

NERIUM OLEANDERDEKİ (ZAKKUM) KARDİYOKTİF  
GLİKOZİDLERİN ARAŞTIRILMASI.

Meryem ÖZKÖK

Anadolu Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca  
Kimya Anabilim Dalı

Organik Kimya Bilim Dalında  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman : Prof.Dr.Sevim BİLGİÇ

Şubat 1990

Meryem ÖZKÖK'ün YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Nerium Oleanderdeki (Zakkum) kardiyak glikozidlerin araştırılması" başlıklı çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

.6./4./1990

Üye : **Prof. Dr. Cemil ÖZBETİR**

Üye : **Prof. Dr. Sevim BİLGİÇ**

Üye : **Yrd. Doç. Dr. Orhan BİLGİÇ**

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun **11 NİSAN 1990**  
.....gün ve **241/8.** sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Rüstem KAYA

Enstitü Müdürü

## ÖZET

Bu çalışma Nerium oleanderdeki kardiyak glikozidlerin ve diğer bileşiklerin izolasyonunu ve yapılarının tayin edilmesini içermektedir. Akdeniz Bölgesinde (Toros Dağları'ndan) yetişen bitkiler incelenmiştir.

Nerium oleander yaprakları yüksek ve düşük sıcaklıklarda metanol su karışımında (3:2) özütlenmiştir. Bu özütler asidik ve nötr fraksiyonlara ayrılmıştır. Her iki durumda da nötr fraksiyonlar incelenmiştir. Soğuk özütün analitik ince tabaka kromatografisi ( $\text{SiO}_2$ ) 14 madde varlığını ve sıcak özüt 4 madde varlığını göstermiştir. Bu nedenle soğuk özüt kullanılmamıştır. Sıcak nötr özütün preparatif ince tabaka kromatografisi sonunda madde I, II, III ve IV izole edilmiştir. Bunların IR ve UV spektrumları alınmış ve yapıları tayin edilmeye çalışılmıştır. IR spektrumlarından OH gruplarının varlığı ve halkalı yapı anlaşılmıştır. Gerçek yapı NMR ve kütle spektrumları alınamadığından tayin edilememiştir.

Ayrıca ursolik asit Siddiqui ve arkadaşlarının yöntemine göre izole edilmiştir, fakat erime noktası literatürden farklı bulunmuştur.

## SUMMARY

This work contains the isolation and the determination of the structures of the cardiac glycosides on the Mediterranean Region (At the Toros Mountains) were investigated.

Nerium oleander leaves were extracted at high and low temperatures with methanol and water (3:2). Those extracts were separated into acidic and neutral fractions. Neutral fractions were investigated in both cases. Analytical thin layer chromatography ( $\text{SiO}_2$ ) of the cold extract showed the presence of 14 compounds and hot extract showed the presence of 4 compounds. For this reason cold extract was abandoned. At the end of preparative thin layer chromatography ( $\text{SiO}_2$ ) of the hot neutral extract compound I, II, III and IV were isolated IR and UV spectra of them were obtained and the structures of them were tried to be determined. From IR spectra the presence of -OH groups and the cyclic structures were understood. True structure could not be determined since the NMR and mass spectra could not be taken.

Also the ursolic acid wanted to be obtained by a methods of Siddiqui and et. al., but melting point was found to be different from the literature.

## TEŞEKKÜR

Nerium Oleanderdeki (Zakkum) Kardiyak Glikozidlerin araştırılması konusundaki bu deneysel çalışma; Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde, Prof.Dr. Sevim BİLGİÇ'in danışmanlığında yürütülmüştür.

Çalışmamda, değerli vakitlerini ayırıp, yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, çalışmalarımı yönlendiren Danışman Hocam, Prof.Dr. Sevim BİLGİÇ'e minnet ve şükranlarımı sunarım.

Deneysel çalışmalarda laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan Bölüm Başkanımız Sayın Prof.Dr. Cemil ÖĞRETİR'e ve deneysel çalışmalarımda her türlü yardımlarını gördüğüm değerli hocam Yrd.Doç.Dr. Orhan BİLGİÇ'e teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca maddi ve manevi her türlü yardımlarını gördüğüm aileme sonsuz şükranlarımı sunarım.

Meryem ÖZKÖK

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	iv
SUMMARY .....	v
TEŞEKKÜR .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	ix
1. NERİUM OLEANDER (ZAKKUM) .....	1
1.1. Bitkisi ve Tarihçesi .....	1
1.2. Aktivitesi ve Toksik Etkisi .....	3
1.3. Tıbbi Kullanım Alanı .....	7
2. KARDİYAK GLİKOZİDLERİ .....	11
2.1. Genel Bilgi .....	11
2.2. Nerium Oleanderdeki Kardiyak Glikozidler .....	17
2.2.1. Nerium Oleanderdeki Diğer Bileşikler .....	28
3. KARDİYAK GLİKOZİDLERİN TANINMASI .....	33
3.1. Belirteçler .....	35
3.2. Kardiyak Glikozidlerin Kantitatif Analizi .....	39
4. ÇALIŞMANIN AMACI .....	44

5. DENEY BÖLÜM .....	45
5.1. Kullanılan Bitkiler ve Çözücüler .....	45
5.2. Kullanılan Belirteçler (Reaktifler) .....	45
5.3. Maddelerin Fiziksel Verilerinin Saptanması ....	46
6. DENEYSEL ÇALIŞMA .....	47
6.1. Nerium Oleanderin Sıcakta Özütlenmesi .....	47
6.2. Nerium Oleanderin Soğukta Özütlenmesi .....	50
6.3. Nerium Oleanderden Ursolik Asit Eldesi .....	51
7. TARTIŞMA .....	65
8. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	77
KAYNAKLAR .....	78

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
1.1. Nerium oleanderin genel görünüşü ve organları	2
2.1. Kardiyak aglükonların yapısı	12
6.1. Analitik İTK'daki madde I,II,III ve IV	48
6.2. Madde I'in IR spektrumu (KBr)	53
6.3. Madde I'in UV spektrumu (MeOH)	54
6.4. Madde II'nin IR spektrumu (KBr)	55
6.5. Madde II'nin UV spektrumu (MeOH)	56
6.6. Madde III'ün IR spektrumu (KBr)	57
6.7. Madde III'ün UV spektrumu (MeOH)	58
6.8. Madde IV'ün IR spektrumu (KBr)	59
6.9. Madde IV'ün UV spektrumu (MeOH)	60
6.10. Ursolik asitin (Urs-I) IR spektrumu (KBr)	61
6.11. Ursolik asitin (Urs-I) UV spektrumu (MeOH)	62
6.12. Ursolik asitin (Urs-II) IR spektrumu (KBr)	63
6.12. Ursolik asitin (Urs-II) UV spektrumu (MeOH)	64



## ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
2.1. Önemli kardiyak glikozidler ve parçalanma ürünleri	13
2.2. Kardiyak glikozidlerin aglukon yapıları	14
2.3. Kardiyak glikozidlerdeki bazı karbonhidratların yapısı	16
6.1. Madde I,II, III ve IV'ün görünür ve UV ışınlarındaki renkleri ve $R_f$ değerleri.	48
6.2. Madde I. II, III ve IV'ün belirteçler ile renk reaksiyonu.	48
7.1. Madde I, II, III ve IV ile Urs-I ve II'nin IR (KBr) spektrumları.	75
7.2. Madde I, II, III ve IV ile Urs-I ve II'nin UV (MeOH) spektrumları.	75
7.3. Nerium oleanderdeki bazı bileşiklerin UV ve IR spektrumları.	76

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

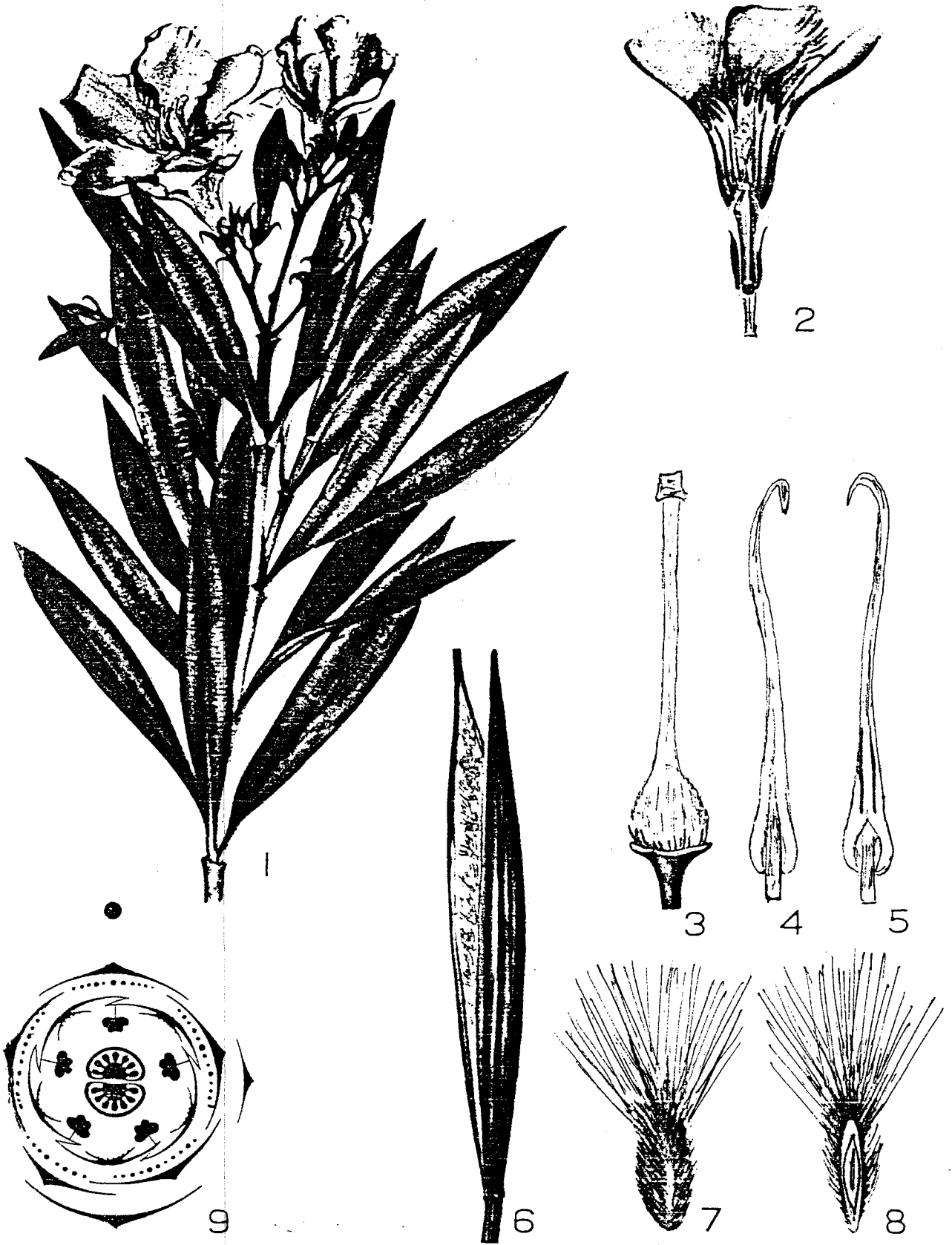
<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
cm <sup>-1</sup>	Dalga boyu
nm	Nanometre
UV	Ultraviyole
IR	İnfrared
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi

## 1- NERIUM OLEANDER (ZAKKUM)

### 1.1. Bitkisi ve Tarihçesi

Nerium oleander Haziran - Eylül aylarında çiçek (pembe veya beyaz) açan, 2,5 m. yükseklikte, süt ihtiva eden, umumiyetle su kenarlarında yetişip, kışın yapraklarına dökme-yen güzel görünüşlü bir ağaçtır. Silindir biçimli, esmer renkli dik gövde üzerinde bazen karşılıklı, ekseriya 3' lü dairesel durumlu kısa saplı yaprakların sivri uçlu, tam kenarlı uzunca, oval biçimde, tüysüz, üst yüzü alt yüze göre daha koyu yeşil, derimsi aya kısımları vardır. Şekil 1.1' de bitkinin genel görünüşü (1), organlarının ayrıntıları (2... 8) ve çiçek diyagramı (9) verilmiştir (Yakar, 1964).

Nerium oleandere Türkiye'de "zakkum", "ağı çiçeği", "zakkım ağı" gibi çeşitli isimler verilmiştir. Genellikle Akdeniz, Ege ve Marmara bölgelerinde yetişir. Özellikle Rum kilisesine mensup kişiler oleandere "rose of the ura-terbrooks", "rhododendron" veya "rose tree" olarak bilirler. İspanyollar ise "laurel" olarak bilirler ve park-bahçe süslemelerinde en çok kullandıkları bitkilerdendir. Da-ima yeşil olması, yapraklarının dayanıklı ve hemen hemen



Şekil 1.1 *Nerium oleander* L. (Zakkum). — 1, Çiçekli dal; 2, Çiçeğin boyuna kesiti; 3, Dişi organ ve taban kısmındaki çok lopluk salgı dokusu; 4, 5, Erkek organın dıştan ve içten görünüşü; 6, Açılmış meyva; 7, Tohumun dış görünüşü; 8, tohumun boyuna kesiti; 9, Çiçek diyagramı.

hiç dökülmemesi tercih edilmesinde etkindir. Yunanistan'da Hindistan'da ve İtalya'da cenaze törenlerinde kullanılır. Hindu tapınaklarında dekorasyon için kullanılır. Filistinliler ise eczacılıkta kullanılan çok aktif bir kardiyak glikozid içerdiği için önem vermişlerdir. Avrupa'da fare zehiri olarak kullanılmıştır. Tropikal ve subtropikal yerlerde genellikle süs bitkisi olarak kullanılmıştır. Musevilerin Gül Bayramlarında kullandıkları ve "willam of the brook" dedikleri bitki muhtemelen Nerium oleander olabilir. Ayrıca Ürdün'ün doğu kısımlarında 25 ft uzunluğunda yetişen Nerium oleandere "Jericho rose" da denmiştir ( Duke, 1983).

## 1.2. Aktivitesi ve Toksik Etkisi

Bütün bitki zehirlidir. Zehirlenme mide ve barsak bozuklukları, solunum güçlüğü ve nabız yavaşlaması gibi belirtiler ile ortaya çıkar. Kalp yetmezliği ölüme sebep olur. Bir gram kuru yaprak insanlarda tehlikeli zehirlenmelere yol açar.

Bitkinin taze yapraklarından oleander boyası hazırlanmış ve % 25 ilaç kuvvetindeki boyanın minimum öldürücü dozu (MLD) kurbağanın vücut ağırlığına göre 0,0020 ml/gr, kobayın vücut ağırlığına göre ise 0,010 ml/gr ve 0,20 ml/gr olarak bulunmuştur. % 10'luk ilaç kuvvetindeki boyanın (U.S.A.'nın resmi "Homeopathic Pharmacopeia" sına göre) minimum öldürücü dozu kurbağanın vücut ağırlığına göre 0,0050 ml/gr dır. Oleander boyasının digitalis boyasından daha toksik olduğu da tespit edilmiştir (Pearson, 1948).

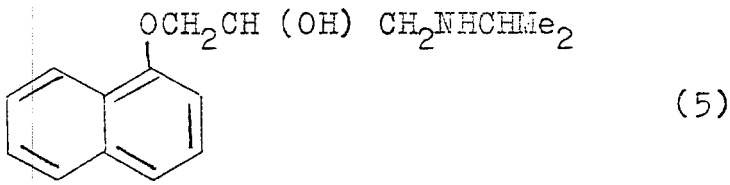
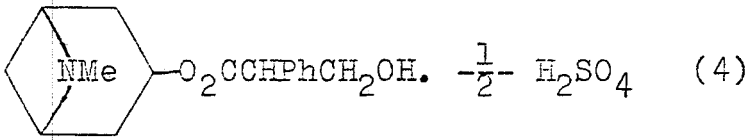
Nerium oleanderin yapraklarından cis- konumunda OH

grubu bulunan bir digitoksigenin (1) izomeri elde edilmiş ve hayvanlar üzerinde biyolojide etkisinin olmadığı tesbit edilmiştir. OH grubunun trans konumunda olduğu izomerinin ise yüksek toksitesinin olduğu gözlenmiştir (Saloman, 1950).

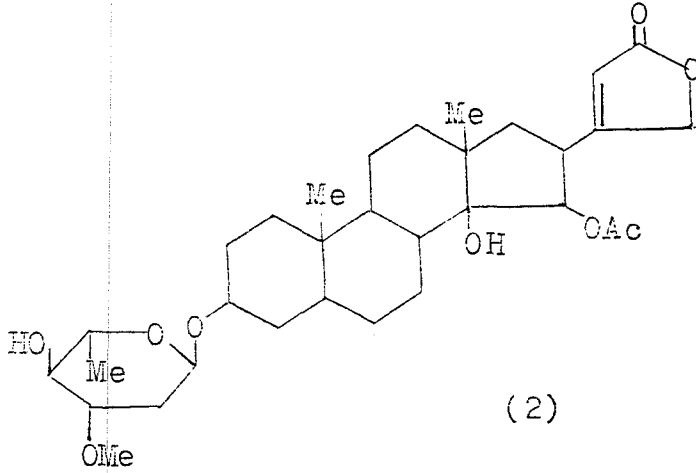
1952 yılında yapılan araştırmada Nerium oleanderdeki glikozidlerden olan oleandrin (2) bileşiğinin % 0.005-0,01 derişimindeki çözeltilerinin hayvanlar üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çok az miktardaki kurbağa, kobay, tavşan ve keçi kalplerine digitalis etkisi göstermiştir ve öldürücü dozu 1.333 mg/kg sökücü etkisinin bulunmadığı anlaşılmıştır (Ajazzi, 1952).  $3 \times 10^{-4}$  gr nerin (3),  $4.5 \times 10^{-5}$  gr oleandrin (2) içeren (oleander yapraklarının suda kaynatılması ile elde edilen öz (10:150)) çözeltinin hamile farelerde düşük etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Bu çözeltinin 20 ml'si (1/4'e kadar deriştirilmiş) farelerde 20-60 dk sonra toksik semptomlar vermiştir. Oleander bileşiklerinin merkezi sinir sistemine özellikle beyinciğe etkili olduğu düşünülmüştür. Çünkü beyincik hasarına benzer şekilde semptomlar gözlenmiştir. Birer gün aralıkla 9 defa 3 ml çözelti verilen farelerde böbrek, karaciğer, kalp bozuklukları gözlenmiştir (Eliakis et. al., 1961). Oleanderin aktivitesi ve toksik etkisi Watt ve Breyer - Branduriyk tarafından teferruatlı bir şekilde açıklanmıştır. Bunlara göre, bir atı 15 - 20 gr , bir ineği 10 - 12 gr, bir koyunu 1 - 5 gr taze yaprak öldürebilir (1962). Bu bitkiyi yiyerek ölmüş hayvanların etleri de zehirlidir.

Zehirlenmeleri önlemek için panzehir araştırmaları yapılmıştır. 1965 yılında yapılan araştırmada oleanderin

yaprağının 1 kg'ından elde edilen 125 mg'luk öldürücü doz veya 0,17 mg oleandrin/kg anestezi uygulanmış kedilerde digitalis ve diğer kardiyotonik ilaçların gösterdiği etkiye benzer kardiyotoksik etki göstermiştir. Bu ilacın öldürücü kardiyak etkisi 0,3 ml/dk hızda %1'lik di-K EDTA uygulaması ile önlenebilmiştir. bu panzehir etkisi di-K EDTA'nın Ca iyonu ile kelat yapabilmesinden ileri gelmektedir. Hücredeki fazla Ca iyonunun azalması hücre zarındaki Ca iyonu azalmasına ve böylece hücrelere K iyonunun geçişinde artışa neden olur (Burtón et, al., 1965) . Atropin sülfat (4), propanolol (5) ile birlikte köpeklerdeki oleander zehirlenmesinden



doğacak ölümleri önlemede kullanılmıştır (Szabuniewicz et. al., 1971). Nerium oleanderin tavşana toksik etkisinin çeşitli organlarında yapılan incelemeler sonucunda oleandrin-den (2) kaynaklandığı düşünülmüştür. Kalp, mide böbrek ve kanda çok yüksek derişimde oleandrin (12) bulunmuş, akciğer ve beyinde ise bulunamamıştır (Bors et. al., 1971).



Hardin ve Arena zehirlenmeye karşı mide yıkamaya diğer tedavi unsurlarına ilaveten potasyum, prokainamid, kinidin sülfat, di-Na EDTA ( $\text{Na}_2$  EDTA,  $\text{K}_2$  EDTA ya tercih edilir) bileşiklerinin rahatlıkla kullanılabileceğini söylemişlerdir (1974).

Nerium oleanderin bitkiler üzerine etkisi de araştırılmış ve defne üzerine etkisinin digitalise benzediği anlaşılmıştır (Rehnelt, 1949). Nerium oleanderin özütünden hazırlanan çözelti (% 60) ağaçlara (*S. terebunthifolius*) verildiğinde iki hafta içinde ağaçta kuruma başladığı, üçüncü hafta sonunda ise tamamen kuruduğu gözlenmiştir. (Hance, 1963; Tahori et. al., 1965).

Nerium oleander, *Digitalis purpurea* gibi türlerin çiçeklerde mutasyonel renk kaybına, klorofil seviyesinde azalmaya ve genel büyümede gerilemeye neden olduğu anlaşılmıştır (Al. Bassam, 1966; Sachs et. al., 1975).

Nerium oleanderin sulu çözeltisindeki glikozidlerin



çimlenmeyi ve bitkilerdeki büyümei engellediği görülmüştür (Tarkowska et.al., 1975). 1979 yılında Von der Dunk Klaus tarafından Nerium oleanderin toksonomisi, aktif maddeleri, toksik etkileri ve bunlara karşı kullanılan panzehirleri toparlayan bir derleme sunulmuştur.

### 1.3. Tıbbi Kullanım Alanı

Çok zehirli bir bitki olan oleander halk arasında astım, kanser, egzema, sara, kızamık, uçuk, sıtma, sedef, manter, uyuz, yılan sokması, yara, tümör, siğil ve deri hastalıklarına karşı deva olarak kullanılmıştır.

1940 yılında yapılan bir araştırmada oleanderdeki glikozidlerin davranışlarının digitalis ve strophanthus arasında olduğu tespit edilmiştir. Periterik sıvı retensiyonuna (idrara tutma) orantılı olarak diüretik etkiyi uyarır. Kalbi uyarıcı etkisi ise ikinci dereceden önemlidir. Sindirimle absorbesi hızlıdır ve çok az kümülatif etkisi vardır. Başlangıç dozu 0,4 mg'dır, daha sonra 3 veya 4 gün ara ile bu doz 50'den 100 mg'a çıkarılabilir (Gibert Queralto, 1940). Bir yıl sonra oleander purpuretinin anestezi uygulanmış köpekler üzerindeki etkisi 20 kg'a 1-2 ml dozlarda enjeksiyondan sonra incelenmiştir. Enjeksiyondan 30 sn sonra sistolik kan basıncında 40'dan 75 mmHg ya yükselme olmuştur. Bundan 50 sn sonra ise kan, başlangıçtaki akış hızının 3 kat hızla akmaya başlamıştır. Bu da dolaşım sistemindeki tahribatın artmasına neden olmuştur. Dolaşım sistemi bozuk olmasaydı bu doz miktarının tahribata neden olmayacağı iddia edilmiştir. Ayrıca oleanderin etkisinin strophanthine benzedi-

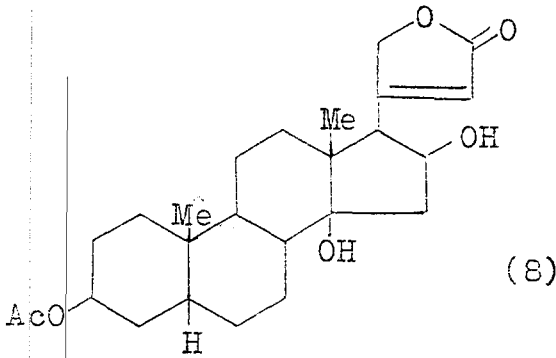
ğine dikkat çekilmiştir (Österwald , 1941 ) . Nerium oleanderin bileşimlerinin ve ilaçlarının kimyası farmakolojisi ve toksik özellikleri Cortesi tarafından ayrıntılı olarak sunulmuştur (1943).

Toz haline getirilmiş oleanderin yapraklarının gözetisi köpeklere enjekte edildiğinde; pozitif inotropik, negatif kronotropik etki ve diüretik etki gözlenmiştir (Fabre et.al., 1950). Oleanderin mezeratinin sulu ve alkolik özütü kobaylara ve köpeklere uygulanmıştır. Kuru özütün sıvıdan daha toksik olduğu bulunmuştur. Neriumun digitalisten daha çok strophanthus benzerlik gösterdiği ve ilaç olarak çok aktif olmadığı ileri sürülmüştür (Cortesi, 1951). Ancak çok kuvvetli bir fungustatik (mantara karşı aktivite) etki göstermiştir (Otto and Karl, 1967).

Kalple ilgili olarak kalp kaslarını kasıcı, siyanogenetik, idrar sökücü, uyarıcı ve kuvvet verici olarak kabul edilen oleanderin, halk arasında çok rağbet görmesinin nedeni belki de Nerium oleanderin Nerium indiciumdan elde edilen rutin (6) ve ursolik esitten (7) başka antikanser ajanı içermesi olabilir (Perdue, 1976). Oleanderdeki glikozidlerin sıçan uterusuna uyarıcı veya depresif aktivitesi gösterdiği ve farelerde düşüğe neden olduğu görülmüştür (Therezinha et al., 1980).

