

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



PROJE BAŞLIĞI

Fumana procumbens'in kimyasal özelliklerinin incelenmesi

Proje No:

THD-2016-7007

Proje Türü

Hızlı Destek

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Perihan Gürbüz

Eczacılık Fakültesi/Farmakognozi Ab.D.

Araştırmacının Adı Soyadı:

Şengül Dilem Doğan

Eczacılık Fakültesi/ Eczacılık Temel Bilimleri

Haziran 2017

KAYSERİ

TEŞEKKÜR:

Bu projeyi maddi olarak destekleyen ERÜ BAP (THD-2016-7007) birimine teşekkürlerimi sunarım.

Perihan Gürbüz

ÖZET:

Fumana procumbens (Dunal) Gren toprak üstü kısımlarının ilk fitokimyasal incelemesi & Godr. sonucunda iki biflavonoit Dihidrodaphnodorin B (1) daphnodorin B (2) ve üç flavonoit, kuersitrin (3), miyrisitrin (4), kersetin (5) ve bir flavan türevi epigallokateşin (6) yapısında altı bileşik izole edildi. Bileşiklerin yapıları, 1D ve 2D- NMR deneyleri ve kütle spektroskopisi deneyleriyle birlikte aydınlatılmıştır. Bu çalışma, biflavonoitlerin *Fumana* cinsinden ve Cistaceae familyasından izole edilmesine ilişkin ilk çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: *Fumana procumbens*; Cistaceae; biflavonoit, kemotaksonomi.

ABSTRACT:

The first phytochemical investigation on the aerial parts of *Fumana procumbens* (Dunal) Gren. & Godr. led to the isolation and identification of six compounds, including two biflavonoids dihydrodaphnodorin B (1) daphnodorin B (2) and, three flavonoids, quercitrin (3), myricitrin (4), quercetin (5) and a flavan derivative epigallocatechin (6). The structures of the compounds were elucidated by extensive 1D- and 2D-NMR spectroscopic analysis in combination with MS experiments. This is the first report on the isolation of biflavonoids from genus *Fumana* and from family Cistaceae.

Keywords: *Fumana procumbens*; Cistaceae; biflavonoid, chemotaxonomy

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	4
ABSTRACT	5
İÇİNDEKİLER	6
SİMGELER VE KISALTMALAR	7
1. GİRİŞ	8
2. GENEL BİLGİLER	9
3. DENEYSEL KISIM	10
3.1. Kimyasal Maddeler ve Aletler	10
3.2. Bitkisel Materyal	10
3.3. Kromatografik Yöntemler	10
3.4. Ekstraksiyon ve İzolasyon Çalışmaları	12
4. BULGULAR	13
4.1. Spektral Bulgular	13
5. TARTIŞMA & SONUÇ	15
Referanslar	16

SİMGELER ve KISALTMALAR

Ac	Asetil
CHCl₃	Diklorometan
CH₂Cl₂	Metanol
¹³C NMR	¹³ C-Nükleer Manyetik Rezonans
d	Dublet
dd	Dublet dublet
dt	Dublet triplet
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetilsülfoksit
ESI-MS	Electron Spray Ionisation Mass Spectroscopy
¹H NMR	¹ H Nükleer Manyetik Rezonans
Hz	Herz
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
<i>J</i>	Kenetlenme Sabiti
MeOH-<i>d</i>₄	Dötero Metanol
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
ppm	Milyonda bir kısım
q	Kuartet
s	Singlet
t	Triplet
UV	Ultraviyole
VSK	Vakum Sıvı Kromatografis

