

52855

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

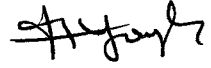
**YERSOMUNU *Cyclamen coum* Miller BİTKİSİNDEN İZOLE EDİLEN DOĞAL
BİLEŞİKLERİN YAPILARININ AYDINLATILMASI**


Kimyager Cemalettin BALTACI

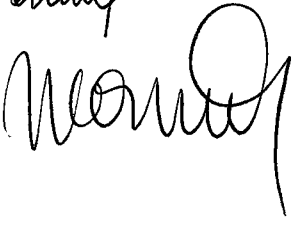
Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"Yüksek Lisans (Kimya)"


Ünvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih :12.01.1996
Tezin Sözlü Savunma Tarihi :29.01.1996

Tezin Danışmanı :Doç.Dr.Nurettin YAYLI 

Juri Üyesi :Prof.Dr.Aykut İKİZLER 

Juri Üyesi :Y.Doç.Dr.Kemal SANCAK 

Enstitü Müdürü :Prof.Dr.Fazlı ARSLAN 

Ocak 1996
TRABZON

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması, K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Yüksek Lisans Tezi danışmanlığımı üstlenerek çalışmamı hangi konuda yapabileceğim hususunda bana yol gösteren, çalışmalarım esnasında bana değerli zamanlarını ayırarak, çalışmaya başladığım andan itibaren her türlü ilmi, pratik , tecrübe ve bigileriyle benim büyük bir heves ve azim içinde çalışmamı sağlayan Sayın Hocam Doç.Dr.Nurettin YAYLI'ya minnet ve şükranla teşekkür ederim.

Bitkinin toplanmasında ve türünün tespitinde yardımcı olan Orman Araştırma Enstitüsü Müdürlüğünde görevli Dr. Mahir KÜÇÜK' e teşekkür ederim.

Yüksek Lisans Çalışmalarımı destekleyen ve zaman zaman laboratuvar imkanlarından yararlandığım Sayın Müdürüm Recep KELEŞ' e ve mesai arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tezin yazılmasında ve düzenlenmesinde bana yardımcı olan Arş. Gör.Dr.Hasan GENÇ' e Teşekkür ederim.

Bu çalışma KTÜ araştırma fonundan desteklenmiştir.

Her konuda olduğu gibi çalışmalarım esnasında beni destekleyen ve yardımcı olan eşim Berna BALTACI' ya teşekkür ederim.

Trabzon, Ocak 1996

Cemalettin BALTACI

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No:
ÖNSÖZ	II
ÖZET	III
SUMMARY	IV
ŞEKİL LİSTESİ	V
TABLO LİSTESİ	VII
SEMBOL LİSTESİ	VIII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Slikagel Kromatografisi	2
1.3. Yapı Aydınlatılmasında Kimyasal Yöntemler	2
1.4. Yapı Aydınlatılmasında Spektroskopik Yöntemler	3
2. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	4
2.1. Çözücülerin Saflaştırılması	4
2.2. İnrümentasyon	4
2.3. İzolasyon	4
3. BULGULAR	9
4. TARTIŞMA	12
4.1. CC3 Molekülünün Spektroskopik Olarak Aydınlatılması 1	12
4.2. CC42B Molekülünün Spektroskopik Olarak Aydınlatılması 2	14
4.3. 3 Nolu Molekülün Yapısının GC-MS Spektrumuyla Aydınlatılması	17
4.4. 4 Nolu Molekülün Yapısının GC-MS Spektrumuyla Aydınlatılması	19
4.5. 5 Nolu Molekülün Yapısının GC-MS Spektrumuyla Aydınlatılması	21
4.6. CC8 Saponin Molekülünün Spektroskopik Aydınlatılması 6	23
4.7. CC9' un Molekülünün Spektroskopik Aydınlatılması 7	26
5. SONUÇLAR	30
6. ÖNERİLER	31
7. KAYNAKLAR	32
8. EKLER	36
9. ÖZGEÇMİŞ	67

ÖZET

Bu çalışmada yersomunu *Cyclamen coum* Miller bitkisinden 7 adet doğal bileşik çeşitli kromatografik yöntemleri uygulayarak ilk defa izole edilmiştir.

4 tanesi literatürde başka bitkilerden izole edildiği ve 3 tanesi de ilk defa izole edilen toplam 7 adet doğal bileşik spektroskopik olarak ¹H-nmr, APT, 2D-COSY, HETCOR gibi nmr teknikleri ve EI-MS, GC-MS ve (+) FAB-MS gibi kütle spektroskopisi yöntemleriyle moleküllerin yapıları ispatlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Doğal bileşikler, Kromatografi, Spektroskopik yöntemler, NMR, EI-MS, GC-MS, (+) FAB-MS.

SUMMARY

Structure Elucidation of Isolated Natural Products From Wild Boar Radish *Cyclamen coum* Miller

In this study 7 novel natural products were isolated first time from *Cyclamen coum* Miller using various chromatographic techniques.

Four of these compounds were isolated from different plants and mentioned in the literature. Three of these were isolated first time as novel natural products.

Structures of seven natural products were elucidated by spectroscopic methods using ^1H -nmr, APT, 2D-COSY, HETCOR and mass spectrometer, EI-MS, GC-MS and (+) FAB-MS.

Key Words: Natural products, Chromatography, Spectroscopic methods, NMR, EI-MS, EI-MS, GC-MS, (+) FAB-MS

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No:

Şekil 1: CC1 Kodlu Numunenin ¹ H-nmr Spektrumu (CDC1 ₃ , 200MHz).	37
Şekil 2: CC2 Kodlu Numunenin ¹ H-nmr Spektrumu (CDC1 ₃ , 200MHz).	38
Şekil 3: 1 Nolu Molekülün ¹ H-nmr Spektrumu (CDC1 ₃ , 200MHz).	39
Şekil 4: 1 Nolu Molekülün APT Spektrumunun Parçası (δ 0.0-100.0 ppm, CDC1 ₃ , 50.0 MHz).	40
Şekil 5: 1 Nolu Molekülün APT Spektrumunun Parçası. (δ 100.0-200.0 ppm, CDC1 ₃ , 50.0 MHz).	41
Şekil 6: 1 Nolu Molekülün EI-MS Spektrumu.	42
Şekil 7: 2 Nolu Molekülün ¹ H-nmr Spektrumunun Parçası (δ 0.0-4.0 ppm, CDC1 ₃ , 200MHz).	43
Şekil 8: 2 Nolu Molekülün ¹ H-nmr Spektrumunun Parçası (δ 4.0-7.3 ppm, CDC1 ₃ , 200MHz).	44
Şekil 9: 2 Nolu Molekülün APT Spektrumunun Parçası (δ 10.0-100.0 ppm, CDC1 ₃ , 50.0 MHz).	45
Şekil 10: 2 Nolu Molekülün APT Spektrumunun Parçası (δ 110.0-200.0 ppm, CDC1 ₃ , 50.0 MHz).	46
Şekil 11: 2 Nolu Molekülün 2D-COSY Spektrumu (CDC1 ₃ , 200 MHz).	47
Şekil 12: 2 Nolu Molekülün EI-MS Spektrumu.	48
Şekil 13: CC42B Kodlu Molekülün GC-MS Spektrumu (MD 800)	49
Şekil 14: 2 Nolu Molekülün GC-MS Spektrumu (MD 800)	50
Şekil 15: 3 Nolu Molekülün GC-MS Spektrumu (MD 800)	51
Şekil 16: 4 Nolu Molekülün GC-MS Spektrumu (MD 800)	52
Şekil 17: 5 Nolu Molekülün GC-MS Spektrumu (MD 800)	53
Şekil 18: 6 Nolu Molekülün ¹ H-nmr Spektrumunun Parçası (δ 0.0-4.2 ppm, C ₅ D ₅ N, 200MHz).	54
Şekil 19: 6 Nolu Molekülün ¹ H-nmr Spektrumunun Parçası (δ 4.8-9.0 ppm, C ₅ D ₅ N, 200MHz).	55
Şekil 20: 6 Nolu Molekülün APT Spektrumunun Parçası (δ 0.0-90.0 ppm, C ₅ D ₅ N, 50.0 MHz).	56
Şekil 21: 6 Nolu Molekülün APT Spektrumunun Parçası (δ 100.0-180.0 ppm, C ₅ D ₅ N, 50.0 MHz).	57
Şekil 22: 6 Nolu Molekülün 2D-COSY Spektrumu (C ₅ D ₅ N, 200 MHz).	58
Şekil 23: 6 Nolu Molekülün HETCOR Spektrumu (C ₅ D ₅ N, 200 MHz).	59
Şekil 24: 6 Nolu Molekülün (+) FAB-MS Spektrumu.	60
Şekil 25: 7 Nolu Molekülün ¹ H-nmr Spektrumunun Parçası (δ 0.0-4.6 ppm, C ₅ D ₅ N, 200MHz).	61

Şekil 26: 7 Nolu Molekülün ^1H -nmr Spektrumunun Parçası (δ 4.6-9.0 ppm, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 200MHz).	62
Şekil 27: 7 Nolu Molekülün APT Spektrumunun Parçası (δ 0.0-100.0 ppm, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 50.0 MHz).	63
Şekil 28: 7 Nolu Molekülün APT Spektrumunun Parçası (δ 106.0-210.0 ppm, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 50.0 MHz).	64
Şekil 29: 7 Nolu Molekülün 2D-COSY Spektrumu ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 200 MHz).	65
Şekil 30: 7 Nolu Molekülün (+) FAB-MS Spektrumu.	66



TABLO LİSTESİ

Sayfa No:

Tablo 1:	Metil Palmitat'ın ^1H ve ^{13}C -nmr Değerleri	13
Tablo 2:	Metil Palmitat'ın EI-MS Fragmentasyonu	14
Tablo 3:	CC42B'nin ^1H ve ^{13}C -nmr Kimyasal Kayma Değerleri	15
Tablo 4:	2 nolu Molekülün EI-MS Fragmentasyon Pikleri	16
Tablo 5:	2 nolu Molekülün GC-MS r.t. 50.98 Olan Pikin Fragmentasyon Değerleri	16
Tablo 6:	3 nolu Molekülün GC-MS r.t. 51.571 Olan Pikin Fragmentasyon Değerleri	18
Tablo 7:	4 nolu Molekülün GC-MS Spektrumunun Fragmentasyonları Pikleri	20
Tablo 8:	5 nolu Molekülün GC-MS Fragmentasyon Değerleri	22
Tablo 9:	CC8 Kodlu Molekülünün Glukan Kısımının ^{13}C ve ^1H -nmr Kimyasal Kayma Değerleri	24
Tablo 10:	CC8 Kodlu Molekülünün Aglukan Kısımının ^{13}C -nmr Kimyasal Kayma Değerleri	25
Tablo 11:	CC9 Kodlu Molekülünün Kısımının ^{13}C ve ^1H -nmr Kimyasal Kayma Değerleri	28

SEMBOL LİSTESİ

A/W	: Aseton-Su
C/M	: Kloroform-Metanol
C/M/W	: Kloroform-Metanol-Su
DEPT	: Karbon Türünü Söyleyen Spektrum
2D-COSY	: İki Boyutlu Proton Spektrumu
d	: Dublet
¹³ C-nmr	: Karbon Sayısını Veren Spektrum
EI-MS	: Kütle Spektrumu
GC-MS	: Gaz Kromatografisi Kütle Spektrumu
(+)FAB-MS	: Hızlı Bombardıman Kütle Spektrumu
H/C	: n-Hekzan-Kloroform
HPLC	: Yüksek Basıç Sıvı Kromatografisi
¹ H-nmr	: Proton nmr Spektrumu
HMBC	: ¹ H- ¹³ C Korelasyon Spektrumu
IR	: İnfrared Spektrumu
J	: Etkileşme Sabiti
MHz	: Mega Hz
m	: Multiple
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
NOESY	: Konformasyon Spektrumu
ptlc	: Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi
ppm	: Milyonda Bir Kısım
R _f	: Maddenin Yürümesinin Çözücünün Yürümesine Oranı
RP-C ₈	: Ters Faz Silika
RP-C ₁₈	: Ters Faz Silika
r.t.	: Alıkonma Zamanı
s	: Singlet
t	: Triplet
tlc	: İnce Tabaka kromatografisi
UV	: Ultra Viyolet

1.GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Bu çalışmada, yersomunu *Cyclamen coum* Miller bitkisinden yedi adet doğal bileşik izole edilip yapıları spektroskopik olarak aydınlatılmıştır. Yapılan literatür araştırması sonunda bu bitki üzerinde doğal bileşiklerin aydınlatılması üzerine hiç bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

İzole edilen doğal bileşikler sırasıyla literatürde olup olmadığı araştırılmış olup, 1 nolu metilpalmitat bileşiği değişik bitkilerden palmitik asit olarak karışım halinde izole edilip, gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi (GC-MS) yöntemiyle metil esterlerine dönüştürülerek bulunduğu belirtilmiştir [1-6]. Yine literatürde palmitik asit saf olarak izole edilip nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi yöntemiyle asit olarak aydınlatıldığı belirtilmiştir [7].

Literatür bilgileri doğrultusunda metilpalmitat diğer organizmalardan izole edilmiş [1-7], fakat *Cyclamen coum* bitkisinden ilk defa bu çalışmada bulunmuştur.

İzole edilen 2 nolu molekül stigmasterol doğal bir bileşik olup, yapılan literatür araştırması sonucu çok sayıda değişik bitkilerden izole edildiği ve yapılarının spektroskopik olarak (NMR, EI, IR gibi) aydınlatıldığı belirtilmiştir [8-15]. Yapılan literatür araştırması sonucu spektroskopik bilgilerin çok uygun olduğu bulunmuştur [8-15]. Stigmasterol' ün 2 değişik doğal bitkilerden GC-MS analizi sonucunda bulunduğu belirtilmiştir [16-19]. Bu bilgiler ışığı altında stigmasterol bilinen doğal bir triterpen molekülü olup ilk defa *Cyclamen coum* bitkisinden bu çalışmada izole edilip yapısı aydınlatılmıştır.

İzolasyon sonucu yapısı aydınlatılan 3 nolu molekül poriferastol doğal bir bileşik olup literatürde başka bitkilerden izole edildiği ve GC-MS ile aydınlatıldığı belirtilmiştir [18]. 3 nolu molekülde literatürde bilinen fakat ilk defa *Cyclamen coum* bitkisinden izole edilip yapısı aydınlatılan doğal bir bileşiktir.

4 nolu stigmast 3,5,22 trien molekülü literatürde stigmasterol' ün triaçilgliserol içinde ısıtılarak yükseltgenmesi sonucu elde edildiğini belirtmektedir [20]. Aynı zamanda başka doğal bileşiklerden izole edilip yapısının aydınlatıldığı belirtilmiştir [21]. 4 nolu molekülde yine *Cyclamen coum* bitkisinden bu çalışmada izole edilip GC-MS analizi sonucu yapısı bulunmuştur.

İzole edilen 5 nolu molekül stigmast 3,5,7,22 tetraen olup, literatürde 5 nolu moleküllerin izomeri olup, stigmast 1,3,5,22 tetraen ve 2,4,6,22 tetraen molekülleri sentez edilmiştir [22-23]. Yapılan araştırma sonucu izole edildiği bulunmamıştır. Böylece 5 nolu molekül doğal bir bileşik olup ilk defa bu çalışmada bulunmuştur.

6 nolu molekül hakkında yapılan literatür araştırması sonucu $C_{33}H_{54}O_6$ molekül formülü altında, $3\beta\text{-O-}\{\beta\text{-D-glikopiranosil}\}\text{-kolost-5,22-dien}$ isimli hiç bir moleküle rastlanmamıştır. Bu 6 nolu molekül ilk defa bu çalışmada bulunmuş yeni bir doğal bileşiktir.

İzole edilen 7 nolu molekül $C_{23}H_{43}NO_{10}$ kapalı formüle sahip olup, bu formüle sahip hiç bir molekül literatürde bulunmamıştır. 7 nolu molekül 2- $\beta\text{-D-glukopranosil-2-undekil-3,5-dihidroksi-6-karboksi piperidin}$ olarak adlandırılmıştır. Bu bileşikte ilk defa bu çalışmada bulunmuş olup yeni bir doğal bileşiktir.

1.2. Silikajel Kromatografisi

Normal faz silikajel kolon kromatografisi doğal bileşiklerin izolasyonunda bol miktarda kullanılmaktadır [1-19]. Normal faz preparatif ince tabaka kromatografisi (ptlc) az ve çok miktarda doğal bileşiklerin saflaştırılmasında sıkca kullanılmaktadır [1-19,24].

Ters faz silikajel kimyasal olarak geliştirilmiş bir adsorbant olup gerek kolon kromatografisi ile ve gereksede ptlc yöntemiyle doğal maddelerin en son saflaştırılmalarında kullanılan tekniktir. Aynı zamanda son yıllarda ters-faz yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) de doğal bileşiklerin saflaştırılmasında kullanılan bir yöntemdir [24].

Basınç kromatografisi preparatif amaçlı hava-basınçlı sıvı kromatografisi tekniğidir. Genelde hızlı bir ayırma yöntemi olup, karışık numuneyi fraksiyonlandırmada sıkca kullanılan bir tekniktir [24].

Doğal bileşiklerin saflaştırılmasında tabiki sadece tek bir kromatografik yöntem yoktur. Yukarıdaki veya diğer kromatografik teknikler ardarda olarak kullanılmaktadır.

1.3.Yapı Aydınlatılmasında Kimyasal Yöntemler

Doğal bileşiklerin yapılarının aydınlatılmasında ilk zamanlar kimyasal yöntemler kullanılmaktaydı. Kullanılan kimyasal yöntemlerin güçlüğü yanında oluşabilecek yan ürünlerin çokluğu, kimyasal yöntemlerle yapı aydınlatılmasının güçlüğünü ortaya koymaktadır.

Bugünün teknolojisinde, moleküllerin yapı aydınlatılmaları spektroskopik olarak yapılmaktadır.

1.4. Yapı Aydınlatılmasında Spektroskopik Yöntemler

Bilindiği gibi moleküllerin yapılarının aydınlatılmasında, infraret (IR), Nükleer manyetik rezonans (NMR), kütle (EI-MS,GC-MS,FAB-MS), ultraviyole (UV) gibi spektroskopik teknikler kullanılmaktadır [25-32].

Bunlardan IR, moleküldeki fonksiyonel gruplar hakkında; EI-MS, GC-MS, veya FAB-MS molekülün molekül iyonu ve fragmentasyonları hakkında, UV moleküldeki çifte bağların durumu hakkında, nmr ise molekülün tamamen C-H iskeleti hakkında bilgi veren spektrokopi teknikleridir. Bugünün teknolojisinde doğal bileşiklerin yapılarının aydınlatılmasında yüksek alan şiddetli (500, 700 MHz) nmr aletleri kullanılmaktadır [25-27].

NMR spektroskopisinin değişik teknikleri olup ^1H -nmr'ı molekülün proton yapısını, ^{13}C -nmr'ı moleküldeki birim karbon sayısını, APT veya DEPT nmr'ı karbon türünü, 2D-COSY komşu proton sırasını, HETCOR hangi protonun hangi karbon üzerinde olduğunu, HMBC komşu karbon atomlarını, NOESY protonların stereokimyası gibi değişik teknikleridir. Kısacası molekülün resmini çizmek için gerekecek tüm bilgileri vermektedirler [24].

2. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

2.1. Çözücülerin Saflaştırılması

Bütün çözücüler kloroform, metanol, aseton, n-hekzan ve etilasetat kullanılmadan önce fraksiyonlu destilasyon sistemiyle saflaştırıldı.

2.2. İnrümentasyon

Bruker AC 200L MHz (^1H frekansı) (50.33 MHz ^{13}C frekansı) nmr aletinde spektrumlar alınmıştır.

GC-MS, VP Zapspec GC-MS, 32 bitlik "Dec Vax Staion Data Processor" aletinde alınmıştır.

2.3. İzolasyon

Yersomunu *Cyclamen coum* Miller bitkisi 07.03.1995 tarihinde Giresun Yağlıdere mevkiinden (rakım ~ 50) 114 adet (~1.5 kg kadar yaş) toplandı. Bitkinin gövdesi çiçek kısımlarından ayrıldıktan sonra daha iyi ekstrakte edebilmesi için bıçakla 6-7 parçaya bölündü.

Destile metanol ile (3 kez, 1.5 lt herbiri, 24 saat) ekstrakte edildi. Ekstraktlar karıştırılıp 35 °C de evaporatörde çözücü çekildi. Geriye kalan sulu ekstrakt (~ 400 ml) ayırma hunisinde kloroform ile (150 ml , 3 kez) ekstrakte edildi. Kloroform ekstraktları birleştirilip çözücü evaporatörde çekildikten sonra numune (0.9 g) tlc 'de kontrol edilip kolon kromatografisi için çözücü sistemi bulunmaya çalışıldı.

Kloroform ekstrakt CC koduyla kodlandı. Saf olmayan doğal ekstrakt kloroform ile çözüldükten sonra normal silikajel (Slikajel 230-400 mesh, 40 g) ile basınçlı kolon (40 ×1.5) kromatografisi yöntemiyle saflaştırılmaya çalışıldı.

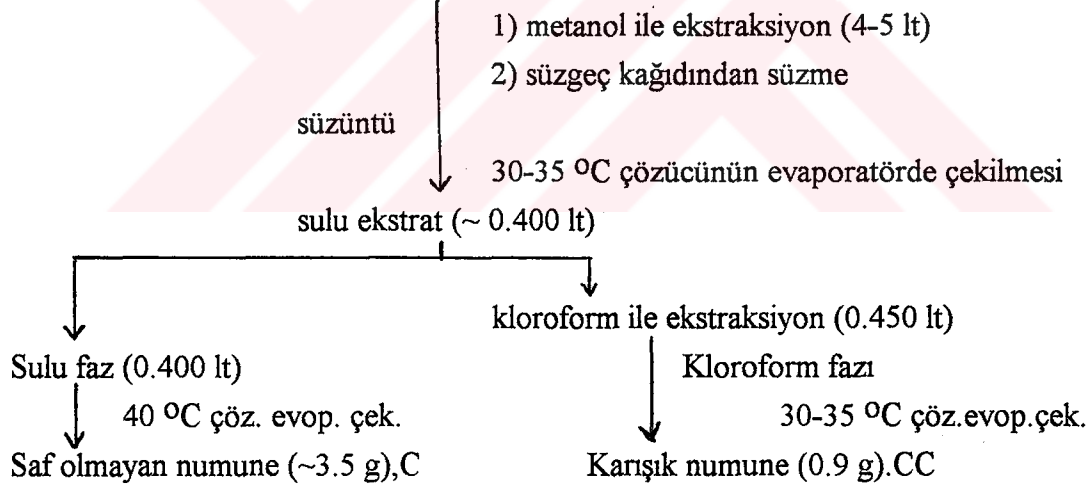
Kolon ilk önce destile n-hekzan (80 ml) ve sırasıyla n-hekzan-kloroform (3:1, 40 ml), n-hekzan-kloroform (2:3, 50 ml), n-hekzan-kloroform (1:4, 100 ml), kloroform (50 ml), kloroform-metanol (9:1, 100 ml), kloroform-metanol (4:1, 100 ml), kloroform-metanol (3.5:1.5, 50 ml), kloroform-metanol (2:3, 100 ml), metanol (50 ml), Kloroform-

metanol-su (C/M/W) (2.0:2.6:0.4, 50 ml) çözücü ve çözücü karışımlarıyla elue edilip 43 fraksiyon (~15-20 ml herbiri) toplandı. Fraksiyonlar ince tabaka kromatografisi (thin layer chromatography, tlc) ile kontrol edildikten sonra aşağıdaki gibi 10 fraksiyon olarak karıştırıldı.

No	Karıştırılan Fraksiyonlar	R _f
Fraksiyon 1 (CC1)	1-7 (57.4 mg)	R _f = 0.95 (H/C,(3.5:1.5))
Fraksiyon 2 (CC2)	10 (19.2 mg)	R _f =0.60 (H/C,(3.5:1.5))
Fraksiyon 3 (CC3)	12-13 (40.1mg)	R _f =0.30 (H/C,(3.5:1.5))
Fraksiyon 4 (CC4)	14-22 (69.2mg)	R _f =0.90-0.70 (C/M,(4:1))
Fraksiyon 5 (CC5)	23-28 (34.7 mg)	R _f =0.70 (C/M,(4:1))
Fraksiyon 6 (CC6)	29-30 (97.2 mg)	R _f =0.65 (C/M,(4:1))
Fraksiyon 7 (CC7)	31-34 (84.1 mg)	R _f =0.60-0.50 (C/M,(4:1))
Fraksiyon 8 (CC8)	35-38 (17.2 mg)	R _f =0.50-0.40 (C/M,(4:1))
Fraksiyon 9 (CC9)	39-40 (14.2 mg)	R _f =0.40-0.20 (C/M,(4:1))
Fraksiyon 10 (CC10)	41-43 (24.3 mg)	R _f =0.20 (C/M,(4:1))

Çözücü sistemi : hekzan-kloroform (H/C)
kloroform-metanol (C/M)

Yersomunu, *Cyclamen coum* Miller (114 adet.~1.5 kg yaş)



Ekstraksiyon şeması

Fraksiyon 1, CC1 (54.7 mg)' in normal ve ters faz silikajel analizleri sonucu, apolar karektere sahip olduğu için ¹H-NMR spektrumu (ek şekil 1) alınmıştır. δ 0.8 ve 1.25

ppm piklerinin hariçinde pik gözlenmediği için doymuş hidrokarbon olduğuna karar verilip, daha ileri analiz yapılmamıştır.

Fraksiyon 2, CC2 (19.2 mg) 'nin tlc analizi (silikajel, 230-400 mesh) (H/C (3.5:1.5) $R_f=0.60$) ve ters faz silika ((RP-C₈) (aseton, $R_f=0.35$)) sonucu saf olduğu tespit edilmiştir. ¹H-NMR spektrumu (ek şekil 2) sonucu olefinik yapıda karışık hidrokarbon olduğu tespit edildi ve daha ileri analiz yapılmadı.

Fraksiyon 3, CC3 (40.1 mg) 'ün tlc analizi normal silikajel, (230-400 mesh) (H/C, 3.5:1.5, $R_f=0.30$) ve ters faz silika (RP-C₈) (aseton, $R_f=0.92$) sonucu saf olduğu anlaşılmış olup spektroskopik analizleri (¹H-NMR, APT, EI-MS) yapılmıştır. Analiz sonucu metil palmitat, (CH₃(CH₂)₁₄COOCH₃) olduğu tespit edilmiştir.

