

***ORNITHOGALUM UMBELLATUM* L. SOĞANLARININ FİTOKİMYASAL İNCELENMESİ VE HAM EKSTRENİN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİ**

TEMİNE ŞABUDAK*, MÜŞERREF TATMAN (OTKUN)** , MELTEM YAVUZ***

ÖZET

Bu çalışmada Edirne civarından toplanan *Ornithogalum umbellatum* L. soğanlarındaki kimyasal bileşikler izole edilmiştir. Soğanların kloroform (CHCl₃) ve CHCl₃:C₂H₅OH (2:1) ekstraktlarına, kromatografik yöntemler uygulanarak ayırma ve saflaştırma işlemleri yapılmıştır. Bitkiden izole edilen maddelerin UV, IR, NMR ve FAB- Mass spektrumları alınarak kimyasal yapıları belirlenmiştir. Kimyasal yapısı belirlenen bileşiklerden 1-(2-metil-undekanil)-2-(3-metil-heptil)-benzen dikarboksilli asit diesterinin spektroskopik yapı analizi burada sunulmaktadır.

Ayrıca, soğanların kloroform ve metanol ile ekstraksiyonu sonucu ele geçen ham ekstraktlar birleştirilerek bunun antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Ham ekstraktların denenen konsantrasyonlarda *Bacillus subtilis*'in üremesini inhibe etmediği, *Enterococcus faecalis* ve *Candida albicans* için daha zayıf etkili olduğu saptanmıştır. Gram-negatif basillere karşı etkilerinin ise değişken olduğu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Ornithogalum umbellatum*, Liliaceae, Hyacinthaceae, antimikrobiyal aktivite.

SUMMARY

Phytochemical investigation of the bulbs of *Ornithogalum umbellatum* L. and antimicrobial activity of its raw extract

In this study, *Ornithogalum umbellatum* L. growing around Edirne has been phytochemically investigated. Chloroform (CHCl₃) and CHCl₃:C₂H₅OH (2:1) extracts of the plant bulbs were separated and purified by using chromatographic methods. The chemical structures of the isolated four compounds from plant were elucidated by using UV, IR, NMR and FAB-Mass spectroscopies. One of them, 1-(2-methyl-undecanyl)-2-(3-methyl-heptyl)-benzenedicarboxylic acid diester, was shown below.

*Araş.Gör.Dr. Temine Şabudak, Trakya Ün. Fen-Ed. Fak. Kimya Böl.

**Yrd.Doç.Dr. Müşerref Tatman (Otkun), Trakya Ün. Tıp Fak. Klinik Bak.ve İnfek.Hst.A.D.

***Araş. Gör. Dr. Meltem Yavuz, Trakya Ün. Tıp Fak. Klinik Bak.ve İnfeksiyon Hst. A.D.

In addition , CHCl₃ and CH₃OH raw extract of the bulbs were combined and then was investigated for its antimicrobial activity. The raw extract at test concentrations did not inhibit growth of *Bacillus subtilis*, it was more effective relatively to gram-positive coccus excluding *Enterococcus faecalis*. For *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*, it was determined to be the least effective. For gram-negative bacils, it showed that extract was variable effective.

Keywords: *Ornithogalum umbellatum*, Liliaceae, Hyacinthaceae, antimicrobial activity.

GİRİŞ

Ornithogalum'un Türkiye'de 25 türü bulunmaktadır. Bunlardan üçü endemiktir. Trakya'da ise onbir türü bulunmaktadır. Bizim çalıştığımız tür endemik değildir. *Ornithogalum* türleri, çoğunlukla çıplak, skapuslu ve soğanlı çok yıllık otsu bitkilerdir. Tıbbi ve ekonomik değeri vardır. Yumruları Dioscorides döneminden beri kusturucu ve çıban açıcı olarak kullanılır. Bilhassa soğanlarında, kalbe etkili bazı bileşikler (konvallotoksin ve glikozitler) ve saponinler taşıdığı bilinmektedir¹. Bu nedenle yumrularının fazla yenilmesi tehlikelidir. *O. umbellatum* L. kozmopolit bir türdür ve büyük soğanları vardır. Soğanları, yaprakları ve geniş skapusu sebze olarak kullanılır.

Ornithogalum türleri üzerine yapılan fitokimyasal çalışmalarda, kolestan glikozitleri^{2,3}, kolestan bisdesmosidleri⁴, kardenolid glikozitleri^{5,6} ve flavonoid glikozitleri^{7,8} bulunmuştur. Bu çalışmada ise, *O. umbellatum* soğanlarından üç aromatik, bir steroid karakterli dört bileşik izole edilmiştir. Bu bileşiklerden birisinin kimyasal yapısı burada açıklanacaktır.

