

Digitalis viridiflora Lindl. Yapraklarında Spektrofotometrik Usulle Total Glikozid ve Primer Glikozidler Miktar Tayini

Spectrophotometric Determination of the Total and Primary Glycosides
Content of the Leaves of *Digitalis viridiflora* Lindl.

Rasım TULUS ve Çiğdem ÇALTI* **

Demirköy (Kırklareli) civarında toplanan ve gölgede kurutulan *Digitalis viridiflora* Lindl. yapraklarından hazırlanan drog ekstresinin Hatcher metoduna göre tetkiki neticesinde droğun kardioaktif olduğu anlaşıldı. Bunu takiben kâğıt kromatografisi ile yapılan incelemeler, yapraklarda primer glikozidler yanında az miktarda sekonder glikozidlerin bulunduğunu gösterdi; ayrıca selüloz sütununda kromatografi ile yapraklardan Lanatosid A tecrid edildi (1).

Digital glikozidlerinin kimyasal olarak miktar tayininde glikozidler önce kâğıt veya sütun kromatografisi (2, 3, 4) veya ince tabaka kromatografisi (5, 6) ile ayrılmakta, sonra kolorimetrik (4, 7, 8), fluorimetrik (9, 10) veya polarografik (11) usuller tatbik edilmektedir. Kolorimetrik usullerde faydalanılan renk reaksiyonları ya molekülün aglikon kısmı ile veya şeker kısmı ile ilgilidir. 3,5-dinitrobenzoik asid (12, 13, 14, 15, 16), Baljet reaksiyonu esas alınarak trinitrofenol (17, 18), Raymond reaksiyonu esas alınarak m-dinitrobenzen (19) ve 1,3,5-trinitrobenzen (20) ile olan reaksiyonlar birincisine, ksanthidrol reaksiyonu (7, 8) ise ikincisine misal olarak gösterilebilir.

Digitalis viridiflora Lindl. yapraklarında total glikozid ve primer glikozidler miktar tayininde 3,5-dinitrobenzoik asid usulü kullanıldı. Total glikozid miktar tayini için, saflaştırılmış ekstre alkollü seyreltik hidroklorik asitle hidroliz edilip genin kısmı tecrid edildikten sonra 3,5-dinitrobenzoik asitle spektrofotometrik tayin yapıldı. Primer glikozidlerin miktar tayini için, saflaştırılmış drog ekstresi, Lemli (3) nin usulü esas alınarak alüminyum oksid sütununda kromatografiye edilerek primer ve

* Analitik Kimya Kürsüsü, Eczacılık Fakültesi, Üniversite, İstanbul.

** C. Çaltı'nın doktora tezinin bir bölümünden.

sekonder glikozidler ayrı ayrı elüe edildi ve sonra primer glikozidlere, total glikozid miktar tayinindeki spektrofotometrik usul tatbik edildi. Total ve primer glikozid miktarları arasındaki fark çok az olduğundan ayrıca sekonder glikozidlerin miktar tayinine lüzum görülmedi. Tafsilâtı denel kısımda bildirilen çalışmalar neticesinde, havada kurutulmuş *Digitalis viridiflora* yapraklarında, digitoksigenin cinsinden, % 0.30 total glikozid ve % 0.27 primer glikozidler bulundu.

D E N E L K I S I M

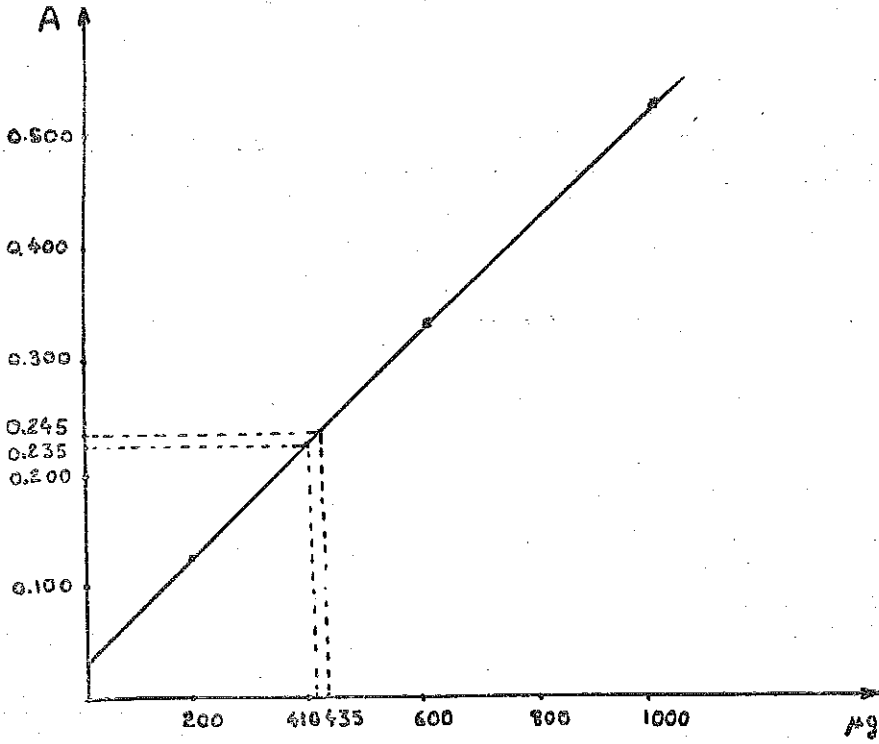
1) Total glikozid miktar tayini

a) *Genine tahvil* : Havada kurutulmuş yapraklardan % 70 lik alkollü ekstre ve bundan, ham glikozid karışımı, daha önce (1) bildirilen tarzda hazırlandı.