Fraksiyon 4, CC4 (49.2 mg) normal silikajel (230-400 mesh, 10 g) kolon (0.70×70 cm) ile saflaştırılmaya çalışıldı. Kolon n-hekzan (50 ml) n-hekzan-kloroform (10:2, 30 ml), n-hekzan-kloroform, (10:4, 30 ml), n-hekzan-kloroform (10:5, 40 ml) çözücü ve çözücü karışımıyla elue edilip, 24 fraksiyon (~3-5 ml herbiri) toplandı. Tlc analizleri sonucu 10-16 nolu fraksiyonlar karıştırılıp, CC42 (22 mg) koduyla kodlandı. Daha sonra preparatif ince tabaka kromatografisi (Preparatif Thin Layer Chromatography, ptcl) (20×20 cm, 0.20 mm, 2 plaka) ile saflaştırıldı. PTLC' de 3 band UV altında gözlenmiş olup iki nolu band CC42B ile kodlanıp, plakadan kazınıp kloroform-metanol (5:1) çözücüsüyle yıkandı, çözücü evaporatörde çekildikten sonra, numune metanol çözücüsünde kristallendirildi. Kristaller süzülüp (CC42B, 7.2 mg) tlc analizi normal silika (C/M, (3:0.2), $R_f=0.50$) ve ters faz silika (RP-C₈, aseton, $R_f=0.65$) ile kontrol edildi. Numune saf olduğu bulunduktan sonra spektroskopik analizleri (¹H-NMR, APT, EI-MS, ve 2D-COSY) sonucu stigmasterol olduğu ispatlanmış oldu. Fraksiyon 4, CC42' nin bir kısım fraksiyonundan (7.1 mg) GC-MS analizi yapıldı. Spektrumdaki fragmentasyonlardan 2, 3, 4 ve 5 nolu moleküllerin yapıları 2 nolu moleküle karşılaştırılarak aydınlatıldı.

Fraksiyon 6, CC6 (97.2 mg) ters faz silika (RP-C₁₈) kolon (20×0.5 cm) ile saflaştırılmaya çalışıldı. Kolon kuru olarak hazırlandıktan sonra numune az miktar çözücüde (A/W(1:2)) çözümlenip kolona ilave edildi. Kolon önce aseton-su (20:1, 20 ml) ve aseton (30 ml) ile elue edilip 15 fraksiyon toplandı (~1-5 ml, herbiri). Fraksiyonların ters faz tlc (A/W, 3:0.2) analizleri sonucu dört grub olarak birleştirildi.

Fraksiyon 1-6	CC61	(A/W; 3:0:2, $R_f=0.80-0.70$)
Fraksiyon 7-9	CC62	(A/W; 3:0:2, $R_f=0.70-0.50$)
Fraksiyon 10-12	CC63	(A/W; 3:0:2, $R_f=0.50$)
Fraksiyon 13-14	CC64	(A/W; 3:0:2, $R_f=0.25$)

CC61, CC62 kodlu numunelerde ters faz tlc analizleri sonucu karışım halinde oldukları bulundu CC63 nolu numunenin ters faz tlc analizi saf olduğunu gösterdi ama çok az miktarda olduğu bulundu (4-5 mg).

CC64 kodlu numune tekrar normal faz silika tlc' de kontrol edildi ve çok az miktarda safsızlığı olduğu bulundu. Daha sonra normal faz silika 60 (230-400 mesh 6 g) ile küçük bir kolanda (20×0.5 cm) basınçlı kromatografi ile saflaştırılmaya çalışıldı. CC64 kodlu numune az miktarda kloroform (2 ml) çözücüsünde çözülüp, kuru olarak hazırlanmış kolana ilave edildi. Kolon önce n-hekzan (20 ml) çözücüsüyle elue edildi. Daha sonra kloroform-metanol (10:0.5; 10 ml), kloroform-metanol (10:1; 20 ml) çözücü ve çözücü karışımlarıyla elue edilip 11 fraksiyon (~2-4 ml herbiri) toplandı. Fraksiyonların normal faz tlc analizleri sonucu 4-8 nolu fraksiyonlar karıştırılıp CC642 (12.2 mg) kodu ile kodlandı. Tlc analizleri sonucu saf olduğuna karar verilip daha sonra spektrokopik analizleri (¹H-NMR, APT, 2D-COSY ve EI-MS) alındı. Fakat spektrumlar henüz elimize geçmedi.

Fraksiyon 8, CC8 (17.2 mg) Kloroform-metanol (2:1) çözücü sisteminde çözüldükten sonra aseton ile çöktürme yoluyla saflaştırıldı. CC8 (10.2 mg) tlc analizleri sonucu saf olduğu tespit edildi, (C/M, 4:1, R_f= 0.4) Daha sonra spektroskopik analizleri (¹H-NMR, APT, 2D-COSY, (+) FAB-MS) sonucu triterpen glikozid olduğu bulundu.

Fraksiyon 9, CC9 (14.2) küçük bir normal faz silikajel 60 (6g, 230-400 mesh) kolon (22×0.5 cm) ile saflaştırılmaya çalışıldı. Numune kuru olarak hazırlanmış kolona kloroform-metanol (1:1) çözücü sistemiyle çözülüp ilave edildikten sonra, kolon basınç kromatografisi yöntemine göre önce n-hekzan (30 ml), kloroform (30 ml) çözücü ve kloroform-metanol (10:1, 20 ml) , kloroform-metanol (10:2, 30 ml) çözücü ve çözücü sistemleriyle elue edilip 34 fraksiyon (~ 3-4 ml, herbiri) toplandı. Fraksiyonların normal faz tlc analizleri sonucu 25-28 nolu fraksiyonlar karıştırıldı ve CC92 (7.2 mg) koduyla kodlandı, (kloroform-metanol, 5:0.5, R_f= 0.35). Numunenin tlc analizleri sonucu saf olduğu tespit edilip, spektroskopik analizleri (¹H-NMR, APT, 2D-COSY ve (+) FAB-MS) alındı. Spektroskopik analizlerinin sonucu glukoz ihtiva eden kompleks bir molekül olduğu ispatlandı.

CC3 1: Yarı sıvı yarı katı bir maddedir. NMR (CDCl₃) bilgileri tablo 1'de görülmektedir. Spektrumlar ek şekil 3-5'da görülmektedir. EI-MS m/z (%) 270 [M]⁺ (34), 239 [M-OCH₃]⁺(14) , 227 [M-(CH₂)₂CH₃]⁺ (20), 199 [M-(CH₂)₄CH₃]⁺ (9), 185 [M-(CH₂)₅CH₃]⁺ (13), spektrum, ek şekil 6'de görülmektedir. EI-MS spektrumundan fragmantasyon değerleri tablo 2'de gösterilmiştir.

CC42B 2:Yarı sıvı yarı katı bir maddedir. NMR (CDCl₃) bilgileri, tablo 3'de görülmektedir. 2 nolu maddenin ¹H-NMR, APT ve 2D-COSY spektrumları ek şekil 8-

11'de görülmektedir. EI-MS m/z (%) 412 $[M]^+$ (21), 394 $[M-H_2O]^+$ (100), 255 $[M-139-H_2O]^+$ (38), EI-MS spektrumundan fragmentasyon değerleri tablo 4'de gösterilmiştir. spektrum, ek şekil 12'de görülmektedir.

CC42B 2: GC-MS spektrumundan frakmantasyon değerleri tablo 5'de gösterilmiştir. GC-MS alıkonma zamanı (r.t.) 50.94 dir. GC-MS m/z (%) 412 $[M]^+$ (24), 394 $[M-H_2O]^+$ (9), spektrum ek şekil 13,14'de görülmektedir.

CC42B 3: Madde karışım halinde olduğu için e.n. tayin edilememiştir. GC-MS spektrumundan frakmantasyon değerleri tablo 6'de gösterilmiştir. GC-MS alıkonma zamanı (r.t.) 51.571'dir ve moleküler iyon ve frakmantasyonlardan 2 nolu molekülün izomeri olduğu bulunmuştur. GC-MS m/z (%) 412 $[M]^+$ (12), 394 $[M-H_2O]^+$ (8), 271 (85), 255 (33), spektrum ek şekil 13, 15'de görülmektedir.

CC42B 4 : Madde karışım halinde olduğu için e.n. tayin edilememiştir. GC-MS spektrumundan frakmantasyon değerleri tablo 7'de gösterilmiştir. GC-MS alıkonma zamanı (r.t.) 47.794'dir. GC-MS m/z (%) 392 $[M]^+$ (28), 253 (10), 207 (14), spektrum ek şekil 13, 16'da görülmektedir.

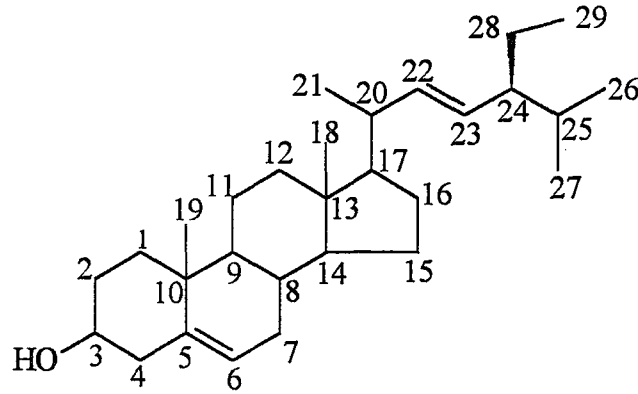
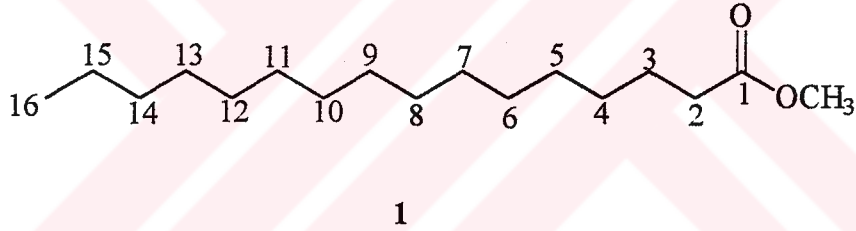
CC42B 5: Madde karışım halinde olduğu için e.n. tayin edilememiştir. Frakmantasyon değeri tablo 8'da gösterilmiştir. GC-MS alıkonma zamanı (r.t.) 48.087 dir. GC-MS m/z (%) 394 $[M]^+$ (37), 379 $[M-CH_3]^+$ (8), 255 (41), spektrum ek şekil 13,17'de görülmektedir.

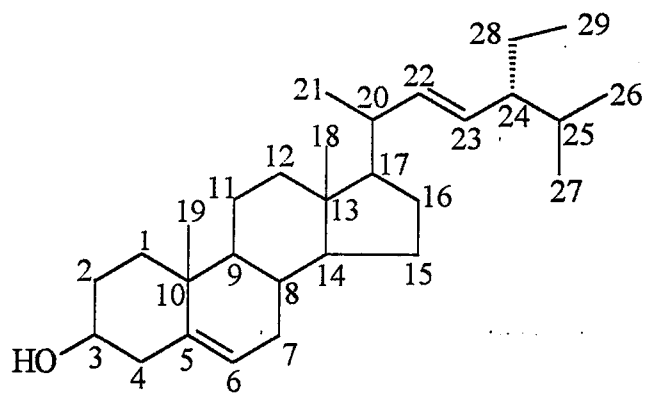
CC8 6: NMR (C_5D_5N) bilgileri tablo 9 ve 10'da görülmektedir. Spektrumlar ek şekil 18-23'de görülmektedir. (+) FAB-MS (mnba) m/z (%) 570 $[M-(Na+H)]^+$ (100), 552 $[M-(Na+H+H_2O)]^+$ (78), 534 $[M-(Na+H+2H_2O)]^+$ (18) spektrum ek şekil 24'de görülmektedir.

CC8 7: Yarı sıvı yarı katı bir numunedir. NMR (C_5D_5N) bilgileri, tablo 11'de görülmektedir. Spektrumlar ek şekil 25-29'de görülmektedir. (+) FAB-MS (mnba) m/z (%) 493 $[M]^+$ (5), 409 $[M-85+H]^+$ (37) , 295 $[M-179-H_2O+H]^+$ (100), spektrum ek şekil 30'da görülmektedir.

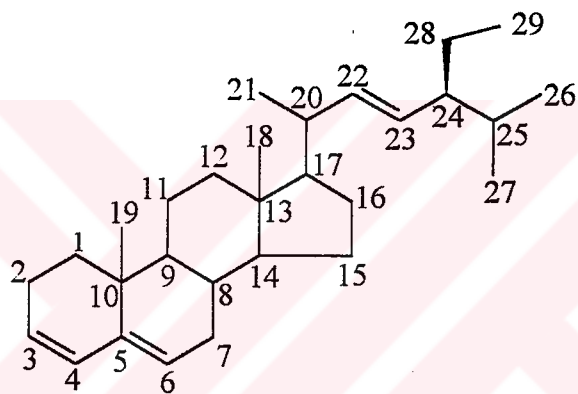
3. BULGULAR

Bu çalışmada, yersomunu *Cyclamen coum* bitkisinde yedi adet doğal bileşik deneysel bölümde bahsedildiği gibi saf olarak izole edilmiştir. Saf olarak izole edilen moleküllerin spektroskopik olarak yapılarının aydınlatılması amacıyla alınan ¹H-NMR APT, 2D-COSY, (+) FAB-MS, EI-MS ve GC-MS gibi spektrumlarının [20-32] alınmasından sonra yorumları yapılarak aşağıdaki yedi adet doğal bileşik bulunmuştur. Bu bileşiklerden aşağıda formülleri yazılı 1, 2, 3 ve 4 nolu bileşikler daha önce başka tür bitkilerden izole edilerek literatürde belirtilmişlerdir[1-23]. Fakat bu *Cyclamen coum* bitkisinden ilk defa izole edilip yapıları spektroskopik olarak aydınlatılmıştır. Diğer 5, 6 ve 7 nolu bileşiklerde ilk defa doğal bileşikler olarak bu çalışmada bulunmuştur. Aşağıda izole edilip yapıları spektroskopik olarak aydınlatılan yedi doğal molekülün yapıları gösterilmektedir.

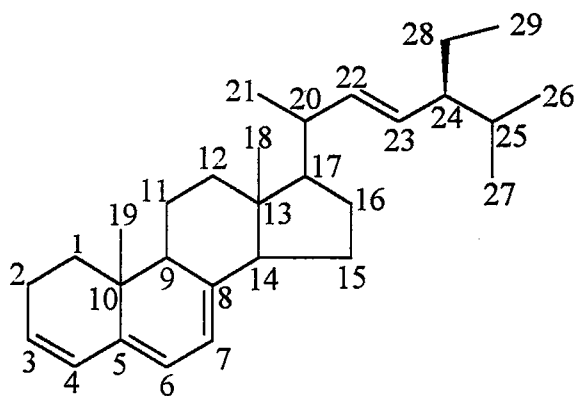




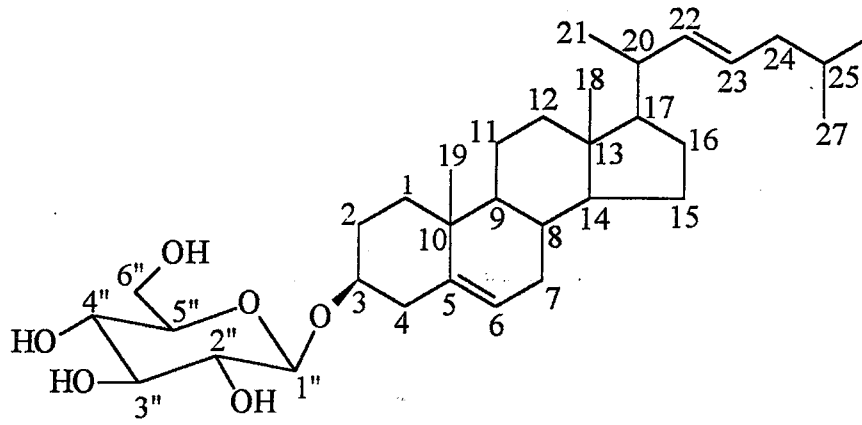
3



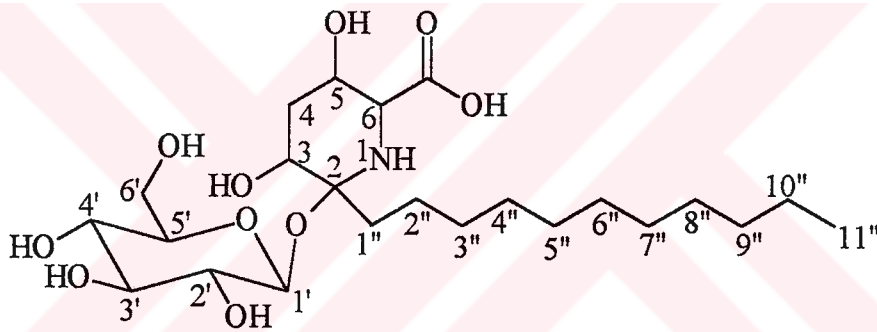
4



5



6



7

4. TARTIŞMA

4.1. CC3 Molekülünün Spektroskopik Olarak Aydınlatılması 1

Basit organik moleküllerin yanında bugün çok kompleks moleküllerde güçlü Nükleer Manyetik Resonans (NMR) aletinin bir boyutlu (1D) ve iki boyutlu (2D) deneyleri sayesinde yapılarını aydınlatmak mümkündür. Moleküler ağırlığında kütle spektroskopisinin çeşitli EI-MS, GC-MS ve (+) FAB-MS gibi teknikleri ve bunun yanındada çeşitli fragmentasyonları yardımıyla tesbit etmek mümkündür [28-33].

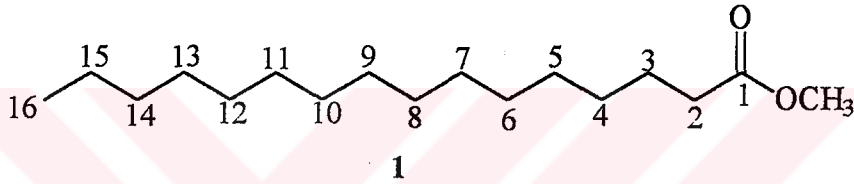
Bugün yüzlerce bilim adamı kimyasal yöntemleri kullanmadan spektroskopik yöntemlerle özellikle nmr aleti sayesinde moleküllerin yapılarını çok rahatlıkla aydınlatmaktadırlar [31-33].

İşte bu spektroskopi tekniklerini kullanarak saf halde izole ettiğimiz moleküllerin yapılarını spektroskopik olarak aydınlattık. CC3' ün ¹H-nmr spektrumundaki ek şekil 3 de aşağı alanda δ 3.60 ppm'de 3H 'na karşılık gelen ve singlet şeklinde pik vermiştir. Buda -OCH₃ için karakteristik bir piktir. Daha yukarı alanda δ 2.32 ppm de 2H' na karşılık gelen ve triplet şeklinde yarıma gösteren pik karbonil α -protonları için çok karakteristiktir. Böylece molekülün fonksiyonel grubu olarak metoksi karbonil grubu ispatlanmış oldu. ¹H-NMR spektrumunda diğer pikler δ 1.60 (2H), δ 1.25 (24H) ve δ 0.82 (3H) ppm'de görülmektedir. Bu bölge sp³ hibridize karbon atomu üzerinde bulunan protonlar için karakteristiktir [1-6]. Böylece molekülün diğer kısmının düz zincirli alkil grubu olduğu ispatlanmış olur. Bu iki parça birleştirildiğinden molekülün bir metilpalmitat molekülü olduğu bulunur [1-6].

Molekülün daha ileri seviyede ispatı, molekülde mevcut bulunan karbon türünü gösteren proton eşleşmiş teknik (attached profeno test,APT) sayesinde hangi türde ve kaç birim sayıda karbon olduğunu söyleyen APT spektrumu (ek şekil 4-5) alınmıştır. APT spektrumu en aşağı alanda δ 174.5 ppm karbonil piki gözlenmiştir. Buda ester karbonil grubu için karakteristiktir. Daha yukarı alanda δ 51.5 ppm de APT spektrumunda aşağı doğru pozisyonda -CH₃ piki olup, o kadar aşağı alanda olmasının nedeni elektronegatif oksijen atomuna substitue olmasıdır. Buda -OCH₃ varlığının ispatıdır. APT spektrumunda en yukarı alanda metil piki olarak tetrametilsilan (TMS) piki (δ 0.0 ppm) hariç δ 14.0 ppm aşağı pozisyonda -CH₃ piki gözlenmiştir ki, buda en

uç pozisyonunda bulunan metil grubudur. Diğer bütün ^{13}C pikleri APT spektrumunda yukarıya doğru yani $-(\text{CH}_2)-$ gurupları olup δ 22.5-34.1 ppm arasında bulunmuştur (ek şekil 4-5). APT spektrumundan elde edilen ^{13}C kimyasal kayma değerlerindeki molekülün düz zincirli bir ester molekülü olduğunu ispatlamıştır [1-6]. ^{13}C ve ^1H -NMR kimyasal kayma değerleri tablo 1'de teorik olarak hesaplanmış [46] ^{13}C değerleriyle birlikte gösterilmiştir. Daha sonra alınan kütle spektroskopisi EI-MS m/z (ek şekil 6) yöntemine göre moleküler iyon $[\text{M}]^+$ 270 m/z olarak bulunmuştur. Buda molekülün $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$ kapalı formülüne karşılık gelip, çeşitli fragmentasyonlar sonucu 239 $[\text{M}-\text{OCH}_3]^+$, 227 $[\text{M}-(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3]^+$, 199 $[\text{M}-(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3]^+$ gibi fragmentasyonlar, molekülün ^1H -nmr ve APT spektrumunda ortaya çıkan formülünün birkez daha hegzadekanoik asit metil esteri 1 (metil palmitat) olduğu ispatlanmıştır [1-6]. EI-MS spektrumundan fragmentasyon değerleri tablo 2'de gösterilmiştir.

Böylece CC3 kodlu numune spektroskopik olarak *Cyclamen coum* bitkisinden izole edilmiş 1 nolu doğal bileşiktir.



Tablo 1 : Metil Palmitat' ın ^1H ve ^{13}C -nmr Değerleri (CDCl_3 , δ , ppm).

No	^{13}C (δ , ppm) Deneysel	APT	^{13}C (δ , ppm) Teo. Hesap.	Δ	^1H (δ ppm)
1	174.5	-C-	175.0	+0.5	
2	34.1	$-\text{CH}_2-$	32.5	-1.3	2.32 (2H,t,J=7.0Hz)
3	29.7	$-\text{CH}_2-$	29.6	-0.1	1.6 (2H, m)
4	29.0	$-\text{CH}_2-$	29.2	+0.2	1.25
5	29.0	$-\text{CH}_2-$	29.7	+0.7	
6	29.0	$-\text{CH}_2-$	29.7	+0.7	
7	29.0	$-\text{CH}_2-$	29.7	+0.7	
8	29.0	$-\text{CH}_2-$	29.7	+0.7	
9	29.0	$-\text{CH}_2-$	29.7	+0.7	1.25 24H, m)
10	29.0	$-\text{CH}_2-$	29.7	+0.7	
11	29.0	$-\text{CH}_2-$	29.7	+0.7	
12	29.0	$-\text{CH}_2-$	29.7	+0.7	
13	29.0	$-\text{CH}_2-$	29.7	+0.7	
14	23.7	$-\text{CH}_2-$	22.2	-1.5	
15	22.5	$-\text{CH}_2-$	22.8	+0.3	1.25
16	14.0	$-\text{CH}_3-$	13,7	-0.3	0.82 (3H,t)
-OCH ₃	51.5	$-\text{CH}_3$			3.60 (3H,s)

Teorik olarak hesaplanmış ^{13}C kimyasal kayma değerleri [46].

Tablo 2 : Metil palmitat'ın EI-MS Fragmentasyonu (m/z) % değerleri.

(m/z) %	
270 (35)	$[\text{M}]^+$
239 (14)	$[\text{M}-\text{OCH}_3]^+$
227 (20)	$[\text{M}-(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3]^+$
199 (8)	$[\text{M}-(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3]^+$
185 (13)	$[\text{M}-(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3]^+$
171 (23)	$[\text{M}-(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3]^+$
157 (9)	$[\text{M}-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3]^+$
143 (39)	$[\text{M}-(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3]^+$
129 (21)	$[\text{M}-(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3]^+$
115 (14)	$[\text{M}-(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3]^+$
101 (23)	$[\text{M}-(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3]^+$
87 (86)	$[\text{M}-(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3]^+$
73 (44)	$[\text{M}-(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3]^+$
59 (53)	$[\text{M}-(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3]^+$

4.2. CC42B Molekülünün Spektroskopik Olarak Aydınlatılması 2

CC42B kodlu numune ^1H -nmr (200 MHz) (ek şekil 7-8) spektrumu tipik bir triterpen olduğunu göstermektedir [8-10]. Çünkü en aşağı alanda δ 5.4 ppm 1H dublet ve δ 5.1 ppm 2H AB kuarterner şeklinde olefenik protonları göstermektedir. Buna göre molekülde iki adet olefenik çifte bağ vardır. Daha yukarı alanda δ 3.54 ppm'de 1H, multiple pik H_3 nolu proton için karakteristiktir [8-15].

Moleküldeki birim karbon sayısını ve türünü tespit etmek amacıyla CC42B kodlu numunenin APT spektrumu (ek şekil 9-10) (50 MHz) alındı. APT spektrumunda farklı kimyasal kayma değerlerine sahip 28 adet pik bulundu. Fakat yukarı alanda δ 31.9 ppm'deki yüksekliği diğerlerine nazaran daha yüksek olduğu için literatürlerle karşılaştırma yapıldığında toplam ^{13}C pik sayısının 29 olduğu bulundu (8-15). APT spektrumunda kuarterneri ve $-\text{CH}_2-$ ^{13}C pikleri yukarı $-\text{CH}-$ ve $-\text{CH}_3$ pikleride aşağı doğru çizilmiştir. Kimyasal kayma değerlerinden $-\text{C}-$ ve $-\text{CH}_2-$ veya $-\text{CH}-$ ve $-\text{CH}_3$ pikleri ayırt edilebilir. APT spektrumunda en aşağı alanda δ 140.8 ppm'de kuarterneri ve δ 138.3, 129.3 ve 121.7 ppm'de $-\text{CH}-$ pikleri vardır. Buna göre bu bölge olefenik karbonlar için karakteristik olduğuna göre çifte bağlardan biri kuarterneri karbon atomunu ihtiva

etmektedir. Literatür değerleri ile karşılaştırıldığında [8-15, 24-26] δ 140.8 ppm (C) ve δ 121.72 ppm (-CH-) olefenik karbonların triterpen halkasındaki Δ^5 pozisyonuna çok uygun olduğu bulundu. Diğer olefenik karbonlar δ 138.3 ve 129.3 ppm -CH-piklerindeki triterpen molekülünün yan zincirindeki Δ^{22} pozisyonuna çok uygun olduğu yapılan literatür araştırmaları sonucunda bulunmuştur [8-15]. δ 71.8 ppm deki ^{13}C piki C_3 nolu karbonun kimyasal kayma değeri için karakteristiktir. Çünkü elektronegatif -OH grubu ihtiva etmektedir.

Molekülün diğer ^{13}C kimyasal kayma değerleri literatürde bilinen değerlerle karşılaştırma yapılarak tayin edildi [10-15].

