

**ERYNGIUM BILLARDIERI DELAR. EKSTRELERİNİN TOPLAM FENOLİK VE FLAVONOİT MADDE  
KOMPOZİSYONLARININ VE ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ  
DETERMINATION OF TOTAL PHENOLIC AND FLAVONOID CONTENTS AND ANTIOXIDANT EFFECTS OF  
ERYNGIUM BILLARDIERI DELAR. EXTRACTS**

Leyla PAŞAYEVA<sup>1</sup>, Esra KÖNGÜL<sup>1</sup>, Gökçe Şeker KARATOPRAK<sup>1\*</sup>, Osman TUGAY<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı, Kayseri

<sup>2</sup> Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı, Konya

**ÖZ**

Bu çalışma kapsamında Apiaceae familyasına dahil *Eryngium billardieri* Delar. 'ın toprak üstü kısımlarından hazırlanan %70 metanol ekstresinin ve bu ekstrede elde edilen fraksiyonların İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) ile analizleri, saponin teşhis reaksiyonları ile saponin içerikleri, DPPH ve ABTS +radikallerini süpürücü aktiviteleri, Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam fenolik, AlCl<sub>3</sub> kolorimetrik yöntemi ile toplam flavonoit madde miktarı incelenmiştir. Metanol ekstresinden elde edilen butanol fraksiyonunun steroidal ve triterpenik saponin içerdiği aydınlatılırken, etil asetat fraksiyonunun toplam flavonoit ve fenol bakımından zengin olduğu ve antiradikal aktivite deneylerinde de güçlü etki gösterdiği belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Eryngium billardieri*; Apiaceae; Antiradikal aktivite

**GİRİŞ**

*Eryngium billardieri* Delar. 'ın yer aldığı *Eryngium* türleri Apiaceae familyasına ait 250 türü ile Dünya'da geniş ölçüde yayılıma sahip bitki türleridir. Bu geniş yayılışın sonucu olarak dünyanın pek çok yerinde geleneksel kullanıma sahiptir. Türkiye'de 23 *Eryngium* türü bulunur; bunların 10'u endemiktir (1,2). *Eryngium* türleri, Türkiye'de halk arasında boğadikeni, eşek diken, deve diken, göz diken ve tengel diken isimleri ile bilinirler (3). Ülkemizde yetişen *Eryngium* türlerinden reçinemsiz tadı olan *Eryngium billardieri*, Doğu Anadolu Bölgesi'nde yetişir ve gövdesi ile kabuğu soyulduktan sonra yenilmektedir (4,5).

*Eryngium* türleri, genel olarak Türk folklorik tıp uygulamalarında yangı giderici, ödem söktürücü, sinüzit ve üriner sistem hastalıklarının tedavisi amacıyla kullanılmaktadır (6). *E. billardieri*'nin kök kısımları ise Erzurum'da halk arasında hemoroid tedavisinde kullanılmaktadır (7). Halk arasında *E. billardieri*'nin toprak üstü kısımları yara tedavisinde de kullanılırken kökleri mukoz membranların lokal enflamasyonunda ve soğuk

Makale Geliş Tarihi : 20.10.2016

Makale Kabul Tarihi: 10.01.2017

**ABSTRACT**

In this study, we investigated the composition of the extract prepared from aerial parts of *Eryngium billardieri* Delar. (Apiaceae family) with 70% methanol and fractions of this extract with TLC analysis, saponin composition with saponin tests, DPPH and ABTS + radical-scavenging activity, the total phenolic content with AlCl<sub>3</sub> colorimetric assay and the total flavonoid content with Folin-Ciocalteu assay. The butanol fraction of methanol extract characterized by the presence of steroidal and triterpenic saponins, ethyl acetate fraction exhibited the highest antiradical activity which was found rich in flavonoids and phenolics.

**Keywords:** *Eryngium billardieri*; Apiaceae; Antiradical activity

algınlığının tedavisinde kullanımı bulunmaktadır (8). *Eryngium* türleri ile yapılan fitokimyasal çalışmalarda antienflamatuvar ve antioksidan olduğu bilinen tanen türevi maddeler, saponinler, alkaloitler, asetlen, flavonoitler, kumarin türevi bileşikler, triterpenik saponinler, monoterenik glikozitler, kemferol, klorojenik asit, kafeik asit, lutein ve β-karoten bulunduğu tespit edilmiştir (2,9).

*E. billardieri* ile yapılan bir çalışmada köklerden ve toprak üstü kısımlardan hazırlanan %80 metanol ekstreleri ve bu ekstrelerden elde edilen fraksiyonlar, sıçanlarda asetik asitle *i.p* olarak oluşturulan arttırılmış vasküler permeabiliteye ve seratonin, bradikinin ve karragenan ile oluşturulan ödeme karşı test edilmiştir. Asetik asitle arttırılmış vasküler permeabiliteyi en yüksek oranda köklerden elde edilen *n*-butanol ekstresinin inhibe ettiği, seratonin, bradikinin ve karragenan ile oluşturulan ödeme karşı da yine köklerden elde edilen *n*

**Corresponding Author:** Yrd.Doç.Dr. Gökçe Şeker Karatoprak, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı, Kayseri 38039  
Tel: 03524380486/28176  
email: gskaratoprak@erciyes.edu.tr

-butanol ekstresinin istatistiksel olarak anlamlı sonuç gösterdiği belirtilmiştir (8).

