

T. C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
KESİN RAPORU

Proje Başlığı

Türkiye’de Yetişen *Erica L.* Türlerinin Antioksidan Etkilerinin Tayini

Proje Yürütücüsünün İsmi

Doç. Dr. Ayşegül Güvenç

Proje Numarası

2003 08 03 044

Başlama Tarihi

12 Aralık 2003

Bitiş Tarihi

02 Ağustos 2007

Rapor Tarihi

14 Mart 2008

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri

Ankara-2007

I. Projenin Türkçe ve İngilizce Adı ve Özeti

Projenin Türkçe Adı

Türkiye’de Yetişen *Erica* L. Türlerinin Antioksidan Etkilerinin Tayini

Projenin İngilizce Adı

Valuation of antioxidant activities of *Erica* species native to Turkey

Özet

Dünya’da 700’ün üzerinde türe sahip olan *Erica* cinsinin Türkiye’de *E. arborea* L., *E. manipuliiflora* Salisb., *E. sicula* Guss. subsp. *libanotica* (C.& W. Barbey) P.F. Stevens (dar yayılışlı) ve *E. bocquetii* (Peşmen) P.F. Stevens (endemik) olmak üzere dört türü doğal olarak yetişmektedir. Anadolu’nun hemen hemen bütün sahil yörelerinde yetişen bu türlerin toprak üstü kısımlarından hazırlanan çay idrar yolları antiseptiği, idrar söktürücü ve kabız edici olarak kullanılmaktadır. Yapraklarından hazırlanan çay zayıflatıcı etkisi nedeniyle önerilmektedir. Bu çalışmanın amacı Türkiye’de doğal olarak yetişen *Erica* türlerinin antioksidan aktivitesinin belirlenmesidir. Bu amaçla, öncelikle türlerin total fenolik madde miktarı belirlenmiştir. Antioksidan aktivite tayini iki farklı yöntemle çalışılmıştır: **1-** serbest radikal süpürücü aktivitenin tayini için DPPH• yöntemi, **2-** liposom lipid peroksidasyonunu tayin etmek için TBA yöntemi. Pozitif kontrol olarak propil galat kullanılmıştır. En yüksek fenolik madde miktarı ve en yüksek antioksidan aktivite bütün türlerin etil asetat ekstraktlarında gözlemlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Ericaceae, *Erica*, Funda, Antioksidan aktivite

Summary

The genus *Erica* L. (Ericaceae) is represented by more than 700 species on the world, and mainly found in the South Africa, furthermore Mediterranean and West Europea. This genus is represented only four species of which one taxon (*E. bocquetii* (Peşmen) P. F. Stevens) is endemic in Turkey. Among the other species, *E. arborea* L. and *E. manipuliiflora* Salisb. are widespread species common in the coastal sides in Turkey, while *E. sicula* Guss. subsp. *libanotica* (C.& W. Barbey) P. F. Stevens has a limited distribution in South West Anatolia. Herbal teas are prepared from aerials parts of *E. arborea* and *E. manipuliiflora* have been

popularly used as diuretic, astringent and treatment of urinary infections in Turkey. In particular, a glass of 5% infusion or decoction of *E. arborea* leaves is suggested after meals to discharge the edema from the body in slimming formulations. The aim of this study was to determine the antioxidant activity of *Erica* species in Turkey. First, total phenolics of all species have been determined. The antioxidant activities were studied by two different techniques: **1-** DPPH• assay to detect the free radical scavenging activity, **2-** the TBA-assay to detect liposome lipid peroxidation. Propyl gallate was used as a positive control. The highest phenolics and high antioxidant activity were observed in ethyl acetate extracts of all species.

Keywords: Ericaceae, *Erica*, Funda, Antioxidant activity

II. Amaç ve Kapsam

Erica L. cinsi çoğunluğu Himalayalar, Yeni Gine ve Güney Afrika'da yayılış gösteren, dünyada 100 cins ve 3000 türü kapsayan Ericaceae familyası içerisinde yer almaktadır (Heywood, 1979). Bu familya Türkiye'de 12 cins ve 30 tür ile temsil edilmektedir. Yurdumuzda sahillere yakın makiliklerin çoğunu Ericaceae familyasına ait oluşturmaktadır. (Zeybek ve Zeybek, 1994).

Dünyada 700'ün üzerinde türe sahip olan, her dem yeşil çalılardan oluşan *Erica* L. cinsi Güney Afrika'da geniş bir dağılım gösterir (Oliver ve Oliver, 2002). *Erica* L. cinsinin Türkiye'de *Erica arborea* L., *E. manipuliflora* Salisb., *E. sicula* Guss. subsp. *libanotica* (C. & W. Barbey) P. F. Stevens ve *E. bocquetii* (Peşmen) P. F. Stevens (Endemik) olmak üzere dört türü doğal olarak yetişmektedir (Stevens 1978). IUCN Kırmızı Liste Kategorilerine göre *Erica sicula* subsp. *libanotica* ve *Erica bocquetii* (Endemik) türleri VU (zarar görebilir) kategorisinde değerlendirilmiştir (Ekim ve ark., 2000).

