KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

BAZI *LATHYRUS* TÜRLERİNİN FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN VE ANTİOKSİDAN POTANSİYELLERİNİN SPEKTROSKOPİK VE KROMATOGRAFİK YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ

RUHİYE KIRAN ACEMİ

KOCAELİ 2020

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

BAZI *LATHYRUS* TÜRLERİNİN FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN VE ANTİOKSİDAN POTANSİYELLERİNİN SPEKTROSKOPİK VE KROMATOGRAFİK YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ

RUHİYE KIRAN ACEMİ

Prof. Dr. Fazıl ÖZEN		
Danışman,	**Kocaeli Üniversitesi**	.....
Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ		
Jüri Üyesi,	**Ondokuz Mayıs Üniversitesi**	.....
Prof. Dr. Yasemin ÖZDENER KÖMPE		
Jüri Üyesi,	**Ondokuz Mayıs Üniversitesi**	.....
Doç. Dr. Özlem AKSOY		
Jüri Üyesi,	**Kocaeli Üniversitesi**	.....
Dr. Öğr. Üyesi Gökhan DURUKSU		
Jüri Üyesi,	**Kocaeli Üniversitesi**	.....

Tezin Savunulduğu Tarih: 31.01.2020

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu tezde üç farklı *Lathyrus* türünün fenolik bileşiklerinin ve antioksidan potansiyellerinin spektroskopik ve kromotografik yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmıştır. Fenolik bileşikler tüm bitkilerde yaygın olarak bulunur ve antioksidan aktivite de dâhil olmak üzere çoklu biyolojik etkilere sahiptirler. Serbest radikalleri inaktive ederek oksidatif stres oluşumunu geciktirebilen veya önleyebilen antioksidan bileşiklere tüm dünyada artan bir ilgi söz konusudur. Fenolik bileşikler bitkilerde fazla miktarda bulunan sekonder metabolitlerdir ve bu bileşikler insan diyetinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır.

Tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimi ile bana yol gösteren, her türlü olanağı sunan, her türlü desteği, anlayışı ve sabrından dolayı değerli danışman hocam Prof. Dr. Fazıl ÖZEN'e, tez izleme ve tez savunmasındaki katkılarından dolayı Prof. Dr. İbrahim Özkoç ve Doç. Dr. Özlem Aksoy'a, deneysel çalışmalarımda ve tezimin yazım aşamasında fikirlerini, desteğini ve yardımını hiçbir zaman eksik etmeyen, tecrübelerinden faydalandığım eşim Dr. Arda ACEMİ'ye, çalışmamın sonlanmasına kadar üstün sabır, anlayış ve maddi manevi desteklerini esirgemeyen, yaşamım boyunca beni her konuda destekleyen, her zaman yanımda olan canım annem Fatma Zeynep KIRAN'a canım babam Rafet KIRAN'a ve canım kardeşlerim Safiye KIRAN ve Nafiye KIRAN'a ve ACEMİ ailesine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ocak - 2020 Ruhiye KIRAN ACEMİ

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER..... ii
ŞEKİLLER DİZİNİ..... iiv
TABLOLAR DİZİNİ vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ vii
ÖZET..... iix
ABSTRACT..... x
GİRİŞ 1
1. GENEL BİLGİLER 2
1.1. Tezde Kullanılan Bitki Materyalleri..... 2
1.1.1. *Lathyrus* cinsinin genel özellikleri..... 2
1.1.2. *Lathyrus laxiflorus*'un biyolojik özellikleri..... 4
1.1.3. *Lathyrus undulatus*'un biyolojik özellikleri 5
1.1.4. *Lathyrus nissolia*'nın biyolojik özellikleri..... 6
1.2. Antioksidan Maddelerin Sınıflandırılması 8
1.2.1. Enzimatik antioksidanlar 9
1.2.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar..... 9
1.3. Bitkilerde Antioksidan Potansiyelin ve Fenolik Maddelerin Belirlenmesi.... 12
1.3.1. Toplam fenolik madde tayini..... 12
1.3.2. Toplam flavonoit içeriğinin belirlenmesi 12
1.3.3. Toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi..... 13
1.3.4. DPPH radikali temizleyici aktivitenin belirlenmesi 13
1.3.5. Toplam indirgeyici güç aktivitesinin belirlenmesi 13
1.3.6. Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi..... 13
1.3.7. Yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC)..... 14
1.3.8. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)..... 15
2. MALZEME VE YÖNTEM..... 16
2.1. Bitki Materyallerinin Eldesi ve Saklanması..... 16
2.2. Bitki Ekstraktlarının Eldesi 16
2.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler 16
2.4. Kullanılan Cihazlar..... 18
2.5. Spektroskopi Temelli Çalışmalar 18
2.5.1. Toplam fenolik içeriğinin belirlenmesi..... 18
2.5.2. Toplam flavanoit içeriğinin belirlenmesi..... 19
2.5.3. Toplam antioksidan aktivitenin belirlenmesi..... 19
2.5.4. DPPH radikali giderici aktivitenin belirlenmesi..... 20
2.5.5. Toplam indirgeyici güç aktivitesinin belirlenmesi 20
2.5.6. Klorofil ve karotenoit içeriğinin belirlenmesi 21
2.5.7. FTIR analizinin yapılması 21
2.6. Kromatografi Temelli Çalışmalar 22
2.6.1. HPTLC analizi..... 22
2.6.2. HPLC analizi..... 22
2.7. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz..... 23

3. BULGULAR 24
3.1. Spektroskopi Temelli Deneylere Ait Bulgular 24
3.1.1. Toplam fenolik içeriklerine ait bulgular 24
3.1.2. Toplam flavonoit içeriklerine ait bulgular 26
3.1.3. Toplam antioksidan aktivitelerine ait bulgular 28
3.1.4. DPPH radikali giderici aktivitelerine ait bulgular 31
3.1.5. Toplam indirgeyici güç aktivitelerine ait bulgular 34
3.1.6. Klorofil ve karotenoit içeriklerine ait bulgular 36
3.1.7. FTIR analizine ait bulgular 37
3.2. Kromatografi Temelli Deneylere Ait Bulgular 41
3.2.1. HPTLC analizine ait bulgular 41
3.2.2. HPLC analizine ait bulgular 43
4. TARTIŞMA 49
4.1. Spektroskopi Temelli Çalışmalar 49
4.1.1. Toplam fenolik madde miktarı 49
4.1.2. Toplam flavonoit miktarı 50
4.1.3. Toplam antioksidan aktivite 52
4.1.4. DPPH temizleyici aktivite 53
4.1.5. Toplam indirgeyici güç aktivitesi 54
4.1.6. Klorofil ve karotenoit içeriği 55
4.2. FTIR Çalışmaları 56
4.3. HPTLC Analizi 60
4.4. HPLC Analizi 61
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 63
KAYNAKLAR 64
KİŞİSEL YAYINLAR VE ESERLER 73
ÖZGEÇMİŞ 75

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. *Lathyrus laxiflora*'nın doğadaki görünümü 4
Şekil 1.2. *Lathyrus laxiflorus*'un Türkiye'deki yayılış haritası 5
Şekil 1.3. *Lathyrus undulatus*'un doğadaki görünümü. 5
Şekil 1.4. *Lathyrus undulatus*'un Türkiye'deki yayılış haritası 6
Şekil 1.5. *Lathyrus nissolia*'nın doğadaki görünümü 7
Şekil 1.6. *Lathyrus nissolia*'nın Türkiye'deki yayılış haritası 7
Şekil 1.7. Antioksidanların sınıflandırılması 8
Şekil 1.8. Çeşitli fenolik asitlerin kimyasal yapıları 10
Şekil 1.9. Çeşitli flavonoitlerin kimyasal yapıları 11
Şekil 3.1. Gallik asit standart grafiği 24
Şekil 3.2. Bitkilerin gövdelerinde gallik asit cinsinden toplam fenolik madde miktarı 25
Şekil 3.3. Bitkilerin yapraklarında gallik asit cinsinden toplam fenolik madde miktarı 25
Şekil 3.4. Kuersetin standart grafiği 27
Şekil 3.5. Bitkilerin yapraklarında kuersetin cinsinden toplam flavonoit miktarı 28
Şekil 3.6. *Lathyrus laxiflorus*'un çeşitli çözücülerle hazırlanan yaprak ekstraktlarının toplam antioksidan aktiviteleri ve bunların standart antioksidanlarla kıyaslanması 29
Şekil 3.7. *Lathyrus undulatus*'un çeşitli çözücülerle hazırlanan yaprak ekstraktlarının toplam antioksidan aktiviteleri ve bunların standart antioksidanlarla kıyaslanması 30
Şekil 3.8. *Lathyrus nissolia*'nın toprak üstü kısımlarının çeşitli çözücülerle hazırlanan ekstraktlarının toplam antioksidan aktiviteleri ve bunların standart antioksidanlarla kıyaslanması 31
Şekil 3.9. *Lathyrus laxiflorus*'un çeşitli çözücülerle hazırlanan yaprak ekstraktlarının DPPH radikali indirgeme aktiviteleri ve bunların standart antioksidanlarla kıyaslanması 32
Şekil 3.10. *Lathyrus undulatus*'un çeşitli çözücülerle hazırlanan yaprak ekstraktlarının DPPH radikali indirgeme aktiviteleri ve bunların standart antioksidanlarla kıyaslanması 33
Şekil 3.11. *Lathyrus nissolia*'nın toprak üstü kısımlarının çeşitli çözücülerle hazırlanan ekstraktlarının DPPH radikali indirgeme aktiviteleri ve bunların standart antioksidanlarla kıyaslanması 34

Şekil 3.12. *Lathyrus laxiflorus* yapraklarının çeşitli çözücülerle hazırlanan ekstraktlarının toplam indirgeyici güç aktiviteleri ve bunların askorbik asitle karşılaştırılması 35
Şekil 3.13. *Lathyrus undulatus* yapraklarının çeşitli çözücülerle hazırlanan ekstraktlarının toplam indirgeyici güç aktiviteleri ve bunların askorbik asitle karşılaştırılması 35
Şekil 3.14. *Lathyrus nissolia*'nın toprak üstü kısımlarının çeşitli çözücülerle hazırlanan ekstraktlarının toplam indirgeyici güç aktiviteleri ve bunların askorbik asitle karşılaştırılması 36
Şekil 3.15. Bitki ekstraktlarındaki fotosentetik pigment içerikleri 37
Şekil 3.16. İncelenen *Lathyrus* türlerine ait FTIR spektrumları 38
Şekil 3.17. İncelenen *Lathyrus* türlerine ait FTIR spektrumlarının ikinci türevleri 39
Şekil 3.18. İncelenen *Lathyrus* türlerindeki fenolik bileşiklere ait HPTLC parmak izi profilleri 41
Şekil 3.19. İncelenen *Lathyrus* türlerindeki flavonoitlere ait HPTLC parmak izi profilleri. 42
Şekil 3.20. İncelenen *Lathyrus* türlerindeki taninlere ait HPTLC parmak izi profilleri 43
Şekil 3.21. Analizlerde kullanılan standart maddelere ait HPLC kromatogramı 44
Şekil 3.22. *Lathyrus laxiflorus* yapraklarının metanolik ekstraktından elde edilen HPLC kromatogramı 45
Şekil 3.23. *Lathyrus undulatus* yapraklarının metanolik ekstraktından elde edilen HTLC kromatogramı 46
Şekil 3.24. *Lathyrus nissolia'nın* toprak üstü kısımlarının metanolik ekstraktından elde edilen HPLC kromatogramı 47

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler ve markaları 17
Tablo 2.2. Deneylerde kullanılan malzeme ve cihazlar ve markaları 18
Tablo 2.3. Analizde uygulanan gradient programı 23
Tablo 3.1. *Lathyrus* türlerinin yaprak ve gövde dokularının FTIR spektrumlarında gözlenen bazı frekanslar 40
Tablo 3.2. *Lathyrus* türlerinin yaprak ve gövde dokularının FTIR spektrumlarındaki piklere ait absorbanslar 40
Tablo 3.3. Standart maddelere ve analitlere ait R_f değerleri 44
Tablo 3.4. İncelenen *Lathyrus* türlerinin metanolik ekstraktlarında tespit edilen fenolik maddeler ve miktarları 48
Tablo 4.1. Spektrumların analizinde odaklanılan bantlar ve temsil ettikleri moleküler gruplar 59

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

cm	:	Santimetre
dk	:	Dakika
g	:	Gram
kHz	:	Kilohertz
L	:	Litre
M	:	Molar
m	:	Kütle, (g)
mg	:	Miligram
ml	:	Mililitre
mm	:	Milimetre
nm	:	Nanometre
ppm	:	Milyonda bir
rpm	:	Dakikada devir sayısı
v	:	Hacim, (ml)
W	:	Watt
µg	:	Mikrogram
µl	:	Mikrolitre
µm	:	Mikrometre
µM	:	Mikromolar
ºC	:	Santigrat derece
γ	:	Gama
α	:	Alfa

Kısaltmalar

Ace	:	Aseton
ANOVA	:	Analysis of Variance (Varyans Analizi)
ATR	:	Attenuated Total Reflectance (Zayıflatılmış Toplam Yansıma)
BHA	:	Bütillenmiş Hidroksi Anizol
BHT	:	Bütillenmiş Hidroksi Toluen
DAD	:	Diode Array Detector (Diyot Dizisi Detektörü)
DPPH	:	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
EN	:	Endangered (Tehlikede)
FAD	:	Fotodiyot Dizi Dedektörü
FTIR	:	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi
GPx	:	Glutatyon Peroksidaz
HPTLC	:	Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi
IUCN	:	Dünya Doğa ve Doğal Kaynakları Koruma Birliği
KAT	:	Katalaz

POD	:	Peroksidazlar
ROS	:	Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)
R_f	:	Retention factor (Tutulma Faktörü)
SOD	:	Süperoksit Dismutaz
RP-HPLC	:	Ters Faz (Reverse Phase) Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
UV	:	Ultraviyole

BAZI *LATHYRUS* TÜRLERİNİN FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN VE ANTİOKSİDAN POTANSİYELLERİNİN SPEKTROSKOPİK VE KROMATOGRAFİK YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ

ÖZET

Bu tezde, üç farklı *Lathyrus* türünün fenolik bileşikleri ve antioksidan düzeyleri spektroskopik ve kromatografik yöntemlerle incelenmiştir. Yaprak ve gövde ekstreleri etanol, metanol, aseton ve su kullanılarak hazırlanmıştır. *Lathyrus* türlerinin toplam fenol, flavonoid, klorofil ve karotenoid içeriği, DPPH süpürme, toplam indirgeme gücü ve toplam antioksidan aktiviteleri UV-VIS spektrofotometresi ile belirlenmiştir. Sonuçlar standart maddeler olarak gallik asit, α-tokoferol, askorbik asit, kuersetin, BHA ve BHT ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Ekstraktlardaki fenolik bileşiklerin tanımlanması RP-HPLC, HPTLC ve FTIR spektroskopisi kullanılarak yapıldı. En yüksek fenolik madde miktarı *L. laxiflorus* aseton yaprak ekstresinde 7,16 ± 0,27 mg GA / g KA olarak bulunurken, en yüksek flavonoit miktarı *L. laxiflorus* yapraklarının metanolik ekstraktında 5,09 ± 0,07 mg QE / g KA olarak kaydedildi. En düşük DPPH indirgeme aktivitesi 0,25 mg/ml konsantrasyonundaki aseton ekstrakttan elde edildi. Toplam klorofil ve karotenoit içerikleri en yüksek olan tür *L. undulatus*, en düşük olan tür ise *L. nissolia* olarak bulundu. Toplam indirgeyici güç aktivitesi en yüksek olarak ölçülen *L. laxiflorus* bitkisinin 1,0 mg/ml konsantrasyonundaki aseton ekstraktında elde edildi. Çeşitli fenolik maddelere ait fonksiyonel gruplardan kaynaklanan titreşimler FTIR spektroskopisi aracılığıyla analiz edildi. HPTLC plakalarında standart olarak kuersetin, katehin ve gallik asit kullanıldı. HPLC analizi sonrası en fazla fenolik madde miktarı *L. laxiflorus*'ta 36,6 ppm rutin fenolik bileşiği olarak tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan Aktivite, FTIR Spektroskopisi, HPLC, HPTLC, *Lathyrus*.

DETERMINATION OF PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT POTENTIALS OF SOME *LATHYRUS* SPECIES BY SPECTROSCOPIC AND CHROMATOGRAPHIC METHODS

ABSTRACT

In this thesis, phenolic compounds and antioxidant levels of three different *Lathyrus* species were examined through spectroscopic and chromatographic methods. Leaf and stem extracts were prepared using ethanol, methanol, acetone, and water. Total phenol, flavonoid, chlorophyll and carotenoid contents, DPPH scavenging, reducing power, and total antioxidant activities of *Lathyrus* species were determined by UV-VIS spectrophotometer. The results were evaluated by comparing against gallic acid, α-tocopherol, ascorbic acid, quercetin, BHA, and BHT as standard substances. The identification of the phenolic compounds in the extracts was done using RP-HPLC, HPTLC, and FTIR spectroscopy. The highest amount of phenolic substance was found in *L. laxiflorus* acetone leaf extract as 7.16 ± 0.27 mg GA / g KA, while the highest amount of flavonoids was recorded as 5.09 ± 0.07 mg QE / g KA in the methanolic extract of *L. laxiflorus* leaves. The lowest DPPH reduction activity was obtained from acetone extract at a concentration of 0.25 mg / ml. The species with the highest chlorophyll and carotenoid contents was *L. undulatus*, and the lowest was *L. nissolia*. Total reducing power activity was obtained in acetone extract at the concentration of 1.0 mg / ml of *L. laxiflorus* plant, which was measured as the highest. The vibrations resulting from the functional groups of various phenolic substances were analyzed by FTIR spectroscopy. HPTLC plates used quercetin, catechin, and gallic acid as standard. After HPLC analysis, the highest phenolic compound concentration was determined as 36.6 ppm of rutin in *L. laxiflorus.*

Keywords: Antioxidant Activity, FTIR Spectroscopy, HPLC, HPTLC, *Lathyrus*.

GİRİŞ

Bitkilerin çoğu antioksidan aktiviteye sahip bileşikleri içermektedirler. Polifenolik olan bu bileşikler bitkinin hemen her bölgesinde, kutikula da dâhil olmak üzere kök, gövde, yaprak, meyve, çiçek, polen ve tohumlarında bulunmaktadırlar. Fenolik maddelerin bu varlığı, antioksidan aktiviteleri dolayısıyla oksidatif stres ile mücadelenin de bir göstergesidir (Pratt, 1992). Canlılar genel olarak hücresel solunum sırasında oksidatif stresle karşılaşırlar. İnsanlarda ise bu durum daha ziyade birçok oksidatif toksinin vücuda çeşitli yollardan alınması nedeniyle görülebilir. Doğal kaynaklardan antioksidan bileşiklerin alımı, kanser, alzheimer, kardiyovasküler ve enflamatuar hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların oluşmasını önlemede yararlıdır (Goodman ve diğ., 2011). Bu özelliklerinden dolayı son zamanlarda gerçekleştirilen araştırmalar, etkili antioksidanların farklı doğal kaynaklarının bulunmasına odaklanmışlardır. Böyle bir nedenden dolayı bir bitki türünün sahip olduğu antioksidan potansiyel ve maddeler hakkında detaylı çalışmalara duyulan ihtiyaç günümüze kadar artarak devam etmiştir.

Bitkilerin ikincil bileşiklerinin en önemli gruplarından biri fenol içeren bileşiklerdir. Bunlar genellikle fenolik bileşikler olarak adlandırılır. Fenolik bileşikler bitkilerde oksidatif stres ile mücadele için gereklidir. Çoğu zaman bu fenolik bileşikler bitkinin kendisini aldığımız zaman bizim için de yararlı olmaktadırlar. Fenolik bileşiklerin ana kaynakları, özellikle çiğ yenildiğinde meyve ve sebzelerdir. Doğal kaynaklar olan diğer değerli antioksidan kaynakları, tarım endüstrisi tarafından üretilen yan ürünler ve gıda endüstrisidir. Doğal kaynaklardan elde edilen antioksidanların insan sağlığının iyileştirilmesinde çok etkili olduğu kanıtlanmış, yapay kaynaklardan elde edilenlerin ise etkili olmalarına rağmen yan etkileri nedeniyle değerlerinin daha düşük olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, yenilebilir yağlarda bulunan doğal antioksidanların ve bazı bitkilerin fenolik açıdan zengin özütlerinin en az sentetik olanlar kadar etkili olduğu gösterilmiştir (Govaerts, 2001; Schippmann ve diğ., 2002; Batugal ve diğ., 2004). Bu nedenle, günümüzde ana odak noktası yeni antioksidanları

sentezlemekte değil, antioksidanları doğal bitki kaynaklarından çıkarmanın ve karakterize etmenin yeni yollarını bulmaktır.

Son zamanlarda, insanın tüm gereksinimlerini yerine getirmek için "Doğa Ana" ya geri dönmesini ifade eden "Yeşil Dalga" teorisine doğru büyük bir uyanış gerçekleşmektedir. Bu durum daha az yan etkilere yol açan veya hiçbir yan etkiye yol açmayan doğal kaynaklı kimyasalların kullanımını desteklemektedir. Ayrıca bu adım, insan ırkını korurken biyolojik çeşitliliğin ve dolayısıyla ekosistemin de korunmasına yardımcı olur (Gijetenbeek, 1999). Bu nedenle, odağımızı halk hekimliğinde kullanılan bitkileri kimyasal olarak tanımlamaya ve daha sonra biyoaktif bileşiklerini izole etmeye yöneltmek gerekir. İzlenecek bir sonraki adım, hayvan çalışmalarında bu biyoaktif bileşiklerin test edilmesi ve eğer yararlı bulunursa bunların yan etkilerinin belirlenmesidir. Kuşkusuz, bitkiler âlemindeki birçok türün kimyasal olarak keşfedilmeyi ve insan sağlığı için kullanılmayı beklediğini söyleyebiliriz (Phillipson, 2003).

Özellikle birçok hastalığın belirtilerini hafifletmek için geleneksel olarak kullanılan şifalı bitkilerden birçoğu Türkiye florasında da bulunmaktadır. Bilinen örneklerin dışında diğer bitki türlerinin de faydalı biyokimyasallar açısından taranması ve potansiyellerinin ortaya konulması gereklidir. Bu tez çalışmasında ise Fabaceae (Baklagiller) familyasından *Lathyrus* cinsinden üç farklı bitki türünün antioksidan potansiyellerinin ve fenolik madde profillerinin spektroskopik ve kromatografik yöntemlerle ortaya konulması amaçlanmıştır.

1. GENEL BİLGİLER

Bu tez çalışmasının arkaplanının anlaşılması için kullanılan bitki materyallerinin özelliklerinin ve uygulanan biyokimyasal analizlerin, kullanılan analitik yöntem ve cihazların bazı özelliklerinin bildirilmesi gerekmektedir.

1.1. Tezde Kullanılan Bitki Materyalleri

Bu tezin konusunu oluşturan bitki materyalleri Fabaceae (Baklagiller) familyasına ait *Lathyrus* (Mürdümük) cinsinin *L. laxiflorus*, *L. undulatus* ve *L. nissolia*'dır.

1.1.1. *Lathyrus* cinsinin genel özellikleri

Lathyrus cinsi Fabaceae familyasının Vicieae oymağında bulunan ve 15 bölümde incelenen toplam 187 tür ve tür altı takson ile zengin bir baklagiller cinsidir (Başaran ve diğ, 2007). *Lathyrus* türleri Türkiye'nin çoğu bölgesinde doğal olarak yetişmekle birlikte çoğunlukla Doğu ve Güney Doğu Anadolu Bölgelerinde yayılış göstermektedir. Bunun yanında Marmara Bölgesi'nin doğusunda ve Orta Karadeniz Bölgesinde de *Lathyrus* biyoçeşitliliğinin yüksek olduğu yapılan bazı çalışmalarda bildirilmiştir (Kılınç ve Özen, 1988a; Kılınç ve Özen, 1988b; Özen ve Acemi, 2011). Dünya genelinde *Lathyrus* türleri hayvan yemi için yaş/kuru ot kaynağı ve taneli yem olarak kullanılmaktadırlar. Bunların yanında gübre olarak, fitoremediasyon amacıyla, yemeklik tane baklagil veya sebze olarak da kullanımları mevcuttur. Ayrıca *L. odoratus* gibi kimi mürdümük türleri ise ornamental amaçlı olarak yetiştirilmektedirler (Başaran ve diğ, 2007). Ülkemizde ise *Lathyrus* cinsine ait 84 adet tür ve türaltı takson bulunmaktadır. Bunlardan 23 tanesi endemiktir. Bu tez çalışmasına konu olan 3 mürdümük türünden ise *L. undulatus* bu endemiklerin içerisindedir.

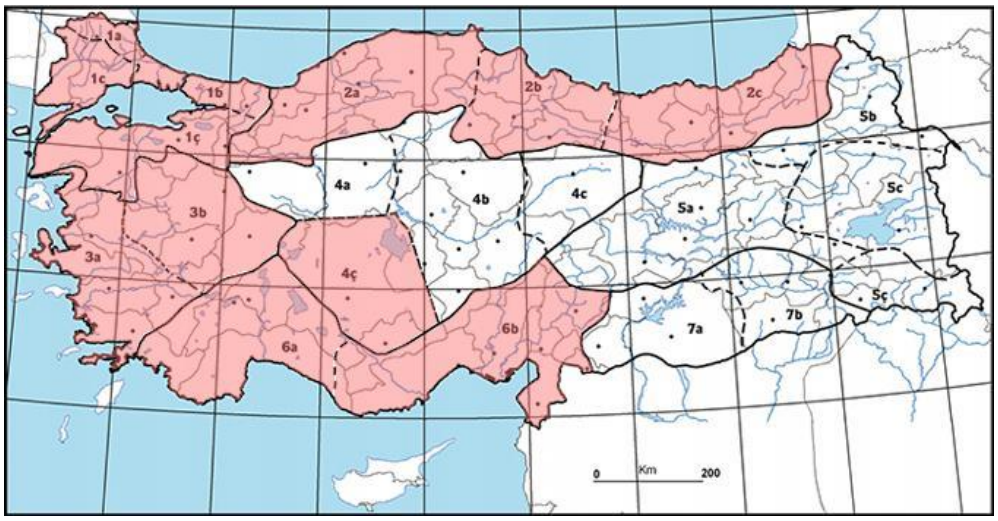
1.1.2. *Lathyrus laxiflorus*'un biyolojik özellikleri

Lathyrus laxiflorus (Desf.) Kuntze (Deliburçak) türü ormanlarda, çalılıklarda ve gölgeli bayırlarda 1900 m yüksekliğe kadar bulunabilen geniş yayılışlı, çok yıllık bir mürdümük türüdür (Şekil 1.1.).



Şekil 1.1. *Lathyrus laxiflorus*'un doğadaki görünümü

Doğu Akdeniz elementidir. Yayılış alanı Türkiye dışında Güneydoğu Avrupa'dan Kafkasya, İran ve Suriye'ye kadar uzanır. Bitkinin gövdeleri köşeli ve dallanmış olup genellikle 15−40 cm arası uzunluktadır. Yaprak uçları ise aristattır veya bazen basit bir tendrille sonlanır. Yaprakçıklar tek veya çift olup, ovat, lanseolat veya bazen akut veya akuminat olabilir. Pedunkül (2−)3−6-çiçekli olup yapraklardan daha uzundur. Petaller eflatun veya mor renkte bulunurlar. Meyveler bakla şeklinde ve geniş şeritsidir. Bitkinin çiçeklenme zamanı Nisan, Mayıs ve Haziran aylarıdır (Davis, 1970). Geniş yayılış gösteren *L. laxiflorus* türü ülkemizin bölgesel olarak Istranca, Çatalca-Kocaeli, Ergene, Güney Marmara, Batı Karadeniz, Orta Karadeniz, Doğu Karadeniz, Asıl Ege, İç Batı Anadolu, Konya, Antalya ve Adana Bölümlerinde (Şekil 1.2.) bulunmaktadır (URL-1).



Şekil 1.2. *Lathyrus laxiflorus*'un Türkiye'deki yayılış haritası (URL-1)

1.1.3. *Lathyrus undulatus*'un biyolojik özellikleri

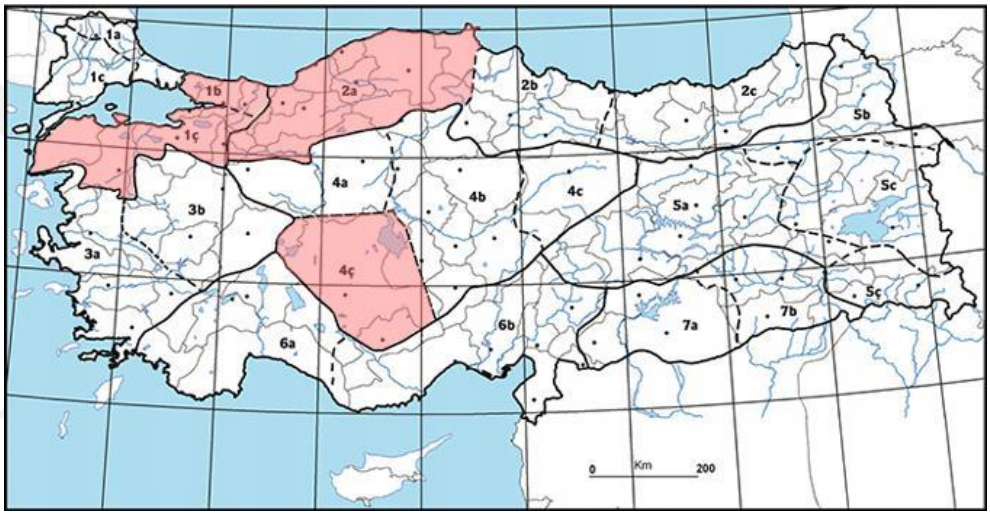
Lathyrus undulatus Boiss. (İstanbul nazendesi) türü yol kenarlarında, açık orman arazilerinde ve çalılıklarda 600 m yüksekliğe kadar bulunabilen dünya çapında dar yayılışlı, çok yıllık ve Türkiye endemiği olan bir mürdümük türüdür (Şekil 1.3.).



Şekil 1.3. *Lathyrus undulatus*'un doğadaki görünümü

Karadeniz / öksin sektörü elementidir. Bitkinin gövdeleri iki yanda belirgin şekilde kanatlı olup yükselici veya tendriller vasıtasıyla sarılıcıdır. Genellikle 50-100 cm

uzunlukta olabilirler. Dallanmış tendriller yaprakların ucunda bulunur. Yaprakçıkları lanseolat veya akuminat olabilir. Pedünkül rasem şekilinde 3-7 çiçekli ve hafifçe eğimli olup uzundur. Çiçekler pembe renklidirler ve genellikle 1-2 cm uzunluğunda bulunurlar. Meyveler bakla şeklinde ve uzun şeritsidir. Bitkinin çiçeklenme zamanı Nisan, Mayıs ve Haziran aylarıdır (Davis, 1970). Bu tür Dünya Doğa ve Doğal Kaynakları Koruma Birliği (IUCN) tarafından "Endangered (EN)" yani "Tehlikede" kategorisinde sınıflandırılmaktadır (Rowe ve diğ., 2019). Ülkemize endemik olan *L. undulatus* türü bölgesel olarak Çatalca-Kocaeli, Güney Marmara, Batı Karadeniz ve Konya Bölümlerinde (Şekil 1.4.) bulunmaktadır (URL-1).