^1H -nmr kimyasal kayma değerleri ve komşu protonlarının tayini 2D-COSY spektrumunun (ek şekil 11) analizi sonucu yapıldı. Tablo 3'de ^{13}C ve ^1H -nmr kimyasal kayma değerlerini göstermektedir.

Tablo 3: CC42B' nin ^1H ve ^{13}C -nmr Kimyasal Kayma Değerleri (CDCl_3 , δ , ppm)

No	^{13}C (δ , ppm)	APT	Proton	^1H (δ , ppm)
1	37.3	CH_2		
2	28.9	CH_2	H_2	2.3
3	71.8	CH	H_3	3.52
4	42.3	CH_2	H_4	2.3
5	140	C		
6	121.7	CH	H_6	5.4 t
7	31.9	CH_2	H_7	2.0
8	51.3	CH		
9	50.2	CH		
10	39.7	C		
11	24.4	CH_2		
12	29.7	CH_2		
13	39.7	C		
14	56.7	CH		
15	25.5	CH_2		
16	29.7	CH_2		
17	56.0	CH		
18	12.1	CH_3		
19	12.2	CH_3		
20	40.5	CH	H_{20}	2.1
21	21.2	CH_3	H_{21}	1.1
22	139.3	CH	H_{22}	5.1 AB,k
23	129.3	CH	H_{23}	5.1 AB,k

24	40.5	CH	H ₂₄	2.1
25	31.9	CH	H ₂₅	2.2
26	19.4	CH ₃		
27	19.0	CH ₃		
28	29.7	CH ₂		
29	12.0	CH ₃		

CC42B molekülünün EI-MS m/z spektrumu (ek şekil 12) alındı. Çok bariz şekilde C₂₉H₄₈O genel formülüne sahip moleküler iyon 412 (19) [M]⁺ ve bir mol H₂O kaybetmiş 394 (100), [M-H₂O]⁺ pikleri görüldü. CC42B' nin diğer EI-MS fragmentasyon piklerinin şeması tablo 4'de görülmektedir. CC42B (7.1 mg) kodlu numunenin GC-MS spektrumu (ek şekil 13, 14) alındı GC-MS' de alıkonma zamanı (r.t.) 50.984 olan pik % 100' lük pik olup MS moleküler iyon piki 412 [M]⁺ olarak bulundu [16-19]. Buda nmr ve EI-MS sonuçlarını birkez daha doğrulamaktadır. GC-MS spektrumunun r.t. 50.984 olan piki fragmentasyon tablosu tablo 4'de görülmektedir.

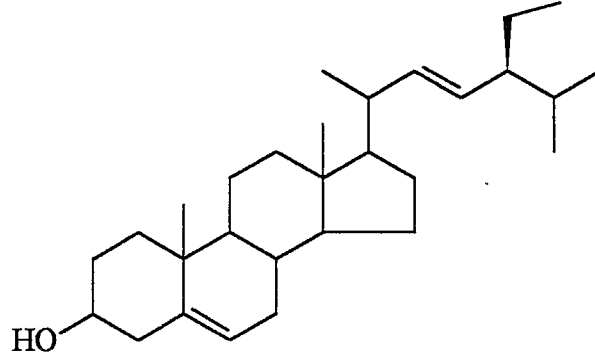
Tablo 4: 2 Nolu Molekülün EI-MS Fragmentasyon Piklerinin Tablosu.

m/z (%)	
412 (22)	[M] ⁺
397 (20)	[M-CH ₃] ⁺
394 (100)	[M-H ₂ O] ⁺
351 (13)	[M-H ₂ O-43] ⁺
300 (10)	[M-112] ⁺
271 (16)	[M-141] ⁺
255 (38)	[M-H ₂ O-139] ⁺

Tablo 5: 2 Nolu Molekülün GC-MS r.t. 50.98 Olan Pikin Fragmentasyon Değerleri.

m/z (%)	
412 (25)	[M] ⁺
397 (5)	[M-CH ₃] ⁺
394 (9)	[M-H ₂ O] ⁺
379 (7)	[M-H ₂ O-CH ₃] ⁺
351 (13)	[M-H ₂ O-43] ⁺
300 (15)	[M-112] ⁺
271 (24)	[M-141] ⁺
255 (33)	[M-H ₂ O-139] ⁺

¹H-, APT, 2D-COSY nmr ve EI-MS spektrum analiz sonuçları ve de literatür değerleriyle [8-19] karşılaştırma sonucu CC42B kodlu numunenin stigmast $\Delta^{5,22}$ dien 3- β -ol, 2 olduğu ispat edilmiştir.



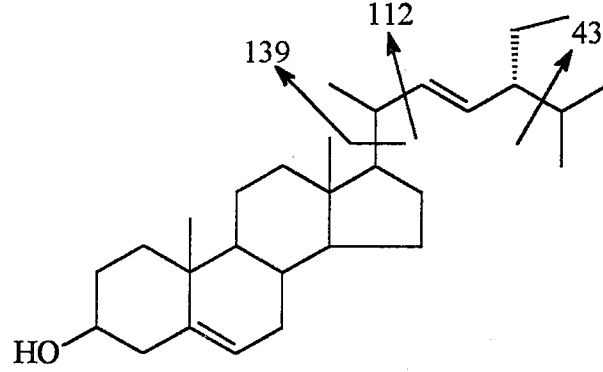
Stigmast $\Delta^{5,22}$ dien 3- β -ol, 2

4.3. 3 Nolu Molekülün Yapısının GC-MS Spektrumuyla Aydınlatılması

CC42B kodlu numune apolar karakterde molekül ihtiva ettiğinden içerisinde bulunabilecek diğer homolog moleküllerin araştırılması için GC-MS spektrumu alınmıştır. İzole edilmiş doğal bir bileşiğin içerisinde bulunabilecek safsızlıklar % 10'dan az ise nmr spektrumlarında safsızlık piklerini düşük alan şiddetine sahip nmr aletlerinde görmek mümkün değildir. İşte CC42B kodlu numunenin nmr spektrumlarında % 90 oranında olan 2 nolu numune gayet temiz spektrumlar vererek analizi yapıldı. Fakat GC-MS spektrumu numunede bulunabilecek % 1 lik safsızlık pikini dahi vermektedir. İşte bu fikir doğrultusunda GC-MS spektrumu [16-19] (ek şekil 13-15) alınmış, CC42B kodlu numunede alıkonma zamanı (r.t.) 51.571 olan pik moleküler iyon piki olarak 412 [M]⁺ vermiştir [18]. Buda nmr ve EI-MS spektroskopik tekniklerle ispatlanan 2 nolu molekülün diğer bir izomeri olduğu, hemde fragmentasyon piklerinden ispatlanmıştır.

Alıkonma zamanı 51.571 olan pikin GC-MS fragmentasyon tablosu tablo 6'da görülmektedir.

Tablo 6: 3 Nolu Molekülün GC-MS r.t. 51.571 Olan Pikin Fragmentasyon Değerleri.

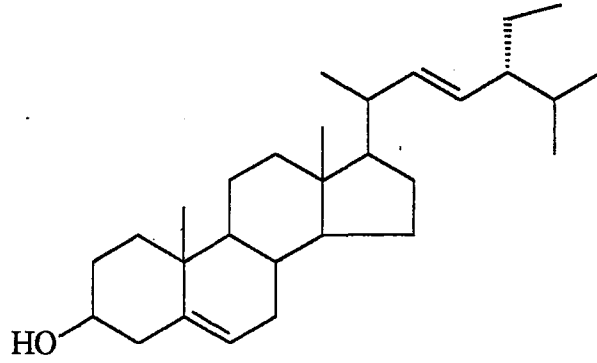


m/z (%)	
412 (12)	$[M]^+$
397 (5)	$[M-CH_3]^+$
394 (3)	$[M-H_2O]^+$
369 (5)	$[M-43]^+$
351 (4)	$[M-H_2O-43]^+$
300 (9)	$[M-112]^+$
271 (82)	$[M-141]^+$
255 (35)	$[M-H_2O-139]^+$

Alıkonma zamanı 51.571 olan pikin relatif yüksekliği % 12 dir.

Yukarıdaki bilgiler ışığında 3 nolu molekül 2 nolu molekülün izomeri olup yapılan literatür araştırması sonucu C₂₄ nolu pozisyonda substitüye etil grubunun konfigürasyonunun farklılığından ileri gelmektedir. 2 nolu bileşikteki C₂₄ nolu sterokimya R konfigürasyonunda olduğu ve diğer 3 nolu molekülde de C₂₄ nolu karbon S konfigürasyonunda olduğu literatür bilgileriyle karşılaştırma sonucu karara varılmıştır [18].

Bu bilgiler ışığında 3 nolu molekülün formülü aşağıdaki gibi olup poriferast $\Delta^{5,22}$ dien 3- β - ol olduğuna karar verildi.



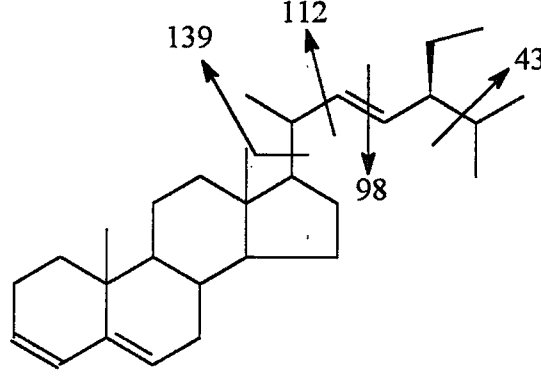
Poriferast $\Delta^{5,22}$ dien 3- β -ol, 3

4.4. 4 Nolu Molekülün Yapısının GC-MS Spektrumuyla Aydınlatılması

CC42B kodlu numunenin alınan GS-MS spektrumunda (ek şekil 13,16) alıkonma zamanı (r.t.) 48.087 olup pikin relatif yüksekliği % 9 dur. GS-MS spektrumunda bu alıkonma zamanına sahip pikin moleküler iyon piki 394 $[M]^+$ olarak bulundu. 2 ve 3 nolu molekülden farkları sadece H_2O molekülünün çıkarılmış olmasıdır. Bilindiği gibi triterpen doğal bileşikleri beş karbonlu olefinik isopiren moleküllerden biyosentez edildikleri bilinmektedir [34]. Buna göre biyolojik olarak 4 nolu molekülün C_3 ve C_4 nolu pozisyonunda, 2 ve 3 nolu molekülde olan C_3 nolu karbondaki -OH grubunun bir dehidrasyonu ki, sonunda $\Delta^{3,5}$ konjuge dien oluşumu söz konusudur. Buda gayet doğal olması beklenen bir adımdır. Fakat gerçekte triterpen molekülü biyolojik mekanizması açısından olefinik molekül olarak sentezlenir [34]. Daha sonra C_3 ve C_4 nolu pozisyonundaki olefinik çifte bağın biyolojik hidroskilasyonu sonucu 2 ve 3 nolu molekül gibi moleküller doğal olarak sentez edilmiş olur. İşte 4 nolu molekülde 2 ve 3 nolu moleküllerin doğal olarak sentez edilmelerinden önce oluşmuş doğal bir bileşiktir [21].

4 nolu bileşiğin GC-MS fragmentasyonları 2 ve 3 nolu bileşiklerin GC-MS fragmentasyonlarına çok benzerlik göstermektedir. Buna göre 4 nolu molekülün GC-MS fragmentasyon tablosu tablo 7'de gösterilmektedir.

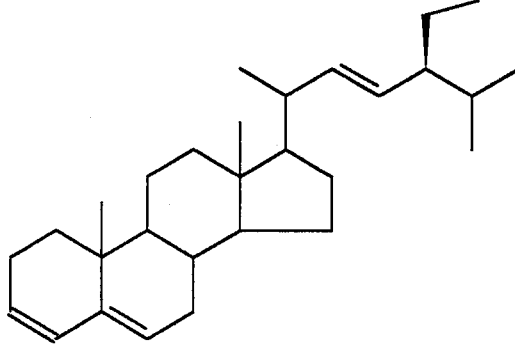
Tablo 7: 4 Nolu Molekülün GC-MS Spektrumunun Fragmentasyonları.



m/z	%	
394	(38)	[M] ⁺
379	(5)	[M-CH ₃] ⁺
351	(7)	[M-43] ⁺
296	(2)	[M-98] ⁺
282	(5)	[M-112] ⁺
267	(3)	[M-CH ₃ -112] ⁺
255	(40)	[M-139] ⁺

4 nolu molekülde işaret edilen üçüncü olefinik bağ C₃-C₄ arasında olacak şekilde belirtilmiştir. Bu çifte bağın başka bir pozisyonda olabileceği ihtimali ortaya atılabilir. Örneğin yan kenar zincirde. Fakat üçüncü çifte bağın yan zincirde olmayışının en önemli sonucu GC-MS deki en yüksek piklerden biri olan 255 [M-139]⁺ piki göstermektedir. 139 rakamı triterpen halkasındaki yan zincirin moleküler ağırlığının tamamıdır. Böylece 4 nolu molekülün 2 ve 3 nolu molekülden 18 birim ağırlık farkı olması nedeniyle üçüncü çifte bağın C₃ ve C₄ nolu karbon atomları arasına yazılmış olması ispatlanmaktadır.

Yukarıdaki bilgiler ışığı altında ve literatür değerleriyle [20-21] karşılaştırma sonucu 4 nolu molekülün, C₂₄ nolu pozisyondaki etil grubunun sterokimyası stigmasterol deki gibi düşünülmektedir. Çünkü bu bitkiden izole edilen fraksiyonun içindeki stigmasterol'ün miktarı daha fazladır. Böylece 4 nolu molekül stigmast $\Delta^{3,5,22}$ trien olarak bulunmuştur.

Stigmast $\Delta^{3,5,22}$ trien, 4

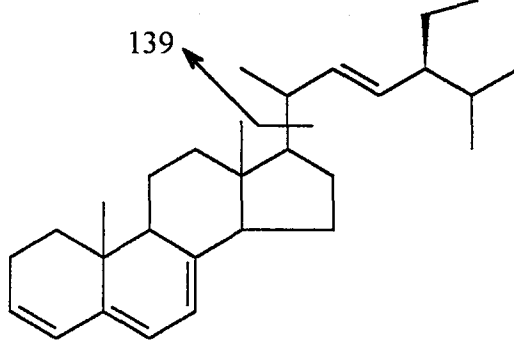
4.5. 5 Nolu Molekülün Yapısının GC-MS Spektrumuyla Aydınlatılması

CC42B kodlu numunenin alınan GC-MS spektrumunda (ek şekil 13,17) alıkonma zamanı (r.t) 47.794 olan pikin relatif yüksekliği %3 olarak bulunmuştur. Bu pikin GC-MS spektrumunda moleküler iyon piki 392 $[M]^+$ olarak bulundu. Buda 4 nolu molekül ile aralarında 2 birim fark olduğunu göstermiştir. Burada 5 nolu molekülde 4'üncü çifte bağın olabileceğini ortaya koymaktadır. Gerçekten dördüncü çifte bağ yazıldığında $C_{29}H_{44}$ formülüne sahip molekülün moleküler iyonu 392 $[M]^+$ dir.

Yapılan literatür araştırması sonucunda [1-19, 31] doğal bileşik olan triterpen halkasında çifte bağların halka içerisindeki pozisyonları C₅, 6, 7, 8, 9 aralarında olduğu bulunmuştur [22-23]. 4 nolu molekülde triterpen halkasındaki çifte bağların pozisyonları Δ^3 ve Δ^5 arasında olduğu için üçüncü olma ihtimali enerji bariyerinden dolayı çok daha fazladır. Çünkü konjuge sistemler, konjuge olmayan sistemlere göre daha karardır [40]. Buda daha düşük enerji seviyesinde olduğunu gösterir. Zaten bu bileşikler doğal bileşikler olduğundan en düşük enerji seviyelerinde olması gereken durumdadırlar. Bu bilgiler ışığı altında ve GC-MS deki fragmentasyonlarından triterpen halkasındaki üçüncü çifte bağın C_{7,8} pozisyonunda işaretlenmiştir.

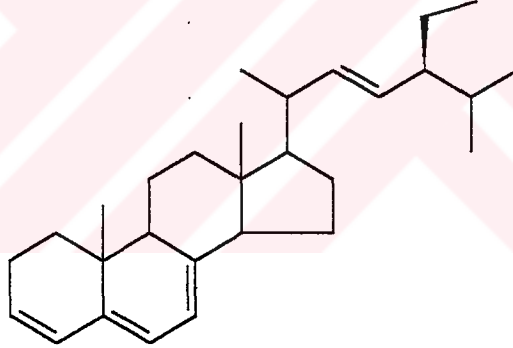
5 nolu molekülün GC-MS fragmentasyon tablosu tablo 8'de gösterilmektedir.

Tablo 8: 5 Nolu Molekülün GC-MS Fragmentasyon Değerleri.



m/z	%	
392	(25)	[M] ⁺
253	(10)	[M-139] ⁺
211	(3)	[M-181] ⁺

Moleküler iyon 392 [M]⁺ ve yan zincirin koparıldığı 253 [M-139]⁺ fragmentasyonundan anlaşıldığı gibi molekülün triterpen halkasında üç tane olefinik bağ olduğu ispatlanmış olur. Bu bilgiler ışığı altında 5 nolu molekül 4 nolu molekülle benzerlik göstermesi sonucu stigmast $\Delta^{3,5,7,22}$ tetraen olarak bulunmuştur.

Stigmast $\Delta^{3,5,7,22}$ tetraen, 5

4.6. CC8 Saponin Molekülün Yapısının Spektroskopik Aydınlatılması 6

Triterpen halkasında şekerlerin (mono, di, tri, tetra,...) glikozidik bağlanması sonucu oluşan moleküllere saponin denir. Doğal bileşikler içerisinde çok sayıda ve değişik yapıları saponin molekülleri literatürde vardır [36].

CC8 kodlu numunenin alınan ^1H -nmr (200 MHz) spektrumu sonucu bir saponin molekülü olduğu anlaşılmıştır [32]. ^1H -nmr spekturumunda (ek şekil 18-19) δ 5.0-5.4 ppm olefinik protonlar. δ 3.5-5.0 ppm de molekülün glukan kısmına (şeker) ait protanların ve δ 2.5-0.8 ppm aralığında molekülün aglukan (triterpen) kısmına ait protanlar gözlenmiştir. ^1H -nmr spektrumunda δ 5.10 ppm'de doublet şeklinde pik gözlenmiştir ki etkileşme sabiti $J=7\text{Hz}$ dir. Buda β -anomerik proton için çok karakteristiktir [32,37-40].

Spektroskopik olarak yapılan ikinci adım moleküldeki karbon sayısını ve türünü tesbit etmek amacıyla APT spektrumu alınmıştır. APT spektrumundaki (ek şekil 20-21) δ 12.2- 140.9 ppm aralığında 33 adet ^{13}C piki gözlenmiştir. Bunlardan 3 tanesi kuartneri, 15 tanesi CH, 10 tanesi CH_2 ve 5 tanesinde CH_3 grupları olduğu tesbit edilmiştir [37-40].

APT spektrumunun δ 102.63 ppm'deki ^{13}C piki glukan molekülünün anomerik karbom atomu için çok karakteristiktir. Saponin moleküllerinde glukan anomerik karbon atomlar β glukozidik olduğu zaman δ 100-105 ppm arsında α -glikozidik bağlandıkları zamanda δ 90-95 ppm arasında oldukları literatürde belirtilmiştir [37-40]. Böylece APT spektrumunda gözlenen δ 102.63 ppm ^{13}C piki β -glikozidik bağlı bir şeker molekülünü anomerik ^{13}C piki olduğu tespit edildi. Glukan molekülündeki diğer 4 adet CH ^{13}C pikleri δ 75.40-78.67 arasındadır. δ 71.70ppm'deki ^{13}C piki glukan molekülünün aglukan molekülüne bağlı olduğu 3 nolu C'nun ^{13}C piki olduğu literatür bilgileriyle karşılaştırma sonucu bulunmuştur [37-40]. APT spektrumunda δ 62.91 ppm'de yukarı pozisyonda duran ve kendisinin bir CH_2 ^{13}C piki olduğunu söyleyen pik ve diğer anomerik karbon ve moleküldeki CH-O piklerinin literatür, monosakkarid şeker moleküllerinin ^{13}C pikleri ile karşılaştırılması sonucu bir β -glukoz molekülü olduğu tesbit edilmiştir. O halde saponin molekülünün glukan kısmını oluşturan parçasının bir monosakkarid olup onunda β -glikoz olduğu isbat edilmiş olur [36-40].

CC8 kodlu molekülün ^1H kimyasal kayma değerleri 2D-COSY spektrumundan (ek şekil 22) yapılmıştır. COSY spektrumu doğrulama spektrumu olup, moleküldeki hangi protonun hangi protana komşu olduğunu bulmaya yarayan bir spektroskopi tekniğidir. Bilinen ^1H kimyasal kayma değerlerinden başlayarak diğer komşu protonlar tayin edilir. CC8 numunesinin COSY analizi sonucu protonların hangi protona komşu olduğu bulunmuştur.

2D-COSY spektrumundan ^1H kimyasal kayma değerleri bulunduktan sonra bu protonların hangi C atomu üzerinde olduğunu göstermek amacıyla 2D-HETCOR (Heteronükleer H-C doğrulama) spektrumu alınmıştır. 2D-HETCOR spektrumu (ek şekil 23) nmr aletinin gücünün düşük olması ve de numunenin yeterli olmayışından iyi

alınamamıştır. Bunun için alan şiddeti daha yüksek olan nmr aletleri denenmelidir (500 veya 700 MHz).

Saponin molekülünün aglukon kısmı APT spektrumundan elde edilen ^{13}C kimyasal kayma değerlerinin (δ 12.20-71.77 ppm, olefinik karbonlar hariç) literatür ve daha önce izole edip yapısını aydınlattığımız iki nolu molekülün (stigmasterol) ^{13}C kimyasal kayma değerleriyle benzerlik gösterdiği tesbit edilmiştir. Yanlız stigmasterol de karbon sayısı 29 adet olup, bu molekülün APT spektrumunda aglukon kısmına ait 27 adet pik bulunmuştur. Bu da C_{24} pozisyonunda substitüye etil grubunun olmayacağı şeklinde fikir ortaya koymuştur. Her iki molekülün APT spektrumlarının ve literatür bilgilerinin karşılaştırılması [36-40] sonucu 2 nolu molekülün APT spektrumunda C_{24} atomunun CH ^{13}C piki olarak işaretlenen δ 40.47 ppm pikinin CC8 kodlu numunenin APT spektrumunda olmadığı gözlenmiştir. Bunun yanında CC8 nolu numunenin APT spektrumunda CH pikine karşılık gelen δ 36.99 ppm'de ekstra CH_2 piki gözlenmiştir. Görüldüğü gibi alifatik CH piki δ 40.47 ppm'de gözlenirken yine alifatik CH_2 piki δ 36.99 ppm gözlenmiş olması literatür bilgileriyle çok iyi derecede uyum içersindedir [24-26]. Bu bilgiler ışığında bu saponin molekülünün triterpen iskeletinin kolestan yapısında olup C_{5-6} ve C_{22-23} nolu karbon atomlarında iki adet çifte bağ içermektedir. CC8 kodlu molekülün bu bilgiler ışığı altında glukan kısmının ^{13}C ve ^1H -nmr kimyasal kayma değerleri tablo 9'da verilmiştir. CC8 kodlu numunenin aglukon kısmının ^{13}C nmr kimyasal kayma değeri tablo 10'da görülmektedir.

Tablo 9: CC8 Kodlu Molekülün Glukan Kısmının ^{13}C ve ^1H -nmr Kimyasal Kayma Değerleri ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ δ ,ppm).

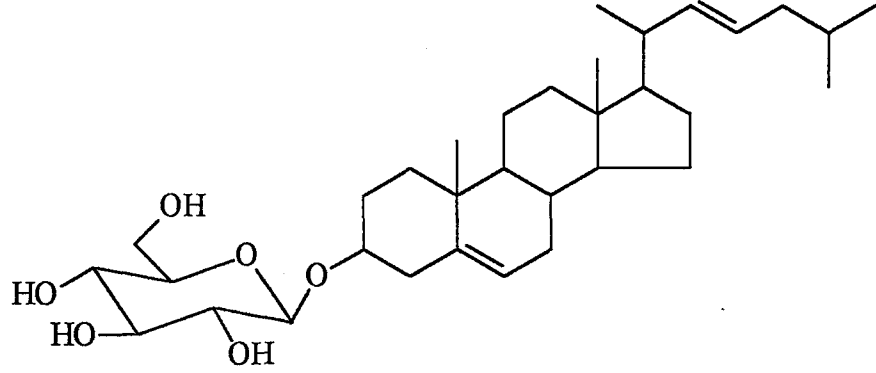
No	^{13}C (δ ,ppm)	APT	Proton	^1H (δ ,ppm)
1'	102.63	CH	H_1	5.10 ppm d, J=7 Hz
2'	78.14	CH	H_2	4.16 ppm
3'	78.55	CH	H_3	4.45 ppm
4'	75.40	CH	H_4	3.98 ppm
5'	78.67	CH	H_5	4.05 ppm
6'	62.91	CH_2	H_6	4.45 -4.60 ppm

CC8 nolu saponin molekülünün (+) FAB-MS spektrumu (ek şekil 24) alınmış olup % 100 oranında 570 (100) $[\text{M}+\text{Na}+\text{H}]^+$ piki gözlenmiştir. Aynı zamanda 552 (81) $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{Na}+\text{H}]^+$ ve 534 (20) $[\text{M}-2\text{H}_2\text{O}+\text{Na}+\text{H}]^+$ pikleri sayesinde molekülün $\text{C}_{33}\text{H}_{54}\text{O}_6$ genel fomülüne uyan bir molekül olduğu bir kez (+) FAB-MS spektrumuylada ispatlanmıştır.

Tablo 10: CC8 Nolu Molekülün Aglukon Kısımının ^{13}C - nmr Kimyasal Kayma Değerleri ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ δ ,ppm).

No	^{13}C (δ ,ppm)	APT
1	37.53	CH ₂
2	29.37	CH ₂
3	71.70	CH
4	42.41	CH ₂
5	140.98	C
6	121.95	CH
7	30.31	CH ₂
8	51.47	CH
9	50.41	CH
10	39.38	C
11	24.59	CH ₂
12	30.03	CH ₂
13	39.40	C
14	56.98	CH
15	25.75	CH ₂
16	30.30	CH ₂
17	56.13	CH
18	12.20	CH ₃
19	12.57	CH ₃
20	40.83	CH
21	21.52	CH ₃
22	38.87	CH
23	129.52	CH
24	36.99	CH ₂
25	32.10	CH
26	19.47	CH ₃
27	19.24	CH ₃

Tüm bu bilgiler ışığı doğrultusunda CC8 kodlu numune yeni bir doğal bileşik olup 3- β -O- $\{\beta$ -D-glikopiranosil]-kolost- $\Delta^{5,22}$ -dien, 6 olarak ispatlanmıştır.



