

Helleborus orientalis Lam. var. hirsutus (Schiffn.) Hay. Kökleri Üzerinde Araştırmalar

Investigations on the Roots of the Helleborus orientalis Lam. var.
hirsutus (Schiffn.) Hay.

Turhan BAYTOP ve Gülsel MALKOÇ*

G İ R İ Ş

Helleborus kökleri eskidenberi zehirli olarak bilinmekte ve nadiren tedavi sahasında kullanılmaktadır. Kimyasal ve farmakolojik olarak iyi tanınan *H. niger* ve *H. viridis* türleridir (5). Memleketimizde şimdiye kadar aşağıdaki 4 tür tesbit edilmiştir (1, 2).

- 1 — *H. antiquorum* Al. Braun. — Bursa (Uludağ).
2 — *H. olympicus* Lindl. — Bursa (Uludağ).
2 — *H. orientalis* Lam. — Trakya, İstanbul (Yukarı Boğaçının her iki yakasındaki tepeler, Belgrat ormanı, Gümüşpınar, Şile), Sakarya, Kocaeli, Bolu, Samsun, Trabzon.
4 — *H. vesicarius* Auch. — Hatay (Keldağ, Belen), Gaziantep, Maras, Adana (Haruniye).

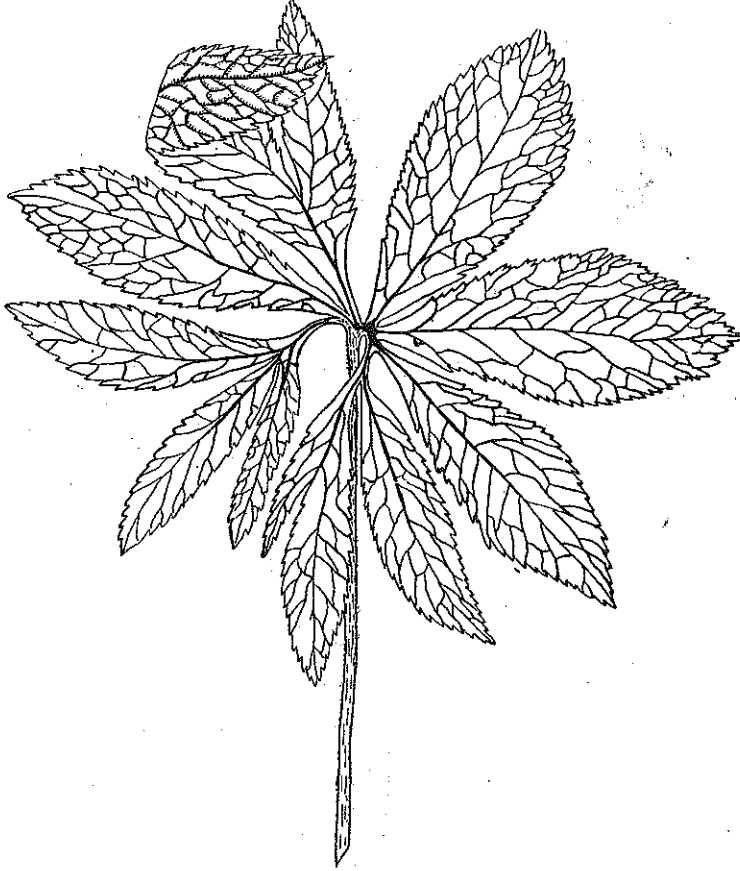
Bu türlerden *H. orientalis* Kuzey Anadolu'da oldukça geniş bir yayılış sahasına sahiptir. Memleketimizde daha ziyade bir varyetesi, var. *hirsutus* (Schiffn.) Hay. bulunmaktadır (8, 13). Bu varyete, tipik türden yapraklarının alt yüzünün tüylü olması ile ayırt edilir (8). Halk arasında zehirli bir tür olarak bilinmekte ve kökleri bilhassa hayvan hastalıklarına karşı kullanılmaktadır (7, 9).

MORFOLOJİK KARAKTERLER

H. orientalis Lam. var. *hirsutus* (Schiffn.) Hay. 30-40 cm yüksekliğinde çok senelik, otsu ve rizumlu bir bitkidir. Taban yaprakları ekseriya tek, uzun saplı, lamina derimsi, 5-11 parçalı, parçalar eliptik, kenarları

[*] Farmakognozi Kürsüsü, Eczacılık Fakültesi, Üniversite, İstanbul.

