

Ephedra major Host. Herbasında d-Psödoefedrin Yanında 1-N-Metilefedrin Saptanması*

Determination of 1-N-Methylephedrin Together With
d-Pseudoephedrin in the Aerial Parts of E.Major Host.

Mekin TANKER İnci KILIÇER**

Ephedra türleri (fam: Ephedraceae), Asya, Avrupa, Afrika, Kuzey Güney Amerika ile Avustralya'nın ılıman ve subtropikal bölgelerinde yetişir (11). Droğun asıl etken maddesi olan efedrin, Asya'da yetişen türlerden elde edilir.

Türkiye'de üç *Ephedra* türü bulunur (7). T.BAYTOP, *E.camplopoda* ve *E.Major* türleri üzerinde çalışmış ve *E.Major*'un psödoefedrin taşıdığını belirlemiştir (3, 4).

Ankara yöresinde yaygın olarak bulunan *E.Major* herbasında yapılan ön denemeler ve kromatografi çalışmaları, bu bitkinin birden fazla bazik madde içerdiğini kanıtlamıştır. Bu nedenle, bitkinin, önceden varlığı saptanan psödoefedrin yanında, başka efedra alkaloidlerini de taşıyacağı olasılığından hareketle bu alkaloidlerin nitel ve nicel olarak araştırılması yoluna gidilmiştir.

DENEL KISIM

MATERYAL

Ankara Çubuk Barajı ve Kırıkkale yolu üzerinde Kırıkkale'ye 11 km. uzaklıkta doğal olarak yetişen bitkinin toprak üstü kısımları

Redaksiyona verildiği tarih: 14 Nisan 1978.

* Ecz. İnci Kılıçer'in *Ephedra major Host. Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar* isimli doktora tezinin bir bölümüdür. Sınav tarihi: Temmuz 1974.

** Farmakognozik ve Farmasötik Botanik Kürsüsü, Eczacılık Fakültesi, Ankara Üniversitesi.

Nisan-Mayıs, Ağustos-Eylül aylarında kesildi, gölgede kurutuldu ve çalışılacağı zaman toz haline getirildi.

YÖNTEM

Alkaloitler dışında drogda bulunan lipoit ve diğer yan maddeleri ayırmak için, drog önce petrol eteriyle tüketildi. Süzülerek ayrılan drog kurutuldu ve bu kez alkaloit tüketimine geçildi. Efedrin grubu alkaloitlerin bazı özellikleri gözönüne alınarak çalışmamızda tüketim solvanı olarak eter, alkali ortamı sağlamak için de amonyak kullanıldı (9).

Temizleme işlemlerinden sonra, bazların ayırımında sütun, ince tabaka kromatografisi ve iyon değiştirici reçinelerden yararlanıldı.

İnce tabaka kromatografisi ile yapılacak ayırmalar için Kieselgel G (Merck) adsorbanı (6, 17, 18) ve $50 \times 20 - 10 \times 20$ cm boyutlarındaki plâklar kullanıldı. Plâklar adsorbanla 0,25 mm kalınlığında Stahl'a (16) göre kaplandı, 110°C 'lik etüvde 1 saat aktive edildi. Solvan sistemi olarak benzen-dietilamin (90:10) karışımı (9, 16) ve revelatör olarak da Folin-Ciocalteux (1, 16) kullanıldı.

İnce tabaka kromatografisi yoluyla droğun içerdiği bazik madde sayısı bulunarak ilkin bu maddeleri kristallendirme ile tüm ekstreden ayırma yoluna gidildi. Maddelerin hepsi bu şekilde ayırlamadığından bu kez çalışmalara sütun kromatografisi ile devam edildi.

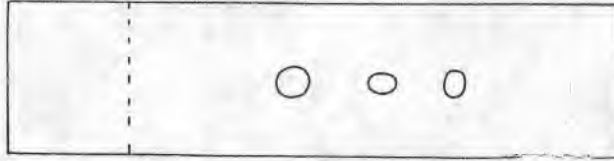
Bu çalışma için 20×4 cm boyutlarındaki sütunlar ve Kieselgel 0,05-0,2 (60:325) mesh) (Merck) adsorbanı kullanıldı.

Ekstreyi temizleme işlemlerindeki bazik madde kaybına engel olmak amacıyla ayırma çalışmalarının bir kısmı da "Ionenaustauscher IV" katyon değiştiricisiyle yapıldı.

