

## KIRMIZI DENİZ YOSUNU *LAURENCIA OBTUSA*'NİN KİMYASAL YÖNDEN İNCELENMESİ\*

### CHEMICAL INVESTIGATION OF THE MARINE RED ALGA *LAURENCIA OBTUSA*

Sezen İSLİMYELİ\*\* - Mahmure ÜSTÜN\*\* - Naciye YILMAZ\*\*

#### SUMMARY

In this study yellow and green varieties of the marine red alga *Laurencia obtusa* collected from Karaburun/İzmir were chemically investigated. Three metabolites were isolated and their structures were identified as the stereoisomer of Laurencienyne (new), Cholesterol, and Obtusallene- I.

#### ÖZET

Bu çalışmada Karaburun/İzmir 'den toplanan kırmızı deniz yosunu *Laurencia obtusa*'nın sarı ve yeşil varyeteleri kimyasal yönden incelendi. Üç metabolit izole edildi ve yapıları Laurensienin'in stereozimeri (yeni), Kolesterol ve Obtusallen- I olarak aydınlatıldı.

#### GİRİŞ

Deniz organizmalarının kimyası yetmişli yılların başında incelenmeye başlanmış ve günümüze değin bu alanda hızlı gelişmeler kaydedilmiştir (1-5).

Kırmızı yosunlardan (algler) *Laurencia* cinsi (*Rhodomelaceae*, *Rhodophyta*) en ilgi çeken deniz organizmaları arasındadır. Bunun nedeni *Laurencia* türlerinin bilinen bazı bileşikler yanında çok ilginç halojenli sekonder metabolitler içermesidir. Bu metabolitler seskiterpenler ve diterpenler ile terminal asetilen ya da allen fonksiyonları içeren C<sub>15</sub> siklik esterler olmak üzere üç ana grupta toplanabilir. Sonuncu gruptaki metabolitler *Laurencia* cinsi yosunlara ve bu yosunlarla beslenen *Aplysia* cinsi deniz tavşanlarına özgüdür.

\* Bu çalışma Yıldız Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (YÜAF- 87- B-01-02-04)

\*\* Yıldız Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Şişli 80270 / İSTANBUL.

Türkiye kıyılarında en çok rastlanan *Laurencia* cinsi yosun *Laurencia obtusa*'dır. Bu yosun türüyle ülkemizde bugüne değin yapılan çalışmalar sonunda altı adet yeni halojenli metabolit izole edilerek yapıları aydınlatılmıştır (6-11). Bunlardan dördü asetilenik, biri allenik siklik eter, biri seskiterpen yapısındadır.

Bu çalışmada İzmir'in Karaburun ilçesi kıyılarından toplanan iki ayrı *Laurencia obtusa* varyetesinden üç metabolit izole edilmiş ve yapıları spektral yöntemlerle aydınlatılmıştır.

## DENEYSEL BÖLÜM

### Genel İncelemeler

Erime derecesi tayinleri Kofler cihazında yapıldı ve sonuçlar düzeltilmedi. UV- spektrumları Philips model PU 8740, IR- spektrumları Philips model PU 9700 cihazlarında kaydedildi. <sup>1</sup>H-NMR spektrumları 220MHz Varian ve 360MHz Bruker cihazlarında kaydedildi, kimyasal kaymalar Me<sub>4</sub>Si (δ=0) a göre saptandı. <sup>13</sup>C-NMR spektrumu 90MHz Bruker cihazında, EI- Kütle spektrumları MS-30 AEI ve CI-Kütle spektrumları Kratos MS-50 (Reaksiyon gazı NH<sub>3</sub>) cihazlarında kaydedildi.

Kromatografik ayırmalarda adsorban olarak silika jel kullanıldı. Kolon kromatografisinde kieselgel 60 (0.063-0.200mm; Merck), ince tabaka kromatografisinde (itk) kieselgel-60 HF<sub>254</sub> ile 0.5mm kalınlığında laboratuarda hazırlanan ve ayrıca 0.2mm kalınlıktaki hazır plaklar kullanıldı. Uygun çözücülerde developpe edilen plaklar Desaga 254-366nm lamba altında incelendi. Püskürtme belirteci olarak antimon (III) klorürün kloroformdaki doymuş çözeltisi ve sülfürik asidin etanoldeki %50 lik çözeltisi kullanıldı. Belirteç püskürtüldükten sonra plaklar oda sıcaklığında ve 90°C de ısıtılarak incelendi. Çözeltileri kurutmak için susuz sodyum sülfat kullanıldı. Kullanılan tüm madde ve çözücüler E.Merck, Darmstadt ürünü olup analitik saflıktadır.

