

FARKLI LİKEN ÖRNEKLERİNDEKİ USNİK ASİT MİKTARLARININ YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ

Determination of Usnic Acid Levels in Various Lichen Species by High Performance Liquid Chromatography and their Antimicrobial Activities

Demet CANSARAN DUMAN

Refik Saydam Hıfzısıhha
Merkezi Başkanlığı,
İlaç ve Kozmetik Araştırma
Müdürlüğü,
Sıhhiye/ANKARA

İletişim:
Demet CANSARAN DUMAN
Refik Saydam Hıfzısıhha
Merkezi Başkanlığı,
İlaç ve Kozmetik Araştırma
Müdürlüğü,
Sıhhiye/ANKARA
Tel: 0312 458 21 69
Faks: 0312 458 24 08
e-posta: dcansaran@yahoo.com

ÖZET

Amaç: Türkiye'nin çeşitli illerinden (Karabük-Çankırı-Trabzon) dört farklı liken türü; *Evernia divaricata* (L.) Ach., *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf., *Letharia vulpina* (L.) Hue ve *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale toplanmıştır. Bu örneklerinin aseton ekstraktlarındaki usnik asit miktarları yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile belirlenmiştir.

Yöntem: Bu çalışmada, liken örneklerindeki usnik asit miktarı, HPLC kullanılarak belirlenmiştir. Disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktiviteleri tespit edilmiştir.

Bulgular: Seçilen türlerin kuru ağırlıklarının % 0.12-2.89'i kadar usnik asit içerdiği görülmüştür. Daha sonra bu ekstraktların *Escherichia coli* ATCC 35218, *Enterococcus faecalis* RSKK 508, *Proteus mirabilis* (Pasteur Ens. 235), *Proteus vulgaris* RSKK 255, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* (Pasteur Ens.), *Bacillus megaterium* (Pasteur Ens.5117), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853'e karşı antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. Liken türleri arasında en fazla antimikrobiyal etkiyi, en yüksek usnik asit miktarı tespit edilen *Letharia vulpina* türü göstermiştir.

Sonuç: Likenlerde belirlenen usnik asit miktarı arttıkça antimikrobiyal aktivitenin de arttığı görülmüştür.

Anahtar Sözcükler: Liken, usnik asit, HPLC, antimikrobiyal aktivite.

ABSTRACT

Objective: Four species of lichens, *Evernia divaricata* (L.) Ach., *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf., *Letharia vulpina* (L.) Hue and *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale were collected from different areas of Turkey (district Karabük-Çankırı-Trabzon). Their usnic acid amounts in acetone extracts were determined by HPLC.

Method: Quantitative analysis of usnic acid in lichen samples was achieved using HPLC. For screening the antimicrobial activity of usnic acid, the agar disk diffusion method was used.

Results: The usnic acid contents of examined lichens species varied between 0.12% to 2.89%. The antimicrobial activity of these extracts were determined against *Escherichia coli* ATCC 35218, *Enterococcus faecalis* RSKK 508, *Proteus mirabilis* (Pasteur Ens. 235), *Proteus vulgaris* RSKK 255, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* (Pasteur Ens.), *Bacillus megaterium* (Pasteur Ens.5117) and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. The maximum antibacterial efficiency among lichen species was exhibited by *Letharia vulpina*, which has also the highest usnic acid level.

Conclusion: With increasing levels of usnic acid there is also an increase in the antimicrobial activity.

Key Words: Lichens, usnic acid, HPLC, antimicrobial activities.

