

**GYPSOPHİLA ERİOCALYX BOİSS'DEN SAPONİN
EKSTRAKSİYONU VE KİMYASAL YAPISININ TAYİNİ**

Hüseyin POSLU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MAYIS 2006
ANKARA**

**GYPSOPHİLA ERİOCALYX BOİSS'DEN SAPONİN
EKSTRAKSİYONU VE KİMYASAL YAPISININ TAYİNİ**

Hüseyin POSLU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MAYIS 2006
ANKARA**

Hüseyin POSLU tarafından hazırlanan GYPSOPHILA ERIOCALYX BOISS'DEN SAPONİN EKSTRAKSİYONU VE KİMYASAL YAPISININ TAYİNİ adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Yrd. Doç. Dr. Bekir Sıtkı ÇEVİRİMLİ

Tez Yöneticisi

Yrd. Doç. Dr. Ali DİŞLİ

Tez Yöneticisi

Bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Şule PEKYARDIMCI

Üye : Prof. Dr. Ahmet YAŞAR

Üye : Prof. Dr. Yılmaz YILDIRIR

Üye : Prof. Dr. Beytiye ÖZGÜN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Bekir Sıtkı ÇEVİRİMLİ

Tarih : 16 /05/ 2006

Bu tez, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygundur.

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Hüseyin POSLU

**GYPSOPHILA ERIOALYX BOISS'DEN SAPONİN
EKSTRAKSİYONU VE KİMYASAL YAPISININ TAYİNİ
(Yüksek Lisans Tezi)**

Hüseyin POSLU

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Mayıs 2006**

ÖZET

Bu çalışmada endemik bir bitki olan *Gypsophila Eriocalyx* Boiss'in kökünden ekstraksiyon sonucu elde edilen saponinin kimyasal, antibakteriyel ve antifungal özellikleri araştırıldı. Ham saponinler kolon kromatografisi ile bileşenlerine ayrılmaya çalışıldı ve çalışma sonucu elde edilen kısımların R_f değerleri hesaplandı. Saf olduğu düşünülen saponinin yapısı 1H NMR, ^{13}C NMR, FT-IR ve MS gibi spektroskopik yöntemlerle araştırıldı.

Bilim Kodu : 201.1.020
Anahtar Kelimeler : Gypsophila, Gypsophila Eriocalyx Boiss, Saponin
Sayfa Adedi : 57
Tez Yöneticisi : Yrd. Doç. Dr. Bekir Sıtkı Çevrimli
Yrd. Doç. Dr. Ali Dişli

**EXTRACTION OF A SAPONIN FROM GYPSOPHILA ERIOCALYX BOISS
AND IDENTIFICATION OF ITS CHEMICAL STRUCTURE**

(M.Sc. Thesis)

Hüseyin POSLU

**GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

May 2006

ABSTRACT

In this study, chemical, antibacterial and antifungal properties of crude saponin obtained by extraction from the root of Gypsophila Eriocalyx Boiss, an endemic plant, were investigated. Crude saponins were separated into its components by column chromatography and the R_f values of fractions obtained under this study were calculated. The structure of the component in the spot, expected to be pure were investigated by spectroscopic methods such as ^1H NMR, ^{13}C NMR, FT-IR and MS.

Science Code	: 201.1.020
Key Words	: Gypsophila, Gypsophila Eriocalyx Boiss, Saponin
Page Number	: 57
Adviser	: Yrd. Doç. Dr. Bekir Sıtkı Çevrimli Yrd. Doç. Dr. Ali Dışli

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans çalışmalarım sırasında, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Bekir Sıtkı Çevrimli ve Yrd. Doç. Dr. Ali Dişli'ye sonsuz teşekkür ederim. Çalışmalarım sırasında desteğini esirgemeyen Araş. Gör. Servet Çete' ye teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Bitkinin Tanıtılması	2
2.2. Çöven Bitkisinin Türkiye’deki Yayılışı	2
2.3. Saponinler Hakkında Genel Bilgi	3
2.4. Saponinlerin Bitkide Bulunduğu Kısımlar.....	5
2.5. Saponinlerin Biyolojik Aktivitesi	8
2.6. Saponinlerin Sınıflandırılması	9
2.6.1. Steroidal saponinler.....	10
2.6.2. Triterpenik saponinler	12
2.6.3. Triterpenik saponinlerin sınıflandırılması.....	15
2.7. Saponin İçerdiği Bilinen Bitkilerin Kullanım Alanları.....	17
2.8. Saponinlerin Yapısını Aydınlatmak için Yapılan İşlemler	19
2.8.1. Saponinlerin hidrolizi.....	19

Sayfa

2.8.2. Şekerlerin ve asitlerin tanınması	20
2.8.3. Metilleme işlemi	20
2.8.4. Şeker molekülleri arasındaki bağların çeşidi	21
2.9. Saponinler ile İlgili Yapılan Bilimsel Çalışmalar	21
2.10. Saponinlerin Antiviral ve Antibakteriyel Aktivitesi	22
3. MATERYAL VE METOD	24
3.1 Bitkinin Toplanması ve Deney İçin Hazırlanması	24
3.2. Deneyde Kullanılan Kimyasallar	24
3.3. Kağıt Kromatoğrafisi	25
3.4. İnce Tabaka Kromatoğrafisi.....	25
3.5. Kolon Kromatoğrafisi	26
3.6. Ekstraksiyon Yöntemi.....	26
4. DENEYSEL KISIM.....	27
4.1. Ekstraksiyon.....	27
4.1.1. Ham saponinlerin bütanol fazına alınması	27
4.1.2. Ham saponinlerin çöktürülmesi	28
4.2. İzolasyon	28
4.2.1. Kromatoğrafi kolonunun hazırlanması	28
4.2.2. İnce tabaka kromatoğrafisinin uygulanması	29
4.3. Saponinin Asit Hidrolizi	32
4.4. Şeker Moleküllerinin Tespiti	32
4.5. Çövenin Antibakteriyel ve Antifungal Aktivitesinin İncelenmesi.....	32
4.5.1. Bakterilerin besiyerinde çoğaltılması.....	33

	Sayfa
4.5.2. Petri kaplarının hazırlanması	33
4.5.3. Çözeltilerinin hazırlanması	33
4.5.4. İnhibisyon zonlarının ölçülmesi	34
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	35
5.1. FT-IR Spektrumu Verileri	35
5.2. ^{13}C Spektrumunun Değerlendirilmesi	37
5.3. ^1H NMR Spektrumunun Değerlendirilmesi	42
5.4. Kütle Spektrumunun Değerlendirilmesi	46
5.5. Sonuçlar	49
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	56

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Gypsophila türlerinin yetiştiği yerler	3
Çizelge 2.2. Saponin bulunduran bazı bitkiler	4
Çizelge 4.1. Denenen hareketli faz sistemleri	28
Çizelge 4.2. Kullanılan çözücü sisteminin bileşen değerleri	29
Çizelge 4.3. R _f değerleri	31
Çizelge 5.1. ¹³ C spektrum verileri	41
Çizelge 5.2. İnhibisyon zonları (mm)	50

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Avenasin 1'in yapısı	4
Şekil 2.2. Bitki hücresinden bir bölüm.....	7
Şekil 2.3. Saponinlerin sterollere bağlanması	8
Şekil 2.4. Mantarların saponin molekülüne etkisi.....	9
Şekil 2.5. Steroidal saponinlerin gösterimi	11
Şekil 2.6. İzoprenoid yol	13
Şekil 2.7. Amrin yapılarının oluşumu	14
Şekil 5.1. Aglikonun FT-IR spektrumu.....	36
Şekil 5.2. Aglikonun ^{13}C spektrumu	38
Şekil 5.3. Aglikonun ^{13}C spektrumu	39
Şekil 5.4. Aglikonun ^1H NMR spektrumu	44
Şekil 5.5. Aglikonun ^1H NMR spektrumu	45
Şekil 5.6. Saponinin kütle spektrumu	47
Şekil 5.7. Aglikonun kütle spektrumu	48
Şekil 5.8. Saponinin yapısı.....	49

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Bitkinin yan kök uçları	5
Resim 2.2. Epidermal hücre tabakası	5

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
mg	Miligram
mL	Mililitre
g	Gram
Hz	Hertz
β	Beta
μ	Mikro
α	Alfa
M	Molarite
p	Para
mm	Milimetre
°C	Celcius
R_f	Maddenin aldığı yolun çözücünün aldığı yola oranı

Kısaltmalar	Açıklama
UV	Ultraviyole
IR	İnfrared
NMR	Nükleer Mağnetik Rezonans
TLC	İnce tabaka kromatografisi
MS	Kütle spektrumu
HIV	AIDS hastalığı virüsü

1.GİRİŞ

Birçok bitki içerdđi kimyasal maddeler bakımından, hastalıkların tedavi edilmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu yüzden günümüzde birçok bilim adamı, bitkilerin yapısında bulunan kimyasal maddeleri araştırmakta ve bu maddelerin özelliklerini incelemektedir.

Saponin adı verilen molekülerin bulunduğu bitkilerin; uzun zamandır halk arasında hastalıkların tedavi edilmesinde kullanıldđı bilinmektedir. Günümüzde de bazı hastalıkları tedavi etmek amacı ile bu moleküllerle çalışma yapılmaktadır.

Saponinler insana dahi zehir etkisi gösterebilecek kadar güçlü biyolojik aktiviteye sahip iken, uygun şartlarda kullanıldığında kanser oluşumunu engellemeden koroner kalp hastalıklarının tedavi edilmesine kadar birçok önemli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır.

Üzerinde çalışma yaptığımız Gypsophila Eriocalyx Boiss adlı bitkinin üyesi olduğu Caryophyllaceae ailesinin de saponin içerdđi bilinmektedir. Bu yüzden yapmış olduğumuz çalışmada yalnızca ülkemizde yetişmekte olan bu çok yıllık bitkinin; kök kısmının etanol ekstraktından saponin elde edilmesi, yapısının aydınlatılması ve antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bitkinin Tanıtılması

Latince adı *Gypsophila* olan çöven, Caryophyllales takımından Caryophyllaceae ailesindendir [1]. Üzerinde çalıştığımız bitki çok yıllık bir bitki olmakla beraber 20 ile 30 cm uzunluğunda kalın bir kazık köke, küçük yan köklere, kısa bir gövdeye ve çiçeklere sahiptir. Bitki topraktan çıkarıldığında esnek yapıda bir köke sahipken, kök kurutulduğunda oldukça zor parçalanan bir yapıya sahip olmaktadır. Gövdesi yaklaşık 1 m olan bitkinin çiçeklenme zamanı Haziran ve Temmuz aylarıdır ve çiçekleri oldukça küçüktür.

2.2. Çöven Bitkisinin Türkiye'deki Yayılışı

Çöven otu; Doğu Anadolu, İç Batı Anadolu ve Orta Anadolu'da yetişmektedir.

I)Doğu Anadolu Bölgesi: Van Gölü çevresinde *Gypsophila bicolor* (Freyn.Sint) Groosh adlı çöven otu yetişmektedir. Bitki Temmuz ayı içinde çiçeklendikten sonra toplanmaktadır.

II)İç Batı Anadolu Bölgesi: Konya, Isparta, Burdur, Uşak, Elmalı çevresinde *Gypsophila arrostii* adlı çöven otu yetişmektedir. Bu bitkinin kökleri, Elmalı çevresinde; bitki çiçek açarken, diğer şehirlerde ise çiçekler açtıktan sonra toplanmaktadır.

III)Orta Anadolu Bölgesi: 2 çeşit *Gypsophila* türü yetişmektedir.

a)Çorum Çankırı Bölgesi: Üzerinde çalıştığımız *Gypsophila Eriocalyx* Boiss isimli çöven otu bu bölgede yetişmektedir. Bitkinin kökleri Haziran ve Temmuz aylarında topraktan çıkarılmaktadır.

b)Niğde Bölgesi: Bor ilçesi civarında *Gypsophila perfoliata* L. adlı çöven türü yetişmekte ve bitki, yapraklarının açtığı zamanlarda topraktan çıkarılmaktadır.

Çöven otunun yılın belirli zamanlarında toplanmasının nedeni; bitkinin sentezlediği saponin miktarının yılın belirli zamanlarında artmasından kaynaklanmaktadır.

Çizelge 2.1. *Gypsophila* türlerinin yetiştiği şehirler

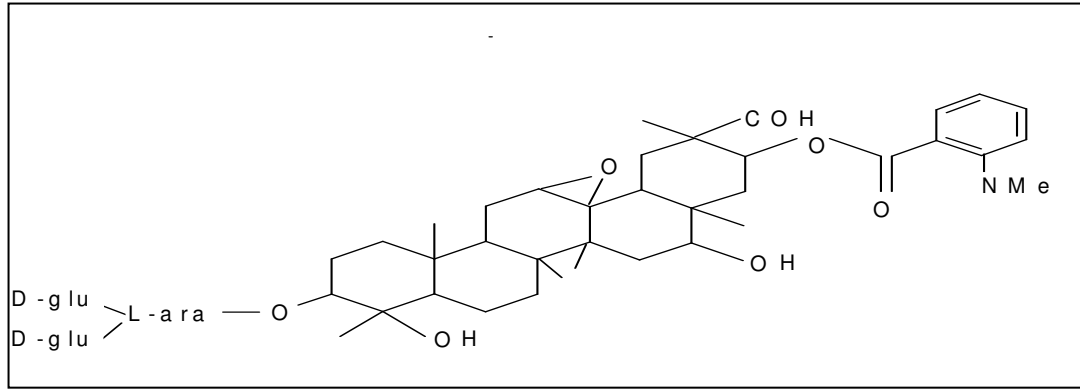
Tür	Yetiştigi yer
G.Bicolor	Van, Artvin
G.arrostii Var. Nebulosa	Isparta, Afyon, Konya, Burdur, Antalya
G.eriocalyx	Ankara, Çankırı, Kars, Eskişehir, Kayseri, Sivas, Niğde
G.perfoliata L.	Niğde, Ankara, Kayseri, Sivas, Erzincan, Denizli

2.3. Saponinler Hakkında Genel Bilgi

Saponin adı Latince sabun anlamına gelen sapo kelimesinden türetilmiştir. Saponinler, sulu çözeltilerinde sabun benzeri kararlı köpük oluşturmaktadır ve yüzey gerilimini azaltıcı özelliğe sahiptirler [2].

Genel bir tanım olarak saponinler; birçok bitki türünün normal gelişme ve büyüme evresinde sentezlediği, bitkinin hayatta kalmasını sağlamak için savunma görevi yapan ikincil metabolitlerin büyük bir ailesidir [3]. Bitkinin büyümesinde ve üremesinde rol almayan saponinler sahip oldukları kuvvetli antimikrobiyal aktiviteleri ile bitkiyi, otçul böceklerin ve mikropların toprak altından yaptığı saldırılardan korumakta ve bitkinin hayatta kalma şansını artırmaktadır [4]. Genelde pentasiklik yapıya sahip apolar aglikon iskeleti ve bu halkaya bağlanmış polar yapıya sahip şeker moleküllerinin birleşiminden oluşan bu moleküller, nötral veya asidik karakterlidir. Saponinler genelde amorf, renksiz olan fakat kristal yapıda ve beyaz renkte türleri bulunabilen; su, etil alkol, metil alkol gibi polar çözücülerde çözünen moleküllerdir.

Saponinlere örnek olarak bir triterpen türü saponin olan Avenasin A-1'in yapısı Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Avenasin A-1'in yapısı

Saponinlerin iskelet yapısını oluşturan aglikon adı verilen polisiklik halkaya, polar şeker molekülleri bağlanmakta ve oldukça polar bir yapıya sahip olan bu moleküller oluşmaktadır. Aynı zamanda meydana gelen bu yapı değişik yerlerinden farklı gruplarla fonksiyonlanabilmektedir.

Saponinler ticari olarak farklı amaçlarda; eczacılıkta, tıpta, köpük oluşturunucularda, kozmetik alanında, tatlandırıcılarda kullanılmaktadır [2].

