

## Styrax Liquidus Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar

### Pharmacognosic Research on Styrax Liquidus

Mekin TANKER ve Erandiz SAYRON \*

#### GİRİŞ ve AMAÇ

Eczacılıkta kullanılan balsamlardan biri ve yurdumuza özgü bir drog olan **Styrax Liquidus** (sığıla yağı, günlük yağı, storax, mia) yüzyıllardan beri Anadolu'da *Liquidambar orientalis* Mill (Sığıla Ağacı, Günlük Ağacı) (Fam : Hamamelidaceae) ağaçlarından elde edilmektedir.

**Styrax Liquidus**'un Avrupa'da tıbbî amaçlarla kullanılması 17. yüzyıla rastlar (5). Fakat doğudan gelen bu maddenin hangi ağaçtan ve nasıl elde edildiği, bilim çevrelerinde ancak 1876 yılında Hanbury (11) nin araştırması sonucu kesinlik kazanmıştır.

*Liquidambar orientalis*, Anadolu'nun endemik bitkilerindedir. Miyosen zamanından günümüze kalmış eski bir türdür. Görünüşü bir çınarı andırır ve Hamamelidaceae familyasının karakteristik özelliklerini taşır. Yağışlı ve sıcak iklimleri seven ağaç Muğla ilinde 26 - 30° boylam ve 36 - 38° (5) enlem dereceleri arasında, deniz seviyesinden 400 m. yüksekliğe kadar yetişir ve Muğla (Merkez), Marmaris, Köyceğiz, Milâs, Fethiye'de toplam 6310 (5) hektar orman yapar. Ayrıca, Rodos (22), Antakya (16) ve Antalya'da da *L. orientalis* ağaçlarına rastlanmıştır.

**Styrax Liquidus**, *Liquidambar orientalis* gövdesinin yaralanmasıyla oluşan, patolojik bir üründür. İlkbaharda yapılan yaralamalar sonucu zedelenen kambiyum, şizolizigen salgı kanal ve cepleri ihti-

Redaksiyona verildiği tarih: 14 Nisan 1974

(\* ) Farmakognozi Kürsüsü, Eczacılık Fakültesi, Ankara Üniversitesi

va eden yeni odun yapar ve buralarda oluşan balsam, kabuk parenkimasına sızar. Balsamın elde edilişi şöyle olmaktadır : Mayıs ayında gövdede özel bıçaklarla açılan yaralar (kızillatma işlemi), Haziran'da derinleştirilir (damar açma işlemi). 15 Temmuz'dan sonra yaralardan sızan balsam, yerel deyimle «kapçık» adı verilen ağaç kabuklarıyla birlikte özel bıçaklarla toplanır. Bu işlem 15 Kasım'a kadar 15 er günlük aralarla tekrarlanır. Kapçıklarla toplanan balsam kabuklardan temizlenmek üzere, yarım saat suyla kazanlarda kaynatılır. Ayrılan balsam aktarılır. Kapçıklar ise mekanik preslerde preslenir. Kapçıklarda kalmış olan balsam böylece presleme sonucu suyla emülsiyon meydana getirerek prestan akar ve su dolu bir havuza sevk edilir. Balsam - su karışımı burada ayrılır ve ayrılan balsam toplanır.

Üretimi Devlet Orman İşletmesi yürütmektedir. Son beş yılda ortalama üretim 53,5 (21) ton kadardır. Ürünün büyük kısmı ihraç edilmektedir. 1972 de 28 ton ihraç edilmiş ve bu ülkemize 2.033271,00 (3) T.L. getirmiştir. Dünya tüketiminin düşük olması bakımından üretimin arttırılmasına gidilmemektedir.

Eczacılıkta saflaştırılmış sığala yağı (**Styrax Depuratus**) (\*) kullanılmaktadır. Drog, günümüzde özellikle bileşimindeki yüksek kaynama noktalı bileşiklerden ötürü parfümeride fiksator olarak kullanılır. Eskiden ekspektoran ve antiseptik özelliğinden dolayı, **Styrax Liquidus** solunum yolları ve deri hastalıkları ilaçlarındandı. Son zamanlarda bu alanlardaki kullanılışı önemini yitirmişse de drog USP XVIII, Pharmacopoea Helvetica Editio Sexta, British Pharmaceutical Code<sup>x</sup> (1968) gibi farmakopelerde kayıtlıdır.

**Styrax Liquidus** üzerinde kimyasal çalışmalar geçen yüzyılda başlamıştır. Anselmino (2), Seitz (2), Bödlander (2), Bohrisch (7), Ahrens (1), Offent (1), Itallie ve Lemkes (15) balsamın çeşitli kimyasal özelliklerini; von Miller (5), Tschirch ve von Itallie (16), Henze (12), Körner (5), Berkel ve Huş (5) balsamın bileşimini araştırmışlardır. Bu çalışmalar sonucu balsamın büyük kısmının sitoressin adı verilen bir reçine bileşiğinden oluştuğu saptanmıştır. Ayrıca bol miktarda sinnamik asit ve esterleri (sinamil, fenil propil, etil,

(\*) Ham droğun 96 derece alkolle muamelesinden sonra alkollü kısmın yoğunlaştırılmasıyla elde edilir.

benzil), eser miktarda vanilin, sitiren ve sitirokamfen bulunmuştur.

Balsamın su buharı destilasyonuna tabi tutulmasıyla elde edilen uçucu yağda da von Miller (19, 20), Tschirch ve von Itallie (16), Simon (24), Van't Hoff (14), Dieterich (19), Laubenheimer (17) çalışmış ve yağın bileşiminde sinnamik asit ve esterleri (sinnamil, fenil propil, etil, benzil), vanilin, sitiren, sitirokamfen, sinnamil alkol, fenil propil alkol tesbit edilmiştir.

Uçucu yağ % 0,5 - 1 miktarında elde edilmektedir (10).

Bilindiği üzere diğer *Liquidambar* türlerinden de çeşitli balsamlar üretilir. A.B.D., Guatemala, Honduras'ta yetişen *L. straciflua*'dan kimyasal yapısı **Styrax Liquidus** a benzeyen ve aynı maksatlarla kullanılan **Styrax Americanus** (Honduras Balsamı) isimli balsam, Formosa ve güney Çin'de yetişen *L. formosona* ve *L. altingia*'dan bileşimi **Styrax Liquidus**'dan farklı olan ve farmakopelerde kayıtlı olmayan balsamlar elde edilir.

**Styrax Liquidus** ve **Styrax Americanus** arasındaki farklar Tablo 1 de gösterilmiştir.

Tablo : I

|                           | (*)                                  | (*)                                 | (*)                                  | (*)  |   |                        |
|---------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--|---|------------------------|
|                           | Kurut-<br>mada<br>ağırlık<br>kaybı   | Alkolde<br>çözün-<br>meyen<br>kısm  | Alkolde<br>çözün-<br>nen kı-<br>sım. | Asit Sayısı<br>(safılaştı-<br>rılmış nu-<br>mune için) | Sabunlaş-<br>ma sayısı<br>(safılaştı-<br>rılmış nu-<br>mune için) | Uçucu<br>kıs m-<br>lar |
| Styrax<br>Liquidus        | % 20<br>den faz-<br>la olma-<br>malı | % 5<br>den faz-<br>la olma-<br>malı | % 70<br>den faz-<br>la olma-<br>malı | 50 - 85  | 160 - 200   | % 1                    |
| Styrax<br>Americ-<br>anus | »                                    | »                                   | »                                    | 36 - 85  | 160 - 200   | % 15-20                |

(\*) USP XVIII

**Styrax Americanus**'dan elde edilen uçucu yağın bileşimi **Styrax Liquidus**'dan elde edilenden farklıdır. **Styrax Americanus** yağında bazı hidrokarbonlar vardır; etil ve benzil sinnamata burada rastlanmamıştır.

**Styrax Liquidus** sadece yurdumuzda elde edildiği için bizler için ilginçtir. Şimdiye kadar droğun üzerinde kromatografik yollarla bir araştırma yapılmamış ve spektral analiz metotları droğa uygulanmamıştır. İnce tabaka, sütun ve gaz kromatografisiyle balsamın bileşimindeki maddelerin daha iyi bir şekilde tesbit edileceğini düşündük. Ayrıca balsamın büyük kısmını oluşturan «sitoresin» hakkında araştırmacılar şimdiye kadar pek çok karşıt görüşler ileri sürmüşlerdir: Siterosinle ilk olarak çalışan von Miller (5), ve daha sonraları Henze (12), Körner (5), sitoresinin bir karışım olduğu; Tschirch, von Itallie (16), Berkel ve Huş (5) saf ve tek bir bileşik olduğu görüşündeydiler. Bu araştırmacıların verdiği formüller ve fiziksel özellikler de birbirini tutmamaktadır. Halen United States Dispensatory 25 th Ed., sitoresini  $C_{36}H_{55}(OH)_3$  formülünde amorf bir reçine alkolü olarak tarif eder ve iki izomer karışımı olduğunu bildirir. Bu konuda en son araştırmayı yapan Berkel ve Huş ise « $C_{39}H_{45}O_3$  veya  $C_{30}H_{48}O_3$  formülünde, bir adet fenolik - OH grubu ihtiva eden doymuş bir reçine alkolü» olduğunu ileri sürmüşlerdir. Henze, sitoresinin birisi bir keton, birisi alkol, birisi de E. N. yüksek bir bileşik olmak üzere 5 - 6 madde karışımı olduğunu iddia etmiş ve ketonun semikarbazonunu hazırlamıştır. Diğer araştırmacılar ketondan bahsetmemektedir. Görüldüğü gibi sitoresin yapısı kesinlik kazanmamıştır. Şimdiye dek kromatografik ve spektral analiz metotlarına uygulanmayan sitoresin yapısının yeni metotlarla açıklığa kavuşacağını düşündük. Bu amaçlarla çalışmamızı hazırladık.

#### MATERYAL VE METOD

Çalışmalarımızda 1969 Marmaris ürünü **Styrax Liquidus** numunelerini kullandık. Herhangi bir tağşişata meydan vermemek için numuneleri doğrudan doğruya Devlet Orman İşletmesi Marmaris Bölgesinden temin ettik. Beklemeyle balsamın bünyesinde değişimler olabileceğini düşünerek taze ürünü seçmeğe dikkat ettik. Herhangi bir bozunmayı önlemek üzere numunemizi ağız sıkıca kapalı

bir cam kavanozda ışıktan uzak ve serin bir yerde sakladık. Çalışmamızın sonunda (bir kaç yıl sonra) numunenin dış görünüşü pek az değişmişti ve kromatografik lekelerinde de bir fark yoktu.

Numune, kahveye çalar koyu gri renkli, çok hoş kokulu, acı ve hafif yakıcı tatlı, çok yapışkan, yarı akıcı bir kütleydi. Aynı ağırlıkta kaynar alkolde, eter, kloroform, etil asetat, karbon sülfür, benzen, asetonda küçük bir bakiye ile çözüldü. Petrol eterinde kısmen çözünüyordu.

Çalışmamız iki yönde gelişti :

1 — **Kromatografik metotlarla** (ince tabaka, gaz, sütun kromatografileri) balsamın bünyesindeki bileşiklerin tesbiti ve separasyonu.

2 — **Sitoresin'in** elde edilmesi ve bünyesinin aydınlatılması.

1 — **Kromatografik metotlar :**

a) Balsamın asit fraksiyonu separe edilip ince tabaka kromatografisine uygulandı.

b) Çeşitli organik solvanlarda çözünen balsam çeşitli kromatografi solvanlarıyla ince tabakaya uygulandı. Şahit maddeler ve bizim balsamdan separe ettiğimiz bileşiklerle karşılaştırarak lekeler saptandı.

c) Gaz kromatografisi : GCQ-SE % 30 sütununda programlı temperatürde çalışarak balsamın uçucu bileşikleri tesbit edildi.

d) Sütun kromatografisi : İnce tabaka ve gaz kromatografisiyle balsamda varlıkları görülen bileşiklerin çeşitli adsorbanlar ile izolasyonuna çalışıldı. Üç bileşik izole edildi. Bunlar, E. N. tayini, elementer analiz, şahit maddelerle ince tabakaya uygulama v.s. ile idantifiye edildi.

2 — **Sitoresin ile yapılan çalışmalar :**

Sitoresin üç yolla elde edildi : Sütun kromatografisiyle separasyon, petrol eterli *Styrax Liquidus* ekstresinden soğukta çöktürme, eterli *Styrax Liquidus* ekstresinden petrol eteri ilâvesiyle çöktürme.

Sitoresinin bünyesinin araştırılması için çeşitli kalitatif reaksiyonlar uygulandı; UV, IR, NMR spektrumları çekildi.

Sitoresin temizlendikten sonra bile, çeşitli kromatografi solvanlarıyla Rf değerleri birbirine yakın aynı şiddete 3 leke veriyordu. Bu durumda sitoresinin bir karışım olduğu düşünüldü ve diğer yollar etkisiz kaldığı için preparatif ince tabaka kromatografisi ile sitoresinin separasyonuna çalışıldı.

Hem sitoresin bünyesinde görülen keton ve hidroksil gruplarının aydınlığa kavuşması, hem de sitoresinin separe edilebilmesi için bu gruplardan hareketle türevler hazırlandı. Keton grubundan hareketle, oksim, 2-4 dinitrofenilhidrazon ve semikarbazon; hidroksil grubundan hareketle asetat türevi elde edildi. Türevlerin E. N. ları, kromatografik lekeleri tesbit edildi. IR ve mass spektrumları, asetat türevinin ilâveten UV ve NMR spektrumları çekildi.

