

## ***Echium italicum* L. var. *biebersteinii* Lac. üzerinde çalışmalar**

### **Investigations on *Echium italicum* L. var. *biebersteinii* Lac.**

Hayriye AMÂL ve Öznur ATEŞ \*

*Echium italicum* L. var. *biebersteinii* Lac. (Engerek otu) \*\* Türkiyede yaygın bir şekilde rastlanan bir *Echium* türüdür. *Echium* türleri Boraginaceae familyası bitkilerinden olduğuna göre bu türlerin pirrolizidin alkaloidleri ihtiva etmesi beklenir. Nitekim *E. plantagineum*'da ekiumin ve ekimidin ile daha iki alkaloidin bulunduğunu Culvenor (1) tesbit etmiştir. *E. vulgare*'de eser miktarda alkaloid (billuri olmayan) mevcudiyeti Manske (2) tarafından bildirilmiştir. *E. plantagineum*'da uzun zincirli asidler ve proteinler (3), *E. rubrum*'da allantoin (4), *E. vulgare*'de allantoin ve organik asidler (5,6), *E. humile* ve *E. longifolium*'da alkanin (7) bulunduğu daha önce yapılmış çalışmalarıyla belirtilmiştir.

*E. italicum* tohumlarından elde edilen yağın analizi bir seri Boraginaceae familyası bitkilerinin ihtiva ettiği yağların incelenmesi (3) sırasında yapılmış; aynı bitkinin kuzey ve güney Kazakistanda yetişeninin stronsiyum ihtiva ettiği (8) de tesbit edilmiştir.

İstanbulda Tuzla civarından toplanan *E. italicum* var. *biebersteinii* üzerinde, ihtiva ettiği aktif maddeler yönünden şimdiye kadar bir çalışma yapılmamıştır. Bu bitkinin kök, sap, yaprak ve çiçeklerinden değişik solventlerle yapılan ekstraksiyondan elde edilen ekstraktlar incelenmiştir.

### P R A T İ K K İ S İ M

Materyel, 1967 yılı haziran ve eylül aylarında toplandı; bitkinin toprak altı ve toprak üstü kısımları birbirinden ayrılarak incelendi.

\* Farmasötik Kimya Kürsüsü, Eczacılık Fakültesi, Üniversite, İstanbul.  
\*\* Bitkinin tanımları Prof. Dr. Asuman Baytop tarafından yapılmıştır, kendilerine teşekkür ederiz.

**Alkaloidler.** Herbanın kurutulup toz edildikten sonra etanol (a), eter (b), aseton (c), kloroform (d) ve diklorometan (e) ile soğukta (maserasyon) veya sıcakta (Soxhlet cihazında) ekstraksiyonu yapıldı. Ekstraksiyon, mahsüllerinden solvent, vakumda distillenerek ayrıldı; elde edilen artıklar hidroklorik asid (% 2), sülfürik asid (% 16) veya sitrik asid (doymuş çözelti) ile alındı, amonyak (% 15) ile muameleden sonra kloroform veya diklorometanla bazik maddeler ekstre edildi. Solvent distillendikten sonra artık,

A) Az etanolde eritildi; bu çözelti Dragendorff reaktifi ile turuncu, Tanret reaktifi ile beyaz, amonyum Reineckat ile kırmızı rusup verdi,