Şekil 1.4. *Lathyrus undulatus*'un Türkiye'deki yayılış haritası (URL-1)

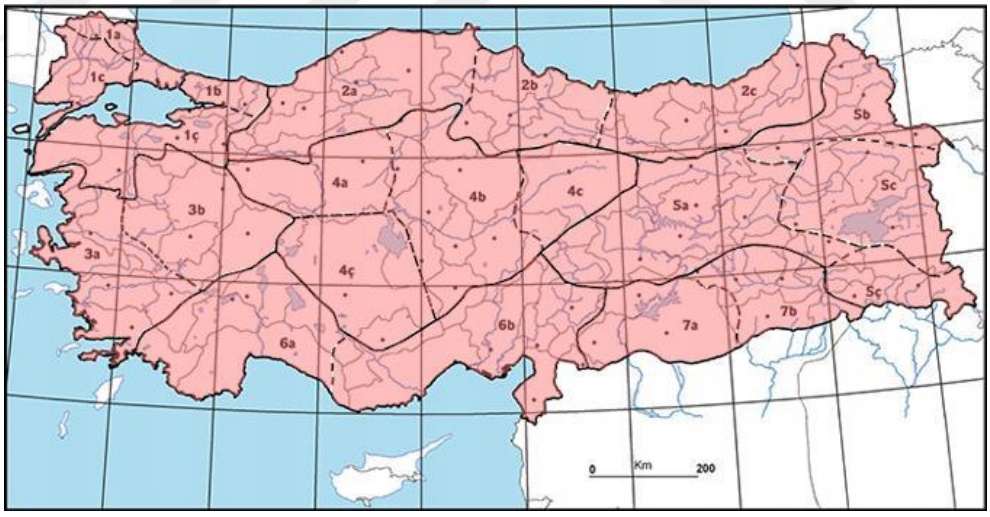
1.1.4. *Lathyrus nissolia*'nın biyolojik özellikleri

Lathyrus nissolia L. (Çimenburçak) türü ormanlarda, çalılıklarda ve gölgeli bayırlarda 1900 m yüksekliğe kadar bulunabilen geniş yayılışlı, çok yıllık bir mürdümük türüdür (Şekil 1.5.). Bitkinin gövdeleri eğimli fakat dik uzanışlıdır. Genellikle 80 cm uzunluğa kadar büyüyebilirler. Yaprakları oldukça dar olup "çimenburçak" ismini yapraklarına atfen almıştır. Çiçek sapları uzundur ve çiçekler tek veya ikili olarak bulunabilirler. Çiçekler açık pembe renklidirler. Meyveler uzun bakla şeklinde olup tüylü veya tüysüz olabilirler. Bitkinin çiçeklenme zamanı Nisan, Mayıs ve Haziran aylarıdır (Davis, 1970).



Şekil1.5. *Lathyrus nissolia*'nın doğadaki görünümü

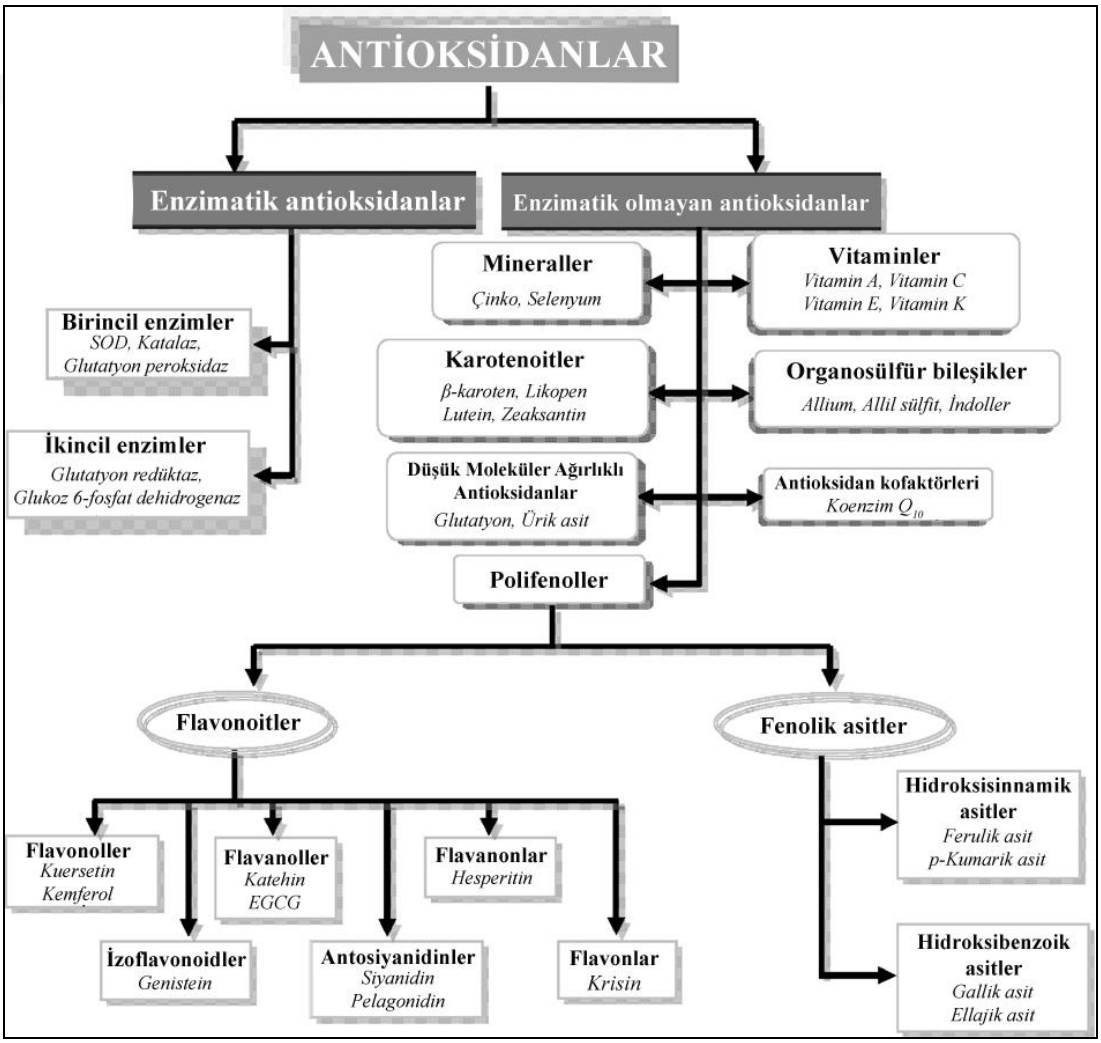
Oldukça geniş yayılış gösteren *L. nissolia* türü ülkemizin tüm bölgelerinde (Şekil 1.6.) bulunmaktadır (URL-1).



Şekil 1.6. *Lathyrus nissolia*'nın Türkiye'deki yayılış haritası (URL-1)

1.2. Antioksidan Maddelerin Sınıflandırılması

Antioksidanlar serbest radikallere karşı rol oynayan maddelerdir ve bunlardan kaynaklanan zararları önlerler. Antioksidanlar serbest radikalleri büyük ölçüde hedeflerle tepkimeye girmeden önce parçalayarak, zincir tepkimelerin önüne geçerek veya oksijenin aktivasyonuyla yüksek reaktif ürünler oluşmasının engelleyerek oksidanlardan kaynaklanan olumsuz etkileri azaltırlar (Azzi ve diğ., 2004). Antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayanlar olarak iki ana gruba ayrılabilir (Şekil 1.7.).



Şekil 1.7. Antioksidanların sınıflandırılması (Venkat Ratnam ve diğ., 2006)

Çeşitli enzimler, düşük molekül ağırlıklı moleküller ve enzim ko-faktörleri gibi bazı antioksidanlar endojen olarak üretilirler. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise çoğunlukla beslenme yoluyla alınırlar. Gıda yoluyla alınan antioksidanlar

polifenollerin en büyük grubu oluşturduğu çeşitli basamaklarda sınıflandırılabilirler. Polifenoller ise fenolik asitler ve flavonoitlerden oluşurlar. Gıda yoluyla alınan diğer antioksidanlar arasında vitaminler, karotenoitler, organosülfürlü bileşikler ve mineraller yer alırlar (Venkat Ratnam ve diğ., 2006).

1.2.1. Enzimatik antioksidanlar

Enzimatik antioksidanlar arasında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimler bulunmaktadır. Antioksidan enzimler, özellikle SOD ve KAT reaktif oksijen türleri (ROT) ile yüksek afiniteye ve reaksiyon oranına sahiptir. SOD ve KAT doğada bilinen en güçlü antioksidanlar arasındadırlar (Christofidou-Solomidou ve Muzykantov, 2006) İnsanlarda sitozolde bulunan Cu/Zn-SOD, mitokondriyal Mn-SOD ve hücre dışı SOD olmak üzere üç tip SOD olduğu bilinmektedir. Bitkilerde ise bunlara Fe-SOD izoformu eklenir. KAT vücutta bol miktarda oluşurken en yüksek aktivitesini sırasıyla karaciğerde, eritrositlerde ve akciğerlerde gösterir. SOD, süperoksitin oksijen ve hidrojen perokside (H_2O_2) dismutasyonunu katalizlerken, KAT serbest radikal oluşumunu engelleyerek H_2O_2 'nin H_2O ve O_2'ye ayrıştırılmasını kataliz eder ve hücrelerin oksidatif hasardan korunmasını sağlar. KAT ayrıca fenoller, formik asit, formaldehit ve alkoller gibi toksik bileşiklere peroksidatif reaksiyon ile etki eder. KAT tarafından ayrıştırılmayan H_2O_2 ise peroksidazlar (POD) tarafından benzer bir yolla zararsız hale getirilirler (McCord, 1986).

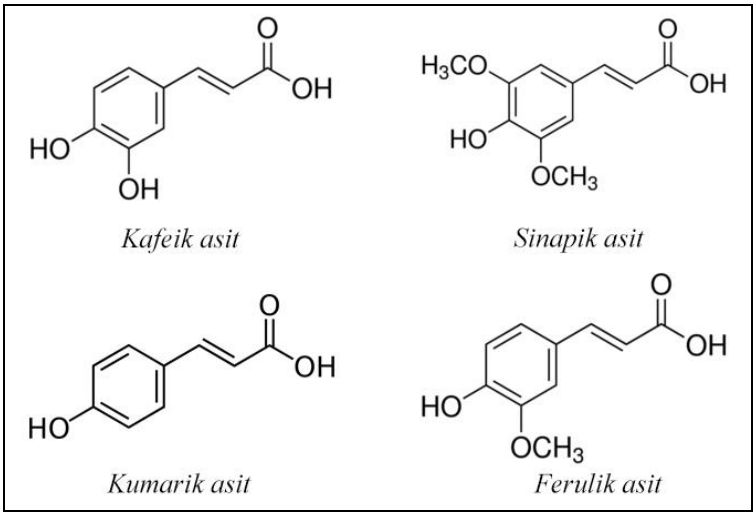
1.2.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar

İnsan antioksidan savunma sistemi gıdalar yoluyla alınan antioksidanlar olmadan bir yönüyle eksik kalmaktadır. Evrim sürecinde bir noktada, insanda suda çözünür ana antioksidan olarak ürik asit askorbik asitin yerini almıştır. İnsanlar mutlak gereksinimleri olan askorbik asidi sentezleme kabiliyetinden yoksundur (Nishikimi ve Yagi, 1991). Dolayısıyla askorbik asit ihtiyacı sadece gıdalar yoluyla karşılanabilmektedir. Askorbik asit haricinde dış kaynaklardan elde edilen diğer antioksidanlar E vitamini, Koenzim Q_{10}, karotenoitler ve polifenollerdir. Bunlarla birlikte karotenler ve diğer antioksidanlar kadar etkili olmasa da klorofilin antioksidan özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu bağlamda, birçok gendeki

mutasyonlar dolayısıyla insanlarda ortaya çıkan kanserlerin üçte ikisinden daha fazlası gıda tüketim alışkanlıklarının değiştirilmesiyle önlenebileceği tahmin edilmektedir (Benzie, 2003). Enzimatik olmayan antioksidanlardan bu tez çalışmasına konu olan polifenoller hakkında daha detaylı bilgiler aşağıda verilmektedir.

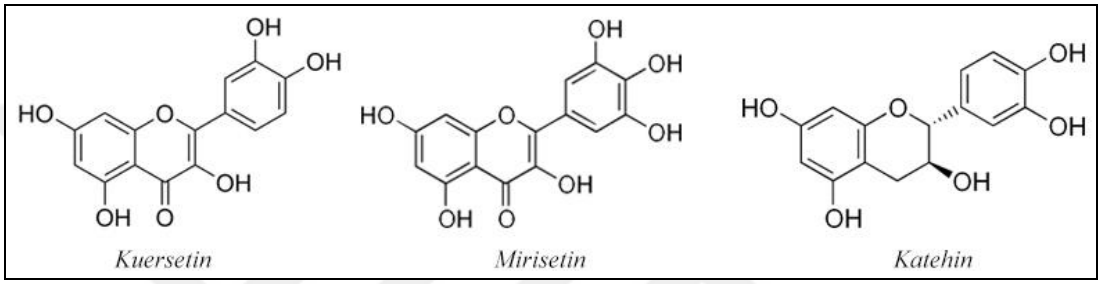
1.2.2.1. Polifenoller

Çeşitli bitki türlerinde 8.000'den fazla polifenolik bileşik tanımlanmıştır. Tüm bitki fenolik bileşikleri ortak bir ara ürün olan fenilalaninden veya onun öncülü olan şikimik asitten meydana gelirler. Polifenoller öncelikle hidroksil gruplarına bir veya iki şeker ünitesi bağlanmış şekilde ortaya çıkarlar. Ayrıca bunun yanında aromatik karbonlarıyla polisakkarit veya monosakkaritler arasında da direkt bağ bulunmaktadır. Fenollerin karboksilik ve organik asitler, aminler, lipitler ve diğer fenollerle yaptığı birlikteliklerde oldukça yaygındır (Kondratyuk ve Pezzuto, 2004). Fenolik asitler gıdalarda bol miktarda bulunur ve benzoik asit türevleri ve sinamik asit türevleri olarak iki sınıfa ayrılırlar. Yenilebilir bitkilerin hidroksibenzoik asit içeriği genellikle düşüktür. İstisna olarak bazı kırmızı meyveler, karaturp ve soğanlar kilogram başına 10-100 mg arası hidroksibenzoik asit içerebilirler (Shahidi ve Naczk, 1995). Hidroksisinamik asitler hidroksibenzoik asitlerden daha yaygındır ve *p*-kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit ve sinapik asit (Şekil 1.8.) gibi başlıca antioksidanları içerirler (Pandey ve Rizvi, 2009).



Şekil 1.8. Çeşitli fenolik asitlerin kimyasal yapıları

Flavonoitler üzerine en çok çalışılan polifenol grubunu oluşturur. Bu grup üç karbon atomu ile birbirine bağlanmış iki aromatik halkadan oluşan ortak bir temel yapıya sahiptir. Bitkilerde çiçeklerin, yaprakların ve meyvelerin çarpıcı renklerinden sorumlu olan 4.000'den fazla flavonoit tanımlanmıştır (de Groot ve Rauen, 1998). Heterosiklik halka yapılarına bağlı olarak flavonoitler; flavonoller, flavonlar, flavanonlar, flavanoller, antosiyaninler ve izoflavanoitler olarak altı sınıfta incelenebilirler. Kuersetin, mirisetin ve katehinler (Şekil 1.9.) bazı yaygın flavonoitlerdir.



Şekil 1.9. Çeşitli flavonoitlerin kimyasal yapıları

Fenolik asitler ve flavonoitler haricinde iki küçük grup polifenol daha bulunmaktadır. Bunlar stilbenler ve lignanlardır. Stilbenler iki karbonlu metilen köprüsü ile bağlanmış iki fenil parçası içerir. Stilbenlerin beslenmedeki yeri oldukça dardır. Birçok stilben bitkilerde mantar karşıtı fitoaleksin olarak ortaya çıkarlar. En çok bilinen ve çalışılmış olan stilben üzümlerde bol miktarda bulunan resveratroldür. Bu yüzden kırmızı şarap yüksek miktarda resveratrol içermektedir (Pandey ve Rizvi, 2009). Lignanlar, iki sinnamik asit biriminin dimerizasyonu ile ortaya çıkan 2,3-dibenzilbütan yapısını içeren difenolik bileşiklerdir. Sekoizolarisiresinol gibi bazı lignanlar fitoöstrojenler olarak kabul edilir. En zengin lignan kaynağı keten tohumu olarak abul edilir. Keten tohumu kg başına 3,4 g sekoizolarisiresinol ve eser miktarda matairesinol içerir (Adlercreutz ve Mazur, 1997).

Bitkilerdeki fenoliklerin hücre bileşenleri, hücresel ve dokusal düzeydeki dağılımı homojen değildir. Çözünmeyen fenolikler hücre duvarlarında, çözünür fenolikler ise hücredeki vakuollerde bulunurlar (Wink, 1997). Kuersetin gibi bazı polifenoller meyve, sebzeler, tahıllar, meyve suları, çay, şarap ve infüzyonlar gibi neredeyse tüm bitkisel ürünlerde ve gıdalarda bulunur. Flavanonlar ve izoflavonlar sadece belirli yiyeceklere özgüdür. Polifenoller genellikle meyvelerin kabuklarında olduğu gibi

bitkilerin dış katmanlarında bulunurlar (Simon ve diğ., 1992). Çok çeşitli faktörler bitkilerin polifenol içeriklerini etkileyebilirler. Bunlar bitkinin hasat zamanı, meyvelerin depo koşulları olabileceği gibi toprak özellikleri, sulama rejimi ve güneşlenme periyotları gibi edafik faktörler de polifenol kompozisyonu ve miktarı üzerine belirleyici olabilir (Manach ve diğ., 2004).

1.3. Bitkilerde Antioksidan Potansiyelin ve Fenolik Maddelerin Belirlenmesi

Mevcut tez çalışmasında yürütülen biyokimyasal ve kimyasal bağ enerjilerini ölçen analizlerin temeli ultraviyole (UV) ve infrared (IR) spektroskopi yöntemlerine, çeşitli fenolik maddelerin moleküler ağırlığa dayalı ayrımı ise yüksek performanslı ince tabaka ve sıvı kromatografi yöntemlerine dayanmaktadır. Bu analizler hakkındaki genel bilgiler aşağıdaki bölümlerde verilmektedir.

1.3.1. Toplam fenolik madde tayini

Fenoller ve polifenoller, fosfomolibdat ve fosfotungstat maddelerinden oluşan ve okside edici bir bileşik olan Folin-Ciocalteu ayıracını bazik ortamda indirgerler. Bu redoks reaksiyonu sırasında oksitlenmiş olurlar ve ayıracın rengi mavi tonlarına döner. Bu mavi rengin absorbansının kolorimetrik olarak spektrofotometre aracılığıyla ölçülmesiyle toplam fenolik madde yoğunluğu hakkında bilgi edinilir (Singleton ve diğ., 1999). Toplam fenolik madde miktarının birimi analizlerde gallik asit eşdeğeri olarak verilmektedir.

1.3.2. Toplam flavonoit içeriğinin belirlenmesi

Flavonoit içeriğinin belirlenmesinde alüminyumun flavonoitlerle kompleks oluşturması sonucu çözeltide ortaya çıkan renk değişiminin ölçülmesine dayanan spektrofotometrik bir yol izlenir. Bu kompleksin oluşmasında $AlCl_3$ kullanılmakta ve renk değişimleri takip edilmektedir. Kompleksin tamamlanması için bazik ortama ihtiyaç duyulur ve çözelti bu ortamda bakır kırmızısı rengini alır. Kolorimetrik yolla toplam flavonoit içeriği belirlenir. Toplam fenolik madde miktarının birimi analizlerde genellikle kuersetin, rutin veya katehin asit eşdeğeri olarak verilmektedir (Pękal ve Pyrzynska, 2014).

1.3.3. Toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi

Toplam antioksidan kapasite tayini fosfomolibden kompleksi oluşumu ile tespit edilebilir. Bu test analiz numunesinin heptamolibdatı (Mo (VI)) pentamolibdata (Mo (V)) indirgemesine dayanan kolorimetrik bir analizdir. Asidik ortamda yeşil renkli fosfat Mo (V) kompleksi oluşur. Ortamdaki toplam antioksidan kapasitesi askorbik asit, gallik asit, α-tokoferol veya BHA gibi çeşitli standartlara göre değerlendirilir (Guo ve diğ., 2018).

1.3.4. DPPH radikali temizleyici aktivitenin belirlenmesi

Serbest elektronunun molekül üzerinde yer değiştirmesine bağlı olarak dimerleşme görülmediği için 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) molekülü oldukça kararlı bir serbest radikal olarak değerlendirilmektedir. Bir DPPH çözeltisi karıştırıldığı zaman DPPH molekülü H atomunu ve menekşe moru olan rengini kaybeder. Bu sayede numunenin DPPH radikali temizleyici potansiyeli kolorimetrik olarak ortaya konur (Haida ve Hakiman, 2019).

1.3.5. Toplam indirgeyici güç aktivitesinin belirlenmesi

Bu yöntem artan antioksidan aktiviteyle birlikte mavi renk oluşumuna bağlı olarak kolorimetrik absorbansın artmasına dayanmaktadır. Numunelerin indirgeyici güçleri Fe^{3+} nin Fe^{2+} e indirgenmesine bağlı olarak ölçülür. İndirgeyici güce sahip bileşikler elektron vericileri olduklarından dolayı lipit peroksidasyonunda ara basamaklardaki oksidasyon işlemlerini azaltma kabiliyetine sahiptirler. Askorbik asit başta olmak üzere gallik asit ve tannik asit gibi çeşitli antioksidanlar pozitif kontrol olarak bu deneylerde kullanılabilirler. (Anandjiwala ve diğ., 2008).

1.3.6. Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi titreşimsel spektroskopi tekniklerinden bir tanesidir. Genel olarak incelenen numune içindeki moleküler bağlardan kaynaklanan titreşimlerin enerji seviyelerinin ölçülmesinde kullanılır. Her kimyasal bağ kendine özgü bir titreşim enerjisine sahiptir. Dolayısıyla bir FTIR spektrumundaki titreşimleri sembolize eden pikler moleküllere özgü olabilir. Bu sayede incelenen numunenin kimyasal yapısı hakkında bilgi sahibi olunabilir (Ellis

ve Goodacre, 2006). FTIR spektroskopisinin arkeolojiden tıbba, fizikten biyolojiye kadar çeşitli bilim dallarında çok geniş uygulama alanı bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada rat enterositlerindeki antioksidanları belirlemek için FTIR spektroskopisinden faydalanılmıştır (Barraza-Garza ve diğ., 2016). FTIR spektroskopisi benzer şekilde; deniz çayırlarında bulunan polifenollerin parmakizi profilerinin belirlenmesinde (Kannan ve diğ., 2011), bazı *Lupinus* (acıbakla) türlerinde toplam fenolik madde içeriğinin belirlenmesinde (Danciu ve diğ., 2017), polifenolik bileşiklerin kanser hücreleri üzerindeki etkilerinin moleküler düzeyde incelenmesinde (Derenne ve diğ., 2013) ve hatta arkeolojide taşlar üzerindeki bitki fosillerinin karakterizasyonunda kullanımıştır (Moner ve diğ., 2013).

1.3.7. Yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC)

Kromatografi fitokimyanın temeltaşı olmakla birlikte terapötiklerin geliştirilmesi için saf bileşiklerin elde edilmesinde kullanılır. Biyoaktif bileşiklerin ayrıştırılması, tanımlanması ve yapılarının aydınlatılması çeşitli kromatografik yöntemlerin geliştirilmesiyle mümkün olmuştur. Genel olarak bu bileşiklerin analizi ve miktar tayini için yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi **(**HPTLC) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi **(**HPLC) olmak üzere iki yaklaşım kullanılmaktadır (Patel ve Mishra, 2012). Bitki türlerinin HPTLC parmak izleri yalnızca bu türlerin tanımlanmasına yardımcı olmakla kalmaz, aynı zamanda içeriklerindeki biyoaktif bileşiklerin izolasyonu ve saflaştırılması için de temel bir metottur. Bu sayede çeşitli bitkilerin tıbbi olarak yararlı olup olamayacakları bitkilerin içerdikleri biyoaktif bileşiklerin tanımlanması yoluyla mümkün olmaktadır (Yadav ve diğ., 2011). Temel olarak HPLTC, homojen dağılıma sahip silika jel ile kaplanmış cam plakalar üzerinde numune içeriklerinin moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılmasına ve bunların çeşitli ayıraçlar kullanılarak görünür hale getirilmesine dayanmaktadır. Bir HPLTC kromatogramı bitkinin kimyasal içeriğini görsel olarak belgelerken R_f (tutulma faktörü) değerlerinin karşılaştırılmasıyla bu maddelerin kompozisyonu ve miktarı hakkında da detaylı bilgiler içermektedir (Naranyan ve Antonysamy, 2016).

1.3.8. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

Polifenollerin kalitatif ve kantitatif analizi için en çok tercih edilen yöntem HPLC'dir. 1970'lerde kullanılmaya başlanmasından bu yana, bu teknik tüm fenolik gruplar için kullanılmış ve yüzlerce gıda analizi konulu makalede yayınlanmıştır (Motilva ve diğ., 2013). HPLC, bu bileşiklerin eser miktarlarında bile yüksek çözünürlüklü, hızlı ve tekrarlanabilir bir tespit yöntemi sağlamaktadır. Birçok bitkideki fenolik bileşiklerin ve flavonoitlerin belirlenmesinde en sık kullanılan yöntem ise ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC)'dir. Ters faz kromatografinin normal fazdan farkı mobil fazın polar olması, sabit fazın ise apolar olmasıdır. Ters fazda kolondan ilk olarak yüksek polariteye sahip analit çıkar. Bunun nedeni ise polar analitlerin yine polar olan mobil fazda iyi çözünmeleridir (Yılmazer, 2002). HPLC cihazları kullanım amacına göre çeşitli detektörlerle birlikte kullanılırlar. Bunlardan fenolik maddelerin tayininde yaygın olarak yararlanılan dedektör tipi diyot dizisi dedektörü (DAD) veya diğer ismiyle fotodiyot dizi dedektörü (FAD)'dür. DAD dedektörü tek bir dalga boyunda veya çoklu dalgaboylarında tespit sağlayabilir. Bu dedektör aynı zamanda pik saflıklarının analizinde de kullanılır. Dizi, her biri farklı bir dalgaboyunu ölçen 1000'den fazla diyottan oluşur. Tüm dalgaboyu aralığı boyunca ışık yoğunluğundaki değişimin ölçülmesi bir absorpsiyon spektrumu verir. Bu tür dedektörler örnekteki bileşenlerin doğrudan spektrumlarını verdiğinden ideal sistemlerdir (Zhao ve diğ., 2017).

2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1. Bitki Materyallerinin Eldesi ve Saklanması

Bu tez çalışmasında bitki materyali olarak *Lathyrus laxiflorus* (Desf.) Kuntze, *Lathyrus undulatus* Boiss. ve *Lathyrus nissolia* L.'nın gövde ve yaprak kısımları kullanıldı. Bu bitki materyalleri 2017-2018 yılında gerçekleştirilen arazi çalışmaları ile Kocaeli İli'nin İzmit İlçesinde yer alan Kent Ormanı ve Çınarlıdere arazilerinden toplandı. Toplanan türlerin teşhisleri "Flora of Turkey and the East Eagean Island" adlı eser temel alınarak gerçekleştirildi (Davis, 1965). Bitkilerin gövde ve yaprak kısımları ayrıldıktan sonra bu kısımlar küçük parçalara ayrılarak 1 gün boyunca liyofilizatörde kurutuldu. Kurutulan örnekler çalışmalarda kullanılmak üzere havanda toz haline getirildi. Öğütülen gövde ve yapraklar etiketlenerek analize alınana kadar -18 °C'de saklandı. Yeterli biyokütleyi elde etmek için *L. nissolia* bitkilerinin topraküstü kısımları bütün olarak kullanıldı.

2.2. Bitki Ekstraktlarının Eldesi

Kurutulan gövde ve yaprak ekstraktları metanol (MeOH), etanol (EtOH), aseton (Ace) ve distile su (dH_2O) ile ekstrakte edildi. Bunun için havanda öğütülerek toz hale getirilen bitki örneklerinden 1 g tartılarak 100 ml'lik cam erlenler içerisine koyuldu. Üzerine % 70'lik (v:v) MeOH, EtOH, Ace ve dH_2O ilave edilerek 50 °C'de 40 dakika ultrasonik banyoda (IsoLab, 300 W, 50 kHz), ağızları kapalı olarak sonikasyon işlemine tabi tutuldu. Oda sıcaklığına soğutulan karışımın sıvı kısmı mikropipet ile 15 ml hacmindeki falkon tüplerine alındı ve 6000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz yeni falkon tüplerine aktarıldı ve etrafı alüminyum folyo ile sarılarak -18 °C'de saklandı. Çalışma esnasında örneklerden 1 mg/ml stok çözelti hazırlanarak gerekli seyreltme işlemlerinde kullanıldı.

2.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu tez çalışmasındaki deneylerde kullanılan kimyasal maddeler ve analitik standartlar ile bu maddelerin temin edildikleri markalar Tablo 2.1.'de verildi.

