

VIBURNUM OPULUS L. VE VIBURNUM LANTANA L.'DA
AMENTOFLAVON HPLC ANALİZİ

HPLC ANALYSIS OF AMENTOFLAVONE IN *VIBURNUM OPULUS L.* AND
VIBURNUM LANTANA L.

M. Levent ALTUN, Betül SEVER YILMAZ, Gülçin SALTAN ÇİTOĞLU

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı, 06100, Tandoğan-
ANKARA

ÖZET

Bu çalışmada Viburnum opulus ve V. lantana yaprak, dal ve meyvalarında amentoflavon'un kantitatif analizi için basit ve duyarlı bir yöntem kullanılmıştır. Amentoflavon'un miktar tayini Supelcosil LC 18 (250x4.6 mm, 5 µm) kolonunda asetonyitril: su : fosforik asit (52: 47: 1) (h/h/h) solvan sistemi kullanılarak yapılmıştır. Amentoflavon miktarı; V. lantana yapraklarında % 0.1104, V. lantana dallarında % 0.0061 olarak bulunmuştur. V. opulus yaprakları için bu değer % 0.0066 olarak belirlenmiştir. V. opulus'un dal ve meyvalarında, V. lantana'nın ise meyvalarında amentoflavona rastlanmamıştır.

Anahtar Kelimeler : Amentoflavon, V. opulus, V. lantana, HPLC, yapraklar, dallar, meyvalar

ABSTRACT

In this study a simple and sensitive HPLC method for separation and quantitative determination of amentoflavone in the leaves, the branches and the fruits of Viburnum opulus L. and Viburnum lantana L. has been used. Amentoflavone was determined Supelcosil LC 18 (250x4.6 mm, 5 µm) column , by using acetonitrile: water : phosphoric acid (52: 47: 1) (v/v/v) as a mobile phase. The amentoflavone content of V. lantana was found to be 0.1104 % for leaves, 0.0061 % for branches. For V. opulus leaves, this value was determined as 0.0066 %. Neither branches and fruits of Viburnum opulus nor fruits Viburnum lantana posses amentoflavon.

Key Words: Amentoflavone, V. opulus, V.lantana, HPLC, leaves, branches, fruits

GİRİŞ

Caprifoliaceae familyasına ait *Viburnum* cinsi Güney Amerika'dan Güney Doğu Asya'ya kadar geniş bir dağılım gösteren ve çoğu endemik olan 230'dan fazla tür içermektedir (1).

Bitki Türkiye Florasında dört türle temsil edilmektedir; *Viburnum opulus* L., *V. orientale* Pallas, *V. lantana* L. ve *V. tinus* L. (2,3).

V. opulus idrar arttırıcı, müshil ve yatıştırıcı etkilere sahiptir. Safra ve karaciğer hastalıklarına karşı Orta Anadolu bölgesinde kırmızı renkli meyvaların (gilaburu meyvası) usaresi kullanılmaktadır. Meyvalar yemiş olarak da yenilmektedir. *V. lantana*'nın taze dal kabukları ise haricen kızartıcı ve ağrı kesici olarak kullanılmaktadır (4). *V. dilatatum* bitkisinin oksidatif hasarlara karşı koruyucu etkisi strese maruz kalmış sıçanlar ve streptozotosin ile uyarılmış diyabetik sıçanlarda gösterilmiştir (5,6). Ayrıca *V. dilatatum* bitkisinin plazma, karaciğer ve midedeki antioksidan enzimler üzerine etkisi incelendiğinde bu bitkinin kullanılması süperoksit dismutaz, katalaz ve glutasyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin tüketiminin azalmasına katkıda bulunabilmektedir (7). *V. erubescens* Wall. bitkisinin alkollü ekstresinin düşük antiviral etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (8). *V. luzonicum*'dan izole edilen bazı iridoit aldehitlerin He La S3 kanser hücrelerine karşı orta derecede inhibitör etki gösterdiği bulunmuştur (9). *Viburnum* cinsine ait türlerin triterpen (10-11), diterpen (12,13), seskiterpen (14) ve iridoit (15-19) yapısında bileşikler taşıdığı bilinmektedir. Ayrıca *Viburnum grandifolium*'dan luteolin 3'-O- β -ksilozil glukozit ve apigenin 7-ksilozil glukozit izole edilmiştir (20). Farklı *Viburnum* türlerinde Yapılan kemotaksonomik çalışmalar sonucunda biflavonoit yapısında olan amentoflavon tesbit edilmiştir (1,21).