B) Etanolde eritilmiş artık kromatografik olarak incelendi; ince tabaka kromatografisinde 1. silikajel G (0.1 N sodyum hidroksitle hazırlanmış) üzerinde metanolle developmandan sonra kromatogramlar iod buharlarına tutuldu ve altı leke tesbit edildi ( $R_{f_1}$  0.62,  $R_{f_2}$  0.48,  $R_{f_3}$  0.42,  $R_{f_4}$  0.33,  $R_{f_5}$  0.25 ve  $R_{f_6}$  0) (t: 26°C); 2. silikajel G üzerinde metanolle sürüklendi, Dragendorff reaktifi ve arkasından 0.1 N HCl püskürtüldü, aynı  $R_f$  teki altı leke bulundu; 3. 2 deki gibi çalışarak developmandan sonra kromatogramlara 0.1 N potasyum permanganat püskürtüldü,  $R_{f_2}$  ye tekabül eden leke dışındakiler reaktifin rengini açtı; 4. kâğıt kromatografisinde Wathman I, BuOH-CH<sub>3</sub>COOH % 5 (1:1) ve Dragendorff reaktifi kullanıldı, dört leke ( $R_{f_1}$  0.98;  $R_{f_2}$  0.93;  $R_{f_3}$  0.84;  $R_{f_4}$  0.65) (t: 18°C) tesbit edildi.

C) a, b, c, d ve e ekstraktlarının asid ve alkali muamelesinden sonra alkaloid miktarı gravimetrik olarak tayin edildi ve cetveldeki sonuçlar elde edildi.

Cetvel a, b, c, d ve e ekstraktlarında total alkaloid miktarı.

Herba	Solvent	Ekstre		Ham alkaloid %
		g	%	
500 g	CHCl <sub>3</sub> (sıcak)	7.59	1.51	0.018
"	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (soğuk)	7.61	1.52	0.011
"	Alkol % 96 (soğuk)	7.11	1.42	0.005
"	Eter (sıcak)	8.29	1.66	0.006
"	Aseton (sıcak)	20.00	4	0.02

**Boyar madde.** Bitki köklerinden petrol eteri ile yapılan ekstraksiyonda kırmızı renkli, macun kıvamında bir boyar madde elde

edildi. Bu madde alkalen pH larda mavi renk alır, asidlendirildiğinde renk, yeniden kırmızıya döner. Ferri klorür çözeltisi ile yeşil renk verir. Silikajel HF<sub>254-368</sub> üzerinde yapılan kromatografisinde sikloheksan-kloroform-asetik asid (70:20:10) ile developmandan sonra Rf : 0.49; kloroform-metanol-asetik asid (25:65:10) ile Rf : 0.94; butanol-asetik asid % 5 (1:1) (organik faz) Rf : 0.94 (alkanin için Rf : 0.93) olan tek leke verir.

**Organik asidler.** Bitkide organik asidlerin tesbiti Kinzel (6)'e göre çalışılarak yapıldı. Taze yapraklardan sıcak su ile elde edilen ekstrakt anyon değiştirici (zayıf alkalen anyon değiştirici II Merck) sütundan geçirildi; sütun amonyum karbonat doymuş çözeltisi ile elüe edildi, amonyum karbonat vakumda bertaraf edildi ve bakiye amonyum iyonundan kurtarılması için katyon değiştirici (zayıf asid katyon değiştirici IV Merck) sütundan geçirildi; mahsul kromatografiye edildi :

a) İnce tabaka kromatografisi. Adsorban : silikajel G, solvent sistemi : etanol-su-amonyak %25 (100:12:16); reaktif : I. gümüş nitrat, II. pirogallol (9); şahit olarak tartarik, süksinik, oksalik ve sitrik asidler kullanıldı. Haziran ve eylülde toplanan bitkilerden alınan ekstraktlarda tartarik asid ve süksinik asidle, Rf'i 0.54 olan üçüncü bir asid tesbit edildi.

b) Kâğıt kromatografisi. Kâğıt: Schleicher Schüll 2043b, solvent : n-propanol-amonyak %25 (6:4); reaktif : 1. gümüş nitrat - pirogallol (9), 2. bromkrezol yeşili. Tartarik asid, süksinik asid ve üçüncü bir asid (Rf : 0.53) bulundu.

Her iki kromatografik çalışmada da ekstrelerde oksalik ve sitrik asidlere rastlanmamıştır.

Bitkinin köklerinde bulunmayan, buna karşılık diğer aksamında, diğer maddelere nazaran daha çok hakim vaziyette bir madde tesbit edildi.