GİRİŞ

Bütün dünyada olduğu gibi Türkiye'de de tıbbi açıdan önemli, farmasötik özelliği olan bitkiler halk arasında yüzyıllardan beri hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Bitkilerin yanında likenler de bu amaçla kullanılmaktadır. Liken metabolitlerinin değişik mikroorganizmalar, mayalar ve *Cyanobacteria* üzerine antibiyotik etki gösterdiği uzun yıllardan beri bilinmektedir. En etkili liken asitlerine örnek olarak usnik asit, rhizokar asidi, barbatin asidi, evernin asidi, atranorin asidi, fizot asidi, fizodal asidi, ramalin asidi, stiktik asit, setrarik asit, gyrophoric asit, fumarprotocetrarik asit, peltigerin (Tenuiorin) asidi ve lichenesterik asit verilebilir (1).

Usnik asit [2,6-diasetil-7,9-dihidroksi-8,9b-dimetil-1,3(2H9bH)-dibenzo-furandion] 1844'de ilk izolasyonundan bu yana en yoğun çalışılan ve ticari olarak üretilen liken metaboliti olmuştur (2). Saf usnik asit krem, diş macunu, deodorant, güneş koruma ürünlerinde aktif bileşen veya koruyucu madde olarak ilaç, parfümeri ve kozmetik endüstrisinde kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra liken metabolitlerinin özellikle gram-pozitif bakterilere ve bazı funguslara antagonist aktivite gösterdiği bildirilmiştir (3-5). Türkiye'deki biyolojik çeşitliliğin önemli bir kaynağı olan likenler Anadolu'da gösterdiği tür zenginliği ile ilaç sanayii dışında boya sanayiinde de kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, Türkiye'nin farklı yerlerinden toplanan liken örneklerinde, ilaç ve parfümeri sanayisinde yaygın olarak kullanılan usnik asit miktarının yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) analiz yöntemiyle belirlenmesi ve antimikrobiyal aktivitesinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Liken örnekleri

Çalışmada kullanılan örnekler 2005 yılında, Karabük Yenice Ormanı Elmaören (45°38'E, 45°43'N, 780m); Çankırı Yapraklı Popirunkaşı Tepe (40°47'E, 33°46'N, 1750 m); Trabzon Uzungöl Soğanlı (37°61'E, 44°84'N, 1799 m) mevkilerinden toplanmıştır.

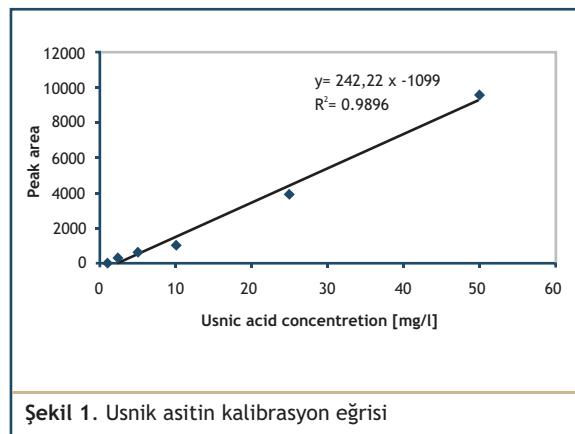
Toplanan örneklerin tür teşhisi, Wirth (1995) (6) ile Purvis ve ark., (7) tarafından tanımlanan anahtar-lara göre yapılmıştır. Laboratuvara getirilen liken örnekleri oda sıcaklığında kurutulduktan sonra likenlere özel zarf sistemi içerisine konulmuştur. Liken örnekleri, Ankara Üniversitesi Herbariumu (ANK)'nda muhafaza edilmiştir.

Liken örneklerinin HPLC analizi

Analiz örnekleri, Cansaran ve ark.'ları (8) tarafından tanımlanan protokole göre hazırlanmıştır. Kurutulan liken örnekleri toz haline getirilerek vidalı kapaklı cam tüplere konulmuştur. Liken örnekleri 5 µg/ml olacak şekilde aseton (Sigma) içerisinde, oda sıcaklığında bir saat inkübasyona bırakılmıştır. Örnekler HPLC'de analize alınmaya kadar +4°C'de karanlıkta saklanmıştır. Analiz öncesi tüm örnekler 0.45 µm gözenek çaplı filtrelerden (Sartorius) geçirilerek 20 µl'lik hacimde HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