Sitoresinin keton olan kısmı oksim halinde bloke edildikten sonra geriye kalan kısmın preparatif ince tabaka ile ayrılmasına, ketonun da oksimin hidrolizi ile elde edilmesine çalışıldı. Preparatif ince tabaka ile separe edilen bileşiklerin IR ve mass spektrumları, oksimin hidroliz ve asetatın sabunlaşma ürününün IR spektrumları çekildi.

## B U L G U L A R

**Styrax Liquidus'ta yapılan bazı tayinler :**

Numunemiz şu özellikleri göstermekteydi :

Asit sayısı (USP XIII. ye göre) : 45 - 46

Sabunlaşma sayısı (B.P. 1963 e göre) : 169 - 173

Total sinnamik asit miktarı (U.S.P. XVII ye göre) : % 22,8.

**Styrax Liquidus'un bünyesindeki bileşiklerin ayrılması ve tanımlanması :**

**I — İnce tabaka kromatografisi :**

a — Balsamın asit fraksiyonunun ince tabakaya uygulanması :

Eterli **Styrax Liquidus** ekstresinin  $\text{NaHCO}_3$  sulu çözeltisiyle çalkalanması ve sulu kısma dilue  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ilavesiyle serbest asit çöktürülürdü. Sisteme eter katıldı ve asidin eterde çözünmesi sağlandı. Eterli kısım yoğunlaştırıldı, bakiye alkolde çözüldü. Böylece izole edilen asit fraksiyonu ince tabakaya uygulandı. Tek leke (sinnamik asit) tesbit edildi. Bu çalışma Tablo II de gösterilmiştir.

Tablo : II

| Adsorban    | Solvan Sistemi  | Reaktif  | Leke sayısı ve Rf |
|-------------|---|--|-------------------|
| Kieselgel G | N - Butanol - Alkol -<br>Amonyak - Su<br>4 : 4 : 2 : 1  | Bromfenol ma-<br>visi, Mavi zemin<br>üzerinde sarı le-<br>keler  | 1 0,58            |
| Kieselgel G | (23)<br>Benzen - Metanol -<br>Asetik Asit<br>45 : 8 : 4 | Bromfenol ma-<br>visi, Yeşil zemin<br>üzerinde sarı le-<br>keler | 1 0,74            |

b — Balsam çözeltilerinin ince tabaka kromatografisine uygulanması :

Literatürde **Styrax Liquidus** ile yapılmış ayrıntılı bir ince tabaka kromatografisine rastlanmaz. Bazı literatürde (25) «**styrax**» veya «**storax**» adı geçse bile kastedilenin **Styrax Liquidus** mu yoksa **Styrax Americanus** mu olduğu belirtilmediği gibi bu çalışmalar tamamen balsamlar için genel bir plâk kromatografisi metodu geliştirme mahiyetindedirler. Hiç birisinde özellikle **Styrax Liquidus** veya bileşikleri veya **Styrax Americanus** üzerinde durulmamıştır. Bu bakımdan çalışmamızın başında **Styrax Liquidus**'un kromatografik lekelerini tesbit etmek istedik.

Etil asetatlı ve alkollü **Styrax Liquidus** ekstreleriyle çalıştık. En iyi sonuçlar petrol eteri - eter (75 : 25) ve metanol - benzen (5 : 95) solvanlarıyla ve  $\text{SbCl}_3$  reaktifiyle elde edildi. Tesbit edilen lekeler ve Rf değerleri kromatogram I ve II de ve tablo III de gösterilmiştir. Plâklara (uzun dalga UV ışığında) penbe, turuncu, sarı,

yeşil, mavi, mor renkler hakimdir (\*). Turuncu veya penbe renkli spotlar çok konsantreyse spot merkezi mavi olmaktadır. Diğer bir özellik konsantre lekelerin Rf lerinin daha yüksek olmasıdır.

Tablo : III

|                | Adsorbant   | Solvan Sistemi                  | Reaktif  | Lek sayısı | Rf  |
|----------------|-------------|---------------------------------|--|------------|---|
| Kromatogram I  | Kieselgel G | Metanol<br>5<br>Benzen<br>95    | SbCl <sub>3</sub><br>(Uzun dalga UV de incelenmiştir.) | 11         | 0,92; 0,65; 0,54;<br>0,42; 0,34; 0,29;<br>0,26; 0,22; 0,14;<br>0,10; 0,05 |
| Kromatogram II | Kieselgel G | Petroleteri<br>75<br>Eter<br>25 | SbCl <sub>3</sub>                                      | 10         | 0,80; 0,60; 0,51;<br>0,40; 0,30; 0,13;<br>0,15; 0,12; 0,07;<br>0,03       |

Balsamın bazı uçucu bileşikleri SbCl<sub>3</sub> reaktifiyle (ısı kullanılmamasından dolayı) tesbit edilememektedir. Bu bileşikler için plâk n reaktif püskürtülmeden önce UV ışığında incelenmesi gerekmektedir. Örneğin : sitirasin (sinnamil sinnamat) hariç bütün sinnamik asit esterleri, fenil propanol, benzil alkol.

Yapıları yakın olan bazı bileşikler ise plâk birkaç kere develope edilse de ayrılmamaktadır. Örneğin : Sinnamik asit esterleri. Ayrıca balsamda az miktarda bulunan sitiren ve vanilini ince tabaka kromatografisi ile tesbit etmek mümkün değildir. Sözü geçen bileşiklerin saptanması için gaz kromatografisine ihtiyaç vardır.

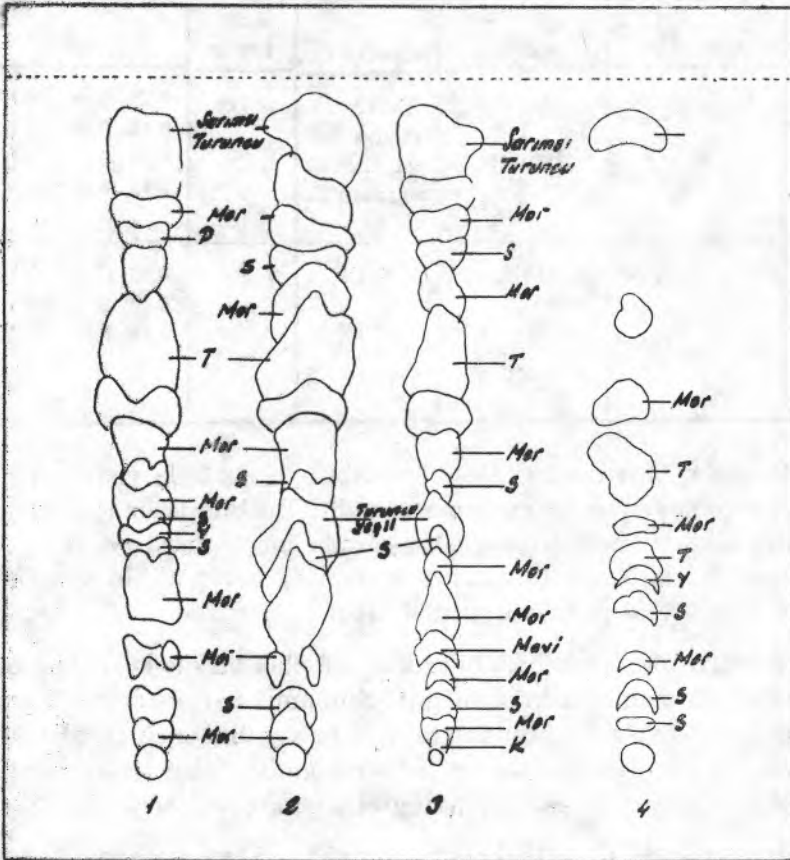
Sinnamik asit de petrol eteri - eter (75 : 25) ve metanol - benzen (5:95) solvanlarıyla iyi sürüklenmemekte ve SbCl<sub>3</sub> ile bariz bir renk vermemektedir. Bu bakımdan balsamın bu bileşimini diğerleriyle birlikte aynı kromatogramda incelemek olanaksızdır.

(\*) Kromatogramlarda renkler şöyle gösterilmiştir :

K : Kahve, M : Mor, P : Penbe, S : Sarı, T : Turuncu, Y : Yeşil.



Adsorban : Silicagel G  
 Solvan : Benzen - Metanol (95 : 5)  
 Reaktif :  $SbCl_3$   
 UV de incelenmiştir.



Kromatogram I

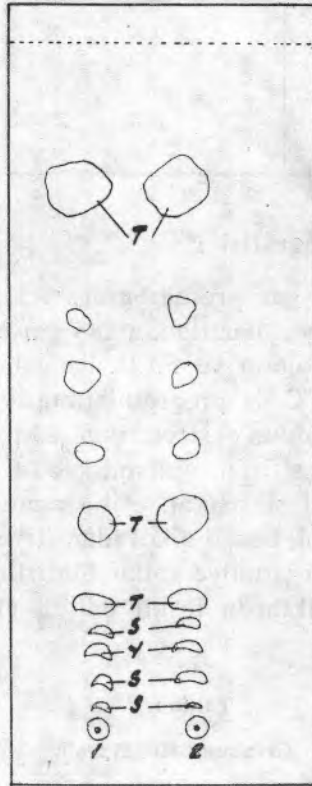
1, 2, 3 : Etil asetatlı *Styrax Liquidus* ekstreleri (sırasıyla 15,10 ve 5  $\mu$ l),  
 4 : etanolli *Styrax Liquidus* ekstresi (10  $\mu$ l)

Adsorban : Silicagel G

Solvan : Petrol eteri - Eter (75 : 25)

Reaktif :  $SbCl_3$

UV de incelenmiştir.



Kromatogram II

1, 2 : Etanolü Styrax Liquidus ekstreleri (sırasıyla 5, 10  $\mu$ l).

Gerek balsamdan izole ettiğimiz, gerek sentezi yapılan bileşiklerle gerekse standart olarak temin edilen bileşiklerle karşılaştırma sonucu idantifiye edilen lekeler Tablo IV de gösterilmiştir.

Tablo : IV

|                                    | Petrol eter-Eter |      | Metanol - Benzen |      | Bileşik                                       |
|------------------------------------|------------------|------|------------------|------|---|
|                                    | 75               | : 25 | 5                | : 95 |   |
| Rf                                 | 0.80             |      | 0.92             |      | Sitirasin                                     |
| SbCl <sub>3</sub>                  | 0.30             |      | 0.42             |      | Sitoresin fraksiyonu                          |
|                                    | 0.18             |      | 0.22             |      | Sitoresin fraksiyonu                          |
| Rf                                 | 0.80             |      | 0.92             |      | Sitirasin, Fenilpropil-                       |
| (Reaktif-<br>siz UV ışı-<br>ğında) | 0.33             |      | 0.50             |      | sinnamat, Benzil sinna-<br>mat, Etil sinnamat |
|                                    |                  |      |                  |      | Fenil propanol, Benzil<br>alkol.              |

## 2 — Gaz Kromatografisi :

Packard 7400 seri gaz kromatograf, % 3 oranında SE 30 la kaplanmış GCQ adsorbantıyla hazırlanan 188 cm boy ve 6 mm çapındaki gaz kromatografi kolonu ve F.I.D. ile çalışıldı. En iyi sonuçlar kolon ısısının 50 - 265°C de programlanmasıyla elde edildi. Bu şekilde eterli **Styrax Liquidus** ekstralarında 20 pik tespit edildi. Şahitlerle karşılaştırılarak, sitiren, sinamik asit, sitirasin (sinnamil sinnamat), fenil propil sinnamat, etil sinnamat, benzil sinnamat, vanilin, n-fenil propanol, benzil alkol idantifiye edildi. Ayrıca **Styrax Liquidus**ta mevcudiyeti şimdiye kadar bildirilmeyen benzaldehit ve sinamaldehit eser miktarda tesbit edildi. (Kromatogram III ve Tablo V)

Tablo : V

| Pik | Ortalama Rt | Bileşik        |
|-----|-------------|----------------|
| 1   | 2,1 cm      |                |
| 2   | 2,9 cm      |                |
| 3   | 3,9 cm      | Sitiren        |
| 4   | 4,65 cm     |                |
| 5   | 5,25 cm     | Benzaldehit    |
| 6   | 6,1 cm      | Benzil alkol   |
| 7   | 6,67 cm     |                |
| 8   | 8,77 cm     |                |
| 9   | 10,12 cm    | Fenil propanol |
| 10  | 11 cm       | Sinnamaldehit  |