Çizelge 2.2. Saponin bulunduran bazı bitkiler

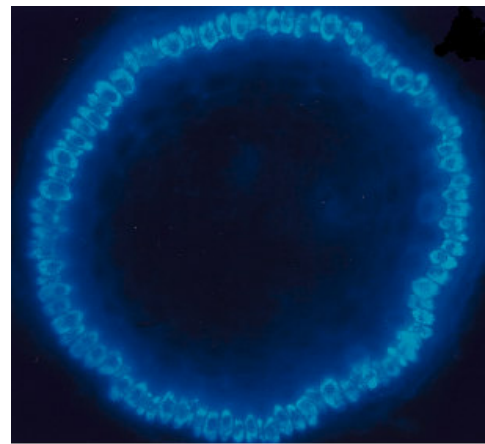
Saponin adı	Saponin türü	Bulunduğu bitki
Styrax-saponin	Triterpenik	Styrax officinalis
Myrioside A	Triterpenik	Oxytropis myriophylla
Hederagenin	Triterpenik	Cephalaria Transsylvanica
Clinopodisides B	Triterpenik	Clinopodium Chinensis
Dioscin	Steroidal	Dioscorea türleri

2.4. Saponinlerin Bitkide Bulunduğu Kısımlar

Triterpenik saponinler temelde çift çenekli bitki türlerinde sentezlenirken, steroidal saponinlerin çoğu tek çeneklilerde sentezlenmektedir. Aynı zamanda bir bitki farklı organlarında farklı türde saponinleri sentezleyebilmektedir [2]. Avena takımının üyesi olan yulaf (*Avena spp*) üzerinde yapılan bir çalışmada, içerdiği saponinlerin steroidal türde olanlarının yapraklarında biriktiği, sahip olduğu triterpenik saponinlerin ise köklerinde biriktiği görülmüştür [4]. Aynı zamanda yulafta bulunan triterpenik saponinlerden en çok bulunanı olan Avenasin A-1 adlı saponinin yulaf kökünün uçlarındaki epidermal hücre tabakasında ve yan kök uçlarında biriktiği görülmüştür. Bu durum Resim 2.1 ve Resim 2.2 'de gösterilmiştir [5].



Resim 2.1. Bitkinin yan kök uçları



Resim 2.2. Epidermal hücre tabakası

Saponinler de dahil olmak üzere bitkilerin ürettiği savunma kimyasalları insana dahi zehir etkisi gösterebilmektedir. Bu yönüyle doğal ürünlerin, bitkiye saldırıda bulunan otçul böceklerle karşı ne kadar iyi savunma yaptığı görülmektedir. Fakat savunma kimyasallarının sentezlenmesinin bitkiye getirdiği yüksek maliyet de bilinmektedir.

Biyosentezleri sırasında kaynaklar çok azalır, bitkinin yapraklarının büyümesi yavaşlar.

Bu moleküller bitkinin kendisine de toksik etki gösterir.

Bitkinin bünyesinde bulunan bu savunma kimyasallarının çevreye yayılması durumunda bitkinin yetiştiği yerlerin civarında başka bitki yetişmemektedir [6].

Bu negatif sonuçları azaltmak için bitkinin izleyeceği yollardan biri, otçul böcekler veya patojenlerin saldırısından hemen sonra bu kimyasalları sentezlemektir. Fakat bu yöntem oldukça risklidir çünkü başlangıç saldırısı çok şiddetli ve çok hızlı olabilir. Bu anda da savunma kimyasallarının hasarı indirmek için etkin bir şekilde ve düzende yerleştirilmesi mümkün olmayabilir. Sonuçta bitkilere her an saldırı olmamaktadır fakat bitki bu saldırılara çok sık maruz kalabilmektedir.

Bitkiler; kendine oldukça yüksek maliyet getiren bu savunma kimyasallarını kendilerine zehir etkisi göstermeksizin bünyesinde saklayabilmektedir. Bu yöntemler şu şekilde sıralanabilir:

1-Saponinlerin aktif olmayan bir önceki durumları ile saklanması; yani aktifleştirici enzimlerinden uzak tutulmasıdır [7].

Hücre içinde Glukosinalatlar ve aktifleştirici enzimi olan Tiyoglukosidaz mirosinaz farklı bölümlerde tutularak birbirleriyle etkileşimleri engellenmektedir. Bu durum Şekil 2.2' de gösterilmiştir.

Kükürtle zenginleştirilmiş olan hücreler, hidroliz edici enzimin bulunduğu pholem parankima hücrelerini ve yüksek derişimde glukosinalatları içeren çiçek sapının epidermisini ayıracak şekilde yerleşmiştir.

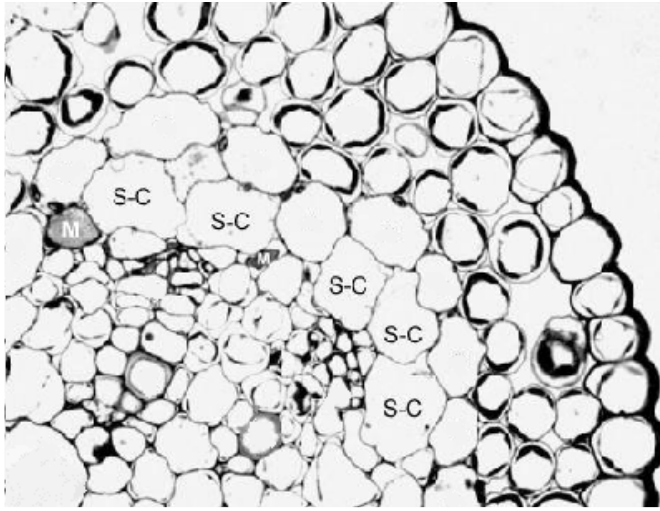
Bitki dokusu zarar gördüğü an glukosinalatlar, tiyoglukosidaz mirosinaz enzimi ile etkileşmekte ve tersinmez olarak aglikonlara hidroliz olmaktadır. Aglikon yapıya ise yeni düzenlemelerle şeker molekülleri bağlanmakta ve antimikrobiyal etki gösteren aktif saponinler oluşmaktadır.

2-Saponinler kolesterol ile kuvvetli derecede kompleks yapma eğilimindedir, kompleks oluşması ise hücrede hemolize yol açmaktadır. Saponinlerin bitki

hücredeki sterollerle kompleks oluşturmaması için, saponin bulunan hücrelerde sterol içeriği olabildiğince az tutulmaktadır.

3-Saponinler bulunduğu hücrelerde yüksek derecede fonksiyonlandırılarak sterollerle kompleks oluşturmaları engellenmektedir.

4-Saponinler bitki hücrelerinin vakuollerinde tutulmaktadır [2].



Şekil 2.2. Bitki hücrelerinden bir bölüm M: Tiyoglukosidaz mirosinaz S-C: Kükürtle zenginleştirilmiş hücreler

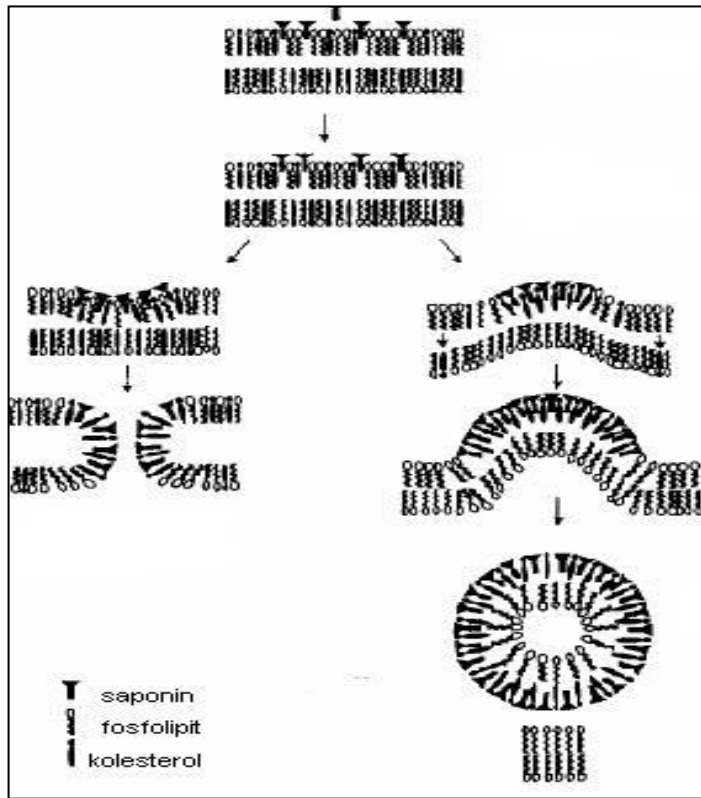
2.5. Saponinlerin Biyolojik Aktivitesi

Saponinler kuvvetli derecede antifungal aktivite göstermektedir. Saponinlerin antifungal aktiviteleri, mantar membranlarındaki sterollerle kompleks oluşturmaları sonucunda hücredeki membran bütünlüğünün kaybolması ve hücre zarında gözenek oluşmasından kaynaklanmaktadır [8].

Saponinler ile bitkiye saldırıda bulunan mikroorganizmaların hücre zarı arasındaki kompleks oluşumunun gerçekleşmesi ile mikroorganizmaların hayatsal faaliyetlerinin düzenlendiği hücrenin bütünlüğü bozulmakta ve hücre görevini yapamaz hale gelmektedir.

Saponinler ile mikroorganizmaların hücre zarı arasındaki etkileşim Şekil 2.5’ de gösterilmiştir.

Saponinler mikroorganizmalara karşı biyolojik aktivite gösterdiği için eczacılıkta da tedavi amacı ile kullanılmaktadır.

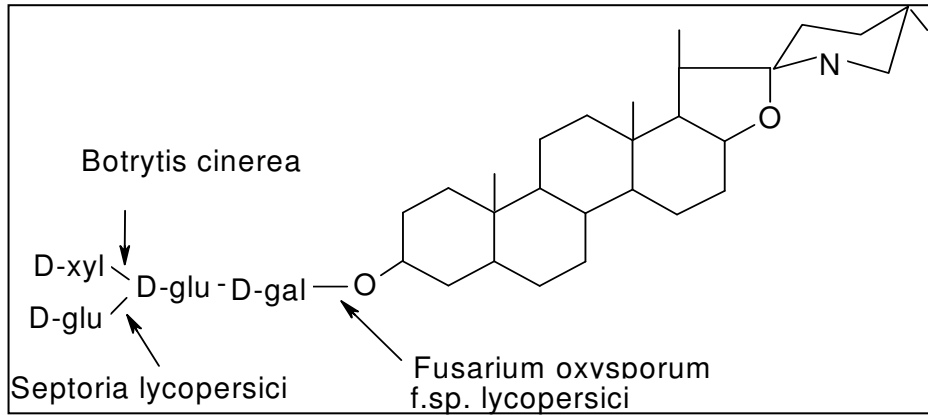


Şekil 2.3. Saponinlerin sterollere bağlanması

Saponinlerin hücre zarındaki sterollerle kompleks oluşturup antimikrobiyal aktivite göstermesinde, bu moleküllerin sahip olduğu şeker moleküllerinin kritik rol oynadığı düşünülmüştür. Şeker zincirindeki bir molekülün dahi uzaklaştırılması sonucunda aktivitede önemli derecede azalma meydana gelmektedir [9–12].

Saponinler bazı mantarlara karşı kuvvetli derecede aktivite gösterirken bazı mantarlara karşı aktivite göstermemektedir. *Botrytis cinerea*, *Septoria lycopersici* ve *Fusarium oxysporum* f.s.p. *lycopersici* adlı mantar hücreleri ile yapılan araştırmada,

bu mantarların saponin molekülünde bulunan şeker zincirindeki şeker molekülleri arasındaki glukozidik bağları kırarak enzimlere sahip olduğu görülmüştür. Şeker zincirinin yapısının bozulması ile antifungal aktivitede büyük oranda azalma meydana gelmektedir [6].



Şekil 2.4. Mantarların saponin molekülüne etkisi

Şekil 2.4’da mantar hücrelerinin sahip olduğu enzimlerle saponin molekülünün şeker zincirindeki bağları spesifik olarak hangi glukozidik bağdan kopardığı görülmektedir.

2.6. Saponinlerin Sınıflandırılması

Saponinler; triterpenik ve steroidal saponinler olarak başlıca iki grup altında sınıflandırılır. Bu ayrımın yapılmasında saponinin yapısındaki polisiklik halkanın yapısı göz önüne alınmaktadır.

Genelde, triterpenik saponinlerde bulunan aglikon kısmı beş halkadan meydana gelirken, steroidal saponinlerde aglikon kısmı altı halkadan meydana gelmektedir.

Bitkiler aleminde; triterpenik saponinler steroidal saponinlere nazaran daha çok bulunmaktadır.

Orta Asya ve Güney Kazakistan’da 104 bitki ailesinin 1730 türü araştırılmış ve 627 triterpenik, 127 steroidal saponin türü bulunmuştur [13].

2.6.1.Steroidal saponinler

Sahip oldukları aglikonlara göre 4 gruba ayrılan steroidal saponinlere; *Digitalis purpurea* (Mayasıl otu), *Digitalis lanata* (Yüksük otu), *Similax* türleri (Silcan), *Dioscorea* türlerinde oldukça sık rastlanılmaktadır.

Triterpenik saponinler bulunduğu bitkinin kök kısmında birikirken; steroidal saponinler bulunduğu bitkinin yapraklarında yer almaktadır.

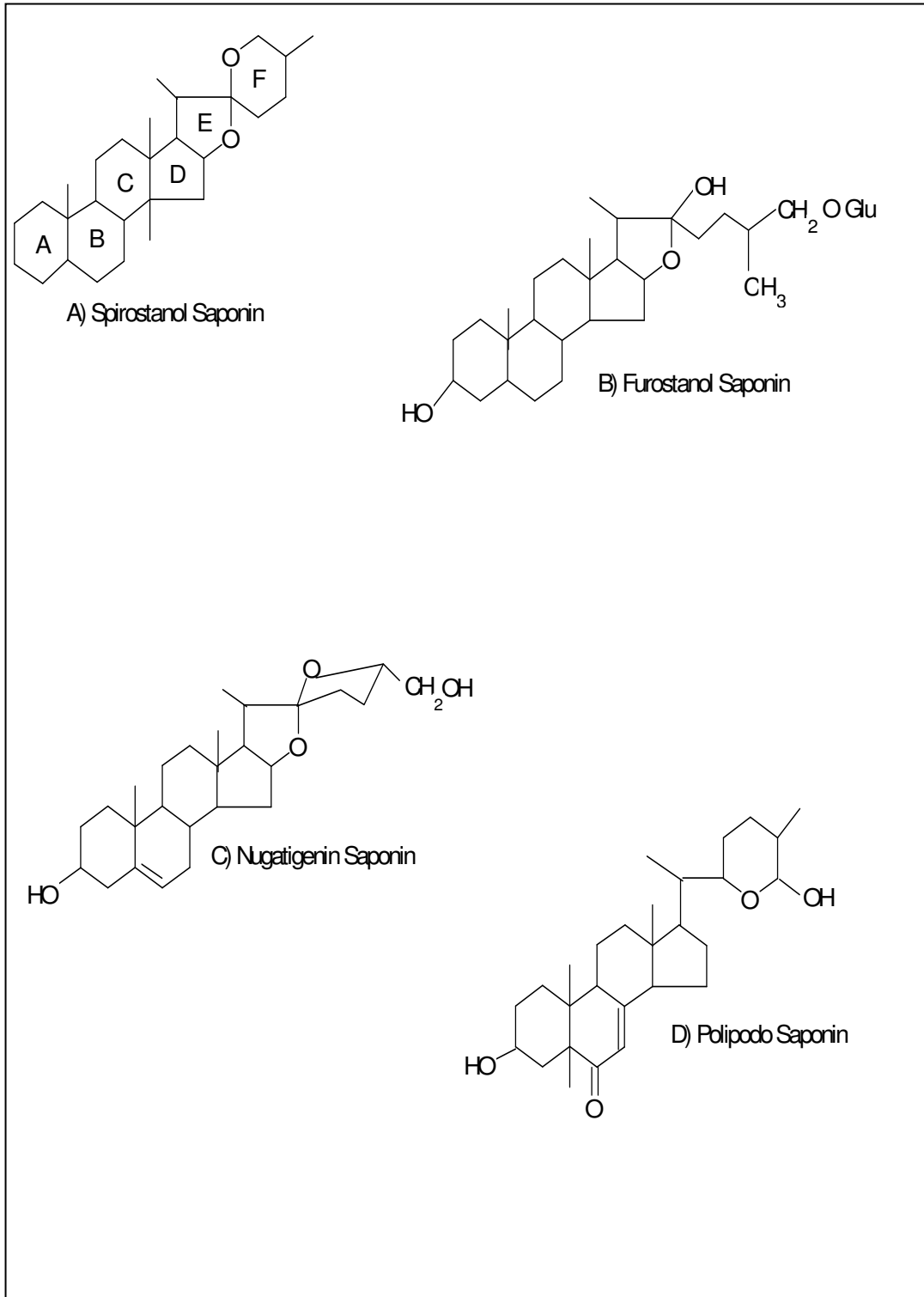
1-Spirostanol saponinler

2-Furostanol saponinler

3-Nuatigenin saponinler

4-Polipodo saponinler

Steroidal saponinlerin yapıları Şekil 2.5’de gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Steroidal saponinlerin gösterimi

1-Spirostanol saponinler: 90'dan fazla spirostanol tipi saponin türü izole edilmiş ve genelde şeker molekülünün veya zincirinin polisiklik halkanın üçüncü karbonu üzerindeki hidroksil grubu üzerinden bağlandığı görülmüştür. Bazı spirostanol saponinlerin yapısındaki şeker zinciri polisiklik halkanın üçüncü karbonu üzerindeki hidroksil grubu üzerinden değil; birinci, ikinci, beşinci, altıncı veya onbirinci karbon atomu üzerindeki hidroksil grubu üzerinden bağlanmaktadır [14]. Aynı zamanda iki karbon atomu üzerinden şeker molekülünün bağlandığı bidesmosidik olarak adlandırılan türleri de bulunmaktadır [15].