Zarei ve arkadaşlarının (2015) yaptığı çalışmada *E. billiardieri*'nin toprak üstü kısımlarından hazırlanan etanolik ekstrenin hiperkolesterelomi oluşturulan sıçanlarda karaciğer fonksiyonlarına ve lipid düzeylerine olan etkisi incelenmiştir. Çalışmanın sonucuna göre *E. billiardieri* ekstresi serum ALT ve ALP, kolesterol, trigliserit ve LDL'yi kontrol grubuna göre belirgin bir şekilde düşürdüğü belirtilmiştir (9).

Bu çalışmanın amacı halk arasında kullanılan *E. billiardieri*'nin toprak üstü kısımlarından hazırlanan %70 metanol ekstresi ve bu ekstrede elde edilen etil asetat, butanol ve su fraksiyonlarının içeriklerini taşıdıkları toplam fenol ve flavonoid miktarları üzerinden karşılaştırmak ve bu ekstrelerin, ABTS<sup>+</sup> ve DPPH radikalini süpürücü etkilerini belirlemektir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Bitkisel Materyal

Çalışmalarda kullanılan *E. billiardieri* bitkisinin toprak üstü kısmı 2015 yılında Temmuz ayında Hadim-Bozkır arası, 1780 m yükseklikten toplanmıştır. Bitkiye ait örnekler, Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi Herbariyumu'nda (KNYA 26907) muhafaza edilmektedir.

### Ekstrelerin Hazırlanışı

Bitkisel materyalin toprak üstü kısmı (50 g) %70'lik metanol ile çalkalamalı su banyosunda 37 °C'de 24 saat süreyle üç kez ekstre edildi. Elde edilen ekstreler vakum altında rotavaporda (37-38 °C) yoğunlaştırıldı. Ekstre liyofilize edildikten ve suda (250 mL) disperse edildikten sonra etil asetat ve *n*-butanol ile fraksiyonlandı. Etil asetat, *n*-butanol ve su ekstreleri vakum altında rotavaporda (37-38 °C) yoğunlaştırılıp liyofilize edildi.

### Kompozisyon Analizleri

Bitkisel materyalden elde edilen ekstreler toplam fenolik bileşikler ve toplam flavonoidler bakımından spektrofotometrik olarak incelendi. Bitkisel ekstrelerin içerisindeki bileşiklerin tanımlanması ayrıca ince tabaka kromatografisi ile gerçekleştirildi. Ekstrelerde saponin varlığını analiz etmek için saponin teşhis reaksiyonları uygulandı.

### Toplam Fenol Miktar Tayini

Ekstrelerin içerdikleri toplam fenol miktarı gallik asite eşdeğer olarak Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak hesaplandı (10). 6 mL distile su içeren 10 mL'lik kap içerisine 100 µL örnek çözeltisi ve 500 µL Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edildi. 1 dakika sonra 1.5 mL % 20'lik sulu Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ilave edilip 10 mL'ye su ile tamamlandı. Kontrol olarak ekstre içermeyen reaktif karışımı kullanıldı. 25 °C'de 2 saat inkübe edildikten sonra 760 nm'de absorbanası ölçüldü ve gallik asit kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırıldı. Toplam fenolik madde miktarı gallik asite eşdeğer olarak hesaplandı. Deneyler üç paralel olacak şekilde yapıldı ve sonuçlar ortalama değerler olarak verildi.

### Toplam Flavonoid Miktar Tayini

Ekstrelerin toplam flavonoid analizi Zhishen ve ark. (1999)'nın çalışmalarında kullandıkları metot modifiye edilerek yapıldı (11). Buna göre 1 mL ekstre t=0. dakı-

kada 0.3 mL % 5'lik NaNO<sub>2</sub> çözeltisi ile karıştırıldı, t=5. dakika'da 0.3 mL % 10'lük AlCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O çözeltisi ilavesinden sonra, t=6. dakika'da 2 mL 1 M NaOH çözeltisi eklendi ve 2.4 mL su ilave edilerek karıştırıldı. 510 nm'de köre karşı absorbanas ölçüldü. Ekstrelerin içerdikleri toplam flavonoid miktarları kateşine eşdeğer olarak mg CE/g<sub>ekstre</sub> olarak hesaplandı. Kateşinin kalibrasyon eğrisi aynı şekilde etanol kullanılarak hazırlandı. Bütün ölçümler 3 paralel olacak şekilde yapıldı ve ortalama değerler alındı.