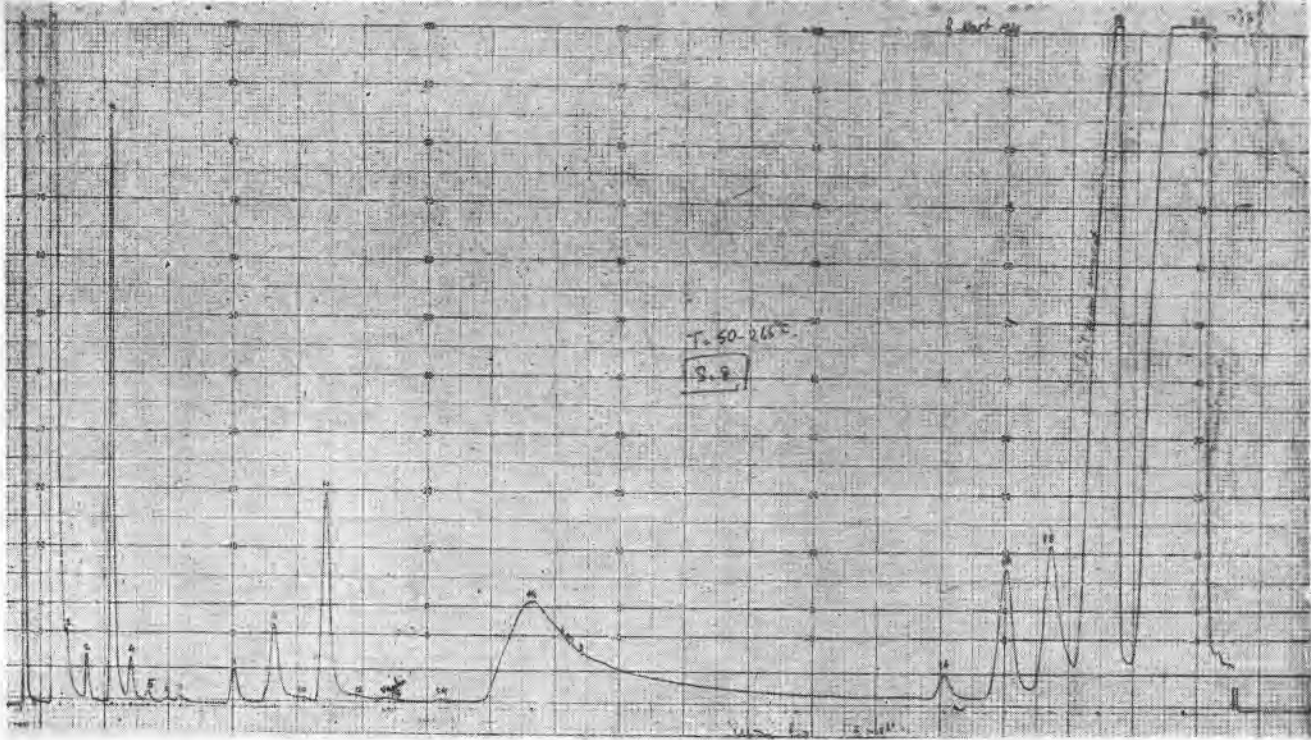
|    |       |    |                               |
|----|-------|----|-------------------------------|
| 11 | 12,1  | cm |                               |
| 12 | 13,6  | cm |                               |
| 13 | 15,45 | cm | Vanilin                       |
| 14 | 17,15 | cm | Etil sinnamat                 |
| 15 | 20,4  | cm | Sinnamik asit                 |
| 16 | 36,9  | cm | Benzil sinnamat               |
| 17 | 38,3  | cm |                               |
| 18 | 40,2  | cm |                               |
| 19 | 42,1  | cm | Fenil propil sinnamat         |
| 20 | 44,4  | cm | Sitirasin (Sinnamil sinnamat) |

### 3 — Sütun Kromatografisi :

Silicagel (0,05 - 0,2 mm çapında), nötr ve bazik  $Al_2O_3$  sütunlarında çeşitli elusyon solvanlarıyla ayırım denendi. Balsamdaki bileşiklerin adsorbanlara afiniteleri ve çeşitli solvanlardaki çözünürlükleri yakın olduğu için, sütun kromatografisi birçok güçlükler arz ediyordu. Silicagel sütunlarında separasyon çok yavaştı. Bu sebeple, zaman kaybından başka sütunda diffüzyon ihtimali beliriyordu. En iyi sonuç bazik  $Al_2O_3$  sütunlarında frontal analiz tekniğinin uygulanmasıyla elde edildi : 100 gr. balsamın önce petrol eteri sonra sırasıyla eter, etil asetat, alkol ile muamelesi sonucu hazırlanan ekstreler  $Al_2O_3$  sütunlarında elue edildi, elusyona başka solvanlarla devam edildi. En iyi ayırım petrol eterli ekstrelerde meydana geldi. Diğer ekstrelerde çözülmüş madde konsantrasyonu çok fazla olduğu için ayırım güç oluyordu. Petrol eterli balsam ekstresinden bazik  $Al_2O_3$  sütununda 3 bileşik izole edildi. Sütunun petrol eteriyle yıkanmasıyla  $S_1$  ve  $S_2$ ; propanol, etanol, metanol, suyla yıkanmasıyla  $S_3$  ayrıldı.

$S_1$ , yıldız şeklinde kümeler oluşturan iğne kristaller halindeydi. E. N. :  $43^\circ C$ . Elementer analiz sonuçları : C : % 81,06; H : % 6,06; O : % 12,88. Sitirasin için hesaplanan değerler : C : % 81,8; H : % 6,0; O : % 12,1,  $S_1$  in sabunlaştırılması ile sinnamik asit meydana geldi. Bu bulgular  $S_1$  in sitirasin (sinnamil sinnamat) Formül :  $C_{18} H_{16} O_2$ ; (mol. ağı. : 264) olduğunu göstermekteydi.

$S_2$ ,  $265 - 280^\circ C$  arası bozunarak ergiyen amorf beyaz bir tozdu. Miktarı çok azdı. Petrol eteriyle kaynatılarak kirliliklerinden kurtarıldı. Elementer analiz sonuçları : C : % 78,32; H : % 10,08. Bu sonuçlar Berkel ve Huş'un (5) sitoresin için verdikleri rakamlara yakındır



### Kromatogram III

Styrax Liquidus ekstrilerinin gaz kromatografisi ile separasyonu

(C : % 79,07, H : % 10,34) (5). S<sub>2</sub>, SbCl<sub>3</sub> reaktifiyle ve metanol - benzen (5 - 95) solvanıyla Rf değeri 0,42; petrol eteri, eter (75 : 25) solvanıyla Rf değeri 0,30 olan turuncu - penbe bir leke veriyordu. S<sub>2</sub> lekesi, Berkel ve Huş'un sitoiresin izolasyonu için verdikleri metotlarla balsamdan elde ettiğimiz ve şahit olarak kullanılan sitoiresinin kromatografik lekelerinden birisiyle çakışmaktaydı. S<sub>1</sub> ve S<sub>2</sub> **Styrax Liquidus** ile mukayeseli olarak Kromatogram IV de verilmiştir.

S<sub>3</sub>, sinnamik asidin Al tuzundan ibaretti. Hidrolizden sonra sinnamik asidin bütün özelliklerini gösterdi.

### Sitoiresin ile Yapılan Çalışmalar :

#### 1 — Sitoiresin'in elde edilmesi ve sitoiresin'i oluşturan bileşiklerin ince tabaka kromatografisiyle tesbiti :

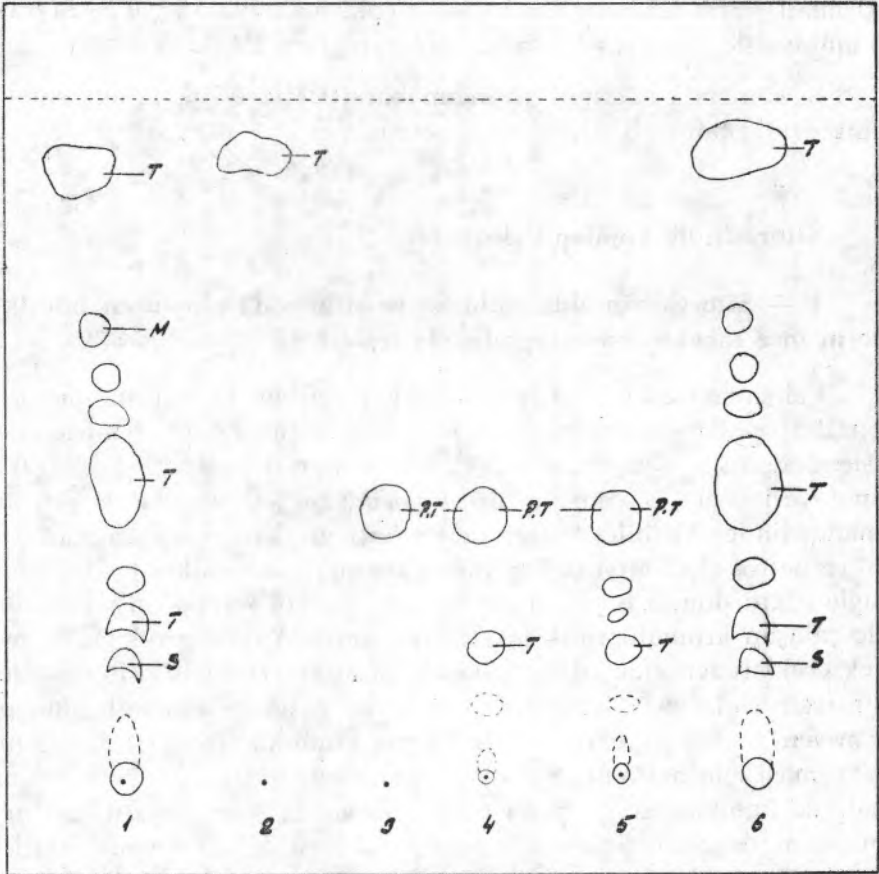
Çalışmamızda Berkel ve Huş'un (5) verdiği iki metotla da elde ettiğimiz sitoiresini şahit olarak kullandık. Şahit madde temizlenme işleminden sonra da ince tabaka kromatografisinde birden fazla spot veriyordu. Bu durum, araştırmacıların «sitoiresin» dediği bu maddenin tek bir bileşik değil de bir karışım olduğunu düşündürdü. S<sub>2</sub> ve petrol eterli **Styrax Liquidus** ekstralarının soğukta bekletilmesiyle çöktürdümüz beyaz amorf bir toz, Berkel ve Huş'un sitoiresini ile çakışan kromatografik lekeler veriyordu. Yalnız gerek S<sub>2</sub> ve gerekse ekstreten elde edilen çökelek az miktarlardaydı. Literatürde sitoiresin izolasyonu için verilen metotlar uzun ve zahmetli olduğu için yeni metotlara gerek vardı. **Styrax Liquidus**'tan ekstrasyonun iyi olması için balsamın sokslette ekstre edilmesi; sitoiresinin ester halinde bulunabileceği düşüncesiyle balsamın sabunlaştırılması gibi yollar denendi. En uygun yol, % 10 verimle, sitoiresinin eterde çok petrol eterinde az çözünmesine dayanan şu metotdu : **Styrax Liquidus**, bütün sinnamik asit esterleri çözününceye kadar petrol eteriyle muamele edildi. Sitoiresinin büyük kısmı bakiyede kalmıştı. Bakiye balsam, kolayca eterde çözüldü. Eterli ekstrete soğuk petrol eteri ilâvesiyle sitoiresin çöktü. Sitoiresin yeniden eterde çözülüp, petrol eteriyle çöktürülerek temizlendi. Beyaz amorf bir tozdu. E. N. ve kromatografik spotları, petrol eterli **Styrax Liquidus** ekstrelerinde soğukta çöken maddeyle aynıydı :

Adsorbant : Silicagel G

Solvan : Benzen - Metanol (95 : 5)

Reaktif :  $SbCl_3$

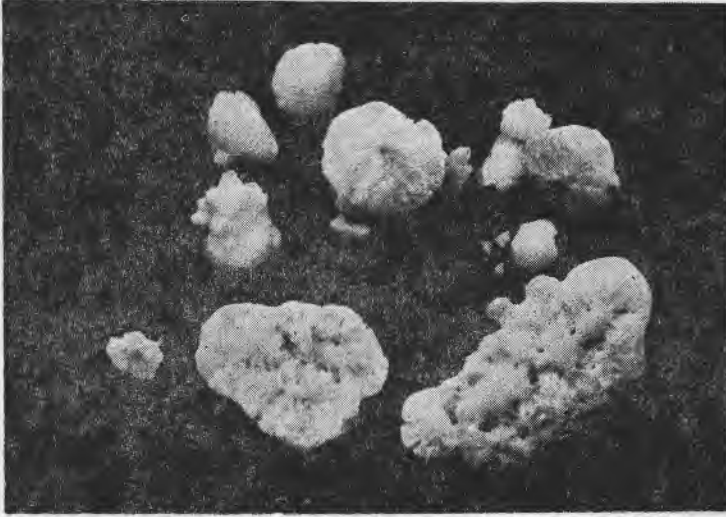
UV de incelenmiştir.



Kromatogram IV

- 1 — Alkollü Syrax Liquidus ekstresi  
 2 — Sutundan elde edilen Sitirasin kristalleri  
 3 — Sutundan elde edilen  $S_2$

- 4 — Petrol eteri Syrax Liquidus ekstresinde çöken madde.  
 5 — Berkel ve Huş metoduyla elde edilen sitoresin  
 6 — 1, 2 ve 3 ün karışımı

S<sub>1</sub> in Fotoğrafi











|   | Metanol - Benzen (5 : 95) Solvan ve<br>SbCl <sub>3</sub> reaktifi ile |                                |
|---|---|--------------------------------|
|   | Leke sayısı   | Rf                             |
| Berkel ve Huş'un metoduyla elde edilen<br>sitosesin (E. N. : 157 - 167°C) | 5   | 0,42 0,29; 0,26;<br>0,22; 0,14 |
| Styrax Liquidus ekstrelerinden çöktürülen<br>madde (E. N. : 165 - 175°C)  | 2   | 0,42; 0,22                     |
| S <sub>2</sub> (E. N. : 265 - 280°C)                                      | 1   | 0,42                           |

Elde ettiğimiz sitosesini separe etmek için çeşitli solvanlarda çözüp yeniden çöktürme, sütun kromatografisinde ayırma gibi yollar denendi. İnce tabakada iyi bir ayırım sağlayan solvanlar sütunda yetersiz kalıyordu. Bu durum, sitosesini oluşturan bileşiklerin yapılarının çok yakın olduğunu akla getiriyordu. Preparatif ince tabakayla ayırım mümkün olduysa da verimin düşüklüğü bakımından bu metodun pratik değeri yoktu.