Çalışmalarımız sonunda ayırdığımız maddeler kurutma tabancasında, kloroform üzerinde kurutulduktan sonra, erime noktaları saptandı. Standart maddelerle ince tabaka kromatografisinde karşılaştırmaları yapıldı. Saf oldukları belirlenen maddelerin elementer analizleri yapıldı, IR, NMR, Mass spektrumları alındı ve bazı tuzlarının erime noktaları gözlemlendi. Drogda etken madde miktarı tayinleri, titrimetrik ve gravimetrik yolla yapıldı.

BULGULAR

Drog, petrol eteriyle tüketilerek bazı yan maddelerden kurtarıldı ve sonra kurutuldu. İkinci kez, alkaloitlerin ayrımı için eterle tüketime geçildi. Eterli ekstrenin çok küçük miktarlarının bile genel alkaloit reaktifleriyle reaksiyon verdiği görüldükten sonra, ekstrenin ince tabaka kromatografisinde ayrımı yapıldı. Değişik solvan sistemleri, adsorban ve revelatörlerle yapılan deneyler sonucu, bu ekstrenin üç leke verdiği görüldü (Krom. 1). En iyi sonuçlar aşağıdaki üç solvan sistemiyle alındı (9, 16).



Krom. 1. Kieselgel G, Benzen: Dietilamin (90:10), Folin-Ciocalteux
Tüm Alkaloit Ekstresi

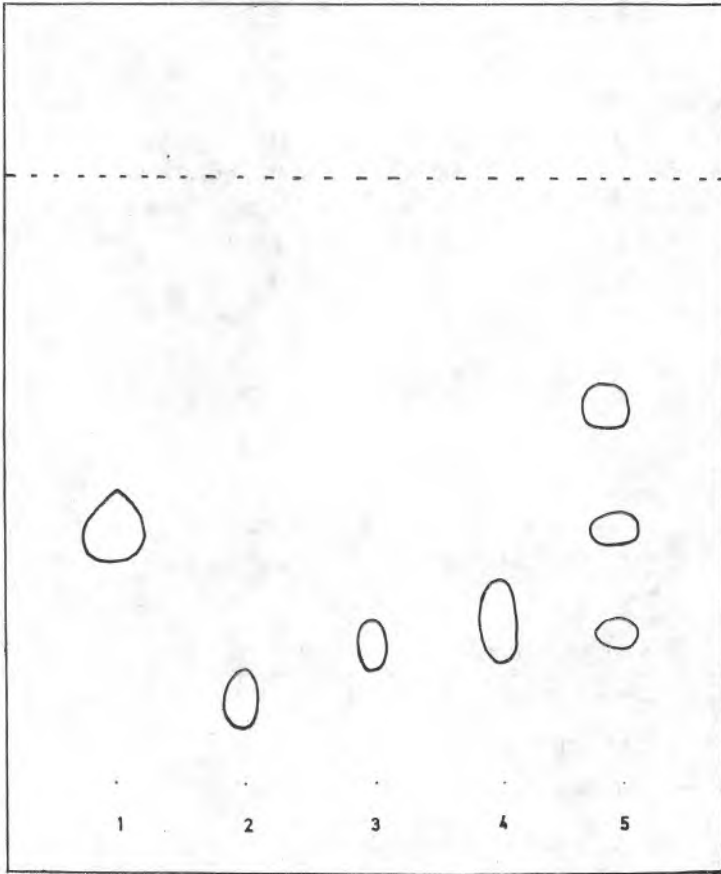
Solvan sistemleri	Rf değerleri
Benzen-eter-Metanol 140:70:70	0,2; 0,8; 0,9
Kloroform-dietilamin 90:10	0,34;0,62;0,89
Benzen-dietilamin 90:10	0,24;0,41;0,58

Bu solvan sistemleri içinden benzen-dietilamin (90:10) karışımı en uygun sistem olarak seçildi.

Kieselgel G ile kaplanmış bir plâğa tüm ekstre ve standart maddelerin çözeltileri damlatıldı. Developmandan sonra Folin reaktifiyle belirlenen lekeler karşılaştırıldı. Başlangıç noktasına (start) en yakın lekenin standart psödoefedrinin ortadaki lekenin ise standart metilefedrinin Rf değerine uyduğu, bitiş çizgisine (front) en yakın lekenin ise standartların hiçbirinin Rf değeriyle uyuşmadığı görüldü (Krom. 2).

