

A. Ü. Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Kürsüsü
Prof. Dr. M. Şahin Akman

ANKARA YÖRESİNDE YETİŞEN MELİLOTUS (KOKULU YONCA) TÜRLERİNDEKİ KUMARİNİK VE FLAVONİK GLİKOZİDLERİN ÇIKAN METOD KÂĞIT KROMATOĞRAFI İLE İNCELENMESİ

M. Şahin Akman* Kemal Ozan**

Etude des Glucosides Cumarinique et Flavonique de Mélilot par la Chromatographie Ascendante sur Papier

Résumé: Dans ce travail, on a fait des essais chromatographiques sur les préparations galéniques de feuilles et de fleurs de mélilot (*Melilotus officinalis*) que l'on rencontre dans la région d'Ankara. On a surtout insisté sur la séparation des glucosides cumarinique et flavonique de cette plante par la chromatographie ascendante sur papier. Comme solvant on a utilisé une solution d'acide acétique à % 15. On a révélé les taches pulvérisant d'une solution de KOH. Puis chromatogramme a été examiné en lumière ultraviolette. Les substances cumariniques ont donné des taches bleues. Tandis que les substances flavoniques ont montré des taches jaune, jaune rosé et verte. De ce fait nous avons tiré la conclusion que ces trois taches flavoniques étaient le quercétol, le kaempférol et le robinoside déjà signalés dans certaines publications⁹.

Özet: Bu çalışmada Ankara yöresinde yetişen kokulu yonca (*Melilotus officinalis*) bitkisinin çiçek ve yaprak karışımlarından hazırlanan maserasyon, infuzyon ve ekstratler üzerinde kromatografik çalışmalar yapıldı. Özellikle kumarinik ve flavonik glikozitlerin çıkan metod kâğıt kromatografisi ile ayrılması üzerinde duruldu. Çözücü olarak % 15 lik asetik asit kullanıldı ve lekeler önce KOH'in alkoldeki % 5 lik çözeltisi püskürtülerek gün ışığında ve sonra da UV altında incelenerek kumarin tipi maddeler mavi ve flavon tipi maddeler ise sarı, turuncu sarı, yeşil lekeler halinde belirdi. Böylece tesbit edilen üç flavon lekesini literatürlerde bildirilen kersetol, kemferol ve robinozid olduğu sonucuna varıldı.⁹

Giriş

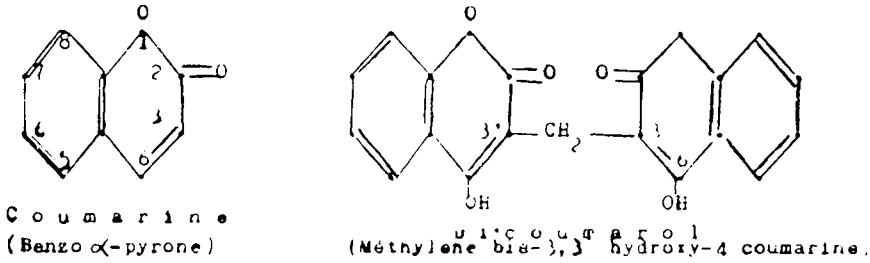
Evcil hayvanlarda bitkilerle zehirlenmeler, eskiden beri bilinen ve rastlanılan olaylardandır. Ancak, bu olayların en ilginçlerinden biri,

* Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Kürsüsü Profesörü, Ankara/Türkiye.

** Aynı kürsüde doçent.

normal olarak zehirli herhangi bir unsur ihtiva etmeyen mera otlarının bazı hallerde hayvanlar arasında zehirlenmelere yol açmasıdır³. Nasıl oluyor da, hayvan beslenmesinde normal olarak yer alan zararsız bir bitki, bazı hallerde geniş çapta zehirlenmelere ve hatta ölümlere sebep olabiliyor? Bu soru özellikle, söz konusu bitkilerde herhangi zehirli bir unsur tesbit edilemediği durumlarda halledilmesi çok güç bir sorun teşkil etmektedir. Böyle durumlarda, yani toksik bir unsur ortaya çıkarılmadığı hallerde çok kez, sadece iklim, yetiştirme bölgesi, toprağın jeolojik yapısı, kullanılan gübre, vejetasyon devri gibi bazı faktörlere bağlı olarak bitkinin sonradan bir toksisite kazanması ihtimalinden başka bir çözüm yolu bulunamamıştır³. İşte bu tip bitkisel zehirlenmelere en tipik bir örneği Melilotus (kokulu yonca) türlerinin sebep olduğu zehirlenmeler teşkil eder⁶. Melilotus türlerinden özellikle Melilotus officinalis, melilotozid denilen bir glikozid ihtiva eder⁵. Bu glikozid glikoz ve kumarik aside parçalanır. Kumarik asitten de kumarin teşekkül eder.