1980 yılında ise oleander ile zehirlenmiş 23 tane inekten 11 tanesi feda edilerek zehirlemeden sonraki ilk 24 saat içerisinde incelemeler yapılmıştır. Zehirlenen hayvanlarda mide - barsak bozuklukları, böbreklerde kan birikmesi ve ciğerlerde ödem tespit edilmiştir. Geriye kalan hay-

vanlar dikkatli bir şekilde atropin sülfat (4) ile tedavi edilmişlerdir. Tedavi edilen hayvanların etinde oleandri-  
genin (8) tayin edilememiş, böylece insanlar tarafından bu  
etlerin yenilmemesi bildirilmiştir. Zehirlenmiş hayvan-  
ların etinde ne digitoksigenin (1) ne de tigogenin (9) bu-  
lunamamıştır (De Pinto et.al., 1981).



Yaprakların yanı sıra çiçekler ve sap kabukları da kalp kasıcı özelliklere sahiptir, özellikle oleandrin (2) kalbi uyarıcı ve idrar sökücüdür. Flavanol glikozidler damar geçirgenliğine etki ederler ve idrar sökücü özelliklere sahiptir. Klinik denemeler sonucunda kornerinin (10) kalp ile ilgili hastalıklara karşı özellikle kalp kası fonksiyonlarını geliştirici etkisi tespit edilmiştir (Duke, 1983).

Dahilen ancak hekim kontrolünde kullanılmalıdır. Çünkü tıbbi miktarların üzerinde kullanıldığı zaman kalp yetmezliği, kusma ve ishal ile kendini gösteren ağır zehirlenmeler yapar. Haricen çeşitli şekillerde kullanılmıştır. Et-

yopya ve Guatemala'da yapraklar deri hastalıklarının tedavisi için kullanılmıştır. Venezuelalılar yaprakların buharını içlerine çekerek sinüzit problemlerini hafifletmeye çalışmışlardır (Duke, 1983). Zeytin yağındaki maserasyonu vücut parazitlerine (bilhassa uyuz parazetine) karşı kullanılır. Bu maserasyonu hazırlamak için toz haline getirilmiş 10 gr oleander 100 gr zeytin yağı içinde bir hafta bırakılır. Sonra bezden süzülür ve sıvı kısım vücuda sürülür. Yaprakların kaynatılarak yaralara ve deri kızarıklarına karşı tatbik edilmesi tehlikelidir.

## 2- KARDİYAK GLİKOZİDLERİ

### 2.1. Genel Bilgi

Kardiyak glikozidler 1-4 mol şekerle kombine durumda steroid eglikonlardan oluşur. Genellikle asit hidroliz ürünleri bir şeker ve bir steroid olan bitki kaynaklardan elde edilmişlerdir. Steroid kısımları aglükon veya genin olarak bilinir. Genelde sarsıcı zehirler olan geninler de bir parça kardiyotonik etkiye sahiplerdir.

Kardiyak glikozidler kalple ve atardamarla ilgili kasların niteliğini, uyarılma kabiliyetini, kasılabilirliğini arttırıcı etki yaparlar. Bu yüzden kalp yetmezliğine karşı rahatlıkla kullanılırlar. Ayrıca kalp vuruşunun hızını yavaşlatarak veya kalbin kan tahliyesini kolaylaştırarak kalbin randımanını arttırır ve böylece kalbin yavaş veya hızlı çarpması rahatsızlıklarındaki önemleri oldukça büyüktür. Bunun yanı sıra idrar sökücü etkileri de vardır. Bugüne kadar toz, merhem ve ham ilaç halinde ve bazı glikozid ve glikozidal karışımlardan hazırlanmış tabletler, deri altına nüfuz eden ilaçlar, enjeksiyon için hazırlanmış eriyikler halinde kullanıla gelmişlerdir.

Aşağıda tedavide kullanılan en önemli glikozidleri içeren bitkiler dört ana grupta sınıflandırılmıştır.

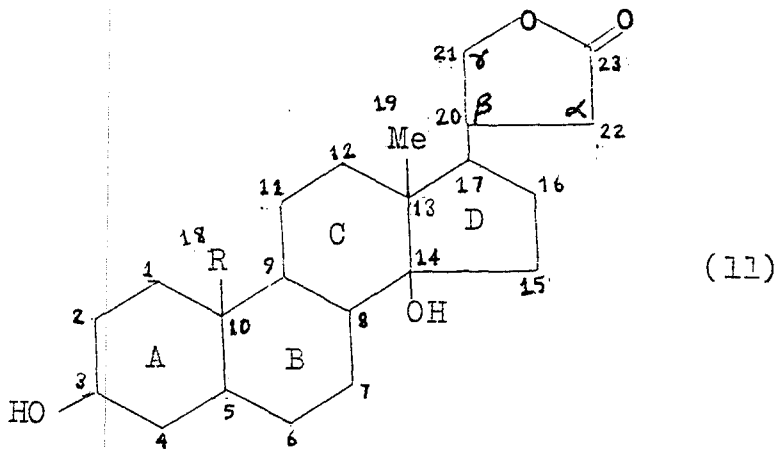
Scrophulariaceae (Sıracotu) : *Digitalis purpurea* (yüksük otu), *Digitalis lanata* ve diğer türler.

Apocynaceae : *Strophanthus*, Komb'e, *S. hirpidus*, *S. gratus* ve diğer türler *Thevetia nerifolia*, *Apocynum cannabinum*, *Merium oleander* (zakkum) ve *Ousebio tree*.

Liliaceae : *Urginea maritima*, *Urginea indica* ve *Convallaria majalis*.

Asplepidaceae : *Periploca graeca* ve *Uzara tree*.

Kardiyak aglükonların yapıları 1915'te Windaus ile başlayan bir çok araştırmalar sonucunda tespit edilmiştir. Şekil 2.1'de bunların yapıları, Çizelge 2.1'de ise kimyasal bileşimleri gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Kardiyak aglükonların yapısı.

A ve B halkaları hem cis- hem de trans-olabilir.  $C_3'$

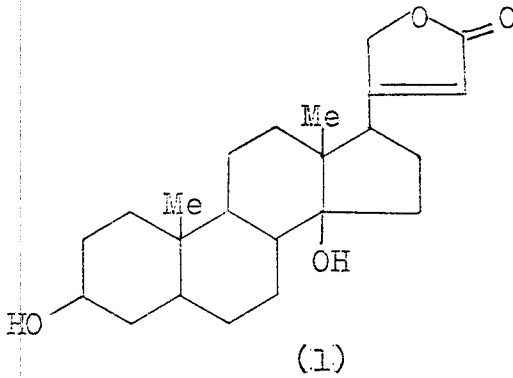
Çizelge 2.1. Önemli Kardiyak Glükozitler ve Parçalanma Ürünleri

Glikosid	Formülü	Parçalanmış Kısımları	
		Genin veya Aglukon	+ Şeker
Digitoksin	$C_{41}H_{64}O_{13}$	Digitoksigenin	+ 3 Digitoksoz
Gitoksin	$C_{41}H_{64}O_{14}$	Gitoksigenin	+ 3 Digitoksoz
Digoksin	$C_{41}H_{64}O_{14}$	Digoksigenin	+ 3 Digitoksoz
Gitalin	$C_{35}H_{54}O_{11}$	Gitoksigenin	+ 2 Digitoksoz
Purpurea glikozid A	$C_{47}H_{74}O_{18}$	Digitoksigenin	+ 3 Digitoksoz+1 glükoz
Purpurea glikozid B	$C_{47}H_{74}O_{19}$	Gitoksigenin	+ 3 Digitoksoz+1 glükoz
Digilanid A	$C_{49}H_{76}O_{19}$	Digitoksigenin	+ 2 Digitoksoz+glükoz+ Asetil digitoksoz
Digilanid B	$C_{49}H_{76}O_{20}$	Gitoksigenin	+ 2 Digitoksoz+glükoz+ Asetildigitoksoz
Digilanid C	$C_{49}H_{76}O_{20}$	Digoksigenin	+ 2 Digitoksoz+glükoz+ asetildigitoksoz
Ouabain	$C_{29}H_{44}O_{12}$	Anhidro-ouabagenin	+ Ramnoz
Kaymarin	$C_{30}H_{44}O_9$	Strophantidin	+ Kaymaroz
Sarmentokaymarin	$C_{30}H_{46}O_8$	Sarmentogenin	+ Sarmentoz
Oleandrin	$C_{32}H_{48}O_9$	Gitoksigenin	+ Oleandroz+Asetik asit
k-Strophantidin- $\beta$	$C_{36}H_{54}O_{14}$	Strophantidin	+ Kaymaroz+glükoz
Tevetin	$C_{42}H_{66}O_{18}$	Anhidrotevetigenin	+ 2 Glükoz+digitaloz
Periplokaymarin	$C_{30}H_{46}O_8$	Periplogenin	+ Kaymaroz
Uzarin	$C_{35}H_{54}O_{14}$	Anhidrouzarigenin	+ 2 Glükoz
Periplosin	$C_{36}H_{56}O_{18}$	Periplogenin	+ Kaymaroz+glükoz
Skillaren A	$C_{36}H_{52}O_{13}$	Skillaridin A	+ Ramnoz+glükoz
Proskillaridin A	$C_{30}H_{42}O_8$	Skillaridin A	+ Ramnoz
Konvallatoksin	$C_{29}H_{42}O_{10}$	Konvallotoksigenin	+ Ramnoz

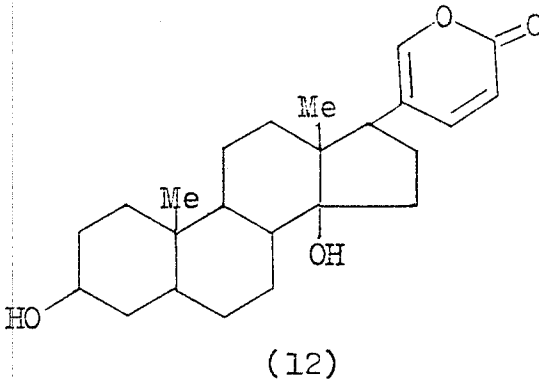
deki OH grubu  $C_{19}$ 'a göre genellikle trans konumdadır. Kardiyak glikozidlerin aglükonlarının bazı karakteristik özellikleri vardır.

- 17 - $\beta$  konumunda doymamış beş veya altı üyeli lakton halkası,
- 14- $\beta$  konumunda OH grubu,
- Siklopentonana perhidropentantren sisteminin cis-anti-trans-syn-cis konfigürasyonu söz konusudur.

17 - $\beta$  konumunda doymamış beş üyeli lakton halkası bulunduranlara kardenolid, altı üyeli lakton halkası bulunduranlara ise bufadienolid denir.



Digitoksigenin(  $3\beta, 14\beta$  -dihidroksi,  $5\beta$ -kardenolid)



Bufalin (  $3\beta, 14\beta$  -dihidroksi  $5\beta$  -bufadienolid)



Bütün yapısal özellikleri içeren en basit kardenolid aglükonu digitoksigeni ndir (1). Aynı zamanda bu aglükon farmasotik ve tıbbi bakımından en önemlisi ve en yaygın olanıdır. Diğer bütün aglükonların yapısal olarak digitoksigeninden ya süstitüsyonla ya da konfigürasyonel değişikliklerle türedikleri kabul edilebilir. Gerçekten yapıll dikkate alınarak Çizelge 2.2'den de görüldüğü gibi başlıca aglikonlar birbirlerinden halke sistemlerinin numaralandırılmasında, hidroksil gruplarının konumlarında ve steriyokimyelerinin tabiatında farklılıklar göstermektedir.

Çizelge 2.2. Kardiyak Glikozidlerin Aglükon Yapıları.

Glikozid	Aglükon	OH grubunun pozisyonu	R	Halkelar* A/B	C(3)OH/R*
Digitoksin	Digitoksigenin	3, 14	CH <sub>3</sub>	Cis	Trans
Tevetin	Tevetigen	3, 14	CH <sub>3</sub>	Cis	Cis
Uzarin	Uzarigenin	3, 14	CH <sub>3</sub>	Trans	Cis
Digoksin	Digoksigenin	3, 12, 14	CH <sub>3</sub>	Cis	Trans
Gitoksin	Gitoksigenin	3, 14, 16	CH <sub>3</sub>	Cis	Trans
Periplokeymarin	Periplogenin	3, 5, 14	CH <sub>3</sub>	Cis	Trans
Sarmentokeymarin	Sarmentogenin	3, 11, 14	CH <sub>3</sub>	Cis	Trans
k-Strophantiden	Strophantidin	3, 5, 14	CHO	Cis	Trans
Kaymarin	Strophantidin	3, 5, 14	CHO	Cis	Trans
Konvalletoksin	Konvalletoksin	3, 5, 8, 14	CH <sub>3</sub>	-	-

\* Muhtemel yapılar.

● Muhtemelen karbon 9 ve 11 arasında bir çift bağ bulunmaktadır.

Çizelgede görüldüğü gibi tevetigen (13) ve uzarigenin (14) digitoksisenin (1) ile aynı molekül formülüne sahiptir. Fakat konumları farklıdır.

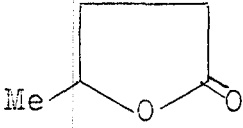
Yukarıda bahsedilen özelliklerine ilaveten kardiyak glikozidler,  $3\beta$  - konumundaki hidroksil grubuna bağlı karbonhidrat zincirinin yapısı ile de karakterize edilebilirler. Hemen hemen bütün durumlarda şeker bulunur (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Kardiyak glikozidlerdeki bazı karbonhidratların yapısı.

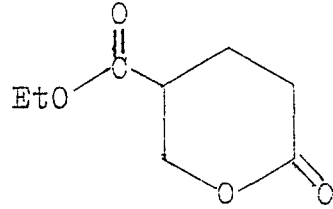
	CHO   H-C-OH	CHO   H-C-OH	CHO   HO-C-H	CHO   H-C-OH	CHO   H-C-OH	CHO   HO-C-H
Margı Selen	H-C-OH	H-C-OH	HO-C-H	H-C-OH	H-C-OH	HO-C-H
Hegzozun	H-C-OH	HO-C-H	HO-C-H	H-C-OH	HO-C-H	HO-C-H
Nonfigü	H-C-OH	H-C-OH	HO-C-H	HO-C-H	HO-C-H	HO-C-H
rasyonu	H-C-OH	H-C-OH	H-C-OH	H-C-OH	H-C-OH	H-C-OH
	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>2</sub> OH
Hegzoz	-	D-glüköz (Gls)	--	--	--	--
6-Deoksi- hegzoz	D-allome- tiloz(Alms)	D-glükome- tiloz(Glms)	D-ramnoz (Rhs)	D-glükome- tiloz(Gms)	D-fukroz (Fcs)	D-talome- tiloz(Tlms)
3-O-Metil 6-deoksi-hegzoz	---	D-tevtoz (Ths)	---	---	D-digilatöz (Dls)	---
2-Deoksi-hegzoz	2-deoksi-D- alloz (2-Des-Als)	2-deoksiglüköz (2-Des-Gls)	---	---	---	---
2,6-Dideoksi- hegzoz	D-digitoksoz (Dxs)	D-kanaroz (Cns)	---	D-boivinoz (Bvs)	---	---
3-O-Metil- 2,6-dideoksi- hegzoz	D-kaymaroz (Cys)	D-oleandroz (Ols)	---	D-sarmentoz (Srs)	D-diginoz (Dns)	---

\* Moleküldeki steriyokimyasal merkezlerin çevrilmesi sonucunda L- formları kolaylıkla bulunabilir.

Daha evvel de belirtildiği gibi kardiyak aglikonlara bağlı, çift bağ içeren lakton halkası bulunur ve normal kalp atışı için halka sisteminin uygun bir konfigürasyonda olması gereklidir.  $\beta$ ,  $\gamma$ -doymamış  $\gamma$ -laktonların incelenmesi sonucunda  $\beta$ ,  $\gamma$ -angelika laktonun (15) ve metil ve etil kümelenen (16) yapıları tayin edilebilmiştir. Bu bileşikler kurbağaların kalp kasılmalarını durdururken, ke-



(15)



(16)

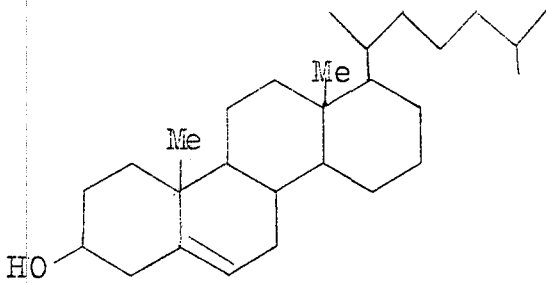
dilerde aynı etkiyi göstermemiştir (Chen, Steldt, Fried, and Elderfield, 1942).

Kardiyak glikozidlerinin aktivitesinin "kalp kasılmasını sağlayan hormon" ile benzerliği bir teori olarak ortaya atılmıştır (Kisch, 1947).

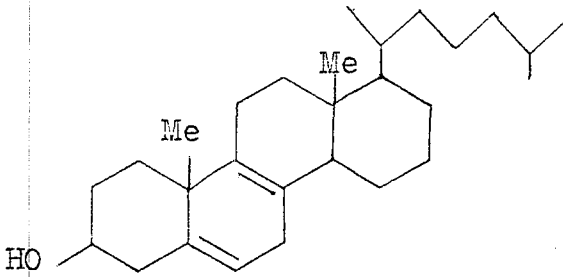
## 2.2. Nerium Oleanderdeki Kardiyak Glikozidler

Nerium oleanderin bir çok organlarından kardiyak glikozid elde edilmesi oldukça eskilere dayanmaktadır. Bunlardan oleandrin (2) (Straub, 1918, Tanret, 1932), neriin (3) (Tanret, 1932), folinerin (17),  $C_{29}H_{46}O_8$ , (Von Hoesslin, 1936) ve oleandrigenin (8) (Neuman, 1937) ilk elde edilen glikozidlerden farzedilebilir. 1938 yılında Tschesche ve arkadaşları adinerigenin (18) için yapı (I) 'i öner -

mişlerdir. Adinerigenin (18) endinerinin (19) oleanderdeki sekonder glikozidlerindedir. O anda (18)'in yapısını başka geninlerle korule etmek mümkün olmamıştır. Çünkü 8-9 çift bağı hidrojenlendirmeye direnç göstermiştir. Daha sonra Windeus, Linsert ve Eckhardt (C.A. 32.4603<sup>3</sup>) 8,9 çift bağı içeren izodehidrokolesterolu (20) indirgemeyi başarmışlardır. İndirgeme HCl'li ortamda 70-80<sup>0</sup>'da gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem tetrahidroanhidroadinerigeninin (21) indirgenmesine uygulanmıştır. Böylece çift bağ ve sekonder OH grubunun indirgenmesi mümkün olmuştur. Kapalı formülü

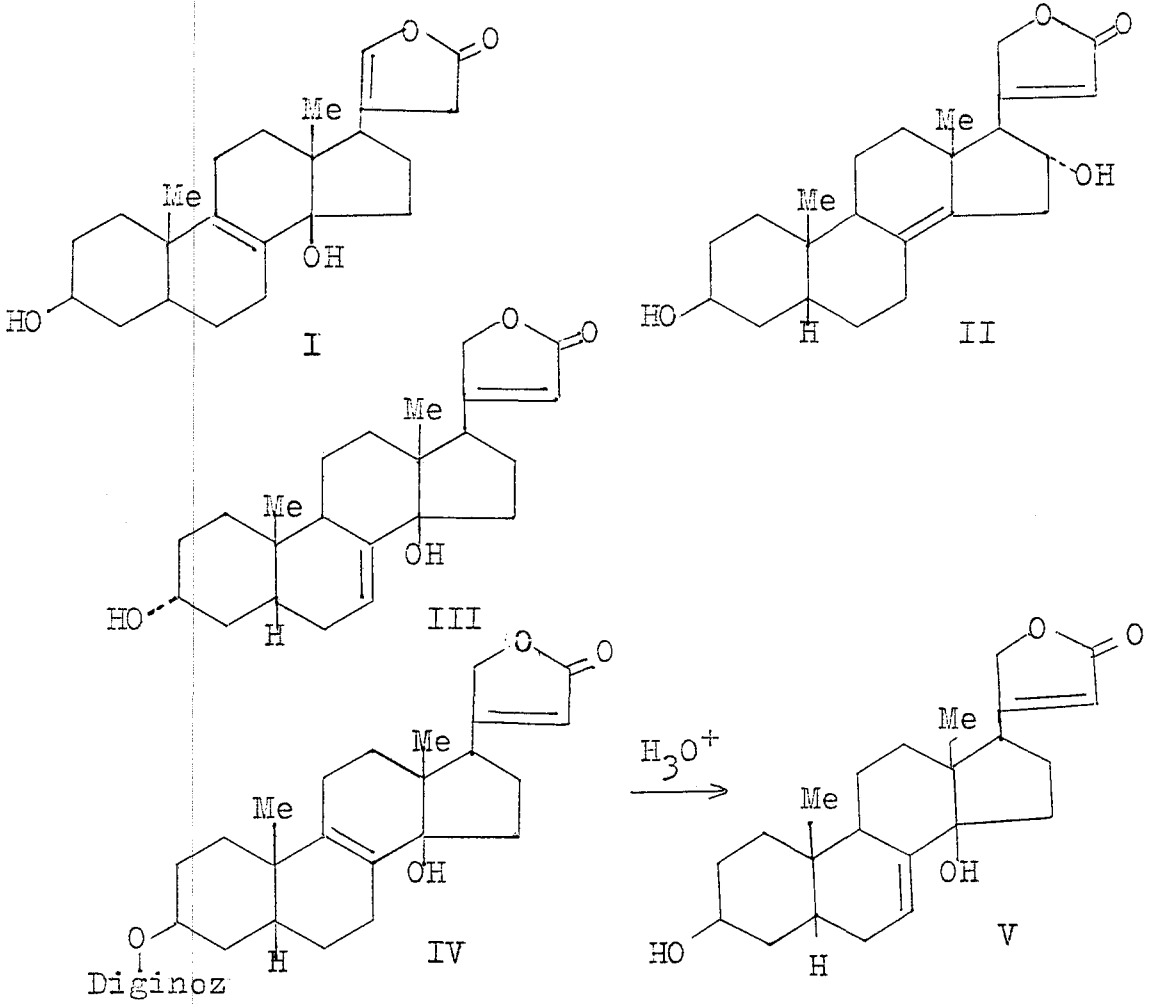


(Kolesterol)

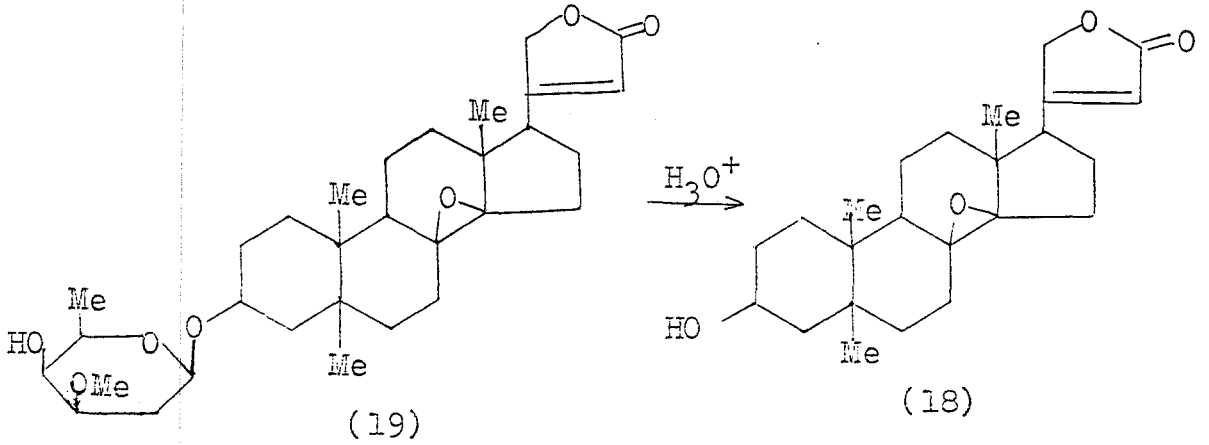


(20)

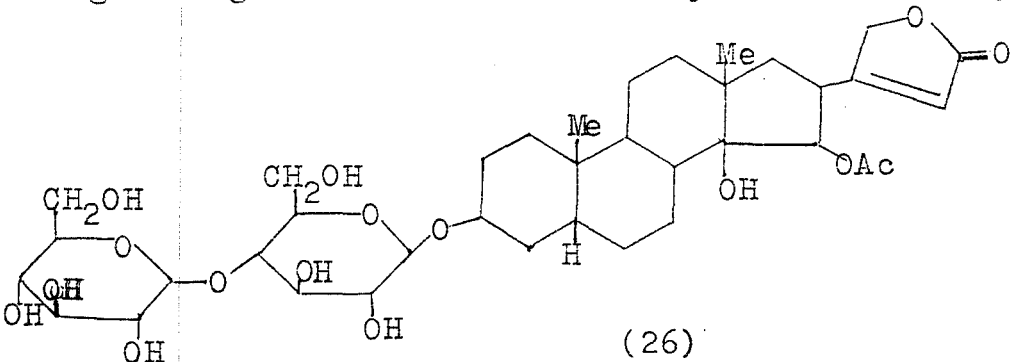
$C_{23}H_{36}O_2$  (e.n. 187-188°) olan digitoksigenin (1) de elde edilmiştir. Bütün bu veriler sonucunda adinerigeninin (18) de diğer kardiyak aglükonlar gibi aynı karbon iskeletini içerdiği ve C-17'deki konfigürasyonun aktif glikozidlere karşı geldiği anlaşılmıştır. Fizyolojik inaktivitesinin 8-9 çift bağından kaynaklandığı düşünülmüştür.