Tablo 2.1. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler ve markaları

Madde Adı	**Marka**
Gallik asit=3,4,5-trihidroksibenzoik asit, %98 ($C_7H_6O_5$)	Alfa Aesar
Folin-ciolteu reaktifi	AppliChem
Sodyum karbonat (Na_2CO_3)	Merck
Kuersetin ($C_{15}H_{10}O_7.xH_2O$)	TCI
Sodyum nitrit ($NaNO_2$)	Labochem International
Alüminyum klorit hekzahidrat ($AlCl_3.6H_2O$)	AppliChem
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck
Bütil hidroksi anisol ($C_{11}H_{16}O_2$)	Alfa Aesar
Bütil hidroksi toluen ($C_{15}H_{24}O$)	Alfa Aesar
α−tokoferol	TCI
1,1 Difenil-2-pikril hidrazil (DPPH)	Alfa Aesar
Askorbik asit	Labochem International
Potasyum fosfat monobazik anhidrus (KH_2PO_4)	Merck
Sodyum fosfat dibazik heptahidrat ($Na2HPO_4.7H2O$)	Merck
Potasyum ferrosiyanür ($K_3Fe(CN)_6$)	Merck
Trikloroasetik asit (TCA)	Merck
Demir klorür ($FeCl_2$)	Merck
Sülfirik asit (H_2SO_4)	Merck
Amonyum molibdat	Merck
Etanol	Merck
Metanol	Merck
Aseton	Merck
Toluen	Merck
Formik asit	Tekkim
Etil asetat	Merck
Gallik asit	Sigma Aldrich
Kafeik asit	Sigma Aldrich
Epikatehin	Sigma Aldrich
Rutin	Sigma Aldrich
Kuersetin	Sigma Aldrich
Hesperidin	Sigma Aldrich
Luteolin	Sigma Aldrich
Apigenin	Sigma Aldrich

2.4. Kullanılan Cihazlar

Bu tez çalışmasındaki deneylerde kullanılan laboratuvar cihazları ve çeşitli bileşenleri ile bu cihazların markaları Tablo 2.2.'de verilmektedir.

Tablo 2.2. Deneylerde kullanılan malzeme ve cihazlar ve markaları

Araç-Gereç Adı	**Marka**
Ultrasonik banyo	ISOLAB
Hassas terazi	AND GR-200
Otomatik pipetler (10 µl -10 ml)	CAPP Ecopipette
Vorteks	BIOSAN multi-vortex V-32
Manyetik karıştırıcı	Heidolph – MR HEI
pH-metre	WTW InoLab pH 720
UV-VIS spektrofotometre	Agilent Technologies Cary 60
UV-VIS spektrofotometre küveti	Biosigma
Saf su cihazı	MP MiniPure Dest
Liyofilizatör	Christ Alpha 1-2 LD
Santrifüj	HERMLE Labortechnik GmbH Z 206 A
Santrifüj	CAPP CR1512
Derin dondurucu	Arçelik 570464 MB
HPLC	Shimadzu
Dedektör	DAD dedektör SPD M 10A
Kolon	Agilent Eclipse XDB-C18
İnkübatör	Memmert UN55
Hamilton şiringası (10µl)	Hamilton
FTIR spektrofotometre	Shimadzu IRAffinity-1S
UV transillüminatör	Vilber Lourmat
HPTLC plakaları	Macherey-Nagel Nano-Silika jel $60F_{204}$
Filtre 0,45 µm	Millipore

2.5. Spektroskopi Temelli Çalışmalar

2.5.1. Toplam fenolik içeriğinin belirlenmesi

Bitkilerin gövde ve yaprak kısımlarındaki toplam fenolik madde içeriği Folin-Ciocalteu metodu ile belirlendi (Singleton ve diğ., 1999). Folin-Ciocalteu reaktifi her çalışma öncesi dH_2O ile 1:1 (v/v) oranında seyreltilerek hazırlandı. EtOH, MeOH, Ace ve dH_2O ile hazırlanmış her bir örnekten 100 µl alınarak üzerine 500 µl Folin-

Ciocalteu reaktifi eklenip 1 dakika çalkalandı. Süre sonunda çözeltiye 6 ml dH_2O ilave edilip çalkalandı. Üzerine 2 ml % 15 (w/v) sodyum karbonat (Na_2CO_3) eklendi ve 30 saniye çalkalandı. Son hacim dH_2O ile 10 ml'ye tamamlandı ve oluşan mavi rengin sabitlenmesi için 30 dakika oda sıcaklığında beklenildi. Elde edilen çözeltinin 750 nm'de referans çözeltiye karşı absorbans değerleri kaydedildi. Standart olarak 0,25, 0,50, 0,75 ve 1 mg/ml konsantrasyonlarında gallik asit kullanıldı. Spektrofotometrede sıfırlama işlemi sırasıyla 100 µl dH_2O + 500 µl Folin-Ciocalteu reaktifi + 6 ml dH_2O + 2 ml Na_2CO_3 + 1400 µl dH_2O içeriğinden hazırlanan çözelti kullanılarak yapıldı. En fazla toplam fenolik madde içeriği tespit edilen bitki kısımları kullanılarak sonraki deneylere devam edildi.

2.5.2. Toplam flavanoit içeriğinin belirlenmesi

Bitki örneklerindeki toplam flavanoit içeriği alüminyum klorit ($AlCl_3$) kolorimetrik metodu ile belirlendi (Guo ve diğ., 2018). EtOH, MeOH, Ace ve dH_2O ekstraktlarından hazırlanan 1 mg/ml konsantrasyondaki her bir örnekten 500 µl alınarak üzerine 75 µl % 5 (w/v) sodyum nitrit ($NaNO_2$) solüsyonu eklenip 6 dakika beklenildi. Süre sonunda karışıma 150 µl % 10 (w/v) alüminyum klorit hekzahidrat ($AlCl_3.6H_2O$) ilave edilip karıştırıldı ve 5 dakika beklenildi. Üzerine 0,5 ml 1 M sodyum hidroksit (NaOH) eklendi ve çalkalandı. Son olarak üzerine 2,5 ml distile su eklendi ve 405 nm'de referans çözeltiye karşı absorbans değerleri kaydedildi. Standart olarak kuersetinin 20, 40, 60, 80 ve 100 mg/l konsantrasyonları kullanıldı. Spektrofotometrede sıfırlama işlemi sırasıyla 500 µl dH_2O + 75 µl $NaNO_2$ + 150 µl $AlCl_3.6H_2O$ + 0,5 ml NaOH + 2500 µl dH_2O içeriğinden hazırlanan çözelti kullanılarak yapıldı.

2.5.3. Toplam antioksidan aktivitenin belirlenmesi

Bitki örneklerindeki toplam antioksidan aktivite amonyum molibdat ($(NH_4)_2MoO_4$) metodu ile belirlendi (Guo ve diğ., 2018). EtOH, MeOH, Ace ve dH_2O ekstraktlarından hazırlanan 0,25, 0,50, 0,75 ve 1 mg/ml konsantrasyondaki her bir örnekten 200 µl alınarak üzerine 600 µl reaktif (0,6 M sülfirik asit (H_2SO_4) + 28 mM Na_2CO_3 + 4 mM $(NH_4)_2MoO_4$) eklenip 95 °C'de 90 dakika inkübe edildi. Çözelti oda sıcaklığına soğutuldu ve 695 nm'de referans çözeltiye karşı absorbans değerleri

kaydedildi. Standart olarak gallik asit, α-tokoferol, ve Bütil Hidroksi Anisol (BHA)'un 0,25, 0,50, 0,75 ve 1 mg/ml konsantrasyonları kullanıldı. Spektrofotometrede sıfırlama işlemi 200 µl dH_2O + 600 µl reaktif ile yapıldı. Örneklerin absorbans değerleri kontrol değerine karşı değerlendirildi. Toplam antioksidan aktivite (%) denklem (2.1)'e göre hesaplandı.

Toplam antioksidan aktivite (%): $(A_{kontrol}-A_{örnek})/A_{kontrol}\times100$ (2.1)

$A_{kontrol}$: Örnek içermeyençözeltisi absorbansı

$A_{örnek}$: 90 dakikalık inkübasyon sonrası örnek absorbansı

2.5.4. DPPH radikali giderici aktivitenin belirlenmesi

Bitki örneklerinde DPPH radikal giderme aktivitesi Blois ve diğ. (1958)'e göre belirlendi. DPPH çözeltisi her çalışma öncesi son konsantrasyonu 0,05 mg/ml olacak şekilde MeOH içerisinde hazırlandı. Hazırlanan DPPH çözeltisinin absorbans okuması yapıldı. EtOH, MeOH, Ace ve dH_2O ekstraktlarından hazırlanan 0,25, 0,50, 0,75 ve 1 mg/ml konsantrasyondaki her bir örnekten 500 µl alınarak üzerine 7000 µl DPPH çözeltisi eklendi ve çalkalandı. Onbeş dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta beklenildi. Absorbans değerleri 517 nm'de referans çözeltiye karşı kaydedildi. Standart olarak gallik asit, α-tokoferol, BHA ve Butil Hidroksi Toluen (BHT)' in 0,25, 0,50, 0,75 ve 1 mg/ml konsantrasyonları kullanıldı. Spektrofotometrede sıfırlama işlemi MeOH ile yapıldı. Elde edilen absorbans değerlerinden % inhibisyon değerleri hesaplandı. Örneklerin absorbans değerleri kontrol değerine karşı değerlendirildi. DPPH radikal giderme aktivitesi (% inhibisyon) denklem (2.2)'e göre hesaplandı.

DPPH radikal giderme aktivitesi: $(A_{kontrol}-A_{örnek})/A_{kontrol}\times100$ (2.2)

$A_{kontrol}$: DPPH çözeltisi absorbansı

$A_{örnek}$: 15 dakikalık inkübasyon sonrası örnek absorbansı

2.5.5. Toplam indirgeyici güç aktivitesinin belirlenmesi

Bitki örneklerinde toplam indirgeyici güç aktivitesi Guo ve diğ. (2018)'e göre belirlendi. EtOH, MeOH, Ace ve dH_2O ekstraktlarından hazırlanan 0,25, 0,50, 0,75 ve 1 mg/ml konsantrasyondaki her bir örnekten 200 µl alınarak üzerine 500 µl 0,2 M

fosfat tamponu (pH: 6,6), 500 µl % 1 potasyum ferrosiyanür ($K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$) eklendi ve karıştırıldı. 50 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Karışım oda sıcaklığına soğutuldu ve üzerine 500 µl % 10 (w/v) trikloroasetik asit ($C_2HCl_3O_2$) eklendi. Bu çözeltiden 500 µl alınıp üzerine 500 µl dH_2O ve 100 µl % 0,1 (w/v) demir klorür ($FeCl_3$) eklendi. Absorbans değerleri 700 nm'de referans çözeltiye karşı kaydedildi. Standart olarak askorbik asit'in 0,25, 0,50, 0,75 ve 1 mg/ml konsantrasyonları kullanıldı. Spektrofotometrede sıfırlama işlemi 1000 µl distile su + 100 µl $FeCl_3$ çözeltisi ile yapıldı.

2.5.6. Klorofil ve karotenoit içeriğinin belirlenmesi

Bitki örneklerinde klorofil a, klorofil b ve toplam kareotenoit içerikleri Lichtenthaler (1987)'e göre belirlendi. Çözücü olarak saf aseton kullanıldı. Her bir ekstraktın konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde ayarlandı. Numunelerin 470, 661,6 ve 644,8 nm'de spektrofotometrede okunmasıyla elde edilen absorbans değerleri kaydedildi. Klorofil – a hesabı denklem (2.3), klorofil – b hesabı denklem (2.4) ve toplam karotenoit hesabı denklem (2.5)'e göre hesaplandı.

$$\text{Klorofil a} = 11{,}24 \times A_{661{,}6} - 2{,}04 \times A_{644{,}8} \quad (2.3)$$

$$\text{Klorofil b} = 20{,}13 \times A_{644{,}8} - 4{,}19 \times A_{661{,}6} \quad (2.4)$$

$$\text{Toplam karotenoit} = 1000 \times A_{470} - 1{,}90 \times \text{Klorofil a} - 63{,}14 \times \text{Klorofil b} / 214 \quad (2.5)$$

2.5.7. FTIR analizinin yapılması

Bitki örneklerinden alınan doku örneklerinden ATR (attenuated total reflectance) ataçmanı vasıtasıyla FTIR analizleri yapıldı. Elde edilen spektrumlar Savitsky-Golay filtresi ile arka plan gürültüsünden arındırıldı. Frekanslar ve bant alanları ikincil türevi alınmış ve dosya uzantısı değiştirilmiş spektrum dosyalarından Spectrum One yazılımı kullanılarak tespit edildi (Türker ve diğ., 2007). Bant pozisyonları piklerin kapsadığı alanların ağırlık merkezlerine (sinyal yüksekliği × 0,8) karşılık gelen noktalardaki frekanslar kullanarak ölçüldü. Her bir bant pozisyonunun absorbans değerleri kaydedildi. Bantların karşılık geldiği titreşimsel hareketler ve yansıttıkları moleküler gruplar literatüre dayalı olarak bulundu.

2.6. Kromatografi Temelli Çalışmalar

2.6.1. HPTLC analizi

Bitki örneklerindeki fenolik madde, flavonoit ve tanenlerin parmakizi profilleri HPTLC analizi yardımıyla Wagner ve Bladt (1996) tarafından yayınlanan metoda göre tespit edildi. Ekstrakt ve standard maddelerin plakalar üzerinde yürütülmesi için 67 mg/ml konsantrasyonundaki EtOH çözeltisinden ve 0,5 mg/ml konsantrasyondaki kuersetin, katehin ve gallik asit standart çözeltilerinden hamilton şırıngası ile 2 µl hacimde çekilerek TLC plakalarına 5 mm bant uzunluğunda yayıldı. Bantlar fenolikler için tolüen : aseton : formik asit (4,5 : 4.5 : 1), flavonoitler için tolüen : aseton : formik asit (4,5: 4.5: 1) ve taninler için tolüen : etil asetat : formik asit : metanol (3 : 3 : 0,8 : 0,2) mobil fazlarında yürütüldü. Geliştirilen plakalar 100 °C etüvde 10 dakika bekletilerek çözücüleri uçuruldu. Plakalar hem görülebilir ışık altında hem de UV_{253} nm'de fotoğraflandı. Ardından plakalar fenolikler için Folin-Ciocalteu, flavonoitler için %1 $AlCl_3$ ve taninler için %2'lik $FeCl_3$ reaktifi ile spreylendi ve tekrar 100 °C etüvde 15 dakika kurutuldu. Daha sonra plakalar görülebilir ışık altında fotoğraflandı. Plakalarda ölçümler yapılarak analitlerin R_f değerleri hesaplandı.

2.6.2. HPLC analizi

HPLC analizi Caponio ve diğ. (1999) tarafından geliştirilen metot kullanılarak yapıldı. Analizler Süleyman Demirel Üniversitesi, Yenilikçi Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi. Fenolik bileşiklerin tespiti DAD dedektörde (λ_{max} = 278 nm) gerçekleştirildi. Kolon olarak ters faz Agilent Eclipse XDB C-18 (250 × 4,6 mm) 5 µm kullanıldı. Ayırım bir gradient program dâhilinde ikili çözücü sistemiyle uygulandı. A çözeltisi %3 asetik asit (pH 2,2), B çözeltisi metanol olarak kullanıldı. Çözeltiler içerisindeki hava kabarcıkları ultrasonik banyo yardımıyla uzaklaştırıldı. Gradient program sonunda kolon içerisinden 10 dk süreyle mobil faz geçirilerek kolon dengelendi. Her bir fenolik standardı metanol içerisinde hazırlandı. Standart fenolik bileşik çözeltileri çeşitli konsantrasyonlarda seyreltilerek alıkonma zamanları belirlendi. Alıkonma zamanları tespit edildikten sonra 9 adet fenolik bileşiği içeren bir karışım hazırlandı. Bütün standartlar -18°C'de

kullanılıncaya kadar saklandı. Kalibrasyon grafiği fenolik madde derişimine karşı pik alanı olarak çizildi. Hazırlanan metanolik ekstraktlar 0,45 µm'lik filtreden geçirildikten sonra 20 µl hacimde HPLC cihazına enjekte edildi. Akış hızı 0,8 ml/dk, kolon sıcaklığı ise 30 °C olarak analiz gerçekleştirildi. Uygulanan gradient programı Tablo 2.3.'de verilmektedir. Kullanılan fenolik madde standartları; gallik asit, klorojenik asit, kafeik asit, epikatehin, rutin, hesperidin, kuersetin, luteolin ve apigenin'dir.

Tablo 2.3. Analizde uygulanan gradient programı

Süre (dakika)	A %	B %
0	93	7
20	72	28
28	75	25
35	70	30
50	70	30
60	67	33
62	58	42
70	50	50
73	30	70
75	20	80
80	0	100
81	93	7

2.7. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

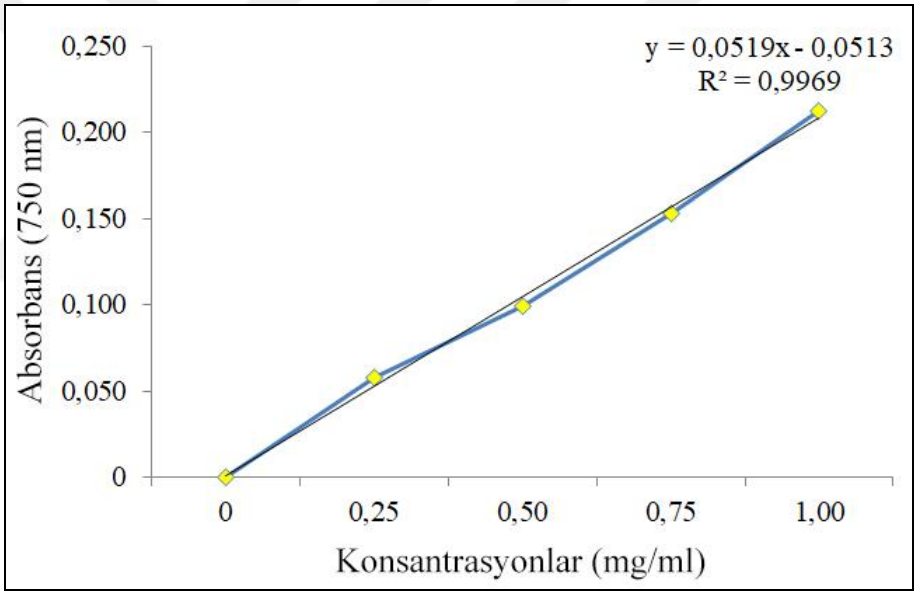
Spektroskopi temelli tüm deneyler 3 tekrarlı olarak yapıldı. Deneylerden elde edilen verilere ANOVA uygulandıktan sonra istatistiki olarak farklı gruplar arasındaki farkın derecesi Duncan çoklu karşılaştırma testine göre önem derecesi $p<0,05$ dikkate alınarak değerlendirildi. Veriler "ortalama ± standart sapma" şeklinde verildi. İstatistiki testler IBM SPSS Statistics 22 programı kullanılarak gerçekleştirildi.

3. BULGULAR

3.1. Spektroskopi Temelli Deneylere Ait Bulgular

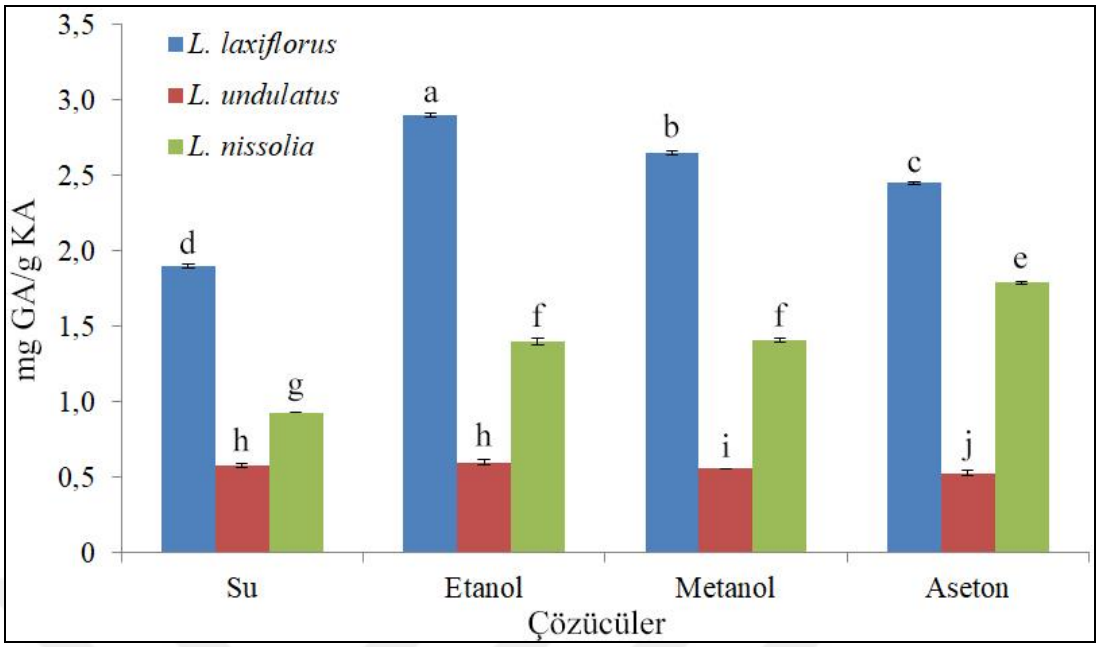
3.1.1. Toplam fenolik içeriklerine ait bulgular

Bitkilerin gövde ve yaprak örneklerindeki toplam fenolik içeriği belirlemek için standart olarak kullanılan gallik asitin 0,25, 0,50, 0,75 ve 1 mg/ml konsantrasyonlarının 750 nm'deki absorbanslarının okunması ile bulunan değerlere göre Şekil 3.1'deki standart grafik elde edildi.

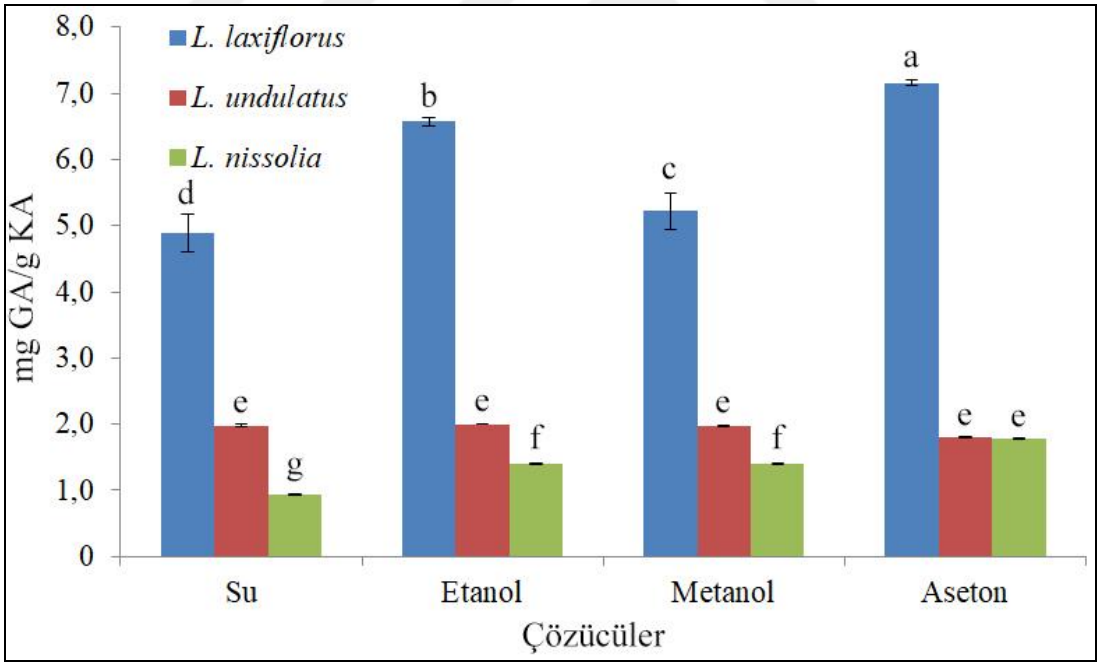


Şekil 3.1. Gallik asit standart grafiği

Gallik asit için hazırlanan standart grafikten de görüleceği üzere okunan absorbans değerleri konsantrasyonlara göre sırasıyla 0,058, 0,099, 0,153 ve 0,212 olarak ölçüldü. Bunun sonucunda doğrusallık değeri R^2= 0,9969 bulundu. Bitkilerin gövde (Şekil 3.2.) ve yaprak (Şekil 3.3.) ekstraktları için yapılan deneylerde elde edilen absorbans değerleri bu grafiğin denkleminde yerine konularak derişimi bulundu ve gallik asit eşdeğeri "mg gallik asit / g kuru ağırlık bitki örneği (mg GA / g KA)" olarak toplam fenolik madde içerikleri bulundu.



Şekil 3.2. Bitkilerin gövdelerinde gallik asit cinsinden toplam fenolik madde miktarı (Aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur)



Şekil 3.3. Bitkilerin yapraklarında gallik asit cinsinden toplam fenolik madde miktarı (Aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur)

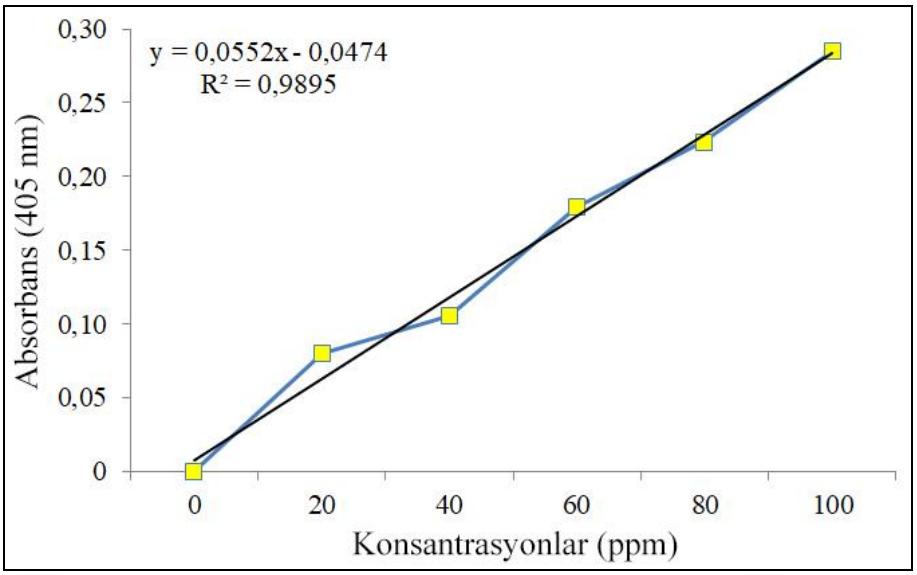
Gövde ekstraktlarından elde edilen verilere göre incelenen bitkiler arasında gövdesinde en yüksek fenolik madde içeriğine sahip olan bitki türü *L. laxiflorus*, en düşük fenolik madde içeriğine sahip olan bitki türü ise *L. undulatus* olarak bulundu.

Gövde örnekleri için su, etanol, metanol ve aseton ekstraktlarındaki fenolik madde içeriği *L. laxiflorus* için sırasıyla 1,90±0,01, 2,90±0,01, 2,65±0,01 ve 2,45±0,01 mg GA / g KA olarak bulundu. Bu değerler aynı sırayla *L. nissolia* için 0,93±0,01, 1,40±0,01, 1,41±0,02 ve 1,79±0,01 mg GA / g KA olarak, *L. undulatus* için ise 0,58±0,02, 0,60±0,01, 0,56±0,02 ve 0,53±0,00 mg GA / g KA olarak kaydedildi. *L. laxiflorus* gövdesindeki fenolik maddelerin ekstraksiyonu için çözücünün önemli derecede rol oynadığı tespit edildi. Bunula birlikte *L. nissolia*'nın etanolik ve metanolik ekstraktlarından elde edilen sonuçlar arasında istatistiki fark bulunmadı. Benzer bir sonuç *L. undulatus* için su ve etanolik ekstraktlarden elde edilen sonuçlar arasında da gözlendi (Şekil 3.2.).

Yaprak ekstraktlarından elde edilen verilere göre incelenen bitkiler arasında yapraklarında en yüksek fenolik madde içeriğine sahip olan bitki türü gövdeden elde edilen sonuçlara benzer olarak *L. laxiflorus,* en düşük fenolik madde içeriğine sahip olan bitki türü ise *L. nissolia* olarak bulundu. Yaprak örnekleri için su, etanol, metanol ve aseton ekstraktlarındaki fenolik madde içeriği *L. laxiflorus* için sırasıyla 4,89±0,05, 6,57±0,29, 5,22±0,07 ve 7,16±0,27 mg GA / g KA olarak bulundu. Bu değerler aynı sırayla *L. nissolia* için 0,93±0,01, 1,40±0,01, 1,41±0,02 ve 1,79±0,01 mg GA / g KA olarak, *L. undulatus* için ise 1,98±0,01, 2,00±0,02, 1,98±0,00 ve 1,81±0,01 mg GA / g KA olarak kaydedildi. *L. laxiflorus* yapraklarındaki fenolik madde içeriğinin incelenen diğer türlere göre 5 ila 7 kat daha yüksek olduğu tespit edildi. *L. laxiflorus* için yaprak dokularından fenolik maddelerin ekstraksiyonunda en uygun çözücünün aseton olduğu bulundu. Bunula birlikte *L. undulatus*'un yapraklarından elde edilebilecek fenolik maddelerin ekstraksiyonunda çözücünün istatistiki olarak önemli bir etkisi olmadığı kaydedildi. (Şekil 3.3.). Yaprak ve gövdedeki fenolik madde içerikleri kıyaslandığında yapraktaki fenolik madde içeriğinin gövdelere oranla 2 ila 3 kat daha fazla olduğu bulundu. Bu nedenle FTIR analizi dışındaki sonraki deneylerde yaprak ekstraktları kullanıldı.

3.1.2. Toplam flavonoit içeriklerine ait bulgular

Bitkilerin yaprak örneklerindeki toplam flavonoit içeriğini belirlemek için 0 ila 100 ppm konsantrasyonda hazırlanan kuersetinin 405 nm'deki absorbanslarının okunması ile bulunan değerlere göre Şekil 3.4'deki standart grafik elde edildi.