Sitosesinin IR spektrumunda kuvvetli keton piki mevcuttu. Bu durumda sitosesinin ince tabakada keton lekesi vermesi gerekir. Gerçekten de çeşitli adsorbanlarla (Kieselgel G ve HF<sub>254</sub> λ, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), solvanlarla (metanol - benzen 5 : 95, perol eter - eter 75 : 25 ve ketonlar için uygun bir solvan olan eter - N. heksan 50 : 50) (25) ve 2 - 4 - dinit-



rofenil hidrazin, m-dinitro benzen, isoniazid - asetik asit gibi keton reaktifleriyle (25),  $SbCl_3$  ve triklorasetik asit gibi balsam reaktifleriyle oluşan spotlarla çakışmayan bir keton lekesi meydana geldi (Kramatogram V). Ancak çok konsantre numunelerde bu leke  $SbCl_3$  reaktifıyla çok hafif penbe bir spot veriyordu. Durumu özetliyecek olursak şöyle bir görünüm ortaya çıkıyor : (Sitoresinin verdiği 3 lekeyi A, B, C olarak isimlendirdik).

|  | $SbCl_3$ ve<br>Triklor asetik<br>asit  | 2.4. dinitro<br>fenilhidrazin   | m. dinitrobenzen   | isoniazid<br>asetik asit   |
|--|--|---|--|--|
| $Al_2O_3$<br>Sutunundan<br>elde edilen<br>Sitoresin<br>(konsantre) | hafif penbe<br>A <br>B <br>penbe - turuncu     | karakteristik<br>sarı renk (göz)<br>A    | karakteristik<br>mor renk (göz)<br>A    | Sarı renk (uv)<br>A       |
| Diğer<br>yollarla<br>elde<br>edilen<br>Sitoresin<br>(konsantre)    | hafif penbe<br>A <br>B <br>penbe - turuncu | karakteristik<br>sarı renk (göz)<br>A  | karakteristik<br>mor renk (göz)<br>A  | Sarı renk<br>(uv)<br>A  |

2 — Sitoresin yapısını aydınlatmak üzere yapılan çalışmalar ve hazırlanan türevler :

Sitoresinin, (A,B,C karışımı) alkollü çözeltileri UV de 275 mu dalga boyunda maksimum absorpsiyon göstermekteydi.

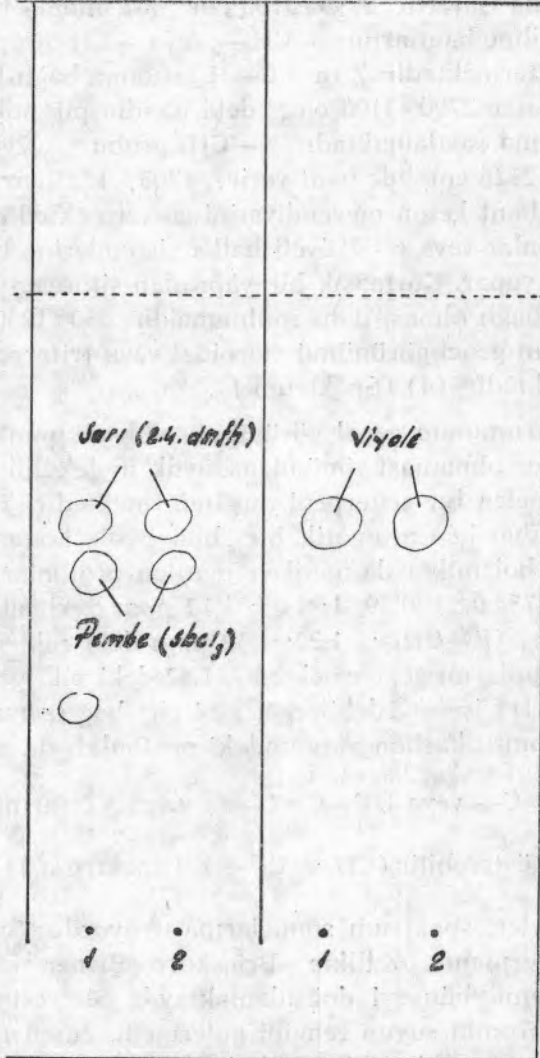
Gerek A,B ve gerekse A,B,C karışımı sitoressinlerin IR spektrumlarında fonksiyonel gruplara ait bantlar aynıdır.  $650 - 1250 \text{ cm}^{-1}$  arasındaki her bileşik için karakteristik olan bölgenin görünümü her iki sitoressin karışımı için çok benzemektedir, fakat aynı olduğu

Adsorban : Silicagel G

Solvan : Benzen - Metanol (95/5)  
(2. developman)

Reaktif : Önce 2-4 d.n.f.h.\*  
sonra  $SbCl_3$

Reaktif : M-dinitrobenzen



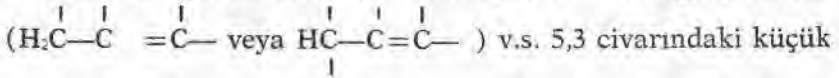
Kromatogram V

- 1 — Sioresin (A, B, C karışımı)  
2 — Sioresin (A, B, karışımı)

(\* ) 2 - 4 dinitro fenil hidrazin.

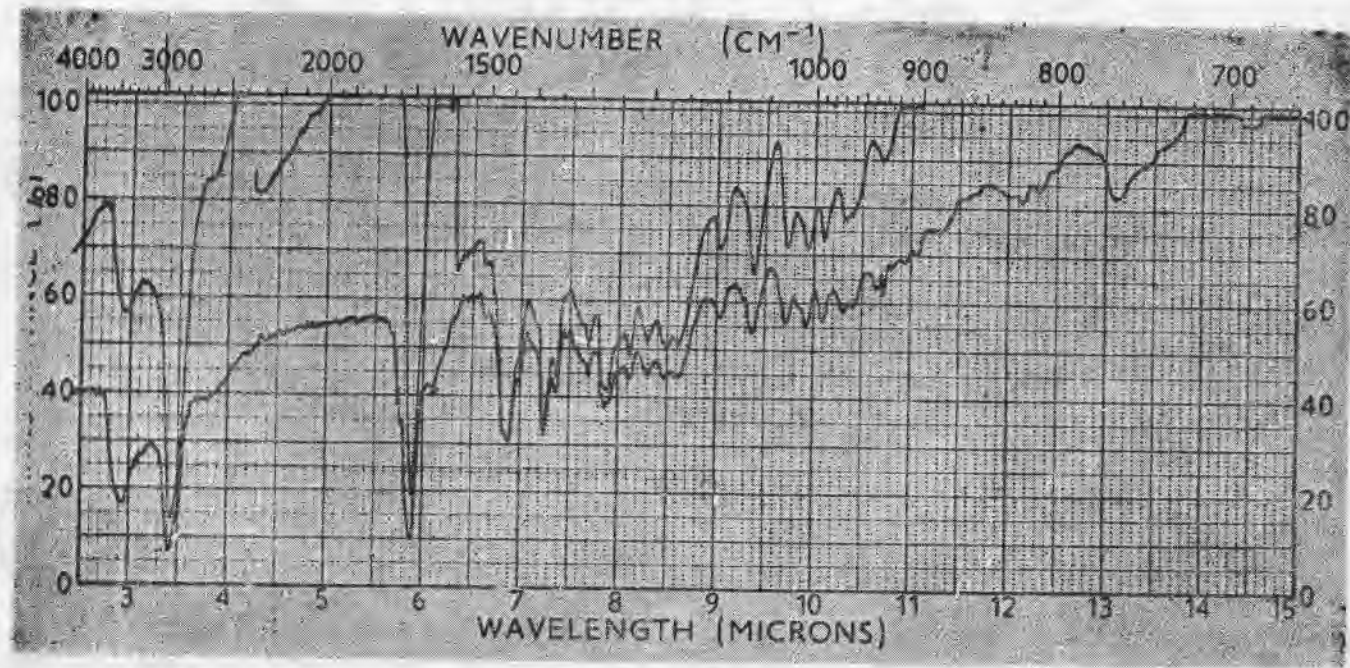
söylenemez. 3200 - 3700  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki bant serbest veya inter molekuler veya her iki cins —OH gruplarını gösterebilir. 2790 - 3100  $\text{cm}^{-1}$ , 1400 - 1480  $\text{cm}^{-1}$  ve 1300 - 1380  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki bantlar C—H gerilme bağlarına işaretlerdir. 2790 - 3100  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki bantın kuvvetli olması gerilme bantlarının —CH<sub>2</sub>— veya —CH<sub>3</sub> gruplarına bağlı olduğunu göstermektedir. Zira  $\equiv\text{C—H}$  grubuna bağlı bantlar çok daha zayıftır. Zaten 2790 - 3100  $\text{cm}^{-1}$  deki bantın pik noktası 2900 - 3000  $\text{cm}^{-1}$  arasına rastlamaktadır. (—CH<sub>3</sub> grubu 2962  $\text{cm}^{-1}$  de, —CH<sub>2</sub> grubu ise 2926  $\text{cm}^{-1}$  de bant verir). 1705 - 1725  $\text{cm}^{-1}$  deki keskin ve kuvvetli bant keton mevcudiyetini göstermektedir. Bu bölgede alifatik ketonlar veya 6 - 7 üyeli halka sistemlerine bağlı ketonlar absorpsiyon yapar. Karmaşık bir yapı olan sitoresin için bu ketonun halkaya bağlı olması daha muhtemeldir. 650 - 1250  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki bantların genel görünümü steroidal veya triterpenik bir yapı düşündürmektedir. (4) (Spektrum I).

NMR spektrumunun genel görünümü, yüksek ppm değerlerinde bariz sinyaller olmaması yönünden büyük moleküllü halkalı bir bileşiği muhtemelen bir triterpeni düşündürmektedir. 7 ppm civarında pik olmadığı için aromatik bir bünye söz konusu değildir. Spektrumlarda bol miktarda metil ve metilen protonlarına ait sinyaller vardır. 0,75; 0,80; 0,89; 1; 1,05; 1,12 ppm deki pikler primer metil gruplarını (R—CH<sub>3</sub>); 1,22; 1,39 ppm deki pikler metilen (R—CH<sub>2</sub>—R) gruplarını göstermektedir. 1,82 deki pik tersiyer metil grubuna (R<sub>3</sub>—CH) işaret edebileceği gibi çift bağ taşıyan bir karbon atomuna komşu karbon atomundaki protonları da gösterebilir,

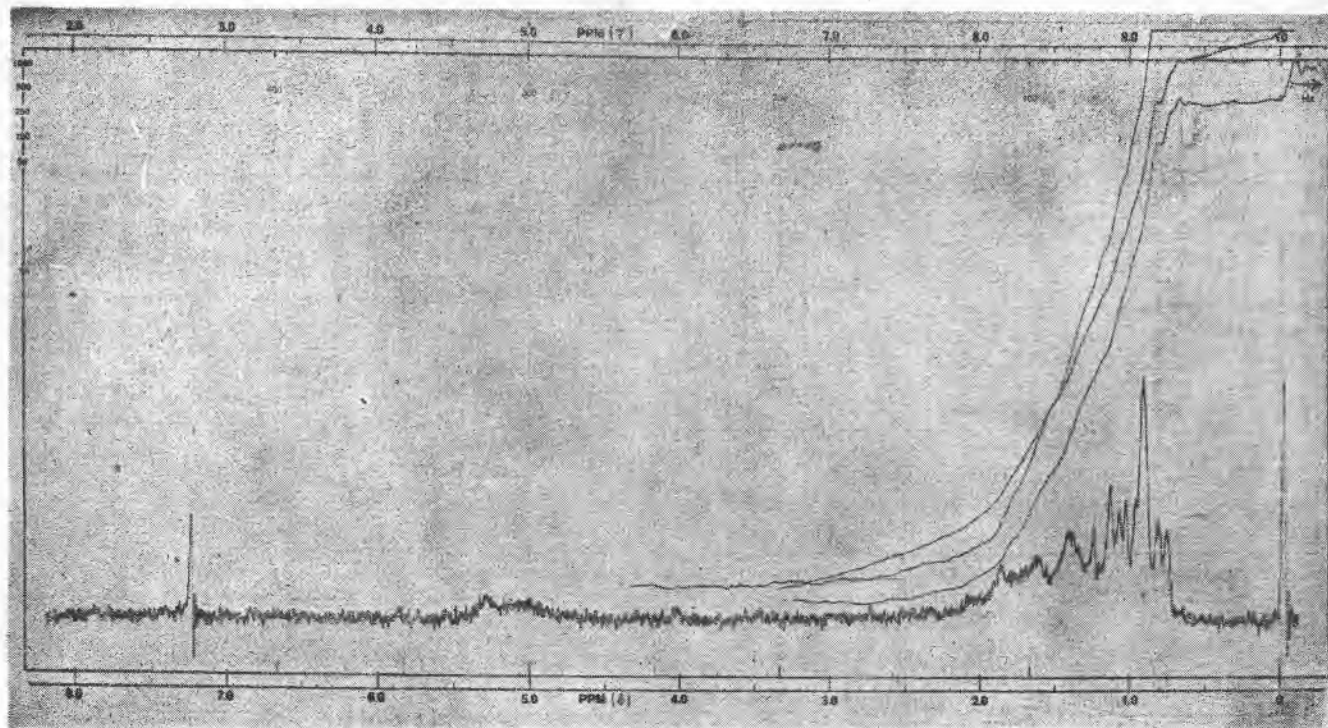


pik de çift bağ gösterebilir ( $\begin{array}{c} | \\ \text{CH} = \text{C} — \\ | \end{array}$ ). (Spektrum II). (18)

Diğer deneyler, spektrum sonuçlarına uyuyordu. Sitoresin çözeltilerinin Liebermann, özellikle Brieskorn - Briner "reaksiyonunu" vermesi triterpenik bünyeyi doğrulamaktaydı. Sitoresin solusyonları KMnO<sub>4</sub> ve bromlu suyun rengini gidermedi. Zaten IR ve NMR da aromatik bünye tesbit edilememişti. Böylece UV de absorpsiyon gösteren çifte bağın konjuge olmadığı anlaşıldı. Asetat türevinin hazırlanmasıyla 2 adet asetillenebilen OH varlığı ispatlandı. Sitoresin çözeltilerinin FeCl<sub>3</sub> ile renk vermemesi, zaten sitoresinin aromatik



Spektrum I  
Sitoresinin IR spektrumu



**Spektrum II**  
Sitoresinin NMR spektrumu

bir yapı olmaması ve asetilasyonun sekonder alkoller için uygun bir metotla gerçekleşmesi, —OH lerin iddia edildiği (5) gibi fenolik olmayıp alkol grupları olduğunu gösterdi. Hidroksillerin glikol grupları halinde olduğu da, kromatografik olarak anlaşıldı. Sitoresin, Seliwanoff ve Legal testlerini veriyordu. Bu durum keton grubunun varlığını destekliyordu. Sitoresinden hazırlanan semikarbazon, oksim, 2 - 4 - dinitrofenilhidrazon türevleri keton varlığını ispat etti.