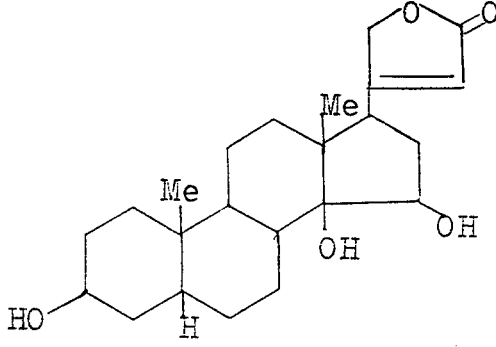


Daha sonraki yıllarda adinerin (19) için IV, adinerigenin (18) için II, III ve V yapıları önerilmiştir. Nihayet 1962 yılında Janiak tarafından (18) ve (19) yapıları bulunmuştur.



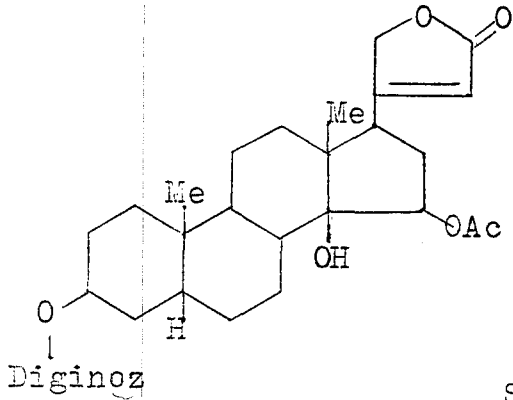
Nerium oleanderin yapraklarından karnenin (10) ( Yu , 1941) ve neriadin (22), e.n. 238-239<sup>o</sup>, ( Bunzaburo, 1949). tohum kabuklarından odorobiyosid D (23) (digitoksigenin (1)+ diginoz + glükoz), odorobiyosid D (23) (digitoksigenin (1)+ diginoz + glükoz), odorotriyosid K (24) (uzarigenin (14) + diginoz + glükoz), odorotriyosid K (25) (uzarigenin (14) + diginoz + 2 glükoz), eser miktarda digitalinum verum (26), odorosid A ve B, (27) ve (28), odorobiyosid G ve K, (29) ve (30), oleandrin (2), odorotriyosid G ve K, (31) ve (32), strospesid (33), anhidrostrospesid (34), gitoksigenin (35) ve digitoksigenin (1) tesbit edilmiştir ( Turkovik, 1959).



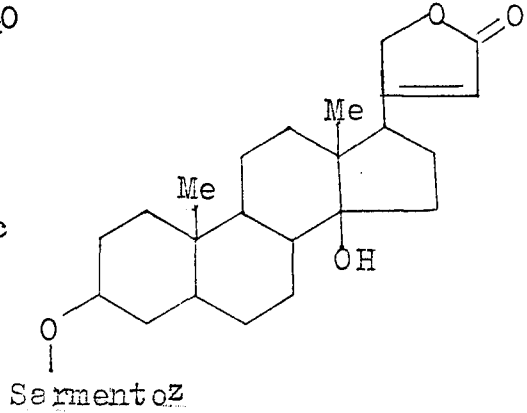


(35)

Nerium oleanderin vakumda kurutulmuş ve toz haline getirilmiş tohumlarının özütü üzerinde yapılan birçok kromatografik çalışmalar sonucunda 18 tane katı halde karde-nolid ve bir tane bilinmeyen (madde A) elde edilmiştir. Ha-va ile temas halindeyken yeşil bir renk veren, fakat  $C(NO_2)_4$  veya % 84  $H_2SO_4$ , Kedde reaktifleri ile renk vermeyen madde A, e.n.  $180-202^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{24} 51,2 \pm 4^\circ$  (MeOH),  $160-170^\circ/0,01$  mm'de süblümleşir ve dalga boyu  $2,99\mu$ 'da karakteristik die-non absorpsiyonu vermiştir. Adigosidin (36), e.n.  $138-142^\circ$  ( $Et_2O-Me_2CO$ ),  $[\alpha]_D^{23} - 16,8 \pm 2^\circ$  (MeOH),  $8,1\mu$ 'da AcO bandı yoktur, %84  $H_2SO_4$  ile nerigosid (37) benzeri renk reaksi-yonu verir. Adigosidin (36) asit hidrolizi kağıt kromatog-rafisinde ( $C_6H_6$   $HCON_2$  içinde)  $\Delta^7$ -adinerigeninle (38) eş bir  $R_f$  değeri ve diginoza eş bir kromatografik şeker frak-siyonu vermiştir. Digistrosid (39), e.n.  $178/205-8^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{25} -48,2 \pm 2$  (MeOH),  $\lambda 217m\mu$ 'da çift bağa sahiptir. Genin kıs-mı digitoksigenin (1), şeker kısmı sarmentoz olarak bulunmuştur.

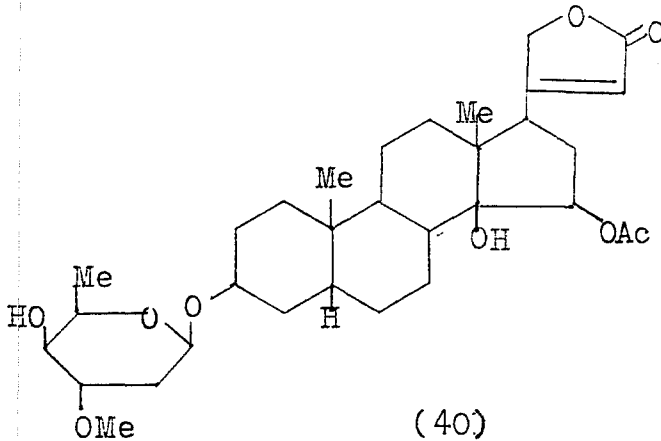


(37)



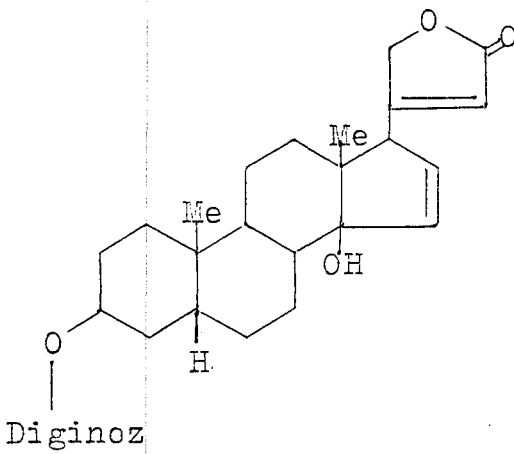
(39)

Oleandrinin (2) e.n.  $242-246^{\circ}$  ( $\text{Me}_2\text{CO} - \text{Et}_2\text{O}$ ),  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} - 48,2 \pm 2$  (MeOH) olarak tespit edilmiştir. Kriptograndosid A (40)'nin e.n.  $115-120^{\circ}$  ( $\text{Me}_2\text{CO}-\text{H}_2\text{O}$ ),  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} - 31,2 \pm 2^{\circ}$  (MeOH); 16 - Anhidrodeasetilkriptograndosid A (41)'nin erime noktası ise  $230-232^{\circ}$  ( $\text{Me}_2\text{CO}-\text{Et}_2\text{O}$ ),  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} 48,0 \pm 2^{\circ}$  (MeOH) olarak bulunmuştur. 41'in 10 mg'ından e.n.  $225-230^{\circ}$ ,  $[\alpha]_{\text{D}}^{26} 41,2 \pm 4^{\circ}$  ( $\text{CHCl}_3$ ) olan 7,4 mg deasetil türevi elde edilmiştir. Odorosid A (27)' bileşiğine ait  $180-185 / 200 - 206^{\circ}$ ,  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} - 5,9 \pm$

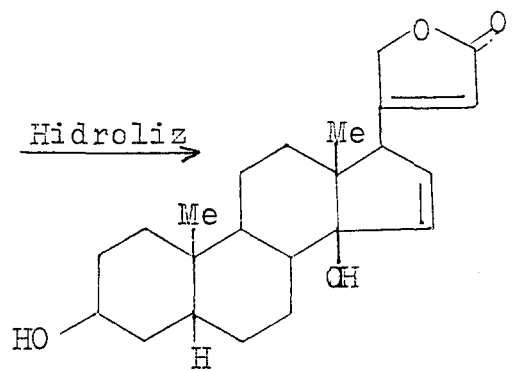




2 °(CHCl<sub>3</sub>) ve  $[\alpha]_D^{23} -4,3 \pm 2^\circ$  (MeOH) olarak iki tane erime noktası bulunmuştur. Nerigosid (37) için, e.n. 155-163° (dioksan-Et<sub>2</sub>O),  $[\alpha]_D^{25} -17,0 \pm 1,5^\circ$  (MeOH),  $\lambda$  216 m $\mu$ 'da pik gözlenmiştir. Genin kısmı oleandrigenin (8) ve şeker kısmı diginoz olarak bulunmuştur. (37)'nin Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ile deasetilasyonu % 19 16-anhidrodeasetil nerigosidi (42) vermiştir. (37)'nin hidrolizi kromatografik olarak deasetilnerigoside (43) benzer bir ürünü oluşturmuştur.  $\Delta^{16}$  - kardanolidleri için tipik bir örnek olan (42), e.n. 182-186°,  $[\alpha]_D^{25} 55,6 \pm 3^\circ$  (MeOH), dalga boyu 270 m $\mu$ 'da pik vermiştir. (42)'nin hidrolizi 16-anhidrogitoksigenini (44), e.n. 220-225°, ve diginozu vermiştir. Digitoksigeninin (1) erime noktası 225-230°,  $[\alpha]_D^{24} -6,9 \pm 3^\circ$  (MeOH)'dir. Deasetil



(42)



(44)

oleandrin(45) için erime noktası  $235-238^{\circ}$ (MeOH),  $[\alpha]_D^{26} -22,2 \pm 2^{\circ}$  (MeOH) olarak bulunmuştur. (45) hidroliz sonunda gitoksigenin (35) ve oleandroza dönüşmüştür. Deasetil-kriptograndosidin (46) e.n.  $203-206^{\circ}$  (MeOH-Et<sub>2</sub>O),  $[\alpha]_D -4,6 \pm 1,5$  (MeOH) olarak bulunmuştur. (45)'in hidrolizi (35) ve diginozu vermiştir. Odorasid H (47)'in e.n.  $228-232^{\circ}$  (MeOH-Et<sub>2</sub>O),  $[\alpha]_D^{24} -11,4 \pm 2^{\circ}$  (MeOH)'dir; neritalosidin (48) ise e.n.  $135-140^{\circ}$ ,  $[\alpha]_D^{26} -11,4 \pm 2^{\circ}$  (MeOH)'dir ve dalga boyu  $217 \text{ m}\mu$ 'da pik gözlenmiştir. Neritalosidin (48) Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'de deasetilasyonu % 25 16-anhidrostrospesidi (49), MeOH'deki KHCO<sub>3</sub> ile hidrolizi ise strospesidi (33) vermiştir. (49)'un e.n.  $230-240^{\circ}$ ,  $[\alpha]_D^{25} 62,2 \pm 4^{\circ}$  (MeOH)'dir ve dalga boyu  $270 \text{ m}\mu$ 'da absorpsiyon göstermiştir. (35)'in e.n.  $224-230^{\circ}$ ,  $[\alpha]_D^{26} 28,0 \pm 2^{\circ}$  (MeOH) ve (33)'ün e.n.  $246-250$ ,  $[\alpha]_D^{24} 17,0 \pm 2^{\circ}$  (MeOH) olarak bulunmuştur. Ayrıca 16-anhidrodeasetiloleandrin (50) (2'nin Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'de deasetilasyon ürünü için, e.n.  $228-232^{\circ}$ ,  $[\alpha]_D^{24} 20,8 \pm 3^{\circ}$  (MeOH), dalga boyu  $270 \text{ m}\mu$ ; (44) (50'nin 0,05 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile hidroliz ürünü) için, e.n.  $218-222^{\circ}$  olarak bulunmuştur ve 14-anhidrodi-O-asetilgitoksigenin (51) ( $15^{\circ}\text{C}$ 'de C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N içindeki SOCl<sub>2</sub> ile 50 mg di-O-asetilgitoksigenin (52)'in muamele edilmesi sonucunda elde edilen ürün) elde edilmiştir. 50 mg (52)'den kardenolid halkasının yanı sıra izole edilmiş bir çift bağa sahip olan (51)'den, e.n.  $158-160^{\circ}/187-190$ ,  $[\alpha]_D^{24} 127,4 \pm 2^{\circ}$  (MeOH), 27,9 mg elde edilmiştir (Jager et. al.,

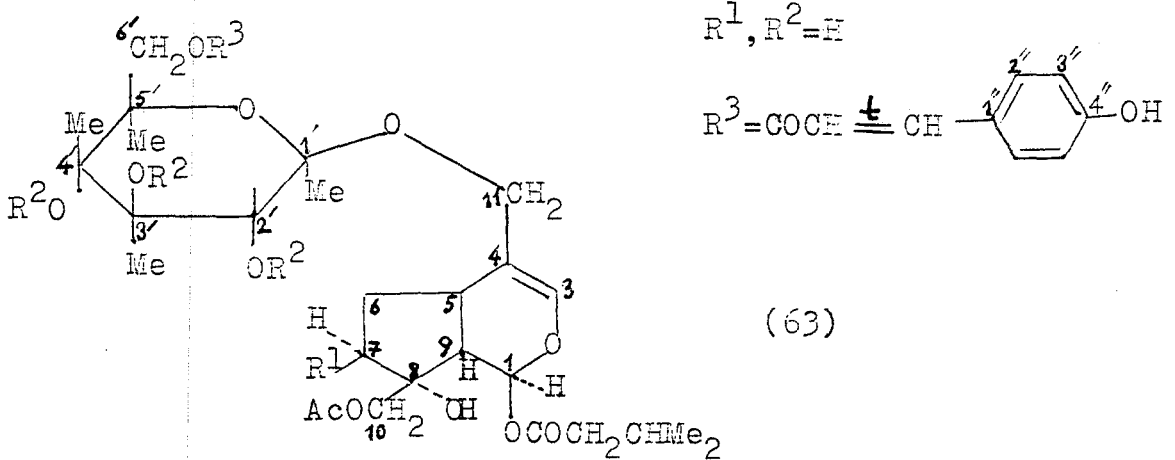
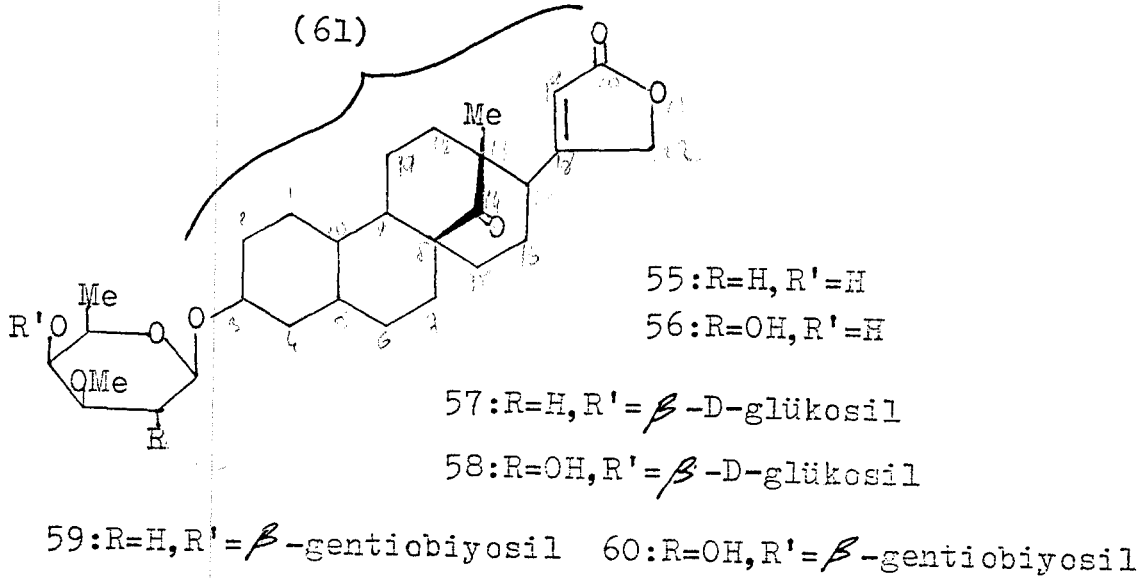
1959). Yine yapraklardan oleandrin (2), deasetiloleandrin (45), edinerin (19) ve neriantin (53), gitoksigenin (35), odorosid H (47), neritalosid (48), urekitoksin (54) ve strospesid (33) izole edilmiştir (Tschesche, 1964). Aynı yıl çiçeklerden gitoksigenin (35), uzarigenin (14), strospesid (33) ve odorosid H (47) elde edilmiştir (Chiarlo, 1964).

1966 yılında Basilico tarafından yaprak, çiçek ve kabuklardaki glikozidlerin kompozisyonları açıklanmış ve oleandrin (2), nerin (3), folinerin (17) ve neriantin (53) tesbit edilmiştir. 1968 yılında ise bufadienolid ve kardenolidleri içeren bitkiler açıklanmıştır. Bu maddeler Apocynaceae familyasından 18 bitkide-genelde Apocynum, Nerium, Trachomitum-, Aschepiadaceae familyasından 40 bitkide-genelde Periploca, Gomphocarpus, Asclepias-, Scrophulariaceae familyasından 36 bitkide-genelde Digitalis- bulunmuşlardır. Bu bitkilerden değişik kardiyotonik glikozidleri ve aglikonları elde edilmiş ve ayırma yöntemleri açıklanmıştır (Zoz et. al., 1968).

Nerium oleanderin kabuk, yaprak, çiçek ve dallarındaki kardiyak glikozidlerin miktarları kolorimetrik olarak tayin edilmiştir (495 nm pik absorbansı). En yüksek değer kabuklarda bulunmuş (% 0,96), bunu yapraklar (% 0,63), çiçekler (% 0,55) ve dallar (% 0,50) izlemiştir. Bütün bitki organlarında oleandrinin (2) olduğu, edinerinin (19) sadece yaprak ve dallarda bulunduğu, dal kabuğu dışındakilerde ursolik asitin (7) olduğu anlaşılmıştır. Sabunlaştırılmayan madde bütün organlarda bulunmuştur. Sərbest karbonhidrat olarak da şeker bulunmuştur (Karawya et. al., 1970). Ayrıca yine fark-

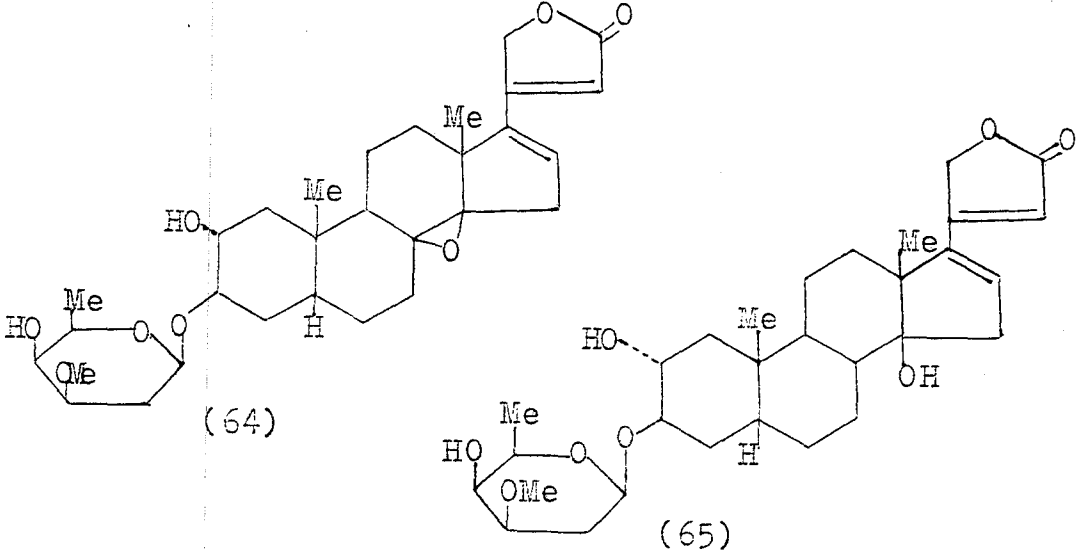
lı organlardan kolon kromatografisi ile oleandrin (2) ve adinerin (19) izole edilmiştir (Karawya et. al., 1973). Yapraklardan oleandrin (2), deasetiloleandrin (45), neritalosid (48), urekitoksin (54) ve adinerin (19) bileşikleri elde edilmiştir (Fayez and Negm, 1973). Oleandrinin verimini arttırmak için Nerium oleander yapraklarının alkol özütünü saflaştırılmış ve aktif kömür ile muamele edilmiştir (Libizova et. al., 1974). Oleander yaprağının sulu özütü ise indirgeyici şeker, kardenolid ve digitoksozu vermiştir. Bu özütteki kardiyak glikozid benzeri maddelerin miktarı 1464 ve 95  $\mu\text{gr}/\text{gr}$  kuru oleander yaprağı olarak bulunmuştur (Yong and Tho, 1976).

Nerium oleanderdeki kardiyak glikozidlerin tekrar araştırılması esnasında oleasid A-F (55-60) olarak isimlendirilen yeni kardenolidler ve müstesna bir aglükon parçası bulunmuştur. Aglükonun (oleagenin) yapısı  $3\beta$ -hidroksi-15 (14 $\rightarrow$ 8)abeo-5 $\beta$  (8R)-14-okso-kard-20 (22)-enolid (61) olarak tespit edilmiştir. Şeker kısımları ise D-diginoz (oleasid A), D-digitaloz (-B),  $\beta$ -D-glükosil-D-diginoz (-C), 4-O- $\beta$ -D-glükosil-D-digitaloz (-D),  $\beta$ -gentibiyosil-D-diginoz (-E) ve 4-O- $\beta$ -gentiyobiyosil-D-digitaloz (-F) olarak tayin edilmiştir (Abe and Yamauchi, 1979). Ayrıca yabani ve bahçivanlıkta kullanılan Nerium oleander yapraklarındaki kardiyak glikozidler hakkında kantitatif çalışmalar yapılmış ve her iki grup bitkide de oleasid A (55) ve ya gentibiyosil adinerin (62) ve oleasid E (59) bulunmuştur (Yamauchi et. al., 1983). Yine yabani ve yetiştirilen Nerium oleanderdeki yeni kardenolid glikozidler ve iridoidin



(63) yapıları ve kantatif dağılımları tartışılmıştır (Yamauchi, 1985). Ayrıca yeşil oleander (*Thevetia peruviana*), oleander (*Nerium oleander*) ve birçok bileşikteki kardiyak glikozidler tespit edilmiş; bunların tehlikeleri ve zehirlenmelere karşı alınacak tedbirler ortaya konmuştur (Radford et al., 1986). Aynı yıl taze yapraklardan kanerosid (64) ve neriumosid (65) ayrıştırılmıştır. Kimyasal ve spektral çalışmalar vasıtasıyla bunların yapıları sırasıyla

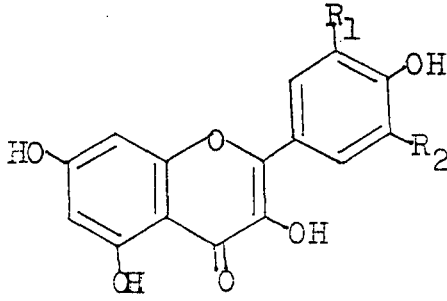
$3\beta$ -O-(D-diginosil)- $2\alpha$ -Hidroksi-8,14 $\beta$ -epoksi-5 $\beta$ -karda-16:17,20:22-dienolid ve  $3\beta$ -O-(D-diginosil)- $2\alpha$ , 14 $\beta$ -dihidroksi-5 $\beta$ -karda-16:17,20:-dienolid olarak bulunmuştur (Siddiqui et. al., 1986)



### 2.2.1. Nerium Oleanderdeki Diğer Bileşikler

Oleander yapraklarındaki flavonoid bileşiklerden olan kuersetin-3-rannoglikozid (66) ve kampferol (67) (Hörhammer et. al., 1956), %90 flovanal fraksiyonu olan rutin (6) (Goerlich, 1961) ve pembe ve beyaz çiçeklerinden rutin (6), kuersetin (68), kuersitrin (66) elde edilmiştir (Dominguez et. al., 1967).

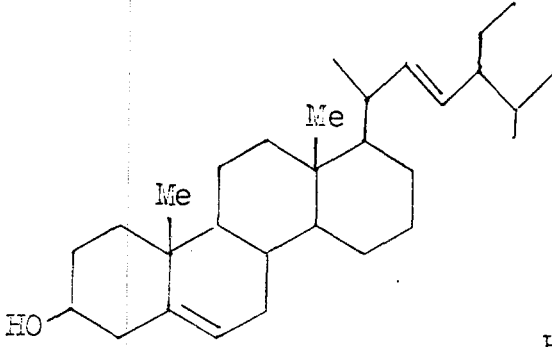
Nerium oleanderin kabuk ve yapraklarından dambonitol (60) (1,3-di-O-metil-miyo-inositol) ayrıştırılmıştır (Plovier, 1960; Kindl and Ostenhof, 1966).



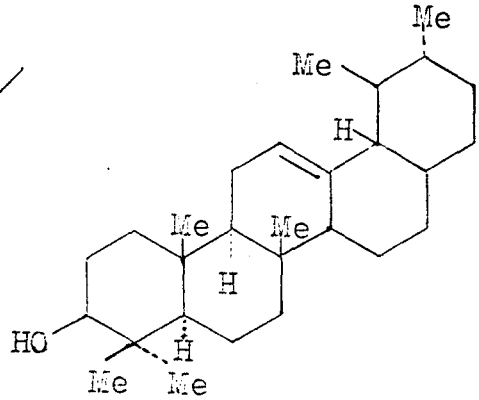
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Aglükon	Glikozid	
OH	H	Kuersetin	---	(68)
OH	H	Kuersetin	-3-O-ramnosid(Kuersitrin)	(66)
OH	H	Kuersetin	-3-O-rutinosid(Rutin)	(6)
H	H	Kampferol	-3-O-glükosid	(67)

Nerium oleanderin tohumlarının petrol eter özütünün sabunlaşma numarası ve kırılma indeksleri daha önce elde edilenlerle karşılaştırılmış ve tohumun yağında kaproik (70) kaprilik (71), kaprik (72), laurik (73), palmitik (74), oleik (75) ve stearik (76) asitlerin bulunduğu anlaşılmıştır (Dominguez and Villarreal, 1963). Çiçeklerin bir fraksiyonundan ise % 24 oleik (75), ~ % 21,5 palmitik (74), ~ % 11 linolenik (77), ve % 10 linoleik (78) asitler elde edilmiştir (Chiarlo, 1964).