Ayrıca bitki soğanlarının kloroform ve metanol ile yapılan ekstraksiyonu sonucu elde edilen, ham ekstreinin değişik gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler ile mantarlar üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi bu çalışmada araştırılmıştır.

Materyal ve metod

Kullanılan Cihazlar:UV:Shimadzu UV-Visible 160A visible spektrofotometresi; IR: Shimadzu IR-470 spektrofotometresi; ¹H NMR: Bruker AC 200 MHz NMR spektrometresi (Referans: CDCl₃); ¹³C NMR: Bruker AC 50.32 MHz NMR spektrometresi (Referans: CDCl₃); FAB-Mass:VG spektrometresi; TLC:Kieselgel 60F 254 (Merck) plakları ve leke tespiti için UV lambası ile serik sülfat belirteci, Kedde reaktifi, vanilin-sülfirik asit belirteci; CC:Kieselgel GF 254(Fluka) kullanıldı.

Bitki Materyali: *O. umbellatum* L. 1995 yılında Edirne çevresinden toplandı. Taksonomik sınıflandırılması Trakya Ün. Fen-Ed. Fakültesi Biyoloji Bölümünden Yrd. Doç. Dr. Güler Dalgıç tarafından yapıldı (EDTU 1923).

Bileşiklerin Ekstraksiyonu ve İzolasyonu

Bitki soğanları (4.5 kg) dilimlenip %70'lik etanol ile Soxhlet cihazında ekstrakte edildi. Toplanan ekstratların çözücüsü 2/3'üne kadar evaporatörde uçuruldu. Kalan fraksiyon kurşun asetatın alkolde doymuş çözeltisi ile çalkalandı. Çözeltiye pH=5'te seyreltik H₂SO₄ ilave edilerek çözelti içindeki kurşun çöktürüldü. Süzme işlemi yapıldıktan sonra elde edilen süzüntü kloroform ve kloroform:etanol (2:1) çözeltisiyle ekstrakte edildi. Çözücüler uçuruldu. Kloroform ekstresine kolon kromatografisi uygulandı. Elüsyon çözeltisi olarak; CHCl₃:MeOH:H₂O (80:10:1), CHCl₃:MeOH:H₂O (75:16:2.2), CHCl₃:MeOH:H₂O (70:22:3.5), EtOAc:MeOH (95:5) ve giderek artan polaritede EtOAc/MeOH karışımları ile %100 MeOH kullanıldı. Buradan elde edilen fraksiyonların ayrılması ve saflaştırılmasında TLC uygulandı. Bu işlemler sonucu izole edilen bileşiklerle ilgili spektral veriler aşağıda verilmiştir.

1-(2-metil-undekanil)-2-(3-metil-heptil)-benzen dikarboksilli asit diesteri (1): (8.5 mg). UV λ_{max} (CHCl₃) nm: 246, 275; IR γ_{max} (nujol) cm⁻¹: 3024, 2960, 2928, 1731, 1596, 1577, 1280-1075, 1040, 960; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.75, 0.78, 0.83, 0.85, 1.2-1.3, 1.35, 1.6, 4.15, 4.2, 7.45, 7.65; ¹³C NMR (CDCl₃): δ 168.1, 168.05, 132.8, 132.7, 129.1, 68.5, 66.5, 66.2, 64.7, 39.1, 30.7, 29, 24.1, 23.1, 14.7, 11.3; Fab Mass *m/z* (rel. int.): 447 (40), 390 (38), 169 (10), 149 (100).