Anadolu'nun hemen hemen bütün sahil yörelerinde yetişen bu türler halk arasında "funda, püren, süpürge çalısı" isimleriyle bilinmektedir. Ülkemizde *Erica* türlerinin çiçekli ve yapraklı dalları **Herba Ericae** adıyla bilinir ve halk arasında, özellikle *E. arborea* ve *E. manipuliflora*'nın bu kısımlarından hazırlanan çay, idrar yolları antiseptiği, idrar söktürücü ve kabız etkilere sahiptir (Baytop, 1999, Tuzlacı ve Eryaşar Aymaz 2001). Funda yaprağının (*E. arborea*) % 5'lik infüzyonu yemeklerden sonra 1 bardak içilerek zayıflamak için kullanıldığı kayıtlıdır (Başer ve ark., 1986). Ayrıca, *E. arborea* İtalya'da dekoksiyon şeklinde diüretik olarak (Antonone et al. 1988); *E. multiflora* Fas'ta diüretik ve antiseptik olarak (Harnafi et al.,

2007) İspanya’da ise aynı tür yara tedavisinde halk arasında kullanılmaktadır (Rios et al. 1987).

Erica türleri, flavonoidler (Bennini et al., 1995; Chulia et al, 1995; Gournelis 1995), antosiyanozitler (Crowden ve Jarman, 1976), kumarinler (Vieitez & Ballester, 1972; Ballester et al., 1975) ve terpenik bileşikler (Ayuso Gonzales et al., 1991) gibi birçok aktif bileşik taşımaktadır. Cinsin değişik türleri üzerinde yapılan biyolojik aktivite çalışmalarına göre değişik türlerinin antiülser (Reyes Ruiz et al., 1996), antimikrobial (Toro Sainz et al., 1987; Aumente Rubio et al., 1988; Ayuso Gonzales et al., 1991; Güvenç et al., 2008), anti-inflamatuvar ve antinosiseptif (Küpeli ve ark. 2008) ve sitotoksik (Martin-Cordero et al., 2001) aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir. Cinsin antioksidan aktivitesi üzerinde yapılmış çalışmalar oldukça azdır (Ay ve ark. 2007).

Reaktif oksijen radikalleri biyolojik sistemlerdeki değişik metabolik olaylar sırasında oluşmaktadır. Oksidanlar ve insan hastalıkları arasındaki ilişki oksidan ve antioksidan arasındaki ilişkiye bağlıdır. Vücutta oksidanların artması veya antioksidanların azalması sonucu oksidanlar normal biyolojik makro moleküllerle kolaylıkla etkileşebilirler. Bu etkileşim kritik moleküllerde ve yeterli şiddette meydana geldiği zaman doku harabiyeti oluşabilir. Aktif oksijen radikallerinin pulmoner oksijen toksisitesi, iskemi sonrası perfüzyon hasarı, iltihabi durumlar, Alzheimer hastalığı, yaşlanma ve birçok kimyasalların toksisitesinin nedeni olabileceğine inanılmaktadır (Aydın ve ark. 1997). Bu projenin amacı, ülkemizde doğal olarak yetişen ve özellikle drog olarak kullanımı da olan *Erica* türlerinin antioksidan aktivitelerini belirlemektir.

Kaynak çalışmaları sırasında, *Erica* cinsinin flavonoit yapısındaki bileşikleri taşıması nedeniyle de antioksidan aktivite yönünden incelenmesi düşünülmüştür. Çünkü flavonoitler serbest radikalleri yok ederek antioksidan etki göstermektedir (Pietta, 2000; Conforti ve ark. 2002). Halk arasında kullanımı olan bu cins üzerinde yapılacak çalışmalarla bilim dünyasına yeni bilgiler aktarması düşünülmektedir.

III. Materyal ve Yöntem

Bitki Materyali

Bu çalışmada kullanılan bitkisel materyaller çiçeklenme döneminde Türkiye’nin çeşitli yerlerinden toplanmıştır. Bitkilerin toprak üstü kısımlarından örnekler alınmış ve herbaryum numuneleri hazırlanmıştır. Bu örnekler Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryum’unda (AEF) muhafaza edilmektedir. Çalışmada kullanılan türlerin toplandığı

istasyonlar tablo 1’de verilmiştir. Çalışmada kullanılmak üzere, bütün türlerin toprak üstü kısımları oda sıcaklığında ve gölgede kurutulmuştur. Kurutulmuş bitki örneklerinden, deneylerde kullanılmak üzere, gerekli miktarlarda numune değirmende toz edilmiştir.

Tablo 1. *Erica* türlerinin toplandığı istasyonlar

TÜR	İSTASYON
<i>E. arborea</i> L.	A3 Bolu: Akçakoca-Bolu arası, Akçakoca çıkışı, yol kenarları. 19. v. 2006, <i>A. ve U. Güvenç, M. Coşkun</i> (AEF 23874!)
<i>E. manipuliflora</i> Salisb.	C5 Mersin: İçel-Antalya yolu, Aydıncık civarı, 08.vi.2007, <i>A. ve U. Güvenç</i> (AEF 23978!)
<i>E. sicula</i> Guss. subsp. <i>libanotica</i> (C. & W. Barbey) P. F. Stevens	C3 Antalya: Antalya-Kemer arası, Beldibi, Göynük deresi, vadi içi, kayalık üzeri, 42 m, 10.v.2003, <i>R. S. Göktürk, G. Kendir</i> (AEF 23009!)
<i>E.bocquetii</i> (Peşmen) P. F. Stevens	C2 Antalya: Elmalı, Çıglıkara, Tekke köyü çıkışı, Topbaş mevki, <i>Cedrus libani</i> altı kayalıklar, 1750 m, 19.vii.2003, <i>A. ve U. Güvenç, R. S. Göktürk</i> (AEF 23016!)