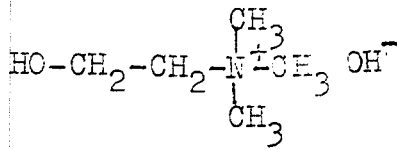
Karawya ve arkadaşları ise oleanderin ince dalları, kabukları, yaprakları ve çiçeklerinden  $\beta$ -stosterol (79), stigmasterol (80), kampesterol (81),  $\alpha$ -amirin (82), ursolik asit (7), kolin (83) ve şeker elde etmişlerdir (1970).



(80)

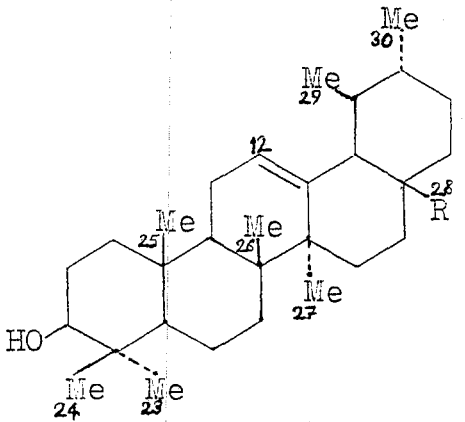


(82)



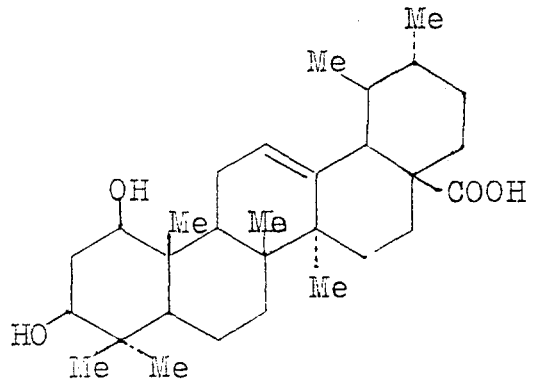
(83)

1986 yılında taze yapraklardan uvaol (84) ile birlikte kanerik asit(85) elde edilmiştir. Kanerik asitin (85) yapısı  $1\beta, 3\beta$ -dihidroksiurs-12-en-28-oik asit olarak saptanmıştır. O zamana kadar kaynağı rapor edilmeyen uvaolün (84)  $3\beta, 28$ -dihidroksi-12-ursen olduğu ispat edilmiştir(Siddiqui et. al., 1986).



(7) R=COOH

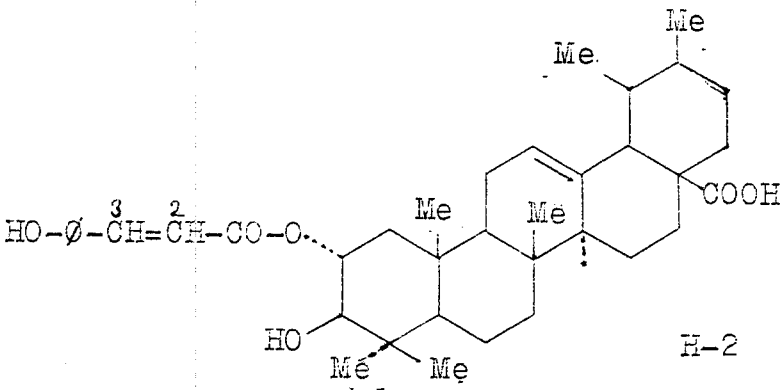
(84) R=OH



(85)



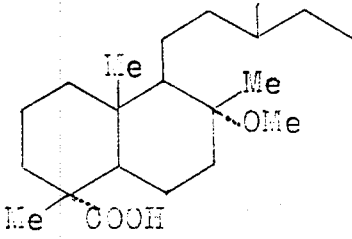
Taze yapraklardan iki yeni kumariloksi triterpenoid olan neriu kumarik (86) ve izoneriu kumarik asit (87) elde edilmiştir. Yapıları sırasıyla,  $3\beta$ -hidroksi- $2\alpha$ -cis-p-kumariloksi-urs-12-en-28-oik asit ve  $3\beta$ -hidroksi- $2\alpha$ -trans-p-kumariloksi-urs-12-en-28-oik asit olarak bulunmuştur (Siddiqui et. al., 1987). Ayrıca yeni bir labdan diterpen olan



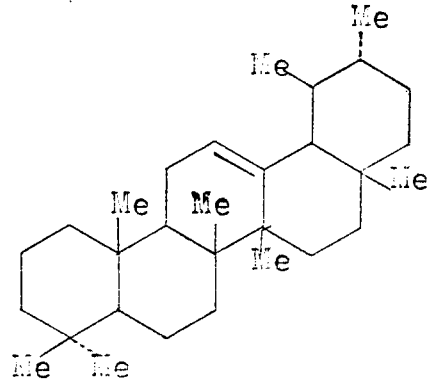
H-2 ve H-3 =cis (86)

H-2 ve H-3 =trans (87)

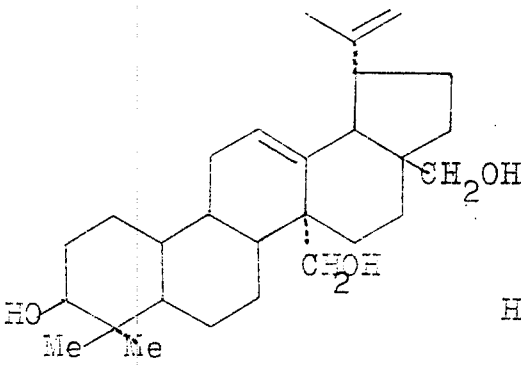
oleanderoik asit (88) ve triterpen olan oleanderen (89) elde edilmiştir (Siddiqui et. al., 1988). Pentasiklik bir triterpen olan oleanderol (90) ve betulin (91), betulinik asit (92), ursolik asit (7) ve oleanolik asit (93) elde edilmiş ve yapıları tespit edilmiştir (Siddiqui et. al., 1988). Yine pentasiklik triterpenlerden kanerin (94) ve 12-13-dihidroursolik asit (95) elde edilmiş ve yapıları sırasıyla 24-nor- $3\beta$ ,5-dihidroksiursa-4(23), 18-dien-28-oik asit ve  $3\beta$ -hidroksiursa-28-oik asit olarak bulunmuştur (Siddiqui et. al., 1989).



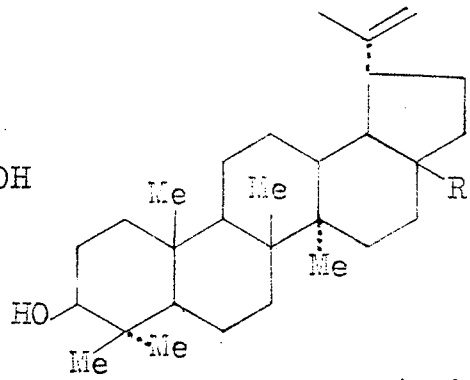
(88)



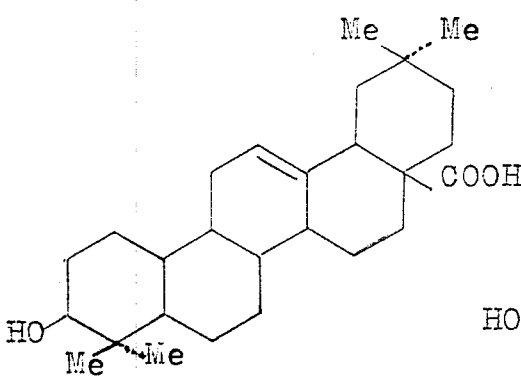
(89)



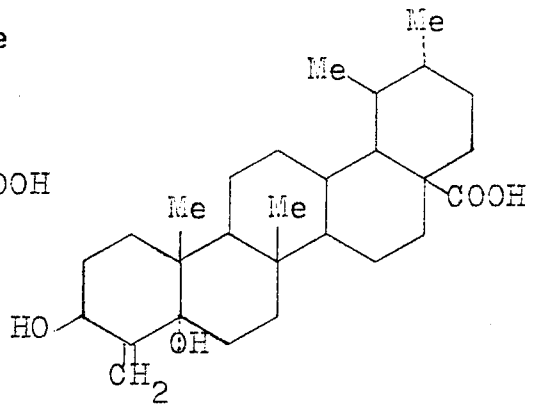
(90)

R=CH<sub>2</sub>OH (91)

R=COOH (92)



(93)



(94)

### 3. KARDİYAK GLİKOZİDLERİN TANINMASI

Bu maddelerin tespit edilmesi için genellikle kromatografik yöntemler uygulanmıştır. Ayrıca bu yöntemler kardiyak glikozitlerin biyokimyasının ve kimyasının anlaşılmasına yardım etmiştir. Önceleri kağıt kromatografisi kullanılmıştır. Fakat daha sonradan ince tabaka kromatografisinin geliştirilmesi ile kağıt kromatografisi yerini ince tabaka kromatografisine (İTK) terk etmiştir. Şu anda her iki yöntemde en polar olanından en az polar olanına kadar bütün kardiyak glikozitleri için kullanım alanı bulunmaktadır. Bitkilerden elde edilen kardiyoaktif ilaçların glikozit karışımlarının karmaşıklığı düşünüldüğünde, ince tabaka ve kağıt kromatografi tekniklerinin bir arada kullanımı analize yardımcı olur. Genelde iyi bu ince tabaka ve kağıt kromatografi sistemi ile kardiyak glikozitlerin ayrılma kalitesi ve yinelenbilirliği yeterlidir.

İnce tabaka sistemlerinin polarite bölgesi normal kağıt kromatografi sisteminden iki kat daha fazladır. Diğer taraftan kağıt kromatografi sistemlerinin düşük polarite bölgeleri steroid çekirdeğine bağlı fonksiyonel grupların büyük etkisinin sonucudur. İnce tabaka kromatografisinin belkide en önemli avantajı yüksek kapasite limiti arasındaki orandır, yani madde en düşük tayin limitinde olup, kuyruk yapmadan yürü-

mektedir. Bu da çok düşük derişimlerde bulunan glikozidlerin de gözlenmesini mümkün kılar. Bunlara ilaveten ince tabaka kromatografisinin yüksek kapasitesi, kalın silika plakaları kullanılarak arttırılabilir (Halpaap, 1965).

Farmakolojik yönden kardiyak glikozitlerin kromatografik analizi için aşağıdaki üç ana problemin halledilmesi ön şarttır.

- a) İnsan ve hayvan tarafından bufadionolidlerin ve karde-nolidlerin transformasyonu, dağılımı ve alınma miktarının araştırılması.
- b) Bitkiden elde edilen saf glikozidlerin kararlılığı ve üretim kontrolü veya kısmî sentezi.
- c) Bitkilerin depolama şartlarını ve harmanlama şartlarını geliştirmek, bitkinin büyümesini kontrol etmek için kardiyak glikozidlerin oluşum ve parçalanmasının araştırılması.

Son nokta kardiyoaktif bitki ilaçlarının kimyasal tanımının esas kısmını oluşturur. Kromatografi; oldukça zor zaman alıcı ve güvenilir olmayan biyolojik yöntemi, gerçek kimyasal yöntemle değiştirir. Bu konuda son otuz kırk yıl içinde pek çok başarılı atılımlar olmuştur.

Biyolojik yöntemler ilacın toksikliğini ölçmeye dayandığından ilaç bitkisinin biyolojik aktivitesi hakkında doğrudan bilgi alınmasına izin verir. Kardiyak glikozidlerinin; kimyasal tanımlarının sonuçları, karışımdaki her bir bileşenin ayrıntılı tedavi etme unsurları bilinmeden sınırlı bir kullanım alanları vardır.

Kromatografik yöntemle steroid hormonlarının yapı tayini uzun yıllardan beri başarıyla uygulanmıştır (Bush, 1964-65). 1966 yılında Kaiser kardiyoaktif bitki ilacının içindeki karmaşık glikozid karışımının ayrıntılı kimyasal analizi hakkında

bilgi vermiştir. Daha sonra bu konu hakkında yoğun araştırmalar yapılmıştır (Nover, 1967; 1969; Nover et. al., 1968,1969). Genelde steroid türevleri değişik süstitüsyonlarla farklı bileşenlerin oluşmasıyla karakterize edilirler. Ayrıca minimum derişimlerdeki türlü değişik biyolojik etkileri ile de ayırt edilebilirler. Bu iki özellik kromatografik yöntemlerle ayrılmalarını sağlar.

### 3.1. Belirteçler

Kardiyak glikozidlerin kromatogramdaki yinelenebilir renkli reaksiyonlarını gözlemek için çeşitli reaktifler (belirteç) kullanılır. Bilinen kardenolid ve bufadienolidleri tayin etmek için kullanılan 49 belirteçten 10 tanesi oldukça kullanışlıdır. Kardiyak glikozidleri için renk verici belirteçler dört gruba ayrılır.

- a) Kardenolidlerin bufadienolid halkasının reaktivitesine bağlı belirteçler.
- b) Steroid çekirdeğine saldıran belirteçler.
- c) Karbonhidrat ile reaksiyona giren belirteçler.
- d) Çoklu noktadan saldıran belirteçler.

a) Pek çok aromatik nitro bileşikleri bazik ortamda kardenoidler için kırmızıdan menekşeye renk verir. Reaksiyon bufadienolid halkasındaki aktif metilen grubuna bağlıdır (Canback, 1950; Tatje, 1958). Diğer doğal ürünler de ( $\beta$ -Thujone, piperidtenone, benzailaseton) aynı şekilde reaksiyon verir. Bu türde kullanılan en yaygın reaktif alkali 3,5-dinitrobenzoik asit (Kedde reaktifi)dir. Metadinitronaftalen (Frerejacque, 1951) ve 2,4,2',4'-Tetranitrodifenil (Maui et. al., 1957). Kedde reaktifinden daha hassastır, fakat

karanlıkta yok olurlar. Nedeni ise butenolid grubunun alkali ile yavaş sabunlaşma reaksiyonu vermesidir.

b)  $C_{16}$ 'da oksijen fonksiyonlu glikozidler ve geninler, örneğin gitoksigenin (96), gitaloksigenin (97), oriontregenin (98), diginatigenin (99), adonitoksigenin (101) ve türevleri kuvvetli asit ile (fosforik, hidroklorik, trikloroasetik asit) 14,16-dianhidro türevlerini 365 nm'lik uv ışığında koyu mavi floresan rengiyle verirler.

c) 2-Deoksi şekerlerinin reaktiviteleri oldukça hassas ve özel bir gözlem yolu olan ksanthidral reaktifi ile (Pesez, 1952) anlaşılır. Serbest 2-deoksi şekerleri için lâl renginde kırmızı renk oluşur. Reaksiyon açillenmiş 2-deoksi şekerleri için daha az hassasdır. Dördüncü konumda şeker varsa negatifdir.

d) Bu gruptaki reaktiflerin davranış modunun diğer üç reaktifler kadar belirgin olmamasına rağmen kardiyak glikozidlerinin gözlenmesinde oldukça önemlidirler. Kloramin T-Trikloro asetik asit (Jensen, 1953) tarafından uygulanmış ve Kaiser (1955) tarafından modiliye edilmiştir. Steroid çekirdeğindeki oksitlenme ve dehidrotasyon reaksiyonları floresan ürün verir. Görünür ışıkta gri-yeşil nokta serbest ve bağlı 2-deoksi şekerleri için gözlenir (Gregg-Gisuold reaksiyonu). 365 nm'lik uv ışığı altında  $C_{16}$  veya  $C_{12}$ 'de OH veya açiloksi grubu içeren bufadionolidler parlak mavi veya çelik mavisi renk gösterirler. Diğerleri sarı renkte gözlenir. 14- $\beta$ -hidroksi grubu içermeyen bazı bufadionolidler ve bazı sentetik kardenolidler negatif cevap verirler. Antimontriklorür (Carr and Price, 1926) yukardaki reaktife benzer sonuçlar verir, ancak onun kadar uygun değildir.

Vanilin-perklorikasit reaktifi (Mcclennan et. al., 1959)

ve p-Anisoldehit-perklorikasitin (Sjöholm,1962) ince tabaka kromatografisi için önemli olduğu belirtilmiştir. Vanilin perklorikasit 2-deoksi şekerlerin kağıt kromatografisinde gözlenmesi için önerilmiştir. Kardenolidlere ve bufadienolidlere uygulanması test edilen maddenin kimyasal yapısına bağlı olarak çok fazla sayıda renk verir. Kromatogramlar 15 dakika sıcak havada ( $50^{\circ}\text{C}$ ) kurutulunca özel renk sıraları elde edilir. Bunlar kromatogramın kurutucu fırında ısıtılması sonunda elde edilen renklerle birlikte maddenin tanımında kullanılabilir. Ancak deney şartlarındaki ufak değişikliklerin ve derişimin önemli etkisi olduğu unutulmamalıdır. UV ışığında kloramin-T de gözlenen floresan olayı vanilin-perklorikasitte de hemen hemen aynı şekilde gözlenir. Paranisol aldehit, Vanilin-perklorikasite benzer. Her iki reaktif de oldukça yaygın olarak kullanılan belirteçlerdir. Bunların yerine vanilin-fosforikasit, p-anisoldehitsuülfürikasit, furfuralülfürikasit de kullanılabilir (Frerejacque and De Graeve, 1963; Krebs et. al., 1967; Waldi 1965). Fauconnet ve Waldesbühl tarafından digitoksigenin (1), gitoksigenin (35), digoksigenin (102), diginatigenin (99), gitalokgenin (97)'lerin digitalis glikozidlerinin ayırımını hızlandırmak için ince tabaka kromatografisinde fosforik asit-Br ve KBr,  $\text{KBrO}_3$  ve HCl karışımının kullanılması önerilmiştir. Gözlemede ilk işlem seyreltik fosforik asidin uygulanmasıdır, UV ışını altında (35), (99) ve (97) serisindeki üyeler mavi noktalar halinde görülür. Çünkü dianhidrol türevleri oluşur. İkinci basamakta sıcak kromatogramlara aktif krom içeren çözeltili ihtiyatla püskürtülür. Bu işlemde sonra kısa dalga boyu UV ışını altında (1) serisindeki glikozidler, (35),(102) ve (97) serisindekiler gri-yeşilden gri-maviye kadar, (99) serisindekiler ise parlak mavi olarak gözlenirler.

Pekçok durumda yukarıda bahsedilen reaktiflerden birisinin kullanılması yeterlidir. Ksanthidrol hemen hemen hepsi için eşdeğer uygunluktadır. Ancak birden fazla reaktifin aynı kromatograma uygulanması hem faydalı hem de bazı durumlarda gerekli de olabilir. Bu işlemlerde kloramin-T, ksanthidrol ve 3,5-dinitrobenzoik asit reaktifleri kullanılarak (Nover, 1967) glikozidler, geninler ve serbest 2,6-dideoksi şekerlerin ayrımı mümkün olabilir. İki maddenin tanımının birden fazla sistemde anlaşılması oldukça zor bir işlemdir. Bu yüzden farklı renk verici maddelerin uygulanması tercih edilir. Ayrıca yukarıda bahsedilen reaktif sırasının kullanılmasına ilaveten p-anisaldehit perklorikasit veya vanilin-perklorik asit reaktifleri ile birlikte % 84'lük  $H_2SO_4$  tavsiye edilir. Bahsedilen son reaktif Von Ew tarafından ilk defa kristal maddelere karşı uygulanmıştır. Bu reaktifin ince tabaka kromatografisi ile maddelerin tespitinde kullanılması mümkündür, ancak günlük çalışmalarda gözleme reaktifi olarak kısıtlı kullanım alanı vardır. İnce tabaka kromatografisinde gözlenen renk sırası ile kristal maddede gözlenen farklıdır. % 84'lük  $H_2SO_4$ 'ün uygulanmasıyla UV (365 nm) ışını altında kolayca floresans özelliği gösteren renkler verir.

Şu ana kadar tartışılan gözleme ve tanıma reaktiflerine ilaveten doğal ürünlerin bazılarının varlığı veya yokluğu ve kısmî yapıları hakkında değerli bilgiler veren özel bir renk testi vardır. Keton grubunun varlığı 2,4-dinitrofenilhidrazonların oluşumu ile; cis-diol gruplarının varlığı sodyum metaperiyodat-benzidin (Waldi, 1965) ile, sodyum meta periyodat-p-nitroanilin (Frerejacque, 1960), kurşun tetra asetat (Sampson et.al., 1961; Wright, 1963) veya benzer reaktiflerle ortaya çıkabilir.

Ester gruplarının sabunlaşması  $FeCl_3$ 'lü hidroksamikasit çözeltisi (Frerejacque, 1965) ile, biyolojik olarak aktif olan



17 $\alpha$ H- ve inaktif olan 17 $\beta$ H- kardenolidleri arasındaki ayırımı Br-formik asit ile anlaşılır (Frerejacque, 1969).

### 3.2. Kardiyak Glikozidlerin Kantitatif Analizi

Kromatografik ayırma işleminden sonra kardiyooktif glikozidlerin kantitatif analizi için elverişli bir çok belirteç vardır. Eğer tekrarlanabilir sonuçlar alınması isteniyorsa kantitatif analiz için aşağıdaki şartların sağlanması gerekir.

i- Tayin edilecek bileşikler kromatografik yöntemle yürütüldükten sonra tam olarak lokalize edilmelidir. Kağıt kromatografisinde bir kaç istisna ile (Brockelt, 1963; Tschesche et al., 1960) bu genellikle ilgili başlangıç noktasının her iki yanından bir test karışımı geçirilerek yapılır. Belirteç ile muamele edilmiş "öncü şeritler" kesilir ve ana kromatogram üzerindeki eşdeğer bölgeler öncü şeritler üzerindeki miktarlara göre işaretlenir. Eğer kromatogram iyi yürütülmezse veya birbirinden ayrılmış çeşitli bölgeler birbirine çok yakınsa güçlüklerle karışılırlar. İTK için floresan boyalar içeren sorban materyallerinin yürütülmesi bufadienolid içeren bir çok ürünle ilgili durumu kayda değer miktarda düzeltir. Çünkü UV ışığı altında bunlar çok küçük miktarlarda olsa bile parlak floresan zemin üzerinde siyah bölgeler halinde gözlenebilirler.

Kardenolidlerin absorpsiyon maksimumları ise yalnızca kırsadalga boylu UV bölgesinde (220 nm) gözlenir. Tanınma limiti nispeten yüksektir.

ii) Bu şart kromatografik sistemin özellikleriyle ilgilidir. Analiz edilecek karışımın her bir bileşiğinin tamamen ayrılması ve renk testinde karışıklığa yol açabilecek tüm refakatçi madde-

lerin uzaklaştırılması gerekir. Kuyruklanma önemli ölçüde kayıplara neden olabilir. Bu yüzden İTK için deaktive tabakaların ve su içeren çözücü sistemlerinin kullanılması tavsiye edilir. Ayrıca kromatogramların kantitatif analiz için daha ileri adımlara götürülmesinden önce çözücü sistemlerinin bütün kısımları dikkatlice uzaklaştırılmalıdır. Bu alandaki zorluklar bazen kağıt kromatografisinde formamid ile doyurma durumunda ortaya çıkar (Wichtl and Fuchs, 1962; Rabitzsch and Jungling, 1969). İyi kromatografik sistemlerle kardiyak glikozidlerin belirlenmesi % 90 dan aşağı değildir. Ancak optimal şartlarda bile % 100'e ulaşamaz. Bu etki bilinen miktarlarda frekans maddelerinin kromatografisini içeren, analitik bir işlemle elde edilen kolikrasyon eğrilerindeki ekstinksiyon (soğurma), değerlerinin okunması ile en iyi biçimde ortadan kaldırılır.

Genellikle materyal tarafından (kağıt, silikajel, sorblanan maddelere renk verici reaktifi direkt olarak tatbik etmek mümkündür. Bu yüzden renk oluşumu ve yıkayarak ayırmanın tek basamakta gerçekleşmesi mümkündür. Kolorimetri işleminden önce taşıyıcı madde dekantasyon, filtrasyon veya santrifüj işlemleri ile kolayca ayrılabilir. Özellikle işaret edilen iki durum hariç bu işlem aşağıda verilen tüm durumlar için uygundur. Kağıt kromatografisi yöntemi kullanılmış ise tayin edilecek kardiyak glikozidleri içeren bölgeler küçük parçalar halinde kesilir. İTK kromatogramları da küçük parçalara bölünür ve elverişli reaksiyon kaplarına aktarılır. Bu şekilde, hazırlanan kromatografik bölgelerden örnek olarak bahsedilecektir. Kolorimetre içinde frekans değer kabaca eşdeğer miktarda, ancak kardenolid ve bufadienolid içermeyen taşıyıcı madde kullanılarak aşağıda gösterilen yöntemlerle hazırlanır.

