T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HEDYSARUM AUCHERI (FABACEAE) BİTKİSİNİN KİMYASAL İÇERİĞİNİN ARAŞTIRILMASI VE FARKLI EKSTRELERİNİN ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ

Ülkü ARSLAN

KİMYA ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2017

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HEDYSARUM AUCHERI (FABACEAE) BİTKİSİNİN KİMYASAL İÇERİĞİNİN ARAŞTIRILMASI VE FARKLI EKSTRELERİNİN ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ

Ülkü ARSLAN

KİMYA ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2017

Yrd. Doç. Dr. Zafer UYAR danışmanlığında, Ülkü ARSLAN'ın hazırladığı **"*Hedysarum aucheri* (Fabaceae) Bitkisinin Kimyasal İçeriğinin Araştırılması ve Farklı Ekstrelerinin Antioksidan Aktivitesinin İncelenmesi."** konulu bu çalışma 03/08/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Zafer UYAR …….

Üye : Doç. Dr. Nasrettin GENLİ …….

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mustafa DURGUN …….

Bu Tezin Kimya Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım

Prof. Dr. Halil Murat ALĞIN
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma HÜBAK Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: 14144

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇİNDEKİLER i
ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
ÇİZELGELER DİZİNİ v
SİMGELER DİZİNİ vi
1. GİRİŞ 1
1.1. Botanik Kısım 1
1.1.1. Fabaceae (Leguminosae =Baklagiller) 1
1.1.2. Yüksek tüketimli baklagillerin antioksidan özellikleri 3
1.1.3. Biyolojik aktivite açısından fabaceae familyasına ait bazı önemli cinsler 4
1.2. Kimyasal Kısım 9
1.2.1. Yağ asitleri ve temel yağ asitleri 9
1.2.2. Sekonder metabolitler 11
1.3. Biyolojik Aktivite Kısmı 13
1.3.1. Antioksidan aktivite 13
1.3.2. Oksidatif stres ve insan sağlığı 14
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 21
3. MATERYAL ve YÖNTEM 27
3.1. Genel 27
3.2. Bitki materyali 28
3.3. Heksan Ekstresinin İçerdiği Yağ Asitlerinin Saptanması 29
3.4. Toplam Flavonoid İçeriğinin Saptanması 30
3.5. Toplam Fenolik İçeriğinin Saptanması 30
3.6. In vitro Antioksidan Aktivite Tayini 31
3.6.1. Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi (CUPRAC) 31
3.6.2. ABTS radikal süpürme testi 31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 33
4.1. Heksan Ekstresinin İçerdiği Yağ Asitleri 33
4.2. Ekstraksiyon Verimi, Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoid İçeriği 44
4.3. Antioksidan Aktivite Çalışmaları 45
4.3.1. CUPRAC testine göre antioksidan aktivite 45
4.3.2. ABTS testine göre antioksidan aktivite 46
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 48
KAYNAKLAR 50
ÖZGEÇMİŞ 58

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

HEDYSARUM AUCHERI (FABACEAE) BİTKİSİNİN KİMYASAL İÇERİĞİNİN ARAŞTIRILMASI VE FARKLI EKSTRELERİNİN ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ

Ülkü ARSLAN

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Zafer UYAR
Yıl:2017, Sayfa:59

Kurutulduktan ve öğütüldükten sonra *Hedysarum aucheri* (Fabaceae) bitkisi kimyasal olarak incelendi. Kurutulmuş materyalin sahip olduğu kimyasal içerik metanol ile bitkiden ekstrakte edildi. Elde edilen kaba metanol ekstresi daha sonra seçici katı-sıvı ve sıvı-sıvı ekstraksiyonları ile farklı ekstrelere ayrıldı. Kaba metanol ekstresi sırasıyla heksan ve diklorometan ile yıkanarak (katı-sıvı ekstraksiyonu) bu çözücülere ait ekstreler elde edildi. Geri kalan kısım üzerine bütanol ve su eklenerek (sıvı-sıvı ekstraksiyonu) maddenin tamamı bu iki fazlı karışım içerisinde çözündü ve ayırma hunisinde bu fazlar ayrılarak bütanol ve su ekstreleri elde edildi. Elde edilen bu ekstrelerin antioksidan aktiviteleri; toplam flavonoid içeriği, toplam fenolik içeriği, CUPRAC bakır(II) indirgeme esaslı antioksidan kapasite ve ABTS radikal süpürme kapasitesi testleri ile belirlendi. Ayrıca heksan ekstresinin metil esterleri hazırlanarak GC-MS analizleri yapıldı ve bitkinin sahip olduğu yağ asitleri tayin edildi.

ANAHTAR KELIMELER: *Hedysarum aucheri*, Yağ asitleri, Antioksidan aktivite, CUPRAC, ABTS, toplam fenolik içerik, toplam flavonoid içeriği.

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF CHEMICAL COMPOSITION OF *HEDYSARUM AUCHERI* (FABACEAE) AND EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ITS DIFFERENT EXTRACTS

Ülkü ARSLAN

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Asst. Prof. Zafer UYAR
Year: 2017, Page:59

After dried and ground, *Hedysarum aucheri* (Fabaceae) plant was chemically examined. The chemical content of the dried material was extracted with methanol. The resulting crude methanol extract was then separated into different extracts by selective solid-liquid and liquid-liquid extractions. Extracts of hexane and dichloromethane were obtained by washing the crude methanol extract with these solvents respectively (solid-liquid extraction). By adding butanol and water over the remainder (liquid-liquid extraction), all of the material was dissolved in this two-phase mixture and these phases were separated in the separation funnel to obtain butanol and water extracts. Antioxidant activities of these extracts obtained were determined by total flavonoid content, total phenolic content, antioxidant capacity based on CUPRAC copper (II) reduction and ABTS radical sweeping capacity tests. In addition, methyl esters of hexane extract were prepared and analyzed by GC-MS, and fatty acids of the plant were determined.

KEY WORDS: *Hedysarum Aucheri* (Fabaceae), Fatty acids, Antioxidant activity, CUPRAC, ABTS.

TEŞEKKÜR

İlham kaynağı ve insana güç veren özelliği sadece bana değil bütün öğrencilerine her gün gösterdiği özelliklerinden biri olan, zorluklarla nasıl mücadele etmemizi, başarısızlık karşısında pes etmememizi, yeniden ve yine yeniden denememizi, her yeni bir bilgi öğrendiğimizde bizimle birlikte sevinen ve bildiklerinin bilmedikleri yanında denizde damla olduğunu söyleyecek kadar mütevazi olan, bildiklerini bizimle paylaşmaktan keyif alan, yüksek lisans eğitimine başladığım ilk günden itibaren bilimsel çalışmalarıma yardım eden, tez çalışmamı yapmamda hiçbir yardımı esirgemeden yanımda olan, sabrı için, ayırdığı zamanı için, samimi ve içten olduğu için, elimden gelenin en iyisini yapmamı sağladığı için ve her zaman her konuda bana gösterdiği büyük anlayışı için danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Zafer UYAR'a, çok teşekkür ederim.

Tez konumla ilgili bilgi toplamamda beni yönlendiren, her sıkıştığımda soru sormaktan çekinmediğim, benim her soruma cevap veren beni asla geri çevirmeyen ve bitmek bilmeyen sorularıma gösterdiği büyük sabrından dolayı sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Ebru UYAR'a, teşekkür ederim.

Tez konum dışındaki çalışmalarda her kouda yanımda olup yardımcı olduğu için, güzel enerjisi ve sabrı için sevgili hocam Prof.Dr. Mustafa DEĞİRMENCİ'ye teşekkür ederim.

Tez düzeltme aşamasındaki yardımlarından dolayı, bana gösterdiği sabrı için ve sağladığı kolaylıklarlardan dolayı sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Mustafa DURGUN'a teşekkür ederim.

Laboratuvar ortamında birlikte çalıştığım ve deneylerim esnasında yardımlarını esirgemeyen Fatma TUMBUL'a teşekkür ederim.

Benimle birlikte uyumayıp bana destek olduğu için ve tez düzeltme aşamasındaki yardımlarından dolayı ev arkadaşım Hasin'e YEL'e çok teşekkür ederim.

Her anımda arkamda büyük desteklerini hissettiğim, iyi bir eğitim almam için her türlü fedakârlığı gösteren, beni asla yalnız bırakmayan, maddi manevi her koşulda yanımda olan aileme çok teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. 1. 2009'da çeşitli bitkiler için dünya çapında hasat edilen alan. Gıda ve Tarım Teşkilatı veri tabanından alınan veriler (FAO URL-1; Graham ve Vance (2003) 3
Şekil 1. 2. Hedysarum Aucheri (Fabaceae) bitkisinin Türkiye'de yetiştiği bölgeler..... 7
Şekil 1. 3. Hedysarum sınıfına ait bazı bitkiler (a) Hedysarum bore, (b) Hedysarum boveanum, (c) Hedysrum aucheri, (d) Hedysarum alpin, (e) Hedysarum occidentale..... 8
Şekil 1. 4. Alfa-linolenik ve linoleik asit yapısı 11
Şekil 1. 5. Oksidan ve antioksidan arasındaki dengesizlik..... 15
Şekil 1. 6. ROI ve RNI'nın karbonhidratlar ve lipitlerle reaksiyona girmesi, bunun sonucu olarak hem hücre içi hem de hücreler arası homeostaside muhtemel hücre ölümü ve rejenerasyon 15
Şekil 1. 7. Oksidatif stresin insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri 16
Şekil 3. 1. Hedysarum aucheribitkisinin ekstraksiyon şeması ..……29
Şekil 4. 1. *Hedysarum aucheri* bitkisinin Heksan ekstresinin metil esterlerinin GC-MS spektrumu33
Şekil 4. 2. *Hedysarum aucheri* bitkisinden elde edilen Heksan ekstresinde bulunan tetradekanoikasit'in yapısı ve GC-MS spektrumu..... 36
Şekil 4. 3. *Hedysarum aucheri* bitkisinden elde edilen Heksan ekstresinde bulunan Heksadekenoik asit, metil ester (Palmitic acid)'in yapısı ve GC-MS spektrumu 37
Şekil 4. 4. *Hedysarum aucheri* bitkisinden elde edilen Heksan ekstresinde bulunan (Z, Z)-9,12-Oktadekadienoik asit, metil ester (Linoleic acid)'in yapısı ve GC-MS spektrumu 38
Şekil 4. 5. *Hedysarum aucheri* bitkisinden elde edilen Heksan ekstresinde bulunan (Z, Z, Z)-9,12,15-Oktadekatrienoik asit, metil ester (Linolenic acid)'in yapısı ve GC-MS spektrumu..... 39
Şekil 4. 6. *Hedysarum aucheri* bitkisinden elde edilen Heksan ekstresinde bulunan [R-[R*,R*-(E)]]-3,7,11,15-tetrametil-2-Heksadeken-1-ol (Phytol)'ün yapısı ve GC-MS spektrumu..... 40
Şekil 4. 7. *Hedysarum aucheri* bitkisinden elde edilen Heksan ekstresinde bulunan Octadecanoic acid, methyl ester (Stearic acid)'in yapısı ve GC-MS spektrumu 41
Şekil 4. 8. *Hedysarum aucheri* bitkisinden elde edilen Heksan ekstresinde bulunan Dokosanoik asit, metil ester (Behenic Acid)'in yapısı ve GC-MS spektrumu..... 42
Şekil 4. 9. *Hedysarum aucheri* bitkisinden elde edilen Heksan ekstresinde bulunan Eikosanoik asit, metil ester (Methyl arachidate)'in yapısı ve GC-MS spektrumu..... 43
Şekil 4. 10. CUPRAC testine göre *H. aucheri* ekstrelerinin ve standart'ın (gallik asit) antioksidan aktiviteleri..... 45
Şekil 4. 11. ABTS radikal süpürme testine göre *H. aucheri* ekstrelerinin ve standart'ın (gallik asit) antioksidan aktiviteleri 46

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 4. 1. Hedysarum aucheri bitkisinin heksan ekstresinin GC-MS analizine göre içerdiği doğal bileşikler (Analiz için bileşenlerin metil esterleri hazırlandığı için yağ asitleri metil esterleri şeklindedir ve mavi zemin rengi ile gösterilmektedir. 34
Çizelge 4. 2. Hedysarum aucheri bitkisinin Heksan ekstresinin GC-MS analizine göre % 92.87'lik kısmını oluşturan ana bileşenler 35
Çizelge 4. 3. Farklı Hedysarum aucheri ekstrelerinin toplam flavonoid, toplam fenolik içerik ve ekstraksiyon verimleri (%)..... 44

SİMGELER DİZİNİ

$AlCl_3$	Alüminyum klorür
BuOH	Bütanol
CH_2Cl	Diklorometan
$CuCl_2$	Bakır (II) klorür
DMSO	Dimetil sülfoksit
GAE	Gallik asit eş değeri
KOH	Potasyum hidroksit
$K_2S_2O_8$	Potasyum persülfat
MeOH	Metanol
MSD	Mass selektiv dedektör-kütle seçici
NaOH	Sodyum hidroksit
$NaNO_2$	Sodyum nitrit

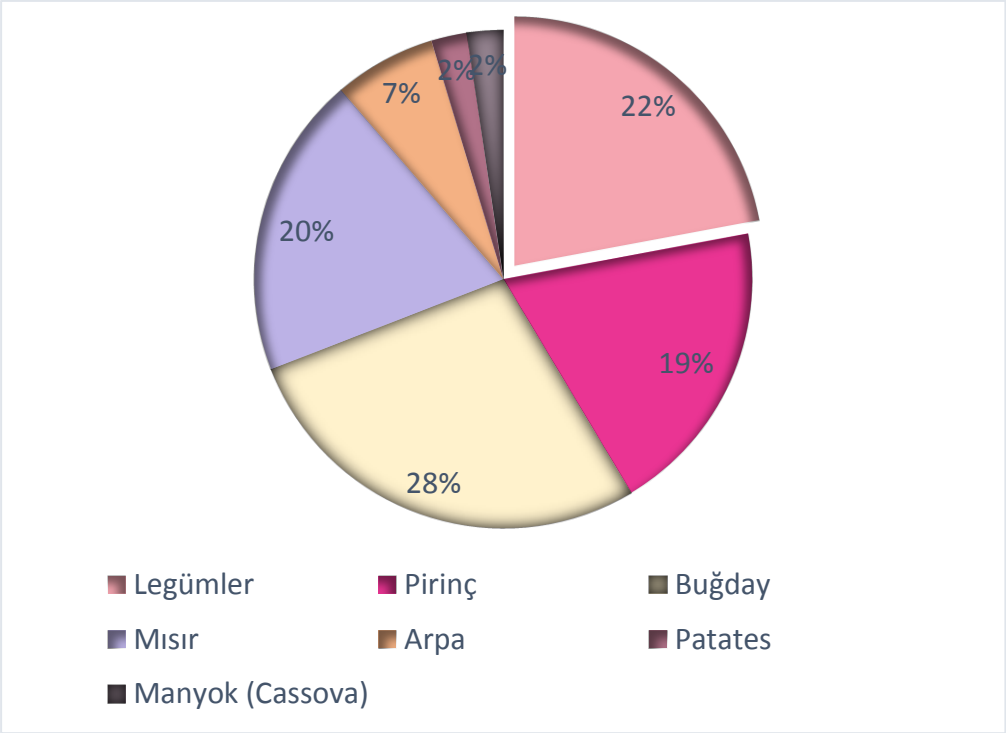
1. GİRİŞ

1.1. Botanik Kısım

1.1.1. Fabaceae (Leguminosae =Baklagiller)

Fabaceae ailesi Leguminosae, fasulye ve bakla olarak da adlandırılır. Bu aile 36 takım, 727 cins ve 19327 türe sahiptir ve kapalı tohum bitkilerinin en büyük üçüncü ailesidir (Levis ve ark., 2005). Bu sınıflandırmanın güvenirliliği yapılan filogenetik çalışmalarla da desteklenmiştir (Doyle ve ark., 2000; Kajita ve ark., 2001; Wojciechowski, 2003; Wojciechowski ve ark., 2004). Baklagiller gerek tarımsal gerekse ekonomik açıdan oldukça değerli bir bitki grubudur. Baklagiller sıra dışı çeşitlilik ve bolluğundan dolayı ekonomik ve kültürel açıdan önemlidir (Allen ve Allen, 1981). Beslenme amaçlı kullanılmalarının yanı sıra topraktaki azotu özümsemeleri bu ailenin değerini bir kat daha arttırmaktadır (Pandey ve ark., 2008). Fasulye, bakla, nohut, soya, mercimek, bezelye gibi insan gıdası olarak da kullanılan türler bu ailedendir. Baklagiller otsu bir yapıda oldukları gibi odunsu bir yapıda da olabilirler. Yalancı akasya, yabani keçiboynuzu ve akasya gibi türler odunsu yapıya sahiptir. Yaprakları saplı neredeyse hepsi almaşık dizilidir; tüylü ve üç yapraklıdır. Çiçekler zigomorfik yapıdadır. Genellikle salkım durumlu başakçık ya da başlıdır. Aile üyelerindeki çiçeklerin hepsi beş taç yapraklıdır. Taç yapraklarının iki kenarında birer yaprakçık bulunur. On erkek organ (stamen) ayrı ya da birleşik grup oluşturur. Dişi organ da (pistil) tek bir tepecik (stigma) vardır. Meyve legümendir. Tohum sert kabukludur ve genellikle böbrek şeklindedir ya da yuvarlak yapıya sahiptir. Kazık köklere sahiptir ve ana kökün etrafında damarlanma gösteren ikinci bir kök vardır. Rhizobium bakterileri tarfından havanın serbest azatonu bağlarlar. Legümler tohum zarfları (seedpods) oluşturabilen çiçekli bitkiler olup, yağmur ormanlarından ve Alplerden/kutuplardan çöllere kadar birçok ekosistemi kolonileştirmişlerdir ve arkeolojik bitki kayıtlarının çoğunda bulunurlar. Antik Roma bilgini Varro, M.Ö 37'li yıllarda çoklu ve karışık ekimin önemini fark etmiş ve bu nedenle baklagillerin hafif toprağa ekilmesinin kendi ürünleri için olmasa da diğer ekimlerin mahsullerini

arttırmada faydalı olacağını belirtmiştir. Baklagiller önemli hububat tohumu, mera ve tarımsal ormancılık türlerini içerir. İnsan ve hayvan tüketimi için mahsul olarak hasat edilmiş bununla birlikte kağıt üretimi, yakacak odun, kereste, yağ üretimi, kimyasal madde ve ilaç kaynakları posa olarak kullanılmaktadır ve ayrıca diğerleri arasında canlı çit ve ateş patlamaları olarak kullanılan dekoratif olarak yetiştirilmektedir. Baklagiller toprağa pek çok fayda sağlarlar bu yüzden genellikle tahıl ve diğer temel gıda maddesi ile birlikte ekilmiş ürün olarak kullanılırlar. Toprakta gözeneklilik ve yapı geliştirmek, besin maddelerini geri dönüştürmek, toprak PH'sını düşürmek, toprak sıkışmasını azaltmak, mikroorganizmaları çeşitlendirmek ve hastalık sorunlarını azaltmak için çok miktarda organik azot üretimi yaparlar. Baklagiller tahıllarla birlikte rotasyonda, sürdürülebilir kırpma sistemlerine katkıda bulunan yavaş salınımlı azot kaynağı sağlarlar. Bu yüzden bu ürünlerin üretimindeki gelişme insan beslenmesi ve toprak sağlığına daha fazla katkıda bulunacaktır. Toplam hasat edilmiş alan ve ürüne dayanılarak tahıllar en önemli mahsuldür ve bunu baklagiller izlemektedir. 180 milyon Ha'ya yakın (Dünya'nın ekilebilir yüzeyinin %12-15'i kadar) tahıl ve baklagiller yem bitkileri üretmek için dünya çapında kullanılır. Bu rakamlar dünya baklagiller üretiminin merkezi önemini göstermektedir. Ayrıca baklagiller biokütle özellikle soya fasulyesinin düşük maliyetli üretimi biyoenerji amaçlı yatırımcıların baklagiller üretiminin geliştirilmesine odaklanmaları için söz vermeleri görüşmelerin tamamının bir bölümüdür.



Şekil 1. 1. 2009'da çeşitli bitkiler için dünya çapında hasat edilen alan. Gıda ve Tarım Teşkilatı veri tabanından alınan veriler (FAO URL-1; Graham ve Vance (2003)

1.1.2. Yüksek tüketimli baklagillerin antioksidan özellikleri

Baklagillerdeki antioksidanlar, flavonoidler, fenolik asitler, lignanlar ve tanninler gibi tohum katlarında bol miktarda bulunurlar. Bu fenolik bileşikler kronik hastalıklara karşı faydalı bazı birkaç fizyolojik özelliklere sahiptir. Antioksidanlar baklagil tohumlarında doğal olarak bulunmaktadır (Chau ve Cheung, 1997).

Birçok çalışmada baklagillerdeki antioksidan aktiviteler ve fenolik bileşikler rapor edilmiştir. Organizmaları oksijen radikallerinin zararlı etkilerine karşı koruyan fenolik bileşiklere atfedilen antioksidan aktivitelerinden dolayı, meyve ve sebzelerinin biyoaktif bileşiklerin vücut arzına önemli ölçüde katkıda bulunduğu kanıtlanmıştır. Baklagiller zengin protein, besin lifi, mikro besin maddeleri ve biyoaktif foto kimyasal maddelerdir. Deneysel, epidemiolojik ve klinik araştımalar, baklagiller tüketimi ile kanser, kardiyovasküler hastalıklar, obezite ve diyabet gibi çeşitli hastalıkların görülme sıklığı arasındaki korelasyonları göstermektedir (Boudjou ve ark., 2012). Baklagillerin antioksidan kapasitesi ve antiproliferatif

etkileri fenolik bileşiklerin varlığı ile ilişkilidir. Bitkinin biyolojik çeşitliliğine ve kökenine bağlı olarak baklagillerin antioksidan kapasitesi çok kapsamlılık gösterir. Diğer yandan, teknolojik işleme baklagil tohumlarındaki doğal antioksidanların (örn., tokoferol, fenoller, vitamin C) seviyelerini etkileyebilir.