2-Furostanol saponinler: Spirostanol saponinin sahip olduğu aglikondaki en son halkanın açılmasıyla furostanol yapıdaki saponinler oluşur. Aglikona bağlanan şeker molekülleri yirmialtıncı karbon atomu üzerinden bağlanmaktadır. Yapılan araştırmada hem üçüncü hem de yirmialtıncı karbon atomu üzerinden şeker moleküllerinin bağlandığı bidesmosidik yapıları tespit edilmiştir [16].

3-Nuatigenin saponinler: Sahip olduğu hegzasiklik halkanın son halkası beş karbonludur. Veronica Species'den elde edilen bidesmosidik saponin bu gruptaki saponinlere örnek gösterilebilir [17].

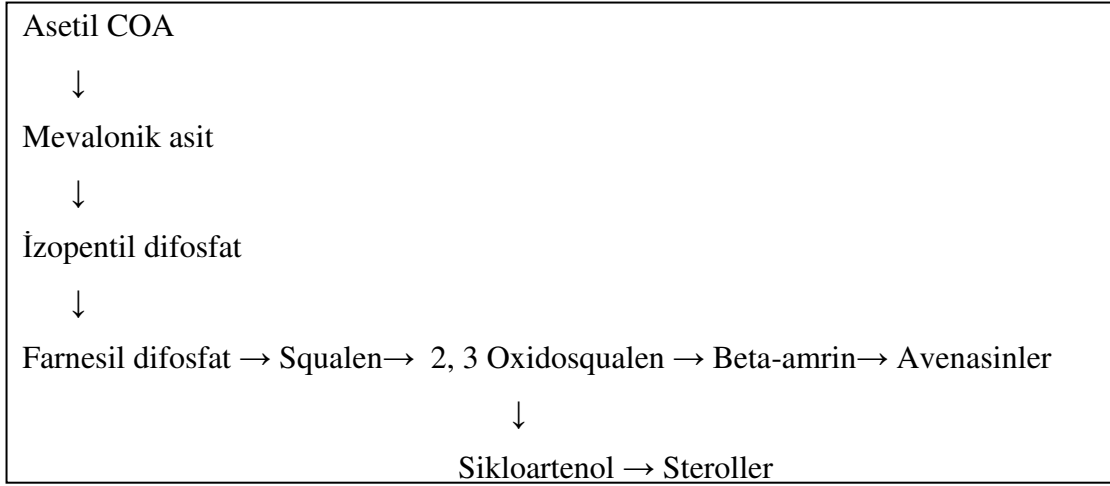
4-Polipodo saponinler: Polypodim vulgae rizomlarından elde edilen saponinin aglikon kısmı bu saponin türüne örnek olarak gösterilebilir. Kolesterolün sekiz karbonlu yan zincirinin altılı halka meydana getirmesiyle oluşmaktadır.

Genel olarak steroidal saponinler; Liliaceae, Dioscoraceae ve Agavaceae ailelerinin tek çenekli üyelerinde sentezlenmektedirler [18].

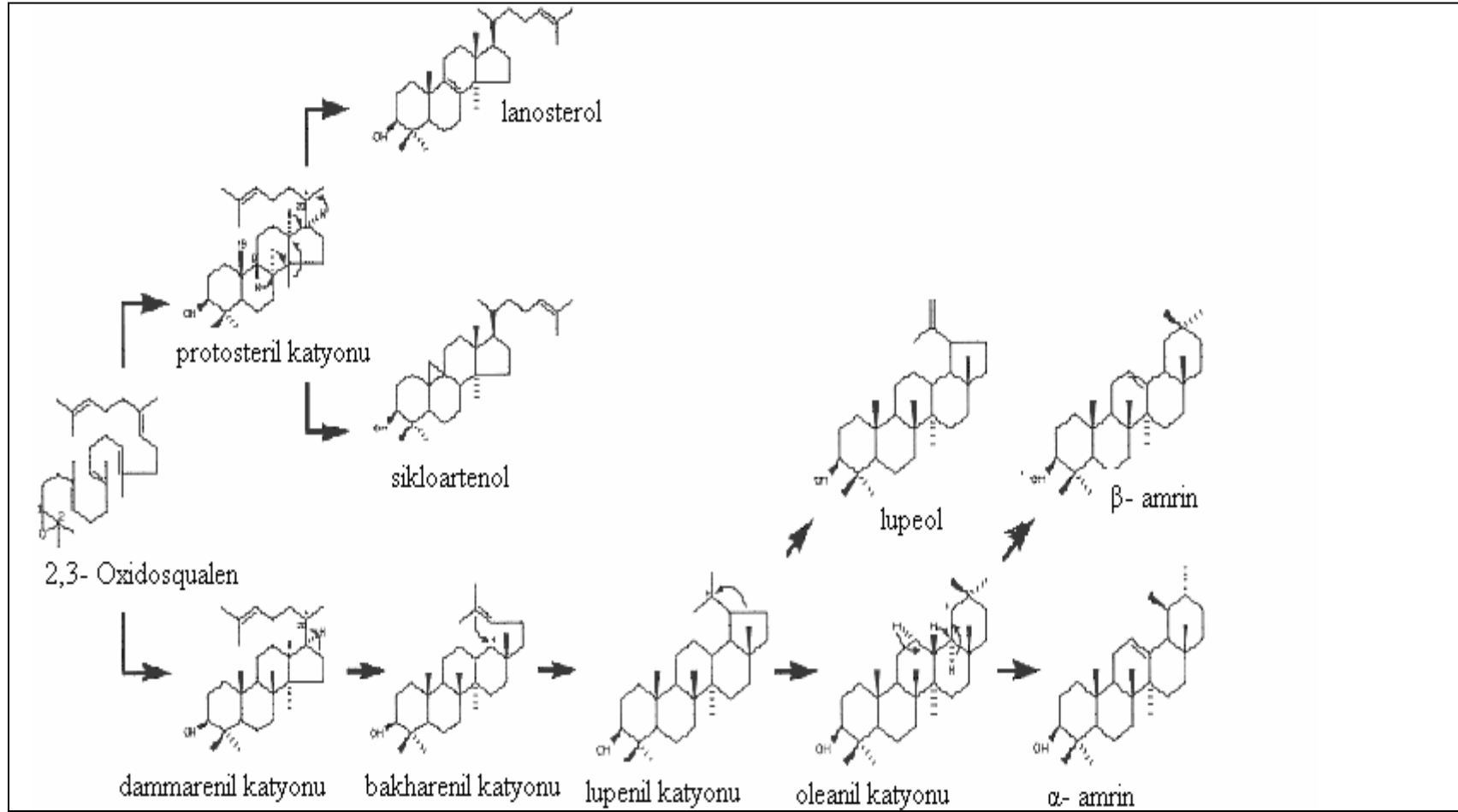
2.6.2.Triterpenik saponinler

Temelde Caryophyllaceae, Hippocastanaceae, Polygaceae gibi çift çenekli bitki ailelerinde sentezlenmektedirler [2]. Triterpenik saponinlerin aglikon kısımlarında genelde beta-amrin halkası vardır.

Mevalonik asitten izoprenoid yol ile 2,3 Oksidosqualen sentezlenmekte ve bu molekülün çevrim ürünü olan pentasiklik halkanın türevlendirilmesi ile beta-amrin yapısı oluşmaktadır [19]. Sentez yolu Şekil 2.6 ve Şekil 2.7’de gösterilmiştir [20].



Şekil 2.8. İzoprenoid yol



Şekil2.9. Amrin yapılarının oluşumu

Triterpenik saponinler, pentasiklik halkanın üçüncü karbonunda hidroksil grubu taşırlar ve şeker molekülleri aglikona genelde bu grup üzerinden bağlanırlar. Aglikon yapısındaki 23, 24, 28, 29, 30 nolu karbonların oluşturduğu metil grupları yüksek oksidasyon basamağına sahiptirler ve bu gruplar karboksil gruplarına yükseltgenebilirler [21]. Pentasiklik halkadaki çift bağ genelde 12. ve 13. karbon atomları arasında bulunmaktadır. Bazı triterpenik saponinlerde 13. ve 28. karbon atomu arasında epoksi köprüsü oluşmakta ve bu durumda 12. ve 13. karbon atomu arasındaki çift bağ kaybolmaktadır [22].

Triterpenik saponinler aglikondaki tek karbon atomu üzerinden şeker molekülleri bağlandığında monodesmosidik, aglikondaki farklı iki karbon atomu üzerinden iki şeker zinciri bağlandığında bidesmosidik olarak adlandırılmaktadır. Bağlanan ikinci şeker zinciri genelde pentasiklik halkadaki 17. karbona bağlı olan karboksil grubunun karbon atomu üzerinden ester bağı ile bağlanmaktadır [23].

2.6.3. Triterpenik saponinlerin sınıflandırılması

A) Monodesmosidik saponinler

1-Nötral saponinler

2-Ester saponinler

3-Asidik saponinler

a) Glukoronik asit taşıyan saponinler

b) Asit aglikonlu saponinler

4-Açıl saponinler

B) Bidesmosidik saponinler

1-Nötral bidesmosidik saponinler

2-Asidik bidesmosidik saponinler

1-Nötral saponinler: Şeker molekülleri aglikona pentasiklik halkanın üçüncü karbon atomu üzerindeki hidroksil grubu üzerinden bağlanmıştır. Kuvvetli hemolitik etkiye sahip olan bu tür saponinler, kolesterolle çok kuvvetli kompleks oluştururlar.

2-Ester saponinler: Pentasiklik halkada ester bağı oluşturan gruplar genelde formik asit, asetik asit, anjelik asit, tiglik asittir [14]. Bu tür saponinlerin hücre içinde biyolojik aktivite gösterdiği bilinmektedir, Aeusoulus Assamica Griff adlı bitkiden elde edilen triterpenik ester saponinin insülin benzeri biyoaktif özellik gösterdiği bulunmuştur. Yapılan bu çalışmada sıçan adipositlerine epinefrin uygulandıktan sonra, sıçanlara bu saponin enjekte edilmiş ve yağ asitlerinin adipositlerden serbest hale geçmesinin engellendiği görülmüştür [24].

3-Glukoronik asit taşıyan asidik saponinler: Bu saponinin sahip olduğu aglikon nötral karakterde olmasına rağmen bu halkaya bağlı bulunan şeker molekülüne bir karboksil grubu bağlı bulunmaktadır [25]. Glukoronik asit olarak adlandırılan bu yapı daima pentasiklik halkaya 3. karbon atomuna bağlı hidroksil grubu üzerinden bağlanmaktadır [14].

a)Asit aglikonlu saponinler: Bu tür saponinlerde; saponinin aglikon kısmına bağlı bir karboksil grubu bulunmaktadır. Bu tip aglikonlara ursolik asit, ekinosistik asit, hederagenin, oleanolik asit örnek olarak gösterilebilir [26].

b)Açıl saponinler: Bu tür saponinlerde pentasiklik halkadaki 17. karbona bağlı olan karboksil grubu üzerinden şeker molekülleri bağlanmaktadır. Bu tür saponinlerin de biyolojik aktivite gösterdiği bilinmektedir.

Yapılan bir çalışmada *Muraltia heisteria* adlı bitkiden elde edilen açillenmiş saponinin insandaki kolon kanserine karşı aktivite gösterdiği bulunmuştur [27].

1-Nötral bidesmosidik saponinler: Aglikon yapısında asidik karakterli bir grup bulunduran bu saponin türünde asit karakterli grup üzerinden şeker molekülü bağlanmakta ve nötral bir yapı meydana gelmektedir [28].

2-Asidik bidesmosidik saponinler: Bu saponinlerin asidik karakteri şeker zincirindeki taşıdığı glukoronik asitten kaynaklanmaktadır. Bu tür saponinler oldukça polar bir yapıya sahiptirler; deterjan yapımında ve köpük oluşturunca olarak kullanılmaktadır [14].

2.7. Saponin İçerdiği Bilinen Bitkilerin Kullanım Alanları

Caryophyllaceae ailesinden Morocco’da yetişen çok yıllık bir bitki olan *Silene cucubulus* halk arasında saç bakımında ve deterjan olarak kullanılmakta ve kırsal kesimlerde bu bitkinin kaynatılmasıyla elde edilen özüt; yaralanmaların, uyuzun ve deri enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır [29].

Tieghemella heckelli adlı ağaç yumurta şeklinde meyveler vermektedir. Bu meyvelerin kurutulmuş tohumlarında yağ asitleri ve yağlı maddelerin olduğu bilinmektedir [30]. Bu meyvenin ekstraktının ise HIV’in hücre içine girmesini kuvvetle inhibe ettiği görülmüştür [31].

Caryophyllaceae ailesinden batı Mısır’da yetişen *Gypsophila capillaris* adlı bitkinin kuvvetli derecede antimikrobiyal özellik gösterdiği bilinmektedir [33]. Aynı zamanda bu bitkinin antiviral özellik gösterdiği de belirtilmiştir [34].

Araliaceae ailesi medikal alanda tedavi için kullanılan en önemli ailelerdendir, bu ailenin en belirgin üyesi ginseng (*Panax Ginseng* C. A. Mayer) dir ve bu bitkinin geleneksel doğu tıbbında 5000 yılın üzerinde kullanıldığı bilinmektedir [35].

Panax türlerinin akli kabiliyetlerin artmasında, metabolik fonksiyonların uyarılmasında, sağlığın güçlendirilmesinde kullanıldığı bilinmektedir [36].

Papua New Guinea’da yetişen *Picrasma Javanica* adlı bitki geleneksel halk tedavisinde; mide ağrısının giderilmesinde, iltihapların iyileştirilmesinde ve ateş düşürücü olarak kullanılmaktadır [37]. Aynı zamanda zehirli kaplumbağa yendiğinde meydana gelen zehirlenme olaylarında, panzehir olarak da kullanılmaktadır [38].

Halk arasında eskiden beri *Fructus trichosanthis* ve *Bulbus allii macrostemi* adlı bitkilerin karışımının şarap ile ekstrakte edildikten sonra elde edilen kısmının bağırsak tembelliğinin giderilmesinde ve kan akımının hızlandırılmasında kullanıldığı bilinmektedir. Aynı zamanda birkaç yüzyıldır da bu bitkinin ekstraktının koroner kalp hastalıklarının tedavisinde kullanıldığı ve de modern klinik uygulamalarda iyi sonuçlar elde edildiği bilinmektedir [39].

Sansevieria takımının üyesi olan ve Güney Afrika'nın ılıman kısımlarında yetişen *S. Trifasciata* adlı bitki, iltihapların tedavisinde ve yılan tarafından ısırılan yaralıların tedavi edilmesinde kullanılmaktadır [40].

Moğol halkı uyguladıkları geleneksel halk tedavisinde *Oxtropis myriophylla* adlı bitkiyi ateş düşürücü olarak kullanmaktadır. Aynı zamanda kanama anında kanamayı kontrol altına almak, kızamıkçığın tedavisi, grip tedavisi, boğaz ağrısının ve şişliğinin giderilmesi için kullanmaktadır [41].

Caryophyllaceae ailesinden olan *Arenaria Junea* Çin'de yetişen bir bitkidir. Geleneksel Çin tedavisinde yetersiz beslenen çocuklarda görülen ateşlenmenin tedavisinde kullanılmaktadır [42].

Merkez Amerika, Meksika ve Türkiye'yi de kaplayan Akdeniz' de *Styrax officinalis* adlı bitki yetişmektedir. Bu bitkinin reçinesi Romanyalılar, Mısırlılar ve İyonyalılar tarafından güzel koku için ve şifa verici bitki olarak kullanılmıştır [43].

Dünyanın yarı ılıman bölgesinde yetişen *Tribulus terrestris* adlı bitki; halk arasında idrar yolları, böbrek, karaciğer ve göz hastalıkları tedavisinde kullanılmaktadır [44].

Nijerya'da yetişen *Eryngium foetidum* (Linn) (*Apiaceae*) adlı bitkinin meyveleri şeker tadında olup yerel halk tarafından bisküvilerde kullanılmaktadır. Aynı zamanda bitkinin yaprakları balgam söktürücü olarak kullanılmaktadır [45].