çift dişli ve alt yüzü tüylü (Şekil: 1). Çiçek aktinomorf, perigon 4-5 cm çapında, 5 parçalı, parçalar serbest, oval, yeşilimsi beyaz renkli (Şekil: 2). Stamenler çok adette. Meyva çok tohumlu, çıplak, soluk yeşil renkli bir folikül, boyu 15-17 mm kadar (Şekil: 3). Tohum koyu kahverenkli, oblong-



Şekil 1. Yaprak (1/2 x).

silindir biçiminde, 3-4 mm uzunlukta. Rizom yatık vaziyette, grimsi, siyah renkli, 5-10 mm çapında. Kökler silindir biçiminde, gri-siyah renkli, boyuna çizgili, 1-3 mm çapında (Şekil: 4).

ANATOMİK KARAKTERLER

Kök ve rizomların mikroskopik tetkikinde parenkima hücrelerinin kalın cidarlı olduğu, bol miktarda yağ damlacıkları ve nisbeten az, küçük

nişasta taneleri (2-3 tanesi bir arada, çapları 2-3 mikron arasında) taşıdığı, iletme demetlerinin normal ve basit olduğu, kristal ve taş hücreleri bulunmadığı tesbit edilmiştir (Şekil: 5,6,7). *H. niger*'den farklı olarak *H. orientalis* rizomlarının iletme demetinin üstünde, sklerenkima demetleri bulunmaktadır.



Şekil 2. Çiçekli bir dal (1/2 x).

KİMYASAL ARAŞTIRMALAR

Helleborus türlerinin kökleri üzerinde yapılan kimyasal araştırmalar sonunda bu türlerde glikozitler (helleborin, helleborein, hellebrin), alkaloidler (celliamin, sprintillamin, sprintillin), acı maddeler, yağ, reçine, akonitik asit, kalsiyum fosfat v.s. tesbit edilmiştir (5, 10).

Tetkik konumuzu teşkil eden *H. orientalis* Lam. var. *hirsutus* kökleri kimyasal olarak az araştırılmıştır (6, 7, 9). Yapılan çalışmalar ham hülâsalar üzerinde renk reaksiyonlarına dayanmakta ve renk reaksiyonları da bu türün kök ve rizomlarında gliko-saponinlerin bulunduğunu göstermektedir.

Biz İstanbul civarında (Kilyos, Şile, Paşaköy, Ayazağa) yetişen bitkilerden elde ettiğimiz kök ve rizomları adi hararete kuruttuktan sonra kaba toz haline getirerek üzerinde çalıştık (11). İlk tecrübelerin sonuçları şöyledir :

Rutubet	:	%	8.7
Kül	:	%	13.3
Asitte erimeyen kül	:	%	8.3
Tanenler	:	—	
Flavonlar	:	—	
Alkaloitler	:	—	
Redüktör şeker	:	+	
Glikozitler	:	+	

Köklerdeki glikozitleri ayırabilmek için daha önce *H. purpurascens* için kullanılmış olan aşağıdaki tüketme ve ayırma metodunu kullandık (18).

100 g numune bir Soxhlet apareyine konarak 300 ml petrol eteri ile (K.N. 50-70°C) 10 saat tüketildi. Yeşilimsi - sarı renkli petrol eteri hülâsası ayrıldıktan sonra iki defa 200 ml metanolla ve iki defa 100 ml % 70 lik metanolla tüketildi. Toplanan metanollü çözeltiler 40°C altında kumuluğa kadar teksif edildi. 30 g koyu kırmızı renkli, akıcı kıvamlı hülâsa iki misli su ile alındı, süzüldü. Berrak süzüntü ayırma hunisine alındı, altı defa 50 ml eter ile tüketildi, eterli çözeltiler ayrıldı, sonra gene altı defa 50 ml kloroform ile tüketildi, bu kısım da ayrıldı. Geriye kalan çözelti 2/1 kloroform - etanol karışımı ile alındı, çekilen çözelti vakumda 30°C altında teksif edildi ve sütun kromatografisine tatbik edildi.