Lakton aranması, redüksiyon v.s. deneylere sitoresin cevap vermedi.

Bu durumda sitoresin, çifte bağ, karbon zinciri ve fenolik olmayan hidroksil grupları taşıyan halkalı triterpenik yapıda bir karışımdır. Başlıca üç bileşikten oluşmuştur.

Şimdi sitoresin türevlerini görelim : Türevlerin, birçok yollar denenmesine rağmen ayrılamayan sitoresin karışımının separe edilmesine yardımcı olacağını düşündük. Gerçekten de keton türevlerinin hazırlanmasıyla sitoresinin A diye isimlendirdiğimiz fraksiyonu izole edildi. Kromatogram VI de keton türevlerinin  $SbCl_3$  ve 2 - 4 - dinitrofenilhidrozin reaktifleriyle verdikleri lekeler göstermiştir. Türevlerin üçü de sitoresin spotlarından apayrı lekeler vermişlerdir ve hepsinde keton grubu tabii ki bloke edilmiştir. Kromatogram VII da ise sitoresin çözeltilerinin her üç türev de hazırlanmadan önce ve sonra  $SbCl_3$ , 2 - 4 - dinitrofenilhidrazin ve m-dinitrobenzen reaktifleriyle verdiği spotlar gösterilmiştir. Kromatogramdan kesinlikle anlaşıldığına göre keton grubunun blokajından önce kuvvetli bir leke veren A bileşiği, ketonun bloke edilmesinden sonra sitoresin çözeltilerinden tamamen kaybolmuştur. Buna karşı, B ve C bileşikleri keton türevlerinin hazırlanmasından sonra hiç bir değişikliğe uğramamıştır. Böylece sitoresin karışımındaki ketonun karışımı oluşturan diğer bileşiklerden ayrı ve farklı bir bileşik olduğu anlaşıldı.

#### **Semikarbazon :**

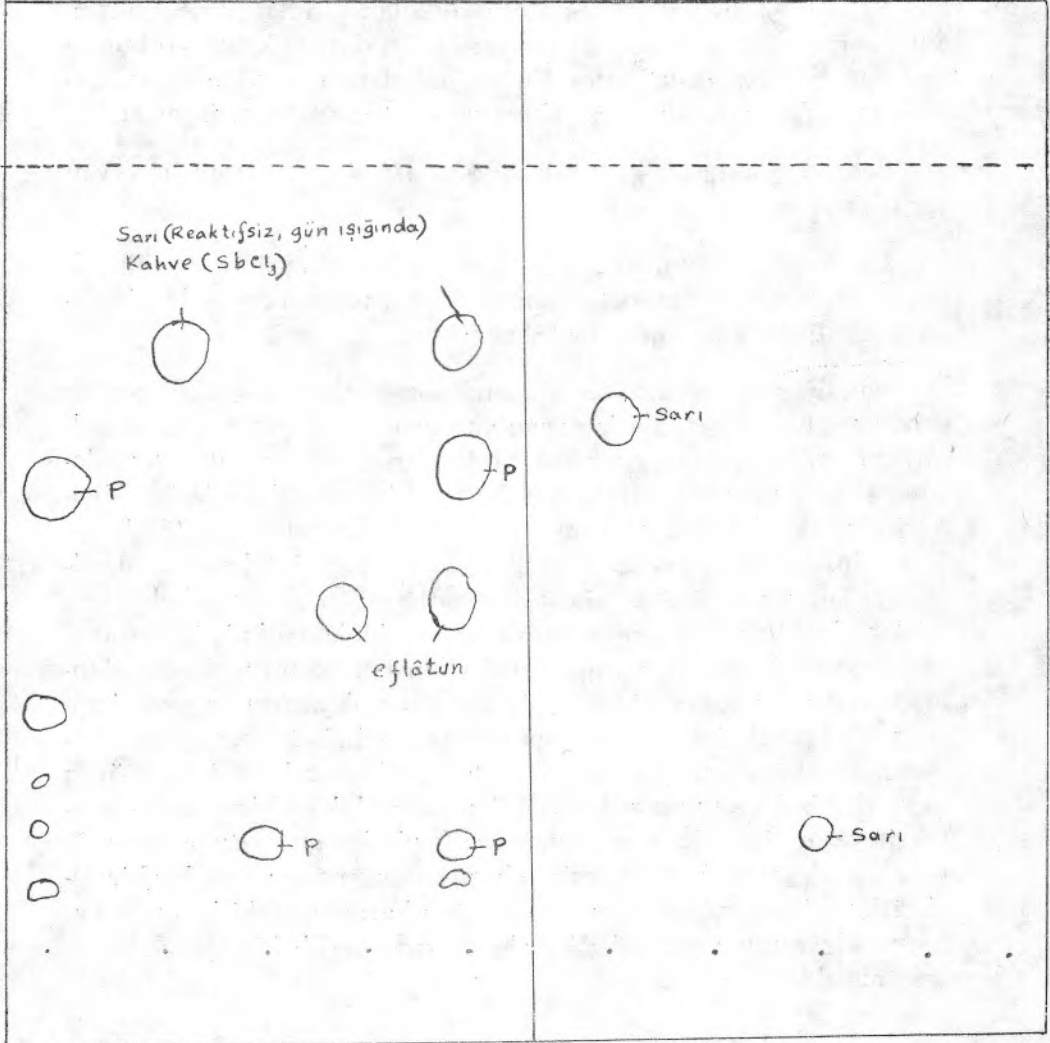
Etanol - metanol (1 : 1) karışımında çözünen sitoresinin (A,B, C) pirdinli vasatta semikarbazid HCl ile muamelesi sonucu hazırlanan semikarbazon, 235 - 240°C de ergiyen beyaz kristal bir tozdu.

Adsorban : Slicagel G

Solvan : Benzen - Metanol (95 : 5)

Reaktif  $SbCl_5$ 

Reaktif : 2-4-dinitrofenilhidrazin



Kromatogram VI

- 1 — Sitoresin
- 2 — 2-4-dinitrofenilhidrazon türevi
- 3 — Semikarbazon
- 4 — Oksim
- 5 — Sitoresin ve türevlerinin karışımı

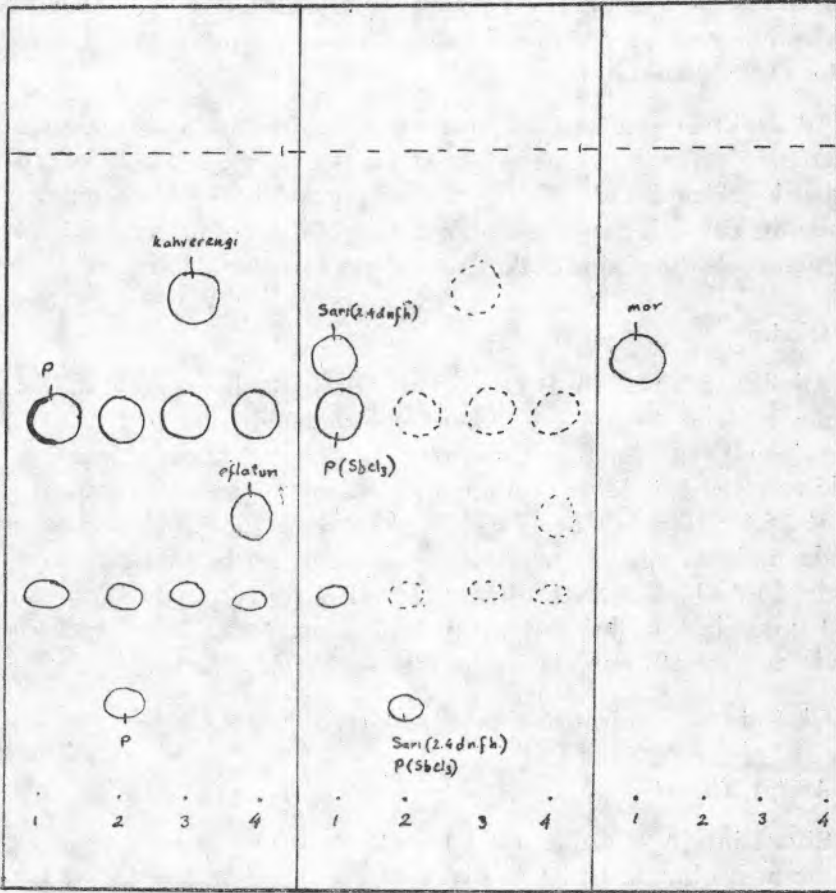
Adsorban : Silicagel G  
Solvan : Benzen Me-  
tanol (95/5)

(2. dev)\*

Reaktif :  $SbCl_3$

Reaktif : Önce 2-4 d.n.  
f.h.\*\* sonra  
 $SbCl_3$

Reaktif : m.dinitroben-  
zen



Kromatogram VII

- 1 — Sitoresin
- 2 — Semikarbazon teşekkülünden sonra sitoresin çözeltisi
- 3 — 2-4-dinitrofenilhidrazon teşekkülünden sonra sitoresin çözeltisi
- 4 — Oksim teşekkülünden sonra sitoresin çözeltisi

(\*) 2. developman.

(\*\*) 2 - 4 dinitrofenilhidrazin.



E. N. Henze'nin (12) hazırladığı semikarbazonunkini tutmaktaydı. Uzun sürede kristallendiği için üzerinde fazla bir çalışma yapılmadı.

#### 2 - 4 - Dinitrofenilhidrazon Türevi :

Alkollu sitoresin (A, B, C) çözeltisinin HCl li ortamda 2 - 4 - dinitrofenilhidrazin ile muamele sonucu elde edildi. Mikrokristallerden oluşan kıvılcımsı sarı bir tozdu. E. N.=250—255°C. Organik çözücülerde özellikle alkolde kolay çözünüyordu. Elementer analiz sonuçları : C= % 68,57; H= % 8,306; N= % 8,24; O= % 14,88. Mass spektrumunda mol. ağı. 636 olarak okundu. Bu durumda kapalı fomül :  $C_{36}H_{52}O_6N_4$  olmaktadır

IR spektrumunun genel görünümü sitoresini andırmaktadır. İlâveten  $1500\text{ cm}^{-1}$ ,  $1510\text{ cm}^{-1}$ ,  $1600\text{ cm}^{-1}$ ,  $1625\text{ cm}^{-1}$  deki bantlar aromatik çekirdekteki  $>C=C<$  bağlarını gösterir (4). Mass spektrumunda en kuvvetli parçalanmalar 203 ve 248 m/e de olanlardır. 248 m/e den molekül pikine kadar büyük bir parçalanma yoktur.

#### Oksim :

Alkollu sitoresin (A, B, C) çözeltilerinin HCl li ortamda hidroksilamin HCl ile muamele edilmesiyle hazırlanan oksim 270 - 275°C de eriyen beyaz renkli prizmatik kristaller halindeydi. Sıcak alkolde ve eterde güçlükle çözünüyordu. Elementer analiz sonuçları : C= % 76,42; H= % 9,67; N= % 2,92; O= % 10,99. Mass spektrumunda molekül ağırlığı 469 olarak saptandı. Bu bilgilerin ışığında kapalı formül :  $C_{30}H_{47}NO_3$  olmaktadır. IR spektrumunda sitoresin spektrumundaki fonksiyonel gruplar görülmektedir. Mass spektrumunda en kuvvetli parçalanmalar 203 ve 248 m/e de olanlardır.

Oksimin asit hidrolizi A bileşiğini verdi.

#### Asetat Türevi :

Sitoresini (A, B, C) ve (B, C) piridinli ortamda asetilleme çabası başarılı olmadı.  $HClO_4$  lü ortamda asetik asit anhidridi ile (sekonder alkoller için metot), ve p-toluen sulfonik asitli ortamda asetik anhidridiyle (tersiyer alkoller için metot) asetilleme suretiyle asetat türevi elde edildi. Her iki yolla da hazırlanan türevler idantik-

ti. Asetat beyaz iğnecikler şeklinde kristaller halindeydi. E. N=255°C. Alkol, eter, kloroformda kolay çözüniyordu. Kesin E. N., çeşitli solvanlarla ince tabakada tek bir leke vermesi üç bileşik karışımından (A, B, C) hazırlanan türevin tek bir bileşik olduğunu gösteriyordu.

#### Elementer analiz sonuçları :

C= % 75,99; H= % 9,53; O= % 15,08. Mass spektrumu sonucu molekül ağı. 540 olarak tesbit edildi. Bu durumda kapalı formül :  $C_{34}H_{52}O_5$ .