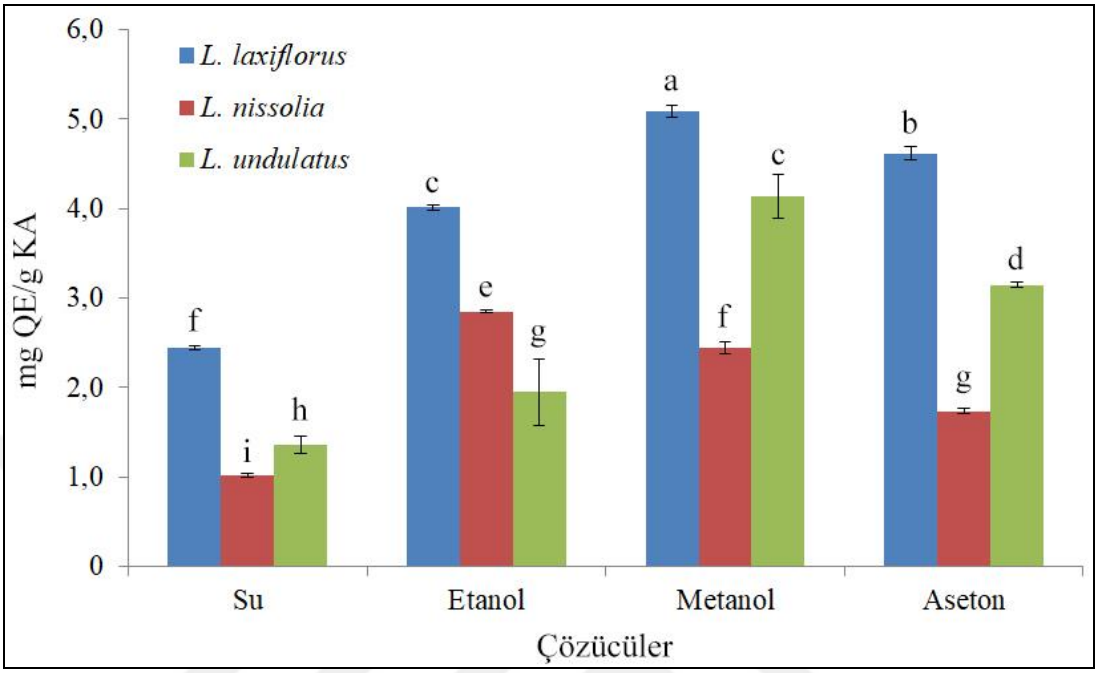


Şekil 3.4. Kuersetin standart grafiği

Kuersetin için hazırlanan standart grafikte okunan absorbans değerleri konsantrasyonlara göre sırasıyla 0,080, 0,106, 0,179, 0,224 ve 0,285 olarak ölçüldü. Bunun sonucunda doğrusallık değeri R^2= 0,9895 bulundu. Bitkilerin yaprak ekstraktları için yapılan deneylerden elde edilen absorbans değerleri bu grafiğin denkleminde yerine konularak derişimi bulundu ve kuersetin eşdeğeri "mg kuersetin / g kuru ağırlık bitki örneği (mg QE / g KA)" olarak toplam fenolik madde içerikleri bulundu.

Deneyden elde edilen verilere göre incelenen bitkiler arasında yapraklarında en yüksek flavonoit içeriğine sahip olan bitki türü *L. laxiflorus,* en düşük flavonoit içeriğine sahip olan bitki türü ise *L. nissolia* olarak bulundu. İncelenen ekstraktlardan su, etanol, metanol ve aseton kullanılanların flavonoit içeriği *L. laxiflorus* için sırasıyla 2,44±0,03, 4,01±0,03, 5,09±0,07 ve 4,62±0,08 mg QE / g KA olarak bulundu. Bu değerler aynı sırayla *L. nissolia* için 1,02±0,02, 2,85±0,01, 2,44±0,07 ve 1,73±0,02 mg QE / g KA olarak, *L. undulatus* için ise 1,36±0,03, 1,95±0,06, 4,14±0,18 ve 3,14±0,13 mg QE / g KA olarak kaydedildi. *L. laxiflorus* yapraklarındaki flavonoit içeriğinin incelenen diğer türlere göre 1,2 ila 5 kat daha yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 3.5.). *L. laxiflorus* ve *L. undulatus* için yaprak dokularından flavonoitlerin ekstraksiyonunda en uygun çözücünün metanol, *L. nissolia* için ise etanol olduğu bulundu. Bunula birlikte incelenen bitkilerin yaprak

dokularından flavonoitlerin ekstraksiyonunda çözücünün istatistiki olarak önemli etkisinin olduğu kaydedildi.

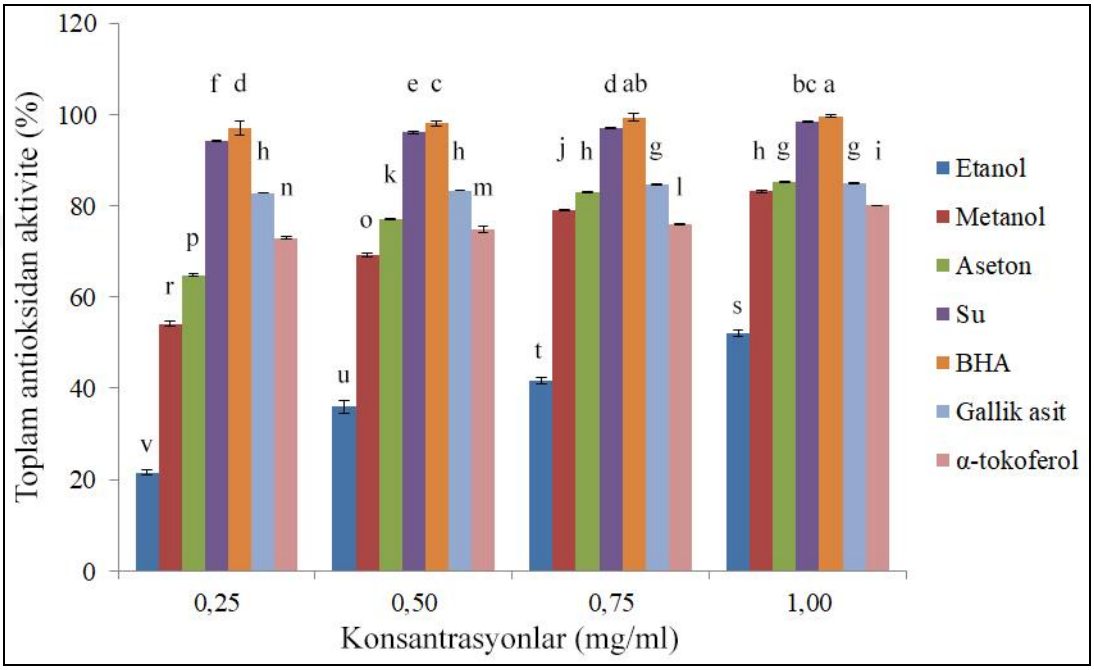


Şekil 3.5. Bitkilerin yapraklarında kuersetin cinsinden toplam flavonoit miktarı (Aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur)

3.1.3. Toplam antioksidan aktivitelerine ait bulgular

Farklı çözücülerle hazırlanmış *L. laxiflorus* yaprak ekstraktlarının toplam antioksidan aktivitesi belirlendi ve elde edilen veriler standart antioksidanlar ile kıyaslandı. Bu antioksidanlardan elde edilen veriler 0,25, 0,50, 0,75 ve 1,00 mg/ml konsantrasyonlarında BHA için sırasıyla %97,02±1,47, %98,07±0,56, %99,27±0,83 ve %99,59±0,24 olarak, gallik asit için sırasıyla %82,79±0,05, %83,31±0,01, %84,66±0,06 ve %84,93±0,03 olarak ve α-tokoferol için sırasıyla %72,94±0,35, %74,71±0,68, %75,88±0,19 ve %80,04±0,12 olarak bulundu (Şekil 3.6.). Aktiviteleri kıyaslanan bu kimyasal maddelerden BHA sentetik, gallik asit ve α-tokoferol ise doğal antioksidandır. Deneyden elde edilen verilere göre toplam antioksidan aktivitesi en yüksek olarak ölçülen *L. laxiflorus* ekstraktı 1,0 mg/ml konsantrasyonundaki su ekstraktı olup, en düşük toplam antioksidan aktivite ise 0,25 mg/ml konsantrasyonundaki etanolik ekstrakttan elde edildi. Bu denemelerden elde edilen veriler 0,25, 0,50, 0,75 ve 1,00 mg/ml konsantrasyonlarında etanolik ekstrakt

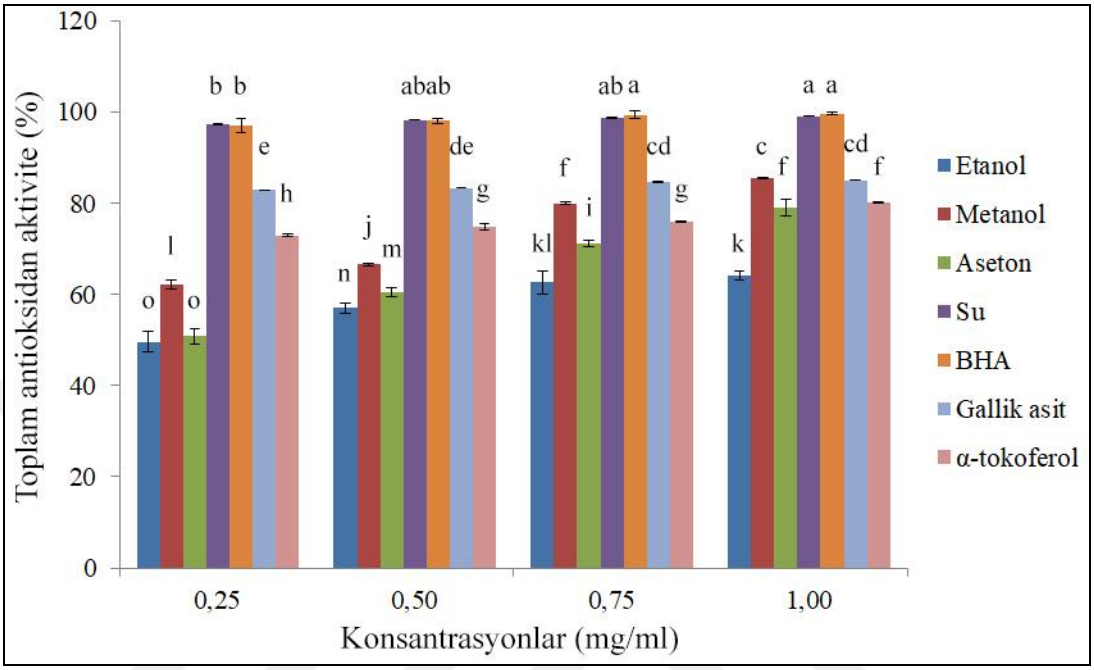
için sırasıyla %21,58±0,61, %35,94±1,46, %41,58±0,69 ve 52,09±0,65 olarak, metanolik ekstrakt için sırasıyla %54,17±0,67, %69,15±0,46, %79,14±0,11 ve 83,13±0,22 olarak, aseton ekstraktı için sırasıyla %64,82±0,21, %77,13±0,21, %82,93±0,05 ve %85,16±0,12 olarak ve su ekstraktı için sırasıyla %94,21±0,05, %96,04±0,18, %96,98±0,09 ve %98,44±0,13 olarak bulundu (Şekil 3.6.). İstatistiki olarak 1,00 mg/ml gallik asit ve aseton ekstraktından elde edilen veriler benzerdir.



Şekil 3.6. *Lathyrus laxiflorus*'un çeşitli çözücülerle hazırlanan yaprak ekstraktlarının toplam antioksidan aktiviteleri ve bunların standart antioksidanlarla kıyaslanması (Aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur)

İncelenen diğer bir bitki türü olan *L. undulatus*'un farklı çözücülerle hazırlanmış yaprak ekstraktlarının toplam antioksidan aktiviteleri 0,25, 0,50, 0,75 ve 1,00 mg/ml konsantrasyonlarında etanolik ekstrakt için sırasıyla %49,60±2,34, %57,04±1,15, %62,56±2,50 ve %64,11±0,92 olarak, metanolik ekstrakt için sırasıyla %62,09±0,93, %66,50±0,23, %79,95±0,19 ve %85,45±0,04 olarak, aseton ekstraktı için sırasıyla %50,78±1,79, %60,39±0,96, %71,11±0,74 ve %78,90±1,86 olarak ve su ekstraktı için sırasıyla %97,22±0,19, %98,11±0,01, %98,55±0,12 ve %99,06±0,04 olarak bulundu (Şekil 3.7.). Elde edilen verilere göre toplam antioksidan aktivitesi en yüksek olarak ölçülen *L. undulatus* ekstraktı 1,0 mg/ml konsantrasyonundaki su ekstraktı olup, en düşük toplama antioksidan aktivite ise 0,25 mg/ml

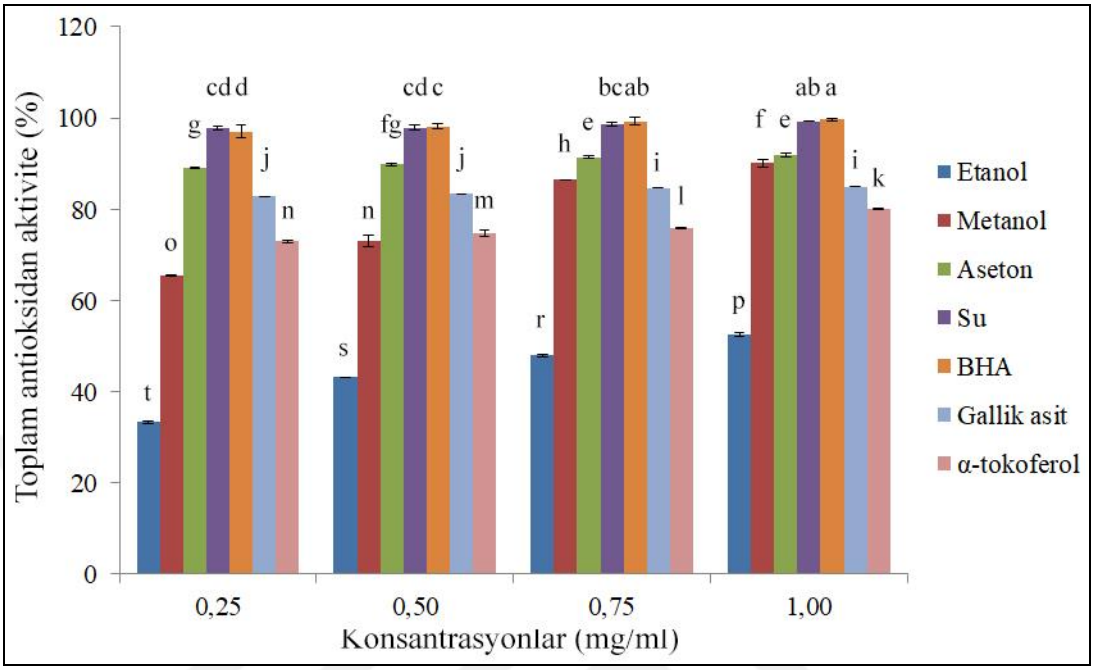
konsantrasyonundaki etanolik ekstrakttan elde edildi. İstatistiki olarak 1,00 mg/ml BHA antioksidanı ve su ekstraktlarından elde edilen veriler benzerdir. Aynı istatistiki benzerlik denenen her konsantrasyon için bu iki madde arasında bulunmaktadır.



Şekil 3.7. *Lathyrus undulatus*'un çeşitli çözücülerle hazırlanan yaprak ekstraktlarının toplam antioksidan aktiviteleri ve bunların standart antioksidanlarla kıyaslanması (Aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur)

L. nissolia'nın toplam antioksidan aktivitesi toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstraklar kullanılarak hesaplandı. *L. nissolia*'nın farklı çözücülerle hazırlanmış ekstraktlarının toplam antioksidan aktiviteleri 0,25, 0,50, 0,75 ve 1,00 mg/ml konsantrasyonlarında etanolik ekstrakt için sırasıyla %33,39±0,28, %43,15±0,09, %47,98±0,29 ve %52,46±0,46 olarak, metanolik ekstrakt için sırasıyla %65,41±0,18, %73,04±1,26, %86,42±0,03 ve %90,05±0,73 olarak, aseton ekstraktı için sırasıyla %89,08±0,10, %89,77±0,26, %91,34±0,24 ve %91,88±0,48 olarak ve su ekstraktı için sırasıyla %97,77±0,38, %97,88±0,64, %98,56±0,34 ve %99,30±0,09 olarak bulundu (Şekil 3.8.). Toplam antioksidan aktivitesi en yüksek olarak ölçülen *L. nissolia* ekstraktı 1,0 mg/ml konsantrasyonundaki su ekstraktı olup, en düşük toplam antioksidan aktivite ise 0,25 mg/ml konsantrasyonundaki etanolik ekstrakttan elde edildi. İstatistiki olarak 1,00 mg/ml BHA antioksidanı ve su ekstraktlarından elde

edilen veriler benzerdir. Aynı istatistiki benzerlik denenen her konsantrasyon için bu iki madde arasında bulunmaktadır.

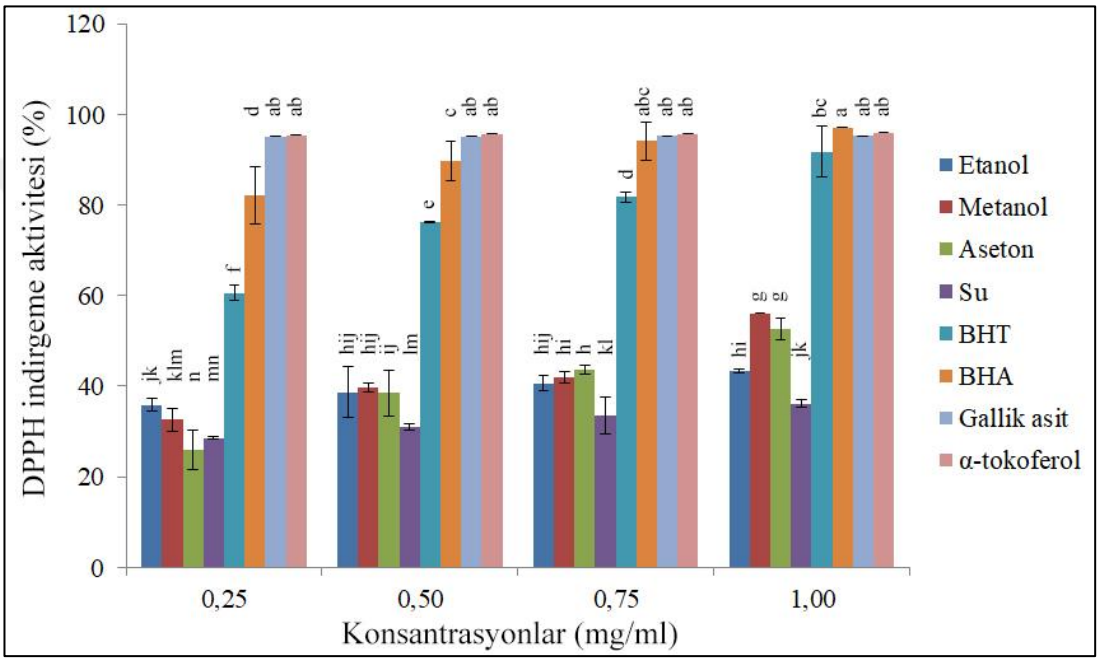


Şekil 3.8. *Lathyrus nissolia*'nın toprak üstü kısımlarının çeşitli çözücülerle hazırlanan ekstraktlarının toplam antioksidan aktiviteleri ve bunların standart antioksidanlarla kıyaslanması (Aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur)

3.1.4. DPPH radikali giderici aktivitelerine ait bulgular

Çeşitli çözücülerle hazırlanmış *L. laxiflorus* yaprak ekstraktlarının DPPH radikalini indirgeme aktivitesi incelenmiş olup elde edilen veriler standart antioksidanlar ile kıyaslandı. Bu antioksidanlardan elde edilen veriler 0,25, 0,50, 0,75 ve 1,00 mg/ml konsantrasyonlarında BHT için sırasıyla %60,61±1,61, %76,15±0,17, %81,74±1,17 ve %91,69±5,61 olarak, BHA için sırasıyla %82,18±6,33, %89,70±4,41, %94,18±4,20 ve %97,13±0,00 olarak, gallik asit için sırasıyla %95,12±0,04, %95,17±0,00, %95,22±0,00 ve %95,25±0,04 olarak ve α-tokoferol için sırasıyla %95,43±0,01, %95,74±0,01, %94,75±0,02 ve %95,95±0,03 olarak bulundu (Şekil 3.9.). Aktiviteleri kıyaslanan bu kimyasal maddelerden BHT ve BHA sentetik, gallik asit ve α-tokoferol ise doğal antioksidandır. Deneyden elde edilen verilere göre DPPH indirgeme aktivitesi en yüksek olarak ölçülen *L. laxiflorus* ekstraktı 1,0 mg/ml konsantrasyonundaki metanolik ekstrakttan, en düşük DPPH indirgeme aktivitesi ise 0,25 mg/ml konsantrasyonundaki aseton ekstrakttan elde edildi. Bu denemelerden

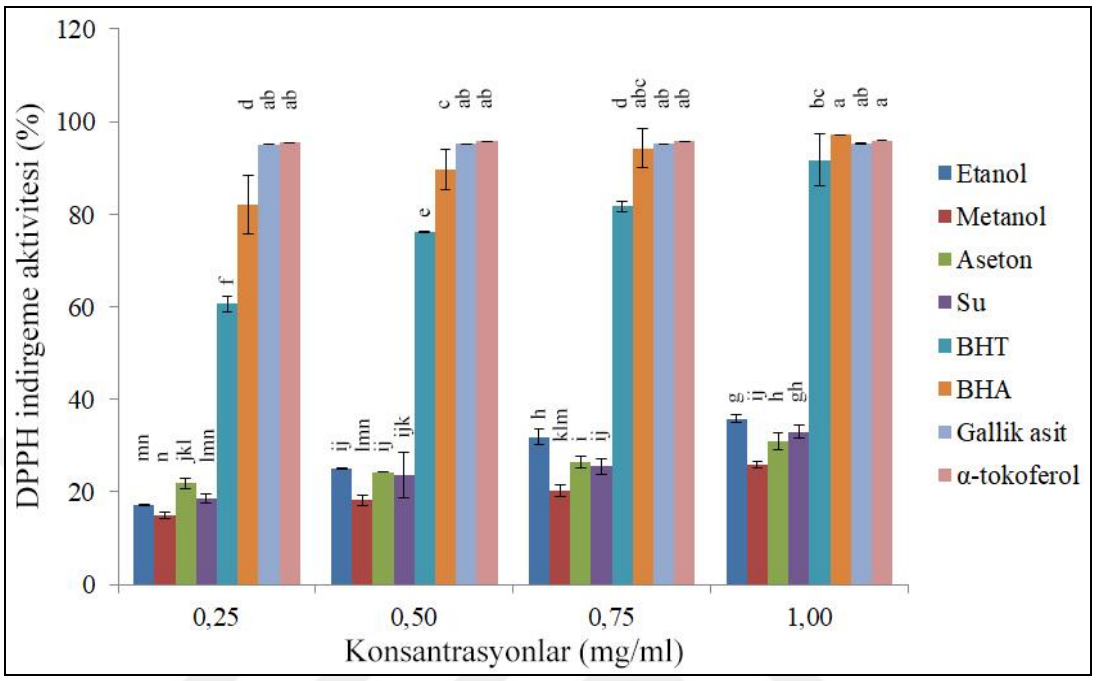
elde edilen veriler 0,25, 0,50, 0,75 ve 1,00 mg/ml konsantrasyonlarında etanolik ekstrakt için sırasıyla %35,89±1,49, %38,71±5,53, %40,62±1,73 ve %43,35±0,44 olarak, metanolik ekstrakt için sırasıyla %32,58±2,58, %39,62±0,96, %42,05±1,27 ve 56,09±0,04 olarak, aseton ekstraktı için sırasıyla %26,00±4,39, %38,48±5,03, %43,62±1,02 ve %52,65±2,45 olarak ve su ekstraktı için sırasıyla %28,57±0,30, %31,06±0,69, %33,54±3,99 ve %36,10±0,81 olarak bulundu (Şekil 3.6.). İstatistiki olarak 1,00 mg/ml metanolik ve aseton ekstraktından elde edilen veriler benzerdir.



Şekil 3.9. *Lathyrus laxiflorus*'un çeşitli çözücülerle hazırlanan yaprak ekstraktlarının DPPH radikali indirgeme aktiviteleri ve bunların standart antioksidanlarla kıyaslanması (Aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur)

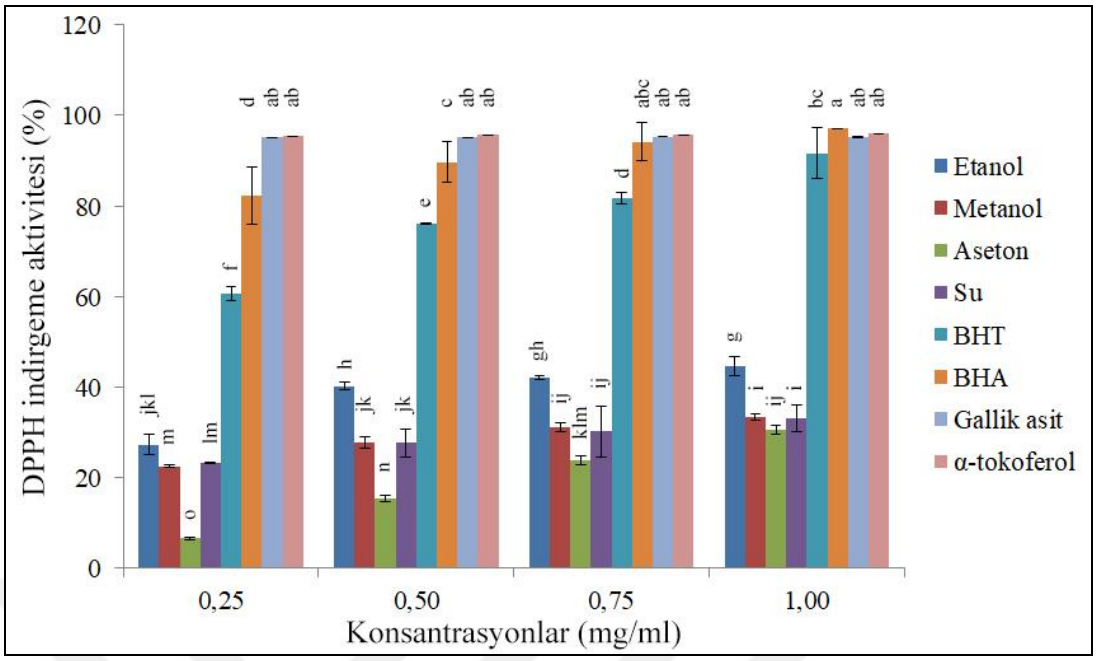
İncelenen diğer bir bitki türü olan *L. undulatus*'un farklı çözücülerle hazırlanmış yaprak ekstraktlarının DPPH radikalini indirgeme aktiviteleri 0,25, 0,50, 0,75 ve 1,00 mg/ml konsantrasyonlarında etanolik ekstrakt için sırasıyla %17,15±0,21, %25,16±0,14, %31,88±1,76 ve %35,82±0,94 olarak, metanolik ekstrakt için sırasıyla %14,94±0,65, %18,20±1,21, %20,25±1,27 ve %25,93±0,79 olarak, aseton ekstraktı için sırasıyla %21,85±1,09, %24,30±0,08, %26,39±1,31 ve %30,82±1,83 olarak ve su ekstraktı için sırasıyla %18,58±0,92, %23,71±4,94, %25,47±1,59 ve %32,99±1,42 olarak bulundu (Şekil 3.10.). Elde edilen verilere göre DPPH indirgeme aktivitesi en yüksek olarak ölçülen *L. undulatus* ekstraktı 1,0 mg/ml konsantrasyonundaki etanolik ekstrakttan, en düşük DPPH indirgeme aktivitesi ise 0,25 mg/ml

konsantrasyonundaki metanolik ekstrakttan elde edildi. İstatistiki olarak 1,00 mg/ml etanolik ve su ekstraktlarından elde edilen veriler benzerdir.



Şekil 3.10. *Lathyrus undulatus*'un çeşitli çözücülerle hazırlanan yaprak ekstraktlarının DPPH radikali indirgeme aktiviteleri ve bunların standart antioksidanlarla kıyaslanması (Aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur)

L. nissolia'nın DPPH radikali indirgeme aktivitesi toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstraklar kullanılarak hesaplandı. *L. nissolia*'nın farklı çözücülerle hazırlanmış ekstraktlarının DPPH radikalini indirgeme aktiviteleri 0,25, 0,50, 0,75 ve 1,00 mg/ml konsantrasyonlarında etanolik ekstrakt için sırasıyla %27,29±2,19, %40,28±0,75, %42,13±0,42 ve %44,64±2,01 olarak, metanolik ekstrakt için sırasıyla %22,59±0,34, %27,82±1,25, %31,12±0,99 ve %33,38±0,76 olarak, aseton ekstraktı için sırasıyla %6,59±0,34, %15,52±0,68, %23,93±0,97 ve %30,58±0,96 olarak ve su ekstraktı için sırasıyla %23,39±0,10, %27,69±3,00, %30,29±5,65 ve %33,14±3,04 olarak bulundu (Şekil 3.11.). DPPH indirgeme aktivitesi en yüksek olarak ölçülen *L. nissolia* ekstraktı 1,0 mg/ml konsantrasyonundaki etanolik ekstrakttan, en düşük DPPH indirgeme aktivitesi ise 0,25 mg/ml konsantrasyonundaki aseton ekstraktından elde edildi. İstatistiki olarak 0,75 ve 1,00 mg/ml etanolik ekstraktlardan elde edilen veriler benzerdir.

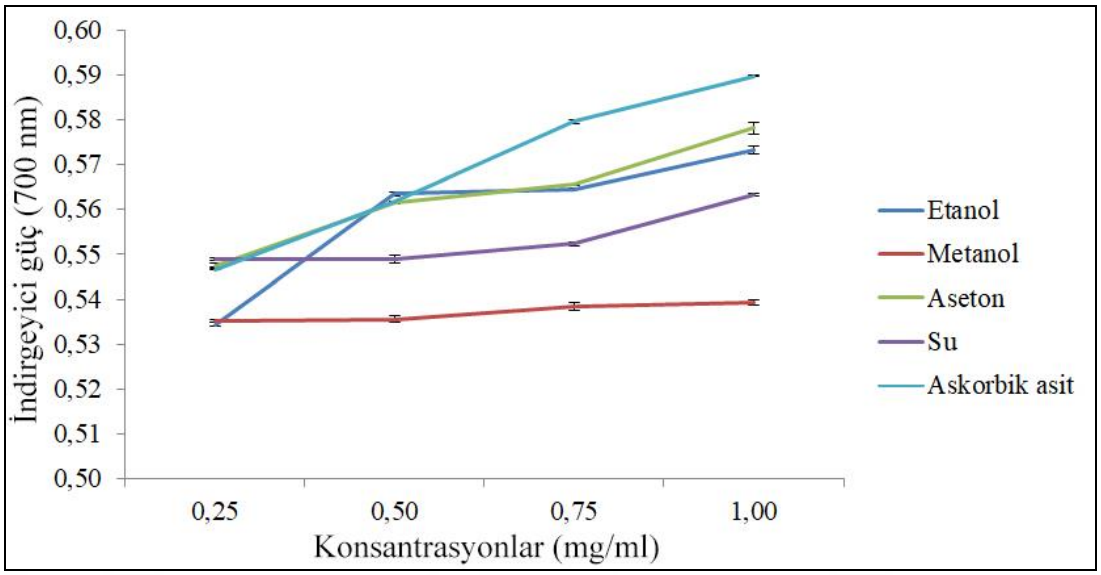


Şekil 3.11. *Lathyrus nissolia*'nın toprak üstü kısımlarının çeşitli çözücülerle hazırlanan ekstraktlarının DPPH radikali indirgeme aktiviteleri ve bunların standart antioksidanlarla kıyaslanması (Aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur)

İncelenen üç bitkiden elde edilen veriler kıyaslandığında en yüksek DPPH radikali indirgeme aktivitesine sahip olan bitki *L. laxiflorus*, en düşük aktiviteye sahip bitki ise *L. undulatus* olarak belirlendi.