### İnce Tabaka Kromatografisi

İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) ile ekstrelerde bulunan bileşiklerin ön tanımlanması gerçekleştirildi. İTK incelemesinde ekstrelerin metanoldeki %4'lük çözeltisi hazırlandı ve her bir numune çözeltisinden 20 µl İTK plağına (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck) uygulandı. Plaklar hareketli faz ile (Kloroform-asetik asit-metanol-su, 64:32:12:8) doyurulmuş tanka yerleştirildi. Bunu takiben plaklar tanktan çıkarılarak kurutuldu, 254 ve 365 nm UV (Camag) ışık altında incelendi. Lekelerin renklendirilmesi amacıyla plaklar vanilin sülfürik asit belirteci ile muamele edildi. Isı tatbik edilerek renkler belirginleştirildi, lekeler incelenerek sonuçlar kaydedildi.

### Saponin Teşhis Reaksiyonları

#### Köpürme Deneyi

50'şer mg metanol, *n*-butanol, etil asetat ve su ekstresi 10 mL sıcak su ile beraber bir deney tüpüne konulup, soğuduktan sonra yaklaşık 10 sn kadar kuvvetle çalkalandı. En az 10 dakika sabit kalan 1-10 cm yüksekliğinde bir köpük tabakası meydana gelmesi saponin varlığına işaret etmektedir. Deney sonucunda yalnızca *n*-butanol ekstresinde kalıcı bir köpük meydana geldiğinden diğer teşhis reaksiyonları sadece *n*-butanol ekstresi ile yapıldı.

#### Salkowski Reaksiyonu

50 mg *n*-butanol ekstresi bir deney tüpünde 5 ml % 3'lük H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile su banyosunda 5 dakika dikkatle kaynatılarak hidroliz edildi. Soğutulduktan sonra ayırma hunisinde süzünüye eşit hacimde kloroform ilave edildi ve kloroformlu faz ayrıldı. Bu kloroformlu faz iki deney tüpüne bölünerek bir kısmı ile *Salkowski* diğer kısmı ile *Lieberman-Burchard* deneyi yapıldı.

Birinci deney tüpünde yaklaşık 2 mL kloroformlu kısım 1-2 mL derişik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile tabakalandırıldı. Başta iki tabaka arasında sarı renkli bir halka oluşumu gözlenmesi sonrasında ise çalkalamakla veya bekletmekle kloroform tabakasının kan kırmızısı renk alması steroidal saponinlerin varlığını gösterir (12).

#### Lieberman-Burchard Reaksiyonu

Diğer tüpteki yaklaşık 2 ml kloroformlu kısım porselen kapsül içerisinde su banyosu üzerinde kuruluğa kadar uçuruldu. Sonra kapsülde kalan bakiye üzerine 1 mL glasiyel asetik asit eklendi ve kapsül içindeki bakiyenin çözünmesi sağlanarak deney tüpüne alındı. 1-2 mL derişik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile tabakalandırıldığında iki tabakanın temas yüzeyinde önce mor, sonra mavi halka görüldü (12).

#### Brieskorn-Briner Reaksiyonu

50 mg *n*-butanol ekstresi bir deney tüpünde 5 ml %

3'lük H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile su banyosunda 5 dakika dikkatle kaynatılarak hidroliz edildi. Sıcakken süzülür ve süzöntü soğutulduktan sonra ayırma hunisinde süzöntüye eşit hacimde kloroform ile ekstre edildi. Kloroformlu kısım ayrılarak kapsülde kuruluğa kadar uçuruldu. Üzerine 1-2 damla klorosülfonik asit ilave edildi ve meydana gelen kırmızı rengin triterpenik saponenlerden ileri geldiği belirlendi (12).

### 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH ) Radikalini Süpürücü Etki Tayini

Ekstrelerin DPPH radikalini süpürücü etkileri Gyamfi ve ark.'nın metoduna göre yapıldı (13). Tris-HCl tamponu (50 nM, pH 7,4) ve 1mL 0.1 mM metanolde hazırlanmış 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil çözeltisi (DPPH ) ile karıştırıldı. Kontrol olarak ekstre içermeyen reaktif karışımı ve pozitif kontrol olarak BHA kullanıldı. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildikten sonra absorbanlar 517 nm'de okundu. İnhibisyon yüzdesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı. IC<sub>50</sub> değerleri nonlineer regresyon eğrileri kullanılarak (Sigma Plot 2001 versiyon 7.0, SPSS Inc., Chicago IL) hesaplandı. Analizler 3 paralel olarak tekrarlandı ve ortalama değerler kullanıldı (13).

### % inhibisyon= [(Abs<sub>kontrol</sub>- Abs örnek) / Abs kontrol] x 100 2,2'-azino-bis (3- etilbenzathiazolin-6- sulfonik asit) (ABTS + ) Radikalini Süpürücü Etki Tayini

Ekstrelerin ABTS<sup>+</sup> radikalini süpürücü etkilerine bakıldı (14). ABTS<sup>+</sup> radikali (7 mM) ABTS'in sulu çözeltisi ile K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (2.45 mM, son konsantrasyon)' un karanlıkta 12-16 saat bekletilmesiyle meydana getirildi ve absorbanı oda sıcaklığında 734 nm'de 0.700 (± 0,030) olacak şekilde ayarlandı. Bu şekilde hazırlanan radikal çözeltisi (990 µL) ile ekstre çözeltileri (10 µL) karıştırıldı ve 734 nm'de 1 dakikalık aralıklarla 30 dakika süresince reaksiyon kinetiği ölçüldü. Konsantrasyona karşı ölçülen inhibisyon yüzdeleri Trolox'a

eşdeğer olarak (TEAC) hesaplandı. Deneyler üç paralel olarak tekrarlandı ve ortalama değerleri hesaplandı (14).