2.8. Saponinlerin Yapısını Aydınlatmak İçin Yapılan İşlemler

Saponinlerin yapısını aydınlatmak için; aglikon yapıyı oluşturan polisiklik halkanın cinsi ve buna bağlı şekerlerin cinsi belirlenmelidir. Ayrıca şekerlerin aglikona bağlı olduğu yerler ve şekerlerin konfigürasyonları da belirlenmelidir.

Bu soruların cevaplanması için, önce saponin saf olarak elde edilir; asidik, bazik veya enzimatik olarak hidroliz edildikten sonra aglikon teşhis edilir, ardından şekerlerin kalitatif ve kantitatif tayini yapılır. Asit hidroliz veya bazik hidrolizle şekerlerin polisiklik halkaya bağlanma şeklini, metilleme ve asit hidrolizle birbirleriyle olan bağlanma şekli belirlenir. NMR spektrumu ile şekerlerin konfigürasyonu kütle spektrumu ile saponinin molekül ağırlığı belirlenebilmektedir.

2.8.1. Saponinlerin hidrolizi

Saponinler, seyreltik asitlerle (HCl, CH₃COOH v.b) ile kaynatıldıktan sonra aglikon ve şeker birimlerine parçalanır. Fakat şeker molekülü aglikona ester bağı ile bağlanmışsa tam bir ayrılma olmaz. Bunun için bazik hidroliz yapılır ve şekerin hidroksil grubu veya karboksil grubu üzerinden halkaya bağlı olduğu belirlenir. Asit hidrolizi için; 2 M HCl ve dioksan karışımıyla 100⁰ C 'da 1 saat hidroliz işleminin iyi sonuç vereceği yapılan bir çalışmada belirtilmiştir. Aglikon yapısı belirlenirken yapısı aydınlatılmış aglikonların karakteristik pikleri karşılaştırılarak yapı önerilebilmektedir [46]. Aglikon yapısı bilinmeyen bir aglikonla karşılaşırsa, yapıyı aydınlatmak için UV, IR, NMR, kütle spektrumu gibi spektroskopik yöntemlerden faydalanılmaktadır.

Asit hidrolizi sonucunda aglikonlar değişik yapılara dönüşebilmektedir. Bunu önlemek için enzim ile hidroliz yöntemi de kullanılabilir. Starfish Anesterias Minuta'dan elde edilen steroidal saponinler Charonia lampas glukasidaz karışımı ile hidroliz edilerek şeker zincirinden glikoz molekülü koparılmıştır [47]. Şekerlerin aglikondan koparılması için yapılan bir başka çalışmada UV ışınları kullanılmıştır. Primula siebaldi'den elde edilen saponinlerin metanoldeki çözeltisi UV ışığına maruz

bırakıldığında, Protoprimulagenin A elde edilmiştir. Bu hidroliz işleminin gerçekleşmesi için aglikona bağlı olan şekerin glukoronik asit olması gerektiği ifade edilmiştir.

2.8.2. Şekerlerin ve asitlerin tanınması

Şeker zinciri hidroliz edildikten sonra uygun gaz kromatoğrafisi yöntemi ile şekerlerin yapısı belirlenebilmektedir [48]. Aynı zamanda kağıt kromatoğrafisi yöntemi kullanılarak şekerlerin yapıları belirlenebilmektedir [49].

F.R. Melek ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, saponin molekülü asit hidrolizine maruz bırakılmış ardından çözelti piridin içinde D-sistein metil esteri ile 1,5 saat 60⁰ C’da karıştırılmıştır. Bu sürenin sonunda reaksiyon ortamına hegzametil disilazan ve trimetilsilil klorür ilave edilip 30 dakika 60⁰ C’de karıştırılmıştır. Reaksiyon sonunda elde edilen şeker molekülleri GC yöntemi uygulanarak tayin edilmiştir [50]. Şeker moleküllerinin tayini gaz kromatoğrafisi yöntemiyle başka çalışmalarda da uygulanılmıştır [51].

Asit özelliği gösteren gruplar (-COOH) alkali ile hidroliz edildikten sonra elde edilen esterler gaz kromatoğrafisi ile tayin edilebilmektedir [52-53]. Ayrıca yapı tayininde ¹³C NMR’ den faydalanılmaktadır [50].

2.8.3. Metilleme işlemi

Metilleme işlemi, şeker molekülünün şeker zincirindeki yerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. İlk olarak metilleme işlemi yapılır, ardından asit hidroliz yapılarak metillenmiş şeker molekülleri monomerleri olarak elde edilmektedir. Gaz kromatoğrafisi ile alıkonma zamanlarından, İTK ile R_f değerlerinden faydalanılarak şekerlerin yapıları belirlenir ve metilleme derecelerine bakılarak, şeker zincirinin ortasında ya da uç kısmında olduğu belirlenebilir.

2.8.4. Şeker molekülleri arasındaki bağların çeşidi

Şekerlerin anomerik protonlarının ^1H NMR spektrumunda verdiği sinyallerden faydalanarak bağların alfa ya da beta durumunda olduğu belirlenebilmektedir. Şekerler arasındaki bağ alfa şeklinde ise yarıлма yaklaşık 3-4 Hz, beta şeklinde ise yaklaşık 8 Hz civarında olmaktadır [50].

2.9. Saponinler ile İlgili Yapılan Bilimsel Çalışmalar

Meryta lanceolata adlı bitki üzerinde yapılan bir çalışmada, bitkinin yaprakları ve gövde sapı kurutulduktan sonra, kloroformla ekstrakte edilerek yağimsı maddeler uzaklaştırılmıştır. Ardından ekstraksiyon sonunda kalan kısım metanol ile ekstrakte edilerek alkol fazına ham saponinler alınmış son olarak elde edilen saponin karışımı silikajel kolondan geçirilerek HPLC cihazına alınmış ve bu işlemle saf olarak elde edilmiştir.

Elde edilen saponinin asit hidrolizi sonucu elde edilen aglikon oleonik asit olarak bulunmuş ^{13}C NMR spektrumunda 30 sinyalin aglikon kısmına ait olduğu belirlenmiştir. Ayrıca asit hidroliz sonucu elde edilen aglikon, yapılan HPLC analizi sonucunda alıkonma zamanından belirlenmiştir. Asit hidrolizi sonucu elde edilen şeker molekülleri ise silillendikten sonra gaz kromatografisi yöntemiyle belirlenmiştir [50].

Styrax officinalis üzerinde yapılan bir çalışmada bitkinin açık havada kurutulmuş meyveleri %80' lik metil alkol ile ekstrakte edilmiştir. Elde edilen çözeltiden çözücü uzaklaştırıldıktan sonra kalan kısım metil alkolde çözülmüş ve aseton kullanılarak çöktürülmüştür. Oluşan çökelek süzöldükten sonra, suda çözülmüş ve dietil eterle yıkanmıştır. Ardından sulu faz butanol ile ekstakte edilmiş ve bütanol fazından elde edilen katı madde karışımına su-metil alkol hareketli fazı kullanılarak kolon kromatografisi yöntemi uygulanmış, elde edilen ham saponinler preperatif TLC ile birbirlerinden ayrıştırılmıştır.

Elde edilen saponinler (1:1) Metil alkol / 2 M HCl karışımı ile asidik hidroliz , % 33 KOH' in metanoldeki çözeltisi ile bazik hidroliz yapılmış, ardından elde edilen moleküllerin IR, ¹³C NMR, ¹H NMR, FAB-MS spektrumları değerlendirilerek yapıları tayin edilmiştir [25].

Diploclesia glaucescens adlı bitkinin kurutulmuş meyveleri hegzan ile ekstrakte edilmiş ve yağlarından arındırılmıştır. Meyveler tekrardan metanol ile ekstrakte edilmiş çözücü uzaklaştırıldıktan sonra saponinleri içeren kahverengi katı elde edilmiştir. Elde edilen kısım silikajel kolondan geçirilmiş ve saponinlerden ikisi elde edilmiştir. Kolondan alınan fraksiyonlar tekrardan başka bir kolona verilmiş bu kolondan alınan elüat HPLC cihazına alınmış ve iki saponin daha elde edilmiştir.

Elde edilen saponinlerden biri 4 M HCl ile asit hidrolizine maruz bırakılmış ve tanık numuneler kullanılarak aglikonunun yapısı phytolaccagenic asit olarak, şekerlerin yapısı da D-glukoz olarak bulunmuştur.

Ayrıca kütle spektrumunda 839'da bir pik gözlenmiştir. Bu da glukozun bir tanesinin aglikona ester bağı ile bağlandığını göstermektedir [54]. Bu tespitite ¹³C NMR spektrumunda 176,0'da görülen sinyal ile desteklenmiştir. Aglikonun üçüncü karbonunun ¹³C NMR spektrumunda 81,9'da görülmesi de diğer iki glukoz biriminin bu karbon atomu üzerinden bağlandığını desteklemektedir. Sonuçta saponinin yapısı 3-O-[β-D- glukopiranozil (1-3)-β-D- glukopiranozil] phytolaccagenic asit 28-O-β-D- glukopiranozil ester olarak bulunmuştur [46]. Yapılan bir çalışmada aglikon kısmına bağlanan glukozların bitki hücresinde bulunan glukozil transferaz enzimi tarafından bağlandığı bulunmuştur [55].

2.10. Saponinlerin Antiviral ve Antibakteriyel Aktivitesi

Yapılan bir çalışmada *Tieghemella heckelli* adlı bir ağaçtan Arganine C ve Tieghemelin adlı iki aktif saponin izole edilmiş ve bu moleküllerin HIV üzerine etkileri incelenmiştir. Yapılan bu çalışmada saponinlerin Syncytium oluşumunu inhibe ettiği görülmüştür. Syncytium oluşumunda; bir hücre virüsü aldıktan sonra

diğer sağlıklı hücrelerin içine girmekte ve diğer hücreleri de hastalandırmaktadır. Bu olay bir hücrenin içine infekte olmuş iki veya daha fazla hücrenin girmesiyle hızlanmaktadır [56].

Yapılan bu çalışmada elde edilen saponinlerden 20 μM 'lık bir derişimde Arginine C %100 oranında Syncytium oluşumunu inhibe ederken Tieghemelin (2)yarı yarıya etki gösterebilmiştir.

Bu saponinlerin bazık hidrolizi yapıldıktan sonra şeker molekülleri yapıdan uzaklaştırılmış bu işlemle elde edilen moleküllerin ise hiçbir aktivite göstermediğı görülmüştür. Yapılan bu çalışmada şeker zincirinin HIV üzerindeki etkide kritik önem taşıdığı belirtilmiştir [30].

Astragalus verrucocus adlı bitkinin polar çözücülerle elde edilen ekstraktlarının gram negatif bakterilere etki göstermezken, Staphylococcus aureus adlı gram pozitif bakteriye karşı aktivite gösterdiği bulunmuştur [57].

Yapılan bir çalışmada Panax ginseng C.A. Meyer (Araliaceae) köklerinden yeni bir oleonik asit türevi saponin elde edilmiştir. Bu saponin de, diğer saponinlerde görülmeyen aglikonun üçüncü karbonundan bağı olan şeker molekülüne bağı uzun bir poliasetilen kuyruğı bulunmaktadır [58].

Bu saponin ile yapılan bir çalışmada 13,4 $\mu\text{g/ml}$ 'lik saponin çözeltisinin HIV replikasyonunu engellediğı bulunmuştur. Yayınlanmış diğer HIV inhibitörü saponinlere nazaran çok düşük derişimde etki göstermesinin nedeni olarak saponinin sahip olduğı poliasetilen kısmının varlığı düşünülmüştür [59]. Bu bileşenlerin etki mekanizması hakkında çok az bilgi mevcut olmasına rağmen biyolojik aktivitenin virüs membranı ile saponin bileşiğinin spesifik olmayan etkileşimi sonucu virüs replikasyonunun başlangıç basamağının gerçekleşmemesinden kaynaklandığı düşünülmüştür [60].

3. MATERİYAL VE METOD

3.1. Bitkinin Toplanması ve Deney için Hazırlanması

Üzerinde çalıştığımız çöven otu, Çankırı ilinde yalnızca bu bitkinin yetiştiği bir araziden toplandı. Toplanan çöven otu Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Zeki Aytaç tarafından teşhis edildi. Teşhis edilen çöven otunun kök kısımlarını, gövdeden ayırdıktan sonra kök parçaları temizlendi ve gölgede kurumaya bırakıldı. Kuruyan kökler Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi değirmenlerinde öğütülerek toz haline getirildi ve deneyde kullanılmak üzere ışık ve nemden korunarak laboratuvarında saklandı.

3.2. Deneyde Kullanılan Kimyasallar

Petrol eteri (40- 60) (Carlo Erba)

Metanol (Merck)

Bütanol (Merck)

Sülfürik asit (Merck)

Etil asetat (Merck)

Hidroklorik asit (Merck)

Kloroform (Merck)

Sodyum hidroksit (BDH)

Asetik asit (Merck)

Dietil eter (Merck)

Aseton (Merck)

Silikajel (0,063- 0,2 mm) (Merck)

Sephadex Lh- 20 (25-100 μ) (Sigma- Aldrich)

Gümüş nitrat (Merck)

3.3. Kağıt Kromatoğrafisi

Kağıt kromatoğrafisinde; sabit faz kağıt; hareketli faz ise bu kağıdın daldırıldığı sıvı bileşimidir, sıvı kağıt üzerinde kapilarite etkisiyle ilerler ve kağıt üzerindeki bileşikler yapılarına göre farklı hızlarda sürükler [61-63].

Ayırılacak karışım, uygun çözücüde çözüldükten sonra, elde edilen çözeltiden bir damla süzgeç kağıdına damlatılır ve kurutulur. Kağıt, deneyde kullanılacak hareketli fazın buharıyla doymuş hale getirilmiş tanka konur ve hareketli faz sistemi kağıt üzerinde ilerlerken, damlatılan karışımı da çözerek, karışımdaki her maddeyi farklı hızda sürükler. Eğer ayırılacak olan maddeler renkli ise lekeler kolayca görülür, renkli değil ise renklendirme reaktifi ile renklendirilir. Tek yönlü, çift yönlü, yükselen ve alçalan olmak üzere çeşitli kağıt kromatoğrafisi yöntemleri vardır.

3.4. İnce Tabaka Kromatoğrafisi

Maddelerin hem R_f değerlerini tayin etmede, hem de preperatif olarak maddeleri elde etmede kullanılmaktadır. Yöntemin esası, çeşitli maddelerin sabit bir faz üzerinde hareketli faz yardımı ile değişik hızlarda sürüklenmesidir. İnce tabaka kromatoğrafisi, basit ve ucuz bir yöntem olmakla beraber iyi bir ayırma sağladığı için kullanılmaktadır. Aynı zamanda değişik metotlarla elde edilen maddelerin saflığını kontrol etmek için de bu yöntem kullanılmaktadır. Yöntemde; sabit faz olarak silika jel, alüminyum oksit gibi maddeler kullanılır. Bu maddeler su ile bulamaç haline getirilir ve temizlenmiş cam tabakalar üzerine ince bir film halinde çekilir. 110 -120 °C arasında film tabakasında su kalmayacak şekilde iki saat bekletilerek, tabakalar kromatoğrafi işlemi için hazır hale getirilir. İnce tabaka kromatoğrafisinde genelde 20x20 cm boyutlarındaki cam plakalar kullanılır. Üzerine çekilen tabaka kalınlığı, yapılacak işlemin türüne göre değişir.

Her maddenin sabit faz üzerinde, hareketli faz ile sürüklenme hızları farklıdır. Buna alıkonma faktörü denir ve R_f ile gösterilir.

R_f değeri, aynı madde ve aynı hareketli faz sistemi için sabittir. R_f değerleri karşılaştırılarak, karışım içinde kaç tür madde olduğu ve hangi maddelerin olduğu hakkında bilgi edinilebilir.

3.5. Kolon Kromatoğrafisi

Kolon kromatoğrafisi adsorbsiyon ve dağılma kromatoğrafisine örnek olarak gösterilebilir. Kolon dolgu maddesi olarak genelde; alüminyum oksit, talk, silikajel gibi maddeler kullanılır. Hareketli faz olarak su, alkol, kloroform veya organik çözücülerin karışımı kullanılabilir [64].

Kolonda düzgün bir ayırma yapabilmek için kolon dolgusunun kolonun her yerinde homojen olmasına dikkat edilmeli bunun için ıslak doldurma yapılmalıdır. Kolon dolgu maddesi, kullanılacak olan hareketli faz ile bulamaç haline getirilir ardından kolona konur. Kolon doldurma esnasında kolona yavaşça vurularak elde edilen bulamacın iyice yerleşmesi sağlanır. Aynı zamanda iyi bir ayırma olması için, hareketli fazın akış hızı en iyi ayırma sağlayacak, en uygun hızda olacak şekilde ayarlanmalıdır.

