

PAPER DETAILS

TITLE: STUDIES ON SEXUAL AND SEASONAL CHANGES IN ALKALOID CONTENT OF EPHE

AUTHORS: Nevin TANKER,Maksut COSKUN,MLevent ALTUN

PAGES: 0-0

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/424993>

**TÜRKİYE'DE YETİŞEN EPHEDRA TÜRLERİNDEKİ ALKALOİTLERİN
MEVSİME VE CİNSİYETE GÖRE GÖSTERDİĞİ DEĞİŞİMLERİN YBSK METODU
İLE İNCELENMESİ***

STUDIES ON SEXUAL AND SEASONAL CHANGES IN ALKALOID CONTENT OF
EPHEDRA SPECIES GROWING IN TÜRKİYE BY RP- HPLC

Nevin TANKER Maksut COŞKUN** M.Levent ALTUN*****

** Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, 06100 Tandoğan/Ankara

*** Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı, 06100 Tandoğan/Ankara

ÖZET

Türkiye 'de yetişen Ephedra türlerinin (E.major Host, E. campylopoda C.A.Mey. ve E. distachya L.) literatür ve herbaryum kayıtlı lokasyonlardan, mart-eylül ayları arasında toplanan hem erkek hem de dişi bireyleri incelenmiştir. Farklı bireylerden hazırlanan toplam 42 ekstredeki alkaloidlerin (efedrin.HCl, psödoefedrin.HCl , N-metilefedrin ve norefedrin) cinsi ve miktarı, aylara ve cinsiyete göre gösterdikleri değişimler ters faz YBSK yöntemiyle araştırılmıştır.

Deney sonuçlarına göre her üç türde de, hem erkek hem de dişi bireylerde, alkaloidlerin aylara göre miktar ve yapı bakımından farklılık gösterdiği tesbit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ephedra, Ters faz -YBSK, Ephedra alkaloidleri

SUMMARY

In this research, both male and female individuals of the Ephedra species(E.major Host, E. campylopoda C. A. Mey.and E. distachya L.) were collected from given localities between march-september. The changes in amount and in content of alkaloids according to the months and the sex of the individuals were determined by RP-HPLC of 42 extract

Key Words: Ephedra, RP- HPLC, Ephedra Alkaloids

*Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenen 93-03-00-02 nolu araştırma projesinin bir bölümünü kapsamaktadır.

GİRİŞ

Ephedra (Ephedraceae) çok eskiden beri Çin, Hindistan ve İspanya'da bilinen ve tedavide kullanılan bir bitkidir. *Ephedra* cinsinin çeşitli türleri ,içerdiği efedrin ve psödoefedrin gibi alkaloitler nedeniyle özellikle Uzakdoğu'da 5000 yıldan beri Ma-huang yöresel adıyla tanınmaktadır(1).

1956 tarihli " Chinese Dispensatory" de bitkiden sirküler stimülan,diaforetik,antipiretik ve öksürük sedatifi olarak yararlanıldığı belirtilmiştir(2,3,4).

Uzakdoğu'da yapılan bir araştırmaya göre, doğu tıbbında "mao-kon" adı verilen *Ephedra'nın* toprak altı kısımları, "mao" adı verilen toprak üstü kısımlarından farklı bir terapötik etki göstermektedir.Bitkinin toprak altı (mao-kon) kısımlarından alkaloit karakterli ve özellikleri sentetik bir bileşik olan, L-tirosin betaine benzeyen bir bileşik izole edilmiş ve buna "maokonin" adı verilmiştir. Bu bileşik , *Herba Ephedra'nın*. başlıca etken maddesi efedrin gibi hipertansif etki göstermektedir; oysa ki toprak altı kısımlarından hazırlanan ekstre , "feruloilhistamin" adı verilen maddelerden dolayı ratlar üzerinde hipotansif etki göstermiştir(3,5).

Efedrin , uzun yıllardan beri soğuk algınlığında, saman nezlesinde ve astım tedavisinde de verilmiştir.Efedrin ve psödoefedrin akut iltihaplarda antienflamatuvar olarak kullanılmıştır.

Efedrin ve norefedrin doping maddesi olarak ta kullanılmaktadır(1,6,7).

Ephedra genusu bugün için Türkiye'de 3 tür ile temsil edilmektedir: *E. major* Host, *E.campylopoda* C.A.Mey. ve *E.distachya* L.(8).

Bu çalışmada önce bitkilerin teşhisi yapılmış; taşıdığı alkaloit miktarlarının türlere, cinsiyete, lokaliteye ve mevsime bağlı olarak gösterdiği değişiklik tesbit edilmiştir.