- i) 2-Deoksiglikozidlerin Ksanthidrol Reaktifi ile Tayini (Pesez, 1952; Tschesche *et.al.*, 1960):

Örnek 5 ml ksanthidrol reaktifi ile (10 mg ksanthidrolun 100 ml % 96'lık  $\text{CH}_3\text{COOH}$  ve  $\text{HCl}$  içinde taze hazırlanmış çözeltisi)  $40^\circ\text{C}$ 'da 10 dk. bekletilir. Daha sonra kaynayan bir su banyosunda 3 dk. tutulur. Sonra buzlu su ile  $20^\circ\text{C}$ 'ye soğutulur. 530 nm'de parlak kırmızı bir renk oluşur (Kaiser et. al., 1957).

ii) Kardenolidlerin 3,5-dinitrobenzoik asitle tayini (Kedde, 1947; Tatje, 1957):

Örnek kapalı bir kaptaki 2 ml alkolle 10 dk. dikkatlice çalkalanır. Daha sonra 2,5 ml % 2'lik alkolik 3,5-dinitrobenzoik asit çözeltisi ve 0,5 ml, 1,5 NaOH eklenir. Bu reaksiyon Brockelt (1963) tarafından kağıt kromatografisinde k-stsophanthin (103), ouabain (104) ve digitoksin (105) ve Görlech (1961) tarafından İTK ile Nerium oleanderin kimyasal değerlendirmesi için, Reissbrodt (1969) tarafından ise İTK'da Corvallaria majaksin incelenmesi için kullanılmıştır.

iii) Kardenolidlerin pikrik asitle tayini (Baljet, 1918, Fucks et.al., 1958):

Örnek kapalı bir test tüpüne konur. Ara sıra çalkalanarak 3 ml metanol ile 2 saat özütlemeye tabi tutulur. 3 ml taze hazırlanmış Baljet reaktifi ( 5 ml %1'lik sulu pikrikasit 5 ml %10 NaOH) eklenir ve kantitatif analiz için kullanılır.

iv) Kardenolidlerin 2,4,2',4'- tetranitrodifenil ile tayini (Rabitsch ve Jungling, 1969; Rabitsch and Tambor, 1969):

Örnekler karanlıkta 2 ml alkol %0,15'lik etanolde tetranitrodifenil çözeltisi ve 0,8 ml sulu 0,15 N NaOH'dah oluşan bir karışımda 25 dk. inküle edilir. 630 nm'de pik okunur. İTK ile analizde maddeler önceden kullanılan düşük alkali de-

siminden dolayı kloroform metanol ile ilave edilmelidir. Çözücü buharlaştırıldıktan sonra kalan maddede normal yolla reaksiyon gerçekleştirilir.

Bu üç yöntem bütenolid halkasının reaktivitesine bağlıdır. Tetranitrodifenil yöntemi en duyarlısı gözükmekle beraber şu ana kadar yalnızca digitoksin (105) için kullanılmıştır. Genelde her üç yöntemin de etkinliği, reaksiyon hızının ve molar ekstinksiyon sabitinin kimyasal yapıya bağlı olması gerçeği ile sınırlıdır (Canback, 1950). Bütenolid halkasına komşu süstitüent içeren maddeler, 16-süstitüye olmamış türevlerinden daha düşük molar ekstinksiyon sabitlerine sahiptirler. 16-keto grubu olan gitoksigenin (35) ise reaksiyona hiç girmemiştir. (Tschesche ve Grimmer, 1960).

v) Bufadienolidlerin UV absorpsiyonu ile tayini (Steidle, 1963; Wichtl ve Fuchs, 1962):

Maddeler 5 ml metanol'de 1 saat çalkalanarak sorbandan ilave edilir. Süzme veya santrifüjlemeden sonra metanol çözeltilisinin 4 ml'sine 1 ml. 5 N KOH eklenir. 2 dk. sonra maksimum ekstinksiyona ulaşılır. 355 nm'de ölçüm yapılır ( $\log = 4,62$ ).

Bu yöntem Wicht ve Fuchs tarafından Urgunea maritima örneklerinin kağıt kromatografisi değerlendirilmesinde önerilmiş ve Steidle tarafından geliştirilecek aynı bitkinin İTK'sine uyarlanmıştır (1962).

vi) Kardiyak glikozidlerin reaksiyon ortamında tayini :

Gitoksigenin (35) digitoksigenin (1) türevlerinin flourometrik tayini Jelliffe ve Seipel ve arkadaşları tarafından ortaya konmuş olup strophanthus kombe glikozidlerinin doğrudan tayininde kloramin T-trikloroasetikasit reaktifi ile elde

edilen floresan renkler kullanılmıştır (1968) Doelker ve arkadaşları üç belirleme reaktifini kardiyak glikozidlerin İTK'da reaksiyon ortamında değerlendirmesinin uygulanabilirliğini test etmişlerdir (1969). Bunlar:

- a) p-toluensülfonikasitle deęiřtirmede ksanthidrol ile reaksiyonu (Bartos, 1963).
- b) 2,4,2',4'- Tetranitrodifenil ile reaksiyonu
- c) Askorbik asit ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'lu HCl içeren p-toluensülfonikasit ile reaksiyonu

şeklinde sıralanabilir ve her üç metodlada tatmin edici sonuçlar alınmıştır.

#### 4. ÇALIŞMANIN AMACI

1988 yılında bir Türk doktoru olan Ziya Özel tarafından Nerium oleanderden elde edilen NO bileşiminin ümit kesilmiş kanser hastalarının tedavisi için kullanıldığı ve büyük bir oranda olumlu sonuç alındığı TV ve diğer yayın organları vasıtasıyla duyurulmuştur. Bu haber bazı kanser hastalarının yanlış ve bilinçsiz bir şekilde bu maddeyi denemelerine veya halihazırda yapılan tedavileri reddetmelerine yol açmıştır. Sonuçta bir çok tartışmalara neden olmuştur.

Bu konuya olumlu veya olumsuz yaklaşan her iki tarafında haklı tarafları olmakla birlikte, bilimde ön yargıya yer yoktur ve temelinde şüphe yatmaktadır. Her ne kadar Nerium oleanderin kanser tedavisinde kullanıldığına dair bir yayın bulunmamasına rağmen antikanser ajanı içerdiği iddia edilmiştir (Perdue, 1976).

Bu yüzden bu konuya bir katkıda bulunabilmek amacı ile Nerium oleander hakkında araştırma yapmaya karar verdim ve çalışmalarımı oleanderdeki kardiyak glikozidleri üzerinde yoğunlaştırdım.

## 5. DENEL BÖLÜM

### 5.1. Kullanılan Bitkiler ve Çözücüler

Deneyde Akdeniz Bölgesinden (Toroslardan) toplanan zakkum (beyaz çiçekli) bitkisinin yaprakları kullanılmıştır.

Çözücü olarak metanol, etanol, eter etil asetat, benzen ve petrol eteri kullanılmıştır. Metanol ve etanol kullanılmadan önce damıtılmıştır.

### 5.2. Kullanılan Belirteçler (Reaktifler)

#### i- Kedde Reaktifi :

Taze hazırlanmış 5 ml %3'lük etanolik 3,5-dinitrobenzoik asit 5 ml 2 M NaOH ile karıştırılır. Plakaya 5-8 ml karışım püskürtülür. Kardenolidler pembe veya mavi menekşe rengi oluştururlar. Buradienolidler reaksiyona girmezler.

#### ii- Antimon (III) Klorür Reaktifi :

$SbCl_3$ 'ün %20'lik  $CHCl_3$  çözeltisi hazırlanır ve plakaya 15-20 ml reaktif püskürtülür. 5-6 dk.  $100^{\circ}C$ 'de ısıtılır. Kardenolid ve bufadienolidler reaksiyon verir. Görünür veya UV-365 nm'de renk gözlenir.

iii- Sülfürük Asit Reaktifi :

- a) %5 veya %10'luk etanolik  $H_2SO_4$
- b) %50 etanolik  $H_2SO_4$
- c) Derişik  $H_2SO_4$

hazırlanır ve plakaya püskürtülür. Plaka  $100^{\circ}C$ 'de 3-5 dk. ısıtılır. Görünür ve UV-365 nm'de renkler gözlenir. Derişik  $H_2SO_4$  ile renkler hemen gözlenir.

### 5.3. Maddelerin Fiziksel Verilerinin Saptanması

UV spektrumları 150-20 Hitachi spektrofotometer (Anadolu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi) ile alınmıştır.

IR Spektrumları, 270-30 Hitachi spektrofotometer (Anadolu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi) ile alınmıştır.

Nmr Spektrumları alınamamıştır.

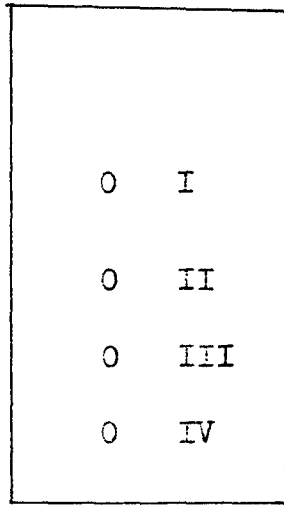
İnce tabaka kromatografisi için Merck Kieselgel (EF.254.60) tipi kullanılmıştır. Analitik çalışmalar için, 0,25 mm, preparatif çalışmalar için 0,75 mm kalınlığında plakalar kullanılmıştır.



## 6. DENEYSEL ÇALIŞMA

### 6.1. Nerium Oleanderin Sıcakta Özütlenmesi

Kurutulmuş ve öğütülmüş olan 30 gr oleander yapraklarının üzerine MeOH konularak sıcakta özütlenme yapıldı. Elde edilen özüt üzerine eter ilâve edilerek PH değeri tespit edildi ve bazik oluncaya kadar %4'lük  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  eklendi. Bu karışıma su ilave edilerek organik (I) ve su (I) fazları ayrıldı. Daha sonra su (I) fazını asidik yapmak için %10'luk HCl eklendi ve tekrar eter ile iki faz oluştururdu. Organik (II) ve su (II) fazları elde edildi. Her iki organik faz  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ile muamele edildi. Organik çözücüler uzaklaştırıldıktan sonra kalan katı maddelerden organik (I) analitik İTK'ya ( $\text{SiO}_2$ , EtOAc- $\text{C}_6\text{H}_6$ , 2:8) tabi tutuldu ve 4 tane nokta elde edildi. Rf değerleri hesaplandı ve belirteçler ile muamele edildi. Çizelge 6.1 ve 6.2 Madde II ve IV'de esas noktaya yakın bölgede başka maddeler de gözlemlendi. Daha sonra preparatif İTK ( $\text{SiO}_2$ , EtOAc- $\text{C}_6\text{H}_6$ ; 2:8) ile maddeler ayrıştırıldı ve IR, UV spektrumları alındı. Aşağıda madde (III ve IV)'ün spektrumlarınının değerleri sırasıyla verilmiştir.



Şekil 6.1. Analitik İTK'daki madde I, II, III ve IV.

Çizelge 6.1. Madde I, II, III ve IV'ün görünür ve UV ışınlarındaki renkleri ve  $R_f$  değerleri.

Madde	Görünür	UV-kısa $\lambda$	UV-uzun $\lambda$	$R_f$
I	Yeşil	Koyu pembe	Koyu yeşil	0,62
II	-	Açık pembe	-	0,46
III	-	-	Mor	0,18
IV	-	Parlak mavi	Morumsu	0,054

Çizelge 6.2. Madde I, II, III ve IV'ün belirteçler ile renk reaksiyonu.

Madde	Kedde	Der. $H_2SO_4$	$SbCl_3$
I	Yeşil	Menekşe rengi	Yeşil
II	-	Pembe	Kahverengi
III	-	Beyazımsı leke	Açık kahverengi
IV	-	Mavimsi	Kirli sarı

## Madde I:

Madde miktarı çok az olduğu için verim ve erime noktası tayini yapılmadı.

IR (KBr),  $\nu_{\max}$ : 3435 (-OH), 2920, 2850 (-CH<sub>3</sub> ve >CH<sub>2</sub> gerilimi), 1725 (konjuge -COOH veya >C=O), 1620, 1610, (konjuge çift bağ), 1468 (>C-H deformasyonu), 1380 cm<sup>-1</sup> (-CH<sub>3</sub> simetrik deformasyonu) (Şekil 6.2.).

UV (MeOH) ,  $\lambda_{\max}$ : 239, 256, 268, 324, 374 nm (Şekil 6.3).

(HCl) ,  $\lambda_{\max}$ : 240, 252, 261, 271, 315, 345 nm (Şekil 6.3).

(NaOH),  $\lambda_{\max}$ : 241, 260, 272, 288, 322, 369 nm (Şekil 6.3).

## Madde II:

Verim : % 1,683

Erime Noktası : 148-151°C

IR (KBr),  $\nu_{\max}$ : 3440 (-OH), 2940, 2875 (-CH<sub>3</sub> ve >CH<sub>2</sub> gerilimi) 1730 ve 1720 (konjuge -COOH veya >C=O), 1479 (-CH deformasyonu) 1395 (-CH<sub>3</sub> simetrik deformasyonu), 1158 cm<sup>-1</sup> (C-OH) (Şekil 6.4).

UV (MeOH),  $\lambda_{\max}$ : 238, 278 nm (Şekil 6.5).

(HCl),  $\lambda_{\max}$ : 239, 270, 280, 338 nm (Şekil 6.5)

(NaOH),  $\lambda_{\max}$ : 238, 256, 278, 286, 318, 335, 362 nm (Şekil 6.5)

## Madde III:

Verim : % 2,97

Erime Noktası : 229-231°C

IR (KBr),  $\nu_{\max}$ : 3430 (-OH), 2940, 2875 (-CH<sub>3</sub> ve >CH<sub>2</sub> ge-

rilimi), 1698 (konjuge  $-COOH$  veya  $>C=O$ ), 1462 ( $\Rightarrow CH$  deformasyonu) 1390 ( $-CH_3$  simetrik deformasyonu), 1268, 1180 ve 1025 ( $C-OH$ ),  $\sim$  1000  $cm^{-1}$  ( $>C=CH_2$ ) (Şekil 6.6.).

UV (MeOH),  $\lambda_{max}$ : 240,249,259,272,279,314,338 nm (Şekil 6.7)

(HCl),  $\lambda_{max}$ : 240,249,259,280,318,337 nm (Şekil 6.7.),

(NaOH),  $\lambda_{max}$ : 240,251,264,281,331 nm (Şekil 6.7.).

Madde IV:

Verim : % 0,42

Erime Noktası : 129-131°C

IR (KBr),  $\nu_{max}$ : 3440 ( $-OH$ ), 2940,2880, ( $-CH_3$  ve  $>CH_2$  gerilimi), 1690 (konjuge  $-COOH$  veya  $>C=O$ ), 1610 (konjuge çift bağ), 1520 ( $>NH$ ), 1460 ( $-CH_3$  bükülme), 1390 ( $-CH_3$  simetrik deformasyonu), 1260 ( $-OH$  bükülmesi), 1170,1140 ve 1000  $cm^{-1}$  ( $>C=CH_2$ ) (Şekil 6.8).

UV (MeOH),  $\lambda_{max}$ : 236,301,313 nm (Şekil 6.9)

(HCl),  $\lambda_{max}$ : 236,301,313 nm (Şekil 6.9).

(NaOH),  $\lambda_{max}$ : 239,286,297,310,359 nm (Şekil 6.9).

## 6.2. Nerium Oleanderin Soğukta Özütlenmesi :

Kurutulmuş ve öğütülmüş 63 gr oleander yaprakları EtOH kullanılarak soğukta özütlendi ve 6.1'deki yöntem aynen uygulandı. Organik fazın (I) İTK'si ( $SiO_2$ , EtOAc- $C_6H_6$ , 2:8) sonunda 14 nokta elde edildi ve maddelerin çokluğu nedeni ile işlem bu aşamada bırakıldı.

### 6.3. Nerium Oleanderden Ursolik Asit Eldesi :

Ursolik asit eldesi Siddiqui yöntemine göre yapıldı (1987). Öğütülmüş Nerium oleander yapraklarının (170 gr) MeOH'deki özütü etil asetat ve su ile partisyona uğratıldı. Etil asetat fazı %4'lük sulu  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ile muamele edildi. Nötr fraksiyonu içeren etil asetat fazı yıkandı.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ile kurutuldu ve aktive kömür ilave edildi, süzüldü ve kömürü sırasıyla etil asetat ve metanol: benzen (1:1) ile yıkandı. Etil asetat süzütüsü petrol eterinde çözünen ve çözünmeyen kısımlara ayrıldı. Petrol eterinde çözünmeyen kısım MeOH'da çözümlenerek soğukta bırakıldı. Beyazımsı kristaller oluştu (Urs-I), 0.25908 gr madde elde edildi.

Aynı şekilde 135 gr yaprak ile paralel bu çalışma yapıldı (Urs-II) ve 0,04185 gr madde elde edildi. Her ikisinin IR ve UV spektrumları alındı.

Urs-I :

Verim : %15,24

Erime Noktası : 180-182°C [Kaynak 278°C (Men and Pourrat 1952)].

IR (KBr),  $\nu_{\max}$  : 3430 (-OH), 2925, 2850 ( $-\text{CH}_3$  ve  $>\text{CH}_2$ - gerilimi), 1698 (konjuge  $-\text{COOH}$  veya  $>\text{C}=\text{O}$ ), 1460 ( $-\text{CH}_3$  bükülme), 1390  $\text{cm}^{-1}$  ( $-\text{CH}_3$  simetrik deformasyonu) (Şekil 6.10).

UV (MeOH),  $\lambda_{\max}$  : 237, 261, 269, 279, 311, 331 nm (Şekil 6.11)

(HCl),  $\lambda_{\max}$  : 238, 270, 278, 316 nm (Şekil 6.11),

(NaOH),  $\lambda_{\max}$  : 238, 268, 277, 285, 358 nm (Şekil 6.11).

Urs-II :

Verim : %3,1

Erime Noktası: 179-181°C

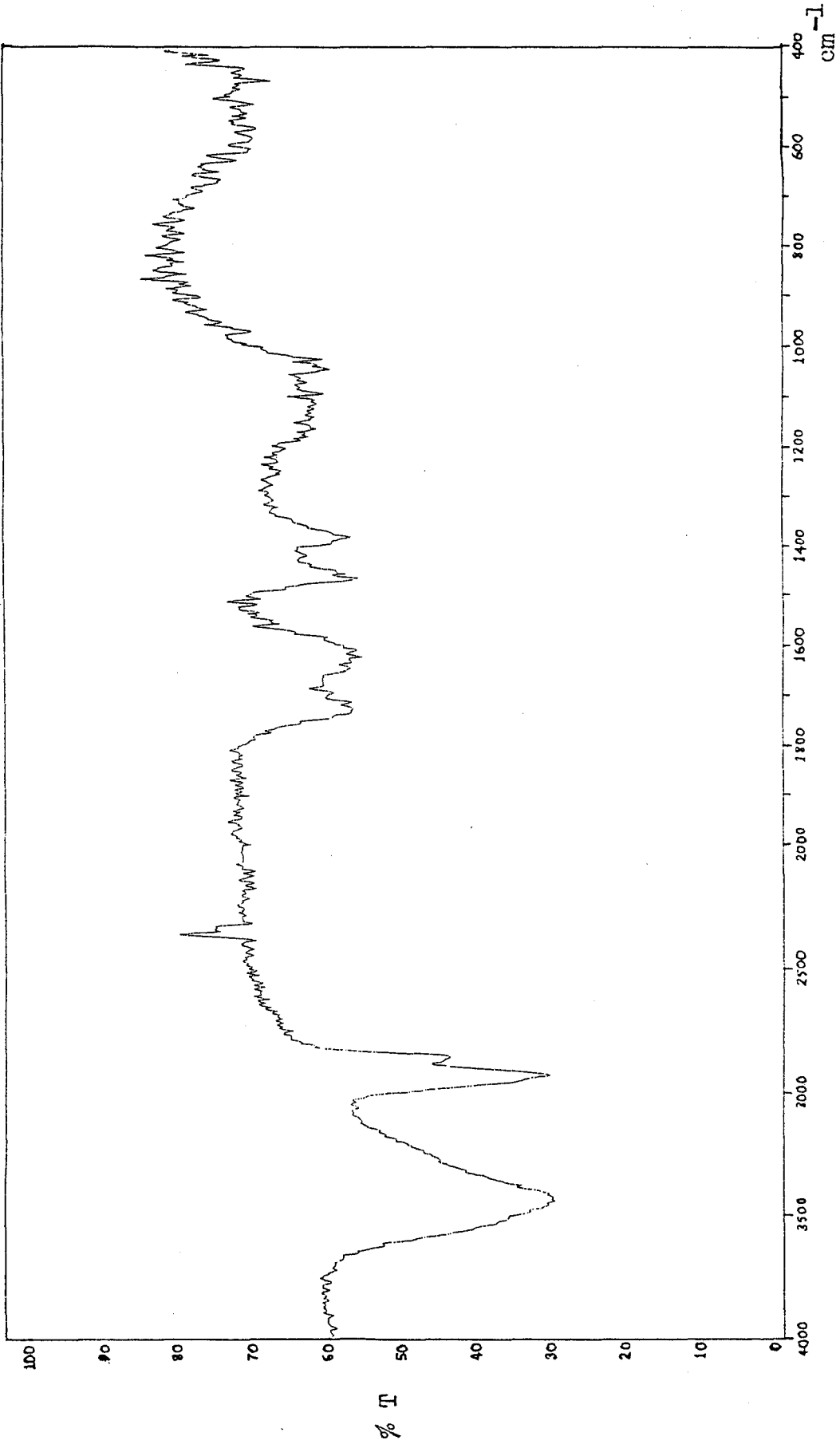
IR (KBr),  $\nu_{\max}$  : 3450 (-OH), 2940, 2860 ( $-\text{CH}_3$ ,  $>\text{CH}_2$  gerilimi)

1695 (konjuge-COOH veya  $>C=O$ ), 1460 ( $-CH_3$  bükülme), 1395  $cm^{-1}$  ( $-CH_3$  simetrik deformasyonu) (Şekil 6.12).

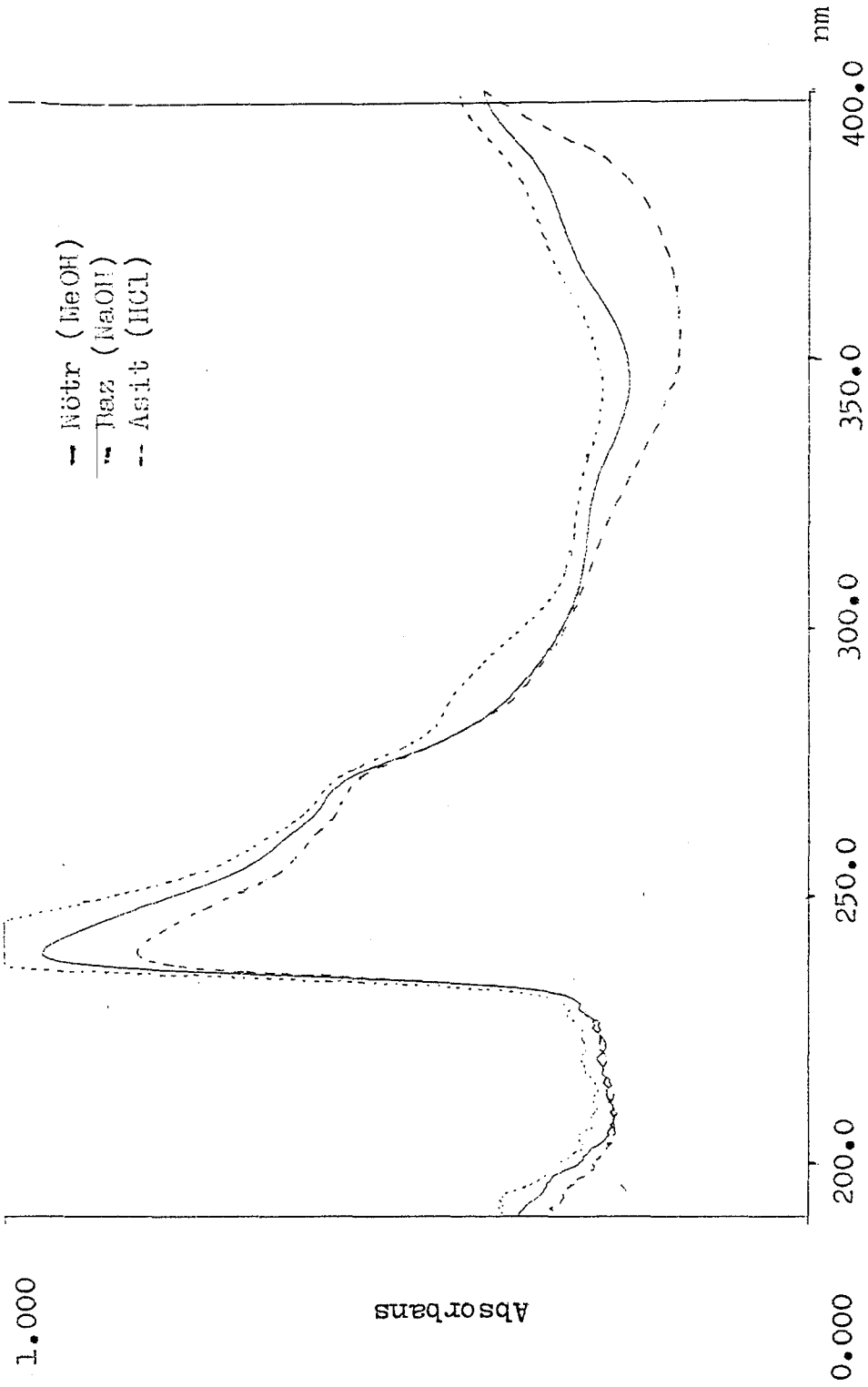
UV (MeOH),  $\lambda_{max}$  : 239, 266, 272, 281, 315, 332 nm (Şekil 6.13),

(HCl),  $\lambda_{max}$  : 241, 257, 282, 316 nm (Şekil 6.13).