### Materyal Toplanması, Ekstraksiyon ve İzolasyon

*Laurencia obtusa*'nın sarı varyetesi (SL) İzmir'in Karaburun ilçesindeki Bodrum koyunda kumluk ve taşlık zemin üzerinden (-0.5m) yeşil varyetesi (YL) ise aynı ilçenin İncirli koyunda kayalık zemin üzerinden (-0.10-0.40m) Temmuz ayında elle topladı. Açık havada gölgede kurutulan yosunlar (kuru ağırlıklar SL 0.800kg, YL 1.500kg) e-

straksiyondan önce 40°C de etüvde kurutuldu. Elle ufalandıktan sonra kloroform-eter (2:1) karışımı ile oda sıcaklığında üç kez maserasyon yoluyla ekstre edildi. Ekstreler kurutuldu ve çözücüleri geri kazanıldı. Ham SLve YL ekstreleri silika jel ile hazırlanan uygun büyüklükteki kolonlarda ayrı ayrı kromatografiye edildi. Aşağıdaki elüsyon sırası takip edilerek 100ml lik fraksiyonlar toplandı: Petrol eteri (40-60°), petrol eteri/benzen (9/1), benzen, benzen/kloroform (9/1), kloroform, kloroform/metanol (9/1) ve metanol. İtk da benzer içerik gösteren fraksiyonlar birleştirildi.

### SL Metabolitleri

Silika jel kolonda benzen-elüsyonu ile elde edilen fraksiyonların ana maddesi olan SL<sub>1</sub>, kloroformda yürütülen silika jel hazır plaklardan izole edildi.

SL<sub>1</sub>- yağsı sıvı (150mg); UV(MeOH) 224.4nm (ε 16000), 235nm (omuz, ε 12300); IR( saf madde) 3275, 2910, 1725, 1445, 1362, 1225, 1140, 1090, 1060, 955cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (360MHz, CD<sub>2</sub>C1<sub>2</sub>) δ 6.07 (1H, td, J=15.0,12.0 ve 12.0 Hz), 5.64 (1H,d, J=15.0 Hz), 5.18 (1H, m), 4.87 (1H, t, J=10.0 ve 8.0 Hz), 4.25 (1H, m), 4.17 (1H, bd, J=10.0 Hz), 4.09 (1H, m), 3.76 (1H, m), 2.84 (1H, d, J=2.0 Hz), 2.63 (3H, m), 2.45 (3H, m), 2.1 (3H, s), 1.97 (2H, m), 1.04 (3H, t, J=7.0 ve7.0 Hz). <sup>13</sup>C-NMR (90 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 169.9, 139.7, 112.8, 82.0, 77.25, 76.64, 75.5, 72.7, 63.2, 62.0, 56.6, 42.1, 37.7, 31.3, 29.5, 20.9, 12.3. Kütle spektrumu: El yöntemiyle çekilen spektrumda moleküler iyon piki çok zayıf. Diğer önemli pikler; m/e 359, 361, 363(M<sup>+</sup>-C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>), 303, 305(M<sup>+</sup>-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>Br). CI kütle spektrumunda (NH<sub>3</sub> taşıyıcı gaz) M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup> piki m/e 442.0580 (C<sub>17</sub>H<sub>27</sub>BrCl<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>) olarak bulundu. (C<sub>17</sub>H<sub>23</sub><sup>79</sup>Br<sup>35</sup>Cl<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+NH<sub>4</sub>) için hesaplanan değer : 442.4043.

Silika jel kolonda benzen/kloroform elüsyonu ile elde edilen fraksiyonlardan preparatif silika jel itk yöntemiyle ayrılan SL<sub>2</sub> maddesi (yürütme çözücüsü kloroform) petrol eterinden kristallendirilerek elde edildi.

SL<sub>2</sub>- Renksiz kiristaller (25mg); e.d. 144-146°C (Lit. (13) 148.5°C); IR(KBr) 3460, 2920, 1460, 1365, 1050, 950cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (220MHz, CDCl<sub>3</sub>) 5.35,3.50,0.98,0.84,0.8,0.64.