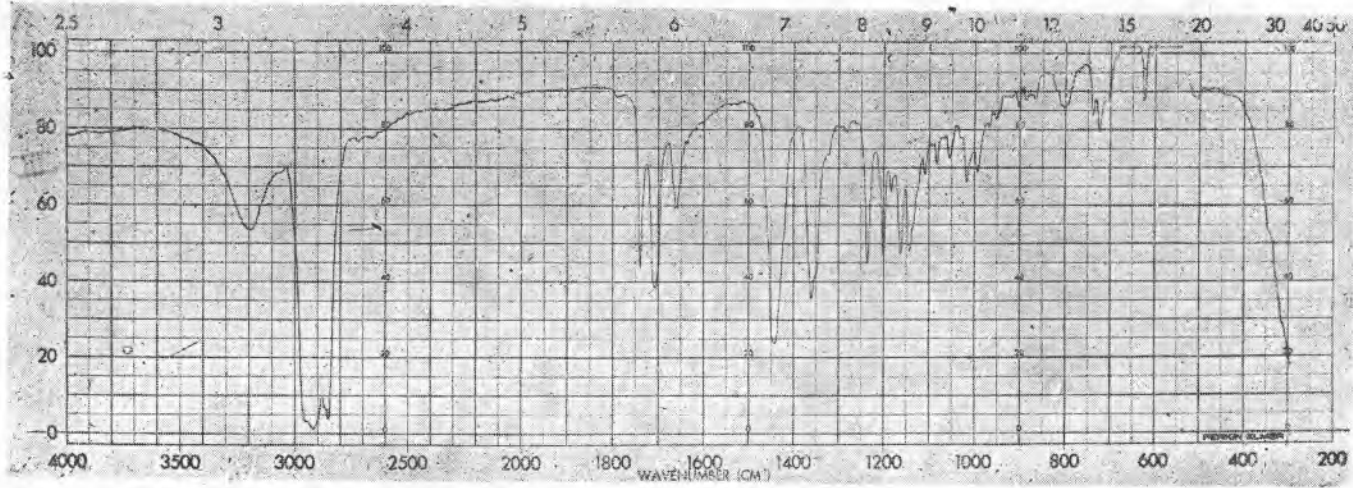
Asetatın sabunlaştırılmasıyla (C) ve eser miktarda (A) meydana geldi.

Alkollü çözeltileri 228 m $\mu$  da maksimum absorpsiyon gösterdi.

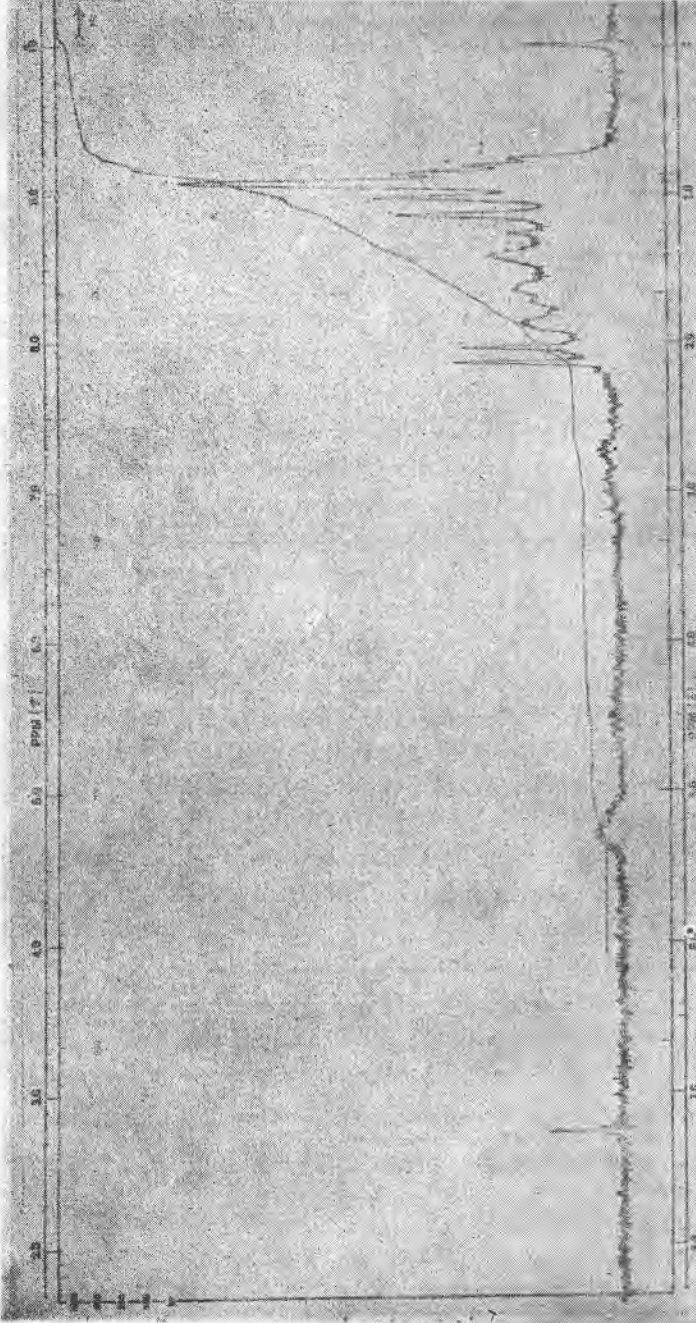
IR spektrumunda (Spektrum III) 1200 cm<sup>-1</sup>, 1225 cm<sup>-1</sup>, 1740 cm<sup>-1</sup> deki kesin bantlar asetat grubunu belirtir. Ayrıca 1020 cm<sup>-1</sup>, 1145 cm<sup>-1</sup> ve 1165 cm<sup>-1</sup> deki bantlar da asetillenmeyi ifade eder. Bunun dışında spektrum sitoresin spektrumunu andırmaktadır. 2850-3010 cm<sup>-1</sup> arasındaki geniş bant, 1350 cm<sup>-1</sup> ve 1370 cm<sup>-1</sup> deki keskin bantlar karbon zincirini gösterir. 3200 cm<sup>-1</sup> deki hidroksil bandı, molekülde bir türlü asetillenmeyen bir OH mevcudiyetini belirtmektedir (4).

NMR spektrumunun (Spektrum IV) genel görünümü sitoresinin NMR spektrumlarına benzemektedir : 0,75; 0,80; 0,85; 0,92; 1; 1,11 ppm deki pikler primer metil gruplarını (R-CH<sub>3</sub>); 1,25; 1,40 ppm deki pikler metilen (R-CH<sub>2</sub>-R) gruplarını gösterir. 1,62; 1,72; 1,85 ppm deki pikler tersiyer metil gruplarını (R<sub>3</sub>-CH) gösterebileceği gibi çifte bağ taşıyan bir karbon atomuna komşu karbon atomundaki protonları da belirtebilir (18). 2,04; 2,12 ppm deki iki pik iki adet asetat grubunu gösterir. 5,3 ppm deki küçük pik çifte bağa veya asetillenmemiş bir -OH a işaretir (18).

Türevlerle yapılan çalışmalarla şu sonuçlar elde edilmiştir : Keton türevleri sitoresinin sadece A diye isimlendirilen bileşiğini kapsamaktadır. Oksim ve 2-4-dinitrofenilhidrazon türevlerinin formüllerinden hareketle A nın kapalı formülünü saptamak kolaydır.



**Spektrum III**  
**Asetat türevinin IR spektrumu**

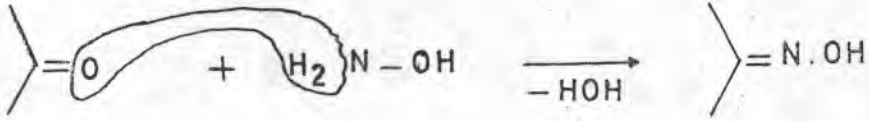


Spektrum IV  
Asetat türevinin NMR spektrumu

...

...

Oksimden hareketle :



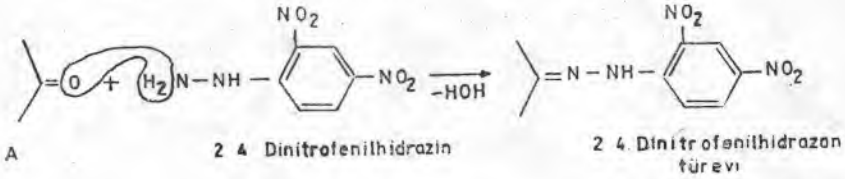
A

Hidroksilamin

Oksim

Reaksiyona göre oksimin mol. tartısının keton bileşiğinden 15 fazla olması gerekir. Oksim  $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{NO}_3 = 469$  olduğuna göre keton bileşiğinin formül ve mol. tartısı  $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3 = 454$  olmalıdır.

2-4-dinitrofenilhidrazon türevinden hareketle :



Reaksiyona göre türevin mol. ağı. keton bileşiğinkinden 180 fazla olmalıdır. Buna göre türev  $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{N}_4\text{O}_6 = 636$  olduğundan ketonun mol. tartısı  $636 - 180 = 456$  ve formülü de  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$  dür.

Bu hesaplara göre sitoresinin keton olan bileşiği  $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3$  veya  $\text{C}_{36}\text{H}_{48}\text{O}_3$  formülünde 454 veya 456 mol. tartısındadır.

Gerek A, B, C ve gerekse B, C karışımı sitoresinden elde edilen asetate türevinin tek ve aynı bileşik olması, sitoresini meydana getiren bileşiklerin yapılarının çok yakın olduğunu düşündürmektedir. Zaten sadece A yi kapsayan oksim ve 2-4-dinitrofenilhidrazon türeviyle, A, B ve C yi kapsayan asetate türevinin mass spektrumlarında parçalanma pikleri hemen hemen aynıdır. A, B ve C nin aynı kapalı formülde oldukları kabul edilirse :

| Sitoresin                                    | 2 - Asetil Sitoresin                                       | Teorik Elementer % ler |
|--|--|------------------------|
| $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3 = 456$ | $\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{O}_5 = 456 + 2(42) = 540$ | C : % 75,5             |
| $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3 = 454$ | $\text{C}_{34}\text{H}_{50}\text{O}_5 = 454 + 2(42) = 538$ | H : % 9,63             |
|  |  | C : % 75,8             |
|  |  | H : % 9,3              |

Gerçekten de asetat türevinin elementer % leri (C : % 75,99, H : % 9.53) bu varsayımı desteklemektedir.

### 3 — Sitoresin karışımının separasyonu :

**A :** Oksim, % 1 lik alkollü  $H_2SO_4$  çözeltisi ile geri çeviren soğutucu altında 1 saat 20 dakika kaynatılarak hidroliz edildi. Daha az sürede oksim parçalanmıyor, daha fazla kaynatılmayla parçalanma çok ileri gidiyordu. Hidroliz ürünü A lekesini vermekteydi. (Kromatogram VIII) Hidroliz ürününün eterle çalkalanması ve eterin uçurulmasıyla A elde edildi. Hafif yağlı görünüşlü renksiz kristaller halindeydi,  $100^{\circ}C$  civarında ergidi.

### IR Spektrumu :

Sitoresin karışımının spektrumunu andırmaktadır.  $3100 - 3700\text{ cm}^{-1}$  arasındaki geniş bant hidroksil,  $1705\text{ cm}^{-1}$  dek keskin bant keton gruplarını,  $2800 - 3000\text{ cm}^{-1}$  arasındaki kuvvetli bant da karbon zincirini göstermektedir.

A stabil değildi.  $N_2$  atmosferinde, ışıktan uzakta ve serin bir yerde saklansa bile bozunmaktaydı. Bozunma sırasında B nin de meydana geldiği kromatografik olarak tesbit edildi. Stabil olmaması A ile çalışmayı güçleştiriyordu.

**B :** A nın oksim halinde blokajı, oksimin tamamının kristallenip süzülerek ortamdaki uzaklaştırılmasından sonra geriye kalan sitoresin çözeltisi (B ve C) preparatif ince tabakaya uygulanarak B ve C separe edildi. Özellikle silicagel HF 254  $\lambda$  adsorbanı ve petrol eter - eter (50/50) solvanıyla ayırım iyi oldu. Plâklardan dikkatlice kazınan B ve C bantları eterle yarım saat çalkalanarak ekstre edilmekte, eter uçurulmaktaydı.

