

CENTAUREA DEPRESSA BIEB.'İN SEKONDER METABOLİTLERİ

SECONDARY METABOLITES OF *CENTAUREA DEPRESSA* BIEB.

Serdar DEMİR¹, Şüra BAYKAN EREL¹, Erdal BEDİR², Canan KARAALP^{1*}

¹Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, 35100 Bornova-İzmir, TURKEY

²Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, 35100 Bornova-İzmir, TURKEY

ÖZET

Bu çalışmada, Denizli Honaz Dağı, 1032 m'den toplanan C. depressa Bieb.'in kurutulmuş ve öğütülmüş toprak üstü kısımlarından, n-hekzan, CHCl₃ ve MeOH ekstraktları hazırlanmıştır. MeOH ekstresi üzerinde çeşitli kromatografik yöntemler (AKK, İTK) kullanılarak fraksiyonlama ve izolasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Sonuç olarak, ülkemiz tıbbi bitkilerinden olan C. depressa'dan iki flavon bileşiği (apigenin ve luteolin) ve iki flavon glukuronopiranozidi (skutellarin ve 6-hidroksikemferol-7-O-β-D-glukopiranozit) izole edilmiştir. Saf maddelerin yapıları spektroskopik yöntemler (¹H ve ¹³C NMR) kullanılarak aydınlatılmıştır. Ayrıca bitkide bir fitosterol (β-sitosterol-3-O-β-D-glukopiranozit), bir fenilpropanoit glikoziti (siringin) ile bir fenolik asit (klorojenik asit) bulunduğu çeşitli İTK yöntemleri ve standart bileşikler kullanılarak saptanmıştır.

Tüm bileşikler, C. depressa'da tarafımızdan ilk kez rapor edilmektedir.

Anahtar kelimeler: *Centaurea depressa, Apigenin, Luteolin, Skutellarin, 6-hidroksikemferol-7-O-β-D-glukuronopiranozit, β-sitosterol-3-O-β-D-glukopiranozit, Siringin, Klorojenik asit.*

ABSTRACT

In this study, n-hexane, CHCl₃ ve MeOH extracts were prepared from dried and powdered aerial parts of C. depressa Bieb. collected from Denizli, Honaz Mountain, (1032 m). Fractionation and isolation procedures were performed on MeOH extract of the plant by using several chromatographical methods (OCC, TLC).

As a result, 2 flavone compounds (apigenin and luteolin) and two flavone glucuronopyranoside (skutellarin and 6-hydroxykaempferol-7-O- β -D-glucuronopyranoside) were isolated. Structure elucidation of the pure compounds were carried out by using spectroscopic methods (^1H and ^{13}C NMR). Furthermore a phytosterol (β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside), a phenylpropanoid glycoside (syringin) and a phenolic acid (chlorogenic acid) were identified by using several TLC techniques and standart compounds.

All compounds are reported for the first time on *C. depressa* in this work.

Key words: *Centaurea depressa*, apigenin, Luteolin, Skutellarin, 6-hydroxykaempferol-7-O- β -D-glucuronopyranoside, β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside, Syringin, Chlorogenic acid.

GİRİŞ

Centaurea L. (Asteraceae) cinsi, Türkiye florasında % 61.6'sı endemik olmak üzere 178 taksonla temsil edilmektedir (1). Çeşitli *Centaurea* türlerinin geleneksel halk tıbbında çeşitli amaçlarla kullanım bulduğu kayıtlıdır (2, 3). Yapılan araştırmalarla *Centaurea* türlerinin antimikrobiyal (4), sitotoksik (5) ve antienflamatuvar (6) aktivitelere sahip olduğu saptanmıştır.

Centaurea türlerinin içermiş olduğu sekonder bileşikler genelde seskiterpen laktonlar (7), flavonoidler (8) ve lignan bileşikleridir (9).

Centaurea depressa Bieb. (Sect. *Cyanus*), işlenmiş tarla ve yol kenarlarında yabani bitki olarak geniş yayılış gösteren bir taksondur (10). Bu bitki, Prof. Dr. Turhan Baytop tarafından, İstanbul'da yetişen tıbbi bitkiler listesine alınmıştır (11).

C. depressa üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar oldukça sınırlı olup, 1967 ve 1972 yıllarına ait sadece 2 makale ile kısmen incelenmiş (12, 13), ayrıca uçucu yağ analizi yapılmıştır (14, 15). *C. depressa*'nın metanol ekstresinin antioksidan aktivite gösterdiği (16) ve *n*-hekzan ekstresinin de *Candida krusei* üzerinde antifungal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (4).

