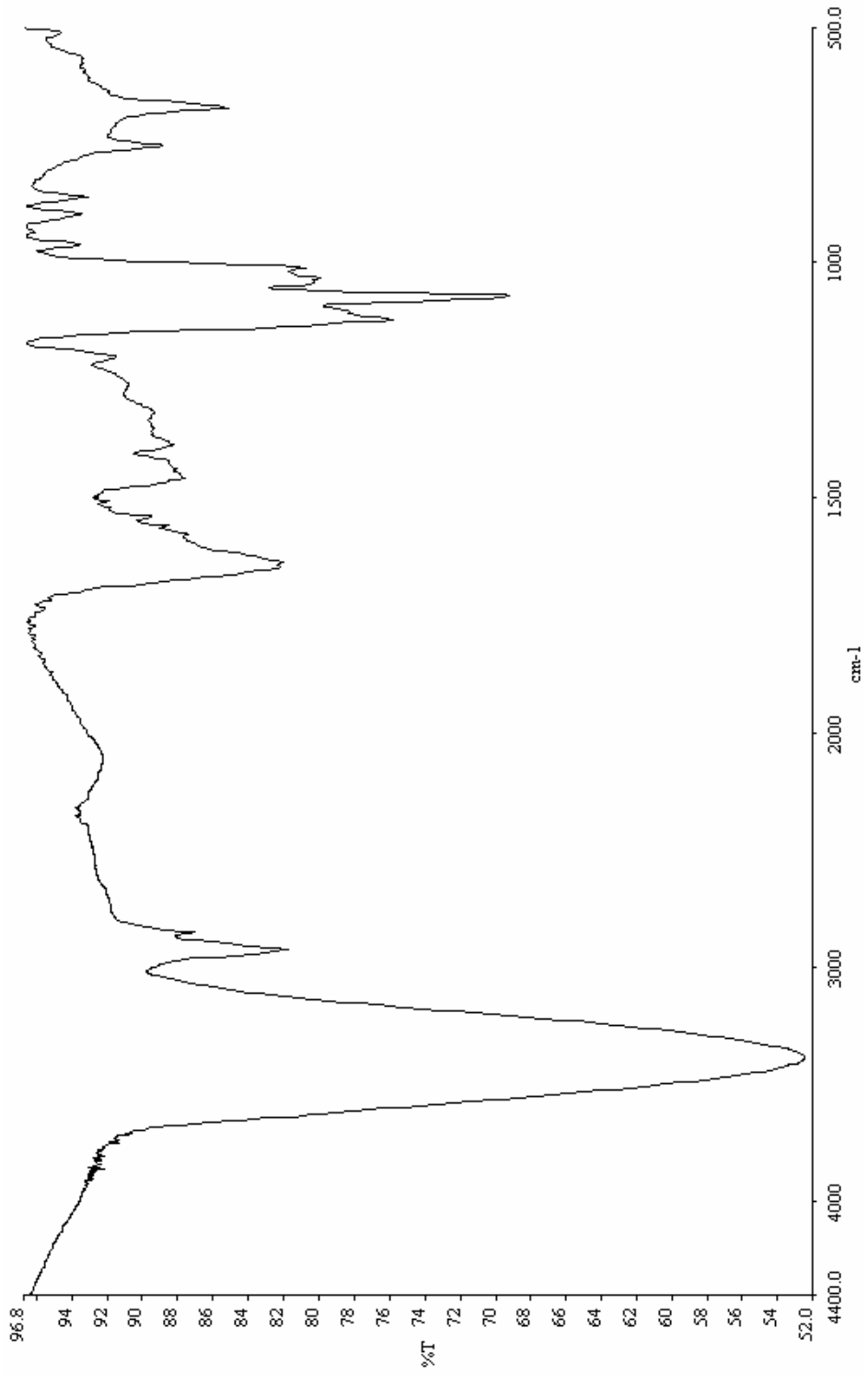
Inositolün kullanımı yağların yakılmasından, kandaki kolesterolün düşürülmesinden ve hatta saç incelmesini önlemesinden sinirsel bozuklukların tedavisine kadar yayılım gösterir.

**Table 5:** Bileşik 3'ün  $\text{CD}_3\text{OD}$  içinde  $^1\text{H}$  NMR ( $^1\text{H}$  ve COSY) ve  $^{13}\text{C}$  NMR (Decoupled ve DEPT) verileri

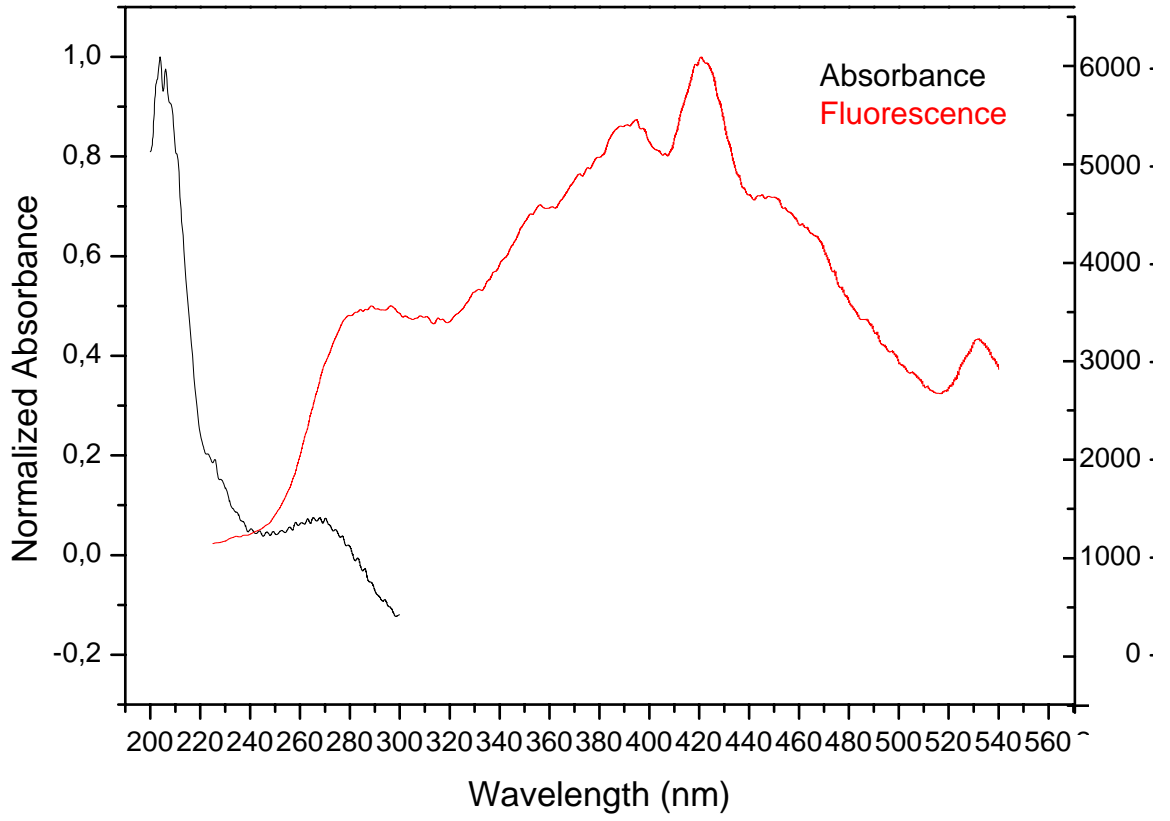
$^1\text{H}$ NMR		$^{13}\text{C}$ -NMR	
$\delta$ (ppm)	H	$\delta$ (ppm)	C
3.88	(5H, s, -OH)	83.74	C-1
3.75-3.68	H-2, H-6 (2H, m, CH-O)	73.10	C-5
		72.59	C-3
3.60	(3H, s, -OCH <sub>3</sub> )	72.29	C-4
3.58	H-3, H-4, H-5 (3H, t, CH-O)	71.37	C-2
		70.85	C-6
3.24	H-1, (1H, t, CH-O)	59.63	C-7