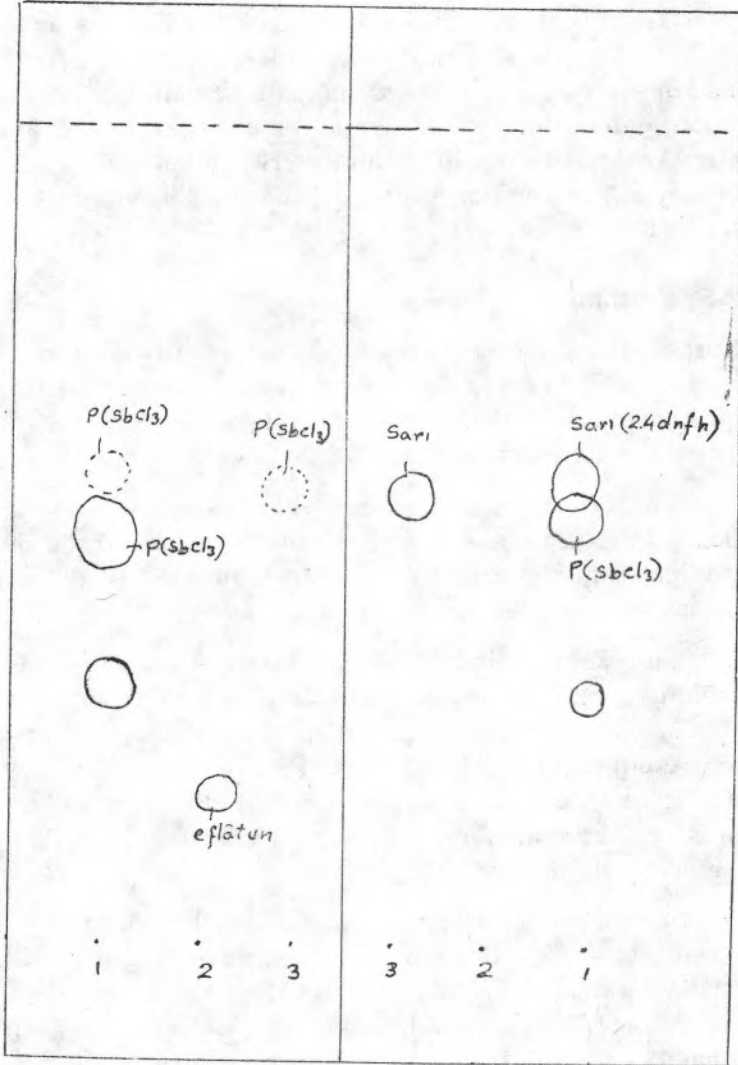
Bu şekilde elde edilen B beyaz renkli amorf bir tozdu.  $250 - 255^{\circ}C$  arası bozularak ergidi. Çekilen mass spektrumunda mol ağırlığı 456 olarak hesaplandı. B ince tabaka kromatografisinde tek leke veriyordu ve keton lekesi kesinlikle yoktu. Yalnız verim çok düşüktü, bu yüzden B üzerinde fazla bir çalışma yapılamadı. Diğer bir sakınca, reaktifimiz yüzünden ( $SbCl_3$ ) plâkların mecburen ısıtılmasıydı. Bazen bu ısıtma sebebiyle labil bir bileşik olan B bozu-

Adsorban : Silicagel HF<sub>254</sub> λ

Solvan : Benzen - Metanol  
(95 : 5)

Reaktif : SbCl<sub>3</sub>

Reaktif : 2-4 d.n.f.h.\* sonra SbCl<sub>3</sub>



### Kromatogram VIII

- 1 — Sitoresin
- 2 — Oksim
- 3 — Oksim hidroliz ürünü (etere geçen)

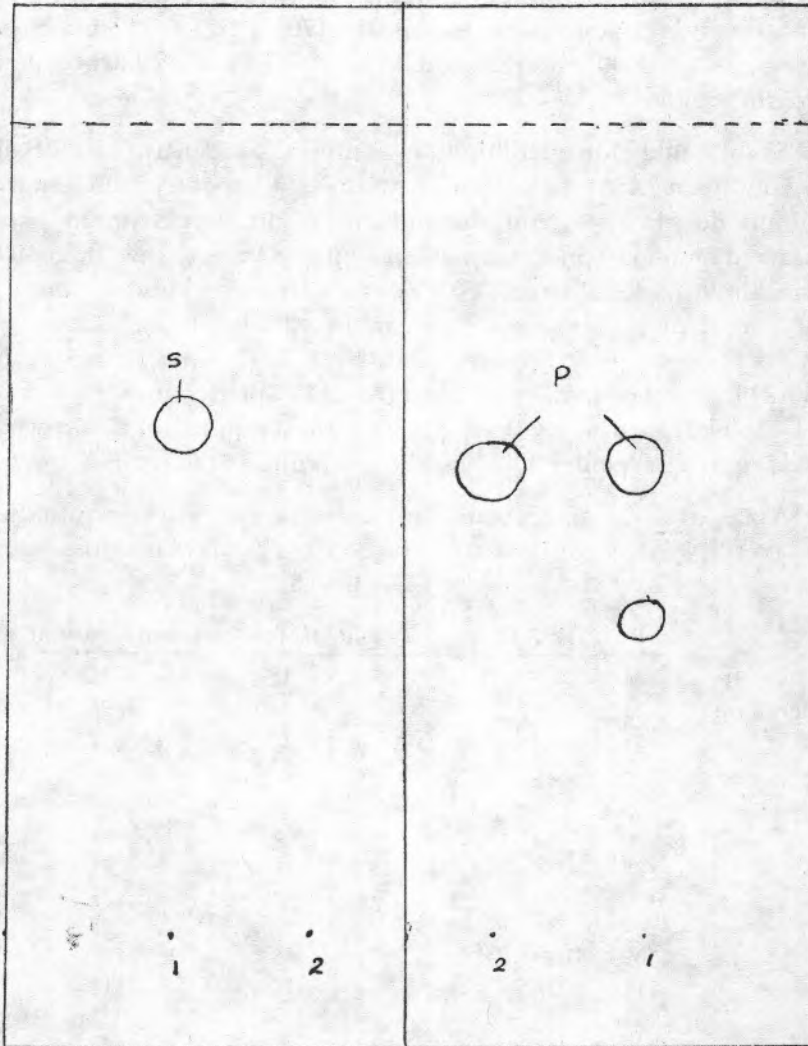
(\*\*) 2, 4 - dinitrofenilhidrazin.

Adsorban : Silicagel G

Solvan : Petrol eteri - Eter (50 : 50)

Reaktif : 2 - 4 - d.n.f.h.

Reaktif  $SbCl_3$



Kromatogram IX

- 1 — Sitoresin
- 2 — B



nuyor ve sarı renkli bir yağ halinde plâktan ekstre ediliyordu. Böyle bozunmuş B ince tabakada A lekesini ve IR spektrumunda da keton pikini veriyordu. Bu şekilde bozunmuş B nin IR spektrumu sitoresin karışımlarının spektrumunu andırmaktadır. 3100 - 3700  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki geniş bant hidroksili, 1705  $\text{cm}^{-1}$  deki keskin bant ketonu, 2800 - 3000  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki kuvvetli bant da karbon zincirini göstermektedir.

Stabl halde elde edebildiğimiz B nin mass spektrumu mol. ağırlığı yönünden (456) 30 karbonlu bir bileşiği, spektrumun genel görünümü de bir triterpeni düşündürmektedir. Spektrumun üst kısımlarında molekül pikinden hemen sonra 18 m/e, 17 m/e deki birkaç parçalanma molekülden kopan çeşitli kısımları, bundan sonra hiç bir parçalanma olmaması parçalanması güç halkalı bir bileşiği belirtmektedir. Spektrumdaki en bariz pikler 203 ve özellikle 248 m/e de olanlardır. 248 m/e deki spektrumun en kuvvetli piki molekülün aşağı yukarı yarısından bölündüğünü gösterir ve bu durum triterpenler için karakteristiktir. (Spektrum V)

Aşağıda B nin parçalanma pikleri sitoresin türevlerinininkilerle mukayeseli olarak verilmiştir. Aradaki benzerlik kolaylıkla görülmektedir.

|            | B   | Oksim | 2 - 4 - d. n. fenilhidrazon | Asetat |
|------------|-----|-------|-----------------------------|--------|
| Parçalanma | 18  | 18    | 18                          | 18     |
| Pikler m/e | 28  | 29    | 28                          | 28     |
|            | 41  | 41    | 41                          | —      |
|            |     | 43    | —                           | 43     |
|            | 55  | 55    | 55                          | 55     |
|            | 69  | 69    | 69                          | 69     |
|            | 81  | 81    | 81                          | 81     |
|            | —   | 93    | 93                          | 93     |
|            | 95  | 95    | —                           | 95     |
|            | 105 | 105   | 105                         | 105    |
|            | 119 | 119   | 119                         | 119    |
|            | 133 | 133   | 133                         | 133    |
|            | 147 | 147   | —                           | 147    |
|            | —   | 161   | —                           | 161    |
|            | 175 | 175   | —                           | 175    |
|            | 189 | 189   | 189                         | 189    |
|            | 190 | —     | —                           | —      |

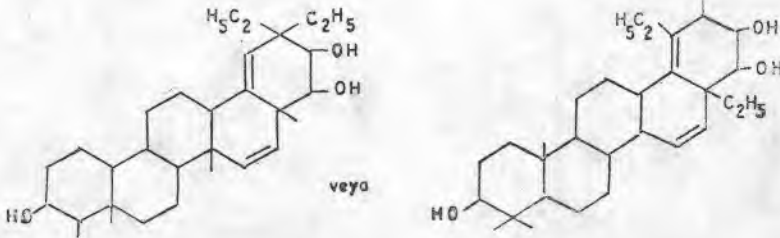
|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
| 203 | 203 | 203 | 203 |
| —   | —   | —   | 219 |
| 222 | 222 | —   | —   |
| 233 | 233 | 233 | 233 |
| 248 | 248 | 248 | 248 |
| —   | —   | —   | 393 |
| —   | —   | —   | 408 |

Görüldüğü gibi B nin mol. ağırlığı A ile aynıdır. Spektrumdaki benzerlik ve kolayca A ya dönüşmesi kapalı formülün de A ile aynı olabileceğini düşündürür.

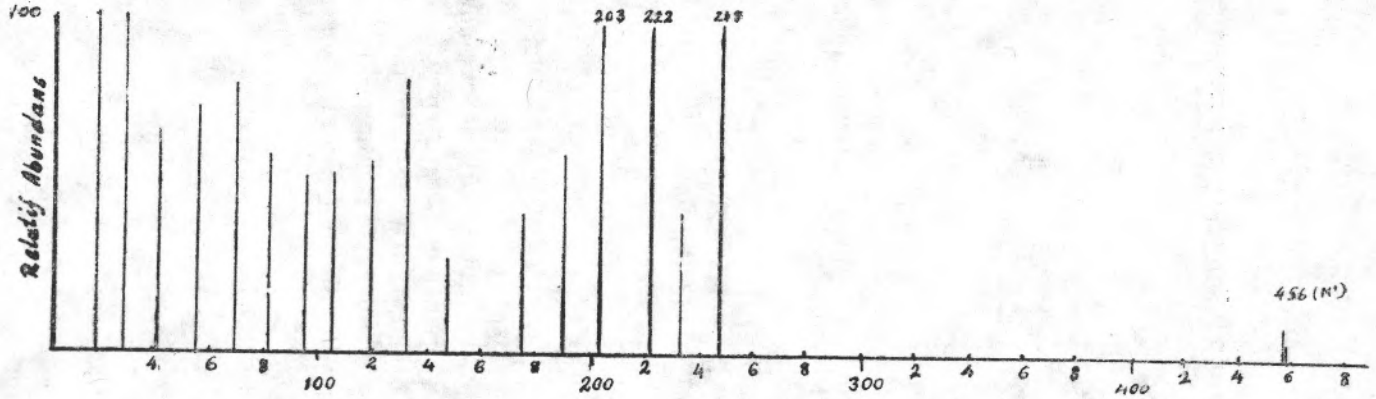
248 m/e deki parçalanma  $\beta$  amiran türevi triterpenlerden friedelan türevinin (8) (molekülün D halkasından ikiye bölünmesi) (8) parçalanmasına ve bauran türevi triterpenlerin (molekülün C ve D halkasında ikiye bölünmesi) parçalanmasına (8) benzemektedir. 203 m/e deki pik de gene bauran türevlerinin parçalanmasını düşündürür. 248 m/e deki parçalanma aynı zamanda molekülün C halkasından da ikiye bölüneceğini akla getirmektedir.

B nin kapalı formülü A ile aynı ( $C_{30}H_{48}O_3$ ) ise mol. ağırlığı 456 olduğuna göre 2 çifte bağ ihtiva ediyor demektir. Molekülde 8 adet (karbon sayısının 30 a tamamlanması için) halkaya bağlı metil veya metilen grubu bulunmalıdır. Yukarda belirtilen parçalanmalar dikate alınırsa metillerden üç adetinin A, B ve C halkalarında, halkaya bağlı diğer 5 adet karbon atomunun D ve E halkalarında bulunması akla yakındır.

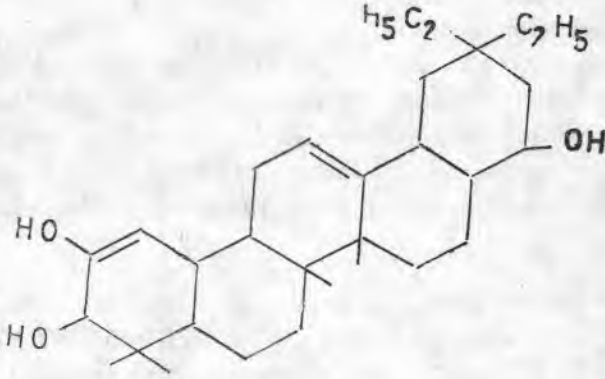
Molekülümüzün friedelan ve bauran türevlerine uyduğu düşünülürse muhtemelen formül :



Molekülün C halkasından bölündüğü düşünülürse muhtemel formül :



Spektrum V  
B nin mass spektrumu



**C** : Preparatif ince tabaka kromatografisiyle elde edilen C 300°C nin üstünde bile ergimeyen beyaz renkli amorf bir tozdu.

Asetat ürünününün % 1 lik alkollü KOH la sabunlaşması sonucu elde edilen ürün esas itibariyle C'den ibarettir. Eser miktarda da A ihtiva ediyordu.

#### SONUÇ VE TARTIŞMA

**Styrax Liquidus** ekstrelerinden ince tabaka kromatografisinde 10- 11 leke separe edildi. Bunlardan üçü sitirasin (sinnamil sinna- mat) ve sitoresinin fraksiyonları olarak tesbit edildi. Reaktif püs- kürtülmeden önce plâkların UV ışığında incelenmesiyle n-fenil pro- panol, benzil akol, fenil propil sinna- mat, benzil sinna- mat lekeleri de saptandı. Ayrıca ince tabaka kromatografisinde sinna- mik asit esterlerinin separasyonunun çok güç olduğu, vanilin, sitiren gibi eser miktardaki bileşiklerin ince tabaka kromatografisiyle tesbiti- nin olanaksız olduğu anlaşıldı.

İnce tabaka kromatografisiyle yapılan çalışmalarda balsamda tek bir asit bulunduğu gösterildi (Sinnamik asit).