Hazırlanan sütunun iç çapı 2,8 cm, boyu 29 cm dir. Sütuna 150 g alüminyum oksit (aktif-basisch Merck 1076) kondu ve aşağıdaki solvan karışımından 10 fraksiyon alındı. Toplanan fraksiyonlar hava akımında kurutuldu ve % 5 nisbetinde metanolde çözülerek kâğıda tatbik edilmiştir.

Metanol-kloroform	1:99	F ₁ -F ₁₀
»	2:98	F ₁₁ -F ₂₀
»	4:96	F ₂₁ -F ₃₀
»	8:92	F ₃₁ -F ₄₀
»	16:84	F ₄₁ -F ₅₀
»	30:70	F ₅₁ -F ₆₀
»	60:40	F ₆₁ -F ₇₀

F_{60} ve daha sonraki fraksiyonları kâğıt kromatografisine tatbikinde tek leke, bundan öncekilerin tatbikinde ise Rf değerleri farklı çeşitli renkte lekeler meydana gelmektedir. F_{50-60} arasındaki fraksiyonları saf hellebrin ile beraber kâğıda tatbik ettiğimizde aynı renk ve hizada karşılıklı iki leke meydana gelmekte, fakat sütun kromatografisi ile bunu diğerlerinden ayırmak mümkün olmamaktadır.

F_{60} ve daha sonraki fraksiyonları bir araya topladık, hava akımında teksif ettikten sonra, metanolde çözüp iki defa sütundan geçirdik (iç çapı 0.8 cm, boyu 15 cm olan sütuna 5 g alüminyum oksit Fluka Typ 5016 A kondu). Madde metanolle alındı, hava akımında kurutuldu. Elde edilen açık sarı renkli madde (e.d. 148-150°C «bloc Maquenne»), metanolde ve % 60 metanol + kloroform karışımında kolay çözünmekte, acı lezzetli ve higroskopiktir. Bu madde % 0.5 nisbetinde metanolde çözülüp çeşitli solvan sistemleri kullanarak kâğıt kromatografisine tatbik edildi.

Revelatör olarak anilin ftalat ve resorsin HCl kullanıldığı zaman hiç bir leke meydana gelmemektedir. Halbuki maddenin asit hidrolizinden sonra meydana gelen hidroliz mahsulü aynı şekilde kâğıda tatbik edildiği zaman anilin ftalatla beliren bir şeker (glikoz) lekesi meydana gelmektedir. Böylece elde edilen bu maddenin glikozit tabiatında olduğu ve asit hidrolizle glikoz ve aglukona ayrıldığı tesbit edilmiştir.

Bu glikozidin saf hellebrin ile birlikte yapılan kromatografik analizlerinde bulunan Rf değerleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir:

Tablo 1. *H. orientalis* var. *hirsutus* toprak altı kısımlarından tecrit edilen glikozitin ve saf hellebrin'in Rf değerleri.

	<i>n. butanol, asetik asit, su</i> 4:1:5 (12)	<i>Butanol, su</i> 1/1 (18)	<i>Pentanol, su</i> 1/1 (15)
<i>H. orientalis</i> glikozidi	0.74	0.65	0.27
Hellebrin	0.50	0.35	0.75

Kâğıt: Whatman No. 1; developman süresi: 16 saat; ısı 20°C ± 1; revelatör: fosvolframik asidin etanoldeki % 25 çözeltisi; metod: yükselen.