1.1.3. Biyolojik aktivite açısından fabaceae familyasına ait bazı önemli cinsler

Astragalus: Fabaceae (Leguminosae) familyasının Papilioneideae alt familyasında olan Astragalus L. cinsi hemen hemen 2500 tür ile temsil edilir (Maassoumi, 1998). Anadolu'da endemizm oranı oldukça yüksektir. Ülkemizde Astragalus cinsinin 456 türü yayılış göstermektedir. Bunun 210'u endemiktir ve endemizm oranı % 47'dir. (Chamberlain ve Matthews, 1970; Davis ve ark., 1988; Duman ve Akan, 2003).

Trifolium: Trifolium taksonu, hem tarımsal hem de tür sayısı bakımından (yaklaşık olarak 300) Leguminosae ailesinin en önemli cinslerinden biridir. Trifolium özellikle Türkiye'de Akdeniz bölgesinde yaygın olup 103 türü temsil etmektedir. Trifolium pretense L. (kırmızı yonca), yüksek konsantrasyonlarda izoflavonoidler içerir; bunlar Leguminosae ailesinde yaygın olarak bulunan bileşiklerdir. Kırmızı yonca içindeki izoflavonlar biohanin A ve formononetin'dir. Bazı Trifolium türlerinin, anti-inflamatuar aktivite, antioksidan aktivite, antisestodal aktivite, sitostatik aktivite, sitotoksik aktivite ve östrojenik aktivite gibi biyolojik aktiviteler sergilediği ve bazı geleneksel tıbbi uygulamalarda kanserlere ve kardiyovasküler hastalıklara karşı bir kemoprotektif madde olarak kullanılabileceği saptanmıştır.

Trigonella: Trigonella baklagiller familyasına ait bir ot türüdür. Anavatanı yakın doğu, özellikle Lübnan ve Suriye, Güneybatı Avrupa, Hindistan ve Çin'dir. Bu bitkinin ülkemizde en yaygın olarak bulunduğu bölge olan Yozgat ve Kayseri'de yerel ismi çaman otudur. Çin'den Akdeniz'e kadar geniş bir alana yayılmıştır. Hint ilaç yönetiminde Trigonella foenum graecum önemli bir tıbbi bitkidir, yapraklar ve kökleri çeşitli hastalıklarda sağlıklı tonik olarak kullanılmıştır. Raporlar Trigonella

foenum graecum'un farmakolojik aktivitelerinin anti diyabetik, antifungal, analgesic (ağrı kesici), anti-inflamatuvar, antipyretic (ateş düşürücü) ve immünomodülatör faaliyetleri içerdiğini ortaya koymuştur. Yapılan bir çalışmada Trigonella foenum graecum ekstresinin alkaloidler, flavonoidler, saponinler, karbonhidratlar, proteinler ve tanninleri içerdiği bulunmuştur (Subhashini ve ark., 2011).

Medicago: Medicago sativa L. (yonca) bitkisi yerel olarak "Lucerne'nin manda otu" olarak bilinir. Yonca (medicago sativa L.) filizi genellikle sebze salatası olarak tüketilir ve yaprakları veya tohımları sağlıklı gıda mağazalarında besin desteği için toplu toz ot, kapsül ve tablet olarak satılır (Nadkarni, 1976).

Glycyrrhiza: Genellikle mulethi ve meyan kökü olarak bilinen glycyrrhiza; küçük, uzun ömürlü bir bitkidir. Anavatanı Rusya ve Çin'dir. Meyan kökü (Glycyrrhiza glabra L.), öksürük şurupları, sakızlar, içecekler, şeker gibi gıda ürünlerinde ve eczacılık ürünlerinde dünya çapında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Glycine: Glycine max. baklagiller (Fabaceae) familyasından 1-1,5 cm boyunda, kısmen sarılıcı, dallanmış bir yıllık bir bitkidir. Çin ve Japonya'da geniş ölçüde ziraatı yapılır. Glycine max. soya fasulyesi olarak da bilinir. Soya dünyada en çok kullanılan bitkilerden biridir. Proteince çok zengin ve dünya da en fazla tüketilen yağ soya yağıdır.

Sutherlandia: Güney Afrika'da en çok bilinen çok amaçlı tıbbi bitkilerden biri olan Sutherlandia frutescens subsp. microphylla (Fabaceae) kanser, viral hastalıklar, inflamatuvar durumlar dahil olmak üzere geniş bir yelpazedeki durumlar için kullanılır. Bağışıklık sistemi üzerine Sutherlandia frutescensin etki mekanizması hakkında belgelenmiş bilimsel veriler bulunmaktadır. Hidrojen peroksit ve süperoksit radikalleri gibi fagosit türevi reaktif oksijen türleri çeşitli inflamatuvar koşulların patogenezinden sorumludur. Çeşitli bitki ekstrelerinin anti-inflamatuvar özellikleri kısmen antioksidan aktiviteleri ile açıklanmıştır.

Indigofera: *Indigofera tinctorial* L. (Fabaceae), geleneksel olarak kanser, karaciğer bozukluğu, iltihaplanma, ülser, ve sinir sistemi bozukluğu gibi çeşitli rahatsızlıklar için Hint ve Çin tıbbi sistemlerinde kullanılır. *Indigofera tinctorial* L. (Fabaceae) dik, tüylü bir çalıdır ve eskiden beri Hint ve Çin tıbbi sisteminin bir parçası olmuştur. Bu bitki yapraklarından ve dallarından elde edilen doğal mavi boya (indigo) ile bilinir. Çeşitli sinir hastalıkları, karaciğer rahatsızlıkları, epilepsi, kanser, inflamasyon, bronşit, yara merhemi, eski ülserler ve hemoroid tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Liang ve ark., 1997; Nadkarni, 1976).

Pueraria: *Puararia tuberosa Linn*. (Leguminosae), Hindistan'ın tropical bölgelerinde yetişen uzun ömürlü bir sarmaşıktır. Ayurverdik (ayuveerdic medicine) tıp sisteminde ağrı, iltihaplanma ve diğer ilgili hastalıkları halletmek için tercih edilen bir ilaç olarak kullanılır.

Hedysarum: Fabaceae ailesinden olan *Hedysarum* cinsi yaklaşık olarak 200 tür içermektedir. Genellikle Avrupa'nın soğuk dağlık bölgelerinde Kuzey Amerika, Asya. Akdeniz Bölgesi ve daha çok Ortadoğu'da yayılım gösterir (Yakovlev ve ark., 1996; Choi ve Ohashi, 2003). Türkiye'de 11 çeşit endemik *Hedysarum* türü bulunmaktadır (Anonim, 1983)

Bu türlerden birisi olan *Hedysarum aucheri* (Fabaceae) Elazığ-Malatya yöresine endemik olup (Davis, 1970), neslinin doğada tükenme riskinin yüksek olduğu kabul edilmektedir (Anonim, 1983).



Şekil 1. 2. Hedysarum Aucheri (Fabaceae) bitkisinin Türkiye'de yetiştiği bölgeler

Hedysarum aucheri çok yıllık bir bitkidir. Yassı ot şeklindedir, yaprakları oval yeşil ve tüylüdür. Haziran ayında çiçeklenir. Çiçek salkımı uzundur. Boyu 15-25 cm civarlarındadır. Yüksekliği 1000 m civarında olan yerlerde yetişir. Türkiye'deki dağılımı Doğu Anadolu bölgesindedir. Endemik ve İran -Turan elementidir.



Şekil 1. 3. Hedysarum sınıfına ait bazı bitkiler (a) Hedysarum bore, (b) Hedysarum boveanum, (c) Hedysrum aucheri, (d) Hedysarum alpin, (e) Hedysarum occidentale

1.2. Kimyasal Kısım

1.2.1. Yağ asitleri ve temel yağ asitleri

Yağ asitleri hidrokarbon zincirli monokarboksilik organik asitlerdir. Yapılarında 4-36 karbonlu hidrokarbon zincirinin ucunda karboksil grubu bulunur. Özellikle biyokimya da bir yağ asidi doymuş ve doymamış uzun bir alifatik zincirine sahip bir karboksilik asittir. Çoğu doğal olarak bulunan yağ asitleri 4 ile 36 arasında eşit sayıda karbon atomuna sahip dallanmamış bir zincire sahiptir. Yağ asitleri genellikle trigliseridlerden ya da fosfolipitlerden türetilmektedir. Yağ asitleri hayvanlar için çok önemlidir çünkü metabolize edilmiş olduğundan onlar için çok miktarda ATP üretirler. Çoğu hücre tipleri ya glikoz ya da yağ asitlerini bu amaç için kullanabilirler.

Yağ asitlerinin yapısında yer alan hidrokarbon zinciri karbonları, -COOH karbonundan itibaren isimlendirilir. –COOH karbonunua komşu olan birinci karbon atomuna α- karbon, ikinciye β- karbon üçüncüye γ-karbon ve en sonda bulunan metil grubunun karbonuna ise ω- karbon denir. Yağ asitleri uzunluklarına göre farklılık gösterir, genellikle çok uzun ve kısa olarak katagorize edilirler. Kısa zincirli yağ asitleri beş ya da daha az sayıda karbon içeren alifatik uçlu yağ asitleridir. Orta zincirli yağ asitleri, orta zincirli trigliseridlerden oluşturulabilen 6 ile 12 karbon içeren alifatik uçlu yağ asitleridir. Uzun zincirli yağ asitleri ise 13 ile 21 karbon içeren alifatik uçlu yağ asitleridir. Ve son olarak çok uzun zincirli yağ asitleri, 22 ya da daha fazla karbon içeren alifatik uçlu yağ asitleridir.

Karbon atomları arasında çift bağ olan yağlar doymamış yağ asidi olarak bilinir. Çift bağ içermeyenler ise doymuş yağ olarak bilinir. Ve bunlar da uzunluk bakımından farklılık gösterir.

Doymamış yağ asitleri karbon atomları arasında bir ya da daha fazla çift bağa sahip olan yağ asitleridir. Çift bağlar ile bağlanmış karbon atomlarının çiftleri, çift bağları hidrojen atomu ile doyurarak onları tekli bağlara dönüştürebilir. Bu yüzden

çift bağlara doymamış denir. Zincirdeki iki bağın her iki yanına bağlı olan iki karbon atomu bir cis veya bir trans konfigürasyonundan oluşabilir.

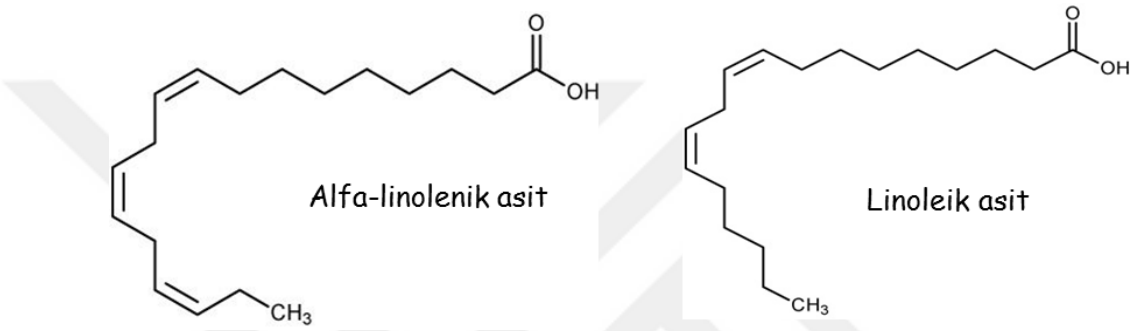
Doymuş yağ asitleri ise içerisinde çifte bağ bulunmayan yağ asitleridir Bu yüzden hidrojen atomu ile iyice doyurulurlar. Doymuş yağ asitleri sadece tek bağa sahip olduğundan zincirdeki her karbon atomu iki hidrojen atomuna sahiptir.

Temel yağ asitleri: İnsan vücudu için gerekli olan ancak insanlar tarafından sentezlenemeyen ve bu yüzden gıdalardan karşılanması gereken yağ asitleri temel yağ asitleri olarak adlandırılır. Temel yağ asitlerinin iki grubu vardır. Biri metil ucundan üç karbon atom uzakta çift bağ sahip, diğeri metil ucundan 6 karbon atom uzakta çift bağa sahiptir. Sadece iki temel yağ asidi vardır. Bunlar linoleik asit ve alfa linolenik asittir. Çoğunlukla bitkisel yağlarda bulunurlar. Temel yağ asitlerinin eksikliği kişide ciddi anlamda dermatolojik rahatsızlıklara neden olur. Cildde kuruma ve kanamalar meydana gelir. Bunun dışında büyüme de yavaşlama olur Bunlar B_6 vitamini ile tedavi edilebilirler.

Alfa-linolenik asit: Alfa-linolenik asit temel bir omega -3 yağ asididir. Normal insanın büyüme ve gelişmi için gerekli olduğundan temel olarak adlandırılır. Ceviz alfa linolenik asit için iyi bir kaynaktır. Ayrıca keten tohumu yağı, kanola yağı ve soya yağı gibi bitkisel ağların yanı sıra kırmızı et ve süt ürünleri de alfa linolenik asit için iyi bir kaynaktır. Alfa-linolenik asit kalp hastalıklarının tedavisi ve önlenmesi için de önemli bir temel yağ asitidir. Kalp krizini önlemek, yüksek tansiyonu düşürmek ve kalp damarlarının sertleşmesini önlemek için de kullanılır. Alfa-linolenik asit aynı zamanda şeker hastalığı böbrek hastalığı Diyet kaynaklı alfa-linolenik asidin, kolestrolü düşürmek dışında bu kullanımlarının hepsinde etkili olabileceğine dair bazı kanıtlar vardır.

Linoleik asit: Linoleik asit omega-6 serisinden 18 karbonlu, iki çift bağı olan ve çoklu bir doymamış yağ asitidir. Linoleik asit tıpkı alfa-linolenik asit gibi insan bünyesinde sentezlenemediği için temel ve elzem bir yağ asitidir. Dışarıdan diyet ile alınan bir temel yağ asitidir. Eksikliğinde büyümede gecikme, üreme

fonksiyonlarında bozulma, karaciğer ve böbrekte patolojik değişiklikler ve deride dermatozlar görülür. Vücuttaki doku ve membranların biçimi değişir ve fonksiyonları bozulur. Eksikliği çok nadir görülür. Toplam diyet enerjisinin %1 ile 2'sinin linoleik asitten karşılanması eksikliğini önler. Omega-6 yağları linoleik asitten türetilir ve yapraklı sebzelerde, tohumlarda, tahıllarda ve bitkisel yağlarda bulunurlar. Çoğu gıdalar bu yağ asitinin yeterli miktarını içlerinde barındırırlar ve bu nedenle omega-6 yağ asitlerinin uygun miktarını karşılamak için bir planlamaya gerek yoktur (Barnard, 1998).



Şekil 1. 4. Alfa-linolenik ve linoleik asit yapısı

1.2.2. Sekonder metabolitler

Sekonder metabolitler bir organizmanın normal büyüme, gelişme ya da üremesi ile doğrudan ilgili olmayan bileşiklerdir. Sekonder metabolitler mikroorganizmanın yaşamlarını sürdürebilmek ve canlı kalabilmek için ürettiği maddelerdir. Sekonder metabolitler genellikle otçul ve diğer türler arasındaki savunmaya karşı bitki savunmasında önmli bir rol oynarlar. İnsanlar sekonder metabolitleri ilaçlar, tatlandırıcılar ve eğlence için alınan uyuşturucu ilaçlar olarak kullanırlar. Sekonder metabolitler bir bitkiye koruma, rekabet ve tür etkileşimi gibi önemli işlevlerde yardımcı olur fakat hayatta kalmak için gerekli değildir. Sekonder metabolitlerin önemli bir belirleyici niteliği onların özgüllüğüdür. Genellikle sekonder metabolitler bir bireysel türe özgüdür.

Flavonoidler: Flavonoidler üç karbon atomu ile bağlı iki aromatik halka içeren C_6- C_3- C_6 iskelet yapısındaki bileşiklerdir. Flavonoidler fenoliklerin en sayısız

olanıdır ve bitkiler aleminde hemen hemen her yerde bulunurlar (Harborne, 1993). Ayrıca yaprakların epidermisindeki ve meyvelerin kabuklarında yüksek oranda bulunurlar ve sekonder metabolitler olarak önemli ve çeşitli rollere sahiptirler. Flavonoidler bitkilerde UV koruması, pigmentasyon, azot-sabitleme nodüllerinin uyarılması ve hastalık gibi çeşitli süreçleri kapsar (Koes ve ark., 1994; Pierpoint, 2000). Temel flavanoidin iskelet yapısı sayısız gruplara sahiptir. Hidroksil grupları genellikle 4, 5 ve 7 konumlarında bulunurlar.

Fenolikler: Oksijenli aromatik bileşiklerdendir ve bir veya daha fazla hidroksil grubu taşıyan, en az bir halkalı yapıya sahip olan organik yapıdaki maddelerdir. Fenolik bileşikler moleküldeki fenol öğelerinin sayısına bağlı olarak basit fenoller veya polifenoller olarak sınıflandırılırlar. Fenolik bileşikler endüstriyel olarak sentezlenir, aynı zamanda bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından üretilirler.

Fenolik asitler hidroksibenzoatlar olarkta bilinirlar ve temel bileşik gallik asittir. Fenolik bileşiklerin % 70'e kadar gallik asit esterlerinden oluştuğu bildirilmiştir (Gross, 1992).

1.3. Biyolojik Aktivite Kısmı

1.3.1. Antioksidan aktivite

Serbest radikaller, çeşitli çevre kimyasalları ve bitkilerin endojen metabolizması tarafından oluşturulur. Biyomedikal bilimlerin gelişmesiyle birlikte pek çok kişide serbest radikallerin yer alması, kanser ve kalp rahatsızlığı gibi birçok hastalıkta serbest radikallerin aktif rol oynadığı bilinen bir durum haline geldi. Serbest radikallerle savaşan antioksidan maddeler insan sağlığında önemli rol oynamaktadır. *Hedysarum* cinsine ait bitkilerden çıkarılan kimyasallardan bazılarının güçlü antioksidan özellikler göstermiştir.

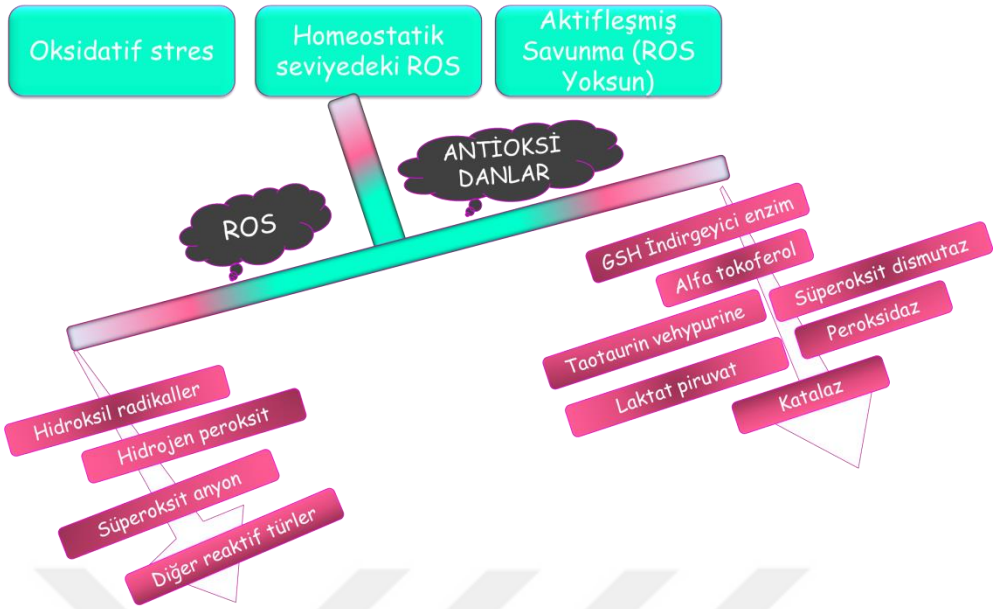
Oksidatif stres oksidan ve antioksidan arasındaki dengesizlik olarak tanımlanır ve protein, nükleik asit, DNA, RNA gibi tüm biyomoleküllerde hasara sebep olur (Dröge, 2002). Reaktif oksijen türleri hidrojen peroksit, süperoksit ve hidroksil radikaller şeklinde normal metabolizmanın yan ürünüdür ve hücreler ve dokulardaki artan konsantrasyonlar ile yaş ilerlemesi gibi sayısız ciddi hastalıklara ve yaşlanmaya sebep olur. Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, sinirsel bozukluklar, bağışıklık sistemi düşüşü, beyin fonksiyon bozukluğu ve birçok kanser türleri ile ilişkilidirler (Ames ve ark., 1993; Ma ve Kinneer, 2002). Antioksidanlar serbest radikal zincir reaksiyonlarını parçalayan maddelerdir. Böylece reaktif türler veya serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki denge iyi bir biyolojik sistemi sürdürmek için kritik bir kavram olduğuna inanılır. Bitki antioksidanları doğal köklerinden dolayı sentetiklere kıyasla daha yararlıdır (Rahman ve ark., 2012). Sentetik antioksidanların bazı genotoksik yan etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Chen ve ark., 1992; Kahl ve ark., 1993). Oysa bitki antioksidanları belgelenmiş zararlı etki ve onlarla ilgili bilinen toksisite çalışması olmaması nedeniyle genellikle güvenli kabul edilir. Bu nedenle son zamanlarda oksidatif stresin azalmasında antioksidanlar olarak şifalı bitkilerde bir ilgi artışı olmuştur. Çok sayıda doğal antioksidanlar arasında; askorbik asit, karatenoidler, flavonoid ve fenolik bileşenler en etkili olanlarıdır (Larson, 1997; Korkina, 2007). Bitki fenolikleri ve flavonoidler hem yenilebilir hem de yenilemeyen bitkilerde yaygın olarak bulunur ve antioksidan aktivitenin, kanser ve kalp

hastalıklarının engellenmesi gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğu raporlanmıştır. Artan popülariteye ve şifalı bitkiler için daha fazla talebe karşılık olarak birtakım gruplar yabani şifalı bitkiler ekilmesi gerektiğini tavsiye etmektedir.