3-β-O-β-D-glikopiranozil]-kolost-Δ^{5,22}-dien, 6

4.7. CC9 ' un Molekül Yapısının Spektroskopik Aydınlatılması 7

CC9 kodlu numunenin ¹H-nmr (200 MHz) spektrumu (ek şekil 25-26) piridin-d₅ nmr çözücüsü içinde alınmış olup, ¹H-nmr spektrumunda en aşağı alanda, piridin pikleri hariç, δ 8.48 ppm'de dublet şeklinde (J= 9Hz) pik görülmektedir. Buda α-amino karboksili asitlerin -NH- protonu için literatür bilgileriyle karşılaştırma sonucu çok karakteristik olduğu bulunmuştur [24-25]. Dublet şeklinde yarıлма göstermiş olması ve integralinde 1H' na karşılık gelmesi -NH- grubunun olduğunu belirtmektedir. δ 3.9-5.6 ppm arasında şeker ve benzeri yapıda protonların olduğu anlaşılmaktadır. ¹H-nmr spektrumunun daha yukarı alanda (δ 2.2-0.8 ppm) ise normal düz zincirli yapıda alifatik yan zincir olduğu anlaşılmaktadır.

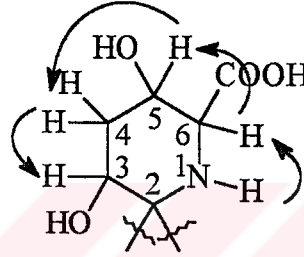
CC9 kodlu moleküldeki karbon sayısını ve türünü belirlemek amacıyla APT spektrumu alınmıştır (ek şekil 27-28). APT spektrumundan molekülde iki adet kuartneri 8 adet CH, 1 adet CH₃ ve 7 adet CH₂ pikleri bulunmuştur. Fakat APT spektrumundaki δ 30.02 ppm deki CH₂ pikinin yüksekliği diğer CH₂ piklerine nazaran 5 kat daha fazla olduğu için toplam CH₂ sayısı 12 olarak bulunmuştur. Tüm karbon sayısı göz önüne alındığında toplam 23 adet karbon bulunmaktadır.

APT spektrumunun en aşağı alan kısmında δ 175.68 ppm kuartneri karbon bulunmuştur bunun kimyasal kayma değerleri literatür değerleriyle karşılaştırıldığında karboksilli asit ¹³C piki için uygun olduğu bulunmuştur [24-25].

APT spektrumunun δ 105.62 ppm deki CH piki yine β-glukosidik bağlı şeker molekülünün anomeric ¹³C piki için çok uygun olduğu bulunmuştur. δ 78.48-71.50 ppm arasında 6 adet CH piki bulunmuştur. Bunlardan dört tanesi şeker molekülü için diğer iki CH piki moleküldeki diğer -CH-O için uygun olduğu bulunmuştur. δ 70.46 ppm de kuartneri pik vardır. δ 62.64 ppm'de de CH₂ ¹³C piki vardır. Yukarıdaki anomeric

karbon, -CH-O-ve CH₂ ¹³C piklerinin şeker molekülü göz önüne alındığında 6 nolu moleküldeki şeker molekülünün ¹³C kimyasal kayma değerleri ve literatrür değerleriyle çok iyi uyum içinde olduğu görülmüştür [24-25]. Bunun sonucu molekülün bir parçasının β-D-glikopiranozil olduğu ispatlanmıştır. APT spektrumundaki diğer üç adet CH δ 78.48, 75.92, 51.76 ppm ve bir adet katerneri karbon 70.46 ppm ve 11 adet CH₂ δ 35.59-22.95 ppm ve bir adet CH₃ pikide δ 14.30 ppm'de bulunmuştur [37-40].

CC9 kodlu molekülün ¹H-nmr kimyasal kayma değerlerini işaretlemek amacıyla 2D-COSY spektrumu (ek şekil 29) alınmıştır. 2D-COSY spektrumunda δ 8.48.ppm deki NH protundan δ 5.3 ppm deki (CH-O) pikine, δ 4.6 ppm deki pikten δ 2.05, δ 1.9 ppm (CH₂) piklerine ve δ 2.05 pikinden δ 5.5ppm (CH-O) deki piklerin komşu oldukları (karşılık) bulunmuştur. Bu bilgiler molekülün bir kısmının yapısının aşağıdaki gibi olacağını doğrulamaktadır.

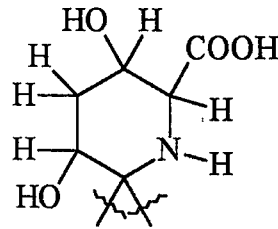


2D-COSY Korelasyon şeması

CC9 molekülünün APT spektrumunda geriye kalan ¹³C piklerinden bir adet CH₃ (δ 14.30 ppm) ve diğerleride CH₂ ¹³C pikleri olduğu bulunmuştur. Buna göre bu grubunda düz zincirli alkil grubu olduğu ispatlanmıştır. O halde şu ana kadar aşağıdaki üç grup ortaya çıkarılmıştır.

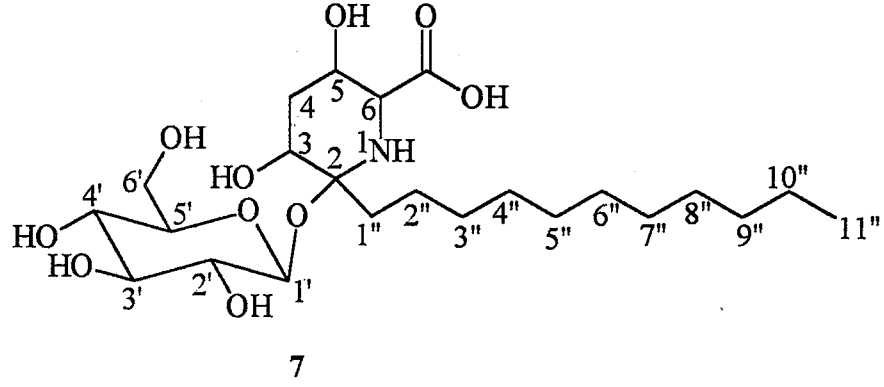
Bunlardan 1.grup β-D-glikopiranosil

2.grup



3. grup -CH₂-(CH₂)₉CH₃

Bu üç grubun tek bir şekilde birleştirilmesi söz konusudur ki o da aşağıdaki gibidir.



CC9 kodlu molekülün ^{13}C ve ^1H -nmr kimyasal kayma değerleri tablo11'de gösterilmektedir.

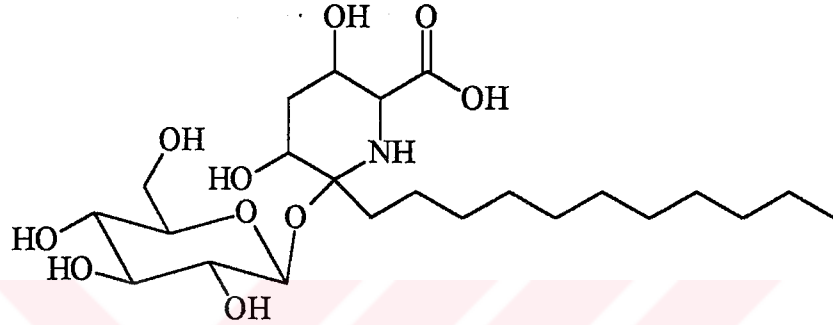
Tablo 11: CC9 Kodlu Molekülün ^{13}C ve ^1H -nmr Kimyasal Kayma Değerleri ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ , ppm)

No	^{13}C (δ ,ppm)	DEPT	Proton	^1H (δ ,ppm)
1	-	-	NH	8.48 d ,J=9 Hz
2	70.46	C	-	
3	78.48	CH	H ₃	5.50 ppm
4	35.59	CH ₂	H ₄	2.09-1.09 ppm
5	75.92	CH	H ₅	4.6 ppm
6	51.75	CH	H ₆	5.3 ppm
-COOH	175.68	C		
1'	105.62	CH	H _{1'}	5.00 ppm d.J=7 Hz
2'	75.18	CH	H _{2'}	4.02 ppm
3'	78.48	CH	H _{3'}	3.90ppm
4'	72.46	CH	H _{4'}	4.12ppm
5'	78.49	CH	H _{5'}	4.30ppm
6'	62.64	CH ₂	H _{6'}	4.50-4.12 ppm
1''	35.59	CH ₂	H _{1''}	1.65 ppm
2''	34.00	CH ₂	H _{2''}	1.24 ppm
3''	32.13	CH ₂	H _{3''}	1.24 ppm
4''	29.63	CH ₂	H _{4''}	1.24 ppm
5''	30.02	CH ₂	H _{5''}	1.24 ppm
6''	30.02	CH ₂	H _{6''}	1.24 ppm
7''	30.02	CH ₂	H _{7''}	1.24 ppm
8''	27.95	CH ₂	H _{8''}	1.24 ppm
9''	25.90	CH ₂	H _{9''}	1.24 ppm
10''	22.95	CH ₂	H _{10''}	1.24 ppm
11''	14.30	CH ₃	H _{11''}	0.92 ppm

CC9 kodlu molekülün (+) FAB-MS spektrumu (ek şekil 30) alınmıştır. (+) FAB-MS spektrumunda moleküler iyon $[M]^+$ 493 olarak bulunmuştur. Diğer önemli fragmantasyonlar $409 [M-85+H]^+$ ve $295 [M-179-H_2O-H]^+$ gözlenmiştir. Tüm bu bilgiler ışığı doğrultusunda CC9 nolu molekülün molekül formülü, 7 nolu molekül formülü olarak $C_{23}H_{43}NO_{10}$ kapalı formülüne sahip olduğu ispatlanmıştır.

Yapılan literatür araştırmaları [24-25] sonucu 7 nolu moleküle literatürde rastlanmamış olup ilk defa bu çalışmada izole edilip yapısı aydınlatılan doğal bir bileşiktir.

CC9 kodlu bileşik 2- β -D-glikopiranosil-2-undekil-3,5-dihidroksi-6-karboksi piperidin, 7 olarak adlandırılmış yeni bir doğal bileşiktir. Molekülün stereokimyası tüm olarak aydınlatılmamıştır.



2- β -D-glikopiranosil-2-undekil-3,5-dihidroksi-6-karboksi piperidin, 7

5. SONUÇLAR

Yersomunu *Cyclamen coum* bitkisinden 4 tanesi daha önce literatürde başka bitkilerden izole edilmiş şekilde ve 3 tanesi de ilk defa bu çalışmada doğal bileşik olarak izole edilip yapılarının spektroskopik aydınlatılması sonucu toplam 7 adet doğal bileşik bulunmuştur.

Bu bileşiklerden; 1 nolu bileşik metil palmitat, 2 nolu bileşik sitigmasterol; 3 nolu bileşik poriferastorol; 4 nolu bileşik stigmast $\Delta^{3,5,22}$ trien; 5 nolu bileşik stigmast $\Delta^{3,5,7,22}$ tetraen; 6 nolu bileşik 3β -O- $\{\beta$ -D-glikopiranosil}-kolast $\Delta^{5,22}$ dien ve 7 nolu bileşik 2- β -D-glikopiranosil-2-undekil-3,5-dihidroksi-6-karboksi piperidin dir.

Bu çalışmada *Cyclamen coum* bitkisinden polar ve apolar moleküllerin izolasyonu için çeşitli kromatografik teknikler yanında bu moleküllerin yapılarının aydınlatılması için modern nmr teknikleri uygulanmıştır.

6. ÖNERİLER

Yersomunu *Cyclamen coum* bitkisinin, tezin deneysel kısmında belirtildiği gibi ekstraksiyon esnasında sadece kloroform ekstrak fazı çalışılmıştır. Fakat kloroform ekstraktındaki tüm fraksiyonlar tam olarak araştırılmamıştır. Hem bu fraksiyonları hemde sulu fazdaki diğer polar maddelerin izole edilip yapılarının aydınlatılması amacıyla daha ileri çalışmalar yapılabilir. *Cyclamen coum* bitkisi organik maddeler bakımından oldukça zengin gözükmetedir.

İzole edilmiş bu moleküllerin biyolojik amaçla aktivitelerinin ölçümleri yapılabilir. Nitekim bu gün kullandığımız ilaçların bir çoğu doğal bitkilerden yapılmaktadır. İşte biyolojik olarak aktif özellik gösterebilecek bu bitkilerden organik moleküller tek tek izole edilip, yapıları aydınlatıldıktan sonra ekonomik değeri olan biyolojik aktiviteleri ölçülerek ilaç olarak kullanılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Watanabe, I., Yanai, T., Awano, K., Kogami, K. ve Hayashi, K., Volatile Components of Zinchoge Flower (*Daphne odara* Thunb.) Agric. Biol. Chem. 47(3)(1983)483-490.
2. Chouchi, D. ve Barth, D., Rapid identification of some coumarin derivatives in deterpenated citrus peel oil by gas chromatography, Journal of Chromatography A 672 (1994) 177-183.
3. Miyaqwaza, M. ve Kameoka, H., Volatile Flavor Components of Corni Fructus (*Cornus officinalis* Sieb.et Zucc.) Agric. Biol. Chem. 53 ,12 (1989) 3337-3340.
4. Mafei, M. ve Peracino, V., Fatty Acids From Some *Lavandula* Hybrids Growing Spontaneously In North West Italy, Phytochemistry 33,2 (1993) 373-376.
5. Fukuhara, K., Fujimori, T., Shigimetsu, H. ve Ohnishi, A., Essential Oil of *Scutellaria baicalensis* G., Agric. Biol. Chem., 51,3 (1987) 1449-1451.
6. Alexander, L.R. ve Joseph, B., Fatty Acid Composition of Human Erythrocyte Membranes By Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry , Journal of Chromatography 342, (1985) 1-12.
7. Bano, S., Ahmad, U.V., Perveen, S., Bano, N. ve Shameel, M., Chemical Constituents of Red Alga *Botryocladia leptopoda*, Planta Medica, 18, (1986) 117-118.
8. Asakawa, Y. Toyato, M. ve Harrison, J., Isotachin A and Isotachin B, Two Sulphur-Containing Acrylates From The Liverwort *Isotachis japonica*, Phytochemistry 24,7 (1985) 1505-1508.
9. Shah, C.V, D'sa, A.S. ve Sousa, N.J., Chonemorphine, Stigmasterol, and Ecdsterone: Steroids isolated Through Bioassay-Directed Plant Screening Programs, Steroids, 53,3-5 (1989) 559-565.

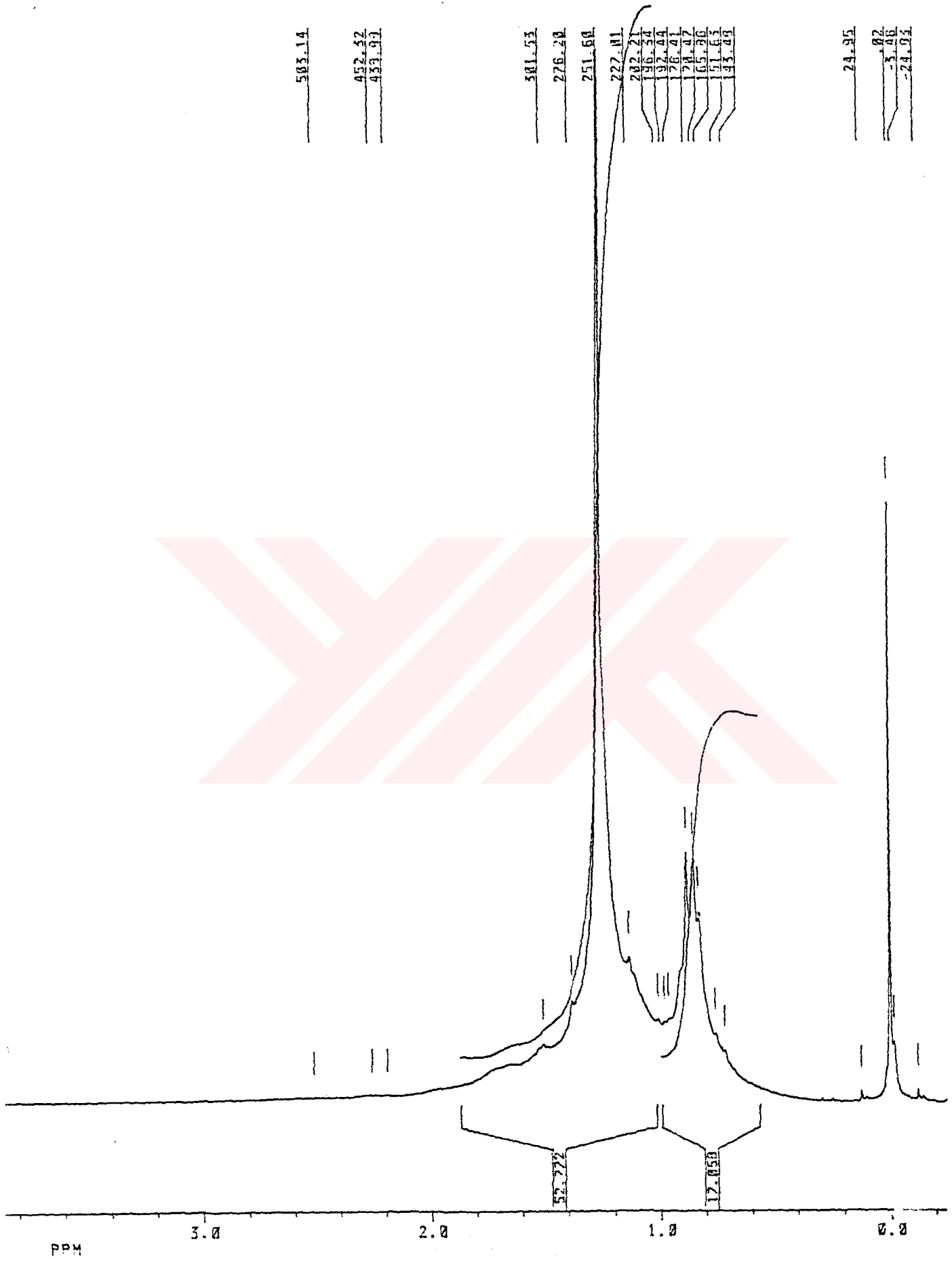
10. Bohlmann, F. Singh, P ve Jakupović, J., Sesquiterpenes and Dimeric Spiroketone From *Cineraria fruticulorum*, Phytochemistry, 21,10 (1982) 2531-2535.
11. Ragasa, Y., Padolina, G. ve Otsuka, Y., Germacranolides From *Pseudoelephantopus spicatus*, Phytochemistry, 33,3 (1993) 627-629.
12. Tanker, N., Gören, N. ve Ulubelen A., Terpenic and Aromatin compounds From *Smyrnum galaticum*, Journal of Natural Products, 48,6 (1985) 1006-1007.
13. Kazmi, H.M., Malik, A., Hameed, S., Akhtar, N. ve Ali, S.N., An Anthraquinone Derivative From *Cassia italica*, Phytochemistry, 36,3 (1994) 761-763.
14. Jakupović, J., Schuster, A., Sun, H., ve Bhakuni, D.S., Prenylated Phthalides From *Anaphalis araeosa* ve *Helichrysum platypterum*, Phytochemistry, 26,2 (1987) 580-581.
15. Kahara, Y., Kumaki, K., Katagiri, S. ve Taido, S., Carthami Flos Extract And Its Component, Stigmasterol, Inhibit Tumour Promotion in Mouse Skin Two-Stage Cacinogenesis, Phytotherapy Research, 8 (1994) 327-331.
16. Nakajima, Y., Satoh, Y., Katsumata, M. Tsujima, K., ve Shoji, J., Terpenoids of *Alisma orientale* Rhizome and Crude Drug *Alismatis hrizoma*, Phytochemistry, 36,1 (1994) 119-127.
17. Marie, F., Costet, C., Chapuis, L., Scalla, R. ve Delbecque, J.P., Analysis of Sterols in Plants And Cell Cultures Producing Endysterids: I. *Chenopodium album*, Plant Sciens, 91, (1993) 23-33.
18. Ballantine, J.A. ve Williams, K., Marine Sterols IV. C21 Sterols From Marine sources. Identification of Pregna Derivatives of The Sponge *Haliclona rubens*, Tetrahedron Letters, 18, (1977) 1547-1550.
19. Ngadjui, B., Ayofor, J., Sondemgam, B.L., Connolly, J.D. ve Rycroft, D.S., Hosludin, Hosludal, and Hoslunddiol: Three New Flavonoids From The Twings of *Hoslundia opposita* (Lamiaceae), Tetrahedron 47, 22 (1991) 3555-3561.

20. Blekas, G. ve Boskou, D. Oxidation of Stigmasterol in Heated Triacylglycerol, Food Chemistry, 33, (1989) 301-310.
21. Eatough, N.L., Synthesis of a Stigmasta Trien, Environ Inst., 15,1-6 (1989) 19-28.
22. Stoilov, I., Shetey, R. ve Pyrek, J.S., Synthesis of a triaromatic Steroid Biomarker, (20R,20S)-4, 17 β -Dimethyl-18-19-dinorstigmasta-1,3,5,7,9,11,13-heptaene, from Stigmastrol¹, J.Org. Chem. 59 (1994) 926-928.
23. Akagi, S. ve Tsuda, K., Dehydrobromation of Bromostigmasteryl Benzeate, Chem. and Pharm. Bull., 9 (1961) 459-463.
24. Voelter, W. ve Breitmaier, E., Carbon-13 NMR Spectroscopy, Third Edition, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1990.
25. Clerc, P. ve Simon, S. Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds, Second Edition, Color-Druck Dorfi GmbH, Berlin, 1989.
26. Blunt, J.W. ve Stothers, J.B., ¹³C NMR Spectra of Steroids, Organic Magnetic Resonance, 9, 8 (1977) 442-464.
27. Yaylı, N., Isolation and Structure Elucidation of Polar Metabolites From Sea Cucumber *Cucumaria frondosa* and Isolation and Synthesis of Polyaromatic Compounds, Doktora Tezi, Universty of New Brunswick, Brunswick, 1993.
28. Bax, A., Two Dimensiol Nuclear Magnetic Resonance in Liquids, Delft Universtiy Press and D.Reidel Publishing Co., Boston (1982).
29. Derome, A.E., Modern NMR Techniques For Chemistry Research, Pergomon Press (1988).
30. Rose, M.E. ve Johnstone, R.A.W., Mass Spectrometry For Chemists and Biochemists, Cambridge University, (1982).
31. Findlay, J.A. ve Yaylı, N., Novel Sulfated Oligosaccharides From The Sea Cucumber *Cucumaria frondosa*, Journal of Natural Products, 55,1 (1992) 93-101.

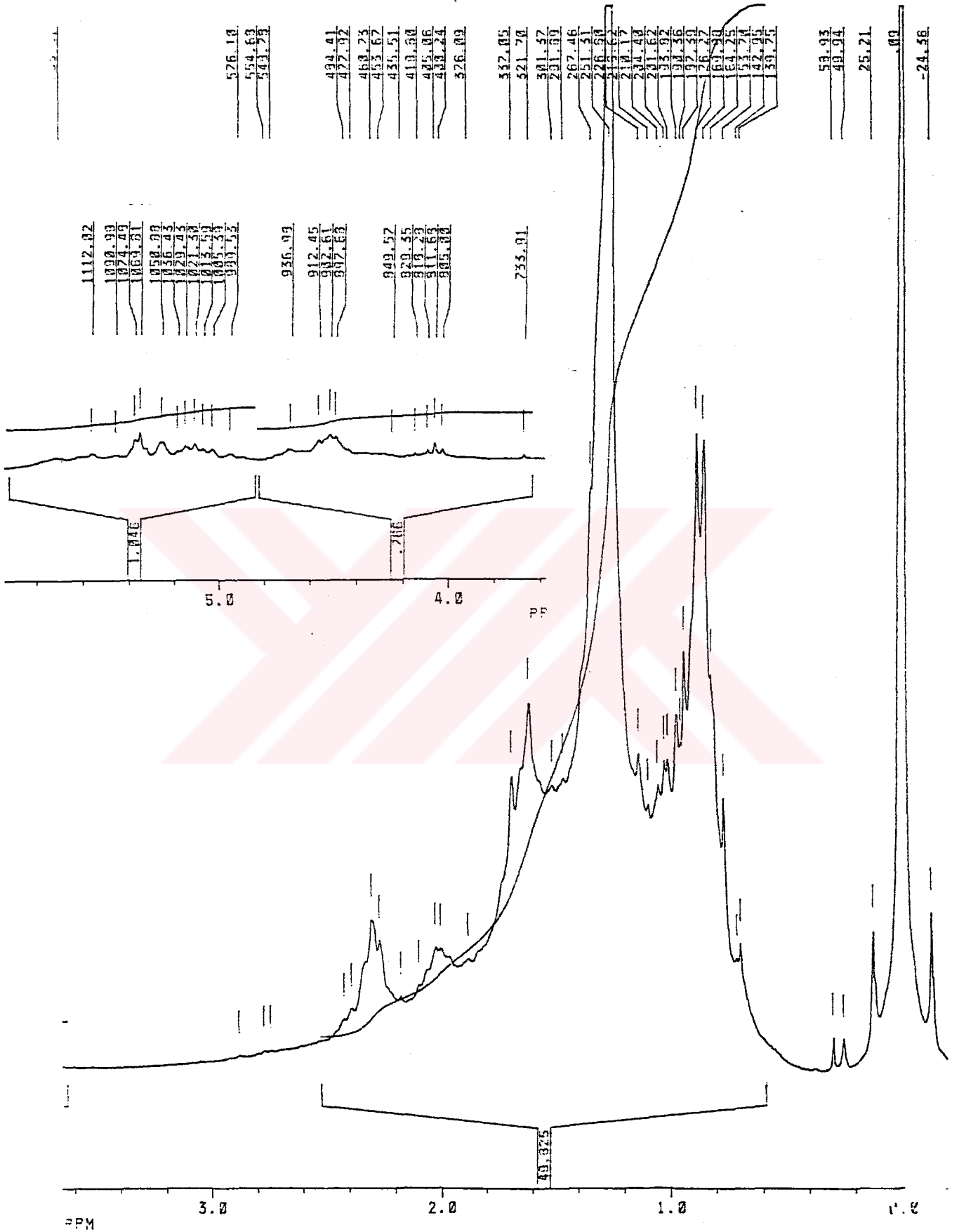
32. Findlay, J.A., Calhoun, L.A. ve Yaylı, N., Novel Sulfated Hydrocarbons From The Sea Cucumber *Cucummaria frondosa*, Journal of Natural Products, 54, 1(1991) 302-304.
33. Findlay, J.A. ve Yaylı, N., Polar Metabolites From The Sea Cucumber *Cucummaria frondosa*, Journal of Natural Products, 57, 1 (1994) 84-89.
34. Fenner, G.P., Patterson, G.W. ve Koines, P.M., Sterol Composition During The Life Cycle of Soybean and The Squash, Lipids, 21, 1 (1986) 48-68.
35. March, J., Advanced Organic Chemistry, Fourth Edition, A Wiley-Interscience Publication, Newyork, 1992.
36. Burnell, D.J. ve Ampison, J.W., Echinoderm Saponins, First Edition, Academic Press.Inc. Ontario, 1983.
37. Leitao, S., Kaplan, C. ve Monache, F.D., Acyglucosylsterols from Two *Aegiphila* Species, Phytochemistry, 36, 1 (1994) 167-170.
38. Kane, V.V., Hoffmann, J.J. ve Bates, R.B., Characterization of Steroidal Glycosides From *Tylophora sylvatica*, Tetrahedron, 47,22 (1991) 3545-3554.
39. Colombo, M.L. ve Servettaz, O., Flavinal Glycosides From *Dryas octopetala*, Jornal of Natural Products, 47, 5 (1984) 809-814.
40. Jolad, S. D., Timmermann, B.N. ve Hoffmann, J.J., Sesquiterpenoid Glycosides and an Acetogenenin Glucoside From *Lessinga glandulifera*, Phytochemistry, 27,7 (1988) 2199-2204.
41. Brown, D.W., A Short Set of ¹³C-NMR Correlation Tables, Journal of Chemical Education, 62, (1985) 209.