Tüm standart ve çözücüler Çetin ve Cansaran'a (9) göre hazırlanmıştır. Usnik asitin (Sigma) stok solüsyonu 1 mg/ml konsantrasyonunda aseton içerisinde hazırlanmıştır. Gerekli seyreltmeler bu stok çözeltiden aseton ile seyreltilerek yapılmıştır (0,01 ppm-50 ppm). Tüm standartlar otomatik örnekleyiciye konmuş ve analiz edilmiştir. Usnik asit için kalibrasyon eğrileri çeşitli konsantrasyonlardaki yedi örnekten lineer regresyon analizi ile elde edilmiştir (Şekil 1).

Deneylerimizde Surveyor LC pompa, Surveyor fotodiyot dizi detektörü, Surveyor oto örnekleyici,



Şekil 1. Usnik asitin kalibrasyon eğrisi

ChromQuest 4.01 veri işlemcisinden oluşan Thermo Finnigan HPLC sistemi kullanılmıştır. Ters faz Shim-pack CLC-ODS (M), 5 m partikül boyutlu, 250 mm x 4.6 mm iç çapında paslanmaz çelik kolon (C18) kullanılmıştır. Akış hızı 0.8 ml/dak. olarak seçilmiştir. Usnik asitin 245 nm'de belirlenmesi için metanol fosfat tamponu (pH 7.4) (70:30 v/v) hareketli faz olarak kullanılmıştır (10-12). 20 µl lik hacimlerde örnekler HPLC sistemine üç defa enjekte edilmiştir. Her bir analiz için ortalama değer hesaplanmıştır.

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

Çalışmamızda Refik Saydam Ulusal Tıp Kültür Koleksiyonu (RSKK) ve Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilen *Escherichia coli* ATCC 35218, *Enterococcus faecalis* RSKK 508, *Proteus mirabilis* (Pasteur Ens. 235), *Proteus vulgaris* RSKK 255, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* (Pasteur Ens.), *Bacillus megaterium* (Pasteur Ens.5117), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşları kullanılmıştır.

Kurutulan liken örneklerinden 0,1 gr tartılarak, vidalı kapaklı cam tüplere konulmuştur. Üzerine 5 ml aseton ilave edilmiş ve 1 saat oda ısısında inkübe edilmiştir. Süre sonunda tüpler santrifüj edilerek likenler ayrılmıştır. Sıvı kısım, antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi için deneylerde kullanılmıştır (13).

Liken ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesinde disk difüzyon yöntemi uygulanmıştır. Hazırlanan 6 mm çapındaki steril kağıt disklere yukarıda belirtilen şekilde hazırlanan ekstraktan 50 µl emdirilmiştir. Kullanılan asetonun tek başına antimikrobiyal etki gösterip göstermediğinin belirlenmesi amacıyla, steril kağıt diskleri hazırlanmıştır. Ayrıca mukayese antibiyotiği olarak, tetrasiklin (Oxoid 30 µg) diskleri kullanılmıştır.

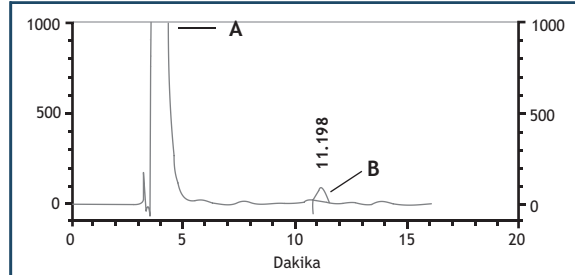
Denenecek 24 saatlik aktif mikroorganizma kültürleri, petride hazırlanan nutrient agar (Merck) besiyerine tüm yüzeye homojen olacak şekilde drigalski ile inoküle edilmiştir. Daha sonra ekstratlar emdirilmiş diskler ve kontrol diskleri hazırlanan petrilere aseptik olarak yerleştirilmiştir (14).