1-N-METİLEFEDRİN

Kieselgel 0,05-0,2 (Merck) adsorbamı ile hazırlanan sütuna yoğunlaştırılmış eterli bitki ekstresi uygulanarak sütun, benzen-dietil-



Krom. 2. Kieselgel G, Benzen-Dietilamin (90:10), Folin-Ciocalteux 1- Standart metilefedrin; 2- Standart norefedrin; 3- Standart psödoefedrin; 4- Standart 1- efedrin; 5- Tüm alkaloit ekstresi.

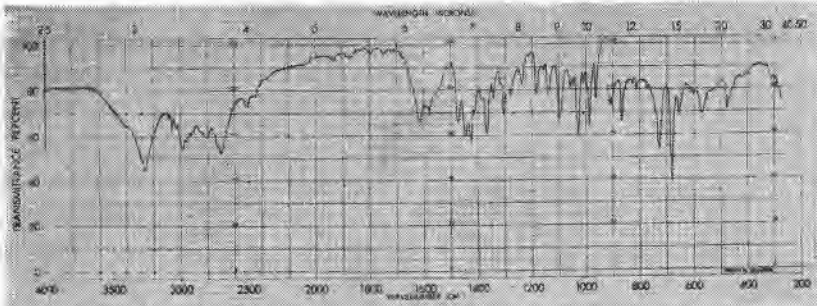
amin karışımının değişen oranlarıyla elüe edildi. Önce, ince tabaka kromatografisinde bitiş çizgisine en yakın lekeyi veren fraksiyonlar ayrıldı. Daha sonra yine ince tabaka kromatografisinde ortada leke veren fraksiyonlar biraraya getirildi ve kuruluğa kadar uçuruldu. Artık, az miktarda metanolde çözüldü ve ortam hafif asit oluncaya kadar metanollü okzalik asit çözeltisi katıldı. Çözücü yeniden uçuruldu. Kalan kısım az miktarda metanole çekilerek ortam eterle doyuruldu. Soğukta bekleme suretiyle oluşan kristaller, işlem yinelenerek saflaştırıldı. Erime noktalarının 185°C olduğu görüldü. Okzalik tuzundan baz

şeklinde çevrilen maddenin erime noktasının bu kez 86°C olduğu saptandı.

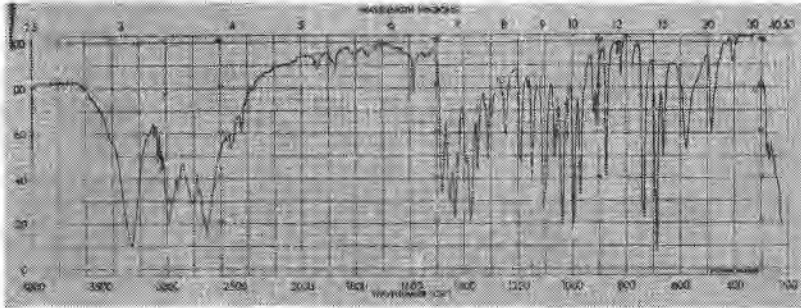
İnce tabaka kromatografisine uygulanan madde standart metilefedrinle aynı Rf değerini verdi.

IR SPEKTRUMU

Standart metilefedrinle aynı Rf değerini veren madde bu kez IR spektrumları alınarak karşılaştırıldı. Bu spektrumlarda 3620 cm^{-1} deki pik serbest OH grubunu, 2990 cm^{-1} de bulunan pik $-\text{CH}_3$ grubunu, 2700 cm^{-1} deki pik N^+ (tuz)u; yine 2510 cm^{-1} ve 2440 cm^{-1} deki pikler N^+ u; 475, 730, 1030, 1140, 1180 ve 1615 cm^{-1} deki pikler de benzen halkasındaki monosubstitusyonu vermektedir. 1240 cm^{-1} , 1300 cm^{-1} ve 1370 cm^{-1} deki pikler tersiyer aminin varlığını; 1425 cm^{-1} deki pik ise CH_3-N bağına bağlı adsorbsiyonu belirlemektedir (2,5). Maddenin IR spektrumu okzalot tuzu halinde çekildiği için spektrumda (Spektr. 1) 1610-1550 cm^{-1} ve 1400-1300 cm^{-1} de COO^- grubunu belirten iki bant vardır (5). Bu bantlara standart metilefedrinin IR spektrumunda rastlanmaz (Spektr. 2).