8. EKLER

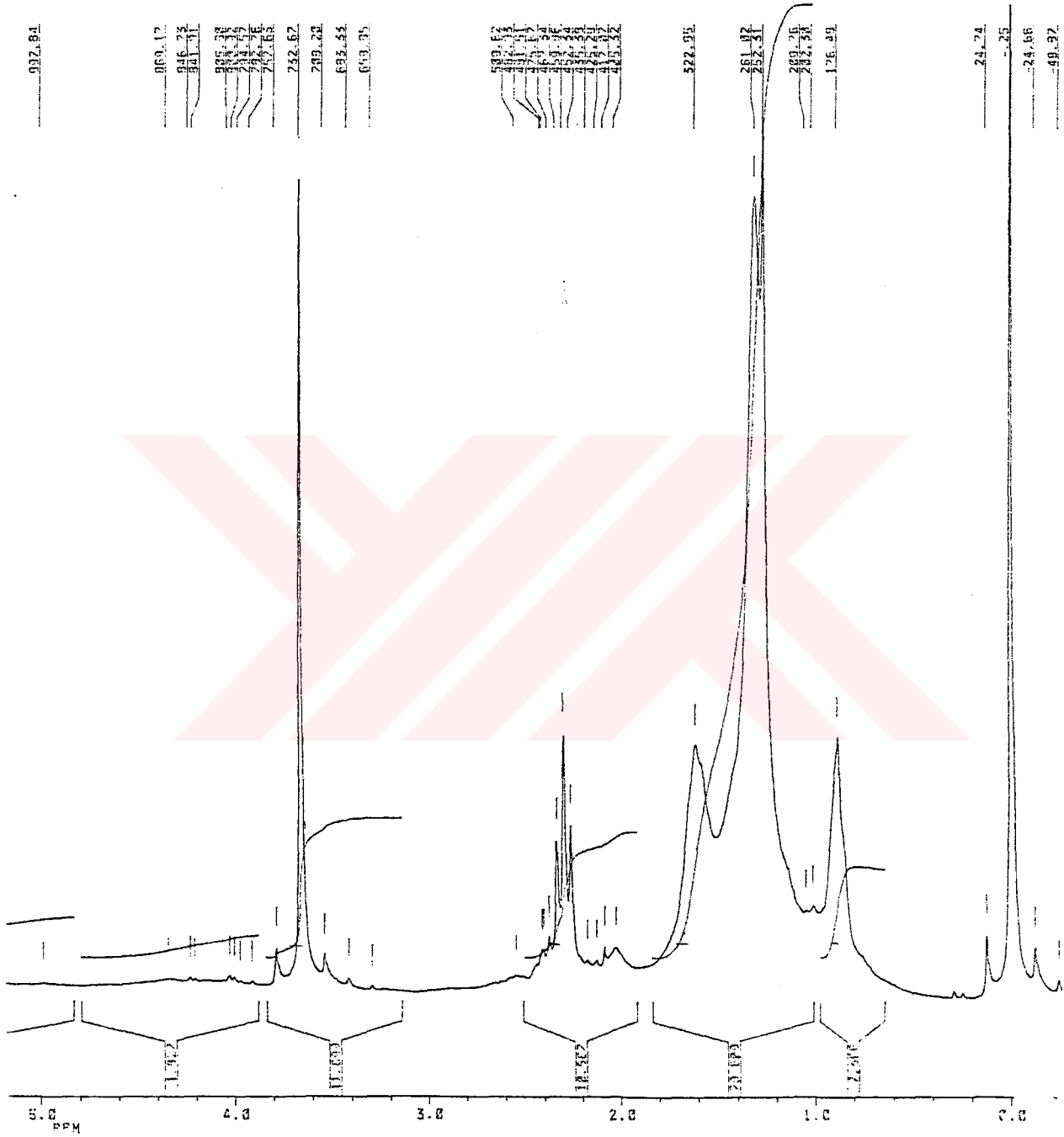




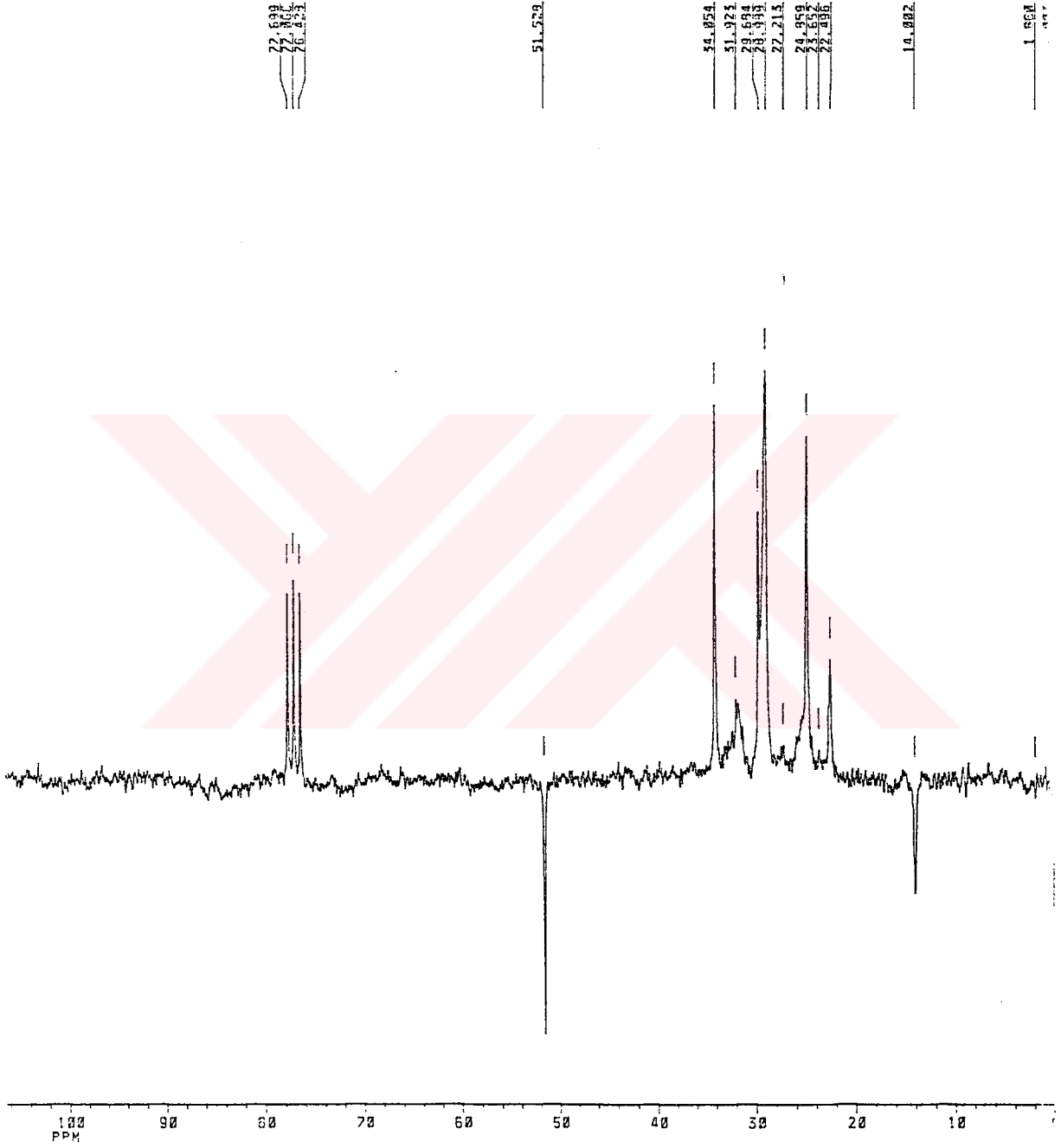
Şekil 1: CC1 Kodlu Numunenin $^1\text{H-nmr}$ Spektrumu (CDCl_3 , 200MHz).



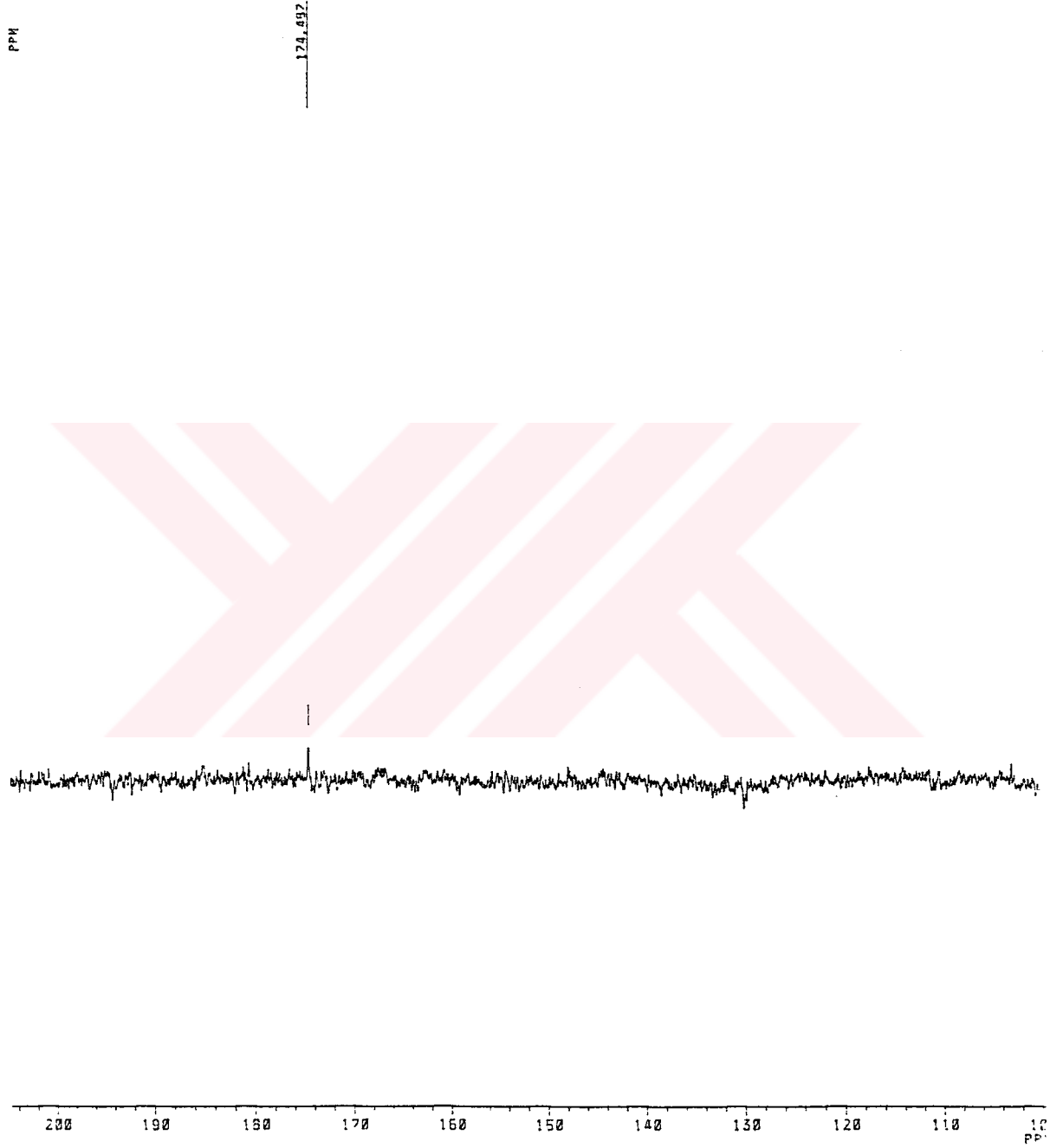
Şekil 2: CC2 Kodlu Numunenin ¹H-nmr Spektrumu (CDC₁₃, 200MHz).



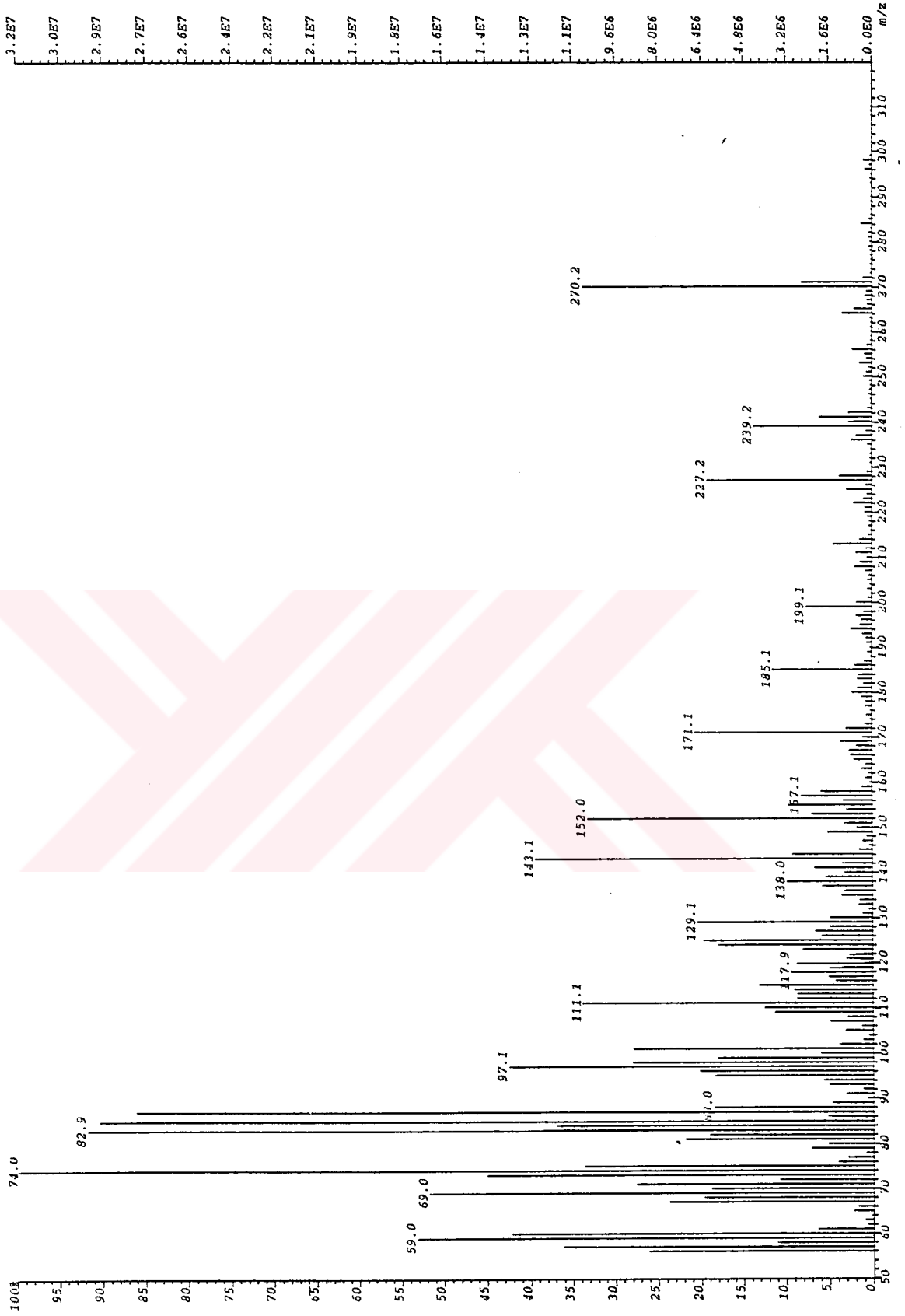
Şekil 3: 1 Nolu Molekülün ^1H -nmr Spektrumu (CDCl_3 , 200MHz).



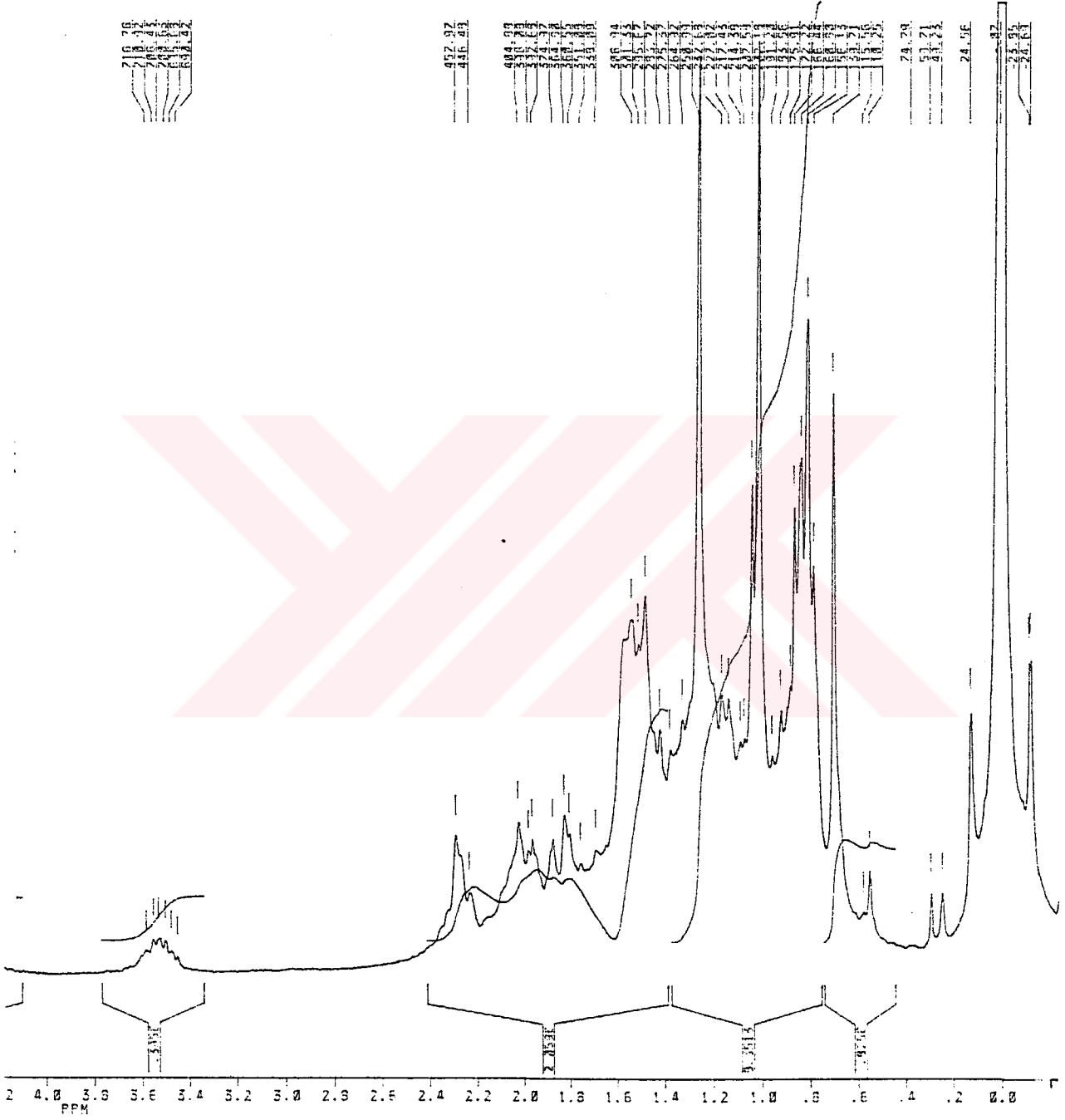
Şekil 4: 1 Nolu Molekülün APT Spektrumunun Parçası
(δ 0.0-100.0 ppm, CDCl_3 , 50.0 MHz).



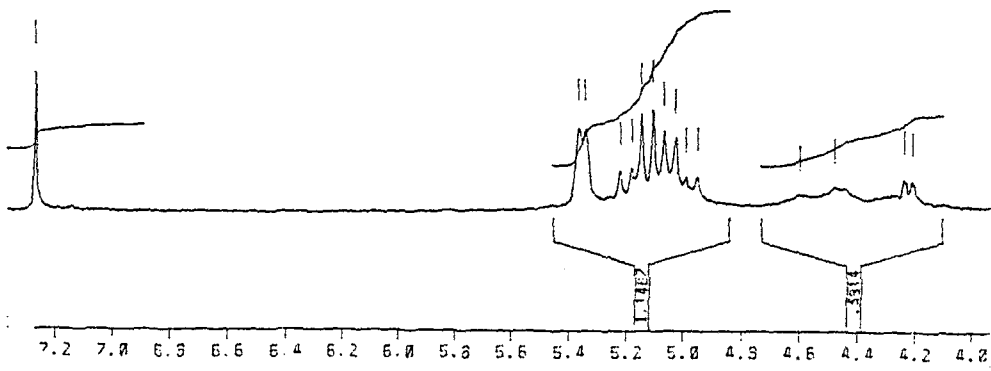
Şekil 5: 1 Nolu Molekülün APT Spektrumunun Parçası.
(δ 100.0-200.0 ppm, CDCl_3 , 50.0 MHz).



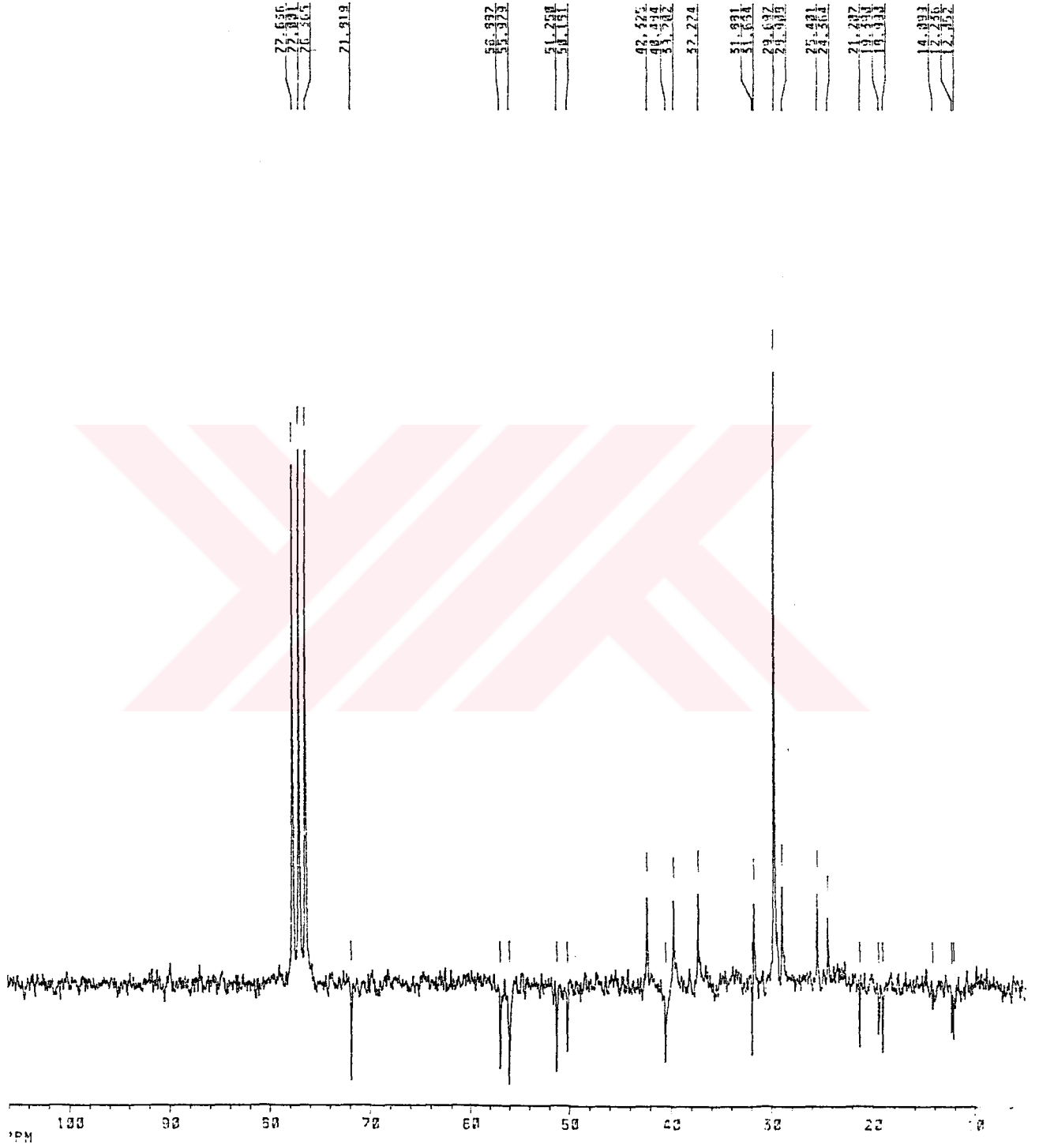
Şekil 6: 1 Nolu Molekülün EI-MS Spektrumu.