MATERYAL -YÖNTEM

Materyal:Bu araştırmada 3 *Ephedra* türü (*E.major* Host, *E. campylopoda* C.A.Mey., *E. distachya* L) aşağıda belirtilen lokalitelerden,hem erkek hem de dişi birey olarak toplanmıştır.

Tablo 1. Araştırma Materyali Olarak Kullandığımız Ephedra Türlerinin Toplandığı Yerler

Ephedra Türleri	Toplandığı Yerler	Toplama Zamanları
E. major	Ankara- Kırıkkale arası 60. km'den	30.3.1994,9.4.1993,13.5.1993,20.6.1993 28.7.1993,13.8.1993,23.9.1993
E. campylopoda	Antalya-Side harabe duvarlarından	20.3.1994,23.4.1994,23.5.1994,8.6.1994,1.7.1994, 25.8.1993,24.9.1993
E. distachya	Kayseri- Yılanlıdağ	16.3.1994,23.4.1993,30.5.1993, 23.6.1993,24.7.1993,5.8.1993,26.9.1993

Toplanan örnekler tayin edilip Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumuna - 'AEF' kondu.

Yöntem: Erkek ve dişi bireylerin içerdiği alkaloidlerin saptanması için ayrı ayrı, toplam 42 ekstre hazırlanmış, miktarları YBSK ile tayin edilmiştir.

Bu çalışmalarda Merck veya Merck kalitesinde saf organik solvan ve maddeler kullanılmıştır.

a) Aparent: Yüksek Basınç Kromatografisi ; Waters'in model 440 kromatograf ve buna bağlı model 6000 A pompa ve M-440 dedektör, Waters model U 6K Universal enjektör , Waters 750 B integratör (fakültemiz Farmakognozi Anabilim Dalında mevcuttur).

b) Standartlar: Literatüre göre(7) bulunması olası bileşikler (efedrin.HCl,psödoefedrin.HCl,N-metilefedrin,norefedrin) Refik Saydam Merkez Hıfzısıhha Enstitüsü ve Aldrich firmasından temin edilmiştir.

c) Kromatografi Şartları:

Solvan : YBSK saflığında solvanlar kullanılmıştır. Solvanlar 0.45 µm filtreden (Milipore, Milford, USA) geçirilmiş ve ultasonik su banyosunda degaze edilerek kullanılmıştır.

Mobil Faz: 0.0009 M Dibutilaminfosfat (pH= 2.2)

Akış Hızı: 1.5 ml/dak.

Kağıt Hızı: 0.5 cm/dak.

Att.:4

Dedektör: 254 nm (UV)

Basınç: 2000 psi

Hassasiyet: 0.05 AUFS

Kolon : Nucleosil - Fenil (5m ,4.6-250 mm, Waters)

d) Ekstrenin Hazırlanışı:

1g civarında tam tartılmış toz numune 100 ml'lik bir balona alındı, üzerine 35 ml 0.5 M H₂SO₄ ilave edildi ve çalkalandı;oda sıcaklığında 12 saat maserasyona bırakıldı. Süzüldü,süzüntünün ilk 10 ml'si atıldı. 25 ml'lik süzüntüye 5 ml 6 M NaOH ilave edilip ve pH 11-13 arasına ayarlandıktan sonra 8 g NaCl ilave edilerek alkaloidlerin doymuş tuzları hazırlandı. Karışım 50 ml (20,10,10,10 ml)diyetilerle ekstre edildi; eterli fazlar birleştirildi ve solvan uzaklaştırıldı. Artığa 3-4 damla 4 M HCl ilave edilerek balonjojeye alındı, metanolle total hacim 10 ml'ye tamamlandı ve iyice çalkalandı. Ekstreler filtreden (fluoropore 0.45 µm, Waters) geçirildikten sonra 5 ml miktarda hassas olarak enjekte edildi(9).

e)Miktar Tayini:

Ephedra türlerinde sıklıkla rastlanan efedrin. HCl , psödoefedrin. HCl , norefedrin ve N-metilefedrin için kalibrasyon eğrileri çizildi. Herbir standarttan 10'ar mg metanolde çözüldükten sonra alınıp balonjojede 10 ml'ye tamamlandı.Daha sonra 1 ml alınıp 10 ml'ye, 2 ml alınıp 10 ml'ye, 3 ml alınıp 10 ml'ye ve 4 ml alınıp 10 ml'ye tamamlanarak herbirinden farklı 4 dilusyon hazırlandı. Dilüsyonlardan peşpeşe 3 kez, 5'er μ l alınıp enjekte edildi, kromatogramda alman piklerin integratör yardımıyla alanları hesaplandı ve ortalaması alındı.