**Maddenin elde edilişi.** 1000 g Herbanın etanol, kloroform veya diklorometan ile sıcakta veya soğukta hazırlanan ekstraktları :

a) Solvent uçurulduktan sonra artık alüminyum oksid (aktivitesi 1, tip 507) sütunundan eterle elüe edildi, sarı renkli çözeltiden eter uçuruldu, aseton-petrol eteri (1:1) karışımından billurlandırıldı; iğne şeklinde düşen billurlar süzülerek alındı, beyaz bir madde elde edildi : 0.1 g (ham madde üzerinden verim : % 0.01).

b) Etanol, kloroform veya diklorometan ekstreleri aktif kömürle arada sırada çalkalamak suretiyle, klorofil tamamen aktif kömür tarafından adsorbe edilinceye kadar (çözeltinin rengi sarı olana kadar) bekletildi. Çözücü uçuruldu, sarı renkteki artık birkaç defa az asetonla yıkanarak rengi açıldı (ham madde üzerinden verim a'ya nazaran düşük).

Ham madde yeniden aseton-petrol eterinden (1:1), etanolden ve arkasından iki defa kloroformdan billurlandırılarak temizlendi. Beyaz, ince iğnelerden ibaret yumuşak kitleler halinde bir maddedir. e.d. 79-81°C.

Madde, su, etanol, aseton ve petrol eterinde sıcakta kolay çözünür. Optikçe aktif değildir; redüktör tesir göstermez; C-C çifte bağı yoktur.

500 mg madde 30 ml 2.5 N etanollü sodyum hidroksitle su banyosunda 5.5 saat, geri çeviren soğutucu altında ısıtıldıktan sonra kloroformla ekstre edildiğinde reaksiyona girmemiş halde madde bulundu, sulu kısım N HCl ile asitlendirildikten sonra petrol eteri ile ekstre edildiğinde ekstraktta reaksiyona girmemiş madde (Rf 0.85) yanında az miktarda ve Rf 0.36 ile Rf 0.09 olan iki madde tesbit edildi (adsorban, silikajel G; sürükleyici solvent, kloroform; reaktif iodyum veya seleniyum sülfat (10) ).

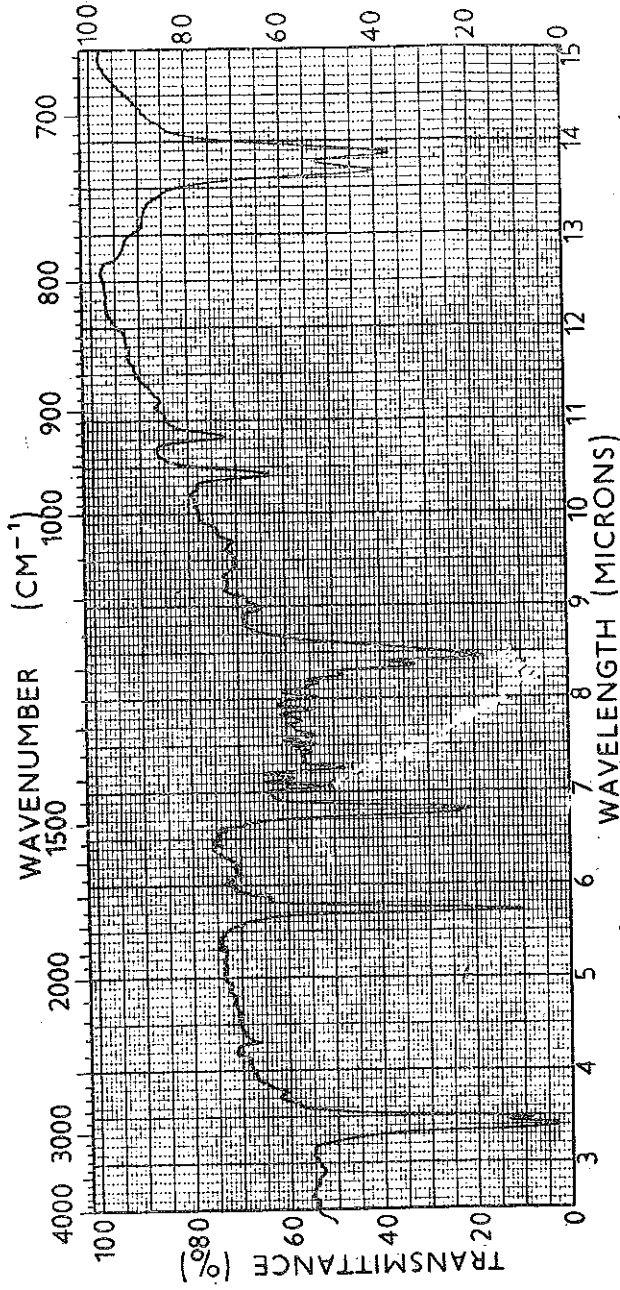
Madde daha kesif bir alkali (KOH/EtOH) ile 10-15 dakika kaynatılıp soğutulduğunda Rf 0.36 olan ve vasattan çöken bir madde ile, HCl ile nötralizasyondan sonra çöken ve Rf 0.09 olan ikinci bir madde tesbit edildi (Adsorban, silikajel HF<sub>254-300</sub>; sürükleyici solvent, kloroform,  $\lambda$  366 da)  $\lambda$  <sup>EtOH</sup><sub>maks</sub> 275 m $\mu$ , ( $\Sigma$  1477) (M.A. 803.5), 228 m $\mu$  ( $\Sigma$  1299) (M.A. 803.5).