Melilotus'da bulunan kumarin, yağışlı yıllarda rutubet ve küflenme gibi kötü koşullar altında dikumaral (bis-méthylène-oxycoumarine) haline dönüşür⁷ (şekil:1).



Şekil 1. Kumarin ve dikumarol

Dikumarol antivitamin K gibi etkiyerek, K vitamini karansına sebep olur. Ve kanın koagülasyon zamanını uzatır, protrombin teşekkülünü engeller. Bu şekilde dikumarol ihtiva eden yoncaları yiyen hayvanlar hemorajilerle seyreden zehirlenme semptomları gösterirler^{1 8 10}. Özellikle, sığırlarda tad duygusu daha az duyarlı olduğundan, diğer hayvanlara nazaran bu zehirlenme daha fazla görülür. Bazan aynı zehirlenmeye koyunlarda ve atlarda da rastlanır. Zehirlenme diyetetik tedbirler almak ve hasta hayvanlara vitamin K vermek suretiyle önlenilmektedir^{2 4}.

Biz bu çalışmamızda, mera otlarında bulanabilecek ve yukarıda izah ettiğimiz koşullar altında zehirli olabilecek unsurlardan biri olan

kumarinik glikozitlerin tanınması ve ortaya çıkarılması üzerinde durduk. Keza, aynı bitkilerde rastlanılan flavonik glikozitlerinde aynı metodla incelenmesini yapmak suretiyle, ele aldığımız mera otlarının etken maddeler yönünden terkiblerini tesbit etmeye çalıştık.

Materyal ve Metod

Çalışmamıza başlangıç teşkil eden ön deneyler, Sivrihisar Hükümet Veterinerliğinin, 1972 yılı Haziran ayında, hayvanlarda zehirlenmelere sebep olduğu iddiası ile Kaymaz bucağı Çaylık mevkiinden toplayarak gönderdiği kuru Melilotus (kokulu yonca) numuneleri üzerinde yapılmıştır. Daha geniş ölçüdeki araştırmalar ise, Haziran-Temmuz aylarında Ankar civarında toplanan melilotus officinalis (kokulu yonca, taş yoncası, sinek tırfılı) üzerinde yapıldı.

Bu maksatla, Melilotus officinalis türleri oda ısısında, gölgede kurutulduktan sonra, toprak üstü kısımları (özellikle çiçek ve yapraklar) kaba toz haline getirildi. Kromatografik çalışmalar, bu çiçek ve yapraklardan ibaret olan karışımlardan hazırlanan % 5 lik maserasyon, infüzyon veya etanollü hülâsa üzerinde yapıldı.

Etanollü hülâsanın hazırlanması için 5 gr. bitki numunesi 100 ml etanol ile, geri çeviren soğutucu altında su banyosunda 30 dakika kaynatıldı. Filtre kağıdından süzülerek, elde edilen hülâsa alçak basınç altında 2 ml kalana kadar yoğunlaştırıldı. Kalıntıya 3 ml sıcak su ilâve edildi. Süzüldükten sonra eter ve etil asetat ile tükeltildi. Anhydre sodium sulfat üzerinde kurutulup yoğunlaştırıldı. Genellikle yoğun organik çözeltilerde sarımsı renkli çökelti teşekkül etti. Bu çökelti alkole alınmak suretiyle kristalleştirildi.

Bu şekilde elde edilen etken maddelerin, önce kumarinik ve flavonik tip maddelerin tanınması için literatürlerde⁹ bildirilen renk reaksiyonları yardımı ile teşhisleri yapıldıktan sonra, kromatografik çalışmalara geçildi.

Kromatografik çalışmalarda Whatman No: 1 kâğıdı kullanılarak çıkan metod kâğıt kromatografi tekniği uygulandı. Çözücü olarak % 15 asetik asid ve % 85 destile su karışımı kullanıldı. Bitki numunelerinden hazırlanan maserasyon, infüzyon ve hülâsalar mikropipetler yardımı ile kromatografi kâğıdına damlatılıp kurutulduktan sonra, kromatografi kâğıdı, çözücü sınırı 10 cm'lik bir yüksekliğe ulaşana kadar (ortalama 40 dk.) devalope edildi. Sonra kromatografi kâğıdı, kromatografi apareyinden çıkartılarak açık havada kurutuldu. Kurutulmayı müteakip kâğıt üzerine KOH'ın alkoldeki % 5 lik çözeltilis-

den püskürtüldü. Glikozitler beyaz zemin üzerinde sarı renkli lekeler halinde belirdi. Aynı kromatografi kâğıdı UV altında incelenerek kumarin tipi maddelere ait mavi ve flavon tipi maddelere ait sarı, turuncu sarı, yeşil lekeler işaretlendi ve Rf değerleri tesbit edildi.