Gaz kromatografisiyle yapılan çalışmalarda ise eterli **Styrax Liquidus** ekstrelerinde 20 pik tesbit edildi. Bunlardan on biri idan- tifiye edildi : Sinnamik asit ve esterleri (sitirasin, fenil propil, etil, benzil), vanilin, sitiren, n-fenilpropanol, benzil alkol; ayrıca benzaldehit ve sinna- maldehit eser miktarlarda saptandı.

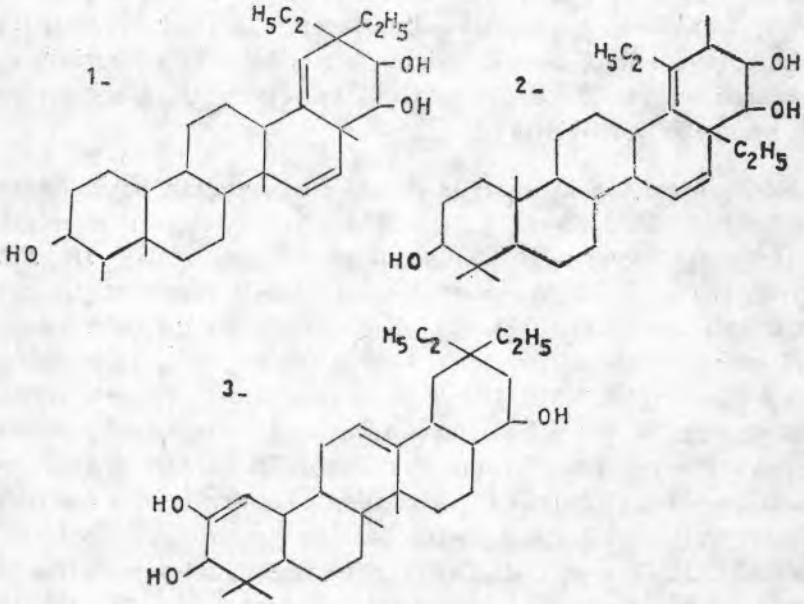
Balsamın bünyesindeki bileşiklerin adsorbanlara afinitelerinin ve solvanlarda çözünürlüklerinin yakın olması sütun kromatografisinde separasyonu güçleştiriyordu. En uygun sonuçlar petrol eterli **Styrax Liquidus** ekstresinin  $Al_2O_3$  sütununda separasyonu ile elde edildi. Bu şekilde sitirasin, sitoressin ve sinnamik asit izole edildi. Literatürde zahmetli bir şekilde elde edilen sitirasin böylece kolay izole edilebildi. Sitoressin ayrıca balsam ekstrelerinden de çöktürüldü.

**Styrax Liquidus**'un en önemli bileşiği sitoressin hakkında araştırmacılar bir çok karşıt görüşler ileri sürmüşlerdir. Özellikle Henze (12) ve Berkel ve Huş'un (5) iddiaları uyuşmamaktadır. Henze'ye göre : «Sitoressin 5 - 6 bileşiğin karışımıdır. Bunlardan biri semikarbazonu  $240^{\circ}C$  de eriyen bir keton, biri bir alkol, birisi de yüksek E. N. lı bir bileşiktir». Berkel ve Huş'a göre ise : «Sitoressin  $C_{30}H_{48}O_3$  veya  $C_{33}H_{46}O_3$  formülünde bir tek fenolik hidrosil ihtiva eden doymuş, halkalı, saf bir bileşiktir».

Bizim yaptığımız kromatografik incelemeler sitoressinin tek bir bileşik değil belli başlı üç bileşiğin karışımı olduğunu ortaya koydu. Separe edilen bu üç bileşik üzerindeki çalışmalar, bunların bünyelerinin çok yakın olduğunu ve birbirlerine dönüşebildiklerini göstermiştir. Bileşiklerden biri  $C_{30}H_{48}O_3$  veya  $C_{33}H_{46}O_3$  formülünde 454 veya 456 mol. ağırlığında triterpenik bir keton, biri aynı molekül ağırlığında triterpenik bir alkol, birisi de yüksek E. N. lı bir bileşiktir. Ketonun semikarbazonu  $235 - 240^{\circ}C$  de erimektedir. Görüldüğü gibi Henze'nin bazı görüşleri doğrulanmıştır. Bizim hesapladığımız formül Berkel ve Huş'un verdiği formülle aynıdır. Muhtemelen sitoressini oluşturan bileşiklerin yapıları çok benzediği için sitoressin saf bir bileşik sanılmıştır.

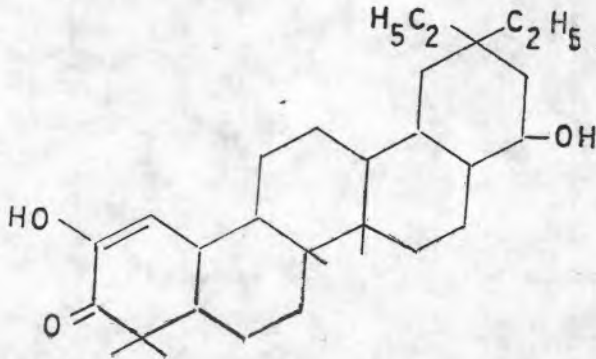
IR, NMR spektrumlarının başka deneylerle de desteklenen sonuçlarına göre sitoressin karışımı aromatik değildir. Metil ve metilen grupları ihtiva eden triterpenik bir bünyedir. İki adet asetillenebilen glikol şeklinde hidroksil grubu vardır. Bünyenin aromatik olmaması, sitoressinin  $FeCl_3$  ile renk vermemesi, asetilasyonun sekonder alkoller için uygun bir metotla gerçekleşmesi, hidroksillerin iddia edildiği gibi fenolik olmadığını göstermiştir.

Mass spektrumundaki parçalanmalar ve diğer bulgulara göre sitoresinin alkol fraksiyonu (sitoresinol) için şu muhtemel formüller ileri sürülebilir :



Sitoresin için 275 m $\mu$  olan maksimum UV absorpsiyonunun asetat türevinde 228 m $\mu$  a düşmesi çifte bağlardan birinin birinci karbondan olma ihtimalini kuvvetlendirmektedir. Bu durum da 3 numaralı formüle benzer bir yapıyı daha muhtemel kılmaktadır.

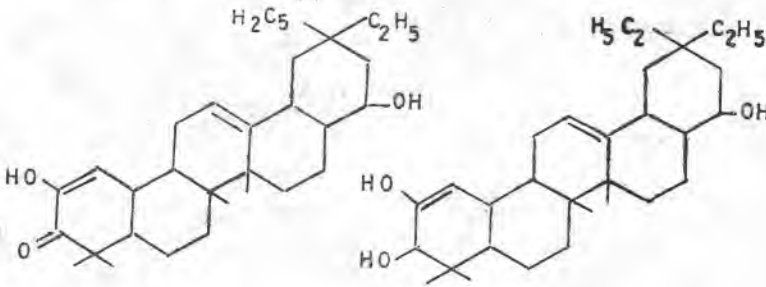
Şu halde sitoresinin keton olan fraksiyonu için (Sitoresinon) şöyle bir formül ileri sürebilir :



## Ö Z E T

Bu çalışmada **Styrax Liquidus** ince tabaka, gaz ve sütun kromatografisine uygulanmış, balsamın bünyesinde sinnamik asit ve esterleri (sinnamil, fenil propil, benzil, etil), sitiren, vanilin, fenil propanol, benzil alkol, sinnamaldehit, benzaldehit ve sitoresinin varlığı gösterilmiş ayrıca droğun kromatografiye uygulanması üzerinde ayrıntılar verilmiştir.

Sitoresin, sütun kromatografisiyle izolasyondan başka balsam ekstrelerinde çöktürülerek elde edilmiştir. Sitoresin ince tabaka kromatografisine uygulanmış, elementer analiz, UV, IR, NMR spektrumları, çeşitli testler yardımıyla bünyesi araştırılmıştır. Sitoresinin semikarbazon, oksim, 2-4-dinitrofenilhidrazon ve asetat türevi hazırlanmış ve türevlerin (semikarbazon hariç) elementer analiz sonuçları, IR, NMR, UV ve mass spektrumlarına göre formülleri saptanmıştır. Bu çalışmaların sonucunda sitoresinin aromatik bir yapı olmadığı, keton grubu, glikol grupları halinde iki adet asetillenebilen alkol grubu, metil ve metilen grupları ihtiva eden triterpenik bir karışım olduğu anlaşılmaktadır. Karışımı kapalı formülleri aynı ( $C_{30}H_{46}O_3$  veya  $C_{30}H_{48}O_3$ ) olan ve muhtemelen birbirine dönüşen 3 bileşiğin oluşturduğu tesbit edilmiştir. Bu bileşiklerden birisi bir keton, birisi bir alkol, birisi de yüksek ergime noktalı bir bileşiktir. Bileşikler sitoresin türevlerinin hazırlanması ve preparatif ince tabaka kromatografisi ile separe edilmiş, keton ve alkol için muhtemel formüller ileri sürülmüştür :



Sitoresinon

Sitoresinol

## SUMMARY

In this research, extracts of **Styrax Liquidus** have been applied to thin layer, gas and column chromatography. Cinnamic acid, and its esters (sinnamyl ester, phenyl propyl ester, ethyl and benzyl esters), styrene, vanillin, phenyl propanol, benzyl alcohol, cinnamaldehyde, benzaldehyde and storesin have been identified. Apart from the facts mentioned above, details have been given for the chromatographic examination of the balsam.

Storesin has been obtained both by column chromatography and by precipitating from the extracts of **Styrax Liquidus**. After chromatographic analysis of storesin, the structure elucidation has been tried by elementary analysis, by taking the UV, IR and NMR spectra and applying several tests and by formation of the derivatives.

The derivatives of storesin, such as semicarbasone, oxim, 2-4-dinitrophenyl hydrasone and acetate have been prepared. Formulas for the oxim; 2-4-dinitrophenyl hydrasone and acetate derivatives have been determined by elementary analysis, IR, UV, NMR, and mass spectra.

Interpretation of these data has indicated that storesin is not an aromatic structure, but a mixture consisting of triterpenes having functions such as a ketone, two hydroxyles that can be acetylated, methyls and methylenes. Storesin has been shown to consist of three constituents having the same formula ( $C_{30}H_{46}O_3$  or  $C_{30}H_{44}O_3$ ) which can isomerize into one another. One of these is a ketone, the second an alcohol, the third a high melting point compound. These compounds have been separated by preparing the derivatives of storesin and by application to preparative TLC. Structures have been suggested for the ketone (Storesinone) and the alcohol (Storesinol).



## L İ T E R A T Ü R

- 1 — Ahrens, C.; Offent, Z. : Chem., **18**, 267-72; Chem., **7**, 1401 (1913).
- 2 — Anselmino, O.; Seitz, R.; Bodlander, E. : *Arb. Reisgesundh* **57**, 162-72 (1926); Chem. Abst. **20**, 3773.
- 3 — Aylık Dış Ticaret İstatistikleri - Monthly Foreign Trade Istatistics, Devlet İstatistik Ens. Matbaası (1972).
- 4 — Bellamy, L. J. : *The Infrared Spectra of Complex Molecules*, London : Methuen Co Ltd., New York, John Wiley and Sons, Inc. (1966).
- 5 — Berkel, A.; Huş, S. : *Ankara Yüksek Ziraat Enst. Derg.*, **3**, 9 (1944).
- 6 — Berkel, A. : *Farm.*, **17**, 73 (1947).
- 7 — Böhrish, P. : *Arch. Pharm.*, **263**, 359-62 (1925), Chem. Abst., **19**, 2724.
- 8 — Budzikiewicz, H.; Jerassi, C.; Dudley, H. W. : *Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry. Vol. II Steroids, terpenoids, sugars and miscellaneous classes*, Holden-Day, Inc., San Francisco, London (1964).
- 9 — Dieterich : *Pharm., Zentralhalle*, **37**, 425 (1896).
- 10 — Guenther, E. : *The Essential Oils, Vol. V*, D. Van Nostrand Company, INC. Princeton, New Jersey, Toronto and London (1967).
- 11 — Hanbury, D. : *Science Papers Chiefly Pharmacological and Botancial* (1876).
- 12 — Henze, M. : *Ber.*, **49**, 1622-32 (1916).
- 13 — Hiller, K. : *Pharmazie*, **20**, (6), 353-6 (1965).
- 14 — Hoff, van't : *Ber.*, **9**, 5 (1876).
- 15 — Itallie, Von L.; Lemkes, H. J. : *Pharm. Weekblad* **55**, 142-9 (1918).
- 16 — Itallie, Von L.; Tschirch, A. : *Arch. Pharm.*, **239**, 506-33 (1901).
- 17 — Laubenheimer. : *Ibid*, **164**, 239 (1872).
- 18 — Martin, M. L.; Martin, G. J. : *Manuel de Résonance Magnétique Nuclear*, Azoulay, Ed. Paris (1971).
- 19 — Miller, von. : *Arch. Pharmaz.*, **220**, 648 (1882).
- 20 — Miller von. : *Liebigs Ann., Chem.*, **188**, 184-200 (1887).
- 21 — Orman Genel Müdürlüğü Ormanlık İstatistik Albümü, (1967-1971).
- 22 — Rechingen, K. H. : *Flora Aegaea, Denkschriften d. Akad. d. Wiss. Wien*, **105** (1943).
- 23 — Schongl, K. : *Naturwissenschaften* **46**, 447 (1959).
- 24 — Simon. : *Liebigs Ann. Chem.* **31**, 265 (1839).
- 25 — Stahl, E. : *Thin layer Chromatography*, George Allen Union Ltd. London, Springer, Verlag-Berlin, Heidelberg, New York (1966).