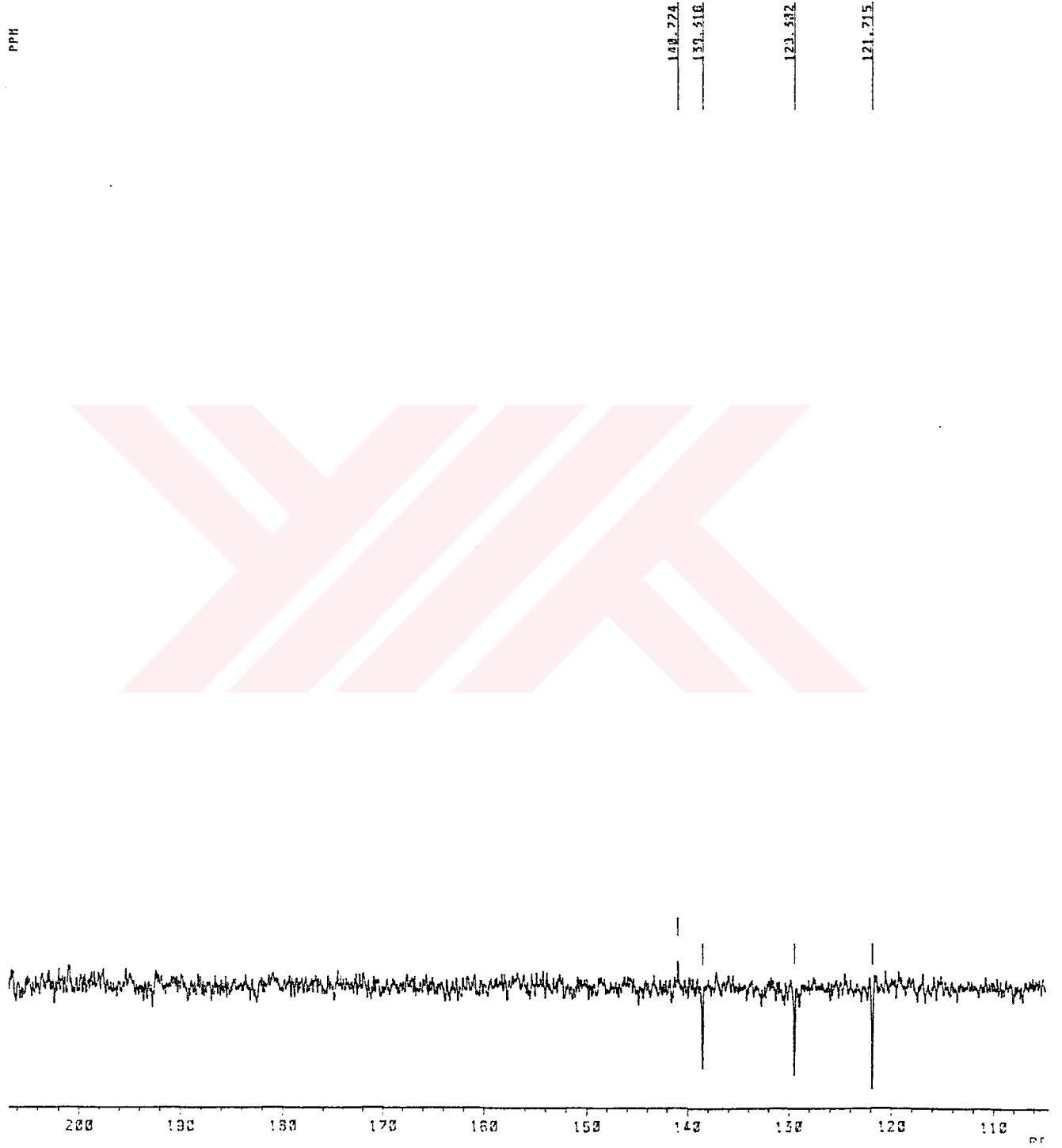
Şekil 7: 2 Nolu Molekülün ^1H -nmr Spektrumunun Parçası
(δ 0.0-4.0 ppm, CDCl_3 , 200MHz).



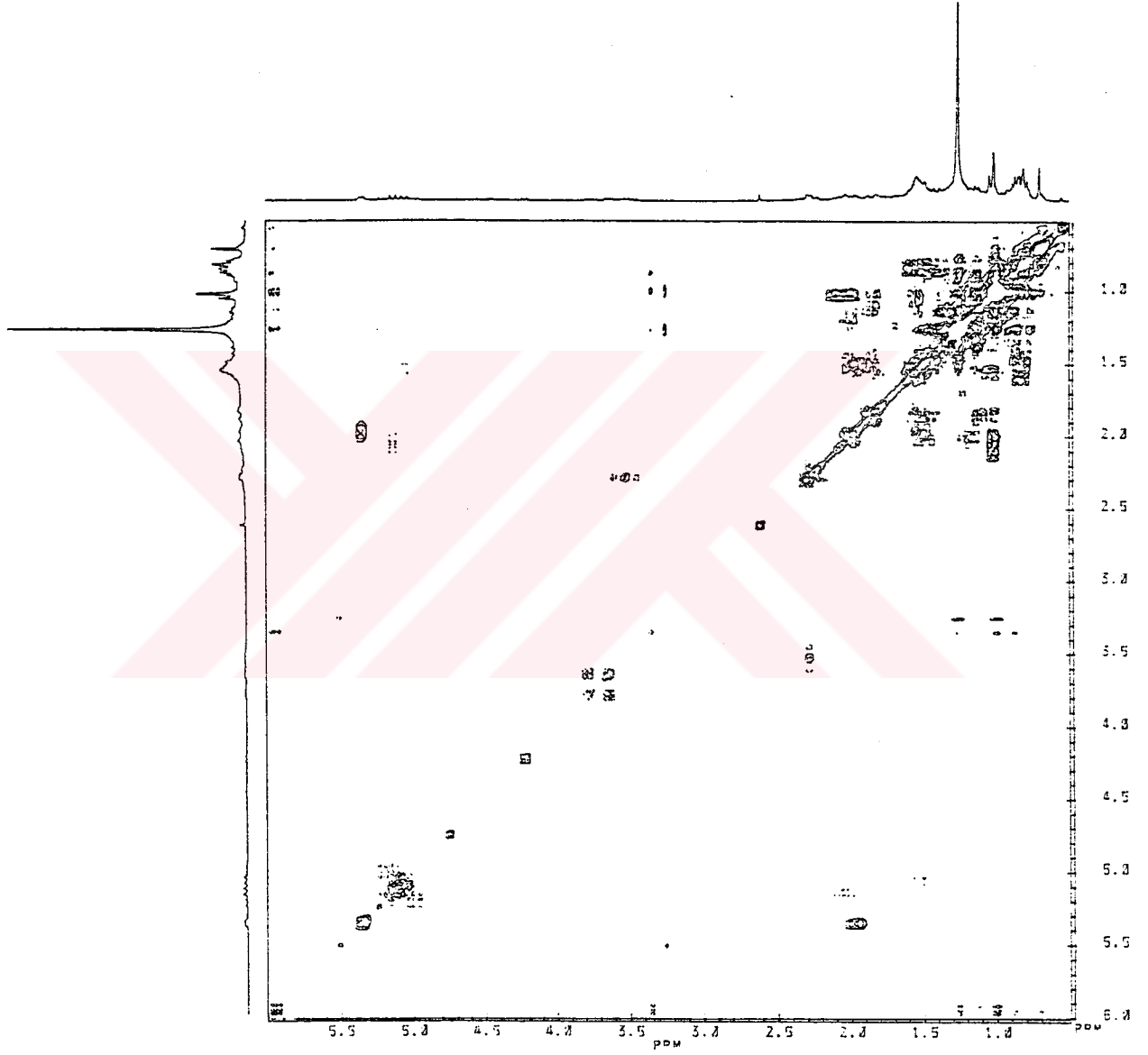
Şekil 8: 2 Nolu Molekülün ^1H -nmr Spektrumunun Parçası
(δ 4.0-7.3 ppm, CDCl_3 , 200MHz).



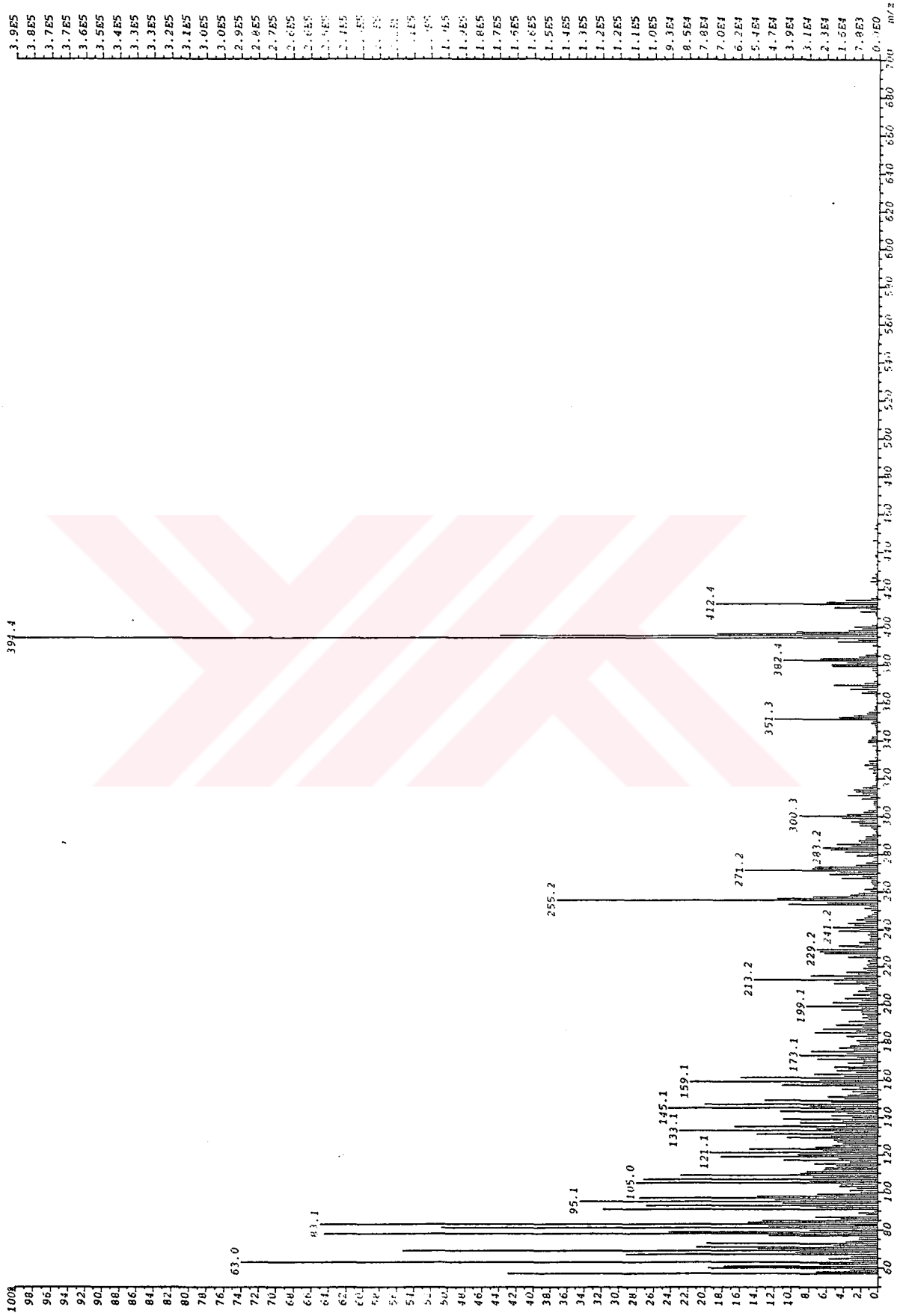
Şekil 9: 2 Nolu Molekülün APT Spektrumunun Parçası
(δ 10.0-100.0 ppm, CDC1₃, 50.0 MHz).



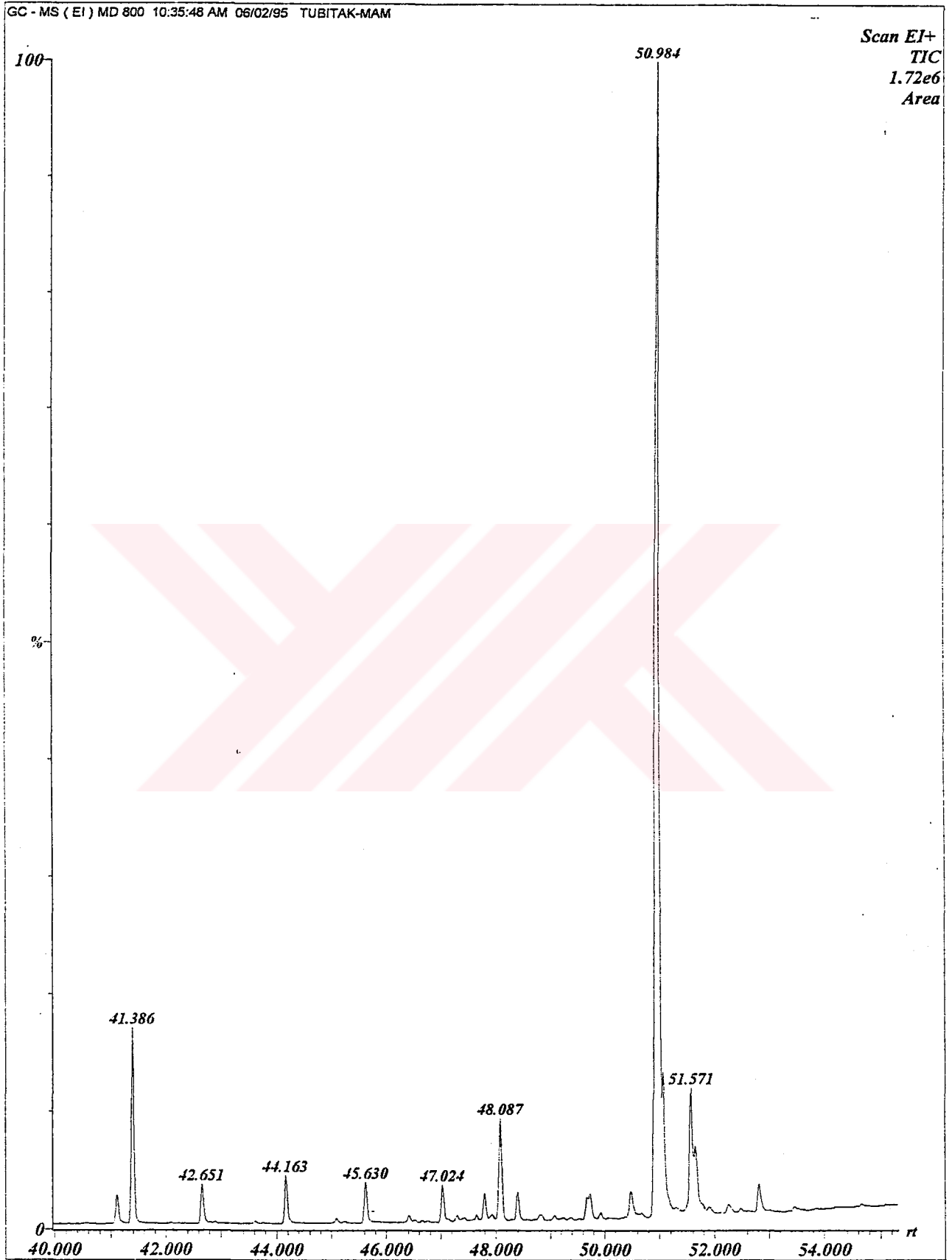
Şekil 10: 2 Nolu Molekülün APT Şpektrumunun Parçası
(δ 110.0-200.0 ppm, CDCl_3 , 50.0 MHz).



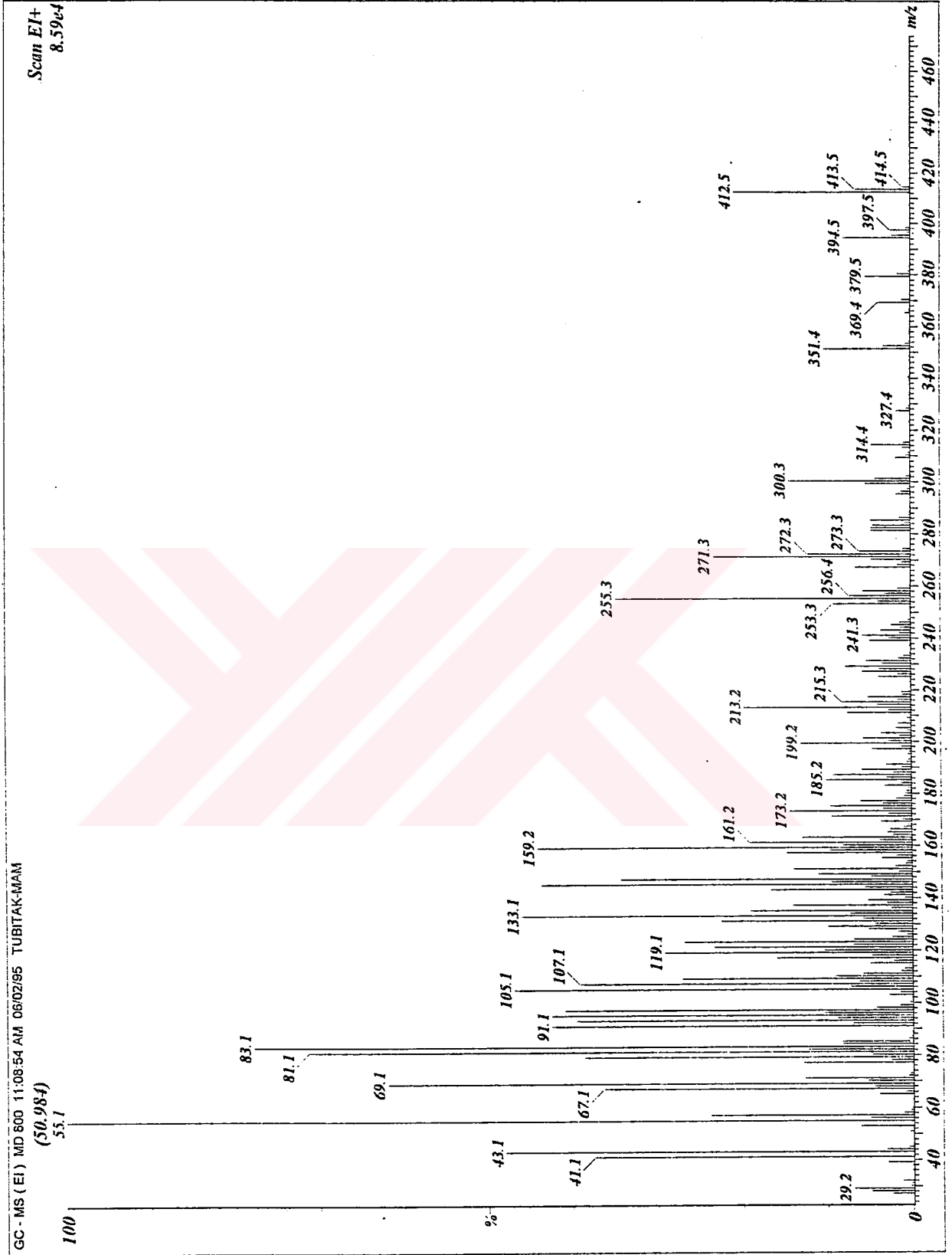
Şekil 11: 2 Nolu Molekülün 2D-COSY Spektrumu (CDCl₃, 200 MHz).



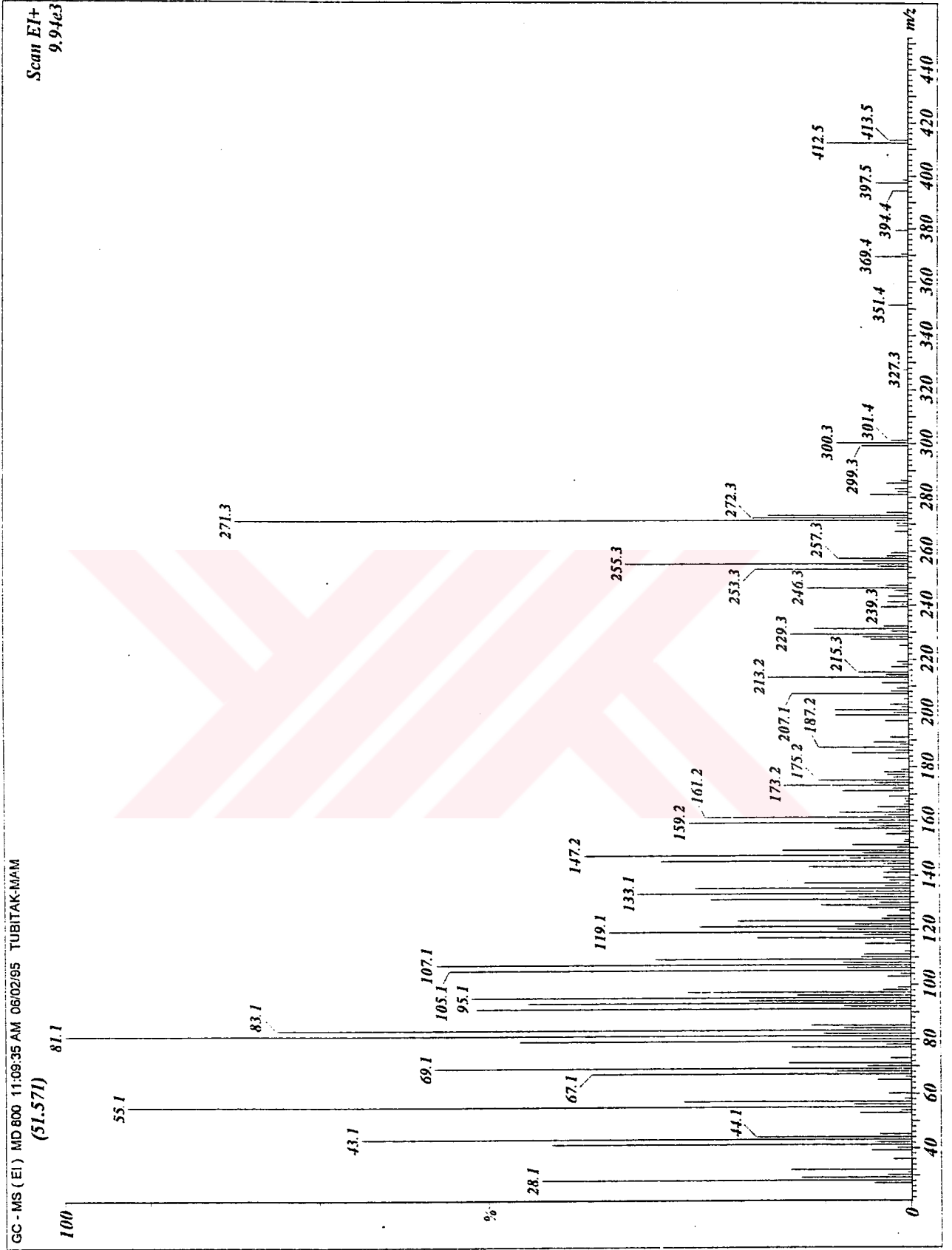
Şekil 12: 2 Nolu Molekülün EI-MS Spektrumu.



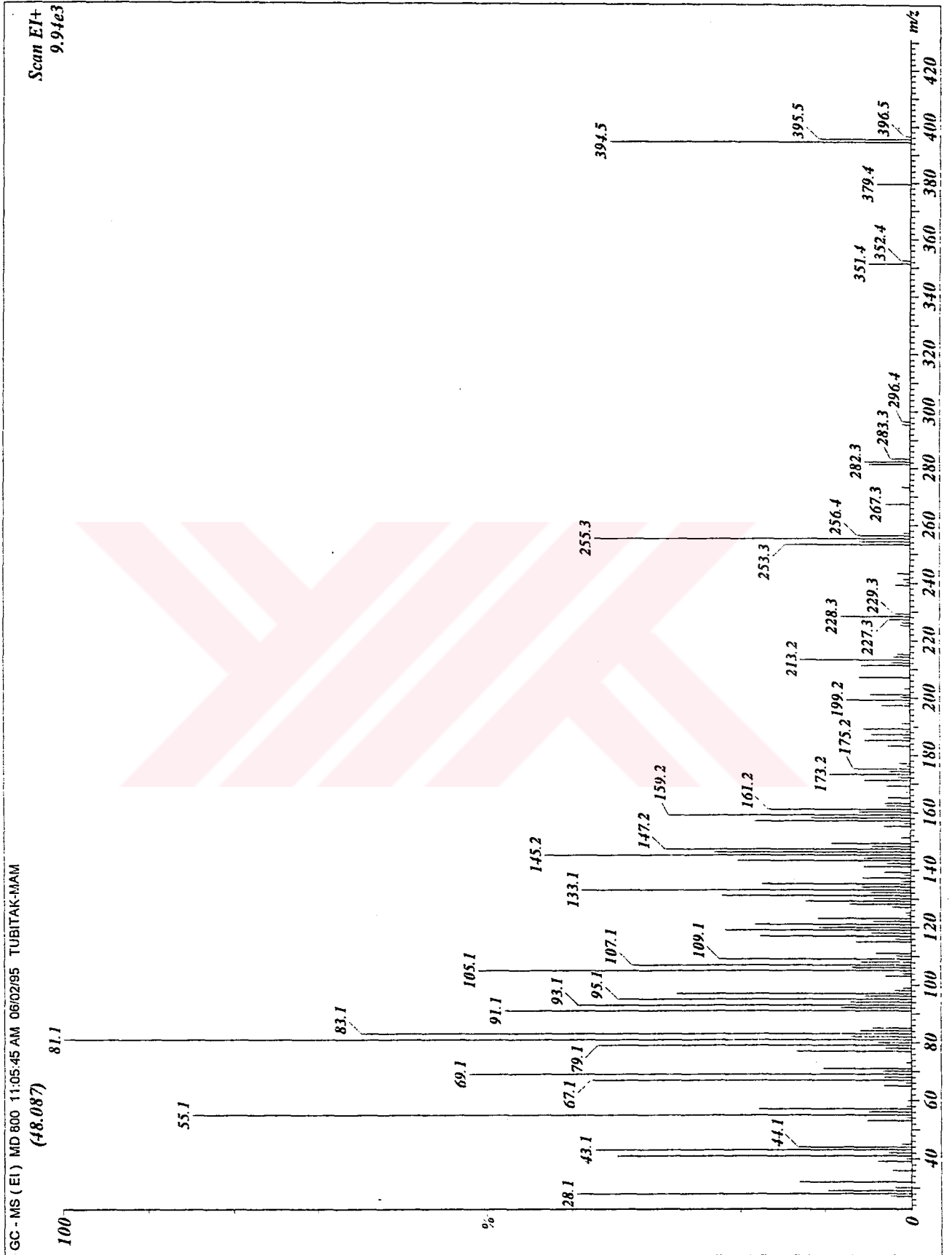
Şekil 13: CC42B Kodlu Molekülün GC-MS Spektrumu (MD 800)