Spektr. 1. Drogdan izole edilen metilefedrin'in okzalot tuzunun IR spektrumu



Spektr. 2. Standart metilefedrin'in IR spektrumu

Madde çok az elde edildiğinden Mass ve NMR spektrumları alınamamıştır. Fakat diğer yöntemlerle elde edilen tüm veriler maddenin 1-N-metilefedrin olduğunu kanıtlamaktadır.

d- PSÖDÖEFEDRİN

Yan maddelerden kurtarılarak etere çekilen alkaloitlerin ayrımı için eter fazı kuruluğa kadar uçuruldu. Kalan kısım hidroklorik asit buharıyla doyurulmuş metanole alındı, vakumda distillendi ve yine vakum desikatöründe kurutuldu. Üzerine az miktarda metanol katılarak çözüldü ve ortam eter ya da etil asetatla doyuruldu. Kısa süre içinde oluşan kristaller buradan ayrıldı, işlem yinelenerek madde saflaştırıldı. Erime noktasının 180–181°C olduğu saptandı. Madde ince tabaka kromatografisinde tüm ekstre ile karşılaştırıldığında başlangıç noktasına en yakın lekeyi verdiği ve Rf değerinin standart psödoefedrinin Rf değerine uyduğu görüldü.

Serbest halde de kristallendirilen maddenin bu kez erime noktası 118°C bulundu.

Sütun Kromatografisi ile Ayrımı

Kieselgel 0,05–0,2 (Merck) adsorbantıyla hazırlanan sütuna temizlenmiş ve yoğunlaştırılmış ekstre uygulandı. Benzen-dietilamin karışımıyla elüe edilen sütundan önce ince tabaka kromatografisinde bi-tiş çizgisine daha yakın olan iki lekeyi veren fraksiyonlar ayrıldı. Sütunun elüsyonuna devam edilerek bu kez başlangıç noktasına yakın lekeyi veren fraksiyonlar toplandı, birleştirildi, yoğunlaştırıldı. Yoğunlaşma sırasında oluşmaya başlayan kristaller ayrıldı. Erime noktaları 118°C bulundu. Bu kristaller ince tabaka kromatografisinde standart psödoefedrin ile aynı Rf değerini verdiler.

İyon Değiştirici Reçinelerle Ayrımı

Drogdan eterle yapılan tüketim sonunda ekstreyi temizleme işlemleri bir miktar madde kaybına neden oluyordu. Bu kaybı azaltmak amacıyla iyon değiştirici reçinelerden yararlanıldı.

Drog % 10 NH₃ la ıslatıldı ve eterle tüketildi. Eter fazı ayrıldı, biraz yoğunlaştırıldı ve katyon değiştirici reçineyle çalkalandı. Bu kez ayrılan reçine kısmı eterle yıkandı, kurutuldu ve sonra % 1 metanollü

hidroklorik asitle çalkalandı. Metanol fazı ayrıldı, vakumda kuruluğa kadar uçuruldu ve kurutuldu. Artık kloroforma çekildi ve eterle doyuruldu. Beklemeyle oluşan kristallerin 181 °C de eridiği saptandı.

İnce tabaka kromatografisi uygulanmasında standart psödoefedrinle aynı Rf değerini verdikleri görüldü.

Tanıma Reaksiyonları

1)- Birkaç mg madde suda çözüldü. Üzerine bakırsülfat (1, 25/10) ile 1/5'lik sodyum hidroksit çözeltisi ilave edildi ve eterle çalkalandı. Sulu tabaka mavi, eterli tabaka menekşe renk aldı (8).

2)- Yine birkaç mg madde osmiumtetraoksit'in normal sodyum hidroksitteki % 1'lik çözeltisiyle kaynar su banyosunda bir dakika kadar ısıtıldı. Sarı renkli çökelek oluştu. Hidroklorik asit ilavesiyle bu renk limon sarısına döndü (13).

3)- Birkaç mg madde iki üç dakika kaynama derecesinde ısıtıldı. Tüp alevden çekilerek üzerine bir iki mg dimetilamino benzaldehit katılıp çalkalandı. Kırmızı-yeşil renk görüldü (10).