IR. (Perkin-Elmer model 137 KBr disk) 3.40  $\mu$  (CH<sub>2</sub> ler), 3.48  $\mu$  (CH<sub>3</sub>—), 5.70  $\mu$  (C=O), 6.76  $\mu$ , 6.83  $\mu$  ve 7.25  $\mu$  CH<sub>2</sub> ve CH<sub>3</sub>, 7.06  $\mu$  CO ya komşu CH<sub>2</sub>, 13.67  $\mu$  ve 13.89  $\mu$  (dublet) (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> (Şekil 1).

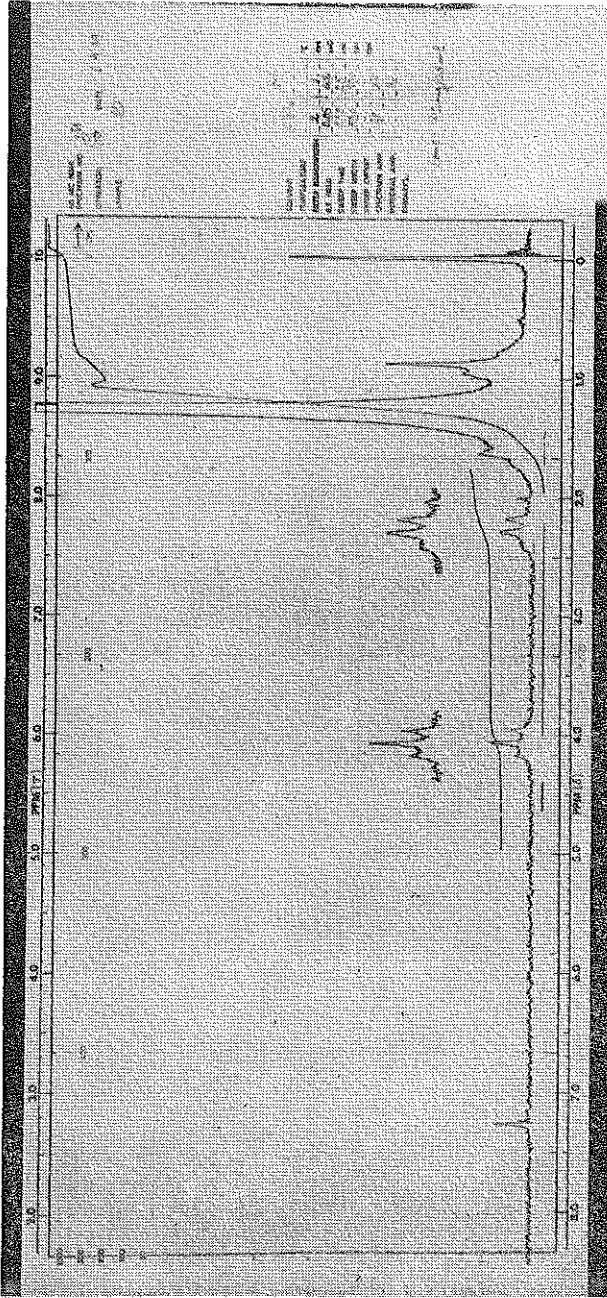
Karbon tetraklorürde alınan IR sinde 13.70  $\mu$  civarındaki pik singlet halindedir.