### İstatistiksel Analiz

Bütün istatistiksel analizler SPSS 12 istatistik programı ile yapılmıştır. Varyansların analizi ANOVA prosedürüne göre uygulanmıştır. Ortalamalar arasındaki belirgin farklılıklar Tukey's pairwise kıyaslama testine göre p< 0.05 seviyesinde değerlendirilmiştir. Deney sonuçlarına ait veriler Shapiro -Wilk normallik testine göre değerlendirilmiştir. Grupların varyans homojenliğini değerlendirmek için Levene testi kullanılmıştır.

### BULGULAR

#### Toplam Fenol ve Toplam Flavonoit Miktar Tayini

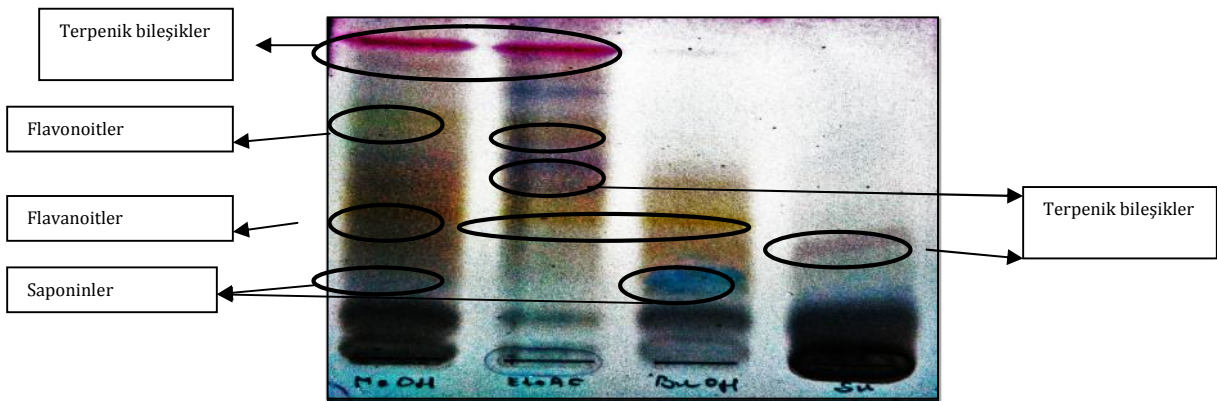
Ekstrenin toplam fenol ve flavonoit miktarı deneysel kısımda verilen yöntem kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Toplam fenol miktarı gallik asite (GAE), toplam flavonoit miktarları kateşine (CA) eşdeğer olarak hesaplanmıştır. *E. billadierei* %70 metanol ekstresinin toplam fenol miktarı 70.651 ± 7.273 mgGAE/g<sub>ekstre</sub> iken etil asetat fraksiyonunun toplam fenol miktarı 205.074 ± 15.662 mgGAE/g<sub>ekstre</sub> bulunmuştur. Etil asetat fraksiyonunun toplam fenol ve flavonoit içeriği (85.058 ± 5.332 mgCA/g<sub>ekstre</sub>) olarak diğer ekstrilerden daha zengin bulunmuştur. Sonuçlar Tablo 1' de verilmiştir. Örneklerin toplam fenolik ve flavonoit madde miktarı arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p< 0,01).

#### İnce Tabaka Kromatografisi

Yapılan inceleme sonucunda ekstrilerin bol miktarda flavonoit ve terpenik yapıda bileşikler içerdiği, aynı zamanda n- butanol ekstresinin diğer ekstrilerle kıyaslandığında daha çok saponin tipi bileşikler içerdiği görülmüştür (Şekil 1).

Tablo 1. *E. billadierei* ile hazırlanan ekstrilerinin toplam fenol ve flavonoit içerikleri

Ekstreler	Toplam Fenol		Toplam Flavonoit [mgCA/gekstre]
	[mgGAE/gekstre]		
EbMeOH	70.651 ± 7.273		30.324 ± 0.580
EbEtoAC	205.074 ± 15.662		85.058 ± 5.332
EbBut	93.182 ± 1.089		33.773 ± 5.314
Ebsu	32.290 ± 0.931		15.680 ± 0.195