3.6. Ekstraksiyon Yöntemi

Sürekli ekstraksiyon yönteminde sokslet cihazı kullanılmaktadır. Cihaz; ekstraksiyonda kullanılacak olan çözücünün konduğu balon, ekstrakte edilecek olan maddenin konduğu gövde ve geri soğutucudan oluşmaktadır. Ekstraksiyon balonunda ısı ile buharlaşan çözücü geri soğutucu ile tekrar sıvı hale gelir ve gövde de toplanır, sıvı miktarı belli bir seviyeyi aştığında, sıvı sifon yapar ve işlem istenildiği kadar tekrarlanır [65].

4. DENEYSEL KISIM

Gypsophila Eriocalyx Boiss adlı bitki 2003-2004 yıllarında iki defa Temmuz ayında Çankırı-Tüney civarından toplandı. Bitkinin kökleri toprak üstü kısımlarından ayrılıp temizlendi, açık havada kurutulduktan sonra öğütülüp toz haline getirildi.

4.1. Ekstraksiyon

Kurutulup toz haline getirilen materyal (1000 g) kartuşlar içinde hazırlanarak sokslet cihazında 8 saat süreyle kloroform ile ekstrakte edildi. Bu sayede büyük çoğunluğu yağlar olan, reçinemi apolar maddeler ve kloroformda çözünen diğer maddeler uzaklaştırılmış oldu. Sarımsı renkte olan çözeltiden, çözücü döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı ve yapışkan kalıntı alındı. Aynı şekilde hazırlanan diğer bir kartuş 8 saat süre ile petrol eteri (40⁰ C) ile ekstrakte edildi. Elde edilen çözeltinin çözücüsü döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı ve balonun dibinde kalan kalıntı saklandı.

Apolar çözücü ekstraksiyonundan sonra kartuş açık havada kurutuldu ve tekrar materyalin bulunduğu kartuş sokslet cihazına konarak 16 saat boyunca etanol ile ekstrakte edildi. Bu sürenin sonunda sokslet cihazının üst kısmında kartuş içindeki materyalin bulunduğu hazneden ekstraksiyon çözeltisi alındı. Ekstraktın çözücüsü uzaklaştırıldıktan sonra ince tabaka kromatografisi yardımı ile CHCl₃:MeOH:AcOH:H₂O (16:8,5:3:2) hareketli faz sistemi kullanılarak ekstraksiyon işleminin devam edip etmediği kromatografik olarak kontrol edildi.

Elde edilen çözeltinin çözücüsü döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı ve sarı renkte saponinleri içeren 95 g kalıntı elde edildi.

4.1.1. Ham saponinlerin bütanol fazına alınması

Elde edilen ekstrakt (1000mL) suda çözüldü ve su ile doyurulmuş bütanol ile (500 mLx3) ekstrakte edildi. Elde edilen bütanol fazının çözücüsü döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldıktan sonra kırmızı renkte 30 g ekstrakt elde edildi.

4.1.2. Ham saponinlerin çöktürülmesi:

Elde edilen bütanol ekstraktı metanolde çözüldü (150 mL) ve dietil eter ile çöktürüldü (1000 mLx3).Elde edilen çökelek süzildükten sonra kurutuldu ve 21 g beyaz-sarı renkte ham saponinler elde edildi.

4.2. İzolasyon

Saponinleri içeren ekstraktın bileşenlerine ayrılması kolon kromatografisi ile yapıldı. Bu işlem için değişik hareketli faz sistemleri literatürden faydalanarak denendi [50].

Çizelge 4.1. Denenen hareketli faz sistemleri

1)MeOH- EtOAc (40: 60)
2)CHCl ₃ –MeOH-H ₂ O (65:35:10)
3)AcOH-H ₂ O-EtOH (20:40:40)
4)CHCl ₃ :MeOH (Hareketli faz sisteminin bileşenlerinin oranları değiştirildi.)

4.2.1. Kromatografi kolonunun hazırlanması

800 g silikajel ayırma işleminde kullanılacak olan CHCl₃-MeOH (50: 50) hareketli fazı içinde bulamaç haline getirildi ve 90 cm boyunda 4 cm çapındaki cam kolona homojen bir şekilde yerleştirildi. Bölüm 4.1.2.'de elde edilen ekstrakt (CHCl₃-MeOH) (50: 50) hareketli fazı içinde çözülerek kolona konuldu, (CHCl₃-MeOH) hareketli faz sistemindeki MeOH oranı sürekli artırılarak kolonda ayırma işlemine devam edildi [50].

Çizelge 4.2. Kullanılan çözücü sisteminin bileşen değerleri

1-500 mL (CHCl ₃ -MeOH) (70: 30)	2-500 mL (CHCl ₃ -MeOH) (65: 35)
3-500 mL (CHCl ₃ -MeOH) (50: 50)	4-500 mL (CHCl ₃ -MeOH) (40: 60)
5-500 mL (CHCl ₃ -MeOH) (30: 70)	6-500 mL (CHCl ₃ -MeOH) (10: 90)
7-1000 mL (CHCl ₃ -MeOH) (5 : 95)	8-1000 mL MeOH

Kolondaki akış hızının iyi bir ayırma olması için çok fazla olmamasına dikkat edilerek kolondan dakikada 1,5- 2 mL' lik kısımlar toplandı. Alınan 20 mL'lik fraksiyonların ince tabaka kromatoğrafisinde R_f değerleri tespit edilerek aynı R_f değerine sahip olan fraksiyonlar birleştirildi.

4.2.2. İnce tabaka kromatoğrafisinin uygulanması

Silikajel, destile su içerisinde çalkalanıp kıvamlı bir süspansiyon elde edildikten sonra iyice temizlenmiş cam tabakalar üzerine ince bir film tabakası halinde çekildi, ardından etüvde 180°C 2 saat kurutulduktan sonra, üzerlerine elde edilen fraksiyonlardan birkaç damla plakalara damlatıldı ve kuruması beklendi. Ardından hareketli fazın buharıyla doymuş hale gelen geliştirme tankına kondu ve çözücünün tabakada ilerlemesi sağlandı. Geliştirme tankından alınan tabakalar kurutulduktan sonra renklendirme reaktifi ile muamele edildi. Bu işlemde sonra plakalar 100 °C'da etüvde 10 dakika bekletildi ve meydana gelen lekelerin R_f değerleri hesaplandı.

İnce tabaka kromatoğrafisinde denenen hareketli faz sistemleri:

Hareketli faz sistemi 1: Kloroform: 65 mL

Metanol: 35 mL

Su: 10 mL

Hareketli faz sistemi 2 : Bütanol: 90 mL
Piridin: 50 mL
Su: 40 mL

Hareketli faz sistemi 3: Kloroform: 16 mL
Metil alkol: 8,5 mL
Asetik asit: 3 mL
Su: 2 mL

Hareketli faz sistemi 4: Kloroform: 40 mL
Metil alkol: 40 mL
Asetik asit: 10 mL
Su:10 mL

Hareketli faz sistemi 5: Etil asetat: 40 mL
Asetik asit: 20 mL
Propanol: 20 mL
Metanol: 40 mL

En iyi ayırma 3 numaralı hareketli faz sistemi ile elde edildi.

Kullanılan renklendirme reaktifi:1,1 g p-hidroksibenzaldehit, 50 mL 2M sülfürik asit çözeltisi içinde çözüldü.

Saponinler renklendirme reaktifi ile mavi renkte kompleksler oluşturduğu bilinmektedir (66). Meydana gelen lekelerin R_f değerleri tespit edildikten sonra aynı R_f değerine sahip olan kısımlar birleştirilerek 5 ayrı R_f değerine sahip 5 ayrı kısım elde edildi.

Çizelge 4.3. R_f değerleri

fraksiyonlar (her fraksiyon 20 mL'dir)	R_f değerleri
1) 60- 110 arası fraksiyonlar	0,4 (yeşil renk) ;0,5 (turuncu renk); 0,6 (açık yeşil renk)
2)110- 140 arası fraksiyonlar	0,3 (açık yeşil renk); 0,65 (mavi renk)
3)140- 160 arası fraksiyonlar	0,6 (turuncu renk); 0,8 (mavi renk)
4)160- 180 arası fraksiyonlar	0,7 (turuncu renk)
5)180- 210 arası fraksiyonlar	0,1 (koyu yeşil renk)

Kolon kromatografisinden elde edilen 110-140 numaralı fraksiyonlar birleştirildi ve elde edilen çözeltinin çözücüsü döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı bu işlem sonucunda çözücüsü uzaklaştırılan çözeltiden 100 mg kalıntı elde edildi. Ardından elde edilen kalıntıdan saponinin saflaştırılması için tekrar kolon kromatografisi yöntemi uygulandı.

Uygulanan ikinci kolon kromatografisi yönteminde, kolon dolgu maddesi olarak silikajel yerine Sephadex Lh-20 kullanıldı. Kolon dolgu maddesi; metil alkol: su (1: 1) çözeltisinde süspansiyon haline getirildi ve 25 cm uzunluğunda 1cm çapında kolona yerleştirildi. Saflaştırılacak olan kalıntı olabildiğince az hacimde hareketli fazda çözüldükten sonra kolona uygulandı ve kolondan 10 mL 'lik fraksiyonlar toplandı, alınan fraksiyonların ince tabaka kromatografisinde R_f değerlerine bakıldı ve R_f değerlerine göre fraksiyonlar ayrı ayrı toplandı. 0,65 R_f değerine sahip, renklendirme reaktifi ile mavi renk veren, saponin olduğu düşünülen 20 mg amorf madde elde edildi. Elde edilen maddenin erime noktası 207- 209°C olarak bulundu.

Kolon kromatografisinden elde edilen 140-160 numaralı fraksiyonlar birleştirildi ve elde edilen çözeltinin çözücüsü uzaklaştırıldı. Çözücünün uzaklaştırılmasından sonra 200 mg kalıntı elde edildi. Elde edilen kalıntı metanolde çözüldü ve Sephdex Lh-20 ile doldurulmuş kolondan geçirildi. Hareketli faz sistemi olarak metil alkol:su (1:1)

karışımı kullanıldı. Kolondan alınan elüatın çözücüsü uzaklaştırıldı ve biyolojik aktivite belirlenmesinde kullanılmak üzere saklandı (90 mg).

4.3. Saponinin Asit Hidrolizi

Saponin (10 mg); 10 mL 3 M HCl çözeltisi içinde 2 saat boyunca hidroliz edildi. Hidroliz işlemi esnasında, başlangıçta homojen olan çözeltide çökmeler gözlemlendi. Hidroliz işlemi bittikten sonra, meydana gelen aglikon etil asetat ile sulu fazdan ekstrakte edildi (3x10 mL). Etil asetat fazının çözücüsü uzaklaştırıldıktan sonra bu fazdan aglikon elde edildi. Sulu faz sodyum karbonat çözeltisi ile nötrleştirildi ve sulu fazdan şeker molekülleri elde edildi.

4.4. Şeker Moleküllerinin Tespiti

Şeker molekülünün yapısını belirlemek için kağıt kromatografisi yöntemi kullanıldı. Asit hidroliz sonucu elde edilen su fazından alınan örnek kağıt üzerine damlatıldı. Ardından kağıt; kloroform, metil alkol, su (8:5:1) hareketli faz sisteminin buharı ile doymuş hale getirilmiş geliştirme tankına kondu. Yürütme işlemi bitirildikten sonra kağıt kurutuldu. Kurutulan kağıt üzerine 0,5 g sodyum hidroksit; su, etanol (3:47) çözücü sisteminde çözülmesiyle elde edilen çözelti püskürtüldü. Kağıt kurutulduktan sonra, kağıt üzerine aseton ve doymuş gümüş nitrat çözeltisi (1:19) püskürtüldü. Püskürtülen çözeltinin çözücüsünün uzaklaşması için bir süre beklendikten sonra kahverengi leke tespit edildi (R_f : 0,62). Görülen kahverengi lekenin R_f 'sinin bu hareketli faz sistemindeki glukoz molekülünün sahip olduğu R_f değeri ile aynı olduğu görüldü. Yapılan bu kromatografik işlemde; asit hidroliz ile elde edilen şeker molekülü şahit numune (glukoz) ile beraber yürütülmüş ve aynı R_f değerine sahip olduğu tespit edilmiştir.

4.5. Çövenin Antibakteriyel ve Antifungal Aktivitelerinin İncelenmesi

Saponinlerin kuvvetli derecede antimikrobiyal aktivite gösterdiği bilinmektedir. Saponinin saflaştırılması sırasında sokslet cihazında; ekstraksiyon yöntemi ile elde

edilen kloroform, petrol eteri ve etanol fazı ile kolon kromatografisi yöntemi uygulanarak saponin bileşiğinin bulunduğu düşünülen kısmın antibakteriyel ve antifungal aktivitesi araştırıldı.

4.5.1. Bakterilerin besiyerinde çoğaltılması

0,1 g sıvı besiyeri alınıp su ile 10 mL'ye seyreltildi ve deney tüplerine alındı. Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümünden temin edilen bakteri kültüründen öze yardımı ile bakteriler alınıp, sıvı besiyerin içine aşılandı ve bir gün süre ile bekletilip bakterilerin çoğalması sağlandıktan sonra Muller Hinton katı besiyeri ile hazırlanmış petri kaplarına ekilerek besiyeri ortamında çoğalması sağlandı. İşlemler Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden elde edilen 2 mantar çeşidi ile de tekrarlandı.

4.5.2. Petri kaplarının hazırlanması

Muller Hinton agardan 5,7 g alınıp 150 mL su içine eklenerek iyice karıştırıldı ve otoklavda sterilize edildi. Steril besiyere steril şartlarda sıvı kültür eklenip homojenize edildi ve petri kaplarına döküldü. Agarın petri kabında sertleşmesi için 30 dakika süre ile buzdolabına bekletildi daha sonra buzdolabından çıkarılan petri kaplarının ortalarına biyolojik aktivitesi incelenecek olan kısımların konacağı küçük boşluklar oluşturuldu.

4.5.3. Çözeltilerinin hazırlanması

Petrol eteri, kloroform, etanol ekstraktlarının ve kolon kromatografisiyle elde edilen madde kendi çözücülerini ile çözülerek, derişimi 50 mg/ml olacak şekilde çözeltileri hazırlandı ve ayrı ayrı petri kaplarında açılan küçük boşluklara her bir çözeltiden 0,1 'er mL mikropipetle enjekte edildi.

4.5.4. İnhibisyon zonlarının ölçülmesi

Aktivitesi belirlenecek madde, mikroorganizmaya karşı bir aktivite gösteriyorsa maddenin difüzlennp ilerlediğı yerlerde ilk besiyeri renginden farklı olarak şeffaf bölgeler oluşmaktadır.

Belirtilen derişimlerde hazırlanan çözeltiler petri kaplarında açılan kuyulara eklendi ve bir gün süreyle beklendi, ardından bir gün sonra oluşan inhibisyon zonları ölçüldü. Elde edilen inhibisyon çapı değerleri deney iki kez tekrarlandıktan sonra ortalamalarının alınmasıyla bulundu.