NMR (\*). (Varian 60 MC/S, TMS'e karşı CDCl<sub>3</sub> de)  $\delta$  0.89 da CH<sub>3</sub> (integral 6hidrojen),  $\delta$  1.23 de CH<sub>2</sub> ler (integral 100 hidrojen singlet),  $\delta$  2.24 de CH ya komşu CH<sub>2</sub> (2hidrojen) ve  $\delta$  4.08 de O-CH<sub>2</sub> (2hidrojen). (Şekil 2).

\* NMR spektrumu Prof. Dr. Ulubelen tarafından Munich Üniversitesinde, alınmıştır; yardımlarına teşekkür ederiz.



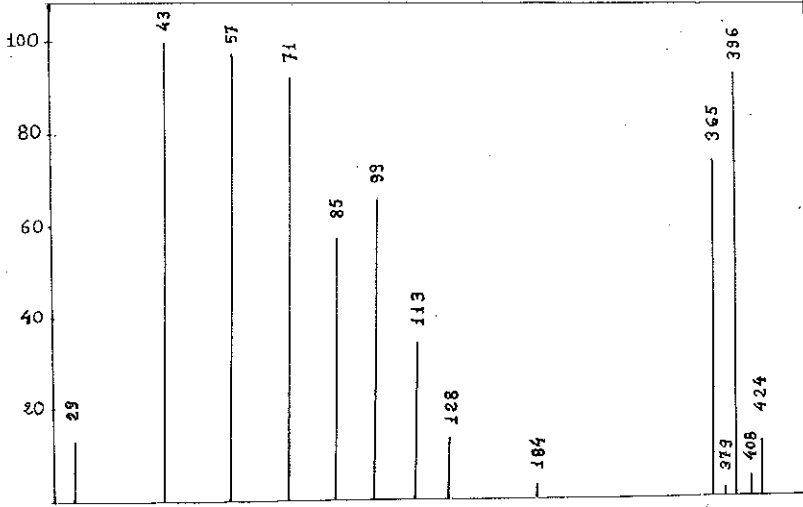
Şek. 1. IR spektrumu.



Şek. 2. NMR spektrumu.

Kütle spektrumu (\*). ( $t=250^{\circ}$ , elektron voltaj 70 eV). Maddenin kütle spektrumunda m/e 424, 408, 396, 379, 365, 184, 128, 113, 99, 85, 71, 57, 43 ve 29 pikleri % 12, 4, 92, 1.2, 73, 3, 13, 34, 65, 57, 92, 97, 100 ve 13 intansite ile tesbit edilmiştir.

**Analiz.**  $C_{65}H_{110}O_2$  için hesaplanan : C, 82.22; H, 13.80; O, 3.98. Bulunan : C, 82, 51; H, 13.64; O, 3.82.



Sek. 3. Kütle spektrumu.