Metilinositol

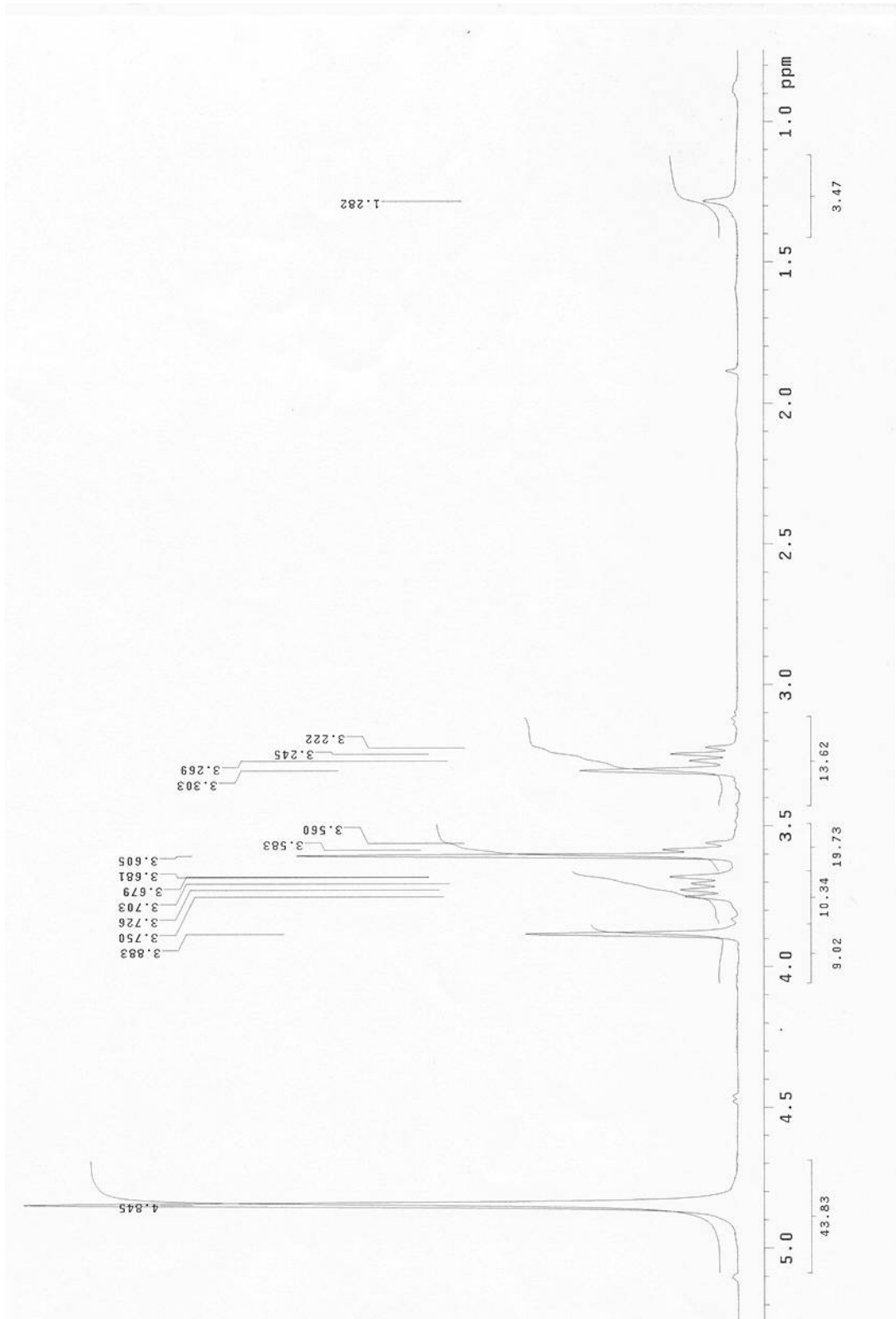


Bileşik 3'ün IR spektrumu

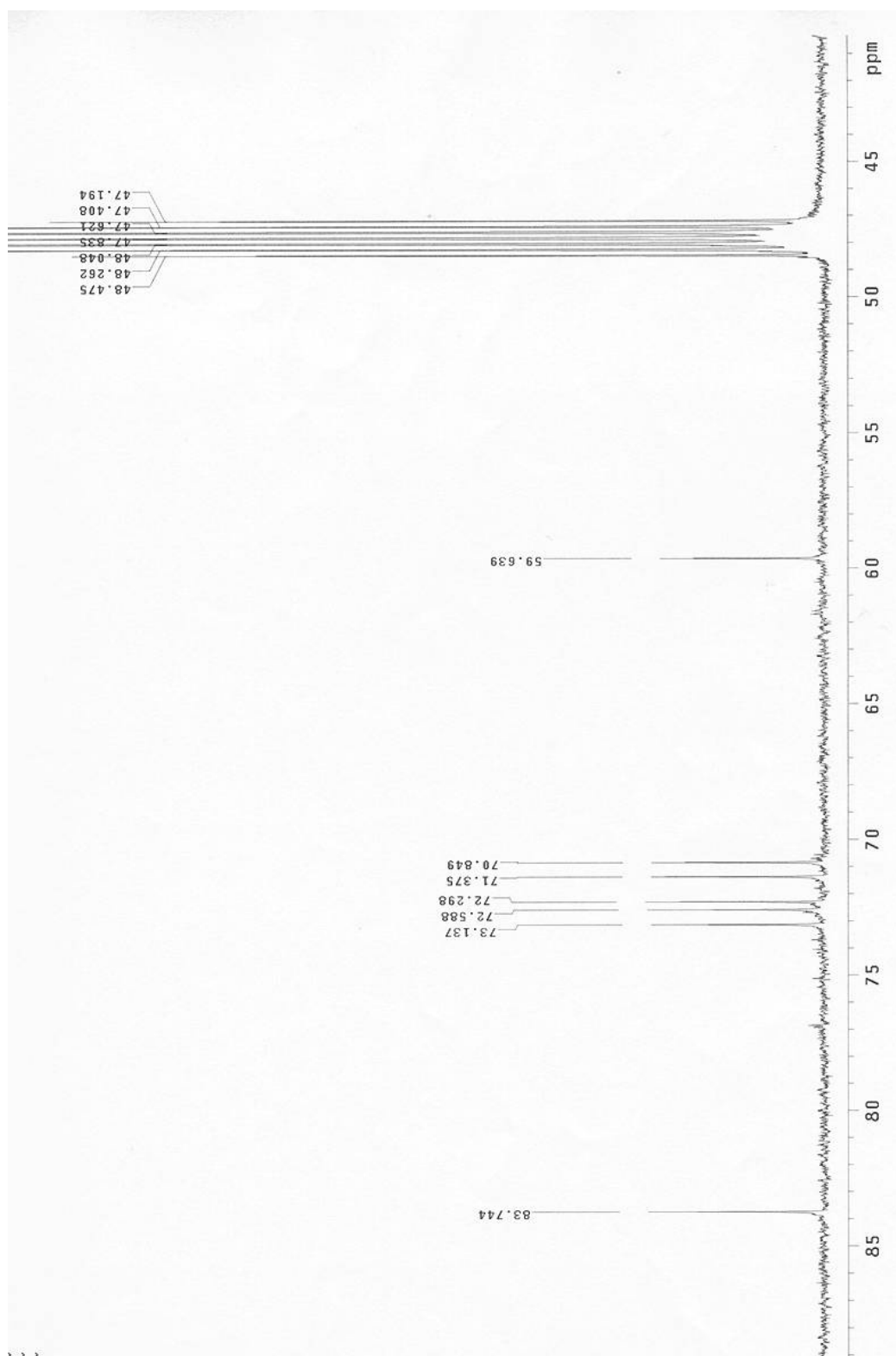


Bileşik 3'ün UV ve Floresans spektrumu

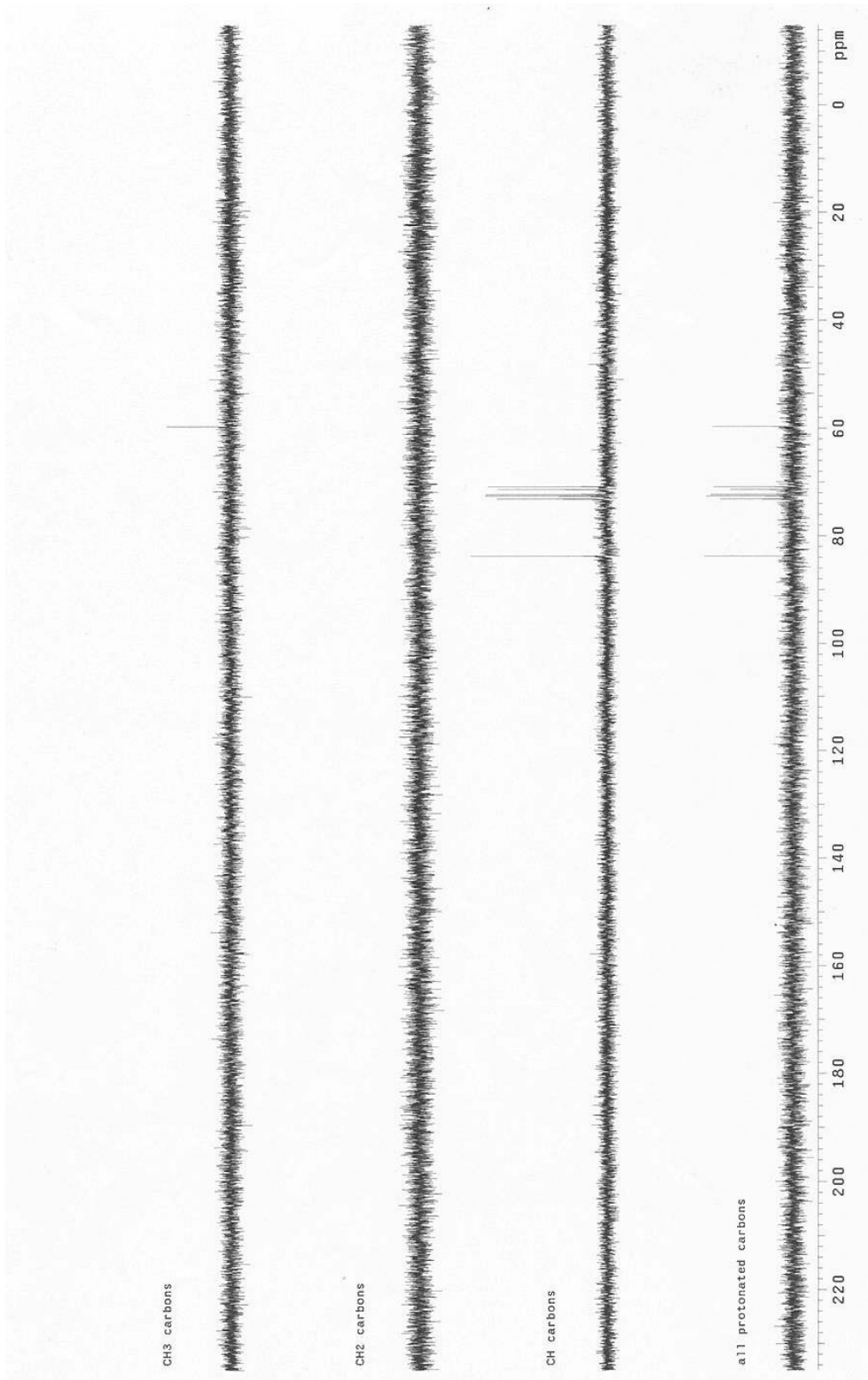




Bileşik 3'ün <sup>1</sup>H-NMR spektrumu



Bileşik 3'ün  $^{13}\text{C-NMR}$  spektrumu



Bileşik 3'ün DEPT spektrumu

### 3.4. Bileşik 4

Bileşik 4 şekilsiz sarı bir toz olarak elde edildi. Pozitif polarite API-ES kütle spektrumu  $m/z$  814.5, 621.1, 475.4, 314.3'de molekülün  $C_{38}H_{42}O_{18}$  moleküler formülüne sahip olduğunu belirten psodömoleküler iyonlar  $[M^+ + H]$  olduğunu gösterdi. Bileşik 4'ün UV spektrumu 259 ve 365 nm'de maksimum pik vermiştir. IR spektrumu  $1654\text{ cm}^{-1}$ 'de spesifik karbonil pikine sahiptir. Diğer spesifik sinyaller  $3357\text{ cm}^{-1}$  (-OH),  $2926\text{ cm}^{-1}$  (-C-H),  $1205\text{-}1059\text{ cm}^{-1}$  (-C-O-C),  $839\text{-}810\text{ cm}^{-1}$  (*o*- ve *m*- subst.)'de gözlenmiştir.

İlk aglikonun proton NMR spektrumu, H-8 [ $\delta$  6.34, (1H, d,  $J= 2.0\text{ Hz}$ )]'de ve H-6 [ $\delta$  6.16, (1H, d,  $J= 2.0\text{ Hz}$ )]'de A halkası üzerinde birbiriyle meta etkileşmiş bir çift aromatik protonun varlığını göstermektedir. Dimetoksi morin'in B halkasında, H-5' [ $\delta$  7.58 (1H, dd,  $J= 8.8; 2.0\text{ Hz}$ )]'deki proton H-3' [ $\delta$  7.91 (1H, d,  $J= 2.0\text{ Hz}$ )] ile meta etkileşmiş ve H-6' [ $\delta$  6.87 (1H, d,  $J= 8.8\text{ Hz}$ )] ile orto etkileşmiştir. Metoksi protonları 3.33 ppm ve 3.92 ppm'de rezonans olurlar.

İkinci aglikonun  $^{13}\text{C}$ -NMR verileri  $\delta$  174.66'deki pikin şekere bağlı olan bir estere ait olduğunu göstermiştir. Aromatik 2 x Ar-H karbon sinyalleri  $\delta$  114.71'de üst üste çakışırken, diğer aromatik 2 x Ar-H karbonları da 131.05 ppm'de üst üste çakışır. Fenolik OH'ın *p* pozisyonundaki karbon 158.01 ppm'de sinyal verir. Karbonil karbonu ve aromatik halka arasındaki 4  $\text{CH}_2$  karbonu pikleri 38.80 ve 25.36 ppm arasında yer alır. 2x  $\text{OCH}_3$  karbonlarına ait pikler 55.41 ppm ve 48.55 ppm'de gözlenmiştir. İkinci aglikonun  $^1\text{H}$  NMR verileri,  $\delta$  8.30 ( $J=8\text{Hz}$ ) ve  $\delta$  6.87 ( $J=8\text{Hz}$ )'deki Ar-H protonlarının ikişer ikişer örtüşüklerini göstermiştir. *p*-sübstütie  $\text{CH}_2$  protonları 3.80 ve 1.00 ppm arasında sinyal verir. Yukarıdaki tüm veriler COSY ve HMQC ile doğrulanmıştır. HMBC korelasyonlarına göre, şeker kısımları morinin 3-O-pozisyonu ile ikinci aglikonun karbonili arasında yer almaktadır. HMBC ayrıca  $-\text{OCH}_3$  gruplarından birinin C-4' bağlı olduğunu ve diğer  $-\text{OCH}_3$ 'ün 2', 5 yada 7'ye mi bağlı olup olmadığı hakkında kesin bir korelasyon olmadığı hakkında bilgi vermektedir. Bu durumda  $\text{OCH}_3$  gruplarının bu karbonlar arasında değişken olabildiğini önerebiliriz. Anomerik karbonlar  $\delta$  101.14 (ramnoz) ve  $\delta$  103.24 (galaktoz)'de rezonans olurlar ve bu sinyaller sırasıyla HMQC'deki  $\delta$  4.52 (geniş singlet,  $\alpha$ -anomerik) ve  $\delta$  5.19 (d,  $J= 7.20\text{ Hz}$ ,  $\beta$ -anomerik) sinyalleri ile aralarında ilişki vardır. Ramnoz'un  $\text{CH}_3$  karbonu ( $\delta$  16.56)  $\delta$  1.10'daki H-6''' ile çok spesifik bir pik verir. Bu şekerlerle ilgili bulgular İTK ve GC-

Mass teknikleri ile desteklendi. HMQC'deki diğerkorelasyonlar A halkası üzerindeki C-8 ve H-8; C-6 ve H-6 arasında, B halkası üzerindeki C-3<sup>1</sup> ve H-3<sup>1</sup>; C-5<sup>1</sup> ve H-5<sup>1</sup>; C-6<sup>1</sup> ve H-6<sup>1</sup> arasında gözlemlendi. Spesifik COSY korelasyonlarının H-8 ve H-6; H-6<sup>1</sup> ve H-5<sup>1</sup>; H-5<sup>1</sup> ve H-3<sup>1</sup> arasında olduğu saptanmıştır.