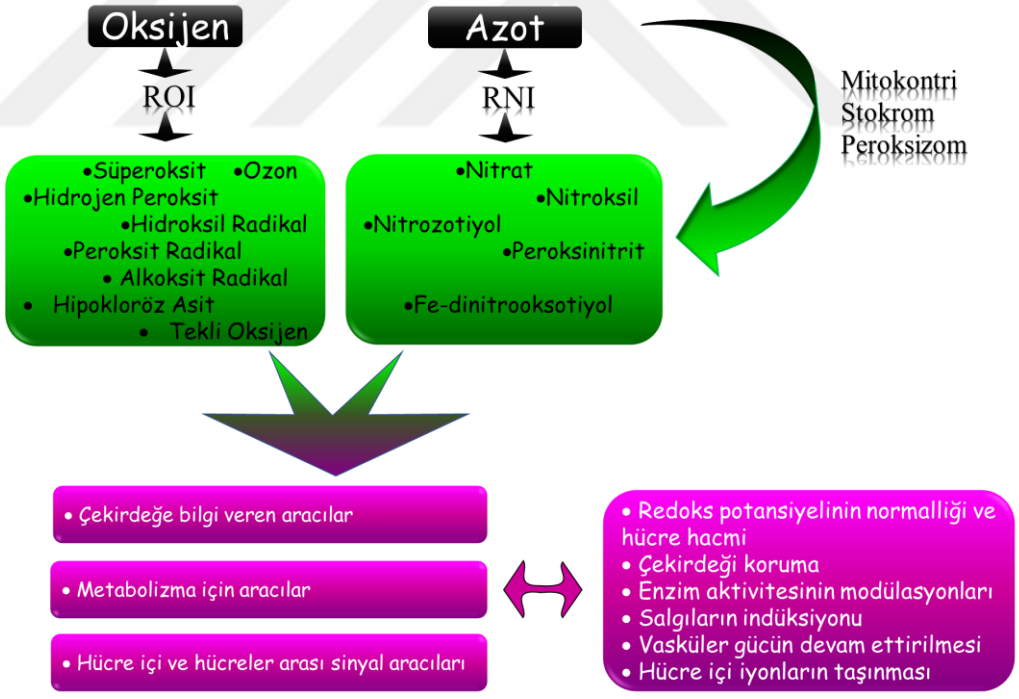
1.3.2. Oksidatif stres ve insan sağlığı

Bir sistemde oluşan serbest radikal ve aktif ara ürünlerin üretiminin sistemin onları yok etme veya nötürleme yeteneğini aştığı zaman oksidatif stres oluşur. (Şekil 1.5) (Sies ve ark., 1985). Günümüzde "oksidatif stres" kavramı artık "nitrosatif stres" ile birlikte anılmalıdır. Canlı organizmalarda fizyolojik koşullar altında sürekli olarak reaktif oksijen ara ürünü (ROI) ve reaktif nitrojen ara ürünü (RNI) üretilmektedir. Oksidatif stresin şimdiye kadar sadece hidroksil, süperoksit radikaller, hidrojen peroksit ve singlet oksijen gibi ROI ürünlerinden kaynaklandığı düşünülmekteydi ama artık nitrik oksit (NO), peroksinitrit, ve son zamanlarda S-nitrozotiyoller gibi RNI ürünlerinin de oksidatif strese sebep olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla ROI ve RNI proteinler, karbonhidratlar ve lipidler ile reaksiyona girerek hem hücre içi hem de hücreler arası homeostazide değişikliğe neden olur, bu da olası hücre ölümüne ve rejenerasyona yol açar (Şekil 1.6) (Garrido ve ark., 2004).

Aerobik metabolizmanın yarattığı oksidatif stresle başa çıkmak için hayvan ve insan hücreleri, yaygın bir antioksidan savunma sistemi geliştirdiler. Bu sistem süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, (CAT), gulutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz gibi enzimlerin yanısıra askorbat, α-tokoferol, sistein, tioredoksin, vitaminler gibi bir dizi düşük molekül ağırlıklı antioksidandan oluşmaktadır. ROS'un (Reaktif Oksijen Türleri) bir kısmı savunma sisteminden kurtulabilir ve çok daha aktif hidroksil radikaller oluşturabilir. Böylece bu antioksidan savunma sistemi çeşitli patolojik veya çevresel faktörler tarafından alt edilebilir. DNA ve diğer biyomoleküllere ROS'un verdiği zarardaki bir artış doku hücrelerinin normal fonksiyonlarına hasar verir ve bu yaşlanma ve hastalıklara yol açar. (Beckman ve ark., 1999; Wei ve ark., 2001).



Şekil 1. 5. Oksidan ve antioksidan arasındaki dengesizlik



Şekil 1. 6. ROI ve RNI'nın karbonhidratlar ve lipitlerle reaksiyona girmesi, bunun sonucu olarak hem hücre içi hem de hücreler arası homeostaside muhtemel hücre ölümü ve rejenerasyon

Reaktif oksijen türleri (ROS) ve Reaktif nitrojen türleri (RNO) oldukça reaktif moleküller içerir. Bu reaktif moleküller arasında $\bullet O_2$, •NO, $ONOO^-$ hakkında en çok araştırma yapılmış türlerdir ve diyabetik kardiyovasküler komplikasyonlarda önemli roller oynamaktadırlar. ROS'un artması zararlı olabilir ve hücre ölümü veya yaşlanmada artışa ve yaşla ilgili hastalıklara sebep olabilir.



Şekil 1. 7. Oksidatif stresin insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri

Oksidatif stres kanser, damar tıkanıklığı, sıtma, kronik yorgunluk sendromu, romatizmal eklem iltihabı gibi çeşitli hastalıklar ve Parkinson hastalığı, alzheimer hastalığı, huntington hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklar ile ilişkillendirilmektedir.

Biyobelirteçler ile işaretlenmiş reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türleri üretiminin izlenmesi yoluyla elde edilen kanıtlar oksidatif hasarın bu hastalıkların oluşumunda rol oynayabildiğini göstermektedir (Yudoh ve ark., 2005; Haydent ve ark., 2002). Oksidatif stres diyabete ve ışığa maruz kalma ve hiperoksi sonrasında doku hasarına ve muhtemelen yaşa bağlı kanser oluşumuna sebep olmaktadır. İnsan midesinde reaktif oksijen ve azot türlerinin üretimini arttıran *Helicobacter pylori*'nin (midede gastrit ve ülsere neden olan bir bakteri) de gastrit kanserinin gelişiminde önemli rol oynadığı düşünülmektedir.

ROS'un ayrıca, büyüme faktörlerine karşı kondrosit yanıtlarını bozarak ve Osteoartrite neden olan kıkırdak yaralanması bölgelerine göç ederek kıkırdaktaki hücresel bileşenlere zarar verdiği bildirilmiştir (Yudoh ve ark., 2005). ROS'un pankreas adacıklarına zarar verme rolünü öne süren kanıtlar artmaktadır (Haydent ve ark., 2002). İnsan kalbindeki artmış ROS aort kapak daralması ile ilişkilidir (Pena-Silva ve ark., 2009). İnsan böbreklerindeki aşırı ROS ürelitiyazise (idrar taşı oluşumu) sebep olur (Vasavidevi ve ark., 2006). Ayrıca, hipergliseminin böbreklerin mezangiyal ve tübüler hücrelerinde ROS oluşumunu tetiklediği ve glomerulide yapısal ve işlevsel değişiklikler yaparak diyabetik nefropatiye neden olduğu gözlemlenmiştir (Verzola ve ark., 2004). Yüksek rakımlardaki fazla ROS üretiminin akut dağ hastalığı (AMS), yüksek rakımlı pulmoner ödemi (HAPE), ve yüksek rakımlı beyin ödeminde (HACE) de rol oynayabildiği rapor edilmiştir (Bailey ve ark., 2001; Baumgartner ve ark., 2002; Chao ve ark., 1999).

Alzheimer hastalığı (AD), Parkinson hastalığı (PD) ve Amyotrofik lateral skleroz (ALS) gibi nörodejeneratif hastalıklar spesifik nöronal hücre popülasyonlarının zamanla azalmasıyla tanımlanır. Bu hastalıkların ortak bir özelliği, oksidatif hasara uğramış olan nöronların sinir hücrelerinin işlev bozukluğuna veya ölümüne sebep olarak hastalığa neden olmalarıdır.

Alzheimer hastalığı (AD) yaşlanan nüfusun büyük bir bölümünü etkileyen ilerleyici bir kişilik bölünmesidir. AD'deki histopatolojik değişiklikler; yaygın nöronal hücre ölümü, amiloid plakların oluşumu ve nörofibril yumrular oluşumu olmak üzere çok dikkat çekmektedir. AD hastalarında beyin dokusunun hastalığın seyri sırasında oksidatif strese maruz kaldığını gösteren çok büyük kanıtlar vardır.

Substantia nigra, vücudun hareket etmesinde önemli bir rol oynayan orta beyinde bulunan bir bazal ganglion yapısıdır. Parkinson hastalığı (PD) substantia nigra'daki dopaminerjik nöronların kaybı ve hücre içi kapsül cisimciklerinin birikmesi sonucu oluşmaktadır. Bu birikintilerin ana protein bileşeni beyinde bulunan α-synuclein'dir (Spillantini ve ark., 1997). α-synuclein'in mutasyonları hastalığın kalıtsal formlarına katkıda bulunur.

Amyotrofik lateral skleroz (ALS), aynı zamanda motor nöron hastalığı olarak da anılan, merkezî sinir sisteminde, omurilik ve beyin sapı adı verilen bölgede motor sinir hücrelerinin (nöronlar) kaybından ileri gelen bir hastalıktır. ALS, omurilikteki alt motor nöronlarının ve serebral korteksteki üst motor nöronların kaybı olarak tanımlanır ve hastalığın hem sporadik hem de kalıtsal formları mevcuttur. Diğer nörodejenaratif hastalıklarda olduğu gibi ALS de yanlış katlanmış bir proteinin sinir dokusundaki birikmesi olarak karakterize edilir.

Oksidatif stres, hücrelerin erken yaşlanmasına ile bağlantılı olduğu bilinir ve doku iltihaplanmasına, hücre zarlarının hasar görmesine, otoimmüniteye ve hücre ölümüne yol açabilir. Son yıllardaki kanıtlar otizmde membran lipid metabolizmasında anormallikler ve bağışıklık ve inflamatuar tepkilerde bir dengesizlik olduğunu göstermiştir. Otizmde oksidatif stresin membran lipid anormallikleri, bağışıklık sisteminin bozulması, inflamatuar yanıt, bozulmuş enerji metabolizması ve artmış eksitotoksite ile bağlantılı olduğu bilinmektedir.

Çeşitli kanıtlar oksidatif stresin, hipertansiyon, dislipidemi (kanda aşırı oranda yağ bulunması), aterosklerosis (damar tıkanıklığı), miyokardiyal enfeksiyon, angina pectoris (göğüs ağrısı) ve kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Linke ve ark., 2005; Cristina Polidori ve ark., 2004; Rizzo ve ark., 2009).

Hiperlipidemi (kolesterol, LDL, vb.), hipertansiyon, sigara kullanımı, şeker hastalığı, aşırı kiloluluk, fiziksel hareketsizlik, yaş, erkek cinsiyeti ve ailesel yatkınlık gibi geleneksel vasküler risk faktörleri, serebrovasküler ve koroner kalp hastalığına yakalanma riskini kısmen açıklamaktadır. Birçok çalışma, hastalık patogenezinde oksidatif stresin rolünü de desteklemektedir. Paradoksal olarak, orta dereceli egzersiz akut bir oksidan strese yol açsa da düzenli egzersiz kardiyovasküler fonksiyonların gelişmesine ve geleneksel koroner kalp hastalıkları risk faktörlerinde bir azalmaya yarar. Çeşitli kanıtlar oksidatif stresin, hipertansiyon, dislipidemi (kanda aşırı oranda yağ bulunması), aterosklerosis (damar tıkanıklığı), miyokardiyal enfeksiyon, angina pectoris (göğüs ağrısı) ve kalp yetmezliği gibi krdiyovasküler

hastalıkların gelişiminde ve patogenezinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Linke ve ark., 2005; Cristina Polidori ve ark., 2004; Rizzo ve ark., 2009).

Ateroskleroz (damar tıkanıklığı), plazma lipoproteinlerinin depolanmasını ve atardamar duvarındaki hücresel elementlerin çoğalmasını içeren karmaşık bir süreçtir. Bu kronik durum, atardamar kan akışına engel oluşturan ve klinik vakalara sebep olan aterosklerotik plaklar oluşumuna yol açan bir dizi aşamada ilerlemektedir. Serbest radikal aracılı oksidatif proseslerin ve onun spesifik ürünlerinin aterogenezide önemli bir rol oynadığı hipotezini destekleyen önemli kanıtlar toplanmıştır. Bunların hepsi plak oluşumunu hızlandırır ve birçok hastada kalp krizine ve felce neden olabilir (Devasagayam ve ark., 2004).

İnme, pek çok ülkede sakatlığın ve mortalitenin başlıca nedenlerinden biridir. Özellikle inmeden sonra meydana gelen iskemi (kan dolaşımında lokal kesinti) ve reperfüzyonun (kan dolaşımının tekrar restorasyonu), potansiyel hücre ölümüne yol açabilecek serbest radikal aracılı reaksiyonlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Alexandrova ve ark, 2004).

Obezite ile oksidatif stres belirteçleri arasındaki ilişkiler ve lipitin oksidatif modifikasyona duyarlılığı insanlarda gözlenmiştir. (Van Gaal ve ark., 1998) Obezite ile oksidatif stres arasında gözlenen ilişkiler için birkaç hipotez önerilmiştir. Örneğin obezitedeki oksidatif stresin kısmen hücre içi trigliseritlerin birikiminden kaynaklanabileceği öne sürülmüştür.

Ürolitiyazis ilk çağdan beri insanoğluna acı veren en yaygın idrar yolu hastalıklarından biridir. Ürolit oluşumu çok bileşenli bir süreçtir. Ürolitiyaz ile serbest radikallerin arasında bi ilişki olduğu bildirilmiştir (Selvam ve ark., 2001), Hayvanlar üzerinde yapılan deneyler (Muthukumar ve Selvam.,1997). kültürler (Thamilselvan ve ark., 2003). ve insan serumu (Singh ve Barjatia., 2002). ,böbrek taşı oluşum koşullarında gelişmiş oksidatif stres bulunduğunu ortaya koymuştur.

Birçok gözlem oksidatif stresin astımda önemli bir rol oynadığını öne sürmektedir. Hava kirliliği olan bölgelerde dış kaynaklı oksidanlar arasında temsili bir uyaran olan bronş astımına rastlamanın daha yüksek olduğu söylenmiştir. Antioksidan içeren gıdaların azaltılması da astım rastlantısının artması ile ilişkilidir (Fogarty ve ark., 2000).

Akciğer kanseri riski günlük olarak sigara içen kişinin sigara sayısına ve sigara içme yaşının oksidatif stres oluşturan veya oksidatif stres yaratan bazı bileşenlerine bağlı olarak en yaygın görülen ölümcül kanserdir.

Modern hipotez oksidatif stresin katarakt gibi yaşla ilgili hastalıklarda önemli bir faktör olduğunu düşünmektedir (Zoric, 2003). Hem ROS üretimi ve hem de endojen antioksidanların azalması katarakt oluşumuna katkıda bulunur. Gözdeki kristalin lens sürekli radyasyon ve diğer kaynaklardan gelen oksidatif strese maruz kalır ve bu kristalin proteinlere, lipidlere, polisakkaritlere ve nükleik asitlere zarar verebilir (Zoric, 2003).

Oksidatif stresin ayrıca karaciğer ve pankreas (Taub, 2004; Irshad, 2002) talasemi (Shazia ve ark., 2012; Pavlova ve ark., 2007; Suryakar ve ark., 2008), Wilson hastalığı (Poli, 1993; Loudianos ve Gitlin, 2000) siroz, diyabet (John ve Suzanne, 1999; Lipinski, 2001), melanin bozukluğu, ağarmış saçlar, erkek ve kadında verimsizlik (Makker ve ark., 2009; Sun ve ark., 1997; Vine ve ark., 1996) gibi birçok hastalık ile ilişkili olduğu yapılan birçok bilimsel çalışma ile ispatlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Fabaceae ailesinden olan *Hedysarum* cinsi yaklaşık olarak 200 tür içermektedir ve Türkiye'de 11 çeşit endemik *Hedysarum* türü bulunmaktadır (Anonim, 1983). Bu türlerden birisi olan *Hedysarum aucheri* (Fabaceae) Elâzığ-Malatya yöresine endemik olup (Davis, 1970), IUCN kırmızı liste kriterlerine göre "Yok Olabilir Tür" (VU) olarak sınıflandırılır ve neslinin doğada tükenme riskinin yüksek olduğu kabul edilmektedir (Anonim, 1983). *Hedysarum aucheri* geçmişte yerel halk tarafından içecek hazırlamak için kullanılmış olup yapılan literatür taraması sonucunda *Hedysarum aucheri* hakkında şimdiye kadar yapılmış herhangi bir kimyasal veya biyolojik aktivite bilimsel çalışması olmadığı tespit edilmiştir. Oysa, *Hedysarum* cinsine ait bazı diğer türlerin biyolojik aktiviteleri özellikle Çin'de geniş bir şekilde araştırılmış ve potansiyel antioksidan (Chen ve ark., 2007; Hui ve ark., 2010), anti-yaşlanma (Hailiqian ve ark., 2007), anti mikrobiyel (Gonchig ve ark., 2008), anti tümör aktivitelere sahip oldukları tespit edilmiştir.

Her ne kadar *Hedysarum aucheri* türüne ait herhangi bir doğal bileşik izolasyonu veya biyolojik aktivite çalışması bulunmasa da *Hedysarum* cinsine üye diğer türlere ait yapılmış bazı çalışmalar şu şekilde özetlenebilir.

Radix hedysari olarak da bilinen *Hedysarum polybotrys* Hand.-Mazz.'ın kuru köklerinden izole edilen polisakkaritlerin (HPS1, HPS2, HPS3 ve HPS4) immün sistemin güçlendirilmesi, antitümör, hipoglisemik, antioksidan ve anti-aging (yaşlanma karşıtı) aktiviteler olmak üzere çeşitli farmakolojik aktiviteler gösterdiği rapor edilmiştir (Zao ve ark., 2010; Hui ve ark., 2009; 1994).

Dang ve ark. (2013), *Radix hedysari*'nin sulu ekstraksiyonunu takiben etanol ile çöktürme ve Dietilaminoetil selüloz kolon kromatografisiyle fraksiyonlama yöntemlerini kullanarak sülfatlanmış asetamit-heteropolisakkariti (HPS4-2A) elde etmişlerdir. Elementel analiz sonuçları HPS4-2A'nın az miktarda sülfat grubu (%1.87) içeren sülfatlanmış bir polissakkarit olduğunu göstermiştir. HPS4-2A'nın

kısmi asidik hidrolizi GC, GC-MS, 1D ve 2D-NMR spektroskopisi analizleri yüksek dallanmış bir yapıya bağlı yoğun miktarda glikoz, galaktoz, ve 2-asetoamido-2-deoksi-D-galaktozun varlığını ortaya koymuştur. HPS4-2A'nın molekül ağırlığının 272 kDa olduğu HPSEC-MALLS ile belirlenmiştir. Bu bileşiğin antioksidan aktivitesi DPPH ve hidroksil radikal süpürme aktivitesi ile tayin edilmiştir. Her iki yöntemde de (HPS4-2A'nın) konsantrasyona bağımlı bir şekilde sırasıyla %85.28 DPPH ve % 66.93 hidroksil serbest radikal süpürme yeteneğine sahip olduğu ve bu değerlerin pozitif kontrol gruplarına oldukça yakınlık gösterdiği saptanmıştır.

Liu ve ark. (2005), *Hedysarum kirghisorum* bitkisinin kök kısmını etanol, petrol eteri, etil asetat ve n-bütanol fraksiyonlarına ayırmıştır. Silika jel ve sefadeks LH-20 nin kullanıldığı kolon kromotografisi ile bu fraksiyonlardan toplam 7 bileşik saflaştırmıştır. Bu bileşiklerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin yanı sıra spektral dataları (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR ve 2D-NMR) daha önceki literatür verileriyle kıyaslandıklarında, 4 bileşiğin izoflavon (formononetin, afromosin, sissotrin, ononin) diğer 3 bileşiğin ise flavanol [(-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin, plumbocatechin] olduğunu belirlemişlerdir. Aynı araştırma grubunun *Radix hedysari* ile gerçekleştirdiği bir diğer çalışmada etanol, etilasetat ve n-bütanol fraksiyonları hazırlanmış ve daha sonra bu fraksiyonlar silika jel kolon kromotografisi, Diaiyon (/Diaion) HP-20 kolon kromotografisi ve semipreparatif revers-faz HPLC ile saflaştırmışlardır. Fiziksel ve kimyasal özelliklerle beraber ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR ve 2D-NMR spektral verileri birlikte değerlendirildiğinde bu bileşiklerin; soyasaponin II methyl ester, soyasaponin II, soyasaponin I ve dehidrosoyasaponin I olarak adlandırılan 4 farklı saponini temsil ettiğini saptamışlardır (Liu ve ark., 2007).