1. GİRİŞ

Bitkiler üzerinde yapılan araştırmalarda bitkilerin, ekosistemle olan ilişkisinde, çevresel koşullara uyumunda, savunma, korunma, hayatta kalma, nesillerini sürdürme gibi önemli olaylarda çeşitli avantajlar sağlayan, sekonder metabolit olarak tanımlanan kimyasal maddeler içerdikleri saptanmıştır. Bitkilerin yapılarında bulunan bu sekonder metabolitlerin çoğu bir bitki cinsine ve hatta bazen tek bir bitki türüne özğüdür. Çok büyük yapısal çeşitliliğe sahip olan sekonder metabolitler, bitkide seconder metabolizma yollarının ara ürünlerinden, özel metabolik yollarla üretilmektedirler. Sekonder metabolitler üzerinde yapılan araştırmalarda bu bileşiklerin bitkiler tarafından çok az miktarlarda üretildiği saptanmıştır. Buna karşılık başta tıp ve gıda sektörü olmak üzere birçok endüstriyel alanda yaygın olarak kullanılmaları (farmasötikler, gıda katkı maddeleri, tatlandırıcılar, boyalar, koku vericiler, yapıştırıcılar, insektisitler, pestisitler vb.) nedeniyle bu metabolitlere duyulan gereksinim giderek artmakta ve bunun sonucunda da ekonomik olarak önem kazanmaktadır.

Fumana cinsi Cistaceae familyasına dahil olup dünyada 22 Türkiye’ de ise doğal olarak yetişen 10 türle temsil edilmektedir. Halk arasında herhangi bir kullanımı bulunmayan bu cinsin kimyası üzerine de çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada üzerinde herhangi bir fitokimyasal çalışma bulunmayan *Fumana procumbens* bitkisinin kimyasal içeriğini belirlemek için çeşitli kromatografik ve spektroskopik metodlar kullanılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Fumana cinsi Akdeniz ikliminin bir parçası olup, Cistaceae familyasına dahil olup dünyada 22 Türkiye’ de ise üçü endemik, doğal olarak yetişen 10 türle temsil edilmektedir (1). Bitkinin halk arasında herhangi bir kullanımı bulunmamaktadır.

Fumana cinsi üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar çok kısıtlı olup, *Fumana thymifolia* üzerinde bir uçucu yağ çalışması ve *F. montana* üzerinde bir flavonoid izolasyon çalışması bulunmaktadır (2,3). Cistaceae familyasında üzerinde en çok çalışma bulunan cins, *Cistus* olup, bu cinsten genellikle labdan tip diterpenler, flavonoller ve flavan türevi maddeler izole edilmiştir.

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Kimyasal Maddeler ve Aletler

Vanilin (Merck), Solvanlar: Aseton, Diklorometan, Etilasetat, Kloroform, Metanol, n-Butanol, n- hekzan, Petrol Eteri, Sülfürik asit, Toluen (Merck, Carlo Erba). İTK çalışmalarında Normal faz silika jel (Hazır aluminyum plak, Kieselgel 60 F254 0,2 mm, Merck 5554) ve Ters faz silika jel (Hazır aluminyum plak, RP-18, 0,2 mm, Merck 5559) kullanılmıştır. Kolon kromatografisi için Normal faz silika jel (Kieselgel 60, 0,063-0,2 mm, Merck 7734), Sephadex (LH-20, Fluka), ters faz kolon kromatografisi için ise Ters faz silika jel (LiChroprep RP-18, 40-63 µm, Merck) kullanılmıştır.

3.2. Bitkisel Materyal

Fumana procumbens, Haziran 2010’ da Antalya’ dan Isparta’ ya giderken yol kenarındaki kalkerli topraklardan toplanmıştır. Çalışmalarımızda, bitkinin gölgede kurutulmuş çiçekli toprak üstü kısımları kullanılmıştır.

3.3. Kromatografik Yöntemler

İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

Kolon kromatografisi çalışmalarında toplanan fraksiyonların izlenmesinde ve bileşiklerin şahit maddeler ile karşılaştırılmasında, normal faz ve ters faz silika jel kaplı hazır aluminyum plaklar kullanılmıştır.