Bir apigenol dimeri olan amentoflavonun antifungal, antienflamatuvar ve antioksidan etkilerinin olduğu bilinmektedir (22).

Bu çalışmada *Viburnum opulus* ve *V. lantana* yaprak, dal ve meyvalarının metanollü ekstrelerinde biflavonoit yapısında olan amentoflavonun ayırımı ve miktar tayini için basit ve duyarlı bir yöntem kullanılmıştır (23).

MATERYAL VE METOD

Bitki Materyali

Viburnum opulus Kayseri'den (AEF 23696), *Viburnum lantana* ise Ankara'dan (AEF 23543) toplanmıştır.

Ekstrenin Hazırlanışı

V. opulus ve *V. lantana* bitkilerinin yaprak, dal ve meyvaları kurutulup toz edildikten sonra 5'er gram tartılmıştır. Oda sıcaklığında 1'er saat süre ile 100 ml metanolle ultrasonik banyoda ekstre edilmiştir. Süzülükten sonra tüm ekstrelerin hacmi balon jodede 100 ml'ye tamamlanmış ve iyice çalkalanmıştır. Bu ekstreler 0.45 µm'lik filtreden geçirilip 20 µl miktarda, cihaza entegre edilmiş otomatik şırınga ile hassas olarak HPLC kolonuna enjekte edilmiştir.

Cihaz

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatograf olan HP-1100 (Agilent Technologies, Inc., California, USA) cihazı kullanılmıştır. Pik alanları Agilent software bilgisayar programı tarafından otomatik olarak hesaplanmıştır.

Kromatografik Şartlar

Mobil Faz: Asetonitril: Su : Fosforik asit (52: 47: 1) (h/h/h) (23).

HPLC saflığında Asetonitril (Merck-100030), Formik asit (Merck-100264) ve kromatografik saflıkta bidistile su kullanılmıştır. Solvanlar 0.45 µm filtreden (Milipore, Milfod, USA) geçirilip ultrasonik su banyosunda degaze edilmiştir.

Akış Hızı: 1ml/dak.

Dedektör: 330 nm (Diod-Array Dedektör)

Kolon: Supelcosil LC 18 (250x4.6 mm, 5 µm)

Standart Çözeltinin Hazırlanması

Amentoflavon (40584) standardı Fluka firmasından temin edilmiştir.

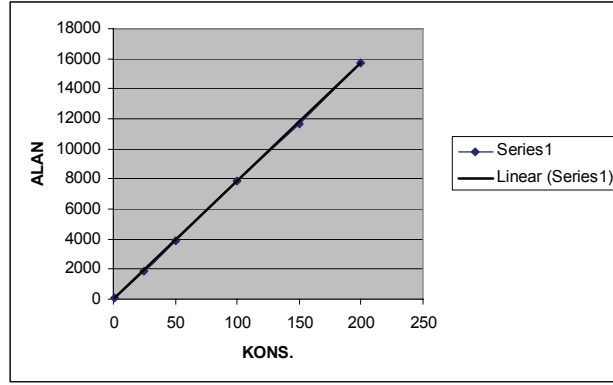
Amentoflavon (5 mg) standardı metanolle çözülüp balon jodede 10 ml'ye tamamlanmıştır. Böylece 500 µg/ ml'lik standart çalışma çözeltisi hazırlanmıştır. Analizler eksternal standart yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Bunun için de; standart çalışma çözeltisinden 1 ml alınıp 10 ml'ye (50 µg/ ml) , 2 ml alınıp 10 ml'ye (100 µg/ ml), 3 ml alınıp 10 ml'ye (150 µg/ ml), 4 ml alınıp 10 ml'ye (200 µg/ ml) tamamlanmıştır. Daha sonra 50 µg/ ml konsantrasyondaki çözelti yarı