Ham Ekstrenin Antimikrobiyal Aktivitesi

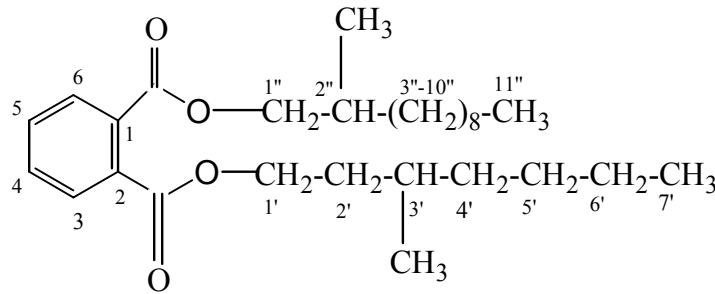
Bitki soğanları dilimlenip iki gece n-heksan içinde bekletildikten sonra süzüldü. Aynı işlem soğanlar iki gece kloroformda bırakılarak ve sonrada iki gece metanolde bırakılarak yapıldı. Elde edilen kloroform ve metanol süzüntüleri birleştirilerek çözücüler uçuruldu ve ekstreye antimikrobiyal aktivite tayini yapıldı. Bu amaçla gram-pozitif basillerden *Bacillus subtilis* (ATCC-6633), gram-pozitif koklardan *Staphylococcus aureus* (ATCC-6538 P), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC-12228), *Enterococcus faecalis* (ATCC-29212) ve B grubu beta-hemolitik streptokok (klinik izolat), gram-negatif basillerden *Proteus mirabilis* (ATCC-14153), *Escherichia coli* (ATCC-8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-9027) ve *Klebsiella pneumoniae* (ATCC-4352) ile bir maya mantarı olan *Candida albicans* (ATCC-10231) kullanıldı.

Ham ekstreye azar azar steril destile su ilave edip arada vorteks cihazı ile çalkalayarak ve 50°C'lik su banyosunda tutarak çözünmesi sağlandı. Sonuçta 184.12 mg/ml'lik konsantrasyonda çözelti elde edildi.

Antimikrobiyal aktivite tayini NCCLS M7-A4'te tarif edilen mikrodilüsyon yöntemi modifiye edilerek çalışıldı⁹. İlk çukur 92.6 mg/ml ham ekstre içermekte olup, ikişer kat dilüsyonlar şeklinde sulandırılan ekstrenin, test edilen mikroorganizmaların üremesini durdurduğu en düşük konsantrasyon minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC) olarak kabul edildi.

Sonuçlar ve Tartışma

Kromatografik ayırma ve saflaştırma işlemlerinden sonra elde edilen maddelerin spektroskopik yöntemlerle kimyasal yapısı belirlenmiştir. Biri steroid, üçü aromatik olan dört bileşik izole edildi ve bu maddeler ilk defa bu çalışmada *O. umbellatum* L. bitkisinden izole edildi. Bunlardan birisi aşağıda sunulmaktadır.



(1)

Bileşik (1)'in UV spektrumu 246 ve 275 nm'deki absorbanslar ile substitüe aromatik halkayı göstermektedir. IR spektrumunda 3024, 1596, 1577 cm⁻¹ aromatik grubun, 1731 ve 1280 cm⁻¹ ester grubunun, 2960 ve 2928 cm⁻¹ alifatik hidrokarbon grubunun varlığını göstermektedir. ¹H NMR spektrumunda δ 7.45 (2H, dd, J=2, 8 Hz, H-4 ve H-5) ve 7.65 (2H, dd, J=3, 8 Hz, H-3 ve H-6)'teki pikler o-disubstitüe aromatik halkaya işaret etmektedir. Spektrumdaki diğer pikler: δ 0.75 (3H, t, J=8 Hz, H-11'), 0.78 (3H, t, J=6 Hz, H-7'), 0.83 (3H, d, J=7 Hz, C-3'-Me), 0.85 (3H, d, J=7 Hz, C-2''-Me), 1.2-1.3 (22H, m, metilen protonları), 1.35 (2H, q, J=7 Hz, H-2'), 1.6 (2H, m, H-2'' ve H-3'), 4.15(2H, t, J=6 Hz, H-1'), 4.2 (2H, dd, J=6, 12 Hz, H-1'') ppm'deki pikler görülmektedir. Bileşik (1)'in ¹³C NMR spektrumunda: δ 168.1 ve 168.05 esterin karbonil karbonunu göstermektedir. δ 132.8, 132.7, 129.1 (C-1=C-2, C-3=C-6, C-4=C-5), 68.5 (C-1' ve C-1''), 39.1(C-2''), 30.7(C-3'), 29.0, 24.1, ve 23.1(üst üste çakışan metilen karbonları), 14.7(C-2''-Me ve C-3'-Me), 11.3(C-11'' ve C-7') sinyalleri görülmektedir. Bileşik (1)'in FAB-Mass spektrumunda ise, moleküler iyon piki m/z 447 [M+1]⁺ 'dir. Moleküldeki diğer kopuşlar ise; m/z 390 [MH-C₄H₉]⁺ ve m/z 169 [M-C₁₆H₂₁O₄]⁺ moleküldeki hidrokarbon kopuşunu göstermektedir. m/z 149 [MH-C₁₉H₃₈O₂]⁺ kopuşu da ftalik asit yapısını desteklemektedir. Bu verilere göre, bileşik (1)'in kimyasal yapısı kapalı formülü C₂₈H₄₆O₄ olan 1-(2-metil-undekanil)-2-(3-metil-heptil)-benzendi karboksilli asit diesteri olarak tayin edilmiştir.