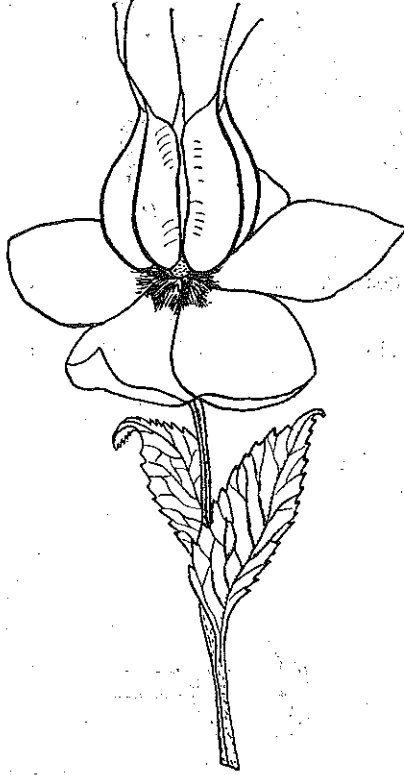
İnce tabaka kromatografisi

Adsorban olarak (alüminyum oksit G nach Stahl), solvan olarak *n* butanol, asetik asit, su 4: 1: 5 ve revelatör olarak da fosvolframik asidin etanoldeki % 25 lik çözeltisi kullanıldı. Üç saat sonunda solvan plakta 7 cm yükselmektedir. Analiz sonunda *H. orientalis* glikozitinin Rf değeri 0.93 olarak hesaplanmıştır, aynı şartlarda hellebrin'in Rf değeri 0.80 olmaktadır.

Renk reaksiyonları

Reaksiyonlar hellebrin ile beraber karşılıklı olarak yapılmış ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

I — Piridinde çözülmüş madde üzerine, taze hazırlanmış % 1 lik sodyum nitro prusiyat çözeltisi ve % 50 potasyum hidroksit ilâvesiy-

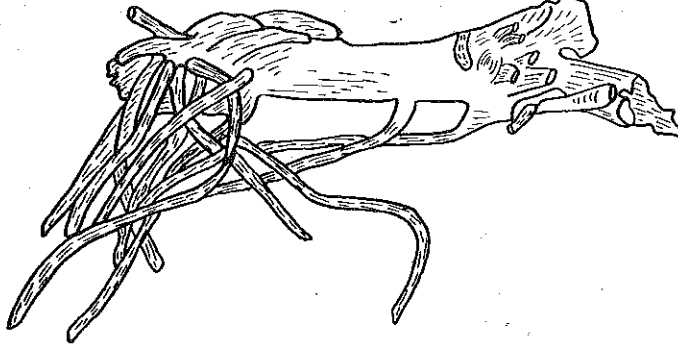


Şekil 3. Meyva (1/2 x)

le kırmızı renk meydana gelmektedir (Legal testi negatif). Hellebrin y lakton halkası ihtiva etmez. Elde edilen glikozit hellebrin gibi bu reaktifle limon sarısı renk vermektedir.

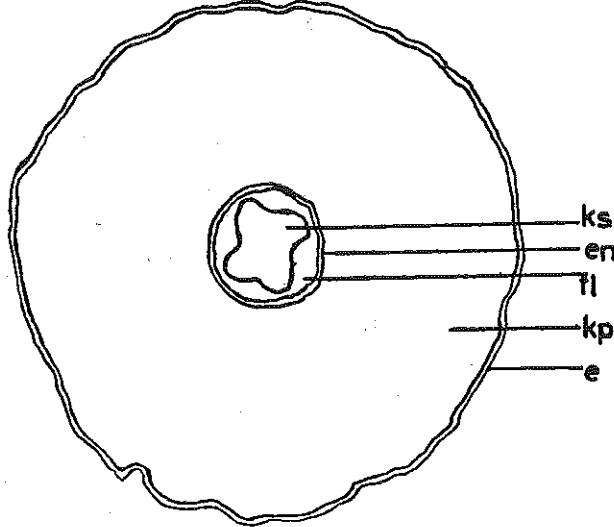
II — Keller-Kiliani reaksiyonu, sülfürik asitle asetik asidin temas yerinde dar kahverengi halka meydana gelmektedir. Bu halkanın üstü pembemsi kahverengiye boyanmaktadır. Halbuki, hellebrin'de bu halkanın alt tarafında sarımsı portakal rengine ve üst tarafında yeşil renkte bir kuşak görünür.

III — Liebermann-Burchard reaksiyonu, her iki bileşikte de müspettir. Hager-Salkowski reaksiyonu ile her ikisinde de koyu kırmızı halka teşekkül etmekte ve iki damla asetik asit anhidriti ile kloroform tabakası sarı yeşile dönmektedir.



Şekil 4. Rizom ve kökler (1/2 x).

IV — Derişik sülfürik asitle iki bileşik de koyu kırmızı renk vermektedir.