yarıya (25 µg/ ml) ve 150 µg/ ml konsantrasyondaki çözelti de 1/100 oranında (1.5 µg/ ml) seyreltilerek farklı toplam 6 dilusyon hazırlanmıştır (1.5- 200 µg/ ml).

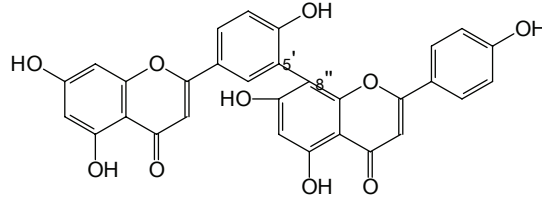
Kalibrasyon Eğrisi

Metanol içinde hazırlanan amentoflavon (1.5- 200 µg/ ml) standardına ait kalibrasyon grafiği elde edilmiştir (**Grafik 1**).

Amentoflavon'un farklı 6 konsantrasyonundan 3'er kez 20'şer µl enjekte edilmesi ile pik alanları saptanmış ve buradan $y = mx + n$ doğru denklemi bulunmuştur.



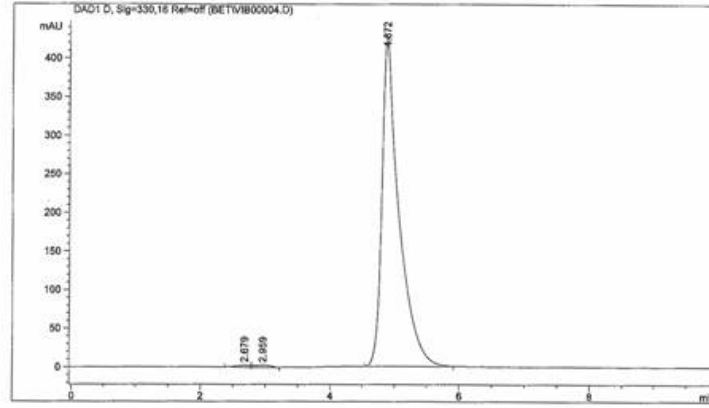
Grafik 1: Amentoflavon'un Kalibrasyon Eğrisi



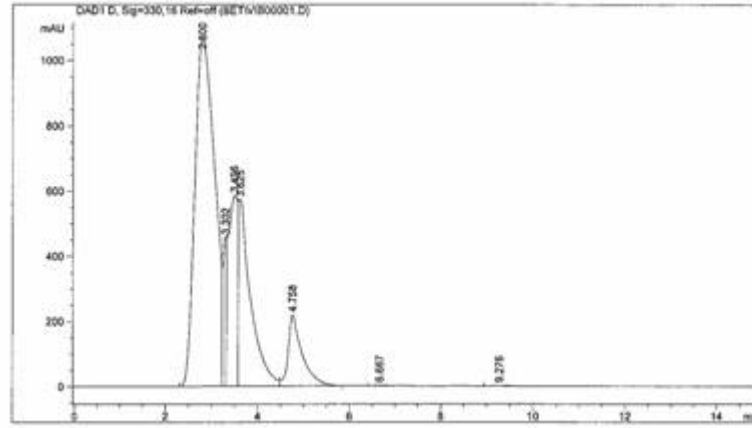
Amentoflavon

BULGULAR

Krauze-Baranowska ve arkadaşları (23) tarafından geliştirilen yöntemle göre; Asetonitril: Su: Fosforik asit (52: 47: 1) (h/h/h) solvan sistemi kullanılarak 1 ml/dak. akış hızında ters faz kolonunda, UV 330 nm'de amentoflavon standardı maksimum bir absorbans göstermiş olup retansiyon zamanı 4.8 dakika olarak tesbit edilmiştir (**Kromatogram 1**).