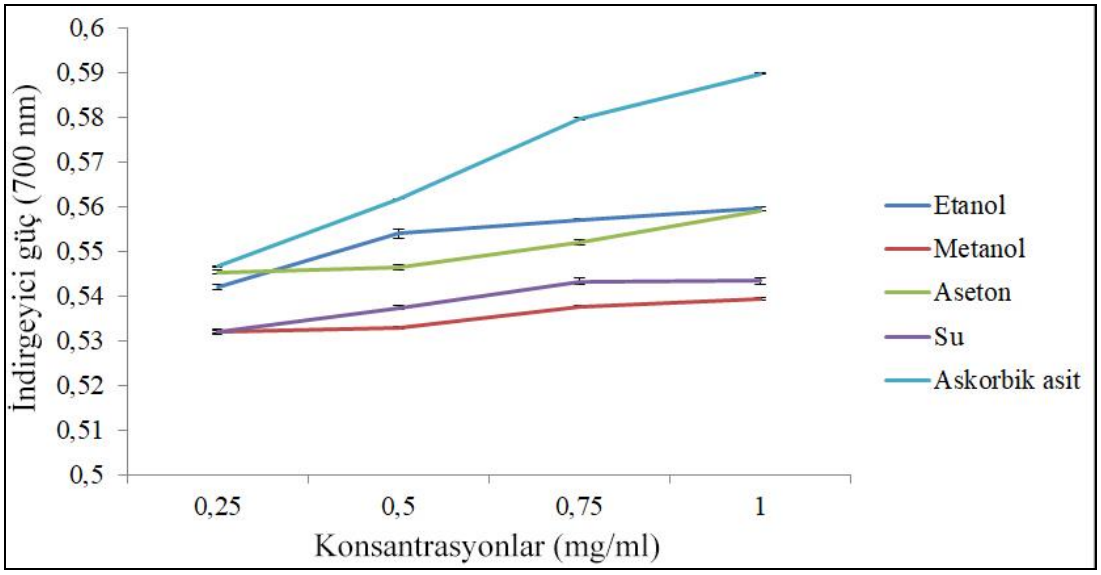
3.1.5. Toplam indirgeyici güç aktivitelerine ait bulgular

Çeşitli çözücülerle hazırlanmış *L. laxiflorus* yaprak ekstraktlarının toplam indirgeyici güç aktiviteleri artan absorbansa karşılık gelmektedir. Bu aktiviteler aynı zamanda askorbik asitin indirgeyici güç aktivitesi ile kıyaslandı. Deneyden elde edilen verilere göre toplam indirgeyici güç aktivitesi en yüksek olarak ölçülen *L. laxiflorus* bitkisinin 1,0 mg/ml konsantrasyonundaki aseton ekstraktı, ölçülen en düşük indirgeyici güç aktivitesi ise 0,25 mg/ml konsantrasyonundaki metanolik ekstrakttan elde edildi (Şekil 3.12.).



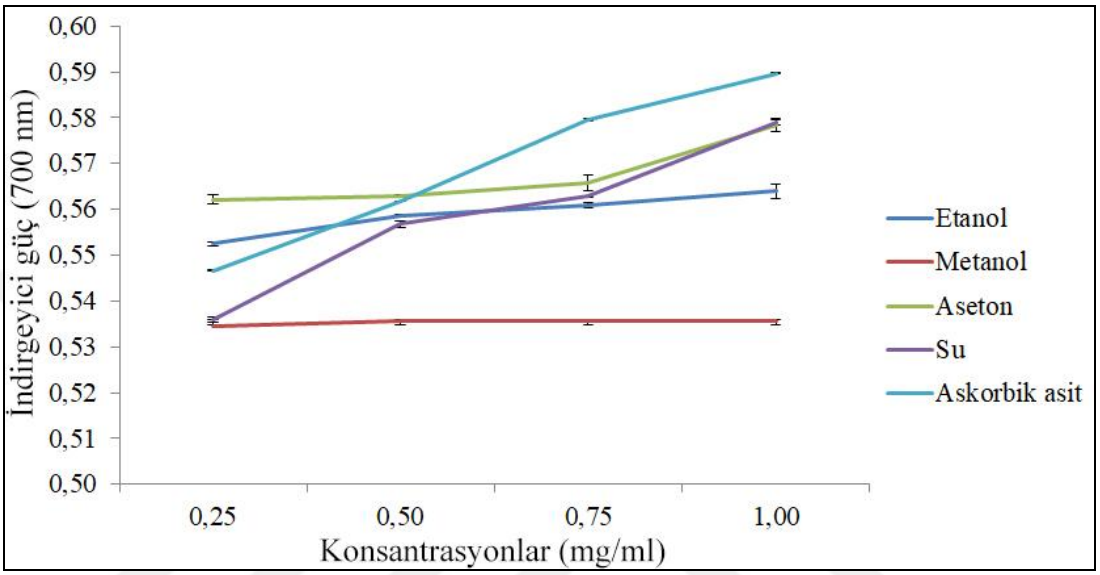
Şekil 3.12. *Lathyrus laxiflorus* yapraklarının çeşitli çözücülerle hazırlanan ekstraktlarının toplam indirgeyici güç aktiviteleri ve bunların askorbik asitle karşılaştırılması

İncelenen diğer bir bitki türü olan *L. undulatus*'un farklı çözücülerle hazırlanmış yaprak ekstraktlarının toplam indirgeyici güç aktivitelerinden elde edilen verilere göre toplam indirgeyici güç aktivitesi en yüksek olarak ölçülen *L. undulatus* ekstraktı 1,0 mg/ml konsantrasyonundaki etanolik ekstrakt, en düşük indirgeyici güç aktivitesi ise 0,25 mg/ml konsantrasyonundaki metanolik ekstrakttan elde edildi (Şekil 3.13.).



Şekil 3.13. *Lathyrus undulatus* yapraklarının çeşitli çözücülerle hazırlanan ekstraktlarının toplam indirgeyici güç aktiviteleri ve bunların askorbik asitle karşılaştırılması

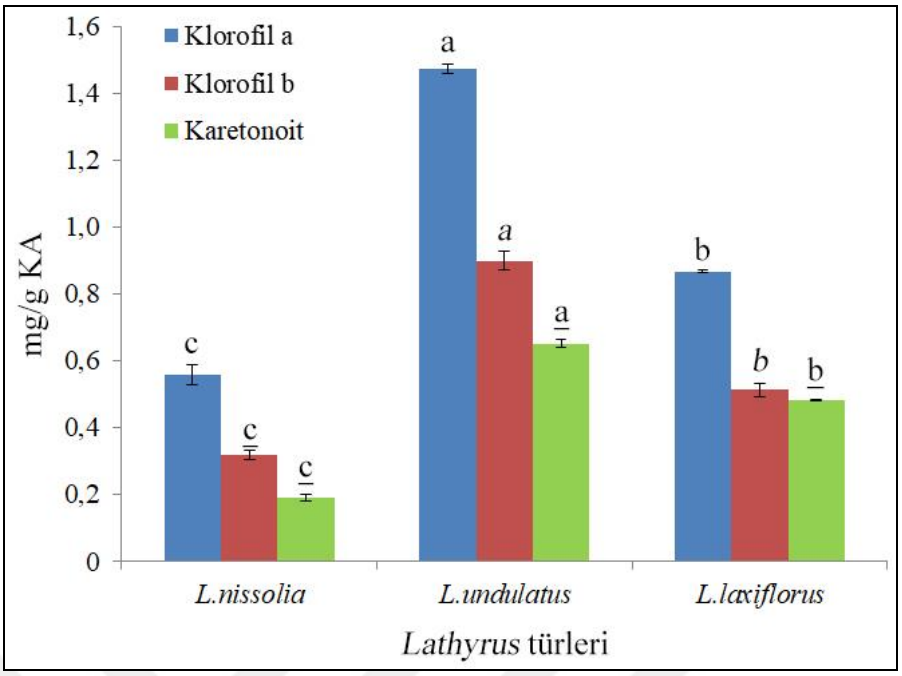
L. nissolia'nın farklı çözücülerle hazırlanmış tokrak üstü kısımlarından hazırlanan ekstraktların toplam indirgeyici güç aktivitelerinden elde edilen verilere göre toplam indirgeyici güç aktivitesi en yüksek olarak ölçülen *L. nissolia* ekstraktı 1,0 mg/ml konsantrasyonundaki aseton ve su ekstraktları, en düşük indirgeyici güç aktivitesi ise 0,25 mg/ml konsantrasyonundaki metanolik ekstrakttan elde edildi (Şekil 3.14.).



Şekil 3.14. *Lathyrus nissolia*'nın toprak üstü kısımlarının çeşitli çözücülerle hazırlanan ekstraktlarının toplam indirgeyici güç aktiviteleri ve bunların askorbik asitle karşılaştırılması

3.1.6. Klorofil ve karotenoit içeriklerine ait bulgular

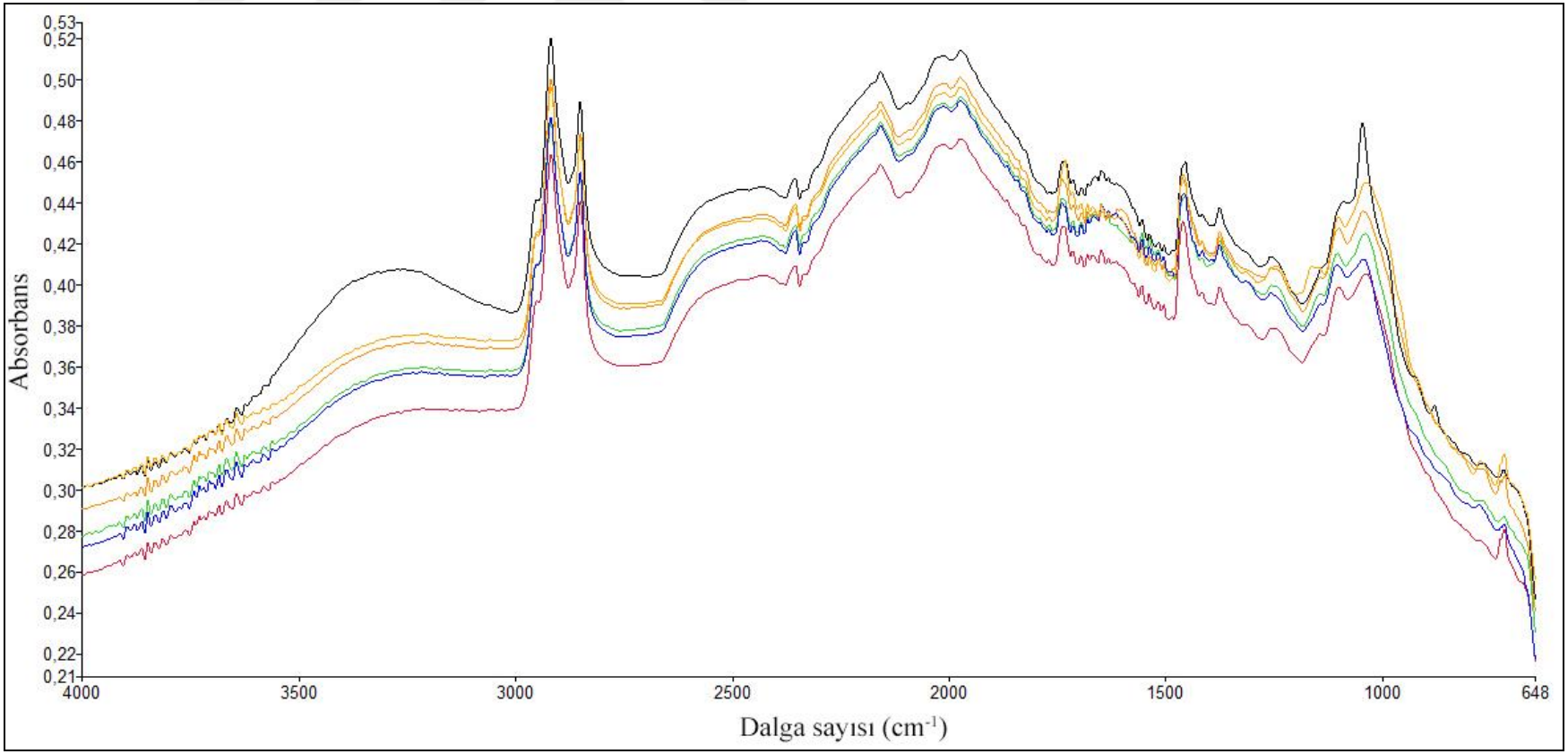
L. undulatus'un klorofil-a, klorofil-b ve karotenoit içerikleri sırasıyla 1,47±0.01, 0,90±0,01 ve 0,65±0,01 mg/g KA olarak bulundu. Aynı parametreler için değerler *L. laxiflorus*'da sırasıyla 0,87±0.01, 0,51±0.01 ve 0,48±0.00 mg/g KA ve *L. nissolia*'da ise sırasıyla 0,56±0.03 mg/g KA, 0,32±0,01 mg/g KA ve 0,19±0,00 mg/g KA olarak bulundu (Şekil 3.12.). Toplam klorofil ve karotenoit içerikleri en yüksek olan tür *L. undulatus*, en düşük olan tür ise *L. nissolia* olarak bulundu (Şekil 3.15).



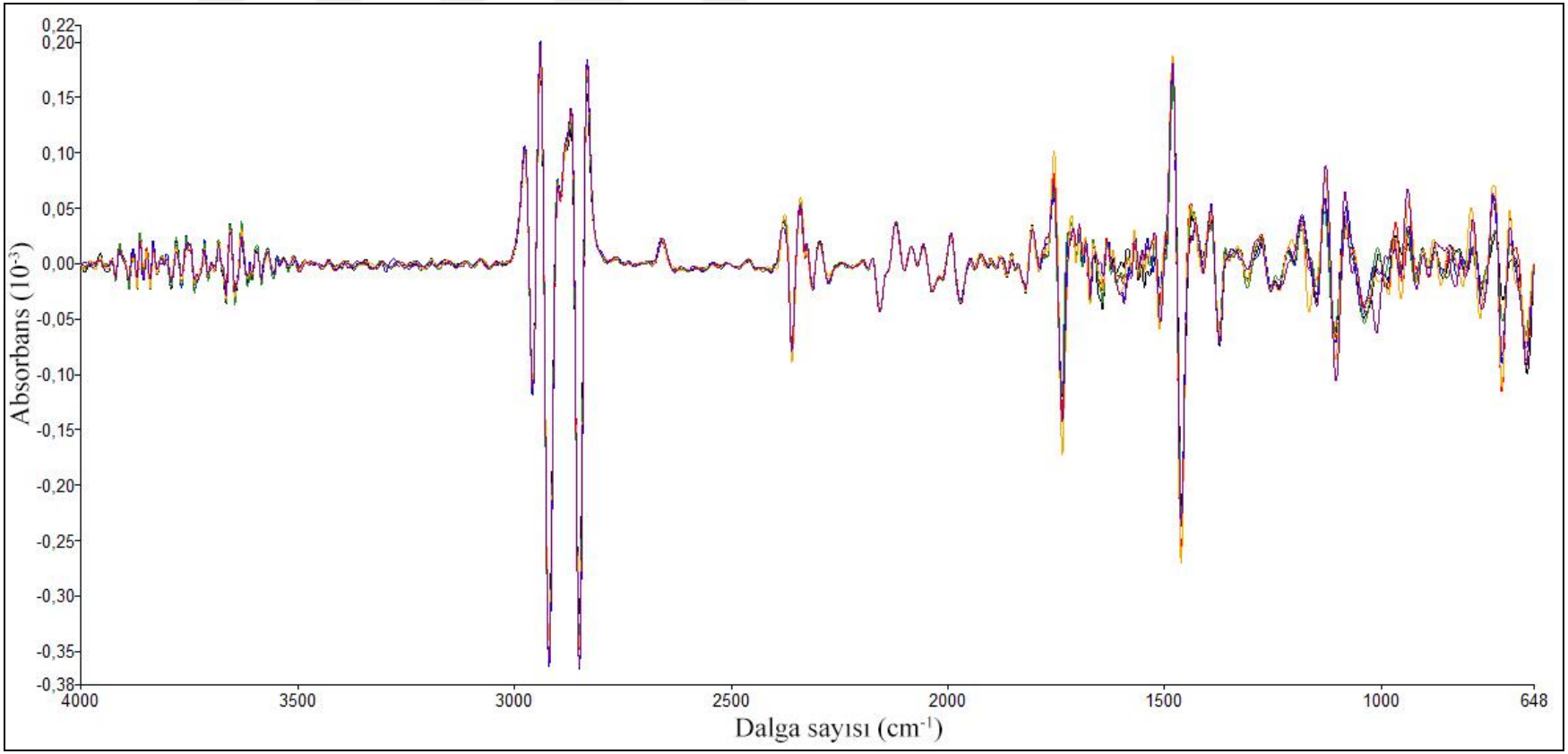
Şekil 3.15. Bitki ekstraktlarındaki fotosentetik pigment içerikleri (Aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur)

3.1.7. FTIR analizine ait bulgular

Çeşitli fenolik maddelere ait fonksiyonel gruplardan kaynaklanan titreşimleri FTIR spektroskopisi aracılığıyla analiz edildi. Elde edilen verilerden görüldüğü üzere yapraklar ve gövdelere ait FTIR spektrumları dokuda bulunan tüm moleküllerdeki fonksiyonel grupları yansıttığı için oldukça karmaşık ve çok sayıda pik içermektedir (Şekil 3.16). Bu nedenle yüksek absorbanslı piklerin kapattıkları geride kalan piklerin de görünür hale getirilmesi için spektrumların ikinci türevleri alındı (Şekil 3.17.). *Lathyrus* türlerinin gövde ve yaprak örneklerinden FTIR spektroskopisi aracılığıyla elde edilen veriler Tablo 3.1. ve Tablo 3.2.'de verilmektedir.



Şekil 3.16. İncelenen *Lathyrus* türlerine ait FTIR spektrumları



Şekil 3.17. İncelenen *Lathyrus* türlerine ait FTIR spektrumlarının ikinci türevleri

Tablo 3.1. *Lathyrus* türlerinin yaprak ve gövde dokularının FTIR spektrumlarında gözlenen bazı frekanslar

	Ortalama Frekans (cm^{-1})							
	2920	**2850**	**1740**	**1651**	**1454**	**1377**	**1105**	**1040**
LU-G	2919,99 ± 0,03	2850,09 ± 0,10	1737,42 ± 1,33	1654,38 ± 2,39	1462,28 ± 4,15	1373,65 ± 1,69	1104,88 ± 0,60	1035,47 ± 3,20
LL-G	2920,12 ± 0,25	2850,26 ± 0,46	1737,34 ± 0,26	1654,47 ± 0,07	1462,10 ± 0,71	1373,48 ± 0,11	1106,81 ± 1,58	1041,28 ± 0,54
LN-G	2920,26 ± 0,20	2850,37 ± 0,22	1736,62 ± 0,36	-	1461,88 ± 0,21	1373,55 ± 0,33	1105,58 ± 0,73	1042,22 ± 1,73
LU-Y	2920,45 ± 0,27	2850,47 ± 0,24	1738,01 ± 1,01	-	1461,59 ± 3,80	1374,45 ± 1,32	1107,53 ± 1,76	1040,73 ± 2,05
LL-Y	2920,23 ± 0,12	2850,25 ± 0,18	1737,36 ± 0,04	1652,52 ± 0,55	1461,99 ± 0,18	1374,21 ± 0,22	1105,86 ± 0,44	1042,93 ± 0,51
LN-Y	2920,31 ± 0,17	2850,48 ± 0,17	1736,81 ± 0,58	-	1461,31 ± 0,63	1374,51 ± 0,64	1106,05 ± 2,48	1044,27 ± 2,44

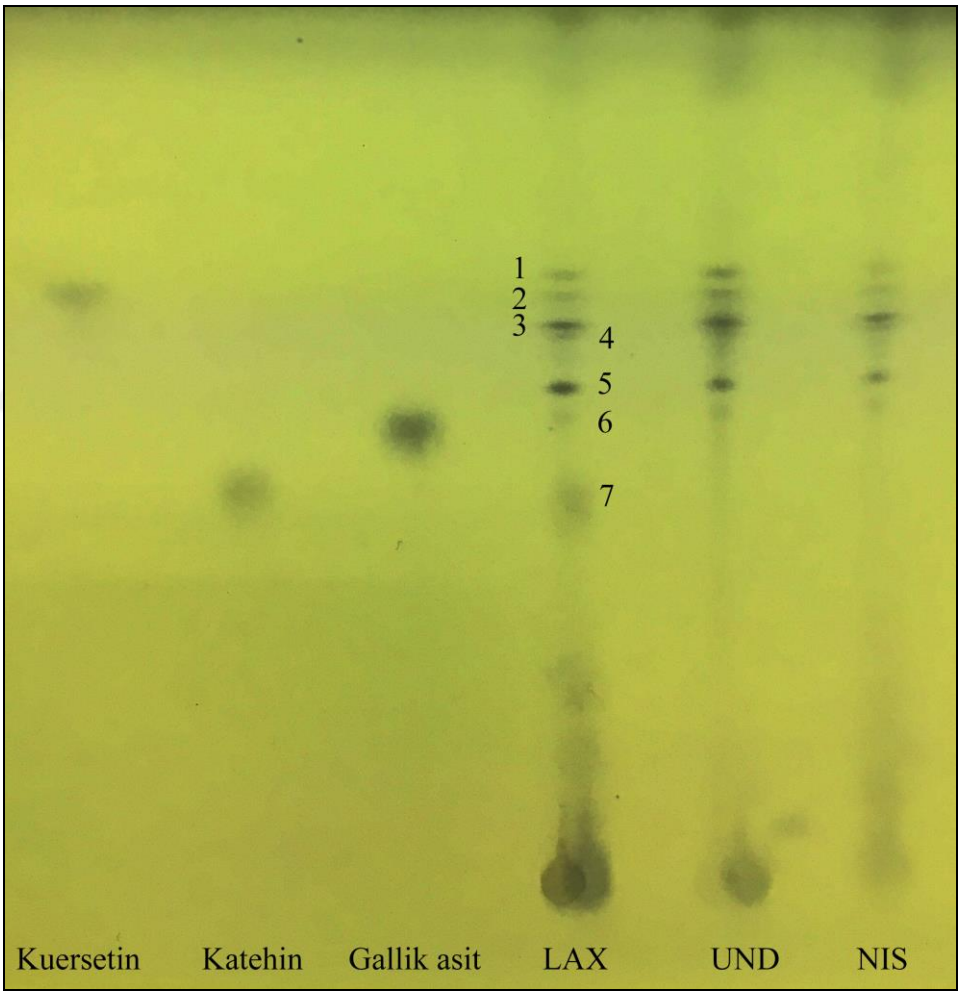
Tablo 3.2. *Lathyrus* türlerinin yaprak ve gövde dokularının FTIR spektrumlarındaki piklere ait absorbanslar

	Ortalama Absorbans (10^{-3})							
	2920	**2850**	**1740**	**1651**	**1454**	**1377**	**1105**	**1040**
LU-G	-0,34 ± 0,03	-0,35 ± 0,02	-0,13 ± 0,00	-0,01 ± 0,00	-0,26 ± 0,00	-0,07 ± 0,01	-0,08 ± 0,02	-0,04 ± 0,00
LL-G	-0,33 ± 0,02	-0,33 ± 0,02	-0,13 ± 0,00	-0,01 ± 0,00	-0,25 ± 0,03	-0,07 ± 0,00	-0,07 ± 0,00	-0,04 ± 0,00
LN-G	-0,34 ± 0,01	-0,34 ± 0,01	-0,16 ± 0,00	-	-0,25 ± 0,02	-0,07 ± 0,00	-0,08 ± 0,01	-0,04 ± 0,01
LU-Y	-0,35 ± 0,01	-0,33 ± 0,02	-0,12 ± 0,00	-	-0,23 ± 0,01	-0,06 ± 0,00	-0,07 ± 0,00	-0,04 ± 0,01
LL-Y	-0,37 ± 0,01	-0,37 ± 0,08	-0,12 ± 0,00	-0,01 ± 0,00	-0,24 ± 0,01	-0,07 ± 0,00	-0,07 ± 0,00	-0,05 ± 0,01
LN-Y	-0,37 ± 0,01	-0,34 ± 0,02	-0,11 ± 0,00	-	-0,22 ± 0,01	-0,07 ± 0,00	-0,07 ± 0,03	-0,13 ± 0,10

3.2. Kromatografi Temelli Deneylere Ait Bulgular

3.2.1. HPTLC analizine ait bulgular

HPTLC plakalarının hazırlanmasından ve mobil fazların yürütülmesinden sonra plakalarda meydana gelen fenolik maddelere ait izler Folin-Ciocalteu reaktifi ile boyanarak görünür hale getirildi (Şekil 3.18.). Plaka üzerinde mesafe kateden fenolik maddelerin enjekte edildikleri yerden yukarı ilerledikleri mesafe (a) ve solventin ilerlediği mesafe (b) ölçülerek R_f değerleri hesaplandı. Bu değerler Tablo 3.3.'de verilmektedir. Analiz sonuçlarına göre 7 ana fenolik madde tespiti yapıldı.

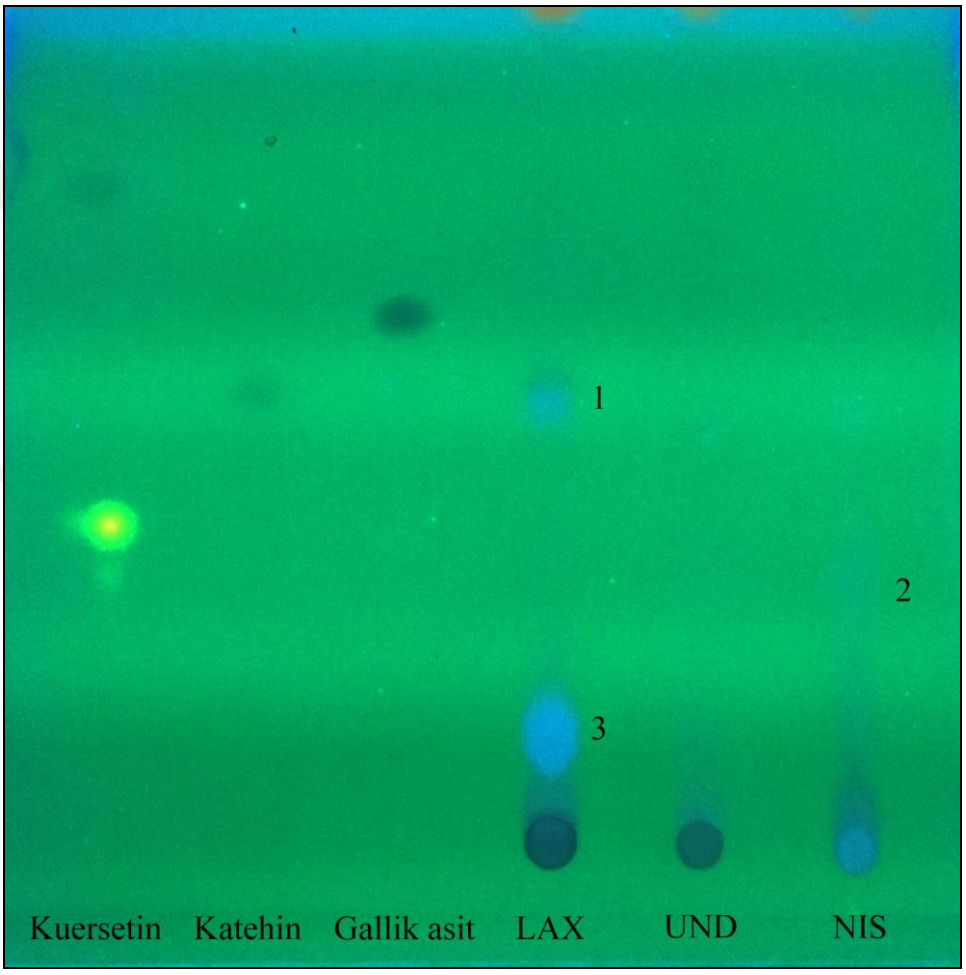


Şekil 3.18. İncelenen *Lathyrus* türlerindeki fenolik bileşiklere ait HPTLC parmak izi profilleri. LAX: *L. laxiflorus*, UND: *L. undulatus*, NIS: *L. nissolia*

Tablo 3.3. Standart maddelere ve analitlere ait R_f değerleri

Analit / Bant									
Kuersetin	Katehin	Gallik asit	1	2	3	4	5	6	7
			R_f						
0,59	0,4	0,46	0,61	0,59	0,56	0,55	0,5	0,47	0,39

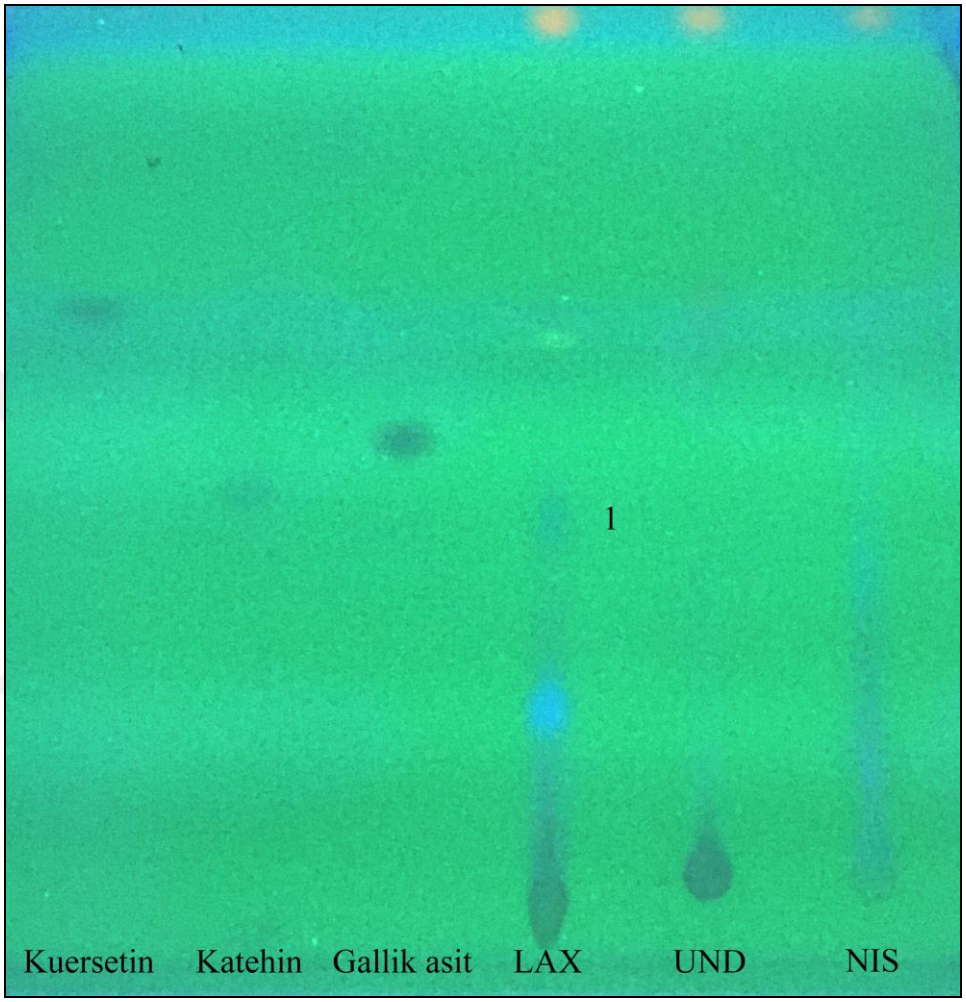
Aynı plaka bir defa daha geliştirilerek %1 $AlCl_3$ reaktifi ile muamele edildi ve flavonoitlerin görünür hale getirilmesine çalışıldı. Elde edilen kromatogram Şekil 3.19.'da gösterilmektedir. Analiz sonuçlarına göre 3 ana flavonoit tespiti yapıldı.