Sonuçlar

Bitkide glikozid halinde bulunan kumarin ve flavon tipi maddeleri tüketmek için su, etanol, eter ve etil asetat kullanılmıştır. Önce çiçek-yaprak karışımından ekstraksiyon yapılarak flavonoidler alkolle alındı. Bu alkollü ekstratlar da eter ve etil asetat ile tüketilerek flavonoidlerin kristal halde elde edilmesi mümkün oldu. Bu şekilde elde edilen etken maddelerin önce renk reaksiyonları yardımı ile teşhisleri yapıldı ve neticelerin tamamlanması için çıkan metod kâğıt kromatografi ile yapılan 31 deney neticesinde kumarinlere ait 0.77 Rf değerleri yanında, flavonoidlere ait 0,24; 0,14; 0.10 Rf değerleri tesbit edilmiştir (Tablo: I ve II).

TABLO I.

Kumarinik ve flavonik glikozitleri çıkan metod kâğıt kromatografi ile ayırma (Séparation des glucosides cumarinique et flavonique par la chromatographie ascendante sur papier).

Preparasyon	Deney adedi	Leke adedi	Rf değerleri	
Maserasyon	6	2	0.77	0.24
İnfusyon	7	1	0.77	—
Etanol ekstraktı	6	2	0.77	0.14
Eter ekstraktı	6	2	0.77	0.24
Etilasetat ekstraktı	6	2	0.77	0.10

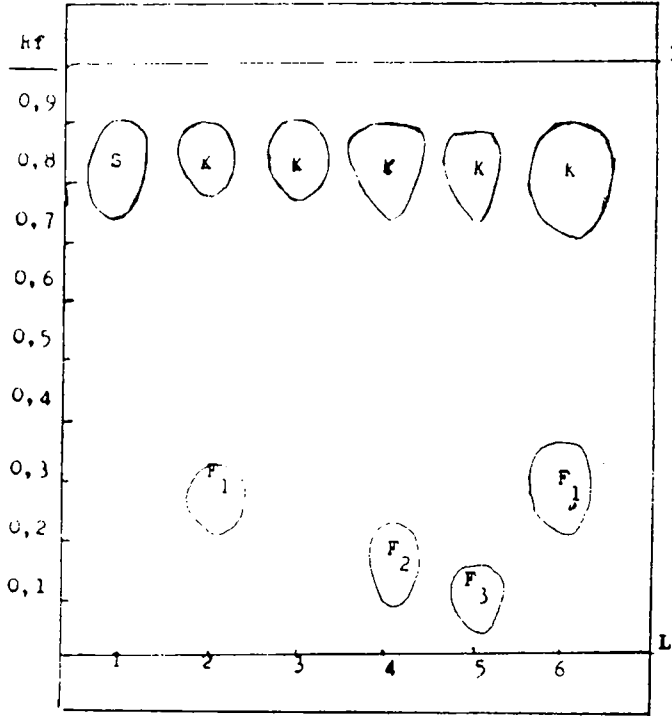
TABLO II.

Kromatogramlardaki lekelerin renkleri (Les couleurs des taches sur la chromatogramme).

Glikozitler	KOH'in alkoldeki % 5 lik çözeltisinde	
	Gün ışığı	UV
Kumarin	Sarı	Mavi
Flavon I	Sarı	Sarı
Flavon II	Sarı	Turuncu Sarı
Flavon III	Sarı	Yeşil

Kumarinik glikozitlerin ayrılması:

Kumarin tipi maddelerin kromatografik incelenmesi, çiçek ve yaprak karışımlarından hazırlanan maserasyon, infuzyon ve ekstre gibi preparasyonlar üzerinde yapıldı. Bu preparasyonlara ait kromatogramların hepsinde, KOH reaktifi ile kumarinlere ait gün ışığında sarı ve UV altında ise mavi renkli, Rf değerleri ortalama 0,77 olan lekeler belirdi. Keza kumarin tipi maddelerin yanında uygulanan standart kumarin çözeltisi de aynı renk ve Rf değerine malik lekeler verdi (Şekil: 2).



Şekil 2. Kumarinik ve flavonik glikozitlerin çıkarılması için kullanılan kağıt kromatografisinde elde edilen lekeler (Chromatogramme sur papier de glucosides cumarinique et flavonique). L: hareket çizgisi; F: çözücü sınırı; 1: standart kumarin çözeltisi; 2: maserasyon; 3: infuzyon; 4: etanol ekstraktı; 5: etilasetat ekstraktı; 6: eter ekstraktı; S: kumarin standardının mavi renkli lekesi; K: kumarin tipi maddelerin mavi renkli lekeleri; F₁: Flavon I'in sarı renkli lekeleri; F₂: Flavon II'nin turuncu-sarı renkli lekesi; F₃: Flavon III'ün yeşil renkli lekesi.