Zengin ve ark. (2015), *Hedysarum varium*'un da dahil olduğu ve Türkiye'de halk tıbbında kullanılan üç Fabaceae türü ile yaptıkları çalışmalarında bitkilerin etil asetat, metanolik ve sulu ekstreleri hazırlanarak antioksidan aktivite, fenolik ve flavonoid içerikleri belirlenmiştir. Toplam fenol ve flavonoid içeriği en yüksek ekstrenin metanol ekstresi olduğu bulunmuş ve bu değerler sırasıyla 45.11 ± 1.399 mg gallik asit ekivalent (GAE)/g ekstre ve 39.71 ± 0.092 mg rutin ekstre (RE)/g ekstre olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlarla uyumlu olacak şekilde *Hedysarum*

varium'un metanol ekstresine ait radikal süpürme yeteneğinin (IC_{50}: 0.30 ± 0.005 mg/mL) pozitif kontrol olarak kullanılan trolox'tan (IC_{50}: 0.31±0.003 mg/mL) bile daha iyi olduğu gözlemlenmiştir.

Salah ve ark. (2016), *Hedysarum carnosum*'dan yeni biyoaktif sekonder metabolitler izole etmeyi amaçladıkları çalışmalarında, *Hedysarum carnosum'un* çiçeklerinin bütanolik ekstrelerini fraksiyonlamak suretiyle iki yeni flavonoid glikozit [kuersetin 3-O-β-D-glukopiranozil-(1→2)-α-L-ramnopiranozil-(1→6)-α-L-ramnopiranozit **1** ve kampferol 3-O-β-D-glukopiranozil-(1→2)-α-L-ramnopiranozil-(1→6)-α-L-ramnopiranozit **2]** ile rutin **3** olarak isimlendirilen kuersetin-3-rutinozid (Rutin)'i tanımlamışlardır. Bu bileşiklerin yapı aydınlatılması sırasında 1D-NMR (^{1}H ve ^{13}C), 2D-NMR spektroskopi, UV ve kütle spektrometrisi (HRMS) sonuçları temel alınmıştır. DPPH ve ABTS serbest radikal süpürme ile ferrik indirgeyici antioksidan güç (FRAP) deneyleri uygulanarak n- bütanol ekstresinin antioksidan aktivite çalışmalarını da gerçekleştirmişlerdir. **1** ve **3** numaralı bileşiklerin DPPH (**1**: 15.33 ± 0.85 µg/ml, **3**: 16.05 ± 0.32 µg/ml) ve ABTS (**1**: 13.00 ± 0.34 µg/ml, **3**: 14.30 ± 0.27) testleri ile en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, GC-MS ile hegzan ekstresinin yağ asidi bileşimi de araştırılmıştır. Yağ asidi profilinin baskın olarak palmitik asit (%20.24), linoleik asit (%14.77) ve linolenik asit (%42.36) bileşiklerinden oluştuğu gözlemlenmiştir.

Liu ve ark. (2009), polibosaponin A (**1**) olarak adlandırılan ve C-15'de bir karbonil grubu taşıyan yeni bir oleanan tipi triterponoid saponinin yanı sıra dehidrosoyasaponin I (**2**) olarak adlandırılan ve daha önceden de izole edilen toplamda iki saponini *Radix hedysari*'den saflaştırmışlardır. Tek ve iki boyutlu NMR ve yüksek çözünürlüklü elektrosprey iyonizayon kütle spektrometresi analizlerine dayalı olarak **1** nolu bileşiğin yapısı aydınlatılmış, ^{1}H ve ^{13}C NMR spektral sinyalleri tamamen ayrılmıştır.

Wei ve ark. (2012), Radix Hedysari'den (RHP) elde edilmiş bir polisakkariti fosforillemek suretiyle modifiye ederek farklı fosforilasyona sahip bir seri RHP (RHPP-1, RHPP-2, RHPP-3, RHPP-4) türevi sentezlemişlerdir ve bu bileşiklerin

antioksidan aktivitelerini karşılaştırmışlardır. Süperoksit anyon süpürme yöntemi, hidroksil radikal-süpürme yöntemi ve DPPH radikal süpürme yöntemi ile yapılan aktivite ölçüm sonuçları fosforillenmiş türevlerin orijinal moleküle kıyasla antioksidan aktiviteyi çok daha arttırdığını göstermiştir.

Shagjjav ve ark. (2014), Hedysarum cinsine üye *H. inandatum* 'un da aralarında bulunduğu ve Moğolistan'ın farklı bölgelerinden toplanan 25 farklı bitki türünün antioksidan aktivitelerini DPPH radikal süpürme yöntemini kullanmak suretiyle taramışlardır. Bu çalışmada *H. inundatum* için belirlenen antioksidan aktivite 8.27±0.31(IC_{50} mg/ml) olarak hesaplanmıştır.

Zhao ve ark. (2014), iyon değişim ve jel permeasyon kromotografilerini kullanarak $1.22x10^4$ Da moleküler ağırlığına sahip ve suda çözünebilen bir polisakkarit (HPS3aS) izole etmişlerdir. Kimyasal ve enstrümental analizlerin kombinasyonuyla yapısal özellikleri tayin edilen bu heteropolisakkaritin, O-6 noktasında dallanma gösteren ve α-D-(1→4)-bağlı glukopiranoz kalıntılarından oluşan bir omurgaya sahip olduğu belirlenmiştir. Dallanma kısımları (1→4)-bağlı galaktopiranoz kalıntılarından ibaret olup glukopiranoz kalıntıları ile sonlanmaktadır. Yapı aydınlatılmasını gerçekleştirilen bu bileşiğin *in vitro* antioksidan aktivitesi DPPH, hidroksil-ve süperoksit radikal süpürme testleri kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, HPS3aS fraksiyonun HPS3'e kıyasla daha fazla süpürme yeteneğinin olduğunu göstermiştir. HPS3aS'nin güçlü radikal süpürme aktivitesi, elde edilen düşük IC_{50} değerleri (DPPH radikalleri için 0.3 mg/ml, hidroksil radikalleri için 3.6 mg/ml, süperoksit radikalleri için 3.4 mg/ml) ile desteklenmiştir.

Cheng ve ark. (2009), *Hedysarum polibotrilerin'*in kökünden kimyasal bileşenleri incelemek suretiyle çalışmalar yapmışlardır. Kimyasal bileşenler kromatografik yöntemlerle izole edilmiş, yapıları ve fizikokimyasal özellikleri NMR spektrumları vasıtasıyla aydınlatılmıştır. Yapısını (E)-3-(4-hidroksi-2-metoksifenil)-propenoik asit 4-hidroksi-3-metoksifenil ester olarak belirlemişlerdir ve bileşiğin yeni bir fenilpropiyonat türevi olduğunu saptamışlardır.

Yang ve ark. (2007), dört tip fenolik bileşiğin parçalanma davranışını coumestans, pterocarpenes, benzofuranlar ve isoflavonları, negatif iyon modunda elektrosprey iyonizasyon çok kademeli kütle spektrometresi (ESI-MS^n) (n = 2-5) kullanarak incelemişlerdir. Metil (15Da), CO (28Da), CO_2 (44Da), izopropil (43Da) ve izobütenilin (55Da) kayıplarının parçalanma modellerine baskın olduğunu ifade etmişlerdir. Grupların farklı konumlarının ve sayılarının farklı parçalanma davranışına yol açtığını saptamışlar. Çalışmada oluşturulan yöntemin bitki ve formülasyonlarının kalite kontrolüne kapsamlı bir şekilde uygulanabileceğini söylemişlerdir. Ayrıca geleneksel Çin ilaçlarının biyolojik ve farmakolojik araştırmalara da uygulanabileceğini dile getirmişlerdir. *Hedysarum multijugum* Kuzeybatı Çin'de bitkisel halk ilacı olarak kullanılan Fabaceae familyasına ait bir bitkidir. *Hedysarum multijugum*'un kökleri çarpıntı ve kronik nefrit tedavisinde kullanılır. Alzheimer hastalığını (AD) tedavi etmek için doğal ürünler ararken *H. multijugum*'un köklerinden alınan etanol ekstresinin *in vivo* ile farelerin öğrenme yeteneğini ve hafızasını geliştirdiğini gözle görülebilir şekilde saptandığını söylemişleridir. Yapılan fitokimyasal araştırmalarda bitkinin başlıca pterokarpen, coumestans, benzofuranlar ve isoflovonlardan oluştuğunu belirlediler. Fakat bitkiden fenolik bileşikler izole edilememiştir. HPLC'nin etkili ayrıştırma yeteneklerini ve MS'in büyük yapısal karakter gücünü birleştiren elektrosprey iyonizasyon çok kademeli kütle spektrometresi (HPLC/DAD/ESI-MS^n) ile yüksek performanslı sıvı kromatografi/diyot dizisi dedektörü, bitki ekstreleri içerisindeki bileşenleri hızlı ve doğru bir şekilde tanımlamak için güçlü bir yaklaşım geliştirmişlerdir. Bu çalışmada *Hedysarum multijugum*'daki fenolik bileşiklerin kapsamlı analizi için basit ve hızlı bir LC/MS yöntemi belirlenmiş ve dokuz yeni bileşik içeren 29 bileşik karakterize edilmiştir.

Wei ark. (2015), *Radix hedysari*'den elde edilen polisakkaritin (RHP) selenilasyon modifikasyonunu antioksidan aktivitelere ve nöroprotektif etkilere ulaşmak için $Aß_{25-35}$ tarafından indüklenen oksidatif stres ve apoptoza karşı incelemişlerdir. Nitrik asit-sodyum selenit (HNO_3-Na_2SeO_3) yöntemi kullanarak RHP'nin selenit içeren bir dizi türevini (Se-RHP) sentezlemişlerdir. FT-IR spektrumları ve ^{13}C-NMR spektrumları, selenit gruplarının çoğunlukla RHP

bileşiğinin C-6'dan moleküle katıldığını göstermiştir. RHP ile karşılaştırıldığında Se-RHP bileşiklerinin *in vitro* RHP'ye kıyasla daha fazla antioksidan gösterdiğini vurgulamışlardır. Selenit içeren RHP türevleri arasında en yüksek antioksidan aktiviteye sahip bileşiğin 29.6kDa olan ve selenyum içeriği 3.29 mg/ Se-RHP3 (Süperoksit radikal süpürme aktivitesi %63.2, indirgeme kapasitesi-/indirgeme gücü-0.58) olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, Se-RHP3'ün hem iyi bir selenyum kaynağı hem de antioksidan olarak bir gıda takviyesi olabileceğini, ayrıca gıda ve farmasötik endüstrilerinde kullanılabileceğini vurgulamışlardır.

Dong ve ark. (2013), *H. polybotrys'*dan yeni bir heteropolisakkarit (HPS4-1A) elde etmişlerdir. HPS4-1A'nın mutlak ve bağıl molekül ağırlıklarının sırasıyla 7.386×10^4 ve 6.68×10^5 olduğunu söylemişlerdir. HPS4-1A'nın ana iskeletinde 1,6-ve 1,2,6-α-D-galaktopiranozil ve 1,5 ve 1,3,5-α-L-arabinofuranosil kısımları, dallarında ise 1,4 ve 1,4,6-α-D-glukopiranozil ve 1,2 ve 1,2,4-α-L-ramnofuranozil kısımları bulunan nötr bir şeker olduğu kanıtlanmıştır. Arabinoz ağırlıklı olarak iskeletin ucuna bağlanır ve glukoz ve arabinozun az bir miktarı da genellikle dalların ucuna bağlanmaktadır. HPS4-1A'nın monodispers kütle dağılımı ile rastgele bir halka hali konformasyona sahip olduğu söylemişlerdir.

Oldukça geniş bir biyolojik aktivite potansiyeline sahip *Hedysarum* cinsinin farmakolojik önemi göz önüne alınarak, araştırmamız hiç çalışılmamış ve endemik olan *Hedysarum aucheri*'nin uçucu yağları ve ekstrelerinin antioksidan aktivitelerinin incelenmesine odaklanmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Genel

Ekstrelerin hazırlanmasında kullanılan MeOH (metanol), heksan, CH_2Cl_2 (diklorometan) çözücüleri önce distillendi daha sonra kullanıldı. BuOH (bütanol) ekstresinin hazırlanmasında kullanılan bütanol Merck'den satın alındı. Su ekstresinin hazırlanmasında ise saf su kullanıldı.

Bir HP-5MS kolon (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) ile kombine edilmiş Agilent 7890A ve Agilent 5975C inert XL MSD (mass selective detector-kütle seçici dedektör) kullanılarak Heksan ekstresi yağ asitlerinin metil esterlerinin analizi gerçekleştirildi. 1 mL/dk sabit akış hızında saf helyum gazı (99.999%) taşıyıcı gaz olarak kullanıldı. Başlangıçta 60 °C' sıcaklığa ayarlanan fırın, 5 dk sonrasında dakikada 5 °C artacak şekilde bir hızla 220 °C'ye ve orada 5 dakika kalacak şekilde programlandı. Cihaza enjeksiyon, 20:1 split oranlı split modunda 1 μL örnek (heksan içerisinde) ile yapıldı. NIST–Wiley veri kütüphanesi sonuçları kullanılarak bileşikler tanımlandı. Uçucu yağ analizi için analitik ölçekde heksan kullanıldı.

Antioksidan çalışmalarında kullanılan Gallic asit, Folin ve Ciocalteu fenol reaktifi, 2,2′-azinibis 3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), etidyum bromür, DMSO Sigma-Aldrich'den satin alındı. $NaNO_2$, $AlCl_3$, NaOH, $CuCl_2$, neokuproin, amonyum asetat, $K_2S_2O_8$ reaktifleri diğer ticari kaynaklardan satın alındı.

İnce tabaka kromotografisi için, TLC Siligacel 60 F254 (Merck 5554) precoated tabakalar kullanıldı.

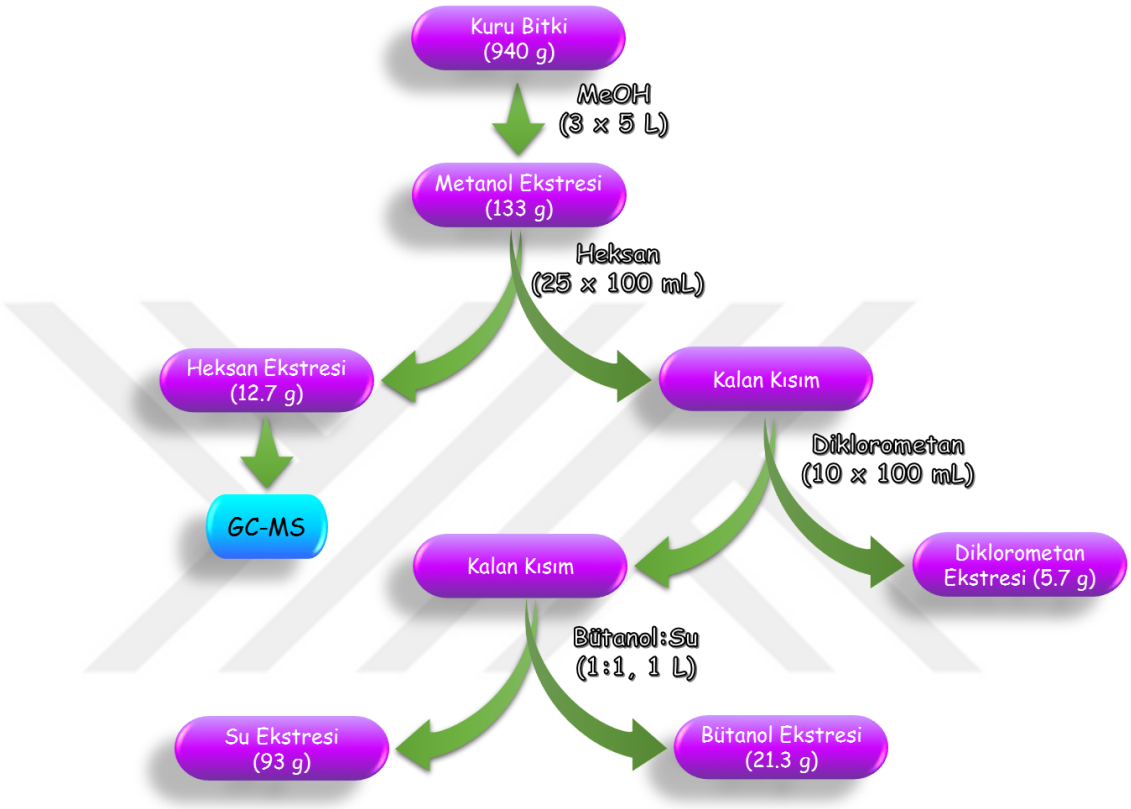
3.2. Bitki materyali

Bu çalışmada, *Hedysarum aucheri* Boiss, Elâzığ'da Pertek feribot limanından 2 km önce yol kenarları ve yamaçlarından haziran ayında deniz seviyesinden 1010 m yüksekte toplandı. Örnekler Bitlis Eren Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden Yrd. Doç. Dr. Murat KURSAT tarafından saptanmıştır.

Toplanan bitki örnekleri, güneş ışığından muhafaza edilerek ortam sıcaklığında ve açık havada kurutuldu. Yaklaşık 1 kg kuru bitki öğütüldükten sonra 6 litre metanol içerisinde bir gece oda sıcaklığında bekletilerek bitkinin kimyasal içeriği ekstrakte edildi ve çözelti kısmı bitki posasından süzülerek ayrıldı. Çözelti kısmının çözücüsü rotary evaporatör yardımı ile 40 ^{o}C'de ve düşük basınç altında uçurularak ham metanol ekstresi elde edildi. Süzülen bitki posası üzerine her seferinde 5 litre MeOH eklenerek bu işlem 3 kez tekrarlandı ve her seferinde elde edilen ekstreler birleştirildi. Bu işlemler sonucunda 133 g kaba MeOH ekstresi elde edildi. Bu işlemden sonra seçici sıvı-katı ekstraksiyon yöntemi uygulandı. Ham MeOH ekstresi üzerine küçük porsiyonlar halinde heksan (25×100 mL) eklenerek yıkandı ve her seferinde çözelti kısım ekstreden No:1 Whatman filtre kâğıdı ile süzülerek ayrıldı. Böylece bitkinin içerdiği yağ asitleri, klorofil ve diğer yağlı kısımlar ham metanol ekstresinden uzaklaştırılarak heksan ekstresi elde edildi. Birleştirilen heksan ekstreleri döner evapaoratör ile kuruluğa getirildi ve 12.7 g heksan ekstresi elde edildi. Daha sonra kalan yağsız ekstre üzerine her seferinde 100 mL CH_2Cl_2 eklendi ve aynı şekilde süzgeç kâğıdı ile süzülerek çözelti kısmı bir armudi balona alındı. Bu şekilde küçük porsiyonlar halinde CH_2Cl_2 (10×100 mL) ile yıkanarak ekstrenin içerdiği serbest aglikonları içeren apolar kısımlar polar kısımlardan ayrıldı ve diklorometan ekstresi elde edildi. Birleştirilen CH_2Cl_2 ekstreleri kuruluğa getirilerek 5.7 g CH_2Cl_2 ekstresi elde edildi. Yağ asitleri, klorofil ve serbest aglikonları uzaklaştırıldıktan sonra kalan oldukça polar kısıma bu kez sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniği uygulandı. Kalan ekstre 1:1 oranında 1 L bütanol:su çözücü sisteminde tamamen çözündü ve fazların ayrılması için oda sıcaklığında 1 gece bekletildi. Bu ekstraksiyonda, inorganik bir çözücü olan H_2O yüksek polaritesinden dolayı ekstrenin içerdiği şekerli ve en polar kısımları yakalarken, sekonder metabolitlerin de

içerisinde bulunduğu ağırlıklı olarak organik bileşiklerden oluşan kısımlar ise bütanol tarafından yakalanır. Ayrılan fazlar kuruluğa getirildikten sonra, 93 g su ve 13.4 g bütanol ekstreleri elde edildi.

Çalışma proses diyagramı aşağıda verilmiştir.



Şekil 3. 1. Hedysarum aucheribitkisinin ekstraksiyon şeması

3.3. Heksan Ekstresinin İçerdiği Yağ Asitlerinin Saptanması

Uluslararası Yağ Komisyonu (IOOC) ve IUPAC tarafından yayınlanan trans esterifikasyon prosesi raporlarına göre yağ karışımı içeren heksan ekstresi türevlendirilerek metil esterlerine dönüştürüldü (Paquat ve ark., 1992; Anonim 2001). Bu prosedüre göre 5 mL'lik bir vidalı kapaklı test tüpü içerisine yaklaşık olarak 0.1 g kuru heksan ekstresi kondu. 2 mL heksan eklenip sallayarak heksan ekstresi çözüldü. Daha sonra oda sıcaklığında 0.2 mL 2M Metanolik KOH eklenip kapağı kapatıldı ve bir teflon bant ile iyice sıkılaştırıldıktan sonra şiddetli bir şekilde 30 saniye sallanarak ekstrakte edildi. Üst faz berraklaşıncaya kadar fazlar ayrılmaya

bırakıldı. Metil esterleri içeren üst kısım dekantasyon ile alındı ve GC-MS ile analiz edildi. Gaz kromatografi analizi yapılıncaya kadar örnek buzdolabında saklanabilir fakat 12 saatten daha uzun süreyle örneğin depolanması tavsiye edilmez.

3.4. Toplam Flavonoid İçeriğinin Saptanması

Her bitki ekstresinin toplam flavonoid içeriği, Zhishen ve ark (1999) tarafından bulunan yönteme göre tayin edildi. Bu yöntem baz alınılarak, metanol içerisinde 0.5 mL'lik her bir numune (100µg/mL) önce 2 mL distillenmiş su ile daha sonra 0.15 mL $NaNO_2$ (%15) çözeltisi ile karıştırıldı. 6 dakika sonra, 0.15 mL $AlCl_3$ (%10) çözeltisi ilave edildi ve 6 dakika bekletildi. Daha sonra 2 mL NaOH (%4) çözeltisi karışıma ilave edildi. Son hacmi 5 mL'ye getirmek için hemen su ilave edildi ve karışım iyice karıştırıldı ve 15 dakika daha bekletildi. Karışımın absorbansı daha 510 nm'de kör numune olarak su ile kıyaslanarak belirlendi. Sonuçlar, Quarcetin eşdeğerleri (mg Quarcetin / g kuru ekstre) olarak ifade edildi.