Kromatogram 1: Standart Amentoflavon'un HPLC Kromatogramı



Kromatogram 2: *Viburnum lantana* yaprak ekstresinin HPLC Kromatogramı
(Amentoflavon Rt=4.758)

Doğrusallık

Tablo 1'de amentoflavon standardına ait korelasyon değeri (r^2), eğim ve kesişimin bağlı standart sapmaları verilmiştir. Amentoflavonun 1.5-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($r^2 = 0.9998$) konsantrasyonlarda elde edilen pik alanları ile mükemmel bir doğrusallık sağlanmıştır.

Teşhis Limiti ve Miktar Tayini Limitlerinin Saptanması

Teşhis edilebilecek en düşük miktar (TL) gürültü sinyalinin 3 katı, miktar tayini yapılabilecek en düşük miktar (MTL) gürültü sinyalinin 9 katı olarak bulunmuştur. Buna göre de amentoflavon için 6 enjeksiyon yapılmış olup teşhis edilebilecek en düşük miktar 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; miktar tayini yapılacak en düşük miktar da 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ olarak hesaplanmıştır (**Tablo 1**).

Tablo 1: Sonuçların Doğrusallığı, Teşhis Limiti ve Miktar Tayin Limiti

| Bileşik | λ | Doğru Denklemi | r^2 | Eğim (%BSS) | Kesişim (%BSS) | MTL ($\mu\text{g/ml}$) | TL ($\mu\text{g/ml}$) |
|--------------|-----------|-------------------------|--------|-------------|----------------|--------------------------|-------------------------|
| Amentoflavon | 330 | $Y = 78.665 X + 58.214$ | 0.9998 | 0.071 | 2.545 | 1.5 | 0.5 |

X = Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$); Y = Alan; λ = Dalga Boyu;

r^2 = Korelasyon değeri; %BSS= % Bağıl Standart Sapma;

MTL= Miktar Tayin Limiti

TL= Teşhis Limiti

%BSS = (Standart Sapma/ Ortalama) x 100

Doğruluk

Metodun doğruluğu amentoflavon standardının miktar tayini yapılabilecek en düşük konsantrasyonundan 9 kez enjekte edilerek kanıtlanmıştır. Ayrıca amentoflavonun miktar tayini yapılabilecek en düşük miktardaki bağıl standart sapması da % 0.931 olarak hesaplanarak kullanılan bu metodun doğruluğu kesinleştirilmiştir (**Tablo 2**).

Tablo 2: Metodun Miktar Tayin Limitindeki Doğruluk Değeri (n= 9)

| Bileşik | λ | Pik Alanı (n=9, ortalama) | %BSS |
|--------------|-----------|------------------------------|-------|
| Amentoflavon | 330 | 107.43 | 0.931 |

V. opulus ve *V. lantana* Ekstrelerinde Amentoflavon Bileşiğinin Analizi

Kayseri ve Ankara'dan toplanan *V. opulus* ve *V. lantana* bitkilerinin yaprak, dal ve meyvalarından hazırlanan ekstrelerde ters faz HPLC ile amentoflavon bileşiğinin teşhisi yapılmıştır. Ekstrele amentoflavon standardı tek bir konsantrasyonda (50 $\mu\text{g/ml}$) ayrı ayrı ilave edilip ayrı ayrı 3'er defa enjeksiyon yapılarak adı geçen bileşiğe ait retansiyon zamanlarında piklerde büyüme olduğu tespit edilmiştir. Böylece ekstrelerde amentoflavon bileşiğinin varlığı kesinleştirilmiştir. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilerek bu standarda ait doğru denklemden hareketle ekstrelerdeki % miktarı hesaplanmıştır (**Tablo 3**).