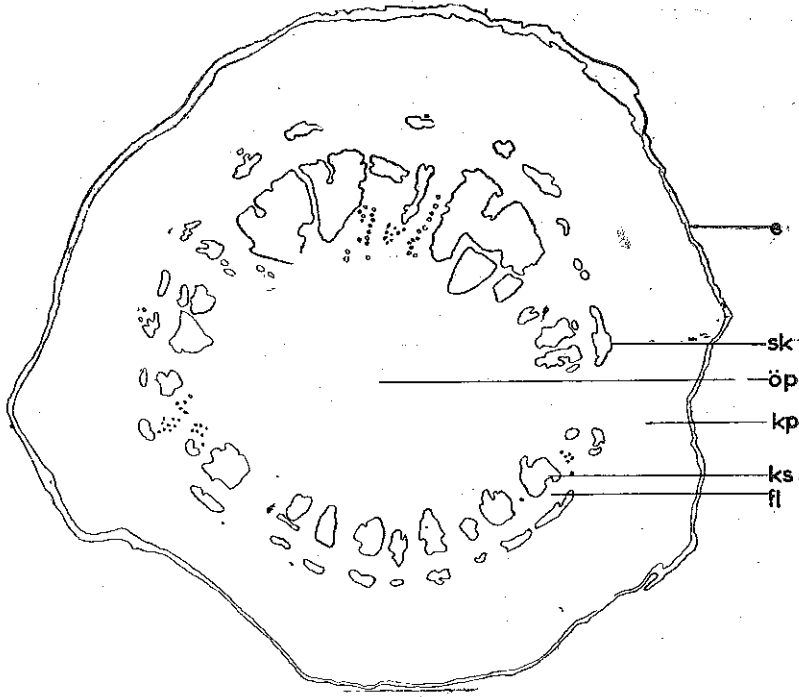


Şekil 5. Kökten enine kesit, şema (30 x): ks ksilem, fl floem, kp kabuk parenkiması, e epiderma.

V — Wasicky reaktifı (19) ile her ikisinde de önce koyu kırmızı renk meydana gelmekte, bu renk 2 saniye sonra mor'a dönmektedir.

Hidroliz

0.20 g *H. orientalis* glikozidi 7 ml % 10 sülfürik asitle 5-6 saat geri çeviren soğutucu altında kaynatıldı, sarımsı bir kısım ayrıldı, soğuduktan sonra iki kere kloroform ile tükettildi, birleştirilen kloroformlu çözeltiler su ile yıkandı, susuz sodyum sülfat ile kurutuldu, süzüldü, kloroform uçuruldu ve 0.012 g açık sarı renkte amorf bir toz olan aglukon ayrıldı. Sulu kısım baryum karbonat ile nötrale edildi (gaz çıkmayınca kadar), meydana gelen çözelti su ile yıkandı, süzüldü ayrıldı, sulu kısım vakumda kuruluğa kadar teksif edildi.



Sekil 6. Rizomdan enine kesit, şema (15 x): e epiderma, sk sklerenkima, öp öz. parenkiması, kp kabak parenkiması, ks ksilem, fl floem.

Bakiye sıcak etanolla alındı, kâğıt kromatografisi analizine tabi tutulduğu zaman, bej zemin üzerinde kahverengi tek leke elde edilmektedir. Kullanılan şahitlere göre çözeltideki şeker glikozdur. Aynı muameleye tabi tutulmuş kâğıt, rezorsin HCl ile revele edildiğinde hiç bir leke meydana gelmemektedir (ramnoz yok).

Aglukon

Ayrılan aglukon, alüminyum oksit sütunundan geçirilerek temizlendi. Adsorban olarak alüminyum oksit Fluka Typ 5016 A kullanıldı. Sütunun iç çapı 0.8 cm, boyu 15 cm; konulan adsorban miktarı 5 g dır. Çözücü olarak metanol-kloroform karışımı kullanılmıştır. Elde edilen sarımsı esmer tozun e.d. 152-154°C (bloc Maquenne). Saf hellebrin'in aynı şekilde hidrolizi ile elde edilen aglukonu (hellebrigenin) kâğıt kromatografisine tatbik edildiği zaman, *H. orientalis* glikozitinin aglukonu ile hellebrigenin aynı Rf değerlerine sahip oldukları görülmüştür. Rf değerleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 2. *H. orientalis* var. *hirsutus* toprak altı kısımlarından tecrit edilen glikozitin aglukonu ve hellebrigenin'in Rf değerleri.