Petriler 37°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra diskler çevresindeki inhibasyon zonları oluşumu milimetrik cetvel ile ölçülerek zon çapları mm olarak değerlendirilmiştir. Denemeler üç tekrarlı yapılmıştır.

BULGULAR

Tür teşhisleri yapılan örneklerden *Evernia divaricata* (Karabük Yenice Ormanı Elmaören), *Pseudevernia furfuracea* (Çankırı Yapraklı Popırunkaşı Tepe), *Letharia vulpina* ve *Flavoparmelia caperata* (Trabzon- Uzungöl- Soğanlı) liken türlerinin aseton ekstratlarındaki usnik asit miktarı HPLC yöntemi ile belirlenmiştir. Şekil 2'de *P. furfuracea*'den elde edilen usnik asitin kromatogramı, Tablo 1'de ise aseton ekstratlarından elde edilen usnik asit miktarları ve alıkonma süreleri verilmiştir.

Tablo 1'de gösterildiği gibi çalışmada kullanılan türlerden *L. vulpina* ve *F. caperata* yüksek miktarda usnik asit içermektedirler.



Şekil 2. HPLC yöntemi ile *Pseudevernia furfuracea*'da usnik asit analizi.
(A) çözücü ($t_R=3.9$ dak); (B) usnik asit ($t_R=11.198$ dak.)

Bu türlere ait aseton ekstratlarının yedi test bakterisine karşı antimikrobiyal aktiviteleri test edilmiştir. Yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmaları sonucunda usnik asit içeren aseton ekstratlarının gram (-) ve gram (+) bakteriler üzerinde farklı oranlarda antimikrobiyal etkiye sahip oldukları belirlenmiştir (Tablo 2). Kontrol amacıyla kullandığımız, sadece aseton emdirilerek hazırlanan diskler mikroorganizmalara karşı hiçbir aktivite göstermemiştir.

L. vulpina ve *F. caperata*'dan elde edilen aseton ekstratlarının test edilen bakterilerin birçoğuna etki ettiği bulunmuştur. *L. vulpina* ekstresi *B. mega-*

Tablo 1. Liken türlerinin usnik asit içeriği ve alıkonma süreleri

Türler	Kuru Ağırlıkta usnik asit miktarı (mg/l)	Kuru Ağırlıkta usnik asit yüzdesi	alıkonma süresi [dak]
<i>Evernia divaricata</i>	13	0.210±0.01	13.858
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	8,5	0.123±0.01	11.198
<i>Letharia vulpina</i>	111	2.897±0.04	10.072
<i>Flavoparmelia caperata</i>	196,8	1.290±0.03	13.962

Tablo 2. likenlerin aseton ekstrelerinin antimikrobiyal aktiviteleri

	İnhibisyon Zonları (mm)				
	A*	B	C	D	Tet
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	–	7±0.02	7±0.03	12±0.03	40
<i>B. subtilis</i> (Pasteur Ens.)	10±0.02	12±0.02	17±0.03	25±0.03	26
<i>B. megaterium</i> (Pasteur Ens. 5117)	12±0.02	10±0.02	15±0.03	21±0.03	20
<i>E. coli</i> ATCC 35218	–	–	–	12±0.03	12
<i>E. feacalis</i> RSKK 508	–	–	–	–	30
<i>P. mirabilis</i> (Pasteur Ens. 235)	–	–	–	8±0.03	8
<i>P. vulgaris</i> RSKK 255	–	–	–	–	27
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	–	–	–	–	20