Ekstrelerin Hazırlanması:

1-Sulu ekstreler

20’şer g toz edilmiş bitkinin toprak üstü kısımları 250 ml’lik balonlara alındı ve üzerine 100 ml distile su ilave edilerek geri çeviren soğutucuda yarım saat kaynatıldı, ekstre sıcakken süzgeç kağıdı ve pamuktan süzüldü. Elde edilen ekstreler soğuduktan hemen sonra buzdolabında donduruldu ve daha sonra liyofilize edildi.

2- Metanol ekstresi

20 g toz drog 250 ml metanol ile Soxhlet apereyinde 8 saat boyunca tüketildi. Elde edilen metanollü ekstre süzüldü ve rotavaporda 40 °C’de kuruluğa kadar uçuruldu.

3- Fraksiyonlama

40 g toz drog 250 ml metanol ile Soxhlet apereyinde 8 saat boyunca tüketildi. Elde edilen metanollü eksre süzüldü ve rotavaporda 40 °C’de kuruluğa kadar uçuruldu. Kurutulmuş ekstre Metanol:Su (1:9) karışımı içinde dispers edildi. Daha sonra sırasıyla 50’şer ml diklormetan, etilasetat ve *n*-butanol ile ayırma hunisinde çalkalandı. Elde edilen kloroform, etilasetat ve *n*-butanol ekstreleri rotavaporda kuruluğa kadar uçuruldu.

Uygulanan Testler

A. Total Fenolik Madde Miktar Tayini

Bitkilerin antioksidan aktivitelerinin tayini yanında total fenolik madde içeriğinin de ölçülmesi gereklidir. Folin-Ciocalteu (Sigma F 9252) reaktifi kullanılarak fenolik maddeler ile renk oluşumu yöntemini uygulamak suretiyle, bitkide bulunan fenolik bileşiklerin ölçümü genelde tercih edilen bir yöntemdir. Çünkü çoğu bitkisel antioksidanlar büyük oranda polifenolik bileşikler içermektedir (Brand-Williams ve ark. 1995; Javanmardi ve ark. 2003; Yıldırım ve ark. 2003; Kumazawa ve ark. 2004). Ekstrelerin içerdikleri toplam fenoller gallik asite eşdeğer olarak Folin-Ciocalteu yöntemi (Slinkard ve Singleton 1977) kullanılarak hesaplandı.

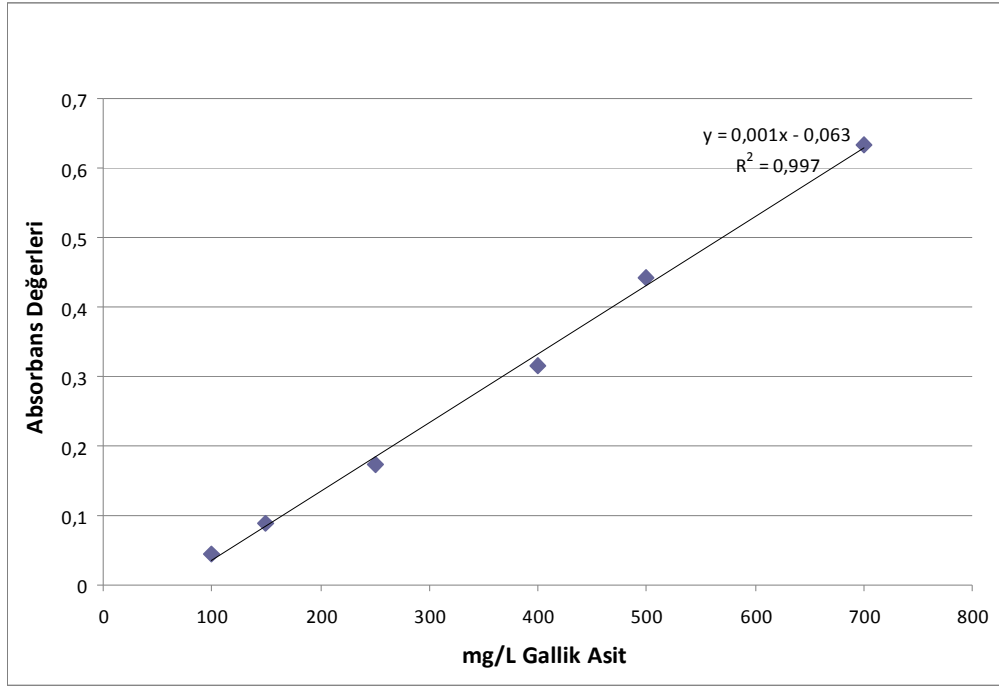
Gallik asit kalibrasyonu:

0.5.g gallik asit balon jodede ultrasonik banyo içinde 10 ml etanolde çözülerek, aynı çözücü ile 100 ml'ye tamamlandı (stok çözelti).

Stok çözültiden değişik dilüsyonlar hazırlanarak Folin-Ciocalteu yöntemi (Slinkard ve Singleton 1977) uygulandı. Her bir dilüsyon üç tekrarla çalışıldı. Kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında kullanılan gallik asit dilüsyonları ve elde edilen absorbans değerleri Tablo 1'de verilmektedir. Gallik asit konsantrasyonuna karşı absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile gallik asit için kalibrasyon grafiği elde edildi (Şekil 1).