Okzalik Asit Tuzu

Baz haldeki maddeden hareketle hazırlanan okzalik asit tuzunun erime noktasının 218 °C olduğu saptandı.

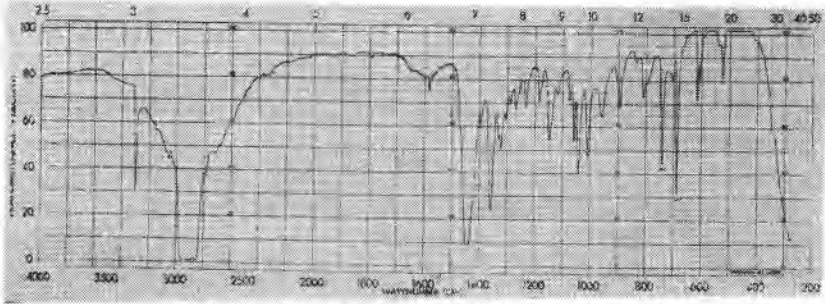
Elementer Analizi

Hidroklorik asit tuzunun elementer analizi sonunda % 59,37 C ve % 7,85 H bulundu. Baz şeklinin elementer analizi sonunda ise % 72,67 C, % 9,05 H ve % 8,68 N saptandı. Bu değerlerin psödoefedrin (% 72,69 C, % 9,15 H, % 8,48 N) ve psödoefedrin klorhidrat (% 59,4 C, % 8 H, % 6,95) a uyduğu görülmektedir.

IR Spektrumu

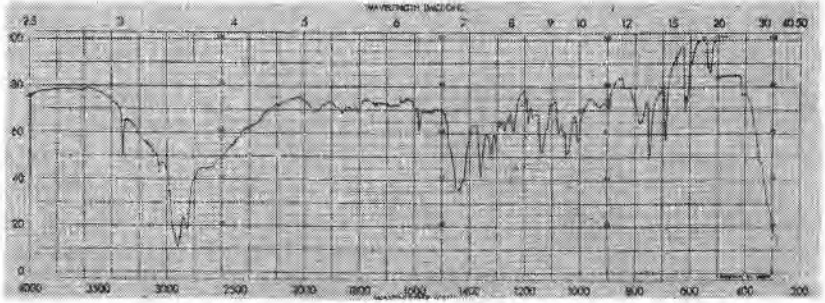
Kristallerin hidroklorik asit tuzunun ve baz şeklinin IR spektrumları standart maddenin IR spektrumlarıyla karşılaştırıldı.

Standart maddede 3300 cm⁻¹ deki pik OH grubunu, 525 cm⁻¹, 790⁻¹, 810 cm⁻¹, 1010 cm⁻¹, 1050 cm⁻¹, 1060 cm⁻¹ ve 1150 cm⁻¹ de görülen pikler benzen halkasındaki sübstitüsyonu, 1585, cm⁻¹ 1320 cm⁻¹ deki bantlar aromatik amin grubunu göstermektedir (Spektr.3).



Spektr. 3. Standart psödöfedrinin IR spektrumu

Baz maddenin IR spektrumunda 3320 cm^{-1} deki pik OH grubunu, 525 cm^{-1} , 750 cm^{-1} , 780 cm^{-1} , 1010 cm^{-1} , 1145 cm^{-1} , 1060 cm^{-1} de bulunan pikler benzen halkasındaki monosubstitusyonu; 1585 cm^{-1} , 1320 cm^{-1} de bulunan bantlar sekonder amini belirtmektedir (Spektr. 4).