Bu işlemleri yaparken çevreden gelecek başka tür bakterilerin deneysel koşulları olumsuz yönde etkilemesini azaltmak için deneyde kullanılan aletler otoklavda steril hale getirilerek kullanıldı.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

5.1. FT-IR Spektrumu Verileri

Spektrumda gözlenen pikler :

1050-1100 cm^{-1} : C–O gerilmesi

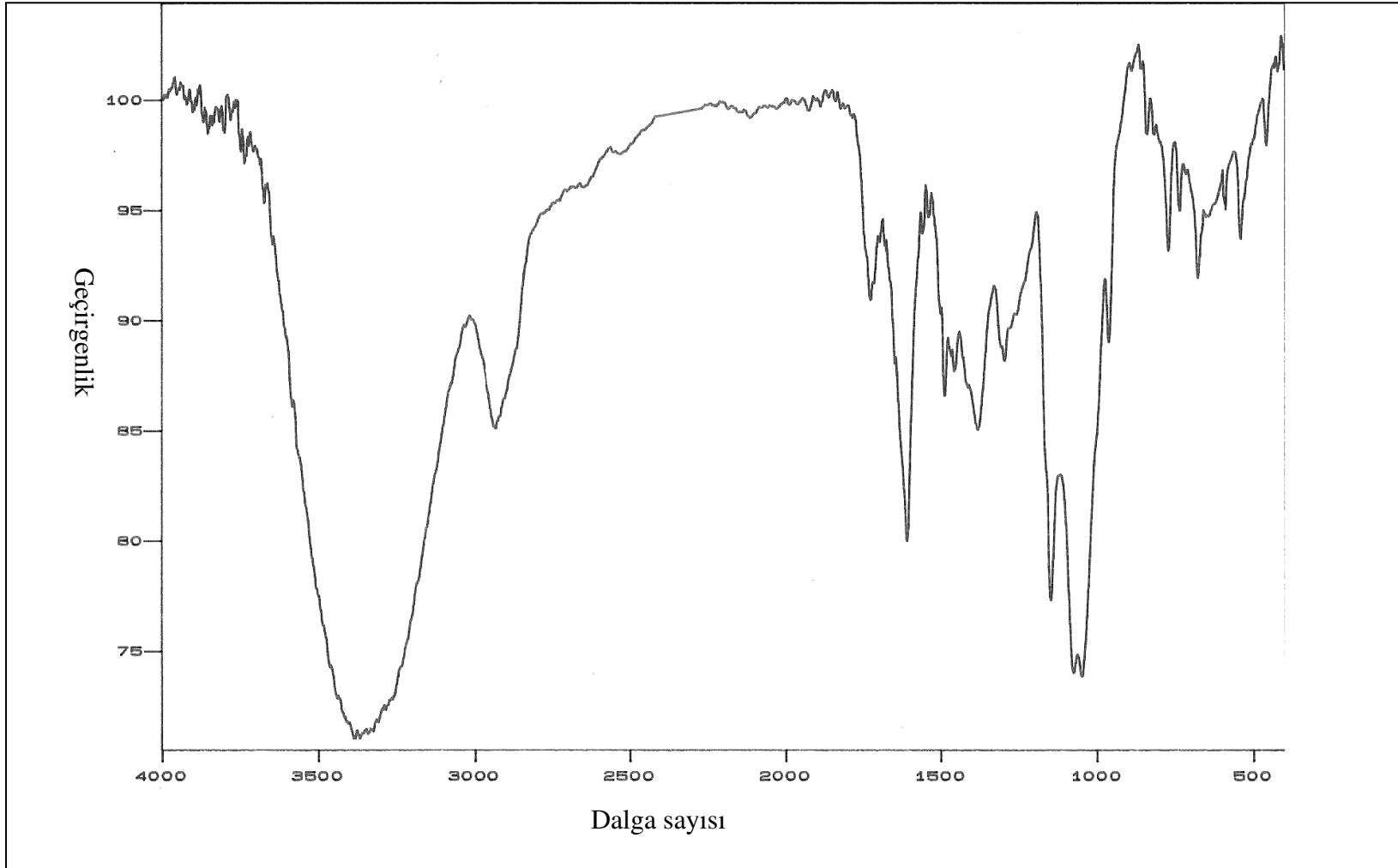
1727 cm^{-1} : C=O piki

3400-3300 cm^{-1} : OH piki

2980-2870 cm^{-1} : Alifatik C-H piki

1620-1650 cm^{-1} : C=C gerilmesi

Elde edilen aglikonun FT-IR spektrumu Şekil 5.1’de verilmiştir.



Şekil 5.1. Aglikonun FT-IR spektrumu

5.2. ^{13}C NMR Spektrumunun Değerlendirilmesi

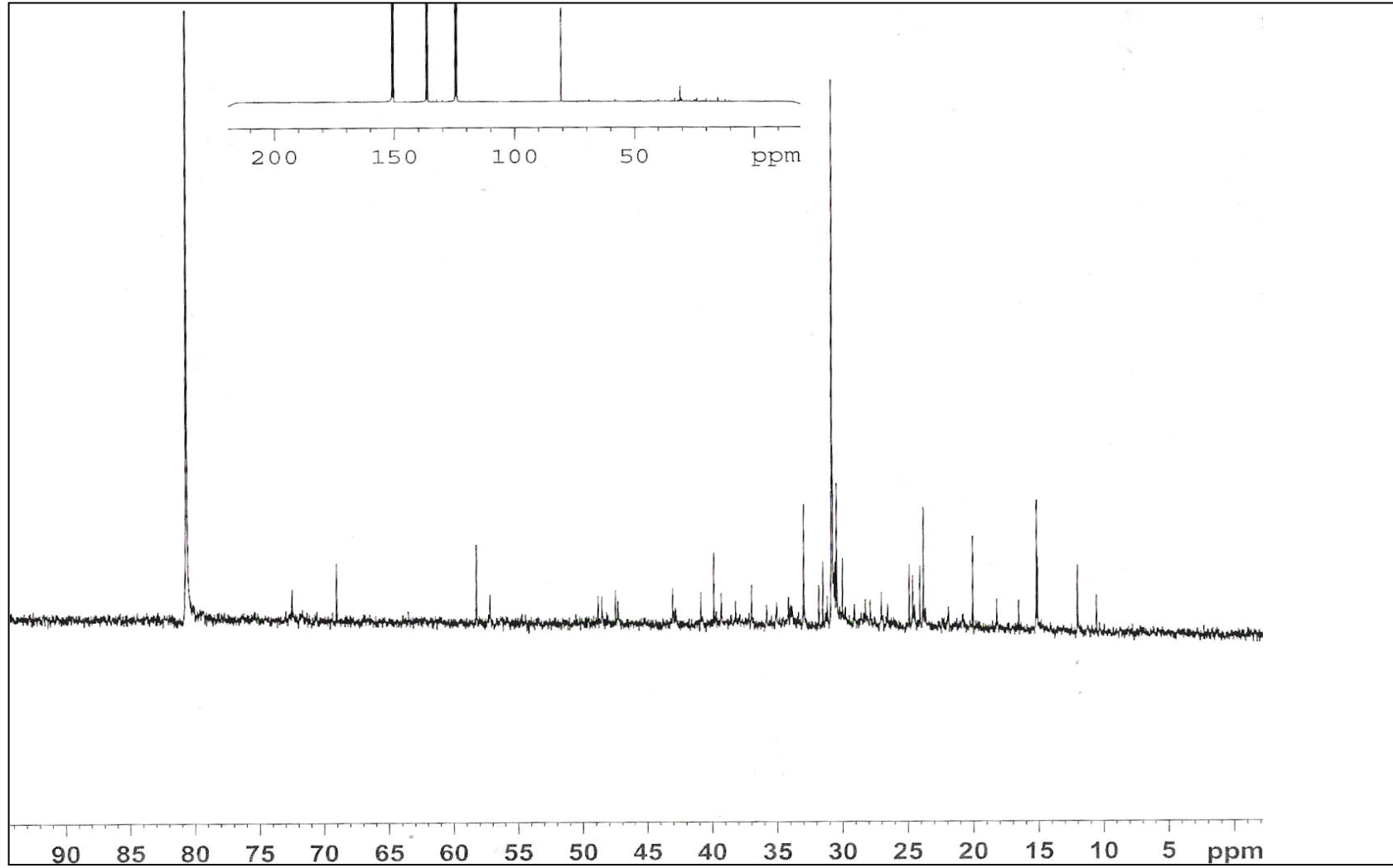
^{13}C NMR spektrumunda; elde edilen verilere göre kimyasal yapısını Şekil 5.8’de gösterildiği gibi düşündüğümüz saponin bileşiğinin aglikon kısmında bulunan toplam 33 karbona ait sinyal beklenen yerlerde gözlenmiştir.

81 ppm ‘ de gözlenen sinyal; şeker moleküllerinin glikozidik bağ ile bağlandığı aglikonun üçüncü karbonuna karşılık gelmektedir.

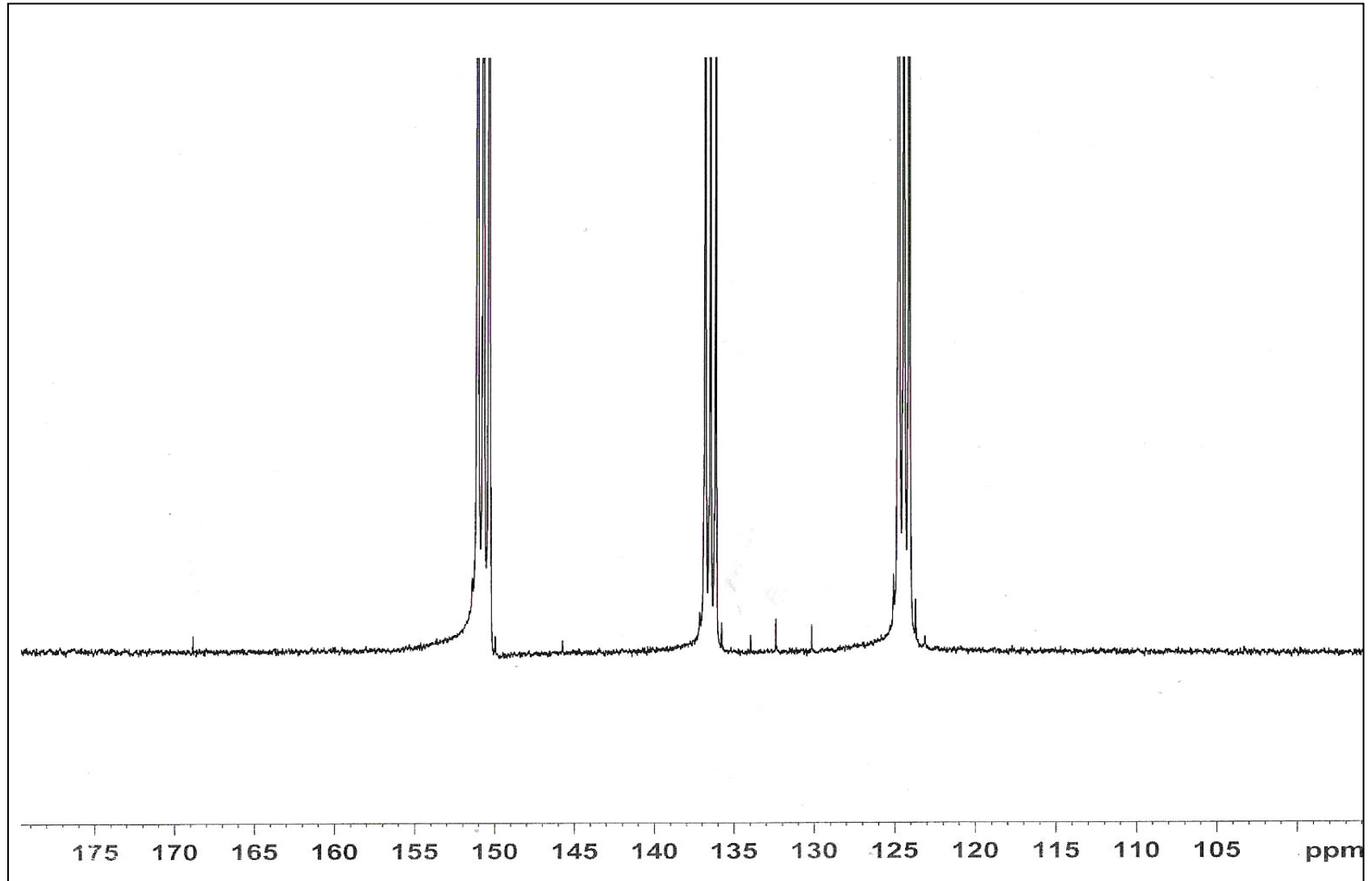
Aglikonun yapısında bulunan birbiri ile çift bağ yapan karbon atomlarının sinyalleri beklendiği gibi 130 – 140 ppm civarında gözlenmiştir.

170 ppm’ de gözlenen sinyal ise ester bağı ile aglikona bağlanmış karbon atomuna karşılık gelmektedir.

Aglikonun ^{13}C spektrumu; Şekil 5.2 ve Şekil 5.3’de verilmiştir.



Şekil 5.2. Aglikonun ^{13}C spektrumu



Şekil 5.3. Aglikonun ^{13}C spektrumu (100-175 ppm arası)

Spektrum alımında çözücü olarak d-piridin kullanılmıştır. 125, 135, 150 ppm’de gözlenen şiddetli sinyaller çözücünden kaynaklanan sinyallerdir.

Saponin bileşiğinin yapısında çok sayıda karbon atomu olduğu için spektrumun büyük bir alanında bu atomlara ait sinyaller gözlenmektedir. Çözücünden kaynaklanan sinyallerle moleküldeki karbon atomlarının sinyallerinin karışmasını engellemek için literatüre uygun olarak çözücü olarak d-piridin seçilmiştir.

Çizelge 5.1 ‘de saponinin asit hidrolizi sonucu elde edilen aglikonun alınan ^{13}C NMR spektrumunda gözlenen sinyallerin karşılık geldiği karbon atomlarının listesi verilmiştir.

Çizelge 5.1. ^{13}C Spektrum verileri

Karbon no	Kimyasal kayma (ppm)
1	37
2	25
3	81
4	40
5	49
6	19
7	31
8	39
9	43
10	32
11	24
12	130
13	134
14	41
15	133
16	136
17	47
18	37
19	39
20	48
21	27
22	28
23	18
24	16
25	12
26	13
27	21
28	169
29	73
30	58
31	169
32	70
33	57

5.3. ^1H NMR Spektrumunun Değerlendirilmesi

7,2 – 7,5 - 8,5 – 8,7 ppm'de gözlenen pikler çözücünden (d-piridin) kaynaklanan piklerdir.

5,3 ppm'de gözlenen yayvan pik çözücünden kaynaklanan su pikine karşılık gelmektedir.

4,4 ppm'de üçe yarılmış olarak gözlenen pik; aglikonun çift bağ yapmış onikinci karbonunda bulunan hidrojen atomuna karşılık gelmektedir.

3,8 ppm'de gözlenen dörde yarılmış piklerin, uç kısımlarının tekrardan ikiye yarıldığı görülmektedir. Bu pik aglikona ester bağı ile bağlanmış olan ve metil grubuna komşu olan 29' ve 32'ci karbon atomuna bağlı hidrojen atomuna karşılık gelmektedir. CH_2 grubundaki hidrojen atomlarına ait pikin beklenenden daha düşük alanda çıkmasının nedeni elektron çekici gruba ($\text{O}=\text{C}-\text{O}$) bağlı olmasından kaynaklanmaktadır.

2,8 ppm'de gözlenen tekli pik; karbonil grubunun bağlı olduğu 20'ci karbona bağlı olan 27'ci karbondaki hidrojen atomuna karşılık gelmektedir. CH_3 grubu hidrojen atomlarının beklenenden daha düşük alanda çıkmasının nedeni, elektron çekici gruba bağlı karbon atomuna komşu karbon atomuna bağlı hidrojen atomu olmasından kaynaklanmaktadır.

2,1 ppm'de gözlenen ikiye yarılmış pik; tek hidrojen atomuna sahip 18'ci karbona komşu olan 19'cu karbona bağlı hidrojen atomuna karşılık gelmektedir.

1- 1,5 ppm'de arasındaki pikler kimyasal kayma değerleri birbirine yakın birçok hidrojen atomu olmasından dolayı karmaşık çıkmıştır.

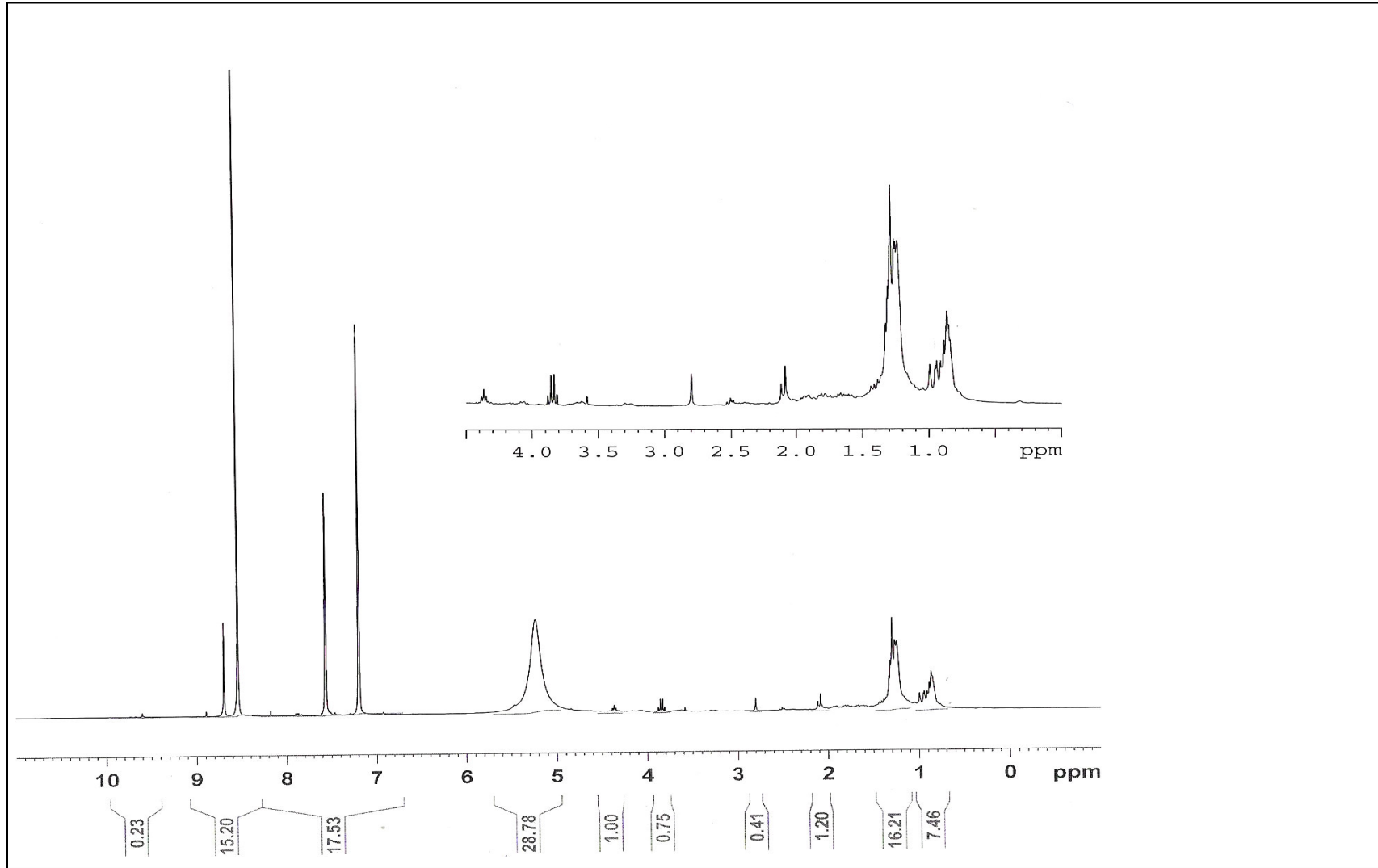
1,3 ppm'de görülen tekli pik 24'cü karbon atomuna bağlı hidrojen atomlarına (CH_3) karşılık gelmektedir. CH_3 grubuna ait bu hidrojen atomlarının diğer tekli pik veren CH_3 hidrojen atomlarına nazaran daha düşük alanda çıkmasının nedeni hidroksil grubunun bağlı olduğu karbona komşu olmasından kaynaklanmaktadır.