(NaOH),  $\lambda_{max}$  : 240, 272, 285, 298, 306, 315, 356, 369 (Şekil 6.13)

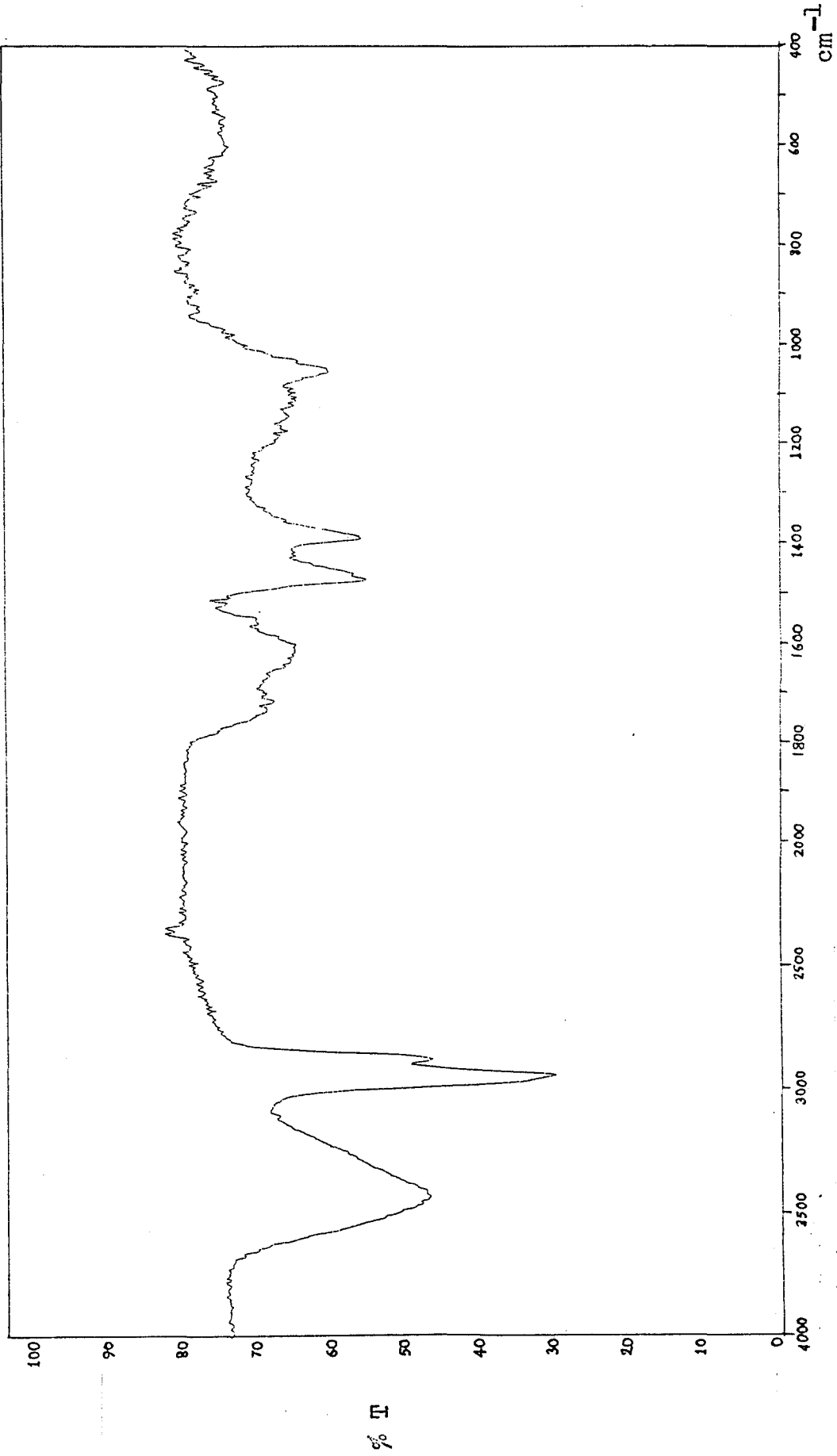


Şekil 6.2. Madde I'in IR Spektrumu (KBr).

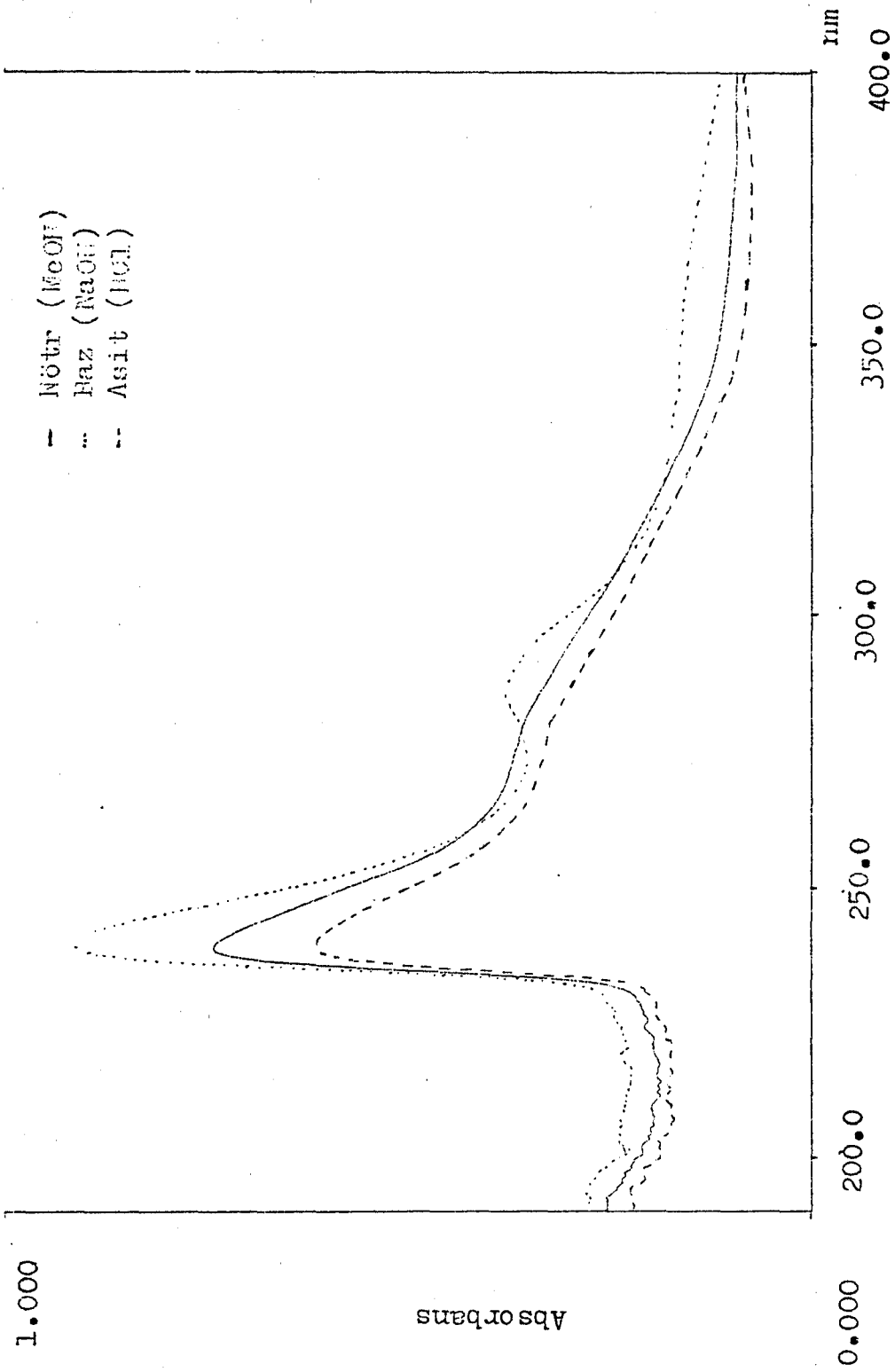


Şekil 6.3. Madde I'in UV spektrumu.

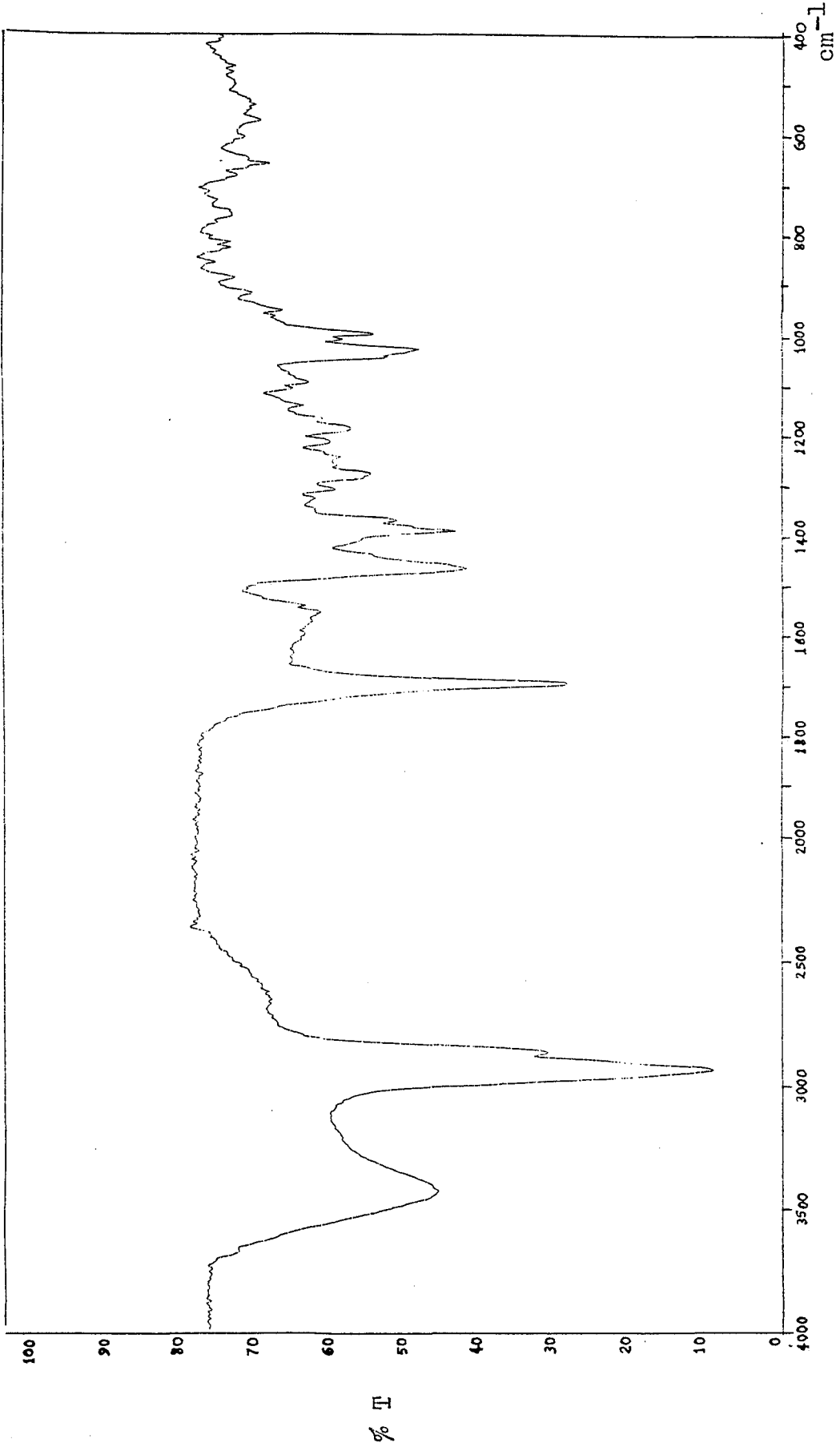




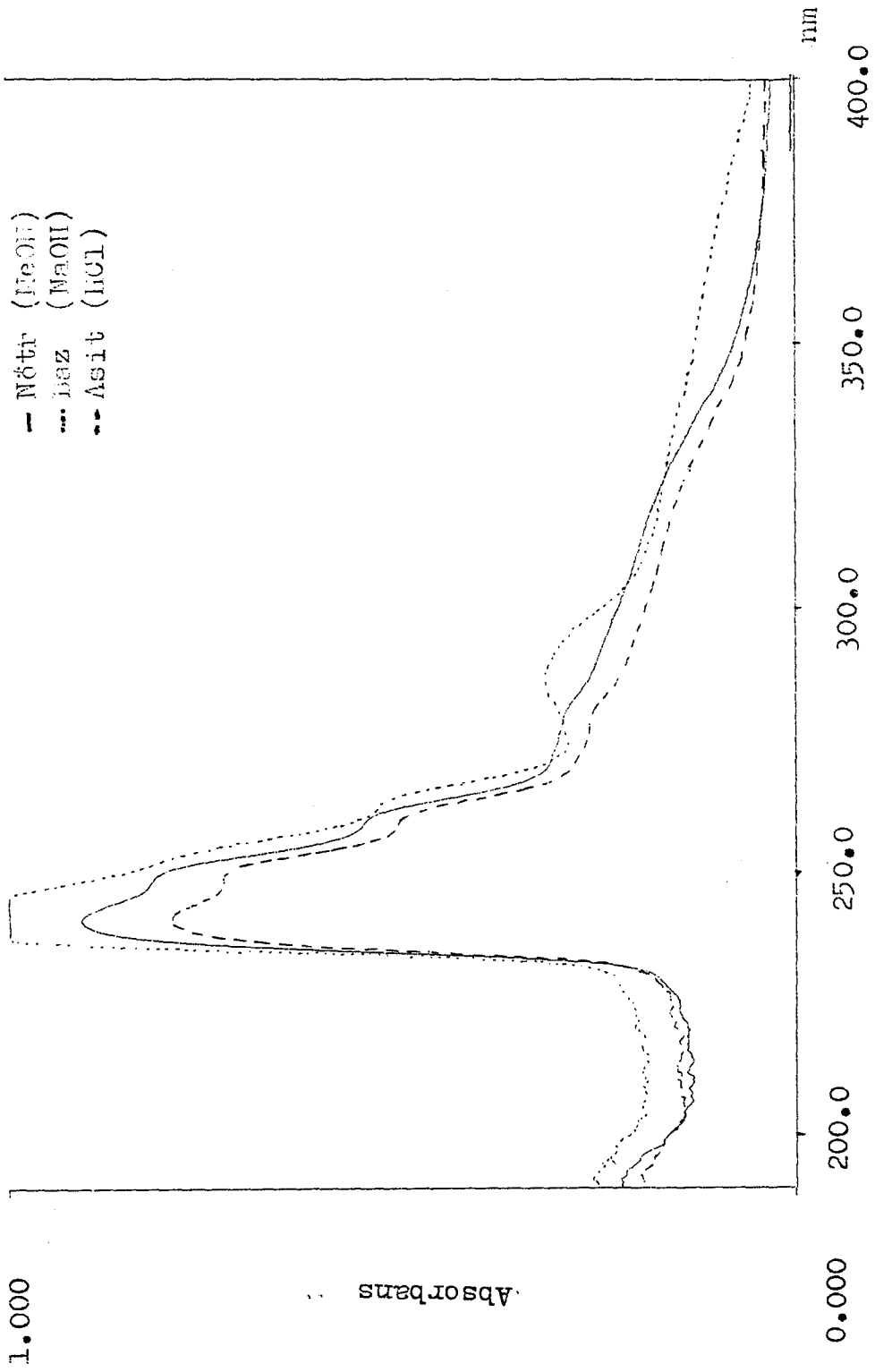
Şekil 6.4. Madde II'nin IR Spektrunu (KBr).



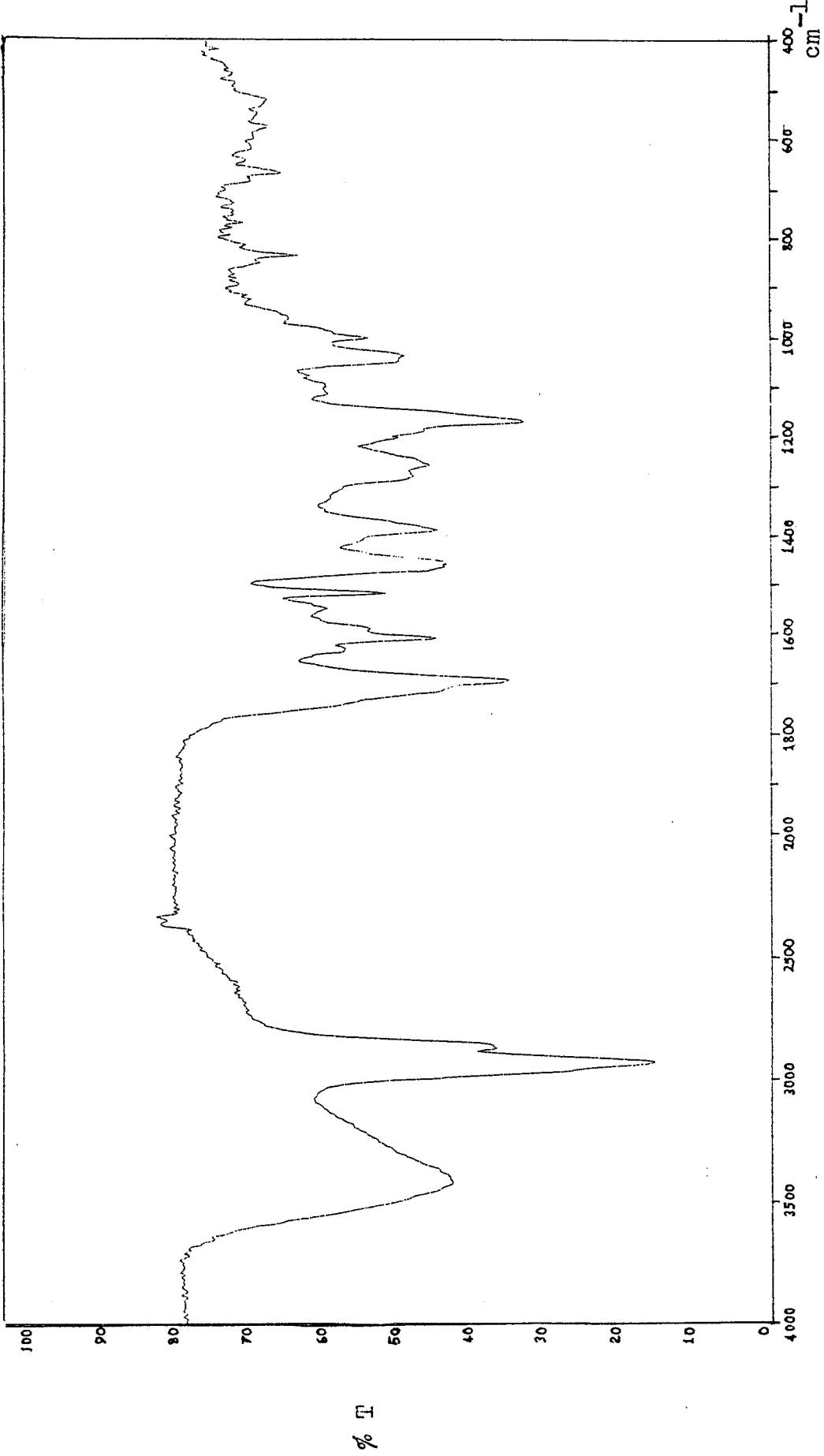
Şekil 6.5. Madde II'nin UV spektrumu.



Şekil 6.6. Madde III'ün IR Spektrumu (KBr)

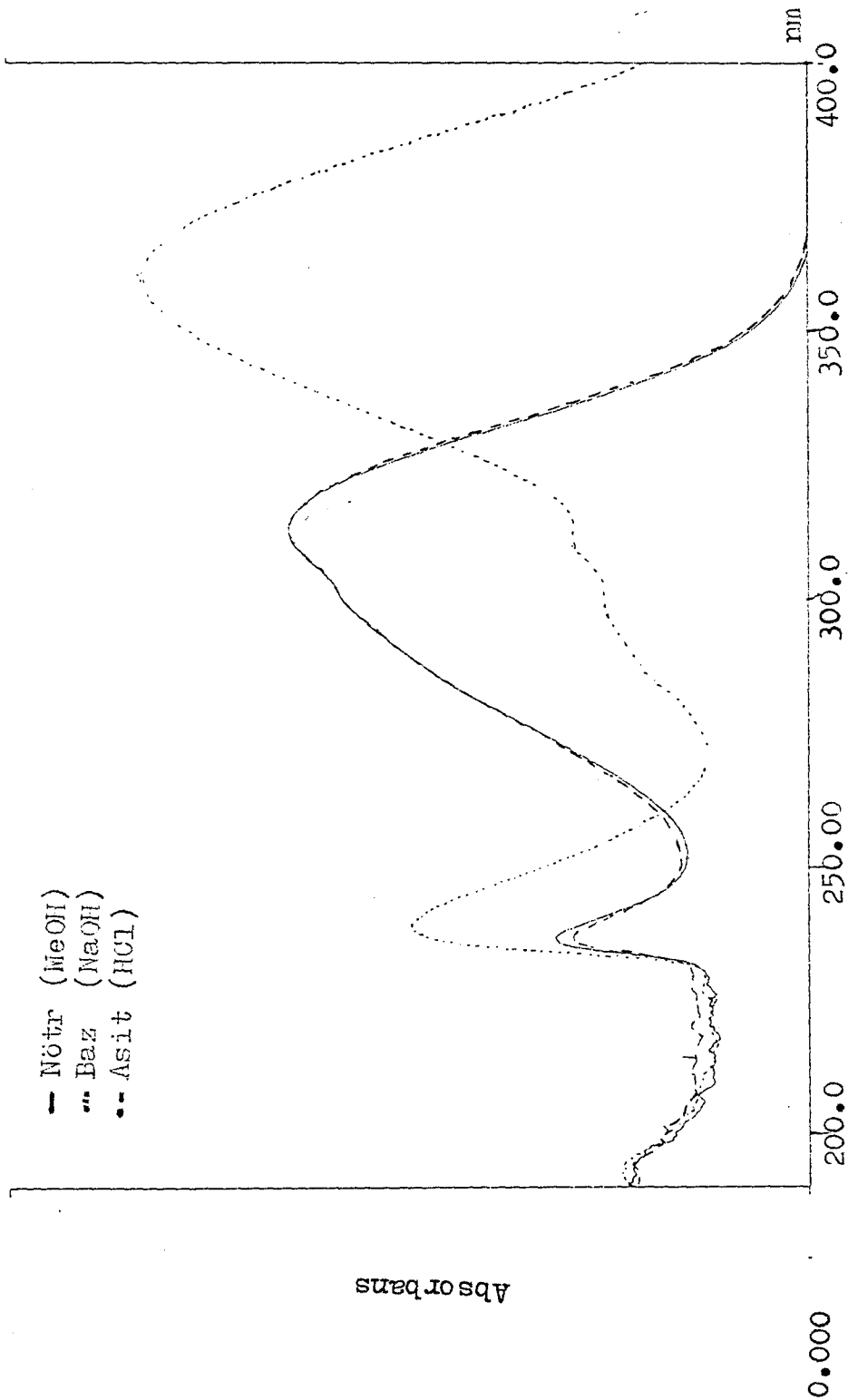


Şekil 6.7. Madde III'ün UV Spektrumu

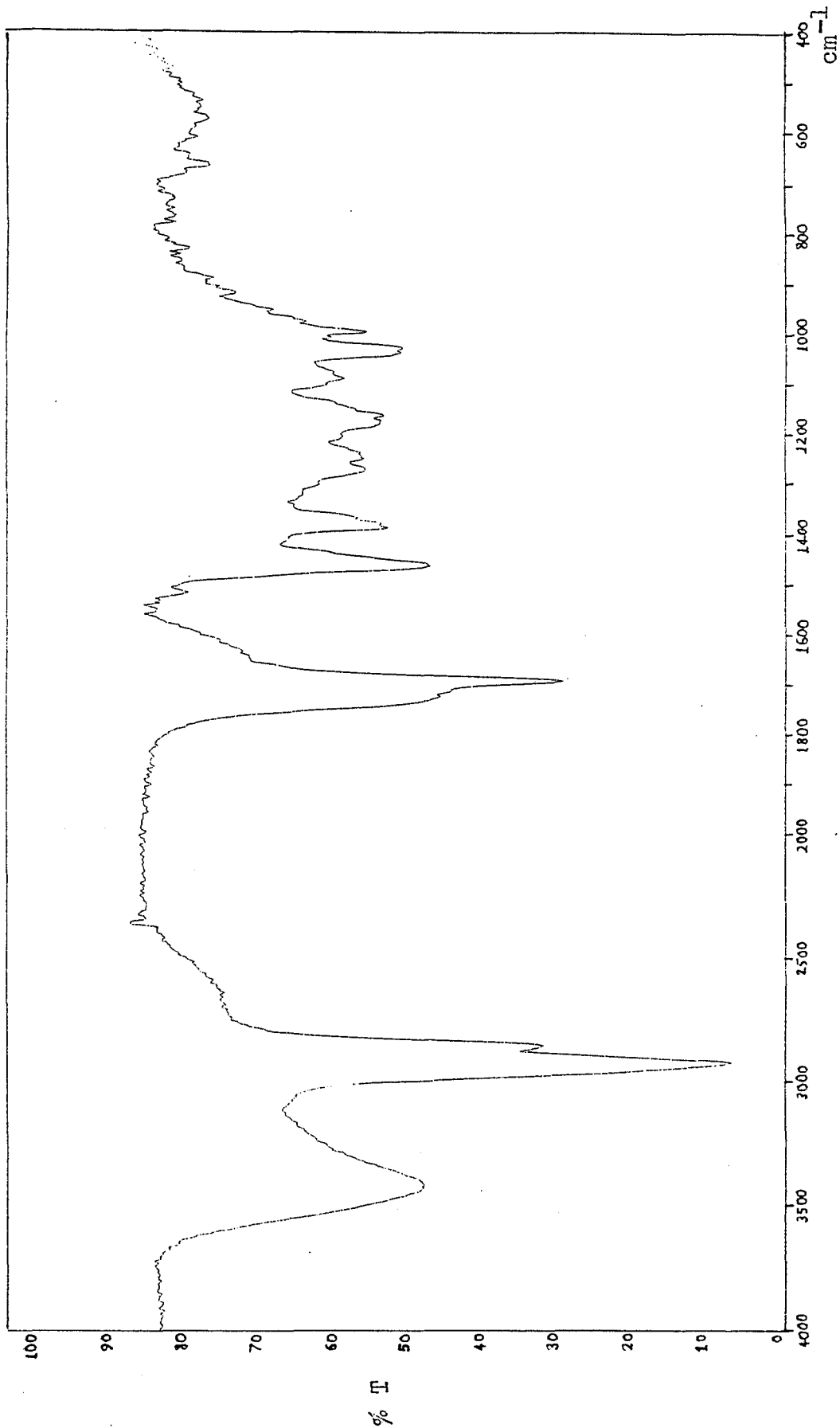


Şekil 6.8. Madde IV'ün IR Spektrumu (KBr).