Şekil 3.19. İncelenen *Lathyrus* türlerindeki flavonoitlere ait HPTLC parmak izi profilleri. LAX: *L. laxiflorus*, UND: *L. undulatus*, NIS: *L. nissolia*

Hesaplanan R_f değerleri kuersetin için 0,34, 1 nolu bant için 0,46, 2 nolu bant için 0,27 ve 3 nolu bant için 0,12 olarak bulundu.

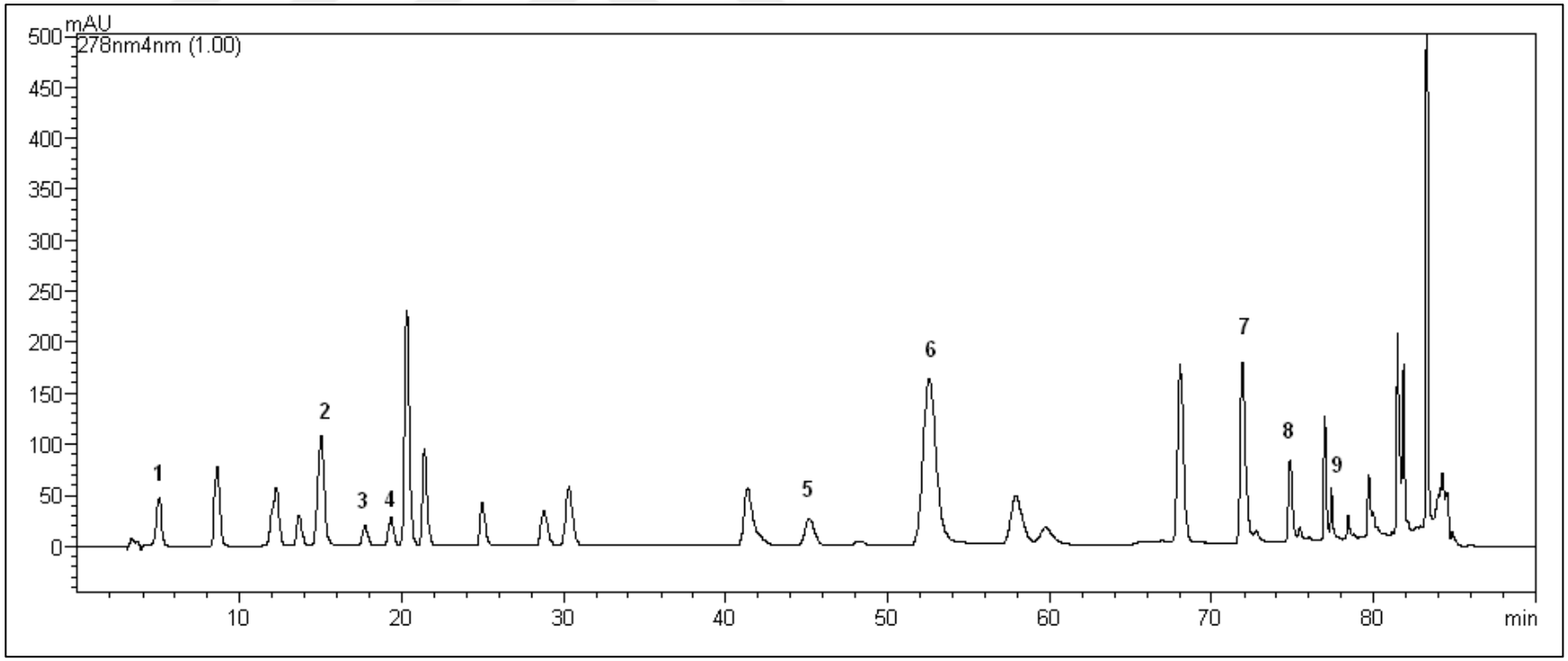
Aynı plaka üçüncü defa daha geliştirilerek taninlerin görünür hale getirilmesi için %2'lik $FeCl_3$ reaktifi ile muamele edildi. Elde edilen kromatogram Şekil 3.20.'da gösterilmektedir. Analiz sonuçlarına göre 1 ana tanin tespiti yapıldı. Hesaplanan R_f değerleri katehin ve 1 nolu bant için 0,37 olarak bulundu.



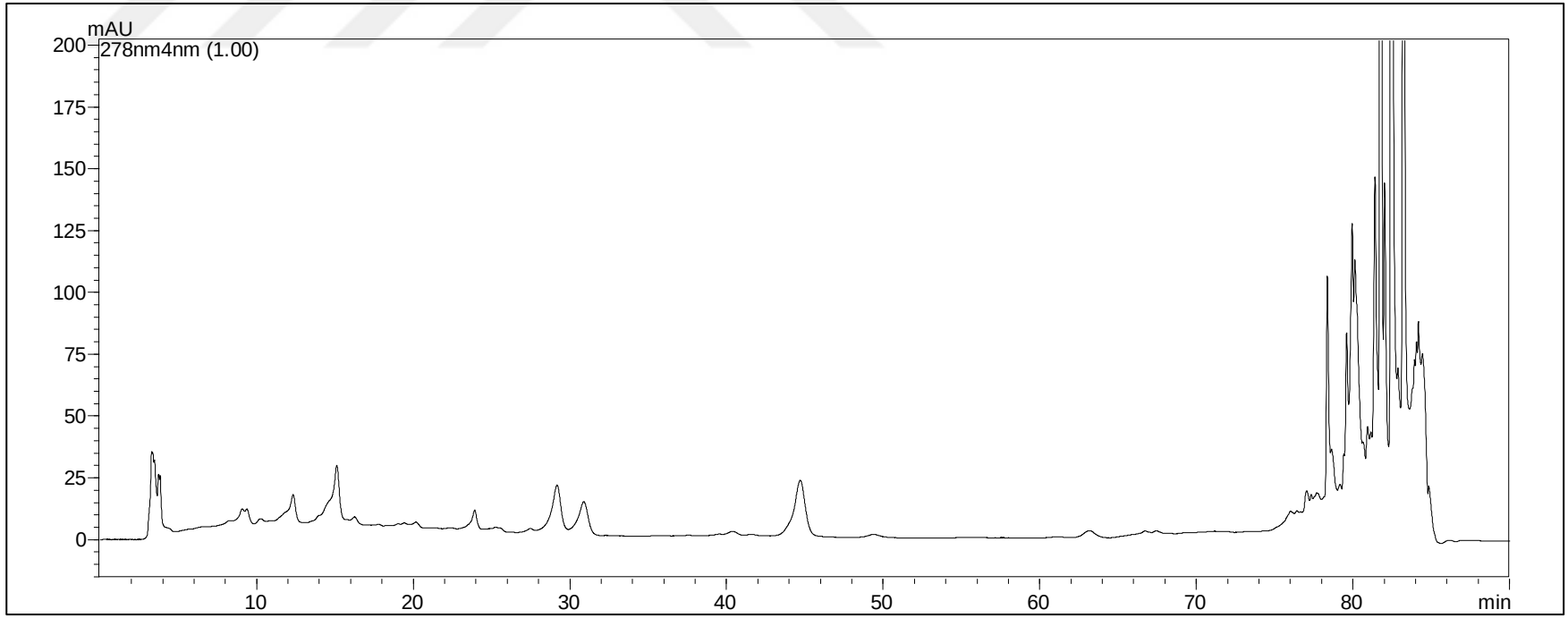
Şekil 3.20. İncelenen *Lathyrus* türlerindeki taninlere ait HPTLC parmak izi profilleri. LAX: *L. laxiflorus*, UND: *L. undulatus*, NIS: *L. nissolia*

3.2.2. HPLC analizine ait bulgular

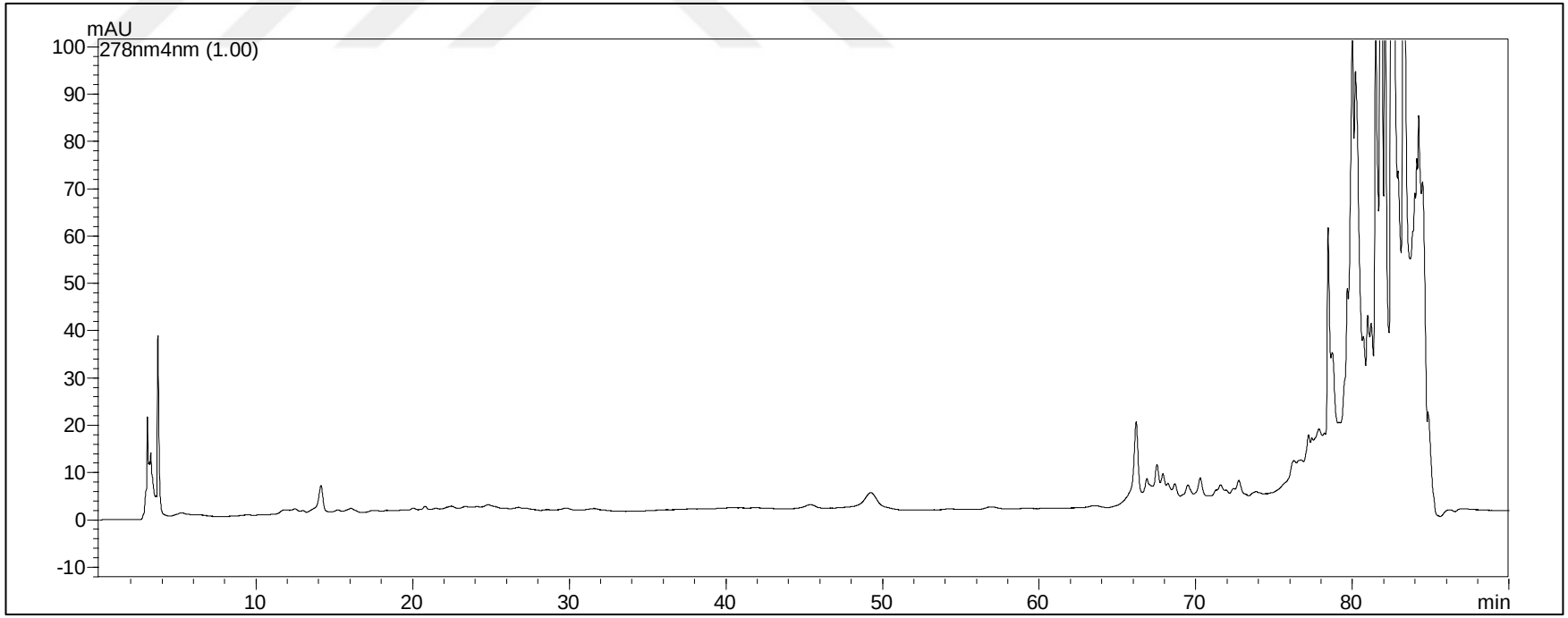
HPLC analizine ait standart maddelerin tutulma zamanlarının ve konsantrasyon bilgilerinin yer aldığı kromatogram Şekil 3.21.'de verilmektedir. Bitki ekstraktlarının analizlerinden elde edilen kromatogramlar ise *L. laxiflorus* için Şekil 3.22.'da, *L. undulatus* için Şekil 3.22.'de ve *L. nissolia* için Şekil 3.23.'de gösterilmektedir. Elde edilen kromatogramlardan hesaplanan fenolik madde içerikleri ppm olarak Tablo 3.4.'de verilmektedir.



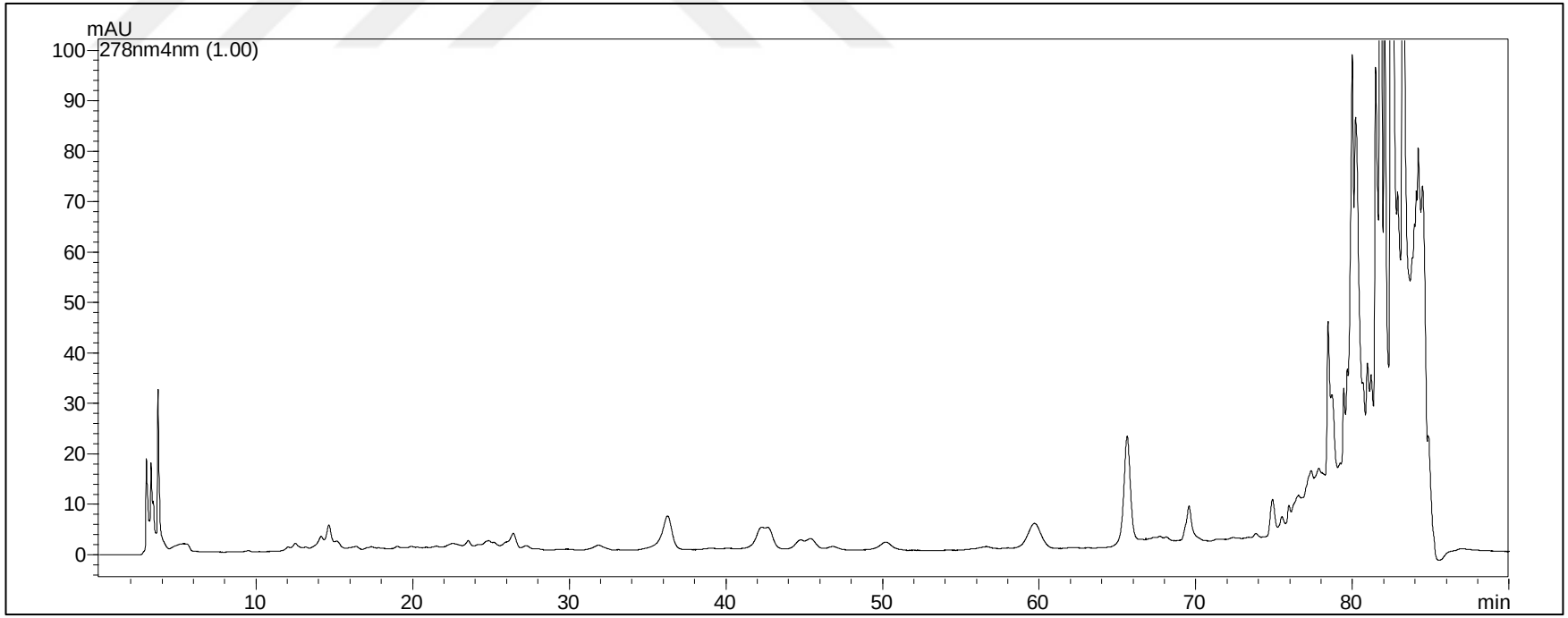
Şekil 3.21. Analizlerde kullanılan standart maddelere ait HPLC kromatogramı (1: Gallik asit, 2: Klorojenik asit, 3: Kafeik asit, 4: Epikatehin, 5: Rutin, 6: Hesperidin, 7: Kuersetin, 8: Luteolin, 9: Apigenin)



Şekil 3.22. *Lathyrus laxiflorus* yapraklarının metanolik ekstraktından elde edilen HPLC kromatogramı



Şekil 3.23. *Lathyrus undulatus* yapraklarının metanolik ekstraktından elde edilen HPLC kromatogramı



Şekil 3.24. *Lathyrus nissolia'nın* toprak üstü kısımlarının metanolik ekstraktından elde edilen HPLC kromatogramı

Tablo 3.4. İncelenen *Lathyrus* türlerinin metanolik ekstraktlarında tespit edilen fenolik maddeler ve miktarları

	Fenolik madde miktarları (ppm)								
	Gallik asit	Klorojenik asit	Kafeik asit	Epikatehin	Rutin	Hesperidin	Kuersetin	Luteolin	Apigenin
LAX	*	19,6	0,6	3,4	36,6	*	1,2	*	3,5
UND	0,4	1,0	*	1,2	2,2	*	1,9	*	3,0
NIS	0,9	1,7	0,3	0,6	4,1	*	*	4,7	3,4

(LAX: *L. laxiflorus*, UND: *L. undulatus*, NIS: *L. nissolia*, *tespit edilemedi)

4. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular, spektroskopi temelli çalışmalar ve kromatografi çalışmaları olarak iki ana başlık altında yorumlamıştır.

4.1. Spektroskopi Temelli Çalışmalar

4.1.1. Toplam fenolik madde miktarı

Antioksidan maddelerin tanımı Halliwell ve Gutteridge (2007) tarafından "bir antioksidan, ortamdaki oksitlenebilir bir substrat ile karşılaştırıldığında düşük bir konsantrasyonda bulunduğunda, substratın oksidasyonunu engelleyen bir maddedir" olarak yapılmıştır. Bu sınıflandırma altında, bitkilerin sekonder metabolizmasından türetilen fenolik bileşikler, birden fazla organı oksidasyondan korur ve bu nedenle fenolik bileşikler doğal antioksidanlar olarak kabul edilmektedir. Bu bileşiklerin oldukça etkili serbest radikal temizleyiciler ve antioksidanlar olduğu bildirilmektedir (Tung ve diğ., 2009). Bu nedenle, bitki örneklerinin fenolik bileşiklerinin miktarını belirlemek önemlidir. Fabaceae türleri için literatürde raporlanan fenolik madde miktarları oldukça geniş bir aralıkta listelenmektedir. Bitkilerdeki fenolik madde miktarlarını Godevac ve diğ. (2008) *Trifolium pannonicum*'da 106,81 mg GAE / g, *Oxytropis halleri*'de 78,84 mg GAE / g, *Coronilla emerus*'da 38 mg GAE / g olarak, Çakmak ve diğ. (2012) *Ceratonia siliqua*'da 16,4 – 39,4 mg GAE / g, Custodio ve diğ. (2009) *Glycyrrhiza echinata* ile yaptıkları çalışmada bitki toprak üstü kısımlarında 146,30 mg GAE / g köklerinde ise 114,33 mg GAE / g olarak raporlamışlardır. Heydari ve diğ. (2015) beş *Lathyrus* türünün toprak üstü kısımları ile yaptıkları çalışmada Folin-Ciocalteu aracılığıyla metanolik ekstraktlardaki fenolik bileşik içeriklerini belirlemişlerdir. Toplam fenolik içeriği sonuçları *L. armenus*'da 150,63 ± 8,48, *L. aureus*'da 452,19 ± 6,88, *L. cilicicus*'da 179,69 ± 4,93, *L. laxiflorus*'da 397,00 ± 10,96, *L. pratensis*'de ise 390,94 ± 7,39 mg GAE / g ekstrakt olarak bulmuşlardır. Hung (2012) ise mango meyvelerinden liyofilize edilerek kurutulmuş örneklerin fenolik madde içeriğini 8,25 mg GAE / g olarak, Abderrahim

ve diğ. (2015) ise kinoa bitkisinin (*Chenopodium quinoa*) fenolik madde içeriğini 1,72 ile 4,52 mg GAE /g olarak bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise sonuçlar 0,93 ile 7,16 mg GAE /g kuru ağırlık arasındaki değerlerde ölçülmüştür. Literatürdeki sonuçlar arasındaki farklılık ekstraksiyon yöntemleri ve ifade biçimlerindeki farklılıktan kaynaklanmaktadır. Literatürdeki birçok çalışmada sonuçlar ekstrakttaki birim ağırlık başına düşen fenolik madde miktarı üzerinden bildirilmiştir. Çalışmamızda ise ekstraktlar konsantre edilmemiş ve ölçümler direkt olarak gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde yapılan ölçümlerden elde edilen sonuçlar yukarıda bildirilen ve bu tez çalışmasında kullanılan metodun uygulandığı kinoa bitkisine ait verilerden de görüleceği üzere kuru bitki örneğinin birim ağırlığı başına düşen fenolik madde miktarı olarak ifade edilmektedir. Sonuçlar incelenen *Lathyrus* türlerinin kullanılan çözücüye bağlı olarak kinoa ve mango gibi bitkilerden daha zengin bir fenolik içeriğine sahip olabileceğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte bitkilerin örnekleme zamanı, çevre koşulları ve fizyolojik yaşına göre fenolik madde içeriklerinin değişebileceği bildirilmektedir (Liu ve diğ., 2016).

4.1.2. Toplam flavonoit miktarı

Flavonoitler bitkilerde fenilalanin, tirozin ve malonat gibi aromatik amino asitlerden olşurlar. Temel flavonoit yapısı içinde 15 karbon atomunun üç halka şeklinde düzenlendiği (C6-C3-C6) flavandır. Temel flavonoit grupları flavonlar, flavanonlar, izoflavonlar, flavonoller, flavanonoller, flavan-3-oller ve antosiyanidinler olarak bilinirler. Bunların dışında diğer flavonoit grupları ise biflavonlar, kalkononlar, auronlar ve kumarinlerdir. Flavonoitler bitkilerde genellikle glikozillenmiş bileşik türevleri olarak bulunurlar (Pietta, 2000). Bitkilerde yapraklar, çiçekler ve meyvelerin mavi, kırmızı ve turuncu gibi renk tonlarına katkıda bulunurlar. Çeşitli sebze ve meyvelerin yanı sıra, flavonoitler tohumlarda, kabuklu yemişlerde, tahıllarda, baharatlarda, farklı tıbbi ürünlerde, şarap, bira ve çayda bulunurlar. Flavonoitler ayrıca bitkinin ekolojisine de etki ederler. Neden oldukları çarpıcı renkler dolayısıyla böceklerin ilgisini çekerek çiçeklerin tozlaşmasında yardımcı görev alırlar. Buruk tatları dolayısıyla kateşinler ve diğer flavanoller bitkiye zararlı olabilecek böceklere karşı savunmada görev alırlar (Mazza ve Miniati, 1993). Flavonoitler fotosentezin ışık reaksiyonları sırasında katalizör olarak veya fotofosforilasyonda demir kanallarınının düzenlenmesinde görev alırlar (Pietta ve

Simonetti, 1999). Ayrıca fotosentetik elektron taşıma zinciri sırasında oluşan reaktif oksijen türlerinin (ROS) temizlenmesine katkıda bulunurlar. Ultraviyole (UV) ışığı soğurdukları için UV stresi kaynaklı oluşabilecek ROS'u da zararsız hale getirmede etkilidirler. Bitkilerdeki görevlerinin dışında flavonoitler insan beslenmesinde önemli bileşenlerdir fakat genellikle besin maddesi olarak kabul edilmezler. Buna rağmen beslenme yoluyla flavonoitlerin günlük alım seviyesi (50-800 mg) C vitamini (70 mg), E vitamini (7-10 mg) ve karotenoitler (β-karoten, 2-3 mg) ile karşılaştırıldığında oldukça yüksektir. Flavonoitler güçlü ROS temizleyici aktivitelerini insan vücudunda da gösterirler. Örneğin; süperoksit anyonunun üretiminden sorumlu olan ksantin oksidaz ve protein kinaz C gibi enzimlerin inhibisyonunu sağlarlar. Ayrıca flavonoitlerin ROS üretiminde rol oynayan diğer enzimler olan siklooksijenaz, lipooksijenaz, mikrozomal monoksijenaz, glutatyon S-transferaz, mitokondriyal sukkinsoksidaz ve NADH oksidazı inhibe ederler (Ursini ve diğ., 1994). Bu sayede insan vücudunda ROS kaynaklı oluşabilecek hücre hasarına karşı da koruma sağlarlar. Fabaceae türleri için literatürde raporlanan flavonoitler *Desmodium adscendens* için yaprakta 2,76 sürgünde ise 2,58 mg/g bitki örneği olarak (Ayoola ve diğ., 2018), çeşitli *Onobrychis* türlerinin polenlerinde 21,49±0,52 mg kateşin eşdeğeri (CAE) /100 g olarak (Temizer ve diğ., 2017), *Lathyrus sativus* tohumlarında varyeteye bağlı olarak 13,91-26,51 kuersetin eşdeğeri (QE) mg / 100 g aralığında (Rathi ve diğ., 2018), *Lathyrus aureus* ve *Lathyrus pratensis*'in toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstraktlarda en yüksek flavonoit miktarı su ekstraktında türler için sırasıyla 15 ve 37 mg rutin eşdeğeri (RE) / g ekstrakt olarak bulunmuştur (Llorent-Martínez ve diğ., 2016). Literatürdeki sonuçlardan da görüleceği üzere çeşitli araştırmacılar flavonoitleri birim miktar üzerinden verirken farklı flavonoit türlerinin eşdeğerleri olarak belirtmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise birim flavonoit kuersetin üzerinden bildirilmiştir. Buna göre en yüksek flavonoit miktarı *L. laxiflorus* yapraklarının metanolik ekstraktından elde edilmiştir. Bu çalışmaya konu olan bitkilerin gıda olarak kullanılabilirliği bulunmamaktadır. Buna rağmen konsantre edilmemiş ve fraksiyonlanmamış ham ekstraktan elde edilen sonuçlar *L. laxiflorus*'un metanolik ekstraktlarının saflaştırılması veya ekstraksiyon metodunun optimize edilmesinden sonra bu bitkinin ortalama bir flavonoit kaynağı olarak değerlendirilebileceğini önermektedir.

4.1.3. Toplam antioksidan aktivite

Serbest oksijen radikalleri ve türevleri Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, otizm, artrit, diyabet, kanser, katarakt, iskemi ve karaciğer bozuklukları gibi farklı nörodejeneratif gelişim bozukluklarını ortaya çıkarabilmektedirler (Giles ve Jacob, 2002). Biyolojik bir sistemde serbest oksijen radikalleri normal olarak hücresel metabolik olayların yan ürünleri olarak ortaya çıkarlar ve iyon taşınmasında, hücresel sinyallerin iletiminde, gen ekspresyonunda ve apoptozda hayati role sahiptirler (Vajragupta ve diğ., 2004). İnsan vücudunda ROS'un başlıca üretim yerleri endotel hücreleri, fagositik hücreler, çekirdekler, endoplazmik retikulum, mikrozomlar ve mitokondrilerdir. ROS'un hücrelerde neden olduğu oksidatif hasarın etkilerini azaltmak veya bunu engellemek için serbest radikal temizleme, metal şelatlama ve serbest radikalleri enzimatik olarak etkisiz hale getirme gibi çeşitli mekanizmalar gelişmiştir. Bu mekanizmalar kimi durumlarda ROS'un zararlı etkilerini yatıştırmada yeterince etkili olmayabilirler. Bu nedenle insan vücudunda antioksidanlara olan ihtiyaç daha belirgin olarak ortaya çıkmaktadır (ul Haq ve diğ., 2019). Bitkiler zengin antioksidan kaynaklarıdır ve bu antioksidanlar vücudun antioksidan savunma kapasitesine katkıda bulunarak inme, kalp hastalıkları ve kanser gibi hastalık risklerini azaltabilir. Bitkilerdeki bilinen antioksidanlar çoğunlukla flavonoitler ve fenolik maddelerdir (Rice-Evans, 2004). Günümüzde yaygın olarak kullanılan BHA, BHT ve tert-bütil hidrokinon (TBHQ) gibi çeşitli sentetik antioksidanlar bulunmaktadır. Özellikle BHA ile deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalar bu kimyasalın ratlarda mide kanseri gibi çeşitli yan etkilerinin olabileceğini ortaya koymuştur (Ito ve diğ., 1983). Bu nedenle doğal antioksidanlara ve bunların bitkisel kaynaklarına olan ihtiyaç artarak devam etmiştir. Bitkilerin antioksidan potansiyellerini belirlemek için yapılan çalışmalarda sonuçlar IC_{50} değeri hesaplanarak veya ekstraktlar standart antioksidan maddelerle kıyaslanarak toplam radikal süpürücü aktivite (RSA) yüzdesi olarak verilmektedir. Sarwar ve diğ. (2015) 0,5 mg/ml konsantrasyondaki çeşitli *Quercus incana* esktraktlarının antioksidan aktivitelerini BHA ile kıyaslamışlar ve BHA, n-bütanol ve etil asetat ekstraktlarının %RSA değerlerini sırasıyla %89,56, %64,85 ve %58,89 olarak bildirmişlerdir. Capecka ve diğ. (2005) ise *Melissa officinalis*, *Origanum vulgare* ve *Mentha* × *piperita* üzerine yaptıkları çalışmada aseton ekstraktların %RSA değerlerini sıracıyla

%95, %95 ve %84 olarak verilmiştir. Bu tez çalışmasında ise %RSA değerlerinde konsantrasyona bağlı bir artış görünse de en etkili ekstrakt su olarak bildirilmiştir. Ayrıca 0,5 mg/ml konsantrasyondaki su ekstraktları için tüm bitkilerin aktioksidan aktiviteleri sentetik antioksidanlardan daha fazla bulunmuştur. Bu sonuçlar incelenen *Lathyrus* türlerinin su ekstraktlarının doğal antioksidanlara yakın bir antioksidan aktivitesinin olduğunu göstermektedir. Diğer kimyasal ekstraktlarda sonuçların önemli ölçüde düşük çıkmasının nedeni ise doğal maddelerin yapısının bu kimyasallar nedeniyle bozulabilir olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.1.4. DPPH temizleyici aktivite

DPPH azot köprüsünün bir atomunda eşleşmemiş bir değerlik elektronuna sahip kararlı bir serbest radikaldir (Berber ve diğ., 2013). Reaksiyon karışımının absorbansındaki bir azalma, test edilen bileşik veya ekstraktın serbest radikal süpürücü aktivitesini gösterir (Krishnaiah ve ark., 2011). Üç Fabaceae türünün çiçek ve yapraklarında (*Bauhinia kockiana, Caesalpina pulcherrima* ve *Cassia surratensis*) bildirilen IC_{50} değerleri, 0,027 ila 0,118 mg / ml arasında değişmektedir (Chew ve diğ., 2009). Benzer şekilde, iki Fabaceae türünün yapraklarında yapılan çalışmada *Platypodium elegans*'ta IC_{50} değeri 184,92 µg / ml ve *Pseudopitadenia concorta*'da 13,84 µg / ml olarak elde edilmiştir (Mensor ve diğ., 2001). Godevac ve diğ. (2008) ise çalıştıkları çeşitli Fabaceae türlerinde IC_{50} değerlerini 13,19 ila 156,98 µg / ml arasında belirlenmiştir. Sabudak ve diğ. (2009) ise beş farklı *Trifolium* türünün oldukça zayıf radikal temizleme kapasitesine sahip olduğunu (inhibisyon değeri % 2,39 – 27,22) bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada *Glycyrrhiza echinata*'nın topraküstü ve kök kısımlarında IC_{50} değerleri sırasıyla 453,94 ve 184,99 µg / ml olarak bildirilmiştir (Cakmak ve diğ., 2012). Berber ve diğ. (2013) *Adenocarpus complexatus*'un DPPH temizleme aktivitesini meyvelerde ve karışık bitki materyalinde sırasıyla IC_{50}= 843,38 ve 474,95 µg / ml olarak tespit etmiştir. Bu değerler sentetik antioksidan standardı BHT (34,061 µg / ml) ile karşılaştırıldığında, metanol ekstraktlarının serbest radikal temizleyici olarak sentetik antioksidandan daha az etkili olduğu bulunmuştur. *Psoralea glandulosa*'da yapılan çalışmada yaprak ekstraktlarının DPPH süpürme aktivitesinin IC_{50} için 1.00 mg / ml ile 1.61 mg / ml konsantrasyonları aralığında olduğu gösterilmiştir (Madrid ve diğ., 2012). Bu tez çalışmasında ise *L. laxiflorus* türünün yaprak metanolik ekstraktlarının IC_{50} değeri

0,89 mg / ml (892 µg / ml) olarak belirlenmiştir. Çalışılan diğer bitkiler ise IC_{50} değerlerini 1 mg / ml konsantrasyonun üzerinde yakalamışlardır. Bu çalışmada elde edilen DPPH temizleyici aktivite değerleri %RSA olarak verilmiştir. Dolayısıyla IC50 değerleri %RSA değerlerinin oranlanmasıyla bulunabilir. Bu şekilde yapılan bir hesaplamada *L. undulatus*'un IC_{50} değeri 1,12 mg / ml, *L. nissolia*'nın IC_{50} değeri ise 1,39 mg / ml olarak belirlenebilir. BHT'nin IC_{50} değeri ise aynı grafikten 0,21 mg / ml olarak hesaplanabilir. Bu veriler ışığında *L. laxiflorus*'un yapraklarının saflaştırılmamış ve fraksiyonlanmamış ham metanolik ekstraktları sentetik bir antioksidan olan BHT'nin yaklaşık ¼'ü kadar DPPH indirgeyici aktivite göstermektedir. Bu sonuca ekstraksiyon ve saflaştırma yöntemleri etki edebilir.