Bütün maddelerin dedektöre cevabının linear olduğu görüldü ve enjekte edilen standart alkaloit miktarına karşı kalibrasyon eğrileri çizildi.

SONUÇ - TARTIŞMA

Ters faz YBSK ile Türkiye'de yetişen 3 *Ephedra* türünden hazırlanan 42 ekstre incelenmiştir. Efedra alkaloit miktarları ayrı ayrı aylara ve cinsiyete göre; erkek birey ve aylara göre; dişi birey ve aylara göre olmak üzere tablolar halinde verilmiştir (Tablo 2,2a,2b).

Mobil faz olarak dibutilaminfosfat tampon çözeltisi ilavesiyle değişik pH'larda görülen ayrımlar denenmiş ve en iyi ay r ı m pH 2.2 'de saptanmıştır. Böylece bu dört standart madde, kimyasal yapıları birbirine çok yakın olmasına rağmen, birbirlerinden kolaylıkla ayrılmıştır (Krom. 1). Bu solvan sisteminde elusyon, ekstrelerin verilmesinden sonra 6-7 dakika gibi kısa bir sürede tamamlanmış ve iyi bir ayırım sağlanmıştır (Krom. 2-4). Burada,önce,standart maddelerle (efedrin. HCl , psödoefedrin. HCl , norefedrin, N-metilefedrin) karşılaştırarak türlerin içerdiği alkaloitler saptanmıştır. Ekstrede bulunan piklerin retansiyon zamanı, standart madde de ilave edilerek doğrulanmıştır. Eksternal standart metoduyla maddelerin pik alanları integratör yardımıyla hesaplanmış ve buradan ekstredeki miktarına geçilmiştir.

E. major 'da psödoefedrin .HCl miktarı, erkek bireyde mart ve nisan aylarında aynı seviyede iken mayıs ve haziran aylarında artmış, temmuzda da en yüksek düzeye ulaşmıştır. Ağustos ve eylül aylarında ise miktarda tekrar azalma meydana gelmiştir. Dişi bireyde martta miktar fazla, nisan ve mayısta azalmakta, haziranda tekrar artarak eylülde en yüksek düzeye çıkmıştı

E. major 'da N-metilefedrin miktarlarına bakıldığında erkek bireyde mart ayında hiç bulunamazken; nisan,mayıs ve haziran aylarında giderek artış görülmüş, temmuzda ise en yüksek orana ulaşmıştır, ağustos ve eylülde ise tekrar azalma görülmüştür. Dişi bireylerde mart ve nisan aylarında hiç alkaloite rastlanmamış , mayısta miktarı artmış, haziran ve temmuzda tekrar azalıp, ağustosta artmış, eylülde en yüksek miktara çıkmıştır.

Tablo 2. Türkiye Ephedra Türlerindeki Alkaloit Miktarının Aylara ve Cinsiyete Göre Değişimi(mg/100g)

AYLAR	E.major E PE NE NME	E.distachya E PE NE NME	E.campylopoda E PE NE NME
Mart Erkek	- 30	e 30 e	e - -
Mart Dişi	- 75.2 -	- 65.2 -	e - -
Nisan Erkek	- 30 1.2	- 23	- - - 2
Nisan Dişi	- 27.2 -	e 30.4 -	- 3.9
Mayıs Erkek	- 59.2 - 4	e 18.4 e e	10 1.8
Mayıs Dişi	- 27.2 -	e 24.8 e	- - e
Haziran Erkek	2.8 74.8 - 4.8	- 2	3 7.8
Haziran Dişi	- 45.2 - 1	- 8 -	- - 11
Temmuz Erkek	2.8 103.8 e 8.8	- 4.4 - e	e 9.2
Temmuz Dişi	- 47.2 - 0.8	- 1.2 -	. .
Ağustos Erkek	4 86 3.2 6.6	- 15.6 - e	- 3.8
Ağustos Dişi	- 55.6 e 2	- 10.4 -	. .
Eylül Erkek	3.6 65.2 e 4.8	- 21.6 -	. -
Eylül Dişi	- 99.6 4 9.6	- 14.4 -	- 3.9 -