3.5. Toplam Fenolik İçeriğinin Saptanması

Her bir bitki ekstresinin toplam fenolik içeriği, Ainsworth metodu (Ainsworth ve ark., 2007) biraz modifiye edilerek Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak belirlendi. Kalibrasyon eğrisi çizmek için referans standart olarak gallik asit kullanıldı. Bitki ekstresinin (100µg / mL) 0.5 mL'lik bir hacmi 2 mL'lik Folin-Ciocalteu reaktifi (deiyonize su ile 1:10 oranında seyreltilmiş) ile karıştırıldı ve 4 mL sodyum karbonat çözeltisi (%7.5, ağırlık/hacim) ile nötralize edildi. Reaksiyon karışımı, renk gelişimi için oda sıcaklığında 60 dakika inkübe edildi. Elde edilen mavi rengin absorbansı, çift ışınlı UV-VIS spektrofotometre (Shimadzu uv-1700) kullanılarak 765 nm'de ölçüldü. Toplam fenolik içeriği, Gallic asit ile hazırlanmış standart bir eğrinin doğrusal denkleminden tespit edildi. Deneyler, her ekstre için 3 kez tekrarlandı ve toplam fenolik bileşiklerin içeriği, kuru ekstrenin mg/g gallic asit eşdeğeri (GAE) olarak ifade edildi.

3.6. In vitro Antioksidan Aktivite Tayini

3.6.1. Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi (CUPRAC)

CUPRAC testi Apak ve ark.'nın (2004) yönteminde bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirildi. Test karışımı 1 mL 10 mM $CuCl_2$, 7.5 mM neokuproin ve 1 M amonyum asetat tamponu (pH 7.0) içeriyordu. Kısaca, 50-400 µg/mL konsantrasyon aralığındaki 1 mL numune, 4 mL'lik son hacme ulaşacak şekilde test karışımına ilave edildi. Test karışımları, oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi ve daha sonra 450 nm'de kör numuneye karşı absorbansı kaydedildi. CUPRAC yönteminde troloks'un molar absorptivitesi ε = 1.66x104 L mol^{-1} cm^{-1} ve trolox için kalibrasyon eğrisi orijin boyunca geçen bir çizgi olduğundan, gözlenen absorbansın trolox'un ε değerine bölünmesiyle son çözeltideki bitki ekstresi numunesinin troloks eşdeğer molar konsantrasyonu, bulunabilir. Orijinal ekstrenin troloks eşdeğer antioksidan kapasitesi, tüm dilüsyonları göz önüne alarak bulunabilir ve µmol TR/g kuru madde birimi cinsinden bir kapasite bulmak için başlangıçtaki bitkisel madde kütlesi ile orantılanabilir.

3.6.2. ABTS radikal süpürme testi

ABTS radikal süpürme kapasitesini belirlemek için, Re ve ark. (1999) yöntemi takip edildi. ABTS radikal katyonu renk giderme yöntemi, test edilen bitki ekstrelerinin içerdiği antioksidanların $ABTS^{\bullet+}$ radikallerini indirgenmesine dayanmaktadır. Reaksiyon mekanizması, elektron verme kabiliyetine dayanır ve radikalin renk kaybetmesine sebep olur. Ilk olarak ABTS 7 mM konsantrasyon olacak şekilde deiyonize suda çözündü. Ardından, 2.45 mM konsantrasyonluk $K_2S_2O_8$ çözeltisi hazırlandı. İki çözelti 1:1 oranında karıştırıldı ve karanlıkta 16 saat bekletildi. ABTS çözeltisi daha sonra 1:35 oranında sulu metanol içerisinde seyreltildi. 30 µL sulu metanolik bitki ekstresi (50-400 µg/mL), 300 µL $ABTS^{\bullet+}$ çözeltisine eklendi ve karışım 30 ° C'lik bir sabit sıcaklıkta bekletildi. Bir mikrolevha okuyucu (Spectramax M5) kullanılarak ilk karıştırmadan sonra 6 dakika içerisinde 734 nm'de absorpsiyon ölçüldü. Ekstrenin ABTS süpürme kapasitesi troloksunki ile

karşılaştırıldı ve yüzdelik inhibisyon aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplandı; burada Abs kontrol, ABTS radikal + metanolün absorbansı; Abs numunesi, ABTS radikal + numune ekstresinin standart absorbansıdır.

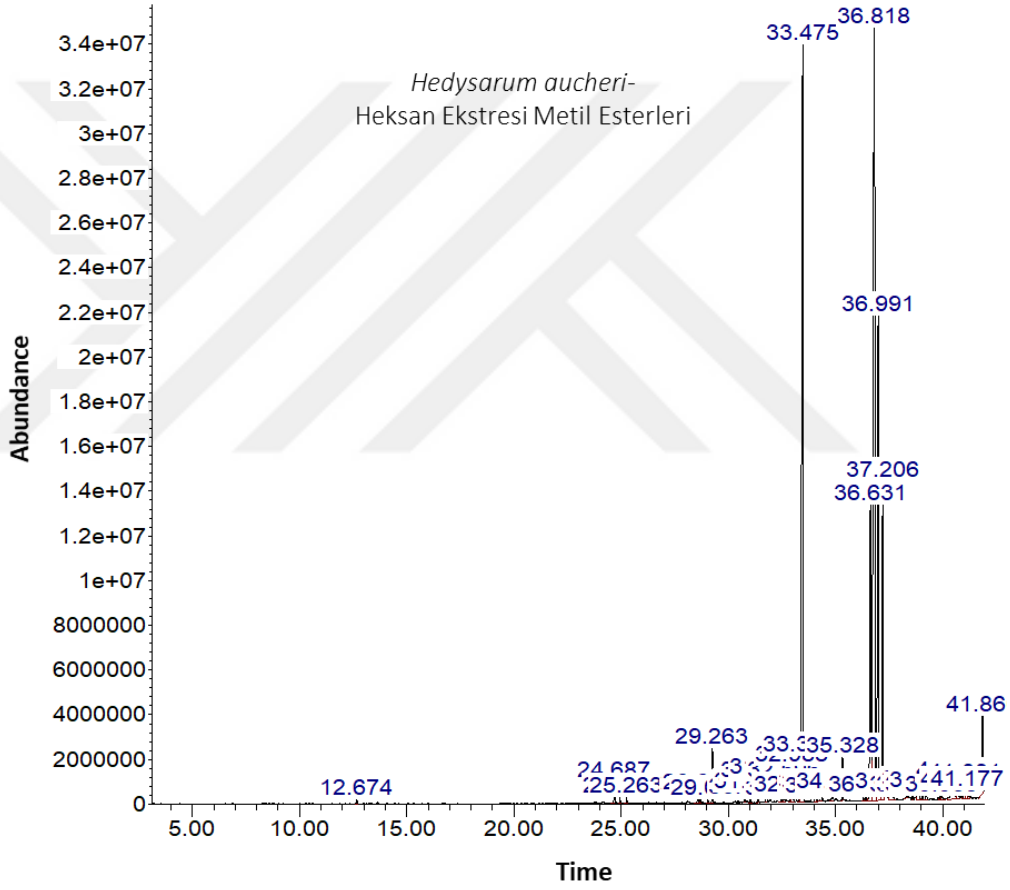
$$ABTS\ Radikal\ Temizleme\ (\%) = \frac{Abs\ Kontrol - Abs\ Örneği}{Abs\ Kontrol} \times 100 \quad (3.1)$$

Absorpsiyon farkı (ΔA) doğrusal bir kalibrasyon eğrisi yardımıyla trolox eşdeğer antioksidan konsantrasyonuyla ilişkillendirildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Heksan Ekstresinin İçerdiği Yağ Asitleri

Hedysarum aucheri bitkisinden elde edilen Heksan ekstresinin trans esterifikasyon sonrası elde edilen metil esterlerine ait GC-MS spektrumu Şekil 4.1.'de verilmektedir.



Şekil 4. 1. *Hedysarum aucheri* bitkisinin Heksan ekstresinin metil esterlerinin GC-MS spektrumu

Bu analiz sonucunda heksan ekstresinin içerdiği bileşikler ve bunların ekstredeki yüzde miktarı Çizelge 4.1.'de verilmektedir. Bileşiklerin alıkonma sürelerine göre cihazın veri bankasından alınan verilere göre farklı miktarlarda olmak üzere toplamda Heksan ekstresinde 39 tane bileşen tespit edilmiştir.

Çizelge 4. 1. Hedysarum aucheri bitkisinin heksan ekstresinin GC-MS analizine göre içerdiği doğal bileşikler (Analiz için bileşenlerin metil esterleri hazırlandığı için yağ asitleri metil esterleri şeklindedir ve mavi zemin rengi ile gösterilmektedir.

RT (dak)	*C:D*	*n-x*	*Bileşik Adı (Özel adı)*	M^+	*%*
12.68	-		Benzoik asit, metil ester	136	0.08
24.69	**12:0**		**Dodekanoik asit, metil ester (Lauric asit ME)**	214	**0.36**
24.95	-		4,4,7A-trimetil-5,6,7,7A-tetrahidro-1-benzofuran-2(4H)-on	180	0.13
25.26	**-**		**Nonendioik asit, dimetil ester (Azelaic asit, diME)**	217	**0.10**
28.57	-		Bisiklo[4.3.1]decan-10-on	152	0.17
28.69	-		(E)-7-Dodeken-1-ol asetat	226	0.18
29.04	-		Heksadekanal	240	0.07
29.26	**14:0**		**Tetradekanoik asit, metil ester (Myristic asit, ME)**	242	**0.96**
30.78	**15:0**		**12-metil-tetradekanoik asit, metil ester (Sarcinic asit)**	256	**0.08**
31.04	**12:1**	*n-7*	***cis*-5- Dodekenoik asit, metil ester**	212	**0.19**
31.38	**15:0**		**Pentadekanoik asit, metil ester**	256	**0.38**
31.79	-		6,10,14-trimetil-2-pentadekanon	268	0.42
32.60	-		3-(3,4-Dimetoksifenil)-2-propenoik asit, metil ester	222	0.41
32.89	**16:1**	*n-5*	**11-Heksadekenoik asit, metil ester (Palmitvaccenic asit)**	268	**0.08**
32.93	**16:1**	*n-9*	**7-Heksadekenoik asit, metil ester**	268	**0.10**
32.98	**16:1**	*n-7*	**(Z)-9-Heksadekenoik asit, metil ester (Z-Palmitoleic asit,)**	268	**0.73**
33.33	**16:1**	*n-7*	**(E)-9-Heksadekenoik asit, metil ester (E-Palmitoleic asit)**	268	**0.98**
33.48	**16:0**		**Heksadekanoik asit, metil ester (Palmitic asit, ME)**	270	**24.69**
34.06	-		*cis*-9-Tetradeken-1-ol	212	0.18
34.21	-		(Z)-1,6-Tridekadien	180	0.17
34.39	**16:1**	*n-14*	**2-Heksadekenoik asit, metil ester**	268	**0.09**
34.88	**17:1**	*n-7*	***cis*-10-Heptadekenoik asit, metil ester**	282	**0.26**
35.33	**17:0**		**Heptadekanoik asit, metil ester (Margaric asit, ME)**	284	**0.82**
36.40	-		1-Octadeken	252	0.12
36.63	**18:2**	*n-6,9*	**(Z, Z)-9,12-Oktadekadienoik asit, metil ester (Linoleic Asit)**	294	**9.16**
36.82	**18:3**	*n-3,6,9*	**(Z, Z, Z)-9,12,15-Oktadekatrienoik asit, metil ester (ALA)**	292	**32.37**
36.99	-		Fitol	296	12.01
37.21	**18:0**		**Oktadekanoik asit, metil ester (Stearic Asit, ME)**	298	**7.11**
37.31	**24:0**		**Tetrakosanoik asit, metil ester (Lignoceric asit, ME)**	382	**0.24**
37.63	**23:0**		**Trikosanoik asit, metil ester**	368	**0.58**
38.33	-		2,6,10,15,19,23-Heksametil-2,6,10,14,18,22-Tetrakosaheksen	410	0.67
38.87	-		Eikosan	282	0.43
39.24	**19:0**		**Nonadekanoik asit, metil ester**	312	**0.20**
40.48	**22:0**		**Dokosanoik asit, metil ester (Behenic asit, ME)**	354	**1.12**
40.68	-		*cis*-9-Trikosen	322	0.30
41.03	-		Trikosan	324	0.42
41.13	**20:1**	*n-9*	**cis-11-Eikosenoik asit, metil ester**	324	**0.26**
41.18	**20:3**	*n-3,6,9*	**11,14,17-Eikosatrienoik asit, metil ester (Dihomolinolenic As.**	320	**0.20**
41.86	**20:0**		**Eikosanoik asit, metil ester (Arachidic Asit, ME)**	326	**3.14**

RT:Alıkonma Süresi, **C:D**: Karbon:Çift Bağ Sayısı, **n-x**:Çifte bağın zincir ucuna uzaklığı
Yağ asitleri mavi zemin rengi ile belirtilmiştir.

Bu bileşenlerden miktarları yüksek olan 8 bileşik (major bileşenler) ve oranları ayrıca Çizelge 4.2.'de sunulmaktadır. Burada verilen 8 tane bileşen ekstredeki tüm bileşenlerin miktar olarak %90.56'sını teşkil etmekte olup, bunların 1 tanesi halkalı olmayan bir diterpen alkol olan Fitol, diğer 7 tanesi ise yağ asitleridir. Tüm ekstrenin %5,22'lik kısmını oluşturan Tetradekanoik asit metil ester, Dokosanoik asit metil ester (Behenic Acid) ve Eikosanoik asit metil ester (Methyl arachidate) bileşiklerinin miktarları sırasıyla %0.96, %1.12 ve %3.14'dür. Ekstrenin %85.34'lük kısmını oluşturan asıl ana bileşenler olan (Z, Z, Z)-9,12,15-Oktadekatrienoik asit metil ester (Alpha-linolenic acid), Heksadekanoik asit metil ester (Palmitic acid), [R-[R*,R*-(E)]]-3,7,11,15-tetrametil-2-Heksadeken-1-ol (Fitol), (Z, Z)-9,12-Oktadekadienoik asit, metil ester (Linoleic acid) ve Oktadekanoik asit metil ester (Stearic acid) sırasıyla %32.37, %24.69, %12.01, %9.16 ve %7.11 miktarlara sahiptir.

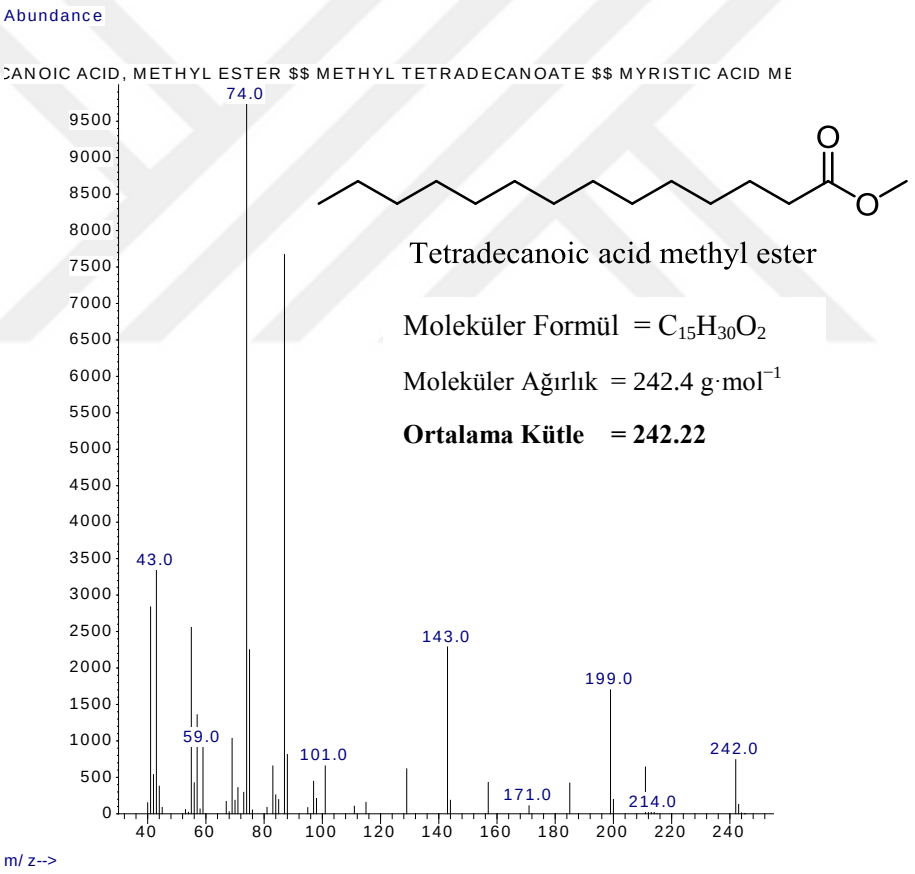
Çizelge 4. 2. Hedysarum aucheri bitkisinin Heksan ekstresinin GC-MS analizine göre % 92.87'lik kısmını oluşturan ana bileşenler

RT (dak)	*C:D*	*n-x*	*Bileşik Adı (Özel adı)*	M^+	*%*
29.26	**14:0**		**Tetradekanoik asit, metil ester (Myristic asit, ME)**	242	**0.96**
33.48	**16:0**		**Heksadekanoik asit, metil ester (Palmitic asit, ME)**	270	**24.69**
36.63	**18:2**	*n-6,9*	**(Z, Z)-9,12-Oktadekadienoik asit, metil ester (Linoleic Asit)**	294	**9.16**
36.82	**18:3**	*n-3,6,9*	**(Z, Z, Z)-9,12,15-Oktadekatrienoik asit, metil ester (ALA)**	292	**32.37**
36.99	-		Fitol	296	12.01
37.21	**18:0**		**Oktadekanoik asit, metil ester (Stearic Asit, ME)**	298	**7.11**
40.48	**22:0**		**Dokosanoik asit, metil ester (Behenic asit, ME)**	354	**1.12**
41.86	**20:0**		**Eikosanoik asit, metil ester (Arachidic Asit, ME)**	326	**3.14**

RT:Alıkonma Süresi, **C:D**: Karbon:Çift Bağ Sayısı, **n-x**:Çifte bağın zincir ucuna uzaklığı
Yağ asitleri mavi zemin rengi ile belirtilmiştir.

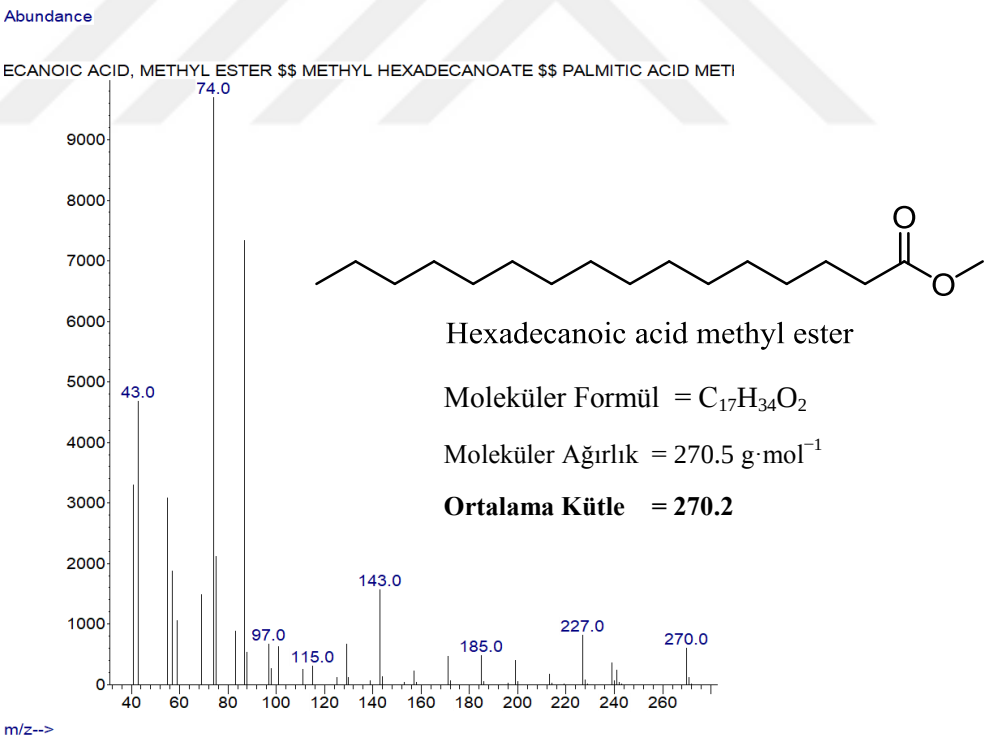
Heksan ekstresinin % 90.56'lık kısmını oluşturan bu 8 bileşene ait yapılar ve GC-MS spektrumları Şekil 4.2.- 4.9. arasında sunulmaktadır.

Tetradekanoik asit heksan ekstresinin %0.96'sını oluşturur. Tetradekanoik asit çoğu hayvansal ve bitkisel yağlarda bulunan özellikle de tereyağı hindistancevizi ve hurma yağlarında bulunan doymuş bir 14 karbonlu yağ asididir. Miristik asit de denilen tetradekanoik asit palmiye yağı Hindistan cevizi yağında doğal olarak bulunmaktadır. Sabun ve kozmetik yapımında da kullanılmaktadır. Miristik asit Playfair L. Tarafından 1841'de tropikal ağaç Myristica fragransın tohumu olan Hindistan cevizinde keşfedilmiştir. 14-18 karbon atomlu uzun zincirli yağ asitleri olarak adlandırılan alt grubun bir doymuş yağ asidi üyesidir. Saf halde suda çözünmeyen beyaz renkte ve katıdır. Erime noktası 53.9 °C ve kaynama noktası 250 °C'dir. Gliserol ester olarak yağlar çoğu hayvansal be bitkisel yağlarda meydana gelir.