Tablo 1. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanmasında Kullanılan Gallik Asit Konsantrasyonları ve Absorbans Değerleri

Konsantrasyon (mg/L)	1. ölçüm	2. ölçüm	3. ölçüm
100	0.045	0.043	0.045
150	0.078	0.102	0.085
250	0.175	0.175	0.173
400	0.316	0.316	0.312
500	0.452	0.441	0.432
700	0.634	0.630	0.637



Şekil 1. Gallik Asit Kalibrasyon Grafiği

Gallik asitin konsantrasyona karşı absorbans eğrisi aşağıdaki denklemlerle tanımlanmıştır:

$$y = 0.001 x - 0.063 \quad (r^2 = 0.997)$$

Tayin Yöntemi:

Esktrelerin içerdikleri toplam fenoller gallik asite eşdeğer olarak Folin-Ciocalteu yöntemi (Slinkard ve Singleton 1977) kullanılarak hesaplandı. 20 µl numune alınarak üzerine 1580 µl distile su ve 100 µl Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edildi. 2 dak sonra 300 µl % 20'lik sulu Na₂CO₃ ilave edilerek karışım vorteks ile karıştırıldı. Kontrol olarak ekstre içermeyen reaktif karışımı kullanıldı. 2 saat 25 °C'de inkübe edildikten sonra absorbans 765 nm'de ölçüldü ve gallik asit kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırıldı. Toplam fenolik madde miktarı gallik asite eşdeğer olarak (mg_{gallik asit} / g_{ekstre}) hesaplandı. Üç paralel deney yapılarak sonuçlar ortalama değerler olarak verildi.

B. Antioksidan Aktivite Tayini

Bu çalışma sırasında antioksidan aktivitenin belirlenmesi için uygulanan testlerin hepsi *in-vitro* yöntemlerdir. Serbest radikal süpürücü aktivite tayini için kalitatif ve kantitatif DPPH[•] yöntemi, liposom lipid peroksidasyonunu belirlemek için de TBA yöntemi kullanılmıştır.

Bitkilerin antioksidan aktivitelerinin tayini için DPPH radikal yakalama aktivitesi çok kullanılan bir yöntemdir. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) (Aldrich D 211400) radikallerinin renk değiştirmesi esasına dayanan radikal yakalama ölçüm yöntemi, stabilitesi, kolaylığı ve tekrarlanabilirliği nedeniyle çok kullanılan bir yöntemdir (Brand-Williams ve ark. 1995).

İn-vitro antioksidan aktivite testlerinden olan TBA testinde, lipozomlarda oluşan lipid peroksidasyonu, bileşiklerin koruyucu etkinliklerinin saptanmasında kullanılır. Peroksidasyon, birçok zar sisteminde, malonaldehit (MDA) oluşumuna yol açar. Asitli ortamda, MDA ile TBA 1:2 oranında reaksiyona girerek oluşan renkli bileşik organik çözücülerle kolaylıkla ekstre edilebilir ve 532 nm’de ışığı absorbe eder. Bu renkli bileşiğin renginin şiddeti MDA konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve konsantrasyonu spektrofotometrik olarak saptanabilir. Lipid peroksidasyonun oluşumu sırasında, ortamda bulunan antioksidan etkili bileşikler, peroksidasyonun redüklenmesine neden olup, renk oluşumu ve absorbansın azalmasına neden olurlar (Conforti et al. 2002; Güvenç ve ark. 2005).

1- Kalitatif DPPH• Yöntemi

10 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan ekstreler Wiretrol II mikropipetler kullanılarak 5 µL miktarda İTK plaklarına (MERCK 5554) uygulandı. Oluşan lekeler üzerine DPPH•’in etanol içindeki % 0.2’lik çözeltisi püskütülerek 20 °C’de 30 dakika bekletildi. Bu süre sonunda eflatun renkli zemin üzerinde oluşan sarı renkli lekeler gözlemlendi (Güvenç ve ark. 2005).

2- Kantitatif DPPH• Yöntemi

7 değişik konsantrasyonda hazırlanan (10 mg/ mL, 5 mg/ mL, 2.5 mg/ mL, 1.25 mg/ mL, 0.625 mg/ mL, 0.3125 mg/ mL, 0.15625 mg/ mL) herbir ekstreten 0.1 mL tüp içine alındı. Üzerlerine 2.9 mL 10⁻⁴ M, DPPH• ilave edilip 30 °C’lik su banyosunda 30 dak. bekletilip 517 nm’de spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601 UV/VIS) ölçüldü (Brand-Williams et al. 1995). DPPH• absorpsiyonundaki renk değişimi aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Numune}}) / A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

Her bir ekstre için ayrı ayrı hesaplanan % inhibisyon değerleri ile konsantrasyon değerlerinden, lineer regresyon analizi kullanılarak IC₅₀ değerleri hesaplandı. Pozitif kontrol olarak kullanılan propil gallat, 1 mg/mL ile 6,4x10⁻⁵ mg/mL değişen yedi konsantrasyonda

denenmiştir. Her bir ekstre ve propil galat için üç paralel deney yapılmış sonuçlar ortalama değerler olarak verilmiştir.