1 ppm'de görülen tekli pik 23'cü karbon atomuna bağlı hidrojen atomlarına (CH_3) karşılık gelmektedir.

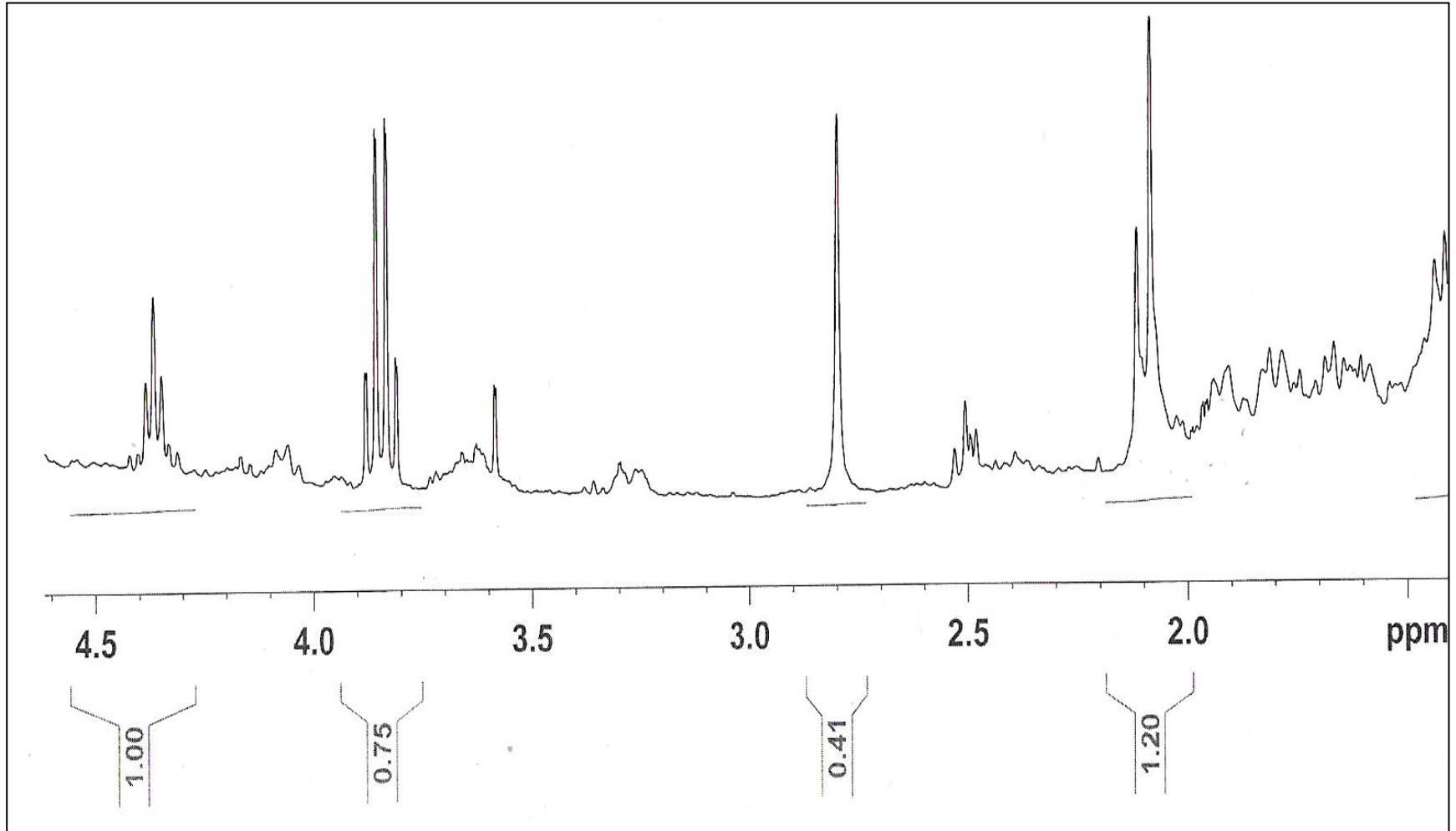
0,95 ppm'de görülen tekli pik 26'cı karbon atomuna bağlı hidrojen atomlarına (CH_3) karşılık gelmektedir.

0,85 ppm'de görülen tekli pik 25'ci karbon atomuna bağlı hidrojen atomlarına (CH_3) karşılık gelmektedir.

Elde edilen aglikonun ^1H NMR spektrumu Şekil 5.4 ve Şekil 5.5'de verilmiştir.



Şekil 5.4. Aglikonun ^1H NMR spektrumu



Şekil 5.5. Aglikonun ^1H NMR spektrumu(1,5-2,5 ppm arası)

5.4. Kütle Spektrumunun Değerlendirilmesi

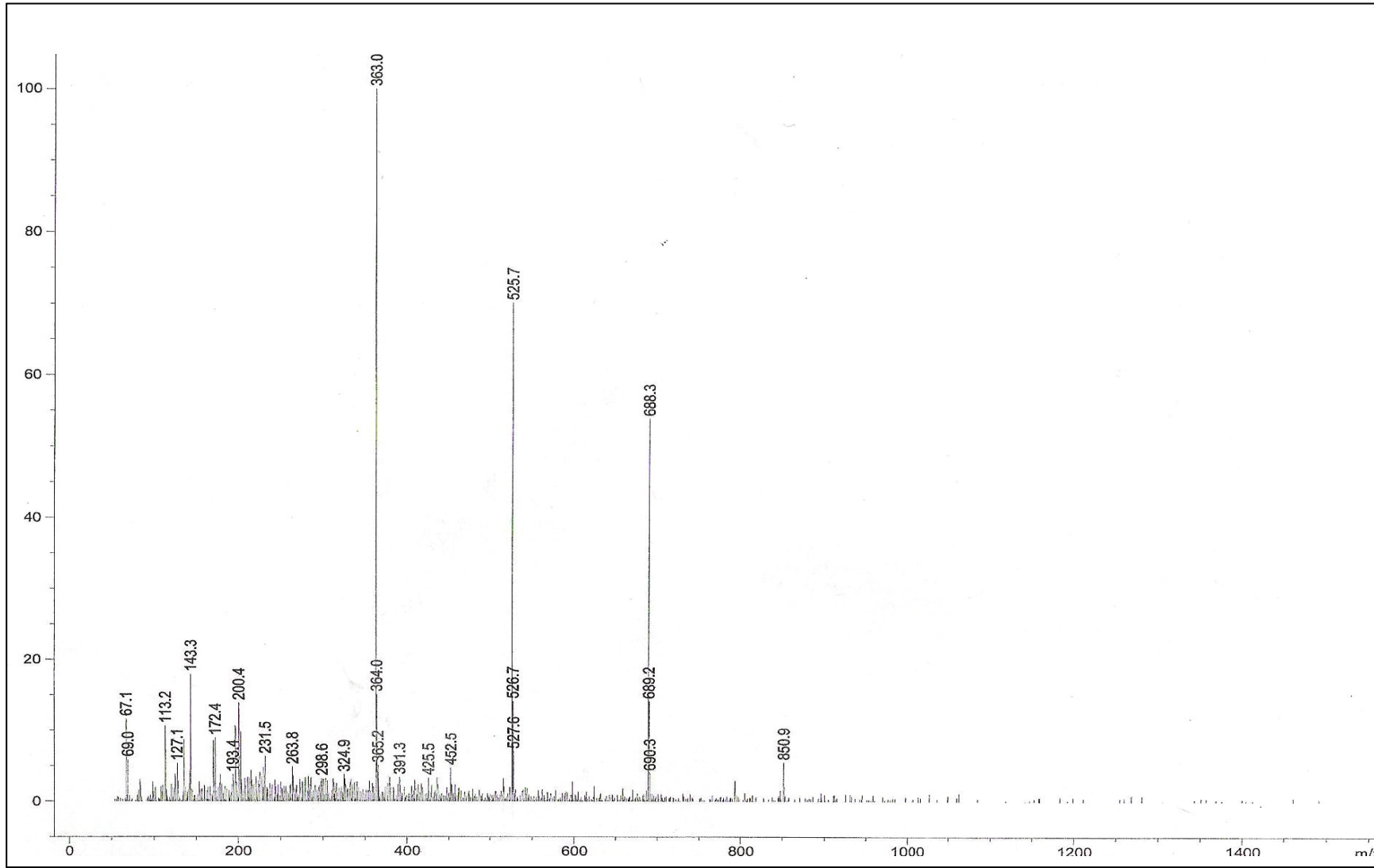
Saponin bileşiğinin alınan kütle spektrumunda M^+ piki 850,9'da gözlenmiştir.

688,3' de $[M - 163]^+$ gözlenen pik, molekülden bir şeker molekülünün uzaklaştığını göstermektedir.

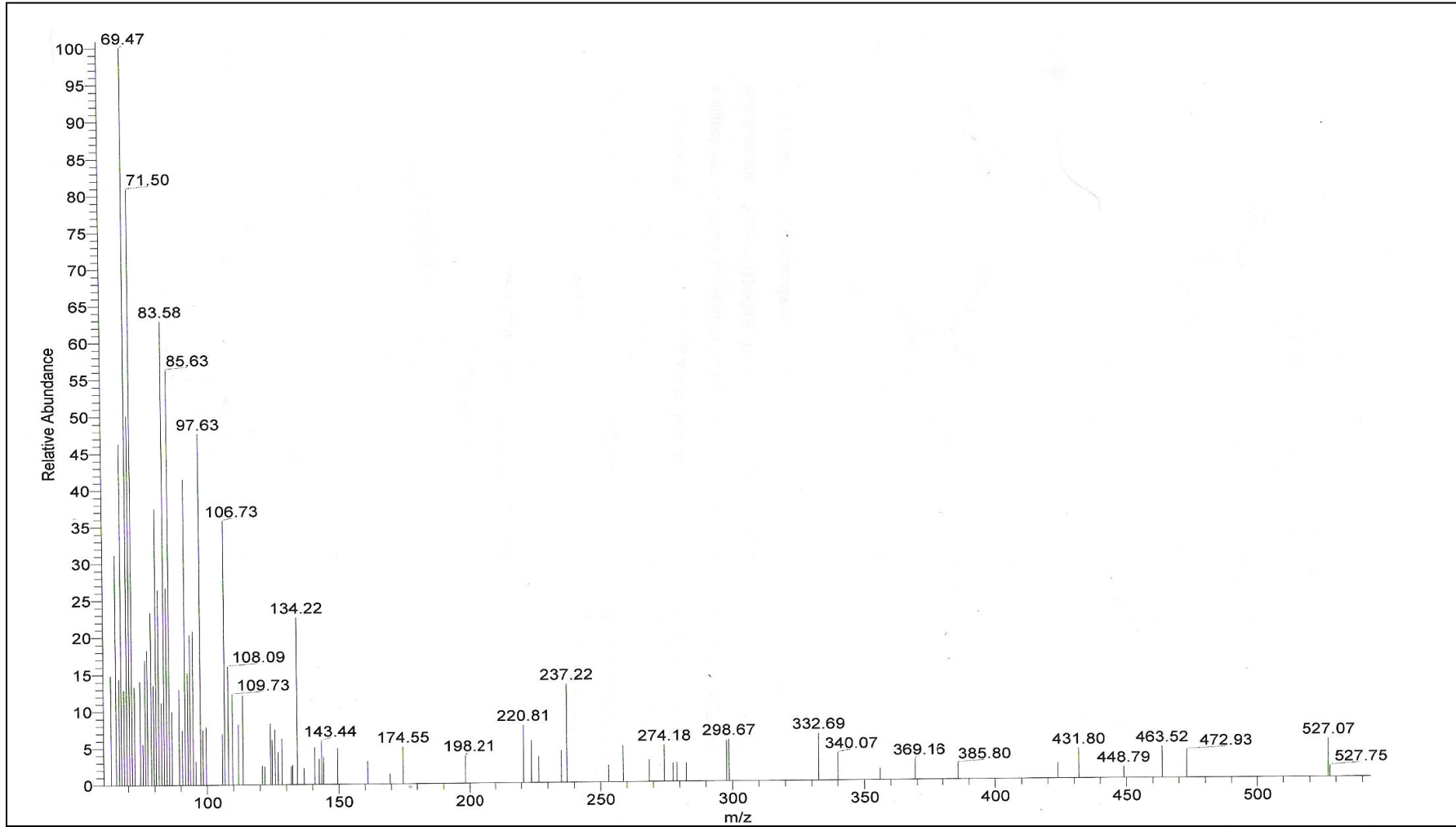
525,7'de $[M - 163 - 162]^+$ gözlenen pik, molekülden bir şeker molekülünün daha uzaklaştığını göstermektedir.

Saponin, asit hidrolizine maruz bırakıldıktan sonra elde edilen aglikonun kütle spektrumu alındığında ise; 527,07'de M^+ piki 527,75'de $[M + 1]^+$ piki gözlenmiştir. Bu sonuca dayanarak aglikonun mol kütlelerinin 526,7 olduğu sonucuna varılmıştır. Saponinin kütle spektrumu Şekil 5.6'da aglikonun kütle spektrumu ise Şekil 5.7'de verilmiştir.

Kütle spektrumu alınırken LC/MS API-ES (Atmosferik Basınç İyonizasyon Elektrospray) yöntemi kullanılmıştır.



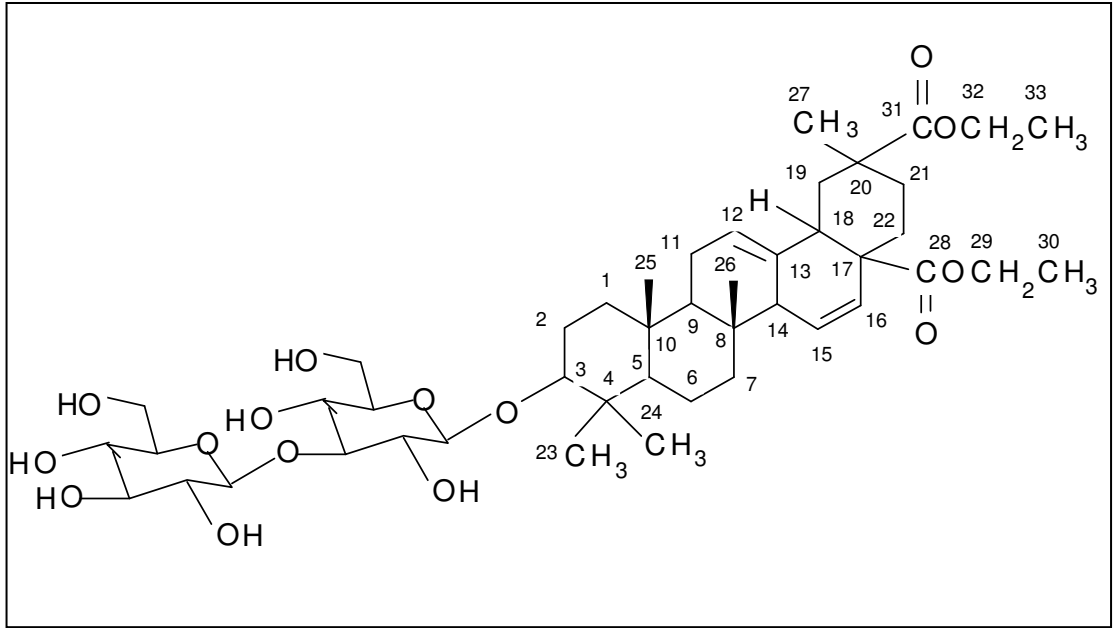
Şekil 5.6. Saponinin kütle spektrumu



Şekil 5.7. Aglikonun kütle spektrumu

5.5. Sonuçlar

Spektrumlardan elde edilen veriler ışığında, *Gypsophila Eriocalyx* Boiss adlı bitkiden elde etmeye çalıştığımız saponin bileşiğinin yapısının Şekil 5.6'da gösterildiği gibi olabileceği düşünülmüştür.