Şekil 1. *E. billadierei* ekstrilerine ait İTK profilleri

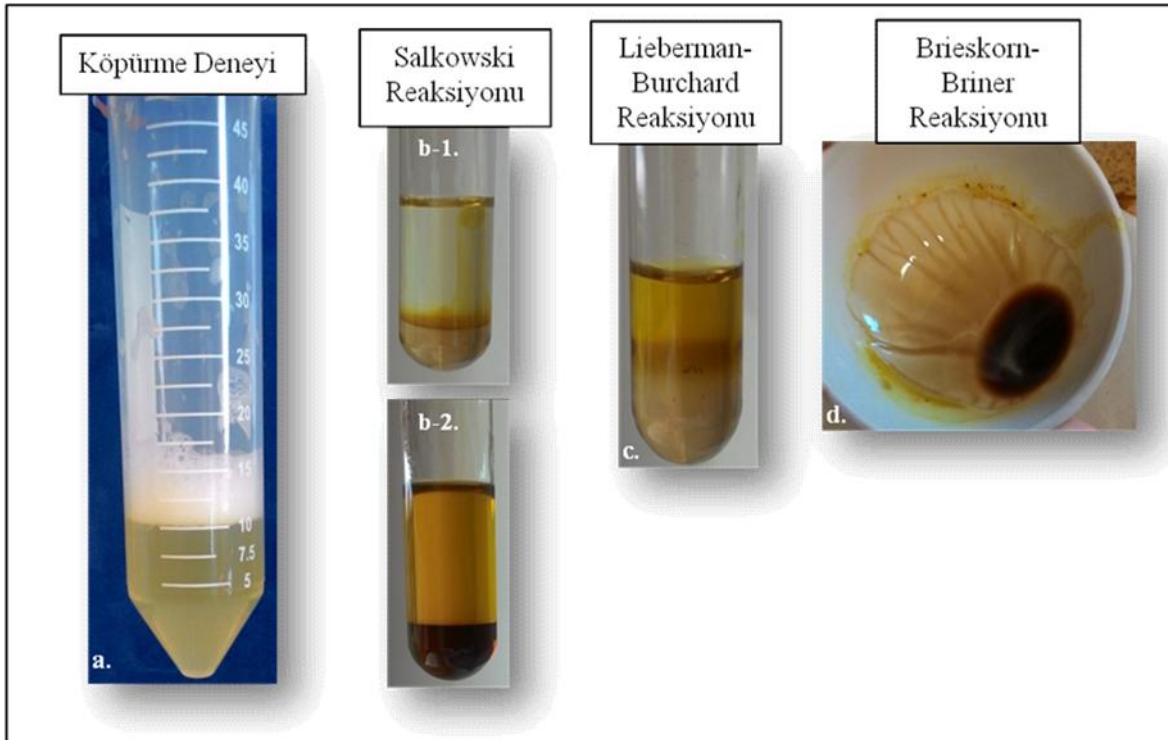
### Saponin Teşhis Reaksiyonları

*E. billardieri* ile hazırlanan bütün ekstrelerle (metanol, *n*-butanol, etil asetat ve su ekstreleri) saponin teşhis reaksiyonlarından köpürme deneyi yapılmıştır. Köpürme deneyinde yalnızca *n*-butanol ekstresinde 10 sn sabit kalan 1,1 cm köpük meydana gelmiştir. Bu nedenle diğer teşhis reaksiyonlarına saponin türevi bileşiklerce zengin olduğu düşünülen *n*-butanol ekstresi ile devam edilerek ekstrenin hangi tip saponinler içerdiği belirlenmeye çalışılmıştır. Salkowski Reaksiyonunun da iki tabaka arasında önce sarı bir halka görülmesi, çalkalama ile kloroformlu kısımda kan kırmızı renk meydana gelmesi ekstrede steroidal saponinlerin var olduğunu göstermiştir. Lieberman-Burchard Reaksiyonunda ise iki tabaka arasında kahverengi-yeşil bir renk görülmüş ve bu rengin streoidal saponinlerden ileri geldiği sonucuna varılmıştır. Ancak bu deney ile triterpenik saponinlerle ilgili net bir sonuç elde edilemediğinden triterpenik saponinlere özgü bir teşhis deneyi olan Brieskorn-Briner Reaksiyonu da yapılmıştır. Bu deney sonunda kapsülde meydana gelen kırmızı rengin triterpenik sapogenollerden ileri geldiği dolayısıyla *E. billardieri* *n*-butanol ekstresinin hem streoidal hem de triterpenik saponinler taşıdığı belirlenmiştir (Şekil 2).

strelerinden etil asetat ekstresinin aktivitesi ile pozitif kontrol olarak kullanılan sentetik antioksidan BHA'nın aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ( $p>0.05$ ). Varyans homojenliğini test etmek için uygulanan Levene istatistiği sonuçlarına göre değişken için varsayımın sağlandığı gözlenmiştir ( $p=0,088$ ). Grupların çoklu karşılaştırıldığı Tukey testi sonuçlarına göre etil asetat fraksiyonu ile BHA arasında, metanol ekstresi ve su fraksiyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır (sırasıyla,  $p=0,505$  ve  $p=0,769$ ). Çalışılan diğer ekstreler birbiri arasında ve BHA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,01$ )

### 2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sulfonyl asit) (ABTS<sup>+</sup>) radikalini süpürücü etki tayini