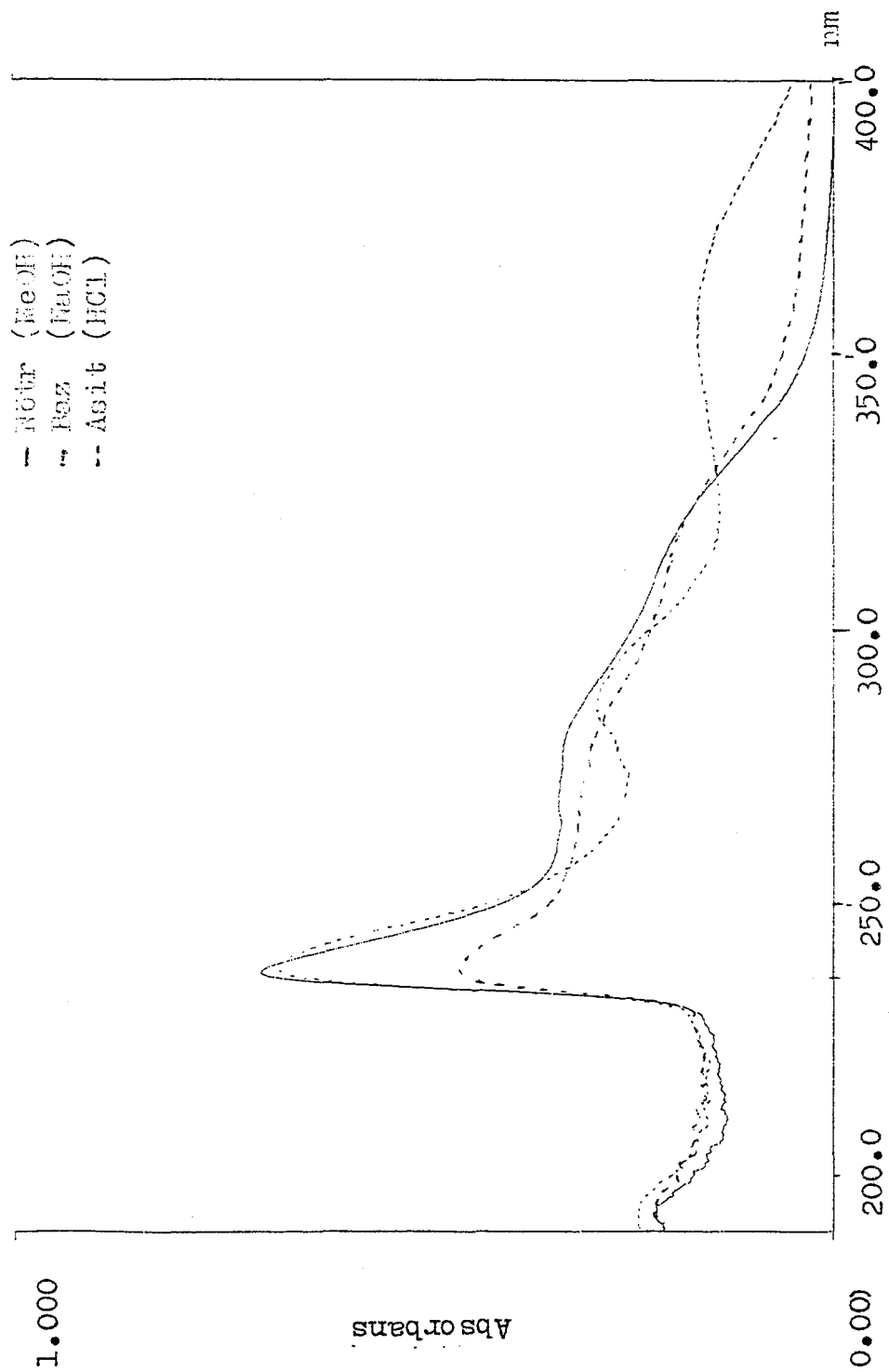
1.000



Şekil 6.9. Madde IV'ün UV Spektrumu

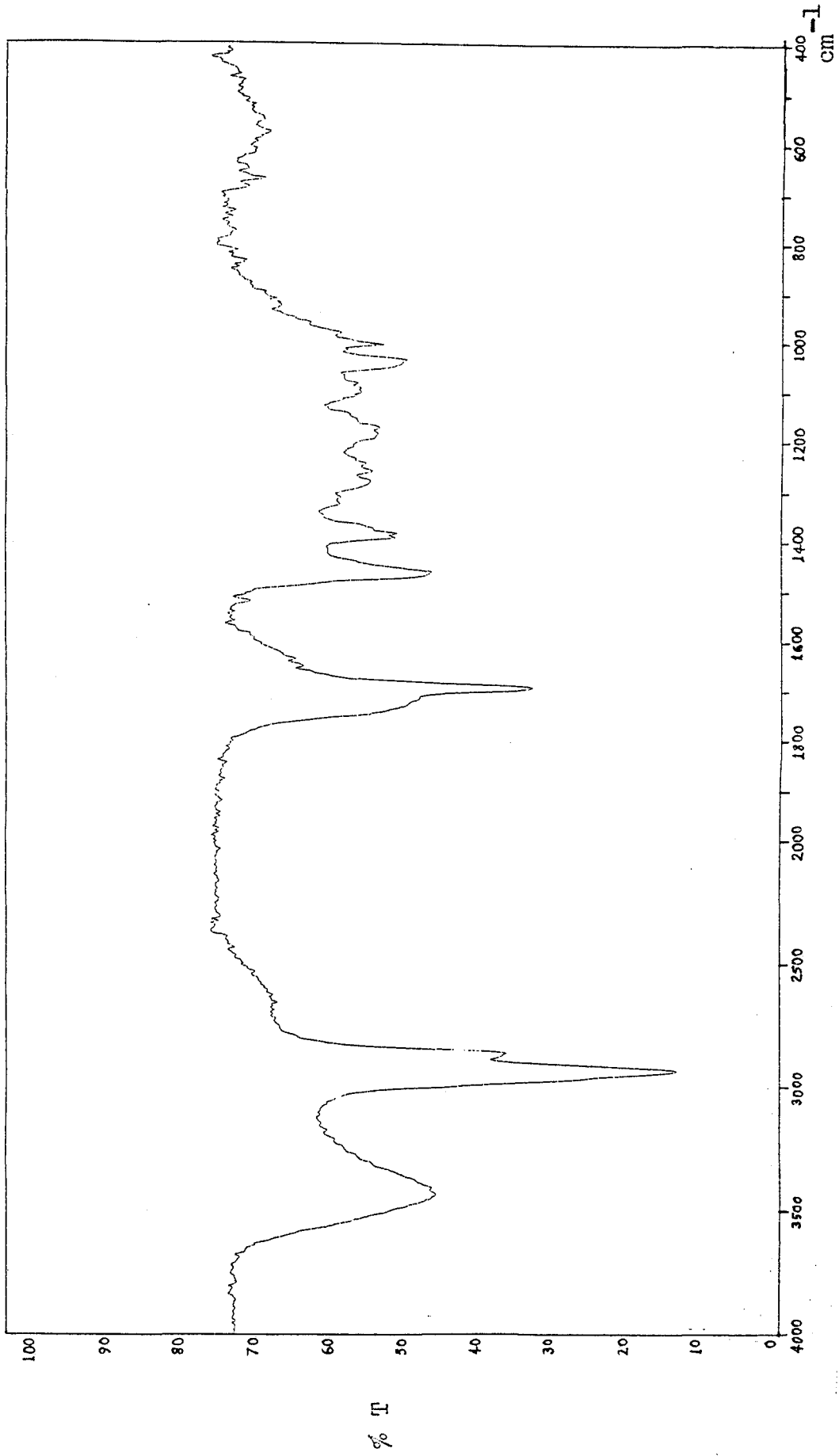


Şekil 6.10. Ursolik esitin (Urs-I) IR Spektrumu (KBr).

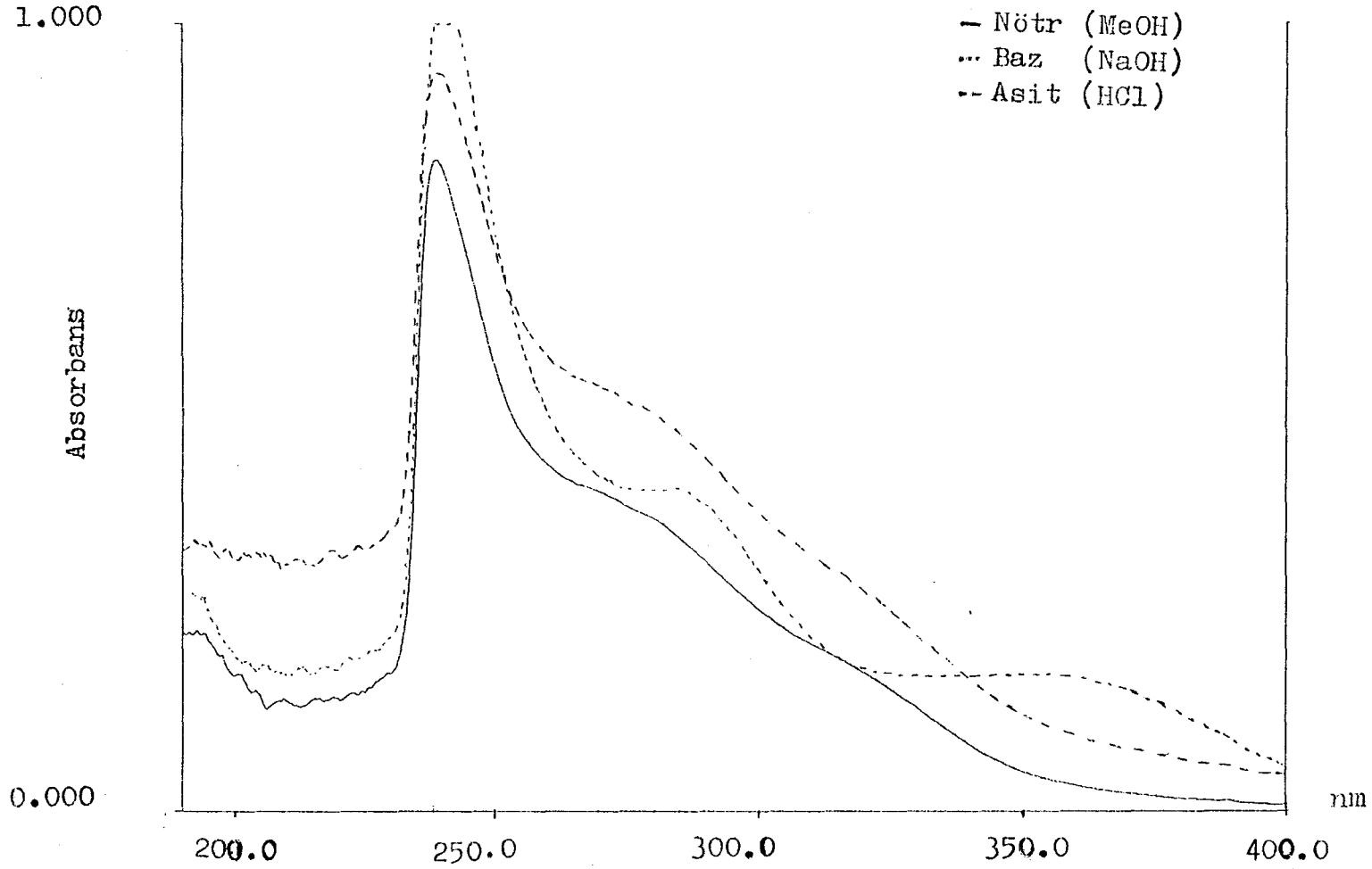


Şekil 6.11. Ursalik asitin (Ur<sub>S</sub>-I) UV spektrumu





Şekil 6.1.2. Ursolik asitin (Urs-II) IR Spektrumu (KBr).



Şekil 6.13. Ursolik Asitin (Urs-II) UV spektrumu.

## 7. TARTIŞMA

Daha önce çalışmanın amacında da belirtildiği gibi bir Türk doktorunun Nerium oleanderi kanser tedavisinde kullandığını bildirmesi ve bunun da gazete ve televizyonda yayınlanması üzerine bu çalışma yapılmıştır.

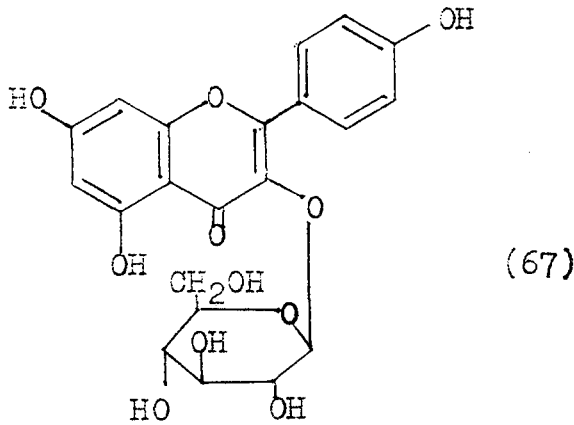
Nerium oleanderdeki bileşikleri izole etmek için yapılan araştırmalarda çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemler uygulanmıştır ve bunlara daha sonraları spektral çalışmalar da eklenmiştir. Bunlardan belli başlıcalarından aşağıda bahsedilmiştir.

1927 yılında Matthes ve Schitz tarafından Nerium oleanderin tohumlarının %8,01 su, %17,43 yağ, %2,8 N, %17,5 ham protein ve %3,76 mineral maddeleri içerdiği bulunmuştur. Tohumdan elde edilen yağ acı tadda olup  $d_{15} = 0,9355$ ,  $n_D^{25} = 1,4721$ ,  $n_D^{40} = 1,6667$ , asit no 2,5, sabunlaşma no 200,8'dir ve %2,12 sabunlaşmayan madde içerdiği anlaşılmıştır. Oleander yağının kurumayan bir yağ olduğu ve suda çözünmeyen yağ asitlerinin %12 katı, %88 sıvı olduğu bulunmuştur.

Bunzaburó ise kuru oleander yapraklarını ılık MeOH'de özütlemiş ve iğne şeklinde neriodin (22) (e.n. 238-239°C) elde etmiştir. Ayrıca neriodinin (22) suda çözünmeyen, alkolde çözünen, eterde az çözünen bir madde olduğunu ve davranışlarının

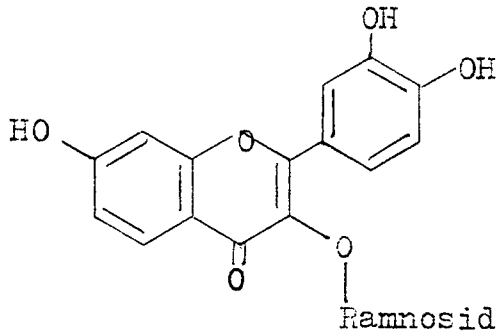
oleandrine (2) benzediğini bulmuştur (1949).

Nerium oleander yapraklarının MeOH özütünün kağıt kromatografisinde (EtOAc-HCO<sub>2</sub>H-H<sub>2</sub>O; 10:2:3) R<sub>f</sub> değerleri 0,06,0,12, 0,35, 0,48 olan dört flavon türeği tespit edilmiştir. Bunlardan esas glikozid (R<sub>f</sub>= 0,35) safsızlıklar göstermiş, diğer glikozid (R<sub>f</sub>= 0,48) ise kampferol-3-ramnoglikozid (67)olarak bulunmuştur. Diğerlerinin yapısı bulunamamıştır (Wagner and Luck 1955).



1956 yılında Nerium oleanderin özütünün Whatman No. 1 ile kağıt kromatografisi (BuOH-MeOH-H<sub>2</sub>O; 15:5:50) alınmıştır. Şekerler 0,1 N amonyaklı AgNO<sub>3</sub> ile gözlenmiştir (R<sub>f</sub> glükoz= 0,3, R<sub>f</sub> oleandroz= 0,88). Glikozidlerin (BuOH-AcOH; 10:1:3) ise sırasıyla R<sub>f</sub> gitonegenin= 0,59, R<sub>f</sub> neriosid= 0,91, R<sub>f</sub> adenerosid= 0,00 olduğu, oleandrosidin (107) çözücü ile yürüdüğü tespit edilmiştir. Kuru oleanderin özütünün kromatografisi iki boyutlu sistemlerle (CHCl<sub>3</sub>-BuOH-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>-H<sub>2</sub>O) incelenmiştir. Neriosid (108) klarofil ve kaninlerden ayrılammıştır. Folinerin (17) ise çözücü ile yürütülmüştür (Agustin, 1956).

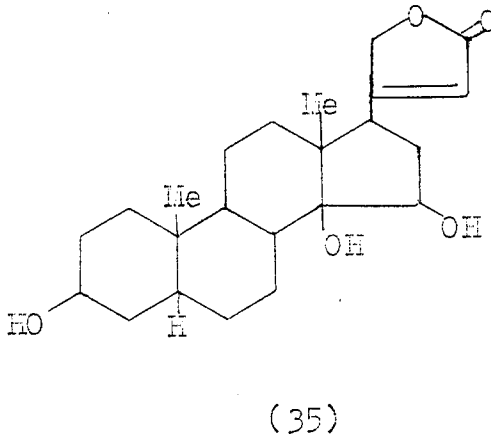
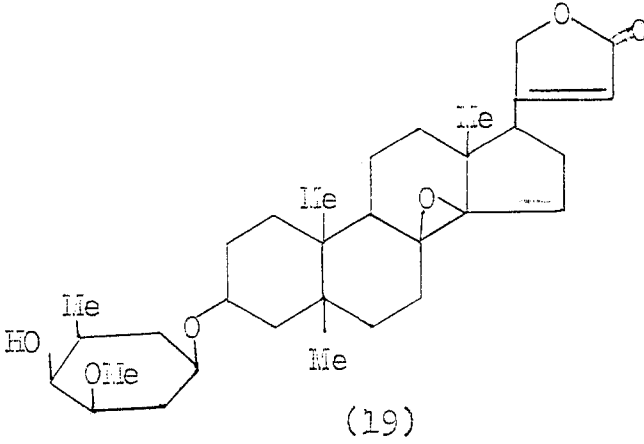
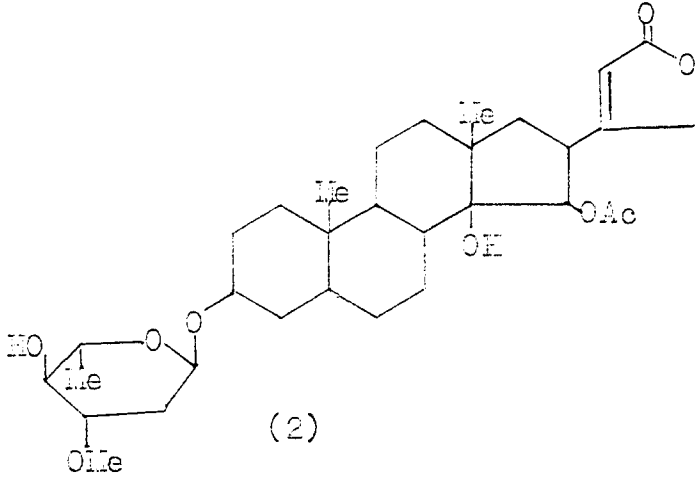
Hörhammer ve arkadaşları kuersetin-3-ramno glikozid (66) bileşiklerini Nerium oleander yapraklarının MeOH'deki özütünden elde etmişlerdir (1956).



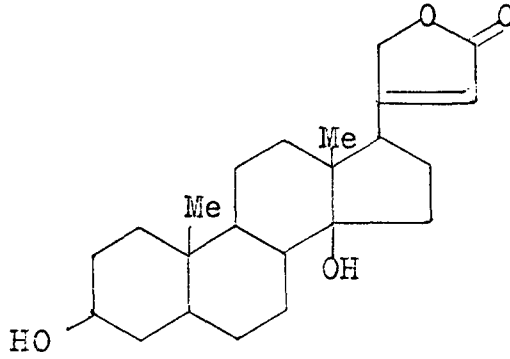
(66)

1964 yılında Tschesche ve arkadaşları tarafından Nerium oleanderin yapraklarından oleanderin (2), deasetiloleandrin (45), adinerin (19) ve neriantin (53) izole edilmiştir. Oleanderin yaprakları EtOH'de özütlenmiş ve çözücü uçurulmuştur. Geriye kalan kısım  $CCl_4$  ile (Özüt A),  $CCl_3$  ile (özüt B) ve 3:2  $CHCl_3$ -EtOH ile (Özüt C) özütlemeye tabi tutulmuş ve slikajel plakalarında kromatogramı alınmıştır. Özüt A'dan (2), (19), (45), gitoksigenin (35), odorosid H (47) ve neritalosid (48); özüt B'den bunlara ilaveten urekitoksin (54), (53) ve strospe-sid (33) elde edilmiştir. Özüt C'nin bileşenleri en azından sekiz farklı glikozid vermiştir ve tam olarak saflaştırılamamıştır. Fakat Luizym enzimi ile hidroliz edildikten sonra elde edilen glikozidler ile özüt A ve B'deki glikozidlerin aynı oldukları görülmüştür. Neriantin (53) ve strospe-sidin (33) yaprakta çok az olduğu anlaşılmıştır.

Aynı yıl Nerium oleanderin taze çiçekleri 750 ml suda özütlenmeye tabi tutulmuştur. Sulu çözelti önce soğuk petrol eteriyle (30-50°) daha sonra eter,  $CHCl_3$  ve  $CHCl_3$ -EtOH (2:1) ile özütlenmiştir.  $CHCl_3$  özütü preparatif İTK ( $SiO_2$ , EtOAc- $CHCl_3$  -MeOH, 8:1:) ile saflaştırılmıştır. Sonuçta gitoksige-



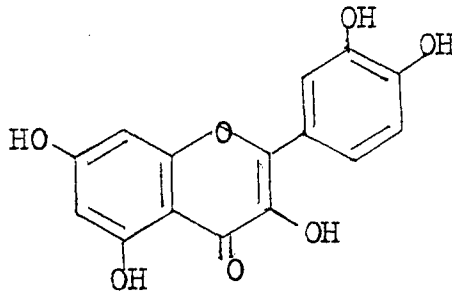
nin (35), uzarigenin (14), strospeid (33) ve oderosid H (47) izole edilmiştir (Chiarlo, 1964).



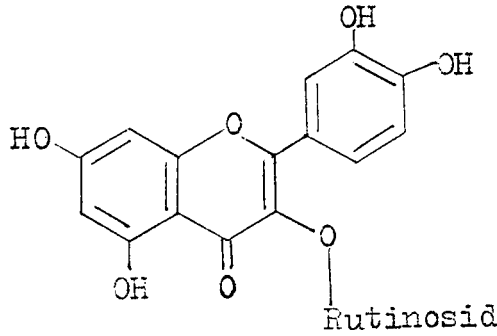
(14)

(Bkz. Çizelge 2.2)

1967 yılında ise pembe ve beyaz çiçekler ayrı ayrı petrol eteri ve EtOH ile özütlenmiştir. Pembe çiçeklerin EtOH özütünün İTK'sı 13 aglükon ve kardiyak glikozidlerini, beyazın EtOH özütü ise 14 tane aglükon vermiştir. Gitoksigenin (35) her ikisinde de mevcuttur ve bunun yanı sıra 4 tane flavanoid (başlıca rutin (6), kuersetin (68), kuersitrin (67)) bileşikleri de bulunmuştur. Pembe çiçeklerin petrol eter özütünden  $\beta$ -sitosterol (79) elde edilmiş, beyaz çiçeklerde ise bu madde ancak İTK yardımıyla gözlenmiştir (Dominguez et.al., 1967).



(68)



(6)

Nerium oleanderdeki kardenolidlerin steroid glikozidlerinden ayrılma yöntemi ve kantitatif tayini 1969 yılında Goetz tarafından açıklanmıştır. Kardenolidlerin flavon glikozidlerinden ayrılmasında  $Al_2O_3$  kolon kromatografisi kullanılmıştır. Metanolik eluatlardaki kardenolidler pikrik asitle reaksiyona sokulduktan sonra spektroskopik olarak tayin edilmiştir. Kolon tersinir olmayan adsorbsiyon ile kardenolidleri tutmaz. Bu yöntem oleander steroid glikozidlerinin tayini için İTK ile birlikte alışıla gelen kantitatif ve kalitatif yöntemlerle kullanıla gelmiştir.

Nerium oleanderdeki glikozidlerden oleandrin (2) İTK ( $SiO_2$ -G; EtOAc- $HCO_2H$ - $H_2O$ -MeOH; 10:2:2:1) ile veya 400 V'luk 20  $\mu$  A'lik kağıt elektroferezi ile ayrıştırılmıştır (Voicu et. al., 1971)

Tittel tarafından yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) yardımıyla ODS Hypersil 3 veya Mn Nucleosil 398 kolonlarında hareketli faz olarak %10-50 MeCN- $H_2O$  kullanılarak bazı bitkilerden kardenolid ve bufadienolidler izole edilmiştir. Kardenolidler 220 nm, bufadienolidler 300 nm UV ışını altında tespit edilmişlerdir. Bitkiler Digitalis, Convallaria,



Nerium ve Strophanthusdur. Bunların özütlerinden tek tek glikozidler ayrıştırılmış ve yapıları az hata ile bulunmuştur (Tittel, 1986).