Numune Tatbiki: Numuneler bir pastör pipeti yardımıyla, plağın alt ucunun 1 cm yukarısından ve 0,6 cm aralıklarla tatbik edilmiştir. Kromatografi tankına konulan plaklar 7 - 10 cm mesafe boyunca sürüklenmiştir.

Açık Kolon Kromatografisi

Çalışmalarımızda adsorban olarak ön fraksiyonlama için silika jel, saflaştırma için silika jel ve Sephadex LH-20 kullanılmış olan açık kolon kromatografisi yönteminden yararlanılmıştır. Fraksiyonlar ön fraksiyonlamada 100’ er ml, saflaştırılma aşamalarında ise 5 - 10 ml toplanmış ve kontrolleri İTK ile yapılmıştır. Aynı Rf değerine sahip olan ve revelasyon sonucunda benzer görünen fraksiyonlar bir araya toplanmıştır.

Kolonun Hazırlanması

Normal faz silika jel kolon kromatografisi (SK):

İstenilen miktarda tartılan silika jel yeterli miktarda solvan sistemi ile süspansiyon haline getirilmiştir ve karışım alt ucuna pamuk yerleştirilmiş olan cam kolona aktarılmıştır.

Kolondan yeterli miktarda solvan sistemi geçirilerek adsorbanın yerleşmesi sağlanmıştır. Adsorban üzerinde 2 - 3 mm solvan kalıncaya kadar beklenmiş ve solvan sisteminde çözülmüş olan numune kolona tatbik edilmiştir.

Sephadex LH-20 kolon kromatografisi (SFK):

İstenilen miktarda tartılan Sephadex LH-20, yeterli miktarda metanol ile karıştırılmıştır. Karışım, alt ucuna pamuk yerleştirilmiş olan cam kolona doldurulmuş ve adsorban tamamen yerleşinceye kadar kolondan metanol geçirilmiştir. Adsorbanın üzerinde 1 - 2 mm solvan kalınca MeOH'da çözülen numune kolona tatbik edilmiştir.

Kolon Kromatografisi İçin Numune Tatbiki

Çözücü yardımı ile tatbik: Numune yeterli miktarda solvan/solvan sistemi içinde tamamı çözüldükten sonra, bir pastör pipeti yardımı ile kolona tatbik edilmiştir. Kolon musluğu açılarak numune adsorbana emdirilmiştir. Kolonun üzerine, adsorban yüzeyinin bozulmasını engellemek için pamuk yerleştirilmiş ve kolona yeterli miktarda solvan sistemi eklenerek elüsyona başlanmıştır.

3.4. Ekstraksiyon ve İzolasyon

F. procumbens' in gölgede kurutulmuş ve toz edilmiş topraküstü kısımları (450 g), %80 MeOH ile 37 °C' de her defasında 1L MeOH kullanılarak üç defa ekstre edilmiştir. Çözücü uçurulduktan sonra kalan ham MEOH ekstresi (29 g), polyamide 6 (50 x 5 cm) kolona yüklenmiştir ve H₂O: MeOH çözücü sisteminin değişen oranlarıyla elüe edilmiştir. Bu kolondan dört ana fraksiyon elde edilmiştir (Fr. 1-4) [FR₁: 11 g, FR₂: 2.6 g, FR₃: 1.4 g, FR₄: 2.4 g]. FR₄ (2.4 g) hazır doldurulmuş Sigel kolona (120 g) tatbik edilmiş ve OBSK sistemi yardımıyla CHCl₃-MeOH-H₂O (80:20:2) çözücü sistemiyle elüe edilmiştir. Bu kolondan on alt fraksiyon (FR₄ A-I). elde edilmiş ve FR₄D' nin (250 mg) SP LH-20 (MeOH) kolonuyla temizlenmesi sonucunda 1 (13 mg) ve 2 (22 mg) nolu bileşikler sırasıyla izole edilmiştir. FR₄B (40 mg) SP LH-20 kolondan MeOH ile elüe edilmiş ve bu alt fraksiyondan 5 (4 mg) ve 6 (7 mg)nolu bileşikler sf olarak izole edilmişlerdir. FR₃ (1.4 g), Sigel kolona tatbik edilmiş ve CHCl₃-MeOH- H₂O (90:10:1 →70:30:3) solvan sistemiyle elüe edilmiştir. Bu fraksiyondan, 3 (20 mg) ve 4 (6 mg) nolu bileşikler de sırasıyla izole edilmişlerdir.