4.1.5. Toplam indirgeyici güç aktivitesi

İndirgeyici güç aktivitesi, antioksidanın reaktif radikallerin azaltılması için elektronlarını verebilme kapasitesine bağlı sahip olduğu antioksidan aktivite ile ilgilidir. İndirgeyici güç aktivitesi antioksidanların elektron verme kabiliyetine dayanmaktadır (Llorent-Martínez ve diğ., 2017). Toplam indirgeyici güç aynı zamanda ferrik indirgeyici antioksidan güç (FRAP) analizi olarak da anılmaktadır. Çünkü antioksidanların varlığına bağlı olarak Fe^{+3}/ferrisiyanit kompleksi Fe^{+2} formuna indirgenir (Amarowicz ve diğ., 2004). Böylece, antioksidanların antioksidatif potansiyelleri hakkında bilgi vermek için indirgeyici güç aktivitelerinin kıyaslanması tercih edilir (Duan ve diğ., 2007). Tanaka ve diğ. (1998) bitki ekstraktlarının indirgeyici gücünün antioksidan kapasiteleri ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Literatürde ise *Fabaceae* türlerinin iyon indirgeyici gücü hakkında çalışma sayısı sınırlıdır. *Adenocarpus complexatus*'un ferrik iyon indirgeme gücü değerleri EC_{50} olarak belirlenmiş ve meyve ve toprak üstü kısımlardan elde edilen ekstraktta sırasıyla EC_{50} değeri olarak 871,25 ± 100,28 ve 901,25 ± 13,97 µg / ml tespit edilmiştir (Berber ve diğ., 2013). *Glycyrrhiza echinata*'nın toprak üstü ve kök kısımlarından elde edilen ferrik indirgeme gücü EC_{50} sırasıyla 432,63 ± 9,93 ve 582,14 ± 2,35 µg / ml olarak raporlanmıştır (Cakmak ve diğ., 2012). Llorent-Martínez diğ. (2017) *Lathyrus* cinsleri ile yaptıkları çalışmada *L. cicera*'da indirgeyici güç aktivitelerini 40 mg trolox eşdeğeri (TE) / g KA ve *L. digitatus*'ta ise 58 mg TE / g KA olarak bulmuştur. Bununla birlikte, verilerin değerlendirilmesinde birimsel değil absorbansa dayalı değerlendirme daha yaygındır. Özellikle birim

zamanda okutulan örneğin 700 nm'deki absorbansının artış miktarı bize o ekstraktın indirgeyici gücü hakkında bilgi vermektedir. Verilerin bu şekilde değerlendirildiği çalışmaların birinde birçok *Thymus* türünün indirgeyici güç aktiviteleri kıyaslanmış ve birim zamanda örnekteki absorbansı en fazla arttıran *T. daenensis* ekstraktının indirgeyici gücünün en yüksek olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Tohidi ve diğ., 2017). Bu tez çalışmasında incelenen *Lathyrus* türleri indirgeyici güç aktivitelerine göre yüksekten düşüğe sıralandığında *L. laxiflorus, L. nissolia* ve *L. undulatus* olarak bulunmuştur. *L. laxiflorus* incelenen diğer türlere göre daha güçlü indirgeme kabiliyeti sergilemiştir. *L. laxiflorus*'un nispeten daha yüksek bu indirgeyici gücü, bu bitkide mevcut olan yüksek fenolik seviyesiyle ilişkili olabilir. Bulgular, fenoliklerin birkaç radikalin redüksiyon sürecinde ana rol oynadığını doğrulayan önceki çalışmalarla uyumludur (Zugic ve ark., 2014). Elde edilen bu sonuç bitkilerden elde edilen DPPH radikali temizleme aktivitesi ile benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte farklı konsantrasyondaki örneklerin arasındaki absorbans farkının düşük olması örneklerin spektrofotometrik ölçüm limitlerinin içinde kalması için seyreltilerek ölçülmesi ile ilgilidir.

4.1.6. Klorofil ve karotenoit içeriği

Bitkiler ve özellikle yenilebilir özellikte olanlar, insan sağlığında önemli bir biyolojik rol oynayan karotenoidler ve pigmentler açısından zengindir. Lutein, karotenler ve klorofillerin yaygın olarak tüketilen sebzelerde yüksek miktarlarda bulunduğu bulunmuştur (Zeb, 2017). Sebzelerden elde edilen bu karotenoidler görmede, cilt bakımında ve insan vücudunda antioksidan olarak gereklidir (Robert ve diğ., 2009). Benzer şekilde, klorofiller insanlarda güçlü anti-kanserojenik etki göstermek (Dashwood, 2009) gibi çeşitli önemli fonksiyonları vardır. Ayrıca bu pigmentler hidrojen peroksit kaynaklı DNA hasarına karşı koruma sağlar (Hsu ve diğ., 2005). Klorofil ve türevleri insan serum albümini ile kompleksler oluşturur ve sonuç olarak radyasyon ve kimyasal alımına bağlı toksisite sırasında koruma sağlar. Bu nedenle, yenilebilir yapraklı sebzelerde karotenoidlerin ve pigmentlerin belirlenmesi, modern bitki ve gıda kimyasında ilginç bir konudur. *Brassica campestris, B. rapa, B. juncea, Malva neglecta* ve *Spinacia oleracea*'nin klorofil ve karotenoit içeriklerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada klorofil-a içerikleri en yüksek *B. campestris*'te, klorofil-b içerikleri ise en yüksek *B. juncea*'da bulunmuştur. Karotenoitler ise toplam

olarak değil ayrı değerlendirilmiştir. En yüksek karotenoit lutein olarak ıspanakta tespit edilmiştir (Zeb, 2017). İki farklı *Cistus* türünde yapılan bir çalışmada pigment içeriği ile DPPH indirgeme aktivitesinin korelasyon gösterdiği bulunmuştur (Mahmoudi ve diğ., 2016). Benzer bir çalışmada Amrani-Allalou ve diğ. (2019) *Pallenis spinosa*'nın yaprağı ekstresinin karotenoit ve klorofil içeriğinin antioksidan aktivitesi ile pozitif korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise antioksidan aktivite ile bitkilerin pigment içerikleri arasında benzer bir korelasyon yoktur. Önceki çalışmalar göstermektedir ki *Thymus* türlerinde olduğu gibi bitkilerin antioksidan potansiyeli sadece sahip oldukları pigmentlere ve esansiyel yağlara bağlı olmayıp aynı zamanda içerdikleri fenolik bileşiklerin aromatik halkalarındaki hidroksil grubunun durumu ile de alakalı olabilir (Jabri-Karoui ve diğ., 2012).

4.2. FTIR Çalışmaları

Fenolik bileşikler, çeşitli kimyasal yapılara sahip sekonder bitki metabolitleridir. Kimyasal yapılar bir veya daha fazla hidroksil grubu bağlı en az bir benzen halkasından oluşur. Yapılarına bağlı olarak eterler ve karboksilik asitler gibi diğer fonksiyonel gruplar da bağlanabilir (Shahidi ve Naczk, 2004). Bitkilerin besin değerleri veya fenolik bileşikeri çoğunlukla HPLC ve kolorimetrik metotlarla belirlenmektedir. Bu teknikler spesifik bir bileşiği veya bileşik ailesini hedefleyen, zaman alıcı, pahalı ve önemli miktarda çözücü gerektiren tekniklerdir (Ceymann ve diğ., 2012). Buna karşın FTIR spektroskopisi bu gibi ikincil metabolitlerin görece miktarlarının belirlenmesinde ve varlığının saptanmasında hızlı ve pratik bir çözüm sağlayabilir. Literatürde FTIR aracılığıyla fenolik bileşiklerin belirlenmesini konu alan çok az sayıda makale bulunmaktadır. Bu makalelerden dikkat çekici olanları *Lavandula officinalis*'in hücre süspansiyon kültürlerinde rosmarinik asitin belirlenmesi (Stehfest ve diğ., 2008), *Herba epimedii* (*Epimedium* cinsinden birkaç farklı otun karıştırılmasıyla oluşturulan geleneksel bir alternatif Çin tıbbı ilacı) karışımları içinde bir flavonol glikozit olan icariin tespiti (Pei ve diğ., 2008), avokado ile mango gibi egzotik bitkilerin biyoaktivitelerinin belirlenmesi (Gorinstein ve diğ., 2010) ve kurkuminin karakterizasyonu (Mangolim ve diğ., 2014) üzerinedir.

FTIR çalışmalarında elde edilen verilerde frekans aralıkları ve bu frekanslardaki piklerin sahip olduğu absorbanslar dikkate alınır. Dolayısıyla öncelikle hangi frekans aralığının hangi moleküler titreşimleri yansıttığı bulunmalıdır. Bu amaçla literatür verilerinden derlenmiş moleküler titreşimlerin hangi frekanslarda tespit edildiğini gösteren bilgiler Tablo 4.1.'de verilmiştir. Tabloda da belirtildiği gibi 2917 - 2921 ve 2848 - 2850 cm^{-1} frekans aralıklarındaki titreşimsel hareketler lipit, protein ve mumsu maddelerden kaynaklanan CH_2 asimetrik ve simetrik gerilmeleri temsil etmektedir (Renuka ve diğ., 2016; Acemi ve diğ., 2016). İncelenen bitki örneklerinde görülen bu bantlar fenolik bileşiklerle doğrudan ilgili olmasa dahi spektrumda oldukça yüksek absorbans değerleriyle ifade edildikleri için genel bir moleküler değerlendirme açısından ele alınmışlardır. Spektrumlardan hesaplanan çeşitli piklere ait absorbans değerleri bu piklerin köken aldığı moleküllerin miktarına işaret etmektedir (Türker-Kaya ve Huck, 2017). Buna karşın bu miktar bilgisi birimsel olarak değil sadece diğer biyomoleküller ile karşılaştırmalı olarak verilmektedir. Bu bağlamda veriler incelendiğinde *L. undulatus*'un gövde örneklerinde lipit, protein ve mumsu madde içeriklerinin diğer *Lathyrus* örneklerinden daha yüksek olduğu bulunmaktadır. Anılan bu biyomoleküllerin miktarının en az olduğu gövdeye sahip bitki türü ise *L. laxiflorus* olarak görülmektedir. Fakat bu fark oldukça küçük boyuttadır. Yaprak örneklerinde ise durum gövdedekinden farklı bulunmuştur. *L. laxiflorus*'un yaprak örnekleri anılan biyomoleküllerce diğer iki bitkden daha zengindir. Buna karşın *L. undulatus*'un yaprakları bu biyomoleküllerin yoğunluğu açısından üç bitki arasında en düşük değerleri vermişlerdir.

Lipitler ve klorofillerde bulunan karbonil gruplarındaki C=O gerilmelerinden ve fenolik asitlerdeki α, β-doymamış karboksilik asit C=O gerilmelerinden kaynaklanan titreşimsel hareketler 1736 - 1740 cm^{-1} frekans aralığında kaydedilmiştir (Suresh ve diğ., 2016; Abbas ve diğ., 2017). Buna göre incelenen bitkilerdeki gövde örneklerinin bu biyomoleküllerce daha zengin olduğu çıkarımı yapılabilir. Buna rağmen spektroskopi temelli deneylerdeki klorofil ve fenolik madde miktarları göze alındığında bu bandın spesifik olarak bu maddeleri simgelemediği ve örneklerdeki membran lipit miktarının bu bantlara yaptığı katkının daha fazla olabileceği söylenebilir. Peaucelle ve diğ. (2011)'e göre FTIR spektrumunda fenolik madde kaynaklı titreşimler hemiselülozlar, lignin, protein ve pektik polisakkaritler gibi

kovalent bağlarla birbirine bağlı ve yakından ilişkili birçok bitki hücre duvarı bileşenlerinin varlığından etkilenebilir.

İncelenen 1625 - 1670 cm^{-1} frekans aralığında ise flavonoit kaynaklı aromatik halkalardaki C=O gerilimi gözlenmektedir. Bu alanda en belirgin pik 1650 – 1655 cm^{-1} aralığında gözlenmiştir. Buna göre flavonoit miktarı açısından *L. laxiflorus* türünün hem yaprak hem de gövdeleri diğer bitki örneklerine göre daha zengin olabilir. *L. nissolia*'da ve *L. undulatus* yapraklarında bu bandın absorbansı oldukça düşüktür. Buna karşın 1625 - 1670 cm^{-1} aralığındaki tüm pikler hesaplamaya dahil edildiklerinde de dahi flavonoit içerik sıralamaları değişmemektedir. Bu sonuçlar diğer biyokimyasal deneylerin sonuçlarını teyit etmektedir.

Bitki dokularında lignini işaret eden ana frekans aralığı 1510 - 1515 cm^{-1} olarak, 1430 – 1640 cm^{-1} frekans aralığı fenoliklerde 6 bileşenli aromatik halkalardaki C=C gerilmesini ve 1470-1435 cm^{-1} frekans aralığı ise fenolik asitlerdeki metoksi asimetrik & simetrik gerilme ve –C-H deformasyonunu belirtilmektedir. İlk aralık lignindeki guayasil halkası ve ligninin genel fenolik iskeletindeki fenolik yapılarındaki C=C gruplarının gerilimini ifade etmektedir (Dokken ve Davis, 2007). Bu bantta en belirgin absorbans ve en keskin pik 1460-1465 aralığında gözlenmiştir. İncelenen bu bantta bitkiler arasında belirgin bir fark olmamakla birlikte gövde örneklerinin absorbansları yapraklara oranla daha yüksek bulunmuştur. Bunun nedeni gövde örneklerindeki yüksek ligninleşme olabilir. Ligninleşme odunlaşma olarak da ifade edilmekte ve bitkinin fiziksel yükünün büyük bölümünü taşıyan gövdelerde daha yüksek oranda görülmektedir.

Tablo 4.1. Spektrumların analizinde odaklanılan bantlar ve temsil ettikleri moleküler gruplar

Bant No	Frekans (cm^{-1})	Açıklama	Kaynak
1	2917 - 2921	CH_2 asimetrik gerilme: çoğunlukla lipitler, protein	Renuka ve diğ., 2016; Suresh ve diğ., 2016
2	2848 - 2850	CH_2 simetrik gerilme: lipit, protein ve mumsu maddeler	Renuka ve diğ., 2016; Suresh ve diğ., 2016
3	1735 - 1755	Karbonil C=O gerilme: lipitler, klorofil (1736-1740)	Suresh ve diğ., 2016
		Fenolik asitlerde α,β-doymamış karboksilik asit C=O gerilme	Abbas ve diğ., 2017
4	1625 - 1670	Flavonoitlerde aromatik C=O gerilme	Abbas ve diğ., 2017
		C=C fenolik gerilme: ligninin guayasil halkası (1510-1515)	Dokken ve Davis, 2007
5	1430 - 1640	C=C aromatik halkada gerilme: 6 bileşenli aromatik halkalar ve lignin	Türker-Kaya ve Huck, 2017; Abbas ve diğ., 2017
		Metoksi asimetrik & simetrik gerilme ve –C-H deformasyonu (1470-1435)	Palacio ve diğ., 2014, Abbas ve diğ., 2017
6	1380 - 1385	Fenolik asitlerde OH deformasyonu (1380-1280)	Abbas ve diğ., 2017; Türker-Kaya ve Huck, 2017
7	1190 - 1075	Fenolik asitlerde C-O gerilme	Abbas ve diğ., 2017; Türker-Kaya ve Huck, 2017
8	1120 - 1020	Fenolik asitlerde alkil-aril eter C-O gerilme Taninlerde metoksi C–O halkası gerilme (1100-950)	Lammers, 2008; Abbas ve diğ., 2017Türker-Kaya ve Huck, 2017

Fenolik asitlerde OH deformasyonu 1380-1280 cm^{-1} frekans aralığında gözlenmektedir (Abbas ve diğ., 2017; Türker-Kaya ve Huck, 2017). Bu aralıktaki en belirgin absorbans 1380-1385 cm^{-1} bandında gözlenmiştir. Burada bulunan piklerin abrosbansları bitkiler arasında aynı denilecek kadar birbibine yakındır. Dolayısıyla örnekler arasında moleküler yapısında OH deformasyonu bulunan fenolik asit miktarları birbirine yakındır. Bu yorumu 1190 – 1075 cm^{-1} frekans aralığında gözlenen fenolik asitlerde C-O gerilmelerinden kaynaklı absorbanslar da destemektedir. Bu bantta ise en belirgin pikler 1104 -1107 cm^{-1} aralığında bulunmuştur. Elde edilen absorbans değerleri ise neredeyse aynıdır.

Odaklanılan bir diğer frekans aralığı 1120 – 1020 cm^{-1} olarak belirlenmiştir. Bu aralık fenolik asitlerde alkil-aril eter C-O gerilmelerini ve kısmen taninlerdeki metoksi C–O halkası gerilmesini (1100-950 cm^{-1}) içermektedir (Lammers, 2008; Abbas ve diğ., 2017Türker-Kaya ve Huck, 2017). Örneklerde bu aralıktaki en belirgin pikler 1035 -1045 cm^{-1} arallığında kaydedilmiştir. Buna göre *L. undulatus* yapraklarındaki tanin içeriği diğer örneklere göre daha fazla olabilir. HPTLC analizinde *L. undulatus*'da taninler belirgin şekilde gözlenmemiştir. Fakat bu durum ekstraksiyon yönteminin ve çözücünün değiştirilmesi veya ekstraktın konsantre edilip saflaştırılması yoluyla değiştirilebilir.

4.3. HPTLC Analizi

Bitkilerden biyoaktif bileşiklerin ayrılması, saflaştırılması ve tanımlanması için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunların arasında TLC karmaşık bitki ekstraktlarından antioksidanların ve antimikrobiyal maddelerin hızlı tespiti ve ayrılması için ideal, kullanışlı ve basit bir yöntemdir (Soberon ve diğ., 2010). Bitkisel ilaçların standardizasyonu günümüzde bitkisel tıbbın gelişigüzel kullanımı nedeniyle daha fazla dikkat çeken önemli bir alandır. Bu bağlamda, kromatografik parmak izi profillerinin tıbbı bitkilerde kalite değerlendirmesi için çok basit, uygun ve etkili olduğu gösterilmiştir (Chen ve diğ., 2006). Düşük maliyetinin avantajları, analiz süresi ve dijital tarama ile görüntü yakalama özelliği birleştiğinde HPTLC tekniği ile bitkilerin kromatografik parmak izlerinin çıkarılması değerli biyokimyasalların tanımlanması için daha uygundur (Annegowda ve diğ., 2012). HPTLC plakalarında analitlerin R_f değerleri 0 ile 1 arasında bir sayı olarak ifade

edilir. Bu tez çalışmasında ise HPTLC plakalarında standart olarak kuersetin, katehin ve gallik asit kullanılmıştır. Bu standartların R_f değerlerine oranla analitler içinden ayrışan bantlarda örnekler içindeki katehin türevleri, kuersetin ve gallik asit belirlenmiştir. Bunların yanında koyu renkle görünen ve her üç bitki örneğinde de raslanan bandın HPLC verilerinden de anlaşılacağı üzere klorojenik asit olduğu değerlendirilmiştir. HPLC analizinde bu tez çalışmasında kullanılmayan standartların da kullanılmasıyla HPTLC plakalarında gözlenen yoğun renkli ara bantların da ifade etikleri fenolik bileşenler bulunabilir. HPTLC analizinden görüleceği üzere flavonoitler ve taninler için boyanan plakalar HPLC analizinde görülmeyen 4 adet daha fenolik maddenin varlığını göstermektedir. Dolayısıyla yapılan HPTLC analizi HPLC analizinde daha fazla standart kullanılmasını önermektedir.

4.4. HPLC Analizi

Fenolik bileşikler, hem yenilebilir hem de yenilebilir olmayan bitkilerde yaygın olarak bulunur ve antioksidan aktivite de dahil olmak üzere çoklu biyolojik etkilere sahip oldukları bildirilmiştir. Fenolik bileşiklerin birçok farmakolojik etkisi, güçlü antioksidanlar gibi davranma yetenekleri ile bağlantılıdır (Sathyaprabha ve diğ., 2011). Bu bileşikler, normal gelişim sırasında ve enfeksiyon, yaralanma ve UV radyasyonu gibi stres koşullarına yanıt olarak bitkiler tarafından sentezlenen ikincil metabolitler olarak kabul edilir (Naczk ve diğ., 2004). Fenolik bileşikler bitkilerin tüm organlarında bulunur. Fenilalanin ve tirosinden türetilmiş çok çeşitli bir fitokimyasal grup olan fenolik bileşikler içerdikleri fenol halkalarının sayısının bir fonksiyonu olarak ve bu halkaları bir birine bağlayan yapısal elementlere dayanarak farklı gruplara sınıflandırılabilirler (Chirinos ve diğ., 2009). Böylece fenolik asitler (örn. hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asitler), stilbenler, kumarinler, tanenler, lignanlar, ligninler ve flavonoidler arasında ayrımlar yapılır (Chirinos ve diğ., 2009). HPLC-DAD dedektör ile yüksek performanslı sıvı kromatografisi, çok yönlülüğü, hassasiyeti ve nispeten düşük maliyeti nedeniyle fenolik bileşiklerin karakterizasyonu için önemli ve güvenilir bir tekniktir (Parejo ve diğ., 2004). En sık olarak, ters fazlı C_{18} kolonları, asitlendirilmiş su içeren bir ikili çözücü sistemi ve bir polar organik çözücü (asetonitril veya metanol), UV-Vis DAD dedektör bitki fenolik bileşiklerinin analizinde şimdiye kadar rutin olarak kullanılan çok önemli ve

güvenilir bir araçtır (Naczk ve diğ., 2004). Aslında, farklı fenolik sınıflardan spektrumlar (hidroksisinamik, hidroksibenzoik ve flavonoitler), numunelerde bulunan fenolik yapıların tanımlanmasına izin verir (Chirinos ve diğ., 2009).

Thomson çekirdeksiz üzüm (*Vitis vinifera*) yapraklarındaki bazı fenolik bileşikler ve ortalama konsantrasyonları; gallik asit 362 mg kg^{-1} (ppm), vanilik asit 4,72 mg kg^{-1}, kafeik asit 4,25 mg kg^{-1}, rutin hidrat 239,80 mg kg^{-1}, kuersetin hidrat 3,34 mg kg^{-1}, kuersetin 2,64 mg kg^{-1}, kateşin 0,58 mg kg^{-1} olarak bildirilmiştir (Taware ve diğ., 2010). *Cytitus multiflorus*'ta (Fabaceae) etanolik ekstraktlarda tanımlanan bileşikler ve miktarları; 2''-O-pentosyl-6-C-hexosyl-luteolin 3,3 ± 0,5, 2''-O-pentosyl-8-C-hexosyl-luteolin 3,5 ± 0,3, Orientin 0,8 ±0,1, 2''-O-pentosyl-8-C-hexosyl-apigenin 0.5 ± 0,1, 2''-O-pentosyl-6-C-hexosyl-apigenin 0,9 ± 0,1, rutin 4,5 ± 0,7, 6''-O-(3-hydroxy-3-methylglutaroyl)-2''-O-pentosylC-hexosyl-apigenin 3,6 ± 0,7, Apigenin-7-O-glucoside 0,8 ± 0,1, Chrysin-7-O-b-D-glucopyranoside 15,9 ± 2,3, Chrysin izomeri dihidroksiflavon 7,0 ± 1,3, Apigenin 0,5 ± 0,1, chrysin 0,5 ±0,1 mg/g kuru bitki olarak rapor edilmiştir (Pereira ve diğ., 2012).

Bu tez çalışmasına ise kullanılan analitik standartlar dahilinde *L. laxiflorus*'ta; klorojenik asit, kafeik asit, epikatehin, rutin, kuersetin ve apigenin, *L. undulatus*'ta gallik asit, klorojenik asit, epikatehin, rutin, kuersetin ve apigenin, *L. nissolia*'da gallik asit, klorojenik asit, kafeik asit, epikatehin, rutin, luteolin ve apigenin fenolik bileşikleri bulunmuştur. Çalışmamızda üç bitki türünde de hesperidin tespit edilememiştir. Ayrıca luteolin sadece *L. nissolia*'da tespit edilmiştir. *L. laxiflorus*'ta gallik asit, *L. undulatus*'ta ise kafeik asit tespit edilmemiştir. Çalışmamızda en fazla fenolik madde miktarı *L. laxiflorus*'ta 36,6 ppm rutin fenolik bileşiğidir. Ardından yine *L. laxiflorus*'ta 19,6 ppm ile klorojenik asittir. Bu miktarlar HPLC cihazına enjekte edilen ekstraktın konsantrasyonu ile önemli ölçüde değişebilir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Son zamanlarda, beslenme ile alınan fenolik bileşiklerin gıdalardaki kompozisyonu daha yaygın olarak incelenmiştir. Halliwell (2012) "mega doz" antioksidanların (yani hapların) tüketilmesinin, kısmen *in vivo* olarak oksidatif hasarı azaltmadıkları için insan hastalıklarını önlemede "genellikle başarısız olduğunu" belirtmiştir. Bireysellik (genetik, cinsiyet, vücut kitle indeksi) ve yaşam alışkanlıkları (egzersiz, uyuşturucu / alkol kullanımı ve sigara içmek) de insanların oksidatif hasar durumlarında önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle insan vücudundaki oksidatif hasarın azaltılması için yüksek antioksidan içeren besinlerin tüketilmesi veya sağlıklı bir beslenme düzeni tekbaşına yeterli olmayabilir. Doğal gıda tüketimi veya takviye edici ürün kullanımının yanısıra kötü yaşam alışkanlıklarının azaltılması ve kilo kontrolü de oldukça önemlidir.

Fenolik bileşikler serbest radikallerin neden olduğu reaksiyonları engelleyerek kanser, diyabet, Alzheimer, parkinson ve kalp hastalıkları gibi pek çok hastalığın oluşumuna engel olur. Fenolik bileşik açısından zengin olan *Lathyrus* türlerinin bu etkinliği farklı ekstraksiyon ve saflaştırma yöntemleriyle artırılabilir. Ayrıca bu türler üzerinde antimikrobiyal etkinlik çalışması gerçekleştirilip, antibakteriyel ve antifungal etkinliğe sahip olup olmadığı incelenebilir. Bu çalışmada fenolik bileşik olarak *Lathyrus laxiflorus* ve *Lathyrus nissolia*'da kafeik asit bulunmuştur. Kafeik asit fenetil esteri (KAFE) de beyinde Ca^{++} ile indüklenen mitokondrial sitokrom C serbestleşmesini azaltarak hem nöron ölümünü hem de hipoksinin yol açtığı enflamasyonu önlediği saptanmıştır. *Lathyrus undulatus*'un halk arasında toprak üstü kısımlarının zayıflama amaçlı kullanıldığı kaynaklarda yer almaktadır. Fakat herhangi bir çalışma ile desteklenmemektedir. Son zamanlarda klorojenik asit yönünden zengin olan yeşil kahve'nin kalp ve damar sağlığını desteklediği ve yine içeriğindeki klorojenik asit sayesinde belli düzeyde yağ yakımını hızlandırıcı etki gösterdiği bildirilmiştir. *Lathyrus* türleri içerisinde fazla miktarda olan klorojenik asit bu açıdan da değerlendirilip çalışmalar bu yönde ilerletilebilir.

KAYNAKLAR

Azzi A., Davies K. J. A., Kelly F., Free Radical Biology Terminology and Critical Thinking, *FEBS Lett*., 2004, **558**, 3-6.

Abbas O., Compere G., Larondelle Y., Pompeu D., Rogez H., Baeten V., Phenolic Compound Explorer: A Mid-infrared Spectroscopy Database, *Vibrational Spectroscopy*, 2017, **92**, 111-118.

Abderrahim F., Huanatica E., Segura R., Arribas S., Gonzalez M. C., Condezo-Hoyos L., Physical Features, Phenolic Compounds, Betalains and Total Antioxidant Capacity of Coloured Quinoa Seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.) from Peruvian Altiplano, *Food Chemistry*, 2015, **183**, 83-90.