3- Tiyobarbutürik Asit (TBA) Yöntemi

Yedi farklı konsantrasyonda (1 mg/ mL, 0.5 mg/ mL, 0.25 mg/ mL, 0.125 mg/ mL, 0.0625 mg/ mL, 0.03125 mg/ mL, 0.015625 mg/ mL) hazırlanan ekstreler üzerine 0.05 mg/mL konsantrasyonda beyin ekstresi (Sigma B 3635) eklenerek 5 mg/mL fosfat tamponlu (Sigma P 4417) ortamda test edildi. Örneklerin peroksidasyonu, 0,1 mL FeCl₃ (1mM) (Sigma F 1513) ve 0,1 mL askorbik asit (1mM) (Aldrich 255564) ilavesi ile 37 C'de 20 dakika inkübe edilerek sağlandı. İyi bir antioksidan olarak bilinen askorbik asit, demir ve bakır gibi belirli iletken metal iyonlarının varlığında prooksidan özellik gösterir. Bu nedenle TBA (Sigma T 5500) testi boyunca, lipid peroksidasyonunun önlemesi için etanol içinde çözülmüş BHT (Sigma B 1378) eklendi. 1 mg/mL ile 6,4x10⁻⁵ mg/ml arasında değişen konsantrasyonda hazırlanan propil gallat (Aldrich P 53306) pozitif kontrol olarak kullanıldı. Deneyler her bir ekstre için 4 kez tekrarlandı. Lipid peroksidasyonunun % inhibisyonu, inhibitör konulmamış reaksiyon karışımının absorbansı ile değerlendirildi. Karışımların absorbansları, 532 nm'de spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601 UV/VIS) ölçüldü. Çalışmada dört paralel deney yapıldı.

Lipid peroksidasyonunun % inhibisyonu şu formülle hesaplandı:

$$\% \text{ İnhibisyon} = 100 \times [(FRM-B) - (ET-B-EA)] / (FRM-B)$$

FRM: Tüm reaksiyon karışımının absorbansı (lipozom + demir kaynağı + test maddesinin bulunmadığı çözücü)

B: Kör karışımının (yalnızca lipozomun bulunduğu) absorbansı

ET: Test maddesinin içinde bulunduğu toplam karışımın absorbansı

EA: Yalnızca ekstrenin bulunduğu karışımın absorbansı

Ekstrelerin ve referans olarak kullanılan propil gallat'ın IC₅₀ değerleri, % inhibisyon değerleri ile konsantrasyon değerlerinden, lineer regresyon analizleriyle hesaplandı (Halliwell ve Chirico, 1993; Güvenç ve ark. 2005).

C. Flavonoid Tayini

10 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan ekstreler Wiretrol II mikropipetler kullanılarak 5 µL miktarda İTK plaklarına (MERCK 5554) uygulandı. CHCl₃:MeOH:Su (80:20:2) çözücü sisteminde sürüklenen lekeler % 1 vanilin -H₂SO₄ çözeltisi püskütülerek 110 °C'de 5 dakika bekletildi. Bu süre sonunda zemin üzerinde oluşan kahverengimsi mor renkli lekeler gözlemlendi (Güvenç ve ark. 2005; Küpeli ve ark. 2008).

IV. Analiz ve Bulgular

Total Fenolik Madde Miktarları

Çalışmamızda materyal olarak kullandığımız 4 *Erica* türünden hazırlanan sulu, metanollü ve metanollü ekstrenin fraksiyonlanması ile elde edilen kloroform, etil asetat ve *n*-butanollü ekstrelerin Folin-Ciocalteu yöntemi (Slinkard ve Singleton 1977) kullanılarak elde edilen total fenolik madde miktarları Tablo 2'de verilmiştir.

Antioksidan Aktivite Tayini

1- Kalitatif DPPH• Yöntemi

10 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan ekstrelerin İTK plaklarına uygulanması ve oluşan lekeler üzerine DPPH• çözeltisi püskürtülmesinden sonra 20 °C'de 30 dakika bekletilmesi sonunda eflatun renkli zemin üzerinde oluşan sarı renkli lekeler Şekil 2'de görülmektedir.

2- Kantitatif DPPH• Yöntemi

7 değişik konsantrasyonda hazırlanan her bir ekstrenin 10⁻⁴ M DPPH• ile radikal süpürücü etkisi IC₅₀ değeri olarak Tablo 3'te verilmiştir.

3- Tiyobarbutürik Asit (TBA) Yöntemi

TBA yönteminde lipozomlar üzerine *Erica* türlerinin göstermiş olduğu antioksidan aktivite değerleri Tablo 4'te verilmiştir.

V. Sonuç ve Öneriler

Bu çalışmada ülkemizde doğal olarak yetişen dört *Erica* (Ericaceae) (*E. arborea*, *E. manipuliflora*, *E. sicula* subsp. *libanotica* ve *E. bocquetii*) türü, antioksidan aktiviteleri

yönünden incelenmiştir. Bu amaçla bitkiler, Türkiye Florası'ndaki (Stevens 1978) kayıtlar ile değişik herbaryumlardaki (AEF; GAZİ ve ANK) lokalite kayıtlarına göre belirlenen istasyonlardan toplanmış ve uygun şekilde kurutulmuşlardır. Her bir türün toprak üstü kısımlarından, yöntemler kısmında verilen ekstraksiyon ve fraksiyonlama işlemleri ile elde edilen, su, MeOH, CHCl₃, EtOAc ve *n*-BuOH ekstraherinin, total fenolik madde içerikleri ve iki farklı *in-vitro* yöntemle antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir.