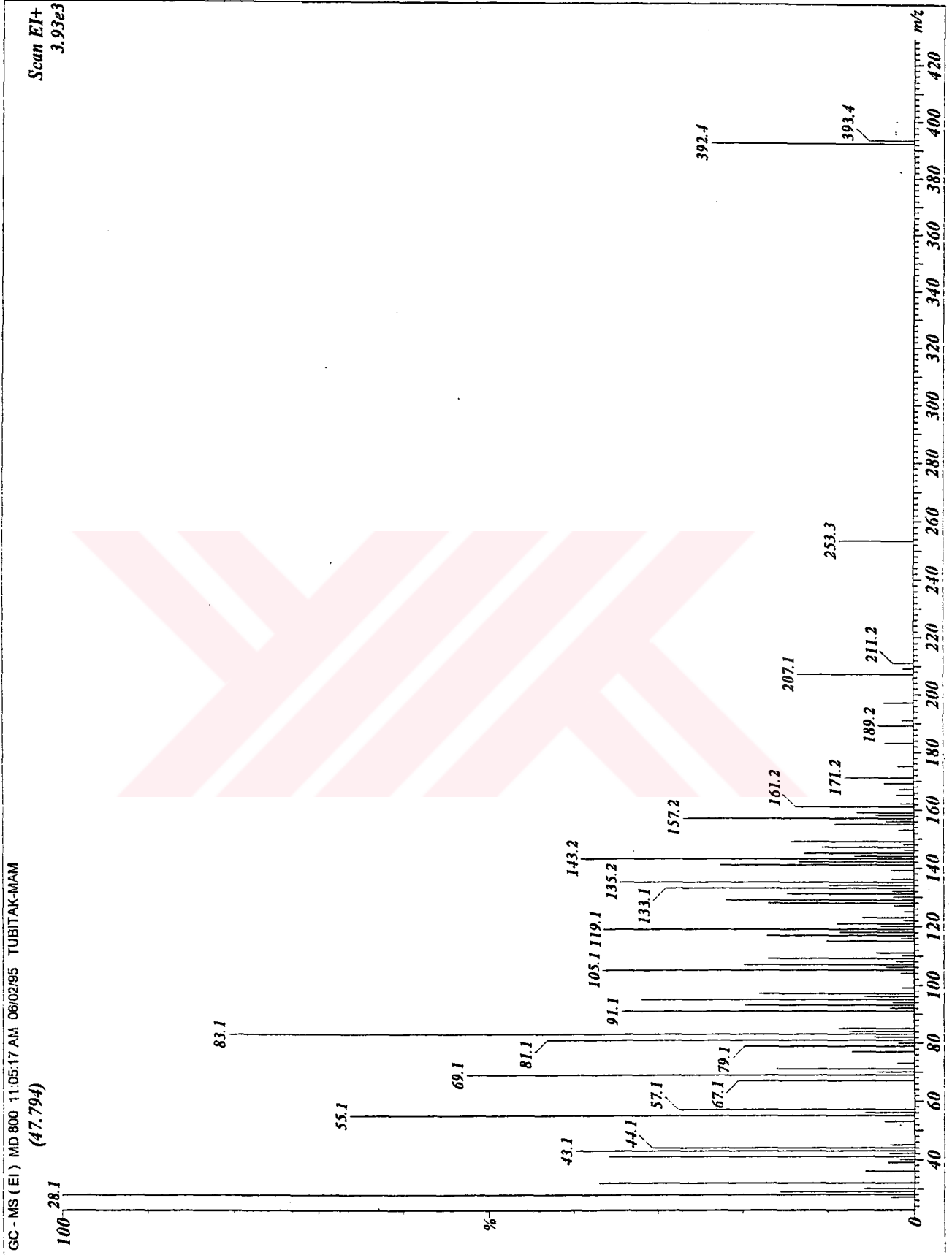
Şekil 14: 2 Nolu Molekülün GC-MS Spektrumu (MD 800)



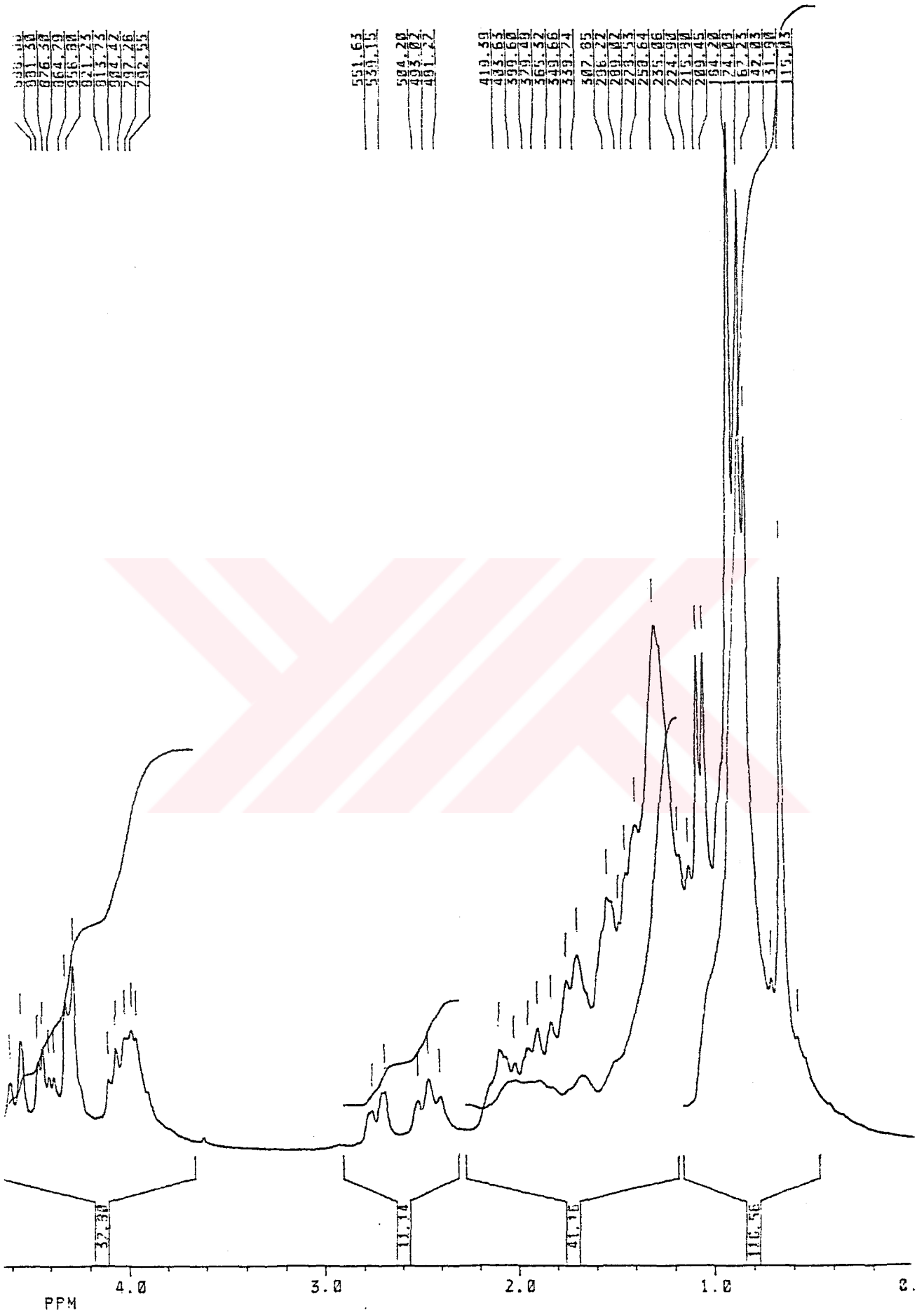
Şekil 15: 3 Nolu Molekülün GC-MS Spektrumu (MD 800)



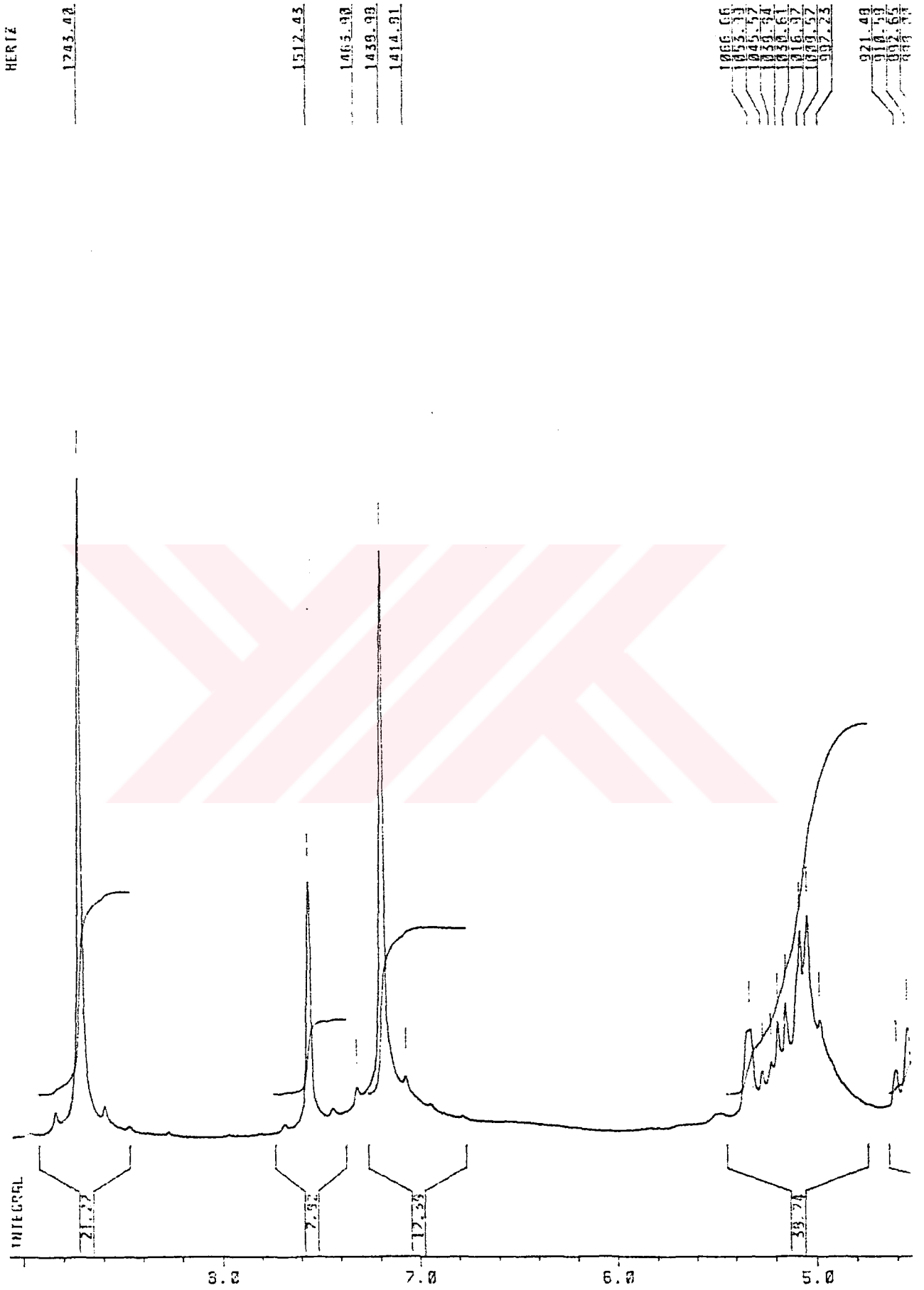
Şekil 16: 4 Nolu Molekülün GC-MS Spektrumu (MD 800)



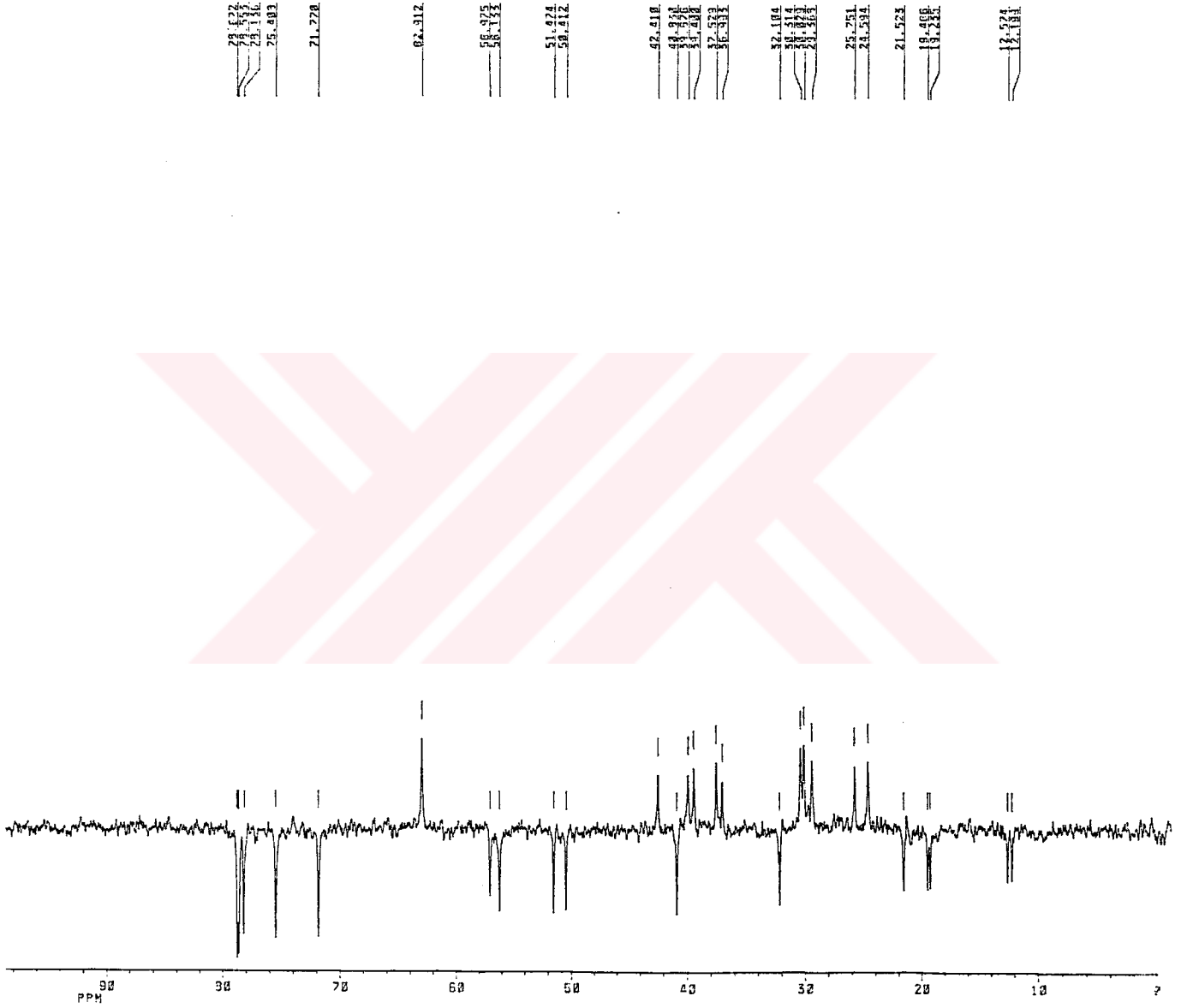
Şekil 17: 5 Nolu Molekülün GC-MS Spektrumu (MD 800)



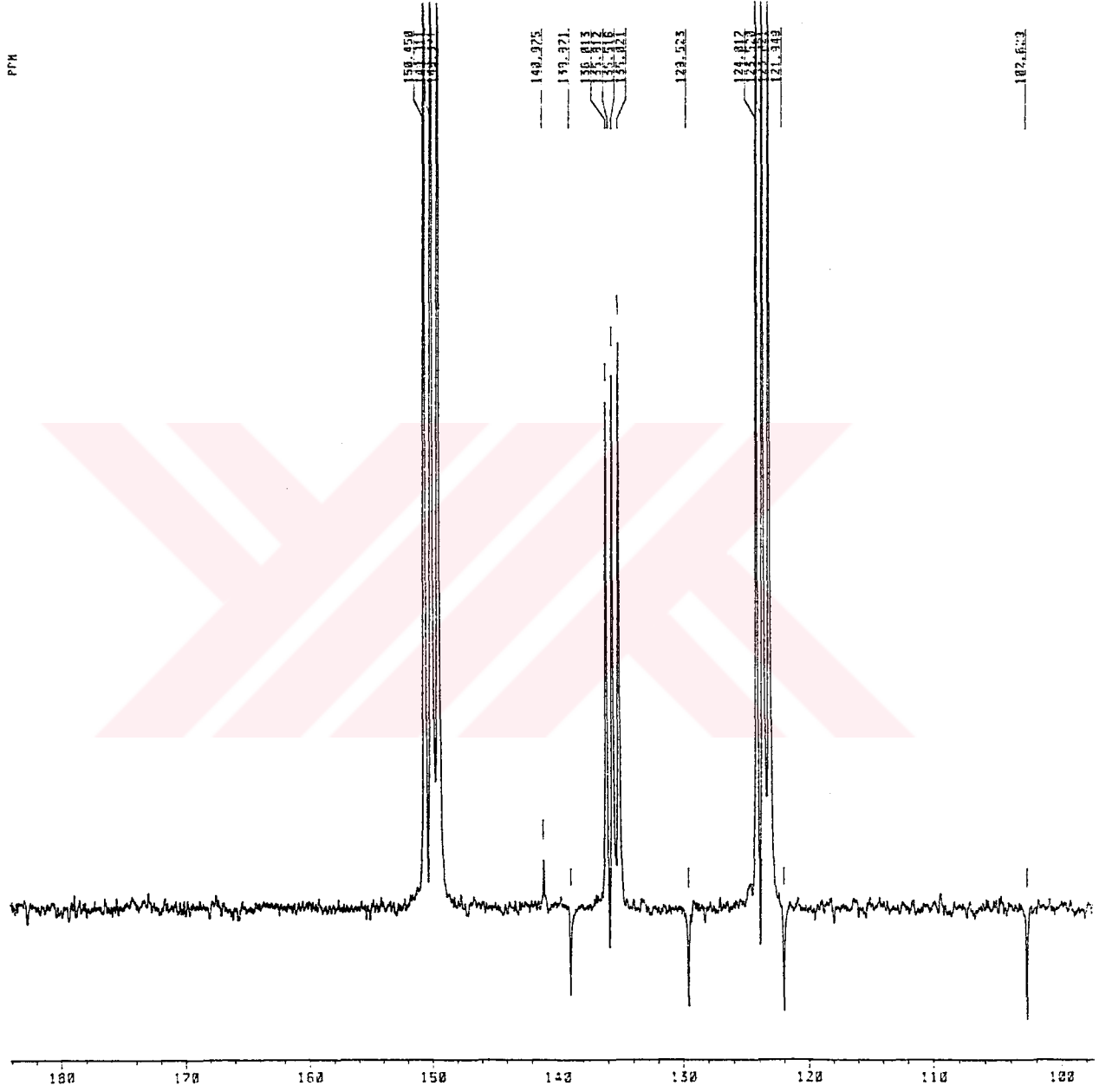
Şekil 18: 6 Nolu Molekülün ^1H -nmr Spektrumunun Parçası (δ 0.0-4.2 ppm, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 200MHz).



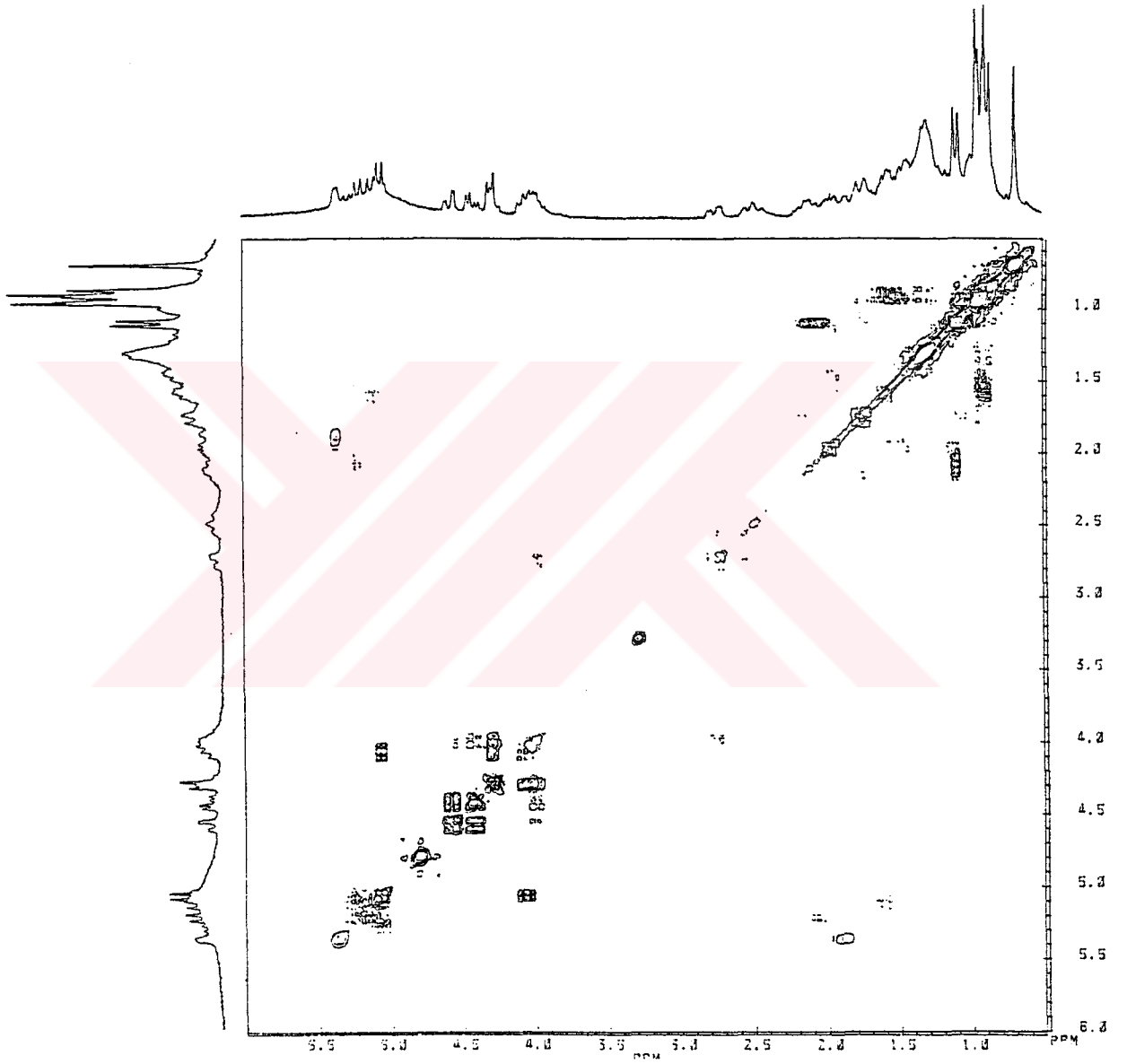
Şekil 19: 6 Nolu Molekülün ^1H -nmr Spektrumunun Parçası
(δ 4.8-9.0 ppm, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 200MHz).



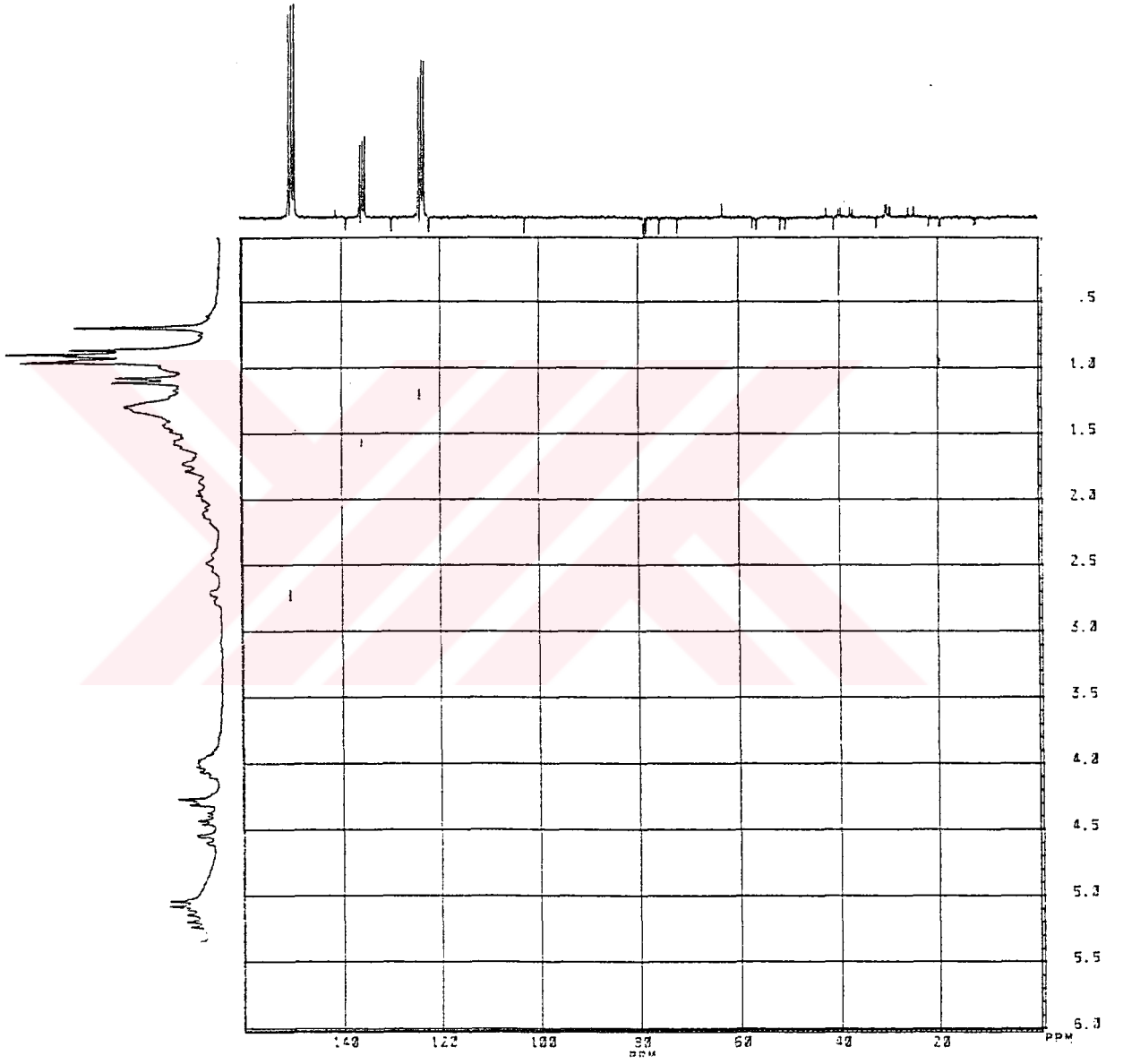
Şekil 20: 6 Nolu Molekülün APT Spektrumunun Parçası
(δ 0.0-90.0 ppm, C_5D_5N , 50.0 MHz).