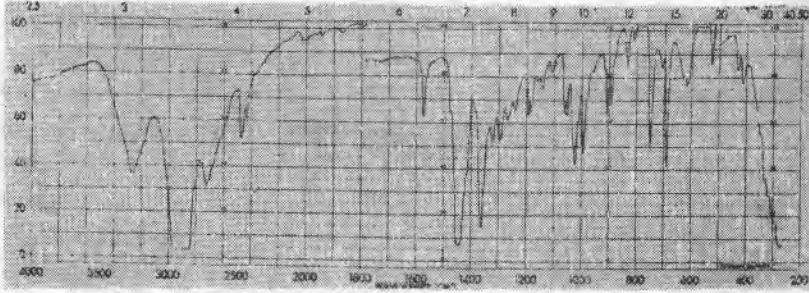


Spektr. 4. Drogdan elde edilen baz psödöfedrinin IR spektrumu

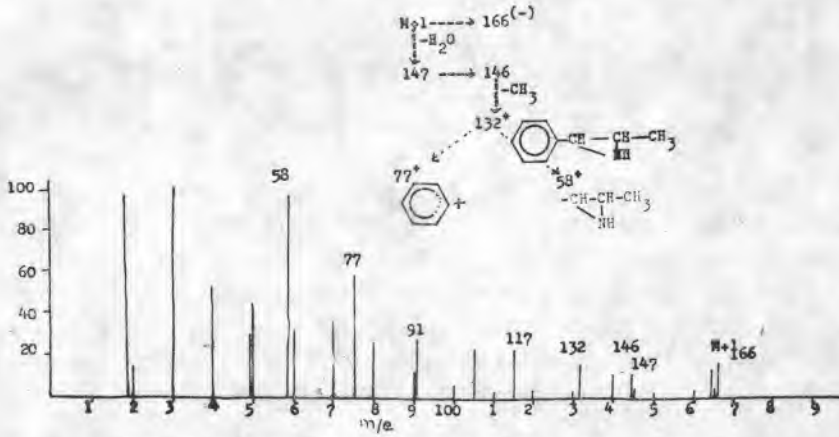
Hidroklorik asit tuzunun IR spektrumunda ise $3100\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ de bulunan pik OH grubunu, 520 cm^{-1} , 750 cm^{-1} , 810 cm^{-1} , 1020 cm^{-1} , 1050 cm^{-1} , 1110 cm^{-1} , 1140 cm^{-1} , 1180 cm^{-1} , 1190 cm^{-1} de görülen pikler monosubstitüe benzen halkasını, 2480 cm^{-1} , $2600\text{--}2700\text{ cm}^{-1}$ deki pikler NH^+Cl^- u ve 1575 cm^{-1} , 1320 cm^{-1} de bulunan bantlar da sekonder amini akla getirmektedir (2, 5) (Spektr.5).

Mass Spektrumu

Spektrum sonucu maddenin mol ağırlığı 166 olarak bulunmuştur. (Spektr.6).



Spektr. 5. Drogdan elde edilen psödoefedrinin klorhidrat tuzunun IR spektrumu

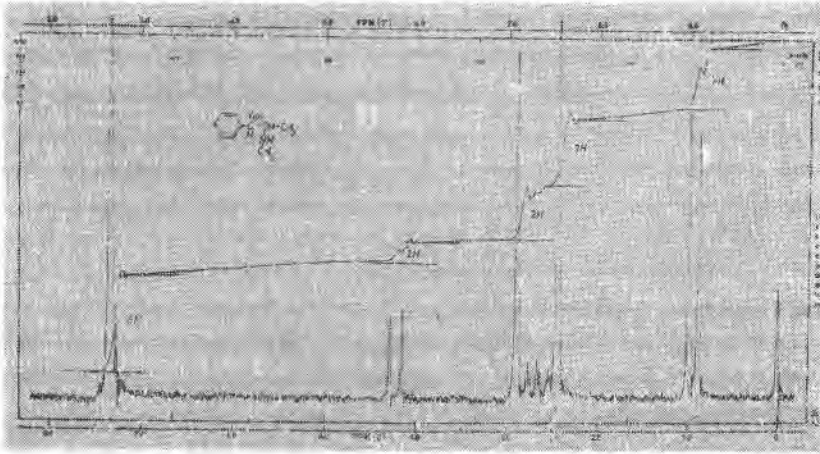


Spektr. 6. Drogdan elde edilen psödoefedrinin Mass spektrumu

NMR Spektrumu

NMR spektrumunda 7,35 ppm (δ) daki singlet 5 protonla fenil grubunu, 4,22 ppm (δ) da görülen dublet —OH grubunu taşıyan —C— atomu üzerindeki protonu vermektedir. 2,90 ppm (δ) da bulunan singlet N—H protonunu ve 2,65 ppm (δ) daki multipllet azotun bağlı olduğu karbondaki bir protonu verir. (Bunun spin couplingi AMX sistemi vermektedir). 2,45 ppm (δ) da görülen ve 3 protonu belirleyen dublet de C'na bağlı CH_3 grubunu göstermektedir (12). (Spektr.7).