Yukarıdaki tüm bulgulardan, Bileşik 4'ün disubstitie morin aglikonu ve 5-*p*-fenol pentanoil aglikonu arasında 1→4 bağı ramnogalaktoz olmak üzere 2 şeker sahip olduğu açıktır. Biyogenetik olarak bu bileşiklerin C-7 karbonunda bir sübsitient grup taşıdığı bilinmektedir. Tüm bu bilgilere dayanarak, Bileşik 4'ün Morin-3-*O*-[4-[5-(4-hydroxyphenyl) pentanoyl]- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1→6)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-7-4'-di-*O*-methyleter olduğu önerilebilir.

**Tablo 6:** Bileşik 4'ün CD<sub>3</sub>OD içinde <sup>1</sup>H NMR (<sup>1</sup>H ve COSY) ve <sup>13</sup>C NMR (Decoupled, APT, HMQC ve HMBC) verileri

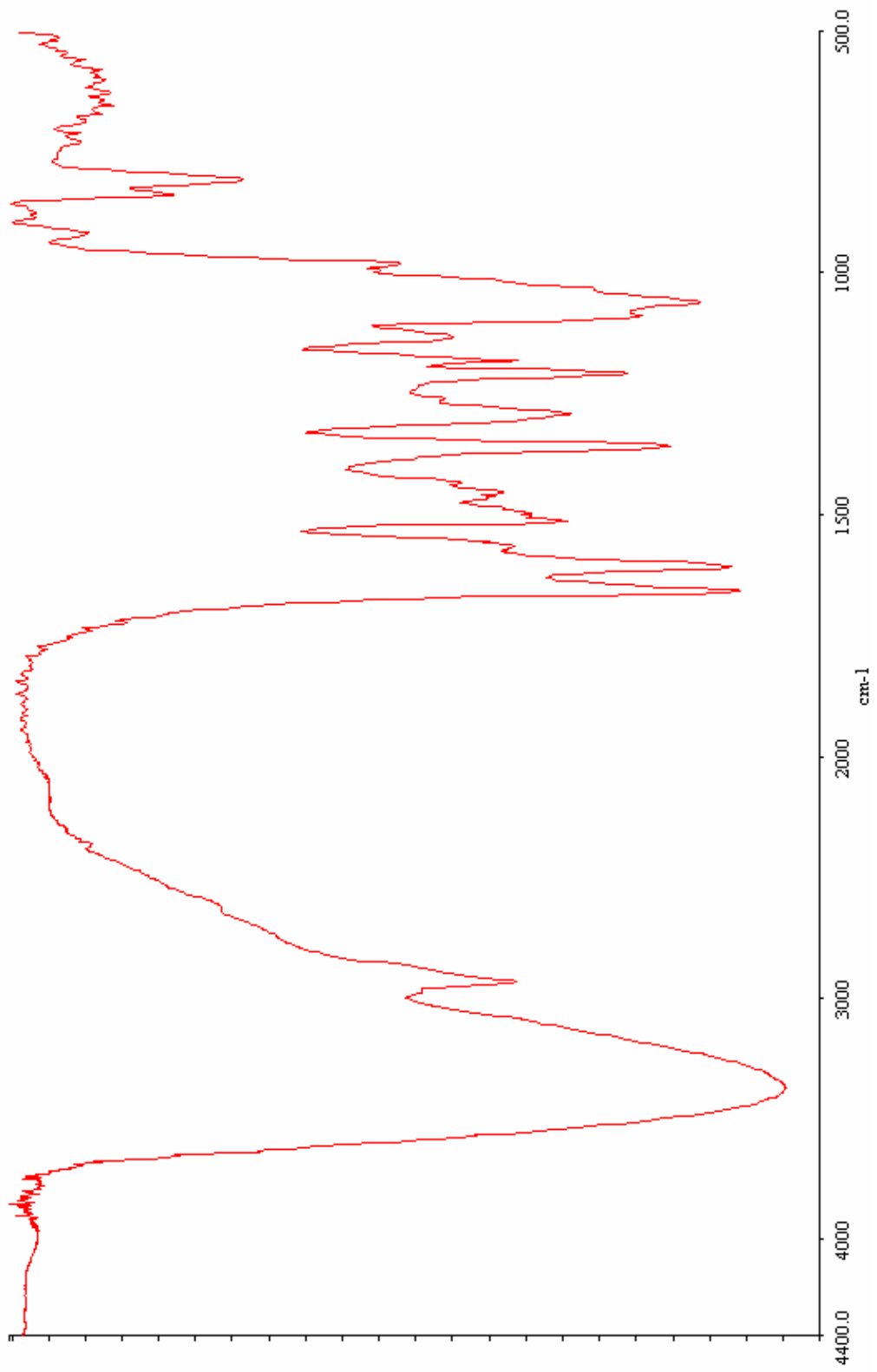
<sup>1</sup> H NMR		<sup>13</sup> C-NMR	
δ (ppm)	H	δ (ppm)	C
7.91	H-3' (1H, d, <i>J</i> = 2.0 Hz )	177.84	C-4
7.58	H-5' (1H, dd, <i>J</i> = 8.8 Hz; 2.0 Hz)	174.66	C-1''
		164.61	C-7
6.87	H-6' (1H, d, <i>J</i> = 8.8 Hz)	161.49	C-5
6.34	H-8 (1H, d, <i>J</i> = 2.0 Hz)	160.08	C-9''
		157.40	C-9
6.16	H-6 (1H, d, <i>J</i> = 2.0 Hz)	156.98	C-2
5.19	H-1''' (β-Anomerik H, d, <i>J</i> = 7.2 Hz)	149.42	C-4'
		146.85	C-2'
4.52	H-1'''' (α-Anomerik H, bs, <i>J</i> = 1.6 Hz)	134.16	C-3
3.92	-OCH <sub>3</sub>	131.05	C-7'' ve C-11''
		122.62	C-5'
3.44	H-6''' (2H, m, -CH <sub>2</sub> O-) (Şeker)	121.54	C-1'
3.33	-OCH <sub>3</sub>	114.78	C-6'
		114.71	C-8'' ve C-10''
3.80-3.22	(8H, m, -CH <sub>2</sub> O-) (Şeker)	113.20	C-3'
1.10	H-6'''' (3H, d, <i>J</i> = 6.4 Hz)	104.29	C10
		103.24	C-1''''
		101.14	C-1''''
		98.66	C-6
		93.64	C-8

**Tablo 6 (Devamı):** Bileşik 4'ün CD<sub>3</sub>OD içinde <sup>1</sup>H NMR (<sup>1</sup>H ve COSY) ve <sup>13</sup>C NMR (Decoupled, APT, HMQC ve HMBC) verileri

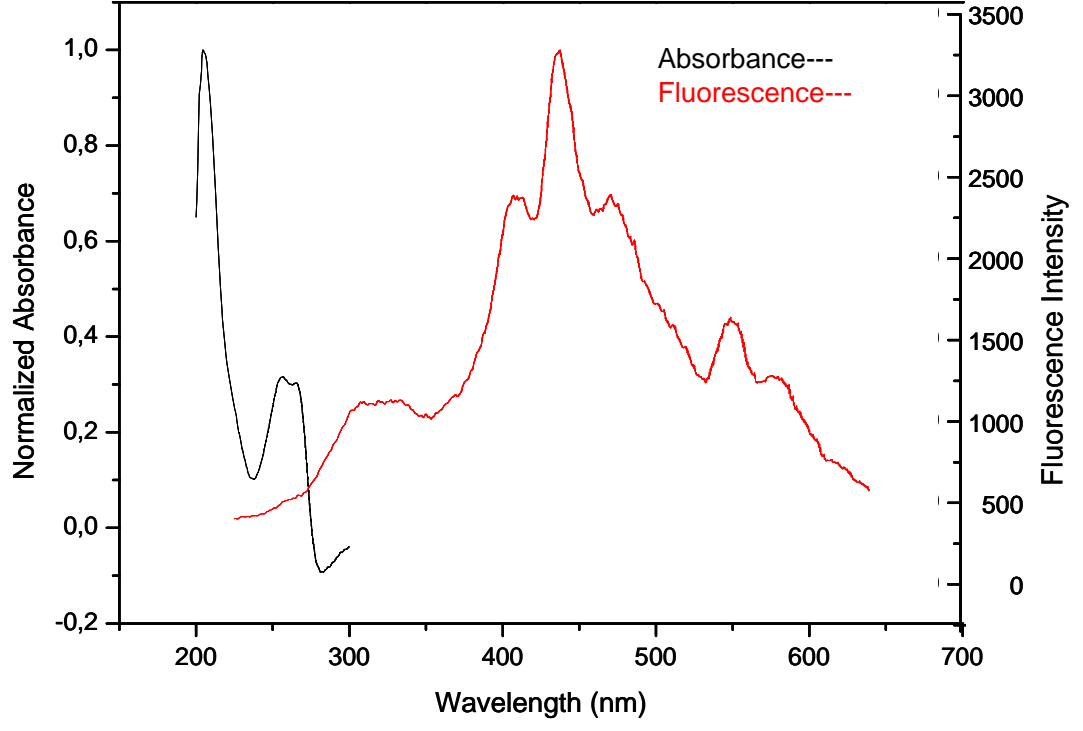
<sup>1</sup> H NMR		<sup>13</sup> C-NMR	
δ (ppm)	H	δ (ppm)	C
		76.78-68.41	8 x (-CH-O-) (Şeker)
		68.36	C-6''' (Şeker)
		55.41	-OCH <sub>3</sub>
		48.55	-OCH <sub>3</sub>
		38.88	C-5''
		35.65	C-2''
		28.75	C-4''
		25.36	C-3''
		16.56	C-6''''

Morin-3-*O*-[4-[5-(4-hydroxyphenyl) pentanoyl]- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -  
D-galactopyranosyl]-7-4'-di-*O*-methyleter