4. BULGULAR

4.1. Spektral Bulgular

İzole edilen bileşiklerin yapıları 1D ve 2D-NMR çalışmaları ve literatür verileri yardımıyla dihidrodafnodorin B (4,5), dafnodorin B (6) (Tablo 1), kuersitrin (7), miyrisitrin (7), kersetin (8) ve epigallokateşin (9) olarak aydınlatılmıştır. Maddelere ait spektral veriler aşağıda verilmiştir.

Tablo 1. NMR spectroscopic data of compounds 1-2 [in CD₃OD (400 MHz for ¹H and 100 MHz for ¹³C, δ in ppm and J in Hz]

Dihydrodaphnodorin B				Daphnodorin B			
No	C/ H	δ_C	δ_H	No	C/ H	δ_C	δ_H
2	CH	80.8	4.72 d, $J=7$	2	CH	81.3	4.52 d, $J=8.2$
3	CH	67.7	3.91 m	3	CH	67.7	3.86 m
4	CH ₂	26.8	2.82 dd, $J=16.1/4.9$ 2.56 dd, $J=16/7.9$	4	CH ₂	28.6	3.02 dd, $J=16.3/5.6$ 2.61 dd, $J=16.2/9$
4a	C	99.7		4a	C	103.1	
5	C	156.3		5	C	153.6	
6	CH	88.7	6.02 s	6	CH	89.2	6.56 s
7	C	160.5		7	C	147.8	
8	C	104.2		8	C	110.1	
8a	C	150.9		8a	C	153.2	
1'	C	130.2		1'	C	129.4	
2'/6'	CH	127.4	7.10 d, $J=8.6$	2'/6'	CH	127.6	6.97 d, $J=8.5$
3'/5'	CH	114.3	6.68 d, $J=8.6$	3'/5'	CH	114.3	6.67 d, $J=8.6$
4'	C	156.2 ^a		4'	C	157.3 ^b	
2''	CH	87.5	6.05 d, $J=10.4$	2''	C	148.3	
3''	CH	55.8	5.94 d, $J=10.5$	3''	C	117.4	
4''	C	201.7		4''	C	195.3	
5''	C	105.1		5''	C	106.4	
6''	C	156.4 ^a		6''	C	166.2 ^c	
7''	CH	94.1	5.65 bs	7''	CH	94.4 ^a	5.68 bs
8''	C	156.3 ^a		8''	C	166.2 ^c	
9''	CH	94.2	5.65 bs	9''	CH	94.3 ^a	5.68 bs
10''	C	156.3 ^a		10''	C	166.2 ^c	
11''	C	128.8		11''	C	122.0	
12''/16''	CH	128.2	7.10 d, $J=8.6$	12''/16''	CH	126.9	7.49 d, $J=8.8$
13''/15''	CH	113.8	6.56 d, $J=8.6$	13''/15''	CH	115.0	6.77 d, $J=8.8$
14''	C	156.5 ^a		14''	C	156.3 ^b	

^{a,b,c} interchangeable

Quercitrin (3): ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.35 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-2'), 7.32 (dd, $J = 8.3, 2.1$ Hz, 1H, H-6'), 6.92 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-5'), 6.38 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-8), 6.21 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-6), 5.36 (bs, 1H, H-1''), 4.23 (dd, $J = 3.2, 1.6$ Hz, 1H, H-2''), 3.76 (dd, $J = 9.3,$