Şekil 5.8. Saponinin yapısı ($C_{45}H_{70}O_{15}$)

Saponin bileşiğinin aglikon kısmının yapısını tayin etmek için yapılan asit hidrolizi sonucu reaksiyon ortamında hem karboksil grubuna sahip aglikon moleküllerinin hem de ester gruplarına sahip aglikon moleküllerinin bulunması gerektiği düşünülmektedir. Aglikonun kütle spektrumu alımında kullanılan GC-MS cihazı, bileşikleri birbirinden ayırıp her birinin mol kütlelerini ayrı ayrı tayin edebilmektedir. Aglikonun alınan kütle spektrumunda görülen 527,75'deki $[M + 1]^+$ piki değerlendirilerek, elde ettiğimizi düşündüğümüz saponin bileşiğinin yapısındaki Aglikon kısmının ester gruplarına sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Çöven bitkisinin sokslet cihazında; petrol eteri, kloroform ve etil alkol ile ekstraksiyonları sonucunda elde edilen ekstraktları ve de kolon kromatografisi

yöntemi ile saflaştırmaya çalıştığımız saponin bileşiğinin biyolojik aktivitesi incelenmiş ve deneyde kullanılan mikroorganizmalara karşı; petrol eteri, kloroform, etil alkol ekstraktlarının biyolojik aktivite göstermediği düşünülmüştür.

Kloroform ve petrol eteri ekstraktlarında saponin bulunmadığı için bu ekstraktların antimikrobiyal aktivite göstermediği düşünülmüştür. Etil alkol ekstraktının içinde saponin bulunmasına rağmen saponin derişiminin bu ekstrakt içinde antimikrobiyal aktivite gösterecek miktarda bulunmadığı düşünülmüştür.

Kolon kromatografisi yöntemi ile elde edilen kısmın petri kaplarında inhibisyon zonları oluşturduğu gözlenmiştir. Bu kısımda deneyde kullanılan mikroorganizmalara karşı biyolojik aktivite gösterecek miktarda saponin bulunduğu düşünülmüştür.

Çizelge 5.2. İnhibisyon zonları (mm)

Mikroorganizma adı	İnhibisyon zonunun çapı
Bacilus Cereus G+	8
MicrococusluteusG+	8
S.Aureus G+	6
B.Subtilis G+	6
Escheria Coli G-	6
P.Aeruginasa G-	6
Candida Albican	10
S.Cerevisia	10

KAYNAKLAR

1. Davis, PH., "Flora of Turkey and the East Aegeen Islands", **Edinburgh Univ. Press**, Edinburgh, 2: 149-171 (1967).
2. Rao, A.V. and Sung, M.G, "Saponins as anticarcinogens ", **The Journal of Nutrition**, 125:717-724 (1995).
3. Osbourn, A.E., "Saponins in cereals", **Phytochemistry**, 62:1-4 (2003).
4. Crombie, W. M. L. and Crombie, L., "Distribution of Avenacins A-1, A-2, B-1 and B-2 in oat roots; their fungicidal activity towards take-all fungus", **Phytochemistry**, 25: 2069-2073 (1986).
5. Turner, E.M.C., "The Nature of the resistance of oats to the take all fungus III", **J.Exp .Bot.**, 11: 403-412 (1960).
6. Kumari, A. and Kohli, R.K., "Autotoxicity of ragweed parthenium (Parthenium, Hysterophorus)", **Weed Science**, 35: 629-632 (1987).
7. Mckey, D., "The distribution of secondary compounds within plants. In: Rosenthal G.A., Janzen D.H. (ed) Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites", **Acamedic Press**, San Diego, 56-133(1979).
8. Morrissey, J.P. and Osbourn, A.E., "Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis", **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 63: 708-724 (1999).
9. Armah, C.N., Mackie, A.R., Roy, C., Price, K., Osbourn, A.E., Bowyer, P. and Ladha, S., "The membrane permeabilising effect of avenacin A-1, involves the reorganisation of bilayer cholesterol", **Biophysical J.**, 76: 281-250 (1999).
10. Turner, E.M., "An enzymic basis for pathogen specificity in Ophiobolus graminis", **J Exp.Bot.**, 4 :264-271 (1961).
11. Crombie, W.M.C., Crombie, L., Green, J.B. and Lucas, J.A., "Pathogenicity of the take all fungus to oats", **Phytochemistry**, 25: 2075-2083 (1986 b)
12. Khan, M.R. and Omolosso, A.D., "Antibacterial, antifungal activity of Harpulli petiolaris", **Fitoterapia**, 73: 331-335 (2002).
13. Gubaou, I.A., Libizow, N.T. and Gladkikh, A.S., "A search for saponin forous plants among the flora of central Asia and South Kazakhstan" , **Farmatsia**, Moscow, 19: 23 (1970).

14. Çalış, I., “Saponoria katschy boiss üzerine farmakognozi araştırmaları” Doktora Tezi, **Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi**, Ankara, 15 (1977).
15. Watanabe, K., Mimaki, Y., Sakagami, H. and Sashida, Y., “Bufadienolide and spirostanol glycosides from the rhizomes of helleborus orientalis “, **J. Nat. Prod.**, 66: 236-241 (2003).
16. Abdel Khalik, S.M., Miyase, T., Melek, F.R., El Shabraway, O. A., mahmoud, I.I. and Mina, S.A., “New steroidal saponins from agave lophantha schiede and their phamacological evaluation”, **Pharmazie**, 57:8 (2002).
17. Ozipek, M., saracoğlu, I., Ogihara, Y. and Çalış, I., “Nuatigenin type steroidal saponins from Veronica fushii and V. multifida “, **Z. Naturforsch.**, 57c: 603-608 (2002).
18. Boiteau, P., Pasich, B. and Ratjimamanga, A.R., “Les triterpenoides en physiologie Vegetale et animale”, **Guathier Villars**, Paris, 1066-1071 (1964).
19. Trojanowska, M. R., Osbourn, A.E., Daniels, M.J. and Threlfall, D.R. “Biosynthesis of avenacins and phytosterols in roots of Avena sativa cv ”, **Phytochemistry**, 54: 153-164 (2000).
20. Haralampidis, K., Trojanowska, M. and Osbourn, A.E. “Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants”, **Advances in biochemical Engineering/Biotechnology**, 75: 32-44 (2002).
21. Woitle, H. D., Kayser, J. P. and Hiller, K., “Fortschritte in der Erforschung der triterpensaponine”, **Pharmazie**, 25: 133 (1970).
22. Machocho, A. K., Kiprono, P.C., Grinberg, S. and Bittner, S., “Pentacyclic triterpenoids from Embelia schimperi”, **Phytochemistry**, 62: 573-577 (2004).
23. Okawa, M., Yamaguchi, R., Delger, H., Tsuchihashi, R., Nohara, T., Kinjo, J., Isoda, S. and Ida, Y., “Five triterpene Glycosides from Oxytropis myriophylla”, **chem. Pharm. Bull**, 50 : 1097-1098 (2002).
24. Sakurai, T., Nishimura, T., Otake, N., Xinsheng, Y., Abe, K., Zeida, M., Nagasawa, H. and Sakuda, S., “Assamicin I and II, novel triterpenoid saponins with insulin-like activity from Aesculus assamica Griff”, **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 12: 807-810 (2002).
25. Yayla, Y., Alankuş- Çalışkan, Ö., Anıl, H., Bates, R. B., Stessman, C. C. and Kane, V.V. “Saponins from styrax officinalis”, **Fitoterapia**, 73: 320-326 (2002).

26. Larhsini, M., Maston, A., Hostetman, K., "Triterpenoid saponin from the roots of *slere cucubalus*", **Fitoterapia**, 74: 237-241 (2003).
27. Elbandy, M., Miyamoto, T. and Chauffert, B., " Novel acylated triterpene glycosides from *muraltia heisteria*", **Phytochemistry**, 40: 213-215 (2004).
28. Bellakhdar, J., Claisse, R., Fleurentin, J. and Younos, C., "Reportory of standart herbal drugs in the moroccan pharmacopoea", **J. Ethnopharmacol**, 35:123 (1991).
29. Bellakhdar, J., "La pharmacopee marocaine traditionnelle, medecine et savoir populaire", **Ibis Press.**, Paris, 227-231 (1997).
30. Gosse, B., Gnabre, J., Bates, B.B., Dicus, C.W., Nakkiew, P. and Huang, R.C.C., "Antiviral Saponins from *Tieghemella heckelii*", **J.Nat.Prod.**, 65:1942-1944 (2002).
31. Kozarsky, K., Penman, M., Basiripour, L., Hasaltine, W., sodriski, J. and Hendrickson, W.A. "Glycosylation and Processing of the human immunodeficiency virus type 1 envelope poetin", **Immune Defic. Sydr.**, 2:163-169 (1994).
32. Chopra, R.N., Nagar, S.L. and Chapra, I.C., "Glossary of India medicinal plants", **Council of Scientific and Industrial Research**, New Delphi ,72 (1956).
33. Borel, C., Gupta, M.P. and Hostetman, K., "Molluscicidal saponins from *swartzia simplex*", **Phytochemistry**, 26: 2675 (1987).
34. Frechet, D., Christ, B., du Sorbier, B.M., Fischer, H. and Vuilhorgne, M., "four triterpenoid saponins from dried rots of *Gypsophila* species", **Phytochemistry**, 30: 927-931 (1991).
35. Tanaka, O. and Kasai, R., " Progressing in the chemistry of organic natural products" Herz, W., Grisebach, H., kirby, G.W., Tamm, C., Eds, **Springer Verlag**, New York, 46(1): 1477-1483 (1984).
36. Duke, I., "Handbook of medical plants", **CRC Press**, Boca Raton FL, 337-341 (1985).
37. Khan, M.R., Kihara, M. and Omolosso, A.D., "Antibacterial activity of *Picrasma javanica*", **Fitoterapia**, 72: 406-408 (2001).
38. Perry, L.M., "Medicinal Plants of east and southeast Asia, attributed properties and uses", **Mit Press**, Cambridge, London, 389 (1980).

39. Xu, P.Y., "Chinese Medical prescriptions", **Press of People's Health**, Beijing, 371-373 (1995).
40. Morton, J., "Atlas of medicinal plants of middle america", **Charles C. Thomas Publisher**, Illionis, 90 (1981).
41. Masafumi, O., Yamaguchi, Y., Tunei, K., "Five triterpene glycosides from *Oxtropis myriophylla*", **Chem. Pharm. Bull.**, 50: 1097-1099 (2002).
42. Lederer, E., "Paper chromatography of sugars", **Phytochemistry**, 26: 787 (2001).
43. Vardar, Y. and Oflas, S., "Saponins from *Styrax officinalis*" **Plant. Mater. Vog.**, 2(14):145-148 (1973).
44. Sun, V., Gaoj, Tu G., Guo, Z. And Zhang, Y., "A new steroidal saponin from *Tribulus terrestris* Linn ", **Natural Product Letters**, 16: 243-247 (2002).
45. Eded, M. and Anam, A., "Novel triterpenoid saponin from *Eryngium foetidum*", **India Jurnal of Chemistry**, 41b:1500 -1503 (2002).
46. Jayasinghe, L., Hara, N. and Fujimoto, Y., "Bidesmosidic saponins from the fruits of *Diploclesia glaucescens*", **Phytochemistry**, 62: 563-567 (2003).
47. Dchulide, H., Msaldes, A. and Marta, S., "Antifungal steroidal glycosides from the Patagonian Starfish *Anasterias Minuta* Structure-activity correlations", **Tetrahedron**, 240: 450 (2002).
48. Watanabe, K., Mimaki, Y., Sakagami, H. and Sashida, Y., "Bufadienolide and Spirostanol Glycosides from the Rhizomes of *Helleborus orientalis*", **J.Nat.Prod.**, 66: 236-241 (2003).
49. Bell, D. and Talukder, M.Q., "Thin layer quantitative chromatography of arabinose, ribose and xylose in the presence of other sugars", **J.Chromatog.** 49: 469 (1970).
50. Melek, F.R., Miyase, K. and Ghaly, N.S., "Triterpene Saponins from *Meryto lanceolata*", **Phytochemistry**, 62: 557-562 (2003).
51. Hara, S., Okabe, H. and Mihashi, K., "Separation of aldose enantiomers by gas liquid chromatography", **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 34: 1843-1844 (1986).
52. Holstein, E., Kipert, M. and Hiller, K., "Zum Gaschromatographischen Nachweis der Estelkomponenten wn Triterpen-saponinen", **Pharmazie**, 25: 366 (1970).
53. Wulff, G., and Über, R., "Triterpene, XXVI. Über die struktur der rosskastanien saponine (aescin) und dier aglykone verwandter glycoside", **Tetrahedron**, 25:

415 (1969).

54. Doman, B. and Hostettmann, K., "New saponins from *Phytolacca dodecandra*", **Helv. Chim. Acta.**, 67:131 (1984).
55. Haralampidis, K., Bryan, G., Qi, X., Papadopoulou, K., Bakht, S., Melton, R. and Osbourn, A.E., "A new class of oxidosqualene cyclases directs synthesis of antimicrobial phytoprotectants in monocots", **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, 98: 13431-13436 (2001b).
56. Burke, D.S., "Recombination in HIV: An important viral evolutionary strategy", **Emerging Infectious Diseases**, 3:249-256 (1999).
57. Pistelli, L., Bertoli, A., Lepori, E., Morelli, I. and Panizzi, L., "Antimicrobial and antifungal activity of crude extracts and isolated saponins from *Astragalus verrucosus*", **Fitoterapia**, 73: 336-339 (2002).
58. Zhang, H., Zhizhen, L., Tan, T., Qiu, S., Farnsworth, N.R., Pezzuto, J.M. and Fong, H.S., "Polyacetyleneginsenoside-Ro, a novel triterpene saponin from *Panax ginseng*", **Tetrahedron Letters**, 43: 973-977 (2002)
59. Ito, M., Sato, A., Hirabayashi, K., Tanabe, F., Shigeta, S., Baba, M., De Clercq, E., Nakashima, H. and Yamamoto, N., "Inhibitory effect of glycyrrhizin on the in vitro infectivity and cytopathic activity of the human immunodeficiency virus [HIV (HTLV-III/LAV)]", **Antiviral Res.**, 7(3):127-137 (1987).
60. Kazuhiro, H., Susumu, I., Hiroatsu, M., Takeo, M., Shoji, S., Masanori, B., Masahiko, I., Shiro, S., Hideki, N., and Yamamoto, N., "Antiviral Activities of Glycyrrhizin and Its Modified Compounds against Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) and Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) in vitro", **Chem Pharm Bull**, 39(1):112-115 (1991).
61. Yücekutlu, A.N., "Çöven (*Gypsophila simanii* Hub.mor.) kökünden saponin saflaştırması", Yüksek Lisans tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 38-39 (2000).
62. Khan, M.R., and Omabsso, L., "Antibacterial activity of *Hygrophila stricta* and *peperomia pellucida*", **Fitoterapia**, 73: 251-254 (2002).
63. Yıldız, A., Genç, Ö., "Enstrümantel Analiz Laboratuvarı " , **Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi**, Ankara, 427 (1994).
64. Yılmaz, M., Deligöz, H., "Enstrümantel Analiz Laboratuvarı", **Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi**, Konya, 116 (1994).
65. Erdik, E., "Denel Organik Kimya", **Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi**, Ankara, 84-88 (1997).

66. Gaidi, g., Miyamoto, T. And Dubois, M., "Junceosides A-C, New triterpene saponins from *Arenaria juncea*" **J.Nat.Prod.**, 64: 1533-1537 (2001).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : POSLU, Hüseyin
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 30.08.1980 Denizli
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0 (258) 264 16 14
e-mail : pentan2@mynet.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	Pamukkale Üniversitesi/ Kimya Bölümü	2001
Lise	Cumhuriyet Lisesi	1997

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2005-	Özel sektör	Kimyager

Yabancı Dil

İngilizce

Hobiler

Kitap, Sinema, Müzik