Tablo 3: *Viburnum* Türlerinde Bulunan % Amentoflavon Miktarları

| Türler | Alan (n= 3, ortalama) | % Amentoflavon Ortalama ± SS |
|-----------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| <i>V. opulus</i> yaprak | 199.96 (3.777) | 0.0066 ± 0.0002 (3.517) |
| <i>V. lantana</i> yaprak | 4283.94 (0.529) | 0.1104 ± 0.0006 (0.543) |
| <i>V. lantana dal</i> | 183.56 (2.049) | 0.0061 ± 0.0005 (0.941) |

*%BSS = Parantez içinde % Bağıl Standart Sapma değerleri verilmiştir.

SS= Standart Sapma

TARTIŞMA

Yapılan analizler sonucunda *V. opulus* yapraklarında % 0.0066, *V. lantana* yapraklarında % 0.1104 (**Kromatogram 2**) ve *V. lantana* dallarında % 0.0061 oranında amentoflavon bulunmasına rağmen *V. opulus* dal , meyva ve *V. lantana* meyvalarında amentoflavona rastlanmamıştır. Lobstein ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmaya göre amentoflavon miktarları; *V. lantana* yapraklarında % 0.578, dallarında 0.026, *V. opulus* yapraklarında % 0.042, dallarında % 0.010 olarak bulunmuştur (1).

Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçların Lobstein ve arkadaşlarının elde ettiği sonuçlara göre daha az olmasının nedeni iklim koşulları, coğrafik farklılıklar gibi bir çok faktöre bağlanabilir.

Woo ve arkadaşlarının (22) yaptıkları çalışmaya göre biflavonoit yapısında olan amentoflavonun antifungal, antienflamatuvar ve antioksidan etkilerinin olduğu tesbit edilmiştir. Ancak çalıştığımız *Viburnum* türlerinde amentoflavon miktarının daha önce çalışılan türlere (1) göre düşük çıkması ya da bazı kısımlarında hiç bulunmaması amentoflavona bağlı olarak görülen etkiler bakımından bu türlerin değerlendirilmesinin doğru olamayacağı kanısına varmamıza neden olmuştur.

Yine bu verilere göre çalıştığımız *V. opulus* ve *V. lantana* yaprak, dal ve meyvalarının amentoflavon kaynağı olarak değerlendirilmesinin ekonomik olamayacağı sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. **Lobstein, A., Haan-Archipoff G., Englert, J., Kuhry, J.G., Anton, R.** “Chemotaxonomical investigation in the genus *Viburnum*” *Phytochemistry*, **50**, 1175-1180 (1999).
2. **Davis, P.H.**, Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Edinburgh University Press, Edinburgh, Vol. 4, s.543 (1972).
3. **Davis, P.H., Mill, R.R., Tan, K.**, Flora of Turkey and the East Aegean Islands, , Edinburgh University Press, Edinburgh, Vol. 10, s.154 (Supplement) (1988).
4. **Baytop, T.**, Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün), 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, s. 210 (1999).
5. **Gruenwald, J., Brendler, T., Jaenicke, C.**, PDR for herbal medicines, Medical EconomicsCompany, Montvale, New Jersey, s. 96-97 (2000).
6. **Iwai, K., Onodera, A., Matsue, H.** “Antioxidant activity and inhibitory effect of Gamazumi (*Viburnum dilatatum* THUNB.) on oxidative damage induced by water immersion restraint stress in rats” *Int. J. Food. Sci. Nutr.*, **52(5)**, 443-451 (2001).
7. **Iwai, K., Kim, M.Y., Onodera, A., Matsue,H.** “Physiological effects and active ingredients of *Viburnum dilatatum* Thunb fruits on oxidative stress” The proceedings of the 3rd International Conference on Food Factors (IcoFF 03), **21(1-4)**, 273-275 (2004).
8. **Kim, M.Y., Iwai, K., Matsue, H.** “Phenolic compositions of *Viburnum dilatatum* Thunb. Fruits and their antiradical properties” *J. Food Compos. Anal.*, **18**, 789-802 (2005).
9. **Fukuyama, Y., Minoshima, Y., Kishimoto, Y., Chen,I., Takahashi, H., Esumi, T.** “Cytotoxic iridoid aldehydes from Taiwanese *Viburnum luzonicum*” *Chem. Pharm. Bull.*, **53(1)**, 125-127 (2005).
10. **Kagawa, M., Minami, H., Nakahara, M., Takahashi, H., Takaoka, S., Fukuyama, Y.** “Oleanane -type triterpenes from *Viburnum awabuki*” *Phytochemistry*, **47(6)**, 1101-1105 (1998).
11. **Fukuyama, Y., Minami, H., Fujii, H., Tajima, M.** “ Triterpenoids from *Viburnum suspensum*” *Phytochemistry*, **60(8)**, 765-768 (2002).
12. **Fukuyama, Y., Minami, H., Matsuo, A., Kitamura, K., Akizuki, M., Kubo, M., Kodama,M.** “Seven- Membered vibsane- type diterpenes with a 5,10-cis relationship from *Viburnum awabuki*” *Chem. Pharm. Bull.*, **50(3)**, 368-371 (2002).