3.3 Hz, 1H, H-3"), 3.43 (m, 1H, H- 5"), 3.36 (m, 1H, H-4"), 0.95 (d, J = 6.1 Hz, 3H, H-6").

¹³C NMR (100 MHz, MeOD) δ 178.2 (C-4), 164.4 (C-7), 161.8 (C-5), 157.9 (C-9), 157.1 (C-2), 148.3 (C-3'), 145.0 (C-4'), 134.8 (C-3), 121.5 (C-1'), 121.4 (C-6'), 115.4 (C-2'), 114.9 (C-5'), 104.4 (C-10), 102.1 (C-1"), 98.3 (C-6), 93.2 (C-8), 71.8 (C-4"), 70.6 (C- 3"), 70.6 (C-5"), 70.4 (C-2"), 16.2 (C-6").

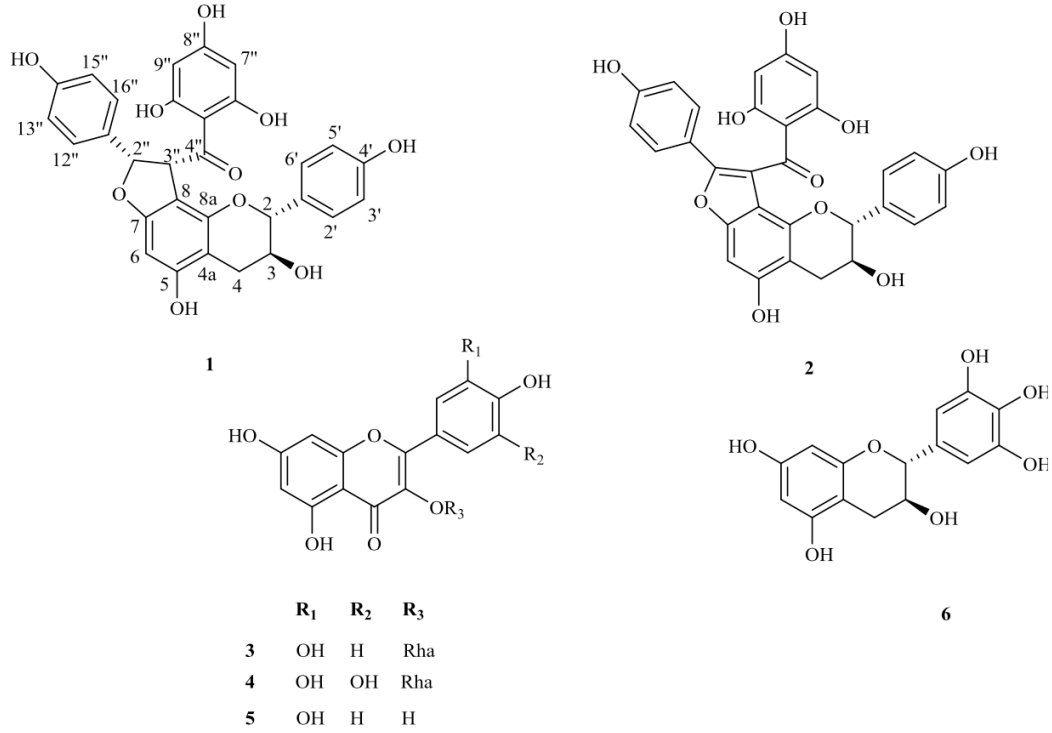
Myricitrin (4): ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 6.95 (s, 2H, H-2', H-6'), 6.37 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H-8), 6.21 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H-6), 5.32 (bs), 4.23 (dd, J = 3.2, 1.7 Hz, 1H, H-2"), 3.80 (dd, J = 9.5, 3.3 Hz, 1H, H-3"), 3.53 (dd, J = 9.6, 6.2 Hz, 1H, H-5"), 3.36 (d, J = 6.1 Hz, 1H, H-4"), 0.97 (d, J = 6.2 Hz, 3H, H-6"). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 178.2 (C-4), 164.5 (C-7), 161.8 (C-5), 158.0 (C-9), 157.0 (C-2), 145.4 (C-3', C-5'), 136.4 (C-4'), 134.8 (C-3), 120.4 (C-1'), 108.0 (C-2', C-6'), 104.3 (C-10), 102.2 (C-1"), 98.3 (C-6), 93.2 (C-8), 71.8 (C-4"), 70.6 (C-3", C-5"), 70.4 (C-2"), 16.2 (C-6").