Şekil 4. 2. *Hedysarum aucheri* bitkisinden elde edilen Heksan ekstresinde bulunan tetradekanoikasit'in yapısı ve GC-MS spektrumu

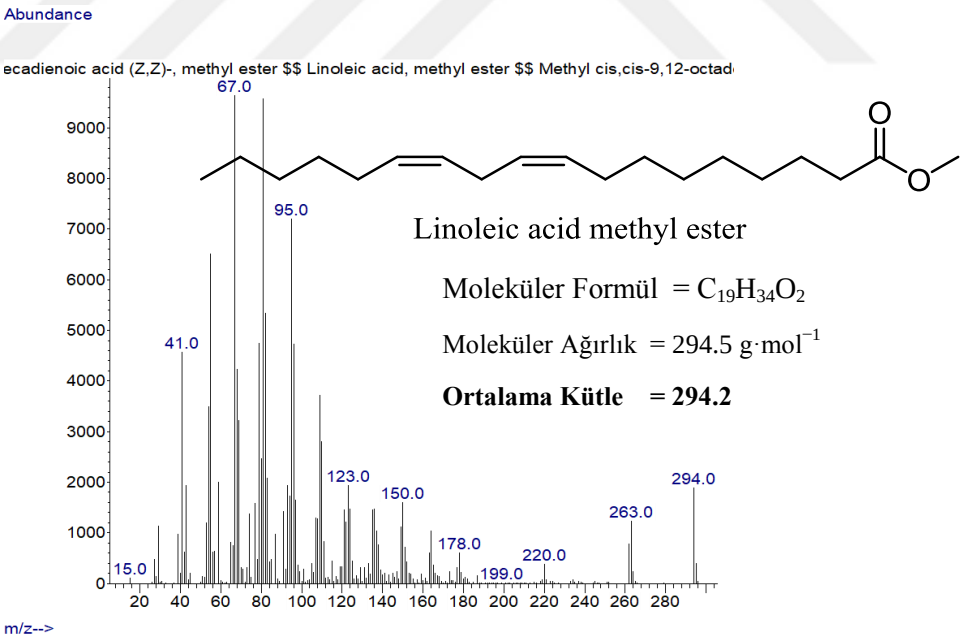
Palmitik asit Heksan ekstresinin %24.69'unu oluşturur ve IUPAC adı heksadekanoik asittir. Palmitik asit bitki, hayvan ve mikroorganizmalarda bol miktarda bulunan en yaygın doymuş yağ asididir. Palmitik asit doğal olarak palmiye yağı ve hurma çekirdeğinde bulunur ve bununla birlikte tereyağı, peynir, et ve sütte de bulunur. Palmitik asit %20 ile %30 seviyeleri arasında hayvan lipidlerinde yaygın olarak bulunur ve %10 ile %40 oranında tohum yağlarında bulunur. Palmiye yağı zengin bir petrol kaynağıdır ve palmitik asitin %40'ından fazlasını içerir (Gunstone ve ark., 2007). Palmitik asit 16:0 yapısında bir lipid zincirine sahiptir ve ismini yoğun olarak bulunduğu palmiye ağaçlarından alır. Kingsbury ve ark (1961) tarafından yapılan bir çalışmada insan depo yağlarının %21 ile %30'unun palmitik asit tarafından oluştuğu gözlemlenmiştir. Ayrıca bu yağ asidi anne sütünün önemli bir bileşenidir (Jensen ve ark., 1978). Dünya sağlık örgütünün (2002) araştırmalarına göre palmitik asit tüketimi kalp damar hastalıklarını arttırdığı için bu yağ trans yağ ile aynı katagori altında yer almaktadır.



Şekil 4. 3. *Hedysarum aucheri* bitkisinden elde edilen Heksan ekstresinde bulunan Heksadekenoik asit, metil ester (Palmitic acid)'in yapısı ve GC-MS spektrumu

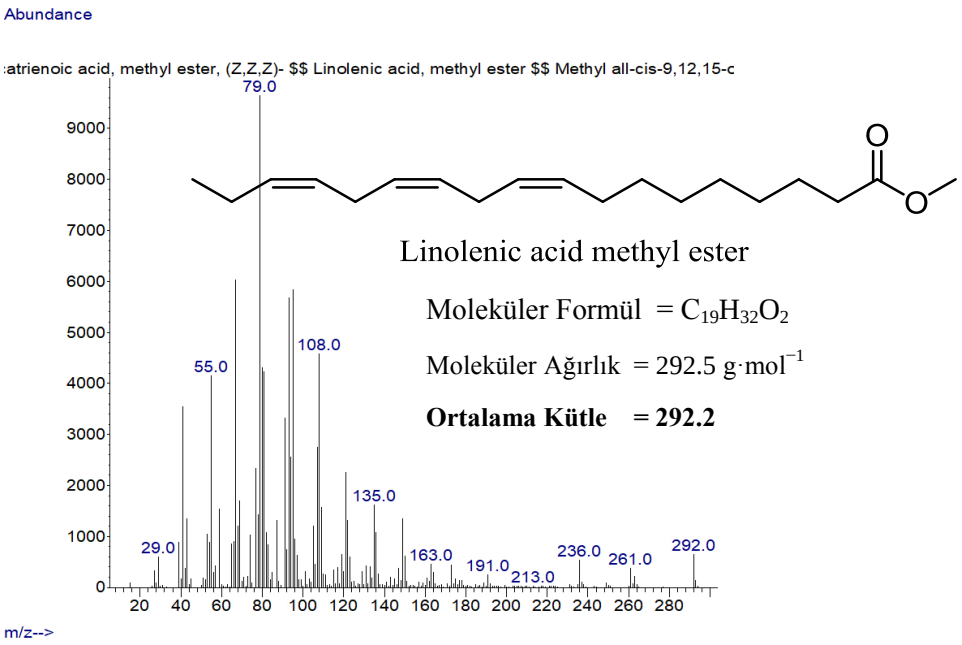
Linoleik asit heksan ekstresinin %9.16'sını oluşturmaktadır. Literatürde 18:2 ($\Delta^{9, 12}$) yapısında bir lipid zincirine sahiptir. Linoleik asit renksiz bir sıvıdır. Linoleik yağ asidi çoklu bir doymamış yağ asididir. Genellikle organik hücre zarlarında bulunan yağlarda bulunur. Kimyasal olarak 18 karbon zincirine ve iki cis yapılı çifte bağa sahip olan linoleik asit bir karboksilik asittir. Çifte bağlardan birincisi zincirin metil ucundan başlayarak 6. karbonda yer aldığı için omega-6 yağ asidi olarak adlandırılmaktadır (Anneken ve ark., 2006)

Linoleik asit insan vücudunun çeşitli fizyolojik fonksiyonlarını düzgün gerçekleştirebilmesi için ihtiyaç duyulan bir esansiyel yağ asitidir. Esansiyel yağ asitleri vücut tarafından sentezlenemediği için dışarıdan takviye ya da besinler yardımıyla alınır. Lineloik asitler genellikle bitkisel yağlarda ve tohum yağlarında yaygındır. Linoleik asit yetersizliğinde büyüme de gecikme. Üreme fonksiyonlarında bozulma, deride dermatozlar, karaciğer ve böbreklerde patalojik değişiklikler görülür (Van ve ark., 2009).



Şekil 4. 4. *Hedysarum aucheri* bitkisinden elde edilen Heksan ekstresinde bulunan (Z, Z)-9,12-Oktadekadienoik asit, metil ester (Linoleic acid)'in yapısı ve GC-MS spektrumu

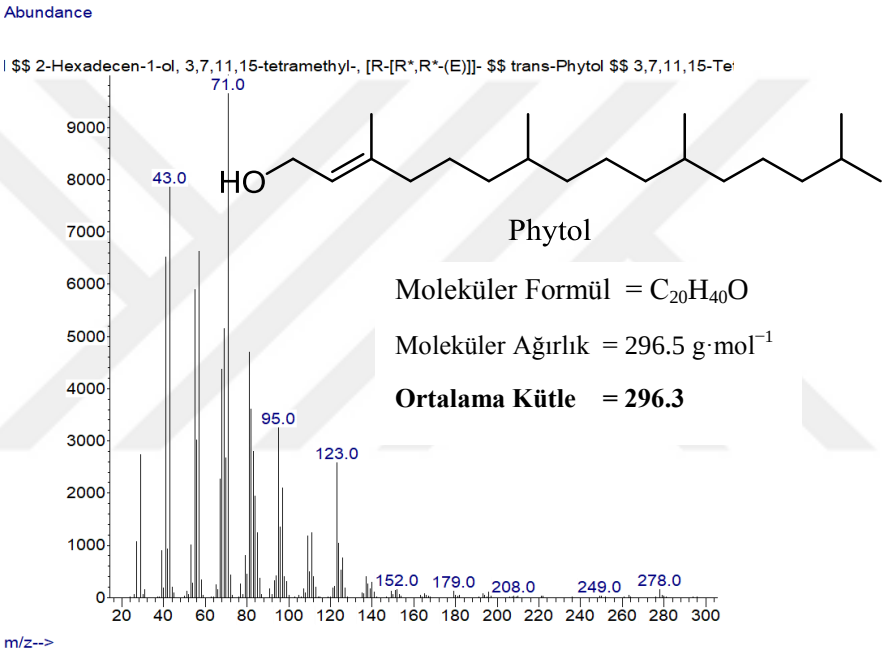
Alfa-linolenik asit bir omega-3 olup çoklu doymamış yağ asididir. 18:3 ($\Delta^{9,12,15}$) yapısında bir lipid zincirine sahip olan alfa-linolenik asit heksan ekstresinin %32.37'ini oluşturmaktadır. Alfa-linolenik asit'in IUPAC adı (Z,Z,Z)-9,12,15-oktadekatrienoik asittir. Alfa-linolenik asit kalp hastalıkları ve kan damarlarının tedavisinde önemlidir ve önleyici rol oynsit olarak adlandırılır ve fizyolojik literatürde ise 18:3 (n-3) şeklinde adlandırılır. Alfa-linolenik linoleik asit gibi 18 karbon zincirine sahiptir ve linoleik asitten farklı olarak üç tane çifte bağa sahip bir karboksilik asittir. Alfa-linolenik asit birinci çifte bağ zincirinin n ucu olarak da isimlendirilen metil ucundan itibaren üçüncü karbonda yer alır. Bu yüzden linolenik asit omega-3 yağ asidi olarak adlandırılmaktadır. Alfa-linolenik asit omega-3 yağ asidinin temelidir. Çünkü büyüme ve gelişme de normal insan için ihtiyaç duyulurar. Reiner ve ark. (2014) çalışmalarında alfa-linolenik asit tüketiminin kalp ve damar hastalıkları oluşumunu az da olsa engelleyici etkilerinin olduğunu söylemişlerdir. Ramon ve ark. (2000) aşırı miktarda alfa-linolenik asit kullanımının prostat kanseri olma riskini arttırdığını savunmaktadırlar. Bu düşüncenin aksine Koralek ve ark. (2006) yaptıkları çalışma ile alfa-linolenik asit miktarı ile prostat kanseri arasında bir ilişki olamadığını ortaya koymuşlardır.



Şekil 4. 5. *Hedysarum aucheri* bitkisinden elde edilen Heksan ekstresinde bulunan (Z, Z, Z)-9,12,15-Oktadekatrienoik asit, metil ester (Linolenic acid)'in yapısı ve GC-MS spektrumu

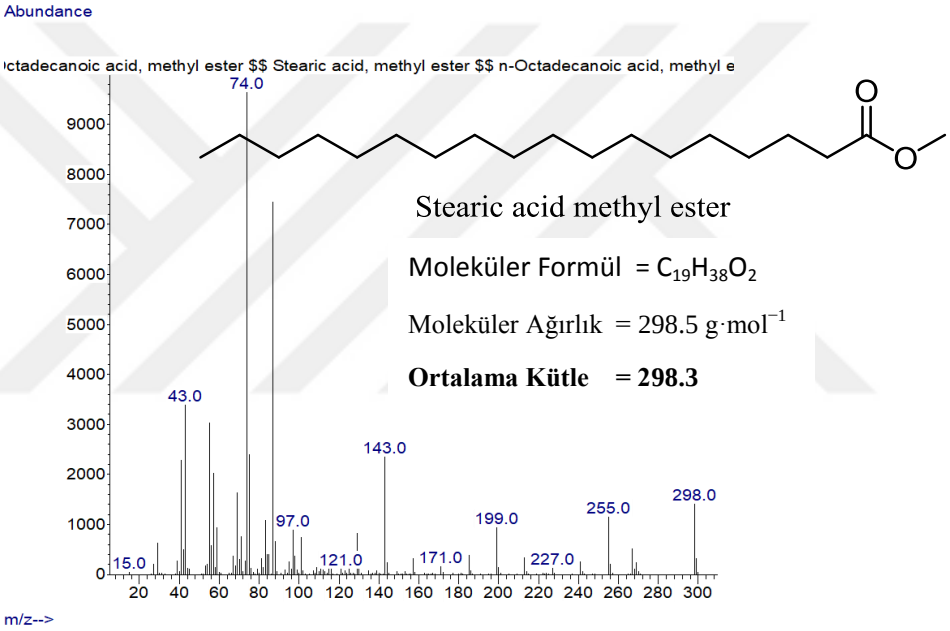
Heksan ekstresinin %12.01'ini oluşturan fitol kaynama noktası 204 °C olan renksiz bir sıvıdır, üç asimetrik karbon atomu içerdiği için optik olarak aktiftir. Yeşil bitkilerde, kırmızı alglerde klorofil moleküllerinin bir unsuru olarak doğada yaygın olarak bulunur. Fitol klorofillerin asit hidroliziyle ve klorofiller üzerinde enzim klorofillerin etkisi ile elde edilebilirler.

Fitol güzel kokularda kullanılır. Bunun dışında şampuanlarda, sabunlarda, kozmetikte, temizlik ürünlerinde kullanılır.



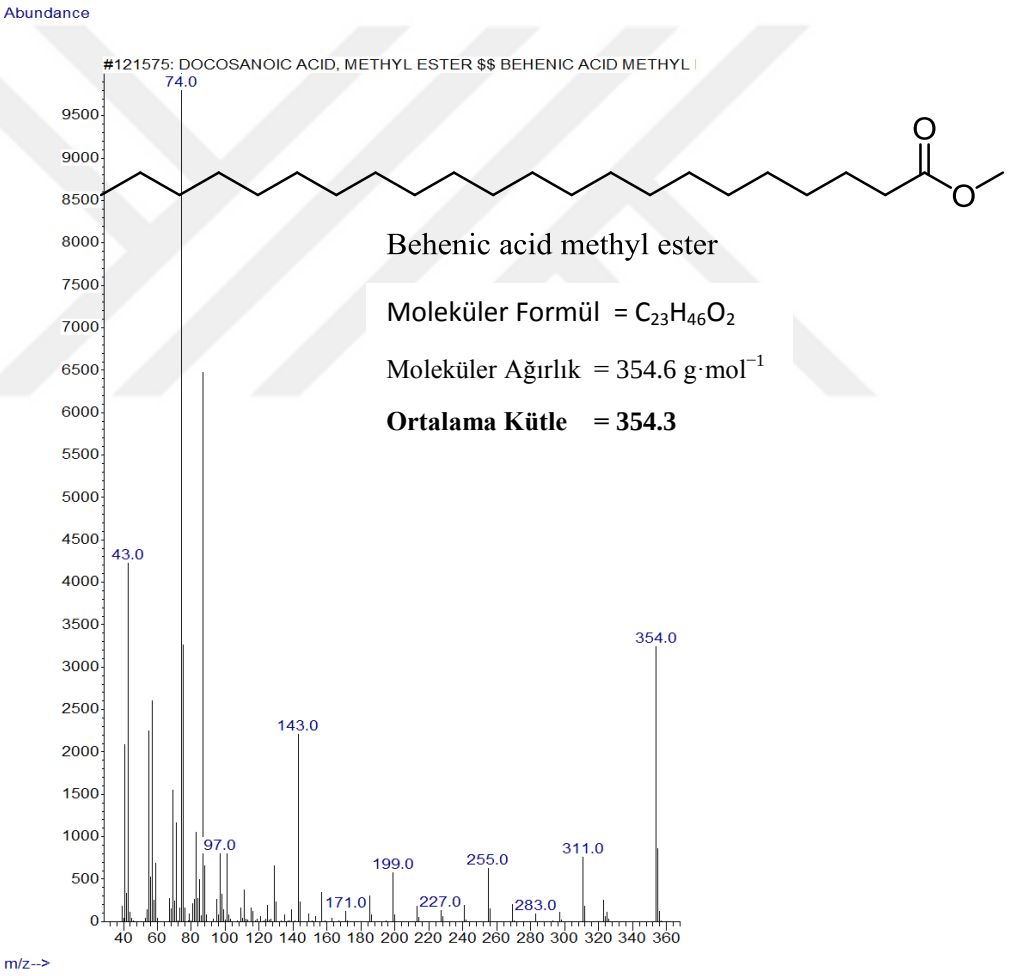
Şekil 4. 6. *Hedysarum aucheri* bitkisinden elde edilen Heksan ekstresinde bulunan [R-[R*,R*-(E)]]-3,7,11,15-tetrametil-2-Heksadeken-1-ol (Phytol)'ün yapısı ve GC-MS spektrumu

Kimyasal adı oktadekanoik asit olan stearik asit 18 karbon zincirine sahip doymuş bir yağ asitidir. Stearik asit doğada palmitik asitten sonra en fazla bulunan doymuş bir yağ asitidir (Gunstone ve ark., 2007). Stearik asit özellikle hayvansal yağ türevlerinde bulunur fakat bitkisel yağlarda da bulunan bir yağ asididir. Çeşitli kozmetik ve kişisel bakım ürünlerinde kullanılır. Ayrıca, emülsifiye ediciler, yumuşatıcılar ve kayganlaştırırcılar olarak kullanılan diğer yağ asit içeriklerinin üretiminde temel olarak da kullanılır. Stearik asidin en popüler kullanımlarından biri mum üretimindedir. Genellikle mumu sertleştirmek ve güçlendirmek için kullanılır. Aynı zamanda mumun erime noktasını da etkiler ve mumun dayanıklılığını geliştirir.



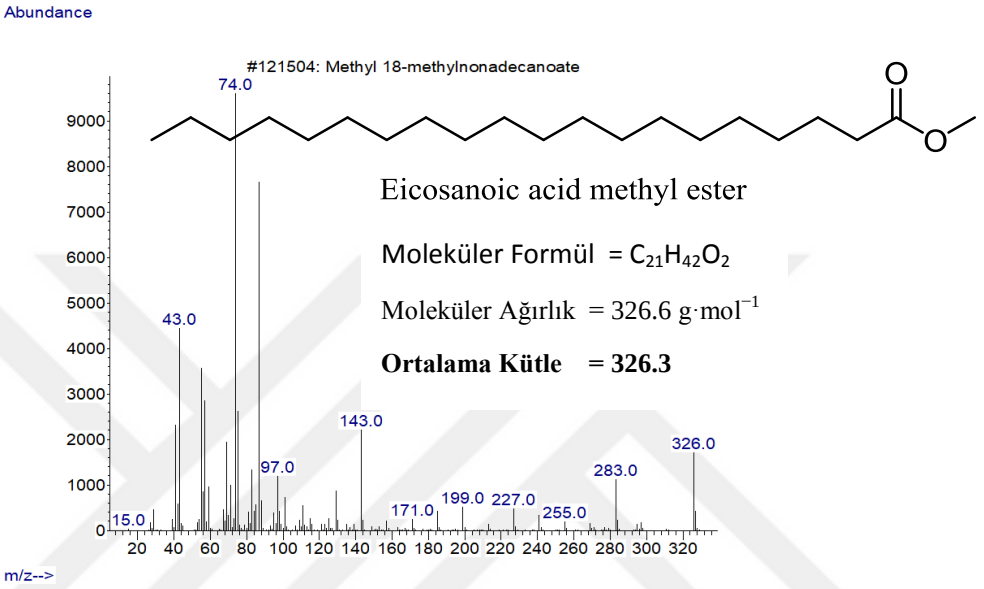
Şekil 4. 7. *Hedysarum aucheri* bitkisinden elde edilen Heksan ekstresinde bulunan Octadecanoic acid, methyl ester (Stearic acid)'in yapısı ve GC-MS spektrumu

Behenik asit (dokosanoik) heksan ekstresinin %1.12'sini oluşturur. Behenik asit (22 karbon atomu) Molinga oleifera tohumlarından ekstrakte edilen ve kozmetikte kullanılan behen yağı veya moringa yağı olarak da bilinen (ilk olarak 1848'de Voelcker A. Tarafından rapor edilen) ben yağının önemli bir bileşenidir. Behenik asit 20 karbon atomundan itibaren çok uzun zincirli yağ asitleri olarak adlandırılan bir doymuş yağ asidinin alt grubudur. Behenik asit saflaştırılmış formda beyaz ile sarımsı yapıda olup ve bal mumu gibi katıdır. Erime noktası 79.95 °C ve kaynama noktası 306 °C'dir. Ayrıca behenik asit genellikle saç kremi ve nemlendiricilerine yumuşatma özelliği vermek için kullanılır.



Şekil 4. 8. *Hedysarum aucheri* bitkisinden elde edilen Heksan ekstresinde bulunan Dokosanoik asit, metil ester (Behenic Acid)'in yapısı ve GC-MS spektrumu

Heksan ekstresinin %3.14 ‘ünü ouşturur. Eikosanoik asit 20 karbon atomundan itibaren çok uzun zincirli yağ asitleri olarak adlandırılan doymuş yağ asidinin alt grubudur. Eikosanoik asit saflaştırılmış formda suda kolay çözünmeyen beyaz bir kristal katıdır. Erime noktası 75.5 °C ve kaynama noktası 328 °C’dir. Eikosanaoik asit sadece gliserol esteri olarak görülen bazı bitkisel yağlarda bulunur.