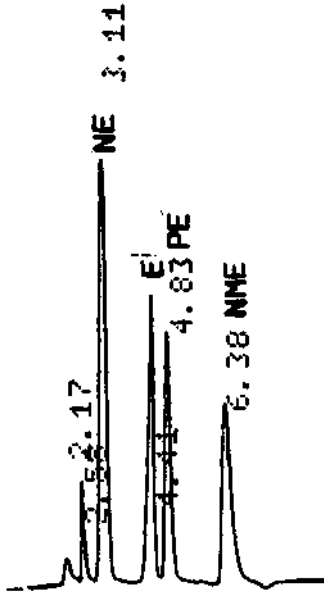
Tablo 2a. Erkek Bireylerde Aylara Göre Değişimi(mg/100g)

AYLAR	E.major E PE NE NME	E.distachya E PE NE NME	E.campylopoda E PE NE NME
Mart	- 30	e 30 e	e - -
Nisan	- 30 - 1.2	- 23 -	e
Mayıs	- 59.2 - 4	e 18.4 e e	- 10 e
Haziran	2.8 74.8 - 4.8	- 2	- 3 7.8
Temmuz	2.8 103.8 e 8.8	- 4.4 e	- e 9.2
Ağustos	4 86 3.2 6.6	- 15.6 - e	- - 3.8
Eylül	3.6 65.2 e 4.8	- 21.6 -	-

Tablo 2b. Dişi Bireylerde Aylara Göre Değişimi(mg/100g)

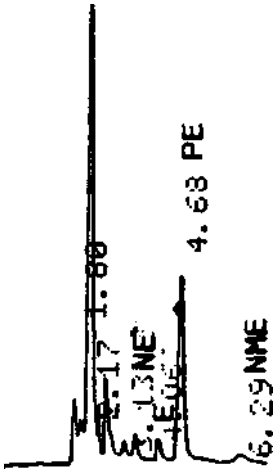
AYLAR	E.major E PE NE NME	E.distachya E PE NE NME	E.campylopoda E PE NE NME
Mart	- 75.2 -	- 65.2 -	e - -
Nisan	- 27.2 -	e 30.4 -	- 3.9
Mayıs	- 27.2 - 2.2	e 24.8 e	e
Haziran	- 45.2 - 1	- 8	11
Temmuz	- 47.2 - 0.8	- 1.2	-
Ağustos	- 55.6 e 2	- 10.4 -	-
Eylül	- 99.6 4 9.6	- 14.4 -	- 3.9

Kısaltmalar: E: Efedrin.HCl; PE: Psödoefedrin.HCl; NE: Norefedrin;
NME:N-metilefedrin; -:Bulunmadı; e:Eser



Krom.1. *Ephedra* Alkaloidlerinin YBS Kromatogramı:

Efedrin.HCl(E), Psödoefedrin.HCl(PE),
Norefedrin(NE), N-metilefedrin(NME).



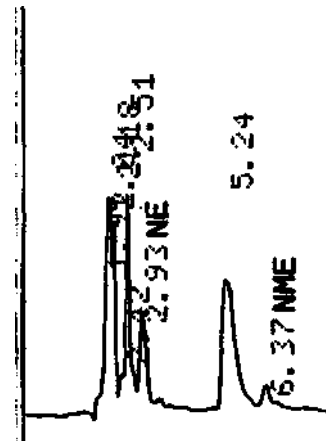
Krom.2. *Ephedra major*'da Bulunan Alkaloidlerin YBS Kromatogramı:

Efedrin.HCl(E), Psödoefedrin.HCl(PE),
Norefedrin(NE), N-metilefedrin(NME).



Krom.3. *Ephedra distachya*'da Bulunan Alkaloidlerin YBS Kromatogramı:

Efedrin.HCl(E), Psödoefedrin.HCl(PE),
Norefedrin(NE), N-metilefedrin(NME).



Krom.4. *Ephedra campylopoda*'da Bulunan Alkaloidlerin YBS Kromatogramı:

Efedrin.HCl(E), Psödoefedrin.HCl(PE),
Norefedrin(NE), N-metilefedrin(NME).

E.distachya 'da psödoefedrin. HCl miktarları erkek bireyde martta yüksek iken nisan,mayıs,haziran aylarında azalmış, temmuzda tekrar bir miktar artmış, ağustos ve eylülde bu artışa devam etmiştir. Dişi bireyde mart en yüksek miktarı gösteren ay olmuştur. Nisan,mayıs,haziran ve temmuz aylarında yine azalma görülmüş, ağustos ve eylülde ise bir miktar artış görülmüştür.