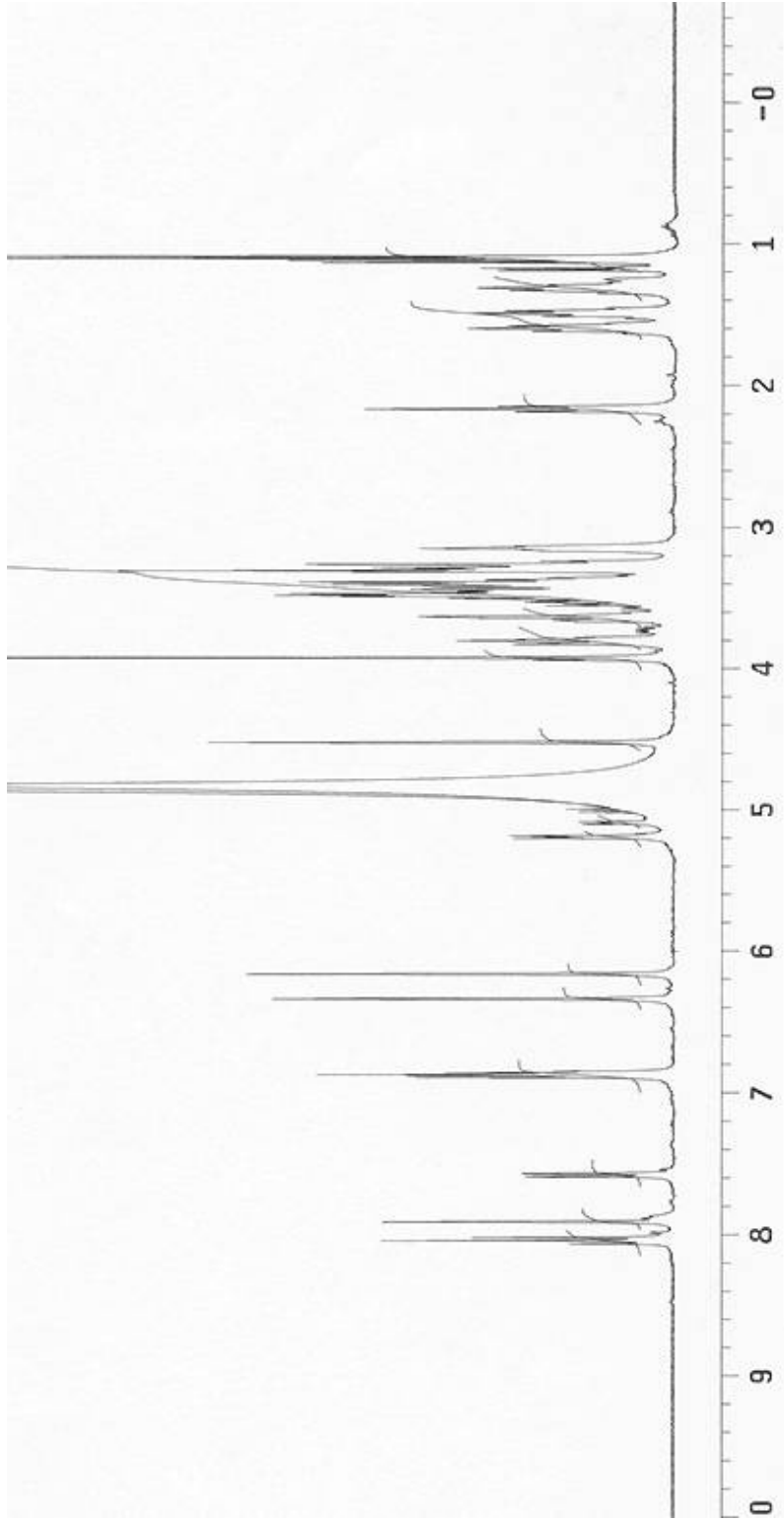




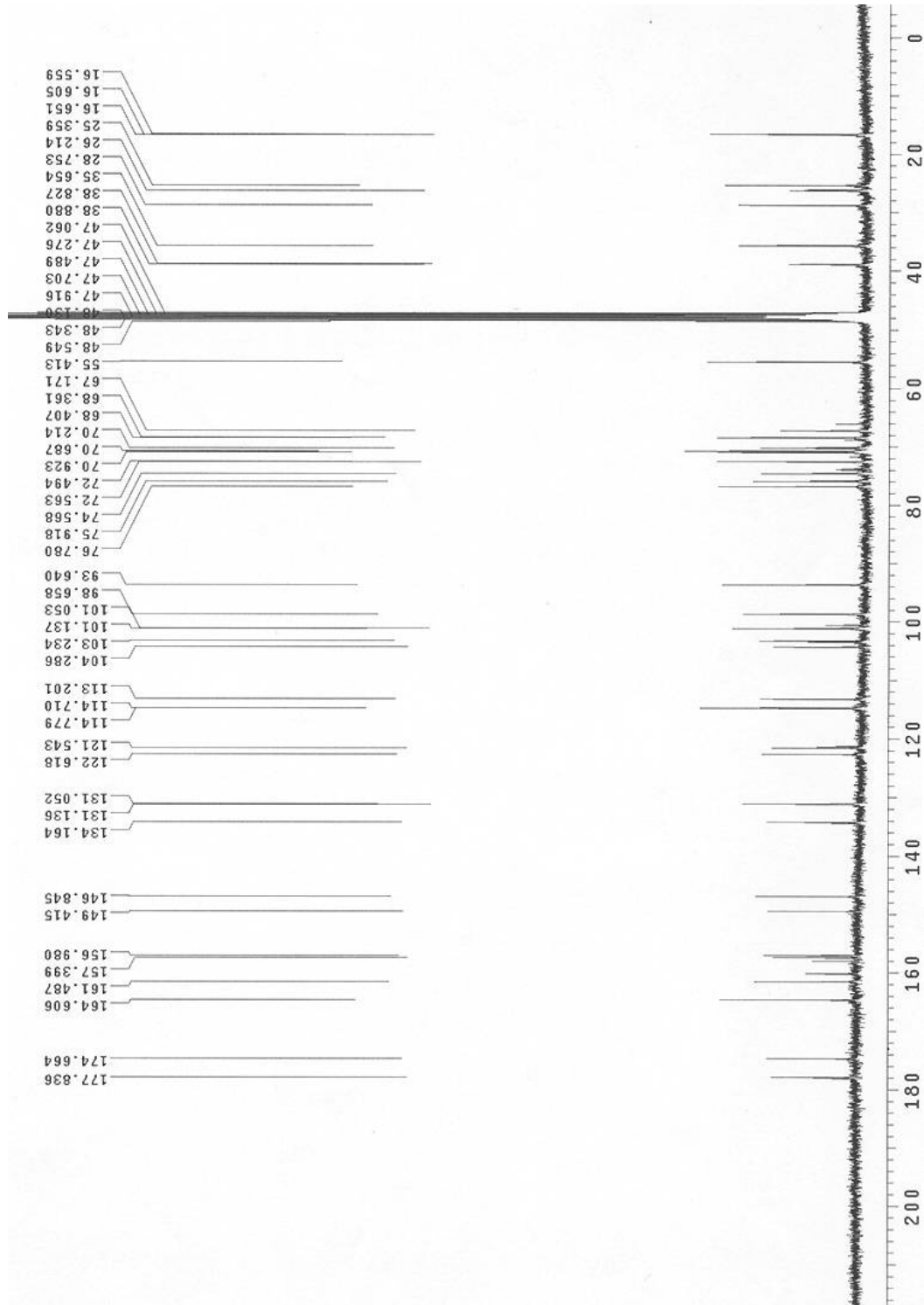
Bileşik 4'ün IR spektrumu



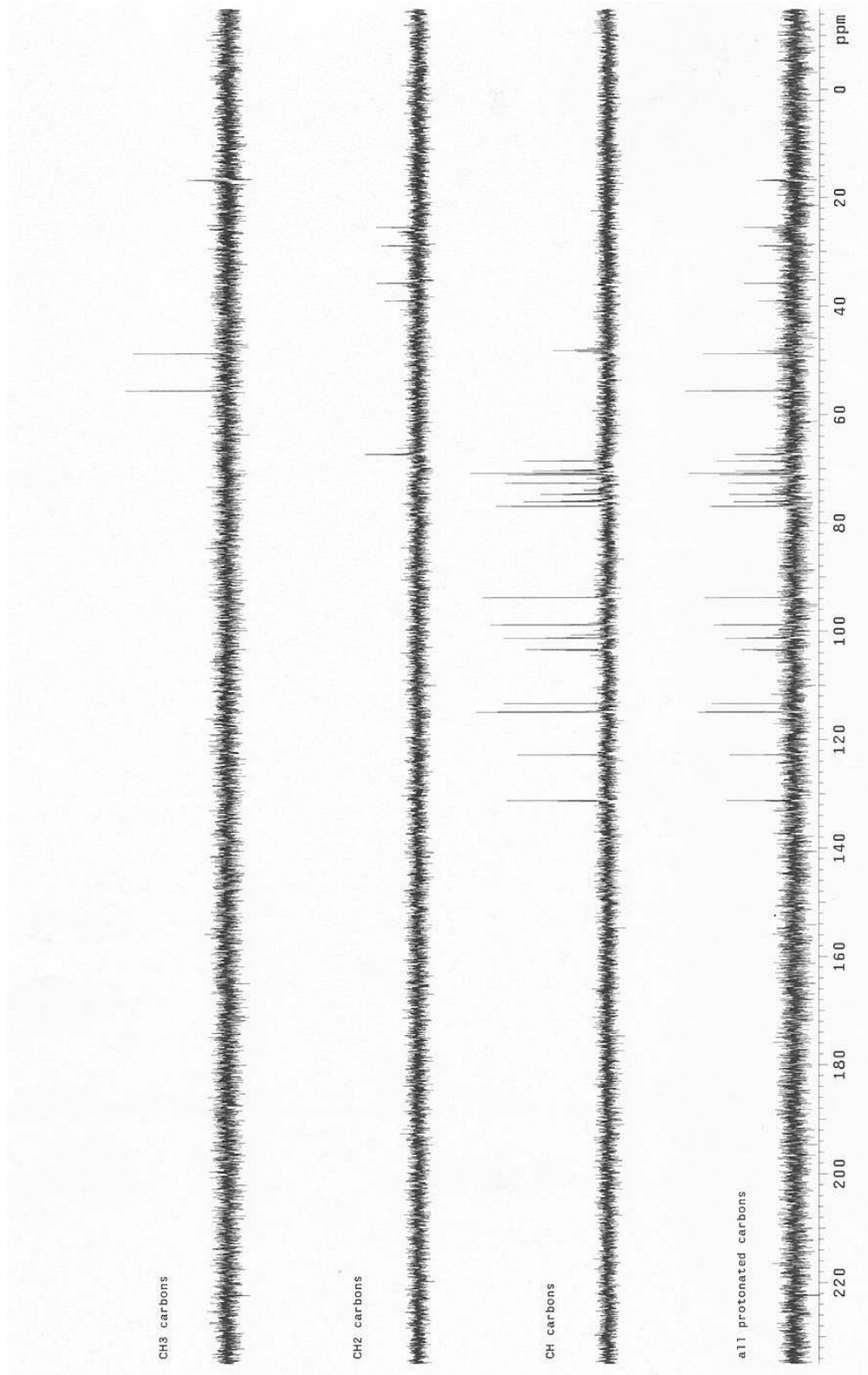
Bileşik 4'ün UV ve Floresans spektrumu



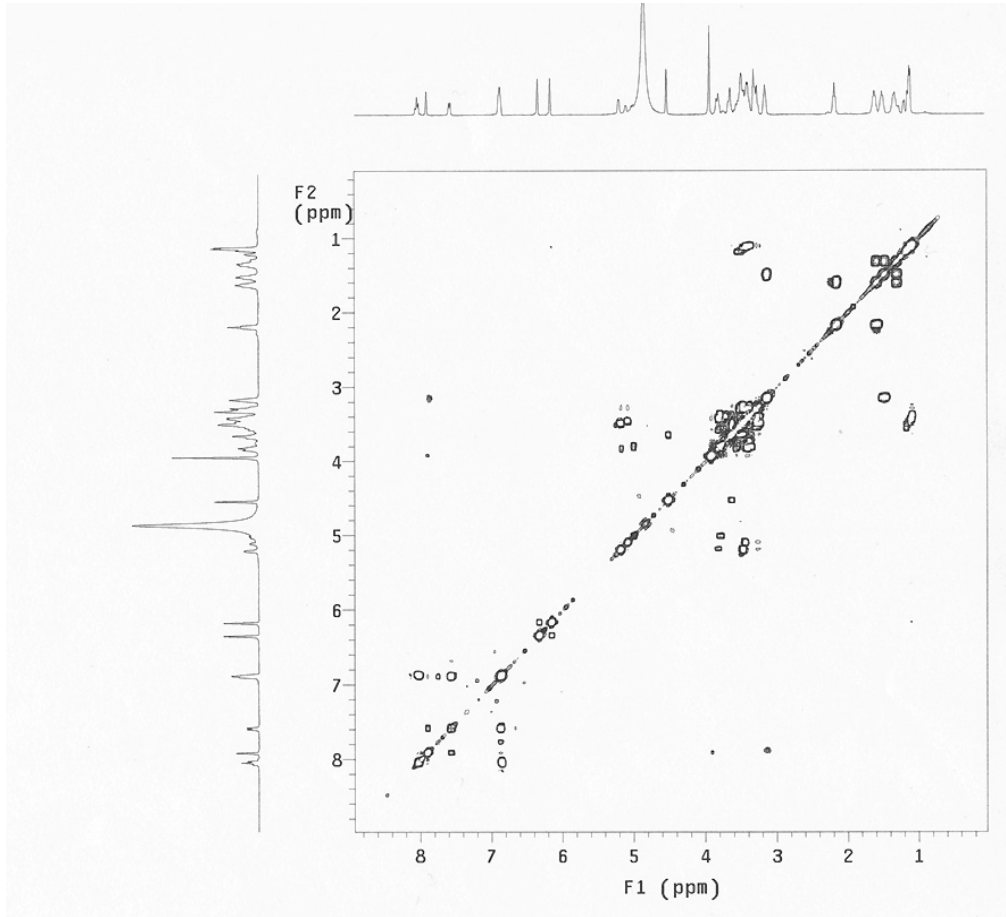
Bileşik 4'ün  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu



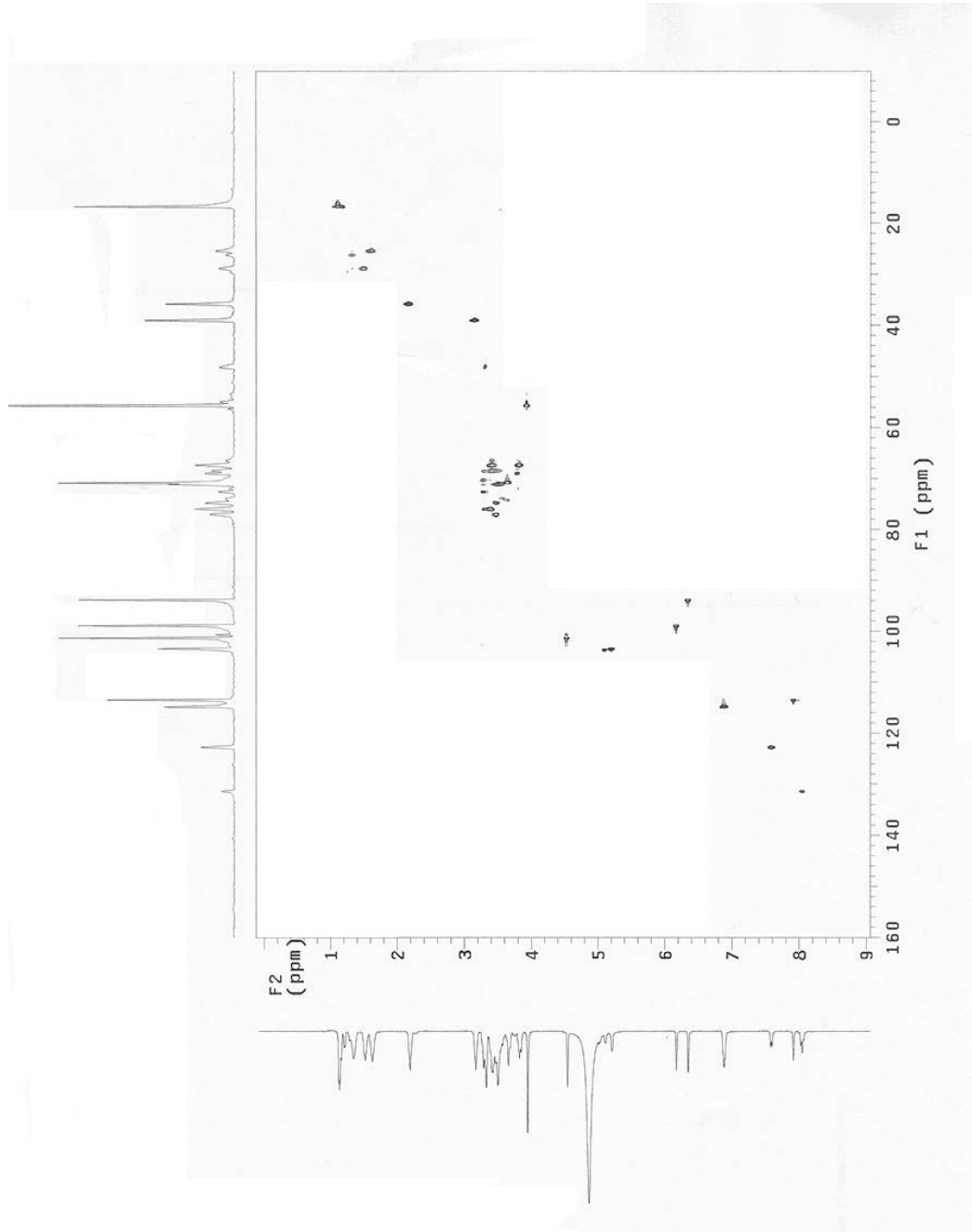
Bileşik 4'ün  $^{13}\text{C-NMR}$  spektrumu



Bileşik 4'ün DEPT spektrumu



Bileşik 4'ün COSY spektrumu



Bileşik 4'ün HMQC spektrumu

### 3.5. Hegzan Ekstresindeki Doymamış Yağ Asitleri

GC-Mass sonuçları linoleik, linolenik, oleik ve palmitik asit metil esterleri yüzdesinin diğer bileşiklerin bolluk şiddetlerinden daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bu dört tane doymamış yağ asidi bitkideki metillenmiş doymamış yağ asitlerinin toplam yüzdesini %75'ini oluşturmaktadır.

Bilindiği gibi, linoleik asit, linolenik asit ve oleik asit doymamış asitlerden bazılarıdır. Bu tür doymamış yağ asitleri memeli hücrelerinde sentezlenemez ve bu yüzden beslenmeyle alınması alınmalıdır (Huertas et al., 2003). Doymamış yağ asitlerinin eksikliği insan vücudunda zararlı ve anormal değişimlere neden olur. Linoleik asidin az alınması ile göğüs kanseri vakalarının sık görülmesi arasında çok net bir ilişki vardır. Linoleik asit tıbbi uzmanlar tarafından kandaki kolesterol seviyesini düşürdüğü için tavsiye edilmektedir. Linoleik asit kalp hastalıklarının tedavisinde kullanıldığı kadar, kan pıhtılaşması, inflamatuvar ve immunolojik reaksiyonlar gibi normal psikolojik proseslerin yer aldığı hücre membranlarında da yer alırlar (Huertas et al., 2003; Kang and Leaf, 2000; Eynard et al, 2003).

Oleik asit, linolenik asit, antioksidan gıdalar ve düşürülmüş miktarda doymuş yağ asidi içeren Akdeniz beslenme şekli koroner olaylarında % 70 ve ölümlerde ise %80 düşme sağlamıştır (Huertas et al., 2003). Doymamış yağ asitlerinin alımının birbiriyle dengede olması gerektiği bilinmektedir. n-6 ve n-3 doymamış yağ asitlerinin alım dengesi yer aldıkları tüm prosesleri etkiler (Innis et al, 2000; Huertas et al., 2003; Brit. Nutr. Found. 2000).

Doymamış yağ asitleri hücre çoğalması ve değişimlerinin düzenlenmesinde rol alır. Böyle yüksek seviyede doymamış yağ asidi içeren bu bitkinin az bulunması bu araştırmayı ve bitkiyi son derece önemli kılmaktadır.



### 3.6. Tartışma

Kimyasal bileşenleri tarafımızdan ilk defa çalışılan *Ebenus haussknechtii*'den ilk defa izole edilen bileşikler yapısal olarak değişiklikler göstermektedir. Bilindiği gibi, su ekstresinin halk ilacı olarak çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan *Ebenus haussknechtii* 13 tane endemic Ebenus türünden birisidir. Bu çalışmada 6 tane doğal bileşik elde edildi ve finansal sebeplerden dolayı sadece 4 tanesinin spectral analizleri gerçekleştirilebildi. Bileşik **1** bir triterpen glikozid iken, Bileşik **2** bir ramnogalakto quersetin, Bileşik **3** bir metilinositol ve Bileşik **4** iki şekerli ve iki aglikonlu bir falvon glikoziddir. Her birinin farklı bir karaktere sahip olduğu bu bileşiklerden üçü glikozidiken, diğeri halkalı bir polioldür. Bunun yanısıra, bu bileşikler bitkinin biyolojik olarak en aktif kısmı olan BuOH ekstresinden elde edildi. Hegzan ekstresinde bulunan doymamış yağ asitlerinin metil esterleri hazırlandı ve bunların birer birer neler oldukları ve örnekteki bulunma bollukları belirlendi. Halk ilacı olarak kullanılan ve yüksek oranda  $\omega$ -3 doymamış yağ asitlerini içeren bu bitkinin antioksidan etkisiyle daha da önemli olacağı açıktır. Bilindiği gibi glikozidler mikrobiyolojik olarak önem taşıırken, vücudun immune sistemini güçlendiren doymamış yağ asitleri ve bazı polioller merkezi sinir sistemi bozukluklarının tedavisinde etkilidirler (Levine et al., 1993; Huertas et al., 2003; Rai and Mares, 2003, Aquino et al., 2001, 2002).

## ÖZET

Türü belirlendikten sonra kurutulan ve öğütülen *Ebenus haussknechtii* (Leguminosae) bitkisi kimyasal ve mikrobiyolojik olarak incelendi. Polar ve apolar kısımları ekstraksiyonla birbirinden ayrıldı. Bu şekilde polaritelerine göre sınıflandırılmış olan fraksiyonlar çeşitli kromatografik yöntemler (CC, PLC, TLC) kullanılarak bileşenlerine ayrılıp saflandırıldı. İzolasyon ve saflandırma teknikleri sonrası, 4 ünün yapısı aydınlatılan 6 doğal bileşik elde edildi. Ayrıca, metillenen heksan ekstresinin GC ve GC-Mass analiz sonuçları faydalı yağ asitleri açısından irdelendi.

Saf bileşiklerin yapı aydınlatılması çeşitli kimyasal, kromatografik ve spektroskopik [IR, UV, NMR (1D ve 2D), ve Mass] yöntemler kullanılarak yapıldı. Kromatografik ve spektroskopik veriler yorumlandıktan sonra bileşiklerin spesifik çevirme açıları ölçüldü.

Çalışmada elde edilen ekstrelerin (MeOH, Heksan, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, BuOH ve H<sub>2</sub>O) antimikrobiyel aktiviteleri, agar-disk difüzyon yöntemiyle, Gentamycine (Referans antibiyotik) ile karşılaştırılarak çeşitli bakteri ve mantarlara karşı incelendi.

## SUMMARY

Taxonomically determined, dried and grinded plant material of *Ebenus haussknechtii* (Leguminosae) was studied by means of chemical and microbiological properties. Several extractions were fulfilled to separate polar and apolar parts from each other. Various purification techniques, such as VLC, CC, PLC using different backfill materials according to each case, were carried out to separate and purify the compounds having similar polarity. After the isolation and purification experiments ended, 6 natural products, the structures of 4 of which have been determined, were obtained. In addition, the methylated hexane extract was investigated on the basis of GC and GC-Mass data and determined to contain essential fatty acids.