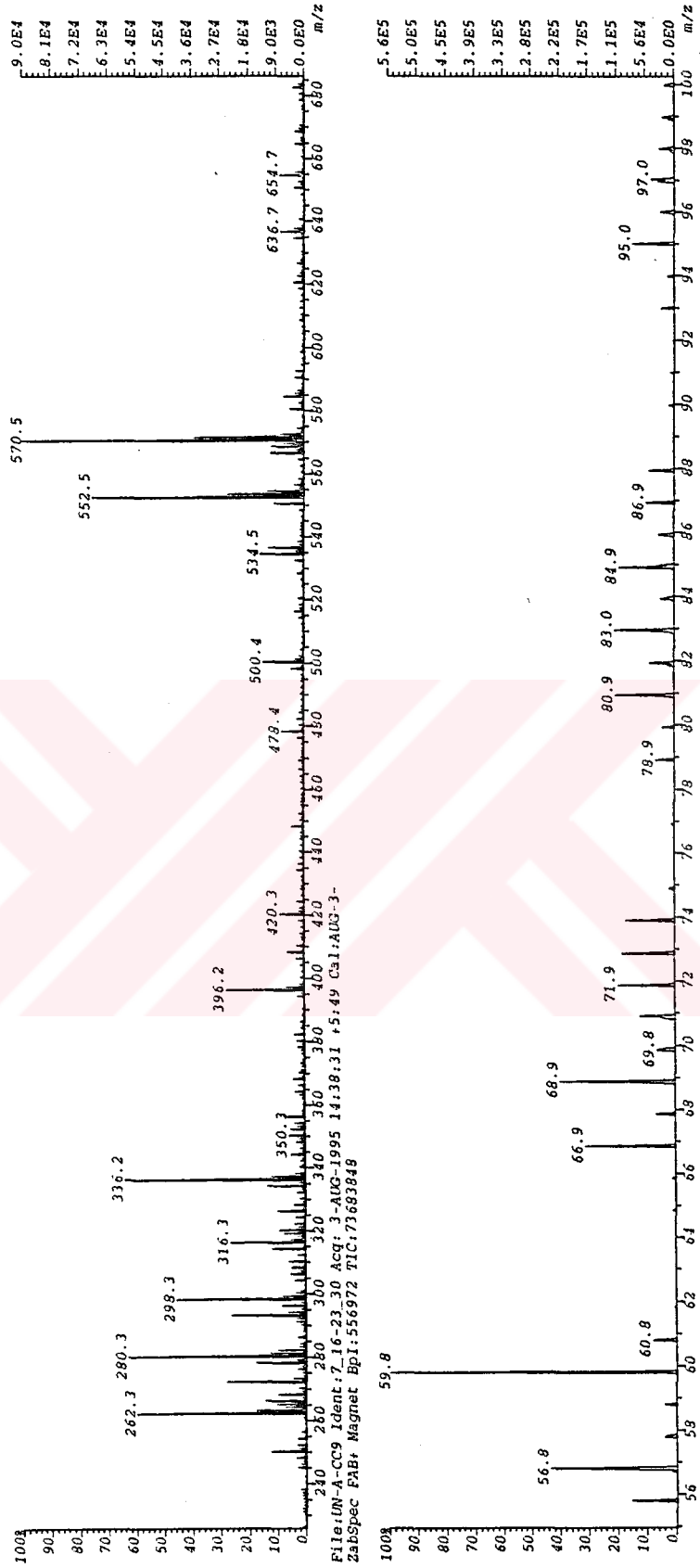
Şekil 21: 6 Nolu Molekülün APT Spektrumunun Parçası
(δ 100.0-180.0 ppm, C_5D_5N , 50.0 MHz).



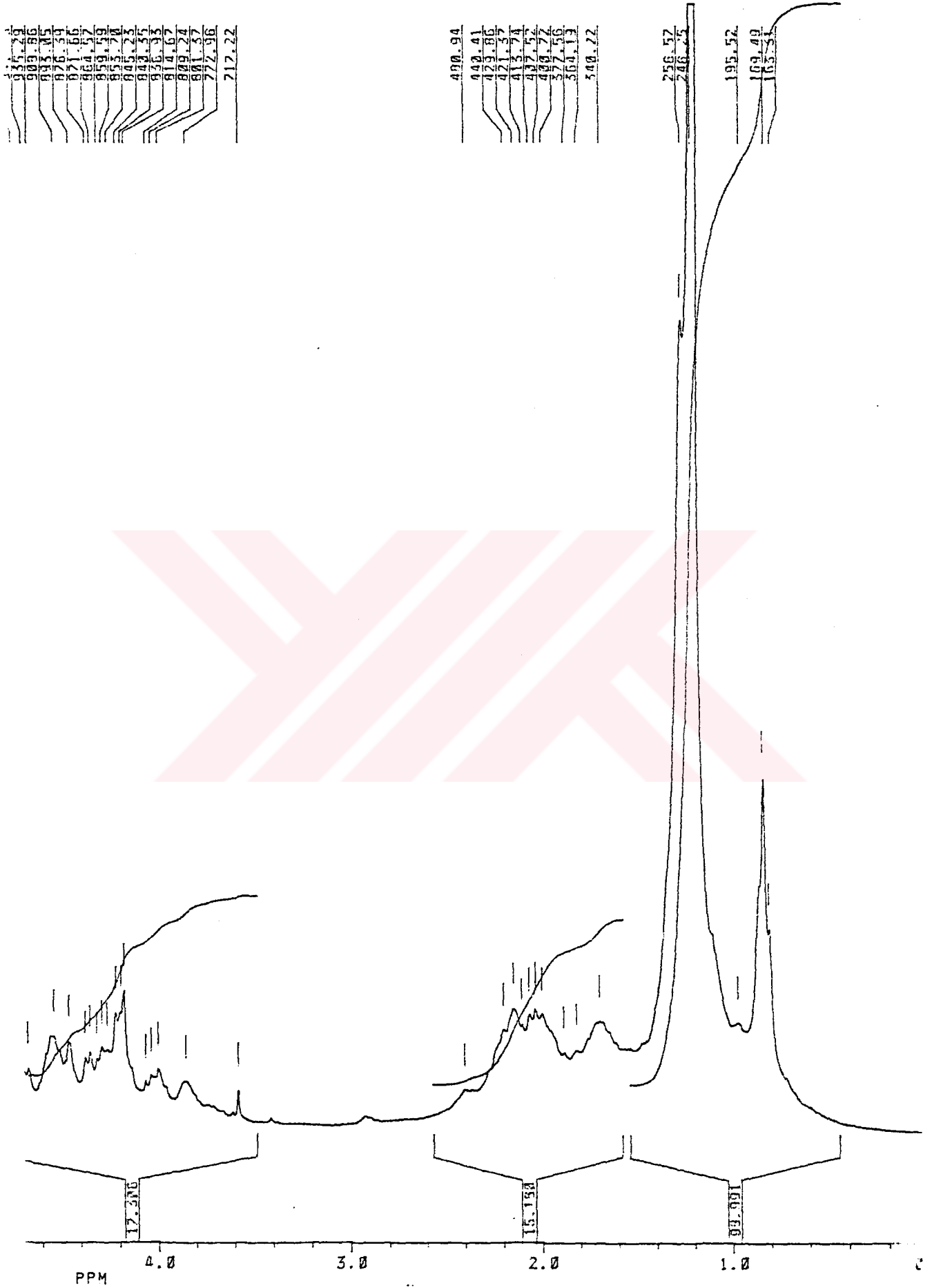
Şekil 22: 6 Nolu Molekülün 2D-COSY Spektrumu (C₅D₅N, 200 MHz).



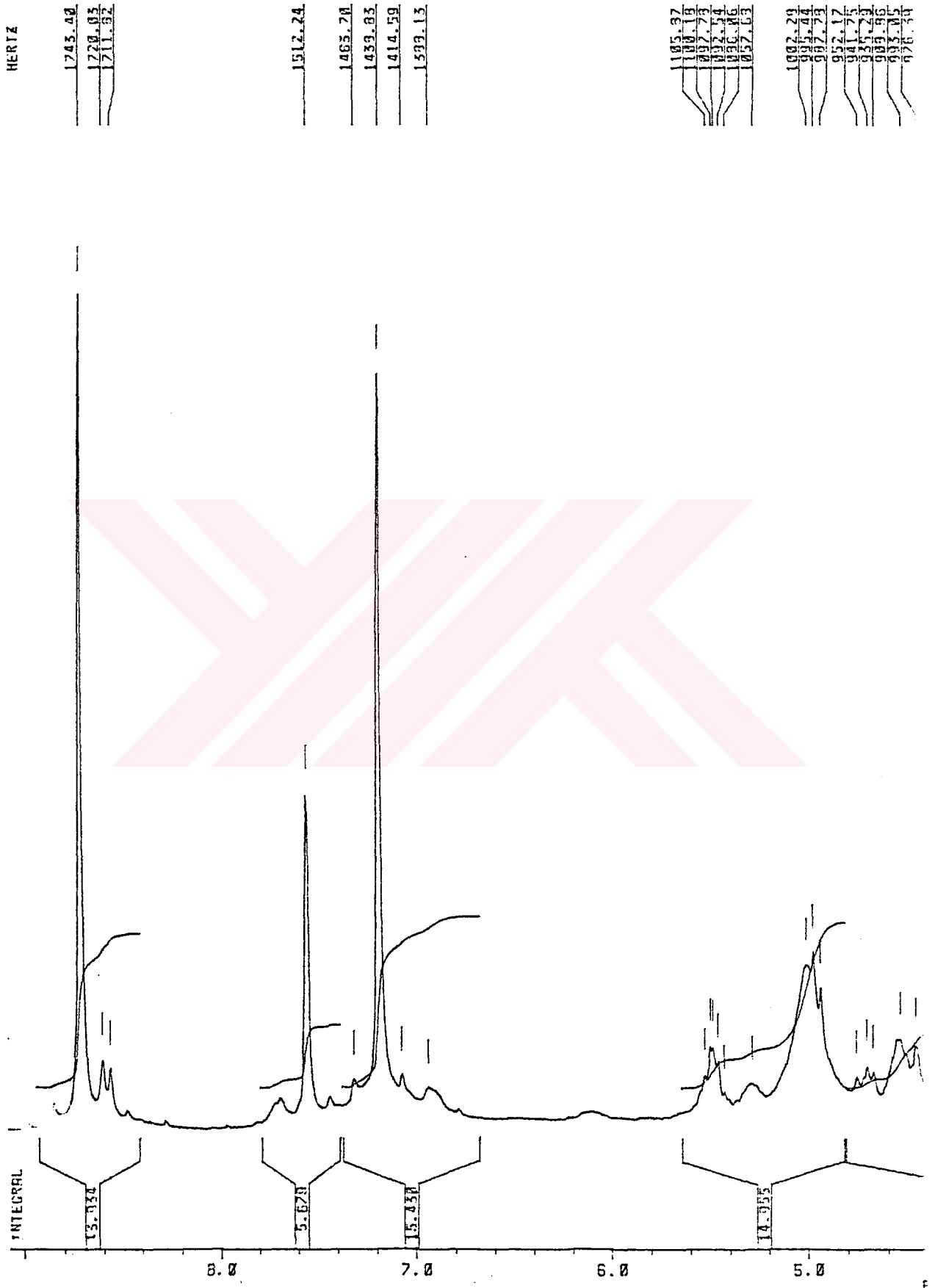
Şekil 23: 6 Nolu Molekülün HETCOR Spektrumu ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 200 MHz).



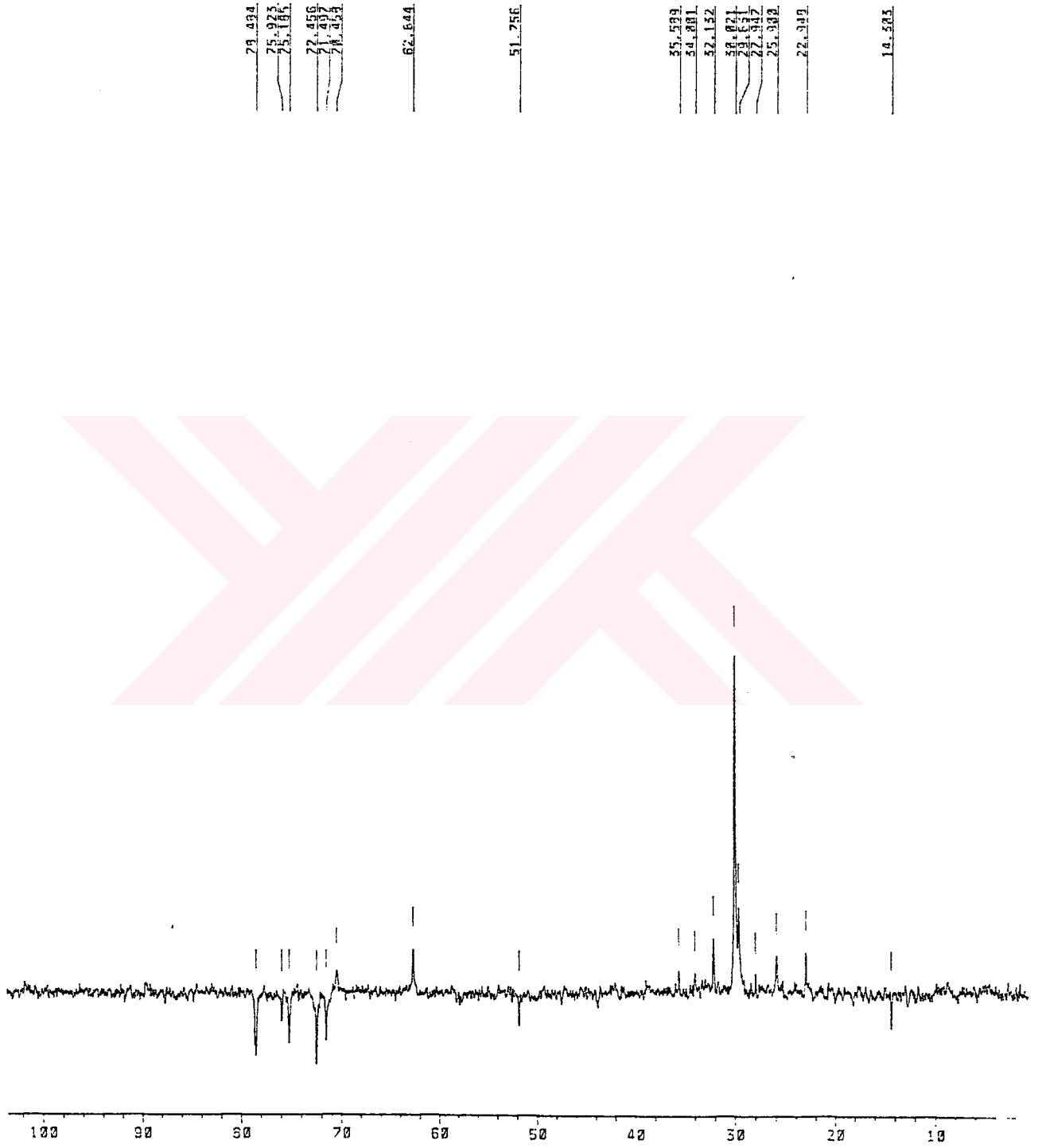
Şekil 24: 6 Nolu Molekülün (+) FAB-MS Spektrumu.



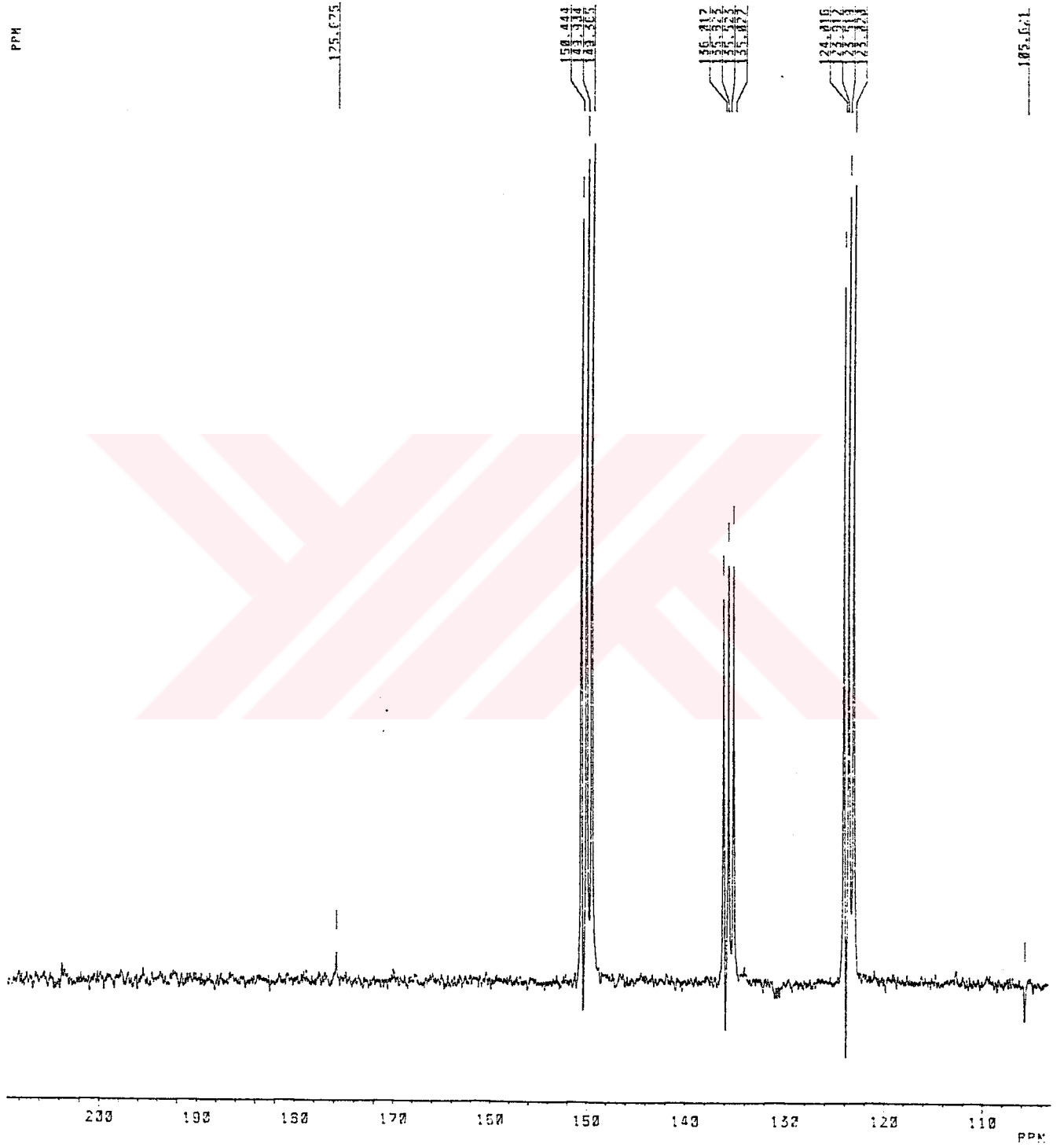
Şekil 25: 7 Nolu Molekülün ^1H -nmr Spektrumunun Parçası
(δ 0.0-4.6 ppm, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 200MHz).



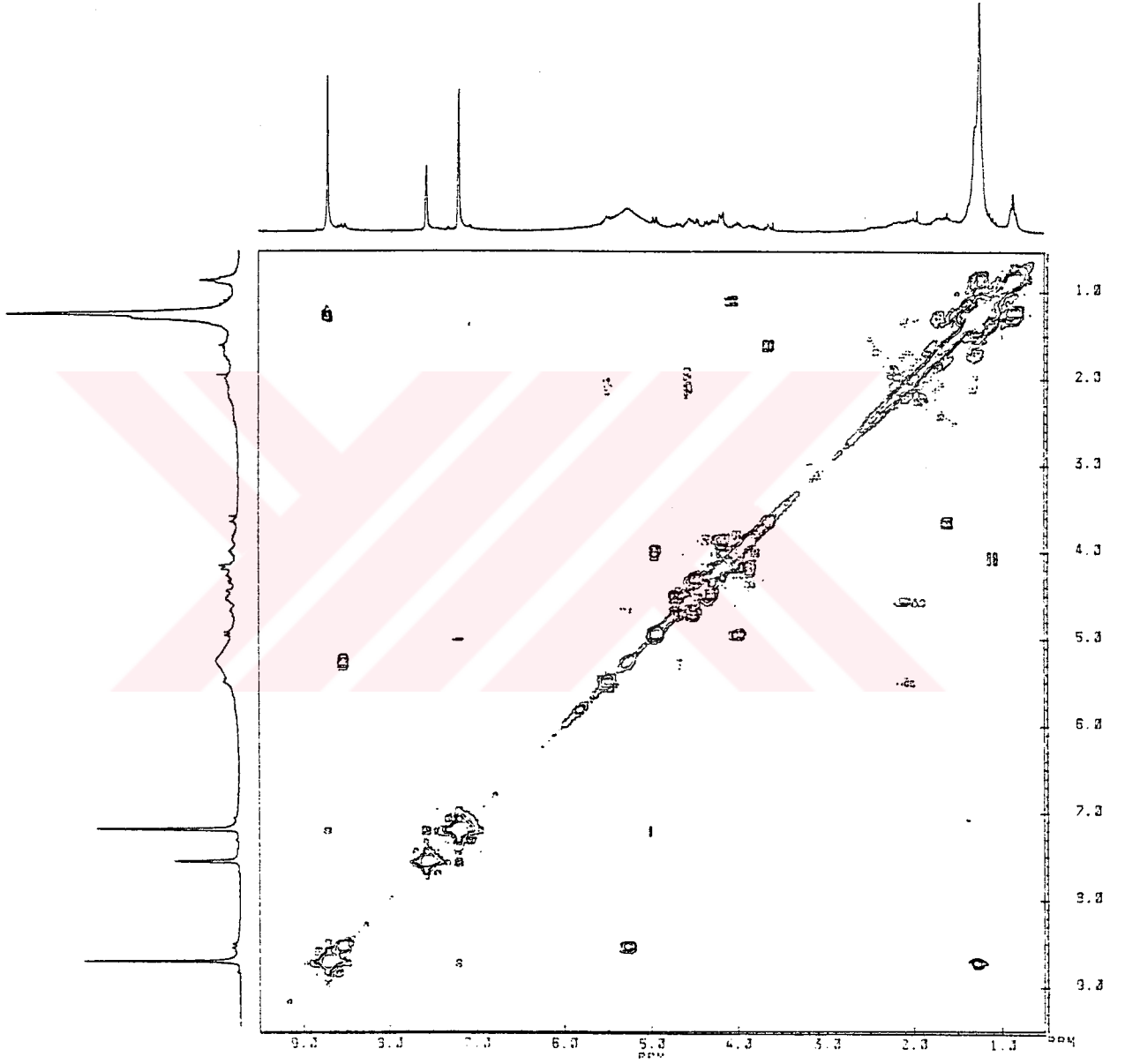
Şekil 26: 7 Nolu Molekülün ^1H -nmr Spektrumunun Parçası
(δ 4.6-9.0 ppm, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 200MHz).



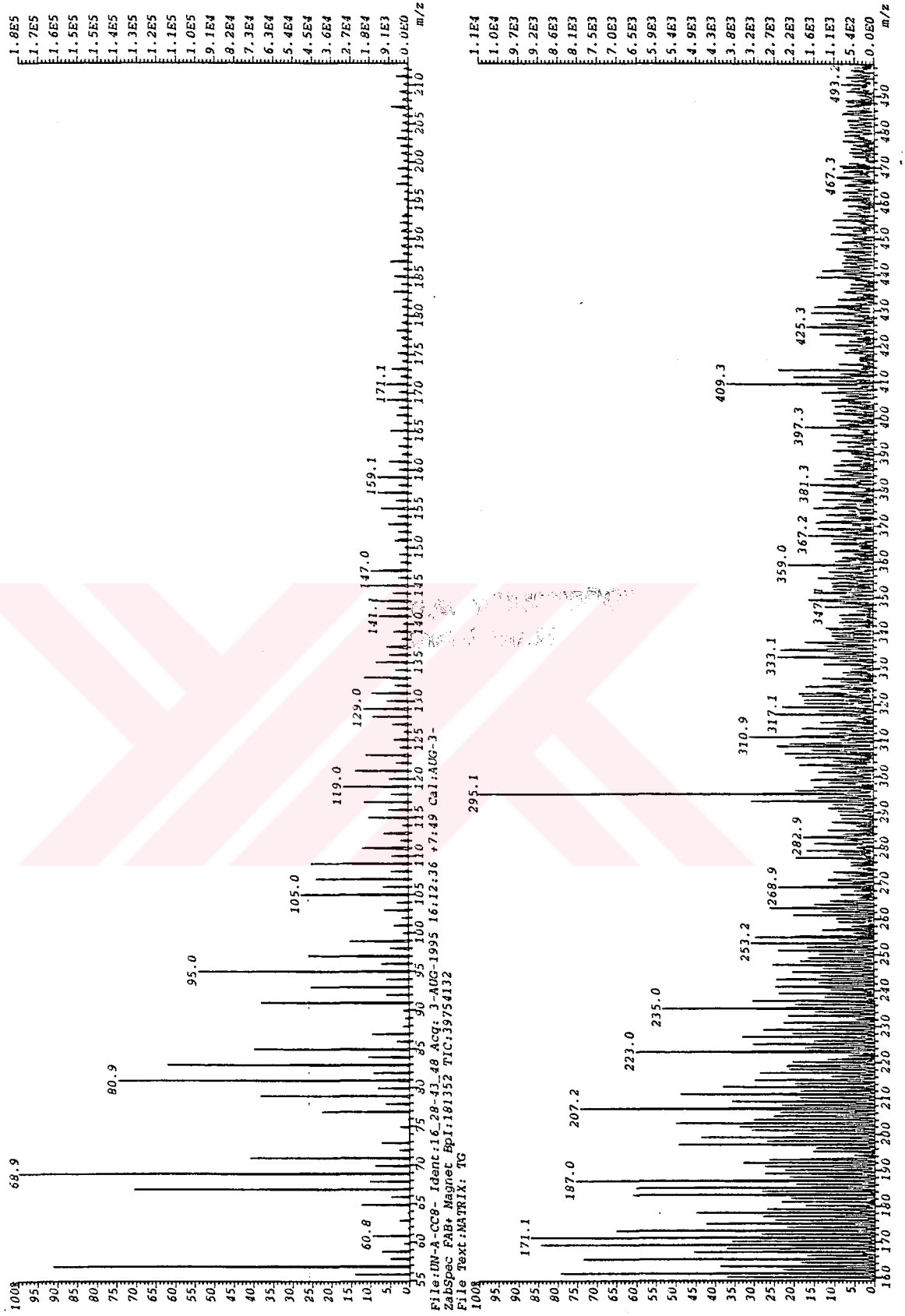
Şekil 27: 7 Nolu Molekülün APT Spektrumunun Parçası
 (δ 0.0-100.0 ppm, C_5D_5N , 50.0 MHz).



Şekil 28: 7 Nolu Molekülün APT Spektrumunun Parçası
(δ 106.0-210.0 ppm, C_5D_5N , 50.0 MHz).



Şekil 29: 7 Nolu Molekülün 2D-COSY Spektrumu (C₅D₅N, 200 MHz).



Şekil 30: 7 Nolu Molekülün (+) FAB-MS Spektrumu.

9. ÖZGEÇMİŞ

1968 yılında Bilecik Bozüyük ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğretimini Bozüyükte tamamladı. 1981 yılında Tarım Bakanlığı Ankara Laborant Meslek Lisesine girdi. 1984 yılında Laborant olarak mezun oldu.1985 yılında Balıkesir İl Kontrol Laboratuvarı Müdürlüğünde göreve başladı. 1988 yılında K.T.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümüne girdi. 1992 yılında buradan Kimyager ünvanıyla mezun oldu. Halen Trabzon İl Kontrol Laboratuvarı Müdürlüğünde Kimyager olarak çalışmakta olup, Fen Bilimleri Enstütüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans yapmaktadır. Yabancı dili İngilizcedir. Evli ve bir çocuk babasıdır.