E.camplopoda 'da N-metilefedrin miktarlarına bakıldığında; erkek bireyde martta bulunamamış, nisan ve mayısta aynı miktarlarda bulunmuş, haziranda miktar artmış, temmuzda en yüksek miktara ulaşmış, ağustosta tekrar düşmüş, eylülde ise hiç rastlanmamıştır

Ephedra türlerinin taşıdığı alkaloitlerin mevsime ve cinsiyete göre değişmesi bitkinin vegetatif gelişmesine paralel olarak oluşan biyosentez mekanizması ile açıklanabilir.Yani bitkide çiçeklenme ve meyva olgunlaşma döneminde taşıdığı maddelerin miktarı biyosentez yolağına bağlı olarak değişmektedir.

Her üç tür de erkek ve dişi bireylerinde yukarıda verilen 4 alkaloit bakımından incelendiğinde şu sonuçlar elde edilmiştir:

E. major ve *E.distachya*'da erkek ve dişi bireylerde psödoefedrin . HCl miktarları diğer alkaloitlere göre daha yüksektir .

E. campylopoda'da ise diğer türlere göre sonuçlar daha farklı olmuştur; norefedrin miktarı erkek bireyde en yüksektir. N-metilefedrinin hemen hemen norefedrin kadar olduğu saptanmıştır. Dişi bireyde psödoefedrin .HCl 'e ve norefedrine rastlanmıştır .

Tüm bu sonuçlara göre; *E. major* ve *E.distachya*'nın hem erkek hem de dişi bireylerinin psödoefedrin HCl bakımından zengin olduğu görülmüştür, yani kaynak olabilir; bunun yanısıra *E. major* erkek ve dişi bireylerinin N-metilefedrin kaynağı olarak ta kullanılabileceği görülmektedir. *E.major*'un erkek ve dişi bireylerinde diğer türlerden farklı olarak az da olsa efedrin HCl de bulunduğu görülmüştür.

Bu türlerden psödoefedrin.HCl elde etmek isteniyorsa erkek bireyden *E.major* için temmuz ayında, dişi bireyden ise eylül ayında materyal toplanması uygun görülmüştür. *E.distachya* için ise hem erkek hem de dişi bireylerde mart ayının daha elverişli ay olduğu anlaşılmaktadır.*E. campylopoda* psödoefedrin. HCl kaynağı olarak uygun bir tür değildir.

Aynı şekilde N-metilefedrin elde etmek isteniyorsa *E.major* ve *E.campylopoda* türlerinde erkek bireylerden temmuz ayında materyal toplanmasının daha uygun olacağı görülmüştür. Ayrıca *E.major*'un dişi bireylerinden de, ancak eylül ayında materyal toplanması uygun olacaktır. Yine *E.distachya* türü ise N-metilefedrin için kaynak olarak düşünülemez.

Efedrin.HCl ve norfedrin alkaloitleri elde etmek için ise Türkiye'deki bu üç türün de uygun olmadığı görülmüştür.

KAYNAKLAR

1. **Saygı,Ş.** Organik Baz Yapısındaki Stimülan İlaçların (Doping Maddeleri) İdrardan İzolasyonları, Nitel ve Nicel Analizlerinin Kromatografik Yöntemlerle Araştırılması, A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Ankara (1982).
2. **Henry,T.A.**, Chemotaxonomie Der Pflanzen,l, Birknauser Verlag Basel Und Stuttgart,pp. 447-464 (1962).
3. **Hikino,H., Ogato,M., Konno,C."** Structure of Feruloylhistamin A Hypotensive Principle of Ephedra Roots" *Planta Med.*, 48, 108-110(1983).
4. **Nawwar,M.A.M., Barakat,H.H., Buddru,J., Linscheidi,M."** Alkaloidal, Lignan and Phenolic Constituents of Ephedra alata" *Phytochemistry*, **24(4)**, 878-879 (1985).
5. **Tamada,M., Endo,K. and Hikino,H."** Maokonine, Hypertensive Principle and Ephedra Roots" *Planta Med*, 34, 291-293 (1978).
6. **Hill, F.A.**, Economic Botany, 2nd ed., Mc. Graw Hill Book Company Inc., New York,p. 251 (1951).
- 7.**Kasahara,Y., Hikino,H., Tsurufuji,S., Watanabe,M. and Okuchi,K."** Antienflammatory Actions of Ephedrines in Acute *Infamations"* *Planta Med.*, 4, 325-331 (1985).
8. **Altun,M.L., Tanker,N.**, Türkiye'de Yetişen Ephedra Türleri Üzerinde Bir Araştırma, A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Ankara (1992).
- 9.**Zhang,J., Tian,Z. and Lou Zhi-Cen"** Smiltaneous Determanition of Six Alkaloids in Ephedra Herba by High- Performance Liquid Chromatography" *Planta Med.*, **54(1)**, 69-71 (1988).