1.8 g droğa tekabül eden ham glikozid karışımı, % 35 lik metanolün 100 ml sinde çözüldü ve buna 10 ml 4N hidroklorik asid ilâve edildikten sonra karbon dioksit atmosferinde, kaynar su banyosunda birbuçuk saat hidroliz edildi. Oda temperaturüne kadar soğutulan karışım, bir ayırma hunisinde 25 er ml kloroform ile 3 defa ekstre edildi. Birleştirilen kloroformlu kısımlar, 15 ml % 1 lik sodyum karbonat çözeltisi ile yıkandı. Sodyum karbonatlı sulü kısım 15 ml kloroform ile çalkalandı. Kloroformlu kısımların hepsi birleştirildi ve susuz sodyum sülfat üzerinde kurutulduktan sonra çözelti, alçak basınçta teksif edildi ve sonunda 25 ml ye tamamlandı.

b) *Ölçü eğrisinin hazırlanması* : 5 mg saf digitoksigeninin yeni distile edilmiş kloroform ile 25 ml ye tamamlanmış çözeltisinden alınan 1, 3 ve 5 ml lik nünunelerin çözücüleri buharlaştırıldı. Herbirine 3,5-dinitrobenzoik asidin metanoldeki % 2 lik çözeltisinden 2 ml, 1 ml N sodyum hidroksid çözeltisi ve 7 ml % 50 lik metanol ilâve edilerek çalkalandı ve Beckman B tipi spektrofotometrede 1 cm lik küvetlerde 540 nm de şahide karşı absorbanları ölçüldü. Ölçmelerin beşinci dakikasındaki absorban değerleri alınarak ölçü eğrisi çizildi (Şekil 1).

c) *Spektrofotometrik tayin* : 1.8 g droğa tekabül eden ve kloroformla 25 ml ye tamamlanmış olan çözeltiden 2 ml alındı ve buharlaştırıldıktan sonra yukarıda bildirilen miyarların aynı miktarları ile aynı şartlarda muamele edilerek absorbanı ölçüldü ($A = 0.247$). Ölçü eğrisinde bu absorban kıymetine tekabül eden konsantrasyon 435 μg dır.



Şekil 1

O halde 1.8 g drogta

$$\frac{25}{2} \times 435 = 5437 \mu\text{g} = 5.4 \times 10^{-3} \text{ g}$$

total glikozid vardır. Buna göre yüzde miktarı

$$\frac{5.4 \times 10^{-3} \times 10^2}{1.8} = 3.0 \times 10^{-1} = \% 0.30 \text{ dür.}$$

II) Primer glikozidlerin miktar tayini:

a — *Sütunun hazırlanması* : Bir nuçe erlenine yerleştirilmiş ve dibine cam pamuğu konmuş olan 1×30 cm eb'adındaki cam boruya birinci çözücü karışımı olan kloroform : metanol (9 : 1) den bir miktar kondu ve hafifçe emilirken, aktivasyon derecesi 3 olan alüminyum oksidin (nötr, Merck) 5 g ı ilâve edilerek sütun dolduruldu. Diğer taraftan 0.3 g droğa tekabül eden ham glikozid karışımı 5 ml kloroform : metanol (1 : 1) de çözüldükten sonra 80°C lik su banyosunda aynı alüminyum oksidin 3 g ı üzerinde buharlaştırıldı. Kuru toz, bir elışı kâğıdına döküldü, kaba sıvışan kısımlar 1 g alüminyum oksid ve 2 ml çözücü karışımı ile temizlendi, buharlaştırıldı ve evvelki kısımla birleştirildi. Maddeyi ihtiva eden alüminyum oksid, sütundakinin üzerine ilâve edildi ve bunun üzerine de aktivasyon derecesi 3 olan alüminyum oksidten 1 g daha ilâve edildi.

b — *Elüsyon* : 100 ml kloroform : metanol (9 : 1) karışımı ile sekonder glikozidler elüe edildi. Akış hızı dakikada 40-50 damla. Bunu takiben 20 ml eter geçirildi. Sonra sütunda kalmış olan eter, az bir vakuum tatbiki ile uzaklaştırıldı. Bunu takiben primer glikozidler % 35 lik metanol ile elüe edildi, en sonunda az bir vakuum tatbik edilerek sütunda kalmış olan metanollü çözeltilerin akması temin edildi.