Ekstrelerin ABTS<sup>+</sup> radikalini süpürücü etkileri değerlendirilmiş ve sonuçlar Tablo 3'de verilmiştir. Tüm ekstre ve standartlarda etki konsantrasyonla doğru orantılı bir şekilde artış göstermiştir. Ekstreler 0.25 mg/ mL ve 0.5 mg/ mL konsantrasyonlarda aktif bulunmuştur. Etil asetat ekstresi 0.5 mg/ mL konsantrasyonda  $1.587 \pm 0.169$  mmol/ L Trolox değeriyle en aktif ekstre olarak bulunurken en düşük aktiviteyi 0.25 mg/ mL konsantrasyonda  $0.394 \pm 0.017$  mmol/ L Trolox değeriyle su ekstresi göstermiştir. Etil asetat ekstresinin her iki kon-



Şekil 2. *n*-butanol ekstresi saponin teşhis reaksiyonları. a) Köpürme deneyi, b-1) Salkowski Reaksiyonu çalkalamadan önce, b-2) Salkowski Reaksiyonu; çalkaladıktan sonra c) Lieberman-Burchard Reaksiyonu, d) Brieskorn-Briner Reaksiyonu

### 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini süpürücü etki tayini

*E. billadieri* ekstresi ile yapılan çalışmalar sonucunda ekstrenin fizyolojik pH da süpürücü etki gösterdiği belirlenmiştir. Ekstreler arasında etil asetat fraksiyonu en yüksek aktiviteyi gösterirken ( $IC_{50}$ :  $0.261 \pm 0.022$  mg/ mL ) en düşük aktiviteyi su ekstresi göstermiştir ( $IC_{50}$ :  $2.683 \pm 0.230$  mg/mL). Tablo 2'ye göre *E. billadieri* ek-

santrasyonda göstermiş olduğu aktiviteler ile standart olarak kullanılan BHA'nın 0,25 mg/mL konsantrasyondaki aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ( $p>0.05$ ). Ekstreler ve ekstrelerin çalışılan konsantrasyonları, aktivite sonuçlarını istatistiksel olarak anlamlı etkilerken (sırasıyla  $p=0,000$  ve  $p=0,000$ ), hem ekstrelerin hem de konsantrasyonların anlamlılığa olan etkisi  $p=0,002$  bulunmuştur. Varyans

**Tablo 2.** *E. billadiieri* ile hazırlanan ekstralarının DPPH radikali süpürücü etkisi

Örnekler	DPPH (IC <sub>50</sub> ) (mg/mL)
EbMeOH	2,550 ± 0,034 <sup>a</sup>
EbEtoAC	0,261 ± 0,022 <sup>b</sup>
EbBut	0,943 ± 0,207 <sup>c</sup>
Ebsu	2,683 ± 0,230 <sup>a</sup>
BHA	0,077 ± 0,001 <sup>b</sup>

EbMeOH: metanol ekstresi, EbEtoAC: etil asetat ekstresi, Eb-But: *n*-butanol ekstresi, Ebsu: su ekstresi, BHA: butilhidroksianisol. Ortalama ± SS olarak verilen değerler ± %95 güven aralığında belirtilmiştir. (a-b), (a,c), (b,c) arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.01$ ) aynı harflerle belirtilmiş değerler a grubu için  $p=0,505$  ve b için  $p=0,769$  olarak bulunmuştur.

homojenliğini test etmek için uygulanan Levene istatistiği sonuçlarına göre değişken için varsayımın sağlandığı gözlenmiştir ( $p=0,053$ ). Grupların çoklu karşılaştırıldığı Tukey testi sonuçlarına göre standart olarak kullanılan BHA'nın yüksek konsantrasyonunun aktivitesi ile ekstraların her iki konsantrasyonda göstermiş olduğu aktiviteler arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Etil asetat ekstresinin yüksek konsantrasyonunun göstermiş olduğu aktivite ile diğer ekstraların her iki konsantrasyonda göstermiş olduğu aktiviteler arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur ( $p < 0.05$ ).

**Tablo 3.** *E. billadiieri* ile hazırlanan ekstralarının ABTS<sup>+</sup> radikali süpürücü etkisi.

Örnekler	Konsantrasyon (mg/mL)	DPPH (IC <sub>50</sub> ) (mg/mL)
EbMeOH	0,25	0,562 ± 0,014 <sup>a,b,c</sup>
	0,5	0,639 ± 0,040 <sup>a,b,c</sup>
EbEtoAC	0,25	1,043 ± 0,081 <sup>b,c,d</sup>
	0,5	1,587 ± 0,169 <sup>d</sup>
EbBut	0,25	0,602 ± 0,38 <sup>a,b,c</sup>
	0,5	0,975 ± 0,054 <sup>a,b,c</sup>
Ebsu	0,25	0,394 ± 0,017 <sup>a,b,c</sup>
	0,5	0,488 ± 0,029 <sup>a</sup>
BHA	0,25	1,023 ± 0,046 <sup>c,d</sup>
	0,5	2,260 ± 0,089 <sup>e</sup>

EbMeOH: metanol ekstresi, EbEtoAC: etil asetat ekstresi, Eb-But: *n*-butanol ekstresi, Ebsu: su ekstresi, BHA: butilhidroksianisol. Ortalama ± SS olarak verilen değerler ± %95 güven aralığında belirtilmiştir. (a-b), (a,c), (b,c) arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.01$ ) aynı harflerle belirtilmiş değerler a grubu için  $p=0,057$  b için  $p=0,077$ , c grubu için  $p=0,077$  ve d grubu için  $p=0,087$  olarak bulunmuştur.