13. Fukuyama, Y., Kubo, M., Minami, H., Matsou, A., Fujii, T., Morisaki, M., Harada, K. “Rearranged vibsane-type diterpenes from *Viburnum awabuki* and phytochemical reaction of Vibsantin B” *Chem.Pharm. Bull.*, **53(1)**, 72-80 (2005).
14. Fukuyama, Y., Minami, H., Ichikawa, R., Takeuchi, K., Kodama, M. “Hydroperoxylated guaiane-type sesquiterpenes from *Viburnum awabuki*” *Phytochemistry*, **42(3)**, 741-746 (1996).
15. Iwagawa, T., Yaguchi, S., Hase, T. “Iridoid Glycosides from *Viburnum suspensum*” *Phytochemistry*, **29(1)**, 310-312 (1990).
16. Iwagawa, T., Yaguchi, S., Hase, T. “Iridoid Glucosides From *Viburnum suspensum*” *Phytochemistry*, **35(5)**, 1369-1370 (1994).
17. Çalış, İ., Yürüker, A., Rügger, H., Wright, A.D., Sticher, O. “Lantanoside, a monocyclic C₁₀ iridoid glucoside from *Viburnum lantana*” *Phytochemistry*, **38(1)**, 163-165 (1995).
18. Tomassini, L., Foddai, S., Nicoletti, M., Cometa, M.F., Palazzino, G., Galeffi, C. “ Iridoid Glycosides from *Viburnum ayavacense*” *Phytochemistry*, **46(5)**, 901-905 (1997).
19. Tomassini, L., Gao, J., Serafini, M., Nicoletti, M. “ Iridoid Glucosides from *Viburnum sargentii*” *Natural Product Research*, **19(7)**, 667-671 (2005).
20. Parveen, M., Khan, M.S., Ilyas, S., Ilyas, M. “Luteolin 3'-xylosyl(1→2) glucoside from *Viburnum grandifolium*” *Phytochemistry*, **49(8)**, 2535-2538 (1998).
21. Lobstein, A., Weniger, B., Malécot, V., Um, B.H., Alzate, F., Anton, R. “Polyphenolic content of two Colombian *Viburnum* species (Caprifoliaceae)” *Biochem. Syst. Ecol.*, **31(1)**, 95-97 (2003).
22. Woo, E.R., Lee, J.Y., Cho, I.J., Kim, S.G., Kang, K.W. “ Amentoflavone inhibits the induction of nitric oxide synthase by inhibiting NF-KB activation in macrophages” *Pharmacological Research*, **51**, 539-546 (2005).
23. Krauze-Baranowska, M., Bączek, T., Glod, D., Kaliszan, R., Wollenweber, E. “HPLC Separation of O- Acylated flavonoids and biflavones from some species of Gymnospermae” *Chromatographia* **60**, 9-15 (2004).

Received: 31.01.2008

Accepted: 11.03.2008