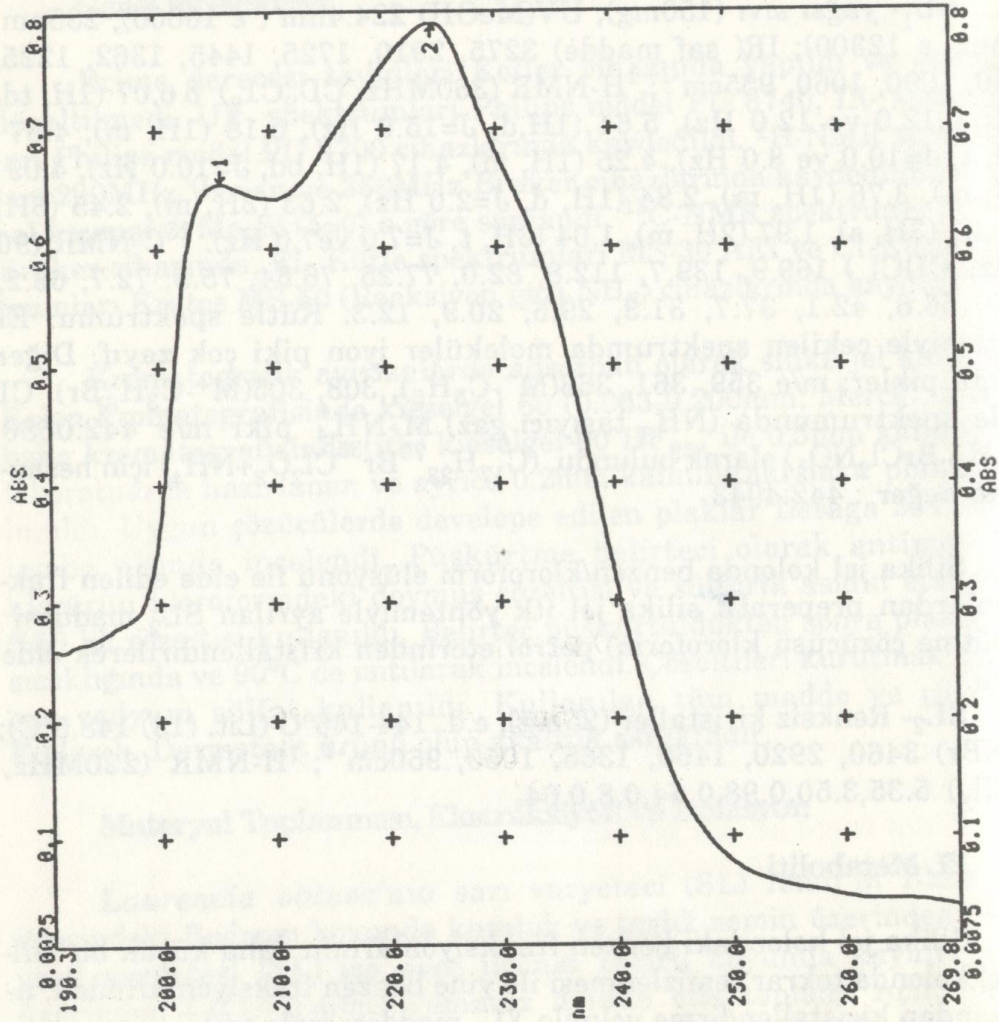
### YL Metaboliti

Silika jel kolondaki benzen fraksiyonlarının daha küçük bir silika jel kolonda tekrar temizlenmesi ile yine benzen fraksiyonlarından, n-hekzandan kiristallendirme yoluyla YL<sub>1</sub> maddesi izole edildi.