Sonuçta bütün bu analizler maddenin. E.majör da bulunduğu daha önce de belirtilen d-psödoefedrin olduğunu kanıtlamaktadır.



Spektr. 7. Drogdan elde edilen psödoefedrinin N.M.R. spektrumu

Bitki ekstresinin Kieselgel 0,05-0,2 (Merck) adsorbantıyla hazırlanan sütuna uygulanması ve bu sütunun benzen-dietil amin karışımıyla elüe edilmesi sonucu ince tabaka kromatografisinde bitiş çizgisine yakın leke veren fraksiyonlar ayrılmış ve birleştirilmiştir. Fakat bu fraksiyonların içerdiği madde tuz ya da serbest halde kristallendirilememiştir. (Dragendorff, Folin gibi reaktiflerle renk vermesi nedeniyle maddenin bir amino asit olma ihtimali mevcuttur).

MİKTAR TAYİNİ

Titrimetrik yolla yapılan tayinde drogda % 0,36 total alkaloid bulunduğu görüldü (9,14). Gravimetrik yolla yapılan tayin sonucunda ise bunun % 78'inin psödoefedrin olduğu anlaşıldı.

SONUÇ ve TARTIŞMA

Araştırmalarımız sonunda memleketimizin birçok bölgesinde doğal olarak yetişmekte olan E.major türünün % 0,36 total bazik madde taşıdığı görülmüştür.

İnce tabaka kromatografisiyle yapılan ayırım sonucunda ise bitki de üç adet bazik maddenin bulunduğu anlaşılmıştır. Bazik maddelerden birin 1-N-metilefedrin, diğerinin ise daha önce bu türde varlığı

belirlenmiş olan d-psödoefedrin olduğu saptanmıştır. Üçüncü bazik madde ise kristal halde elde edilememiştir.

Ülkemizde yetişen *E. major* türünde saptanan değerlerle, Avrupa kaynaklı numuneler için literatürde verilen değerler arasında, total alkaloit miktarı bakımından önemli bir fark yoktur ve bizde yetişen bitkide psödoefedrin miktarı daha da fazladır.

Literatürde bazı EPHEDRA türlerinin kültürlerinin yapılması halinde içerdikleri alkaloit miktarında artış olduğu kayıtlıdır (15). Bu nedenle ülkemizde de kültürünün iyi sonuç vereceği düşünülebilir.

ÖZET

Çalışmamız Ankara civarından toplanmış *E. major* Host bitkisinin kurutulmuş toprak üstü kısmıyla yapıldı.

Alkaloit tüketimi için, petrol eteriyle muamele edilip daha sonra kurutulmuş olan drog, amonyakla ıslatıldı ve eterle masere edildi. Maserasyon işleminin sonuna temizlenen ekstrenin ince tabaka kromatografisinde (adsorban Kieselgel G - Merck, solvan benzen-dietilamin (90:10), revalatör; Folin) üç leke verdiği görüldü.

Sütun kromatografisiyle (20×4 cm boyutlarındaki sütunlar ve Kieselgel 0,05-0,2 Merck adsorbanı kullanıldı.) elüsyon sonunda (benzen-dietilamin karışımı) her üç lekeyi tek olarak veren fraksiyonlar ayrıldı. İnce tabaka kromatografisine uygulandığında, ekstreye göre ortadaki lekeyi veren fraksiyonlardan okzalat tuzu halinde bir madde ayrıldı. Erime noktası tayinleri, IR spektrumu ve ince tabaka kromatografisinde standart maddeyle aynı Rf değerini vermesi, bu maddenin 1-N-metilefedrin olduğunu kanıtladı.

Yine aynı sütunun elüsyonu sonunda ince tabaka kromatografisinde ekstreye göre en alttaki lekeyi veren fraksiyonlardan kristal halde bir madde daha ayrıldı. Bazı tuzlarının erime noktası tayini, ince tabaka kromatografisinde standart maddeyle Rf değerlerinin uyuşması, IR, NMR ve Mass spektrumlarının alınması, bazı tanıma reaksiyonlarının olumlu sonuç vermesiyle bu maddenin daha önce yapılmış bir çalışmada saptanmış olan d-psödoefedrin olduğu anlaşıldı. Bu madde tüm alkaloit ekstresinden de kristallendirilerek ayrıldı. İyon

değiştirici-reçinelerden yararlanılarak yine aynı madde kristal halde elde edildi.