Bu çalışmanın amacı, ülkemiz tıbbi bitkilerinden olan *C. depressa*'nın sekonder metabolitlerinin, gelişmiş kromatografik ve spektroskopik yöntemlerle araştırılmasıdır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Centaurea depressa, çiçeklenme döneminde (2004-Haziran), Denizli, Honaz Dağı, 1032 m'den toplanmıştır (37°40'15.6"N, 29°14'03.9"E). Bitkinin herbaryum örneği hazırlanarak, Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'na kaydedilmiştir (İZEF 5675).

Ekstraksiyon ve izolasyon

Kurutularak toz edilmiş *C depressa*'nın toprak üstü kısımları (550 g), sırası ile *n*-hekzan, CHCl₃ ve MeOH (2 x 2 L) ile, ultrasonik su banyosunda 1 gün süre ile ekstre edilmiştir. Solvanlar evaporatörde kuruluğa kadar uçurularak, *n*-hekzan (9.65 g), CHCl₃ (5.26 g) ve MeOH (53.35 g) ekstraları elde edilmiştir. MeOH ekstresi su (250 ml) ile süspanse edilerek *n*-butanol (4 x 1.5 L) ile partisyona tabi tutulmuş ve *n*-butanol fazı konsantre edilmiştir. BuOH ekstresi (27.48 g), RP C-18 silika jel kolona uygulanmıştır. Vakum sıvı kromatografisi (VSK) ile fraksiyonlama işlemine, çözücü sistemi H₂O:MeOH (100:0→ 0:100 (%10'luk artışlarla, 1'er L) şeklinde değiştirilerek devam edilmiş ve CHCl₃:MeOH (sırasıyla 2:8, 4:6 ve 5:5, 200'er ml) çözücü sistemleriyle fraksiyonlama işlemi tamamlanmıştır. Ayırma işlemi sonucunda toplam 35 ana fraksiyon elde edilmiştir. Fraksiyon 24'ün (303 mg) açık kolon kromatografisi (AKK) ile Sefadeks kolondan %100 MeOH ile elüsyonu sonunda bileşik 1 (13 mg), fraksiyon 22'nin (353 mg) Sefadeks kolondan %100 MeOH ile elüsyonu sonunda bileşik 2 (21 mg) ve bileşik 3 (17 mg), fraksiyon 11'in (270 mg) yine Sefadex kolondan %100 MeOH ile elüsyonu sonucunda ise bileşik 4 (8mg) elde edilmiştir.

İzolasyon çalışmaları esnasında elde edilen bazı fraksiyonlarda, standart örneklerle İTK karşılaştırması yapılmıştır. Fraksiyon 34'te β-sitosterol-3-*O*-β-D-glukopiranozit (5) (silika jel plak, CH₂Cl₂:MeOH (90:10), vanilin/H₂SO₄ reaktifi), fraksiyon 7'de siringin (6) (silika jel plak, CHCl₃:MeOH:H₂O (61:32:7), vanilin/H₂SO₄ reaktifi) ve fraksiyon 4'te de klorojenik asit (7) [silika jel plak, EtOAc:formik asit:asetik asit:H₂O (100:11:11:26), NP/PEG reaktifi, UV 366 nm ve selüloz plak, BuOH:asetik asit:H₂O (4:1:5, üst faz), NP/PEG reaktifi, UV 366 nm)] varlığı belirlenmiştir.

Çalışma koşulları:

Eksraksiyon işlemi ultrasonik su banyosunda (Bandelin Sonorex, 10 L) gerçekleştirilmiştir. İTK çalışmalarında, 60 F₂₅₄ (Merck) ve Lichroprep RP-C18 (Merck) alüminyum plaklar, vanilin/sülfürik asit belirteci, selüloz cam plak (Merck), Natural Products-Polietilenglikol Belirteci (NP/PEG, Roth) kullanılmış ve UV altında (254 ve 366 nm) teşhis yapılmıştır. Kolon dolgu materyali olarak Lichroprep RP-C18 (Merck, 25-40 µm) ve Sefadeks LH-20 (Ge Healthcare) kullanılmıştır. ¹H ve ¹³C spektrumları, Varian 400 MHz NMR cihazında, DMSO-d₆ çözücüsü ve, tetrametil silan (TMS) standartı kullanılarak alınmıştır.

SONUÇ VE TARTIŞMA

C. depressa'dan izolasyon ve saflaştırma işlemleri sonucunda izole edilen bileşik 1-4'ün ¹H ve ¹³C datalarının literatür verileri ile karşılaştırılması ile bu maddelerin sırasıyla apigenin, luteolin, skutellarin ve 6-hidroksikemferol-7-*O*-β-D-glukuronopiranozit oldukları belirlenmiştir (17-19).