Çalışma sırasında hazırlanan bütün ekstraherler içinde, EtOAc ekstraherleri hem total fenolik madde içeriği hem de antioksidan aktivite değerleri açısından en aktif ekstraher olarak belirlenmiştir. Türler açısından değerlendirildiği zaman en yüksek aktivite *E. manipuliiflora*'da en düşük aktivite ise *E. sicula* subsp. *libanotica*'da tespit edilmiştir. Bu sonuçlar daha önce çalışıp yayınladığımız antimikrobiyal aktivite (Güvenç ve ark. 2008) ile antienflamatuvar ve antinosiseptif aktivite (Küpeli ve ark. 2008) çalışmalarının sonuçları ile de uyumludur. Yine Ay ve arkadaşlarının *E. arborea* üzerinde yaptıkları antioksidan aktivite çalışmasının sonuçları ile de uyumludur (Ay ve ark. 2007). Bu çalışmada da *E. arborea*'nın EtOAc ekstrahesinin yüksek aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiş ve aktiviteden sorumlu olan bileşikler izole edilerek yapıları aydınlatılmıştır.

Erica türleri üzerinde daha önce yapılmış olan çalışmalar incelendiği zaman türlerin flavonoidler, antosiyanozitler, kumarinler ve terpenik bileşikler taşıdığı görülmüştür (Vieitez & Ballester, 1972; Ballester et al., 1975; Crowden & Jarman, 1976; Mendez, 1978; Bennini et al., 1993; Chulia et al., 1995; Ay ve ark. 2007). Yaptığımız çalışmalar sırasında bütün ekstraherlerin genel içerikleri, İTK ile incelendiği zaman EtOAc ekstraherlerinin, % 1 vanilin-H₂SO₄ püskürtüldükten sonra, fenolik (başlıca flavonoid yapısında) bileşikler taşıdığı düşünülmüştür. Bu sonuç total fenolik madde miktar tayini yöntemi ile de uyum göstermektedir. Ay ve arkadaşları, *E. arborea* üzerinde yaptıkları izolasyon çalışmasında (-)-epicatechin ve kersitrin elde etmişlerdir (Ay ve ark. 2007). EtOAc ekstraherlerinin antioksidan aktivite özelliğinin fenolik bileşikler özellikle de flavonoidlerden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.

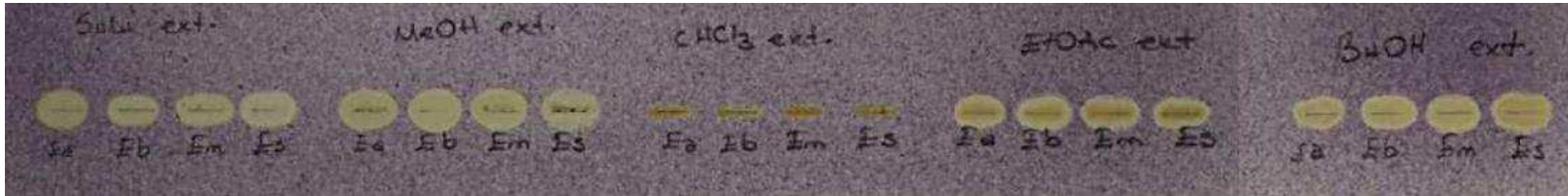
Bundan sonraki aşamada halk arasında yaygın kullanıma sahip olan tür olarak belirlenen, *E. manipuliiflora* ve yine yüksek antioksidan aktiviteye sahip olan ve üzerinde hiç çalışma olmadığı tespit edilen, en önemlisi endemik bir tür olan *E. bocquetii* izolasyon çalışması için seçilmiştir. Bu türlerin içerdiği aktif bileşiklerin izolasyonu çalışmalarımız devam etmektedir.

Tablo 2. Türkiye’de yetişen *Erica* türlerinden hazırlanan farklı ekstrelerin total fenolik madde miktarları

Tür	Total Fenolik Madde Miktarı (mg gallic asit/g ekstre) ± SH*				
	Sulu ekstre	MeOH ekstresi	CHCl ₃ ekstresi	EtOAc ekstresi	<i>n</i> -BuOH ekstresi
<i>Erica arborea</i>	192.0 ± 6,03	227.7 ± 3.18	50.0 ± 1.851	875.5 ± 19.28	275.1 ± 7.57
<i>E. bocquetii</i>	211.3 ± 8.97	227.3 ± 2.33	44.9 ± 1.11	810.0 ± 14.95	202.3 ± 3.48
<i>E. manipuliflora</i>	265.7 ± 14.62	221.0 ± 3.46	90.53 ± 0.98	735.5 ± 19.35	520.7 ± 3.24
<i>E. sicula</i> subsp. <i>libanotica</i>	109.5 ± 0.27	80.2 ± 3.11	62.2 ± 1.91	701.7 ± 10.20	271.7 ± 8.65

SH= Standart hata

Şekil 2. Türkiye’de yetişen *Erica* türlerinden hazırlanan farklı ekstrelerin kalitatif DPPH • radikal temizleyici etkileri



Tablo 3. Türkiye’de yetişen *Erica* türlerinden hazırlanan farklı ekstrelerin kalitatif DPPH• radikal temizleyici aktivite değerleri