### TARTIŞMA ve SONUÇ

*Echium italicum* var. *biebersteinii* (Engerek otu) içinde, bitkinin bütün kısımlarında etanol, eter, aseton, kloroform ve diklorometan ekstraktlarına geçebilen altı tane alkaloid tesbit edilmiştir. Alkaloidlerin tesbiti kromatografik olarak yapılmış ve bunlardan bir tanesi hariç diğerleri redüktör tesir göstermiştir ki, bu durum *Echium plantagineum*'da mevcut pirolizidin türevi alkaloidlerin karakterine uyar. Bitkide alkaloid miktarı o kadar azdır ki bunların tecridine imkân olmamıştır. Ancak bu alkaloidlerin, *E. plantagineum* ve Boraginaceae bitkilerinde olduğu gibi N-oksit halinde bulunmadığı gerek kromatogramlarda gerekse tüp denemesinde anhidrid asetikle kırmızı veya kahverengimsi-kırmızı renk vermemesi; redüksiyondan önce ve redüksiyondan sonra aynı miktarda alkaloid vermesi, ayrıca kromato-

\* Kütle spektrumu Mr. B. J. Millard tarafından Londra Üniversitesi, Eczacılık Okulunda alınmıştır; yardımlarına teşekkür ederiz.

gramlardaki alkaloid lekesi sayısında bir değişme olmamasile anlaşılmıştır (2). Ayrıca Culvenor (1) ile Chalmers ve arkadaşları (13) tarafından verilen bilgiye dayanarak yapılan kromatografik incelemelerden *E. italicum*'da ekiumin (Rf 0.65, kâğıt kromatografisinde) yanında retronisin diester (Rf 0.42, ince tabakada) ve heliotridin diester (Rf 0.33 ve 0.25, ince tabakada) yapısında üç alkaloid ile bunlardan başka biri redüktör, diğeri non redüktör olan ve yapıları bakımından retronisin veya heliotridin esteri olmayan iki alkaloid daha bulunduğu söylenebilir.

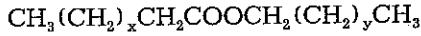
Bitkide uçucu yağ ve allantoin bulunmamış; buna karşılık tanen ve bir boyar madde bulunmuştur ki bu boyar madde *E. humile* ve *E. longifolium*'da bulunan alkanine yakın yapıda olup onun gibi fenol grubu ihtiva eder.

Bitkinin yapraklarında süksinik ve tartarik asitle *Echium* türlerinde şimdiye kadar rastlanmamış üçüncü bir asid bulunmaktadır.

*Echium italicum* var. *biebersteinii*'de diğer aktif maddelerden daha çok olmak üzere bulunan madde de şimdiye kadar *Echium* türlerinde mevcudiyetinden bahsedilmemiş olan beyaz renkte bir maddedir ki bu maddeye bitkinin kök, sap, yaprak ve çiçeklerinde rastlanır, değişik zamanlarda toplanan bitkilerde bu madde oranı bariz bir fark göstermez. Bu madde alkaloidlerin ekstraksiyonu esnasında asidli suya geçmediğinden onlarla beraber bulunmaz; fakat bütün ekstraktlara geçer. Madde üzerinde yapılan ön denemeler bunun büyük moleküllü, karbonca zengin, redüktör grubu bulunmayan, optikçe aktif olmayan, alkali ile çok güç sabunlaşabilen ve serbest alkol veya karboksil OH ı ihtiva etmeyen bir madde olduğunu göstermiştir. Spektral analizler, maddede uzun bir CH<sub>2</sub> zincirinin bulunduğunu ayrıca C=O grubunun mevcudiyetini ortaya koymuştur ki bu durum bilhassa IR spektrumunda 5.74 μ daki C=O bandı, 7.06 μ daki karbonile komşu CH<sub>2</sub> yi karakterize eden band ve 13.67 - 13.89 μ da bir dublet ile tesbit edilmiştir; bilhassa son absorpsiyon bandının (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> n ≥ 26 olduğunda KBr diskte alınan spektrumunda bir dublet halinde görüldüğü, buna karşılık kloroform, karbon tetraklorür gibi solventlerdeki çözeltisinde çalışıldığında aynı yerde singlet verdiği (11) esasına dayanılarak teyid edilmiştir. Ayrıca NMR spektrumunda δ 0.89 daki pik genellikle CH<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> lerde olduğu gibi n sayısı çok olduğundan singlet, δ 1.28 daki pik, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>'e ait olup aynı şekilde düz zincirde bağlı n kadar CH<sub>2</sub> den dolayı bölünme yapmadan singlet halinde görülmüş, karboksile komşu CH<sub>2</sub> lerin karakteristiği olarak δ 2.24 de görülen pik yanındaki CH<sub>2</sub> lerden dolayı triplet vermiştir; δ 4.08 daki pik, CH<sub>2</sub> nin alkoksi