*A: *Pseudevernia furfuracea*, B: *Evernia divaricata*, C: *Flavoparmelia caperata*, D: *Letharia vulpina*, Tet: Tetrasiklin, (-) inhibisyon yok

terium (Pasteur Ens.5117) ve *B. subtilis* (Pasteur Ens.) üzerine en yüksek inhibisyon etkisi göstermiştir. Aynı zamanda bu ekstrakt *E. coli* ve *P. mirabilis* gibi gram negatif bakterilerin bile gelişimini inhibe etmiştir. Bunlara ek olarak *E. divaricata*, *P. furfuracea*, *L. vulpina* ve *F. caperata*'nın aseton ekstrelerinin usnik asit miktarı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile belirlenmiştir. Liken ekstraktlarının kromatogramdaki piklerinin tanımlanması standart usnik asit ile alıkonma sürelerinin karşılaştırılması ile yapılmıştır. Usnik asit miktarları ve *E. divaricata*, *P. furfuracea*, *L. vulpina* ve *F. caperata* türlerinin aseton ekstrelerinin alıkonma süreleri Tablo 1'de verilmiştir. Trabzon İli Uzungöl Yöresi'nden toplanan *L. vulpina* likeninin kuru ağırlığının yaklaşık % 2.89 inde en yüksek usnik asit miktarı belirlenmiştir.

Çalışılan örneklerdeki usnik asit miktarının antimikrobiyal aktivitesine bakıldığında, hazırlanan ekstreler; özellikle *B. megaterium* (Pasteur Ens.5117), *B. subtilis* (Pasteur Ens.) ve *S. aureus* ATCC 25923 bakterilerinin üremesine karşı etkili bulunmuştur. Ancak ekstrelerin Gram negatif bakte-

rilerden, *P. vulgaris* RSKK 255, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve Gram pozitif bakterilerden *E. feacalis* RSKK 508 üzerine antimikrobiyal etki göstermediği saptanmıştır.

TARTIŞMA

Likenlerin antibiyotik özelliği konusunda birçok ülkede araştırma yapılmıştır. Günümüzde likenlerden elde edilen 80 civarında antibiyotik madde tespit edilmiştir. Usnik asitin ve usnik asit içeren liken ekstrelerinin Gram pozitif bakteriler, anaerobik bakteriler ve bazı mayalara karşı antimikrobiyal aktivitesinin olduğu pek çok çalışma ile gösterilmiştir (1,15-17). Çalışmamızın usnik asitin antimikrobiyal aktivitesi ile ilgili bulguları Cansaran 2006 (8); Dülger vd. 1997 (13); Esimone ve Adikwu 1999 (18) ve Tay vd. 'nin 2004 (19) araştırma sonuçları ile uygunluk göstermektedir.

Usnik asit; *Cladonia*, *Usnea*, *Lecanora*, *Ramalina*, *Evernia*, *Parmelia* ve diğer liken türlerinde yaygın olarak bulunmaktadır. *Usnea* türlerinde % 6.5, *Alectoria* % 6, *Rhizoplaca* türlerinde % 4.0'e kadar usnik asit bulunduğu kaydedilmiştir (8, 20). Bu

çalışmada araştırılan liken türlerinde kuru ağırlığın % 0.12-2.89'i kadar usnik asit bulunduğu, *L. vulpina'* nın % 2.89 ile en yüksek oranda usnik asit içerdiği görülmüştür. İlginç olarak, çalışılan türler içinde en yüksek oranda usnik asit içeren *L. vulpina'* nın aseton ekstresinin en yüksek antimikrobiyal etkiye sahip olduğu da tespit edilmiştir.

Dünyada son yıllarda, likenlerin salgıladığı asitler ve bunların etkilerinin değerlendirilmesi konusunda yapılan çalışmalar büyük hız kazanmıştır. Ülkemizde çeşitli liken türleriyle yapılan çalışmalarda bazı liken türlerinin test mikroorganizmaları üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir. Farklı liken türleri ve test mikroorganizmaları kullanılarak yapılan bu çalışma ile Türkiye'de bulunan liken çeşitlerinin usnik asit içeriğinin tespit edilmesi ve antimikrobiyal aktivitelerinin ortaya çıkarılması çalışmalarına katkıda bulunulması hedeflenmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Enstrümental Analiz Laboratuvarı tarafından desteklenmiştir. Yazar, destekleri ve teşviklerinden dolayı Prof. Dr. Orhan Atakol'a (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü) teşekkür eder.