The structural determination of pure compounds was carried out using different chemical, chromatographic and spectroscopic [IR, UV, NMR (1D and 2D), and Mass] methods. After chromatographic and spectroscopic data were interpreted, the physical properties of the compounds such as specific rotation were measured.

Antimicrobial activity of each extract (MeOH, Hexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, BuOH, and H<sub>2</sub>O) obtained during the work was examined against different bacteria and fungi comparing with Gentamycine as reference by using agar-disc diffusion method.

## REFERANSLAR

- Aksu, S., 1972, Bitkisel Maddeler Kimya ve Teknolojisi, Tekel Enst. Yayınları, A-12
- Aquino, R., Morelli, S., Lauro, M.R., Abdo, S., Saija, A., Tomaino, A., 2001, Phenolic Constituents and Antioxidant Activity of an Extract of *Anthurium versicolor* Leaves, *J. Nat. Prod.*, 64, 1019-1023
- Aquino, R., Caceres, A., Morelli, S., Rastrelli, L., 2002, An Extract of *Tagetes lucida* and its Phenolic constituents as Antioxidants, *J. Nat. Prod.*, 65, 1773-1776
- Arda, N., Goren, N., Kuru, A., Pengsuparp, T., Pezzuto, J.M., Qiu, S.X., and Cordell, G.A., 1989b, Specionin and Speciosides A and B: New Aromatic Lactones from *Ononis speciosa*, *Journal of Natural Products*, 52, 6, 1334-1337
- Azcan N., Saricoban S., Demirci B., Aytac Z., Baser K.H.C., 2001, Seed Oils of Fifteen *Ebenus* Taxa Growing in Turkey, *Chemistry of Natural Products*, 37, 3, 253-255
- Baraban JM, Worley PF, Snyder SH: Second messenger systems and psychoactive drug action: focus on the phosphoinositide system and lithium. *Am. J. Psychiatry* 1989; 146:1251-1260
- Barkai IA, Dunner DL, Gross HA, Mayo P, Fieve RR, 1978, Reduced myo-inositol levels in cerebrospinal fluid from patients with affective disorder. *Biol Psychiatry*; 13, 65-72
- Barton, D.H.R., Overton, K.H., 1955, Triterpenoids. Part XX. The Constitution and Stereochemistry of a Novel Tetracyclic Triterpenoid., *J. Chem. Soc.*, 2639-2652
- Baytop, T., 1980, Farmakognozi, Fatih Yayınevi, İstanbul, p. 84
- Bukharov, V.G., and Karlin, V.V., 1970, Chem. Abstr., 73, 110059.
- Bukharov, V.G. and Karneeva, L.N., 1971, Chem. Abstr., 74, 121340.
- Corea, G., Fattorusso, E., and Lanzotti, V., 2003, Saponins and Flavonoids of *Allium triquetrum*, *Journal of Natural Products*, 66, 11, 1405-1411
- Davis, P. H., 1970, Flora of Turkey, University of Edinburgh, Edinburgh, 3, 590-596
- David, F., Sandra, P., Wylie, P.L., 2003, Improving the Analysis of Fatty Acid Methyl Esters Using Retention Time Locked Methods and Retention Time Databases, *Agilent Technologies*

- Eynard, MD. A. R.**, 2003, Potential of essential fatty acids as natural therapeutic products for human tumors, *Nutrition*, 386-388
- Finar, I.L., Pincibat M.R.**, 1983, Organic Chemistry, Vol.2, Longman, London and New York, p. 788
- Gilman, H.**, 1943, Organic Chemistry on Advanced Treatise, John Willey and Sons Copyright, p. 1338
- Harborne, J.B.**, 1973, Phytochemical Methods, Chapman and Hall, London, p. 47.
- Harborne, J.B., Mabry T.J.**, 1975, The Flavonoids, Chapman and Hall Ltd., USA. p. 669
- Harborne, J.B.**, 1988, The Flavonoids Advances in Research Ed., Chapman and Hall, London, p. 329
- Hiller, K.**, 1987, New results on the structure and biological activity of triterpenoid saponins, 167-184, Biologically Active Natural Products, Hosttettmann, K. and Lea, P. J. (Eds.), New York.
- Huertas, E.L., Baro, L., Carrero, J.J., Fonolla J., Jimenez, J., Boza, J.J.**, 2003, n-3 Fatty Acids: Health Effects and Opportunities to Increase Intake, *AGRO food industry hi- tech*, 18-21
- Ikan, R.**, 1991, Natural Products, Academic Press, London, p.1
- Innis, S. M.**, 2000, Essential fatty acids in infant nutrition: lessons and limitations from animal studies in relation to studies on infant acid requirements, *Am. J. Clin. Nutr.*, 71, 238-244
- Kang, J.X., Leaf A.**, 2000, Prevention of fatal cardiac arrhythmias by polyunsaturated fatty acids, *Am. J. Clin. Nutr.*, 71, 202- 207
- Kırmızıgül S.**, 1993, PhD. Thesis, Ege University, Izmir
- Kırmızıgül, S., Anıl, H., Uçar, F. and Akdemir, K.**, 1996, Antimicrobial and Antifungal Activities of Three New Triterpenoid Glycosides, *Phytother. Res.*, 10, 274-276
- Kırmızıgül, S., Gören, N., Yang, S.W., Cordell, G.A., Johansson, B.C.**, 1997, Spinonin, A Novel Glycoside from *Ononis spinosa* subsp. *leiosperma*, *J. Natural Products*, 60, 378-381
- Kitagawa, I., Koboyashi, M. and Sugawara, T.**, 1978a, *Chem. Pharm. Bull.*, 26(6), 1852-1863.

- Kitagawa, I., Koboyashi, M. and Sugawara, T.,** 1978b, *Chem. Pharm. Bull.*, 26(6), 1864-1873.
- Levine J, Gonzalves M, Babur I, Stir S, Elizur A, Kofman O, Belmaker RH:** Inositol 6 gm daily may be effective in depression but not in schizophrenia. *Human Psychopharmacology* 1993a; 8: 49-53
- Levine J, Rapaport A, Lev L, Bersudsky Y, Kofman O, Belmaker RH, Shapiro J, Agam G:** Inositol treatment raises CSF inositol levels. *Brain Res* 1993b; 627:168-170
- Lisa Colodny, Pharm D. and Ronald L. Hoffman, M.D,** Inositol Clinical Applications for Exogenous Use, *Altern Med Rev* 1998; 3(6):432-447
- Markham, K. R.,** 1989, Flavones, Flavonols and their Glycosides, *Methods in Plant Biochemistry*, Dey, P.M., Harborne, J.B. (Eds), Academic Press, London, Vol. 1, p. 197-235,
- Markham, K. R.,** 1982, *Techniques of Flavonoid Identification*, Academic Press, London.
- Maul C, Sattler I, Zerlin M, Hinze C, Koch C, Maier A, Grabley S, Thiericke, R.,** 1999, Bimolecular-chemical screening: A novel screening approach for the discovery of biologically active secondary metabolites - III. New DNA-binding metabolites, *Journal of Antibiotics*, 52(12), 1124-1134
- Mitrocosta, D., Skaltsounis, A.L., Mitaku, S., Harvala, C., Tillequin, F.,** 1999, Flavanoid and Terpene Glycosides from European *Ebenus* species, *Biochemical Systematics and Ecology*, 27, 305-307
- n-3 Fatty Acids and Health,** 2000, *British Nutrition Foundation*.
- Rai, M. and Mares, D.,** 2003, *Plant-Derived Antimycotics*, Chapter 22: Triterpenic Glycosides- Their Isolation Methods and Antifungal Activities by Kırmızıgül, S, the Haworth Press, New York, London, p. 459-496.
- Seo, S., Tomita, Y., Tori, K., and Yoshimura, Y.,** 1978, Determination of Absolute Configuration of a Secondary Hydroxy Group in a Chiral Secondary Alcohol Using Glycosilation Shifts in Carbon-13 NMR spectroscopy, *Tetrahedron Letters*, 3331-3339
- Takemoto, T., Nishimoto, N., Takagi, N., Hayashi, S., Odashima, S., and Wada, Y.,** 1983, Pfaffic acid, a novel nortriterpene from *Pfaffia paniculata* Kuntze, *Tetrahedron Lett.*, 24, 10, 1057-1060

- Tommasi, N.D., Piacente, S., Gacs-Baitz, E., Simone, F.D., Pizza, C., Aquino, R.,** 1998, Triterpenoid Saponins from *Spergularia ramosa*, *J. Nat. Prod.*, 61, 323-327
- Tori, K., Seo, S., Shimaoka, A., and Tomita, Y.,** 1974, Carbon-13 NMR spectra of olean-12-enes, *Tetrahedron Letters*, 48, 4227-4230
- Tori, K., Seo, S., Yoshimura, Y., Arita, H., and Tomita, Y.,** 1977, Glycosilation Shifts in Carbon-13 NMR spectroscopy, *Tetrahedron Letters*, 179-182
- Tschesche, R., Wulff, G.,** 1973, Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe, Spinger-Verlag, Wien, 30.
- Woitke, H.D., Kayser, J.P. and Hiller K.,** 1970, Fortschritte in der Erforschung der Triterpensaponine Pharmazie, Vol. 25, p. 133.
- Williams, C. A. and Harborne, J.B.,** 1989, Isoflavonoids, Methods in Plant Biochemistry, Academic Press, London, Vol. 1, p. 421-449
- Zechmeister, L., Herz, W. Griseback, H. and Kirby. G.W.,** 1973, Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe, Spinger-Verlag, Wien, p.30.
- Wulff G,** 1965, ÜBER Die Quantitative Zuckerbestimmung in Glykosiden und Oligosaccariden mit Hilfe Der Gaschromatographie, *J. Chromatography*, 18, 285-296

## TEŞEKKÜR

Danışmanım Prof. Dr. Süheyla KIRMIZIGÜL'e sürekli gözetim ve denetimi, tavsiyeleri, araştırma dışında bile herhangi bir sorunumda yardımlarını esirgememesi ve bu çalışmanın en zor kısımlarındaki teşvik ve cesaretlendirmeleri sebebiyle teşekkürü bir borç bilirim.

Araştırma Görevlisi Ömer Koz'a faydalı yardımları, yakın ilgisi ve dostluğu için, Nazlı BÖKE ve Elçin TÜRKAY'a laboratuarda bulunamadığım zamanlardaki samimi yardımları için teşekkür ederim.

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü ve Kimya Bölümü yönetici kadrosuna Ege Üniversitesindeki çalışmalarımı tamamlamam için izin verdikleri için müteşekkirim.

Emrah KÖK'e bitki materyalini topladığı, Gökhan Şenol'a bitkinin botanik özelliklerini tanımladığı, Yard. Doç. Dr. İhsan YAŞA'ya bitkinin antimikrobiyel çalışmalarını yaptığı, Selami SOLMAZ'a ve Ahmet ÖĞÜT'e hegzan ekstresinin GC analizlerini yaptıkları, Yurdanur AKGÜL'e NMR spektrumlarını aldığı, Özgül HAKLI'ya UV ve Floresans Emisyon spektrumlarını aldığı için teşekkür ederim.

Ebru TÜRKMEN'e yürekten desteği ve her zamanki sınırsız sabrı için minnettar ve daima borçluyumdur.