### TARTIŞMA-SONUÇ

*E. billadiieri* ekstralarında toplam fenol ve flavonoit içerikleri incelendiğinde fenolik bileşim bakımından metanol ekstresinden fraksiyonlanarak elde edilen etil asetat ekstresinin daha zengin olduğu tespit edilmiştir.

Ekstrelerin genel içerik kompozisyonları hakkında fikir sahibi olmak amacıyla yapılan İTK analizinde plakta görülen sarı renkli lekeler flavonoit türevi, pembe-mor renkli lekeler terpen türevi, mavi renkli lekeler ise saponin türevi bileşiklerden ileri gelmektedir. Genellikle sarı renkli lekelerin flavonoit tipi, pembe mor renkli lekelerin terpenik, mavi renkli lekelerin ise saponin tipi bileşikler olduğu literatürlerde bildirilmiştir (15). İTK plağı incelendiğinde ekstraların flavonoit ve terpenik bileşiklerce zengin olduğu, *n*-butanol ekstresinin ise diğer ekstralardan farklı olarak daha çok saponin tipi bileşikler içerdiği görülmüştür.

Saponin teşhis reaksiyonlarından köpürme deneyinde, yalnızca *n*-butanol ekstresinde 1,1 cm kalıcı köpük meydana gelmesi İTK analizi ile benzer şekilde bu ekstranın diğerlerinden daha fazla saponin taşıdığını ortaya koymuştur. *n*-butanol ekstresinin taşıdığı saponinlerin tipini belirlemek amacıyla yapılan Salkowski Reaksiyonu, Lieberman-Burchard Reaksiyonu ve Brieskorn-Briner Reaksiyonu ile ekstranın hem streoidal hem de triterpenik saponinler taşıdığı belirlenmiştir.

Literatürde *Eryngium* cinsinin bizim çalışmamızla uyumlu olarak; flavonoitler, saponinler, uçucu yağ, triterpenoitler, kumarinler, steroidler ve asetlen türevi bileşikler taşıdığı, içerdiği saponinlerin ise büyük çoğunlukla polihidroksilli triterpen glikozitleri ve bunların esterlerinden oluştuğu bildirilmektedir (16,17).

Ekstrelerin azot merkezli stabil bir radikal olan DPPH radikali süpürme kapasiteleri fizyolojik pH da incelenmiş ve sonuçlar IC<sub>50</sub> değerleri olarak (mg/ mL) verilmiştir. IC<sub>50</sub> değeri küçüldükçe aktivite artmaktadır. *E. billadiieri*'den elde edilen etil asetat ekstresinin DPPH radikali süpürücü etkisi (IC<sub>50</sub>: 0.261 ± 0.022 mg/mL) diğer ekstralardan yüksek bulunmuştur. Etil asetat ekstresinin aktivitesi ile pozitif kontrol olarak kullanılan sentetik antioksidan BHA'nın aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı tespit edilmiştir ve etil asetat ekstresinin güçlü DPPH radikali süpürme kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir.

En çok kullanılan antioksidan aktivite ölçüm metodlarından birisi olan ABTS<sup>+</sup>/TEAC yöntemi, ABTS<sup>+</sup>'nin (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) oksidasyonu sonucu oluşan ABTS<sup>+</sup> radikal çözeltisi üzerine, antioksidan içeren örneğin eklenmesi sonucu radikalın indirgenmesi ve oluşan mavi/yeşil renkli ABTS<sup>+</sup> radikalinin renginin 600-750 nm dalga boyunda belirlenmesi ilkesine dayanmaktadır (18).

ABTS<sup>+</sup> radikali süpürücü etki tayini ekstralar ve BHA için 0.25 ve 0.5 mg/mL konsantrasyonda çalışılmıştır. Etil asetat ekstresi her iki konsantrasyonda da TEAC 1.043 ± 0.081 ve 1.587 ± 0.169 mmol/ L Trolox bulunurken BHA için 1.023 ± 0.046 ve 2.26 ± 0.089 mmol/ L Trolox olarak bulunmuştur. Etil asetat ekstresinin her iki konsantrasyonda göstermiş olduğu aktiviteler ile standart olarak kullanılan BHA'nın 0,25 mg/mL konsantrasyondaki aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olması bu ekstranın radikal süpürücü etkisinin güçlü olduğunu kanıtlamıştır. Son yıllarda fitokimyasalların doğal antioksidan kaynağı olarak araştırılması hızla artmaktadır. Yenilebilir *Eryngium* türleri ile yapılan birçok *in vitro* antioksidan çalışmada bu türlerin çalışılan deney modellerinde antioksidan aktivite gösterdiği belirtilmiştir (16). Literatürde *E. billadiieri*

etanol ekstresinin demir fruktoz fosfat ile indüklenen lesitin lipozomlarının ve linoleik asitin oksidasyonunu belirgin şekilde inhibe ettiği ve güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu açıklanmıştır (19). *E. billadierei*'nin antiradikal aktivitesi daha önce çalışılmamış olup ilk defa bu çalışmada aydınlatılmıştır.