Apigenin (1): ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ, ppm, J/Hz.): δ 6.19 (1H, d, J 2 Hz, H-6), 6.48 (1H, d, J 2 Hz, H-8), 6.76 (1H, s, H-3), 6.90 (1H, d, J 8.8 Hz, H-3', H-5'), 7.90 (1H, d, J 8.8 Hz, H-2', H-6'). ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): 164.4 (C-2), 103.5 (C-3), 182.4 (C-4), 161.8 (C-5), 99.5 (C-6), 164.8 (C-7), 94.6 (C-8), 158.0 (C-9), 104.3 (C-10), 121.8 (C-1'), 129.1 (C-2', C-6'), 116.6 (C-3', C-5'), 162.1 (C-4').

Luteolin (2): ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ, ppm, J/Hz.): δ 6.20 (1H, d, J 2 Hz, H-6), 6.40 (1H, d, J 2 Hz, H-8), 6.63 (1H, s, H-3), 6.87 (1H, d, J 8.4 Hz, H-5'), 7.38 (1H, dd, J 8.4, 1.2 Hz, H-6'), 7.40 (1H, d, J 1.2 Hz, H-2'). ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): 164.5 (C-2), 103.5 (C-3), 182.3 (C-4), 162.1 (C-5), 99.5 (C-6), 164.8 (C-7), 94.5 (C-8), 157.9 (C-9), 104.3 (C-10), 119.6 (C-1'), 114.0 (C-2'), 146.4 (C-3'), 150.4 (C-4'), 116.7 (C-5'), 122.1 (C-6').

Skutellarin (3): ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ, ppm, J/Hz.): 5.11 (1H, d, J 6.8 Hz, H-1"), 6.77 (1H, s, H-3), 6.92 (2H, d, J 9.2 Hz, H-3', H-5'), 6.97 (1H, s, H-8), 7.89 (2H, d, J 8.8 Hz, H-2', H-6') ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): 164.8 (C-2), 103.1 (C-3), 183.0 (C-4), 147.47 (C-5), 131.2 (C-6), 151.9 (C-7), 94.6 (C-8), 149.6 (C-9), 106.5 (C-10), 121.8 (C-1'), 129.0 (C-2', C-6'), 116.6 (C-3', C-5'), 161.9 (C-4'), 101.1 (C-1"), 73.5 (C-2"), 75.5 (C-3"), 72.3 (C-4"), 76.2 (C-5"), 171.4 (C-6").

6-Hidroksikemferol-7-O-β-D-glukuronopiyranozit (4): ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ, ppm, J/Hz.): δ 3.38 (1H, m, H-3"), 3.40 (1H, m, H-2"), 3.43 (1H, m, H-4"), 4.0 (1H, d, J 10 Hz, H-5"), 5.19 (1H, d, J 7.2 Hz, H-1"), 6.90 (2H, d, J 8.8 Hz, H-3', H-5'), 6.96 (1H, s, H-8), 8.03 (2H, d, J 8.8 Hz, H-2', H-6') ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): 148.2 (C-2), 136.2 (C-3), 176.8 (C-4), 146.3 (C-5), 130.3 (C-6), 151.9 (C-7), 93.8 (C-8), 148.8 (C-9), 105.8 (C-10), 122.4 (C-1'), 130.2 (C-2', C-6'), 116.1 (C-3', C-5'), 159.9 (C-4'), 100.6 (C-1"), 73.4 (C-2"), 75.8 (C-3"), 71.9 (C-4"), 76.1 (C-5"), 170.7 (C-6").

Fraksiyonlarda β-sitosterol-3-O-β-D-glukopiranozit, siringin ve klorojenik asit varlığı standart bileşikler kullanılarak yapılan İTK karşılaştırması ile belirlenmiştir.