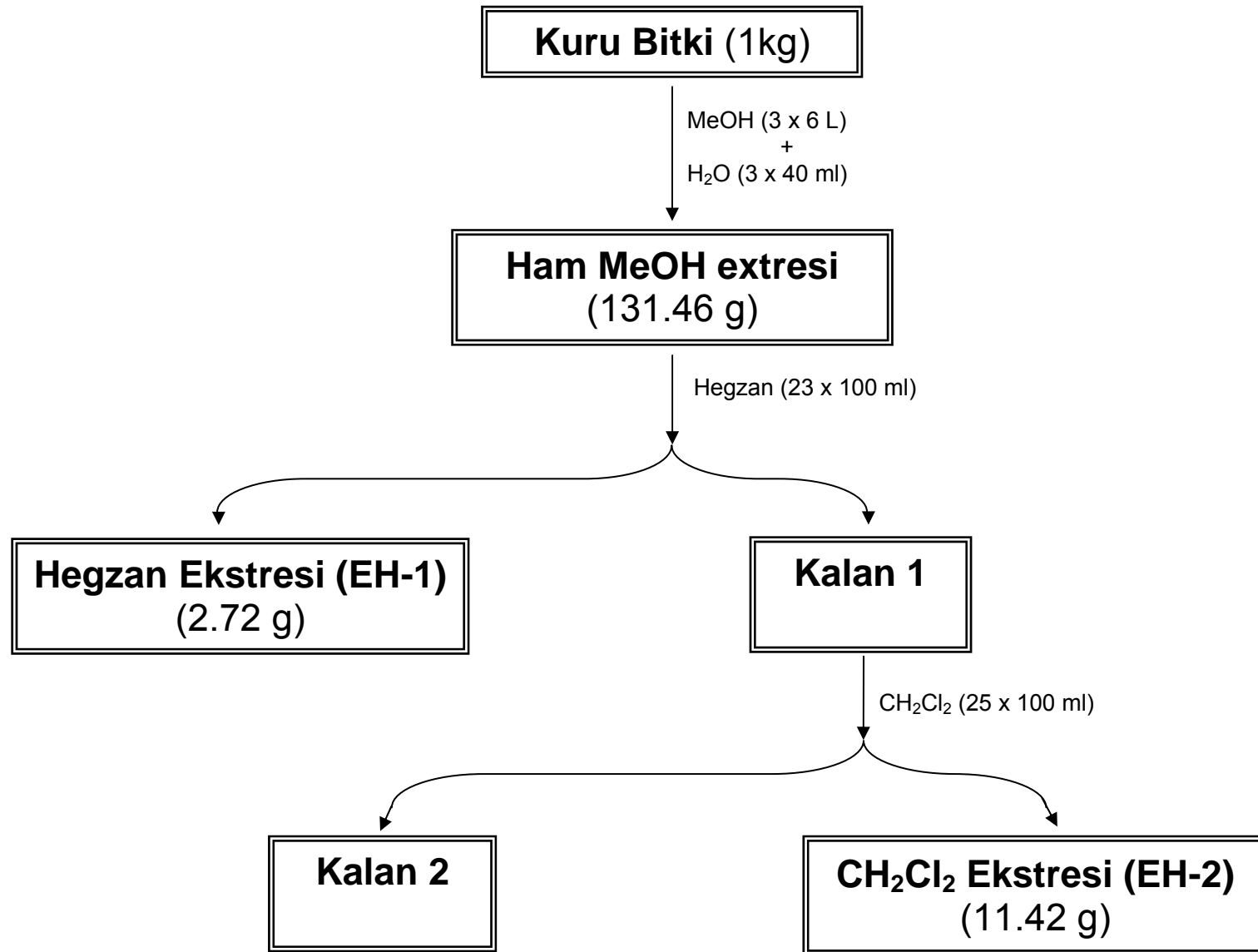
Son olarak, aileme karşılıksız ve yürekten destekleri, teşvik etmeleri ve bu çalışma esnasındaki bazı durumlarda ve tüm eğitim yaşamım boyunca bana yol göstermelerinden dolayı minnettarım. Fedakarlıklarından dolayı onlara teşekkür ederim.