c — *Genine tahvil* : Primer glikozidleri ihtiva eden elüat, total, glikozidlerin hidrolizinde belirtildiği tarzda hidroliz edildi.

d — *Spektrofotometrik tayin* : Hidroliz ürünü kloroformda çözümlenip 50 ml ye tamamlandı. Bu çözeltilerin 25 ml si, çözücü buharlaştırıldıktan sonra, total glikozidlerin miktar tayininde bildirilen miyarların aynı miktarları ile aynı şartlar altında muamle edilerek absorbanı ölçüldü ($A = 0.235$). Ölçü eğrisinde bu absorban kıymetine tekabül eden konsantrasyon $410 \mu\text{g}$ dir. O halde 0.3 g droğa

$$410 \times \frac{50}{25} = 820 \mu\text{g} = 8.2 \times 10^{-4} \text{ g}$$

primer glikozid vardır. Buna göre drogtaki primer glikozidlerin yüzde miktarı

$$\frac{8.2 \times 10^{-4} \times 10^2}{3 \times 10^{-1}} = 2.7 \times 10^{-1} = \% 0.27 \text{ dir.}$$

Ö Z E T

Digitalis viridiflora Lindl. yapraklarındaki total glikozid ve primer glikozidler miktarı 3,5-dinitrobenzoik asitle spektrofotometrik olarak tayin edildi. Primer glikozidler, drog ekstresinden hazırlanan glikozidler karışımını aluminium oksid (Merck, nötr) sütunundan kromatografiye etmek suretiyle sekonderlerden ayrıldıktan sonra tayine tâbi tutuldu. Havada kurutulmuş yapraklarda bu usullerle (digitoksigenin cinsinden) % 0.30 total glikozid ve % 0.27 primer glikozidler bulundu.

S U M M A R Y

Total and primary glycosides of the leaves of *Digitalis viridiflora* Lindl. have been estimated by the spectrophotometric method, using 3,5-dinitrobenzoic acid as reagent. Primary glycosides were separated from the secondaries on a neutral aluminium oxide column. Air dried leaves yield 0.30 % total and 0.27 % primary glycosides, which was calculated as digitoxigenin.

L İ T E R A T Ü R

1. Tulus, R., Çaltı, C., *Arch. Pharmaz.*, (basılmak üzere).
2. Fuchs, L., Wichtl, M. ve Jachs, H., *Arch. Pharmaz.*, 291, 193 (1958).
3. Lemli, J., *Pharm. Acta Helv.*, 34, 19 (1959).
4. Ulubelen, A., *J. Pharm. Sci.*, 51, 62 (1962).
5. Zurkowska, J., Lukaszewski, M. ve Ozarowski, A., *Acta. Polon. Pharm.*, 20, 115 (1963) - Ref. *Anal. Abstr.*, 11, 744 (1964).
6. Fauconnet, L., Waldesbühl, M., *Pharm. Acta Helv.*, 38, 423 (1963).
7. Tschesche, R., Grimmer, G. ve Seehofer, F., *Ber.*, 86, 1235 (1953).
8. Pesez, M., *Ann. Pharm. Franc.*, 10, 104 (1952).
9. Jensen, K.B., *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 12, 27 (1956).
10. Silberman, H., Thorp, R.H., *J. Pharm. Pharmacol.*, 5, 438 (1953).
11. Deys, H.P., Application of Electrophoretic and Polarographic Methodes in Digitalis-Analysis, 58, Utteversmaatschappij, Neerlandia, Utrecht (1961).
12. Hauser, W., Berger, N., *Sci. Pharm.*, 28, 161 (1960) - Ref. *Anal. Abstr.*, 8, 776 (1961).
13. Hauser, W., Berger, N., *ibid.*, 29, 39 (1961) - Ref. *ibid.*, 8, 3451 (1961).
14. Hauser, W., Berger, N., *ibid.*, 29, 154 (1961) - Ref. *ibid.*, 9, 1646 (1962).
15. Rowson, J.M., *J. Pharm. Pharmacol.*, 4, 814 (1952).
16. Bhatt, I., Brindle, H. ve MacDonald, A.D., *ibid.*, 13, 283 (1961).
17. Bell, F.K., Krantz, J.C., *J. Pharmacol.*, 83, 213 (1948) - Ref. *J. Pharm. Pharmacol.*, 4, 818 (1952).

18. Eastland, C. A., Lawday, D. P. ve Sellwood, E. H. B., *J. Pharm. Pharmacol.*, 4, 811 (1952).
19. Anderson, R. C., Chen, K. K., *J. Am. Pharm. Ass. Sci. Ed.*, 35, 353 (1946) - Ref. *Chem. Abstr.*, 41, 7052c (1947).
20. Momose, T., Matsukuna, T. ve Ohkura, V., *J. Pharm. Soc. Japan*, 83, 143 (1963) - Ref. *Anal. Abstr.*, 11, 1457 (1964).

(Redaksiyona verildiği tarih : 30 Kasım 1966)