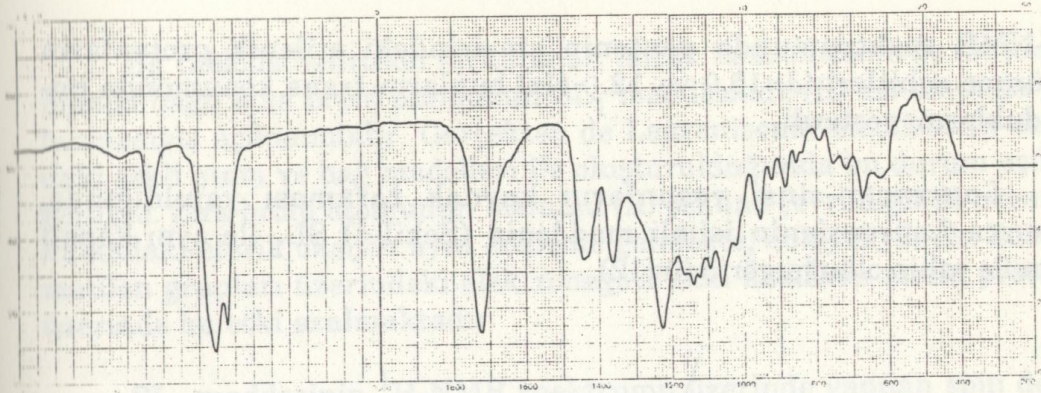
YL<sub>1</sub>- Renksiz kristaller (44mg); e.d. 164-166°C (lit (9) 165-167°C); IR (nujol) 3038, 1948, 1675, 1368, 1198, 1165, 1128, 1073, 1046, 968, 955, 917, 862, 838, 725, 657, 648cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (220MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ6.20 (1H, dd, J=15.0 ve 10.5 Hz), 6.0 (1H, dd, J=5.5 ve 2.0 Hz), 5.90 (1H, dd, J=15.0 ve 6.0 Hz), 5.56 (1H, t, J=6.5 ve 6.0 Hz), 4.59 (1H, bd, J=5.0 Hz), 4.45 (1H, dt, J=6.5, 6.5 ve 2.0 Hz), 4.23 (2H,m) 3.95 (1H, dt, J=9.0, 1.5 ve 1.5 Hz), 3.60 (1H,m), 2.80 (1H, dd, J=12.0 ve 6.0 Hz), 2.55 - 2.30 (3H, m), 1.05 (3H, d, J=7.0 Hz).

### SONUÇLAR VE TARTIŞMA

İzmir'in Karaburun İlçesi Bodrum koyundan toplanan sarı renkli *Laurencia obtusa* varyetesinden izole edilen SL<sub>1</sub> simgeli maddenin itk ile yapılan kıyaslamalı kontrolü sonunda bu metabolitin daha önce izole ettiklerimiz ile benzer olmadığı görüldü (6,11). Yağsı sıvı karakterdeki

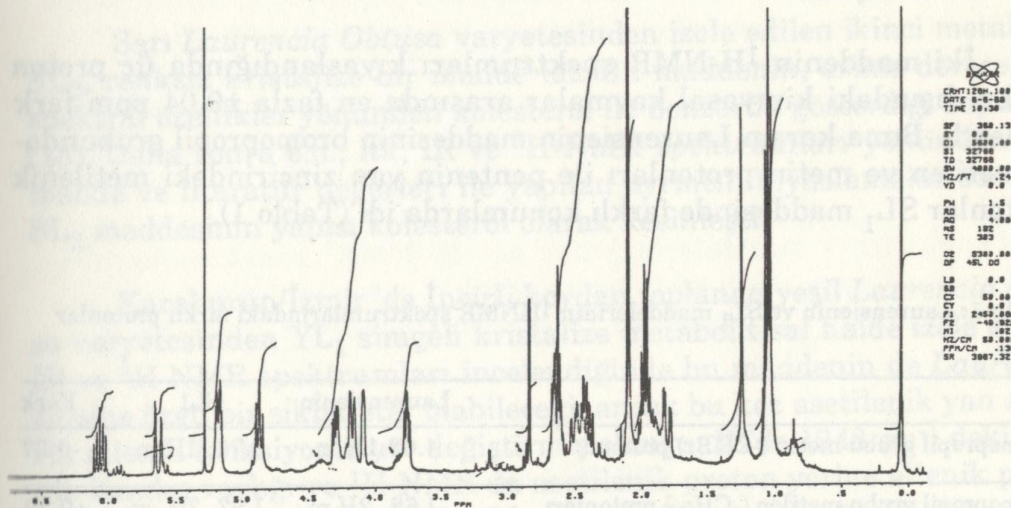


Şekil-1 : SL<sub>1</sub> maddesinin UV spektrumu.

Şekil-2 : SL<sub>1</sub> maddesinin IR spektrumu.