Cyanus seksiyonunda yer alan *Centaurea* türleri üzerinde az sayıda fitokimyasal çalışma bulunmaktadır. *C. reuterana* var. *reuterana* bitkisinde 5 flavonoit glikozitinin (şaftozit, izoşaftozit, luteolin-7-O-β-D-glukozit, homoorientin ve orientin) bulunduğu rapor edilmiştir (20). *C. cyanus* tohumlarından, 2 epoksilignan bileşiği (21), bir başka çalışmada ise indol alkaloidleri izole edilmiştir (22). *C. cyanus*'un toprak üstü kısımlarından kersetin, kemferol, izoramnetin, kersimeritrin, izoramnetin-7-O-β-D-glukozit, kemferol-7-O-β-D-glukozit, apigenin, luteolin, hispidulin, kosmosiin, apigenin-4'-O-β-D-glukozit, sinarozit, apiin, graveobiyozit ile kafeik,

klorojenik, neoklorojenik ve izoklorojenik gibi hidroksisinnamik asitler izole edilerek yapıları aydınlatılmıştır (23). *C. lanigera*'nın taze kapitulularından elde edilen uçucu yağın GC ve GC/MS analizinde ana bileşenlerin germakren-D (%43.1) ve β -karyofillen (%13.7) olduğu belirlenmiştir (24). İsviçre ve Yugoslavya'dan toplanan *C. triumfettii*'de 27 flavonoit saptanmış, ana bileşenler olarak apigenin, luteolin, krizoeriol ve bunların bazı 2"-O-konjuge deriveleri belirlenmiştir (25).

C. depressa üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar ise oldukça sınırlı olup, bitkinin toprak üstü kısımlarından skutellarein, skutellarin, skutellarein-5-O- β -D-glukuronozit, kersetin, izokersitrin ve bir apigenin glikoziti izole edilmiştir (12, 13). İran'da yayılış gösteren *C. depressa*'nın toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın GC/MS analizi ile 26 bileşik tanımlanmış, ana bileşenlerin, piperiton (%35.2) ve elemol (%14.1) olduğu belirlenmiştir (14). Floramızda yayılış gösteren *C. depressa* toprak üstü kısımlarından mikrodilasyonla elde edilen uçucu bileşiklerin GC/MS analizinde ana bileşenlerin hegzadekanoik asit (%21.3), karvakrol (14.2) ve tetradekanoik asit (%8.8) olduğu saptanmıştır (15).

Apigenin, luteolin, skutellarin, siringin, klorojenik asit ve β -sitosterol-3-O- β -D-glukopiranozit bileşikleri, çeşitli *Centaurea* türlerinden daha önce izole edilmiş olmakla beraber, *C. depressa* türünde bu çalışma ile tarafımızdan ilk kez rapor edilmektedir. Daha önce yapmış olduğumuz bir çalışma ile, 6-hidroksikemferol-7-O- β -D-glukuronopiranozit, *C. urvillei*'den izole edilmiş doğa ve bilim için yeni bir bileşiktir (19). Bu bileşik, bu çalışma ile bir kez daha *C. depressa*'dan da izole edilmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma TUBİTAK (proje no:106S197) ve E.Ü. Araştırma Fon Saymanlığı (proje no: 08/ECZ/004) tarafından desteklenmiştir. Adı geçen kurumlara teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. **Davis, P.H.** Flora of Turkey and The East Aegean Islands, Vol. 10, Edinburgh University Press, Edinburgh, p. 431-463 (1988)
2. **Arif, R., Küpeli, E. and Ergun, F.,** "The biological activity of *Centaurea L. species*" *G. U. J. Science* **17**, 149-164 (2004)
3. **Baytop, T.,** Türkiye'de Bitkilerle Tedavi (Geçmişte ve Bugün), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2.baskı, p.316 (1999)