KAYNAKLAR

1. Ingoldsdottir K. Usnic acid. *Phytochemistry*, 2002; 61: 729-736.
2. Knop W. Chemisch-physiologische Untersuchung über die Flechten. *Ann Chem Pharm*, 1844; 49:103-124.
3. Ahmadjian V, Hale ME. *The Lichens*. Academic Press. London: 1973.
4. Manojlovic NT, Solujic S, Sukdolak S. Antimicrobial activity of an extract and anthraquinones from *Caloplaca schaeereric*. *The British Lichen Society*, 2002; 34:83-85.
5. Müller K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001; 56:9-16.
6. Wirth V. *Die Flechten Baden-Württembergs*. Teil 12, Eugen Ulmer GmbH. Co. Germany: 1995.
7. Purvis WO, Coppins BJ, Hawksworth DL, James PW, Moore DM. *The lichen flora of Great Britain and Ireland*. Natural History Museum Publications. England: 1992.
8. Cansaran D, Çetin D, Halıcı MG, Atakol O. Determination of usnic acid in some *Rhizoplaca* species from middle Anatolia and their antimicrobial activities. *Z. Naturforsch*, 2006; 61c:47-51.
9. Çetin D, Cansaran D. Türkiye'de bulunan farklı liken türlerinin usnik asit miktarlarının yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile belirlenmesi. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2006;23-31.
10. Feige GB, Lumbsch S, Huneck JA, Elix J. Identification of lichen substances by a standardized high-performance liquid chromatographic method. *J Chromatography*, 1993; 646:417-427.
11. Yoshimura I, Kinoshita Y, Yamamoto S, Huneck S and Yamada Y. Analysis of secondary metabolites from lichen by high performance liquid chromatography with a photodiode array detector. *Phytochem Anal*, 1994; 5:195-205.
12. Kranner I, Beckett RP, Varma AK (Eds.) *Protocols in Lichenology*. Culturing, Biochemistry, Ecophysiology and Use in Biomonitoring. Springer Verlag, Berlin: 2002.
13. Dülger B., Gücin F., Kara A., Aslan A. *Usnea florida* (L.) Wigg. Likenin Antimikrobiyal Aktivitesi. *Tr J of Biology*, 1997; 21:103-108.
14. Perry NB, Benn MH, Brennan NJ, Burgess EJ, Ellis G, Galloway DJ, Lorimer SD, Tangney RS Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of New Zealand lichens. *Lichenologist*, 1999; 31:627-636.
15. Lauterwein M, Oethinger M, Belsner K, Peters T, Marre R. In vitro activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+)-usnic acid and (-)-usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995; 39: 2541-2543.
16. Krishna DR, Venkataramana D. Pharmacokinetics of D-(+)-usnic acid after intravenous and oral administration. *Drug Metabol Dispos*, 1992; 20:909-911.
17. Ghione M, Parrello D, Grasso L. Usnic acid revisited, its activity on oral flora. *Chemoterapie*, 1988; 7:302-305.
18. Esimone CO, Adikwu MU. Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Ramalina farinacea*. *Fitoterapia*, 1999; 70:428-431.
19. Tay T, Türk AÖ, Yılmaz M, Türk H, Kıvanç M. Evaluation of the antimicrobial activity of the acetone extract of the lichen *Ramalina farinacea* and its (+)-usnic acid, norstictic acid, and protocetraric acid constituents. *Z. Naturforsch*, 2004; 59c: 384-388.
20. Proksa B, Sturdikova M, Pronayova N, Liptaj T. (-)-Usnic acid and its derivatives. Their inhibition of fungal growth and enzyme activity. *Pharmazie*, 1996; 51:195-196.