Pakistanlı araştırmacı Siddiqui ve arkadaşları bu konuda son yıllarda bir çok araştırma yapmışlardır. Oleanderin taze ve kurumamış yapraklarından kimyasal ve spektral çalışmalar sonucunda kanerosid (64), neriumosid (65) (1986); neriukumarik (86), izoneriukumarik (87) (1987); oleanderoik asit (88), oleandren (89) (1988); oleandrol (90), betulin (91), betulinik asit (92), ursalik asit (7), oleanolik asit (93) (1988); kanerin (94), 12-13 dihidro ursolik asit (95) (1989) bileşiklerini tespit edilmiş ve yapıları bulunmuştur (Bkz. Sayfa 28, 30,31 ve 33).

Bu araştırmada ise oleander yapraklarının özütünden bileşikler ayrıştırılmaya çalışıldı. Ayrıca bu konuda bir çok araştırma yapmış olan Siddiqui'nin yöntemi kullanılarak ursolik asit elde edildi (1987).

Sıcakta ve soğukta elde edilen özütlerin üzerine uygulanan işlemler aşağıda şematik olarak kısaca gösterildi.

NO<sub>1</sub> = Sıcakta elde edilen özüt

NO<sub>2</sub> = Soğukta elde edilen özüt

(NO<sub>1</sub> veya NO<sub>2</sub>)

Eter + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

H<sub>2</sub>O

Organik Faz (I)  
(Nötr)

+  
Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Su Fazı (I)  
(PH= 9-10)

+  
% 10'luk HCl  
(PH = 1-3)

+  
Eter

Organik Faz(II)

+  
Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Su Fazı(II)

Elde edilen organik fazların çözücüleri uzaklaştırıldı.  $\text{NO}_1$ 'den elde edilen organik (I) analitik İTK'ya ( $\text{SiO}_2$ , EtOAc- $\text{C}_6\text{H}_6$ ; 2:8) tabi tutuldu ve 4 tane nokta elde edildi.  $R_f$  değerleri hesaplandı ve belirteçler ile muamele edildi (Çizelge 6.1 ve 6.2). Madde II ve IV'de esas noktaya yakın bölgede başka maddeler de gözlemlendi. Daha sonra preparatif İTK ( $\text{SiO}_2$ , EtOAc- $\text{C}_6\text{H}_6$ ; 2:8) ile maddeler ayrıştırıldı ve IR, UV spektrumları alındı.

$\text{NO}_2$ 'den elde edilen organik (I)'den analitik İTK'sı ( $\text{SiO}_2$ , EtOAc- $\text{C}_6\text{H}_6$ ; 2:8) sonucunda 14 nokta elde edildi ve maddelerin çokluğu nedeniyle işlem bu aşamada bırakıldı. İzolasyon için çeşitli organik çözücü ve daha fazla madde miktarı gerekmektedir.

$\text{NO}_1$ 'den elde edilen madde I sakızımsı yapıda idi. IR spektrumunda  $3435 \text{ cm}^{-1}$  de -OH grubuna ait yayvan absorpsiyon bandı,  $1725 \text{ cm}^{-1}$ 'de konjuge -COOH veya  $>\text{C}=\text{O}$  gruplarına ait olabileceği düşünülen bandlar,  $1620-1610 \text{ cm}^{-1}$  de konjuge çift bağ bandı ve çok halkalı sistemlerde beklenen  $2920-2850 \text{ cm}^{-1}$  de  $-\text{CH}_3$  ve  $>\text{CH}_2$  gerilimi,  $1468 \text{ cm}^{-1}$ 'de  $>\text{CH}$  deformasyonu, bandları gözlemlendi (Şekil 6.1)

UV (MeOH) spektrumu  $239 \text{ nm}$ 'de absorpsiyon maksimumu verdi. Baz (NaOH) daha sonra da asit ilave edilmesi sonucunda UV spektrumlarında kayma olmadı (Şekil 6.2). Buna göre IR'de  $1725 \text{ cm}^{-1}$ 'de gelen band asit grubuna değil, karbonile ait olabilir.

Madde II'nin IR spektrumu  $3440 \text{ cm}^{-1}$ 'de -OH grubuna ait yayvan bir band,  $1730-1720 \text{ cm}^{-1}$ 'de konjuge -COOH veya  $>\text{C}=\text{O}$  gruplarına ait olabileceği düşünülen bandlar,  $1158 \text{ cm}^{-1}$ 'de

C-OH bandı ve 2940-2875  $\text{cm}^{-1}$ 'de  $-\text{CH}_3$  ve  $>\text{CH}_2$  gerilimi, 1479  $\text{cm}^{-1}$  de  $>\text{CH}$  deformasyonu, 1395  $\text{cm}^{-1}$ 'de  $-\text{CH}_3$  simetrik deformasyonu olarak açıklanan bandlar gözlemlendi (Şekil 6.4).

UV (MeOH) spektrumu 238 nm'de absorpsiyon maksimumunu verdi. Baz (NaOH) daha sonra da asit (HCl) ilave edilmesi sonucunda elde edilen spektrumlarda kayma olmadı (Şekil 6.5). Dolayısıyla IR'de 1730-1720  $\text{cm}^{-1}$ 'de gelen bandlar karbonile ait olabilir.

Madde III'ün IR spektrumu 3430  $\text{cm}^{-1}$ 'de yayvan bir -OH bandı 1698  $\text{cm}^{-1}$ 'de konjuge  $-\text{COOH}$  veya  $>\text{C}=\text{O}$  bandı, 1268, 1180 ve 1025  $\text{cm}^{-1}$ 'de C-OH bandları olarak düşünülen ve 2940-2870  $\text{cm}^{-1}$ 'de  $-\text{CH}_3$  ve  $>\text{CH}_2$  gerilimi, 1462  $\text{cm}^{-1}$ 'de  $>\text{CH}$  deformasyonu, 1390  $\text{cm}^{-1}$ 'de  $-\text{CH}_3$  simetrik deformasyonu,  $\sim 1000$   $\text{cm}^{-1}$ 'de  $>\text{C}=\text{CH}_2$  olarak açıklanan bandlar gözlemlendi (Şekil 6.6).

UV (MeOH) spektrumunda 240 nm'de absorpsiyon maksimumunu gözlemlendi. Madde III'te de baz ve asit ilavesinden sonraki UV spektrumlarında kayma gözlenmedi (Şekil 6.7). Asit grubu olmayabilir.

Madde IV'ün IR spektrumu ise 3440  $\text{cm}^{-1}$ 'de -OH grubuna ait yayvan band, 1690  $\text{cm}^{-1}$  konjuge  $-\text{COOH}$  veya  $>\text{C}=\text{O}$  bandları, 1610  $\text{cm}^{-1}$ 'de konjuge çift bağ bandı, 1520  $\text{cm}^{-1}$   $>\text{NH}$  bandı ve 2940-2880  $\text{cm}^{-1}$ 'de  $-\text{CH}_3$  ve  $>\text{CH}_2$  gerilimi, 1460  $\text{cm}^{-1}$ 'de  $-\text{CH}_3$  bükülme, 1390  $\text{cm}^{-1}$ 'de  $-\text{CH}_3$  simetrik deformasyonu, 1260  $\text{cm}^{-1}$ 'de -OH bükülmesi, 1170, 1140 ve 1000  $\text{cm}^{-1}$ 'de  $>\text{C}=\text{CH}_2$  olarak düşünülen bandlar gözlemlendi (Şekil 6.8).

UV (MeOH) spektrumu 236 ve 313 nm'de absorpsiyon maksimumları verdi. Baz (NaOH) ilavesi sonucunda alınan spektrumda 313 nm'deki absorpsiyon maksimumu 359 nm'ye kaydı. 46 nm'lik bu kayma çok halkalı sistemde konjugasyonun olduğunu gösterir. Asit (HCl) ilavesiy sonucunda alınan spektrum maddenin tekrar eski haline döndüğünü gösterdi (Şekil 6.9).

Görüldüğü gibi Nerium oleanderdeki kardiyak glikozidler ve diğer bileşiklerden beklenen karakteristik (çok halkalı bileşiklere substituye -OH, -Me,  $>C=O$ , -COOH vb.) pikler gözlenmiştir. Fakat NMR spektrumları alınamadığı için tam yapı tayini mümkün olmamıştır.

Urs-I'in IR spektrumu  $343\text{ cm}^{-1}$ 'de yayvan bir -OH bandı,  $1698\text{ cm}^{-1}$ 'de konjuge -COOH veya  $>C=O$  bandı olarak düşünülen ve  $2925-2850\text{ cm}^{-1}$ 'de -CH<sub>3</sub> veya  $>CH_2$  gerilimi,  $1460\text{ cm}^{-1}$ 'de -CH<sub>3</sub> bükülme,  $1390\text{ cm}^{-1}$ 'de -CH<sub>3</sub> simetrik deformasyonu olarak açıklanan bandlar verdi (Şekil 6.10).

UV (MeOH) spektrumu  $237\text{ nm}$ 'de absorpsiyon maksimumu verdi. Baz (NaOH) ve asit (HCl) ilavesi sonucunda kayma olmadı (Şekil 6.11). Buna göre asit grubu olmayabilir.

Urs-II'nin IR spektrumu  $3450\text{ cm}^{-1}$ 'de yayvan bir -OH bandı,  $1695\text{ cm}^{-1}$ 'de konjuge -COOH veya  $>C=O$  bandı  $2940-2860$  -CH<sub>3</sub> ve  $CH_2$  gerilimi,  $1460\text{ cm}^{-1}$ 'de -CH<sub>3</sub> bükülme,  $1395\text{ cm}^{-1}$  -CH<sub>3</sub> simetrik deformasyonu olarak düşünülen bandlar gözlenmiştir (Şekil 6.12).

UV (MeOH) spektrumu ise  $239\text{ nm}$ 'de absorpsiyon maksimumu verdi. Baz (NaOH) ve asit (HCl) ilavesi sonucunda kayma gözlenmedi (Şekil 6.13).

Yukarıdaki verilere göre ursolik asitin (7) yapısına uygun IR ve UV pikleri gelmiştir, fakat erime noktası farklı bulunmuştur (Men and Pourrat, 1952). Bu maddelerin yapısını tespit edebilmek için NMR spektrumu alınmaya çalışılmış, fakat  $CCl_4$ 'de tam çözünmemiştir. Bunun üzerine çözücü olarak  $CHCl_3$  kullanılmıştır ve iyi bir spektrum elde edilememiştir.  $CDCl_3$  temin edilemediği ve NMR aleti bozulduğu için yapı tayini mümkün olmamıştır.

Aşağıda elde edilen maddelerin ve kaynaklardan alınan diğer bileşiklerin IR ve UV spektrumları kısaca verilmiştir.

Çizelge 7.1. Madde I,II,III ve IV ile Urs-I ve II'nin IR (KBr) Spektrumları.

Madde	Absorbsiyon değerleri ( $\nu_{\max}$ , $\text{cm}^{-1}$ )
I	3435,2920,2850,1725,1620,1610,1468,1380
II	3440,2940,2875,1730,1720,1479,1395,1158
III	3430,2940,2875,1698,1462,1390,1268,1180,1025,1000
IV	3440,2940,2880,1690,1610,1390,1260,1170,1140,1000
Urs-I	3430,2925,2850,1698,1460,1390

Çizelge 7.2. Madde I,II,III ve IV ile Urs-I ve II'nin UV (MeOH) Spektrumları

Madde	Absorbsiyon maksimumları ( $\lambda_{\max}$ 'nm)
I	239,256,268,324,374
II	238,278
III	240,249,259,272,279,314,338
IV	236,301,313
Urs-I	237,261,269,279,311,331
Urs-II	239,266,272,281,315,332

Çizelge 7.3. Nerium Oleanderdeki Bazı Bileşiklerin UV ve IR Spektrumları

Madde	E.N. (°C)	UV $\lambda_{\max}$ (MeOH) <sub>nm</sub>	IR $\nu_{\max}$ (CHCl <sub>3</sub> ) cm <sup>-1</sup>
Oleandroik asit	293-95	220	3450,2800,2900,2840,1710,1150,120
Oleanderen	215-17	208	2900,2870,165 <sup>0</sup>
Kanerosid	110-11	218,267	2450,1780,1750,1625
Neriumosid	140-42	218,267	3450,1780,1750,1625
Oleanderol	206-8	208	3400,2900,2840,1640,1150,1020,880
Neriokumarik asit	120-21	208,280	3450,1720,1700,1600,1380
Kaneriokumarik asit	208-9	208,280	3450,1720,1700,1600,1380
Kanarik asit	122	208	3400,3420,2500,2900,2840,1700,1640,1000,1150
Uvarol	222-24	205	3400,2900,2840,1640,1000,1150

## 8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma Nerium oleanderdeki (Zakkum) kardiyak glikozidlerin araştırılması esasına dayanmaktadır. Oleander yapraklarının özütünden maddeler ayrıştırılmış fakat tam yapı tayini yapılamamıştır. Çünkü bilinmeyen çalışması yapılmıştır ve yapı tayininde önemli bir yeri olan  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR ve kütle spektrumları alınamamıştır. Buna rağmen IR spektrumunda beklenen karakteristik pikler gözlenmiştir. Ayrıca Siddiqui ve arkadaşlarının yöntemi kullanılarak elde edilen ursolik asit (7)'in erime noktası daha evvel izole edilenlerden farklı çıkmıştır ve bu maddenin yapı tayini mümkün olmamıştır. Bunların yanı sıra madde miktarının az olması ve çok çeşitli organik çözücünün gerekli olması çalışmayı olumsuz etkilemiştir. Başlangıçta madde miktarının daha fazla alınması tavsiye edilir.

Tıbbî açıdan oldukça önemli olan Nerium oleanderin kimyasal bileşenlerinin ayrıntılı olarak incelenmesinin bilime katkısı büyük olacaktır. Ayrıca Dr. Ziya ÖZEL'in bu bitkiden elde edilen bir bileşimin kanser tedavisinde kullanılabileceği iddiası gözardı edilmemelidir. Temennimiz bu iddianın Türk araştırmacıları tarafından aydınlatılmasıdır.

## K A Y N A K L A R

- Abe F., and Yamauchi T., 1979, Chem. Pharm. Bull., 27 (7),  
1604.
- Agustin, B., 1956, Llopis Mari. Galenica Acta, 9, 81; cf. C.A.  
50, 8140 g.
- Ajazzi-Mancini M., 1952, Arch. Intern. Pharmacodyn, 139, 42.
- Al Bassam H., 1966, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 168 (6), 1405.
- Baljet H., 1918, Schweiz Apotheker Ztg., 156,71.
- Basilico F., 1966, Corriere Farm., 21 (17), 417.
- Bors Gh., Popa I., Voicu A., Radian I.S., 1971, Pharmazie,  
26 (12), 764.
- Brockelt G., 1963, Pharmazie, 18 671.
- Bunzaburo N., 1949, Folia Pharmacol Japon, 45, No 2, Proc, 134.
- Burton L.E., Picchioni A.L., and Chin L., 1971, Arch. Intern.  
Pharmacodyn. Ther., 189 (1), 12.
- Bush I.E., 1965, Methods Biochem. Anal., 13, 357.
- Bush I.E., 1961; 1964, The Chromatography of Steroids, Pergamon,  
Oxford.
- Canback Th., 1950, Svensk Farm. Tidska., 54, 201 ve 225.
- Carr F.H., and Price E.A., 1926, Biochem. J., 20, 498.
- Chen, Steldt, Fried and Elderfield, 1942, J. Pharmacol, 74, 381.



- Chiarlo I.B., 1964, Boll. Chim. Farm., 103 (6), 423.
- Chiarlo I.B., 1964, Riv. Ital. Sostanze Grasse, 41 (11), 585.
- Cortesi R., 1951, Boll, Chim. Farm., 90 (48).
- Cortesi R., Pharm. Acta Helv., 18, 215 (1943).
- De Pinto F., Palermo D., Milillo M.A., Laffaldano D., 1981,  
Clin. Vet., 104 (1), 15.
- Doelker F., Kapetanidis J., and Mirimanoff A., 1969, Pharm.  
Acta Helv., 44, 647.
- Dominguez J.A., Gallardo M., Arauz J., and Rivera R., 1967, Ciencia  
(Mexico), 25 (31), 103.
- Duke J.A., 1983, Medicinal Plants of the Bible, 1st ed., Conch  
Publications, New York.
- Duke J.A., 1981, Nutrition File, Computer index to nutritional  
data in 21 a to e.
- Eliakis C.E., Eliakis E.C., and A.S., 1961, Coutselinis. Ann.  
Med. Legale Criminal., Police Sci. Toxicol., 41, 367.
- Fabre R., Cortesi R., Rougier G., and Cortesi J., 1950, J. Med.  
Bordeaux, 127, 839.
- Fauconnet L., and Wallesbühl M., 1963, Pharm. Acta Helv, 38, 423.
- Fayez M.B.E., and Negm. S.A.R., 1973, Egypt J. Chem., 16 (1), 75.
- Frerejacque M., 1951, R. Acad. Sci. Paris, 232, 2369.
- Frerejacque M., 1960, C.R. Acad. Sci. Paris, 251, 591.
- Frerejacque M., and De Graeve P., 1963, Ann. Pharm. Frac., 21,  
509.
- Fuchs L., Wichtl M., and Jachs H., 1958, Arch. Pharm., 291, 193.
- Gibert Queralto L.J., 1940, Rev. Clinican Espana, 1, 516.

- Goetz M.H., 1969, *Arzneim. Forsch.*, 19 (7), 1146.
- Görlich B., 1961, *Planta Med.*, 9, 442.
- Halpaap H., 1965, *Chemiker-Zig.*, 89,885.
- Hance F.E., 1963, *Hawaiian Planters Records*, 56 (4), 245.
- Hardin J.W., and Arena J.M., 1974, *Human Poisoning from Native and Cultivated Plants*, 2nd ed., Duke University Press, Durhan, 194.
- Hörhammer L., Wagner H. and Luck R., 1956, *Arch Pharm.*, 298, 613.
- Jöger H., Schindler O., Reichstein T., 1959, *Helv. Acta*, 42, 661.
- Janiak P. St., Weiss Ek., Euw J.V., Reichstein T., 1963, *Helv. Acta XLVI*, 37, 374.
- Jeliffe R.W., 1967, *J. Chromatog.*, 27, 172.
- Jensen K.B., 1953, *Acta Pharmacol Toxicol.*, 9, 99.
- Kaiser F., 1966, *Arch. Pharm.*, 229, 263.
- Kaiser F., 1955, *Chem Ber.*, 88, 556.
- Kaiser F., Heack E., and Spingler H., 1957, *Ann. Chem*, 603, 75.
- Karawya M.S., Elkiey M.A., El-Moghazy A.M., Salem S.A., 1970, *UAR J. Pharm. Sci.*, 11 (2) 211.
- Karawya M.S., Elkiey M.A., El-Moghayz A.M., Salem S.A., 1970, *UAR J. Pharm. Sci.*, 11 (2), 221.
- Karawya M.S., Balbaa S.L., Khayyal S.E., 1973, *Egypt J. Pharm. Sci.*, 14 (2), 113.
- Kedde D.L., 1947, *Pharm. Weekbl.*, 82, 741.
- Kindl H., and Hoffmann-Ostenhof O., 1966, *Monats. Chem.*, 97 (6), 1778.
- Kish, 1946, *Exptl. Med. Surg.*, 4,4; *C.A.*, 41, 218 (1947).

- Krebs K.G., Heusser D., and Wimmer H., in E. Stahl (Editor)., 1967, *Dünnschicht-Chromatographie*, 2nd ed., Springer, Berlin, p. 813.
- Libizova L.F., Loshkarev P.M. Burdeleva T.V., USSR, 435, 825 (Cl. A 61 k 27 (14), 15 Jun. 1974, Appl. 1, 849, 000, 17 Nov. 1972.
- Mac Lennan A.P., Randall H.M., and Smith D.W., 1959, *Anal. Chem.*, 31, 2020.
- Matthes H. and Schütz P., 1927 *Chem. Zentr.*, 1, 2753.
- Mauli R., Tamm Ch. and Reichstein T., 1957, *Helv. Chim. Acta*, 40, 284.
- Men J.L., and Pourrat H., 1952, *Ann. Pharm. Franc.*, 10, 349.
- Neumann W., 1937, *Ber.* 70B., 1547.
- Nover L., 1967, *Arch. Pharm.*, 300, 1022.
- Nover L., 1969, *Arch. Pharm.*, 302, 321.
- Nover L., Baumgarten G. and 1968a, *M.J. Chromatog.*, 32, 93; 1968b, 32, 123; 1968c, 32, 14.
- Nover L., Juttner G., Noack S., Baumgarten G., and Luckner M., 1969a, *J. Chromatog.*, 39, 419.
- Osterwald K.H., 1941, *Klin. Wochschr.*, 20, 146.
- Otto M., Karl H., 1967, *Ind. Congr. Chemother. Proc.*, 2 (1), 73.
- Pearson W.A., 1948, *J. Am. Inst. Homeopathy*, 41, 202.
- Perdue R.E., Hartwell Jr and J.T., 1976, Eds., *Plants and Cancer Proc. 16th Annu. Meet. Soc. Econ. Bot. Cancer Treatment Rep.*, 60 (8), 973.
- Pesez M., 1952, *Ann. Pharm. Franc.*, 10, 104.
- Plouvier V., 1960, *Compt. Rend.*, 251, 131.
- Rabitzsch G., and Jüngling S., 1969, *J. Chromatog.*, 41, 96.

- Rabitzsch G., and Tambor U., 1969, *Pharmazie*, 24, 266.
- Radfoad D.J., Gillies A.D., Hinds J.A., Duffy P., 1986, *Med. J. Aust.*, 144 (10), 540.
- Rehnelt K., 1949, *Süddeut. Apoth. Ztg.*, 89, 10.
- Reissbrodt R., (Veb. Ysat wernigerode), 1969, *Personal Communication*.
- Sachs R.M., Hield H., De Bie. J., 1975, *Hort Science*, 10 (4), 367.
- Salamon A., 1950, *Magyar Keim. Polyoirat*, 56, 121.
- Sampson K., Schild F., and Wicker R.J., 1961, *Chem. Ind. (London)*, 82.
- Siddiqui S., Begum S., Siddiqui B.S., Hafeez F., 1989, *J. Nat. Prod.*, 52 (1), 57.
- Siddiqui S., Hafeez F., Begum S., and Siddiqui B.S., 1986, *J. Nat. Products*, 49 (6), 1086.
- Siddiqui S., Hafeez F., Begum S., and Siddiqui B.S., 1988, *J. Nat. Prod.*, 51 (2), 229.
- Siddiqui S., Hafeez F., Begum S., Siddiqui B.S., 1986, *Phytochemist*, 26 (1), 237.
- Siddiqui S., Hafeez F., Begum S., Siddiqui B.S., 1987, *Planta Med.*, 53 (5), 424.
- Siddiqui S., Siddiqui B.S., Hafeez F., and Begum S., 1988, *Planta Med.*, 54 (3), 232.
- Sjöholm I., 1962, *Svensk Farm. Tidskr.*, 66, 321.
- Steidle W., 1963, *Ann. Chem.*, 662, 126.
- Straub W., 1918, *Arch. Exp. Path. Pharm.*, 82, 327.
- Szabuniewicz M., McCardy J.D., Camp. B.J., 1971, *Arch. Lut. Pharmacodyn. Ther.*, 189, (1), 12.

- Tahari A.S., Halevy H.H., and Zeidler E., 1965, J. Sci. Food. Agr., 16 (9), 568.
- Tanret G., 1932, Compt. Rend., 194, 914.
- Tarkowska J.A., Matuszewska A., 1975, Acta. Soc. Bot. Pol., 44 (3) 451.
- Tatje D.H.E., 1957, J. Pharm. Pharmacol., 9, 29.
- Tatje D.H.E., 1958, Pharm. Weekbl., 93, 245.
- Therezinhar Myrtes Costa L.M., Newton Marcos G., Neto S., Moises J., Jose Elias M., 1980, Ciene. Cult. (Sao Paulo) 32 (Suppl. Simp. Plant. Med. Bros., 5th, 1978, 172-9.
- Tittel G., 1986, Pharm. Ind., 48 (7), 822.
- Tschesche R. and Grimmer G., 1960, Chem. Ber., 93, 1477.
- Tschesche R., Bohle K., and Neumann W., 1938, Ber. 71B, 1927.
- Tschesche R., Chaudhuri and Snatzke P.K., 1964, Naturwissenschaften 51 (6), 139.
- Turkovic I., 1959, J. Pharm. Belg., 14, 376.
- Turkovic I., 1959, J. Pharm. Belg., 14, 447.
- Voicu A., Popa I., Bors Gh., 1971, Farmacia (Bucharest), 19 (1), 11.
- Von der Dunk Klaus, P.T.A. Prakt. Pharm., 8 (11), 340, 1979.
- Von Hoesslin H., 1936, Klin. Wachschs, 15, 1677.
- Wagner H., and Luck R., 1955, Naturwissenschaften, 42, 607.
- Waldi D., 1965, J. Chromatog., 18, 417.
- Watt J.M., and Breyer-Brandwijk M.G., 1962, The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa, 2nd ed., E. ve S. Livingtone, Edinburgh, 1457.

- Wichtl M., and Fucks L., 1962, Arch. Pharm., 295, 361.
- Wright, 1963, J. Chem. Ind. (London), 1125.
- Yakar, N., 1964, Renkli Türkiye Bitkileri Atlası.
- Yamauchi T., Abe F., Tachibana Y., Atal C.K., Sharma B.M.,  
Imre Z., 1983, Phytochemistry, 22 (10), 2211.
- Yamauchi, 1985, Yakugaku Zasshi, 105 (8), 695.
- Yong K.L., and Tho Y.L., 1976, J. Sains Farm-Malays, 1(1), 12.
- Yu E., 1941, Shass. Farmatsiya 4, No. 11/12, 43.
- Zoz I., Komissarenko and Chernykh N.A., 1968, Rast. Resur.,  
4(1), 112.