Tür	IC ₅₀ değeri (10 mg/mL) ± SH*				
	Sulu ekstre	MeOH ekstresi	CHCl ₃ ekstresi	EtOAc ekstresi	<i>n</i> -BuOH ekstresi
<i>Erica arborea</i>	0,033 ± 0,01	0,09 ± 0,29	1,85 ± 0,78	0,11 ± 1,019	0,80 ± 0,67
<i>E. bocquetii</i>	0,030 ± 0,04	0,04 ± 0,01	1,80 ± 1,17	0,004 ± 0,002	0,27 ± 1,26
<i>E. manipuliflora</i>	0,021 ± 0,05	0,05 ± 0,01	2,11 ± 2,14	0,002 ± 0,013	0,50 ± 3,01
<i>E. sicula</i> subsp. <i>libanotica</i>	0,012 ± 0,26	1,55 ± 1,07	1,98 ± 1,21	0,019 ± 0,13	0,17 ± 2,71
Propil gallat	0, 04 ± 0,001 (1 mg/mL)				

* SH= Standart hata

Tablo 4. Türkiye’de yetişen *Erica* türlerinden hazırlanan farklı ekstrelerin TBA yöntemi ile elde edilen antioksidan aktivite değerleri

Tür	IC ₅₀ değeri (µg/mL) ± SH*				
	Sulu ekstre	MeOH ekstresi	CHCl ₃ ekstresi	EtOAc ekstresi	<i>n</i> -BuOH ekstresi
<i>Erica arborea</i>	1,02 ± 0,4	2,65 ± 0,6	≥ 50 ± 3,1	0,22 ± 0,2	13,54 ± 2,9
<i>E. bocquetii</i>	19,92 ± 1,9	4,05 ± 1,7	≥ 50 ± 14,6	2,65 ± 0,9	25,98 ± 5,2
<i>E. manipuliflora</i>	0,03 ± 0,2	3,03 ± 0,6	≥ 50 ± 1,8	0,001 ± 0,3	2,77 ± 1,2
<i>E. sicula</i> subsp. <i>libanotica</i>	10,15 ± 0,9	29,1 ± 1,1	≥ 50 ± 1,8	0,31 ± 0,9	15,04 ± 6,3
Propil gallat	0,14 ± 0,07				

* SH= Standart hata

Kaynaklar

- Antonone, R., Simone, F., Morrica, P. and Ramundo, O. 1988. Traditional phytotherapy in the roccaonfina volcanic group, campania, southern Italy. *Journal of Ethnopharmacology* . 22, 295-306.
- Aumente Rubio, M. D., Ayuso Gonzalez, M. J., Garcia Gimenez, M. D., Toro Sainz, M. V. 1988. Flavonols isolated from *Erica andevalensis* Cabezudo-Ribera: antimicrobial activity of the species. *Plantas Medicinales et Phytotherapie*. 22. 113-118.
- Ay, M., Bahadori, F., Öztürk, M., Kolak, U., Topçu, G. 2007. Antioxidant activity of *Erica arborea*. *Fitoterapia*. 78, 571-573.
- Aydın, A., Sayal, A., Işimer, A. 1997. Oksijen radikalleri ve biyolojik sistemlerdeki rolü. *GATA Bülteni*. 39, 270-274.
- Ayuso Gonzalez, M. J.; Reyes Ruiz, M.; Toro Sainz, M. V. 1991. Antimicrobial activity of isolated triterpenic compounds from *Erica andevalensis* Cabezudo-Ribera. *Anales de la Real Academia de Farmacia*. 57, 419-23.
- Ballester, A., Verwey, A., Ovbrem., J. C. 1975. 2-hydroxyphenyl acetic acid and 2, 4-dihydroxyphenyl acetonitrile from *Erica scoparia*. *Phytochemistry*. 14: 1667-68.
- Başer, K. H. C., G. Honda and W. Miki. 1986. Herb Drugs and Herbalists in Turkey. Institute for the study of Languages and Cultures of Asia and Africa. Tokyo, p. 191.
- Baytop, T. 1999. Türkiye’de Bitkilerle Tedavi, Geçmişte ve Bugün. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, p. 208.
- Benini, B., Chulia, A. J., Kaouadji, M. 1995. The revised structure of two flavonol 3-and 4'-monoglucosides from *Erica cinerea*. *Phytochemistry*. 38, 259-261.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. und Technol*. 28, 25-30.
- Conforti, F., Statti, G.A., Tundis, R., Menichini, F., Houghton, P. J., (2002). Antioxidant Activity of Methanolic Extract Of *Hypericum triquetrifolium* Tura Aerial Part, *Fitoterapia*, 73: 479-483.
- Chulia, A., Benini, B., Kaouadji, M., Allais, D.P., Delage, C. 1995. Two flavonol conjugates from *Erica cinerea*. *Journal of Natural Products*. 58, 560-563.