4. **Karamenderes, C., Khan, S., Tekwani, B.L., Jacob, M.R. and Khan, I.A.**, “Antiprotozoal and antimicrobial activities of *Centaurea* species growing in Turkey” *Pharm. Biol.* **44**, 534-539 (2006)
5. **Koukoulitsa, E., Skaltsa, H., Karioti, A., Demetzos, C. and Dimas, K.** “Bioactive sesquiterpene lactones from *Centaurea* species and their cytotoxic/cytostatic activity against human cell lines *in vitro*” *Planta Med.* **68**, 649-652 (2002)
6. **Kim, S.H., Shin, K.J., Kim, D., Kim, Y.H., Han, M.S., Lee, T.G., Kim, E., Ryu, S.H. and Suh, P.G.** “Luteolin inhibits the nuclear factor- κ B transcriptional activity in Rat-1 fibroblasts” *Biochem. Pharm.* **66**, 955-963 (2003)
7. **Janackovic, P., Tecevic, V., Milosavljevic, S., Vajs, V. and Marin, P.D.** “Sesquiterpene lactones, lignans and flavones of *Centaurea affinis*” *Biochem. Syst. Ecol.* **32**, 355-357 (2004)
8. **Akkal, S., Benayache, F., Medjroubi, K., Tillequin, F. and Seguin, E.** “Flavonoids from *Centaurea furfuracea* (Asteraceae)” *Biochem Syst Ecol* **31**, 641-643 (2003)
9. **Gousiadou, C. and Skaltsa, H.** “Secondary metabolites from *Centaurea orphanidea*” *Biochem Sys Ecol*, *31*: 389-396 (2003)
10. **Wagenitz G.**, “*Centaurea* L.” in Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Davis P.H. (Ed.), vol: 5, Edinburgh University Press, Edinburgh, p.465-585 (1975)
11. **Baytop T ve Kadioğlu D.** “İstanbul bölgesinin tıbbi bitkileri” 14. BİHAT, Eskişehir, Bildiri kitabı s:45-47 (2002)
12. **Bandyukova, V.A. and Khalmatov, Kh.Kh.** Isolation of scutellarin from *Centaurea depressa*, *Chem. Nat. Comp.* **3**, 48-49 (1967)
13. **Bandyukova, V.A., Khalmatov, Kh.Kh. and Alimov, Kh.I.** “Flavonoids of *Centaurea depressa*” *Chem. Nat. Comp.* **5**, 274-275 (1972)
14. **Esmaceli, A., Rustaiyan, A. and Nadimi, M.** “Volatile constituents of *Centaurea depressa* M.B. and *Carduus pynoccephalus* L. Two *Compositae* herbs growing wild in Iran” *J. Essent. Oil Res*, **17**, 539-541 (2005)
15. **Karamenderes, C., Demirci, B. and Baser, K.H.C.** “Composition of essential oils of ten *Centaurea* L. taxa from Turkey” *J. Ess. Oil Res.* **20**, 342-349 (2008)

16. **Karamenderes, C., Konyalıoğlu, S., Khan, S. and Khan, I.A.** “Total phenolic contents ,free radical scavenging activities and inhibitory effects on the activation of NF-kappa B of eight *Centaurea* L. species” *Phytother. Res.* **21**, 488-491 (2007)
17. **Agrawal, P.K., Thakur, R.S. and Bansal, M.C.**, “Flavonoids” in *Carbon-13 NMR of Flavonoids*, Agrawal P.K. (Ed.), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands, p. 95 (1989)
18. **Chen, X., Cui, L., Duan, X., Ma, B. and Zhong, D.** “Pharmacokinetics and metabolism of the flavonoid scutellarin in humans after a single oral administration” *Drug Metab. Dispos.* **34**, 1345 (2006)
19. **Gülcemal, D., Alankuş Çalışkan, Ö., Karaalp, Ballar, P. and Bedir, E.** “Phenolic Glycosides with antiproteasomal activity from *Centaurea urvillei* DC. subsp. *urvillei*” *Carbohydrate Res.*, **345**, 2529-2533 (2010)
20. **Karamenderes, C., Alankuş Çalışkan, Ö., Baykan Erel, Ş. ve Karabay Yavaşoğlu, Ü., Avunduk, S.**, “Batı Anadolu’da yayılış gösteren bazı *Centaurea* L. türlerinin biyoaktif sekonder bileşiklerin araştırılması”, TÜBİTAK, 106S197 no’lu araştırma projesi (2009)
21. **Shoeb, M., Jaspars, M., MacManus, S.M., Mjinda, R.R.T. and Sarker, S.D.** “Epoxy lignans from the seeds of *Centaurea cyanus* (Asteraceae)” *Biochem. Syst. Ecol.* **32**, 1201-1204 (2004)
22. **Sarker, S.D., Laird, A., Nahar, L., Kumarasamy, Y. and Jaspars, M.** “Indole alkaloids from the seeds of *Centaurea cyanus* (Asteraceae)” *Phytochemistry* **57**, 1273–1276 (2001)
23. **Litvinenko, V.I., and Bubenchikova, V.N.** “Phytochemical study of *Centaurea cyanus*” *Khimiya Prirodnkh Soedinenii*, **6**: 792-795 (1988)
24. **Flamini, G., Tebano, M., Cioni, P.L., Bagci, Y., Dural, H., Ertugrul, K., Uysal, T. and Savran, A.** “A multivariate statistical approach to *Centaurea* classification using essential oil composition data of some species from Turkey” *Pl Syst Evol*, **261**, 217-228 (2006)
25. **Gonnet, J.F.** “Flavonoid glycoside variation in wild specimens of *Centaurea triumfetti* (Compositae) and comments on its relationships with *Centaurea montana* based on flavonoid fingerprints” *Biochem. Syst. Ecol.* **21**, 389-396 (1993)

Received: 06.04.2011

Accepted: 07.05.2011