SL<sub>1</sub> maddesi, değişik çözücüler denenmesine karşın kiristellenmedi. Maddenin kapalı formülü, yüksek rezolüsyonlu kütle spektrumundan, C<sub>17</sub>H<sub>23</sub><sup>79</sup>B<sup>35</sup>Cl<sub>2</sub>O<sub>3</sub> olarak saptandı. Kütle spektrumunda gözlenen M<sup>+</sup>-C<sub>5</sub>H<sub>5</sub> ve M<sup>+</sup>-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>Br kokuşları ile UV (Şekil-1) ve IR (Şekil-2) spektrumlarındaki verilerden SL<sub>1</sub> maddesinin pentenin (-CH<sub>2</sub>-CH=CH-C≡CH) ve bromopropil (-CHBr-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) yan zincirleri ve halojen içeren *Laurencia* cinsi yosunlara özgü bir siklik eter olduğu kanısına varıldı.

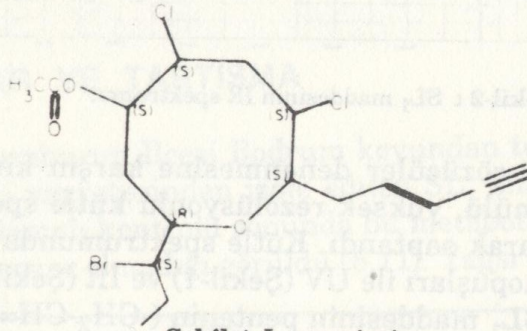
IR spektrumunda 1725 cm<sup>-1</sup> deki şiddetli band ile <sup>1</sup>H NMR spektrumunda (Şekil-3) 2.1 ppm'deki 3 protonluk singlet, molekülde bir asetil grubunun varlığını gösterdi.

Şekil-3 : SL<sub>1</sub> maddesinin <sup>1</sup>H-NMR spektrumu.

SL<sub>1</sub> maddesinin toplam doymamışlık derecesi, kapalı formül üzerinden 5 olarak hesaplandı. Bu değer bir asetilenik, bir etilenik ve bir karbonil bağı ile birlikte bir halkanın varlığı anlamına gelmekteydi.

$^1\text{H-NMR}$  spektrumunda pentenin zincirindeki etilenik protonların bölünme sabitleri ( $J=15.0$  ve  $12.0$  Hz) bunların trans konumunda bulduklarını gösterdi.

*Laurencia* cinsi yosunların kaynak taraması yapıldığında, yalnızca Laurensienin isimli maddenin (Şekil-4)  $\text{SL}_1$  ile aynı kapalı formüle sahip olduğu görüldü (12).



Şekil-4: Laurensienin.

İki maddeyi kıyaslamak amacıyla bir miktar Laurensienin test maddesi ile bu maddeye ait spektrumların birer kopyası temin edildi. Spektral verileri çok benzer olan iki maddenin farklı oldukları öncelikle, Laurensienin'in kristalize olmasına karşın  $\text{SL}_1$  in yağsı sıvı halde oluşundan ve bu maddelerin itk plaklarında farklı lekeler göstermelerinden anlaşıldı.

İki maddenin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumları kıyaslandığında üç proton grubu dışındaki kimyasal kaymalar arasında en fazla  $\pm 0.04$  ppm fark gözlemlendi. Buna karşın Laurensienin maddesinin bromopropil grubundaki metilen ve metin protonları ile pentenin yan zincirindeki metilenik protonlar  $\text{SL}_1$  maddesinde farklı konumlarda idi (Tablo 1).

**Tablo-1:** Laurensienin ve  $\text{SL}_1$  maddelerinin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumlarındaki farklı protonlar (ppm)

	Laurensienin	$\text{SL}_1$	Fark
Bromopropil grubu metin (-CHBr) protonu	4.03, 1H, m	3.76, 1H, m	-0.27
Bromopropil grubu metilen (-CH <sub>2</sub> -) protonları	1.68, 2H, m	1.97, 2H, m	+0.29
Pentenin yan zinciri metilen (-CH <sub>2</sub> -) protonları	2.50, 2H, m	2.63, 3H*, m	+0.13

\* Bu protonlardan bir tanesi halka içindeki iki klor atomunun arasında kalan metilene ait.