	Benzen, kloroform n-butanol, asetik 1/1 formamitle asit, su 4:1:5 (12) doyurulmuş (3)	Kloroform, form- amid 1/1 (14)
<i>H. orientalis</i> glikozitinin aglukonu	0.07	0.98
Hellebrigenin	0.07	0.98

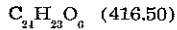
Kâğıt: Whatman No.1; developman süresi: 7 saat; ısı: 20°C \pm 1; revelatör: krosfovolframik asitin etanoldeki % 25 çözeltisi; metod: yükselen.

Elementel Analiz

Elementel analiz Alfred Bernhardt mikro analiz laboratuvarında (*) yapılmış ve aşağıda gösterilen % C, H miktarları bulunmuştur.

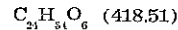
Hellebrin'in hidrolizi ile elde edilen aglukon (hellebrigenin)'un kapalı formülü iki ayrı şekilde gösterilmiştir (16, 17).

Formül (1)



Hesaplanan: % 69,20 C, % 7,74 H

Formül (2)

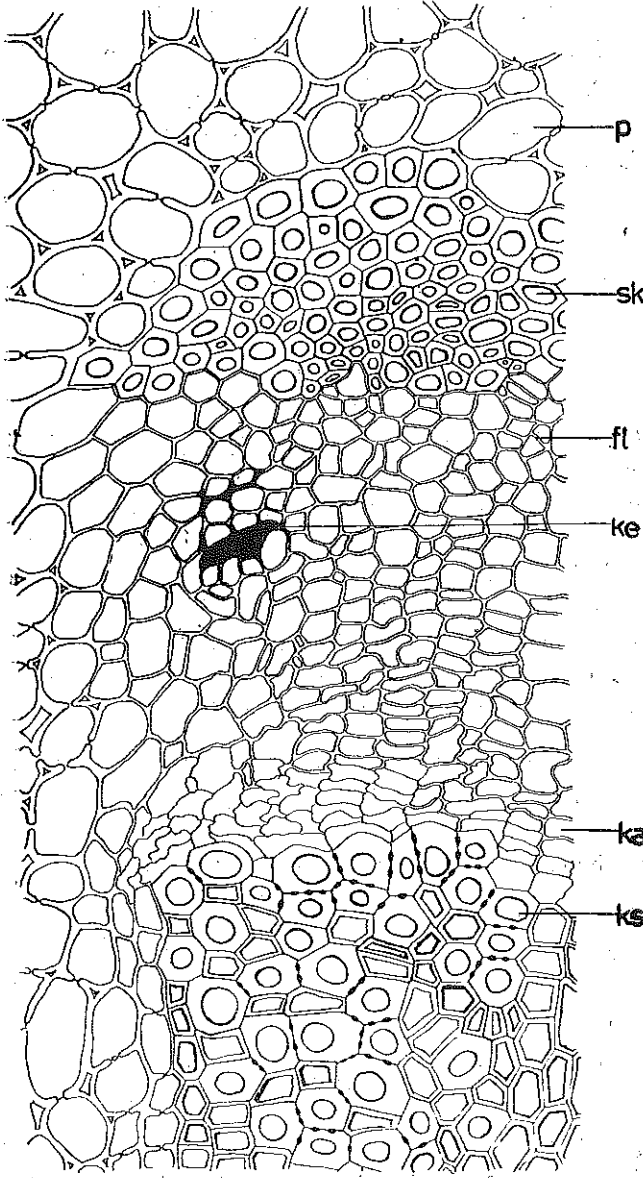


% 68,87 C, % 8,18 H

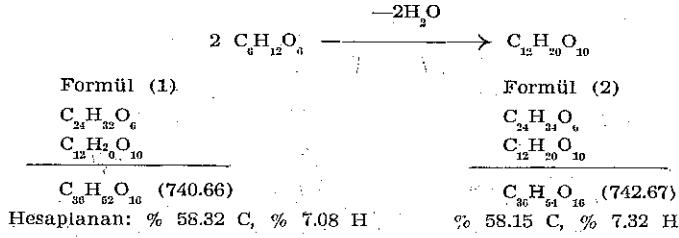
Analiz neticesi: 0.887 mg maddeden hareket ederek 2.24 mg CO₂, 0.80 mg H₂O ve % 69,15 C, % 10 H bulunmuştur.