Acemi A., Türker-Kaya S., Özen F., FT-IR Spectroscopy Based Evaluation of Changes in Primary Metabolites of *Amsonia orientalis* After *in vitro* 6 benzylaminopurine Treatment, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 2016, **44**(1), 209-214.

Adlercreutz H., Mazur W., Phyto-oestrogens and Western Diseases, *Ann Med*, 1997, **9**, 95-120.

Amrani-Allalou H., Boulekbache-Makhlouf L., Mapelli-Brahm P., Sait S., Tenore G. C., Benmeziane A., Kadri N., Madani K., Martinez A.J.M., Antioxidant Activity, Carotenoids, Chlorophylls and Mineral Composition from Leaves of *Pallenis spinosa*: An Algerian Medicinal Plant, *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 2017, 2017-0081.

Anandjiwala S., Bagul M. S., Parabia M., Rajani M., Evaluation of Free Radical Scavenging Activity of An Ayurvedic Formulation, Panchvalkala, *Indian J. Pharm. Sci*, 2008, **70**(1), 31-35.

Annegowda H. V., Mordi M. N., Ramanathan S., Hamdan R. M., Mansor S. M., Effect of Extraction Techniques on Phenolic Content, Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Bauhinia purpurea*: HPTLC Determination of Antioxidants, *Food Anal. Methods*, 2012, **5**, 226–233.

Ayoola G. A., Eze S. O., Johnson O. O., Adayemi D. K., Phytochemical Screening, Antioxidant, Antiulcer and Toxicity Studies on *Desmodium adscendens* (Sw) DC Fabaceae Leaf and Stem, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2018, **17**(7), 1301-1307.

Bakasso S., Lamien-Meda A., Lamien C., Kiendrebeogo M., Millogo J., Ouedraogo A. G., Nacoulma, O. G., Polyphenol Contents and Antioxidant Activities of Five *Indigofera* species (Fabaceae) from Burkina Faso, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2008, **11**, 1429-1435.

Barraza-Garza G., Castillo-Miche H., de la Rosa L. A., Martinez-Martinez A., Pérez-León J. A., Cotte M., Alvarez-Parrilla E., Infrared Spectroscopy as a Tool to Study the Antioxidant Activity of Polyphenolic Compounds in Isolated Rat Enterocytes, *Oxidative Medicine and Cellular Longev*ity, 2016, Article ID 9245150.

Başaran U., Acar Z., Önal Aşcı Ö., Mut H., Ayan İ., Mürdümük (*Lathyrus* sp.) Türlerinin Önemi, Tarımda Kullanım Olanakları ve Zararlı Madde İçerikleri, *OMÜ Zir. Fak. Dergisi*, 2007, **22**(1), 139-148

Batugal P. A., Kanniah J., Lee S. Y., Oliver J. T., *Medicinal Plants Research in Asia: The Framework and Project Work plans*, Vol. 1., International Plant Genetic Resources Institute, Regional Office for Asia, Serdang, Selangor, Malaysia, 2004.

Berber A., Zengin G., Aktumsek A., Sanda M., Uysal T., Antioxidant Capacity and Fatty Acid Composition of Different Parts of *Adenocarpus complicatus* (Fabaceae) from Turkey, *Rev. Biol. Trop.*, 2014, **62**(1), 337-346.

Blois M. S., Antioxidant Determinations by the Use of A Stable Free Radical, *Nature*, 1958, **181**, 1199–1200.

Mangolim C. S., Moriwaki C., Nogueira A. C., Sato F., Baesso M. L., Neto A. M., Matioli G., Curcumin–β-cyclodextrin Inclusion Complex: Stability, Solubility, Characterisation by FT-IR, FT-Raman, X-ray Diffraction and Photoacoustic Spectroscopy, and Food Application, *Food Chem.*, 2014, **153**, 361–370.

Cakmak Y. S., Aktumsek A., Duran A., Studies on Antioxidant Activity, Volatile Compound and Fatty Acid Composition of Different Parts of *Glycyrrhiza echinata* L., *Excli Journal*, 2012, **11**, 178-187.

Capecka E., Mareczek A., Leja M., Antioxidant Activity of Fresh and Dry Herbs of Some Lamiaceae Species, *Food Chemistry*, 2005, **93**, 223-226.

Caponio F., Alloggio V., Gomes T., Phenolic Compounds of Virgin Olive Oil: Influence of Paste Preparation Techniques, *Food Chemistry*, 1999, **64**, 203-209.

Ceymann M., Arrigoni E., Scharer H., Bozzi Nising A., Hurrell R. F., Identification of Apples Rich in Health-promoting Flavan-3-ols and Phenolic Acids by Measuring the Polyphenol Profile, *J. Food Comp. Anal.*, 2012, **26**, 128-135.

Chen S. B., Liu H. P., Tian R. T., Yang D. J., Chen S. L., Xu H. X., Chan A. S. C., Xie P. S., High-performance Thin-layer Chromatographic Fingerprints of Isoflavonoids for Distinguishing between *Radix puerariae* Lobate and *Radix puerariae* Thomsonii, *J. Chromatogr. A.*, 2006, **1121**, 114–119.

Chew Y., Goh J., Lim Y., Assessment of *in vitro* Antioxidant Capacity and Polyphenolic Composition of Selected Medicinal Herbs from Leguminosae Family in Peninsular Malaysia, *Food Chemistry*, 2009, **116**, 13-18.

Chirinos R., Betalleluz-Pallardel I., Huaman A., Arbizu C., Pedreschi R., Campos R. HPLC-DAD Characterisation of Phenolic Compounds from Andean Oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) Tubers and Their Contribution to the Antioxidant Capacity, *Food Chem*, 2009, **113**(4), 1243-1251.

Custodio L., Fernandes E., Escapa L. A., Lopez-Aviles S., Fajardo A., Aligue R., Alberico F., Romano A., Antioxidant Activity and *in vitro* Inhibition of Tumor Cell Growth by Leaf Extracts from Carob Tree (*Ceratonia siliqua*), *Pharmaceutical Biology*, 2009, **47**, 721-728.

Krishnaiah D., Sarbatly R., Nithyanandam R., A Review on the Antioxidant Potential of Medical Plant Species, *Food Bioprod Process*, 2011, **89**(3), 217-233.

Dashwood R., Chlorophylls as Anticarcinogens, *Int. J. Oncol*., 1997, **10**(4), 721–727.

Davis P. H., *Flora of Turkey and East Aegean Islands*, vol 1-9, Edinburgh University Press, Edinburgh, 1965-1985.

Davis P. H., *Lathyrus laxiflorus (Desf.) Kuntze, In: Davis PH (ed.), Flora of Turkey and the East Aegean Islands,* 3rd ed., Edinburgh University Press, Edinburgh, 1970.

de Groot H., Rauen U., Tissue Injury by Reactive Oxygen Species and the Protective Effects of Flavonoids, *Fundam Clin. Pharmacol.*, 1998, **12**, 249-55.

Dokken K. M., Davis L. C., Infrared Imaging of Sunflower and Maize Root Anatomy, *J. Agric. Food Chem*., 2007, **55**(26), 10517-10530.

Ellis D. I., Goodacre R., Metabolic Fingerprinting in Disease Diagnosis: Biomedical Applications of Infrared and Raman Spectroscopy, *Analyst*., 2006, **131**(8), 875-885.

Giles G. I., Jacob C., Reactive Sulfur Species: An Emerging Concept in Oxidative Stress, *Biological chemistry.* 2002, **383**(3-4), 375-88.

Gijetenbeek J. M. M., Vanden Bent M. J., Vecht C. J., Cyclosporine Neurotoxicity - A review, *Journal of Neurology*, 1999, **246**(5), 339-346.

Godevac D., Zdunic G., Savikin K., Vajs V., Makovic N., Antioxidant Activity of Nine Fabaceae Species Growing in Serbia and Montenegro, *Fitoterapia*, 2008, **79**, 185-187.

Goodman M., Bostick R. M., Kucuk O., Clinical Trials of Antioxidants as Cancer Prevention Agents: Past, Present, and Future, *Free Radical Biology & Medicine*, 2011, **51**(5), 1068–1084.

Gorinstein S., Haruenkit R., Poovarodom S., Vearasilp S., Ruamsuke P., Namiesnik J., Leontowicz M., Leontowicz H., Suhaj M., Sheng G. P., Some Analytical Assays for the Determination of Bioactivity of Exotic Fruits, *Phytochem. Anal*., 2010, **21**, 355–362.

Gou H., Saravanakumar K., Wang M-H., Total Phenolic, Flavonoid Contents and Free Radical Scavenging Capacity of Extracts From Tubers of *Stachys affinis*, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2018, **15**, 235-239.

Govaerts R., How Many Species of Seed Plants Are There?, *Taxon*, 2001, **50**, 1085–1090.

Haida Z., Hakiman M., A Comprehensive Review on the Determination of Enzymatic Assay and Nonenzymatic Antioxidant Activities, *Food Science and Nutrition*, 2019, **7**, 1555–1563.

Heydari H., Saltan G., Bahadır Acıkara Ö., Yılmaz S., Çoban T., Tekin M., Antioxidant Activity of Five *Lathyrus* L. Species Growing in Turkey, *Turk J. Pharm. Sci.*, 2015, **12**(3), 369-376.

Hsu C. Y., Yang C. M., Chen C. M., Chao P. Y., Hu S. P., Effects of Chlorophyll-Related Compounds on Hydrogen Peroxide Induced DNA Damage within Human Lymphocytes, *J. Agric. Food Chem*., 2005, **53**(7), 2746–2750

Hung L. M., Antioxidative Effects of Mango Wastes on Shelf Life of Pork products, Doctor of Philosophy Thesis, Lincoln University, Yeni Zelanda, 2012.

Benzie I.F.F., Evolution of Dietary Antioxidants, *Comp. Biochem. Physiol.*, 2003, **136**, 113–126.

Ito N., Fukushima S., Hagiwara A., Shibata M., Ogiso T., Carcinogenicity of Butylated hydroxyanisole in F344 rats, *J. Natl. Cancer Inst.*, 1983, **70**, 343–352.

McCord J. M., Superoxide Dismutase: Rationale for Use in Reperfusion Injury and Inflammation, *J. Free Radic. Biol. Med.*, 1986, **2**, 307–310.

Jabri-Karoui I., Bettaieb I., Msaada K., Hammami M., Marzouk B., Research on the Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of Tunisian *Thymus capitatus*, *Journal of Functional Foods*, 2012, **4**, 661-669.

Jan S., Khan M. R., Rashid U., Bokhari J., Assessment of Antioxidant Potential, Total Phenolics and Flavonoids of Different Solvent Fractions of Monotheca Buxifolia Fruit, *Osong Public Health Res. Perspect*, 2013, **4**(5), 246-254.

Stehfest K., Boese M., Kerns G., Piry A., Wilhelm C., Fourier Transform Infrared Spectroscopy as A New Tool to Determine Rosmarinic Acid *in situ*, *J. Plant Physiol.*, 2003, **161**, 151-156.

Kılınç M., Özen F., A5 ve A6 Karelerinden Yeni Floristik Kayıtlar, *OMÜ. Fen Dergisi*, 1988, **1**(2), 75-88.

Kılınç M., Özen F., Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Kurupelit Kampus Alanı ve Çevresinin Florası, *OMÜ. Fen Dergisi*, 1988, **1**(2), 97-121

Kondratyuk T. P., Pezzuto J. M., Natural Product Polyphenols of Relevance to Human Health, *Pharm. Biol*., 2004, **42**, 46-63.

Pei L. K., Sun S. Q., Guo B. L., Huang W. H., Xiao P. G., Fast Quality Control of Herba Epimedii by Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2008, **70**(2), 258-64.

Lammers K., Infrared Spectral and Statistical Analysis of Leaf Litter Decomposition from the New Jersey Pine Barrens, Master Thesis, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, 2008.

Li M., Xu Y., Yang W., Li J., Xu X., Zhang X., Chen F., Li D., *In vitro* Synergistic Anti-oxidant Activities of Solvent-extracted Fractions from *Astragalus membranaceus* and *Glycyrrhiza uralensis*, *LWT-Food Science and Technology*, 2011, **44**, 1745-1751.

Liu W., Yin D., Li N., Hou X., Wang D., Li D., Liu J., Influence of Environmental Factors on the Active Substance Production and Antioxidant Activity in *Potentilla fruticosa* L. and Its Quality Assessment, *Scientific Reports*, 2016, **6**, 28591.

Llorent-Martínez E. J., Ortega-Barrales P., Zengin G., Uysal S., Ceylan R., Guler G. O., Mocan A., Aktumsek A., *Lathyrus aureus* and *Lathyrus pratensis*: Characterization of Phytochemical Profiles by Liquid Chromatography-mass Spectrometry, and Evaluation of Their Enzyme Inhibitory and Antioxidant Activities, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 88996-89006.

Llorent-Martínez E. J., Zengin G., Fernández-de Córdova M. L., Bender O., Atalay A., Ceylan R., Mollica A., Mocan A., Uysal S., Guler G. O., Aktumsek A., Traditionally Used *Lathyrus* Species: Phytochemical Composition, Antioxidant Activity, Enzyme Inhibitory Properties, Cytotoxic Effects, and *in silico* Studies of *L. czeczottianus* and *L. nissolia*, *Front. Pharmacol*., 2017, **8**, 83.

Christofidou-Solomidou M., Muzykantov V.R., Antioxidant Strategies in Respiratory Medicine, *Treat. Res. Med.*, 2006, **5**, 47–78.

Nishikimi M., Yagi K., Molecular Basis for the Deficiency in Humans of Galonolactone Oxidase, A Key Enzyme for Ascorbic Acid Biosynthesis, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1991, **54**, 1203–1208.

Madrid A. M., Espinoza L. J., Mellado M. A., Osoria M.E., Montenegro I. J., Jara C. E., Evaluation of the Antioxidant Capacity of *Psoralea glandulosa* L. (Fabaceae) Extracts, *J. Chil. Chem. Soc.*, 2012, **57**(3), 1328-1332.

Mahmoudi H., Aouadhi C., Kaddour R., Gruber M., Zargouni H., Zaouali W., Ben Hamida N., Ben Nasri M., Ouerghi Z., Hosni K., Comparison of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Two Cultivated *Cistus* Species from Tunisia, *Biosci. J. Uberlândia,* 2016, **32**(1), 226-237.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jimenez L., Polyphenols: Food Sources and Bioavailability, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004, **79**, 727-47.

Mazza G., Miniati E., *Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains*, 3rd ed., CRC Press, Florida, 1993.

Mensor L. L., Menezes S. F., Leitao G. G., Reis S. A., Dos Santos C. T., Coube S. C., Leitao G. S., Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method, *Pharmaceutical Biology*, 2001, **15**, 127-130.

Monnier G., Frahm E., Luo B., Missal K., Developing FTIR Microspectroscopy for Analysis of Plant Residues on Stone Tools, *J. Archaeol Sci.*, 2017, **78**, 158-178.

Motilva M. J., Serra A., Macià A., Analysis of Food Polyphenols by Ultra High-performance Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry: An Overview, *Journal of Chromatography*, 2013, **1292**, 66–82.

Naczk M., Shahidi F., Extraction and Analysis of Phenolics in Food, J. Chromatogr., 2004, **1054**(1-2), 95-111.

Narayanan J., Antonysamy J. M., HPTLC Fingerprint Profile (Phenolics) of Selected *Cyathea* Species from Western Ghats, South India, *Chinese Journal of Biology*, 2016, Article ID 6420371.

Özen F., Acemi A., Kocaeli'de Yayılış Gösteren Bitkilerin Endemikler ve Tehlike Sınıfları Yönünden Değerlendirilmesi, *Ot Sistematik Botanik Dergisi*, 2011, **18**(1): 147-190

Palacio S., Aitkenhead M., Escudero A., Montserrat-Martí G., Maestro M., Robertson A. H. J., Gypsophile Chemistry Unveiled: Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy Provides New Insight into Plant Adaptations to Gypsum Soils, *Plos One*, 2014, **9**(9), 107-285.

Pandey K. B., Rizvi S. I., Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2009, **2**(5), 270-278

Parejo I., Viladomat F., Bastida J., Codina C., Development and Validation of A High-performance Liquid Chromotographic Method for the Analysis of Antioxidative Phenolic Compounds in Fennel Using a Narrow Bore Reversed Phase C_{18} Column Analytica, *Chim Acta.*, 2004, **512**(2), 271-280.

Patel M. B., Mishra S.H., Quantitative Analysis of Marker Constituent Swertisin in *Enicostemma hyssopifolium* Verdoon by RP-HPLC and HPTLC, *Acta Chromatographica*, 2012, **24**(1), 85–95.

Packer, L., Hiramatsu, M., Yoshikawa, T., *In Antioxidant Food Supplements in Human Health*, 1st ed., Academic Press: San Diego, 1999.

Peaucelle A., Braybrook S., Höfte H., Cell Wall Mechanics and Growth Control in Plants: The Role of Pectins Revisited, *Frontiers in Plant Science*, 2012, **3**(121), 1-6.

Pękal A., Pyrzynska K., Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay, *Food Anal. Methods*, 2014, **7**, 1776–1782.

Pereira O. R., Silva M. S. A., Domingues R. M. M., Cardoso S. M., Identification of Phenolic Constituents of *Cytisus multiflorus*, *Food Chemistry*, 2012, **131**, 652–659.

Phillipson, J. D., 50 Years of Medicinal Plant Research - Every Progress in Methodology is A Progress in Science, *Planta Medica*, 2003, **69**(6), 491–495.

Pietta P. G., Flavonoids as Antioxidants, *J. Nat. Prod*., 2000, **63**, 1035-1042.

Pratt D. E., Natural Antioxidants from Plant Material, Editors: Huang M-T., Ho C-T., Lee C. Y., *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II,* Vol. 507, ACS Publications, New-Jersey, 54–71, 1992.

Rathi D., Pareek A., Gayali S., Chakraborty S., Chakraborty N., Variety-specific Nutrient Acquisition and Dehydration-induced Proteomic Landscape of Grasspea (*Lathyrus sativus* L.), *Journal of Proteomics*, 2018, **183**, 45-57.

Renuka B., Sanjeev B., Ranganathan D., Evaluation of Phytoconstituents of *Caralluma nilagirina* by FTIR and UV-Vis Spectroscopic Analysis, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2016, **5**(2), 105-108.

Rice-Evans C., Flavonoids and Isoflavones: Absorption, Metabolism, and Bioactivity, *Free Radical Biology and Medicine*, 2004, **36**(7), 827-8.

Roberts R.L., Green J., Lewis B., Lutein and Zeaxanthin in Eye and Skin Health, *Clin Dermatol*, 2009, **27**(2):195–201.

Rowe J., Shehadeh A., Maxted N., *Lathyrus undulatus*, The IUCN Red List of Threatened Species, 2019, e.T176595A19405199.

Sabudak T., Ozturk M., Goren C. A., Kolak U., Topcu G., Fatty Acids and Other Lipids Composition of Five *Trifolium* Species with Antioxidant Activity, *Pharmaceutical Biology*, 2009, **47**, 137-141

Sarwar R., Farooq U., Khan A., Naz S., Khan S., Khan A., Rauf A., Bahadar H., Uddin R., Evaluation of Antioxidant, Free Radical Scavenging, and Antimicrobial Activity of *Quercus incana* Roxb., *Front Pharmacol*., 2015, **6**, 277.

Sathyaprabha G., Kumaravel S., Panneerselvam A., Analysis of Antioxidant Activity, Total Phenol, Total Flavonoid and Screening of Phyto Components in *Pleurotus platypus* and *Pleurotus eous, J. Chem. Pharm. Res*., 2011, **3**(6), 1-6.

Schippmann U., Cunningham A. B., Leaman D. J., Impact of Cultivation and Gathering of Medicinal Plants on Biodiversity: Global Trends and Issues, In (FAO). Biodiversity and Ecosystem Approach in Agriculture, Forestry and Fisheries, *Open Journal of Foresty*, 2002, **6**(2), 1-6.

Shahidi F., Naczk M., *Food Phenolics, Sources, Chemistry, Effects, Applications*, 1st ed., Technomic Publishing Co Inc, Lancaster, 1995.

Shahidi F., Naczk M., *Phenolic in Food and Nutraceutical*, 1st ed., CRC Press, Boca Raton, 2004.

Simon B. F., Perez-Ilzarbe J., Hernandez T., GomezCordoves C., Estrella I., Importance of Phenolic Compounds for the Characterization of Fruit Juices, *J. Agric. Food Sci.*, 1992, **40**, 1531-5.

Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventós R. M., [14] Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-ciocalteu Reagent, *Methods in Enzymology*, 1999, **299**, 152–178.

Soberon J. R., Sgariglia M. A., Sampietro D. A., Quiroga E. N., Sierra M. G., Vattuone M. A., Purification and Identification of Antibacterial Phenolics from *Tripodanthus acutifolium* Leaves, *J. Appl. Microbiol*., 2010, **108**, 1757–1768.

Suresh S., Karthikeyan S., Jayamoorthy K., FTIR and Multivariate Analysis to Study the Effect of Bulk and Nano Copper Oxide on Peanut Plant Leaves, *Journal of Science*: *Advanced Materials and Devices*, 2016, **1**, 343-357.

Taware P. B., Dhumal K. N., Oulkar D. P., Patil S.H., Banarjee K., Phenolic Alterations in Grape Leaves Berries and Wines Due to Foliar and Cluster Powdery Müldew Infections, *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2010, **1**(1), 1-6.

Temizer I. K., Guder A., Turkmen Z., Celemli O. G., Gas Chromatography and Mass Spectrometry Analysis, Chemical Contents and Antioxidant Properties of *Onobrychis* spp. (Fabaceae) Pollen Collected by Honeybees, *Fresenius Environmental Bulletin*, 2017, **26**, 962-968.

Tohidi B., Rahimmalek M., Arzani A., Essential Oil Composition, Total Phenolic, Flavonoid Contents, and Antioxidant Activity of *Thymus* Species Collected from Different Regions of Iran, *Food Chemistry*, 2017, **220**, 153–161.

Tung Y., Wu J., Hsieh C., Chen P., Chang S., Free Radical-Scavenging Phytochemicals of Hot Water Extracts of *Acacia confuse* Leaves Detected by An On-line Screening Method, *Food Chemistry*, 2009, **115**, 1019-1024.

Turker S., Dogan M., Severcan F., The Characterization and Differentiation of Higher Plants by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Applied Spectroscopy*, 2007, **61**, 300-308.

Türker-Kaya S., Huck C. W., A Review of Mid-Infrared and NearInfrared Imaging: Principles, Concepts and Applications in Plant Tissue Analysis, *Molecules*, 2017, **22**(168), 1-6.

ul Haq U., Hussain M. A., Sharif A., Akram M., Tahir I. M., Abbaass W., Zainab R., Khan I., Antioxidant Potential of *Cuscuta reflexa* and *Lathyrus odoratus*, *Pak. J. Med. Biol. Sci*, 2019, **2**(1), 12-17.

URL-1: http://www.bizimbitkiler.org.tr/yeni/demos/technical, (Ziyaret tarihi: 06 Aralık 2019).

Ursini F., Maiorino M., Morazzoni P., Roveri A., Pifferi G., A novel Antioxidant Flavonoid (IdB 1031) Affecting Molecular Mechanisms of Cellular Activation, *Free Rad. Biol. Med.*, 1994, **16**, 547-553.

Vajragupta O., Boonchoong P., Berliner L. J., Manganese Complexes of Curcumin Analogues: Evaluation of Hydroxyl Radical Scavenging Ability, Superoxide Dismutase Activity and Stability Towards Hydrolysis, *Free radical research.*, 2004, **38**(3), 303-314.

Wagner H., Bladt S., Plant Drug Analysis: *A Thin Layer Chromatography Atlas*, 2nd ed., Springer-Verlag, Berlin, 1996.

Wink M., Compartmentation of Secondary Metabolites and Xenobiotics in Plant Vacuoles, *Adv. Bot. Res.*, 1997, **25**, 141-69.

Yadav D., Tiwari N., Gupta M. M., Simultaneous Quantification of Diterpenoids in *Premna integrifolia* Using a Validated HPTLC Method, *Journal of Separation Science*, 2011, **34**(3), 286–291.

Yılmazer M., Meyve Sularında Patulinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi İle Tayini, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 2002, TF00504.

Zeb A., A Simple, Sensitive HPLC-DAD Method for Simultaneous Determination of Carotenoids, Chlorophylls and Alpha-tocopherol in Leafy Vegetables, *J. Food Meas. Charact.*, 2017, **11**(3), 979–986.

Zhao L., Wen E., Upur H., Tian S., High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector Method for the Simultaneous Determination of Five Compounds in the Pulp and Seed of Sea Buckthorn, *Pharmacogn Mag.*, 2017, **13**(49), 136–140.

Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W., The Determination of Flavonoid Contents in Mulberry and Their Scavenging Effects on Superoxide Radicals, *Food Chemistry*, 1999, **64**(4), 555-559.

Zugic A., Dordevic S., Arsic I., Markovic G., Zivkovic J., Jovanovic S., Tadic V., Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in 10 Selected Herbs from Vrujci Spa, *Serbia Ind. Crops Prod*., 2014, **52**, 519-527.

KİŞİSEL YAYINLAR VE ESERLER

[1] **Kıran Acemi R.,** Acemi A., Polymerization degree-dependent changes in the effects of *in vitro* chitosan treatments on photosynthetic pigment, protein, and dry matter contents of *Ipomoea purpurea*, *The EuroBiotech Journal.*, 2019, **3**(4), 1-6.

[2] Acemi A., Özen F., **Kıran R**., *In vitro* Propagation of *Amsonia orientalis* Decne. from Nodal Segments of Adult Plants, *Propag. Ornam. Plants*, 2013, **13**(1), 25-32.

[3] Acemi A., **Kıran R.,** Özen F., Balcı S., Baydemir S., İlmaz Ç., Influence of Medium Composition on *In vitro* Propagation of *Amsonia orientalis* Decne., *J. Anatolia Nat. Sci*., 2013, **4**(2), 1-6.

[4] Acemi A., Özen F., **Kıran R.,** Development of an Efficient Callus Production Protocol for *Amsonia orientalis*: A Critically Endangered Medicinal, *Plant. Eurasia J. Biosci.*, 2012, **6**, 105-112.

[5] **Kıran R.,** Acemi A., Özen F., Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed Production in *Amsonia orientalis* Decne., *International Symposium on Biology of Rare and Endemic Plant Species*, Antalya, Türkiye, 19-23 Nisan 2014.

[6] Acemi A., **Kıran R.,** Özen F., Kinetin ve 6-benzilaminopürinin *Orchis sancta*'nın *In vitro* Gelişimine Etkileri, *22. Ulusal Biyoloji Kongresi*, Eskişehir, Türkiye, 23-27 Haziran 2014.

[7] Acemi A., **Kıran R.,** Özen F., Balcı S., Baydemir S., İlmaz Ç., Besi Ortamı Bileşiminin *Amsonia orientalis* Decne.'nin *In vitro* Çoğaltımına Etkisi, *Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi*, Samsun, Türkiye, 01-04 Ekim 2013.

[8] Acemi A., **Kıran R.,** Özen F., *In vitro* Germination and Protocorm Formation of a Naturally Growing Salep Orchid in Turkey: *Orchis sancta, 5th International Orchid Workshop*, Rende, Italy, 17-19 June 2013.

[9] Acemi A., Özen F., **Kıran R.,** Effects of Media, Giberellic Acid and Sonication Treatment on *In vitro* Germination of *Serapias vomeracea* Seeds, *5th International Orchid Workshop*, Rende, Italy, 17-19 June 2013.

[10] Acemi A., **Kıran R.,** Özen F., The Effects of Plant Growth Regulators on the Callus Induction of *Amsonia orientalis*, *Plant Biology Congress*, Freiburg, Germany, 29 July-3 August 2012.

[11] Acemi A., **Kıran R.,** Özen F., Micropropagation of *Amsonia orientalis* from Axillary Buds of Field-grown Adult Plants, *Plant Biology Congress*, Freiburg, Germany, 29 July-3 August 2012.

[12] **Kıran R.,** Acemi A., Özen F., *Amsonia orientalis*'in (Apocynaceae) *In vitro* Çoğaltımında Farklı NaCl Konsantrasyonlarının Sürgün gelişimi Üzerine Etkisi ve Bitkiciklerdeki Kalsiyum Miktarı Değişimleri, *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, İzmir, Türkiye, 3-7 Eylül 2012.

[13] Acemi A., **Kıran R.,** Özen F., Mavi Yıldız (*Amsonia orientalis*)'in *In vitro* Çoğaltımında Farklı IAA ve IBA Konsantrasyonlarının Kök Gelişimi Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması, *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, İzmir, Türkiye, 3-7 Eylül 2012.

[14] Acemi A., Özen F., **Kıran R.,** Bazı Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin *Amsonia orientalis* (Apocynaceae)'in *In vitro* Çoğaltımında Sürgün Gelişimi Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması, *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, İzmir, Türkiye, 3-7 Eylül 2012.

[15] Özen F., **Kıran R.,** Acemi A., Mavi Yıldız'ın *In vitro* Sürgünlerden Elde Edilen Yapraklar Kullanılarak Mikroçoğaltımı, *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, İzmir, Türkiye, 3-7 Eylül 2012.

[16] Özen F., **Kıran R.,** Acemi A., Tıbbi Önemi Olan ve Gıda Olarak Kullanılan *Arum italicum* (Yılan yastığı)'un Yaprak ve Yaprak Sapı Eksplantlarından İndirekt Sürgün Rejenerasyonu, *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, İzmir, Türkiye, 3-7 Eylül 2012.

[17] **Kıran R.,** Acemi A., Özen F., *Begonia semperflorens*'in *In vitro* Çoğaltımında Kullanılan Farklı Eksplantların Rejenerasyon Potansiyellerinin Değerlendirilmesi, *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, İzmir, Türkiye, 3-7 Eylül 2012.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Kırklareli'de doğdu. İlk ve orta öğrenimini aynı ilde tamamladı. Lisans eğitimine 2005 yılında Niğde Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde başladı. Lisans eğitiminde, 2008-2009 döneminde erasmus değişim programı ile İtalya Napoli Federico II Üniversitesi'nde bulundu. 2009 yılında Lisans eğitimini tamamlayarak, 2010 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Yüksek Lisans eğitimine başladı, 2013 yılında mezun oldu. Yüksek Lisans derecesi aldıktan sonra aynı bölümün doktora programına başladı. 2010-2014 yılları arasında bitki doku kültürü laboratuvarında yürütülen birçok araştırma projesinde görev aldı. Yine bu yıllar arasında arasında (Kocaeli Anadolu Sağlık Meslek Lisesi, Yahya Kaptan Ticaret Meslek Lisesi ve Kocaeli Hayrettin Gürsoy Güzel Sanatlar ve Spor Lisesi) biyoloji öğretmeni olarak çalıştı. Şubat 2014 itibari ile İlaç Sanayi alanında çalışmaya başladı ve aynı sektörde çalışmaya devam etmektedir.