Şekil 4. 9. *Hedysarum aucheri* bitkisinden elde edilen Heksan ekstresinde bulunan Eikosanoik asit, metil ester (Methyl arachidate)’in yapısı ve GC-MS spektrumu

4.2. Ekstraksiyon Verimi, Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoid İçeriği

Flavonoid ve fenolik bileşiklerin içeriği ve *H. aucheri'*den elde edilen her ekstrenin ekstraksiyon verimleri Çizelge 4.3'de verilmiştir. Metanol ekstresi, kuru bitki materyalinden ekstrakte edilen ana fraksiyondur ve kalan fraksiyonlar bu ham metanol ekstresinden elde edilmiştir. Fraksiyonların ekstraksiyon verimleri % 4.30 ila % 70 arasında değişmektedir. Ekstrelerin toplam fenolik içeriği ve toplam flavonoid içeriği sırasıyla gallik asit kalibrasyon eğrileri ($y = 0.0042x + 0.1895$, $R^2 = 0.9929$) ve kuersetin ($y = 0.024x + 0.0218$, $R^2 = 0.9974$) ile belirlendi. Sonuçlar, bütanol ekstresinin en yüksek fenolik (kuru madde 122.4 ± 1.6 mg GAE / g) ve flavonoid içeriğine (66.3 ± 1.3 mg QE / gr kuru madde) sahip olduğunu gösterdi. Açık bir şekilde, bu polar ikincil metabolitlerin çoğunluğunu butanol çözücüsü ekstrakte etmiş ve sadece yüksek polariteye sahip şeker bileşikleri ekstraksiyon sırasında suya gitmiştir.

Çizelge 4. 3. Farklı Hedysarum aucheri ekstrelerinin toplam flavonoid, toplam fenolik içerik ve ekstraksiyon verimleri (%).

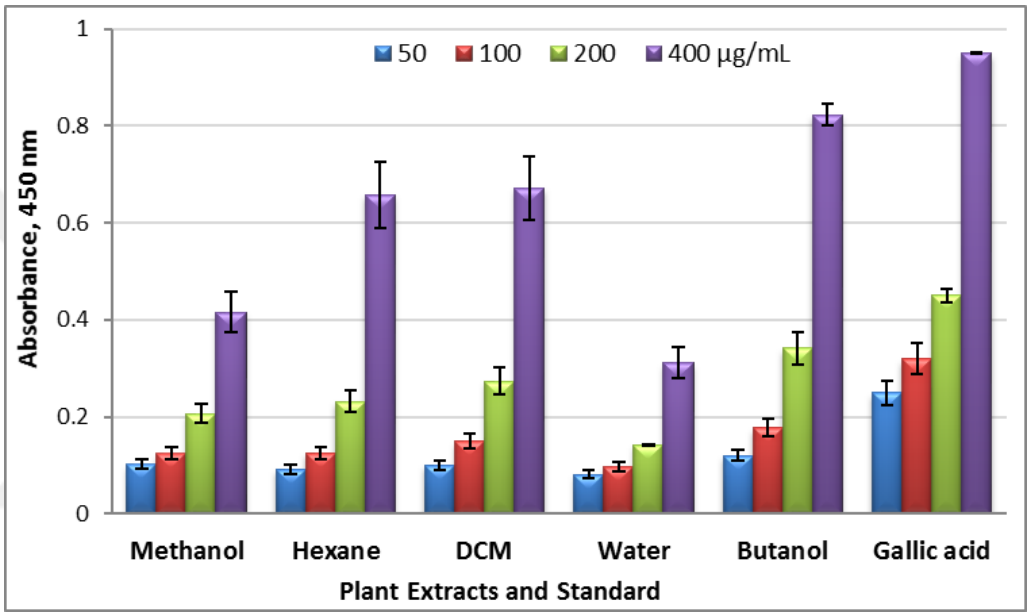
Ekstreler	Toplam Flavonoid İçeriği (mg QU/g DW)	Toplam Fenolik İçeriği (mg GAE/g DW)	Ekstraksiyon Verimi (%)
Metanol	42.6±1.4	56.9± 1.3	14.2[a]
n-Heksan	20.8 ±0.6	51.7±1.6	9.5[b]
Diklorometan	22.7 ±2.5	25.4 ±0.8	4.30[b]
Su	9.4 ±1.1	15.7±0.4	70.0[b]
Bütanol	66.3 ±1.3	122.4±1.6	16.0[b]

[a] Ham ekstrenin öğütülmüş bitki materyaline (940 g) göre ağırlık yüzdesi olarak ekstraksiyon verimi
[b] Ekstrenin ham metanol ekstresine (133 g) göre ağırlık yüzdesi olarak ekstraksiyon verimi

4.3. Antioksidan Aktivite Çalışmaları

4.3.1. CUPRAC testine göre antioksidan aktivite

H. aucheri ekstrelerinin Cupric-Ion İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) testlerine göre belirlenen antioksidan aktivitesi sonuçları Şekil 4.10'da sunulmaktradır.



Şekil 4. 10. CUPRAC testine göre *H. aucheri* ekstrelerinin ve standart'ın (gallik asit) antioksidan aktiviteleri.

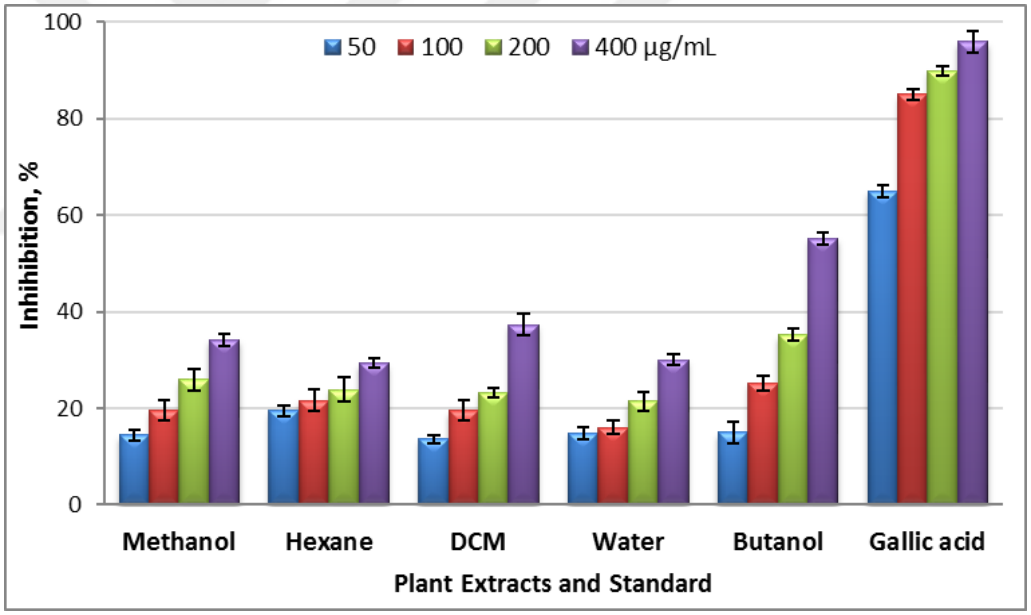
CUPRAC testi, birçok araştırmacı tarafından farklı test solüsyonlarının indirgeme gücünü belirlemek için kullanılmıştır. CUPRAC testinde, ana oksitleyici ajan olan bakır (II) -neokuproin (Cu (II) -Nc), renkli ve kararlı bir bakır (I) -neokuproin kompleksine (Cu (I) -Nc) indirgenir ve bu kompleks 450 nm'de maksimum absorbans gösterir. Dolayısıyla, 450 nm'de absorbans ölçümü, bu kararlı kompleksin oluşumuna dayanır. *H. aucheri* ekstrelerinin Cu^{+2} indirgeme yetenekleri, konsantrasyona bağlı olarak bulunmuştur ve Şekil 4.10.'da sunulmuştur.

Bu deneyde, daha yüksek bir absorbans, daha yüksek antioksidan aktivite olduğunu gösterir. *H. aucheri*'nin tüm ekstreleri, konsantrasyondaki artışa bağlı

olarak absorbansda bir artış gösterdi. Tüm ekstreler arasında bütanol fraksiyonu, 400 µg / mL konsantrasyonda 0.823 ± 0.08 ile en yüksek absorbansı gösterdi. Bütanol ekstresi bu konsantrasyonda, standart gallik asit'in 0.95 ± 0.04'lük değerine oldukça yakın bir değerde absorbans gösterdi ve dolayısıyla butanol ekstresinin antioksidan aktivitesi standarda çok yakın bir değerdir. *H. aucheri* ekstrelerinin Cu^{+2} iyonlarını indirgeme gücü aşağıdaki sıraya göre sıralanmaktadır: bütanol> diklorometan> heksan> metanol> su.

4.3.2. ABTS testine göre antioksidan aktivite

H. aucheri ekstrelerinin ABTS Radikal Süpürme testlerine göre belirlenen antioksidan aktivitesi sonuçları Şekil 4.11.'de sunulmaktadır.



Şekil 4. 11. ABTS radikal süpürme testine göre *H. aucheri* ekstrelerinin ve standart'ın (gallik asit) antioksidan aktiviteleri

H. aucheri'nin tüm fraksiyonları konsantrasyona bağlı bir şekilde ABTS radikalini süpürmektedir. Bütanol ekstresi diğer ekstrelerle karşılaştırıldığında hızlı ve ABTS radikalinin en etkili süpürücüsü olduğu görülmektedir. Elde edilen sonuçlar, örneklerin ABTS radikal süpürme kabiliyetinin bütanol> diklorometan> metanol> n-heksan> su olarak sınıflandırıldığını gösterdi.

Bu testlerden elde edilen verilere dayanarak, butanol ekstresi için toplam fenolik-flavonoid içeriği ve antioksidan aktivitesi arasında güçlü bir korelasyon bulunmuştur. Özellikle CUPRAC test sonuçları, butanol ekstresinin antioksidan kapasitesinin standart gallik asitinkine oldukça yakın olduğunu gösterdi. Literatürde, *in vitro* CUPRAC ölçümlerinden elde edilen sonuçların, antioksidanların olası *in vivo* reaksiyonlarına daha verimli bir şekilde uygulanabileceği rapor edilmektedir (Gülçin ve ark., 2011). Ancak ekstrelerin geri kalanı için, toplam fenolik-flavonoid içeriği ve antioksidan aktiviteleri arasında anlamlı bir korelasyon bulunamadı. Örneğin, metanol ekstresi diklorometan ekstresinden daha yüksek fenolik ve flavonoid içeriğine sahip olmasına rağmen, diklorometan ekstresi daha yüksek antioksidan aktivite gösterdi. Folin-Ciocalteu yönteminde farklı fenolik bileşiklerin farklı tepkilere sahip olduğu bilinmektedir. Benzer şekilde, ekstrelerdeki fenolik bileşiklerin moleküler antioksidan aktivitesi, kimyasal yapılarına bağlı olarak belirgin şekilde değişir (Satué-Gracia ve ark., 1997; Kähkönen ve ark., 1999). Bu nedenle, fenolik bileşikler ekstrelerin antioksidan kapasitesine büyük bir katkıda bulunsa da bir ekstrenin antioksidan aktivitesi, sadece toplam fenolik veya flavonoid içeriğine bağlı olarak tahmin edilemez. Başka bir deyişle, antioksidan aktivite yüksek miktarda fenolik ile bağıntılı değildir ve bu nedenle ekstrelerin antioksidan potansiyelini değerlendirirken hem fenolik içerik hem de antioksidan aktivite bilgileri birlikte tartışılmalıdır.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Fabaceae ailesinin biyolojik aktivite, sekonder metabolit içeriği ve temel yağ asitleri içeriği açısından en zengin cinslerinden birisi olan *Hedysarum* cinsine ait *Hedysarum aucheri* Türkiye'ye endemik bir bitki olup literatürde bu bitkiye ait herhangi bir kimyasal ya da biyolojik bilimsel çalışma bulunmamaktadır. Dolayısıyla ilk defa tarafımızdan çalışılan bu bitkiye ait elde edilen veriler oldukça değerli ve literatürde ilktir. IUCN kırmızı liste kriterlerine göre "Yok Olabilir Tür" (VU) olarak sınıflandırılan ve neslinin doğada tükenme riskinin yüksek olduğu kabul edilen bu bitki hakkında elde edilen her veri oldukça değer teşkil etmektedir.

Bu çalışmanın ilk kısmını heksan ekstresinin içerdiği kimyasal bileşiklerin ve yağ asitlerinin tayini oluşturmaktadır. Heksan ekstresinin içerdiği yağ asitlerinin metil esterlerine dönüştürülmesinden sonra gerçekleştirilen GC-MS analizi, heksan ekstresinin yağ asitleri açısından oldukça zengin bir içeriğe sahip olduğunu ortaya koydu. İnsanlar için sadece iki tane temel yağ asidi bulunmaktadır ve bunlar bir omega-6 yağ asidi olan alfa-linolenik asit (ALA) ve omega-3 yağ asidi olan linoleik asittir (LA). IUPAC isimleri (Z, Z, Z)-9,12,15-Oktadekatrienoik asit ve (Z, Z)-9,12-Oktadekadienoik asit olan alfa-linolenik asit ve linoleik asit'in Hedysarum aucheri'nin heksan ekstresi içerisindeki miktarları sırasıyla %32.37 ve %9.16 gibi oldukça yüksek bir yüzdeye sahiptir. İnsan ve birçok canlı sistemde ihtiyaç duyulan temel yağ asitlerinden olan bu yağ asitlerinin dışarıdan gıda olarak alınması gerekmektedir çünkü bu bileşikler insan hücreleri tarafından üretilemezler. Bu temel yağ asitleri anti-inflamatuar, kalp ve damar hastalıkları oluşumunu engelleyici, iştah artışını baskılayıcı, nem tutucu ve akne azaltıcı gibi farmakolojik açıdan çok önemli rollere sahiptirler. Doymamış yağ asitlerinin eksikliğinin insan vücudunda zararlı ve anormal değişimlere neden olduğu uzun süredir bilinmektedir. Yeterli miktarda temel yağ asidi alınmadığı durumlarda saç dökülmesi, yaraların yavaş iyileşmesi ve deride hafif pullanma gibi etkiler gözlemlenebilir. Doymamış yağ asitleri kozmetik, ilaç, yüzey kayganlaştırıcı ve sabun gibi endüstride de geniş bir kullanım yelpazesine sahiptir. Heksan ekstresi içerisindeki yüksek miktara sahip diğer yağ asitleri ise

Heksadekanoik asit (Palmitik asit) (%24.69), oktadekanoik asit (Stearik asit) (%7.11), Eikasanoik asit (%3.14)' tir. %12.01 orana sahip olan fitol ise bir diterpen alkol olup kozmetik ve temizlik ürünlerinde kullanılan oldukça yaygın bir kullanım alanına sahiptir.

Ayrıca ekstrelerin içerdiği toplam flavonoid ve fenolik bileşiklerin içeriği tayin edildi. En yüksek fenolik bileşik içeriğinin (kuru madde 122.4 ± 1.6 mg GAE / g) ve flavonoid içeriğinin (66.3 ± 1.3 mg QE / gr kuru madde) bütanol ekstresi olduğu bulundu. Bu sonuç bitkinin savunma mekanizmasında rol alan ve bitkiyi çeşitli hastalıklara karşı koruyan ikincil metabolitlerin çoğunluğunun bütanol ekstresinde bulunduğunu göstermektedir.

Bu çalışmanın aktivite kısmında ise *Hedysarum aucheri*'den elde edilen metanol, heksan, diklorometan, bütanol ve su ekstrelerinin antioksidan aktiviteleri; CUPRAC bakır(II) indirgeme esaslı antioksidan kapasite ve ABTS radikal süpürme kapasitesi testleri ile belirlendi. *H. aucheri* ekstrelerinin Cu^{+2} iyonlarını indirgeme gücü bütanol> diklorometan> heksan> metanol> su sırasına göre iken, ABTS radikal süpürme kabiliyetleri bütanol> diklorometan> metanol> n-heksan> su sırasına göre değişim gösterdi. Antioksidan aktivite sonuçları ile toplam fenolik ve toplam flavonoid içerikleri arasında doğrudan bir korelasyon olduğu açık bir şekilde görülmektedir. Sekonder metabolit açısından en zengin içeriğe sahip bütanol ekstresinin en etkili antioksidan aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi.

Hedysarum aucheri (Fabaceae) Türkiye'ye endemik bir bitki olup içerdiği doğal bileşikler ve biyolojik aktiviteleri hakkında bilinen bir çalışma yoktur. Bu çalışma halk arasında halk ilacı olarak kullanılan Fabaceae ailesi üyesi olan *Hedysarum aucheri'nin* içerdiği uçucu yağlarının tespiti ve antioksidan etkisinin incelenmesi açısından ilk çalışmadır.

KAYNAKLAR

AINSWORTH, E. A. and GILLESPIE, K. M., 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. Nat. Protoc., 2 (4): 875-877.

AKOH, C.C. and MİN, D.B., 2008. Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology. CRC press., 1028s.

ALLEN, O.N. and ALLEN, E.K., 1981. The Leguminosae. A source book of characteristics, uses and nodulation, 799s.

ALEXANDROVA, M., BOCHEV, P., MARKOVA, V., BECHEV, B., POPOVA, M., DANOVSKA, M. and SİMEONOVA, V., 2004. Dynamics of free radical processes in acute ischemic stroke: Influence on neurological status and outcome. Journal of Clinical Neuroscience, 11: 501-506.

AMES, B.N., SHIGENAGA, M.K. and HAGEN, T.M., 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 (17): 7915-7922.

ANONİM, 1983. List of rare, threatened and endemic plants in Europe (1982 edition). Council of Europe, 338s.

ANONİM, 2001. International Olive Oil Council 2001. Method of Analysis. International Olive Oil Council COI/T. 20/ Doc.No: 24.

ANONİM, 2002. World Health Organization, WHO mortality data, 176s

ANNEKEN, D. J., BOTH, S., CHRISTOPH, R. and FIEG, G., 2006. Udo Steinberner, Alfred Westfechtel Fatty Acids in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim.

APAK, R., GÜÇLÜ, K., ÖZYÜREK, M. ve KARADEMIR, S.E., 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. J Agric Food Chem., 52 (26): 7970-7981.

BAILEY, D.M. and DAVIES, B., 2001. Acute mountain sickness; prophylactic benefits of antioxidant vitamin supplementation at high altitude. High Altitude Medicine and Biology, 2(1): 21-29.

BAUMGARTNER, R., EICHENBERGER, U. and BÄRTSCH, P., 2002. Postural ataxia at high altitude is not related to mild to moderate acute mountain sickness. European Journal of Applied Physiology, 86 (4): 322-326.

BECKMAN, K.B. and AMES, B.N.,1999. Endogenous oxidative damage of mtDNA. Mutation Research, 424: 51-58.

BEERMANN, C., JELINEK, J., REINECKER, T., HAUENSCHILD, A., BOEHM, G. and KLOR, H. U., 2003. Short term effects of dietary medium-chain fatty acids and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids on the fat metabolism of healthy volunteers. Lipids in Health and Disease, 2: 1-10.

BOUDJOU S., OOMAH, B.D., ZAIDI, F. and HOSSEINIAN, F., 2013. Phenolics content and antioxidant and anti-inflammatory of legume fractions. Food Chemistry, 138 (2-3): 1543-1550.

CHAMBERLAIN, D.F. and MATTHEWS, V.A., 1970. Astragalus L. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh Univ. Press, Edinburgh, 3: 49-254.

CHAU, C.F. and CHEUNG, P.K., 1997. Eect of various processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch of two Chinese indigenous legume seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45 (12): 4773-4776.

CHAO, W.H., ASKEW, E.W., ROBERTS, D.E., WOOD, S.M. and PERKINS, J.B., 1999. Oxidative stress in humans during work at moderate altitude. The Journal of nutrition, 129 (11): 2009-2012.

CHEN, C., PEARSON, A. and GRAY, J.I, 1992. Effects of synthetic antioxidants (BHA, BHT and PG) on the mutagenicity of IQ-like compounds. Food Chemistry, 43(3): 177-183.

CHEN, C., DONG, J.Y., LIU, K., LIU, Y.Q. and WANG, Y.L., 2007. (Antioxidant effect of total flavonoids of Hedysarum polybotry on human umbilical vein endothelial cells injury induced by hydrogen peroxide). Zhong Yao Cai., 30 (9): 1099-1102.

CHENG, F., KUN, Z.O.U., SHU, Z.H.U. and KATSUKO, K., 2009. A new phenylpropionate derivative from the rhizomes of Hedysarum polybotrys. Chinese Journal of Natural Medicines,7 (5): 351-353.

CHOI, B.H. and OHASHİ, H., 2003. Generic criteria and an infrageneric system for Hedysarum and related genera (Papilionoideae-Leguminosae). Taxon, 52: 567–576.

CIFUENTES, A., (Ed.). 2013. Foodomics: Advanced mass spectrometry in modern food science and nutrition John Wiley and Sons, 580s.

COPPACK, S.W., 2001. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. Proceedings of the Nutrition Society,60 (03): 349-356.

POLIDORI, M.C., PRATICO, D., SAVINO, K., ROKACH, J., STAHL, W. and MECOCCI, P. 2004.Increased F2 isoprostone plasma levels in patients with congestive heart failure are correlated with antioxidant status and disease severity. Journal of Cardiac Failure, 10: 334-338.

DANG, Z., FENG, D., LIU, X., YANG, T., GUO, L., LIANG, J., LIANG, J., HU, F., CUI, F. and FENG, S., 2013. Structure and antioxidant activity study of sulfated acetamido-polysaccharide from Radix Hedysari. Fitoterapia, 89: 20-32.

DAVIS, P. H., 1970. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. University of Edinburgh. Edinburgh, 3: 558.