Elde edilen glikozidin hidrolizi ile aglukon yanında şeker olarak glikoz teşhis edilmiştir, bunun iki mol olduğu düşünülerek bulunan iki ayrı formül aşağıda gösterilmiştir:

(*) Mikroanalytisches Laboratorium, 443 Mülheim (Ruhr), Höhenweg 17, Almanya.



Şekil 7. Rizomdan enine kesit (245 x): p parenkima, sk sklerenkima, fl floem,



Analiz neticesi: 1.875 mg maddeden hareket ederek 4.00 mg CO₂, 1.37 mg H₂O ve % 58.22 C, % 8.18 H bulunmuştur.

S O N U Ç

Anadolu'da yetiştiği bilinen 4 *Helleborus* türünden en yaygın olanı *H. orientalis* Lam. var. *hirsutus* (Schiffn.) Hay. dir.

Bu tür üzerinde yapılmış olan çalışmalarda, köklerden elde edilen ham hülâsalar üzerine tatbik edilen renk reaksiyonuna dayanarak, hellebrin'in bu türde de bulunduğu ileri sürülmüştür.

Saf hellebrin ile yaptığımız karşılıklı mukayeseler sonunda kullanılan renk reaksiyonunun hellebrin için spesifik olmadığını gördük, saf hellebrin Wasicky reaktifi ile eozin kırmızısı değil, mor renk vermektedir. Eozin kırmızısı rengi gliko-saponinlere aittir (4).

Köklerden hazırladığımız bir hülâsanın kâğıt kromatografisi ile tetkikinde elde edilen lekelerden birinin hellebrin ile aynı renk ve Rf değerinde bulunduğu görülmüştür. Fakat kullandığımız birçok usullere rağmen, hellebrin ile aynı renk ve Rf değerinde lekeyi veren maddeyi saf olarak ayırmamız mümkün olmadı. Buna karşılık bu türden saf bir glikozit tecrit ettik. Elde ettiğimiz bu glikozidin aglukon kısmı, hellebrinin aglukonu olan hellebrigenin ile aynı, şeker kısmı ise hellebrinde bulunan ramnoz ve glikozdan farklı olarak 2 mol glikozdan ibarettir.

Ö Z E T

H. orientalis Lam var. *hirsutus* (Schiffn.) Hay., morfolojik, anatomik ve kimyasal olarak incelenmiştir. Bu tür Türkiye'nin kuzey bölgesinde (Trakya, İstanbul, Kocaeli, Sakarya, Bolu, Samsun, Trabzon) yayılmıştır. Anadolu menşeli diğer *Helleborus* türlerinden yapraklarının alt yüzünün tüylü olması ile kolayca ayırt edilir. *H. orientalis* rizomlarının

anatomik yapısı ile hâlen tedavi sahasında kullanılan *H. niger* rizomları arasında mühim farklar mevcut değildir. Bununla beraber *H. orientalis* rizomlarının iletme demetlerinin üzerinde sklerenkima demetlerinin bulunması, bu iki türün rizomları arasında ayırıcı bir karakter teşkil etmektedir.

Bu türün, İstanbul civarında toplanan toprak altı kısımları (kök ve rizom) üzerinde yapılan kimyasal araştırmalar sonunda şu neticelere varılmıştır:

a — Rutubet: % 8.7; kül: % 13.3; asitte erimeyen kül % 8.3.

b — Tanen, flavon ve antrakinon tipi glikozitler ve alkaloid bulunmaktadır.

c — İnfüzyon ve tentüründe fazla miktarda redüktör şeker (glikoz, fruktoz) ve sakkaroz bulunmuştur.

d — Nümunenin metanollü hülâsası kâğıt kromatografisine tatbik edildiğinde hellebrin ile aynı renk ve Rf değerinde bir leke meydana gelmektedir. Fakat bu lekeyi veren glikozit saf olarak tecrit edilememiştir.

e — Kapalı formülü $C_{20}H_{32}O_{16}$ ve e.d. 148-150°C (bloc Maquenne) olan glikozit yapısında bir bileşik elde edilmiştir. Bu glikozit kimyasal bakımından hellebrin'e çok yakındır. Asit hidroliz sonucu hellebrigenin ve 2 mol glikoza ayrılır.