Sütun kromatografisinden ayrılan ve bitiş çizgisine yakın leke veren fraksiyonlardan bu fraksiyonların içerdiği madde ayrılmadı.

Drogdaki total alkaloit miktarı titrimetrik yolla % 0,36 bulundu. yapılan gravimetrik tayin sonucunda bu miktarın % 78'inin d-psödoefedrin olduğu anlaşıldı.

SUMMARY

This research was carried out on the dried aerial parts of *Ephedra major* Host growing nearby Ankara.

After treatment with petroleum ether, the dried material was macerated with ether in alkaline medium for the extraction of alkaloids. The purified ether extract gave three spots with the Folin reagent when applied to TLC. The extract was separated by column chromatography and 1-N-methyl ephedrine was eluted by benzene-diethylamine as its oxalate salt. It corresponded to the second spot from the start; and was identified by means of m.p., IR spectrum and comparison with authentic sample.

The substance corresponding to the first spot from the start was also eluted in crystal form and identified as d-pseudoephedrine, which had been already determined in *E. major* (4), by m.p., IR, NMR, mass spectra, and the m.p.s of salts prepared. d-Pseudoephedrine was crystallised directly from the extract, and also isolated by ion exchange resins.

The substance corresponding to the third spot from the start was not obtained in crystal form.

Total alkaloid assay was determined to be 0,36 % by titrimetry, and 78 % of the total alkaloid was determined to consist of d-Pseudoephedrine.

LİTERATÜR

1. **Alessandro, A., De Sio, F.**, *Boll. Chim. Farm.*, 104 (8), 498-502 (1965) Ref. C.A., 63, 17798d (1965).
2. **Avram, M., Mateescu, G.H.D.**, *La Spectroscopie Infrarouge*, Dunod, Paris (1970).

3. **Baytop, T.**, Ephedra Campylopoda C.A. Mey'in morfolojik, anatomik ve kimyasal karakterleri (Doktora tezi), İstanbul, (1949).
4. **Baytop, T.**, İst. Üniv. Tıp Fak. Mec., 21 (3), 518-26 (1958).
5. **Bellamy, L.J.**, The Infrared Spectra of Complex Molecules, London, Methuen Co. Ltd., New York, John Wiley Sons Inc (1966).
6. **Covischi, M. Sondri, G., Quaglio, M.P., Baraghirdi, A.**, *Boll. Chim. Farm.* 105 (9), 670-4 (1966) Ref. C.A., 66, 2229 r (1967).
7. **Davis, P.H.**, Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol. 1, University Press, Edinburg (1965).
8. **Feng, C.T.**, *Chinese J. Physiol*, 1, 397-406 (1927) Ref. C.A., 22, 2027 (1928).
9. **Junk, M.G.**, Contribution a L'Etude Chimique des Ephedra, These, Nancy (1967).
10. **Lebeau, P., Janot, M.M.**, Traité de Pharmacie Chimique, 5, Tomas, Masson, Paris (1955-56).
11. **Manske, R.H.F., Holmes, H.L.**, The Alkaloids Chemistry and Physiology, Vol III, Academic Press Inc., New York (1954).
12. **Martin, M.L., Martin, G.J.**, Manuel de Resonance Nucléar, Azoulay Ed. Paris (1971).
13. **Roques, Forman, P.**, *Bull. Sci. Pharmacol*, 44, 372-6 (1937)-Ref. C.A., 31, 8114² (1937).
14. **Rymil, F.B., Mc Donald, C.A.**, *Quart. J. Pharmacol*, 10, 463 (1937).
15. **Soskov Yu. D.**, *Med. Prom. SSSR*. 15, No 3, 20-3 (1961).
16. **Stahl, E.**, Dünnschicht-Chromatographie, Springer-Verlag Berlin, Heildekberg, New York, (1967).
17. **Szasz-Zacsko, M., Sszasz, G.**, *Acta Pharm. Hung*, 1970 40 (1) 38-43 (1970). Ref. C.A., 73, 69926f (1970).
18. **Tulus, R., Zeytinoğlu, L.**, *İst. Üniv. Ecz. Fak. Mec.*, 5 (3), 159-69 (1969).