DAVIS, P.H., MILL, R.R. and TAN, K., 1988. *Astragalus* L. Davis, P.H. (ed.), Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Edinburgh Univ. Press, Edinburgh, 10: 114-124

DEVASAGAYAM, T.P.A., TILAK, J.C., BOLOOR, K.K., SANE, K.S., GHASKADBI, S.S and LELE, R.D. 2004 Free radicals and antioxidants in human health. Current status and future prospects. Journal of the Association of Physicians India, 52: 794-804

DONG, Y., TANG, D., ZHANG, N., LI, Y., ZHANG, C., LI, L. and LI, M., 2013. Phytochemicals and biological studies of plants in genus Hedysarum. Chem. Cent J, 7 (1): 124-137.

DOYLE, J. J., CHAPPILL, J. A., BAILEY, C. D.and KAJITA, T. 2000. Towards a comprehensive phylogeny of legumes: evidence from rbcL sequences and non-molecular data. Advances in Legume Systematics, 9: 1-20.

DROGE, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol. Rev., 82: (1) 47-95.

DUMAN, H. ve AKAN, H., 2003. New species of Astragalus L. (sect. Alopecuroidei: Leguminossae) from Turkey. Bot. J. Linn. Soc., 143: 201-205.

FOGARTY, A., LEWIS, S., WEISS, S. and BRITTON, J., 2000. Dietary vitamin E, IgE concentrations, and atopy. The Lancet, 356 (9241): 1573-1574.

GARRIDO, N., MESEGUER, M., SIMON, C., PELLICER, A. and REMOHI, J., 2004. Pro-oxidative and anti-oxdative imbalance in humn semen and its relation with male fertileity. Asian Journal of Andrology, 6: 59-65.

GROSS, G. G., 1992. Enzymes in the biosynthesis of hydrolysable tannins. In R. W. Heminway, P.E. Laks and S.J. Branham, Plant Polyphenols. Plenum press Newyork, 1045s.

GONCHIG, E., ERDENEBAT, S., TOGTOO, O., BATAA, S., GENDARAM, O., KIM, Y. S. and RYU, S. Y., 2008. Antimicrobial activity of Mongolian medicinal plants. Nat. Prod. Sci., 14 (1): 32.

GUNSTONE, F. D., HARWOOD, J. L and DIJKSTRA A. J., 2007. The Lipid Handbook with Cd-Rom. CRC Press, 525s.

GÜLÇİN, İ., TOPAL, F., SARIKAYA, S. B. Ö., BURSAL, E., BILSEL, G. ve GÖREN, A. C., 2011. Polyphenol Contents and Antioxidant Properties of Medlar (Mespilus germanica L.). Records of Natural Products, 5 (3): 158.

HAILIQIAN, T., KANG, J.S. and SUN, L., 2007. Effects of aqueous extract of Hedysarum austrosibiricum on metabolism of oxyen free radicals in subacute aging mice caused by D-galactose. China journal of Chinese materia medica, 32 (8): 729-731.

HARBORNE, J.B., 1993. The Flavonoids: Advances in Research Since 1986. Chapman and Hall, London, 616s.

HÄTTENSCHWILER, S. and VITOUSEK, P. M., 2000. The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. Trends in ecology and evolution, 15 (6): 238-243.

HAYDENT, M.R. and TYAGI, S.C., 2002. Neural redox stress and remodeling in metabolic syndrome, type 2diabetes. Journal of the Pancreas, 3: 126-138.

HU, F., LI, X., ZHAO, L., FENG, S. and WANG, C., 2010. Antidiabetic properties of purified polysaccharide from Hedysarum polybotrys. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 88 (1): 64-72.

HUI, H.P., FENG, S.L., HU, F.D., CUI, F. and WU, Y.Q., 2010. Study on antioxidative activity of polysaccharide from Radix Hedysari in vitro. J. Anhui. Agri. Sci., 38: 4056-4057.

IRSHAD, M., 2002 Oxidative stress in liver diseases. Tropical Gastroenterology, 23: 6-8.

JENSEN, R. G., HAGERTY, M. M., and MCMAHON. K. E., 1978. Lipids of human milk and infant formulas: a review. Am. J. Clin. Nutr., 31 (6): 990-1016.

JOHN, W.B. and SUZANNE, R.T., 1999 Role of oxidative stress in diabetic complications. Diabetes, 48: 1-9.

KÄHKONEN, M. P., HOPIA, A. I., VUORELA, H. J., RAUHA, J.-P., PIHLAJA, K., KUJALA, T. S. and HEINONEN, M., 1999**.** Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. J. Agric. Food. Chem, 47: 3954-3962.

KAHL, R. and KAPPUS, H., 1993. (Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E). Z Lebensm Unters Forsch, 196 (4): 329-338.

KAJITA, T., OHASHI, H., TATEISHI, Y., BAILEY, C. D. and DOYLE, J. J., 2001. rbcL and legume phylogeny, with particular reference to Phaseoleae, Millettieae, and allies. Systematic Botany, 26 (3): 515-536.

KAURINOVIC, B., POPOVIC, M., VLAISAVLJEVIC, S., SCHWARTSOVA, H. and VOJINOVIC-MILORADOV, M., 2012. Antioxidant profile of Trifolium pratense L. Molecules, 17 (9): 11156-11172.

KHODDAMI, A., WILKES, M. A. and ROBERTS, T. H., 2013. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. Molecules,18 (2): 2328-2375.

KOES, R. E., QUATTROCCHIO, F. and MOL, J. N. M., 1994. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. BioEssays, 16: 123–132.

KORALEK, D. O., PETERS, U. and ANDRIOLE, G., 2006. "A prospective study of dietary α-linolenic acid and the risk of prostate cancer (United States)". Cancer Causes and Control,17 (6): 783–791.

KORKINA, L., 2007. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants from plant defense to human health. Cell. Mol. Biol., 53 (1): 15-25.

KINGSBURY, K. J., PAUL, S., CROSSLEY, A. and MORGAN, D. M., 1961. The fatty acid composition of human depot fat. Biochemical Journal, 78: 541–550.

LARSON, R. A., 1997. Naturally occurring antioxidants. CRC Press, New York, 191s.

LEWIS, G., SCHRIRE, B., MACKINDER, B. and LOCK, M., 2005. Legumes of the world. Royal Botanical Gardens, Kew UK, 434s.

LI, Y., HUANG, J., GUO, H. and REN, B., 2009. Chemical constituents from Hedysarum polybotrys and their antitumor activities. Chinese Traditional and Herbal Drugs**,** 40: 1195-1198.

LIU, Y., ZHAO, Y. Y., TU, G. Z. and CHEN, H. B., 2005. Flavonoids of the roots of *Hedysarum kirghisorum.* Biochem. Syst. Ecol., 33 (8): 809-812.

LIU, Y., ZHANG, Q. Y., ZHAO, Y. Y., WANG, B., HAI, L. Q., YING, Y. P., and CHEN, H. B., 2007. Saponins from the roots of Hedysarum polybotrys. Biochemical Systematics and Ecology, 35 (6): 389-391.

LINKE, A., ADAMS, V., SCHULZE, P.C., ERBS, S., GIELEN, S., FIEHN, E., MÖBIUS-WINKLER, S., SCHUBERT, A., SCHULER, G. and HAMBRECHT, R., 2005. Antioxidative effects of exercise training in patients with chronic heart failure. Circulation,111 (14): 1763-1770.

LIPINSKI, B., 2001. Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. Journal of Diabetes and Complications, 15: 203-210.

LIU, Y., ZHAO, Y.Y., TU, G.Z. and CHEN, H.B., 2005. Flavonoids of the roots of Hedysarum kirghisorum. Biochemical Systematics and Ecology, 33 (8): 809-812.

LIU, Y., ZHAO, Y., CHEN, H., WANG, B. and ZHANG, Q., 2009. Structure elucidation and complete NMR spectral assignment of two triterpenoid saponins from Radix Hedysari. Fitoterapia,80 (2): 127-129.

LOUDIANOS, G. and GITLIN, J.D., 2000. Wilson's disease. Seminars in Liver Disease, 20: 353-364.

MAASSOUMI, A.A., 1999. Astragalus in the Old World: check-list. Research Institute of Forests and Rangelands, 743-751.

MA, Q. and KINNEER, K., 2002. Chemoprotection by Phenolic Antioxidants. Inhibition of tumor necrosis factor α induction in macrophages. J Biol Chem., 277 (4): 2477-2484.

MAKKER, K., AGARWAL, A. and SHARMA, R., 2009. Oxidative stress and male infertility. Indian Jornal of Medical, ;129 (4): 357-67.

MALENČIĆ, D., POPOVIĆ, M. and MILADINOVIĆ, J., 2007. Phenolic content and antioxidant properties of soybean (Glycine max (L.) Merr.) seeds. Molecules,12 (3): 576-581.

MUTHUKUMAR, A. And SELVAM, R., 1997. Renal injury mediated calcium oxalate nephrolithiasis. Role of lipid peroxidation. Renal Failure, 19: 401-408.

NADKARNI, K.M., 1976. Indian Materia Medica, Popular Prakashan, Private Limited, 18 (3-4): 205–209.

PANDEY, A., CHAKRABORTY, S., DATTA, A. and CHAKRABORTY, N., 2008 Proteomics approach to dentify dehydration responsive nuclear proteins from Chickpea (Cicerarietinum L.), Molecular and Cellular Proteomics, 7 (1): 88-107.

PAVLOVA, L.E., SAVOV, V.M., PETKOV, H.G. and CHAROVA, I.P., 2007 Oxidative stress in patients wit beta-thalassemia major. Prilozi, 28: 145-154.

PAQUAT, C. and HAUTFENNE A., 1992. International Union of Pure and Applied Chemistry. Applied Chemistry Division. Commission on Oils, Fats, and Derivatives. Blackwell Scientific Publications, London, 347s.

PENA-SILVA, R.A., MILLER, J.D., CHU, Y. and HEISTAD, D.D., 2009. Serotonin produces monoamine oxidase-dependent oxidative stress in human heart valves. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 297 (4): 1354-1360.

PIERPOINT, W. S., 2000. Why do plants make medicines. Biochemist, 22: 37–40.

POLI, G., 1993. Lever damage due to free radicals. British Medical Bulletin, 49: 604-620.

RAHMAN, T., HOSEN, I., ISLAM, M.T. and SHEKHAR, H.U., 2012. Oxidative stress and human health. Advances in Bioscience and Biotechnology, 3 (7A): 997.

RAMON, J. M., BOU, R., ROMEA, S., ALKIZA, M. E., JACAS, M., RIBES, J. and OROMI, J., 2000. Dietary fat intake and prostate cancer risk: a case-control study in Spain. Cancer Causes and Control, 11 (8): 679–85.

RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M. and RICE-EVANS, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved. ABTS radical cation decolarization assay. Free Radical Biolgy and Medicine, 26 (9): 1231-1237.

REINER, M. F., STIVALA, S., CAMICI, G. G. and BEER, J. H., 2014. (The effects of Omega-3 fatty acids in clinical medicine). Praxis (Bern 1994), 103 (6): 329–35.

RIZZO, M., KOTUR-STEVULJEVIC, J., BERNEIS, K., SPINAS, G., RINI, G.B., JELIC-IVANOVIC, Z., SPASOJEVIC-KALIMANOVSKA, V. and VEKIC,

J., 2009. Atherogenic dyslipidemia and oxidative stress: a new look. Translational Research,153 (5): 217-223.
ROBBINS, R. J., 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51 (10): 2866-2887.
ROHMAN, A., RIYANTO, S., YUNIARTI, N., SAPUTRA, W.R. UTAMI, R., and MULATSIH, W., 2010. Antioxidant activity, total phenolic, and total flavaonoid of extracts and fractions of red fruit (Pandanus conoideus Lam). Int Food Res J., 17 (1): 97-106.
SALAH, N.B., CASABIANCA, H., ESSAIDI, I., CHENAVAS, S., FILDIER, A., SANGLAR, C., JANNET, H.B. and BOUZOUITA, N., 2016. Isolation and structure elucidation of two new antioxidant flavonoid glycosides and fatty acid composition in Hedysarum carnosum Desf. Industrial Crops and Products, 81: 195-201.
SATUÉ-GRACIA, M. T., HEINONEN, M. and FRANKEL, E. N., 1997**.** Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. J. Agric. Food. Chem., 45: 3362-3367.
SELVAM, R. And KALAISELVI, P., 2001. Studies on calcium oxalate binding proteins. Effect of lipid peroxidation. Nephron, 88: 163-167.
SHAGJJAV, O., BHATTARAI, H.D., YIM, J.H. and DONDOG, P., 2014. Antioxidant Activity of Some Mongolian Plants. Mongolian Journal of Biological Sciences, 12 (1-2): 27-32.
SHAZIA, Q., MOHAMMAD, Z.H., RAHMAN, T. And SHEKHAR, H.U., 2012 Correlation of oxidative stress with serum trace element levels and antioxidant enzyme status in beta thalassemia major patients: Areview of the literature, 7
SIES, H., 1985. Oxidative stress introductory remarks. Oxidative stress, Dusseldorf Federal Republic of Germany, 507s.
SIMOPOULOS, A. P., 2008. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. Experimental Biology and Medicine, 233 (6): 674-688.
SING, P.P. and BARJATIA, M. K., 2002. Peroxidative stress and antioxidant status in relation to age in normal population and renal stone formers. Indian Journal of Nephrology, 12: 10-15.
SPILLANTINI, M.G., SCHMIDT, M.L., LEE, V.M.Y., TROJANOWSKI, J.Q., JAKES, R. and GOEDERT, M., 1997. α-Synuclein in Lewy bodies. Nature, 388 (6645): 839-840.
SUBHASHINI, N., THANGATHIRUPATHI, A. and LAVANYA, N., 2011. Antioxidant activity of Trigonella foenum graecum using various in vitro and ex vivo models. Int. J. Pharm. Pharm. Sci., 3 (2): 96-102.
SUN, J.G., JURISICOVA, A. and CASPER, R.F., 1997 Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: Correlation with fertilization in vitro. Biology of Reproduction, 56: 602-607
SURYAKAR, A.N., KATKAM, R.V. and JOSHI, N.G., 2008. Oxidative stress and disturbance in antioxidant balance in beta thalassemia major. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 23: 337-340.
TAUB, R., 2004. Liver regeneration: From myth to mechanism. Nature Reviews Molecular. Cell Biology, 5: 836-847.

THAMILSELVAN, S., KHAN, S.R. and MENON, M., 2003. Oxalate and calcium oxalate mediated free radical toxicity in renal epithelial cells. Effect of antioxidants. Urological Research, 31: 3-9.

TSUJI, A., 2005. Small molecular drug transfer across the blood-brain barrier via carrier-mediated transport systems. NeuroRx, 2 (1): 54-62.

URL:1. http://faostat.fao.org/site/567/default.aspxancor), Erişim Tarihi: 06/12/2016

URL:2. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68019814, Erişim tarihi: 15/07/2017

VAN NIEUWENHOVE, C. P., OLISZEWSKI, R. and GONZALEZ S.N., 2009. Fatty acid composition and conjugated linoleic acid content of cow and goat cheeses from northwest Argentina. Journal of food quality, 32.(3): 303-314.

VAN GAAL, L. F., VERTOMMEN, J. and DE LEEUW, I.H., 1998. The in vitro oxidizability of lipoprotein particles in obese and non-obese subjects. Atherosclerosis, 137: 39-44.

VALENTINE, J. S. and HART, P. J., 2003. Misfolded CuZnSOD and amyotrophic lateral sclerosis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100 (7): 3617-3622.

VASAVIDEVI, V. B., KISHOR, H. D., ADINATH, N. S., RAJESH, D. A. and RAGHAVENDRA, V. K., 2006. Depleted nitrite and enhanced oxidative stress in urolithiasis. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 21: 177-180.

VERZOLA, D., MARIA, B. B., BARBARA, V., LUCIANO, O., FRANCO, D., FRANCESCA, S., VALERIA, B., MARIA, T. G., GIACOMO, G. and GIACOMO, D., 2004. Oxidative stress mediates apoptotic changes induced by hyperglycemia in human tubular kidney cells. Journal of the Aamerican Society of Nephrology, 115: 85-87.

VINE, M. F., TSE, C. K., HU, P. and TRUONG, K. Y. 1996. Cigarette smoking and semen quality. Fertility and Sterility, 65: 835-842.

YAKOVLEV, G. P., SYTİN, A. K. and ROSKOV Y. R., 1996. Legumes of northern Eurasia, a check-list. Royal Botanic Gardens, Kew, UK, 724s.

YANG, M., WANG, W., SUN, J., ZHAO, Y., LIU, Y., LIANG, H.and GUO, D. A., 2007. Characterization of phenolic compounds in the crude extract of Hedysarum multijugum by high performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 21 (23): 3833-3841.

YUDOH, K., VAN TRIEU, N., NAKAMURA, H., HONGO-MASUKO, K., KATO, T. and NISHIOKA, K., 2005. Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. Arthritis Res. Ther., 7 (2): R380.

WANG, J., ITO, H. and SHIMURA, K., 1989. Enchancing effect of antitumor polysaccharide from Astragalus or Radix hedysarum on C3 cleavage production of macrophages in mice. The Japonse Journal of Pharmacology, 51: 432-434.

WEI, Y. H., LU, C. Y., WEI, C. Y., MA, Y. S. and LEE, H. C., 2001. Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease-consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system. Chinese Journal of Physiology, 44 (1): 1-11.

WEI, D., CHENG, W., WEI, Y. and ZHANG, L., 2012. Phosphorylated modification and in vitro antioxidant activity of Radix Hedysari polysaccharide. Glycoconjugate journal, 29 (4): 167-172.

WEI, D., CHEN, T., YAN, M., ZHAO, W., LI, F., CHENG, W. and YUAN, L., 2015. Synthesis, characterization, antioxidant activity and neuroprotective effects of selenium polysaccharide from Radix hedysari. Carbohydrate polymers, 125: 161-168.

WOJCIECHOWSKI, M. F., 2003. Reconstructing the phylogeny of legumes (Leguminosae) an early 21st century perspective. Advances in legume systematics, part, 10: 5-35.

WOJCIECHOWSKI, M. F., LAVIN, M. and SANDERSON, M. J., 2004. A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid matK gene resolves many well-supported subclades within the family. American J. Botany, 91: 1846-1862.

ZHAO, L. G., CHEN, T. Q., FENG, D. M., XIAO, T. G., DANG, Z. L., FENG, S. L. and XIA, Y. Y., 2014. Structural characterization and antioxidant activity of a heteropolysaccharide isolated from Hedysarum polybotrys. Journal of Asian Natural Products Research,16 (6): 677-684.

ZENGIN, G., GULER, G. O., AKTUMSEK, A., CEYLAN, R., PICOT, C. M. N. and MAHOMOODALLY, M. F., 2015. Enzyme inhibitory properties, antioxidant activities, and phytochemical profile of three medicinal plants from Turkey.Advances in pharmacological sciences, Article ID 410675, 8 pages.

ZHISHEN, J., MENGCHENG, T. and JIANMING, W., 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food chem., 64 (4): 555-559.

ZORIC L., 2003.Parameters of oxidative stress in the lens. Aqueous humor and blood in patients with diabetes and senile cataracts. Srpski Arhiv za Celokupno lekarstvo, 131: 137-142.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Ülkü ARSLAN
Uyruğu: T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : ADANA, 31.01.1989
Telefon: +90 (531) 984 8648
e-mail: ulkuarslan01@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı	İlçe	İl	Bitirme Yılı
Lise:	Mehmet Kemal Tuncel Lisesi	Seyhan	Adana	2005
Üniversite:	Harran Üniversitesi/Fen-Edebiyat fakültesi/Kimya Bölümü	Haliliye	Şanlıurfa	2013
Yüksek lisans:	Harran Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü/Kimya Anabilim Dalı	Haliliye	Şanlıurfa	2017

YABANCI DİLLER: İngilizce

YAYINLAR:

UYAR, Z., ARSLAN, Ü., TUMBUL, F., KOZ, Ö. Ve UYAR, E., 2014. Hedysarum pycnostachyum (Fabaceae)ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi ve bu bitkilerden elde edilen iki terpenik glikozid bileşiğinin izolasyonu ve karakterizasyonu. 2. Ulusal Organik Kimya Kongresi, 24-26 Eylül, Ankara.

UYAR, Z., YILMAZ, A., GENLİ, N., ARSLAN, Ü. ve DEĞİRMENCİ, M., 2014. Miktoarm Yıldız Tipi Polimer Sentezi ve Karakterizasyonu. 2. Ulusal Organik Kimya Kongresi, 24-26 Eylül, Ankara.

UYAR, Z., ARSLAN, Ü., UYAR, E., KOZ, Ö., KOYUNCU, İ. ve YÜKSEKDAĞ, Ö., 2015. Hedysarum pycnostachyum bitki ekstrelerinin çeşitli biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi. 18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 18-19 Aralık, Konya.

UYAR, Z., ARSLAN, Ü., UYAR, E., KOZ, Ö., KOYUNCU, İ. ve YALÇIN, H. T., 2015. Helleborus vesicarius bitki ekstrelerinin antimikrobiyal, antioksidan ve sitotoksik aktivitelerinin belirlenmesi. 18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 18-19 Aralık, Konya.

UYAR, Z., ARSLAN, Ü. ve DEĞİRMENCİ, M., 2015. Synthesis of Bisbenzoin End-Functionalized Poly(Ɛ -Caprolactone) Macrophotoinitiator and Its Use in Miktoarm Star Copolymerization. Internatıonal Turkıc World Conferance on Chemıcal Scıences and Technologıes (ITWCCST) 27th October-1st November, Bosna Hersek.

UYAR, Z., DURGUN, M., YAVUZ, M. Ş., ABACI, B., ARSLAN, Ü. Ve DEĞİRMENCİ, M., 2017. Two-arm PCL and PLLA macrophotoinitiators with benzoin end-functional groups by combination of ROP and click chemistry and their use in the synthesis of A2B2 type miktoarm star copolymers. Polymer 123: 153-168