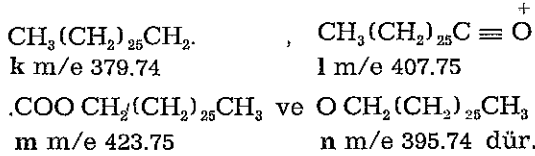
grubuna bağlı olduğunu gösterir ve yanında  $\text{CH}_2$  ler bulunduğundan triplet halindedir (12). Maddenin ikinci bir NMR grafiğinde sweep offset yaptırılmış bu sahada pik vermediği tesbit edilmiştir. Entegral sayısı ve C, H, O analiz sonuçları ile yukardaki kalitatif bulgular maddenin



yapısında ve  $x + y = 50$  olduğunu teyid etmiştir.

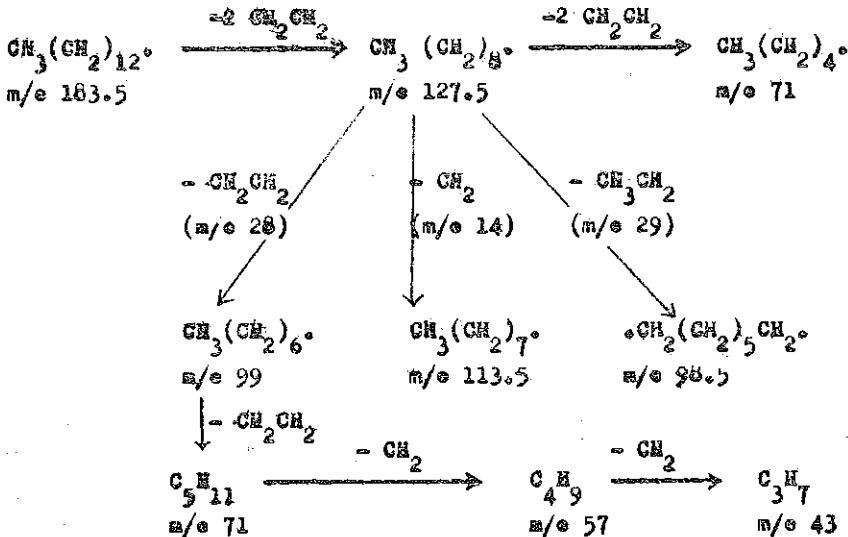
Maddenin düşük e.d. ve yapısı sebebiyle kütle spektrumunda moleküler iyon görülmemiş fakat ester parçalanması sonunda aşağıdaki fragmanlara tekabül eden pikler yardımıyla x ve y sayıları bulunmuştur.

Molekül  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{CH}_2\text{COOCH}_2(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$  olduğuna göre  $\alpha$  yarılması k, l, m ve n iyonlarını verecektir; grafikte bulunan rakamlara uyan iyonlar :



$\beta$  yarılma sonucunda molekülün k iyon parçasından  $\text{CH}_2$  (14),  $\text{CH}_2\text{-CH}_2$  (28) ya da  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$  (29) kaybetmesiyle geri kalan fragmentler tesbit edilmiştir.