*E. billadierei* toprak üstü kısmından hazırlanan ekstrelere fenolik ve flavonoid bileşikler bakımından zengin olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca *n*-butanol ekstresinin steroidal ve triterpenik saponin içerdiği aydınlatılmıştır. Antioksidan aktivite deneylerinde etil asetat ekstresinin güçlü antioksidan aktivite göstermesi fenolik içeriği ile ilişkilendirilmiştir. Halk arasında antiinflamatuar olarak kullanılan *E. billadierei*'nin güçlü antioksidan aktivite göstermesi literatürde antioksidan zengin kaynakların oksidatif stres ve enflamasyonla gelişen hastalıkların tedavisinde güçlü antiinflamatuar ajanlar olarak kullanılmasını desteklemektedir (20). Çalışmalarımız etil asetat ekstresinin etki mekanizması ve etkiden sorumlu bileşiklerinin tespiti alanında devam etmektedir.

#### KAYNAKLAR

1. Wörz A. On the distribution and relationships of the South-West Asian species of *Eryngium* L. (Apiaceae-Saniculoideae). Turk J Bot 2004; 28: 85-92.
2. Aslan Erdem S. Türkiye'de Yetişen Bazı *Eryngium* Türlerinde Farmakognozik Araştırmalar. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2009: 7-128.
3. Baytop T. Türkiye'de bitkiler ile tedavi (geçmişte ve bugün). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 1999; ss 169.
4. Akan H, Korkut MM, Balos, MM. Arat Dağı ve çevresinde etnobotanik bir araştırma. Fırat Üniv. Fen ve Müh. Bil. Dergisi 2008; 20(1): 67-81.
5. Yurdakök B. Türkiye'de Yetişen *Eryngium kotschyi* (Boğadikeni) ve *Eryngium maritimum* (Deniz Boğadikeni) Bitkilerinin Sitotoksik Etkilerinin hep2, hepg2, vero ve u138 mg Hücre Kültürlerinde Araştırılması. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2010: 9.
6. Küpeli E, Kartal, M, Aslan, S, Yeşilada E. Comparative evaluation of the antiinflammatory and antinociceptive activity of Turkish *Eryngium* species. J Ethnopharmacol 2006; 107(1): 32-37.
7. Gürhan G, Ezer N. Halk arasında hemoroit tedavisinde kullanılan bitkiler. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi 2004; 24(1): 37-55.
8. Yeşilada E, Tanaka S, Tabata M, Sezik E. The antiinflammatory activity of the fractions from *Eryngium billadierei* in mice. Phytother Res 1989; 3(1): 38-40.
9. Zarei A, Ashtiyani SC, Hamidzadeh S, Rezaei A. The Study of the Effects Hydro-Alcoholic Extract of *Eryngium billadierei* on Lipid Profiles Levels and Liver and Renal Functions Tests in Hypercholesterolemic Rats. GJP 2015; 9(1): 21-27.
10. Singleton V, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic 1965; 16(3): 144-158.
11. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem 1999; 64(4): 555-559.
12. Madhavi M, Ram MR. Phytochemical Screening And Evaluation Of Biological Activity Of Root Extracts Of *Syzygium samarangense*. IJP 2016; 3(7): 325-335.
13. Gyamfi MA, Yonamine M, Aniya Y. Free-Radical Scavenging Action of Medicinal Herbs from Ghana *Thonningia Sanguinea* on Experimentally Induced Liver Injuries. Gen Pharmacol Vasc Syst 1999; 32(6): 661-667.
14. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. Free Radical Bio Med 1999; 26(9): 1231-1237.
15. Wagner H, Bladt S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Springer Science & Business Media, 1996; pp 305-310.
16. Wang P, Su Z, Yuan W, Deng G, Li S. Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Eryngium* L.(Apiaceae). Pharm Crop 2012; 3: 99-120.
17. Zhang Z, Li S, Ownby S, et al. Phenolic compounds and rare polyhydroxylated triterpenoid saponins from *Eryngium yuccifolium*. Phytochem 2008; 69(10): 2070-2080.
18. Dorman HD, Bachmayer O, Kosar M, et al. Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. J Agr Food Chem 2004; 52(4): 762-770.
19. Ahmet M, Glen DL, Saban K, Ali Y. Inhibition of ironfructose-phosphate-induced lipid peroxidation in lecithin liposome and linoleic acid emulsion systems by some edible plants. J. Food Biochem 2011; 35 (3): 833-844.
20. Joo T, Sowndhararajan K, Hong S, et al. Inhibition of nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by stem bark of *Ulmus pumila* L. J Biol Sci 2014; 21(5): 427-435.