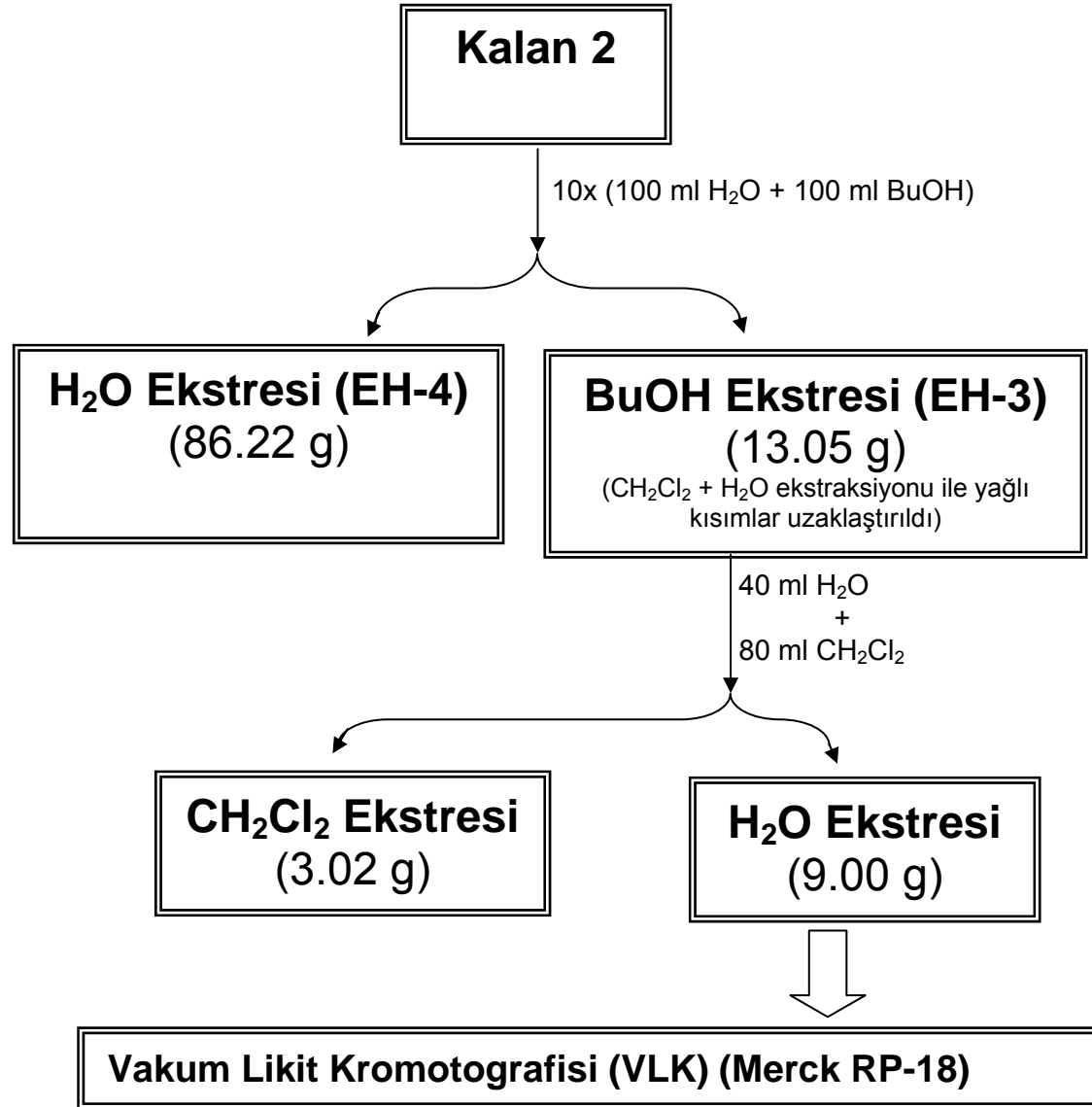
Zafer UYAR



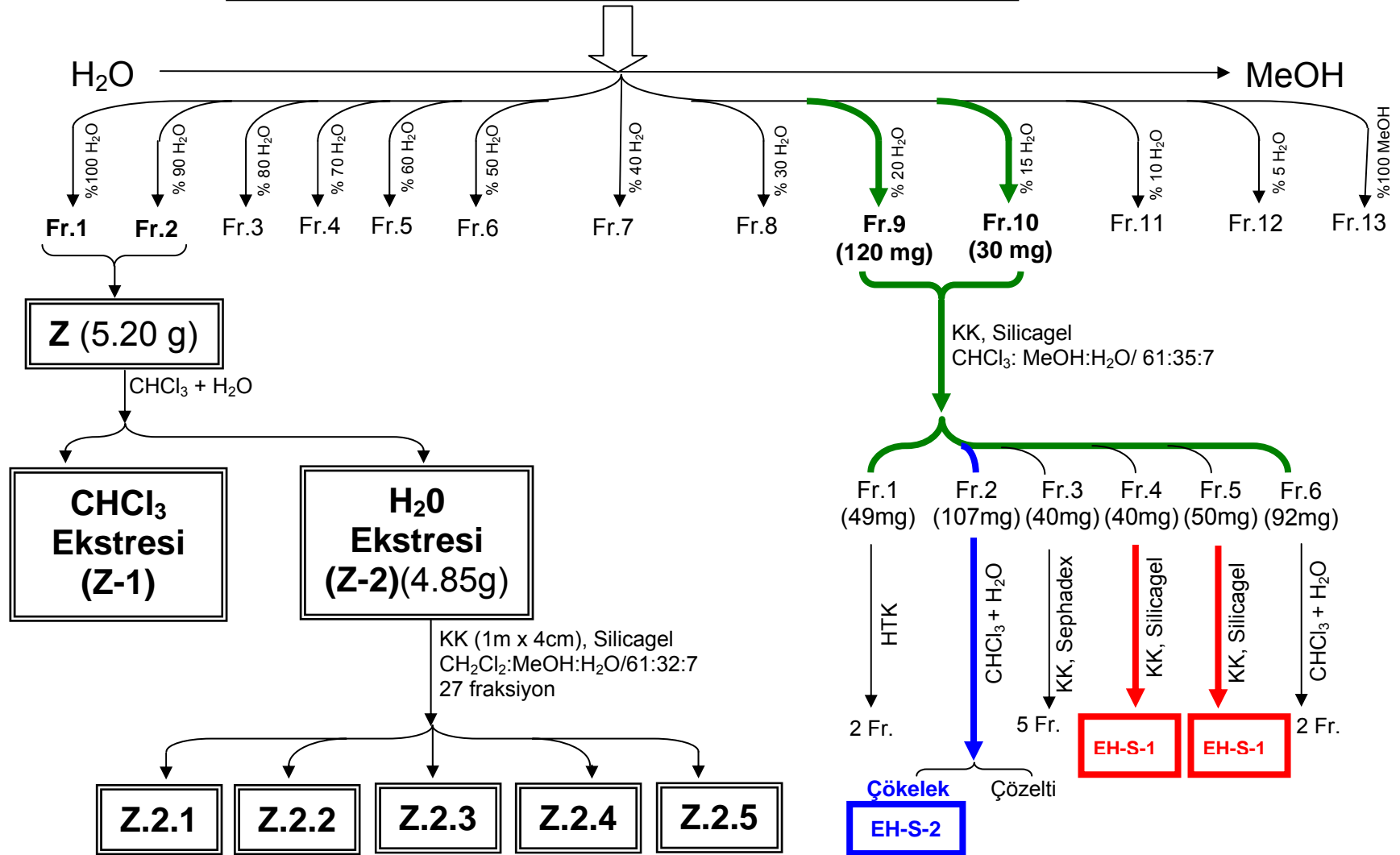
## ZAFER UYAR

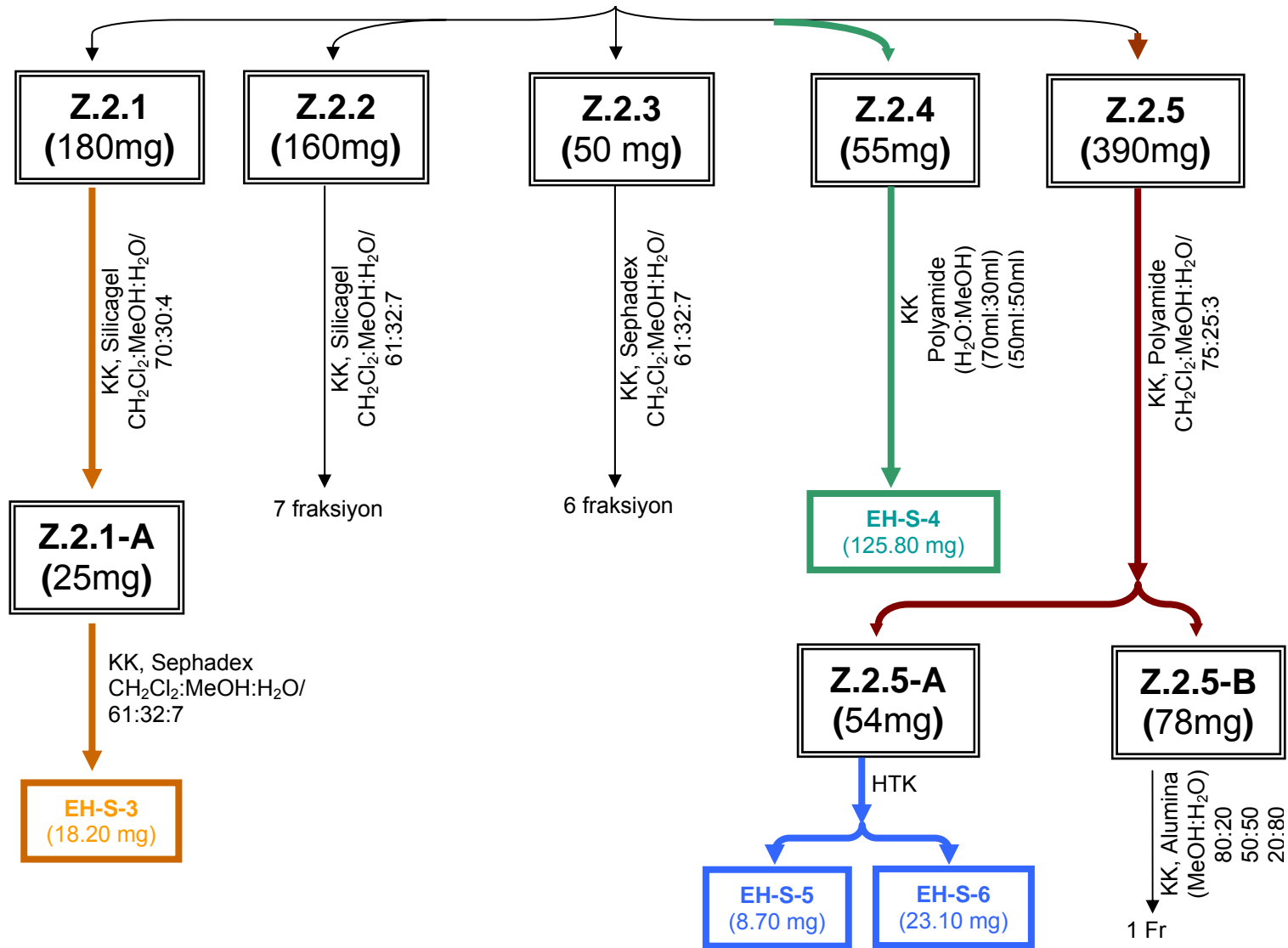
Kişisel Bilgi	<ul style="list-style-type: none"><li>• Medeni Hali: Bekar</li><li>• Uyruğu: Türkiye</li><li>• Yaş: 26</li><li>• Doğum Yeri: Elazığ</li></ul>
Eğitim	<p>2004.... Ege Üniversitesi ve Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi İzmir,Türkiye Çanakkale, Türkiye</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Ege Üniversitesi Organik Kimya Bölümünde Yüksek Lisans ve Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Organik Kimya A.B.D. da Araştırma Görevlisi</li><li>• TÜBİTAK yüksek lisans bursu devamı</li></ul> <p>2002-2004 Ege Üniversitesi İzmir,Türkiye</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Organik Kimya yüksek lisans</li><li>• TÜBİTAK yüksek lisans bursu</li><li>• Yaşar Holding yüksek lisans bursu</li></ul> <p>1997-2002 Ege Üniversitesi İzmir,Türkiye</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Fen Fakültesi Kimya Bölümü</li><li>• Başbakanlık Bursu</li><li>• Kimya Bölümü ve tüm Fen Fakültesi birinciliği</li><li>• EBILTET (E18-05-01) projesiyle desteklenen <i>Helichrysum stoechas</i> (Compositae)'nin bileşenleri adlı çalışma</li><li>• 3 yıl sınıf temsilciliği</li></ul> <p>1993-1996 Elazığ Karşıyaka Lisesi Elazığ,Türkiye</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Lise</li></ul>
İlgi Alanları	Koşmak, bilgisayarlar, futbol, yüzme, fitnes, müzik, okumak
Diller	<ul style="list-style-type: none"><li>• İngilizce (253 TOEFL skoru (eski sistemde 610))</li></ul>
Yayınlar	2002 yılında Trabzon Karadeniz Teknik Üniversitesi tarafından organize edilen "1. Uluslar arası Doğal Bileşikler Kimyası Kongresi" " <i>Helichrysum Stoechas</i> bitkisinin Antibakteriyel ve Antifungal Aktivitesi" isimli çalışmanın sunumu
Kazanılan Ödüller	Kimya Bölümü ve Fen Fakültesi birinciliği belgesi ve plaketi



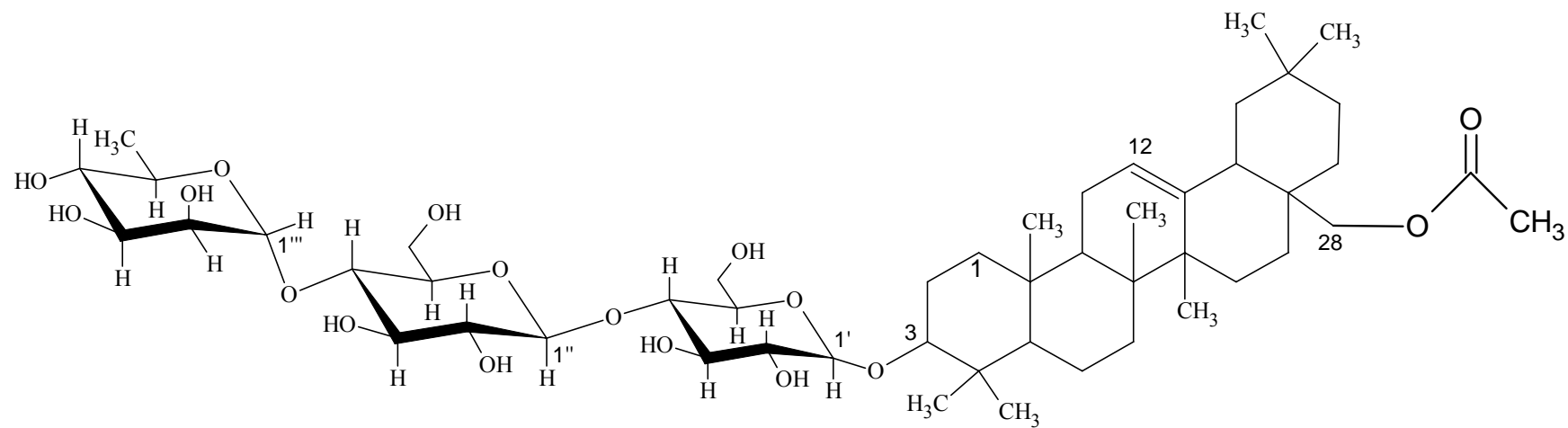


# Vakum Likit Kromatografisi (VLK) (Merck RP-18)



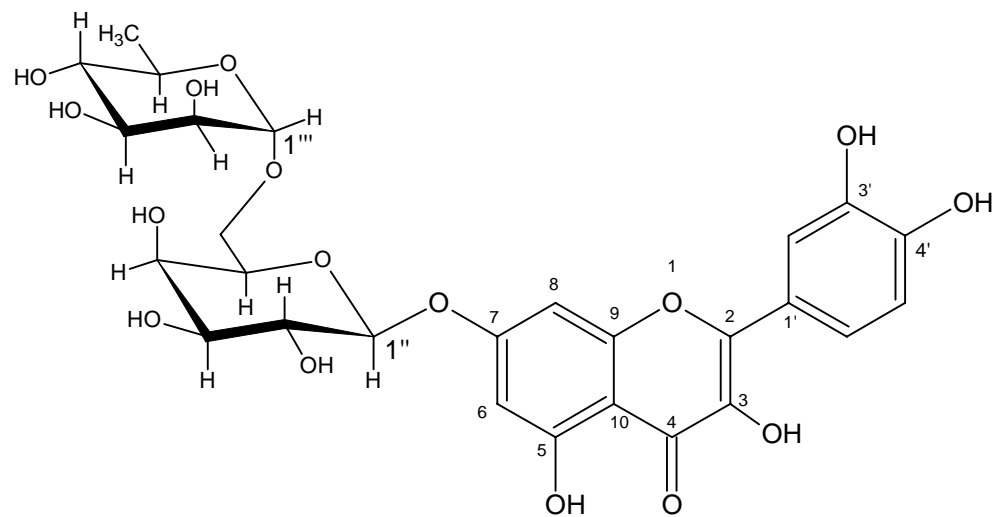


Compound 1:



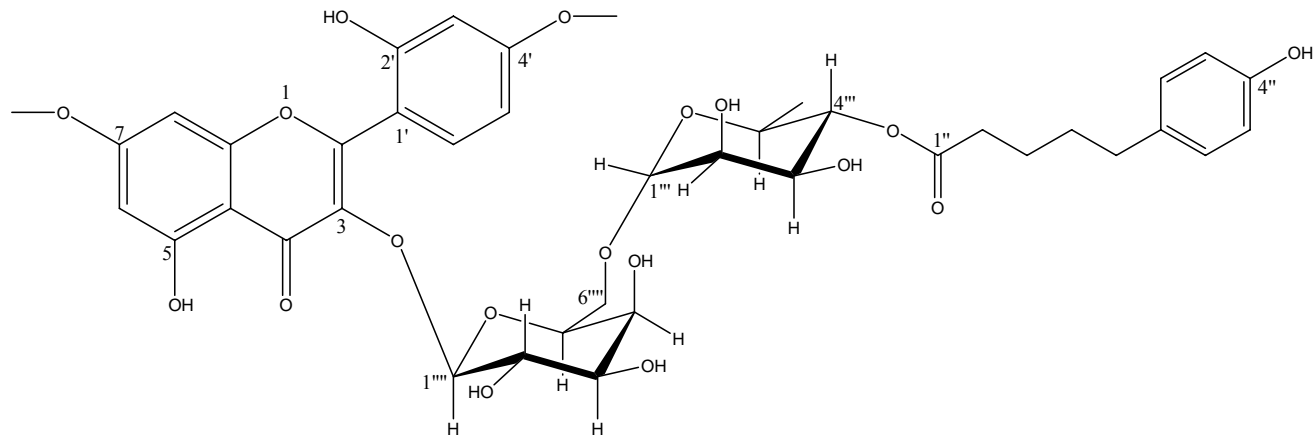
$3\beta$ -O-( $\beta$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4)-rhamnopyranosyl) - 28-acetyloxy- $\Delta^{12}$ -oleanene

Compound 2:



Quercetin-7-O-[α-L-rhamnopyranosyl (1→6)-β-D-galactopyranoside]

Compound 4:



Morin-3-O-[4-[5-(4-hydroxyphenyl) pentanoyl]- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl]-7-O-[4-(4-hydroxyphenyl) pentanoyl]-7-O-methyl ether