Quercetin (5): ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.75 (bs, 1H, H-2'), 7.65 (bd, J = 8.3 Hz, 1H, H-6'), 6.89 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-5'), 6.40 (bs, 1H, H-8), 6.19 (bs, 1H, H-6).

Epigallocatechin (6): ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 6.52 (s, 2H), 5.94 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H-8), 5.92 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H-6), 4.76 (bs, 1H, H-2), 4.18 (m, 1H, H-3), 2.86 (dd, J = 16.7, 4.6 Hz, 1H, H-4a), 2.74 (dd, J = 16.8, 2.9 Hz, 1H, H-4b).

5. TARTIŞMA SONUÇ

Bu çalışmada *F. procumbens*' in toprak üstü kısımlarından 2 biflavonoit, Dihidrodafnodorin B, Dafnodorin B, 2 flavonoit glikoziti kuersitrin ve miyrisitrin, b,r flavonoid aglikonu kersetin ve bir flavonol yapısında madde olan epigallokateşin izole edilmiştir. Maddelerin yapıları Şekil 1' de verilmiştir.



Şekil1. *F. procumbens*' ten izole edilen seconder metabolitler

Sonuç olarak bu çalışma ile 1-4 ve 6 nolu maddeler *Fumana* cinsinden, 1 ve 2 nolu maddeler de Cistaceae' den ilk defa izole edilmiştir.

Referanslar

- [1]. S. Bogdanović, I. Boršić, I. Rešetnik and T. Šegedin (2012). Taxonomic revision of the genus *Fumana* (Cistaceae) in Croatia, *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*. 146, 69-85.
- [2]. M. Couladis and O. Tzakou (2001). The Oil of *Fumana thymifolia* (L.) Spach ex Webb from Greece, *Journal of Essential Oil Research*. 13, 434-435.
- [3]. H. Laraoui, C. Long, H. Haba and M. Benkhaled (2013). New methylated flavonol glucosides from *Fumana montana* Pomel, *Natural product research*. 27, 1770-1775.
- [4]. M. Taniguchi, A. Fujiwara and K. Baba (1997). Three flavonoids from *Daphne odora*, *Phytochemistry*. 45, 183-188.
- [5]. S. Liang, J.-M. Tian, Y. Feng, X.-H. Liu, Z. Xiong and W.-D. Zhang (2011). Flavonoids from *Daphne aurantiaca* and their inhibitory activities against nitric oxide production, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 59, 653-656.
- [6]. K. Baba, K. Takeuchi, F. Hamasaki and M. Kozawa (1985). Three new flavans from the root of *Daphne odora* Thunb, *Chemical and pharmaceutical bulletin*. 33, 416-419.
- [7]. M. A. Aderogba, A. R. Ndhlala, K. R. Rengasamy and J. Van Staden (2013). Antimicrobial and selected in vitro enzyme inhibitory effects of leaf extracts, flavonols and indole alkaloids isolated from *Croton menyharthii*, *Molecules*. 18, 12633-12644.
- [8]. P. Gürbüz, L. Ö. Demirezer, Z. Güvenalp, A. Kuruüzüm-Uz and C. Kazaz (2015). Isolation and Structure Elucidation of Uncommon Secondary Metabolites from *Cistus salviifolius* L, *Records of Natural Products*. 9, 175.
- [9]. A. L. Davis, Y. Cai, A. P. Davies and J. Lewis (1996). ¹H and ¹³C NMR assignments of some green tea polyphenols, *Magnetic resonance in Chemistry*. 34, 887-890.