Bitki soğanlarının kloroform/metanol ham ekstresiyle yapılan antimikrobiyal aktivitelerinin saptanmasında değişik mikroorganizmaların üremelerini durduran konsantrasyonları Tablo 1'de gösterilmektedir. Sonuç olarak ham ekstrenin denenilen konsantrasyonlarda *B. subtilis*'in üremesini engelleyici olmadığı, *E. faecalis*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* ve *C. albicans*'in üremesini daha yüksek konsantrasyonlarda engellediği, *S. aureus*, *S. epidermis*, B grubu beta-hemolitik streptokok, *E. coli* ve *P. aeruginosa*'nın üremesini daha düşük konsantrasyonlarda engellediği bulundu.

Ham ekstrenin ağızdan ya da enjeksiyon yoluyla kullanımı hakkında bilgi olmadığından bu yollarla kullanımı önerilemez. Lokal pansuman şeklinde kullanımı ile MIC değerlerine ulaşmak mümkün olabilir. Bu uygulamayı yapabilmek için önce *in vivo* olarak toksisite ve yan etkilerinin araştırılması gerekmektedir.

Antimikrobiyal etkinin ham ekstrenin içindeki hangi bileşen veya bileşenlerden oluştuğunun ortaya konabilmesi için bileşenlerin tek tek yeterli miktarda eldesi, tanımlanması ve antimikrobiyal etki testinin tekrarlanması uygun olacaktır. Bu çalışmada izole edilen bileşiklerin miktarları, ancak bu bileşiklerin UV, IR ve NMR spektrumlarını almaya yeterli olduğu için antimikrobiyal aktivite testi sadece ham ekstre için yapılabilmektedir.

Tablo 1: Ham ekstrenin değişik mikroorganizmalar için bulunan minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) değerleri

Mikroorganizma adı	MIC değeri mg/ml
<i>Bacillus subtilis</i>	92.6 üzeri
<i>Staphylococcus aureus</i>	46.3
<i>Staphylococcus epidermis</i>	46.3
<i>Enterococcus faecalis</i>	92.6
<i>B grubu beta-hemolitik Streptokok</i>	46.3
<i>Proteus mirabilis</i>	92.6
<i>Escherichia coli</i>	46.3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	46.3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	92.6
<i>Candida albicans</i>	92.6

Referanslar

- 1) Baytop T., Türkiye'de Bitkilerle Tedavi 2, II. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri,146, 19996.
- 2) Kubo S., Mimaki Y., Terao M., Sashida Y., Nikaido T., Ohmoto T., Phytochemistry, " Acylated cholestane glycosides from the bulbs of *O. saundersiae* ", 31 (11), 3969-3973, 1992.
- 3) Kubo S., Mimaki Y., Sashida Y., Nikaido T., Ohmoto T., Chem. Pharm. Bull., " New polyhydroxylated cholestane glycosides from the bulbs of *O. saundersiae* ", 40 (9), 2469-2472, 1992.
- 4) Kubo S., Mimaki Y., Sashida Y., Bull.Chem. Soc. Jpn., " New cholestane Bisdesmosides from the bulbs of *Ornithogalum thyrsoides* ", 65, 1120-1124, Vol.5, No.4, 1992.
- 5) Ferth R., Bauman A., Mayer K. K., Robien W., Kopp B., Z. Natur., " Cardenolide aus *Ornithogalum nutans* (2n=30) ", 47b, 1459-1468, 1992.
- 6) Ferth R., Kopp B., Pharmazie, " Cardenolide aus *O. umbellatum L.* ", 47, 627-629, 1992.
- 7) Demirkıran Ö., Oyman Ü., Trakya Ün. Fen Bil. Yay., Yüksek Lis. Tezi, 1998.
- 8) Azzoui O., Braemer R. L., Biochem. Syst. And Ecol., "C-glucosyl flavones in the genus *Ornithogalum* ", 17(6), 449-450, 1989.
- 9) National Committee for Clinical Lab.Standards: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 4 th ed., NCCLS document M7-A4, Villonova, Pennsylvania: NCCLS, 1997.