- Crowden, R. K., J.R. Jarman, 1976. Anthocyanins in the genus *Erica*. *Phytochemistry*. 15: 1796-1797.
- Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z., Adıgüzel, N. 2000. Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı (Eğrelti ve Tohumlu Bitkiler). Ankara. s. 87, 165.
- Gournelis, D. C., 1995. Flavonoids of *Erica verticillata*. *Journal of Natural Products*. 58, 1065-1069.
- Güvenç A., Houghton P. J., Duman H., Coşkun M., Şahin P. 2005. Antioxidant Activity Studies on Selected *Sideritis* Species Native to Turkey, *Pharmaceutical Biology*. 43, 173-177.
- Güvenç, A., Kendir, G., Yıldız S. 2008. Antimicrobial Activity of *Erica* L. Species (Ericaceae) of Turkey. In Recent Progress in Medicinal Plants. Vol. 20, Phytopharmacology and Therapeutic Values II. Govil, J. N., Singh, V. K., Mishra, S. K. (Ed.) Studium Pres LLC, U. S. A., p. 173-180.
- Halliwell B., Chirico S. 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance¹⁻³. *American Journal of Clinical Nutrition*. 57: 715—725.
- Harnafi, H., El Houda Bouanani, N., Aziz, M., Caid, H. S., Ghalim, N., Armani, S. 2007. The hypolipidaemic activity of aqueous *Erica multiflora* flowers extract in triton WR-1339 induced hyperlipidaemic rats: A comparison with fenofibrate. *Journal of Ethnopharmacology*. 109, 156-160.
- Heywood, V.H. 1979. Flowering Plants Of The World. Oxford University Pres. p.:124-127
- Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E., Vivanco, J. M. 2003. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Iranian *Ocimum* Accessions, *Food Chem.*, 83, 547-550.
- Kumazawa, S., Hamasaka, T., Nakayama, T. 2004. Antioxidant Activity of Propolis of Various Geographic Origins, *Food Chem.*, 84, 329-339.
- Küpeli, E., Yeşilada, E., Güvenç, A., 2008. Valuation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Erica* species native to Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*. (baskıda).
- Martin- Cordero, C., Reyes, M., Ayuso, M. J., Toro. M. V. 2001. Cytotoxic triterpenoids from *Erica andevalensis*. *Z. Naturforsch. C*. 56: 45-48.
- Mendez, J. 1978. Isofraxidin in *Erica* flowers. *Phytochemistry*. 17, 820.

- Oliver, E.G.H., Oliver, I.M. 2002. The genus *Erica* (Ericaceae) in southern Africa: taxonomic notes 1. *Bothalia*, 32(1): 37-61.
- Pietta, P. G. 2000. Flavonoids as antioxidant. *J. Nat. Prod.* 63, 1035-1042.
- Reyes Ruiz, M., Martin-Cordero, C., Ayuso Gonzalez, M. J., Toro Sainz, M. V., Alarcon de la Lastra, C. 1996. Antiulcer activity in rats by flavonoids of *Erica andevalensis* Cabezudo-Rivera. *Phytotherapy Research*. 10, 300-303.
- Rios, J. L., Recio, M. C. and A. Villar. 1987. Antimicrobial activity of selected plants Employed in the Spanish Mediterranean area. *Journal of Ethnopharmacology*. 21, 139-152.
- Slinkard, K., Singleton, V. L. 1977. Total phenols analysis: Automation and comparison with manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*. 28, 49-55.
- Stevens, P. F. 1978. "*Erica* L." in Flora of Turkey and the Aegean Islands. Vol 6, ed. P. H. Davis, University Press, Edinburgh. pp. 95-97.
- Toro Sainz, M. V., Garcia Gimenez, M. D., Pascual Martinez, M. 1987. Isolation and identification of phenol acids from *Erica andevalensis* Cabezudo-Ribera: Their contribution to an antibacterial activity. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 45. 401-407.
- Tuzlacı, E. and P. Eryaşar Aymaz. 2001. Turkish folk medicinal plants, Part IV: Gönen (Balıkesir). *Fitoterapia*. 72: 323-343.
- Yıldırım, A., Mavi, A., Kara, A. A. 2003. Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Polgonum cognatum* Meissn Extracts, *J. Sci. Food Agric.*, 83, 64-69 .
- Zeybek, N. Zeybek, U. 1994. Farmasötik Botanik. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir. s. 221.
- Vieitez, E. and A. Ballester, 1972. Phenolic and coumaric components in *Erica cinerea* *Anales del Instituto Botánico A. J. Cavanilles*, 29. 129-42.

VII. Ekler

a) Mali Bilanço ve Açıklamaları

Projenin toplam ödeneđi: 10 250 000 000 TL

Giderler

Otomatik pipet ve pipetleyici: 1 218 000 000 TL

Santrifüj + Vortex + Su banyosu: 5 900 000 000 TL

Butanol: 399 000 TL

UV küveti ve plastik santrifüj tüpü: 440 480 000 TL

Arazi çalışmaları: 362 000 000 TL

Fotokopi masrafları: 320 830 000 TL

Harcanmayan miktar: 2 265 700 000 TL

b) Makine ve Techizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar

Üniversitemiz Bilimsel Araştırma Projeleri merkezince satın alınan cihaz/malzeme Fakültemiz demirbaşına kaydedilmiş ve Farmasötik Botanik Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda bulunması ve fakültenin diğer birimlerince de kullanıma açık olması uygun bulunmuştur. Bu cihaz/malzeme demirbaş numaraları aşağıda verilmiştir.

cihaz/malzeme	demirbaş numaraları
1 adet Santrifüj 30x15 mL Rotor 5702 model	1007-1
1 adet su banyosu çalkalamalı 28 Lt.	1009-1
1 adet vortex	1008-1