S U M M A R Y

We studied on the *H. orientalis* Lam. var. *hirsutus* (Schiffn.) Hay. anatomically, morphologically and made some chemical investigations on the subterranean parts of the plants.

This species is widely spread along the Black Sea region of Turkey (Trakya, İstanbul, Kocaeli, Sakarya, Bolu, Samsun, Trabzon) and it can be easily distinguished from the other wild species of Anatolia by being pubescent on the lower surface of the leaves.

There is no other important anatomical difference between *H. orientalis* and *H. niger* rhizomes which is used in therapeutics, except that *H. orientalis* rhizomes have sclerenchyma bundles above the phloem islands.

Chemical studies were carried on the underground parts (roots and rhizomes) of the plants collected in the outskirts of the city of İstanbul and the following results are obtained:

- a — In the dry sample, there are about 8.7 per cent of moisture, 13.3 per cent of total ash and 8.3 per cent acid - insoluble ash.
- b — Tannins, flavons, antraquinone derivatives and alkaloids are not present.
- c — Its infusion and tincture have reducing sugar (glucose, fructose) and saccharose.
- d — The methanolic extract is applied on the paper chromatography. A spot which detected by the use of the following reagents (antimony trichlorid and phosphotungstic acid reagents) gave the same colour and the same Rf value as hellebrin. We could not isolate hellebrin in the pure form.
- e — A substance having a glycosidal structure with formula $C_{36}H_{62-64}O_{16}$ and melting point 148-150°C (bloc Maquenne) was isolated. It yielded on hydrolysis by acid, hellebrigenin and 2 molecules glucose.

L I T E R A T Ü R

- 1 — BAYTOP, T., *Türkiyenin Tıbbi ve Zehirli Bitkileri*, 135, İstanbul (1963).
- 2 — BOISSIER, E., *Flora orientalis* 1, 60, Geneva (1867).
- 3 — BOLLIGER, R., MEYER, K., Toad poisons XI. Isolation and identification of the poisonous secretion of *Bufo mauretanicus*, - Ref. C.A. 52, 5442a (1958).
- 4 — FISCHER, R., *Praktikum der Pharmakognosie*, 226, Wien (1952).
- 5 — GARNIER, G., BEZANGER-BEAUQUESNE, L., DEBRAUX, G., *Ressources Médicinales de la Flore Française*, 1, 439-446, Paris (1961).
- 6 — GÜLEY, M., *Ankara Üniv. Veteriner Fak. Der.*, 7, 114-123 (1960).
- 7 — GÜRGEN, A.R., *Ankara Y. Ziraat Enst. Yay.*, No. 138, 92 (1943).
- 8 — HAYEK, A., *Prodromus Florae peninsulae, balcanicae*, 1, 298, Berlin (1927).
- 9 — KANTEMİR, İ. TEMELİ, E., *Ankara Üniv. Tıp Fak. Mec.*, 16, 25-36 (1963).
- 10 — KARRER, W., *Helv. Chim. Acta*, 26, 1353 - 1365 (1943).
- 11 — MALKOÇ, G., *Helleborus orientalis* Lam. var. *hirsutus* (Schiffn.) Hay. bitkisi üzerinde farmakognozik araştırmalar, *İstanbul Üniv. Eczacılık Doktora Tezi* (1965).
- 12 — PARTRIDGE, S.M., *Biochem. J.*, 42, 238 (1948).
- 13 — POST, V.D., *Boğaziçi ve dolayları florası*, 10, İstanbul (1945).
- 14 — REES, R., SCHINDLER, O., REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*. 42, 1052-1065 (1949).

- 15 — SCHECK, G., SADDE, H., *Arch. Pharm.*, 288/60, 101-102 (1955).
- 16 — SCHMUTZ, J., *Pharm. Acta Helv.* 22, 373-380 (1947).
- 17 — SCHMUTZ, J., *Helv. Chim. Acta*, 32, 1442 - 1452 (1949).
- 18 — SIKL, D., BAUER, S., MASLER, V., *Planta Med.*, 94-96 (1961).
- 19 — WASICKY, R., *Physiopharmakognosie*, 35, Wien (1932).

(Redaksiyona verildiği tarih: 15 mart 1965)