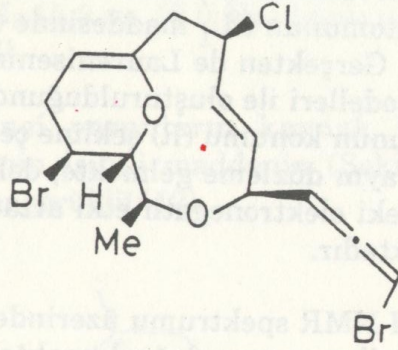
Bu tabloda belirtilen farklılıklar, ancak Laurensienin'de (S) konumunda bağlı olan brom atomunun  $SL_1$  maddesinde (R) konumunda bulunmasıyla açıklanabilir. Gerçekten de Laurensienin maddesinin uzaydaki şekli atom ve bağ modelleri ile oluşturulduğunda bu durum açıkça görüldü. Zira brom atomunun konumu (R) şekline çevrildiğinde brom ve halkadaki eterik oksijen aynı düzleme gelmekte, dolayısıyla söz konusu metilen grupları üzerindeki elektronegatif etki artarken metin protonu üzerinde bu etki azalmaktadır.

$SL_1$  maddesinin  $^1H$ -NMR spektrumu üzerinde yapılan spin dekapling çalışmaları da önerilen yapıyı doğrulamaktadır. Şöyle ki ; 1.97 ppm deki bromopropil metilenine ait pik ışınlandığında 1.10 ppm deki metil grubuna ait triplet singlete dönüşmekte, 3.76 ppm deki bromometin protonuna ait multipler sadeleşmektedir. 3.76 ppm deki metin grubuna ait pik ışınlandığında 1.97 ppm deki multipler sadeleşirken 4.17 ppm deki -OCH- protonuna ait geniş dublet keskin bir dublete dönüşmektedir. Diğer protonlar üzerinde yapılan spin dekapling çalışmaları da Laurensienin literatüründe verilen sonuçlarla uyum içindedir.

Tüm bu değerlendirmeler sonunda  $SL_1$  maddesinin yapısı, Laurensienin maddesinin, bromopropil grubundaki (S) yapısının (R) yapısıyla yer değiştirdiği ve daha önce izole edilmemiş bir stereoizomeri olarak kesinleşti.

Sarı *Laurencia Obtusa* varyetesinden izole edilen ikinci metabolit  $SL_2$ , renksiz kristalize bir madde idi. Bu maddenin, erime derecesi ve spektral özellikler yönünden kolesterol ile benzerlik gösterdiği saptandı (13). Daha sonra e.d., itk, IR ve  $^1H$ -NMR spektrumları yönünden test madde ve literatür değerleri ile yapılan ayrıntılı kıyaslamalar sonunda  $SL_2$  maddesinin yapısı kolesterol olarak kesinleşti.

Karaburun/İzmir 'de İncirli koydan toplanan yeşil *Laurencia obtusa* varyetesinden  $YL_1$  simgeli kristalize metabolit saf halde izole edildi. IR ve  $^1H$ -NMR spektrumları incelendiğinde bu maddenin de *Laurencia* cinsine özgü bir sıklık eter olabileceği, ancak bu kez asetilenik yan zincirin allenik fonksiyonla yer değiştirmiş olduğu; IR'de  $1948\text{ cm}^{-1}$  deki allenik bandın varlığı ve  $^1H$ -NMR da asetilenik proton yerine allenik protonun (6.0 ppm) varlığı ile anlaşıldı.  $YL_1$  maddesi, daha önce izole ederek göstermekteydi (9). Test madde ile itk'da yapılan kıyaslama, erime dereceleri ve iki maddenin IR ve  $^1H$ -NMR spektrumlarının karşılaştırılması sonunda  $YL_1$  maddesinin Obtusallen-I yapısında olduğu kesinleşti.



Şekil-5: Obtusallen - I.

"Bazı Deniz Organizmalarının Kimyasal Yönden İncelenmesi" başlıklı araştırma programının bir bölümünü oluşturan bu çalışmada, kıyılarımızda rastlanan ve oldukça farklı sekonder metabolitleri biyosentez edebilen bir yosun türü olan *Laurencia obtusa* ile kimyasal incelemeler yapılmış ve iki ayrı varyeteden izole edilen üç metabolitin yapısı kesinleştirilmiştir. Bunlardan ikisi (SL<sub>1</sub> ve YL<sub>1</sub>) *Laurencia* cinsine özgü halojenli asetlenik ve allenik siklik eter yapısındadır ve SL<sub>1</sub> maddesi ilk kez tarafımızdan izole edilmiştir. Çalışılan yosunlar ile araştırmalar devam etmektedir.