Flavonoidlerin ayrılması:

Flavonoidler özellikle etanol, eter ve etil asetat ekstraktında tespit edildi. Aynı şekilde maserasyon tarzında hazırlanan preparasyon-

larda tesbit edilebildiyse de, infüzyonlarda hiç bir deneyde tesbit edilemedi. Flavonik glikozitlere ait lekeler KOH reaktifi ile gün ışığında sarı renkli, UV altında ise sarı, turuncu-sarı ve yeşil renkte belirmekte olup, Rf değerleri sırayla ortalama 0,24; 0,14 ve 0,10 olarak tesbit edildi (Şekil: 2). Bu lekelerden Rf'si 0,24 olan sarı lekeler maserasyon ve eter ekstraktında; Rf'si 0,14 olan turuncu-sarı lekeler ise etanol ekstraktında ve Rf'si 0,10 olan yeşil leke ise sadece etil asetat ekstraktında tesbit edildi. Böylece flavonik glikozitlere ait olan üç farklı leke tesbit edilmiş oldu.

Tartışma

Melilotus türlerinin çiçek-yaprak karışımları üzerinde yaptığımız kromatografik incelemeler, bu bitkilerde bulunan kumarinik ve flavonik glikozitlerin ayrılması ve aynı kromatogramda ortaya çıkarılmasını sağladı. Bu maksatla, bitki kısımlarını maserasyon, infüzyon ve hülâsa tarzında hazırlayarak, çözücü olarak % 15 lik asetik asid kullandık. Ancak, flavon'ların ayrılması için, etanol, etil asetat ve eter ekstraktlarının kullanılması gerekti. Böylece çeşitli ekstraktlardan hazırlanan kromatogramlarda şekil: 2 de F₁, F₂ ve F₃ ile gösterdiğimiz üç çeşit flavon tipi madde tespit ettik. Bu üç çeşit flavon, literatürlerde⁹ Melilotus officinalis de bulunduğu zikredilen *kersetol*, *kemferol* ve *robinozid* adlı flavonlara tekâbül etmekte olup, bu hususu ön deneylerde yaptığımız renk reaksiyonları da doğrulamaktadır.

Diğer taraftan, aynı kromatogram üzerinde tesbit ettiğimiz kumarin tipi maddeler de, gerek renk reaksiyonları gerekse kumarin standardı ile birlikte uygulanmak suretiyle teşhis edilmişlerdir. Melilotus türlerinde bulunan kumarinler, kötü toplama ve saklama koşulları altında dikumarol haline dönüşerek⁷, hayvanlarda zehirlenmelere sebep olması yönünden, mera otlarında araştırılması gereken önemli bir etken maddedir^{8 10}. Bu gibi durumlarda, çalışmamızda kullandığımız metodların aydınlatıcı olacağı kanısındayız.

Literatür

- 1- **Campbell, H. A. and Link, K. P.** (1941): *Studies on the Hemorrhagic Sweet Clover Disease*. IV. J. Biol. Chem., 138, 21.
- 2- **Collentine, G. C. and Quick, A. J.** (195): *The interrelationships of vitamin K and dicoumarin*. Am. J. Med. Sci. 222, 7.
- 3- **Florio, R.** (1963): *De quelques problèmes de toxicologie vétérinaire*. Rev. de Méd. Vét. 114 (12), 860-875.

- 4- **Link, K. P.** (1959): *The discovery of dicoumarol and its squels.* Circulation, 19. 97.
- 5- **Mascre, M.** (1961): *Matière Médicale Végétale. Monographie: Mélilots.* Centre de documentation Universitaire, Paris. sayfa: 472.
- 6- **Pammel, L. H.** (1923): *Alleged sweet clover poisoning: its relation to hemorrhagic septicemia.* Vet. Med., 18, 245.
- 7- **Rosenfeld, I. and Beath, O. A.** (1945): *Tissue changes induced by senecio riddellii.* Am. J. Clin. path., 15, 407.
- 8- **Stahman, M. A., Huebner, C. F., Link, K. P.** (1941): *Studies on the hemorrhagic sweet clover disease.* V. J. Biol. Chem., 138, 513.
- 9- **Torck, M., Bezanger-Bauquesne, L., Pinkas, M.** (1971): *Resherches sur les flavonoides des légumineuses. I. Etude chimique.* Annales Pharmaceutiques Françaises, 29 (3), 201-210.
- 10- **White, V. M.** (1970): *Sweet clover poisoning in cattle.* Veter. Med. Small Animal Clinician, U. S. A. 65 (8), 804-807.

Yazı "Dergi Yazı Kuruluna" 29. 9. 1972 günü gelmiştir.