Bunlar :



*Echium diffusum* Sibth. et Sm. adlı bir *Echium* türünde de *E. italicum*'daki gibi çalışıldı ve total alkaloid % 0.05 olarak bulundu ve bu bitkideki alkaloidin üç tane olduğu, *E. italicum* türünde 2 No. ile belirtilen ve redüktör olmayan alkaloidin bu bitkide bulunmadığı, buna karşılık 1,3,4 No. lu alkaloidlerin bulunduğu tesbit edildi. Ayrıca *E. italicum*'da bulunan  $C_{55}H_{110}O_2$  kaba formülündeki madde bu türden de elde edildi.

#### Ö Z E T

İstanbulda Tuzla civarından toplanan *E. italicum* bitkisi üzerinde yapılan çalışma bitkide altı tane alkaloid (biri ekiumin), üç tane organik asid, bir boyar madde ile oldukça bol miktarda, alkaloid olmayan ve  $CH_3(CH_2)_xCH_2COOCH_2(CH_2)_yCH_3$  yapısında bir maddenin bulunduğu tesbit edilmiştir. Aynı yerden toplanan *E. diffusum* da üç alkaloid ile  $CH_3(CH_2)_xCH_2COOCH_2(CH_2)_yCH_3$  yapısındaki madde tesbit edilmiştir.

#### S U M M A R Y

Chromatographic investigations on *E. italicum* L. var. *biebersteinii*, collected from Tuzla, Istanbul, showed the existence of alkaloids, one of them correspond to echiumine, the second and the third having the structure of retronecine diester and heliotridine diester respectively, and three more alkaloids of unknown structure, one of which is non-reducing, unlike the other two which are reducing. In addition to the alkaloids and organic acids a substance which does not contain nitrogen and is not of an alkaloid nature is isolated, and its structure is determined by elementary analysis, IR, NMR and Mass spectrography, the result of this investigations showed that the compounds has a structure of  $CH_3(CH_2)_xCH_2COOCH_2(CH_2)_yCH_3$ .

Samples of *E. diffusum* collected from the same area also contained the three alkaloids and the ester mentioned above.

#### L İ T E R A T Ü R

1. Culvenor, C. C. J., *Australian Journal of chemistry*, **9**, 512 (1956).
2. Manske, R. H. F., *The Alkaloids, Chemistry and Physiology*, VI, 46, Academic Press, New York, (1960).
3. Kleiman, R., Earle, F. R., Wolff, I. A., *J. Am. Oil Chemist's Soc.*, **41**, (7), 459 (1964)-Ref., *C. A.*, **61**, 8531h (1964).

4. Constantinescu, E., Istudor, V., Rindaşu, G., Agrigoroaici, M., Forstner, S., *Farmacia*, **16**, 713 (1968).
5. Constantinescu, E., Tumuşdan, L., *Rev. Sci. Med. Acad. Rep. Populaire Roumaine*, **6**, 21 (1961).
6. Kinzel, H., *Ber. Deut. Botan. Ges.*, **77**, 14 (1964).
7. Vileczek, E., *C.*, **1**, 988 (1925).
8. Koval'skii, V. V., Zazorina, E. F., *Agrokhimiya*, **4**, 78 (1965)-Ref., *C. A.* **63**, 15488d (1965).
9. Révélateurs pour la chromatographie en couches minces et sur papier, E. Merck AG. Darmstadt. s. 15 (No. 57).
10. Stahl, E., *Thin-Layer Chromatography*, 487, 493, Academic Press, New York, (1965).
11. Nakanishi, K., *Infrared Absorption Spectroscopy-Practical 1. ed.*, Nankodo Co. Ltd., Tokyo (1962).
12. High Resolution NMR Spectra Catalog, Vol. I. 1962-1963, Varian Analytical Instrument Division.
13. Chalmers, A. H., Culvenor, C. C. J., Smith, L. W., *J. Chromatog.* **20**, 270 (1965).

(Redaksiyona verildiği tarih : 14 Mayıs 1971)