Deniz organizmalarının toplanmasındaki güçlük ve kirlenme sonucu çeşitli organizmaların yokolmaları, bu tür araştırmaları güçleştiren faktörlerdir. Ancak elde edilen metabolitlerin ilginç yapıları ve biyolojik etki gösterme olasılıkları bulunması yönünden "deniz organizmaları kimyası" üzerinde önemle durulması gereken bir alan olma niteliğini sürdürmektedir.

**Teşekkür** - Maddelerin kütle ve <sup>1</sup>H-NMR spektrumlarının alınmasını sağlayan ve değerli görüşlerinden yararlandığımız Prof.Dr. Ronald H. Thomson'a (Aberdeen Üniversitesi/İskoçya) şükranlarımızı sunarız.

#### KAYNAKLAR

1. Scheur, P.J., Marine Natural Products, Chemical and Biological Perspectives. Vol: I-V, Academic Press, New York, San Francisco, London, 1978-1983.
2. Faulkner, D.J., *Natural Products Reports*, 1, 25 (1984).
3. Faulkner, D.J., *Ibid.*, 3, 1 (1986).
4. Faulkner, D.J., *Ibid.*, 4, 539 (1987).
5. Faulkner, D.J., *Ibid.*, 5, 613 (1988).



6. King, T.J., Imre, S., Öztunç, A., Thomson, R.H., *Tetrahedron Letters*, **16**, 1453 (1979).
7. Falshaw, C.P., King, T.J., Imre, S., Islımyeli, S., Thomson, R.H., *Ibid.*, **21**, 4951 (1980).
8. Imre, S., Islımyeli, S., Öztunç, A., Thomson, R.H., *Phytochemistry*, **20**, 833 (1981).
9. Cox, P.J., Imre, S., Islımyeli, S., Thomson, R.H., *Tetrahedron Letters*, **23**, 579 (1982).
10. Imre, S., Lotter, H., Wagner, H., Thomson, R.H., *Z. Naturforsch.*, **42c**, 507 (1987).
11. Imre, S., Öztunç, A., Islımyeli, S., *DOĞA, TU Kim. Dergisi*, **11**, 119 (1987).
12. Caccamese, S., Azzolina, R., Duesler, E.N., Paul, I.C., Rinehart, L. Jr., *Tetrahedron Letters*, **21**, 2299 (1980).
13. Graselli, J.G., Ritchey, W.M., Atlas of Spectral Data Physical Constants for Organic Compounds, Vol: III, CRC Press, 2nd. Ed., p. c400, 1975.

## SUMMARY

The simultaneous determination of paracetamol and mephenoxalone in tablets by third-derivative UV spectrophotometry using a zero-crossing method at 232.4 nm and 248.2 nm for paracetamol and mephenoxalone, respectively, over the concentration ranges of 5-20 µg/ml<sup>2</sup> for paracetamol and 5-15 µg/ml<sup>2</sup> for mephenoxalone ( $r = 0.9994$ ) were obtained. The method was applied to a commercially available tablet. The relative standard deviations are 0.33 % and 1.17 % and the average percentage recoveries are 99.56 % for paracetamol and mephenoxalone, respectively.

## TAKKI

Parasetamol ve mefenoksolonun tabletlerdeki miktarlarının eşzamanlı olarak üçüncü türev UV spektrofotometri ile parasetamol için 232.4 nm ve mefenoksolon için 248.2 nm'de "zero-crossing" tekniği kullanılarak tayin edilmiştir. Parasetamol için 5-20 µg/ml<sup>2</sup> ( $r = 0.9994$ ) ve mefenoksolon için 5-15 µg/ml<sup>2</sup> ( $r = 0.9994$ ) konsantrasyon aralığında doğrusal ilişki elde edilmiştir. Bu yöntem, bir ticari tablet için uygulanmıştır. Ortalama geri kazanım oranları 0.33 % ve 1.17 %, ortalaması geri kazanım oranları 99.56 % ve 99.56 %'dir.

## DISCUSSION

Paracetamol is an analgesic and antipyretic drug widely used in combination with several other drugs for a number of years. The combination of paracetamol with mephenoxalone is a muscle relaxant used for the aches of skeleton muscles and spasms caused by

( Received September 3, 1990 ) *Tetrahedron Letters*